

筑波大学

博士（医学）学位論文

一軸連通孔人工骨による皮質骨再生
一血管新生、連通孔サイズの影響一

2016

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

牧原 武史

目次

第 1 章 本研究の背景	5
1. 1. 一軸連通孔ハイドロキシアパタイト	
1. 1. 1. 現在流通している人工骨	
1. 1. 2. UDPHAp の特徴	
1. 1. 3. 先行研究	
1. 2. 皮質骨の微細構造、血管構造および骨リモデリング	
1. 3. 連通性人工骨内部の血管新生	
1. 4. 一軸性人工骨内新生骨の微細構造	
1. 5. 骨リモデリングに影響する因子	
第 2 章 本研究の目的	13
第 3 章 対象と方法	14
3. 1. 移植材料	
3. 2. 皮質骨欠損動物モデル	
3. 2. 1. モデル動物	
3. 2. 2. 評価時期と方法	

3.3. 人工骨内新生血管の評価

3.4. 組織評価

3.4.1. 非脱灰標本

3.4.2. 脱灰標本

3.5. 組織形態計測

3.5.1. 骨小腔、骨細胞数

3.5.2. オステオン様構造

3.5.3. 連通孔サイズの測定

3.6. 統計解析

第4章 結果.....21

4.1. 皮質骨欠損動物モデルの作製、合併症の有無

4.2. 皮下、筋膜に作製された血管鑄型の肉眼的評価

4.3. 組織評価

4.3.1. 非脱灰標本

4.3.1.1. 矢状断 Villanueva Goldner 染色標本による新生骨組織と

新生血管の評価

4.3.1.2. 水平断未染色、およびカルセイン蛍光標識標本による

新生骨組織とオステオン様構造の評価

4.3.2. 脱灰標本

4.3.2.1. 矢状断 HE 染色

4.3.2.2. 矢状断カタプシン K 免疫染色

4.3.2.3. 水平断 Bodian 染色

4.4. 組織形態計測

4.4.1. 領域別骨細胞数

4.4.2. 領域別オステオン様構造数

4.4.3. 連通孔サイズとオステオン様構造

第5章 考察.....26

5.1. 結果のまとめ

5.2. 本材料における血管新生の特徴

5.3. オステオン様構造の形成

5.4. 皮質骨の再生

5.5. 理想的な連通孔サイズ

5.6. 研究限界

第6章 結論	33
図、表	34
引用論文	48
学会発表	53
謝辞	55
参考論文	56

第 1 章 本研究の背景

1. 1. 一軸連通孔ハイドロキシアパタイト

一軸連通孔ハイドロキシアパタイト (Unidirectional porous hydroxyapatite: UDPHA_p) は筑波大学整形外科、株式会社クラレ及び独立行政法人物質・材料研究機構で共同開発した新規人工骨である。現在一般的に流通している人工骨の種類、当材料の特徴および先行研究について以下に述べる。

1. 1. 1. 現在流通している人工骨

人工骨は腫瘍切除術後や骨折後の骨欠損を補填することを目的に使用される。現在一般的に流通している人工骨は、骨の主成分であるリン酸カルシウムから合成される、ハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite; HA; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)、および β リン酸 3 カルシウム (β -tricalcium phosphate; β -TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) が用いられている。 β -TCP は生体吸収性を持つという特徴がある一方で、強度については HA が有利であり両者とも広く使用されている[1]。

現在一般的に用いられている HA には、ネオボーン[®][2] (コバレントマテリアル)、アパセラム-AX[®][3] (HOYA) が挙げられる。両者とも骨伝導に重要である気孔間連通性に主眼が置かれており、球形の内腔が小孔により連続する泡状構

造の形状をとっている。ネオボーン[®]は気孔率 75%、圧縮強度は 10MPa であるのに対して、アパセラム-AX[®]は気孔率 85%と高い値であるもののそれにより圧縮強度は 2MPa と低値である。

1. 1. 2. UDPHA_p の特徴

UDPHA_p は柱状氷結晶をテンプレートとして作成され、一方向に配列する柱状の連通孔を有する。一軸連通孔は長径 30-300 μm の楕円形形状をしており毛細管現象により液体成分が速やかに材料内部に侵入するため、速やかな組織侵入、骨新生が期待されている[4]。当人工骨の 3DμCT 写真、及び家兎の血液を使用した毛細管現象検証の写真を示す (図 1)。

また、この異方的構造は圧縮強度に反映され、長軸方向の強度は約 14 MPa、短軸方向の強度は約 2 MPa と大きく異なる。気孔率は 75 %である。名井は当人工骨を、特定方向の強度を得ると同時に、その特徴的な構造と高い気孔率からより組織侵入を容易にしていると述べている[1]。

UDPHA_p を用いた基礎実験からは良好な骨伝導能が報告されている[5-8]。他材料と直接的に比較した報告はないものの、その良好な骨伝導能は有用性を支持するものと考察されている。

人工骨の性能を考える上で、従来の報告では「骨伝導」、すなわち材料内に形

成される骨の量が評価されている。人工骨の本来の目的である「骨補填」を考える上では形成される骨の性質も重要なのではないかと考えた。その観点から次に新生骨の性質について注目し先行研究の知見を述べる。

1. 1. 3. 先行研究

Iwasashi らは日本白色家兎の脛骨近位に作成した 4 mm× 7 mm の皮質骨欠損部に UDPHAp を埋植し、2、6、12 週後に検体採取し材料内骨形成を評価した。12 週時点で皮質骨に接する領域では髓腔（海綿骨）に接する領域よりも旺盛な骨形成が得られていた[5]。この結果は UDPHAp 内の新生骨がおかれた環境の違いにより骨形成・リモデリングの動態が異なることを示している。

Iwasashi らは同モデルを 104 週まで経過を追い、同現象が長期に持続していることを示した。また、カテプシン K の免疫染色では新生骨表面に破骨細胞が接着していることが確認され、新生骨の骨リモデリングが生じている可能性があると考察した[6]。

野口は、ビーグルの大腿骨骨欠損モデルを使用し、プレート固定の位置を変えることで力学的環境を変化させ、適切な負荷がかかると人工骨内の骨形成がより旺盛となることを示した[7]。

以上 3 報の先行研究から、UDPHAp 内の新生骨は力学的因子を含めた環境に

応じて骨リモデリングが生じうると考えられた。生理的な組織構造をもつ骨再生を得ることは人工骨を **scaffold** として使用することの目標であることから、この性質は重要であると思われ、その詳細を研究する必要があると考えた。次項では骨組織に関する基礎知識について述べる。

1.2. 皮質骨の微細構造、血管構造および骨リモデリング

ヒト生体の骨組織微細構造について述べる。

ヒトの四肢を構成・支持する長管骨は外周を取り巻く皮質骨と内腔を占める海綿骨に分けられ、支持組織としての強度は主に皮質骨が担っている。皮質骨は緻密な組織で硬く、多数の層板構造からなる。骨組織を形成する骨細胞の集団は **3 から 20** 数層のオステオンと呼ばれる層板構造（図 2）を形成する。この層板は骨の長軸方向に年輪状の配列を示す。中空部分はハバース管と呼ばれ内腔には血管及び神経を含む。ハバース管は骨細胞と骨細管で連結されている。骨細胞は骨小腔内に存在し、骨細胞同士は **gap junction** により樹状に連結され[9]、骨細胞、骨小腔、骨細管システムという細胞ネットワークを形成している。このシステムこそが力学的環境の感知や栄養・酸素の運搬を担っており、骨リモデリングの鍵となる役割を果たしている[10]。

このように、血管を含めた骨微細構造と骨リモデリングは密接な関係がある

ため、UDPHAp 内新生骨の微細構造を評価する必要があると考えた。次項、次々項では人工骨内の血管新生、一軸性人工骨の骨新生について評価している報告について述べる。

1.3. 連通性人工骨内部の血管新生

材料内部の新生組織が生理的に機能するには血管新生が不可欠である。

Nakasa らは家兎の血管束を取り囲むようにして中空構造をした連通性人工骨を移植し、microangiography を行い材料内の血管新生を評価した[11]。組織評価により血管造影剤の存在、すなわち材料内血管新生が証明され、移植前に血流のある人工骨を作製できる可能性を示している。しかしながらこのモデルでは皮下に埋植され、骨への移植前準備を想定しているため、人工骨が実際に使用される骨欠損への移植での動態は明らかではない。また、使用された連通性人工骨は球形の内腔がそれぞれ連通する泡状構造であり、UDPHAp とは異なる。

Bolland らは放射線不透過性の血管造影剤を使用し、 μ CT により 3 次元的に新生血管を評価、その体積を定量的に求めている [12]。使用材料はポリ乳酸 (polylactic acid; PLA) および自家骨であり UDPHAp とは大きく異なるものの、新生血管の定量評価という点から有用な手法と考えられる。

Mehdizadeh らはコンピュータモデルを使用し、材料構造の違いが材料内血管

新生にもたらす影響をシミュレーションした[13]。材料内腔のサイズが大きく、連通性・気孔率が高い構造が血管新生に有利であるとした。この報告から、移植部位の違い、構造の違いは血管新生に関して影響すると考えられる。

骨内に移植された **UDPHAp** 内の血管新生、その動態は現状では不明であり、骨組織の微細構造を評価するためには必要な検討項目であると考えた。

1. 4. 一軸性人工骨内新生骨の微細構造

Ryu らは家兎脛骨近位部に一軸構造人工骨および泡状構造人工骨を移植し、移植後 4、8 週で骨組織の評価を行った[14]。その結果一軸構造人工骨内部には同心円状のオステオン様新生骨が形成され、泡状構造には同構造はみられないと報告した。

Iwasashi らは日本白色家兎脛骨近位に埋植した **UDPHAp** の組織評価を 52 週、104 週で行い、連通孔に沿った断面の評価から層板骨が形成され維持されていることを示した[6]。しかしながら連通孔に垂直な断面は評価しておらず **UDPHAp** 内に **Ryu** らが使用した一軸構造の人工骨同様オステオン様構造が形成されるのかは不明である。

オステオン様構造は正常組織に類似した微細構造であり、骨リモデリングに重要な役割を果たすと思われ、その評価が必要であると考えた。**Ryu** らの報告で

は短期のみの検討であり、長期に持続する構造なのかは不明である。また、オステオン構造では中央の血管が重要な役割を果たすと思われ、血管構造と合わせた評価が必要であると考えた。

1.5. 骨リモデリングに影響する因子

ヒトや動物の骨組織は力学的環境に反応し、リモデリングが生じることにより強度を増減させる性質をもつ。環境に対する適応のための重要な生理的機能であり、**Wolff's law** と呼ばれる[15,16]。

UDPHAp の先行研究[3-5]から、新生骨の骨リモデリングには力学的環境が影響すると考えられる。しかしこれらの報告は、骨新生を組織標本の面積から評価しており、骨微細構造との関連は不明である。

また、骨リモデリングに影響する因子として、人工骨内腔のサイズが挙げられる。**Karageorgiou** は人工骨の構造と骨新生についてのレビューの中で、人工骨の気孔率および内腔のサイズは骨新生に対して決定的な役割を果たすと述べている[17]。骨新生は最低 $100\ \mu\text{m}$ のサイズが必要であり、 $300\ \mu\text{m}$ 以上が勧められると述べている。その一方で **Chang** らは一軸構造人工骨内 $50\ \mu\text{m}$ 径の内腔に旺盛な骨新生を認めたとし[18]、未だ一致した見解は得られていない。

骨新生は内腔の連通性や表面形状など様々な因子に影響されると考えられ、

UDPHAp においてはその詳細は不明である。UDPHAp は 30-300 μm 径の様々な大きさの連通孔が存在しており、それぞれの内腔における骨新生、骨微細構造を比較することで検討可能と思われる。

以上の背景から、UDPHAp における骨リモデリングの詳細を明らかにするためには、材料内新生骨に構築された微細構造の解析が重要であると考えた。具体的には依然として明らかとなっていない血管新生、オステオン様構造の有無を評価する必要があると考えた。また、力学的環境の違い、連通孔サイズの違いと微細構造の関連が重要な検討項目と考えた。そこで、骨欠損動物モデルへ UDPHAp を埋植し、以上の項目を検討する研究を発案した。

第2章 本研究の目的

UDPHApに関する先行研究、連通性人工骨に関する過去の知見から、本研究の仮説は「骨欠損への移植後、UDPHAp内には血管新生を伴う正常皮質骨に類似した骨新生が生じる。それらの微細構造は力学的環境および連通孔サイズに影響される」とした。

本研究の目的は、皮質骨欠損動物モデル移植後のUDPHAp内の新生血管および新生骨微細構造を観察し、それらが力学的環境および連通孔サイズによってどのように影響されるかを明らかにすることである。

第 3 章 対象と方法

本研究は筑波大学動物実験取扱い規定に従い、動物実験委員会の承認を得て行った。

3. 1. 移植材料

UDPHAp（株式会社クラレ、岡山）を使用した。UDPHAp はヒドロキシアパタイト $[\text{Ca}_{12}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ のスラリーから **Freeze-casting** テクニックにより製造される[4]。上底 3 mm、下底 5 mm、高さ 5 mm の台形で長さ 7 mm の台形柱に形成し、連通孔を長軸方向に配列させたものを使用した。

3. 2. 皮質骨欠損動物モデル

皮質骨欠損動物モデルの作製、材料の埋植は Iwasashi らの報告に従って行った[5, 6]。先行研究において安定した結果が得られており、微細構造観察のため適切なモデルと考え、採用した。

3. 2. 1. モデル動物

28羽の日本白色家兎を使用した。骨成熟の得られた 28-32 週齢の家兎を用い

た。全個体は個別のケージに飼育され、実験前に 7 日間の順化期間をおいた。

手術手順は以下の通りである。

- ケタミン 50 mg/kg およびキシラジン 14 mg/kg の筋肉注射により全身麻酔を得る。
- 仰臥位で固定し、右脛骨結節の内側を剃毛した後に 1%リドカイン 0.5-2 ml の局所注射麻酔を行い 2.5 cm の皮膚切開を縦におく。
- 皮下組織及び筋膜を切開し、脛骨を露出する。
- 横 5×縦 8 mm の大きさを骨膜を切除する。
- ハイスピードバーを用いて横 4×縦 7 mm の皮質骨欠損を作製する。このサイズであれば前述のサイズの台形柱に形成した UDPHAp が安定して埋植可能であることが示されている[5]。
- 同骨窓に UDPHAp をはめ込むようにして埋植する。連通孔の向きは脛骨の長軸に沿うようにする (図 3)。
- 筋膜および皮膚を非吸収糸で縫合する。
- 術後は特に制限を加えず、すぐに下肢を使えるようにする。

3. 2. 2. 評価時期と方法

評価時期は埋植後 2 週 (n=4)、6 週 (n=6)、9 週 (n=6)、12 週 (n=6)、29

週 (n=6) とした。屠殺はペントバルビタールの過量投与により行い、屠殺 2 日前、9 日前にカルセイン (8 mg/kg, 同仁化学研究所、熊本) を背部に皮下投与し骨形成の蛍光標識を行った。

カルセインはカルシウム錯体が強い蛍光を示すことが特徴であり、これを利用して組織中のカルシウムを分析することができる[19]。骨組織においては、非脱灰標本から暗視野で明瞭に骨形成を観察可能であり、組織形態学的に定量評価を行う事が可能である[20]。

3.3. 人工骨内新生血管の評価

埋植した材料内に存在する新生血管評価のため、Nakasa らの方法に沿い血管鑄型の作製を行った[11]。

鑄型材料である Microfil[®] (MV-120 (青色)、Flow Tech Inc., Massachusetts) は液状のシリコンラバーであり、2-エチルヘキサン酸すず(II)およびエチルシリケートからなる硬化剤の添加により重合反応を起こし鑄型を形成する。非脱灰標本において組織評価を行うことが可能であり、また X 線非透過性であるため、 μ CT などの画像評価を行うことが可能である[12]。ただし、酸性の脱灰液を使用すると色素および X 線透過性が失われてしまうため、中性の脱灰液を使用する必要がある。

手順は以下の通りである。

- ケタミン 50 mg/kg およびキシラジン 14 mg/kg の筋肉注射により全身麻酔を得る。
- 右大腿部内側近位を展開、大腿動脈・静脈を露出する。
- 24 G 留置針を用いて大腿動静脈を確保し、ヘパリン生食を連結する。
- 大腿静脈を切開、またはカニューレションし排出孔とした後に動脈・静脈とも近位をクランプし、下肢の灌流を限定的に行うことができるようにする。
- 灌流圧はウサギの正常血圧である 90-140 mmHg になるよう連結した血圧計でモニタリングする。
- 灌流開始後、耳介静脈よりペントバルビタールを過量投与し屠殺を実施する。
- 排出が透明になるまで灌流を行った後に、Microfil[®]を 20-30 ml 注入し、排出液中に血液が混じらず Microfil[®]のみになったのを確認する。
- 注入完了後、動静脈確保部分よりも遠位でクランプし、90-120 分放置する。
余った Microfil[®]が硬化しているのを確認した後、組織を摘出する。

右下肢を灌流する血管の基部は大腿動脈であり、本法により右下肢全体、少なくとも脛骨の血管を染色することが可能と考えられる。

3.4. 組織評価

摘出した検体は 10%緩衝ホルマリンにより固定した。人工骨中央で縦に半割し、一方から非脱灰標本を、他方から脱灰標本を作成した。それぞれについて矢状断標本および水平断標本を作成した (図 4)。

3.4.1. 非脱灰標本

非脱灰標本は MMA 樹脂により包埋、剖面から矢状断標本を約 30 μm の厚さで研磨標本を作成し Villanueva Goldner 染色を行った。残ったものから人工骨中央の高さにおいて水平断で研磨標本を作成し未染色で観察した。

3.4.2. 脱灰標本

脱灰標本は K-CX (Meiji Seika ファルマ株式会社、東京) により脱灰を行った後にパラフィン包埋した。剖面から 5 μm で切り出し、矢状断標本を 2 枚作成、片方を HE 染色、もう片方はカテプシン K の免疫染色を行った。残ったものから水平断に 5 μm で切り出し、近位端より 1 mm の位置のスライスに Bodian 染色を行った。

K-CX は塩酸を含む酸性脱灰液であり、鋳型色素と X 線透過性が失われる。中性脱灰液では UDPHAp が脱灰されないため、やむなく K-CX を使用した。

3.5. 組織形態計測

非脱灰、水平断標本から組織形態計測を行った。荷重による影響を明らかにするため、Iwasashi らの方法[5,6]に従い材料内を 2 領域に分割した。母床骨の皮質骨から連続する領域を皮質領域、髓腔から連続する領域を髓腔領域と定義した (図 5)。それぞれの領域において以下の項目を測定し比較した。

3.5.1. 骨小腔、骨細胞数

400 倍視野をランダムに 5 箇所設定し、骨組織の中に存在する骨小腔、骨細胞の数をカウントし合計数を記録した。

3.5.2. オステオン様構造

Ryu らの報告[14]に従い、同心円状に骨小腔、骨細胞が配列する構造をオステオン様構造と定義し、100 倍視野 1 箇所からその個数を測定した。

3.5.3. 連通孔サイズの測定

画像解析ソフト Image J[®][21]を使用して連通孔を楕円形に近似し、その長軸を連通孔サイズと定義した。100 倍 1 視野から連通孔サイズを測定し、オステオン様構造形成との関連を解析した。

3.6. 統計解析

領域間の骨細胞数、オステオン様構造数は平均±標準偏差で表し、比較に **Student's t-test** を使用、**p 値 0.05** 未満を有意差ありとした。連通孔サイズとオステオン様構造形成の関連解析に **ROC** 解析を使用し、**Youden index** からオステオン様構造が形成されるカットオフ値を求めた。

第4章 結果

4.1. 皮質骨欠損動物モデルの作製、合併症の有無

全個体において骨欠損の作成、材料の安定した埋植を完遂しトラブルは生じなかった（図6）。UDPHAp 内部には移植後数秒以内に血液が浸透する様子が観察された。全個体とも実験期間中良好な全身状態を維持し、最長 29 週にわたり体重減少や感染兆候は観察されなかった。

4.2. 皮下、筋膜に作製された血管鑄型の肉眼的評価

血管の確保、下肢の灌流、Microfil[®]の注入およびその硬化が全個体で完遂可能であった。血管の破綻や Microfil[®]の流出は観察されなかった。皮下組織や筋膜上の血管が青色に染色されているのが肉眼的に確認可能であった（図7）。

4.3. 組織評価

全個体、全検体について非脱灰標本および脱灰標本の作製、各染色を予定通り行う事が可能であった。

4.3.1. 非脱灰標本

4.3.1.1. 矢状断 Villanueva Goldner 染色標本による新生骨組織と

新生血管の評価

図 8 に 2、6、9、29 週標本を示す。弱拡大像では埋植された人工骨全体が観察可能である (図 8 A-D)。2 週時点で人工骨内に組織が侵入し、周囲組織と連続していた。材料辺縁 500 μm 程度の範囲で緑色に染色される新生骨組織が観察された (図 8 A)。新生骨組織は 6、9、29 週時点では材料全体に観察された (図 8 B-D)。100 倍拡大視野においては Microfil の青色粒子が観察され (図 8 A'-D')、粒子を含む管状構造は連通孔に沿って一方向性に走行し、2 週時点ですでに新生血管が材料中央に達している様子が観察された。

4.3.1.2. 水平断未染色、およびカルセイン蛍光標識標本による

新生骨組織とオステオン様構造の評価

図 9 に 2 週、9 週、29 週標本を示す。2 週では連通孔内部にランダムな新生骨組織が観察され、9 週では規則的な層状構造が観察された。各週での連通孔内には青色の Microfil[®]粒子を含む血管構造が認められ、9 週、29 週では層状に骨組織が取り囲む構造、すなわちオステオン様構造の形成が確認された。オステオン様構造は比較的小さな連通孔 (40-120 μm) に見られ、大きな連通孔 (160 μm)

以上)では脂肪滴を含む疎な骨形成が観察された(図9B-C)。29週の新生骨組織には骨小腔が存在し、骨小腔同士および中央の血管が細管で連絡している様子が観察された。皮質骨にみられるオステオンと非常に類似した構造であった(図9D,E)。

図9F-Hに示す暗視野、明視野の合成像ではカルセインにより蛍光標識されたカルシウムが認められ活発な骨形成が観察された。2週時点では連通孔の壁に沿った著しい骨形成が見られ、皮質領域でより旺盛な骨形成が観察された。骨形成は29週時点でも継続しており、血管周囲の骨組織表面に集中して明瞭に標識されている様子が確認された。

4.3.2. 脱灰標本

4.3.2.1. 矢状断 HE 染色

図10Aに2週、9週標本のHE染色を示す。

2週で材料内には凝固した血液、フィブリン網が観察された。9週では材料内に新生骨、線維性組織、脂肪滴(白矢頭)が観察された。明らかな軟骨組織の形成はみられなかった。

4.3.2.2. 矢状断カテプシン K 免疫染色

図 10 B に 6 週標本のカテプシン K 免疫染色を示す。カテプシン K 陽性、多核の巨細胞が新生骨表面に多数認められた。巨細胞付近の新生骨は一部 Howship 窩と思われる窪みを形成していた（白矢頭）。

4.3.2.3. 水平断 Bodian 染色

図 10 C に 29 週標本、D に正常皮質骨の Bodian 染色を示す。材料内に形成されたオステオン様構造内の骨小腔、骨細管が黒く染色されていた。骨小腔内には細胞体の存在が認められた。母床骨の皮質骨には同様に黒く染色される骨小腔、骨細管を有するオステオンが認められた。

4.4. 組織形態計測

骨細胞、オステオン様構造を明瞭に識別できるのは 6 週以降の検体であったため、それらを対象に皮質、髓腔領域における計数を行った。

4.4.1. 領域別骨細胞数

皮質領域、髓腔領域の骨細胞数は 6 週 (n=6) 111 ± 30 、 52 ± 13 、9 週 (n=6) 114 ± 24 、 45 ± 18 、12 週 (n=6) 109 ± 26 、 42 ± 19 、29 週 (n=6) 127 ± 117 、

42 ± 23 であり全ての時点で皮質領域の方が有意に多かった。髓腔領域の骨細胞数は減少傾向を示していたが、各時点間に有意差は無かった (図 11)。

4.4.2. 領域別オステオン様構造数

皮質領域、髓腔領域のオステオン様構造の数は 6 週 (n=6) 6 ± 17、2 ± 4、9 週 (n=6) 9 ± 24、4 ± 9、12 週 (n=6) 6 ± 14、2 ± 6、29 週 (n=6) 14 ± 19、8 ± 13 であり、全ての時点で皮質領域の方が有意に多かった (図 12)。

4.4.3. 連通孔サイズとオステオン様構造

オステオン様構造は評価した 6 週以降の全検体に含まれる全 654 の連通孔のうち 202 に形成されていた。連通孔サイズ別のオステオン様構造形成をヒストグラムで示す (図 13)。オステオン様構造はより径が小さい連通孔に形成される傾向があり、ROC 解析からオステオン様構造が形成されるカットオフ値は 105.1 μm であった (図 14)。105.1 μm よりも小さい連通孔では全 397 のうち 150 (37.8%) に形成され、一方 105.1 μm よりも大きい連通孔では全 257 のうち 52 (20.2%) に形成されていた。

第5章 考察

5.1. 結果のまとめ

本研究では、骨欠損動物モデルに **UDPHAp** を埋植し、材料内部に形成される新生骨組織の微細構造、血管新生の評価を行った。29 週の経過の中で材料内部には骨細胞、骨細管、血管を含むオステオン様構造が形成されることが明らかとなった。骨細胞数およびオステオン様構造は皮質領域に有意に多く、力学的環境が骨細胞、オステオン様構造形成に影響すると考えられた。また、オステオン様構造は径の小さい連通孔に多く形成される傾向があり、連通孔サイズも骨新生、骨再生に影響する因子であることが示唆された。

5.2. 本材料における血管新生の特徴

骨折の治癒過程においては骨新生と血管新生がお互いに作用することが報告されている[22]。血管新生は骨折部位に骨芽細胞を流入させるため、骨折治癒の鍵となる役割を果たしている[23]。そのため、人工骨を骨欠損の補填に使用する場合、効果的に血管新生が生じることが非常に重要である。

Nakasa らは泡状構造をした人工骨を円柱状に成型し、血管を取り囲むように皮下へ移植した材料内の血管新生を **Microangiography** により評価し、新生血管

の存在を証明した[11]。新生血管の組織像が提示されており、それを参照する限りでは青く染色された新生血管は泡状構造の内腔を大きく蛇行し走行している様子が観察されている。また埋植後 2 週時点での新生血管長は 1.94 mm であったと記載されている。それに対して本研究、本材料では新生血管は連通孔に沿って一方向性に走行しており、2 週で材料中央 (3.5 mm) まで達している様子が観察された。連通孔の一方向性の構造が血管新生を一方向性に導き、早期に深部へ達する助けとなっているのではないかと考えられる。Nakasa らの報告は骨内への移植ではなく、また移植前に血流のある人工骨を作製する、という目的の研究でありモデルは大きく異なるが、新生血管の形状を観察する上では参考になる所見と考えられる。

また、29 週時点でも密に形成された骨組織の内部に血管が維持されていた。骨組織の代謝、リモデリングに血流は必須であり、血管の存在・維持が証明されたことは大きな意味を持つと考える。

5.3. オステオン様構造の形成

Ryu らは本材料と類似した一軸性の連通孔を有するハイドロキシアパタイトを使用し、泡状構造ハイドロキシアパタイトには見られない、オステオン様構造を呈する新生骨の存在を報告した[14]。本材料でも同様にオステオン様構造が観

察され、特徴的な連通孔構造は新生骨が皮質骨同様の骨形態を呈する重要な要因の一つとなっていると考えられる。

本研究では図 9 B-D に示すように、オステオン様構造の中心に血管が存在し、29 週まで同構造が維持されうることを示した。また図 10 C に示すように、骨組織が骨細胞を含む骨小腔、およびそれらと血管を連結する骨細管を有することを明らかにした。これらの結果は、骨単位としての最小形状が材料内に再現されていることを意味しており、新生骨が新生血管および骨細管により栄養、代謝されている事実を示唆している。新生骨の性質・機能を論じる上で重要な所見であると考えられる。

5.4. 皮質骨の再生

Iwasashi らは本研究同様の動物モデルを用いて、材料内の領域分けを行い、皮質領域と髄腔領域で骨形成が異なり、その現象が 104 週まで持続していることを報告した[6]。長期に持続することから新生骨の骨リモデリングが生じている可能性を考察しているが、そのメカニズムは不明であった。

本研究ではより詳細な組織評価により、領域ごとの骨形成の差を、骨細胞数・オステオン様構造の数から検討し、どちらも皮質領域で有意に多いという結果が得られた。Nguyen らは骨小腔－骨細管構造が有する繊毛が力学的環境を感知

し、周囲環境に応じた骨リモデリングに重要な役割を果たすと報告している[10]。前述の結果から、本研究における新生骨は骨小腔－骨細管構造を有することが明らかとなっており、周囲環境を感知できるものと考えられる。したがって、材料内領域ごとの骨形成の差は、周囲刺激に対して新生骨組織が反応し骨細胞数、オステオン様構造数に反映されたことによりもたらされたものである可能性を示唆している。宇宙など無重力状態や廃用症候群では筋肉の萎縮や脂肪浸潤がみられることが知られている[24]が、図 9 B、C に示すように一部の連通孔内に脂肪滴の存在がみられたことは、力学的因子が関わっている可能性を想定させる。

カルセインによる蛍光標識では図 9 H に示すように 29 週経過後もオステオン様構造中心の血管周囲に骨形成が活発に生じていることが明らかになり、材料内新生骨にリモデリングが継続しているものと考えられる。

以上のことから、本材料内に形成された新生骨は皮質骨と類似したオステオン様構造を呈し、また環境に応じてリモデリングされるという生理的な皮質骨と類似した性質を有するということが明らかとなった。

5.5. 理想的な連通孔サイズ

しかしながら、材料内の連通孔全てにオステオン様構造が生じた訳ではなく、

図 13 に示すようにサイズが小さい連通孔に多く形成される傾向があった。オステオン様構造の形成は様々な因子に影響を受けると考えられ、本研究からは前述した力学的環境に加え連通孔サイズが影響因子になりうると考えられた。

人工骨の理想的な内腔サイズは以前から議論の的となっている。Hulbert らは、人工骨内に骨形成を得られる最低サイズは 100 μm であるとし[25]、Karagerogiou らは 300 μm 以上の内腔を有することを勧めている[17]。Kuboki らは小さい内腔サイズは低酸素環境を引き起こしそれにより軟骨形成を引き起こす可能性があるとして述べている[26]。

その一方で Chang らは 50 μm の内腔でも旺盛な骨形成が得られたと報告している[18]。これらの結果の異なる報告は、違った構造を有する材料を使用しており、骨形成は内腔のサイズのみならず、内腔構造や表面形状等によって影響されうると示していると考えられる。

本研究においては内腔の小さい連通孔に旺盛な骨形成が得られ、160 μm を超す大きな連通孔ではむしろ脂肪滴が存在し、疎な骨形成が認められた（図 9 B、C）。オステオン様構造は 105 μm 以下の小さい連通孔により形成される傾向があった。また、全検体を通じて明らかな軟骨形成は確認されなかった。一軸性の連通孔を有する人工骨の場合、従来報告されているよりも理想的な連通孔サイズは小さい可能性がある。

5.6. 研究限界

第一に、本研究では力学試験を行っていないため、オステオン様構造の形成と力学的強度の関連が明らかではない。圧縮強度や曲げ試験など、力学的試験の追加により評価できる可能性があり、オステオン様構造形成の意義を検討することができると思われる。

第二に今回使用した骨欠損モデルは必ずしも十分に大きなサイズとは言えず、実臨床で遭遇するような大きな骨欠損で本研究のような結果が得られるのかは明らかではない。本研究では材料内部の骨形成微細構造を評価することを目的としていたため、短期間に安定した骨形成が得られる欠損サイズのモデルを採用した。より大きな骨欠損を作製、材料を移植することでより現実に即した検討が可能と考えられる。

血管新生の評価について、本研究では組織所見からその存在を確認する、定性的な評価にとどまっている。血管新生についての定量的評価には、X線非透過性造影剤、 μ CTを使用した体積測定[12]や、血管内皮細胞の表面抗原である CD34 の免疫組織科学的評価[27]といった方法がある。どちらの方法においても UDPHA_p の脱灰が必要となるが、酸性脱灰液を使用しなくてはならず、それにより Microfil[®] の X 線非透過性が失われてしまうこと、また表面抗原の染色が不安定になってしまうこと、から本研究では実施不可能であった。

家兎の生理的オステオンは約 100 μm 径であり、ヒトの約 200 μm [28]と比較し明らかに小さい。生理的オステオン径の数値と今回得られたオステオン様構造形成のカットオフ値 105 μm は近い数値であり、連通孔サイズがオステオン様構造形成に重要な役割をもつと考えられる。理想的な連通孔サイズは種によって異なる可能性があり、ヒトの臨床使用に理想的な材料を考えていく上ではさらなる検討が必要である。オステオンの径は種によって異なる（鹿: 約 140 μm 、イヌ: 約 120 μm [28]) ため、モデル動物を変更し比較することで検討可能と思われる。

第6章 結論

家兎皮質骨欠損モデル移植後の UDPHAp 内には血管を含む正常皮質骨に類似したオステオン様構造が形成された。オステオン様構造および骨細胞数は力学的環境に影響され、環境に応じた骨リモデリングが生じている可能性が示唆された。連通孔サイズは骨リモデリングに影響する因子と考えられるが、至適なサイズに関しては今後さらなる研究が必要である。

図・表

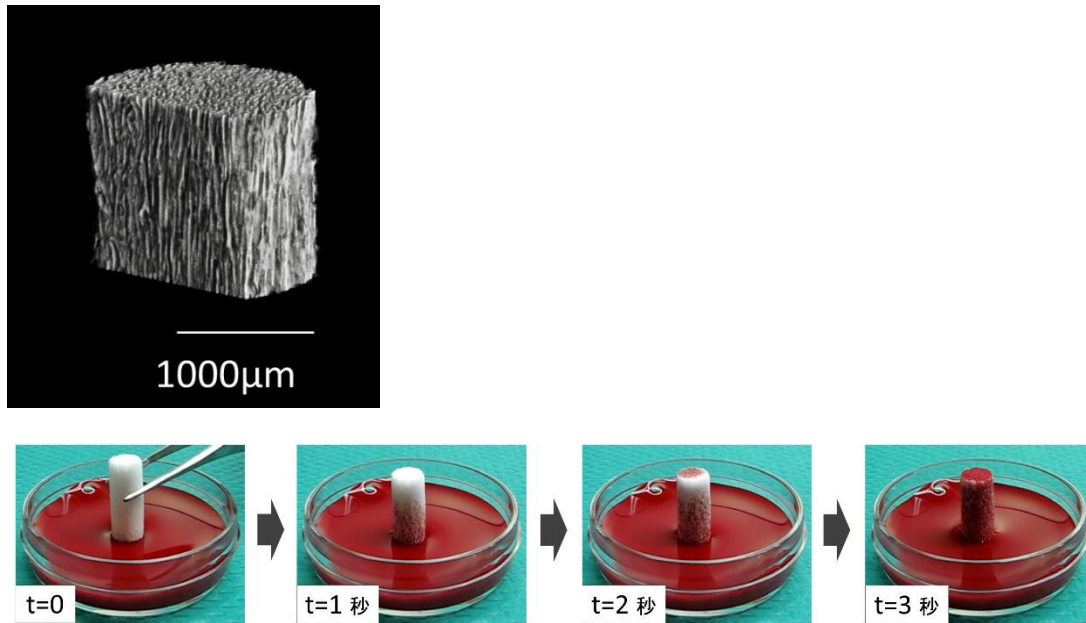


図1 UDPHAp の 3D μ CT 写真（上）および家兎血液を使用した毛細管現象検証
実験（下）

一軸性の内腔構造（上）、毛細管現象（下）が確認される

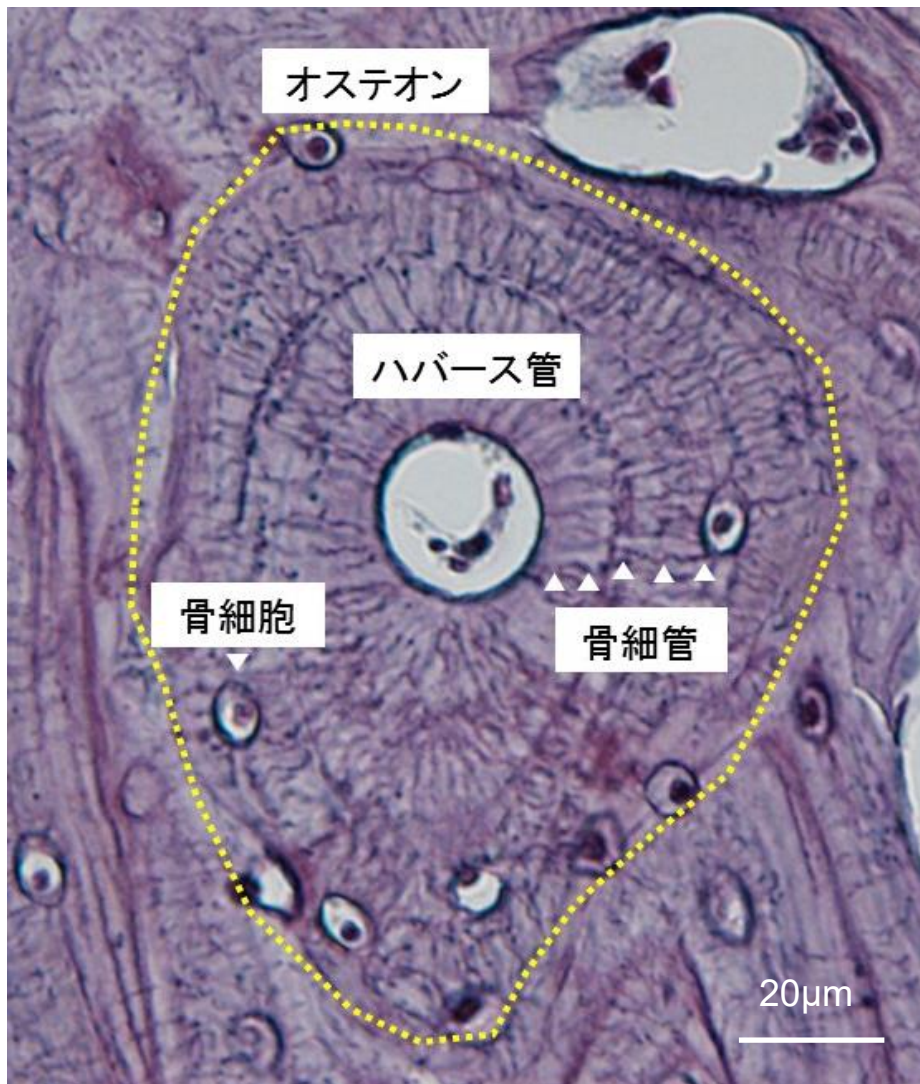


図2 家兎オステオン (Bodian 染色標本)

血管を含むハバース管を中心に骨組織が年輪状に配列し、ハバース管と骨細胞、および骨細胞同士は骨細管で連絡される

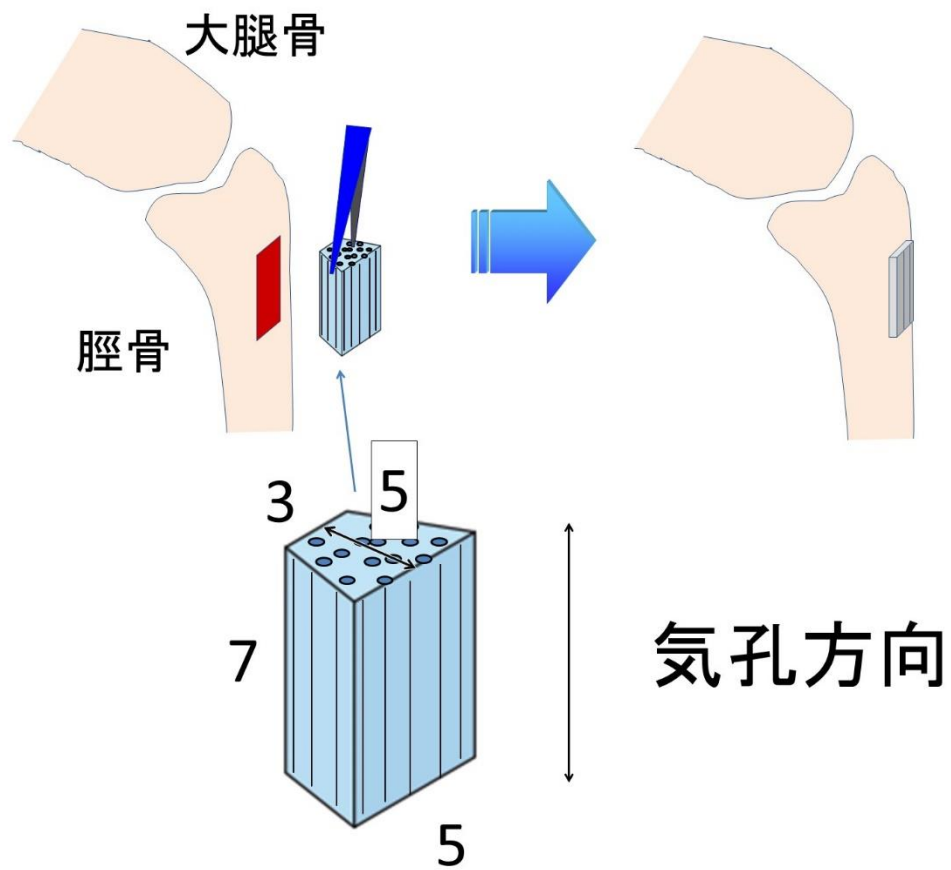


図3 皮質骨欠損モデル作成、人工骨移植の模式図

脛骨近位内側に骨窓を作成、台形柱に形成した **UDPHAp** を埋植する

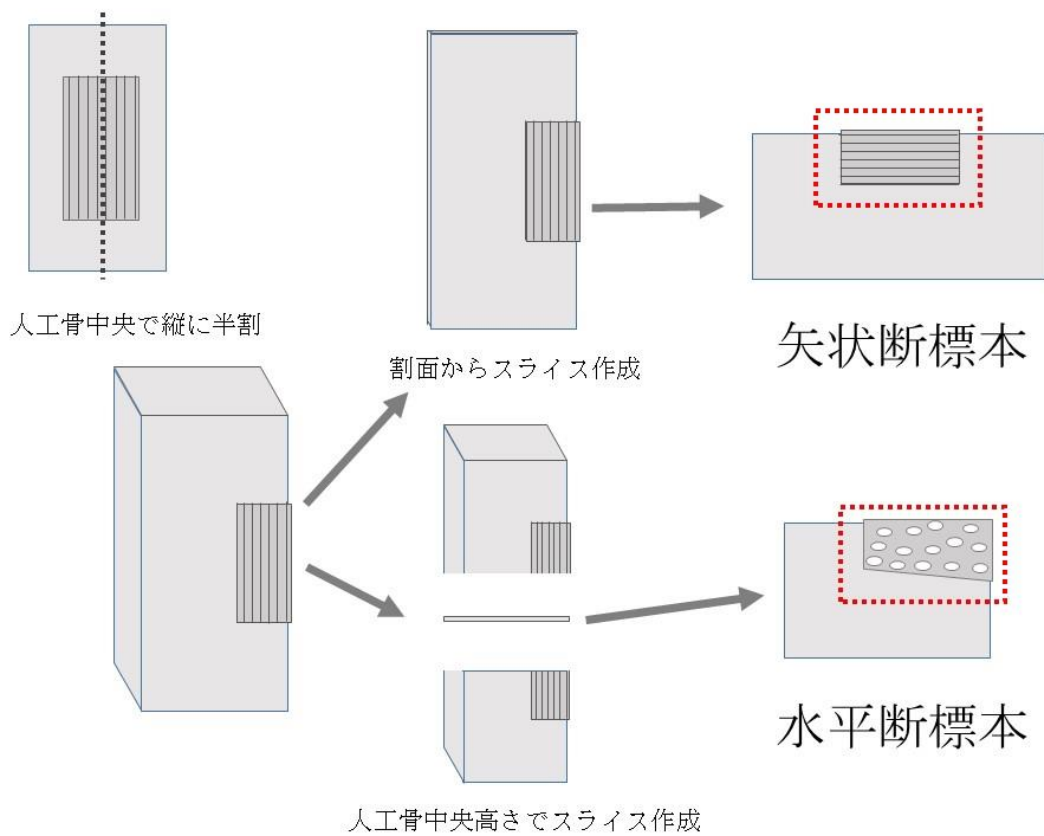


図4 組織標本作成模式図 矢状断標本及び水平断標本

矢状断標本では連通路は横向きに、水平断では連通路は輪切りの状態で観察が可能である

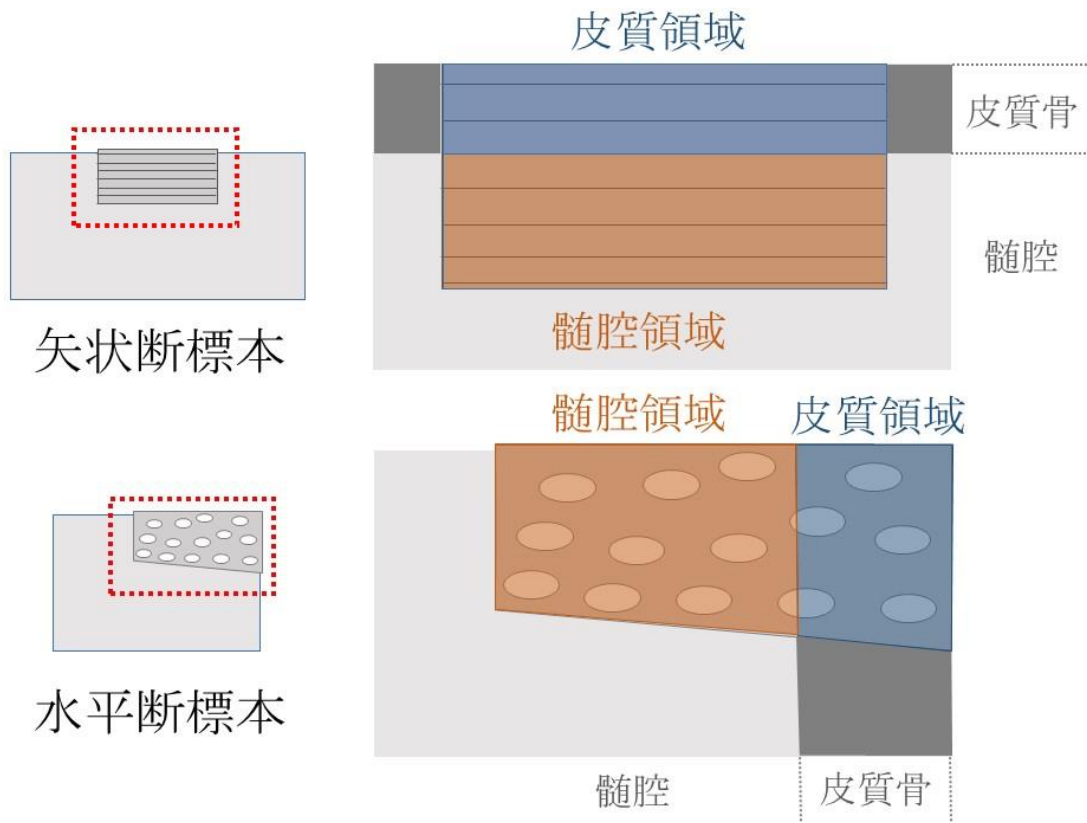


図5 材料内領域分けの模式図

母床骨の皮質骨から続く領域が皮質領域、髓腔から続く領域が髓腔領域である

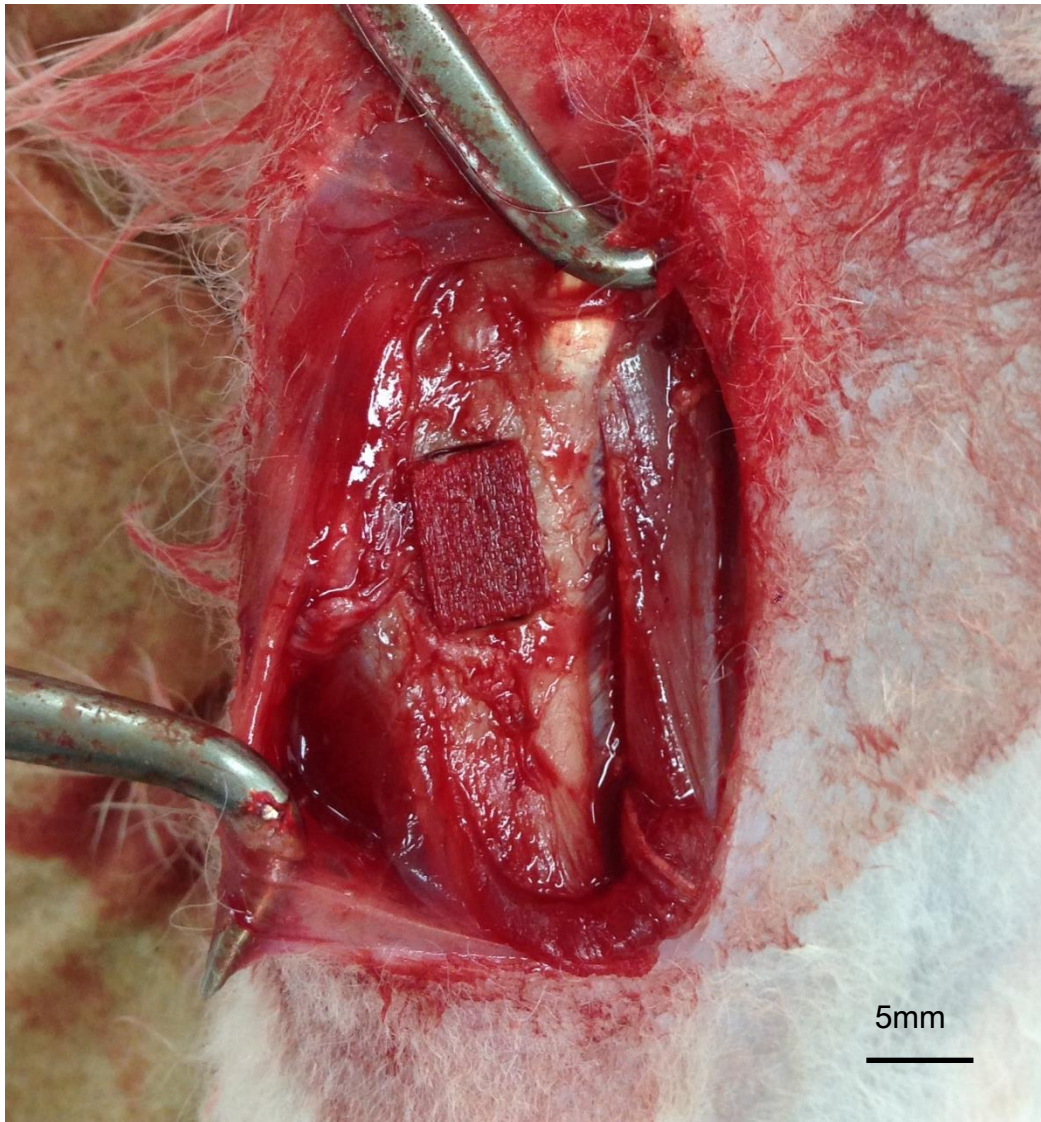


図6 皮質骨欠損動物モデルの作製および UDPHAp 移植直後

上が頭側、左が前方、脛骨近位内側に骨窓を作製している

人工骨埋植後、迅速に材料内へ血液が浸透している

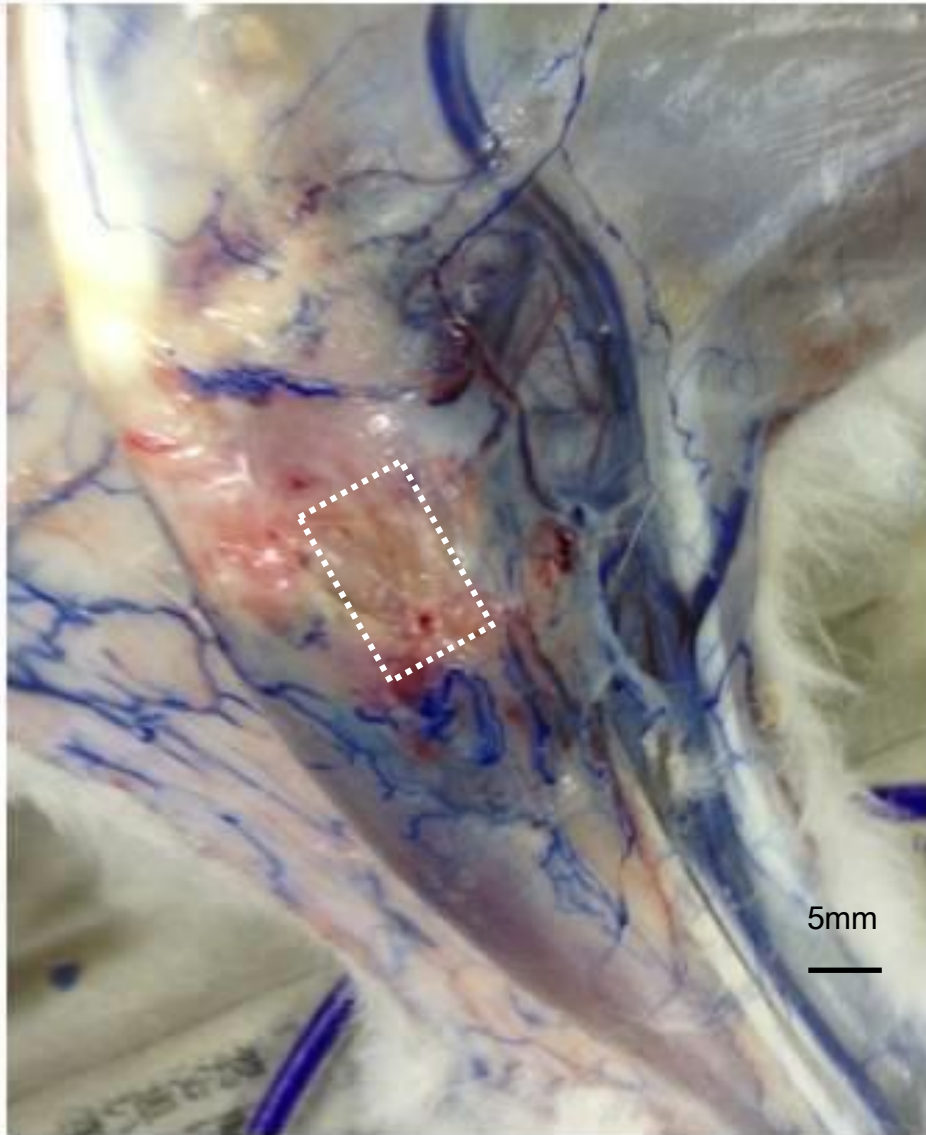


図7 屠殺、血管鑄型作製直後、皮膚、真皮を反転してある

埋植後6週の一例 人工骨埋植部位を白点線で示す

皮下組織、および筋膜上の細血管に Microfil[®]が満たされ青く染まっている

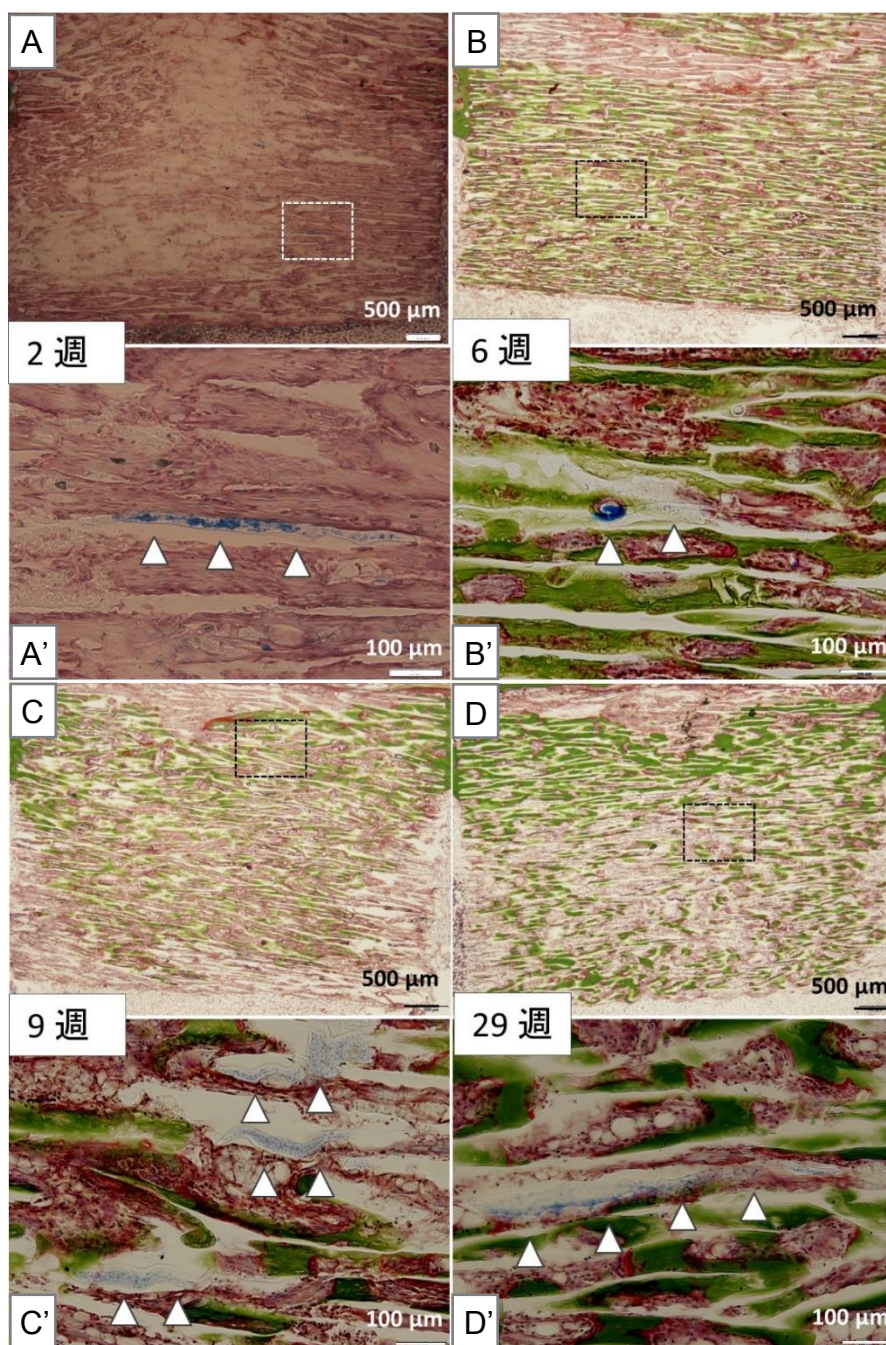


図8 矢状断 Villanueva Goldner 染色

A-D が弱拡大、A'-D'が強拡大である

石灰化骨が緑色に、線維組織や血球成分が薄赤色に染色されている

A'-D'に矢頭で Microfil により青く染色された新生血管を示す

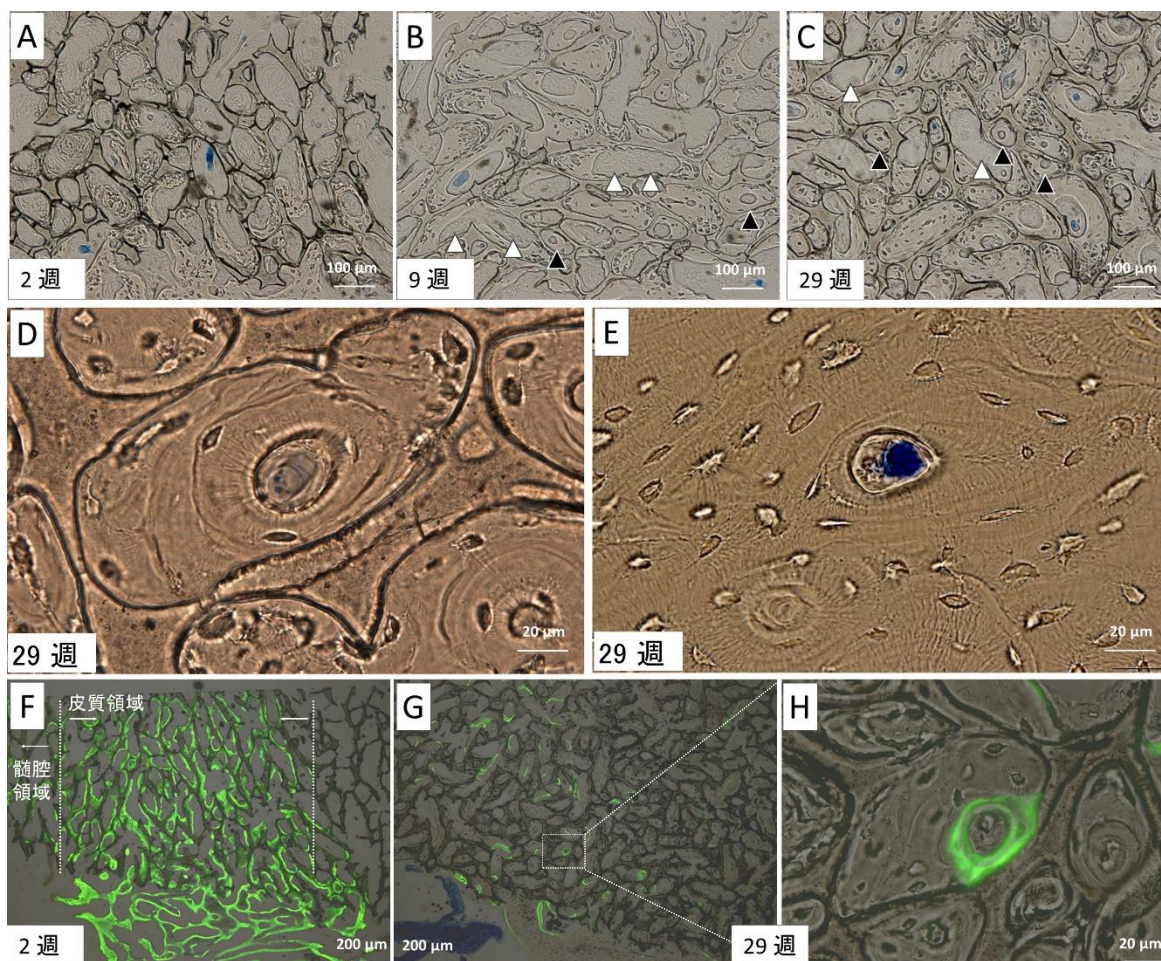


図9 水平断未染色

A-C 弱拡大像 オステオン様構造（黒矢頭）および比較的疎な骨形成、脂肪滴（白矢頭）

D,E 新生骨に見られるオステオン様構造、血管（D）および正常皮質骨にみられるオステオン（E）

F-H 暗視野、明視野の合成像 カルセインにより蛍光標識されている部分は活発な骨形成が生じている

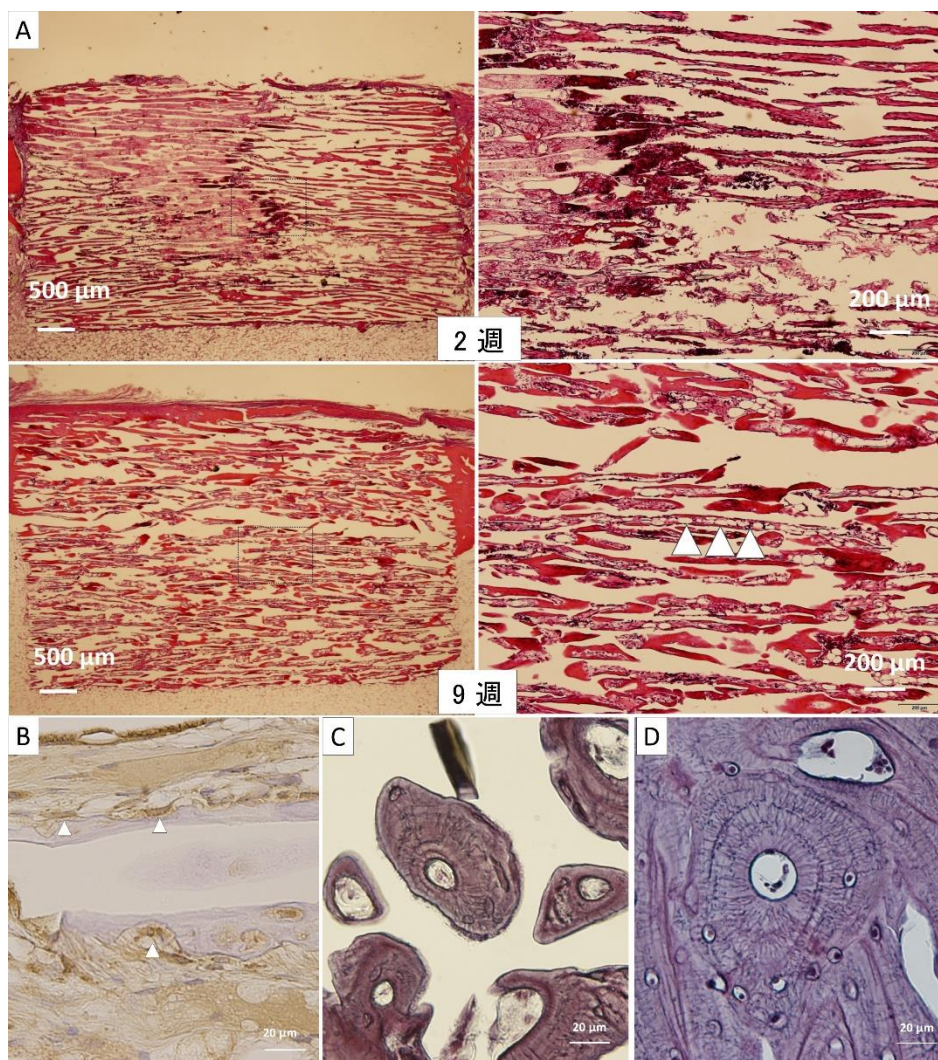


図 10 脱灰標本

A 矢状断 HE 染色 2 週では凝集した血球が濃赤色に示され、周囲にフィブリン網が認められる 9 週での脂肪滴を白矢頭で示す

B 矢状断カテプシン K 免疫染色 (6 週) カテプシン K 陽性細胞および Howship 窩と思われる窪みを矢頭で示す

C-D 水平断 Bodian 染色 (29 週) 新生骨 (C) および正常皮質骨 (D) の黒く染色される骨小腔、骨細管

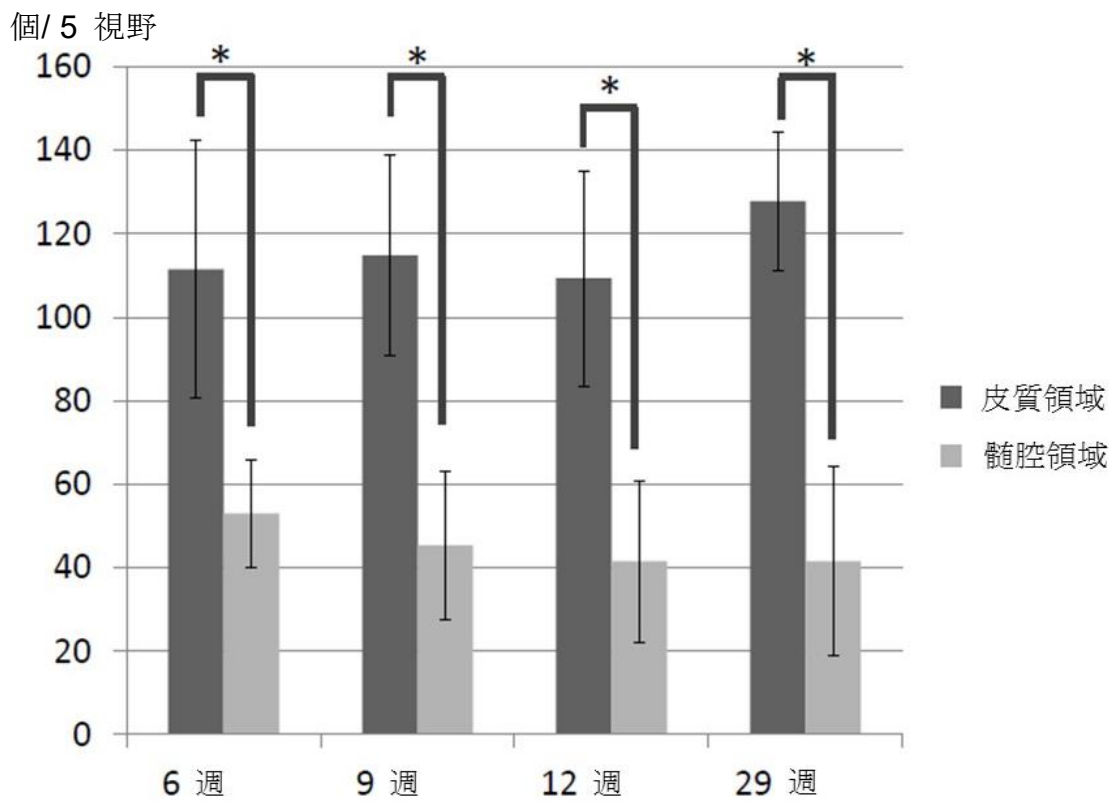


図 11 領域別骨細胞数

どの時期でも皮質領域において髄腔領域よりも有意に多い骨細胞数が認められる 全群とも n=6 *: p< 0.05

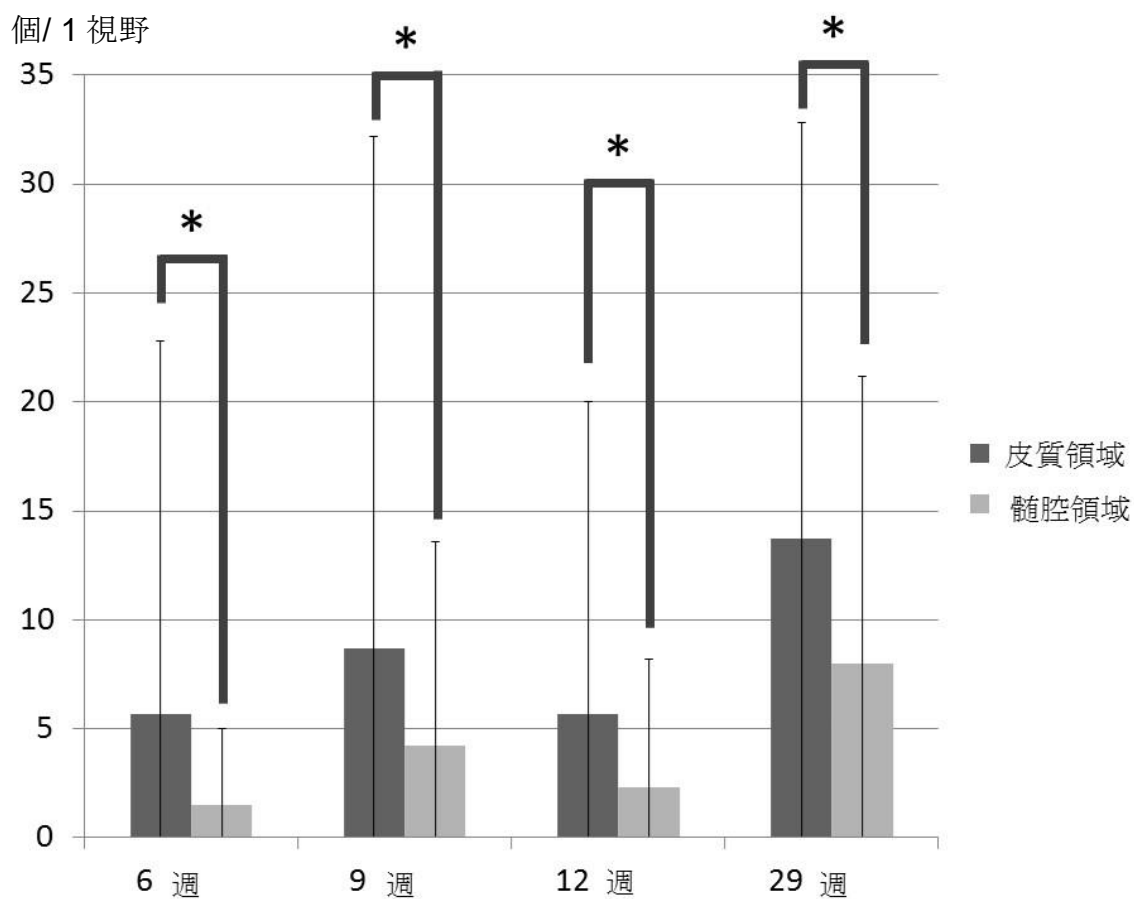


図 12 領域別オステオン様構造数

どの時期でも皮質領域において髓腔領域よりも有意に多いオステオン様構造数が認められる 全群とも n=6 *: p < 0.05

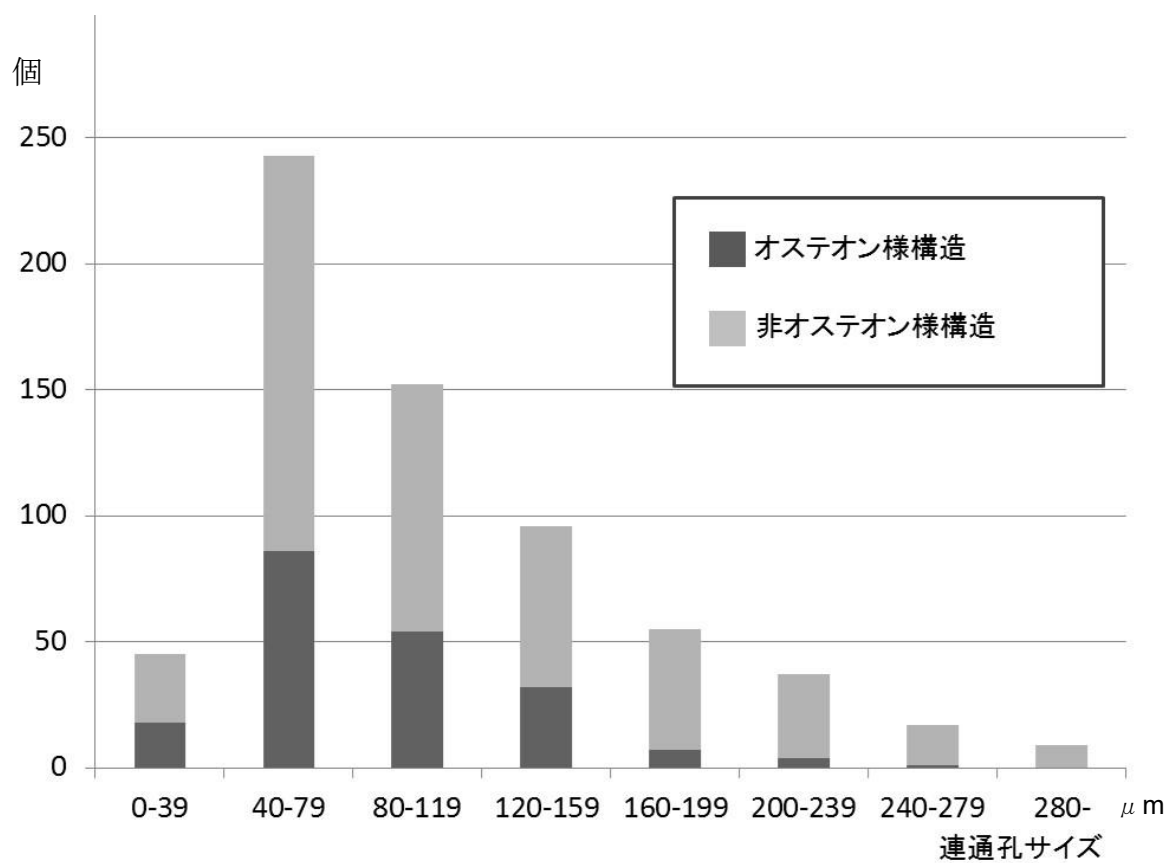


図 13 連通孔サイズ別のオステオン様構造形成

サイズが小さい連通孔に多くオステオン様構造が形成される傾向が認められる

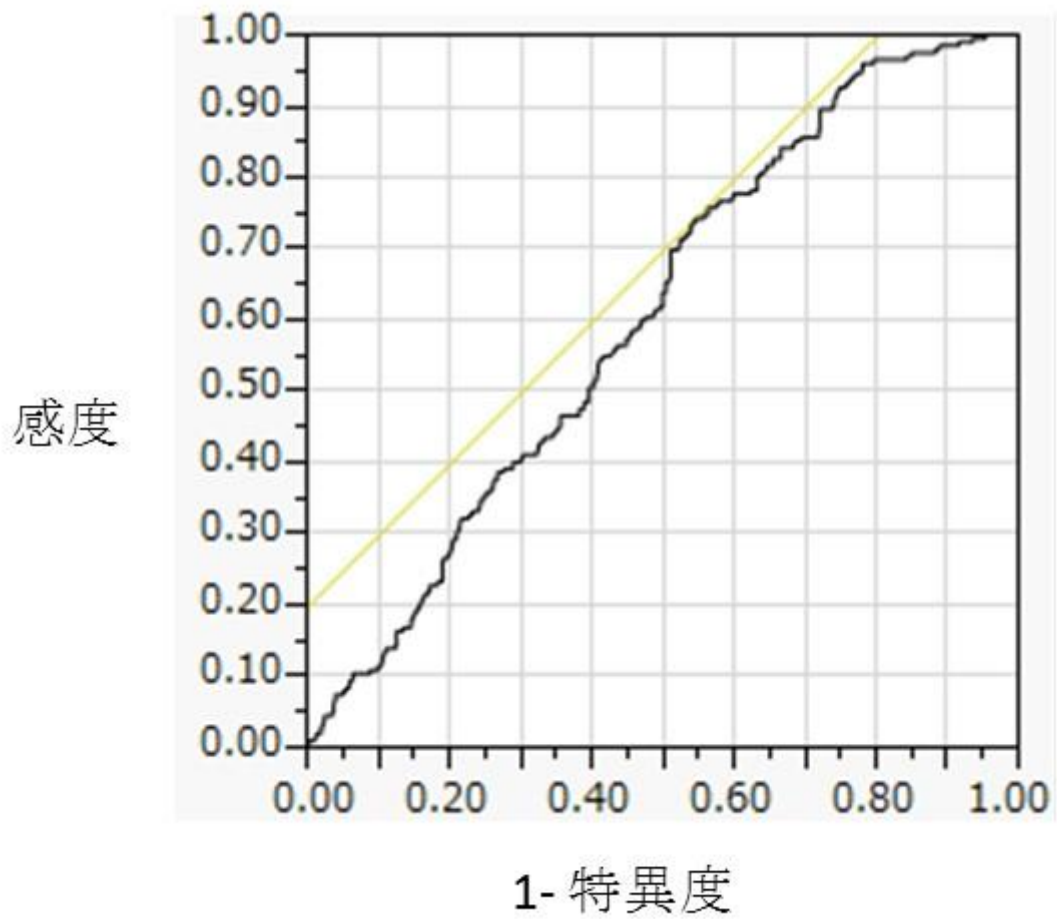


図 14 連通孔サイズとオステオン様構造形成 ROC 曲線

黒線と黄線の接点が、カットオフ値（連通孔サイズ= 105.1 μ m）と算定される

引用論文

1. 名井 陽, *人工骨の歴史と最新デザインコンセプト*. 人工臓器, 2011. 40(1): p. 76-80.
2. Tamai, N., Myoui, A., Tomita, T., Nakase, T., Ochi, T., Yoshikawa, H., *Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo*. J Biomed Mater Res, 2002. 59: p. 110-117.
3. Sakamoto, M., Nakasu, M., Matsumoto, T., Okihana, H., *Development of superporous hydroxyapatites and their examination with a culture of primary rat osteoblasts*. J Biomed Mater Res A, 2007. 82: p. 238-242.
4. Suetsugu, Y., Hotta, Y., Iwasashi, M., Sakane, M., Kikuchi, M., Ikoma, T., Higaki, T., Ochiai, N., Tanaka, J., *Structural and tissue reaction properties of novel hydroxyapatite ceramics with unidirectional pores*. Key Engineering Materials, 2007. 330-332: p. 1003-1006.
5. Iwasashi, M., Sakane, M., Suetsugu, Y., Ochiai, N., *Bone regeneration at cortical bone defect with unidirectional porous hydroxyapatite in vivo*. Key Engineering Materials, 2009. 396-398: p. 11-14.

6. Iwasashi, M., Funayama, T., Watanabe, A., Noguchi, H., Tsukanishi, T., Suetsugu, Y., Makihara, T., Ochiai, N., Yamazaki, M., Sakane, M., *Bone regeneration and remodeling within a unidirectional porous hydroxyapatite bone substitute at a cortical bone defect site: Histological analysis at one and two years after implantation*. *Materials*, 2015. 8(8): p. 4884-4894.
7. 野口 裕史, *高気孔率高気孔関連通性 HA 人工骨に対する荷重が骨再生に及ぼす効果に関する研究*. 筑波大学学位論文, 2015.
8. Watanabe, A., Sakane, M., Funayama, T., Iwasashi, M., Kanamori, A., Ochiai, N., *Novel unidirectional porous hydroxyapatite used as a bone substitute for tibial wedge osteotomy in canines*. *Biomaterials Res*, 2010. 14(1): p. 6-9
9. Loisel, A.E., Jiang, J.X., Donahue, H.J., *Gap junction and hemichannel functions in osteocytes*. *Bone*, 2013. 54(2): p. 205-212.
10. Nguyen, A.M., Jacobs, C.R., *Emerging role of primary cilia as mechanosensors in osteocytes*. *Bone*, 2013. 54(2): p. 196-204.
11. Nakasa, T., Ishida, O., Sunagawa, T., Nakamae A., Yasunaga, Y., Agung, M., Ochi, M., *Prefabrication of vascularized bone graft using a combination of fibroblast growth factor-2 and vascular bundle implantation into a novel*

- interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic*. J Biomed Mater Res A, 2005. 75(2): p. 350-355.
12. Bolland, B.J.R.F., Kanczler, J.M., Dunlop, D.G., Oreffo, R.O., *Development of in vivo μ CT evaluation of neovascularisation in tissue engineered bone constructs*. Bone, 2008. 43: p. 195-202
 13. Mehdizadeh, H., Sumo, S., Bayrak, E.M., Brey, E.M., Cinar, A., *Three-dimensional modeling of angiogenesis in porous biomaterial scaffolds*. Biomaterials, 2013. 34(12): p. 2875-2887.
 14. Ryu, H.S., Kim, S.J., Kim, J.H., Kim, H., Hong, K.S., Chan, B.S., Lee, D.H., Lee, J.H., Lee, C.K., Chung, S.S., *Fabrication of 1 dimensional hydroxyapatite and evaluation of osteoconduction*. J Mater Sci Mater Med., 2004. 15: p. 267-273.
 15. Frost, H.M., *Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians*. Angle Orthod., 1994. 64(3): p. 175-188.
 16. Ruff, C., Holt, B., Trinkaus, E., *Who's afraid of the big bad Wolff?: "Wolff's law" and bone functional adaptation*. Am J Phys Anthropol., 2006. 129(4): p. 484-498.
 17. Karageorgiou, V., Kaplan, D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and*

- osteogenesis*. *Biomaterials*, 2005. 26(27): p. 5474-5491.
18. Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S., Youn, H.J., Ryu, H.S., Chung, S.S., Park, K.W., *Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations*. *Biomaterials*, 2000. 21: p. 1291-1298.
 19. Demertzis, M.A., *Fluorimetric determination of calcium in serum with calcein: complexation of calcein with calcium and alkali metals*. *Anal Chim Acta*, 1988. 209: p. 303-308
 20. Ogawa, T., Ishii, T., Mishima, H., Sakai, S., Watanabe, A., Nishino, T., Ochiai, N., *Effectiveness of bone marrow transplantation for revitalizing a severely necrotic small bone: experimental rabbit model*. *J Orthop Sci*. 2010. 15(3): p. 381-388.
 21. Rasband, W.S., *ImageJ*, U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2012.
 22. Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P., Wang, L., Adams, R.H., *Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone*. *Nature*, 2014. 507(7492): p. 376-380.
 23. Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G., Kronenberg, H.M., *Osteoblast precursors, but not*

- mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. Dev Cell, 2010. 19(2): p. 329-344.*
24. Tischler, M.E., Slentz, M., *Impact of weight lessness on muscle function. ASGSB Bull, 1995. 8(2): p. 73-81.*
25. Hulbert, S.F., Young F.A., Mathews, R.S., Klawitter, J.J., Talbert, C.D., Stelling, F.H., *Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. J Biomed Mater Res, 1970. 4(3): p. 433-456.*
26. Kuboki, Y., Jin, Q., Takita, H., *Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. J Bone Joint Surg Am, 2001. 83-A Suppl 1(Pt 2): p. S105-115.*
27. Mikalsen, L.T., Dhakal H.P., Bruland, O.S., Nesland, J.M., Olsen, D.R., *Quantification of angiogenesis in breast cancer by automated vessel identification in CD34 immunohistochemical sections. Anticancer Res, 2011. 31(12): p. 4053-4060.*
28. Dominquez, V.M., Crowder, C.M., *The utility of osteon shape and circularity for differentiating human and non-human haversian bone. Am J Phys Anthropol, 2012. 149(1): p. 84-91*

学会発表

1. 牧原武史、坂根正孝、野口裕史、塚西敏則、山崎正志 一軸連通孔を有する
ハイドロキシアパタイト内の血管新生、骨リモデリングー組織学的評価ー
第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014、鹿児島
2. 牧原武史、坂根正孝、野口裕史、塚西敏則、山崎正志 一軸連通孔ハイドロ
キシアパタイト全体に至る早期血管新生が骨新生、骨リモデリングを司る
第 34 回整形外科バイオマテリアル研究会 2014、大阪
3. 牧原武史、坂根正孝、野口裕史、塚西敏則、山崎正志 一軸連通孔ハイドロ
キシアパタイト内の皮質骨再生 つくば医工連携フォーラム 2015、茨城
4. Takeshi Makihara, Masataka Sakane, Hiroshi Noguchi, Toshinori Tsukanishi,
Masashi Yamazaki. Capillary formation through the bone substitute is a key
factor of rapid new bone formation and bone remodeling in unidirectional
porous hydroxyapatite. Orthopaedic Research Society 2015 annual meeting.
Mar, 2015, Las Vegas.

5. 牧原武史、坂根正孝、野口裕史、山崎正志 一軸連通孔ハイドロキシアパタイト内のオステオン様構造は孔径120 μm 以下の孔に形成される 第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月、富山
6. 牧原武史、坂根正孝、野口裕史、山崎正志 一軸連通孔 β -リン酸3カルシウム内の骨形成と材料吸収速度 第30回日本整形外科学会基礎学術集会、2015年10月、富山
7. Takeshi Makihara, Masataka Sakane, Hiroshi Noguchi, Masashi Yamazaki.
The balance between bone formation and material resorption in unidirectional porous β -tricalcium phosphate implanted in a rabbit tibia. 27th symposium and annual meeting of the international society for ceramics in medicine. Oct. 2015, Bali.

謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、御校閲を賜りました山崎正志教授に心より感謝いたします。また、疾患制御医学専攻運動器系制御医学分野、坂根正孝前准教授のご指導、ご助言、ご協力に対してここに改めて感謝いたします。さらに実験をするにあたり、多大なるご協力、ご指導をいただいた筑波大学附属病院、野口裕史病院講師に厚く御礼申し上げます。

なお、本研究の各種実験は株式会社クラレより研究助成を得て行いました。

参考論文

1. Makihara T, Onishi S, Wadano Y, Fujii K, Nagata H, Sakane M. Regrowth of the deteriorated glenoid in advanced Charcot shoulder after suboccipital decompression for syringomyelia: a case report. *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*. (Published online: 24 August 2015)
2. Makihara T, Sakane M, Noguchi H, Yamazaki M. The balance between bone formation and material resorption in unidirectional porous β -tricalcium phosphate implanted in a rabbit tibia. *Key Engineering Materials*. (Published online: 24 May 2016)