basic Fibroblast Growth Factor 含浸ゼラチンハイドロ ゲルシートならびにバンコマイシン含有ポリ乳酸 グルコール酸共重合体シートを用いた 中足骨開放骨折の乳用子牛の1例

瀬尾洋行¹⁾ 佐々木直樹^{2)†} 杉山仁志¹⁾ 都築 直²⁾ 西井 知²⁾
大塚健史²⁾ 山田明夫²⁾ 田畑泰彦³⁾

- 1) 十勝農業共済組合北西部事業所 (〒080-0573 河東郡音更町駒場南3-4)
- 2) 帯広畜産大学臨床獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)
- 3) 京都大学再生医科学研究所生体組織工学研究部門 (〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町53)

(2009年9月17日受付・2010年2月4日受理)

要 約

症例はホルスタイン種乳用子牛(5カ月齢, 雌)であり, 右中足骨開放骨折を発症した。螺旋状骨折ならびに短縮性縦軸転位が認められ, 内外側2カ所で皮膚損傷ならびに排膿が観察された。全身吸入麻酔下でDCP固定およびLag Screw固定を実施し, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) 含浸ゼラチンハイドロゲル (GH) シートならびにバンコマイシン含有ポリ乳酸グルコール酸共重合体 (PLGA) シートを骨折部位に装着した。術後107日目のX線撮影により骨折部位の仮骨形成が観察された。GHがbFGFを徐放することにより, 骨再生を効果的に促進したものと推察された。また, バンコマイシン含有PLGAシートにより重篤な骨髓炎の併発を予防できたものと推察された。今後, 牛の開放骨折治療に対するbFGF含浸GHシートならびにバンコマイシン含有PLGAシートの応用が期待された。

——キーワード: bFGF含浸GHシート, 乳用子牛, DCP, 開放骨折, バンコマイシン含有PLGAシート。

----- 日獣会誌 63, 435~438 (2010)

牛の中足骨骨折は発生頻度が高く, 開放骨折によって汚染や損傷が著しい場合には骨髓炎を継発して予後不良となることが多い。塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic Fibroblast Growth Factor: bFGF) は, 骨芽細胞系細胞の増殖能を示すため, 骨折治癒を促進することが期待されている [1-3]。最近, 生体内で薬剤を徐放化するためのドラッグデリバリーシステムとしてゼラチンハイドロゲル (以下GH) [4] およびポリ乳酸グルコール酸共重合体 (以下PLGA) が注目されている [5]。今回, 乳牛の中足骨開放骨折症例に対して, ダブルDCP固定術, bFGF含浸GHシートならびにバンコマイシン含有PLGAシートの使用を試みたので報告する。

症 例

症例はホルスタイン種乳用子牛(5カ月齢, 雌, 体重150kg)で, 右中足骨骨折を発症後, 肢をできるだけ伸展させた状態でフルリムキャスト (スコッチキャストプラス3[®], 住友スリーエム株, 東京) による外固定を実施した。しかし, 第9病日に起立困難となり, 帯広畜産大学動物医療センターに搬入された。キャスト除去後, 右中足内外側2カ所で皮膚損傷, 排膿ならびに骨断端の露出をともなう伴う開放骨折が観察され, X線撮影 (70kv, 10mA, 0.16S) により中足骨中央の骨折部位の螺旋状骨折ならびに短縮性縦軸転位が認められた (図1)。膿汁の細菌学的検査により黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: SA) と *Fusobacterium necrophorum*

† 連絡責任者: 佐々木直樹 (帯広畜産大学臨床獣医学研究部門大動物外科学研究室)

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11 ☎・FAX 0155-49-5378 E-mail: naoki@obihiro.ac.jp

図1 骨折発症9日目のX線写真（前後方向像）螺旋骨折，短縮性縦軸転位および剥離骨片が観察される。

図3 術後107日目のX線写真（前後方向像）螺旋骨折線周囲の骨増生が著明

図2 手術直後のX線写真（外内側方向像）。Lag Screw1本とDCP2本により固定。骨折中央には剥離骨片除去に伴う骨間隙が存在する。

(CFN) が検出された。

イソフルラン-酸素を用いた間歇的陽圧換気による全身吸入麻酔下において，中足骨背側および外側の2カ所にDCP固定（ナローDCPプレート，8穴，シンセス®，東京）およびLag Screw固定（コーテックスクリュー4.5mm，シンセス®，東京）を実施した（図2）。次いで，bFGF（100 μ g）含浸GHシート（30×30×1mm）ならびにバンコマイシン（塩酸バンコマイシン®，塩野義製薬®，東京）100mg含有PLGAシート（30×30×1mm）を骨折部位に装着後，吸収糸（2-0号 Coated VOIVRYL®，ETHICON，U.S.A.）を用いて皮内縫合

した。手術終了時にフルリムキャストを装着し，麻酔覚醒を行った。術後管理はペニシリン（懸濁水性プロカインペニシリンG®，明治製菓®，東京）300万単位の筋肉内投与ならびにフルニキシンメグルミン（パナミン注射液5%®，大日本住友製薬®，大阪）1mg/kgの静脈内投与を3日間実施した。

キャストは1週間後に除去した。術後2週間目には開放創部位より少量の滲出液の排出があったため，術後3週間目までイソジン消毒剤塗布後にガーゼで被い，伸縮性粘着包帯（ヴェトラップ®，住友スリーエム®，東京）で被覆した。術後107日目には歩行に支障ない程度まで歩様は改善し，X線撮影（70kv，10mA，0.16S）では骨折部周囲に顕著な骨増生を伴う仮骨形成が観察された（図3）。その後，症例は順調に成長し，種付けして無事に出産した。

考 察

本症例は，短縮性縦軸転位を伴う螺旋骨折であり，初診9日経過し，剥離骨片も認められた。したがって，非観血的整復による治癒は困難であると考え，ダブルDCP固定による観血的整復を選択した。DCP固定法は骨折断端を密着・圧迫させ，一次性治癒を促進するとされている。本症例では術後107日目には歩行に支障のない程度まで回復したことから，ダブルDCP固定術の有用性が示された。

骨代謝を促進する可能性のある増殖因子として，酸性および塩基性線維芽細胞増殖因子（acidおよびbasic Fibroblast Growth Factor：以下aFGF [6-8] およびbFGF [1-3]），骨形成蛋白（Bone Morphogenic Proteins：BMPs）[9-11]，形質転換成長因子 β 1（Trans-

forming Growth Factor- β 1 : TGF- β 1) [13, 14], インスリン様成長因子 I (Insulin-like growth factor I : IGF-I) [15, 16] などが知られている。この中で bFGF は多種の間葉系細胞に対する強力な分裂促進因子である [17-19]。bFGF は造骨系統の細胞により産生後、骨基質に蓄積され、自己分泌および傍分泌因子として作用し [20]、他の骨形成因子 (TGF- β 1 や BMPs 等) の発現をも誘導する [1, 17, 21]。また血管新生作用や骨再生作用がマウス、ラット、ウサギ、サルなどにおいてすでに報告されている [1, 17, 19, 22]。いっぽう、bFGF などの細胞増殖因子はその生物学的半減期が短く、その溶解溶液を単回局所注射しても効果は得られない [23]。近年、このような欠点を補う技術として、生物学的半減期が短い薬物を効率よく利用する方法としてドラッグ・デリバリー・システム (Drug Delivery System : DDS) が開発されてきた [24]。種々の動物種において bFGF のキャリアとして GH を用いた DDS が報告されていることから [25, 26]、本症例においては剥離骨片除去にともなう骨間隙の骨増生促進を目的として、骨折面に bFGF 含浸 GH シートを装着した。なお、bFGF 量は、佐々木ら [27] の報告を参考に $100\mu\text{g}/\text{site}$ としたが、術後 107 日目に治癒し、X 線撮影により骨折部位の仮骨形成が観察されたことから、骨再生を効果的に促進したものと推察された。いっぽう、仮骨形成の範囲は骨折部位を中心として骨体の近位から遠位まで広い範囲であったことから、bFGF 含浸 GH シートからの bFGF の浸透範囲は比較的広く及ぶものと推察された。今後、骨折パターンの違いによる bFGF 含浸 GH シートの大きさや設置方法についての検討が必要と考えられた。

開放骨折では、汚染や損傷が著しい場合に骨髓炎を継発して予後不良となることが多い。細菌感染の予防には、徹底した術創の洗浄に加え壊死組織の除去ならびに抗生物質の長期投与が必要となる。いっぽう、抗生物質残留などによる畜産食品の安全性の確保や耐性菌の出現などの問題に対して、局所に効果的に作用し薬剤量を低減できる代替の治療方法が望まれている。PLGA シートは生体分解性ポリマーであり、含浸させた抗生物質を 14 日間にわたり徐放できる DSS として人医領域での応用が検討されている [4]。本症例では大部分のグラム陽性菌とグラム陰性菌に殺菌作用をもち、人外科領域で使用されているバンコマイシン含有 PLGA シートを使用した。バンコマイシンは、本症例の開放創から検出された SA と FN 殺菌作用を有する。本シートに含有されるバンコマイシン量は 100mg であり、静脈内投与した場合の有効投与量に比較して少量で 2 週間にわたって局所の殺菌作用を持続することが可能となっている。本症例では中足骨の開放骨折に伴う細菌感染を併発していたもの、術後経過は良好であったことからバンコマイシン含

有 PLGA シートにより重篤な骨髓炎の併発を予防できたものと推察された。

以上のことから、牛の開放骨折の観血的整復に際して、bFGF 含浸 GH シートならびにバンコマイシン含有 PLGA シートの併用は有効と考えられた。

引用文献

- [1] Kato T, Kawaguchi H : Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits, *J Orthop Res*, 16, 654-659 (1998)
- [2] Nakamura T, Hara Y : Recombinant human basic fibroblast growth factor accelerates fracture healing by enhancing callus remodeling in experimental dog tibial fracture, *J Bone Miner Res*, 13, 942-949 (1998)
- [3] Wong WC, Yu Y : Use of a polymeric device to deliver growth factors to a healing fracture, *ANZ J surg*, 73, 1022-1027 (2003)
- [4] Tabata Y, Hijikata S : Neovascularization through biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor, *J Biomater Sci, Polym Ed*, 10, 79-94 (1999)
- [5] Otani Y, Tabata Y, Ikada Y : Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly (L-glutamic acid) mixture, *Biomaterials*, 19, 2167-2173 (1998)
- [6] Cuevas P, de Paz V : Osteopromotion for cranioplasty : an experimental study in rats using acidic fibroblast growth factor, *Surg Neurol*, 47, 242-246 (1997)
- [7] Reiff DA, Kelpke S : Acidic fibroblast growth factor attenuates the cytotoxic effects of peroxynitrite in primary human osteoblast precursors, *J Trauma*, 50, 433-438 (2001)
- [8] Tang KT, Capparelli C : Acidic fibroblast growth factor inhibits osteoblast differentiation in vitro : altered expression of collagenase, cell growth-related, and mineralization-associated genes, *J Cell Biochem*, 61, 152-166 (1996)
- [9] Perrier M, Lu Y : Acceleration of second and fourth metatarsal fracture healing with recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate cement in horses, *Vet Surg*, 37, 648-655 (2008)
- [10] Ishihara A, Shields KM : Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human BMP-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models, *J Orthop Res*, 26, 764-771 (2008)
- [11] Takahashi Y, Yamamoto M : Skull bone regeneration in nonhuman primates by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from a biodegradable hydrogel, *Tissue Eng*, 13, 293-300 (2007)
- [12] Kain S, Einhorn A : Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures, *Foot Ankle Clin*, 10, 639-650 (2005)
- [13] Tieline L, Puolakkainen P : The effect of transforming growth factor- β 1, released from a bioab-

- sorbable self-reinforced polylactide pin, on a bone defect, *Biomaterials*, 23, 3817-3823 (2002)
- [14] Ueda H, Hong L : Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β to promote bone repair in skull defects in rabbits, *Biomaterials*, 23, 1003-1010 (2002)
- [15] Aspenberg P, Albrektsson T : Local application of growth-factor IGF-1 to healing bone. Experiments with a titanium chamber in rabbits, *Acta Orthop Scand*, 60, 607-610 (1989)
- [16] Wong C, Yu Y : Use of a polymeric device to deliver growth factors to a healing fracture, *ANZ J Surg*, 73, 1022-1027 (2003)
- [17] Kawaguchi H, Nakamura K : Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2, *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 875-880 (2001)
- [18] Nakajima F, Nakajima A : Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat, *Calcif Tissue Int*, 81, 132-138 (2007)
- [19] Miyoshi M, Kawazoe T : Effects of bFGF incorporated into a gelatin sheet on wound healing, *J Biomater Sci Polym Ed*, 16, 893-907 (2005)
- [20] Hurley M, Abreu C : Expression and regulation of fibroblast growth factor mRNA levels in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells, *J Biol Chem*, 269, 9392-9396 (1994)
- [21] Noda M, Vogel R : Fibroblast growth factor enhances type β 1 transforming growth factor gene expression in osteoblast-like cells, *J Cell Biol*, 109, 2529-2535 (1989)
- [22] Nakajima H, Sakakibara Y : Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury : toward safety and minimal invasiveness, *J Artif Organs*, 7, 58-61 (2004)
- [23] Iwakura A, Tabata Y : Novel method to enhance sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries with use of basic fibroblast growth factor, *Circulation*, 102, 307-311 (2000)
- [24] Tabata Y, Hijikata S : Neovascularization through biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor, *J Biomater Sci Polym*, 10, 79-94 (1999)
- [25] Iwakura A, Tabata Y : Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126, 1113-1120 (2003)
- [26] Nakajima F, Nakajima A : Effects of a single percutaneous injection of basic fibroblast growth factor on the healing of a closed femoral shaft fracture in the rat, *Calcif Tissue Int*, 81, 132-138 (2007)
- [27] Sasaki N, Minami T, Yamada K, Yamada H, Inoue Y, Kobayashi M, Tabata Y : In vivo effects of intra articular injection of gelatin hydrogel microspheres containing basic fibroblast growth factor on experimentally induced defects in third, *Am J Vet Res*, 64, 1555-1559 (2008)

Calf with Metatarsal Open Fracture Treated with bFGF-Impregnated GH Sheet and Vancomycin-Loaded PLGA Sheet

Hiroyuki SEO*, Naoki SASAKI[†], Hitoshi SUGIYAMA, Nao TSUZUKI, Satoru NISHII, Kenji OTSUKA, Haruo YAMADA and Yasukiko TABATA

* Tokachi NOSAI, Northwest Clinic, Komaba Minami 3-4, Otofuke-town, 080-0573, Japan

SUMMARY

A Holstein dairy cow (female, age 5 months) presented with an open right metatarsal fracture. The cow had a spiral fracture and displacement with a longitudinal contraction. Skin injury and pus discharge were also observed on the medial and lateral sides. DCP and lag screw fixations were conducted under general inhalation anesthesia. A sheet of gelatin hydrogel (GH) impregnated with basic fibroblast growth factor (bFGF) and a sheet of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) loaded with vancomycin were applied to the site of the fracture. The wounds were healed by 107 days post surgery, when a radiography revealed that a callus had formed at the site of the fracture. The sustained release of bFGF from GH effectively promoted bone regeneration, and the vancomycin-loaded PLGA sheet prevented complications associated with serious osteomyelitis. We believe that the bFGF-impregnated GH sheet and the vancomycin-loaded PLGA sheet can be applied for the future treatment of severe fractures in cattle.

—Key words : bFGF-impregnated GH sheet, calf, DCP, open fracture, vancomycin-loaded PLGA sheet.

[†] Correspondence to : Naoki SASAKI (Department of Clinical Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan

TEL • FAX 0155-49-5378 E-mail : naoki@obihiro.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 435 ~ 438 (2010)