

ラット頭頂骨骨膜下におけるrhBMP-2添加多孔性キトサン/ ハイドロキシアパタイト複合体による骨形成

学位論文内容の要旨

【背景と目的】ハイドロキシアパタイト(HAp)は生体親和性と骨伝導性に優れた生体材料であるが、その硬さと脆性のため、望む形状に成形することが困難である。それゆえ、HApの欠点である成形性を改善するHAp/高分子の新規複合材料の開発に多くの関心が集まっている。キトサンは甲殻類の外殻などに含まれる天然高分子で、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注目されている。我々はこれまでに、多孔性キトサン/HAp複合体を作製し、歯槽骨再生材料に適した成形性や操作性の高い物理的性質を持つことを報告してきた。骨の再生医療の基本要素として、1) 足場材料：担体、2) 細胞、3) 細胞増殖因子の3つの要素が不可欠とされている。骨欠損部位が小さく、周囲組織の再生能力が高い場合は足場材料を与えるだけで再生が得られるが、欠損部位が大きい場合は望む再生は得られず、細胞の分化増殖を促す細胞増殖因子との併用が必要とされる。その代表的なものに、骨形成蛋白質(Bone morphogenetic protein: BMP)がある。しかし、BMPは生体内で拡散、吸収が早いため、骨形成能を十分に発揮するためには、BMPを保持してその作用を増強する担体が必要である。本研究では、この複合体の骨形成蛋白質(rhBMP-2)担体としての有用性を評価する目的で、ラット頭頂骨骨膜下埋入実験を行い、骨形成過程と担体複合体の吸収変化を組織形態学的に検討した。

【材料と方法】共沈澱法とポロージェンリーチング法により、気孔率75~80%、気孔径100~300 μ mの連通孔を有する多孔性キトサン/HAp複合体を作製した。多孔性キトサン/HAp複合体を一辺が3mmの立方体に成形した後、5 μ gのrhBMP-2を添加した複合体をrhBMP-2添加群とし、rhBMP-2無添加の複合体を対照群とした。10週齢のSDラット頭頂骨骨膜下に複合体(rhBMP-2添加群、対照群)を埋入した。4, 8週後に屠殺し、各埋入物および皮膚・頭頂骨まで一塊として摘出した。試料は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、10%EDTA溶液で脱灰を行い、通法に従い厚さ5 μ mの切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。複合体の吸収と骨形成過程を光学顕微鏡を用いて組織学的観察を行った。

また、埋入物の最大断面での高さを測定した。埋入物組織中に占める複合体、新生骨、骨髄、線維性結合組織の割合を Weibel 法に基づき、組織形態計測を行った。

【結果】 rhBMP-2 添加群では、埋入 4 週後で複合体の吸収がかなり進んでおり複合体中心部まで新生骨が見られた。また骨髄も見られた。複合体周囲から内部にかけて頭頂骨と連続した新生骨がみられた。複合体周囲には複合体を貪食している多核巨細胞が存在し、新生骨周囲や複合体周囲に沿って並んでいる骨芽細胞も観察された。埋入 8 週後には骨形成がさらに進み、複合体は新生骨に取り囲まれ、そのほとんどが吸収されていた。骨梁の連続性が増加して新生骨が母床の頭頂骨と連続していた。新生骨の一部に骨髄が認められ骨量の増加が観察された。4 週後と比べて複合体の量が減少しており、断片化したわずかな複合体が、広範囲を占める新生骨内部に局在していた。対照群では 4, 8 週後ともに複合体内部での骨や骨髄は見られなかった。4 週後では複合体内部は線維性結合組織で満たされており、複合体の連続性も残っていた。8 週後では 4 週後と比べ複合体の量は減少していた。4 週後に比べて、複合体は断片化されており、周囲は線維性結合組織で満たされていた。rhBMP-2 添加群の埋入物の高さの平均値は、4 週後では $1.64 \pm 0.08\text{mm}$ 、8 週後では $1.65 \pm 0.08\text{mm}$ で、ほとんど変化は見られなかった。対照群の埋入物の高さの平均値は、4 週後では $1.18 \pm 0.20\text{mm}$ 、8 週後では $0.88 \pm 0.20\text{mm}$ と経時的に低下した。4 週後と 8 週後のいずれにおいても rhBMP-2 添加群に比べて埋入物の高さは有意に低下した ($p < 0.05$)。組織形態計測を行なった結果、骨および骨髄は rhBMP-2 添加群のみに認められた。rhBMP-2 添加群における線維性結合組織の占有率は、4, 8 週後のいずれにおいても対照群に比べ有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。また、rhBMP-2 添加群における複合体の占有率も、4, 8 週後のいずれにおいても対照群に比べ有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

【考察】骨再生の足場材料として、必要な細胞群に十分な栄養と酸素を供給しなければならないため多孔質体である必要があるといわれている。本研究では使用した多孔性キトサン/HAp 複合体は、気孔率 75~80%、孔径 100~300 μm の外部と交通する連通孔を有している。本実験では 4 週以降には rhBMP-2 添加群、対照群ともに複合体内部気孔内への線維性組織の侵入が観察された。また多核巨細胞も観察されたことから、本実験材料の内部構造は細胞の遊走が十分可能な連通孔構造を有しており、ラット頭頂骨骨膜下という複合体に負荷のかかりやすい環境においても複合体の強度をある程度維持できると考えられた。埋入後の複合体の高さについては、対照群、rhBMP-2 添加群ともに埋入時に形成した 3mm よりも低い値となっていたが、rhBMP-2 添加群のほうが対照群よりも有意に高い値を示した。これは rhBMP-2 を添加したことで複合体の気孔内に早期に細胞・血管が侵入・増殖して骨芽細胞への分化がおこり、骨が誘導されたことで強度が増し、

頭頂部皮膚の張力に抵抗したためと考えられる。本研究では、HApの欠点である低い成形性を改善するために、吸収性高分子であるキトサンに注目し、多孔性キトサン/HAp複合体をrhBMP-2担体として使用した。吸収性である複合体でも組織増量材としてBMPによる骨形成の場を一定期間維持すれば、骨形成および骨増生が可能であることを期待した。その結果、rhBMP-2添加群において埋入4週後には全組織面積の半分以上を占める新生骨を形成することに成功した。rhBMP-2添加群に新生骨の形成が認められた理由として、多孔性キトサン/HAp複合体の構造が細胞増殖や血管侵入を妨げることなく、rhBMP-2による骨芽細胞への分化誘導に適した環境を提供した可能性やキトサン/HAp複合体とrhBMP-2の結合度が比較的高く適度な徐放効果を示した可能性が考えられる。またrhBMP-2添加群では、骨形成が進むにつれて複合体の占有率が対照群に比べ有意に減少していた。埋入8週後には複合体のほとんどが吸収、断片化され、その一部は新生骨に取り囲まれていた。多核巨細胞による複合体の貪食や骨芽細胞による骨形成も見られた。これはrhBMP-2を複合体に添加することにより、骨芽細胞、多核巨細胞に対する情報伝達が活性化され、骨改造に組み込まれた様式で複合体の吸収が促進すると考えられる。以上より、この複合体はrhBMP-2担体として骨形成能と生体吸収性に優れ、生体のリモデリングシステムに早期に組み込まれる生体材料であると考えられた。

【結論】ラット頭頂骨骨膜下埋入実験において、rhBMP-2添加群では埋入4週後に複合体中心部まで骨形成が観察され、対照群では骨形成がみられなかった。rhBMP-2添加群では埋入8週後に骨形成がさらに進むと共に複合体のほとんどが吸収され、その一部は新生骨に取り囲まれていた。以上より、成形性や操作性の高い多孔性キトサン/HAp複合体は、rhBMP-2の担体として優れた骨形成能と生体吸収性を有することから、複雑な形態を呈する骨欠損部における生体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 特任教授 井 上 農夫男
副 査 教 授 網 塚 憲 生
副 査 教 授 土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

ラット頭頂骨骨膜下におけるrhBMP-2添加多孔性キトサン/ ハイドロキシアパタイト複合体による骨形成

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

【背景と目的】ハイドロキシアパタイト(HAp)は生体親和性と骨伝導性に優れた生体材料であるが、その硬さと脆性のため、望む形状に成形することが困難である。それゆえ、HApの欠点である成形性を改善するHAp/高分子の新規複合材料の開発に関心が集まっている。キトサンは甲殻類の外殻などに含まれる天然高分子で、その生体吸収性や熱安定性などの性質から生体材料として注目されている。我々はこれまでに、多孔性キトサン/HAp複合体を作製し、骨再生材料に適した成形性や操作性の高い物理的性質を持つことを報告してきた。骨欠損部位が小さい場合は足場材料を与えるだけで再生が得られるが、欠損部位が大きい場合は望む再生は得られず、細胞の分化増殖を促す細胞増殖因子との併用が必要とされる。その代表的なものに、骨形成蛋白質(Bone morphogenetic protein : BMP)がある。しかし、BMPは生体内で拡散、吸収が早いいため、骨形成能を十分に発揮するためには、BMPを保持してその作用を増強する担体が必要である。本研究では、複合体の骨形成蛋白質(rhBMP-2)担体としての有用性を評価する目的で、ラット頭頂骨骨膜下埋入実験を行い、骨形成過程と担体複合体の吸収変化を組織形態学的に検討した。

【材料と方法】共沈澱法とポロージェンリーチング法により、気孔率75~80%、気孔径100~300 μ mの連通孔を有する多孔性キトサン/HAp複合体を作製した。多孔性キトサン/HAp複合体を一辺が3mmの立方体に成形した後、5 μ gのrhBMP-2を添加した複合体をrhBMP-2添加群とし、rhBMP-2無添加の複合体を対照群とした。10週齢のSDラット頭頂骨骨膜下に複合体(rhBMP-2添加群、対照群)を埋入した。4、8週後に屠殺し、各埋入物および皮膚・頭頂骨まで一塊として摘出した。試料は10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、

10%EDTA 溶液で脱灰を行い、通法に従い厚さ 5 μ m の切片を作製し、HE 染色を行った。骨形成と複合体の吸収過程を光学顕微鏡を用いて組織学的に評価した。埋入物組織中に占める新生骨、骨髄、線維性結合組織、複合体の割合を Weibel 法に基づく組織形態計測により評価した。

【結果】 rhBMP-2 添加群では、埋入 4 週後で複合体の吸収が進み、複合体周囲から中心部にかけて頭頂骨と連続した新生骨がみられた。埋入 8 週後には骨形成がさらに進み、新生骨の骨梁の連続性が増加していた。4 週後と比べて複合体の量は減少し、断片化したわずかな複合体が、広範囲を占める新生骨内部に局在していた。対照群では 4、8 週後ともに複合体内部には新生骨は見られず内部には線維性結合組織がみられた。4 週後では複合体の連続性が残っていたが、8 週後では複合体は断片化され、複合体の量は減少していた。組織形態計測の結果、rhBMP-2 添加群における複合体の占有率は 4、8 週後のいずれにおいても対照群に比べ有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。

【考察】 rhBMP-2 添加群に旺盛な新生骨の形成が認められた理由として、多孔性キトサン/HAp 複合体の構造が細胞増殖や血管侵入を妨げることなく、rhBMP-2 による骨芽細胞への分化誘導に適した環境を提供した可能性が考えられる。また rhBMP-2 添加群で複合体の占有率が対照群に比べ有意に減少していた。これは rhBMP-2 を複合体に添加することにより、骨芽細胞、多核巨細胞に対する情報伝達が活性化され、骨改造に組み込まれた様式で複合体の吸収が促進すると考えられる。以上より、この複合体は rhBMP-2 担体として骨形成能と生体吸収性を有し、生体のリモデリングシステムに組み込まれる生体材料であると考えられた。

【結論】 成形性や操作性の高い多孔性キトサン/HAp 複合体は、rhBMP-2 の担体として骨形成能と生体吸収性を有することから、複雑な形態を呈する骨欠損部における生体材料として有用であることが示唆された。

各審査委員が行った主な質問内容は、①多孔性キトサン/HAp 複合体に対して、コラーゲン/HAp 複合体などの対照群を用いた場合の骨再生について、②本研究で観察された多核巨細胞と破骨細胞との異同について、③骨再生の領域で観察された骨芽細胞は、頭頂骨骨膜あるいは間葉系細胞のどちらに由来するか、④長期間（8 週以上）経過した場合の再生骨の想定される変化について、⑤多孔性キトサン/HAp 複合体の物理学的強度について、などであった。

これらの質問に対して、申請者は明快な回答と説明を行い、今後の研究についても発展的な将来展望を示した。審査委員一同は、本研究には新知見が認められ、今後の歯科医学の発展に大きく貢献するものと評価した。また、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認めた。よって、申請者は北海道大学博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。