

# BMP-2添加多孔性キトサン／ハイドロキシアパタイトナノ 複合体の骨誘導能および生体吸収性

## 学位論文内容の要旨

【緒言】近年の少子高齢化、および医療技術の発展にともない全国民における高齢者の占める割合が増加する中で、多くの高齢者が、高い Quality of life (QOL) を獲得し生き生きと生活することが望まれている。歯科の領域においては、歯周病などによる歯牙の喪失や口腔癌などによる術後の審美障害および咀嚼障害といった問題が高齢者の QOL に大きく関わっている。また、これらの問題に対し、歯槽骨および顎骨の残存量がその後の治療に大きく影響を与える。そこで現在まで、さまざまな骨再生材料が開発され臨床において使用されてきたが、それぞれの材料には長所と短所があり、総合的に骨再生材料として求められる特性すべてを兼ね備える材料の開発には至っていない。そこで我々は、天然高分子として甲殻類の外殻などに含まれるキチンを脱アセチル化処理することで得られるキトサンに注目した。キトサンは、生体吸収性や高い熱安定性などの性質を有しており、すでに多くの臨床の場において応用されているハイドロキシアパタイトとナノレベルで合成可能である。我々は、キトサンとハイドロキシアパタイト(HAp)をナノレベルで合成した、キトサン/HAp ナノ複合作製し、この複合体が歯槽骨再生材料に適した物理的性質を持つことを報告してきた。しかし、歯槽骨再生材料として必要な骨の再生能についてはまだ評価されていない。

そこで本研究では、歯槽骨再生材料に適した物理的性質をもつキトサン/HAp ナノ複合体に、多孔質構造を付与し、さらに細胞増殖因子として BMP-2 を添加させたものをラット背部皮下に埋入し、骨誘導能および生体吸収性を組織形態学的に検討した。

【材料と方法】脱アセチル化度 96%のキトサンと HAp を、キトサン : HAp=70 : 30 の割合で共沈殿法にて合成したキトサン/HAp ナノ複合体にポロゲンリーチング法にて多孔質構造を付与し、BMP-2 を 5 $\mu$ l 含浸させたものを BMP-2 添加群、滅菌蒸留水 20 $\mu$ l のみ含浸させたものを対照群とした。どちらも凍結乾燥後、-30℃にて埋入直前まで保存した。ラットの背部体軸に対し左右 1 か所ずつ、計 2 か所に切開を加え、皮下組織と筋膜上でポケットを形成し複合体を埋入した。埋入後 1, 2, 4, 8 週にて複合体を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡にて組織学的観察を行った。また、観察された組織像をもとに、形態学的計測を WEIBEL 法に基

づき行った。形態学的計測では、キトサン/HAp ナノ複合体、軟骨、骨、血管、線維性結合組織の全組織面積に占める割合について解析ソフトを使用し算出した。算出した値についてノンパラメトリック検定(Mann-Whitney U-test)にて統計分析を行った。

【結果】組織学的観察では、BMP-2 添加群、対照群ともに 1 週で内部気孔内への線維性結合組織の侵入はみられず、わずかな血球成分のみが観察され、2 週以降で、内部気孔内への線維性結合組織の侵入および血管の新生が観察された。4, 8 週で巨細胞による複合体の貪食がみられ、BMP-2 添加群では複合体の断片化が観察された。軟骨の形成は BMP-2 添加群の 1, 2 週でのみ観察され、骨の形成も同じく BMP-2 添加群の 4, 8 週でのみ観察された。また、骨形成に関しては 4, 8 週において、複合体周囲に成熟した骨の形成が観察されたが、内部気孔内での骨の形成はみられなかった。

形態学的計測では、BMP-2 添加群における線維性結合組織の占有率が、対照群に比べ 2, 4, 8 週で有意に高く( $p<0.05$ )、複合体の占有率は、対照群に比べ 2, 4, 8 週で有意に低かった( $p<0.05$ )。血管は経時的に増加したが、BMP-2 添加群と対照群との間に有意差はみられなかった。

【考察】本研究で使用した複合体は、気孔率 60%、孔径 100~300 $\mu\text{m}$  の連通孔を有している。実験では 2 週以降で BMP-2 添加群、対照群ともに複合体内部気孔内への血球成分および線維性結合組織の侵入が観察され、その後も増加傾向を示した。また、巨細胞の経時的増加も観察されたことから、本実験材料は細胞の遊走が十分可能で複合体の強度を十分維持できる構造であると考えられた。

異所性骨誘導能に関しては、BMP-2 添加群においてのみ複合体周囲に軟骨、骨の形成がみられたが、内部気孔内には骨の形成がみられなかったことから、この複合体は、BMP-2 の担体として、その作用を阻害することなく機能するが、さらなる骨形成量の増加を期待するには BMP-2 の保持および拡散時間の調整のために何らかの工夫が必要であることが示唆された。

次に生体吸収性に関しては、2, 4, 8 週における BMP-2 添加群の複合体占有率が、対照群に比べ、有意に少なく、吸細胞の貪食による複合体の断片化が観察されたことから、BMP-2 を添加したことで、添加しない場合に比べ、多核巨細胞などの細胞が活性化されたこと。また、この複合体は生体材料として優れた吸収性を有することが示唆された。

【結論】本実験で使用した複合体は、BMP-2 を添加し、多孔質構造を付与することで、異所性骨誘導能と良好な生体吸収性を有するものとなり、複雑な形態を呈することが多い歯槽骨および顎骨の再生材料として有用であることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 横 山 敦 郎

学 位 論 文 題 名

## BMP-2添加多孔性キトサン／ハイドロキシアパタイトナノ 複合体の骨誘導能および生体吸収性

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

### 【論文の要旨】

本研究の目的は、キトサン/HAp ナノ複合体の骨再生材料としての有用性を組織形態学的に明らかにすることである。

現在まで、さまざまな骨再生材料が開発され臨床において使用されてきたが、総合的に骨再生材料として求められる特性すべてを兼ね備える材料の開発には至っていない。ハイドロキシアパタイト（以後 HAp）は生体適合性と骨伝導性を併せ持つ生体材料として使用されてきたが、HAp はその堅さと脆性のため、望むような形状に成形することが困難であった。それゆえに、HAp の欠点である成形性を改善する可能性のある HAp と高分子材料との新規複合材料の開発が進められてきた。キトサンは、天然高分子として甲殻類の外殻などに含まれるキチンを脱アセチル化処理することで得られ、その生体吸収性や高い熱安定性などの性質から生体材料として応用されてきた。われわれは、これまでナノレベルで均質な構造のキトサン/HAp ナノ複合体を作製し、骨再生材料に適した物理的性質をもつことを報告してきた。しかし、骨再生材料として必要な骨再生能についてはまだ評価されていない。

そこで本研究では、多孔質構造を付与したキトサン/HAp ナノ複合体に、細胞増殖因子として BMP-2 を 5 $\mu$ l 含浸させたものをラット背部皮下に埋入し、骨誘導能と生体吸収性を組織形態学的に評価した。

組織学的観察では、2 週以降で、内部気孔内への線維性結合組織の侵入および血管の新生が観察された。4, 8 週で巨細胞による複合体の貪食がみられ、BMP-2

添加群では複合体の断片化が観察された。軟骨の形成は BMP-2 添加群の 1, 2 週でのみ観察され、骨の形成も同じく BMP-2 添加群の 4, 8 週でのみ観察された。また、骨形成に関しては 4, 8 週において、複合体周囲に成熟した骨の形成が観察されたが、内部気孔内での骨の形成はみられなかった。形態学的計測では、BMP-2 添加群における線維性結合組織の占有率が、対照群に比べ 2, 4, 8 週で有意に高く ( $p < 0.05$ )、複合体の占有率は、対照群に比べ 2, 4, 8 週で有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

実験では 2 週以降で BMP-2 添加群、対照群ともに複合体内部気孔内への血球成分および線維性結合組織の侵入が観察され、その後も増加傾向を示した。また、巨細胞の経時的増加も観察されたことから、本実験材料は細胞の遊走が十分可能で複合体の強度を十分維持できる構造であると考えられた。

異所性骨誘導能に関しては、BMP-2 添加群においてのみ複合体周囲に軟骨、骨の形成がみられたが、内部気孔内には骨の形成がみられなかったことから、この複合体は、BMP-2 の担体として、その作用を阻害することなく機能するが、さらなる骨形成量の増加を期待するには BMP-2 の保持および拡散時間の調整のために何らかの工夫が必要である。生体吸収性に関しては、2, 4, 8 週における BMP-2 添加群の複合体占有率が、対照群に比べ、有意に少なく、巨細胞の貪食による複合体の断片化が観察されたことから、BMP-2 を添加したことで、添加しない場合に比べ、多核巨細胞などの細胞が活性化され、吸収性が増すことが示唆された。

本実験で使用した複合体は、BMP-2 を添加し、多孔質構造を付与することで、異所性骨誘導能と良好な生体吸収性を有するものとなり、複雑な形態を呈することが多い歯槽骨および顎骨の再生材料として有用であることが示唆された。

### 【審査の内容】

以上、論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問内容は、①組織像において、複合体周囲の染色が濃くなっている部分は石灰化か、②複合体内部まで BMP は含浸されているか、③BMP の保持力を増強させるための対策、④複合体には連通孔が形成されているか、⑤キトサンと炎症反応について、などであった。論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は多孔性キトサン/HAp ナノ複合体は BMP-2 を添加することにより異所性骨誘導能と良好な生体吸収性を有するものとなり、骨再生材料として有用であることを示唆した点が、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価された。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。