ラット頭蓋骨への BMP 複合体移植に関する研究

三井 妹 美

Implantation of bone morphogenetic protein composite
in rat skull defects

Maimi MITSUI

Abstract: Hydroxyapatite (HAP) is considered one of the best bioactive ceramics because of its high osteoconductivity. Although it has several characteristics of an ideal bone substitute, it does not possess osteoinductive activity.

On the other hand, bone morphogenetic protein (BMP), which can induce the differentiation of mesenchymal cells into cartilage and bone, can be extracted from bone matrix.

We used true bone ceramics (TBC) particles, instead of artificial HAP, together with atelocollagen (AC) and BMP as a bone substitute.

The bone-inducing and bone-regenerating potency of TBC-AC-BMP composite was evaluated to determine its value as a bone-inductive biomaterial.

TBC-AC composite and TBC-AC-BMP composite were implanted into rat skull defects. The animals were sacrificed every 2 weeks after implantation and examined by radiographical and histological methods. The calcium content of the newly formed bone in the implant sites was determined spectrophotometrically using o-cresolphthalein complexone (OCPC) method.

In this animal experiment, TBC-AC-BMP composite produced new bone more rapidly than TBC-AC composite, and it produced larger quantities of new bone formation from an early stage.

From the results of this study, TBC-AC-BMP composite has excellent bone-inducing ability and has the possibility to become an ideal bone substitute.

Key words: TBC (true bone ceramics) (天然アパタイト), AC (atelocollagen) (アテロコラーゲン), BMP (bone morphogenetic protein) (骨誘導タンパク), bone-inducing biomaterial (骨誘導生体材料)

緒 言

顎顔面領域の臨床において、種々の顎骨腫瘍、嚢胞、口唇口蓋裂、などその治療において骨欠損部の修復、

再建が必要とされる場面が多く、安全かつ確実な顎骨の機能的、審美的回復は、口腔外科医にとって非常に重要な問題である。骨欠損部の修復には、自家骨移植が最良の方法であるとされているが、供給量に限界があること、採骨部へ二次的手術侵襲が加わること、その際の変形や疼痛の残存による合併症の問題もあり、古くから自家骨の代用材の研究が重ねられてきた。近年、各種のセラミックスが開発され、整形外科をはじめとした医療の広い分野で応用されるようになった。なかでも、リン酸カルシウム系の HAP は生体親和性

東京医科歯科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：榎本昭二)

The Second Department of Oral and Maxillofacial
Surgery Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and
Dental University (Chief: Prof. Shoji Enomoto)

受付日：平成 7 年 3 月 9 日

や安全性に優れ、多領域で高い評価を得ており、その基礎的研究^{1~7)}や臨床応用^{8~15)}に関しては多くの研究成果が報告されている。歯科、口腔外科領域においても、デンタルインプラントや顎堤挙上、あるいは顎骨疾患患者の骨欠損の補填にしばしば用いられている。しかし、これらの材料は生体親和性に優れ、骨伝導能を有するものの、骨誘導能をもたないため自家骨移植に代わるものではない。

一方、BMPはUristら^{16, 17)}により凍結した失活骨や脱灰骨が異所性に内軟骨性の骨形成を誘導することが報告され、異所性に骨を誘導するタンパクとして命名されたもので¹⁸⁾、骨誘導能を有する生体材料のひとつとして開発が望まれ、それ以降、さまざまな研究が重ねられ、その臨床応用が検討されている。

また、BMPを臨床応用する際に、徐放および賦形材が必要であり、その担体に関する研究も重要である。

そこで今回、骨誘導能を有する骨代用材の開発を目的として、ウシ脱灰骨基質から抽出したBMPを用い、天然HAP顆粒体(TBC)と医療用コラーゲングル(AC)との複合体を作製し、ラットの頭蓋骨への移植実験を行ったので、ここに報告する。

材料および方法

1. BMPの精製

BMPの精製は、朝比奈¹⁹⁾、櫻井²⁰⁾の方法に従い行った。以下の操作はことわりのない限り原則として4℃の低温で行った。

1) 脱灰骨基質の調製

1歳ホルスタイン種ウシ長管骨を骨端部を切断し骨幹部のみとし、骨髓組織および筋肉、腱、骨膜などの軟組織を可及的に除去した後、10倍容のアセトンに1週間浸漬し脱脂を行った。これを常温にて風乾後、液体窒素存在下で、プラスチック粉碎機(吉田製作所)およびロールクラッシャー(吉田製作所)にて粉碎し、径約1mm(0.71~1.71mm)の大きさに骨粉を調製した。

骨粉を0.9%の塩化ナトリウム溶液にて16時間洗浄し、蒸留水にて約2時間洗浄後、100%エタノールで2時間脱水、アセトンにて2時間脱脂を行った。この骨粉を乾燥させ、0.6N塩酸にて48時間脱灰を行い、十分に蒸留水で洗浄後、再び、脱水、脱脂したものを室温で約16時間乾燥を行い脱灰骨基質を調製した。

2) BMP画分の抽出

脱灰骨基質より10倍容(vol/wt)の4M塩酸グアニジン/50mM Tris-HCl pH 7.4にて48時間抽出を行い、ガーゼおよび濾紙(Filterpaper 1, Whatmann, Cat. No. 100197)にて濾過し抽出残渣(G-Res)と塩酸グアニジン抽出画分(G-ext)とに分離した。さらにG-extをYM-100およびYM-10 membrane(Dia-

flo, Amicon Co., Ltd.)を用いて限外濾過を行い透過分子量10-100KDaの画分として約20倍に濃縮し、セルロースチューブ(分子サイズ: 12,000~14,000, Viskase)にて蒸留水に対し透析を行った。透析後15000rpmで30分間遠心分離し、その水不溶性画分(G-WI)を凍結乾燥した。

3) ゲル濾過クロマトグラフィー

塩酸グアニジン抽出・水不溶性画分(G-WI)を4M塩酸グアニジン/50mM Tris-HCl pH 7.4に溶解し(20mg/ml)、同じ緩衝液で平衡化したSephacryl S-200カラム(Pharmacia)により分画した。

4) イオン交換クロマトグラフィー

Sephacryl S-200にて分離した活性画分を6M尿素/50mM酢酸ナトリウム/0.1M塩化ナトリウムpH 4.8に2mg/mlの濃度で溶解し、不溶性成分を10,000rpm、10分の遠心分離にて除去し、さらに0.22μmフィルター(Advantec)にて濾過を行い、クロマトグラフィーの試料とした。同じ緩衝液で平衡化した陽イオン交換クロマトカラム(Mono-S5/5, 5mm×5cm, Pharmacia)に添加し、吸着したタンパク質を0.1~0.6Mの塩化ナトリウム濃度勾配にて分画した。流速1ml/minで溶出し、1mlずつ分取し、その活性画分を凍結乾燥して得た粗精製物をBMPとして用いた。

2. True bone ceramics (TBC)

1) TBCの作製方法

株式会社高研社製のTBCを使用した。新鮮な牛骨(主に海綿骨)を適当な大きさに切断し、脂質が観察されなくなるまで精製水で煮沸を繰り返した。これを1%水酸化ナトリウムと1%過酸化水素溶液に1時間浸漬して除蛋白した後、精製水で十分に洗浄、風乾した。

乾燥した骨を電気炉で600℃で2時間、さらに1100℃で1時間焼成し、炉中で放冷した。放冷後、破碎し、さらにボールミルで粉碎、これを水洗し、抽出液が中性となるように洗浄、乾燥後、篩で分級し不定型顆粒のTBCを作製した。

2) TBCの諸性質

TBCは、色調は白色で、走査電顕で観察すると天然の骨構造を細部にまで残しており、その小腔は、もとは骨髓細胞で満たされていた空間であるため、血管新生や骨形成の場として、合成HAPより有利な環境にあるといわれている²¹⁾。また、高倍率では結晶の集合体が観察され、この多結晶体はX線回折で主にHAP結晶体が確認され、合成HAP同様、典型的なHAPの回折パターンを示している(図1)。

TBCの成分には有機物が全く含まれておらず、Ca 38.9%, P 21.3%, および天然骨と同様の少量のNa, Mg, Al, Si, Fe, Cu, Pbで構成されている。

10mm角の海綿骨部TBCを用いた圧縮試験の結果

図1 TBC の X 線回折チャート

は、1100℃の焼成条件で平均 $12.3\text{kg}/\text{cm}^2$ で、対照の新鮮牛骨未処理では、 $103\text{kg}/\text{cm}^2$ である²¹⁾。

無菌試験，急性毒性試験，ヒ素試験はいずれも陰性である²¹⁾。

3. アテロコラーゲン (AC)

1) アテロコラーゲン (AC) の作製方法

AC は株式会社高研社製の 3% コーケン・アテロコラーゲン・インプラントを使用した。

これは、子牛皮膚のコラーゲン (I 型コラーゲン) をペプシン処理して、テロペプチドを取り除き、免疫活性を失ったアテロコラーゲンで、操作しやすいようにゲル状に仕上げられており、移植すると体温にさらされるのでコラーゲン線維が組織内で再生する²²⁾。

4. 移植材料の作製

TBC 50mg を 3% AC 50 μl で混合，TBC-AC 複合体とし、一試料あたりの移植材料とした。また、0.5 mg の BMP を 50 μl の 3% AC と機械的に混和し、さらに、TBC 50mg を混合して、一試料あたりの TBC-AC-BMP 複合体を調製した。

5. 移植実験

1) 皮下移植実験

TBC-AC 複合体，および TBC-AC-BMP 複合体を 4 週齢雄性ウィスター系ラットの胸部皮下に移植し，移植後，2 週で摘出し，軟 X 線および組織学的に骨形成の程度を観察した。摘出した組織は軟 X 線撮影 (20 kV, 3 mA, 2 分) を行った後，10% の中性緩衝ホルマリンで固定し Plank-Rychlo 法で脱灰した。その後，通法どおりパラフィンに包埋し 6 μm の切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色，トルイジンブルー染色を施し，組織学的に観察した。

2) 頭蓋骨欠損部移植実験

動物は 10 週齢雄性ウィスター系ラットを用い，エーテルにて麻酔後，頭部から背部にかけて剃毛し，イソジンにて術野の消毒を行った。皮膚切開後，骨膜を切開，骨膜を剥離し頭蓋骨を露出した。トレファンバーにて，頭蓋骨に直径 8 mm の人工的骨欠損を作製し TBC-AC 複合体および TBC-AC-BMP 複合体を移植，骨膜縫合し閉創した。移植後 2，4，6，8，16，24 週

写真1 TBC-AC 複合体の皮下移植 2 週後の軟 X 線写真
TBC 顆粒間および周囲に骨形成を思わせる X 線不透過像は認められない。

で屠殺し，移植部を頭蓋骨とともに摘出した。摘出物は，10% の中性緩衝ホルマリンで固定後，軟 X 線撮影 (30 kV, 3 mA, 2 分) を行い，骨形成状態を観察した。

① 光学顕微鏡による病理組織学的観察

軟 X 線撮影後，摘出した 2，4，6，8 週の試料を Plank-Rychlo 法で脱灰した。その後，通法どおりパラフィンに包埋し 6 μm の切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色，トルイジンブルー染色を施し，光学顕微鏡にて組織学的に観察した。

② Ca 含量の測定

摘出した 2，4，6，8，16，24 週の試料より移植部分のみをトレファンバーにて採取し，ホモジェナイズした沈渣をおのおの 5.0 ml の 0.1 N 塩酸にて 3 週間脱灰した。遠心分離し，その上清を採取し OCPC 法 (和光純薬工業株式会社，カルシウム C-テストワコー) により Ca 含量を測定した。なお，各複合体とも各週おのおの 4 匹ずつ測定を行った。その際，TBC 50 mg の Ca 含量をあらかじめ測定し，その値を採取した試料の Ca 含量より減じ，新生骨の Ca 含量とした。また各データは平均 $\pm$ SD で表し，各群間の有意差検定には t 検定を使用した。

写真2 TBC-AC-BMP 複合体の皮下移植2週後の軟X線写真

TBC 顆粒間およびその外側に骨形成と思われる X 線不透過像が認められる。

写真3 TBC-AC-BMP 複合体の皮下移植2週後の病理組織像

TBC 顆粒間に線維組織の侵入と骨形成が認められる。(H-E 染色, ×82)

写真4 TBC-AC 複合体および TBC-AC-BMP 複合体移植2週後の軟X線写真

写真5 TBC-AC 複合体および TBC-AC-BMP 複合体移植4週後の軟X線写真

写真6 TBC-AC 複合体および TBC-AC-BMP 複合体移植8週後の軟X線写真

結 果

1. 皮下移植による骨誘導能の比較

1) 軟X線写真による骨形成能の確認

TBC-AC 複合体: 移植後8週までに骨形成を思わせる不透過像は認められなかった(写真1)。

TBC-AC-BMP 複合体: 移植後1週で TBC 顆粒間に骨形成を思わせる不透過像が認められ, 2週ではその不透過性が充進していた(写真2)。

2) 組織学的観察による骨形成能の確認

TBC-AC 複合体: TBC 顆粒間は線維性結合組織で満たされ, 移植後8週までに骨の新生は認められなかった。

TBC-AC-BMP 複合体: 移植後1週で軟骨形成が認められ, 2週ではさらに軟骨および骨形成が認められ, BMP の異所性骨誘導能が確認された(写真3)。

写真7 TBC-AC 複合体移植 2 週後の病理組織像
TBC 顆粒間では線維性結合組織の侵入が観察されるのみで骨形成は認められない。(H-E 染色, $\times 42$)

写真9 TBC-AC 複合体移植後 4 週の病理組織像
硬膜側より骨形成が認められ, 新生骨は TBC 顆粒と直接接している。(H-E 染色, $\times 42$)

写真8 TBC-AC-BMP 複合体移植 2 週後の病理組織像
硬膜側, 骨膜側に, 軟骨および幼若骨の形成が認められる。(H-E 染色, $\times 52$)

写真10 TBC-AC-BMP 複合体移植後 4 週の病理組織像
移植中心部にも骨髓形成を伴う新生骨が観察され欠損部をほぼ閉鎖している。(H-E 染色, $\times 52$)

2. 頭蓋骨欠損部移植による複合体の骨形成能の比較

1) 軟 X 線写真による骨形成能の比較

移植後 2 週において TBC-AC 複合体では移植部の辺縁に一層の X 線透過像があるのに対し, TBC-AC-BMP 複合体では移植部に若干の不透過性を認めた(写真 4)。4 週では, TBC-AC 複合体において母骨と移植部の境界部に不透過像が認められ, TBC-AC-BMP 複合体においては, TBC 顆粒間の不透過性の亢進が観察された(写真 5)。6 週では, TBC-AC 複合体においても, 顆粒間に不透過像が認められ, 8 週になると, その不透過性が亢進し, TBC-AC-BMP 複合体に

においては, 移植部の不透過性は著明で顆粒形態は不明瞭になっていた(写真 6)。16 週, 24 週になると TBC-AC 複合体でもさらに不透過性が亢進し, 顆粒形態が不明瞭になった。TBC-AC-BMP 複合体においては, 8 週と同様に移植部の全体が不透過像として認められた。

2) 組織学的観察による骨形成能の確認

移植後 2 週で, TBC-AC 複合体では母骨断端部にわずかな骨がみられたが, 顆粒間は線維性結合組織の侵入のみであった(写真 7)。一方, TBC-AC-BMP 複合体は, 新生毛細血管の侵入が認められ母骨断端部に加え, 硬膜側, 骨膜側において, 軟骨および幼弱な骨の

写真 11 TBC-AC 複合体移植後 8 週の病理組織像
TBC 顆粒間層板構造を呈する新生骨で満たされているが完全な骨閉鎖はされていない。(H-E 染色, ×52)

写真 12 TBC-AC-BMP 複合体移植後 8 週の病理組織像
骨髓腔の拡大が観察され、旺盛な新生骨で欠損部は閉鎖されていた。(H-E 染色, ×42)

形成が観察された(写真 8)。

移植後 4 週では、TBC-AC 複合体において骨断端部から離れた硬膜側に骨形成が認められた。また、新生骨は線維性結合組織を介することなく TBC 顆粒と直接接して形成されていた(写真 9)。TBC-AC-BMP 複合体では、移植部の中心の顆粒間にも骨髓形成を伴った新生骨が入り込み、欠損部をほぼ閉鎖していた(写真 10)。

移植後 6 週で、TBC-AC 複合体では骨量を増し、TBC-AC-BMP 複合体では、欠損部は新生骨にてほとんど修復されているのが観察された。

8 週目の所見では、TBC-AC 複合体において硬膜側より、層板構造を呈する骨の新生がみられ、顆粒間も新生骨で満たされていたが、骨髓の形成は認められなかった。また、線維性結合組織の残存する部位もみ

図 2 新生骨の Ca 含量

られ、完全な骨修復はされていなかった(写真 11)。一方、TBC-AC-BMP 複合体では、欠損部は骨髓組織を伴う旺盛な新生骨で完全に閉鎖されていた(写真 12)。

3) Ca 含量の測定による骨形成量の比較

TBC-AC 複合体における新生骨の Ca 含量は 2, 4, 6, 8, 16, 24 週でおの、 1.1 ± 0.1 , 22.6 ± 13.6 , 64.3 ± 4.5 , 156.9 ± 21.5 , 180.6 ± 5.6 , 165.9 ± 10.2 mg/dl であった。

一方、TBC-AC-BMP 複合体では、おのの 111.7 ± 6.8 , 215.6 ± 14.7 , 222.3 ± 4.5 , 266.4 ± 9.1 , 258.5 ± 14.7 , 248.3 ± 19.2 mg/dl であった。

TBC-AC 複合体では、2 週と 6, 8, 16, 24 週の Ca 含量間には有意差 ($p < 0.01$) が認められたが、2 週と 4 週では有意差は認められなかった。また、4 週と 6, 8, 16, 24 週、6 週と 8, 16, 24 週には有意差 ($p < 0.01$) を認めたが、8 週と 16, 24 週、16 週と 24 週では有意差を認めなかった。

TBC-AC-BMP 複合体においては、2 週と 4, 6, 8, 16, 24 週の間に有意差 ($p < 0.01$) を認めたが、4 週と 6 週には有意差を認めなかった。また、24 週と 4, 6, 8, 16 週の間に有意差を認めなかった。

TBC-AC 複合体と TBC-AC-BMP 複合体間の比較では各週の試料のすべてにおいて有意差 ($p < 0.01$) を認めた(図 2)。

考 察

近年、HAP は生体親和性に優れていることから自家骨の代用材として、しばしば用いられている。しかしながら、HAP は骨誘導能をもたないため理想的な骨代用材とはいえない。そこで骨誘導能をもつ生体材料の開発が望まれ、そのひとつとして、異所性骨誘導能を有するタンパクとして知られている BMP の臨床

応用に関するさまざまな研究が行われている^{19, 23~36)}。

BMP は臨床応用を考えた場合に、その収量が微量であること、また、BMP が骨誘導を起こすには一定レベルの BMP 濃度が必要であるため、徐放性のある何らかの担体が必要となる。さらに、骨代用材としての使用を考えた場合には、その賦形性も重要な問題となってくるため、BMP の担体に関する研究報告も多くみられる^{19, 23~36)}。

朝比奈¹⁹⁾は、ウシ骨基質をペプシン処理して得た骨の I 型コラーゲン、ウシ皮膚より調整した I 型のアテロコラーゲン、キチン、キトサン、ゼラチンあるいは合成 HAP 顆粒と BMP の再構成を行い、骨および皮膚のコラーゲンと再構成したものでは、幼若ではあるが、旺盛な骨組織の形成を認めた。また、HAP でも少量ではあるが新生骨が観察されたが、キチン、キトサン、ゼラチンと再構成したものでは新生骨の形成はみられなかったと報告している。

コラーゲンを担体として用いる研究は、Moore ら²³⁾、Doll ら²⁴⁾の報告があり、Moore らは、ヒトの I 型コラーゲンをうい、骨欠損部において良好な骨形成を認めた。また、Doll らは、I 型コラーゲンとサンゴから作製した HAP を担体として用い実験を行った結果、HAP との混合では、骨欠損辺縁部にわずかな骨形成を認めたのみであるのに対し、コラーゲンと混合すると、骨髄形成を伴う旺盛な骨形成を認めたと報告し、両者ともコラーゲンの担体としての有用性をのべている。

また、フィブリン糊を担体として用いる報告もみられ、Kawamura ら²⁵⁾は、BMP とフィブリン糊の複合体をゼラチンカプセルに入れ、良好な異所性骨誘導を確認している。一方、宇野²⁶⁾はフィブリン糊と HAP セメントを BMP の担体として使用し比較しているが、HAP セメントに比べ、フィブリン糊は賦形性も悪く、骨形成も認められなかったと報告している。HAP 顆粒の散乱を防ぐための接着剤材としてのフィブリンの有用性も報告されているが、2液を混和して使用しなければならないので、実際の臨床応用の際に不便なことが多く、材料が血液製剤であるため使用に際して、感染に対する注意が必要であり、さらに、高価なことも大量の臨床応用には不適当であると思われる。

一方、賦形性を有する担体としては、無機生体材料の検討が行われており、Urist ら²⁷⁾、三枝樹²⁸⁾は、BMP を β -TCP に吸着させ、良好な骨形成が得られたと報告している。HAP を用いたものも多数報告されており、David ら²⁹⁾は、BMP と HAP 顆粒の複合体では、異所性の骨誘導はみられなかったと報告しているが、Timothy ら³⁰⁾は、サンゴの HAP ブロックに BMP を吸着させウサギ頭蓋骨骨膜下に移植したものは、BMP 処理をしていないコントロール群と比較

して 3~4 か月で有意に骨形成量が多いと述べている。Takaoka ら³¹⁾は、HAP ディスクと BMP の複合体では骨および軟骨形成は認められないが、HAP ディスク-BMP-コラーゲンの複合体では、1 週で異所性の軟骨誘導を認め、4 週では、軟骨は吸収し、骨髄を伴う骨組織に置き換わっていたと報告している。また、Ono ら³²⁾も、HAP ペレット-BMP-コラーゲンの複合体はウサギの骨膜下で 3 週で母骨とペレット間に、活発な骨誘導を起こしたと述べている。

さらに、骨代用材としては、骨形成とともに移植材が吸収され、骨と置換するような材料が望まれるため、吸収性の担体も研究されている。Yamazaki ら³³⁾は、石膏を用い、2 週で軟骨形成を観察し、徐々に石膏は吸収され、6 週後には骨髄形成を伴う層板骨を形成すると述べている。しかし、石膏は、練和後の硬化熱発生の問題もあり、その熱による BMP および周囲組織への影響も指摘される。宇野²⁶⁾は、HAP セメントを用い、練和時の硬化熱の発生がほとんどなく、硬化体は骨に近い HAP 結晶を有し、BMP との複合化においても、硬化体と同様の形態に良好な骨形成を示したと述べ、BMP の担体、賦形材として有用であるとしている。

神出³⁴⁾は、HAP、 β -TCP、 α -TCP、OCP (octacalcium phosphate)、DCPD (dicalcium phosphate dehydrate) の 5 種類の材料を用い、BMP 活性におけるリン酸カルシウム系材料の影響について検討し、HAP、 β -TCP、 α -TCP のように溶出により Ca、P、pH が大きく変化しない材料は、in vivo、in vitro とともに BMP の骨、軟骨誘導能を抑制せず、BMP が作動する期間の時間経過では生体内で安定であると報告している。しかし、DCPD のように溶解性が高く、Ca、P 濃度を著しく増加させる材料では、BMP の骨、軟骨誘導に対して抑制的に働くと報告している。

また、Miki ら³⁵⁾は、ポリ L 乳酸ディスク (PLLA) を担体として用い、2 週で軟骨および新生骨形成を示し、4 週で軟骨は骨髄を伴う新生骨で置き換わったとし、その有用性を述べているが、PLLA が吸収して骨と置き換わっているわけではなく、その吸収速度の検討も今後の課題であろう。

Ugo ら³⁶⁾は、霊長類の頭蓋骨に吸収性、非吸収性の HAP と Osteogenin の複合体を移植し、吸収性 HAP では、90 日で新生骨がみられるのに対し、非吸収性 HAP では 30 日で広範な新生骨の形成を認め、骨量も吸収性と比べ、有意に多いことを示している。これは、吸収性 HAP では、HAP の早期の吸収により、骨よりもむしろ線維および筋組織に置き換わったのではないかと述べ、さらに、HAP コーティングの早期分解によって、Osteogenin との結合が早く破壊された可能性があると考えしている。

本研究においては、BMP の担体として天然 HAP

とアテロコラーゲンをを用い、その複合体の骨形成能を検討した。天然 HAP にはサンゴに由来する Interpore 200™や動物の骨を焼成加工したものが利用されているが、今回使用した True Bone Ceramics (TBC) は牛骨を焼成した天然 HAP である。

TBC は 1982 年、植野ら³⁷⁾が天然骨を焼成し、骨補填材として埋入実験を行ったのが最初で、異物反応が無く、組織親和性に優れており、特に海綿骨部の TBC では移植された生体と一体化し、癒合する像が観察されたと報告している。植野らは最初、牛骨から作成した焼成骨を“Bone Ceramic”として発表した³⁷⁾、本材が、天然骨から作成されたことを強調して、1984 年にこれを“True Bone Ceramics”と命名した³⁸⁾。

今回使用した TBC は株式会社高研から供給されたものである。TBC は焼成処理により天然の骨塩や骨構造を温存しながら、有機物のみを完全に除去したものである。残された骨塩は Ca, P からなる HAP のほかに、天然骨と同様の少量のミネラルが含まれるが、それらの組成は生体内で調節されたものであるため特に問題はないとされている²¹⁾。また、天然骨の有する小腔は、もとは骨髓細胞で満たされていた空間であるため、血管新生や骨形成の場として、合成 HAP より有利な環境にあるといえる。本研究においても、新生骨は線維性結合組織を介することなく TBC に直接接しており、骨親和性はきわめて良好であった。さらに、TBC を自家骨代わりにもちいることには、さまざまな利点がある。すなわち、自家骨採取時の手術侵襲やそれに関わる種々の合併症を回避できること、採取量の問題を考慮しなくても良いこと、また、有機成分を含まないため免疫反応が起こらないこと、などの利点があれば、BMP の担体としても、賦形性を付与するとともに骨形成の足場として効率の良い欠損部の骨修復を促していると考えられる。

一方、トロポコラーゲンは本来弱いながらも、抗原性を示すが、コラーゲン分子をペプシン、トリプシンなどのタンパク加水分解酵素で処理すると、分子全体の 3～4% を占めている末端部分のテロペプチドのみが消化され、分子本体はなんら作用を受けずにコラーゲン分子としての構造が残される。テロペプチドは動物の種類によって固有の構造を有しており、コラーゲンの免疫特性を決定する最も大きな役割を果たしている。また、コラーゲン分子に対しトリプシンなどのタンパク加水分解酵素処理の回数を増やすと、それに応じて抗原性が漸次減少することが宮田らの実験で報告されている^{39, 40)}。

本研究で使用したコラーゲンは若いウシの真皮より抽出されたトロポコラーゲンをペプシン処理しテロペプチドを完全に除去したもので、抗原性がなく、周囲の生体組織となじみやすく、生体に埋入された後、組織の修復を促し、最終的には吸収する。今回の実験

において、コラーゲンは、その粘着性により、TBC 顆粒体を一塊として移植することができるため操作性は数段改善され、移植時の顆粒の散乱は多少みられるものの、少なかった。また、生体内で再生された線維状コラーゲンは組織内でほとんど移動せず、TBC 顆粒を保持するので、移植後の顆粒体の移動もなくなり、母組織への固定が改善された。そのほかにも、コラーゲンは、細胞を支える足場としても機能し、体内に埋入すると周囲組織から細胞の侵入が起こり、コラーゲンは徐々に吸収されると同時に宿主自身のコラーゲンが生成される。つまり、コラーゲンインプラントは、まずそこに自己組織を再構築するための鋳型として働き、細胞や血管などの導入をガイドする役割を果たす⁴¹⁾。また、細胞分化に及ぼす効果も重要である。

今回の実験では、ウシ脱灰骨基質より抽出、部分精製した BMP を用い、4 週齢のウィスター系ラットの胸部皮下に移植して BMP の生物学的活性を確認した。その後、10 週齢のウィスター系ラットの頭蓋骨に作成した自然閉鎖されない大きさの人工的骨欠損部⁴²⁾に TBC-AC-BMP 複合体を移植し、その骨形成能について検討した。この骨欠損は径 8 mm でラットにおいて自然閉鎖されない大きさであるとされている。組織学的には、TBC-AC 複合体では、2 週において骨断端部にわずかな骨形成を認め、4 週では硬膜側より骨形成が認められ、TBC 顆粒間にも侵入し、8 週では層板構造を呈する骨で顆粒間がほぼ満たされていた。一方、TBC-AC-BMP 複合体においては、2 週で骨断端部から離れた骨膜、硬膜側においても、軟骨および幼若な骨形成が認められた。4 週では、すでに顆粒間にも骨髓を伴う新生骨の侵入が認められ、欠損部を閉鎖していた。両者ともに、新生骨は TBC と直接接し、線維性結合組織を介さないことにより、TBC 顆粒は生体および骨親和性に優れ、骨形成の場に有利な生体材料であることが確認された。また、アテロコラーゲンも移植後、2～3 週で徐々に吸収され、BMP が早期に拡散するのを防ぎ、骨誘導を起こすのに適当な時間で BMP の徐放が行われていると考えられた。

新生骨の Ca 含量の測定による骨形成量の検討において、TBC-AC 複合体と TBC-AC-BMP 複合体間の比較では全週で有意に TBC-AC-BMP 複合体の Ca 含量が多かった。TBC-AC 複合体群においては、2 週と 4 週では有意差はみられなかったが、4 週と 6 週、6 週と 8 週では有意に Ca 含量の増量が認められた。また、8 週以降では、有意差は認められず、4 週～8 週で旺盛な骨形成を示し、8 週では安定化すると考えられた。

TBC-AC-BMP 複合体群においては、2 週ですでに活発な骨形成を示し、さらに 4 週で有意に Ca 含量が増加し、4 週と 6 週の間では有意差が認められないこ

とから、4週で骨欠損部全体を閉鎖していると考えられた。さらに、BMP によって誘導された骨は、24 週までの間に吸収、減量することなく、ほぼ一定に保たれていた。

遺伝子工学的手法によって作られたリコンビナント BMP が骨誘導活性をもつことが報告され、人工的に大量の合成が可能となり、最近では BMP の臨床応用も現実のものとなってきた。したがって、さらに臨床応用に則したあらゆる場面での骨修復に適するような担体の開発が望まれる。そのためには、抗原性が低く、生体適合性に優れていることは当然であるが、BMP が標的細胞に作用する期間中保持されるような適当な徐放材として働き、細胞分化、増殖の足場となり、血管侵入など骨形成の場として有利に働くことが必要であり、骨形成とともに崩壊、吸収し、新生骨と完全に置換されることが望ましい。口腔外科領域においては、腫瘍および嚢胞摘出後の骨腔、口唇口蓋裂の顎裂や顎変形症などさまざまな骨修復の場があるため、おののに必要な形態、機械的強度が得られることが望ましい。そして、それには、その場に適した担体を選択することによって、より確実な骨欠損部の修復が達成されるものと考ええる。

本研究において検討した TBC-AC-BMP 複合体は新生骨に置換はしないものの、BMP の骨誘導を阻害せず、適度な徐放性を持ち、生体親和性、骨形成性に優れ、粘性、賦形性を有するため、口腔外科領域の骨誘導生体材料として有用であると考ええる。

結 論

ウシ脱灰骨基質より、4 M 塩酸グアニジン・50 mM Tris/HCl, pH 7.4 で抽出を行い、その不溶性画分よりゲル濾過クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて得た骨誘導因子 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) の粗精製物を使用し、True Bone Ceramics (TBC) と Atelocollagen (AC) の複合体を作製した。この複合体をラットの頭蓋骨欠損部に移植して骨形成能を検討し、以下の結論を得た。

1. TBC-AC-BMP 複合体は、操作性に優れ、移植時および移植後の顆粒の散乱や移動が少なかった。

2. TBC-AC 複合体は、4 週頃より顆粒間に骨形成を認め、8 週において顆粒間は層板骨でほぼ満たされたが、欠損部全体が骨で閉鎖されてはいなかった。

3. TBC-AC-BMP 複合体では、2 週で軟骨および幼若な骨形成を認め、4 週において骨髄形成を伴った新生骨で欠損部は閉鎖されていた。

4. 新生骨の Ca 含量の測定では全週において TBC-AC-BMP 複合体が有意に多かった。また、TBC-AC 複合体では 8 週で、TBC-AC-BMP 複合体では 4

週で骨形成量はほぼ安定した。

5. 以上のことより、TBC-AC-BMP 複合体は骨誘導能を有する骨代用材として有用であると思われた。

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なる御指導、御校閲を賜りました榎本昭二教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり多大な御教示、御助言を賜りました渡辺正敏先生、ならびに御協力頂きました三木貴司先生に深く感謝致します。最後に本研究に際し、数々の御協力、御援助、御理解をいただきました口腔外科学第 2 講座の皆様にご心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は、第 4 回 World Biomaterials Congress (1992 年 4 月 25-26 日, Berlin), 第 37 回日本口腔外科学会総会 (1992 年 11 月 19 日, 横浜), 第 35 回大韓口腔・顎顔面外科学会総合学術大会 (1994 年 4 月 1 日, Seoul) において発表した。

引 用 文 献

- 1) 小木曾誠：Apatite 焼結体埋入による顎骨組織の経時的推移変化。口病誌 45: 170-221 1987.
- 2) 倉科憲治, 小谷 朗, 他：Ceramics 材料の臨床応用に関する研究 第 1 報 Dense calcium hydroxyapatite ceramics に対する骨の反応。信州医誌 30: 161-173 1982.
- 3) 倉科憲治, 小谷 朗, 他：Ceramics 材料の臨床応用に関する研究 第 2 報 Porous calcium hydroxyapatite ceramics に対する骨の反応。信州医誌 30: 174-181 1982.
- 4) 山崎安晴, 大西正俊, 他：人工骨としての多孔質アパタイトー 1 脛骨埋入実験一。口病誌 49: 251-278 1982.
- 5) 山崎安晴：人工骨としての多孔質アパタイトー顎骨補填実験一。口病誌 51: 372-406 1984.
- 6) 勝山直彦, 千葉博茂, 他：ヒドロキシアパタイト・セラミックス埋入に続く歯槽骨変化の研究 (1) —マイクロラジオグラフィーとラベリング法による自家腸骨移植との比較観察一。日口外誌 31: 2035-2054 1990.
- 7) 千葉博茂：歯槽骨の保護を目的とした各種生体材料の可能性—2 Kiel bone 移植や Hydroxyapatite ceramics の埋入とその変化一。日本歯科評論 576: 151-170 1990.
- 8) 久野吉雄, 宮下幸久, 他：ハイドロキシアパタイト (Calciite) の臨床使用経験。日口外誌 31: 1602-1611 1985.
- 9) 倉科憲治, 矢島幹人, 他：Ceramics 材料の臨床応用に関する研究 第 5 報 口腔外科領域での hydroxyapatite ceramics の使用経験。日口外誌 31: 2169-2178 1985.
- 10) 高橋庄二郎, 齊藤 力, 他：口腔外科領域におけるハイドロキシアパタイト・セラミック Alveograf® の臨床評価—他施設による協同研究一。日口外誌 32: 92-107 1986.
- 11) 倉科憲治, 峯村俊一, 他：Ceramics 材料の臨

- 床応用に関する研究 第7報 顆粒状 hydroxy-apatite による顎堤挙上について. 日口科誌 36: 344-353 1987.
- 12) 倉科憲治, 峯村俊一, 他: Ceramics 材料の臨床応用に関する研究 第8報 顆粒状 hydroxy-apatite による部分歯槽堤形成について. 日口外誌 33: 1377-1382 1987.
- 13) 若月達也, 中島信也, 他: 多孔性 hydroxy-apatite 顆粒の臨床応用. 日口科誌 36: 82-95 1987.
- 14) 千葉博茂, 早乙女雅彦, 他: 歯科領域における多孔質ハイドロキシアパタイト (APS-7) の臨床評価. 歯学 76: 691-710 1988.
- 15) Mitsui, M., Watanabe, M., et al.: True Bone Ceramics/Atelocollagen Implant for Bone Defects: Experimental and Clinical Study. Proc 1st Int Symp on Apatite, Apatite vol. 1: 487-492 1992.
- 16) Urist, M.R. and Maclean, F.C.: Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. J Bone Joint Surg 34-A: 443-479 1952.
- 17) Urist, M.R.: Bone formation by auto-induction. Science 150: 893-899 1965.
- 18) Urist, M.R. and Strates, B.S.: Bone Morphogenetic Protein. J Dent Res 50: 1392-1406 1971.
- 19) 朝比奈泉: 骨形成因子 (BMP) の精製とその臨床応用に関する基礎的研究. 口病誌 54: 91-105 1987.
- 20) 櫻井規雄: 骨誘導因子 (BMP) の精製および骨芽細胞系細胞に対する作用に関する研究. 口病誌 60: 169-182 1993.
- 21) Ueno, Y., Shima, Y., et al.: Development of a new biomaterial as a bone substitute; True Bone Ceramics. Materials Science Monographs, 39. Ceramics in Clinical Applications. Proc int Symp on Bioceramics 369-378 1987.
- 22) 宮田輝夫: コラーゲンの応用 (V). Frangrance 3: 70-7 1990.
- 23) J.C. Moore, V.J. Matukas, et al.: Craniofacial osseous restoration with osteo-inductive protein in a collagenous delivery system. Int J Oral Maxillofac Surg 19: 172-176 1990.
- 24) B.A. Doll, H.J. Towle, et al.: The osteogenic potential of two composite graft systems using Osteogenin. J Periodontol 61: 745-750 1990.
- 25) Kawamura, M and Urist, M. R.: Human fibrin is a physiologic delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop 235: 302-310 1988.
- 26) 宇野克美: 骨形成タンパク (BMP) の賦形材の検討. 日口外誌 38: 271-280 1992.
- 27) Urist, M.R., Lietze, A., et al.: β -tricalcium-phosphate delivery system for bone morphogenetic protein. Clin Orthop 187: 277-280 1984.
- 28) 三枝樹明道, 河合達志, 他: 骨形成因子結合 β -リン酸 3 カルシウムの骨形成能について. 歯材器 8: 224-230 1989.
- 29) David A. Glass, James T. Mellonig, et al.: Histologic evaluation of bone inductive proteins complexed with coralline hydroxylapatite in an in an extrasketal site of the rat. J Periodontol 60: 121-126 1989.
- 30) Timothy A. Miller, Ishida, K., et al.: The induction of bone by an osteogenic protein and the conduction of bone by porous hydroxyapatite: A laboratory study in the rat. Plast Reconstr Surg 87: 87-94 1991.
- 31) Takaoka, K., Nakahara, H., et al.: Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein. Clin Orthop 234: 250-254 1988.
- 32) Ono, I., Ohura, T., et al.: A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. Plast Reconstr Surg 90: 870-879 1992.
- 33) Yamazaki, Y., Oida, S., et al.: Response of the mouse femoral muscle to an implant of a composite of bone morphogenetic protein and plaster of Paris. Clin Orthop 234: 240-249 1988.
- 34) 神出敏彰: BMP 活性に及ぼすリン酸カルシウム系材料の影響について. 日口外誌 40: 377-395 1994.
- 35) Miki, T., Harada, K., et al.: Effect of freeze-dried poly-L-lactic acid discs mixed with bone morphogenetic protein on the healing of rat skull defects. J Oral Maxillofac Surg 52: 387-391 1994.
- 36) Ugo Ripamonti, Shu-Shan Ma, et al.: Osteogenin, a bone morphogenetic protein, absorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvaria! defects of adult primates. Plast Reconstr Surg 90: 382-393 1992.
- 37) 植野 裕, 佐々木俊二, 他: 焼成骨の研究. Orthopaedic Ceramic Implants 3: 11-16 1983.
- 38) 植野 裕: 焼成骨移植の実験的究. 真角昭吾編集: 別冊整形外科. 骨・軟骨移植の基礎と臨床. 南江堂, 東京, 京都, 1985, 85-88 頁.
- 39) Nishihara, T. and Miyata, T.: The effect of proteases on the soluble and insoluble

- collagens and the structure of the insoluble collagen fiber. Collagen symposium vol. III: 66-93 1962.
- 40) Kurrt H. Stenzel, Miyata, M., et al.: Collagen as a biomaterial. Annu rev biophys bioeng vol. III: 231-253 1974.
- 41) 宮田輝夫: コラーゲンの応用 (Ⅲ). *Fracture J* 1: 108-115 1990.
- 42) John P. Shcmiz and Jeffrey O. Hollinger.: The critical defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop related res* 205: 299-308 1986.
-