

氏名	村山 瑛
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第 619 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 16 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	血管付き β リン酸三カルシウムの作成と応用に関する検討
論文審査委員	(委員長) 教授 吉村 浩太郎 (委員) 教授 森 良之 教授 西野 宏

論文内容の要旨

1 研究目的

骨移植は、重度外傷や骨腫瘍切除後、感染、先天異常などによって生じる骨欠損部の修復方法として広く用いられている手法である。骨移植に用いられる骨は、自家骨、新鮮同種骨、保存同種骨、人工骨があり、自家骨を用いた骨移植が現在のゴールドスタンダードである。自家骨移植は、骨誘導能や骨伝導能に優れ、良好な骨形成が期待できる反面、侵襲的な手技で採取部位の痛みや変形、感染などの危険があり、患者自身から採取できる骨量にも限界がある。一方、人工骨は正常な骨組織を犠牲にすることがなく、使用量や使用部位に制限なく使用でき、近年その利用が増加している。

これまでに、ハイドロキシアパタイトおよび β -リン酸三カルシウム (β -TCP) を材料としたさまざまな人工骨が開発されており、特に多孔体 β -TCP は骨伝導性が高く、自家骨にすみやかに置き換わることが示されている。最近では、新しい形状をもつ人工骨として一方向性配向連通多孔体 β -TCP (UDPTCP) が開発され、これまでの蜂巢状の気孔形状と違い、一方向に列をなすように気孔が形成されている。UDPTCP の一方向に整列した気孔は、すみやかに周囲の血液や体液、細胞などを人工骨内に取り込むことが可能である。このように、人工骨の進歩は近年著しいが、自家骨と異なり人工骨内に幹細胞や骨芽細胞、骨形成タンパク質 bone morphologic protein (BMP) などの骨形成因子が存在しないため、自家骨に匹敵するほどの骨誘導能や骨伝導能を持っていないのが現状である。

過去の報告では、移植した人工骨の周囲に伸びてくる栄養血管が骨形成に重要であると述べており、人工骨に新生血管を誘導できれば、新生血管を介して幹細胞や骨形成因子が導入され、骨形成が促進される可能性があると考えられる。そこで本研究では、UDPTCP を含む 3 種類の多孔体 β -TCP をラット鼠径部の浅下腹壁動静脈の下に移植して血管付き β -TCP を作成し、 β -TCP 内に形成された新生血管の特徴について調査した。また、作成した血管付き β -TCP をラット大腿骨の骨欠損部に移植し、血管付き β -TCP が骨欠損部の修復に有用かどうか検討した。

2 研究方法

本研究では、気孔率 60% の β -TCP (β -TCP60、オスフェリオン 60®; オリンパステルモバイオマテリアル)、気孔率 75% の β -TCP (β -TCP75、オスフェリオン®; オリンパステルモバイオマテ

リアル)、UDPTCP (アフィノス® ; クラレ) の3種類のβ-TCPを使用した。また、Lewis ラット雄 (体重 280~320 g) を実験動物として使用した。

まず、各β-TCPの血液浸透性を調べるため、ラットより血液を採取しβ-TCPが血液吸収した前後の重量を比較し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行って内部に浸透した赤血球を観察した。次に血管付きβ-TCPの作成のため、ラット鼠径部の浅下腹壁動静脈下に各β-TCPを留置した。移植後1,2,3,4週でβ-TCPを摘出し、β-TCP周囲および内部の新生血管の評価を行うため、墨汁染色、レクチン染色、HE染色、および von Willebrand Factor、α-平滑筋アクチン、IV型コラーゲンに対する免疫染色を行った。また、β-TCP内部の新生骨の評価を行うために、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP)、アルカリホスファターゼ (ALP)、およびアリザリンレッド S 染色を行った。作成した血管付き UDPTCP の骨癒合能を評価するため、ラット用創外固定器を用いて大腿骨骨欠損モデルを作成し、骨欠損部へ UDPTCP 単独 (n=5) と血管付き UDPTCP (n=5) を移植し、レントゲンでの評価を行った。最後に Human Bone Morphogenetic Protein-2 recombinant protein (BMP-2) を添加した UDPTCP を用いて血管付き UDPTCP を作成し、内部の新生骨の評価を行うために TRACP、ALP、アリザリンレッド S 染色を行った。

3 研究成果

β-TCP60、β-TCP75、UDPTCP への血液浸透性実験では、UDPTCP が最も血液を浸透した。ラット鼠径部に移植したβ-TCP周囲には、浅下腹壁動静脈由来の新生血管が観察された。β-TCP60の内部にはほとんど血管新生がなかったが、β-TCP75 と UDPTCP の内部では移植後3週でβ-TCP 全域にわたり新生血管が観察できた。血管付きβ-TCPの骨評価では、UDPTCP でのみ破骨細胞が観察されたが、いずれのβ-TCPでも骨芽細胞と石灰化は観察されなかった。ラットの大腿骨骨欠損部に UDPTCP のみと血管付き UDPTCP を移植したが、移植後3ヶ月で骨癒合を得たのは UDPTCP のみを移植した2例 (40%) で、血管付き UDPTCP 移植では全例骨癒合を得ることが出来なかった。BMP2を添加した UDPTCP をラットの鼠径部に移植したところ、移植後4週において内部に豊富な石灰化組織が観察された。

4 考察

近年、骨欠損部に移植する骨として自家骨の代わりに人工骨を用いる機会が増えているが、人工骨は自家骨に匹敵するほどの骨誘導能や骨伝導能を持っていないのが現状である。今回の研究では、β-TCP60、β-TCP75、および UDPTCP の3種類のβ-TCPを使用して血管付きβ-TCPを作成した。UDPTCPは、他のβ-TCPより細胞や血液を容易に取り込んで新生血管を誘導する能力があり、適度な力学的強度を持ち、分解・吸収が速やかに行われるため、骨移植に最適なβ-TCPであることが示唆された。今日の臨床で有効とされている血管柄付き自家骨移植は、採取部位の疼痛や感染などの問題を生じることがあるため、我々が開発した血管付き UDPTCP の有用性が証明されれば、移植医療において多大なメリットがあると考えられる。しかし、今回の血管付き UDPTCP の骨欠損部への移植実験では骨癒合を得ることが出来ず、さらなる研究が必要であると考えられる。

本研究では、BMP2を UDPTCP に添加してラット鼠径部に移植することで、血管付き UDPTCP 内に骨新生と血管新生を確認することが出来た。将来、ラット大腿骨骨欠損モデルにこの BMP2

を添加した血管付き UDPTCP を移植することで骨癒合が得られる可能性が高いと考えている。

5 結論

本研究は、3種類の多孔体 β -TCP (β -TCP60、 β -TCP75、および UDPTCP) をラット鼠径部の浅下腹壁動脈静脈下に移植して血管付き β -TCP を作成した。血管付き UDPTCP は速やかに新生血管を誘導したが、ラット大腿骨骨欠損部に移植しても骨癒合は得られなかった。我々は、BMP2 を添加することで UDPTCP に骨誘導能を持たせた血管付き UDPTCP の開発に成功したことから、今後は BMP2 添加血管付き UDPTCP の骨癒合能を確認するさらなる研究が必要と考える。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、既製の β リン酸カルシウム 3 製品の物理的特性を調べるとともに、移植した場合の組織親和性、ならびに血管柄付きで移植した場合の有用性について動物実験を通して、明らかにした。研究成果の新規性と学問的意義が認められた。

最終試験の結果の要旨

本学位論文は、既製の β リン酸カルシウム 3 製品の物理的特性を調べるとともに、移植した場合の組織親和性、ならびに血管柄付きで移植した場合の有用性について動物実験を通して、明らかにした。研究成果の新規性と学問的意義が認められた。

プレゼンおよびその質疑を通して、方法などの不明瞭であった記載についての修正を依頼した。修正論文を審査して、最終的に合格と判断した。