

氏名	清瀧 優也
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5499号
学位授与の日付	平成29年3月24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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	コラーゲンスポンジをポリアジピン酸ジビニルで補強した多孔性吸収性骨補填材の有用性
論文審査委員	松本 卓也 教授      前川 賢治 准教授      皆木 省吾 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

感染症、外傷あるいは骨腫瘍切除によって骨欠損が生じた場合、これを補填する手段として自家骨移植が行われる。しかし、自家骨を採取するには外科的侵襲が必要な事や供給側から十分な骨量が採取できない事を理由に適応が制限され、それらの問題を解決するため人工骨補填材の開発が行われてきた。人工骨補填材の足場の一つであるコラーゲンスポンジの長所は生体親和性や生分解性が挙げられる一方、短所として力学的強度が低く、形状安定性に劣る事が挙げられる。近年、コラーゲンスポンジの物性改善を目的とした乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)等を組み合わせた複合材料の製作に関する報告がされているが、製作過程において操作が煩雑である欠点が挙げられる。

PLGA は吸収性縫合糸に用いられているようにエステル基が生体内のエステラーゼ等によって加水分解され、吸収、排泄される事が報告されている。本研究で使用するアジピン酸ジビニル (DVA) の重合体(PDVA) は架橋構造となり、その骨格はエステル結合で結ばれている事から生分解性を有する可能性が考えられる。しかし、PDVA の生体埋入材料としての有用性については未だ詳細な解明は行われていない。本研究の目的は、コラーゲンスポンジ表面を PDVA で補強した試料を作製して、多孔型吸収性骨補填材としての有用性について検討することとした。

### 【材料ならびに方法】

コラーゲンスポンジを物性の計測用は 2×2×25mm に、動物埋入実験用は直径 8mm 厚さ 2mm にそれぞれトリミングし、1w/v%過酸化ベンゾイル含有 DVA に浸漬して、5 分間真空抜気を行った。その後、気孔率 90w/v%とした L 群、70w/v%とした H 群を設定した。そして、嫌気条件下で 65°C60 分+100°C90 分加熱重合を行った。加熱重合前後で近赤外分光分析を行い、重合率測定を行った。重合後、試料断面の SEM 観察、3 点曲げ試験を行った。

8 週齢 Wistar 系雄性ラット 3 匹の背部皮下に H 群試料、陽性対照としてポリグリコール酸(PGA)糸、陰性対照としてコラーゲンスポンジを埋入した。2 週間後、皮下組織と一塊に試料を採取して凍結切片を作製、エステラーゼ染色による酵素組織化学的観察を行った。

8週齢 Wistar 系雄性ラット 45 匹を対照群, L 群, H 群に振り分けて, 麻酔下で頭蓋骨上に試料の埋入手術を行った。1, 2 および 4 ヶ月後, 各群 5 匹ずつラベリング, 屠殺を行った。頭蓋骨ごと試料を採取した後, 標本作製した。パラフィン標本はヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を施して病理組織学的観察, 非脱灰研磨標本は Villanueva 骨染色を施して骨形態計測を行った。計測項目は骨量(BV), 組織量(TV)を一次計測した後, 計算インデックスにおける骨量(BV/TV)と骨形成速度(BFR)を算出した。

統計処理は 3 点曲げ試験の計測結果は一元配置分散分析, 骨形態計測の計測結果は二元配置分散分析の後, Tukey 法を用いて多重比較を行った。有意水準は 5%とした。

#### 【結果と考察】

重合率測定の結果, 試料の重合率は 98.2%であった。この結果を MMA 加熱重合レジンの重合率のデータ(JIS 規格 T6501 による測定法にて 99~99.5%, ジーシー社内データ)と比較すると本実験材料の重合は十分に進行したと推察された。

SEM 観察では, 試料の一部には PDVA が填塞されていたが, 50~150 $\mu$ m 孔径の多孔構造ならびにコラーゲン線維周囲に薄壁状の PDVA が観察された。

3 点曲げ試験において H 群は対照群および L 群より有意に高い物性を示し, PDVA によるコラーゲンスポンジ表面のコーティングによって物性の改善が可能である事が明らかとなった。

エステラーゼ染色では, 試料内の PDVA ならびに PGA 糸周囲にアゾ色素の沈着が認められ, エステラーゼによる PDVA の加水分解が進行している事が明らかとなり, 本実験材料が生分解性を有する事が示唆された。

H-E 染色の結果, 対照群では 1 ヶ月後においてコラーゲンスポンジは完全に吸収され, 期間を通して新生骨の形成は認められなかった。L 群ならびに H 群では試料内への線維性組織の侵入, 新生骨の形成が認められた事から, 本実験材料は連通孔構造を有しており, 細胞遊走が可能である事が明らかとなった。

骨形態計測の結果, L 群では経時的な TV の減少が認められた。その要因としては, PDVA によるコーティング量が H 群と比較して少なく, 埋入部位にかかる負荷に耐えうる物性の改善が得られなかった事や加水分解の進行過程で試料の強度低下が起こった事による変形が推察された。一方, H 群では観察期間を通して TV の有意な減少は認めず, 試料の形態を維持した結果, 長期間 BV の増加が観察されたと推察された。また, L 群の BV/TV は 1 ヶ月以降増加が認められなかった事から, 1, 2 ヶ月後における BFR は BV の増加が起こる形成速度ではないと考えられた。一方, H 群では 1, 2 ヶ月後における BFR が L 群より有意に高い数値を示した結果, 4 ヶ月後まで BV/TV が増加したと推察された。

#### 【結論】

コラーゲンスポンジ表面を PDVA で補強した試料は, 多孔型で吸収性と骨伝導能を示したことから, 骨補填材として有用である可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

人工骨補填材の足場の一つであるコラーゲンスポンジの長所は生体親和性や生分解性が挙げられる一方、短所として力学的強度が低く、形状安定性に劣る事が挙げられる。近年、コラーゲンスポンジの物性改善を目的とした乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)等を組み合わせた複合材料の製作に関する報告がされているが、製作過程において操作が煩雑である欠点が挙げられる。また、本研究で使用するアジピン酸ジビニル(DVA)の重合体(PDVA)は架橋構造となり、その骨格はエステル結合で結ばれている事から生分解性を有する可能性が考えられるが、PDVAの生体埋入材料としての有用性については未だ詳細な説明は行われていない。本研究は、コラーゲンスポンジ表面をPDVAで補強した試料を作製して、多孔型吸収性骨補填材としての有用性について検討したものである。

本研究によって以下の研究成果が得られた。

- 1) SEM観察の結果、コラーゲン線維周囲は薄壁状のPDVAによってコーティングされており、試料内の一部にはPDVAが充填されていたが、50~150 $\mu$ m孔径の多孔構造を有することが観察された。
- 2) 3点曲げ試験の結果、PDVAによるコラーゲンスポンジ表面のコーティングによって物性の改善が可能である事が明らかとなった。
- 3) 生分解性評価の結果、エステラーゼによるPDVAの加水分解が進行している事が明らかとなり、試料が生分解性を有する事が示唆された。
- 4) 動物埋入実験の結果、試料の有する連通孔構造によって、試料内へ線維性組織の侵入と新生骨の形成が認められた。

上記の結果から、コラーゲンスポンジ表面をPDVAで補強した試料は、多孔型で吸収性と骨伝導能を示したことから、骨補填材として有用である可能性が示唆された。本論文は、今後の新規骨補填材の開発において新たな知見となりうるものであると考えられる。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。