

Experimental Studies on Vascular Bundle Transplantation to Free Iliac Bone

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8046

遊離骨に対する血管束移植の実験的研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 野村 進教授)

金 粕 浩 一

(昭和63年5月19日受付)

大きな骨欠損に対し従来の遊離自家骨移植では移植骨が吸収されたり腐骨となり不成功に終わることが少なくない。そこで遊離移植骨の吸収・腐骨化の予防と確実な生着のために、遊離骨に血管束移植を行い、血行再建と骨新生が促進されるかを検討するため以下の実験を行った。75頭の雑種成犬を用い、伏在動静脈を血管束とし、腸骨より採取した遊離骨内に移植し、遊離骨の血行再建と骨の修復機転を組織学的に検討した。実験方法は、採取した 3.0×3.0cm 大の腸骨片の骨髓中心部に長軸方向に直径 2.5mm の孔を穿ち、ここに血管束を挿入した。腸骨片はいずれも大腿部皮下に埋没した。骨髓中心部の孔に血管束を移植したものを A 群、血管束移植後遊離骨をシリコン膜で包み周囲組織より隔離したものを B 群、対照として血管束を移植しなかったもの C 群、オートクレーブ処理 (121°C, 20分間) にて実験的に壊死骨を作成し、血管束を移植したものを D 群、オートクレーブ処理骨に血管束を移植しなかったものを E 群とした。移植後経時的に摘出して微小血管造影, Hematoxylin-eosin 染色, Rális tetrachrome 染色およびテトラサイクリン骨標識法を行った。結果は、A 群では移植後3週で、B 群では移植後4週で新生血管は遊離骨全体に分布し、血管網を形成するようになり、新生血管を足場として壊死骨の修復像および骨新生像が見られた。一方、C 群では血行再開が遅延し、移植後4週経過後も遊離骨の中心部には無血管野と壊死骨が残存し、骨の修復像は血管束を移植したのに比べて劣っていた。また D 群では新生血管網は移植後6週でオートクレーブ処理骨の約80%に分布していたが、E 群では血行再開が遅延し、6週経過後も新生血管網はオートクレーブ処理骨の約24%を占めるにすぎなかった。D 群と E 群では壊死骨の修復像は遊離骨に比べて明らかに劣っていた。以上の所見より、遊離骨に血管束を移植すると遊離骨への血行再建に優れた効果があり、早期の血行再開により中心部壊死を起こさずに、骨新生に優れた効果が期待できることが示された。またオートクレーブ処理骨に対しても血管束を移植することにより血行再建が認められた。

Key words vascular bundle transplantation, bone graft, autoclaved bone graft, revascularization

四肢の外傷や腫瘍の切除などにより広範囲の骨欠損をきたした場合、従来遊離骨移植による種々の再建が試みられてきた。

新鮮自家遊離骨移植は Albee¹⁾以来広く臨床に応用されている。しかし、骨欠損が大きい症例や骨移植母床として条件が悪い症例では、従来の自家遊離骨移植ではせっかくの移植骨が萎縮・吸収されたり、腐骨化して最終的に骨移植が失敗することも少なくない。そのため最近では、血管柄付骨移植が多く用いられている。血管柄付骨移植は骨の血行を温存し

たまま骨を移植するため従来の自家遊離骨移植と異なり、骨細胞が死滅せずに生存し続けるので最も確実に骨癒合が得られる。しかし、血管柄付骨移植は血管吻合などの可能な場所でなければならず、吻合血管の開存に高度の技術が必要であるなどの制限が存在する。そこで著者は、新鮮自家遊離骨移植に際し、早期に移植骨への血行再開をはかることにより、血管柄付骨移植に近い成績を得られるのではないかと考え、その手段として実験的に自家遊離骨の骨髓内に血管束を移植した。血管束を移植した群と対照

Abbreviations: BMP, bone morphogenetic protein.

として血管束を移植しなかった群を比較し、経時的に遊離骨の血行再開と骨の修復機転像を組織学的に検討した。また、新鮮自家骨移植で骨の採取量が不足した場合などには保存骨が用いられている。多くは同種骨移植であるが、免疫などの問題を除外するため、本実験では保存骨としてオートクレープ処理を行った自家骨を用いた。新鮮自家遊離骨と同様にオートクレープ処理骨の骨髓内に血管束を移植し、血管束を移植した群と対照として血管束を移植しなかった群を比較し、経時的にオートクレープ処理骨の血行再開と骨の修復機転像を組織学的に検討した。

対象および方法

I. 実験動物

10~15kg の雑種成犬75頭を使用し以下の実験を行った。フロースンの全身麻酔下に、仰臥位で下肢を開排させ大腿内側に皮膚切開を加え伏在動静脈を

展開した。伏在動静脈を一つの血管束として剝離し、大腿動静脈の分岐部より約8cm末梢部で結紮・切離した後、血管周囲の脂肪組織を温存しつつ愛護的に中枢に向かって反転した。なお実験には動物の左右両側を用いた場合(28頭)が含まれる。

II. 実験方法

1. 新鮮遊離骨移植

腸骨より3.0×3.0cm大の骨片を採取し、骨膜を除去した後、骨髓中心部に長軸方向に骨髓腔を貫くように、ドリルで直径2.5mmの孔を穿った。この中へ先に遊離しておいた血管束を通したのち、腸骨片を大腿部皮下に埋没した。遊離骨周囲の母床の変化が血行再建へ与える影響を比較するために次の3群に分類した。遊離骨周囲の血行が良い群として血管束を移植したものをA群(27頭)、遊離骨周囲の血行が悪い群として血管束を移植後、腸骨片をシリコン膜で包み周囲組織より隔離したものをB群(26頭)、対

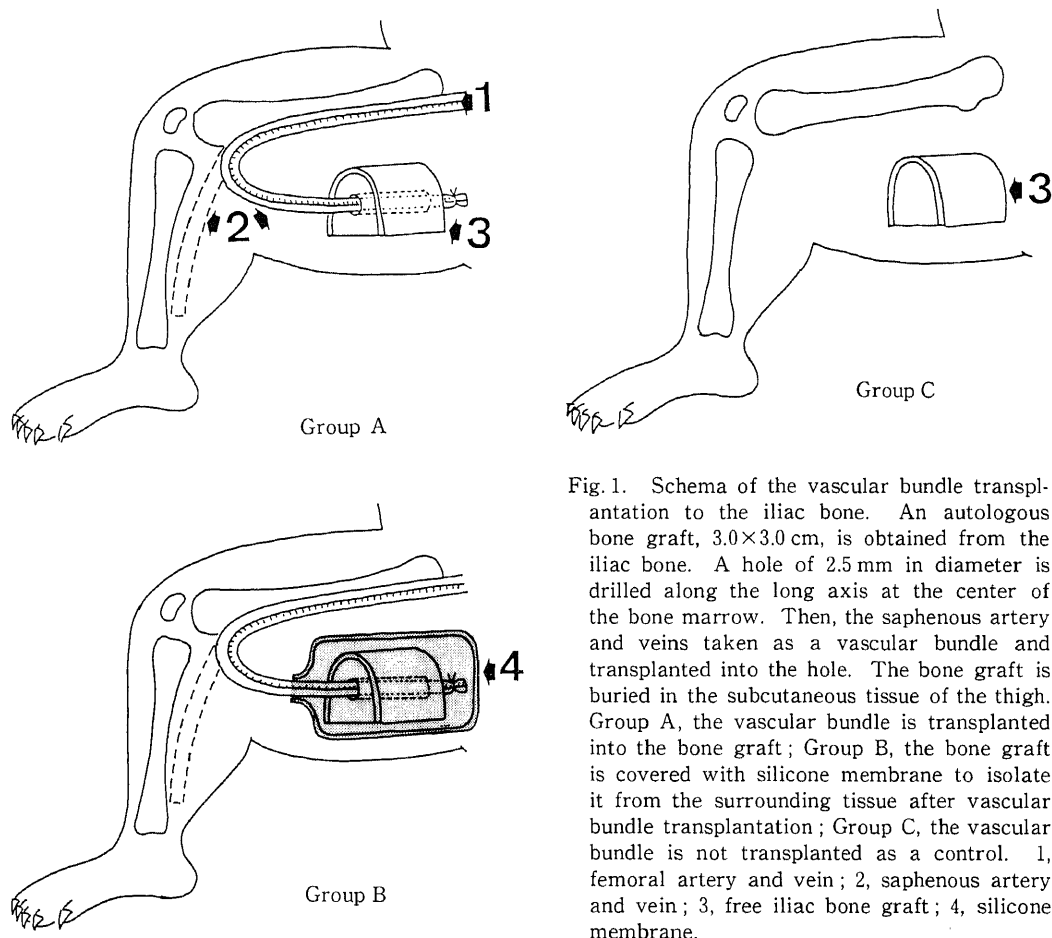


Fig.1. Schema of the vascular bundle transplantation to the iliac bone. An autologous bone graft, 3.0×3.0 cm, is obtained from the iliac bone. A hole of 2.5 mm in diameter is drilled along the long axis at the center of the bone marrow. Then, the saphenous artery and veins taken as a vascular bundle and transplanted into the hole. The bone graft is buried in the subcutaneous tissue of the thigh. Group A, the vascular bundle is transplanted into the bone graft; Group B, the bone graft is covered with silicone membrane to isolate it from the surrounding tissue after vascular bundle transplantation; Group C, the vascular bundle is not transplanted as a control. 1, femoral artery and vein; 2, saphenous artery and vein; 3, free iliac bone graft; 4, silicone membrane.

照として遊離骨に血管束を移植しなかったものを C 群 (30頭) とした (図 1)。

2. オートクレープ処理骨移植

腸骨より実験 1 と同様に腸骨片を採取した後、Köhler²⁾の方法に準じてオートクレープ処理 (121°C, 20分間) にて壊死骨を作成し大腿部皮下に埋没した。オートクレープ処理骨に血管束を移植したものを D 群 (10頭)、対照としてオートクレープ処理骨に血管束を移植しなかったものを E 群 (10頭) とし

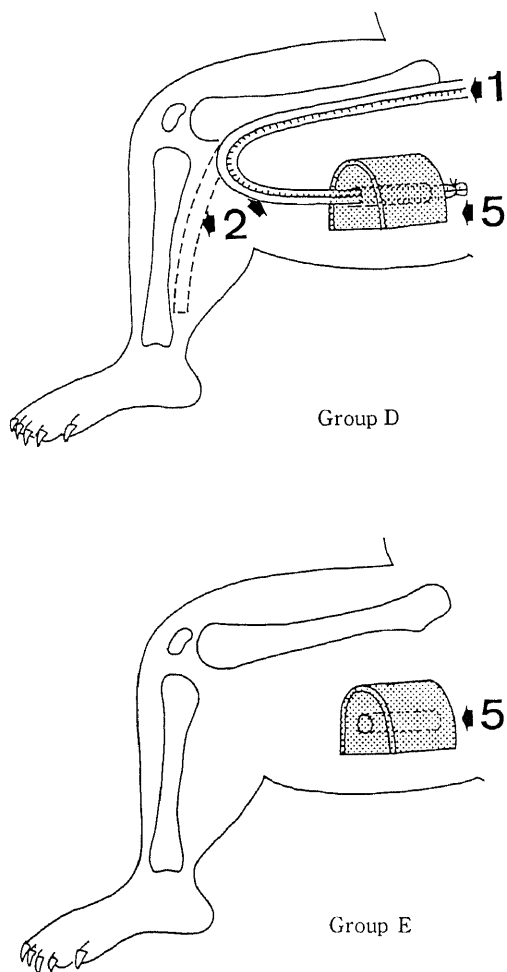


Fig. 2. Schema of the vascular bundle transplantation to the necrotized bone. Group D, the bone is autoclaved to make a necrotic bone, and the vascular bundle is transplanted inside it; Group E, the vascular bundle is not transplanted to the necrotized bone. 1, femoral artery and vein; 2, saphenous artery and vein; 5, autoclaved iliac bone.

た (図 2)。

III. 観察方法

血管束移植後 1 週, 2 週, 3 週, 4 週, 一部の標本では 6 週, 2 カ月, 3 カ月経過時に腸骨片を摘出して以下の検討を行った (表 1)。

1. 微小血管造影法

1) 墨汁注入法

全身麻酔下に開腹し, 約 40°C に加温したヘパリン加生食水 (ヘパリン 50 単位/ml) を約 100mmHg の加圧で腹部大動脈より注入しつつ, 腹部大動脈より濁血操作を行った。流出液が透明化したのちに, 5%ゼラチン・10%ホルマリン・20%墨汁加生理食塩水を約 40°C に加温し 1000~1500ml 注入した。爪床が黒変する時をもって注入を中止した。注入後は直ちに全身を冷却し, 約半日後に骨を摘出した。摘出標本は 10%ホルマリン液で 1 週間固定後, 硝酸・くえん酸ナトリウム法にて脱灰した。

2) 新生血管網計測法

各群それぞれ 3~5 頭について計測した。

i. 標本の中央部分から約 5mm の切片を切り出し, 横断切片を約 500 μ m の厚さに作製した。アルコール脱水後ツェデル油に浸して透徹標本として接写撮影した。

ii. i と同様に約 5mm の切片を切り出し, パラフィン包埋を行い 15 μ m の横断切片を作製した。Henning³⁾の point count 法に準じて, 顕微鏡倍率 100 倍下でマイクロメーターディスクを用いて墨汁の存在する部分を計測し, 標本の全横断面積に対する新生血管網の範囲を測定した。

2. Hematoxylin-eosin 染色法

10%ホルマリンで固定し, 脱灰後パラフィン包埋を行い 4~6 μ m の横断切片を作製・染色した。

3. Rális tetrachrome 染色法

パラフィン包埋後に約 15 μ m の横断切片を作製し Rális tetrachrome 染色を行った。本法により類骨は濃青色に染色され, 石灰化骨はレンガ色に, 骨芽細胞はオレンジ色に染色され明瞭に区別される。

4. テトラサイクリン骨標識法

各群それぞれ 1~2 頭について標本摘出の 1 週間前にテトラサイクリンによる骨標識をおこなった (20mg/kg/day, 3 日間経口投与)。摘出標本を 70% アルコールによって固定し, メチルメタクリレート樹脂包埋し研磨標本を作製, 20~50 μ m の厚さで蛍光顕微鏡にて蛍光を観察した。本法により, 骨新生の行われている所でテトラサイクリンの蛍光が認められる。

成 績

I. 新鮮遊離骨移植

1. 微小血管造影所見 (表2)

1) 移植後1週目 (図3)

A 群: 挿入血管束は末梢まで開存していた. 血管束から樹枝状に同心円状の良好な血管の増生と腸骨片の周辺部からの僅かな血管の増生が認められた. 新生血管網は標本の全断面積の約30%を占めていた.

B 群: 血管束から同心円状の血管の増生が認めら

れたが, 骨周囲よりの血管は認められなかった. 新生血管網は全断面積の約25%を占めていた.

C 群: 腸骨片の周辺部から骨髓方向にごく僅かな血管の増生が認められた. 新生血管は全断面積の約5%を占めていた.

2) 移植後2週目 (図4)

A 群: 血管束からと骨周辺部からの新生血管網は一部連絡し, 全断面積の約75%を占めていた.

B 群: 血管束からの新生血管網は全断面積の約70%を占めていたが, 骨周囲よりの血管は認められ

Table 1. No. of experimental dogs (75 adult mongrel dogs)

	Follow terms							
	1 w	2 ws	3 ws	4 ws	6 ws	2 mos	3 mos	6 mos
Group A (27 dogs)	6	5	6	4		1	1	1
Group B (26 dogs)	7	6	5	6				
Group C (30 dogs)	7	7	6	6				
Group D (10 dogs)		3		3	4			
Group E (10 dogs)		3		3	4			

A-C graft, 9 dogs; B-C graft, 9 dogs; D-E graft, 10 dogs.
w, week; ws, weeks; mos, months.

Table 2. The rate of revascularization on the free iliac bone

	1 w	2 ws	3 ws	4 ws
Group A	1339/4644 (28.83%)	2996/3594 (83.36%)	4237/4690 (90.34%)	4898/5135 (95.38%)
	1138/3754 (30.31%)	2362/2947 (80.14%)	4678/5312 (88.06%)	4866/4963 (98.04%)
	1168/2917 (40.04%)	2814/4033 (69.77%)	4462/4516 (98.80%)	4332/4407 (98.29%)
	1226/5120 (23.94%)	3098/4652 (66.59%)	3886/3977 (97.71%)	
	1214/4833 (25.11%)			
	29.65±6.36%	74.96±8.04%	97.73±5.32%	97.24±1.61%
Group B	1101/5047 (21.81%)	2086/2816 (74.08%)	3215/4520 (71.13%)	4856/5124 (94.77%)
	1090/4880 (22.34%)	1965/2754 (71.35%)	3183/3989 (79.79%)	4128/4260 (96.90%)
	964/3977 (24.24%)	2380/3945 (60.33%)	3221/3773 (85.37%)	4012/4124 (97.24%)
	1004/2995 (33.52%)	2494/3396 (73.44%)	3579/4285 (83.52%)	
	25.48±5.46%	69.80±6.42%	79.96±6.33%	96.31±1.35%
Group C	214/5118 (4.18%)	544/3169 (17.16%)	2520/5952 (42.33%)	3304/4546 (72.47%)
	223/4996 (4.46%)	426/3522 (12.09%)	2157/4950 (43.57%)	3172/4150 (76.43%)
	196/3825 (5.12%)	439/2985 (14.70%)	2214/4877 (45.39%)	3494/3825 (91.34%)
	191/2983 (6.40%)	518/4640 (11.16%)		
	5.04±0.94%	13.78±2.70%	43.76±1.53%	80.15±9.87%

w, week; ws, weeks. The data represents mean±SD.

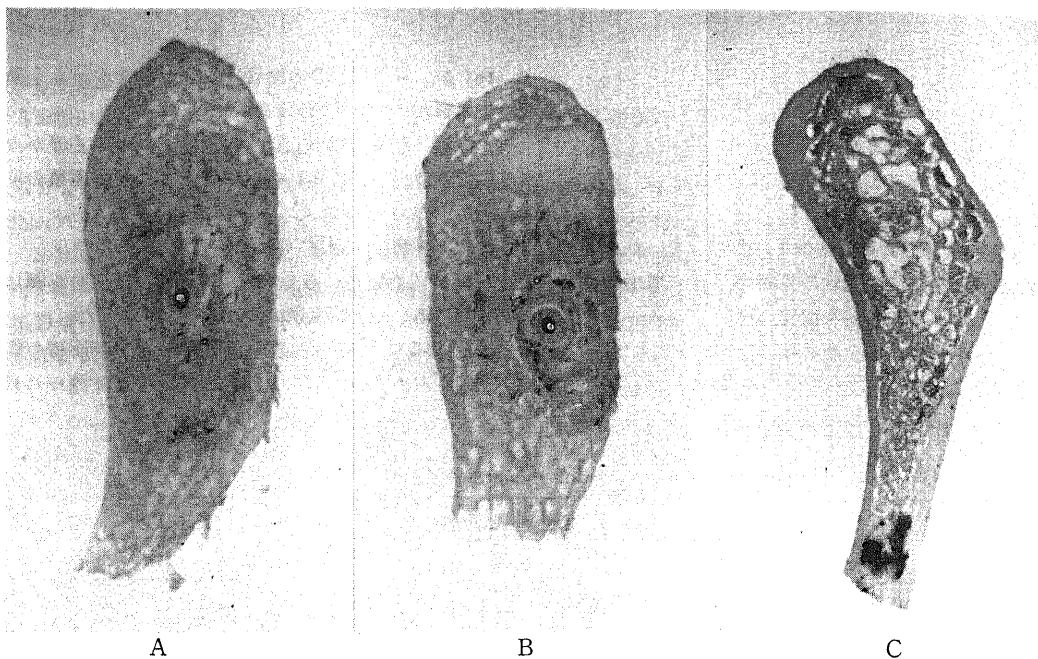


Fig. 3. Microangiogram of the bone at 1 week after operation. A, group A; B, group B; C, group C. Concentric vascular proliferation is noted around the vascular bundle in group A and B.

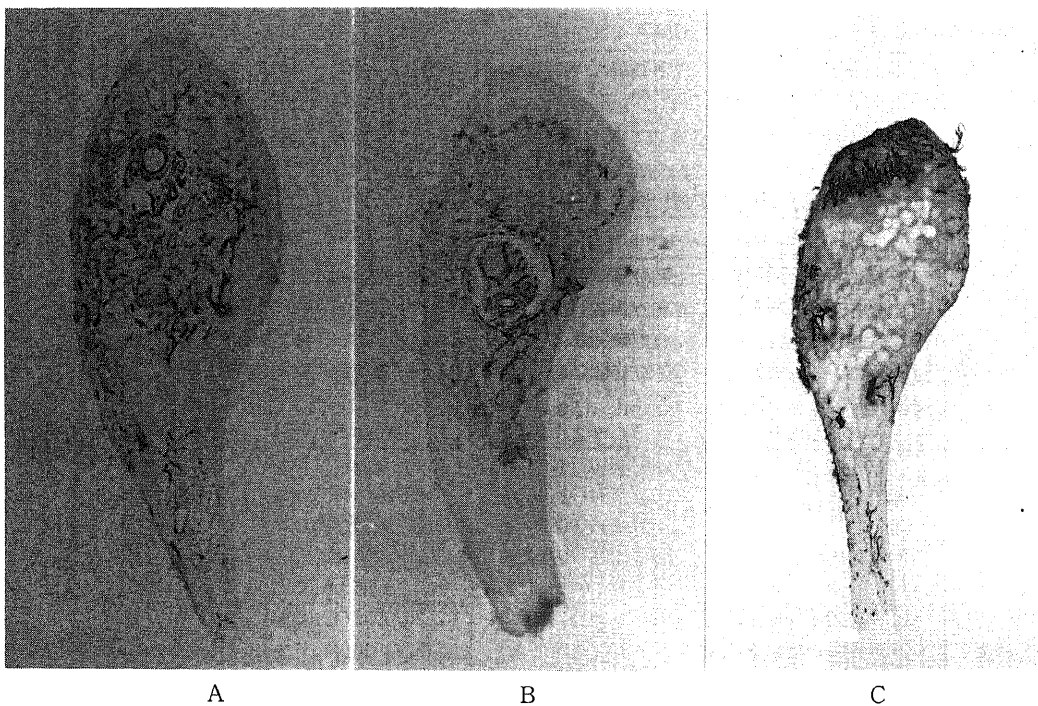


Fig. 4. Microangiogram of the bone at 2 weeks after operation. A, group A; B, group B; C, group C. Good revascularization is noted in group A.

なかった。

C 群：新生血管網は全断面積の約13%を占めていた。

3) 移植後3週目 (図5)

A 群：血管束からと骨周辺部からの新生血管網は完全に連絡し、全断面積の約97%を占めていた。

B 群：挿入血管束より血管が派生し、骨中心部より骨皮質まで分布していた。新生血管網は全断面積の約80%を占めていた。骨周囲よりの血管は認められなかった。

C 群：骨周辺部からの新生血管網は最大で内骨膜側から3mm、周囲組織と接した骨髓部から8mmの深さまで侵入していた。皮下側と筋膜側を比べると皮下側の方が血管新生に優れていた。新生血管網は全断面積の約44%を占めていた。

4) 移植後4週目 (図6)

A 群：血管束からと骨周辺部からの新生血管網は完全に連絡し、全断面積の約97%を占めていた。

B 群：新生血管は骨全体に分布した血管網を形成しており、全断面積の約96%を占めていた。骨周囲よりの血管は認められなかった。

C 群：新生血管網は全断面積の約80%を占めていたが、骨中心部には無血管野が見られた。

2. Hematoxylin-eosin 染色・Rális tetrachrome 染色所見

1) A 群

移植後1週目：骨髓腔と骨梁及び骨皮質は壊死となっていた。血管束周辺部の骨髓腔に新生血管および炎症細胞と結合組織の増生が認められ、その部分で骨芽細胞が認められた。骨皮質の表面に細胞浸潤と血管侵入が見られた。

移植後2週目：骨髓腔は大部分が血管と結合組織で置換されていた。血管束の周辺部は破骨細胞と骨芽細胞が盛んに生じており、内骨膜や骨梁内膜で woven bone が多数認められた (図7)。骨皮質内のハバース管に血管を認めた。

移植後3週目：骨髓腔は血管の増生と結合組織への置換が完了していた。内骨膜や骨梁内膜で活発な破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が見られた (図8)。ハバース管の周囲に類骨の形成と骨細胞を認めた。

移植後4週目：3週群よりも更に壊死骨の修復像が著明に認められた。すなわち新生血管を中心とした、破骨細胞による壊死骨の蚕食やそれに続く新生骨の増生、壊死骨への新生骨添加など種々の骨新生が見られた。

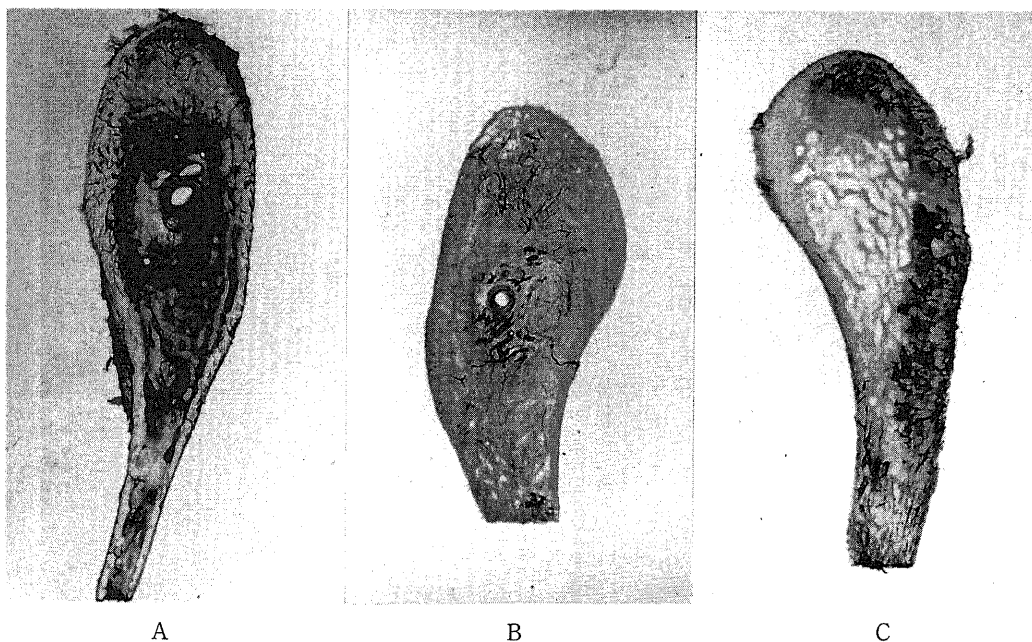


Fig. 5. Microangiogram of the bone at 3 weeks after operation.

A, group A; B, group B; C, group C. Good revascularization is noted in group A and B.

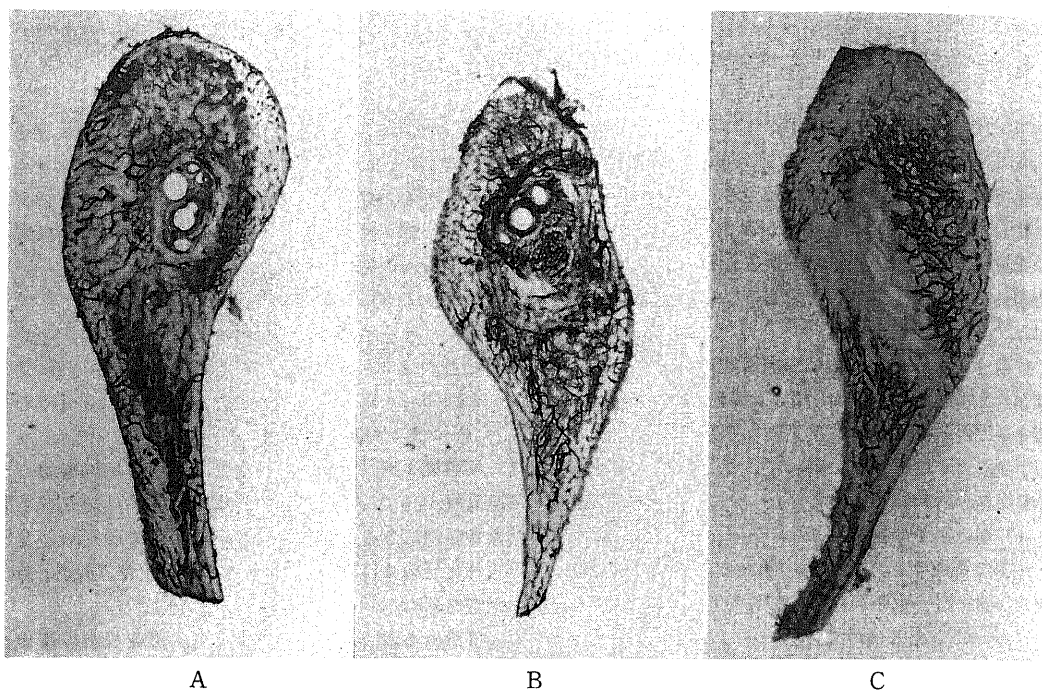


Fig. 6. Microangiogram of the bone at 4 weeks after operation.

A, group A; B, group B; C, group C. In group A and B, complete revascularization is noted, while in group C no vessel is seen in the central part of the bone.

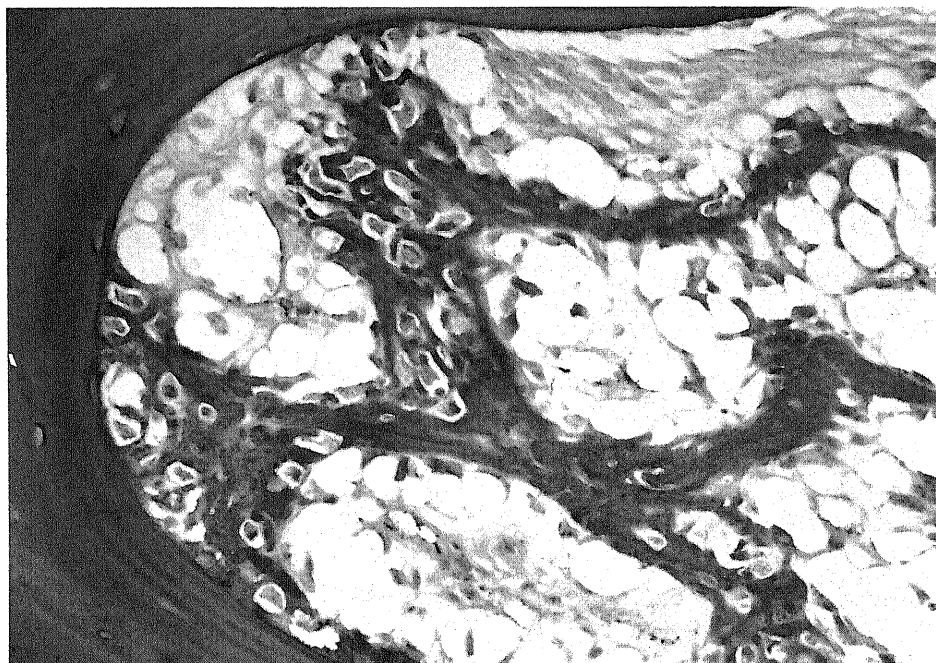


Fig. 7. Histology of the bone at 2 weeks after operation, showing the woven bone. Ralis tetrachrome stain. $\times 250$.

移植後2ヵ月目：添加性骨新生により骨梁幅は増加していた（図9）。

移植後3ヵ月目：骨髓腔に新生骨髓の形成を認め、骨髓細胞が出現していた（図10）。

2) B 群

移植後1週目：遊離骨とシリコン膜の間には薄い

偽膜様の組織が見られた。骨髓腔と骨梁は壊死となっていた。血管束周辺部には血管と炎症細胞の増生が見られA群とほぼ同じ所見であった。骨皮質の表面には細胞浸潤や血管新生は認められなかった。

移植後2週目：骨髓腔は血管束周辺部で血管と結合組織の増生が認められた。結合組織の部分では破

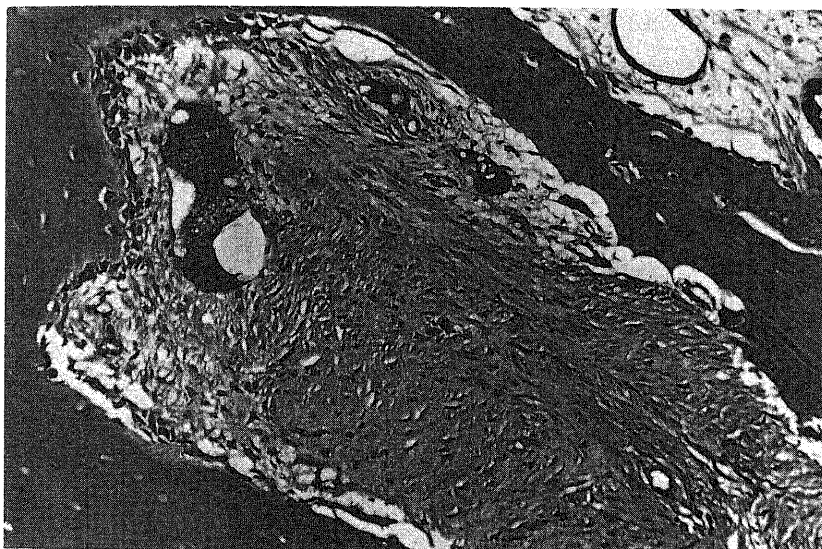


Fig. 8. Histology of the bone at 3 weeks after operation, showing the absorption of the bone by osteoclasts and appositional bone formation by osteoblasts. Hematoxylin-eosin stain. $\times 125$.

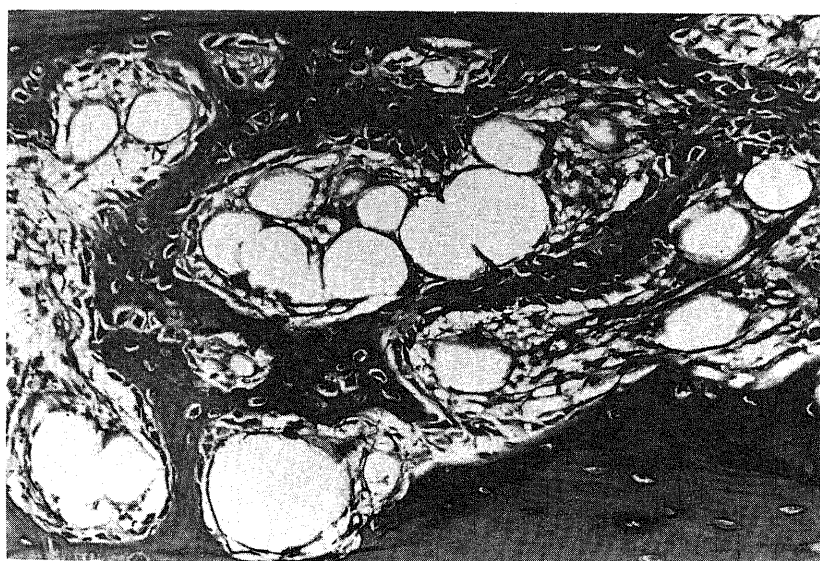


Fig. 9. Histology of the bone at 2 months after operation, showing newly formed trabeculae. Hematoxylin-eosin stain. $\times 125$.

骨細胞が主として見られ (図11), 骨吸収が活発に行われていた。woven bone の増生は認められず, A 群に比べて骨修復像は劣っていた。

移植後 3 週目: 骨髓腔には血管と結合組織の増生が見られたが, 骨の辺縁部で壊死組織が残存していた。破骨細胞を中心とした骨吸収と新生血管を足場

とした類骨の形成が認められた (図12)。

移植後 4 週目: 骨梁や骨髓には血管に富む結合組織により骨の吸収と新生が活発に認められ, 壊死骨は添加性に新生骨に置換されていた (図13)。骨皮質にはハバース管内に血管を認める部分が多く存在していた。

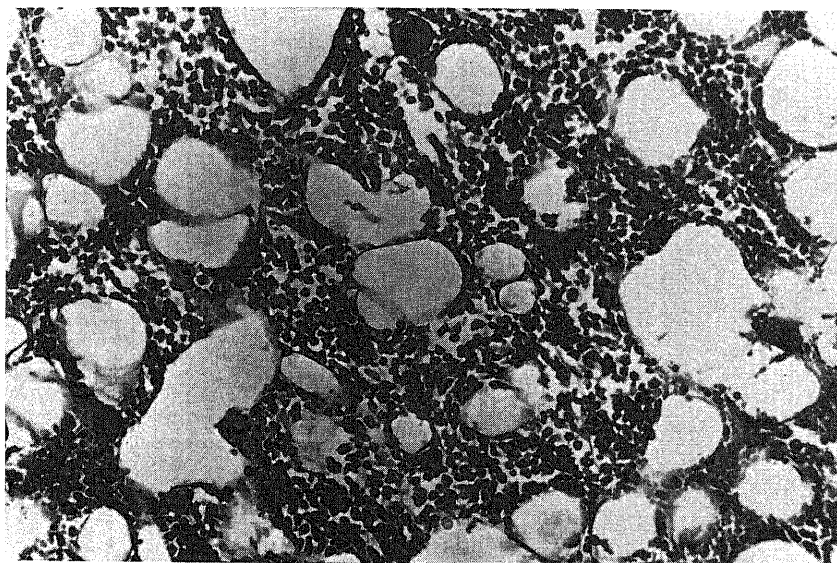


Fig.10. Histology of the bone at 3 months after operation, showing the appearance of the new bone marrow. Hematoxylin-eosin stain. $\times 160$.

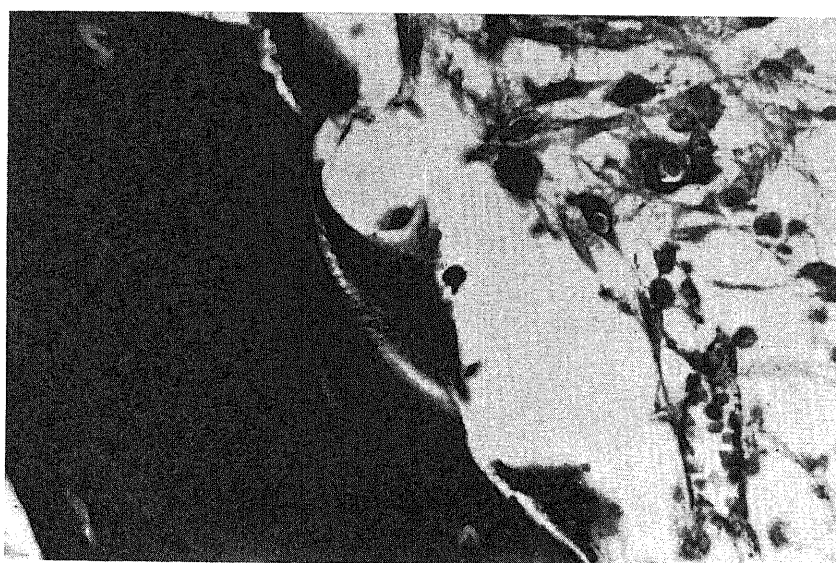


Fig.11. Histology of the bone at 2 weeks after operation, showing osteoclasts. Hematoxylin-eosin stain. $\times 400$.

3) C 群

移植後1週目：骨皮質と骨梁及び骨髓腔は壊死となっていた。周囲組織に接した骨髓腔部には僅かに細胞浸潤と血管侵入を認めた。

移植後2週目：血管の侵入は骨皮質の外側から内骨膜を越えて骨髓腔に達していた。骨皮質内に血管を伴ったハバース管を認めた。血管の侵入に伴って内骨膜に結合組織と骨芽細胞や類骨を認めた。

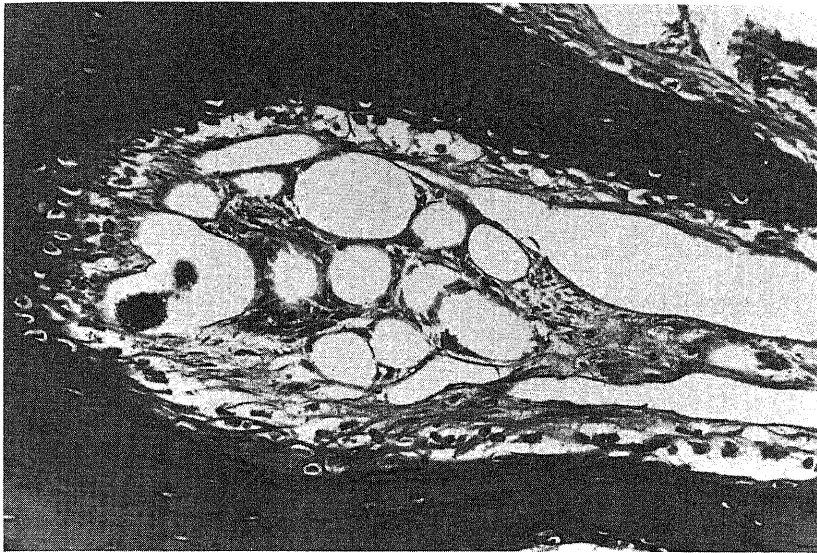


Fig.12. Histology of the bone at 3 weeks after operation, showing the osteoclasts and the appositional bone formation. Hematoxylin-eosin stain. $\times 125$.

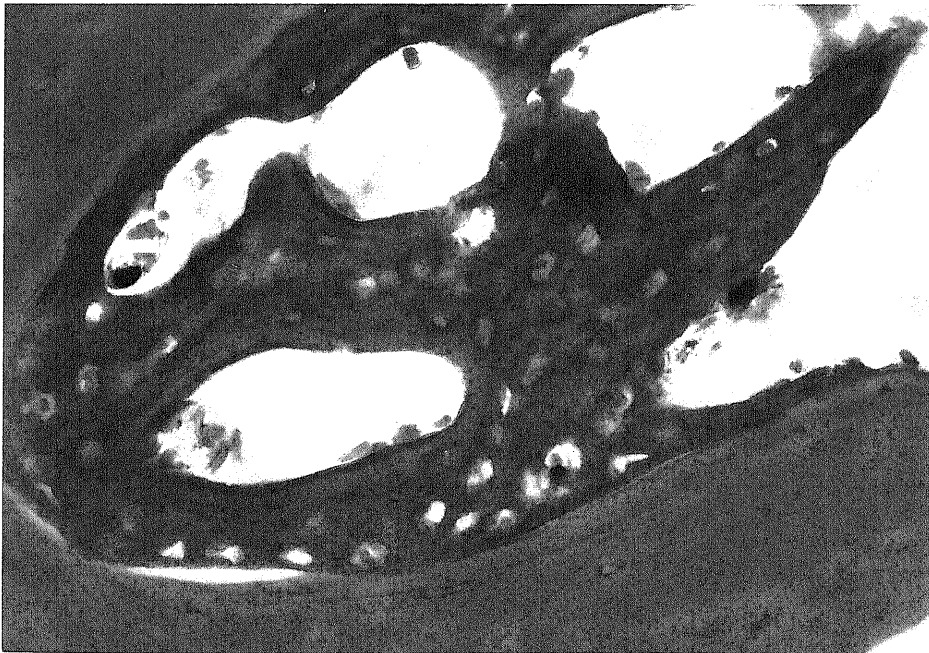


Fig.13. Histology of the bone at 4 weeks after operation, showing the newly formed bone being laid down over the dead trabeculae. Ralis tetrachrome stain. $\times 250$.

移植後3週目：骨髓腔は周囲組織から侵入した豊富な血管を伴った結合組織の所で、活発な骨吸収と骨芽細胞による添加性骨新生が見られたが、骨中心部には血管や結合組織の侵入は見られず壊死のまま

であった。

移植後4週目：血管の侵入と結合組織の増生は内骨膜を越えて骨髓腔に及んでいたが、骨中心部には無血管野と壊死骨が存在していた（図14）。内骨膜と

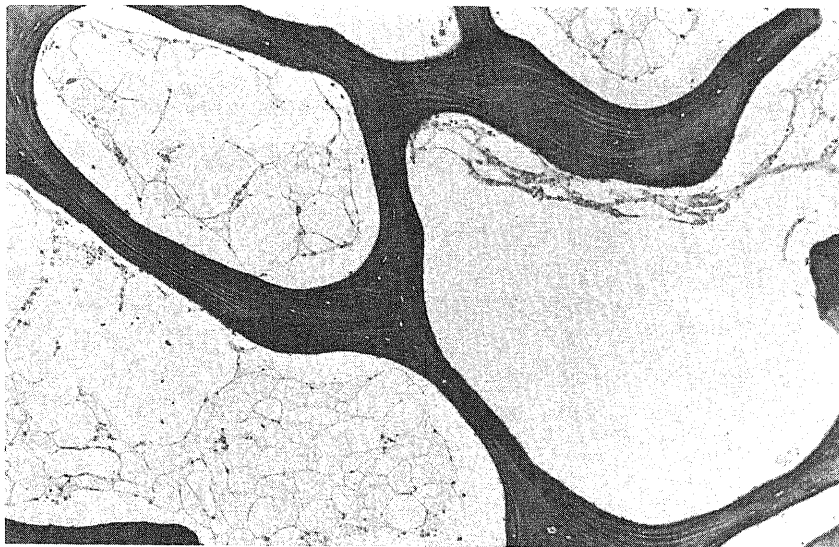


Fig.14. Histology of the central portion of the bone at 4 weeks after operation, showing the necrosis of the marrow and trabeculae. Hematoxylin-eosin stain. $\times 125$.

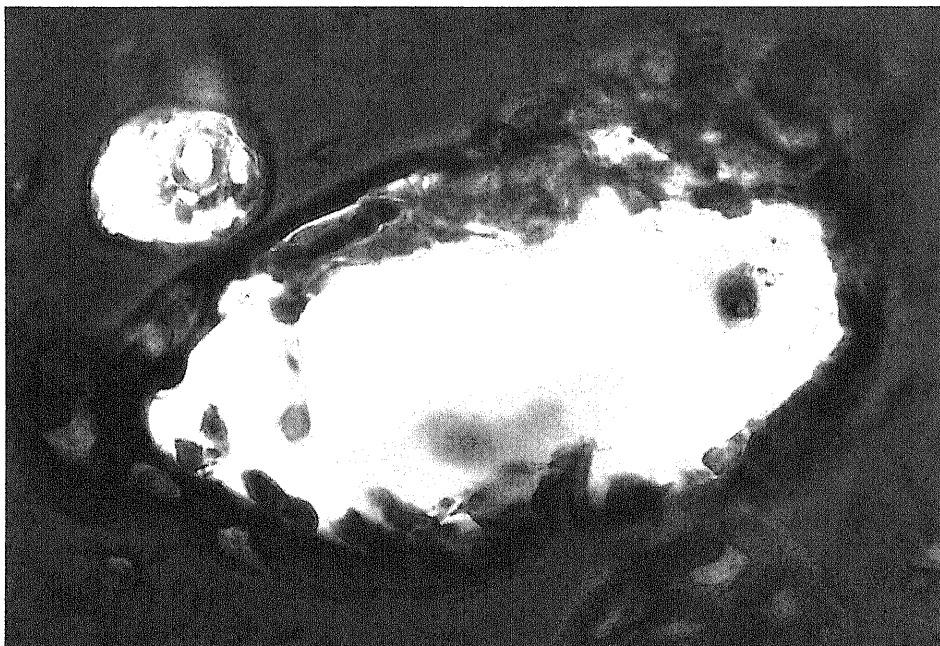


Fig.15. Histology of the bone at 4 weeks after operation, showing the Haversian canals with the new osteoid matrix. Rális tetrachrome stain. $\times 400$.

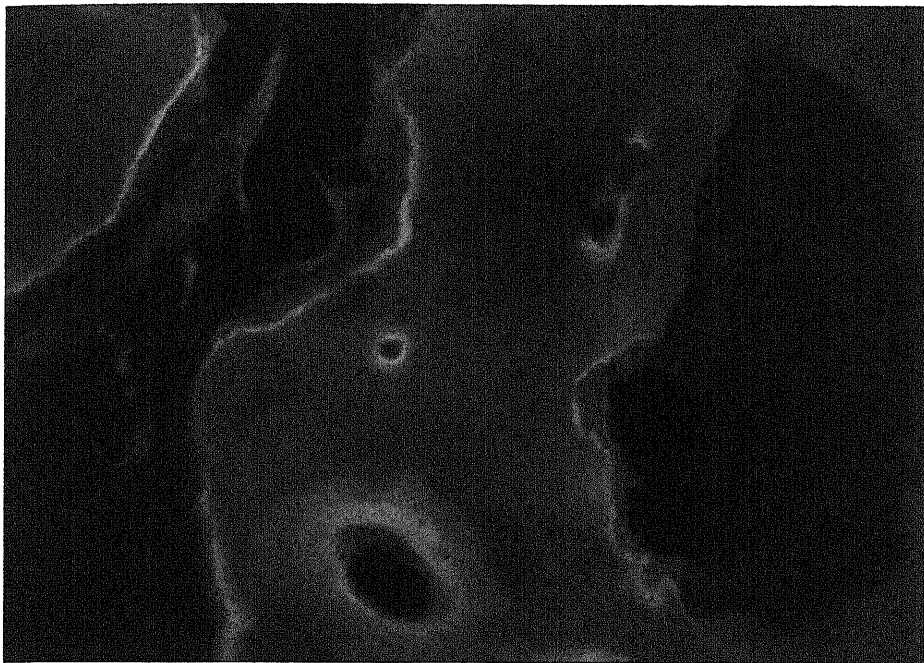


Fig.16. Histology of the bone at 4 weeks after operation, showing the fluorescence of tetracycline at the trabeculae of the bone. $\times 100$.

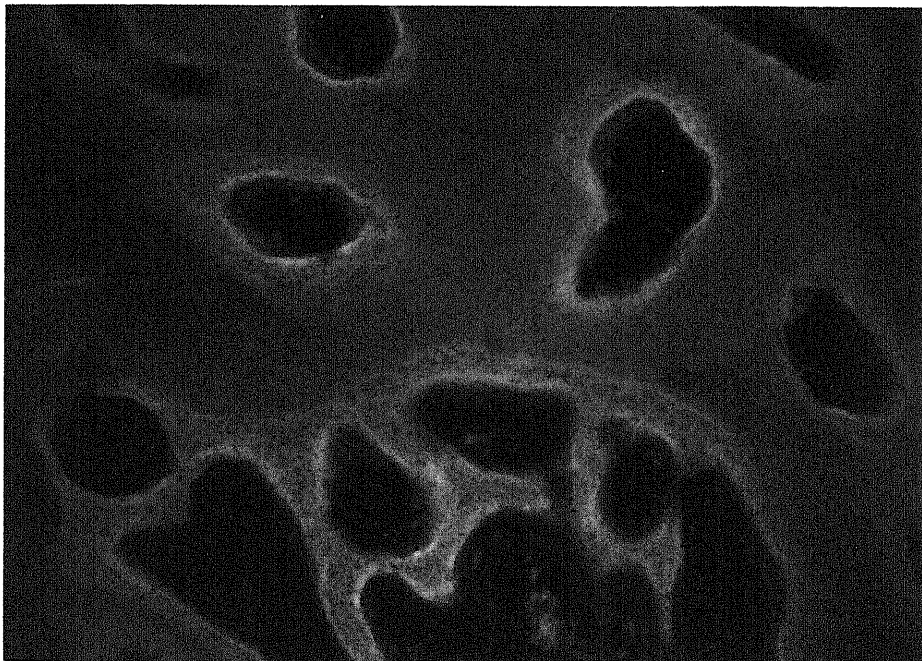


Fig.17. Histology of the bone at 4 weeks after operation, showing the fluorescence of tetracycline at the cortex of the bone. $\times 100$.

血管周囲の骨梁内膜には壊死骨の修復機転といえる骨吸収や添加性骨新生が認められた。骨皮質のハバース管内に血管と骨芽細胞及び類骨の形成などの骨新生像が活発に見られた(図15)。A群・B群に比べ骨髓腔の修復像は明らかに劣っていた。

3. テトラサイクリン骨標識所見

1) A 群

移植後1・2週目：蛍光を認めなかった。

移植後3週目：骨皮質部と内骨膜部と骨梁内膜に蛍光を認めた。

移植後4週目：遊離骨全体に蛍光を認めた。

2) B 群

移植後1・2・3週目：蛍光を認めなかった。

移植後4週目：骨梁部に蛍光を認めた(図16)。

3) C 群

移植後1・2・3週目：蛍光を認めなかった。

移植後4週目：骨皮質部と内骨膜部に蛍光を認めた(図17)。

II. オートクレープ処理骨移植

1. 微小血管造影所見(表3)

血行再開が著明に遅延していたので2・4・6週の変化につき検討した。

1) 移植後2週目

D群：血管束は末梢まで開存していた。血管束の周囲に僅かに新生血管を認めた。骨周辺部からの血管の侵入は周囲組織と接した骨髓部を除いて認めら

Table 3. The rate of revascularization on the autoclaved bone

	2 ws	4 ws	6 ws
Group D	46/3845(1.19%)	1779/4198(42.37%)	3275/3967(82.55%)
	35/3836(0.91%)	1793/3547(50.54%)	2896/3407(85.00%)
	48/3568(1.34%)	1882/3332(56.48%)	2284/3163(72.21%)
	$1.15 \pm 0.22\%$	$49.80 \pm 7.08\%$	$79.92 \pm 6.79\%$
Group E	34/3944(0.86%)	388/2688(14.47%)	637/2709(23.51%)
	38/3523(1.07%)	324/2457(13.18%)	540/2558(21.11%)
	30/3175(0.94%)	383/2166(17.68%)	635/2225(28.54%)
	$0.96 \pm 0.11\%$	$15.11 \pm 2.31\%$	$24.39 \pm 3.79\%$

w, week; ws, weeks. The data represents mean $\pm$ SD.

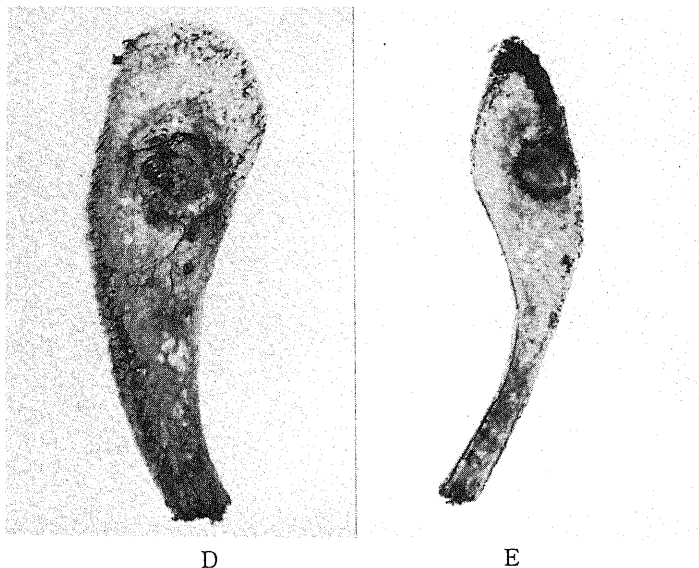


Fig.18. Microangiogram of the bone at 4 weeks after operation.
D, group D; E, group E.

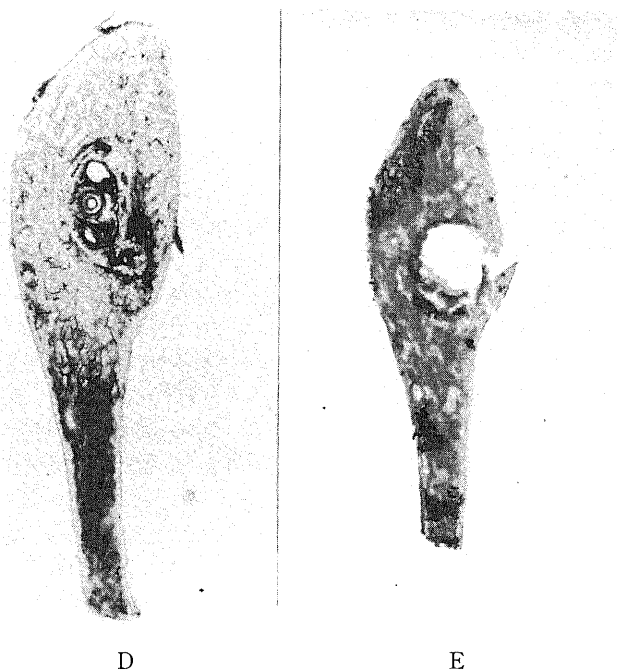


Fig.19. Microangiogram of the bone at 4 weeks after operation. D, group D; E, group E. The newly formed vascular nets occupied 80 per cent of the whole bone in group D and about 24 percent in group E.

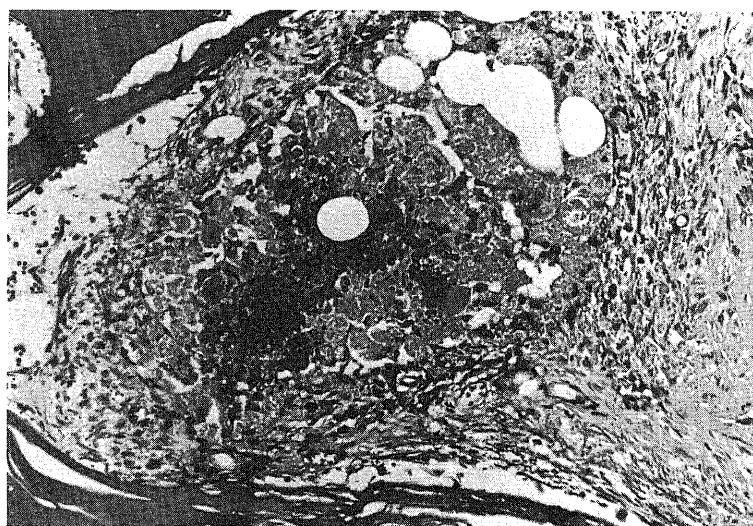


Fig.20. Histology of the bone at 6 weeks after operation, showing the necrotic bone marrow being surrounded by the connective tissue. Hematoxylin-eosin stain. $\times 125$.

れなかった。新生血管網は全断面積の約1%を占めていた。

E 群：骨周辺部からの血管の侵入は骨皮質部では認めず、周囲組織と接した骨髓部から最大で1mmの深さの範囲に認めた。新生血管網は全断面積の1%以下であった。

2) 移植後4週目 (図18)

D 群：血管束を中心とした同心円状の血管網と骨周辺部からの血管網が見られ、新生血管網は全断面積の約50%を占めていたが、同じ時期の遊離骨移植群に比べ劣っていた。

E 群：骨周辺部からの新生血管網は骨皮質を越えて骨髓腔に侵入し、最大で内骨膜から約1.5mm、周囲組織と接した骨髓部から3mmの深さの範囲に認めた。新生血管網は全断面積の約15%を占めていた。ドリル孔には墨汁のものがみられるがドリル孔からの新生血管は認められなかった。

3) 移植後6週目 (図19)

D 群：血管束及び骨周辺部からの新生血管網は骨髓腔に向かって拡大し、全断面積の約80%を占めていた。骨髓腔には無血管野が存在していた。

E 群：骨周辺部からの新生血管網は最大で内骨膜から約2mm、周囲組織と接した骨髓部から約4.5mmの深さの範囲に認めた。新生血管網は全断面積の約24%を占めていた。骨髓腔には無血管野が広

く存在していた。

2. Hematoxylin-eosin 染色・Ralis tetrachrome 染色所見

1) D 群

移植後2週目：骨髓腔と骨梁及び骨皮質は完全に壊死となっていた。血管束周囲に僅かに血管と結合組織の増生を認めた。骨皮質の表面に細胞浸潤や血管新生を認めなかった。

移植後4週目：骨髓腔には血管束を中心とした細胞浸潤や血管と結合組織の増生が見られた。内骨膜及び骨皮質にも結合組織と血管を認めた。この状態はA群の1週目よりも更に骨修復が遅れていた。

移植後6週目：骨髓腔は血管束を中心とした結合組織によって約80%が置換されていた。壊死骨髓を取り囲むように結合組織の増生が見られた (図20)。骨皮質には血管と骨芽細胞を伴ったハバース管を認めた。類骨染色では類骨は染色されなかった。この状態はA群の2週目よりも骨修復が遅れていた。

2) E 群

移植後2週目：D群と同様であった。ドリル孔の周囲に血管を認めなかった。

移植後4週目：骨周辺部からの結合組織の増生がみられた。ドリル孔付近の骨髓腔には血管や結合組織は見られなかった。

移植後6週目：骨髓腔に骨周辺部からの新生血管

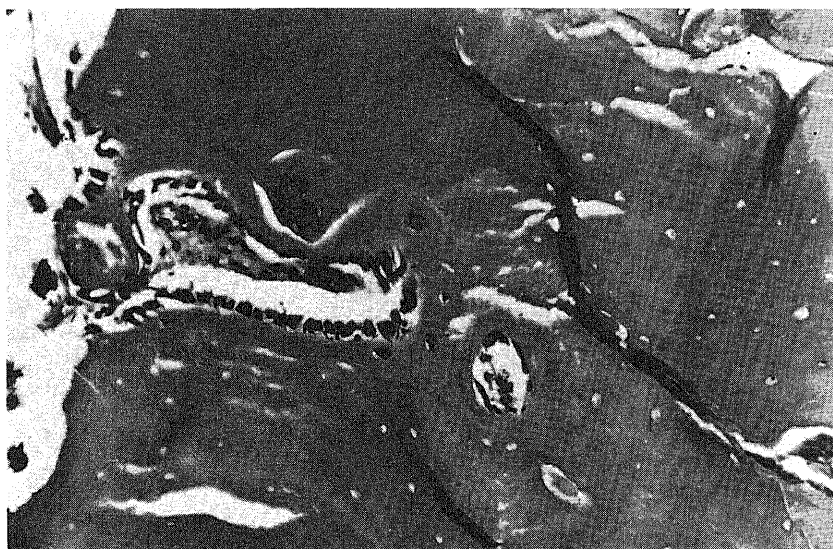


Fig.21. Histology of the bone at 6 weeks after operation, showing newly formed vessels and osteoblasts at the cortex of the necrotized bone. Hematoxylin-eosin stain. $\times 160$.

網と結合組織増生を認めた。ドリル孔には結合組織が粗に癒着していた。ドリル孔周囲の骨髓腔に僅かながら新生血管を認めた。骨皮質に血管を伴ったハバース管が見られ、骨芽細胞を認めた(図21)。類骨染色では類骨を認めなかった。

3. テトラサイクリン骨標識所見

D 群と E 群では移植後 6 週間以内ではテトラサイクリンの蛍光を認めなかった。

考 案

自家遊離骨移植は同種骨移植や異種骨移植に比べて骨誘導能と骨形成能に最も優れており、現在は新鮮自家遊離骨移植が最も多く臨床に使用されている。しかし、Rhineland⁹は完全骨欠損部に大きな骨塊として遊離骨移植を行った場合には、移植骨の中央部は長期間壊死状態として残ると述べている。つまり大きな骨塊として使用すれば力学的強度は強くなるが、移植骨の血行再開は遅延し、中心部壊死を生じたり骨の吸収や置換に非常に時間がかかる。そこで種々の血行を温存した生骨移植法が利用されている。

生骨移植には Snyder⁸らの皮膚柄付き骨移植や Davis⁹, Conlay⁷の筋肉柄付き骨移植の報告にはじまり、Östrup⁸, Taylor⁸の血管柄付き骨移植の報告以後多くの実験的臨床的報告がある^{10,11}。しかし、血管柄付き骨移植は最も確実に骨癒合が得られるが、手術に時間がかかる、血管吻合の可能な場所でないといけない、血管吻合に高度の技術を要するなどの制限が多い。また、血管吻合に失敗すると、生骨移植でなくなり、更に移植骨に付着する筋肉は壊死に陥るため感染の危険が高くなる。そこで著者は遊離大骨移植の際に、移植骨への早期の血行再開をはかることにより、生骨移植に近い骨移植方法の開発が可能か否かを検討した。

移植骨について、古くは Ollier¹²により移植骨の骨細胞は生き延びると考えられていたが、現在は海綿骨小細片の一部が移植床の組織液によって生き延びる以外は、移植骨は一度死滅したのちに再形成されるという Phemister¹³の creeping substitution 説が一般的である。本実験でも遊離骨は一旦壊死に落ちている。大部分の遊離骨移植で、移植骨は移植後に死滅し、周囲よりの毛細血管の侵入によって血行再建がなされると同時に破骨細胞による吸収を受ける。その後、移植床からの未分化間葉系細胞に由来する骨芽細胞によって再び骨の新生が生じ海綿骨と皮質骨の再構築がなされる。更に、Urist¹⁴は未

分化間葉系細胞が骨芽細胞に分化する過程で、骨組織内の基質に含まれる物質 bone morphogenetic protein (BMP) が重要であり、これが分化をおし進める原動力となると推論している。移植骨への血行再建の重要性について Springfield¹⁵は creeping substitution の比率は移植骨の血行再開の速さに依存すると報告している。つまり、早期の血行再開により移植骨の吸収・腐食化が防止可能となる。更に、骨髓内の血行再建の重要性については Rhineland⁹によれば、骨皮質のほとんどは内側2/3が骨髓動脈から栄養され、ある部分では骨皮質の全層が骨髓動脈から栄養されており、全体としての血液の流れは骨髓内より外側に向かっているという。以上の報告などから著者は、遊離大骨移植においては遊離骨の骨髓内への早期の血行再開が最も重要と考え、遊離骨の骨髓内に直接血行再建を行う方法を検討した。

骨組織に対し血管を移植して血行再開をはかる試みには Woodhouse¹⁶, Dickerson¹⁷, Torto¹⁸, Boyd¹⁹らの報告がある。しかしながら以上の報告はすべて遊離骨ではなく健常骨組織に対して行われたものである。保利²⁰は犬の脛骨を用いた実験で、7cm の長さの遊離骨とヒビテン液にて作成した 4cm の長さの壊死骨に血管束を移植することにより骨への血行再建が促進し、壊死骨の再生が期待できることを示唆した。同様の実験では矢島²¹がラットの脛骨を用いて、健常骨に血管束を移植した場合には、移植後 2 週以後において生骨移植としての移動が可能だったと報告している。しかし、前者の実験では血管束からの新生血管網の範囲が明確に示されておらず、後者の実験ではラットを使用しているため骨片が小さく臨床応用の参考とはなりにくい。しかも、臨床において最も遊離骨移植に利用されているのは海綿骨を多く含んだ腸骨であるので、著者はより臨床応用に近い遊離大骨移植の実験方法として犬の腸骨を用いた実験を行った。

実験結果は、血管束は良く開存しており、血管束刺入部も遊離骨中央部も血管束刺出部も血管束からの新生血管の派生に差はなかった。遊離骨中央部における全横断面積にたいする新生血管網の範囲は、移植後 1 週目では A 群で約 30%、B 群で約 25%、C 群で約 5%、2 週目では A 群で約 75%、B 群で約 70%、C 群で約 14%、3 週目では A 群で約 97%、B 群で約 80%、C 群で約 44%、4 週目では A 群で約 97%、B 群で約 96%、C 群で約 80%を占めていた(表 2)。遊離骨周囲の血行が良い A 群では移植後 3 週間で、遊離骨周囲の血行が悪い B 群でも移植後 4 週

間で骨全域で新血行路が完成していた。この事実は骨皮質よりの血行よりも骨髓側での血行再建が重要であることを物語っている。一方、対照として血管束を移植しなかった C 群では遊離骨周囲からの血行再開は遅延し、4 週経過後も遊離骨中心部には無血管野が存在した。すなわち、血管束を遊離骨の骨髓内に移植することで遊離骨の血行再開が早期に得られた。

本実験で遊離骨は一旦全組織が壊死におちいるが、血行の再開と共に骨新生が始まることが認められた。すなわち Hematoxylin-eosin 染色法において、壊死骨内に新生血管が増生し結合組織が侵入してくるのと並行して破骨細胞が出現し、壊死骨の吸収を開始するのに続いて骨芽細胞があらわれ、類骨の形成や新生骨の形成が活発となり creeping substitution が認められた。更に、遊離骨内に幼若な新生骨髄の形成が開始していた。遊離骨内の骨新生反応はすべて新生血管の周囲より始まっており、このことは磯部²⁰、森田ら²⁰、Trueta²⁰、Urist ら¹⁰の主張した如く、骨芽細胞の未分化細胞由来説を支持したもののといえる。

骨新生を証明する方法には、類骨染色により骨芽細胞から形成された類骨を確認する方法と、テトラサイクリンが類骨に石灰沈着を生じ骨が形成される過程で骨に取り込まれる性質を利用してテトラサイクリン骨標識による蛍光を確認する方法がある。本実験では類骨染色法においては、A 群は 2 週間で、B 群は 3 週間で遊離骨全体に類骨が認められた。C 群では 2 週間で内骨膜付近に類骨を認めたが、遊離骨中心部は骨の修復が遅れ 4 週経過後も壊死のままであった。テトラサイクリン骨標識法においても A 群は 3 週間で、B 群は 4 週間で遊離骨に骨新生が生じている事を確認した。C 群で骨片の中央部に長期間壊死部が残存している事実は、移植骨の役割上重要であり、骨髓側よりの血行再建の重要性を本実験で示している。

以上の結果から遊離骨に対する血管束移植は母床の血行が良い場合も悪い場合にも血行再建効果のみならず、骨新生に関してもすぐれた効果があることが示された。遊離骨骨髓内血管束移植法は手技が簡単で、血管吻合を必要とせず、腫瘍切除後や骨髓炎後の大きな骨欠損の補填、偽関節の治療、大腿骨頭壊死の治療などに際して自家遊離骨移植をより確実に行うために有用な方法である。更に、A 群では 2 週間経過後において血管柄付骨移植としての移動が可能となるなど新しい血管柄付骨移植の一方法と

なりうる。

新鮮自家骨移植では骨の採取量が足りない場合などに対して種々の保存骨移植法が行われている^{25)~29)}。同種骨移植や異種骨移植は目的とする骨量を容易に得ることができるが、組織適応抗原など移植免疫の問題があり、移植骨の血行再開には長期間を要する³⁰⁾。

一方腫瘍切除後に大きな骨欠損が生じ自家骨採取量が足りない場合などに対して Thompson ら²⁰⁾、Smith ら²⁰⁾、Johnston ら³⁰⁾、Harrington ら³⁰⁾がオートクレープ処理骨の臨床例を報告した。Köhler ら²⁾、Kreicbergs ら³⁰⁾はウサギを用いた実験的研究を報告している。オートクレープ処理骨移植は自家骨移植の一種であるが、腫瘍を含んだ骨を一塊として取り出しオートクレープを行ったのち、取り出した骨を元に戻す方法である。この方法では移植免疫に問題がないが、欠点として骨梁表面の BMP が変性を生じるために移植骨の血行再開と壊死骨の新生骨への置換に通常の自家骨移植の数倍の時間がかかることが報告されている。本実験では、オートクレープ処理骨の中央部における全横断面積に対する新生血管網の範囲は、移植後 2 週目では D 群で約 1%，E 群で約 1%，4 週目では D 群で約 50%，E 群で約 15%，6 週目では D 群で約 80%，E 群で約 24% を占めていた（表 3）。オートクレープ処理骨に血管束を移植した場合には 6 週後には骨全体の約 80% が血行再開されていたが、対照として血管束を移植しなかった場合には血行再開は遅延し、6 週経過後も骨全体の約 24% しか血行再開がされなかった。すなわち、遊離骨に対する血行再建効果よりは劣るが、オートクレープ処理骨に対しても骨髓内への血管束移植による骨の血行再建効果が認められた。しかし、壊死骨の修復像は遊離骨に血管束を移植した場合に比べて明らかに劣っていた。Hematoxylin-eosin 染色法においては D 群で 6 週経過後に血管束周囲の骨髓腔と骨皮質部に骨芽細胞を認め、E 群では 6 週経過後に骨皮質部のみに骨芽細胞を認めた。D 群と E 群では類骨染色法においては 6 週経過後も類骨を認めず、テトラサイクリン骨標識法においても蛍光を認めなかった。以上よりオートクレープ処理骨にも血管束移植を併用すると血行再建をいくらか促進することができる。

結 論

大骨移植における移植骨への早期の血行再建を目的として、犬の腸骨を用い、新鮮遊離骨およびオー

トクレープ処理骨の骨髓内に血管束移植実験を行い、経時的に標本を組織学的に検討して以下の結論を得た。

1. 血管束移植遊離骨群では対照群（血管束非移植群）に比べ早期に血行再開が起こる（移植後3週で血管束移植群は約97%，対照群は約44%）。

2. 血管束移植遊離骨群とその周囲をシリコン膜で包んだ群では血行再開は後者が僅か（移植後3週で約80%）に遅れるが、対照群にくらべると明らかに早い。これは遊離骨移植では骨皮質部よりの血行再開よりも、骨髓内（血管束）よりの血行再開が重要であることを示している。

3. 遊離骨は一旦壊死におちいるが、血行の再開に比例して骨の修復が行われる。従って血管束移植群は対照群に比し早期に骨修復像が見られた。なお対照群では長期間骨髓部に壊死組織が残存し、骨修復を妨げていた。

4. 血管束移植オートクレープ処理骨群は対照群（血管束非移植群）に比べ早期に血行再開が起こる（移植後6週で血管束移植群は約80%，対照群は約24%），オートクレープ処理骨移植においても血管束移植は血行再建に有用である。

5. 血管束移植オートクレープ処理骨群と血管束移植遊離骨群では前者は後者よりも血行再開が約2倍遅延する（前者は移植後6週で、後者は移植後3週で約80%）。

6. オートクレープ処理骨は骨修復機転が遊離骨に比べ遅延する。

以上、遊離骨移植の際に血管束移植を併用すれば、中心部壊死を生ずることなく骨新生に優れた効果が期待できる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師野村進教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり御助言を賜りました福井医科大学整形外科、吉村光生助教授に深く感謝の意を表します。

本論文の要旨は第70回日本整形外科災害外科学会において発表した。

文 献

- 1) Albee, F. H.: Fundamentals in bone transplantation. *J. Am. Med. Ass.*, **81**, 1429-1432 (1923).
- 2) Köhler, P., Glas, J. E., Larsson, S., & K-reichbergs, A.: Incorporation of nonviable bone grafts. *Acta. Orthop. Scand.*, **58**, 54-60 (1987).
- 3) Henning, A.: Microscopic volume determination and probability. *Lab. Invest.*, **12**, 460-464 (1963).
- 4) Rhineland, F. W.: Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin. Orthop.*, **105**, 34-81 (1974).
- 5) Snyder, C. C., Bateman, J. M., Davis, C. W., & Warden, G. D.: Mandibulo facial restoration with live osteocutaneous flaps. *Plast. Reconstr. Surg.*, **45**, 14-19 (1970).
- 6) Davis, J. B., Fagan, T. E., & Beals, R. K.: Follow-up notes on artiles previously published in the journal muscle-pedicle bone graft in hip fusion. *J. Bone Joint Surg.*, **53-A**, 1645-1647 (1971).
- 7) Conley, J.: Use of composite flaps containing bone for major repairs in the head and neck. *Plast. Reconstr. Surg.*, **49**, 522-532 (1972).
- 8) Östrup, L. T. & Fredrickson, J. M.: Distant transfer of a free living bone graft by microvascular anastomoses. *Plast. Reconstr. Surg.*, **54**, 274-285 (1974).
- 9) Taylor, G. I., Miller, G. D. H., & Ham, F. J.: The free vascularized bone graft. *Plast. Reconstr. Surg.*, **55**, 533-544 (1975).
- 10) Berggren, A., Weiland, A. J., & Östrup, L. T.: Bone scintigraphy in evaluating the viability of composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses, conventional autogenous bone grafts, and free non-revascularized periosteal grafts. *J. Bone Joint Surg.*, **64-A**, 799-809 (1982).
- 11) Goldberg, V. M., Shaffer, J. H., Field, G., & Davy, D. T.: Biology of vascularized bone grafts. *Orthop. Clin. Nor. Am.*, **18**, 197-205 (1987).
- 12) Ollier, L.: *Traité expérimental et clinique de la regeneratia des os et de la production artificielle du tissu osseux.* Paris Victor Masson et fils., (1867).
- 13) Phemister, D. B.: The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **19**, 303-333 (1914).
- 14) Urist, M. R. & Strates, B. S.: Bone morphogenetic protein. *J. Dent. Res.*, **50** (supple. 6), 1392-1406 (1971).

- 15) **Springfield, D. S.:** Massive autogenous bone grafts. *Orthop. Clin. Nor. Am.*, **18**, 249-256 (1987).
- 16) **Woodhouse, C. F.:** The transplantation of patient arteries to bone. *J. Internat. Coll. Surg.*, **39**, 437-446 (1963).
- 17) **Dickerson, R. C.:** The diversion of arterial blood flow to growing bone. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **123**, 103-110 (1966).
- 18) **Torto, U. D. & Zannini, G.:** Technic for arterial transplants into the growing distal epiphysis of femur. *Internat. Surg.*, **47**, 362-370 (1967).
- 19) **Boyd, R. J. & Ault, L. L.:** An experimental study vascular implantation into the femoral head. *Surg. Gynecol. Obstet.*, **121**, 1009-1014 (1965).
- 20) 保利嘉英, 増原健二, 玉井 進, 奥田寿夫, 坂本博志, 田北武彦: 骨組織への血管移植. 日整会誌, **52**, 25-44 (1978).
- 21) 矢島弘嗣, 玉井 進, 水本 茂, 五島 淳, 増原健二: **Secondary living bone graft** の実験的研究. 形成外科, **30**, 171-181 (1987).
- 22) 磯部 饒: 骨はどのようにしてできているか. 整形外科, **25**, 893-900 (1974).
- 23) 森田正之, 磯部 饒, 荒井孝和: **Osteogenesis** の基礎的研究. 骨代謝, **5**, 65-70 (1972).
- 24) **Trueta, J.:** The role of the vessels in osteogenesis. *J. Bone Joint Surg.*, **45-B**, 402-418 (1963).
- 25) **Inclan, A.:** The use of preserved bone graft in orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg.*, **24**, 81-96 (1942).
- 26) **Bush, L. F.:** The use of homogenous bone grafts. *J. Bone Joint Surg.*, **29**, 620-629 (1947).
- 27) **Maatz, R. & Bauermeister, A.:** A method of bone maceration. *J. Bone Joint Surg.*, **39-A**, 153-166 (1957).
- 28) 太田正紀: ^{60}Co 照射骨移植に関する実験的研究. 医学研究, **33**, 253-268 (1963).
- 29) 信原克哉: 異種脱蛋白骨移植の研究. 日整会誌, **39**, 761-787 (1965).
- 30) **Mankin, H. J., Gebhardt, M. C. & Tomford, W. W.:** The use of frozen cadaveric allografts in the management of patients with bone tumors of the extremities. *Orthop. Clin. Nor. Am.*, **18**, 275-289 (1987).
- 31) **Thompson, V. P., Steggall, C. T.:** Chondrosarcoma of the proximal portion of the femur treated by resection and bone replacement. *J. Bone Joint Surg.*, **38-A**, 357-367 (1956).
- 32) **Smith, W. S., & Simon, M. A.:** Segmental resection for chondro sarcoma. *J. Bone Joint Surg.*, **57-A**, 1097-1103 (1975).
- 33) **Johnston, J. O., Harries, T., Alexander, C. E., & Alexander, A. H.:** Limb salvage procedure for neoplasms about the knee by spherocentric total knee arthroplasty and autogenous autoclaved bone grafting. *Clin. Orthop.*, **181**, 137-145 (1983).
- 34) **Harrington, K. D., Johnston, J. O., Kauferr, H. N., Luckr, J. V., & Moor, T. M.:** Limb salvage and prosthetic joint reconstruction for low grade and selected high-grade sarcomas of bone after wide resection and replacement by autoclaved autogeneic grafts. *Clin. Orthop.*, **211**, 180-214 (1986).
- 35) **Kreicbergs, A. & Köhler, P.:** Diaphyseal reconstruction by autoclaved bone. *Acta. Orthop. Scand.*, **58**, 61-65 (1987).

Experimental Studies on Vascular Bundle Transplantation to Free Iliac Bone
Kouichi Kanekasu, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 97, 652—671 (1988)

Key words: vascular bundle transplantation, bone graft, bone necrosis, revascularization

Abstract

Conventional free bone graft for a large bone defect results occasionally in failure because of absorption of the grafted bone or formation of sequestrum. The purpose of this study is to examine the revascularization of the grafted bone and the mechanism of bone repair. Histology of the free iliac bones of 75 adult mongrel dogs was studied. An autologous bone graft, 3.0×3.0 cm, was obtained from the iliac bone. A hole of 2.5 mm in diameter was drilled along the long axis at the center of the bone marrow. Then, the saphenous artery and veins were taken as a vascular bundle and transplanted into the hole. The bone graft was buried in the subcutaneous tissue of the thigh. The vascular bundle was transplanted into the bone graft in group A. In group B, the bone graft was covered with silicone membrane to isolate it from the surrounding tissue after vascular bundle transplantation. In group C, the vascular bundle was not transplanted as a control. In group D, the bone was autoclaved to make a necrotic bone, and the vascular bundle was transplanted inside it. In group E, the vascular bundle was not transplanted to the necrotized bone. These specimens were taken out in course of time after surgery and studied histologically. The newly formed vessels were distributed over the whole bone at 3 weeks after operation in group A and at 4 weeks in group B. Moreover, an image of bone repair and bone formation was seen at the same time. In group C, no vessel was found in the central part of the bone at 4 weeks after operation and necrotic bone remained. In group D, the newly formed vessels were distributed over about 80 per cent of the whole bone at 6 weeks after operation. Revascularization was delayed in group E, the newly formed vessels occupied only about 24 per cent of the whole bone even after 6 weeks. It is concluded that the vascular bundle transplantation to free iliac bone has an excellent effect on revascularization, and a good bone repair is expected through this procedure.