



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Studies on Fracture Repair using Tissue Engineering and Locking Compression Plate in Horses( 内容と審査の要旨(Summary) )
Author(s)	徐, 鍾筆
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第422号
Issue Date	2014-03-13
Type	博士論文
Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/49045">http://hdl.handle.net/20.500.12099/49045</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本 (国) 籍)	徐 鐘 筆 (大韓民国)
主 指 導 教 員 名	帯広畜産大学 准教授 佐々木 直 樹
学 位 の 種 類	博士(獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第422号
学位授与年月日	平成26年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Fracture Repair using Tissue Engineering and Locking Compression Plate in Horses (ウマの骨折に対する生体組織工学及びロッキングコンプレッションプレートを用いた骨折治療に関する研究)
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 山 田 一 孝 副査 帯広畜産大学 准教授 佐々木 直 樹 副査 岩 手 大 学 教 授 山 岸 則 夫 副査 東京農工大学 教 授 加 茂 前 秀 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 海 野 年 弘

### 学位論文の内容の要旨

骨折はウマにとって致命的な損傷となり有る。骨折治療のためには、長期間の骨折部位の固定が必要であるものの、500kg に及ぶ体重と有するウマでは、その安定的な固定維持は難しい。効果的な骨折治療のためには、早い骨再生と強力な固定法が必要とされる。医学領域において、骨損傷に対して生体組織工学的的手法を用いることで治癒促進を図る方法が検討されている。生体組織工学は現在、幹細胞、成長因子ならびに足場の3要素から成ると考えられている。ロッキングコンプレッションプレート（以下、LCP）は、最近開発されたプレートであり、従来のプレートとは異なってスクリューがプレートに固定されるため、強力な固定力を持つことが知られている。

生体組織工学的的手法ならびに LCP はウマの骨損傷治療にも応用可能であると考えられる。しかし、ウマに応用した研究は現段階では少なく、臨床応用のための基礎的検討は十分であるといえる状況ではない。そこで、本研究では、ウマの骨疾患に対する生体組織工学的ならびに LCP の有効性を検討した。

第1章では、幹細胞の培養に一般的に使用されているウシ胎児血清の問題（倫理的、科学的、安全性）を解決するために、幹細胞の培養に対する、血小板溶解液とウシ胎児血清の作用について比較検討した。ウマの胸骨から骨髓液を採取して、ウシ胎児血清あるいは血小板溶解液を含む培養液中に混和し、10日間培養を行った後、幹細胞数を測定し、幹細胞の特性（ALP染色陽性、カルシウム沈着、mRNA発現）を分析した。細胞数については有意差は認められず、特性については同様の結果が認められた。このことから、血小板溶解液はウシ胎児血清に見られるような問題点がなく、ウマ間葉系幹細胞の培養に有用であると考えられ

た。

第 2 章では、生理学および力学的安定性のための足場として最近注目されているゼラチンβ-リン酸 3 カルシウムスポンジ（以下、スポンジ）内でウマ幹細胞の増殖能を検討した。胸骨より採取した骨髓液を分離・培養して単核細胞と様々な細胞濃度の幹細胞を得た。これらを 5x5x5 mm のスポンジに移植した。移植後 CCK-8 test および組織学的検査により幹細胞の増殖や分布を評価した。本実験により、スポンジ内で馬幹細胞の増殖を確認することができた。また、5x5x5 mm のスポンジの幹細胞の最大収容能力は約  $10^6$  個であり、安定的な増殖のためには、約  $10^4$  個以上の幹細胞移植が必要だった。以上の結果は、スポンジを臨床応用するうえで役立つものと考えられた。

第 3 章では、ウマの骨欠損に対する幹細胞混合骨形成蛋白-2（以下、BMP-2）含浸スポンジの骨再生効果を検討した。ウマの第 3 中足骨に骨欠損を作成し、幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジを移植した。その結果、X 線検査、CT 検査ならびに病理組織学的検査において、幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジ群は他の群（ブランク群、スポンジのみ群、幹細胞混合スポンジ群、BMP-2 含浸スポンジ群）と比較して優れた骨再生が観察された。この結果により、幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジの骨再生効果が認められた。

第 4 章では、ウマの骨軟骨欠損に対する幹細胞、軟骨細胞、多血小板血漿ならびに BMP-2 含浸スポンジの骨軟骨再生効果を検討した。ウマの両足根下腿関節における距骨外側滑車に骨軟骨欠損を作成し、テスト群には幹細胞、軟骨細胞、多血小板血漿ならびに BMP-2 含浸スポンジを移植し、コントロール群には生理食塩水含浸スポンジのみを移植した。その結果、X 線検査、CT 検査ならびに病理組織学的検査において、テスト群はコントロール群と比較して優れた骨軟骨再生が観察された。このことから、幹細胞、軟骨細胞、多血小板血漿ならびに BMP-2 含浸スポンジはウマにおいて頻発する骨軟骨欠損を伴う関節骨折の治療に有用であると考えられた。

第 5 章では、ウマの近位指節間関節固定術における LCP と従来の Dynamic compression plate(以下、DCP)の生体力学的特性を比較検討した。実験には筋骨格系疾患と関係なく安楽死となったウマの前肢を利用した。片方の肢には LCP を用いて固定を実施し、反対側の肢には DCP を用いて固定を実施した。プレートを装着設置後、肢を油圧式万能試験機に装着後、3-ポイント背掌側曲げ試験を実施して降伏荷重、破壊荷重、変位ならびに剛直性を測定した。その結果、降伏荷重、破壊荷重ならびに剛直性において LCP は DCP に比較して有意な高値を示した ( $p < 0.05$ )。このことから、LCP は従来の DCP に比べてウマの骨折の治療に有用であると考えられた。

第 6 章では、LCP を用いた関節固定術に加え、関節内に幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジを装填し、関節の安定性ならびに早期骨癒合の効果を検討した。ウマの両前肢近位指節間関節に LCP を用いた低侵襲法により関節固定術を実施し、一方の近位指節間関節内には水平方向にドリルホールを 1 か所作成し(テスト群)、幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジを移植した。その結果、X 線検査、CT 検査ならびに病理組織学的検査において、テスト群ではコントロール群と比較して骨癒合像が早期に観察され、術後 16 週目に良好な骨癒合像が認められた。この結果は、LCP の強力な固定力と幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジの骨再生促進効果のためと考えられた。

本研究により、ウマにおける生体組織工学の骨および骨軟骨組織再生促進効果及び LCP の優れた固定力が証明された。また、生体組織工学と LCP の組み合わせは早期骨癒合を促進することが明らかになった。今後、ウマの骨折治療における生体組織工学および LCP の臨床応用が期待された。

## 審査結果の要旨

学位申請者である徐鍾筆君は、ウマにおける生体組織工学の骨および骨軟骨組織再生促進効果及びロッキングコンプレッションプレート (LCP) の優れた固定力を明らかにした。また、生体組織工学と LCP の組み合わせは早期骨癒合を促進することが明らかにした。その結果、以下の成績を得たことを踏まえ、審査した。

1. 幹細胞の培養に一般的に使用されているウシ胎児血清の問題 (倫理的, 科学的, 安全性) を解決するために、幹細胞の培養に対する、血小板溶解液とウシ胎児血清の作用について比較検討した。その結果、細胞数については有意差が認められず、特性については同様の結果が認められた。このことから、血小板溶解液はウシ胎児血清に見られるような問題点がなく、ウマ間葉系幹細胞の培養に有用であることを明らかにした。
2. 生理学および力学的安定性のための足場として最近注目されているゼラチンβ-リン酸3カルシウムスポンジ(以下, スポンジ)内でウマ幹細胞の増殖能を検討した。その結果、スポンジ内で馬幹細胞の増殖を確認し、5x5x5 mm のスポンジの幹細胞の最大収容能力は約10<sup>6</sup>個であり、安定的な増殖のためには、約10<sup>4</sup>個以上の幹細胞移植が必要であることを明らかにした。
3. ウマの骨欠損に対する幹細胞混合骨形成蛋白-2 (以下, BMP-2) 含浸スポンジの骨再生効果を検討した。その結果、幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジの骨再生効果を明らかにした。
4. ウマの骨軟骨欠損に対する幹細胞, 軟骨細胞, 多血小板血漿ならびに BMP-2 含浸スポンジの骨軟骨再生効果を検討した。その結果、幹細胞, 軟骨細胞, 多血小板血漿ならびに BMP-2 含浸スポンジはウマにおいて頻発する骨軟骨欠損を伴う関節骨折の治療に有用であることを明らかにした。
5. ウマの近位指節間関節固定術における LCP と従来の Dynamic compression plate(以下, DCP)の生体力学的特性を比較検討した。その結果、降伏荷重, 破壊荷重ならびに剛直性において LCP は DCP に比較して有意な高値を示し、LCP は従来の DCP に比べてウマの骨折の治療に有用であることを明らかにした。
6. LCP を用いた関節固定術に加え、関節内に幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジを装填し、関節の安定性ならびに早期骨癒合の効果を検討した。その結果、LCP の強力な固定力と幹細胞混合 BMP-2 含浸スポンジの骨再生促進効果により、早期に骨癒合像が生じることを明らかにした。

本研究により、ウマにおける生体組織工学の骨および骨軟骨組織再生促進効果及び LCP の優れた固定力が証明された。また、生体組織工学と LCP の組み合わせは早期骨癒合を促進することが明らかになった。今後、ウマの骨折治療における生体組織工学および LCP の臨床応用が期待されることから、学術的意義は高い。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Proliferation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells in gelatin/β-tricalcium phosphate sponges  
著 者 名 : Seo, J.P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : Research in Veterinary Science

卷・号・頁・発行年 : 93(3):1481-1486, 2012

- 2) 題 目 : Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for *in vitro* expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells

著 者 名 : Seo, J.P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : Research in Veterinary Science

卷・号・頁・発行年 : 95(2):693-698, 2013

- 3) 題 目 : *In vitro* biomechanical comparison of a 5-hole 4.5 mm locking compression plate and 5-hole 4.5 mm dynamic compression plate for equine proximal interphalangeal joint arthrodesis

著 者 名 : Seo, J.P., Yamaga, T., Tsuzuki, N., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : Veterinary Surgery

卷・号・頁・発行年 : In Press

- 4) 題 目 : Effects of bilayer gelatin/ $\beta$ -tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses

著 者 名 : Seo, J.P., Tanabe, T., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : Research in Veterinary Science

卷・号・頁・発行年 : In Press