

骨形成蛋白質 (BMP) を用いた 顎骨再生の PIXE 分析

中谷寛之、石橋 修、中村ますみ、杉山芳樹、
関山三郎、二ッ川章二^{*1}、世良耕一郎^{*2}

岩手医科大学歯学部口腔外科学第二講座
020-8505 岩手県盛岡市中央通1-3-27

^{*1} (社)日本アイソトープ協会滝沢研究所
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森348-1

^{*2} 岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森348-58

1 はじめに

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^{1,2)}。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^{3,4)}から、ヒドロキシアパタイト (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⁵⁻⁷⁾。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⁸⁾。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⁹⁻¹¹⁾。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。そこで、本研究は rhBMP-2 を用いた顎骨再生における元素分析を粒子励起X線分光法 (particle induced X-ray emission, 以下 PIXE 法と略す) を用いて行った。

2 測定方法

2.1 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 のもとで固形飼料 (CD-5M, 日本クレア) と水道水を与えて飼育した。

2.2 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 μ m 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, pH 4.5) で溶解された rhBMP-2 100 μ g 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) 0.5 ml 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 0.5 ml 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。

2.3 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 25 mg/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, 周囲組織に障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 20 mm, 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G 10万単位の筋肉内注射を行った。実験群は, β -TCPをPIXE 法で元素分析を行う群を β -TCP、骨欠損作製後、何も挿入せず12週で屠殺する群をGroup1、骨欠損作製後、 β -TCPのみ挿入し12週で屠殺する群をGroup2、骨欠損作製後、 β -TCPとBMP-2を挿入し12週で屠殺する群をGroup3、骨欠損作製後、 β -TCPとBMP-2 を挿入し24週で屠殺する群をGroup4、の4群とした。移植12週もしくは24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, 移植部の骨再生の評価を行った。

2.4 PIXE 法

摘出した下顎骨を, 低速切断機 (ISOMET[®], Buehler 社) にて移植部を近遠心的に約 20 mm の幅で切断した。切断した骨片の一部をさらに 1 mmの厚さに切断し, 元素分析の試料とした。薄切試料を 20 mlの生理食塩水の入った 50 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 $^{\circ}$ 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 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 μ l , 内部標準元素としてインジウム (和光純薬) 5 μ l を加え, 200 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¹²⁾。その後, 電子レンジからテフロン容器を取り出し, 20 ~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 μ m のポリプロピレンフィルム3枚にそれぞれ 10 μ 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トロン (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。

2.5 統計学的検討

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, t検定を用いて統計学的処理を行い, $P < 0.05$ を有意水準とした。

3 結果

3.1 元素の検出数と検出率

準主要元素では, Na, P, Cl, Ca では全ての群で100%検出された。また, β -TCPでは, S, K が全く検出

されなかったのに対し，他の群では全群に検出された（表1）。微量元素では，Fe，Cu，Zn が全群から100% 検出された（表2）。超微量元素では，Br が全群から検出されたが， -TCPのみ50%で、他の群は100%であった（表3）。汚染元素では，Al，Sr が全群から検出され，Sr は100%検出された（表4）。本研究で検出された元素は， -TCP で19元素，Group1 で22元素，Group2 で21元素，Group3 で24元素，Group4 で20元素であった。その中で100%検出された元素は， -TCPで9元素，Group1で11元素，Group2で12元素，Group3で12元素，Group4で12元素であった。

表1 準主要元素の検出数と検出率

	-TCP		Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率
Na	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
Mg	3/6	50	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
P	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
S	0/6	0	5/6	83	6/6	100	6/6	100	6/6	100
Cl	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
K	0/6	0	6/6	100	6/6	100	3/6	50	6/6	100
Ca	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100

検出率：%

表2 微量元素の検出数と検出率

	-TCP		Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率
Si	0/6	0	0/6	0	0/6	0	1/6	17	0/6	0
V	2/6	33	1/6	17	0/6	0	1/6	17	2/6	33
Cr	2/6	33	4/6	67	1/6	17	0/6	0	2/6	33
Mn	0/6	0	1/6	17	0/6	0	0/6	0	0/6	0
Fe	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
Co	1/6	17	2/6	33	5/6	83	5/6	83	3/6	50
Ni	2/6	33	2/6	33	2/6	33	2/6	33	1/6	17
Cu	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
Zn	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
Se	0/6	0	2/6	33	2/6	33	1/6	17	1/6	17
Mo	3/6	50	2/6	33	0/6	0	1/6	17	1/6	17
Sn	2/6	33	0/6	0	0/6	0	1/6	17	0/6	0
I	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0

検出率：%

表3 超微量元素の検出数と検出率

	-TCP		Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率
Br	3/6	50	6/6	100	6/6	100	6/6	100	6/6	100
Rb	0/6	0	1/6	17	1/6	17	0/6	0	0/6	0
Cd	0/6	0	0/6	0	0/6	0	1/6	17	0/6	0

検出率：%

表4 汚染元素の検出数と検出率

	-TCP		Group 1		Group 2		Group 3		Group 4	
	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率	検出数	検出率
Al	6/6	100	4/6	67	5/6	83	2/6	33	4/6	67
Ti	0/6	0	0/6	0	0/6	0	6/6	100	0/6	0
Ga	0/6	0	2/6	33	0/6	0	0/6	0	0/6	0
Sr	6/6	100	6/6	100	6/6	100	0/6	0	6/6	100
Nb	0/6	0	0/6	0	1/6	17	0/6	0	0/6	0
Ru	1/6	17	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0
Ag	0/6	0	0/6	0	0/6	0	0/6	0	1/6	17
Hg	0/6	0	0/6	0	2/6	33	2/6	33	0/6	0
Pb	2/6	33	0/6	0	1/6	17	1/6	17	0/6	0

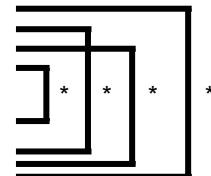
検出率：%

3.2 検出元素の有意差検定

今回検出された元素のうち検出数が多い元素について有意差の検定を行なった。準主要元素では、Na, Mg, Ca において Group 1 4 が -TCP に比較して有位に高い値を示した。Mg, Ca において rhBMP-2 を使用した Group 4 が rhBMP-2 を使用しない Group 2 に比較して有位に高い値を示した。Ca においては、Group 3 が Group 2 に比較して有位に高い値を示した（表5）。微量元素では、Zn において Group 4 が Group 1 に比較して有位に高い値を示した（表6）。超微量元素では、全群有意差を認めなかった（表7）。汚染元素では、-TCP が Group 1 4 に比較して有位に高い値を示した（表8）。

表5 準主要元素の測定値

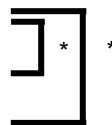
	Na			Mg		
-TCP	644.51	±	282.32	88.79	±	33.28
group 1	1,317.09	±	419.98 #	389.44	±	79.70 #
group 2	1,244.89	±	452.62 #	448.15	±	83.60 #
group 3	1,362.65	±	422.04 #	626.33	±	98.19 #
group 4	1,231.35	±	547.97 #	582.18	±	119.81 #



	P			S		
-TCP	57,464.87	±	31,824.34			
group 1	27,344.43	±	5,979.01 #	217.33	±	65.89
group 2	33,394.44	±	3,633.48 #	228.39	±	120.23
group 3	38,790.51	±	11,780.29	311.60	±	89.03
group 4	39,885.08	±	8,543.56	281.22	±	92.63

	Cl			K		
-TCP	231.94	±	147.43			
group 1	1,454.25	±	695.98 #	275.26	±	47.75
group 2	932.29	±	583.72	274.00	±	119.97
group 3	1,548.28	±	1,457.72	328.16	±	82.64
group 4	693.00	±	198.57 #	276.96	±	59.53

	Ca		
-TCP	205,086.73	±	51,721.83
group 1	129,353.26	±	17,496.15 #
group 2	137,394.81	±	17,868.66 #
group 3	171,718.59	±	19,017.18 #
group 4	160,257.28	±	30,648.49 #



単位：平均値 ± 標準偏差、μg/g
 #： -TCP との有差有、p<0.05
 *： p<0.05

表6 微量元素の測定値

		Fe		Cu		
-TCP	24.19	±	16.41	29.85	±	31.16
group 1	148.09	±	336.92	5.39	±	3.73 #
group 2	14.52	±	16.11	16.92	±	11.62
group 3	11.88	±	6.57	9.87	±	13.57 #
group 4	5.64	±	1.93	8.08	±	2.42 #

		Zn		
-TCP	67.45	±	66.26	
group 1	132.08	±	30.62	
group 2	161.23	±	42.77	#
group 3	210.22	±	104.96	#
group 4	163.37	±	52.89	#

単位：平均値 ± 標準偏差、μg/g
 #： -TCP との有差有、p<0.05
 *： p<0.05

表7 超微量元素の測定値

		Br	
-TCP	1.82	±	0.67
group 1	6.04	±	5.31
group 2	4.09	±	1.14
group 3	4.62	±	1.95
group 4	4.85	±	3.07

単位：平均値 ± 標準偏差、μg/g

表8 汚染元素の測定値

		Sr		
-TCP	169.42	±	32.33	
group 1	77.00	±	13.38	#
group 2	77.82	±	8.53	#
group 3	89.82	±	13.29	#
group 4	90.75	±	18.13	#

単位：平均値 ± 標準偏差、μg/g
 #： -TCP との有差有、p<0.05

4 考察

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¹⁰⁾。

本研究の結果では、Mg と骨の主要構成成分である Ca において、rhBMP-2 を使用した実験群が rhBMP-2 を使用しない実験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¹¹⁾ 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¹²⁾ もあることから、-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。-TCP は、材料中の Ca 塩が溶解していくことで吸収されていく¹³⁾。Group 2 4 が -TCP の Ca 量より低い値を示したのは、この吸収様式によるものである。しかし、rhBMP-2 を使用した Group 3 が rhBMP-2 を使用しない Group 2 の Ca 量より高い値を示したのは、rhBMP-2 の骨形成能による新生骨の形成

量が増加したものと考えられる。

本研究は、rhBMP-2 を用いた骨再生の元素分析を行った。これまでに、骨再生の PIXE 法を用いて元素分析を行った報告は無く、本研究の検体数も少ないため、今後さらなる研究が必要であると思われる。

参 考 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, 1968
- 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) 岩田吉弘: 粒子励起線分光法 (PIXE 法), 日本臨床, 54: 221-227, 1996.
- 11) de Chateau, M., Chen S., Salas, A., and Springer, T. A.: Kinetic and mechanical basis of rolling through an integrin and novel Ca²⁺-dependent rolling and Mg²⁺-dependent firm adhesion modalities for the alpha 4 beta 7-MAcAM-1 interaction. Biochemistry 40: 13972-13979, 2001.
- 12) 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 MgCO₃ apatite accelerating osteoblast adhesion. J. Biomed. Mater. Res. 62: 99-105, 2002.
- 13) 森川茂: 人工骨充填材としての高純度 β -tricalcium phosphate (β -TCP) と hydroxyapatite との比較検討, 慈恵医大誌, 115: 193-207, 2000.