

# 骨形成蛋白質 (BMP) を用いた顎骨再生に関する実験的研究

中谷 寛之

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座

(主任: 関山 三郎 教授)

(受付: 2002年12月18日)

(受理: 2003年1月9日)

**Abstract :** It is well known that bone morphogenetic protein (BMP) encourages bone formation strongly. This study evaluated bone regeneration using rhBMP-2 in bone defects of the mandible. Bone defects 20 mm wide were surgically created in mandibular bones of adult male beagles and implants were placed into the bone defects. Experimental groups comprised a rhBMP-2 (+) group, a rhBMP-2 (-) group and a control group (no bone defects created). Animals were killed 12 weeks postoperatively, followed by quantitative, radiological and histological evaluations. Bone mineral measurement using dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) revealed significant differences between the rhBMP-2 (+) group and, the rhBMP-2 (-) and control groups in bone mineral density (BMD) ( $p < 0.01$ ). Elementary analysis using particle induced X-ray emission (PIXE) revealed significant differences between the rhBMP-2 (+) group and, the rhBMP-2 (-) and control groups in concentrations of Mg and Ca ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). Using soft X-ray, the rhBMP-2 (+) group displayed better absorption of implants and new bone formation than the rhBMP-2 (-) group. Using microfocus X-ray CT, the rhBMP-2 (+) group displayed better absorption of implants, bone regeneration and internal structure of mandible than the rhBMP-2 (-) group. In histology, the rhBMP-2 (+) group displayed better absorption of implants and new bone formation than the rhBMP-2 (-) group. This study therefore suggested the utility of rhBMP-2 in bone regeneration.

**Key words :** recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), bone regeneration, dual energy X-ray absorptiometry (DEXA), particle induced X-ray emission (PIXE), microfocus X-ray CT

## 緒 言

口腔外科領域の臨床では、悪性腫瘍による顎骨切除や顎骨嚢胞の摘出等、さまざまな大きさ、形態の骨欠損が生じる機会が多い。この失われた顎骨に対し形態のみならず、機能的に再建する必要がある。従来はこのような骨再建に、新鮮自家骨の移植が一般的に行われてき

た<sup>1,2)</sup>。ところが、自家骨移植には、移植骨を得るために、二次的な手術侵襲を加えること、血行や骨膜の確保が困難なこと、採取量に限界があるなどの問題点<sup>3,4)</sup>から、ヒドロシキアパタイト (hydroxyapatite, 以下 HA と略す) やリン酸三カルシウムなどの人工生体材料の開発が行われてきた<sup>5-7)</sup>。人工生体材料は生体親和性、骨伝導性に優れているが、骨誘導能や骨形成能が

---

Experimental study of bone regeneration using bone morphogenetic protein (BMP)

Hiroyuki NAKATANI

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, 1-3-27 Chuo-dori morioka, Iwate 020-8505 Japan

ないため、より効果的な移植材料の開発が求められてきた。近年、骨の再生に対して、人工生体材料を単独で用いる方法より、人工生体材料にさまざまなサイトカインを複合させて用いる方法が考えられている<sup>8)</sup>。サイトカインの中で、骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein, 以下 BMP と略す) は、未分化間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させることで、強力な骨形成促進作用を有することが知られている<sup>9-11)</sup>。また、研究の発展により純粋な BMP である組み替え型ヒト BMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, 以下 rhBMP-2 と略す) の作製が可能となった。しかし、最適なサイトカインと生体材料の選択は明らかにされていない<sup>8)</sup>。そこで、本研究は rhBMP-2 を用いた顎骨再生の有用性に関する評価を骨塩定量、元素分析、X 線学的検索、組織学的検索方法を用いて行った。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験動物

実験には、生後 1 年、体重 12~15kg の雄性ビーグル犬 6 頭を用いた。実験期間中、室温 24 ± 2°C のもとで固形飼料 (CD-5 M, 日本クレア) と水道水を与えて飼育した。

#### 2. 移植材料

実験に使用した rhBMP-2 は山之内製薬より提供を受けた。担体には気孔率約 75%、気孔径約 100~400 μm の β-リン酸三カルシウム (β-tricalcium phosphate, 以下 β-TCP と略す, オリンパス光学工業) の大気孔体ブロックを用いた。

移植片の調整は、まず緩衝液 (5 mM グルタミン酸, 5 mM 塩化ナトリウム, 2.5% グリシン, 0.5% 精製白糖, 0.01% ポリソルベート 80, pH4.5) で溶解された rhBMP-2 100 μg を滅菌された β-TCP に滴下した。β-TCP に滴下後、β-TCP ブロック体表面に 3% アテロコラーゲンインプラント (高研) 0.5ml を塗布した移植片と、rhBMP-2 を滴下せず、3% アテロコラーゲンインプラント 0.5ml を β-TCP ブロック体表面

に塗布しただけの 2 種類の移植片を作製した。

#### 3. 移植および試料採取

移植に際し、まずペントバルビタールナトリウム 25mg/kg の静脈内注射による全身麻酔下に、両側下顎第 3, 第 4 前臼歯を歯科用タービンにて、周囲組織に傷害を加えないように、十分注意しながら分割抜去を行った。抜歯 12 週後、全身麻酔下に歯槽頂より近遠心方向に切開を入れ、頬側・舌側の歯槽粘膜を骨膜下で剥離し、粘膜骨膜弁を形成した。次にエンジンバーにてガイドグループを形成し、骨ノミを用いて近遠心径 20mm, 深さ 6 mm の骨欠損を作製した。rhBMP-2 を含有した移植片あるいは、rhBMP-2 を含有しない移植片をそれぞれ 3 頭の骨欠損に挿入した。移植片の固定は行わず、粘膜骨膜弁を復位させ一次閉鎖を行った。術後 3 日間は、感染予防のためペニシリン G10 万単位の筋肉内注射を行った。実験群は、rhBMP-2 を含む材料を移植したものを含有群、rhBMP-2 を含まない材料を移植したものを非含有群とした。対照には各群の反対側を抜歯後、骨欠損を作製しないものを用い、これを対照群とした。移植 12 週後、実験動物をペントバルビタールナトリウムの大量投与により屠殺し、下顎骨を慎重に摘出、移植部の骨再生を以下の検索方法を用いて評価した。

#### 4. 軟 X 線撮影

撮影には軟 X 線装置 (TF-6 TL-6, 東芝メディカル) を用いた。摘出した下顎骨を加圧電圧 54kVp, 管電流 100mA, 露出時間 1 秒, 焦点-フィルム間距離 50cm の条件で撮影した。

#### 5. 骨塩定量

二重エネルギー X 線吸収測定法 (Dual Energy X-ray Absorptiometry, 以下 DEXA 法と略す) を用いた Quantitative digital radiography-1000 (以下 QDR-1000 と略す, Hologic 社) にて、摘出した下顎骨の骨塩量の定量を行った。測定に先立ち、QDR-1000 に共通の人工的に作られた骨塩量 (bone mineral content, 以下 BMC と略す) が 53.8 ± 0.28g で、単位面積あたりの骨塩量 (bone mineral

density, 以下 BMD と略す) が平均 $1.000\text{g}/\text{cm}^2$ となるように設計された腰椎ファントムにて、キャリブレーションを行った。骨塩量の測定値はこの値を基準として算出した。摘出した下顎骨をアクリルボックス内の水深 $3\text{cm}$ の水の中に静置し、歯軸に対し X 線束が垂直となる方向で、スキャン速度 $60\text{mm}/\text{sec}$ 、スキャン幅 $1\text{mm}$ 、管電圧 $140/70\text{kVp}$ 、管電流 $2\text{mA}$ にて、摘出した下顎骨とその周囲を充分含むよう 2 回スキャンした。スキャンされた画像にて、下顎骨が自動的に設定される計算範囲 (Fig. 1 : L1 + L2 + L3) の中心になるように、コンピュータ上で位置を調整した。その後、移植部を含んだ近遠心的に幅約 $20\text{mm}$ の関心領域を設定し (Fig. 1 : L2), 設定した関心領域の面積 ( $\text{cm}^2$ ), BMC (g), BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) をコンピュータ上で自動解析し、各パラメータの平均値を実験群ごとに求めた。全測定において、最初に設定した関心領域と同一の領域で解析を行った。

## 6. 元素分析

軟 X 線撮影と骨塩定量が終了した下顎骨を、

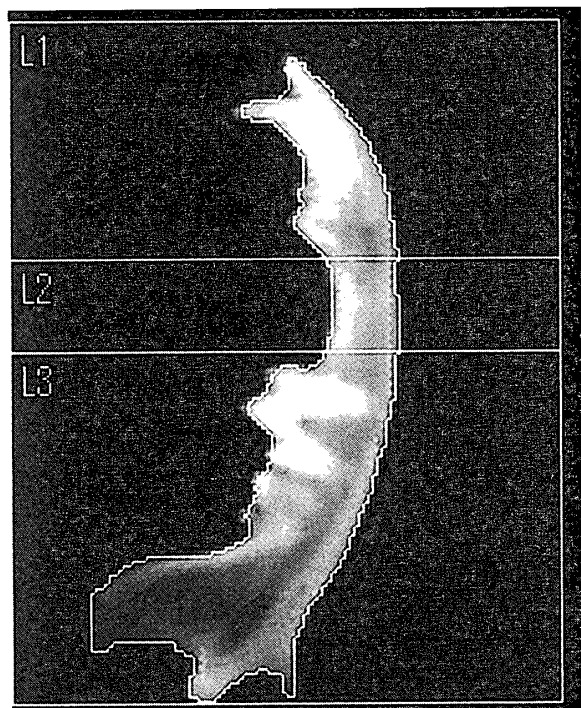


Fig.1. Region of interest (ROI) in bone mineral determination. L1, L2 and L3 were global ROI setting automatically. ROI of L2 was about  $20\text{mm}$  wide including implants.

低速切断機 (ISOMET®, Buehler 社) にて移植部を近遠心的に約 $20\text{mm}$ の幅で切断した。切断した骨片の一部をさらに $1\text{mm}$ の厚さに切断し、元素分析の試料とした。薄切試料を $20\text{ml}$ の生理食塩水の入った $50\text{ml}$ のコニカルチューブ (CORNING 社) に入れ、攪拌器上で1時間ずつ計2回、洗浄を行った。その後、試料を $40^\circ\text{C}$ のホットプレート上で十分に乾燥した。1個の薄切試料から移植周辺部を2つに分け、電子天秤でそれぞれ $5\text{mg}$ になるように秤量した。秤量した試料を専用テフロン容器に移し、硝酸 (和光純薬)  $200\mu\text{l}$ 、内部標準元素としてインジウム (和光純薬)  $5\mu\text{l}$ を加え、 $200\text{W}$ の電子レンジにて2分間加熱、電子レンジ内にて1分間の自然冷却後さらに2分間加熱し、硝酸灰化を行った<sup>12)</sup>。その後、電子レンジからテフロン容器を取り出し、 $20\sim 25$ 分間自然冷却を行った。硝酸灰化を行った試料を厚さ $4\mu\text{m}$ のポリプロピレンフィルム3枚にそれぞれ $10\mu\text{l}$ 滴下し、十分に自然乾燥を行った。乾燥したフィルムを粒子励起 X 線分光法 (particle induced X-ray emission, 以下 PIXE 法と略す) を用いた小型サイクロン (MCY-1750, 島津製作所) にて含有元素を定量的に測定し、実験群ごとにその平均値を求めた。本研究では、検出された元素のうち、骨の主要な構成元素である  $\text{Ca}$ ,  $\text{P}$  などを含む準主要元素についてのみ検討を行った。

## 7. マイクロフォーカス X 線 CT 撮影

元素分析に使用しない骨片をマイクロフォーカス X 線 CT 装置 (SMX-225CT, 島津製作所) にて撮影した。骨片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、モニターを見ながらターンテーブルを移動させ試料の位置、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 $67\text{kVp}$ 、管電流 $230\mu\text{A}$ 、SOD $55\sim 60\text{mm}$ 、SID $398\text{mm}$ で行った。その後、ス

ライス間隔300 $\mu$ m, ビュー数2400分割, 平均回数4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で観察した。

## 8. 組織学的検索

マイクロフォーカス X 線 CT 撮影後, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, 移植部骨片の切り出しを頬舌方向に行った。その後, ギ酸・クエン酸ナトリウムで脱灰を行い, 通法に従いアルコール系列で脱水, キシレンに浸漬後, パラフィン包埋した。4  $\mu$ m の厚さで薄切を行い, H-E 染色を施し, 光学顕微鏡にて観察した。

## 9. 統計学的検討

骨塩定量, 元素分析における各パラメータの実験群ごとの平均値の検定は Mann-Whitney's U test を用いて統計学的処理を行い,  $P < 0.05$  を有意水準とした。

## 結 果

### 1. 軟 X 線所見

含有群では, 移植部は全体的に X 線不透過性を示すが, 移植底部は皿状に吸収されており, 梁状の新生骨が観察された (Fig. 2 a)。一方, 非含有群でも移植部は全体的に X 線不透過性を示すが, 含有群と比較して X 線不透過性が強く, 移植底部の皿状の吸収, 梁状の新生骨は不明瞭であった (Fig. 2 b)。また, 含有群,

非含有群ともに移植片と骨の境界は不明瞭であった。対照群では, X 線不透過性の強い線が抜歯窩に沿って認められるが, 抜歯窩上方は X 線透過像を示し, 抜歯窩と歯槽骨の判別は不可能であった (Fig. 2 c)。

### 2. 骨塩定量 (Table 1.)

関心領域の面積 (平均 $\pm$ 標準偏差) は, 含有群は  $2.75 \pm 0.59 \text{ cm}^2$  であり, 非含有群の  $2.38 \pm 0.04 \text{ cm}^2$  は, 対照群の  $2.90 \pm 0.12 \text{ cm}^2$  に比較し有意に低いことを認めた ( $p < 0.01$ )。BMC (平均 $\pm$ 標準偏差) は, 含有群が  $1.91 \pm 0.56 \text{ g}$  と, 非含有群の  $1.19 \pm 0.16 \text{ g}$  に比較し有意に高いことを認め ( $p < 0.05$ ), 非含有群は対照群の  $1.41 \pm 0.12 \text{ g}$  に比較し有意に低いことを認めた ( $p < 0.05$ )。BMD (平均 $\pm$ 標準偏差) は含有群が  $0.688 \pm 0.067 \text{ g/cm}^2$  と, 非含有群の  $0.552 \pm 0.004 \text{ g/cm}^2$ , 対照群の  $0.486 \pm 0.039 \text{ g/cm}^2$  に比較し有意に高いことを認め ( $p < 0.01$ ), 非含有群は対照群に比較し有意に高いことを認めた ( $p < 0.01$ )。

### 3. 元素分析 (Table 2)

Na, P, S, Cl, K の含有量の平均値では, 含有群, 非含有群, 対照群の間に有意差は認めなかった。Mg の含有量 (平均 $\pm$ 標準偏差) では, 含有群が  $0.63 \pm 0.10 \text{ mg/g}$  と, 非含有群の  $0.45 \pm 0.08 \text{ mg/g}$ , 対照群の  $0.43 \pm 0.12 \text{ mg/g}$  に比較し有意に高いことを認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。Ca

Table 1. Bone mineral measurement by DEXA

Experimental group	Bone mineral measurement (mean $\pm$ S.D.)		
	Area ( $\text{cm}^2$ )	BMC (g)	BMD (g/ $\text{cm}^2$ )
rhBMP-2 (+)	$2.75 \pm 0.59$	$1.91 \pm 0.56$	$0.688 \pm 0.067$
rhBMP-2 (-)	$2.38 \pm 0.04$	$1.19 \pm 0.16$	$0.552 \pm 0.004$
Control	$2.90 \pm 0.12$	$1.41 \pm 0.12$	$0.486 \pm 0.039$

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  : significant difference

BMC : Bone mineral content

BMD : Bone mineral density

Table. 2 Concentration value of submajor elements by PIXE

Experimental group	Concentration value (mean $\pm$ S.D.) (mg/g)						
	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca
rhBMP-2(+)	$1.36 \pm 0.42$	$0.63 \pm 0.10$	$38.79 \pm 11.78$	$0.31 \pm 0.09$	$1.55 \pm 1.46$	$0.33 \pm 0.08$	$171.72 \pm 19.02$
rhBMP-2(-)	$1.24 \pm 0.45$	$0.45 \pm 0.08$	$33.39 \pm 3.63$	$0.23 \pm 0.12$	$0.93 \pm 0.58$	$0.27 \pm 0.12$	$137.39 \pm 17.87$
Control	$1.07 \pm 0.30$	$0.43 \pm 0.12$	$34.59 \pm 7.84$	$0.24 \pm 0.07$	$1.31 \pm 0.64$	$0.31 \pm 0.04$	$140.98 \pm 12.91$

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  : significant difference

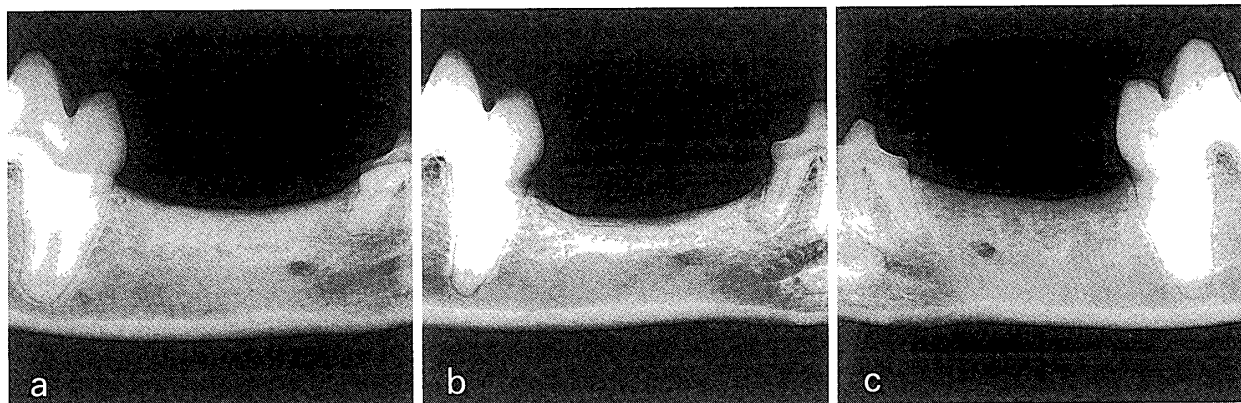


Fig. 2. Soft X-ray photograph of 3 months after implantation. The rhBMP-2 (+) group (a) displayed better absorption of implants and new bone formation than the rhBMP-2 (-) group (b). Bone tissue was observed inside of tooth extraction sockets in control group (c).

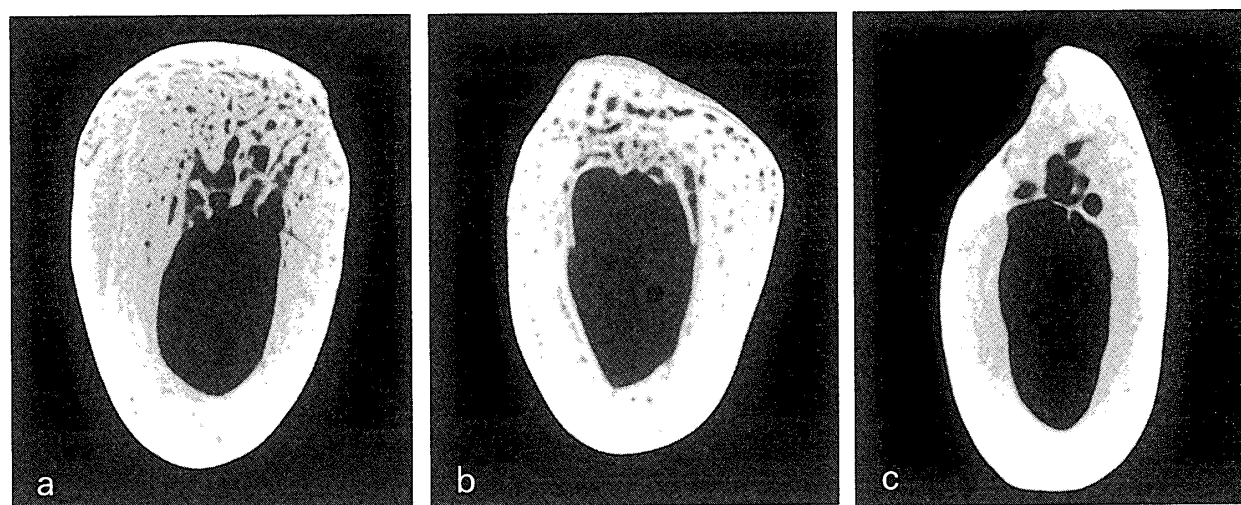


Fig. 3. Microfocus X-ray CT image of 3 months after implantation. The rhBMP-2 (+) group (a) displayed better absorption of implants and bone regeneration than the rhBMP-2 (-) group (b). Tooth extraction sockets was surrounded bone tissue in control group (c).

の含有量 (平均±標準偏差) では、含有群が  $171.72 \pm 19.02 \text{ mg/g}$  と、非含有群の  $137.39 \pm 17.87 \text{ mg/g}$ 、対照群の  $140.98 \pm 12.91 \text{ mg/g}$  に比較し、それぞれ有意に高いことを認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。

#### 4. マイクロフォーカス X 線 CT 所見

含有群 (Fig. 3 a), 非含有群 (Fig. 3 b) ともに移植部に  $\beta$ -TCP の気孔部分が観察されたが、含有群では非含有群に比較して気孔径の小さいものが多く観察された。含有群の移植部上方は丸味を帯びており、下顎骨全体の形態も滑らかであるのに対し、非含有群の移植部上方は、やや角張っている部分があり、下顎骨の形態もやや不整である像が観察された。また、含有群、非含有群ともに移植片と骨との境界は不

明瞭であった。対照群では抜歯窩と思われる像が観察されるが、周囲は骨皮質に囲まれていた (Fig. 3 c)。

#### 5. 組織学的検索

含有群では、 $\beta$ -TCP の気孔である腔が認められるが、気孔周囲にはハバース層板が形成されていた。また、ハバース層板の発達した骨組織に近い像も観察された (Fig. 4 a)。一方、非含有群では、大きな腔を多数認め、周囲のハバース層板の発達が悪く、一部に骨組織を認めるが、含有群と比較すると、全体的に幼弱な骨組織の像が観察された (Fig. 4 b)。対照群において、抜歯窩は全体的に成熟した骨組織に置換されていた (Fig. 4 c)。

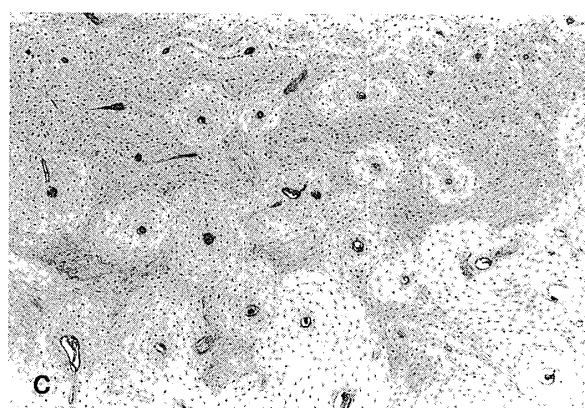
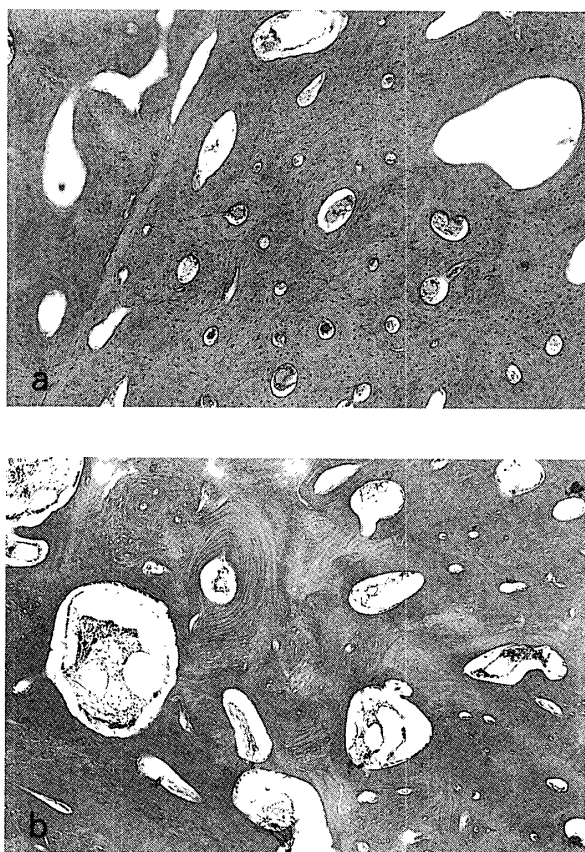


Fig. 4. Photomicrographs of histological sections at implants (H-E stain  $\times 100$ ). The rhBMP-2 (+) group (a) displayed better absorption of implants and new bone formation than the rhBMP-2 (-) group (b). Mature bone tissue was observed in control group (c).

## 考 察

1965年に Urist<sup>13)</sup> は、塩酸で脱灰した骨基質を筋肉内に移植すると、異所性に骨が作られることを証明した。これは、骨基質中には異所性に骨を誘導する因子が存在することを意味し、BMP の概念が提唱された<sup>14)</sup>。その後、1988年 Wozney et al.<sup>15, 16)</sup> が、遺伝子工学の手法を用いて、ヒト BMP の cDNA のクローニングに成功したことにより、BMP の構造が明らかとなり、rhBMP の作製が可能となった。これにより、BMP はトランスフォーミング成長因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , 以下 TGF- $\beta$  と略す) とアミノ酸配列で30~40%の相同性を持ち、TGF- $\beta$  スーパーファミリーの1つであることが明らかにされた<sup>15)</sup>。TGF- $\beta$  スーパーファミリーは、現在約40の因子がクローニングされているが<sup>17)</sup>、その中で BMP サブファミリーは最も多くの因子が存在し、その数は約20近くになる。ほとんどの BMP は in vivo で異所性に骨を形成する作用をもつが、それ以外に

も細胞の増殖や分化、アポトーシスの調節をするなど、初期の発生段階において重要な役割を果たしていることが明らかになり、BMP は多機能なサイトカインの一群と考えられるようになった<sup>18)</sup>。これまでに、BMP の有用性についてさまざまな報告<sup>9-11)</sup>がされてきたが、最適な担体の選択<sup>9, 18)</sup>、加齢による応答性の低下<sup>20)</sup>などの問題点も報告されている。

### 1. rhBMP-2 の担体について

骨の形成に関与する要素として、久保木ら<sup>19)</sup>は細胞、基質 (細胞外マトリックス)、ミネラル・イオンを含む体液、細胞間シグナル因子 (制御因子) の4大物質要素ほかに、メカニカルストレスがあると述べている。この中で基質の骨における役割として、細胞の支持、基質どうしの相互反応、石灰化誘導能、微量活性物質との結合、メカニカルストレスへの対応があると述べている。rhBMP-2 は、それ自身を単独で移植してもすぐに拡散し、体内に吸収されてしまうため、その効果が得られない。そのため、rhBMP-2 を局所に留め、徐放していくために基質つまり担体が必要となる。これまでの研究で、rhBMP-2 の骨形成能が担体の種類に大きく影響されるという、担体依存性が明らかにされている<sup>9, 19)</sup>。榎本<sup>9)</sup>は担体の要件として、細胞

接着性、血管と標的細胞の供給を確保できるような構造と機械的強度、BMP ならびに他の生体分子に対する親和性、生体適合性、生体内吸収性の 5 つを挙げている。これまでの rhBMP-2 に関する研究も効率的な担体の開発を中心に行われている<sup>21-30)</sup>。rhBMP-2 の担体には、不溶性骨基質<sup>21, 22)</sup>、コラーゲン<sup>23, 24)</sup>、ポリ乳酸<sup>9, 10, 25, 26)</sup>、HA<sup>27, 28)</sup>、 $\beta$ -TCP<sup>11, 29, 30)</sup> など、さまざまなものが用いられてきた。コラーゲン、ポリ乳酸は生体内で良好な被吸収性を示し、rhBMP-2 の徐放も良好であるため、これまで多くの研究が行われている。しかし、コラーゲン、ポリ乳酸には骨誘導能が無い。また、HA は生体親和性、強度、骨伝導能などは優れているものの、吸収されにくいため生体内に長期残存し、異物や感染源となることや、破折する可能性がある。これらに比べ  $\beta$ -TCP は、コラーゲン、ポリ乳酸よりは吸収速度が遅いこと、HA に比較すると生体親和性がやや劣ることなどの欠点はあるものの、生体内に吸収され骨に置換される性質を持っていること<sup>31)</sup>、BMP の活性も阻害しないこと<sup>32, 33)</sup>から、本研究の担体とした。

## 2. 骨塩定量について

DEXA 法は、2 つの異なるエネルギーピークを有する X 線を試料に照射し、X 線強度減弱率から軟部組織量の影響を補正し、骨塩量を求める方法である<sup>34)</sup>。当教室では過去に基礎的研究として<sup>125</sup>I を用いた単一光子吸収法による抜歯創治癒過程<sup>35)</sup>、骨創治癒過程<sup>36)</sup>ならびに骨創治癒に及ぼす低 Ca 食の影響<sup>37)</sup>の検討、DEXA 法を用いたヒト下顎骨の健常者と慢性腎不全患者の骨塩量の比較検討<sup>38)</sup>と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<sup>39)</sup>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。これらの研究の結果より、本研究では rhBMP-2 を用いた骨再生において、骨の再生状態の評価の指標として骨塩定量が応用できるのではないかと考えた。

本研究では、骨塩定量の関心領域を移植部を含めた範囲に設定した。これは、小さい関心領域を設定した場合、測定部位による誤差が生じ

やすくなり、精度に問題がでるためである。また、対照群は抜歯後、骨欠損を作製しないものとした。これは、これまでの研究で抜歯後12週以降は極端な骨塩量の変化がないこと<sup>35, 39)</sup>、当該部位に植立する歯の骨塩量に対する影響を排除するためであった。また、移植後の観察期間を12週としたのは、 $\beta$ -TCP の残存量は12週で約半分以上<sup>31)</sup>になるとの報告があり、骨の再生状況が把握し易いと考えたためである。なお、面積、BMC については移植片の有無により測定値が変化するため、本研究においては、BMD の結果についてのみ考察した。

HA、 $\beta$ -TCP のような人工生体材料は無機質成分から構成されているため、BMD は高い値を示す。しかし、本研究では X 線学的、組織学的に含有群より多くの  $\beta$ -TCP が残存していると思われる非含有群で BMD は低い値を示した。このことは、 $\beta$ -TCP の吸収過程において、材料自身からカルシウム塩が溶解してくことで移植部の無機質成分が減少することに起因していると考えられる。そのため、含有群は非含有群より  $\beta$ -TCP の残存量は少ないが、新生骨の形成量が多いため BMD が高い値を示したのではないかと推測された。

## 3. 元素分析について

PIXE 法は、測定試料の複雑な化学処理の必要が無く、少量の試料から多種類の元素を短時間で同時に定性、定量分析することができ、かつ分析精度が高い測定方法である<sup>40)</sup>。

本研究では、骨の主要構成成分である Ca、P を含む準主要元素に注目して検索を行った。その中で、Mg と Ca において、含有群は非含有群、対照群に比較し有意差を示した。最近、Mg が細胞間接着力の向上に関係しているとの報告<sup>41)</sup>や、Mg を添加したアパタイトにおいて、骨芽細胞の付着量が多いとの報告<sup>42)</sup>もあることから、 $\beta$ -TCP においても骨との接着に関し、Mg が何らかの関与をしている可能性が考えられ、今後、より詳細な検討が必要であると思われる。また、Ca については、骨塩定量の項で述べたように、 $\beta$ -TCP の吸収様式と新生骨の形

成量により、含有群が非含有群より高い値を示したと推測された。

#### 4. X線学的検索方法について

硬組織のX線学的検索方法として軟X線撮影は一般的に行われている方法であるが、マイクロフォーカスX線CTを用いた検索方法は報告例が少ない<sup>43, 44)</sup>。本研究で用いたマイクロフォーカスX線CT装置は、現在幅広く医療用に使われているCT装置とは異なり、試料をターンテーブル上で回転させながら試料のX線透過像をあらゆる角度からとらえて、撮像データをコンピュータに蓄積し、断層像を再構成して表示する仕組みとなっている。ターンテーブルは垂直方向に移動ができ、任意の位置で断層像を得ることができる<sup>45)</sup>。さらに通常のCT装置の空間分解能が数100 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ 以下と優れている<sup>46)</sup>。これは、焦点の大きさが極めて小さい場合、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。このため、試料の微細な構造を非侵襲的に観察することが可能であるが、回転ステージに乗せられないような大型の試料での撮影ができないこと、撮影時間が撮影条件によっては数時間と長くなるために生体での観察には向いていないなどの欠点がある。

本研究において、含有群の軟X線写真で、移植底部にX線透過像が観察され、マイクロフォーカスX線CT像では、皮質骨の部分に小腔はあまり認められず、骨髓腔の上方に不規則な腔が観察された。 $\beta$ -TCPはX線不透過性を示すため、マイクロフォーカスX線CT像の不規則な腔は $\beta$ -TCPの気孔ではなく、骨の新生により骨髓腔あるいは骨に置換されている途中であると推測された。また、軟X線写真でX線不透過性を示した移植部のマイクロフォーカスX線CT像では、独立した小腔が多数観察され、これは逆に、 $\beta$ -TCPの気孔であると推測された。同様に非含有群の軟X線像では移植部のX線透過性は不明瞭であり、マイクロフォーカスX線CT像では、小腔が多数観察さ

れ、 $\beta$ -TCPの残存が推測された。組織所見で観察されたハバース管などの微細な腔は、対照群のマイクロフォーカスX線CT像が示すように観察することはできなかった。しかし、 $\beta$ -TCPの気孔のようなある程度の大きさの腔は、マイクロフォーカスX線CT像にも観察することができ、骨の再生状態の把握が可能であったと考えられた。これらのことから、マイクロフォーカスX線CTは非侵襲的に骨の内部構造を観察することができ、本研究のみならず、硬組織研究に有用であると考えられた。

本研究において、rhBMP-2を使用した骨再生は良好であった。現在、rhBMP-2を用いた骨再生の臨床試験の結果が報告され<sup>47, 48)</sup>、その安全性と有効性が確認されている。しかし、適切な担体、骨形成に適したrhBMP-2の濃度など明らかになっていないことがあり、今後さらなる研究が必要であると思われる。

## 結 論

rhBMP-2を用いたビーグル犬下顎骨骨欠損に対する骨再生の有用性に関する検討を、DEXA法による骨塩定量、PIXE法による元素分析、軟X線撮影、マイクロフォーカスX線CT撮影、組織学的観察を用いて行い、以下の結論を得た。

1. DEXA法による骨塩定量において、移植部を含めた関心領域のBMDは、含有群が非含有群、対照群に比較し有意に高いことを認めた( $p < 0.01$ )。このことから、含有群は非含有群より新生骨の形成量が多いことが推測された。
2. PIXE法による元素分析において、MgとCaの含有量は、含有群では非含有群と比較し( $p < 0.05$ )、また対照群と比較し( $p < 0.01$ )有意に高いことを認めた。新生骨の形成促進に、骨の主要な構成元素であるCaの取込量の増加が寄与していることが推測された。
3. 軟X線写真、マイクロフォーカスX線CT像、組織像から含有群は $\beta$ -TCPの残存を認めるが、非含有群に比較し、良好な移植片の吸収と骨の再生が観察された。

4. 以上のことより、ビーグル犬下顎骨骨欠損に対する rhBMP-2 の適用が骨再生の促進に有効であることが示唆された。

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関山三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究の遂行に際しご助言を頂きました当講座杉山芳樹助教授に深く感謝致します。さらに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サイクロトロンセンター世良耕一郎助教授、日本アイソトープ協会滝沢研究所二ッ川章二部長、ならびに本学歯科放射線学講座小豆島正典助教授に深謝致します。併せて本研究の遂行にご助言を頂きました星 秀樹講師に深く感謝するとともに口腔外科学第二講座医局員各位に心より謝意を表します。合わせて本研究を行うにあたり、rhBMP-2 を提供してくださいました山之内製薬に心から感謝致します。

本論文の要旨は第47回日本口腔外科学会総会(2002年11月1日、札幌市)において発表した。

本研究の一部は文部科学省私立大学ハイテク・リサーチ・センター補助金を受けて行った。

## 文 献

- 1) John, F. S., Alexander, S. C., and Frank, H. Jr. : Autogenous bone graft for post-prostatectomy incontinence. *J. Urol.* 99 : 656-659, 1868
- 2) Donald, L. L., and Mutaz, B. H. : Craniofacial and mandibular osseous contour reconstruction : The use of a new combination graft. *Laryngoscope* 86 : 1879-1885, 1976.
- 3) Aro, H. T., and Aho, A. J. : Clinical use of bone allografts. *Ann. Med.* 25 : 403-412, 1993.
- 4) Yaszemski, M. J., Payne, R. G., and Hayes, W. G., Langer, R., and Mikos, A. G. : Evolution of bone transplantation : molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17 : 175-185, 1996.
- 5) Sturb, J. R., Gaberthuel, T. W., and Firestone, A. R. : Comparison of tricalcium phosphate and frozen allogenic bone implants in man. *J. Periodontol.* 50 : 624-629, 1979.
- 6) Baldock, W. T., Hutchens, Jr. L. H., Mcfall, W. T., and Simpson, D. M. : An evaluation of tricalcium phosphate implants in human periodontal osseous defects of two patients. *J. Periodontol.* 56 : 1-7, 1985.
- 7) Blitterswijk, C. A., Bakker, D., Grote, J. J., and Daems, W. T. : The biological performance of calcium phosphate ceramics in an infected implantation site : II. Biological evaluation of hydroxyapatite during short-term infection. *J. Biomed. Mater. Res.* 20 : 1003-1015, 1986.
- 8) 田畑泰彦：細胞増殖因子と生体再生、遺伝子医学, 5 : 111-114, 2001.
- 9) 榎本昭二：骨形成因子の歯科臨床への応用, 歯医学誌, 15 : 5-17, 1996.
- 10) Toriumi, D. M., O'Grady, K., Horlbeck, D. M., Desai, D., Turek, T. J., and Wozney, J. M. : Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2 : long-term follow-up in a canine model. *Laryngoscope* 109 : 1481-1489, 1999.
- 11) Laffargue, P., Hildebrand, H. F., Raimate, M., Frayssinet, P., Amoureux, J. P., and Marchandise, X. : Evaluation of human recombinant bone morphogenetic protein-2-loaded tricalcium phosphate implants in rabbits' bone defects. *Bone* 25 (2 Suppl) : 55S-58S, 1999.
- 12) Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Saitou, S., and Sera, K. : Present status of NMCC and sample preparation method for bio-samples. *Int. J. PIXE.* 3 : 319-328, 1993.
- 13) Urist, M. R. : Bone formation by auto-induction. *Science* 150 : 893-899, 1965.
- 14) Urist, M. R., and Strates, B. S. : Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.* 50 : 1392-1406, 1971.
- 15) Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M. and Wang, E. A. : Novel regulators of bone formation : Molecular and activities. *Science* 242 : 1528-1534, 1988.
- 16) Wang, E. A., Rosen, V., Cordes, P., Hewick, R. M., Kriz, M. J., Luxenberg, D. P., Sibley, B. S., and Wozney, J. M. : Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 : 9484-9488, 1988.
- 17) Derynck, R., and Feng, X. H. : TGF- $\beta$  receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333 : F105-150, 1997.
- 18) Hogan, B. L. : Bone morphogenetic proteins : multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10 : 1580-1594, 1996.
- 19) 久保木芳徳, 滝田裕子, 小野一郎：骨形成蛋白質(BMP)を応用した骨の組織工学原理, 臨床外科, 56 : 61-74, 2001.
- 20) Fleet, J. C., Cashman, K., Cox, K., and Rosen, V. : The effects of aging on the bone inductive activity of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Endocrinology* 137 : 4605-4610, 1996.

- 21) Syftestad, G. T., and Urist, M. R. : Bone aging. *Clin. Orthop. Rel.* 162 : 288-297 1982.
- 22) Sampath, T. K., and Reddi, A. H. : Homology of bone-inductive proteins from human, monkey, bovine, and rat of the extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80 : 6591-6595, 1983.
- 23) Hanisch, O., Tatakis, D. N., Boskovic, M. M., Rohrer, M. D., and Wikesjo, U. M. : Bone formation and reosseointegration in peri-implantitis defects following surgical implantation of rhBMP-2. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 12 : 604-610, 1997.
- 24) Okubo, Y., Bessho, K., Fujimura, K., Kusumoto, K., Ogawa, Y., Tani, Y., and Iizuka, T. : Comparative study of intramuscular and intraskeletal osteogenesis by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 87 : 34-38, 1999.
- 25) Marukawa, E., Asahina, M., Oda, M., Seto, I., Alam, Md., and Enomoto, S. : Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 31 : 287-295, 2002.
- 26) Seto, I., Asahina, I., Oda, M., and Enomoto, S. : Reconstruction Of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 59 : 53-61, 2002.
- 27) Yoshida, K., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Kusumoto, K., Ogawa, Y., and Iizuka, T. : Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects. *J. Dent. Res.* 78 : 1505-1510, 1999.
- 28) Noshi, T., Yoshikawa, T., Dohi, Y., Ikeuchi, M., Horiuchi, K., Ichijima, K., Sugimura, M., Yonemasu, K., and Ohgushi, H. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 potentiates the in vivo osteogenic ability of marrow/hydroxyapatite composites. *Artif. Organs* 25 : 201-208, 2001.
- 29) Urist, M. R., Lietze, A., and Dawson, E. :  $\beta$ -tricalcium phosphate delivery for bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.* 187 : 277-280, 1984.
- 30) Benz, H., Nathan, R. M., Rosen, D. M., Armstrong, R. M., Thompson, A. Y., Segarini, P. R., Mathews, M. C., Dasch, J. R., Piez, K. A., and Seneidin, S. M. : Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone. *J. Biol. Chem.* 264 : 20,805-20,810, 1989.
- 31) 森川 茂 : 人工骨充填材としての高純度  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) と hydroxyapatite との比較検討, 慈恵医大誌, 115 : 193-207, 2000.
- 32) 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.
- 33) 三枝樹明道 :  $\beta$ -リン酸三カルシウム-骨形成因子複合体の骨形成能, 愛院大歯誌, 28 : 43-58, 1990.
- 34) 曾根照善 : X 線吸収法 (DXA 法), 日本臨床, 60 (増刊 3) : 192-196, 2002.
- 35) 橋場友幹 : 抜歯創治癒過程の  $^{125}$  I-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.
- 36) 岩崎浩二郎 : 犬下顎骨々創治癒過程の  $^{125}$  I-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.
- 37) 坂岡丈利 : 犬下顎骨骨創治癒過程の  $^{125}$  I-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.
- 38) 佐藤重信 : Dual energy x-ray absorptiometry によるヒト下顎骨骨塩定量に関する研究, 岩医大歯誌, 16 : 1-14, 1991.
- 39) 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.
- 40) 岩田吉弘 : 粒子励起 X 線分光法 (PIXE 法), 日本臨床, 54 : 221-227, 1996.
- 41) de Chateau, M., Chen, S., Salas, A., and Springer, T. A. : Kinetic and mechanical basis of rolling through an integrin and novel  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent rolling and  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent firm adhesion modalities for the  $\alpha 4 \beta 7$ -MAdCAM-1 interaction. *Biochemistry* 40 : 13972-13979, 2001.
- 42) Yamasaki, Y., Yoshida, Y., Okazaki, M., Shimazu, A., Uchida, T., Kubo, T., Akagawa, Y., Hamada, Y., Takahashi, J., and Matsuura, N. : Synthesis of functionally graded  $\text{MgCO}_3$ apatite accelerating osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* 62 : 99-105, 2002.
- 43) Shibata, T., and Nagano, T. : Applying very high resolution microfocus X-ray CT and 3-D reconstruction to the human auditory apparatus. *Nature Medicine* 8 : 933-935, 1996.
- 44) 須永一洋, 佐藤香子, 貝津 徹, 佐藤友則, 北島佳代子, 五十嵐勝 : マイクロフォーカス X 線 CT 装置を用いたヒト下顎小臼歯の過剰根管の解剖形態, 日歯保存誌, 45 : 133-139, 2002.
- 45) 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, 6th Symposium on "MATE", (抄), 85-90, 2000.
- 46) 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.
- 47) Cochran, D. L., Jones, A. A., Lilly, L. C., Fiorellini, J. P., and Howell, H. : Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in oral applications including the use

- of endosseous implants : 3-year results of a pilot study in humans. *J. Periodontol.* 71 : 1241-1257, 2000.
- 48) Selvig, K. A., Sorensen, R. G., Wozney, J. M., and Wikesjo, U. M. : Bone repair following recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulated periodontal regeneration. *J. Periodontol.* 73 : 1020-1029, 2002.