

学位論文題名

BMP誘導骨形成における細胞支持体の幾何学的要素について

—多孔性ヒドロキシアパタイトの最適気孔径—

Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum
controls BMP-induced osteogenesis

学位論文内容の要旨

【目的】

骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic protein : BMP) による異所性骨誘導実験において、様々な細胞支持体を用いてきた結果、軟骨あるいは骨への細胞の分化は、細胞支持体の物理的、化学的、生物学的性質に依存することを明らかにしてきたが、更に細胞支持体の幾何学的要素にも大きく左右されることが示されてきた。そこで、細胞支持体として、多孔性ブロック状ヒドロキシアパタイト (Porous block of hydroxyapatite, PBHAP) を用い、その気孔径が骨の誘導に与える影響を比較検討した。

【材料と方法】

1. 担体

5種類(106~212, 212~300, 300~400, 400~500, 500~600 μm)の大きさの樹脂(スチレン-メタクリル酸ブチル系)とヒドロキシアパタイト(800 $^{\circ}\text{C}$, 3時間仮焼成)を3:7の割合で混合し、鋳型中で400 kg/cm^2 の圧力にて圧縮後、1200 $^{\circ}\text{C}$ で1時間焼成した。各アパタイトブロックの気孔径は、樹脂の大きさに相当し、各気孔は連続性を有している。気孔率は、いずれも70%である。

5種類の気孔径を有するPBHAPをディスクでスライスし、40 mg (5 \times 5 \times 1 mm)に調製した。次に、蒸留水にて微粒子を除き、その後乾熱滅菌したものを実験に使用した。

2. BMPと担体の複合、および埋植

準備したPBHAP 40 mg に、ヒトリコンピナントBMP-2 4 μg を含浸させ、雄性、4週齢のWistar-king系ラット(体重:約60 g)の背部皮下結合組織内に埋植した。

3. 生化学的分析

(1) アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性

摘出した埋植体を凍結乾燥後、粉碎したものを界面活性剤 Nonidet-P40 を含む buffer で懸濁し、その懸濁液を ALP 活性測定用のサンプルとし、Kind-king 法により測定した。

(2) オステオカルシン

オステオカルシン量は、同様に粉碎した pellet を、40% ぎ酸で抽出し、抽出液を蒸留水で透析後凍結乾燥したものをサンプルとし、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法により測定した。

4. 形態学的観察

摘出した埋植体を、10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰標本を作製した。10% 蟻酸で脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ 4 μm の連続切片を作製しヘマトキシリンエオジン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

【結果】

1. 生化学的分析

直接骨を誘導することが明らかになっている 150 μm の気孔径を含む 106-212 μm の PBHAP について、1 週から 4 週にかけて経時的にアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性およびオステオカルシン量を測定したところ、ALP 活性は、1 週より増加し 2 週でピークに達し以後減少傾向を示した。オステオカルシン量は、1 週から 3 週にかけては徐々に増加し、4 週にかけては急激に増加した。そこで、各気孔径の PBHAP の骨誘導能を比較するに際し、ALP 活性はピークである 2 週において、オステオカルシン量は 4 週において比較検討した。

その結果、ALP 活性においては、106-212 μm のものに比べ、300-400 μm のものが 3.5 倍、400-500 μm のものが 3 倍の活性値を示し、ともに有意な差が認められた。オステオカルシン量においては、106-212 μm のものに比べ、300-400 μm のものが 1.9 倍、400-500 μm のものが 1.7 倍、500-600 μm のものが 1.4 倍となり、いずれも有意な差が認められた。この様に、ALP 活性とオステオカルシン量ともに 300-400 μm のものが最大の値を示した。

2. 形態学的観察

埋植後 4 週目の各サイズの PBHAP の組織像を観察した。

1) 106-212 μm

骨の形成が気孔の表面に観察され、セメントラインを伴う骨の改造線が認められた。

2) 212-300 μm

ほとんどの気孔内に骨が認められ、一部の気孔内に血管の侵入が認められた。

3) 300-400 μm

同様に骨形成が認められ、造血細胞で満たされた骨髓様細胞を気孔内に伴っていた。その一部には、脂肪髄が認められた。

4) 400-500 μm

同様に気孔表面に沿って血管侵入を伴う骨が形成され、内部に骨髓様細胞が認められた。形成された骨と血管、骨髓様細胞が明瞭に区別できる像が認められた。

5) 500-600 μm

気孔表面に沿って骨形成が認められたが、形成された骨に連続性がなく、気孔内部に骨が形成されている像も認められた。

【考察】

気孔径により骨誘導能を比較した結果、気孔径が 300-400 μm のものが、最も高い誘導能を示したことのついて、以下の考察を行なった。

1) 血管侵入について

組織像から血管の直径は、約 50 μm と推定されたが、これはいずれの気孔径よりも小さく、血管侵入はどのサイズにおいても可能であると考えられる。しかし、Harvasian system によりオステオンを形成する際、オステオンの直径が約 200-300 μm であることを考えると、今回最大の骨誘導能を示した 300-400 μm のサイズとほぼ一致していることになる。300-400 μm のサイズが、血管が侵入しオステオン形成に適した気孔径であったと考えられる。

2) 細胞密度について

細胞がそこに定着し増殖、分化する足場となる気孔内部の凹面構造が、気孔径が 300-400 μm 付近のとき、骨形成を行なうのに適した細胞密度を提供し得るのではないかと考えられる。

3) 骨の力学的安定性について

500-600 μm の組織写真で、形成された骨が連続せず、気孔表面に沿っていなかったことから、骨の力学的な安定性が、300-400 μm 付近で高いのではないかと考えられる。

【結論】

BMPによりPBHAP内に誘導される骨形成能は、気孔径の大きさに大きな影響を受け、今回の条件下では300~400 μm において、最大の骨形成を促すこと認められ、細胞支持体の幾何学的構造の重要性を支持すると共に、将来の硬組織に代表される人工臓器の設計に大きく寄与するものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 久保木 芳 徳
副 査 教 授 脇 田 稔
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

BMP誘導骨形成における細胞支持体の幾何学的要素について

－多孔性ヒドロキシアパタイトの最適気孔径－

Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum
controls BMP-induced osteogenesis

審査は、まず、申請者に提出論文の概要の説明を求めた後、本論文の内容とその関連事項について口頭により試問した。

骨形成タンパク質 (Bone morphogenetic protein : BMP) による異所性骨誘導実験において、BMP の機能を効果的に発現させるために細胞支持体が必要とされており、これまで様々な支持体がいわれてきた。その中でもヒドロキシアパタイトは、生体との親和性が高く、BMP との複合体は同所性および異所性において骨を誘導することがわかっている。本論文では支持体として、多孔性ブロック状ヒドロキシアパタイト (Porous block of hydroxyapatite, PBHAP) を用い、その気孔径が骨組織の誘導能に与える影響について、生化学的に比較検討したものである。

実験は、5種類の気孔径を有する PBHAP 40 mg に、ヒト・リコンビナント BMP-2 4 μ g を含浸させ、雄性、4週齢の Wistar-king系ラット (体重: 約60 g) の背部皮下結合組織内に埋植し、埋植後1週から4週にかけて経時的に摘出している。生化学的分析は、骨形成のマーカーとされるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性とオステオカルシン量を測定している。形態学的観察は、摘出した pellet を、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰標本を作製した。10%ギ酸で脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ4 μ m の連続切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡で観察している。

まず、106-212 μm のPBHAPについて、1週から4週にかけて経時的にアルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性およびオステオカルシン量を測定し、それぞれの値の最大を示す週において各気孔径での比較を試みた。その結果、ALP活性は、2週において最大値をしめし、オステオカルシン量は4週まで増加傾向を示した。そこで、各気孔径のPBHAPの骨誘導能を比較するに際し、ALP活性は2週において、オステオカルシン量は4週において比較検討した。以上の方法により得られた結果は次の通りである。

ALP活性においては、106-212 μm のものに比べ、300-400 μm のものが3.5倍、400-500 μm のものが3倍の活性値を示し、ともに有意な差が認められた。オステオカルシン量においては、106-212 μm のものに比べ、300-400 μm のものが1.9倍、400-500 μm のものが1.7倍、500-600 μm のものが1.4倍となり、いずれも有意な差が認められた。

このように、生化学的分析の結果、ALP活性とオステオカルシン量ともに300-400 μm のものが最大の値を示した。

形態学的には、5種類すべてのPBHAPにおいて、骨の形成が気孔の表面に観察され、一部の気孔内に血管の侵入が認められた。また、造血細胞で満たされた骨髄様細胞を気孔内に伴っており、その一部には、脂肪髄が認められた。さらに、500-600 μm のPBHAPについては、気孔表面に形成された骨の厚さが薄くなり、気孔内部に骨が占められている組織像が観察されている。

これらの結果から本論文提出者は、気孔径が300-400 μm のものが、最も高い誘導能を示したことのついて、次のように考察した。

Haversian systemによりオステオンを形成する際に、オステオンの直径が約200-300 μm であり、今回最大の骨誘導能を示した300-400 μm のサイズとほぼ一致しており気孔内での骨の形成に適していたのではないかと考えた。また、直径が300-400 μm の時に与える気孔内部の凹面構造が、骨形成に適した細胞密度を提供したのではないかと考えた。さらに、組織像から、気孔径が大きくなるにつれて、形成された骨の厚さが薄くなっていることから、骨の力学的安定性が関与しているのではないかと考えた。

以上をまとめると、BMPによりPBHAP内に誘導される骨形成能は、今回の条件下では300~400 μm において、最大の骨形成を促すことが認められ、細胞支持体の幾何学的構造の重要性を支持する結果となり、人工臓器の設計に大きく寄与するものと考えられ、本研究の意義が高く評価された。

次いで、本論文の内容に関連のある質問が行なわれた。脇田教授から、形態学的観点からの貴重な指摘がなされ、特に、Haversian systemとの関連についての質問がなされたが、申請者は、ほぼ脇田教授の指摘を理解した上で、適

切な弁明をした。また、松本教授は、本研究の多孔性ブロック状ヒドロキシアパタイトによる骨誘導能の気孔径による差を評価し、最適気孔径を決定した最初の報告であることを評価した。本研究は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、本人も歯学全般にわたる十分な見識を示しているので、博士（歯学）の学位授与に値することが認められた。