

Micro-engineering を併用した血管付人工骨による股関節巨大骨欠損の再建

京都大学附属病院 整形外科 助教
河井 利之

背景

骨盤・大腿骨骨欠損は、骨折・変性・先天性形成異常・腫瘍切除・人工股関節周囲感染・骨溶解などの結果生じ治療には多くの場合骨補填（骨再生）を要する。このような患者に対しては本邦では自家骨移植が選択される事が多いが、採骨可能な部位・量が限られる上、採骨部の疼痛・機能低下といった問題が避けられない。欠損部のサイズや部位によっては自家骨移植単独では十分な血流が得られず、血管柄付自家骨移植が必要になる場合もある。近年採骨を行わず、Tissue engineering（組織工学）的手法により、細胞・Scaffold・成長因子などを組み合わせて硬組織再生を行う方法が有望視されている。しかし、人工物内部で組織再生が起こるには、scaffold 深部まで宿主細胞が進入して生存する必要があるが、細胞は栄養の供給源から数百マイクロメートル以上離れてしまうと生存することができないため巨大な人工骨移植を行っても結局は生着しない。こういった問題のため、血管柄付自家骨移植に匹敵するような骨再生の手法はいまだ確立していない。そこで我々は、組織工学的手法と外科的血行再建を組み合わせた新たな骨欠損再建法の開発に着手した。

現在の手法の課題

組織工学的手法によって作成された人工物内部で組織再生が起こるには、インプラント深部まで宿主細胞が進入して生存する必要がある。

る。しかし、細胞は栄養の供給源から数百マイクロメートル以上離れてしまうと生存することができない。そのため組織工学的手法においてはインプラント全体を栄養する微小血行路の再生が必要となる。これまでの多くの研究は、吸収性材料の中に細胞を含有させ、それらが生体内で自己集合し自ら三次元血管ネットワークを形成することを期待するものであったが、実際生体内でそのような構造が形成されることは稀であった。そこで、我々は微小血管の発芽・三次元ネットワーク形成を誘導する scaffold を作成し、その scaffold の内腔に血管束移植し術直後からの血流獲得を実現させることとした。具体的なアプローチは以下のとおりである。3Dprinting により中央に大きな管腔構造（中央チャネル）を内包した多孔体 scaffold を作成し、scaffold 全体に中央チャネルからの血管発芽を促す多数の微小連通孔を放射状に作成する。tube 状のマイクロハイドロゲルを多数作成し、これを外壁連通孔に挿入する。これを大腿骨または骨盤巨大骨欠損に設置し、中央チャネルに大腿動脈の分枝動脈血管束を挿入し術直後から人工骨を還流させるとともに人工骨内への早期血管発芽を可能にする。

方法

Scaffold の作成

多孔性の polycaprolactone (PCL) scaffold を、我々の研究チーム自作の 3 次元印刷システムを用いて作成した。多孔体デザインは直径 4mm、長さ 8mm の円柱状多孔体構造で

中央に直径 2mm のトンネル構造をもたせた。作成した scaffold は 5M NaOH 溶液に室温で 12 時間浸漬し親水性と表面粗さを付与した。その後、scaffold を BMP2 添付と非添付の 2 タイプに分けた。BMP2 添付群には 2 μg の rhBMP-2 を付与する目的で次の処理を行った。フィブリン 1 mg/ml 溶液に 37 度で 24 時間浸漬した後リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄、次にスロンビン 4 unit/ml 溶液に 37 度 2 時間浸漬、PBS で 3 回洗浄した後に 0.2 mg/ml の rhBMP-2 を 10 μl 滴下し 4 度で保存した。

動物実験

48 匹の雄 Sprague-Dawley ラットを使用し、骨欠損部の骨形成癒合と血管新生を評価した。scaffold のみ (Group1)、血管束挿入 scaffold (Group2)、BMP2 添付 scaffold (Group3)、血管束挿入 BMP2 添付 scaffold (Group4) の 4 群に分けて評価を行った。

8mm の骨欠損を大腿骨骨幹部に作成した。大腿骨近位と遠位に 22mm 長の PEEK (poly ether ether ketone) プレートを宛がい、1.1 mm ねじ切り k-wire4 本で固定した。次に superficial epigastric artery (SEA), vein (SEV) を同定し、周囲組織から剥離し挙上した。大腿動脈からの分枝点から 2.5cm 末梢側で 7-0nylon を用いて SEA, SEV を結紮した。Group2, 4 では SEA, SEV の血管束を scaffold 中央のトンネルに挿入し、骨欠損部に留置した。Group1, 3 では血管束は剥離挙上したあと大腿動脈からの分枝点から 2.5cm 遠位側で 7-0nylon を用いて結紮してもとの位置にもどし、骨欠損部には scaffold を留置した。術後 2, 4, 8 週でレントゲンを撮影し骨癒合評価を行った。術後 8 週で血管造影を行い血管新生量を評価した。Microfil を下大静脈から生理的な圧力をかけながら注入し、Mic

rofil 硬化後に大腿部を採取した。採取した大腿のマイクロ CT 撮影を行い、その後脱灰した後に再度マイクロ CT 撮影を行った。ラットの正常大腿骨 3 本をコントロールとして使用した。

結果

骨欠損部の骨癒合は、術後 4 週では Group1 で 0/12 (0%)、Group2 で 2/12 (16.7%)、Group3 で 11/12 (91.7%)、Group4 で 11/12 (91.7%) であった。術後 8 週では Groups 1, 3, 4 では 4 週と同様の癒合率であったが Group2 では 3/12 (25%) に上昇していた。骨欠損部内での骨形成は Group1 で $25.3 \pm 12.8 \text{ mm}^3$ 、Group2 で $46.9 \pm 22.8 \text{ mm}^3$ 、Group3 で $80.3 \pm 22.7 \text{ mm}^3$ 、Group4 で $87.7 \pm 15.6 \text{ mm}^3$ (各 n=12) であった。骨形成量は Group3 と 4 の間では統計学的有意差は無かったが、それ以外の全ての組み合わせの Group 間で統計学的有意差があった。scaffold 全体の血管量は Group1 で $1.2 \pm 1.1 \text{ mm}^3$ 、Group2 で $3.8 \pm 2.4 \text{ mm}^3$ 、Group3 で $5.3 \pm 2.0 \text{ mm}^3$ 、Group4 で $8.2 \pm 2.5 \text{ mm}^3$ であった。

Groups2, 3 は Group1 と比較して有意に多い血管量を認めていた。また、Group4 は Group1, 2, 3 と比較して有意に多い血管量であった。中央トンネル内の血管量は、Group1 で $0.2 \pm 0.2 \text{ mm}^3$ 、Group2 で $1.5 \pm 0.9 \text{ mm}^3$ 、Group3 で $1.6 \pm 0.7 \text{ mm}^3$ 、Group4 で $2.5 \pm 1.0 \text{ mm}^3$ であった。Group1 のトンネル内血管量は Group2, 3, 4 に比較して有意に少なかった。Group2 と 4 のトンネル内血管量にも有意差があった。CT 画像では、Group2, 4 においては造影された血管様構造がトンネル内の血管束から scaffold を通って放射状に広がっていることが確認された。Group3 では周囲組織から scaffold 内に向けて新生血管が進入

していることを示唆する所見であった。本研究では3次元印刷 scaffold と血管束挿入を用いた、骨形成評価の新たなモデルを提唱した。骨形成量と血管新生量は epigastric artery and vein 血管束の Scaffold 内挿入により有意に向上していた。

考察

scaffold + 血管束挿入(Group 2) の骨形成量は正常大腿骨の骨量とほぼ同等であったが、骨癒合率(8週で25%)は満足のいくレベルではなかった。今回のモデルでは挿入血管の末梢端が結紮されて血流量が十分に得られていなかった可能性もある。BMP2 の添付は骨形成量だけでなく、骨欠損部内での血管新生量も向上させていた。血管束挿入単独と BMP2 添付はほぼ同等の血管形成量を示しており、その二つを組み合わせることでさらに旺盛な血管新生が得られていた。我々は、3次元印刷技術で作成した scaffold に血管束挿入により血流を与えることで効果的に骨形成が得られることを示した。今後、大動物のモデルを用いてさらに長期的な効果について検証することとする。