

### 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 519 号	氏 名	小 寺 隆 三
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	藤 倉 美 久 	
	副査氏名	飯 本 正 志 	
	副査氏名	河 野 実 司 	
<p><b>論文題目</b>                  Manipulation of anabolic and catabolic responses with bone morphogenetic protein and zoledronic acid in a rat spinal fusion model.                  (ラット脊椎固定モデルにおける BMP-2とゾレドロン酸による骨の形成と吸収の操作)</p> <p><b>論文掲載雑誌名</b>                  Bone, 58 : 26-32, 2014</p> <p><b>論文要旨</b>                  骨形成においてbone morphogenetic protein(BMP)とbisphosphonate との相互効果が報告されており、学位申請者らは臨床の場での骨再生の基礎研究としてラット脊椎固定モデルを用い各々BMP-2と zoledronic acid(ZA)を使用し実験を行った。                  対象として16週齢雄性SD系ラットを使用した。方法はL4-5高位の横突起間をdecorticationし、担体を移植した。実験は6群に分け、第1群は担体のみ移植、第2群は担体移植後2週目にZAを皮下投与し、第3群はBMP-2(1 μg)を移植、第4群は3群と同様処置2週間目にZAを皮下投与、第5群はBMP-2(3 μg)を移植、第6群は5群と同様処置2週間目にZAを皮下投与した。動物からの脊椎取り出しは術後6週目に行った。各群とも約10匹ずつ実験を行った。骨癒合の判定は、①徒手的评价、②放射線学的評価、③マイクロCT評価、④病理組織学的評価で行った。②と④では骨癒合の見られた範囲ごとに5点スケールとして、③ではtissue volume、bone volume、bone volume fraction、trabecular thickness、trabecular number、trabecular spacing の6項目で評価した。                  徒手的评价で骨癒合率を評価した結果、第6群の60%の例が他群に対し有意差を認めた。放射線学的評価では第1、2群では骨癒合を認めなかった。BMP1 μgを使用する(第3群)と少量の骨癒合傾向を認め、ZAを投与した第4群では旺盛な骨癒合を認めた。放射線学的評価では第6群が他群に比し高く有意差を認めた。マイクロCT評価では第6群に於いてtissue volumeやbone volumeが増大し、bone volumeは他群に対し有意差を認めた。病理組織学的評価では第1群に於いて横突起間に線維形成を認めたが骨形成は見られなかった。第2群では未熟骨と厚い骨梁組織の形成があった。第3群では術部の大部分の領域で仮骨形成があった。第4群は成熟骨組織、骨梁形成を一部の範囲で認めたが間隙も存在した。第5群では横突起間部に成熟骨組織、骨梁形成を認めたが、一部軟骨組織も存在した。第6群では旺盛な骨梁形成があり、よく発達した骨髓組織で囲まれていた。病理スコアでも第6群が他群に比し高く、有意差を認めた。                  BMPは骨のremodeling と resorption を亢進させ、ZA単回投与はcatabolic phaseを抑制し、BMPの効果を増大させたと考えられた。また術後2週目のZA投与はosteoclastic stimulationを減少させ、callus volume及びfracture repair strength を増大させたと推察した。                  BMPには骨吸収作用による癒合不全という副作用があるが、本研究はzoledronic acidの投与によりBMPの副作用を抑制しBMP投与量を減少させる可能性が示唆された論文で、審査員の合議により本論文は学位(医学博士)論文に値すると判定した。</p>			

最終試験  
の結果の要旨  
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第519号	氏名	小寺 隆三
審査委員会委員	主査氏名	藤倉 美久	
	副査氏名	鈴木 正志	
	副査氏名	河野 達司	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の背景、目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. BMP-2とzoledronic acid (ZA) は、日本では臨床的にはどのように使用されているのか？</li> <li>2. BMP-2とZAの相互効果とはどのようなものか？ 今回の両者の併用効果は、相乗効果なのか、あるいは相互作用効果なのか？ お互いの作用機序の中で影響しあうことはあるのか？</li> <li>3. 以前大腿骨骨折で、この両薬の併用効果が報告されていた。脊椎骨でのこの効果のメカニズムは分かっていないとのことであるが、骨の部位によってメカニズムは異なるのか？</li> <li>4. Remodelingという用語の定義をどう考えているのか？ 「成熟骨組織へのRemodeling」という表現が見られたが、不適切ではないか？</li> <li>5. ZAの投与方法で、何故皮下注射を選択したのか、また投与量はどのようにして決定したのか？</li> <li>6. Decorticationはどのようにして行ったのか？</li> <li>7. 薬物の徐放剤としてMedGEL使用した理由は何か？</li> <li>8. マイクロCT評価の時のみ、例数が6と少ないが何故か？ 選択した6つの対象が無作為に選ばなければならないと思うが如何か？</li> <li>9. 16週ラットの赤色骨髓は何処か？</li> <li>10. 骨組織と仮骨はどう違うのか？</li> <li>11. ZAを投与された動物は破骨細胞が殆どいないと考えて良いのか？</li> <li>12. 横突起間に形成された軟骨組織はどういう過程で骨組織に置換されたのか？</li> <li>13. 破骨細胞はMPSに属するが、他のMPSの細胞にはどのような影響があったのか？</li> <li>14. 第6群で骨癒合していなかった40%はどのような状況下であったか？</li> <li>15. Fig4.-B, Cの組織はハバース管ではないか？</li> <li>16. ZAの投与時期を実験開始から2週間後としているが、BMPの量によって投与時期を変えた方がよりよい結果(より高率の骨癒合)が得られた可能性はなかったか？</li> <li>17. 第3群の組織像は軟骨が骨化しつつある所見であり、まだRemodelingの段階ではないようである。従って第4群でより骨形成が多く見られるのは、ZA投与によりRemodeling過程の骨吸収が抑制されたというよりも、ZAが骨形成を促進しているように見えるが、どのように考えるか？</li> <li>18. 今後の臨床応用に向けた取り組みはどのようなものか？</li> </ol> <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位(医学博士)取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 小寺 隆三

## 論 文 題 目

Manipulation of anabolic and catabolic responses with bone morphogenetic protein and zoledronic acid in a rat spinal fusion model

## 要 旨

## &lt;緒言&gt;

骨形成において、bone morphogenetic protein(BMP)と bisphosphonate と相互効果が報告されており、BMP の必要量を減少できる可能性がある。本研究の目的はラット脊椎固定モデルを用いて BMP-2 と zoledronic acid (ZA) の相互効果を研究することにより臨床の場での骨再生における有用な情報を得ることである。

## &lt;研究対象及び方法&gt;

16 週齢雄 SD ラットに L4-5 高位の横突起間を decortication し、material を移植した。それを 6 群に分けて検討した。1 群は担体のみ移植した群、2 群は担体のみ移植し術後 2 週間目に ZA を皮下注射した群、3 群は 1- $\mu$ g BMP-2 を移植した群、4 群は 1- $\mu$ g BMP-2 を移植し術後 2 週間目に ZA を皮下注射した群、5 群は 3- $\mu$ g BMP-2 を移植した群、6 群は 3- $\mu$ g BMP-2 を移植し術後 2 週間目に ZA を皮下注射した群とした。各群ほぼ 10 匹ずつ合計 67 匹とし脊椎取り出しは術後 6 週に行った。骨癒合の判定は①manual palpation、②単純 X 線像では骨癒合の得られた範囲ごとに 5 point scale として評価、③micro CT による分析では tissue volume、bone volume、bone volume fraction、trabecular thickness、trabecular number、trabecular spacing の 6 項目を評価、④病理では骨癒合の得られた範囲ごとに 5 point scale として評価した。

## &lt;結果&gt;

manual palpation による骨癒合率は 6 群の 60%が他群のすべてに対して有意差を認めた。単純 X 線像では 1、2 群は骨癒合を認めなかった。BMP 1 $\mu$ g 使用すると少量の骨癒合傾向を認め、それに ZA を追加すると旺盛な骨癒合を認めた。X 線スコアも 6 群が他群に比べ

て高く、他群のすべてにおいて有意差を認めた。micro CT では1、2群は骨癒合を認めなかった。BMP 1 $\mu$ g 使用すると少量の骨癒合傾向を認め、それに ZA を追加すると旺盛な骨癒合を認めた。micro CT による分析では tissue volume や bone volume において6群が他群に比べて高く、bone volume では有意差を認めた。組織学的分析では、1群では横突起間部に線維組織の形成が目立ち、骨形成は認めなかった。2群では未熟な骨組織および厚い骨梁形成を認めた。3群では横突起間部は軟骨仮骨で大部分が占められていた。4群では成熟した骨組織および骨梁形成を一部認めたが、横突起間部にギャップを認めた。5群では横突起間部に骨梁形成および成熟した骨組織を認めたが、一部軟骨組織が存在していた。6群では骨梁形成が旺盛であり十分に発達した骨髄により囲まれていた。病理スコアでも6群が他群に比べて高く、他群のすべてにおいて有意差を認めた。

#### <考察>

BMP は骨の remodeling と resorption を共に亢進させ、ZA 単回投与により catabolic phase を抑制し、BMP の効果を増大させると考えられる。また ZA の2週間後全身投与により osteoclastic stimulation を減少させ、callus volume および fracture repair strength を増大させると推察される。本研究でも検討項目すべてにおいて6群が他群に対して有意差を認めた。ZA 単回投与により BMP の骨吸収効果による癒合不全などの副作用を減少させ、また ZA 至適投与により骨吸収 phase を抑制し、BMP 必要量を減らす可能性が示唆される。

#### <結語>

ラット脊椎固定モデルにおいて少量の BMP-2 の固定部位への投与と至適な時期に ZA を全身投与することによる効果的な相互効果が認められた。ラット脊椎固定モデルにおいて BMP-2 と ZA の相互効果により少量の BMP にて脊椎固定術が期待できる。