

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09046

研究課題名(和文) 骨欠損治療に画期的成果をもたらすMasquelet法の理論的裏付けと最適な人工骨

研究課題名(英文) Novel Finding of Masquelet technique in rat femoral critical sized bone model

研究代表者

奥田 貴俊 (OKUDA, TAKATOSHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00348955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：巨大骨欠損に対し、A.C.Masqueletにより提唱された二段階骨再建法(Masquelet法)は臨床において良好な結果が得られている。しかし線維膜についての基礎研究の報告はあるものの骨欠損部の生物学的活性についての報告は少ない。そこでラット大腿骨巨大骨欠損モデルの骨欠損部環境について評価した。その結果、Masquelet法の骨欠損部の間質では、線維膜によって異物反応による炎症性肉芽組織や異物肉芽腫形成が抑えられていた。さらに、サイトカインによる破骨細胞誘導の促進が起こり、骨代謝が活性化することで新生骨置換に有利な環境となっていることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

巨大骨欠損に対するMasquelet法の線維膜や骨欠損部の生物学的な意義については、意見の一致を見ない。今回の研究で線維膜は炎症の進入を防ぎ、骨欠損部に移植した人工骨には炎症反応を起こさないことを明らかにした。

この研究成果は、一期手術で挿入する骨セメントスペーサーの代わりに、テフロン膜で覆った骨欠損部位に多孔質スペーサーを移植し、骨髄線維組織および血管内皮細胞を豊富に含むスペーサーを形成させ、それを二期手術時に自家骨と混合して再移植することでMasquelet法の治療成績を上げることを目的とした基盤研究(C)(21K09285)の貴重な基礎データとなった。

研究成果の概要(英文)：For a critical bone defect, as for two phases of bone reconstruction method (the Masquelet method) proposed by A.C.Masquelet, a good result is provided in clinical practice. However, there were few reports about the biological activity of the bone defect region of clinical practice, in spite of some basic researches about induced membrane. Therefore we evaluated bone defect region environment of the rat critical bone defect model. As a result, in the stroma of the bone defect region of the Masquelet method, the inflammatory granulation tissue and foreign body granuloma formation by the inflammation were controlled by induced membrane. Furthermore, promotion of the osteoclast induction by cytokine leads to bone metabolism activated. It was suggested that the environment of the bone defect region of the Masquelet method was advantageous to subsequently new bone formation.

研究分野：整形外科

キーワード：Masquelet法 induced membrane 人工骨 巨大骨欠損 多核巨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は再生能が高い組織であるが、大きな骨欠損は修復が困難である。実験医学的にも臨床医学的にもクリティカルサイズと表現され、ある大きさ以上の骨欠損は自然治癒が見込めないことが証明されている。しかし、医療現場では大きな骨欠損を有する患者が絶えることはなく、治療法の開発は重要な課題である。自然治癒が見込めない大きさの骨欠損に対する治療の第一選択は自家骨移植である。Masqueletらは自家骨移植するにあたり、一期手術で骨欠損部にスパーサーを入れて線維膜を形成させ、二期手術でスパーサーを除去し、膜の内側に自家骨を充填するという独自の二段階骨再建法を提唱した。この新しい治療法は我が国でも比較的最近導入され、画期的な治療成果が出始めているが、なぜ治療成績がよいかの理論的な裏付け研究は乏しく、不明な点が多い。一期手術で形成させる線維膜中の一部の細胞には骨形成能があることが最近ようやく報告されはじめた状況である(Sagardoy et al, Tissue Eng Part A, 2017; Henrich et al, J Tissue Eng Regen Med, 2016; Gruber et al, Bone Joint Res, 2016; Olli-Matti Aho et al, J Bone Joint Surg Am, 2013)。また、線維膜はセラミック骨ペーストやポリメチルメタクリレート骨セメント等、異なる性質のものでも特に問題なく形成され、一期手術で用いるスパーサーの種類が異なっても、二期手術で自家骨や人工骨を移植する場を提供する線維膜が比較的容易に形成されることを示している。

一方、二期手術で膜の内側の骨欠損部位に充填する自家骨が不足する場合には人工骨を添加する必要があるが、人工骨の添加が予後に及ぼす影響、Masquelet法に最適な人工骨の種類に関する情報は皆無に近く、臨床現場での試行錯誤が続いている。

2. 研究の目的

Masquelet法が優れた治療成績を挙げることができる細胞生物学的な根拠は何なのか、また、人工骨の添加が予後にどのような影響を及ぼすのか、さらに、Masquelet法に最適な人工骨はどのようなものであろうか。これを明らかにすることが本研究課題の核心をなす目的である。本研究は、Masquelet法が炎症の極期を越えた後に二期手術で骨移植することにより、移植骨が炎症性肉芽組織の形成に向かわせる環境内に置かれずに済むことが極めて重要な点であるという独自の仮説をつくり、これを独自の人工骨移植実験を通して証明することを第一の目的として行う。また、Masquelet法の手技を確立するために、人工骨の添加が予後に及ぼす影響に加え、最適な移植人工骨を見いだすことを第二の目的とした。

3. 研究の方法

イソフルランを用いてラットに全身麻酔を施行後、生後14週齢で雄Fischerラットの左側大腿骨骨幹部を5mmの幅で切断し、critical sized bone defectを作成する。骨欠損部は【Stryker社: Variax Hand 1.7mm straight plate】を用いて、近位にスクリュー長6mm、幅1.7mmのロッキングスクリュー2本で固定を行い、遠位は顆部のみ7mm長のロッキングスクリュー1本と、その他のスクリューホールは6mm長ロッキングスクリュー2本の計3本で固定しモデルを作成した。Masquelet群(以下M群)は、欠損部に5mmのポリメタクリル酸メチル(以下PMMA)のセメントスパーサーを挿入後、セメントスパーサーが動かないように皮質骨スクリュー1本追加固定した。初期手術4週後にセメントスパーサーを除去し、我々が独自に開発した直径500 μ m～直径600 μ mの球状顆粒(気孔率70%)で、生体内吸収性を有するハイドロキシアパタイト(以下柱状粒子HA)を用いて、induced membrane内に柱状粒子HA 0.2mgを移植した(図1)。柱状粒子HA移植4週

後にラットを屠殺し、移植部位を摘出して脱灰薄切標本を作成し、修復状態を HE (Hematoxylin Eosin) 染色を用いて組織学的に比較した (N=6)。Control 群 (以下 C 群) は、初期手術で大腿骨骨欠損部に 5mm の Critical sized bone defect を作成し、柱状粒子 HA 0.2 mg 移植した。4 週でラットを屠殺後に、M 群同様に大腿骨移植部位の組織学的評価を行った (N=6)。

検討項目は、図 2 に示す通り 骨断端部周囲、induced membrane 周囲、移植骨中央部の 3 か所における M 群、C 群の両群間の、1: 炎症細胞数の差、2: 血管新生、3: 線維芽細胞の状態について検討を行った。また induced membrane 周囲は、Induced membrane を含まない間質と人工骨の部位で評価を行った。計測方法は、図 2 に示す各々 3 か所において光学顕微鏡 20 倍視野で計測を行い、各々の細胞数 (n) と、間質面積当たりの各々の細胞数の割合 (n/mm^2) を計算した。

4. 研究成果

間質面積当たりの各々の細胞数の割合 (n/mm^2) について示す。

1: 炎症細胞数の差

C 群では、M 群と比較し炎症細胞数が多く、炎症細胞数は 3 か所すべてで有意差を認めた。また、炎症細胞として白血球数よりも全体的にリンパ球が多い印象であった(表 1)。

2: 血管新生

C 群では血管新生は豊富に認めるものの、毛細血管自体は拡張し浮腫状であった(図 3)。M 群では、毛細血管の拡張は認めなかった。

血管数は、M 群で C 群と比較して Induced Membrane 周囲で少なかったが、全体量での差はなく、間質面積当たりの血管数についても有意差はなかった(表 2)。

3: 線維芽細胞数

骨断端周囲の M 群で線維芽細胞が多く、一方 Induced Membrane 周囲で C 群と比較し M 群で線維芽細胞数が少ない印象であったが、全体量として差はなく有意差はなかった(表 3)。

以上より、Masquelet法の骨欠損部の間質では、線維膜によって異物反応による炎症性肉芽組織や異物肉芽腫形成が抑えられていたことが分かった。この成果は次のステップの基盤研究(C) (21K09285) の貴重な基礎データとなった。

図 1

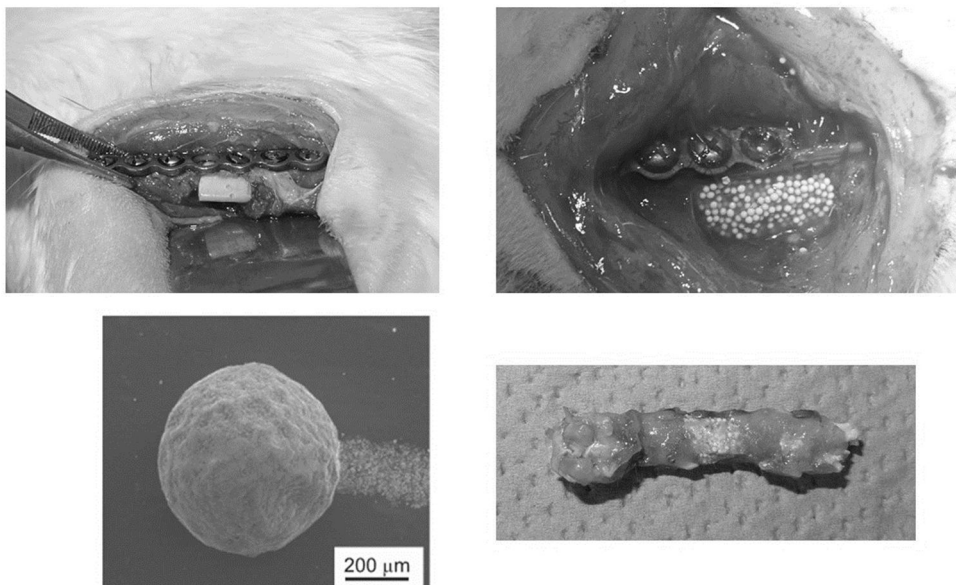
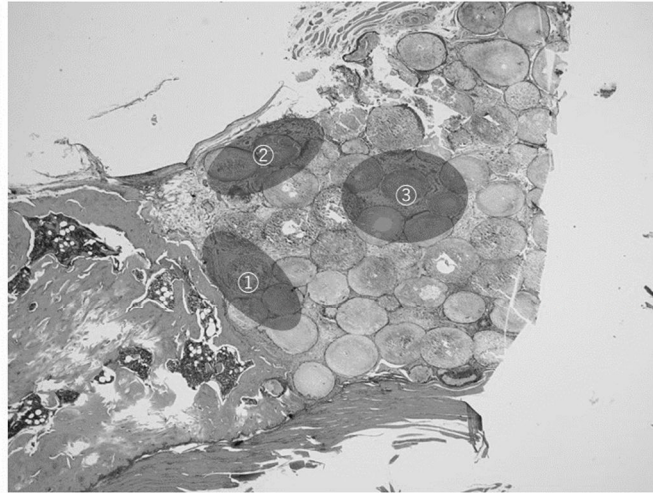


図 2

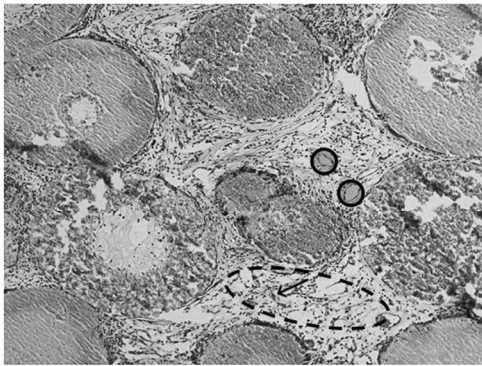


- ① : Induced Membrane周囲
- ② : 骨断端部周囲
- ③ : 移植骨中央部

図 3

Control群

Masquelet群



- ⊖ 線維芽細胞
- 毛細血管
- ← 炎症細胞(白血球,リンパ球)

表 1

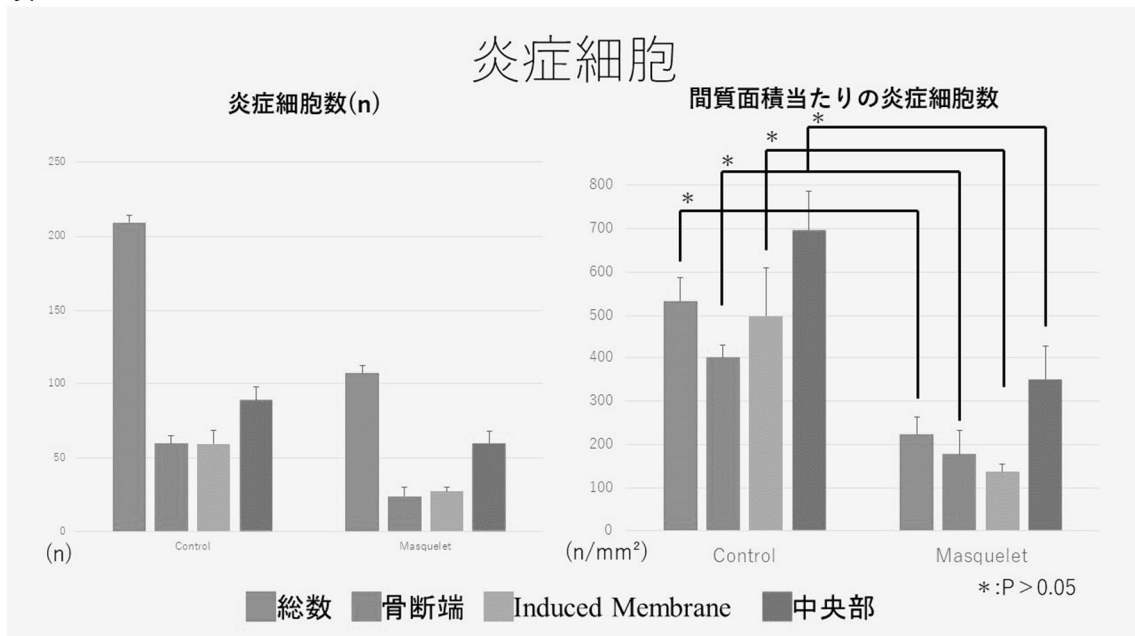


表 2

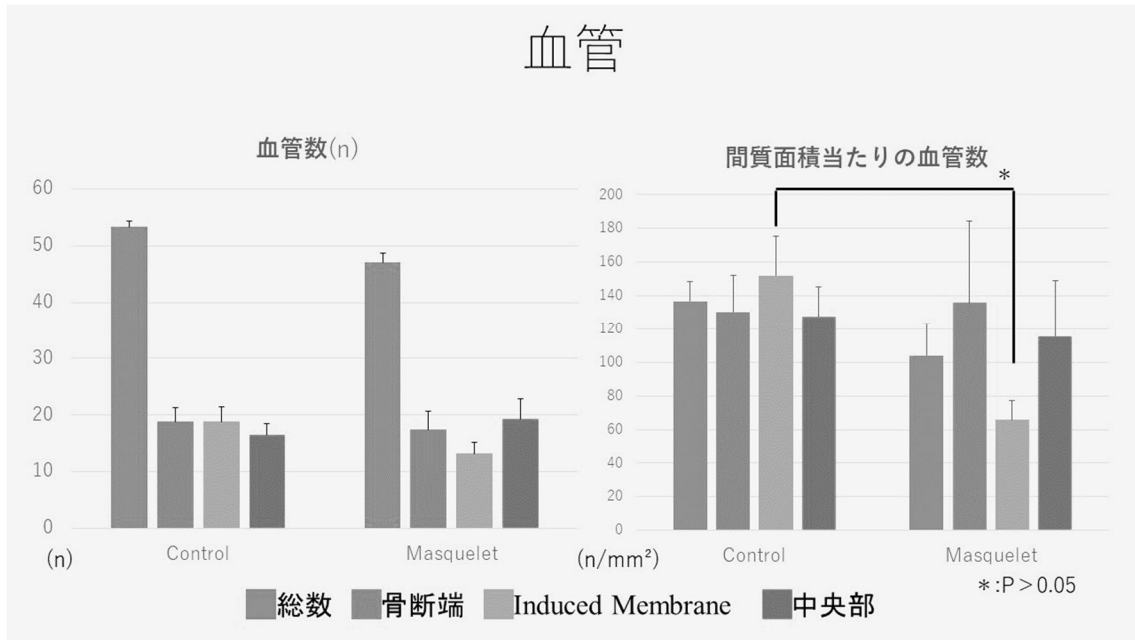
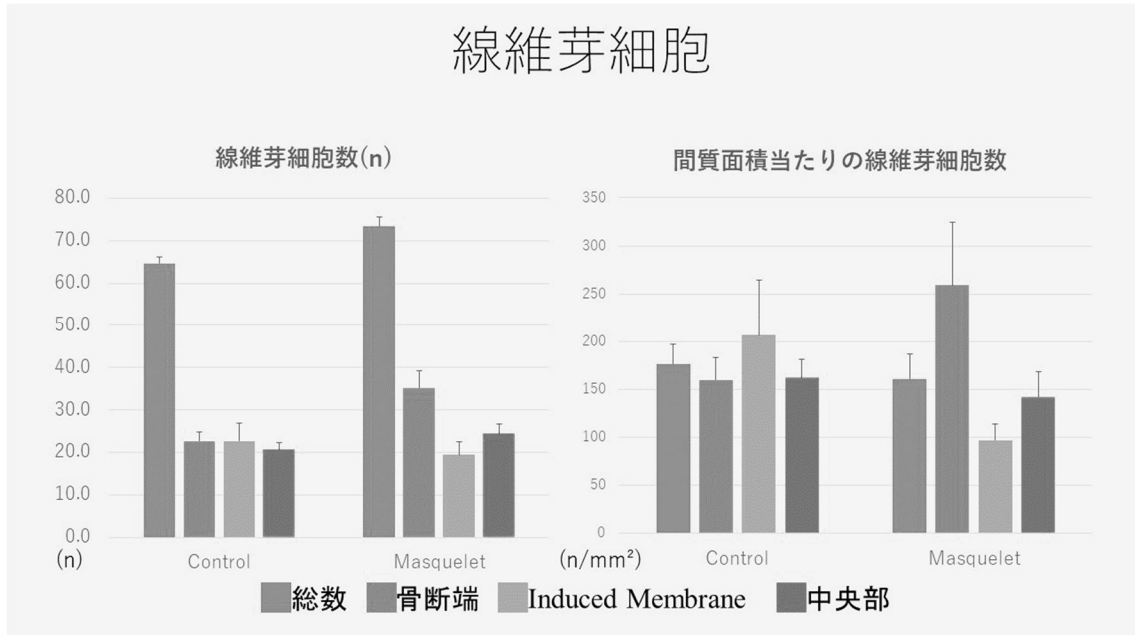


表 3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木雅生、奥田貴俊、池田通	4. 巻 44
2. 論文標題 ラットMasquelet法モデルにおける細胞生物学的な挙動	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 骨折	6. 最初と最後の頁 533 - 537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 ラットMasquelet法モデルにおける細胞生物学的な挙動
3. 学会等名 第46回骨折治療学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 鈴木雅生、奥田貴俊
2. 発表標題 ラット巨大骨欠損モデルにおけるMasquelet法の新知見
3. 学会等名 第47回骨折治療学会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	池田 通 (IKEDA TOHRU) (00211029)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上高原 理暢 (KAMITAKAHARA MASANOBU) (80362854)	東北大学・環境科学研究科・教授 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 雅生 (SUZUKI MASAO)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関