

Hydroxyapatite と poly-lactide を主成分とする

吸収性人工素材に関する研究

(The application of a bioresorbable scaffold composed of

hydroxyapatite and polylactide)

赤木 浩之

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：原 康)

平成 26 年 3 月

## 目次

第1章 序論	1
序論	2
図	7
第2章 大腿骨骨折後癒合不全症例に対する同種保存骨を用いた再建術に関する検討	8
2.1 緒言	9
2.2 材料と方法	10
2.2.1 同種保存骨	10
2.2.2 患者	10
2.2.3 外科的処置	10
2.2.4 術後管理	11
2.2.5 脚短率の算出	11
2.2.6 放射線学的骨治癒スコアによる経時的な骨癒合評価	12
2.2.7 C-reactive protein (CRP) の推移	12
2.2.8 統計処理	12

2.3	結果	13
2.4	考察	14
2.5	小活	17
	図および表	18
第3章 Hydroxyapatite/poly-L-lactide 製人工素材と poly-L-lactide 製人工素材の 生体親和性と骨孔閉鎖に関する比較評価		
		27
3.1	緒言	28
3.2	材料と方法	29
3.2.2	PLLA・HA/PLLA screw の準備	29
3.2.2	供試動物	30
3.2.3	外科的手技	30
3.2.4	血液検査	31
3.2.5	単純 X 線検査	31

3.2.6	X線CT検査	32
3.2.7	組織学的評価	32
3.2.8	統計学的評価	33
3.3	結果	33
3.3.1	血液検査	33
3.3.2	放射線学的検討	33
3.3.3	Screw骨孔の $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量	35
3.3.4	組織評価	35
3.4	考察	37
3.5	小活	41
	図および表	42
第4章 非荷重部位における hydroxyapatite/poly-D/L-lactide 製人工骨の		
	適応に関する検討	54
4.1	緒言	55

4.2. 材料と方法	57
4.2.1 生体吸収性人工骨	57
4.2.2 実験 1: 組織学的検討による HA/PDLLA 製人工骨と $\beta$ -TCP 製人工骨の比較検討	57
4.2.2.1 供試動物	57
4.2.2.2 外科的手技	57
4.2.2.3 X 線 CT 検査	58
4.2.2.3 定量評価	58
4.2.3 実験 2: 熱変形 HA/PDLLA 製人工骨と未変形 HA/PDLLA 製人工骨の比較検	60
4.2.3.1 外科的手技	60
4.2.3.2 X 線 CT 検査	60
4.2.3.3. 組織学的評価	60
4.2.4 実験 3: 力学的検討と HA/PDLLA 製人工骨の重量平均分子量変化	60
4.2.4.1 供試動物	60
4.2.4.2 強度試験	61
4.2.4.3 重量平均分子量の測定	61
4.2.5 統計学的処理	62
4.3 結果	62
4.3.1 実験 1	62

4.3.1.1	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 相当量	62
4.3.1.2	組織学的評価	62
4.3.2	実験 2	63
4.3.2.1	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 相当量	63
4.3.2.2	組織学的評価	63
4.3.3	実験 3	64
4.3.3.1	強度試験	64
4.3.3.2	HA/PDLLA 製人工骨の Mw の経時的変化	65
4.4	考察	65
4.5	小括	69
	図および表	70
第 5 章 荷重部位における hydroxyapatite/poly-D/L-lactide 製人工骨の		
	適応に関する検討	89
5.1	緒言	90

5.2 材料と方法	91
5.2.1 生体吸収性人工骨	91
5.2.2 供試動物	92
5.2.3 外科的手技	92
5.2.4 単純 X 線検査	93
5.2.4 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量測定	93
5.2.6 組織学的評価	93
5.2.7 免疫組織化学染色	94
5.2.8 組織写真を用いた定性評価と面積測定、細胞数計測による半定量評価	95
5.2.9 統計学的処理	96
5.3 結果	97
5.3.1 単純 X 線検査	97
5.3.2 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量	97
5.3.3 組織学的検討	98
5.3.4 成熟骨、類骨、そして残存人工骨面積測定	98
5.3.5 線維組織面積測定	99
5.3.6 I 型コラーゲン	100
5.3.7 血管腔数測定	100

5.3.8	破骨細胞様細胞数測定	100
5.3.9	RUNX2 陽性細胞数測定	101
5.4	考察	102
5.5	小括	106
	図および表	108
第6章	総括	123
	謝辞	135
	参考文献	136
	Summary	160



# 第 1 章

## 序論

## 序論

獣医整形外科領域における犬の骨折は発生率 7%と報告されており、遭遇する機会の多い疾患の一つである (Johnson JA. ら, 1989)。骨折治療において、外科的手技の失宣、血液供給の不足、感染によって骨折後に癒合不全を呈し、広範囲の骨欠損が形成され、骨幹軸の再建術を必要とする症例が存在する。特に対側肢に対して患肢長が 80%を下回る際には跛行を呈すると報告されている (Franczuski D. ら, 1987)。その際には骨長の再建をすることが必要となる。骨幹軸の再建には構造的に欠損部位を充填する必要があり、自家皮質骨移植、同種保存骨移植、吸収性人工骨移植がその候補として挙げられる (Darryl LM. ら, 2003; Stevenson S. ら, 1999; Ragetly G.R. ら, 2012; Vertenten G. ら, 2010.)。自家骨移植は骨移植においてはゴールドスタンダードとされている。自家骨は免疫反応を惹起せず、骨へと分化する骨芽細胞前駆細胞を豊富に含み、骨誘導能と骨伝導能の両方を保持している理想的な移植骨である (Samartzis D. ら, 2005; Urist MR. ら, 1967)。しかし、自家骨移植はその採取時に患者に対して外科的侵襲を加えるために、疼痛や感染のリスクが存在する (Samartzis D. ら, 2005)。そのリスクや外科的侵襲を軽減させるために考えられたのが、同種保存骨である。同種保存骨は構造的に適切な強度を有していることから細胞の足場となる骨伝導能、さらに細胞分化を促進させる骨誘導能を有していることから、荷重部位における使用には適切であると考えられた (Darryl LM. ら, 2003)。しかしながら、同種保存骨自体は細胞成分に乏しいという問題点を有している (Giannoudis PV. ら, 2005)。さらに、同種保存骨は-80℃の

条件下で保存するための特殊な設備が必要であり、他の個体から採取するために、個体の確保、採取に伴う感染のリスク、そして保存骨自体が宿主に完全吸収されるまで長期間の経過観察が必要となる(Wilson J.W. ら, 1990)。そのため、特殊な設備を必要とせず、管理と術中の取り扱いが簡便であり、より早期に宿主に吸収される吸収性人工骨の開発が望まれていた。

吸収性人工素材は大きく分類すると、poly glycolic acid (PGA) や poly lactic acid (PLA) を代表例とする生体吸収性ポリマー、そして Hydroxyapatite (HA) や beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP)を代表例とするリン酸カルシウムの2つに分けられる。1971年に Cutright DE et al が、poly-L-lactide (PLLA) を吸収性骨接合材料として骨折治療への使用を報告して以来、table 1-1 に示すように多くの人工素材が生体吸収性骨接合材料として利用されてきた (Cutright DE. ら, 1971; Rezwan K. ら, 2006)。1977年に Miller et al が poly glycolic acid (PGA)、PGA と PLLA の共重合体の埋植実験、さらに1992年に Holland et al が polycaprolactone (PCL) の埋植実験によって人工ポリマーが吸収性接合材料として利用可能であることが示されてきた (Miller RA. ら, 1997; Holland SJ. ら, 1992)。しかし、PGA はその曲げ強度が埋植後2週間で半減し、さらにウサギ大腿骨遠位への埋植実験においては36週目に完全吸収されたと報告されている (Rokkanen P.U. ら, 2000; Böstman O. ら, 1992)。一方で PCL は24ヶ月の経過観察後も分解吸収されず、生体内に長期間残存することが報告されている (Rezwan K. ら, 2006)。PGA は生体適合性に優れると Nellson et al や Hollinger が報告した一方で、Böstman は PGA の分解過程において異物反応が惹起され、骨融解を引き起こすと報告した (Nellson

JF. ら, 1977; Hollinger JO. 1983; Böstman O. ら, 1992)。吸収性骨接合材料は優れた強度と生体適合性を有する人工素材が必要とされており、異物反応を惹起する人工素材の使用は不適切である。PLLA を主成分とする人工素材では術後 16 週までの経過において、合併症の発生は報告されていないが、PGA を主成分とする人工素材では約 2%と報告されている (Rokkanen P.U. ら, 2000)。PLLA は骨の癒合において必要とされる期間、適切な強度を保持し、さらに炎症反応を惹起することなく生体へと吸収されると報告された (Rokkanen P.U. ら, 2000; Böstman O. ら, 1992; Nellson JF. ら, 1977; Hollinger J.O. 1983; Böstman O. ら, 1992)。さらに生体吸収性ポリマーの中で PLLA のみがピエゾ効果を有し、局所における骨形成を有意に促進させることが報告されている。(Ikada Y. ら, 1996)。一方で、PLLA は 5 年を超える長期的な観察を行った報告において、遅延性無菌性壊死を引き起こし、疼痛を引き起こすことが知られている (Matsusue Y. ら, 1996)。そのため、生体適合性に優れるリン酸カルシウムを主成分とする人工素材と PLLA を混合させることで生体適合性を向上させた人工素材の開発が進められており、その人工素材としては特に HA と  $\beta$ -TCP が注目されている。HA と  $\beta$ -TCP は同等の生体適合性と骨形成能を有し、さらに HA は  $\beta$ -TCP に比較し長期間、生体内においてその強度を維持することが報告されている。(Doi Y. ら, 1999; Oyake Y. ら, 2002; Ghosh SK. ら, 2008)。1993 年に Veheyen et al によって HA と PLLA を混合させて作成された HA/PLLA は PLLA に比較し優れた生体適合性を示し、骨との直接癒合を得たと報告されている (Verheyen C.C. ら, 1993)。獣医領域における生体吸収性骨接合材料の使用は実験的な報告が多く、臨床応用に関する報告は非常に少ない (Backstorm AS. ら 2005:

Pihlajamäki H. ら, 1992; Tegnander A. ら, 1994; Hara Y. ら, 1994; Hara Y. ら, 1994)。それは、吸収性骨接合材料が金属製インプラントに比較し高価であり、活動制限の困難な動物においては強度に劣る吸収性骨接合材料は選択肢となりにくいためである。しかしながら、犬における骨折症例において術後に癒合不全が発生する頻度は約4%とされており、癒合不全と遭遇することは稀ではない (Rudd RG. ら, 1992; Smith SG. 1991; Hunt JM. ら, 1980)。こういった背景から、獣医整形外科領域においては、癒合不全症例に対する再建術に用いる移植骨として吸収性人工骨が必要とされている。我々は先述した HA と PLLA、そして PLLA の D 体である poly-D-lactide (PDLA) と PLLA のステレオコンプレックスである poly-D/L-lactide (PDLLA) を主成分とする生体吸収性人工素材が新たな吸収性人工骨として利用可能であると考え、以下に示す一連の検討を行った。

第 2 章では、現在、本学附属動物医療センターにおいて行っている同種保存骨を用いた広範囲の骨欠損を有する骨折後癒合不全症例に対する骨幹軸再建術の有用性とその問題点についての検討を行った。第 3 章では、先述した HA/PLLA 製骨接合材料の長期的な経過観察を行い、皮質骨へのリモデリングと炎症反応を PLLA 製骨接合材料と比較検討した。第 4 章では、新開発の HA/PDLLA 製吸収性人工骨の非荷重部位におけるリモデリング過程を吸収性人工骨として一般的に使用されている  $\beta$ -TCP 製人工骨と比較検討し、その有用性について評価した。PLLA は構造異性体の PDLA を有し、この 2 つを混合させて作成された PDLLA は PLLA に比較し早期に加水分解を受けることが報告されている (Pietrazak WS. ら, 1997)。HA と PDLLA を組み合わせて開発された吸収性人工骨が骨欠損を伴う骨幹軸再建術

に用いることが可能であると考え、その有用性について検討した。また、HA/PDLLA 製人工骨は熱変形による欠損部位への充填が可能であることが特徴として挙げられる、熱変形を行った HA/PDLLA 製人工骨と未変形 HA/PDLLA 製人工骨の比較検討を行い、熱変形によるリモデリングへの影響についても評価を行った。第 5 章では、脛骨骨欠損モデルを作成し HA/PDLLA 製人工骨を埋植した。対側肢には同様の骨欠損を作成し  $\beta$ -TCP 製人工骨を埋植し、荷重部位における両者のリモデリング過程について比較検討し、HA/PDLLA 製人工骨の有用性を荷重部位において評価した。

Table 1-1 : 人工素材の融点・圧縮強度・分解速度

人工素材	融点: Tm(°C)	圧縮強度(MPa)	分解期間 (month)
Poly-L-lactide (PLLA)	173-178	40-120	>24
Poly-D-lactide (PDLA)	173-178	40-120	>24
Poly-D/L-lactide (PDLLA)	不定形	35-150	12~16
Poly glycolic acid (PGA)	225-230	340-920	6~12
Polycaprolactone (PCL)	58	40-100	>24

## 第 2 章

# 大腿骨骨折後癒合不全症例に対する 同種保存骨を用いた 再建術に関する検討



## 2.1 緒言

長管骨骨折後の癒合不全は一般に固定後の不安定性、血液供給の不足、そして感染に起因する。癒合不全は犬において、橈尺骨に 60%、脛骨に 25%、そして大腿骨では 15%発生すると報告されている (Piermattei D.L. ら, 2006)。癒合不全は放射線学的所見によって生物学的活性型と生物学的無活性型に分類される。生物学的活性型は骨折部位における固定強度が不十分なことに起因し、一方で生物学的無活性型は血液供給の不足、組織の壊死、そして骨欠損に起因する。特に対側肢に対して 20%以上の骨欠損を有する症例では、跛行を呈することが報告されている (Franczuszki D. ら, 1987)。健常肢に対して 20%以上の骨欠損を伴う癒合不全症例に対しては骨癒合を達成させることと同時に、骨長を再建することが必要となる。

骨欠損の再建には自家海綿骨移植、自家皮質骨移植、同種保存骨など、様々な手法が報告されている (Darryl L.M. ら, 2003; Stevenson S. ら, 1999; Ragetly G.R. ら, 2012; Vertenten G. ら, 2010.)。自家海綿骨移植は臨床的には骨折治療において骨治癒を促進させる目的で使用されているが、広範な骨欠損を有する癒合不全症例において自家海綿骨は構造的な強度が低い事と、適切な量を採取することが困難な事から不適である。一方で同種保存骨は構造的に適切な強度を有していることから細胞の足場となる骨伝導能、さらに細胞分化を促進させる骨誘導能を有していることから、荷重部位における使用には自家海綿骨に比較しより適切であると考えられた (Darryl L.M. ら, 2003)。しかしながら、同種保存骨自体は細胞成分に乏しいという問題点を有している (Giannoudis P.V.ら, 2005)。

本検討では、大腿骨骨幹部骨折後の癒合不全に対する自家海綿骨と同種保存皮質骨を用いた再建術の有用性を評価した。

## 2.2 材料と方法

### 2.2.1 同種保存骨

同種保存骨は健常ビーグル犬から採取した。両側の長管骨(上腕骨、橈骨、尺骨、大腿骨、脛骨)を滅菌下にて採取し、滅菌生理食塩加ガーゼにてパックし、プラスチックチューブ (BD Falcon, New Jersey, USA) に密封した後に $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。使用する際には $37^{\circ}\text{C}$ の滅菌生理食塩水にて加温し、残存していた骨髄や筋肉、そして骨膜を除去した後に使用した。

### 2.2.2 患者

2000年1月から2010年8月の期間に本学付属動物医療センターに来院し、再建手術を行った大腿骨骨幹部骨折後の癒合不全症例7頭を対象とした。7頭は骨幹部に大きな骨欠損を有し、患肢への負重が術後1ヶ月後にも回復しなかった。症例の体重、年齢、犬種、そして雌雄は table 2-1 に示した。患者に対して過去に行われた処置、受傷から本施設への来院までの期間、単純X線検査から行った Weber BG et al による癒合不全分類の結果を table 2-2 に示した (Weber B.G. ら,1976)。

### 2.2.3 外科的手技

麻酔前には一般身体検査、全血球検査、血液生化学検査、血液ガス検査を行った。ドロペリドール ( $0.25\text{mg/kg}$ , IM) を前投与薬として使用した。プロポフォール ( $7\text{mg/kg}$ , IV) を用

いて導入を行い、イソフルランと 100%酸素を維持麻酔として使用した。大腿骨外側からアプローチを行い、大腿骨骨幹部を露出した。症例 3 と 6 では膝蓋骨内方脱臼を有していたため、脛骨粗面骨切り術を併用した。癒合不全部位を露出させた後に、インプラントと腐骨を除去し、細菌培養検査と細菌感受性試験を行った (Mitsubishi Chemical Medience CO, Tokyo, Jpn)。近位と遠位の骨を皮質骨から出血が認められるまでサジタルソーを用いて切除をした。切除後は欠損幅を測定し、単純 X 線検査で得られた正常肢長を参考にして保存骨長を調節した。Plate には 2.5mm の reconstruction plate (MIZUHO, Tokyo, Jpn)、2.0 mm もしくは 2.7 mm の screw を使用した。Plate は保存骨に固定された後に遠位の自家骨に screw に固定した。その後、上腕骨近位から採取した海綿骨に 200 $\mu$ g の fibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加し、保存骨の髓腔と宿主骨と保存骨の境界面に充填した後に宿主骨近位に固定し、定法通り閉創した。浮腫予防を目的にロバート・ジョーンズ包帯を 7 日間使用した。術後 3 週間までは運動制限を指示し段階的な負重を許可した。

#### 2.2.4 術後管理

術後 2 週間は入院管理とした。退院後は術後 1, 2, 3, 6, 12 ヶ月後に定期的なフォローアップを行った。一般状態、患肢の使用状況をオーナーより聴取し、さらに炎症マーカーである C-反応性タンパク (CRP) の測定と単純 X 線検査による癒合の状況を確認した。

#### 2.2.5 脚短率の算出

正常肢と術前と術後の患肢を内外側方向から撮影した。大腿骨の脚短率は Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて計測した。正常肢長は大転子から大腿骨骨幹部の近位 1/3・中

央・遠位 1/3 の中央を通過し、大腿骨遠位において大腿骨顆にひいた接線に交差する点までの長さを正常肢長とした (Figure 2-1A)。患肢長の近位端・遠位端は正常肢長の測定と同じ点を使用し、それぞれの骨片ごとの骨幹軸を通過する直線長を合わせたものを患肢長とした (figure 2-1B)。脚短率 (%) は患肢長/正常肢長×100 で算出を行った。また、各症例に使用した移植片の長さについて計測した。

#### 2.2.6 放射線学的骨治癒スコアによる経時的な骨癒合評価

Weiland AJ, et al の報告に基づいた放射線学的骨治癒スコアを一部改変し、術後 1, 2, 3, 6、そして 12 ヶ月でのスコア評価を行った (Weiland A.J. ら, 1984) (table 2-1)。宿主骨-近位移植骨間、遠位移植骨-宿主骨間、そして移植骨本体の X 線所見についてそれぞれ 6 段階で評価を行い、総スコアを算出した。この評価法では最高総スコアは 18 点となる。

#### 2.2.7 C-reactive protein (CRP) の推移

術前・術後 7 日目・術後 14 日目、その後は一ヶ月毎の定期健診の際に CRP の測定を行った。CRP は犬用 CRP 測定キット (Shima laboratories, Tokyo, Jpn) Automatic analyzer 7180 (Hitachi high-technologies, Tokyo, Jpn) を用いて測定を行った。

#### 2.2.8 統計処理

CRP の統計処理には Turkey's HSD test、脚短率には paired t test、放射線学的骨治癒スコアには turkey 法による多重範囲検定を行った。P<0.05 をもって有意差ありと判定した。表記は放射線学的スコアについては中央値 ± SD、その他の表記については Average ± SD の形式で表している。

### 2.3 結果

年齢、性別、犬種、そして体重は table1 に示した。平均年齢は  $4.2 \pm 3.2$  (0.6~9.1) 歳、平均体重は  $4.8 \pm 4.0$  (2.5~13.8) kg であった。Table 2-2 には受傷から本学での治療までの期間、初期治療での使用インプラント、癒合不全分類、そしてフォローアップ期間を記載した。7 頭中 6 頭で 2 度の手術を経験しており、主に使用されていたインプラントは髓内ピン (IM ピン) あるいは plate であった。受傷から来院までの期間は平均  $110.7 \pm 58.1$  日であった。初診時の X 線検査所見より Weber BG et al の報告に基づいた癒合不全分類を行ったところ、生物学的無活性型癒合不全 4 例、生物学的活性型癒合不全 3 例であった (Stevenson S. ら, 1991)。Weber BG et al の癒合不全分類は Table 2-3 の通りである。本学における治療後の合併症は症例 2 でのみ screw のルーズニングが認められた。その他の症例では合併症は認められなかった。全ての症例は術後 2 週間位内に患肢への負重が可能となり、3 ヶ月位内に通常歩行が可能となった。

正常大腿骨長は  $92.3 \pm 15.9$ mm であった。術前の患肢長は  $78.5 \pm 18.5$ mm、術後の患肢長は  $90.3 \pm 15.7$ mm であった。術前の脚短率は  $85.2 \pm 8.1\%$  であったが術後には  $95.0 \pm 4.8\%$  と顕著な改善が認められた (figure 2-2)。使用した保存骨長は  $29.1 \pm 4.4$ mm であった。

単純 X 線検査所見からは症例 3 を除く 6 症例において術後 3 ヶ月までに近位の境界面の消失が認められた、症例 2、3 を除く 5 症例においては術後 6 ヶ月までに近位と遠位の両方の境界面の消失が認められた。移植骨自体は術後 6 ヶ月目以降よりデンシティーの低下が

認められ、リモデリングが進行したと考えられた。術後 12 ヶ月まで経過観察の可能であった 4 症例では移植骨は負重部位であったが破綻は認められなかった。放射線学的骨癒合スコアは術後 1 ヶ月目は  $9.1 \pm 0.4$  (n=7)、術後 2 ヶ月目は  $10.0 \pm 1.4$  (n=4)、術後 3 ヶ月目は  $10.3 \pm 0.5$  (n=4)、術後 6 ヶ月目は  $13.2 \pm 1.3$  (n=5)、術後 12 ヶ月目は  $14.8 \pm 0.5$  (n=4) であった。一例として症例 4 の経過を示す(Figure 2-3)。術後 3 ヶ月目と術後 6 ヶ月目の群の間に有意差が認められた(p=0.002、Figure 2-4)。

7 症例の経過観察の期間は table 2-2 の通りである。細菌培養検査の結果、症例 1 からは *Staphylococcus aureus*、症例 7 からは *Non Fermentative Rods* が検出された。症例に使用した抗生物質とその使用経過は table 2-4 の通りである。抗生物質の投与を中止した後に感染を示唆する所見を呈する症例は認められなかった。

CRP は術後 7 日目に  $3.6 \pm 1.6$  mg/dl (平均 $\pm$ SD) と一過性の上昇を示したが、術後 14 日目には  $1.4 \pm 0.3$  mg/dl と減少傾向が認められた (Figure 2-5)。全ての群の間に有意差は認められなかった。その後も定期検診の際に測定を行ったが、症例 2 のみ異常値を示した。術後の合併症として症例 2 は術後 64 日目に 1.82 mg/dl と高値を示し、screw・plate の破損が認められたため、65 日目に screw・plate の交換を行った。交換後 12 日目の術後 77 日目には CRP は 0.42mg/dl と正常値を示した。

## 2.4 考察

本検討において、大腿骨骨折後の癒合不全症例に対して同種保存皮質骨移植を実施した。

その結果、全ての症例で 2 週間後には患肢の負重が可能となり、術後 3 ヶ月目には通常の負重歩行が可能となった。術後の合併症として 1 例で screw の破損が認められたが、plate・screw の再設置後には合併症は認められなかった。全ての症例で同種保存骨自体の破綻は観察期間中には認められなかった。Sinibaldi KR は同種保存骨移植を行った症例の経過を経時的に観察した報告を行っており、その中で同種保存骨移植においては強固な固定器具、移植骨と宿主骨の連絡、そして海綿骨移植が骨癒合には重要であるとしている (Sinibaldi K.R. ら, 1989)。同種保存皮質骨は異物反応を惹起せず、強度に優れてはいるが海綿骨移植に比べ骨誘導能に劣る (Nather A. ら, 2010)。そのため、成長因子を添加した海綿骨移植は有用であると考えられた。健常犬に保存骨を用いた移植実験において近位と遠位の境界面は術後 3 ヶ月で消失したと報告された (Johnson A.L. ら, 1988)。我々の放射線学的検討においても同様に術後 3 ヶ月に近位と遠位の境界面の消失が認められた。本検討と過去の報告の消失時期が同時期であったことは大腿骨癒合不全症例に対する治療法として患肢における癒合と機能回復が得られた点から有効であったと考えられた。

FGF2 は骨代謝において重要な役割を果たす細胞や因子の活性上昇を促進すると報告されている (Solchaga L. ら, 2005; Saadeh P.B. ら, 2000; Miraoui H. ら, 2009)。しかし、FGF2 の単回投与は半減期は 17 時間とされているが、単回投与においても初期の反応を活性化し骨形成を促進すると報告されている (Zuo J. ら, 2004; Nakamura T. ら, 1998; Kawaguchi H. ら, 2001; Kato T. ら, 1998)。Nakamura T et al は犬における FGF2 の使用によって顕著な仮骨形成と破骨細胞形成が認められ、FGF2 の有する骨代謝の促進によって早期の骨癒合

が得られたと報告した (Nakamura T. ら, 1998)。また、同種保存皮質骨が吸収されたこと  
によって BMP や IGF-1 といった骨形成に有用な因子を放出することが報告されている  
(Stevenson S. ら, 1999)。同種保存骨移植を行った際に FGF2 を添加することは骨癒合を  
促進する有用な組み合わせであると考えられた (Wang J.S. ら, 1994)。FGF2 は局所投与  
された際にはウサギの脛骨骨欠損モデル、犬の尺骨骨切りモデルにおいても 200 $\mu$ g の使用  
が骨形成には望ましいと報告されている (Kawaguchi H. ら, 2001; Kato T. ら, 1998)。

FGF2 が骨代謝を促進するという過去の報告を考慮し、本手法が比較的早期の移植骨と宿  
主骨との癒合に至ったと考えられた (Solchaga L. ら, 2005; Pri-Chen S. ら, 1998; Zuo J.  
ら, 2004; Gospodarowicz D. ら, 1987; Saadeh P.B. ら, 2000; Sinibaldi K.R. ら, 1989)。  
本検討では同種保存骨と海綿骨移植のみを行った対照群は設定していないため、FGF2 の影  
響は明確にすることは不可能であった。同様の理由で、組織学的な検討を行うことは高い  
リスクが存在するため治癒後の症例からは行っていない。

感染は癒合不全の一般的な原因である。感染の有無と抗生物質の感受性を除去したイン  
プラントや感染部位から採取することは重要である (Piermattei D.L. ら, 2006)。凍結同  
種保存骨は免疫反応を惹起しないが、バイオフィームとして作用することが知られている  
(Wang J.S. ら, 1994; Stevenson S. ら, 1989)。そのため、術中には腐骨、そして感染が  
疑われる組織のデブリードメントをすることは重要であり、CRP を経時的に計測すること  
は有用である (Stevenson S. ら, 1989)。本検討では 2 症例に感染が認められた。しかしな  
がら、抗生剤による処置を行ったにも関わらず 1 症例では CRP の上昇が認められた。持続



的な CRP を示した症例では plate と screw のルーズニングが関連していたと考えられた。

移植骨の完全置換は 8 年以上を要すると報告されており、より長期間の経過観察が必要であるが、本再建法は長管骨骨折後の癒合不全によって生じた広範な骨欠損に対する有用な手法であると示唆された (Wilson J.W. ら, 1990)。

しかしながら、本手法は健常ビーグル犬から骨を無菌的に採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ の条件下にて凍結保存することが必要となる。そのため、国内では一部の大学病院をはじめとする特殊な施設でのみ使用が可能であり、再建術に使用可能な代替物の開発が望まれている。

#### 2.4 小括

- 1 同種保存骨移植によって脚長が温存され、正常な歩行機能の回復が得られた。
- 2 免疫反応や炎症反応は観察期間中には認められなかった。
- 3 完全吸収には長期間を要する。
- 4 同種保存骨の採取には健常犬・特殊な保存設備が必要であり使用可能な設備が一部に限られる。

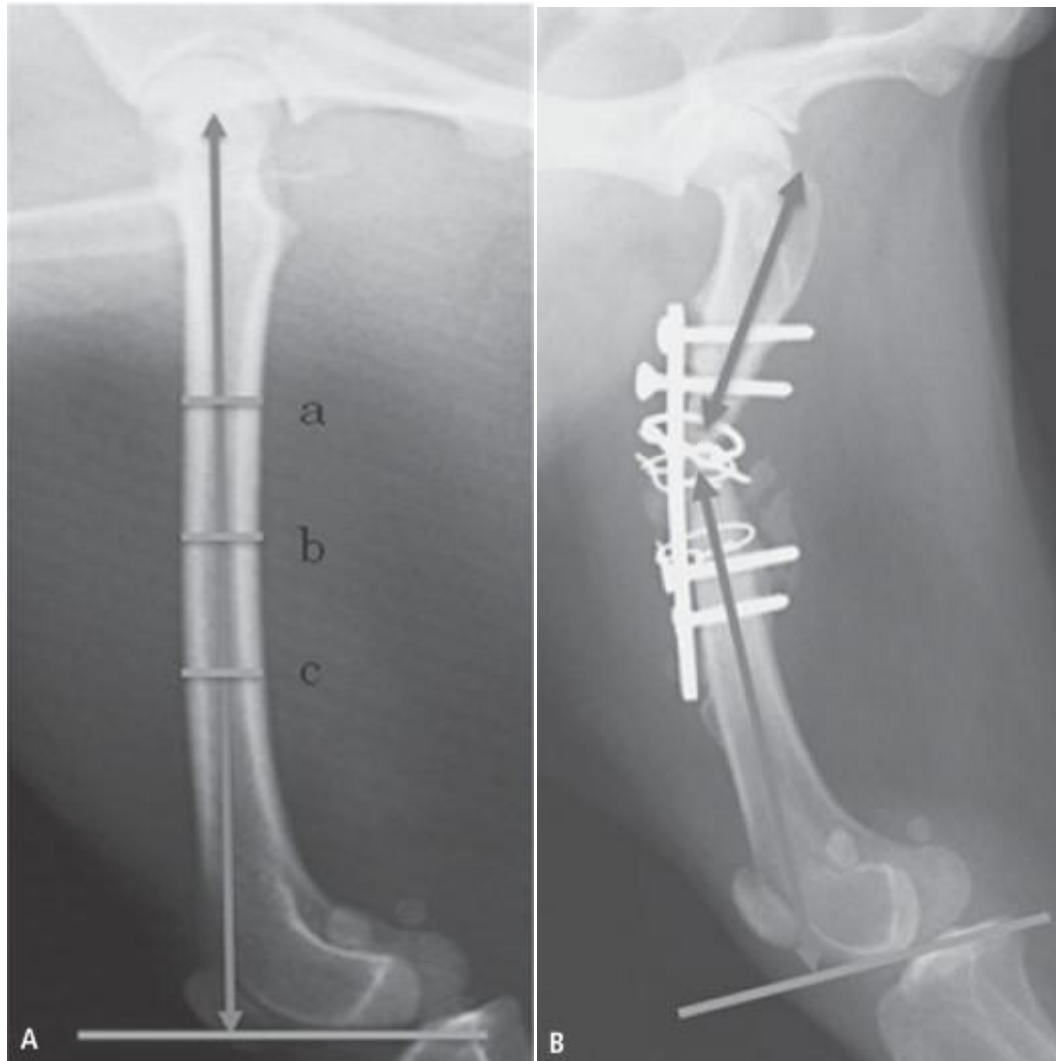


Figure 2-1 脚長計測

内外側方向からの撮影を行った単純 X 線写真を使用した。

A) 大転子から大腿骨全長の近位 1/3、1/2、遠位 1/3 の中点を通過し、大腿骨骨顆の接線までの長さを正常肢長とした。

B) 近位端・遠位端は正常肢長の測定と同じ点を使用し、それぞれの骨折片毎の骨幹軸を通過する直線長を合わせたものを患肢長とした。

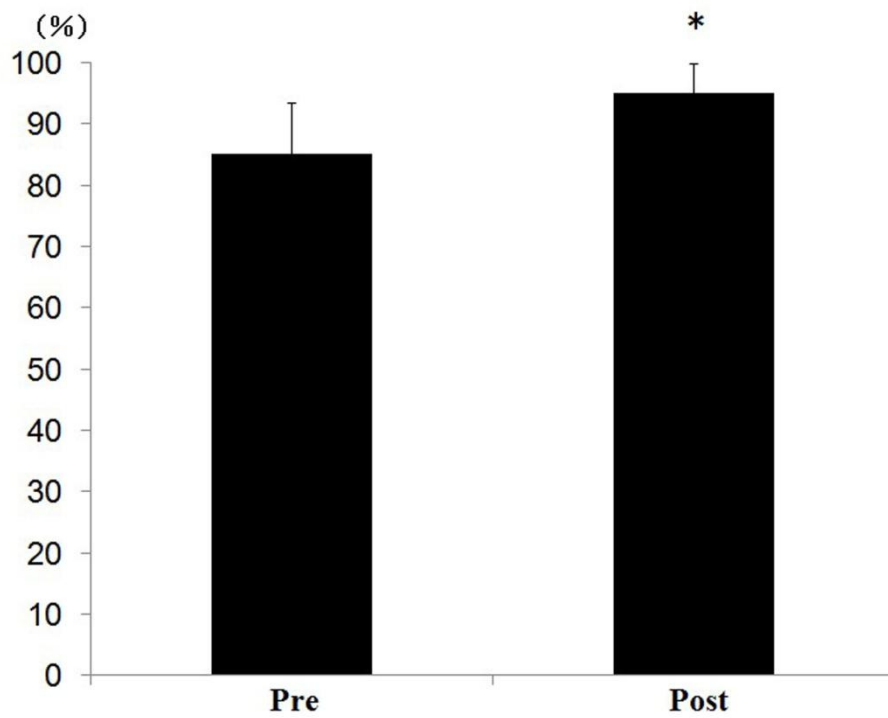


Figure 2-2 術前と術後の患肢長

術前と術後の患肢長を示した。85.3 ± 8.1%から 97.3 ± 2.3%の術前と比較し術後には顕著な患肢長の改善が認められた。

Value : mean±S.D.

Paired t-test \*p<0.05



Figure 2-3 症例 4 における放射線学的骨治癒スコアの一例

内外側方向、前後方向からの単純 X 線写真。

A : スコア = 9。術直後は近位、遠位、移植骨共に 3。B : スコア = 9。術後 1 ヶ月では両境界面、移植骨本体共に変化が認められないためスコア 3 とつけた。C : スコア = 12。術後 2 ヶ月では骨折線の消失が認められたため近位・遠位を共に 4、移植骨自体の明瞭化が認められたため 4。D : スコア = 15。術後 6 ヶ月目には遠位・近位での皮質骨の連続性が認められたためスコア 5、移植骨は変化が認められなかったため 4 とした。

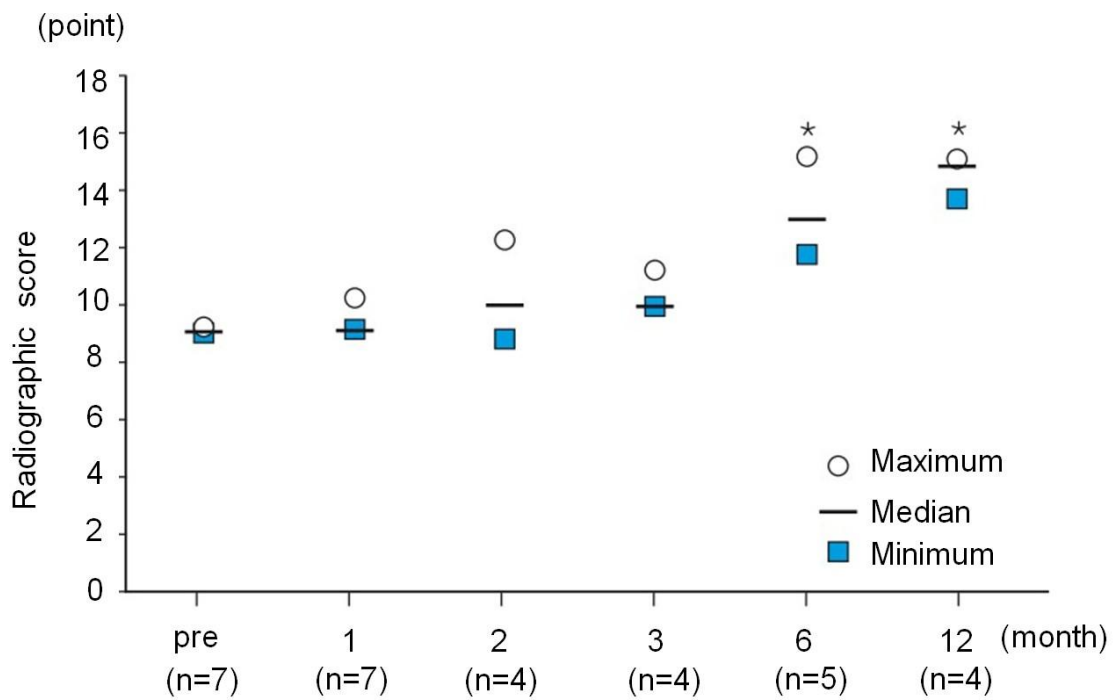


Figure 2-4 放射線学的骨治癒スコアの推移

Table 1 を元に術後 1・2・3・6・12 ヶ月でのスコア評価を行った。術後 3 ヶ月群と術後 6 ヶ月群、術後 6 ヶ月群と術後 12 ヶ月群の間に有意差が認められた。

Turkey 法による多重範囲検定 \* $p < 0.05$

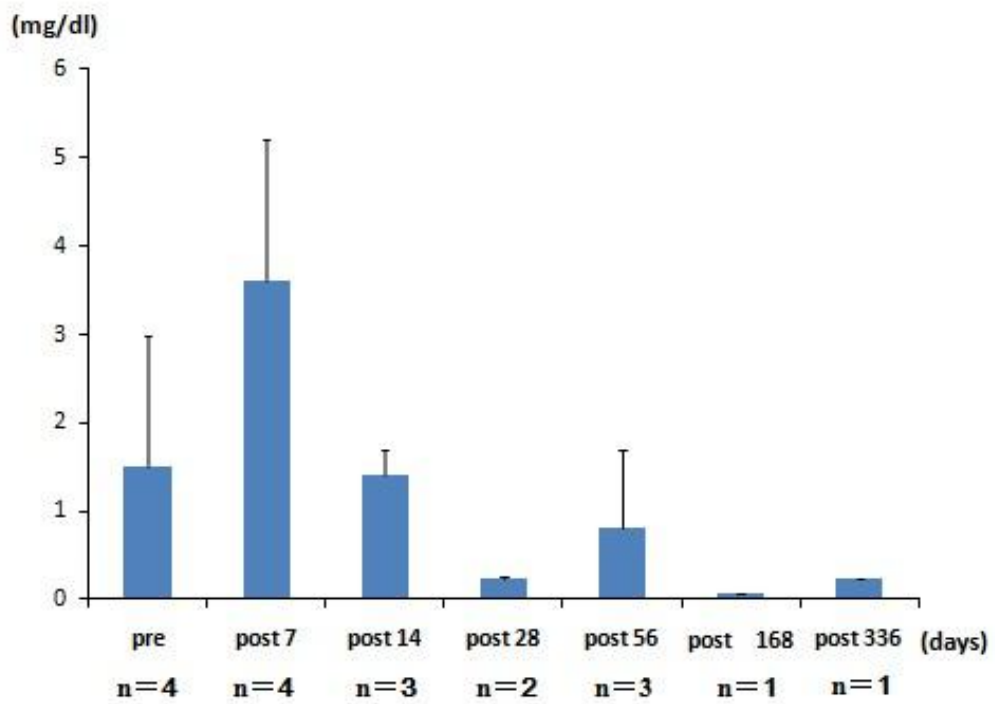


Figure 2-5 CRPの推移

術前・術後7日目・14日目・28日目、その後1ヶ月毎にCRPの測定を行った。各群間に有意差は認められなかった。

Value : mean±S.D.

Turkey's HSD test  $p < 0.05$

Table 2-1 症例の基礎データ

症例	年齢 (year)	性別	犬種	体重 (kg)
1	9.1	未避妊♀	トイ・プードル	3.5
2	0.8	未避妊♀	トイ・プードル	3.5
3	3	未去勢♂	トイ・プードル	3.4
4	0.6	未避妊♀	トイ・プードル	2.5
5	7.6	去勢♂	パピヨン	4.8
6	5.3	避妊♀	パピヨン	2.4
7	3	未避妊♀	ビーグル	13.8

年齢、性別、去勢・避妊、犬種、体重を示した。初診時の平均年齢は  $4.2 \pm 3.3$  歳 (mean±S.D.)、

初診時の平均体重は  $4.8 \pm 4.0$  kg (mean±S.D.) であった。

Table 2-2 症例の経過、初診時の単純 X 線検査所見、本学での経過観察期間

症例	受傷から受診までの日数	使用された固定器具	癒合不全分類	経過観察可能な期間
1	108	plate・ワイヤー	無活性型 萎縮型	357
2	127	plate	無活性型 欠損型	77
3	124	IM ピン・plate・創外固定	活性型 低栄養型	56
4	106	IM ピン・創外固定	無活性型 萎縮型	196
5	217	plate	活性型 低栄養型	1233
6	36	plate	無活性型 萎縮型	1608
7	57	IM ピン・ワイヤー	活性型 寡少仮骨型	770

症例 7 を除き 2 度の手術を経験していた。また、Weber BG et al の報告に基づいた癒合不全分類を行った (Weber B.G. ら, 1976)。



Table 2-3 放射線学的骨治癒スコア

	近位・遠位の結合部		移植骨本体
0	完全な吸収像/偽関節	0	完全な吸収像/偽関節
1	Severe な吸収像	1	Severe な吸収像
2	Mild な吸収像	2	Mild な吸収像
3	術後と変化なし	3	術後と変化なし
4	初期の癒合	4	Mild な新生骨
5	強固な癒合	5	Moderate な新生骨
6	宿主骨サイズへのリモデリング	6	宿主骨サイズへのリモデリング

Weiland AJ, et al の報告に基づいたスコア評価法を一部改変し使用した。移植骨と宿主骨の遠位・近位の境界面、移植骨自体の3ヶ所の評価を行い、各部位6点、最高18点のスコア評価を行った (Weiland A.J. ら, 1984)。

Table 2-4 使用した抗生物質とその期間

症例	CMZ (days)	ゲンタマイシ ン(days)	バンコマイシ ン(days)	その他 (days)
1	1~8		8~18	ミノサイクリン(7mg/kg bid)18 ~96
2	1~9			
3	6~15	1~6	1~6	セファロスポリン(25mg/kg bid) 15-71
4	1~3		3~7	
5	1~18		1~10	
6	1~14			
7		6~11		エンロフロキサシン(5mg/kg bid) 1-20

本学付属動物医療センターで手術を行った日を第0病日とした。

セファメジンは 25mg/kg bid、ゲンタマイシンは 2mg/kg bid、バンコマイシンは 10mg/kg

bid CRI の用法用量で投与を行った。

## 第 3 章

# Hydroxyapatite/poly-L-lactide 製人工素材 と poly-L-lactide 製人工素材の 生体親和性と骨孔閉鎖に関する検討

### 3.1 緒言

理想的な吸収性骨接合材料は整形外科領域の重要な研究テーマの一つである。理想的な吸収性骨接合材料とは骨折の治療が完了するまでの期間はその部位に発生する荷重に耐え骨折片の整復を維持し、骨癒合の進行とともに分解され、骨癒合完了後には異物反応を惹起すること無く生体に吸収され、さらに骨孔自体も骨に置換される特性を有することが要求される。過去には polyglycolic acid (PGA)、polydioxanone (PDS) そして poly L-lactic acid (PLLA) の使用が報告されてきた(Pihlajamäki H. ら, 1998; Rokkanen P.U. ら, 2000; Deorio J.K. ら, 2001)。そのうち、PLLA は優れた強度と生体適合性を有しており理想的な人工素材として過去には前十字靭帯整復や骨折整復・固定といった整形外科領域において使用されてきた(Pihlajamäki H. ら, 1992; Tegnander A. ら, 1994; Hara Y. ら, 1994; Hara Y. ら, 1994)。しかしながらヒトでは PLLA 製骨接合インプラントは分解の遅延、疼痛そして遅延性無菌性腫脹などの合併症が報告されている(Tegnander A. ら, 1994; Bergsma E.J. ら 1993; Matsusue Y. ら, 1996)。Matsusue Y et al は PLLA 製骨接合インプラントの欠点として、PLLA は異物反応を惹起し、構造的な特性により骨折片の整復には強度が低いと報告した(Matsusue Y. ら, 1996)。また、PLLA 製骨接合インプラントをウサギ大腿骨に埋植し、長期観察を行った研究結果からウサギでは PLLA 製骨接合インプラント周辺に、線維組織によるカプセル化が認められ骨との接合が弱いとされている。これらの報告から、PLLA 製骨接合インプラントは最適な吸収性材料ではなく、さらなる生体適合性と長期間強度を有する吸収性骨接合材料の開発が必要であるとされてきた。

これらの問題を解決するために、PLLA に Hydroxyapatite (HA) を含有させた HA/PLLA が 1992 年に Verheyen CC et al によって開発された(Verheyen C.C. ら, 1993)。HA/PLLA は HA 含有によって PLLA のみの素材に比較して優れた骨への接着と生体適合性の改善が得られると報告されている(Verheyen C.C. ら, 1993; Saito T. ら, 2004; Hasegawa S. ら, 2006)。

HA/PLLA 製インプラントをウサギの大腿骨髄腔内に埋入した実験では術後 4~6 年にかけて吸収されていき、異物反応を惹起しないという結果が得られた(Hasegawa S. ら, 2006)。

Yasunaga T et al は HA/PLLA と PLLA の脛骨皮質骨への接着強度を評価し、その中で HA/PLLA 製骨接合インプラントは PLLA 製骨接合インプラントに比較し有意に強固な固定強度を有していたと報告した(Yasunaga T. ら, 1999)。このように、これまで HA/PLLA、PLLA の接着強度や炎症反応について関心が持たれ検討されてきたが、これらの材料で作成された screw を皮質骨に使用した際の、皮質骨に形成された骨孔は再骨折を惹起する可能性を有し、その閉鎖過程に関しての検討を行う必要がある。さらに、現在までに同一の動物で PLLA と HA/PLLA の分解吸収過程の比較検討を行った報告も存在しない。そこで本研究は、HA/PLLA 製骨接合インプラントと PLLA 製骨接合インプラントの皮質骨領域と髄腔領域における分解吸収過程を評価し、PLLA に HA を含有させた有用性を評価することを目的とし実験を行った。

## 3.2 材料及び方法

### 3.2.1 PLLA・HA/PLLA screw の準備

PLLA 製 screw と HA/PLLA 製 screw は GUNZE(Kyoto, Jpn).より提供を受けた。PLLA 製 screw は GUNZE より市販されている GRANDFIX® cortex screw を使用した(Yasunaga T. ら, 1999; Tatsumi A. ら, 1999)。

HA/PLLA 製 screw は平均分子量 2 万の PLLA と 900 度に焼成した HA を 70 対 30 の重量比にて均一に混合させた。HA/PLLA 製 screw は高圧伸展法により作成した。さらにその後プレス加工により成形されたものを使用した。今回、使用した screw シャフト径は 2.6mm、screws 直径は 3.5mm であり、長さは、18mm、24mm、そして 26mm のものを使用した。

### 3.2.2 供試動物

臨床的に健常な 12 頭の雌のビーグル成犬を使用した。全ての供試動物の年齢は 11～12 ヶ月齢、平均体重は  $10.3 \pm 0.7$ kg であった。実験群はその観察期間により 12 ヶ月群、36 ヶ月群、60 ヶ月群、そして 84 ヶ月群の 4 群にランダムに分類した。各群ともは 3 頭で構成した。

### 3.2.3 外科的手技

すべての供試動物に対してドロペリドール(0.5mg/kg,im)を使用した前処置後に、プロポフォール(10mg/kg,iv)を使用して麻酔導入を行った。全ての犬に気管内チューブを挿管しイソフルランと酸素を使用した維持麻酔を行った。また硬膜外鎮痛として塩酸ブプレノルフィン(5 $\mu$ g/kg)、塩酸ピバカイン(0.5mg/kg)を使用した。供試動物の左右の後肢を剃毛後、無菌的処置を施し、大腿骨骨幹部外側にアプローチにより大腿骨近位から遠位の外側面を露出した。2.5mm のドリルを使用して大腿骨近位・大腿骨中央部・そして遠位に骨孔を作成し、使用する screw と同じネジ山を備えた専用タップを用いてタッピングを行った。骨のデブリ

スを十分に洗浄・除去した後に右側大腿骨近位には  $\phi 3.5\text{mm} \times 24\text{mm}$ 、中央部には 18mm、そして遠位には 26mm の HA/PLLA screw をそれぞれ刺入固定した。また、左側の大腿骨には右側と同じ位置に同様の手順で、同じ口径そして長さの PLLA screw をそれぞれ刺入固定した。固定後、各組織そして皮膚は定法通り閉鎖した。動物は処置肢の浮腫を予防する目的で 1 週間のロバート・ジョーンズ包帯法を装着した。術後 14 日間は感染予防を目的としてセフメタゾン(25mg/kg)を 1 日 2 回経口投与した。観察期間中、動物はケージレストとした。

一連の外科的処置、術後管理法、そして安楽死の方法は日本獣医生命科学大学の動物実験倫理委員会の許可の基に実施した。

#### 3.2.4 血液検査

術前、そしてその後は 12 ヶ月間隔で全血球検査、血液ガス検査そして血液生化学検査を実施した。CBC 検査では白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht) そして血小板 (PLT) の測定を行った。血液生化学検査では総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、ビリルビン (Bil)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cre)、グルコース (Glu)、総コレステロール (T-Cho)、カルシウム (Ca)、リン (P)、の計測を行った。血液ガス検査として、pH、酸素飽和度 (PO<sub>2</sub>)、二酸化炭素飽和度 (PCO<sub>2</sub>)、重炭酸イオン濃度 (HCO<sub>3</sub>)、過剰塩基 (BE)、そしてナトリウムイオン濃度 (Na)、カリウムイオン濃度 (K) そしてクロール濃度 (Cl) の測定を行った。

#### 3.2.5 単純 X 線検査

術後 1, 3, 6, 12 ヶ月そしてその後は 6 ヶ月間隔で左右大腿骨の内外側方向そして前後方向の単純 X 線撮影を定期検査ごとに実施した。撮影された X 線前後象をもとにして、table 3-1 に基づき近位・中央部そして遠位での screw 刺入部の皮質骨領域の骨孔閉鎖について評価した。さらにそれぞれの screw に関して骨折、異常な骨形成や骨膜反応の有無について観察を行った。

### 3.2.6 X 線 CT 検査

術後 1, 3, 6, 12 ヶ月そしてその後は 6 ヶ月間隔で X 線 CT 検査を実施し、screw 刺入孔の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量について評価した。全身麻酔下にて動物を伏臥位に固定し 120kv・100mAs の 2mm スライス厚で大腿骨全長の撮影を行った。CT 画像再構成関数は FC30 に設定し DICOM データを Image J に取り込んだ。撮影した CT 画像はウインドウ幅は 1500、ウインドウレベルは 300 の条件下で評価した。CT 撮影時には標準骨塩量ファントム(B-MAS 200, Kyoto Kagaku, Jpn )を同時に撮影し、QCT 法により screw 骨孔の CT 値を計測し、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量を算出した。

### 3.2.7 組織学的評価

全ての実験犬はペントバルビタールの過剰投与によって安楽死を行った。安楽死直後に左右の大腿骨を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、4%ギ酸で脱灰した。その後パラフィン包埋を実施し、大腿骨長軸に対して垂直方向に 5 $\mu\text{m}$  厚で切片を作成し、HE 染色を実施した。作成した組織標本を基に骨孔の閉鎖、髓腔内における線維組織浸潤、組織球浸潤そして screw の性状変化について評価を行った。骨孔閉鎖は、無形成、線維性閉鎖、



線維性骨性閉鎖、そして骨性閉鎖の4つに分類した(Figure 3-1)。それぞれ、骨孔領域に線維組織、線維組織と骨性組織、そして骨性組織のみが観察されたことを示している。Screwは変化なし、液状化、一部吸収、そして完全吸収の4段階に分類した(Figure 3-2)。線維組織浸潤は微弱、中程度、そして重度の3段階に分類した(Figure 3-3)。組織球浸潤は浸潤なし、軽度、中程度、そして重度の4段階に分類した(Figure 3-4)。

### 3.2.8 統計解析

HA/PLLA と PLLA screw の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の統計には one way ANOVA を使用した。統計ソフトは SPSS を使用した。(SPSS, Japan Inc, Tokyo, Japan)  $P < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。

## 3.3 結果

### 3.3.1 血液検査

Table 3-2A に全血球検査、table 3-2B に生化学検査、table 3-2C に血液ガス検査の結果を示した。観察期間中に明らかな異常値は認められず、供試動物の一般状態に問題は認められなかった。

### 3.3.2 放射線学的検討

各実験群の大腿骨の経時的な X 線前後像写真を Figure 3-5 に示した。Figure 3-5A・C・E・G・I は PLLA 製 screw の埋入された左側大腿骨、Figure 3-5B・D・F・H・J は HA/PLLA 製 screw の埋入された右側大腿骨の単純 X 線写真である。単純 X 線検査で認められた screw 刺

入部での骨孔の変化を table 3-1 に示したように分類した。Table 3-3 は table 3-1 に基づく結果を示した。Figure 3-5 に示したように X 線写真をもとに screw 骨孔の閉鎖について評価すると、HA/PLLA 製 screw では 60 ヶ月目には完全な骨孔閉鎖が認められた(Figure 3-5H)。しかしながら、PLLA 製 screw では完全な骨孔閉鎖はすべての部位で 84 ヶ月が経過した段階でも認められなかった(Figure 3-5I)。観察期間を通じてすべての screw そしてその周辺に異常な骨形成や骨膜反応そして刺入部位での骨折などの異常な所見は認められなかった。

埋植後 12 ヶ月の時点では、骨孔に関して PLLA 製 screw は埋入直後と比較し変化が認められなかった(Figure 3-5C)。しかし、HA/PLLA 製 screw は一部の X 線不透過性の亢進が認められた(Figure 3-5D)。埋植後 24 ヶ月では骨孔に関しては HA/PLLA 製 screw では大部分の X 線不透過性の亢進が認められたが PLLA 製 screw では一部の X 線不透過性の亢進が認められたのみであった(Figure 3-5E・F)。

埋植後 60 ヶ月では骨孔に関しては HA/PLLA 製 screw は共に大部分の X 線不透過性の亢進が認められ、完全な閉鎖が認められたが、PLLA 製 screw では認められなかった。(Figure 3-5G・H)。埋植後 72 ヶ月では骨孔に関しては HA/PLLA 製 screw では figure 3-5H と同様に完全な骨孔閉鎖が認められた(Figure 3-5J)。しかしながら PLLA 製 screw では 60 ヶ月と比較し変化が認められなかった(Figure 3-5I)。

### 3.3.3 Screw 骨孔の $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量

HA/PLLA 群そして PLLA 群の骨孔の経時的な  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は figure 3-6 に示した。近位・骨幹部そして遠位に固定されたすべての screw について、HA/PLLA 群の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当

量は PLLA 群と比較し術後から高値を推移した。また、36 ヶ月以降では全ての部位の HA/PLLA screw の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は各々の 12 ヶ月前の測定値に比較し有意な上昇が認められた (近位 :  $p=0.01$ 、中央 :  $p=0.04$ 、遠位 :  $p=0.02$ )。しかし、PLLA screw では  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は骨幹部に埋入した 48 ヶ月において有意な低値を示したのみで、その他は観察期間中には変化が認められなかった ( $p=0.04$ )。

### 3.3.4 組織学的評価

Table3-4 に組織評価の結果を示した。組織学的検討では、HA/PLLA 群では 60 ヶ月後には骨孔の骨性閉鎖が認められたが、PLLA 群では観察期間中には骨性閉鎖は認められなかった。

12 ヶ月 :

骨孔は両群とも術直後と変化は認められなかった。近位の HA/PLLA screw とすべての PLLA screw には変化が認められず、固形の状態であった。一方で、骨幹部そして遠位の HA/PLLA screw は髓腔内においては液状化が認められた。線維組織そして組織球の浸潤は両群共に軽度であった。

36 ヶ月 :

骨幹部そして近位に埋入された HA/PLLA screw で骨孔では線維性骨性閉鎖が認められた。一方、遠位に埋入された HA/PLLA screw そしてすべての PLLA screw は骨孔の線維性閉鎖が認められた。両群ともにすべての髓腔内 screw において液状化が認められた。髓腔内における screw 周囲の線維組織は 12 ヶ月に比較して両群ともに大半の screw で肥厚が認められたが、遠位の HA/PLLA screw のみ、その他の部位に比べて線維組織の肥厚が軽度であった。

さらに組織球浸潤の程度は HA/PLLA 群に比較し、PLLA 群で強く認められた。

60 ヶ月：

骨幹部そして近位に埋入された HA/PLLA screw では骨性閉鎖が認められた。また、遠位に埋入された HA/PLLA screw そしてすべての PLLA screw は骨孔の線維性骨性閉鎖が認められた。一方、PLLA screw はすべての部位で screw の一部吸収が認められた。しかし HA/PLLA は 36 ヶ月から変化が認められず、骨髓腔内では液状化した状態であった。近位そして骨幹部に埋入された PLLA screw ではすべての HA/PLLA screw と遠位に埋入された PLLA screw に比較して強い組織球浸潤が認められた。

84 ヶ月：

すべての HA/PLLA screw では骨孔に完全な骨形成が認められた。しかしながら、すべての PLLA screw では骨孔の線維性骨性閉鎖が認められた。PLLA screw 自体は近位そして遠位では完全な吸収が認められたが、骨幹部の PLLA screw そして HA/PLLA screw では一部の吸収が認められたのみであった。

組織球の浸潤は PLLA 群では骨幹部において若干認められたが、近位そして遠位では認められなかった。HA/PLLA 群では骨幹部では軽度の浸潤、近位そして遠位では中程度の組織球の浸潤が認められた。

### 3.4 考察

本検討では全ての動物の一般状態は良好であり、跛行、screw 適応部位の疼痛あるいは腫

脹といった異常所見は観察期間中には認められなかった。そして全ての動物では血液検査では異常値を示さなかったことから、PLLA 製 screw そして HA/PLLA 製 screw を使用することにより、動物の一般状態、肢の使用状況には影響を与えないことが示された。一方では PLLA 製骨接合材料は遅延性無菌性腫脹、髄腔内における吸収遅延を含めた様々な合併症が報告されている(Tegnander A. ら, 1994; 1993; Matsusue Y. ら, 1996; Verheyen C.C. ら, 1993)。我々は本検討とこれらの報告の違いは動物種そして実験モデルの違いが影響していると考えた。過去の報告では PLLA 製骨接合材料を骨折モデルあるいは前十字靭帯断裂モデルの整復に使用しているが、我々の実験モデルでは screw の吸収過程を評価することを目的としており、骨折は作成されておらず、screw は健全な大腿骨に固定されている(Tegnander A. ら, 1994; 1993; Matsusue Y. ら, 1996; Verheyen C.C. ら, 1993)。従って、大腿骨に挿入固定された各動物 6 本の screw には外部からの力が加わっていない。このことが過去の報告とは異なり臨床症状を呈さなかった理由の一つであると考えた。

吸収性骨接合インプラントを骨折治療に使用した際に骨孔は再骨折を惹起させる原因となるため、骨孔の皮質骨形成は理想的な結果の一つと考えられる。Yasunaga .T らは HA/PLLA 製 plate と PLLA 製 plate を使用したウサギの実験では術後 4 週目には皮質骨と HA/PLLA 製 plate との直接的な結合が認められたが、PLLA 製 plate では 25 週後も骨との直接的な結合が認められなかったと報告した(Yasunaga T. ら, 1999)。この結果は生体適合性に優れる  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  含有の有無によると考えられている。本検討では皮質骨領域において HA/PLLA 製 screw は骨孔領域において骨との直接的な接着、さらにその後に骨孔の皮質骨への置換が確

認された。これに対して PLLA 製 screw では骨孔領域において皮質骨と screw の間に線維組織浸潤が認められ完全な皮質骨への置換は認められなかった。HA/PLLA 製 screw は放射線学的検討では埋植後 72 ヶ月、組織学的検討では埋植後 60 ヶ月で骨孔の完全な皮質骨置換が認められたが、PLLA 製 screw では埋植後 84 ヶ月の観察を続けたにも関わらず観察期間中には完全な皮質骨形成は認められなかった。以上のことから、PLLA 製 screw では問題となっていた骨孔の閉鎖不全が HA の添加によって改善したことから、HA/PLLA 製骨接合材料は皮質骨置換においては理想的な結果を得ることの出来る吸収性骨接合材料であると考えられた。

皮質骨領域における  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量に関しては現在までに同一個体における経時的な変化を観察した報告はない。本検討においては埋植直後から HA/PLLA 製 screw の HA 含有の影響により、PLLA 製 screw に比較し高値を推移したが、これは HA/PLLA 製 screw 自体に含まれる HA の影響と考えられた。しかし、HA/PLLA 群では全ての screw において埋植 36 ヶ月後には埋入直後と比較し有意な  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の上昇が認められ、さらにその後も HA 相当量の経時的な上昇が認められた。埋入 36 ヶ月後の皮質骨領域における組織所見からは HA/PLLA 製 screw は骨性線維性閉鎖が認められた。PLLA 群においても 60 ヶ月後には骨性線維性閉鎖が認められているが、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は術直後と比較して変化していなかった。同様の組織所見にも関わらず  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量には HA/PLLA 群と PLLA 群との間で大きな差異が生じていたが、これは皮質骨領域において置換された組織の細胞外 Matrix の石灰化度に HA/PLLA と PLLA では大きな差異が生じていることが疑われた。In vitro の研究におい

ても、HA/PLLA と PLLA 上に間葉系幹細胞を播種し分化を検討した報告において、HA 含有によって有意に ALP 産生が促進されることが認められている(Wang M. ら, 1998)。PGA や PDS といった PLLA 以外の生体吸収材料(bioresorbable polymer)に HA を含有することによっても生体親和性の向上や骨への分化を促進することが報告されている(Wang M. ら, 1998; Hench L.L. 1998; Ramakrishna S. ら, 2001)。HA を含有させることによって骨芽細胞は HA に直接結合し、HA を分化増殖の場とする (Yasunaga T. ら, 1999)。以上のことから、HA/PLLA 製骨接合材料は骨孔の皮質骨置換においては理想的な結果を得る事のできる吸収性骨接合材料であると考えられた。

組織球の浸潤は HA/PLLA 群に比較し PLLA 群でより強い浸潤が認められた。Matsusue Y. ら、そして Hasegawa Y. らは組織球の浸潤は PLLA の分解吸収における最終段階において認められると報告した(Matsusue Y. ら, 1995; Hasegawa Y. ら, 2002)。本検討においても組織球の浸潤は screw 自体の分解後期から吸収の過程において強く認められる傾向があった。

HA/PLLA 群では埋植後 60 ヶ月から埋植後 84 ヶ月にかけて、PLLA 群では埋植後 36 ヶ月から埋植後 60 ヶ月にかけて、ともに中程度以上の組織球浸潤が認められた。特に PLLA 群は埋植後 60 ヶ月の組織学的所見において重度の組織球浸潤が確認された。PLLA に HA を含有させることによって生体適合性が改善されるが、それと同時に吸収の遅延が報告されている(Verheyen C.C. ら, 1993; Ishii S. ら, 2003)。今回の検討においても PLLA 製 screw は HA/PLLA 製 screw に比較して早期に分解・吸収反応が進行することが確認された。HA/PLLA 群では埋植後 84 ヶ月の時点で髄腔内において screw の残存が認められた。ウサギの髄腔内

に PLLA 製 rod を埋入した Matsusue Y.らの実験では、埋植後 24～42 ヶ月にかけては PLLA の分解とその周囲に非常に多くの組織球浸潤が認められ、さらに埋植後 62 ヶ月が経過した段階では PLLA は完全に吸収され骨髄への置換が認められたと述べられている (Matsusue Y. ら, 1995)。本検討においても PLLA 群では時期は異なるが、同様の変化が認められ埋植後 84 ヶ月が経過した時点で骨髄への完全な置換が認められた。現在までに最も長期間の HA/PLLA の観察を行った Hasegawa S.らは、ウサギ大腿骨髄腔内に埋植後 88 ヶ月の時点で材料の萎縮と少数の組織球浸潤が認められたと報告した(Hasegawa S. 2006)。本検討における HA/PLLA 群においても同様の所見が認められ、さらに HA/PLLA の分解吸収が進行し screw の内部にまで組織球の浸潤している所見が認められた。さらに Hasegawa S らの報告と同様に本検討においても、髄腔内における HA/PLLA は埋入後 5 年が経過した時点で、骨幹部に比較して遠位側でより X 線透過性の亢進が認められた(Hasegawa S. 2006)。

今回、健常ビーグル犬の大腿骨に HA/PLLA 製 screw を固定した後 84 ヶ月間、その吸収過程そして骨孔の変化について検討した。その結果、HA/PLLA 製 screw を皮質骨に挿入固定した場合、その吸収過程において HA/PLLA は PLLA に比較して炎症反応も少なく、また HA/PLLA では吸収後に皮質骨に形成された骨孔は骨により置換されるという理想的な結果が得られた。

これらの所見より HA/PLLA は共に理想的な吸収性骨接合材料としての性質を備えていることが示唆されたが、本検討において 84 ヶ月を経過しても髄腔内において HA/PLLA は残存し、さらに中程度の組織球浸潤が認められたことから長期的な経過観察は不可欠であ



ると考えられた。また、今回の検討では、骨折を伴わない健常な大腿骨に screw を埋入固定したモデルを使用している。従って、骨折片を安定化するためには screw に加わる力学的負荷は最小限であったことが予測される。HA/PLLA 製 screw は PLLA の加水分解の進行するとともに強度が低下することが予想され、in vivo において HA/PLLA 製 screw の強度の経時的な変化を評価することが必要であると考えられる。

### 3.5 小括

- 1  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は HA/PLLA 製 screw は経時的な数値の上昇が認められた。これは HA が骨と直接的に癒合し自家骨への置換が進行したためであると考えられた。
- 2 PLLA 製 screw は観察期間中に重度の組織球浸潤が認められたが、HA を含有させて作製された HA/PLLA 製 screw は観察期間中、中程度の組織球浸潤が認められたのみであった。
- 3 HA/PLLA 製 screw は皮質骨との直接癒合を獲得し、その後、自家骨へと置換された。放射線学的にも埋植後 60 ヶ月において骨孔の閉鎖が認められた。
- 4 これらの結果から HA と PLLA から構成された人工素材は自家骨へと置換することが認められた。HA と PLLA から構成された人工素材は新たな吸収性人工骨としての利用が可能であると示唆された。

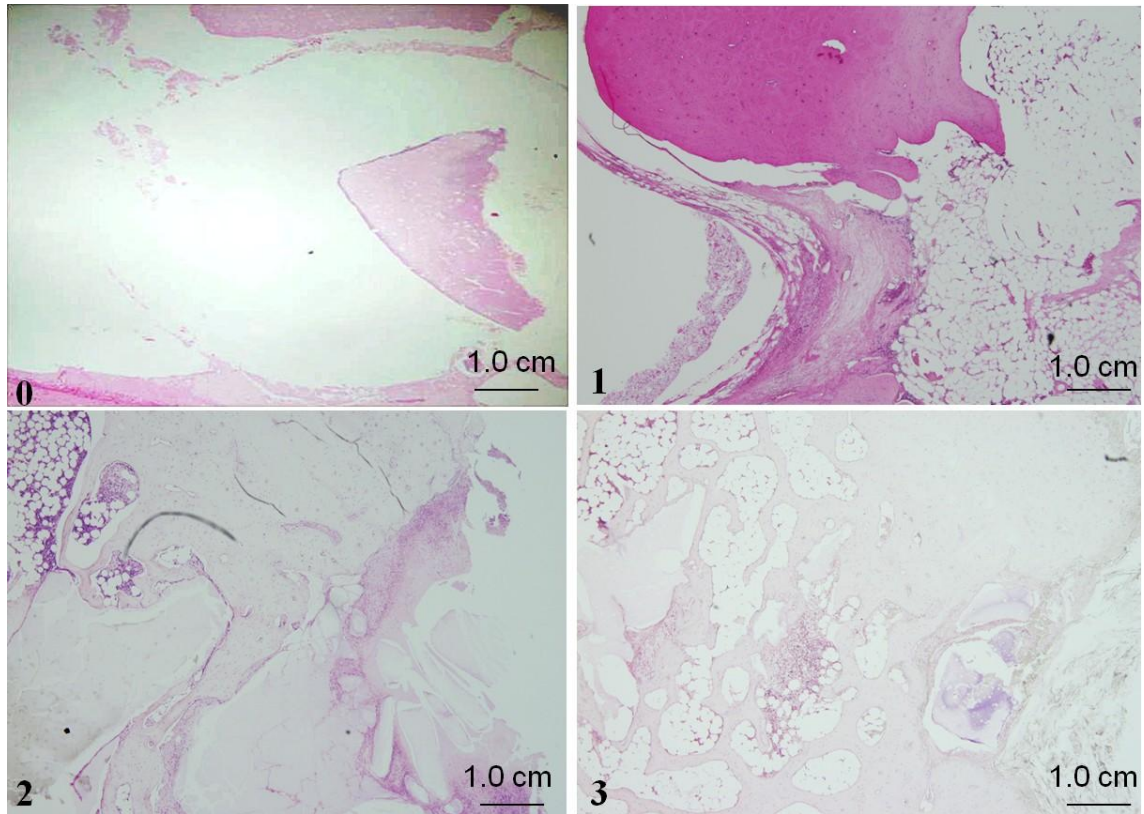


Figure 3-1 骨孔閉鎖の分類

HE 標本を使用し、12.5 倍にて観察。

0：無形成

1：線維組織閉鎖

2：線維組織性骨性閉鎖

3：骨性閉鎖

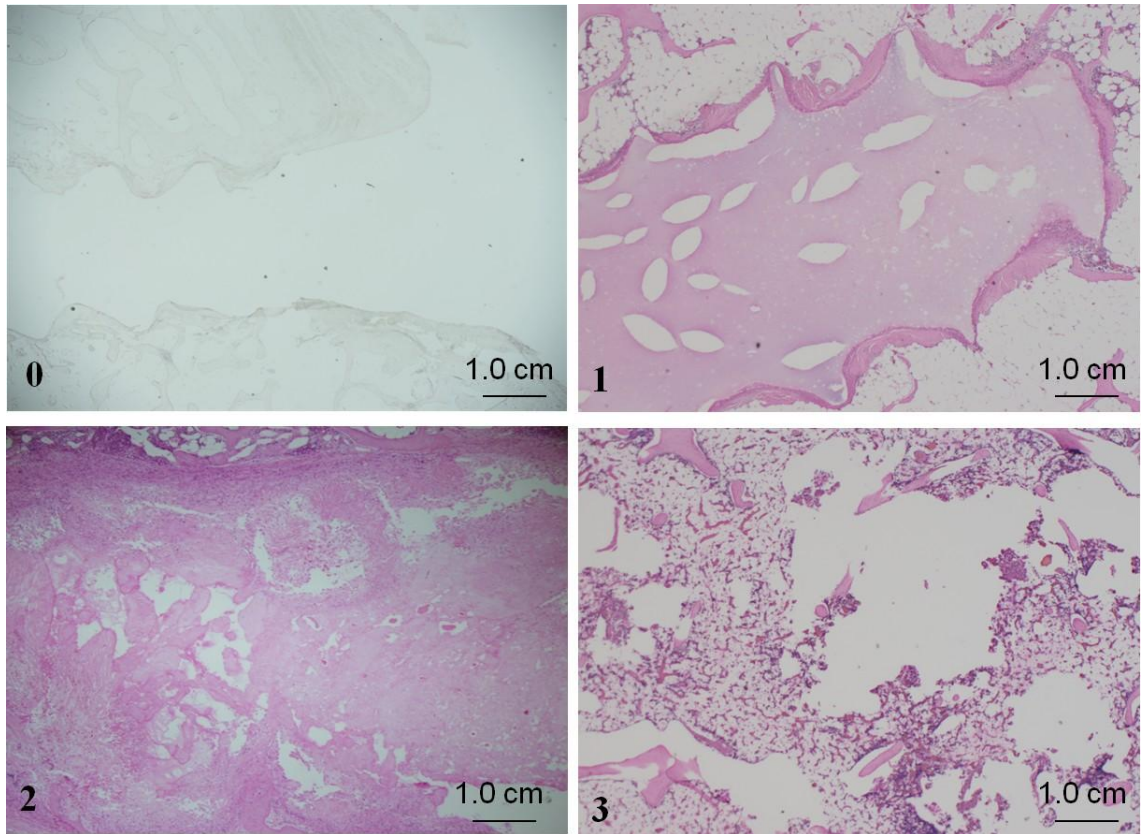


Figure 3-2 Screw の性状変化分類

HE 標本を使用し、12.5 倍にて観察。

0： 変化なし

1： 液状化

2： 一部吸収

3： 完全吸収

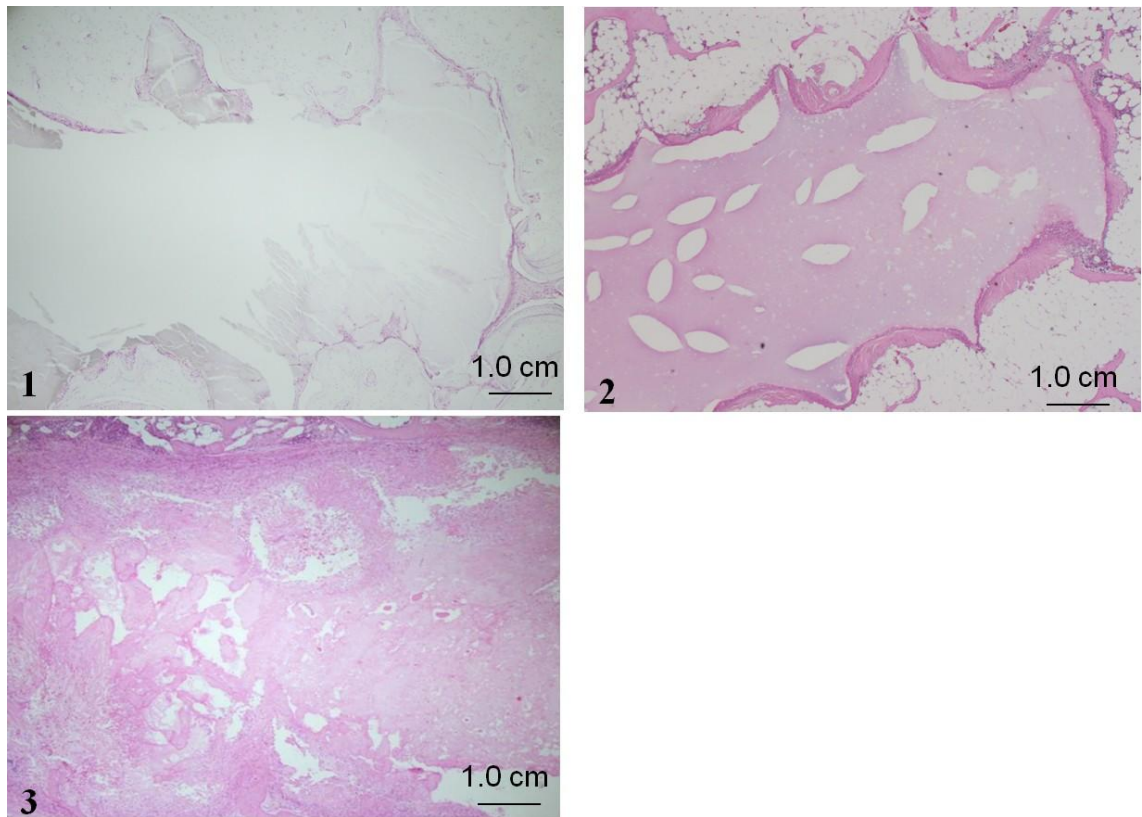


Figure 3-3 線維組織浸潤の分類

HE 標本を使用し、12.5 倍にて観察。

1： 若干の浸潤

2： 中程度の浸潤

3： 重度の浸潤



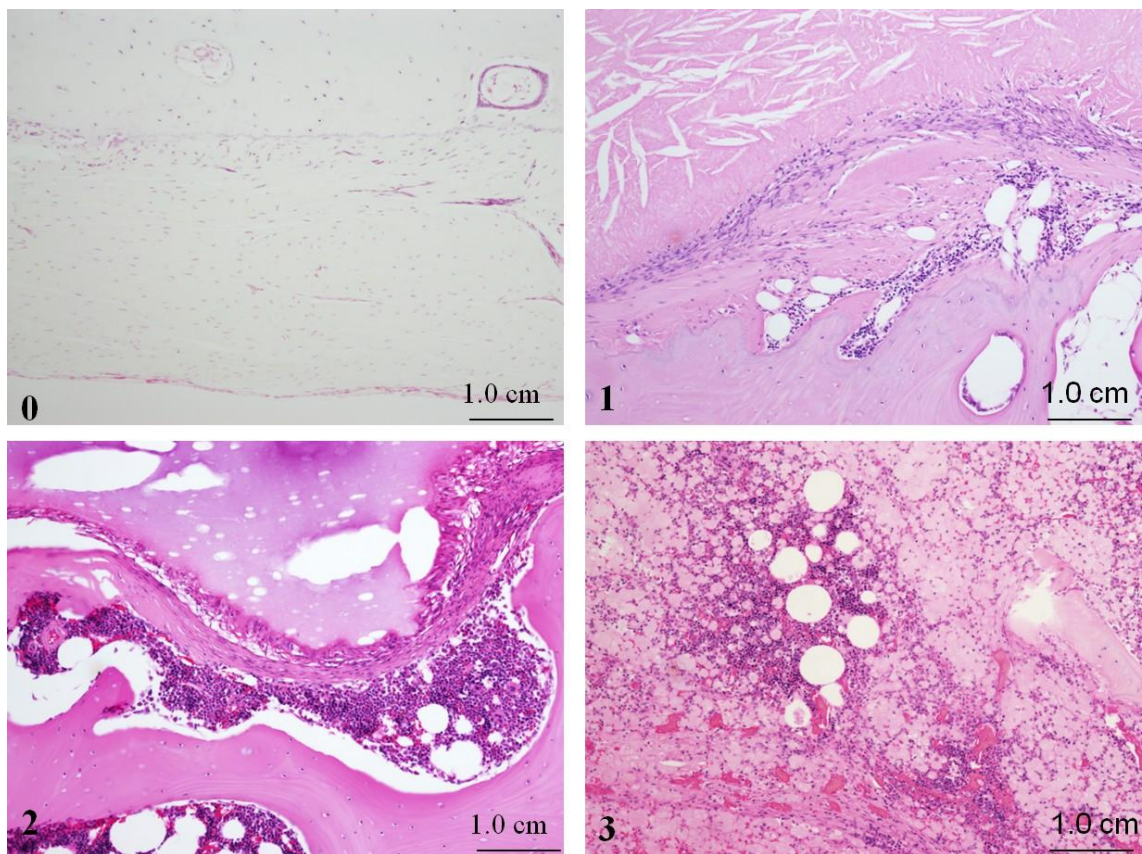


Figure 3-4 組織球浸潤の分類

HE 標本を使用し、20 倍にて観察。

0： 浸潤なし

1： 僅かな浸潤

2： 中程度の浸潤

3： 重度の浸潤



Figure 3-5 単純 X 線検査による骨孔の変化

A, C, E, G, I : PLLA screw (左側)

B, D, F, H, J : HA/PLLA screw (右側)

A, B : 術直後、C, D : 術後 12 ヶ月後、E, F : 24 ヶ月後

G, H : 60 ヶ月後、I, J : 72 ヶ月後

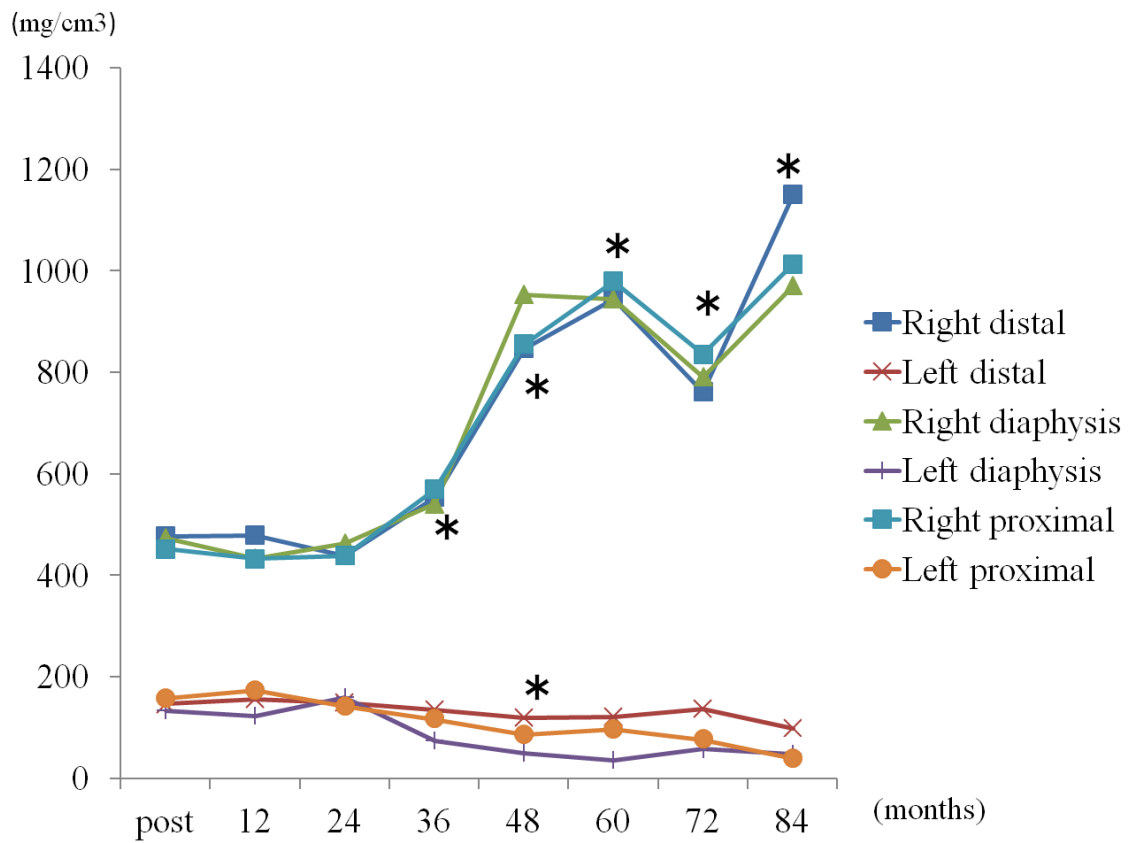


Figure 3-6 皮質骨領域における  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の推移

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の変化を示した。大腿骨に埋植した HA/PLLA screw、PLLA screw の皮質骨領域での  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量を測定した。

Value : mean

\* . . . p < 0.05 (Tukey HSD test)

Table 3-1 単純 X 線検査による骨孔閉鎖分類

score	The burr hole closure
0	non-formation
1	partially formation
2	mostly formation
3	completely formation

単純 X 線検査所見から得られた骨孔閉鎖を table 3-1 に基づいて分類を行った。



Table 3-2A : CBC 検査結果

(month)	RBC ( $10^3/\mu\text{l}$ )	WBC ( $10^2/\mu\text{l}$ )	Ht (%)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)
Pre	720.6±113.2	128.9±26.3	49±4.7	16.9±3.1	68.8±2.1	23.5±0.8
12	737.5±95.9	123.9±34.9	52.5±5.7	16.4±4.7	68.7±3.3	24.2±2.2
24	747±56.2	113±29.2	50.6±5.1	18.4±1.0	67.4±3.8	21.1±1.1
36	755.2±80.9	107.5±28.5	50.5±3.6	16.1±1.4	68±4.2	22.6±0.9
48	753.7±50.2	116±10.9	48.5±2.8	18.2±2.8	66.7±2.9	24.4±1.4
60	787.2±80.7	124.1±30.5	52.7±5.2	18.1±1.6	65.9±2.6	23.7±0.9
72	687±41.3	85.3±11.2	43.8±2.7	17.1±0.8	69.5±3.4	22.6±1.3
84	736.3±38.3	82±10.5	48.1±3.9	16.8±1.2	69.5±3.2	22.5±0.2

(month)	MCHC (%)	PLT ( $10^4/\mu\text{l}$ )
Pre	23.5±0.6	30.5±10.5
12	24.2±0.8	30.9±16.4
24	21.1±0.6	33.5±10.9
36	22.5±1.7	29.7±11.2
48	22.6±0.5	34±9.2
60	22.7±0.4	24.7±6.4
72	23.7±1.2	30±10.6
84	22.6±0.6	35.7±0.6

Table 3-2B : 血液生化学検査結果

(month)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	Bil (mg/dl)	Glu (mg/dl)	T-Cho (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)
Pre	6.2±0.7	3.5±0.2	0.15±0.01	99.6±18.2	159.3±60.5	15.4±4.8	0.66±0.17
12	6.4±0.4	3.6±0.3	0.13±0.07	96±15.6	182.1±50.2	10.2±5.2	0.61±0.15
24	6.7±0.3	3.4±0.2	0.08±0.05	106±8.6	181.9±18.2	14.3±2.8	0.71±0.16
36	6.8±0.8	3.6±0.3	0.12±0.07	104.7±9.6	182.4±25.6	13.9±4.6	0.75±0.2
48	6.3±0.3	3.6±0.2	0.03±0.01	97.3±10.6	174.2±9.6	9.8±2.8	0.81±0.18
60	6.9±0.6	3.7±0.3	0.02±0.01	104.7±15.4	180.2±20.2	11.5±2.8	0.68±0.2
72	6.5±0.3	3.8±0.4	0.05±0.02	100.8±12.7	171.1±11.5	9.8±1.6	0.75±0.19
84	6.8±0.5	3.2±0.3	0.06±0.02	95.6±10.5	190.2±10.6	16.3±2.5	0.6±0.3

(month)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	GOT (U/L)	GPT (U/L)	ALP (U/L)
Pre	10.7±0.7	5.7±1.3	32±14	59±15	252±35
12	10.9±0.3	5.2±0.3	32±8	69±18	181±26
24	10.5±0.4	3.9±0.6	31±9	41±9	135±36
36	10.4±0.7	4.1±0.5	33±9	42±11	182±51
48	10.3±0.8	4.2±0.8	35±8	54±9	126±26
60	10.9±0.9	3.8±0.6	40±6	43±10	118±40
72	9.8±0.7	3.9±0.7	26±8	47±12	152±26
84	9.8±0.8	4.1±0.9	35±11	48±10	170±42

Table 3-2C : 血液ガス検査結果

(month)	pH	PO <sub>2</sub> (mmHg)	PCO <sub>2</sub> (mmHg)	HCO <sub>3</sub> (mmol/L)	BE (mmol/L)
Pre	7.38±0.03	52.8±4.93	34.05±4.65	22.44±9.41	-2.7±1.7
12	7.4±0.03	51.73±10.68	39.53±4.32	24.36±1.7	0.01±1.7
24	7.37±0.05	49.91±7.14	35.6±7.52	21.7±1.86	-2.91±1.5
36	7.31±0.03	50.25±13.49	34.48±4.15	22.5±1.71	-2.27±2.3
48	7.44±0.02	50.92±7.57	36.79±4.04	21.33±2.52	-3.8±1.6
60	7.42±0.03	47.99±8.44	31.56±1.15	19.5±1.31	-2.55±1.1
72	7.44±0.01	53.63±8.74	35.71±3.06	19.5±1.02	-4.07±1.7
84	7.36±0.11	43.9±10.01	30.94±3.06	20.7±1.06	-3.2±1.4

(month)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
Pre	151±4	4±0.8	114±3
12	152±3	3.7±0.3	111±2
24	150±4	3.6±0.4	113±5
36	148±2	3.8±0.7	115±4
48	153±5	3.9±0.4	106±6
60	157±5	4.4±0.3	111±5
72	148±3	4.2±0.4	112±3
84	146±4	3.8±0.2	117±4

Table 3-3 骨孔閉鎖の経時的変化

month	Site	Proximal	Diaphysis	Distal
12	Left	0	0	0
	Right	0	1	0
24	Left	0	0	0
	Right	1	2	0
36	Left	0	1	0
	Right	2	2	1
48	Left	1	1	0
	Right	2	2	1
60	Left	1	2	1
	Right	2	3	2
72	Left	1	2	1
	Right	2	3	2
84	Left	2	2	1
	Right	2	3	2

大腿骨近位、骨幹部、遠位にされた HA/PLLA 製 screw と PLLA 製 screw の骨孔閉鎖について中央値を示した。

Table 3-4 : Screw の性状変化結果

12 month L					12 month R				
	closure	screw	fibrous	histiocyte		closure	screw	fibrous	histiocyte
Proximal	0	0	1	0	Proximal	0	0	1	0
Diaphysis	0	0	1	0	Diaphysis	0	1	1	0
Distal	0	0	1	0	Distal	0	1	1	0
36 month L					36 month R				
	closure	screw	fibrous	histiocyte		closure	screw	fibrous	histiocyte
Proximal	1	1	2	2	Proximal	2	1	2	1
Diaphysis	1	1	2	2	Diaphysis	2	1	2	1
Distal	1	1	2	2	Distal	1	1	1	1
60 month L					60 month R				
	closure	screw	fibrous	Histiocyte		closure	Screw	fibrous	histiocyte
Proximal	2	2	3	3	Proximal	3	1	2	2
Diaphysis	2	2	3	3	Diaphysis	3	1	2	2
Distal	1	2	2	2	Distal	2	1	2	2
84 month L					84 month R				
	Closure	screw	fibrous	histiocyte		Closure	Screw	fibrous	histiocyte
Proximal	2	3	2	0	Proximal	3	1	2	2
Diaphysis	2	3	2	2	Diaphysis	3	2	2	1
Distal	2	3	1	0	Distal	3	2	2	2

大腿骨近位、骨幹部、遠位にされた HA/PLLA 製 screw と PLLA 製 screw の性状変化について

figure3-1～3-5 までの分類に基づきスコア評価を行い、その中央値を示した。

第4章  
非荷重部位における  
hydroxyapatite/poly-D/L-lactide 製人工骨  
の適応に関する検討

#### 4.1 緒言

第3章の結果から、PLLAにHAを含有させたHA/PLLA screwは皮質骨との直接的な癒合を獲得し、さらに皮質骨への良好な置換を獲得した。PLLAにHAを含有させて作成された吸収性骨接合材料は優れた生体適合性を有していると考えられた。現在までに吸収性人工骨は人医領域においては腫瘍、外傷、そして骨折後の癒合不全により生じた骨欠損部位に対する再建術の一つとして用いられている(Galois L. ら, 2002)。獣医領域においては、癒合不全により生じた骨欠損部位や骨切り術の際に生じた欠損部位への充填に用いられている(Spector D.I. ら, 2007; Boudrieau R.J. ら, 2004)。理想的な吸収性人工骨の性質とは骨伝導能、骨誘導能、骨形成が得られるまで維持される適切な強度、そして骨形成の過程に合わせて置換される事が必要であるとされている。HAとPLLAから作成された人工素材は第3章の結果より、良好な生体適合性を有し、そして自家骨への置換を行うことが認められ、骨再建に使用する吸収性人工骨としても利用することが可能であると考えた。しかしながら、HA/PLLA screwは7年の経過においても完全吸収には至ることがなかったと報告されている。(Akagi H. ら, 2013; Hasegawa S. ら, 2006)。このことから、PLLAの有する優れた強度は吸収性骨接合材料としては有用であるが、吸収性が遅延する傾向にあることは吸収性人工骨として使用する際には改善すべき点であると考えられた。L-乳酸には構造異性体のD-乳酸が存在する。L-乳酸はD-乳酸と同様の性質を有する人工素材であるが、共重合体であるpoly-D/L-lactide (PDLLA)は、単一素材とは異なる性質を示す(Pietrazak W.S. ら, 1997)。

第1章のtable 1-1に示したようにPDLLAはPLLAとは融解温度、強度、さらには分解速度

まで異なる。特に PDLLA の完全分解には皮下への埋植においては 12 から 16 ヶ月、PLLA は 24 ヶ月以上を要すると報告されている (Pietrazak W.S. ら, 1997)。7 年が経過した段階においても完全吸収には至らない HA/PLLA に比較し、HA/PDLLA は優れた分解吸収能を有していることが Hasegawa S. らによって報告された。(Akagi H. ら, 2013; Hasegawa S. ら, 2006)。

過去に HA/PDLLA 製人工骨をウサギ大腿骨髄腔領域に埋植した実験においては、HA 単体の人工骨に比較し、良好な骨形成と人工骨吸収が認められ、海綿骨の再建が得られたと報告している (Hasegawa S. ら, 2005)。これまでに、髄腔領域における骨形成と人工骨吸収について評価されたが、HA/PDLLA 製人工骨がより一般的に使用されるには、現在、一般的に用いられている吸収性人工骨である  $\beta$ -TCP 製人工骨と同一動物において置換過程について比較を行い、HA/PDLLA 製人工骨の有用性を検討する必要がある。また、HA/PDLLA 製人工骨の特徴として術中に熱成型が可能であることが挙げられる。しかし、熱変形による骨形成や人工骨吸収に対する影響についてはこれまで検討されていない。

本検討の目的は、 $\beta$ -TCP 製人工骨と HA/PDLLA 製人工骨の非荷重部位における置換過程を組織学的に評価し、さらに接着強度試験を行い HA/PDLLA 製人工骨と  $\beta$ -TCP 製人工骨の宿主骨との接着強度を評価することで HA/PDLLA 製人工骨の有用性を評価することである。

さらに、熱変形後の HA/PDLLA 製人工骨と未変形 HA/PDLLA 製人工骨の組織学的な比較検討を行い、熱変形後の HA/PDLLA 製人工骨における置換過程について評価した。

## 4.2 材料と方法

### 4.2.1 生体吸収性人工骨



非焼成の HA と PDLLA（重量平均分子量：Mw：210kDa、D/L=50/50 mol %）を重量比 70：30 で、PDLLA に顆粒状の HA を複合繊維沈殿法（composite fiber precipitation method）により合成させた。HA/PDLLA 製人工骨は気孔率 70%、気孔径は 40～480 $\mu$ m(平均 170 $\mu$ m) の連通構造を有しており、圧縮強度は  $4.1\pm 0.4$ MPa を有している(Hasegawa S. ら, 2005)。対照として  $\beta$ -TCP 製人工骨は気孔率 75%、圧縮強度 0.9 MPa の Osferion® (Olympus Terumo Biomaterials, Tokyo, Jpn)を使用した。両人工骨は共に  $\phi 8.0\times 20$  mm の円柱状のものを使用した。

#### 4.2.2 実験 1 組織学的検討による HA/PDLLA 製人工骨と $\beta$ -TCP 製人工骨の比較検討

##### 4.2.2.1 供試動物

平均体重は  $10.5\pm 0.9$  kg、平均年齢は  $12.1\pm 0.8$  ヶ月齢の雄の健常ビーグル犬 16 頭を実験に供試した。実験群はその観察期間により、1 ヶ月群、3 ヶ月群、6 ヶ月群、そして 12 ヶ月群の 4 群を設定し各群 4 頭の合計 16 頭を実験に供試した。今回の実験で実施した一連の外科的手技と術後管理の方法は日本獣医生命科学大学の動物倫理委員会の承認を得て行った。

##### 4.2.2.2 外科的手技

すべての供試動物に対して前処置としてドロペリドール(0.5mg/kg, im)を使用し、プロポフォール(7mg/kg, iv)を使用して麻酔導入を行った。気管内チューブを挿管しイソフルランと酸素を使用した維持麻酔を行った。また硬膜外鎮痛として塩酸ブプレノルフィン(5 $\mu$ g/kg)、塩酸ブピバカイン(0.5mg/kg)を使用した。供試動物の左右の後肢と前肢を剃毛後に無菌的処置を施し、左側大腿脛関節に外側アプローチを行い、関節包を切開した後に膝蓋骨を内方

へ脱臼させた。両側大腿骨骨顆を露出した後に、φ8.0mm のドリルを使用して骨孔を作成した。作成時のデブリを除去した後に、骨孔には φ8.0×20mm の β-TCP 製人工骨を埋植した。大腿骨外側面と内側面から逸脱した人工骨はメスを使用して切除した。その後は定法通り閉鎖した (TCP 群)。その後、右側にも同様の手技にて HA/PDLLA 製人工骨を埋植した (FHP 群)。術後 14 日間は感染予防を目的としてセフメタゾン (25mg/kg, SC) と疼痛管理のためにブプレノルフィン (20μg/kg, IM) を 1 日 2 回投与した。観察期間中、動物はケージレストとした。一定期間の経過観察を行った後に、ペントバルビタールナトリウムの過剰投与により安楽死を実施した

#### 4.2.2.3 X 線 CT 検査

安楽死後には、速やかに X 線 CT 検査 (Asteion, Toshiba medical systems corporation, Tokyo, Jpn) を実施した。120kv・100mAs の 1.0mm スライス厚で脛骨全長の撮影を行った後に DICOM データを Image J に取り込んだ。撮影した CT 画像はウインドウ幅 1500HU、ウインドウレベル 300HU の条件下で評価した。CT 撮影時には標準骨塩量ファントム (B-MAS 200, Kyoto Kagaku, Jpn) を同時に撮影し、quantitative Computed Tomorography (qCT) 法により人工骨中央部分の sagital 面における  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の測定を行った。

#### 4.2.2.4 組織学的検討

X 線 CT 撮影後にはダイヤモンドソー (BC-3000CP, EXAKT cutting system) を使用して、大腿骨に対して横断面中央部にて切断を行った。4%パラホルムアルデヒドを使用して固定後に近位部は 10%EDTA を用いて脱灰標本とし、作製した組織切片には TRAP 染色、そし

て I 型 collagen (COL I) と Runt related transcription factor (RUNX2) の免疫組織化学染色を実施した。使用した一次抗体、二次抗体については table 4-1 に示した。遠位部は 30、50、70、80、90 そして 100%のエタノールにそれぞれ 2 日ずつ浸漬させ脱水した後に、LR ホワイトレジン(LONDON Resin company Ltd)を使用して包埋した。バンドソー(BC-3000CP, EXAKT cutting system)を使用して切断した後に、ダイヤモンドペーパー (MG-4000, EXAKT cutting system) を使用して研磨した。完成した組織切片には villanueva goldner (VG) 染色を実施した。

#### 4.2.2.5 定量評価

VG 染色を対象として中心領域全域を撮影し、figure 4-1 に示したように赤い枠で示した領域の残存人工骨面積と新生骨面積を計測した。TRAP 染色を実施した標本の中心領域 5 視野を×200 の倍率で撮影した。デジタル画像は BX51 (Olympus, Tokyo, Jpn) を使用して撮影を行った。画像は tiff 形式に変換した後に、画像解析ソフト Image J (NIH, Bethesda, MD) を使用して計測を行った。COL I は 100 倍、RUNX2 は 200 倍と 400 倍の倍率で観察を行った。免疫染色を行った組織はそれぞれ figure 4-2 に示したように 1~3 までの段階評価を行った。それぞれ、1: 全く認められない、あるいはわずかに陽性細胞・組織が認められる、2: 軽度の浸潤が認められる、3: 中程度の浸潤が認められると分類した。Figure 4-1 で示した赤い枠で囲まれた部分に相当する部分を観察した。

### 4.2.3 実験 2 熱変形 HA/PDLLA 製人工骨と未変形 HA/PDLLA 製人工骨の比較検討

#### 4.2.3.1 外科的手技

実験 1 と同一個体を用いて、後肢への埋植手術が終了した後に、硬膜外ブロックと同用量の腕神経叢ブロックを実施した。右肩関節の頭側アプローチを行った。右上腕骨大結節を露出させ、棘上筋付着部の一部を切断、さらに上腕横支帯を付着部で切断した後に上腕二頭筋を脱臼させた。上腕大結節の内外側を視認可能とした後に上腕骨長軸に垂直にφ8.0mm のドリルを使用して骨孔を作成した。その後、HA/PDLLA 製人工骨を 60°C に加熱した滅菌生理食塩水内で 60 秒間温浴させ、熱変形をさせた後に骨孔を内外側に貫通させ用手にて成型した後に、逸脱した人工骨は切除した (RHP 群)。その後、切除した上腕横支帯、棘上筋を縫合し、定法に従い閉鎖した。同様の手技にて左側上腕骨には未変形の HA/PDLLA 製人工骨を埋植した (LHP 群)。術後管理、安楽死については実験 1 と同様の手技にて行った。

#### 4.2.3.2 X 線 CT 検査

実験 1 と同様の手技を用いて同時に測定を行った。

#### 4.2.3.3 組織学的評価

実験 1 と同様の染色方法を用いて、同様に測定を行った。ただし免疫染色は実施しなかった。

### 4.2.4 実験 3 力学的検討と HA/PDLLA 製人工骨の平均分子量変化

#### 4.2.4.1 供試動物

平均体重は  $10.6 \pm 1.1$  kg、平均年齢  $11.9 \pm 0.8$  ヶ月齢、雄の健常ビーグル犬 12 頭を実験に供試した。実験 1 と同様の手技を用いて両側大腿骨骨顆に φ8.0mm の骨孔を作成し、左側に

は  $\beta$ -TCP 製人工骨、右側には HA/PDLLA 製人工骨を埋植した。大腿骨骨顆の内外側面から逸脱していた人工骨はメスを用いて切除した。術創は定法に従い閉鎖した。術後管理についても実験 1 と同様の手法を用いた。観察群は 1、3、そして 6 ヶ月の 3 群、各群 4 頭を設定した。安楽死にはペントバルビタールナトリウムの過剰投与により安楽死を行った。

#### 4.2.4.2 強度試験

安楽死後には大腿骨骨顆部分を切り出し、生理食塩水に浸漬させた。大腿骨骨顆は中央部分で切断し、外側を皮質骨側からの圧縮強度試験、内側を海綿骨側からの圧縮強度試験に使用した。左側皮質骨 (LCO)、左側海綿骨 (LCA)、右側皮質骨 (RCO)、そして右側海綿骨 (RCA) と定義し実験を行った。強度試験は ISO 844 (Rigid cellular plastics – Determination of compression properties : 2007) に準拠して行った。精密万能試験機 (AG-20kNXD, Shimadzu co, Kyoto, Jpn) に検体を設置し、 $\phi 7.0\text{mm}$  のジグを使用して 10% のひずみが認められるまで圧縮を行い、その際の圧縮強度を測定値とした。

#### 4.2.4.3 重量平均分子量の測定

強度試験後に、HA/PDLLA 製人工骨に残存している重量平均分子量 (Mw) を測定した。採材した HA/PDLLA 製人工骨はテトラヒドロフラン (WAKO, Osaka, Jpn) に溶解させた後に、HA 顆粒と不溶性物質を除去し、gel permeation chromatography (GPC, TOSOH Cor, Tokyo, Jpn) を用いて、強度試験実施後の RCO と RCA の Mw を測定した。

#### 4.2.5 統計学的処理

$\beta$ -TCP 製人工骨と HA/PDLLA 製人工骨、そして熱変形 HA/PDLLA 製人工骨と未変形

HA/PDLLA 製人工骨の比較は Mann whitney test、それぞれの人工骨における経時的な変化については Tukey HSD test を用いて有意差判定を行った。統計ソフトは SPSS を使用した。(SPSS, Japan Inc, Tokyo, Japan)  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。表記はすべて平均±標準偏差とした。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 実験 1

##### 4.3.1.1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の結果は Figure 4-3 に示した。TCP 群と比較し、FHP 群は 1 ( $p < 0.01$ ), 6 ( $p = 0.01$ )、そして 12 ヶ月 ( $p = 0.03$ ) において有意な高値が認められた。全観察期間を通じて TCP 群では経時的には認められなかった。FHP 群では術後 6 ヶ月の時点で 1 ヶ月に比べ有意な高値が認められ ( $p < 0.01$ )、術後 12 ヶ月の時点では全ての観察時に対して有意な高値が認められた (vs 1 month :  $p < 0.01$ 、vs 3 month :  $p < 0.01$ 、vs 12 month :  $p = 0.02$ )。

##### 4.3.1.2 組織学的評価

VG 染色から得られた組織所見は Figure 4-4 に示した。骨形成面積、残存人工骨面積については Figure 4-5、4-6 に示した。3 ヶ月 ( $p < 0.01$ )、6 ヶ月 ( $p < 0.01$ ) の時点において TCP 群は有意な骨形成の増加が認められた。残存人工骨面積については TCP 群では 1 ヶ月群と 3 ( $p < 0.01$ )、6 ( $p < 0.01$ )、12 ( $p < 0.01$ ) ヶ月群の間で有意差が認められた。FHP 群では全観察期間を通じて有意な変化が認められなかったが、TCP 群に比較し残存面積は有意に高値を示した (3、6、12 ヶ月群において  $p < 0.01$ )。

TRAP 染色の組織所見は Figure 4-7 に示し、計測を行った結果は Figure 4-8 に示した。TRAP 陽性細胞数は全期間を通じて TCP 群に比較し FHP 群で有意に高値を示した (1 month:  $p < 0.01$ 、3 month:  $p = 0.01$ 、6 month:  $p < 0.01$ 、12 month:  $p < 0.01$ )。TRAP 陽性細胞数は TCP 群では術後 3 ヶ月をピークとして 6 ヶ月 (vs 3 month:  $p = 0.01$ )、12 ヶ月 (vs 1 month:  $p < 0.01$ 、vs 3 month:  $p < 0.01$ ) と有意な低値が認められた。FHP 群では 1 ヶ月をピークとして徐々に減少し 1 ヶ月と比較し 3 (  $p < 0.01$ )、6 (  $p < 0.01$ )、12 ヶ月 (  $p < 0.01$ ) では有意に低値を示した。

RUNX2 と COL1 の免疫組織染色の代表的な所見は Figure 4-9 に示した。定性評価の結果は Table 4-2 に示した。TCP 群では COL1、RUNX2 は共に陽性組織、細胞は FHP 群に比較し、僅かに認められるのみであった。対して、FHP 群では COL1、RUNX2 共にその多くにおいて中程度の浸潤が認められた。

#### 4.3.2 実験 2

##### 4.3.2.1 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の結果は Figure 4-10 に示した。LHP と RHP の比較では両群間において有意差は認められず、6 ヶ月の RHP 群において 1 ヶ月に比較し有意差が認められた ( $p = 0.01$ )。12 ヶ月において、LHP 群は 1 ( $p = 0.02$ )、3 ヶ月群 ( $p = 0.02$ ) に対して、RHP 群は 1 ( $p < 0.01$ )、3 ( $p < 0.01$ )、6 ヶ月群 ( $p < 0.01$ ) に対して有意な高値が認められた。

##### 4.3.2.2 組織学的評価

VG 染色から得られた組織所見は Figure 4-11 に示した。骨形成面積、残存人工骨面積については Figure 4-12、4-13 に示した。骨形成については術後 1 ヶ月の時点では LHP は有意に

高値が認められたが ( $p<0.01$ )、その後は認められなかった。経時的な変化については LHP 群と RHP 群は共に同様の経過が認められ、6 ヶ月群 (LHP 群 :  $p=0.03$ 、RHP 群 :  $p<0.01$ ) と 12 ヶ月群 (LHP 群 :  $p=0.02$ 、RHP 群 :  $p<0.01$ ) は 1 ヶ月群に比較し有意な高値が認められたが、3 ヶ月群との間では有意な変化が認められなかった。残存人工骨は術後、一貫して LHP 群と RHP 群では有意差は認められず、経時的な変化も認められなかった。

TRAP 染色の組織所見は Figure 4-14 に示し、計測を行った結果は Figure 4-15 に示した。

LHP と RHP を比較した際には、観察期間中は両群間に有意差は認められなかった。LHP 群は 6 ヶ月と 12 ヶ月においてそれぞれ 1 ヶ月 (vs 6month :  $p<0.01$ 、vs 12 month :  $p=0.03$ ) と 3 ヶ月 (vs 6month :  $p=0.03$ ) に対して有意な低値を示した、RHP 群においては 6 ヶ月群と 12 ヶ月群は 1 ヶ月群と比較し有意に低値を示した (vs 6 month :  $p<0.01$ 、vs 12 month :  $p=0.01$ )、両群ともに陽性細胞数は一貫して減少傾向にあることが示唆された。

### 4.3.3 実験 3

#### 4.3.3.1 強度試験

強度試験を行った結果は Figure 4-15 に示した。LCO、RCO、LCA、RCA の間では全観察期間を通じて各群間に有意差は認められなかった。LCO においては 3、6 ヶ月において 1 ヶ月と比較して有意差が認められた (3 month :  $p=0.04$ 、6 month :  $p=0.04$ )。RCA においては 6 ヶ月において 1、3 ヶ月との間に有意に高値を示した (1 month :  $p=0.03$ 、3 month :  $p=0.02$ )。しかし、全体の傾向として時間経過とともに徐々に強度が上昇する傾向が認められた。

#### 4.3.3.2 HA/PDLLA 製人工骨の Mw の経時的変化



Mw は RCO、RCA 共に 1、3、そして 6 ヶ月と経時的に有意な減少が認められた (すべて  $p < 0.01$ )。RCO 群と RCA 群では 6 ヶ月の段階で有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。

#### 4.4 考察

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は FHP 群、LHP 群、そして RHP 群においては徐々に増加傾向が認められ、6 ヶ月、12 ヶ月と有意な  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の増加が認められた。一方で TCP 群において有意差は認められなかったが、経時的に減少傾向にあることが認められた。TCP 群においては VG 染色の結果から良好な置換が得られていることが認められた。残存人工骨の面積は徐々に減少し、新生骨についても 6 ヶ月の時点では一時的に高値を示したが、その後はさらなる置換の進行に伴い、髓腔構造が形成され新生骨面積が減少していることが認められた。12 ヶ月における TCP 群の VG 染色では正常な骨梁構造が再構築され、自家骨への置換が完了しつつあることが認められた。動物種、埋植した  $\beta$ -TCP 量、そして観察期間は異なるが、ウサギ大腿骨顆への  $\beta$ -TCP 製人工骨の埋植実験においては、術後 8 週において残存  $\beta$ -TCP 面積は一視野あたり約 20%、同様に新生骨面積についても約 20%と報告されており、本検討と同様の経過が認められた。(Chazono M. ら, 2004)。 $\beta$ -TCP 製人工骨は優れた生体吸収性を有することが報告されており、ウサギの埋植実験例において 12 ヶ月で完全吸収に至ると報告されている (Morikawa S. ら, 2000; Stubbs D. ら, 2004)。一方で HA/PDLLA 製人工骨を使用した FHP 群は TCP 群の比較において 1、6、12 ヶ月において有意に高値が認められた。当初の TCP 群における  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の高値は素材自体による差異であるが、6 そして 12 ヶ月の時点で FHP 群では有意な高値が認められた。そ

の原因としてはVG染色結果から認められたようにFHP群における骨形成と人工骨吸収の遅延が影響していると考えられたが、特に、人工骨吸収の遅延が影響していると考えられた。12ヶ月が経過した時点で、TCP群はFHP群に対して高値を示す傾向にはあるが、有意差は認められなかった。しかしTCP群とFHP群と比較した際には残存人工骨料が12ヶ月の時点でFHP群はTCP群に比較し有意に高値を示した。HA/PDLLAのうち70%はHAであり、HAの生体吸収の遅延がFHP群において $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の高値を示した原因であると示唆された。TRAP染色の結果からはFHP群においてTCP群に比べ有意に多くのTRAP陽性細胞数が確認された。 $\beta$ -TCPの吸収は全て破骨細胞が担うとされており、TCP群において確認されたTRAP陽性細胞は破骨細胞であると考えられた(Kondo N. ら, 2005)。しかし、HA/PDLLA製人工骨においては含有されているHAは破骨細胞が吸収を担うが、PDLLAは加水分解によって分解され、Mwを減少させることで最終的には水と二酸化炭素にまで分解される。今回、FHP群、LHP群、そしてRHP群で確認されたTRAP陽性細胞の一部は炎症反応により集合したマクロファージの可能性が示唆された。過去にShikinami Y.らが犬背部への埋植実験を行った際には炎症反応は認められなかったと報告したが、Heidemann W.らはラット背部へ埋植したHA/PDLLA製rod周辺では、炎症が認められたと報告している(Shikinami Y. ら, 2006; Heidemann W. ら, 2001.)。この点に関しては、さらにCD68による破骨細胞の同定を行い検討する必要があると考えられた(Athanasou N.A. ら, 1990)。

過去にチタン製あるいはステンレス製screwやrod周囲に顆粒状の $\beta$ -TCPやHAを噴霧

し作成した screw の引き抜き試験においては  $\beta$ -TCP と HA の間には引き抜き強度に有意な差は認められなかったと報告されている (Oyake Y. ら, 2002; Ghosh S.K. ら, 2008)。本検討においても同様に TCP 群と FHP 群の間で有意差は認められなかった。これらの報告における組織評価においては、HA と  $\beta$ -TCP は同等の骨伝導能を有しており、埋植 4 週間後には宿主骨と直接癒合を獲得する。その後、本検討においても確認されたように  $\beta$ -TCP は速やかな生体吸収性を示すことが報告されている (Oyake Y. ら, 2002; Ghosh S.K. ら, 2008; Morikawa S. ら, 2000; Stubbs D. ら, 2004)。HA/PDLLA 製人工骨内部には埋植 12 ヶ月後に、COL I 陽性組織が  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し多く認められた。HA/PDLLA 製人工骨における接着強度には COL I による支持が寄与している可能性が示唆された (Brodsky B. ら, 2005)。また、RUNX2 は間葉系幹細胞を骨分化させる重要な役割を有する転写因子であり、RUNX2 陽性細胞が多数認められた HA/PDLLA 製人工骨では自家骨置換は遅延傾向にあるが、骨代謝活性は低下していないことが示唆された (Komori T. 2011.)。

過去にラット背部に PDLLA 製 rod と HA/PDLLA 製 rod を埋植し、生体適合性と生体吸収性の比較検討を行った報告では、PDLLA 製 rod は埋植後 3 ヶ月において Mw が約 60% 減少し、埋植 12 ヶ月後には完全吸収が認められたと報告されている (Heidemann W. ら, 2001.)。同報告の中で HA/PDLLA 製 rod は 12 ヶ月が経過した段階で PDLLA の分解が終了したが、完全吸収には 24 ヶ月以上を要するとしている。本検討においても Mw は埋植後 6 ヶ月の時点で残存分子量が約 50% を示しており、Heidemann W. らと同様の経過が認められた (Heidemann W. ら, 2001.)。

本検討において、実験 2 から LHP 群と RHP 群では  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量、新生骨面積、残存人工骨、そして TRAP 陽性細胞数については、新生骨面積の 1 ヶ月以外では有意差は認められなかった。特に 12 ヶ月群において、両群間に有意差が認められなかったことから熱変形を行うことによる骨形成や人工骨吸収に対しての影響は存在しないと考えられた。これまでに、熱変形によって欠損部位への補填が可能な吸収性人工骨素材は報告されておらず、HA/PDLLA 製人工骨の良好な操作性は外科医の術中操作を容易にする一助となると考えられた。

$\beta$ -TCP 製人工骨に比較し HA/PDLLA 製人工骨は残存し、骨形成が遅延する傾向が認められた。PDLLA 製人工骨は PDS 液中に浸透し荷重条件下にて Mw の測定を行った結果、12 週間後には 50%、非荷重条件下においては 22% の Mw の低下が起こると報告されている (Fan YB. ら, 2008)。PDLLA は荷重を受けることによってその構造内に水分子が侵入し、加水分解が引き起こされ、それにより分子量が低下し吸収が促進される (Fan YB. ら, 2008)。本検討における、 $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し HA/PDLLA 製人工骨の置換過程が遅延することの原因として非荷重部位への埋植が原因の一つとして考えられた。しかしながら、 $\beta$ -TCP に比較し置換が遅延することは必ずしも人工骨の素材として一概に劣っていることを示唆する所見ではなく、糖尿病や骨粗鬆症、そして大理石病といった破骨細胞の活性に左右されず一定の期間、埋植部位に存在することは、局所に安定した強度をもたらす、さらに細胞の足場として機能する有利な点でもあると考えられた (Maquest V, ら 2003)。

#### 4.5 小括

- 1 新生骨・残存人工骨面積の測定結果から、HA/PDLLA 製人工骨は  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較して、自家骨置換が遅延する傾向が認められた。
- 2 しかし、HA/PDLLA 製人工骨内部には 12 ヶ月後に RUNX2 陽性細胞が多数認められ、自家骨への置換過程は停止していないことが示唆された。
- 3 HA/PDLLA 製人工骨と  $\beta$ -TCP 製人工骨は同等の接着強度が認められ、両人工骨ともに自家骨との直接癒合が認められた。 $\beta$ -TCP 製人工骨は自家骨への置換によって強度の増加が得られており、HA/PDLLA 製人工骨では自家骨との直接癒合と同時に COL I 陽性組織が人工骨内に浸潤しており、それが強度の増加の一助となっていることが示唆された。
- 4 HA/PDLLA 製人工骨の Mw は有意な低下が認められたが、過去の報告と同等の減少率であったが、荷重条件下において PDLLA はより早期に Mw が減少することが報告されており、HA/PDLLA 製人工骨の荷重下での使用が期待された。
- 5 熱変形による自家骨置換への影響は認められなかった。HA/PDLLA 製人工骨は欠損部位への熱変形による埋植が可能であり、有用な手法となることが示唆された。

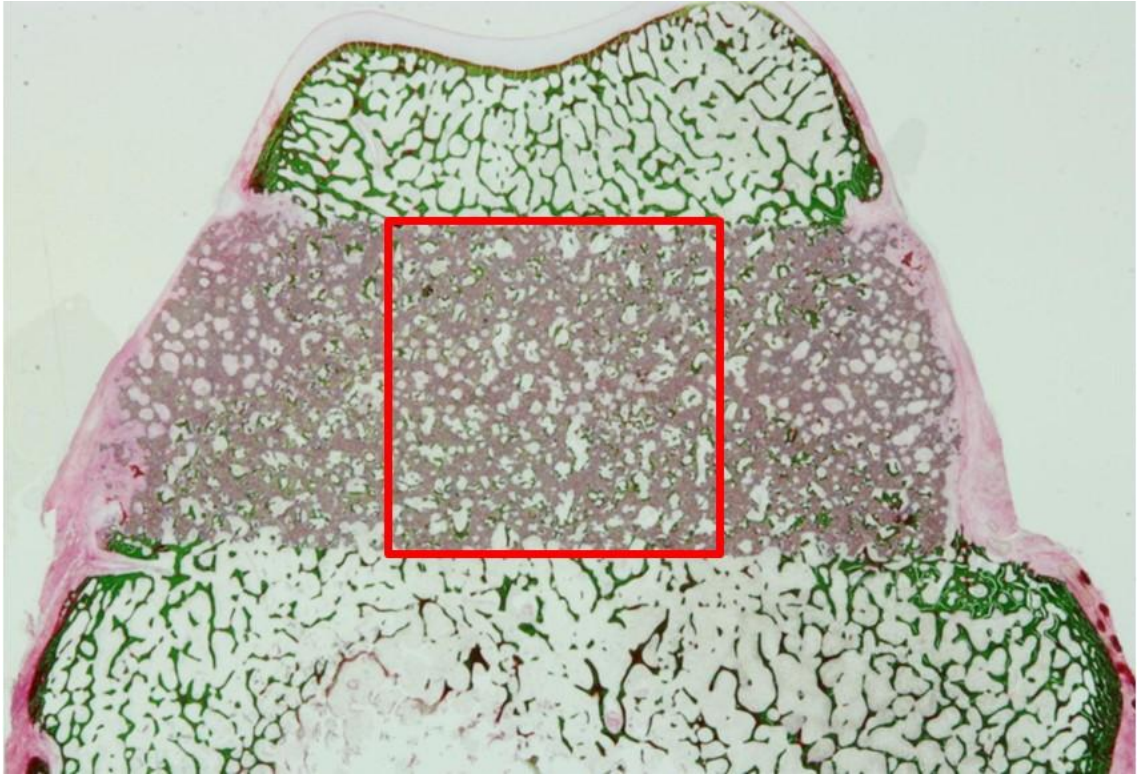


Figure 4-1 : VG 染色を用いた新生骨、残存人工骨面積測定部位

VG 染色組織切片を用いて枠内における、新生骨面積と残存人工骨面積を計測した。

枠は短軸長の 1/2 を一辺とする正方形とし、設置場所は短軸中心と枠中心が一致するポイントとした。

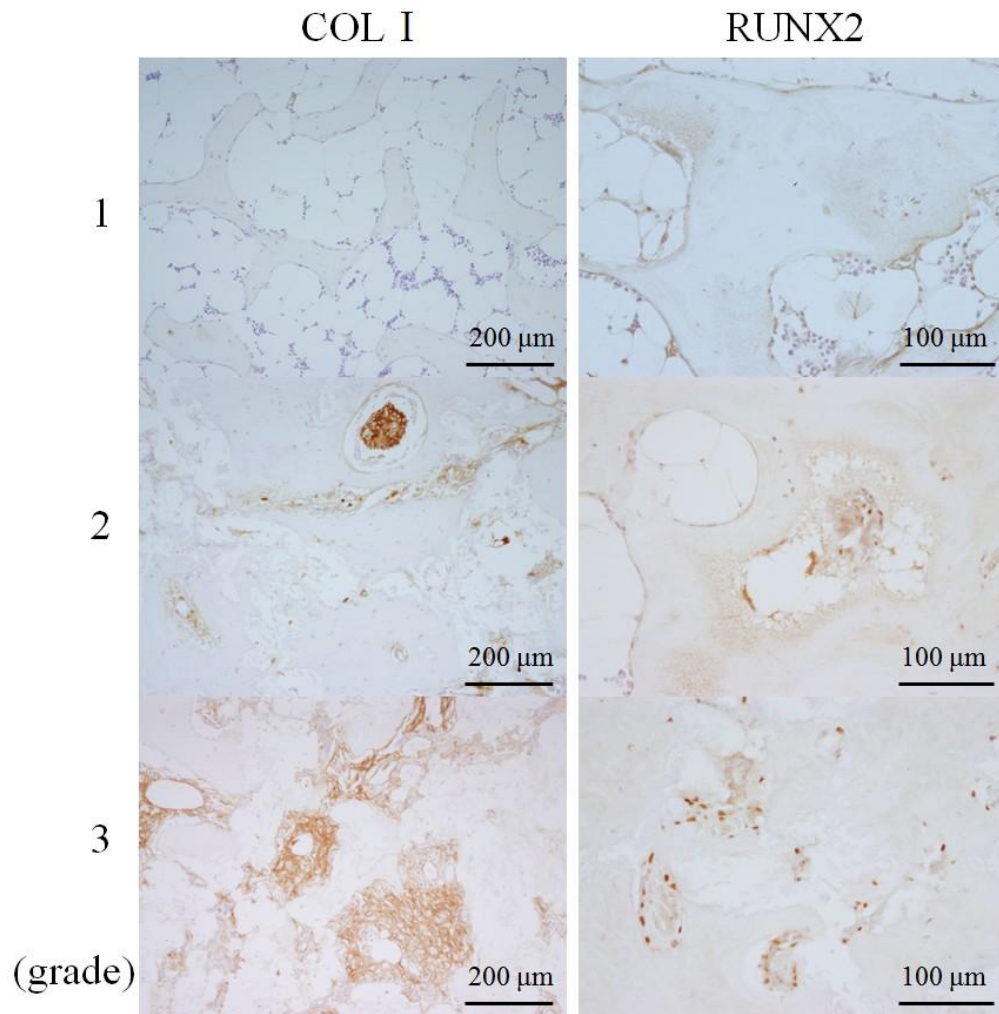


Figure 4-2 : RUNX2 と COL I の定性的評価

COL1 と RUNX2 の免疫組織化学染色を実施した。COL1 は 100 倍、RUNX2 は 200 倍にて観察を行った。

1 : わずかに陽性組織や細胞の浸潤が認められた

2 : 軽度の浸潤が認められた。

3 : 中程度の浸潤が認められた。

以上の、3段階に分類し定性評価を行った

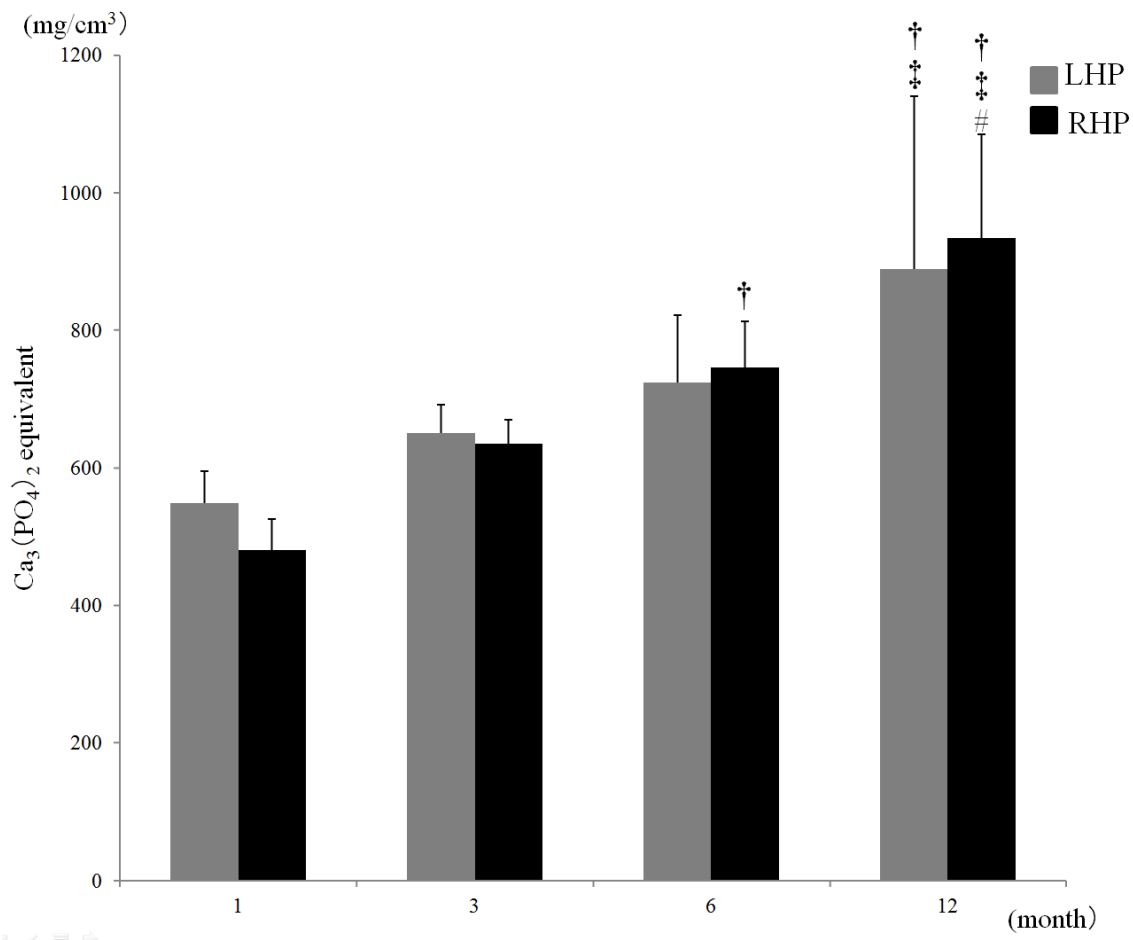


Figure 4-3 : TCP と FHP の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量測定結果

(1 month : n=16、3 month : n=12、6 month : n=8、12 month : n=4)

Gray box : TCP 群、Black box : FHP 群

\* . . . vs TCP group (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean±S.D.



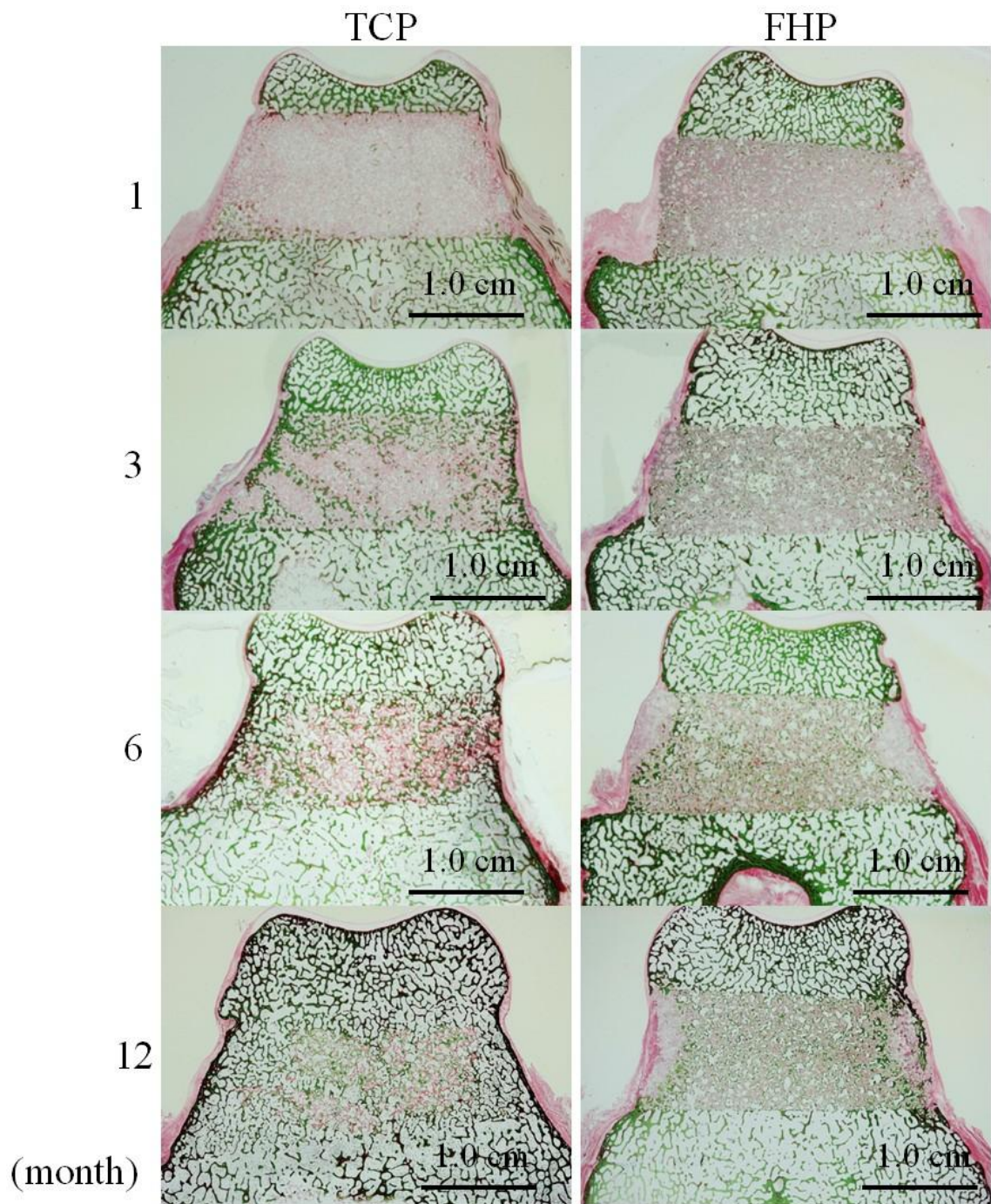


Figure 4-4 : 大腿骨における VG 染色結果

TCP 群と FHP 群の 1, 3, 6 そして 12 ヶ月群の VG 染色結果を示した。

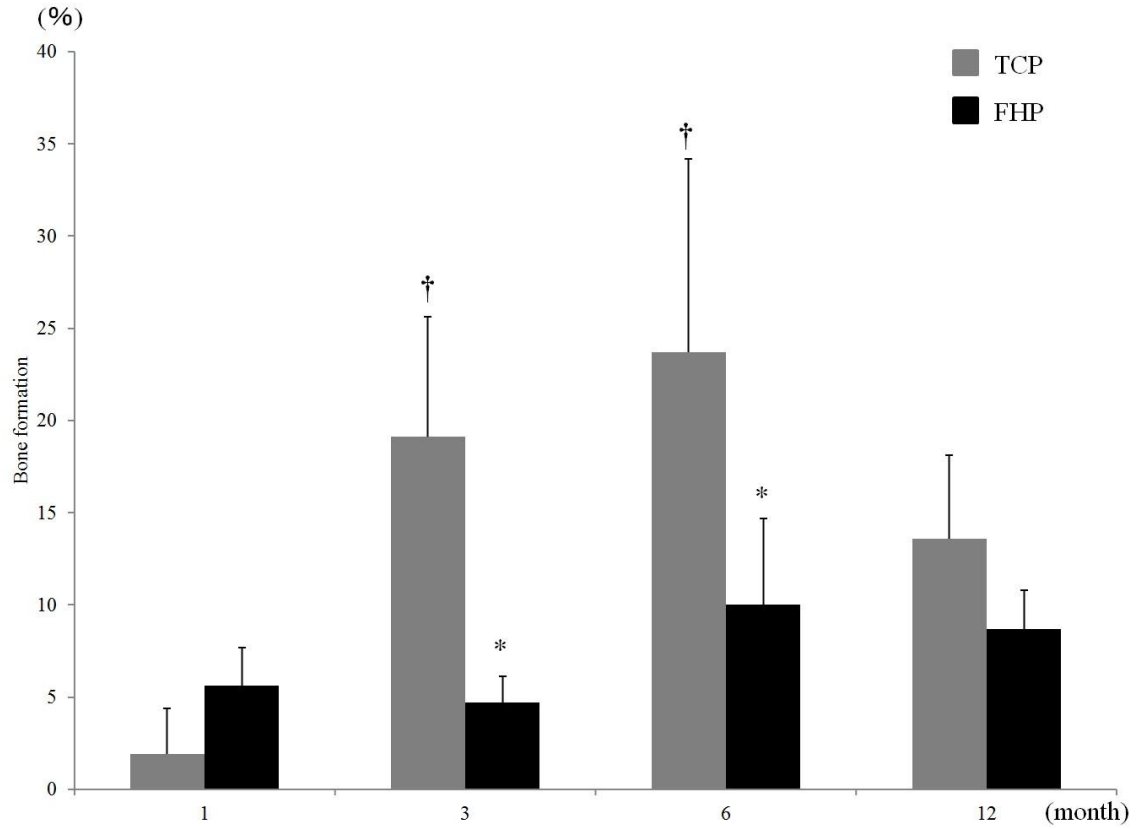


Figure 4-5 : VG 染色による TCP group と FHP group の骨形成面積 (全て n=4)

Gray box : TCP 群、Black box : FHP 群

\* . . . vs TCP (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean±S.D.

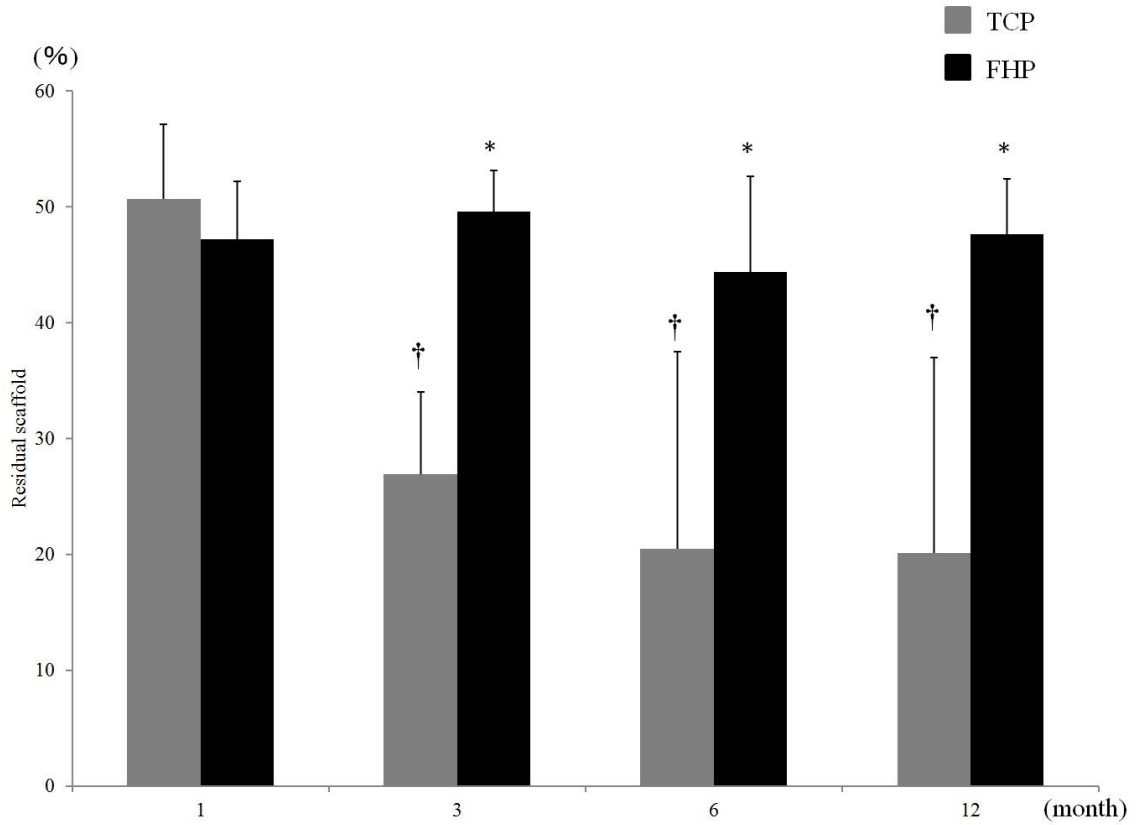


Figure 4-6 : VG 染色による TCP group と FHP group の残存人工骨 (全て n=4)

Gray box : TCP 群、Black box : FHP 群

\* . . . vs TCP (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean±S.D.

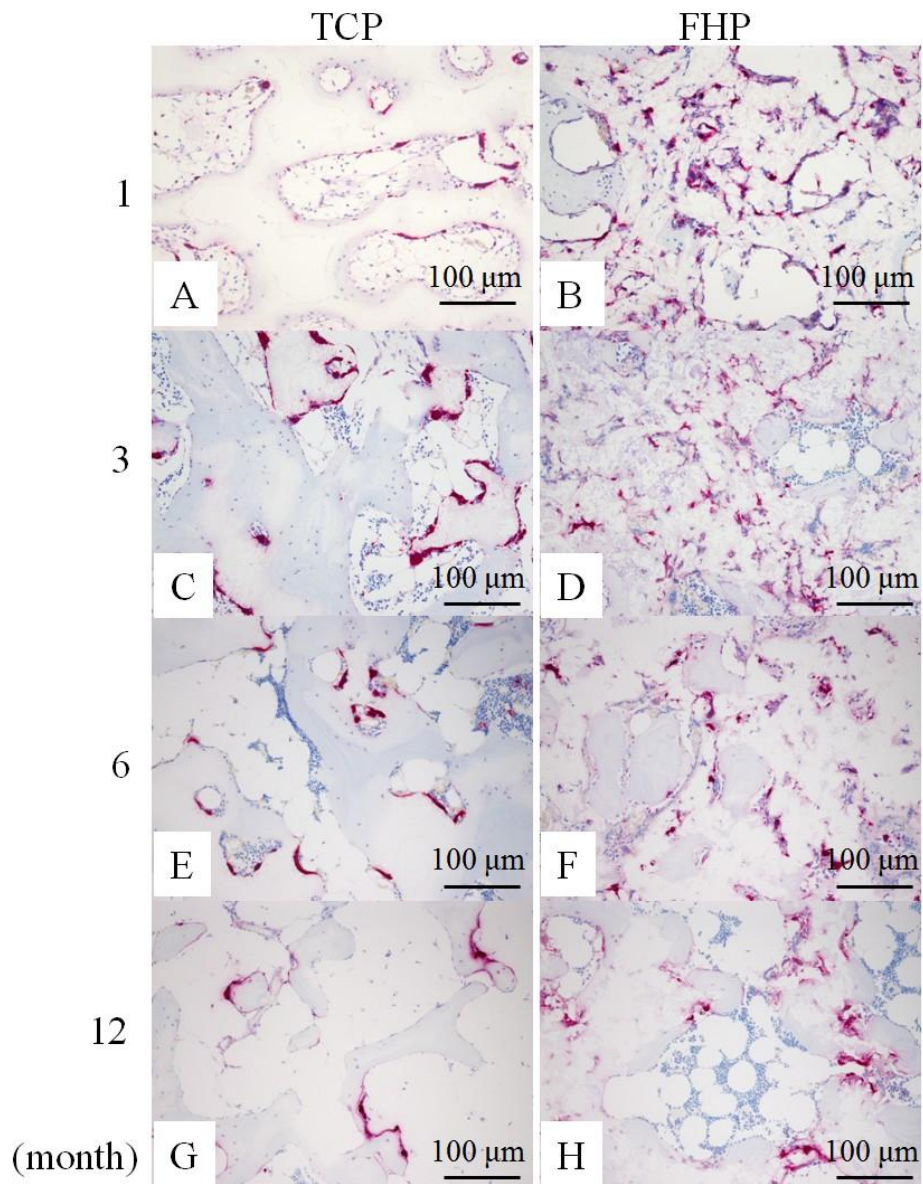


Figure 4-7 ; 大腿骨における TRAP 染色 (200 倍にて観察)

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 6 ヶ月、G・H : 術後 12 ヶ月

A・C・E・G : TCP group、B・D・F・H : FHP group

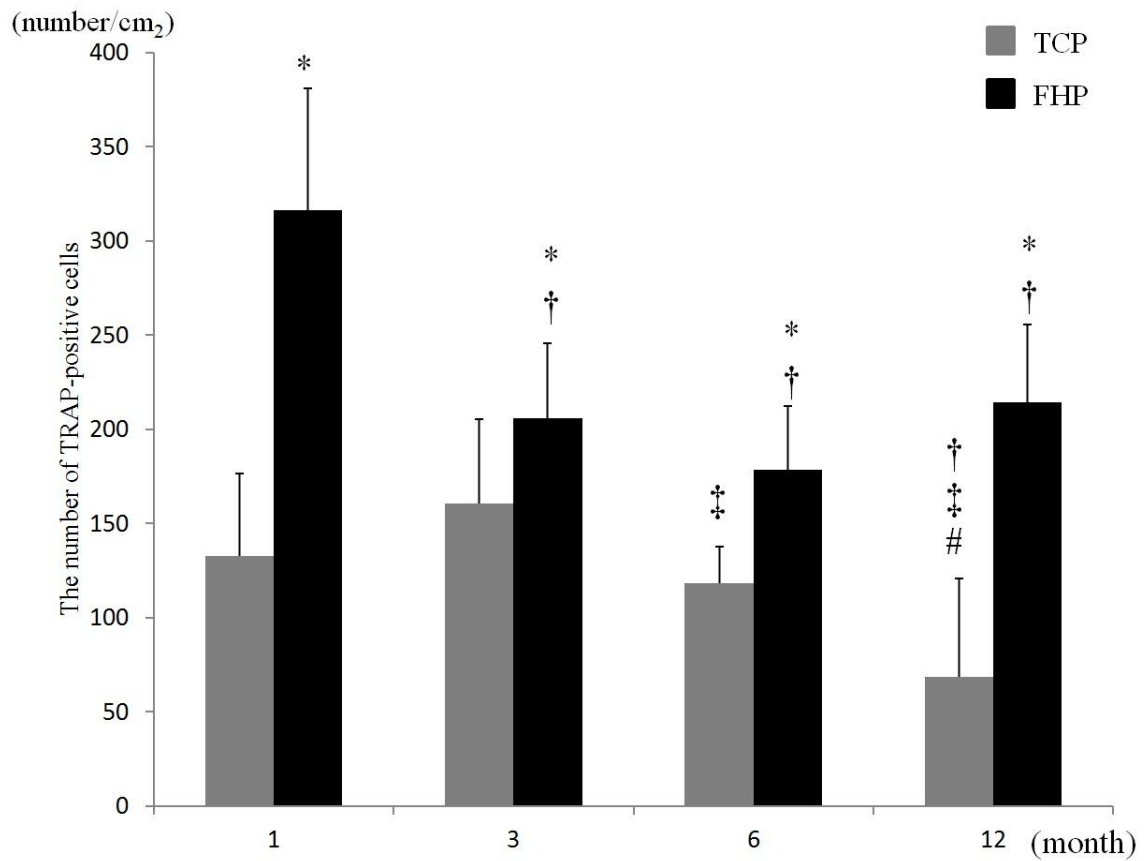


Figure 4-8 : 大腿骨における TRAP 陽性細胞数 (全て n=4)

Gray box : TCP 群、Black box : FHP 群

\* . . . vs TCP (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean $\pm$ S.D.



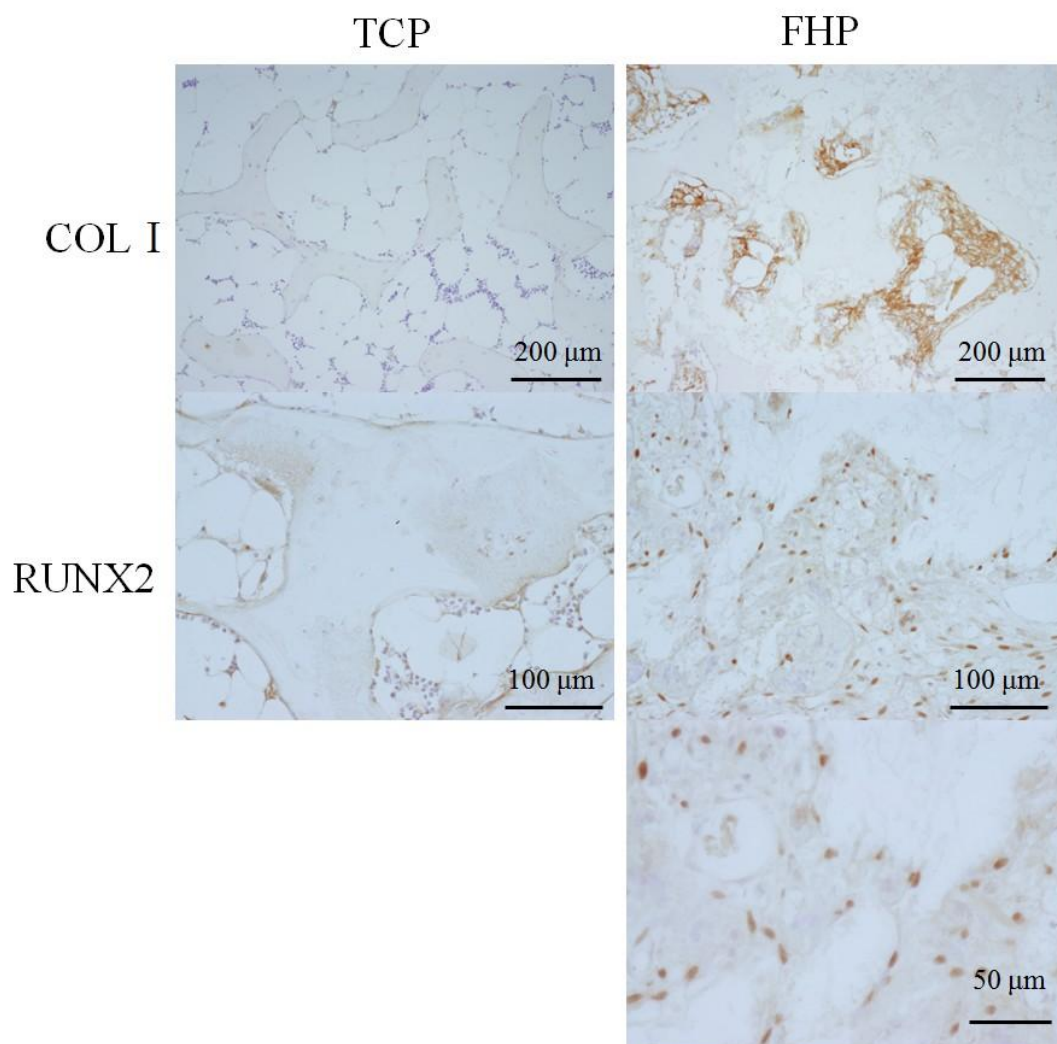


Figure 4-9 : COL1 と RUNX2 の免疫染色結果

COL I は 100 倍、RUNX2 は 200 倍と 400 倍で観察を行った。

定性評価の結果は Table 4-2 に示した。

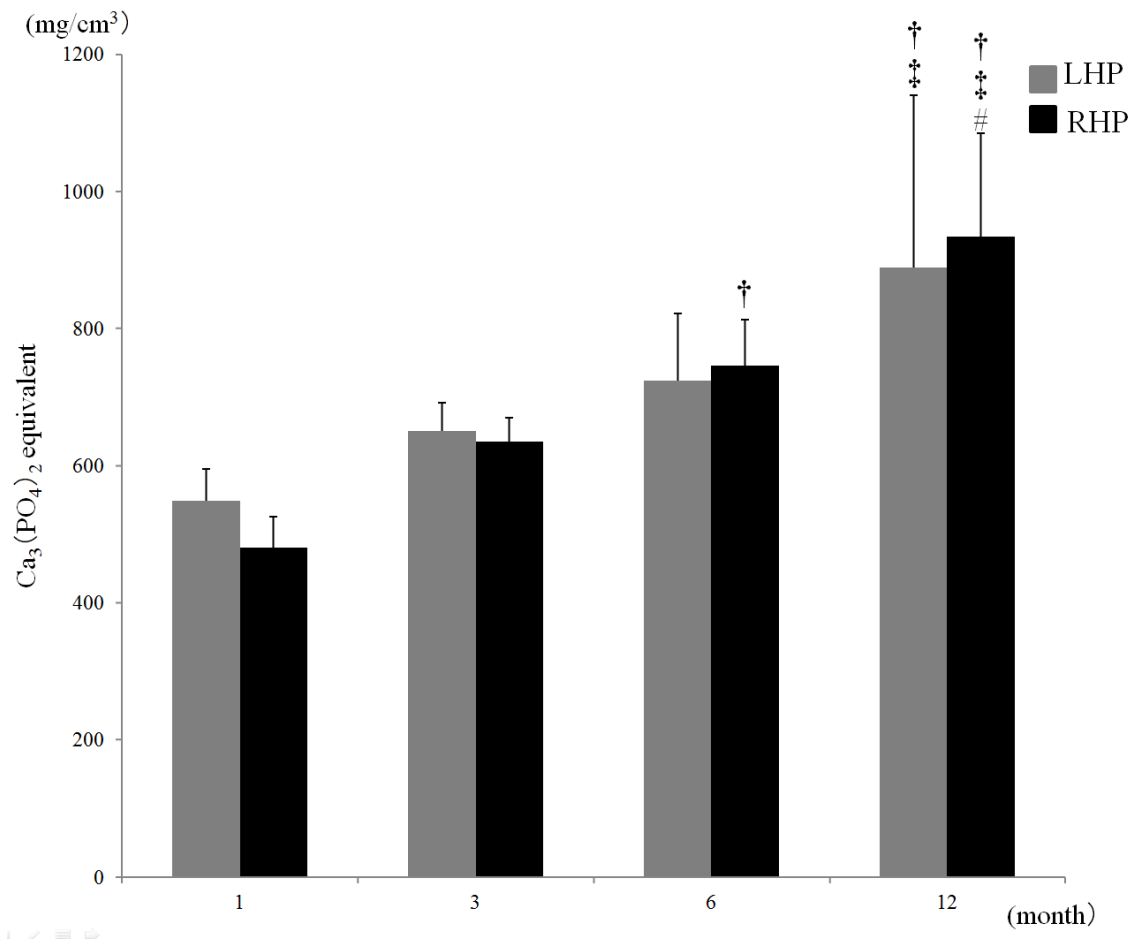


Figure 4-10 : LHP と RHP の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量測定結果

(1 month : n=16、3 month : n=12、6 month : n=8、12 month : n=4)

Gray box : LHP 群、Black box : RHP 群

\* . . . vs TCP group (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean±S.D.

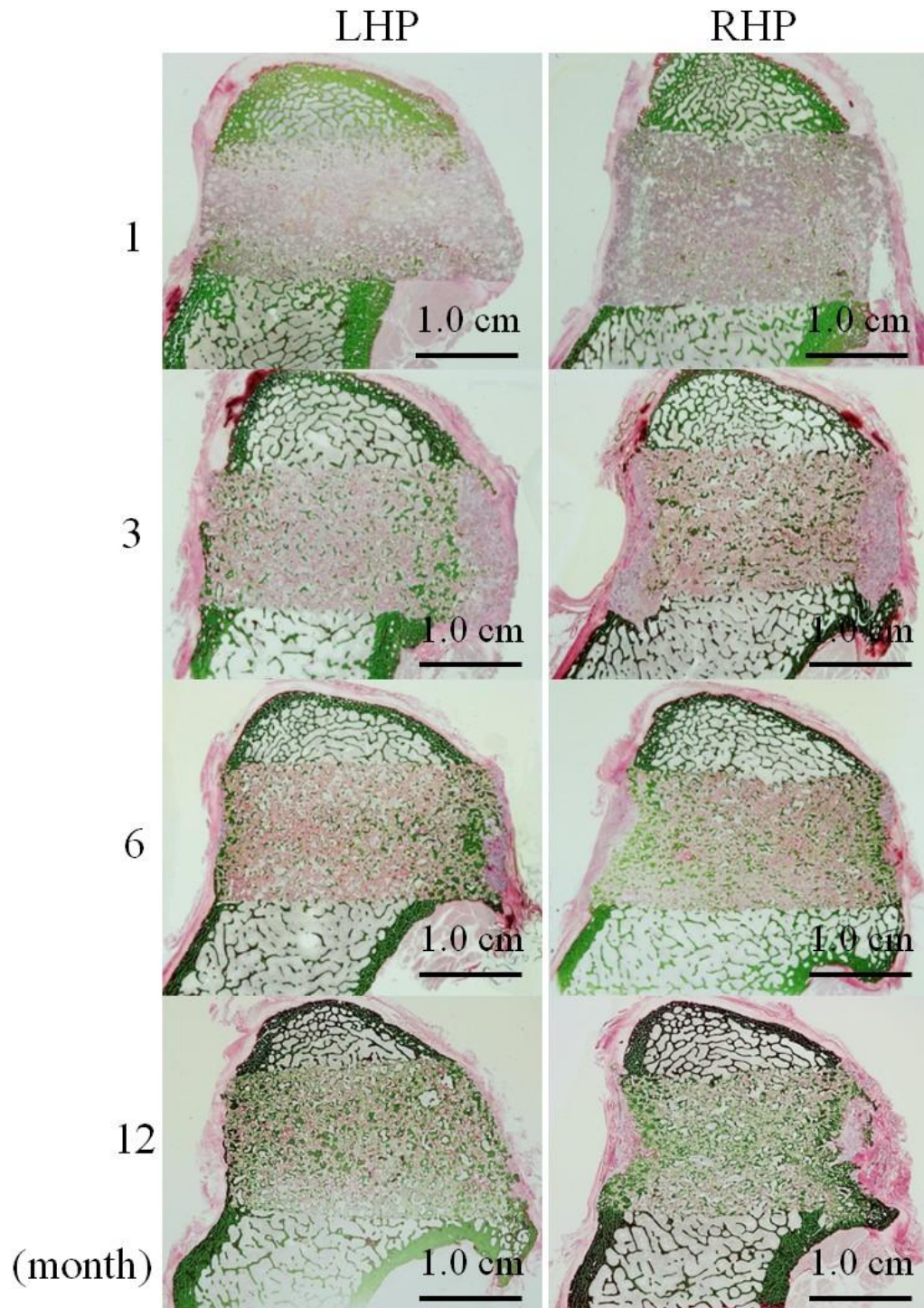


Figure 4-11 : 上腕骨における VG 染色結果

LHP 群と RHP 群の 1, 3, 6 そして 12 ヶ月群の VG 染色結果を示した。



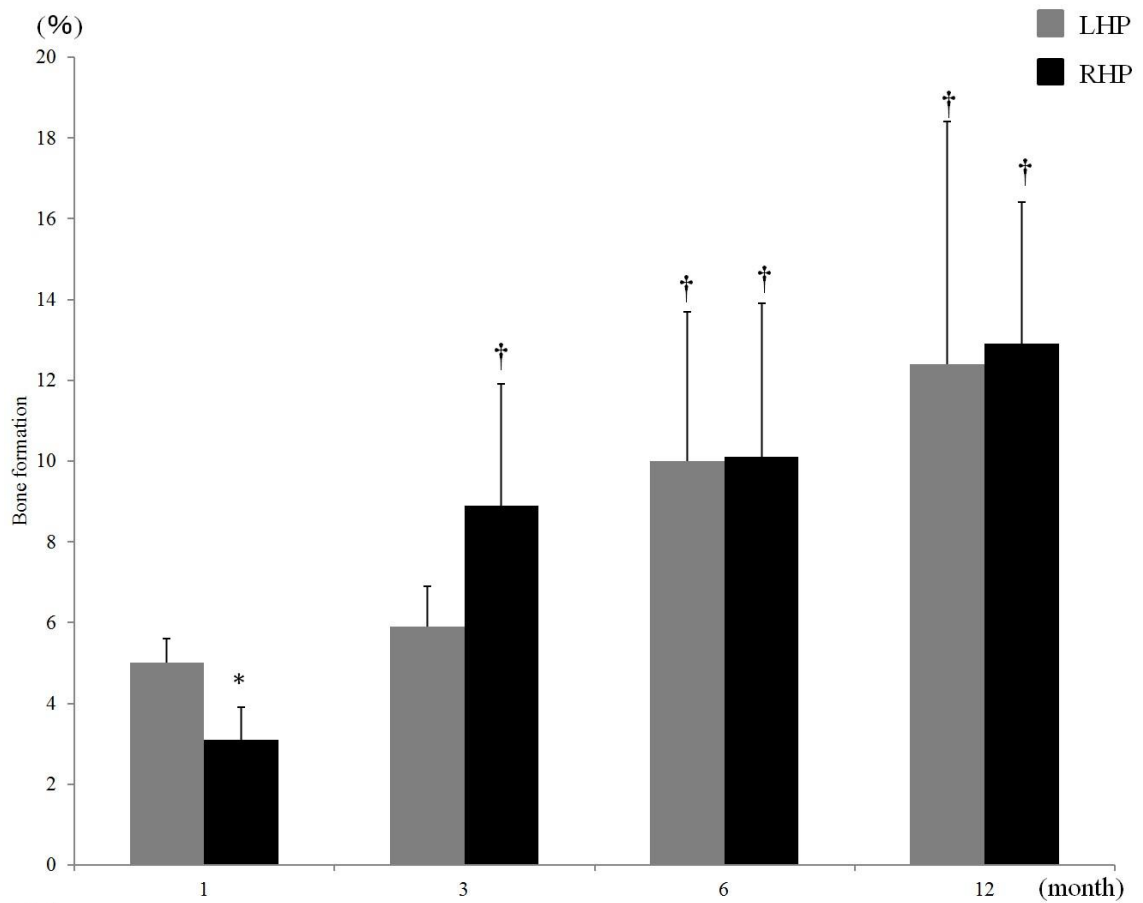


Figure 4-12 : VG 染色による LHP group と RHP group の新生骨形成面積 (全て n=4)

Gray box : LHP 群、Black box : RHP 群

\* . . . vs LHP (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean±S.D.

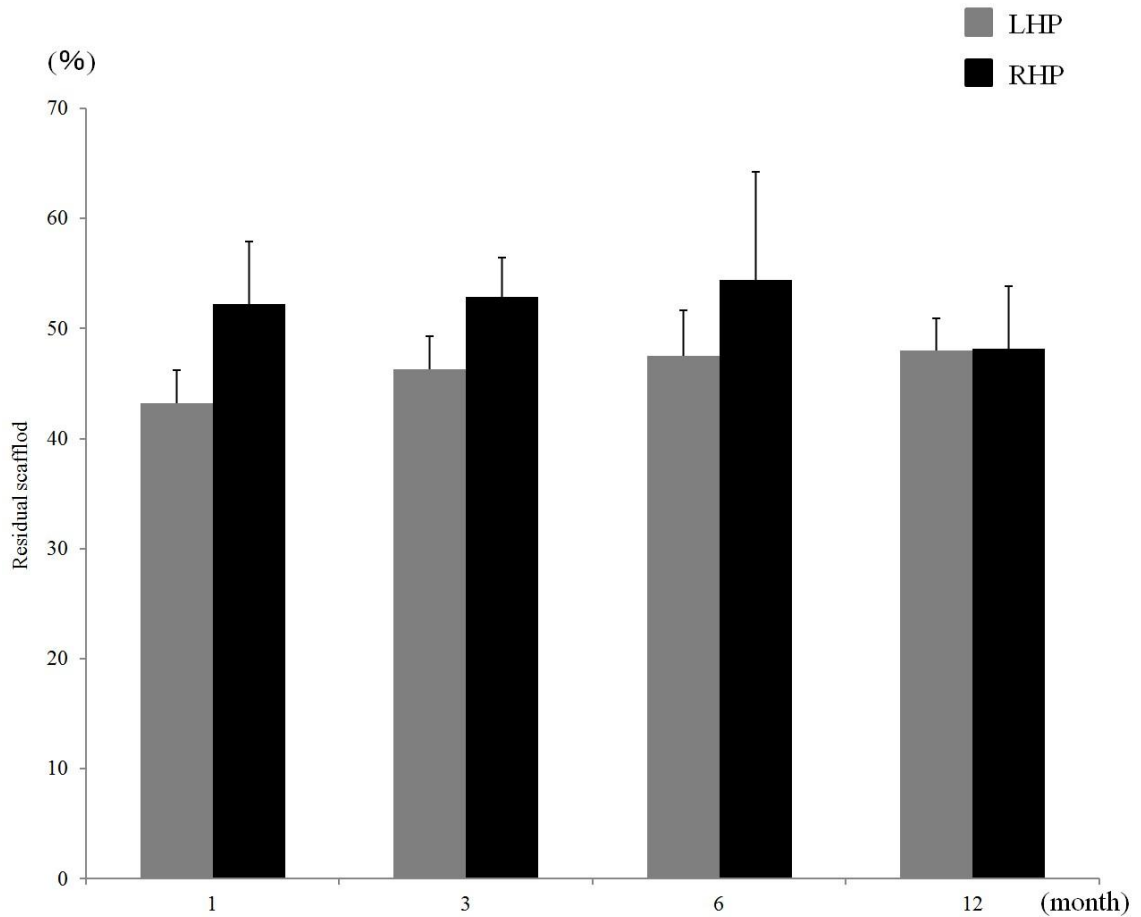


Figure 4-13 : VG 染色による LHP group と RHP group の残存人工骨面積 (全て n=4)

Gray box : LHP 群、Black box : RHP 群

\* . . . vs LHP (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean $\pm$ S.D.

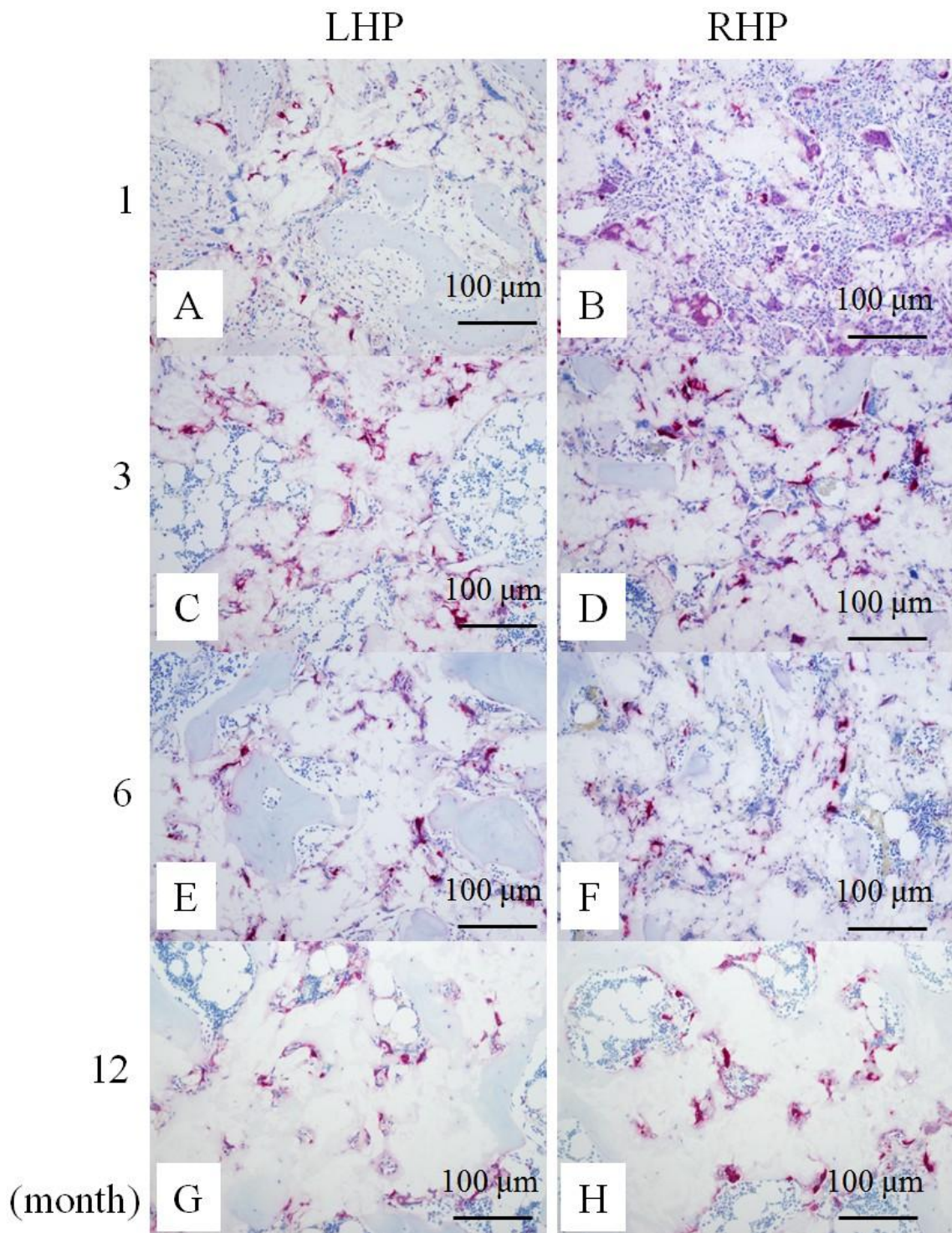


Figure 4-14 ; 上腕骨における TRAP 染色 (200 倍にて観察)

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 6 ヶ月、G・H : 術後 12 ヶ月

A・C・E・G : LHP group、B・D・F・H : RHP group

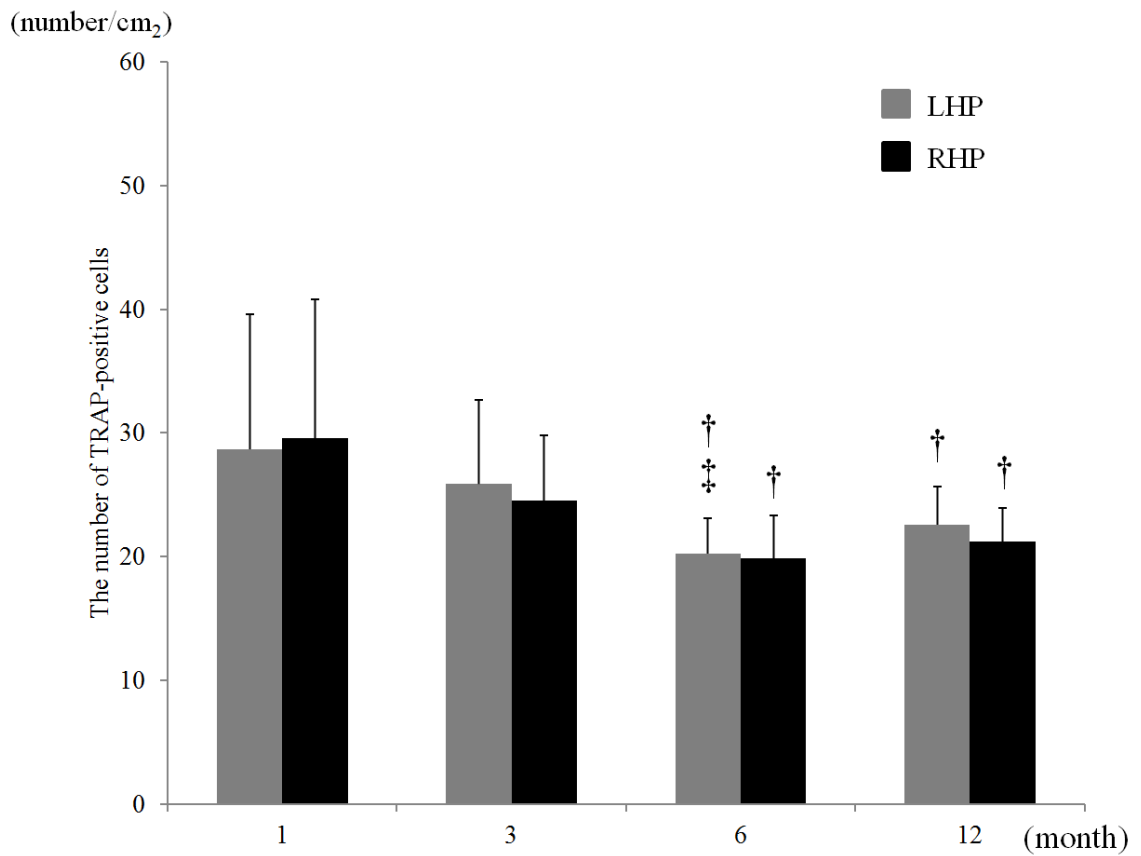


Figure 4-15 : 上腕骨における TRAP 陽性細胞数 (全て n=4)

Gray box : LHP 群、Black box : RHP 群

\* . . . vs LHP (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

‡ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

# . . . vs 6 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean $\pm$ S.D.

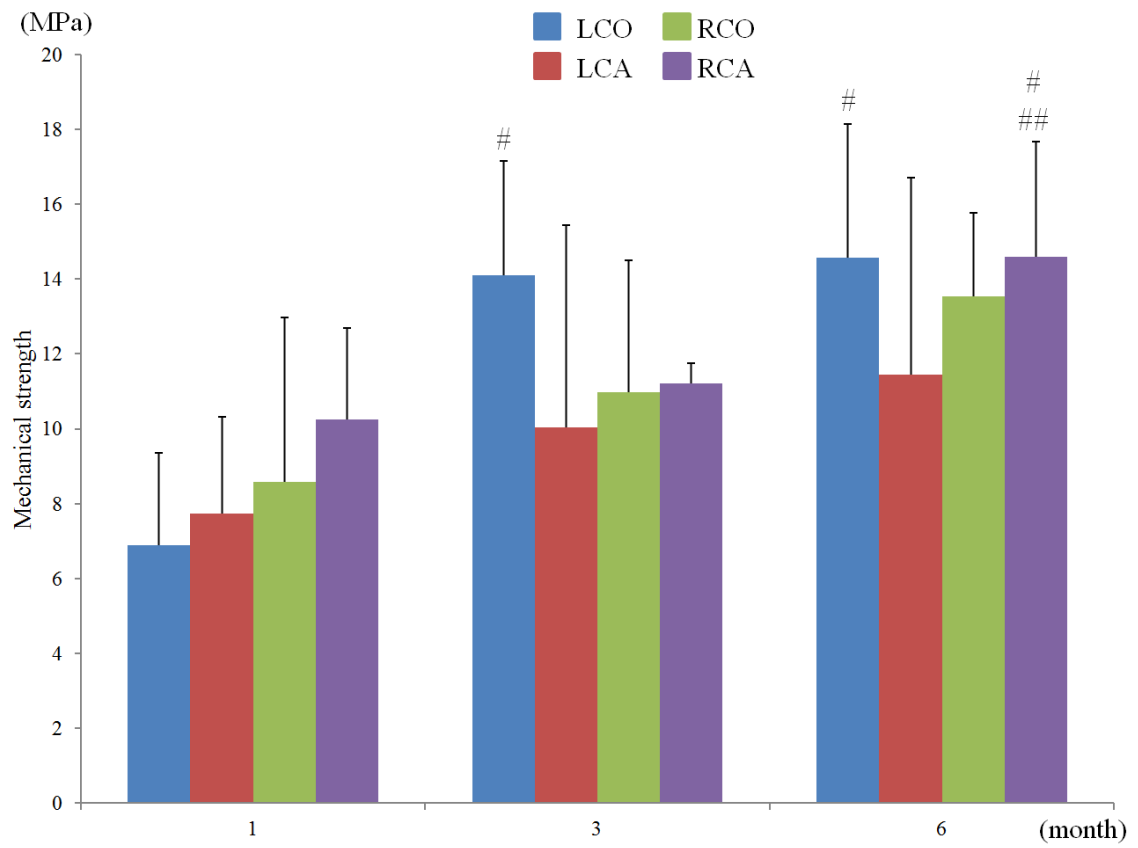


Figure 4-16 : 強度試験結果 (全て n=4)

Blue box : LCO 群、Red box : LCA 群、Green box : RCO 群、Purple box : RCA 群

# : vs 1 month (Tukey HSD test : p<0.05)

## : vs 3 month (Tukey HSD test : p<0.05)

Value : mean±S.D.

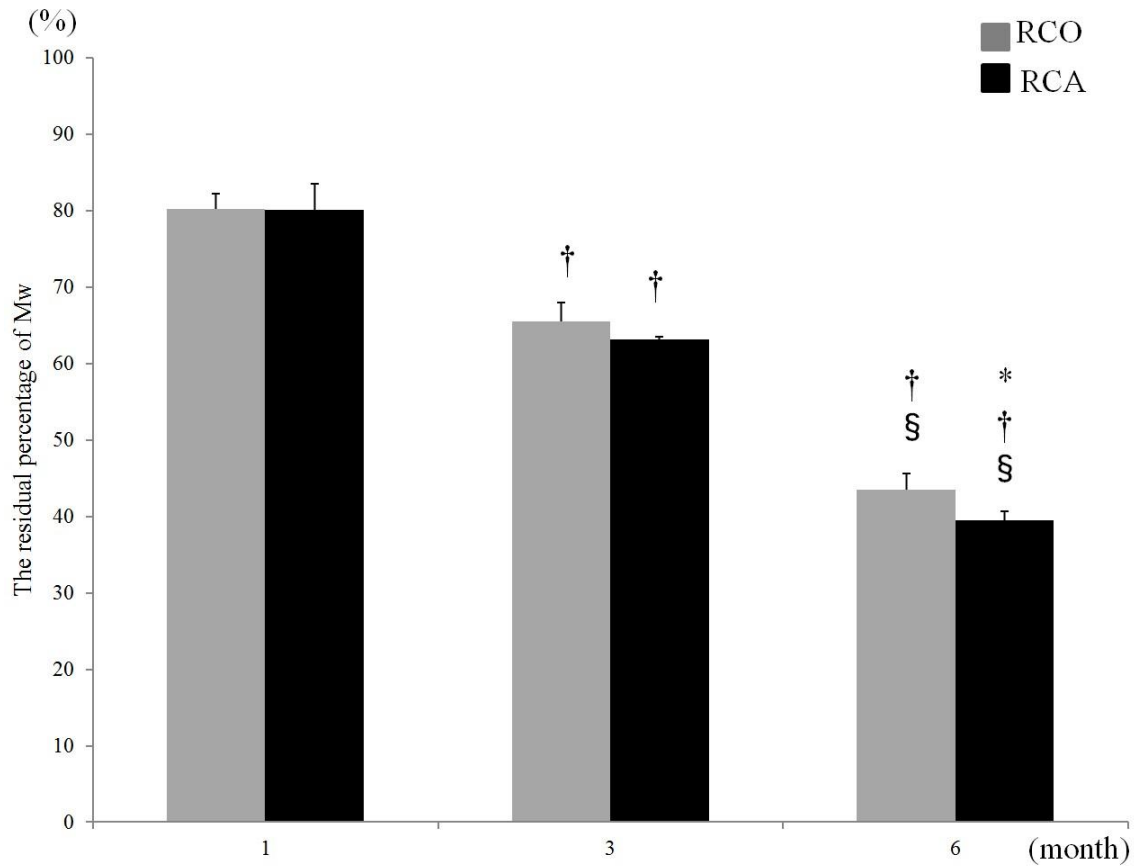


Figure 4-17 : 重量平均分子量 (Mw) の経時的変化 (全て n=4)

Gray box : RCO 群、Black box : RCA 群

\* . . . vs RCO (Mann whitney test :  $p < 0.05$ )

† . . . vs 1 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

§ . . . vs 3 month (Tukey HSD test :  $p < 0.05$ )

Value : mean±S.D.

Table 4-1 使用した抗体

Name	Primary antibody	Dilution rate	Secondary antibody
COL I	Rabbit polyclonal anti-COL I	5000	Anti-rabbit IgG
Runx2	Goat polyclonal anti-runx2	100	Anti-goat IgG

Rabbit polyclonal anti-COL I CosmoBio, Tokyo, Jpn

Goat polyclonal anti-runx2 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA

Anti-rabbit IgG DAKO, Glostrup, Denmark

Anti-goat IgG Nichirei Biosciences, Inc., Tokyo Jpn

Table 4-2 : RUNX2 と COL I の定性評価

	No.	1	2	3	4
RUNX2	TCP	1	1	2	1
	FHP	2	3	3	3
COL I	TCP	1	1	1	1
	FHP	2	3	3	3



第 5 章  
荷重部位における  
hydroxyapatite/poly-D/L-lactide 製人工骨  
の適応に関する検討

## 5.1 緒言

腫瘍、外傷、感染、そしてそれらに対する治療により生じた大きな骨欠損への治療法としては、第 2 章で述べた凍結同種保存骨移植、自家皮質骨移植、そして吸収性人工骨移植による再建術がその選択肢として挙げられる。長管骨は持続的に荷重の加わる部位であることから、強度に優れた素材が求められていた。しかし、Liu G.らは適切な固定器具の使用により、強度に劣る吸収性人工骨の荷重部位への使用が可能であると報告した(Liu G. ら, 2008)。

1980 年から、生体適合性に優れ、骨伝導能と骨誘導能を有しそして生体に吸収される特性を有する吸収性人工骨の研究が進められてきた (Navarro M. ら, 2008)。現在ではリン酸カルシウムや吸収人工素材を利用した人工骨が開発され、骨や軟骨の再建術に利用されている (Slivka M. ら, 2001; Yang S. ら, 2001; Doi Y. ら, 1996; Watanabe T. ら, 2004)。

リン酸カルシウムから構成される多孔性素材の人工骨は生体親和性が高く、細胞の足場として機能する優れた骨伝導能を示す (Daculsi G. ら, 2003)。こういったリン酸カルシウムを主成分とする素材はその結晶構造が本来の骨を構成する構造である HA と同一あるいは酷似しているために、骨芽細胞や破骨細胞といった骨の形成と吸収を担う細胞の適合性に優れることから優れた生体適合性と骨伝導能を有するとされている (Singh S. ら, 2000; Basset C.A.L. ら, 1962; Shimazaki K. ら, 1985)。しかしリン酸カルシウムは吸収に時間を要すること、そして骨誘導能に乏しい事が問題点として挙げられていた (Daculsi G. ら, 2004)。特に非焼成 HA は  $\beta$ -TCP に比較し、骨伝導能に優れるが、生体への吸収は遅延すると報告

されている (Doi Y. ら, 1999)。

2000 年以降にはリン酸カルシウム製人工骨と生体吸収性人工素材の組み合わせによって、互いの長所を生かし短所を補う概念を有する新しい吸収性人工骨の開発が進められた (Kasuga T. ら, 2003; Kunze C. ら, 2003)。この組み合わせは適切な強度を有し、自家骨との直接的な癒合を獲得し、そして人工骨の吸収過程と骨形成の調和のとれた治癒過程を得ることを目的としている。HA/PDLLA 製人工骨は異所性の骨形成を示す骨誘導能と優れた生体適合性、そしてウサギの骨内において良好な生体吸収性を示した (Hasegawa S. ら, 2007) 第 4 章の結果からは  $\beta$ -TCP 製人工骨と比較した際には HA/PDLLA 製人工骨は自家骨置換の進行が遅延する傾向が認められたが、人工骨内部には I 型コラーゲン陽性組織、RUNX2 陽性細胞が多数確認され、自家骨への置換が停止しているのではなく徐々に進行していることが認められた。現在までに、HA/PDLLA 製人工骨は非荷重下において良好な置換を行う事が証明されたが、荷重部位における置換過程について検討されていない。そこで、本検討では HA/PDLLA 製人工骨の荷重部位における皮質骨形成と置換過程を  $\beta$ -TCP 製人工骨と比較し、HA/PDLLA 製人工骨の荷重部位における有用性について検討を行った。

## 5.2 材料と方法

### 5.2.1 生体吸収性人工骨

HA/PDLLA 製人工骨は第 4 章と同じ素材を使用した。対照として  $\beta$ -TCP 製人工骨は気孔率 60%、圧縮強度 20MPa の Osferion 60<sup>®</sup> (Olympus Terumo Biomaterials, Tokyo, Jpn)を使用した。

両人工骨は共に 15×10×10mm、かつ中心領域に直径 3mm の円筒形の孔を作成した。

### 5.2.2 供試動物

一般状態と筋骨格系に異常のない 9 頭の雄の健常ビーグル成犬を使用した。全ての供試動物の年齢は実験開始時には 11.4±0.5 ヶ月齢、平均体重は 10.3±0.7 kg であった。実験群はその観察期間により、1 ヶ月群、3 ヶ月群、12 ヶ月群の 3 群を設定し各群 3 頭の合計 9 頭を実験に供試した。今回の実験で実施した一連の外科的手技と術後管理の方法は日本獣医生命科学大学の動物倫理委員会の承認を得て行った。

### 5.2.3 外科的手技

すべての供試動物に対して前処置としてドロペリドール(0.5mg/kg, im)を使用し、プロポフォール(7mg/kg, iv)を使用して麻酔導入を行った。気管内チューブを挿管しイソフルランと酸素を使用した維持麻酔を行った。また硬膜外鎮痛として塩酸ブプレノルフィン(5µg/kg)、塩酸ブピバカイン(0.5mg/kg)を使用した。供試動物の左右の後肢を剃毛後、無菌的処置を施し、最初に右側脛骨骨幹部に内側アプローチを行い、脛骨骨幹部内側面を露出した。事前に単純 X 線内外側像より脛骨長を計測し、その脛骨中央部 15mm をサジタルソーを使用して切除した。その後、10×10×15mm の直方体の中心に直径 3.0mm 空洞を作成した HA/PDLLA 製人工骨を挿入した(HP 群)。その後、81mm 長、9 穴の Locking Compression plate( LCP, Synthes, SE)を、φ2.7mm×16mm の Locking Head screw ( Synthes, SE ) で近位と遠位にそれぞれ 3 本ずつの架橋固定を行い、その後は定法通り閉鎖した。対照として左側の脛骨には右側と同じ位置に同様の手順で β-TCP 製人工骨を挿入し、定法通り閉鎖した(TCP 群)。動物は術後の

安静そして、処置肢の浮腫予防を目的に2週間のロバート・ジョーンズ包帯法を装着した。

術後14日間は感染予防を目的としてセフメタゾン(25mg/kg SC)と疼痛管理のためにブプレノルフィン(20µg/kg IM)を1日2回投与した。観察期間中、動物はケージレストとした。一定期間の経過観察を行った後に、ペントバルビタールナトリウムの過剰投与により安楽死を実施した。

#### 5.2.4 単純X線検査

手術日から1、3、6、9、12ヶ月後に両後肢の前後像と内外側像を撮影し、人工骨と宿主骨との癒合状況や人工骨の破損や逸脱、さらに固定器具の破損の有無を確認した。

#### 5.2.5 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量測定

供試動物の安楽死後に、左右脛骨の全てのプレートとスクリューを除去し、X線CT撮影(Asteion, Toshiba medical systems corporation, Tokyo, Jpn)を実施した。120kv・100mAsの1.0mmスライス厚で脛骨全長の撮影を行った。DICOMデータをImage Jに取り込んだ。撮影したCT画像はウインドウ幅1500HU、ウインドウレベル300HUの条件下で評価した。CT撮影時には標準骨塩量ファントム(B-MAS 200, Kyoto Kagaku, Jpn)を同時に撮影し、QCT法により中央部分の横断面における人工骨領域の $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量の測定を行った。

#### 5.2.6 組織学的評価

X線CT撮影後に左右の脛骨を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液にて7日間固定した。横断面中央にて人工骨を切断し、近位部を脱灰標本、遠位部を非脱灰標本とした。10%EDTA液を使用して脱灰を行い、その後パラフィン包埋を実施し、矢状断面5µm厚で薄切し、HE

染色ならびに鍍銀染色を実施した。

遠位部は 30、50、70、80、90 そして 100%のエタノールにそれぞれ 2 日ずつ浸漬させ、脱水した後に、LR ホワイトレジジン(LONDON Resin company Ltd.)を使用して包埋した。バンドソー(BC-3000CP, EXAKT cutting system)を使用して切断した後に、ダイヤモンドペーパーを使用して研磨し、完成した組織切片には villanueva goldner 染色を実施した。

### 5.2.7 免疫組織化学染色

脱灰標本に対して、脱パラフィン処理を施した後に免疫組織染色を実施した。

- ・ I 型コラーゲン

polyclonal rabbit anti-collagen type 1 (1:5,000, CosmoBio, Jpn )を 4°Cにて over night させ、二次抗体として anti-rabbit monoclonal secondary antibody (DAKO, Glostrup, DK)を使用した後に DAB(DAKO)にて発色を行った。

- ・ フォン・ウィレブランド因子 (VW 因子 : Von Willebrand Factor)

血管形成は骨折治癒の際には重要な治癒過程の一つである(Hausman MR. ら, 2001)。一次抗体として rabbit polyclonal anti-von willebrand factor (1:2,000, DAKO) を 4°Cにて over night させ、二次抗体として anti-rabbit monoclonal secondary antibody(DAKO)を使用した後に DAB(DAKO)にて発色を行った。

- ・ カテプシン K

一次抗体として goat polyclonal anti-cathepsin K (1:300, Santa Cruz biotechnology)を 4°Cにて over night させ、二次抗体として Anti-goat secondary antibody (Nichirei biosciences inc)を使用

した後に DAB( DAKO )にて発色を行った。

- Runt-related transcriptional factor 2 (RUNX2)

一次抗体として goat polyclonal anti-RUNX2 antibody(1:100, Santa Cruz )を 4℃にて over night  
させ、二次抗体として anti-goat secondary antibody (Nichirei biosciences inc, Tokyo, Jpn)を使用  
した後に DAB( DAKO )にて発色を行った。

### 5.2.8 組織写真を用いた定性評価と面積測定、細胞数計測による半定量評価

鍍銀染色を行った 3 枚の組織標本を使用して、浸潤の認められた線維組織面積を計測し  
た。1 標本の頭側領域 3 視野と尾側領域 3 視野の合計 6 視野を×40 の倍率で撮影した。デジ  
タル画像は BX51( Olympus, Tokyo, Jpn )を使用して撮影を行った。画像は tiff 形式に変換し  
た後に、画像解析ソフト Image J (NIH, Bethesda, MD) を使用して線維組織面積の測定を行  
った。

#### I 型コラーゲン

鍍銀染色によって線維組織と判断した部位の大部分が I 型コラーゲン陽性反応を示し、  
その代表的な部位の写真を撮影した。BX51(Olympus)を使用し、×100 の倍率で撮影した。

#### カテプシン K 陽性細胞数測定

カテプシン K の免疫染色を実施した組織標本 3 枚を、BX51 ( Olympus )を使用して×200  
の倍率で 1 標本から頭側領域 5 視野と尾側領域 5 視野の合計 10 枚の撮影を行った。撮影し  
た画像は tiff 形式に変換した後に、Image J に取り込み、5 核以上かつ、カテプシン K 陽性  
細胞を破骨細胞と定義し細胞数を計測し、その平均値を算出した。

#### VW 因子陽性血管腔数測定

VW 因子の免疫染色を実施した組織標本 3 枚を、BX51 (Olympus) を使用して×100 の倍率で 1 標本からそれぞれ 10 枚の撮影を行った。撮影した画像は tiff 形式に変換した後に、Image J に取り込み VW 因子陽性細胞に囲まれた血管腔数を計測し、その平均値を算出した。

#### Runx2 陽性細胞数測定

Runx2 の免疫染色を実施した組織標本 3 枚を、BX51(Olympus) を使用して×200 の倍率で 1 標本からそれぞれ 10 枚の撮影を行った。撮影した画像は tiff 形式に変換した後に、Image J に取り込み Runx2 陽性細胞数を計測し、その平均値を算出した。

新生骨、類骨、残存人工骨面積評価。

Villanueva goldner 染色 (VG 染色) を行った組織標本上で、新生骨、類骨、そして残存人工骨の各面積測定を行った。組織写真は×20 の倍率にて頭側と尾側領域の中央部分の組織写真をそれぞれ 1 枚ずつ撮影した。取り込んだ画像は同様に Image J を使用して 3 つの面積をそれぞれ計測した。

#### 5.2.9 統計学的処理

$\beta$ -TCP と HA/PDLLA 製人工骨の比較には Mann whitney test、それぞれの人工骨における経時的な変化については Tukey HSD test を使用して有意差判定を行った。統計ソフトは SPSS を使用した。(SPSS, Japan Inc, Tokyo, Japan)  $p < 0.05$  をもって有意差ありと判定した。表記はすべて平均±標準偏差とした。

#### 5.3 結果



### 5.3.1 単純 X 線検査

単純 X 線の変化は前後像を Figure 5-1 に、内外側像を Figure 5-2 に示した。Figure 5-1 と Figure 5-2 は共に A、B は術直後、C、D は術後 1 ヶ月、E、F は術後 3 ヶ月、G、H は術後 6 ヶ月、I、J は術後 9 ヶ月、K、L は術後 12 ヶ月に撮影した。さらに A、C、E、G、I、K は右側に埋植された HP 群、B、D、F、H、J、L は左側に埋植された TCP 群である。腓骨骨折が術後 1 ヶ月から 3 ヶ月において 6 頭、左側 3 肢、右側 5 肢の合計 8 肢で確認された。3 ヶ月以降では新たに腓骨に骨折や再骨折は認められなかった。また、移植した人工骨の変位や破損、そして脛骨の固定インプラントの破損はすべての実験犬で認められなかった。

前後像では HP 群に比較し、TCP 群は術後から高い X 線不透過性を示していた。術後 12 ヶ月までの全観察期間を通じてこの傾向が認められた。12 ヶ月では単純 X 線検査において両人工骨共に髓腔構造が明確に認められた (Figure 5-1 K, L)。

内外側方向では HP 群は HA/PDLLA 製人工骨自体の X 線不透過性が徐々に充進してくる傾向が認められたが、TCP 群では  $\beta$ -TCP 製人工骨の周囲を覆うような仮骨の形成が顕著に認められた。9 ヶ月を経過した段階で、内外側方向からは HP 群では人工骨と宿主骨との境界面は不明瞭であり (Figure 5-2 I)、宿主骨との連続性が認められたが、TCP 群では宿主骨との境界面が明瞭であり、さらに仮骨内部に人工骨自の形状が明瞭に維持されていた (Figure 5-2 J)。これは 12 ヶ月群においてもそれぞれ同様の所見が認められた (Figure 5-2 K, L)。

### 5.3.2 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 相当量

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の測定結果は Figure -3 に示した。HP 群では術後 1、3 ヶ月と比較し術後

12ヶ月において有意な  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の上昇が認められた (vs 1 month, 3 month:  $p < 0.01$ )。

TCP 群では術後 1、3ヶ月と比較し術後 12ヶ月においては有意  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量の減少が認められた (vs 1 month, 3 month:  $p < 0.01$ )。HP 群と TCP 群の同月の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量を比較した時、術後 1ヶ月 ( $p < 0.01$ ) と 3ヶ月 ( $p < 0.01$ ) の時点では TCP 群の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量は HP 群に比較し有意に高値を示したが、術後 12ヶ月では HP 群と TCP 群の  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  相当量に有意差は認められなかった。

### 5.3.3 組織学的検討

HE 染色を実施した組織標本は Figure 5-4 に示した。Figure 5-4 A、C そして 4E は TCP 群、Figure 5-4 B、D そして F は HP 群のそれぞれ術後 1、3、そして 12ヶ月の経過を示した。低倍率で 2つの人工骨を比較した際には、骨形成については同程度の形成過程が認められたが、人工骨の吸収については TCP 群に比較し HP 群では比較的早い段階から吸収が促進されている傾向があった。また、それぞれの人工骨における置換過程に相違が認められた。特徴的な所見として TCP 群においては、線維組織の浸潤はわずかに認められるのみであったが、HP 群では線維組織の浸潤が非常に強く認められた。

### 5.3.4 成熟骨、類骨、そして残存人工骨面積測定

VG 染色標本から成熟骨、残存人工骨そして類骨面積の測定を行った。組織標本は Figure 5-5 に示した。それぞれの面積を計測した結果はそれぞれ Figure 5-6 A, B, C に示した。Figure 5-6 A より両群ともに経時的な骨形成面積の増加が認められた。両群とも術後 1ヶ月と術後 3ヶ月 (TCP group:  $p = 0.03$ , HP group:  $p = 0.04$ )、そして術後 3ヶ月と術後 12ヶ月 (TCP group:

p<0.01、HP group : p<0.01) の間に有意差が認められた。残存人工骨面積については Figure 5-6 B より両群ともに経時的な減少傾向が認められたが、HP 群では術後 1 ヶ月と術後 3 ヶ月 (p<0.01)、そして術後 3 ヶ月と術後 12 ヶ月 (p<0.01) の間で有意な減少が認められた。一方で TCP 群では術後 3 ヶ月と術後 12 ヶ月 (p<0.01) の間で有意な減少が認められた。HP 群は全期間を通じて TCP 群に比較し残存人工骨面積が有意に少ないことが認められた (1 month : p<0.01、3 month : p<0.01、12 month : p=0.04)。figure 5-6 C より術後 1 ヶ月と 3 ヶ月では両群ともに類骨はごく僅かに認められるのみであった。しかし、術後 12 ヶ月の時点では両群とも術後 3 ヶ月に比較し有意な類骨面積の増加が認められ (HP group : p<0.01、TCP group : p<0.01)、特に TCP 群では HP 群に比較しても有意な類骨面積の増加が認められた (p<0.01)。

### 5.3.5 線維組織面積測定

鍍銀染色を実施した組織標本は Figure 5-7 に示した。線維組織面積の測定結果は figure 5-8 に示した。TCP 群では 3 ヶ月においては 1 ヶ月に比較して優位に高値を示し (p<0.01)、12 ヶ月において 3 ヶ月に対して有意に低値を示したが (p<0.01)、すべての期間を通じて線維組織の浸潤はわずかに認められた程度であった (Figure 5-4 A,C,E)。一方、HP 群では TCP 群に比較し強い線維組織の浸潤が認められた (Figure 5-7 B,D,F)。HP 群は 1 (p<0.01)、3 (p=0.04)、そして 12 ヶ月 (p<0.01) とすべての期間を通じて TCP 群に比較し有意な線維組織の浸潤が認められた。HP 群では 1、3 (vs 1 month : p<0.01)、12 ヶ月 (vs 1 month : p<0.01、vs 3 month : p=0.04) と時間経過とともに前回計測値に対して有意に浸潤面積が低下してい

ることが認められた。

### 5.3.6 I型コラーゲン

I型コラーゲンの免疫組織化学染色により得られた組織所見を figure 5-9 に示した。人工骨内に浸潤した線維組織の多くは両人工骨共に I 型コラーゲン陽性反応を示していた。そのため、人工骨内に線維組織浸潤がほとんど認められない  $\beta$ -TCP 製人工骨では Figure 5-9 A. C. E に示すように、わずかに陽性反応が認められたのみであったが、figure 5-6 B. D. F に示すように HP 群では非常に多くの範囲で陽性反応が認められた。特に線維組織浸潤の強く認められた 1、3 ヶ月の HP 群では非常に多くの I 型コラーゲンの陽性反応が認められた。

### 5.3.7 血管腔数測定

VW 因子の免疫組織化学染色により得られた組織所見は Figure 5-10 に示した。VW 因子陽性細胞に囲まれた血管腔数の測定結果は Figure 5-11 に示した。HP 群では、術後 1 ヶ月から多くの血管腔数が認められ (Figure 5-10 B)、3 ヶ月 (Figure 5-10 D) (vs 1 month :  $p<0.01$ )、12 ヶ月 (figure 5-10 F) (vs 1 month :  $p<0.01$ ) と経過日数と共に減少していることが認められた。一方、TCP 群では 3 ヶ月において術後 1 ヶ月と比較して有意な血管腔数の上昇が認められたが ( $p<0.01$ )、12 ヶ月では減少傾向が認められた ( $p<0.01$ )。HP 群と TCP 群を比較した際には 1 ( $p<0.01$ )、3 ( $p<0.01$ )、そして 12 ヶ月 ( $p<0.01$ ) において HP 群が有意に高値を示していた。

### 5.3.8 破骨細胞様細胞数測定

カタプシン K の免疫組織化学染色により得られた組織所見は Figure 5-12 に示した。カタ

プシン K 陽性細胞数の測定結果は Figure 5-13 に示した。術後 1 (p<0.01)、3 (p<0.01) そして 12 ヶ月 (p<0.01) において HP 群は TCP 群に比較して有意なカテプシン K 陽性細胞数の増加が認められた (p<0.01)。HP 群では時間経過と共に有意に陽性細胞数が減少していることが認められた。TCP 群では術後 3 ヶ月の時点で有意な上昇が認められた (p<0.01)。しかし、術後 1 ヶ月の時点での組織浸潤が TCP 群では非常に微弱であり、人工骨内におけるカテプシン K 陽性細胞数はごく僅かであった。術後 3 ヶ月においてもこの傾向は同様であったが、浸潤組織の増加に伴い増加していたことが認められた。HP 群では 1、3 (vs 1 month : p<0.01), 12 ヶ月 (vs 1, 3 month : p<0.01) と時間経過とともに有意な減少が認められた。

#### 5.3.9 RUNX2 陽性細胞数測定

RUNX2 の免疫組織化学染色により得られた組織標本は Figure 5-14 に示した。RUNX2 陽性細胞数の測定結果は Figure 5-15 に示した。HP 群において浸潤が多く認められた紡錘形状の細胞の多くは RUNX2 陽性細胞であった。特に 1 と 3 ヶ月では HP 群において RUNX2 陽性細胞数が多く認められたが、12 ヶ月の時点での発現は 1 と 3 ヶ月に比較し有意な低下が認められた (vs 1, 3 month : p<0.01)。TCP 群は術後 3 ヶ月において 1 ヶ月に比較し有意な陽性細胞数の増加が認められたが (p<0.01)、術後 12 ヶ月は術後 1 ヶ月に比較し高値を示したが (p=0.02)、術後 3 ヶ月に比較し低値を示した (p=0.03)。全観察期間を通じて、RUNX2 陽性細胞数は HP 群に比較し有意に低値を示した。

#### 5.4 考察

本検討の目的は新開発の HA/PDLLA 製人工骨を現在、吸収性人工骨として最も一般的に使用されている  $\beta$ -TCP 製人工骨と比較することで、HA/PDLLA 製人工骨の有用性を評価することである。過去には  $\beta$ -TCP 製人工骨は優れた骨伝導能と骨誘導能を有し、Cutlight D.E らがラット脛骨への埋植実験において、術後 48 日後には 95% が吸収され骨髄の形成まで認められたと報告したように、 $\beta$ -TCP 製人工骨は吸収性に優れた素材であると報告されている (Littlewood-Evans A.J. ら, 1997; Cutright D.E. ら, 1972)。しかし、本検討において、単純 X 線検査では TCP 群は術後 12 ヶ月までの観察期間中にはその形状が intact の形状のまま明確に維持されていたことが確認された。これは使用した  $\beta$ -TCP 製人工骨の気孔率そして使用した形状が影響していると考えられた (Karageorgiou V. ら, 2005)。一方で HP 群は術後 9 ヶ月の時点で宿主骨と人工骨との境界面が認められなくなった。ウサギ大腿骨髄腔への埋植実験では術後 26 週までの経過で HA/PDLLA 製人工骨の X 線透過性の亢進が認められたとされているが、本検討では X 線透過性は徐々に低下し、術後 9 ヶ月では宿主皮質骨と同等の X 線透過性を呈していた。イヌとウサギでは元来の皮質骨の X 線透過性が異なるために、本検討では X 線透過性が徐々に亢進する経過が得られたと考えられた (Hasegawa S. ら, 2005)。時間経過とともに宿主骨と同等の X 線透過性が認められたという点では同様の結果であった。

組織学的評価の結果、骨形成については HP 群と TCP 群は同等の骨形成を示した。残存人工骨について、HP 群は TCP 群に比較し有意に低値を示した。以上の評価項目からは、術後 12 ヶ月目までの観察期間においては、HP 群は TCP 群と同等以上の有用性を有する人工

骨であると考えられた。しかしながら、HP 群では線維組織の浸潤が強く認められるが、TCP 群ではごく僅かに認められたのみであったように、その置換過程には大きな相違が認められた。 $\beta$ -TCP 製人工骨は犬の背部に埋植された実験からは、膜性骨化様に骨形成がなされていると報告された(Kondo N. ら, 2006)。本実験においても Figure 5-4 A、C、E に示したように TCP 群における線維組織の浸潤は HP 群に比較しわずかであり、さらに Figure 5-5 E に示したように術後 12 ヶ月の VG 染色から非常に多くの類骨が認められたことから、膜性骨化様の骨形成過程を経ていることが示唆された。一方で、HP 群では多数の線維組織の浸潤が認められ、その線維組織が徐々に骨へと分化するような骨化様式が認められたことから、それぞれの人工骨における骨形成の特徴を明確にするために鍍銀染色や免疫組織化学染色を実施した。

鍍銀染色による線維組織の面積評価結果から HP 群は TCP 群に比較し全ての観察期間において有意に高値を示した。VW 因子は血管内皮細胞に特異的に発現し (McComb R.D. ら, 1982; Weidner N. ら, 1995)、血管形成は軟骨内骨化、膜内骨化の両方の骨形成様式において重要な役割を果たすとされている(Harper J. ら, 1999)。血流を通じて、各種ホルモン、栄養、酸素、そして様々な細胞が人工骨内へと宿主より運搬される(Jienau J. ら, 2009)。さらに、骨折症例においては血液供給の不足は癒合遅延や癒合不全の原因となる事が報告されていることから、血管形成は宿主の様々な細胞が人工骨内部へと浸潤する際には非常に重要な過程の一つである (Hausman M.R. ら, 2001)。Figure 5-10.11 で示したように HP 群は TCP 群に比較し有意に多くの血管腔数が形成されていることが認められた。鍍銀染色と VW 因

子陽性血管腔数の結果から  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し、HA/PDLLA 製人工骨は宿主組織の浸潤性に優れることが示唆された。

人工骨内部に形成された血管により様々な細胞が人工骨内部へと浸潤する。特に人工骨吸収を担う破骨細胞の人工骨への浸潤は重要である。Chazono M.らは破骨細胞による人工骨吸収の後に骨形成がなされると報告している(Chazono M. ら, 2004)。カテプシン K は破骨細胞に豊富に発現している事が知られている (Littlewood-Evans A.J. ら, 1997; Tezuka K. ら, 1994; Inaoka T. ら, 1995)。HP 群では全観察期間を通じて Cathpsin K 陽性細胞の多く認められ、TCP 群に比べ有意に破骨細胞による人工骨の吸収が起きていると考えられた。以上の点から HA/PDLLA 製人工骨は初期の血管形成、さらにはそれに続く破骨細胞吸収が非常に迅速に行われていることが示唆された。

線維組織内部に浸潤していた線維の大部分は I 型コラーゲン陽性であり、さらに浸潤細胞の多くは抗 RUNX2 抗体陽性反応を示した。HP 群においては TCP 群に比較し有意に多数の抗 Runx2 抗体陽性細胞が認められた。RUNX2 は骨形成をはじめ、置換過程において中心となって作用する必要不可欠な転写因子である。その役割として、RUNX2 は間葉系細胞が骨芽細胞へと分化するために不可欠であり、I 型コラーゲンの発現を活性化することや、血管形成にも関係していることが報告されている (Komori T. ら, 2006; Komori T. ら, 2005; Inada M. ら, 1999; Kim I.S. ら, 1999)。RUNX2 は骨形成だけでなく骨吸収に対しても影響する。Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) – RANK シグナルが破骨細胞形成には不可欠であるが、RUNX2 は骨芽細胞への分化を促進することによって RANKL 発現を促進し、そ



れにより破骨細胞形成を促進することが報告されている (Hsu H. ら, 1999; Nakagawa N. ら, 1998; Enomoto H. ら, 2003. )。HP 群では TCP 群と比較し、RUNX2 陽性細胞が全観察期間を通じて有意に多く認められたことから、自家骨への置換過程が活性化されていることが示唆された。

一般的には吸収性人工骨は強度に劣るために、荷重部位での使用は避けられていたが Liu G. らは適切な固定器具の使用により、強度に劣る吸収性人工骨の荷重部位への使用が可能であると報告した(Liu G. ら, 2008)。しかしながら、報告の中で Liu G. らは広範囲の骨欠損に対しては  $\beta$ -TCP 製人工骨単体での使用では良好な骨形成は得られないとも結論づけた。つまり、海綿骨移植や何らかの成長因子の添加が広範な骨欠損に対する治療には不可欠であるとした。本検討においては広範な骨欠損に対して人工骨単体の移植によって良好な骨形成が得られ、過去の報告とは異なる結果が得られた。これは動物種、人工骨の気孔径、気孔率、さらには人工骨に作成した髄腔様構造など様々な要因がその原因として考えられたが、骨癒合に至った最大の要因は骨欠損を血液供給が十分に得られる健常ビーグル犬の脛骨に作成したことであると考えられた。

HA/PDLLA 製人工骨は過去に行われた皮下への埋植実験において、術後 3 週間には軟骨組織や軟骨細胞の形成が認められた(Hasegawa S. ら, 2007)と報告されたが、本検討においては認められなかった。これは力学的負荷のかかる環境がその理由の一つと考えられたが、詳細は不明である。

Ozawa M. らは 167 例の  $\beta$ -TCP 製人工骨の臨床例において移植部位において放射線学的に自

家骨置換が進行していることを報告したが、その一方で、 $\beta$ -TCP 製人工骨は複雑な形状をした欠損部への補填が非常に困難であり、HA/PDLLA 製人工骨はメスや熱変形によって様々な形状の欠損部への成型が容易であることから、HA/PDLLA 製人工骨は外科医にとって術中の取り扱いが容易なより有用な人工素材であると推測された(Ozawa M. ら, 2000)。

以上の点から、HA/PDLLA 製人工骨は  $\beta$ -TCP 製人工骨と同等の骨形成能を有し、吸収性と操作性に優れる新たな吸収性人工骨であると考えられ、新たな吸収性人工骨としての臨床応用が期待された。しかしながら、本検討は 12 ヶ月を観察期間として設定したが、両人工骨共に完全置換には至っていない。人工骨の残存は臨床的に疼痛や機能障害を惹起することから、より長期間の観察を行う必要が考えられた。また、本検討は健常動物に作成した新鮮骨切除モデルを使用した検討であり、様々な程度の血行障害を伴う臨床的に発生する骨折後癒合不全症例に対しては条件が著しく異なる。

### 5.3.5 小括

- 1 第4章の結果から、HA/PDLLA 製人工骨は置換過程が遅延する傾向が認められたが、荷重部位においてはHA/PDLLA 製人工骨は  $\beta$ -TCP 製人工骨と同等の骨形成と優れた生体吸収性が認められた。
- 2 HA/PDLLA 製人工骨は優れた組織浸潤性が認められ、人工骨内部には多くの宿主細胞や組織の浸潤が認められた。 $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し、血管腔、COL I 陽性組織、RUNX2 陽性細胞が有意に多く認められた。このことから、人工骨内部における置換過程が

HA/PDLLA 製人工骨では $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し活性化していることが示唆された。

- 3 両人工骨ともに完全吸収は認められなかったことから、より長期的な経過観察が必要であると考えられた。さらに近年、注目されている骨分化を促進させる成長因子の添加は人工骨内部に多くの細胞を有するHA/PDLLA 製人工骨では $\beta$ -TCP 製人工骨への添加以上に有用な結果が得られると期待された。

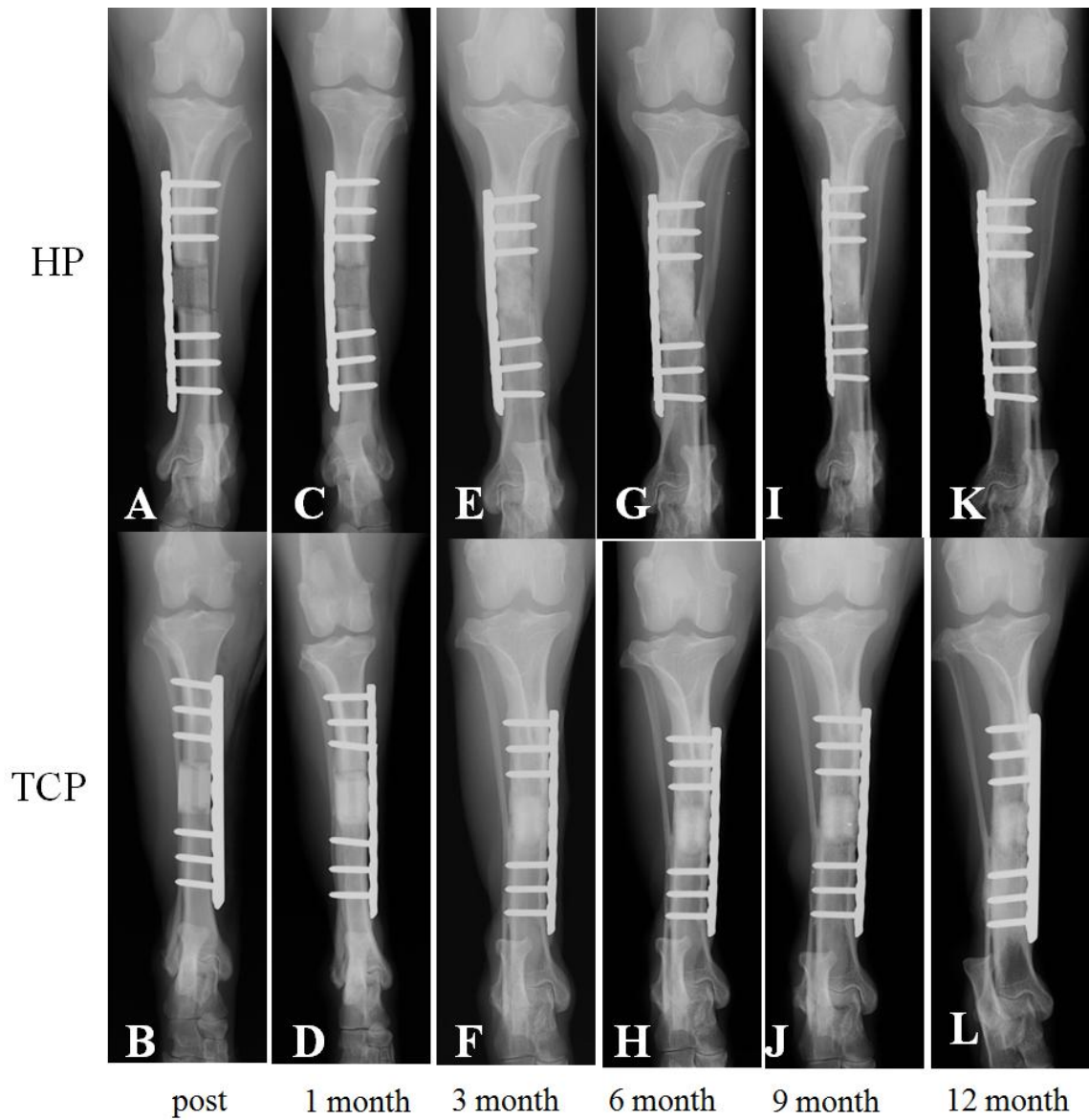


Figure 5-1 : 術後の単純 X 線検査所見 (前後方向像)

A・B : 術直後, C・D : 術後 1 ヶ月, E・F : 術後 3 ヶ月, G・H : 術後 6 ヶ月,

I・J : 術後 9 ヶ月, K・L : 術後 12 ヶ月

A・C・E・G・I・K : HA/PDLLA 製人工骨

B・D・F・H・J・L :  $\beta$ -TCP 製人工骨

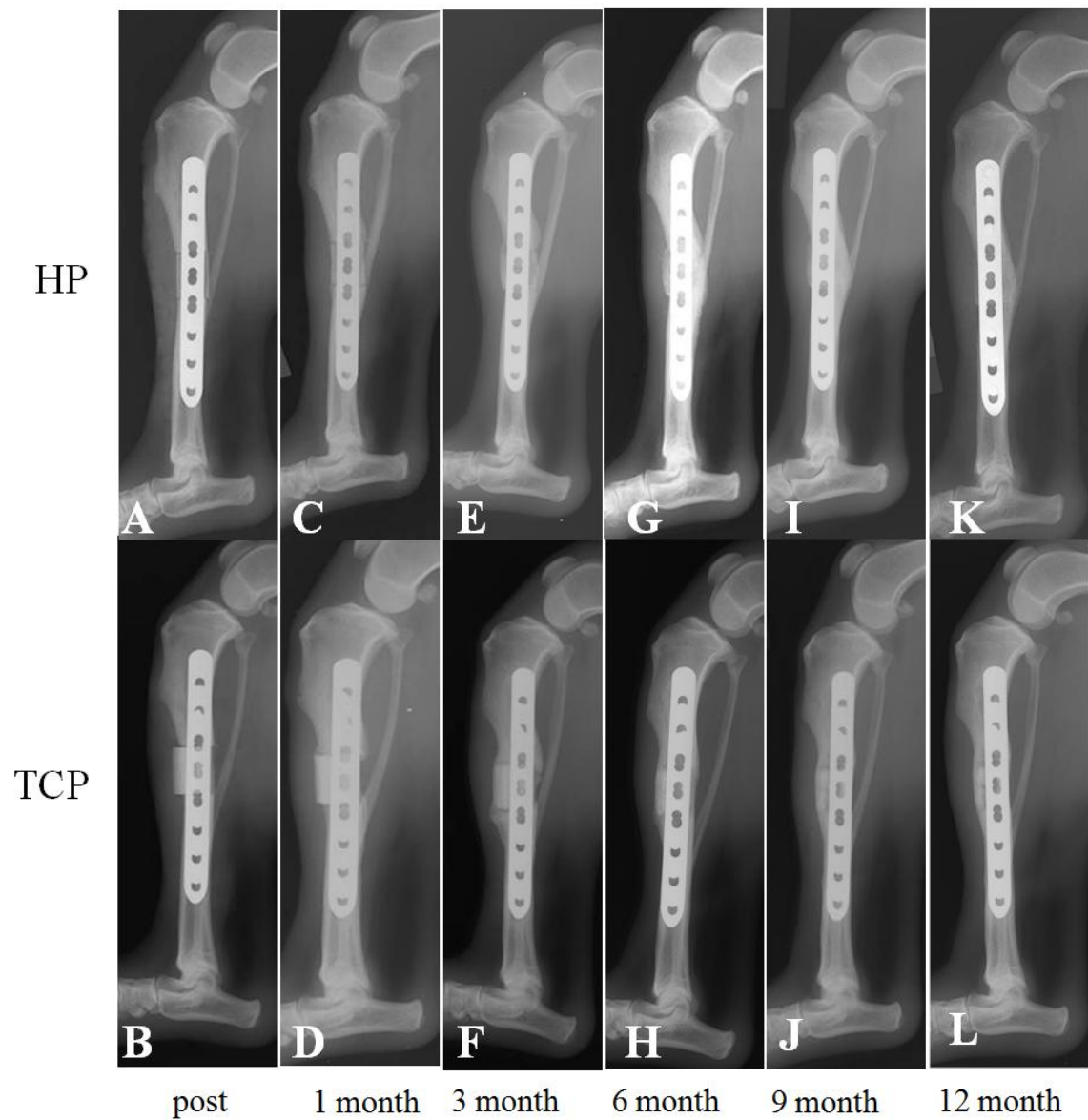


Figure 5-2 : 術後の単純 X 線検査所見 (内外方向像)

A・B : 術直後, C・D : 術後 1 ヶ月, E・F : 術後 3 ヶ月, G・H : 術後 6 ヶ月,

I・J : 術後 9 ヶ月, K・L : 術後 12 ヶ月

A・C・E・G・I・K : HA/PDLLA 製人工骨

B・D・F・H・J・L :  $\beta$ -TCP 製人工骨

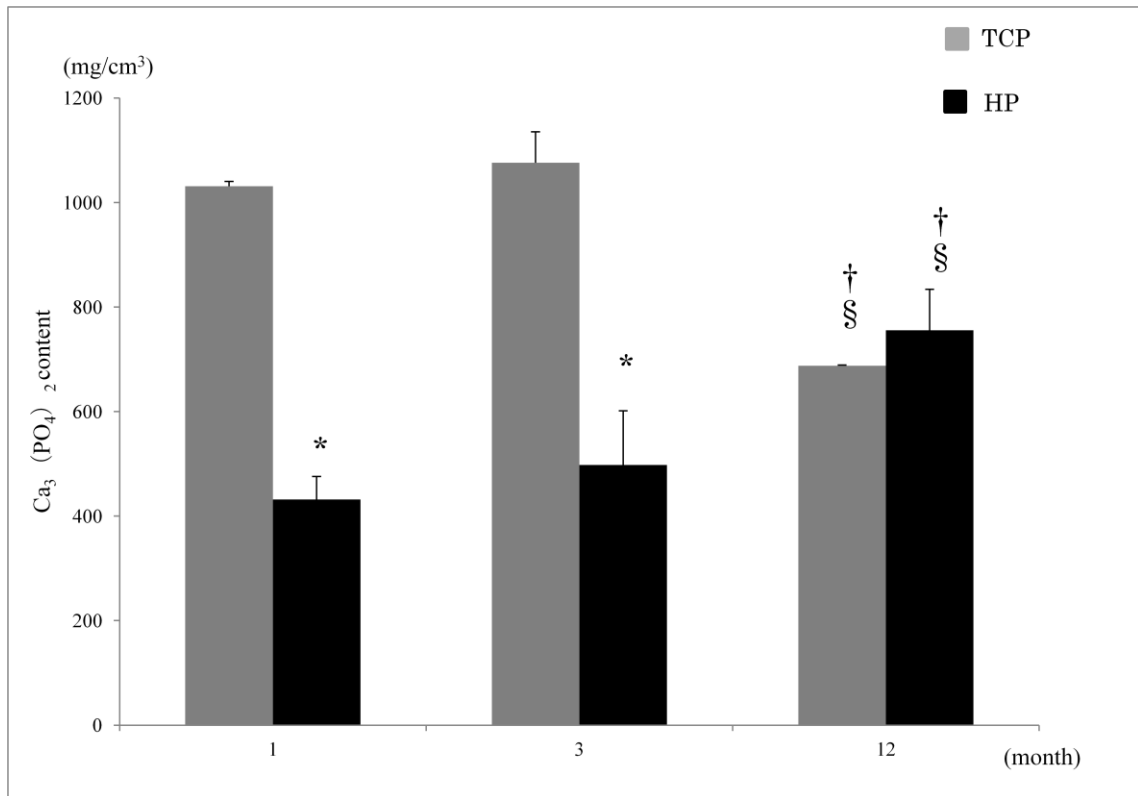


Figure 5-3 : Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 相当量

TCP group (grey box)、HP group (black box) (全て n=3)

\* . . . TCP group vs HP group (p<0.05 : Mann-Whitney U test)

† . . . vs 1 ヶ月 (p<0.05 : Tukey HSD test)

§ . . . vs 3 ヶ月 (p<0.05 : Tukey HSD test)

Value : mean ± S.D.

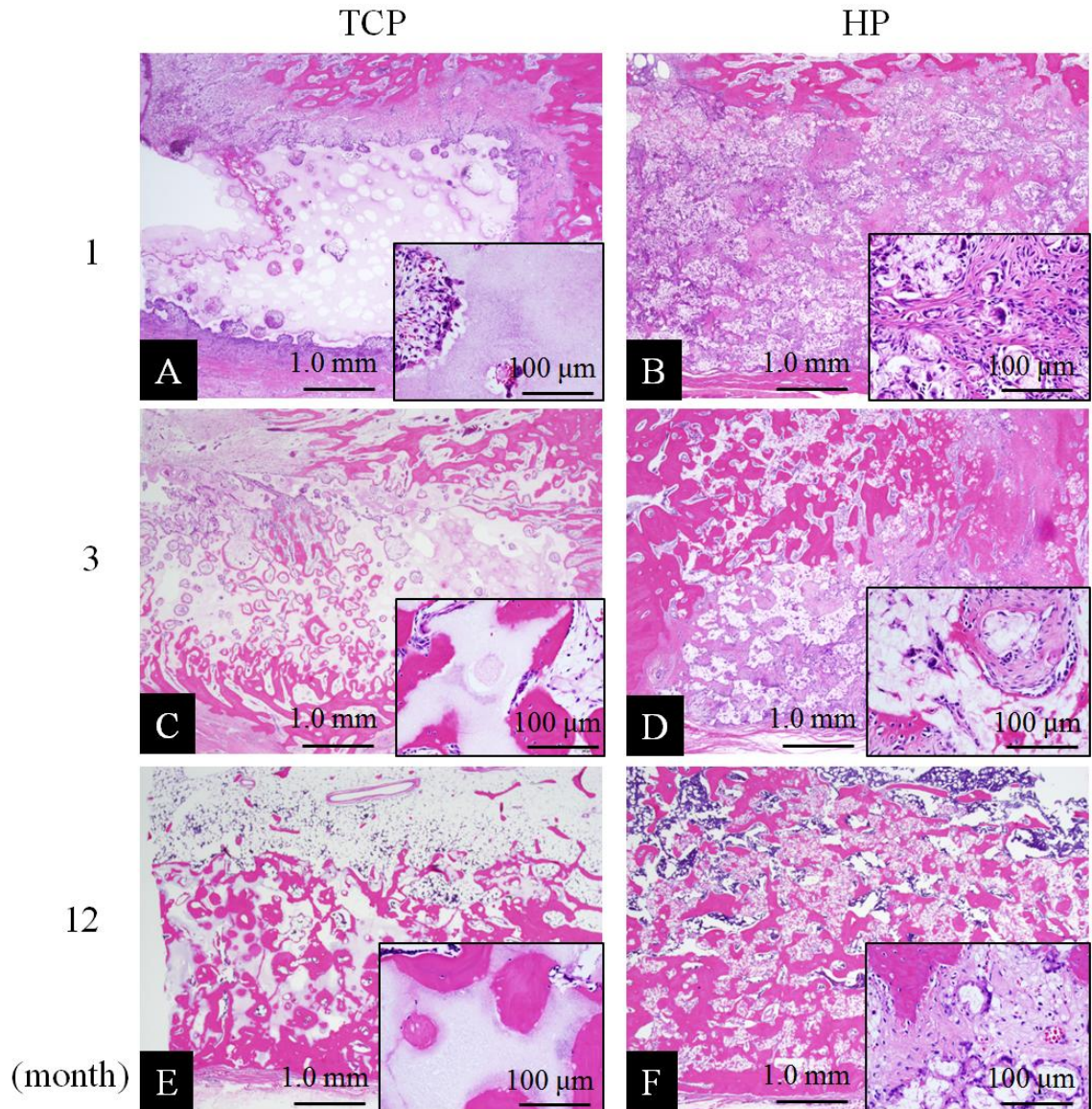


Figure 5-4 : HE 染色 12.5 倍、200 倍にて観察

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 12 ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group



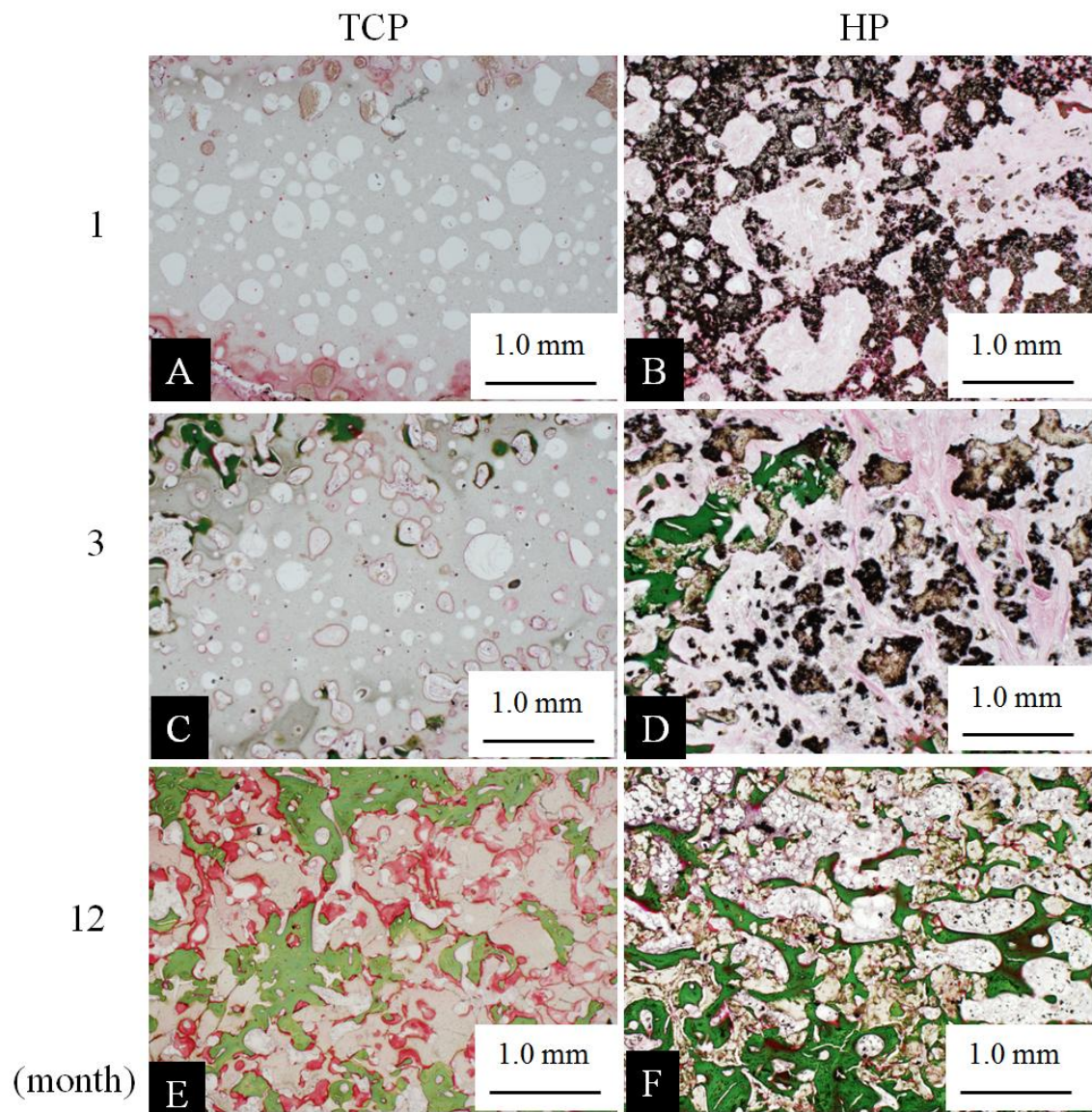


Figure 5-5 : VG 染色 20 倍にて観察

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 12 ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group



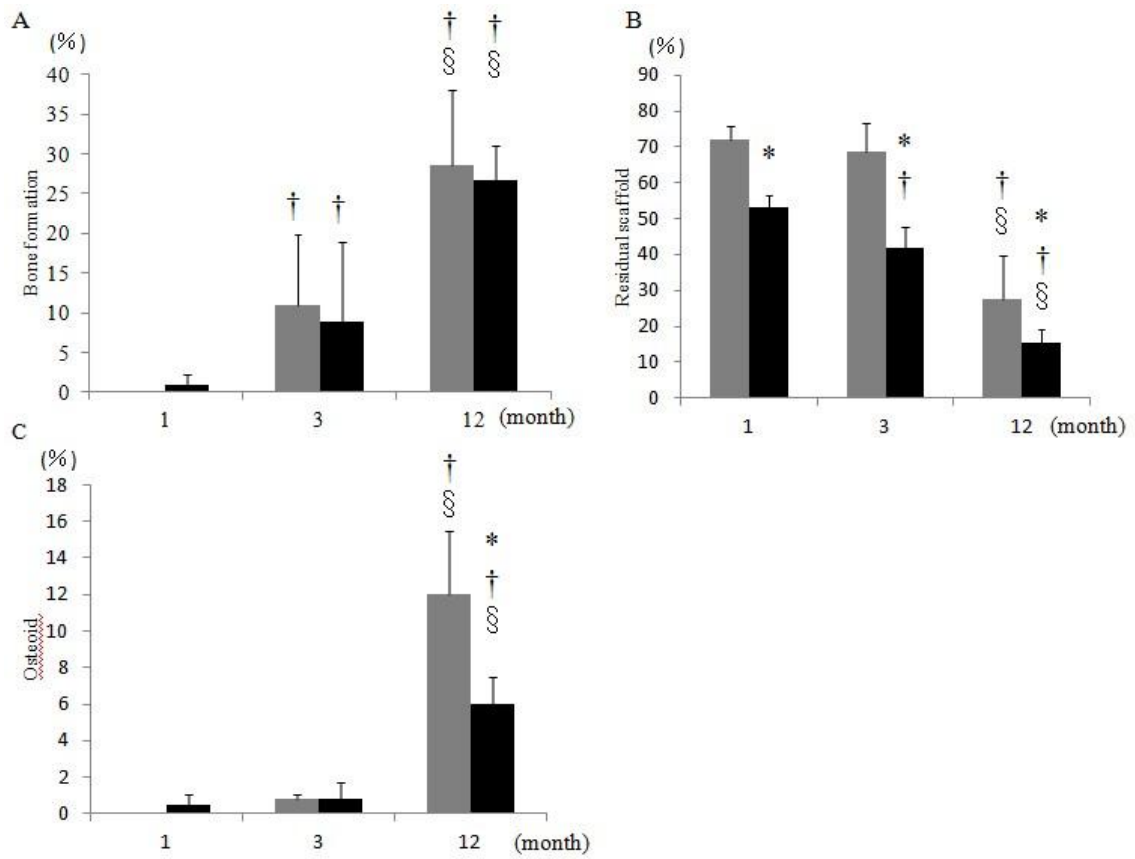


Figure 5-6 A : VG 染色による新生骨面積、B : 残存人工骨面積、C : 類骨面積

TCP group (grey box)、HP group (black box) (全て n=3)

\* . . . TCP group vs HP group ( $p < 0.05$  : Mann-Whitney U test)

† . . . vs 1 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

§ . . . vs 3 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

Value : mean  $\pm$  S.D.

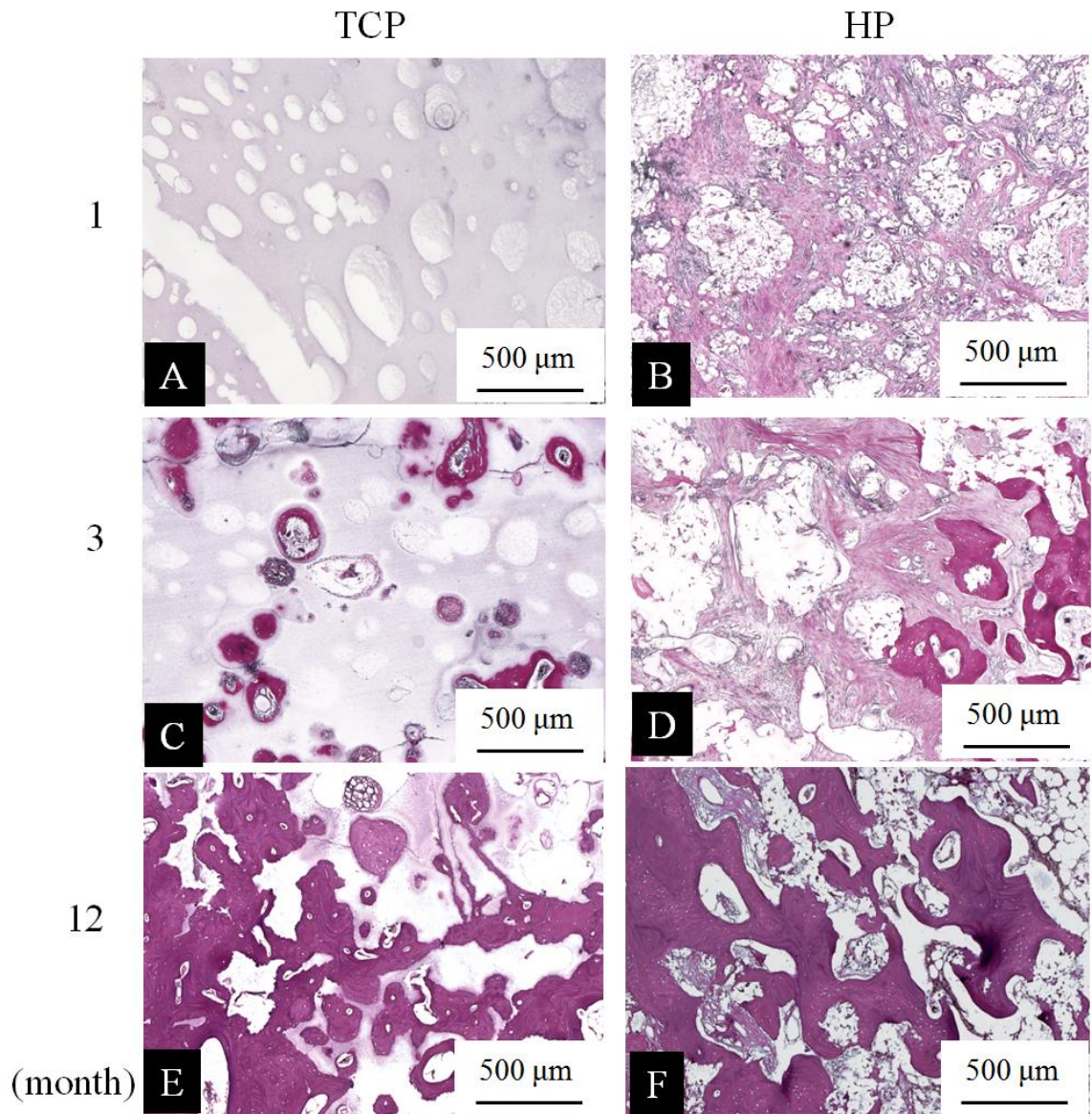


Figure 5-7 : 鍍銀染色 40倍にて観察

A・B : 術後1ヶ月、C・D : 術後3ヶ月、E・F : 術後12ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group

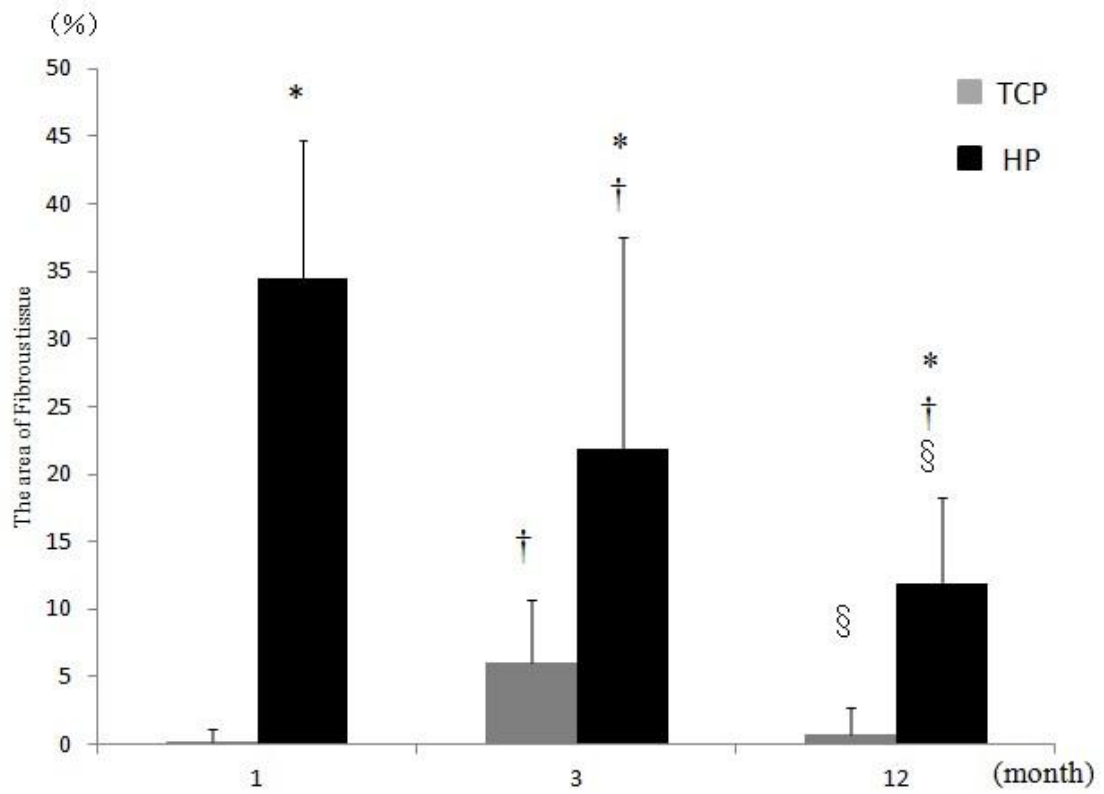


Figure 5-8 : 線維組織面積

TCP group (grey box)、HP group (black box) (全て n=3)

\* . . . TCP group vs HP group ( $p < 0.05$  : Mann-Whitney U test)

† . . . vs 1 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

§ . . . vs 3 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

Value : mean  $\pm$  S.D.

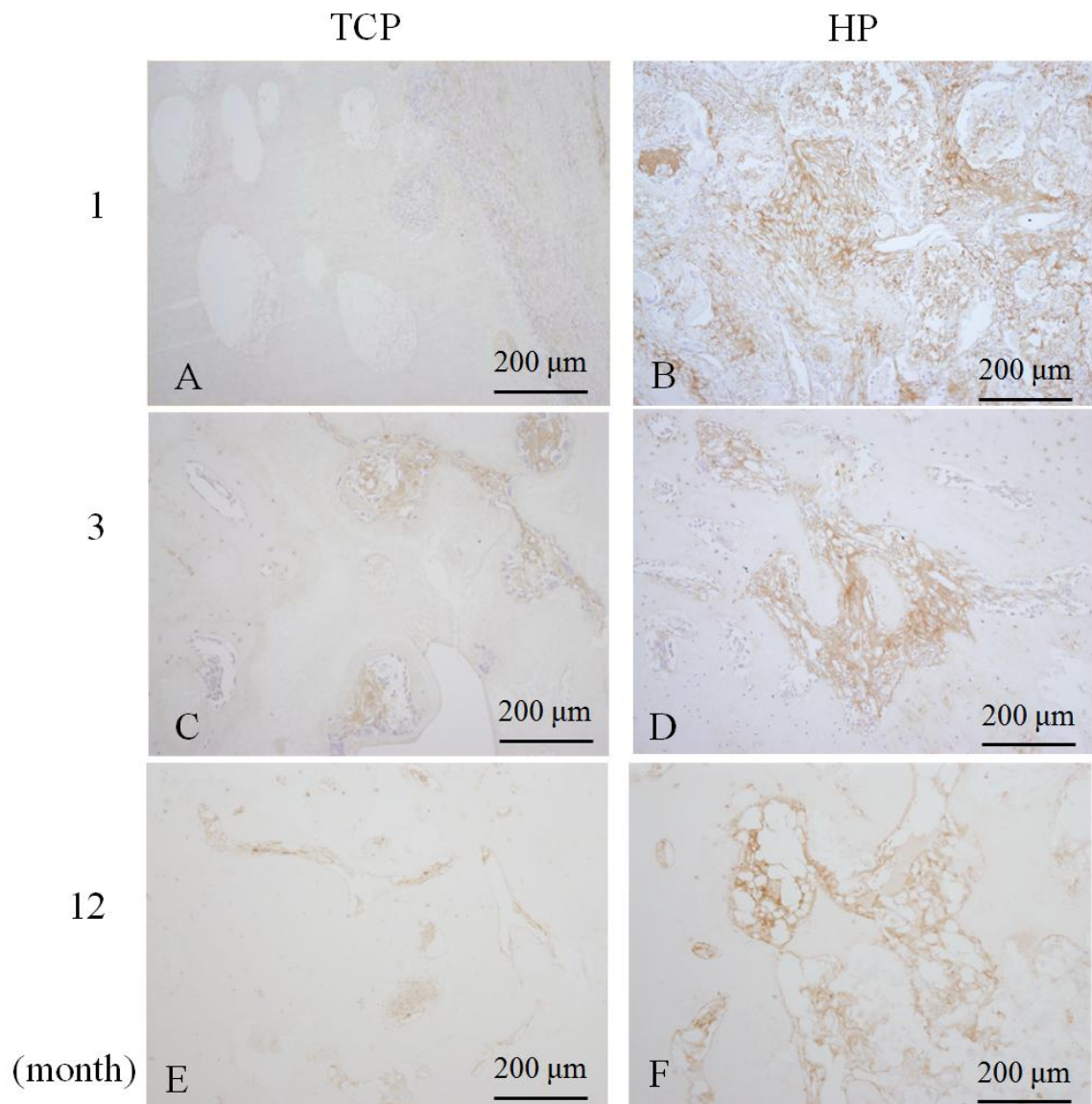


Figure 5-9 : I 型 Collagen 免疫染色結果 100 倍にて観察

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 12 ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group



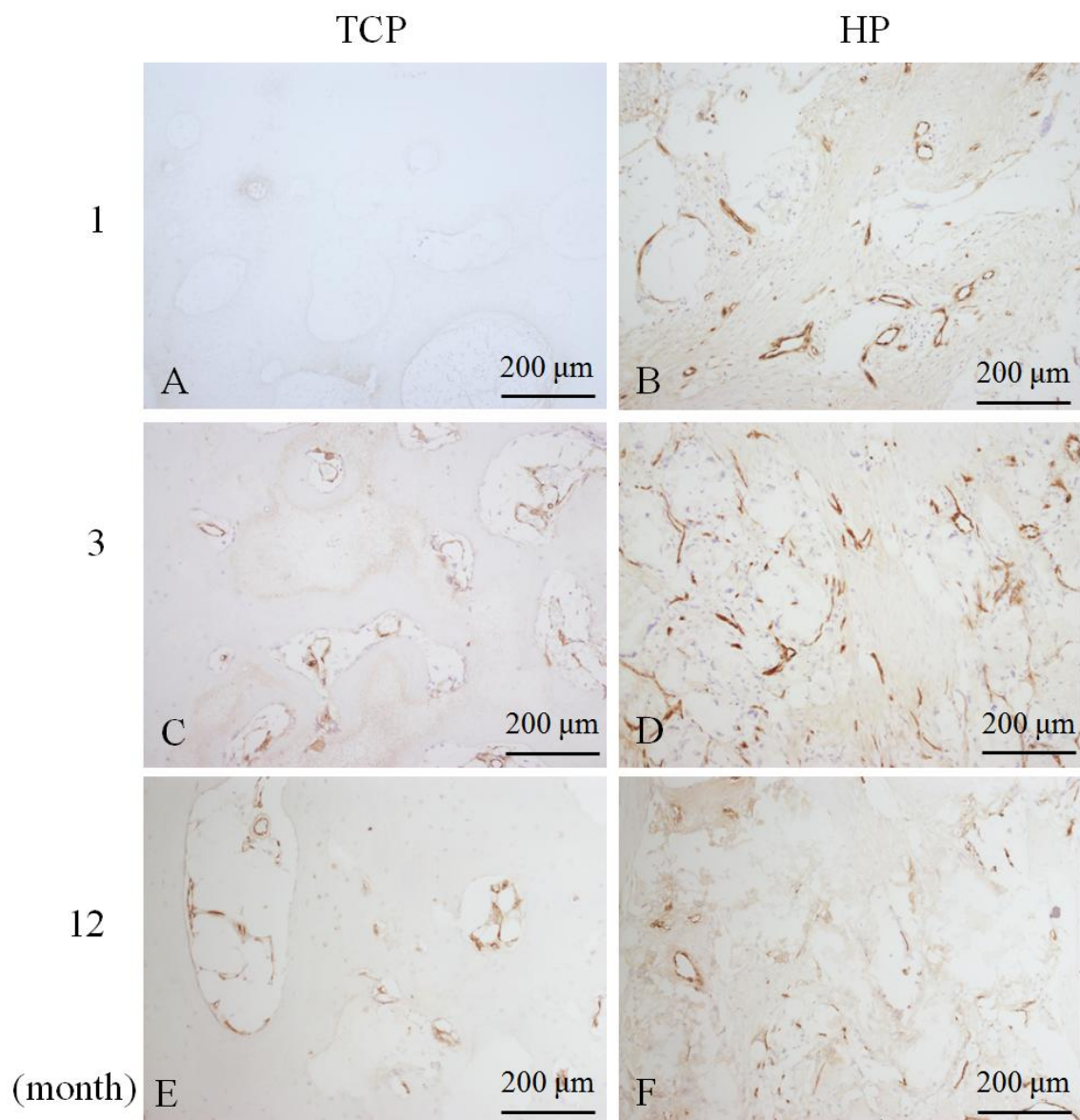


Figure 5-10 : Von willebrand factor 免疫染色結果 (100 倍にて観察)

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 12 ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group

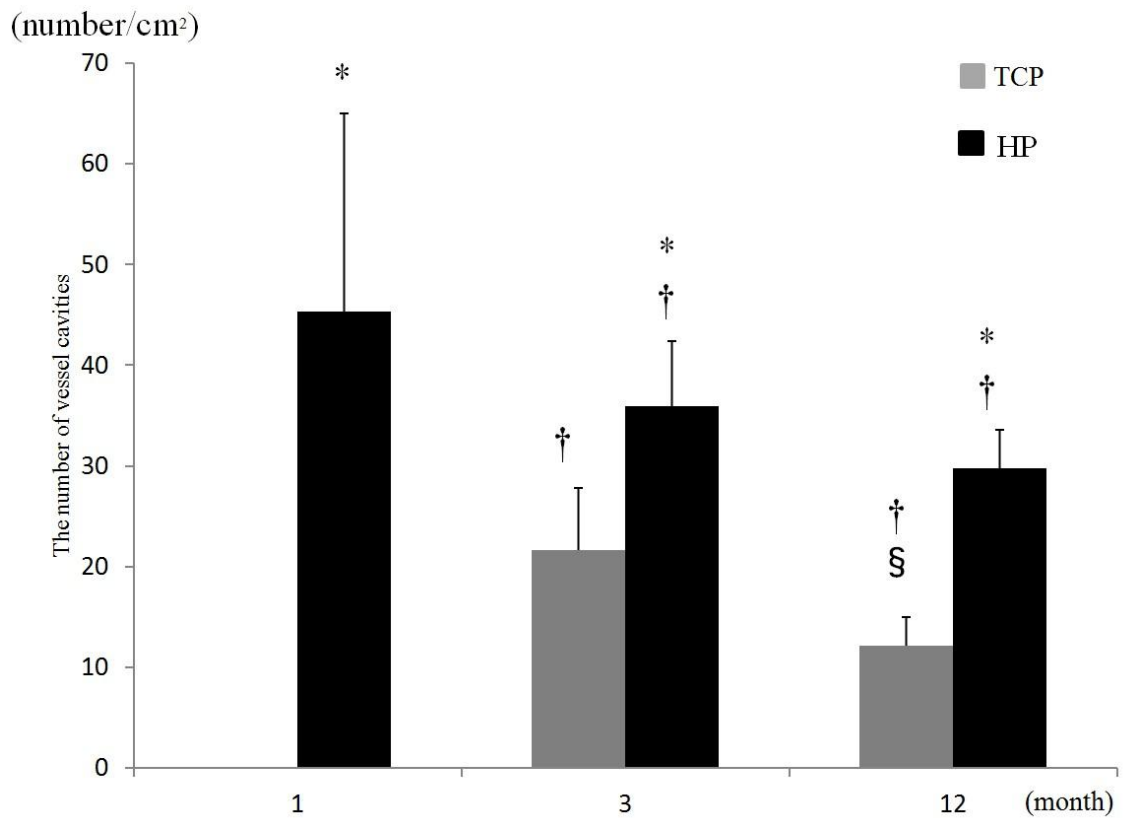


Figure 5-11 : 血管腔数測定結果

TCP group (grey box)、HP group (black box) (全て n=3)

\* . . . TCP group vs HP group (p<0.05 : Mann-Whitney U test)

† . . . vs 1 ヶ月 (p<0.05 : Tukey HSD test)

§ . . . vs 3 ヶ月 (p<0.05 : Tukey HSD test)

Value : mean ± S.D.

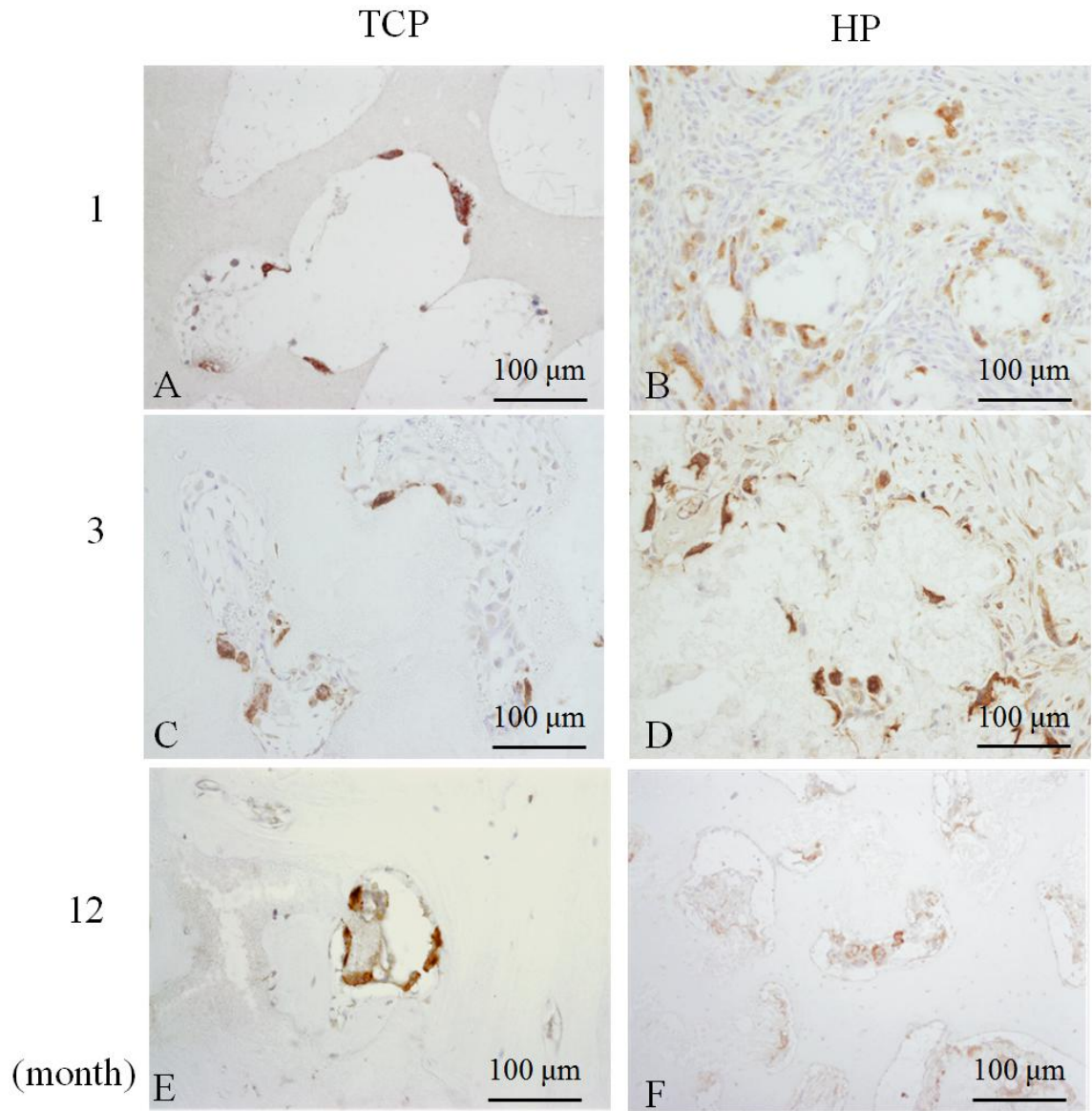


Figure 5-12 : Cathepsin K 免疫染色結果 200 倍にて観察

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 12 ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group

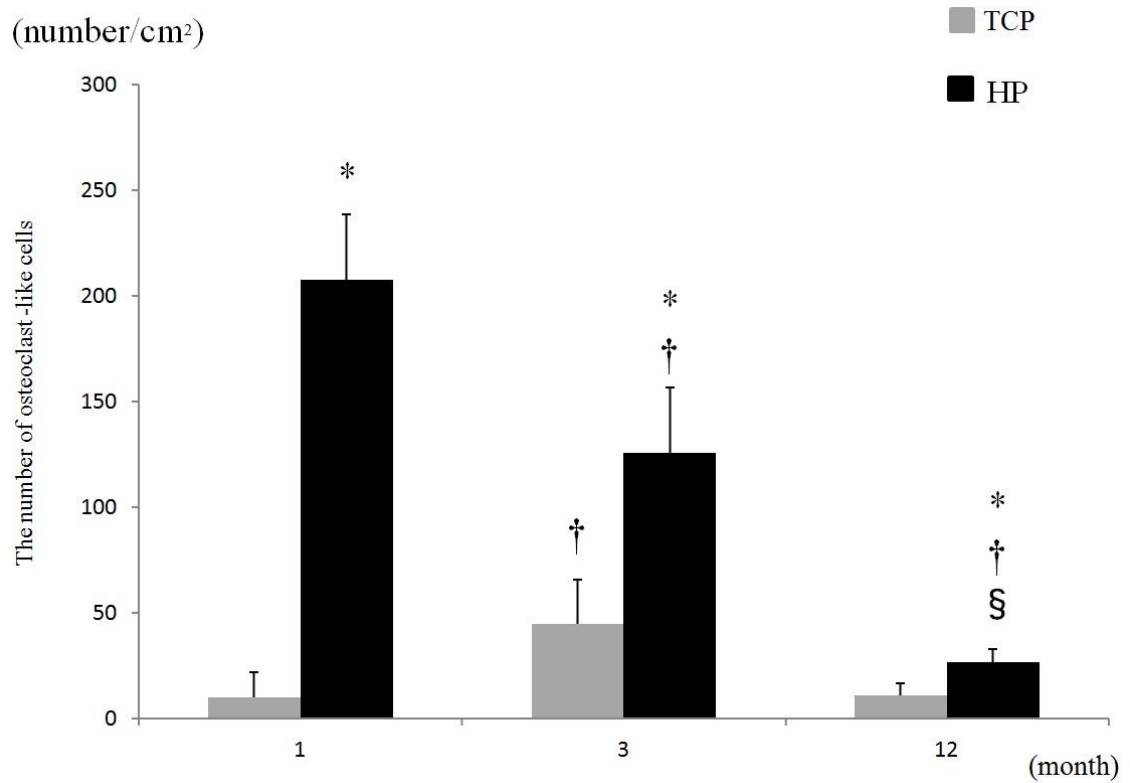


Figure 5-13 : 破骨細胞様細胞数測定結果

TCP group (grey box)、HP group (black box) (全て n=3)

\* . . . TCP group vs HP group ( $p < 0.05$  : Mann-Whitney U test)

† . . . vs 1 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

§ . . . vs 3 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

Value : mean  $\pm$  S.D.



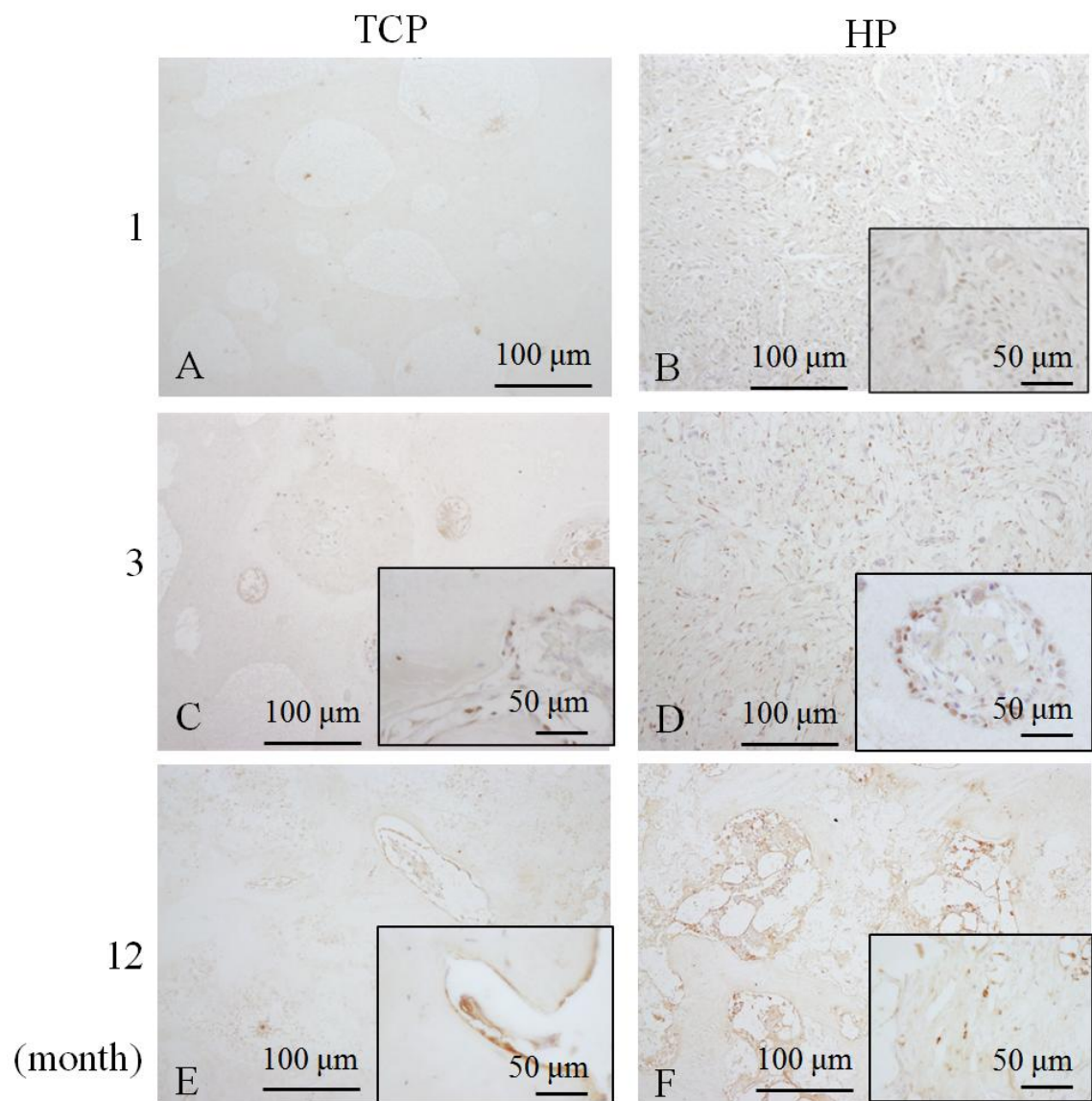


Figure 5-14 : RUNX2 免疫染色結果 (200 倍、400 倍にて観察)

A・B : 術後 1 ヶ月、C・D : 術後 3 ヶ月、E・F : 術後 12 ヶ月

A・C・E : TCP group、B・D・F : HP group

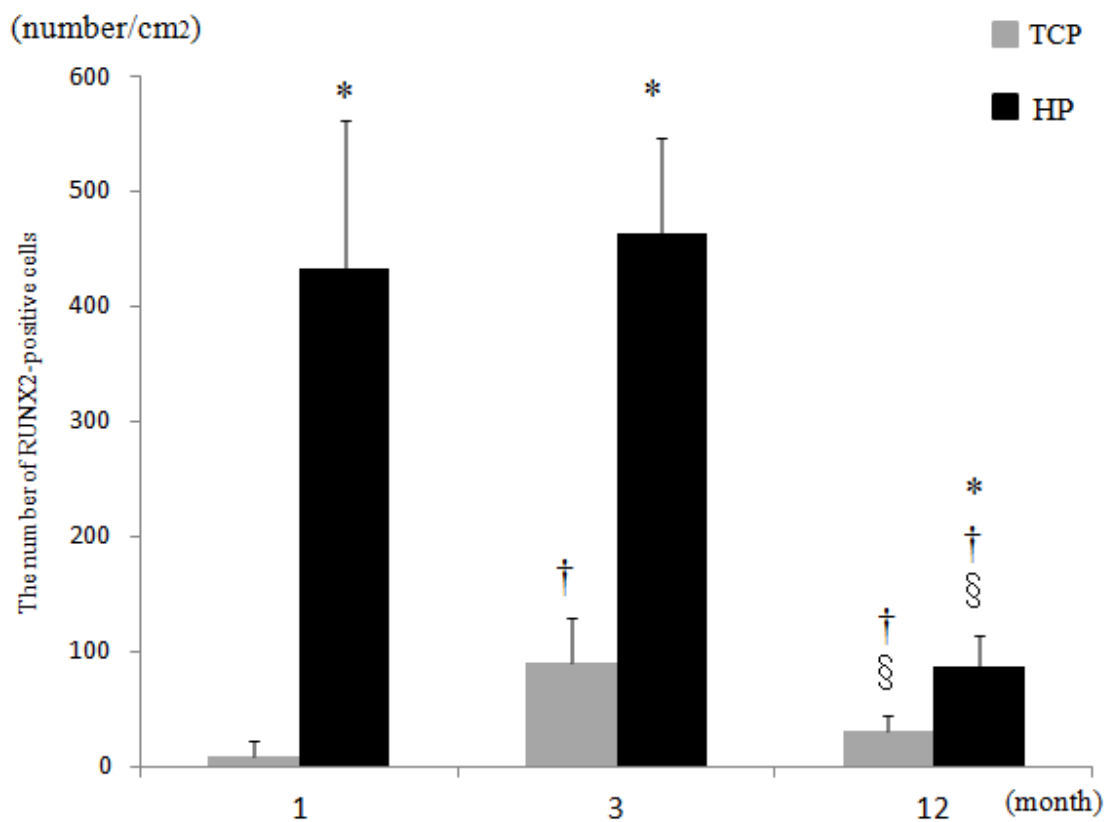


Figure 5-15 : RUNX2 陽性細胞数測定結果

TCP group (grey box)、HP group (black box) (全て n=3)

\* . . . TCP group vs HP group ( $p < 0.05$  : Mann-Whitney U test)

† . . . vs 1 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

§ . . . vs 3 ヶ月 ( $p < 0.05$  : Tukey HSD test)

Value : mean  $\pm$  S.D.

# 第 6 章

## 総括

## 総括

獣医整形外科領域における犬の骨折は発生率7%と報告されており、遭遇する機会が多い疾患の一つである (Johnson J.A. ら, 1989)。癒合不全によって広範囲の骨欠損を有する症例においては骨長の温存が必要となる。骨幹軸の再建術には構造的に欠損部位を充填する必要があり、自家皮質骨移植、同種保存骨移植、吸収性人工骨移植がその候補として挙げられる (Darryl L.M. ら, 2003; Stevenson S. ら, 1999; Ragetly G.R. ら, 2012; Vertenten G. ら, 2010.)。自家骨移植は骨移植においてはゴールドスタンダードとされている。自家骨は骨芽細胞前駆細胞を豊富に含み、骨誘導能と骨伝導能の両方を保持している理想的な素材であるが、同時に患者への外科的侵襲が非常に強いことが問題点として挙げられる (Samartzis D. ら, 2005; Urist M.R. ら, 1967)。同種保存骨は優れた強度、骨伝導能、さらに骨誘導能を有していることから、荷重部位における使用には自家海綿骨に比較しより適切であると考えられた。しかしながら、同種保存骨自体はリモデリングに長期間を要し、さらに-80°Cの条件下で保存するための特殊な設備が必要である (Bacher J.D. ら, 2008; Johnson L.L. ら, 2000; Marsh J.L. ら, 2006; Welch R.D. ら, 2003)。そのため、特殊な設備を必要とせず、管理と術中の取り扱いが簡便であり、より早期に宿主に吸収される吸収性人工骨の開発が望まれていた。

吸収性人工素材は大きく分類すると、PGA や PLA を代表例とする生体吸収性ポリマー、そして HA や  $\beta$ -TCP を代表例とするリン酸カルシウムの2つに分けられる。この内、強度に優れる吸収性ポリマーが吸収性骨接合材料として使用されてきた。過去には PGA、PDS、

PLLA など様々な生体吸収性ポリマーが用いられてきたが、その中で PLLA が骨の癒合において必要とされる期間、適切な強度を保持し、さらに炎症反応を惹起することなく生体へと吸収されると報告された (Rokkanen P.U. ら, 2000; Böstman O. ら, 1992; Nellson J.F. ら, 1977; Hollinger J.O. 1983; Böstman O. ら, 1992)。さらに生体吸収性ポリマーの中で PLLA のみがピエゾ効果を有し、局所における骨形成を有意に促進させることが報告されている。(Ikada Y. ら, 1996)。獣医領域における生体吸収性骨接合材料の使用は主には実験的な報告であり、臨床例へ用いた報告は非常に少ない (Backstorm A.S., ら 2005; Pihlajamäki H. ら, 1992; Tegnander A. ら, 1994; Hara Y. ら, 1994; Hara Y. ら, 1994)。それは、吸収性骨接合材料が金属製インプラントに比較し高価であり、活動制限の困難な小動物においては強度に劣る吸収性骨接合材料は選択肢とならないためである。しかしながら、犬における骨折症例において術後に骨癒合不全が発生する頻度は約 4%とされており、吸収性人工骨はそういった症例のうち広範囲の骨欠損を有する症例への応用が望まれている。(Rudd R.G. ら, 1992; Smith S.G. 1991; Hunt J.M. ら, 1980)。

PLLA は炎症反応を惹起しないと報告されていたが、5 年を超える長期的な観察において遅延性無菌性壊死により疼痛を引き起こすと報告されてきた (Matsusue Y. ら, 1996)。近年、生体適合性に優れたリン酸カルシウムを主成分とする人工素材と PLLA を混合させることで生体適合性を向上させた人工素材の開発が進められており、その人工素材としては特に HA が注目されている。HA は骨を構成する主成分であり、その結晶構造から  $\beta$ -TCP に比較し優れた生体適合性を有し、HA 単体を骨へ埋植した結果、4 週間には宿主骨との直接癒合

が得られたと報告されている (Oyake Y. ら, 2002; Ghosh S.K. ら, 2008)。1993年に Veheyen C.C.らによって HA と PLLA を混合させて作成された HA/PLLA は PLLA に比較し優れた生体適合性を示し、骨との直接癒合を得たと報告されている (Verheyen, C.C. ら, 1993)。

我々は HA と PLLA の組み合わせにより作成された新たな吸収性人工骨が、吸収性人工骨に必要とされる、骨誘導能、骨伝導能、そして生体適合性を有する新たな生体吸収性素材として機能すると考えた。PLLA は構造異性体の PDLA を有し、この 2 つを混合させて作成された PDLLA は PLLA に比較し早期に加水分解を受けることが報告されている (Pietrazak W.S. ら, 1997)。HA と PDLLA を組み合わせて開発された吸収性人工骨が骨欠損を伴う骨幹軸再建術に用いることが可能であると考え、その有用性について検討した。第 2 章において、現在、本学附属動物医療センターにおいて行っている同種保存骨を用いた広範囲の骨欠損を有する骨折後癒合不全症例に対する骨幹軸再建術の有用性とその問題点についての検討を行った。第 3 章において、先述した HA/PLLA 製骨接合材料の長期的な経過観察を行い、皮質骨への置換過程と炎症反応を PLLA 製骨接合材料と比較検討した。第 4 章において、新開発の HA/PDLLA 製吸収性人工骨の非荷重部位における置換過程を吸収性人工骨として一般的に使用されている  $\beta$ -TCP 製人工骨と比較検討し、その有用性について評価した。また、HA/PDLLA 製人工骨は熱変形による欠損部位への充填が可能であることが挙げられる、本検討においては熱変形を行った HA/PDLLA 製人工骨と未変形 HA/PDLLA 製人工骨の比較検討を行い、熱変形による置換への影響についても評価を行った。第 5 章において、脛骨骨欠損モデルを作成し HA/PDLLA 製人工骨を埋植した。対側肢には同様の骨欠損を作

成し  $\beta$ -TCP 製人工骨を埋植し、荷重部位における両者の置換過程について比較検討し、HA/PDLLA 製人工骨の有用性を荷重部位において評価した。

## 第 2 章

同種保存骨移植は優れた強度と低い免疫原性を有する優れた移植骨である。同種保存骨は優れた強度を有し細胞増殖と分化の足場として機能するが、細胞成分に乏しいことが問題点として挙げられる (Darryl L.M. ら, 2003; Giannoudis P.V.ら, 2005)。今回、その問題解決のために自家海綿骨移植を同種保存骨移植に組み合わせた骨幹軸再建術を、大腿骨骨折後に癒合不全を呈した 7 症例に対して行い、放射線学的検討を中心に経過を評価した。

壊死組織の切除と十分な洗浄を行った後に、正常肢長を参考に適切な長さにトリミングした同種保存骨を移植した後に、宿主骨と移植骨の境界面を中心に FGF-2 を添加した自家海綿骨移植を行った。術後は定期的な CRP の観察と単純 X 線検査を行った。単純 X 線写真は Weiland A.J.らの報告に基づいた放射線学的骨癒合スコアを用いて宿主骨と移植骨の境界面と移植骨自体の経時的な変化を 1 箇所を 6 点とし、3 箇所の合計 18 点満点で評価した (Weiland A.J. ら, 1984)。CRP については術後、一過性の上昇は認められたが適切な抗生剤の使用により術後は安定して低値を示した。患肢長は術前の  $85.2 \pm 8.1\%$  から  $95.0 \pm 4.8\%$  と優位に改善した。術後 3 ヶ月の時点で近位境界面における骨折線の消失が確認され、術後 6 ヶ月には近位と遠位の両方での境界面の消失が認められた。宿主骨自体のリモデリングは術後 6 ヶ月以降に進行していることが認められた。放射線学的骨癒合スコアからは

術後3ヶ月と6ヶ月の間に有意差が認められた。

本手法は術後2週目から患者は負重が可能となり、良好な機能回復が得られた。過去に実験的に作成した骨欠損モデルに同種保存骨移植を移植し経過観察を行った報告と同様の経過が認められた (Sinibaldi K.R. ら, 1989)。本検討は骨形成が遅延傾向にある癒合不全症例における検討であり、同様の経過が得られたことは本手法による骨幹軸再建術は癒合不全に対する優れた治療法として考えられた。しかし、同種保存骨は宿主に完全吸収するには7年以上を要するとされており、長期的な経過観察が必要である。-80°Cの低温条件下において細胞成分を除去し、免疫原性を低下させ保存する必要がある。そのため、特殊な設備が必要であり、使用可能な施設は限られている。我々はより簡便に使用可能な足場材料の開発が必要であると考えた。

### 第3章

吸収性人工素材として我々は PLLA に注目した。その他にも PGA や PDS といった吸収性ポリマーの使用が報告されてきたが、生体における骨折の治癒過程、吸収性骨接合材料としての強度には PLLA が最適であると考えられた (Pihlajamäki H. ら, 1998; Rokkanen P.U. ら, 2000; Deorio J.K. ら, 2001)。しかしながら、PLLA は3~5年の経過において遅延性無菌性壊死を起こし、疼痛を引き起こすことが報告されている (Tegnander A. ら, 1994; Bergsma E.J. ら 1993; Matsusue Y. ら, 1996)。近年ではこの問題点の解決として、生体適合性に優れた HA を含有させた HA/PLLA が Verheyen C.C. らによって開発された (Verheyen C.C. ら, 1993)。



HA/PLLA 製骨接合材料は PLLA 製骨接合材料に比較し、骨との直接癒合を獲得し異物反応を惹起させない優れた生体適合性を示した (Verheyen C.C. ら, 1993; Saito T. ら, 2004; Hasegawa S. ら, 2006)。我々はこの HA/PLLA 製骨接合材料に注目し、その皮質骨への置換と炎症反応について PLLA 製骨接合材料と比較検討しその有用性を評価した。左側大腿骨に PLLA 製骨接合材料、右側大腿骨に HA/PLLA 製骨接合材料を埋植し、12、36、60、そして 84 ヶ月の放射線学的評価と組織学的な評価を行った。放射線学的には HA/PLLA 製骨接合材料において骨孔の閉鎖が 60 ヶ月で認められたが、PLLA 製骨接合材料においては 84 ヶ月までの経過観察においても認められなかった。組織学的には HA/PLLA 製骨接合材料では骨孔の骨性閉鎖が確認されたが、PLLA 製骨接合材料では 84 ヶ月の経過においても認められなかった。髄腔内における screw の吸収は HA/PLLA 製骨接合材料において遅延する傾向にあり、84 ヶ月においても残存が確認された。一方で PLLA 製骨接合材料では 60 ヶ月の段階で急激な screw の分解吸収が生じ、強い組織球浸潤が認められた。

本検討から HA/PLLA 製骨接合材料は分解吸収が遅延する傾向にあるが、組織球浸潤はわずかに認められたのみであり、遅延性無菌性壊死を示唆するような所見は全個体で認められなかった。しかし PLLA 製骨接合材料では埋植後 3~5 年において急激な分解吸収が生じ、強い組織球浸潤が認められた。また、HA/PLLA 製骨接合材料は 60 ヶ月の時点で完全な皮質骨への置換が得られた。骨孔は再骨折を引き起こす原因となるため、皮質骨の形成は骨接合材料の理想的な結果の一つと考えられた。また、線維組織を挟まずに直接骨と癒合する優れた生体親和性も認められた。これらの点から HA と PLLA を組み合わせた吸収性人工素

材は生体適合性に優れており、骨との直接的な癒合を獲得する優れた人工素材であり、広範な骨欠損に対する足場材料として利用可能であると示唆された。

#### 第4章

第3章より、PLLAにHAを含有させた吸収性素材は広範な骨欠損における足場材料として利用可能であると示唆された。しかし、HA/PLLAは吸収までに長時間を要するため吸収性人工骨としての利用は不適當であると考えられた。PLLAは構造異性体としてPDLAが存在している。PDLAとPLLAを50:50の重量比で混合させ、作成させることでステレオコンプレックスを作成し、PDLLAとなる。PLLAは完全吸収には24ヶ月以上を要するが、PDLLAは12~16ヶ月で完全吸収に至ると報告されている(Pietrazak W.S. ら, 1997)。過去にHA/PDLLA製人工骨をウサギ大腿骨髄腔領域に埋植した実験においては、HA単体の人工骨に比較し、良好な骨形成と人工骨吸収が認められ、海綿骨の再建が得られたと報告している(Hasegawa S. ら, 2005)。しかしながら、現在までに犬におけるHA/PDLLA製人工骨の経時的な置換過程について検討されていない。また、HA/PDLLA製人工骨はその特徴として術中のメスやハサミによる裁断、さらに熱による変形が可能である。しかし、現在までに、熱変形後の置換過程についても未変形のものとは比較検討されていない(Shikinami Y. ら, 2006)。本章では、実験1としてHA/PDLLA製人工骨と $\beta$ -TCP製人工骨、さらに熱変形後のHA/PDLLA製人工骨と未変形HA/PDLLA製人工骨について組織学的な比較検討を行った。また、実験2としてHA/PDLLA製人工骨と $\beta$ -TCP製人工骨の打ち抜き強度試験によ

る人工骨と宿主骨との接着強度を比較検討した。強度試験後には HA/PDLLA の Mw を計測した。実験 1 の実験モデルとして左側大腿骨骨髄に  $\beta$ -TCP 製人工骨、右側大腿骨骨髄に HA/PDLLA 製人工骨を埋植し、組織学的な評価を行った。また、右側上腕骨大結節には熱変形 HA/PDLLA 製人工骨、左側上腕骨大結節には未変形 HA/PDLLA 製人工骨を埋植した。実験 2 の実験モデルとして実験 1 の大腿骨に行った処置を実施した。VG 染色の結果から、 $\beta$ -TCP 製人工骨は HA/PDLLA 製人工骨に比較し優れた骨形成と早期の生体吸収性を示した。HA/PDLLA 製人工骨の熱変形による置換過程への影響は認められなかった。TRAP 染色からは TRAP 陽性細胞数は全観察期間を通じて HA/PDLLA 製人工骨において  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し有意に多く認められた。熱変形による骨形成や生体吸収性については影響が認められなかった。強度試験からは HA/PDLLA 製人工骨と  $\beta$ -TCP 製人工骨の間には有意差は認められなかった。また、HA/PDLLA 製人工骨の Mw は経時的に有意に減少していることが GPC を用いた検討から確認された。

本章において HA/PDLLA 製人工骨の自家骨置換が遅延する傾向が認められたのは、PDLLA は荷重が加わり持続的に負荷が加わることで Mw が減少していくことが報告されており、本検討は非荷重部位への埋植であったために PDLLA 自体の分解が遅延した可能性が示唆された(Heidemann W. ら, 2001.)。本検討における Mw の減弱は各経過観察時において約 20%程度、荷重条件下に比較して遅延していることが認められた。また、TRAP 陽性細胞が HA/PDLLA 製人工骨では有意に多数確認されたが、VG 染色からは  $\beta$ -TCP 製人工骨において人工骨吸収が有意に促進されていた。HA/PDLLA 製人工骨において確認された TRAP

陽性細胞については詳細を検討する必要が考えられた (Athanasou N.A. ら, 1990)。接着強度については両群とも有意差は認められず、同等の値を示した。 $\beta$ -TCP については自家骨置換が進行しているが、一方で HA/PDLLA 製人工骨では自家骨への置換自体の進行は遅延していたが、COL I 陽性領域が広範囲に認められ、接着強度の向上に寄与している可能性が示唆された。以上のことから、非荷重部位における HA/PDLLA 製人工骨は  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し、吸収が遅延する傾向にあるが、明らかな分解吸収遅延は認められず、さらに強度に関しても明らかな脆弱性は認められなかった。長期間の経過観察が必要になるが、明らかに生体に対して機能不全を引き起こす人工骨ではないことが示され、さらに荷重条件下においては、PDLLA の分解が促進され、さらに良好な組織浸潤性によって骨形成を促進させることが期待された。

## 第 5 章

第 4 章の結果を受け、我々は小動物整形外科領域において必要とされる機会の多い、荷重条件下における HA/PDLLA 製人工骨の有用性を評価した。

脛骨骨幹部中央に 15mm の骨欠損を作成し、架橋 plate を行った後に欠損部に左側は  $\beta$ -TCP 製人工骨、右側は HA/PDLLA 製人工骨を埋植した。その後、1、3、12 ヶ月の 3 群を設定し経過観察の後に安楽死を行い、組織学的な検討を中心にその置換過程の比較検討を行った。

VG 染色の結果から、HA/PDLLA 製人工骨と  $\beta$ -TCP 製人工骨は同等の骨形成を示した、生体吸収性については全観察期間を通じて HA/PDLLA 製人工骨は  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し有

意に優れた生体吸収性を示した。線維組織の浸潤、血管新生、破骨細胞様細胞数、など浸潤性を示す評価項目の全てにおいて HA/PDLLA 製人工骨は  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し有意に優れた浸潤性を示した。また、HA/PDLLA 製人工骨に浸潤していた組織の多くは COL1 陽性組織であり、さらに浸潤していた紡錘形の細胞は RUNX2 陽性細胞であった。

以上のことから、HA/PDLLA 製人工骨に浸潤している組織や細胞は骨の主成分である COL I と間葉系幹細胞を骨へと分化させる RUNX2 陽性細胞であった。一連の観察結果から、HA/PDLLA 製人工骨は現在まで、一般的に使用される吸収性人工骨である  $\beta$ -TCP と同等の骨形成と優れた生体吸収性と浸潤性を示した。これらの結果から、HA/PDLLA 製人工骨は新たな吸収性人工骨として利用可能であると示唆された。

第 3 章の結果から、HA と PLLA を主成分とする骨接合材料は優れた生体適合性を示し、さらに宿主骨へと完全にリモデリングされる結果を得た。また、PLLA の構造異性体である PDLA と PLLA のステレオコンプレックスである PDLLA と HA からなる吸収性人工骨は非荷重部位における使用ではリモデリング速度は  $\beta$ -TCP 製人工骨に比較し遅延する傾向が認められたが、生体との接着性については両人工骨間に有意差は認められなかった。また、熱変形によるリモデリング過程については有意な変化は認められなかった。さらに荷重部位における HA/PDLLA 製人工骨と  $\beta$ -TCP 製人工骨との比較検討においては、骨形成については同等であったが、人工骨の生体吸収性や細胞と組織の浸潤性は HA/PDLLA 製人工骨において有意に優れている結果が得られた。優れた浸潤性は今後、成長因子の添加によって

より多くの細胞を骨分化へと促進させる働きが期待された。しかしながら、人工骨の残存は疼痛を引き起こすことが知られている、本検討においては12ヶ月の経過観察においても人工骨の残存が認められた。そのため、吸収性人工骨が完全吸収されるまでの期間、経過観察を行う追加実験が必要であると考えられた。しかしながら、HA/PDLLA 製人工骨は $\beta$ -TCP 製人工骨と荷重部位において同等の骨形成能と細胞浸潤性を有し、さらに優れた操作性を有することから新たな吸収性人工骨として今後、新たな吸収性人工骨として臨床利用が期待された。

## 謝辞

本研究を行うに際して懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医外科学教室 原 康教授ならびに多川政弘名誉教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究に対し有益な御指導と御鞭撻を賜りました。日本獣医生命科学大学微生物学教室 越智広樹助教、同学外科学教室 原田恭治講師、余戸拓也講師、同学解剖学教室 尼崎肇教授、添田聡准教授に深く感謝の意を表します。

同研究を行うにあたり、多大なるご協力を頂き、多くのご配慮を頂きました、日本獣医生命科学大学附属動物医療センター 神野信夫博士、同大学外科学教室 岩田宗峻学士、一戸登夢学士、箱崎貴治学士、網本宏和学士、林佑将学士、小澤麻里子学士、越智善行学士、河津充伸学士、長弘友加里学士、室井謙宏学士、河北耕太郎、巢山由乃、寺島彰子、向峠一志、香取大智、伊藤亜衣、内山莉花、高野重徳、松村和紀、の各氏に深謝致します。

本研究遂行の為に犠牲となった動物達に深く感謝し、ご冥福をお祈りいたします。

最後に、30年間にわたり叱咤激励を頂きました、父 赤木哲也、母 赤木恵美に心より感謝致します。

## 参考文献

- Akagi H, Iwata M, Ishinohe T, Amimoto H, Hayashi Y, Kanno N, Ochi H, Fujita Y, Harada Y, Tagawa M and Hara Y. Hydroxyapatite/poly-L-lactide acid screws have better biocompatibility and femoral bone hole closure than does poly-L-lactide acid alone. *J Biomater Appl.*2013;ahead of print.
- Athanasiou K.A, Agrawal C.E, Barber F.A, Burkhart S.S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. *Arthrosc: J Arthrosc Relat Surg.* 1998;14(7):726-737.
- Athanasou N.A, Quinn J. Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function. *J Clin Pathol.*1990;43(12):997-1003.
- Bacher J.D, Schmidt R.E. Effects of autogenous cancellous bone on healing of homogenous cortical bone grafts. *J Small Anim Pract.*2008;21:235-245.



- Bergsma E.J, Rozema F.R, Bos R.R, Boering G. Foreign body reactions to reconstructions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 1993;51:666–670.
- Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. *Orthop Clin North Am* 1999;30:571-581
- Brianza S.Z, Delise M, Maddalena Ferraris M, D’Amello P, Botti P. Cross-sectional geometrical properties of distal radius and ulna in large, medium and toy breed dogs. *J Biomech* 2006;39:302–311.
- Brodsky B, Persikov AV: Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem.*2005; 70: 301–339,
- Böstman O, Päivärinta U, Partion E, Vasenius J, Manninen M, Rokkanen P. Degradation and tissue replacement of an absorbable polyglycolide screw in the fixation of rabbit femoral osteotomies. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74(7):1021-1031.
- Chazono, M., Tanaka, T. Bone formation and bioresorption after implantation of injectable

beta-tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. J Biomed Mater Res A 2004;70:542-549.

- Cicconci W, Motz C, Bentley C, Tasto J. Biosresorbable implants in orthopaedics: new developments and clinical applications. J am acad orthop surg 2001;9:280-288.
- Cutright D.E, Hunsuck E.E, Beasley J.D. Fracture reduction using a biodegradable material, polylactic acid. J Oral Surg.1971;29:393-397.
- Cutright D.E, Bhaskar S.M, Brady J.M, Getter L, Posey W.R. Reaction of bone to tricalcium phosphate ceramic pellets. Oral Surg Oral Med Oral Pathol.1972; 33:850-856.
- Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. J mater sci mater med 2003;14:195-200.
- Daculsi G, Layrolle P. Osteoinductive properties of micro macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. Key eng mater 2004;254-56:1005-1008.
- Darryl L.M, Steven A.M. Bone grafts, In Slatter D. Text book of small animal surgery, Third

edition. WB Saunders. 2003:p1876.

- Dell PC, Burchardt H, Glowczewskie FP Jr. A roentgenographic, biomechanical, and histological evaluation of vascularized and non-vascularized segmental fibular canine autografts. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67:105-12.
- Deorio J.K and Ware A.W. Single absorbable polydioxanone pin fixation for distal chevron union osteotomies. *Foot Ankle Int.* 2001; 22: 832–835.
- Doi K, Tominaga S, Shibata T. Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles : an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am.* 1977; 59:806-815.
- Doi Y, Horiguchi T, Moriwaki Y, Kitago H, Kajimoto T, Iwayama Y. Formation of apatite-collagen complexes. *J biomed mater res.* 1996;31:43-49.
- Doi Y, Iwanaga K, Shibutani T, Moriwaki Y, Iwayama Y. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J biomed mater res* 1999;47:424-433.
- Ehrler D.M and Vaccaro A.R. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop.*

2000;371:38-45.

- Enomoto H, Shiojiri S, Hoshi K, Furuichi R, Fukuyama R, Yoshida C.A, Kanatani N, Nakamura R, Mizuno A, Zanma A, Yano K, Yasuda H, Higashio K, Takada K, Komori T. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor –  $\kappa$ B ligand (RANKL) and osteoprotegrin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2  $-/-$  mice by RANKL transgene. *J Biological Chemi.* 2003;26:23971-23977.
- Fan Y.B, Li P, Zeng L, Huang X.J. Effects of mechanical load on the degradation of poly (D,L-lactic acid) form. *Polymer Degradation Stability.* 2008;93:677-683.
- Finkemeier C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84A : 454-464.
- Franczuszki D, Chalman J.A, Butler H.C, DeBowes R.M, Leipold H. Postoperative effects of experimental femoral shortening in the mature dog. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1987;23:429
- Ghosh S.K, Nandi S.K, Kundu B, Datta S, De DK, Roy S.K, Basu D. In vivo response of porous hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate prepared by aqueous solution combustion method

and comparison with bioglass scaffold. *J Biomed Mater Res Part B*. 2008;86:217-227

- Giannoudis P.V, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36:20-27.
  
- Gospodarowicz D, Ferrara L, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev*. 1987; 8: 95–114.
  
- Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1: 25-32.
  
- Hara Y, Tagawa M, Ejima H, Orima H, Sugiyama M, Shikinami Y, Hyon SH, Ikada Y. Clinical evaluation of uniaxially oriented poly-L-lactide rod for fixation of experimental femoral diaphyseal fracture in immature cats. *J Vet Med Sci*. 1994;56(6):1041-1045
  
- Hara Y, Tagawa M, Ejima H, Orima H, Fujita M, Yamaguchi T, Umeda M, Sugiyama M, Shikinami Y, Hyon SH, Ikada Y. Application of oriented poly-L-lactide screws for experimental Salter-Harris type 4 fracture in distal femoral condyle of the dog. *J Vet Med Sci*. 1994;56(5):817-822.
  
- Harper J, Klagsbrun M. Cartilage to bone—angiogenesis leads the way. *Nat Med*. 1999;5:617–618.

- Harasen G. Common long bone fractures in small animal practice-part 1. *Can Vet J.* 2003 Apr;44(4);333-334.
  
- Hasegawa Y, Sakano S, Iwase T, Warashina H. The long-term behavior of poly-L-lactide screws in minipig fracture model: Preliminary report. *J Biomed Mater Res.* 2002; 63:679–685.
  
- Hasegawa S, Tamura J, Neo M, Goto K, Shikinami Y, Saito M, Kita M, Nakamura. In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/ poly-DL-lactide composite for use as a bone substitute. *J biomed mater res.* 2005;75:567-579.
  
- Hasegawa S, Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Neo M, Matsusue Y, Okuno M, Nakamura T. A 5–7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures.*Biomaterials.* 2006;27:1327–1332.
  
- Hasegawa S, Neo M, Tamura J, Fujibayashi S, Takemoto M, Shikinami Y, Okazaki K, Nakamura T. In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/ poly-DL-lactide composite for bone tissue engineering. *J biomed mater res.* 2007;81:930-938.
  
- Hausman M.R, Schaffler M.B, Majeska RJ. 2001. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone* 29:560–564.

- Hench L.L. Bioceramics. *J Am Ceram Soc.* 1998; 81:1705–1728.
  
- Hollinger J.O. Preliminary report on osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide(PLA) and polyglycolide(PGA). *J Biomed Mater Res.* 1983;17;71-82.
  
- Holland S.J, Tighe BJ. Biodegradable polymers. In: *Advances in Pharmaceutical science.* Academic Press London. 1971;6;101-164.
  
- Hsu, H, Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H. L., Elliott, G., Kelley, M. J., Sarosi, I., Wang, L., Xia, X. Z., Elliott, R., Chiu, L., Black, T., Scully, S., Capparelli, C., Morony, S., Shimamoto, G., Bass, M. B., and Boyle, W. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999;96;3540–3545
  
- Hunt J.M. Aitken M.L, Denny H.R, Gibbs C. The complications of diaphyseal fractures in dogs: a review of 100 cases. *J Small Anim Pract.* 1980;21(2);103-119.
  
- Inada M, Yasui T, Nomura S, Miyake S, Deguchi K, Himeno M, Sato M, Yamagiwa H, Kimura T,

- Yasui N, Ochi T, Endo N, Kitamura Y, Kishimoto T, Komori T. Maturation disturbance of chondrocytes in *Cbfa1*-deficient mice. *Dev Dyn* 1999;214:279–290.
- Inaoka, T., Bilbe, G., Ishibashi, Tezuka, K., Kumegawa, M., and Kokubo, T. Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;206:89-96.
  - Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Matsusue Y, Shikinami Y, Okuno M. Long-term study of high-strength hydroxyapatite-poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures: A 2–4 year follow-up study in rabbits. *J Biomed Mater Res Part B* 2003;66B:539–547.
  - Jienau J, Bleek K.S, Paters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schu'tze, N, Jakob F, Schell H. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res.*2009;27;1133-1140.
  - Johnson A.L, Stein L.E. Morphologic comparison of healing patterns in ethylene oxide-sterilized cortical allografts and untreated cortical autografts in the dog. *Am J Vet Res.* 1988;49:101-105.
  - Johnson J.A, Austin C, Breur GJ, Incidence of canine appendicular musculoskeletal disorders in 16 veterinary teaching hospitals from 1980 through 1989. *Vet Comp Orthop Traumatol.*



1994;7;56-69.

- Johnson L.L, Morrison K.M, Wood D.L. The application of arthroscopic principles to bone grafting of delayed union of long bone fractures. *Arthroscopy*. 2000;16:279-289.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005;26(27):5474-5491.
- Kasuga T, Macda H, Kato K, Nogami M, Hata K, Ueda M. Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite). *Biomaterials*. 2003;24:3247-3253.
- Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, Kuzutani K, Tamura M, Kurokawa T, Nakamura K. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defect in rabbits. *J Orthop Res*. 1998;16:654-659.
- Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J, Nakamura T, Hiyama Y, Tamura M. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:875-880.

- Kim I.S, Otto F, Zabel B, Mundlos S. Regulation of chondrocyte differentiation by cbfa1. *Mech Dev.*1999;80:159–170.
  
- Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem.* 2005;95:445–453.
  
- Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J cellular Biochem.* 2006;99:1233-1239.
  
- Komori, T. Signaling networks in RUNX2 dependent bone development. *J. Cell. Biochem.* 2011 112,750-755.
  
- Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified  $\beta$ -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials.* 2005;26:5600-5608.
  
- Kondo N, Tokunaga K, Umezumi H, Arai K, Kudo N, Hoshino M, Inoue H, Irie H, Kuroda K, Mera H, Endo N. Osteoinduction with highly purified  $\beta$ -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials.* 2006;27:4419-4427.

- Kunze C, Freier T, Heldwig E, Sandner B, Reif D, Wutzler A, Radosch H.J. Surface modification of tricalcium phosphate for improvement of the interfacial compatibility with biodegradable polymers. *Biomaterials*. 2003;24:967-974.
  
- Littlewood-Evans A.J, Bilbe G, Bowler W.B, Wlodarski B, Kokubo T, Inaoka T, Sloane J, Evans DB, Gallagher JA. The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res*. 1997;23:5386-5390.
  
- Liu G, Zhao L, Zhang W, Cui L, Liu W, Cao Y. Repair of goat tibial defects with bone marrow stromal cells and beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci*. 2008;19:2367-2376.
  
- Marsh J.L. Principles of bone grafting: non-union, delayed union. *Surgery* 2006;24:207-210.
  
- Matsusue Y, Hanafusa S, Yamamuro T, Shikinami Y, Ikada Y. Tissue reaction of bioabsorbable ultra high strength poly(L-lactide) rod. *Clin Orthop Relat Res* 1995; 317: 246–253.

- Matsusue Y, Nakamura T, Suzuki S, Suzuki S, Iwasaki R. Biodegradable pin fixation of osteochondral fragments of the knee. *Clin Orthop* 1996; 322: 166–173.
- McComb R.D, Jones T.R, Pizzo S.V, Bigner D.D. Specificity and sensitivity of immunohistochemical detection of factor VIII/von Willebrand factor antigen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1982;30:371–377.
- Miller R.A, Brady J.M, Cutright D.E. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J Biomed Mater Res.* 1997;11(5):711-719.
- Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie P.J. Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK 1/2 and protein kinase C signaling. *J Biol Chem.* 2009;284:4897-4904.
- Muir P, Markel M.D: Geometric variables and bone mineral density as potential predictors for mechanical properties of the radius of Greyhounds. *Am J Vet Res* 1996;57:1094–1097.
- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., and

- Higashio, K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:395–400.
- Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, Nigi H. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 942-949.
  - Nather A, David V, Teng J.W, Lee C.W, Pereira B.P. Effect of autologous mesenchymal stem cells on biological healing of allografts in critical-sized tibial defects simulated in adult rabbits. *Ann Acad Med Singapore.* 2010;39:599-606.
  - Navarro M, Michiardi A, Castano O, Planell J.A. Biomaterials in orthopaedics. *J R soc interface* 2008;5:1137-1158.
  - Nelson J.F, Stanford H.G, Cutright D.E. Evaluation and comparison of biodegradable substances as osteogenic agents. *Oral Surg.* 1977;43:836-843.
  - Ogose A, Hotta T, Hatano H, Kawashima H, Tokunaga K, Endo N, Umezu H. Histological examination of beta-tricalcium phosphate graft in human femur. *J Biomed Mater Res.*

2002;63:601-604.

- Oyake Y, Beppu M, Ishii S, Takagi M, Takahashi M. Intramedullary anchoring strength of titanium rod with mixed  $\beta$ -tricalcium phosphate and fibrin adhesive. *J Ortho Sci.* 2002;7;123-130.
- Ozawa M, Tanaka T, Morikawa S, Chazono M, Fujii K. Clinical study of the pure  $\beta$ -tricalcium phosphate-reports of 167 cases. *J East Jpn Orthop Traumatol.* 2000;12:409-413.
- Piermattei D.L, Flo G.L, DeCamp C.E. Delayed union and nonunion. In: Brinker, Piermattei, and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair. 4 th ed. Saunders; 2006. pg. 168-176.
- Pietrzak W.S, Sarver D.R, Verstynen BS. Bioabsorbable polymer science for the practicing surgeon. *J Craniofacial Surg.* 1997;2;87-91.
- Pihlajamäki H, Böstman O, Hirvensalo E, Tormala P, Rokkanen P. Absorbable pins of sell-reinforced poly-L-lactic acid for fixation of fractures and osteotomies. *J Bone Joint Surg.* 1992;74-B;857-863

- Pihlajamäki H, Böstman O, Rokkanen P. Absorbable polyglycolide and polylactide devices for fracture fixation. *Surg Technol Int.* 1998;7: 395–401.
  
- Pri-Chen S, Pitaru S, Lokiec F, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the growth and expression of the osteogenic phenotype of dexamethasone-treated human bone marrow-derived bone-like cells in culture. *Bone.* 1998; 23: 111-117.
  
- Putzier M, Strube P, Funk J.F, Gross C, Mönig H.J, Perka C, Pruss A. Allogenic versus autologous cancellous bone in lumbar segmental spondylodesis: a randomized prospective study. *Eur Spine J* 2009;18:687-695.
  
- Ragetly G.R, Griffon D.J. The rationale behind novel bone grafting techniques in small animals. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2012; 24: 1-18.
  
- Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E. Biomedical application of polymer-composite materials: A review. *Compos Sci Technol* 2001; 61: 1189–1224.
  
- Rezwan K, Chen Q.Z, Blaker J.J, Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.*

2006;27;3413-3431.

- Rokkanen P.U. Bioabsorbable fixation devices in orthopaedics and traumatology. *Ann chir gyn* 1998;87:13-20.
  
- Rokkanen P.U, Böstman O, Vainionpää S, Vihtonen K, Törmälä P, Laiho J, Kilpikari J, Tamminmäki M. Biodegradable implants in fracture fixation: early results of treatment of fractures of the ankle. *Lancet*. 1985;1422-1444.
  
- Rokkanen P.U, Böstman O, Hirvensalo E, Mäkelä EA, Partio E.K, Päätiälä H, Vainiopää S.I, Vihtonen K, Törmälä P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*. 2000; 21: 2607–2623.
  
- Rudd R.G, Whitehair J.G. Fracture of the radius and ulna. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1992;22(1);745-760.
  
- Sai S, Fujii K.  $\beta$ -tricalcium phosphate as a bone graft substitute. *Jikeikai med J*. 2005;52:47-54.
  
- Saadeh P.B, Mehrara B.J, Steinbrech D.S, Spector J.A, Greenwald J.A, Chin G.S, Ueno H, Gittes G,



Longaker M.T. Mechanisms of fibroblast growth factor-2 modulation of vascular endothelial growth factor expression by osteoblastic cells. *Endocrinology* 2000; 141: 2075-2083.

- Saito T, Iguchi A, Sakurai M, Tabayashi K. Biomechanical study of poly-L-lactide (PLLA) sternal pin in sternal closure after cardiothoracic surgery. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:684–687.

- Samartzis D, Shen F.H, Goldberg E.J, An H.S. Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation? *Spine.* 2005;30 :1756-1761.

- Shikinami Y, Saito M, Okuno M, Okazaki K. Bioactive, resorbable porous scaffolds mostly comprising particulate bioceramics in poly-D/L-lactide. In: proceedings of the 18<sup>th</sup> European Conference on biomaterials, Stuttgart, Germany, October 2003. LMP 025.

- Shikinami Y, Okazaki K, Saito M, Okuno M, Hasegawa S, Tamura J, Fujibayashi S, Nakamura T. Bioactive and bioresorbable cellular cubic-composite scaffolds for use in bone reconstruction. *J R S Interface.* 2006;3;805-821.

- Simonds RJ, Holmberg S.D, Hurwitz R.L. Transmission of human immunodeficiency virus type I

- from a seronegative organ and tissue donor. *N Engl J Med* 1992;326:726-732.
- Sinibaldi K.R. Evaluation of full cortical allografts in 25 dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1989;194: 1570-1577.
  - Slivka M.A, Leatherbury N.C, Kieswetter K, Niederauer G.G. Porous, resorbable, fiber-reinforced scaffolds tailored for articular cartilage repair. *TissueEng.* 2001;7:767–780.
  - Solchaga L, Penick K, Porter J.D, Goldberg V.M, Caplan A.I, Welter J.F. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2005; 203: 398–409.
  - Spector D.I, Keating J.H, Boudrieau R.J. Immediate mandibular reconstruction of a 5 cm defect using rhBMP-2 after partial mandibulectomy in dog. *Vet Surg.* 2007;36:752-759.
  - Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; 30 : 543-552.
  - Stevenson S, Dannucci G.A, Sharkey N.A, Pool R.R. The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched

- osteochondral allografts in dogs. *J Bone and Joint Surg Am* 1989; 71: 1297-1307.
- Stevenson S, Li X.Q, Martin B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am*. 1991; 73: 1143-1156.
  - Stubbs D, Deakin M, Sheath P.C, Bruce W, Debes J, Gillies R.M, Walsh W.R. In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials*. 2004;25(20);5037-5044.
  - Summer-Smith G. Delayed unions and nonunions. Diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1991;21(4);745-760.
  - Tatsumi A, Kanemitsu N, Nakamura T, Shimizu Y. Bioabsorbable poly-L-lactide costal coaptation pins and their clinical application in thoracotomy. *Ann Thorac Surg*. 1999; 67: 765–768.
  - Tegnander A, Engerbretsen I, Bergh K, Eide E, Holen K.J, Iversen O.J. Activation of the complement system and adverse effects of biodegradable pins of polylactic acid (Biofix) in osteochondritis dissecans. *Acta Orthop Scand*. 1994;65(4);472-475

- Tezuka K, Tezuka Y, Macjima A, Sato T, Nemoto K, Kamioka H, Hakeda Y, Kumegawa M.

Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol. Chem.* 1994;269: 1106-1109.

- Tomford W.W. Transmission of disease through transplantation of musculo-skeletal allografts.

*J Bone Joint Surg Am.* 1995;77:1742-1754.

- Urist M.R, Silverman B.F, Buring K, Dubucl F.L, Rosenberg J.M. The bone induction principle.

*Clin Orthop.* 1967;53:243-283

- Verheyen C.C, de Wijin J.R, van Blitterswijk C.A, Groot K, Rozing P.M.

Hydroxyapatite/poly(L-lactide) composites: An animal study on push-out strengths and interface histology. *J Biomed Mater Res.* 1993;27:433-444.

- Vertenten G, Gasthuys F, Cornelissen M, Schacht E, Viaminck K. Enhancing bone healing and

regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2010; 23: 153-162.

- Wan Y, Tu C, Yang J, Bei J, Wang S. Influences of ammonia plasma treatment on modifying depth and degradation of poly(L-lactide) scaffolds. *Biomaterials*. 2006;27:2699–2704.
  
- Wang J.S, Aspenberg P. Basic fibroblast growth factor increases allograft incorporation. Bone chamber study in rats. *Acta Orthop Scand*. 1994;65:27-31.
  
- Wang M, Joseph R, Bonfield W. Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: Effect of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* 1998;19:2357–2366.
  
- Watanabe T, Ban S, Ito T, Tsuruta S, Kawai T, Nakamura H. Biocompatibility of composite membrane consisting of oriented needle-like apatite and biodegradable copolymer with soft and hard tissues in rats. *Dent mater J*. 2004;23:609-612.
  
- Weber B.G, Cech O. *Pseudoarthrosis: Pathology, Biomechanics, Therapy, Results*: Hans Huber Medical Publisher; 1976.
  
- Weiland A.J, Phillips T.W, Randolph M.A. Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984;74:368-379.

- Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36:169–180.
- Welch J.A, Boudrieau R.J, Dejardin L.M, Spodnick G.J. The intraosseous blood supply of the canine radius: implications for healing of distal fractures in small dogs. *Vet Surg* 1997;26:57–61.
- Welch R.D, Zhang H, Bronson D.G. Experimental tibial plateau fractures augmented with calcium phosphate cement or autologous bone graft. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85A : 222-231.
- Wilson J.W, Hoefle W.D. Diaphyseal allograft: Eight year evaluation in a dog. *Vet Comp Orthop Traumatol* 1990; 3: 78-81.
- Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Hagio M, Izumisawa Y, Kotani T. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci.* 1994; 56: 487-492.
- Yamaze T, Goto T, Kamiya T, Kobayashi Y, Sakai H, Tanaka T. Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur.

Bone. 1998 23:499-509.

- Yang S, Leong K.F, Du Z Chua C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I.

Traditional factors. Tissue Eng. 2001;7:679–689.

- Yasunaga T, Matsusue Y, Furukawa T, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. Bonding behavior of ultrahigh strength unsintered hydroxyapatite particles/poly(L-lactide) composites to surface of tibial cortex in rabbits. J Biomed Mater Res. 1999;47:412–419.

- Zuo J, Jiang J, Dolce C, Holliday LS. Effects of basic fibroblast growth factor on osteoclasts and osteoclast-like cells. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 318: 162-167.

The application of a bioresorbable scaffold  
composed of hydroxyapatite and polylactide

Summary of Doctoral Thesis

Hiroyuki Akagi

Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science  
Nippon Veterinary and Life Science University



Fractures are common in small animal orthopedics, with the rate of incidence being approximately 7%. The incidence rate of nonunion fractures in the dog was about 4%. In some nonunion fracture cases with a large bone defect, restoration of the limb length requires reconstruction. Several methods of bone reconstruction using an autograft, allograft, and a bioresorbable scaffold have been reported. Bioresorbable scaffolds have the advantages of being minimally invasive, not requiring any special storage facilities, and ease of intervention; they are therefore needed in veterinary orthopedic surgery.

Bioresorbable scaffolds are divided into two major groups: bioresorbable polymer and calcium phosphate. Several bioresorbable polymers have been used as the bioresorbable osteosynthetic material, particularly poly-L-lactide (PLLA), because PLLA maintains mechanical strength during bone healing and is absorbed without any inflammatory reaction. Furthermore, PLLA also has a piezoelectric effect and promotes local bone formation. Although the use of bioresorbable osteosynthetic implants was not popular in veterinary orthopedics, the bioresorbable scaffold might have a potency to be a useful implant as an artificial bone for the dog with nonunion. However, it has been pointed out that PLLA caused

pain and acute aseptic necrosis five years after implantation in the past report. Then, a bioresorbable osteosynthetic material composed of a combination of a hydroxyapatite(HA) and PLLA was developed. The biocompatibility and osteoinductive potential of HA are equal to those of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), and it maintains mechanical strength longer than  $\beta$ -TCP. It has been reported that a HA/PLLA osteosynthetic implant showed good biocompatibility and direct integration with the host bone. However, PLLA needs a long period for its degradation and absorption more than poly-D-lactide (PDLA), which is an structural isomer of PLLA. Then, HA/PDLLA, which is composed of HA and PDLLA, has recently developed as a new bioresorbable material. I considered that HA/PDLLA might be suitable for a bioresorbable scaffold.

In this study, I studied on the application of this bioresorbable scaffold as an artificial bone. In chapter 2, we discussed the application and issues associated with a frozen cortical allografts(FCAs) for a femoral nonunion patient. In chapter 3, the substitution process and inflammatory reaction of the HA/PLLA composite was compared to the PLLA composite in the cortical bone. In chapter 4, the HA/PDLLA scaffold was studied, and the substitution process and mechanical strength were compared to those of the  $\beta$ -TCP

scaffold at the unloading site. The HA/PDLLA composite has a characteristics to be transformed with heat and trimmed with a scalpel. We conducted an experiment to analyze the transforming effect of heat on the substitution process. In chapter 5, the substitution process of HA/PDLLA scaffold was studied histologically and compared to the  $\beta$ -TCP scaffold at the loading site using the canine tibial osteotomy model.

2: The application and issues associated with frozen cortical allografts(FCAs) at a femoral nonunion fracture.

We performed reconstructive surgery using a frozen cortical allografts(FCAs) and cancellous autograft for femoral nonunion patients. The remodeling process of the FCAs itself and the interface of proximal and distal portions of the FCAs and host bone were analyzed according to the radiographic score system reported by Weiland et al. The bony union between the proximal or distal host bone and FCAs was observed after 3 months. The remodeling of the FCAs was recognized at six months. The continuousness between the ends of the host bone and FCAs were observed. Moreover, it was observed that remodeling of the FCAs itself were progressed after 12 months. These results indicated that the FCAs showed

good mechanical strength and biocompatibility in the grafted site. However, it has been reported that the implanted allograft needs a long period more than 7 years to be completely substituted by the host bone. These findings indicated that a long-term follow-up would be needed. Moreover, FCAs need special storage to maintain the temperature at  $-80^{\circ}$  and normal dogs to retrieve their bone. Therefore, reconstructive surgery using FCAs was conducted in only a few facilities in Japan in the field of veterinary orthopedics. It was concluded that more convenient bioabsorbable scaffolds would be needed to treat a bone defect of nonunion fractures.

### 3: Comparative study of PLLA composite and HA/PLLA composite on the substitution process in canine femur

It has been reported that the HA/PLLA osteosynthetic implants achieved direct union with the host bone and demonstrated a superior biocompatibility to the PLLA osteosynthetic implants. We therefore studied the use of HA and PLLA osteosynthetic implants as a bone scaffold. The basis of this chapter was a study of whether the HA/PLLA osteosynthetic material achieved substitution to the host bone. The aim of this study was to analyze the substitution process of the HA/PLLA osteosynthetic implants to

cortical bone histologically and compare it to the PLLA osteosynthetic implants. The HA/PLLA screws and PLLA screws were inserted in the femur and a histological analysis was performed at 12, 36, 60, and 84 months.

It was confirmed that the screw hole were closed radiographically at 60 months in the HA/PLLA group, and histological analysis demonstrated that screw holes were substituted by bony tissue. However, in the PLLA group, screw holes were not closed by the bony tissue at 84 months. Additionally, the PLLA screw showed severe histiocyte cell infiltration at 60 months, whereas the HA/PLLA screw did not show severe infiltration during the follow-up period. This study showed that the HA/PLLA composite showed superior biocompatibility compared to the PLLA screw, direct union with the host bone, and substitution to the host bone. These results indicated that a bioresorbable composite composed of HA and PLLA might be available for use as a bioresorbable artificial bone.

4: A comparative study on the substitution process of HA/PDLLA scaffold and  $\beta$ -TCP scaffold, and the heat-transforming difference of HA/PDLLA scaffold at the unloading site.

In this chapter, I studied on the application of the HA/PDLLA scaffold

compared to the  $\beta$ -TCP scaffold. Experiment 1 was conducted to analyze the area of new bone formation and the residual HA/PDLLA and  $\beta$ -TCP scaffolds. Experiment 2 was conducted to evaluate the transforming influence by heat. Experiment 3 was conducted to analyze the adherence strength of HA/PDLLA scaffold and host bone compared to that of the  $\beta$ -TCP scaffold. Then, the average molecular weight (Mw) of HA/PDLLA scaffold was measured.

The results of experiment 1 showed that bone formation and scaffold absorption of the HA/PDLLA scaffold was delayed compared to the  $\beta$ -TCP scaffold. Although the remodeling process of the HA/PDLLA scaffold was not stopped, numerous Runx-related transcription factor 2 (Runx2) -positive cells and type I collagen(Col-I)-positive tissue were observed in the HA/PDLLA scaffold compared to that in the  $\beta$ -TCP scaffold. The results of experiment 2 showed that the heat-transforming of the HA/PDLLA scaffold did not affect any substitution process. The results of experiment 3 showed that the HA/PDLLA scaffold and  $\beta$ -TCP scaffold had equal bonding strength, and the Mw of HA/PDLLA scaffold decreased significantly with time. These results indicated that the substitution process of the HA/PDLLA scaffold was slightly delayed compared to the  $\beta$ -TCP scaffold at the unloading site.

5: A comparative study on substitution process of the HA/PDLLA scaffold and  $\beta$ -TCP scaffold at the loading site.

It has been reported that the degradation rate of PDLLA was promoted at the loading site. In this chapter, I evaluated the substitution process of the HA/PDLLA scaffold at the loading site. The tibial diaphysis was osteotomized (15 mm) and the HA/PDLLA scaffold and  $\beta$ -TCP scaffold were inserted on each side, and three experimental groups were prepared (1, 3, and 12 months). After the follow-up period, we conducted a histological analysis. The results of this study showed that the HA/PDLLA scaffold and  $\beta$ -TCP scaffold represented equal bone formation. The HA/PDLLA scaffold showed earlier and better infiltration of the cell and tissue than the  $\beta$ -TCP scaffold. In the HA/PDLLA scaffold, numerous vessel cavities and osteoclast like-cells as well as Runx2-positive cells were present that were responsible for primary bone formation and scaffold substitution, as well as differentiation to osteoblasts, respectively. These results showed that the HA/PDLLA scaffold had induced numerous cells that were essential for bone remodeling and promoted the substitution process. There were many differences in the substitution process between the HA/PDLLA scaffold and

$\beta$ -TCP scaffold. However, both scaffolds did not show complete substitution at 12 months; a long-term follow-up is therefore needed for observation of complete substitution.

This study showed that the HA/PDLLA scaffold, which was developed as a new artificial bone, showed no inflammatory reaction as well as the the  $\beta$ -TCP scaffold and were substituted to the host bone. The HA/PDLLA scaffold was slightly delayed in the substitution process compared to the  $\beta$ -TCP scaffold at the unloading site, although their bonding strength was equal. Furthermore, the HA/PDLLA scaffold showed equal bone formation compared to the  $\beta$ -TCP scaffold, and superior infiltration of tissue and cell compared to the  $\beta$ -TCP scaffold at the loading site. It was concluded that the HA/PDLLA scaffold was expected to be usefull as a new bioresorbable artificial bone. However, neither scaffold achieved complete substitution to the host bone, therefore, it was considered that the follow-up study would be needed to confirm the complete substitution.