

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：30110  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792378  
 研究課題名（和文） 超音波部分溶解析出 HAp/BMP-2 複合物による骨膜上誘導骨の移植実験  
 研究課題名（英文） Autograft experiment of the induced bone on the periosteum  
 by the supersonic and partial dissolution - precipitation HAp/BMP-2  
 研究代表者  
 日野 純 (HINO JUN)  
 北海道医療大学・歯学部・助教  
 研究者番号：20508709

研究成果の概要（和文）：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。但し、今回の処理条件では、骨形成の進行に時間がかかり、HAp は 9 か月後も全て吸収されずに残存した。また、HAp 単独でもラットのような小動物の頭部骨膜上へ埋入しても、骨誘導を生じる事が示唆された。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 hydroxyapatite modified by a partial dissolution-precipitation technique using supersonic treatment might be improved the ability of hard tissue induction with BMP-2. But, on this processing condition, bone formation takes time and the hydroxyapatite was not absorbed all even after nine month. In addition, it was suggested to insert the hydroxyapatite alone induced a new bone on the periosteum of the small animal such as the rat. 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
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：生体材料、材料加工・処理、セラミックス、移植・再生医療、骨膜上骨誘導

## 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や、採取する骨量や形態に制限があり、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、HAp は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。そこで研究代表者らのグループは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高め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、生体模倣傾斜機能アパタイト (functionally graded HAp : fg-HAp) を考案した (特許番号 第 3718723 号, J. Biomed. Mater. Res., 76 : 44-51, 2005.)。しかしウシの大腿骨を用いた新規材料であるため、実用化に至っていない現在では簡便に用いる事のできる材料とはなり得ない。そこで、臨床医が各々の医療機関においてその場により優れた担体へと改良を行える方法として、HAp の超音波部分脱灰溶解析出処理を考案した (Journal of the Ceramic Society of Japan 118 : 535-540, 2010.)。

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研究代表者らが報告したのみ (日口腔インプラント誌, 21 : 327-337, 2008.) である。これらの報告では骨膜上に誘導された新生骨と既存骨との骨架橋を生じず、骨膜を介するという結果が示されている。そこで、骨膜上への埋入が、将来的には“bone reserver”として誘導した新生骨を摘出し、目的の場所へと自家移植できる治療技術に応用できる可能性があると考え、研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

ラット頭部骨膜上へ様々な条件で調製した超音波部分溶解析出 HAp/BMP-2 複合物および未処理 HAp/BMP-2 複合物を埋入して、硬組織形成能・HAp の吸収性の組織学的評価および比較を行い、骨膜上埋入における最適な条件を明らかにすることと、最適な条件で調製した超音波部分溶解析出 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。

## 3. 研究の方法

### (1) HAp への超音波溶解析出処理条件の検索

HApブロック (アパセラム-AX、HOYA、東京) を同HAp細粒が完全溶解している硝酸水溶液中に含浸し超音波で部分溶解を行った。アンモニア水を滴下し熟成して析出処理を行い、濾過、蒸留水で洗浄後、乾燥し超音波部分溶解・析出処理を施したHAp(PDP-HAp)の完成とした。この超音波処理時間を様々に設定し、最適な条件の検索を行った。

### (2) PDP-HAp/BMP-2による頭部骨膜上での骨誘導実験

実験群:PDP-HAp、対照群:未処理HApのそれぞれ4×4×4mmブロックにrhBMP-2(1μg)を添加したものを、Wistar系ラット(雄性、4週齢)の頭部骨膜上へ埋入し、1、2、4、8週後に安楽死させ摘出し組織学的観察を行った。

### (3) PDP-HAp/BMP-2による頭部骨膜上での長期的な骨誘導実験

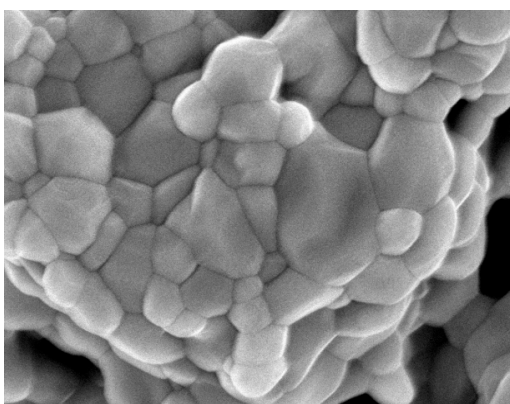
PDP-HAp(3×3×3mm)にrhBMP-2(1μg)を添加したBMP-2添加群と、PDP-HAp(3×3×3mm)単独群とを、それぞれWistar系ラット(雄性、4週齢)の頭部骨膜上へ埋入し、3、6、9か月後に安楽死させ摘出し組織学的観察を行った。



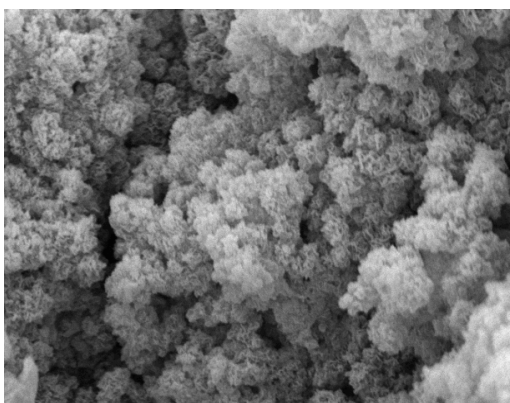
#### 4. 研究成果

##### (1) HAp への超音波溶解析出処理条件の検索

SEM像では未処理HApが比較的平らな表面構造であるのに対し、PDP-HApはマイクロ気孔やマイクロクラックを生じ、表面に針状微細結晶が多数析出していた。超音波処理時間を25分、30分、35分と変更したところ、35分処理では原型をととどめないまでに細分化され、25分処理と30分処理との比較では、SEM像で30分処理の方がより広範囲にマイクロクラックを生じており、30分を処理時間として設定した。



<未処理 HAp の SEM 像>

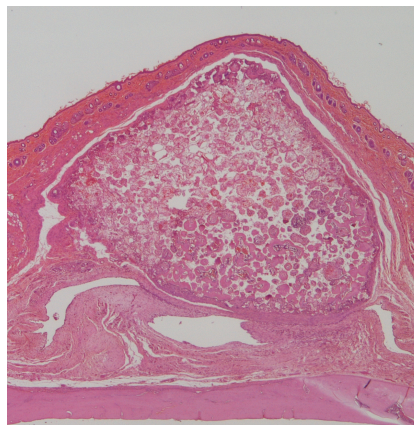


<PDP-HAp の SEM 像>

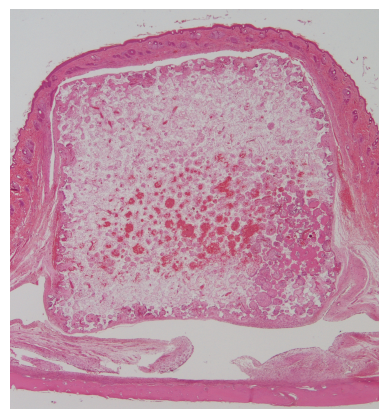
##### (2) PDP-HAp/BMP-2 による頭部骨膜上での骨誘導実験

実験群および対照群のどちらも1週後は骨形成を認めず、2週後は一部の辺縁部気孔内に骨形成を認めた。4、8週後は実験群では新生骨

の形成範囲が徐々に増大し、中心部にかけても一部の気孔内に骨形成を認め、形態計測で4、8週後において有意に骨形成範囲が広範囲におよぶことが確認された。



<PDP-HAp/BMP-2群 4週後>



<未処理 HAp/ BMP-2 群 4 週後>

	1 週 後	2 週後	4 週後	8 週後
PDP-HAp/ BMP-2 群	0	5.3 ± 3.0	26.8 ± 6.3 <sup>※1</sup>	27.6 ± 5.0 <sup>※2</sup>
未処理HAp/ BMP-2 群	0	5.5 ± 4.9	9.3 ± 4.1 <sup>※1</sup>	14.0 ± 3.7 <sup>※2</sup>

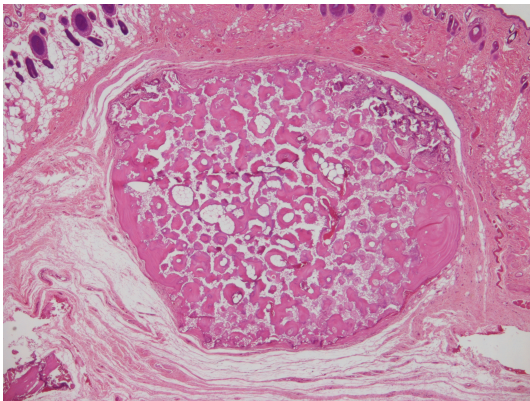
<新生骨の形成範囲>

値 (%) = 平均値 ± 標準偏差値

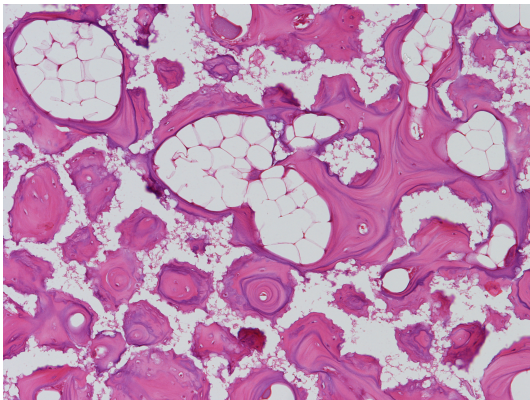
※1, 2 : p < 0.05 student's t 検定

(3)PDP-HAp/BMP-2 による頭部骨膜上での長期的な骨誘導実験

BMP-2添加群の3か月後の骨形成範囲は埋入物中の約55%であった。その後、徐々に骨形成範囲は拡大し9か月後で約91%となった。しかしHApは全て吸収されずに残存した。これは、これまでの処理条件では深部まで構造の変化が生じていないためであると考えられ、より深部まで構造が変化し少量の細胞増殖因子の添加で早期に骨形成が生じ、HApが速やかに吸収・置換されるように処理方法をさらに改良する必要があると思われた。



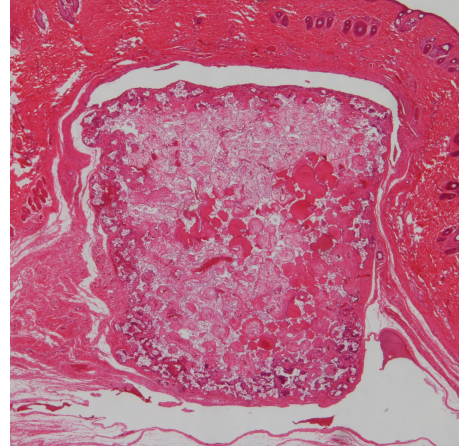
<PDP-HAp/BMP-2群 9か月後 全体像>



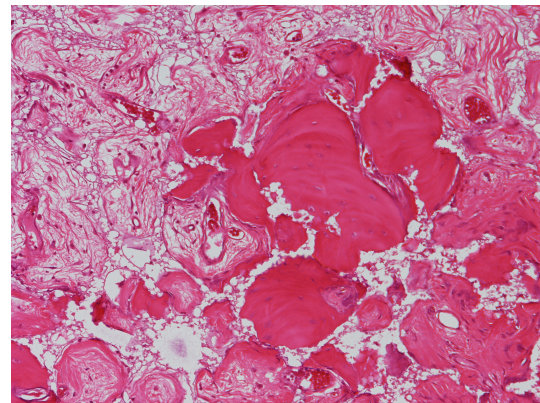
<PDP-HAp/BMP-2群 9か月後 中心部拡大像>

また、単独群では3,6か月後では骨形成を認めなかったが、9か月後に一部に新生骨を認め、HApを単独で犬やヒヒなどの大型動物の筋肉

内に埋入した際に骨誘導を生じた報告はあるものの、小動物での報告はなく、ラットのような小動物の頭部骨膜上という異所性の実験環境でも骨誘導を生じることが示唆された。



<PDP-HAp単独群 9か月後 全体像>



<PDP-HAp単独群 9か月後 中心部拡大像>

	3か月後	6か月後	9か月後
PDP-HAp/ BMP-2群	54.7± 3.5	61.1± 4.7	91.3± 3.6
PDP-HAp 単独群	0	0	6.3± 5.5

<新生骨の形成範囲>

値(%)=平均値±標準偏差値

またこの研究においても全ての実験の標本について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た。

## 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)

[学会発表] (計2件)

### ① 日野 純、他

超音波部分溶解・析出処理を施した HAp のラット頭部骨膜上での骨誘導-長期的観察-  
第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
2012 年 10 月 19 日

パシフィコ横浜会議センター (神奈川県)

### ② 日野 純、他

超音波部分溶解・析出処理を施した HAp/BMP-2 による頭部骨膜上での骨誘導  
第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
2011 年 10 月 21 日

大阪国際会議場(大阪府)

## 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・助教

研究者番号：20508709