

氏名	黄 炳 珍
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 1854号
学位授与の日付	平成11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/コラーゲン複合体によるラット頭部骨膜 下骨増生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 滝川正春 教授 永井教之

### 学位論文内容の要旨

骨形成タンパク質 (BMP) は、異所性に軟骨と骨を誘導するという特性を有するタンパク質であるが、近年、遺伝子工学による rhBMP-2 の大量生産が可能となり、抽出 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 を応用する場合は支持体との併用が必要とされる。従来、rhBMP-2 支持体として、ヒドロキシアパタイト (HAP) やポリエチレンなどの非吸収性材料とポリ乳酸やコラーゲンの様な吸収性材料、或は両者の複合支持体が使用されてきた。骨表面で骨増生を期待する場合、非吸収性支持体は異物として残存する問題や既存骨との結合が弱いなどの欠点が指摘されることから、増骨する場合の支持体としては、増骨部分がすべて生体の新生骨に置換される吸収性材料とするのが好ましいと考えられる。既に我々は、真皮由来の I 型アテロコラーゲンを rhBMP-2 の支持体として用いて、ラット背部皮下における異所性骨誘導実験を試みた結果、良好な骨誘導を確認している。I 型コラーゲンは骨の主要成分であり、操作性に優れ、アテロコラーゲンとして処理された場合は、免疫原性が極めて低い。そこで本研究では、rhBMP-2/I 型アテロコラーゲン複合体を 8 カ月齢のラット頭部骨膜下に埋入し、骨増生の過程を経時的に長期観察し、rhBMP-2/I 型アテロコラーゲン複合体の骨増生について病理組織学的に検討した。

#### 【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 $\mu$ g を I 型アテロコラーゲン 10mg と混合後、凍結乾燥して複合体とした。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 か月齢のウイスター系雄性ラットを合計 64 匹を使用した。ネンブタール (Pentobarbital sodium) 腹腔内全身麻酔下で頭部に約 8mm の皮下切開を加え、骨膜を剥離挙上して骨膜下にポケットを形成し、埋入物を切開創から約 10mm 離れた部位に挿入した。埋入後 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 週目に各 4 匹ずつ屠殺し、埋入物と頭蓋骨を一塊として摘

出した。試料は、10%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  $\mu$  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。一部は脱灰せず、ポリエステル樹脂に包埋し、研磨標本を作成し、Electron Probe X-ray Microanalyzer (EPMA) で観察した。二次元的形態計測法はWeibel法を用いた。

### 【結 果】

実験群では、埋入1週後、挙上辺縁角部から間葉系細胞の増殖と線維性骨の形成がみられ、それに連続して、骨膜に沿って、骨形成がみられた。骨膜下埋入物外層の線維性組織には血管の増生が認められた。中央部の支持体内部には大小さまざまな空洞が形成された。2週後には、埋入物外層に帯状の線維性骨がドーム状に形成され、内方に向かって多数の間葉系細胞と血管が侵入していた。支持体内部の空洞内には紡錘形細胞や骨芽細胞様細胞が観察された。新生骨基質内には線維状の支持体コラーゲンが封入されていた。骨膜には細胞性骨膜の出現が認められた。3週後では、帯状の線維性骨が内方に向かって増殖し、一部に破骨細胞が観察された。4週後には、内方に増殖した線維性骨と既存骨が連結し、骨髄組織の形成が認められた。間葉系細胞と血管侵入は中央部まで達していた。6週後には梁状の線維性骨がほぼ全体に形成され、既存骨と融合していた。8週後、線維性骨が層板骨に変化し、既存骨との境界が不明瞭になった。12週後から24週後にかけては全体に形成された層板骨は既存骨と一体化していた。最大断面での骨形成量を計測した結果、骨髄を含む骨組織は経時的に増加し、6週には支持体のほとんどが増生骨に置換された。増生骨の高さは一定に保たれた。6週までの初期の新生骨のCa,Pの濃度は、既存骨のそれより低いが、後期の8週、12週、24週では既存骨とほぼ同様であった。

### 【考察と結論】

(1) rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体による成熟ラット骨膜下骨表面での骨形成は、対照群に比べ、早期に開始し、長期的に高さが維持され、著明な骨増生効果が認められた。

(2) 実験群での骨増生様式は辺縁角部と挙上骨膜側からドーム状に形成され、内方へ向かい、対照群の骨形成 (反応性、骨伝導) とは異なっていた。

(3) 血管増生は初期線維性骨形成に先行していたことから、骨新生と密接な関連があることが示唆された。

(4) I型アテロコラーゲンは、初期にはrhBMP-2の支持体として、また一部は骨基質の一部として利用され、長期的には改造現象による成熟骨形成につれて吸収された。

以上の結果から、I型アテロコラーゲンはrhBMP-2の有効な吸収性支持体であり、rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体は、高度に萎縮した顎堤の骨増生等の局所的骨膜下骨再建法として、臨床応用が期待できるものと考えられた。

## 論文審査結果の要旨

骨形成タンパク質 (BMP) は、異所性に骨を誘導するタンパク質であるが、BMPを応用する場合は支持体との併用が必要とされる。骨表面で骨増生を期待する場合、用いる支持体として増骨部分がすべて生体の新生骨に置換される吸収性材料とするのが好ましいと考えられる。I型コラーゲンは骨の主要成分であり、操作性に優れており、またアテロコラーゲンとして処理された場合は、免疫原性が極めて低い特性を有する。本研究はI型アテロコラーゲンをBMPの支持体に用いて、1) rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体の骨膜下骨表面における骨増生効果と長期経過、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を目的として、rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体を8カ月齢のラット頭部骨膜下に埋入し、骨増生の過程を経時的に長期観察し、病理組織学的に検討したものである。

その結果、以下のことを明らかにした。(1) rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体によるラット骨膜下骨表面での骨形成は、対照群(反応性、骨伝導)に比べ、早期に開始し、著明な骨増生効果が認められた。(2) 骨形成様式は早期に辺縁角部と挙上骨膜側からドーム状に形成され、次いで内方へ向かって新生骨が形成された。このことは長期的に高さが維持されることと密接に関連していることが示唆された。(3) 骨膜下線維性組織内での血管増生は骨形成に先行して内方へ増生していたことから、骨新生と密接な関連があることが示唆された。(4) I型アテロコラーゲンは、初期にはrhBMP-2の支持体として、また一部は骨形成初期には線維性骨基質の中に残存していたが、長期的には改造現象による成熟骨形成と共に吸収され、増骨部分がすべて生体の新生骨に置換された。

これらの知見は、I型アテロコラーゲンはrhBMP-2の有効な吸収性支持体であり、rhBMP-2/I型アテロコラーゲン複合体は、顎堤の骨増生等の局所的骨膜下骨再生法として有用と考えられることから極めて意義がある。よって本申請論文は博士の学位を受けるに足りるものと認める。