

機関番号：30110  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2009年度～2010年度  
 課題番号：21792027  
 研究課題名（和文） 吸収性HAp/BMP-2による頭部骨膜上誘導骨の下顎骨離断部への移植実験  
 研究課題名（英文） Autograft experiment of the induced bone on the periosteum by absorptive HAp/BMP-2 to mandibular resected region.  
 研究代表者  
 日野 純 (HINO JUN)  
 北海道医療大学・歯学部・助手  
 研究者番号：20508709

研究成果の概要（和文）：生体模倣傾斜機能アパタイト（fg-HAp、吸収性HAp）/BMP-2は頭皮下骨膜上で高い細胞増殖活性と優れた硬組織誘導特性を示した。さらに骨形成の進行とともに周囲組織が骨膜化していくことが示唆された。またHApに超音波部分溶解析出処理を施すと、BMP-2添加時の硬組織誘導能が向上されると示唆された。なお新生骨と頭頂骨とは骨架橋を認めないので、骨膜上の新生骨は容易に摘出して骨移植へ用いることができると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The supra-periosteal implant of the biomimetic functionally graded hydroxyapatite (fg-HAp, absorptive HAp) / BMP-2 showed high cell proliferation activity and excellent hard tissue induction. Moreover, it was suggested that the surrounding tissue become a periosteum according to the progress of the bone formation. In addition, the hydroxyapatite modified by a partial dissolution-precipitation technique using supersonic treatment might be improved the ability of hard tissue induction with BMP-2. Because a bony bridge formation between the new bone and the skull was not made, it was thought that the new bone on the periosteum could be removed easily and used for the bone graft.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：吸収性セラミックス、生体材料、骨膜上骨誘導、骨移植、移植・再生医療、超音波部分溶解析出処理

## 1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域において先天奇形や嚢胞あるいは腫瘍摘出後、また外傷などによる骨欠損が生じる場合がある。このような症例に対する骨再建方法として、今まで自家骨移植が最も多く行われてきた。しかし自家骨による移植は正常組織への手術的侵襲や感染、疼痛、神経麻痺などの合併症を引き起こす可能性があり、採取する骨量や形態に制限があるため、その代替方法としてバイオマテリアルを用いた骨再生療法が行われている。

バイオマテリアルとしてはハイドロキシアパタイト (HAp) などが応用されてきているが、非吸収性であることから生体のリモデリングシステムに組み込まれることはなく、生涯異物として生体内に残存することが指摘されている。そこで天然の海綿骨構造を保持しながら、表面積を増大させるとともに吸収性を付与するために硝酸エッチングによりマイクロオーダーの人工気孔を形成し、溶解析出条件の選定により材料表面にナノオーダーの針状結晶とマイクロオーダーの球状結晶を有するアパタイトが考案され、表面から深部に向けて結晶性と化学組成が連続的に変化するため、生体模倣傾斜機能アパタイト (functionally graded HAp : fg-HAp) と命名された (特許番号第3718723号, J. Biomed. Mater. Res., 76: 44-51, 2005.)。

これまでの人工骨移植実験では、移植部の骨を削除し骨空洞を形成して人工骨を移植する方法が多数なされ、既存骨を削除することなく骨膜下へ埋入する方法も行われているが、骨膜上での骨誘導実験はコラーゲンの埋入 (日歯周誌, 34: 125-132, 1992.), Octacalcium Phosphateの埋入 (Anat. Rec., 256: 1-6,

1999.), 線状切開骨膜上へのコラーゲンの埋入 (J. Hard Tissue Biology, 10: 143-147, 2000.) の他、HApの骨膜上への埋入実験は我々が報告したのみ (日口腔インプラント誌, 21: 327-337, 2008.) であった。骨膜上に形成された新生骨は既存骨との間に骨膜を含む軟組織を介在するため、既存骨に埋め込まれた骨を切断して摘出するよりも容易に摘出することができると考えられ、骨造成の必要な場が骨髓細胞や小血管が豊富など骨形成条件の良い環境であれば問題ないが、悪性腫瘍の摘出後など直接の骨造成が難しい場への骨移植を想定して、その際に既存骨と連続していない

“bone reserver” として他部位の骨膜上に誘導した新生骨を摘出し、目的の場所へ自家移植できる治療技術として将来的に応用できる可能性があると考え、骨膜上への埋入に着目して研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究はラット頭部骨膜上へfg-HAp/BMP-2複合物を埋入して、硬組織形成能・fg-HApの吸収性の組織学的評価および骨膜の組織学的・免疫組織化学的観察を行うとともに、非吸収性HAp/BMP-2複合物を同様に埋入して硬組織形成能について比較を行うこと。さらに、fg-HAp/BMP-2複合物をラット頭部骨膜上に埋入して誘導した新生骨を同一のラットへ移植する実験により、“bone reserver” としての可能性を明らかにしていくことを当初の目的とした。

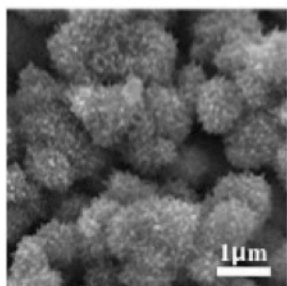
しかしfg-HApよりも将来的に早期に臨床応用できると考えられる、既存の市販されている合成HApに吸収性を付与し、より優れた材料へと加工するという方向性に着目して次年度

は研究を行い、市販HApをfg-HApの作製過程を参考にして、超音波部分溶解析出処理

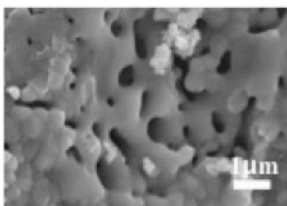
(Supersonic and Partial Dissolution - Precipitation) を施したSPDP-HApを作製した。そしてfg-HApの場合と同様にBMP-2複合物をラット頭部骨膜上へと埋入し、硬組織形成能およびHApの吸収性、また骨膜について組織学的に観察して未処理HAp/BMP-2群と比較することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) fg-HAp (3×3×3mm) /rhBMP-2 (5 $\mu$ g) または非吸収性 HAp (ボーンセラム<sup>®</sup>P、オリンパステルモバイオマテリアル) (3×3×3mm) /rhBMP-2 (5 $\mu$ g) を Wistar 系ラット (雄性、4 週齢) の頭部骨膜上に埋入した。1、2、4、8 週後に屠殺・摘出して組織学的観察とともに、抗増殖細胞核抗原抗体による免疫組織化学的観察を行って陽性細胞率を算定し細胞増殖活性を比較した。



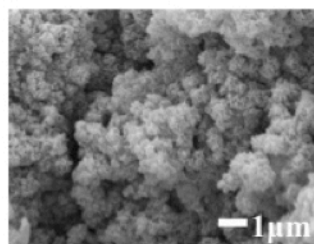
<Fig.1 fg-HAp SEM 像>



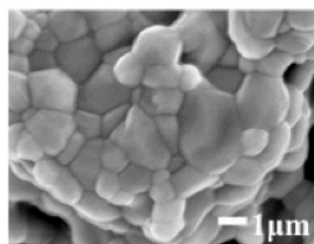
<Fig.2 非吸収性 HAp(ボーンセラム<sup>®</sup>) SEM 像>

(2) 市販 HAp (アパセラム-AX<sup>®</sup>、HOYA) 細粒を硝酸水溶液中で完全溶解し、その中に HAp ブロックを含浸しエッチングおよび超音波処理を行って部分溶解を施した。その溶液中へアンモニア水を滴下し熟成して表面に針状

微細結晶を析出させ、洗浄・乾燥し SPDP-HAp の完成とした。3×3×3mm に加工したブロックに骨芽細胞増殖因子である rhBMP-2 (5 $\mu$ g) を複合化したものを Wistar 系ラット (雄性、4 週齢) の頭部骨膜上へ埋入し、硬組織誘導能と HAp の吸収性について組織学的な評価と骨膜の観察を行い、処理を施さない HAp での同様の実験と比較した。



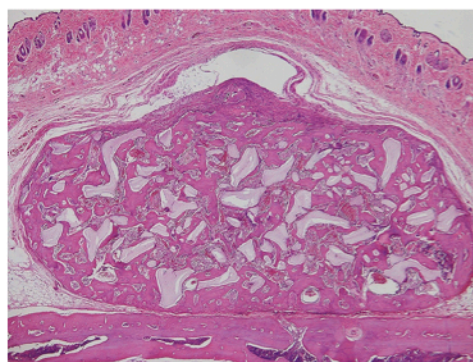
<Fig.3 SPDP-HAp SEM 像>



<Fig.4 未処理 HAp(アパセラム-AX<sup>®</sup>) SEM 像>

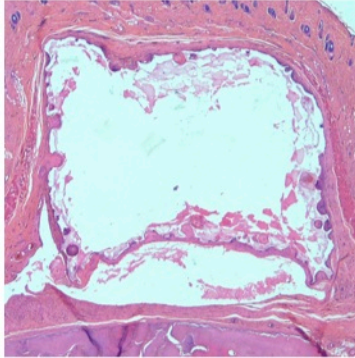
### 4. 研究成果

(1) fg-HAp/BMP-2 群では骨形成は1週後骨膜側に生じ、2週後梁状となり、4、8週後は埋入物の中心部まで認めた。いずれも新生骨と既存骨間は骨架橋を認めなかった。fg-HAp は骨格内部へ体液が浸透、崩壊・吸収により断片化して8週後まで吸収は続いたが部分的に残存した。



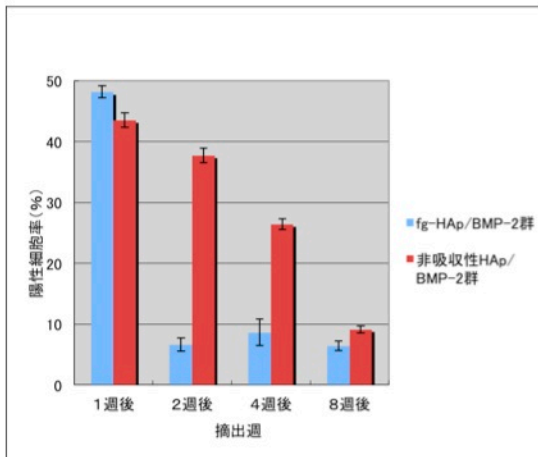
<Fig.5 fg-HAp/BMP-2 群 4 週後>

非吸収性 HAp (ボーンセラム®P) /BMP-2 群では HAp は崩壊・吸収せず埋入時の形状を保ち、内部の気孔への間葉系細胞侵入がみられず、骨形成は極めてわずかであった。



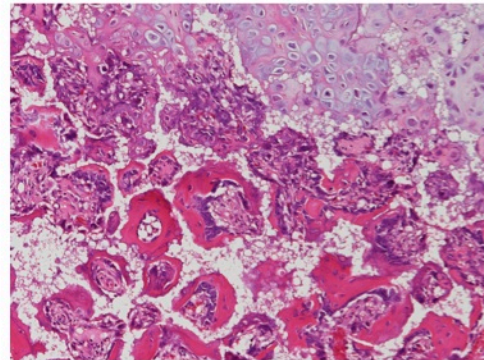
〈Fig. 6 非吸収性 HAp/BMP-2 群 4 週後〉

骨膜組織の細胞増殖活性は、fg-HAp/BMP-2 群は 1 週後最大となり、2 週後急激に低下して 8 週後まで同程度であった。非吸収性 HAp/BMP-2 群は 1 週後最大となり、2、4 週後と徐々に低下して 8 週後に fg-HAp/BMP-2 群と同程度になった。

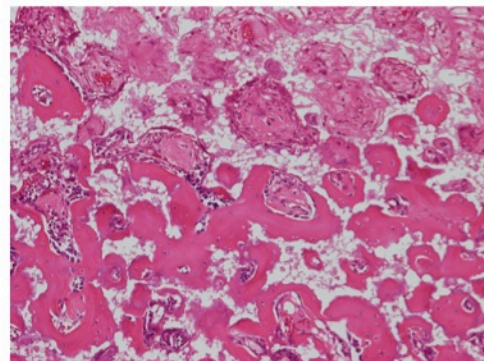


以上より fg-HAp は骨膜上への埋入において BMP-2 添加により優れた骨誘導特性を示す吸収性セラミックスであり、骨形成が進むと周囲組織の細胞増殖活性が低下していくことから、埋入物周囲組織が骨膜化することが示唆された。また既存骨と新生骨の連続性を認めなかったことから、骨膜の硬組織形成における境界膜組織としての恒常性維持機構の関与が考えられた。

(2) 1 週後は、それぞれ埋入物周囲の結合組織内に幼若な新生軟骨あるいは新生骨の形成が認められ、中心部においてはどちらも骨形成を認めなかった。2 週後ではさらに硬組織形成が進み、埋入物の中心部から辺縁部にかけて気孔内に部分的に新生骨がみられた。4 週後になると、辺縁部ではどちらも同程度の骨形成を認めたが、中心部では SPDP-HAp/BMP-2 群ではほぼ全ての気孔内に硬組織形成を認めたのに対し、未処理 HAp/BMP-2 群では一部の気孔内に硬組織形成がみられなかった。これは表面積が増加したことで、BMP-2 の吸着徐放性が向上して、硬組織形成が迅速に進行したものと思われた。



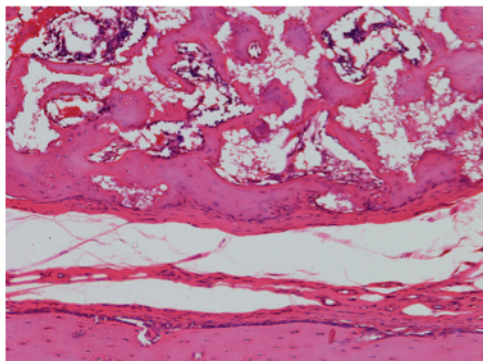
〈Fig. 7 SPDP-HAp/BMP-2 群 4 週後中心部〉



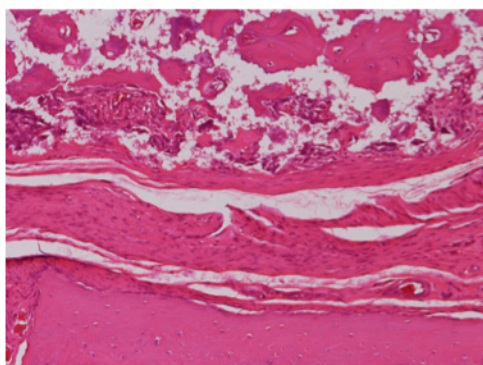
〈Fig. 8 未処理 HAp/BMP-2 群 4 週後中心部〉

8 週後になると、中心部ではどちらもほぼ全ての気孔内に新生骨を認めたが、辺縁部では SPDP-HAp/BMP-2 群では梁状の新生骨がみられたのに対し、未処理 HAp/BMP-2 群では気孔内でのみ新生骨を認めた。これは HAp の表面近傍部に崩壊吸収性が付与されたことで、

各気孔内で形成された新生骨同士が結合して、辺縁部に梁状骨を形成したと考えられた。なお全ての標本において新生骨と既存骨間は骨架橋を認めなかった。



<Fig. 9 SPDP-HAp/BMP-2 群 8 週後辺縁部>



<Fig. 10 未処理 HAp/BMP-2 群 8 週後辺縁部>

以上より、HAp に超音波部分溶解析出処理を施すことで、BMP-2 添加時の硬組織誘導能を向上させることが示唆された。

但し、fg-HAp での実験と比較すると骨形成量は少なく、HAp 吸収量も微量であり、骨膜上への埋入においてはさらなる処理方法の改良が必要と思われた。またこの研究においても新生骨と頭頂骨との骨架橋を認めなかったため、骨膜上で作られた新生骨は容易に剥離・摘出でき、骨移植へ用いることができると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Akazawa T, Murata M, Takahata M, Xianjun D, Abe Y, Nakamura K, Hino J, et al.: Characterization of microstructure and bio-absorption of the hydroxyapatite ceramics modified by a partial dissolution-precipitation technique using supersonic treatment. J. Ceram. Soc. Japan 118(6): 535-540, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

① 日野 純、他

ラット頭部骨膜上での傾斜機能HAp/BMP-2の硬組織誘導と細胞増殖活性

第54回日本口腔外科学会総会・学術大会  
2009年10月10日、札幌コンベンションセンター(北海道)(ゴールドリボン賞受賞)

② 日野 純、他

超音波部分溶解析出処理を行ったHApとBMP-2複合物の頭部骨膜上での硬組織誘導  
第55回日本口腔外科学会総会・学術大会  
2010年10月17日、幕張メッセ(千葉県)

③ 日野 純、他

超音波部分溶解析出処理を施したHApとBMP-2複合物の頭部皮下での硬組織誘導  
第14回生体関連セラミックス討論会  
2010年12月3日、京都テルサ(京都府)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

日野 純 (HINO JUN)

北海道医療大学・歯学部・助手

研究者番号: 20508709

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者