

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小久保 諭

従来、大きな骨欠損部位の治療には自家骨、同種骨及びセラミクスなどが移植材料として用いられてきたが、自家骨では採骨部位の疼痛や採骨量の制約、同種骨では移植片への免疫反応や感染症伝搬の危険性、人工材料では生体内での残存や骨組織との力学強度特性の差異等、様々な問題点が指摘されており、新たな移植材料が求められている。

骨形成因子-2 (BMP-2) は 1988 年、Wozney らにより遺伝子配列が同定された蛋白であり、ヒト遺伝子組換え型 BMP-2 (rhBMP-2) が開発されて以降、その強力な骨及び軟骨系細胞への分化誘導作用から、新たな骨欠損補填材料としての応用が期待されている。しかし、生体内に移植された rhBMP-2 は速やかに分解及び拡散されることから、その薬効発現には本蛋白を保持し、かつ徐々に放出し得る適切な担体が必須である。これまでに多くの担体が検討されてきたが、rhBMP-2 の薬効発現に最適な担体は未だ見出されていない。著者らはその担体候補として、ゼラチンスポンジを PLGA でコートした PLGA-coated gelatin sponge (PGS) を創製し、ラット異所性骨誘導モデルにおいて、優れた性能を有することを示した。

そこで本研究では、長管骨骨欠損を主たる適応症と想定し、ウサギ尺骨及びイヌ脛骨分節性骨欠損モデルを用い、PGS 担体と rhBMP-2 の臨床応用を目的として以下の実験を行った。

第 1 章の緒言に続き、第 2 章では、PGS の rhBMP-2 担体性能の探索を目的とし、日本白色ウサギの尺骨分節性骨欠損モデル (1.5cm の分節性欠損) において rhBMP-2/PGS の骨修復作用、rhBMP-2 用量反応性及び安全性を検討した。骨欠損部に rhBMP-2 をそれぞれ 0.1, 0.4, 1 mg/cm³ 含浸させた PGS (BMP 群)、あるいは PGS のみ (PGS 群) を移植し、移植後 8 もしくは 16 週まで観察した。その結果、PGS 群では骨欠損修復が見られなかったのに対し、BMP 群では rhBMP-2 濃度依存的に X 線学的癒合率が増加した。組織学的にも移植後 16 週の BMP 群

では、層板構造を有する成熟骨組織が認められた。一方、再生骨組織の力学強度の回復は濃度依存的に認められたが、正常尺骨の強度までには回復しなかった。

第3章では、rhBMP-2/PGS 移植後初期における骨形成過程に関する詳細な検討を、ウサギ尺骨分節性骨欠損モデルを用いて実施した。材料と方法は前章と同様であり、移植後 3, 7, 14, 21, 28 日に採材し組織検査に供した。移植後 3 日及び 7 日において、rhBMP/PGS 移植部位周囲の筋組織間隙には未分化間葉系細胞あるいは血管内皮細胞と推定される多数の紡錘系細胞が観察された。PGS 群では骨再生が見られなかったが、BMP 群では移植後 14 日より血管再生を伴う骨再生像が認められ、移植後 28 日までには骨欠損部が再生骨組織により充填され、rhBMP-2/PGS が濃度依存的に骨欠損を修復することが認められた。さらに、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を免疫組織化学により検討したところ、BMP の作用の一部は未分化間葉系細胞あるいは血管内皮細胞の動員、VEGF 誘導を介した血管新生に因ることが示唆された。

第4章では、再生された骨組織の長期的機能を検討する目的で、イヌ脛骨分節性骨欠損モデルにおける rhBMP-2/PGS の骨欠損修復作用を X 線及び組織所見、ならびに力学強度を指標に検討した。イヌ脛骨骨幹部に 2.5cm 長の分節性骨欠損を作製し、金属プレートで固定後、rhBMP-20.4 mg/cm³ 含浸させた PGS を移植し、移植後 32、52、104 週まで X 線学的に観察した。その結果、移植後 8 週にて全例で骨欠損部断端間の骨癒合を認めた。また、再生骨組織の力学強度は、全てのパラメータで移植後 32 週に正常脛骨と同程度に回復し、かつ移植後 104 週もその力学強度は正常骨と同程度に維持されていた。移植後 104 週の再生骨組織は緻密な層板構造を有していた。以上の結果より、誘導された骨組織は長期にわたり機能的に安定であることが示された。また、これらの実験を通じて、PGS に対する有害な反応は見られなかった。

以上要するに、本研究は rhBMP-2/PGS が長管骨大欠損部の移植材料としてきわめて有用であることを示し、かつその至適濃度や安全性も明らかにしたものであり、臨床応用上その貢献するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（獣医学）として価値あるものと認めた。