



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The osteogenic potential of Phosphorylated-Pullulan/ β -TCP composite scaffolds and low doses of Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) in subcutaneous tissues [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Alruwaili, Mohammed Katib R
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15490号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89525
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mohammed_Alruwaili_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学）
氏 名 モハメッド カティブ アルルワイリ

学 位 論 文 題 名

The osteogenic potential of Phosphorylated-Pullulan/ β -TCP composite scaffolds and low doses of Bone Morphogenetic Protein-2

（リン酸化プルラン/ β -TCP 複合スキャホールドと低用量骨形成タンパク質 2 による骨形成）

キーワード（5つ） リン酸化プルラン, β -三リン酸カルシウム, rhBMP-2, 骨形成, 低用量

骨形成タンパク質（BMP）は骨誘導能が高く、優れた骨形成能を有するが、破骨細胞も同時に活性化して骨吸収を引き起こす。そのため、脊髄内に異所性骨形成が生じたり、骨吸収が増加したりするなどの合併症が報告されている。BMPが骨形成効果を発揮するためには適切な担体が必要で、現在は生体適合性と分解性に優れるコラーゲンスポンジがrhBMP-2の担体として臨床応用されている。しかし、コラーゲンスポンジはrhBMP-2 の保持が不十分との指摘もあり、rhBMP-2による骨形成では高濃度かつ大量の投与が行われており、そのことも副作用の発現に関与している可能性がある。

そこで、rhBMP-2 の担体としてコラーゲンスポンジを用いた場合に、骨形成能を発揮するrhBMP-2 の下限濃度を評価することを目的として実験1を行った。rhBMP-2（Infuse® Bone Graft, Medtronic）の濃度を0、0.039、0.117、1.167（メーカー指定濃度）mg/mlとし、コラーゲンスポンジに含浸してラットの背部皮下結合組織に移植した。1、4週後に μ CTによる硬組織形成の評価と組織学的分析を行った結果、手術後4週で0.117 mg/mlのrhBMP-2では、1.167 mg/mlの骨形成量の約1/4と有意（ $p < 0.05$ ）に減少し、0.039 mg/mlでは骨形成はみられなかった。したがって、rhBMP-2はメーカー指定の1/10でも骨形成能はあるが、濃度を下げると骨形成量が不十分になる可能性が示された。

一方、リン酸化プルラン（PPL）は、骨基質と化学的に結合し、高い生体適合性や優れた機械的強度を有しており、分子量を変えることで組織侵入性や吸収速度も調節可能な材料である。また、水分量を増やすことでスラリー状にしたり、塩化カルシウムを加えることでゲル化させたりすることが可能で、 β TCPや炭酸アパタイトなどの顆粒を混和するとパテ状にもできることから、骨欠損部位や使用用途に応じて、簡単かつ自在に操作性を変えることができる。これらの特徴から、PPLはrhBMP-2を併用する場合のスキャホールドとして優れた効

果を発揮する可能性がある。そこで、実験2では分子量の異なるPPLをrhBMP-2のスキヤホールドとして、骨形成能と吸収性を組織学的に評価した。

600,000 MWのPPLと600,000 + 100,000 MWのPPLを1:3 (PPL1-3群) または1:5 (PPL1-5群) で混合し、両群とも1.167 mg/mlのrhBMP-2を添加後、2 % CaCl₂を混合してゲル化させるとともに、 β TCP顆粒を混和して、パテ状の複合移植材を2種類作製した。移植材をラット背部皮下結合組織内に移植し、2週後に骨形成状態と移植材の残存状態を組織学的に計測した。その結果、両群とも骨髓様組織、骨細胞、および骨芽細胞を伴う新生骨が形成されたが、骨形成量はPPL1-5群がPPL1-3群1:3の約4倍となり有意差 ($p < 0.05$) が認められた。また、残存PPLは新生骨基質内に取り込まれて直接PPLに接していたが、 β TCP周囲には骨芽細胞が配列しており骨基質の直接接触は少なかったことから、rhBMP-2は β TCPよりPPLに保持されて骨を誘導していたと考えられた。さらに、移植材の残存量は両群間に有意差は見られなかったが、PPL1-5群の方が少なかった。すなわち、PPL1-5群の方がPPL1-3群より骨形成能が高く吸収性も同等以上であったことから、rhBMP-2のスキヤホールドとしてPPL1-5群の方が優れていると考えられた。

実験1, 2の結果から、PPL1-5群で用いたスキヤホールドは、rhBMP-2の濃度を低下させても十分な骨形成効果が得られる可能性があると考え、実験3ではrhBMP-2の濃度と骨形成量の関係をコラーゲンスポンジとの比較で検討した。

PPL/ β TCP複合スキヤホールドは実験2のPPL1-5群と同様で、rhBMP-2の濃度を1.167、0.117、0.039、0.023、0 mg/mlとし、それぞれBPT1、BPT2、BPT3、BPT4、BPT0群とした。BPT群と同様のrhBMP-2濃度でコラーゲンスポンジを担体としたものを、それぞれBC1、BC2、BC3、BC4、BC0群とした。各移植材をラット背部皮下結合組織に移植し、2週後に μ CTによる評価と組織学的分析を行った。その結果、BCP0群を除くすべての群で骨形成が観察され、新生骨は両群とも骨細胞や骨髓様組織を伴い、豊富な骨芽細胞が骨基質表面に配列していたが。しかし、同濃度のrhBMP-2で比較すると、コラーゲンスポンジを用いたBC群よりPPLと β TCPを含むBPT群の方が骨梁は太く緻密であった。また、BC群では新生骨の外形が偏平になったり陥凹したりするものが多かったが、BPT群では移植時の外形を概ね維持した状態で骨に置換していた。さらに、BPT群ではBC群に比べて、すべての濃度で骨形成量が有意 ($p < 0.05$) に多く、メーカー指示濃度である1.167 mg/mlでは、約4倍の骨形成量を示した。メーカー指示濃度であるBC1群の骨形成量はBPT2群とほぼ同じであり、PPL/ β TCP複合材料を用いることで、rhBMP-2濃度を1/10に低下させても同等の骨形成が可能であった。

以上の結果から、rhBMP-2を用いた骨形成において、PPL/ β -TCP複合スキヤホールドはコラーゲンスポンジよりきわめて優れていることが明らかとなり、今後、骨形成量の増加や骨形態の賦形性、副作用の低減、コストの削減などに役立ち、骨欠損治療の発展が期待される。しかし、本研究では異所性骨形成能を評価していることから、臨床における骨欠損治療では骨の残存部位に用いることが多いため、残存骨と新生骨の結合が得られるか、残存骨の吸収が生じないかなどの点については、今後の検討が必要である。