

原 著

焼成温度の違いによる骨補填材としての  
炭酸含有アパタイトの臨床的有用性の検討

門 中 貴 義<sup>1)</sup> 田 邊 俊一郎<sup>1)</sup> 山 田 尚 子<sup>1)</sup> 長谷川 ユ カ<sup>1)</sup>  
近 藤 雄 三<sup>1)</sup> 高 橋 潤<sup>1)</sup> 江 原 道 子<sup>2)</sup> 永 山 元 彦<sup>2)</sup>  
田 沼 順 一<sup>2)</sup> 永 原 國 央<sup>1)</sup>

Evaluation on Clinical Usefulness of the Sinter Temperature Differences of  
Carbonate Apatite as Bone substitute

MONNAKA TAKAYOSHI<sup>1)</sup>, TANABE TOSHIICHIRO<sup>1)</sup>, YAMADA NAKO<sup>1)</sup>, HASEGAWA YUKA<sup>1)</sup>,  
KONDOU YUZO<sup>1)</sup>, TAKAHASHI JUN<sup>1)</sup>, EHARA MICHIKO<sup>2)</sup>, NAGAYAMA MOTOHIKO<sup>2)</sup>,  
TANUMA JUN-ICHI<sup>2)</sup>, NAGAHARA KUNITERU<sup>1)</sup>

歯科インプラント治療症例における高度の骨吸収や骨欠損に対し、骨再生療法が行われている。

骨再生療法としては骨再生誘導法（Guided Bone Regeneration: GBR）としてメンブレンテクニックが応用されているが骨造成量が多く必要な場合には、自家骨を始めとする骨補填剤が応用される。自家骨を応用する場合はその採取のための手術侵襲や、手術時間の延長などの問題があるため、人工骨補填材料が臨床応用されている<sup>3)</sup>。

人工骨補填材としてはハイドロキシアパタイト（HA）や $\beta$ -TricalciumPhosphate（ $\beta$ -TCP）等のリン酸カルシウム系材料が応用されてきた<sup>5)</sup>。しかし、HAは生体親和性に優れるが材料吸収性ではないため、生体内に残存する<sup>6)</sup>。また、 $\beta$ -TCPは生体内で吸収され、骨と置換する材料であるが<sup>7-9)</sup>、含有されている成分の中には生体親和性において問題が指摘されている。

このような問題点を改善すべく、DoiらとElliesは生体親和性に優れ、吸収性材料である炭酸含有アパタイト（Carbonated Apatite, CA）を開発した<sup>12-13)</sup>。そして、その優れた特性を活かした生体応用研究がこれまでに報告されてきた<sup>14)</sup>。

本研究では、ラット大腿骨を用いた動物実験モデルにおいて焼成温度の異なる（700℃ / 500℃）CA顆粒を人工骨補填材料として填入し、組織学的に評価し、さらに、吸着徐放性の検討も併せて行った。

実験結果では、500℃焼成と700℃焼成のCAの臨床応用を考慮すると、500℃では生体における材料吸収性が良い反面、骨形成開始や骨成熟に至る期間やCA顆粒の臨床的操作性においては700℃の方が良好であった。

以上の結果から臨床応用には700℃焼成のCA顆粒に、骨吸収や骨欠損部に対する人工骨補填材料としての期待ができる。また、CA顆粒とFGF2の併用は、至適濃度等の検討が必要ではあるが、骨形成や骨成熟を促進させることが示されたことから、同様に他の成長因子の併用による有用性も期待される。

キーワード：骨補填剤、炭酸含有アパタイト、骨造成、GBR、除放材

*For severe bone resorption and bone defects at dental implant treatment sites, bone augmentation treatment is required. For bone augmentation treatments such as guided bone regeneration (GBR), the membrane technique is most commonly applied, but bone substitute materials including autogenous bone*

<sup>1)</sup> 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座インプラント学分野

<sup>2)</sup> 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野  
〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851-1

<sup>1)</sup> Department of Oral Pathogenesis and Medicine, Division of Implantology

<sup>2)</sup> Department of Oral Pathogenesis and Medicine, Division of Oral Pathology, School of Dentistry, Asahi University  
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, JAPAN  
(平成30年5月15日受理)

are used when large quantities of bone are required. However, the collection of autogenous bone requires increased surgical invasiveness, and artificial bone substitute materials have therefore been applied clinically.

Calcium phosphate-based materials such as hydroxyapatite (HA) or  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) have been applied as artificial bone substitute materials. Although HA has superior biocompatibility, it remains in the living bone because it is not resorbable. In contrast,  $\beta$ -TCP is resorbable in vivo, as it is replaced with bone, but it has lower biocompatibility.

Doi and Ellies reportedly developed Carbonated Apatite (CA), which shows superior biocompatibility and is resorbable, and preliminary studies have reported superior characteristics in the living.

In the present animal experiment using rat femur to evaluate differences in sintered temperature (700°C /500°C), CA granules were used as an artificial bone substitute material, and were observed histologically for their absorption and controlled release characteristics.

The resorbability in the living body was good at 500° C, which we considered to be suitable for clinical application of CA, but 700° C was apparently better for early bone formation and maturity, as well as the clinical maneuverability of CA granules.

Based on these results, we concluded that for clinical application of CA granules, preparation at 700°C is optimal for severe bone resorption and bone defects at the dental implant treatment sites. In addition, the combination of CA granules and FGF-2 requires further study to determine optimal concentrations, and their usefulness in combination with other growth factors is expected because CA granules were shown to promote bone formation and bone maturity.

Key words : Bone Substitute, Carbonated Apatite, Bone Augmentation, GBR, Sustained Release Materials

## 緒 言

歯科インプラント治療はオッセオインテグレーションタイプのインプラントシステムの確立によって、咬合回復を目的とする治療効果の予知性が高まり、盛んに臨床応用が行われている。一方で高齢社会を迎えた日本では、歯科インプラント治療対象患者の高齢化も進み、加齢や歯周病による骨吸収や外傷による骨欠損を伴った症例に遭遇することも少なくない。このような骨吸収や骨欠損に対し、骨再生療法には自家骨を用いた処置が最も有用であるとされてきたが<sup>1,2)</sup> 自家骨採取のための処置が必要のため、手術侵襲の増大や、手術時間の延長など、様々な問題が残されている。そこで、自家骨にかわる人工骨補填材料を用いた骨増生処置が臨床応用されている<sup>3)</sup>。

人工骨補填材の骨欠損部への臨床応用にあたり、材料に具備される条件には、生体親和性と材料吸収性がある<sup>4)</sup>。これまで臨床では、ハイドロキシアパタイト (HA) や $\beta$ -TricalciumPhosphate( $\beta$ -TCP) 等のリン酸カルシウム系材料が応用されてきた<sup>5)</sup>。しかし、HAは生体親和性に優れるが材料吸収性ではないため、生体内に残存する<sup>6)</sup>。 $\beta$ -TCPは生体内で吸収され、骨と置換する材料であるが<sup>7-9)</sup>、含有されている成分の中には生体には存在しない物質が含まれているため、異物反応を示したという報告もあり<sup>10)</sup>、生体親和性において問題がある。さらに $\beta$ -TCPは、最終的に骨に置

換するとされているが、生体へ填入された後、6～9か月で27～39%が残留するという報告もあり<sup>11)</sup>、完全に吸収されるまでには長期間を要することから、インプラント体を埋入して正常なオッセオインテグレーションを得るには早期の骨への置換が求められる。

このような問題点を改善すべく、DoiらとElliesは生体親和性に優れ、吸収性材料である炭酸含有アパタイト (Carbonated Apatite, CA) を開発した<sup>12-13)</sup>。そして、その優れた特性を活かした生体応用研究がこれまでに報告されてきた<sup>14)</sup>。

本研究では、CAの臨床応用の可能性と、その人工骨補填材としての有用性を検討する目的にラット大腿骨を用いた動物実験モデルにおいて焼成温度の異なる(700°C /500°C) CA 顆粒を人工骨補填材料として填入し、組織学的に評価し、さらに、吸着徐放性の検討も併せて行った。使用したCAは渡辺らの報告をもとに500°Cおよび700°Cの温度で焼成した<sup>5)</sup>。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験動物は8週齢近交系 Wistar/Slc 雄性ラット (平均体重190.0±20.0g 中部科学資材, 名古屋) 64匹を室温22±2°C, 湿度55±5%, 12時間の照明サイクルで、各ケージは自由運動可能な環境とし、固形飼料 (MF<sup>®</sup>, オリエンタル酵母工業, 日本) や飲用水を自由摂取できる飼育環境とした。なお、動物実験は、朝日大学歯

学部動物実験倫理委員会（承認番号12-004）の指針に基づいて行い、実験操作に用いる器具は高圧蒸気滅菌処理後に使用した。

## 2. CA (Carbonate Apatite) 顆粒の作製

実験に際し、CA 顆粒は土井らの方法に準じて<sup>13)</sup>、6Mの炭酸二ナトリウムを含む1.2Mのリン酸二ナトリウム水溶液4ℓ中に2Mの硝酸カルシウム水溶液1ℓを2時間にわたり滴下し、pH 9.0±0.1を100℃（沸騰状態）で3日間維持しながら合成した。合成後の試料は沈殿、水洗を10回以上繰り返し、一昼夜乾燥させた。その後、炭酸ガス量を熱重量測定（TG）（Thermo plus, TMA-8120, Rigaku）で、炭酸イオン含有率が約12.5wt%の試料を予備加熱した後、500℃と700℃で1時間焼成処理した。焼成後、各試料を乳棒と乳鉢で粉碎し、メッシュサイズ300～500 $\mu$ mの篩にかけ、500℃焼成CA（CA500）あるいは700℃焼成CA（CA700）のCA実験試料とした（図1）。

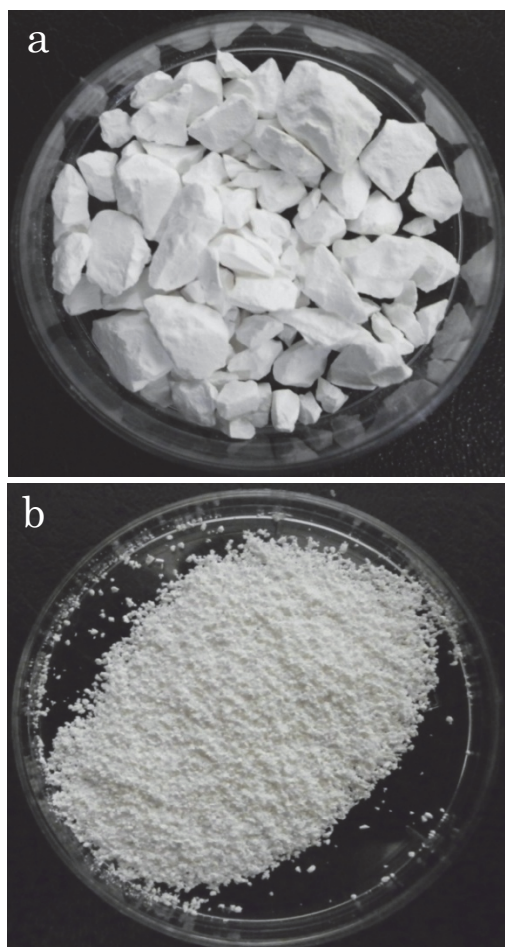


図1 CA 実験材料

a: 焼成後の精製されたCA

b: 粉碎後、300～500 $\mu$ m顆粒に整粒されたCA

焼成温度の違いによる炭酸含有アパタイトの有用性の検討

## 3. Fibroblast Growth Factor 2(FGF-2) の添加

FGF-2をCA500とCA700にそれぞれ含有させたCA顆粒を作製した。Human FGF-basic (Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, US) 50 $\mu$ g粉末を滅菌生理食塩水1mlに溶解し、濃度50 $\mu$ g/mlのFGF-2溶液10mlをCA20mgに滴下し、氷上で1時間浸漬させてそれぞれCA500FGF、CA700FGFとした（図2）。

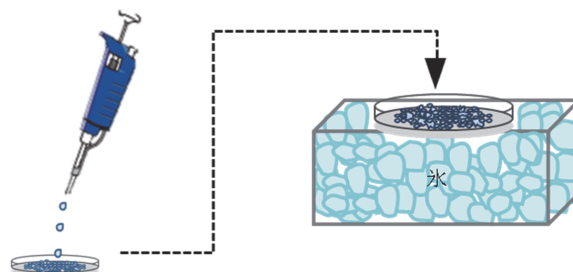


図2 CA 顆粒への FGF2の吸着操作

## 4. CA 顆粒の填入処置

ペントバルビタール（ソムノベンチル<sup>®</sup>、共立製薬、東京）を腹腔内（1ml/kg）へ投与し、全身麻酔下で、両側大腿部を除毛後、クロルヘキシジンで消毒し、大腿部皮膚に切開を加え、筋組織を避けながら大腿骨を露出させた。骨膜を剥離した後、大腿骨近位骨幹部で直径2.4mmの歯科インプラント用トレフィンバー（株デンテック、東京）で熱を加えないよう注水下で骨髓腔に達する骨欠損を形成した（図3-A）。鋭匙鉗子で骨髓を搔爬し、止血確認後、アマルガム充填器を用いて各種実験材料を、それぞれ、CA群ならびにFGF群の各個体に加圧填入した（図3-B）。

CA 顆粒填入後、速やかに筋組織および皮膚を4-0 ナイロン糸で縫合し、表面をヨードで消毒した後、デンタルエックス線写真でCA 顆粒の填入を確認後、抗菌薬（セファゾリン注<sup>®</sup> 明治製薬、5 $\mu$ g/ml）の筋注射を3日間行った。

## 5. 標本採取

填入処置後1、2ならびに4週経過までを実験期間として、それぞれの実験期間後のラットを全身麻酔下で10%ホルマリンによる灌流固定を行い、大腿骨を摘出し、同固定液に4℃で1晩浸漬して採取試料とした。

## 6. 観察方法

### 1) マイクロCT（ $\mu$ CT）による材料吸収性

骨欠損部に填入したCA 顆粒の経時的材料吸収性を評価するため、CA500群とCA 700群の填入処置直後を含めた各実験期間経過後の摘出した大腿骨をパラフィルム（富士理科工業、大阪）で覆い、乾燥を防止



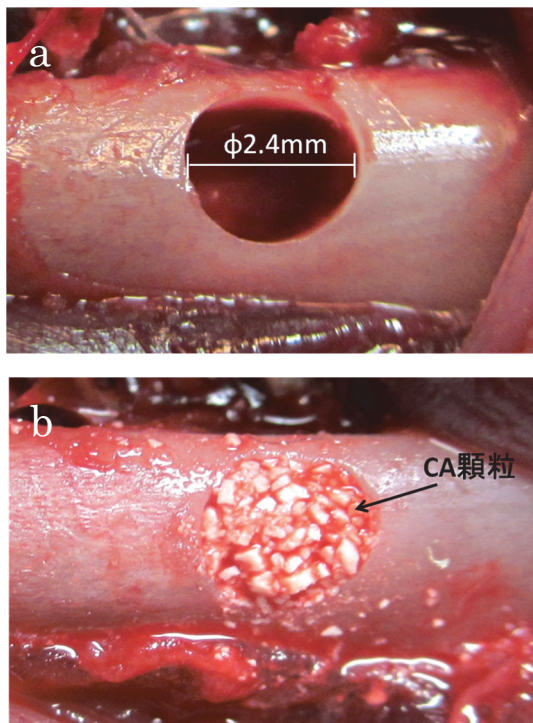


図3 ラット大腿骨 CA 顆粒填入処置  
a: トレフィンバーにて形成した骨欠損  
b: CA 顆粒填入後の状態

しながら、管電圧90.5kV、管電流87.5 $\mu$ A、幾何学的拡大率9.00倍、解像度11.1 $\mu$ m/pixelで $\mu$ CT (Scanmate-RB090SS150, コムスキャンテクノ, 横浜) 断層撮影を行った。なお、骨塩量計測ファントムも同一条件のもと撮影を行った。

骨欠損部の CA 体積は三次元画像解析ソフトウェア (TRI/3D-BONE RATOC System Engineering, 東京) を使用し、骨塩量計測ファントムと大腿骨試料の CT 値から大腿骨試料の骨密度 (BMD 値) を算出し、BMD 画像を作成した。なお、骨塩量計測ファントムは合成アパタイト / 合成樹脂の複合物: 200~800mg HA/ $\text{cm}^3$ , アルミ箔: 2437mg HA/ $\text{cm}^3$ , ヒトエナメル質: 3100mg HA/ $\text{cm}^3$  を標準物質とした。画像解析は BMD 画像上における骨欠損部の CA, 新生骨を含む領域を計測領域とし、計測領域のマニュアルトレースを行い、CA, 新生骨を含む全組織量 (計測組織量, TV) を抽出した。TV の中で BMD 値が445以上943mg/ $\text{cm}^3$ 未満の部位を新生骨とみなし、TV から新生骨を差し引いた BMD 値943mg/ $\text{cm}^3$ 以上のものを CA とみなし、CA 群の填入処置直後から各実験期間経過時点までの残存 CA の体積を算出した。なお、CA500群と CA700群における経時的減少率の有意差は Student *t* test ( $P < 0.05$ ) で評価した。

## 2) 組織標本の作製と観察

固定後の大腿骨試料は10%EDTA で4週間中性脱灰し、通法に従い、アルコール上昇系列にて脱水後、キシレンで置換、パラフィン包埋後、4 $\mu$ mの連続切片を作製した。

## 3) HE 染色による観察

CA 填入後の骨欠損部の修復過程を経時的に観察するため、各実験群の実験期間のパラフィン切片を通法に従って HE 染色後、光学顕微鏡で観察した。

## 4) TRAP 染色による観察

脱パラフィンした薄切切片を、下降アルコールで水和し、10 mM PBS で1時間洗浄した。続いて0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.0に浸漬した後、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, (TRAP) 溶液を滴下して常温1~2時間の発色反応後、0.01N 水酸化ナトリウム水溶液で反応を停止させ、水洗後、ヘマトキシリンによる対比染色を行った。

## 5) 免疫組織学的検索

脱パラフィン後に下降アルコールで水和し、PBS で洗浄した切片を、0.3%過酸化水素水にて組織中の内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。次に1%ウシアルブミン血清で30分間のブロッキング後に、骨芽細胞分化マーカーとする Osterix 抗体 (以下 OSX 抗体, rabbit polyclonal, 抗体濃度1.8 $\mu$ g/ $\text{mL}$ , Abcam Inc. Cambridge, UK) ならびに形成された骨細胞と骨小腔に存在するタンパクを骨成熟マーカーとして Dentin Matrix Protein-1 (以下 DMP-1抗体, rabbit polyclonal, 抗体濃度2.0 $\mu$ g/ $\text{mL}$ , TAKARA, Otsu) をそれぞれ室温で2時間反応させた。なお、DMP-1抗体反応前に、0.1% trypsin 処理 (37 $^{\circ}\text{C}$ , 15分) による抗原賦活化を行った。1次抗体反応後、PBS 洗浄を行い、ヒストファイニンシンプルステイン MAX-PO<sup>®</sup> (ニチレイバイオサイエンス, 東京) を HRP 標識2次抗体として常温で30分間反応させた。PBS 洗浄後、0.03% 過酸化水素水を活性化剤として含ませた濃度0.05%の 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Dako, 東京) を発色基質として5分間基質発色させ、ヘマトキシリンによる対比染色を行い、光学顕微鏡で組織を観察した。さらに、OSX については OSX 抗体陽性細胞数を高倍率3視野で計測し、CA500群と CA700群、CA500FGF 群と CA700FGF 群における OSX 抗体陽性細胞の有意差を Student *t* test ( $P < 0.05$ ) で評価した。

## 結 果

### 1. $\mu$ CT による CA 顆粒の経時的材料吸収性

CA500と CA700を填入直後から4週までの各実験期間における骨欠損部の一定範囲単位面積当たりの



CA 量を填入直後の CA 体積量を100%として算出し、その経時的減少率を求めた (図4)。

CA500群では填入直後から4週まではほぼ一定の割合でCA 顆粒が吸収され、4週では60%の吸収(残存CA 体積40%)を示した。一方、CA700群ではCA500群よりも緩徐なCA 顆粒吸収を示し、2週以降、わずかに吸収量増加を認めたが、4週では28%の吸収(残存CA 体積72%)であった。

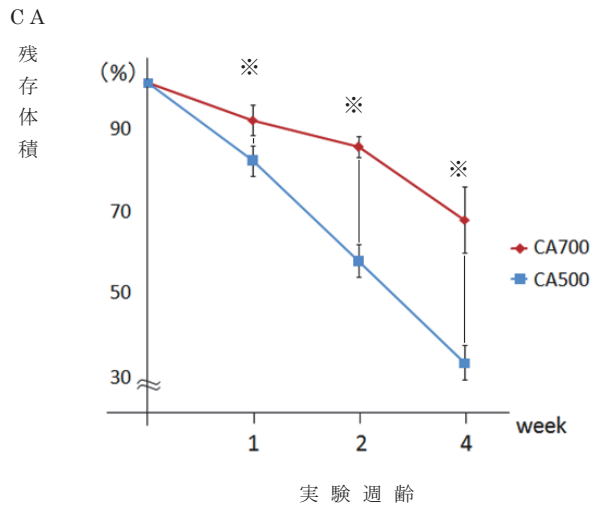


図4 CA の経時的吸収率±SD (※ P<0.05 student t test)

## 2. HE 染色の組織像

### 1) CA 群

填入処置後1週では、CA500群、CA700群の両群でCA 顆粒が線維芽細胞を主とする肉芽組織によって被包されており、このCA 顆粒周囲の肉芽組織とCA 顆粒との間に紡錘形、多角形あるいは多核を示す巨細胞の集族を認めた (図5c, d)。

填入処置後、2週では、CA 顆粒の吸収に伴い、CA 顆粒周囲ならびに間隙に増殖し始めた肉芽組織に接するCA 表面に未熟な新生骨の形成を認めた (図6c, d)。CA 顆粒の吸収はCA500群で大きく、一方、新生骨の骨梁はCA700 群で太く、CA 表面における骨芽細胞の分化も旺盛であった (図6d)。

填入処置後4週を経過すると、CA 顆粒は填入処置時と比べ、明らかなCA 顆粒の吸収を認め、その傾向はCA500群で顕著であった、(図7a, b)。

一方、CA500群、CA700 群の両群で、成熟骨の特徴である骨層板や骨細胞を容れた骨小腔を認めた。

### 2) FGF 群

填入処置後1週における FGF 群ではCA 群と同様にCA 顆粒の肉芽組織による被包や紡錘形、多角形あるいは多核を示す巨細胞の集族を認めたが、1週におけるCA 群と FGF 群間にその細胞数や形態に特異な差はみられなかった (図8c, d)。

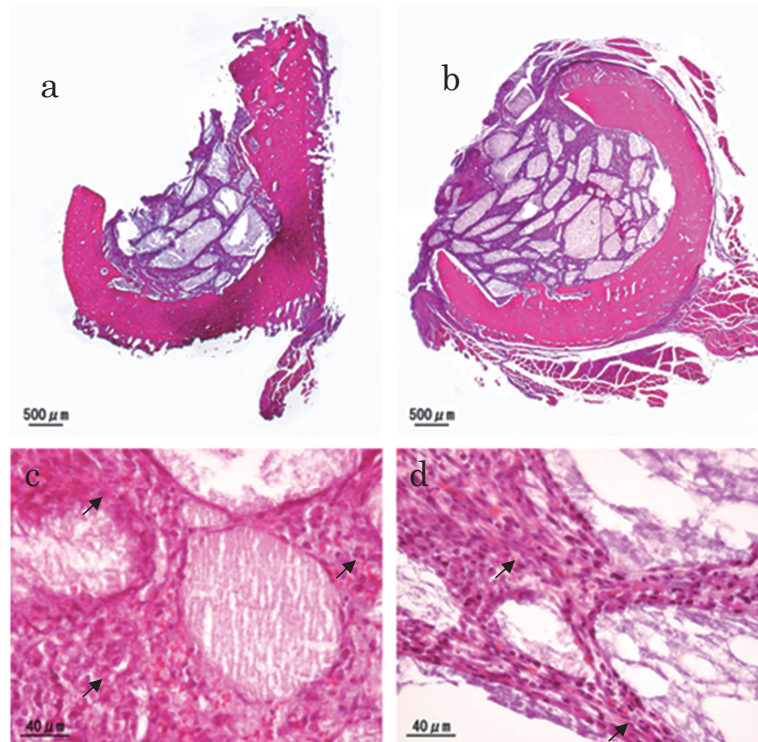


図5 填入処置後1週の組織像 (黒矢印：肉芽組織)

a : CA500の弱拡大, b : CA700の弱拡大, c : CA500の強拡大, d : CA700の強拡大.

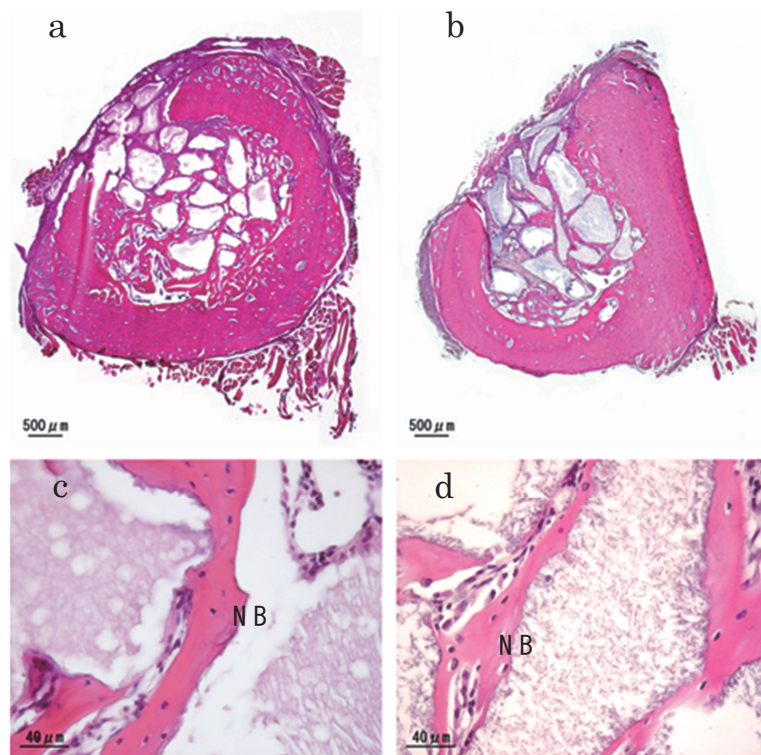


図6 填入処置後2週の組織像 (NB：新生骨)  
a：CA500の弱拡大, b：CA700の弱拡大, c：CA500の強拡大, d：CA700の強拡大.

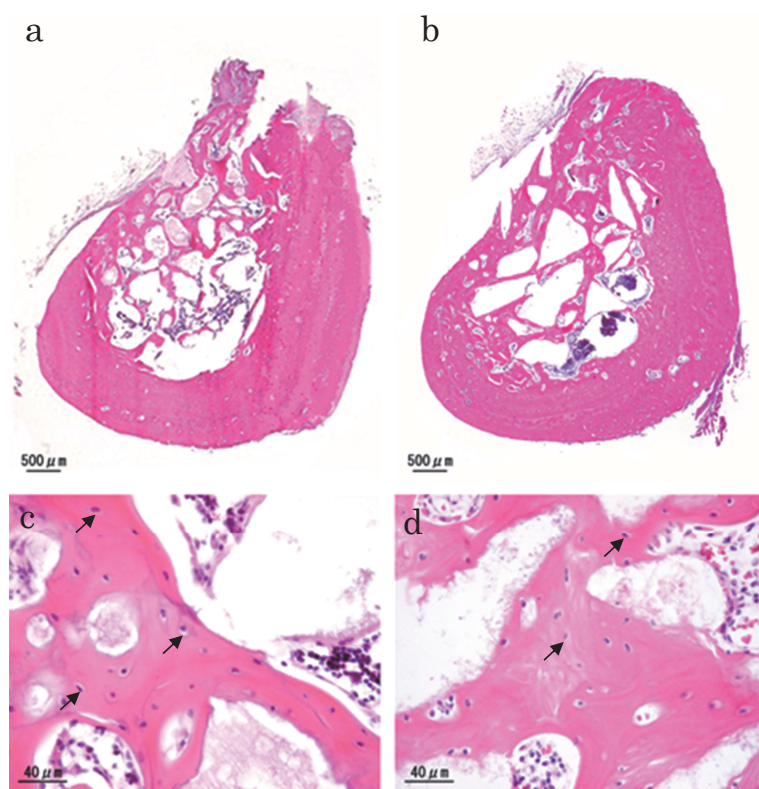


図7 填入処置後4週の組織像 (黒矢印：骨小腔)  
a：CA500の弱拡大, b：CA700の弱拡大, c：CA500の強拡大, d：CA700の強拡大.



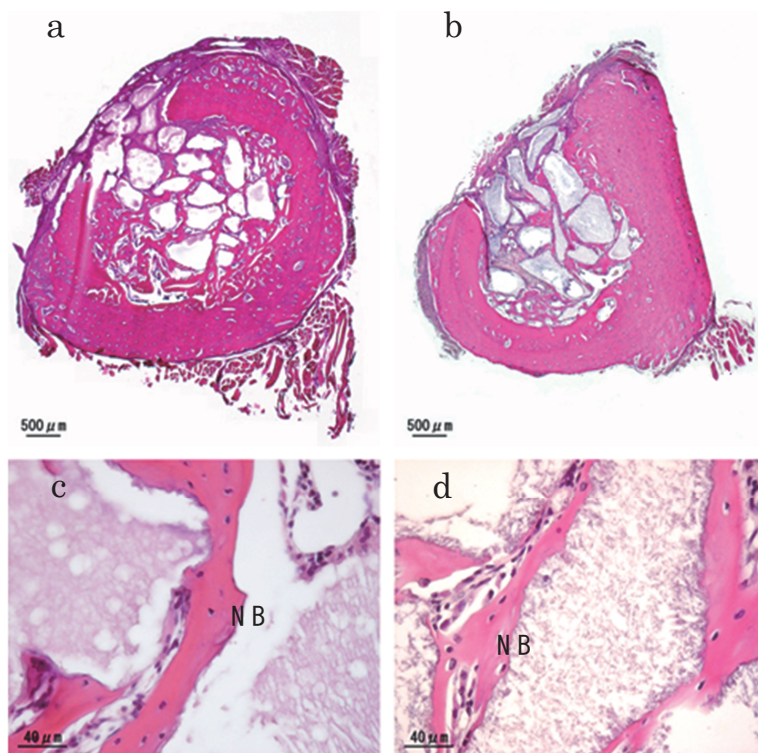


図8 FGF群填入処置後1週の組織像（黒矢印：多核巨細胞）  
a：CA500FGFの弱拡大，b：CA700FGFの弱拡大，c：CA500FGFの強拡大，d：CA700FGF強拡大。

填入処置後2週ではCA群と同様にCA顆粒周囲およびその間隙に未熟な骨形成がみられたが，その骨梁はCA群に比較して太く，骨小腔も多い傾向を示した。しかし，CA500FGFとCA700FGF間にはその差は認めなかった（図9c, d）。

填入処置後4週を経過すると，明らかな骨層板や多数の骨小腔が観察され，それらはCA群よりも多くみられた（図10b, d）。

さらに，CA700FGFでは骨のリモデリングにおける改造線もみられた（図10d）。

### 3. TRAP染色の組織像

μCT解析結果からCA500で吸収傾向が強く，さらに，填入処置後1週のHE染色所見においてCA顆粒と肉芽組織との境界部に多核を示す破骨細胞様細胞の集族を認めたため，これをTRAP染色で確認した結果（図11），多核の細胞はTRAP陽性を示し，CA500群ならびにCA500FGF（図11a, cでその数は多く，CA500FGF群（図11a）でその傾向は顕著であった。

### 4. 免疫染色の病理組織像

#### 1) OSXの発現と解析

填入処置後2週のCA表面における肉芽組織からの

骨芽細胞への分化をOSX抗体免疫染色で検索した。CA群，FGF群ともに焼成温度500℃よりも700℃でCA顆粒周囲の細胞核に陽性を示し，FGF群で多くの陽性細胞を認めた（図12）。

OSX抗体陽性細胞数を高倍率3視野で計測したところ，CA700群がCA500群よりも，また，FGF2群がCA群よりも有意にその発現を認めた。しかし，FGF2群ではCA500とCA700間に有意な差は認めなかった（図13）。

#### 2) DMP-1の発現

成熟した骨細胞，骨小腔や骨基質に発現を示すDMP-1はCA500群よりもCA700群で免疫染色によるタンパクの高発現を認めた。また，FGF群においても700℃で陽性発現が多く，CA700FGF群で最も多い陽性細胞を認めた（図14）。

## 考 察

骨再生による骨欠損部の創傷治癒には，一般的な組織の再生要素と同様，スキャフォールド，成長因子ならびに幹細胞という3要素が必要とされている<sup>15,16)</sup>。この場合のスキャフォールドとなる人工骨補填材には良好な骨伝導能とともに生体親和性，さらには臨床的操作性と材料吸収性を有していることが求められる<sup>9)</sup>。現在，臨床においてはHAやβ-TCP等のリン酸カル



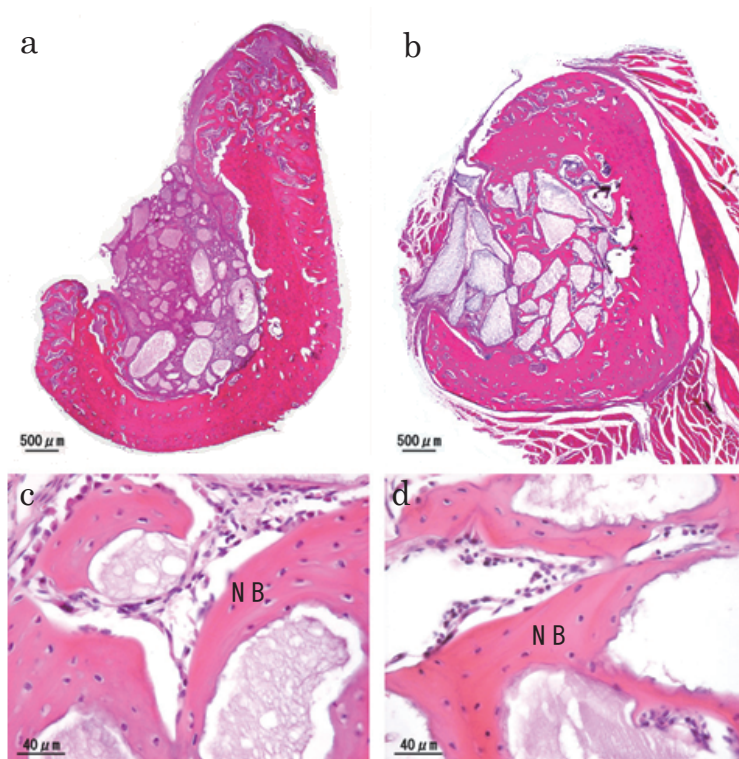


図9 FGF 群填入処置後2週の組織像 (NB：新生骨)  
a：CA500FGF の弱拡大, b：CA700FGF の弱拡大, c：CA500FGF の強拡大, d：CA700FGF 強拡大.

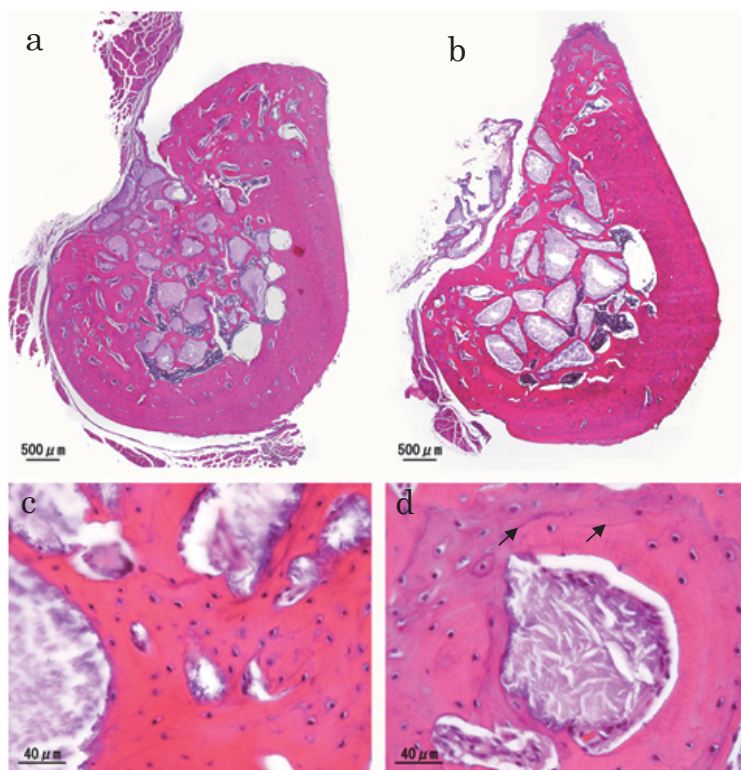


図10 FGF 群填入処置後4週の組織像 (黒矢印：改造線)  
a：CA500FGF の弱拡大, b：CA700FGF の弱拡大, c：CA500FGF の強拡大, d：CA700FGF 強拡大.

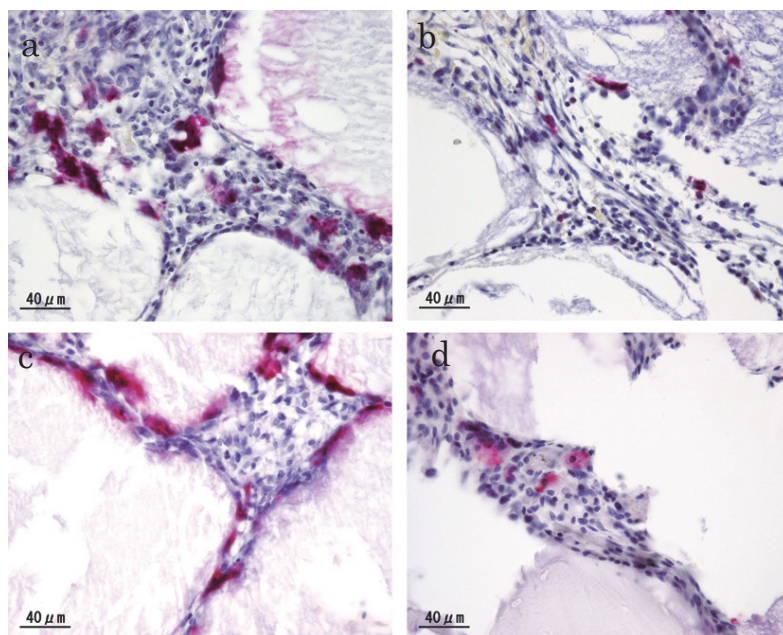


図11 填入処置後1週のTRAP染色組織像

a : CA500の強拡大, b : CA700の強拡大, c : CA500FGF の強拡大, d : CA700FGF 強拡大.

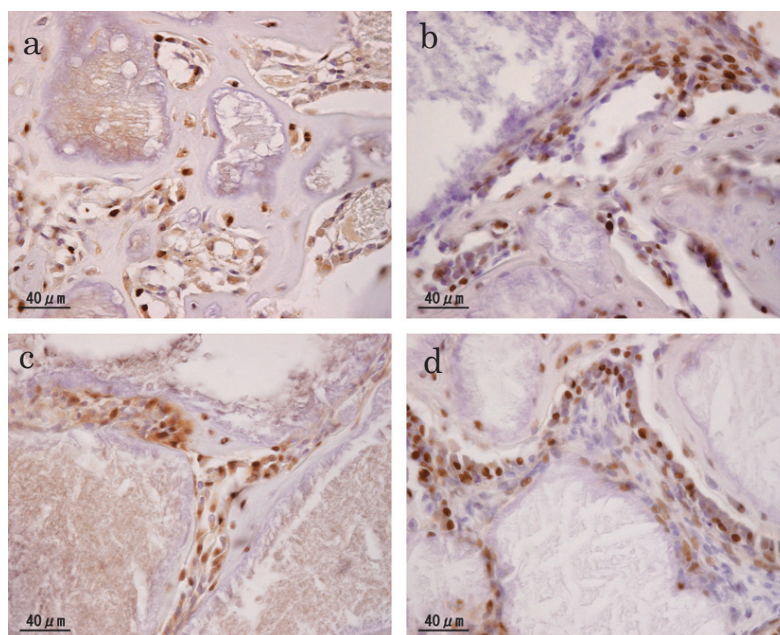


図12 填入処置後1週のOSX免疫染色組織像

a : CA500の強拡大, b : CA700の強拡大, c : CA500FGF の強拡大, d : CA700FGF 強拡大.



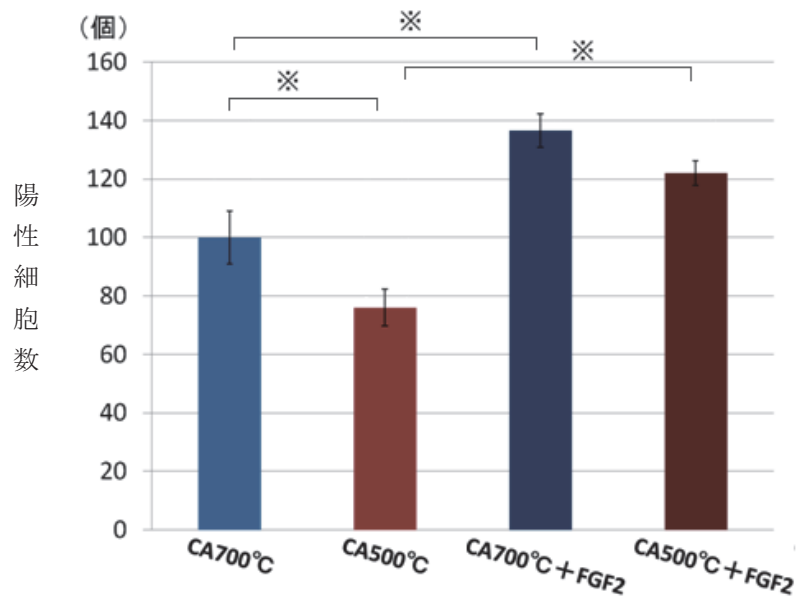


図13 各種材料の OSX 陽性細胞数 ± SD (※  $P < 0.05$  student  $t$  test)

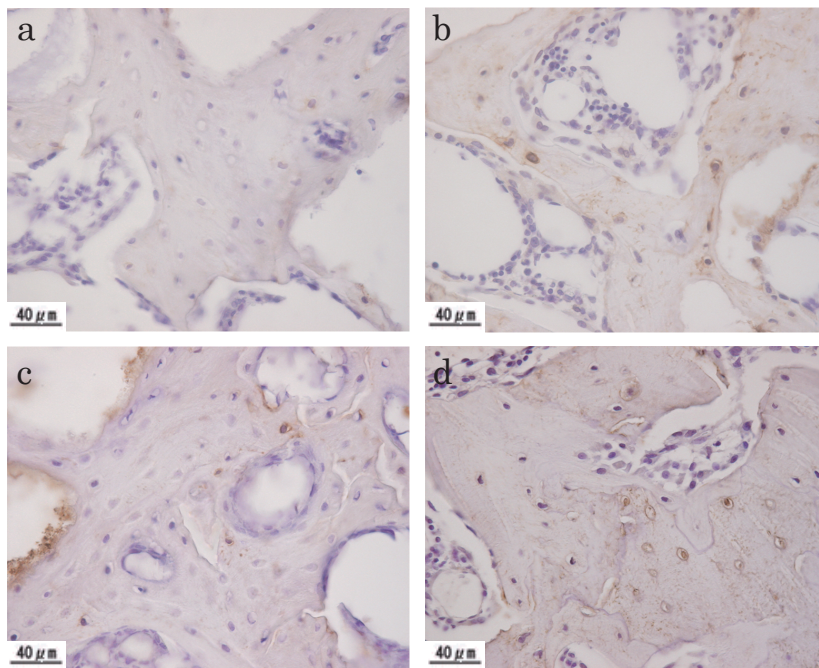


図14 填入処置後4週のDMP-1免疫染色組織像

a : CA500の強拡大, b : CA700の強拡大, c : CA500FGF2の強拡大, d : CA700FGF2の強拡大.

シウム系材料が応用されているが<sup>5)</sup>, 上記のような人工骨補填材料に求められるすべての要件を具備しているものは少ない.

土井らは, これらの要件を可能な限り満たすことを目的にCAを開発してきた<sup>13)</sup>. CAは, その構成要素に炭酸基( $\text{CO}_3^{2-}$ )を含有したリン酸カルシウム結晶であり, 単純なリン酸カルシウム構造を有するHA

よりもその構造は生体の骨アパタイトのリン酸カルシウム結晶に類似している<sup>17)</sup>. また, HAの作製には大気圧で1100~1200℃の焼成が必要で<sup>18, 19)</sup>, この条件で焼成されたアパタイトは骨アパタイトよりも高結晶となり生体ではほとんど吸収されなくなる. 一方, 炭酸基イオン含有量約9wt%以上のCAは結晶が極めて微細となるため従来のアパタイトに比べて500~700℃の



温度で焼成が可能であり<sup>19)</sup>、また、焼成処理温度により炭酸含有量が変化することも分かっている。今回使用した焼成温度500℃と700℃のCAでは約6wt%で<sup>19)</sup>、生体の骨アパタイトと近似し、生体親和性と材料吸収性を兼ね備えるといえる。またCAに関する研究報告により、これらの条件を具備するだけでなく、骨伝導能も有するCAの人工骨補填材としての臨床的有用性を、材料の焼成温度の違いによる材料吸収性、ならびに骨形成能と比較し、臨床応用への可能性を探った。さらに、CAはタンパク吸着性にも優れることから、成長因子の徐放性基材としての有用性も検討した。本研究では血管新生や創傷治癒などに関与し、骨芽細胞に対して増殖と分化を制御することが示されている<sup>20)</sup> FGF2を成長因子とし、骨形成促進を目的にCAとの併用を試みた。最近の研究ではコラーゲンを基材として局所投与したFGF2がウサギの骨折治癒を促進したと報告され<sup>21)</sup>、FGF2は骨再生を促進させる可能性が示唆されている<sup>21)</sup>。また金山らはbFGF5ng含有CAによる骨形成促進作用を報告している<sup>22)</sup>。

填入処置後の材料吸収性については4週までの実験期間でCA500とCA700の材料填入部における経時的材料吸収性を填入直後100%として追跡したところ、CA700では2週以降でやや材料吸収が増加したものの、全体では比較的緩やかな材料吸収を示したのに対し、4週経過時のCA500では填入直後からCA700を上回る材料吸収性を示し、吸収率では4週でそれぞれ60%と28%で、逆にCA残存率はそれぞれCA500で40%、CA700で72%となった。生体内でのリン酸カルシウム系基材の吸収は、2つの異なる機序が考えられており、組織液による溶解や崩壊によるものである。今回使用したCA500とCA700の生体内での吸収動態の違いは上記の材料吸収性の違いが反映しているものと思われる。すなわちCA500はCA700よりも物理的に非常に脆く、僅かな外力が加わることで崩れてしまう。また、焼成温度がCA700よりも低く、結晶度も低いためにCA500は生体内で崩壊性を示し、その結晶性もまた破骨細胞による吸収を受けやすいため、材料の吸収性が進んだと考えられる。さらに、1週において材料の吸収に関する検索でTRAP染色を行ったが、CA500群でCA700群よりも多く、CA周囲の多核の巨細胞に陽性を示した。これは溶解による材料吸収に加え、細かく崩壊した材料が細胞により吸収されることを裏付けており、その性質が焼成温度条件により最終的な材料吸収状態を示した本研究結果を反映するものであった<sup>23,24)</sup>。

骨補填材としての骨形成を目的とする骨伝導能について、一般的な骨形成の概念を基に考察を加えた。一般に骨の形成は間葉系幹細胞から前駆細胞、前骨芽細胞、

骨芽細胞へと分化した後、最終的に骨細胞へと変化すると考えられている<sup>25,26)</sup>。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化過程は、BMPシグナルやWntシグナルが重要な役割を果たしており、これまでにBMPによって発現誘導が認められる転写因子としての遺伝子にはRunx2、OSXが報告されている<sup>27,28)</sup>。Runx2は骨芽細胞分化に必須の転写因子であるが、骨芽細胞分化の初期では促進的に、一方で後期には抑制的に作用すると報告されている<sup>29,30)</sup>。OSXはNakashimaらによって同定されたZinc-fingerタンパクファミリーに属する転写因子であり<sup>31)</sup>、骨芽細胞分化の比較的初期に発現し、Runx2と同様に骨形成に必須の転写因子であると考えられているが、OSXノックアウトマウスで、頭蓋骨形成予定部位と長管骨の一次石灰化軟骨周囲の間葉系細胞に、Runx2遺伝子の発現を認め、一方、Runx2ノックアウトマウスではOSXの発現が認めなかったことから、OSXはRunx2の下流で発現することが示されている。本研究では、2週における骨形成状態および骨芽細胞への分化の評価を行うため、OSXの免疫染色を行ったところ、新生骨と材料周囲との境界部でみられたOSX陽性細胞は、CA群ではCA500群よりもCA700群で有意にその発現を認めた。

今回用いた人工骨補填材周囲での骨形成では材料がスキファールドとしての役割を果たし、細胞が定着し、分化、増殖する必要がある。CA500は顆粒の結晶が生体内で崩壊することで細胞の定着がCA700と比較して悪いことから、細胞の分化、増殖も遅れると考えれば、OSX陽性細胞は少なく、逆に、CA700では安定した場としての材料環境のため、OSX陽性細胞が数多く観察されたと考えられた。

本研究における形成された骨の成熟については、その指標に骨細胞や骨小腔内内面、あるいは骨基質に沈着するDMP-1に着目した。歯の象牙質や骨の非コラーゲン性タンパクであるDMP-1は、Georgeらによってラット象牙質から分離されたリンタンパクで、その後、骨基質にも存在することが知られている<sup>32)</sup>。また、分化した骨細胞でも産生され、骨基質に沈着することからカルシウムイオン結合を介して骨の石灰化に関与する<sup>33-35)</sup>。HE染色による観察では、処置後4週を経過すると、すべての群で新生骨部に骨成熟の指標となるハバース管や、骨層板が認められた。そこで、4週の標本でDMP-1による免疫染色を観察した結果、材料周囲の新生骨部で発現を認めたが、その数はCA500群よりもCA700群で多かった。この結果はOSXの各群発現状況と近似しており、骨芽細胞分化が早期に起これば骨細胞への分化も速やかとなり、骨成熟も進んだと考えられた。

さらに本研究ではCAが人工骨補填材として優れた成長因子のスキヤフォールドでもあることを検討した。

金山らは、bFGF含有CAは有さないCAと比較して、術後2週目および12週目において、新生骨形成量の著しい増加があり、CAが骨増強の成長因子キャリアおよび足場として有用であると報告されている<sup>22)</sup>。本研究ではFGF2に浸漬したCAを用いて、填入部における骨再生の動態をCA群と同様に比較検討したところ、填入1週後のTRAP染色では、CA群と同様、CA500FGF群がCA700FGF群よりも陽性細胞を数多く認めた。FGF2の添加の有無によるTRAP陽性細胞数の差はCA500群とCA700群間でみられなかったため、FGF2は破骨細胞活性には影響を及ぼさないことが考えられた。一方、填入後2週におけるOSX陽性細胞数と4週におけるDMP-1陽性細胞数をCA群とFGF群で比較したところ、CA500群よりもCA700群で陽性発現を数多く認めたが、CA500FGF群とCA700FGF群の間には有意な差を認めなかった。またFGF含有CAの骨形成においては、金山らの報告と類似する結果となった<sup>22)</sup>。これはCAの焼成温度条件の影響を受けるよりも、FGF2との併用が骨形成ならびに骨成熟に促進的に働いていることが示唆された。

## 結 論

500℃焼成と700℃焼成のCAの臨床応用を考慮すると、生体における材料吸収性は500℃が良いが、骨形成開始や骨成熟に至る期間やCA顆粒の臨床的操作性においては700℃の方が良好であった。

以上の結果から臨床応用には700℃焼成のCA顆粒に、骨吸収や骨欠損部に対する人工骨補填材料としての期待ができる。また、CA顆粒とFGF2の併用は今後、至適濃度等の検討が必要ではあるが、骨形成や骨成熟を促進させることが示されたことから、同様に他の成長因子の併用による有用性も期待される。

本論文に関する、開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

- 1) 篠原正徳, 白砂兼光編. 口腔外科学. 第3版. 東京: 医歯薬出版; 2011: 552-563.
- 2) 山下善弘, 山本哲彰, 山内健介. 下顎辺縁切除後, インプラントによる咬合再建のために腸骨海綿骨移植とチタンメッシュトレイにより骨造成を行った1例. 顎顔面インプラント誌. 2010; 9: 55-58.
- 3) 真鍋真人. 歯槽骨造成法の現在と未来. 昭歯誌.

- 2007; 27: 297-303.
- 4) Hench LL. Bioceramics from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991; 74: 1487-1510.
- 5) Ozawa M, Tanaka K, Morikawa S, Chazono M and Fujiki K. Clinical study of the pure  $\beta$ -tricalcium phosphate-reports of 167 cases. *J East JpnOrthop-Traumatal.* 2000; 2: 409-413.
- 6) Kwong CH, Burns WB and Cheung HS. Solubilization of hydroxyapatitic crystals by murine bone cells, macrophages and fibroblasts. *Biomaterials.* 1989; 10: 579-584.
- 7) LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials:calcium phosphates.*ClinOrthop Relat Res.* 2002; 395: 81-98.
- 8) Stavropoulos A, Windisch P, Szendrői-kiss D, Peter R, Gera I and Sculean A. Clinical and histologic evaluation of granular Beta-tricalcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects: a report on five cases. *J Periodontol.* 2010; 81: 325-334.
- 9) 渡邊 岳, 坂野美栄, 永山元彦, 堀田正人, 竹内 宏. リン酸カルシウム基材によって形成された伝導性骨の改造現象とそのリン酸カルシウム基材の吸収. 岐歯学歯. 2010; 37: 20-32.
- 10) NagayamaM, Takeuchi H and Doi Y. Comparison of carbonate apatite and  $\beta$ -tricalciumphosphohate(Resorbable calcium phosphates) implanted subcutaneously into the back of rats. *Dent Mater J.* 2006; 25: 219-225.
- 11) Simunek A, Kopecka D, Somanathan RV, Pilathadka S and Brazda T. Deproteinized bovine bone versus beta-tricalciumphosphate in sinus augmentation surgery:a comparative histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008; 35: 935-942.
- 12) Ellies LG, Nelson DGA and Feathersone JDB. Crystallographic structure and surface morphology of sintered carbomateapatites. *J Biomed Mater Res.* 1988; 22: 541-553.
- 13) Doi Y, Koda T, Wakamatsu N, Goto T, Kamemizu H, Moriwaki Y, Adachi M and Suwa Y. Influence of carbonate on sintering of apatites. *J Dent Res.* 1993; 72: 1279-1284.
- 14) Doi Y, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T and Iwayama Y. Shintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitute. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39: 139-143.
- 15) 鈴江 懐, 小林忠義編. 病理学総論. 第2版. 東京. 医学書院; 1975: 426-438.
- 16) 中村敏一編. 再生医学から再生医療へ, 幹細胞システムの解明と臨床応用への可能性へ迫る. 1版, 東京. 羊土社; 2000: 21-45.
- 17) Aoki H. Science of medical applications of hydroxyapatite Takayama Press System center Co.,

- Inc., 1991: 99-106.
- 18) 土井 豊, 森脇 豊. ハイドロキシアパタイト. 歯科ジャーナル. 1992; 36: 355-370.
- 19) 土井 豊, 幸田起英, 足立正徳. 炭酸含有アパタイトの焼成. 歯材器. 1995; 14: 313-320.
- 20) Gospodarowicz D. Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*. 1974; 249: 123-127.
- 21) Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, Yamano Y, Kato Y, Koike T. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induce the healing of segmental bony defects in rabbit. *Calif Tissue Int*. 1998; 63: 490-495.
- 22) Kanayama K, Kitago M, Shiraki M, Doi Y, Shibutani T. Induction of new bone by basic FGF - loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clinical Oral Implants Research*. 2009; 120: 560-565.
- 23) Brian KH. Bones and cartilage. illustrated edition. *Amsterdam: Elsevier Academic Press*. 2005; 197-213.
- 24) 幸田起英, 土井 豊, 志水雄一郎, 若松宣一, 足立正徳, 後藤隆康, 亀水秀男, 森脇 豊. 炭酸含有アパタイトの焼成 - 弱酸中での焼成体の溶解挙動 -. 歯材器. 1997; 16: 107-113.
- 25) Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K and Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues. *American College of Rheumatology*. 2005; 52: 2521-2529.
- 26) 山田志津香, 林 善彦. 骨芽細胞分化と骨形成に関する転写因子とシグナル伝達機構. 生体医工学. 2006; 44: 490-495.
- 27) 松本俊夫. 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患. 1 版, 東京. 羊土社; 2002: 42-47.
- 28) 小守壽文, 福本誠二編, 転写因子による骨芽細胞分化抑制と骨の成熟. Runx2は骨形成においてオールマイティな因子か? 1 版. 東京: 医歯薬出版; 2008: 53-56.
- 29) Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A and Komori T. Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*. 2001; 155: 157-166.
- 30) Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, Fukuyama R, Kanatani N, Kobayashi S, Satake M, Takada K and Komori T. Core-binding factor  $\beta$  interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nature Genet*. 2002; 32: 633-638.
- 31) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR and Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; 108: 17-29.
- 32) George A, Sabsay B, Philip ALS and Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. *Biol Chem*. 1993; 268: 12624-12630.
- 33) Toyosawa S, Oya K, Sato S and Ishida K. Osteocyte and DMP1. *Clinical Calcium*. 2012; 22: 713-720.
- 34) Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N and Komori T. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2001; 16: 2017-2026.
- 35) Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B and George A. Differentiation of embryonic-mesenchymal cell to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 4516-4521.