

20092104/A

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21年度 総括・分担研究報告書

研究者代表者 橋 本 祐 介

平成22(2010)年4月

目 次

I. 総括研究報告	
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	2
主任研究者 橋本祐介	
II. 分担研究報告	
1. BMPを用いた人工骨腱骨の再生技術の確立とそれを用いた臨床応用モデルでの前十字靱帯再建術での評価	8
分担研究者 脇谷滋之	
2. BMPを用いた半月板再建術方法の確立と組織学的評価	15
分担研究者 寺井秀富	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25

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(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

研究代表者 橋本祐介 講師

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 の初期病因である靱帯、半月板損傷に対して機能的な靱帯、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。現在の靱帯再建術、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、有効な骨靱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 年度の結果を踏まえ 21 年度は以下の研究を行った。

①再生された骨靱帯結合部を自家移植材料に用いた前十字靱帯再建モデルの確立

前年度の研究により至適化された条件である rhBMP（15ug）を 2 箇所家兎半腱様筋腱に注入した。注入 6 週後にその Bone-Tendon-Bone 複合体を使用して ACL 再建術を行った（BMP+群）。2 ヶ月で組織採取した。X-P、CT、H-E 染色、Toluidine Blue 染色で enthesis 構造の再現と骨癒合を検索した。力学試験機を用いて引き抜き試験を行い、最大破断強度、stiffness を測定した。PBS 注入群をコントロールとした（BMP-群）。ACL 再建術後 2 ヶ月の組織切片面の肉眼像では BMP+群で母床骨と同様の組織が骨孔内を占拠していた。組織像にて移植骨と大腿骨および移植骨と脛骨は骨癒合しており、正常組織に近い様相を呈していた。一方、BMP-群では CT 同様、骨孔内に移植腱が存在し、その周りに骨増殖が見られた。トルイジンブルー染色の強拡大像では、4 層構造が確認され、一部にタイドマークの出現も見られたことから組織学的には enthesis 構造が保たれていたと考えられた。術後 4 週、8 週において破断強度は BMP 群で有意に強く、stiffness においても新生 BTB を用いた前十字靱帯再建術は機能的にも優れていると考えられた。以上から、我々が用いた方法では腱を直接骨化させ、膝蓋腱のごとくの組織を新生することによって、より正常に類似した組織学的な再建が出来ると考えられた。

②BMP を用いた半月板再建術方法の確立と組織学的評価

前年度の研究により、1 期的な組織学的半月板再建術を施行した。

内側半月板切除後、1 期的に移植腱の関節部分のみに rhBMP-2 溶液 10ul を注入した家兎半腱様筋腱を関節内に移植した。rhBMP-2 の使用量により rhBMP（-）群・Low-dose 群

（1ug）・High-dose 群（5ug）とした。術後 4 週・8 週にて組織採取し、soft X ray、H-E 染色、Toluidine Blue 染色・Safranin O 染色を行った。免疫学的染色として、type I・II collagen に対する抗体を用いて染色した。軟骨損傷の評価に Mankin' s score を用いた。移植腱の軟骨化を Safranin O 染色を用いてスコアリングした。また対象として正常膝群・内側半月板切除群も作成し、同様に評価した。術後 4、8 週ともに Low-dose 群では関節軟骨の変性は内側半月板切除群に比べ軽度であった。また rhBMP（-）群と比較して、移植腱が軟骨化していた。一方、High-dose 群は術後 8 週において移植腱の一部が骨化し

ており、関節軟骨変性も進行した。rhBMP-2 を腱に注入すると局所的に軟骨細胞が多数出現することで半月板様組織をする一方、高濃度であれば骨化まで誘導された。臨床においては BMP の至適量の検索が必要と考えられた。関節軟骨変性は Low-dose 群で半月板切除群に比し軽度であり、正常と類似した半月板の再建は軟骨変性を抑制する可能性が示唆された。

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

寺井 秀富

大阪市立大学医学研究科整形外科 講師

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 の病因に靱帯損傷、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 次性関節症が指摘されている。早期に機能的な靱帯、半月板再建によって 2 次性 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、靱帯・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 を用いた新しい靱帯再建術と半月板再建術の確立を目指し、計画した。

①BMP を用いた人工骨腱骨の再生技術の確立とそれを用いた前十字靱帯再建術

現在の靱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認している。この技術を利用した臨床応用できるモデルを作成し、有効な骨靱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症が抑制されることが期待できる。

B. 研究方法

①再生された骨靱帯結合部を自家移植材料に用いた前十字靱帯再建モデルの確立

前年度の研究により至適化された条件である rhBMP（15ug）を 2 箇所家兎半腱様筋腱に注入した。注入 6 週後にその

Bone-Tendon-Bone 複合体を使用して ACL 再建術を行った (BMP+群)。2 ヶ月で組織採取した。X-P、CT、H-E 染色、Toluidine Blue 染色で enthesi 構造の再現と骨癒合を検索した。力学試験機を用いて引き抜き試験を行い、最大破断強度、stiffness を測定した。PBS 注入群をコントロールとした (BMP-群)。

②BMP 注入半月板様筋腱を用いた 1 期的手術半月板再建術の確立

前年度の研究により、1 期的な組織学的半月板再建術を施行した。内側半月板切除後、1 期的に移植腱の関節部分のみに rhBMP-2 溶液 10ul を注入した家兎半月板様筋腱を関節内に移植した。rhBMP-2 の使用量により rhBMP (-) 群・Low-dose 群 (1ug)・High-dose 群 (5ug) とした。術後 4 週・8 週にて組織採取し、soft X ray、H-E 染色、Toluidine Blue 染色・Safranin O 染色を行った。免疫学的染色として、type I・II collagen に対する抗体を用いて染色した。軟骨損傷の評価に Mankin' s score を用いた。移植腱の軟骨化を Safranin O 染色を用いてスコアリングした。また対象として正常膝群・内側半月板切除群も作成し、同様に評価した。

C. 研究結果

①ACL 再建術後 2 ヶ月の組織切片面の肉眼像では BMP+群で母床骨と同様の組織が骨孔内を占拠していた。組織像にて移植骨と大腿骨および移植骨と脛骨は骨癒合しており、正常組織に近い様相を呈していた。一方、BMP-群では CT 同様、骨孔内

に移植腱が存在し、その周りに骨増殖が見られた。トルイジンブルー染色の強拡大像では、4 層構造が確認され、一部にタイドマークの出現も見られたことから組織学的には enthesi 構造が保たれていたと考えられる。術後 4 週、8 週において破断強度は BMP 群で有意に強く、stiffness においても新生 BTB を用いた前十字靱帯再建術は機能的にも優れていると考えられた。

以上から、我々が用いた方法では腱を直接骨化させ、膝蓋腱のごとくの組織を新生することによって、より正常に近似した組織学的な再建が出来ると考えられた。

②術後 4 週・8 週ともに、Low-dose 群では関節軟骨の変性は内側半月板切除群と比べ軽度であった。また rhBMP (-) 群と比較して、移植腱が軟骨化していた。一方、High-dose 群は術後 8 週において移植腱の一部が骨化しており、関節軟骨変性も進行した。rhBMP-2 を腱に注入することで半月板様組織を呈する一方、高濃度であれば骨化まで誘導された。臨床においては BMP の至適量の検索が必要と考えられた。関節軟骨変性は Low-dose 群で半月板切除群に比し軽度であり、正常と類似した半月板の再建は軟骨変性を抑制する可能性が示唆された。

D. 考察

膝 OA の病因に靱帯損傷、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。現在、靱帯・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的とした。

今回行った研究によって、

①生理的 entheses 再生が動物レベルで可能となった。この技術を応用することでより正常構造に近い生理的組織構造を有した靭帯再建術が行われることが期待できる。その一方、今回の方法では 2 期的手術を余儀なく行う必要があり、臨床応用において患者に対する侵襲の大きさから一つの関門となりうる。以上から、1 期的な再建技術の確立が必要と考えられる。また今回の研究では家兎を用いていることから、より臨床応用に向けて大型動物を使用した研究が必要と考えられる

②関節内環境によって移植腱の腱内軟骨化が生じ、組織学的に半月板様組織の再生が確認できた。一方、BMP の量が多くなると骨化まで誘導され、関節軟骨変性を助長する可能性が示唆された。今後至適な BMP 量を確認する必要があると考えられた。また骨化抑制物質等の追加投与によって、より類似した半月板組織再生を研究する必要があると考えられる。また長期モデルにおける軟骨変性抑制効果を確認する必要がある。

E. 結論

①rhBMP を用いることによって腱を直接骨化させ、膝蓋腱のごとくのエンテシス組織を新生することが動物実験レベルで可能となった。これを用いることで、ドナー部

位の短所を補い、かつ、より正常に近似した組織学的な再建が出来ると考えられた。

②rhBMP を用いた腱内注入によって、関節外では骨化まで誘導されてしまうが、関節内内環境では軟骨化で維持され、半月板様組織再建が動物実験レベルで可能となった。この手法を用いることによって関節軟骨変性抑制手術の可能性が広がった。

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, Hoshino M, Egi T, Terai H, Namikawa T, Kato M, Hashimoto Y, Takaoka K.J Biomed Mater Res A. 2009 Aug;90(2):514-21 Repair of long intercalated rib defects in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate.

2, K.Fukunaga, A.Kobayashi,Y.Minoda,Iwaki,Y. Hashimoto, K.Takaoka. J Bone Joint Surg Br2009;91-B:463-8.The incidence of the patellar clunk syndrome in a recently designed mobile-bearing posteriorly stabilised total knee replacement

3,Takayama K, Suzuki A, Manaka T, Taguchi S, Hashimoto Y, Imai Y, Wakitani S, Takaoka K. J Bone Miner Metab.2009;27(4):402-11 RNA interference for noggin enhances the biological activity of bone morphogenetic proteins in vivo and in vitro.

4,Iwakiri K, Minoda Y, Kobayashi A, Sugama R, Iwaki H, Inori F, Hashimoto Y, Ohashi H, Ohta Y, Fukunaga K, Takaoka K.J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Jul

27;91B(2):799-804

In vivo comparison of wear particles between highly crosslinked polyethylene and conventional polyethylene in the same design of total knee arthroplasties.

5, Wakitani S, Okabe T, Kawaguchi A, Nawata M, Hashimoto Y. Rheumatology (Oxford). 2010 Jan;49(1):57-62. Highly sensitive ELISA for determining serum keratan sulphate levels in the diagnosis of OA.

6, Eguchi Y, Wakitani S, Imai Y, Naka Y, Hashimoto Y, Nakamura H, Takaoka K. J Bone Miner Metab. 2009 Oct 29. [Epub ahead of print] Antitumor necrotic factor agent promotes BMP-2-induced ectopic bone formation.

7, 瀧上順誠、橋本祐介、山崎真哉、島崎朗、中田信昭、高岡邦夫 関節鏡 34 : 294-298, 2009

半月板損傷および軟骨損傷診断における Helical CT Arthrography の有用性 -MRI と比較して-

8, 山崎真哉、橋本祐介、瀧上順誠、島崎朗、中田信昭、高岡邦夫. 膝 31 巻 243-246. 2009 CT arthrography を用いた変形性関節症の軟骨および骨硬化病変の検討

2. 学会発表

1, Nishikino, S; Hashimoto, Y; Hara, Y; Minoda, Y; Iwaki, H ; Nakamura, H .55th ORS

Anatomical and Computed Tomographic analysis of the Femoral Attachment of the Posterior Cruciate Ligament

2, Hashimoto Y , Tomihara H , Yamazaki S Takigami J , Nishikino S , Takaoka K 7th biennial ISAKOS congress Anatomical and

Computed Tomographic analysis of Femoral Attachment of Anterior Cruciate Ligament.

3, 箕田行秀、小林章郎、岩城啓好、池渕充彦、福永健治、飯田高広、渭川徹秀、栲史明、橋本祐介、高岡邦夫

第 82 回日本整形外科学会学術集会 2009 Mobile bearing PS 型人工膝関節は大腿骨コンポーネント周囲の骨密度減少を低減する

4, 渭川徹秀、池渕充彦、飯田高広、福永健治、箕田行秀、橋本祐介、岩城啓好、高岡邦夫 第 82 回日本整形外科学会学術集会 2009 人工股関節置換術後のインプラント間におけるステム周囲の骨量変化

5, 谷内政俊、富原朋弘、吉田玄、橋本祐介、金田国一、松浦健司、佐竹信爾、青木大輔、島田永和 第 82 回日本整形外科学会学術集会 2009 ACL2 ルート再建術後のスポーツ復帰

6, 橋本 祐介、富原朋弘、吉田玄、島田永和 第 1 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2009 前十字靱帯 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

7, 富原朋弘、吉田玄、金田国一、松浦健司、佐竹信爾、青木大輔、谷内政俊、榎孝俊、松田淑伸、近藤幹大、島田永和、橋本祐介 第 1 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2009 ACL 2 重束再建術における脛骨側骨孔位置の影響

8, 原庸、橋本祐介、錦野匠一、瀧上順誠、中村博亮 第 1 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2009 屍体膝を用いた前十字靱帯脛骨付着部の検討 -Parsons' knob と付着部骨梁に着目して-

9, 瀧上順誠、橋本祐介、原庸、山崎真哉、
錦野匠一、中村博亮、高岡邦夫

第 1 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2009 屍体膝を用いた線維方向スライスによる前十字靱帯脛骨付着部の検討

10, 錦野匠一、橋本祐介、瀧上順誠、原庸、
岩城啓好、高岡邦夫、中村博亮 第 1 回日本
関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2009
屍体膝を用いた後十字靱帯大腿骨側付着部
の検討

11, 近藤幹大、富原朋弘、吉田玄、島田永
和、橋本祐介 第 1 回日本関節鏡・膝・ス
ポーツ整形外科学会 2009 2 ルート ACL 再
建術における CT による骨孔隔壁の経時的
変化

12, 橋本祐介、仲哲史、福永健治、高岡邦
夫 第 16 回 BMP 研究会 2009 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

13, 仲哲史、橋本祐介、高岡邦夫 第 16 回
BMP 研究会 2009 rhBMP を用いた自家腱
移植による半月板再生

14, 橋本祐介、仲哲史、福永健治、中村博
亮、高岡邦夫 第 35 回日本整形外科スポー
ツ医学会 2009 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

15, 原庸、橋本祐介、錦野匠一、瀧上順誠、
中村博亮 第 35 回日本整形外科スポーツ
医学会 2009 屍体膝を用いた前十字靱帯脛
骨付着部の検討—Parsons' knob と付着部
骨梁に着目して—

16, 錦野匠一、橋本祐介、瀧上順誠、原庸、
岩城啓好、高岡邦夫、中村博亮
第 35 日本整形外科スポーツ医学会 2009
屍体膝を用いた後十字靱帯大腿骨側付着部

の検討

17, 古川枝里子、橋本祐介、錦野匠一、西
田洋平、中村博亮 第 35 回日本整形外科ス
ポーツ医学会 2009 スポーツ医学サークル
立ち上げ経緯と活動紹介

18, 松浦健司、橋本祐介、吉田玄、金田国
一、富原朋弘、佐竹信爾、島田永和
第 35 回日本整形外科スポーツ医学会 2009
分離期前期の肘上腕骨小頭離断性骨軟骨炎
に対する手術治療成績

19, 橋本祐介、吉田玄、豊田宏光、仲哲史、
中村博亮、高岡邦夫 第 24 回日本整形外科学
会基礎学術集会 2009 BMP を用いた骨と
靱帯結合部（エンテシス）の再生とその
臨床応用の可能性

20, 仲哲史、橋本祐介、中村博亮、高岡邦
夫 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集
会 2009 rhBMP-2 を用いた半月板再建術に
よる関節軟骨変性抑制効果

21, 江口佳孝、脇谷滋之、今井祐記、仲哲
史、橋本祐介、中村博亮、高岡邦夫 第 24
回日本整形外科学会基礎学術集会 2009 抗
TNF 阻害剤は BMP-2 異所性骨形成能を促進
する

22, 奥平修三、橋本祐介、中田研 第 20
回日本臨床スポーツ医学会 2009 テニス関
西ジュニアトップ選手(14 才以下)の身体特
性

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

BMPを用いた人工骨腱骨の再生技術の確立とそれを用いた
臨床応用モデルでの前十字靭帯再建術での評価

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な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。

再生された骨靭帯結合部を自家移植材料に用いた前十字靭帯再建モデルの確立

前年度の研究により至適化された条件である rhBMP (15ug) を 2 箇所家兎半腱様筋腱に注入した。注入 6 週後にその Bone-Tendon-Bone 複合体を使用して ACL 再建術を行った (BMP+群)。2 ヶ月で組織採取した。X-P、CT、H-E 染色、Toluidine Blue 染色で enthesis 構造の再現と骨癒合を検索した。力学試験機を用いて引き抜き試験を行い、最大破断強度、stiffness を測定した。PBS 注入群をコントロールとした (BMP-群)。ACL 再建術後 2 ヶ月の組織切片面の肉眼像では BMP+群で母床骨と同様の組織が骨孔内を占拠していた。組織像にて移植骨と大腿骨および移植骨と脛骨は骨癒合しており、正常組織に近い様相を呈していた。一方、BMP-群では CT 同様、骨孔内に移植腱が存在し、その周りに骨増殖が見られた。トルイジンブルー染色の強拡大像では、4 層構造が確認され、一部にタイドマークの出現も見られたことから組織学的には enthesis 構造が保たれていたと考えられる。術後 4 週、8 週において破断強度は BMP 群で有意に強く、stiffness においても新生 BTB を用いた前十字靭帯再建術は機能的にも優れていると考えられた。以上から、我々が用いた方法では腱を直接骨化させ、膝蓋腱のごとくの組織を新生することによって、より正常に近似した組織学的な再建が出来ると考えられた。

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。その発生過程は腱附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靱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、十字靱帯再建手術後の骨孔拡大や再建靱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な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、靱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、靱帯とコラーゲン繊維を腱、靱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 週間後から靱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、骨靱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靱帯再建技術を開発するための研究である。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

再生された骨靭帯結合部を自家移植材料に用いた前十字靭帯再建モデルの確立

前年度の研究により至適化された条件である rhBMP (15ug) を 2 箇所家兎半腱様筋腱に注入した (図 1)。

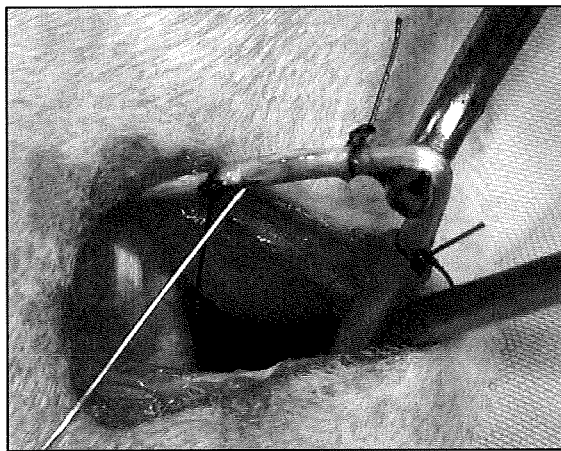


図 1: 腱に 4 箇所、rhBMP が骨予定の部分からもれないように、3-0 ナイロンで結さつし、骨予定腱部に rhBMP を 15ug 注入した。

注入後 6 週後にその Bone-Tendon-Bone 複合体を使用して ACL 再建術を行った (BMP + 群)。レントゲンにて異所性骨化形成を確認後、半腱様筋腱を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 2.8mm のドリルで骨孔を作成する。あらかじめ採取した骨付き移植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金属性ワイヤーを結びつけることで固定した。靭帯再

建術後 4, 8 週で屠殺し、組織採取した (図 2)。

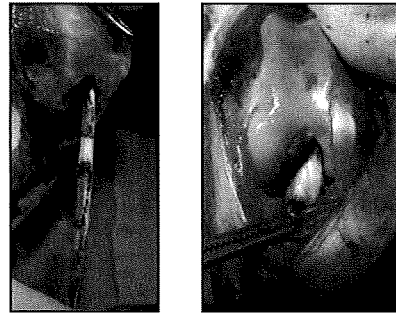


図 2: 再生骨—腱—骨移植腱を用いた靭帯再建術
骨孔を作成し、骨孔を通して移植腱を固定する

X-P、CT、H-E 染色、Toluidine Blue 染色で entheses 構造の再現と骨癒合を検索した。力学試験機を用いて引き抜き試験を行い、最大破断強度 (N)、stiffness (N/mm) を測定した (図 3)。

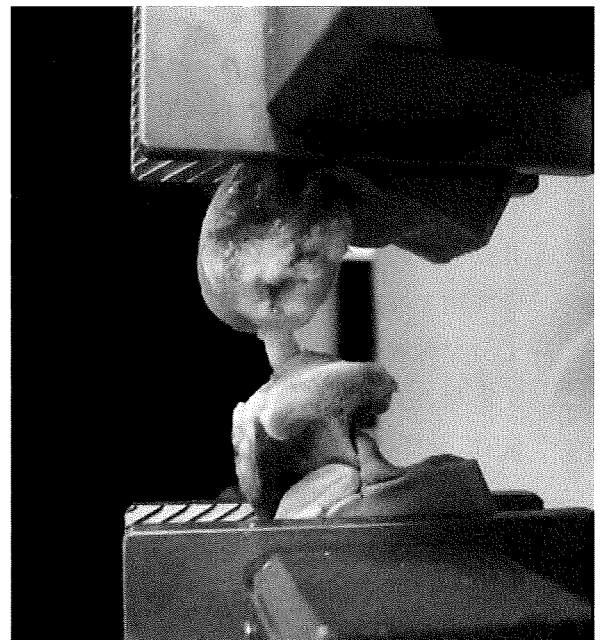


図 3: 力学試験機による引っ張り試験
大腿骨、脛骨を骨セメントで固定し、専用把持器をもちいて引っ張り試験を行った

PBS 注入後の移植腱を用いた前十字靭帯再建術群をコントロールとした（BMP-群）。

C. 研究結果

①ACL 再建術後 2 ヶ月の CT 像では BMP+ 群で骨孔部分に移植骨化部分が占拠されており、移植骨と大腿骨および移植骨と脛骨は骨癒合しており、正常組織に近い様相を呈していた（図 4）。組織切片面の肉眼像では BMP+ 群で母床骨と同様の組織が骨孔内を占拠していた。

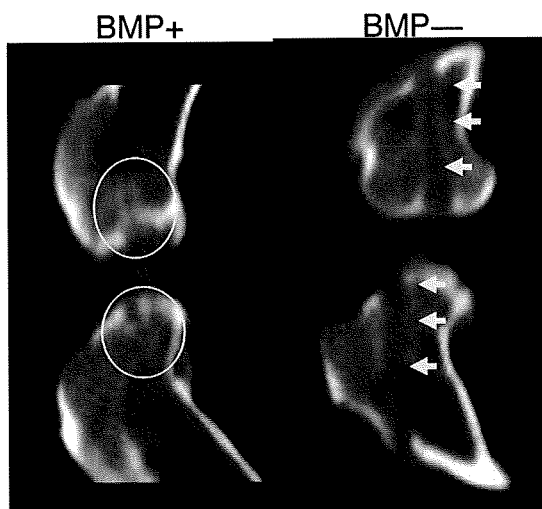


図 4: 靭帯再建膝の CT 画像

BMP+ 群では移植腱の骨化部分が母床骨と癒合している（丸印）

BMP- 群では骨孔は残存し、骨硬化が見られる（矢印）

一方、BMP- 群では CT 同様、骨孔内に移植腱が存在し、その周囲に骨増殖が見られた（図 5）。H-E 染色組織像では、CT と同様に、BMP+ 群では母床骨と移植骨が骨癒合しており、正常組織に類似している一方、BMP- 群では骨孔には腱が残存していた（図

6）。

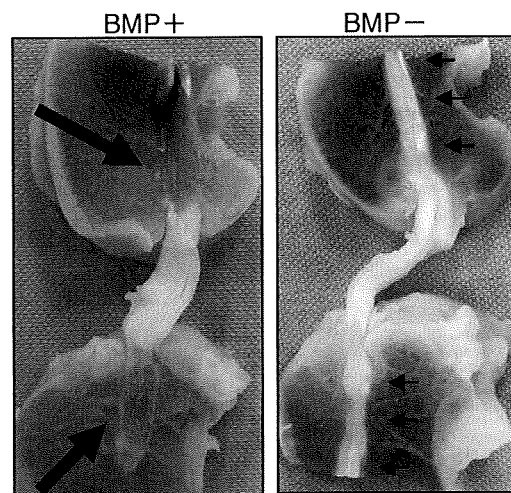


図 5: 靭帯再建膝の組織切片面の肉眼像

BMP+ 群では移植腱の骨化部分が母床骨と癒合している（太い矢印）

BMP- 群では骨孔は残存し、骨孔内に移植腱が残存する（矢印）

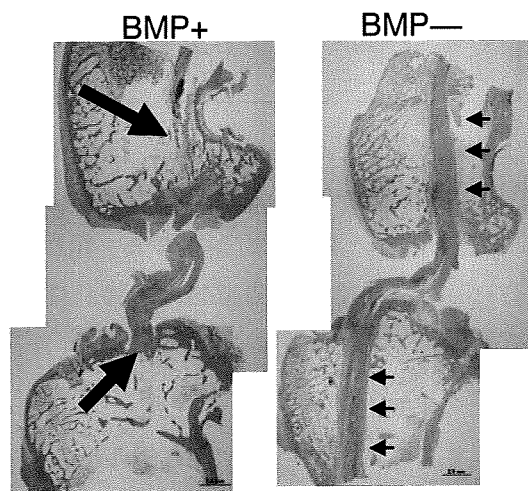


図 6: 靭帯再建膝の H-E 染色組織像

BMP+ 群では移植腱の骨化部分が母床骨と癒合している（太い矢印）

BMP- 群では骨孔内に移植腱が残存し、移植腱の周囲には骨硬化像を呈する（矢印）

トルイジンブルー染色の強拡大像では4層構造が確認され、一部にタイドマークの出現も見られたことから組織学的には enthesis 構造が保たれていたと考えられる (図7)。

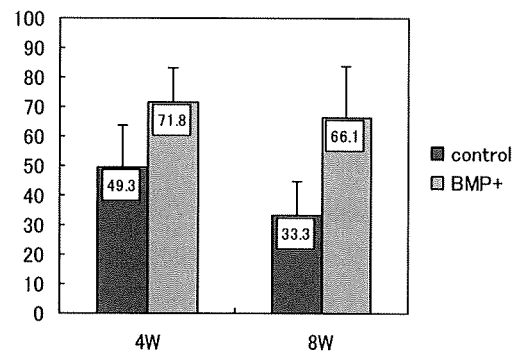


図7: 靱帯再建膝の移植腱骨以降部の強拡大像

BMP+群において、移植腱骨以降部において、エンテシス構造は保存されている。一部ではタイドマークも出現していた。(矢印)

力学試験結果において、術後4週、8週において破断強度はBMP群で有意に強く、stiffnessにおいても新生BTBを用いた前十字靱帯再建術は機能的にも優れていると考えられた (図8)。

Load to failure(N)



Stiffness(N/mm)

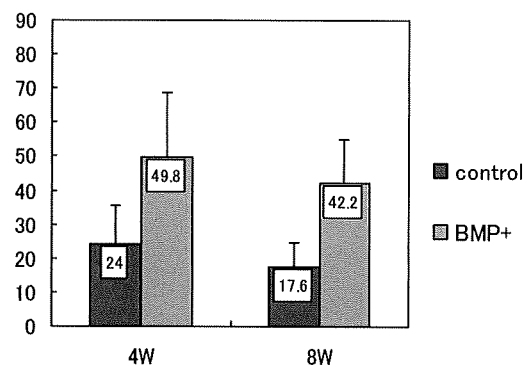


図8: 力学試験 (最大破断強度、stiffness)

4週、8週ともにBMP+群において、BMP-群よりも最大破断、stiffnessに有意に強度を保っていた。

以上から、我々が用いた方法では腱を直接骨化させ、膝蓋腱のごとく組織を新生することによって、より正常に近似した組織学的な再建が出来ると考えられた。

D. 考察

今回の手法を用いることによって生理的 enthesis 再生が動物レベルで可能となった。この技術を応用することでより正常構造に近い生理的組織構造を有した靱

帯再建術が行われることが期待できる。
 その一方、この方法では 2 期的手術を余儀なく行う必要があり、臨床応用において患者に対する侵襲の大きさから一つの関門となりうる。以上から、1 期的な再建技術の確立が必要と考えられる。また今回の研究では家兎を用いていることから、より臨床応用に向けて大型動物を使用した研究が必要と考えられる

E. 結論

①rhBMP を用いることによって腱を直接骨化させ、膝蓋腱のごとくのエンテース組織を新生することが動物実験レベルで可能となった。これを用いることで、ドナー部位の短所を補い、かつ、より正常に近似した組織学的な再建が出来ると考えられた。

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) 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
- 2) 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* 27:402-411,2009
- 3) 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 18:505-512,2009.

- 4) Tokumitsu A, Wakitani S, Takagi M. Noninvasive estimation of cell cycle phase and proliferation rate of human mesenchymal stem cells by phase-shifting laser microscopy. *Cytotechnology* E-pub on Aug 20, 59:161-167,2009
- 5) Kawaguchi A, Nakaya H, Okabe T, Tensho K, Nawata M, Eguchi Y, Imai Y, Takaoka K, Wakitani S. Blocking of tumor necrosis factor promotes natural repair of osteochondral defects in rabbit knee. *Acta Orthop* 80:606-611,2009
- 6) Tokuhara Y, Wakitani S, Oda Y, Kaneshiro Y, Masada T, Kim M, Kadoya Y, Azuma T, Takaoka K. Low levels of steroid-metabolizing hepatic enzyme (Cytochrome P450 3A) activity may elevate responsiveness to steroids and may increase risk of steroid-induced osteonecrosis even with low glucocorticoid dose. *J Orthop Sci* 14:794-800,2009
- 7) Dohzono S, Imai Y, Nakamura H, Wakitani S, Takaoka K. Successful spinal fusion by E.coli derived BMP-2-adsorbed porous β -TCP granules. *Clin Orthop* 467:3206-3212,2009.
- 8) Tokuhara Y, Wakitani S, Imai Y, Kawaguchi A, Fukunaga K, Takaoka K. Repair of experimental large osteochondral defect in rabbit knee by various concentration of E. coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Int Orthop* E-pub on Jun16.
- 9) Tokuhara Y, Wakitani S, Nomura C, Hoshino M, Imai Y, Takaoka K. Local delivery of rolipram, a phosphodiesterase 4 specific

inhibitor, augments bone morphogenetic protein-induced bone formation. J Bone Mineral Metab 28:17-24,2010 (E-pub on Jun 25,2009).

10) Han DW, Bae JY, Matsumura K, Wakitani S, Nawata M, Hyon SH. Non-frozen preservation of articular cartilage by epigallocatechin-3-gallate reversibly regulating cell cycle and NF- κ B expression. Tissue Engineering Part A E-pub on Sep 8.

11) Eguchi Y, Imai Y, Naka Y, Hashimoto Y, Nakamura H, Takaoka K, Wakitani S. Anti-tumor necrotic factor agent promotes BMP-2-induced ectopic bone formation. J Bone Mineral Metab E-pub on Nov 1.

12) 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

13) 中嶋勝己、金澤秀和、高木睦、脇谷滋之、稲木誠. Mini review 接着系細胞の細胞自動培養装置の開発. Inflammation and regeneration 29:131-134, 2009

14) 脇谷滋之. 膝関節軟骨：コラーゲングルに包埋した骨髄間葉系細胞移植による関節軟骨欠損修復. 田畑泰彦編、遺伝子医学MOOK13、患者までとどいている再生誘導治療. バイオマテリアル、生体シグナル因子、細胞を利用した患者のための再生医療の実際. pp278-281、メディカルドウ、大阪、2009

15) 脇谷滋之. バイオ軟骨—臨床的な有効性の評価—. 土屋利江編、新材料・新素材シリーズ、医療材料・医療器械—その安全性と生体適合性への取り組み— Bio

materials and medical devices ? approach to the safety and bio compatibility-.

pp167-171、シーエムシー出版、東京、2009

16) 中村美どり、宇田川信之、上松隆司、下平滋隆、田原秀晃、脇谷滋之. ヒト自己培養骨髄間葉系細胞移植を用いた歯槽骨再生の可能性. The Bone 23(3):303-309, 2009

17) 清水孝志、堀部秀二、米谷泰一、田中美成、塩崎嘉樹、脇谷滋之、服部耕治. 膝関節骨軟骨病変に対する超音波プローブを用いた関節鏡視下評価. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 30:57-62, 2009

18) 迫田秀行、石川格、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高密度架橋ポリエチレンの疲労特性評価. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 30:263-268, 2009

19) 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 第二報 人工股関節. 日本臨床バイオメカニクス学会誌 30:319-323, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

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 寺井 秀富 講師

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。

BMPを用いた半月板再建術方法の確立と組織学的評価

前年度の研究により、1期的な組織学的半月板再建術を施行した。内側半月板切除後、1期的に移植腱の関節部分のみに rhBMP-2 溶液 10ul を注入した家兎半腱様筋腱を関節内に移植した。rhBMP-2 の使用量により r h BMP (-) 群・Low-dose 群 (1ug)・High-dose 群 (5ug) とした。術後 4 週・8 週にて組織採取し、soft X ray、H-E 染色、Toluidine Blue 染色・Safranin O 染色を行った。免疫学的染色として、type I・II collagen に対する抗体を用いて染色した。軟骨損傷の評価に Mankin's score を用いた。移植腱の軟骨化を Safranin O 染色を用いてスコアリングした。また対象として正常膝群・内側半月板切除群も作成し、同様に評価した。術後 4 週・8 週ともに、Low-dose 群では関節軟骨の変性は内側半月板切除群と比べ軽度であった。また r h BMP (-) 群と比較して、移植腱が軟骨化していた。一方、High-dose 群は術後 8 週において移植腱の一部が骨化しており、関節軟骨変性も進行した。rhBMP-2 を腱に注入すると局所的に軟骨細胞が多数出現することで半月板様組織を呈する一方、高濃度であれば骨化まで誘導された。臨床においては BMP の至適量の検索が必要と考えられた。関節軟骨変性は Low-dose 群で半月板切除群に比し軽度であり、正常と類似した半月板の再建は軟骨変性を抑制する可能性が示唆された。

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sccafold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

前年度の研究により、1 期的な組織学的半月板再建術を施行した。内側半月板切除後、1 期的に移植腱の関節部分のみに rhBMP-2 溶液を注入した家兎半腱様筋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と

とで関節内に移植した。rhBMP-2 の使用量により rhBMP (-) 群・0.1ug 群、1ug 群、5ug 群とした (図 1)。

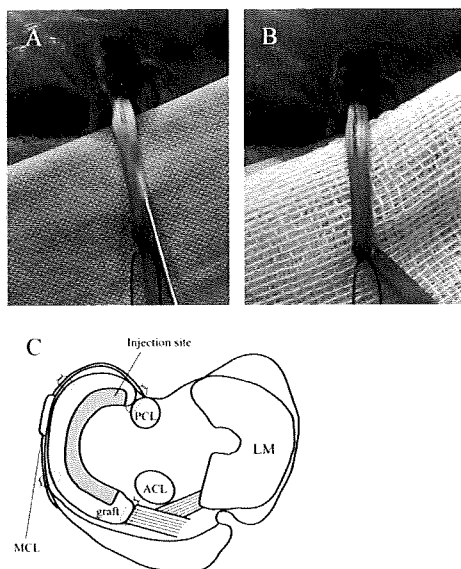


図 1.A,B:半腱様筋腱に 29G 針を用いて rhBMP 溶液を腱の半分に注入した。
C:注入側を関節内になるように注入腱を用いて半月再建術を施行した。

術後 4 週・8 週にて組織採取し、soft X ray、H-E 染色、Toluidine Blue 染色・Safranin O 染色を行った。免疫学的染色として、type I・II collagen に対する抗体を用いて染色した。軟骨損傷の評価に Mankin' s score を用いた。移植腱の軟骨化を Safranin O 染色を用いてスコアリングした。また対象として正常膝群・内側半月板切除群も作成し、同様に評価した。

C. 研究結果

術後組織の肉眼像は rhBMP (-) 群・0.1ug 群では再建半月板は柔らかく、1ug 群では弾力性があった。一方 5ug 群では一部骨化が見られた (図 2)。

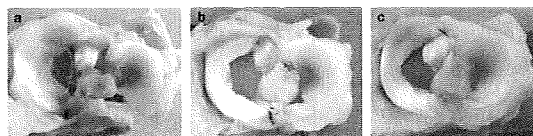


図 2.術後 8 週の肉眼像

a:BMP0ug 群,b:BMP1ug 群 c:BMP5ug 群

軟 X 線では、正面像で半月板を中心部と辺縁部に分類し、それぞれの石灰化の有無を調べたところ、辺縁部では術後 4 週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群では石灰化なかったが、1ug 群で 12.5%、5ug 群で 50%の石灰化が存在した。術後 8 週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群には石灰化は存在しなかったが、1ug 群で 12.5%、5ug 群で 100%存在した。一方、中心部では、石灰化を認めたものはなかった (図 3)。

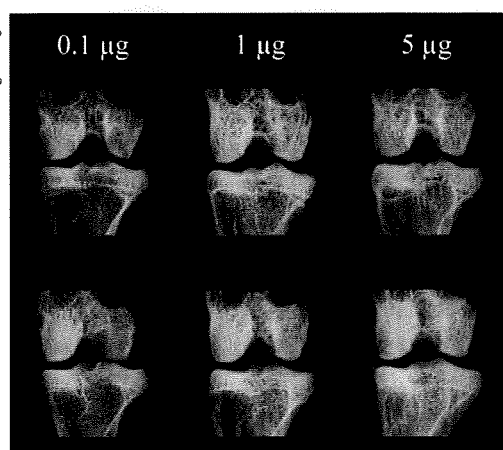
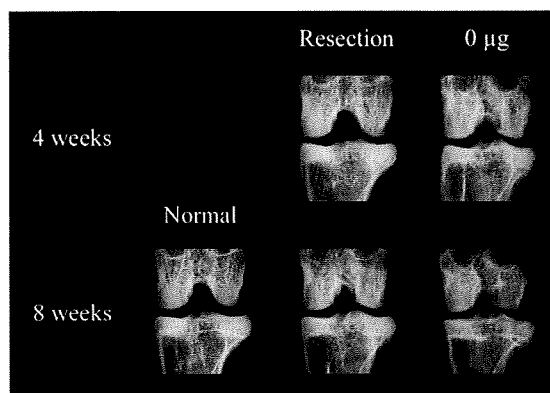


図 3:各 dose での軟 X 線写真。

High-dose 群の 8 週において全例に石灰化が見られた。

組織学的評価では、術後4週で1ug群、5ug群に toluidine blue で異染性を認めた。強拡大では、異染性を認める領域に卵円形を示す軟骨細胞が出現していた。rhBMP (-) 群・0.1ug 群において異染性は認められなかった。8週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群には依然と異染性は認められないが、1ug 群、5ug 群の graft 部分の異染性は異染性を示す領域が拡大していた。強拡大でみると、関節包側の一部分に骨化部分があったが、中心部では異染性の増強を認めた (図4)。

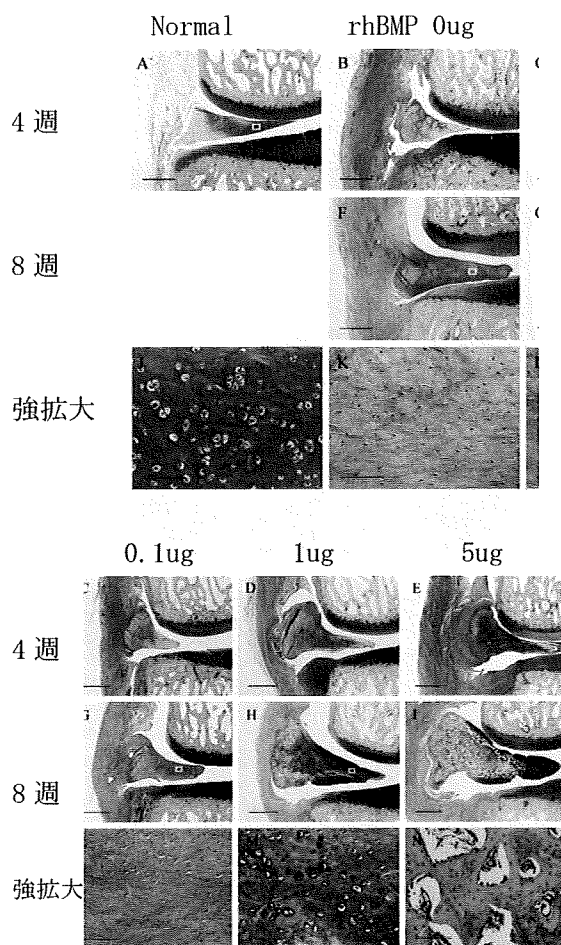


図4: 各 dose 群における toluidine blue 染色写真

type1・2 コラーゲンに対する免疫染色を行ったところ、正常では type1 コラーゲンが辺縁部～中心部にかけて染色される。術後4週では各 dose 群で type1 コラーゲンが全体的に染色されていた。術後8週では 1ug 群、5ug 群で関節中心部での染色性の低下が見られた (図5)。

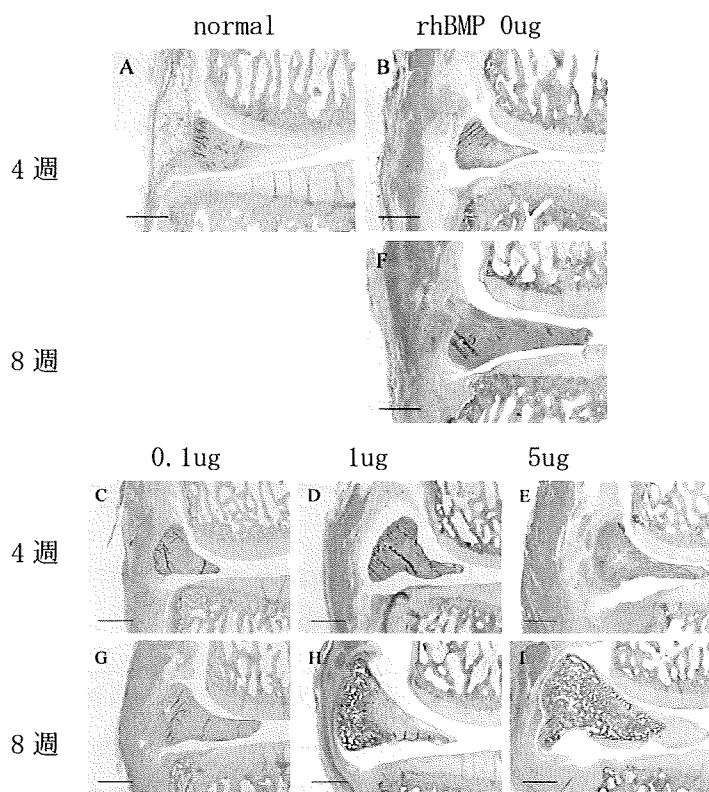


図5: 各 dose 群における type1 コラーゲン免疫染色写真

type2 コラーゲン染色において、正常では関節中心部が染色されている。術後4週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群では染色性がなかったが、1ug 群、5ug 群においては関節中心部に中心に染色性が認められた。術後8週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群において4週と同様に染色性が認められなかったが、1ug 群で関節中心部に染色性が認められ正常に近い染色性があった。5ug 群は表層中心に染色性が認

められた (図6)。

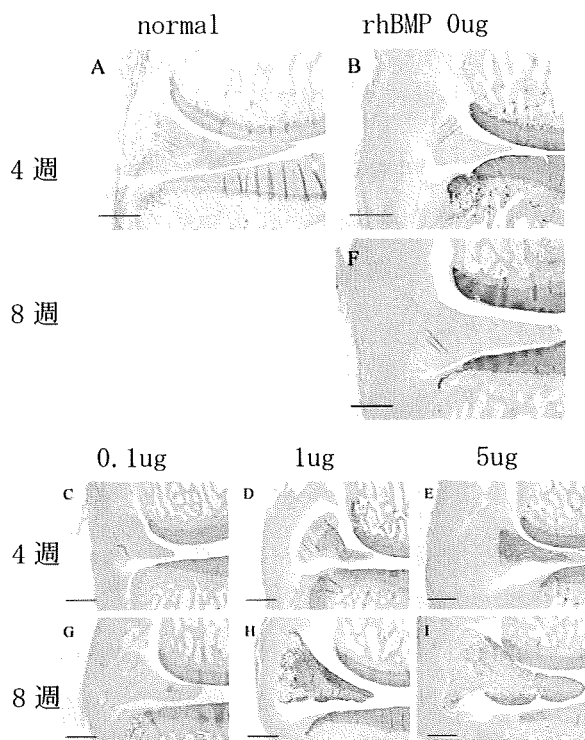


図6: 各 dose 群における type2 コラーゲン免疫染色写真

Safranin O 染色において、正常では関節中心部の無血行野が染色されている。術後4週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群では染色性がなかったが、1ug 群、5ug 群において移植腱内に染色性が認められた。術後8週では rhBMP (-) 群・0.1ug 群において4週と同様に染色性が認められなかったが、1ug 群で関節中心部に染色性が認められ正常に近い染色性があった。5ug 群は表層中心に強い染色性が認められた (図7)。

移植腱の軟骨化スコアリングでは BMP (-) 群 1ug 群、0.1ug 群と比較し 5ug 群において4週、8週いずれにおいても有意に移植腱が軟骨化していた (図8)。

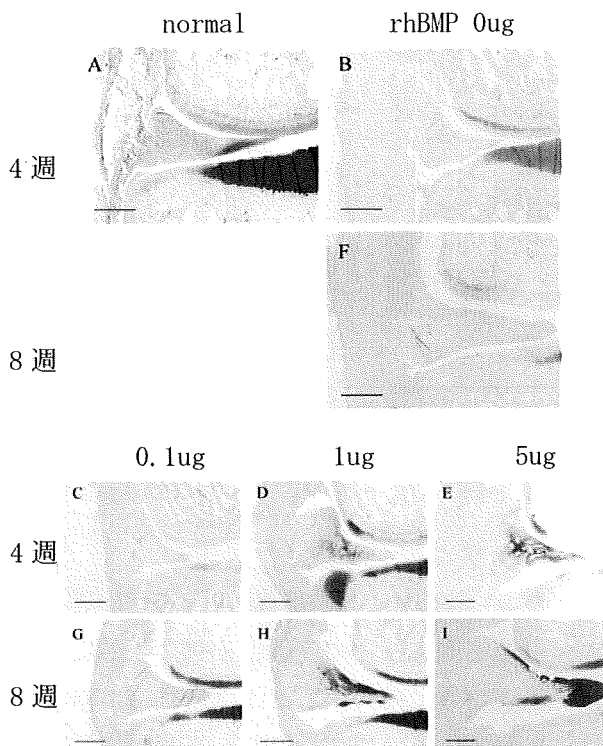


図7: 各 dose 群における Safranin O 染色写真

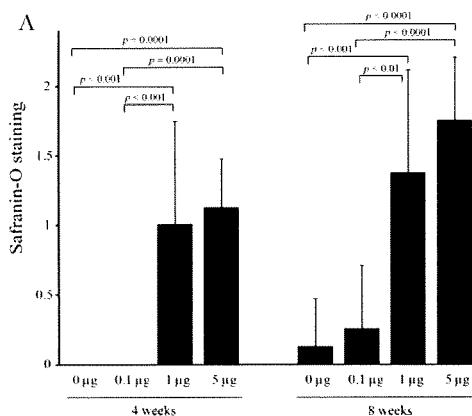


図8: 移植腱の軟骨化スコアリング

軟骨損傷スコアリングでは術後4週・8週ともに、Low-dose 群では関節軟骨の変性は内側半月板切除群と比べ軽度であった。

一方、High-dose 群は術後8週において移植腱の一部が骨化しており、関節軟骨変性