

氏名	韓	松
授与した学位	博	士
専攻分野の名称	歯	学
学位授与番号	博甲第 2005 号	
学位授与の日付	平成12年3月25日	
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第4条第1項該当）	
学位論文題名	rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体による異所性骨誘導の長期経過に関する病理組織学的研究	
論文審査委員	教授 山本敏男	教授 鈴木一臣 教授 永井教之

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨形成タンパク質（BMP）は、異所性に軟骨・骨誘導の特性を有するタンパク質である。近年、遺伝子組み換えBMP（以下rhBMP-2）の大量生産が可能となり、牛骨由来粗精製BMPに代わり、骨再生治療への応用が強く期待されている。BMPを応用する場合、支持体との併用が必要とされるが、粗精製BMPの場合に有効な支持体を、rhBMP-2の支持体として利用した場合、骨誘導を認めないか、骨形成が不安定であるとされ、rhBMP-2の支持体の決定は未解決である。I型コラーゲンは骨の主要成分であり、操作性に優れている。特にI型アテロコラーゲンは免疫原性が低く、BMPの新しい支持体として注目されている。BMPの骨形成実験を行う場合は、同所性実験では生体における骨膜反応や骨伝導が加わることが知られていることから、rhBMP-2による組織反応の検索には異所性組織で観察する必要がある。又、BMPを臨床応用する場合、成人に应用する場合が多いことから、加齢動物における骨増生の長期過程について詳細に検討する必要がある。そこで本研究では、1) rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体の皮下組織における骨増生效果と長期経過、2) I型アテロコラーゲン支持体の役割の解明、3) 加齢動物における骨誘導過程の解析に焦点を絞り、ラット皮下におけるrhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体による骨増生の長期経過を病理組織学的に検討し、局所的骨再生法としての可能性について検討した。

【材料および方法】

rhBMP-2は山ノ内製薬より提供をうけた。支持体として、0.3% I型アテロコラーゲン酸性溶液（CELLGEN I-PC, KOKEN）を用いた。実験群では rhBMP-2 10 μ gを I型アテロコラーゲン10mgと混合後、凍結乾燥し、加圧整形して複合体とした。対照群では、I型アテロコラーゲン10mgのみを凍結乾燥した。実験動物として、8ヶ月齢のウイスター系雄性ラットを合計32匹使用した。ネンブタール（Pentobarbital sodium）腹腔内全身麻酔下で背部に約8 mmの皮下切開を加え、皮下組織を剥離して各4カ所のポケットを形成し、3カ所に実験群、1カ所に対照群の複合体を、切開創から約10 mm離れた部位に挿入した。観察期間は、1週目、2週目、3週目、4週目、6週目、8週目、12週目、24週目である。試料は、10%中性緩衝ホルマリン溶液で灌流固定後、一部は10%蟻酸で7日間脱灰した。その後、通法に従いパラフィン包埋し、4 μ mの切片を作製後、ヘマトキシリン-エオジン（H.E.）染色とIV型コラーゲンの免疫組織化学的染色（ダコ社製のEnvisionシステム）を行い、光学顕微鏡で観察した。皮下埋入時の骨形成の程度と骨膜下埋入時の骨形成とを比較するため、骨膜下埋入実験（黄の実験、1998）を対照として、二次元的形態計測法（Weibel法）を行った。

【結果】

① 経時的組織所見：複合体の外層と内層では、骨形成過程に時間的差のあることが示された。外層では、1週目で支持体間に間葉系細胞が血管と共に増生した。支持体への添加性類骨形成は2週から始まり、3週で線維性骨が外層全体に広がった。4、6週では破骨細胞による吸収が開始され、6週以降、12週、24週では細胞成分の少ない成熟骨となり骨髄は脂肪髄となった。内層では、1、2、3週で支持体内層の大小の空洞に、少数の間葉系細胞と血管が侵入してくる。支持体空洞内での類骨形成は4週に始まった。6週では内層の空洞内は類骨で占められ、埋入された支持体と共に全体的に不均一な骨基質となった。6、8週でそれらの骨基質には、外層から内方に向かって破骨細胞による骨吸収、改造現象が見られた。12週になると、塊状の細胞成分の少ない成熟骨となり、外層の骨成分と一体化し、成熟骨塊は皮下に長期的に維持された。内層の一部の支持体は細胞成分と共に残存した。全期間中軟骨形成は認めなかった。対照群は一過性的の間葉系細胞の増加、リンパ球の浸潤を認めたが、骨形成は認めなかった。

② 初期骨形成の組織所見：初期骨形成は、複合体外層と内層の2カ所で生じていた。外層では、埋入1週後、コラーゲン支持体は血管と間葉系細胞の侵入により分割された。2週でその界面には線維芽細胞様細胞と骨芽細胞様細胞の付着が見られ、類骨組織の形成が観察された。内層では外層に比べ、遅れて空洞内への血管と間葉系細胞の侵入が観察された。4週でコラーゲン支持体の空洞界面には、血管と共に線維芽細胞様細胞と骨芽細胞様細胞が増殖し、空洞内で添加性の類骨形成が観察された。

③ 皮下埋入実験と骨膜下埋入実験との比較：皮下及び骨膜下組織の複合体の最大断面を測定した。パラメーターとして、支持体コラーゲン、支持体コラーゲンと間葉系組織、新生骨（初期では線維性骨、後期では骨髄を有する成熟骨）に分けて計測した。骨膜下の場合には急速に骨増生が生じるが、皮下の場合には、骨量は徐々に増加し、支持体の一部は残存した。

【結論】

吸収性材料であるI型アテロコラーゲンをrhBMP-2の支持体に用いて成熟ラット皮下に埋入して骨誘導を試み、骨誘導の過程を経時的に長期観察し、病理組織学的に検討し、又同一材料の骨膜下組織での骨形成と比較し、以下の結論を得た。

(1) rhBMP-2/I型アテロコラーゲンの異所性組織での骨形成過程は、細胞増殖期、線維性骨期、骨改造期、成熟骨様組織期に分けられるが、骨形成過程は外層と内層で時間的差を認める。長期的には成熟骨様組織は皮下組織に維持されると考えられる。

(2) 外層では支持体アテロコラーゲン断片界面で血管、間葉系細胞の侵入と共に添加性類骨が形成される。内層ではそれより遅れて大小の空洞内壁で類骨形成から開始される。

(3) 皮下組織における骨形成速度は骨膜下より遅れ、支持体アテロコラーゲンの一部は残存し、骨基質の一部を構成したことから、吸収性材料、I型アテロコラーゲンの性状変化が生じていると考えられる。

以上の結果から、rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体は、異所性組織ではゆっくりした骨誘導効果を生じ、形成された成熟骨様組織は支持体I型アテロコラーゲンを含んだまま長期的に維持される。加齢動物に於いてもI型アテロコラーゲンは支持体として臨床応用が期待できるものと考えられる。

論文審査結果の要旨

近年、異所性に軟骨と骨を誘導する骨形成蛋白質（Bone Morphogenetic Protein: BMP）の骨再生治療への応用が期待されている。rhBMP-2の臨床応用を考えた場合、応用部位、支持体の選択、年齢などの影響で異なる結果が得られると考えられる。

そこで本研究では、1) rhBMP-2の異所性組織における骨増生効果、2) 異所性誘導骨の長期経過とI型アテロコラーゲンの支持体の役割、3) 加齢動物における異所性と同所性骨原性組織との比較に焦点を絞り、ラット皮下におけるrhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体による骨増生の過程を経時的に長期観察すると共に、同一条件の骨膜内骨増生実験とを形態計測学的に比較し、異所性組織における局所的骨誘導法としての可能性について検討した。

(1) rhBMP-2/コラーゲンの異所性組織での骨形成過程は、細胞増殖期、線維性骨期、骨改造期、成熟骨様組織期に分けられたが、骨形成過程は外層と内層で時間的差を認める。長期的には成熟骨様組織は皮下組織に維持されることが考えられる。

(2) 外層では支持体コラーゲン断片界面で血管、間葉系細胞の侵入と共に添加性類骨が形成される。内層ではそれより遅れて大小の空洞内壁で類骨形成から開始される。

(3) 皮下組織における骨形成速度は骨膜下より遅れ、支持体の一部は残存するものの、加齢動物に於いてもI型アテロコラーゲンはBMPの支持体として臨床応用が期待できるものと考えられる。

以上の研究成果はBMPの骨形成機構や生体材料の開発の基礎的な研究として価値ある内容である。従って本論文は博士（歯学）の学位授与に値すると判定した。