

# 骨膜・吸収性ポリマー (poly (L-lactide- $\epsilon$ -caprolactone)) を用いた骨再生とイヌ眼窩床骨折モデルへの応用

草田 朗子

近畿大学医学部形成外科学教室

## 抄 録

本研究では、吸収性ポリマーである poly (L-lactide- $\epsilon$ -caprolactone) 50:50共重合体を用いて、骨再生を試みた。さらに、実験的に作成したイヌ眼窩床骨折モデルに吸収性ポリマーを導入して、その有用性について検討した。実験1では、ウシ橈骨より採取した骨膜を、ポリマーに付加して骨膜・ポリマー複合体を作成した。複合体をヌードマウス背部皮下に移植し、移植後5および11週目で標本を摘出した。その結果、骨膜・ポリマー複合体より、正常ウシ眼窩底骨とほぼ同等の力学特性を有する新生骨組織が再生誘導された。次に実験2では、本法を臨床応用する立場から、イヌ眼窩床骨折モデルを作成し、骨膜・ポリマー複合体を眼窩骨欠損部へ移植した。骨欠損部に再生誘導された新生骨組織を組織学的検索およびマイクロCTを用いて、骨構造解析を行った。その結果、骨膜・ポリマー複合体より、骨組織が再生された。再生骨組織は、正常骨組織と同様な組織構造を示した。骨膜を吸収性ポリマーと複合化する方法は、今後、眼窩床骨折の新たな治療法の一つとなりうることが示唆された。

**Key words:** 眼窩床骨折, 骨膜, 吸収性ポリマー

## 緒 言

眼窩は、前頭骨・頬骨・上顎骨など7個の骨から構成され、その形状は、変形した四角錐の窪みを呈する。眼窩縁と上壁、外側壁は厚く丈夫にできているが、内側壁と下壁は紙のように薄い骨で副鼻腔と境されている。

外傷による眼窩床骨折 (吹き抜け骨折, Blowout fracture) は、顔面の前方より眼窩に対して強い直達外力が加わることによって、脆弱な眼窩の内側壁と下壁が骨折して骨欠損を生ずる。この部位に、眼窩内容が逸脱するため、眼球陥凹や眼球運動障害を呈する<sup>1,2</sup>。このため骨欠損に対する再建は必須であり、再建手術では、複雑な眼窩形状を再構築するための骨補填材が必須となる。

形成外科においては、眼窩床骨折の骨欠損部に対する骨補填材として、これまで抗原性がなく、骨伝導能を有する自家骨が多用されてきた。しかし、ドナーの犠牲、骨採取時の煩雑さ、侵襲(疼痛、瘢痕、出血)の大きさ、眼窩領域の複雑な形状の再現性に限界があるなどの問題点<sup>3</sup>から、自家骨の代わりに

金属材料<sup>4</sup>(チタン)、高分子材料<sup>5,6,7,8</sup>(シリコン、ポリエチレン、生体ガラス)、セラミックス<sup>9</sup>(アパタイト)などのさまざまな人工材料が臨床試用されてきた。一方、これらの人工材料を眼窩床骨折の骨欠損部に用いた場合、副鼻腔に露出すると感染の可能性が著しく高くなり、非吸収性であるため、異物反応が生じ、組織親和性が不良なため移植後の変位・突出が生ずることなど、数多くの欠点が報告されている<sup>10,11</sup>。

自家骨および人工材料に代わって、近年、組織内でバリアーとして働き、分解されるまでの期間に骨再生を可能とする吸収性高分子が開発され注目されている。なかでも、poly (L-lactide- $\epsilon$ -caprolactone) (以下 P(LA/CL)と略す)は、poly L-lactide (PLA) と poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) の2種類のモノマーを重合した吸収性の共重合体であり、内部がスポンジ様構造のため、すばやく組織が入り込み、広範囲な血管侵入により感染に強い利点を有している<sup>12,13</sup>。また、炎症反応が少なく組織適合性に優れ、操作性が高いため複雑な形状を有する眼窩壁へ3次元的に良好に組み込まれると考えられる。

そこで本研究では、吸収性ポリマーである P(LA/CL) シートにウシ橈骨骨膜を付加してヌードマウスに移植し、骨再生の可能性を検討した。さらに、実験的イヌ眼窩床骨折モデルを用いて自家骨膜・吸収性ポリマーによる骨再生を試み、本法の臨床応用への可能性について検討した。

### 方法と材料

#### 吸収性ポリマー

吸収性ポリマーの作成においては、あらかじめ準備した円盤状の鋳型(直径16 mm, 厚さ0.3 mm)にポリマー溶液(5% (w/w) 1,4-dioxane および P(LA/CL) 50:50を泡立てないように駒込ピペットにて注入した。ポリマーを注入した鋳型を $-40^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫へ移し、1時間静置した。次に、ポリマーを鋳型より取り出し、40 Pa,  $-40^{\circ}\text{C}$ , 12時間の条件下に凍結乾燥(TF10-80ATA, 宝製作所, 東京)処理した。最後に真空乾燥( $60^{\circ}\text{C}$ , 12時間)にてモノマーおよび溶媒の除去を行い、円盤状ポリマーを作成した。作成したポリマーは、分子量367000, ポリマーの内部はスポンジ構造を有し、気孔径 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ , 空隙率95%, 生体内での分解速度は4~6ヶ月となるように調整した(図1)。

実験1:ヌードマウスを用いた骨再生の検討  
実験動物

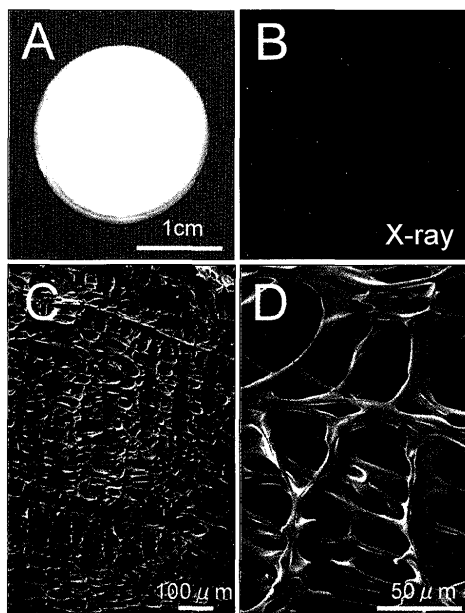


図1 吸収性 P(LA/CL) ポリマーとその構造。  
A. 全体像。直径16 mm, 厚さ0.3 mm。  
B. 単純X線写真像。ポリマーのみを撮影した。図1 Aと同位置にポリマーがあるが、ポリマーのみではX線写真には写らない。  
C, D. 走査電顕像。吸収性ポリマーは、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の小孔を有している。

実験動物は、BALB/cAJcl ヌードマウス(6週齢, 雄, 平均体重28 g, 60匹, 日本クレア株式会社, 静岡)を用いた。飼育は、クリーンラック内で室温 $22^{\circ}\text{C}$ , 湿度50%, 12時間明暗サイクルの条件下に行った。飼料は、放射線(3 mGy)にて滅菌された固形飼料を与え、試料用水は制限なく与えた。

#### 実験方法

ウシの橈骨骨幹部より、 $16\times 16\ \text{mm}$ の骨膜組織を採取した。採取した骨膜は、骨形成層を吸収性ポリマー P(LA/CL), 直径16 mm, 厚さ0.3 mm, 円盤状)と直接密着させるようにして吸収糸(5-0 Vicryl, Ethicon, Somerville, NJ)を用いて縫合固定した。作成したポリマー・骨膜複合体を、ヌードマウスの背部皮下に移植した。移植操作では、まず、硫酸アトロピン(硫酸アトロピン注射液, 0.04 mg/kg, 田辺製薬株式会社, 大阪)を皮下注射し、15分後イソフルラン(フォーレン, アボットジャパン株式会社, 東京)にて導入および吸入麻酔を行った。次に、ヌードマウスの背部をポピドンヨード(イソジン, 明治製薬株式会社, 東京)にて消毒し、約2 cmの皮膚切開を加えた。皮下を剝離して形成した皮下ポケット内に複合体を挿入し、5-0ナイロン縫合糸(SIGMA REX, 長門石器械店, 東京)を用いて閉創した(図2上)。

実験群(骨膜・ポリマー複合体,  $n=30$ ), およびコントロール群(ポリマーのみ,  $n=30$ )の2群を作成した。円盤状組織の標本採取は、移植後5週目( $n=6$ ), 11週目( $n=6$ )に行い、採取組織の肉眼的形状およびサイズ(直径・厚さ), 単純X線写真所見, 組織学的変化, 分子生物学的解析について検討した。さらにメカニカルテストを行い、力学的解析を加えた。メカニカルテストには、別途移植した骨膜・ポリマー複合体およびポリマーを5週目( $n=6$ ), 11週目( $n=6$ ), 20週目( $n=6$ )に摘出して、ウシ眼窩底より採取した正常骨に力学的解析を加え、実験群およびコントロール群と比較検討した。

単純X線写真撮影は、軟X線発生装置(SOFRON, TRS-1005, 東京)を用いて、40 kV, 2.5 mA, 90秒の条件下にて撮影し、全ての標本における石灰化を観察した。

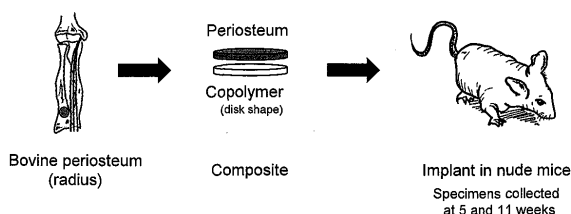
円盤状の採取組織は半切し、一方を組織学的検索に、他方をPCRによる分子生物学的解析に用いた。組織学的検索では、採取組織を10%中性ホルマリンにて浸漬固定し、エタノール系列により脱水した後、パラフィン切片(厚さ $4\ \mu\text{m}$ )を作成した。切片には、一般的な組織構成およびメタクロマジーを調べるために Toluidine blue 染色, プロテオグリカンを調べるために Safranin O 染色, 石灰化の有無および範

困を調べるために von Kossa 染色を施した。

分子生物学的解析では、RT-PCR 法を用いて、オステオカルシン、オステオポンチン、1型コラーゲンの遺伝子発現について検討した。さらに遺伝子の発現量を、画像処理解析ソフト NIH image (Scion Corporation, Washington, D.C.) を用いて、数値化して、オステオカルシン、オステオポンチン、1型コラーゲンの相対的な量的比較を行った。定量解析のため、多くの細胞でほぼ一定に含まれると予想される遺伝子を対照 RNA として量的比較を行った。ハウスキーピング遺伝子の一つであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いた。RNA を diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に溶解し、紫外可視分光光度計 (Eppendorf Biophotometer, Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY) を用いて測定を行った。抽出した RNA 1  $\mu$ g に対して 5 $\times$  reaction buffer (4  $\mu$ l), 25 mM 塩化マグネシウム (2.5  $\mu$ l), dithiothreitol (DTT, 2  $\mu$ l), RNase inhibitor (20 unit, 0.5  $\mu$ l), random hexamers (1  $\mu$ l), oligo dT primer (1  $\mu$ l), 10 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP, 2  $\mu$ l) を加えた。各サンプルを 2 チューブずつ用意し、一方に multiscribe reverse transcriptase (50 unit/ $\mu$ l, 1  $\mu$

l) を加え、もう一方は DEPC 処理水を加え minus RT とし、コントロールとした。RT-PCR 法では、サンプルに AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster, CA), 0.2 mM dNTP, 0.67  $\mu$ M のプライマーを加えて総量 30  $\mu$ l に調整した。PCR 装置は、Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystem) を使用し、PCR 産物を 3.5% アガロースゲルに入れ、100V, 30分の条件下に電気泳動 (Mupid-21, アドバンス, 東京) を行った。さらに、SYBR gold (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) 核酸染色にて各 DNA バンドを確認した。また、Real time RT-PCR 法では、サンプルに SYBR green master mix (Molecular Probes, Inc) と 0.3  $\mu$ M のプライマーを加えて総量 30  $\mu$ l に調整した。PCR 装置は、AMI Prism 7700 Sequence detector (Applied Biosystems) を使用し、各サンプルの Threshold cycle (Ct) 値を求めた。 $\Delta$  Ct = (オステオカルシンまたはオステオポンチンまたは I 型コラーゲン) - (対照 RNA の Ct 値) とし、 $\Delta$  Ct 値を相対的に比較した。また、v.IObI (Applied Biosystems) を用いて dissociation curve を作成し、PCR 産物の融解温度と PCR 産物が純水であることを確認した。PCR の条件は、逆転写 37°C で 1 時

#### Experiment 1. Nude mouse model



#### Experiment 2. Canine autologous model

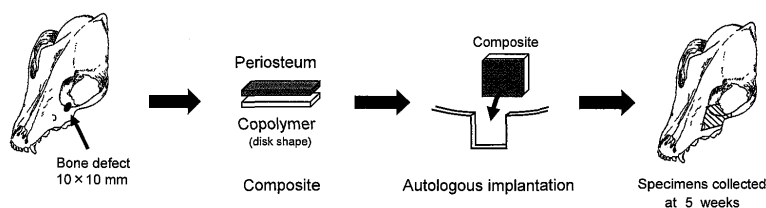


図2 実験プロトコール  
(上) 実験1 (ヌードマウスを用いた骨再生の検討) プロトコールを示した。  
(下) 実験2 (イヌ眼窩床骨折モデルにおける骨膜・吸収性ポリマーの有用性) プロトコールを示した。

表1 Primer sequences

Gene	Primer forward	Primer reverse
COLLAGEN (type 1)	5' AAACAAGCCATCTC GCCTGC 3'	5' CAATCCTTCTCCTC TTTTGCCACA 3'
OSTEOCALCIN	5' CAGCGAGGTGGTGA AGAGACTC 3'	5' GGAAGCCGATGTGG TCAGC 3'
OSTEOPONTIN	5' ATTGCCTCCGCCCT TCCAGTTA 3'	5' CAGAATGGTGAGAC TCGTCGGAATG 3'
GAPDH	5' GAGATCCTGCCAAC ATCAAGTG 3'	5' CCAGCCTTCTCCAT GGTAGTG 3'

間、変性95°Cで15秒、アニーリング60°Cで30秒、伸長反応を72°Cで2分を1サイクルとして、40サイクル行った。また、使用したプライマーを表1に示す。

メカニカルテストは、Instron series 5565 (Instron corporation, Canton, MA)を用いて静的三点曲げ試験<sup>14</sup>を行った。標本は、移植後5, 11, 20週目に採取した。摘出標本は、下部2点で支持し、クロスヘッドスピード2.0 mm/分にて、圧縮荷重1 Nを上部中央から負荷した際の荷重応答を連続10回測定して、標本の粘弾性を検討した。実験中、試料の乾燥を防止するために生理食塩水を滴下した。

実験2：イヌ眼窩床骨折モデルにおける骨膜・吸収性ポリマーの有用性

#### 実験動物

実験動物はイヌ（ビーグル、12～16週齢、雌、平均体重5.6 Kg、12匹、株式会社薬研ファーム、兵庫）を用いた。飼育は、個別ゲージ内で室温23°C、湿度50%、12時間明暗サイクルの条件下で行い、飼料は、飼育繁殖固形飼料 CD55 $\alpha$ （日本クレア株式会社、東京）を1日1回約300 g与え、飲料用水は制限なく与えた。

#### 実験方法

入眠導入を塩酸ケタミン（ケタラル、15 mg/kg、三共株式会社、東京）の殿部筋肉注射にて行い、次に、ペントバルビタール（ネプタール、25 mg/kg、大日本製薬株式会社、大阪）を用いて静脈麻酔を行った。骨欠損は、左側に作成した。眼窩周囲を剃毛後、ポピドンヨード（イソジン、明治製薬株式会社、東京）にて消毒し、切開部に沿って10万倍希釈エピネフリン添加塩酸リドカイン（エピレナミン含有キシロカイン1% E、アストラゼネカ株式会社、大阪）で局所麻酔を行い、眼窩下縁から外嘴部外側まで皮膚切開を加えた。眼輪筋を電気メスで切開して骨膜まで到達し、眼窩前縁を露出させた。骨欠損作成部分の骨膜を剝離し切除した後、リュウエルを用いて全層性の骨欠損（大きさ10×10 mm）を作成した（図2下）。

実験群（骨膜・ポリマー複合体、n=6）、およびコントロール群（ポリマーのみ、n=6）の2群を作成した。骨膜・ポリマー複合体移植群では、自家脛骨前面より骨膜を採取し、骨形成層（Cambium layer）をポリマーと密着させ、5-0ナイロン糸（SIGMA REX、長門石器械店、東京）で縫合固定した。その後、ポリマー・骨膜複合体を、骨欠損部分に挿入、移植した。骨膜・ポリマー複合体は、周囲の残存骨膜と4-0ナイロン糸で縫合固定した。次に、眼輪筋を4-0ナイロン糸で縫合した後、4-0ナイロン糸で閉鎖した。術後5週目に標本採取を行い、骨欠損作成時

と同様の方法にて入眠導入後、1モル塩化カリウム液（KCL、20 mEq、清水製薬株式会社、静岡）を静脈内注射して屠殺した。標本は、骨欠損を作成した左側、および正常骨として右側の両側から摘出した。実験1と同様の条件下で単純X線写真を撮影し、石灰化像を検討した。さらにマイクロCT（Scan Xmate-A090S、コムスキャンテクノ社、横浜）を用いて62 kV、10  $\mu$ A、スライス厚51.84  $\mu$ mの条件下にて標本を撮影し、骨構造解析を行った。マイクロCTにより得られた画像データは、骨梁構造解析ソフトLuzex-F（株式会社ニレコ、東京）を用いて解析し、欠損部における新生骨の微細構造（特に骨梁を中心として）を観察し、正常骨構造と比較検討した<sup>15</sup>。（コントロール群では、明らかな新生骨は認められず、比較対照とならなかったため健側の正常骨組織を対照として比較検討した。）次に、70%エタノールにて摘出標本を浸漬固定し、MMA（Methylmethacrylate）樹脂ブロックを作成した。Saw microtome SP1600（ライカマイクロシステムズ株式会社、東京）を用いて前額断切片（厚さ30  $\mu$ m）を作成し、Toluidine blue染色を施した。

#### 統計処理

実験1では、円盤状組織（n=6）の4ヶ所を無作為に設定して直径および厚さを求め、平均値と標準偏差を算出した。メカニカルテストにおいては、各回数ずつに有意差検定を行った。実験2では、マイクロCTを用いた骨構造解析を行い、新生骨組織が認められる領域において3ヶ所を無作為に選択し、骨量（Trabecular bone volume）、骨梁幅（Trabecular thickness）、骨梁数（Trabecular number）、骨梁間隙（Trabecular separation）を求め、その平均値と標準偏差を算出した。分散検定はKruskal-Wallis testを行い、続いてScheffe's F testによる多重比較検定を用いて統計学的有意差を検討した。

## 結 果

実験1：ヌードマウスを用いた骨再生  
肉眼所見と単純X線写真による石灰化像

摘出標本の肉眼的所見において、コントロール群は円盤状で扁平な形態を示した。一方、骨膜・ポリマー複合体群は、辺縁が不均一で、やや肥厚していた。単純X線写真では、骨膜・ポリマー複合体群にて、経時的な石灰化の増加が認められ、5週目において不均一に認められた石灰化像は、11週目ではより均一な分布を示していた。コントロール群においては、石灰化像は認められなかった（図3）。摘出組織の直径および厚さの変化を検討した。その結果、

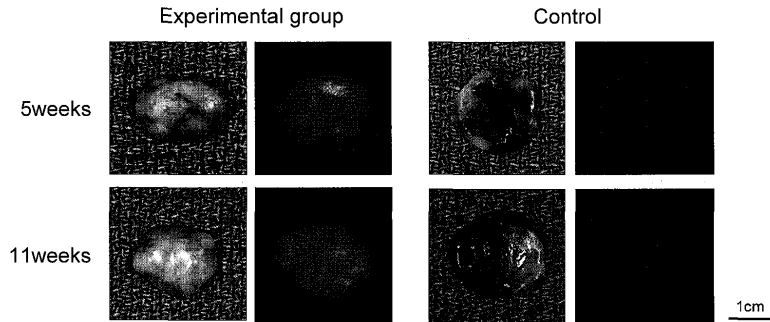


図3 ノードマウス皮下移植後5週目および11週目における摘出標本の肉眼的所と単純X線写真像。骨膜・ポリマー複合体群の摘出標本は厚さが増加し、標本内部において石灰化像が認められた。移植期間が長期になると、厚さは変化しないが、石灰化像は均一となっていた。コントロール群では、厚さの増加傾向や石灰化像は認められなかった。

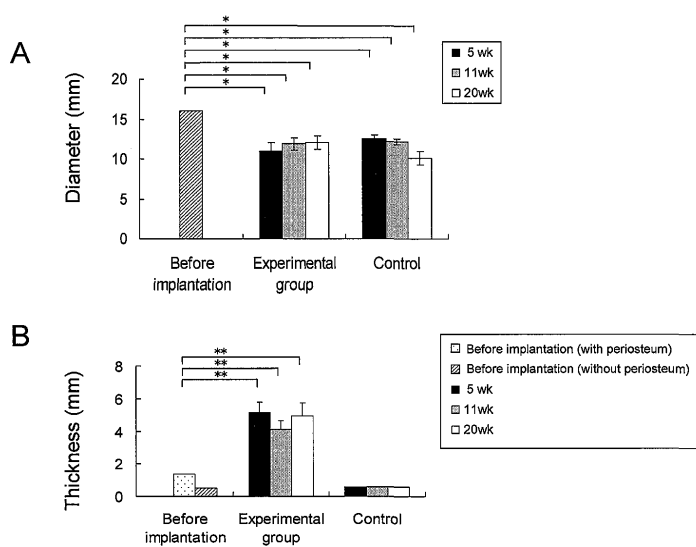


図4 新生骨組織における直径および厚さの変化

移植後5, 11, 20週目における骨膜・ポリマー複合体群およびコントロール群の直径および厚さの変化を検討した。直径は、両群ともに有意な減少を認めた ( $p < 0.05$ )。厚さは、実験群において有意な増加を認めた ( $p < 0.01$ )。グラフの値は、平均値±標準偏差で示す ( $n=6$ )。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

骨膜・ポリマー複合体群においては、5週目において厚さが有意に増加していることが判明した ( $p < 0.01$ )。しかし、5週目以降には、それ以上の有意な厚さの増加は認められなかった。直径に関しては、5週目で有意に減少 ( $p < 0.05$ ) していたが、5週目以降ではそれ以上の変化は認めなかった。コントロール群では、厚さの変化は認められず、直径は減少していた (図4)。

#### 組織学的所見

骨膜・ポリマー複合体群では、移植後5週目において、不均一な骨梁形成 (von Kossa 染色) が認められた (図5)。11週目では、Safranin O 染色によって赤く染まるプロテオグリカンが認められ、von Kossa 染色によって陽性に染色される領域は拡大していた。また、骨梁幅は増大し、著しく増加した骨梁形成が認められた。この結果、骨膜・ポリマー複合体群では、内軟骨性骨化の過程を経て骨新生が生じていることが判明した (図6)。コントロール群では、5週目、11週目の標本は、ともに骨形成像は

認められず、経時的に、中心部からポリマーの構造が崩れ、空隙領域が増加し、菲薄化していた。分子生物学的解析

RT-PCR法を用いて骨関連マーカーであるオステオカルシン、オステオポンチン、1型コラーゲンの遺伝子発現を検討した。その結果、骨膜・ポリマー複合体群において、使用した骨関連マーカー全てに発現を認めた。特に、オステオカルシン、1型コラーゲンの遺伝子発現は、経時的に増強する傾向を示し、骨膜・ポリマー複合体群において骨新生が生じていることが示された。一方、コントロール群では、骨関連マーカーの遺伝子発現は認められなかった (図7)。

#### 力学試験

Instronを用いて、標本の粘弾特性を検討した。その結果、コントロール群では、標本に圧縮荷重をかけても荷重応答は1Nに到達せず、粘弾性の測定は不能であった。一方、骨膜・ポリマー複合体群では、正常ウシ眼窩底骨組織と比較して、5週目の標本で

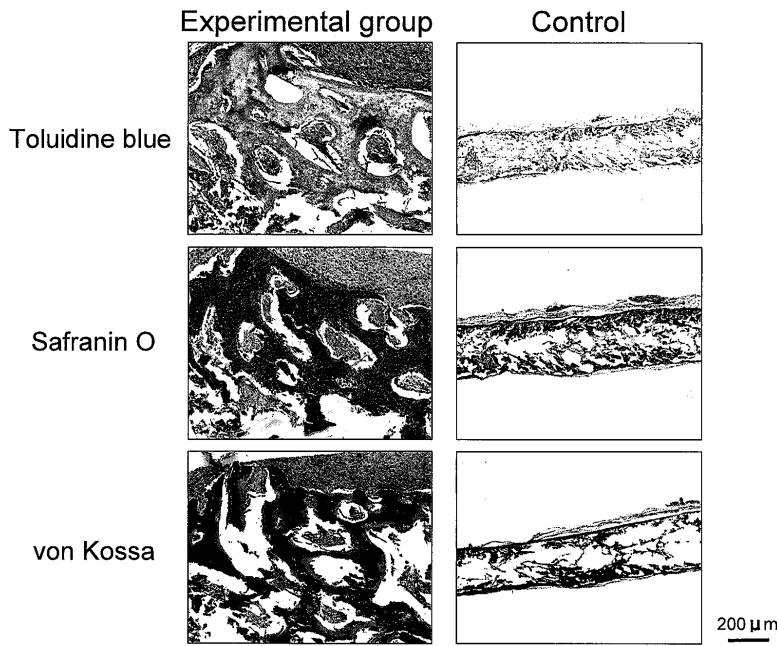


図5 ノードマウス皮下移植後5週目における組織像。  
骨膜・ポリマー複合体群では、von Kossa 染色で不均一な骨梁形成が認められた。コントロール群では骨形成像は認められず、ポリマーの中心部からその構造が崩れていた。

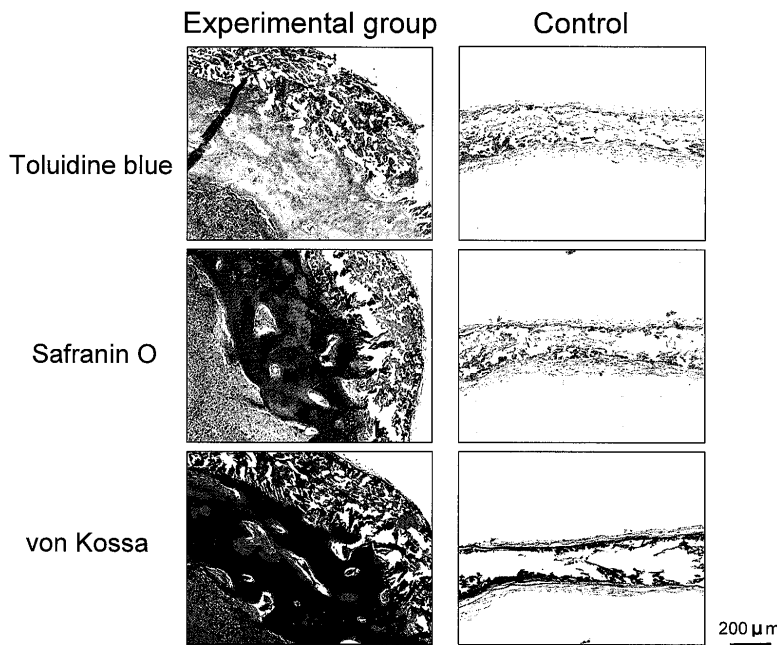


図6 ノードマウス皮下移植後11週目における組織像。  
骨膜・ポリマー複合体群では、Safranin O 染色によって赤く染色されるプロテオグリカンが認められた。von Kossa 染色に対して陽性に染色される領域は拡大していた。コントロール群では、ポリマー構造が吸収により分解されていた。

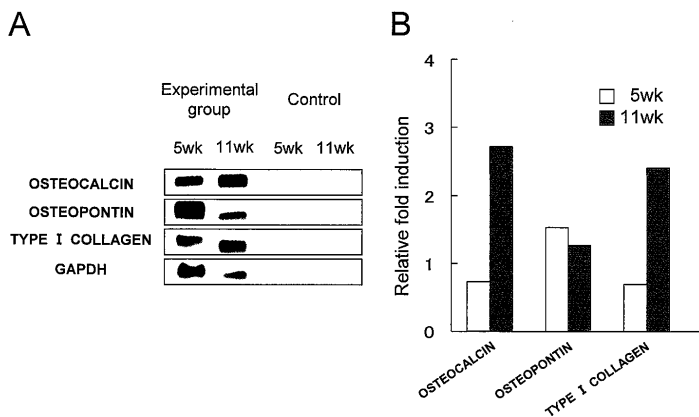


図7 骨関連マーカーの遺伝子発現。  
A. RT-PCR 法による遺伝子発現。  
骨膜・ポリマー複合体移植群においてオステオカルシン、オステオポンチン、1型コラーゲンの発現を認めた。  
B. Relative fold induction.  
オステオカルシンと1型コラーゲンは経時的に増加しているが、オステオポンチンは減少している。

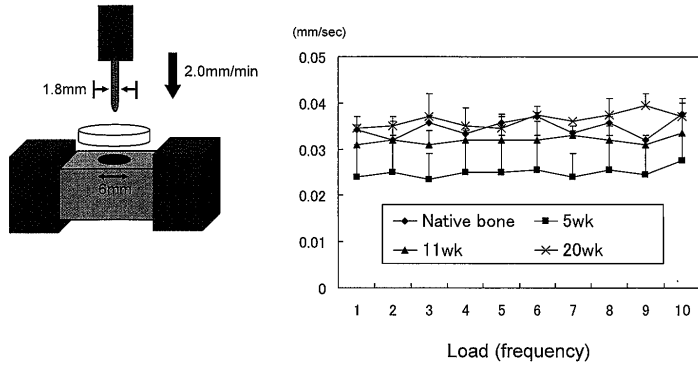


図8 力学試験を用いた粘弾性の検討  
3点曲げ試験は、インストロン（クロスヘッドスピード2.0 mm/分）で行った。荷重1 Nを負荷した際の荷重応答を測定した。力学試験の結果、ウシ正常眼窩底骨と比較して、骨膜・ポリマー複合体群においては、5週目の標本では粘弾性が低い傾向を示したが、11週目の標本では粘弾性が獲得され、正常骨組織の力学特性に近似した値を示した。グラフの値は、平均値±標準偏差を示す (n=6)。

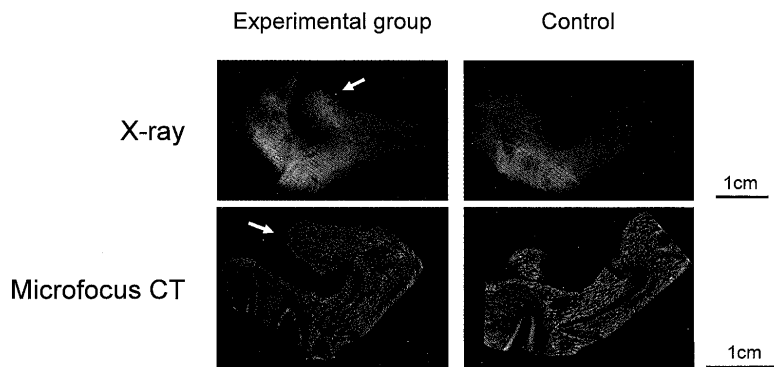


図9 イヌ眼窩床骨折モデルにおける単純X線写真およびマイクロCT所見。骨欠損部において、5週目の骨膜・ポリマー複合体群では、骨欠損領域に石灰化像（矢印）が認められ、これにより骨欠損領域は縮小していた。コントロール群では、骨欠損領域に明らかな石灰化像は認められなかった。

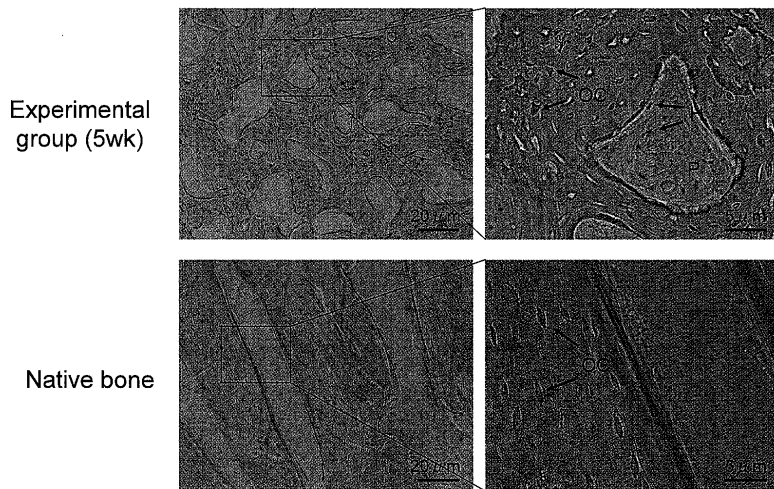


図10 骨膜・ポリマー複合体移植後5週目における組織学所見  
新生骨組織は、骨梁幅がやや細く、不規則な分枝を持つ網目状構造を示した。骨梁間には、組織球とポリマーの残存が認められる。OC：骨細胞 (Osteocyte), H：組織球 (Histocyte), P：ポリマー (Polymer)。

は低値傾向を示した。しかし、経時的に荷重応答は増加した。11週目および20週目の標本において、10回の連続する荷重に対する負荷応答（粘弾性）は正常骨組織の力学特性に近似する傾向を示した（図8）。

実験2：イヌ眼窩床骨折モデル  
単純X線写真およびマイクロCT所見

眼窩壁骨欠損部における単純X線写真およびマイクロCT所見を図9に示した。移植後5週目において、骨欠損を作成した領域に一致して石灰化像が認められ、骨欠損領域は著明に減少していた。コント

ロール群では、わずかな骨欠損領域の縮小を認めたのみであった。

組織学的所見

骨膜・ポリマー複合体群の組織学的所見を図10に示した。新生骨の骨梁部分は、正常の骨梁と比較して、より細かく不規則に分枝し、網目状構造を示していた。骨梁幅はやや狭く、骨梁内部には層板構造を示す骨基質と豊富な骨細胞が観察された。骨梁間には、多数の組織球と、ポリマーの残存像が認められた。

骨構造解析

表 2

	Trabecular bone volume (%)	Trabecular thickness (um)	Trabecular number ( $\times 10^{-3}/\text{mm}$ )	Trabecular separation (um)
Experimental group (5 wk)	54.3 $\pm$ 13.1	342.5 $\pm$ 167.7	1.7 $\pm$ 0.4	268.0 $\pm$ 30.0
Native bone	58.9 $\pm$ 5.5	329.9 $\pm$ 33.5	1.8 $\pm$ 2.6	231.9 $\pm$ 29.4

マイクロCTを用いて、骨膜・ポリマー複合体群における石灰化領域の3カ所を無作為に選択し、骨構造解析を行った。その結果、移植後5週目では、骨量、骨梁幅、骨梁間隙は、すべて正常骨組織とほぼ等しい値を示し、統計的有意差は認められなかった(表2)。

### 考 察

眼窩床骨折の治療における骨補填材料の条件として、まず、眼窩漏斗が変形四角錐という複雑な曲面を有するため、この解剖学的構造への良好な適合性が重要となる。さらに、眼球(直径24 mm, 重量7.4 g, 容積6.5 ml, 眼圧10.5~20.5 mmHg)<sup>16</sup>および外眼筋や眼窩脂肪から構成される眼窩重量および内圧の変化に耐えうる強度が必要と考えられる。

近年、生体材料の開発が進み、ハイドロキシアパタイトを代表とする種々のバイオセラミックスやポリエチレンシートが開発され、眼窩床骨折の骨補填材料として臨床使用されている<sup>6-9,17</sup>。バイオセラミックスは、生体親和性に優れ、セラミック表面に形成されるアパタイト層を介して周囲の骨組織と良好に直接結合することが判明している。小野ら<sup>18</sup>はハイドロキシアパタイトバイオセラミックスを検討し、骨伝導に優れた多孔体の気孔径は200~400  $\mu\text{m}$ 前後であり、骨形成に優れているのは50~60%の気孔率であると報告している。また、Hammerleら<sup>19</sup>は骨の侵入には最低100  $\mu\text{m}$ の気孔径が必要であると報告している。しかし、これらのバイオセラミックスは、生体にほとんど吸収されず、その形状は保たれるが、材料内部にまで細胞は侵入しない。そのため、術後感染や、複雑な形状に加工しにくいといった欠点が指摘されている。一方、Romanoら<sup>6</sup>は、ポリエチレンシートを多孔性に加工して顔面骨の再建に用いている。その結果、多孔性ポリエチレンシートは、操作性や固定性が良く、多孔体とすることで、生体内で細胞増殖に有利に働き、広範囲な血管侵入が得られるため感染防御に有効であることを報告している。これらの非吸収性高分子材料は簡便に使用できるが、一方、異物反応、補填物の変位や突出、後出血、感染、瘻孔形成など重篤な合併症が数多く報告されている<sup>10,11</sup>。

非吸収性高分子材料に代わって、骨再生における吸収性高分子材料の有効性が近年注目されている。特に、PLAやポリグリコール酸(poly glycolic acid, PGA), PCL, その共重合体であるPLGAやP(LA/CL)を用いた良好な研究結果が報告されている<sup>20,21,22</sup>。

Ishaugら<sup>22</sup>の実験によると、厚さ1.9 mmのPLGAに骨芽細胞を播種した場合、深さ240  $\mu\text{m}$ まで石灰化が認められたと報告されている。また、Attawiaら<sup>23</sup>は、PLGAにハイドロキシアパタイトを含有させると骨伝導能や力学的強度が増加すると報告している。PCLは細胞毒性が少なく<sup>24</sup>、優れた屈曲性を有し、単体ではなく他の材料と混和して用いられる。また、分子量によって分解時間の調節が可能である。この性質を利用して、Yamadaら<sup>13</sup>はPCLをPLAと共重合化(P(LA/CL))し、さらにP(LA/CL)ポリマーをPGA不織布に混和して、ヒト人工硬膜として臨床応用した。その結果、感染や有害な異物反応を起こさず、硬膜様の組織が再生した後、ポリマーは完全吸収されたと報告している。眼窩底の再建では、骨補填材料が直接副鼻腔に交通する可能性が高いため、感染のコントロールは特に重要な課題と考えられる。本実験では、この感染を解決し、高度な力学的強度としなやかさを併せ持ち、細胞毒性が少なく、補填物自体が吸収素材であるPLAとPCLの共重合体(P(LA/CL))を選択した。

骨組織の再生に利用される骨芽細胞は、間葉系由来の細胞で、未分化間葉系細胞から骨原性細胞を経て次第に成熟した骨芽細胞へと分化する。この骨形成能を有する細胞の採取部位として、骨髄および骨膜が知られている。組織の再生誘導において、骨髄もしくは骨膜由来のいずれの細胞を用いても、長期間の培養は必須であり、また、培地にウシ胎児血清を含むため、狂牛病などの動物感染は不可避な問題として残されている。そこで本研究では、骨芽細胞の供給源として骨膜を用い、これを共重合体に直接付加することにより、in vitroにおける培養過程を回避した。実験1では、採取骨膜をP(LA/CL)ポリマーと複合化して、ヌードマウス背部に皮下移植した。その結果、骨膜・ポリマー複合体は、内軟骨性骨化の過程を経て骨組織に置換され、骨再生が可



能であることが確認された。摘出組織の厚さ・直径を測定した結果、その厚さは増し、直径は減少した。厚さが増した原因として、骨膜の採取部位による影響が大きいと推測されるが、骨膜採取部位と得られる骨量の関係については明らかになっていない。直径の減少に関しては、ポリマーと複合化させた骨膜が移植後に萎縮したためと考えられる。再生骨組織は、力学特性上、5週目では粘弾性が低く脆弱な組織であったが、11週目には、ほぼ正常ウシ眼窩底骨組織に等しい粘弾性を示すことが判明した。さらに、臨床応用を目指して、イヌ眼窩床骨折モデルを作成し、自家脛骨骨膜・ポリマー複合体の移植実験(実験2)を行った。眼窩床骨折モデルの作成に際して、移植骨膜以外の残存骨膜による新生骨組織の誘導を除外するため、骨欠損部の骨膜は直視下に骨膜剝離子で剝離し、剪刀を用いて除去した。その結果、骨欠損部は、自家骨膜・ポリマーより再生された骨組織によりその大部分が修復された。骨再生の機序については、今後詳細な検討を予定している。再生骨組織の骨構造解析を行った結果、移植後5週目において、再生骨は正常骨組織に近似した骨量、骨梁幅、骨梁間隙を示した。このことから、再生骨の良好な骨構造が生じていることが示唆された。

自家骨膜と吸収性ポリマーを複合化して、in vivoで新生骨組織を再生誘導する本法は、ドナーの犠牲を必要としない点で画期的であり、今後、臨床応用が可能な骨再生法の一つと考えられた。

#### 謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました磯貝典孝教授に深謝申し上げます。

#### 文 献

- Smith B, Regan WF Jr (1957) Blow-out fracture of the orbit. *Am J Ophthalmol* 44: 733-739
- Miller GR, Glaser JS (1966) The retraction syndrome and trauma. *Arch Ophthalmol* 76: 662-663
- Krishnan V, Johnson JV (1997) Orbital floor reconstruction with autogenous mandibular symphyseal bone grafts. *J Oral Maxillofac Surg* 55: 327-330
- Siritongtaworn P (2001) Correction of severe enophthalmos with titanium mesh. *J Med Assoc Thai* 84 Suppl 2: S485-90
- Borghouts JM, Otto AJ (1978) Silicone sheet and bead implants to correct the deformities of inadequately healed orbital fractures. *Br J Plast Surg* 31: 254-258
- Romano JJ, Iliff NT, Manson PN (1993) Use of Medpor porous polyethylene implants in 140 patients with facial fractures. *J Craniofac Surg* 4: 142-7
- Villarreal PM, Monje F, Morillo AJ, Junquera LM, Gonzalez C, Barbon JJ (2002) Porous polyethylene implants in orbital floor reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 109: 877-887
- Aitasalo K, Kinnunen I, Palmgren J, Varpula M (2001) Repair of orbital floor fractures with bioactive glass implants. *J Oral Maxillofac Surg* 59: 1390-1396
- Reddi SP, Stevens MR, Kline SN, Vilanueva P (1999) Hydroxyapatite cement in craniofacial trauma surgery. *J Craniomaxillofac Trauma* 5: 7-12
- Jacono AA, Moskowitz B (2000) Alloplastic implants for orbital wall reconstruction. *Facial Plast Surg* 16: 63-68
- Gilhotra JS, McNab AA, McKelvie P, O'Donnell BA (2002) Late Orbital haemorrhage around alloplastic orbital floor implants. *Clin Experiment Ophthalmol* 30: 352-355
- Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y, Iwata H, Yamamoto K (1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J Neurosurg* 86: 1012-1017
- Yamada K, Miyamoto S, Takayama M, Nagata I, Hashimoto N, Ikada Y, Kikuchi H (2002) Clinical application of a new bioabsorbable artificial dura mater. *J Neurosurg* 96: 731-735
- 橋本八郎 (1979) 機械的性質の把握とその評価方法。セラミックスの機械的性質、窯業協会編集委員会講座小委員会、59-65、社団法人窯業協会、東京
- 内山陽介、谷澤龍彦、高橋栄明 (1994) 骨組織形態計測における骨梁構造の評価法。日骨形態誌 4: 83-89
- 塚原 勇、坂上 英 (1968) 眼科学提要、金原出版、東京
- 新城 清 (1992) セラミックスを応用しためざましい外科治療の進歩、現代医学 40: 93-95
- Ono I, Ohura T, Murata M, Yamaguchi H, Ohnuma Y, Kuboki Y (1992) Study on bone induction hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. *Plast Reconstr Surg* 90: 870-879
- Hammerele CH, Schmid J, Lang NP, Olah AJ (1995) Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defect using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 167-174
- Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko A, Yaszemski MJ, Mikos AG (1997) Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res* 36: 1-8
- Ishaug SL, Yaszemski MJ, Bizios R, Mikos AG (1994) Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 28: 1445-1453
- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko A, Yaszemski MJ, Mikos AG (1997) Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 36: 17-28
- Attawia MA, Herbert KM, Laurencin CT (1995) Osteoblast-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 639-644

24. Huatan H, Collett JH, Attwood D, Booth C (1995)  
Preparation and characterization of poly (epsilon-

caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins. *Biomaterials* 16: 1297-1303