学位論文題名

BMP-induced osteogenesis with two geometrically different biodegradable carbonate apatites

（幾何学的性質の異なる2種類の炭酸アパタイトを担体として用いた BMP 誘導骨形成）

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨形成の機構を理解し組織工学による骨組織の再建を行うためには、細胞、基質、体液、制御因子及びメカニカルストレスという5つの要素の適切な組み合わせが重要である。骨誘導タンパク質（BMP）による骨形成には、基質としての担体が必要であり、担体の幾何学的性質の違いによって骨誘導性が異なることが知られている。10種類以上の BMP 担体の開発と報告から、担体の機能は、おそらく細胞の支持体として機能し、未分化な細胞が増殖分化していく足場として働き、そのため担体の種類によって骨、軟骨形成の違いが生じるものと考えられている。

ハイドロキシアパタイト（HAP）系担体のなかでも、多孔性顆粒状ハイドロキシアパタイト（PPHAP）は、BMP による骨誘導性が優れており抜歯窩の早期治癒等に極めて有効であるが、生体内ではほとんど吸収されない。しかしながら、比較的早期に生体内で吸収される担体も適応部位によっては有用であることが考えられる。炭酸アパタイトは、骨ミネラルの成分の1つであり、HAP より溶解度が高い。そこで本研究では、炭酸アパタイト系の2種類の担体を作製し、それら担体を用いた BMP による異所性骨誘導ならびに担体の生体内における吸収性等について、PPHAP と比較検討を行い、BMP による骨誘導における炭酸アパタイト担体の有効性を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

炭酸アパタイトは、2 L の 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶液と 8 L の 6 M Na_2CO_3 を含む 0.15 M Na_2HPO_4 溶液を 3 日間 100°C、pH 9.0 の条件下で攪拌した。その後、ろ過し、蒸留水で洗浄後、一晚 90°C で乾燥した。加圧処理は 200 Mpa の加圧を行い、750°C で 2 時間焼結し、加圧性炭酸アパタイト（P-CAP）を得た。また、加圧処理を行な

わずに焼結し、非加圧性炭酸アパタイト (NP-CAP) を作製した。これら2種類の炭酸アパタイトの表面構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察を行った。

5 μ g のヒト組換え BMP-2 (rhBMP-2) (山之内製薬より供与) を含む緩衝液を、P-CAP もしくは NP-CAP それぞれ 80 mg ならびにコントロールとしての PPHAP 40 mg にしみこませた。凍結乾燥を行った後、担体を4週齢の Wistar 系雄ラットの背部皮下に埋植した。1~4週後に、担体を摘出した後、切片を作製し、ヘマトキシリンエオシンを用いた染色を行い組織学的に骨形成の程度について検討した。骨形成の生化学的な評価としては、Kind-king phenylphosphate 法を用いたアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定、及び ELISA 法を用いたオステオカルシン含有量の測定を行った。ラット内における NP-CAP の吸収性については、rhBMP-2 を含む NP-CAP を同様に4週齢の Wistar 系雄ラットの背部皮下に埋植した後、1、2、4、6、及び8ヶ月後に担体を摘出し、脱灰後パラフィン切片を作製し、切片における NP-CAP の面積の測定を行った。

【結果】

1. SEM による炭酸アパタイト表面構造の観察

P-CAP の表面には凹凸が少ないが、NP-CAP の表面には凹凸が多く、より粗い構造が認められ、表面構造が異なっていた。

2. BMP-2 による骨形成の組織学的観察

骨組織の形成は1週後では、P-CAP、NP-CAP ならびに PPHAP いずれの担体でも認められなかった。2週後ではいずれの担体を用いた場合でも、骨組織の形成が見られたが、NP-CAP と P-CAP を比べると、NP-CAP を用いた方が骨の形成量が多く見られた。4週後では、3種類の担体いずれを用いた場合でも、層板骨と骨髄の構造が観察され骨のリモデングが生じていたが、担体は残存していた。

3. BMP-2 による骨形成における生化学的評価

ALP の活性は、1週目では3種類の BMP 担体とも殆ど検出されなかったが、2週目になると3種類いずれも急増しピークに達した。2週目における ALP 活性は NP-CAP が最も高い値で、次いで PPHAP であり、P-CAP を用いた場合の活性は最も低い値を示した。この NP-CAP と P-CAP の値の間には有意差が認められた ($P < 0.05$)。3週目の ALP の活性は、いずれも減少したが、3者の間には有意差は認められなかった。オステオカルシン含有量は、埋植後4週目に最大値を示した。NP-CAP 及び PPHAP と P-CAP の値の間には有意差が認められたが、NP-CAP と PPHAP の間に差は認められなかった。

4. 長期間後に残存した NP-CAP 量の組織計測による測定

長時間 rhBMP-2 を含む NP-CAP の埋植を行い、摘出した担体の切片のうち炭酸アパタイト顆粒の占める面積の変化は、埋植6ヶ月後ならびに8ヶ月後では、1ヶ月

後の値と比べるとそれぞれ約 60%ならびに 50%と著しく減少した。

【考察】

BMP による骨、軟骨形成においては、担体の性質のみならずその立体的な構造が骨、軟骨の誘導に重要な役割を演じている。本研究で用いた炭酸アパタイトは、骨ミネラルの成分の 1 つであり、炭酸の存在によって化学反応性が増加されて弱い酸に対して高い溶解性を有している。SEM の観察から、本研究で用いた 2 種類の炭酸アパタイトの表面構造は異なる構造を示していた。すなわち、NP-CAP の表面は P-CAP よりも凹凸が多く、また両者の密度を比べると、NP-CAP の方が P-CAP よりも密度が低かった。これらを BMP-2 の担体として用いたラットの異所性骨形成は、2 週後では組織学的ならびに ALP 活性より、NP-CAP を用いた場合の方が P-CAP を用いた場合よりも、骨形成が良好という結果が得られた。この NP-CAP を担体として用いた骨形成は、コントロールとして用いた PPHAP と同程度と考えられた。

BMP による骨、軟骨形成においては、担体への細胞の関与を示唆する報告がある。本研究における 2 種類の炭酸アパタイトを担体として用いた骨形成の違いは、担体の立体構造の違いによるものと推測された。おそらく、担体表面の凹凸構造によって、細胞の担体表面への定着や遊走の程度へ影響を及ぼし、更に骨芽細胞の分化と基質の合成に影響するものと考えられた。

【結語】

2 種類の炭酸アパタイトを作製し、ラット異所性骨形成の実験系において BMP-2 の担体として用い、骨形成を比較した。吸収性である炭酸アパタイトを用いた場合、2 週後では組織学的ならびに ALP 活性の結果から、表面構造がより粗造である NP-CAP を用いた場合の方が、P-CAP を用いた場合よりも、骨がより形成され、PPHAP とほぼ同程度の骨形成をもたらした。本研究において、炭酸アパタイトを担体として用いた場合においても、担体の幾何学的性質の違いが BMP-2 による骨形成に影響を及ぼすことが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 正 人
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

BMP-induced osteogenesis with two geometrically different biodegradable carbonate apatites

(幾何学的性質の異なる2種類の炭酸アパタイトを担体として用いたBMP誘導骨形成)

審査は、全審査委員出席のもと、学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

骨誘導タンパク質 (BMP) による骨形成には、基質としての担体が必要であり、担体の違いによって骨誘導性が異なることが知られている。担体は、おそらく細胞の支持体として機能し、そのため担体の種類によって骨、軟骨形成といった違いが生じるものと考えられている。

ハイドロキシアパタイト (HAP) 系担体のなかでも、多孔性顆粒状ハイドロキシアパタイト (PPHAP) は、BMP による骨誘導性において優れているが生体内での吸収性は低い。一方、炭酸アパタイト (CAP) は、骨ミネラルの成分の1つであり HAP より溶解性が高い。そこで本研究では、加圧性炭酸アパタイト (P-CAP) ならびに非加圧性炭酸アパタイト (NP-CAP) の2種類の担体を作製し、担体の違いによる BMP による異所性骨誘導の程度ならびに担体の生体内における吸収性について検討した。

2種類の CAP の表面構造について走査型電子顕微鏡を用いて観察を行ったところ、P-CAP の表面には凹凸が少なかったが、NP-CAP の表面には凹凸が多くより粗い構造が認められた。ヒト組換え BMP-2 (rhBMP-2) を含む緩衝液を、P-CAP もしくは NP-CAP ならびにコントロールとしての PPHAP にしみこませ、凍結乾燥した後、4週齢の Wistar 系雄ラットの背部皮下に埋植した。経時的に担体を摘出した後、組織学的および生化学的に骨形成の程度を調べた。骨形成の生化学的な評価として、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定、及び ELISA 法を用いたオステオカルシン量の測定を行った。また、rhBMP-2 を含む NP-CAP を同様にラットの背部皮下に埋植した後、経時的に担体を摘出し、脱灰後パラフィン切片を作製し切片における NP-CAP の面積の測定を行った。

2 週後ではいずれの担体を用いた場合でも骨組織の形成が見られたが、NP-CAP と P-CAP の比較では NP-CAP を用いた方が骨の形成量が多く、NP-CAP を担体として用いた骨形成は、PPHAP と同程度と考えられた。2 週後における ALP 活性は NP-CAP が最も高い値で、次いで PPHAP であり、P-CAP を用いた場合の活性は最も低かった。オステオカルシン含有量は、埋植後 4 週目に最大値を示し、NP-CAP 及び PPHAP と P-CAP の値の間には有意差が認められたが、NP-CAP と PPHAP の間に有意差は認められなかった。rhBMP-2 を含む NP-CAP の埋植を長時間行い、摘出した担体の切片上の NP-CAP が占める面積を測定すると埋植 6 ヶ月後ならびに 8 ヶ月後では 1 ヶ月後と比べてそれぞれ約 60% ならびに 50% と著しく減少した。

本研究で用いた CAP は、炭酸の存在によって化学反応性が増加されて弱い酸に対して高い溶解性を有する。本研究における 2 種類の CAP を担体として用いた骨形成の違いは、担体の立体構造の違いによると推測された。おそらく、担体表面の凹凸構造によって、細胞の担体表面への定着や遊走の程度へ影響を及ぼし、更に骨芽細胞の分化と基質の合成などに影響を与えたものと考えられた。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた。主な質疑項目は、CAP を開発した理由、CAP の製造法、試料を凍結乾燥して用いた理由、生体内での吸収面積の測定方法、実験群のサンプル数、CAP のみを埋植した結果について、認められた NP-CAP の吸収は物理的な吸収か細胞による吸収か、その吸収に破骨細胞が関与していたかどうか、血管侵入と骨形成について、皮下ではなく筋肉内に埋植するとどのような結果が予想されるか等であった。また、本研究の背景となる骨と軟骨形成の機構、CAP の臨床における適用部位についてなど、多岐にわたる関連事項の試問も行った。学位申請者からは、いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られた。更に、今後の研究の方向性についても、明確な将来の展望が示された。

本論文は、炭酸アパタイトを BMP の担体として用いた場合においても、担体の幾何学的性質の違いが骨形成に影響を及ぼすことが示された点が評価され、この業績は、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるにふさわしいと認められた。