

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成18年博士課程入学
氏名：崔 成真
指導教員：佐々木 伸雄

**論文題目：Study on the Treatment for Large Bone Defects with Basic Fibroblast
Growth Factor-incorporated Tailor-made Artificial Bones in Dogs
(犬の大きな骨欠損に対する塩基性線維芽細胞増殖因子結合テーラーメイド人工骨による治療に関する研究)**

外傷、腫瘍あるいは先天的な奇形により発生する大きな骨欠損に対し、従来から骨移植が用いられてきた。骨移植には自家移植、同種移植、異種移植の3種があり、自家移植が最も広く用いられている。しかし、採骨量の限界、採骨部への手術やその後の痛みなど、患者への負担は大きい。一方、それに代わって最近広く用いられている人工骨にはhydroxyapatiteやtricalcium phosphate(TCP)などのリン酸カルシウム系人工骨がある。

著者らはCTデータをもとに α -TCP粉末をインクジェットプリンターを用い、シート状に固形、積層、造形して欠損部と同様の形状を有するテーラーメイド人工骨を開発した。本人工骨は短時間で作製され、移植手術も短時間で終了できるなどの利点がある。しかし、本人工骨の作用は骨伝導のみであり、さらに骨誘導能も持つ人工骨の開発が望ま

れていた。本研究では、著者らが開発したテーラーメイド人工骨にbFGFを結合させ、大きな骨欠損部の修復における臨床的有用性について総合的に評価した。

リン酸カルシウム系人工骨に骨形成蛋白や塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)などの骨誘導因子を結合させた場合、それは強力な吸着能のため、結合したこれらの因子の放出に問題が生じることが示唆されている。

第1章では細胞膜ないし組織の保護作用を有する二糖類トレハロースに着目し、これを人工骨へコーティングした時の bFGFの放出量について *in vitro* で検討した。また、この人工骨は体液などに浸漬すると強度の低下する可能性があり、その点に対するトレハロースの効果を確認した。その結果、トレハロース処理をした人工骨ではbFGFの放出により培養中の骨芽様細胞の増殖が非トレハロース処理人工骨より有意に高く、トレハロースによるbFGF放出を促進する効果が認められた。さらに、生理食塩水への浸漬によって本人工骨の強度は低下したが、トレハロース処理により浸漬していない本人工骨と同様の力学的強度が保持されることが明らかとなった。

第2章では犬の頭蓋骨欠損モデルを用い、トレハロースコーティング、非コーティングの人工骨にbFGFを結合させ、その骨増殖効果について検討した。

直径11mmの2つの連通孔を持つ人工骨を造形し、0, 1, 10, 100, 200 μ g濃度のbFGFをトレハロースコーティング、非コーティング人工骨に結合させた。実験犬の頭蓋骨に人工骨と同様の骨欠損を作製し、各人工骨を移植し、1ヵ月間、臨床症状、CT所見を観察した。

1ヵ月後に安楽死した犬から人工骨および周囲の骨組織を採材し、マイクロCTおよび組織学的に骨形成状態を評価した。その結果、bFGF濃度100, 200 μg を結合させた人工骨を移植した骨欠損部では新生骨量が有意に増加しており(図1)、bFGF濃度200 μg では異所性新生骨も観察された。これらの結果から骨欠損部における骨新生はトレハロースコーティング、非コーティングによる差がみられず、トレハロースコーティングによるbFGF早期放出効果は認められなかった。

これはアルブミンなどの体内蛋白質が人工骨に結合し、トレハロースのコーティングと同様の効果を示したのか、あるいは人工骨と電解質との反応により

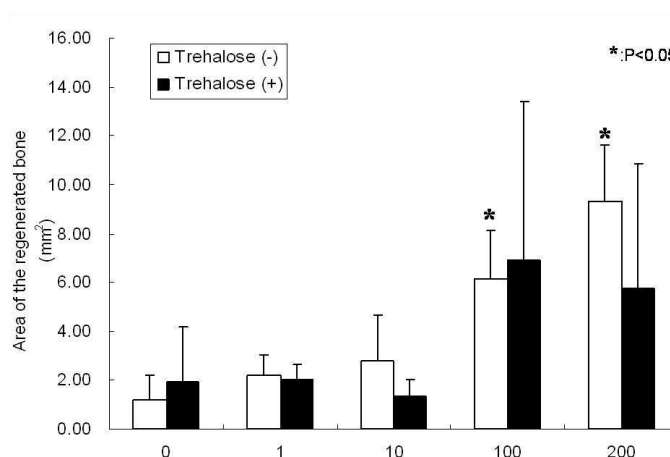


図1.bFGF濃度による新生骨増殖効果。bFGF濃度100,200 μg で有意な新生骨増殖効果が認められたが、トレハロース処理による新生骨増殖効果は認められなかった。

bFGFが放出されたのかもしれない。

一方、骨形成量の評価から、本人工骨に対する至適bFGF量は100 μg 程度と考えられた。

第3章ではbFGF結合テーラーメイド人工骨の臨床応用を目的とし、犬の頭蓋骨に大型の骨欠損部(Critical size defect ; CSD)を作成し、本人工骨による治療効果を1年間にわたって検討した。

人工骨は犬の頭蓋骨のCTデータを用い、直径20mmで直径2mmの6個の連通孔を設けたデザインで造形した。なお、すべての人工骨に対してトレハロースコーティングを行った。実験群は欠損部のみのコントロール群、bFGF非結合人工骨(TI群)、および200 μ g bFGFを結合させた人工骨(fTI群)の3群である。観察方法は1-2ヵ月毎にCT撮影を行うとともに、2ヵ月、6ヵ月、12ヵ月の時点でそれぞれテトラサイクリン、カルセイン、アリザリン・コンプレクソンによる蛍光染色を行った。12ヵ月後に安楽死し、組織を採取して、マイクロCTおよび蛍光染色および組織学的評価を行った。さらに、骨欠損部の強度評価のために3点曲げ強度実験を行った。

CT上ではfTI群では連通孔での骨形成がTI群より多く、また画像を基にした人工骨の三次元的な大きさが有意に高かったことから、より多くの骨形成の生じたことが示された。12ヵ月後の組織所見では、コントロール群では骨欠損部に明らかな新生骨はなかった。一方、TI群とfTI群では、テーラーメイド人工骨はその形態を維持していたが、その一部は新生骨に置換されていた。さらに、新生骨量はTI群よりfTI群で有意に増加していた。蛍光染色の結果、これらの新生骨はほとんど移植後1-2ヵ月の間に形成されたことが確認され、この時期に人工骨より放出されたbFGFが効果を示したことが推測された。3点曲げ強度実験ではすべての実験群に強度の差は認められなかったことから、人工骨自体は骨欠損部の強度に寄与しないことが示唆された。

以上の結果から犬の大きな頭蓋骨の骨欠損部に対するbFGF結合テーラーメイド人工骨

の有用性が示された。頭蓋骨は扁平骨であり、必ずしも大きな荷重は生じない。そこで、第4章では長骨などの荷重部への本人工骨の応用可能性について、犬の橈骨欠損モデルを用いて検討した。

犬の両側橈骨の中央部に長さ20mmの欠損部を作製し、橈骨形状と同一の無処理人工骨(TI群)と100 μ g bFGF結合人工骨(fTI群)を移植した。その結果、移植後4週目にfTI群では骨欠損部に仮骨が形成され、人工骨は橈骨と癒合していた。しかし、TI群では1例を除いて人工骨は橈骨に癒合しておらず、2例では人工骨の破損が認められた。また、fTI群ではTI群より新生骨の量が増加していたが、統計的な有意差は認められなかった。この理由は、用いた人工骨に対して結合させたbFGF量が不足したため、骨増殖効果が不十分であったものと考えられた。

以上の結果から、荷重部に対する本人工骨の強度は十分ではないが、適切量のbFGFを結合させ、早期骨増殖を誘導し、早期に骨欠損部の安定化が得られれば、十分に応用可能であることが示唆された。

以上本研究の結果から、 α -TCP粉末からCTデータをもとに欠損部と同一形状を有する人工骨を作製し、これに骨誘導能を持つbFGFを結合させたテーラーメイド人工骨は、複雑な形状の大きな骨欠損部に対し、早期に骨形成を誘導し、人工骨の安定化を生じさせるきわめて有力なインプラントであり、きわめて高い臨床的有用性を有すると考えられた。