

論 文 要 旨

頭蓋顎顔面領域における骨補填用途の
3D バイオプリンティングスキャフォールド
の開発に関する研究

令和5年度
北海道医療大学大学院歯学研究科

山崎 祥太郎

【緒論】

頭蓋顎顔面領域において、先天的な骨形成不全や唇顎口蓋裂、顎矯正手術などで生じる間隙部の治療には、骨移植が行われる。自家骨は、最も優れた生体適合性、骨伝導性および骨誘導性を有するが、採取できる量に限りがある。そこで、ハイドロキシアパタイト (HA) から成る人工骨が用いられることがある。HA も、生体適合性と骨伝導性を有するが、長期間、骨置換 (リモデリング) されず残存するという欠点がある。残存した HA は、歯の移動を妨げ、歯根吸収などの重大な副作用を引き起こす。そのため、適切にリモデリングされる骨補填材の開発が求められている。

3D プリンターは、従来の加工技術では難しかった複雑な立体構造を作製することができ、また、個々のオーダーに合わせて造形物を容易にデザインできることから、近年医療分野でも利用されるようになってきている。さらに、生体分子や細胞をインク材に混和して印刷するバイオプリンターが開発され、注目を集めている。

本研究では、アルギン酸ベースにナノセルロースファイバーを加えたバイオインクに、骨芽細胞および骨形成タンパク質である BMP-2 を混和し、押し出し式 3D バイオプリンターを用いて、直径 8.0 mm、厚さ 1.0 mm のスキャフォールドを作製し、骨補填剤としての利用可能性について検討した。

【材料および方法】

1. スキャフォールドの作成

CAD ソフト上で、直径 8.0 mm 厚さ 1.0 mm、中心に井桁状の格子構造を有する円盤状スキャフォールドを設計した。アルギン酸ベースのバイオインクを使用し、3D バイオプリンターを用いてスキャフォールドの印刷を行った。

2. スキャフォールド試料の特性評価

kBr 法を用いて、バイオインクをフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) で解析した。コーンタイプレオメータ (ARES-G2, TA Instruments) を用いてバイオインクの動的粘弾性を測定した。スキャフォールドの断面を走査型電子顕微鏡 (SEM, JMS-6610LA) で観察した。スキャフォールドを培地上に 14 日間浸漬し、培地上での寸法の変化を測定した。

3. 細胞傷害性とスキャフォールド内の細胞の分布

作製したスキャフォールドと同量のバイオインクをインク噴霧口から直接回収し、印刷プロセスにおける細胞傷害性を検討した。1 日間の培養後、乳酸脱水素酵素 (LDH) 量を Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (同人化学研究所, 熊本) を用いて測定した。

また、骨芽細胞を含むバイオインクで作製したスキャフォールドを骨芽細胞用培地で、37°C、5%CO₂ 下で 14 日間培養し、生細胞と死細胞を染め分けることができる Cellstain® Double Staining Kit (富士フイルム和光純薬) で染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (A1, ニコン, 東京) で観察した。スキャフォールドの 3 次元画像を構築し、スキャフォールド内の細胞分布を検討した。

4. 石灰化特性

骨芽細胞 (0.3×10^4 , 0.6×10^4 , 1.2×10^4 , 2.4×10^4 cells/ml) と BMP-2 (50, 100, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$) を濃度を変えてバイオインクに配合し、スキャフォールドを作製した。スキャフォールドを骨芽細胞石灰化培地にて 14 日間培養し、アリザリンレッド S 染色の後に、10%塩化セチルピリジニウムを用いて染色液を抽出し、色素量を吸光度 (測定波長 450 nm, 基準波長 620

nm) で測定した.

5. 動物実験

10 週齢の Wistar 雄性ラットの頭蓋冠に歯科用トレフィンバーを用いて、8.0mmの骨欠損を作成した. ラットを5群(各群3匹ずつ)に分け、5つの異なる処置を行った. (A群) 術後、そのまま縫合した、(B群) 骨芽細胞と BMP-2 を含まないスキャフォールドを埋入した、(C群) 骨芽細胞のみを混和したスキャフォールドを埋入した、(D群) BMP-2 のみを混和したスキャフォールドを埋入した、(E群) 骨芽細胞と BMP-2 の両方を混和したスキャフォールドを埋入した. それぞれ、8週後に骨再生を評価した.

6. マイクロ CT 解析

マイクロ CT (inspeXio SMX-225CT, 島津製作所) を用い、管電流 160 μ A, 管電圧 70 kV, 解像度 7 μ m で撮像を行った. また、解析ソフト (TRI/3D-BON, ラトック) を用いて、頭蓋骨における骨量 (BV/TV, %) と骨梁幅 (Tb.Th, μ m), 骨塩量 (mg/cm³) を測定した.

7. ナノインデンテーション試験

回収した E 群のラット頭蓋冠から新生骨と既存骨を含むサンプルを回収し、エポキシ樹脂中に包埋した後に、ナノインデンター (ENT-1100a, エリオニクス) により新生骨と既存骨の機械的特性 (硬さと弾性係数) を測定した.

【結果と考察】

1. スキャフォールド試料の分析

FT-IR スペクトルから、バイオインクは SA と NCF の特性を有した. レオロジー試験では顕著な周波数依存性の剪断粘減挙動を示し、理想的な動的粘弾性を有していることを示した. スキャフォールドの特性評価から、SA ベースのバイオインクはバイオプリンティングに適した生体適合性と粘弾特性を有していることが明らかとなった.

2. スキャフォールド内部構造の観察および浸漬試験

SEM 像では、スキャフォールド断面に多孔性の網目状構造が観察できた. 多孔性の網目状構造は、細胞の分化、増殖と新生血管の定着に有利であると推察される. 浸漬試験では 14 日間の培養で寸法の大きな変化はなかった. スキャフォールドが、骨治癒初期の創部に留まり、形状と機能を維持することが示唆された.

3. 細胞傷害性

LDH Assay では印刷による細胞傷害性は認められなかった. 共焦点レーザー顕微鏡では細胞が二次元的にも三次元的にも均一に分散していることが明らかとなった.

4. 石灰化特性

アリザリンレッド S 染色の測光法による定量評価では、 2.4×10^4 cells/ml の細胞濃度、100 μ g/ml の BMP-2 濃度で最も石灰化が認められた. スキャフォールドの石灰化能力は細胞の濃度に依存し、BMP-2 の添加はその石灰化を有意に高めることが示唆された.

5. 骨のリモデリング

マイクロ CT 画像では、無処置群 (A 群) および細胞、成長因子を混和しなかった群 (B 群) では、骨再生が観察できず、細胞と BMP-2 を混和した群 (C, D, E 群) では有意に骨の再生が確認できた. 特に E 群では広い面積で新生骨の形成が確認できた. 新生骨と既存骨の骨塩

量に有意差はなく，Tb.Thは新生骨，BV/TVは既存骨が有意に多くなった．新生骨と既存骨の硬さと弾性係数に有意差は認められなかった．新生骨は既存骨と同等の機械的特性を有していることが示唆された．

【結論】

骨芽細胞と BMP-2 を混和したナノセルロースファイバー添加アルギン酸ベースのバイオインクを 3D プリンターで作製したスキャフォールドは，優れた骨誘導性，骨伝導性および骨形成性を示し，さらに，速やかにリモデリングされる代用骨補填材になる可能性が示された．