

リコンビナントBMP-2 を用いた新しい骨移植法  
(自家誘導骨移植) の開発

(課題番号 : 1 2 6 7 1 9 3 2)

平成 1 2 - 1 4 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))

研究結果報告書

平成 1 5 年 6 月

研究代表者 山本 学

(滋賀医科大学 医学部 講師)

# 平成12年度科学研究費補助金（一般研究(C)）

## 研究結果報告書

研究課題：リコンビナントBMP-2を用いた新しい骨移植法（自家誘導骨移植）の開発  
課題番号：12671932

### はしがき

歯科口腔外科領域において、う蝕のような歯そのものの疾患以外のほとんどの疾患は骨を吸収、侵襲しまた、病変を摘出、切除することにより骨が欠損する。機能的、審美的に患者のQOLを回復するためには骨を再生、再建することが必要である。そのため、「骨の再生、再建」は過去から今日まで様々な試みがなされてきた。しかし、未だ確固たる方法は確立されていないのが現況であり、骨の再生、再建法の確立は歯科口腔外科領域における大きなテーマである。

骨の再建法には、血管柄付き骨移植、遊離骨移植、人工材料による再建が代表的である。血管柄付き骨移植、遊離骨移植は移植骨を採取するために生体の健常部を侵襲しなければならないこと、採骨量に限界があることが大きな欠点であり、人工材料は生体にとってはあくまでも異物であり、感染や移植体の脱落を招くことが問題点である。

Lopezは1990年、未脱灰の真珠貝(*Hyriopsis schlegeli*)が新生骨の形成を活性化する能力を有することを報告した。これは真珠貝には骨を誘導するある種のタンパクが存在するためであると考えられている。真珠貝の表面には骨と同様に多量のハイドロキシアパタイトが存在する。そこで、真珠貝を脱灰しハイドロキシアパタイトを除去すれば、さらに新生骨の形成は向上する可能性が高いものと考え、培養液を検討すると共にマウスの骨芽細胞(MC3T3-E1)を用いて*Hyriopsis schlegeli*の骨誘導能を検討した。

また一方、近年大きな注目を集めている成長因子の1つに骨誘導タンパク(Bone Morphogenetic Protein)があり、これは人骨の皮質骨にも多量に存在している。そこで、われわれは他家の人骨に脱灰およびその他の化学的操作を加え Autolyzed, Antigen extracted, allogeneic (AAA) bone を作製し独自のBone Bankを設立し、臨床適用を行い、その有用性を報告してきた。

近年の遺伝子工学の進歩に伴い、rhBMPを作製することが可能になった。中でもrhBMP-2は高い骨誘導能を有していることが報告されている。そこで、ドナーとレシピエントを同一体にすれば免疫反応を消失させることが可能であろうと予測し、スポンゼルを担体としてrhBMP-2をラットの腹直筋内に移植し、誘導された新生骨を移植骨として同一ラットの頭蓋骨に形成した骨欠損部に移植しその経過を病理組織学的に観察した。

これらの結果について報告する。

滋賀医科大学附属図書館



2002018417

## 研究組織

研究代表者： 山本 学  
(滋賀医科大学 医学部 講師)

研究分担者： 瀧上 啓志  
(滋賀医科大学 医学部 助手)

## 研究経費

平成12年度	3,000千円
平成13年度	400千円
平成14年度	400千円
<hr/>	
計	3,800千円

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. Nan-Chang Su, Gaku Yamamoto, Yusuke Kimura, and Kazusada Yoshitake:  
Effects of decalcified and undecalcified nacre of freshwater mollusk *hyriopsis schlegeli* on mouse osteoblasts (MC3T3-E1) to induce osteoid *in vitro*.  
J Shiga Univ Med Sci, 17: 63-71, 2002.
2. Nan-Chang Su, Gaku Yamamoto, Yusuke Kimura, Yang Xu, and Kazusada Yoshitake:  
Can decalcified nacre induce new bone formation ?  
J Shiga Univ Med Sci, 16: 27-32, 2001
3. 山本 学, 坂本耕三, 北中一寿, 蘇 南彰, 徐 洋, 瀧上啓志, 山口芳功, 吉武一貞 :  
滋賀医科大学歯科口腔外科学講座における骨銀行の現状. 滋賀医科大学雑誌, 16: 5-15, 2001.
4. N. C., Su, G. Yamamoto, Y. Kimura, and K. Yoshitake:  
The influence of fluoride on the calcification induced in a co-culture of mouse osteoblasts and nacre of mollusk *Hyriopsis schlegeli*.  
Fluoride 34: 205, 2001.
5. G. Yamamoto, K. Sakamoto, K. Takigami, M. Mori, and K. Yoshitake:  
Clinical Evaluation of Autolyzed, Antigen Extracted, Allogeneic (AAA) Bone as a Filling Material for Bonny Defect J Dent Res 78: 1121, 1999.

### (2) 口頭発表

1. N. C., Su, G. Yamamoto, Y. Kimura, K. Yoshitake:  
The influence of fluoride on the calcification induced in a co-culture of mouse osteoblasts and nacre of mollusk *Hyriopsis schlegeli*.  
International Society for Fluoride Research, 2001.
2. Inoda, H., Yamamoto, G.:  
Histological study of osteoinduction by rh-BMP2 in bone defect of rat calvaria.  
The 5th Meeting of the International Congress on Maxillofacial Rehabilitation,  
Oct. 3-5, 2002.

# ラット頭蓋骨骨欠損モデルにおけるrhBMP-2自家誘導骨と凍結他家骨の組織修復機序の比較検討について

滋賀医科大学歯科口腔外科学講座 猪田浩理、山本 学

## 緒 言

1965年、M.R.Uristが異所性骨誘導現象を発見して以来、骨誘導タンパク(Bone Morphogenetic Protein: BMP)は間葉系細胞を骨芽細胞へ分化させる能力を有するタンパクとして様々な試みがなされている<sup>1,2)</sup>。BMPのアミノペプチド構造も明らかにされ、現在ではBMP1~15までの同定がなされており、遺伝子学的手法の発展と共に recombinant BMP(rhBMP)を精製することも可能となった<sup>3)</sup>。中でもrhBMP-2は骨誘導性の高いタンパクとして知られている。rhBMP-2の局所応用としては、生体親和性の高い物質を担体として移植する方法、ウイルスにrhBMP-2の遺伝子を組み込んでrhBMP-2を産生する方法が試みられており、rhBMP-2による骨形成に関する検討は数多く認められるが、形成された骨の移植材料としての生物学的活性についての報告は認められない。

今回われわれは、rhBMP-2を用いてラットの腹直筋内に誘導した骨を同一ラットの頭蓋骨欠損部に移植した自家誘導骨移植群と凍結した他家骨を移植する凍結他家骨を頭蓋骨の欠損部に移植した他家骨移植群を設定し、両者の骨接合状態を比較した。すなわち、ドナーとレシピエントを同一にし、自家誘導骨の生体親和性を凍結処理を施した他家骨と比較した。

## 材 料

### 1. 自家誘導骨の作製

2 × φ5 mmの吸収性ゼラチンスポンジに山之内製薬より譲渡を受けたrhBMP-2 (50 μg) を浸透させ、24時間凍結乾燥したものを移植体とした。これをエーテル麻酔下に4週齢のウイスター系雄ラット(日本クレア)の腹直筋内に形成したポケット内に移植した。移植後7週(11週齢)に軟X線写真を撮影し、不透過物の形成を確認した。この不透過物を自家誘導骨と称し、移植体として使用した。

### 2. 他家骨の作製

11週齢のウイスター系雄ラットの頭蓋骨をφ4 mmのトレフィンバーを用いて頭蓋骨骨片を採取し、-80<sup>o</sup>で冷凍保存したものを移植体とした。

## 方 法

11週齢のウイスター系雄ラットをエーテルにて麻酔後、頭部を剃毛。イソジンにて消毒後、皮膚を切開した。さらに骨膜を切開、剥離後、頭蓋骨を露出した。そしてφ4 mmのトレフィンバーを用いて生理食塩水注水下に頭蓋骨を開削し、φ4 mmの骨欠損を作製し、そのまま閉創したものを自然治癒群とした。一方、この骨欠損部に自家誘導骨を移植したグループを自家誘導骨移植群とした。同様に頭蓋骨に骨欠損を作製し、こ

ここに他家骨を移植したグループを他家骨移植群とした。

移植後、3、6、9週齢に各々3匹のラットを屠殺し、頭蓋骨を摘出し、10%ホルマリン溶液にて固定した。脱灰処理後、通法に従いパラフィン包埋し4  $\mu\text{m}$ の切片にヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的に検索した。

## 結 果

### 1. 自然治癒群

術後3週には、骨欠損部は線維性組織で置換され、散在的に新生血管を認めた。出血巣に炎症性細胞はほとんど認められなかった。術後6週および9週には、母床骨の欠損部辺縁にわずかに骨の添加を認めるだけであった。また、9週以降、骨の添加は認められず、術後40週経過しても、骨欠損部に骨の添加は認められず、大部分が線維性組織で満たされていた。以上の結果から、本実験で設定した $\phi 4\text{ mm}$ の骨欠損はCritical Size Defect (CSD)の条件を満たし、 $\phi 4\text{ mm}$ の骨欠損が本実験を行うにあたっての適切なサイズであることが示された。

### 2. 自家誘導骨移植群

移植3週後には、移植骨と母床骨の間には毛細血管を含んだ線維性組織と結合性組織が介在し、一部に母床骨からの新生骨梁の発育が認められた。また、これは移植骨と母床骨の近接部に特異的に観察された(図1)。

移植6週後には、母床骨と移植骨間の線維組織中の毛細血管は減少し、母床骨側縁部からの新生骨梁の発育はさらに著明となり、移植骨と母床骨の近接部位においては新生骨が両者を連結している箇所も認められた(図2)。

移植9週には、母床骨側の辺縁全体に新生骨梁が発育しており、移植骨と母床骨の離開が残存している部分においても、孤立性に骨組織が認められた。また、移植骨が吸収を受けた所見は認められなかった(図3)。

### 3. 他家骨移植群

移植3週、6週、9週において、移植骨と母床骨間は線維性結合組織で満たされるのみで母床骨からの新生骨の発育は認められなかった(図4, 5, 6)。

## 考 察

従来から、骨欠損部の補填、再建には、他家骨および自家骨を用いたり、あるいは人工生体材料を用いるのが一般的であった。しかし、他家骨は抗原性を完全消失させることができず、一方、自家骨を採取するためには生体の健常部を傷害することを避けることができず、そして採骨量に限界があることが大きな問題点であった。さらに人工生体材料はあくまでも生体にとっては異物であり、異物反応や感染が生じることも少なくはないことが問題であった。

そこで、本研究においては、レシピエントとドナーを同一にし、自己で誘導された骨を移植骨として用い、抗原性の問題を解消することを目的とした。すなわち、自家誘導骨はレシピエントとドナーの同一生体中で形成されたものであり、骨を形成する全ての細胞が同一生体由来のものである。従って、他家骨移植時に懸念される細胞表面の抗原

に対する免疫反応がない。骨欠損部にBMPを移植し、骨欠損部へ新生骨の形成を促す実験は数多く認められるが、ドナーとレシピエントを同一としその生体内で移植骨を形成させ、これを移植体として用いる実験の報告は皆無である。

BMPは未分化な間葉細胞を骨芽細胞や軟骨細胞に分化させる能力を有している<sup>4)</sup>。脂肪組織内においてはやや不良であり、これは筋肉内に比べ、脂肪組織内では局所の血液循環および酸素供給がやや不良であるためであると考えられている。しかしながら、皮下、筋肉内、脂肪組織内などにおいても異所性骨誘導を示し、良好な骨形成がなされることが確認されている<sup>1)</sup>。

担体については、本実験ではゼラチンスポンジを使用した。これはコラーゲンと並んでBMPの担体として頻用されており、その利用価値の高さは数多く報告されている。しかしながら、生体吸収性材料であり、機械的強度が高くなく、移植操作中に血液に接触するとその形態が変化するため、移植操作は可及的短時間に行う必要性があった。

移植9週後、外側には成熟した骨組織が認められ、内側には骨髄組織が認められた。

本研究において、自家誘導骨移植群においては、各所に自家誘導骨と母床骨間に骨性結合が認められた。また、その結合状態は継ぎ目がなく、両者の境界が不明瞭な骨組織間の融合部分も確認され、良好な組織親和性が認められた。

また、自家誘導移植骨を移植した後、母床骨からの旺盛な新生骨梁の形成が認められた。これは移植骨が母床骨から遊走してくる骨芽細胞のフレームワークとなっただけではなく、移植骨自体が骨伝導能および骨誘導能を発揮したものと考えられる。その理由は第1に、自家誘導骨は豊富な骨髄組織を含み、その内部には間葉系細胞や骨髄組織が含まれ、移植部に対して多くの前骨芽細胞の供給が可能であったためであると考えられる。臨床例においても骨接合不全に対し、骨髄細胞の局所注入が自家骨移植と同程度であったとの報告<sup>5)</sup>が認められる。第2に移植骨と母床骨との介在部には自家誘導移植群の方が早期に微小血管構造が確認された。これはrhBMP-2により組織修復機転が速やかに進行したものと考えられると共に、形成された自家誘導骨から遊走してきた骨細胞および骨芽細胞が産生したangiogenic factorが積極的な血管新生を促した結果であるものと思われる。第3に豊富な血管新生は骨形成に必要なTGF- $\beta$ などのpracrine factorの供給を可能にし、また将来、骨芽細胞に分化しうるprevascular cellの供給を可能にする。そしてまた、この細胞に自家誘導骨中の骨芽細胞が分泌するbone inducing factorが作用しさらに骨芽細胞への分化が促進するものと考えられる。移植9週後の標本において、母床骨と移植骨の間に存在する線維性組織の中に孤立性に骨形成を認めたことから、この組織内においても骨誘導作用が働いたことが示唆された。また、他家骨移植群においては母床骨と移植骨の骨性結合は認められなかった。

## 結 語

rhBMP-2を腹直筋内に移植し、形成された新生骨を移植骨として、同一ラットの頭蓋骨欠損部に移植した。移植7週後には欠損部は治癒しており、自家誘導骨は良好な組織親和性と骨形成能および骨伝導能を示した。

そしてrhBMP-2により腹直筋内に形成された新生骨（移植後7週）を移植骨として

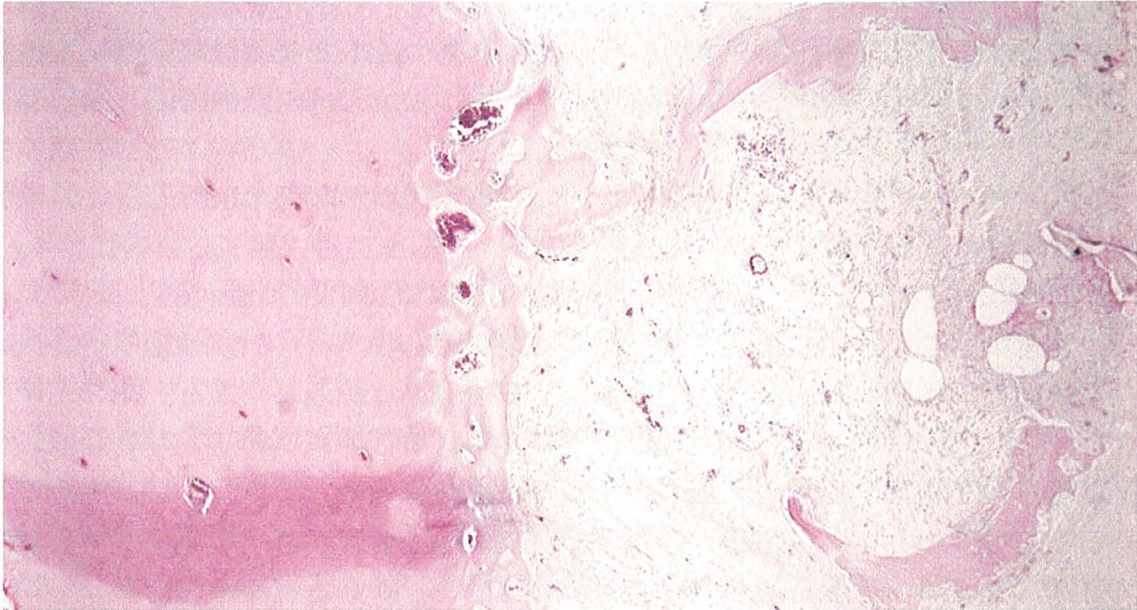
使用し、良好な結果を得た。今後は形成された移植骨が最も高い生物学的活性度を有する時期がいつであるのか、また、十分な機械的強度が得られるのはいつなのかをさらに詳細に検討する必要性が示された。

#### 引用文献

- 1) Urist, M.R.: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965.
- 2) Urist, M.R., Delange, R.J., Fineman, G.A.M.: Bone cell differentiation and growth factors. *Science* 220: 680-686, 1983.
- 3) Dube, J.L., Celeste, A.J.: Human bone morphogenetic protein-15: *Miner Res* 11 (Supple-1): S382, 1996.
- 4) Yamamoto, G.: Die Wirkung von Natriumfluorid auf induzierte Knochenneubildung in vivo. Inaugural-Dissertation, Wuerzburg Universitat, 1-58, 1994
- 5) Connolly, J.F.: Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop* 355: 257-266, 1998.

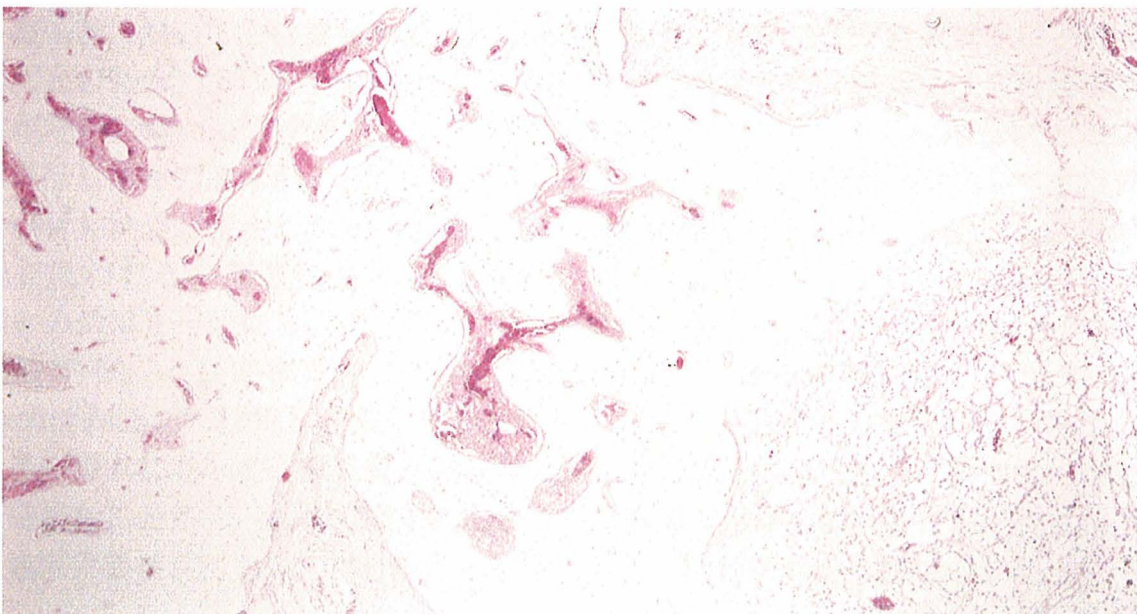


図1 自家誘導骨移植群 移植後3週 【拡大率36倍】(HE染色)



母床骨から幼弱な骨新生を認める。(左側が母床骨側、右側が移植骨側)

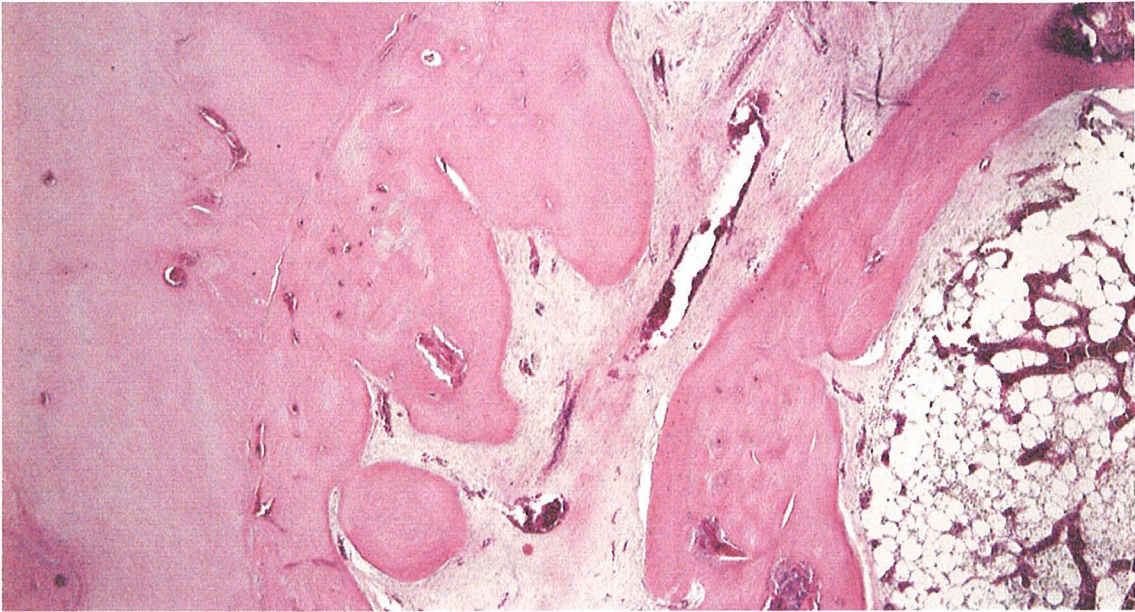
図2 自家誘導骨移植群 移植後6週 【拡大率36倍】(HE染色)



母床骨からの骨新生は移植後3週より増加し、旺盛な部位が認められる。また骨新生部の骨梁も成熟している。(左側が母床骨側、右側が移植骨側)

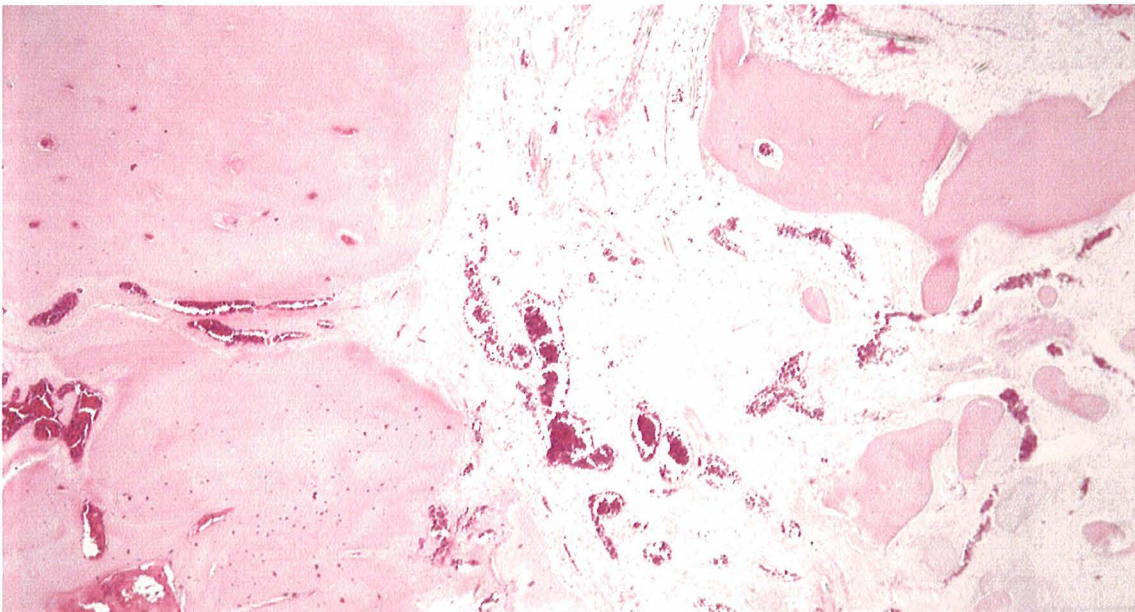


図3 自家誘導骨移植群 移植後9週 【拡大率36倍】(HE染色)



母床骨からの骨新生はすべて辺縁から発生しており、6週よりもさらに骨新生は進行している。また、移植骨の吸収は認めない。(左側が母床骨側、右側が移植骨側)

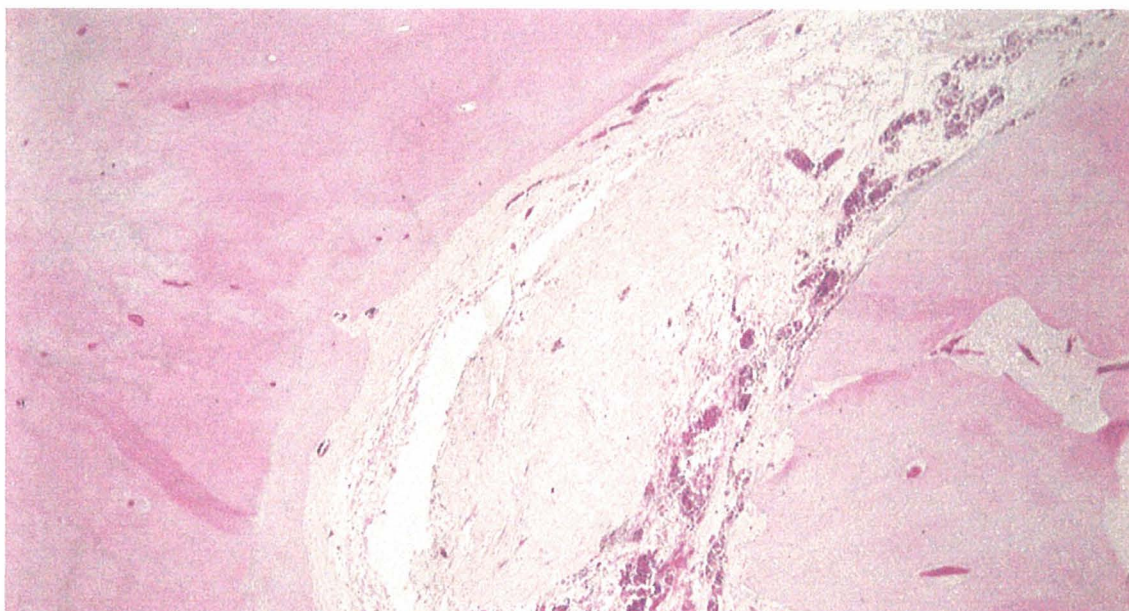
図4 他家骨移植群 移植後3週 【拡大率36倍】(HE染色)



母床骨と移植骨との間は結合性組織と線維性組織によって満たされており、母床骨からの骨新生は認められない。(左側が母床骨側、右側が移植骨側)

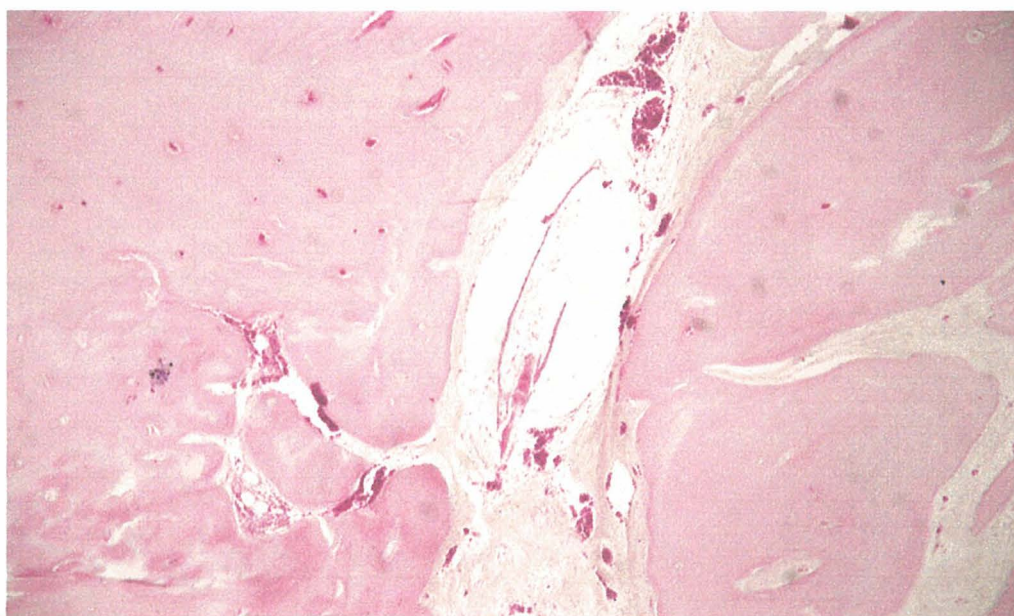


図5 他家骨移植群 移植後6週 【拡大率36倍】(HE染色)



母床骨からの骨新生はわずかである。(左側が母床骨側、右側が移植骨側)

図6 他家骨移植群 移植後9週 【拡大率36倍】(HE染色)



母床骨からの骨新生はわずかに確認できるが、移植後6週とほぼ変化はない。(左側が母床骨側、右側が移植骨側)