

氏 名	糟 谷 彰 宏
(ふりがな)	(かすや あきひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成24年 1月 25日
学位授与の要件	学位規則第4条 第2項該当
学位論文題名	<i>In Vivo</i> Degradation and New Bone Formation of Calcium Phosphate Cement-Gelatin Powder Composite Related to Macroporosity after <i>In Situ</i> Gelatin Degradation (リン酸カルシウム骨セメント・ゼラチンパウダー 混合人工骨の生分解性および骨形成の評価)
論文審査委員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 植 野 高 章 教授 上 田 晃 一 教授 鳴 海 善 文

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究の目的》

リン酸カルシウム骨セメント (Calcium Phosphate Cement : 以下、CPC) は優れた生体適合性と骨伝導能を有する人工骨であり、リン酸カルシウムを主体とした粉体と、コハク酸ナトリウムとコンドロイチン硫酸ナトリウムを含有した水溶液を混和することによりペースト状となり、骨欠損部に注入すると水和反応により硬化する特徴を持っている。ペースト状であるため様々な形の骨欠損に使用することができるが、骨再生の観点からは CPC の生分解性に問題があり、骨に置換されず体内に長期間残存する。これは、骨髄系細胞等が進入できる有効な気孔径がなく、連通構造でないことが原因と考えられている。ところ

で、ゼラチンは生体適合性のあるポリマーであり、コラーゲンとは異なり生体内で抗原性を示さず、酵素反応により完全に吸収されるという特徴を有している。そこで、CPC にゼラチンパウダーを混ぜ合わせることにより、CPC に連通多孔体構造が形成されるのではないかと考えた。本研究の目的は、CPC とゼラチンパウダーを混合した人工骨（以下、混合人工骨）を作製し、その生分解性、骨形成と骨置換された骨の強度特性を明らかにすることである。なお、本研究は大阪医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

《方 法》

体重 3.0～3.5kg のニュージーランド白色ウサギ 60 羽を対象とした。このうち 20 羽を X 線学的評価および組織学的評価に供し、残りの 40 羽を力学的評価に供した。ウサギの両大腿骨外顆部に直径 4mm、深さ 13mm の円柱状骨孔を作製し、海綿骨欠損モデルとした。本研究では、CPC はバイオペックス - R^B (HOYA 株式会社、東京) を使用した。まず、CPC 粉末に対して粉液比 3.18 で混和液を添加し 1 分間混和したのち、重量比 0% (C₀ 群)、10% (C₁₀ 群)、15% (C₁₅ 群) の割合でゼラチンパウダーを添加し、さらに 1 分間混和して 3 種類の混合人工骨を作製した。ゼラチンはアルカリ処理ゼラチンを使用し、真空下 130°C で 14 時間熱架橋したものを破碎しパウダーとした（平均粒子径は 200±0.2μm）。作製したペースト状の混合人工骨は骨欠損部に注射器を用いて注入充填した。Sham 群は骨孔作製のみとし、各群のウサギをペントバルビタール過量投与にて安楽死させ以下の項目について評価した。

1) X 線学的評価および組織学的評価

処置後 3 日、4、12、24 週で各群の軟 X 線検査とマイクロ CT 検査による人工骨の形態変化を観察した後、Villanueva 染色標本により類骨、線維骨、層板骨形成の有無について観察した。

2) 三次元構造解析

処置後 3 日の C₁₀ 群および C₁₅ 群について、マイクロ CT により三次元構造を解析し、混合人工骨注入部位に関心領域 (ROI) を設定し、TRI/3D-BON[®] (ラトックシステムエン

ジニアリング株式会社、東京) ソフトウェアを用いて気孔率と連通率を調べた (paired t-検定、有意水準 1%未満)。

3) 組織形態計測

処置後 4、12、24 週の C₁₀ 群および C₁₅ 群について、混合人工骨の骨置換性を評価するために組織形態計測を行った。American Society of Bone and Mineral Research のガイドラインに従い、標本の人工骨注入部位に ROI を設定し、新生骨面積と、残存する混合人工骨面積の割合を評価した。

4) 力学的評価

処置後 3 日、1、4、12、24 週で、C₀、C₁₀、C₁₅ の各群について、大腿骨顆部を長さ 2cm、厚さ 2mm の大きさに矢状断で切り出し、試験片を各 4 検体作製した。万能試験機 (EZ Graph、株式会社島津、京都) を用い圧縮強度を計測した。また、対照群として大腿骨顆部の未処置部海綿骨の圧縮強度を計測した (二元配置分散分析、有意水準 5%未満)。

《結 果》

1) X 線学的評価および組織学的評価

軟 X 線検査およびマイクロ CT 検査では、処置後 3 日の C₀、C₁₀、C₁₅ 各群とも、注入した CPC 辺縁に明らかな変化は認めなかった。処置後 4 週においても各群初期の X 線画像と比べて明らかな変化は認めなかった。処置後 12 週では、C₀ 群の CPC 周囲に変化はなかったが、C₁₀ 群、C₁₅ 群において CPC と周囲海綿骨組織との識別は困難となった。処置後 24 週では、C₀ 群の CPC 面積は若干減少しやや辺縁が不明瞭となっていたが、C₁₀ 群、C₁₅ 群については、その X 線透過性は周囲海綿骨と同程度になっていた。Sham 群では、処置後 24 週においても骨形成は認めなかった。

組織学的評価では、C₀ 群は処置後 3 日では CPC と周囲海綿骨の境界は鮮明であり、12 週以降も CPC の分解は大きくは進んでいなかった。C₁₀ 群では、処置後 4 週で混合人工骨のゼラチン分解に伴ってできた空洞内に辺縁から骨髄細胞が進入し、処置後 12 週ではこれが中心部にまで達していた。また、骨の辺縁に沿って骨芽細胞が観察された。処置後 24

週では類骨形成とともに、新生骨に CPC が取り込まれている像が観察された。C₁₅ 群では、これらの現象がより早期に観察され、処置後 4 週で CPC 分解と線維骨形成、類骨形成が認められた。処置後 12 週では CPC の減少と線維骨がみられ、処置後 24 週ではこれらの変化は顕著になり骨梁形成を認めた。

2) 三次元構造解析

処置後 3 日の気孔率は、C₁₀ 群 $54.5 \pm 6.6\%$ 、C₁₅ 群 $72.8 \pm 4.6\%$ であった。連通率は、それぞれ C₁₀ 群 $27.1 \pm 5.8\%$ 、C₁₅ 群 $47.1 \pm 6.7\%$ であり、気孔率・連通率とも 2 群間の差は有意であった (paired t-検定; $p < 0.01$)。

3) 組織形態計測

新生骨面積率は、処置後 4 週では C₁₀ 群 $3.8 \pm 3.4\%$ 、C₁₅ 群 $4.2 \pm 4.7\%$ であり両群間に有意差を認めなかった。処置後 12 週では C₁₀ 群は $9.8 \pm 2.9\%$ 、C₁₅ 群は $15.6 \pm 7.3\%$ であった。処置後 24 週では C₁₀、C₁₅ 両群とも 4 週に比べて有意に増加し、それぞれ $18.2 \pm 7.8\%$ 、 $21.9 \pm 4.7\%$ であった。混合人工骨面積率は、処置後 4 週では C₁₀ 群 $65.4 \pm 16.0\%$ 、C₁₅ 群 $69.9 \pm 17.6\%$ であった。処置後 12 週では C₁₀ 群 $54.2 \pm 13.4\%$ 、C₁₅ 群 $35.5 \pm 25.7\%$ 、処置後 24 週では C₁₀、C₁₅ 両群とも 4 週に比べて有意に減少し、それぞれ $31.0 \pm 15.9\%$ 、 $20.0 \pm 17.1\%$ であった。

4) 力学的評価

圧縮強度は C₀ 群が最も高く、処置後 3 日から 24 週までの期間を通して 70~80MPa であった。C₁₀ および C₁₅ 群は、C₀ 群に比べて有意に低い圧縮強度であった。C₁₀ 群は全期間を通して海綿骨の圧縮強度である 14.6MPa を上回る圧縮強度であった。C₁₅ 群では、処置後 1 週の圧縮強度は 9.2MPa、4 週では 11.8MPa と海綿骨と比べ低い値であったが、12 週以降は海綿骨と同等の強度となった。

《考 察》

CPC は、優れた骨伝導能と良好な初期強度を有し、ペースト状であるため整形外科手術で使用される機会が少なくない。ところが、生分解性に問題があるため移植部位に長期間

残存し、人工骨と移植部周囲組織の力学的特性が異なることから隣接部位が骨折するなどの問題点がある。これらの欠点を改良する目的で、CPC にゼラチンパウダーを混合することにより、硬化前はペースト状であるという特徴を残したまま、生体内においては連通多孔体が形成され、生分解性と骨形成が促進されるのではないかと考えた。予備実験では、CPC にゼラチンパウダーを 15%より高く混合するとペースト状態が維持できず、5%以下になると生分解性と骨置換性は著しく低下した。本研究では、ゼラチンパウダーを混合しない C₀ 群、ゼラチンを混和した C₁₀ 群と、ペースト状態を維持できる限界の C₁₅ 群を作製し、各群の生分解性と骨形成、および力学的特性について調査し、ゼラチンの最適な混合比率について検討した。

C₀ 群では X 線学的大体および組織学的評価において、処置後 24 週でも内部まで骨置換されることはなく、圧縮強度も注入部周囲の海綿骨よりはるかに高い値を維持し続けた。一方、C₁₀、C₁₅ 両群ではともに良好な骨置換性を示しており、C₁₀ 群は、海綿骨より高い圧縮強度を保ちながら、徐々に分解され骨形成していた。C₁₅ 群では、注入後早期には対照とした海綿骨の強度より低下していたが、4 週以降は海綿骨に近い圧縮強度を示した。また、組織学的評価では C₁₀ 群に比べてより早期に人工骨内部まで細胞進入が認められた。さらに、組織形態計測でも早期に骨形成がみられ、三次元構造解析では、気孔率・連通率ともに C₁₀ 群より C₁₅ 群の方が有意に高かった。これらの結果から、C₁₅ 群の方が C₁₀ 群より、生分解性、骨形成、および力学的特性において優れていることが分かった。

臨床において、人工骨には使用部位に応じた適切な初期強度が求められ、最終的な支持性は移植部周囲の生体骨と癒合することによって達成される。長期にわたる人工骨の隣接部位への力学的影響を考えると、人工骨に望まれる特性は時間経過とともに生体骨に置き換わり、さらにその強度特性も移植部位の特性と同様になることである。本研究結果において、C₁₅ 群は C₁₀ 群に比べより早期に分解、骨置換される傾向にあり、強度特性も海綿骨に近い値であった。本研究で開発した CPC・ゼラチンパウダー混合人工骨は、ペースト状かつ優れた骨伝導能を有した骨再生の足場として臨床応用が期待できる材料である。

論文審査結果の要旨

リン酸カルシウム骨セメント (Calcium Phosphate Cement : 以下、CPC) は優れた生体適合性と骨伝導能を有するペースト状人工骨であるが、臨床例では骨に置換されず体内に長期間残存することが報告されている。この原因は、骨髄系細胞等が進入できる有効な気孔径がなく、連通構造でないことであると考えられている。申請者らは、CPC にゼラチンパウダーを混合することにより、生体内で連通多孔体構造が形成されるのではないかと考え、CPC とゼラチンパウダーを混合した人工骨 (以下、混合人工骨) を作製し、その生分解性、骨形成と骨置換された骨の強度特性を調査した。

CPC に重量比 0% (C₀ 群)、10% (C₁₀ 群)、15% (C₁₅ 群) の割合でゼラチンパウダーを添加し、ウサギ海綿骨欠損モデルに各群の混合人工骨を注入充填した。軟 X 線、マイクロ CT 検査および Villanueva 染色標本での観察と、組織形態計測による生分解性と骨形成の評価、圧縮強度の計測を行った。また、C₁₀ 群、C₁₅ 群について三次元構造解析による気孔率、連通性の評価も行った。

本研究結果では、C₀ 群では X 線学的および組織学的評価において、処置後 24 週でも内部まで骨置換されることはなく、圧縮強度も注入部周囲の海綿骨よりはるかに高い値を維持し続けた。一方、C₁₀、C₁₅ 両群ではともに良好な骨置換性を示しており、C₁₀ 群は海綿骨より高い圧縮強度を保ちながら、徐々に分解され骨形成していた。C₁₅ 群では、注入後早期には海綿骨の強度より低下していたが、4 週以降は海綿骨に近い圧縮強度を示した。また、三次元構造解析では、気孔率、連通率ともに C₁₀ 群より C₁₅ 群の方が有意に高かった。

これらの結果から、申請者らは、C₁₅ 群の方が C₁₀ 群より、生分解性、骨形成、および力学的特性において優れていることを明らかにし、本研究で開発した CPC・ゼラチンパウダー混合人工骨が、ペースト状かつ優れた骨伝導能を有した骨再生の足場として臨床応用が期待できる材料であることを示した。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Orthopaedic Research 30(7): 1103-1111, 2012