

氏名	譚 軍
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 2008 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/コラーゲン支持体における化学的固定化の有無による異所性骨誘導への影響について
論文審査委員	教授 鈴木一臣 教授 山本敏男 教授 永井教之

学位論文内容の要旨

【研究目的】

近年、遺伝子組み換え技術によってヒトBMPの産生が成功し、特にリコンビナントヒトBMP-2 (rhBMP-2) が強力な骨誘導活性を有することで重視されている。この際、問題となるのはrhBMP-2を支持体へどのように維持するかである。従来より、多くの支持体に関する研究は吸収性及び非吸収性の生体材料が用いられてきた。しかし、支持体の性状によって、骨形成が生じないか、あるいは効果が一定ではないことが知られている。一方、インシュリンやEGFなどの成長因子を生体材料に共有結合により固定化させたin vitroの研究では、固定化された成長因子は細胞膜のリセプターと鎖体を形成した後も、細胞内に取り込めずに長時間にわたり刺激を伝達することが可能であると報告されている。本研究は、研究IとしてrhBMP-2/IBMの従来の複合化法により異所性骨誘導、支持体の役割について考察すると共に、研究IIではrhBMP-2とアテロコラーゲンの共有結合を化学的成立させ、rhBMP-2を支持体へ固定化した後、ラット皮下での異所性骨誘導効果を判定した。

【研究方法】

研究I. rhBMP-2/IBM複合体による骨誘導を観察し、支持体の役割について検討する。

rhBMP-2/IBM複合体群: rhBMP-2は0.1MPBSを用い、0.025 μ g/ μ lとなるように希釈調整した。IBM 40mgを改良シリンジ内に入れ、埋入直前に上記rhBMP-2溶液 (80 μ l) を滴下含浸した。

IBM単独群(対照群). IBM 40mgのみを改良シリンジに入れ、PBS (80 μ l) を滴下した。

研究II-1 . WSC処理rhBMP-2/アテロコラーゲン複合体の異所性骨誘導効果の観察

固定化処理群：0.3%I型アテロコラーゲン酸性溶液3.3mlを凍結乾燥した後、1%Water-Soluble Carbodiimide(WSC)5 μ gを加え、2時間、4 $^{\circ}$ Cで前処理を行った。さらに、rhBMP-2 10 μ gを加えて、48時間、4 $^{\circ}$ Cで複合化した。次に、0.1%Trifluoroacetic Acid (TFA) に対して透析を行い、凍結乾燥した。

非固定化処理群：0.3%I型アテロコラーゲン酸性溶液3.3mlにrhBMP-2 10 μ gを加えて複合化し、凍結乾燥した。

rhBMP-2非添加群 (対照群)：固定化処理群と同一作製過程で、rhBMP-2の代わりに、牛由来アルブミン10 μ gを用いた。

研究II-2. 研究II-1においてrhBMP-2/アテロコラーゲンの複合化後、固定されていないrhBMP-2を洗浄で除去した後、両者の異所性骨誘導効果の差を判定する。

固定化处理洗浄群：研究II-1の固定化方法に従って複合化後、0.1M PBSで洗浄し、凍結乾燥した。

非固定化处理洗浄群：固定化处理洗浄群の方法に従って行うが、WSCを加えずに、0.1M PBSで洗浄し、凍結乾燥した。

動物実験と観察方法

実験動物として、雄性、4週齢Wistar系ラットを研究Iは18、研究IIでは20匹を使用した。ネンブータル（Pentobarbital Sodium：40mg/kg）腹腔内全身麻酔下で、背部皮下組織に複合体を埋入した。研究Iと研究II-1は埋入後1週、2週、3週、研究II-2は埋入後2週目に動物を屠殺し、埋入物を摘出した。摘出した組織は半割し、半分を4%パラフォルムアルデヒド（0.1M PBS溶液）で固定した。10%蟻酸で7日間で脱灰した後、通法に従ってパラフィン包埋し、4 μ mの薄切切片を作製後、H.E.洗色を施し、光学顕微鏡で観察した。研究II-1の摘出した組織の一方は、生化学的分析の試料として、アルカリフォスファターゼ（ALP）活性とCa含量を測定した。研究II-1埋入前の試料各10 μ gを電気泳動泳動した後、抗BMP-2抗体によりWestern-blottingを行い、rhBMP-2とアテロコラーゲンの化学結合する可能性を検討した。

【研究結果】

研究Iの組織学的所見：埋入1週後、IBM顆粒の間に関葉系細胞の侵入と軟骨の形成が認められた。埋入2週後、軟骨組織の辺縁部は吸収を受け、線維性骨の形成が認められた。埋入3週後、複合体の外周に線維性骨が形成され、内部に骨髄様組織が世立した。

研究II-1におけるWestern blottingによるBMP-2の検出：非固定化处理群は16.5KDa付近に単一のバンドが認められた。固定化处理群は32KDaより高分子量に複数のバンドが認められた。

研究II-1の組織学的所見：1週目に固定化处理群は、支持体外周から骨芽細胞様細胞と類骨形成を認める。非固定化处理群では骨形成は認められない。2週目の固定化处理群は、支持体外周と内層に線維性骨の形成が認められた。非固定化处理群では、支持体外周のみに線維性骨が形成された。3週目には固定化处理群が支持体外周に層板骨様の骨形成と中心部で骨髄様組織を伴う梁状線維性骨を認めた。非固定化处理群では外周にのみ一層の石灰化した線維性骨が形成された。

研究II-1のALP活性とCa含量の測定結果：固定化处理群は非固定化处理群よりも1,2,3週でのALP活性が著明な増加が見られ、両群の有意差がみとめられた（ $P<0.01$ ）。1週目のCa含量は固定化处理群と非固定化处理群ともに低く、2週目から、固定化处理群のCa含量は著明に上昇していた、両群の有意差が認められた（ $P<0.01$ ）。

研究II-2の組織学的所見：固定化处理洗浄群が軟骨様組織と類骨様組織の形成を認めるが、非固定化处理洗浄群では間葉系細胞の増加を認めるものの軟骨、骨形成は認められない。

【まとめ】

rhBMP-2/IBM複合体による異所性骨誘導実験を行うと共に、rhBMP-2/アテロコラーゲン複合体を用いて、アテロコラーゲンとrhBMP-2間で共有結合を成立させ、ラット皮下での異所性骨誘導効果を検討し、以下の結論を得た。

1. IBMを用いたrhBMP-2の異所性骨誘導は内軟骨性骨化と直接骨化様式が認められた。IBMにはrhBMP-2の維持に必要な機械的構造が付与していると考えられる。
2. rhBMP-2の支持体としてアテロコラーゲンを用いる場合は、rhBMP-2とアテロコラーゲンとの共有結合を行うことにより、極めて有効な骨誘導効果が見られた。

以上のことから、rhBMP-2と支持体の複合化におけるrhBMP-2の支持体への固定化は新たな方法であり、臨床応用が期待できると考えられた。

論文審査結果の要旨

近年、遺伝子組み換え技術によって骨誘導蛋白（BMP）の産生が成功し、特にリコンビナントヒトBMP-2（rhBMP-2）は強力な骨誘導活性を有することで、生体材料として期待されている。rhBMP-2の骨誘導能を最大限に発揮するためには、適切な支持体との併用複合化が必須である。この際、問題となるのはrhBMP-2を支持体へどのように維持するかである。従来の支持体に関する研究は、浸透法や凍結乾燥法など複合化法を用いているが、効果は一定しない。I型アテロコラーゲンは、免疫性が低く、操作性と生体親和性に優れた吸収性生体材料であり、rhBMP-2の新しい支持体として注目されている。本研究は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（Water-soluble carbodiimide：WSC）を利用して、rhBMP-2とアテロコラーゲンの共有結合を化学的に成立させ、rhBMP-2を支持体へ固定化した後、ラット皮下での異所性骨誘導効果を判定したものである。

その結果、以下のことを明らかにした。

1. 対照として用いた脱灰骨基質（IBM）支持体はrhBMP-2の維持に働き、未分化間葉系細胞の付着と増殖分化、骨、軟骨添加の足場として作用する。IBMにはrhBMP-2の維持に必要な機械的結合が付与している。

2. rhBMP-2の支持体としてアテロコラーゲンをを用いる場合は、rhBMP-2とアテロコラーゲンとの共有結合を行うことにより、固定化rhBMP-2の骨誘導効率が高い。

以上の研究成果は、骨形成機構及び生体材料の開発に新展開をもたらす価値ある内容である。したがって、本論文は博士（歯学）の学位の授与に値すると判定した。