

学位論文審査の結果の要旨

平成 29年 6月 2日

審査委員	主査	永年 智久		
	副主査	互氣 実		
	副主査	三木 宗弘		
願出者	専攻	機能構築医学	部門	医用工学
	学籍番号	13D703	氏名	山口幸之助
論文題目	Prefabrication of Vascularized Allogenic Bone Graft in a Rat by implanting a Flow-through Vascular Pedicle and Basic Fibroblast Growth Factor containing Hydroxyapatite/Collagen Composite			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	・	<input type="radio"/> 不合格	(該当するものを○で囲むこと。)

〔 要 旨 〕

【緒言】

従来、大きな骨欠損に対しては血管柄付き自家骨移植が通常行われてきたが、正常な自己組織を犠牲にする問題があった。そのため、我々は代替え法として、同種骨移植時にレシピエントの血管束を導入することで血管柄付き同種骨を作成し、さらに basic fibroblast growth factor (bFGF) 添加により骨形成を促進する方法を報告してきた。しかし bFGF は生体内寿命が短いため、徐放化が必要となる。そこで、スポンジ状人工骨であるリフィット® (HAp/Col) に bFGF を添加することで徐放化させ、移植骨の髄腔内に充填することで、効果的な骨形成および血管新生の促進を図れるかを、組織学的および遺伝子学的に検討した。

【方法】

9週齢メスSDラットをdonorに、9週齢オスWistarラットをrecipientとした。まず、donorの大腿骨より10mmの骨柱(移植骨)を採取し、加温滅菌・凍結保存の後、recipientの大腿内側に移植した。

群分けは、コントロール群(以下C群)、血管束導入群(以下V群)、人工骨FGF添加群(以下F群)、血管束導入および人工骨FGF添加群(以下VF群)とした。

V群は血管束を同種骨髄腔に導入した。F群は移植時に recombinant human bFGF (rh-bFGF) 100 μg を添加した人工骨を移植骨の髄内へ充填した。VF群は血管束を同種骨髄腔に Flow through にして導入したのちに、rh-bFGF を添加した人工骨を移植骨の髄内へ充填した。これらの外科的処置は手術用の顕微鏡を使用して行った。

骨回収の2日前にカルセインにて骨標識を行い、移植後4週間後にこれらの移植同種骨を回収した。回収した移植骨から非脱灰および脱灰標本の作成と、total RNAの抽出を行った。非脱灰標本では contact microradiographs (CMR) による骨形成の評価と骨形成面率(%LS)の計測を行った。脱灰標本では移植骨内での微小血管形成の評価(HA染色)および破骨細胞面率(%OcS作成)の計測(TRAP染色)を行った。Total RNAはRT-PCRによる遺伝子(骨形成:BMP-2、osteocalcin、type-1 collagen、BAP、骨吸収:RANKL、血管新生:VEGF)発現の定量に用いた。

【結果】

H.E 染色切片では V 群、VF 群の移植血管は開存しており、特に VF 群においては微小血管の増生を認めた。

CMR では、V 群および F 群において軽度の骨形成と、VF 群での著明な骨形成を認めた。

%LS (%) は C 群 4.8 に対し、V 群 14.3 および F 群 16.5 と増加し、VF 群では 40.1 と有意に増加した。TRAP 染色における %OcS (%) は C 群 6.1、V 群 5.2、F 群 5.3、VF 群 3.8 で有意差はなかった。骨形成、血管新生の各関連遺伝子発現は、F 群および V 群で微増し、VF 群で増加を認めた。一方、骨吸収関連遺伝子の発現は、各群間で有意差はなかった。

【考察】

骨組織再生に必要な要素として、機能的な足場材料、骨組織を作る元となる細胞成分、骨芽細胞を増殖させる増殖因子の存在が知られている。本研究では機能的足場として同種移植骨を使用し、細胞成分の供給のために血管柄の導入を行った。増殖因子としては bFGF を使用し、さらにこの徐放化のみではなく、骨伝導能や足場材料になる工夫としてスポンジ状人工骨であるリフィットを併用した。

本研究において、移植同種骨に血管束および、FGF 添加人工骨を骨髄内に充填することで、組織学的に骨形成の有意な増加は認められたが、骨吸収の増加は認めなかった。また、各関連遺伝子の評価でも、血管新生関連遺伝子の発現増強および、骨形成関連遺伝子の発現増強は認められたが、骨吸収関連遺伝子には大きな変化を認めないことが確認された。このことから、今回の方法により血管新生および骨形成のみが促進され、骨吸収が促進されない理想的な血管柄付き同種骨を prefabricate できることが確認された。

本研究に関する学位論文審査委員会は平成29年5月30日に行われた。

本研究は血管柄付き同種骨を作成し移植を行う際に basic fibroblast growth factor (bFGF) を添加し、その徐放材としてスポンジ状人工骨である Hydroxyapatite/Collagen (HAp/Col) を用いることで、良好な骨形成能を持つ血管柄付き同種移植骨が作成できることを証明したもので、結果に対する十分な考察もなされている。

本研究で得られた成果は、今後の臨床において、腫瘍切除術後や外傷による大きな骨欠損に対する、骨組織再建の発展において意義があり、学術的価値が高い。

委員会の合議により、本論文は博士（医学）の学位論文に十分値するものと判定した。

審査においては

1. 他家骨や人工骨を使うと、どのような結果になるのか
2. 移植骨の強度について
3. bFGF を使用している他の同様の研究と比較して同様の結果であったか
4. 実際の臨床での bFGF や BMP-2 の使用状況
5. 整形外科領域での臨床においての同種骨の使用状況
6. 導入した血管の径と、その血行や塞栓について
7. ドナーとレシピエントの性差、種類の違いについて
8. 血管柄の導入方法に他の方法はないのか
9. 徐放性とその作用時間が実際に骨形成に及ぼす影響
10. ラットよりも大きな動物での研究や、今後の実験計画について
11. 実際に FGF の添加を行った手技について
12. 本研究での良好な結果を得られた要因について
13. 本研究を用いての、今後の展望

などについて多数の質問が行われた。申請者はいずれにも明確に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

掲 載 誌 名	Journal of Reconstructive Microsurgery 第 33 巻, 第 5 号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2017年	2月	出版社(等)名 Scholar One

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。