

縮の防止材として臨床応用するために必要な基礎的検討を完成させることである。

骨折は、骨強度の低下した高齢者に頻発する代表的な外傷であり、上腕骨近位部・橈骨遠位端・脊椎椎体・大腿骨頸部が主な発生部位であるが、転倒様式により様々な骨折が生じる。骨折発生後、骨折部の骨癒合過程が進むに従い、骨と近接する筋肉・腱・靭帯とが癒着しそれぞれが独立した運動器としての役割を果たせなくなった結果、関節が拘縮する。関節拘縮は正常な関節運動を障害し、それまで容易であった動作も困難なものにしてしまう。しかも、重度な関節拘縮は一度発生すると長期のリハビリテーションや大掛かりな外科的処置を用いなければ、通常は解消困難である。このため、拘縮が発生する前の予防策が求められ、これまで主として運動療法の有効性が報告されてきた。しかし、効果的な運動療法には人材の確保、患者本人の向上意欲、必要となる運動器具の用意など複数の要素が求められる。しかし、これらをすべて満たすケースばかりでないことは医療現場の現状として明らかであり、運動療法とは異なる観点からの現状打開策が期待される。そこで、我々は、分担研究者の石原らが開発した MPC ポリマーゲルを新規関節拘縮防止材に応用することを創案した。この MPC ポリマーゲルは、MPC・ブチルメタクリレート・ビニルフェニルボロン酸の共重合体 (PMBV) 溶液 (A 液) とポリビニルアルコール (PVA) 溶液 (B 液) を混合して形成するものである。MPC ポリマーは生体細胞膜類似構造を有するため生体親和性も高く、様々な医療材料に臨床応用されている。また、今回の MPC ポリマーゲルは、ナノメー

ター単位の小孔を持つ蜂巢状の三次元微細構造を有するため、組織の修復に必要な液性因子の透過が期待できる一方、表面へのタンパク吸着や細胞接着を抑制するため癒着防止効果も期待できる。さらに、分担研究者の金野らの一昨年度の研究において、このゲルが生体内で A 液と B 液の 2 剤に解離し、その速度が制御可能であることが明らかとなっており、生体内解離性をも有するものである。

今年度の本研究の目的は、MPC ポリマーゲルの *in vivo* での関節拘縮防止効果を昨年度に引き続き、さらに評価することである。「骨折部の骨癒合を妨げずに、関節の拘縮を防止する」ことを明らかにするため、マウス大腿骨骨折モデルを用いて、骨折部の骨塩量所見、組織所見によりゲルの有用性を検討した。

B. 研究方法

1) マウス大腿骨骨折モデルにおける MPC ポリマーゲルの関節拘縮防止効果の検討 (組織所見)

- a) 麻酔・前処置・体位・皮切：麻酔薬として Avatin を準備し、これを腹腔内注射 (0.02 ml/g) することで麻酔を行った。右大腿部を除毛クリームで除毛し、70%エタノールにて消毒後、マウスを左側臥位とし、手術用顕微鏡下に大腿骨直上を皮膚切開した。
- b) 大腿骨の全周性剥離：手術用顕微鏡下に右大腿骨骨幹部を全長に渡り全周性に剥離し、骨と筋肉を分離した (図 1)。



図 1. 大腿骨の全周性剥離

- c) 大腿骨の骨折操作：電動ボーンソーを使用して、骨幹部中央にて大腿骨を骨折した（図 2）。



図 2. 大腿骨の骨折

- d) 骨折部の内固定：23G 普通針にて骨髓腔を拡大後、22G スパイナル針の内針を髓内釘として骨折部を内固定した（図 3）。

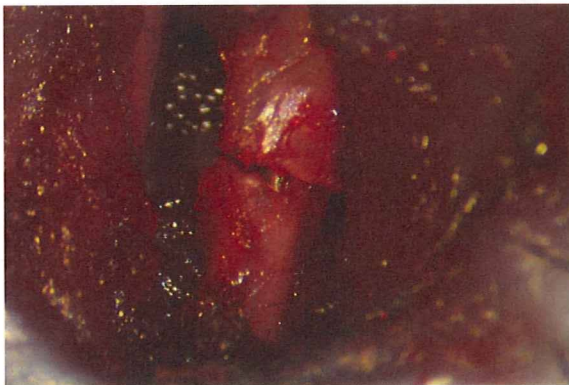


図 3. 骨折部の内固定

- e) MPC ポリマーゲルの滴下・閉創：創内を生理食塩水にて洗浄後、MPC ポリマーゲル (PMBV:PVA[%]=5.0:2.5) を 200 μ l 滴下し、骨折部を含む大腿骨周囲を被覆し、対照群では生理食塩水 200 μ l を創内に滴下した（図 4）。6-0 ナイロン糸にて皮膚縫合し、閉創した。

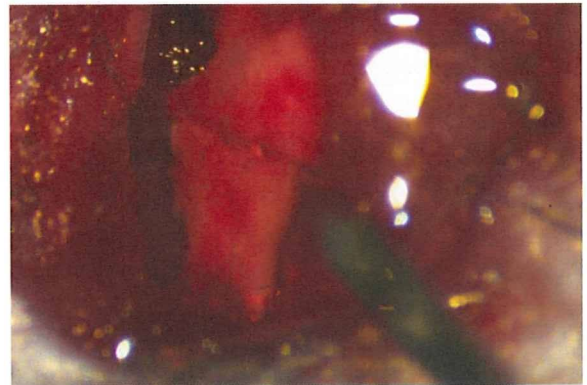


図 4. MPC ポリマーゲルの滴下

- f) 覚醒・運動：閉創後、麻酔からの覚醒を待ち、以後はケージ内で自由に運動させた。
- g) 骨折部周囲の癒着評価：術後 3 週の時点で、周囲の筋肉を含めて採取した大腿骨を組織標本とし、Hematoxylin および Eosin (H-E) にて染色した。これを顕微鏡にて観察し、骨折部と周囲の筋肉との癒着状態を評価した。合わせて骨癒合の状態も観察した。

2) マウス大腿骨骨折モデルにおける MPC ポリマーゲルの骨癒合への影響についての検討（骨塩量所見）

上記 1-f まで行い、術後 1・3・6 週で、骨折部の骨塩量変化を術前の骨塩量に対する割合 (%) として計算し、骨癒合状態を評価した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準総理府告示」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

1) マウス大腿骨骨折モデルにおける MPC ポリマーゲルの関節拘縮防止効果の検討（組織所見）

大腿骨を周囲の筋肉とともに採取し、HE 染色した後の組織所見では、術後 3 週でのゲルを使用しなかった対照群において、骨折部と周囲筋肉との間隙が見られず癒着が高度であった（図 5-a、スケールバー：200 μm 、黒矢頭：癒着あり）。一方、MPC ポリマーゲルを使用して骨折部を被覆した MPC 群では骨折部と周囲筋肉との境界に間隙が見られ、癒着が抑制されていた。また、MPC ポリマーゲルの残存は確認できず、元のポリマー水溶液に解離したものと考えられた（図 5、スケールバー：200 μm 、白矢頭：癒着なし）。また、両群ともに骨折部の離開はなく、骨癒合は同程度に進行していた。

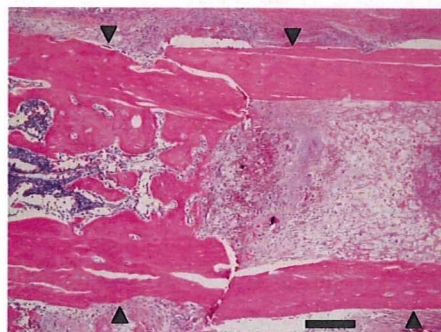


図 5-a. マウス大腿骨骨折部（対照群、術後 3 W）

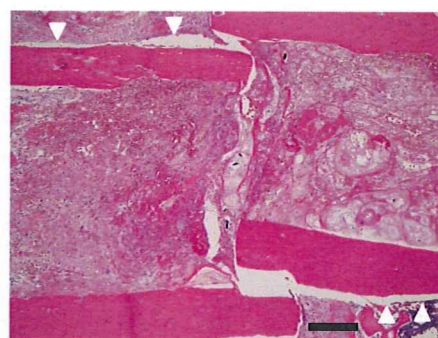


図 5-b. マウス大腿骨骨折部（MPC、術後 3 W）

2) マウス大腿骨骨折モデルにおける MPC ポリマーゲルの骨癒合への影響についての検討（骨塩量所見）

骨形成の進行程度を表す骨塩量（各群 $n=3$ ）は、術後 1・3・6 週のすべてにおいて両群間で有意な差はみられず、骨癒合の過程が同程度であることが示唆された（図 6、バー：平均値、エラーバー：標準誤差、* $P<0.05$ vs. 対照群）。

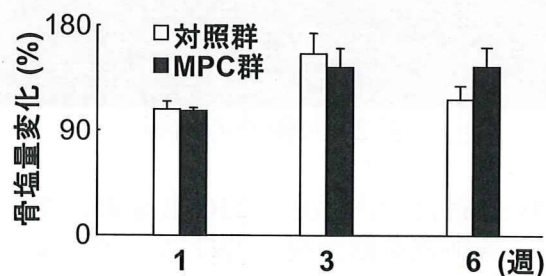


図 6. 骨塩量変化

D. 考察

今年度の研究では、昨年度確立したマウス大腿骨骨折モデルを使用し、これまでの研究にて組織癒着防止材としての有効性が特に示唆されていた MPC ポリマーゲル

(PMBV:PVA[%]=5.0:2.5) を用い、骨折部の組織所見での骨折部の癒着による関節拘縮の定性的評価と骨塩量による骨癒合の定量的評価を行うことができた。

この結果、MPC ポリマーゲルが接

合した骨組織の治癒を阻害することなく、効果的に骨折部周囲の癒着を防ぎ、これによって関節拘縮を予防することが期待できた。また、術後3週までにゲルが消失し、元のポリマー水溶液に解離したと考察された。MPC群における対照群と同程度の骨塩量変化は、サイトカインや成長因子がゲルに妨げられることなく持続的に骨折部に到達したことや、癒着防止により筋肉の可動性が改善し適度な力学的ストレスが加わったことなどに起因するものと考えられた。以上の結果から、MPCポリマーゲルは骨折治癒過程において可動域訓練を開始する最初の3週間以内に術野から解離して消失すること、ゲルが解離した後も新たな癒着が形成されることなく、骨折部の治癒もはかれること、が明らかとなった。これらのことは、骨折治療において必要以上の関節固定を行わずにすみ、骨接合術後の関節可動域制限や筋力低下などの合併症の抑制をMPCポリマーゲルの局所投与効果により期待できることを示している。

関節拘縮は、本来の関節可動域を制限し、筋骨格系の運動を阻害する大きな要因である。骨折後に良好な骨癒合が得られたとしても、骨折部が周囲の筋肉と癒着してしまうとその筋肉の収縮が抑制され、十分に筋力および腱の滑走を発生させることができず、関節可動域が制限される。これにより、当該関節は制限された可動域内でのみ運動することとなり、それ以上の可動性を失い、靭帯の柔軟性も失われ関節拘縮が生じる。このマウス大腿骨骨折モデルは高齢者の外傷として発生しやすい骨折を念頭に置いたモデルである。今後さらに増加することが予想される骨折後の関節拘縮による自立喪失を防止するため、このモデルに

おいてMPCポリマーゲルが骨折部周囲の癒着を抑制することにより関節拘縮を予防できれば、運動器疾患の新規治療材として大いに期待できる。

社会的制約の多い運動療法のみならず、関節拘縮防止策として、骨折手術時にMPCポリマーゲルで骨折部周囲を被覆することにより術後のリハビリテーションが容易になるのであれば、極めて独創的かつ画期的な関節拘縮防止策が実現することとなる。また、MPCポリマーゲルはPMBVとPVAの水溶液を混合し、術野にあわせた量を局所へ注入することで対象組織をしっかりと被覆することができるため、臨床現場での手技が簡易である。しかも生体細胞膜の類似構造を有するため、生体内で異物反応を惹起しないと考えられる。これらのことから、関節拘縮防止材としてMPCポリマーゲルの早期の実用化が望まれるところである。

E. 結論

今年度の研究により、マウス大腿骨骨折モデルにおいて、MPCポリマーゲルの被覆にて骨折部周囲の癒着抑制による関節拘縮防止と骨折部の骨癒合が両立することが示唆された。また、術後3週での関節固定解除時にはゲルが消失しており、関節可動域訓練に影響しないことが期待できた。この結果は、有効な関節拘縮防止材としてMPCポリマーゲルの臨床応用が期待でき、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を今後とも推進しうるものである。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Choi J, Konno T, Takai M, and Ishihara K: Controlled drug release from multilayered phospholipid polymer hydrogel on titanium alloy surface. *Biomaterials* 30(28): 5201-5208, 2009.
- 2) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Superlubricious surface mimicking articular cartilage by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A* 91(3): 730-41, 2009.
- 3) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Effects of mobility/immobility of surface modification by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on the durability of polyethylene for artificial joints. *J Biomed Mater Res A* 90(2): 362-371, 2009.
- 4) Kyomoto M, Ishihara K: Self-initiated Surface Graft Polymerization of 2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine on Poly(ether-ether-ketone) by Photoirradiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1(3): 537-542, 2009.
- 5) Choi J, Konno T, Takai M, and Ishihara K: Smart controlled preparation of multilayered hydrogel for releasing bioactive molecules. *Current Applied Physics* 9(4): 259-262, 2009.
- 6) Shimizu T, Konno T, Takai M and Ishihara K: Super-hydrophilic silicone hydrogels composed of interpenetrating polymer networks with phospholipid polymer. *Trans. Mater. Res. Soc* 34(2): 193-196, 2009.
- 7) Jang K, Sato K, Konno K, Ishihara K, and Kitamori T: Surface modification by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine coupled to a photolabile linker for cell micropatterning. *Biomaterials* 30(7): 1413-1420, 2009.
- 8) Xu Y, Takai M, Ishihara K: Suppression of Protein Adsorption on a Charged Phospholipid Polymer Interface. *Biomacromolecules* 10(2): 267-274, 2009.
- 9) Yu B, Lowe AB, Ishihara K: RAFT Synthesis and Stimulus-Induced Self-Assembly in Water of Copolymers Based on the Biocompatible Monomer 2-(Methacryloyloxy)ethyl Phosphorylcholine. *Biomacromolecules* 10(4): 950-958, 2009.
- 10) Xu Y, Takai T, Ishihara K: Protein Adsorption and Cell Adhesion on Cationic, Neutral, and Anionic

- 2-Methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine Copolymer Surfaces. *Biomaterials* 30(28): 4930-4938, 2009.
- 11) Seo JH, Matsuno R, Takai M, Ishihara K: Cell Adhesion on Phase-separated Surface of Block Copolymer Composed of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) and Poly(dimethylsiloxane). *Biomaterials* 30(29): 5330-5340, 2009.
- 12) Ye SH, Johnson CA, Woolley JR, Oh H, Gamble LJ, Ishihara K, Wagner WR: Surface Modification of a Titanium Alloy with a Phospholipid Polymer Prepared by a Plasma-Induced Grafting Technique to Improve Surface Thromboresistance. *Colloid Surf B: Biointerface* 74(1): 96-102, 2009.
- 13) Kitano K, Inoue Y, Konno T, Matsuno R, Takai M, Ishihara K: Nanoscale Evaluation of Lubricity on Well-defined Polymer Brush Surfaces Using QCM-D and AFM. *Colloid Surf. B: Biointerface* 74(1): 350-357, 2009.
- 14) Ishiyama N, Moro T, Ishihara K, Ohe T, Miura T, Konno T, Ohyama T, Kimura M, Kyomoto M, Nakamura K, Kawaguchi H: The prevention of peritendinous adhesions by a phospholipid polymer hydrogel formed in situ by spontaneous intermolecular interactions. *Biomaterials* 31: 4009-4016, 2010.
- 15) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Self-initiated surface grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on poly(ether-ether-ketone). *Biomaterials* 31(6): 1017-1024, 2010.
- 16) Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, Fujihara Y, Chung UL, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K: Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A* 92(4): 1273-1282, 2010.
- 17) Kyomoto K, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K: Lubricity and Stability of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) Polymer Layer on Co-Cr-Mo Surface for Hemi-arthroplasty to Prevent Degeneration of Articular Cartilage. *Biomaterials* 31(4): 658-668, 2010.
- 18) Ishiyama N, Moro T, Ishihara K, Ohe T, Miura T, Konno T, Ohyama T, Yoshikawa M, Kyomoto M, Nakamura K, Kawaguchi H: Reduction of peritendinous adhesions by hydrogel containing biocompatible phospholipid

polymer MPC for tendon repair. J Bone Joint Surg Am (in press).

- 19) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Cartilage-mimicking, high-density brush-like structure confers high durability to cross-linked polyethylene. *Clin Orthop Relat Res* (in press).
- 20) 石原一彦: ポリマー界面でのナノバイオ機能. *高分子* 58(4) 199-203, 2009.
- 21) 石原一彦: ポリマーバイオマテリアル -医療のための分子設計-. コロナ社, 2009.
- 22) 井上佑貴, 石原一彦: バイオマテリアル表面のナノ創製と機能表面. 47(11) 388-398, 2010.

2. 学会発表

① 国内学会

- 1) 茂呂徹, 高取吉雄, 荻田達郎, 伊藤英也, 赤坂嘉之, 齊藤貴志, 中村耕三: 前・初期股関節症に対する寛骨臼回転骨切り術の術後30年成績. 第82回日本整形外科学会学術総会, 福岡, 2009. 5. 14-17.
- 2) 星野隆行, 金野智浩, 石原一彦, 森島圭祐: 細胞ナノシステムによるバイオハイブリッドナノマシン構築—ナノマシンの自己組織的組み立てに向けた細胞移動の制御—. 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会. 2009. 5. 25-26.
- 3) 松野亮介, 後藤佑介, 金野智浩, 高井まどか, 石原一彦: 細胞内取り込み促進機能ペプチド担持量子ドット内包リン脂質ポリマーナノ粒子の創製と細胞内イメージング. 平成21年度繊維学会年次大会, 東京, 2009. 6. 10-13.
- 4) 齊藤あや, 金野智浩, 伊掛浩輝, 栗田公夫, 石原一彦: フェニルボロン酸基を有する細胞親和性リン脂質ポリマーによる可逆細胞接着表面の創製. 平成21年度繊維学会年次大会, 東京, 2009. 6. 10-13.
- 5) 金野智浩, 石原一彦: 自発形成-解離性リン脂質ポリマー-ハイドロゲルによる幹細胞保持と機能評価. 第58回高分子討論会, 熊本, 2009. 9. 16-18.
- 6) 石山典幸, 茂呂徹, 三浦俊樹, 大江隆史, 伊藤祥三, 金野智浩, 古河美都奈, 大山但, 石原一彦, 中村耕三, 川口浩: 生体内解離性ハイドロゲルのウサギ指屈筋腱損傷モデルにおける組織癒着防止効果. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会. 横浜, 2009. 11. 5-6.
- 7) 石山典幸, 茂呂徹, 三浦俊樹, 大江隆史, 伊藤祥三, 金野智浩, 古河美都奈, 大山但, 中村耕三, 川口浩, 石原一彦: 生体内解離性ポリマーハイドロゲルの癒着防止効果に関する経時的検討. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 8) 豊本泰央, 松野亮介, 金野智浩, 高井まどか, 石原一彦: MPCポリマー/HApハイブリッドマトリックスの創製と細胞応答. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 9) 金野智浩, 石原一彦: 細胞親和性ポリマーマトリックスを用いた均

- 質細胞凝集塊形成とその機能. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 10) 磯江晋輔, 松野亮介, 金野智浩, 高井まどか, 石原一彦: ポリマーブラシ表面がタンパク質吸着に与える因子の解明. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 11) 徐知勲, 松野亮介, 金野智浩, 坂田利弥, 高井まどか, 石原一彦: バイオ分子・MPCポリマーコンジュゲートの光反応を利用した表面固定化と細胞パタン化への応用. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 12) 京本政之, 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦: ポリ芳香族ケトン表面からの自己開始光グラフト重合による生体親和性ポリマー層の構築. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 13) 福栄晟, 金野智浩, 石原一彦: 可逆形成-自発解離型 MPC ポリマーハイドロゲルによる細胞の長期固定化と細胞周期の同調. 第31回日本バイオマテリアル学会大会. 京都, 2009. 11. 16-17.
- 14) 豊本泰央, 松野亮介, 金野智浩, 高井まどか, 石原一彦: MPC ポリマー/ ハイドロキシアパタイト複合体の作製. 第19回 MRS-J. 横浜, 2009. 12. 9.
- 15) 福栄晟, 金野智浩, 石原一彦: 細胞親和性リン脂質ポリマーハイドロゲルによる細胞機能の保持. 第19回 MRS-J. 横浜, 2009. 12. 9.
- 16) 伊藤英也, 荻田達郎, 高取吉雄, 茂呂徹, 角田俊治, 馬淵昭彦, 中村耕三: Metal-on-metal THA で hypersensitivity による広範な骨溶解を生じた1例. **第40回日本人工関節学会**. 沖縄, 2010. 2. 26-27.
- 17) 高取吉雄, 茂呂徹, 荻田達郎, 伊藤英也, 赤坂義之, 角田俊治, 馬淵昭彦: Q5LP カップと摺動面を傷つけないライナー固定法の開発. 第50回関東整形外科学会. 東京, 3. 19-20, 2010.
- ② 国際学会
- 1) Ishihara K, Matsuno R, Konno T, Takai M, and Asanuma Y: Antithrombogenic Polymer Alloy with Well-defined Block-type Phospholipid Polymer and Segmented Polyurethane for Cardiovascular Medical Devices. 2nd Asian Congress of Biomaterials. Singapore, Singapore, 2009. 6. 26.
- 2) Ishihara K, Goto Y, Matsuno R, Konno T, Takai M: Novel stable fluorescence nanoparticles covered with biocompatible phospholipid polymers and specific biomolecules. Controlled Release Society Annual Meeting. Copenhagen, 2009. 7. 21.
- 3) Moro T, Takatori Y, Kyomoto M, Ishihara K, Karita T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible Poly(MPC) Grafting on the Liner Surface of Artificial Hip Joints Enhances the Wear Resistance Independently of Femoral Head

- Material. 22nd Annual conference of the European Society for Biomaterials (ESB). Lausanne, Switzerland, 2009. 9. 7-11.
- 4) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Yamawaki N, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Cross-linked brush-like structure of surface-modified layers gives high durability to joint replacement. 22nd Annual conference of the European Society for Biomaterials (ESB). Lausanne, Switzerland, 2009. 9. 7-11.
- 5) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: High-density brush-like structure mimicking cartilage gives high durability to cross-linked polyethylene. 4th UHMWPE International Meeting. Torino, Italy, 2009. 9. 16-18.
- 6) Ishihara K, Konno T: Control of ES Cell Functions in Biocompatible Reversible Hydrogel System. 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem Cell Techniques. Taiwan, 2009. 9. 21.
- 7) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Self-initiated surface graft polymerization of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on PEEK and carbon fiber reinforced PEEK for orthopaedic and spinal applications. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). New Orleans, USA, 2010. 3. 6-9.
- 8) Kyomoto M, Moro T, Saiga K, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Biocompatible polymer layer on Co-Cr-Mo surface for hemi-arthroplasty prevents degeneration of cartilage. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). New Orleans, USA, 2010. 3. 6-9.
- 9) Ishiyama N, Moro T, Ohe T, Miura T, Ishihara K, Konno T: Biocompatible MPC polymer hydrogel prevents tendon adhesion without impairing the healing. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). New Orleans, USA, 2010. 3. 6-9.
- ③ シンポジウム・招待講演
- 1) 茂呂徹, 高取吉雄, 石原一彦, 山脇昇, 京本政之, 川口浩: ミニシンポジウム「骨のバイオマテリアルと医工連携」MPC ポリマーのナノ表面修飾による新しい人工股関節の開発. **第27回日本骨代謝学会学術集会**. 大阪, 7. 23-25, 2009.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1) 特願2007-303389 組織癒着および関節拘縮防止材 2007年11月22日出願
- 2) 国際特許PCT/JP2008/71168 組織癒着防止材および関節拘縮防止材 2008年11月14日出願

椎弓切除モデルを用いた硬膜周囲癒着防止効果の検討

研究分担者 川口 浩（東京大学医学部附属病院 准教授）
三浦俊樹（東京大学医学部附属病院 助教）

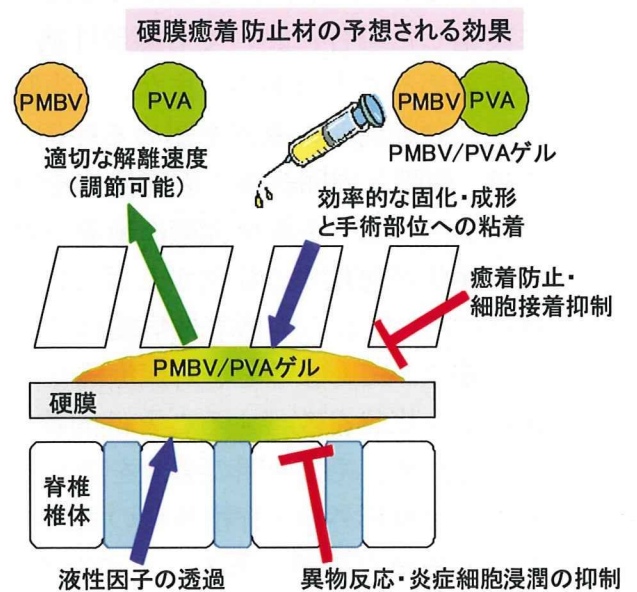
研究要旨：脊椎変性疾患は高齢社会の到来に伴い増加しているが、良い治療結果を得るためには手術後の硬膜周囲の癒着を防止することが重要である。しかし癒着を防止するための方策は現時点において確立されていない。本研究の目的は、生体適合性と操作性に優れた 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーゲルを脊椎外科手術後の硬膜周囲癒着防止材として臨床応用するための基礎的検討を完成させることである。

今年度の研究では、昨年度に確立したラット椎弓切除モデルおよび癒着評価方法を改良した上で使用し、MPC ポリマーゲルの硬膜周囲癒着防止効果を検討した。MPC ポリマーゲルで硬膜周囲を被覆した群では、コントロール群と比較し、硬膜周囲の癒着形成が抑制されていた。また、神経学的評価では MPC ポリマーゲル群とコントロール群において有意な差はなく、神経障害の可能性を示唆する所見は見られなかった。

以上の結果は、MPC ポリマーゲルが神経を傷害することなく癒着を防止することを示唆するものであり、この新しいマテリアルを組織癒着防止材として臨床応用するための研究開発を推進しうるものであった。

A. 研究目的

高齢社会の到来に伴い、脊柱管狭窄症や椎間板ヘルニアに代表される脊椎変性疾患は増加の一途をたどっている。例えば、米国の統計では、毎年人口の1%が椎間板ヘルニアに罹患しているという報告がある。またわが国の平成16年度国民生活基礎調査によれば国民の有訴率の第1位は腰痛であることから、相当数の脊椎変性疾患罹患者がいると考えられている。脊椎変性疾患は進行するにつれて背部や上下肢の疼痛の増強や上下肢の筋力低下を生じるため、特に高齢者におい



ては ADL・QOL 低下の重要な原因と位置付けられている。また青壮年においてもこれらの疾患に罹患すると長期間休業せざるを得ないケースが多く、この場合の社会経済的損失は計り知れないものがある。したがって、これらの疾患への対策は社会的にも焦点の課題となっている。

現在、脊椎変性疾患に対する治療は、鎮痛剤や各種ブロック治療、理学療法などの対症療法および、脊椎除圧術などの手術治療が一般的に行われている。手術治療は多くの場合良好な術後成績を示すものの、手術後数週間から数カ月の経過とともに再悪化する成績不良例は少なからず存在する。

Burton らは術後成績不良例の原因のうち 6~8%に硬膜外の癒着性病変を認め、16%が癒着性クモ膜炎によるものだったとしている(*Clin*

Orthop,157,191,1980)。術中の硬膜周囲の操作に起因することが指摘されてはいるが、術中操作を極めて愛護的に実施した場合においても癒着性病変を認めることはある。また、手術時に既に硬膜周囲の癒着を認める症例では、硬膜と周囲組織の剥離操作を行ったとしても、手術後次第に癒着が再発し症状が悪化する症例がしばしば存在する。これらの癒着性病変はひとたび確立してしまうと、対症療法や手術により症状を改善することは困難であるため、硬膜周囲の癒着を防止することは整形外科・脊椎外科の領域において重要な課題である。このため、トロンビンベースの止血剤、酸化セル

ロース、ヒアルロン酸シート・ゲル、抗がん剤、炭化メチルセルロース・酸化ポリエチレンゲル複合体などを用いた癒着防止材の研究開発が行われてきたが、生体適合性や手術野での固定、生体内での解離や体外への排出などの問題があり、これまでに有効なものとは実用化されていない。

そこで我々は、生体適合性の高い材料で硬膜周囲を被覆することができれば癒着を防止できると考え、

2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC)ポリマーに着目した。MPC ポリマーは研究分担者の石原らが開発した生体適合性材料で、細胞膜と同様の構造を有するため、生体内で異物として認識を受けず優れた生体適合性を発揮する(2000 年日本人工臓器学会技術賞受賞、2001 年日本バイオマテリアル学会賞受賞) (*Polym J*,22,355,1990)。また、MPC ポリマーは、液性因子の透過を妨げないこと、表面にタンパク質の吸着が起きないことが明らかになっており、これらの特質をいかし、様々な医療材料への応用研究が進んでいる (*Nature Mater*,3, 829, 2004、*Clin Orthop Relat Res*,453, 58, 2006、*Biomaterials*,23,1455,2007)。本研究では、この MPC を基盤として 2 液混合型の生体内解離性ハイドロゲル (PMBV/PVA ゲル)の癒着防止材を創案した。これは、MPC・*n*-butyl methacrylate・*p*-vinyl-phenylboronic acid からなる三元系ポリマー(PMBV)と poly vinyl alcohol

(PVA) の 2 液からなるものがある。2 液のフェニルボロン酸基とポリオール化合物間の可逆的共有結合形成により自発的にゲル化し、粘性が高まり、手術部位に固定することができる。したがって術野に応じて瞬時に成型でき、持続して効果を発揮できる。また、ポリマーの分子設計によりゲルの解離時間を任意に制御することが期待できる。本研究の目的は、PMBV/PVAゲルを脊椎手術における硬膜癒着防止材として実用化するための基礎検討を完成させることである。

B. 研究方法

1) ラット脊椎硬膜外癒着モデルの作成

生後 7-8 週令 (体重 200-220 g) の Sprague-Dawley(SD)ラットを使用した。

- a) 麻酔・体位：ジエチルエーテルによる麻酔導入後、腹腔内麻酔 (4% 抱水クロラル 2ml) および 1% キシロカイン 5ml で局所麻酔を実施し、ラットを腹臥位とした。背部を電動式バリカンにて剃毛し、四肢を軽く固定し体位をとった。(図 1)



図 1. ラットを腹臥位とし剃毛

- b) 腰椎椎弓切除：背側正中切開をおき、第 1 腰椎 (L1) から第 4 腰椎 (L4) までの棘突起および椎弓を展開した。次に手術用顕微鏡下において電動式ドリル、リュエル、ケリソン鉗子を用いて L1~L4 の椎弓切除を行い、硬膜背側を展開した。(図 2) 筋層からの出血に対してはバイポーラメスで焼灼し止血した。骨からの出血は綿棒で圧迫止血した。



図 2. 椎弓切除および硬膜背側の展開

- c) 硬膜周囲の処置：剥離子を用いて硬膜側面の剥離操作を実施し、硬膜表面の血管をバイポーラメスで焼灼した。
d) 閉創：止血を確認した後、創内を

生理食塩水にて洗浄、4-0 ナイロン糸にて皮膚を縫合し、閉創した。縫合部分にゲンタマイシン軟膏を塗布した。

e) 術後処置：手術後はケージ内で自由に運動させた。

2) MPC ポリマーゲルの被覆による硬膜周囲の癒着防止効果についての検討

1) で確立したラット脊椎硬膜外癒着モデルを使用して、実験動物を2群に分け、1群はMPCゲル1mlを硬膜周囲に注入し、他群は生理食塩水を硬膜周囲に注入した。液を注入後数分でゲル化し、体位を移動させても流出しないことを確認後閉創した。(図3,4)

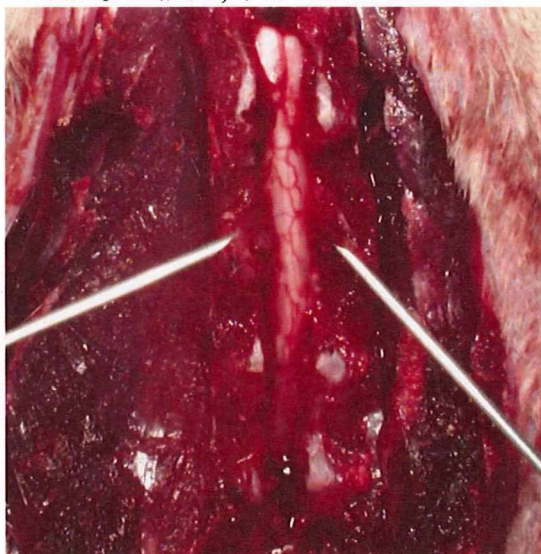


図3. MPC ポリマーゲルはA液とB液を混和して注入

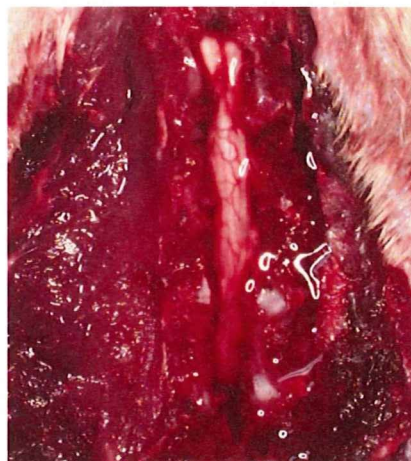


図4. 注入後数分でゲル化

硬膜周囲癒着の評価：2群に分けた実験動物をいずれも、術後6週、8週の時点で、術後の硬膜周囲組織の癒着の状態を以下の3)~6)で評価した。

3) 硬膜周囲癒着の肉眼的評価

硬膜周囲の癒着の程度を肉眼所見で分類した。Grade0(癒着なし)、1(弱い引っ張り力ではがれる)、2(中等度から強度の引っ張り力で剥離できる)、3(鋭的な切除のみ剥離できる)の4段階評価を行った。

4) 硬膜周囲の組織学的評価

摘出した脊椎および硬膜から組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン(HE)染色によって組織学的に観察した。硬膜表面から癒着組織までの距離・硬膜の厚み・癒着中の炎症細胞数・クモ膜下腔の面積について測定した。同時に癒着防止材料の残存の有無・量についても評価した。

5) 神経学的評価

癒着防止材が脊髄・硬膜の治癒

を妨げず、神経機能に障害を与えないことを確認するため、神経学的評価を行った。評価基準には、ラット後肢の運動機能評価を行う Basso, Bresnahan, and Beatle(BBB)open field locomotor rating score (*Experimental Neurology* 139,244,1996)を使用した。

6) 硬膜周囲癒着の力学的評価

上記の 3)~5)の評価方法に加え、今年度から力学的評価法について検討を行った。硬膜および脊椎を周囲組織から切離後に、手術施行部位の全長にわたって採取する。図 5 に示すレオメーターシステムを用い、椎体および硬膜管をそれぞれエアチャックで把持し、遠位方向へ 10 mm/min の速度で硬膜と椎体とが破断するまで牽引する(図 6)。この際の最大破断張力を癒着程度の指標として測定し、統計学的解析を実施した。

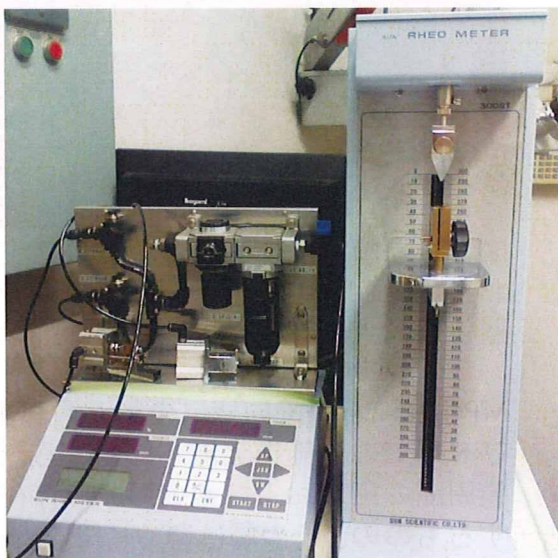


図 5. レオメーターシステム



図 6. レオメーターでの硬膜—椎体破断張力の測定

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準総理府告示」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

1) ラット脊椎硬膜外癒着モデルの作成

麻酔による術中・術後死例はなく、麻酔からの覚醒も安定していた。また手術中の中途覚醒はなく十分な麻酔深度が得られていた。手術用顕微鏡を用いた慎重な操作により、出血のコントロールも良好であり、手術行程を妨げたり、生命の危険が心配されたりするような出血量はなかった。また椎弓切除や硬膜の剥離操作において硬膜および脊髄神経の肉眼的損傷はなかった。

2) 硬膜周囲癒着の肉眼的評価

コントロール群 n=6 において肉眼での観察では、術後 6 週および 8 週の時点において、硬膜周囲の癒着がみられ、鈍的剥離のみでは硬膜を周囲組織から遊離させることは困難で、剪刀による鋭的切離を必要と

した。(図7)癒着の程度が比較的軽度であったものもあったが(図8)全例で何らかの癒着が確認できた。Grade 0 :0 例、Grade 1 :1 例、Grade 2 :3 例、Grade 3 :2 例

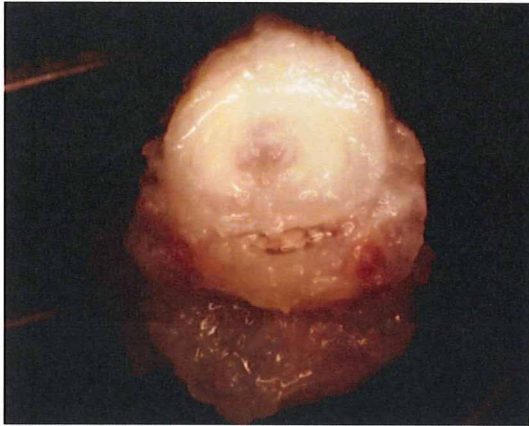


図7. 硬膜周囲に高度の癒着が見られる: Grade 3 (コントロール群: 術後6週)

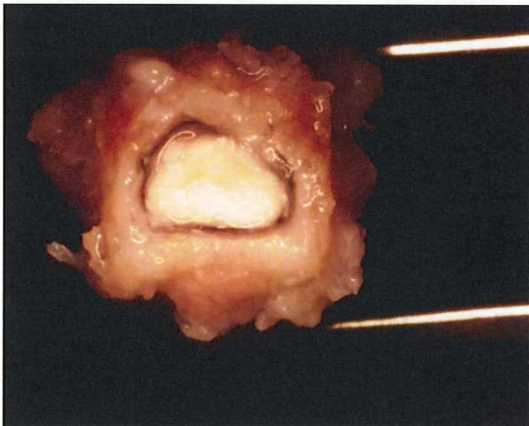


図8. 比較的軽度の癒着: Grade 1 (コントロール群: 術後8週時点)

MPC 群 n=5 においても全例で何らかの癒着がみられたが、その程度はコントロール群と比較してやや軽度であった。(Grade 0 :0 例、Grade 1 :2 例、Grade 2 :3 例、Grade 3 :0 例)

3) 硬膜周囲の組織学的評価

コントロール群において術後6週および8週での組織学的評価を行ったところ、硬膜周囲の癒着および脊柱管の圧迫所見が見られた。椎弓

切除を行った硬膜背側に肉芽組織が増生し脊柱管は圧排され扁平化していた。硬膜と肉芽組織との境界は不明瞭で高度に癒着している所見であった。(図9)強拡大では硬膜周囲に炎症細胞の浸潤および線維性組織の増生が見られた(図10)

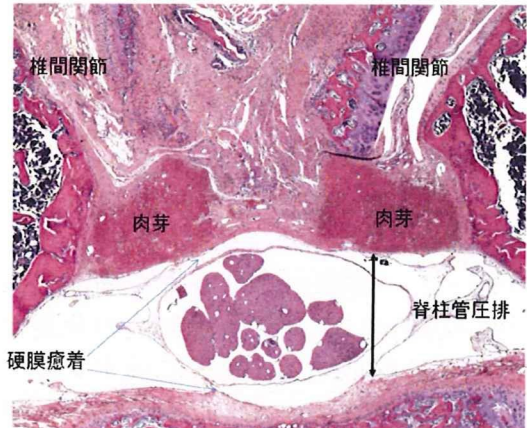


図9. 硬膜周囲の肉芽形成および脊柱管の圧排あり(術後6週)

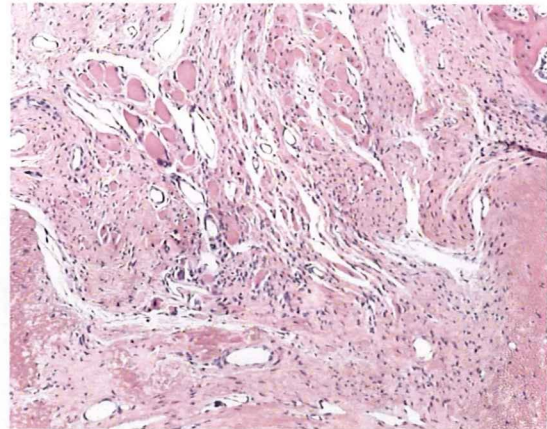


図10. 硬膜周囲に線維性組織の増生および炎症細胞の浸潤あり(術後6週: 強拡大)

MPC 群において同様に術後6週および8週での評価を実施したところ、硬膜周囲の癒着および癒痕形成は存在するものの、その層は薄く、組織内に多数の空胞形成がみられた。(図11、12) この空胞は MPC ポリマーゲルが存在していた部位とみられ、ゲルが脱出したために生じたと考えられる。ま

た、空胞の上層には多数の炎症細胞および血管新生がみられたが、脊柱管との間には空胞が介在しているため、脊柱管の圧排は見られなかった。(図13)

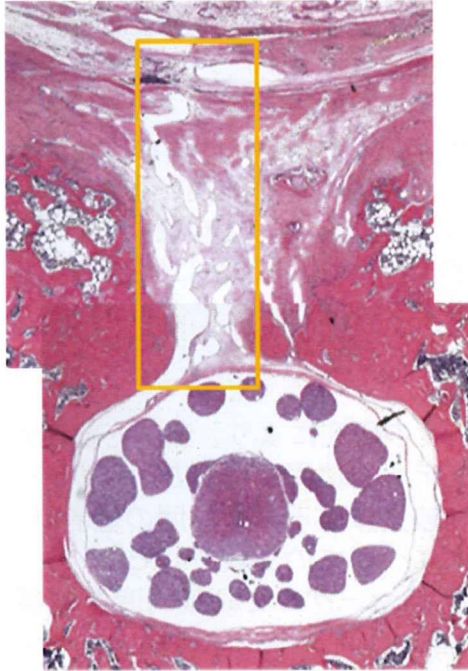


図 11. 硬膜上に多数の空胞形成あり。硬膜外の癒着は存在するも軽度 (MPC 群：術後 6 週)

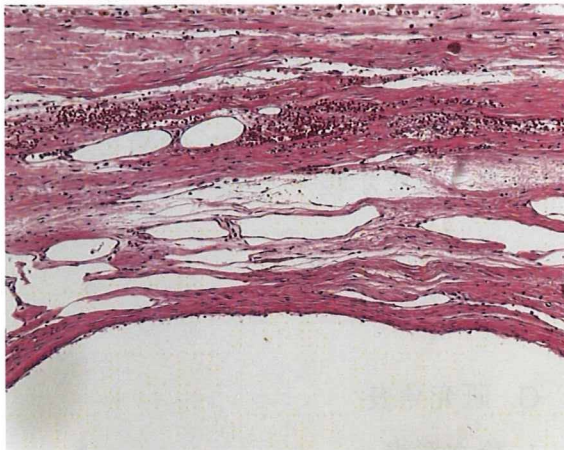


図 12. 硬膜上に空胞形成があり、その上層に炎症細胞浸潤がある (MPC 群：強拡大：術後 6 週)



図 13. 周囲に癒着および癒着形成はみられるが、硬膜の圧排所見はみられない (MPC 群：術後 6 週)

硬膜の損傷・硬膜周囲組織の異常所見・創部感染等は特にみられなかった。また、術後 6 週、8 週いずれの時点においても MPC ポリマーゲルの残存はなかった。

4) 神経学的評価

MPC ポリマー群およびコントロール群の両群においていずれも、術翌日および術後 4 週、6 週、8 週の時点において BBB score はいずれも 21 点であり神経障害は見られなかった。

5) 硬膜周囲癒着の力学的評価

採取した組織の椎体および硬膜管をそれぞれエアチャックで把持し、遠位方向へ 10 mm/min の速度で硬膜と椎体とが破断するまで牽引し、最大破断強度を測定した。

コントロール群 n=3 および MPC 群 n=3 の両群において上記の方法にて牽引したところ、いずれの群においても、椎体と硬膜管との間の癒着はほとんどなく、最大破断強度は、両側の神経根の引き抜き強度とほぼ同等の強度

であった。この強度は、癒着の全くない未手術のマウスにおける最大破断強度とほぼ同等であった。

今回の研究においてその組織学的評価から、硬膜の癒着は主に硬膜背側に存在し、硬膜腹側の椎体との癒着はほとんど生じていなかったことが判明した。そこで、次に背側の軟部組織と硬膜とを把持して同様の牽引試験を行ったが、背側の軟部組織の強度が牽引検査に耐えうるほどではなく、容易に破損を生じたため、正確な最大破断強度を得られることはできなかった。

D. 考察

MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果を検討する今年度の研究では、脊椎外科手術後の硬膜周囲癒着防止材として臨床応用するための基礎的検討を継続実施した。

脊椎硬膜周囲の癒着は重篤な合併症であるにもかかわらず、これを防止する材料・手法は未だ確立されておらず、現時点ではいくつかの材料の単発的な報告が散見するにとどまっている。いずれの報告においても、癒着の防止効果を客観的かつ明確に検討したのではなく、また、副作用の問題もあり、実用化には至っていない。本研究は、MPC ポリマーゲルを脊椎硬膜周囲の癒着防止材として用いるという、従来行われてこなかった視点からの研究開発である。評価方法においては従来の肉眼的・組織学的評価のみにとどまらず、癒着の力学的評価、画像評価を行うことにより、癒着防止効果を客観的に明らかにする最初の研究となることが予想される。また運動機能評価、残存物性評価も実施し、この癒着防止材が脊椎硬膜周囲の治癒を妨げないことを確認した。

今年度の研究では、昨年度に確立し

たラット脊椎硬膜外癒着モデルを使用し、MPC ポリマーゲルの被覆による硬膜周囲の癒着防止効果についての実験を行った。本研究の結果から、MPC ポリマーゲルは脊椎硬膜周囲の癒着形成を抑制し、癒着を防止することが示唆された。また、ラットの神経を傷害する可能性を示唆する所見は見られなかった。しかしレオメーターシステムを使用した硬膜—椎体破断張力の測定においては有意な差はみられず、これは測定方法に限界があるためと考えられた。

E. 結論

今年度の研究により、ラット硬膜外癒着モデルを使用して MPC ポリマーゲルの被覆による硬膜周囲の癒着防止効果についての実験を行った。MPC ポリマーゲルで硬膜周囲を被覆した群では、コントロール群と比較し、硬膜周囲の癒着形成が抑制されていた。また、神経学的評価では MPC ポリマーゲル群とコントロール群において有意な差はなく、神経障害の可能性を示唆する所見は見られなかった。以上の結果は、MPC ポリマーゲルが神経を傷害することなく癒着を防止することを示唆するものであった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to

- runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis Rheum* 60: 166–178, 2009.
- 2) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP β promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57^{Kip2}. *PLoS ONE* 4: e4543, 2009.
 - 3) Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Association of occupational activity with radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in elderly patients of population-based cohorts: A large-scale population-based study. *Arthritis Rheum* 61: 779–786, 2009.
 - 4) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kinoshita H, Yoshida M, Mabuchi A, Kawaguchi H, Nakamura K, and Akune T: Epidemiology of lumbar osteoporosis and osteoarthritis and their causal relationship – Is osteoarthritis a predictor for osteoporosis or vice versa?: The Miyama study. *Osteoporosis Int* 20: 999–1008, 2009.
 - 5) Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1065–1075, 2009.
 - 6) Muraki S, Oka H, Mabuchi A, Akune T, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Prevalence of radiographic lumbar spondylosis and its association with low back pain in the elderly of population-based cohorts: the ROAD study. *Ann Rheum Dis* 68: 1401–1406, 2009.
 - 7) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* 27: 620–628, 2009
 - 8) Muraki S, Oka H, Akune T, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: The ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage* 17: 1137–1143, 2009.
 - 9) Kan A, Ikeda T, Saito T, Yano F, Fukai A, Ogata N, Nakamura K,

- Chung UI, and Kawaguchi H: Screening of chondrogenic factors by a real-time fluorescence monitoring cell line ATDC5-C2ER: Identification of sorting nexin 19 as a novel factor. *Arthritis Rheum* 60: 3314-3323, 2009.
- 10) Oka H, Akune T, Muraki S, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Sasaki S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Low dietary vitamin K intake is associated with radiographic knee osteoarthritis in the Japanese elderly: Dietary survey in a population-based cohort of the ROAD study. *J Orthop Sci* 14: 687-692, 2009.
- 11) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Superlubricious surface mimicking articular cartilage by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A* 91(3): 730-41, 2009.
- 12) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Effects of mobility/immobility of surface modification by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on the durability of polyethylene for artificial joints. *J Biomed Mater Res A* 90(2): 362-371, 2009.
- 13) Kyomoto M, Ishihara K: Self-initiated Surface Graft Polymerization of 2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine on Poly(ether-ether-ketone) by Photoirradiation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 1(3): 537-542, 2009.
- 14) Ishiyama N, Moro T, Ishihara K, Ohe T, Miura T, Konno T, Ohyama T, Kimura M, Kyomoto M, Nakamura K, Kawaguchi H: The prevention of peritendinous adhesions by a phospholipid polymer hydrogel formed in situ by spontaneous intermolecular interactions. *Biomaterials* 31: 4009-4016, 2010.
- 15) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Self-initiated surface grafting with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on poly(ether-ether-ketone). *Biomaterials* 31(6): 1017-1024, 2010.
- 16) Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, Fujihara Y, Chung UL, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K: Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A* 92(4): 1273-1282, 2010.

- 17) Kyomoto K, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K: Lubricity and Stability of Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) Polymer Layer on Co-Cr-Mo Surface for Hemi-arthroplasty to Prevent Degeneration of Articular Cartilage. *Biomaterials* 31(4): 658-668, 2010.
- 18) Ishiyama N, Moro T, Ishihara K, Ohe T, Miura T, Konno T, Ohyama T, Yoshikawa M, Kyomoto M, Nakamura K, Kawaguchi H: Reduction of peritendinous adhesions by hydrogel containing biocompatible phospholipid polymer MPC for tendon repair. *J Bone Joint Surg Am* (in press).
- 19) Kyomoto M, Moro T, Takatori Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Ishihara K: Cartilage-mimicking, high-density brush-like structure confers high durability to cross-linked polyethylene. *Clin Orthop Relat Res* (in press).
- 20) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, and Akune T: Cohort profile: Research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol* (in press).
- 21) Fukai A, Kawamura N, Saito T, Oshima Y, Ikeda T, Kugimiya F, Higashikawa H, Yano F, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiological and pathological conditions. *Arthritis Rheum* (in press).
- 22) Itoh S, Miura T, Oka H, Nakagawa T, Nakamura K: Reproducibility of measurements of thumb abduction. *Hand Surg* (in press).
- 23) Shinoda Y, Kawaguchi H, Higashikawa A, Hirata M, Miura T, Saito T, Nakamura K, Chung U, Ogata N: Mechanisms Underlying Catabolic and Anabolic Functions of Parathyroid Hormone on Bone by Combination of Culture Systems of Mouse Cells. *J Cell Biochem* (in press).
- 24) Morizaki Y, Miura T: Unusual pattern of dislocation of the trapeziometacarpal joint with avulsion fracture of the trapezium. *Hand Surg* (in press).
- 25) Miura T, Tokuyama N, Ohya J: Spontaneous rupture of the flexor digitorum superficialis tendon of the little finger with aplasia of the flexor digitorum profundus tendon. *J Hand Surg Eur* (in press).
- 26) 川口浩: Osteovisual「変形性関節症における軟骨破壊のメカニズム」. *Arthritis* 16(3): 149-153, 2009.
- 27) 川口浩: 遺伝子変異マウスによる変形性関節症の病態解明へのアプローチ. *The Bone* (特集: 変形性関節症の基礎と臨床) 23(1): 35-40, 2009.