



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	原田, 尚樹; Harada, Naoki; 柏崎, 晴彦 他
Citation	北海道歯学雑誌, 32(2), 166-176
Issue Date	2012-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48711
Type	journal article
File Information	07-harada_gencho.pdf



原 著

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

原田 尚樹¹⁾ 柏崎 晴彦¹⁾ 赤澤 敏之²⁾ 村田 勝³⁾ 相沢 智康⁴⁾
出村 誠⁴⁾ 田中 順三⁵⁾ 飯塚 正⁶⁾ 井上農夫男¹⁾

抄 録：【背景・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柔軟性のある物性を持つことを報告してきた。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。

【方法】共沈澱法とポロージェンリーチング法により多孔性キトサン/HAp複合体を作製し、5 μ g のrhBMP-2を添加した。rhBMP-2無添加の複合体を対照として、10週齢のSDラット頭頂骨骨膜下に埋入し、4、8週後に屠殺し、組織学的観察および形態計測を行った。

【結果】rhBMP-2添加多孔性キトサン/HAp複合体では、埋入4、8週後に複合体の周辺部から中央部にかけて多数の細胞侵入および骨形成が認められた。対照群では骨形成はみられなかった。形態計測した結果、埋入4、8週後における複合体の占有率はrhBMP-2添加群では対照群に比べ有意に減少し ($p < 0.05$)、骨形成に伴う複合体の吸収が認められた。

【考察・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。

キーワード：キトサン、ハイドロキシアパタイト (HAp)、rhBMP-2

緒 言

現代社会において国民の高齢化が進むなか、加齢とともに歯牙の喪失や歯槽骨の吸収が起り、咀嚼機能の低下に伴い生活の質 (Quality of Life) が低下する。歯槽骨の吸収が高度になると義歯やインプラント治療も困難になり、咀嚼機能の回復は困難となる。この状況を解決する有力な方法のひとつが骨の再生療法である。著しい歯槽骨吸収に

対する骨再生治療のゴールドスタンダードは新鮮自家骨移植であるが、移植骨採取のため健康な組織を侵襲することと骨採取量に制限があるという欠点のため、特に高齢者の治療には不向きである。近年、このような欠点を改良するため、自家骨の代わりにハイドロキシアパタイト (以後、HAp) などのセラミックス人工骨を駆使した治療法が増加してきておりHApは整形外科や歯科の分野において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

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室 (主任：井上農夫男 教授)

²⁾ 〒060-0819 札幌市北区北19条西11丁目

北海道立総合研究機構

³⁾ 〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野 (主任：有末 眞 教授)

⁴⁾ 〒060-0819 札幌市北区北10条西8丁目

北海道大学大学院先端生命科学研究所

⁵⁾ 〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1

東京工業大学大学院理工学研究科材料工学専攻 (主任：田中順三 教授)

⁶⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科学術支援部

いる¹⁻⁴⁾。しかし、HApはその硬さと脆性のため、望むような形状に成形することが困難である。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に多くの関心が集まっている。

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⁵⁾や高い熱安全性⁶⁾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^{7,8)}。

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⁹⁾。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。細胞増殖因子として代表的なのは、骨形成蛋白質 (Bone morphogenetic protein: BMP) である。BMPは1965年にUrist¹⁰⁾により筋組織内での塩酸脱灰骨の軟骨性骨化が報告され、1971年Uristら¹¹⁾によって命名された。1990年にリコンビナントヒトBMP (recombinant human bone morphogenetic protein: rhBMP) が発表された¹²⁾。現在までに約20種類以上のBMPファミリー分子が同定されているが、中でもBMP-2は強力な骨形成能を持つことが多くの研究により報告されている^{13,14)}。しかし、BMP-2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-2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、rhBMP-2担体としての多孔性キトサン/HAp複合体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。

方 法

1. 実験動物

10週齢Sprague Dawley (SD) 雄性ラット (体重300~350g) 8匹を使用した。実験に際し、1週間健康状態を観察し、異常のないものを使用した。なお、動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき行なった (承認番号: 09-0008)。

2. 実験材料

1) キトサン粉末

キトサン粉末は北海道曹達株式会社から提供された。その脱アセチル化度 (Degree of deacetylation: DDA) はフーリエ変換赤外線分光光度計 (Fourier transform infrared spectrophotometer: FTIR) による吸光度比より算出したところ、96%であった。試薬として、85.0wt%リン酸、99.5wt%炭酸カルシウム、99.7wt%酢酸、99.0wt%塩化ナ

トリウム (和光純薬工業株式会社、東京) を使用した。

2) キトサン/HAp複合体の作製と多孔質化

Yamaguchiらの方法¹⁵⁾に準じて共沈澱法によるキトサン/HAp複合体の作製、及びその多孔化を行なった。3 wt%のキトサン水溶液を、1 wt%の酢酸を含む蒸留水にキトサンの粉末を溶かし、次いでその溶液に8.5wt%のリン酸溶液を加えて作製した。市販されている水酸化カルシウムは純度が低いため、高純度の炭酸カルシウムを加水消化することで水酸化カルシウムの合成を行なった。まず、炭酸カルシウムを10℃/分の速度で温度上昇し、1050℃で3時間焼成することで、酸化カルシウムを作成した。次いで自然冷却し、300℃以下になった時点で2 lの蒸留水を加え、24時間攪拌し0.5mol/lの水酸化カルシウム懸濁液を作製した。次にキトサン/リン酸溶液を水酸化カルシウム懸濁液にpH9.0±0.2になるまで攪拌 (300rpm) しながら滴下すると、キトサン/HAp複合体が沈澱した。反応温度を25℃に保ち、滴下速度はチューブポンプを使用し、3.2ml/minに制御した。DDA=96%、混合比率がキトサン/HAp=80/20 (%)のキトサン/HAp複合体を作製するために表1で示す試薬の分量で上記合成を行なった。合成した泥漿を24時間攪拌し熟成させた後、酢酸を用いてpHを7.2±0.2に調整した。次にその沈澱物を濾過し、蒸留水で3回水洗し、脱水した。多孔質化はポローゲンリーチング法¹⁶⁾を用いて行なった。ポローゲンリーチング法は水溶液の糖質や塩化ナトリウムの微粒子をポローゲンとして用いて多孔質材料を作製する方法である。ポローゲンとしては粒径を100~300μmとした塩化ナトリウムを用いた。キトサン/HAp複合体100重量部に対し、塩化ナトリウムの添加量を1250重量部とした。複合体脱水後、塩化ナトリウムが混和しやすいように、重量の1.5倍量の塩化ナトリウム飽和水溶液を加えた。スラリー状になったキトサン/HAp複合体に粒径100~300μmの塩化ナトリウムを上記の重量で加え、素早く攪拌した。再度脱水し、単動型シリンダで一軸方向に20MPaの圧で24時間圧縮、脱水させた。単動型シリンダから塩化ナトリウム粒子を含有した複合体を取り出し、恒温水槽にて20℃で12時間、50℃で12時間かけて塩化ナトリウムを溶出させ、多孔性キトサン/HAp複合体を得た。複合体は滅菌したメスにて埋入実験で使用するサイズ (3×3×3 mm) に成形し、オートクレーブにて蒸気加圧滅

表1 キトサン/HAp複合体の作製

Chitosan	^{a)} CH ₃ COOH	^{b)} H ₃ PO ₄	^{c)} Ca(OH) ₂ Suspension	Chitosan/HAp composition (Weight Ratio)
16.0(g)	5.19(g)	2.75(g)	166.0(ml)	80/20

a) CH₃COOH aq. Solution of 1.5wt%

b) H₃PO₄ aq. Solution of 8.5wt%

c) Ca(OH)₂ Suspension of 0.5wt%

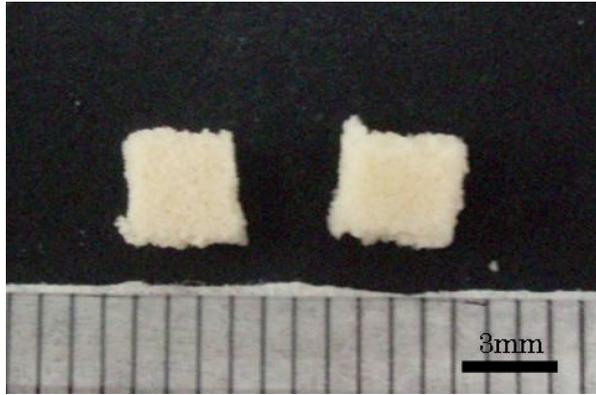


図1 多孔性キトサン/HAp複合体の外観像

滅菌したメスにて埋入実験で使用するサイズ(3×3×3 mm)に成形後、オートクレーブにて蒸気加圧滅菌を行なった複合体。

菌を行なった(図1)。

3) 多孔性キトサン/HAp複合体の微細構造

作製した複合体の微細構造を評価するために、走査電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope: SEM)による観察、エネルギー分散型X線分析(Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: EDX)、X線回折分析(X-ray Diffraction: XRD)を行なった。

4) 複合体へのrhBMP-2の添加

rhBMP-2粉末(PEPROTECH社, ロンドン)10 μ gに滅菌蒸留水20 μ lを加えてrhBMP-2溶液(濃度0.5 μ g/ μ l)を作製した。多孔性キトサン/HAp複合体を滅菌シャーレ内に置き、rhBMP-2溶液10 μ l(rhBMP-2:5 μ g)を複合体に滴下含浸させた。対照群として滅菌蒸留水10 μ lのみを滴下含浸した複合体も作製した。

3. 実験方法

1) 埋入方法

滅菌生理食塩水にて希釈したペントバルビタール(ネンブタール[®]:40mg/kg, 大日本住友製薬株式会社, 大阪)の腹腔内投与による全身麻酔下でSDラットの頭頂部を剃毛し、術野を10%ポビドンヨード(イソジン[®]液, 明治製菓株式会社, 東京), 70%エチルアルコールで消毒した。両耳の間にハサミで皮膚に約10mmの切開を加えた後、メスで骨膜切開し、骨膜を鈍的に剥離挙上して骨膜下に試料を埋入するための空隙を形成した。複合体(rhBMP-2添加群, 対照群:3×3×3 mm)をピンセットで把持し、切開創から10mm前方に挿入し、創部をナイロン糸で1針縫合し閉鎖創とした。術後感染予防のため抗生物質軟膏(クロロマイセチン軟膏[®], 第一三共株式会社, 東京)を創部に塗布して終了とした。

2) 摘出と組織標本作製

埋入後4, 8週後に各4匹ずつジエチルエーテルで屠殺し、頭部を剃毛しハサミで埋入部を幅5mm程で取り囲むように周囲の頭頂骨から皮膚まで同時に切開を加え、各埋入物および皮膚・頭頂骨まで一塊として摘出した。試料は直ちに10%中性緩衝ホルマリン液で5日間浸漬固定を行った。試料は10%EDTA溶液で6週間脱灰を行い、通法に従いエタノールで脱水後パラフィン包埋し、ミクロトームを用いて厚さ5 μ mの切片を作製した。通法に従ってヘマトキシリン-エオジン染色を行った。

3) 組織形態計測

複合体の吸収と骨形成過程を光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE[®]. 80i, 株式会社ニコン, 東京)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。なお、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はWeibel法¹⁷⁾に基づき、埋入物組織面積に占める各組織面積の割合をImage-ProPlus[®](株式会社プラネトロン, 東京)を用いて算出することにより形態計測を行った。形態計測は、それぞれ4検体中3検体を無作為に抽出し、各検体の中央部最大断面を計測範囲に設定した。算出したそれぞれの割合について有意差検定(t検定)を行った。

結 果

1. 多孔性キトサン/HAp複合体の微細構造

作製した複合体の微細構造を評価するためにSEM観察, EDS, XRDを行なった。低倍率にて複合体のSEM観察を行うと、気孔率75~80%, 孔径100~300 μ mの外部と交通する連通孔が認められた(図2-A, 図2-B)。高倍率にてSEM観察を行うと、粗造な形状を呈する複合体表面が認められ、キトサン単体の存在やHAp結晶の偏在はみられなかった(図3-A, 図3-B)。2000倍率でSEM観察した複合体表面をEDSでマッピングした結果、キトサンに由来する炭素の均一な拡散像が認められ(図3-C)、HApに由来するカルシウムの均一な拡散像が認められた(図3-D)。キトサン単体と複合体のXRDを行なった結果、キトサン単体のXRDパターンでは、 $2\theta=20^\circ$ 付近にピークが見られたが、複合体のXRDパターンでは、ピークが消失し、HApの特徴を示す $2\theta=32^\circ$ 付近に弱いピークが見られた(図4)。

2. 組織学的所見

1) rhBMP-2添加多孔性キトサン/HAp複合体群

(1) 埋入4週後

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(図5-A)。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

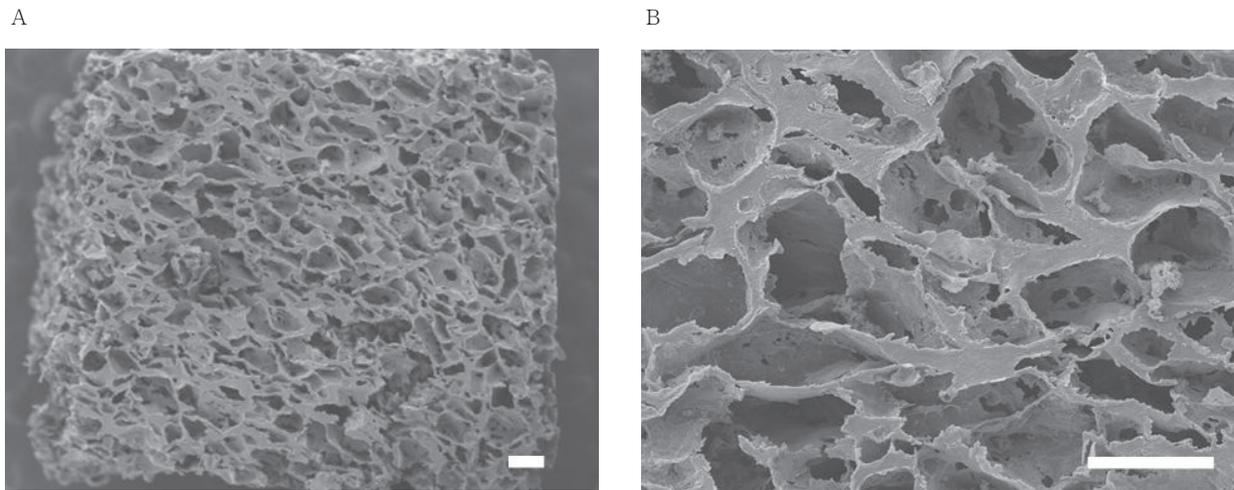


図2 多孔性キトサン/HAp複合体のSEM

キトサン/HAp複合体100重量部に対する塩化ナトリウムの添加量を1250重量部とし、ポロージェンリーチング法で作製した多孔体表面のSEM。孔径100~300 μm の連通孔を認める。気孔率は75~80%。

A : $\times 50$ B : $\times 200$ bar : 200 μm

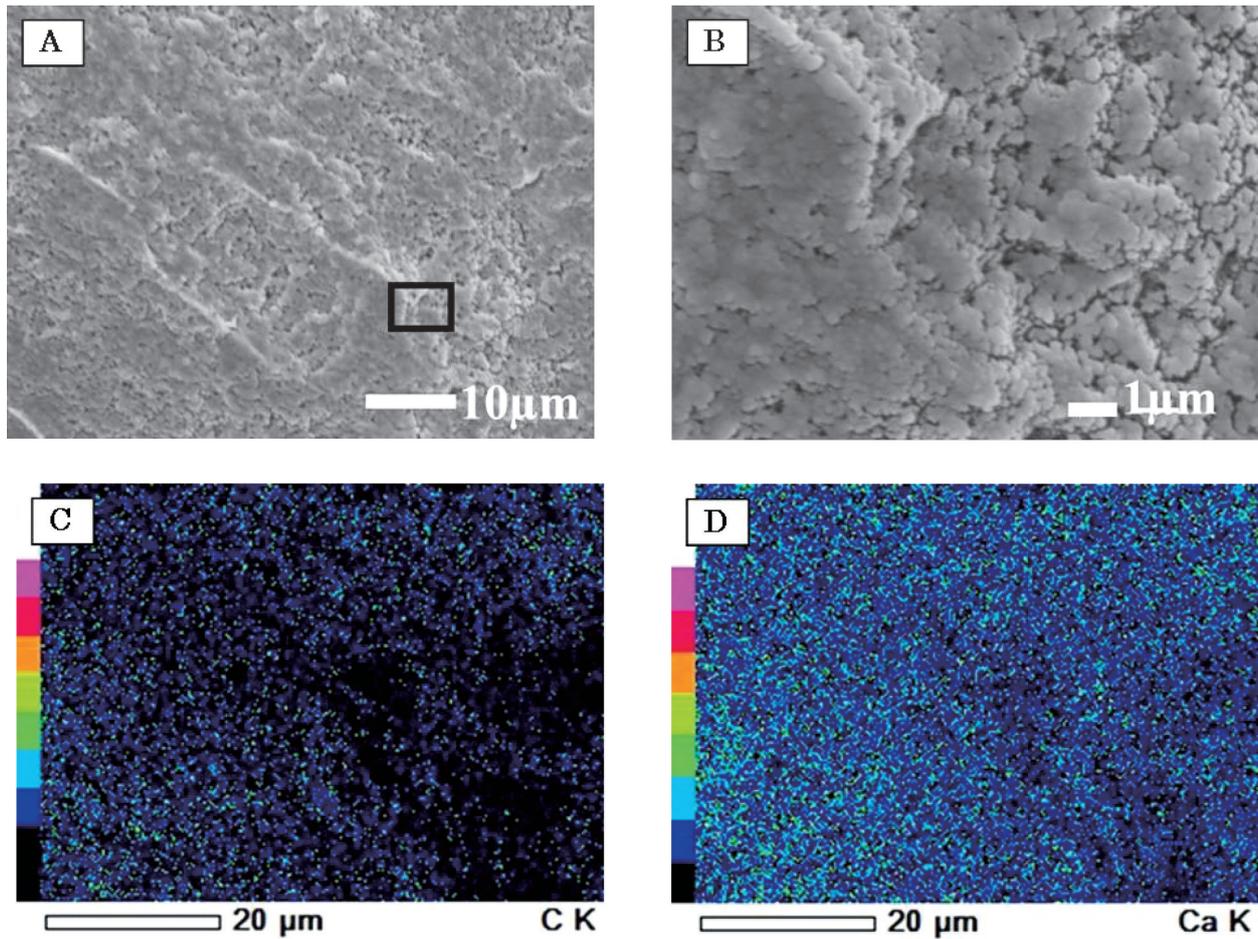


図3 多孔性キトサン/HAp複合体のSEMとEDS

A : 複合体表面2000倍のSEM。複合体表面は一様に粗造な形状をしている。

B : 複合体表面10000倍（写真Aの枠の拡大像）のSEM。複合体表面には、HAp単体の結晶やキトサン単体の結晶が存在するといった像は見られない。

C : 炭素のマッピングではキトサンに由来する炭素が均一に散在している。

D : カルシウムのマッピングではHApに由来するカルシウムが均一に散在している。

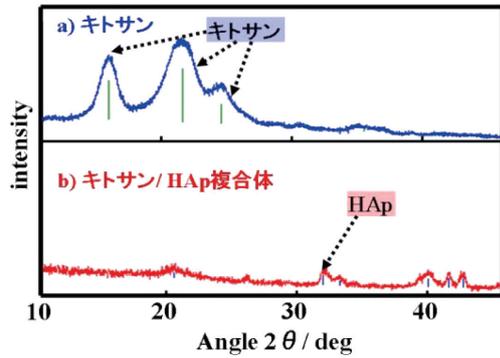


図4 多孔性キトサン/HAp複合体のXRDパターン
 図の上方のXRDパターンはキトサン単体のもので、 $2\theta = 20^\circ$ 前後にキトサンの結晶のピークが見られる。
 図の下方のXRDパターンは複合体のもので、複合体では $2\theta = 20^\circ$ 前後のキトサン結晶のピークが消失し、HApの特徴とされる 32° 付近に弱いピークがみられる。

(図5-B). 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(図5-C). 新生骨が複合体を取り込むように形成を進めている像が観察された(図5-D).

(2) 埋入8週後

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(図6-A). 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. 新生骨の一部に骨髓が認められ骨量の増加が観察された(図6-B). 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(図6-C, D).

2) 対照群(多孔性キトサン/HAp複合体単独群)

4, 8週後ともに複合体内部での骨や骨髓は見られなかった. 4週後では複合体内部は線維性結合組織で満たさ

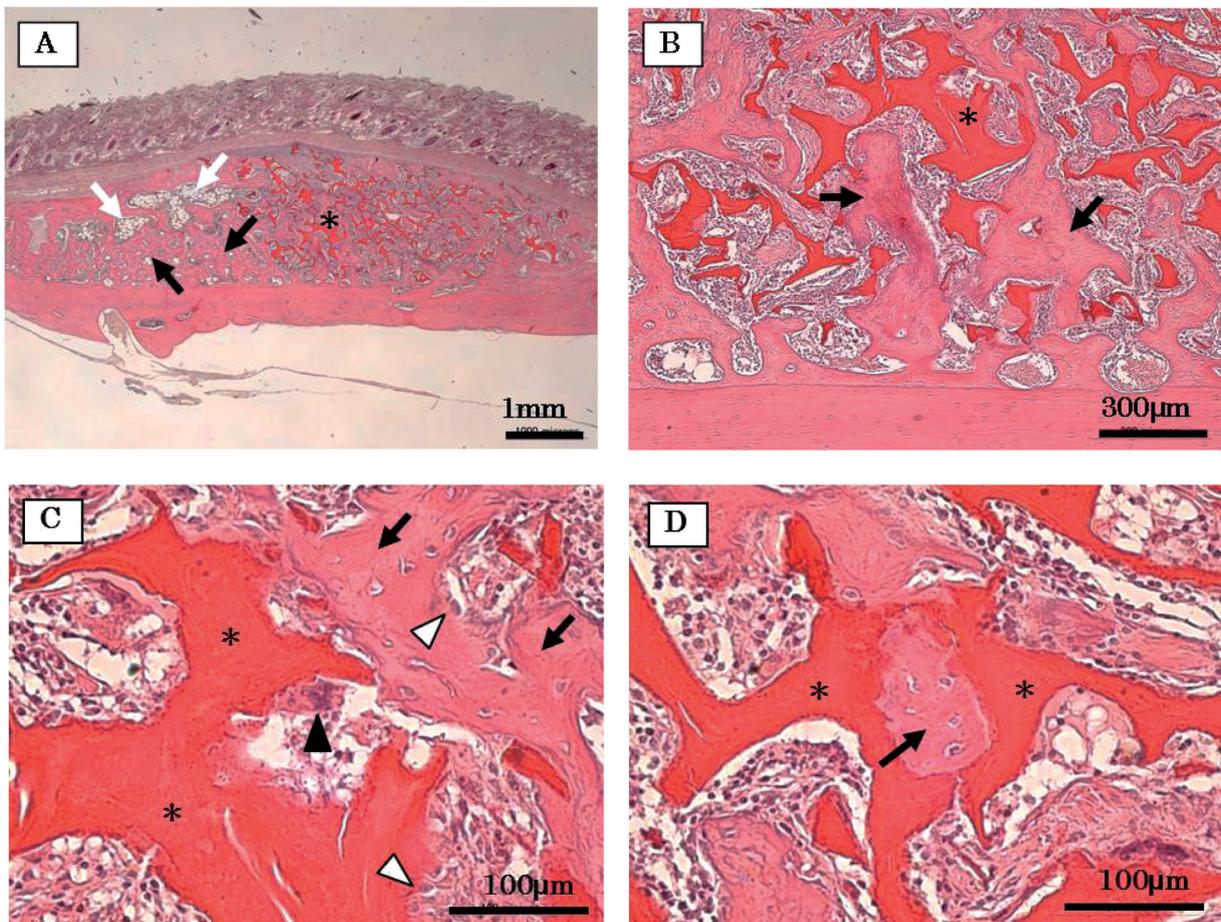


図5 rhBMP-2添加多孔性キトサン/HAp複合体群 4週後
 A: 全体像(H-E染色, $\times 20$). 複合体(*)は吸収が進んでおり、新生骨(黒矢印)と骨髓(白矢印)の形成がみられた。
 B: 頭頂骨側拡大像(H-E染色, $\times 100$). 複合体と接して新生骨が形成されている部分も観察された。
 C: 中央部拡大像(H-E染色, $\times 400$). 複合体周囲には貪食している巨細胞(黒矢頭)が存在し、新生骨周囲や複合体周囲に沿って並んでいる骨芽細胞(白矢頭)も観察された。
 D: 中央部拡大像(H-E染色, $\times 400$). 複合体と接するように新生骨が形成されている。

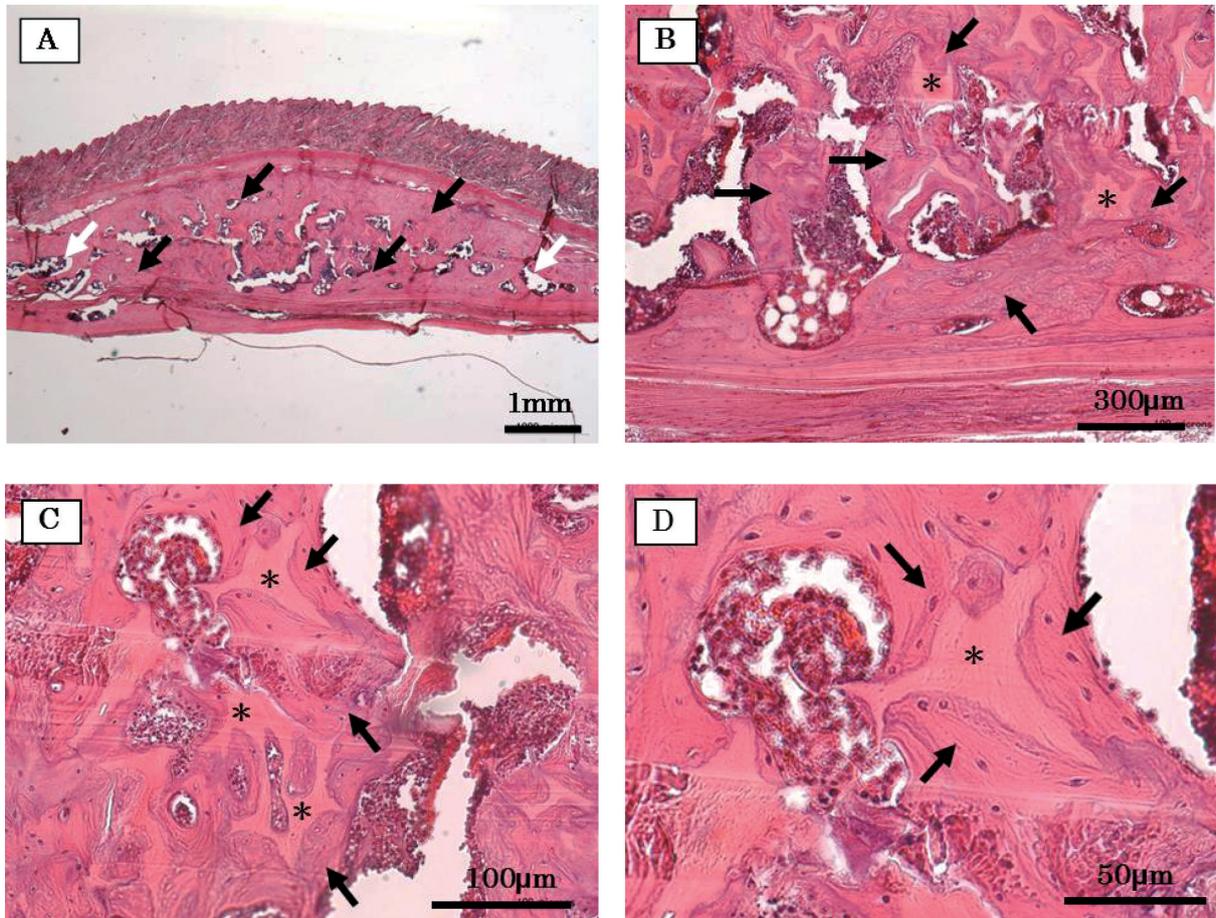


図6 rhBMP-2添加多孔性キトサン/HAp複合体群 8週後

- A: 全体像 (H-E染色, ×20). 複合体は新生骨 (黒矢印) に取り囲まれており, そのほとんどが吸収されている. 骨髄 (白矢印) の形成もみられる.
- B: 頭頂骨側拡大像 (H-E染色, ×100). 複合体 (*) は新生骨に取り囲まれている.
- C: 中央部拡大像 (H-E染色, ×200). 複合体周囲に新生骨が形成され, 複合体は新生骨に取り込まれている.
- D: 中央部拡大像 (H-E染色, ×400). 複合体は新生骨に取り囲まれ, 同化している.

れており (図7-A), 複合体の連続性も残っていた (図7-B). 8週後では4週後と比べ複合体の量は減少していた (図7-C). 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 (図7-D).

3. 埋入物の高さ

1) rhBMP-2添加多孔性キトサン/HAp複合体群

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 (表2).

2) 対照群 (多孔性キトサン/HAp複合体単独群)

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 (表2). 図8に示すように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 ($p < 0.05$).

4. 形態計測

全組織面積に占める骨, 骨髄, 線維性結合組織, 複合体の割合を表3に示す. 骨および骨髄は複合体単独群では認められず, rhBMP-2添加群のみに観察された. 図9に示すように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

現在, 骨再生材料としてHApについては数多くの基礎研究^{18, 19)}ならびに臨床応用^{20, 21)}が報告されているが, その硬さと脆性のため, 望むような形状やサイズに成形加工することが困難であった. 今回, 吸収性高分子であるキトサンに注目し, スポンジ様の柔軟性を持ち, 歯科用メス等で成形可能な物性を持つ多孔性キトサン/HAp複合体を

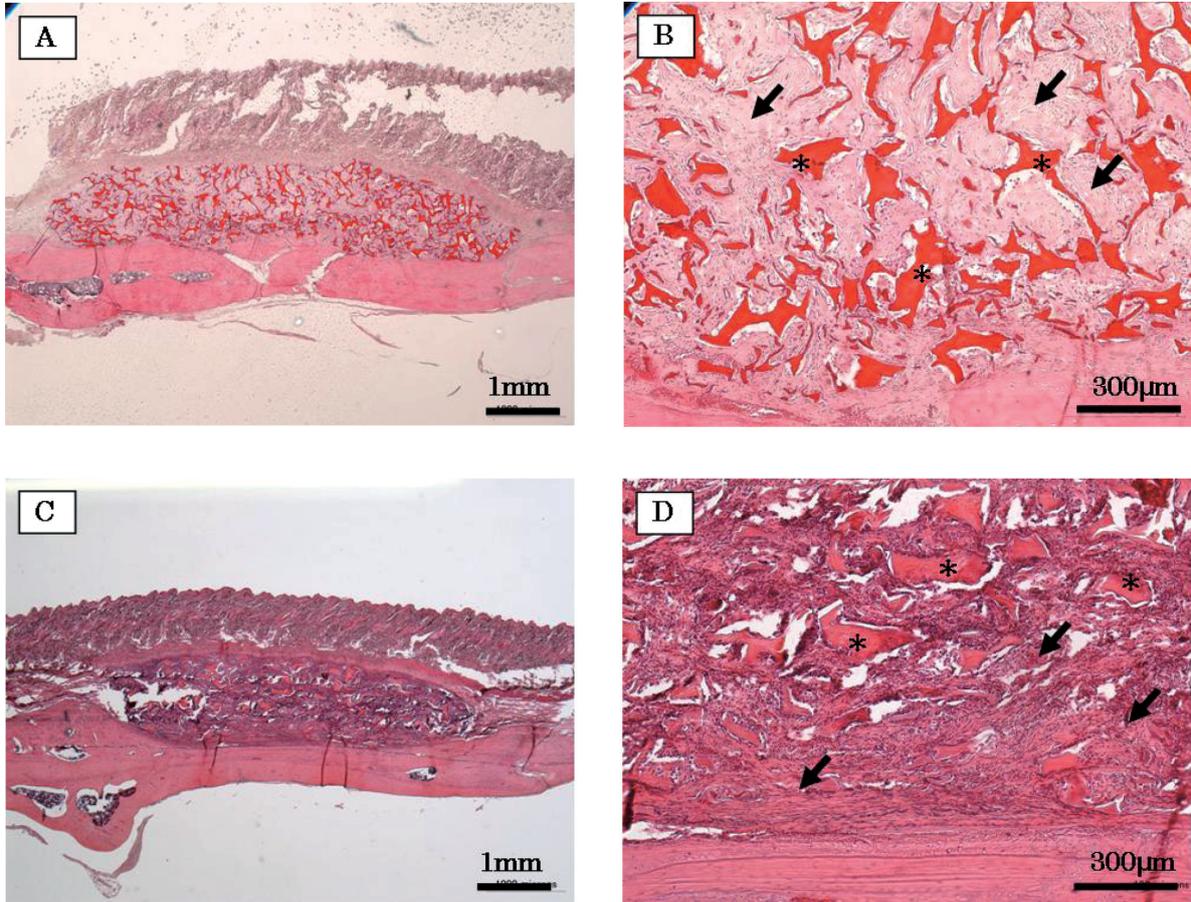


図7 対照群 (多孔性キトサン/HAp複合体単独群)

A : 4 週後全体像 (H-E染色, ×20). 複合体内部への新生骨形成は見られない.
 B : 4 週後頭頂骨側拡大像 (H-E染色, ×100). 複合体 (*) 内部は線維性結合組織 (黒矢印) で満たされている.
 C : 8 週後全体像 (H-E染色, ×20). 複合体内部への新生骨形成は見られない.
 D : 8 週後頭頂骨側拡大像 (H-E染色, ×100). 4 週後と比べ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る.

表2 埋入物の高さ (mm)

	4 週後	8 週後
rhBMP-2添加群	1.64 ± 0.08	1.65 ± 0.08
対照群	1.18 ± 0.20*	0.88 ± 0.20*

(n=3, *p<0.05, 値=平均値±標準偏差)

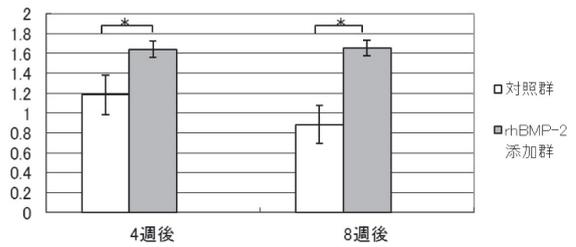


図8 埋入物の高さ

4 週後と 8 週後のいずれにおいても rhBMP-2 添加群の埋入物の高さの平均値は, 対照群に比べて有意に高かった. (n=3, *...p<0.05)

rhBMP-2担体として使用した. この複体の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体の吸収変化を組織形態学的に検討した.

表3 形態計測 (%)

	BMP-2添加多孔性キトサン/HAp複合体				多孔性キトサン/HAp複合体単独			
	骨	骨髄	結合組織	複合体	骨	骨髄	結合組織	複合体
4 週	51.3 ± 5.82*	24.39 ± 8.4*	13.72 ± 1.99*	10.59 ± 1.22*	0	0	70.07 ± 2.38	29.93 ± 2.38
8 週	57.8 ± 3.64*	22.87 ± 3.75*	9.94 ± 7.11*	9.39 ± 0.72*	0	0	77.05 ± 6.05	22.95 ± 6.05

(n=3, *p<0.05, 値=平均値±標準偏差, ALL tissue=100%)

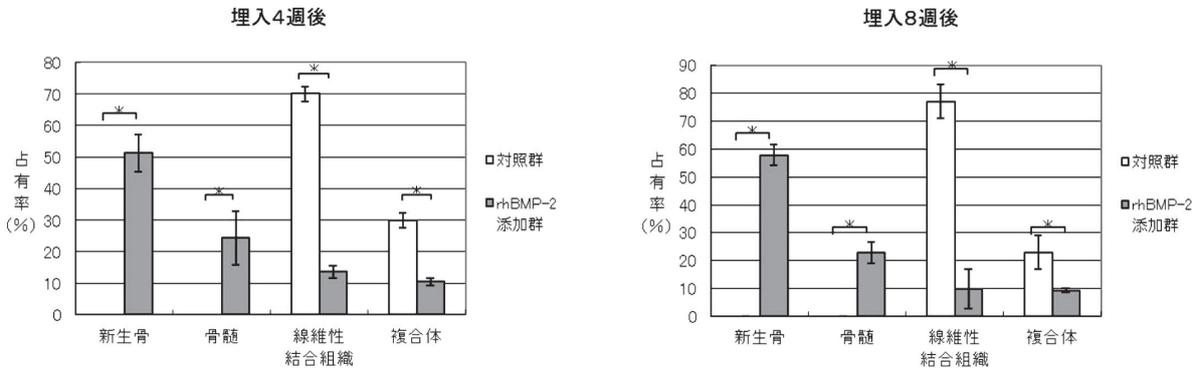


図9 形態計測

新生骨および骨髓の形成は複合体単独群では認められず、rhBMP-2添加群のみに観察された。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減少した。(n=3, *…p<0.05)

1. 多孔性キトサン/HAp複合体の微細構造について

本研究では作製した複合体の微細構造を評価するためにSEM観察、EDS、XRDを行なった。高倍率のSEM観察より、複合体表面は一様に粗造な形状を呈しており、キトサンやHAp結晶の偏在はみられなかった。2000倍率でSEM観察した複合体表面をEDSでマッピングした結果、キトサンに由来する炭素の均一な拡散像とHApに由来するカルシウムの均一な拡散像が認められ、その両元素の拡散の状態は類似していた。これは、キトサンとHApが分子レベルで均質に複合化されていることを示しており、Yamaguchiらの解析と一致している¹⁵⁾。キトサン単体と複合体のXRDを行なった結果、キトサン単体のXRDパターンでは、 $2\theta = 20^\circ$ 付近にキトサンのピークがみられたが、複合体のXRDパターンでは、キトサンのピークが消失し、HApの特徴を示す $2\theta = 32^\circ$ 付近に弱いピークがみられた。このことから複合体はHAp単体、キトサン単体と比べて結晶化度が低く、アモルファスな状態であると考えられ、結晶粒界や格子欠陥のような物理的強度を弱くする構造がほとんど存在しないことが、この複合体にスポンジ様の物性を与えている1つの要因と考えられる。

2. 多孔性キトサン/HAp複合体の生体材料としての構造について

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²²⁾。また、約20~30 μm の骨芽細胞が分化・増殖しネットワークを構成するのに必要なスペースはその10倍といわれている²³⁾。藤田ら²⁴⁾は、気孔率70%、孔径20 μm のHAp単体をラット頭蓋骨骨膜下への移植にて新生骨を確認し、村田ら²⁵⁾は気孔率70%、孔径100~300 μm のHApを部分精製BMP-2の担体として用いたラット皮下にて新生骨を確認している。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。

3. 多孔性キトサン/HAp複合体の骨形成能および吸収性について

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、対照群では骨形成が認められなかった。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。これは佐々木ら²⁶⁾の報告と同様に、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

成形性に優れた有機無機複合体である多孔性キトサン/HAp複合体をrhBMP-2の担体に用いて、ラット頭頂骨骨膜下における骨形成過程と複合体の吸収変化を組織形態学的に検討し、以下の結論を得た。

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。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究にご協力、ご援助を賜りました北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室諸先生方、北海道大学大学院歯学研究科学術支援部 本間義幸先生、滝田裕子先生、ならびに東京工業大学大学院理工学研究科/材料工学専攻諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 山崎安晴：人工骨としての多孔質アパタイト 顎骨補填実験。口病誌 51：372-406, 1984.
- 2) 梅田正博：ハイドロキシアパタイトセラミックスの骨伝導能に関する組織学的・生化学的研究。神大医紀 48：45-62, 1987.
- 3) Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, and Ono K：The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. J Bone Joint Surg Br 72：298-302, 1990.
- 4) Cooke FW：Ceramics in orthopedic surgery. Clin Orthop Relat Res：135-146, 1992.
- 5) Onishi H, and Machida Y：Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. Biomaterials 20：175-182, 1999.
- 6) Lim LY, Khor E, and Ling CE：Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. J Biomed Mater Res 48：111-116, 1999.
- 7) 岸屋雄介, 柏崎晴彦, 松田篤, 山口圭輔, 飯塚正, 田中順三, 井上農夫男：歯槽骨再生材料としてのキトサン/ハイドロキシアパタイトナノ複合体の力学的および生物学的特性。北海道歯誌 28：110-119, 2007.
- 8) 山口圭輔, 柏崎晴彦, 原田尚樹, 飯塚正, 田中順三, 井上農夫男：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。北海道歯誌 29：221-230, 2008.
- 9) Langer R, and Vacanti JP：Tissue engineering. Science 260：920-926, 1993.
- 10) Urist MR：Bone：formation by autoinduction. Science 150：893-899, 1965.
- 11) Urist MR, and Strates BS：Bone morphogenetic protein. J Dent Res 50：1392-1406, 1971.
- 12) Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, and et al：Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Natl Acad Sci U S A 87：2220-2224, 1990.
- 13) 村田勝, 黄炳珍, 秦春林, 野島鉄人, 方 肇福, 野坂幸雄, 永井教之：18ヵ月齡ラット頭頂骨膜下におけるBMP/コラーゲン複合物による骨増生。日口腔インプラント誌 11：190-197, 1998.
- 14) 日野純, 村田勝, 赤澤敏之, 田崎純一, 有末眞：生体模倣傾斜機能アパタイト/rhBMP-2複合体によるラット頭頂骨膜上骨誘導。日口腔インプラント誌 21：327-337, 2008.
- 15) Yamaguchi I, Tokuchi K, Fukuzaki H, Koyama Y, Takakuda K, Monma H, and Tanaka J：Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites. J Biomed Mater Res 55：20-27, 2001.
- 16) Mikos AG, Thorsen AJ, Czerwonka LA, Bao Y, Langer R, Winslow DN, and Vacanti JP：Preparation and characterization of poly (l-lactic acid) foams. Polymer 35：1068-1077, 1994.
- 17) Weibel ER：Quantitation in morphology：possibilities and limits. Beitr Pathol 155：1-17, 1975.
- 18) Jarcho M：Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Relat Res 157：259-278, 1981.
- 19) Knaack D, Goad ME, Aiolo M, Rey C, Tofighi A, Chakravarthy P, and Lee DD：Resorbable calcium phosphate bone substitute. J Biomed Mater Res 43：399-409, 1998.
- 20) 鈴木基之, 塩野目学, 坂田純一：歯周病変による歯槽骨欠損への多孔性ハイドロキシアパタイト (IP-200)

- の臨床応用. 日歯保存誌 36: 1832-1838, 1993.
- 21) 島田勝弘, 寺延治, 花田泰宣: HAP顆粒と骨髄混合移植による骨形成について. 日口腔インプラント誌 7: 65-70, 1994.
- 22) Kikuchi M, Itoh S, Ichinose S, Shinomiya K, Tanaka J: Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. Biomaterials 22: 1705-1711, 2001.
- 23) Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y: Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. J Biochem 2: 317-324, 1997.
- 24) 藤田留美, 若狭るみ子, 横山敦郎, 小松原浩実, 武石篤典, 川崎貴生, 向後隆男: ハイドロキシアパタイトおよび β -3リン酸カルシウムブロックのonlay graftにおける骨形成ならびに材料の経時的変化. 北海道歯誌 21: 118-129, 2000.
- 25) 村田勝: 骨形成タンパク質 (BMP) による細胞分化のマトリックス依存性 多孔質ヒドロキシアパタイトにおける直接骨形成の確認. 北海道歯誌 15: 148-160, 1994.
- 26) 佐々木智也, 村田勝, 赤澤敏之, 入江一元, 有末眞: 生体模倣傾斜機能アパタイトの開発 rhBMP-2による骨誘導. 日口腔インプラント誌 18: 540-548, 2005.

ORIGINAL

Bone formation by porous chitosan /hydroxyapatite composite with rhBMP-2 on rat calvaria

Naoki Harada¹⁾, Haruhiko Kashiwazaki¹⁾, Toshiyuki Akazawa²⁾, Masaru Murata³⁾,
Tomoyasu Aizawa⁴⁾, Makoto Demura⁴⁾, Junzo Tanaka⁵⁾, Tadashi Iizuka⁶⁾ and Nobuo Inoue¹⁾

ABSTRACT : The objective of this study was to estimate bone formation and bio-absorption of porous chitosan/hydroxyapatite (HAp) composites with 5 μ g of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for use in an alveolar bone substitute. The SEM observations confirmed that composites with 75-80% porosity resulted in interconnected pores with pore diameters of 100-300 μ m. Porous chitosan /HAp composites with or without rhBMP-2 were implanted beneath the calvarial periosteum of 10-week-old SD rats to assess bone development. At 4 and 8 weeks after implantation, the composites with the rhBMP-2 displayed active bone formation, whereas the composites alone showed no bone formation. The average areas of composites with rhBMP-2 were significantly smaller than those without rhBMP-2 in the implant. These results suggest that porous chitosan/ HAp composites with rhBMP-2 is an effective absorbant compound with osteoconductivity in applications as an alveolar bone substitute.

Key Word : Chitosan, Hydroxyapatite (HAp), rhBMP-2

¹⁾Department of Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. (Chief : Prof. Nobuo Inoue) N13 W7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾Hokkaido Research Organization. N19 W11, Kita-ku, Sapporo, 060-0819, Japan

³⁾Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology, Health Sciences University of Hokkaido. (Chief : Prof. Makoto Arisue) 1757 Kanazawa, Tobetsu-cho, Ishikari-gun, Hokkaido, 061-0293, Japan

⁴⁾Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University. N10 W8, Kita-ku, Sapporo, 060-0810, Japan

⁵⁾Department of Inorganic Materials, Tokyo Institute of Technology. (Chief : Prof. Junzo Tanaka) 2-12-1, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8550, Japan

⁶⁾Support Section for Education and Research, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University. N13 W7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan