

論文審査の結果の要旨

申請者氏名：赤木浩之

小動物整形外科領域において骨折後の癒合不全は骨折治療に伴う深刻な合併症であり、その発生率は約 4%と認識されている。骨折後の癒合不全は、特に小型犬の橈尺骨骨折の治療に際して好発することが認識されており、小型犬種が多い国内では臨床的に大きな問題となっている。罹患症例では時間経過とともに骨折端の骨吸収が進行し、その結果、広範囲の骨欠損が形成される。また治療には、自家皮質骨移植、同種保存骨移植、吸収性人工骨移植を使用した骨長の再建が必要となる。近年では患者への負担が少なく、特殊な設備が不要であり、そして取り扱いが簡便な吸収性人工骨の使用に関する関心が小動物臨床領域においても高まっている。一方、これまで、骨癒合に必要とされる期間は体内で適切な強度を保持し、その後に加水分解により分解そして吸収される poly-L-lactide (PLLA) などの生体内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。しかし、PLLA 単体では 5 年を超える長期観察において、作成された骨孔の未閉鎖、急性無菌性壊死などの問題点が指摘されてきた。近年では、生体適合性に優れるハイドロキシアパタイト (HA) などの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いる。さらに、PLLA は生体内での吸収時間が長いため、より吸収時間の短い構造異性体である poly-D-lactide (PDLA) と混合し、新規の吸収性素材として poly-D/L-lactide (PDLLA) が開発されている。HA/PDLLA 製人工骨はその特徴として、熱処理により形状を変形させ、欠損部位へ充填することが可能である。

本研究では、獣医療において臨床的に問題となる長管骨の骨欠損に対する治療を最終的な目的において、新規の HA/PDLLA 製吸収性人工骨の有用性について、放射線学的そして組織学的に検討している。本論文は 6 章から構成され、第 1 章は序論で、第 6 章が総括である。実験内容は、以下に示した要約について第 2 章から第 5 章に記述されている。

第 2 章：大腿骨骨折後癒合不全症例に対する凍結同種保存骨を用いた再建術に関する検討

大腿骨骨折後の癒合不全症例 7 例に対して凍結同種保存骨（FCA）及び自家海綿骨移植を実施し、その有用性を検討している。術後の FCA と宿主骨との境界面、そして FCA 自体の経時的な変化を Weiland らによる放射線学的スコア評価に基づき検討している。その結果、術後約 3 ヶ月において宿主骨と FCA の近位そして遠位での骨癒合が得られ、さらに術後 6 ヶ月において FCA 自体の再構築も進行していることが認められた。長期的な経過観察を行ったところ、12 ヶ月を経過した段階では宿主骨と FCA の皮質骨の連続性が認められ、FCA 自体も再構築が進行していることが確認された。以上の成績より、申請者は FCA は骨欠損部に対する優れた再建方法であると考察しながらも、FCA は 7 年の経過後も移植部位に存在していたという報告とも併せて、患者に対して長期的な経過観察を要するという短所も指摘している。また FCA は -80℃ で保存管理が要求されることより特殊な設備が必要であり、さらに FCA の採取のためには健常動物が必要であり、倫理的にも制約を受ける。そのため、骨バンクの整備されていない国内の小動物臨床領域においては限られた施設でのみ使用が可能であり、より簡便に使用可能な代替物の開発が望まれると結論づけている。

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検討

HA/PLLA 製吸収性骨接合材料が PLLA 製吸収性骨接合材料と比較し生体適合性に優れ、早期に骨との直接癒合を獲得したという報告から、申請者は HA と PLLA から構成された人工素材が再建術における足場材料として利用可能であると考え、その基礎実験として HA/PLLA 製骨接合材料そして PLLA 製骨接合材料を大腿骨に埋植後 84 ヶ月の長期間の経過観察を行い、両骨接合材料の皮質骨への置換過程と炎症反応について組織学的評価を中心に比較検討を行っている。その結果、HA/PLLA 製骨接合材料を埋植した群では埋植後 60 ヶ月において放射線学的評価そして組織学的評価により骨孔の骨性組織による閉鎖が認められた。しかし、PLLA 製骨接合材料を埋植した群では放射線学的評価そして組織学的評価により

埋植後 84 ヶ月においても骨孔の閉鎖は認められなかった。さらに埋植後 60 ヶ月において PLLA 製骨接合材料を埋植した群では骨孔に重度の組織球浸潤が認められたが、HA/PLLA 製骨接合材料を埋植した群では観察期間中に重度な組織球浸潤は認められなかった。本検討において HA/PLLA 製骨接合材料は炎症反応を惹起することなく骨との直接癒合し、さらに自家骨への置換が認められたことより、HA と PLLA から構成された吸収性素材が吸収性人工骨としての性質を備えていることを示唆している。

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

本章では、長管骨の非荷重部に作製した骨孔に HA/PDLLA 製人工骨を埋植し、 β -TCP 製人工骨を対照としてその有用性を比較検討している。実験 1 として HA/PDLLA 製人工骨と β -TCP 製人工骨の骨への置換過程について比較検討を、実験 2 として、熱変形 HA/PDLLA 製人工骨と未変形 HA/PDLLA 製人工骨の組織学的評価を、実験 3 として HA/PDLLA 製人工骨と β -TCP 製人工骨の接着強度の比較検討、さらにその後 HA/PDLLA 製人工骨の平均分子量の変化を検討している。実験 1 では、HA/PDLLA 製人工骨は β -TCP 製人工骨に比較し骨形成と人工骨吸収が遅延することを確認しているが、HA/PDLLA 製人工骨では骨への置換過程が停止している状態ではなく、 β -TCP 製人工骨に比較して旺盛な Runx-related transcription factor 2 (Runx2)陽性細胞と Type-I collagen(COL I)陽性組織の浸潤を確認している。実験 2 では、熱変形による骨置換過程への影響は認められなかった。実験 3 では、HA/PDLLA 製人工骨と β -TCP 製人工骨は同等の接着強度を示すこと、また PDLLA の平均分子量は経時的に有意に減少していることを明らかにしている。以上の成績より、非荷重部位では HA/PDLLA 製人工骨は β -TCP 製人工骨に比較し自家骨への置換過程が遅延する傾向があるものの、その要因は骨形成の遅延ではなく人工骨の分解吸収過程の遅延と結論づけている。

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

PDLLAは荷重条件下においては分解が促進されることが報告されていることより、本章においては HA/PDLLA 製人工骨の荷重部位での骨置換過程について、 β -TCP 製人工骨を対照として比較検討を行っている。両側脛骨骨幹部に 15mm の骨欠損を作成し、左側には β -TCP 製人工骨、右側には HA/PDLLA 製人工骨を埋植し、1、3、12 ヶ月の時点での組織学的評価を行っている。その結果、HA/PDLLA 製人工骨と β -TCP 製人工骨は同等の骨形成を示すことを明らかとしている。さらに HA/PDLLA 製人工骨では早期から COL I 陽性の線維組織そして宿主の細胞浸潤が強く確認されたこと、さらに血管腔と人工骨吸収の一部を担う破骨細胞様細胞、そして間葉系幹細胞を骨芽細胞へと分化させる Runx2 など、HA/PDLLA 製人工骨では骨代謝において重要とされる因子が強く浸潤していることより、自家骨への置換が活性化されていることも明らかとしている。以上の成績より、荷重条件下においては β -TCP 製人工骨と HA/PDLLA 製人工骨は人工骨の吸収過程と骨形成過程に両者間で大きな差異が認められるものの、同等の骨形成能を備えていることを明らかにしている。

以上のように、申請者は、第 2 章において小動物整形外科領域で癒合不全罹患症例の骨欠損に対する治療として現在行われている FCA の有用性を再確認するとともに、FCA 使用の問題点を提示することに始まり、第 3 章では PLLA 製吸収性素材単独では達成困難な皮質骨孔の骨性閉鎖は PLLA 製吸収性素材に HA を添加することにより早期に達成されることを証明し、さらに第 4 章そして第 5 章では、この所見をもとに HA と PDLLA から構成された新規の HA/PDLLA 製人工骨が長管骨の骨欠損部内で炎症反応を惹起せず、自家骨へと置換されることを放射線学的そして組織学的に証明した。また HA/PDLLA 製人工骨の特徴である熱変形後においても、吸収・骨置換に影響することなく使用することが可能なこと、そして自家骨への置換速度が荷重条件下、非荷重条件下において大きく異なることを明らかにしている。これらの成績は、獣医療のみならず、人医療においても極めて重要であり、学術上、応用上、貢献することが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。