

氏名	うえだひろき 上田寛樹
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2413号
学位授与の日付	平成13年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor $\beta 1$ to promote bone repair in skull defects in rabbits (トランスフォーミング成長因子 $\beta 1$ 徐放能を有するコラーゲンスポンジを用いたウサギ頭蓋骨欠損の修復促進に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中村孝志 教授 開祐司 教授 清水慶彦

### 論文内容の要旨

コラーゲンは、細胞外マトリックスとして良好な生体親和性と生体吸収性の特性を持つことから医用材料として頻繁に用いられており、良好な結果が報告されてきた。しかし、コラーゲンだけでは再生の促進は不十分であることがあり、成長因子やサイトカインの付与が検討されてきた。こうした生体内で速やかに分解されてしまう因子の生体への応用にはその因子を目的部位にとどめ、徐放するドラッグ・デリバリーシステムが必要となる。本研究の目的は、新たに考案した徐放システムとして、TGF- $\beta 1$ を収着させたコラーゲンスポンジによる骨の修復促進について検討することである。

酵素抽出ブタ皮膚由来アテロコラーゲン (type I 70%, type III 30%) の1%塩酸水溶液 (pH3) をホモジナイザーで泡立てた後、直ちに $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結し、さらに凍結乾燥することによりコラーゲンスポンジを調製した。生体吸収性を調節するために、このスポンジに減圧下、1時間から48時間の $140^{\circ}\text{C}$ 熱処理を行い、コラーゲン分子鎖間に架橋を施した。

まずコラーゲンスポンジにTGF- $\beta 1$ を収着する能力があるか評価するため、*in vitro*での $^{125}\text{I}$ 標識TGF- $\beta 1$ の放出実験を行った。 $^{125}\text{I}$ 標識TGF- $\beta 1$ 溶液を滴下、膨潤させたコラーゲンスポンジを、 $37^{\circ}\text{C}$ のリン酸緩衝水溶液 (PBS) 中でインキュベートした。最初の1時間内に少量のTGF- $\beta 1$ がスポンジから放出されたが、その後はスポンジに施した架橋反応時間によらずTGF- $\beta 1$ の放出は観察されなかった。このことからコラーゲンスポンジはTGF- $\beta 1$ を収着し、収着されたTGF- $\beta 1$ はコラーゲンが分解しないと放出されないと考えられた。

次に*in vivo*での $^{125}\text{I}$ 標識TGF- $\beta 1$ 放出挙動を評価した。 $^{125}\text{I}$ 標識TGF- $\beta 1$ を収着したコラーゲンスポンジをマウスの背部皮下に埋入した。試料中の放射活性は、埋入初日の初期バーストの後、埋入時間とともに減少した。すなわち*in vivo*では、架橋反応時間が長いスポンジほど、 $^{125}\text{I}$ 標識TGF- $\beta 1$ をスポンジ内に長くとどめていた。

この*in vivo*における放出がコラーゲンスポンジの分解によるものであることを確かめるため、*in vivo*での $^{125}\text{I}$ 標識コラーゲンスポンジの分解挙動を追跡した。TGF- $\beta 1$ 放出試験と同様に $^{125}\text{I}$ 標識したコラーゲンスポンジをマウスの背部皮下に埋入し、所定時間後の試料の残存放射活性から $^{125}\text{I}$ 標識コラーゲンの残存量を評価した。*in vivo*におけるTGF- $\beta 1$ の放出速度はスポンジの生体吸収速度と一致し、架橋反応時間が長いスポンジほど、生体内に長くとどまった。走査型電子顕微鏡による観察では、スポンジの構造は架橋反応時間によらず一定であった。以上のことより、スポンジ内に収着されたTGF- $\beta 1$ の*in vivo*における放出は、スポンジの生体内分解吸収により生じることが示された。

最後にTGF- $\beta 1$ を徐放するコラーゲンスポンジが組織の修復に有効であるかを評価するため、ウサギ頭蓋骨で骨修復実験を行った。物理的負荷のかからない頭頂部頭蓋骨に直径6mmの全層欠損を作製し、 $0.1\mu\text{g}$ のTGF- $\beta 1$ を収着させたコラーゲンスポンジを埋入した。6週間後、コラーゲンスポンジのみ、あるいは $0.1\mu\text{g}$ のTGF- $\beta 1$ 水溶液のみを投与した個体では、欠損部に何も施さなかった個体と同様、骨修復はほとんど見られなかった。TGF- $\beta 1$ を収着したスポンジを投与した個体では骨修復が優位に促進され、欠損は新たに再生した骨で覆われていた。このことより、コラーゲンスポンジから放出されるTGF- $\beta 1$ は生物学的活性を維持していること、そしてTGF- $\beta 1$ を収着させたコラーゲンスポンジは骨修復促進

材料として有効であることが示された。

本研究は、特別な薬物担体を併用せず、細胞の足場であるコラーゲンスポンジそのものを TGF- $\beta$ 1 の担体として捉え、徐放機能の評価を行った最初の研究であり、足場と因子を併せ持つ組織再生の場を有効に構築することが可能であることを示唆する。

### 論文審査の結果の要旨

コラーゲンは、細胞外マトリックスとして医用材料に頻繁に用いられてきたが、コラーゲンのみでは組織再生の促進は不十分であり、成長因子の付与が望まれてきた。本研究の目的は、コラーゲンスポンジに TGF- $\beta$ 1 を収着させると骨の修復促進が得られるか否かを検討することである。

凍結乾燥法により調製したアテロコラーゲンスポンジに、減圧下で異なる時間、脱水熱架橋を施した。

得られたコラーゲンスポンジに  $^{125}\text{I}$  標識した後、マウスの背部皮下に埋入し、スポンジの分解挙動を追跡した。また  $^{125}\text{I}$  で標識した TGF- $\beta$ 1 を収着させたスポンジを埋入し、TGF- $\beta$ 1 放出挙動を調べた。スポンジの生体吸収速度と TGF- $\beta$ 1 の放出速度とはよく一致した。即ち吸収速度と放出速度は熱架橋時間の増加にともない低下した。このことから、スポンジ内に収着された TGF- $\beta$ 1 は、スポンジの生体内分解吸収とともに徐放されていることが示された。

また、ウサギの頭蓋骨に直径 6mm の欠損を作製し、0.1 $\mu\text{g}$  の TGF- $\beta$ 1 を収着させたコラーゲンスポンジを埋入した。6週間後、TGF- $\beta$ 1 を収着したスポンジを投与した個体では、スポンジのみ、TGF- $\beta$ 1 水溶液のみ、あるいは何も施さなかった個体に対し、優位に骨修復が促進されていた。このことより、TGF- $\beta$ 1 を収着させたコラーゲンスポンジは骨修復促進材料として有効であることが示された。

以上の研究は、細胞の足場であるコラーゲンそのものを TGF- $\beta$ 1 の担体として捉え、足場と因子を併せ持つ組織再生の場の機能の解明とその構築に貢献し、再生医学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年8月23日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。