

# バイオマテリアルによる骨欠損部における組織再生の試み

## *Approach of tissue regeneration in bone defect with biomaterials*

市原伸恒, 浅利昌男, 松井久実

麻布大学大学院獣医学研究科

Nobutsune Ichihara, Masao Asari, Kumi Matsui

Nobutsune Ichihara, Masao Asari, Kumi Matsui

**Abstract.** The approaches for the bone tissue engineering in the maxillary region of veterinary density is receiving the attention as a means of restoring the bone defects caused by the disease such as serious periodontitis. The challenges of bone tissue engineering with the use of biomaterial or cytokines have proved their effects. In this study, we used the basic fibroblast growth factor (bFGF) with three different kinds of biomaterials, non-absorbable bio-glass, hydroxyapatite, and beta-tricalcium phosphate, as the sources of bone tissue engineering and filled in the artificial pocket of dental extraction. The effectiveness of each biomaterial was evaluated radiographically and histologically. None of the biomaterials showed signs of clinical abnormalities through out the time of experiments. Moreover, all of the biomaterials showed osteoanagenesis and regeneration of new bones, with some difference of effectiveness dependent on the site of filling. The inflammatory responses at the site of biomaterial filling were neither observed. Thus, these results indicate that each biomaterial not only have advantage on biocompatibility but also shows effectiveness as a source of bone tissue engineering in combination with bFGF.

### 1. 目 的

1950年代から歯周疾患に対して種々の歯根膜および歯槽骨の再生治療が開発されてきたが、獣医歯科学への試みはヒト歯科学への実験的な研究にとどまり、プラークコントロールの困難さ、飼い主への経済的な負担、適応症選択能力を含む術者の技術習得不足などから、一般臨床への応用は遅れている。このため、獣医歯科学における顎顔面領域の骨組織再生治療の試みは、歯周病治療より、嚢胞や腫瘍切除後に骨欠損部が生じた症例や重度歯周炎による病的骨折部の骨組織再生、あるいは重度歯周疾患罹患歯の抜歯に伴う顔面の変形や二次的骨折を回避する手段として注目されている<sup>1)</sup>。その手段として、Bm

(Biomaterial ; 以後, Bm) を組織工学的観点から scaffold (足場) として用いた骨組織の再生治療が数多く検討されている。Bm は生体構成要素と直接あるいは間接的に接触させ、生体の障害された部位を修復するために用いられる材料で、Hydroxyapatite (以後, Ha),  $\beta$ -tricalcium phosphate (以後,  $\beta$ -TCP), Bioglass (以後, Bg) などのセラミック材や、チタンなど様々なものが開発されている<sup>2)</sup>。また、Bm と同時に埋入する細胞増殖因子として働くサイトカインも研究されており、その効果が証明されている<sup>1)</sup>。サイトカインとしては骨形成蛋白 Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)、塩基性線維芽細胞成長因子 basic fibroblast growth factor (以後, bFGF) などが知られている。特に bFGF は強力な血管新生作用と間葉系

細胞の増殖誘導能を有するサイトカインであり、歯槽骨欠損部を作製し炎症を誘起した犬にbFGFを局所投与すると、早期に新生歯槽骨、新生歯根膜、新生セメント質が観察され、歯周組織再生が誘導、促進された報告がある<sup>3)</sup>。骨欠損部の再生を担う骨補填材の中では自家骨移植が最も優れているが、自家骨を得るには健常部への外科的侵襲が必要となることから大きな欠点となっている。これに比べBmは骨組織の再生を助ける、あるいは速やかに促す役割(骨伝導材)でしかなく、高い生体適合性や強度が要求されるが、生体を侵襲することなく得ることができる。組織再生工学の側面から考えると、骨補填材としてのBmはサイトカインを運ぶ担体として、また、同時に骨芽細胞や血管が3次元構造を作り上げるための足場として重要な役割を果たす<sup>1)</sup>。本研究は、bFGF存在下で非吸収性のHa、Bgあるいは吸収性の $\beta$ -TCPを用いて骨再生を促し、各Bmの骨再生時の特性について明らかにするものである。

## 2. 材料と方法

供試動物：

健康なビーグル犬(体重10 kg, 年齢2歳, 雄)3頭を使用した。搬入後一週間飼育した後、実験を行い、その後3ヶ月間飼育した。

埋入方法：

a. BmならびにbFGFの埋入

両側の上顎犬歯(以後、C)、下顎第三切歯(以後、I3)、下顎第一M1(以後、M1)に処置を施した。右側はコントロール側として、左側はHa、 $\beta$ -TCP、BgのいずれかのBmとbFGFを埋入し実験側とした。埋入時の処置は次の通りである。①埋入前に歯石除去、X線撮影を行った。②左Cを抜歯し、欠損部に止血剤を充填し、歯槽骨に骨欠損部を作製した。その後bFGFとBmを埋入し、歯肉を寄せて縫合した。③左I3を抜歯した後、抜歯窩のC側の歯槽骨に骨欠損部を作製して、欠損部に止血剤を充填後、bFGFとBmを埋入し、歯肉を寄せて縫合した。④左M1を抜歯し、欠損部に止血剤を充填後、歯槽骨に骨欠損部を作製して、bFGFとBmを埋入し、歯肉を寄せて縫合した。bFGFは、Bmと共にI3抜歯窩に50  $\mu$ l、M1抜歯窩・C抜歯窩に100  $\mu$ lずつ挿入した。⑤コントロール側(右側)も実験側(左側)と同様の手技で骨

欠損部を作製し、骨欠損部形成後は止血剤のみを充填し、歯肉を引き寄せて縫合を行った。⑥全箇所処置後にX線撮影を行った。

観察方法：

a. 術後から毎日身体検査を行い、一般状態の異常の有無を確認した。

b. X線による撮影

X線撮影は処置前と処置後に加え、14日後、28日後、42日後、56日後、70日後、90日後の計8回行った。歯科用X線撮影装置(TEXCO DENTAL X-RAY UNIT:(株)東京エンジン工業)を用いて、平行法、二等分面法にて処置を施した部位を撮影し、観察した。

c. 組織観察

90日間飼育後の犬を全身麻酔後、放血死させた後、頭部を10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定した。処置部位を採材し、数日間10%中性緩衝ホルマリン溶液にて再固定した。実験側は非脱灰標本(研磨標本)を、コントロール側は非脱灰標本と脱灰標本(パラフィン切片)を作製した。非脱灰標本はポリエステル樹脂包埋後、脱灰標本はパラフィン包埋後、研磨あるいは薄切を行った。得られた切片はHE染色を施して観察に供した。

## 3. 結果と考察

a. 一般状態：

本実験に用いた全ての個体において抜歯窩の歯肉を中心とする口腔内、全身状態に異常所見は認められなかった。

i) Bgの埋入実験

b. X線所見：3部位共に42日経過後にBg顆粒が明確に確認できなくなった。また、3部位共に90日経過後で抜歯窩の透過性は実験側がコントロール側より低かった(Fig. 1)。

c. 組織観察：①Cの抜歯窩中央では、Bg顆粒周囲にはコントロール側では見られない、赤褐色に染まる多くの線維性結合組織が見られ、それはBg顆粒と周囲新生骨との間を結ぶように存在していた。②C以外の部位では、Bg顆粒周囲を新生骨が取り囲んでいた③C、I3では、新生骨量が実験側のほうが多かった。④M1では新生骨量に明瞭な差は見られな

った。⑤炎症性反応は見られなかった (Fig. 4)。

一般状態に異常が無かったこと、Bg埋入を施した全部位で炎症性の組織像がなかったことから、Bgの生体親和性は高く、また、Bgは機械的強度が劣るとされるが<sup>4,5)</sup>、今回は全く臨床上問題なく90日間飼育できたことから、強い衝撃が患部に加わる事故などがなければ機械的強度に問題はないと考えられる。X線所見において42日経過後にBg顆粒が明確に確認できなくなったが、Bgは非吸収性のBmであることから、Bg顆粒周囲に骨組織などが再生し、Bg顆粒間を埋めたものと思われる。また、90日経過時点で、実験部位3部位共にコントロール側より、実験側抜歯窩の透過性が低かったことは、実験側ではコントロール側より多くの骨組織が再生したと考えられる。組織観察ではBg周囲に骨再生、線維形成が起こっていたことから、Bgが担体ならびに足場としての役割を果たし、bFGFがBgの存在下において組織再生を促す生理活性物質として働いたことが示唆される。M1では実験側とコントロール側間に大きな差が無かったが、X線所見よりM1においても実験側では多くの骨組織が再生したと考えられる。Bg粒子は滑らかな砂のような形をとっており、多くの体液を保持しておくことができる。今回の実験でBg顆粒周囲に新生骨、線維性結合組織が形成されていたことから、Bg顆粒は、投与されたbFGFと生体中の多くの体液を保持していたと思われる。Bg顆粒周囲にHydroxycarbon-ateapatite層が形成され、それが鉱物化しつつある骨と組み合わせ、Bmと骨組織との間に安定した結合を作ることが報告されている<sup>6)</sup>。今回の実験でも実験側Cで見られたような多くの線維性結合組織をBg顆粒周囲に形成していたこと、その線維性結合組織が周囲新生骨との間を生めるように存在していたことから同様な機序が生じていたと示唆される。実験側C中央部においてのみBg顆粒周囲は多量の線維性結合組織で占められていたが、その他の部位では、Bg顆粒周囲は新生骨でほぼ満たされており、多くの線維性結合組織は認められなかった。このような組織所見の違いは、骨欠損部の大きさ、Bgの充填されている位置に左右されるのではないかと思われる。歯周疾患の場合、歯槽骨は強い骨吸収を起こしていることが多く、本実験よりBgとbFGFを利用することは、本来の歯槽骨の形態

を保持するために効果が期待できるものと考えられる。

#### ii) Haの埋入実験

b. X線所見：本実験終了時までHA顆粒が認められた。X線所見上ではコントロール側、実験側において顕著な差は見られなかった (Fig. 2)。

c. 組織観察：①コントロール側では抜歯窩中央部で新生骨が見られず、線維性結合組織で占められていたのに対し、実験側では抜歯窩中央部にもHA顆粒を取り囲むように、新生骨と線維様構造物が形成されていた。③C抜歯窩全体の新生骨量を比較すると、実験側の方がやや多く形成されていた。M1においても実験側の方が抜歯窩全体を占める新生骨の割合は高かった。④I3では、新生骨の増生は他の抜歯窩に比べると少なく、線維性結合組織の方が優勢であった。新生骨量は実験側でやや多い傾向であった。⑤炎症性反応は見られなかった (Fig. 4)。

今回のX線所見では手術後90日目までHA顆粒が確認された。HAのような非吸収性の骨補填材に期待されることは、骨欠損部に機械的強度を与え、生体との高い親和性を持つことである。今回、実験期間を通じて実験犬に全身的、局所的な異常所見は見られなかったこと、組織観察ではHA顆粒に直接多くの新生骨や線維様組織が結合、形成されていたこと、炎症像などが無かったことから、HAは生体親和性、骨親和性があると考えられる。いずれの抜歯窩においても、新生骨は実験側のほうがコントロール側より多く認められた。犬の下顎骨に骨欠損部を形成し、そこにHAを充填した場合、HAの周囲の血管や骨の新生が早期(術後1ヶ月)から開始され、活発に進行することがわかっている<sup>7)</sup>。実験側に多くの新生骨形成が見られたのは、bFGFによって誘導された新生骨が、HA顆粒を足場として、コントロール側よりも早期に新生骨を形成したことによると考えられる。骨欠損部に対するbFGFおよびHAの利用は、本来の歯槽骨の形態、強度を早期に保持するため、臨床上において効果が期待できることが示唆される。

#### iii) $\beta$ -TCPの埋入実験

b. X線所見：実験側I3, M1抜歯窩では、手術後14

日において、手術直後より透過性の高まる部位が確認された。実験側のほうがコントロール側より透過性の低い部分の広がり早く、また、 $\beta$ -TCPの存在部位周囲から透過性の低下が認められ、実験終了時の抜歯窩透過性も低かった (Fig. 3)。

c. 組織観察：①いずれの抜歯窩においても実験側では大小不同の $\beta$ -TCP顆粒が抜歯窩に確認された。 $\beta$ -TCP顆粒を核とするように新生骨に取り囲まれ、 $\beta$ -TCPと新生骨の間には何もなく直接結合しているように見えた。②炎症像などは確認されなかった。③M1の実験側では $\beta$ -TCPを核とする新生骨周囲のみ線維様構造物が確認できた。コントロール側では線維性結合組織が抜歯窩上部の一部にのみ認められた。新生骨量は大きな差は見られなかった。④Cの実験側は $\beta$ -TCPを核とする新生骨が多く存在しているが、コントロール側の非脱灰標本では線維様構造物、脱灰標本では線維性結合組織が多く確認された。④実験側I3の、浅部では線維様構造物が $\beta$ -TCPを核とする新生骨の周囲に多かった。深層では $\beta$ -TCPを核とする新生骨は周囲の新生骨と結合していた。コントロール側では線維性結合組織はあまり確認されなかった (Fig. 4)。

本実験では、処置後において歯肉の発赤など肉眼所見の変化は見られず、組織観察でも $\beta$ -TCPに対する炎症反応を示す所見は見られなかった。また、X線所見より吸収が起きていることから $\beta$ -TCPの生体親和性は高いと考えられ、組織観察で $\beta$ -TCP顆粒と新生骨が直接結合しているように観察出来ることより骨親和性も高いと考えられる。実験側I3, M1抜

歯窩では、手術後14日において、手術直後より透過性の高まる部位が確認されたが、 $\beta$ -TCP顆粒の吸収により、透過性の亢進したためと思われる。組織観察においてC抜歯窩で、実験側で新生骨が多く確認できたことは、 $\beta$ -TCPの骨伝導能<sup>1)</sup>とbFGFの骨誘導能<sup>1)</sup>によるものと考えられる。疎にBmを充填すると線維性結合組織が介在することがあるとする報告があり<sup>8)</sup>、第三切歯抜歯窩において新生骨量がコントロール側のほうが多かったことは疎にBmを充填したことによると示唆される。 $\beta$ -TCPが吸収されることから力学的脆弱性はあるものの、本実験では飼育期間中に異常を起こさなかったことから、 $\beta$ -TCPは充填後早期のケアを怠らなければ強度の不安はないと考えられ、 $\beta$ -TCPの臨床応用の可能性が高いことが示唆される。

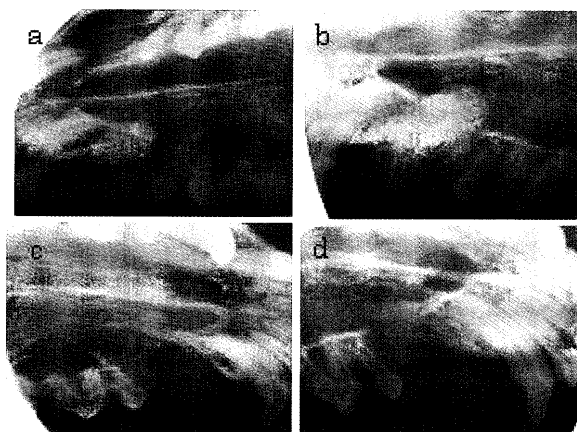


Fig. 2 X-ray photographs defect with hydroxyapatite at 90 days after treatment. a,b: contral. c,d: defect filled with Hydroxyapatite.

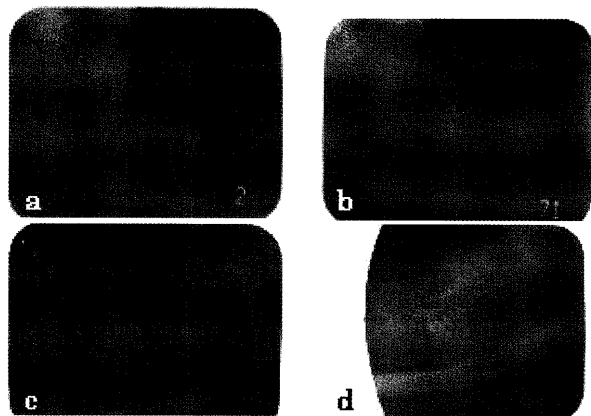


Fig. 1 X-ray photographs defect with bioglass at 90 days after treatment. a, b: contral. c, d: defect filled with bioglass.

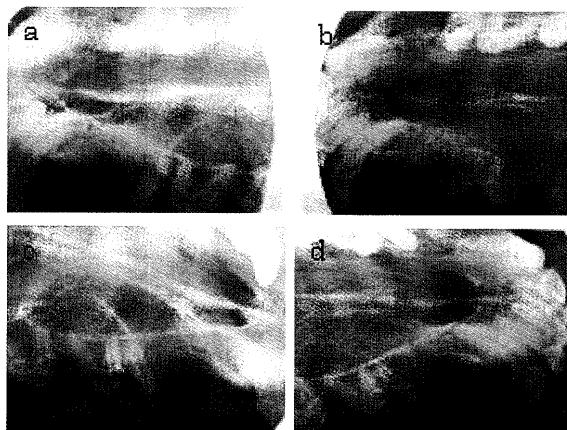


Fig. 3 X-ray photographs defect with  $\beta$ -TCP at 90 days after treatment. a,b: contral. c,d: defect filled with  $\beta$ -TCP.

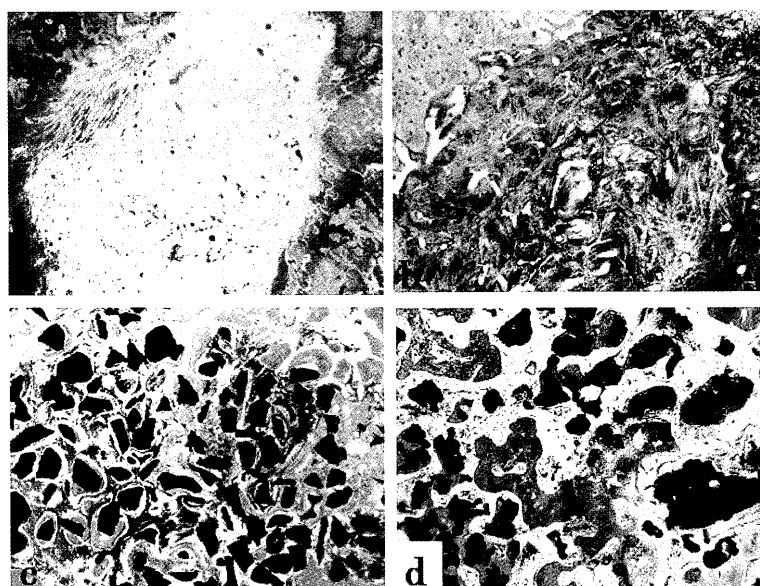


Fig. 4 Photomicrograph of pockets of dental extraction canines in canines at 90 days after treatment. a; control. b; Bioglass. c; Hydroxyapatite. d;  $\beta$ -TCP

#### 4. 要約

獣医歯科学における顎顔面領域の骨組織再生治療の試みは、重度歯周炎などによる骨欠損部を補う手段として注目されている。現在までにバイオマテリアルやサイトカインを用いた骨組織の再生治療が検討され、その効果が証明されている。本実験は細胞増殖因子として basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) を、バイオマテリアルとして非吸収性のバイオガラス、ハイドロキシアパタイト、吸収性の  $\beta$ 三リン酸カルシウムを、人工的に作製した犬顎骨抜歯窩に埋入し、放射線学的ならびに組織学的に評価し、各バイオマテリアルの有効性を検討した。その結果、実験期間を通して臨床状態に異常は見られなかった。放射線学的ならびに組織学的評価において、実験部位により差はあるものの、バイオマテリアル埋入部位で骨再生が促進され、多くの新生骨が再生していた。また、埋入したバイオマテリアルによる炎症反応は認めなかった。以上より、各バイオマテリアルは生体親和性に優れ、各バイオマテリアルと bFGF

を利用することは有用であると考えられた。

#### 文献

- 1) 奥田綾子, CAP. No.190. pp57-63. 2005. チクサン出版, 東京.
- 2) 筏義人. バイオマテリアルの開発. pp1-9, 25-42. シーエムシー出版, 東京.
- 3) Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al. J Periodont Res. Vol.38. pp97-103. 2003.
- 4) 土屋敏雄, 新井敦. 窯業協会紙 Vol.89. No.4. pp181-182. 1981.
- 5) 石原一彦, 畑中研一, 山岡哲二, 大矢裕一. バイオマテリアルサイエンス. pp39-43. 東京化学同人, 東京.
- 6) Charles R. Andreereg, Dvid C. Alexander and M. Freidman. J Periodontol. Vol.70. No.4. pp384-387. 1999.
- 7) Takayama S, Murakami S, Miki Y, et al. J Periodont Res 32 pp667-675. 1997.
- 8) 大串始. 奥村元昭. 吉川隆章. Orthopaedic Ceramic Implants. vol,9. pp143-146. 1991.