

200821076A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

関節構成支持体(靱帯、半月板)損傷に対する  
細胞移植を必要としない組織再生と臨床応用の研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究者代表者 橋本 祐介

平成 21 (2009) 年 4 月

## 目 次

I. 総括研究報告	
関節構成支持体(靭帯、半月板)損傷に対する細胞移植を必要としない組織再生と臨床応用の研究	----- 2
主任研究者 橋本祐介	
II. 分担研究報告	
1. BMPを用いた人工骨髄骨の再生技術の確立	----- 8
分担研究者 脇谷滋之	
2. BMPを用いた腱内軟骨化の技術と半月板再建術方法の確立	----- 13
分担研究者 高岡邦夫	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 20

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

関節構成支持体(靭帯、半月板)損傷に対する細胞移植を必要としない組織再生と  
臨床応用の研究

研究代表者 橋本祐介 助教

研究要旨

運動器痛の一つであり、本邦1千万人を超えている変形性膝関節症(膝 OA)は予防的治療がなく、高価な人工関節置換術によって、医療費高騰が危惧される。膝 OA の初期病因である靭帯、半月板損傷に対して機能的な靭帯、半月板再建方法は2次的膝 OA 発症を減少させ、医療費削減すると考えられる。現在の靭帯再建術、半月板損傷の治療は不十分で正常に類似した組織学的再生修復による再建が必要と考える。細胞移植なしにサイトカインである BMP を用いた方が簡易、安価であり実用性が高いと考えられる。我々は腱に骨形成因子(BMP; Bone Morphogenetic Protein)を注入することにより正常構造に近い生理的組織構造である enthesis の再生技術を確立している。この技術を利用した臨床応用が可能なモデルを作成し、有効な骨靭帯結合部の合理的修復技術開発を計画した。また BMP-2 による腱内骨化の前段階において腱内に軟骨誘導されることが確認されている。半月板再建の問題点として半月板構造再生の困難であり、人工材料開発と細胞移植が研究されているが開発途上である。欧米では同種組織移植されているが本邦では用いることができない。我々の研究から rhBMP を用いて腱内軟骨化が生じることを確認しており、半月板再建における材料としての条件が整っている。この軟骨化された腱を用いて半月板組織学的半月板再建術を行う研究計画をした。

20年度は以下の研究を行った。

① 骨靭帯移行部(enthesis)の再生技術を用いた再生 Bone-Tendon-Bone 作成

白色家兎のアキレス腱に対して rhBMP-2 を2箇所注入した。その際 3-0 ナイロンで4箇所結紮し BMP が漏れないように工夫した。注入する BMP の量を 0,15,30,60  $\mu\text{g}$  とし、最適な BMP 量を検索したところ、6週で15、30 $\mu\text{g}$  群において十分に骨形成が確認された。またアキレス腱における Bone-Tendon-Bone 自家移植材はウサギ膝前十字靭帯よりも相当太く問題であった。臨床現場ではアキレス腱より半腱様筋を用いる靭帯再建術が一般的であるために、半腱様筋腱に rhBMP-2 を2箇所15 $\mu\text{g}$  ずつ注入したところ、6週で良好な骨形成があり、移植材料として十分な大きさであった。よって以後の実験として半腱様筋腱に Bone-Tendon-Bone を作成し、これを用いた前十字靭帯再建術を試行している。

② 半腱様筋腱内での腱内軟骨化モデルの作成

白色家兎の半腱様筋腱に対して rhBMP-2 を注入し、移植後1,2,3週に半腱様筋腱を採取、レントゲン撮影、組織学的評価を行ったところ、2週の時点で十分な軟骨細胞は存在するも腱の一部に石灰化が見られた。よって注入後10日の軟骨化腱を用いて半月板再建術を行った。半月板再建術後1、2ヶ月において再建半月板内に高率に骨化がみられた。関節外環境で BMP を使用すると骨化する可能性が示唆された。関節内という特殊な環境では骨化しにくいと言われていることから、骨化の進行を抑制し、軟骨化でとどまって半月板様の組織を再生できると考え、rhBMP-2 注入腱を直接半月板再建材料に使い、半月板再建術を行った所、関節包側には石灰化は見られるものの関節内では骨化が見られなかったため、今後 BMP 注入腱を直接再建材料に用いる予定である。

分担研究者

脇谷 滋之  
大阪市立大学医学研究科整形外科 准教授

高岡 邦夫  
大阪市立大学医学研究科整形外科 教授

A. 研究目的

高齢者の生活の質 (QOL) を障害する運動器痛の一つである変形性膝関節症 (膝 OA) に対して末期では高価な人工膝関節置換術の選択にならざるを得ない。わが国の膝 OA 発症数は1千万人を超え、積極的予防処置が必要とされている。膝 OA の病因に靭帯損傷、半月板切除後など関節内支持体の変性、損傷による関節不安定性に由来する 2 次的関節症が指摘されている。早期に機能的な靭帯、半月板再建によって 2 次的 OA の発症を減少させ、将来的な OA の減少、さらに医療費削減に寄与すると考えられる。現在、靭帯・半月板損傷に対して正常ではない代替物での再建や切除が多く見られ、より正常に類似した機能と組織学的修復、再建が必要と考えられる。この研究では新しい生理的再建を目指して、細胞移植ではなくサイトカインの BMP を用いた新しい靭帯再建術と半月板再建術の確立を目指し、計画した。

①BMP を用いた人工骨髄骨の再生技術の確立とそれを用いた前十字靭帯再建術

現在の靭帯再建術式は自家腱による物理的結合であり生理的 entheses 再生はなされておらず、再断裂やゆるみの問題点がある。我々は正常構造に近い生理的組織構造である entheses の再生を骨形成因子 (BMP ; Bone Morphogenetic Protein) を用いた再生技術を確立している。この技術を利用した臨床応

用できるモデルを作成し、有効な骨靭帯結合部の合理的修復技術を開発する。

②BMPを用いた腱内軟骨化の技術と半月板再建術方法の確立

半月板再建の問題点として半月板構造再生の困難であり、人工材料開発と細胞移植が研究されているが開発途上である。欧米では同種組織移植されているが本邦では用いることができない。我々の研究から rhBMP を用いて腱内軟骨化が生じることを確認しており、半月板再建における材料としての条件が整っている。この軟骨化された腱を用いて組織学的半月板再建術を行うことにより、組織学的に有用な半月板再建術が可能になり、変形性膝関節症の発生が抑制されることが期待できる。

B. 研究方法

①骨靭帯結合部の自家移植材の作成技術の確立

白色家兎のアキレス腱に対して rhBMP-2 を 2 箇所注射した。2 箇所の骨化の位置制御のため 3-0 ナイロンで 4 箇所結紮し BMP が漏れないように工夫した。注入する BMP の量を 0,15,30,60  $\mu$ g、注入後経時的に 3,4,6 週でレントゲン撮影を行った。レントゲンで良好な骨形成が見られた時期に屍殺し組織切片を作成した。H-E 染色、トルイジンブルー染色を行い組織学的評価を行った。

白色家兎の半腱様筋に同様な操作を行い、アキレス腱と同じく骨形成がなされるかを検討した。

②半腱様筋腱内での腱内軟骨化モデルの作成と半月板再建術の確立

白色家兎の半腱様筋腱に対してrhBMP (0, 10, 20, 40  $\mu$ g) を注入した。移植後7, 10, 14, 21日に半腱様筋腱を採取、腱の形態を観察した。またレントゲン撮影、組織学的評価を行い、正常の半月板の大きさや類似した組織像を呈するhBMPの量、濃度を検索した。

軟X線装置 (ソフロン) を用いてBMPによる腱内軟骨化を7, 10, 14, 21日で撮影、測定し骨形成を評価した。

採取した半腱様筋腱を H-E, toluidine blue 染色を行った。

以上から軟骨形成形態の把握と発生時期、半月板として利用できる時期を検討した。

次に軟骨化腱を使用した半月板再建術の臨床応用に向けての実験的モデルの作成を行った。あらかじめ最適化された条件において作成された軟骨化腱を採取し、ウサギ膝内側半月板を切除した後、軟骨化腱を内側後方から関節内に翻転し、inside-out に関節包に縫着する。この半月板再建術モデルを1, 2ヶ月で屠殺した。

再建術膝を軟X線装置 (ソフロン) を用いてレントゲン撮影し、半月板内の異所性骨化の評価を行った。

その組織切片を H-E, toluidine blue 染色を行い、再建半月板の軟骨形成と骨形成を観察した。

### C. 研究結果

①予定された部分に骨化させるためのナイロン糸4針結紮をしなければ2箇所のが1塊になることがたびたび観察された。よって骨化予定部分にナイロン糸で結紮し、その間にBMPを注入、20分静置した後ナイロンを解いて閉創した。BMP注入後3週から骨化が見られ6週で十分な骨化

が確認できた。30 $\mu$ g 群において最適な骨形成が確認された。一箇所につき30 $\mu$ g 注入し待機期間を6週として、前十字靭帯再建術を計画した。しかしながら、実際の手術中においてアキレス腱に作成したBone-Tendon-Bone 自家移植材料はウサギ膝前十字靭帯よりも相当太く、問題であった。臨床現場ではアキレス腱より半腱様筋を用いる靭帯再建術が一般的であるために、半腱様筋腱に対してアキレス腱と同様にナイロン結紮後 rhBMP-2 を2箇所15, 30 $\mu$ g ずつ注入したところ、6週の15 $\mu$ g で良好な骨形成があり、移植材料として最適な大きさであった。よって以後の実験に半腱様筋腱に rhBMP を注入、再生Bone-Tendon-Bone を作成し、これを用いた前十字靭帯再建術を試行している。

②白色家兎の半腱様筋腱に rhBMP を10 $\mu$ g 注入した群において、注入後7・10日ではレントゲン上明らかな石灰化は認めなかった。注入後14日では腱内に点状の石灰化が出現し、21日では腱内に彌慢性の骨化を認めた。H-E 染色では、注入後7日では著明な変化は認めなかったが、10日では腱内に細胞の増加を認めた。注入後14日では円形を呈する肥大軟骨様細胞の増殖を著明に認め、腱内に点状の石灰化が出現した。21日では肥大軟骨様細胞は減少し、骨化部分を一部に認めた。これらの結果より rhBMP 注入後10~14日にかけて腱内に軟骨細胞の出現と軟骨基質産生がみられ、その後骨化に進むことが確認できた。BMP20, 40 $\mu$ g では骨化形成が強く誘導されたために条件としては不適切と考えられた。そこで rhBMP 注入後10日の軟骨化腱を半月板の代替物として

用いて半月板再建術を行った。再建術後1,2ヶ月で高率に半月板内に骨化が見られた。組織像では半月板内(主に関節包側)に骨化が見られた。このことから関節外で軟骨化腱を誘導し、それを移植材料として半月板再建とする2期的手術では骨化まで誘導されることがわかった。よって低酸素環境下である関節内でBMPを作用させる1期的手術を計画し、実施している。

#### D. 考察

①当初はアキレス腱にrhBMPを注入するモデルを検討した。ナイロン糸を用いることによって良好な位置制御が可能となった。ただし移植腱としてはウサギとしては大きすぎたため、靭帯断裂が多く見られた。

次に半腱様筋腱に注目して同様の操作を行ったところ、rhBMPの量は減ったものの良好な位置制御が可能であったために、より臨床に近い移植腱として半腱様筋腱を選択した。

②半腱様筋腱にrhBMPを注入し、関節外で軟骨化腱を誘導し、それを移植材料として半月板再建とする2期的手術を行ったが、骨化まで誘導される結果となった。これはBMPの作用が骨化誘導であり、一度スイッチが入ってしまうと骨化まで誘導される可能性があった。しかしながら低酸素下においてはBMPが軟骨誘導されるという過去の報告があることから、関節内という低酸素環境でBMPを作用させることによって、骨化誘導されることなく軟骨で留まる可能性があった。また臨床の現場では半月板再建術は1期的に行うことから移植腱に直接BMPを注入する1期的再建術のほうが理想的である。今後

1期的再建術での検討を行う予定である。

#### E. 結論

①腱に予定した骨化部分にナイロン結紮することにより、位置制御が可能となった。アキレス腱より半腱様筋腱の方がよりウサギ前十字靭帯再建術の移植腱として有用と考えられた。

②rhBMPを注入することで関節外に軟骨化腱を誘導できた。

それを移植材料として半月板再建とする2期的手術を行ったが、骨化まで誘導された。関節内という低酸素環境でBMPを作用させるように移植腱に直接BMPを注入する1期的再建術を選択し検証する予定である。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1, Hashimoto Y, Yoshida G, Toyoda H, Takaoka K. "J Orthop Res. 2007

Nov;25(11):1415-24"Generation of tendon-to-bone interface "entheses" with use of recombinant BMP-2 in a rabbit model.

2, Hashimoto Y, Yoshida G, Tomihara T, Matsuura T, Satake S, Kaneda K, Shimada N. Arch Orthop Trauma Surg. 2008 128(11):1265-8. Bilateral osteochondritis dissecans of the lateral femoral condyle following bilateral total removal of lateral discoid meniscus: a case report.

3, Nomura-Furuwatari C, Wakitani S, Hashimoto Y, Imai Y, Ohta Y, Nakagawa K, Nakao Y, Takayama K, Manaka T,

Takaoka K. J Bone Miner Metab 2008  
26 : 152-158 Expression profiles of  
phosphodiesterase 4D splicing variants  
in osteoblastic cells

4, Uemura T, Kazuki K, Hashimoto Y,  
Takaoka K. Clin J Sport Med. 2008  
18(3):292-4 Skiing-induced rupture of the  
extensor pollicis longus tendon: a report  
of three cases.

5, Hoshino M, Egi T, Terai H, Namikawa  
T, Kato M, Hashimoto Y, Takaoka K. J  
Biomed Mater Res A. 2008 Jun 18  
Repair of long intercalated rib defects in  
dogs using recombinant human bone  
morphogenetic protein-2 delivered by a  
synthetic polymer and beta-tricalcium  
phosphate.

6, Takayama K, Suzuki A, Manaka T,  
Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y,  
Wakitani S, Takaoka K. J Bone Miner  
Metab. 2009 Feb 28 RNA interference for  
noggin enhances the biological activity of  
bone morphogenetic proteins in vivo and  
in vitro.

2. 学会発表

1, Hashimoto, Y; Tomihara, T; Yano,  
K; Iwaki, H ; Takaoka, K the 54th  
ORS, 2008 "Anatomical and Computed  
Tomographic analysis of Femoral  
Attachment of Anterior Cruciate  
Ligament

2, Yusuke Hashimoto; Hiroshi Naka;  
Kenji Fukunaga; Kunio Takaoka. the 55th  
ORS 2009 Generation of  
Bone-Tendon-Bone graft using rhBMP  
and application to the ACL

Reconstruction

3, Naka Y; Hashimoto Y; Takaoka K  
the 55th ORS 2009 Meniscus  
reconstruction by a tendon autograft  
with recombinant human bone  
morphogenetic protein-2 in a rabbit  
model

4, 橋本祐介、富原朋弘、矢野公一、岩城啓  
好、高岡邦夫 第 81 回日本整形外科学会学  
術集会 2008 屍体膝を用いた前十字靭帯  
大腿骨側付着部の検討 大腿骨外側壁にお  
ける resident ridge に注目して

5, 橋本祐介、富原朋弘、山崎真也、瀧上  
順誠、錦野匠一、高岡邦夫 第 33 回日本膝  
関節学会 2008 前十字靭帯損傷膝の大腿  
骨側付着部における CT 値変化

6, 山崎真哉 橋本祐介 瀧上順誠  
島崎朗 中田信昭 高岡邦夫 第 33 回日  
本膝関節学会 2008 CT arthrography を  
用いた変形性膝関節症の軟骨および骨硬化  
病変の検討

7, 瀧上順誠 橋本祐介 山崎真哉 錦野  
匠一 島崎朗 中田信昭 高岡邦夫 第 34  
回関節鏡学会 2008 半月板損傷および軟骨  
損傷診断における Helical CT  
Arthrography (HCTA) の有用性・MRI と  
比較して・

8, 橋本祐介、仲哲史、福永健治、高岡邦夫  
第 27 回日本運動器移植再生医学研究会  
2008 rhBMP を用いた人工  
Bone-Tendon-Bone の作成とそれを使用した  
ACL 再建術

9, 仲哲史、橋本祐介、高岡邦夫 第 27 回  
日本運動器移植再生医学研究会 2008  
rhBMP を用いた自家腱移植による半月板  
再建術の試み

9, 橋本祐介、仲哲史、福永健治、高岡邦夫  
第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会

2008 rhBMP を用いた人工

Bone・Tendon・Bone の作成とそれを使用した ACL 再建術

10, 仲哲史, 橋本祐介, 高岡邦夫 第 23 回  
日本整形外科学会基礎学術集会

2008rhBMP を用いた自家腱移植による半月板再建術

11, 山崎真哉 橋本祐介 原庸 瀧上順誠  
錦野匠一 高岡邦夫

第 19 回臨床スポーツ医学会 2008 前十字  
靭帯 2 ルート再建術における CT を用いた  
大腿骨側の骨孔評価

12, 瀧上順誠 橋本祐介 山崎真哉  
錦野匠一 高岡邦夫 第 19 回臨床スポー  
ツ医学会 2008 体操競技中の外傷を契機に

足関節背屈制限をきたした一例

13, 松浦健司、吉田玄、金田国一、富原朋  
弘、佐竹信爾、谷内政俊、青木大輔、島田  
永和、橋本祐介 第 21 回肘関節学会 2009  
外側壁広範囲欠損上腕骨小頭離断性骨軟骨  
炎に対する骨軟骨柱移植を用いた外側壁再  
建の工夫と治療成績.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



BMPを用いた人工骨髄骨の再生技術の確立

研究分担者 脇谷 滋之 准教授

研究要旨

正常な tendon bone junction には enthesis と呼ばれる構造が存在し、力学的負荷を円滑に伝達する役割を担っている。すなわち tendon の collagen fibers が Sharpy 線維として軟骨から骨の中へと連続する。その組織構造として、4層構造が特徴的である。すなわち、Zone 1: tendon 終末、Zone 2: 非石灰化 fibrocartilage 層、Zone 3: 石灰化 fibrocartilage、Zone 4: 皮質骨という連続である。この4層構造により組織構造によって、局所的ストレスの集中を防ぎ、円滑な load transmission に重要な役割を果たしている。その発生過程は腱付着部における内軟骨性骨化によって完成するといわれている。しかし現在行われている腱や靭帯の骨との境界部での断裂修復法ではこの組織構造の再生修復ではなく fibrous scar tissue によるものであり、正常な4層構造を有する tendon と bone の insertion site を再構築することはできない。従って現時点では生理的な力学的強度回復が得られない。したがって十字靭帯再建手術後の骨孔拡大、再建靭帯の骨への固定力不足などの問題となっている。正常な enthesis の特徴的な4層構造の再生によって生理的力学的特性を有する enthesis 構造を再生回復させる技術を開発し、将来の腱、靭帯と骨との移行部修復に臨床利用を進展させるのが本研究の目的である。我々は以前の研究から、腱実質部に骨形成因子 (BMP; Bone Morphogenetic Protein) を注入し腱内に軟骨化・骨化を生じさせることにより enthesis において特徴的な4層構造を新生させる技術を開発した。その内容は白色家兎のアキレス腱に対しリコンビナントヒト BMP(15ug) を注入することによって術後4週でアキレス腱内に軟骨、骨の形成が見られ、腱線維が骨に連続的に移行し結合されることが確認された。この骨組織と移植母床の骨が癒合すればこれらは enthesis の発生、成熟過程に類似した組織像を呈して、骨靭帯結合部の再生が可能であることが示唆される。つまり新生 enthesis を含む Bone-Tendon-Bone を作成し、これを移植腱として前十字靭帯損傷動物モデルで靭帯再建に用い、その有用性を検証する。

骨靭帯移行部(enthesis)の再生技術を用いた再生 Bone-Tendon-Bone 作成

白色家兎のアキレス腱に対して rhBMP-2 を2箇所注入した。その際3-0 ナイロンで4箇所結紮し BMP が漏れないように工夫した。注入する BMP の量を 0,15,30,60  $\mu\text{g}$  とし、最適な BMP 量を検索したところ、6週で15、30ug 群において十分に骨形成が確認された。30ug では一部骨が連結する現象も見られたため、今後の計画としては15ug 使用して実験を遂行する予定である。またアキレス腱における Bone-Tendon-Bone 自家移植材はウサギ膝前十字靭帯よりも相当太く問題であった。臨床現場ではアキレス腱より半腱様筋を用いる靭帯再建術が一般的であるために、半腱様筋腱に rhBMP-2 を2箇所15ug ずつ注入したところ、6週で良好な骨形成があり、移植材料として十分な大きさであった。よって以後の実験として半腱様筋腱に Bone-Tendon-Bone を作成し、これを用いた前十字靭帯再建術を試行している。

#### A. 研究目的

正常な tendon bone junction には enthesis と呼ばれる構造が存在し、力学的負荷を円滑に伝達する役割を担っている。すなわち tendon の collagen fibers が Sharpy 線維として軟骨から骨の中へと連続する。その組織構造として、4 層構造が特徴的である。すなわち、Zone 1: tendon 終末、Zone 2: 非石灰化 fibrocartilage 層、Zone 3: 石灰化 fibrocartilage、Zone 4: 皮質骨という連続である。この 4 層構造により組織構造によって、局所的ストレスの集中を防ぎ、円滑な load transmission に重要な役割を果たしている。その発生過程は腱付着部における内軟骨性骨化によって完成するといわれている。しかし現在行われている腱や靭帯の骨との境界部での断裂修復法ではこの組織構造の再生修復ではなく fibrous scar tissue によるものであり、正常な 4 層構造を有する tendon と bone の insertion site を再構築することはできない。従って現時点では生理的な力学的強度回復が得られず、十字靭帯再建手術後の骨孔拡大や再建靭帯の骨への固定力不足などの問題となり、長期的には変形性関節症の十分な抑制がなされていないと考えられる。正常な enthesis の特徴的な 4 層構造の再生によって生理的力学的特性を有する enthesis 構造を再生回復させる技術を開発し、将来の腱、靭帯と骨との移行部修復に臨床利用を進展させるのが本研究の目的である。

Enthesis の 4 層構造の再生には腱、靭帯とコラーゲン繊維を腱、靭帯と共有し連続する繊維軟骨および骨の形成が必須である。その目的に骨形成因子 (BMP、未分化間葉系

細胞から軟骨細胞への分化促進作用がある) を用いる。BMP を腱内に投与し、Bone-cartilage-tendon-構造を腱内に誘導し、その誘導骨を enthesis 再生が必要な部位の骨と癒合させることで enthesis の再生が可能と考えている。

すなわち (1) BMP を用いて、正常な 4 層構造を有する tendon bone junction を再構築すること (すなわち、断裂腱と骨とを正常な解剖学的結合をさせること)、及び (2) 再構築 enthesis の機能的評価と臨床に直結した動物実験モデルでの有用性を検証する。

我々は以前の研究から、腱実質部に骨形成因子 (BMP ; Bone Morphogenetic Protein) を注入し腱内に軟骨化・骨化を生じさせることにより enthesis において特徴的な 4 層構造を新生させる技術を開発した。その内容は白色家兎のアキレス腱に対しリコンビナントヒト BMP (15ug) を注入することによって術後 4 週でアキレス腱内に軟骨、骨の形成がみられた。2 週間後から靭帯内での軟骨細胞分化が観察され、4 週間後には腱内に骨組織が形成され腱線維が骨に連続的に移行し結合されることが確認された。この骨組織と移植母床の骨が癒合すればこれらは enthesis の発生、成熟過程に類似した組織像を呈して、骨靭帯結合部の再生が可能であることが示唆される。これを応用し、生理的構造と力学的特性を有する新生 enthesis を用いてより正常に近似させる腱靭帯再建技術を開発するため本研究である。つまり新生 enthesis を含む Bone-Tendon-Bone を作成し、これを移植腱として前十字靭帯損傷動物モデルで靭帯再建に用い、その有用性を検証する。

## B. 研究方法

rhBMPによるアキレス腱内での異所性骨化モデルの作成と最適化

白色家兎(3.2~4.0kg)のアキレス腱に対して rhBMP (0, 15, 30, 60  $\mu$ g) を 2 箇所注入した。2 箇所の骨化の位置制御のため 3-0 ナイロンで 4 箇所結紮し BMP が漏れないように工夫した。1 週ごとにレントゲン撮影を行った。十分な骨形成が見られた時点で屠殺し、軟 X 線撮影(ソフロン)と、組織学的評価を行った。

レントゲンで良好な骨形成が見られた時期に屠殺し組織切片を作成した。H-E 染色、トルイジンブルー染色を行い組織学的評価を行った。

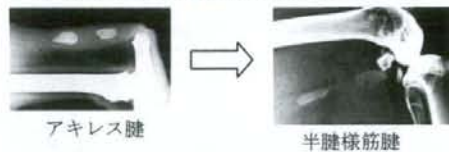
白色家兎の半腱様筋に同様な操作を行い、アキレス腱と同じく骨形成がなされるかを検討した。

注入後 6 週後にレントゲンにて異所性骨化形成を確認後、アキレス腱を約 3cm 採取し両端を金属製ワイヤーで縫合する。その後同側膝関節を切開、前十字靭帯を切離し、大腿骨、脛骨付着部に直径約 3mm のドリルで骨孔を作成する。あらかじめ採取した骨付きアキレス腱をドリルホールに通し、骨化部分を骨孔内に納めるようにする。固定は大腿骨、脛骨ともにポストスクリューを用いて非吸収糸で固定する。靭帯再建術後 4, 8 週で屠殺し、膝関節を採取する。組織学的評価として H-E、toluidine blue 染色を行い、腱骨連結部の軟骨形成と骨形成を観察する。

## C. 研究結果

① 予定された部分に骨化させるためのナイロン糸 4 針結紮をしなければ 2 箇所の骨

が 1 塊になることがたびたび観察された。よって骨化予定部分にナイロン糸で結紮し、その間に BMP を注入、20 分静置した後ナイロンを解いて閉創した。BMP 注入後 3 週から骨化が見られ 6 週で十分な骨化が確認できた。30ug 群において最適な骨形成が確認された。一箇所につき 30ug 注入し待機期間を 6 週として、前十字靭帯再建術を計画した。しかしながら、実際の手術中においてアキレス腱に作成した Bone-Tendon-Bone 自家移植材料はウサギ膝前十字靭帯よりも相当太く、問題であった。臨床現場ではアキレス腱より半腱様筋を用いる靭帯再建術が一般的であるために、半腱様筋腱に対してアキレス腱と同様にナイロン結紮後 rhBMP-2 を 2 箇所 15、30ug ずつ注入したところ、6 週で 15ug で良好な骨形成があり、移植材料として最適な大きさであった。よって以後の実験に半腱様筋腱に rhBMP を注入、再生 Bone-Tendon-Bone を作成し、これを用いた前十字靭帯再建術を試行している。



## D. 考察

① 当初はアキレス腱に rhBMP を注入するモデルを検討した。ナイロン糸を用いることによって良好な位置制御が可能となった。ただし移植腱としてはウサギとしては大きすぎたため、靭帯断裂が多く見られた。次に半腱様筋腱に注目して同様の操作を行ったところ、rhBMP の量は減ったものの良好な位置制御が可能であったために、より臨床に近い移植腱として半腱様筋腱を選択

した。

#### E. 結論

①腱に予定した骨化部分にナイロン結紮することにより、位置制御が可能となった。アキレス腱より半腱様筋腱の方がよりウサギ前十字靭帯再建術の移植腱として有用と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nakajima M, Wakitani S, Harada Y, Tanigami A, Tomita N. In vivo mechanical condition plays an important role for appearance of cartilage tissue in ES cell transplanted joint. *J Orthop Res* 26(1):10-17, 2008
- 2) Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Zhao C, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Okabe T, Wakitani S, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H, Nakamura H. Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. *Bone* 42 (2) :350-357, 2008
- 3) Nomura-Furuwatari C, Wakitani S, Ohta Y, Imai Y, Nakagawa K, Nakao Y, Takayama K, Manaka T, Takaoka K. Expression profiles of phosphodiesterase 4D splicing variants in osteoblastic cells. *J Bone Mineral Metab* 26(2):152-158, 2008
- 4) Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Mineral Metab* 26(2):115-122, 2008
- 5) Takagi M, Kitabayashi T, Koizumi S, Hirose H, Kondo S, Fujiwara M, Ueno K, Misawa H, Hosokawa Y, Masuhara H, Wakitani S. Correlation between cell morphology and aggrecan gene expression level during differentiation from mesenchymal stem cells to chondrocytes. *Biotechnology Letters* 30:1189-1195, 2008
- 6) Yokoyama M, Miwa H, Maeda S, Wakitani S, Takagi M. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells during expansion. *J Biosci Bioeng* 106(1):46-50, 2008
- 7) Wei JP, Nawata M, Wakitani S, Kametani K, Ota M, Toda A, Konishi I, Ebara S, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells differentiate into chondrocytes. *Cloning Stem Cells* 11:19-26, 2009
- 8) Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K. RNA interference for Noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro. *J Bone Mineral Metab* in press
- 9) Bae JY, Matsumura K, Wakitani S, Kawaguchi A, Tsutsumi S, Hyon SH. Beneficial storage effects of epigallocatechin-3-O-gallate on the articular cartilage of rabbit osteochondral allografts. *Cell*

Transplantation in press.

- 10) 脇谷滋之. 細胞移植による関節軟骨修復. 大阪保険医雑誌 507:53-59, 2009
- 11) 細谷明宏, 平賀徹, 中村浩彰, 吉羽邦彦, 吉羽永子, Zhao Chen, 高橋将文, 岡部高弘, 脇谷滋之, 山田博任, 笠原悦夫, 二宮禎, 小澤英浩. 歯根膜組織の歯槽骨再生能力. Bone 22(1):3-7, 2008
- 12) 脇谷滋之, 今井祐記, 川口杏夢, 矢野公一, 仲哲史, 高岡邦夫. 関節軟骨欠損修復へのES細胞の応用, 整形・災害外科 51:445-449, 2008
- 13) 脇谷滋之. 前駆細胞移植による関節軟骨修復. 遺伝子医学MOOK別冊 すすみ つづける細胞移植治療の実際 —再生医療の実現に向けた科学・技術と周辺要素の理解— (下巻) 細胞移植治療の現状とその周辺環境, 田端泰彦編, メディカルドゥ, 大阪, pp42-45, 2008
- 14) 迫田秀行, 鄭徳泳, 脇谷滋之, 天正恵治, 佐藤道夫, 土屋利江. 人工関節の不具合要因分析. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 29:361-365, 2008
- 15) 迫田秀行, 鄭徳泳, 脇谷滋之, 天正恵治, 佐藤道夫, 土屋利江. 微小試験片を用いた人工関節用UHMWPEの疲労特性評価. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 29:367-372, 2008
- 16) 脇谷滋之. 超音波薬剤導入法を用いた関節リウマチの腫脹関節局所抗炎症療法. 大阪難病研究財団 平成16年度～平成18年度研究報告書, pp308-310, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべき事項なし

BMPを用いた腱内軟骨化の技術と半月板再建術方法の確立  
研究分担者 高岡 邦夫 教授

研究要旨

半月板は組織学的に線維軟骨で構成されており、その弾力性によって関節にかかる荷重の緩衝や吸収に大きく寄与している。半月板損傷による半月板切除術後に関節軟骨が損傷し、関節症変化が出現することは周知の事実であり、半月板を修復、再生させることは臨床的意義が大きい。半月板の血行動態は辺縁側の10～30%にのみ分布し、それ以外の大部分は無血行野である。このことは半月板損傷後の組織修復の困難さを物語っている。現在の半月板損傷に対する治療は、血行野における断裂は半月板縫合、無血行野では半月板切除とされているが、血行野においても半月板切除されるケースが散見される。海外では、このような症例に対し同種半月板移植がなされているが、病原性等で本邦では使用できない。人工半月板の開発もなされているが、十分な強度、耐久性を有した scaffold はいまだ開発されていない。その他として自家腱を半月板の代替材料として使用した、自家腱移植術も行われているが、組織学的に異なった材料であり、本来の機能を有するかは不明である。今後、病原性がなく組織学的に類似した代替材料が必要であると考えられる。我々は以前の研究から、rhBMPを用いて腱内骨化させる技術を開発した。その過程において、骨化する前段階に腱内軟骨化が生じることを確認している。つまり、線維間に軟骨細胞が存在している半月板と類似した構造が再現されている。この、軟骨化された腱を用いて組織学的半月板再建術を行うことが今回の目的である。すなわちBMPを用いて、半月板の代替材料となるうる軟骨化腱の最適化及び軟骨化腱を用いて臨床に直結した動物実験モデルでの有用性を検証することである。

rhBMPによる半腱様筋腱内での腱内軟骨化モデルの作成と最適化

白色家兔の半腱様筋腱に rhBMP を注入し、注入後 7・10・14・21 日に組織採取してレントゲン及び組織学的評価を行った。注入後 7・10 日ではレントゲン上明らかな石灰化は認めなかった。注入後 14 日では腱内に点状の石灰化が出現し、21 日では腱内に彌漫性の石灰化を認めた。組織学的評価では H-E 染色・toluidine blue 染色を行った。H-E 染色では、注入後 7 日で著明な変化は認めなかったが、10 日では腱内に細胞の増加を認めた。14 日では円形を呈する肥大軟骨様細胞の増殖を著明に認めた。21 日では肥大軟骨様細胞は減少し、骨化部分を一部に認めた。一方、toluidine blue 染色では、注入後 7 日で軟骨気質を表す異染性を腱内の一部分に認めた。10 日では腱内全体に淡い異染性を認め、14 日では強く異染性を認めた。21 日では異染性を認める範囲は減少していた。これらの結果より rhBMP 注入後 10～14 日にかけて腱内に軟骨細胞の出現と軟骨気質産生がみられ、その後骨化に進むことが確認できた。注入後 14 日に見られる肥大軟骨細胞は骨化の前段階に出現することが広く知られている。よって半月板再生に用いる軟骨化腱を骨化させないために rhBMP 注入後 10 日の軟骨化腱を半月板の代替物として用いて半月板再建術を行った。再建術後 1、2 ヶ月でのレントゲンで再建半月板内に高率に骨化が見られたため、関節内という低酸素環境で BMP を作用させるように移植腱に直接 BMP を注入する 1 期的再建術を選択し検証する予定である。

A. 研究目的

半月板は組織学的に線維軟骨で構成されて

おり、その弾力性によって関節にかかる荷重の緩衝や吸収に大きく寄与している。半月板損傷による半月板切除術後に関節軟骨が損傷し、関節症変化が出現することは周知の事実であり、半月板を修復、再生させることは臨床的意義が大きい。半月板の血行動態は辺縁側の10~30%にのみ分布し、それ以外の大部分は無血行野である。このことは半月板損傷後の組織修復の困難さを物語っている。現在の半月板損傷に対する治療は、血行野における断裂は半月板縫合、無血行野では半月板切除とされているが、血行野においても半月板切除されるケースが散見される。海外では、このような症例に対し同種半月板移植がなされているが、病原性、強度不足などの問題が解決されていない。人工半月板の開発もなされているが、病原性のない、十分な強度、耐久性を有したscaffoldはいまだ開発されていない。その他として自家腱を半月板の代替材料として使用した、自家腱移植術も行われているが、組織学的に異なった材料であり、本来の機能を有するかは不明である。今後、病原性がなく組織学的に類似した代替材料が必要であると考えられる。

我々は以前の研究から、rhBMPを用いて腱内骨化させる技術を開発した。その過程において、骨化する前段階に腱内軟骨化が生じることを確認している。つまり、線維間に軟骨細胞が存在している半月板と類似した構造が再現されている。この軟骨化された腱を用いて組織学的半月板再建術を行うことが今回の目的である。

すなわち、(1) BMPを用いて、半月板の代替材料となるうる軟骨化腱の最適化及び  
(2) 軟骨化腱を用いて臨床に直結した動

物実験モデルでの有用性を検証することである。

半月板は複雑なコラーゲンネットワークと軟骨基質を含んだ構成体であり、この特異な構造によって多大な力学的ストレスに対する分散が可能になっている。ところが一度損傷を受けると容易には再生せず、修復させることは臨床的な課題となっている。また現在のところ複雑なコラーゲンネットワークの再現、組織学的特長を人工補填材料で再現することは不可能である。わが国では同種移植は困難な状況にあり、現実的には自家組織での修復を行う必要がある。BMPは近年遺伝子組み換え技術によって生産可能となり整形外科臨床で骨再生に利用されることは確実であるが、このBMPを半月板の組織学的再生に利用することはこれまでに全く行われていない独創的な研究である。

我々は以前の研究により、BMPを腱内に注入すると内軟骨性骨化と同様の過程を経て腱内骨化が生じることを明らかにしていることから、時間的、量的制御によって腱内軟骨化を起こし、半月板再建マテリアルに使用可能と考えている。

## B. 研究方法

白色家兔 (3.2~4.0kg) の半腱様筋腱に対して rhBMP を注入する。移植後 7・10・14・21 日ごとに半腱様筋腱を採取、腱の形態を観察する。またレントゲン撮影、組織学的評価を行い、正常の半月板の大きさや類似した組織像を呈する hBMP の量を検索する。軟 X 線装置 (ソフロン) を用いて BMP による腱内軟骨化を 7・10・14・21 日で撮影、測定し骨形成を評価する。採取した半腱様

筋腱を H-E, toluidine blue 染色を行った。以上から軟骨形成形態の把握と発生時期、半月板として利用できる時期を検討した。

次に軟骨化腱を使用した半月板再建術の臨床応用に向けての実験的モデルの作成を行った。あらかじめ最適化された条件において作成された軟骨化腱を採取し、ウサギ膝内側半月板を切除した後、軟骨化腱を内側後方から関節内に翻転し、inside-out に関節包に縫着する。コントロールとして半月板様筋腱のみを関節内に縫着する。この半月板再建術モデルを 1, 2 ヶ月で屠殺した。

再建術膝を軟 X 線装置 (ソフロン) を用いてレントゲン撮影し、半月板内の異所性骨化の評価を行った。

その組織切片を H-E, toluidine blue 染色を行い、軟骨形成形態の把握と発生時期、半月板として利用できる時期の検討をする。軟骨化腱を使用した半月板再建術の臨床応用に向けての実験的モデルの作成

あらかじめ最適化された条件において作成された軟骨化腱を遠位付着部を残して採取する。ウサギ膝内側半月板を切除した後、軟骨化腱を内側後方から関節内に翻転し、inside-out に関節包に縫着する。コントロールとして腱のみを関節内に縫着する。この半月板再建術モデルを 1, 2 ヶ月で屠殺し、レントゲン、半月板の評価、軟骨評価を行う。

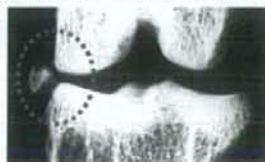
### C. 研究結果

白色家兎の半月板様筋腱に rhBMP を 10ug 注入し、注入後 7・10・14・21 日に組織採取してレントゲン及び組織学的評価を行った。注入後 7・10 日ではレントゲン上明らかな石灰化は認めなかった。注入後 14 日では腱内に点状の石灰化が出現し、21 日では腱内

に彌漫性の骨化を認めた。



H-E 染色では、注入後 7 日では著明な変化は認めなかったが、10 日では腱内に細胞の増加を認めた。注入後 14 日では円形を呈する肥大軟骨様細胞の増殖を著明に認め、腱内に点状の石灰化が出現した。21 日では肥大軟骨様細胞は減少し、骨化部分を一部に認めた。一方、toluidine blue 染色では、注入後 7 日で軟骨基質を表す異染性を腱内の一部分に認めた。10 日では腱内全体に淡い異染性を認め、14 日では強く異染性を認めた。21 日では異染性を認める範囲は減少していた。これらの結果より rhBMP 注入後 10~14 日にかけて腱内に軟骨細胞の出現と軟骨基質産生がみられ、その後骨化に進むことが確認できた。20, 40ug では骨化形成が強く誘導されたために条件としては不適切と考えられた。注入後 14 日に見られる肥大軟骨細胞は骨化の前段階に出現することが広く知られている。よって半月板再生に用いる軟骨化腱を骨化させないために rhBMP 注入後 10 日の軟骨化腱を半月板の代替物として用いて半月板再建術を行った。再建術後 1, 2 ヶ月でのレントゲンで再建半月板内に高率に骨化が見られた。



半月板内に骨化あり

組織では主に関節包側に骨化が見られた。このことから関節外で軟骨化腱を誘導し、



それを移植材料として半月板再建とする 2 期的手術では骨化まで誘導されることがわかった。よって低酸素環境下である関節内で BMP を作用させる 1 期的手術を計画し、実施している。

#### D. 考察

②半腱様筋腱に rhBMP を注入し、関節外で軟骨化腱を誘導し、それを移植材料として半月板再建とする 2 期的手術を行ったが、骨化まで誘導される結果となった。これは BMP の作用が骨化誘導であり、一度スイッチが入ってしまうと骨化まで誘導される可能性があった。しかしながら低酸素下においては BMP が軟骨誘導されるという過去の報告があることから、関節内という低酸素環境で BMP を作用させることによって、骨化誘導されることなく軟骨で留まる可能性があった。また臨床の現場では半月板再建術は 1 期的に行うことから移植腱に直接 BMP を注入する 1 期的再建術のほうが理想的である。今後 1 期的再建術での検討を行う予定である。

#### E. 結論

rhBMP を注入することで関節外に軟骨化腱を誘導できた。

それを移植材料として半月板再建とする 2 期的手術を行ったが、骨化まで誘導された。関節内という低酸素環境で BMP を作用させるように移植腱に直接 BMP を注入する 1 期的再建術を選択し検証する予定である。

#### F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1,"Imai Y, Youn MY, Kondoh S, Nakamura T, Kouzmenko A, Matsumoto

T, Takada I, Takaoka K, Kato S"

Annals of New York Academy of Sciences in press. Estrogens Maintain Bone Mass by Regulating Expression of Genes Controlling Function and Life Span in Mature Osteoclasts

2, "Hoshi M, Takami M, Kajikawa M, Teramura K, Okamoto T, Yanagida I, Matsumura A." Arch Orthop Trauma Surg 128 149-54 2008"A case of multiple skeletal lesions of brown tumors, mimicking carcinoma metastases"

3,"Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Sugama R, Iwakiri K, Kadoya Y, Ohashi H, Takaoka K." Arch Orthop Trauma Surg 128(4) 435-42 2008 Sagittal alignment of the lower extremity while standing in Japanese male.

4, Dohzono S, Imai Y, Nakamura H, Wakitani S, Takaoka K Clin Orthop Relat Res. in press.Successful spinal fusion by E.coli derived BMP-2-adsorbed porous  $\beta$ -TCP granules.

5,"Uemura T, Kazuki K, Hashimoto Y, Takaoka K. Clin J Sport Med 18 292-4 2008 Skiing-induced rupture of the extensor pollicis longus tendon: A report of three cases.

6, "Iwakiri K, Iwaki H, Minoda Y, Ohashi H, Takaoka K." Clin Orthop Relat Res. 466 1189-92 2008 Alumina inlay failure in cemented polyethylene-backed total hip arthroplasty.

7, "Minoda Y, Kobayashi A, Iwaki H, Ohashi H, Takaoka K." Clin Orthop Relat Res. in press 2008 TKA Sagittal

Alignment with Navigation Systems and Conventional Techniques Vary Only a Few Degrees.

8, "Ito Y, Nakao Y, Manaka T, Naka Y, Matsumoto I, Takaoka K" *Current Orthopaedic Practice* 19 677-681 2008 Advantages of a navigation system to create portals for shoulder arthroscopy: a preliminary investigation.

9, "Hoshi M, Ieguchi M, Taguchi S, Sasaki K, Inoue K, K Wakasa, K Takaoka" *Eur J Orthop Surg Traumatol* 18 409-413 2008 Liposarcoma with radiologically biphasic patterns.

10, "Iwakiri K, Iwaki H, Kobayashi A, Minoda Y, Kagiya H, Kadoya Y, Takaoka K." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 85(1) 125-9 2008

Characteristics of Hylamer polyethylene particles isolated from peri-prosthetic tissues of failed cemented total hip arthroplasties.

11, "Hoshino M, Egi T, Terai H, Namikawa T, Kato M, Hashimoto Y, Takaoka K." *J Biomed Mater Res A.* 2008 Repair of long intercalated rib defects in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate.

12, "Minoda Y, Kobayashi A, Sakawa A, Aihara M, Tada K, Sugama R, Iwakiri K, Ohashi H, Takaoka K." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 86B 501-5 2008 Wear particle analysis of highly crosslinked polyethylene isolated from a

failed total hip arthroplasty.

13, "Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K." *J Bone Mineral Metab* 26 115-22 2008 Present status of and future direction for articular cartilage repair.

14, "Nomura-Furuwatari C, Wakitani S, Hashimoto Y, Imai Y, Ohta Y, Nakagawa K, Nakao Y, Takayama K, Manaka T, Takaoka K." *J Bone Mineral Metab* 26 152-8 2008 Expression profiles of phosphodiesterase 4D splicing variants in osteoblastic cells.

15, Ohta Y, Nakagawa K., Imai Y, Katagiri T, Koike T, Takaoka K." *J Bone Miner Metab* 26 478-84 2008 Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway.

16, Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K" *J Bone Miner Metab* in press RNA Interference for Noggin Enhances the Biological Activity of Bone Morphogenetic Proteins in vivo and in vitro.

17, "Yano K, Hoshino M, Ohta Y, Manaka T, Naka Y, Imai Y, Sebald W, Takaoka K" *J Bone Miner Metab* in press Osteoinductive Capacity and Heat Stability of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Produced by *Escherichia coli* and Dimerized by Biochemical Processing.

18, "Imai Y, Nakamura T, Matsumoto T, Takaoka K, Kato S" *J Bone Miner Metab* in press 2009 Molecular Mechanisms Underlying the Effects of Sex Steroids on

Bone and Mineral Metabolism.

19, "Yamamoto M, Beppu H, Takaoka K, Meno C, Li E, Miyazono K, Hamada H." *J Cell Biol* 184 323-34 2009 Antagonism between Smad1 and Smad2 signaling determines the site of distal visceral endoderm formation in the mouse embryo.

20, "Kato M, Nakamura H, Suzuki E, Terai H, Wakasa K, Wakasa T, Takaoka K." *J Clin Neurosci*. 15(7) 827-30 2008 Ependymal cyst in the lumbar spine associated with cauda equina compression.

21, Kato M, Nakamura H, Terai H, Konishi S, Nagayama R, Takaoka K." *J Clin Neurosci*. 15(8) 880-5 2008 Why does delay exist in the diagnosis of intradural spinal cord tumor despite the availability of MRI?

22, "Masada T, Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, Iwaki H, Ohashi H, Takaoka K." *J Orthop Res*. 26 91-5 2008 Increased hepatic cytochrome P4503A activity decreases the risk of developing steroid-induced osteonecrosis in a rabbit model.

23, "Nakata N, Kira Y, Yabunaka Y, Takaoka K" *J Orthop Sci* 13 456-62 2008 Prevention of venous thrombosis by preoperative glycyrrhizin infusion in a rat model.

24, "Iwakiri K, Oda Y, Kaneshiro Y, Iwaki H, Masada T, Kobayashi A, Asada A, Takaoka K." *J Orthop Sci*. 13 463-8 2008 Effect of simvastatin on steroid-induced

osteonecrosis evidenced by the serum lipid level and hepatic cytochrome P4503A in a rabbit model.

25, "Hoshi M, Ieguchi M, Takami M, Aono M, Taguchi S, Kuroda T, Takaoka K" *Jpn J Clin Oncol* 38 701-9 2008 Clinical Problems After Initial Unplanned Resection of Sarcoma.

26, "Koike T, Orito Y, Toyoda H, Tada M, Sugama R, Hoshino M, Nakao Y, Kobayashi S, Kondo K, Hirota Y, Takaoka K." *Osteoporos Int*. in press 2009 External hip protectors are effective for the elderly with higher-than-average risk factors for hip fractures.

27, "Matsumoto T, Hagino H, Shiraki M, Fukunaga M, Nakano T, Takaoka K, Morii H, Ohashi Y, Nakamura T." *Osteoporos Int*. in press 2008 Effect of daily oral minodronate on vertebral fractures in Japanese postmenopausal women with established osteoporosis: a randomized placebo-controlled double-blind study.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特記すべき事項なし

氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
橋本祐介、仲哲史、福永健治、高岡邦夫	rhBMPを用いた骨と靭帯結合部（エンテシス）の再生とその臨床応用の可能性	移植	43巻2号	158	2008
仲哲史、橋本祐介、高岡邦夫	rhBMPを用いた自家腱移植による半月板再建術	日本整形外科学会雑誌	82巻8号	1065	2008
橋本祐介、仲哲史、福永健治、高岡邦夫	rhBMPを用いた人工Bone-Tendon-Boneの作成とそれを使用した ACL再建術	日本整形外科学会雑誌	82巻8号	949	2008