

実験的人工椎間板置換術における立体織物型人工椎間板と 椎体の界面に関する組織形態学的研究

学位論文内容の要旨

緒言

構造的破綻をきたした脊椎あるいは椎間板の再建は、脊椎固定術が主体で成績も安定している。一方脊椎固定により固定隣接椎間の変性が進行するといった、脊椎固定術の弊害が指摘されてきた。脊柱の可動性と支持性を具えた再建法として人工椎間板は理想的とされ、現在まで開発が行われている。しかし既存人工椎間板の臨床応用報告では、椎体との界面に弛みや脱転など問題点も多い。この背景から著者らは多軸三次元立体織物型人工椎間板(3-DF disc: Three dimensional fabric disc)の開発を進めてきた。本研究の目的は、動物モデルに3-DF discを用いた腰椎椎間板置換術を施行し、第1に置換部位の不動化が人工椎間板と椎体の界面および3-DF disc内部における骨形成に与える効果を明らかにすること、第2に生体活性セラミックスコーティング材料である水酸化アパタイトと Apatite-Wollastonite ガラスセラミックスの骨伝導効果の差を組織形態計測学的に明らかにすることである。

材料と方法

1.人工椎間板(3-DF disc)の概要: 3-DF disc は、超高分子量ポリエチレン繊維束を直鎖型低密度ポリエチレンで被覆した生体適合性微細繊維を三次元立体織物に織りあげたものである。表面の椎体終板側には、水酸化アパタイト(HA,平均粒子径 $2.88\mu\text{m}$)または Apatite-Wollastonite ガラスセラミックス(AW,平均粒子径 $4\mu\text{m}$)粉体が、圧力 8.5kgfcm^{-2} で表面から深度 3mm まで吹付け処理され生体活性が付与されている。実験動物の成羊椎間板の形状に合わせ作成した羊用 3-DF disc($20\text{mm} \times 17\text{mm} \times 10\text{mm}$)を使用した。

2.実験計画: 実験には成羊 17 頭(サフォーク種, 2-3 歳, 体重 $70-80\text{kg}$)を用い、第 2-3 腰椎椎体間(L2-3)椎間板および第 4-5 腰椎椎体間(L4-5)椎間板を羊用 3-DF disc を用いて置換した。各椎間には異なる生体活性セラミックス(AW および HA)で表面処理した人工椎間板を用いた。設置高位は無作為に決定した。本実験(実験 1)には 13 頭を用いた。実験動物は 2 群に分け、Group I ($n=8$) では L2-3 椎間板および L4-5 椎間板を羊用 3-DF disc を用いて置換した後、何の追加処置も加えなかった。Group II ($n=5$) では同様の人工椎間板置換を行った後、同部位の内固定による不動化を加えた。いずれの群も羊舎内で飼育して術後 6 ヶ月で屠殺した。補助実験(実験 2)には 4 頭(Group III)を用いた。この実験は第 1 実験の内固定による不動化の効果が、より早期にあたる術後 4 ヶ月で得られているか否かを知るために行われた。Group III では Group II と同様の人工椎間板置換と同部位の内固定による不動化を加えた後に、術後 4 ヶ月で屠殺した。

3.手術手技: 後腹膜進入で L2-3 および L4-5 椎間高位を展開した。上位椎体の椎体終板ならびに下位椎体の終板を椎間板ごと切除後羊用 3-DF disc を設置し、脊椎内固定を行わない動物は閉創し手術を終了した。内固定を行った動物には Kaneda SR one-rod system を使用した。3-DF disc 設置椎間の上下椎体の中央部にスクリューを各 1 本ずつ刺入して Rod で連結し、椎体-3-DF disc に対する脊柱前方固定術が完了した。

4.標本作成と観察: 摘出脊柱は、インプラント抜去後椎間板-椎体複合体とし、10%ホルマリン固定を行った。光学顕微鏡的観察、組織形態計測には非脱灰硬組織標本を作製、使用した。10%ホルマリン固定後にエタノール上昇系で脱水処理し、Methylmethacrylate 樹脂に包埋、重合し、椎間板-椎体複合体の全体を樹脂ブロック状の標本として作成した。椎間板-椎体複合体を脊柱矢状断面に平行な面で 3 ブロックに分割し、各ブロックごと平均間隔 $300\mu\text{m}$ 毎、平均厚さ $300\mu\text{m}$ の平行切片を切り出した。

各切片は平均厚さ 70 μ m まで研磨し、Cole's Hematoxylin または Toluidine Blue O 染色(pH5.0)を行った。3-DF disc 界面の骨梁と周辺組織の定性的評価は、染色標本での光学顕微鏡観察による。走査型電子顕微鏡による界面の観察も行った。組織形態計測は、染色標本に対してコンピューター解析ソフトを使用した。対象標本は 3 ブロックから無作為に 1 枚ずつ抽出した合計 3 枚である。すべての形態計測的手法で椎体と 3-DF disc 上・下縁にある両界面の全長について計測し、また各椎間板-椎体複合体ごとに 3 切片の標本の平均値を検討した。界面の椎体側に形成された新生骨梁の検討では、界面部分に 2 領域: Zone 1 および 2 を定義し (Zone 1: 3-DF disc 繊維最外層から椎体側に 500 μ m まで, Zone 2: 500 μ m から 1000 μ m まで), 各 Zone ごとに 3 つのパラメーター, 骨梁幅 (TbTh), 骨梁数 (TbN) 骨梁間隙 (TbSp) を計測した。骨梁幅 (TbTh) は, 骨梁の平均幅を示すパラメーターであり, 標本上で骨面 (BS), 骨量 (BV) を計測し、下式により算出した $TbTh=2 \times BV/BS (\mu m)$ 。

骨梁数 (TbN) は単位距離あたりの骨梁数を示し、下式から算出した (TV: tissue volum(組織量))。

$$TbN=(BV / TV) / TbTh = BV / (TV \times TbTh)=BS/(2 \times TV) (/mm)$$

骨梁間隙 (TbSp) は, 隣接した骨梁の端と端の距離を示し, 下式で定義される。

$$TbSp=TbTh \times (TV/BV - 1) = (1/ TbN) - TbTh$$

また 3-DF disc 繊維間隙に進入する骨梁の定量的評価は以下のように定義し計測した (骨梁進入率 % Penetration)。最外層の 3-DF disc 繊維の隣接する繊維間に接線を規定する。この接線を超え 3-DF disc 側へ進入している骨梁の接線横断距離を計測, これを各繊維間で繰り返し計測し総和を算出 (Σa) する。つぎに測定範囲内の総接線距離 (Σb) を計測し, それに対する比率を下式で計算した $\% Penetration = (\Sigma a / \Sigma b) \times 100$ 。

統計学的検討には, One-way ANOVA を用い多重比較のために Tukey-Kramer 法を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結果

I. 実験 1

1. 肉眼的観察 Group I の 3-DF disc 表面は, 癒痕組織で覆われ周囲に骨棘の形成が目立った。骨棘は 3-DF disc 前方 (腹側) にも形成され, 一部の標本は disc 表面が骨棘によりほぼ完全に埋没していた。一方 Group II の表面は大きく異なり, 癒痕形成はあるが骨棘形成はわずかで 3-DF disc 前方に骨棘が形成された標本はなかった。

2. 光学顕微鏡による観察 3-DF disc 内部へ進入する骨梁は, Group I は界面全体にわたりほぼ同程度の深度で骨梁が形成, 進入した均一型で特に 3-DF disc 前方に形成された骨棘周囲が中心だった。Group II では界面の一部分において際立って骨梁が内部進入した突出型が多く全例で骨梁進入の最深部は椎体に刺入したスクリュー直下付近であった。両 Group で, セラミックス処理による違いはなかった。界面の骨梁と周辺組織は, Group I では, 界面全体に周囲を配向が不規則な線維性結合組織が取り巻き, 新生骨梁は界面に平行な数層の層状構造を呈し 3-DF 繊維間への進入は Group II より少なく, 一部は進入した骨梁と 3-DF disc 繊維が微細間隙で接していた。Group II は, 軟組織膜の介在はなく繊維表面に骨梁が直接接触し繊維内へ連続的に進入していた。新生骨梁の先端が 3-DF disc 内部へと向かうものが多く, 周辺は類骨や線維軟骨に富み, その配向は 3-DF disc 内部へ向かう放射状であった。3-DF disc 内部の繊維間隙では Group I, II とも類骨や層状骨が島状に存在していた。全群とも大部分はセラミックスコーティング深度内の進入であった。炎症反応を示唆する細胞は見られなかった。

3. 骨形態計測:

①骨梁幅, 骨梁数, および骨梁間隙: HA に関して Zone 1 では, Group II が骨梁幅が広く ($P=0.0018$), 骨梁数が多くその骨梁間隙は狭い ($P=0.0038$) 結果であった。Zone 2 も同様の傾向を示した。AW の結果は, HA におけるそれと極めて近似していた。各 Zone における各パラメーターに関して AW と HA には全く有意差を認めなかった。

② 骨梁進入度: HA に関して Group II は有意に高い結果であった ($P=0.0013$)。AW も同様の結果で HA, AW の間で有意差を認めなかった。

4. 電子顕微鏡による観察: Group I では 3-DF disc 繊維との間に癒痕と思われる組織が介在し骨梁が接している部分は見られなかった。Group II では骨梁が 3-DF disc 繊維表面に密接している像が観察された

II. 実験 2

1. 肉眼的および光学顕微鏡による観察: Group III と実験 1 における Group II との間に明らかな差はできなかった。

2. 骨形態計測 (Table 2): 各 Zone におけるパラメーターは, いずれも Group III と実験 1 における Group II との間に有意の差はな

った。

考察

本研究は、第一に 3-DF disc を用いた人工椎間板置換術における置換部位の不動化が、3-DF disc と椎体界面の骨梁形成ならびに繊維間隙内への骨梁進入のために有意の促進効果を与えることを明らかにした。第二に 3-DF disc 表面の吹きつけ処理材料である水酸化アパタイトと Apatite-Wollastonite ガラスセラミックスの骨伝導効果には有意の差がないことを明らかにした。しかし本研究にはいくつかの限界がある。第一は経過観察期間が短いことである。今後、一度形成進入した骨梁がそのままリモデリングを繰り返し界面強度を維持するのか、あるいは吸収され 3-DF disc の固着強度の低下を生じるのか、あるいは完全に骨梁が貫通し椎体間固定と同様になるのかは不明である。第二は、4 つ足歩行動物を用いており、椎間板そのものにかかる力学的負担がヒトとは大きく異なることである。第三は、初期不動化の方法が前方からの脊椎内固定であることである。理想的な人工椎間板を開発するためには、種々の角度からのさらなる研究が必要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

実験的人工椎間板置換術における立体織物型人工椎間板と 椎体の界面に関する組織形態学的研究

構造的破綻をきたした脊椎再建には、固定術がその主体を占める。その一方で、固定術が隣接椎間の変性をきたすという弊害も指摘されている。脊柱の可動性と支持性を備えた脊椎再建法として人工椎間板は理想的だが、既存人工椎間板の報告では弛みや脱転など問題点も多い。申請者らは表面に生体活性セラミックスコーティングした立体織物型人工椎間板 (3-DF disc) の開発を進めてきた。本研究の目的は、動物モデルに 3-DF disc を用いた腰椎椎間板置換術を施行し、置換部位の不動化が人工椎間板と椎体の界面および 3-DF disc 内部における骨形成に与える効果、生体活性セラミックスコーティング材料の水酸化アパタイトと Apatite-Wollastonite ガラスセラミックスの骨伝導効果の差を、組織形態計測学的に明らかにすることである。実験は成羊 17 頭を用い、第 2 - 3 および第 4 - 5 腰椎椎体間椎間板を羊用 3-DF disc で置換した。本実験 13 頭のうち Group I (n=8) では羊用 3-DF disc 置換のみ、Group II (n=5) はさらに脊椎内固定(脊椎前方固定法: Kaneda SR one-rod system)を加え、術後 6 ヶ月で屠殺した。補助実験 4 頭 (Group III) は置換と内固定を行い、術後 4 ヶ月で屠殺した。屠殺後に非脱灰硬組織標本を作製し、椎体との界面に対し光学顕微鏡観察、組織形態計測を行った。Group I は界面に軟組織膜を形成していたのに比し、Group II の界面新生骨梁は、直接 3-DF disc 繊維に接触、内部へ進入するものが多かった。また内部の繊維間隙にも骨梁形成が見られたが、いずれもセラミックスコーティング層内に留まった。骨形態計測では、界面に形成される骨梁の骨梁幅、骨梁間隙、骨梁数を、また 3-DF disc 内部に進入する骨梁進入率を検討した。いずれのパラメーターも、椎体海綿骨と 3-DF disc 間に生じる上下両界面の全長に対して計測を行った。Disc 内部に進入する骨梁は Group II が有意に多く幅広で密で、内部への進入率も Group II で有意に高かった。また Group II の界面には disc 内部へと向かう配向の線維軟骨が存在し、これらは界面の骨形成ならびに力学的界面強度を獲得するのに必要と考察された。Group III との間には肉眼的構造ならび

に骨形態計測の結果に有意差はなく、少なくとも術後4ヵ月で内固定による効果が発現するものと思われた。いずれのGroupにおいてもセラミックコーティング間に有意差はなかった。

以上より、3-DF disc による椎間板置換では内固定併用が有効であり少なくともその効果は術後4ヵ月で発現すること、ならびに3-DF disc 表面に吹付け処理した2種類のセラミックスコーティングは、今回の処理方法においては界面での骨梁形成に有意差がないことが明らかとなった。

審査にあたり、副査安田和則教授から、脊椎内固定解除後の界面新生骨梁の行方と人工椎間板の材料であるポリエチレンの磨耗と骨溶解についての質問があった。申請者は、術後6ヵ月以降界面強度が維持されるか骨梁が吸収されるか不明であること、金属抜去により生じる骨梁の変化については関連実験において吸収性材料を用いた内固定術により検討していること、またポリエチレンについて生体外疲労実験では磨耗粉や繊維破壊はないものの、生体内で磨耗粉が出現した場合骨溶解の可能性も考えられると回答した。続いて、副査岩崎喜信教授から人工椎間板の椎体内沈みこみ現象の可能性と、吹き付けたセラミックスと繊維間の破損、長期的使用による問題点についての質問があった。申請者は、沈み込みは起こりうる危険性があり臨床応用では適応に留意すべきであり、また3-DF disc 繊維径に対しセラミックス粒子径は100分の1以下で繊維-セラミックス界面での破損が生じる危険は少ないと考察するが、物性が異なるものの界面では可能性も将来検討していくべき問題であると回答した。最後に主査三浪明男教授より、臨床応用を考慮した場合の内固定の最低期間について、今回使用した前方法以外の内固定法適応の可能性について、質問があった。申請者は、内固定の最低期間は、今回用いたヒツジでは最低4ヵ月以内と推測されるものの、骨形成速度は種により違うため別の観察期間における検討が必要だが、少なくとも骨折治癒の場合のように数ヶ月の単位が必要と思われること、後方固定術との併用や脊椎のその他の高位にも適応可能であると思われる、と回答した。

本研究は、人工椎間板置換術における界面の骨梁ならびに組織形成に対して行った独創的な研究であり、人工椎間板置換における内固定ならびに生体活性セラミックス併用の有効性を示した点で、脊椎の組織学分野に大きく寄与した。更に骨梁の経時的变化に着目した追加実験が行われると、骨梁形成時期がより一層解明され、臨床応用への足がかりとなることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。