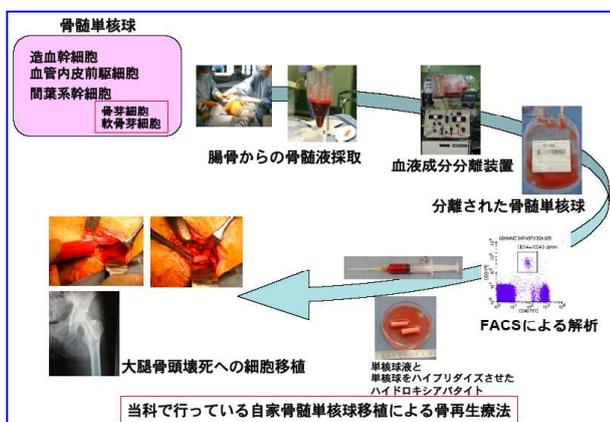


対象とした。MNC 移植の際に、MNC 単独移植のみ行ったのが 11 例 16 関節、骨頭回転骨切り術(TRO)で移動した壊死領域への MNC 移植の併用のみ行ったのが 6 例 6 関節、両側罹患で MNC 単独移植と TRO との併用を行ったのが 7 例 14 関節であった。内訳は男性 14 例、女性 10 例で、平均手術時年齢は 40 歳(18 ~ 64 歳)、誘因はステロイド性 11 例、アルコール性 10 例、狭義の特発性 3 例であり、Steinberg の方法を用いて算出した平均壊死体積率は 21% (3 ~ 37%) であった<sup>12)</sup>。

手術開始時に腸骨稜より骨髓液を約 700ml 採取し、フィルターにて濾過した後に細胞遠心分離装置 (Spectra, Gambro) を用いて骨髓液より単核球を含む分画液 (約 30 ~ 40ml) を抽出した (図 1)。



【図 1】

骨髓液より分離した MNC 分画における総 MNC 数、CD34 陽性細胞数、及び CD34 陽性細胞数と性別・誘因・年齢・壊死体積率・壊死領域の骨陰影の増強開始時期との関連について調査した。統計学的には Spearman's rank correlation を用い、有意水準を 5% としして相関関係を判定した。

### (3) MNC 移植による治療効果の臨床研究

ION に対し MNC 移植を行った症例のうち術後 1 年以上経過した 22 例 30 関節を対象とした (MNC 群)。MNC 群の内訳は、女性 8 例、男性 14 例、平均手術時年齢は 41 才 (17 ~ 64 才)、誘因はステロイド性 14 例、アルコール性 6 例、狭義の特発性 2 例であった。術前病期は Stage 1 が 2 関節、Stage 2 が 25 関節、Stage 3A が 3 関節、術前病型は Type B が 2 関節、Type C-1 が 13 関節、Type C-2 が 15 関節であった。平均壊死体積率は 21% (3 ~ 48%) であり、平均経過観察期間は 24 ヶ月 (12 ~ 37 ヶ月) であった。移植の足

場材料として用いた連通孔性ハイドロキシアパタイト (interconnected porous calcium hydroxyapatite: IP-CHA) は、連通気孔を有する多孔体 HA (気孔率: 75%、平均気孔径: 150µm、気孔間連通率: 90%以上) で、MNC を術中に播種して移植に使用した<sup>13)</sup>。また反対股には骨切り術を 10 関節に、THA を 1 関節に、人工骨頭置換術を 1 関節に同時に行い、血管柄付腸骨移植を 1 関節に細胞移植前 1 ヶ月時に行った。

また、骨壊死部に IP-CHA のみ移植した 8 例 9 関節を対照群とした (HA 群)。HA 群の内訳は、女性 1 例、男性 7 例、平均手術時年齢は 49 才 (28 ~ 73 才)、誘因はステロイド性 2 例、アルコール性 3 例、狭義の特発性 3 例であった。術前病期は全例 Stage 2 であり、術前病型は Type C-1 が 1 関節、Type C-2 が 8 関節であった。平均壊死体積率は 22% (15 ~ 55%) であり、平均経過観察期間は 26 ヶ月 (16 ~ 45 ヶ月) であった。また反対股には骨切り術を 1 関節に、THA を 1 関節に、血管柄付腸骨移植を 1 関節に行った。

前述と同様にして骨髓液より MNC を含む分画液を抽出した。分画液中の総 MNC 数は約  $2 \times 10^9$  個であった。分画液を IP-CHA に浸潤させて移植に使用した。手術は大転子遠位から大腿骨頭の壊死領域に向けて軟骨下骨の直下までイメージ下に 5 ~ 10mm 径でドリリングを 2 カ所に行い、MNC 分画液を浸潤させた円柱状 IP-CHA を骨孔よりに挿入し、骨壊死部へ移植した (図 1)。

X 線学的評価として骨頭圧潰の進行、骨壊死部の骨陰影の増強、壊死体積率の変化、及び骨壊死部の骨吸収の有無の項目について評価した。また術後の骨頭圧潰の進行と他の因子との関連についても調査した。統計学的には Spearman's rank correlation を用い、有意水準を 5% としして相関関係を判定した。

## 3. 研究結果

### (1) ラット骨頭壊死モデルを用いた CD34 陽性細胞による骨修復の基礎研究

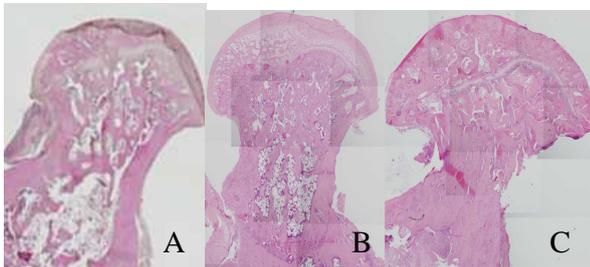
肉眼的には対照群では移植後 4 週で 60% に、6 週で 100% に骨壊死による頸部骨折を認めた。CD34 移植群では移植後 4 週、6 週ともに頸部骨折を認めた症例はなかったが、骨頭表面の軟骨変性を認めた (図 2)。



【図 2】肉眼所見

A: MNC 群 B: CD34 群 C: 対照群

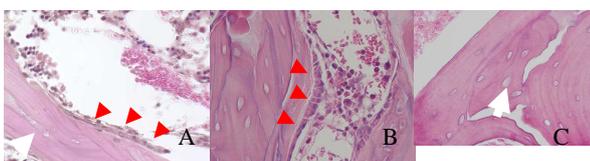
術後 4 週での MNC 群、CD34 群、及び対照群の HE 染色評価において、骨梁内には empty lacuna を認め、骨梁間には骨髓組織を認めず、骨壊死の改善を示す所見は認めなかった。CD34 移植群では、骨梁内には empty lacuna を認めるが、骨梁表面に lining cell を多数認め、一部には壊死骨梁表面に添加骨形成を認めた。また骨梁間に骨髓細胞を認め、骨壊死改善の所見と考えられた。MNC 移植群も CD34 陽性細胞にはやや劣るものの、骨壊死の改善所見を認めた。対照群では骨頭が扁平化し頸部が狭小化していた(図 3)。



【図 3】組織所見(HE 染色) × 40

A: MNC 群 B: CD34 群 C: 対照群

骨梁内には empty lacuna を認め、骨梁間には骨髓組織を認めず、骨壊死の改善を示す所見は認めなかった。CD34 移植群では、骨梁内には empty lacuna を認めるが、骨梁表面に lining cell を多数認め、一部には壊死骨梁表面に添加骨形成を認めた。また骨梁間に骨髓細胞を認め、骨壊死の改善所見と考えられた(図 4)。



【図 4】組織所見(HE 染色) × 400

A: MNC 群 B: CD34 群 C: 対照群

白矢印: empty lacuna 赤矢印: lining cell

(2) MNC 分画中の CD34 陽性細胞数の基礎研究  
MNC 分画中の平均総 MNC 数は  $1.8 \times 10^9$  個 ( $0.4 \sim 3.6 \times 10^9$  個) であり、うち CD34 陽性細胞の平均含有率は 0.42% ( $0.14 \sim 0.81\%$ ) で、CD34 陽性細胞の平均細胞数は  $7 \times 10^6$  個 ( $0.08 \sim 2.3 \times 10^8$  個) であった。また CD34 陽性細胞数と他の因子との関連を調査したが、性別において男性に細胞数が多い傾向を認めただけ以外に、病因・年齢・壊死体積率・壊死領域の骨陰影の増強時期に明らかな相関を認めなかった。

(3) MNC 移植による治療効果の臨床研究

MNC 群において、骨頭圧潰は 17 関節 (57%) で進行を認めず、2mm 未満の進行を 9 関節 (30%) に、2mm 以上の進行を 4 関節 (13%) に認めた。2mm 未満の圧潰を来した症例はいずれも術後 1 年以内に生じたが、非進行性である。骨頭内の修復層の骨陰影増強を 28 関節 (93%) に認め、3~6 ヶ月頃より増強する傾向にあった。壊死体積率は全例とも経時的な減少を認め、特に術後 6~12 ヶ月頃にかけて著明な減少傾向にあった。また術後経過中に骨壊死部の骨吸収像を 14 関節 (47%) に認め、術後 1~4 ヶ月より出現していた。HA 群では骨頭圧潰はいずれも進行しており、2mm 未満の進行を 3 関節 (33%) に、2mm 以上の進行を 6 関節 (67%) に認めた。骨頭内の修復層の増強は術後 12 ヶ月頃より僅かに認めるのみであった。また術後経過中に骨壊死部の早期の骨吸収像を呈した症例はなかった。

また術後の骨頭圧潰の進行と有意な関連のある因子として、手術時年齢 ( $P=0.04$ ) と術前病型 ( $P<0.01$ ) が挙げられた。

#### 症例供覧

症例 1: 18 才女性、狭義の ION で左股の病期は Stage 2、病型は Type C-1、壊死体積率は 15% であった。右股には骨頭回転骨切り術を行い、同時に左股に MNC 移植を行った。移植後 3 ヶ月より修復層の骨陰影の増強を認めるようになり、経時的に壊死領域の著明な縮小を認め、現在では僅かな壊死領域を残すのみである(図 5)。



【図 5】症例 1 18 才女性 MNC 群

A: 術後 2 ヶ月 B: 術後 3 ヶ月 C: 術後 9 ヶ月 D: 2 年 9 ヶ月

症例 2: 34 才女性、アルコール性 ION で左股の病期は Stage 2、病型は Type C-1、壊死体積率は 17% であった。右股には広範な骨壊死を認めたため血管柄付き腸骨移植を行い、その 1 ヶ月後に左股に対して MNC 移植を行った。移植後 3 ヶ月頃より移植した IHA の陰影が中枢側まで増強し、術後 9 ヶ月頃より壊死領域に部分的に骨陰影の増強する部位が認められた。特に荷重部外側の軟骨下骨の骨陰影が増強し徐々に内側まで健常骨が延長している(図 6)。



【図 6】症例 2 34 才女性 MNC 群

A: 術後 1 ヶ月 B: 術後 3 ヶ月 C: 術後 9 ヶ月 D: 3 年 1 ヶ月

症例 3: 64 才男性、ステロイド性 ION で両股とも病期は Stage 2、病型は Type C-2、壊死体積率は右 33%、左 39% であり、両側に MNC 移植を行った。右股は術後 2 年まで経過良好であったが、以後壊死領域内側縁での陥没を認めるようになった。左股には骨頭に軽度の扁平化を認めるものの非進行性であり、修復層及び軟骨下骨において硬化像の増大を認めている(図 7)。



【図 7】症例 3 64 才男性 MNC 群

A: 術後 1 ヶ月 B: 術後 3 ヶ月 C: 術後 9 ヶ月 D: 術後 2 年 7 ヶ月

症例 4: 42 才男性、ステロイド性 ION で病期は右 Stage 3A、左 Stage 2、病型は両側とも Type C-2、壊死体積率は右 21%、左 20% であり、両側に MNC 移植を行った。右骨頭には術前より陥没を認めていたが、術後の新たな圧潰の進行を認めず、両側とも修復層の硬化像の増大に伴う壊死領域の縮小を認めている(図 8)。



【図 8】症例 4 42 才男性 MNC 群

A: 術後 1 ヶ月 B: 術後 3 ヶ月 C: 術後 9 ヶ月 D: 術後 2 年 6 ヶ月

症例 5: 62 才男性、アルコール性 ION で右股の病期は Stage 2、病型は Type C-2、壊死体積率は 18% であり、HA 移植のみを行った。術後より明らかな反応層の陰影増強など認めず、術後 8 ヶ月にて軽度の圧潰を認めるようになり、術後 1 年には壊死部外側縁より明らかな圧潰の進行を認めた(図 9)。



【図9】症例5 62才男性 HA群

A:術後1ヵ月 B:術後8ヵ月 C:術後1年 D:術後3年3ヵ月

#### 4. 考察

以前よりIONに対する低侵襲な治療の一つとしてcore decompressionが報告されているが、その成績は決して満足できるものではなく、また壊死の局在や大きさによる成績評価ではないために手術適応も明確になっていない<sup>14)-17)</sup>。近年、末梢血管障害に対する再生医療としてMNC移植の臨床応用が行われており<sup>12)</sup>、IONに対しても骨壊死部への血管・骨再生を目的としてcore decompressionに加えたMNCの骨壊死部への注入が試みられている。HernigouらはMNCが骨芽細胞やその前駆細胞を供給しうることを<sup>3)</sup>、GangjiらはMNCが血管内皮前駆細胞・間葉系幹細胞の供給や血管新生因子の分泌に関与することを述べている<sup>4)</sup>。我々の基礎研究でもMNCが骨髄内における早期の血管内皮前駆細胞への分化及び血管新生に有用であり、CD34陽性細胞単独の移植よりも血管新生や骨形成に有効であることを確認している<sup>5)-7)</sup>。これらの結果を踏まえてMNCの臨床応用を開始したが、我々はMNC移植に対しても足場材料を用いることで、より多くの細胞を骨壊死領域に留めることが可能と考えており、骨伝導能に優れ気孔間連通構造により細胞活性の維持が可能なIP-CHAを用いてきた<sup>13)</sup>。

IONに対するMNC移植の短期成績について平成17-19年度報告書でも報告してきた<sup>8)9)</sup>。MNC移植後の骨壊死部の変化として、移植後早期に骨壊死部の骨吸収が生じるとともに反応層の骨陰影の増強が認められるようになり骨修復の過程を辿ると考えられるが、骨吸収による骨壊死部の脆弱性のために圧潰の進行する可能性が危惧される。今回の調査ではMNC移植後に圧潰の進行を軽微なものも含めて13関節に認めたが、このうち10関節(77%)は壊死領域

内側縁から圧潰が生じていた。これまで壊死領域外側縁での圧潰発生を予防することが重要と考え、MNC移植を骨頭外側部に向けて行ってきた。多くの症例で外側縁では反応層や軟骨下骨の陰影増強を認め、部分的骨修復が示唆されたが、その反面、内側縁に力学的脆弱部位が残っていたものと推察した。しかし、内側縁に脆弱部位が生じて外側からの軟骨下骨の修復が得られている症例では圧潰の進行を認めておらず、軟骨下骨の修復が得られるまでの期間は部分免荷を続けるなど圧潰発生を予防しながら慎重に経過観察を行うことが、本法の成績向上に繋がると考えられた。

#### 5. 結論

IONに対し、単核球移植を施行した症例の短期成績を報告した。細胞移植後の骨頭圧潰の進行を予防するためには移植後早期の慎重な経過観察を要すると考えられた。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫. 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髄単核球移植の短期成績. Hip Joint 33: 35-39, 2007
- 2) Yamasaki T, Yasunaga Y, Terayama H, Ishikawa M, Ito Y, Adachi N, Ochi M. Transplantation of bone marrow mononuclear cells enables simultaneous treatment with osteotomy for osteonecrosis of the bilateral femoral head. Med Sci Monit 14: CS23-30, 2008.

##### 2. 学会発表

- 1) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対し骨髄単核球移植の短期成績. 第108回 中部日本整形外科災害外科学会, 広島, 2007.4.14.
- 2) 寺山弘志, 安永裕司, 山崎琢磨, 石川正和, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髄単核球移植後のX線学的変化. 第80回 日本整形外科学会学術集会, 東京, 2007.5.24.
- 3) 安永裕司, 山崎琢磨, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対し骨髄単核球移植術. 第80回 日本整形外科学会学術集会, 東京, 2007.5.27.

- 4) 寺山弘志, 安永裕司, 石川正和, 越智光夫: ラット大腿骨頭壊死モデルにおけるヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞移植の骨再生効果. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 19 年度報告, 京都, 2007.7.7.
  - 5) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫: 大腿骨頭壊死症における骨髓単核球分画中の CD34 陽性細胞数の検討. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 19 年度報告, 京都, 2007.7.7.
  - 6) Yamasaki T, Yasunaga Y, Terayama H, Ishikawa M, Ochi M : Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells for osteonecrosis of the femoral head . 第9回日仏整形外科学会合同会議, Nice, 2007.9.14 .
  - 7) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫: 変形性股関節症における骨髓中の前駆・幹細胞分画の検討 . 第34回 日本股関節学会, 金沢, 2007.10.11.
  - 8) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対し骨髓単核球移植の短期成績 . 第 34 回 日本股関節学会, 金沢, 2007.10.12.
  - 9) 寺山弘志, 安永裕司, 石川正和, 越智光夫: ラット大腿骨頭壊死モデルにおけるヒト末梢血由来 CD34 陽性細胞移植の骨再生効果 . 第 22 回 日本整形外科学基礎学術集会, 浜松, 2007.10.25
  - 10) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対し骨髓単核球移植の短期成績 . 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 19 年度報告, 京都, 2007.12.1.
  - 11) Improvement of osteonecrosis by administration of human peripheral blood derived CD34 positive cells in rat osteonecrosis model. 54<sup>th</sup> Orthopaedic Research Society, San Francisco, Mar. 2-5, 2008.
  - 12) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 濱木隆成, 吉田友和, 大島誠吾, 堀淳司, 山崎啓一郎, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髓単核球移植後の壊死体積率の変化 . 第 81 回 日本整形外科学会学術集会, 札幌, 2008.5.27.
  - 13) 寺山弘志, 安永裕司, 石川正和, 越智光夫: ラット大腿骨頭壊死モデルにおける骨髓・末梢血由来細胞移植の骨再生効果の検討 . 第 23 回 日本整形外科学基礎学術集会, 京都, 2008.10.25
  - 14) Yamasaki T, Yasunaga Y, Ishikawa M, Hamaki T, Yoshida T, Oshima S, Hori J, Yamasaki K, Ochi M : Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells for osteonecrosis of the femoral head . 日仏整形外科学会, 東京, 2008.9.27 .
  - 15) Yasunaga Y, Yamasaki T, Ochi M.: Transplantation of bone marrow-derived mononuclear cells for osteonecrosis of the femoral head . 4<sup>th</sup> CNUH Hip Arthroscopy, Joint Preserving & Less Invasive Surgery of the Hip Symposium. Chungnum National University, Daejeon, Korea. Sep. 28, 2008.
  - 16) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 濱木隆成, 吉田友和, 大島誠吾, 堀淳司, 山崎啓一郎, 越智光夫: 特発性大腿骨頭壊死症に対し骨髓単核球移植の短期成績 . 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 12 年度報告, 京都, 2008.10.4.
- 7. 知的所有権の取得状況**
1. 特許の取得  
なし
  2. 実用新案登録  
なし
  3. その他  
なし
- 8. 参考文献**
- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275: 964-67, 1997
  - 2) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells. A pilot study and a randomized controlled trial.

- The Lancet 360: 427-35, 2002
- 3) Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. Clin Orthop 405: 14-23, 2002
  - 4) Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. J Bone Joint Surg 86-A: 1153-60, 2004
  - 5) Hisatome T, Yasunaga Y, Yanada S, Tabata Y, Ikada Y, Ochi M. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. Biomaterials 26: 4550-6, 2005
  - 6) 自己骨髄単核球細胞移植による血管新生と骨形成. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成16年度報告書 :128.
  - 7) CD34陽性骨髄単核細胞による血管新生と骨形成. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成17年度報告書 :173-5.
  - 8) 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髄単核球移植. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成18年度報告
  - 9) 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髄単核球移植. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成19年度報告
  - 10) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫. 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髄単核球移植の短期成績. Hip Joint 33: 35-39, 2007
  - 11) Yamasaki T, Yasunaga Y, Terayama H, Ishikawa M, Ito Y, Adachi N, Ochi M. Transplantation of bone marrow mononuclear cells enables simultaneous treatment with osteotomy for osteonecrosis of the bilateral femoral head. Med Sci Monit 14: CS23-30, 2008
  - 12) Steinberg ME, Hayken GD, Steinberg DR. A quantitative system for staging avascular necrosis. J Bone Joint Surg 77-B: 34-41, 1995
  - 13) Ito Y, Tanaka N, Fujimoto Y, Yasunaga Y, Ishida O, Agung M, Ochi M. Bone formation using novel interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic hybridized with cultured marrow stromal stem cells derived from Green rat. J Biomed Mater Res 69: 454-61, 2004
  - 14) Scully SP, Aaron RK, Urbaniak JR. Survival analysis of hips treated with core decompression or vascularized fibular grafting because of avascular necrosis. J Bone Joint Surg 80-A: 1270-5, 1998
  - 15) Lavernia CJ, Sierra RJ. Core decompression in atraumatic osteonecrosis of the hip. J Arthroplasty 15: 171-8, 2000
  - 16) Steinberg ME, Larcom PG, Strafford B, Hosick WB, Corces A, Bands RE, Hartman KE. Core decompression with bone grafting for osteonecrosis of the femoral head. Clin Orthop 386: 71-8, 2001
  - 17) Aigner N, Schneider W, Eberl V, Knahr K. Core decompression in early stages of femoral head osteonecrosis--an MRI-controlled study. Int Orthop 26: 31-5, 2002

# 特発性大腿骨頭壊死症における骨髓単核球分画中の CD34 陽性細胞数の検討

山崎琢磨、寺山弘志、石川正和、濱木隆成、越智光夫（広島大学大学院医歯薬学総合研究科整形外科）  
安永裕司（広島大学大学院医歯薬学総合研究科人工関節・生体材料学）

特発性大腿骨頭壊死症に対し、これまでに骨壊死部への血管・骨再生を目的とした骨髓単核球移植を 25 例に行ってきた。今回、自家骨髓より分離した単核球分画中で血管内皮前駆細胞の phenotype と考えられる CD34 陽性/CD45 弱陽性細胞数を検討した。分画中の単核球数は平均  $1.8 \times 10^9$  個 ( $0.4 \sim 3.6 \times 10^9$  個)、CD34 陽性/CD45 弱陽性細胞数は平均  $7.0 \times 10^6$  個 ( $0.08 \sim 2.3 \times 10^8$  個)であった。

## 1. 研究目的

当科で行っている特発性大腿骨頭壊死症 (ION) に対する骨髓単核球移植では、まず腸骨より骨髓液を採取した後に細胞分離装置を用いて分離した単核球分画を細胞源として移植に用いている<sup>1,2)</sup>。今回、単核球分画中の細胞数及び細胞の character について調査し治療効果との関連について検討した。

## 2. 研究方法

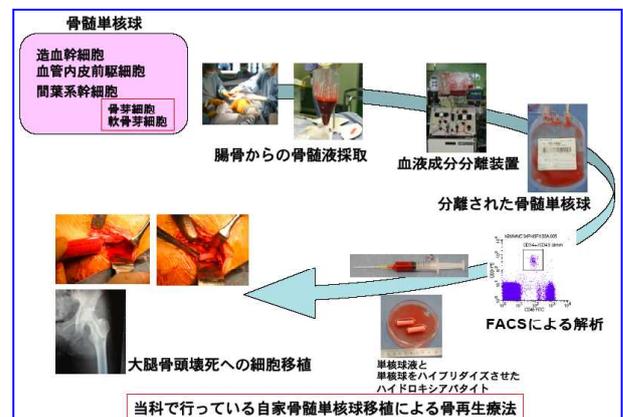
### A. 対象

ION に対して骨髓単核球 (単核球) 移植を行った 24 例 36 関節を対象とした。単核球移植の際に、単核球単独移植のみ行ったのが 11 例 16 関節、骨頭回転骨切り術 (TRO) で移動した壊死領域への単核球移植の併用のみ行ったのが 6 例 6 関節、両側罹患で単核球の単独移植と TRO との併用を片側ずつに行ったのが 7 例 14 関節であった。内訳は男性 14 例、女性 10 例で、平均手術時年齢は 40 歳 (18 ~ 64 歳)、誘因はステロイド性 11 例、アルコール性 10 例、狭義の特発性 3 例であり、Steinberg の方法を用いて算出した平均壊死体積率は 21% ( $3 \sim 37\%$ ) であった<sup>2)</sup>。

### B. 方法

#### 1) 単核球の単離

手術開始時に腸骨稜より骨髓液を約 700ml 採取し、フィルターにて濾過した後に細胞遠心分離装置 (Spectra, Gambro) を用いて骨髓液より単核球を含む分画液 (約 30 ~ 40ml) を抽出した (図 1)。



【図 1】

#### 2) 検討項目

骨髓液より分離した単核球分画における総単核球数、CD34 陽性細胞数、及び CD34 陽性細胞数と性別・誘因・年齢・壊死体積率・壊死領域の骨陰影の増強開始時期との関連について調査した。統計学的には Spearman's rank correlation を用い、有意水準を 5% として相関関係を判定した。

#### 3. 研究結果

単核球分画中の平均総単核球数は  $1.8 \times 10^9$  個 ( $0.4 \sim 3.6 \times 10^9$  個) であり、うち CD34 陽性細胞の平均含有率は 0.42% ( $0.14 \sim 0.81\%$ ) で、CD34 陽性細胞の平均細胞数は  $7 \times 10^6$  個 ( $0.08 \sim 2.3 \times 10^8$  個) であった。また CD34 陽性細胞数と他の因子との関連を調査したが、性別において男性に細胞数が多い傾向を認めた以外に、病因・年齢・壊死体積率・壊死領域の骨陰影の増強時期に明らかな相関を認めなかつ

た。

#### 4. 考察

単核球分画中には造血幹細胞・血管内皮前駆細胞・間葉系幹細胞が含まれており、血管新生や骨新生に関与する細胞源として注目されている<sup>4-6)</sup>。当科で行ったフローサイトメーターによる単核球分画液の質的評価でも、末梢血や骨髓液と比較して分画液中に血管内皮前駆細胞を含むCD34陽性細胞が多く存在することを確認している<sup>1,2)</sup>。Tateishi-Yuyamaらは末梢動脈疾患による虚血肢への単核球移植について報告しており、CD34陽性細胞の18%に血管内皮系細胞の特徴を有するが、CD34陰性細胞中にbFGF・VEGF・angiopoietin-1のmRNA発現を認めており、血管新生にはCD34陽性細胞だけでなくCD34陰性細胞の関与も考えられると述べている<sup>7)</sup>。当科でも単核球とCD34陽性細胞の比較に関する実験的研究を行い、単核球・CD陽性細胞・CD陰性細胞を家兎大腿骨に移植して血管形成及び骨形成を比較しており、CD34陽性群と単核球群ではCD34陰性群に比し有意に血管新生や骨形成の増加を認めている<sup>8)</sup>。今回の調査では、単核球数と壊死領域の骨陰影の増強開始時期に明らかな関連が認められなかったことから、移植された単核球が十分に血管内皮系細胞に分化せず、壊死領域周囲の骨陰影の増強は単核球分画中に有する血管増殖因子の作用により生じている可能性が考えられた。今後は単核球分画中のgrowth factorについての解析も検討している。

#### 5. 結論

ION症例における単核球分画中の細胞数及びCD34陽性細胞数を計測した。CD34陽性細胞数は病因・年齢・壊死体積率・移植後の骨陰影の増強時期との関連を認めなかった。

#### 6. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許の取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

#### 7. 参考文献

- 1) 山崎琢磨, 安永裕司, 寺山弘志, 石川正和, 越智光夫. 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髓単核球移植の短期成績. Hip Joint 33: 35-39, 2007
- 2) 特発性大腿骨頭壊死症に対する骨髓単核球移植. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成18年度報告: 110-13
- 3) Steinberg ME, Hayken GD, Steinberg DR. A quantitative system for staging avascular necrosis. J Bone Joint Surg 77-B: 34-41, 1995
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 275: 964-67, 1997
- 5) Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. Clin Orthop 405: 14-23, 2002
- 6) Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. J Bone Joint Surg 86-A: 1153-60, 2004
- 7) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells. A pilot study and a randomized controlled trial. The Lancet 360: 427-35, 2002
- 8) CD34陽性骨髓単核細胞による血管新生と骨形成. 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成17年度報告書: 173-75

# ステロイドが骨壊死後の骨再生に及ぼす影響

高野玲子、徳永邦彦、近藤直樹、伊藤知之、遠藤直人

(新潟大学大学院医歯学研究科機能再建講座整形外科学分野)

ステロイド性大腿骨頭壊死症(以下 ION)患者では、原疾患に対しステロイド剤を継続投与されている場合が少なく、ION に対する治療に対する影響を無視することはできない。我々は Norman 変法で作成したラット ION モデルに術後 7 日目よりメチルプレドニゾロン(以下 MPSS)を 100mg/day/kg を連続 5 日間殿筋内投与し、術後 14・42 日目に脱灰パラフィン切片を作成し、骨壊死後の骨再生に与える影響を大腿骨骨幹端部で観察し、組織学的に検討した。HE 染色では術後 42 日目にコントロール(C)群で正常骨髄の再生と添加骨形成が見られたのに対し、ステロイド投与(S)群では髓腔内は線維芽細胞様細胞で充満し添加骨形成は見られなかった。また、術後 42 日目に骨幹端部で TRAP 陽性巨細胞や ALP 免疫染色陽性細胞が観察されたのは C 群のみだった。MPSS は骨壊死後の骨修復を遅延させる可能性があることが考えられた。今後 MPSS を使用している患者への ION 治療を行う際には骨再生の遅延の可能性を考えて配慮する必要があり、また、細胞治療や遺伝子治療など、ION に対する新しい治療法を考案する際には、ステロイド使用患者に適応しても骨再生を遅延させうる影響に打ち勝つ内容であることが要求されると考える。

## 1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症の患者では治療開始時や治療中に原疾患に対するステロイドを使用している場合が少なく、その骨に対する影響は無視できない。本研究ではラット阻血性大腿骨頭壊死(以下 ION)モデルを用いて、ステロイドが骨壊死の骨再生過程に与える影響を組織学的に検討した。

## 2. 研究方法

材料は雌 Wister 系ラット、retired、体重平均 330g (298 ~ 366g) 28 匹を用いた。大腿骨頭壊死は全身麻酔下に Norman 変法を用いて作成した<sup>1)2)</sup>。左大腿骨大転子より前方 1/3 の外転筋群を剥離し前方関節包を切開、円靭帯切離後、股関節を脱転し、パイポ一ラを用いて大腿骨頭部を全周性に電気凝固して大腿骨頭への栄養血管を遮断する。股関節を整復し関節包・外転筋群を可及的に修復した。術後 7 日目より 11 日目まで連日 5 日間、コントロール群(以下 C 群)には生理的食塩水を、ステロイド群(以下 S 群)には MPSS を 100mg/day/kg 殿筋内投与した。感染予防のため術後 6 日目から 13 日目までセファゾリンナトリウムを 100mg/day/kg 腹腔内投与した。術後 14 日目と

42 日目に大腿骨頭を採取した。脱灰パラフィン切片を作製し、骨幹端部について組織学的評価を行った。組織学的評価にはヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色、アルカリフォスファターゼの免疫染色を行った。

## 3. 研究結果

### 1. HE 染色(図1)

術後 14 日目は両群とも骨幹端部には empty lacuna が観察され、完全に骨壊死に陥っており添加骨形成は見られなかった。C 群では骨幹端部の髓腔は線維芽細胞様組織が充満していたが、S 群は赤血球が充満していた。術後 42 日目になると C 群では旺盛な添加骨形成が観察され、髓腔内には正常骨髄が再生していた。一方 S 群では添加骨形成はほとんど見られず、骨壊死像が残存しており、髓腔内は線維芽細胞様組織が充満していた。

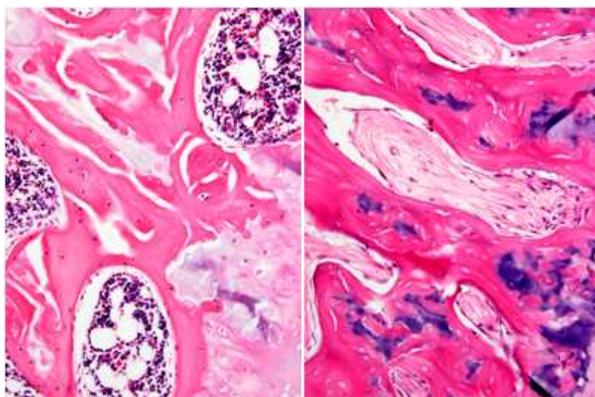
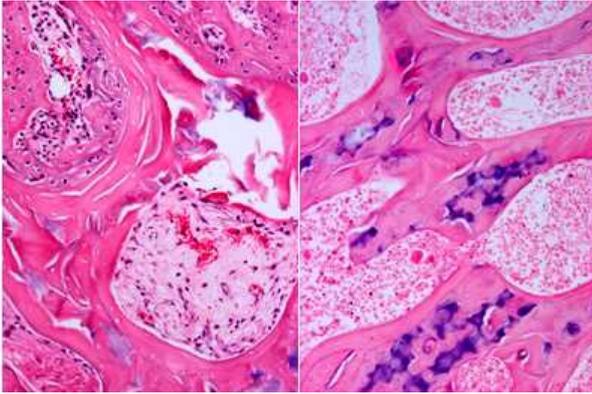


図1 HE 染色 ×100 左)C 群 右)S 群  
上段)術後 14 日目 下段)術後 42 日目

## 2. TRAP 染色

術後 14 日目は両群とも TRAP 陽性細胞は骨幹端には見られなかったが、大腿骨頸部の壊死と健常骨の境界部に TRAP 陽性の多核巨細胞が集積していた(図2)。術後 42 日目では C 群は骨幹端部にも TRAP 陽性多核巨細胞が集積して観察されたが、S 群ではほとんど見られなかった(図3)。

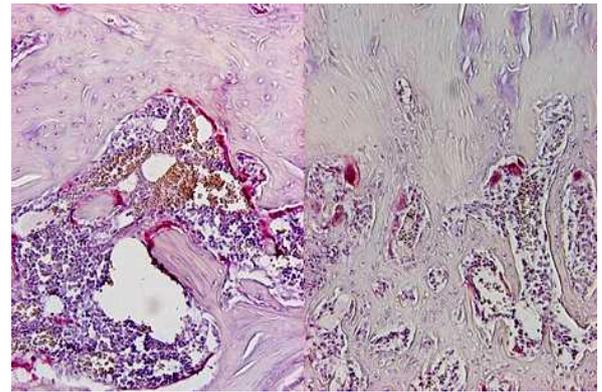
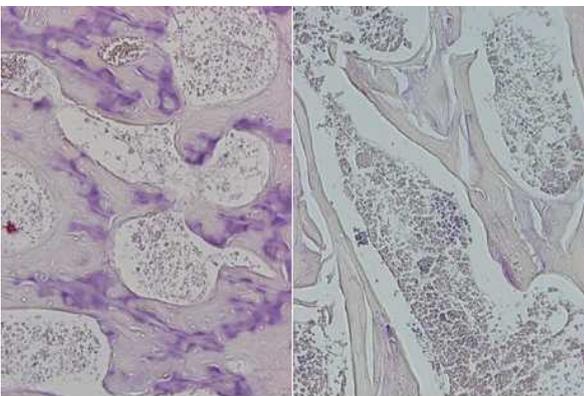


図2 術後 14 日目 TRAP 染色 ×100  
左)C 群 右)S 群  
上段)骨幹端部 下段)境界部

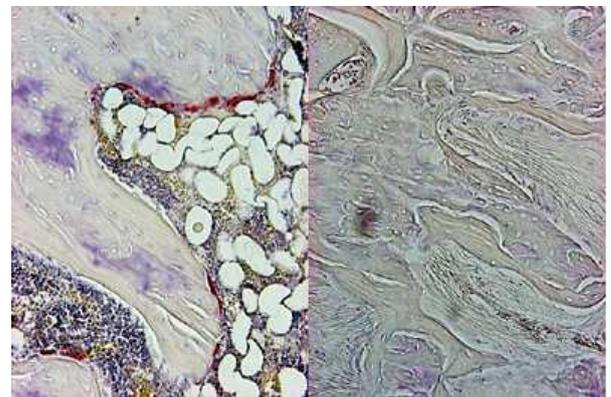
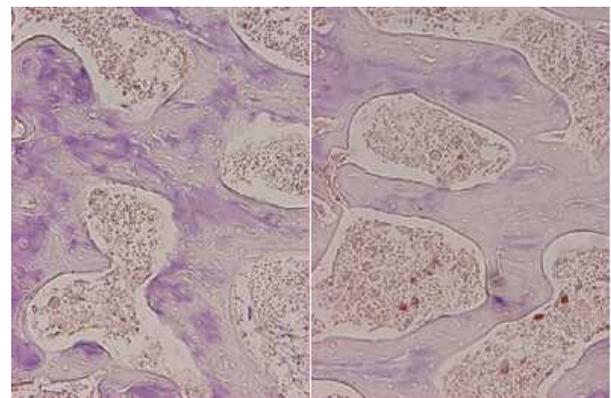


図3 術後 42 日目 TRAP 染色 ×100 (骨幹端部)  
左)C 群 右)S 群

## 3. ALP の免疫染色(図4)

術後 14 日目では両群とも骨幹端部に ALP 陽性細胞は観察されなかった。術後 42 日目では添加骨形成の見られた C 群では添加骨表面の lining cell や立方状骨が細胞には強い ALP 染色性を認めた。術後 42 日目の S 群では ALP 陽性細胞は見られなかった。



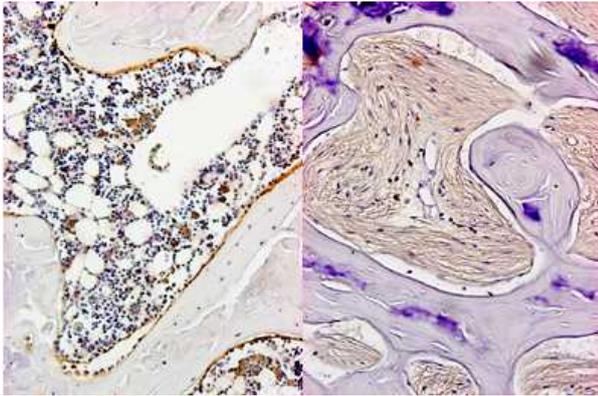


図4 ALP免疫染色 ×100

左)C群 右)S群

上段)術後14日目 下段)術後42日目

#### 4. 考察

ステロイドの骨形成に与える影響は、過剰量で抑制されると理解されている。グルココルチコイド過剰投与により骨芽細胞数の抑制や骨形成にかかわるインスリン増殖因子 (IGF-) の転写抑制が、骨形成抑制の原因とされている<sup>3)</sup>。本研究でもS群では術後42日目のHE染色では添加骨形成がほとんど認められず、ALP染色陽性細胞も見られなかったことから、C群に比し骨形成は抑制されていたと考える。

ステロイドの骨吸収に与える影響も、過剰量で抑制されると理解されている。Jeeらはラットにコルチコステロイドを5日間投与した場合、低容量1.5mg/kg/dayでは骨吸収亢進により脛骨骨幹端の骨量が減少するが、高容量の20.75mg/kg/dayでは骨吸収が減少したと述べている<sup>5)</sup>。またDempsterらは新生児ラットは骨細胞にグルココルチコイドを投与した場合グルココルチコイドレセプターを解して破骨細胞のアポトーシスが誘導されたと報告している<sup>6)</sup>。

ステロイドの骨髄再生に及ぼす影響について、近藤らはラット骨髄損傷モデルにMPSSを100mg/kg/dayで3日間投与したところ、骨形成・骨吸収とも抑制されていたことを報告している<sup>7)</sup>。その中でMPSSは破骨細胞数には影響せず、波状縁形成に影響を及ぼしている可能性を述べている。本研究でもS群は骨形成・骨吸収ともに抑制されていたが、術後42日目の骨幹端部の破骨細胞数はC群に比して明らかに少ない点が近藤らの報告とは異なっていた。また、術後42日目のS群では骨幹端部の正常な骨髄の再生が見られなかった。本IONモデルは外傷性阻血モデルであり、骨髄損傷モデルに比べて血流

再開が遅延すること、破骨細胞は骨髄中の造血幹細胞から分化することで知られるがS群は骨幹端部に破骨細胞が供給されにくい状態にあったことが原因として考えられる。よってMPSSは壊死後の骨髄内血行の再生を遅延に影響している可能性がある。

ステロイドが血管新生に及ぼす影響について原田らは、ラットin vitro血管モデルにデキサメサゾンを作作用させると、間葉系細胞であるmyofibroblastic cellのコラーゲン合成抑制を介して著明に血管新生を抑制作用を及ぼすことを報告し、グルココルチコイドが血管の修復阻害作用を有する可能性を述べている<sup>8)</sup>。またWolffらはラットの脳へglioma, gliosarcomaを移植したところ、デキサメサゾン投与群で腫瘍内血管の密度が小さいことを報告している<sup>9)</sup>。赤池らはグルココルチコイド過剰状態では血管内皮細胞のNO bioavailabilityの低下による血管内皮機能障害が引き起こされ、大腿骨頭内の微小循環の破綻が生じる結果IONが発症する可能性を報告している。本研究で観察されたS群での骨幹端部骨髄内の血行の再開が遅延には、これらの血管の修復阻害作用や血管内皮機能障害が関与している可能性があると考えられる。

ステロイドが過剰投与されている状態ではステロイドが直接骨芽細胞による骨形成や破骨細胞による骨吸収を抑制するという機序のほかに、骨髄内血行再開の遅延にともなう骨吸収・骨形成の抑制という機序の存在が示唆された。結果、MPSSは骨壊死後の骨再生は遅延させる可能性が考えられる。

現時点で本研究は定性的な観察しか行っていないが、今後添加骨や破骨細胞数などの定量性評価やC群とS群の骨髄内血行の差を定性的・または定量的に評価できる手法を継続して行い、検討することになっている。

今後MPSSを使用している患者へのION治療を行う際には骨再生の遅延の可能性を考えて治療法に配慮する必要がある。また、細胞治療や遺伝子治療など、IONに対する新しい治療法を考案する際には、ステロイド使用患者に適応しても骨再生を遅延させざる影響に打ち勝つ内容であることが要求されると考える。

#### 5. 結論

MPSSは骨壊死後の骨再生を遅延させる可能性がある。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 研究発表

高野玲子, 徳永邦彦, 近藤直樹, 北原洋, 伊藤知之, 伊藤雅之, 宮坂大, 遠藤直人. ラット大腿骨頭壊死モデルにおけるステロイドの骨修復への影響, 第 33 回 日本股関節学会, 東京, 2006.10.27.

## 7. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許の取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 8. 参考文献

- 1) Norman D, Reis D, Zinman C et al. Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat; an experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Leg- Perthes disease. *Int J Exp Pathol* 79:173-181, 1998
- 2) 北原洋, 徳永邦彦, 伊藤知之, 伊藤雅之, 近藤直樹, 高野玲子, 遠藤直人. ラット大腿骨頭壊死モデルにおける骨再生. 別冊整形外科 骨壊死 最新の診断と治療: 2 - 7, 2005
- 3) Scatt A, Bertram P, Br äutigam M. The role of glucocorticoid and prostaglandin E2 in the recruitment of bone marrow mesenchymal cells to the osteoblastic lineage; positive and negative effects. *Calcif Tissue Int* 59:156-162, 1996
- 4) Delany AM, Canalis E: Transcriptional repression of insulin like growth factor by glucocorticoids in rat bone cells. *Endocrinology* 136:4776-4781, 1995
- 5) Jee WSS, Park HZ, Roberts WE et al. Corticosteroid and bone. *Am J Anat* 129: 477-480, 1970
- 6) Dempster DW, Moonga BS, Stein LS et al. Glucocorticoids inhibit bone resorption by isolated rat osteoclasts by enhancing apoptosis. *J*

*Endocrinol* 154: 397-406, 1997

- 7) Kondo N, Tokunaga K, Ito T et al. High dose glucocorticoid hampers bone formation and resorption after bone marrow ablation in rat. *Microscopy research and technique* 69: 839-846, 2006
- 8) 原田育生. 血管新生におよぼすグルココルチコイドの影響. *日整会誌* 66:763-770, 1992
- 9) Wolff JE, Molenkamp G, Hotfilder M et al. Dexamethasone inhibits glioma-induced formation of capillary like structures in vitro and angiogenesis in vivo. *Klin Padiatr* 209(4); 275-277, 1997
- 10) 赤池雅史, 松本俊夫. 血管内皮細胞に対するステロイドの影響と大腿骨頭壊死. 別冊整形外科 骨壊死-最新の診断と治療:25-29, 2005