

BMP-2 含浸徐放ゼラチンハイドロゲルシートによる 骨再生とイヌ眼窩床骨折モデルへの応用

望月 祐一

近畿大学医学部形成外科学教室

抄 録

近年、骨誘導能をもつサイトカインを用いた骨再建法が注目されている。しかし、サイトカインを単独で生体内に注入しても、早期に拡散・吸収され、骨形成促進作用は制限される。そこで本研究では、骨形成促進作用を有するサイトカインである Bone morphogenetic protein-2 (以下、BMP-2) をゼラチンハイドロゲルにより徐放化することを試みた(実験1)。さらに、生分解性ポリマーと複合化させ、骨欠損部における骨再生の有用性について検討した(実験2)。実験1では、¹²⁵I によって標識した BMP-2 溶液、ゼラチンハイドロゲル単体および BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲルをそれぞれヌードマウス皮下に投与し放射能活性残存率を測定した。その結果、ゼラチンハイドロゲルの経時的な分解により BMP-2 が徐放されていることが示唆された。実験2では、イヌ眼窩床骨折モデルを作製し、BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲル・生分解性ポリマー複合体を眼窩骨欠損部へ移植した。移植後、骨欠損部について、単純X線写真による検索、組織学的検索およびマイクロCTを用いた骨構造解析を行った。その結果、BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲル・生分解性ポリマー複合体において新生骨組織が再生誘導された。さらにこの新生骨組織は、正常骨組織に近似した骨梁の再構築を示した。

Key words: ゼラチンハイドロゲル, 生分解性ポリマー, BMP-2, 眼窩床骨折, 骨構造解析

緒 言

骨性眼窩は、前頭骨、頬骨、上顎骨、蝶形骨、篩骨、涙骨、口蓋骨の7つの骨より構成される変形四角錐の窪みであり、内部には眼球、外眼筋および眼窩脂肪が存在する。骨性眼窩の上壁および外側壁は骨皮質が厚く、強度も高い。一方、下壁および内側壁は骨の厚さが0.3~0.9 mmと紙のように薄く、脆弱である。眼窩床骨折では、この脆弱な眼窩下壁や内側壁に骨欠損が生じ、この部位より眼窩内容物(主に眼球、外眼筋、眼窩脂肪)が副鼻腔内に逸脱する。このため、臨床症状として、眼球陥凹や眼球運動障害を認める^{1,2}。

眼窩床骨折における骨欠損部の再建において、現在主に施行されている方法は、自家骨移植である。再建材料として下顎骨や腸骨が多く選択され、移植された自家骨は抗原性が無いため、骨欠損部周囲の骨組織と骨融合する。しかし、この自家骨移植では、採骨部の疼痛および変形など、ドナーの犠牲に関す

る種々の欠点が指摘されている。また、採取骨を整形しても、骨性眼窩が有する複雑な曲面形状に沿って移植することは困難である³。これらの諸問題を解決するため、これまで、チタンやシリコンなどの人工材料が試用されてきた⁴⁻⁹。しかし、これらは生体にとって異物であり非吸収性であるため、感染、異物反応、移植後の変位など、より数多くの合併症が報告されている^{10,11}。

近年、ドナー採取の必要のない骨欠損部の再建法として、bone morphogenetic protein (BMP), basic fibroblast growth factor (b-FGF), insulin-like growth factor (IGF) などの骨誘導能をもつサイトカインを用いた骨再生法が注目されている。特に BMP は、骨折部において遺伝子発現が亢進している事実から、骨再生の過程において重要な役割を果たしていることが示唆されてきた¹²。BMP の発見は、1965年、Urist が塩酸で脱灰した骨基質を筋肉内に移植して、異所性に骨形成が可能であることを報告したことによる¹³。1988年、Wozney らは、4種類

の BMP 遺伝子のクローニングに成功し、その構造を明らかとした¹⁴。その後、遺伝子組み換え技術により recombinant human BMP (rhBMP) の合成が可能となり¹⁴⁻¹⁶、現在までに30種類以上の BMP がクローニングされている¹⁵。特に BMP-2, -4, -5, -7 には、骨誘導活性があることが確認されており¹⁵⁻¹⁸、なかでも BMP-2 は強力に迅速な骨誘導を示し¹⁹⁻²³、未分化間葉系細胞を、骨芽細胞や軟骨細胞へと分化誘導する作用が報告されている²⁴。一方、BMP は単独で生体内に注入しても、早期に拡散・吸収されるため骨形成促進作用は極端に制限される^{25,26}。BMP の骨誘導能を最大限有効に作用させるためには、BMP の薬理作用を、ある一定期間、継続させる必要があり、そのためには、薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の技術を導入することが必要と考えられる²⁷。

本研究では、骨形成促進因子である BMP-2 を *in vivo* 環境下に長期間、安定して供給するため、徐放化ゼラチンハイドロゲルを用いた徐放システムを開発した。さらに、この BMP 徐放システムを生分解性ポリマーに複合化させて、イヌ眼窩床骨折モデルの骨欠損部に移植し、骨形成促進作用について検討した。

方法と材料

実験 1 BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲルの作成と BMP-2 の徐放

実験動物

実験動物は、BALB/c Slc ノードマウス (6 週齢、雄、日本エスエルシー、浜松、102 匹) を用いた。ノードマウスの飼育環境は、クリーンラック内にて、室温 22°C、湿度 50%、12 時間の明暗周期とした。飼育は、放射線 (3 mGy) にて滅菌された固形飼料 (CL-2、日本クレア株式会社、静岡) を与え、飲料用水道水は制限なく与えた。

1. ゼラチンハイドロゲルの作製

3% 塩基性ゼラチン (等電点 9.0、重量平均分子量 99,000、含水率 97.8 wt %、豚皮コラーゲンの酸処理品、新田ゼラチン株式会社、大阪) 水溶液に 0.163% のグルタルアルデヒドを加えた。この混合液をポリプロピレン製秤量皿 (直径 138 mm) に流延後、4°C にて 12 時間静置することによって化学架橋したゼラチンシート (厚さ 2 mm) を得た。この架橋ハイドロゲルを直径 6 mm のディスク状に打ち抜いた後、100 mM 濃度のグリシン水溶液で 37°C にて 3 時間処理し、未反応のグルタルアルデヒドを不活性化した。次に、蒸留水にて数回洗浄し、冷凍凍結することに

よって架橋ゼラチンハイドロゲルを得た。凍結乾燥したゼラチンハイドロゲルは、エチレンオキシドガスをを用いて滅菌した。

2. BMP-2 のゼラチンハイドロゲルへの含浸及び放射性物質による標識と徐放挙動

BMP-2 (アステラス製薬株式会社、大阪) を、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ 不含リン酸緩衝液 (PBS, Gibco, Grand Island, New York, USA) に溶解し、濃度を 340 ng/ml に調節した。その後、20 µl を凍結乾燥ゼラチンハイドロゲルディスクに滴下し、4°C にて 12 時間静置することにより、BMP-2 をゼラチンハイドロゲルへ含浸させた。

BMP-2 の標識は、Greenwood らの方法²⁸ に従い、Na¹²⁵I 水溶液 4 µl を 3 mg/ml 濃度の BMP-2 溶液 40 µl に加えたものに、0.2 mg/ml 濃度の Chloramine T 溶液を加えて攪拌することにより行った。塩基性ゼラチンハイドロゲルディスクの標識は Bolton-Hunter 試薬²⁹ を用いてヨウ素化を行った。

BMP-2 の徐放挙動を調べるため、3 つの実験群を作製した。実験群は、①¹²⁵I ラベル化ハイドロゲルディスク移植群 (n=30)、②¹²⁵I ラベル化 BMP-2 含浸ハイドロゲルディスク移植群 (n=30)、③¹²⁵I ラベル化 BMP-2 水溶液 (340 ng/ml) 投与群 (n=42) とした。作製した 3 群を、それぞれヌードマウス背部皮下に埋入もしくは注入後、検体を含めたマウス背部の皮膚を採取し、その残存放射活性をガンマカウンター (ARC-310B, Aloka 株式会社、東京) を用いて測定した。測定は、①¹²⁵I ラベル化ハイドロゲルディスク移植群および②¹²⁵I ラベル化 BMP-2 含浸ハイドロゲルディスク移植群では、皮下埋入後、3 時間、1 日、3 日、7 日、14 日目に行い、③¹²⁵I ラベル化 BMP-2 水溶液 (340 ng/ml) 投与群では、皮下注入後、3 時間、8 時間、12 時間、1 日、2 日、4 日、6 日目に行った (図 1)。

実験 2 イヌ眼窩床骨折モデルにおける徐放化 BMP-2 の骨誘導能の評価

実験動物

実験動物は、イヌ (ビーグル、12~16 週齢、雌、浜口動物、兵庫、12 頭) を用いた。飼育は、個別ゲージ内で室温 23°C、湿度 50%、12 時間明暗サイクルの条件下で行い、飼料は、飼育繁殖固形飼料 CD55α (日本クレア株式会社、東京) を 1 日 1 回約 300 g 与え、飲料用水は制限なく与えた。

1. 生分解性ポリマーの作製

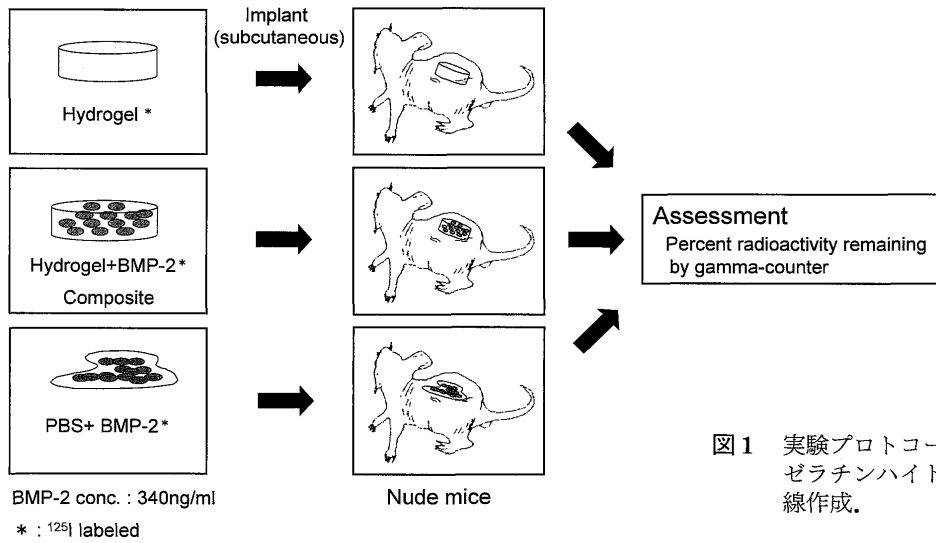


図1 実験プロトコル1
ゼラチンハイドロゲル及びBMP-2の徐放曲線作成。

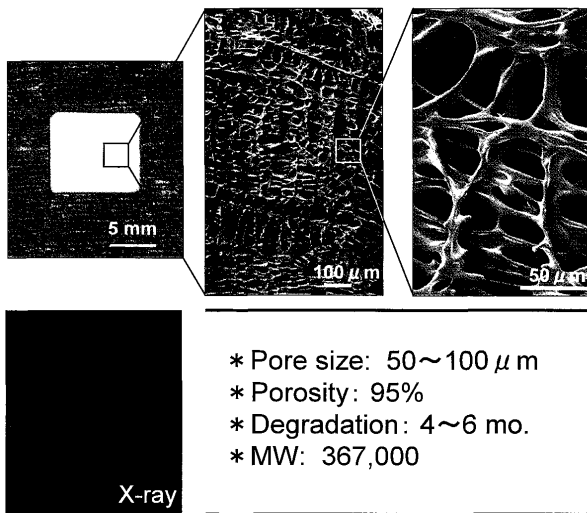


図2 生分解性ポリマーとその構造

ポリマー溶液 (5% (w/w) 1,4-dioxane) およびポリマー (P (CL/LA) 50:50共重合体) を、あらかじめ準備しておいた円盤状の鋳型 (直径16 mm, 厚さ0.3 mm) に泡立てないように駒込ピペットにて注入し、冷凍庫内で静置 (-40°C, 1時間) した。ポリマーを鋳型より取り出し、40Pa, -40°C, 12時間の条件下にて凍結乾燥 (TF10-80ATA, 宝製作所, 東京) 処理した。次に、真空乾燥 (60°C, 12時間) によりモノマーおよび溶媒の除去を行い、円盤状ポリマーを作成した。生分解性ポリマーの分子量は367,000, 内部はスポンジ構造で、気孔径は50~100 μ m, 空隙率は95%, 生体内での分解速度は4~6ヶ月となるように調整した。軟X線所見では、透過性の変化は認められなかった (図2)。

2. イヌ眼窩床骨折モデルと実験群の作製

眼窩床骨折モデルの作製においては、睡眠導入を

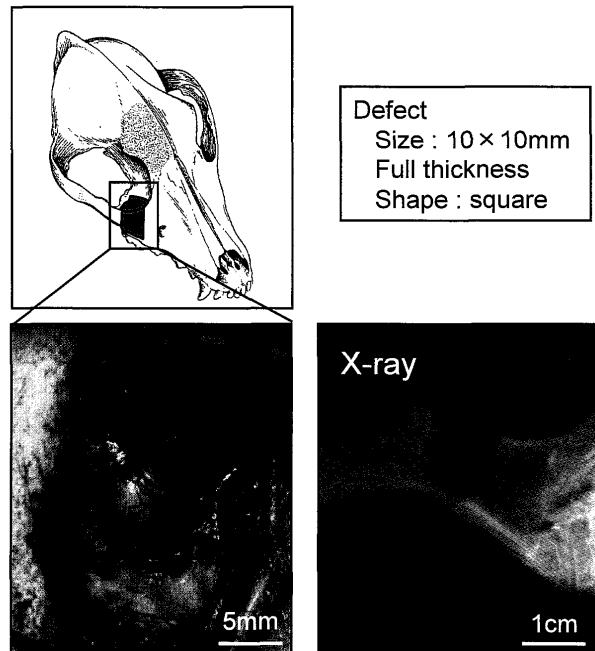


図3 イヌ眼窩床骨折モデルの作製
イヌ眼窩部に10 mm×10 mmの全層性骨欠損部を作製した。また、残存骨膜による新生骨組織の誘導を回避するため、骨欠損部の骨膜は完全に除去した。

塩酸ケタミン (ケタラール[®], 15 mg/kg, 三共株式会社, 東京) の殿部筋肉注射にて行い、次に、ペントバルビタール (ネンプタール[®], 25 mg/kg, 大日本製薬株式会社, 大阪) を用いて静脈麻酔を行った。眼窩周囲を剃毛後、ポピドンヨード (イソジン[®], 明治製薬株式会社, 東京) にて消毒し、切開線に沿って10万倍希釈エピネフリン添加塩酸リドカイン (エピレナミン含有キシロカイン[®] 1% E, アストラゼネカ株式会社, 大阪) にて局所麻酔を行い、眼窩下縁から外嘴角外側まで皮膚切開を加えた。眼輪筋を電

気メスで切開して骨膜まで到達し、眼窩前縁を露出させた。骨欠損作製部分の骨膜を剝離し切除した後、リュウエルを用いて全層性の骨欠損（大きさ：10 mm×10 mm）を作成した（図3）。

イヌ眼窩壁骨欠損部の3週目及び5週目における単純X線画像、組織学的所見およびマイクロCT画像を示す（図4）。単純X線画像では、3週目、5週目ともに骨欠損部において明らかな石灰化陰影は認められなかった。組織学的所見及びマイクロCT画像では、3週目、5週目ともに骨欠損部において新生骨の形成はほとんど認められなかった。

骨欠損部に対して、① BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲルシート・ポリマー複合体（グループ1）、② BMP-2 水溶液・ポリマー複合体（グループ2）からなる2種類の複合体を骨欠損部に挿入・固定した。グループ1では、あらかじめ作製しておいた BMP-2 含浸ゼラチンハイドロゲルシート（10 mm×10 mm、BMP-2 含浸量：10 µg）を生分解性ポリマー（10 mm×10 mm）に密着させ、5-0ナイロン糸（SIGMA REX®, 長門石器械店、東京）にて縫合固定した。次に、グループ2では、BMP-2 を Ca⁺⁺,

Mg⁺⁺ 不含リン酸緩衝液（PBS, Gibco, Grand Island, N.Y. USA）に溶解し、濃度を500 µg/ml に調節した後、20 µl を生分解性ポリマーに含浸させた。それぞれの複合体を骨欠損部に移植した後、複合体を周囲の残存骨膜と4-0ナイロン糸で縫合固定した。眼輪筋を縫合した後、4-0ナイロン糸で閉創した。

術後3週目および5週目に標本採取を行い、骨欠損作製時と同様の方法にて睡眠導入後、1モル塩化カリウム液（KCL, 20 mEq, 清水製薬株式会社、静岡）を静脈内注射して屠殺した（図5）。

3. 単純X線撮影による石灰化像の検討

単純X線撮影は、軟X線発生装置（TRS-1005, SOFRON, 東京）を用いて、40 kV, 2.5 mA, 90 sec の条件下にて撮影し、全ての標本における石灰化像を観察した。

4. 組織学的検討

組織学的検討を行うため、移植後5週目の採取組織を70%エタノールにて浸漬固定し、MMA (Meth-

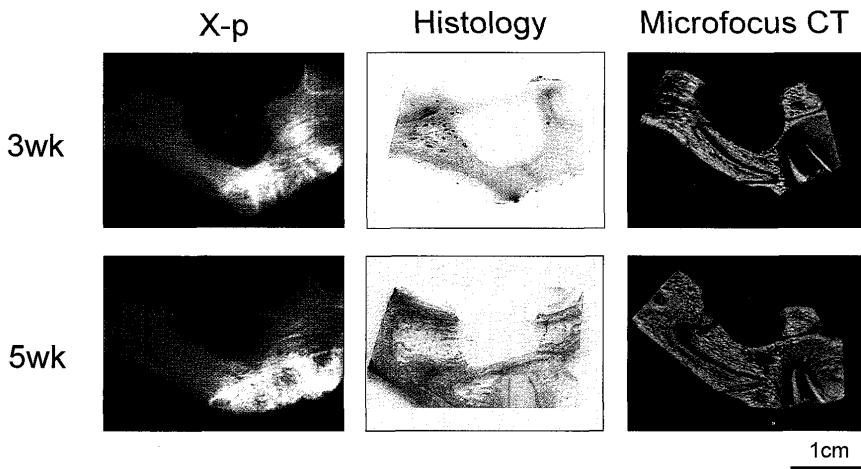


図4 イヌ眼窩骨欠損部の経時的変化
骨欠損部の経時観察では、3週目、5週目ともに、明らかな骨新生は認められなかった。

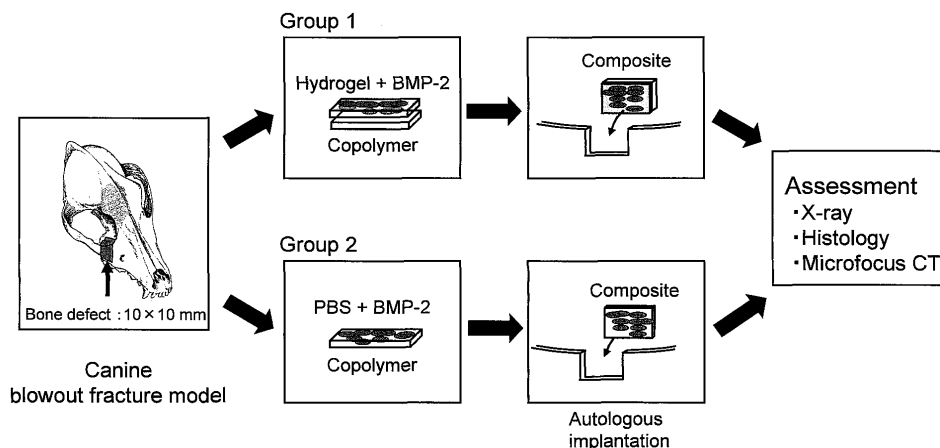


図5 実験プロトコール2
イヌ眼窩床骨モデルにおける徐放化BMP-2の骨誘導能の評価。

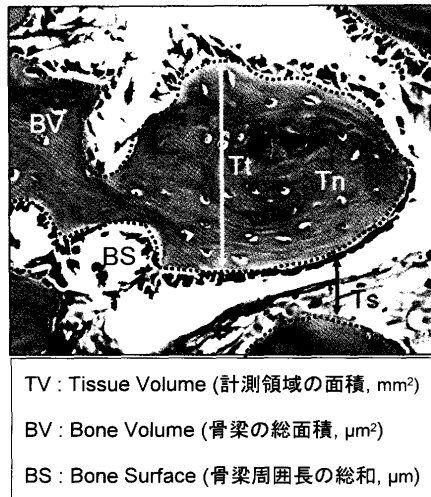


図6 骨構造解析のパラメータ
 計測領域の面積, 骨梁の総面積, 骨梁周囲長の総和の3つの測定値より, 骨量, 骨梁幅, 骨梁数, 骨梁間隙の4つのパラメータについて算出した。

ylmethacrylate) 樹脂ブロックを作成した。Saw microtome SP1600 (ライカマイクロシステム株式会社, 東京) を用いて, 前額断方向にスライスした切片(厚さ: 30 μm)を作成した。切片には Toluidine blue 染色を施し, 一般的な組織構成および異調染色性(メタクロマジー)について検討した。さらに, 偏光顕微鏡(ECLIPS E-800, NIKON, 東京)を用いて, 骨梁の層板(lamellar)構造について観察した。

5. 骨構造解析

マイクロフォーカスCTスキャン(Scan Xmate-A090S, コムスキャンテクノ社, 横浜)を用いて, 骨梁を中心に, 移植後5週目の新生骨の微細構造を観察した。次に, 62 kV, 10 μA, スライス厚51.84 μmの条件下に画像撮影した。骨梁構造解析ソフトLuzex-F(株式会社ニレコ, 東京)を用いて, 得られた画像の骨構造解析を行った。骨構造解析では, 新生骨組織が認められる3領域を無作為に選択し, 骨量(Trabecular bone volume, Bv, %), 骨梁幅(Trabecular thickness, Tt, μm), 骨梁数(Trabecular number, Tn, /mm), 骨梁間隙(Trabecular separation, Ts, μm)を求め³⁰⁾, その平均値と標準誤差を算出した(図6)。骨量(Bv, %)は, 計測領域の面積(Tissue Volume, TV, mm²)における骨梁総面積(Bone Volume, BV, μm²)の割合(BV/TV, %)として算出した。骨梁幅は, 骨梁の平均幅を示し, 骨梁総面積と骨梁周囲長の総和(Bone Surface, BS, μm)より算出((2×BV)/BS, μm)した。骨梁数(Tn, /mm)は, 単位距離あたりの骨梁の数を示し, 骨梁総面積, 骨梁幅, 計測領域の面積より算出(BV/(TV×Tt), /mm)した。骨梁

骨量(Trabecular bone volume, Bv)

$$BV / TV (\%)$$

骨梁幅(Trabecular thickness, Tt)

$$(2 \times BV) / BS (\mu\text{m})$$

骨梁数(Trabecular number, Tn)

$$BV / (TV \times Tt) (/mm)$$

骨梁間隙(Trabecular separation, Ts)

$$(1 / Tn) - Tt (\mu\text{m})$$

間隙は, 隣接した骨梁間の距離を示し, 骨梁幅と骨梁数より算出((1/Tn)-Tt, μm)した。分散検定はKruskal-Wallis testを行い, Scheffés F testによる多重比較検定を用いて統計学的有意差を検討した。

結 果

実験1 in vivoにおけるゼラチンハイドロゲル及びBMP-2の徐放挙動の検討

ヌードマウスに埋入もしくは注入した検体の残存放射能活性を測定し, ゼラチンハイドロゲル及びBMP-2のin vivoにおける徐放挙動を検討した(図7)。①ハイドロゲル単体をマウス皮下に埋入した移植群におけるハイドロゲルの残存放射能活性は, 58.5%(1日後), 45.0%(3日後), 41.9%(7日後), 29.0%(14日後)であった。次に, ②BMP-2含浸ハイドロゲルをマウス皮下に埋入した移植群におけるBMP-2の残存放射能活性は, 59.2%(1日後), 39.5%(3日後), 28.3%(7日後), 17.1%(14日後)であった。③BMP-2水溶液単体をマウス皮下に注入した移植群におけるBMP-2の残存放射能活性は, 投与後急激な減少を示し, 18.2%(3時間後), 7.8%(8時間後), 5.0%(12時間後)であり, 投与1日後には4%以下となった。これらの結果より, BMP-2水溶液投与群に比較し, BMP-2含浸ハイドロゲルディスク移植群の方が, BMP-2の放射能活性残存率の減少は緩慢であることが判明した。さらに, ハイドロゲルディスク移植群とBMP-2含浸ハイドロゲルディスク移植群における放射能活性残存率は相関していることが明らかとなった。

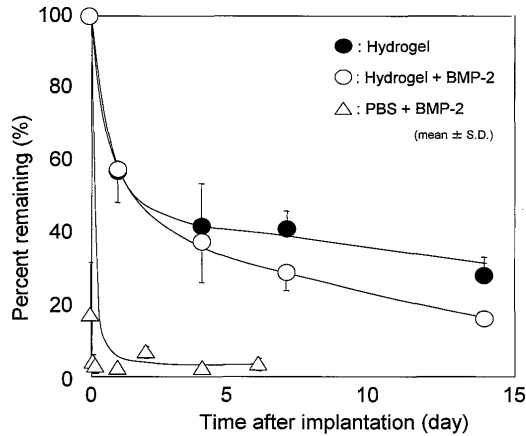
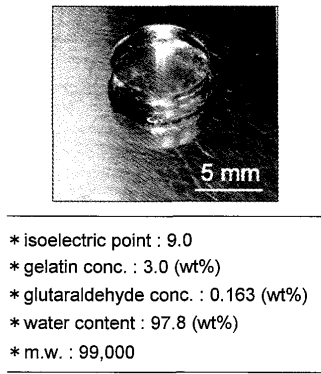


図7 BMP-2徐放曲線
 ハイドロゲル(黒丸)と
 BMP-2含浸ハイドロゲル
 (白丸)の徐放曲線は相関し
 ている。

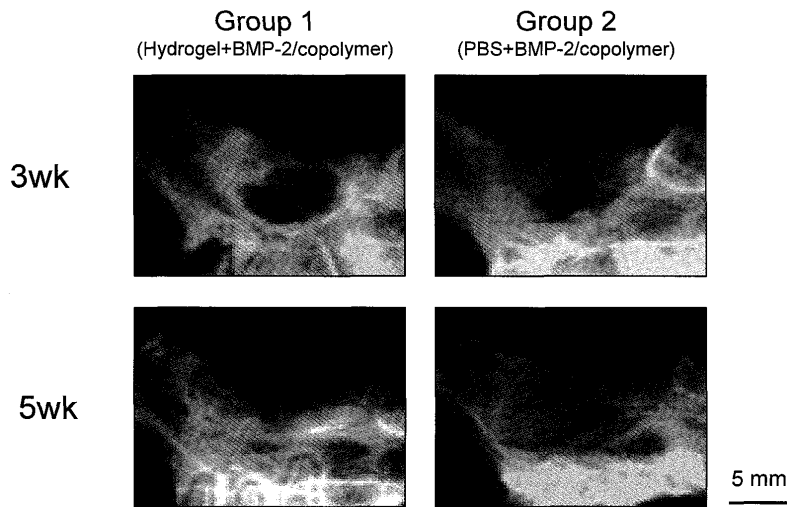


図8 単純X線所見
 グループ1では、移植後3週目で骨欠損部周縁に沿って石灰化陰影を認めた。移植後5週目になると、石灰化陰影はさらに拡大していた。グループ2では、移植後5週目において骨欠損部に僅かに淡く不均一な石灰化陰影が認められた。

実験2 イヌ眼窩床骨折モデルにおける徐放化BMP-2の骨誘導能の評価

グループ1 (BMP-2含浸ハイドロゲルシート・ポリマー複合体の移植群)、およびグループ2 (BMP-2水溶液・ポリマー複合体の移植群)について単純X線所見、組織学的所見、マイクロCTを用いた骨構造解析について検討した。

単純X線所見

移植後3週目におけるグループ1の単純X線所見では、骨欠損部の周縁に沿って不均一な薄い石灰化陰影が認められた。移植後5週目になると、不均一な石灰化陰影はさらに濃厚となり、骨欠損部の中心部に向かい、より著明な石灰化陰影の拡大が認められ、骨欠損部は縮小していた。これに対し、グループ2では、移植後5週目において骨欠損部に、僅かに淡く不均一な石灰化陰影が認められるのみであっ

た(図8)。

組織学的所見

移植後5週目におけるグループ1の組織学的所見では、骨欠損部の周縁より中央部にわたって広範囲に新生骨が認められた。新生骨領域の強拡大像では、骨梁内部には骨細胞、骨梁辺縁には骨芽細胞を認め、成熟した層板構造を有する骨梁構造が数多く観察された。次に、グループ2では、骨欠損の一部において新生骨が散在性に認められるのみであった。新生骨領域の強拡大像では、グループ1と比較して、骨梁は狭く、細く、不均一で、未熟な層板構造を呈していた。また、骨梁間隙には、生分解性ポリマーの残存が数多く認められた(図9, 10)。

マイクロCT画像所見と骨構造解析

移植後5週目におけるグループ1のマイクロCT

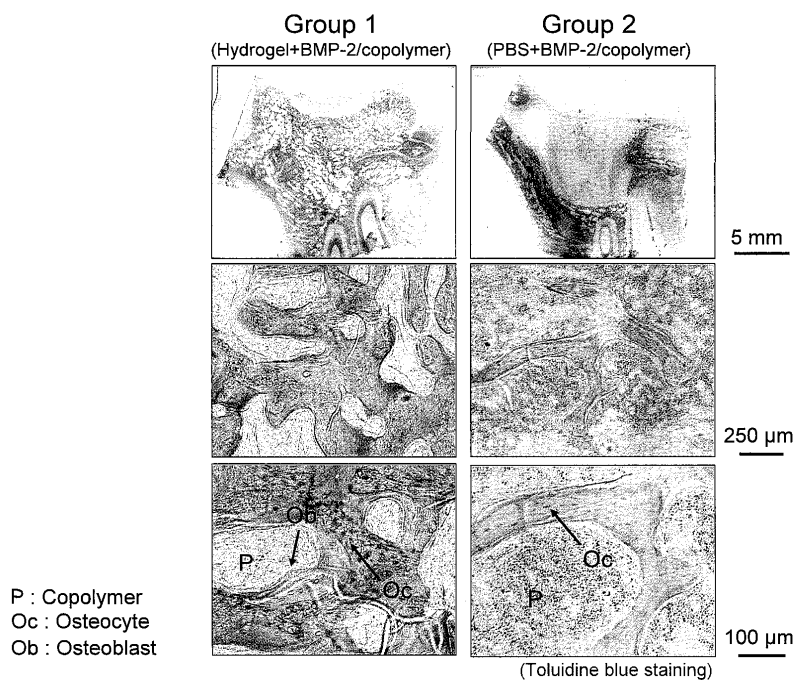


図9 組織学所見
グループ1では、骨欠損部の広域にわたり新生骨が認められた。新生骨領域の強拡像では、骨細胞、骨芽細胞を認めた。グループ2では、骨欠損部の一部において新生骨が散在性に認められるのみであった。

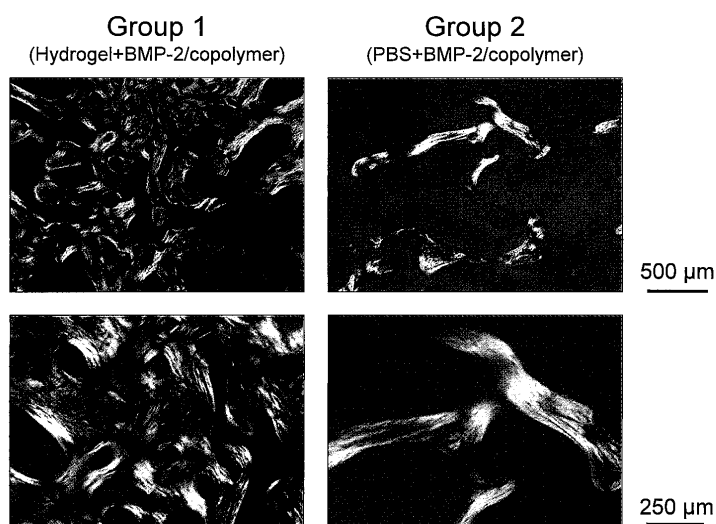


図10 偏光顕微鏡所見
グループ1では、グループ2と比較し、より明確に lamellar の走行が観察された。

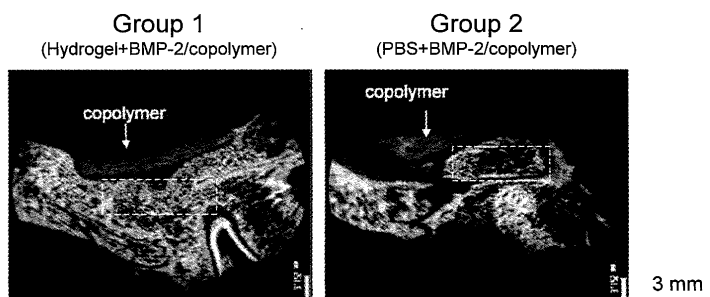


図11 マイクロCT所見
グループ1では、骨欠損部の広域に著名な新生骨を認めた。グループ2では、骨欠損部の周縁に僅かに新生骨を認めるのみであった。また、骨新生が認められない領域に一致して、生分解性ポリマーの残存が観察された。

画像所見では、骨欠損部の全域に著明な新生骨を認めた。グループ2では、骨欠損部の周縁を中心として僅かに新生骨を認めるのみであった。また、それぞれの群において、骨新生が認められない領域に一致して、生分解性ポリマーの残存が認められた。骨

新生の少ないグループ2では、より多くの残存ポリマーが観察された。(図11)。

マイクロCT画像による骨構造解析を行った結果を表1に示す。コントロールとして正常イヌ眼窩骨を採取して解析に用いた。骨量の検討では、グルー

表 1

Experimental groups	Trabecular bone volume (%)	Trabecular thickness (um)	Trabecular number ($\times 10^{-3}/\text{mm}$)	Trabecular separation (um)
Group 1 (Hydrogel+BMP-2 /copolymer)	69.1 \pm 4.3	493.3 \pm 86.2	1.5 \pm 0.2	211.4 \pm 13.9
Group 2 (PBS+BMP-2 /copolymer)	19.9 \pm 7.7	150.4 \pm 18.2	1.1 \pm 0.1	870.6 \pm 360.3
Native bone	58.9 \pm 3.2	329.9 \pm 19.3	1.8 \pm 0.1	231.9 \pm 17.0

Values were given as mean \pm S.E.

** p<0.01

* p<0.05

プ1とコントロールに比較して、グループ2は有意に低い値を示した。グループ1とコントロールは有意差を示さなかった。骨梁数の検討では、グループ1とコントロールに有意差は認められなかった。グループ2は、コントロールと比較して、有意に低い値を示した。骨梁幅の検討では、グループ1に比較して、グループ2が有意に低い値を示した。4つのパラメータの検討結果より、グループ1とコントロールは極めて近似する骨梁構造を示すことが判明した。

考 察

BMP-2による骨形成促進作用を有効に作用させる目的で、これまでコラーゲンあるいは乳酸系高分子を担体とした徐放システムが研究されており、この徐放システムを用いると、BMPの局所濃度は長期間、高く維持されることが報告されてきた³¹⁻³³。また、このBMP-2徐放システムは、すでに動物疾患モデルにも応用されている。Hollingerらは、コラーゲンスポンジ³⁴やポリ乳酸スポンジ³⁵とBMP-2を組み合わせて、ウサギ尺骨骨欠損の骨修復を行い、良好な結果を得ている。

今日、徐放システムの担体として最も多く利用されている生体吸収性の天然高分子は、ゼラチンである。ゼラチンは、コラーゲンの変性体であり、生体安全性の高い線維状のタンパク質として、医薬品や食品として広く利用されている³⁶。また、化学架橋することによって、生体吸収速度の調節が容易なハイドロゲルの形成が可能であり、多岐の目的に使用することが可能となった³⁷。

Yamamotoらは、BMP-2の徐放にゼラチンハイドロゲルを担体として用い、生体吸収性の変化(含水率)が異所性骨形成へ及ぼす影響について検討した。その結果、含水率97.8 wt%のゼラチンハイドロ

ゲルを用いた場合に、最も高いALP活性を示したと報告している³⁸。さらに、ゼラチンハイドロゲルを用いて、ウサギ³⁹やサル⁴⁰における頭蓋骨骨欠損部の自己再生を促進させた。そこで本研究では、BMP-2の担体としてゼラチンハイドロゲルを用いた。実験1の結果より、ハイドロゲルディスク移植群とBMP-2含浸ハイドロゲルディスク移植群における放射能活性残存率は相関していることから、ゼラチンハイドロゲルの経時的な分解によりBMP-2が徐放されていることが示唆された。

近年の研究より、BMP-2投与量と骨誘導能との関係が明らかとなった。Bostromらは、ウサギ尺骨に2cmの骨欠損を作製して検討し、BMP-2の骨誘導能を検討した。その結果、100 μ gを埋植した群は、50 μ gを埋植した群に比較し、より良好な骨梁形成を認めたと報告した¹⁹。さらに小宮らは、ウサギ尺骨に作製した1cmの骨欠損部に、PLGAを担体としてBMP-2を徐放した。その結果、50 μ g以上を埋植した群において良好な骨梁形成を認めたと報告している⁴¹。北郷らは、サル頭蓋骨に作製した骨欠損部(10mm \times 10mm)に、含水率97.8%のゼラチンハイドロゲルを担体としてBMP-2を徐放し、徐放量と新生骨の骨密度について検討した。その結果、50 μ g以上の徐放量で、正常骨と同等の骨密度を有する新生骨が誘導可能であることを報告した⁴²。

今回我々は、眼窩床骨折への臨床応用を目指して、ゼラチンハイドロゲルを用いたBMP徐放システムをイヌ眼窩床骨折モデルに応用して骨誘導の有用性について検討した。本研究における実験1の結果から、ゼラチンハイドロゲルは、生体内において早期に分解・吸収(2週間で71%)されることが明らかになった。したがって、骨誘導が完成されるまでの間、眼窩内容を支持することは困難である。そのため、眼球、外眼筋および眼窩脂肪などの眼窩重量に

耐えることができる骨誘導の足場が必要と考えられた。また、眼窩床骨折の骨欠損部における骨誘導では、複雑な曲面を有する眼窩形状に沿って新生骨が再構築されなければならない。さらに、眼窩床は副鼻腔粘膜と接しているため、感染が誘発されないことも重要な課題である。これらの問題を解決するため、本研究では、BMP-2 徐放システムと生分解性ポリマー poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) (以下 P (CL/LA)) を組み合わせて、複合化して移植した。P (CL/LA) は、poly L-lactide と poly ϵ -caprolactone の 2 種類のモノマーを block 状に重合させた共重合体であり、内部がスポンジ様構造のため、迅速かつ広範囲な血管進入により感染に強い利点を有している^{43,44}。また、炎症反応が少なく、生分解性を有し、組織適合性に優れている。さらに、優れた屈曲性をもち、操作性が高いため、複雑な形状の眼窩壁へ三次元的に組み込むことが比較的容易であると考えられた。これまでの報告によると、BMP-2 の至適投与量は 50 μ g もしくはそれ以上であったが、今回の実験では、BMP-2 投与量は 10 μ g とした。ゼラチンハイドロゲルに、P (CL/LA) を併用した場合、BMP-2 投与量を約 1/5 に減少させても、良好な骨誘導が認められた。

新生骨を評価する方法として、単純 X 線写真による検索や組織学的検索に加え、マイクロフォーカス CT を用いた骨構造解析を行った。マイクロフォーカス CT を導入して骨梁構造を数値化し、新生骨の定量的客観的評価を行った。その結果、BMP-2 をゼラチンハイドロゲルに含浸させ、生分解性ポリマーと複合化した群において、より太い骨梁と狭い骨梁間隙を有する骨梁構造が再生誘導されることが判明した。この新生骨は、骨構造に関するすべてのパラメータの値において、正常骨組織に極めて近い成熟した骨梁の再構築が再現された。

以上の結果より、BMP-2 をゼラチンハイドロゲルにより徐放化し、生分解性ポリマーと複合化する方法を導入することにより、新生骨の再生誘導が可能であることが示唆された。今後、ドナー採取による二次的な手術侵襲を伴わない理想的な骨移植法として、本法が眼窩床骨折の治療に応用される可能性が期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました磯貝典孝教授に深謝いたします。

文 献

1. Smith B, Regan WF (1957) Blow-out fracture of the orbit. *Am J Ophthalmol* 44: 733-739

2. Gordon RM, Joel SG, Miami F (1966) The retraction syndrome and trauma. *Arch Ophthalmol* 76: 662-663
3. Krishnan V, Johnson JV (1997) Orbital floor reconstruction with autogenous mandibular symphyseal bone graft. *J Oral Maxillofac Surg* 55: 327-330
4. Borghouts JM, Otto AJ (1978) Silicone sheet and bead implants to correct the deformities of inadequately healed orbital fractures. *Br J Plast Surg* 31: 254-258
5. Romano JJ, Iliff NT, Manson PN (1985) Use of Medpor porous polyethylene implants in 140 patients with facial fracture. *J Craniofac Surg* 4: 142-147
6. Reddi SP, Steven MR, Kline SN, Villanueva P (1999) Hydroxyapatite cement in craniofacial trauma surgery. *J Craniomaxillofac Trauma* 5: 7-12
7. Siritongtaworn P (2001) Correction of severe enophthalmos with titanium mesh. *J Med Assoc Thai* 84: S485-490
8. Aitasalo K, Kinnunen I, Palmgren J, Varpula M (2001) Repair of orbital floor fractures with bioactive glass implants. *J Oral Maxillofac Surg* 59: 1390-1396
9. Villarreal PM, Monje F, Morillo AJ, Junquera LM, Gonzalez C, Barbon JJ (2002) Porous polyethylene implants in orbital floor reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 109: 877-887
10. Jacono AA, Moskowitz B (2000) Alloplastic implants for orbital wall reconstruction. *Facial Plast Surg* 16: 63-68
11. Gilhotra JS, Mcnab AA, Mckelvie P, O' Donnell BA (2002) Late Orbital haemorrhage around alloplastic orbital floor implants. *Clin Experiment Ophthalmol* 30: 352-355
12. Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Lonqaker MT (1992) Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast Reconstr Surg* 107: 124-134
13. Urist MR (1965) Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899
14. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988) Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-1534
15. Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM (1988) Purification and characterization of other distinct bone inducing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9484-9488
16. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, Lapan P (1990) Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2220-2224
17. Sampath TK, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH (1992) Recombinant human osteogenic protein (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast prolifera-

- tion and differentiation in vitro. *J Biol Chem.* 267: 20352-20362
18. Yasko AW, Lane JM, Fellingner EJ, Rosen V, Wozney JM, Wang EA (1992) The healing of segmental bone defects induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rh-BMP-2). A radiographic histological and biomechanical study in rats. *J Bone Joint Surg Am* 74: 659-670
 19. Bostrom M, Lane JM, Tomin E, Browen M, Berberian W, Turek T, Smith J, Wozney J, Schildhauer T (1996) Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model. *Clin Orthop* 327: 272-282
 20. Gerhart TN, Kirker-head CA, Kriz MJ, Hipp JA, Rosen V, Schelling S, Wozney JM, Wang EA (1991) Healing of segmental defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rh-BMP-2). *Transpl Orthop Res Soc* 16: 172
 21. Sciadini MF, Johnson KD (2000) Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. *J Orthop Res* 18: 289-302
 22. Toriumi DM, Kotler HS, Luxenberg DP, Holtrop ME, Wang EA (1991) Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic and biomechanical evaluation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 1101-1112
 23. Utida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K (1990) The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumor surgery. *J Bone Joint Surg Br* 72: 298-302
 24. Ducy P, Karsenty G (2000) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57: 2207-2214
 25. Takaoka K, Nakahara H, Yoshioka H, Masuhara K, Tsuda T, Ono K (1988) Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone Morphogenetic protein. *Clin Orthop* 234: 250-254
 26. Takaoka K, Koezuka H, Nakahara H (1991) Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone Morphogenetic protein. *J Orthop Res* 9: 902-907
 27. Tabata Y (2003) Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng* 1: S5-15
 28. Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS (1963) The Preparation of ¹³¹I-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J* 89: 114-120
 29. Bolton AE, Hunter WM (1973) The Labelling of Proteins to High Specific Radioactivities by Conjugation to a ¹²⁵I-Containing Acylating Agent. *J Biochem* 133: 529-539
 30. 内山陽介, 谷澤龍彦, 高橋栄明 (1994) 骨組織形態計測における骨梁構造の評価法. *日骨形態計測会誌* 4: 83-89
 31. Saito N, Okada T, Horiuchi H, Murakami N, Takahashi J, Nawata M, Ota H, Nozaki K, Takaoka K (2001) A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. *Nat Biotechnol* 19: 332-335
 32. Uludag H, D'Augusta D, Palmer R, Timony G, Wozney J (1999) Characterization of rhBMP-2 pharmacokinetics implanted with biomaterial carriers in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 46: 193-202
 33. Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J, Timony G, Riedel R, Wozney JM (2000) Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers. *J Biomed Mater Res* 50: 227-238
 34. Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh S-P, Zegzula HD, Wozney J (1998) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *J Biomed Mater Res* 43: 356-364
 35. Wheeler DL, Chamberland DL, Schmitt JM, Buck DC, Brekke JH, Hollinger JO, Joh S-P, Suh K-W (1998) Radiomorphometry and biomechanical assessment of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and polymer in rabbit radius osteotomy model. *J Biomed Mater Res* 43: 365-373
 36. Yamamoto M, Tabata Y, Hong L, Miyamoto S, Hashimoto N, Ikada Y (2000) Bone regeneration by transforming growth factor beta1 released from a biodegradable hydrogel. *J Control Release* 64: 133-142
 37. Wheeler DL, Chamberland DL, Schmitt JM, Buck DC, Brekke JH, Hollinger JO, Joh SP, Suh KW (1998) Radiomorphometry and biomechanical assessment of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and polymer in rabbit radius osteotomy model. *J Biomed Mater Res* 43: 365-373
 38. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y (2003) Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 24: 4375-4383
 39. Yamada K, Tabata Y, Ikada Y (1997) Potential efficacy of basic fibroblast growth factor incorporated in biodegradable hydrogels for skull bone regeneration. *J Neurosurg* 86: 871-875
 40. Tabata Y, Yamada K, Ikada Y (1999) Skull bone regeneration in primates in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosurg* 91: 851-856
 41. 小宮宏一郎, 糸満盛憲, 前原秀夫, 関口昌和 (2000) Recombinant Human BMP-2 を用いたウサギ尺骨骨欠損部修復に関する実験的研究. *北里大学医学会雑誌* 30: 422-431
 42. 北郷明成, 山本雅哉, 田畑泰彦 (2005) 高分子ハイドロゲルを利用した細胞増殖因子の徐放化とその骨再生誘導活性. *化繊講演集* 62: 107-114
 43. Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y, Iwata H, Yamamoto K (1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J Neurosurg* 86: 1012-1017
 44. Yamada K, Miyamoto S, Takayama M, Nagata I, Hashimoto N, Ikada Y, Kikuchi H (2002) Clinical application of a new bioabsorbable artificial dura mater. *J Neurosurg* 96: 731-735