

# 髓内釘による Bone Segmental transport 方式 仮骨延長骨形成術の実験的研究

## Experimental Study of New Bone Forming Method by Bone Segmental Transport with the Use of Intra-medullary Nail.

慶大整形 山口 健治・柳本 繁

麻布大学獣医学部外科学第2教室 陰山 敏昭

### はじめに

骨欠損に対する治療法として仮骨延長術 Callus Distraction は確立された方法となっている。骨折の初期に出現する仮骨を徐々に牽引延長する方法である。本来の正常骨と同等な生きた骨を、骨移植なしに、しかも多量に再生できる点が最大の利点である。

仮骨延長術には単純延長術、一期的短縮延長術 (acute shortening & gradual lengthening)、骨移動術 (Bone Transport) があるが、単純延長術は周囲軟部組織にも延長が加わるため、延長量に限界がある。一期的短縮延長術においても短縮率が本来の骨長の25～50%以上の短縮は血管のねじれに起因して組織壊死を起こし、神経も傷害されることから同様に限界がある。<sup>(1)</sup> 軟部組織は骨延長における制限因子とされる。これに対し、骨移動法は、骨欠損部の近位あるいは遠位部で骨切りを行い、骨片を徐々に移動させ骨間隙を新生仮骨で埋めてゆく方法である。理論上、この方法で補填できる骨欠損の量には限界がなく、本来の骨長を保ったまま骨欠損部を修復するため、周囲組織に与える影響は少ない点が優れている。しかし問題点として、周囲軟部組織が骨欠損部

に介在して輸送骨の移動が妨げられる点、移動方向の不良により輸送骨が予定の場所に移動しない点、輸送骨の骨壊死等が挙げられる。また従来法は創外固定を長期間使用するため、ピン刺入による感染、近傍関節の可動域制限や関節拘縮が生じる。また創外固定器除去後の再骨折や精神的負担等が挙げられる。創外固定の合併症を軽減する目的で髓内釘を併用する方法<sup>(2)</sup> (monorail system) もあるがいずれにしても創外固定の使用による合併症は解消されない。そこで今回我々は、髓内釘のみで延長を行える装置を開発し、動物実験により有効性を確認し、臨床応用について検討する事を目的に研究を行った。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験材料

##### ①実験犬

臨床上健康なビーグル犬6頭 (オス4頭、メス2頭) を用いた。月齢: 平均  $34.5 \pm 12.6$  (24 ~ 58) months、体重: 平均  $1.3 \pm 1.0$  (10 ~ 13) kg、大腿骨長: 平均  $138.2 \pm 9.3$  (127 ~ 152)

mmであった。

## ② 髓内釘型骨延長器 (Fig.1)

我々が開発した髓内釘型骨延長器は、ステンレス製で、長さは110mm径は6mm、7mmの2種類を作製した。その本体は円筒型の外筒と、その中心に内蔵される中心軸、輸送骨を乗せる移動部(長さ15mm)の3partsより構成される。それぞれをscrewで固定する。中心軸と移動部の内側にネジ山がきいてあり、髓内釘近位の孔よりレンチを挿入し内部の中心軸をまわすと、移動軸が移動する仕組みとなっている。レンチを360度回転させると0.5mm移動する。

Fig.1) 髓内釘型骨延長器



## 2. 実験方法

### ① 術式

手術は全身麻酔下に行った。体位は側臥位とした。切皮は大腿骨大転子から大腿骨骨幹の前外側縁に沿って膝蓋靭帯の外側に沿うようにして脛骨粗面まで行った。その後、大腿二頭筋を後方に、外側広筋を前方に牽引して大腿骨骨幹を露出した。また、膝関節の部位では関節包を切開し、大腿骨遠位端も露出した。大腿骨近位では、浅殿筋腱を大転子より切断し、延長器を挿入する転子窩を露出した。骨孔を作製し髓内釘と same size までreamingを行い髓内釘を挿入した。image 下に外筒の近位、遠位、輸送

軸をscrewで固定し、triple osteotomyを行い、欠損部30mmを作製した。Osteotomyは骨切部の骨膜を剥離し、リトラクターで周囲の組織を保護し、生理食塩水で十分に冷却しながらbone saw、線鋸を用いて行った。輸送骨片の骨膜は温存できなかったが後面に付着している内転筋は温存した。閉創後、レンチを刺入し移動骨片が動く事を確認した。レンチ刺入部はタイオーバードレッシング法にて保護した。術後、実験犬は特に免荷はせず、術後は1日2回、15分程度の軽度の運動を行った。それ以外は原則としてケージレストとした。

### ② 骨延長計画

術後7日間を待機期間とした。延長速度は1日あたり1.0mm(0.5mm/1回、2回/1日)とした。延長期間終了後、骨硬化期間をおよそ30日間設けた。

### ③ X線撮影

撮影は、術直後と待機期間終了時、延長終了時、延長期間と骨硬化期間は7日ごとに行った。単純X線を、合成樹脂ファントム、アルミニウムファントム、鉛のマーカ入り定規とともに無麻酔下で撮影した。

### ④ 骨標識

待機期間終了時には、3-[N,N-Bis(carboxymethyl)aminomethyl]:20mg/kgを生理食塩水150mlで溶解し、60分かけて橈側皮静脈より微量点滴器を用いて投与した。骨延長終了時には、塩酸オキシテトラサイクリン:30mg/kgは生理食塩水で100mlに希釈し、40分かけて同様に投与した。骨硬化期間終了時には、3,3-Bis [N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl] fluorescein:20mg/kgを2%NaHCO<sub>3</sub>:30mg/kgで溶解し、同様に滅菌を行い、20分かけて投与した。

### ⑤ 剖検ならびにmicroangiography

全身麻酔下において、仰臥位に保定し、臍部から恥骨前縁まで腹部正中切開を行い、腹大動脈にアプローチ、確保後、灌流用カテーテルを

留置した。また、左側頸動脈にもアプローチし、同様に放血用カテーテルを留置した。その後、血管内での血液凝固を防止するためにヘパリン500IU/kgを橈側皮静脈より投与した。腹大動脈から生理食塩水を合計800mlを灌流した後、50%硫酸バリウムを140mmHgを越えないように合計400ml注入した。この間、全身循環血液量が過剰にならないように頸動脈より放血を行った。

X線撮影後、両側大腿骨を、内転筋を付着させたまま摘出し、生理食塩水を浸したガーゼに包み、切り出しまでの間、 $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

### ⑥非脱灰研磨染色標本の作製

冷凍保存した検体は、非脱灰研磨標本を作製した。検体の不要部分をインプラントごと切除した後、アルコールによる固定、脱脂、脱水後、MMA (methyl methacrylate) monomerで包埋を行った。包埋ブロックは、長軸方向に2等分し、その半分のブロックより延長部とドッキング部の長軸切片、延長部の横軸切片を切り出した。長軸薄片は最終的に $100\mu\text{m}$ 厚まで、横軸薄片は $30\sim 40\mu\text{m}$ 厚まで研磨を行った。 $100\mu\text{m}$ 厚の長軸切片は、Coleのヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

### ⑦軟X線撮影

剖検直後には、大腿骨に内転筋を付着させた状態の側面と大腿骨から内転筋を取り外した状態の正面の撮影を行った。この時の撮影条件は3640kvp、4.0mAs、90secで行った。また、 $300\mu\text{m}$ 厚まで研磨を行った標本に対して、条件17kvp、4.0mAs、90secにて撮影を行った。

内転筋は透過性を一定にするために長軸方向に5mm厚にスライスし、撮影を行った。(超軟X線装置・TYPE-M50: SOFRON、フィルム・Fuji X線フィルムFR: Fuji Film)。撮影条件は28kVp/240mAsとした。撮影した画像を透過原稿ユニット付スキャナ (ES-8500: EPSON) にて、1200dpi/8bit Gray Scaleの条件で取り込んだ。

## 3. 検討項目

### ①X線学的所見

#### ・単純X線

延長後7日ごとに撮影した単純X線像より形成仮骨の形態を観察した。

#### ・軟X線

撮影した軟X線写真より、以下の項目について評価を行った。

A) 剖検で摘出した骨について撮影した細血管造影像より、延長仮骨領域およびDocking Siteへの周囲組織からの血管供給を観察した。

B) 摘出した内転筋の重量、体積を測定した後、血管新生の評価として軟X線像より血管密度、径300以上の血管数を比較した。スキャナーにて取り込んだ画像を画像処理ソフト (Photoshop<sup>®</sup>: Adobe Systems) を用いて明暗反転させ、2階調化して、そのピクセル数を血管ピクセル数とした。その値と筋肉断面のピクセル数より血管密度を求めた。また、コントロール肢の全ピクセル数に対する延長肢の血管密度も求めた。直径 $300\mu\text{m}$ 以上の血管数の測定は画像処理ソフト (Photoshop<sup>®</sup>: Adobe Systems) を用いて各筋肉の筋腹部に横軸方向に直線を引き、その直線と交差する $300\mu\text{m}$ 以上の血管像を細動脈として数えた。

### ②剖検肉眼所見

剖検時、延長仮骨部と周囲組織を肉眼的に観察した。

### ③組織学的所見

Coleのヘマトキシリン・エオジン染色を実施した切片より、延長仮骨部位とドッキング部の線維性結合組織、骨組織、軟骨組織、血管、骨膜などについて観察を行った。

### ④研磨切片における蛍光観察

・延長仮骨領域近位部、遠位部の横断面における骨ラベリング像を、最高級写真顕微鏡 (AX80TR: Olympus) を用いて観察した。この際、アリザリンではIG励起法、オキシテト

ラサイクリンではU励起法、カルセインではIB励起法を用いた。

・延長仮骨の骨ラベリング像(100)を画像解析ソフト(DP70:Olympus)で取り込み、各励起法ごとの画像を重ね合わせた。各蛍光標識色素によるラベリング間の距離を10ヶ所計測しその平均を、intervalの日数で除し、石灰化速度(mineral appositional rate,MO)を求めた。計測は延長仮骨部の遠位横軸断面で行い、その平均を石灰化速度とした。

#### ⑤統計学的解析法

統計処理ソフト(StatView<sup>®</sup>:SAS Institute)を用いて解析を行った。延長肢のデータとコントロール肢のデータを比べる際にはWilcoxon signed rank testを用いた。また相関関係を調べる際には、ピアソンの相関係数を用いた。いずれの場合においても、有意水準を危険率5%未満とした。

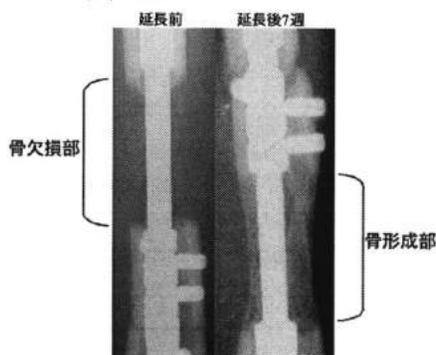
## 4. 結果

### ① X線学的所見

#### 単純X線 (Fig.2)

全例、骨欠損部に新生骨が観察された。どの例も術後2週(延長後1週)の時点で大腿骨遠位骨片後面より仮骨が観察された。大腿骨遠位骨片からの仮骨形成が優位であったが術後3週の時点では輸送骨からも仮骨形成がみられた。ただし完全にdockingしたものは2例にとどまった。原因は機械の破損が2例、固定性の問題で移動骨片が脱転したものが2例であった。

Fig.2) X線所見

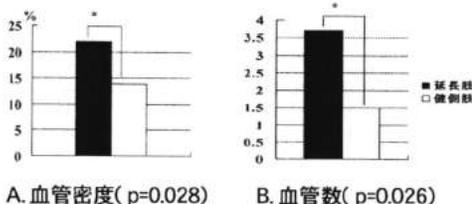
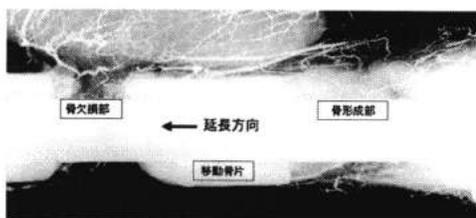


### ・軟X線所見 (Fig.3)

① 延長仮骨部の周囲組織には旺盛な新生血管が確認された。特に付着する内転筋から新生血管が延長仮骨部へ侵入していた。新生血管の中には一度遠位側に伸び、折り返して近位に伸びている像がみられ、移動骨片に血液供給している血管が移動骨片とともに移動し、それに合わせて延長されたと考えられた。横断面では周囲組織より延長仮骨部に新生血管が侵入しているのが観察された。

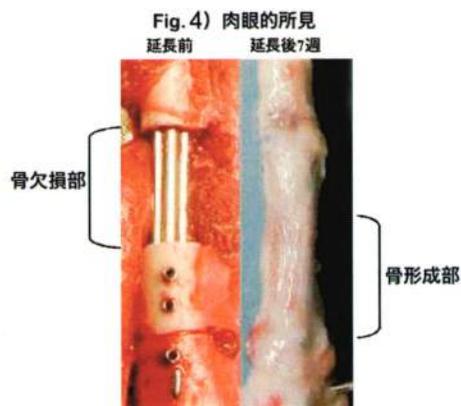
内転筋の体積は延長肢平均54.0±9.9ml、コントロール肢(健側肢)81.3±11.5ml、(p=0.028)、重量は延長肢平均52.6±10.2g、コントロール肢80.6±9.6g(p=0.028)であり、体積、重量とも有意差がみられ、コントロール肢に比べ約30%減少していた。軟X線像は、延長肢は太い血管から細い血管が木の枝状に蜜に分布し、四方にきめ細かに広がっている像が観察されたが、それらのコントロール肢では、延長肢ほどの太い血管は少なく、細い血管も分布しているが延長肢と比較してみると、それほど分布が密ではなかった。血管密度の測定では、延長肢では22.0±6.4%、コントロール肢では13.9±4.6%(p=0.028)と延長肢で高く、有意差が認められた。筋腹部における直径300μm以上の血管数は、内転筋の延長肢では3.7±2.0本、コントロール肢では1.5±1.0本(p=0.026)、有意差が認められ、延長肢の方が直径300μm以上の血管数は多かった。(Fig.3 A,B)

Fig.3) 軟X線所見



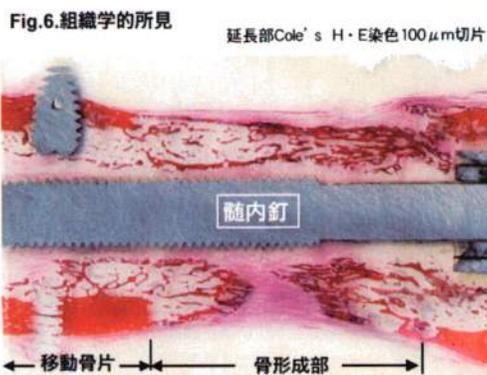
## ②肉眼的所見 (Fig.4)

肉眼的には周囲は軟部組織で覆われ延長仮骨と周囲骨とは区別できなかつた。触診上は周囲骨と同様に強固であった。延長部を覆う結合組織の表面には細血管がはっきりと確認され。それは、骨を取り巻くように全周にわたっていた。延長部周囲の結合組織に侵入する血管のほとんどは長軸方向に向かって走行していた。



## ③組織学的所見 (Fig.6)

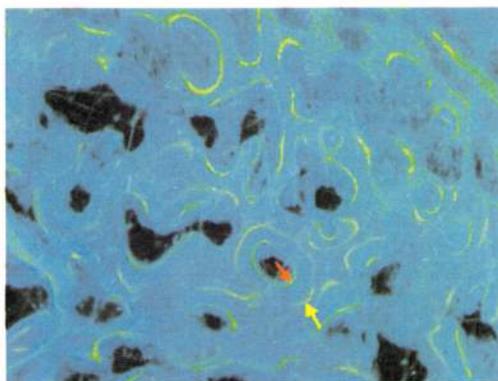
組織像では骨膜は線維が増生し、肥厚していた。未分化間葉系細胞が豊富に観察され、血管が旺盛に新生していた。延長仮骨中央では延長方向に配列する線維性組織が残存し、その近位、遠位では破骨細胞が確認されリモデリングが盛んであった。docking siteでは骨癒合を認め、骨膜も連続していた。



## ④骨ラベリング像及び石灰化速度

全例において待機期間終了時に投与したアリザリンは発色が見られなかつた。延長期間終了時に投与したオキシテトラサイクリンは髓腔側に多く、網状に発色していた。骨硬化期間終了前のカルセインは外骨膜側の仮骨に多く観察された。(Fig.7) 石灰化速度の解析はオキシテトラサイクリンとカルセインを用いて行った。石灰化速度は平均 $2.01 \pm 0.29 \mu\text{m}/\text{日}$  (最大値:  $2.34 \mu\text{m}/\text{日}$ 、最小値:  $1.52 \mu\text{m}/\text{日}$ )であった。

fig.7



赤矢印: 骨硬化期間終了1週前に投与したカルセイン  
黄矢印: 延長期間終了時に投与したオキシテトラサイクリン

## 5. 考察

bone segmental transport法では移動骨片への血液供給が問題となる<sup>(3)</sup>。創外固定を使用した従来のbone segmental transport法では骨膜、髓内、髓外血行より移動骨片に血液供給がある。また、仮骨形成において骨膜を温存することが重要との報告があるが<sup>(4)</sup>、今回の研究では手術時、移動骨片の骨膜は温存できず、また髓内釘挿入により髓内血行も阻害されるため移動骨片への血液供給が障害され、仮骨の形成障害、移動骨片の壊死等が危惧された。しかし、組織像で骨膜は再生し、付着する内転筋からの新生血管により十分に代償でき、強固な骨形成が起こったことが明らかとなった。

Ilizarovらは仮骨延長において、血管造影で軟部組織の血管が増多したことを報告している<sup>(5)</sup>。Aronsonはテクネシウムシンチで血流計測し延長後2週で約10倍、硬化期間であっても2~3倍増加したと報告している<sup>(6)</sup>。一般的には筋萎縮がおこると血流が低下するが、本研究においては、筋萎縮を呈していたにもかかわらず、周囲の血管が増多していた事が確認された。特に筋組織内では比較的太い径300 $\mu$ m以上の血管が増多していた。これらの結果より、本法では周囲軟部に伸展刺激がないにもかかわらず血流が増加していた事が推測される。

仮骨延長時には石灰化速度が増加することが報告されている<sup>(7)</sup>。一般的に犬の石灰化速度は1日1.5 $\mu$ mと報告されているが<sup>(8)</sup>、本研究でも同様に石灰化速度は増加していた。骨のremodelingが良好に起こっていることが確認された。

我々が開発した犬用骨延長機能付き髓内釘の問題点として、サイズが小さく、強度、固定法に問題があった。また仮骨が一部髓内釘の窪みに形成され除去できなかった。臨床応用に際しては解決しなければならない点である。機能的には十分臨床応用できる方法と考えられ、外傷や感染、骨腫瘍切除後の骨欠損、人工関節ステムに延長機能を組み込み、ゆるみやセメント除去によるステム周囲の骨欠損等に対し十分応用できると考えられる。

## 6. 結 語

本方式による仮骨延長で画像的、組織学的に強固な新生骨形成を確認した。周囲軟部組織には良好な新生血管を確認した。髓内釘により髓内血行の障害が危惧されたが、移動骨片には内転筋より旺盛な新生血管を画像的、定量的にも確認された。本方式の新生骨は石灰化速度も速く、従って骨のremodelingも良好であり、本髓内釘は十分に臨床応用可能と考えられる。

## 参考文献：

- [1] Kenwright, J., and Albinana, J. 1991. Problems encountered in leg shortening. *J. Bone Joint Surg. Br.* 73:671-675.
- [2] Raschke, M.J. 1992. Segmental transport after undreamed intramedullary nailing. Preliminary report of a "Monorail" system. *Clin. Orthop.* 282:233-240.
- [3] DsCoster, T.A., Shimpson, A.H., Wood, M., Li, G., Kenwright, J. 1999. Biologic model of bone transport distraction osteogenesis and vascular response. *J. Orthop. Res.* 17(2):238-245.
- [4] Yasui, N., Kojimoto, H., Sasaki, K., Kitada, A., Shimizu, H. and Shimomura, Y. 1993. Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin. Orthop.* 293:55-60.
- [5] Ilizarov, G. A., 1989. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues, part ; The influence of stability of fixation and soft tissue preservation. *Clin. Orthop.* 238:249-281.
- [6] Aronson, J. 1994. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin. Orthop.* 301:124-131.
- [7] Ilizarov, G.A. 1975. Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis. *Orthop. Traumatol. Protez.* 10:7-15. (Translated from Russian).
- [8] 乗松尋道 1986. 骨吸収に関する定量的分析法. 骨形態計測 volume 6, 骨の定量的分析法 (乗松尋道編). pp.2-8. 西村書店, 東京.