

氏名	高島 清文
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4931号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Effect of geometry and microstructure of honeycomb TCP scaffolds on bone regeneration (骨再生におけるハニカム TCP の性状と微小構造の影響)
学位論文審査委員	松本 卓也 教授      鳥井 康弘 教授 飯田 征二 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

近年、頭頸部領域において外傷、腫瘍、外科的侵襲等による骨組織欠損部の治療には自家骨や人工生体材料が用いられることが多い。人工生体材料の中でもリン酸カルシウム系セラミックス (tricalcium phosphate, TCP) は吸収性骨組織再建材料として期待されているが、TCP は作成時の焼成温度により生体親和性、骨組織形成能に違いが生じることが報告されている。

一方、組織再生には幹細胞や細胞を分化誘導するサイトカインが重要であるが、近年それらに加えて細胞外微小環境 (scaffold) が重要な役割を担っていると考えられている。特に硬組織形成過程では、細胞外基質の組成に加えて scaffold の幾何学的構造が骨組織形成に大きな影響を与えると報告されており、マイクロオーダーの幾何学的構造の付与について研究が行われている。また多孔性顆粒状アパタイトは気孔径が直径 300~400  $\mu\text{m}$  において最大の骨伝導能を示すことが報告されている。また BMP-2 及び TCP を用いた異所性骨組織誘導実験では、直線的に貫通する気孔を有するハニカム構造が血管誘導に効果的に働く幾何学的構造であり骨組織形成には良いと報告されている。

そこで今回我々は直径 300  $\mu\text{m}$  の貫通孔をハニカム状に配列したハニカム TCP を新規に開発し、その焼成温度が結晶構造、性状に与える影響を解析するとともに、骨組織欠損動物モデルにハニカム TCP を埋入し、頭頸部領域における新規生体材料としての臨床応用の可能性を検討した。

### 【材料と方法】

$\text{CaCO}_3$  と  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  粉末を 1:2 の割合で混和、ボールミルにて水とともに 24 時間粉碎混合させスラリーを作製し、直径約 300  $\mu\text{m}$  の貫通孔を有する鋳型にて加圧整形し、幅 3.95mm × 3.95mm、高さ 1mm の直方体のハニカム TCP を作製した。それらを 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1500°C の異なる温度で焼成した。各焼成温度で作成したハニカム TCP は X 線回折法を用いて結晶構造、走査型電子顕微鏡を用いて表面性状を解析した。またハニカム TCP の生体組織内での反応を検討するため、4 週齢 Wistar 系ラット外耳道骨組織欠損部位に埋入した。さらに骨欠損部埋入において最も生体親和性の高かったハニカム TCP に BMP-2 を添加し、外耳道骨組織欠損部位及び背部皮下に埋入、4 週後に摘出し HE 染色を施し組織学的に観察を行った。

## 【結果および考察】

ハニカムTCPは焼成温度1200℃以下では結晶系が $\beta$ 型であったが、1250℃より $\alpha$ 型が検出され温度上昇に伴い $\alpha$ 型含有量の増加を認め、1500℃では $\alpha$ 型のみ検出された。

各温度で焼成したハニカムTCPの表面性状は、1100℃では細顆粒状の粒子構造が破断面及び表面に観察され、小さな間隙を有してしていた。しかし焼成温度の上昇に伴い、粒子同士が融合し、個々の粒子が大きくなり、TCP全体の表面積が減少する傾向が認められた。粒子間の間隙は粒子の融合により数は減少傾向にあるが、個々の間隙の容積の増大が観察された。そして1500℃では明確な間隙が観察されなくなった。

外耳道骨欠損部にハニカムTCPを埋入した実験において、焼成温度1100℃ではハニカムTCP周囲全体に炎症性細胞浸潤が観察される肉芽組織の増生やハニカムTCPに隣接して多核巨細胞が観察され、異物反応が生じていると考えられた。しかし1200℃では炎症性細胞浸潤は認められず、TCP孔内に新生骨組織の形成、微小血管の侵入を認めた。 $\alpha$ 型の結晶系が検出される1250℃以上の焼成温度で作製したTCPはいずれも炎症性細胞浸潤を認めた。また1500℃では、外耳道骨組織欠損部に埋入したTCPは認められず、溶解し消失した可能性が考えられた。

また最も生体親和性が高かった1200℃で焼成したハニカムTCPにBMP-2を添加すると外耳道骨欠損部において強い骨組織誘導を認め、さらに背部皮下結合組織内においても骨組織形成を認めた。

焼成温度が1200℃以下では結晶型は $\beta$ 型のみで構成され、焼成温度の上昇と共に、TCP表面の個々の粒子が大きくなり、結果としてTCP全体の表面積が小さくことから、生体内での溶出性が小さくなったため炎症反応が減少したと考えられた。しかし $\alpha$ 型が検出される1250℃以上においては、焼成温度の上昇とともにTCP全体の表面積は小さくなるが、生体内での溶解性が高い $\alpha$ 型の含有量が多くなるため、炎症が惹起されたと考えられた。

1200℃で焼成したハニカムTCPは骨組織形成を認め、さらに孔内に微小血管の侵入を認められ骨形成を誘導したことから、その性状は生体内での新生骨組織形成に関連した血管新生に相応しい環境を作り出し、血管誘導に優れ骨組織形成に有効に働いたと考えられた。

## 【まとめ】

作成時の焼成温度が高い $\beta$ 型ハニカムTCPは骨組織再建材料として極めて優れた性状を有しており、scaffoldとして臨床応用が期待できる。

## 学位論文審査結果の要旨

近年、頭頸部領域において外傷、腫瘍、外科的侵襲等による骨組織欠損部の治療には自家骨や人工生体材料が用いられることが多い。人工生体材料の中でも第3リン酸カルシウム (tricalcium phosphate, TCP) は吸収性骨組織再建材料として期待されているが、TCPは作製時の焼成温度の違いにより生体親和性、骨組織形成能が異なること報告されている。本研究では直径 300  $\mu\text{m}$  の貫通孔をハニカム状に配列した TCP (以下ハニカム TCP) を新規に開発し、その作製時の焼成温度が結晶構造、性状に与える影響を解析し、ハニカム TCP を埋入した移植実験において生体内での反応を組織学的に解析することで、頭頸部領域における新規生体材料としての臨床応用の可能性を検討する目的で行った。

研究は、 $\text{CaCO}_3$  と  $\text{CaHP04} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  粉末を 1:2 の割合で混和し、ボールミルにて水とともに 24 時間粉碎混合させスラリーを作製し、直径約 300  $\mu\text{m}$  の貫通孔を有する鋳型にて加圧成形し、幅 3.95mm $\times$ 3.95mm、高さ 1mm のシート状のハニカム TCP を作製した。それらを 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1500 $^{\circ}\text{C}$  の異なる温度で焼成し、それぞれについて X 線回折法を用いて結晶構造、走査型電子顕微鏡を用いて表面性状を解析した。各ハニカム TCP を 4 週齢 Wistar 系ラット外耳道骨欠損部位に埋入し、生体内での反応を組織学的に観察した。さらに骨欠損部埋入実験において最も生体親和性の高かったハニカム TCP に BMP-2 を添加したサンプルを外耳道骨組織欠損部及び背部皮下に埋入し組織学的に解析することにより、ハニカム TCP が BMP-2 の担体として機能するか検討した。

その結果ハニカム TCP は作製時の焼成温度が 1200 $^{\circ}\text{C}$  までは  $\beta$  型のみが析出し、焼成温度の上昇に伴い  $\alpha$  型の含有量が増加する傾向が認められた。 $\alpha$  型を含む TCP では炎症反応が著しいが、1200 $^{\circ}\text{C}$  で焼成作製した  $\beta$  型 TCP では炎症反応が殆ど認められず、良好な骨組織形成が観察された。ハニカム TCP 孔内には多数の微小血管が認められ、孔内壁に添加するように骨組織が形成されていた。また最も生体親和性が高かった 1200 $^{\circ}\text{C}$  で焼成したハニカム TCP に BMP-2 を添加すると外耳道骨欠損部において強い骨組織誘導を認め、さらに背部皮下結合組織内においても骨組織形成を認めた。

本研究は広く臨床に用いられている TCP に貫通孔をハニカム状に配列した立体構造を付与することがより効率的な骨組織形成に働くことを確認し、またそれをを用いる上で作製時の最も良い条件を見出したという点で、臨床応用の可能性が期待できるものと考えられる。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。