

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16704

研究課題名（和文）高圧処理を施した自家骨移植の有効性の検討

研究課題名（英文）Evaluation of Autogenous Bone Grafting after Devitalization by High Hydrostatic Pressure

研究代表者

新村 和也 (Shinmura, Kazuya)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80622886

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究結果により、高圧処理骨移植は骨癒合が得られる有用な処理方法であることが明らかとなった。骨癒合の時期に関しては、高圧処理群では新鮮自家骨群に比べ、早期での骨癒合率は劣っていたが、長期では同程度の骨癒合率であった。高圧処理が液体窒素処理に比べ優れているということは示せなかったが、すでに臨床使用されている液体窒素処理と同等以上であったという結果からは臨床応用可能な骨癒合能であると考えられた。処理骨の電気顕微鏡による物理学的変性に関する検討においては液体窒素に比べて高圧処理で変性が少ない結果があったことから、力学的特性に関しては液体窒素を上回る可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により骨腫瘍の殺細胞処理の一つとして高圧処理が有用である可能性が示された。さらなる安全性や有効性の検討・研究が必要ではあるが、本研究成果は高圧処理が臨床応用されるために必須となる重要な成果である。既存の処理方法は骨腫瘍のみを対象とするものであったが、高圧処理は皮膚腫瘍に対しても有効性が示されており、皮膚と骨の2つの臓器を扱う全く新しい処理方法である。さらなる検討を進め、骨腫瘍患者に対して有効な治療選択肢となるよう研究を進めていく予定である。

研究成果の概要（英文）：The results of this study show that high hydrostatic pressure (HHP) treated bone grafting is a useful treatment method that can achieve bone fusion. With regard to the time of bone healing, the early bone fusion rate was inferior in the HHP group compared to the fresh autogenous group, but the long-term bone healing rates were comparable. Although the HHP treatment could not be shown to be superior to liquid nitrogen treatment, the fact that it was comparable or superior to liquid nitrogen treatment, which is already in clinical use, suggests that it is clinically applicable. The results of degeneration of the treated bones by electroscope showed less degeneration with the HHP treatment than with liquid nitrogen, suggesting that the mechanical properties may be superior to those of liquid nitrogen.

研究分野：整形外科

キーワード：高圧処理 骨移植 脊椎後側方固定 骨腫瘍 殺細胞処理 処理骨移植 腫瘍不活化

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

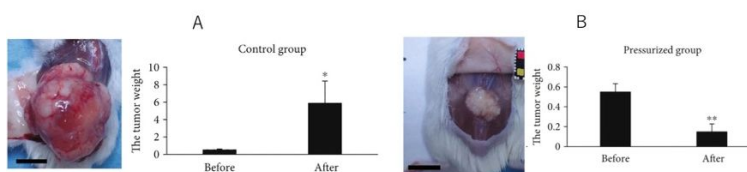
骨腫瘍切除後の広範な骨欠損に対しては、骨移植および強固な内固定によって生物学的・力学的な再建が必要である。骨腫瘍切除後の再建材料として、切除した骨腫瘍を殺細胞処理し使用することは、別部位からの正常自家骨採取が不要となるため低侵襲であり、採骨部合併症を回避できるなどのメリットがある。従来、腫瘍組織の処理方法には温熱処理や放射線処理が用いられてきたが、骨折・骨吸収・感染などの合併症が問題であった。

当教室では四肢・骨盤の悪性腫瘍に対して、摘出腫瘍骨を液体窒素に浸して殺細胞処理し再建に利用するという自家液体窒素処理骨移植を開発し、良好な臨床成績を報告しており(Tsuchiya H, et al. 2005)、2020年に保険収載されるに至った。また、当教室では脊椎悪性腫瘍に対する腫瘍脊椎骨全摘術においても液体窒素処理を応用しており、良好な成績を報告している(Murakami H, et al. 2014)。液体窒素処理による腫瘍凍結免疫効果により、がんに対する特異的細胞性免疫活性が上昇することが証明されており(Murakami H, et al. 2014)、局所治療のみならず全身の治療効果も期待される。しかし、液体窒素処理自家骨を使用した腫瘍脊椎骨全摘術では、新鮮自家骨に比べ骨癒合遅延が生じることが動物実験や臨床例で確認されている(Shinmura K, et al. 2018, Shinmura K, et al. 2020)。骨癒合遅延によって固定金属折損などの implant failure をきたし再手術を余儀なくされる症例も少なくなく、より早期に骨癒合が獲得できる処理方法が待ち望まれている。

近年、骨腫瘍・皮膚腫瘍における新たな処理方法として、力学的強度や細胞外蛋白を損なうことなく腫瘍死が得られる“高圧処理”が注目されている。高圧処理は食品加工の分野で一般に使用されている安全な処理方法であるが、これまで医療分野での応用はなかった。形成外科領域において腫瘍組織処理を用途とした高圧処理機が開発製作され、2000気圧(200MPa)・10分間の加圧で腫瘍死が得られると報告している(Mitsui T, et al. 2020)。また、実際にマウスを用いた扁平上皮癌モデルにおいても、高圧処理で腫瘍が縮小することが確認されている(Mitsui T, et al. 2020)(図1)。さらには、200MPaの高圧処理はがんに対する免疫活性効果を高めることも報告されており、がん免疫による全身の治療効果も期待されている。

一方、骨腫瘍の分野では、高圧処理は腫瘍死が得られるだけでなく、細胞外蛋白を損傷しない処理方法であるため、骨形成・骨誘導に有利に働くと考えられる。しかしながら、高圧処理を施した骨組織を骨移植に利用し、骨癒合が得られるかを検討した報告は腫瘍骨のみならず、正常骨組織においても皆無であった。

図1. 扁平上皮癌モデルマウスによる高圧処理の治療効果



扁平上皮癌組織をマウス背部皮下に移植し、移植後5週で腫瘍サイズを測定
A) 未処理群：腫瘍サイズは有意に増大 B) 高圧群：腫瘍サイズは有意に縮小

2. 研究の目的

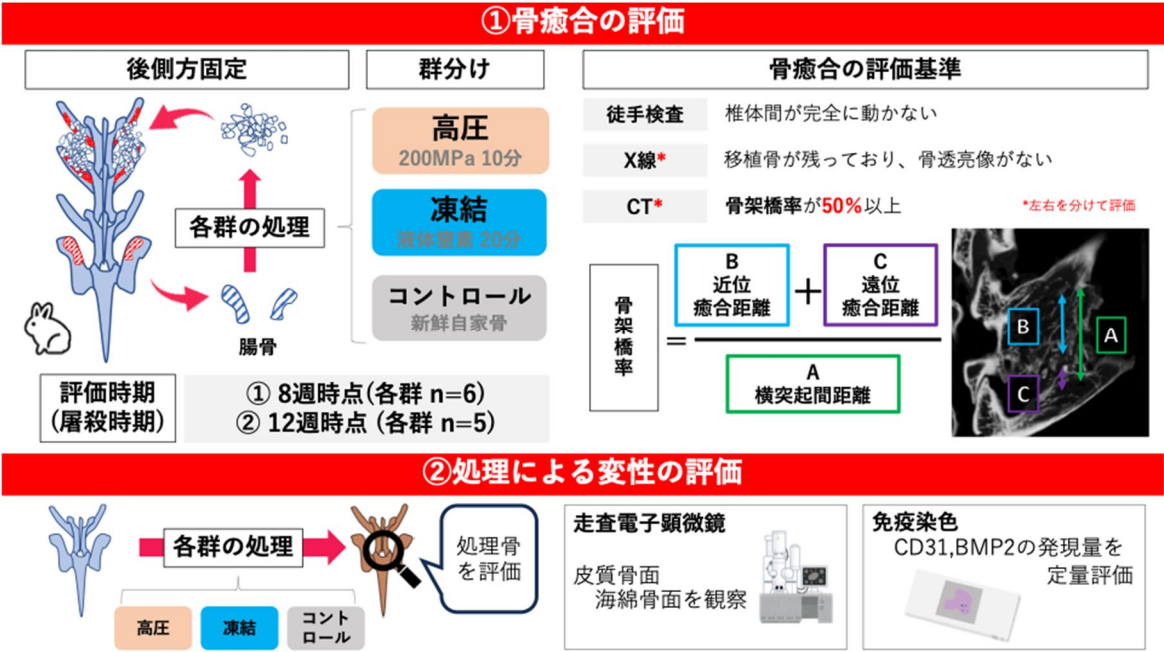
本研究は、動物モデルにおいて自家高圧処理骨移植で骨癒合が得られるかを検討することを目的とする。また、高圧処理自家骨の骨癒合の時期に関して、新鮮自家骨および液体窒素処理自家骨と比較検討を行う。高圧処理を行なった自家骨の物理的変性や骨関連因子の変性の有無について免疫学的な検討を行い、移植骨としての適性も評価する。自家高圧処理骨移植の骨癒合に関する in vivo の検討は皆無であり、本実験が初めての報告となる。自家高圧処理骨移植の骨癒合獲得への有効性が明らかになれば、骨腫瘍に対する新たな処理方法として臨床応用への可能性が高まることとなる。

3. 研究の方法

日本白色家兔の自家骨処理方法を3群に分け、脊椎後側方固定(L5/6)を施行した。群分けは高圧群(P群)、液体窒素群(F群)、新鮮自家骨群(C群)とした。術後8週で各群6羽、術後12週で各群5羽を屠殺し、骨癒合について徒手検査・単純X線・CTで評価した。骨癒合の基準は徒手検査では椎体間が全く動かないもの、単純X線では骨塊が残存し骨透亮像が無いもの、CTでは横突起間の骨性架橋の連続性が50%以上のものとした。単純X線、CTでの骨癒合評価では左右を分けて評価した。それぞれの評価基準における骨癒合率についてカイ2乗検定を行い、有意差があったものは残差分析にて高値、低値の群を算出した。CTの架橋率に関してはクルスカールウォリス検定を用いて検討した。また、各群の移植前の骨に対してCD31、BMP2の発現量を免疫染色で評価した。CD31に関しては40倍でランダム5視野を観察し、染色された面積を自動カウントした。BMP2に関しては120倍ランダム5視野にて陽性細胞の数をカウントした。さらには物理的変性の有無について皮質骨面と海綿骨面に分けて走査電子顕微鏡(SEM)で観察し、新鮮自家骨に対する変性程度を3段階評価(0変性なし、1やや変性あり、2変性あり)した。(図2)

統計処理はSPSS version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)を用いて、有意確率 5%未満を有意とした。

図 2. 骨癒合、処理による変性に関する評価方法



4. 研究成果

<結果>

8週モデルの骨癒合率は、徒手検査でP群0%、F群0%、C群83.3%、X線検査でP群91.7%、F群75%、C群100%、CT検査でP群33.3%、F群16.7%、C群91.7%であった。3群間の残差分析の結果、CTでの骨癒合率はC群で有意に高く、F群で低かった。12週モデルの骨癒合率はCTでP群70%、F群80%、C群90%であり、3群間に有意差はなかった。(図3)

免疫染色におけるBMP2の発現はF群に比べP群で多い傾向であったが有意差はなかった。SEMでは皮質骨ではP群、F群ともに変性所見はなかったが、海綿骨ではP群において、F群よりも変性が少なかった。(図4)

図 3. 骨癒合評価の結果

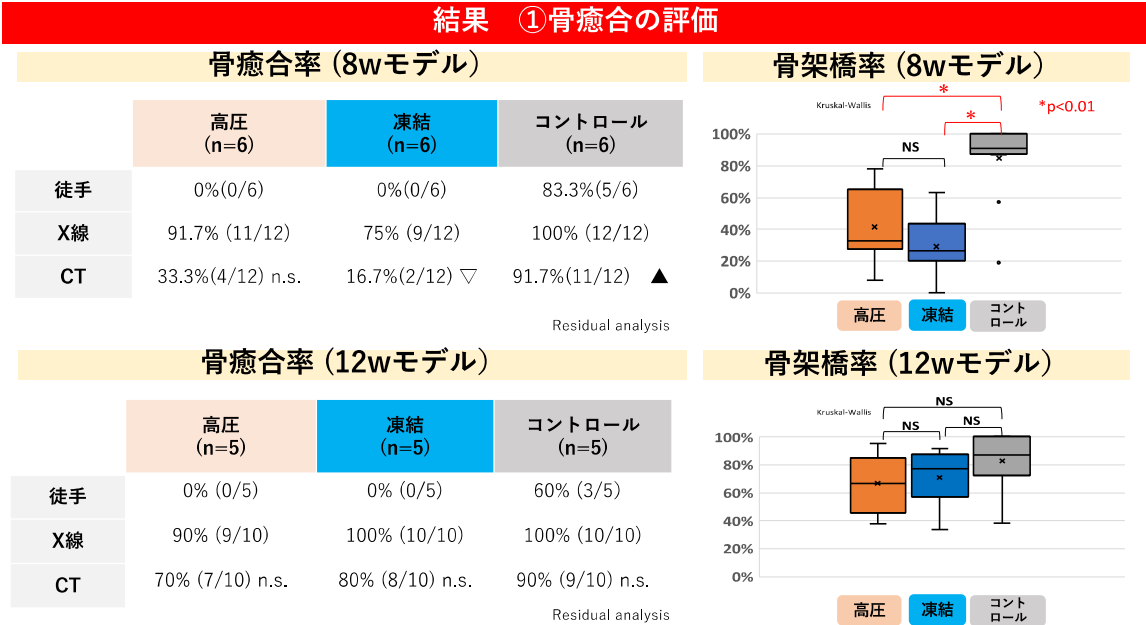
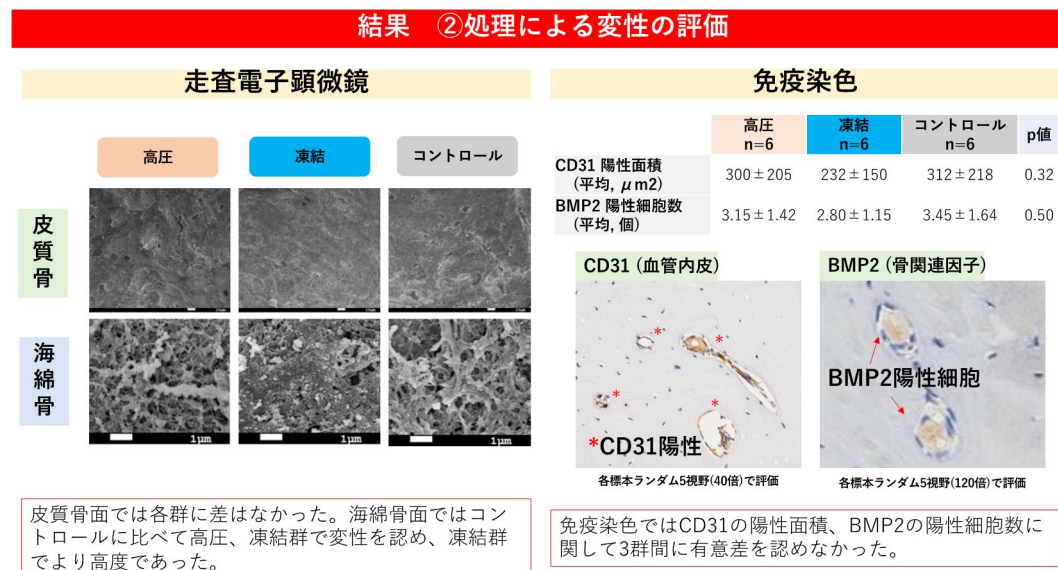


図 4. 変性評価の結果



<考察>

今回の結果から、高圧処理自家骨移植で骨癒合が得られることが生体内で初めて確認された。これは高圧処理が殺細胞処理として骨腫瘍分野に応用するにあたり、非常に重要な成果である。

また、液体窒素との比較においては明らかな優位性を示すことが出来なかったが、8週時点でのCTでの骨癒合がやや優れているという結果からは液体窒素処理骨に比べるとやや早い時期で骨癒合が得られる可能性が示唆された。8週時点では新鮮自家骨に劣る結果ではあったが、12週では新鮮自家骨に劣らず、すでに臨床応用されている液体窒素とも同等であったことから骨癒合評価の上では臨床応用に値する結果であったと考えている。また、走査電子顕微鏡における検討では高圧処理では物理的変性が少ない可能性が示唆された。物理的変性が少ないことは骨細胞などの細胞遊走に有利に働くとされ、さらには力学的に正常骨組織と同等の強度を維持している可能性が示唆される。今後の検討課題として、液体窒素に比べて早期に骨癒合が得られるのかという点に関しては個体数を増やし、屠殺時期を細かく分けた検討が必要と考える。また、力学的試験により実際の力学的強度に差があるかも検討すべき課題である。免疫染色においては新鮮自家骨と高圧処理骨、液体窒素処理骨の間で明らかな差は見られなかったが、BMP2などの活性などを見ることで骨癒合カスケードに処理方法が影響するか検討するアプローチも試みるべきであると考えている。

高圧処理は既存の処理方法と同等以上の骨癒合率であり、処理による変性が少ないことから理想的な処理方法である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山田遥平，出村諭，新村和也，森本尚樹，土屋弘行
2. 発表標題 新たな殺細胞処理である高圧処理は自家骨移植に有用か
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田遥平，出村諭，新村和也，森本尚樹，土屋弘行
2. 発表標題 Bone healing after autogenous bone grafting using ‘ high hydrostatic pressure ’ in posterolateral spinal fusion of rabbit
3. 学会等名 International Society of Limb Salvage（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田遥平，出村諭，新村和也，森本尚樹，土屋弘行
2. 発表標題 ウサギ脊椎固定モデルを用いた「自家高圧処理骨移植」の有用性の検討
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田遥平，出村諭，新村和也，森本尚樹，土屋弘行
2. 発表標題 Bone healing after autogenous bone grafting using ‘ high hydrostatic pressure ’ in posterolateral spinal fusion model
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田遼平, 出村論, 新村和也, 森本尚樹, 土屋弘行
2. 発表標題 新たな腫瘍処理方法である「高圧処理」を施した自家骨の骨癒合に関する検討
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田遼平, 出村論, 新村和也, 森本尚樹, 土屋弘行
2. 発表標題 ウサギ脊椎後側方固定モデルを用いた「自家高圧処理骨移植」の有用性の検討
3. 学会等名 日本脊椎脊髓病学会
4. 発表年 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------