

preting the context of the questions that were divided into each domain. The five domains into which the 24 questions were divided were designated as: (1) lower extremity function, (2) quality of life, (3) cervical spine function, (4) bladder function, and (5) upper extremity function. Then the equations to calculate the score for each domain were assembled in order to intuitively indicate the status of patients in the five different functional domains. The numbers prefixed to the answers chosen by the patients were multiplied by the coefficients so that the difference between the minimum score representing the worst condition and the maximum score representing the best condition would become 100. The equations were further manipulated by other supplemental coefficients so that the minimum score became 0 and the maximum score became 100 to make recognition of the status of the patient as intuitive as possible.

Because the previous JOA scoring system was a preference-based system, and the scores for different neurological functions (i.e., upper and lower extremity motor function, upper and lower extremity and trunk sensory function, and bladder function) were added up to represent overall status of the patients by one simple score, the new system was initially supposed to use a similar manner. However, because the five factors derived from factor analysis were completely independent statistically, and it was considered impractical to evaluate the multidimensional aspects of the patient suffering cervical myelopathy by one digit, we decided to use the scores in different domains independently without simply adding them.

We have successfully assembled the final questionnaire that is capable of demonstrating the status of the patient suffering cervical myelopathy in five different functional aspects with five intuitive numerical scores, after rigorous yet sophisticated statistical analyses. The remaining issue to be confirmed is the responsiveness of this finalized questionnaire against the changes in patient status after various surgical and nonsurgical treatments. We have investigated if the changes in the patient functional status after surgical treatment would be accurately reflected by the changes in the scores in the different domains. The results will be shown and discussed in part V of our study.

## References

1. Japanese Orthopaedic Association. Japanese Orthopaedic Association scoring system for cervical spondylotic myelopathy (in Japanese). *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1976;50:18–9.
2. Hirabayashi K, Miyakawa J, Satomi K, Maruyama T, Wakano K. Operative results and postoperative progression of ossification among patients with ossification of cervical posterior longitudinal ligament. *Spine* 1981;6:354–64.
3. Japanese Orthopaedic Association. Japanese Orthopaedic Association scoring system for cervical myelopathy (17-2 version and 100 version) (in Japanese with English translation). *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1994;68:490–503.
4. Benzel EC, Lancon J, Kesterson L, Hadden T. Cervical laminectomy and dentate ligament section for cervical spondylotic myelopathy. *J Spinal Disord* 1991;4:286–95.
5. Hamburger C, Buttner A, Uhl E. The cross-sectional area of the cervical spinal canal in patients with cervical spondylotic myelopathy. Correlation of preoperative and postoperative area with clinical symptoms. *Spine* 1997;22:1990–4.
6. Houten JK, Cooper PR. Laminectomy and posterior cervical plating for multilevel cervical spondylotic myelopathy and ossification of the posterior longitudinal ligament: effects on cervical alignment, spinal cord compression, and neurological outcome. *Neurosurgery* 2003;52:1081–7.
7. Ware JE Jr. SF-36 health survey update. *Spine* 2000;25:3130–9.
8. Fairbank JC, Pynsent PB. The Oswestry disability index. *Spine* 2000;25:2940–52.
9. Roland M, Fairbank J. The Roland-Morris disability questionnaire and the Oswestry disability questionnaire. *Spine* 2000;25:3115–24.
10. Fukui M, Chiba K, Kawakami M, Kikuchi S, Konno S, Miyamoto M, et al. An outcome measure for patients with cervical myelopathy: Japanese Orthopaedic Association Cervical Myelopathy Evaluation Questionnaire (JOACMEQ): part 1. *J Orthop Sci* 2007;12:227–40.
11. Fukui M, Chiba K, Kawakami M, Kikuchi S, Konno S, Miyamoto M, et al. Japanese Orthopaedic Association Cervical Myelopathy Evaluation Questionnaire (JOACMEQ): part 2. Endorsement of the alternative item. *J Orthop Sci* 2007;12:241–8.
12. Fukui M, Chiba K, Kawakami M, Kikuchi S, Konno S, Miyamoto M, et al. Japanese Orthopaedic Association Cervical Myelopathy Evaluation Questionnaire (JOACMEQ): part 3. Determination of reliability. *J Orthop Sci* 2007;12:321–6.
13. Clinical Outcomes Committee of the Japanese Orthopaedic Association, Subcommittee on Evaluation of Back Pain and Cervical Myelopathy; Fukui M, Chiba K, Kawakami M, Kikuchi S, Konno S, Miyamoto M, et al. JOA Back Pain Evaluation Questionnaire: initial report. *J Orthop Sci* 2007;12:443–50.

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
高齢者の腰痛症に係る効果的な診断、治療、リハビリテーション等の確立  
分担研究報告書

再生医療を用いた高齢者腰痛症に対する新たな治療法の開発  
分担研究者：持田讓治 東海大学医学部外科学系整形外科学 教授

研究要旨：椎間板変性抑制あるいは再生のための方法論の中で、その組織が元々持つ細胞の移植が最も効率が高く、また生物学的に自然で安全性が高いと考える。その観点から、自家椎間板髄核細胞の変性椎間板髄核腔への移植実験系を設定し、髄核細胞活性化の高効率化、また活性化期間の短縮化のために、自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養法を確立した。小型、大型動物での *in vitro*, *in vivo* 実験を経て、ヒト椎間板髄核細胞に対する自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養結果を検討したところ、1 髄核細胞あたりの DNA 活性、プロテオグリカン活性は髄核細胞の単培養に比べ、培養 5 日以内に 5 倍以上の活性亢進を示した。活性化終了後の髄核細胞の安全性が次の重要な命題であり、4 日間の共培養では、活性化髄核細胞の染色体異常は一切確認されず、また免疫不全マウスへの活性化髄核細胞移植による腫瘍化検査でも異常所見は全く認められなかった。Cell processing center での試行過程で、細胞受け入れ、工程管理、最終製品試験のすべてにおいて、安全性検査項目、品質検査項目の基準値の全てを満たすことができた。

A. 研究目的

ヒト椎間板変性抑制、再生のための細胞移植療法として椎間板髄核細胞の移植術（再挿入術）を確立し、その安全性と効率を検証する。

B. 研究方法

小型動物、大型動物の *in vitro*, *in vivo* 研究で確立した細胞間接着を伴う共培養を用いて、自家骨髄間葉系幹細胞による椎間板髄核細胞の活性化を *in vitro* で検討し、活性化終了後の髄核細胞の異常、腫瘍化の有無を検索する。本学医の倫理委員会の承認のもと患者同意の上手術中（平成 19 年度 12 例、研究全体で 38 例）に提出した椎間板髄核細胞と自家骨髄間葉系幹細胞（ともに  $1 \times 10^5$  個）を細胞間接着を伴う共培養で 4 日間培養し、髄核細胞の活性化状態と染色体異常の有無、免疫不全マウスへの移植後 6 ヶ月以上での腫瘍化の有無について検討し、またその活性化過程における感染をはじめとする安全性項目について検討する。

C. 研究結果

1 髄核細胞あたりの DNA 活性、プロテオグリカン活性は髄核細胞の単培養に比べ、培養 5 日以内に 5 倍以上の活性亢進を示し

た。4 日間の共培養では、活性化髄核細胞の染色体異常は一切確認されず、また免疫不全マウスへの活性化髄核細胞移植による腫瘍化検査でも異常所見は全く認められなかった。しかし培養期間を基準より著しく長期である 8 継代まで継続すると、染色体に倍数体が 1/12 の割合で出現した。ヒトへの将来的な応用を考え、cell processing center における髄核細胞活性化過程の試行をつづけているが、細胞受け入れ時、工程管理時、最終製品時の試験のすべてにおいて、安全性検査項目、品質検査項目の基準値のすべてを満たすことができた。

D. 考察

髄核細胞の体外での活性化が高効率で可能となり、活性化による髄核細胞自体の器質的異常（染色体異常など）や腫瘍化などが否定され、活性化工程における感染所見も一切認められなかった。このことから、細胞移植療法のファーストステップで命題となる安全性が十分に担保された方法と施設であることが確認できた。

E. 結論

自家骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養による自家髄核細胞は短期間に良好な細胞活性化を得ることができ、活性

化後の髄核細胞の安全性が確認されたことから、将来的な椎間板変性抑制、再生への方法としての活性化髄核細胞移植が臨床現場に還元される可能性が示された。現在、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究審査委員会でさらにご検討をいただいている。

## F. 発表業績

### 1. 論文発表

- 1) An HS, Masuda K, Thonar E, Mochida J: Biologic Repair and Regeneration of the Intervertebral Disc. In Corbin TP, Connolly RJ, Yuan HA, Bao QB, Boden SD (eds): Emerging Spine Surgery Technologies Quality Medical Publishing, Inc., St. Louis, MO, 2006 pp. 161-177.
- 2) Lee CR, Sakai D, Nakai T, Toyama K, Mochida J, Alini M, Grad S. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine J*, 2007, in press
- 3) Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, Omi H, Watanabe T, Serigano K, Tamura F, Sakai D. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res*, 2007 in press.
- 4) Omi H, Mochida J, Iwashina T, Katuno R, Hiyama A, Watanabe T, Serigano K, Iwabuchi S, Sakai D. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation enhances TIMP-1 in nucleus pulposus cells and MCP-1 in macrophages in the rat. *J Orthop Res*, 2007, in press
- 5) 酒井大輔, 岩品徹, 渡邊拓也, 桧山明彦, 大見博子, 中井知子, 持田讓治: 椎間板再生の現状と展望 椎間板髄核、線維輪細胞の識別と間葉系幹細胞からの誘導: 日本整形外科学会雑誌 (0021-5325) 81 巻 7 号 Page545-550 (2007. 07)
- 6) 酒井大輔, 持田讓治: 【腰椎椎間板ヘルニアの基礎から最先端治療まで】 椎間板の変性と再生: 整形・災害外科 (0387-4095) 50 巻 3 号 Page197-204 (2007. 03)
- 7) 岩品徹, 持田讓治: 椎間板の biology 椎間板内細胞移植療法による椎間板変性の抑制効果 自家活性化髄核細胞再挿入術を中心に: 脊椎脊髄ジャーナル (0914-4412) 20 巻 1 号 Page21-29 (2007. 01)

### 2. 学会発表

- 1) Mochida J. Role of cells for disc regeneration. 10<sup>th</sup> International Symposium. New horizons in spine technology, April 2007
- 2) Mochida J. Intervertebral disc. Repair of disc degeneration. 15<sup>th</sup> Asia Pacific Orthopaedic Association. September 2007
- 3) 持田讓治: シンポジウム 椎間板再生への細胞移植療法の展開. 第 80 回日本整形外科学会学術総会 2007 年 5 月
- 4) 持田讓治: 椎間板再生への細胞移植による橋渡し研究. 第 32 回日本外科系連合学会学術集会
- 5) 岩品徹, 持田讓治ほか: 椎間板内細胞移植療法の現状と展望 シンポジウム 腰痛の基礎研究 第 15 回日本腰痛学会 2007 年 11 月
- 6) 桧山明彦, 酒井大輔, 大見博子, 芹ヶ野健司, 持田讓治: 転写因子と Smad と TNF $\alpha$  間のシグナル伝達経路間の Cross Talk について 椎間板変性の観点から. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月
- 7) 芹ヶ野健司, 古川克子, 佐藤正人, 酒井大輔, 牛田多加志, 持田讓治. 旋回培養法を用いた三次元的椎間板線維輪組織構築の試み. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月
- 8) 桧山明彦, 酒井大輔, 大見博子, 芹ヶ野健司, 岩品徹, 持田讓治: パネルディスカッション 間葉系幹細胞を用いた椎間板領域の再生医療 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月
- 9) 内山善康, 持田讓治, Risbud Makarand: 脊椎椎間板における酸感受性イオンチャンネルの発現. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月
- 10) 内山善康, 持田讓治, Risbud Makarand: 椎間板髄核細胞における酸感受性イオンチャンネル 3 の発現は p75NTR と ERK Signaling が調整する. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 2007 年 10 月

### G. 知的財産権

特許査定『椎間板再生用懸濁液又は包埋物』  
起案日: 平成 19 年 9 月 28 日

特許出願人：学校法人東海大学および  
持田讓治

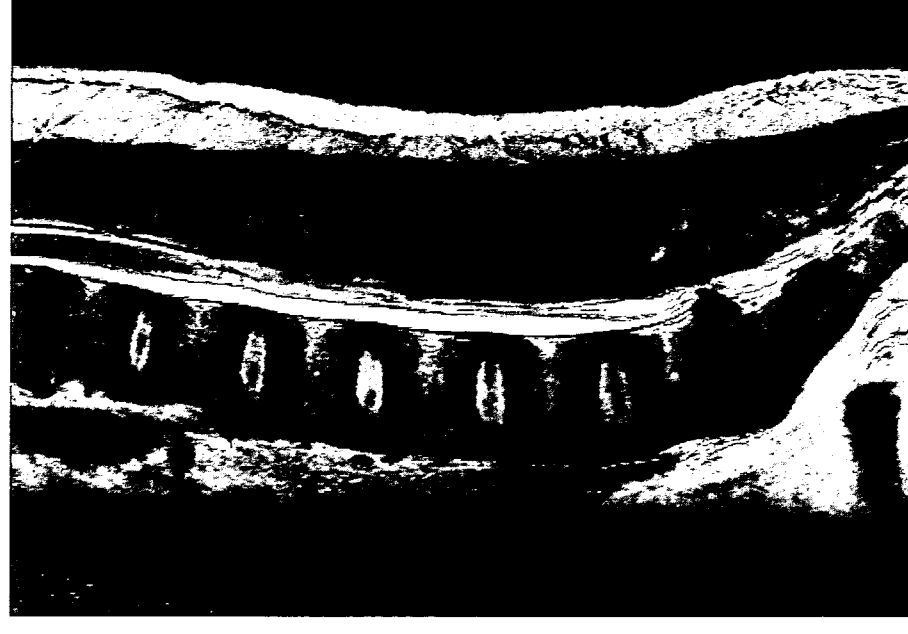
# 椎間板変性に対する新たな治療法

- 成長因子注入療法
- 遺伝子治療
- 組織移植
- 細胞移植療法

その組織が元々持つ細胞の

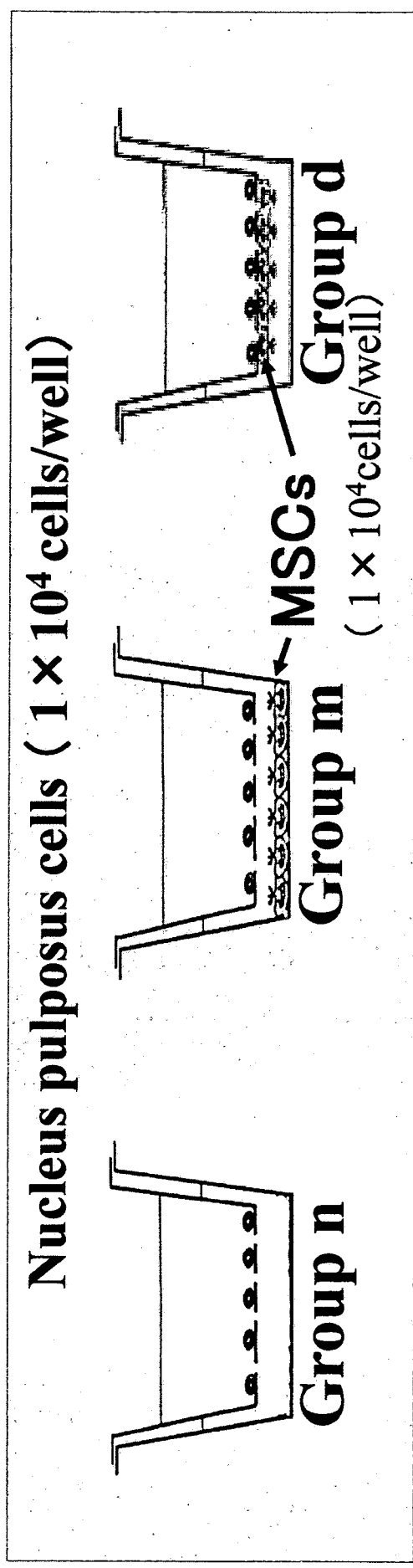
移植が最も効率が高く、  
生物学的に自然で安全性が高い

髄核細胞移植



# Study design

*(in rabbit)*

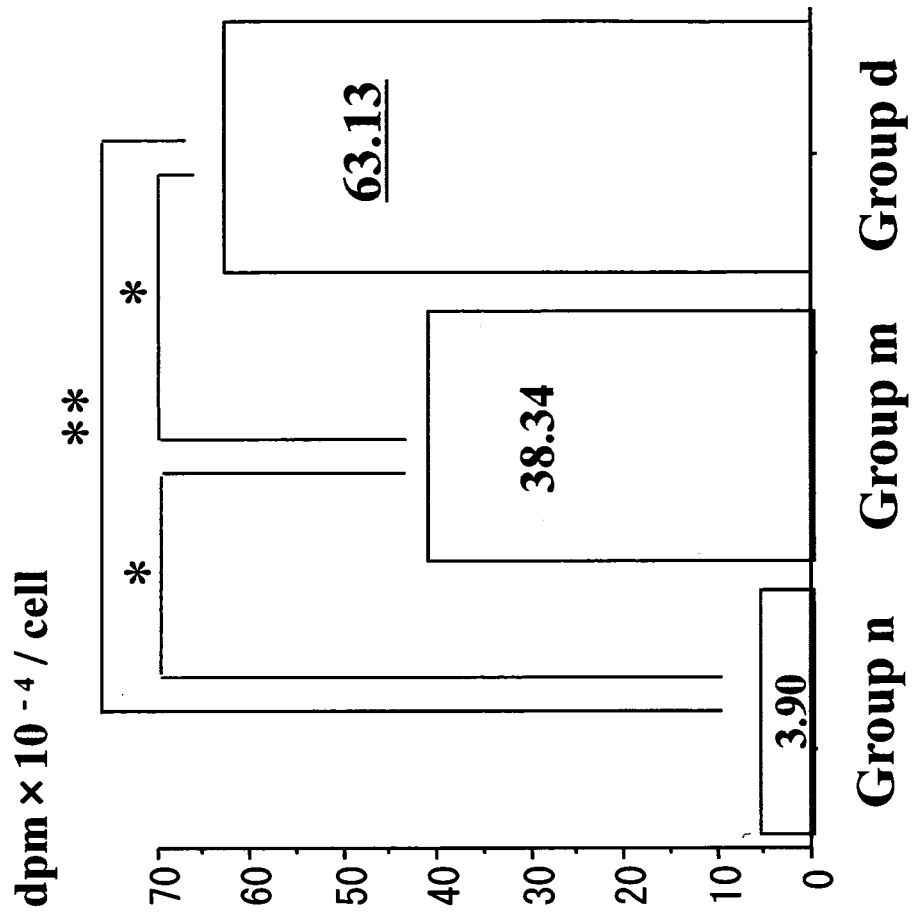
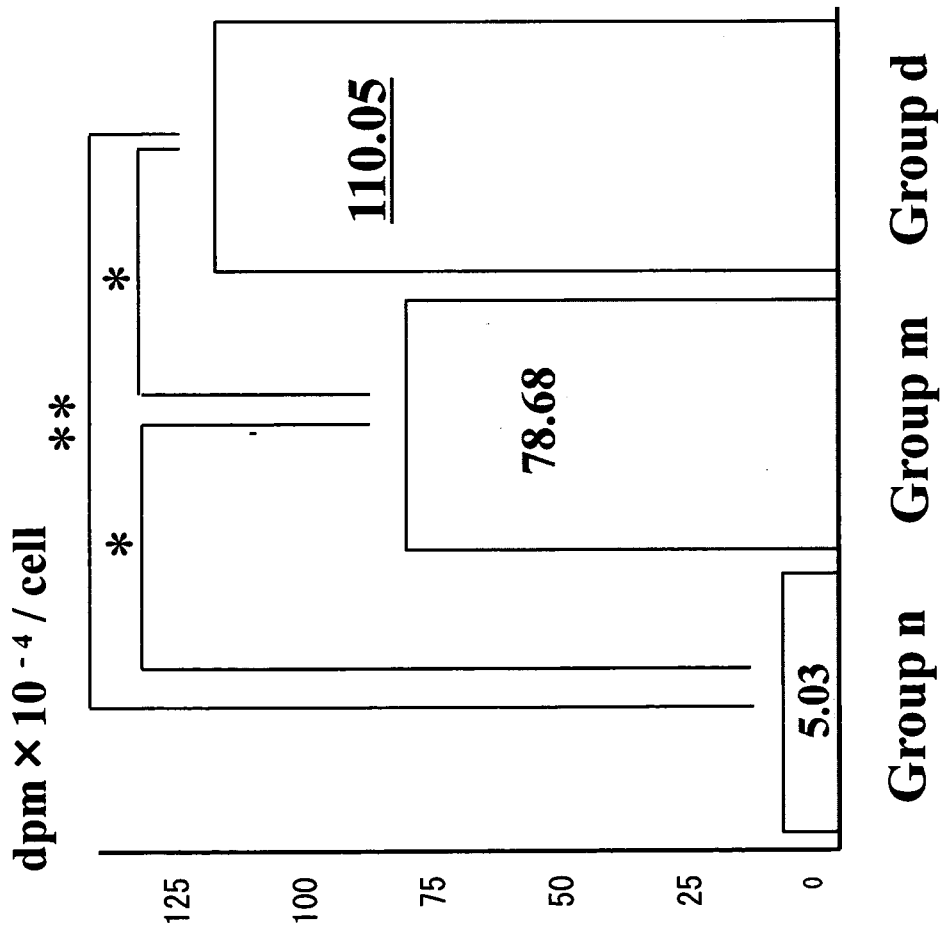


- n : Nucleus pulposus cells monolayer culture
- m : Nucleus pulposus cells cocultured with MSCs
- d : Nucleus pulposus cells cocultured with MSCs having direct cell-to-cell contact between NP cells and MSCs

# DNA

# Proteoglycan

\* P < 0.01 , \*\*P < 0.001



実験A: 大型動物での検討 *in vivo* 研究

実験B: ヒト椎間板細胞を用いた *in vitro* 研究



# 実験A

# Materials and method

Beagle(10~12 months, ♀)



control

NC group



NP aspiration  
(operation 1)

D group



NP aspiration  
(operation 1)



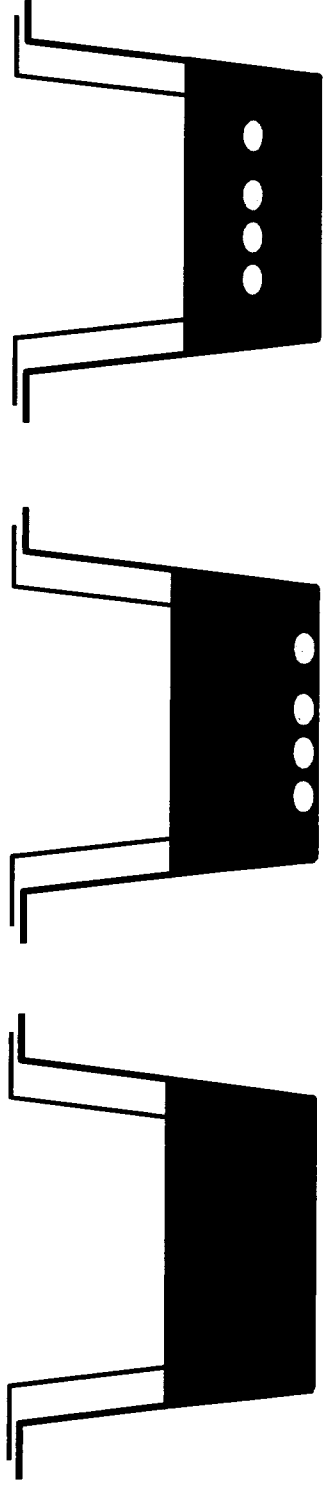
Cell transplantation therapy  
(at 2 weeks after operation)

Tx group

# Co-culture system in beagle (auto)

● NP

○ MSC



monoculture

coculture

cell interaction

TX-1

TX-2

TX-3

5 days in co-culture



Only NP cells were detached



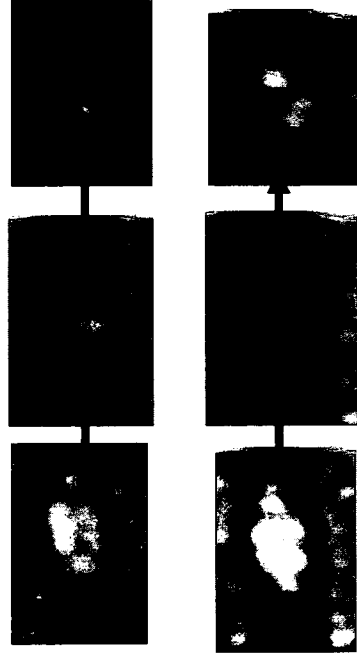
Cell transplantation

# MRI assessment

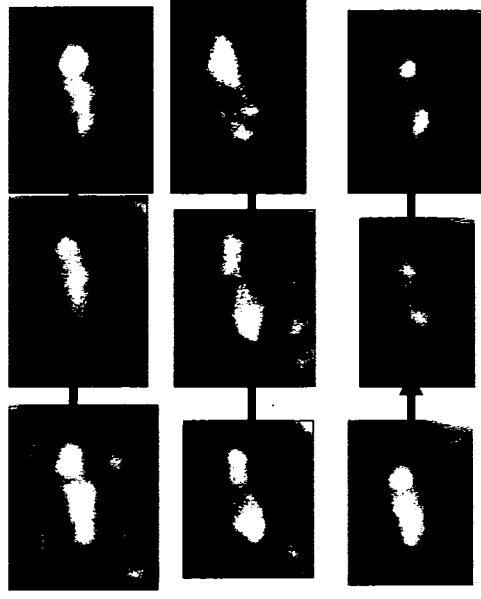
NC group



D group



Tx-3 group



grade

I ○○○

II ○○○○

III

IV

V

●●

●●●●●●●●●●

●●●●

●

at 24 weeks (22 weeks after cell transplantation)

*Classification by Pfirrmann et al*

# Degenerative changes in the annulus fibrosus

Grade 0: normal structure

Grade 1: mildly serpentine with rupture

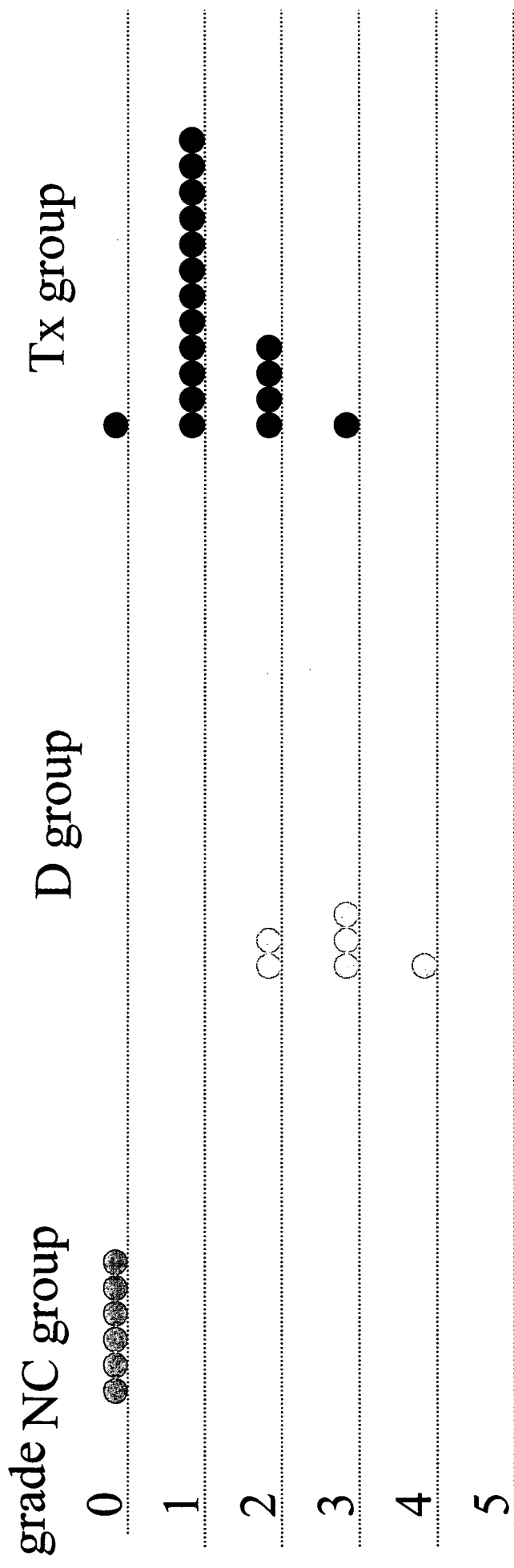
Grade 2: moderately serpentine with rupture

Grade 3: severely serpentine with mildly reversed contour

Grade 4: severely reversed contour

Grade 5: indistinct

*(Nishimura K et al, Spine 1998)*



at 24weeks (22weeks after cell transplantation)

# ヒトでの応用

## (NP cells isolation)

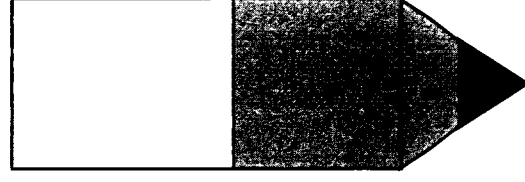
- ① Lumbar disc removed as surgical specimens
- ② NP separation from AF and subsequent washing
- ③ digestion by TrypLE Express 遺伝子組み換え  
真菌由来プロテアーゼ酵素 (1hr 37°C)
- ④ digestion by 0.025% collagenase P (2hrs 37°C)

②



③

⇨ 0.27%  
pronase  
(1hr)



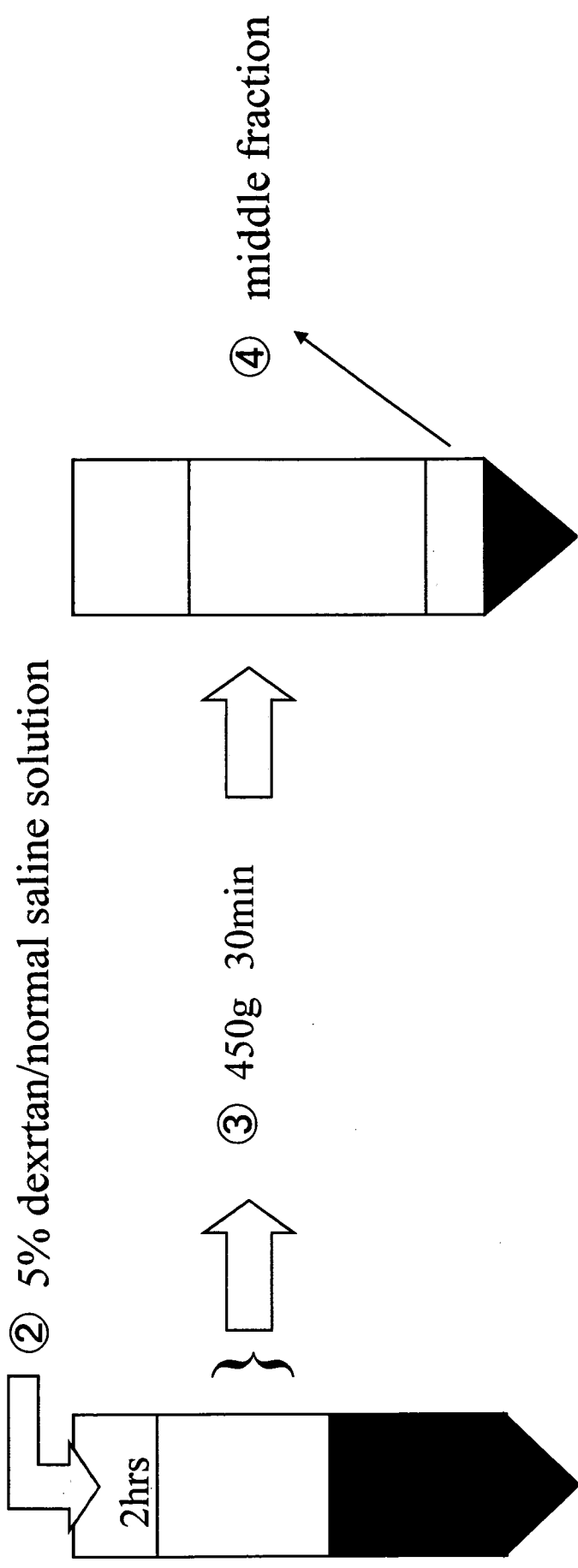
④

⇨ 0.025%  
collagenase  
(2hrs)



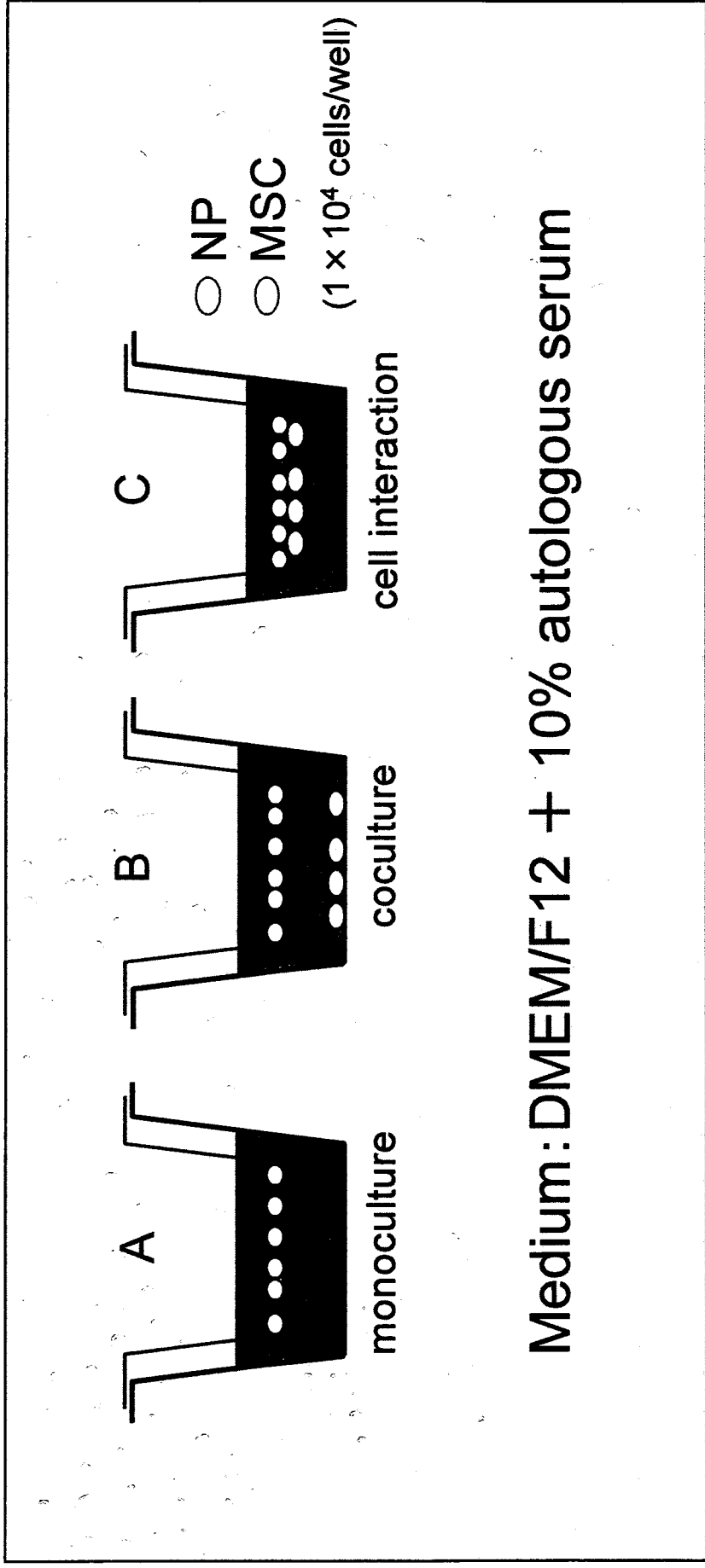
# (MSCs isolation)

- ① bone marrow from patient's vertebral body or iliac bone
- ② mixed with 5% dextran/normal saline solution(2hrs)
- ③ gradient separation (450g 30min)
- ④ the mononuclear cell fraction were cultured

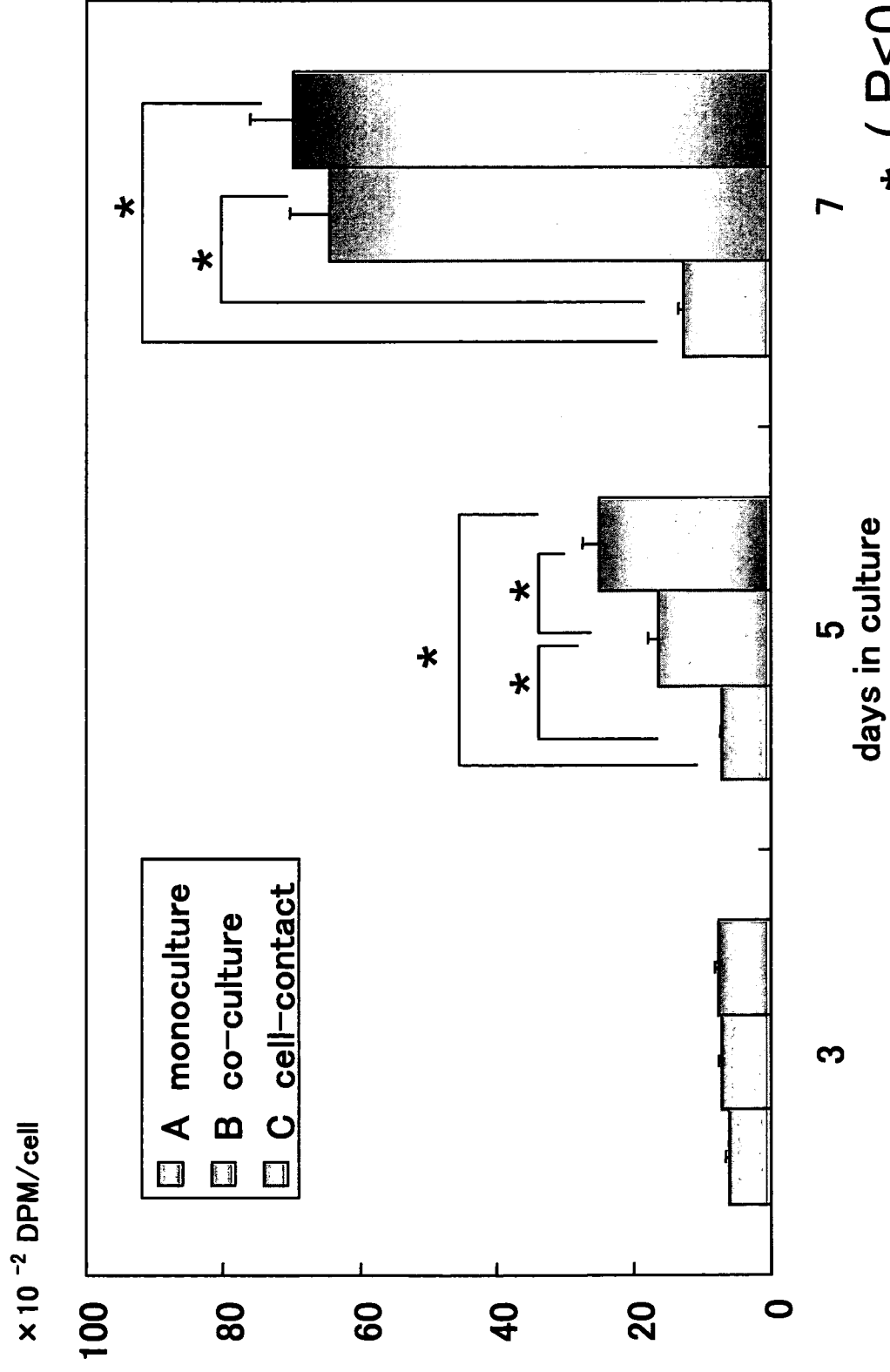


# Study design

*(in human)*

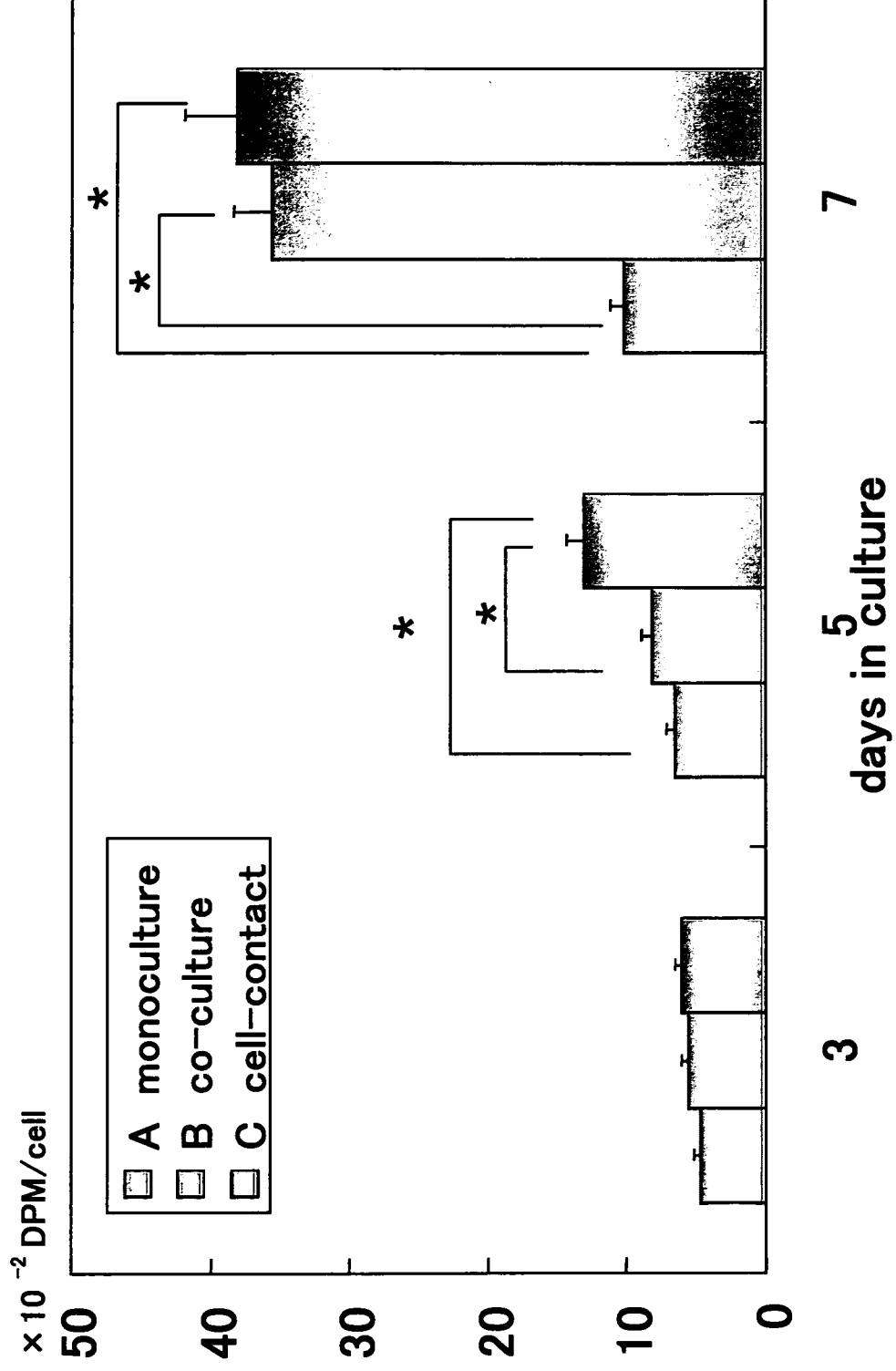


# DNA synthesis (case 2: 22 years old, male)



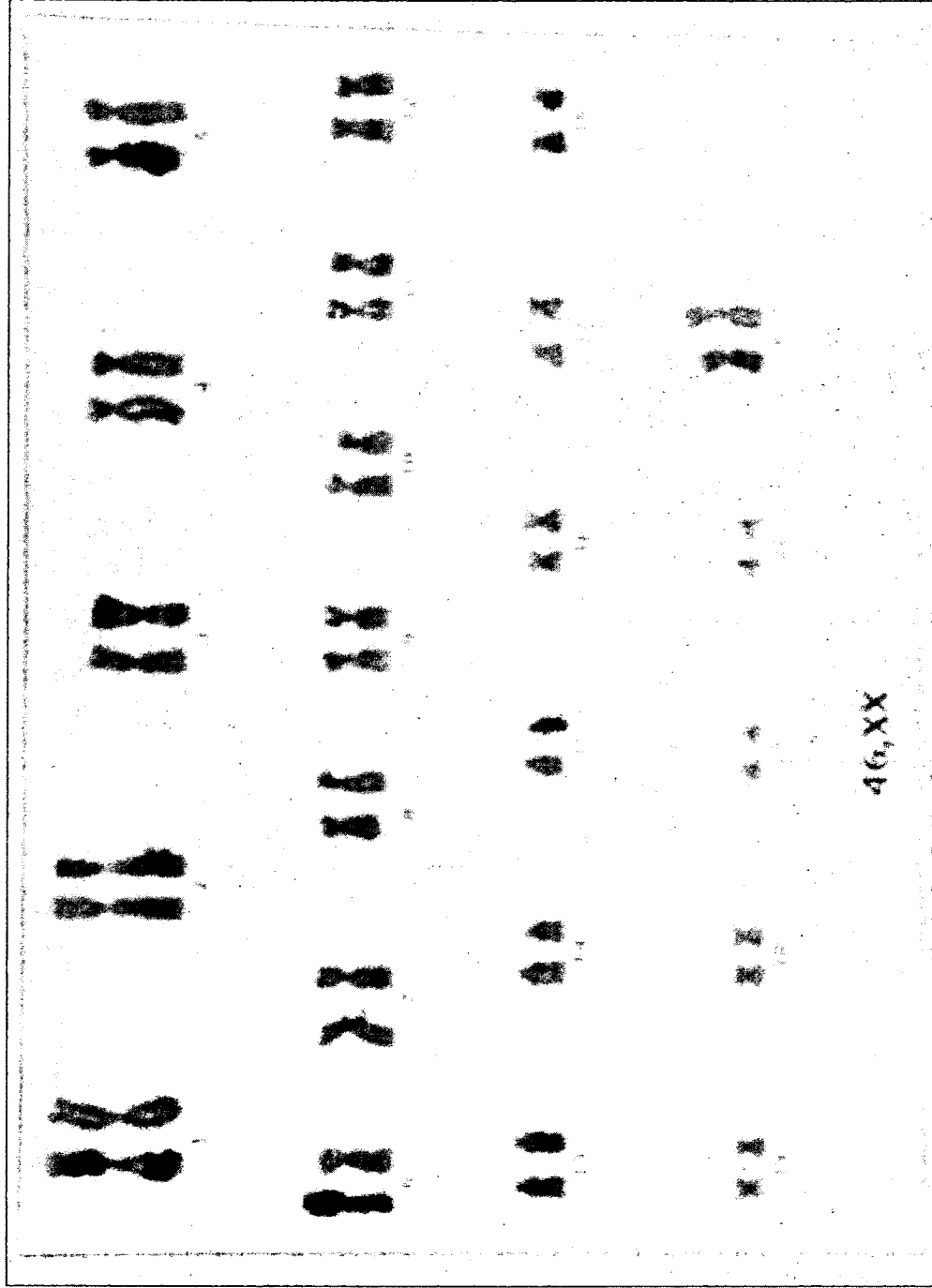


# PG synthesis (case 2: 22 years old, male)



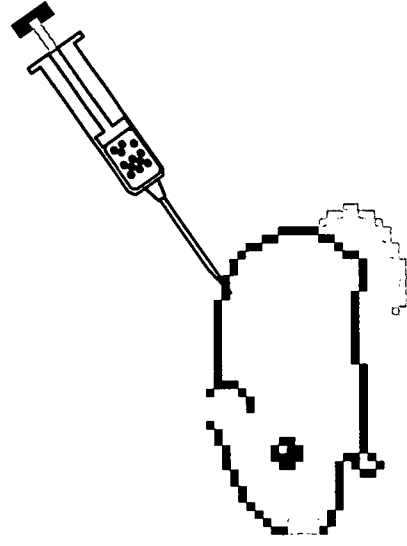
\*( P<0.01 )

結果③ 染色体検査 (全例 正常)



症例 6 : 22歳 女性

# 髓核細胞移植後の腫瘍化の否定



免疫不全マウス

活性化髓核細胞を皮下に注入

6カ月以上経過後、組織採取し評価

細胞の瘢痕化、髓核組織の吸収は  
みられるが腫瘍細胞は一切認められない

# Cell Processing Center at Tokai Univ. SOM

