

201434005A

厚生労働科学研究委託費

医療機器開発推進研究事業

コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 中田 研

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の先端的基盤開発研究事業による委託業務として、国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科が実施した平成26年度「コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究	----- 1
中田 研	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. コラーゲン半月板補填材の非臨床試験(GLP)に関わる研究	----- 3
中田 研、前 達雄、佐藤 幸宏	
2. 大動物を用いた安全性・有効性試験に関わる研究	----- 5
米谷 泰一	
3. PMDA への非臨床試験, 臨床治験実施の相談	----- 9
岡田 潔、井岡 亮一	
III. 学会等発表実績	----- 11
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 12

厚生労働科学研究委託費（先端的基盤開発研究事業）
委託業務成果報告（総括）

コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究

業務主任者 中田 研 大阪大学大学院医学系研究科スポーツ医学 教授

研究要旨

欠損を有する半月板損傷に対するコラーゲン半月板補填材を用いた治療法の実用化に向け、PMDA の医療機器戦略相談を活用し、GLP 試験の試験項目の決定を行ない、それに基づき生物学的安全性試験を実施した。また、大動物を用いた安全性・有効性試験として動物モデル、埋植期間、評価方法、評価項目について PMDA と協議し合意に達した。臨床に近似しかつ安定した欠損モデルを作成したのち、ミニブタ 10 匹を用いた埋植試験を行った。埋植 1 ヶ月群を、単純 X 線、MRI といった臨床上頻用される画像検査モダリティにて評価するとともに、肉眼的解析を行った。同時に非臨床 POC 獲得に向け、コラーゲン担体を用いて *in vitro* での三次元培養圧縮試験を行った。

A. 研究目的

半月板は、膝関節の線維性軟骨でスポーツや日常生活での損傷が多く、疼痛や活動障害となり、関節軟骨障害、変形性関節症を惹起するので機能回復治療が重要である。しかし、半月板は血行に乏しく修復は困難であり、欠損に対しては現在治療法がない。本研究は、欠損を有する半月板損傷に対し、コラーゲン半月板補填材を用いた治療の安全性、有効性検索の臨床研究を行い、本治療の実用化をめざす。

B. 研究方法

- ① コラーゲン半月板補填材の非臨床試験 (GLP) の実施
「医療器機の製造販売申請等に必要な生物学的

安全性評価の生物学的安全性試験の基本的考え方」(平成 24 年 3 月 1 日薬食機発 0301 第 20 号別紙)に基づき生物学的安全性試験等を GLP にて実施する。

- ② 大動物を用いたコラーゲン半月板補填材の安全性・有効性試験の実施

コラーゲン半月板補填材に関わる研究開発について大動物を用いた安全性・有効性試験を実施した。

- ③ PMDA への非臨床試験、臨床治験実施の相談
コラーゲン半月板補填材の非臨床試験、臨床治験の実施等について、PMDA 相談を行った。

C. 研究結果

上述の研究方法にある①、②、③の業務を実施し、本年度に目標である、コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究として、以下の結果を得た。

1. PMDA との非臨床試験、臨床治験実施についての試験項目、内容の合意と、それに基づく非臨床試験の実施
2. 大動物を用いたコラーゲン半月板補填材の安全性・有効性試験の実施
3. 非臨床 POC 獲得に向け、コラーゲン担体を用いて *in vitro* での三次元培養圧縮試験による、細胞を含むコラーゲン半月板補填材の繰返し力学負荷下の生物学的応答機序の解明

D. 考察

半月板は、膝関節の恒常性維持に重要な組織であるとの認識がひろまり、半月板機能温存が変形性膝関節症の予防、さらに、ロコモティブ症候群の予防には重要であると知見が定着しているが、半月板損傷に対する機能温存治療は未だ不十分である。特に、欠損のある半月板に対しては、補填治療が未だ開発されておらず、本事業の目標であるコラーゲン半月板補填材の臨床実用化は重要な社会的課題である。本年度の事業により、コラーゲン半月板補填材の臨床実用化について、計画が具体化し、大きく推進することが可能となった。

コラーゲン半月板補填材の臨床実用化により、安全で有効な半月板の治療法が開発されれば、運動器の退行性疾患で大きな比率を閉める変形性膝関節症の予防にむけて大きな医

学的進歩であると考えられる。特に、半月板は、比較的若年者である10才代からスポーツや、日常生活動作にても発症し、その後の健全な関節の維持に非常に重要であるため、本事業による成果は社会的意義が大きいと考

E. 結論

本事業の本年度の計画を実施し、コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた計画を具体的に実施し、特に、非臨床試験の試験項目の決定と実施、さらに、大動物安全性・有効性試験内容の決定と実施、臨床治験実施についての PMDA との試験内容の審議により、臨床実用化に大きな成果をみた。今後、次年度に計画通り進めることで、本事業の目的である、コラーゲン半月板補填材の臨床実用化が進展する。

厚生労働科学研究委託費（先端的基盤開発研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究
コラーゲン半月板補填材の非臨床試験（GLP）に関わる研究

業務主任者 中田 研 大阪大学大学院医学系研究科スポーツ医学 教授
担当責任者 前 達雄 大阪大学大学院医学系研究科整形外科 講師
担当責任者 佐藤 幸宏 ㈱高研第三開発部生体材料製造

研究要旨

欠損を有する半月板損傷に対するコラーゲン半月板補填材を用いた治療法の実用化に向け、PMDA の医療機器戦略相談を活用し、GLP 試験の試験項目の決定を行ない、それに基づき生物学的安全性試験を実施した。

A. 研究目的

コラーゲン半月板補填材（以下、本品）を実用化するのに必須である臨床治験実施に必要な生物学的安全性試験の試験項目を検討し、PMDA との合意を得て、非臨床試験（GLP）を実施すること。

B. 研究方法

1. コラーゲン半月板補填材（以下、本品）を実用化するのに必須である臨床治験実施に必要な生物学的安全性試験の試験項目の検討
2. 上記1に基づき、臨床治験実施に必要な生物学的安全性試験の試験項目を PMDA と検討し合意に達する。
3. 上記1、2に基づき、コラーゲン半月板補填材の非臨床試験（GLP）を実施

C. 研究結果

1. コラーゲン半月板補填材（以下、本品）を実用化するのに必須である臨床治験実施に必要な生物学的安全性試験の試験項目の検討を、過去の事例、既存の承認医療機器を調査し、以下の項目と検討した。
 - 1) 細胞毒性試験
 - 2) 感作性試験
 - 3) 刺激性・皮内反応試験
 - 4) 急性全身毒性試験
 - 5) 亜急性全身毒性試験
 - 6) 遺伝毒性試験
 - 7) 埋植試験
2. 上記1に基づき、臨床治験実施に必要な生物学的安全性試験の試験項目を PMDA と検討した結果、コラーゲン半月板補填材の臨床治験に必要な生物学的安全性非臨床試験（GLP）については、本品が既承認品「インテگران」

と同一の原材料、類似した製造工程であることから、抽出物を用いる試験の一部（感作性試験、刺激性・皮内反応試験、遺伝毒性試験）を省略する事は可能であるとの合意に至った。

一方、インテگرانと本品に架橋度に差分があり、その差分が生体内における分解・吸収、それに伴う安全性について影響がある可能性が否定できないことから、埋植試験は必要であり、ウサギの皮下単回埋植、12週間の期間で良いとの助言を得た。

3. 上記1、2の結果に基づき、コラーゲン半月板補填材の非臨床試験(GLP)を実施した。(本試験は、当初計画の試験項目より大幅に減少となったため、事業費は、本事業と並行して実施している文科省橋渡し研究加速ネットワークプログラムで計画していた試験項目内で実施可能となったため、本事業からは事業費は支出していない。)

D. 考察

本事業である、コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究を推進していくうえで、臨床治験に必要な生物学的安全性試験 GLP 試験の確定と実施は必須であるが、PMDA との協議、合意により、試験項目が確定し実施できたことは、本事業のゴールに向かって大きな成果であると考えられる。また、試験項目は、従来の既存の承認品との類似性が大きく PMDA とも合意の上認められたため、実施すべき試験項目は限られたものとなり、本事業と並行して実施を計画して、本研究開発と切り離して計画していた、文科省橋渡し

ネットワークプログラムにより全試験項目が実施可能となり、本事業からの費用支出がなくて済むこととなった。その費用は、本事業での別の業務項目である、大動物を用いた安全性・有効性試験を加速させて遂行することが可能になった。

E. 結論

PMDA 薬事戦略相談を活用し、本品実用化に向けた必要な生物学的安全性試験の試験項目が決定し、GLP 試験を遂行した。

厚生労働科学研究委託費（先端的基盤開発研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究
大動物を用いたコラーゲン半月板補填材の安全性・有効性試験の実施に関する研究

業務主任者 中田 研 大阪大学大学院医学系研究科スポーツ医学 教授
担当責任者 米谷 泰一 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学 助教

研究要旨

欠損を有する半月板損傷に対するコラーゲン半月板補填材を用いた治療法の実用化にあたり、その有効性を明らかにすべく、大動物を用いた埋植実験を行った。

まず PMDA との医療機器戦略相談・対面助言を活用し、動物モデル、埋植期間、評価方法、評価項目について協議した。次に臨床に近似しかつ安定した欠損モデルを作成したのち、ミニブタ10匹を用いた埋植試験を行った。埋植1ヶ月群を、単純X線、MRIといった臨床上頻用される画像検査モダリティにて評価するとともに、肉眼的解析を行った。

同時に非臨床 POC 獲得に向け、コラーゲン担体を用いて *in vitro* での三次元培養圧縮試験を行った。

A. 研究目的

半月板は、膝関節の線維性軟骨でスポーツや日常生活での損傷が多く、疼痛や活動障害となり、関節軟骨障害、変形性関節症を惹起するので機能回復治療が重要である。しかし、半月板は血行に乏しく修復は困難であり、欠損に対しては現在治療法がない。

本研究では、コラーゲン半月板補填材の実用化を目指し、その有効性を明らかにすべく、PMDA とも合意のもと、ミニブタを用いて臨床に近似した半月板欠損モデルを作成し、埋植実験を行った。

同時に、非臨床 POC 獲得を目指し、コラーゲン担体を用いた *in vitro* 三次元培養下での圧縮試験を行い、埋植されたコラーゲン半月板に誘導される修復組織中の細胞の挙動を解析した。

B. 研究方法

本研究は大阪大学医学部の動物実験申請を経て、学内倫理規定及び動物愛護規定に則り行った。

a) モデル開発

屠殺後の家畜ブタ膝及びミニブタ膝を用い 3～4×8～10 mm の矩形の欠損を、関節鏡下及び内側傍膝蓋切開による直視下で作成し、そ

のモデルとしての安定性を検討した。

b) in vivo 埋植試験

1) 群構成

PMDA との協議により、経時的なコラーゲン半月板の体内での吸収動態及び組織修復評価の必要性があるとの合意のもと、埋植 1 ヶ月・3 ヶ月・6 ヶ月の 3 点での評価を行うこととした。

	コラーゲン半月板		Fibrin clot		欠損のみ	
	組織	画像	組織	画像	組織	画像
1ヶ月	2	2				
3ヶ月	2	2				
6ヶ月	4	4	4	4	4	4

2) 埋植手術

ミニブタの飼育管理実績があり、施設内で MRI を撮像可能な(株)新日本科学(鹿児島県)に飼育管理業務を外注した。実施可能性から、1 ヶ月群 2 頭(4 膝)と 6 ヶ月群 8 頭(16 膝、コラーゲン半月板+欠損のみ群)の埋植を行った。

クラウン系ミニブタ 10 匹を用い、全身麻酔導入後、内側傍膝蓋切開により内側半月板前節を露出し、3mm ポンチを用いて 3x8mm の矩形の欠損を作成した。動物番号 1,2 を 1 ヶ月群として両膝にコラーゲン半月板を埋植し、動物番号 3~10 を 6 ヶ月群として、ランダムにいずれかの膝にコラーゲン半月板群と欠損のみ群とした。周術期に抗生剤及び鎮痛剤を投与し、感染予防及び除痛に努めた。

3) 飼育一般観察

毎日の創部の観察・接餌量測定その他、週 1 回の体重測定を行った。

c) 1 ヶ月埋植群解析

1) 肉眼評価

安楽死後、膝関節を切開し、内側半月板を肉眼的に観察したのち、のちの組織学的評価のため中性ホルマリン固定した。

2) 画像検査

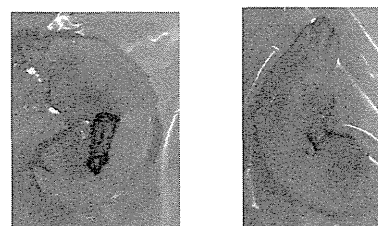
NAOMI-NX (株)アールエフ製)を用い膝関節の正面・側面の単 X 線 (Xp) 撮影を行った。MRI ではシーメンス製 3T 機器を用い、T1、T2、プロトン密度強調シーケンスで膝関節冠状断・矢状断像を撮像した。

d) in vitro 試験

コラーゲン半月板と同等の構造を有した、実験用コラーゲン担体 Mighty® (株)高研)を用い、軟骨細胞を 0.5%コラーゲンゲル中に播種することで三次元培養組織化し、0.5Hz、1 時間、40kPa (≒10%ひずみ強度)の繰り返し圧縮刺激を与え、12 時間後の BMP2 遺伝子及び培養上清中のタンパク発現量を real time RT-PCR 法及び ELISA 法にて解析した。また、三次元培養組織を BMP2 500ng/mL 存在下で 4 週間培養し、Safranin-O 染色にて組織の軟骨分化を評価した。

C. 研究結果

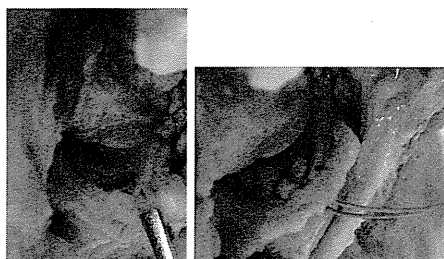
a) モデル開発



関節鏡でヒトと同様に関節内の観察は可能なものの、欠損の作成においては上図の如く上面と下面で著しく大きさが異なる等、欠

損モデルの安定性の点で問題が残った。

一方、直視下法で位置・大きさとも安定して欠損が作成可能であり、直視下法を採用することとした（下図）。



b) in vivo 埋植試験

全例周術期大きなトラブルなく終えた。術後、動物番号 1,4,7 で膝の腫脹を認めたが、膿瘍等の感染徴候はなく経過観察とした。術後1週間程度で接餌量は回復した。5-10%程度の体重減少を認めた。

c) 1ヶ月群解析

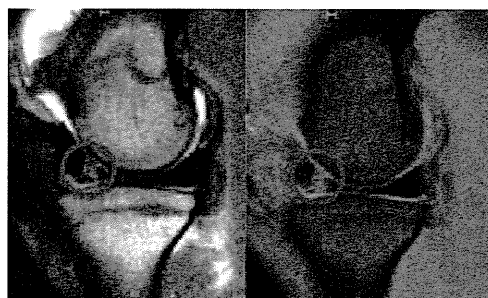
1) 肉眼所見

動物番号 2 で、関節外の膿瘍を認めた。関節内の感染を示唆する所見はなかった。半月板欠損作成部を中心に滑膜増生を強く認め、欠損部は修復組織で充填されていた（下図）。



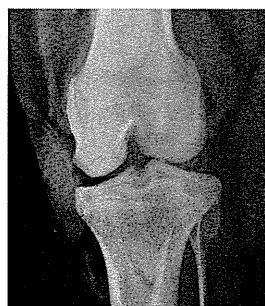
2) MRI 所見

Mighty 移植部は MRI で描出良好であった（下図）。



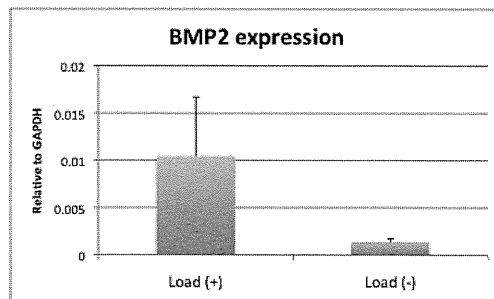
3) Xp 所見

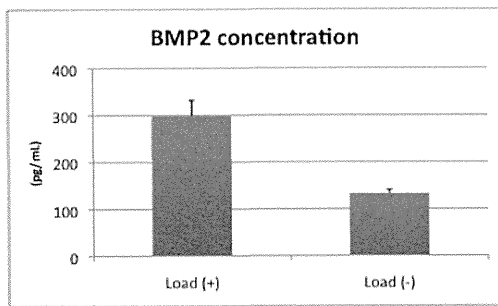
正面像にて内側関節裂隙の観察が可能であり（下図）、1ヶ月群では著変ないものの、6ヶ月群で欠損群・半月切除群での変形性関節症の進行が評価可能と考えられ、コラーゲン半月板の性能評価になり得ると考えられた。



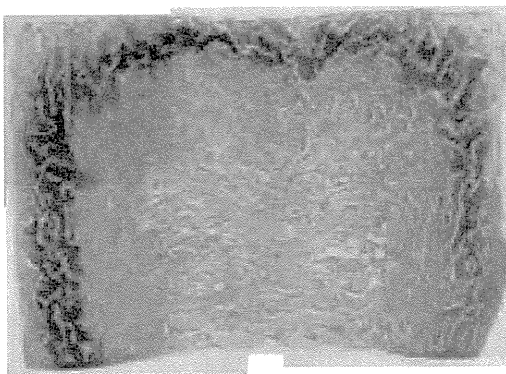
d) In vitro 圧縮試験

軟骨細胞の三次元培養圧縮負荷にて BMP2 の発現は遺伝子・蛋白レベルともに上昇していた。





BMP2 刺激により、軟骨細胞・コラーゲン担体三次元組織は、軟骨組織への分化を示した（下図）。



D. 考察

実臨床では半月縫合術後外固定、免荷で縫合部へのストレスを最小限とコントロールすることが可能であるが、動物実験では甚だ困難であることから、二重縦断裂を想定した矩形型の欠損を作成した。また実臨床では関節鏡下での埋植を想定しているが、関節鏡を用いた欠損作成はモデルの安定性という点で問題があり、直視下での欠損作成・埋植モデルとした。これにより安定した動物モデルとなり、動物実験の本来の目的である、コラーゲン半月板の効能および時間経過での組織修復の過程を検討するのに則したと考えられる。1ヶ月埋植群では肉眼的な修復反応が認められ、MRI では水とは異なる信号強度を示した。今後組織学的解析・生体力学的解析を進め、臨

床にも応用可能な非侵襲的検査であるMRIとの相関を検討することで、臨床試験に応用することが可能と考える。また、6ヶ月埋植群の膝をXp撮影することにより、半月欠損によるOA進行の保護効果を明らかにできると考える。

コラーゲン半月板は足場素材であり、埋植後は細胞の遊走、分化、細胞外マトリックス合成といった、局所の治癒応答による修復再生を促すと考えられる。修復再生過程における力学負荷の与える影響は不明な点があるため、どのようなリハビリプロトコルが望ましいのか現時点では知見がない。この問題を解決するために、*in vitro* で生体内に近似した圧縮刺激を三次元培養組織に与え、半月板の軟骨基質産生を指標に機能分化に関与するBMP2 遺伝子発現とその軟骨分化を確認した。本結果からは細胞が浸潤した後の圧縮刺激は組織の半月組織への再生に有効と考えられた。

E. 結論

矩形の半月板欠損を用いた動物モデルは安定していた。肉眼所見・画像所見よりコラーゲン半月板は半月板再生に有効と考えられた。コラーゲン半月板への細胞浸潤後の圧縮刺激は、半月板再生に有効と考えられた。まだ1ヶ月埋植群の短期の解析であり、今後長期の解析を要すると考える。

厚生労働科学研究委託費（先端的基盤開発研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

コラーゲン半月板補填材の臨床実用化に向けた開発研究
PMDA への非臨床試験, 臨床治験実施の相談

業務主任者 中田 研 大阪大学大学院医学系研究科スポーツ医学 教授
担当責任者 岡田 潔 大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 特任講師
担当責任者 井岡 亮一 榎高研第三開発部生体材料製造

研究要旨

欠損を有する半月板損傷に対するコラーゲン半月板補填材を用いた治療法の実用化に向け、PMDA の医療機器戦略相談を活用した。助言を得て、GLP 試験の省略、大動物を用いた効能試験の再計画を行った。

A. 研究目的

コラーゲン半月板補填材（以下、本品）を実用化するのに必須である臨床治験実施に必要な生物学的安全性試験のパッケージ、治験デザインについて、PMDA の意見を伺うこと。

B. 研究方法

H26.8.25 下記相談事項につき対面助言を受けた。

- 治験実施に必要な生物学的安全性試験のパッケージについて
- 生物学的安全性試験の埋植試験に用いる動物種、観察期間、部位について
- 埋移植試験に亜急性全身毒性試験を含めることの是非について
- 生物学的安全性試験の際の溶出に用いる溶媒について
- 既に実施した細胞毒性試験を治験、承認

申請の資料に用いることについて

- 生体力学的特性の規格値の妥当性について
- 治験において、KOOS・VAS・MRI・活動性・関節鏡いずれを主要評価項目にするかについて、また非盲検化の必要性について

この対面助言にて効能試験についての助言を得た事から、本委託研究事業項目②にもある大動物を用いた検討を重ねた試験内容について、H26.12.15 フォローアップ面談を受けた。

C. 研究結果

H26.8.25 の助言内容の要旨を示す。

本品が既承認品「インテگران」と同一の原材料、類似した製造工程であることから、抽出物を用いる試験の一部（感作性試験、刺激性・皮内反応試験、遺伝毒性試験）を省略

する事は可能であるとの助言を得た。これにより、GLP 試験の大半を省略可能になった。

一方、インテグランと本品に架橋度に差があり、その差分が生体内における分解・吸収、それに伴う安全性について影響がある可能性が否定できないことから、埋植試験は必要であり、ウサギの皮下単回埋植、12 週間の期間で良いとの助言を得た。

本品の機械的安全性評価として、実使用条件を考慮し、トリミング、移植、縫合などの外科的操作や、半月板の動態に伴う引っ張り・摩擦による破損・剥離・摩耗の影響について検討を要する旨、また本品の機械的品質担保のため、製造条件の最適化に関して検討要である旨助言を得た。これを踏まえ、気孔率を変えることにより、圧縮強度に比べ若干機械的強度に劣る引っ張り張力を改善すべく、製造方法の調整を行っている。

治験において、有効性主要評価項目を KOOS とすることは受け入れ可能だが、このスコアを用いる意義及び評価時期の妥当性を説明できる必要があるとの助言を得た。また、非盲検単群試験とするためには、本品の適応となる半月板欠損の標準的治療法である半月板説叙述の治療成績がヒストリカルコントロールとして必要であり、現時点では非盲検単群試験が適当か判断できず、臨床研究・非臨床研究の情報が蓄積した適切な時期に、再度対面助言を活用するよう助言を得た。

大動物を用いた効能試験において、可能な限り本品の適応対象となる欠損・断裂モデルを作成し、縫合も含め臨床使用条件を模して適用する必要性、本品の吸収・分解過程の評

価の必要性、本品内部への細胞浸潤の速度や組織修復過程、計時的な細胞の分化状態の評価の必要性、などの助言を得た。

大動物の性能試験についての助言を踏まえ、モデルを種々検討し、モデル及び評価時期、評価方法について、H26.12.15 フォローアップ面談を活用し、PMDA の合意を得た。

D. 考察

N/A.

E. 結論

PMDA 薬事戦略相談を活用し、本品実用化に向けた各種研究を調整の上遂行した。

III. 学会等発表実績

- 1) 中田研 教育研修講演「半月板損傷の最新治療」 第 87 回日本整形外科学会学術総会
2014 年 5 月 神戸

- 2) 中田研 招待講演「運動器の健康寿命：コラーゲン細胞外マトリックスのメカノバイオロジーから半月板再生 第 46 回日本結合組織学会学術大会・第 61 回マトリックス研究会大会 合同学術集会 2014 年 6 月 名古屋

- 3) 中田研 招待講演「エクササイズメディスンからグローバルヘルスへ：加速度トレーニングによる組織再生とアクティブエイジング」
第 14 回日本抗加齢医学会 2014 年 6 月 大阪

- 4) 中田研 教育研修講演「細胞外マトリックスの役割と半月板の未来医療」第 29 回 日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 鹿児島

Jan 12.

IV. 研究成果の刊行物・別刷

- 1) Matsuo T, Mae T, Kita K, Tachibana Y, Yoshikawa H, Nakata K. Bone Substitutes and Implantation Depths for Subchondral Bone Repair in Osteochondral Defects of Porcine Knee Joints Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. DOI 10.1007/s00167-014-2853-4 2014
- 2) Shimomura K, Kanamoto T, Kita K, Akamine Y, Nakamura N, Mae T, Yoshikawa H, Nakata K. Cyclic compressive loading on 3D tissue of human synovial fibroblasts upregulates prostaglandin E2 via COX-2 production without IL-1 β and TNF- α . Bone Joint Res. 3(9):280-8 doi 10.1302/2046-3758.39.2000287 2014
- 3) Nakai N, Fujita R, Kawano F, Takahashi K, Ohira T, Shibaguchi T, Nakata K, Ohira Y Retardation of C2C12 myoblast proliferation to low-temperature atmospheric plasma J Physiol Sci doi 10.1007/s12576-014-0328-5 2014
- 4) Kaneko K, Higuchi C, Kunugiza Y, Yoshida K, Sakai T, Yoshikawa H, Nakata K. Hyaluronan inhibits BMP-induced osteoblast differentiation FEBS Lett. 2015 Feb 13;589(4):447-54. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.031. Epub 2015

Bone substitutes and implantation depths for subchondral bone repair in osteochondral defects of porcine knee joints

Tomohiko Matsuo · Keisuke Kita · Tatsuo Mae ·
Yasukazu Yonetani · Satoshi Miyamoto ·
Hideki Yoshikawa · Ken Nakata

Received: 15 August 2013 / Accepted: 12 January 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Purpose The purpose of this study was to identify the optimal material and implantation method for subchondral bone repair.

Methods Four osteochondral defects in a femoral groove were created in both knees of 12 pigs, and the total number of defects was 96. Eight defects were left empty (empty group). Beta-tricalcium phosphate (β -TCP) bone substitutes with 75 and 67 % porosity were implanted in 30 and 29 defects, respectively (β -TCP75 and β -TCP67 groups). Hydroxyapatite (HA) bone substitutes with 75 % porosity were filled in 29 defects (HA group). Bone substitutes were implanted at 0, 2, or 4 mm below the subchondral bone plate (SBP). The reparative tissue was assessed using microfocus computed tomography and histology 3 months after implantation.

Results Regardless of the kind of bone substitutes, the defects were filled almost completely after implanting them at the level of the SBP, while the defects remained after implanting them at 2 or 4 mm below the SBP. Reparative

tissue of the β -TCP75 group was similar to the normal cancellous bone, while that of the β -TCP67 or HA group was not.

Conclusions Subchondral bone defects were filled almost completely only when bone substitutes were implanted at the level of the SBP. The reparative tissue after implanting the β -TCP bone substitutes with 75 % porosity was the most similar to the normal cancellous bone. Therefore, implanting the β -TCP bone substitutes with 75 % porosity at the level of the SBP could be recommended as a treatment method for subchondral bone repair in osteochondral defects.

Level of evidence I.

Keywords Subchondral bone osteochondral defect · Bone substitute · Hydroxyapatite · Beta-tricalcium phosphate

Introduction

Autografts are the gold standard for bone repair in the field of orthopaedics, but have some disadvantages including donor site morbidity and graft quantity limitations [6, 8, 13]. Although allografts can be used as an alternative to autografts, they are associated with the risk of immune reaction, disease transmission, infections, and incomplete incorporation [4, 6, 8, 20, 30]. Because of the limitations of autografts and allografts, materials such as hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) have been developed as synthetic ceramic bone substitutes. The first generation of bone substitutes comprised solid or low-porosity HA ceramics. They were reported to have poor osteoconductive ability because of their low porosity in several studies [19, 21, 28]. Subsequently, newer bone

T. Matsuo · T. Mae · Y. Yonetani · S. Miyamoto ·
H. Yoshikawa
Department of Orthopaedic Surgery, Osaka University Graduate
School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871,
Japan

K. Kita
Department of Sports Orthopaedics, Osaka Rosai Hospital,
1179-3, Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai, Osaka 583-8555, Japan

K. Nakata (✉)
Medicine for Sports and Performing Arts, Department of Health
and Sports Sciences, Osaka University Graduate School of
Medicine, 1-17 Machikaneyama-cho, Toyonaka,
Osaka 560-0043, Japan
e-mail: ken-nakata@umin.ac.jp

substitutes have become widely available [11, 26, 34]. Regardless of the kind of materials (HA or β -TCP), these second-generation bone substitutes have a high porosity and interconnected pores that allow new bone tissue to penetrate deeply into the implant. Many animal and clinical studies reported that these newer bone substitutes yielded excellent bone repair, mainly in the diaphyses or metaphyses of long bones [5, 7, 10, 20, 23, 24, 28, 29, 32, 34].

However, they have rarely been used or evaluated in subchondral bone defects, especially in defects open to the joint cavity. Subchondral bone, which is composed of subarticular spongiosa and subchondral bone plate (SBP), plays an important role in joint function as a shock absorber against mechanical loading and as a source of nutrition for cartilage [2, 17]. Therefore, subchondral bone repair is crucial for the treatment of osteochondral defects in joints [9, 17]. Nevertheless, in past decades, considerable efforts have been made predominantly in the area of cartilage repair. As a result, treatment options, such as bone marrow stimulation, osteochondral autologous transplantation (OAT), and autologous chondrocyte implantation (ACI), have been developed. In contrast, the optimal treatment method for subchondral bone repair has not been a focus of research and is still unclear. The objective of this study was to identify the optimal material and implantation method for subchondral bone repair by comparing the quality and quantity of the reparative tissue in subchondral bone defects in which different bone substitutes had been implanted at different depths. In addition, cartilage repair over the repaired subchondral bone was assessed. In terms of the clinical relevance, the information about the optimal material and implantation method for subchondral bone repair would be useful for the treatment of osteochondral defects.

Materials and methods

Sample preparation

Three recently developed, interconnected, porous ceramic bone substitutes were used in this study. SUPERPORE (HOYA Corp., Tokyo, Japan) comprises β -TCP and has 3 types of pores, including macropores (100–300 μ m), interconnecting pores (50–100 μ m) that run between the macropores, and micropores (0.5–10 μ m). The sintering temperature is higher than 1,000 $^{\circ}$ C. The standard type of SUPERPORE has 75 % porosity, and its compressive strength is 5 MPa, while the hard type (67 % porosity) has a compressive strength of 20 MPa. The standard and hard types of SUPERPORE have been commercially available and clinically used in Japan since 2010 and 2011, respectively. NEOBONE (Covalent Materials Corp., Tokyo,

Japan) was developed as an interconnected porous HA ceramic bone substitute. It has 75 % porosity, with macropores of 150 μ m that are fully interconnected by openings of 40 μ m. Its compressive strength is >8 MPa, and its sintering temperature is 1,200 $^{\circ}$ C. NEOBONE has been commercially available and clinically used in Japan since 2003.

Animal experiments

A total of 12 skeletally mature, miniature pigs weighing 33–50 kg were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine hydrochloride (50 mg/ml and 0.1 ml/kg of body weight), medetomidine (1.0 mg/ml and 0.08 ml/kg of body weight), and butorphanol tartrate (5 mg/ml and 0.04 ml/kg of body weight) followed by inhalation of 2 % isoflurane. After a medial parapatellar incision, the femoral grooves of both knees were exposed. Four cylindrical osteochondral defects (7 mm diameter and 10 mm depth) in a femoral groove were created in both knees of 12 pigs, and the total number of defects was 96. Eight of these osteochondral defects were left empty (empty group). Standard and hard types of SUPERPORE were implanted in 30 and 29 subchondral bone defects, respectively (β -TCP75 and β -TCP67 groups). NEOBONE was filled in 29 subchondral bone defects (HA group). Cylindrical bone substitutes were implanted in the defects at 3 different depths: 0, 2, or 4 mm below the SBP. In the β -TCP75 group, 10 bone substitutes each were implanted at 0, 2, and 4 mm below the SBP. In the β -TCP67 and HA groups, 10, 9, and 10 bone substitutes were implanted at 0, 2, and 4 mm below the SBP, respectively. All animals were anesthetized with an intramuscular injection of pentobarbital sodium (64.8 mg/ml and 0.5 ml/kg of body weight) and euthanized with an intravenous injection of potassium chloride (1 mEq/ml and 20 ml) 3 months after implantation for analyses. After removing all soft tissues, the femur was cut just proximal to the proximal edge of articular cartilage.

Microfocus computed tomography analysis

Each implanted region was scanned with a microfocus computed tomography (CT) system (SMX-100CT-SV; Shimadzu, Kyoto, Japan). The tube voltage was set at 50 kV, and the current was 200 μ A. With an angular step of 0.3 $^{\circ}$ over an angular range of 180 $^{\circ}$, 600 radiographic projections were acquired. The spatial resolution was 24 μ m.

Two-dimensional (2-D) evaluation was performed in the sagittal plane, which passed the long axis of each bone substitute. Using Image J software (NIH Image, Bethesda, MD, USA), the filling rate was calculated and defined as

the total area of newly formed bone and remaining bone substitute divided by the original subchondral bone defect (Fig. 2a).

Next, 3-D images were reconstructed with a threshold of 1,000 Hounsfield units using TRI3D-BON software (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan), and a cube ($2 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$) was extracted from the centre of each implanted region. First, the calcified volume of newly formed bone and remaining bone substitute was measured. The calcified ratio was calculated as the calcified volume divided by the total volume of the cube (CV/TV). Second, bone mineral density (BMD) was evaluated using a phantom made of epoxy resin and hydroxyapatite. Third, the following 3-D parameters of microarchitecture were assessed: trabecular thickness, trabecular number, trabecular separation, fractal dimension (FD), trabecular pattern factor (TBPf), and structural model index (SMI). FD, TBPf, and SMI were structural indices. As a control, the normal cancellous bone of the same femoral condyle was also evaluated in a similar fashion.

The reliability calculations were based on each parameter measured by the same observer (3 times repeat) and by three different observers. The intra- and inter-observer intra-class correlation coefficient (ICC) and standard deviation (SD) are shown in Table 1.

Histological evaluation

Specimens were fixed in 4 % formaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). All specimens except HA were decalcified in

Table 1 The intra-observer and inter-observer intra-class correlation coefficient (ICC) and standard deviation (SD) for each parameter

		Intra-observer		Inter-observer	
		ICC	SD	ICC	SD
2-dimension	Filling rate (%)	0.96	1.1	0.92	1.4
3-dimension	CV/TV (%)	0.98	0.4	0.91	0.9
	BMD (g/cm^3)	0.99	0.003	0.99	0.005
	Trabecular thickness (μm)	0.43	5.0	0.43	5.2
	Trabecular number (/mm)	0.92	0.05	0.91	0.06
	Trabecular separation (μm)	0.64	1.6	0.82	1.3
	FD	0.99	0.01	0.98	0.01
	TBPf (/mm)	0.91	0.6	0.78	1.0
	SMI	0.95	0.2	0.87	0.5

CV/TV calcified volume divided by total volume, BMD bone mineral density, FD fractal dimension, TBPf trabecular pattern factor, and SMI structural model index

20 % ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). HA was decalcified in 50 % K-CX (FALMA Co., Tokyo, Japan) after 20 % EDTA. After decalcification, specimens were embedded in paraffin and cut into 2- μm sections parallel to the long axis of the osteochondral defects. The sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or toluidine blue.

All experiments were approved by the Animal Laboratory, Faculty of Medicine, Osaka University, Japan (ID: 22-071-004).

Statistical analysis

All statistical tests were performed with JMP statistical software (version 9.0.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A power analysis, with a power of 0.8 being considered acceptable, showed that 96 defects in all were sufficient for comparison. The Wilcoxon rank sum test was used, and differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Quantity of the reparative tissue filling the subchondral bone defect

In the 2-D microfocus CT images, the subchondral bone defects remained evident when the defects were left empty or when bone substitutes were implanted at 4 mm below the SBP (Fig. 1). The defects were filled almost completely after implanting bone substitutes at the level of the SBP, while slight defects remained after implanting them at 2 mm below the SBP.

The filling rate of the empty group was only $45.9 \pm 15.8 \%$ and was significantly lower than that of any other group (Fig. 2b). In the β -TCP75 group, when bone substitutes were implanted at 4 mm below the SBP, the filling rate was significantly lower than that at 0 mm. This result was the same in the β -TCP67 and HA groups.

Calcified volume of the reparative tissue

No significant difference was observed between the normal cancellous bone and the β -TCP75 group in terms of CV/TV (Fig. 3). CV/TV of the β -TCP67 group was significantly higher than that of the normal cancellous bone, whereas CV/TV in the HA group was significantly higher than that in the other 3 groups.

Mineralization of the reparative tissue

BMDs of the β -TCP75 and β -TCP67 groups were not significantly different from that of the normal cancellous

bone, whereas BMD in the HA group was significantly higher than that in the other three groups (Fig. 4).

Microarchitecture of the reparative tissue

No significant differences were noted for any parameter measured in the β -TCP75 group compared with those in the normal cancellous bone (Table 2). In the β -TCP67 group, trabecular number and FD were significantly higher compared with those in the normal cancellous bone, while trabecular separation and TBPf were significantly lower. In the HA group, all parameters except trabecular thickness and trabecular number were significantly different from those in the other 3 groups.

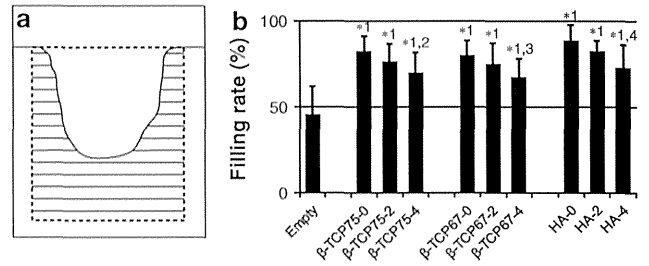


Fig. 2 a The filling rate was calculated and defined as the total area of newly formed bone and remaining bone substitute (lined area) divided by the original subchondral bone defect (the area surrounded by dotted line). b Filling rate of empty group ($n = 8$), β -TCP75 group ($n = 10, 10, 10$), β -TCP67 group ($n = 10, 9, 10$), and HA group ($n = 10, 9, 10$). In three implanted groups, bone substitutes were implanted at 0, 2, or 4 mm below the subchondral bone plate. *1, 2, 3, and 4 denote significant differences compared with empty, β -TCP75-0, β -TCP67-0, and HA-0 groups, respectively ($p < 0.05$)

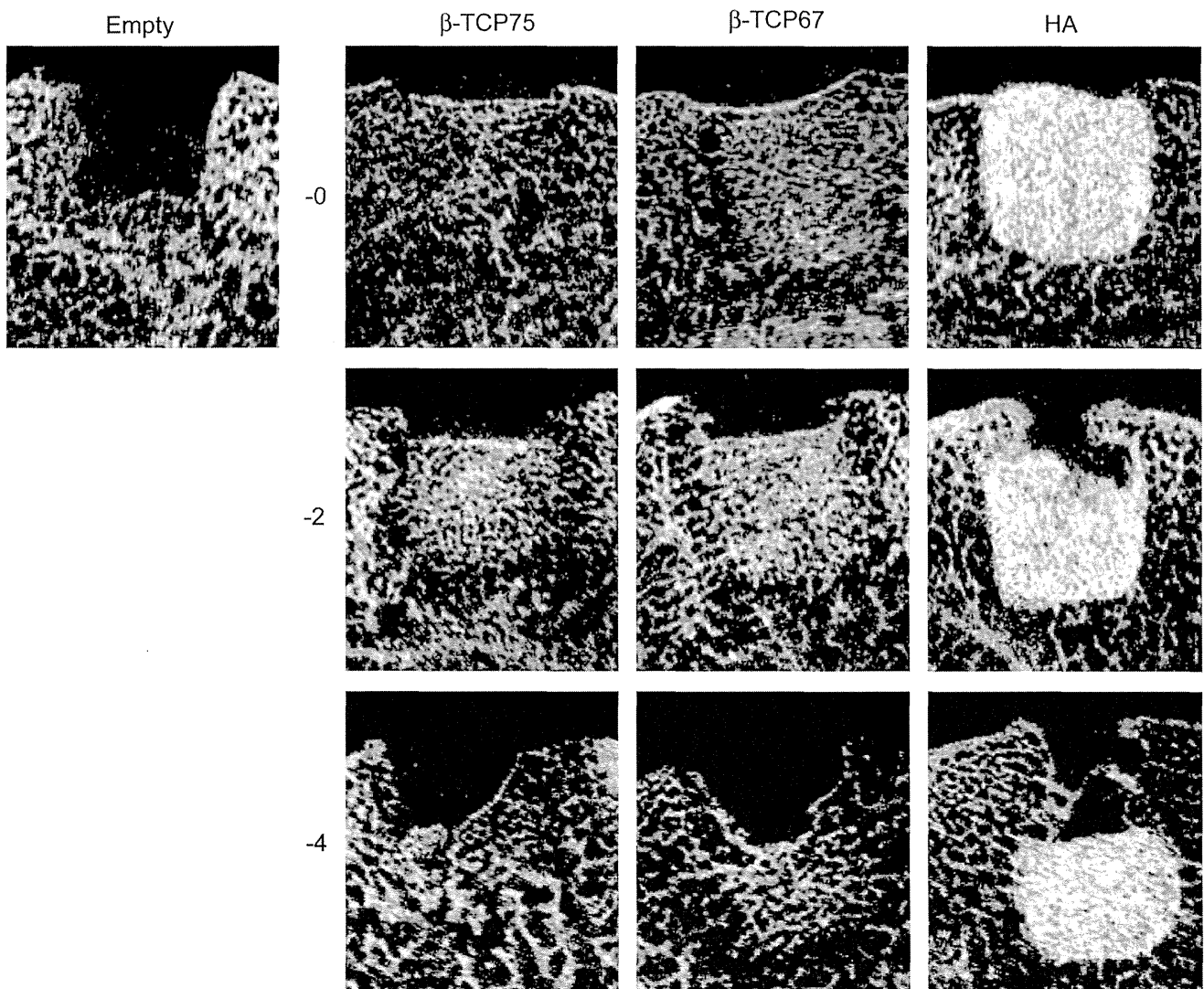


Fig. 1 2-D microfocus CT images of the reparative tissue

Fig. 3 3-D reconstructed images. **a** Normal cancellous bone. **b, c** Reparative tissues of β -TCP75 group (**b**), β -TCP67 group (**c**), and HA group (**d**). **e** Calcified volume divided by total volume (CV/TV). * $p < 0.05$

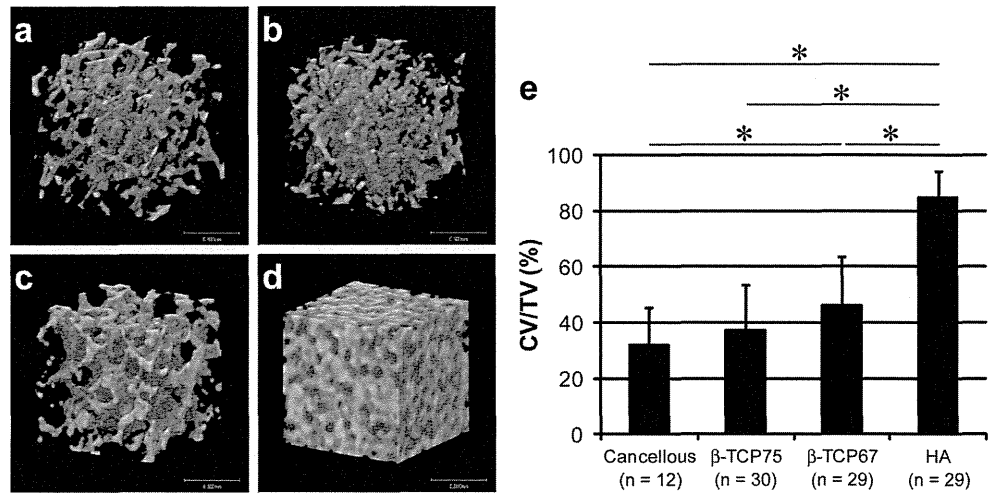


Fig. 4 3-D reconstructed images coloured by bone mineral density (BMD). **a** Normal cancellous bone. **b, c** Reparative tissues of β -TCP75 group (**b**), β -TCP67 group (**c**), and HA group (**d**). Blue, white, and pink colours denote low, moderate, and high mineralization, respectively. **e** BMD. * $p < 0.05$

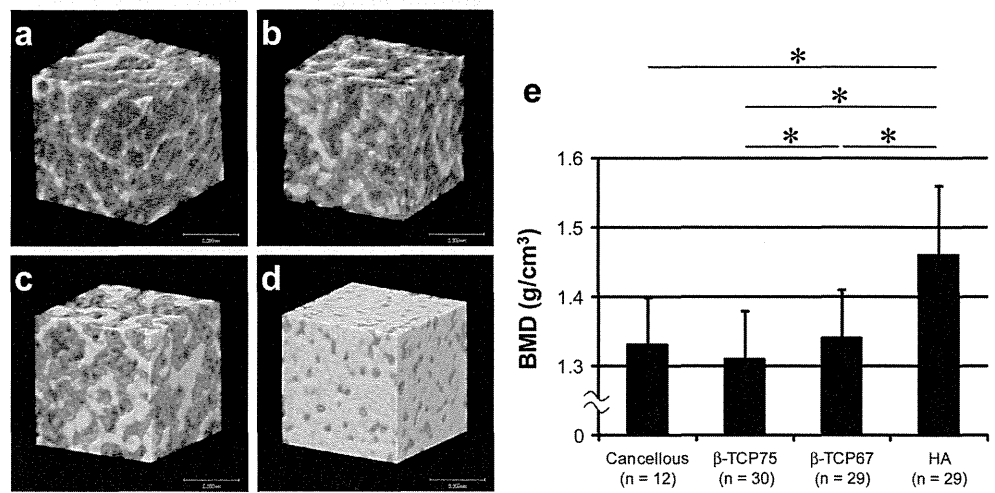


Table 2 Parameters of microarchitecture

	Cancellous (n = 12)	β -TCP75 (n = 30)	β -TCP67 (n = 29)	HA (n = 29)
Trabecular thickness (μ m)	128.2 \pm 20.4	132.2 \pm 24.6	139.0 \pm 20.7	132.0 \pm 14.1
Trabecular number (/mm)	1.41 \pm 0.24	1.46 \pm 0.31	1.58 \pm 0.27 ^a	1.62 \pm 0.49
Trabecular separation (μ m)	205.0 \pm 58.3	181.3 \pm 62.8	152.6 \pm 59.8 ^a	61.9 \pm 7.5 ^b
FD	2.30 \pm 0.09	2.34 \pm 0.14	2.41 \pm 0.13 ^a	2.51 \pm 0.13 ^b
TBPf (/mm)	3.6 \pm 3.0	3.2 \pm 5.7	0.2 \pm 5.8 ^a	-24.3 \pm 9.7 ^b
SMI	1.6 \pm 0.6	1.4 \pm 1.0	0.8 \pm 1.3	-7.5 \pm 3.9 ^b

FD fractal dimension, TBPf trabecular pattern factor, and SMI structural model index

^a $p < 0.05$ compared with the normal cancellous bone

^b $p < 0.05$ compared with the normal cancellous bone, the β -TCP75 group, and the β -TCP67 group

Histological findings

Subchondral bone repair was poor in the empty group (Fig. 5). In the β -TCP75, β -TCP67, and HA groups, subchondral bone defects remained obvious when bone substitutes were implanted at 4 mm below the SBP. Higher magnification views showed that reparative tissue

resembled the normal cancellous bone after implanting the β -TCP with 75 or 67 % porosity and also that the remaining β -TCP could not be detected (Fig. 6). However, in the HA group, a large amount of HA remained. Additionally, fibrous tissue and newly formed bone filled pores, showing no similarity to the normal cancellous bone.