

骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein-BMP)と フィブリン糊混合剤の骨・軟骨誘導能に関する研究

(名古屋大学医学部整形外科教室 指導：三浦隆行教授)

服 部 寿 門

Experimental Investigations of Osteogenesis and Chondrogenesis by Implant of BMP-Fibrin Glue Mixture

TOSHIKADO HATTORI

Department of Orthopedic Surgery, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Aichi

(Received for Publication, May 9, 1989, Express Print)

Key words: BMP: Bone Morphogenetic Protein(骨形成因子), Fibrin glue(フィブリン糊), BMP-fibrin glue mixture (BMP フィブリン糊混合剤), Aprotinin(アプロチニン), Osteo-chondrogenesis (骨軟骨誘導能)

The influence of fibrin glue on ectopic osteo-chondrogenesis induced by bone morphogenetic protein(BMP), which was extracted from decalcified rabbit long bones, was investigated histologically, radiographically, and electronmicroscopically. The mixtures, consisting of fibrin glue and BMP, were implanted between femoral biceps muscles of AKR mice. They were examined 3 days, 5 days, 1 week, and 2 weeks after implantation, respectively. The fibrin glue did not affect osteo-chondrogenesis by BMP under the mixture conditions, and new bone formation was seen almost in every implant. The fine network of fibrin glue seemed to be effective for adhesion, differentiation of BMP responding cells and was well cooperated on BMP. Fibrin glue network could control the area of osteo-chondrogenesis by BMP. It might be due to restriction of diffusion of BMP.

In addition, the whole shape of the newly formed cartilage and bone was influenced by the quantity of Aprotinin administered to fibrin glue. Fibrin glue may be regarded as an effective cooperator of BMP in the case of clinical application of BMP in the future.

要 旨 本実験の目的は骨形成因子 (bone morphogenetic protein 以下 BMP) の骨・軟骨誘導能に与えるフィブリン糊の効果を検討することである。骨形成因子(BMP)とフィブリン糊の混合サンプルを AKR マウスに移植し、経時的に軟 X 線学的に検討した。その後に移植サンプルをとりだし組織学的検討および電顕学的検討を行った。フィブリン糊は BMP と混合しても BMP の骨・軟骨誘導能を阻害することはなかった。またフィブリン糊の微細ネット構造は BMP 反応細胞の接着、分化、増殖のための足場となることにより BMP によく協力した。フィブリン糊は BMP 移植後の散逸を防止し、その骨・軟骨誘導の範囲を限局する binder となった。BMP に対するフィブリン糊の量

やそれに含まれるアプロチニンの量を変えることにより新生骨・軟骨の全体的な形状をコントロールしえた。以上より BMP が臨床応用される時フィブリン糊はすぐれた BMP の協力物質となる。

緒 言

1909 年 Bergel³⁾ は創傷の治癒機転におけるフィブリンノーゲンの二次的役割を報告した。次いでフィブリンは fibrin powder や fibrin patch として創部の止血に応用された。その後、factor XIII, thrombin, 塩化カルシウムなどが fibrinogen の凝集能を高め、fibrin cross-linkage に関与することが明らかにされた^{2), 6), 7)}。またアプロチニンの添加により生体内でフィブリンの安定性のコントロールが可能となった⁹⁾。近年 fibrinogen の高濃度精製技術の開発とあいまって、factor XIII, thrombin, 塩化カルシウム、アプロチニンを添加したフィブリン糊(fibrin glue)が臨床応用されるに至っている。

フィブリン糊の臨床応用には

1) Fibrin glue として：神経吻合、血管縫合⁵⁾、遊離皮膚移植、osteochondral fracture^{11), 16)}などフィブリン糊の接着能を主に利用する方法。

2) Clotting substance として：骨生検、骨移植、脊椎管狭窄症などの術中術後の骨からの出血の防止のためにフィブリン糊の血液凝固能を主に利用する方法⁷⁾。の2つがあげられるが、二見ら⁸⁾や光嶋ら¹²⁾は腱や神経の縫合時に単なる接着剤としてでなく、フィブリン糊の線維芽細胞の増殖能、新生血管の増成能、それらによる旺盛な結合組織増成能に注目しフィブリン糊を応用している。

一方、BMP は骨・軟骨を誘導し、欠損骨組織を修復することが報告されている。

すなわち、フィブリン糊の組織修復機能は血管、神経、腱、靱帯などの軟部組織間ばかりでなく、BMP との併用で、腱、靱帯と骨組織間での接合をより早期により強固に完成させ得る可能性があると考えられる。

そこで、フィブリン糊と BMP 混合剤の骨・軟骨誘導能について基礎的な実験を行い結果を報告する。この実験は同時に、腱、靱帯と骨とをより早期に、より強固に接着させうる薬剤の開発を目的とするものである。

材 料

1) フィブリン糊(TISSEEL KIT)

Fibrinogen と thrombin による血液凝固第III相を

応用した2成分系生体接着剤である IMMNO 社製の TISSEEL KIT を使用した。

a) ティシール；加熱処理ヒト濃縮接着剤性蛋白質の凍結乾燥したものであり溶解したティシール溶液 1 ml は 75~115 mg の凝固性蛋白質となりそのなかに以下の物質が含まれる。

フィブリンノーゲン 70~110 mg

血漿フィブロンネクチン 2~9 mg

第XIII因子 10~50 単位

(1 単位は 1 ml の新鮮ヒト正常血漿中に含まれる第XIII因子の量に相当する)

プラスミノゲン 40~120 mg

b) ウシアプロチニン溶液 3,000 KIU/ml

(30 カリジノゲナーゼ不活性単位-KIU は 1 FIP 単位に相当する)

c)-1 ウシトロンビン 4 4 IU

c)-2 ウシトロンビン 500 500 IU

(トロンビンの国際単位-IU は第一次国際標準ヒトトロンビン 0.0853 mg 中に含まれる活性として定義される)

d) 塩化カルシウム溶液 40 mM CaCl₂/l

ティシールキットの使用法は、凍結乾燥ティシール(a)をアプロチニン溶液(b)で溶解して第1成分とし、凍結乾燥トロンビン(今回の実験には c-1 を使用した)を塩化カルシウム溶液(d)で溶解して第2成分とする。第1成分と第2成分を混合することにより白く粘着性のある安定化フィブリン接着剤ができる。

2) 骨形成因子(BMP)

BMP は花村らの方法^{8), 13)}に準じ以下の如く作製した。まず、白色家兎長管骨を凍結乾燥したものにクロロフォルム・メタノール(1:1)同量混合液を加え、室温にて6時間以上攪拌し、脱脂した。それをガーゼ濾過した後に自然乾燥させ、0.6 N 塩酸にて4℃下、48時間の脱灰操作を行った後、4 M 塩酸グアニジン溶液を加え4℃・12時間攪拌し、BMP 成分を含む淡茶色の粘稠性のある抽出液を採取した。その抽出液を4℃下に10分間遠心し、その上清を蒸留水にて48時間の透析を行った。より粘稠度の増した水不溶性析出物を、再び4℃下に遠心し、その沈査を凍結乾燥させたものを粗 BMP として今回の実験に使用した。

3) BMP(5 mg)とフィブリン糊(0.2 ml)の混合サ

ンプルの作製

ティシールキットの第1成分1 ml(ティシール, アプロチニン)を入れた注射筒と細粉BMP計50 mgを入れた注射筒を連続管にて接続し, ゆっくり交互にパンプを繰り返し, 第1成分とBMPを均一に混合させた。別の注射筒にティシールキットの第2成分1 ml(トロンビン, 塩化カルシウム)を準備し, BMPを含んだ第1成分とこの第2成分のそれぞれの注射筒より0.1 mlずつ計0.2 mlを微小カップ上に抽出混合した。抽出混合物が完全に凝固する前に, 均一な大きさのゼラチンカプセルに詰め移植用サンプルを作製した。

実験方法

a) BMPとフィブリン糊混合剤の骨・軟骨誘導能の検討

腹腔内へpentobarbiturate(Nembutal)を注入麻酔したAKRマウス(6週令 体重120~150 g)の両殿部より両大腿へ, それぞれ約1 cmの皮切を加え, 直下の血管を損傷しないように筋膜を鈍的に開き, 大腿二頭筋に達した。止血後, その大腿二頭筋間にゼラチンカプセルに封入したサンプルを移植した。移植条件を同一にするためにBMP(5 mg)単独群(13匹)のサンプルは右側に, BMP(5 mg)とフィブリン糊(0.2 ml)混合群(13匹)のサンプルは同一マウスの左側に移植した。フィブリン糊(0.2 ml)単独群(10匹)も同一の方法にて作製した。

BMP単独サンプルとBMPフィブリン糊混合サンプルの移植群を1週目(5匹), 2週目(8匹)に屠殺し, 軟X線にて骨・軟骨の形成状況を観察した。またフィブリン糊単独移植群も移植後1週目, 2週目に屠殺し同様の観察を行った。次いで移植部より, これらの移植片を取り出しホルマリン固定後, 組織標本作製し, H-E染色, アルシヤンブルー染色, トルイジンブルー染色を行い光顕にて組織学的検討を行った。

b) BMPへのフィブリン糊量の影響の検討

細粉BMP量は実験a)と同様に5 mgとし, これに混合するフィブリン糊(ティシール, アプロチニン3,000 KIU, トロンビン500 IU, 塩化カルシウム40 mmol)の量を0.1 ml, 0.5 mlとして, 2群のサンプル(以下0.1 ml群, 0.5 ml群)を作製した。

同一マウス(13匹)の両大腿二頭筋筋間の一侧を0.1 ml群, 他側を0.5 ml群としてサンプルを移植した。移植後1週目, 2週目に屠殺し, 軟X線撮影後,

移植片を取り出しH-E染色, アルシヤンブルー染色, トルイジンブルー染色を行い最・軟骨新生のX線学, 組織学的検討を行った。

c) BMPへのアプロチニン量の影響の検討

BMPの量を実験a)と同様の5 mgと一定にした。これに混合するティシールキット第1成分中のアプロチニン溶液量は3,000 KIU, 2,250 KIU, 1,500 KIU, 750 KIU, 0 KIU(フィブリンのみ含有)とした。これらのサンプルを各11匹, 6匹, 6匹, 6匹, 5匹のマウスの両大腿二頭筋筋間に移植し, 経時的に屠殺して軟X線学, 組織学的検討を行った。なお, 移植の際にアプロチニン量が異なる2種のサンプルを同一マウスの左右下肢に分けて移植した。

d) BMP反応細胞に対するフィブリンネットの役割の検討

実験a)と同様にBMP量は5 mgにし, フィブリン糊の量を0.1 mlとした。サンプル移植後, 3日目, 5日目, 1週目, 2週目に移植片を取り出して, 電顕により細胞学的に検討した。

結 果

a) BMPフィブリン糊混合剤の骨・軟骨誘導能 (Table 1)

(フィブリン糊単独群)

移植後1週目, 2週目にも骨・軟骨の新生はみられなかった。移植5日目から7日目までは移植部にマウス皮膚上より移植サンプルを確認できたが, それ以降は移植サンプルを確認できなかった。摘出サンプルの組織像は移植初期には摘出サンプルの周辺部に旺盛な小円形細胞の集簇がみられた。5日目から7日目の移

Table 1 Incidence of new bone and cartilage formation according to the composite of implants, 1 and 2 weeks after implantation

time after operation	1 W	2 W	total
fibrin glue with BMP	5/5*	8/8	13/13
BMP alone	5/5	8/8	13/13
fibrin glue alone	0/5	0/5	0/10

(BMP 5mg, fibrin glue 0.2ml)

* ; The data represent the number of implant with new bone and cartilage formation out of the total number of implants

植中期には移植サンプルは肉芽様小塊となっていた。移植7日目から10日目以降の後期には、移植サンプルは吸収され確認できなかった。これら全期を通じて軟X線像にても新生骨・軟骨の像はみられなかった。

(BMP 単独群)

移植3日目の摘出サンプルの周辺部には少数の小円形細胞の集簇がみられるが、軟骨細胞へ分化した細胞はなかった。

移植5日目の摘出サンプルでは幼若な軟骨細胞に分化しているものがあつた。

移植7日目では軟X線像にても新生軟骨の像がみられるようになり、組織学的には軟骨基質の発達した細胞が出現した。

移植2週目ではトリイジンプルーにて濃染する骨芽細胞が一部にみられた。同時に軟X線像で移植サンプルがより明らかに確認しえた。光顕像では新生骨・軟

骨細胞がサンプル内に島嶼状にみられた(Fig. 1)。

(BMP とフィブリン糊の混合群)

移植3日目の摘出サンプルの周辺部には BMP 単独群に比べ、より旺盛な小円形細胞の集簇がみられた。その一部の細胞が移植サンプルの表層部に到達していた。しかしこれらの細胞の形態は小円形であり、膨化した胞体をもつ未分化間葉系細胞や軟骨芽細胞様ではなかった。これらの細胞の分化の程度は、BMP 単独群と BMP フィブリン糊混合群では相違がなかった。

移植5日目ではより旺盛に細胞が集簇し、これらの細胞群は移植サンプルの中に深く進入し、胞体も大きく膨化していた。この時期には細胞分化の程度は BMP 単独群と変わりがなかった。また軟X線像で BMP 単独群同様に新生骨・軟骨は確認しえなかった。

移植1週目で、分化した細胞が多くみられるようになり細胞の進入している領域の中心部には明るい胞体に丸い核を持った軟骨芽細胞がみられた。移植サンプル

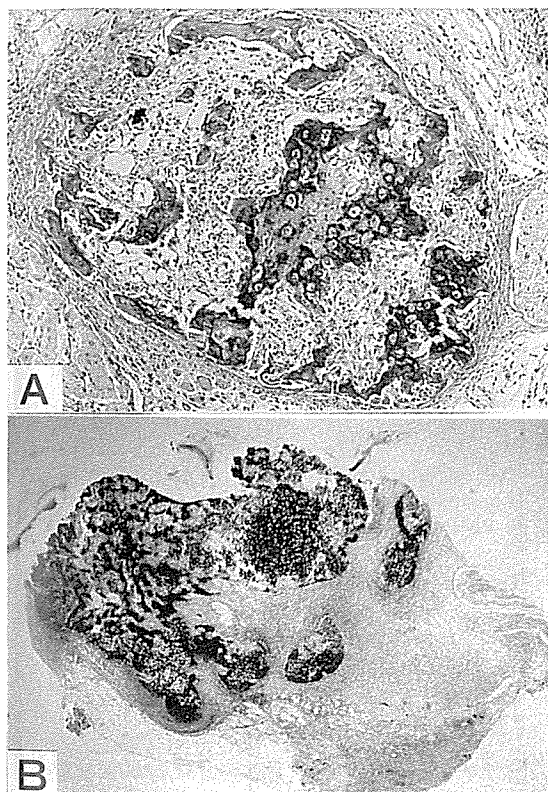


Fig. 1 Photomicrographs of the implants with BMP alone at two weeks after operation, showing small island-like form of massive new bone and cartilage.

A: Alcian blue stain, original magnification (o. m.) $\times 50$. B: Toluidine blue stain, o. m. $\times 10$.

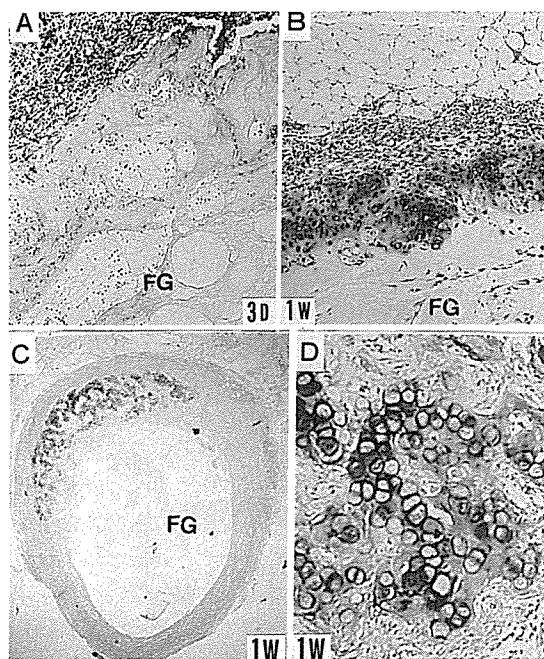


Fig. 2 Photomicrographs of new cartilage produced by implants of BMP and fibrin glue mixture.

A: Implant at 3 days after operation (Toluidine blue stain, o. m. $\times 5$). B: Implant at 1 week after operation (Toluidine blue stain, o. m. $\times 5$). C: Implant at 1 week after operation (Alcian blue stain, o. m. $\times 25$). D: High power magnification of a part of C (Alcian blue stain, o. m. $\times 100$).

ルの中心に進入した細胞ほど分化が進んでいた。また細胞分化のより進んでいる領域ほどフィブリン糊が消失していた。線維芽細胞が移植サンプル周辺領域を層状に囲むようにあり、次いで移植サンプルの外郭に厚い層状の未分化間葉系細胞群がみられ、これらの未分化間葉系細胞の一部が移植サンプルの内部に進入し、軟骨芽細胞に分化しているが、中心部はフィブリン糊とBMPがそのままで残存していた。したがって弱拡大の光顕像では、移植サンプルが卵殻のようにみられた(Fig. 2)。これは同時期のBMP単独群の移植片の新生骨・軟骨が、島嶼状に出現する像とは大きく異なっていた。軟X線像でこれらの断生骨・軟骨が確認できるものもあった。移植2週目で摘出サンプルの最外郭はトルイジンブルーにて淡く染まる骨梁様構造を呈したwoven boneと軟骨細胞で構成されており、より卵殻状構造が明瞭になっていた。この最外郭層の厚さは大部分のサンプルでほぼ一定(0.5 mm から 1.0 mm)となっていた(Fig. 3)。軟X線像では新生骨・軟骨はよ

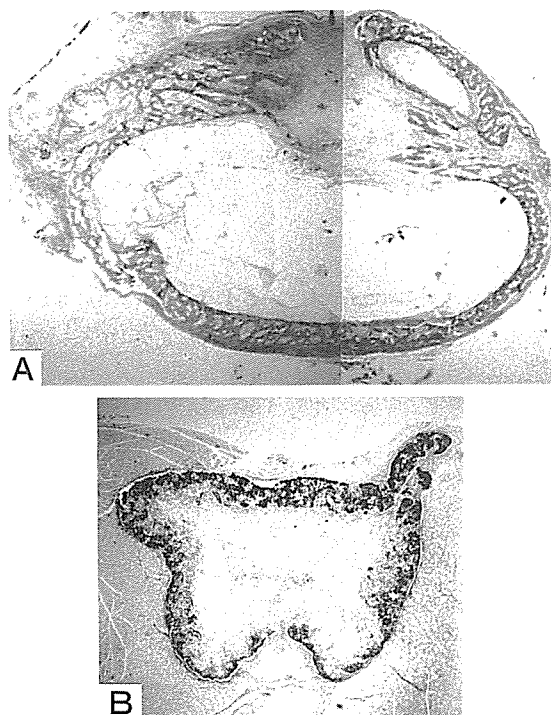


Fig. 3 Photomicrographs of implants of BMP and fibrin glue mixture at 2 weeks after operation, showing new bone and cartilage formation which looks like egg with shell of almost constant thickness (Toluidine blue stain, o. m. $\times 5$).

り明瞭になった。またBMP単独群と比較して移植サンプルは移植時の形状を維持しているものが多かった(Fig. 4)。

b) BMP へのフィブリン糊量の影響 (Table 2)
(フィブリン糊量 0.1 ml の群)

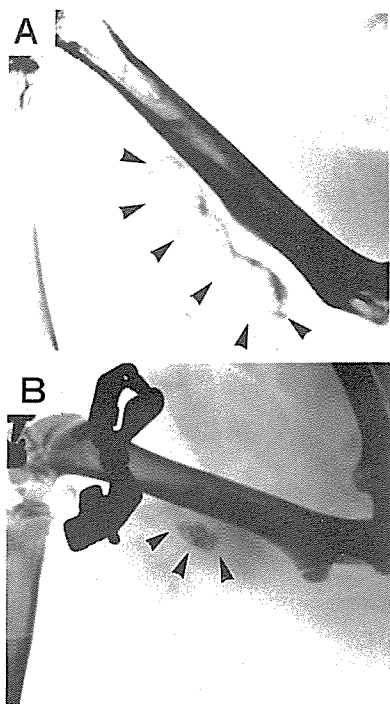


Fig. 4 Soft X-ray radiographs of implants at 2 weeks after operation.

A: BMP alone B: Mixture of BMP and fibrin glue

The implant containing BMP alone induces new bone and cartilage more extensive than the implant of BMP and fibrin glue mixture.

Table 2 Quantitative relationship between new bone and cartilage formation and volume of fibrin glue containing BMP (5mg)

time after operation volume of fibrin glue	1W	2W	total (1~3W)
0.1 ml	5/5*	8/8	13/13
0.5 ml	2/5	6/8	8/13

(BMP 5mg)

* ; The data represent the number of implant with new bone and cartilage formation out of the total number of implant

Table 3 Quantitative relationship between new bone and cartilage formation and the amount of Aprotinin in fibrin glue

time after volume of operation Aprotinin	3D	1W	2W	3W	total (1~3W)
3000(KIU/ml)	(0/2)	5/5*	4/4	2/2	11/11
2250	(0/1)	4/4	2/2	(-)	6/6
1500	(0/2)	2/2	2/2	1/2	5/6
750	(0/1)	3/4	1/2	(-)	4/6
0	(0/2)	3/3	1/2	(-)	4/5

(BMP 5mg, fibrin glue 0.2ml)

* ; The data represent the number of implant with new bone and cartilage formation out of the total number of implant

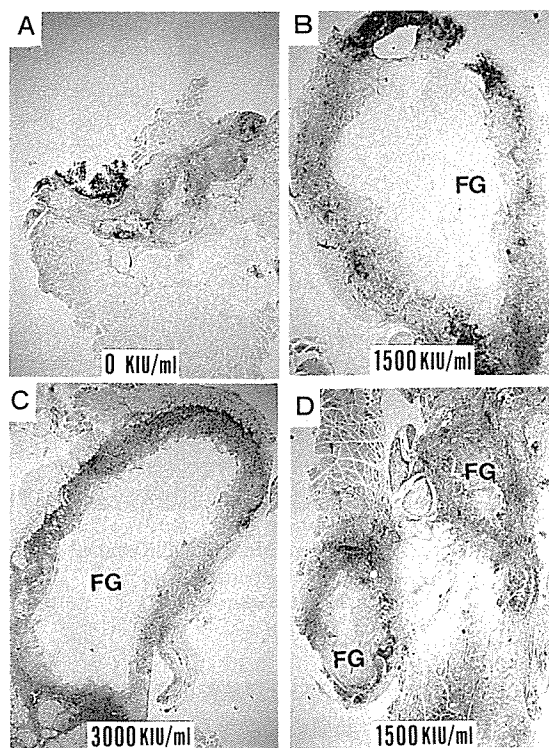


Fig. 5 Various forms of implants with new bone and cartilage induced by the different volume of Aprotinin in fibrin glue (Toluidine blue stain, o. m. $\times 5$).

FG: fibrin glue A: Aprotinin; 0 KIU/ml B, D: Aprotinin; 1,500 KIU/ml C: Aprotinin; 3,000 KIU/ml

移植後1週目では移植した5サンプル全例(5/5, 100%)に、2週目でも8サンプル全例(8/8, 100%)に光顕にて新生骨・軟骨が認められた。また1週目、2週目の軟X線撮影では、ほぼ移植時のサンプルの形状のままにサンプルが確認できた。

(フィブリン糊量 0.5 ml の群)

移植後1週目では5サンプル中2サンプル(2/5, 40%)に、2週目では8サンプル中6サンプル(6/8, 75%)に光顕にて新生骨・軟骨が認められた。しかし0.1 ml 群に比較して0.5 ml 群の新生骨・軟骨の出現率は低かった。また、0.5 ml 群の新生骨・軟骨のみられたサンプルでも0.1 ml 群に比較して摘出サンプルの切片中の新生骨・軟骨の量は少なかった。

c) BMP へのアプロチニン量の影響 (Table 3)

アプロチニンの量の変化(3,000 KIU から 0 KIU)による新生骨・軟骨の出現率には大きな差異はみられなかった。しかし移植サンプルの新生骨・軟骨の全体的な形状はアプロチニン量の変化により大きく異なっていた (Fig. 5)。

すなわち、アプロチニン量が1,500 KIU より多い場合には、移植時のサンプルに類似した形状、大きさのままで摘出時に確認でき、ここに新生骨・軟骨が形成されていた。

一方、アプロチニン量が1,500 KIU より少ない場合には、摘出時に移植サンプルが膨化したような形状をとる傾向があった。ここに形成される新生骨・軟骨はBMP 単独群の場合に似て島嶼状に分散していた。

d) BMP 反応細胞に対するフィブリンネットの役割

3日目の移植サンプルの電顕所見では、フィブリン糊はそのまま残存していた。移植サンプル周辺に形質細胞、肥胖細胞、マクロファージなどの他、間葉系細胞が集簇していた。これらの細胞はまだフィブリンネットの表面に接着しておらず、その細胞形態も円形に近いものが多かった (Fig. 6)。

5日目の電顕像では、単核の明るい胞体を有するやや紡錘形の細胞がフィブリンネットの中に入っていた。これらはフィブリンネットに細胞突起を出し接着し、定着・分化しつつある未分化間葉系細胞が多かった (Fig. 7)。

7日目の電顕像では移植サンプル周辺にコラーゲン線維を有する線維芽細胞が多くみられた。その内層のフィブリンネットの中には小数ではあるがクロマチンに富んだ大きな核を持ち、少量のコラーゲン線維を分泌している軟骨芽細胞がみられた。

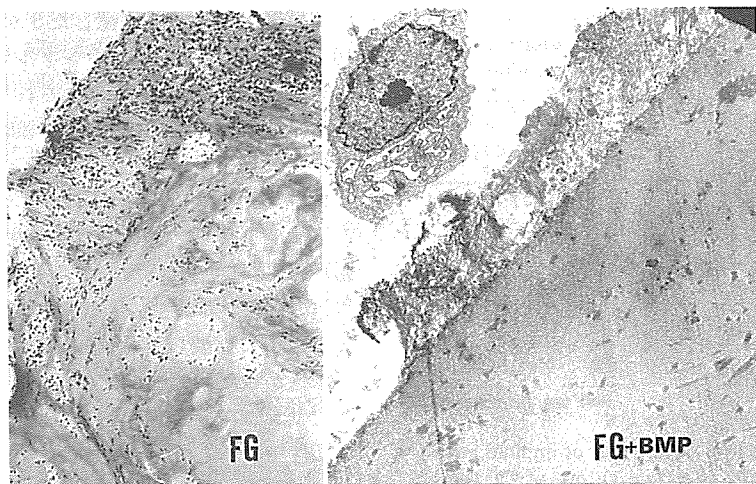


Fig. 6 Photomicrograph and electronmicrograph at 3 days after implantation, showing fibrin glue surrounded by many small round cells not attached to fibrin glue.

FG : fibrin glue BMP : bone morphogenetic protein

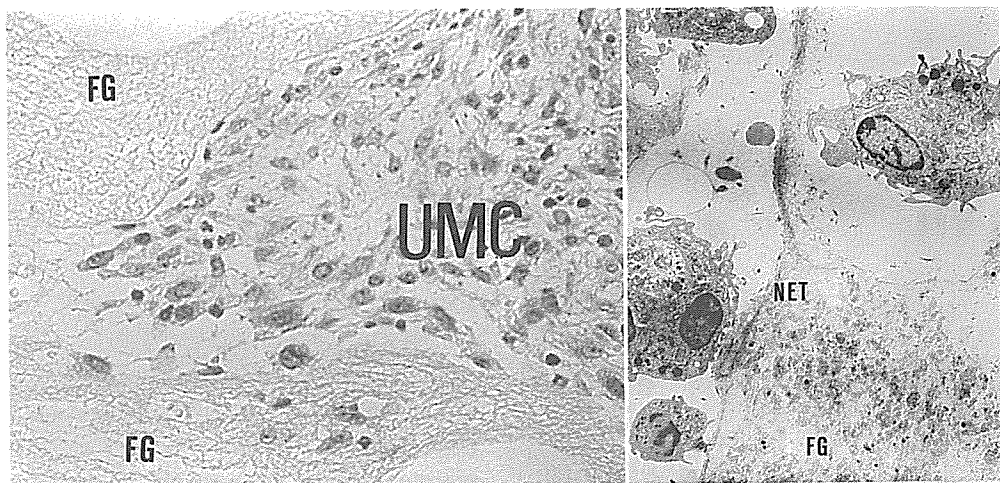


Fig. 7 Photomicrograph and electronmicrograph at 5 days after implantation. Many spindle shaped cells attach to fibrin glue (fibrin networks).

FG : fibrin glue UMC : undifferentiated mesenchymal cell NET : fibrin networks

9日目の電顕像ではコラーゲン線維の豊富な軟骨細胞もみられ、その細胞周辺のフィブリンネットは消失していた(Fig. 8).

10日目の移植サンプルでは、細胞外基質に von Kossa 染色にてカルシウムの沈着が確認された。電顕像では特徴的な三角波状の細胞外突起を持つ軟骨細胞がみられた。その細胞外基質には針状のカルシウム沈着が細胞を取り囲むようにみられた(Fig. 9).

14日目には細胞周辺に骨様基質を持ち、胞体内に粗面小胞体とゴルジ装置の発達した骨芽細胞もみられた。光顕像ではこれらの骨芽細胞と軟骨細胞が骨梁様構造状に配列していた(Fig.10).

考 察

Bergel³⁾(1909)のフィブリンの止血機序における役割の報告、杉本¹⁸⁾(1984)のフィブリン糊の組織接着能

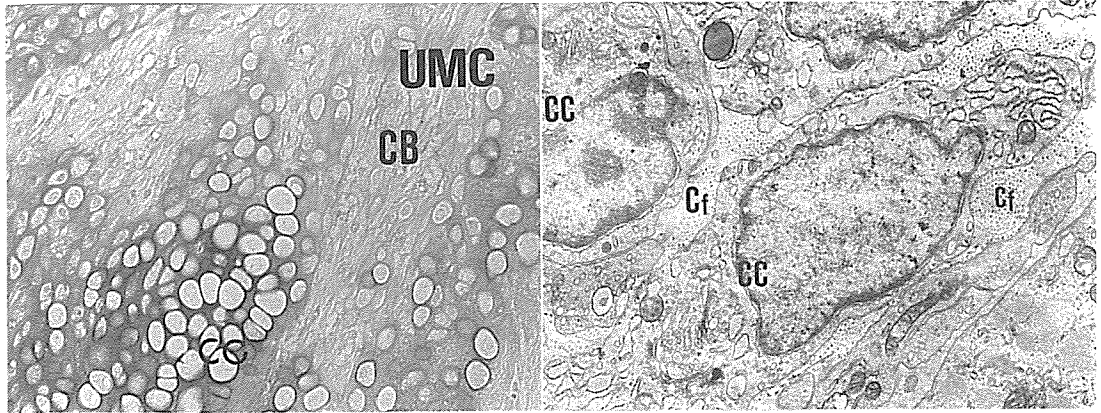


Fig. 8 Photomicrograph and electronmicrograph at 9 days after implantation, showing the proliferation of chondrocytes and chondroblastic cells. Fibrin glue disappears from these area.
CC: chondrocyte CB: chondroblastic cell Cf: collagen fiber UMC: undifferentiated mesenchymal cell

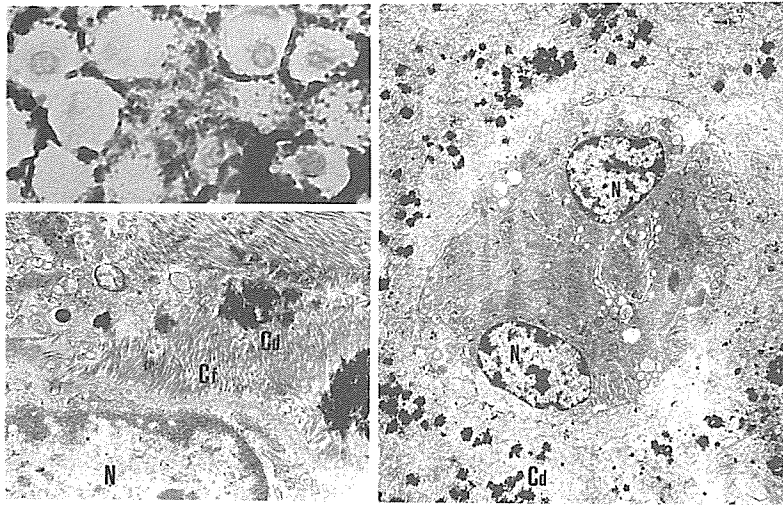


Fig. 9 Photomicrograph and electronmicrograph at 10 days after implantation.
Above left: photomicrograph of calcified cartilage (von Kossa stain. o. m. ×250).
Right: electronmicrograph of chondrocytes surrounded by calcified matrix. Below left:
electronmicrograph (high power magnification) of calcified matrix.
CB: chondroblast CM: chondromatrix Cd: calcium deposit Cf: collagen fiber N: nucleus

に関する報告などにより、フィブリン糊が組織接合に有用なことは広く知られている。一方、Grinnel⁷⁾ (1980)らは線維芽細胞がフィブリノーゲンやフィブリンによく接着してその場で分化・増殖を示すことを示し、フィブリン糊が軟部組織の修復機転に積極的に関与するとの見解を示した。同時に多くの研究者により、フィブリンは線維芽細胞の接着・増殖・分化の過程に関与するばかりでなく、早期の小血管新生、旺盛な結

合織の形成を促し損傷組織の修復を円滑に行うことが示された^{12),15)}。また、Bösch⁴⁾ (1980)らはウサギの骨盤に骨欠損部を作製し、そこへKiel boneとフィブリン糊を混合したものを移植し、Kiel bone単独で移植したコントロール群に比べ、フィブリン糊混合群ではより早期に確実に骨欠損部が修復されることを報告した。Böschはフィブリン糊を応用したこの骨移植術をfibrin adhesive system (FAS)と名付け、その後臨床応

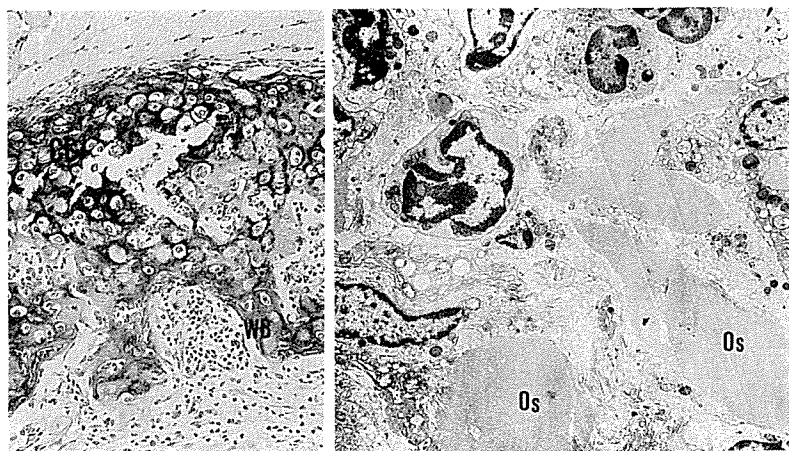


Fig. 10 Photomicrograph and electronmicrograph at 14 days after implantation.

Woven bone is formed at the inside of implants.

CC: chondrocyte WB: woven bone Os: ossification

用し好成績をあげている。Arbes¹¹⁾(1981)らは網様骨とフィブリンの混合剤の移植実験によって、フィブリン糊が新生骨の増殖を促すと報告した。その後ハイドロキシアパタイト(HAP)、トリカルシウムフォスフェイト(TCP)などもフィブリン糊と混合して骨欠損の補填に応用されている^{10),17)}。

しかしBMPに及ぼすフィブリン糊の影響については未知であり、BMPフィブリン糊混合剤を臨床応用する為には、まず1) BMPフィブリン糊混合剤の骨・軟骨誘導能、2) BMPとフィブリン糊の至適混合比、3) アプロチニンがBMPの骨・軟骨誘導に及ぼす影響、4) フィブリンネットとBMP反応細胞との関係などを検討する基礎的実験が必要となる。

BMPとフィブリン糊混合群は、BMP単独群と同様に骨・軟骨が再現性よく誘導され、また経時的に観察したサンプルの光顕所見でも、BMP単独群と同様な経過で骨・軟骨が出現した。このことからフィブリン糊がBMPの骨・軟骨誘導能を阻害することはないと思われた。しかし、サンプル移植後のごく初期の段階(移植後1日から5日目あたりまで)では、BMPとそれに反応する細胞の集簇の程度は両群間で明らかな相違があった。これはGrinnel⁷⁾(1980)の報告にある未分化間葉系細胞や線維芽細胞に対するフィブリンの作用によるものと思われる。すなわち、フィブリン糊はより多くのBMP反応細胞を集簇させ、二次的にBMPの骨・軟骨誘導を旺盛にすると考えられる。しかし、BMPに対するフィブリン糊の量を増大すると移植サ

ンプル内の新生骨・軟骨が減少し、同時にBMPに未反応部分が増加した。このことはBMPとフィブリン糊との至適混合比が存在することを示唆している。今回の実験ではBMP 5mgに対してフィブリン糊が0.1mlから0.2mlの量では骨・軟骨がよく誘導されるが、0.5mlでは骨・軟骨は誘導されるものの移植片に未反応部が多くなっていた。これはBösch⁴⁾(1980)がKiel boneとフィブリン糊の混合実験の結果から指摘しているように、混合するフィブリン糊が適量を越ええると、BMP反応細胞は過量のフィブリン糊に囲まれているBMPまでは到達できず、その骨・軟骨誘導能の影響を受けられないためと思われた。

神経吻合や骨接合にフィブリン糊を応用する時には、フィブリン糊に加えるアプロチニン量を減じるほうが損傷神経や骨の治療機転に有効に働くと考えられている^{9),12)}。しかし、アプロチニン量が3,000 KIU以下の範囲ではBMPの新生骨・軟骨の誘導能に対する影響はみられなかった。これはBöschのKiel boneを使用した実験報告と一致し、BMPも脱蛋白されておりKiel boneに生物学的に近い性状を持つためと思われる。一方、アプロチニン量の変化により新生骨・軟骨の出現した移植サンプルの全体的な形状が異なった。この形状の違いは移植後5日目から7日目より、一旦凝集したフィブリン糊が、線溶系の亢進により溶解し始めるが、アプロチニンの量によりこの溶解を遅延させる程度が異なるためと思われる。この現象は軟X線撮影像でより明らかに確認できた(Fig. 11)。

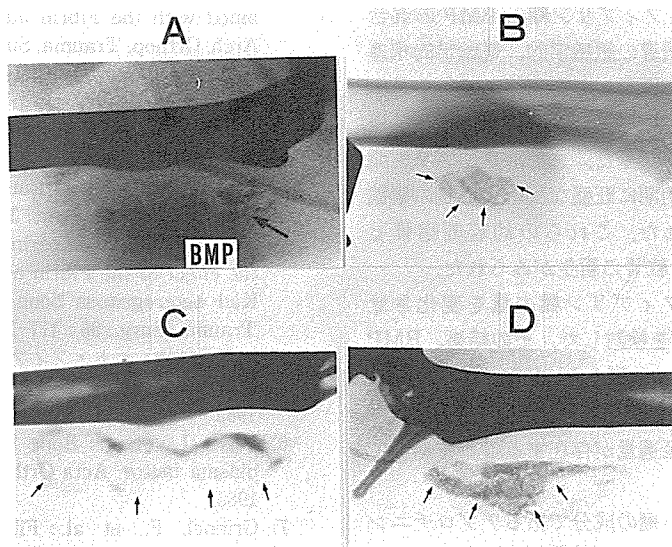


Fig. 11 Soft X-ray radiograph, showing the influence of Aprotinin in the mixture of BMP and fibrin glue to new bone and cartilage formation.

A: BMP alone (at 1 week after operation). B: mixture of BMP and fibrin glue with Aprotinin (3,000 KIU/ml, at 2 weeks after operation). C: BMP alone (at 2 weeks after operation). D: mixture of BMP and fibrin glue without Aprotinin (at 2 weeks after operation).

移植3日目では集簇してきた細胞群は未だ小円形のままであり、その形態からは細胞分化は始まってはいないように思われた。これは野上¹⁴⁾(1979)が報告しているように、BMPはその反応細胞に3日目以降にその分化の情報を与えるということと一致している。フィブリン糊はBMPのその反応細胞への情報伝達時期には影響を与えていないものと思われた。

移植5日目では、フィブリン糊の内部に進入した未分化間葉系細胞はフィブリンネットに細胞突起を出し接着・分化していた。このようにフィブリンネットはそれに細胞の接着を可能にし、細胞が分化するための良い足場を提供していると思われた。これはフィブリン糊が細胞の分化を促進するという報告^{7),18)}と一致している。一方、フィブリン糊に含まれる fibronectin, factor XIIIが細胞分化に関与するという報告²⁾もあるが、今回の実験系ではその証明は困難であった。

移植7日目から10日目で、細胞分化の進んだ部位ではフィブリンネットは消失しており、フィブリン糊は移植後7日目ごろより吸収され消失するという過去の報告と一致していた。

以上のようにフィブリンネットはBMP反応細胞に

その接着の足場を与えることによって、細胞の分化と増殖を促した後、吸収され消失していくことがわかった。よってこのBMPフィブリン糊混合剤中のBMPとフィブリン糊はよく協力し、またフィブリン糊は移植後に遊離拡散しがちなBMPを移植場所に安定させる binder ともなりうると思われた。このことはBMPによる新生骨・軟骨を必要範囲に出現させることができ、BMPとフィブリン糊混合剤の臨床応用への可能性が増大すると思われた。

今回の実験結果により、フィブリン糊の軟部結合組織に対する増殖作用とBMPの骨・軟骨誘導の作用を合わせ持つBMPフィブリン糊混合剤を応用すれば、骨終止部で断裂した腱、靱帯を早期に再固着できる可能性もある。したがって、BMPフィブリン糊混合剤が腱、靱帯と骨との接合に有用であるという基礎的な資料が得られたといえる。

ま と め

フィブリン糊と骨形成因子(BMP)の混合剤を臨床応用する目的で、フィブリン糊がBMPの骨・軟骨誘導能に及ぼす影響を検討した。

- 1) BMP 単独使用群とフィブリン糊と BMP の混合剤使用群との骨・軟骨誘導の組織学的, 電顕学的相違を検討した。その結果, 両群とも再現性よく新生骨・軟骨が形成され, フィブリン糊は BMP の骨・軟骨誘導能を阻害しないことがわかった。また, フィブリン糊混合剤使用群では移植初期に旺盛な反応性細胞の集簇が移植片周辺にみられた。これらの幼若細胞骨と BMP が反応して, 骨, 軟骨の新生がみられた。
- 2) BMP と混合するフィブリン糊の量を変化させて, 骨・軟骨誘導の状態を検討した。その結果, BMP 5 mg にたいしてフィブリン糊 0.1 ml を混合した群は 0.5 ml 群より新生骨・軟骨が旺盛に出現した。BMP に対するフィブリン糊の至適量が存在することを示していた。
- 3) 混合するフィブリン糊の成分であるアプロチニンの量を変化させ, 新生骨・軟骨の状態を検討した。その結果, アプロチニン量が少なくなれば移植片が膨化したようになり, 新生骨・軟骨は島嶼状に出現した。アプロチニン量が多くなれば移植片は移植時の形態を保ち, そこに新生骨・軟骨が出現した。
- 4) BMP とフィブリン糊の微細構造であるフィブリンネットとの関係を電顕的に検討した。その結果, フィブリンネットは BMP 反応細胞の接着, 分化それに増殖の良い足場を提供していた。
- 5) フィブリン糊は BMP の移植後の遊離拡散を防止する binder となった。また, BMP 反応細胞の増殖を旺盛にし, 細胞の分化の足場となることで, BMP とよく協同することがわかった。
- 6) フィブリン糊の結合組織増殖能と BMP の新生骨・軟骨誘導能を同時に利用できる BMP フィブリン糊混合剤は, 腱, 靱帯を骨に再結合する場合にも応用できる可能性があると思われた。

稿を終えるにあたり, ご指導, ご校閲を賜りました恩師三浦隆行教授に深甚なる感謝の意を表します。また終始懇切なご指導を頂いた岩田久助教授, 佐藤啓二講師, 久野常治先生, 愛知県身障者コロニー野上宏先生に深謝いたします。

(本論文の要旨は第 2 回日本整形外科学会基礎学術集会, 第 69 回, 第 70 回中部日本整形外科学会災害外科学会において発表した)

文 献

- 1) Arbes, H., et al.: First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the Fibrin adhesive system (FAS). Arch. Orthop. Trauma, Surg., 98: 183-188, 1981.
- 2) Beck, E., et al.: The influence of fibrin stabilizing factor XIII on the growth of fibroblast *in vitro* and wound healing. Z. Zellforsch., 57: 327-335, 1982.
- 3) Bergel, S.: Über Wirkung des Fibrins. Deutsche. Med. Wochenschr., 35: 633-640, 1909.
- 4) Bösch, P., et al.: Experimental investigation of the effect of the Fibrin adhesive system on the Kiel heterogenous bone graft. Arch. Orthop. Trauma, Surg., 96: 177-185, 1980.
- 5) 二見俊郎他: ヒト・フィブリン糊による神経, 腱, 骨接着の検討. 整形外科と災害外科, 31: 123-127, 1982.
- 6) Claes, L., et al.: Bone healing stimulated by plasma factor. Acta Orthop. Scand., 56: 57-62, 1985.
- 7) Grinnel, F., et al.: Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata; Requirement for cold-insoluble globulin. Cell, 19: 517-525, 1980.
- 8) Hanamura, H., et al.: Solubilization and purification of Bone Morphogenetic Protein (BMP) from Dunn osteosarcoma. Clin. Orthop., 153: 232-240, 1980.
- 9) Haberland, G. L., et al.: トラジロールの薬理学, Proteinase inhibitor. Medicin von Heute, 62: 51-66, 1980.
- 10) Hetherington, V. J., et al.: Pyrolytic carbon, Porous implant, and the Fibrin adhesive system. Journal of Foot Surgery, 25: 341-347, 1986.
- 11) Keller, J., et al.: Fixation of osteochondral fractures. Acta Orthop. Scand., 56: 323-326, 1985.
- 12) 光嶋勲他: 高濃度フィリノーゲンを使用した神経縫合に関する実験的研究. 臨床整形外科, 18: 735-741, 1983.
- 13) Mizutani, H., et al.: The nature of Bone Morphogenetic Protein (BMP) fractions derived from bovine bone matrix gelatin. Clin. Orthop., 171: 213-223, 1982.
- 14) Nogami, H., et al.: Postnatal new bone formation. Clin. Orthop., 184: 106-113, 1984.
- 15) 小原一則他: コラーゲン創傷保護材の表在性皮膚欠損創に対する上皮再生効果. 基礎と臨床, 16: 1041-1048, 1982.
- 16) 杉本良洋他: フィブリンによる組織接着に関する研究. 整形外科基礎科学, 11: 358-361, 1984.
- 17) Urist, M. R., et al.: Bone regeneration under the influence of a Bone Morphogenetic Protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composites defects in dogs. Clin. Orthop., 214: 295-304, 1987.