


## 論文内容要旨

受付番号	① 乙	第 <b>363</b> 号	氏名	山岡 隆広
論文審査委員	主査 朝日大学歯学部教授 渋谷 俊昭 副査 朝日大学歯学部教授 土井 豊 副査 朝日大学歯学部教授 江尻 貞一			
論文題目	アパタイト基盤上で培養した間葉系細胞-各種成長因子複合体の骨形成への影響			
<p><b>【目的】</b> 歯周組織再生は歯周病治療における最終目標の1つとして取り上げられ様々な治療法が行われている。組織再生には、細胞、成長因子、スキャホールドの組み合わせが重要とされている。現在、細胞には骨髄由来の間葉系細胞(MSC)が検討されており、成長因子としては FGF-2, BMP-2, PDGF などが検討され、スキャホールドとしては主にヒドロキシアパタイト(HAP), <math>\beta</math>-リン酸三カルシウム(<math>\beta</math>-TCP) が利用されている。近年、組織親和性や組織内吸収性に優れた炭酸含有アパタイト(CAP)多孔体が注目されている。そこで本研究ではまずラット骨髄由来間葉系細胞(MSC)に FGF-2, BMP-2 添加後培養を行い、成長因子の影響を観察した。さらにスキャホールドとして CAP 多孔体を用いて、CAP-MSC-各種成長因子複合体をラット皮下に埋入し、組織新生および骨形成能を検討した。</p> <p><b>【材料および方法】</b> 実験 1. Well plate 上での MSC 増殖実験: 丸形カバーガラス(直径 12mm)に MSC を <math>1 \times 10^4</math> cell/well となるよう播種し、硬組織誘導培地(デキサメタゾン含有 10mM <math>\beta</math>-グリセロリン酸, 50 <math>\mu</math>g/ml アスコルビン酸, 10%FCS 添加 D-MEM)を加え、BMP-2 および FGF-2 100ng/ml を添加し 1~3 週間培養を行った。培養後カバーガラスを ALP 染色し、陽性細胞の面積を測定した。実験 2. ラット皮下への CAP 複合体埋入実験: (1) 複合体の作製: 硬組織誘導培地(2ml/well)中に気孔率 50%CAP 多孔体(直径 6mm, 高さ 2mm)を静置し、MSC を <math>1 \times 10^4</math> cell/well となるよう播種し 1 週間培養を行った。(2) 複合体のラット皮下埋入実験: 1 週間培養後、CAP-MSC に成長因子として FGF-2, BMP-2 を添加、さらに骨誘導因子として活性型ビタミン D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)を添加して 1 時間含浸し複合体を作製した。実験動物には Wister 系雄性ラット 10 週齢 30 匹を使用した。ラット背部皮膚に切開を加え、複合体を埋入した。また対照群として細胞及び成長因子を播種しない CAP 多孔体を同様に埋入した。(3) 複合体の摘出および組織標本の作製: ラットを 2 週目, 4 週目及び 8 週目に屠殺し複合体を摘出した。通法に従い、固定, 脱灰後パラフィン切片とした。(4) 組織切片の染色: HE 染色, AZAN 染色, TRAP 染色および ALP 染色を行い組織観察, 組織計測を行った。</p> <p><b>【結果】</b> (実験 1) 2 週目および 3 週目において BMP 添加群, FGF 添加群で多くの ALP</p>				

陽性細胞が発現し、特に BMP 添加群において有意に増加した。

(実験 2) HE 染色による組織学的所見: 4 週目においては BMP 添加群及び VD 添加群において活発な結合組織の増加が見られた。8 週目においては対照群と比較して MSC 群でより結合組織の CAP 多孔体内への侵入が確認され、因子添加群では増加傾向を示した。ただし因子添加群間では有意差は認められなかった。AZAN 染色による組織学的検討: 1) 新生組織形成率: 新生組織形成率は、新生組織量/ CAP 総面積で算出した。4 週目において対照群と比較して MSC 群および因子添加群は高値を示した( $P<0.05$ )。また 8 週目においては MSC 群及び因子添加群では対照群と比べて高い値を示したが( $P<0.05$ )、因子添加群間では有意差は認められなかった。2) 新生骨形成率: 新生骨形成率は、新生骨量/ 新生組織量で算出した。4-8 週目において、MSC 播種群及び因子添加群では対照群と比較して高値を示した( $P<0.05$ )。なかでも BMP-2 の新生骨形成率が最も高かった。TRAP 染色による組織学的所見: 4 週目では BMP 添加群にのみ TRAP 陽性細胞が確認された。8 週目では因子添加群及び MSC 播種群において TRAP 陽性細胞が確認され、特に BMP 添加群及び FGF 添加群において多数の TRAP 陽性細胞が観察された。ALP 染色による組織学的所見: 4 週目では BMP 添加群及び FGF 添加群において CAP 気孔部分に侵入した結合組織周囲に ALP 活性がみられた。8 週目では MSC 群及び因子添加群で高い ALP 活性を認め、特に BMP 添加群においては強い ALP 活性が観察された。

【考察および結論】 CAP 多孔体をラット背部皮下に埋入したところ以下の知見を得た。

- (1) MSC に BMP-2, FGF-2 を添加することで ALP 陽性細胞が有意に増加した。
- (2) 成長因子を CAP-MSC 複合体に添加することで、骨形成を有意に促進することが示された。
- (3) CAP-MSC-BMP 複合体は最も高い新生骨形成能を示した。

以上の結果から、CAP をスキャホールドとした MSC および成長因子の添加は組織新生に有用であることが示唆された。