

皮質骨リモデリング in vivo 実験モデルの基礎的検討

山本 創太^{*}, 田中 英一^{*}, 安達 泰治[#],

坪田 健一^{##}, 横田 秀夫⁺, 姫野 龍太郎⁺

^{*}名古屋大学 大学院工学研究科機械情報システム工学専攻

名古屋市千種区不老町

e-mail: sota@mech.nagoya-u.ac.jp

tanaka@mech.nagoya-u.ac.jp

[#]神戸大学 工学部機械工学科

神戸市灘区六甲台町 1-1

e-mail: adachi@mech.kobe-u.ac.jp

^{##}東北大学 大学院工学研究科バイオロボティクス工学専攻

仙台市青葉区片平二丁目 1-1

e-mail: tsubota@pfs1.mech.tohoku.ac.jp

⁺理化学研究所 情報環境室

埼玉県和光市広沢 2-1

e-mail: hyokota@postman.riken.go.jp

himeno@postman.riken.go.jp

要旨 骨組織の力学的リモデリングは典型的な生体組織の機能的適応の例として広く知られているが、力学的負荷とそれによる骨リモデリング作用の定量的関係を明らかにするような十分な精度を持つ生体力学的実験結果がない。

そこで本研究では、構造要素として重要な役割を果たしている皮質骨のリモデリングを定量的に評価する in vivo 実験モデルの開発を目指す。そのためにまず、負荷履歴が明らかな新生骨組織を生体内で誘導できるような実験システムの開発を行った。具体的には、フレーム型デバイスを開発し、ラット脛骨に埋入してフレーム内に新生骨を生成する実験を試みた。さらに、整形外科で臨床に広く用いられている骨延長術を応用した新生骨誘導実験を行った。その結果、創外固定法を用いた骨延長術を応用することにより新生骨誘導が可能であることが示された。今後は手術成功率高上のための実験器具と手術手順の改良、新生組織に力学負荷を作用させる機構開発が必要である。

1. 緒言

骨組織では、破骨細胞による既存骨の吸収と骨芽細胞による新生骨の形成という代謝回転を伴い構造や形態を最適な状態に維持しており、力学的環境が変化した際には骨の吸収量と形成量のバランスを変化させることにより、骨リモデリングが生じる。このような作用により、例えばスポーツ選手の利き腕の骨の増大や、無重力状態に長く滞在した宇宙飛行士の骨量減少などが生じる。

骨組織のリモデリングは19世紀後半から知られており、実験的観察が数多くなされてきた。1960年代末頃から、定量的な実験も行われるようになった。しかし、リモデリングの実験は、長期間にわたり力学的環境の制御を行うことが容易ではないことや、生体を対象としているため個体差生じることから、まだ十分な精度を持つ実験結果が蓄積されておらず、力学的負荷とそれによるリモデリング作用の定量的関係は明らかではない。骨リモデリング作用の定量的解明は、各種整形外科処置やリハビリテーション、トレーニングの効率化や無重量空間滞在者の身体機能維持を検討する上で非常に重要な知見を与える。

そこで本研究では、骨格支持に重要な役割を果たしている皮質骨のリモデリングを定量的に評価する *in vivo* 実験を目指す。そのためにまず、負荷履歴が明らかな新生骨組織を生体内で誘導し、これに定量的に制御された力学負荷を作用し、リモデリング量を測定できるような実験システムの開発を行なった。具体的には骨に欠損を作成し、フレーム状デバイスを設計・開発し、ラット脛骨に埋入し、フレーム内に新生骨を生成する実験を試みた。次に、整形外科領域で臨床に広く用いられている骨延長術を応用した新生骨誘導実験を行った。

2. フレーム埋植試験

骨組織は、組織の発生または新生の過程において、形成作用（モデリング）と力学環境の変化に対する再構築作用（リモデリング）の影響を同時に受けている。よって骨リモデリングの評価のためには、対象となる試料の負荷履歴をも考慮する必要があると考えられる。しかし、生体内の骨組織を用いてリモデリング実験を行う場合、試料の初期状態は全て異なっており、またそれらを規定することも困難である。そこで本研究では生体内に新生骨組織を誘導し、その形成過程で作用する負荷を制御することで負荷履歴の明らかな骨組織を作る手法を検討した。まず、基礎実験として実験領

域を規定するフレーム型デバイスを骨に埋入し、フレーム内に骨組織を誘導する実験を行った。

2.1 実験装置および手順

以下の3種類のフレームを作製し、埋植する実験モデルを用いた。

- (1) 15×2×0.5 mmのプレート2枚を骨幹軸に対して平行に埋入
- (2) 2×2×0.5 mmのプレート2枚を骨幹軸に対して平行に埋入
- (3) 12×3×2 mmのブロックに10×2 mmの開口部のある口型フレームを埋入

実験モデル(1)、(2)により、オステオンの配向性の骨誘導への影響を調査できると考えた。また実験モデル(3)では、誘導領域を周囲の骨組織から隔離した状態での骨誘導の可能性を調査できると考えた。また骨組織の本来の再生能を知るため、(4)骨欠損のみ作製

した実験も行った。

埋入する金属の材質はSUS304とした。SUS304は長期間の埋植では骨組織内に溶出するが、この実験では骨組織形成初期の短期的な応答を調べることを目的とするため、溶出の影響は小さいと考えられる。そこでコストと加工性を優先しSUS304を選択した。

実験動物にはラット(Std:Wister/ST)を用いた。右脛骨にフレームを埋植し、左脛骨をコントロールとした。各フレーム、それぞれ3体のラットで実験を行った。

埋植手術手順は以下の通りである。まずラット腹腔内に生理食塩水で3倍希釈したソムノペンチル(ペントバルビタールナトリウム64.8 mg/ml)を0.3 ml投与し、麻酔した。右脛部を剃毛し、皮膚を切開した。小型リユータを用いてフレームを埋植するための欠損を脛骨に作った。実験モデル(1)では2枚のプレートの間隔を約1 mmとした。また、実験モデル(2)では、2枚のプレートの間隔を約10 mm、欠損の幅を約1 mmとした。実験モデル(4)では欠損部の幅を1 mmとした。実験モデル(1)~(3)について、プレート及びフレームを埋入した際の様子を図1(a)から(c)に示す。手術後は、ケージ内で特に運動の制限を与えずに飼育した。

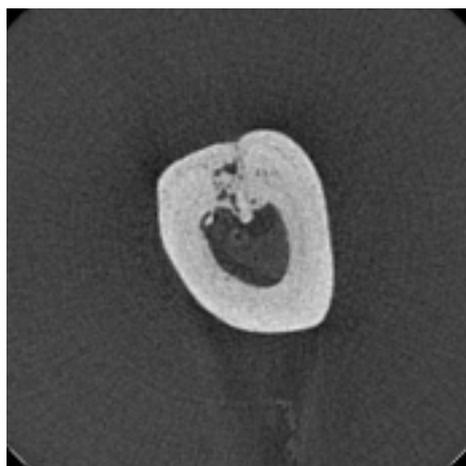


(a) Frame Model (1) (b) Frame Model (2) (c) Frame Model (3)

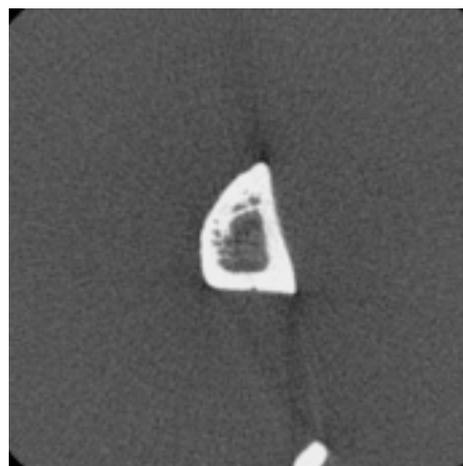
Fig. 1 Embedded frames in rat tibia

2.2 実験結果

フレームを埋入した実験モデルでは、全てのタイプでフレームの脱落や欠損部周辺での骨折のため、新生骨誘導ができなかった。フレームを埋植しなかった実験モデル(4)では、4週間後には外観上、欠損が塞がった。欠損作成後4週及び8週経過後に屠殺し、マイクロCTにより内部構造の観察を行った結果を図2に示す。4週経過時で脛骨表面は塞がっていたが、内部には空孔や海綿骨様の組織が見られた。実験領域は脛骨骨幹中央なので、本来、海綿骨組織はない。したがって、この海綿骨様の構造は再生過程で形成された網状骨の名残りと考えられ、完全な皮質骨組織としては再生していないといえる。8週経過時では欠損部に再生した皮質骨層がはっきりしてきているものの、厚さが他の領域よりも薄かった。未処置の左脛骨の対応する部位との比較においても薄かった。また内部の海綿骨様の構造も残存したままであった。



(a) 4 weeks after surgery



(b) 8 weeks after surgery

Fig. 2 Micro CT images of the tibias of experimental model (4)

2.3 考察

実験モデル(1)～(3)におけるフレームの脱落は、骨に対する固定性の悪さに起因すると考えられる。人工関節置換術などの整形外科処置では骨セメントを固定剤に用いるが、界面近傍では骨セメントが新生骨組織と混在した組織を形成することになる。このような混合組織は骨リモデリング実験には不適であり、また生分解性材料を用いたとしても、負荷履歴の明らかな新生骨組織を形成する目的を果たせない。以

上の観点から、本実験では固定剤を用いず、はめ合わせによる固定を行おうとしたが、生体の小さな実験領域内に精度の良い手加工を施さなくてはならず、手技の難度が非常に高かった。そこで、新生組織との親和性が骨セメントより高いと考えられるハイドロキシアパタイト充填剤（バイオペックス、三菱マテリアル）による固定を試みたが、良好な結果は得られなかった。実験領域はフレームの大きさにより決まるが、負荷機構を組み込み及び骨組織を連続体近似して取り扱う必要性からある程度以上の小型化は困難である。そのためフレーム埋入のための欠損が大きく、充填剤では十分な固定性を得られなかった。したがって、フレーム型デバイスを骨組織の一部に埋植するような実験にはより大きな動物を用いる方がよいと考えられるが、飼育環境の準備と管理が容易ではない。

実験モデル（４）において皮質骨厚さの完全な回復が得られなかった。これは、通常の体重支持機能が欠損部以外の骨組織により十分に果たされたため、新生組織への負荷が小さく、組織の成長速度が緩やかになっているものと考えられる。したがって、新生組織に十分な負荷を作用することができれば、より速やかな組織形成が可能であると期待できる。

以上の考察より、ラットを用いた生体内骨誘導及び力学負荷試験には、負荷もしくは固定デバイスを可能な限り大きくし、かつ誘導段階から新生組織に負荷を作用させることができる必要があると考えられる。

3．創外固定術を応用した新生骨組織誘導試験

前章での検討結果をふまえ、整形外科で広く用いられている創外固定法を応用した骨延長術を用いた新生骨誘導実験モデルを考案し、その有用性を検討した。

3．1 創外固定法と骨延長術および動物実験への応用

創外固定法とは、骨折した長管骨の破壊されていない部分に創外、すなわち生体外から軟組織を突き抜いてピンを刺入し、これらのピンを支柱もしくは籠型の治具で固定することで、骨折部を固定する方法である⁽¹⁾。粉碎骨折のようないわゆる骨接ぎが困難な場合に用いられ、プレートを髓内釘により直接骨に取り付ける内固定法より手術侵襲が小さく、術後の経過観察や処置が容易である利点がある。創外固定法には

様々な種類があり、症例によってそれらを使い分けられる。本研究ではもっともポピュラーな固定法として知られているホフマン型創外固定法を参考とすることにした。

ホフマン型創外固定法では、まずプローブピンを刺入することにより骨の形状、位置を確認し、ピンガイドを用いてピンを刺入する。ピンの刺入にはドリルブレースと呼ばれる手動ドリル様の器具を用いる。刺入したピンをクランプにより固定し、これをスライドバーと呼ばれる外固定器に取り付ける。骨の固定性はピンの数と径に比例して強くなるが、ピンの径が骨の太さの20%以上の場合、ピン刺入による骨折の危険が高く、通常ピンの直径は骨の太さの1/3程度までとされている。また外固定器のフレームの組み方によっても固定性を向上させることができる。ホフマン創外固定法ではハーフピン固定 (unilateral frame)、貫通ピン固定 (bilateral frame)、三角立体固定もしくはV字型固定フレームが用いられる。ハーフピン固定 (unilateral frame) はいわゆる可変固定で、神経・血管の多い上肢にもっとも適応がある。下肢ではピンの数や太さを考慮して用いる必要がある。貫通ピン固定 (bilateral frame) は下腿ではもっとも基本的な固定法で、ハーフピンの倍以上の強さがあり、圧縮力に強い。貫通ピンとハーフピンの組み合わせによる三角立体固定は、最も強固な固定となる。V字型固定は、下腿に用いた場合、筋組織を避けたピン刺入が可能であり、せん断や曲げに対して比較的強い。

外固定器を伸縮可能な構造にすることにより、骨延長術が可能となる。創外固定法を応用した骨延長術は、牽引速度を低くできるため、周辺軟組織にかかる負担が小さく、より多くの骨延長量を得ることができる。いくつかの術式が提案されているが、通常1回あたり1 mm前後の延長を1日1回から数回かけて行う。

創外固定法を応用した骨延長術では延長作業だけで数週間を要するが、創外固定器により延長部が保護されること、一定方向への延長が安定してできることからその有効性は高い。骨延長は正に新生骨組織の誘導であり、本研究で行おうとしている骨リモデリング実験への適用が期待できる。

Richardsらは、雌のSprague-Dawley ratに対して創外固定器を用いた大腿骨における新生骨誘導実験を行った⁽²⁾。骨切断術を施した後、切断面を接触させた状態で6日間静置し、1日0.5 mm (1日2回、1回につき0.25mm) の延長を12日間施し、さらに18日間静置した。5つの実験群のうち、4つの群については骨形成因子を投与し、残り1群については骨誘導因子を投与しなかった。実験の結果、全てのグループで切断した大腿骨の皮質骨表面から骨誘導が確認された。しかし、ギャップを完全につなぐほどの骨誘導は確認されなかった。また、組織観察を行った結果、誘導された骨は

どのグループでも組織学的には全く同様の組織であった。この実験により、骨延長術により骨形成因子を投与しなくても新生骨組織の誘導が可能である可能性が示された。さらに、骨延長を施す際に、骨に作用する力を制御することにより、生成過程における負荷履歴が明らかな骨が誘導できると考えられる。そこで創外固定法を用いた骨誘導実験を実施し、生体内骨リモデリング実験への応用性を検討した。

3.2 実験装置および手順

本実験では整形外科で最もポピュラーなホフマン型創外固定器を参考に、ラット用創外固定器を開発し、それを用いた骨延長術を試みた。実験モデルの概念を図3に示す。一本のネジで連結された二つのブロックからなる固定器を、大腿骨骨幹部に4本のピンを用いて取り付け、大腿骨を切断した。切断面に仮骨を形成させつつ固定器のブロック間隔をネジにより広げ、骨延長を行った。

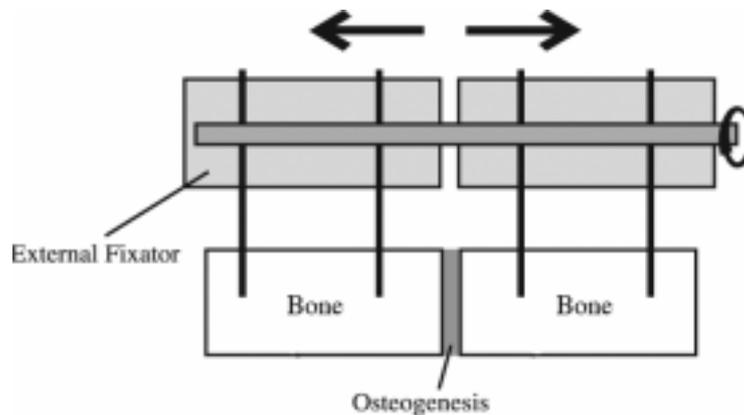


Fig. 3 Schematic diagram of distraction osteogenesis model

試作した創外固定器を図4に示す。2つのブロック、2枚の背板、2本のガイド、4本の止めネジおよび1本のネジからなり、背板はブロックに4本のネジで固定される。ブロックと背板との間に後述のピンを挟む構造となっている。また、本体中央に配置されるネジを回転させることによりブロックが動き、骨を圧縮もしくは伸展することができる。ブロックと背板は軽量化のためアルミ製とし、ネジおよびガイドはステンレス（SUS304）とした。

創外固定用ピンは、1mmのキルシュナー鋼線の先端に、ダイスでM1の雄ネジを切り作製した。ピン挿入作業に用いるピンガイドは2つのブロックと1本のネジからなり、ブロックの材質はアルミ、ネジはステンレスとした（図5）。

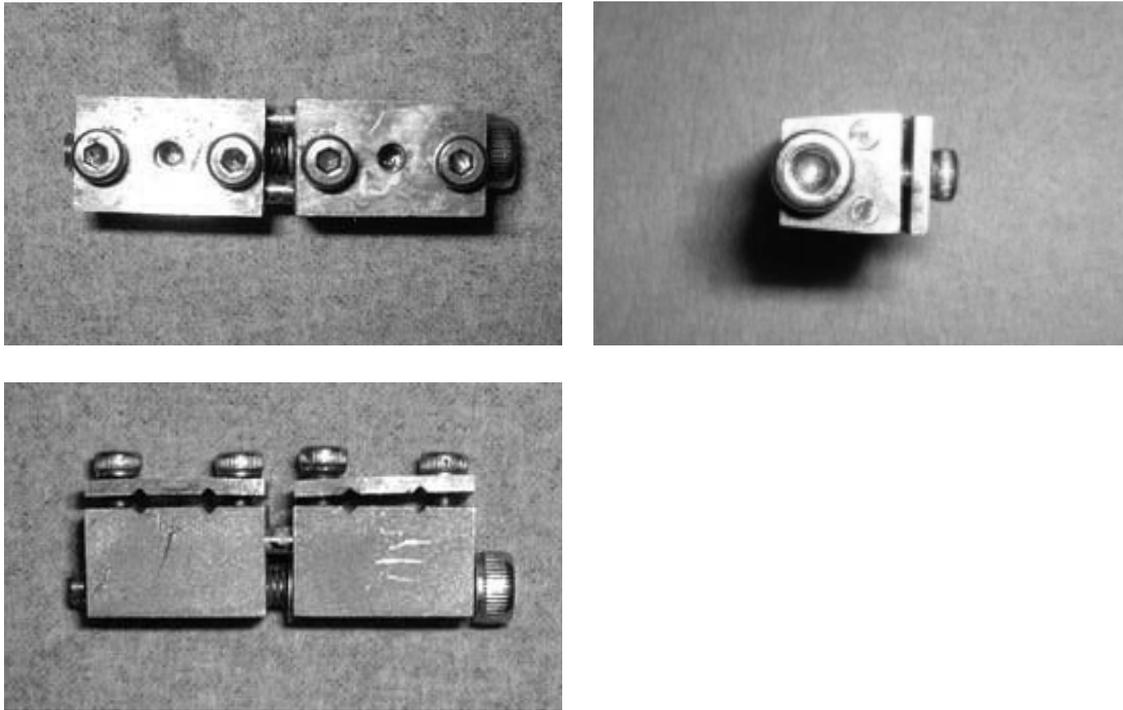


Fig. 4 External fixator for rat

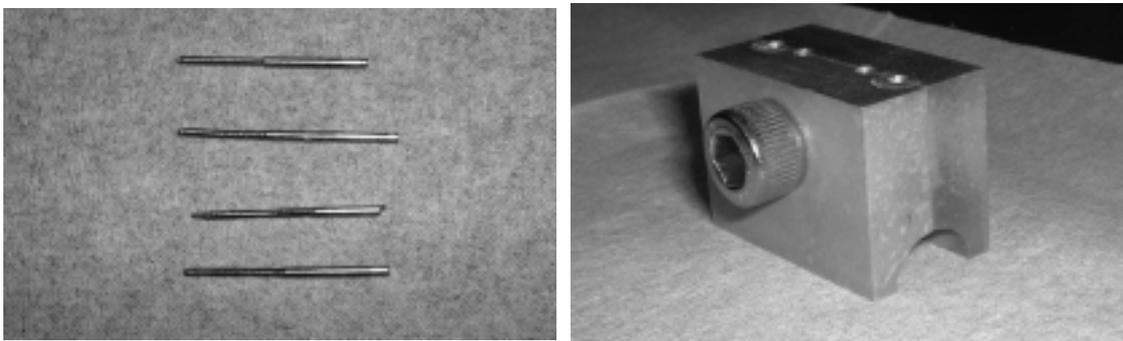
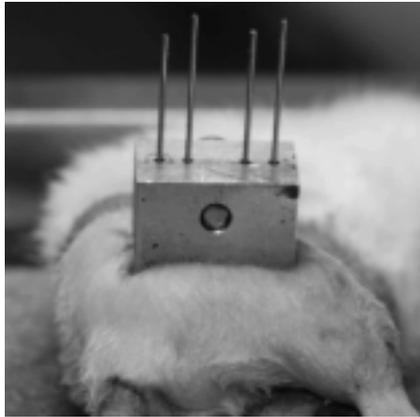


Fig. 5 Pins and pin guide

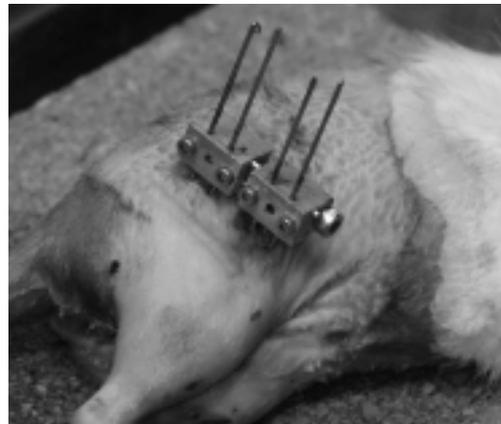
実験動物にはラット (Std:Wister/ST) を用いた。実験には骨形状が整っており、創外固定術が容易と考えられる大腿骨を用いた。右大腿骨に骨延長術を施し、左大腿骨をコントロールとした。

創外固定術の手順を以下に示す。ラットに生理食塩水で3倍希釈しソムノペンチル (ペントバルビタールナトリウム64.8 mg/ml) 0.5 ml投与し、麻酔した。剃毛した右大腿外側からピンガイドを押し当て、ピン挿入位置を決定した。その際、22Gの注射針をプローブピンとして用いた。ピンバイスに 0.75 mmのドリル刃を装着し、ガイドに従ってピン挿入のための下穴を手作業で明けた。さらに別のピンバイスに装着

した雄ネジを切ったキルシュナー鋼線を装着し、下穴にピンを4本挿入した（図6 (a)）。ピンガイドを取り外し、4本のピンが全て大腿骨に挿入されていることを確認した後、創外固定器のブロックと背板で4本のピンを挟み、固定器を装着した（図6 (b)）。



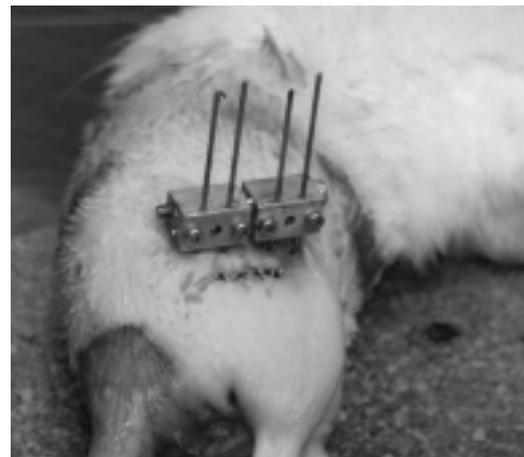
(a) Pins inserted into the femur



(b) External fixator attached on the thigh



(c) Abscission of the femur



(d) Sutured thigh after surgical operation

Fig. 6 Procedure of external fixation

次にピン刺入位置から約5 mm背側の皮膚を大腿骨と平行にメスで切開し、大腿骨を露出させた。マイクロサージカルソーにより、刺入した4本のピンのうち近位から2本目と3本目の中間を2つに切断した（図6 (c)）。すなわち二分された大腿骨は固定器の2つのブロックのそれぞれに2本のピンで固定された。切断面が互いに接触するように固定器のブロック間隔をネジにより調整した後、切開部を縫合した（図6 (d)）。

術後ラットはケージ内で抗生物質を適宜投与しながら飼育した。ケージ内での運動、食事に特に制限を与えず6日間経過した後、1日2回、1回につき0.25mm、すなわち

1日あたり0.5 mmずつの骨延長を4日間施した．さらに延長をせずに4日間飼育したのちに屠殺し，マイクロX線CTにより骨内部構造を観察した．

3.3 実験結果

摘出した大腿骨のうち，実験期間中に固定器の脱落，感染症による患部のひどい化膿，体調不良による衰弱などの明らかな問題が発生しなかったもの4体について，マイクロX線CTによる内部構造観察を行った．その結果の1例を図7に示す．側面像に見られるとおり，切断面が平行を保った状態で骨延長されており，固定器の装着と延長作業が良好に実施されたことがわかる．また断面像には骨折治癒過程初期に形成されるwoven boneに特徴的な編目構造が観察できたことから，新生骨組織形成が順調であると考えられる．

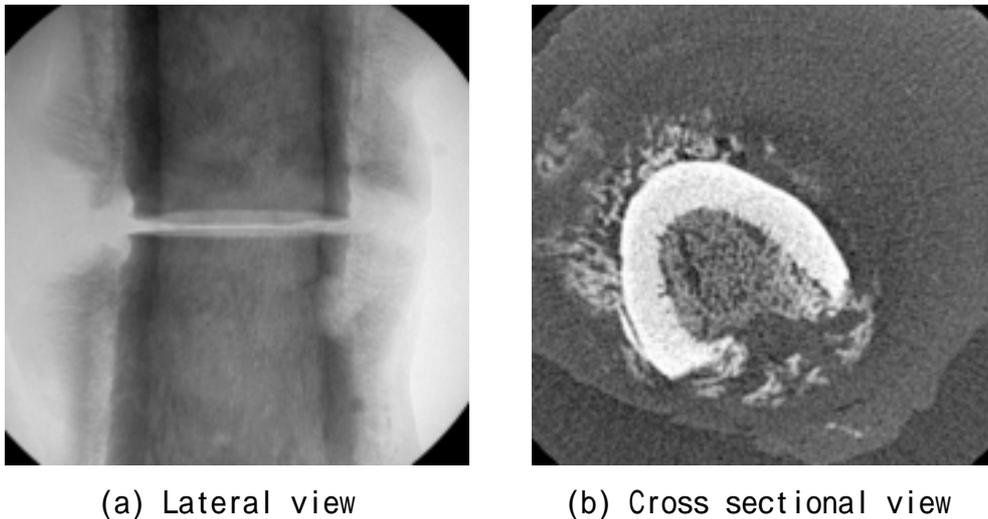
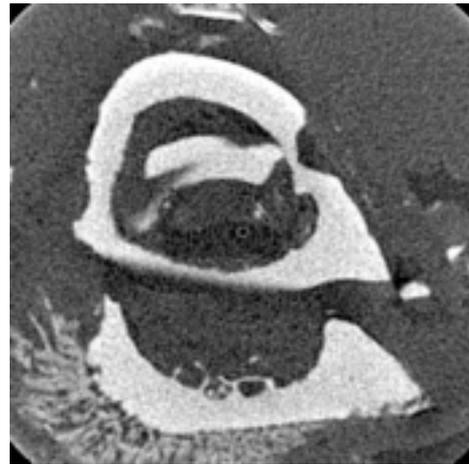


Fig. 7 An example of woven bone formation after distraction osteogenesis operation

しかし，骨延長に失敗し，治癒が正常に進行していない個体もあった．その例を図8に示す．側面像では明らかに切断面同士がずれた状態で固定されたことがわかる．断面像では一部に骨幹外側の一部にwoven boneが見られたが，完全な癒合が期待できる状態ではなかった．



(a) Lateral view



(b) Cross sectional view

Fig. 8 A failed example of distraction osteogenesis operation

3.4 考察

骨延長術が成功した個体では，骨折治癒過程で典型的に見られるwoven boneの構造が観察できた．骨折直後には仮骨と呼ばれる血腫様の組織が骨折部周辺に形成されるが，その内部に生成された線維組織が石灰化し，woven boneとなる．これは治癒の進行につれて構造的により強固な皮質骨組織が形成されるにつれて吸収され，消滅する．したがってwoven boneは新生皮質骨組織の前駆組織であるといえるため，本実験結果から静置期間をより長くすることで完全な新生皮質骨組織が得られることが期待できる．

骨延長術に失敗した例では，ピン刺入作業に問題があったと考えられる．図8の例ではピンが平行に刺入されていなかったため，骨幹を切断した際に骨がずれたものと考えられる．このときwoven boneは骨の外側の一部にしか形成されなかったが，これは骨の接合が不完全なため内部の骨髄や血液が流出したため，仮骨形成がなされなかったものと考えられる．また飼育期間中に創外固定器が脱落したものは，ピン刺入時に大きな穴を開けたためにピンが脱落したか，ピンが平行でなかったために過度な負荷がピン近傍にかかり，骨吸収を生じたためと考えられる．ピン近傍での応力集中による骨吸収と思われる観察例を図9に示す．

以上より，骨リモデリング作用の定量的実験に必要な新生骨組織誘導は骨延長術の応用により実現可能なことが示された．しかし，本研究で実施した骨延長術は，実験の成否が実験者の手技に非常に強く依存するものであった．今後，この実験モデルを確立するには，成功率の高い実験器具と手術手順の開発が必要である．

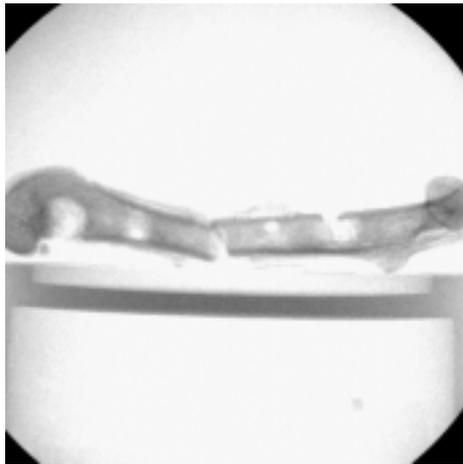


Fig. 9 Bone resorption caused by stress concentration around pin screw

4. 結 言

本研究では力学的骨リモデリングの定量的評価を行うために不可欠な、負荷履歴が明らかな骨組織の形成を行うための基礎実験を行った。

まずフレーム型デバイスを用いて骨内に仕切りを設け、その内部に新生骨組織を誘導する実験を行った。しかしこの方法ではフレーム型デバイスのサイズの縮小化が困難であり、必要以上に骨に欠損を作成しなければならず、骨や生体自体への影響が過大になってしまうことや、逆に骨へ作成する骨欠損の形状を正確に作成することが困難で、デバイスの骨への固定性が確保できないこと等が原因で骨誘導を達成できなかった。

次に、創外固定法を用いた骨延長術を応用した新生骨誘導実験を行った。この方法では、石灰化は確認できなかったものの、仮骨内部にwoven boneの形成が確認できた。これにより本手法による新生骨組織誘導が可能であることが示された。しかし、実験結果が術者の手技に強く依存することから、実験モデルの更なる改良が必要である。

創外固定法を応用した実験手法では、固定器にアクチュエータを組み込むことにより骨に作用する力学的負荷の制御も可能であると考えられる。今後、本手法を改良することにより、従来にない高い定量性を持った実験モデルを構築し、骨の力学的リモデリング作用を定量的に解明できると期待される。

参考文献

(1) 井上四郎他，創外固定法テクニックマニュアル，1993，南江堂

(2) Richards, M., Huibregtse, B.A., Caplan, A.I., Goulet, J.A., Goldstein, S.A., Marrow-derived Progenitor Cell Injections Enhance New Bone Formation during Distraction, J. Orthopaedic Research, Vol. 17, 1999, pp. 900-908.