

# 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	奥野 公巳郎
論 文 審 査 委 員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 河野 哲 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 堀田 正人
論 文 題 目 滅菌象牙質顆粒の骨補填材としての評価と有機成分の探索	
<p><u>論文内容の要旨</u></p> <p>【目 的】</p> <p>今日、顎口腔領域において、骨再生を必要とする疾患が増加している。骨再生のためには、自家骨移植が信頼性の高い治療法の一つとされているが、骨採取のための新たな外科的侵襲という問題がある。このような背景から、様々な人工骨補填材が開発され、ハイドロキシアパタイト (HA) や<math>\beta</math>-リン酸三カルシウム (<math>\beta</math>-TCP) が、広く歯科臨床で応用されている。しかしながら、人工骨補填材が自家骨に匹敵する特性をもつためには、さらに改良が必要とされている。</p> <p>一方、象牙質は骨と類似した硬組織であり、抜去歯は多くの場合、医療廃棄物として活用されることなく処理されている。これに着目し、以前の研究で骨髄由来幹細胞 (hBMSC) および歯髄由来幹細胞 (hDPSC) をそれぞれ象牙質顆粒と組合せた骨補填材の作用について検討した。これらの結果をもとに、本研究では、hBMSC および hDPSC に、脂肪組織由来幹細胞 (hASC) を加え、3 種の幹細胞の象牙質あるいは比較対照となる人工骨補填材存在下での増殖評価と、骨補填材浸漬培地を用いた増殖評価、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性評価、およびマウス骨髄細胞の破骨細胞分化評価を行った。また、ヌードマウスへの埋植実験により、象牙質と人工骨補填材の硬組織誘導について評価した。さらに、オートクレーブ後の象牙質顆粒に残存する有機成分の探索を行った。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 抜去歯の採取：実験に用いる抜去歯は、齲蝕のないものを選択し抜歯直後に<math>-80^{\circ}\text{C}</math>で凍結保存した。本研究は、朝日大学歯学部倫理委員会の承認（第 23111 号）を得ている。</li> <li>2. ヒト象牙質および既存の骨補填材顆粒の調整：抜去歯から象牙質のみとし、ボーンミルにて粉碎後、整粒し、オートクレーブ滅菌して<math>-80^{\circ}\text{C}</math>で凍結保存した。比較対照として、HA 骨補填材 (ネオボーン®, MMT) と <math>\beta</math>-TCP 骨補填材 (オスフェリオン®, オリンパス) を同様に処理した。</li> <li>3. 骨補填材上での 3 種の幹細胞の応答解析：hBMSC (ロンザジャパン), hDPSC (Allcells), hASC (ロンザジャパン) をそれぞれ 粒径 <math>38\sim 74\mu\text{m}</math> の骨補填材をコート (<math>4\text{ mg/cm}^2</math>) したプレート、あるいは未処理のコントロールプレートで 24 時間培養し、Alamar Blue 試薬を用いて細胞増殖を評価した。</li> <li>4. 骨補填材顆粒浸漬培地を用いた 3 種の幹細胞の応答解析：骨補填材/培地の量比を 3. と同様に調整して浸漬し、<math>4^{\circ}\text{C}</math> で 24 時間振盪後に遠心分離した上清を骨補填材浸漬培地とし、3 種の幹細胞</li> </ol>	

胞を 24 時間培養し、Alamar Blue 試薬を用いて細胞増殖を評価した。同様に 7 日間培養してアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定した。

5. hBMSC を組合せた複合骨補填材の作製：300～500  $\mu\text{m}$  に整粒した骨補填材顆粒 (2.5mg/well) と hBMSC ( $4 \times 10^4$  個/ $\text{cm}^2$ ) を 7 日間共培養し、hBMSC 複合骨補填材を作製した。

6. マウス背側皮下への骨補填材あるいは hBMSC 複合骨補填材の埋植：骨補填材のみ (顆粒 20 mg/匹)，あるいは hBMSC を組合せた複合骨補填材 (顆粒 20mg/匹) を 8 個ずつヌードマウス (BALB/c *Slc-nu/nu*) (6 週齢，雄性，体重：約 25g) 6 匹の左側背部皮下に埋植した。動物実験は、朝日大学動物実験専門委員会の審査・承認を得て実施した (承認番号 17-017)。

7. 埋植物の組織化学的，免疫組織化学的解析：埋植 6 週後に埋植物を周囲組織と共に摘出した。試料は 4 %PFA に 24 時間浸漬固定し，通法に従い，樹脂包埋切片およびパラフィン包埋切片を作製した。樹脂包埋切片には von Kossa 染色を行い，パラフィン包埋切片には HE 染色および抗オステオカルシン抗体 (LSL)，抗オステオポンチン抗体 (サンタクルズ) を用いた免疫染色を行った。

8. 骨補填材顆粒浸漬培地を用いたマウス骨髄懸濁液の破骨細胞分化評価：6 週齢マウス (BALB/c *Cr Slc*) 下肢由来骨髄細胞を  $10^{-8}\text{M}$  活性型ビタミン  $\text{D}_3$  を含有する 3 種の骨補填材顆粒浸漬培地で 5 日間混合培養後に 4 % PFA-PBS に固定し，酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。

9. 象牙質顆粒に残存する有機成分の探索：新鮮象牙質顆粒あるいはオートクレーブ滅菌後の象牙質顆粒をタンパク質抽出バッファーで懸濁し，溶出タンパク質量の測定と，ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による検討，試料中のシアル酸量，およびムコ多糖量の検討を行った。

#### 【結 果】

3 種のヒト幹細胞を用いて，象牙質および骨補填材との共培養で増殖を検討したところ，象牙質は hBMSC および hDPSC の増殖を顕著に促進し，hDPSC の増殖は象牙質浸漬培地でも有意に促進された。また，HA 骨補填材浸漬培地は hBMSC の ALP 活性を顕著に上昇させた。そこで，幹細胞として hBMSC を選択し，ヌードマウスにおける骨補填材単体あるいは幹細胞複合骨補填材の異所性硬組織誘導を検討したところ，象牙質を用いた群で，埋植 6 週後の顆粒周囲にわずかな石灰化や一層の線維性骨様組織が認められた。また，象牙質浸漬培地で培養したマウスの骨髄細胞混合培養系では TRAP 陽性の巨細胞が多数検出された。さらに，滅菌象牙質中の有機成分について，新鮮象牙質と比較検討したところ，滅菌象牙質では，低分子化がみられたが，新鮮象牙質の抽出物と同様の電気泳動パターンがみられ，タンパク質の糖鎖成分であるシアル酸や複合多糖類のムコ多糖も検出された。

#### 【考察および結論】

滅菌象牙質顆粒とその浸漬培地が hBMSC や hDPSC の増殖促進，ALP 活性の上昇および，骨髄由来細胞の破骨細胞様細胞への分化を促進し，さらに滅菌象牙質顆粒および象牙質と hBMSC との複合骨補填材がヌードマウス皮下に異所性に線維性骨様組織を誘導したことから，この象牙質が複合骨補填材として自家生体移植に活用できる可能性が示唆された。象牙質顆粒には，タンパク質や糖鎖等の有機成分が残存しており，これらが幹細胞の増殖促進や骨芽細胞様細胞，破骨細胞様細胞への分化に寄与することが考えられた。

以上より，象牙質顆粒は幹細胞の足場として有用であり，滅菌後も残存する象牙質由来の有機成分が硬組織誘導に寄与すると考えられ，象牙質を自家移植の可能な幹細胞複合骨補填材料として利用することにより，抜去歯の有望な活用法となりえることが示唆された。