

学位番号甲第 490 号

学位申請者 : すな かわ たか ひで
砂 川 隆 英

主 論 文 : Development and evaluation of a novel bone hemostatic agent that does not inhibit bone repair

(骨修復を阻害しない新規骨止血剤の開発と評価)

著 者 : Takahide Sunakawa, Takao Kaneko, Tomohiro Umeda, Keisuke Ito, Hiroyasu Ikegami, Yoshiro Musha

公 表 誌 : Journal of the Medical Society of Toho University 60 (3) : ***-***, 2013

論文内容の要旨 :

[目的]

骨蠟 (Wax) は、骨の手術時にはその止血のために必要不可欠であり、整形外科領域では広く使用されている。しかし生体親和性に乏しく、塗り込められた部分の骨組織の仮骨形成や骨癒合を阻害する欠点がある。本研究では、新素材を用いた骨修復を阻害しない新たな骨止血材の開発を目的とした。

[材料と方法]

エチレンオキシド (EO) とプロピレンオキシド (PO) をランダム共重合して得た EPO と、これに水酸アパタイト HAp を複合化したものを作製した。

1. ゲル状 EPO の作製と経時的な化学変化

粉状 EPO を水で練和し Wax と同じ稠度に調整してゲル状 EPO を得た。疑似体液内に入れ、37 度恒温槽内で 10 時間に亘る経時的な pH 計測を行った。

2. POs-Ca, HAp-EPO の作製と、新規止血材の接着強度および止血持続時間の評価

糖修飾リン酸カルシウム (POs-Ca) から得た水酸アパタイト HAp と EPO を複合化して POs-Ca, HAp-EPO を作製した。ゲル状 EPO 単体 (EPO)、POs-Ca, HAp-EPO および従来の Wax について、以下の測定を行い比較した。サンプル

数は各々5個である。

(i) 接着強度の測定

オートグラフ強度試験機で接着強度を測定した。

(ii) 止血持続時間の測定

HAp多孔体の上に0.1gの試料を塗布し、これに擬似血液を浸透させ、試料の上のせたキムワイプの色の変化が出現した時間（止血持続時間）を計った。

3. 生体内での評価（動物実験）

日本白色家兎、雄10羽の脛骨の頭側端部の内側の皮質骨に全身麻酔下でドリルを用いて直径4mmの円形孔を製作し、円柱形に成形した①EPO、②POs-Ca, HAp-EPO、③Waxを充填して骨欠損部を埋めた（円形孔グループ）。別系列8羽ではスチールバー（直径3mm）を用いて長軸上に幅3mm、長さ15mmにわたり皮質骨を削り取り、海綿骨を露出した。この溝に3つの試料を充填した（縦溝グループ）。各グループで同様のボーリングを行い、何も充填しなかったControl（sham）も作成した。同一白色家兎の左右の脛骨に①②または③④を作製した。

(i) 止血機能

止血効果を評価するために、円形孔グループの5羽の④Controlの5か所で止血が得られるまでの時間、および10羽で正中耳動脈に針を刺入した後、直ちに抜去し、圧迫せずに自然に止血されるまでの時間（出血時間）を計測した。充填部では、いずれも30分以上外見を観察した。

(ii) 生体親和性と骨修復

処置後4,8週時に4羽ずつ屠殺し、生体親和性と骨修復を評価した。円形孔の2羽は4ヶ月後にも観察した。組織学的評価には縦溝グループの8羽の標本を用い、Villanueva bone stainで染色して観察を行った。

[結果]

1. ゲル状EPOの経時的な化学変化

粉状EPOは水だけで容易にゲル化した。疑似体液に浸漬したEPOゲルでは経時的な化学組成の変化は認められず、溶解を終えるまで中性を維持できることが明らかになった。

2. 新規止血材の接着強度と止血持続時間の評価

(i) 接着強度の測定

EPOの接着強度 54.0 ± 1.0 Nに比し、POs-Ca, HAp-EPOは 65.0 ± 1.21 Nと高かった（ $p < 0.001$ ）。EPOはWaxの接着強度 68.7 ± 3.56 Nに比して弱かったが、POs-Ca, HAp-EPOの接着強度はWaxと同等で、有意差はなかった。

(ii) 止血持続時間の測定

EPOが 4.5 ± 0.25 時間であったのに対し、POs-Ca, HAp-EPOでは 6.0 ± 0.23 時間と長時間であった（ $p < 0.001$ ）。Waxは不溶性であるため、12時間経過しても変化は認められなかった。

3. 生体内での評価（動物実験）

(i) 止血効果

円形開窓したControl（sham）の5か所での出血時間は、9分35秒～19分、平均14分3秒（ ± 3 分29秒）、10

羽の正中耳動脈の出血時間は1分45秒～2分45秒、平均2分16秒（±18秒）であった。両 group の骨欠損部に試料を充填した全ての部位（27箇所）で出血は30分以上認められなかった。

（ii）生体親和性および吸収性の評価

円形孔グループの8週埋入後の皮質骨表面の写真を示す。EPO、POs-Ca、HAp-EPO および control では8週間後、全ての標本で完全に修復されていた。一方 Wax は全部位で埋入後もそのままの状態で残留しており、皮質骨欠損部分はほぼ原形のまま残っていた。

縦溝グループの水平断切片標本の組織学的観察所見を示す。EPO および POs-Ca、HAp-EPO は4週経過時点で既に溶解、吸収されていた。EPO、POs-Ca、HAp-EPO では control と同様、8週間後には骨欠損部の全域に亘って新生骨による架橋を認め、ほぼ修復されていた。2つの新素材の経時変化には大きな差はなく、新生骨部分の観察でも目立った差は認められなかった。一方 Wax は全例で骨表面の観察結果と同様、そのままの状態に残留していた。Wax では、4か月経過後も欠損部分に変化なく遺残しており、長期間にわたり骨形成、修復を阻害することが証明された。

〔 考察 〕

ゲル状 EPO では経時的に中性を維持できることから、添加物の化学組成に影響を及ぼさないことが証明された。それゆえ、あらゆる素材や薬剤との組合せが可能である。接着強度、止血機能の向上と骨伝導能を期待し、EPO に POs-Ca、HAp の添加を図った。POsCa、HAp-EPO は、接着強度は wax と同等で、止血持続時間は EPO より長く、優位であった。

EPO および POs-Ca、HAp-EPO では、生体親和性は良好で、骨形成、修復をも阻害しないことが明らかになり、Wax の欠点を克服できたといえる。POs-Ca、HAp-EPO は EPO に比し接着強度、止血効果に優れる点から、新しい骨止血材として有用と考えられた。

1. 論文審査の要旨および担当者

学位番号甲第 490 号	氏 名	砂 川 隆 英
論文審査担当者	主 査	土 谷 一 晃
	副 査	林 明 照
	副 査	岩 淵 聡
	副 査	高 橋 寛
	副 査	中 川 晃 一
<p>論文審査の結果の要旨 :</p> <p>現在、骨の手術の際、骨からの止血には bone wax が広く用いられているが、生体親和性に乏しいため、骨形成や骨癒合が阻害されるという欠点がある。そこで、著者らは、骨修復を阻害しない新たな骨止血材の開発を目的とした実験を行った。</p> <p>方法：エチレンオキサイド (EO) とプロピレンオキサイド (PO) をランダム共重合させた EPO ゲル (EPO gel) と、糖修飾リン酸カルシウム (POs-Ca) を水熱合成して得た水酸アパタイト hydroxyapatite: HAp (POs-Ca・HAp) を EPO に複合化した POs-Ca・HAp-EPO を作成し、1) ゲル状 EPO の化学的变化、2) 止血材の接着強度および止血持続時間、3) 動物実験で止血材の生体内での評価を行った。</p> <p>結果：1) EPO ゲルは、化学組成に変化は認められず中性を維持していた。2) EPO ゲルの接着強度は 54.0 ± 1.0 N、POs-Ca・HAp-EPO は 65.0 ± 1.21 N でより高く、bone Wax と同等の強度を有した。止血持続時間は EPO ゲルの 4.5 ± 0.25 時間に比し、POs-Ca・HAp-EPO は 6.0 ± 0.23 時間と長かった。3) 動物実験では、術中観察時間 (30 分以上) で EPO ゲルと POs-Ca・HAp-EPO のいずれも止血が得られていた。組織学的に、EPO ゲルおよび POs-Ca・HAp-EPO は 4 週経過時点で既に吸収され、8 週間後では、いずれもコントロールと同様、骨欠損部の全域で新生骨による架橋を認めた。2 つの素材の経時的変化や新生骨部での変化に差は認められなかった。bone Wax では、4 か月経過後も欠損が遺残し、骨修復が阻害されていた。接着強度と止血効果も含めると、POs-Ca・HAp-EPO が、骨止血材としてより有用と評価できた。</p> <p>4 月 22 日に行われた公開審査会では各委員から質疑があり、申請者は適切に回答していた。</p> <p>今回の新素材の止血機序について。「充填後、初期段階の圧迫によるもので、凝固能に対する薬理的な作用ではない。」 EPO の生体材料としての使用実績、生体毒性について。「米国では市販され他の目的で生体内に投与されており安全性は確認されている。」 動物実験でコントロールと 2 つの新素材間の組織学的な相違について。「4 週で 2 つの新素材は溶解、吸収されていた。素材周辺に炎症反応は認めず、新生骨を認めたが架橋が完成していなかった。8 週間後にはいずれも新生骨による架橋により皮質骨表面の修復が得られていた。POs-Ca, HAp-EPO</p>		

にはある程度の骨置換能を期待したが、4週時点ですでに溶解していたため、骨置換に至らなかったと考えている。骨修復は両者ともコントロールと同等で阻害されなかったという結果にとどまったが、骨止血機能は POs-Ca, HAp-EPO に優位性が見出された」臨床応用する場合、どのような骨欠損に用いるか。「従来の骨止血剤を使用している手術における代替として使用し、特に人工関節置換術における骨切り部、インプラントと皮質骨の間の海綿骨の止血、その他、脊椎の骨組織の温存、修復を必要とする手術に適応があり、骨欠損部の補填材としての使用は考えていない」骨補填材となりうるかなど、今後の検討課題。「現在は、骨止血剤としての実験であるが、骨欠損部に対する骨補填材として旺盛な骨造成能を付与する場合は、骨の定量的評価、逸脱試験や骨蛋白評価が必要である」。など。

新たな骨止血材の開発を目的として著者らが行った実験で、EPO ゲルと POs-Ca・HAp-EPO は、止血効果や骨修復能の点から、bone wax に代わる骨止血剤としての可能性を示した論文であり、審査員一同は、本研究が学位授与に値すると評価した。