

< 研究課題 >

難治性巨大骨欠損に対する

生体異物反応を応用した新規治療法の開発

代表研究者 筑波大学大学院人間総合科学学術院 医学学位プログラム 中谷卓史
共同研究者 筑波大学医学医療系 整形外科 准教授 三島初
筑波大学大学院人間総合科学学術院 医学学位プログラム 戸塚将
筑波大学大学院人間総合科学学術院 医学学位プログラム 渡邊竜之介

【抄録】

四肢長管骨巨大骨欠損の新規治療として、近年 Masquelet 法が行われるようになった。Masquelet 法は骨欠損部に骨セメントを留置し、数週間待機することで異物反応に由来する形成膜が誘導される。2 回目の手術で骨セメントを取り出し、骨移植を行うことで骨癒合が促進される画期的な治療法である。今回我々は、線維組織増生および血管内皮細胞の増殖を促進する効果をもつヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor;以下 bFGF)および骨代謝を促進する副甲状腺ホルモン(以下 PTH)が形成膜に及ぼす効果についてラット大腿骨骨欠損モデルを用いて検討した。結果としては、bFGF 投与の欠損部への局所投与および PTH 全身投与は形成膜の膜面積、血管腔面積に有意な影響を認めなかった。今後、スペーサー種類や組織評価方法を再考していく必要があると思われた。

1. 研究の目的

四肢の巨大骨欠損は、治療困難な病態である。巨大骨欠損の要因として、骨腫瘍切除、慢性骨髄炎、重症開放骨折などがある。一般的に骨欠損に対する Gold standard の治療は自家骨移植である。自家骨移植は有用な治療法だが、骨欠損が巨大になると移植骨が骨吸収されてしまい、治療成績が不良となることが知られている。

Masquelet は、2000 年に新しい巨大骨欠損に対する治療を報告した(以下 Masquelet 法)。Masquelet 法は二次的治療法であり、初回手術

として、Polymethylmethacrylate (PMMA) の骨セメントを骨欠損部に充填する。4-6 週間後に PMMA スペーサーを抜去して、そこに自家海綿骨移植を行う。PMMA スペーサー周囲には異物反応により induced membrane(以下形成膜)が形成される。形成膜が移植骨の生着に寄与し、膜そのものも骨化してくることが報告されている。しかし、異物反応に由来する形成膜については基礎的な研究があまり行われておらず、骨形成促進の機序などは不明な点が多い。Masquelet 法の成功率は過去の報告では、創外固定を用いる骨延長術ないし、血管柄付き骨移植術を遜色ない成績が報告されている。今回

我々は、従来の Masquelet 法に種々の薬物投与を行うことでさらなる治療成績向上に結びつく研究を想起した。研究費との兼ね合いから、まずは膜形成に関する基礎研究からスタートした。

本邦で開発された薬剤として、ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor; 以下 bFGF) がある。bFGF は線維芽細胞に作用して、線維組織増殖を促進するとともに血管内皮細胞の遊走、増殖を促進し、強力な血管新生作用を有することがわかっており、褥瘡・皮膚潰瘍治療および鼓膜穿孔治療適応として認可・販売されている。また、高容量の投与で間葉系幹細胞の増殖促進作用・骨芽細胞への分化促進作用を持つことが明らかとなっており歯科領域における歯槽骨欠損に対しても認可されている。また、副甲状腺ホルモン (PTH) は副甲状腺から分泌されるホルモンであり、骨粗鬆症治療薬として認可されている。間欠投与することで間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進するとともに、骨芽細胞の骨細胞への分化を促進することがわかっている。

本研究では、薬物投与と Masquelet 法の膜形成および血管増生を促進できないかと考え、本研究を行った。

2. 研究方法と経過

2-1 bFGF・PTH 投与が膜形成に与える影響の研究

すべての動物は、筑波大学の動物実験規則に則り、適切な管理の下、行われた。

10 週齢の Sprague-Dawley ラット (SLC, Shizuoka, Japan) を使用した。すべてのラットは自由に飼料と水にアクセスでき、週に 1 回の体調チェックを行った。3 匹まで同一のケージで飼育した。腹腔内全身麻酔 (ケタラール 50mg/kg、キシラジン 1mg/kg) のもと、ラットを左側臥位とし、右脚を剃毛・洗浄した。皮膚と筋膜を縦に切開し、上腕二頭筋と

広背筋を骨膜下に剥離して大腿骨を露出させた。

Masquelet 法として、大腿骨の前面に 6 穴の 1.5mm チタンプレート (Synthes 社、VA-LCP ハンドプレート) を設置した。プレートの固定には、近位に 2 本、遠位に 2 本の 1.5mm 皮質ネジを使用した。ボーンソーを用いて 10mm の骨欠損を作成し、スペーサーとして骨欠損部には骨蠟 (ボーンワックス) を挿入した。スペーサーの脱転を避けるために、スペーサー周囲の筋肉を 3-0 吸収糸で縫合した。

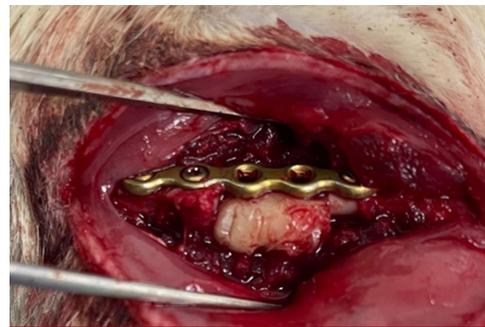


図 1 術中写真

<薬剤投与について>

bFGF 投与群は、フィブラストスプレー (科研製薬) の薬液を使用した。手術前に低濃度 bFGF (200 μ g/ml) および高濃度 bFGF (600 μ g/ml) を 0.3% ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) に溶解しておく。スペーサー留置後に 0.1ml 局所投与し、閉創する。PTH 投与群においては、通常通り手術を行った後に、手術から 2 週間、週 3 回テリパラチド 20 μ g の皮下注射を行う。割り付けは以下とし、各群は (n=12) とした。

1. Control (ボーンワックスのみ)
2. FGF なし HPC のみ群
3. FGF20 μ g 投与群
4. FGF60 μ g 投与群
5. PTH 投与群

動物は手術後 3 週間と 6 週間で半数ずつ安楽死させた。安楽死は、動物を CO₂ チャンバーに入れ、二酸化炭素の過量投与を行った。視診上、

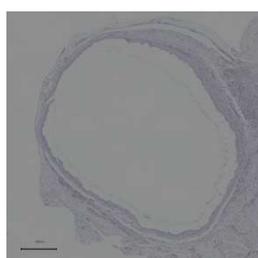
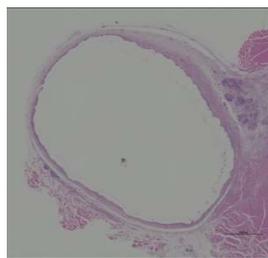
呼吸停止を確認し、触診上、心拍が停止していることを確認した。膜の採取は最初の手術と同様に展開した。まずプレートを出し、スクリーとプレートとを抜去した。形成膜は、周囲の筋肉ごと摘出して採取した。膜とスパーサーを一塊にして、そのまま 4%パラホルムアルデヒドで固定した。組織は固定後にパラフィン包埋を行った。

パラフィンに固定した形成膜はボーンワックスの短軸方向で切片作成するように 3µm で薄切し、脱パラフィンし、ヘマトキシリン/エオジン(HE)染色を行った。

図 2 HE 染色

図 3 CD31 染色

形成膜の血管数を評価するために CD31 抗体で血管内皮細胞を免疫染色した。一次抗体は抗 CD31 抗体 (overnight、4°C、ab182981、1:300



希釈、Abcam、Cambridge、UK) を使用した。2 次抗体を用いて免疫染色を行った (Histofine simplestainratMAX-PO、Nichireibioscience、Tokyo、Japan)。

コンピューターでサポートした画像処理システム (BZ-X710、KEYENCE、Osaka、Japan) を使用して組織を撮影した。4 倍の拡大率で組織全体を撮影し、撮像した写真を並べ替え、1 つの画像ファイルになるように再構成した。

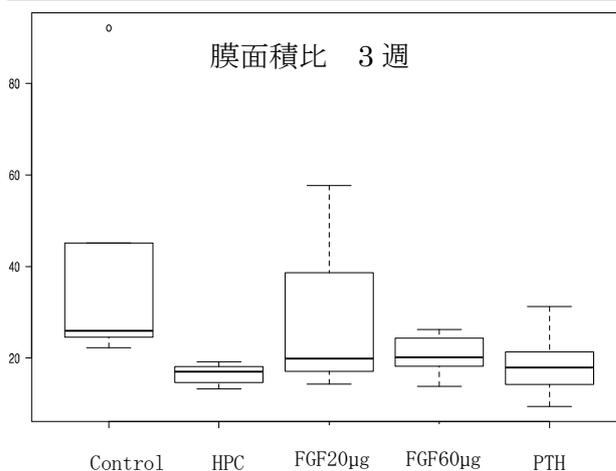
画像は TIFF ファイルに保存した。形成膜の面積を算出するために画像解析ソフト Image J を使用した。Manual で形成膜周囲とスパーサー留置部をそれぞれ Trace することで膜の面積を算出し、スパーサー面積で除すことで、スパーサー面積あたりの膜面積を算出した。血管面積に関しては Colour deconvolution 機能の Vector 「H DAB」 を使用して、色を 3 つに分割

した。Colour2 画像を Threshold を 15-170 に設定することで CD31 陽性の血管内皮細胞のみを抽出した。Binary の 「Fill Holes」 を選択し、血管腔を塗りつぶすことで画像から血管腔のみを抽出した。血管腔面積を測定し、膜面積で除すことで膜面積当たりの血管面積比率を求めた。全ての統計は、EZR を使用して行った。

3-1 膜面積比(%)

膜面積比に関しては、3 週においては各群間での有意差は認めなかった。6 週においては、HPC のみ群と PTH 群間の 2 群比較のみで有意差を認めた。各群間で 3 週と 6 週の経時変化について比較したところ、全ての群

	3 週	6 週
Control	26.0 (22.3-92.1)	21.5 (11.6-30.2)
HPC のみ	17.1 (13.3-19.2)	12.0 (8.5-14.9)
FGF20µg	19.9 (14.3-57.7)	18.8 (10.0-35.3)
FGF60µg	20.2 (13.9-26.2)	10.6 (9.3-15.0)
PTH	17.9 (9.5-31.2)	15.9 (14.0-20.1)



で 3 週に比べ 6 週の膜面積比が小さくなる傾向を認めたが、有意差を認めなかった。

3-2 血管面積比(%)

血管面積比においては、3 週で PTH 群が最も

血管に富んでいた。FGF 投与に関しては投与しても血管増生にはつながらない結果であった。しかし、3 週、6 週どちらにおいても各群間に有意差を認めず、FGF に期待された血管増生効果は認めなかった。血管面積比の経時的变化については、経時的に増加する群も減少する群もあり、こちらも有意差を認めなかった。

	3 週	6 週
Control	1.8 (0.9-2.9)	2.5 (1.5-4.2)
HPC のみ	2.7 (1.5-4.7)	3.3 (0.5-5.6)
FGF20 μ g	1.9 (1.4-2.5)	2.5 (1.2-3.1)
FGF60 μ g	2.1 (1.1-5.2)	1.7 (0.6-6.2)
PTH	3.0 (0.8-3.9)	2.8 (1.9-6.1)

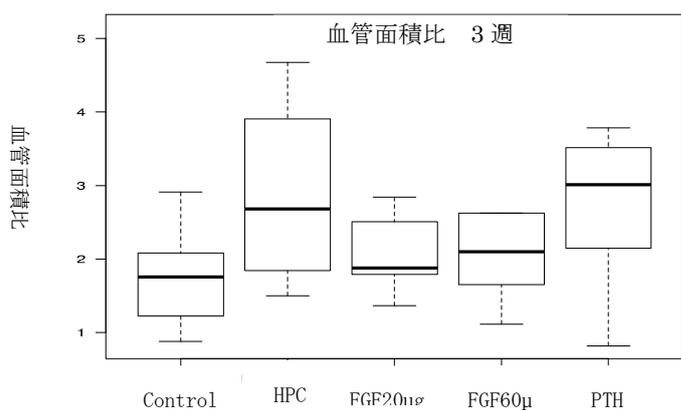
4. 今後の課題

今回、スペーサーとして、PMMA ではなくボーンワックスを使用した。PMMA をスペーサー

げる必要があり、もともと薄い膜の観察が困難になることを経験した。そのため、円柱状の形態を保ったまま組織学的評価ができるようにボーンワックスを使用した。ボーンワックスはミツロウを主成分とした骨髄様の止血材である。ボーンワックスを用いる事で、形成膜を *en block* で摘出し、そのままパラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンブロックを作成できる。スライド染色の脱パラフィンの際には主成分がミツロウのボーンワックスはパラフィンとともに分解され、硬組織の切片に作成な道具や特別な技術を要せずに全周で評価可能な組織スライドが作成できる。本研究では形成膜の全周評価が可能になるメリットに着目し、本研究のスペーサーをボーンワックスとした。膜の厚さではなく、膜全周の面積比で評価した報告は過去になく、非常に画期的な方法と思われた。しかし、スペーサーの種類により惹起される異物反応の強さやそこに集簇するマクロファージ、間葉系幹細胞の数や分布などが異なる可能性があり、今後、比較検討が必要と考える。また、組織評価の方法としても全周性の評価が可能となった反面、弱拡大を合成した画像では解像度の問題が残るため、今後、視野を分けての評価を行う予定である。

5. 研究成果の公表方法

本研究では有意差がでなかったため、PMMA スペーサーとボーンワックススペーサーの違いについて今後追加実験を行うことと評価方法を再検討した上で英語論文化予定である。



ーとして使用する場合、膜の組織固定の際に広

以上

(Title of the research)

New treatment applying a biological foreign body response for critical bone defect

Primary Researcher: Takushi Nakatani, Postgraduate Student

University of Tsukuba, Graduate School of Comprehensive Human Sciences

Co-researchers: Hajime Mishima, Associate Professor

Department of Orthopaedic Surgery, University of Tsukuba

Sho Totsuka, Postgraduate Student

University of Tsukuba, Graduate School of Comprehensive Human Sciences

Ryunosuke Watanabe, Postgraduate Student

University of Tsukuba, Graduate School of Comprehensive Human Sciences

The Masquelet technique is a novel treatment for massive bone defects in the long bones of the limbs. Bone cement is placed in the defect and left in place for several weeks to induce a membrane derived from the foreign body reaction. Removal of the bone cement and placement of a bone graft within the membrane promotes bone healing. In this study, the effects of human basic fibroblast growth factor (bFGF), which promotes fibrogenesis and vascular endothelial cell proliferation, and parathyroid hormone (PTH), which promotes bone metabolism, on the induced membrane were investigated with a rat femur bone defect model. The results showed that local administration of bFGF to the defects and systemic administration of PTH had no significant effect on the membrane area and vascular lumen area of the induced membrane. The type of spacer and tissue assessment methods need to be reconsidered in the future.