

研 究

bFGF 含有酸性ゼラチンを用いた 骨再生モデルに対する X 線学的検討

澤田 剛光

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任：杉山 芳樹 教授)

(受付：2006年12月11日)

(受理：2006年12月25日)

Abstract : The objective of this study was to establish an X-ray radiographic evaluation method of regenerated bone by comparison of X-ray photograph, bone mineral content, and bone morphometry by microfocus X-ray CT in a bone regeneration model using an acidic gelatin disc (AGD) containing a sustained release basic fibroblast growth factor (bFGF) system.

A defect 6 mm in diameter was made in the cranium of 36 Wistar rats aged 16 weeks (6 animals per group). bFGF (1.0 and 10.0 μ g) and physiological saline (control) were added to AGD with a water content of $81.8 \pm 0.2\%$, and the discs were implanted in the bone defects. The animals were sacrificed after 4 and 8 weeks, and evaluated.

Regenerated bone was evaluated by X-ray photodensitometry using an aluminum step wedge and imaging plate (IP) and based on the CT concentration (pixel concentration) and volume on microfocus X-ray CT.

Photodensitometry showed that bFGF promoted bone regeneration with time in a concentration-dependent manner. Microfocus X-ray CT also detected similar changes in the pixel concentration in the regenerated region and the regenerated bone volume, clarifying that bFGF promoted bone regeneration. The relative aluminum concentration measured by photodensitometry and the pixel concentration measured by microfocus X-ray CT were correlated. It was revealed that microfocus X-ray CT can non-invasively evaluate regenerated bone, and is capable of quantitative and 3-dimensional analyses. These findings suggested that microfocus X-ray CT is useful for the assessment of regenerated bone in the clinical application of regenerative medical methods.

Key words : microfocus X-ray CT, basic fibroblast growth factor, acidic gelatindisc, regeneration bone.

X-ray study of bone regeneration model using basic FGF-incorporated acidity gelatin

Takemitsu SAWADA

Second Department of oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

緒 言

口腔外科領域では、歯槽骨整形術やインプラント治療時のサイナスリフト、唇顎口蓋裂患者の顎裂部二次的骨移植などの顎骨小骨欠損の治療に対して、再生医学的なアプローチが求められている。骨欠損に対する組織再生は、組織空隙を埋める足場材料、骨や血管の早期再生を促す成長因子、そして間葉系幹細胞などの自己細胞の三要素が必要とされている^{1, 2)}。欠損した骨が少量の場合、骨膜や周囲の骨から細胞成分の供給が期待できるが、顎骨区域切除術や半側切除術後のような顎骨の大きな欠損の骨再生にはこの三要素が必要と思われる。

この三要素のうち、足場材料としてゼラチンや PLLA など^{3, 4)}の適用が研究されている。そのなかで酸性ゼラチンは、生体吸収性で偽害作用が少なく、骨形成促進因子を長期的に徐放させることで骨の再生を十分に促すことができると考えられている^{1, 2)}。また、効率よく骨欠損部を再生する生理活性物質には、近年、BMPs (骨形成蛋白)^{5, 6)}、TGF β -1 (β 型トランスフォーミング増殖因子)⁷⁾、bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子)⁸⁾ などが骨誘導あるいは骨形成促進因子として注目されている。なかでも bFGF は、血管新生を誘導⁹⁾するとともに、骨形成過程において未分化間葉系細胞の増殖¹⁰⁾を促進し、骨形成量を増やすことが実験的に確かめられ、その臨床応用が期待されている。

一方、現状では実際の臨床応用に際しての有効な骨再生における評価法は未だ確立されていない。骨再生の基礎的研究では、従来から X 線写真、骨塩量などで評価が行われてきた。しかしこれらの評価法の問題点として、実験動物を屠殺して対象となる部位を摘出し、軟組織の除去をしなければならないことがあげられる。またこの際に、再生された骨の微細構造の損傷を防ぐために細心の注意が必要である。さらに骨塩量は、形成された骨のミネラル量を測定しており、再生された骨量の評価はできない。そこで移植材料と骨再生評価について、非侵襲的に

硬組織を検索することが可能であり、また、再生された骨を体積や密度の計測、三次元的評価が可能であるマイクロフォーカス X 線 CT¹¹⁾ に着目した。

本研究では、ラットの頭蓋骨欠損に対して酸性ゼラチンを用いた bFGF 徐放システム¹²⁾による骨再生モデルを作製し、再生した骨組織を単純 X 線写真、骨塩量測定、マイクロフォーカス X 線 CT により比較検討することで、有効な再生骨の評価方法の確立を目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

16週齢 (平均体重380g) の Wistar 系ラットの雄 6 匹を 1 群として、計36匹用いた。動物は購入後、岩手医科大学動物センター (室温21±1℃、湿度55±5%) にて1週間予備飼育して、全身状態に異常のないことを確認した。実験期間中、水と固形飼料 (オリエンタル酵母工業社) は自由に摂取させ飼育した。

2. 足場材料

本研究の足場材料として、酸性ゼラチン (等電点4.9, 重量平均分子量99,000, 新田ゼラチン社) を用いた。この酸性ゼラチンは、牛骨より抽出したものである。

1) 酸性ゼラチンディスクの作製

Tabata ら⁷⁾の方法に従って酸性ゼラチンディスクを作製した。すなわち、10wt%濃度の酸性ゼラチン水溶液を作製し、37℃, 48時間の条件で適時攪拌した。この水溶液に0.25%グルタルアルデヒドを加え、数回攪拌後50×50mmの正方形のプラスチック容器に厚さ2mmとなるように流し込み、4℃, 24時間の条件で酸性ゼラチンを化学架橋した。未反応のグルタルアルデヒドを不活性化させるために、100mM グリシン水溶液で37℃, 45分間浸漬することで洗浄を行った。グリシン水溶液洗浄を3回行った後、蒸留水で30分間、2回同様に洗浄して、直径6mmの円盤状に打ち抜いて成形した。これを-35℃で12時間凍結後、凍結乾燥を行った。その後、4℃で12時間真空吸引して乾燥したのち、

エチレンオキサイドガス (EOG) 滅菌を行い、十分時間をかけガス抜きを行って酸性ゼラチンディスク (Acidity gelatin disc, 以下 AGD と略す) を作製した。

2) 含水量の測定

AGD の吸水量は、グルタルアルデヒドによる架橋度によってコントロールが可能とされている⁷⁾。そこで作製した AGD の架橋度を知らるために、Tabata ら⁷⁾の方法に従って含水量を測定した。はじめに乾燥重量を測定した後、37℃で24時間、蒸留水中に AGD を浸漬した。その後、蒸留水を吸収させた AGD の重量を測定して、浸漬前後の重量の比から含水率 (含水重量 / (AGD 重量 + 含水重量) × 100) を求めた。含水率は AGD を 3 枚測定して平均値で表した。

3. 骨形成促進因子

bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子, FGF-2) としてフィブラスト® (科研製薬社) を使用した。bFGF は数社から供給されているが、本研究の成果が臨床に可及的早期に応用できるように、実際に臨床に使用されているフィブラスト®を選択した。

1) bFGF 含有 AGD の調製 (Fig. 1)

bFGF の骨形成量は、動物種にもよるが 1 ng から 100 µg 以上と広範囲に及んでいる¹³⁻¹⁵⁾。しかし、未だ骨形成至適量は明確ではない。臨床で使用するフィブラスト®の bFGF 濃度は通常 0.1 µg/µl である。bFGF の作用は濃度依存性であり、副作用の発現頻度を低くするために、本研究では 10 倍量 (1.0 µg/µl) を最大含有濃度とした¹⁶⁾。一方、本研究で使用する AGD 1 枚あたりの含水量は、後述の通り 21.7 ± 4.4 µg であった。このことから確実に一定量の含水を確保するために、含水量は 10 µl/枚とした。以上のことから、AGD 1 枚あたりの bFGF の最大含有量を 10.0 µg/枚 (10.0 µg 含有群) とし、比較対照のために通常濃度の 1.0 µg/枚 (1.0 µg 含有群) のものを作製した。また bFGF は、埋入 24 時間前に含浸させ、対照群としては生理食塩水 10.0 µl/枚 (対照群) を含浸させた。

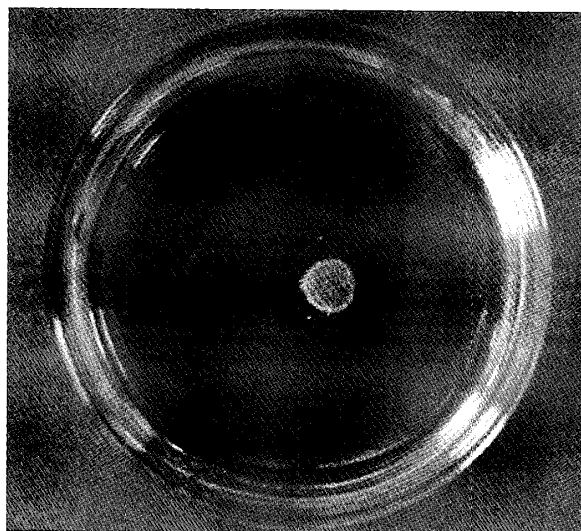


Fig. 1. A sample of acidity gelatin discs (AGD)
The discs contained saline or bFGF.

4. bFGF 含有 AGD の埋入および試料採取 (Fig. 2)

ラットへの bFGF 含有 AGD の埋入は以下の手順で行った。

- ① ペントバルビタール酸ナトリウム (ネンブタール®) 30mg/kg の腹腔内投与およびエーテル吸入麻酔を併用した全身麻酔を行った。
- ② 頭頂骨の切開予想範囲より十分広い範囲に除毛を行った後、頭頂部に 1/100,000 エピネフリン含有 1% リドカイン溶液 (キシロカイン®) 約 0.5ml にて浸潤麻酔を行った。
- ③ No.15 メスにて頭頂部皮膚に骨膜下に及ぶ約 15mm の横切開を加え、骨膜剥離子にて皮膚・骨膜弁を形成し、頭頂骨を露出した (Fig. 2 A)。
- ④ 手術用拡大鏡下にて歯科用エンジンにインプラントバー (ボートレフィン 6.0®, デンテック社) を装着して、生理食塩水注水下で硬膜を傷つけないように注意しながら頭頂骨に直径 6.0mm の円形状骨欠損を作製した (Fig. 2 B)。
- ⑤ 作製した骨欠損部に、生理食塩水および調製した bFGF 1.0 µg, 10.0 µg を含浸させた AGD を埋入した。埋入した AGD は骨欠損部に隙間なく適合した (Fig. 2 C)。
- ⑥ AGD が骨膜で完全に被覆されるように、皮膚および骨膜を復位し、4-0 の吸収性縫合糸にて骨膜および皮膚を層ごとに縫合した。

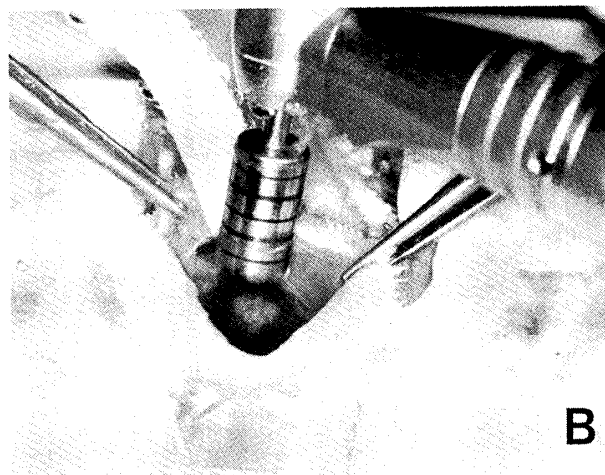
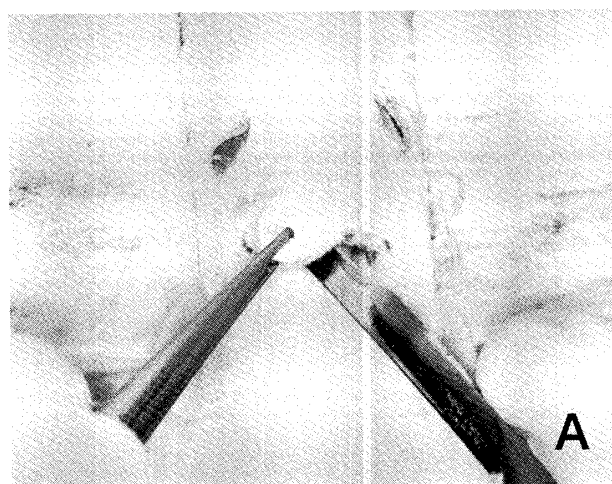


Fig. 2. Experiment procedure

A : Incision of the parietal skin of a rat

B : Perforation of the cranium : Making a bone defect of 6 mm in diameter with an implant bar

C : Implantation of the AGD with saline or bFGF

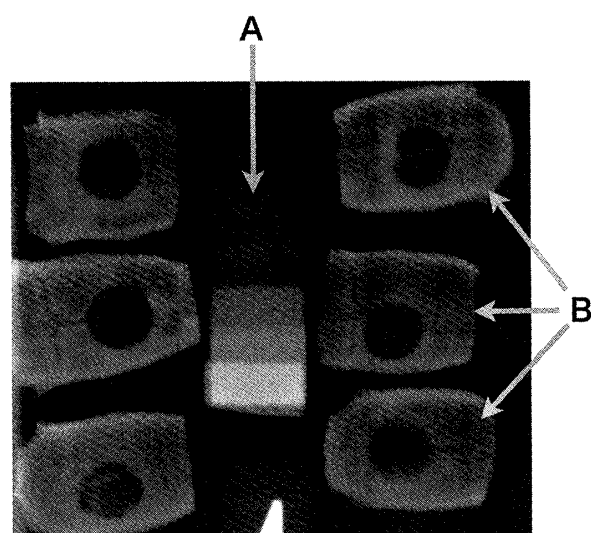


Fig. 3. Bone mineral content by photodensitometry method

A : The aluminum foils on the X-ray film as a reference

B : Samples of experimental cranium with bone defects

実験に使用したラットは、埋入後4週、8週で炭酸ガスの大量吸入にて屠殺し、速やかに10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。骨塩量の定量には骨欠損周囲の軟組織の除去が必要である。そこで、同一個体でマイクロフォーカスX線CT撮影と骨塩量の定量を比較するために、先にマイクロフォーカスX線CT撮影を行い、次いで骨塩量の定量を行った。すべての動物実験は「岩手医科大学動物実験指針」ならびに「動物の保護および管理に関する法律」にしたがって実施した。実験計画書承認番号第17-0030号。

5. Photodensitometry 法による骨塩定量 (Fig. 3)

骨の再生の確認のため、従来から行われている骨塩量測定を Photodensitometry 法^{17, 18)}により行った。骨の平均原子番号に近いアルミニウム板を、0.1mm, 0.2mm, 0.4mm, 0.8mm, 1.6mm,

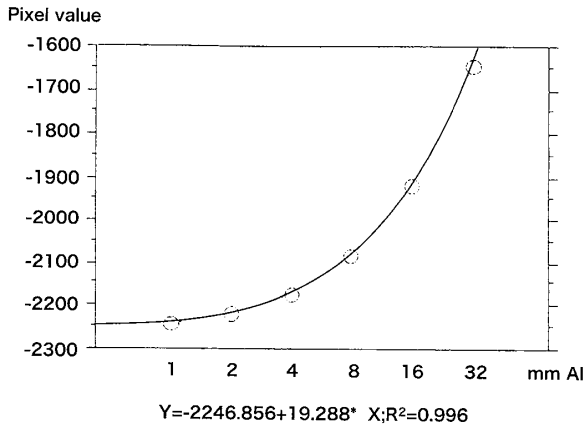


Fig. 4. Relation between pixel value and aluminum thickness (mm Al)

3.2mmの階段状になるように重ね合わせたものを参照体とし、骨標本と一緒にイメージングプレート (IP: FCR, 富士フイルムメディカル) の照射面上部に貼付して X 線撮影を行った。X 線装置 (MODEL TF-6 TL-6, 東芝) の条件は、管電圧50kV, 管電流20mA, 距離110cmとし、撮影後 DICOM データとしてコンピュータに入力して、DICOM viewer ソフト (OsiriX) にて骨塩量をアルミニウム当量として測定した。画面上で再生骨部分を十分に拡大して直径 2 mm の正円の関心領域 (Region of interest, 以下 ROI と略す) を設定した。そして、参照体 (アルミニウム板 0.1~3.2mm) の厚さをピクセル濃度値に換算した (Fig. 4)。この参照体と再生骨の ROI のピクセル濃度値をそれぞれ 3 回測定して、その平均値を測定値とした。

6. マイクロフォーカス X 線 CT 撮影

ラットの頭蓋骨欠損部に対する骨再生の観察をマイクロフォーカス X 線 CT 装置 (SMX-225CT, 島津製作所) にて行った。すなわち、頭蓋をターンテーブル上に置き、X 線を照射してコントラスト, 拡大率, 鮮鋭度を考慮してターンテーブルを移動した。これにより、試料の位置, 管電圧, 管電流, X 線源の焦点からターンテーブルの回転中心までの距離 (Source to Object Distance, 以下 SOD と略す), X 線源の焦点からイメージ・インテンシファイアまでの距離 (Source to Image Distance, 以下 SID と略す) を決定した。本研究では、管電圧90

kV, 管電流300 μ A, SOD 196mm, SID 600mmで行った。その後、スライス間隔80 μ m, ビュー数2400分割, データ加算回数3回の条件にて撮影, デジタル処理後コンピュータのディスプレイ画面 (画像解析ソフト TRI/3 D-BONE, ラトック社) で骨形態計測を行った。再生骨の体積および作製した骨欠損部全体の体積に対する再生骨の体積の割合, マイクロフォーカス X 線 CT 上のピクセル濃度値を測定した。測定したピクセル濃度値は骨密度を表す指標として使用した。また、骨の再生状態を立体的に観察するために 3D 画像の構築を行った。

7. 統計処理

骨形態計測および骨塩量における各パラメータの実験群ごとの平均値の検定は Student's-t 検定で行った。

結 果

1. 酸性ゼラチンの含水率について

本研究では、3週間程度と比較的長期の bFGF 徐放効果を期待するために、架橋度が 0.25% の AGD を作製した。その結果、AGD (乾燥平均重量4.6mg) 3個の平均含水重量は 21.6 ± 4.4 mg, 含水率は 81.8 ± 0.2 wt% であった。この平均含水量から、AGD 1個あたり10.0 μ l の bFGF 水溶液, 生理食塩水を含水させることにした。

2. 単純 X 線写真について (Fig. 5)

1) 移植 4 週後

対照群では、ほぼ AGD 埋入直後と同様の骨欠損像を呈していたのに対して (Fig. 5 A), bFGF1.0 μ g 含有群では骨欠損辺縁部に X 線不透過像がみられた (Fig. 5 B)。bFGF10.0 μ g 含有群では、さらに骨欠損辺縁部の X 線不透過性が増加し、辺縁不整な像を呈していた (Fig. 5 C)。

2) 移植 8 週後

対照群では骨欠損辺縁部の X 線不透過部が増加し、辺縁不整な像を呈していたのに対して (Fig. 5 D), bFGF1.0 μ g 含有群では骨欠損中央から再生骨様の X 線不透過像が観察された

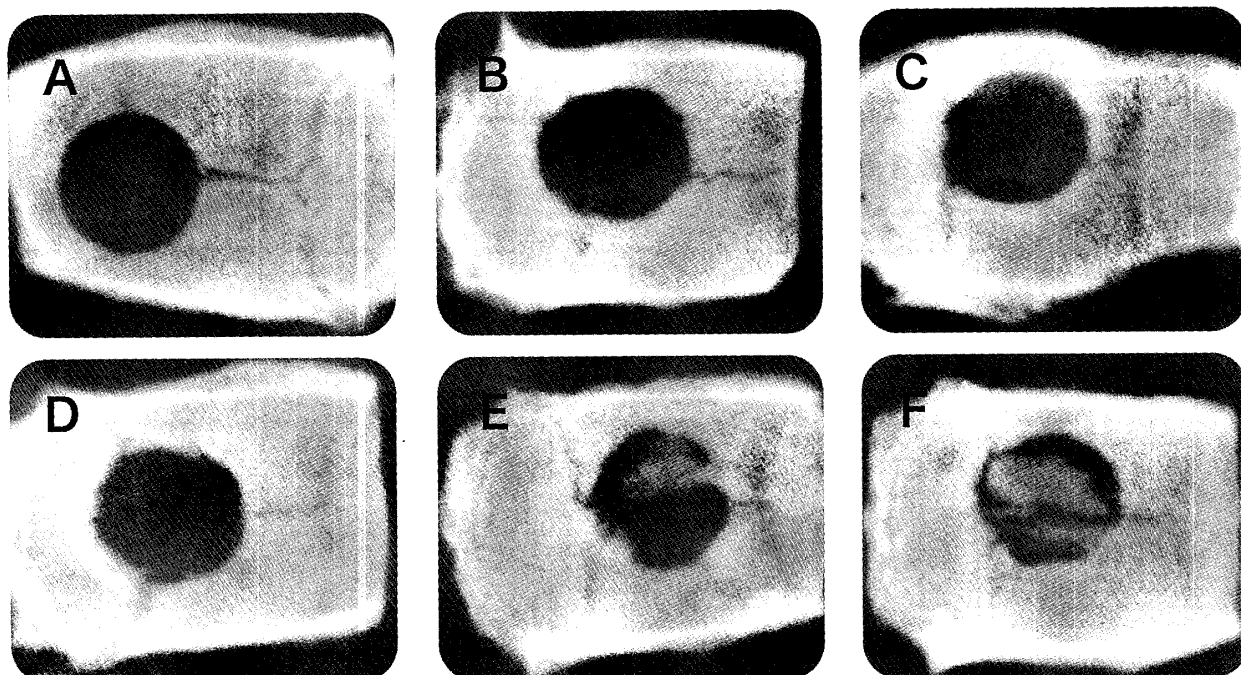


Fig. 5. Radiographic findings of cranium defects after implantation

- A : Control sample at 4 weeks
 B : A sample with AGD containing 1.0 μ g bFGF at 4 weeks
 C : A sample with AGD containing 10.0 μ g bFGF at 4 weeks
 D : Control sample at 8 weeks
 E : A sample with AGD containing 1.0 μ g bFGF at 8 weeks
 F : A sample with AGD containing 10.0 μ g bFGF at 8 weeks

Table 1. Bone mineral content of cranium defects after implantation measured by photodensitometry method

There are significant differences among the groups both at 4 weeks and at 8 weeks after implantation. The values of control, bFGF 1.0 μ g and bFGF 10.0 μ g at 8 weeks were significantly higher than those at 4 weeks, respectively.

Experimental group	Bone mineral content (mm Al) (Mean \pm S. D.)	
	4 weeks (n = 6)	8 weeks (n = 6)
control	2.12 \pm 0.84	3.34 \pm 0.59 [†]
bFGF 1.0 μ g	3.71 \pm 0.43 ^{**}	6.59 \pm 0.36 ^{††}
bFGF 10.0 μ g	4.52 \pm 0.04 ^{**}	8.46 \pm 0.99 ^{††}

†. : p<0.05, ††. ** : p<0.01

(Fig. 5 E)。bFGF10.0 μ g含有群では、さらに再生骨様の不透過性が増加して、骨欠損部の面積が縮小していた (Fig. 5 F)。

2. 骨塩量について (Table 1)

1) 移植 4 週後

bFGF1.0 μ g含有群 (3.71 \pm 0.43mm Al) は、対照群 (2.12 \pm 0.84mm Al) と比較して有意に高い値 (p<0.01) を示した。また bFGF10.0 μ g含有群 (4.52 \pm 0.04mm Al) は、対照群と比較して有意に

高い値 (p<0.01) を示した。bFGF10.0 μ g含有群と bFGF1.0 μ g含有群を比較すると、bFGF10.0 μ g含有群は bFGF1.0 μ g含有群より有意に高い値 (p<0.01) を示した。

2) 移植 8 週後

bFGF1.0 μ g含有群 (6.59 \pm 0.36mm Al) は、対照群 (3.34 \pm 0.59mm Al) と比較して有意に高い値 (p<0.01) を示した。また bFGF10.0 μ g含有群 (8.46 \pm 0.99mm Al) は、対照群と比較して有意に

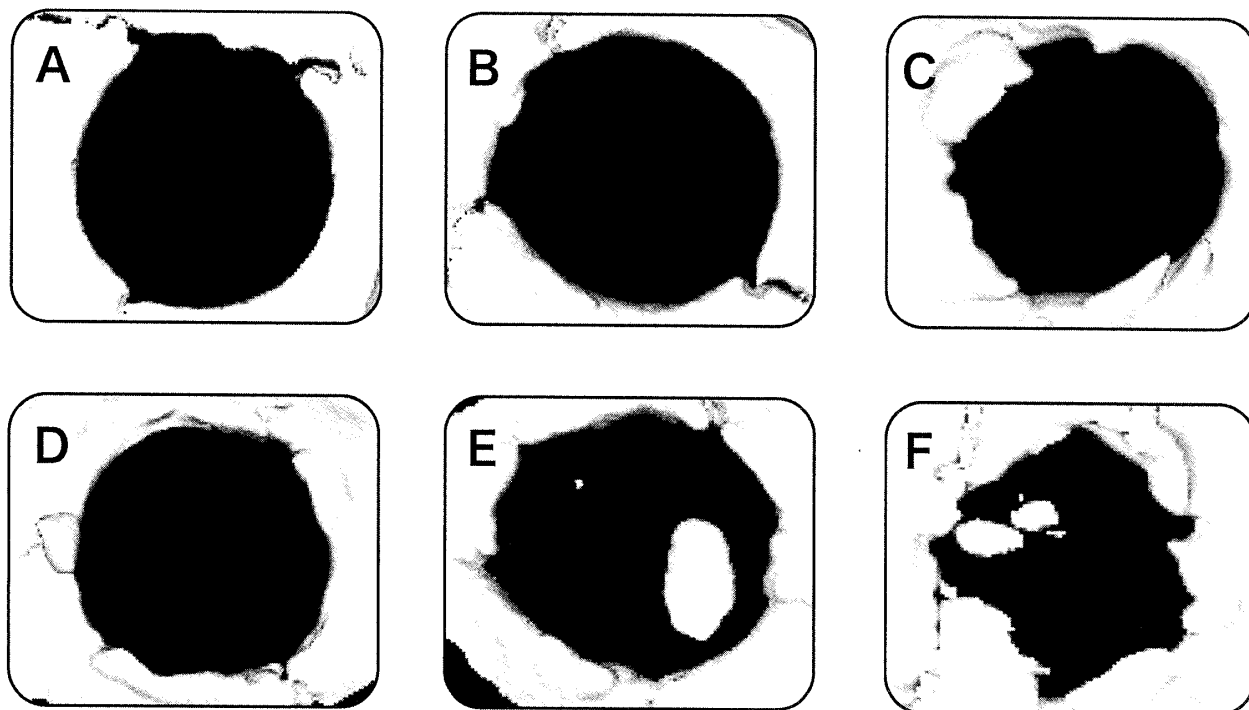


Fig. 6. Microfocus X-ray CT 3 D photographs of cranium defects after implantation

A : Control sample at 4 weeks

B : A sample with AGD containing 1.0 μ g bFGF at 4 weeks

C : A sample with AGD containing 10.0 μ g bFGF at 4 weeks

D : Control sample at 8 weeks

E : A sample with AGD containing 1.0 μ g bFGF at 8 weeks

F : A sample with AGD containing 10.0 μ g bFGF at 8 weeks



Fig. 7. Microfocus X-ray CT 3 D photograph of a cranium defect

The bone was regenerated from periosteum side.

高い値 ($p < 0.01$) を示した。4 週後の結果と同様に、bFGF10.0 μ g 含有群は bFGF1.0 μ g 含有群と比較して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。

3) 移植 4 週後と 8 週後の比較

対照群、bFGF1.0 μ g、10.0 μ g 含有群のそれぞれを 4 週後と 8 週後について比較すると、対照

群 ($p < 0.05$)、bFGF1.0 μ g ($p < 0.01$)、10.0 μ g 含有群 ($p < 0.01$) のすべての群において 8 週後が 4 週後に比べて有意に高い値を示した。

3. マイクロフォーカス X 線 CT 所見 (Fig. 6, 7)

1) 移植 4 週後

対照群 (Fig. 6 A) では骨欠損部の辺縁が丸みを帯びてきているものの、ほぼ AGD 埋入直後と同様の骨欠損径を呈していた。これに対して、bFGF1.0 μ g 含有群 (Fig. 6 B) では、骨欠損部の辺縁の一部に再生骨像を呈していた。bFGF10.0 μ g 含有群 (Fig. 6 C) では、骨欠損部に辺縁不整な再生骨像を認め、骨欠損径が縮小し骨膜側への骨の添加が認められた。また bFGF1.0 μ g 含有群と比較して、再生骨像は著明に増加していた。

2) 移植 8 週後

対照群 (Fig. 6 D) では 4 週後よりも骨欠損辺縁での骨再生が一部認められるものの、骨欠

Table 2. Bone volume of cranium defects after implantation measured by Microfocus X-ray CT

There are significant differences among the groups both at 4 weeks and at 8 weeks after implantation. The values of control, bFGF 1.0 μ g and bFGF 10.0 μ g at 8 weeks were significantly higher than those at 4 weeks, respectively.

Experimental group	Bone volume (mm ³) (Mean \pm S. D.)	
	4 weeks (n = 6)	8 weeks (n = 6)
control	0.42 \pm 0.06	2.45 \pm 0.56 ^{††}
bFGF 1.0 μ g	0.61 \pm 0.08	3.34 \pm 0.56 ^{††}
bFGF 10.0 μ g	1.24 \pm 0.17	8.17 \pm 1.14 ^{††}

* : $p < 0.05$, ††. ** : $p < 0.01$

Table 3. Ratio of regeneration bone in bone defects after implantation measured by Microfocus X-ray CT

The values of bFGF 10.0 μ g were significantly higher than those of control and of bFGF 1.0 μ g both at 4 weeks and 8 weeks. The values of control, bFGF 1.0 μ g and bFGF 10.0 μ g at 8 weeks were significantly higher than those at 4 weeks, respectively.

Experimental group	Ratio of bone regeneration in bone defects (%) (Mean \pm S. D.)	
	4 weeks (n = 6)	8 weeks (n = 6)
control	1.48 \pm 0.37	8.98 \pm 1.96 ^{††}
bFGF 1.0 μ g	1.90 \pm 0.43	10.39 \pm 3.43 ^{††}
bFGF 10.0 μ g	3.99 \pm 1.67	24.00 \pm 7.67 ^{††}

* : $p < 0.05$, ††. ** : $p < 0.01$

損径の縮小は顕著ではなかった。これに対し bFGF1.0 μ g含有群 (Fig. 6 E) では、骨欠損中央部から再生骨様の像が観察され、4週後の bFGF1.0 μ g含有群と比較して骨欠損周囲の外形は、辺縁不整であり、骨欠損範囲が縮小していた。bFGF10.0 μ g含有群 (Fig. 6 F) では、bFGF 1.0 μ g含有群と比較して、さらに骨欠損範囲が縮小し骨の再生が著明に認められた。

また3D構築することによって、骨欠損中央部の微細な点状の再生骨や皮膚側すなわち骨膜側への骨の添加が行われていることが観察された (Fig. 7)。

4. 骨形態計測

1) 再生骨の体積 (Table 2)

(1)移植4週後

bFGF1.0 μ g含有群 (0.61 \pm 0.08mm³) は対照群 (0.42 \pm 0.06mm³) と比較して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。また bFGF10.0 μ g含有群 (1.24 \pm 0.17mm³) は、対照群と比較して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。bFGF 10.0 μ g含有群と

bFGF1.0 μ g含有群を比較すると、bFGF10.0 μ g含有群は、bFGF1.0 μ g含有群より、有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。

(2)移植8週後

bFGF1.0 μ g含有群 (3.34 \pm 0.56mm³) は、対照群 (2.45 \pm 0.56mm³) と比較して有意に高い値 ($p < 0.05$) を示した。また bFGF10.0 μ g含有群 (8.17 \pm 1.14mm³) は、対照群と比較して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。bFGF 10.0 μ g含有群と bFGF1.0 μ g含有群を比較すると、bFGF10.0 μ g含有群は、bFGF1.0 μ g含有群より、有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。

(3)移植4週後と8週後の比較

対照群、bFGF1.0 μ g、10.0 μ g含有群のそれぞれを4週後と8週後について比較すると、各群ともに8週後が4週後に対して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。

2) 骨欠損体積に対する再生骨の体積の割合 (Table 3)

(1)移植4週後

Table 4. Pixel value of regenerated bone in bone defects after implantation measured by Microfocus X-ray CT

There were no significant differences among all the values at 4 weeks and 8 weeks.

Experimental group	Pixel value (Pixel $\times 10^4$) (Mean \pm S. D.)	
	4 weeks (n=6)	8 weeks (n=6)
control	3.47 \pm 0.01	3.51 \pm 0.02
bFGF 1.0 μ g	3.52 \pm 0.01	3.58 \pm 0.02
bFGF 10.0 μ g	3.52 \pm 0.01	3.63 \pm 0.01

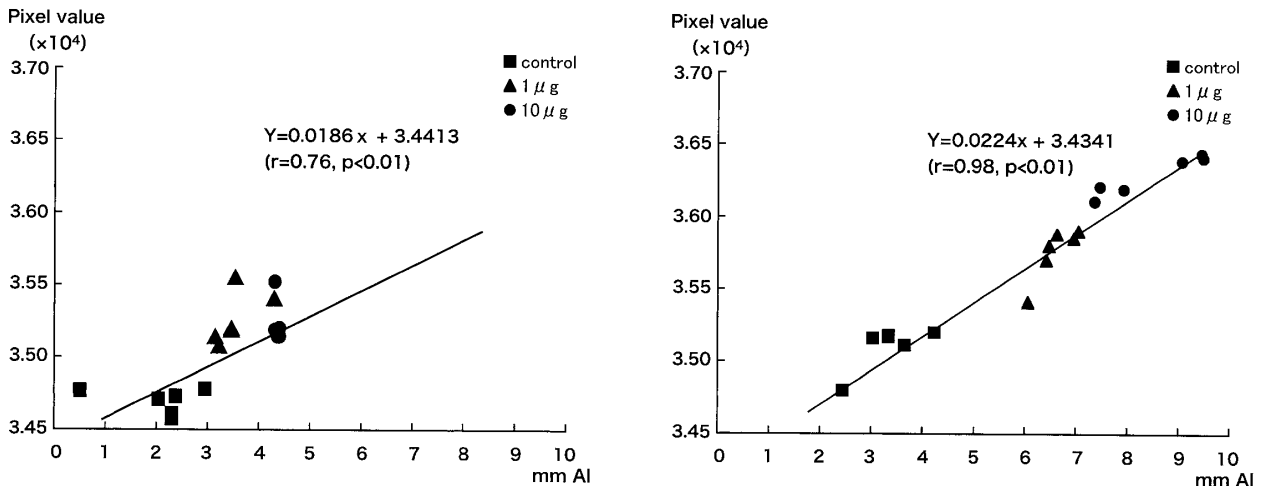


Fig. 8. The scatter diagram of bone mineral content and relative concentration

A : 4 weeks after implantation

B : 8 weeks after implantation

The diagrams shows significant positive correlation between them.

bFGF10.0 μ g含有群 (3.99 \pm 1.67%) は対照群 (1.48 \pm 0.37%) と比較して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。bFGF10.0 μ g含有群は bFGF1.0 μ g含有群 (1.90 \pm 0.43%) と比較して有意に高い値 ($p < 0.05$) を示した。bFGF1.0 μ g含有群と対照群との間に有意差は認めなかった。

(2) 移植 8 週間後

bFGF10.0 μ g含有群 (24.0 \pm 7.67%) は対照群 (8.98 \pm 1.96%) と比較して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。bFGF10.0 μ g含有群は bFGF1.0 μ g含有群 (10.39 \pm 3.43%) より有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。bFGF1.0 μ g含有群と対照群との間に有意差は認めなかった。

(3) 移植 4 週間後と移植 8 週間後の比較

対照群, bFGF1.0 μ g, bFGF10.0 μ g含有群のそれぞれを 4 週間後と 8 週間後について比較すると, 各群ともに 8 週間後が 4 週間後に対して有意に高い値 ($p < 0.01$) を示した。

3) ピクセル濃度値 (Table 4)

対照群では, 4 週間後は3.47 \pm 0.01 $\times 10^4$ Pixel で, 8 週間後が3.51 \pm 0.02 $\times 10^4$ Pixel とほぼ同じ数値であった。また bFGF1.0 μ g含有群では, 4 週間後は3.52 \pm 0.01 $\times 10^4$ Pixel で, 8 週間後3.58 \pm 0.02 $\times 10^4$ Pixel とほぼ同じ数値であった。さらに bFGF10.0 μ g含有群では, 4 週間後は3.52 \pm 0.01 $\times 10^4$ Pixel で, 8 週間後が3.63 \pm 0.01 $\times 10^4$ Pixel とすべての群においてピクセル濃度値に差は認めなかった。

4) 骨塩量およびピクセル濃度値の関係 (Fig. 8 A,B)

マイクロフォーカス X 線 CT の骨形態計測で, 骨塩量を表すピクセル濃度値が Photodensitometry 法で求めた骨塩量を反映しているかを検討するために, 両者の比較を 4 週, 8 週で行った。その結果, 4 週間後では, bFGF10.0 μ g含有群は対照群および bFGF1.0 μ g含有群に比べ

て骨塩量の増加は認めるものの、ピクセル濃度値の増加は認められなかった。しかし4週後の対照群、bFGF含有群全体をみると、骨塩量とピクセル濃度値の有意な相関関係が認められた($r=0.76$, $p<0.01$) (Fig. 8 A)。また8週後では、対照群、bFGF1.0 μ g, 10.0 μ g含有群単独に、それぞれ骨塩量とピクセル濃度値の間に相関がみられた。また、これらの8週後の対照群、bFGF含有群全体をみても、すべてに骨塩量の増加とともにピクセル濃度値も増加し有意な相関関係を認めた($r=0.98$, $p<0.01$)。(Fig. 8 B)

考 察

再生医療における骨再生の基礎的研究では、従来からX線写真を用いた骨塩量測定などで評価が行われてきた。しかし、有効な骨再生の評価法は、未だ確立されていない。本研究では、ラットの頭蓋骨に小骨欠損を作成して、酸性ゼラチンを足場材料とするbFGFの徐放システムを利用した骨再生を行った。この骨再生モデルに対して、再生した骨組織の単純X線撮影によるPhotodensitometry法、マイクロフォーカスX線CTを利用したピクセル濃度測定および骨形態観察を行い、それぞれの評価法を比較し検討した。

1. 本研究における骨再生モデルについて

口腔外科では、治療上顎骨の小欠損に遭遇する機会が多い。顎骨の区域切除後の骨欠損など、比較的大きな骨欠損に対する再生医学的なアプローチには、足場材料、骨形成促進因子、細胞成分の三要素が重要と思われる。しかし、体積の少ない骨欠損に対する骨再生には、細胞成分が周囲の骨膜や顎骨から供給されることは、临床上よく経験される。しかもこれら小欠損の骨再生のために、自己の幹細胞を採取することは、新たな創を作ることになり、再生医療を応用する意義がなくなると思われる。また临床上、患者にとっても決して有利なこととはいえない。そこで本研究では、小骨欠損の骨再生モデルを用いて、足場材料と骨形成因子だけの組み合わせとした。

近年、効率よく骨欠損部を再生するbFGF, BMPs, TGF- β 1⁵⁻⁸⁾などの骨形成促進因子が注目されている。しかし、これら骨形成促進因子を含む増殖因子の重大な副作用の一つに、悪性腫瘍細胞の増殖が上げられ¹⁹⁾、臨床応用の大きな障害となっている。その中でbFGFは、すでに皮膚科領域では創傷治癒促進薬として安全性が確立され、臨床応用されている。bFGFは創傷治癒過程において血管新生を誘導するとともに^{10, 20)}、骨髄骨原性細胞の増殖を促進することが確認されている¹²⁾。そこで本研究では、骨形成促進因子として最も臨床応用に近いと考えられるbFGFを使用した。しかし、実際の組織欠損部に骨形成促進因子単体の局所投与を行っても生物学的半減期が短いため、その効果が十分に得られないことが多い¹⁾。このため、持続的に局所に有効な濃度を保つための促進因子の徐放を、いかに有効に機能させるかが大きな課題となっている。また組織再生には、細胞が接着でき、細胞を3次元的に配置させ、しかも細胞の増殖分化を誘導する足場材料を欠損部に与える必要がある。骨再生のための足場材料としてゼラチン, PLLA, PLGA, コラーゲンスポンジなどがあげられる^{3, 4)}。このうち酸性ゼラチンは、中性領域の水中下でマイナスに帯電する等電点5.0の酸性で、等電点9.6のbFGFはこの酸性ゼラチンと静電結合が可能であり、生体内吸収に伴ってbFGFを徐放することが報告されている^{21, 22)}。本研究で使用した酸性ゼラチンによるbFGF徐放システムは、ラベリング化を行った徐放期間の実験からその徐放効果は実証されており、ゼラチンの含水率によりコントロールされる事が分かっている^{11, 21)}。以上のことから本研究では、この両者の組み合わせを骨再生における評価の対象モデルとした。

2. 単純X線写真について

X線写真では、骨欠損部に対して再生骨様不透過像が認められた。しかし、実際にはX線写真を撮影する際、対象となる頭頂骨を外科的に摘出し、軟組織の除去が必要であり、この軟組織除去の際に、再生骨の損傷を防ぐために細心

の注意が必要であった。また、評価にあたっては、一部に付着した軟組織の X 線不透過像なのか硬組織の不透過像なのかの正確な判断は難しく、単純 X 線だけで再生骨の評価は困難と思われた。

3. 骨塩定量について

近年, Quantitative computed tomography (QCT), Dual energy x-ray absorptiometry (DEXA) 等をはじめ、骨のミネラル成分が定量的に評価出来るようになり、骨粗鬆症等の骨代謝性疾患の診断に利用されている^{23,24)}。当教室でも過去に基礎的研究として¹²⁵Iを用いた単一光子吸収法による抜歯創治癒過程²⁵⁻²⁷⁾や DEXA 法を用いた犬下顎骨骨欠損治癒過程における骨回復量に関する研究など²⁸⁻³⁰⁾を行い、下顎骨における骨塩定量の有用性を報告してきた。

本研究では、Photodensitometry 法にて骨塩量を測定した。同法はアルミニウム板を参照体として IP 上に添付し、対象の骨を同時に撮影して得られた X 線フィルム濃度を対比することによって、骨塩量を定量するものである²⁴⁾。

その結果、すべての実験群において骨塩量は時間の経過とともに増加したが、対照群と bFGF 含有群を比較すると、bFGF 含有群が有意に増加した。酸性ゼラチン自体には骨再生能は有していない事が Tabata ら³¹⁾によって報告されているが、本研究の結果からも bFGF 含有群に比較して対照群の骨塩量の値は低く、それ自体の骨再生能は高くないことが考えられた。

アルミニウム当量画像は、骨塩量の絶対値を求めることは困難であるが、X 線フィルムの持つ空間分解能に優れた特色を生かし、相対的な評価として用いられてきた¹⁷⁾。本研究における骨再生モデルについては、従来から行われている骨塩量 (Al 当量) の測定で良好な骨再生の結果が得ることが確認できた。

しかし Photodensitometry 法の問題点として、実験動物を屠殺して、対象となる部位を摘出しなければならないことがあげられる。またその際、軟組織除去の手技によるテクニカルエ

ラーにて再生骨の損傷を引き起こす可能性がある。さらに同法は、再生された骨のごく一部分のみで評価するため、再生された骨全体を評価することは不可能である。加えて歯科臨床では、本研究のように参照体を用いた骨塩定量を行うことがあるが、顎骨は厚みがあり、頭蓋骨の形態は複雑であるため、骨欠損を他の骨と重ならないように撮影することは困難なことが多い。顎骨の欠損が小さい程この傾向は強くなる。したがって本法が実際の臨床応用に適しているとは考えにくい。そこで本研究では、これらの問題点を解決すべくマイクロフォーカス X 線 CT を用いた骨再生の評価を行った。

4. マイクロフォーカス X 線 CT について

bFGF を用いた骨再生についてマイクロフォーカス X 線 CT を用いた評価は、ほとんど報告されていない^{8,12)}。先に記述した X 線撮影、骨塩量測定は、従来から多くの研究の評価法として用いられているが、前述の通り多くの問題点がある。その最大の問題点は、これらの評価法は検体を全て外科的に処理しなければならないことである。これに対し、マイクロフォーカス X 線 CT 撮影は、外科的侵襲を必要とせず、非侵襲的に評価が可能である。また、評価対象骨を摘出する前処理を必要としないため、評価に要する時間が短い。したがってより臨床応用に近いものと考えられる。

医療用 CT 装置の空間分解能は数 100 μm であるのに対し、マイクロフォーカス X 線 CT 装置の空間分解能は 5 μm 以下と優れている³²⁾。これは、焦点の大きさが極めて小さいため、拡大率を大きくしても半影の影響が少ないことに起因している。このことより、微細な構造を非侵襲的に観察することが可能であり、骨再生において微細な硬組織再生を、侵襲により破壊せず検索できる。さらに、本研究のように X 線透過像を多角的にとらえて、断層像を再構成し³³⁾、骨形態計測および三次元的評価を行うことが可能である。本研究では、形態学的計測として再生骨の体積、骨欠損部内の再生骨の割合、相対的な濃度について、マイクロフォーカス X 線 CT

の結果をもとに解析ソフトを用いて評価した。さらに、3D構築することにより三次元的に評価を行った。

骨再生を実際の臨床で行う際に問題となるのは、いかに目的に合った量（体積）の骨を再生させるかである。骨塩量の測定は、あくまで再生された骨組織のミネラル濃度を観察しているに過ぎず、欠損全体に対して、どの程度の量の骨が再生されたかは計測することはできない。本研究の骨形態計測の結果、再生骨の体積を平均値でみると、4週目では対照群の0.42mm³に対し、bFGF1.0μg含有群で0.61mm³、10.0μg含有群で1.24mm³とbFGF含有群の骨再生量は有意に増加していた。8週目には対照群の体積2.45mm³に対しbFGF10.0μg投与群では8.17mm³と有意に増加していた。また骨欠損部内の再生骨の割合は、8週目の対照群で8.98%に対しbFGF10.0μg含有群では24.0%と有意に増加していた。これらの結果から、臨床的に最も評価が望まれる再生骨自体の総量がマイクロフォーカスX線CTで評価可能になると考えられた。また、再生された骨の質を表すピクセル濃度値に関しては、対照群、bFGF含有群のいずれもほぼ同等の値を示していた。このことは、bFGFにより再生された骨は、促進因子を使用しないでできた骨と何ら骨質の点で劣るものではないことを示している。このピクセル濃度値について骨塩量との関係を散布図として表した結果、4週後および8週後の相対的濃度値と骨塩量との間に非常に高い相関関係が認められた。このことから、マイクロフォーカスX線CTは、現在行われている骨塩量の評価にとって代わる可能性が考えられた。

一方、マイクロフォーカスX線CTの問題点として、撮影装置自体が必要であり、撮影するための施設数が少ないことがあげられる。また、撮影時間が撮影条件によっては長時間であることから被曝線量が多い点があげられる。さらにファンビームCTに比べてコントラストの低下が認められる。しかし生体においては、すでにコーンビームCTといった装置が開発され

ており、空間分解能が非常に高く照射線量も約10分の1程度に抑えることが可能となってきた。また近年、X線の散乱線を低減することで画像ノイズを減少させ、高コントラストな画像を得ることが可能となってきた。このように、装置の進化に期待が寄せられ、ごく近い将来に問題点が解決可能になると思われる。

以上のことから、マイクロフォーカスX線CTは、非侵襲的な硬組織研究に有用であることが示唆され、再生医学的なアプローチによる骨再生を臨床応用する際に、評価法として有用であることが多面的に示唆された。

結 論

Wister系ラットの頭蓋骨に骨欠損を作成し、濃度の異なるbFGF含有酸性ゼラチンを用いた骨再生について、X線学的に骨形態計測を行い、骨塩量をアルミニウム当量として評価し、以下の結論を得た。

1. 本研究の骨再生モデルは良好な骨再生が認められ、従来から行われている単純X線写真および骨塩定量評価からモデルとして妥当なものと考えられた。
2. マイクロフォーカスX線CTを用いて非侵襲的に再生骨の評価が可能であった。
3. マイクロフォーカスX線CT写真より、3D構築したことで、再生骨が皮膚側、すなわち骨膜側から骨の再生が始まることが明らかになった。
4. マイクロフォーカスX線CTによる骨形態計測にて、bFGF含有群が骨再生を促進させていることが認められ、骨形成促進因子を使用する、しないに関わらず再生された骨の骨質は同等と考えられた。また、ピクセル濃度値と骨塩量との間に相関関係が認められた。
5. 以上のことから、bFGF徐放システムを用いた骨再生について、マイクロフォーカスX線CTが非侵襲的な硬組織研究に有用であることが示唆され、骨再生を多面的詳細に評価し得ると考えられた。
6. 再生医学的なアプローチによる骨再生を臨

床応用した際にマイクロフォーカス X 線 CT は評価法として有用な方法になると思われた。

謝辞：稿を終えるにあたり，終始ご懇篤な指導，校閲を賜りました恩師杉山芳樹教授に深甚なる謝辞を捧げます。また，本研究の遂行に際しご助言を頂きました当講座星秀樹助教授に深く感謝いたします。また，本研究の遂行に際し数々のご教示，ご助言を頂きました本学歯科放射線学講座小豆島正典教授に衷心より謝意を捧げます。さらに，懇切丁寧な実験手技のご指導を賜りました本学歯科理工学講座平雅之助教授，ならびに当講座古内秀幸講師に心から感謝の意を表します。最後に，様々な面でご協力ご援助を頂きました口腔外科学第二講座医局員各位に深く御礼申し上げます。

本論文の要旨は，2006年5月12日，第60回日本口腔科学会総会（名古屋市）において発表した。

文 献

- 1) 山本雅也，田畑泰彦：細胞増殖因子の徐放化による骨組織の再生，日本再生医療学会誌，2：19-26，2003。
- 2) Chen, S., Pitaru, S., Lokiec, F., and Savion, N.: Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cell in culture. *Bone*. 23: 111-117, 1998.
- 3) 平雅之，荒木吉馬：組織再生用足場材料 - 種類と臨床応用について，*DE*. 152: 27-30, 2005.
- 4) 杉山芳樹：顎骨用吸収性骨接合材料について - 高強度 PLLA 材料を中心として，*岩医大歯誌*，30: 121-131, 2005.
- 5) Cook, S. D., and Wolfe, M. W.: Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates. *J. Bone Joint Surg. Am.* 77: 734-750, 1995.
- 6) Seto, I., and Asahina, I.: Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 59: 53, 2001.
- 7) 洪流，田畑泰彦，山本雅哉，宮本享，橋本信夫，筏義人：TGF- β 1 含有吸収性ゼラチンハイドロゲルの頭蓋骨再生能，*Drug Delivery System*. 14: 91-99, 1999.
- 8) Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweiger, L., and Neufeld, G.: Structural characterization and biological function of fibroblast growth factor. *Endocrin Rev.* 8: 95, 1987.
- 9) Folkman, J., and Klagsbrun, M.: Angiogenic Factors. *Sci.* 235: 442-447, 1987.
- 10) 新井文用，須田年生：骨・軟骨・間葉系幹細胞からの分化誘導メカニズム，須田年生，岡野栄之 編集：再生医学，臨時増刊号，40巻，中山書店，東京，246-256ページ，2003。
- 11) 加藤道夫，佐藤淳一，長野孝俊，五味一博：rhbFGF と rhBMP-7 を添加培養した骨髄細胞に可溶性アテロコラーゲンを担体とし用いた異所性骨形成，*鶴見歯学*，31: 15-29, 2005.
- 12) Tabata, Y., Hijikata, S., and Ikada, Y.: Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogel. *J. Cnt. Rel.* 31: 189-199, 1994.
- 13) Yamada, K., Tabata, Y., Yamamoto, K., Miyamoto, S., Nagata, I., Kikuchi, H., and Ikada, Y.: Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J. Neurosurg.* 86: 871-875, 1997.
- 14) 村田洋一郎：Basic fibroblast growth factor (bFGF) による遊離骨移植に対する効果，*山口医学*，53: 55-65, 2004.
- 15) 富山徹，佐藤淳一，林和喜：仮骨延長における rhbFGF/アテロコラーゲンスポンジ複合体の骨形成促進に関する実験的研究，*鶴見歯学*，30: 63-76, 2004.
- 16) Okumura, M., Okuda, T., Okamoto, T., Nakamura, T., and Yajima, M.: Enhanced angiogenesis and granulation tissue formation by basic fibroblast growth factor in healing-impaired animals. *Drug Res.* 46: 1021-1026, 1996.
- 17) 野井倉武憲，森田康彦，岩下洋一郎：アルミニウム当量画像に関する骨塩量の測定による相違，*歯科放射線*，34: 171-177, 1994.
- 18) Shozushima, M., Nakano, H., Kubota, M., Kamagai, T., Ishikawa, F., Saito, H., and Sakamaki, K.: Bone mineral content of human mandible related to bite force and occlusal contact area. *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 21: 215-222, 1996.
- 19) 長谷剛志，川尻秀一，田中彰，能崎晋一，野口夏代，加藤広禄，中谷弘光，大原照比左，中川清昌，山本悦秀：in vitro 浸潤系における口腔扁平上皮癌細胞と繊維芽細胞の相互作用に関する FGF-2 の役割，*口腔腫瘍*，17: 105-113, 2005.
- 20) Javerzat, S., Auguste, P., and Bikfalvi, A.: The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med.* 8: 483-489, 2002.
- 21) Tabata, Y., Nagano, A., and Ikada, Y.: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Engineering*. 5: 127-138, 1999.

- 22) Tabata, Y., and Ikada, Y.: Protein release from gelatin matrices. *Adv. Drug Delivery Reviews*. 31 : 287-301, 1998.
- 23) Ito, M., Hayashi, K., and Ito, M. : Vertebral density distribution pattern. *Radiology*. 180 : 253-257, 1991.
- 24) Reinbold, W.D., Genant, H. K., Reiser, U. J., Harris, S. T., and Ettinger, B. : Bone mineral content in early postmenopausal and postmenopausal osteoporotic woman. *Radiology*. 160 : 469-478, 1986.
- 25) 橋場友幹 : 抜歯創治癒過程の¹²⁵I-photon absorptiometry による骨塩定量に関する実験的研究, 岩医大歯誌, 12 : 5-23, 1987.
- 26) 岩崎浩二郎 : 犬下顎骨骨創治癒過程の¹²⁵I-photon absorptiometry による骨塩定量に関する実験的研究, 岩医大歯誌, 13 : 269-282, 1988.
- 27) 坂岡丈利 : 犬下学骨骨創治癒過程の¹²⁵I-photon absorptiometry による骨塩定量に関する実験的研究 - 低カルシウム食飼育の影響について -, 岩医大歯誌, 14 : 233-248, 1989.
- 28) 橋場友幹, 佐藤重信, 坂岡丈利, 岩崎浩二郎, 星秀樹, 深澤肇, 結城勝彦, 関山三郎 : 顎骨病変の病態ならびに治癒過程における二重エネルギー X 線吸収測定法による骨塩定量に関する研究 - 犬下顎骨骨欠損治癒過程における骨回復量について -, 日口外誌, 38 : 15-22, 1992.
- 29) 佐藤重信 : Dual energu x-ray absorptiometry によるヒト下学骨骨塩定量に関する研究, 岩医大歯誌, 16 : 1-14, 1991.
- 30) 中谷寛之 : 骨形成蛋白質 (BMP) を用いた顎骨再生に関する実験的研究, 岩医大歯誌, 28 : 16-26, 2003.
- 31) 田畑泰彦 : ドラッグデリバリーシステム, 蛋白質核酸酵素, 45 : 2179-2187, 2000.
- 32) 江尻貞一 : 新しい形態学的解析方法 マイクロ CT, 日骨代謝会誌, 18 : 15-21, 2000.
- 33) 高堂積, 姫井志乃夫, 有田宏志, 久富恭義, 大野恭秀, 大西修平, 開本亮 : X 線 CT 装置による半導体実装部品の解析, 6 th Symposium "MATE", (抄), 85-90, 2000.