

氏名	熊谷 洋		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9559 号		
学位授与年月	令和2年3月25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	テリパラチドと骨髄血が配向連通孔構造を有するβ-リン酸三カルシウム人工骨に及ぼす骨新生促進効果の検討		
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）	三好 浩稔
副査	筑波大学講師	博士（医学）	田中 秀峰
副査	筑波大学講師	博士（医学）	坪井 洋人

## 論文の内容の要旨

熊谷 洋氏の博士学位論文は、配向連通孔構造を有するβ-リン酸三カルシウム人工骨移植に対してテリパラチド投与と骨髄血含浸の単独あるいは併用が人工骨内の骨形成に及ぼす効果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）

整形外科手術において、外傷による骨欠損や、手術部位の骨性の癒合を目指すために、しばしば骨移植が行われる。自家骨移植が一般的に行われるが、採骨に伴う合併症が多く、採取できる骨の量に限りがあるという問題点がある。代替法として、人工骨移植が行われるが、人工骨は骨誘導能を持たないため、その成績は自家骨移植に劣る。著者は、人工骨移植の成績の向上は骨移植を要する患者の治療に寄与すると考えた。整形外科グループで行ってきた配向連通孔構造を有する人工骨および自家骨髄血移植に関する先行研究と、テリパラチドによる骨形成促進効果を踏まえ、著者は、配向連通孔構造を有するβ-リン酸三カルシウム人工骨移植に対しテリパラチド投与と骨髄血移植の単独あるいは併用が材料内の骨形成に及ぼす効果を検討した。

### （対象と方法）

骨成熟が得られた日本白色家兎 24 羽を使用した。脛骨開窓モデルを作製し、配向連通孔構造を有するβ-リン酸三カルシウム人工骨（以下アフィノス®）を埋植した。骨髄血含浸群、骨髄血含浸+テリパラチド投与群のアフィノス®には家兎腸骨稜から採取した骨髄血を含浸した。テリパラチド投与群および骨髄血含浸+テリパラチド投与群には移植直後より屠殺時までテリパラチド 30μg/kg を 3 回/週の間隔で皮下注射した。

骨形成マーカーとして、カルセインを屠殺 9 日前と 2 日前に投与した。著者は、移植後 6 週で屠殺して人工骨を取り出し、非脱灰標本を作製した。矢状断薄切切片（Villanueva-Goldner 染色）において材料中央を中心として縦 5 mm、深さ 3 mm の長方形を関心領域に設定し、連通孔内部の新生骨面

積を測定した。測定領域内の新生骨部分面積を測定領域面積で除して新生骨の面積率を計測した。また著者は、水平断薄切切片（未染色）において1辺200 $\mu\text{m}$ の測定領域をランダムに5箇所設定し、測定領域内において二重蛍光標識の最も伸長した箇所を計測し、各検体5箇所の平均を算出した値を石灰化速度として計測した。人工骨単独群、テリパラチド投与群、骨髓血含浸群、骨髓血含浸+テリパラチド投与群の4群の比較には、テリパラチド投与の有無と、骨髓血含浸の有無を独立変数とした2元配置分散分析法（Two-way factorial ANOVA）を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

（結果）

矢状断薄切切片（Villanueva-Goldner 染色）において、関心領域内の新生骨面積の割合は人工骨単独群で平均 $24.0 \pm 3.9\%$ 、テリパラチド投与群で平均 $33.0 \pm 9.0\%$ 、骨髓血含浸群で平均 $18.2 \pm 9.3\%$ 、骨髓血含浸+テリパラチド投与群で平均 $29.5 \pm 7.7\%$ であった。テリパラチド投与は新生骨面積率を有意に上昇させたが（ $p=0.004$ ）、骨髓血含浸は影響を与えなかった（ $p=0.156$ ）。テリパラチド投与と骨髓血含浸に相互作用はなかった（ $p=0.717$ ）。水平断薄切切片（未染色）において、石灰化速度は人工骨単独群で平均 $3.0 \pm 0.33 \mu\text{m/day}$ 、テリパラチド投与群で平均 $4.0 \pm 0.27 \mu\text{m/day}$ 、骨髓血含浸群で平均 $2.7 \pm 0.47 \mu\text{m/day}$ 、骨髓血含浸+テリパラチド投与群で平均 $3.3 \pm 0.68 \mu\text{m/day}$ であった。2元配置分散分析法においてテリパラチド投与は石灰化速度を有意に上昇させたが（ $p < 0.001$ ）、骨髓血含浸は石灰化速度を低下させた（ $p=0.01$ ）。テリパラチド投与と骨髓血含浸に相互作用はなかった（ $p=0.286$ ）。

（考察）

新生骨面積率と、石灰化速度という2つの評価において、テリパラチド投与は有意に人工骨内での骨新生を促進させることがわかった。今回初めてテリパラチド投与が人工骨内の骨形成を促進することが明らかとなった。テリパラチドの骨への作用は、破骨細胞の活性を上回る骨芽細胞による骨形成であり、高代謝回転となることが $\beta$ -リン酸三カルシウム人工骨の材料吸収と骨形成にも影響を及ぼしたと考えた。骨髓血移植を行った群と骨髓血移植を行わなかった群とで骨新生面積に有意差はなかった。初回採取のウサギ骨髓血に含まれる間葉系幹細胞様細胞数は、採取骨髓血1mL当たり95個であった。整形外科グループで実施している濃縮自家骨髓血移植に用いる自家濃縮骨髓血1mL当たりの間葉系幹細胞様細胞数は、平均126.7個であり、未濃縮ながら相当数の間葉系幹細胞様細胞を含んでいるといえる。しかし、本研究に用いた人工骨には、容積の制限から約0.086mLしか骨髓血を含浸することができなかった。大腿骨頭壊死症の治療には片股あたり15-20mLの濃縮骨髓血を移植しており、およそ2000-2500個の間葉系幹細胞様細胞が含まれている。本実験系では人工骨に含浸させた骨髓血量が不十分であり、骨新生効果を十分に認めることができなかったと考えた。また著者は、骨髓血含浸した場合に早期の凝固がみられ連通孔で目詰まりを起こした結果、同部への細胞浸潤が阻害されていることも見つけ出した。今後は骨髓血を濃縮する、間葉系幹細胞を培養して用いるなどの骨髓血移植法の改善を考えている。

## 審査の結果の要旨

（批評）

本研究で著者は、人工骨の骨形成を促進させる方法を探索するため、 $\beta$ -リン酸三カルシウム人工骨の移植に加えてテリパラチド投与や骨髓血含浸を単独あるいは併用を行い、その有効性、安全性を病理学的に検討した。その結果テリパラチド投与は、骨髓血含浸の有無に拘らず人工骨内での骨新生促進効果があることを世界で初めて実証した。一方、骨髓血含浸は予想に反して骨新生促進効果が明確には認められなかった。著者はこの理由として、骨髓血含浸が通常臨床で使用されている方法に比べると間葉系幹細胞様細胞が少ないことと早期に凝固を起こして骨新生に必要な細胞浸潤を止めることを証明した。これらの結果は、実際の臨床応用において、人工骨でのより良い再建法を探索するうえで根拠となる大切な基礎データを示したものであり、大変高く評価される。

令和2年1月8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。