

テーラーメイドチタンインプラント，顆粒状人工骨および  
bFGF 結合イオン・コンプレックスゲルを組み合わせた  
長管骨巨大欠損の新規治療法

本阿彌 宗紀

テーラーメイドチタンインプラント，顆粒状人工骨および  
bFGF 結合イオン・コンプレックスゲルを組み合わせた  
長管骨巨大欠損の新規治療法

Repair for a large segmental bone defect using a tailor-made titanium implant in  
combination with granular artificial bones and  
bFGF-binding ion complex gel

東京大学大学院農学生命科学研究科

獣医外科学研究室

獣医学専攻 博士課程

平成 20 年度入学

Laboratory of Veterinary Surgery  
Department of Veterinary Medical Science  
Graduate School of Agricultural and Life Science  
The University of Tokyo

本阿彌 宗紀

Muneki Honnami

## 要旨

高エネルギー外傷や骨腫瘍等により生じた長管骨巨大骨欠損の再建治療は、極めて困難であり、より簡便でかつ早期の機能回復と骨再生が得られる新たな治療法が求められている。これらの骨欠損に対し、様々なセラミックス系および金属系バイオマテリアルが開発されている。セラミックス系バイオマテリアル（人工骨）としては、ハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウム（TCP）の研究が盛んである。著者らのグループは、 $\alpha$ TCP粉末から射出成形された、外径 1 mm のテトラポッド型顆粒状人工骨（TB）を開発した。TB は集積により血管侵入性にすぐれた隙間（連通孔）を形成する特徴を持つ。一方、骨折治癒には、血管ネットワークの形成による栄養や酸素の供給が必須である。そのため、血管新生を促進させる目的で、従来から様々な増殖因子が使用されてきた。その中でも、塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル（bFGF-IC gel）は、より早期に強力に血管を誘導する足場として開発された。bFGF-IC gel は、コラーゲンとクエン酸誘導体から成る血管侵入性や保持性にすぐれた足場（IC gel）に、血管新生誘導因子である bFGF を電氣的に結合させたハイドロゲルである。

しかしながら、長管骨に生じた巨大な骨欠損を再建するには、これらの骨新生や血管新生の足場としてすぐれた TB と bFGF-IC gel だけでなく、これらを骨欠損部に正確に保持し、かつ骨欠損を強固に安定化するための金属インプラントが必要である。

そこで、著者らのグループは、金属系バイオマテリアルとして、骨欠損部の形態に完全に一致するチタンメッシュケージと骨表面に完全に重なるプレートが一体化した、テ

一ラメドチタンメッシュケージ一体型プレート (tTMCP) を開発した。tTMCP は、患者の CT データと選択的レーザー溶融積層造形法により、短時間で正確な造形が可能であり、また、ケージとプレートが一体となった形状であるため、骨欠損の補填と骨折断端の固定の双方を容易に実現するインプラントである。

本研究の最終目標は、長管骨巨大骨欠損に対して、新しく開発されたこれら 3 つのバイオマテリアルを組み合わせ、より早期の機能回復と骨再生を達成することにある。

そこで第 1 章では、まず TB と bFGF-IC gel の併用による骨欠損部の血管新生と骨新生の促進効果について、ウサギ大腿骨骨幹部部分欠損モデルを用いて検討した。実験動物には日本白色家兎 40 羽を用い、麻酔下にて左大腿骨骨幹部中央に 10 mm の骨欠損を作成し、ステンレスプレートを用いて固定した。本モデルには、TB を骨欠損内部に保持する目的で、ポリプロピレンメッシュケージ (PMC) を使用した。実験群は、骨欠損部に PMC のみを移植した pm 群、TB を充填した PMC を移植した pm/TB 群、TB と bFGF 溶液 (PBS にて 100 ng/ml に調整した溶液を 0.5 ml) を充填した PMC を移植した pm/TB/f 群、TB と IC gel を充填した PMC を移植した pm/TB/ICgel 群 (0.5 ml)、TB と bFGF-IC gel (100 ng/ml 溶液を 0.5 ml) を充填した PMC を移植した pm/TB/f-ICgel 群の 5 群 (各 n=8) とした。動物は術後 2, 4 週目 (各 n=4) に安楽殺し、単純 X 線検査、 $\mu$ CT 検査ならびに組織形態学的検査を行った。組織形態学的検査には、新生骨伸長距離、新生骨量、血管数の計 3 項目を用いた。

単純 X 線写真および  $\mu$ CT 画像では、全群で骨欠損部周囲に旺盛な仮骨形成を認めた。組織形態学的検査では、pm/TB/f-ICgel 群は、2 週目の新生骨伸長距離を除き、2, 4

週目ともに全項目において他の 4 群よりも有意に高い値を示した。bFGF を用いていない pm/TB/ICgel 群の 4 週目では、新生骨量と血管数が IC gel を用いていない他の 3 群よりも有意に高かった。この IC gel を用いていない 3 群の間には、いずれの観察期間でも全項目において有意差は認められなかった。以上より、ウサギモデルにおける TB と bFGF-IC gel の併用は、血管新生と骨新生を促進することが明らかとなった。しかし、このウサギモデルでは骨欠損内部の骨新生よりも骨欠損部周囲の仮骨形成の方が旺盛であり、また、TB を用いなかった骨欠損部にも多くの骨形成が認められたことから、このモデルはこれらの項目の評価には必ずしも適切でないと考えられた。

そこで、第 2 章ではイヌ橈骨骨幹部部分欠損モデルを用いて、第 1 章と同様に TB と bFGF-IC gel の併用による骨再生効果についてより詳細な検討を行った。ビーグル成犬 5 頭を用い、麻酔下にて両側橈骨骨幹部中央に 20 mm の骨欠損を作成し、PMC を用いて各材料を移植し、ステンレスプレートを用いて固定した。実験群は、pm/TB 群、pm/TB/f 群、pm/TB/f-ICgel 群の 3 群（各 n=3）とした。なお、bFGF 溶液ならびに bFGF-IC gel は第 1 章と同様に調整し、用量は 1.0 ml とした。動物は術後 4 週目で安楽殺し、単純 X 線検査、 $\mu$ CT 検査ならびに組織形態学的検査を行った。組織形態学的検査には、テトラサイクリンとカルセインにより蛍光標識を行った非脱灰研磨組織切片を用い、第 1 章で用いた 3 項目に加え、骨代謝回転の指標となる層板状骨量および石灰化速度を計測した。

単純 X 線写真および  $\mu$ CT 画像では、全群で骨欠損部両端にわずかな仮骨形成を認めた。組織形態学的評価では、pm/TB/f-ICgel 群は、新生骨伸長距離、新生骨量、血管数において他の 2 群に比べて有意に高い値を示し、bFGF を用いていない pm/TB/ICgel 群では有

意な骨新生の増加を認めなかった。また、骨代謝回転の指標である層板状骨量および石灰化速度については3群間に有意な差は認められなかった。これらの結果から、イヌモデルにおいては、TBとbFGF-IC gelの併用により、術後早期に血管新生が誘導され骨新生が活性化されることが明らかとなった。bFGF-IC gelが骨代謝回転に直接影響していないことから、この骨新生は、bFGF-IC gelが血管新生を誘導した結果として引き起こされたものと考えられた。

そこで、第3章では、より容易かつ早期に骨欠損部の安定化を達成するため、テーラーメイドインプラントであるtTMCPを作製し、第2章と同様のイヌモデルを用いて、TBおよびbFGF-IC gelとの併用による機能回復ならびに骨再生効果を、より長期的に検討した。実験動物としてビーグル成犬18頭を用い、個体毎に左橈骨のCTデータを3次元モデル化し、橈骨中央部に20 mmの骨欠損をデザインした。次いで、CAD/CAMシステムにてtTMCPの設計と加工プログラムの作成を行い、金属光造形複合加工機を用いてチタン合金粉末(Ti-6Al-7Nb)からtTMCPをレーザー溶融積層造形した。手術は麻酔下にて左橈骨中央に20 mmの骨欠損を作製し、tTMCPおよび6本の純チタンスクリューにて整復した。実験群は、TBを充填したtTMCPを移植したtm/TB群と、TBとbFGF-IC gelを充填したtTMCPを移植したtm/TB/f-ICgel群(100 ng/ml溶液を1.0 ml)の2群(各n=9)とした。術後4, 8, 24週目(各n=3)で安楽殺し、単純X線検査、肉眼的評価、組織形態学的検査を行った。組織形態学的検査には、第2章と同様に5項目を用いた。

全てのtTMCPは骨欠損部および既存骨の形態と正確に一致し、骨欠損部の再建が極めて容易であった。また、術後3日目には全例患肢への負重を開始し、術後10日目には

跛行はほぼ消失していた。単純 X 線写真では、全群で骨欠損部両端にわずかな仮骨形成を認めた。肉眼的には 4 週において、tm/TB 群に比べ、tm/TB/f-ICgel 群で明らかに多くの血管がメッシュ孔からケージ内部に侵入していた。組織形態学的検査では、新生骨伸長距離は 4、24 週において tm/TB/f-ICgel 群が有意に高く、24 週では tm/TB 群では 1 例も骨癒合していないのに対し、tm/TB/f-ICgel 群は 3 例中 2 例に骨癒合が認められた。新生骨量は 4 週のみ tm/TB/f-ICgel 群が有意に高かったが、それ以降は両群に有意差は認められなかった。また、血管数は全ての観察期間において tm/TB/f-ICgel 群が有意に高かった。層板状骨量および石灰化速度は、いずれの観察期間においても両群に有意な差は認められなかった。

臨床的観点からは、tTMCP の移植により、骨欠損部は自然に解剖学的整復が達成され、手術は極めて容易に実施できた。さらに、早期に正常歩行を示すなどのすぐれた機能回復が認められたことから、tTMCP により骨欠損部が強固に安定化したと考えられ、その有用性が確認された。一方、組織形態学的には、tm/TB/f-ICgel 群の 24 週において、有意に高い血管数と骨癒合期間の短縮が認められたことから、TB と bFGF-IC gel の併用による長期的な血管新生および骨新生効果が示された。さらに第 2 章の結果と比較すると、TB を充填した tTMCP の新生骨量は、TB を充填した PMC よりも低かったが、bFGF-IC gel の併用により血管新生と骨新生が促進され、新生骨量は PMC と同程度まで増加していた。

以上の成績から、長管骨巨大骨欠損に対する tTMCP、TB ならびに bFGF-IC gel の併用療法は、早期の機能回復と骨癒合を達成できる理想的な治療法となる可能性が示唆された。tTMCP はどのような骨欠損形態にも造形できることから、再建困難な長管骨骨幹端

部の巨大骨欠損にも応用できる可能性が高く、臨床上極めて有用な治療法になると考えられた。



## 目次

緒言	10
第1章 ウサギ片側大腿骨骨幹部部分欠損モデルにおけるテトラポッド型顆粒状人工骨 ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲルの併用による骨再生 効果	
第1節 緒言	19
第2節 材料および方法	22
テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB)	22
塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel)	22
動物ならびに手術方法	23
実験計画	24
臨床的評価ならびに肉眼的評価	25
単純X線学的検査	25
$\mu$ CT検査	25
組織形態学的検査	26
統計解析	27
第3節 結果	28
周術期の臨床所見	28
肉眼的検査所見	28
単純X線学的検査所見	28
$\mu$ CT検査所見	29
組織形態学的検査所見	30
第4節 考察	32
第2章 イヌ両側橈骨骨幹部部分欠損モデルにおけるテトラポッド型顆粒状人工骨なら びに塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲルの併用による骨再生効果	
第1節 緒言	49
第2節 材料および方法	50
テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) および塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コ ンプレックスゲル (bFGF-IC gel)	50
動物ならびに手術方法	50
実験計画	51
臨床的評価ならびに肉眼的評価	52
単純X線学的検査	52
$\mu$ CT検査	52
組織形態学的検査	52
蛍光標識と蛍光顕微鏡観察	54
統計解析	55
第3節 結果	56
周術期の臨床所見	56

肉眼的検査所見.....	56
単純X線学的検査所見.....	56
$\mu$ CT 検査所見.....	57
組織形態学的検査所見.....	57
第4節 考察.....	60
<b>第3章 イヌ片側橈骨骨幹部部分欠損モデルにおけるテーラーメイドチタンメッシュケージ一体型プレート、テトラポッド型顆粒状人工骨ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲルの併用による骨再生評価</b>	
第1節 緒言.....	74
第2節 材料および方法.....	77
テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) および塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) .....	77
テーラーメイドチタンメッシュケージ一体型プレート (tMCP) .....	77
動物ならびに手術方法.....	78
実験計画.....	79
臨床的評価ならびに肉眼的評価.....	79
単純X線学的検査.....	79
組織形態学的検査.....	80
蛍光標識と蛍光顕微鏡観察.....	80
統計解析.....	81
第3節 結果.....	82
周術期の臨床所見.....	82
肉眼的検査所見.....	82
単純X線学的検査所見.....	83
組織形態学的検査所見.....	83
第4節 考察.....	86
<b>総合考察</b> .....	<b>100</b>
謝辞.....	105
参考文献.....	106

## 緒言

長管骨に生じた巨大骨欠損の再建は、ヒトおよび獣医整形外科学領域において最も困難な治療の一つである。長管骨における巨大骨欠損の多くは高エネルギー外傷、骨癒合不全、そして悪性骨腫瘍の治療による広範切除などに起因する。ヒト整形外科学領域では、これらの治療法として自家骨・同種骨移植、血管柄付き自家骨移植、仮骨延長術などが一般的に行われている。しかし、いずれも長期に及ぶ荷重制限や術後管理が必要となるため、機能回復や社会復帰の遅れが問題となっている。例えば、自家骨移植には採取部位の手術侵襲や採取量の制限が問題となる[1]。同種骨移植は感染率が高いにも関わらず癒合率は低く、感染症の伝搬や拒絶反応のリスクも懸念される[2,3]。血管柄付き自家腓・腸骨移植は骨癒合期間が最も短い方法とされているが、採取部位の手術侵襲はもちろん、移植骨が荷重可能な太さになるまでの長期間の徹底した荷重制限、そして術者の高い技術と経験が必要とされる[4-7]。仮骨延長術は骨延長が完了するまで、長期に及ぶ創外固定器の装着が必要である[8-10]。一方、獣医整形外科学領域では、厳密な荷重制限や術後管理が困難であることから、やむを得ず骨短縮術や断脚術が選択されることも少なくない。したがって、ヒトおよび獣医整形外科学領域において、より容易に早期の機能回復と骨再生が得られる長管骨巨大欠損治療法が望まれている。

最近では巨大骨欠損に対して、セラミックス系もしくは金属系バイオマテリアルを用いた治療法が盛んに研究されている。セラミックス系バイオマテリアルのうち、骨修復用セラミックス（人工骨）として広く用いられているのがハイドロキシアパタイト（hydroxyapatite: HA）やリン酸三カルシウム（tricalcium phosphate: TCP）である。これらの人工骨はすぐれた骨伝導能を持ち、様々な形やサイズに成形でき、供給量に制限がないと

いう利点から自家骨に代わる素材として注目されている[11]. 長管骨部分欠損動物モデルを用いた研究では, 人工骨による良好な骨再生が報告されている[12-15]. 特にTCPはHAと異なり生体内吸収性を有するという特徴を持ち, より生体活性の高い人工骨とされている. TCPは合成時の焼結温度や冷却の有無により, 主に $\alpha$ 相( $\alpha$ TCP)と $\beta$ 相( $\beta$ TCP)に分けられる. 現在市販されているブロック状および顆粒状人工骨のほとんどは加工性の点から $\beta$ TCPが用いられており,  $\alpha$ TCPは主にペースト状人工骨に用いられている.  $\alpha$ TCPは $\beta$ TCPに比べ水に対する溶解度が高いため, 生体内でより早期に吸収されると考えられている.

著者らのグループは, 新しい人工骨素材として $\alpha$ TCPを主成分とした外径1mmの定型均質なテトラポッド形状の顆粒状人工骨(Tetrabones®, NEXT21, Tokyo, Japan, 以下TBと表記する.)を開発した(Fig.1-1). 人工骨がすぐれた骨伝導能を発揮するためには, 材質だけでなく, 新生骨が人工骨内に伸長し一体化するための適切な間隙が必要である. TBが集積した場合, その特徴的な形状から細胞および血管の侵入性に適した間隙(連通孔)が形成され, すぐれた骨伝導能を発揮することが確認されている(unpublished data).

骨折治療全般においては, 血流の存在も重要な役割を果たすことが知られている[16,17]. 長管骨への血液供給は, 栄養動脈, 骨端部・骨幹端部・骨膜の動脈による血管ネットワークに依存しており, 酸素や栄養素, 可溶性因子および様々な細胞を供給している. 外傷などで骨折が生じると血管ネットワークが障害され, 周囲の組織に急性壊死や低酸素症が引き起こされる[18]. この障害が持続すると, 仮骨への血液供給の低下が起これ, その結果として骨壊死を引き起こしたり感染への抵抗性が低下することが, 骨癒合遅延や骨

癒合不全の大きな原因の一つと考えられている。特に萎縮性癒合不全の原因には、血液供給の不足が重要視されている[19,20]。したがって、できるだけ早期に血管ネットワークを再構築させることが骨癒合への鍵である。

骨折治療における血管新生法として、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor: bFGF）、血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）、血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor: PDGF）などの成長因子が用いられている[17]。この中でも bFGF は、血管新生因子としての歴史が最も古く、最近では VEGF や PDGF の発現誘導を制御することも明らかとなってきた[21-24]。さらに、bFGF は血管新生を促進する[25-27]だけでなく、間葉系細胞の増殖も促進する[28]ため骨折治癒過程において理想的な成長因子であると言える。また、現在では遺伝子組み換えヒト bFGF が製品化され、より低価格で入手しやすくなったこともこれらの研究を後押しする要因である。しかしながら、bFGF は生体内での半減期が非常に短く、容易に吸収され血流によって拡散されるため、局所からの消失も早い。そこで bFGF の効果を局所で緩やかに発現させるために、コラーゲンから成るハイドロゲルやシートならびにペレットなどを担体として用いる骨再生研究が注目されている[29-31]。これらの担体は bFGF の生理活性を保ったまま保持することが可能で、生体内で担体が溶解・吸収されるにつれて bFGF が遊離される。

イオン・コンプレックスゲル（ion complex gel: IC gel）は、血管再生医療分野において、移植した培養細胞などに対して母体からの血管新生を誘導し、早期に定着させることを目的として開発された[32]。IC gel はコラーゲンを主成分としたハイドロゲルであり、ゲル内への血管侵入性および、構築された血管ネットワークの保持性にすぐれているだけ

でなく、bFGF をゲル中に電氣的に結合させることが可能である。bFGF が結合した IC gel (bFGF-IC gel) は、IC gel 単独よりもさらに強力に血管を誘導することが確認されている。

しかしながら、これらの骨新生や血管新生の足場としてすぐれたテトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) と bFGF 結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) を併用しても、巨大な骨欠損を再建するには、顆粒状人工骨に特有な二つの問題点を解決する必要がある。一つは人工骨形状が顆粒状であるために、骨欠損部に単純に充填しただけでは人工骨顆粒を局所に留めておくことは困難であり、術後に人工骨顆粒が骨欠損部の外へ漏出してしまふことである。そのため、生体適合性の高いポリプロピレンやナイロンなどの化学合成繊維製もしくはチタンやステンレスなどの金属製メッシュシートで骨欠損部周囲を包み、人工骨顆粒の漏出を防止する必要がある。二つ目は、人工骨単独では負重を支えるだけの強度を得ることができないため、骨欠損部の安定化にはプレートや髓内ピン、創外固定器などの他の強固な固定術を併用する必要がある。

一方、金属系バイオマテリアルを用いた骨欠損再建法には、チタンメッシュケージ (titanium mesh cage: TMC) を骨欠損部に移植する方法がある。TMC は円筒形のメッシュケージであり、長期埋植を目的としているためすぐれた生体適合性を有するチタンおよびチタン合金から作製されている。TMC は 1990 年に骨欠損部の強化用インプラントとしてアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) に認可されている。自家骨や人工骨などを充填した TMC による椎体置換術や椎体固定術は、脊椎外科分野ではすでに一般的な手法として行われている[33-36]。また、TMC は Cobos らにより、2000 年にはじめて長管骨に応用された。Cobos らは、脛骨骨幹部巨大骨欠損の 2 症例に対して、同種海

綿骨と脱灰骨基質を充填した TMC とロック型髄内ピンを併用して再建に成功した[37]. その後, TMC は上腕骨や大腿骨骨幹部の骨欠損再建術や足根関節固定術などにも適用され, 良好な機能回復が得られている[38-41]. また, TMC の生体力学的特性として, Lindsey らはイヌ大腿骨骨幹部欠損モデルに対して TMC を使用すると, 使用しない場合に比べて術後 18 週でねじり剛性は約 5 倍, ねじれ強度は約 2 倍に増加したと報告している[42]. この他にも, TMC 自体に生物活性を付与する試みや, TMC と骨形成性タンパク質 (bone morphogenetic protein: BMP) の併用など, 多くの発展的な研究が行われている[43,44].

しかし, TMC の長管骨への応用には二つの問題点がある. その一つは TMC の形やサイズである. 負重を支えるためには骨欠損部の形態に適合した TMC を使用することが望ましいが, 現在市販されている TMC のほとんどは円筒形であり, 形やサイズのバリエーションに乏しい. したがって, 多様な骨欠損部の形態に, TMC の形態を完全に一致させるのは困難である. 二つ目は既存骨との固定法である. 現在のところ TMC と既存骨を直接固定する方法はなく, 骨欠損部に TMC を置いた状態で既存骨をプレートや髄内ピンで再建するのが一般的である. そのため, 最近では TMC 移植後の骨癒合不全による失敗例が報告されている[45, 46]. Carlsson は, 3 例の足根関節全置換術の失敗例に対して, 自家骨を充填した TMC と髄内ピンの併用により関節固定術を施した. しかし, 複数回の手術で患部周辺の血流が減少していたこと, 強固な安定性が得られなかったことなどが原因となり, 骨癒合が得られなかったと報告している[46].

したがって, 長管骨に適用できる TMC の開発には, その形やサイズ, 固定方法, ならびに周囲組織からの血流の確保など様々な問題を解決する必要がある. そこで著者ら



のグループは、TMC の形態や固定法の解決策として、各骨欠損形態に一致した形状の TMC と、既存骨表面の形態に一致したプレートとを一体化させた、テーラーメイド TMC 一体型プレート (tailor-made titanium mesh cage with plate: tTMCP) を考案した (Fig. 3-1 A-E). tTMCP は、患者の CT データとラピッド・プロトタイピング・システム (rapid prototyping system: RP) の一つであるレーザー溶融積層造形法 (the selective laser melting: SLM) により、チタン合金粉末から直接的に短期間で造形することが可能である。骨欠損部や既存骨の形態に完全に一致した tTMCP を製作すれば、tTMCP 単独で容易な整復と強固な安定性が同時に得られ、より早期のすぐれた機能回復が期待される。

本研究の最終目標は、新しく開発されたこれら 3 つのバイオマテリアルを組み合わせることによる機能回復効果と骨再生効果を検討することである。長管骨巨大骨欠損動物モデルに対して、テーラーメイド TMC 一体型プレート (tTMCP) を作製し、そのケージ内に骨伝導能にすぐれたテトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) と、血管誘導能にすぐれた bFGF 結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) を充填することにより、早期の機能回復と骨癒合を同時に達成できる可能性が高い。本研究では、この新たな治療法の有効性を検討するために 3 つの実験を行った。すなわち、第 1 章としてウサギ片側大腿骨骨幹部欠損モデルを用いて、TB と bFGF-IC gel の併用による骨再生効果を検討した。続いて第 2 章では、よりヒトに近い骨形成能を示し、より大きな動物であるイヌの両側橈骨骨幹部部分欠損モデルを用いて、TB と bFGF-IC gel の併用による骨再生効果をより詳細に検討した。最後に第 3 章として、イヌ片側橈骨骨幹部部分欠損モデルを用いて、tTMCP, TB ならびに

bFGF-IC gel の併用による機能回復効果と骨再生効果を、より長期的な観察期間を設けて検討を行った。

第1章 ウサギ片側大腿骨骨幹部部分欠損モデルにおけるテトラポッド型顆粒状人工骨ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲルの併用による骨再生効果

## 第1節 緒言

ヒト FGF ファミリーは、現在少なくとも FGF-1 から 23 までの 22 種類 (FGF-15 は欠番) が存在し、7 種類の FGF レセプター (FGFR) との組み合わせにより多様な機能が発揮されている[47-49]。このうち FGF-2 (bFGF) は 154 個のアミノ酸から成る分子量 18 kD の 1 本鎖ポリペプチドであり、FGFR-1 を介して作用する[47-49]。bFGF は種々の細胞から放出された後、細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) に豊富に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し安定化される。そしてマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMPs) やプラスミノゲン活性化因子 (plasminogen activator: PAs) などのタンパク分解酵素により、これらを含む ECM が分解されると bFGF が遊離し、標的細胞に作用する。bFGF は種々の細胞の増殖を促進するため、再生医療の研究分野において主に骨再生と血管再生の二つの側面から注目されている。bFGF の骨新生誘導効果は、骨形成原細胞の骨芽細胞への分化誘導や骨芽細胞の増殖促進により引き起こされると考えられる[28,50]。実際、ラット、ウサギ、イヌ、霊長類の骨欠損部に 100-200  $\mu$ g の bFGF を直接単回投与すると骨新生が促進されることが確認されている[51-54]。

また、bFGF の血管新生誘導効果は、血管内皮細胞に発現している FGFR-1 を介した細胞内シグナルによる血管内皮細胞の増殖、遊走、管腔形成によって引き起こされる。同じ血管新生誘導因子である VEGF も、レセプターを介して血管内皮細胞の増殖を促進するが、VEGF は血管内皮細胞に比較的特化した増殖因子である。これに対して、FGFR-1 は血管内皮細胞に加え、血管平滑筋細胞や間葉系細胞などの血管を構成する細胞のほとん

どに発現しているため、bFGF はより成熟した機能血管の形成を促進すると考えられている[55]. この他にも bFGF は、内因性の VEGF の発現を制御する作用も有し、血管新生において司令塔の役割を担っていると考えられている[21-23]. 今回用いた bFGF-IC gel の血管新生誘導効果はラットにおいて確認されており、4 つの bFGF 濃度 (0, 10, 100, 1000 ng/ml) で検討した結果、100 ng/ml が十分な効果の得られる至適用量であったと報告されている [32].

このように bFGF はその多彩な細胞増殖効果により、再生医療分野において盛んに研究されている。特に骨の治癒機転には血管新生と骨新生の両方が非常に重要であることから、bFGF は骨再生において最も注目されている成長因子の一つである。血管再生医療分野で開発された塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) は、これまでにラットにおけるすぐれた血管新生誘導効果が確認されているが、骨再生における有用性は検討されていない。bFGF-IC gel とテトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) を併用することにより、TB の連通孔全体に血管新生や骨新生を誘導することができれば、すぐれた骨再生効果が得られるかもしれない。

そこで本章では、bFGF-IC gel の骨欠損部における血管新生効果と骨新生効果について、基礎的な検討を行うために、ウサギ片側大腿骨骨幹部部分欠損モデルを用いて TB との併用による骨再生効果を検討した。また、このウサギモデルには、骨欠損部に顆粒状人工骨を保持する目的でポリプロピレン製メッシュシートを使用した。ポリプロピレン製メッシュシートは、金属製メッシュシートに比べて加工性や伸縮性にすぐれているため、骨欠損のサイズに合わせやすく、TB の保持が容易であると考えられた。さらにポリプロ

ピレンメッシュシートは、骨欠損部における新生骨の X 線学的評価の妨げとならず、また血管侵入の阻害も最小限であることから、TB と bFGF-IC gel の併用効果の検討に適切な材料であると考えられる。

## 第2節 材料および方法

### テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB)

本研究に使用した人工骨は、外径 1 mm の定型均質なテトラポッド型顆粒状人工骨 (Tetrabones®, NEXT21 K.K., Tokyo, Japan) である (Fig.1-1)。作成方法は、はじめに 60/40 wt% の  $\alpha$ TCP 粉末 (Taihei Chemical Industrial Co., Tokyo, Japan) と結合剤 (55 % のオレフィン樹脂, 30 % のワックス, 15 % の可塑剤を含む) をタンブラーミキサー (Neo Tec K03P) により混和した。次に、回転ドラムミキサーにより室温下で 300 分間十分に混合させた。この混合体を外径 1 mm のテトラポッド型の射出成形金型を用いて、射出成形機 (J34AD, Japan Steel Works, Tokyo, Japan) により成形した。次いで、この成形物を脱脂し、か焼した後、0.2 mol/L のコハク酸に 24 時間浸漬した。その後、蒸留水にて二度すすぎ、減圧下で乾燥させ、25 kGy の電子線照射により滅菌した。本研究においてはこの最終産物を Tetrabones® (TB) と呼ぶ。

### 塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel)

イオン・コンプレックスゲル (IC gel) の調整法についてはすでに報告されている [32, 56-58]。IC gel はコラーゲンとクエン酸誘導体から成る安定したゲルであり、クエン酸誘導体-アルカリ処理コラーゲン (alkali-treated collagen modified with a citric acid derivative: AlCol-CAD) にアテロコラーゲン (atelocollagen: AtCol) を混合することによりゲル化する。AlCol と AtCol のコラーゲン成分は、共に豚組織由来コラーゲン (Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan) であり、それぞれ 1% (w/v) になるように調整した。本研究ではこのゲル化した状態

を IC gel と呼ぶ。また、塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) として、bFGF (Recombinant Human FGF basic; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) をあらかじめ AtCol-CAD に加え、AtCol と混合した際に bFGF 濃度が 100 ng/ml になるように調整した。一方、IC gel を含まない bFGF 溶液は、リン酸緩衝液 (phosphate buffer solution: PBS) により 100 ng/ml に調整した。コラーゲン濃度 (1%(w/v)) および bFGF 濃度 (100 ng/ml) は、Takayama らのラット腹直筋筋膜下移植モデルにおいて最も血管を誘導する最小濃度を用いた[32]。

これらの IC gel, bFGF-IC gel および bFGF 溶液は、東京大学大学院医学系研究科血管再生医療講座、小山博之准教授より供与された。

## 動物ならびに手術方法

実験動物として、体重 3.0-3.4 kg, 17-21 週齢の雄の日本白色家兔 40 羽 (Saitama Experimental Animals Supply Co.,Ltd.) を用いた。動物は塩酸ケタミン (10 mg/kg) と塩酸メドミジン (0.2 mg/kg) の混合液の筋肉内投与により不動化し、イソフルラン吸入麻酔にて維持した。術前術後に鎮痛剤としてブプレノルフィン (30  $\mu$ g/kg) を筋肉内投与し、同様に抗生剤としてエンロフロキサシン (10 mg/kg) を皮下投与した。術中はラクトリンゲル液 (10 ml/kg/hr) を持続点滴した。手術は無菌処置後、右側臥位にて左大腿部外側より切皮し、大腿二頭筋と外側広筋の間をアプローチして大腿骨を露出した。サジタルソー (Osada Electronics, Tokyo, Japan) を用いて、大腿骨骨幹部中央に 10 mm の骨欠損を作成した。TB の骨欠損部への移植には、移植後の TB の変位を防止するため、生体移植用ポリプ



ロピレン製メッシュシート (15 cm × 15 cm, Bard\* Mesh, Davol inc., USA) を使用した。メッシュシートを 24 mm × 17 mm に切り取り、医療用焼灼器で直径 7 mm, 高さ 17 mm の円筒形に加工し、ポリプロピレンメッシュケージ (PMC) を作製した (Fig. 1-2 A)。PMC の直径は、保存していた同条件の日本白色家兎の大腿骨標本を計測し決定した。TB は PMC の中心に骨欠損サイズに合うように充填し、操作時の漏出を防ぐため、2.5 ml シリンジの内筒を PMC 下方より挿入して移植を行った (Fig. 1-2 B)。PMC の両端の余り部分 (片側 3.5 mm) を両側の大腿骨断端の全周に被せる様に装着し、8 穴ステンレスプレート (T: 1.5 mm, W: 7 mm, D: 6 mm, VCP, SYNTHES Vet, Japan) と 6 本の直径 2.0 mm 皮質骨用ステンレススクリューにて固定した。必要に応じてプレートと骨の固定性を高めるため、各スクリュー間を通る様に合計 4 本の直径 0.6 mm 軟ステンレスワイヤーを締結した。術創は 3-0 ポリジオキサノンにて筋縫合、皮内縫合を行い閉創した。

動物は 2 週間もしくは 4 週間の観察期間終了後に、塩酸ケタミン (20 mg/kg) の筋肉内投与により不動化し、ネンプタール (overdose) の静脈内投与後に塩化カリウム溶液 (2 mEq/kg) を静脈内投与し安楽殺した。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認の下に行った。

## 実験計画

40 羽のウサギを TB, bFGF, IC gel, bFGF-IC gel の組み合わせにより 5 つの群に分類した。すなわち、骨欠損部に PMC のみを移植する pm 群 (n = 8), TB を充填した PMC を移植する pm/TB 群 (n = 8), TB と bFGF 溶液 (100 ng/ml 溶液を 0.5 ml, bFGF として 50

ng) を充填した PMC を移植する pm/TB/f 群 (n=8), TB と IC gel (0.5 ml) を充填した PMC を移植する pm/TB/ICgel 群, および TB と bFGF-IC gel (100 ng/ml 溶液を 0.5 ml, bFGF として 50 ng) を充填した PMC を移植する pm/TB/f-ICgel 群 (n=8) を作成した.

5 群のうち pm/TB/f 群では, 閉創直前に PMC 内やその周囲の血液などの液体成分を丁寧に吸収した後に, bFGF 溶液を 25 G 注射針とシリンジで PMC 内に注入した. また, pm/TB/ICgel 群, pm/TB/f-ICgel 群では, IC gel および bFGF-IC gel はあらかじめ TB と混合した状態で PMC 内に充填した. 各群移植後 2 週間もしくは 4 週間の観察期間を設けた.

### **臨床的評価ならびに肉眼的評価**

各個体の術創や全身状態を毎日観察した. 安楽殺後に剖検し, PMC の周囲組織, 特に PMC 内への血管侵入の有無について評価した. 次に, 全ての金属インプラントを除去し, サジタルソーを用いて欠損部を含む約 20 mm の左大腿骨を回収した.

### **単純 X 線学的検査**

安楽殺後に患肢である左大腿骨の単純 X 線側面像を撮影した. 得られた X 線写真から骨欠損部の骨新生や仮骨形成, インプラントの不具合の有無について評価した.

### **$\mu$ CT 検査**

患肢から金属インプラントを除去した後に  $\mu$ CT 撮影 (SMX-90CT, Shimadzu Co., Kyoto, Japan) を行い,  $\mu$ CT 解析ソフト (TRI/3D-VIE, Ratoc, Tokyo, Japan) を用い欠損部の骨新生を評価した.

## 組織形態学的検査

骨欠損部を含む検体を、10 %中性緩衝ホルマリン液 (Wako, Tokyo, Japan) で5日間固定した後、プランク・リュクロ液 (Wako, Tokyo, Japan) にて週2回の液換えを行いながら40日間脱灰した。脱灰完了後パラフィンに包埋し、両側に既存の大腿骨を含むように正中矢状断で7  $\mu\text{m}$  に薄切した。切片はマッソントリクローム染色を行った。これらの切片を用いて骨欠損部における新生骨伸長距離、新生骨量、血管数を計測した。

新生骨伸長距離は、新生骨が既存骨断端から骨欠損部中央に向かってどれだけ伸長したかを示し、全組織長に対する骨欠損部の正中線上の新生骨長の割合 (the distance of new bone tissue per distance of total tissue: BD/TD, %) として下式により算出した (Fig. 1-3 A)。

$$\text{BD/TD (\%)} = \text{新生骨長} / \text{全組織長} \times 100$$

新生骨量の計測は、骨欠損部より5つの区画を無作為に抽出して行った。1区画は一边が2 mmの正方形とし、区画内には縦横に5本の直線から成る格子で25個の交点を設定した。区画内の新生骨上に存在する交点数を計測し、全交点数 (125 個) に対する割合を下式により算出し、計測領域全組織量に対する新生骨量 (the volume of new bone tissue per volume of total tissue: BV/TV, %) とした (Fig. 1-3 B)。

$$\text{BV/TV (\%)} = \text{5区画の新生骨が重なる総交点数} / \text{5区画の総交点数} \times 100$$

血管数の計測は、同様に骨欠損部より5つの区画を無作為に抽出して行った。1区画は15  $\text{mm}^2$  とし区画内に存在する血管数を1  $\text{mm}^2$  あたりの血管数 (the number of vessels per

square millimeter :  $N.Ve/mm^2$ ) として下式により算出した。この際、血管とは管腔構造を持ち、内腔に赤血球を含むものを血管とした (Fig. 1-3B)。

$$N.Ve/mm^2 = 5 \text{ 区画の総血管数} / 5 \text{ 区画の総面積}$$

本文ならびに図で使用した骨形態計測に関する用語、記号、単位は ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee の報告にならって使用した[59]。

### 統計解析

すべての結果は平均値±標準偏差として表記した。また、統計解析には StatView Version 5.01 software (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)を用いた。分散分析には一元配置分散分析 (One-way Factorial ANOVA) を用い、有意差が認められた場合には、多重比較法として Tukey-kramer 法を用いて群間の比較を行った。p 値が0.05 未満の場合に統計学的に有意差ありと判断した。

## 第3節 結果

### 周術期の臨床所見

PMC に充填した TB を骨欠損部に挿入する際には、TB 単独では PMC から漏出することがあったが、TB を IC gel や bFGF-IC gel と混合した場合には漏出することはなかった。作製した PMC の直径は全例大腿骨断端とほぼ一致した。また、PMC の両断端を橈骨とプレートの上に挟み込むことにより骨欠損部に PMC をしっかりと固定させることが可能であった (Fig. 1-4)。移植手術後の創面離開や感染兆候は認められず、術後 10 日目には創面は完全に治癒した。また、創面の治癒後は、観察期間中において手術部位の腫脹や疼痛は認められなかった。

### 肉眼的検査所見

剖検時の肉眼所見では、PMC 周囲は軟部組織で覆われており、メッシュと周囲組織の境界を判別できなかったため、PMC に侵入する血管の評価は不可能であった。Fig. 1-5 は、骨欠損部を含む 20 mm の長さで切断した大腿骨のプレート接着面である。骨欠損部と既存骨は分離することなく連続性を維持し、表面は軟部組織で覆われていた。

### 単純 X 線学的検査所見

Fig. 1-6 に安楽殺後の各群の単純 X 線写真を示した。X 線写真上は、TB の変位や漏出が認められなかったことから、TB は PMC 内に保持されていたと考えられた。骨欠損部の尾側には大きな仮骨形成が認められ、これは既存骨の両断端から出現したのと考えら

れた。特に遠位端尾側からの仮骨形成が旺盛であったが、5つの群間に明確な差は認められなかった。一方、骨欠損内部の新生骨については、TBのX線不透過性が高いため判別できなかった。TBを用いていないpm群は、2週の時点では骨欠損内部にほとんど新生骨は認められず、4週時には骨新生が認められたものの全例で癒合には至っていなかった。

### **μCT 検査所見**

Fig. 1-7にμCT画像を示した。画像は既存骨を含む骨欠損部の正中矢状断像である。単純X線学的検査所見と同様に、TBの変位は認められず、骨欠損部外側の仮骨形成は確認できたが、TBのX線不透過性が高いため骨欠損内部の新生骨の判別ならびにその評価は不可能であった。

## 組織形態学的検査所見

Fig. 1-8 A-J に組織切片全体像を示した。PMC は炎症反応を誘発することなく TB をしっかりと保持していた。また、TB は PMC 内に大きな死腔なく均一に充填されていた。TB を用いたこれらの群では、骨新生は両端の既存骨周囲から起こっていた。一方、TB を用いていない pm 群は 2 週の時点ではほとんど骨新生が起こらず、4 週時には骨新生は認められたものの全例で骨癒合には至っていなかった。

Fig. 1-8 に新生骨伸長距離 (BD/TD)、新生骨量 (BV/TV)、および血管数 (N.Ve/mm<sup>2</sup>) の算出に用いた組織像を示し、これらの値を Fig. 1-9 に示した。

BD/TD (%) (Fig. 1-8 A-J, Fig. 1-9 A) は、pm 群、pm/TB 群、pm/TB/f 群、pm/TB/ICgel 群、pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ、2 週 :  $1.0 \pm 2.0$ ,  $5.5 \pm 7.8$ ,  $7.0 \pm 8.1$ ,  $10.4 \pm 8.6$ ,  $21.9 \pm 8.1$  %, 4 週 :  $36.9 \pm 11.3$ ,  $22.1 \pm 7.7$ ,  $21.9 \pm 11.5$ ,  $37.8 \pm 10.4$ ,  $60.0 \pm 8.3$  %であった。pm/TB/f-ICgel 群では 2 週の時点で pm/TB/f 群、pm/TB/ICgel 群との間に有意差は認められなかったが、4 週では他の 4 群すべてに比べて有意に高い値を示した。その他の 4 群においては 2, 4 週ともにいずれの群間にも有意差は認められなかった。

BV/TV (%) (Fig. 1-8 a-j, Fig. 1-9 B) は、pm 群、pm/TB 群、pm/TB/f 群、pm/TB/ICgel 群、pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ、2 週 :  $0.8 \pm 1.6$ ,  $8.0 \pm 5.6$ ,  $9.0 \pm 3.3$ ,  $7.4 \pm 3.3$ ,  $24.8 \pm 1.5$  %, 4 週 :  $23.4 \pm 2.8$ ,  $16.0 \pm 0.7$ ,  $17.0 \pm 2.1$ ,  $36.8 \pm 5.2$ ,  $55.6 \pm 5.6$  %であった。pm/TB/f-ICgel 群は 2, 4 週ともに他群に比べて有意に高い値であった。pm/TB/ICgel 群は 2 週では他の 4 群との有意差を認めなかったものの、4 週では pm/TB/f-ICgel 群に次いで他群よりも有意に高い値であった。一方、pm/TB/f 群は pm/TB 群と比較していずれの観察期間においても差

は認められなかった。また、この2群は2週ではpm群よりも有意に高い値であったが、4週では有意差は認められなかった。

N.Ve/mm<sup>2</sup> (Fig. 1-8 k-t, Fig. 1-9 C) は、pm群、pm/TB群、pm/TB/f群、pm/TB/ICgel群、pm/TB/f-ICgel群においてそれぞれ、2週 : 0.9±0.3, 1.2±0.3, 1.1±0.1, 1.3±0.2, 2.3±0.2, 4週 : 1.2±0.1, 1.1±0.2, 1.0±0.1, 1.7±0.2, 2.7±0.3であった。pm/TB/f-ICgel群では2, 4週ともに他群に比べて有意に高い値であった。pm/TB/ICgel群は2週では他群との有意差を認めず、4週ではpm/TB/f-ICgel群に次いで他群よりも有意に高い値であった。その他の3群においては2, 4週ともにいずれの群間にも有意差は認められなかった。



## 第4節 考察

本研究に用いたウサギ片側大腿骨骨幹部部分欠損モデルは、6週の時点まで骨癒合しない骨欠損サイズ（Critical defect size）であることが確認されている[29, 60]。本研究の結果においても、pm 群では4週の時点で骨癒合は認められず、十分な骨欠損サイズであることが確認された。

本研究ではこのウサギ骨欠損モデルに対して、顆粒状人工骨であるTBを骨欠損部に正確に保持するためにPMCを使用した。顆粒状人工骨は、骨嚢胞やスクリーホール、骨折整復時に生じたわずかな間隙を埋める用途としては適しているが、長管骨全周欠損では移植後に沈下や漏出などの変位が生じる可能性がある。特に実験動物モデルでこれらの変位が生じると、正確な骨再生評価の妨げとなり得る。そこで、TBを保持し血管侵入性への影響が最小限となるように、医療用ポリプロピレンメッシュシートを円筒形に加工しPMCを作製した。その結果、既存骨とほぼ同形状に顆粒状人工骨を移植でき、移植後の沈下や漏出を防止することが可能であった。また、TB単独では手術時の操作性が悪く、骨欠損部への挿入時にはTB顆粒がPMCの外へ漏出することが少なくなかったが、TBとbFGF-IC gelを混合させることでゲル状の混合体となり、漏出することなく形状が保持され、極めてすぐれた操作性を示した。

本研究において、TBとIC gelを併用したpm/TB/ICgel群は、4週においてpm/TB群、pm/TB/f群よりも有意に高い血管数と新生骨量を示した。すなわち、TBとIC gelのみで血管新生と骨新生を有意に促進することが明らかとなった。IC gel自体が血管新生のす

ぐれた足場であり、血管新生を促進させる作用[32]があることから、IC gel により形成された新生血管により骨新生が促進されたものと考えられる。

このように、骨や血管の再生には成長因子などによる細胞の増殖促進だけではなく、細胞の増殖やその分化を支持するための足場が重要な役割を果たす[11, 32, 61]。骨新生の足場となるバイオマテリアルの一つが、骨伝導能や生体内活性にすぐれた TCP である。TCP 内に骨が伸長し一体化するためには、TCP に多数の間隙が形成されている必要がある。ヒトのオステオンのサイズが約  $223 \mu\text{m}$  であることから、 $200\text{--}400 \mu\text{m}$  の間隙を持つことが細胞や血管の侵入に重要であるとされている[11, 62]。現在市販されている TCP の形態はブロック状、ペースト状、顆粒状が一般的である。ブロック状 TCP の内部には一定の間隙が存在するが、骨欠損部の複雑な形態に合わせて成形するのは困難である。一方、ペースト状 TCP と顆粒状 TCP は様々な骨欠損形態に適応でき操作性にすぐれている。しかし、ペースト状 TCP は、事実上内部の間隙は皆無であり、また顆粒状 TCP の多くはブロック状 TCP を破碎して作製されているため、一粒あたりの形状やサイズが不均一である。そのため、充填する際に死腔が生じたり間隙が消失する可能性があり、集積後の間隙サイズは予想できない。したがって理想的な TCP の形態は、骨欠損部への充填が可能な顆粒状であり、かつ定型均質で集積により顆粒間に  $200\text{--}400 \mu\text{m}$  の間隙が形成されることが望ましい。本研究で用いた TB は、これらの条件を勘案してデザインされた。つまり、TB は、 $\alpha$ TCP 粉末から射出成形された外径  $1 \text{ mm}$  の定型均質なテトラポッド型顆粒状人工骨であり、集積により顆粒間に均一に  $600 \mu\text{m}$  未満の連通孔が形成される (unpublished data) ことから、理想的な骨新生の足場であると予想された。実際に、ウサギとイヌの大腿骨遠位端円柱状欠損

モデルにおける TB の研究では、市販の  $\beta$  TCP 顆粒状人工骨と比べて有意に高い新生骨量が得られ、すぐれた骨伝導能が確認されている (unpublished data).

しかしながら、本研究においては、pm 群と pm/TB 群との間に有意な差は認められなかった。本モデルでは単純 X 線学的検査、 $\mu$ CT 検査より、全群において骨欠損部の周囲を覆うように旺盛な仮骨が形成されていた。骨形成能力の高いウサギでは人工骨はかえって新生骨の伸長の妨げとなるのかもしれない。

一方、生体内の血管は ECM によりその構造が保持され、そこから様々なシグナルの受け渡しが行われる[61, 63-65]。そのため、血管新生の足場として ECM に代わるバイオマテリアルが開発されている[61, 66]。その中でも IC gel はより ECM に近いバイオマテリアルとして注目されている[32]。IC gel の主要成分であるクエン酸誘導体-アルカリ処理コラーゲン (AICoI-CAD) は、*in vitro* において血管内皮細胞に対し、毒性なく高い親和性を発揮する[56-58]。さらに、IC gel は血管の保持に重要な安定した三次元マトリックス構造を持つ。また、IC gel は血管内皮細胞や血管構成細胞が放出するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) やプラスミノゲン活性化因子 (PAs) などのタンパク分解酵素により容易に分解されるため、血管の侵入性にすぐれている。ラット腹直筋筋膜下移植モデルでは、IC gel は同濃度のコラーゲンや Matrigel® (BD Biosciences, Bedford, MA) に比べて、血管に富んだ肉芽組織が有意に増加することが確認されている[32]。

また、足場としてすぐれた特性をもつ TB と IC gel を混合することは、手術時の操作性を向上させるだけでなく、TB 顆粒間の連通孔全体に容易に IC gel を行き渡らせることができ、血管新生の促進に有用であると期待された。生体内において、細胞が血管から拡

散により酸素や栄養素を得るためには、血管から 200  $\mu\text{m}$  以内に存在することが必要である[67]. すなわち、TB 間の連通孔 (600  $\mu\text{m}$  未満) 内に血管が侵入すると、細胞の生存にとって最も適した血管との距離となり得る. このことから、TB と IC gel の併用による骨再生効果は、骨欠損部に骨新生と血管新生にすぐれた足場を提供することにより得られたものと考えられる.

TB と bFGF-IC gel を併用した pm/TB/f-ICgel 群では、pm/TB/f 群ならびに pm/TB/ICgel 群に比べて新生骨伸長距離、新生骨量、血管数すべてにおいて有意に高い値を示した. IC gel は、使用直前に室温下で AICol-CAD と AtCol を同量混合すると、イオン・コンプレックスハイドロゲルマトリックスが形成される. これは負に荷電した AtCol-CAD と、正に荷電した AtCol が電氣的に結合するためである[32]. また、IC gel の CAD 部分には bFGF を保持する役割がある. これは、bFGF は正に荷電しているため、負に荷電した CAD 部分と電氣的に結合するためである[32]. こうして bFGF は、IC gel 中に留まることにより局所での拡散を免れ、IC gel の分解に伴って遊離され、より効率的に標的細胞に作用することができる. ラットを用いた研究では、bFGF-IC gel は IC gel 単独よりも有意に血管新生を誘導するとともに、成熟した血管形成も認められている[32]. このことから、bFGF-IC gel は bFGF 単独もしくは IC gel 単独に比べて、より効率的に多くの血管を誘導したことにより、pm/TB/f-ICgel 群において最も骨新生が促進されたと考えられる.

本研究で用いた bFGF-IC gel の用量は、Takayama らのデータから、血管新生の誘導においては十分な効果を発揮する用量 (100 ng/ml, 1.0 ml, bFGF として 50 ng) を用いた. この用量は、骨新生誘導を期待するには極めて少ない量であると考えられる. 例えば、Inui

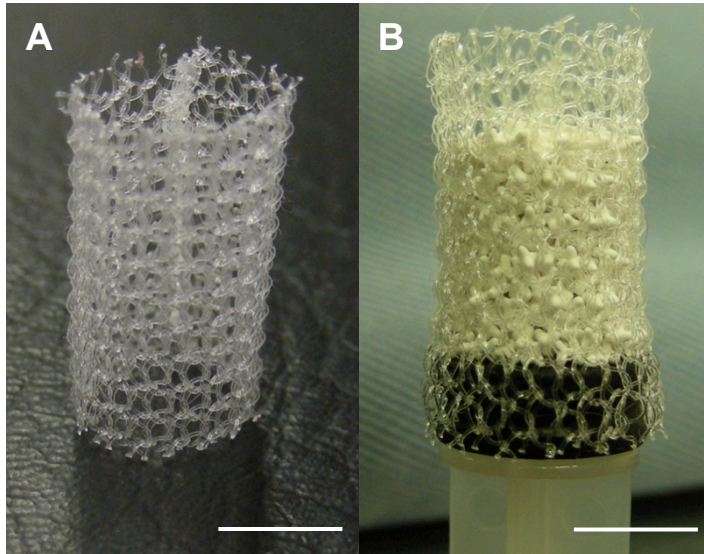
らはウサギ大腿骨 10 mm 欠損モデルに対して、骨欠損部に 2.0  $\mu\text{g}$  の bFGF を直接投与しても骨新生誘導効果が認められず、bFGF の徐放化のためにコラーゲンミニペレットを担体として用いたところ、1.4  $\mu\text{g}$  でその効果が認められたと報告している[29]。一方、このような担体を用いない場合、骨新生に必要な bFGF の量はさらに高用量となり、ラット、ウサギ、イヌ、霊長類の骨欠損モデルに対する bFGF の骨新生の誘導には、直接単回投与で通常 100-200  $\mu\text{g}$  の bFGF が必要とされている[51-54]。このことは、直接投与された bFGF の大部分が拡散などにより失われ効果を発揮していないことを示唆している。Inui らの研究では、コラーゲンミニペレットを担体とした 1.4  $\mu\text{g}$  の bFGF 投与群では、移植後 4 週の単純 X 線写真において、骨欠損部に対する新生骨占有率は 62.4 %であった。これに対して本研究の pm/TB/f-ICgel 群 4 週の新生骨量は 55.6 %とほぼ同等の結果であった。しかし、bFGF の量を比較すると、Inui らのモデルは本研究の 20 倍以上の bFGF を使用している。したがって、本研究の結果は極めて低用量の bFGF であっても、IC gel と併用することで血管新生誘導効果を最大限に発揮させることが可能であり、その結果すぐれた骨再生効果が得られたものと考えられた。IC gel 中の bFGF の量を増やすことで、さらなる骨再生効果が得られるかどうかは今後の検討課題である。

最近になって、本研究に類似した骨新生と血管新生の関係性を示す研究が報告された。Wang らはウサギ大腿骨 15 mm 欠損モデルにおいて、ブロック状  $\beta$ TCP の側溝に大腿動静脈を転位し接触させることにより、血管新生と骨新生が促進されたと報告している[68]。この研究では、大腿動静脈の転位を行っていない対照群に対して、移植後 2 週の時点では新生骨量に差が認められず、4 週ではじめて有意な差が認められている。また、血

管数においては、2、4週それぞれ0.4 および 1.4 /mm<sup>2</sup> (論文中の値を骨欠損面積で除した値) であり、ともに有意差が認められている。これに対して、本研究の pm/TB/f-ICgel 群は pm/TB 群に対して、2週の時点で新生骨量に有意差が認められており、血管数は、2、4週それぞれ 2.3 および 2.7 /mm<sup>2</sup> と、2週の時点ですでに Wang らの報告を上回る高値を示した。骨欠損サイズや評価方法が異なるため、数値の直接的な比較は困難であるが、この大腿動静脈転移法に比べても、bFGF-IC gel は移植後早期に血管を誘導し、骨新生が促進されたものと考えられる。ラットの研究では、bFGF-IC gel は移植後5日で豊富な血管を含む肉芽組織を形成することが確認されており[32]、本研究においても bFGF-IC gel は、移植後早期の血管新生が誘導された可能性が高い。

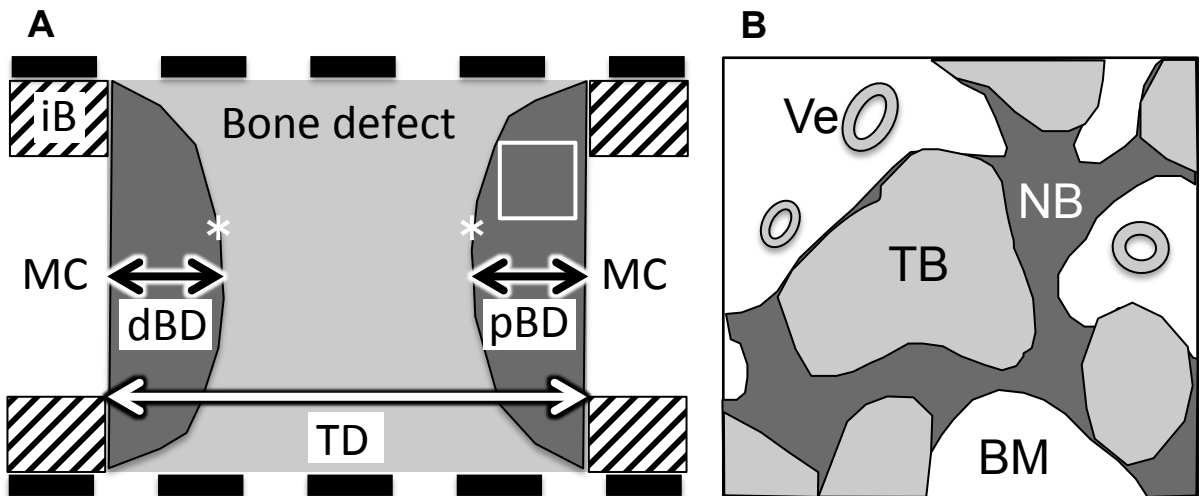


**Fig. 1-1.** Tetrabones® (TB) are tetrapod-shaped granular artificial bones made of  $\alpha$ TCP with the size of 1 mm. Scale bar = 1 mm.



**Fig. 1-2.** (A) The polypropylene mesh cage (PMC) was fabricated from a polypropylene mesh sheet using medical low-temperature cautery. (B) TB within the PMC for a rabbit femoral segmental defect model. Scale bar =  $500\mu\text{m}$ .

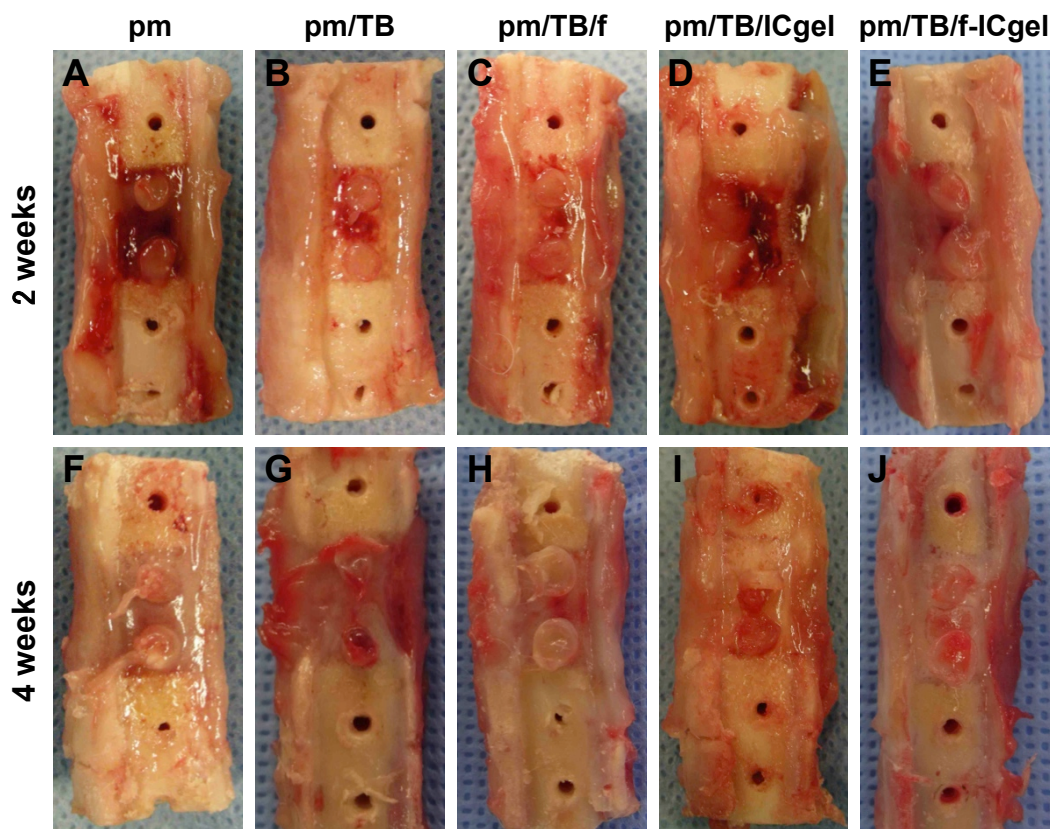




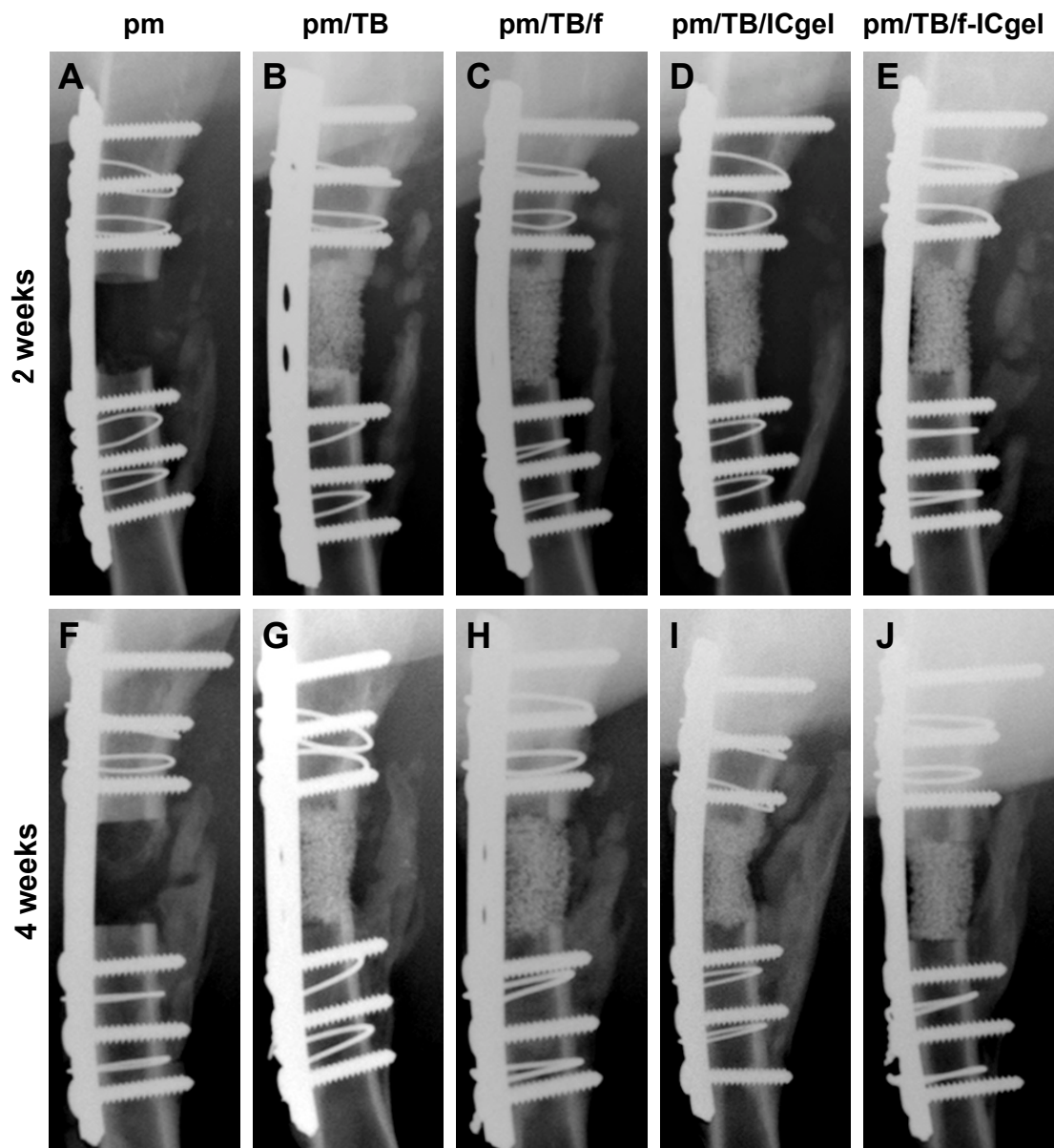
**Fig. 1-3.** (A) The schematic drawing represents the bone defect area at the median sagittal plane to calculate BD/TD. (B) The schematic drawing of magnified the rectangle (C) to calculate the parameters of BV/TV and N.Ve/mm<sup>2</sup>. iB: intact bone; MC: medullary cavity; dBD: distal new bone distance; pBD: proximal new bone distance; TD: total tissue distance; BM: bone marrow; NB: new bone; TB: Tetrabone; Ve: vessel; Asterisks (\*) represent the surface of new bone area.



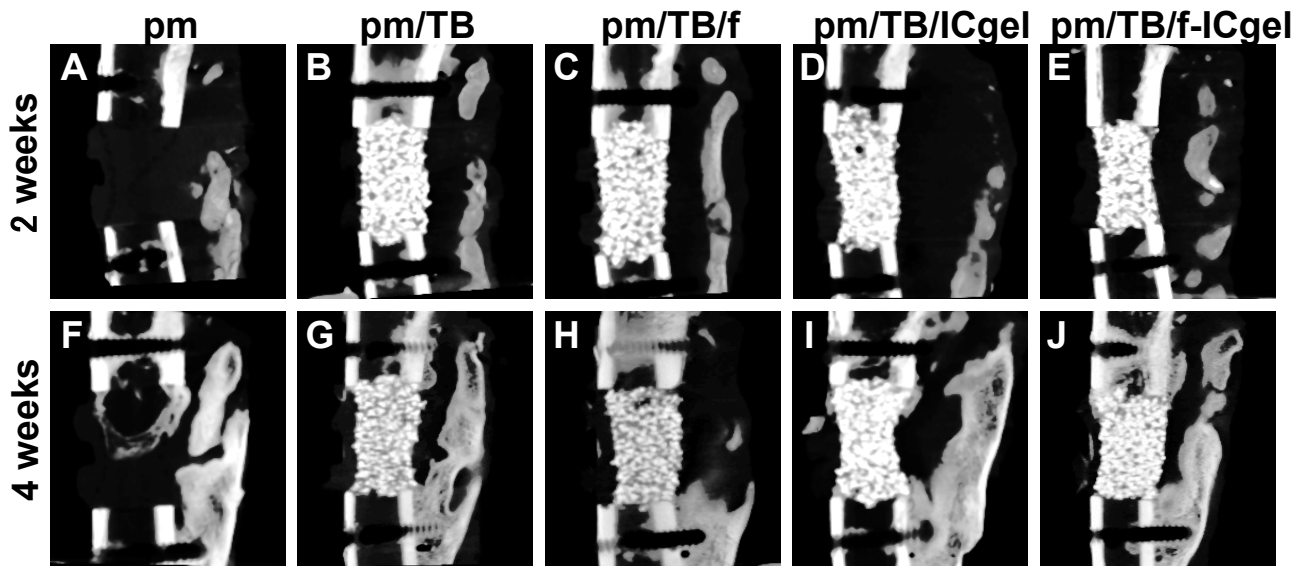
**Fig. 1-4.** An eight-hole stainless-steel bone plate with six cortical screws, four cerclage wires and PMC containing TB was implanted into the femoral segmental defect in a rabbit (dF: distal femur; pF: proximal femur). Asterisks (\*) indicate both ends of the PMC tucked between the plate and intact bone ends. Scale bar = 5 mm.



**Fig. 1-5.** Gross findings of the specimens in each group at 2 and 4 weeks after surgery. (A, F) the *pm* group; (B, G) the *pm/TB* group; (C, H) the *pm/TB/f* group; (D, I) the *pm/TB/ICgel* group; and (E, J) the *pm/TB/f-ICgel* group. There were no differences in macroscopic findings between the five groups.

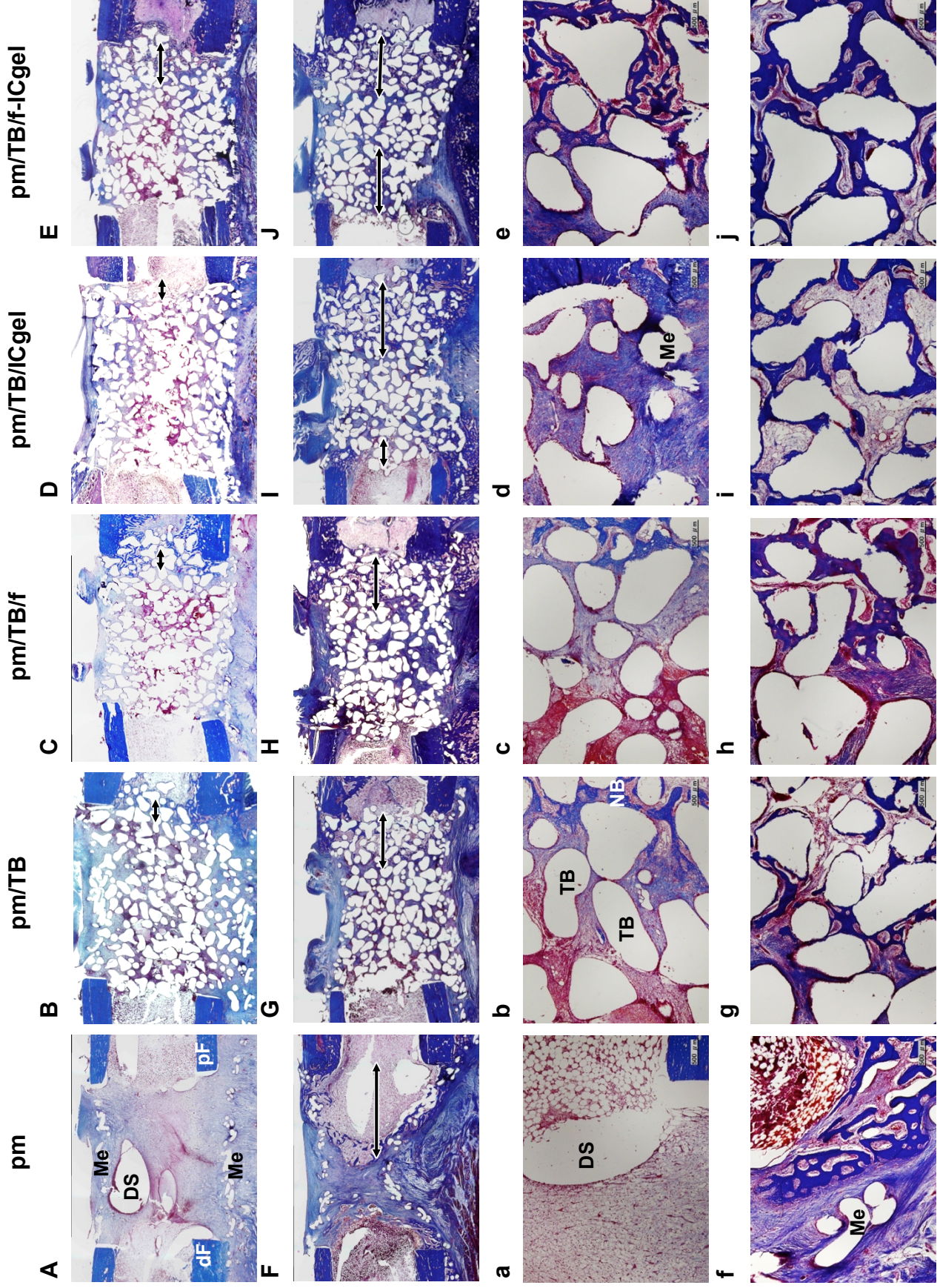


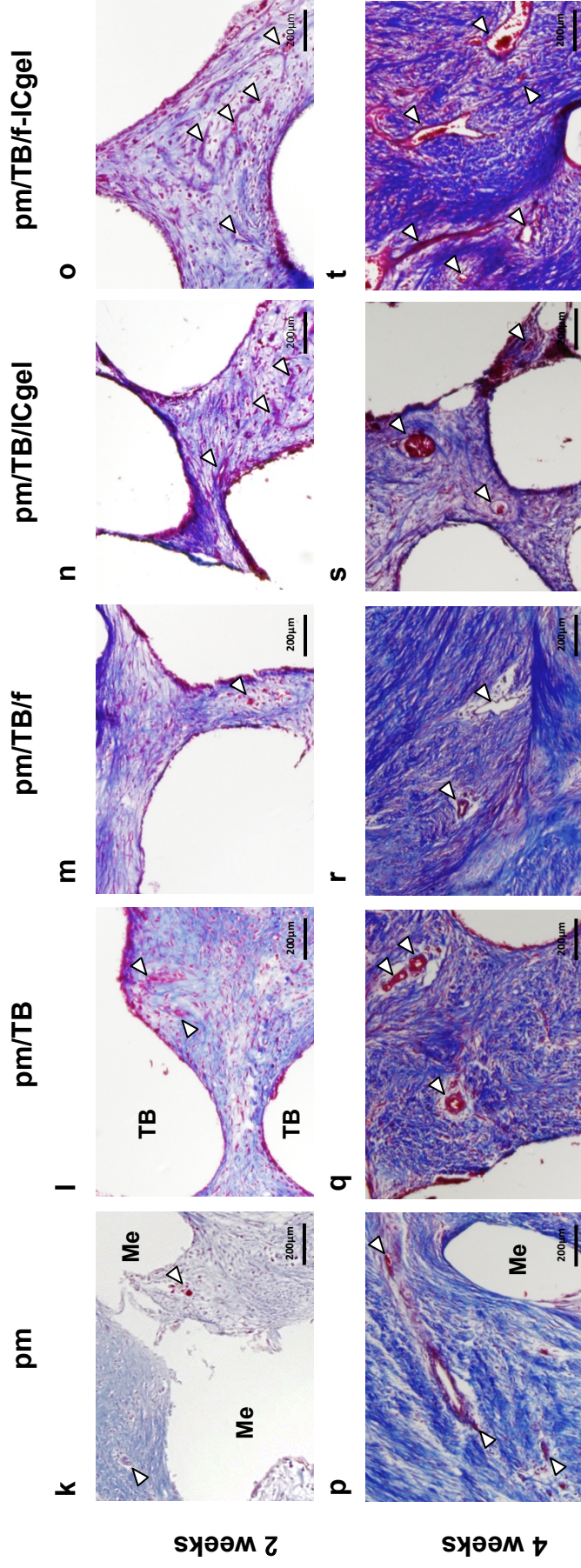
**Fig. 1-6.** Radiographs of the femoral segmental defect in each treatment group at 2 and 4 weeks after surgery. (A, F) the *pm* group; (B, G) the *pm/TB* group; (C, H) the *pm/TB/f* group; (D, I) the *pm/TB/ICgel* group; and (E, J) the *pm/TB/f-ICgel* group. Newly formed bone within the intergranular pores was not distinguishable from TB. The large osseous callus formation was observed caudally, however, there was no obvious difference between the groups.



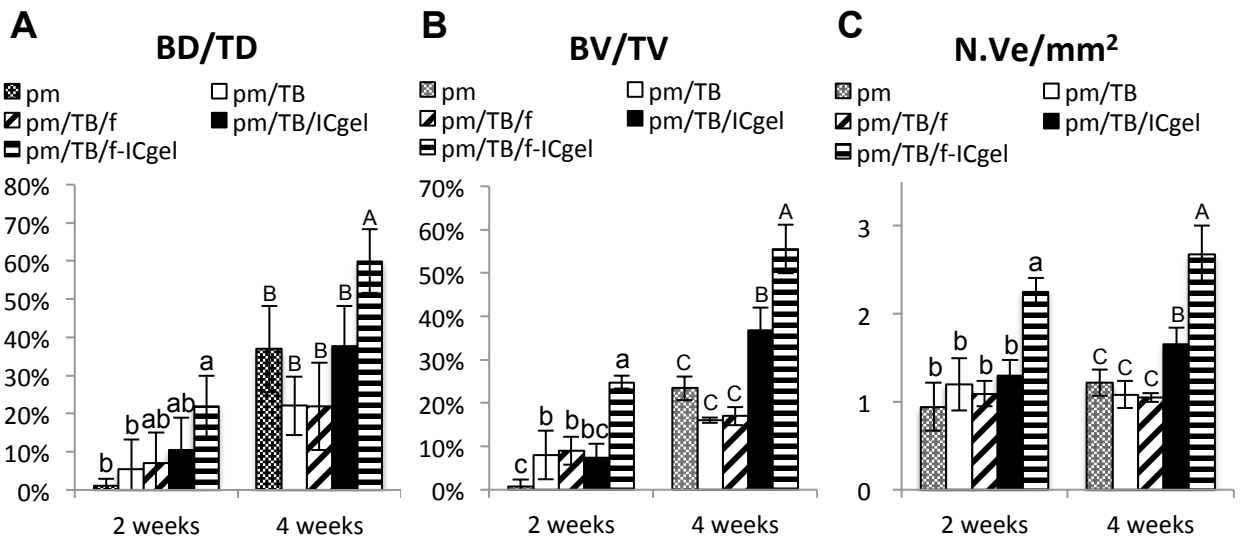
**Fig. 1-7.**  $\mu$ CT images of each treatment group at the median sagittal plane. (A, F) the *pm* group; (B, G) the *pm/TB* group; (C, H) the *pm/TB/f* group; (D, I) the *pm/TB/ICgel* group; and (E, J) the *pm/TB/f-ICgel* group. Newly formed bone within the intergranular pores was not distinguishable from TB.

2 weeks                      4 weeks                      2 weeks                      4 weeks





**Fig. 1-8.** Histological sections (Masson's trichrome stain) at the median sagittal plane. (A, F, a, f, k, p) the *pm* group; (B, G, b, g, l, q) the *pm/TB* group; (C, H, c, h, m, r) the *pm/TB/f* group; (D, I, d, i, n, s) the *pm/TB/ICgel* group; and (E, J, e, j, o, t) the *pm/TB/f-ICgel* group. (A-J) Whole sections of each group. Histological findings of regenerated bones (a-j) and neovascularization (k-t) in each group at 2 and 4 weeks after surgery. More newly formed bones and vessels were observed in the *pm/TB/f-ICgel* group compared to other groups. dF: distal femur; pF: proximal femur; Me: mesh; DS: dead space; TB: Tetrabone; NB: new bone. Horizontal lines indicate the distance of distal and proximal new bone tissues at the midline of the defect (A-J). Arrowheads point the newly formed vessels (k-t).



**Fig. 1-9.** Histomorphometric analyses for the newly formed bone tissues at 2 and 4 weeks after implantation. (A) The distance of proximal and distal new bone tissues per total tissue distance (BD/TD), (B) the volume of bone tissue per volume of total tissue (BV/TV) and (C) the number of vessels per square millimeter (N.Ve/mm<sup>2</sup>). Values are shown as mean  $\pm$  standard deviation (n = 4). Different letters indicate significant difference in each group at the same week. (one-way ANOVA followed by Tukey-kramer test for multiple comparison, p value < 0.05).



**第2章 イヌ両側橈骨骨幹部部分欠損モデルにおけるテトラポッド型  
顆粒状人工骨ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプ  
レックスゲルの併用による骨再生効果**

## 第1節 緒言

前章のウサギ大腿骨骨幹部部分欠損モデルにおいて、テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) と塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) を併用すると血管新生と骨新生が促進され、良好な骨再生が得られることが明らかとなった。しかしながら、この結果からは bFGF-IC gel が血管新生を誘導したことにより骨新生が促進されたのか、bFGF が血管新生だけでなく骨新生も促進したのか判断することはできなかった。これを明らかとするためには、より詳細な骨形態計測を行い、新生骨の骨代謝回転に差が認められるかを検討する必要がある。

また、前章のウサギモデルでは、5 群間の骨再生効果に明らかな差が認められたものの、全例で骨欠損部周囲に旺盛な仮骨形成が認められた。一般にウサギは、哺乳類やヒトに比べて骨形成能が高いことが知られているため、臨床応用を視野に入れた研究には、よりヒトに近い骨形成能を示す実験動物を用いて、その効果を検証する必要がある。

そこで本章ではイヌ両側橈骨骨幹部部分欠損モデルを用い、TB と bFGF-IC gel を併用することによる骨再生効果および、bFGF-IC gel が血管新生だけでなく骨新生を直接誘導するかについて詳細な検討を行った。

## 第2節 材料および方法

### テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) および塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel)

これらの材料は第1章と全く同様である。

### 動物ならびに手術方法

実験動物として、体重 10.5-11.3 kg, 13-19 カ月齢, 雄のビーグル犬 5 頭を用いた。動物はプロポフォル (8 mg/kg) の静脈内投与により麻酔導入し, イソフルラン吸入麻酔にて維持した。抗生剤は, 術前にセファメジン (20 mg/kg) を静脈内投与し, 術中はセファメジン (20 mg/kg) を 2 時間毎に静脈内投与した。また, 術中の補液としてラクトリンゲル液 (10 ml/kg/hr) を持続点滴し, 疼痛管理としてフェンタニル (10-20  $\mu$ g/kg/hr) を持続投与した。手術は無菌処置後, 側臥位にて両側前腕の頭外側より切皮した後, 橈側手根伸筋と総指伸筋の間をアプローチし橈骨を露出した。サジタルソーを用いて, 両側の橈骨骨幹部中央に 20 mm の骨欠損を作成した。TB の骨欠損部への移植には, 第1章と同様の方法で作製した直径 9 mm, 高さ 28 mm のポリプロピレンメッシュケージ (PMC) を使用し, その中央部分に TB を骨欠損サイズに合うように充填した (Fig. 2-1)。PMC の直径は, 凍結保存していた同条件のビーグル犬の橈骨標本を計測し決定した。PMC の両端余り部分 (片側 4 mm) を橈骨断端全周に被せる様に装着し, 8 穴ステンレスプレート (T: 1.8 mm, W: 8 mm, D: 6 mm, Mizuho Co., Ltd., Tokyo, Japan) と 8 本の直径 2.7 mm 皮質骨用ステンレス

クリューにて固定した。術創は 3-0 ポリジオキサノンにて筋縫合、皮内縫合を行い、3-0 ナイロンにて皮膚縫合を行った。術後は疼痛管理としてフェンタニル ( $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$ ) を 12-24 時間持続投与し、その後はブプレノルフィン ( $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ , TID) を 3 日間筋肉内投与した。また、術後 3 日間セファメジン ( $20 \text{mg}/\text{kg}$ , BID) の皮下投与を行い、浮腫軽減のため術後 1-2 日間は指端から肩関節までバンテージを巻いた。皮膚のナイロン糸は術後 14 日で創面の離解がないことを確認して抜糸した。

動物は観察期間終了後に、チオペンタールナトリウム ( $25 \text{mg}/\text{kg}$ ) の静脈内投与により麻酔導入し、イソフルラン吸入麻酔薬にて深麻酔を得た後に、塩化カリウム溶液 ( $2 \text{mEq}/\text{kg}$ ) を静脈内投与し安楽殺した。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認の下に行った。

## 実験計画

5 頭のイヌの両側橈骨について TB, bFGF, bFGF-IC gel の組み合わせにより 3 群に分類した。すなわち、骨欠損部に TB を充填した PMC を移植する pm/TB 群 ( $n = 3$ )、TB と bFGF 溶液 ( $100 \text{ng}/\text{ml}$  溶液を  $1.0 \text{ml}$ , bFGF として  $100 \text{ng}$ ) を充填した PMC を移植する pm/TB/f 群 ( $n = 3$ )、および TB と bFGF-IC gel ( $100 \text{ng}/\text{ml}$  溶液を  $1.0 \text{ml}$ , bFGF として  $100 \text{ng}$ ) を充填した PMC を移植する pm/TB/f-ICgel 群 ( $n = 3$ ) を作成した。

3 群のうち pm/TB/f 群では、閉創直前に PMC 内やその周囲の血液などの液体成分を丁寧に吸収した後に、bFGF 溶液を 25G 注射針とシリンジで PMC 内に注入した。

pm/TB/f-ICgel 群では, bFGF-IC gel はあらかじめTB と混合した状態でPMC 内に充填した.  
各群移植後 4 週間の観察期間を設けた.

### **臨床的評価ならびに肉眼的評価**

各個体の術創や全身状態を毎日観察した. 安楽殺後は移植部を剖検し, PMC の周囲組織, 特に PMC 内への血管侵入の有無について評価した. さらに, 全ての金属インプラントを抜去し, サジタルソーを用いて骨欠損部を含む約 30 mm の両側橈骨を回収した.

### **単純 X 線学的検査**

移植直後, 2 週後, 安楽殺後に両側橈骨の単純 X 線側面像を撮影した. そして, 得られた X 線写真から骨欠損部の骨新生や仮骨形成, インプラントの不具合の有無について評価した.

### **$\mu$ CT 検査**

第 1 章と全く同じ方法で  $\mu$ CT 検査を行った.

### **組織形態学的検査**

骨欠損部を含む骨検体を 70 %エタノールで 3 日間固定した. 次に, ビラヌエバ骨染色にて染色した後メチルメタクリレートに包埋した. この非脱灰組織標本を両側に既存橈骨を含むように正中矢状断で 40  $\mu$ m の厚みになるまで研磨し, 非脱灰研磨切片を作製

した。この切片に対し、光学顕微鏡 (BX-53, Olympus Co., Tokyo, Japan) 下で骨形態計測専用システム (System Supply, Nagano, Japan) を用い、骨欠損部に含まれる新生骨伸長距離、新生骨量、層板状骨量、血管数の4項目を計測した。層板状骨量の観察には偏光フィルターを使用し、その他の項目は自然光で観察した。

新生骨伸長距離は、新生骨が既存骨断端から骨欠損部中央に向かってどれだけ伸長したかを示し、全組織長に対する骨欠損部の正中線上の新生骨長の割合 (the distance of new bone tissue per distance of total tissue: BD/TD, %) として下式により算出した (Fig. 1-3A)。

$$\text{BD/TD (\%)} = \text{新生骨長} / \text{全組織長} \times 100$$

新生骨量は、骨欠損部における新生骨の総面積を計測し、全組織量における割合 (the volume of new bone tissue per volume of total tissue: BV/TV) として下式により算出した (Fig. 1-3 B)。

$$\text{BV/TV (\%)} = \text{新生骨量} / \text{全組織量} \times 100$$

層板状骨量は、新生骨総面積における層板状骨の総面積の割合 (the volume of lamellar bone tissue per volume of new bone tissue: LBV/BV, %) として下式により算出した。

骨欠損部に最初に生じる新生骨は線維状骨 (woven bone) と呼ばれ、一度もリモデリングを受けていない配列の乱れた幼弱な骨である。この線維状骨がリモデリングを受けて新しい骨が形成されると、層状に配列した成熟骨である層板状骨 (lamellar bone) に置き換わる [69]。これらは自然光でも観察可能であるが、より詳細な評価には偏光顕微鏡を用いる必要がある。偏光により線維状骨はモザイク状に、層板状骨は層状に観察される。リモデリングにより生じた層板状骨の領域は、破骨細胞によって吸収された骨のラインであるセメ

ントライン (cement line) で区画された骨梁単位 (basic multicellular unit: BMU) として区別される[59]. したがって, 本研究においてはBMUを検出することにより, 新生骨における層板状骨の割合 (LBV/BV) を計測した (Fig.2-2).

$$\text{LBV/BV (\%)} = \text{層板状骨量} / \text{新生骨量} \times 100$$

血管数は骨欠損部の頭尾側と正中の3列の計60視野 (1視野=1 mm<sup>2</sup>) の血管数を計測し, 1 mm<sup>2</sup>あたりの血管数 (the number of vessels per square millimeter : N.Ve/mm<sup>2</sup>) として下式により算出した (Fig.1-3 B). 血管とは管腔構造を持ち, 内腔に赤血球を含むものとした.

$$\text{N.Ve/mm}^2 = \text{血管数} / \text{計測領域}$$

本文ならびに図で使用した骨形態計測に関する用語, 記号, 単位は ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee の報告にならって使用した[59].

### 蛍光標識と蛍光顕微鏡観察

術後に2種類の蛍光色素を1回ずつ投与した. 術後14日目には, カルセイン (20 mg/kg, Calcein, Sigma-Aldrich Co., Tokyo, Japan, 以下CLと表記する.) を静脈内投与した. カルセインは炭酸水素ナトリウムでpH7.0に調整し, 0.22 μmのフィルターを通して濾過滅菌し使用した. 術後21日目には, オキシテトラサイクリン (20 mg/kg, oxytetracycline, Terramycin/LA Injectable solution, Pfizer Japan Inc., Tokyo, Japan, 以下TCと表記する.) を静脈内投与した.

得られた組織切片より、蛍光顕微鏡にて石灰化速度 (mineral apposition rate: MAR) を計測した (Fig. 2-2 B)。MAR は、半自動画像解析ソフト (System Supply, Nagano, Japan) を用いて CL-TC 間 (術後 14 日から 21 日までの 7 日間)、TC-類骨間 (術後 21 日から 28 日の 7 日間) の距離を計測し、日数で除した値を 1 日あたりの MAR ( $\mu\text{m}/\text{day}$ ) とした。

### 統計解析

第 1 章と全く同じ方法で統計解析を実施した。



### 第3節 結果

#### 周術期の臨床所見

PMC に充填した TB を骨欠損部に挿入する際には、TB 単独では PMC から漏出することがあったが、TB を bFGF-IC gel と混合した場合には漏出することはなかった。作製した PMC の直径は全例橈骨断端直径とほぼ一致した。また、PMC の両断端を橈骨とプレート間に挟み込むことにより骨欠損部に PMC をしっかりと固定させることが可能であった (Fig. 2-3)。全例術後 3 日以内には起立が可能となり、術後 10 日以内にはわずかに跛行が認められるものの歩行は可能であった。移植手術後の創面離開や感染兆候は認められず、術後 14 日目には創面は完全に治癒した。また、創面の治癒後は、観察期間中において手術部位の腫脹や疼痛は認められなかった。

#### 肉眼的検査所見

剖検時の肉眼所見では、PMC 周囲は軟部組織で覆われており、メッシュと周囲組織の境界を判別できなかつたため、PMC に侵入する血管の評価は不可能であった。Fig. 2-4 は、骨欠損部を含む 30 mm の長さで切断した橈骨のプレート接着面である。骨欠損部と既存骨は分離することなく連続性を維持し、表面は軟部組織で覆われていた。

#### 単純 X 線学的検査所見

Fig. 2-5 に安楽殺後の各群の単純 X 線写真を示した。X 線写真上は、TB の変位や漏出が認められなかったことから、TB は PMC 内に保持されていると考えられた。また、プレートやスクリューの不具合は認められなかった。骨欠損両端の既存骨尾側には全群でわずかな仮骨形成が認められたが 3 群間に明確な差は認められなかった。しかし、骨欠損内部の骨新生については、TB の X 線不透過性が高いため判別できなかった。

### **μCT 検査所見**

Fig. 2-6 に μCT 画像を示した。画像は既存骨を含む骨欠損部の正中矢状断像である。単純 X 線学的検査所見と同様に、TB の変位は認められず、既存骨断端のわずかな仮骨形成は確認できたが、TB の X 線不透過性が高いため骨欠損内部の新生骨の判別ならびにその評価は不可能であった。

### **組織形態学的検査所見**

Fig. 2-7 に組織切片全体像を示した。PMC は炎症反応を誘発することなく TB をしっかりと保持していた。また、TB は PMC 内に大きな死腔なく均一に充填されていた。PMC の一部が、骨欠損内部に陥入している例 (Fig. 2-7 B, C, PMC 遠位尾側端の骨欠損内部への陥入所見) が認められたが、新生骨は陥入したメッシュを超えて伸長していたため、陥入の認められた個体も統計解析に使用した。骨新生は両端の既存骨周囲から骨欠損部の中央に向かって起こっていた。

Fig. 2-7 の組織像から算出した新生骨伸長距離 (BD/TD) の値を Fig. 2-10 に示した.

BD/TD (%) (Fig. 2-7, 2-10 A) は, pm/TB 群, pm/TB/f 群, pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ  $36.9 \pm 2.6$ ,  $44.1 \pm 2.9$ ,  $61.6 \pm 7.0$  %であった. pm/TB/f-ICgel 群は, pm/TB/f 群, pm/TB 群に対して有意に高い値を示し, pm/TB/f 群と pm/TB 群の間に有意差は認められなかった.

Fig. 2-8 に新生骨量 (BV/TV), 層板状骨量 (LBV/BV) および血管数 (N.Ve/mm<sup>2</sup>) の算出に用いた組織像を示し, これらの値を Fig. 2-10 に示した.

BV/TV (%) (Fig. 2-8 A-C, 2-10 B) は, pm/TB 群, pm/TB/f 群, pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ  $10.1 \pm 0.3$ ,  $9.5 \pm 1.3$ ,  $17.9 \pm 2.0$  %であった. pm/TB/f-ICgel 群は, pm/TB/f 群, pm/TB 群に対して有意に高い値を示し, pm/TB/f 群と pm/TB 群の間に有意差は認められなかった.

LBV/BV (%) (Fig. 2-8 D-F, 2-10 C) は, pm/TB 群, pm/TB/f 群, pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ  $3.6 \pm 1.3$ ,  $4.2 \pm 0.8$ ,  $4.5 \pm 3.3$  %であり, いずれの群間にも有意差は認められなかった.

N.Ve/mm<sup>2</sup> (Fig. 2-8 G-I, 2-10 D) は, pm/TB 群, pm/TB/f 群, pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ  $3.7 \pm 0.3$ ,  $4.5 \pm 0.8$ ,  $7.3 \pm 0.4$  %であった. pm/TB/f-ICgel 群は, pm/TB/f 群, pm/TB 群に対して有意に高い値を示し, pm/TB/f 群と pm/TB 群の間に有意差は認められなかった.

Fig. 2-9 に石灰化速度 (MAR) の算出に用いた, テトラサイクリンおよびカルセインによる骨標識を行った組織像を示し, その値を Fig. 2-10 に示した.

MAR ( $\mu\text{m}/\text{day}$ ) (Fig.2-9,2-10 E) は, pm/TB 群, pm/TB/f 群, pm/TB/f-ICgel 群においてそれぞれ術後 14-21 日では :  $4.2 \pm 0.4$ ,  $4.5 \pm 0.5$ ,  $4.1 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{day}$ , 術後 21-28 日では :  $3.1 \pm 0.3$ ,  $3.6 \pm 0.4$ ,  $3.1 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{day}$  であり, いずれの計測期間においても 3 群間に有意差は認められなかった.

#### 第4節 考察

前章のウサギモデルではプレート修復の容易な大腿骨を選択したが、大腿骨は他の長管骨に比べて周囲の軟部組織が豊富であるため、もともと血流に富む部位であったと考えられる。このことから、本研究では最も骨周囲の軟部組織の少ない荷重骨である橈骨を選択し、より厳しい条件下で骨再生の評価を行った。使用した骨欠損モデルは、両側橈骨骨幹部に critical defect size である 20 mm 欠損[60]を作成し、ステンレスプレートとスクリューで固定した。また、TB の保持にはウサギモデルと同様に PMC を使用した。PMC の断端の一部が骨欠損部に陥入してしまう例が認められたものの、TB は PMC 内に正確に保持されており、沈下や漏出は認められなかった。PMC 断端の陥入は、PMC と既存骨との重なり部分を増やすことにより改善可能な問題であると考えられる。また、ウサギモデルに比べて PMC のサイズが大きくなったため、TB 単独では骨欠損部へ挿入する際に TB が漏出しやすかったが、TB と bFGF-IC gel の混合体は漏出することなく形状を保持しており、操作性にすぐれていた。

本研究において、bFGF-IC gel を用いた pm/TB/f-ICgel 群では、pm/TB 群ならびに pm/TB/f 群に比べて新生骨伸長距離 (BD/TD)、新生骨量 (BV/TV)、血管数 (N.Ve/mm<sup>2</sup>) すべてにおいて有意に高い値を示した。bFGF-IC gel の用量は、骨欠損サイズや TB の使用量が増えたためウサギモデルの 2 倍量 (100 ng/ml, 1 ml, bFGF として 100 ng) を用いたが、イヌの脛骨横骨折モデルで骨再生効果が認められた bFGF の単回投与量 (200  $\mu$ g) に比べると、極めて少ない量であると言える[53]。IC gel を用いていない bFGF 単独の pm/TB/f 群

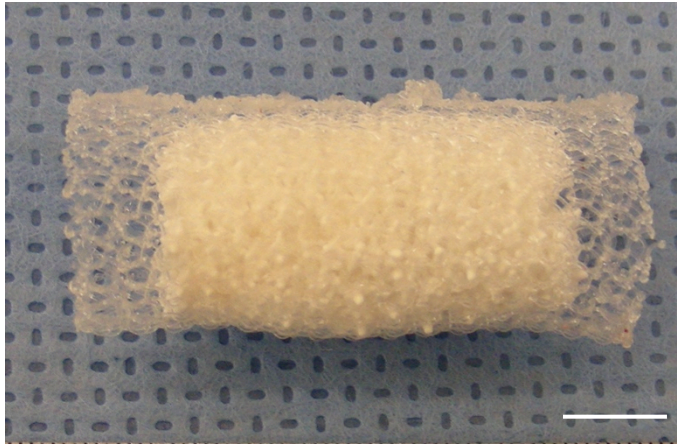
は, pm/TB 群と全評価項目において有意差は認められなかったことから, この用量の bFGF では単独で血管新生や骨新生を誘導することはできず, IC gel と結合させてはじめてすぐれた骨再生効果が得られたと考えられる. しかしながら, ウサギモデルと同様に, これら 3 つの評価項目だけでは bFGF-IC gel が血管新生だけでなく, 骨新生においても直接作用しているのかについては不明なままである. ラット, ウサギ, イヌ, 霊長類の骨欠損部に 100-200  $\mu\text{g}$  の bFGF を直接単回投与すると骨新生が促進されることから[51-54], 本研究で用いた 100 ng という極めて微量な bFGF では, 直接骨新生を誘導するだけの効果は得られない可能性が高い. そこで本研究では, bFGF-IC gel の骨新生誘導効果について評価するため, 層板状骨量 (LBV/BV) と石灰化速度 (MAR) の計測を行った.

層板状骨量は, 新生骨量における層板状骨量の割合として算出した. 層板状骨は, 骨欠損部に最初に生じる幼弱な線維状骨がリモデリングを受けた結果として形成される, 層状に配列した成熟骨である[69]. そのため, 新生骨における層板状骨の割合を計測することにより, 新生骨の成熟度を比較することができる. 本研究において, 層板状骨は各群ともに全新生骨量の約 4%とわずかに認められる程度であり, 群間に有意な差は認められなかった. このことから, 移植後 4 週目では依然として幼弱な新生骨の形成が優位であり, bFGF-IC gel および bFGF 単独では骨リモデリングを促進しないことが示唆された.

石灰化速度[59]は, カルセインとテトラサイクリンなどの蛍光色素を投与すると, 投与時の石灰化前線が標識され, 投与間隔をあけて二重標識をすることによりその期間の石灰化速度を知ることができる. ビーグル成犬の黄色髄部分である上腕骨遠位や尺骨近位の骨梁骨では, 日常のリモデリングにおける石灰化速度は  $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m/day}$  であったと報告

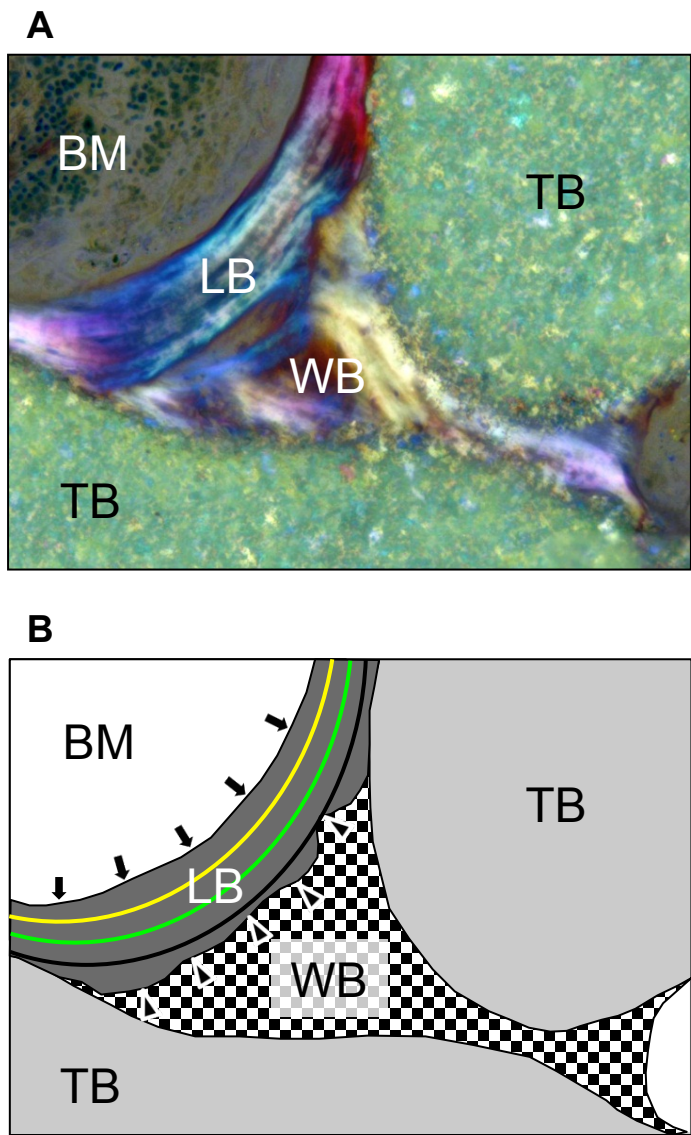
されている[70]。これに対して、本研究では骨折治癒過程のため全群において 3-4  $\mu\text{m/day}$  と石灰化速度は亢進していたが、群間に有意な差は認められなかった。このことから、bFGF-IC gel および bFGF 単独では石灰化速度、つまり新生骨の形成速度には影響しないことが示唆された。

以上より、2つの骨代謝回転を示す評価項目において群間の有意差が認められなかったことから、bFGF-IC gel はリモデリングの起きた領域や骨の石灰化速度には直接影響しないことが明らかとなった。つまり、bFGF-IC gel は直接骨新生を誘導するのではなく、血管新生を誘導することにより骨新生に適した環境（酸素、栄養素など）が提供され、通常骨新生が起き得る領域よりも広範囲に骨新生が引き起こされたものと考えられる。ウサギモデルでは移植後2週の時点ですでに血管数、新生骨量に差が認められていたため、イヌモデルにおいても、より早期の豊富な血管新生が広範囲の骨新生を可能にしたと考えられた。



**Fig. 2-1.** TB within the PMC for a dog radial segmental defect model. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ .

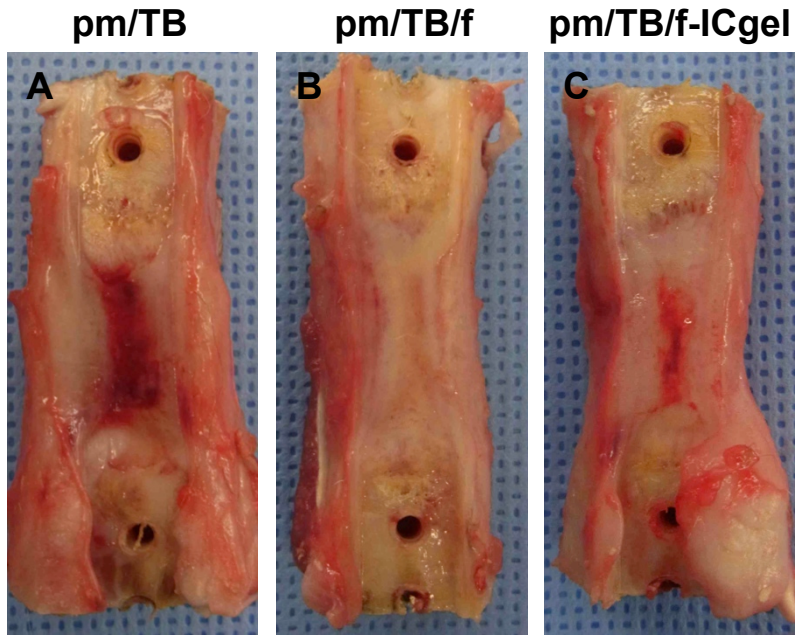




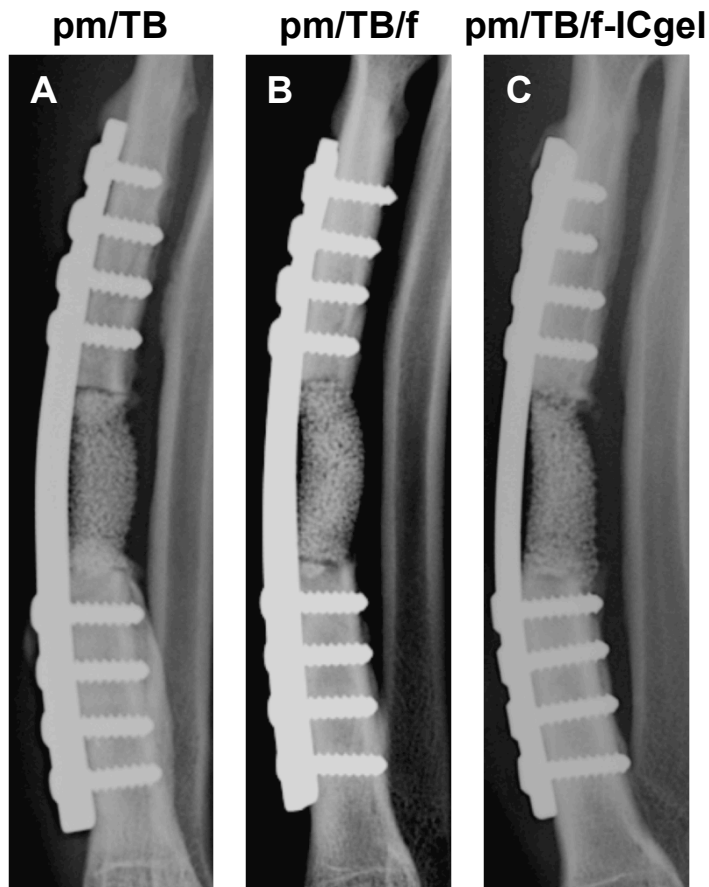
**Fig. 2-2.** (A) Typical example of lamellar bone and woven bone on histological section under polarized light. (B) The schematic drawing for the parameter of LBV/BV and MAR. BM: bone marrow; TB: Trabecular bone; LB: lamellar bone; WB: woven bone; Arrows: osteoid; Arrowheads: cement line. The yellow line and green line indicate the tetracycline and calcein signals, respectively.



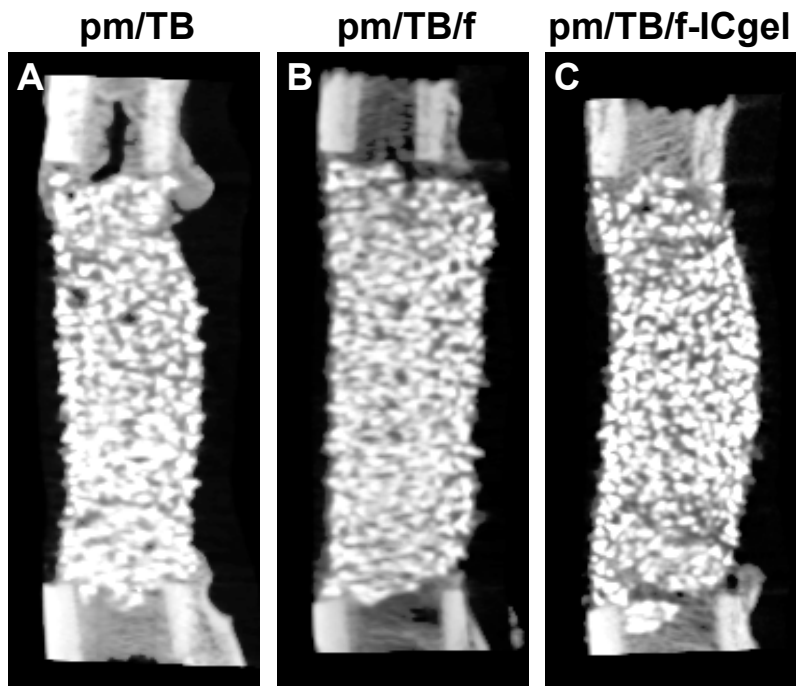
**Fig. 2-3.** An eight-hole stainless-steel bone plate with eight cortical screws and TB within the PMC was implanted into the radial segmental defect in a dog (dR: distal radius; pR: proximal radius). Asterisks (\*) indicate both ends of the PMC tucked between plate and intact bone.



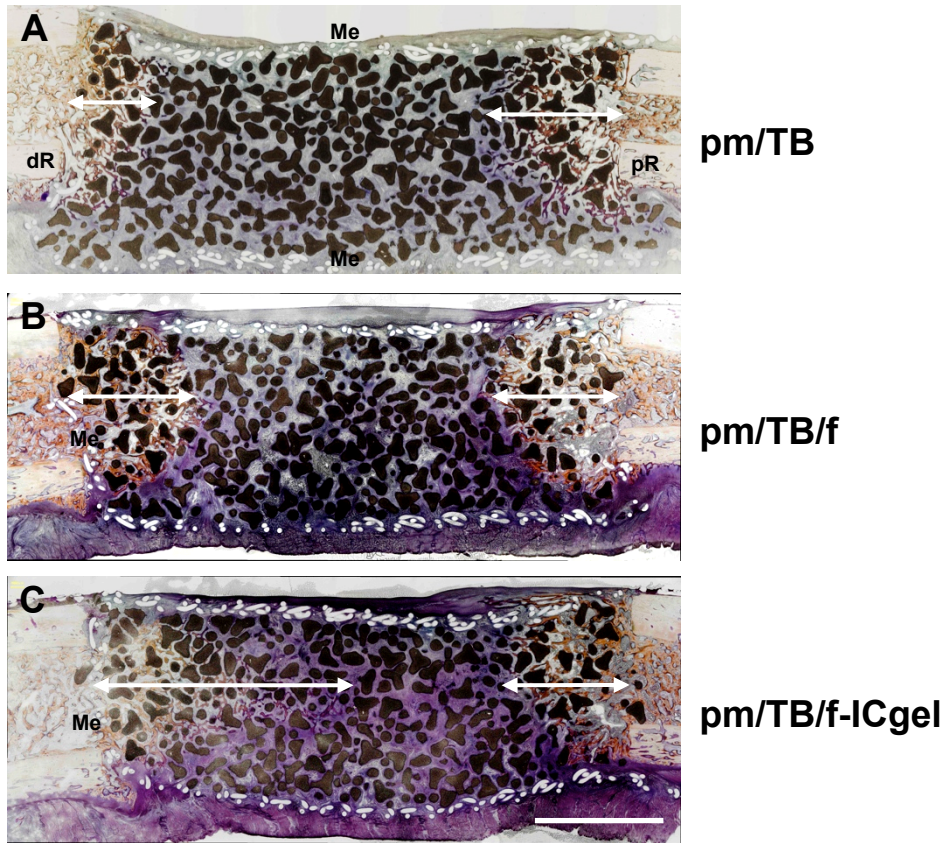
**Fig. 2-4.** Gross findings of the specimens in each group at 4 weeks after surgery. (A) the *pm/TB* group; (B) the *pm/TB/f* group; and (C) the *pm/TB/f-ICgel* group. There was no difference in macroscopic findings between the five groups.



**Fig. 2-5.** Lateral radiographs of the radial segmental defect in each treatment group at 4 weeks after surgery. (A) the *pm/TB* group; (B) the *pm/TB/f* group; and (C) the *pm/TB/f-ICgel* group. Newly formed bone within the intergranular pores was hardly distinguishable from TB. However the osseous callus was observed between the intact radius and PMC. There was no difference in these findings between three groups.

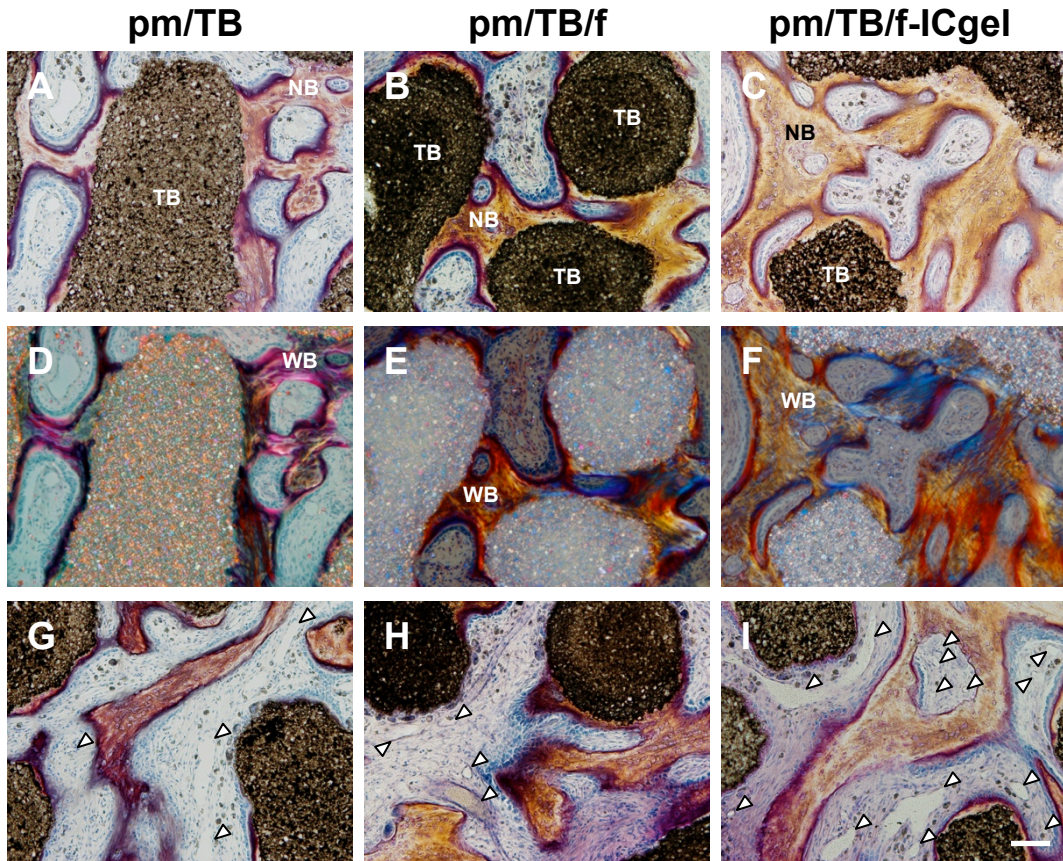


**Fig. 2-6.**  $\mu$ CT images of the defect at the median sagittal plane in each treatment group. (A) the *pm/TB* group; (B) the *pm/TB/f* group; and (C) the *pm/TB/f-ICgel* group. Newly formed bone within the intergranular pores was not distinguishable from TB.

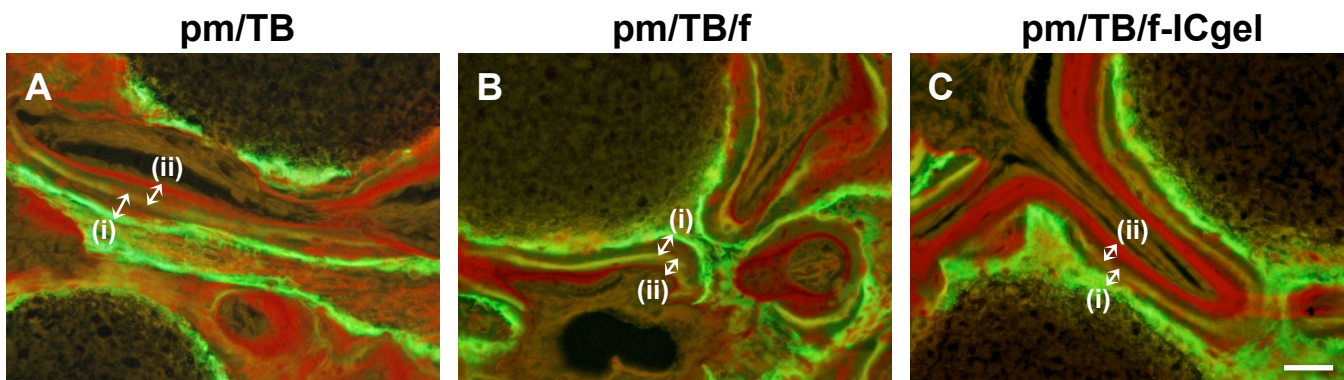


**Fig. 2-7.** Histological sections (Villanueva Bone stain) at the median sagittal plane. (A) the *pm/TB* group; (B) the *pm/TB/f* group; and (C) the *pm/TB/f-ICgel* group.

(dR: distal radius; pR: proximal radius; Me: mesh). Horizontal lines indicate the distance of new bone tissues from the distal and proximal bone edges at the midline of the defect. More new bone tissues were observed in the *pm/TB/f-ICgel* group than in the other groups. Scale bar = 5 mm.

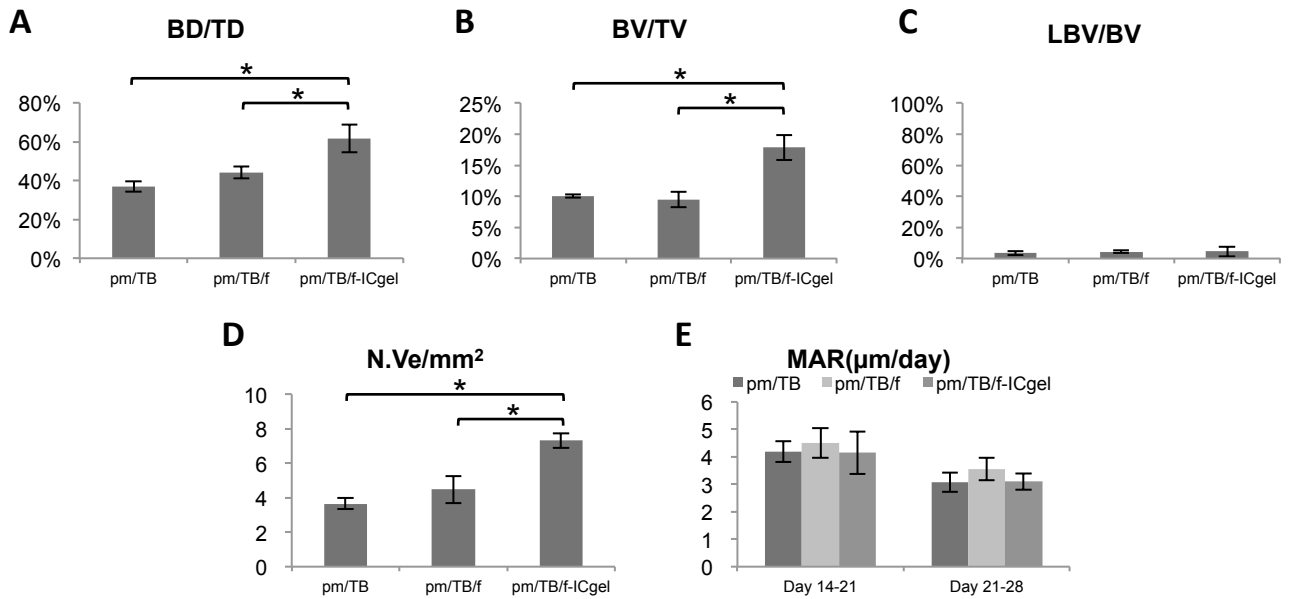


**Fig. 2-8.** Histological findings of the regenerated bones (A-C: Natural light, D-F: Polarized light) and neovascularization (G-I: Natural light) in the *pm/TB* group (A, D, G) ; the *pm/TB/f* group (B, E, H); and the *pm/TB/f-ICgel* group (C, F, I) at 4 weeks after surgery. (D-F) Almost all newly formed bones showed woven bones in each groups. TB: Tetrabone; NB: new bone; WB: woven bone; Arrowheads: the newly formed vessels. Scale bar = 100  $\mu$ m.



**Fig. 2-9.** Histological findings of fluorescent-labeled regenerated bones (Villanueva Bone stain). (A) the *pm/TB* group; (B) the *pm/TB/f* group; and (C) the *pm/TB/f-ICgel* group. The tetracycline (the yellow lines) and calcein (the green lines) signals at 4 weeks after surgery: (i) the distance of day 14 to 21; (ii) the distance of day 21 to 28 (osteoid). There was no difference in the distance between three groups.  
Scale bar = 50  $\mu$ m.





**Fig. 2-10.** Histomorphometric analyses for the newly formed bone tissues at 4 weeks after implantation. (A) the distance of new bone tissue per distance of total tissue (BD/TD), (B) the volume of bone tissue per volume of total tissue (BV/TV), (C) the volume of lamellar bone tissue per volume of bone tissue (LBV/BV), (D) the number of vessels per square millimeter (N.Ve/mm<sup>2</sup>), and (E) mineral apposition rate (MAR). Values are shown as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). Asterisks (\*) indicates statistical significance with p value < 0.05 (one-way ANOVA followed by Tukey-kramer test for multiple comparison).

**第3章 イヌ片側橈骨骨幹部部分欠損モデルにおけるテーラーメイド  
チタンメッシュケーシング一体型プレート、テトラポッド型顆粒状人工骨  
ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル  
の併用による骨再生効果**

## 第1節 緒言

前章までの結果から、ウサギおよびイヌの長管骨骨幹部部分欠損モデルに対するテトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) と塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) の併用は、より早期に豊富な血管新生を誘導することにより、広範囲な骨新生を引き起こし、すぐれた骨再生効果が得られることが明らかとなった。しかし、これらのモデルは、ステンレスプレートが荷重の全てを支持している。骨幹部中央の骨欠損であればプレートで安定性に問題は生じないと考えられるが、骨幹端などに生じた骨欠損では、プレート単独により強固な安定性を得るのは困難である。その解決策の一つとして、骨欠損部を直接支持することが可能なチタンメッシュケージ (TMC) を、プレートや髄内ピンと併用する方法が提唱されている[37-41]。しかし、様々な部位に TMC を応用する際には、市販の円筒形 TMC では明らかに不十分であり、特にその形やサイズ、固定方法、周囲組織からの血流確保などの問題を解決する必要がある。

そこで、各個体の骨欠損部の形態に完全に適合する TMC と、既存骨表面に完全に重なるプレートを一体化させた、テーラーメイドチタンメッシュケージ一体型プレート (tTMCP) を考案した。tTMCP のメッシュケージ部分 (tTMC) は両端の既存骨断面と形態が完全に一致するため、長管骨の巨大な骨欠損であっても荷重を直接支持することができる。さらに、tTMC は既存骨表面形状と完全に一致したプレートと一体化しているため、骨欠損部に挿入するだけで正確なアライメントの整復や強固な安定性を得ることができる。

医学領域における金属系バイオマテリアルのテーラーメイド化は、新しい製品加工技術であるラピッド・プロトタイピング・システム (RP) の進歩により現実のものとなってきている。RP とは製品開発において、試作品 (prototype) を素早く (rapid) 製作する技術全般を示し、3D データから STL (stereo lithography interface format) データに変換し、computer-aided design/computer-aided manufacturing (CAD/CAM) システムを用いて直接的に製作する積層造形法のことである。積層造形法とは、粉体、樹脂液、紙などの材料を薄い膜状に積層して製作する技術であり、造形物の 3D データを造形高さ方向に等間隔 (通常 0.05-0.18 mm) にスライスしたデータをもとに製作される。そのため、従来法である切削法や鋳造法に比べ、鋳型を必要とせず直接的に製作できるため、大幅な製作期間の短縮と複雑な形状の造形が可能である。

積層造形法には液体光造形、選択的レーザー溶融造形 (the selective laser melting: SLM)、電子ビーム融解造形 (the electron beam melting: EBM)、インクジェット造形、シート積層造形、押し出し造形などがある。これまで医療分野においては、CT スキャンデータから積層造形された樹脂や石膏モデルが、手術方法の検討や骨切り用ガイドなどの手術補助ツールとして間接的に応用されてきた[71-74]。最近では、ハイドロキシアパタイト (HA) やリン酸三カルシウム (TCP) を原料とする、骨欠損部に完全に一致するテーラーメイドセラミックスを積層造形し、骨欠損部補填材料として用いる報告も散見される[75-77]。これに対して直接金属製品の造形を可能にするのが SLM と EBM の 2 種類である[78]。SLM はレーザーを任意の立体断面形状に走査・照射して、その熱源により金属粉末を溶融焼結し積層する方法であり、EBM は金属粉末の融解に電子ビームを利用している。SLM は完

全な真空状態で厚さ約 30  $\mu\text{m}$ , EBM は不完全真空状態で厚さ約 100  $\mu\text{m}$  の積層造形が可能であり, 造形精度は SLM の方がすぐれている. また, チタン合金 (Ti-6Al-4V) で比較した場合の機械的特性は, SLM, EBM とともに鋳造法で製作された場合と同等かそれ以上である[78]. 現在, SLM や EBM によるテーラーメイド金属系バイオマテリアルは人工関節において広く用いられ, とくに人工股関節のステムに関する研究や臨床応用は 1990 年代より盛んに行われ, 長期的な報告も多数認められる[79-82]. 骨欠損部に対する応用は, 顎骨の再建法として報告されている[83, 84]. しかしながら, 長管骨骨欠損部に対するテーラーメイド TMC に関する報告はない.

そこで本研究では, より高精度の造形が可能な SLM で製作した tTMCP をイヌ片側橈骨骨幹部部分欠損モデルに使用した. 各個体の骨欠損部, 既存骨形態に完全に一致するメッシュケージとプレートが一体化したこの tTMCP を用いることで, 術後早期の機能回復が得られるかを検討した. さらに, TMC のもう一つの問題点である周囲組織からの血流確保に関しては, 前章までの結果を元に TB と bFGF-IC gel を充填することにより tTMC 内に血管新生を誘導し, より広範囲な骨新生を引き起こすことができるかを検討した. また, tTMC は PMC と比べるとメッシュ孔は少なく, 厚みも大きいため, 血管侵入性に乏しく骨再生効果は低いことが予想される. このような悪条件であっても TB と bFGF-IC gel の併用によって血管新生を促進できれば, 早期に tTMCP と既存骨の癒合が得られる可能性が高い. そのため, 移植後 4 週に加え, 8, 24 週という, より長期に及ぶ経過観察を行い, 血管新生と骨新生効果について検討した.

## 第2節 材料および方法

### テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) および塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel)

これらの材料は第1章と全く同様である。

### テーラーメイドチタンメッシュケーシング一体型プレート (tTMCP)

個体毎に橈骨骨幹部部分欠損部の形態と完全に一致するメッシュケーシングと、既存骨表面に完全に重なるプレートが一体となった tTMCP を考案・開発した。

はじめに、塩酸メデトミジン ( $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) とミダゾラム ( $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) の混合筋肉内投与によって鎮静を得た後、左橈骨の CT 撮影 (Asteion4, Toshiba Medical Systems Corp., Tochigi, Japan) を行い、0.5 mm スライスのスキャンデータを得た。撮影後は塩酸アチパメゾール ( $8 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を筋肉内投与し覚醒させた。

次に、CT データを 3 次元モデル化し、橈骨中央に 20 mm の欠損を設計した。同時に橈骨近位関節面から骨欠損までの距離を計測し、その値を手術時のランドマークとした。続いて、3 次元 CAD でスクリーホール、メッシュ孔などの詳細設計を行った。以上の設計にはソフトウェアとして Mimics ver. 12.1 (Materialise N.V., Leuven, Belgium), 3-matic ver. 4.3 (Materialise N.V., Leuven, Belgium), NX I-deas 6 (Siemens PLM Software inc., Texas, USA) を用いた。最後に、CAM により加工プログラムを作成し、金属光造形複合加工機 (LUMEX

Avance-25, Matsuura Machinery Corp., Fukui, Japan)にてチタン合金粉末(Ti-6Al-7Nb, <45  $\mu\text{m}$ )から tTMCP を作製した。

完成した tTMCP は 6 穴プレート部分と中央のメッシュケージ部分から成る (Fig. 3-1 A-E)。プレート部分は全長 75 mm, 幅 10 mm, 厚み 2 mm で, その形状は移植各個体の橈骨表面形状と一致している。また, ケージ部分は全長 20 mm, 厚み 1 mm, メッシュ孔径 0.5  $\times$  0.5 mm で, ケージの形状は移植個体の骨欠損部の橈骨形状と一致している。各個体につき 2 本の tTMCP を作製した。tTMCP は, 高圧蒸気滅菌により滅菌し移植に用いた。

### 動物ならびに手術方法

実験動物として, 体重 10.0-12.0 kg, 15-23 カ月齢のビーグル犬 18 頭 (雄 8 頭, 雌 10 頭) を用いた。術中, 周術期の麻酔疼痛管理および安楽殺法は第 2 章と同様である。手術は無菌状態で行い, 側臥位にて左側前腕に手術を行った。頭外側より, 橈側手根伸筋と総指伸筋の間をアプローチし橈骨を露出した。サジタルソーにて橈骨骨幹部中央に 20 mm の骨欠損を作成した。骨欠損の正確な位置は, あらかじめ計測した橈骨近位関節面から欠損までの距離を用いて決定した。術野をよく洗浄した後, tTMCP を骨欠損部へ挿入し, 6 本の直径 2.7 mm 皮質骨用純チタンスクリューにて固定した。術創は 3-0 ポリジオキサノンにて筋縫合, 皮内縫合, 次いで 3-0 ナイロンにて皮膚縫合を行い閉創した。動物は観察期間終了後に安楽殺した。浮腫軽減のため術後 1-2 日間は指端から肩関節までバンテージを巻いた。皮膚のナイロン糸は術後 14 日で創面の離解がないことを確認して抜糸した。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科動物実験委員会の承認の下に行った。

## 実験計画

18頭のイヌを bFGF-IC gel の有無により 2 群に分類した。tm/TB 群として、tTMC 内に TB を充填し、遠位端は TB の漏出を防止するためフィブリンゲル (BOLHEAL, Kaketsuken, Kumamoto, Japan) を 30  $\mu$ l 滴下した (n = 9) (Fig. 3-1 F)。また、tm/TB/f-ICgel 群として、tTMC 内に TB と bFGF-IC gel (100 ng/ml 溶液を 1.0 ml, bFGF として 100ng) を充填した (n = 9) (Fig. 3-1 G)。bFGF-IC gel はあらかじめ TB と混合した状態で tTMC 内に充填した。各群移植後 4, 8, 24 週の時点で 3 頭ずつ安楽殺し橈骨を回収した。

## 臨床的評価ならびに肉眼的評価

各個体の術創や全身状態を毎日観察した。安楽殺後は移植部を剖検し、tTMC の周囲組織、特に tTMC 内への血管侵入の有無について評価した。プレート端の橈骨をサジタルソーにて切断し、欠損部を含む約 75 mm の橈骨を回収した。

## 単純 X 線学的検査

移植直後ならびに移植後 4 週毎に左橈骨の単純 X 線側面像を撮影し、欠損部の骨新生や周辺の仮骨形成、インプラントの不具合の有無について評価した。



## 組織形態学的検査

組織形態学的検査として非脱灰研磨切片を作成し、第2章と同様に下の4項目について計測した。

$$BD/TD (\%) = \text{新生骨伸長距離} / \text{全組織長} \times 100$$

$$BV/TV (\%) = \text{新生骨量} / \text{全組織量} \times 100$$

$$LBV/BV (\%) = \text{層板状骨量} / \text{新生骨量} \times 100$$

$$N.Ve/mm^2 = \text{血管数} / \text{計測領域}$$

## 蛍光標識と蛍光顕微鏡観察

移植後14日毎に、2種類の蛍光標識を計4回投与した。移植後14, 28日目にテトラサイクリン (TC), 移植後42, 56日目にカルセイン (CL) を静脈内投与した。8, 24週群の骨標識スケジュールは以下の通りである。

8週群：移植後14, 28日目にTC, 移植後42日目にCLを投与。

24週群：移植後42, 56日目にCLを投与

各群8週の切片を用いTC-TC間（移植後14日から28日までの14日間）、TC-CL間（移植後28日から42日までの14日間）、24週の切片を用いCL-CL間（移植後42日から56日までの14日間）、CL-類骨間（移植後56日から168日までの112日間）の石灰化速度（MAR,  $\mu\text{m}/\text{day}$ ）を計測した。使用した蛍光色素の調整法・用量ならびにMARの計測法は、第2章と同様である。

## 統計解析

すべての結果は平均値±標準偏差として表記した。また、統計解析には StatView Version 5.01 software (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)を用いた。2群の比較には unpaired Student's t test を用い、p 値が0.05 未満の場合に統計学的に有意差ありと判断した。

### 第3節 結果

#### 周術期の臨床所見

tTMCP の骨欠損部への挿入時には、両群ともに TB の漏出は認められなかった。tTMCP は各個体の骨欠損ならびに既存骨と正確に一致した (Fig. 3-2)。全例術後 3 日以内には患肢に負重し四肢にて歩行が可能であり、術後 10 日には跛行なく歩行が可能であった。術後の創面離開や感染兆候は認められず、術後 14 日目には創面は完全に治癒した。また、創面の治癒後は観察期間中において患部の腫脹や疼痛は認められなかった。

#### 肉眼的検査所見

剖検時、tTMCP のケージ部分 (tTMC) の周囲は軟部組織で覆われており、それを慎重に切開し、周囲組織から tTMC 内部に侵入する血管を評価した。Fig. 3-3 に tTMC と周囲組織の境界部の肉眼所見を示した。tm/TB 群に対して tm/TB/f-ICgel 群の血管侵入は明らかに多く、4 週の tm/TB 群では tTMC と周囲組織の連続性は全く認められないのに対して、同時期の tm/TB/f-ICgel 群ではすでに多くの血管が tTMC 内に侵入していた。8 週になると、tm/TB 群にも血管侵入が認められたが tm/TB/f-ICgel 群ではさらに多くの血管侵入が認められ、周囲組織との連続性が強くなっていた。24 週では両群ともに血管はほとんど認められず、ほぼ結合組織に置き換わっていた。

## 単純 X 線学的検査所見

Fig. 3-4 に各群の単純 X 線写真を示した。tTMCP は術直後の単純 X 線写真において、各個体の骨欠損ならびに既存骨と正確に一致していることが確認された。また、経過観察中 TB の漏出は認められず、1 例を除いて金属インプラントに不具合は認められなかった。インプラントに不具合の生じた 1 例は tm/TB 群であり、移植後 4 週の単純 X 線頭尾側像にて遠位から 3 番目のスクリーホールにクラックが生じているのが確認された。しかし、24 週の観察期間中、単純 X 線写真上では金属インプラントの変位は認められなかったため本データを統計解析に使用した。全例において、単純 X 線写真上に認められる仮骨は、骨欠損両端の既存骨からわずかに形成されたのみで、群間に明らかな差は認められなかった。また、ケージ内部での骨新生の程度は、tTMC 部分の高い X 線不透過性のため評価不能であった。

## 組織形態学的検査所見

Fig. 3-5 に組織切片の全体像を示した。tTMC は炎症反応を誘発することなく TB をしっかりと保持しており、tTMC 外への TB の漏出は認められなかった。また、TB は、tTMC 内に大きな死腔なく均一に充填されていた。骨新生は主に両端の既存骨から骨欠損中央に向かって伸長していた。

Fig. 3-5 の組織像から算出した新生骨伸長距離 (BD/TD) の値を Fig. 3-8 に示した。BD/TD (%) (Fig. 3-5, 3-8 A) は、tm/TB 群、tm/TB/f-ICgel 群それぞれ 4 週で  $20.8 \pm 4.9$ ,  $47.0 \pm 10.5$  %, 8 週で  $23.9 \pm 10.5$ ,  $37.9 \pm 6.9$  %, 24 週では  $60.1 \pm 12.7$ ,  $91.9 \pm 14.0$  %であった。

tm/TB/f-ICgel 群は, tm/TB 群に対して, 4 週ならびに 24 週において有意に高い値を示した.

24 週の tm/TB/f-ICgel 群の 3 例中 2 例では両端の既存骨から伸長した新生骨が連続性を達成 (Fig. 3-5 F) していたのに対して, tm/TB 群では 1 例も癒合していなかった.

Fig.3-6 に新生骨量 (BV/TV), 層板状骨量 (LBV/BV) および血管数 (N.Ve/mm<sup>2</sup>) の算出に用いた組織像を示し, これらの値を Fig. 3-8 に示した.

BV/TV (%) (Fig. 3-6 A-F, 3-8 B) は, tm/TB 群, tm/TB/f-ICgel 群それぞれ 4 週で  $5.6 \pm 2.2$ ,  $10.6 \pm 0.8$  %, 8 週で  $6.7 \pm 3.4$ ,  $10.5 \pm 1.5$  %, 24 週では  $28.2 \pm 5.6$ ,  $30.3 \pm 4.1$  % であった. tm/TB/f-ICgel 群の BV/TV は, 4 週でのみ tm/TB 群に対して有意に高い値を示した. 8, 24 週では 2 群間に有意差は認められなかった.

LBV/BV (%) (Fig. 3-6 G-L, 3-8 C) は, tm/TB 群, tm/TB/f-ICgel 群それぞれ 4 週で  $0.3 \pm 0.5$ ,  $3.8 \pm 2.9$  %, 8 週で  $49.4 \pm 5.0$ ,  $59.4 \pm 5.5$  %, 24 週で  $88.2 \pm 5.1$ ,  $91.3 \pm 0.7$  % であり, いずれの観察期間においても 2 群間に有意な差は認められなかった.

N.Ve/mm<sup>2</sup> (Fig. 3-6 M-R, 3-8 D) は, tm/TB 群, tm/TB/f-ICgel 群それぞれ 4 週で  $3.9 \pm 0.5$ ,  $5.4 \pm 0.4$  %, 8 週で  $5.8 \pm 0.4$ ,  $8.2 \pm 0.5$  %, 24 週では  $3.5 \pm 1.1$ ,  $5.7 \pm 0.4$  % であった. tm/TB/f-ICgel 群の N.Ve/mm<sup>2</sup> は, tm/TB 群に対して全ての期間において有意に高い値を示した.

Fig. 3-7 に石灰化速度 (MAR) の算出に用いた, テトラサイクリンおよびカルセインによる骨標識を行った組織像を示し, その値を Fig. 3-8 に示した.

MAR ( $\mu\text{m}/\text{day}$ ) (Fig. 3-7, 3-8 E) は, tm/TB 群, tm/TB/f-ICgel 群のそれぞれで術後 14-28 日は  $7.6 \pm 0.9$ ,  $8.8 \pm 0.7$   $\mu\text{m}/\text{day}$ , 術後 28-42 日は  $4.2 \pm 0.8$ ,  $5.3 \pm 0.8$   $\mu\text{m}/\text{day}$ , 術後 42-56

日は  $4.1 \pm 0.8$ ,  $4.6 \pm 0.6 \mu\text{m/day}$ , 術後 56-168 日は  $1.0 \pm 0.0$ ,  $1.1 \pm 0.0 \mu\text{m/day}$  であった。いずれの計測期間においても 2 群間に有意な差は認められなかった。

#### 第4節 考察

本研究で用いた tTMCP は、粒径 45  $\mu\text{m}$  未満のチタン合金粉末 (Ti-6Al-7Nb) から製作されている。チタンおよびチタン合金は軽量、非磁性、機械的特性、耐食性、低アレルギー性などのすぐれた生体適合性を有するばかりでなく、光学顕微鏡レベルで骨組織と完全に密着する (osteointegration) という他の金属系バイオマテリアルにはない特性も有している[85]。チタンおよびチタン合金はこのようなすぐれた特性を背景に、整形外科、歯科などにおいて、主に力学的な強度が要求される部位や、骨との長期間の密着が想定される部位へ応用されている。チタンおよびチタン合金はその構造から  $\alpha$  型、 $\alpha + \beta$  型、 $\beta$  型に分類される。純チタンは  $\alpha$  型に分類され、耐食性や成形性にはすぐれているが、強度が低いことが問題となっている。そのため、 $\alpha$  安定化元素と  $\beta$  安定化元素をチタン (Ti) に含有させたチタン合金が開発された。その中でもアルミニウム (Al) とバナジウム (V) をそれぞれ 6%、4% 含有した  $\alpha + \beta$  型チタン合金である Ti-6Al-4V は、すぐれた強度・延性バランスを有し、高強度が要求される部位に用いられている。しかしながら、バナジウムは長期間生体内に埋入する際には、細胞毒性などの懸念が指摘されている [86, 87]。そのため、バナジウムを含まない  $\alpha + \beta$  型チタン合金として、バナジウムを他の  $\beta$  安定化元素であるニオブ (Nb) で置き換えた Ti-6Al-7Nb が開発され、人工関節や歯科インプラントに用いられている[88-90]。このような背景から、本研究ではチタン合金粉末として Ti-6Al-7Nb を選択した。

本研究において作製された tTMCP は、全個体の骨欠損部ならびに既存骨の形態と完全に一致した。特に、術中は tTMCP を骨欠損部に挿入し骨鉗子などで既存骨と固定すると、既存骨は自然に解剖学的な位置に引き寄せられ、容易に正しいアライメントを得ることができた。これは患者毎の骨欠損形態に合わせて造形されるテーラーメイドインプラント特有の利点であり、実際の臨床応用の現場では極めて有用な特徴であると考えられた。

円筒形チタンメッシュケージ (TMC) はこれまで長管骨の様々な骨欠損症例に対して用いられており、一定の機能回復が認められている[37-41]。本研究ではイヌの橈骨骨幹部欠損モデルに対して、tTMCP にて骨欠損の再建を行った結果、術後 3 日には全例で移植肢への負重を開始し、術後 10 日には跛行は消失し、正常な歩行を開始したというすぐれた機能回復を発揮した。これに対して、Teixeira らは、テーラーメイドではないがメッシュケージとプレートとを溶接したインプラントを作製し、ヒツジ片側脛骨骨幹部 35 mm 欠損モデルに移植したところ、術後 7-10 日で負重を開始し、跛行が消失したのは術後 60 日であったと報告している[44]。動物種、移植部位の違いはあるものの、この機能回復期間の違いは tTMCP の機械的な有用性を示している。つまり、TMC とプレートと一体化させるだけでなく、メッシュケージの断端と既存骨の断端形状を完全に一致させることにより、荷重負荷に耐えることが可能となり、迅速な機能回復が得られたものと考えられた。

また、同じ報告の中で Teixeira らは、術後 15 日で 12 例中 5 例 (41.6%) において、TMC の両端のプレート部に変形が生じたと報告している。この変形の理由として、プレートの厚みが薄かったこと、TMC をプレートに溶接したことで TMC とプレートの境界部分で機械的強度の違いが存在したことを挙げている。本研究においても術後 4 週の X 線学的



検査において、18 例中 1 例 (5.6 %) に遠位 3 番目のスクリーホールクラックが認められた。発生率が低いため、その原因が想定以上の衝撃によるものなのか、tTMCP の構造的問題なのかを判断するのは困難である。しかし、プレートと tTMC の移行部には応力が集中し、インプラントの破損が生じる可能性が示唆された。臨床応用に際してはクラック発生率をさらに低下させるため、インプラント材質などの改良に関する検討が必要である。

tTMC 内の充填剤として用いた TB と bFGF-IC gel の混合体は、操作性にすぐれ、tm/TB/f-ICgel 群では全ての tTMC 内に死腔なく均一に充填することが可能であり、挿入時に TB が漏出することはなかった。TB を単独で用いた tm/TB 群では、重力方向の遠位端のみ極めて微量のフィブリンゲル (約 30  $\mu$ l) で表面の TB を接着することにより、TB の逸脱を防止することが可能であった。フィブリンゲルは生体適合性や生体吸収性が高く、創傷治癒に不可欠であることから、バイオポリマーとして注目されている[91]。また、フィブリンゲルは間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) など種々の細胞の成長や移動、分化を支持するため、移植用担体としての応用も進んでいる[92-94]。これらのことから、フィブリンゲルの使用により、骨新生が抑制される可能性は低いと考えられる。

本研究において、bFGF-IC gel を用いた tm/TB/f-ICgel 群は、4 週において pm/TB 群に比べて新生骨伸長距離 (BD/TD)、新生骨量 (BV/TV)、血管数 (N.Ve/mm<sup>2</sup>) すべてにおいて有意に高い値を示した。bFGF-IC gel の血管新生誘導効果は肉眼的にも明らかであり、tm/TB 群では tTMC と周囲組織の連続性は全く認められないのに対して、tm/TB/f-ICgel 群ではすでに多くの血管が tTMC 内に侵入していた。これらの結果は第 2 章のイヌ PMC モデルの実験結果と同じ傾向を示しており、PMC に比べると少ないメッシュ孔ではあるが、

bFGF-IC gel は tTMC 内に豊富な血管新生を誘導することが可能であり、より広範囲な骨新生を引き起こすことが示唆された。一方、層板状骨量 (LBV/BV) と石灰化速度 (MAR) は、4 週の時点では 2 群間に有意な差は認められず、これも第 2 章の結果と同様であった。つまり、bFGF と IC gel は、この時点における骨代謝回転には影響を与えていないことが示唆された。そこで本研究は 4 週の観察期間に加え、骨癒合期間について調査するため 8 週ならびに 24 週における血管新生および骨新生効果を検討した。

bFGF-IC gel を用いた tm/TB/f-ICgel 群の血管数は、8, 24 週ともに tm/TB 群よりも有意に高い値を示し、新生骨量には 2 群間に有意差は認められないものの、新生骨伸長距離では 24 週において tm/TB/f-ICgel 群が有意に高い値を示した。さらに、明らかな差異として、tm/TB 群では 24 週の時点で 1 例も骨癒合が得られていないにも関わらず、tm/TB/f-ICgel 群では 2/3 例 (66.7 %) において骨癒合が達成されていた。このことから、bFGF-IC gel は単回の局所投与にも関わらず、早期の血管新生と骨新生効果に加え、長期的な効果を示すことが明らかとなった。bFGF-IC gel 自体は移植後 5 日以内にほぼ肉芽組織に置き換わることが確認されているため[32]、骨欠損部内に極めて初期の段階ですぐれた血管ネットワークを形成することが、より早期の広範な骨新生を可能にし、それらの新生骨を栄養するための血管が成熟するにつれてさらなる骨新生が促進され、ついには迅速な骨癒合を可能にしたと考えられた。

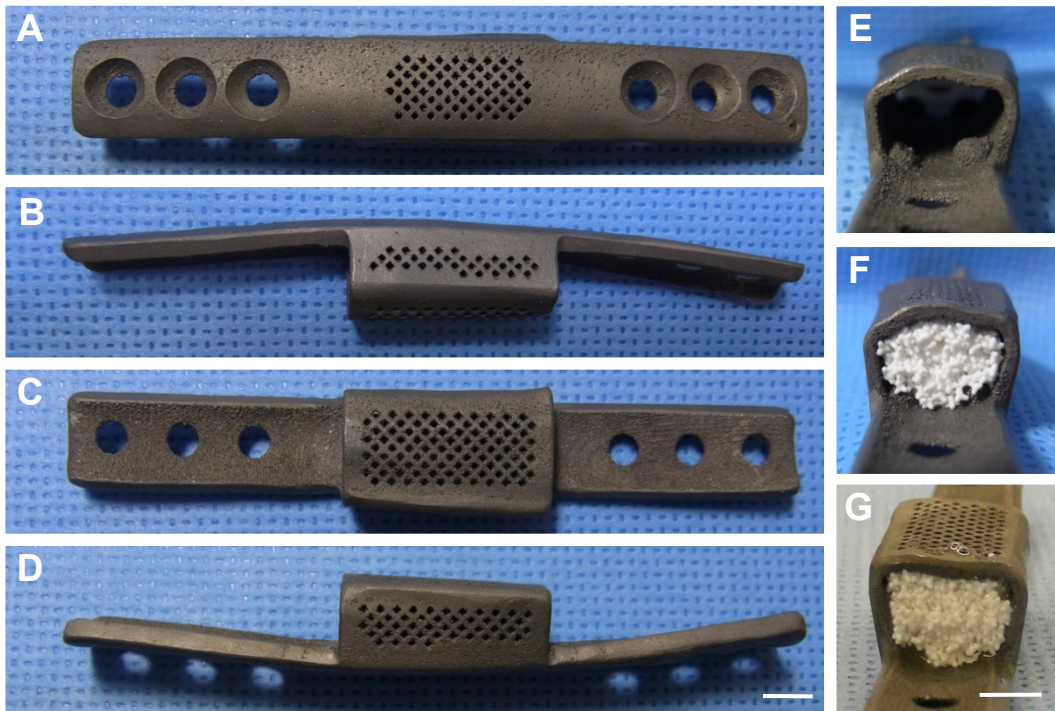
血管数の経時的推移については、tm/TB 群、tm/TB/f-ICgel 群ともに 8 週から 24 週にかけて減少する傾向を示したが、これは新生骨量の増加に伴い骨髄の供給が再開され、不要な血管が退縮していったものと考えられる。一方、肉眼的な血管侵入所見は、8 週ま

では増加傾向を示したが、24週では両群ともに tTMC 外からの血管侵入はほとんど認められず、ほぼ全てが結合組織に置き換わっていた。24週の時点では両群ともに tTMC 外からの血管侵入は退縮傾向にあるにも関わらず、tm/TB/ICgel 群では有意に高い血管数を示したのは、骨癒合により骨髄の再疎通が得られ血管ネットワークが骨欠損部全体に構築されていたためと考えられた。

骨代謝回転のマーカースとして用いた層板状骨量と石灰化速度は、4週と同様に8、24週においても2群間に有意差が認められなかったことから、bFGF-IC gel は長期的にもリモデリングの起きた領域や新生骨の形成速度には影響しないことが明らかとなった。つまり、bFGF-IC gel は直接骨新生を誘導するのではなく、血管新生を誘導することにより骨新生に適した環境（酸素、栄養素など）が提供され、通常骨新生が起き得る領域よりも広範囲に骨新生が引き起こされたものと考えられる。層板状骨量の経時的推移は、tm/TB 群、tm/TB/f-ICgel 群ともに増加傾向にあり、24週では骨欠損内部の新生骨のほとんどが層板状骨にリモデリングされていた。一方、石灰化速度の経時的推移は、両群ともに減少傾向を示し、移植後56-168日の期間では約  $1 \mu\text{m/day}$  と、ビーグル成犬の日常のリモデリングにおける石灰化速度 ( $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m/day}$ ) にまで低下していた[70]。このことは、骨折治癒の臨床病態、すなわち、骨折直後の急激な骨形成から始まり次第にリモデリングにシフトし骨が再生していく流れとほぼ一致していることから、層板状骨量と石灰化速度は骨代謝回転のマーカースとして有用であると考えられた。

また、8週における新生骨伸長距離と新生骨量は、tm/TB/f-ICgel 群が高い値を示す傾向が認められたものの、2群間に有意な差が認められなかった。この理由については不

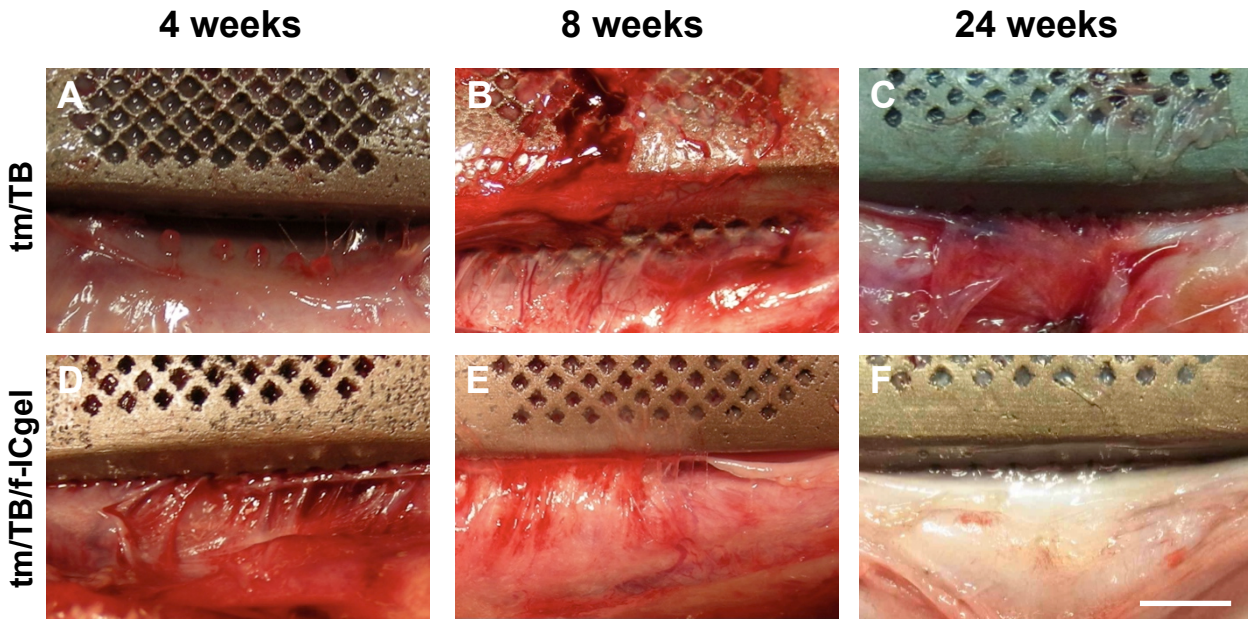
明であるが、両群とも4週から8週にかけて層板状骨量は急激に上昇し、石灰化速度は減少していたことから、初期の旺盛な骨新生から骨リモデリングにシフトしていく時期だったために、有意な差には至らなかったのかもしれない。一方、24週における新生骨伸長距離は tm/TB/f-ICgel 群において有意に高い値を示したが、新生骨量には2群間に有意差が認められなかった理由として、骨欠損部における新生骨の分布密度の差が考えられる。すなわち、tm/TB/f-ICgel 群では血管新生に伴い、tTMC 内により広範囲に均一に新生骨が形成されていたのに対し、tm/TB 群では、新生骨は骨髄の豊富な既存骨の断端周囲にのみ高密度に形成されていた。tm/TB/f-ICgel 群では24週においてもTB群よりも有意に多くの血管が存在していたことから、この血管新生が骨欠損部中央部分への骨新生を活性化させ、より迅速な骨伸長および骨癒合が得られたと考えられる。



**Fig. 3-1.** (A-E) The tailor-made titanium mesh cage with plate (tTMCP) was manufactured in rapid prototyping machine. (F) the *tm/TB* group; TB within the tTMC. (G) the *tm/TB/f-ICgel* group; TB and bFGF-IC gel within the tTMC. Scale bar = 5 mm.

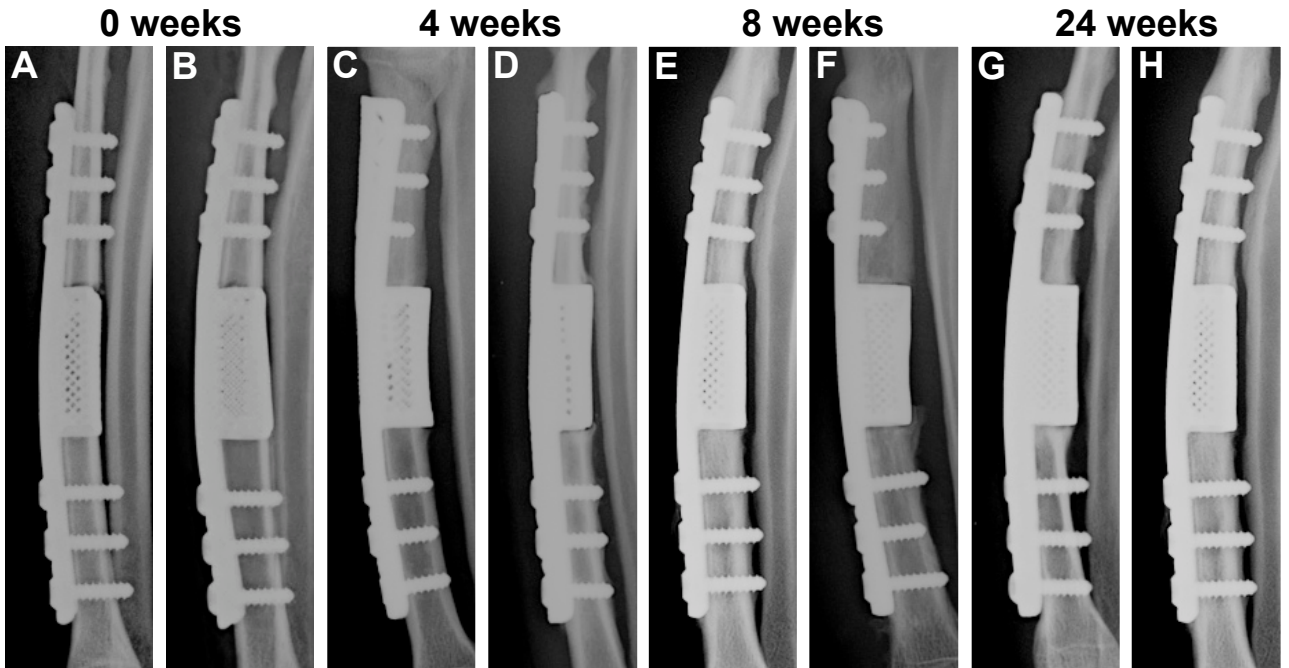


**Fig. 3-2.** The tTMCP was implanted into the radial defect (dR: distal radius; pR: proximal radius). The tTMCP was completely fit to the radius and the defect.



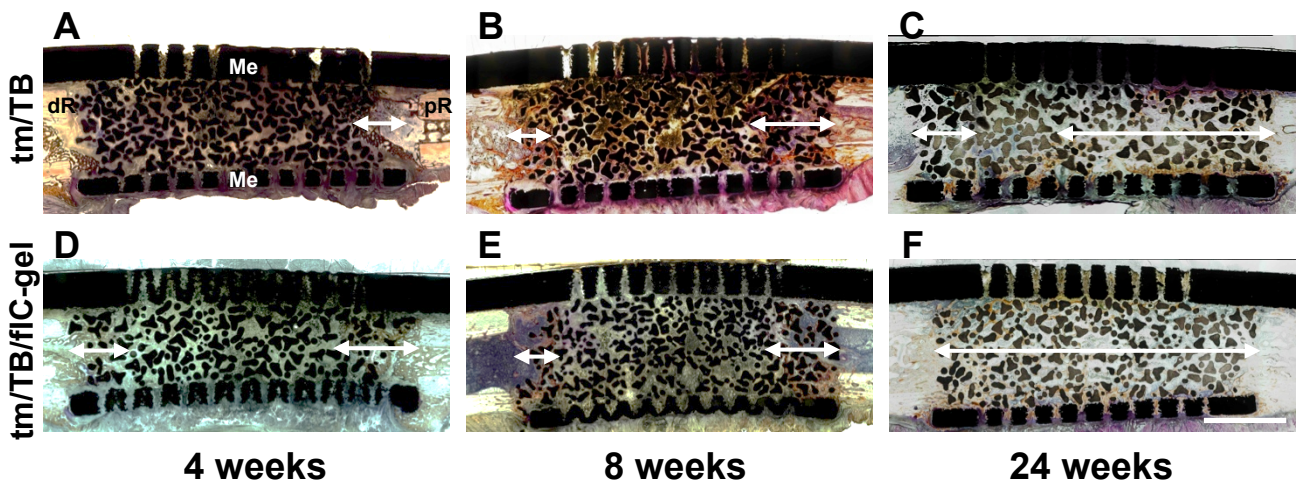
**Fig. 3-3.** Gross observation at autopsy. Neovascularization around the implant and the surrounding tissue was shown in the *tm/TB* group (A-C) and the *tm/TB/f-ICgel* group (D-F) at 4, 8 and 24 weeks after surgery. More vessels invading into the cage was observed in the *tm/TB/f-ICgel* group at 4 weeks than that in the *tm/TB* group. At 24 weeks, the mesh cage of both groups was fully surrounded by connective tissues.

Scale bar = 5 mm.

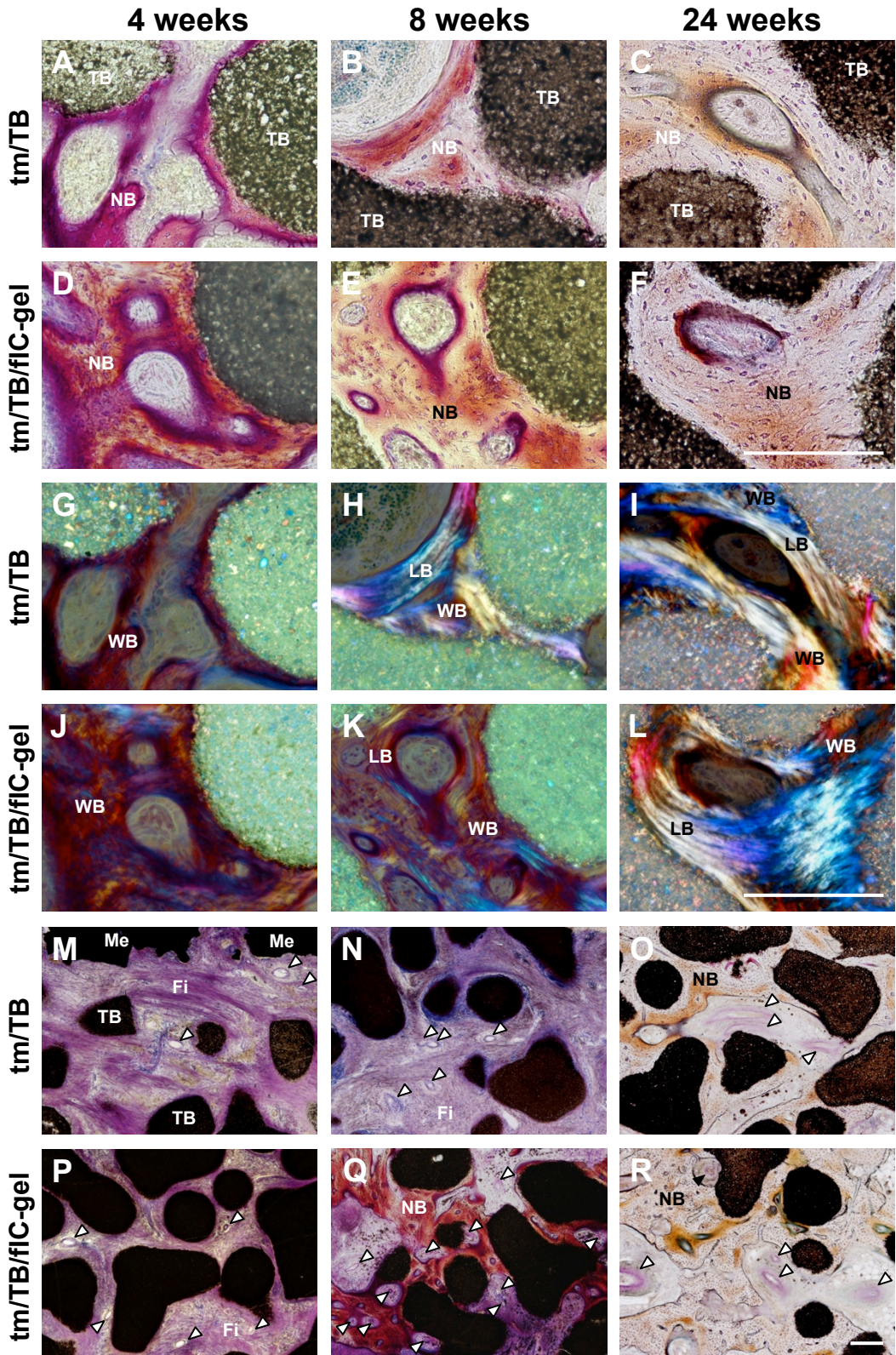


**Fig. 3-4.** Lateral radiographs of the radial segmental defect in the *tm/TB* group (A, C, E, G) and the *tm/TB/f-ICgel* group (B, D, F, H) immediately after surgery and at 4, 8 and 24 weeks after surgery. The osseous callus formation was observed from both proximal and distal cortical bone over the tTMC in each group at 4, 8 and 24 weeks after surgery.

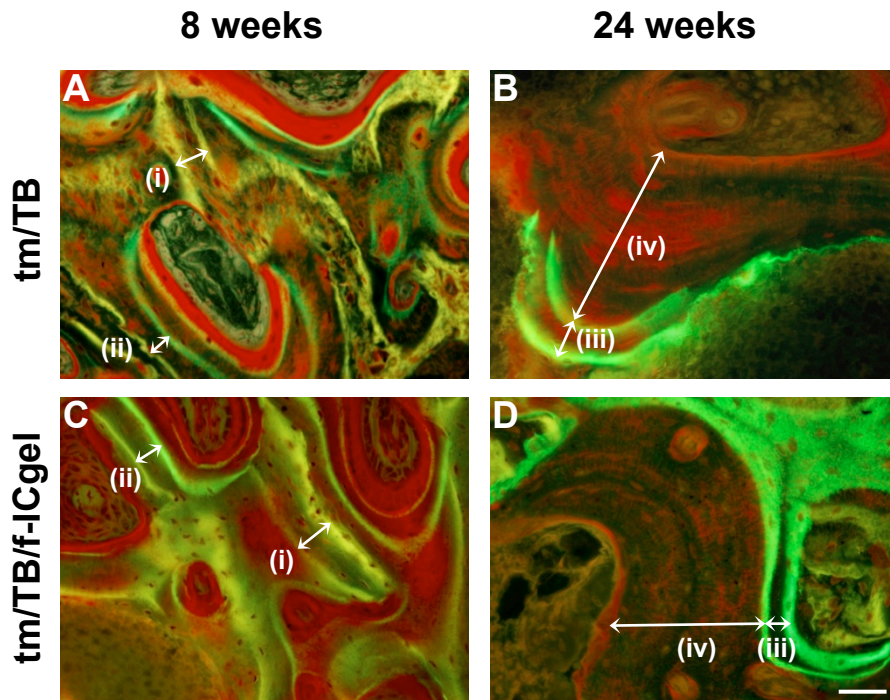




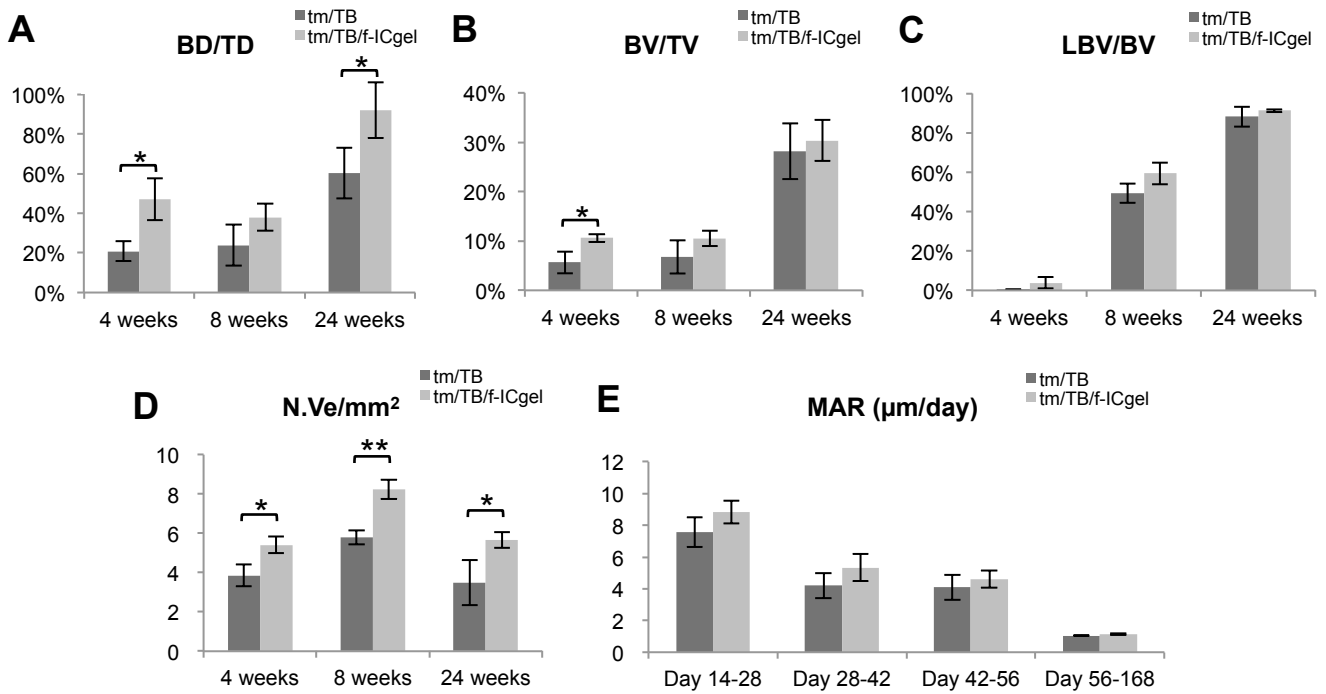
**Fig. 3-5.** Histological sections (Villanueva Bone stain) at the median sagittal plane of the *tm/TB* group (A-C) and the *tm/TB/f-ICgel* group (D-F) (dR: distal radius; pR: proximal radius; Me: mesh). Horizontal lines indicate the distance of distal and proximal new bone tissues at the midline of the defect. At 24 weeks, the defect was almost filled with newly formed bone in the *tm/TB/f-ICgel* group. Scale bar = 5 mm.



**Fig. 3-6.** Histological findings of regenerated bones (A-F: Natural light, G-L: Polarized light) and neovascularization (M-R: Natural light) in the *tm/TB* group (A-C, G-I, M-O) and the *tm/TB/f-ICgel* group (D-F, J-L, P-R) at 4, 8 and 24 weeks after surgery. There seemed to be massive newly formed bones at 4weeks and vessels at 4, 8 and 24 weeks in the *tm/TB/f-ICgel* group compared to the *tm/TB* group. TB: Tetrabone; NB: new bone; Me: mesh; Fi: fibrous tissue; Arrowheads: the newly formed vessels. Scale bar = 200  $\mu$ m.



**Fig. 3-7.** Histological findings of fluorescent-labeled regenerated bones (Villanueva Bone stain). The tetracycline (the yellow lines) and calcein (the green lines) signals in the *tm/TB* group (A, B) and the *tm/TB/f-ICgel* group (C, D) at 8 and 24 weeks after surgery: (i) the distance of day 14 to 28; (ii) the distance of day 28 to 42; (iii) the distance of day 42 to 56; (iv) the distance of day 56 to 128 (osteoid). There was no difference in the distance between the two groups. Scale bar = 50  $\mu$ m.



**Fig. 3-8.** Histomorphometric analyses for the newly formed bone tissue at 4, 8 and 24 weeks after implantation. (A) the distance of new bone tissue per distance of total tissue (BD/TD), (B) the volume of new bone tissue per volume of total tissue (BV/TV), (C) the volume of lamellar bone tissue per volume of bone tissue (LBV/BV), (D) the number of vessels per square millimeter (N.Ve/mm<sup>2</sup>) and (E) mineral apposition rate (MAR). Values are shown as mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). Asterisks (\*) indicate statistical significance between the groups with p value < 0.05 (\*\*: p < 0.01).

## 総合考察

本研究は 3 つの実験により、テトラポッド型顆粒状人工骨 (TB) と塩基性線維芽細胞増殖因子結合イオン・コンプレックスゲル (bFGF-IC gel) ならびにテーラーメイドチタンメッシュケージ一体型プレート (tTMCP) の併用による有用性を検討した。

第 1 章ではウサギ大腿骨骨幹部部分欠損モデルにおいて、TB と bFGF-IC gel を併用することにより、移植後 2 週の時点で血管新生と骨新生が有意に促進されることが明らかとなった。また、顆粒状の TB とハイドロゲル状の bFGF-IC gel を混合することにより手術時の操作性が向上し、TB の連通路に bFGF-IC gel が均一に満たされたまま、骨欠損部全体に容易に充填が可能であったことも、臨床上すぐれた利点であると考えられた。

第 2 章では、ウサギと異なる骨形成能を示すイヌを用いて検討したが、ウサギモデルと同様に、イヌ橈骨骨幹部部分欠損モデルにおいても TB と bFGF-IC gel を併用することによりすぐれた骨再生効果が得られた。また、骨代謝回転のマーカースとして用いた層板状骨量 (LBV/BV) と石灰化速度 (MAR) は、bFGF や bFGF-IC gel の有無に関わらず有意な差が認められなかったことから、bFGF-IC gel は骨新生を直接促進するのではなく血管新生を誘導することにより、より広範囲に骨新生が引き起こされることが示唆された。つまり、TB の連通路に充填された bFGF-IC gel は、連通路内に広範囲な血管ネットワークを形成することにより、骨芽細胞など種々の骨構成細胞へ栄養や酸素を供給し、かつ骨伝導性にすぐれた TB を足場としていることでより安定した骨再生を可能にしたと考えられる。

一方、長管骨に生じた巨大な骨欠損の治療には、早期の骨再生効果だけでなく、少ない手術回数と早期の機能回復効果もまた重要な意味を持つ。特に、ヒト医学においては長期の負重制限や術後管理は、患者の社会復帰を遅らせる大きな原因となる。そこで第 3

章では、各個体の骨欠損部の形態に完全に適合する TMC と既存骨表面に完全に重なるプレートが一体化したインプラントである tTMCP を考案・開発し、第 2 章と同じイヌ橈骨骨幹部部分欠損モデルを用いて、tTMCP と TB、そして bFGF-IC gel を併用することによる機能回復効果と骨再生効果について検討した。その結果、tTMCP は術後 3 日という早い時期から負重を開始し、術後 10 日には跛行が消失することが明らかとなった。つまり、メッシュケージの断端と既存骨の断端形状を完全に一致させることにより、荷重負荷に耐えることが可能となり、すぐれた機能回復が極めて早期に得られたものと考えられた。

bFGF-IC gel 併用時の骨再生効果に関して、第 2 章のポリプロピレンメッシュケージ (PMC) モデルと第 3 章の tTMCP モデルの結果を比較すると、移植後 4 週では、pm/TB 群 (PMC+TB)、tm/TB 群 (tTMCP+TB) それぞれ、血管数 : 3.7 および 3.9 /mm<sup>2</sup>, 新生骨量 : 10.1 および 5.6 %であった。tTMCP のケージ部分 (tTMC) は、PMC に比べてメッシュ孔の数が少なく厚みも大きいため、血管侵入性には不利に働くと予想されたが、pm/TB 群、tm/TB 群どちらも血管数はほぼ同じ値であった。これに対して、tTMC モデルである tm/TB 群の新生骨量は、PMC モデルである pm/TB 群の約半分の値であった。しかしながら、tTMC に bFGF-IC gel を併用した tm/TB/f-ICgel 群 (tTMCP+TB+bFGF-IC gel) では、血管数は 5.4 /mm<sup>2</sup>, 新生骨量は 10.6 %まで上昇し、ほぼ pm/TB 群 (PMC+TB) と同じレベルまでその効果を増強させることが可能であった。Takayama らの報告では、bFGF-IC gel は移植後 5 日という早期の血管新生誘導効果と、新生血管の成熟にも関与することが確認されている[32]。したがって、4 週の時点で pm/TB 群、tm/TB 群の血管数がほぼ同じ値でも、tTMC は PMC に比べてより未熟な新生血管が多かったのかもしれない。そのため、

bFGF-IC gel を併用した tm/TB/f-ICgel 群では、より早期の血管新生と成熟した機能血管を増加させたことにより、骨新生に必要な栄養や酸素、細胞の供給が促進され、より広範囲な骨新生を可能にしたと考えられる。

また、bFGF-IC gel を用いた tm/TB/f-ICgel 群の血管数は4週だけでなく、8週および24週においても tm/TB 群に比べて有意に高い値を示し、24週では骨癒合率においても有意差が認められたことから、bFGF-IC gel は早期の血管新生と骨新生効果に加え、長期的にもすぐれた効果があることが示唆された。つまり、早期の血管ネットワークの形成により早期の広範な骨新生を可能にし、それらの新生骨を栄養するための血管が成熟するにつれてさらなる骨新生が促進され、最終的には迅速な骨癒合を可能にしたと考えられた。

一方、本研究により tTMCP の改善すべき問題点も明らかとなった。1例ではあるが、tTMCP にはプレートとケージの境界部分にクラックが生じる可能性が示唆された。tTMCP の特徴であるケージとプレートの一体型構造を維持したままクラックを防止するには、チタン合金の素材を変えることにより弾性率を低下させることがより現実的な改善策である。皮質骨の弾性率は10-30 GPa であるのに対して、tTMCP に用いられている  $\alpha + \beta$  型チタン合金の弾性率は90-110 GPa と5倍程度の差がある。最近では、弾性率をなるべく皮質骨の値に近づけるため、新しいチタン合金である  $\beta$  型チタン合金の研究が行われている。中でも  $\beta$  型チタン合金の一つである Ti-35.3Nb-5.1Ta-7.1Zr や Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr など、Nb の含有率を高めた上にタンタル (Ta) とジルコニウム (Zr) を加えたチタン合金では、50-60 GPa の弾性率が得られている[95]。  $\beta$  型チタン合金は  $\alpha + \beta$  型に比べて強度が高



く、加工性にもすぐれているため、より不具合の少ないインプラントの製作が可能となるかもしれないが、現状では他のチタン合金に比べて高価であることが問題であろう。

また、本研究で用いた bFGF-IC gel に含まれる bFGF の用量は、血管新生に適した用量であり、骨新生に対する至適用量については検討していないため、より高濃度の bFGF を用いれば骨新生効果はさらに向上するかもしれない。同様の理由から、BMP などの bFGF 以外の骨新生誘導因子を併用することも検討する価値がある。さらに、bFGF-IC gel は血管新生の誘導により、細胞全般にとってすぐれた足場を提供するため、間葉系幹細胞などの培養細胞を併用することは骨欠損部断端部における骨新生の誘導効果だけでなく、骨髄からの細胞供給のない骨欠損部中央部分での骨新生も可能となるかもしれない。

以上のことから、長管骨巨大骨欠損に対する tTMCP, TB そして bFGF-IC gel の併用法は、術者の高度な技術を必要とせず、早期の機能回復と骨癒合を同時に達成できる理想的な治療法となる可能性が高い。また、tTMCP はどのような骨欠損形態にも造形できることから、再建困難な長管骨骨幹端部の巨大骨欠損にも応用できる可能性が高く、臨床上極めて有用な治療法になると考えられた。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を戴いた東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室 佐々木伸雄教授に深甚たる感謝の意を表す。

また、本研究の遂行にあたり終始御指導、御助言を戴いた同 高度医療科学研究室 西村亮平教授、同 獣医外科学研究室 望月学准教授、中川貴之助教、越後良介特任助教、そして東京大学大学院医学系研究科 臨床医工学部門 鄭雄一教授、井川和代先生、下畑宣行先生、崔成真先生、北條宏徳先生、同 血管再生医療講座 小山博之准教授、上村涉助教に深謝の意を表す。

さらに、本研究に多大な御協力、御援助を戴いた株式会社 松浦機械製作所 松浦勝俊氏、天谷浩一氏、漆崎幸憲氏、市村誠氏、株式会社ネクスト 21 鈴木茂樹先生、鎌田浩之氏、株式会社伊藤骨形態計測研究所 伊藤明美先生、伊藤彰氏に感謝の意を表す。

そして、本研究に供した多くのウサギ、イヌたちに心から哀悼の意を表するとともに、彼らの甚大なる功績に敬意を表す。また、その功績を他分野に広げて戴いた東京大学大学院農学生命科学研究科 高度医療科学研究室 藤田直己特任研究員、鍾承澍先生、南根列先生、河原直哉氏、高橋彩佳氏、天野まど香氏に謝意を表す。

最後に、本研究に際し多大な御協力を戴いた劉以立先生、上田綾子先生、芳我彩佳先生、林莉萱先生、阿島麻里子氏、喜多裕和氏、西岡幸姫氏、橋本裕子氏、八島由香氏をはじめとする東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医外科学研究室、高度医療科学研究室ならびに東京大学 動物医療センター外科系診療科の諸氏、そして、経済的、精神的な援助を戴いた両親に心から感謝する。

## 参考文献

- [1] Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989;3:192-5.
- [2] Donati D, Di Liddo M, Zavatta M, Manfrini M, Bacci G, Picci P, et al. Massive bone allograft reconstruction in high-grade osteosarcoma. *Clin Orthop*. 2000;186-94.
- [3] Brigman BE, Hornicek FJ, Gebhardt MC, Mankin HJ. Allografts about the Knee in Young Patients with High-Grade Sarcoma. *Clin Orthop*. 2004;232-9.
- [4] Banic A, Hertel R. Double vascularized fibulas for reconstruction of large tibial defects. *J Reconstr Microsurg*. 1993;9:421-8.
- [5] Malizos KN, Zalavras CG, Soucacos PN, Beris AE, Urbaniak JR. Free vascularized fibular grafts for reconstruction of skeletal defects. *J Am Acad Orthop Surg*. 2004;12:360-9.
- [6] DeCoster TA, Gehlert RJ, Mikola EA, Pirela-Cruz MA. Management of posttraumatic segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg*. 2004;12:28-38.
- [7] Rose PS, Shin AY, Bishop AT, Moran SL, Sim FH. Vascularized free fibula transfer for oncologic reconstruction of the humerus. *Clin Orthop*. 2005;438:80-4.
- [8] Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop*. 1989;263-85.
- [9] Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop*. 1989;249-81.
- [10] Chaddha M, Gulati D, Singh AP, Maini L. Management of massive posttraumatic bone defects in the lower limb with the Ilizarov technique. *Acta Orthop Belg*. 2010;76:811-20.
- [11] Burg KJ, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21:2347-59.
- [12] Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res*. 1987;5:114-21.
- [13] Wolff D, Goldberg VM, Stevenson S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. *J Orthop Res*. 1994;12:439-46.
- [14] Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, et al. Porous ceramics as bone graft substitutes in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res*. 1996;14:351-69.
- [15] Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R, Rocca M, Corsi A, et al. Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif Tissue Int*. 1999;64:83-90.
- [16] Kanczler JM, Oreffo ROC. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15:100-14.
- [17] Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury*. 2011;42:556-61.
- [18] Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop*. 1998:S82-9.

- [19] Dickson K, Katzman S, Delgado E, Contreras D. Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clin Orthop*. 1994;189-93.
- [20] Brownlow HC, Reed A, Simpson AH. The vascularity of atrophic non-unions. *Injury*. 2002;33:145-50.
- [21] Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*. 1995;92:11-4.
- [22] Kubo H, Cao R, Brakenhielm E, Makinen T, Cao Y, Alitalo K. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor-3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8868-73.
- [23] Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tanii M, Komori K, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*. 2002;90:966-73.
- [24] Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tanii M, Okano S, et al. Essential role of PDGFRalpha-p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFRalpha during angiogenesis. *Circ Res*. 2004;94:1186-94.
- [25] Collin-Osdoby P, Rothe L, Bekker S, Anderson F, Huang Y, Osdoby P. Basic fibroblast growth factor stimulates osteoclast recruitment, development, and bone pit resorption in association with angiogenesis in vivo on the chick chorioallantoic membrane and activates isolated avian osteoclast resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1859-71.
- [26] Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:7297-301.
- [27] Hayek A, Culler FL, Beattie GM, Lopez AD, Cuevas P, Baird A. An in vivo model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;147:876-80.
- [28] Globus RK, Patterson-Buckendahl P, Gospodarowicz D. Regulation of bovine bone cell proliferation by fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology*. 1988;123:98-105.
- [29] Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y, Sakawa A, et al. Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calcif Tissue Int*. 1998;63:490-5.
- [30] Iwakura A, Tabata Y, Tamura N, Doi K, Nishimura K, Nakamura T, et al. Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances healing of devascularized sternum in diabetic rats. *Circulation*. 2001;104:I325-9.
- [31] Iwakura A, Tabata Y, Koyama T, Doi K, Nishimura K, Kataoka K, et al. Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003;126:1113-20.
- [32] Takayama T, Taguchi T, Koyama H, Sakari M, Kamimura W, Takato T, et al. The growth of a vascular network inside a collagen-citric acid derivative hydrogel in rats. *Biomaterials*.

2009;30:3580-7.

[33] Zdeblick TA, Ghanayem AJ, Rapoff AJ, Swain C, Bassett T, Cooke ME, et al. Cervical interbody fusion cages. An animal model with and without bone morphogenetic protein. *Spine*. 1998;23:758-65; discussion 66.

[34] Thalgott JS, Xiongsheng C, Giuffre JM. Single stage anterior cervical reconstruction with titanium mesh cages, local bone graft, and anterior plating. *Spine J*. 2003;3:294-300.

[35] Fayazi AH, Ludwig SC, Dabbah M, Bryan BR, Gelb DE. Preliminary results of staged anterior debridement and reconstruction using titanium mesh cages in the treatment of thoracolumbar vertebral osteomyelitis. *Spine J*. 2004;4:388-95.

[36] Chuang HC, Wei ST, Lee HC, Chen CC, Lee WY, Cho DY. Preliminary experience of titanium mesh cages for pathological fracture of middle and lower cervical vertebrae. *J Clin Neurosci*. 2008;15:1210-5.

[37] Cobos JA, Lindsey RW, Gugala Z. The cylindrical titanium mesh cage for treatment of a long bone segmental defect: description of a new technique and report of two cases. *J Orthop Trauma*. 2000;14:54-9.

[38] Ostermann PA, Haase N, Rubberdt A, Wich M, Ekkernkamp A. Management of a long segmental defect at the proximal meta-diaphyseal junction of the tibia using a cylindrical titanium mesh cage. *J Orthop Trauma*. 2002;16:597-601.

[39] Attias N, Lehman RE, Bodell LS, Lindsey RW. Surgical management of a long segmental defect of the humerus using a cylindrical titanium mesh cage and plates: a case report. *J Orthop Trauma*. 2005;19:211-6.

[40] Clements JR, Carpenter BB, Pourciau JK. Treating segmental bone defects: A new technique. *J Foot Ankle Surg*. 2008;47:350-6.

[41] Segal U, Shani J. Surgical management of large segmental femoral and radial bone defects in a dog: through use of a cylindrical titanium mesh cage and a cancellous bone graft. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2010;23:66-70.

[42] Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res*. 2006;24:1438-53.

[43] Fujibayashi S, Neo M, Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*. 2004;25:443-50.

[44] Teixeira CR, Rahal SC, Volpi RS, Taga R, Cestari TM, Granjeiro JM, et al. Tibial segmental bone defect treated with bone plate and cage filled with either xenogeneic composite or autologous cortical bone graft. An experimental study in sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2007;20:269-76.

[45] Panchbhavi VK, Trevino, S.G. Use of titanium cages with cancellous bone graft in hind foot fusion: literature review and case reports with complications. *Foot Ankle Surg*. 2003;9:51-5.

[46] Carlsson Å. Unsuccessful use of a titanium mesh cage in ankle arthrodesis: A report on three cases operated on due to a failed ankle replacement. *J Foot Ankle Surg*. 2008;47:337-42.

[47] Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*. 2001;2:REVIEWS3005.

[48] Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors.

Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16:139-49.

[49] Romero-Fernandez W, Borroto-Escuela DO, Tarakanov AO, Mudo G, Narvaez M, Perez-Alea M, et al. Agonist-induced formation of FGFR1 homodimers and signaling differ among members of the FGF family. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409:764-8.

[50] Rodan SB, Wesolowski G, Thomas KA, Yoon K, Rodan GA. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connect Tissue Res.* 1989;20:283-8.

[51] Kawaguchi H, Kurokawa T, Hanada K, Hiyama Y, Tamura M, Ogata E, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology.* 1994;135:774-81.

[52] Kato T, Kawaguchi H, Hanada K, Aoyama I, Hiyama Y, Nakamura T, et al. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res.* 1998;16:654-9.

[53] Nakamura T, Hara Y, Tagawa M, Tamura M, Yuge T, Fukuda H, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture. *J Bone Miner Res.* 1998;13:942-9.

[54] Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J, et al. Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:875-80.

[55] Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, et al. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res.* 2003;92:561-8.

[56] Saito H, Murabayashi S, Mitamura Y, Taguchi T. Unusual cell adhesion and antithrombogenic behavior of citric acid-cross-linked collagen matrices. *Biomacromolecules.* 2007;8:1992-8.

[57] Saito H, Taguchi T, Aoki H, Murabayashi S, Mitamura Y, Tanaka J, et al. pH-responsive swelling behavior of collagen gels prepared by novel crosslinkers based on naturally derived di- or tricarboxylic acids. *Acta Biomater.* 2007;3:89-94.

[58] Taguchi T, Saito H, Iwasashi M, Sakane M, Kakinoki S, Ochiai N, et al. Development of a novel glue consisting of naturally-derived biomolecules: citric acid and human serum albumin. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007;7:742-7.

[59] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2:595-610.

[60] Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16:263-71.

[61] Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13:377-83.

[62] Holmes RE. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. *Plast Reconstr Surg.* 1979;63:626-33.

[63] Roberts R, Gallagher J, Spooncer E, Allen TD, Bloomfield F, Dexter TM. Heparan sulphate

- bound growth factors: a mechanism for stromal cell mediated haemopoiesis. *Nature*. 1988;332:376-8.
- [64] Kagami S, Kondo S, Loster K, Reutter W, Urushihara M, Kitamura A, et al. Collagen type I modulates the platelet-derived growth factor (PDGF) regulation of the growth and expression of beta1 integrins by rat mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252:728-32.
- [65] Cheresh DA, Stupack DG. Regulation of angiogenesis: apoptotic cues from the ECM. *Oncogene*. 2008;27:6285-98.
- [66] Badylak SF, Kropp B, McPherson T, Liang H, Snyder PW. Small intestinal submucosa: a rapidly resorbed bioscaffold for augmentation cystoplasty in a dog model. *Tissue Eng*. 1998;4:379-87.
- [67] Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2009;15:353-70.
- [68] Wang L, Fan H, Zhang ZY, Lou AJ, Pei GX, Jiang S, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;1-10.
- [69] Bernard GW. The ultrastructural interface of bone crystals and organic matrix in woven and lamellar endochondral bone. *J Dent Res*. 1969;48:781-8.
- [70] Wronski TJ, Smith JM, Jee WS. Variations in mineral apposition rate of trabecular bone within the beagle skeleton. *Calcif Tissue Int*. 1981;33:583-6.
- [71] Heissler E, Fischer FS, Bolouri S, Lehmann T, Mathar W, Gebhardt A, et al. Custom-made cast titanium implants produced with CAD/CAM for the reconstruction of cranium defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27:334-8.
- [72] Winder J, Cooke RS, Gray J, Fannin T, Fegan T. Medical rapid prototyping and 3D CT in the manufacture of custom made cranial titanium plates. *J Med Eng Technol*. 1999;23:26-8.
- [73] Ciocca L, De Crescenzo F, Fantini M, Scotti R. CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: A pilot study. *Comput Med Imaging Graph*. 2009;33:58-62.
- [74] Esses SJ, Berman P, Bloom AI, Sosna J. Clinical applications of physical 3D models derived from MDCT data and created by rapid prototyping. *Am J Roentgenol*. 2011;196:W683-8.
- [75] Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, et al. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J Artif Organs*. 2006;9:234-40.
- [76] Choi SJ, Lee JI, Igawa K, Sugimori O, Suzuki S, Mochizuki M, et al. Bone regeneration within a tailor-made tricalcium phosphate bone implant with both horizontal and vertical cylindrical holes transplanted into the skull of dogs. *J Artif Organs*. 2009;12:274-7.
- [77] Li J, Hsu Y, Luo E, Khadka A, Hu J. Computer-aided design and manufacturing and rapid prototyped nanoscale hydroxyapatite/polyamide (n-HA/PA) construction for condylar defect caused by mandibular angle ostectomy. *Aesthetic Plast Surg*. 2010;35:636-40.
- [78] Murr LE, Quinones SA, Gaytan SM, Lopez MI, Rodela A, Martinez EY, et al. Microstructure and mechanical behavior of Ti-6Al-4V produced by rapid-layer manufacturing, for biomedical applications. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2:20-32.

- [79] Bert JM. Custom total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 1996;11:905-15.
- [80] Kawate K, Ohneda Y, Ohmura T, Yajima H, Sugimoto K, Takakura Y. Computed tomography-based custom-made stem for dysplastic hips in Japanese patients. *J Arthroplasty*. 2009;24:65-70.
- [81] Muirhead-Allwood SK, Sandiford N, Skinner JA, Hua J, Kabir C, Walker PS. Uncemented custom computer-assisted design and manufacture of hydroxyapatite-coated femoral components: survival at 10 to 17 years. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92:1079-84.
- [82] Santori FS, Santori N. Mid-term results of a custom-made short proximal loading femoral component. *J Bone Joint Surg Br*. 2010;92:1231-7.
- [83] Wang G, Li J, Khadka A, Hsu Y, Li W, Hu J. CAD/CAM and rapid prototyped titanium for reconstruction of ramus defect and condylar fracture caused by mandibular reduction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.03.034>
- [84] Ciocca L, Fantini M, De Crescenzo F, Corinaldesi G, Scotti R. Direct metal laser sintering (DMLS) of a customized titanium mesh for prosthetically guided bone regeneration of atrophic maxillary arches. *Med Biol Eng Comput*. 2011;49:1347-52.
- [85] Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg. Suppl*. 1977;16:1-132.
- [86] Browne RC. Vanadium poisoning from gas turbines. *Br J Ind Med*. 1955;12:57-9.
- [87] Sjoberg SG. Vanadium dust, chronic bronchitis and possible risk of emphysema; a follow-up investigation of workers at a vanadium factory. *Acta Med Scand*. 1956;154:381-6.
- [88] Semlitsch MF, Weber H, Streicher RM, Schon R. Joint replacement components made of hot-forged and surface-treated Ti-6Al-7Nb alloy. *Biomaterials*. 1992;13:781-8.
- [89] Kobayashi E, Wang TJ, Doi H, Yoneyama T, Hamanaka H. Mechanical properties and corrosion resistance of Ti-6Al-7Nb alloy dental castings. *J Mater Sci Mater Med*. 1998;9:567-74.
- [90] Iijima D, Yoneyama T, Doi H, Hamanaka H, Kurosaki N. Wear properties of Ti and Ti-6Al-7Nb castings for dental prostheses. *Biomaterials*. 2003;24:1519-24.
- [91] Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng*. 2006;12:1587-95.
- [92] Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003;24:2497-502.
- [93] Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, et al. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2003;31:27-33.
- [94] Ichianagi T, Anabuki K, Nishijima Y, Ono H. Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow wastes of spinal fusion procedure (TLIF) for low back pain patients and preparation of bone dusts for transplantable autologous bone graft with a serum glue. *Biosci Trends*. 2010;4:110-8.
- [95] Narushima T. New generation metallic biomaterials. In: *Metals for Biomedical Devices*. (Niinomi N. ed.), 2010, p. 355-378, Woodhead Pub., Cambridge.