

原著

実験動物用マイクロCTを用いたrhBMP-2・アテロコラーゲンゲルによるウサギの顎骨欠損部再建の経時的観察

岡藤範正¹⁾、清水貴子^{1, 5)}、渡邊武寛^{1, 5)}、木村晃大²⁾、栗原三郎¹⁾、新井嘉則³⁾、
古澤清文⁴⁾、長谷川博雅^{2, 5)}、川上敏行⁵⁾

¹⁾松本歯科大学 歯科矯正学講座、〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780

²⁾松本歯科大学 口腔病理学講座、〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780

³⁾松本歯科大学大学院 臨床病態評価学、〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780

⁴⁾松本歯科大学大学院 臨床機能評価学、〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780

⁵⁾松本歯科大学大学院 硬組織疾患病態解析学、〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原1780

Micro CT Observation of Reconstruction Course of Rabbit Experimental Mandibular Defect with rhBMP-2 and Atelocollagen Gel

Norimasa Okafuji¹⁾, Takako Shimizu^{1,5)}, Takehiro Watanabe^{1,5)}, Akihiro Kimura²⁾, Saburo Kurihara¹⁾,
Yoshinori Arai³⁾, Kiyofumi Furusawa⁴⁾, Hiromasa Hasegawa^{2,5)} and Toshiyuki Kawakami⁵⁾

¹⁾ Department of Orthodontics, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan

²⁾ Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan

³⁾ Evaluation of Orofacial Abnormalities Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan

⁴⁾ Evaluation of Orofacial Function Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan

⁵⁾ Hard Tissue Pathology Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan

Abstract: A rabbit experimental mandibular defect was reconstructed with rhBMP-2 and atelocollagen gel, and examined using μ CT (R_mCT, Rigaku mechatronics, Tokyo) *in vivo* and histological techniques. Using eight rabbits, we made an experimental mandibular defect and filled it with 1% atelocollagen gel including rhBMP-2 10 μ g (Astellas Pharma Inc.). In μ CT observation, the density was slightly elevated at the bone marrow side at day 5, and the phenomenon gradually expanded during the course of this experiment. Histologically, mesenchymal cell proliferation and immature bone formation occurred at one week, and mature bone gradually increased and filled in at four weeks. The histological data suggests that atelocollagen gel is effective as carrier of rhBMP-2. The μ CT observation is extremely useful for follow-up of such reconstruction of animal bone defect model.

Key words: Micro CT; rhBMP-2; atelocollagen gel; bone reconstruction; rabbit

緒言

骨折の治癒、骨欠損に対する再建、および修復には骨形成因子 (Bone morphogenetic protein: BMP) が重要な役割を果たしていることは周知の事実である¹⁾。現在では遺伝子組換え型ヒトBMP (recombinant human BMP、以下rhBMP) が合成されており、臨床応用に向けて活発に研究されている。すなわち、これら臨床応用に向けたものとしてラットなどの小動物を用いたrhBMPによる骨形成実験が数多く為され、良好な結果が得られている^{2,3)}。ウサギ⁴⁾、イヌ⁵⁾、サル

^{6,7)}など、動物が大型になるに従い骨形成量が減少し、多量のrhBMPが必要になるようである。なお、これらの場合にはその場に合った適切な担体を用いることが必須である。

さて骨の形成過程を知るには、組織所見の観察とX線写真を併用が有効である²⁾。しかし、X線写真は経時的に縦断的な観察を行うことはできるが、一方向からの撮影となり、骨の形成過程の全貌を詳細に明らかにするという点では十分ではない。また、組織観察では詳細な骨の形成過程を観察することができるが、当然のことながら実験動物を

屠殺した後に試料作製するため、同一個体の経時的な観察は不可能である。

従来から、3次元的な画像が得られる非破壊検査としてX線マイクロCTが活用されてきたが、撮影時間が長く、被写体を回転させなくてはならないことから、飼育中の実験動物を、経過を追って観察することは難しかった⁸⁻¹⁰⁾。

一方、歯科臨床に最適化された小照射野X線CTが開発^{11, 12)}され、利用されている。この装置の特性には高い解像度、17秒という短い撮影時間、低被曝などがあげられる^{11, 12)}。今回この技術を応用した実験小動物に最適化した専用のX線マイクロCT装置 (R_mCT、理学メカトロニクス、東京、以下μCT) が開発された¹³⁾。

そこでこの装置を用いて、ウサギの実験的顎骨欠損モデルについてアテロコラーゲンを担体としたrhBMP-2による再建過程を経時的に観察した。

材料と方法

実験動物には生後8週、体重約1.4kgの雄性日本白色種ウサギ (Slc: JW/CSK) 8頭を使用した。リドカイン噴霧剤にて耳の皮膚に表面麻酔を施した後、1%ペンタバルビタールナトリウム25mg/kgの耳静脈内投与によってウサギに全身麻酔を施行した。顎下部を広く剃毛した後、手術野の消毒を行い、8万分の1エピネフリン添加2%リドカイン溶液2mlを局所に数箇所に分けて注射した。次に顎下部を皮切し、咬筋と内側翼突筋から骨膜に至る切開を加えた。その後、下顎骨下縁の骨膜を剥離し、同部顎骨下縁に骨髄に達する約6×4mmの方形骨欠損を作製した (図1a)。同部にrhBMP-2-10μg (アステラス製薬より供与) を含む1%アテロコラーゲンを充填し、顎骨の外形に沿うようにポリ乳酸グリコール酸共重合体膜 (GCメンブレン、(株)

ジーシー、以下PLGA) で覆い縫合、閉鎖した (図1b、c)。

なお対照としては、rhBMPを含まないACGのみを充填した後、PLGAで覆い縫合し2週間経過を追ったものとrhBMPとACGの両者を充填せずPLGAで覆い4週間経過を追ったものの2者を設定した。

μCTの撮影は実験動物の全身麻酔下で行い、術直後、5日後、7日後、10日後、14日後、21日後および28日後まで経時的に行った。撮影条件は管電圧60kV、管電流は60μA-130μAとし、画像再構成ソフトにはi-view (モリタ製作所、京都) を使用した。本μCTの画素数は512×512×384で撮影時間は17秒、画像再構成時間は約2分であった。断層画像は、X方向は側方向、Y方向は前後方向、Z方向は下方向からの三方向からの画像を同時に確認することが可能で、画素サイズは100μm×100μm、撮像範囲は51mm×51mm×38mmである。

組織学的には、5日後、7日後、14日後、28日後に実験動物の屠殺を行い、通法に従い10%EDTAによる脱灰パラフィン切片とし、hematoxylin-eosin染色を施し観察した。

結果

1. 実験群

μCT観察所見

術直後の画像では、周辺骨と明らかな境界を示す顎骨下縁から骨髄に達する方形の骨欠損がX方向の画像で観察された。Y方向の画像では頬舌側方向に骨の欠損が抜けているのが確認され、Z方向の画像でも骨欠損部が周辺骨と明らかな境界となって認められた (図2.a)。

図2.aで示す術直後の画像と同一個体の同部位において、実験7日後の骨欠損部は骨髄側から僅かではあるがX線吸収度の上昇が認められた (図2.b)。実験14日後の所見では

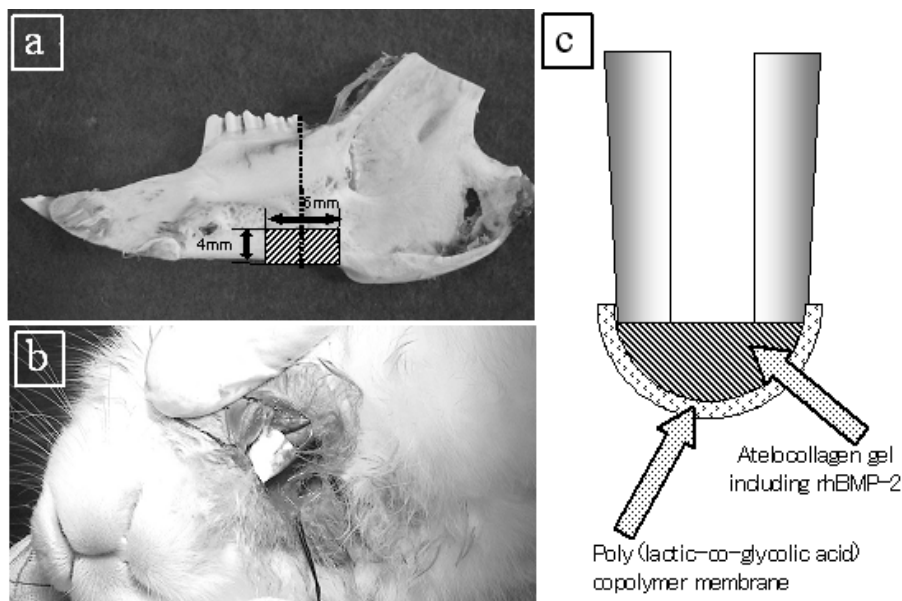


図1 . a. ウサギ下顎骨下縁に約6×4mmの方形骨欠損を作製
b. rhBMP-2-10μgを含む1%アテロコラーゲンを充填し、顎骨の外形に沿うようにPLGAで覆い縫合、閉鎖 c. 模式図

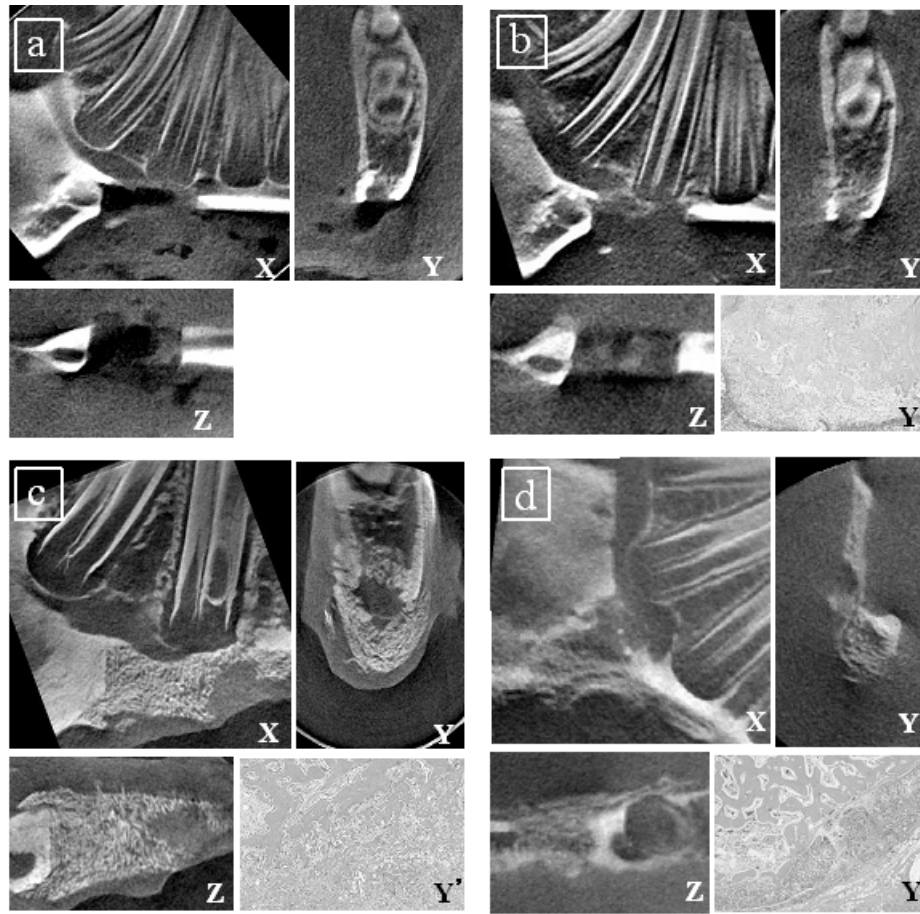


図2. a.X,Y,Z.方向 術直後、マイクロCT観察所見：周辺骨と明らかな境界を示す顎骨下縁から骨髄に達する方形の骨欠損が観察される。 b.X,Y,Z.方向 実験7日後、マイクロCT観察所見：同一個体の同部位において、骨髄側からX線吸収度の上昇が認められ、明らかな骨の添加像を確認することができる。Y' :Y方向同様部位、組織学的観察所見：骨欠損部領域をポリ乳酸グリコール酸共重合体膜で覆った内側から円形や紡錘状の未分化な間葉系細胞の増殖が一部に認められ、骨髄側から間葉系細胞の増殖が認められる。
 c.X,Y,Z.方向 実験14日後、マイクロCT観察所見：境界は認められるもののX線吸収度の上昇範囲は拡大して骨欠損部全域に亘る。Y' : Y方向同様部位、組織学的観察所見：顎骨下縁から骨髄側に至るまでほぼ全域に幼若な細い骨梁で満たされている。
 d.X,Y,Z.方向 実験28日後、マイクロCT観察所見：周辺骨と骨欠損領域の境界は不明瞭となり、明らかな骨修復と考えられる所見を示す。 Y' :Y方向同様部位、組織学的観察所見：顎骨下縁から骨髄側に至る骨欠損部位のほぼ全域に亘って成熟された骨梁が満たされている。

境界は認められるもののX線吸収度の上昇範囲は拡大して骨欠損部全域に亘った(図2. c)。X線吸収度の上昇範囲は経時的に上昇を示し、実験28日後では周辺骨と骨欠損領域の境界が不明瞭となっていた。(図2. d)。

組織観察所見

実験5日後で早くも骨欠損部領域をPLGAで覆った内側から楕円形や紡錘状を呈する未分化な間葉系細胞の増殖が一部に認められた。実験7日後には骨髄側から間葉系細胞の増殖によって一部ではあるが幼若な骨形成が存在し(図2. b.Y')、実験14日後では顎骨下縁から骨髄側に至るまでほぼ全域に幼若な細い骨梁で満たされ(図2. c.Y')、実験28日終了時には骨欠損部位に全域に亘って成熟された骨梁と

なっていた(図2. d.Y')。

2. 対照群

ACGのみを充填した群においては、 μ CTを用いた経時的な観察では28日実験終了時においても僅かなX線吸収度の上昇は認められるのみであった。28日実験終了時点の組織観察所見では、骨髄側の一部に間葉系細胞の増殖があったが骨梁は形成されていなかった。また骨欠損部位をPLGAのみで覆った対照群の μ CTを用いた経時的な観察で、14日時点において欠損領域の境界は明瞭なままで組織観察所見においても、未分化な間葉系細胞の増殖と若干の幼若な骨梁形成があったが、その範囲は骨髄側の一部にとどまっていた。

考察

骨欠損、骨折などの骨再建実験モデルとしての動物実験において、rhBMPの有用性は数多く報告されている。しかし、その実験系や実験動物は様々である。小動物であるラットを用いた大腿骨骨折モデル²⁾や歯槽骨欠損部³⁾にrhBMPを応用して骨の形成が促進したという報告がX線写真による所見や組織学的所見で明らかにされている。また、ウサギの顎関節の切除実験⁴⁾やイヌの下顎歯槽骨に欠損を作製しrhBMPを用いた報告⁵⁾など大型な動物を用いた骨欠損モデル実験も認められる。さらに臨床応用の前段階として、よりヒトに近いサルを用いた実験系では下顎骨下縁に骨欠損部位を設け、ハイドロキシアパタイトの果粒やブロックにrhBMPを加えたモデル⁶⁾や下顎骨を離断、30mmの骨切除を行いチタンプレートで固定した後、rhBMPで骨再生を促がしたモデル⁷⁾などがある。この離断実験では再生された骨にデンタルインプラントを埋入し、約1年間長期維持されたとしており、今後のヒトへの臨床応用が期待される。しかしながら、この顎骨再建には高濃度のrhBMPが必要であり、その濃度はイヌの顎骨再生の5-10倍、ラットの20-50倍が用いられており、高等な動物になるにしたがい、BMPの用量は増加する。この実験系では担体としてポリ乳酸グリコール酸共重合体で被覆したゼラチンスポンジを用いていたが、骨再建においてrhBMPを効果的に用いる方法についてはその応用法によってどのような担体が適切なのかについては、いまだ確立されていない。

今回のわれわれの実験はACGをrhBMP-2の担体として用い、欠損部に充填させてPLGA膜で覆う実験系である。その結果、経時的な骨形成の様相が組織学的に観察できた。ACGのみを充填した群においては未分化な間葉系細胞の増殖と幼若な骨梁を一部に認めたがその範囲は僅かで、rhBMPをACGに充填し同期間（実験終了時28日経過）観察した群における骨形成の成熟度と比較し、明らかに幼若であった。以上の結果から、骨形成におけるACGをrhBMP-2の担体として用いた効果は、対照群の観察との比較でも明らかであった。

今回の実験の最大の特徴は、この実験系の検証にあたって、われわれは著者の一人である新井が開発した実験動物用のX線マイクロCT装置を用いたことである¹³⁾。現在、一般に使用されているマイクロCT装置は工業用に開発されたものを応用しており、X線とセンサーが固定されており、被写体を小型のターンテーブルに乗せて撮影されている^{8, 9)}。このため、生きたまま撮影することは困難で、撮影には5分から数時間を要することからも骨の変化の観察には多数の小動物の標本を作成した後に撮影する必要がある¹⁰⁾。

今回、撮影に用いたX線マイクロCT装置は実効焦点サイズ7 μ m、光電子倍増管は4インチで、X線管球と光電子倍増管をIの字型のアームとして固定し、Iアームが垂直面状を回転するrotate-rotate方式のcorn-beam X-ray CTである。これによりIアームの中心部に10x10cm程度の自由空間が確保され、実験動物を安定したステージに置いて撮影することが可能となる。画素数は512x512x384で撮影時間は17

秒、画像構成時間は約2分であった。撮影時間が従来のシステムに比べ非常に短いため、実験動物を屠殺することなく麻酔下における生体で撮影が可能となり、実験動物のrhBMPによる骨の形成過程の観察に非常に有用な方法であった。

このマイクロCT装置による経時的な生体観察により、エックス線密度の上昇が僅か5日目で観察され、その範囲は骨髄側より経時的に段階的に拡大されており、これは骨形成の組織的観察所見に一致していた。

まとめ

顎骨欠損モデルの再建過程について日本白色種ウサギを用い検討した。下顎骨下縁に骨欠損を作製し、rhBMP-2-10 μ g（アステラス製薬）を含む1%アテロコラーゲンゲルを充填した。以後4週まで経時的に μ CT（R_mCT, 理学メカトロニクス, 東京）観察と組織学的検討を行った。 μ CT観察において、5日で骨髄側から僅かであるがX線吸収度の上昇があり、以後拡大を示した。これは2週以降で骨欠損部全域に亘っていた。組織学的に、1週では骨髄側からの間葉系細胞の増殖と一部に幼若な骨形成があり、4週で成熟していた。以上の結果から、rhBMP-2の担体としてアテロコラーゲンゲルを用いた顎骨再建の有効性が明らかになった。

なお、本稿の要旨はInternational Symposium of Maxillofacial & Oral Regenerative Biology in OKAYAMA 2005（口腔顔面頭蓋再生研究国際シンポジウム; 2005年9月17日.岡山）において発表した。

文献

1. Urist MR: Bone: formation by autoinduction, *Science*, 1965, 150 (698),893-899
2. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA: The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats, *J Bone Joint Surg Am*, 1992, 74 (5),659-670
3. King GN, King N, Hughes FJ: Effect of two delivery systems for recombinant human bone morphogenetic protein-2 on periodontal regeneration in vivo, *J Periodontol Res*, 1998, 33 (4),226-236
4. Ueki K, Takazakura D, Marukawa K, Shimada M, Nakagawa K, Takatsuka S, et al.: The use of polylactic acid/polyglycolic acid copolymer and gelatin sponge complex containing human recombinant bone morphogenetic protein-2 following condylectomy in rabbits, *J Craniomaxillofac Surg*, 2003, 31 (2),107-114
5. Choi SH, Kim CK, Cho KS, Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM, et al.: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs, *J Periodontol*, 2002, 73 (1),63-72

6. Asahina I, Watanabe M, Sakurai N, Mori M, Enomoto S: Repair of bone defect in primate mandible using a bone morphogenetic protein (BMP)-hydroxyapatite-collagen composite, *J Med Dent Sci*, 1997, 44 (3),63-70
7. Marukawa E, Asahina I, Oda M, Seto I, Alam M, Enomoto S: Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2002, 31 (3),287-295
8. Hanson NA, Bagi CM: Alternative approach to assessment of bone quality using micro-computed tomography, *Bone*, 2004, 35 (1),326-333
9. Ruegsegger P, Koller B, Muller R: A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture, *Calcif Tissue Int*, 1996, 58 (1),24-29
10. Kinney JH, Lane NE, Haupt DL: In vivo, three-dimensional microscopy of trabecular bone, *J Bone Miner Res*, 1995, 10 (2),264-270
11. Arai Y, Tammsalo E, Iwai K, Hashimoto K, Shinoda K: Development of a compact computed tomographic apparatus for dental use, *Dentomaxillofac Radiol*, 1999, 28 (4),245-248
12. Terakado M, Hashimoto K, Arai Y, Honda M, Sekiwa T, Sato H: Diagnostic imaging with newly developed ortho cubic super-high resolution computed tomography (Ortho-CT), *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000, 89 (4),509-518
13. Arai Y, Yamada A, Ninomiya T, Kato T, Masuda Y: Micro-Computed Tomography newly developed for In vivo small imaging, *Oral Radiol*, 2005, 21 14-18