

氏名	Darwin Diampo Javier Lim		
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	2020	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	骨移植における破骨細胞性骨吸収阻害剤ビスフォスフォネートの前処理による効果		
論文審査委員	教授	菅原利夫	教授 滝川正春 教授 松村智弘

学位論文内容の要旨

【緒言】

海綿骨骨髄 (PCBM) やブロック骨は安定な骨移植材料として顎顔面領域では顎裂部や顎骨切除後の再建, 歯槽堤の増量など広く用いられている。移植骨の骨形成過程において破骨細胞性骨吸収は必須のステップであるが, 移植後早期の移植床の状態は血液の供給低下や術後炎症がみられ, また不備な移植骨の固定や年齢的要因など移植床の条件によっては移植骨の過度の破骨細胞性骨吸収を引き起こすことがあり臨床問題となっている。最近, 破骨細胞性骨吸収阻害剤である第3世代ビスフォスフォネート (BP) が破骨細胞性骨吸収を抑制するのみならず間接的に骨形成を促進することが報告されている。それ故にこの破骨細胞性骨吸収阻害剤が移植骨量の維持に有効であることが期待できる。本研究では, 第3世代BPにより前処理したPCBMおよびブロック骨の移植が移植後の骨吸収の抑制と骨形成を促進し, 臨床的に有用であるかどうかをについて検討した。BP処理法として, 全身の骨代謝系への影響や, 長期間の作用が生理的な移植骨の骨改造機転を抑制するのを避けるためにBPが骨のハイドロキシアパタイトに選択的に結合する作用を利用して移植前処理を行った。

【実験材料と方法】

動物は4週齢, 雄Wistar系ラット(日本クレア)を使用した。ラット骨芽細胞様細胞(FRC)は, Harrisらの方法に従い, 胎児ラット頭蓋冠をコラゲナーゼ処理することにより得た。第3世代BPとして山之内製薬筑波研究所よりYM175の供与を受けた。

a) *in vitro*におけるFRC細胞の増殖に対するYM175の影響:

FRC細胞を, α -MEM (10% FCS, 50 mg アスコルビン酸含有)で48時間培養後, 10^{-4} MのYM175をそれぞれ, 10, 30, 45分, 1, 2, 5時間作用させた。YM175を培養液から除き7日間培養後, 細胞数をコールターカウンターを用いて測定した。

b) 動物実験:

YM175によるPCBM移植への影響: PCBMはラットの腸骨, 大腿骨より採取した。PCBM採取後, YM175 (10^{-4} M)を含む培養液中で45分間処理の後, ペントバルビタールの腹腔内麻酔下にて頭蓋骨にtrephan barを用いて円形の骨欠損($\phi=6$ mm)を作製し, 同部にYM175処理したPCBMを移植した。対象として α -MEMで処理したPCBMを移植した。移植後1, 2, 4, 6, 8週目にラットを屠殺し頭蓋骨を摘出した。

YM175によるブロック骨移植への影響: ラットより大腿骨と腸骨をブロック骨片として採取後, YM175 (10^{-4} M)を含む培養液中で, 45分間処理後, PCBMと同様に, 腹腔内麻酔下で背部筋肉内に移植を行った。対象として α -MEMで処理した骨を移植した。移植後1, 2, 4, 6, 8, 10, 12週目にラットを屠殺し検体を採取した。

c) X線学的評価:

摘出した頭蓋冠並びにブロック骨はX線フィルム(Fuji Industrial X-ray film FR)にSofron X線照射装置(35 kV, 4 mA, 5秒間)で撮影した。得られたX線画像をイメージプロセッサ (ARGUS-20)を用いてデジタル化し, PCBMは骨密度の評価を, ブロック骨は経時的形態変化について, その画像データを基にNIHイメージを用いて解析した。

d) 組織学的検討：

移植骨は10%中性緩衝ホルマリン(pH 7.4)で固定後、14%EDTAで脱灰し、パラフィン包埋を行った。通法に従い組織切片を作製しヘマトキシリン-エオジン染色を行い組織学的に評価した。

【結果】

1. *in vitro* におけるFRC細胞の増殖に及ぼすYM175の影響：

YM175で処理すると1時間までは処理時間依存性に細胞数は増加傾向を示したが、2時間以上で増殖抑制を認めた。この結果から移植前のYM175による処理時間を45分間として以下の実験を行った。

2. PCBM移植に対する YM175 の効果：

1週目では非処理群はX線写真上でPCBMに僅かの骨吸収像がみられ、2週目ではX線透過性は亢進した。2週目以降、徐々にX線不透過性が亢進し新生骨形成が示唆された。YM175処理群では2週目で非処理群と同様にX線透過性は亢進したがその程度は低く、以後、徐々にX線不透過性の亢進を認めた。移植部の経時的骨密度は両群共に2週目で一旦低下したが、以降徐々に増加を認め同様のパターンを示した。しかしYM175処理群は非処理群と比較して有意に骨密度が高い傾向を示した。組織学的には非処理群では1週目で移植骨表面に多数の破骨細胞による骨吸収を認め、その周囲には炎症細胞浸潤が著明であった。2週目では、移植骨はさらに吸収したが残存移植骨を中心に活発な骨リモデリングを伴う新生骨形成を認め、以後、徐々に新生骨形成を認めた。一方、YM175処理群では、1週目には破骨細胞は認められず移植骨周囲には炎症性細胞浸潤は認めるものの血管新生と活発な類骨形成を認めた。2週目では破骨細胞による骨吸収像と移植骨量の減少を認めるものの、その周囲は活発な類骨形成を認めた。以後、骨リモデリングを伴う新生骨形成を認めたが、骨形成はYM175処理群でより著明で早い傾向を認めた。

3. ブロック骨移植に対する YM175 の効果：

大腿骨、腸骨共に、非処理群と比較してX線学的にYM175の前処理により移植骨の経時的形態変化ならびに骨吸収の程度は著明に抑制された。組織学的には、PCBM移植と比較して著明な組織変化は乏しく、非処理群において部分的に破骨細胞が骨表面で観察されるのみで新生骨形成は移植骨表面では著明でなかった。しかし、8週目までにX線像と同様に組織学的にも非処理群では移植骨の形態は著明に縮小しており緩徐な骨吸収が起こっているものと推察された。移植骨の形態的变化の程度と骨吸収程度から臨床的評価を行ったがYM175処理群でその有用性が認められた。

【考察】

PCBM移植の目的は豊富な骨形成細胞の供給にあり、ブロック骨移植は主に骨格の形態維持に利用される。本研究では、PCBM移植においてはYM175前処理により、移植床の微小環境の不良な移植初期から骨吸収の抑制と類骨形成の促進を認め、移植骨の一時的吸収を著明に抑制し、新生骨形成段階に移行した。この事は臨床上問題となりやすい顎裂閉鎖など移植環境の不良な症例において、移植骨量を維持することが可能であり軟組織の収縮を予防し良好な結果が得られると考えられる。YM175を前処理することで骨吸収が抑制されることが示されたが、YM175処理骨の骨吸抑制効果は、破骨細胞の出現や骨吸収の状態より約2週程度効果が持続することが示唆された。また、45分間のYM175の作用は*in vitro*でのFRC細胞の増殖を促進したことからPCBMで認められた初期段階での類骨形成は、YM175の薬理効果により誘導されたことが示唆された。一方、ブロック骨移植では組織学的に細胞レベルでの変化に乏しいものの経時的形態変化や骨吸収は明らかに抑制され、骨のリモデリングがPCBMと比較して緩徐である事が示唆された。ブロック骨が骨格の形態維持に用いられる点から、YM175により活発な骨形成は認められなかったものの経時的形態変化が少ないことから審美的、機能的に臨床上有用であることが示唆された。

【結論】

本研究において、YM175による前処理はPCBMにおいて破骨細胞性骨吸収を抑制する同時に、骨形成を促進する可能性を示し、ブロック骨移植においては、移植骨の骨吸収抑制と形態維持を示し、骨移植治療において移植骨に対するビスフォスフォネートの応用は有用な治療法であると考えられた。

論文審査結果の要旨

自家海綿骨骨髄 (PCBM) やブロック骨は安定な骨移植材料として顎顔面領域の顎裂部や顎骨切除後の再建, 歯槽堤の増量に対して用いられている。しかしながら, 移植骨の過度の破骨細胞性骨吸収は移植骨骨量を減弱し臨床上問題となる。ピロフォスフェイト誘導体であるビスフォスフォネート (BP) は強力な破骨細胞性骨吸収阻害剤であり, 骨吸収を抑制するのみならず間接的に骨形成を促進することが報告されている。本研究では移植骨をBPを用いて前処理することの有効性をin vitroで, さらにin vivoにおいて, この前処理を行ったPCBMやブロック骨の骨吸収抑制の効果を検討した。その結果, 移植骨の破骨細胞性骨吸収は抑制され, さらに骨形成が促進されること, 移植骨骨量が維持されることが明らかになった。以上のことは骨移植治療へのBPの有効性を示すものであり, 本申請論文は博士 (歯学) の学位論文としての価値があるものと認めた。