

ふりがな氏名	はら えいき 原 瑛紀
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 834 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Epigallocatechin Gallate-Modified Gelatins with Different Compositions Alter the Quality of Regenerated Bones (異なる組成のエピガロカテキンガレート結合ゼラチンは再生骨の骨質を変化させる)
学位論文掲載誌	International Journal of Molecular Sciences 第 19 巻 第 10 号 平成 30 年 10 月 16 日
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 今井 弘一 教授 副査 竹村 明道 教授

論文内容要旨

歯科・整形外科領域において優れた骨補填材が求められ、積極的な開発が進められている。緑茶由来の Epigallocatechin gallate (EGCG) は抗炎症等の薬理効果を持つものの、生体内での骨再生に関する効果には更なる解明の余地を残す。近年我々は、EGCG とゼラチンを化学的に結合させた EGCG 結合ゼラチン (EGCG-GS) を開発するとともに、それに真空加熱処理を施した vhEGCG-GS が優れた骨再生能を示すことを明らかにした。しかしながら、得られた再生骨の骨質についての解明には至っていない。本研究では、vhEGCG-GS の組成変化が形成する再生骨の骨質に及ぼす影響を調査した。

同量の EGCG および異なる量のゼラチンを含有する 5 つの vhEGCG-GS を作製し用いた。ゼラチンには豚皮膚由来の Type A ゼラチンを、EGCG は緑茶から抽出されたものを用いた。両材料の配合比を変化させた EGCG-GS を水中にて合成し、凍結乾燥後、150 度 24 時間真空加熱を行い vhEGCG-GS を作製した。各試料の組成は、EGCG が 0.0007wt% に対して、ゼラチンを 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0 wt% と変化させた。0.01wt%ゼラチンで合成した vhEGCG-GS では、スポンジ状の担体が作製できなかった。骨形成評価は、8 週齢雄性 S.D ラットに 9 mm の臨界骨欠損を作製し、各試料を埋入して行った。移植 4 週間後、採取した再生骨の骨質は、 μ CT、組織学的評価 (hematoxylin-eosin および Villaneueva Goldner 染色)、偏光顕微鏡観察と picrosirius red 染色によるコラーゲン成熟度評価、およびフーリエ変換赤外分光法とイメージング解析による mineral-matrix 比の算出で見積もった。結果は、vhEGCG-GS 中のゼラチン含有量の増加は、骨および類骨の形成を促進するが、多孔質な骨を産生した。さらに、tissue mineral density は減少し、最大の mineral-matrix 比は増加した。対照的に、ゼ

ラチン含有量が少ない vhEGCG-GS では、再生骨に成熟コラーゲンを形成した。

以上の結果を考慮すると、vhEGCG-GS の組成の変化が再生骨の形成および骨質に影響を与えたことを示唆している。本実験で形成された異なる骨質をもつ再生骨は、骨再生療法のメカニズムや機能解析に向けた有用な基盤ツールとなり得る。

論文審査結果要旨

再生医療の進歩に伴い、骨再生医療時に再生される骨の骨質評価の重要性が高まっている。緑茶から抽出される Epigallocatechin gallate (EGCG) をゼラチンに化学結合させることで、EGCG の骨形成能が増強し、更に、同実験で調製した EGCG 結合ゼラチンスポンジ (EGCG-GS) に対し真空熱処理を施した真空熱処理 EGCG-GS (vhEGCG-GS) では、骨形成が飛躍的に高められることが報告されている。しかしながら、骨形成を促す EGCG とゼラチンの最適配合比や、得られた再生骨の骨質は明らかになっていない。本研究では、EGCG とゼラチンの配合比を変化させた数種類の vhEGCG-GS と、ラット頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて、再生骨の骨質の解明を試みた。

水中にて EGCG-GS を合成し、凍結乾燥後、真空熱処理を行い vhEGCG-GS を作製した。合成時に、EGCG を 0.0007 wt% に、ゼラチンを 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0 wt% と変化させ、配合比の異なる vhEGCG-GS を合成した。vhEGCG-GS の形状及び表面性状は、走査型電子顕微鏡にて確認した。骨形成能は、8 週齢の雄性ラットの頭蓋冠に直径 9 mm の骨欠損を形成し、各試料を埋入して評価した。埋入 4 週後に、頭蓋冠を摘出し μ CT による骨形態計測、Hematoxylin-Eosin および Villaneueva Goldner 染色による組織学的評価、偏光顕微鏡観察と picrosirius red 染色によるコラーゲン成熟度評価、フーリエ変換赤外分光法とイメージング解析による mineral-matrix 比の算出による骨質評価を行った。結果は、 μ CT 画像解析によると、各スポンジが促す再生骨の体積では統計的有意差は認められなかった。一方、ゼラチン濃度増加により、骨石灰化度の低下を認めた。更に、V.Goldner 染色像より、ゼラチン濃度の増加により、類骨が多くなることを明らかにした。picrosirius red 染色像では、ゼラチン含有量が少ない vhEGCG-GS では、再生骨に成熟コラーゲンを形成した。フーリエ変換赤外分光法とイメージング解析による mineral-matrix 比は増加した。

これらの結果から、vhEGCG-GS による再生骨の骨質には、ゼラチンの配合比が影響することが明らかとなった。

以上、緑茶から抽出される EGCG とゼラチンを化学的に結合させ、それに真空加熱を行った vhEGCG-GS のゼラチン濃度を変化させることで、再生骨の形成および骨質に影響を与えることを明らかにしたという点において、本論文は博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。