

## 自家組織を犠牲にしない新規骨再生療法の開発

神戸大学大学院医学研究科外科系講座整形外科学 新倉隆宏

### 1 研究の背景と目的

骨折のわが国での年間患者発生数は約 200 万人と推計されている。また、わが国においては他の先進国と比較しても顕著な高齢化とともに、発生数が増加傾向にあり、今後も増加していくことが予測されている。一方、骨折患者の 5-10%は、標準的な治療期間を超えても治癒しない遷延治癒、あるいは治療を行って 6-9 ヶ月を経過しても骨癒合が得られない偽関節に陥る。年間骨折患者数から推計すると相当な数であり、今後も増加する可能性がある。このように難治化した骨折では、著しい生活の質の低下、甚大な社会的損失がもたらされる。これら難治骨折の治療には難渋することが多く、自己の骨を健常部から骨折部へ移植する自家骨移植術や、自己の骨を健常部で骨切りし骨延長術を行うことで骨欠損部を補填する等の手術が行われるが、それでも全例で治癒が得られるわけではなく、また、治癒までには 1 年以上の長期間を要する症例も多くある。したがって、これら難治骨折を何とか治癒に導く、さらに、早く治癒させる新たな治療法の実用化が切望されている。

これまでに臨床で行われてきた自家骨移植術や骨延長術では、自己の骨を犠牲にすることが避けられなかったが、これがなくなれば画期的なことである。骨形成能を持つ蛋白 **Bone morphogenetic protein: BMP** は欧米では臨床使用が開始されているものの、わが国ではまだ臨床使用に至っていない。欧米で臨床使用されている **BMP** は牛骨由来成分を含むため感染症発生の危険性があるが、遺伝子組み換え技術によって作成した **BMP** にはこの危険性がない。本研究の目的は、上記した社会的ニーズに応えるべく、人工骨と遺伝子組み換え **BMP** を用いて、自家組織を犠牲にしない新規骨再生療法を開発することである。

### 2 研究方法・研究内容

ウサギを用いた動物実験を行った。ウサギ大腿骨の一部を外科的に切除し、創外固定器で固定する骨欠損モデルを作成した。この動物モデルは、臨床における、感染・腫瘍・外傷にて相当量の骨を失った患者、また、骨折後長期間を経ても自然経過では治癒し得ない患者を模している。骨欠損部を自家組織移植を行うことなく再生することを目的に、**BMP** と人工骨を組み合わせた再生療法につき実験した。

#### ウサギ骨欠損モデルの作成

ウサギ大腿骨の中央部を 20mm にわたって外科的に切除し、創外固定器で固定する骨欠損モデルを作成した。創外固定器は、ヒトの手の手術において用いるものを使用した。ウサギは 6 ヶ月齢のものを用い、これは若齢のものよりも骨再生に不利な条件としている。

#### **BMP**

オステオファーマ (株) 製の recombinant human BMP-2 を用いた。骨再生に最適な用量は不明であり、これを本研究にて探索した。

#### 人工骨

HOYA (株) 製のスーパーポア顆粒 ( $\beta$ -tricalcium phosphate, 2-4mm 径) を用いた。骨欠損の大きさに応じて充填量を調整するが、必要用量は不明であり、これを本研究にて探索した。

#### 実験群

- 骨欠損部に人工骨のみ充填する群
- 骨欠損部に **BMP** を含有させた人工骨を充填する群

二群で骨再生を単純 X 線画像、マイクロ CT、組織学的評価 (Hematoxylin-eosin 染色)、骨強度試験 (摘出大腿骨の三点曲げ試験) にて比較検討した。

### 3 研究成果

#### ウサギ骨欠損モデルの確立

まず大腿骨に創外固定器を設置し、骨を約 20mm 切除する。創外固定器を使って欠損長を 20mm に正確に調整する。この再現性ある動物モデルを確立した。\*図 1

#### 動物の手術と飼育の実績

合計 60 羽のウサギの手術、飼育を実施した。最長 24 週間飼育した。

#### BMP と人工骨の適当用量

欠損部への人工骨充填量は 0.67g が適当であること、BMP 用量は 50 $\mu$ g で十分な骨再生が得られることが明らかになった。

#### 骨再生の X 線学的評価

骨欠損部に人工骨のみ充填した群では骨再生は起こらず、BMP を含有させた人工骨を充填した群では骨再生が起こることが X 線学的に確認された。\*図 2 \*図 3

24 週時のマイクロ CT 解析にて、骨欠損部における新生組織の

Tissue mineral density (TMD)

Percentage of bone volume out of total volume (BV/TV)

Volumetric bone mineral density (vBMD)

が、BMP 添加群の方が人工骨のみの群よりも有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。\*表 1

#### 組織学的評価

骨欠損部に人工骨のみ充填した群では骨再生は起こらず、BMP を含有させた人工骨を充填した群では骨再生が起こることが組織学的に確認された。\*図 4

#### 骨強度試験

骨形成が認められた、骨欠損部に BMP を含有させた人工骨を充填した群において評価した。

Ultimate Stress

Extrinsic Stiffness

Failure Energy

のいずれもが、12 週時よりも 24 週時の方が有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。\*表 2

骨欠損部に新生骨組織が形成されること、また、新生骨組織がさらに骨としての力学的強度を持つまで成熟することが明らかとなった。



図 1 : 術中写真 (上) 大腿骨 20mm 欠損を創外固定器で固定 (下) 人工骨を充填したところ

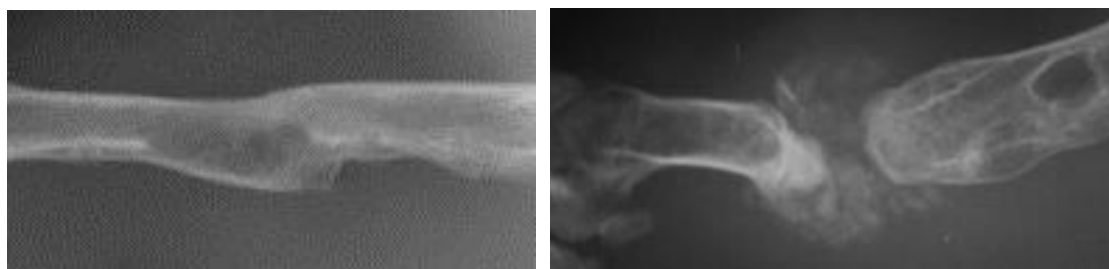


図2：単純X線写真（左）BMP含有人工骨を充填した動物の24週経過時（右）人工骨のみ充填した動物の24週経過時

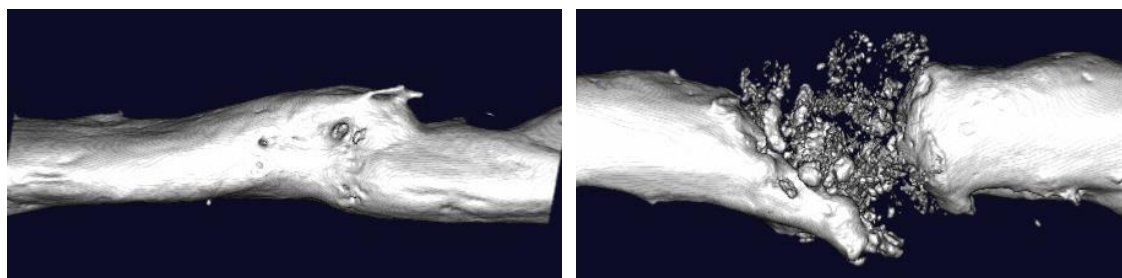


図3：3D-CT（左）BMP含有人工骨を充填した動物の24週経過時（右）人工骨のみ充填した動物の24週経過時

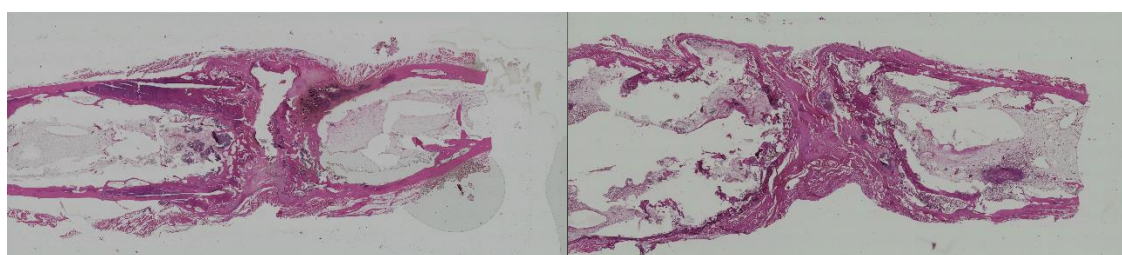


図4：組織像（左）BMP含有人工骨を充填した動物の24週経過時（右）人工骨のみ充填した動物の24週経過時

	TMD (mg/cm <sup>3</sup> )	BV/TV (%)	vBMD (mg/cm <sup>3</sup> )
Control group	612 ± 41.9	27 ± 3.7	165 ± 28.3
BMP-2 group	702 ± 25.4*	33 ± 2.5*	235 ± 20.5*

表1：24週時のマイクロCT解析データ

	Ultimate Stress	Extrinsic Stiffness	Failure Energy
BMP-2 group at 12W	30.6 ± 36.5	6.6 ± 7.8	16.2 ± 19.4
BMP-2 group at 24W	121.2 ± 41.8*	31.6 ± 16.1*	145.8 ± 45.1*

表2：骨強度試験（摘出大腿骨の三点曲げ試験）データ

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

骨折は治癒までに相当期間を要する。難治骨折ではなおのこと治療期間が長引き、患者の社

会復帰が遅れ、医療費・補償費用等も高騰する。わが国では他の先進国と比較しても顕著な高齢化とともに、骨折発生数が増加傾向にある。これに伴って、遷延治癒、偽関節という難治骨折の症例数も増加すると見込まれる。したがって、骨折をただ治すだけではなく早く治し早期社会復帰させる、また、難治例を何とか治癒に導くための新規治療法に対するニーズは将来においてますます増大することが予測される。

骨再生医療が発展すれば、患者、社会に大いなる福音をもたらすことが推測される。また、今後患者数増加が見込まれることから医療産業においても重要な対象となる。国内、海外を問わず新規骨再生療法の開発が試みられているが、実臨床で使用可能なものは超音波骨折治療法、骨折電気刺激療法しかなく、しかもこれらの効果も限定的であるのが現状である。本研究における新規骨再生療法は骨折治療法の新たな選択肢となるだけでなく、骨髄炎など感染症や外傷、骨腫瘍によって骨欠損を生じた患者の骨再生にも応用できるものであり、大いなる将来の発展性が見込まれる。

**BMP** と人工骨を組み合わせることで、自家骨移植を必要とせずに欠損した骨を再生できることを前臨床で証明できた。本法は自家組織を犠牲にしない新しい骨再生療法であり、将来の臨床応用に向けて有用な前臨床データを得ることができた。