

氏名	牧原 武史		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 8272 号		
学位授与年月	平成 29年 3月 24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	一軸連通孔人工骨による皮質骨再生－血管新生、連通孔サイズの影響－		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	武川 寛樹
副査	筑波大学講師	博士（医学）	大川 敬子
副査	筑波大学講師	博士（医学）	岡本 嘉一
副査	筑波大学講師	博士（医学）	西野 衆文

論文の内容の要旨

牧原氏の博士学位論文は、一軸連通孔人工骨による骨新生の微細構造を組織学的に評価し、その新生骨微細構造と連通孔サイズとの関連を検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

（目的）

一軸連通孔ハイドロキシアパタイト（UDPHAp）は、一方向に配列する楕円性状の内腔を持つ人工骨であり、現在広く流通している泡状の内腔構造を持つ他の人工骨とは大きく異なっており、その特徴的な構造は特定方向の強度を持ち、迅速な組織侵入を容易にすると考えられている。著者は先行研究にて UDPHAp 内部に新生した骨組織にリモデリングが生じていることを確認し、本研究ではそのメカニズムおよび本人工骨の scaffold としての機能を調べるため、UDPHAp 内に新生した血管および骨組織の詳細な組織評価、またそれらが力学的環境および連通孔サイズにどのように影響されるかを評価することを目的としている。

（対象と方法）

著者はまず、日本白色家兎 28 羽を使用し、7×4 mm の脛骨皮質骨欠損モデルを作製、台形柱状の UDPHAp を同欠損部に埋植し 2 週(n=4)、6 週(n=6)、9 週(n=6)、12 週(n=6)、29 週(n=6)で組織評価を行っている。屠殺 3 日、10 日前にカルセインを投与し骨形成の蛍光標識を行い、屠殺直前に大腿動脈から血管造影、鋳型剤（シリコンラバー）を注入、血管鋳型を作製した。次いで、脛骨を人工骨中央で半割し一方から非脱灰標本を他方から脱灰標本を作製し、新生骨、新生血管の組織評価と組織形態計測を行っている。他方においては力学的環境の影響を評価するため、人工骨内を母床骨の皮質骨から連続する領域と、髓腔から連続する領域に分けて比較を行っている。さらに連通孔サイズの影響を調べるため、組織標本から連通孔サイズを測定し、骨新生との関連を評価している。新生骨は、組織評価によって存在が明らかとなった骨細胞およびオステオン様構造を組織形態計測における評価対象とし、統計解析は 2 群間の比較に student's t-test を、連通孔サイズと

新生骨の関連評価には ROC 解析および Youden index を使用している。

(結果)

2 週時点で青い血管鋳型材料の粒子が管腔内に存在し、材料中央に達している様子が観察され、各評価時点で血管が存在し維持されていることを著者は確認した。新生骨は 2 週時点では壁に沿ってランダムな骨組織を形成し人工骨辺縁に存在していたが、6 週以降では規則的な層板構造を形成し、人工骨全体に骨形成が得られていた。年輪状に配列した骨組織の中央には青い粒子を含む血管の存在が明らかとなった。著者は、この内腔を含む骨組織集団をオステオン様構造と定義したが、このオステオン様構造は骨小腔を有しその内部に骨細胞があり、骨細胞同士また血管と骨細胞は骨細管で連絡しており、正常皮質骨にみられるオステオンと類似した構造であることを確認している。29 週時点で血管周囲に明瞭に蛍光標識される骨組織が存在し、新生骨表面にはカテプシン K 陽性細胞が Howship 窩と思われる窪みの表面に存在していることも確認した。骨形態計測では、どの評価時点でも皮質領域において髓腔領域よりも骨細胞数が有意に多く、またオステオン様構造も同様に皮質領域に有意に多いことを認めた。オステオン様構造は連通孔サイズが小さい孔に多く存在する傾向があり、そのカットオフ値は $105 \mu\text{m}$ であることを示した。連通孔サイズが大きい孔ではむしろ骨形成が疎であり、一部では脂肪滴の存在も認めた。

(考察)

UDPHAp 内には生理的皮質骨に存在するオステオンと類似した構造が形成され、それらは内腔に存在する血管により栄養、代謝されている可能性が示唆された。他の人工骨に関する過去の文献と比較検討したところ、迅速な血管侵入、オステオン様構造の形成は本人工骨の特徴であると著者は考察している。力学的環境により骨細胞数、オステオン様構造形成数に差がみられたことから、骨小腔・骨細胞・骨細管システムが荷重の感知システムとして機能しており、29 週時点まで環境に応じた骨リモデリングが持続していると著者は考えた。以上のことから UDPHAp 内に形成された新生骨は、生理的皮質骨に類似した構造だけではなく、類似した性質を有していると著者は考察した。また著者は、連通孔サイズとオステオン様構造形成の関連から、連通孔サイズは皮質骨再生に影響する因子の一つと考えた。過去の文献では連通孔サイズは大きい方がより骨形成が得られるという報告もあるが、今回の研究では UDPHAp はむしろサイズが小さい連通孔にオステオン様構造が形成されており、これは一軸性構造の特徴であると著者は考察している。この知見は将来の新規人工骨開発や改善に必要であるが、オステオン径の種差が研究限界となる可能性もあり、ヒトにおいて理想的な連通孔サイズを明確にするには、オステオン径の異なる動物種の基礎実験が今後必要になると考えた。さらに本研究で作製した骨欠損の大きさは、臨床での使用上ではやや小さいと思われ、異なった欠損サイズでの検討も今後必要と考えた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究は、UDPHAp 内の新生骨の微細構造を評価したものである。優れている点として、新生骨が生理的皮質骨に存在するオステオンと類似した構造であることを組織学的に確認しただけでなく、血管内にシリコンラバーを注入することで血管新生を経時的に評価したことがあげられる。従来の血管内皮を染める CD34 等の方法では、脱灰操作により表面抗原の染色性が不安定で使用できなかったが、血管の評価方法を工夫し血管鋳型を用いたことからより詳細な検討が可能になった点は、高く評価される。またカルセインを用いて、新生骨のリモデリングが 29 週目でも持続することを確認したことも重要である。次いで骨新生と連通孔サイズの関係では、過去の報告とは逆に連通孔サイズが小さい方が骨形成に優れるという結果が得られた。著者は、骨形成の起こるカットオフ値は家兎の生理的オステオンのサイズ $100 \mu\text{m}$ とほぼ同じサイズであったことから、動物種差のオステオン径の相違の可能性についても考察している。これは今後のヒトでの骨新生において、重要な所見であり高く評価される。将来の研究として、荷重による影響を評価する実験モデルの必要性や骨欠損モデルの大きさによる骨新生の相違ならびに本人工骨に横からの骨新生を期待するべく孔を横に開けた人工骨での検討等の指摘がなされた。

平成 28 年 12 月 27 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。