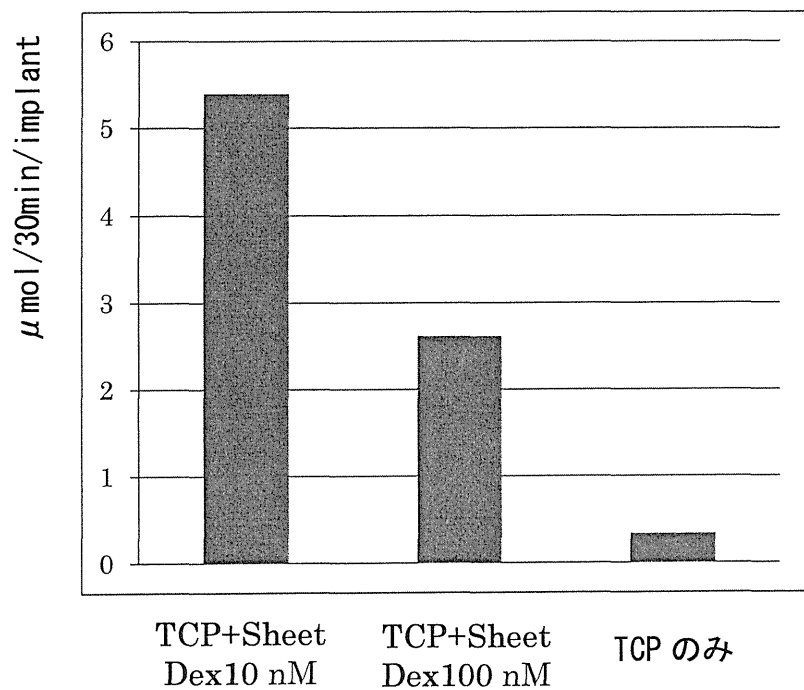
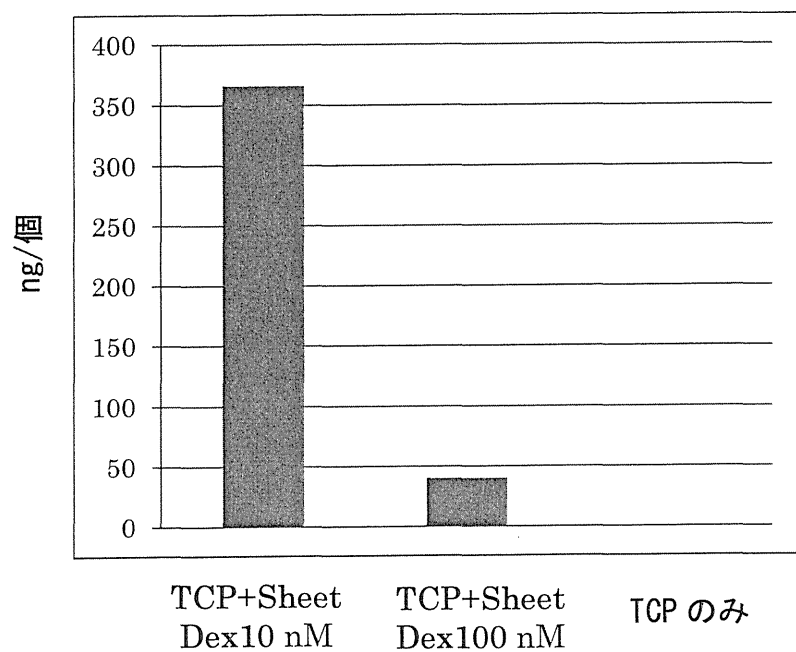


図6 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果（生化学的評価）

A. アルカリフォスファターゼ活性



B. オステオカルシン含有量



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

生体内における細胞シートの骨形成能および細胞シートの注入法

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究分担者 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

我々はこれまでにラットを用いた動物実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で注入移植することで、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」として報告している。本手技は scaffold free で注入を行うため scaffold による弊害がなく、低侵襲で実施でき、既存の治療法に併用できるため、偽関節が完成する前の状態（遷延治癒等）にも早期から応用できる。

本研究ではヒト骨髄間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal stem cells; hMSCs) を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討にて確立した培養条件で作製したヒト細胞シートが、生体内で骨形成が得られるかどうかを検証した。ラットを用いた動物実験で注入による細胞シートの移植法を考案し検証してきたが、ヒト細胞シートを生体内に注入によって移植をすることで骨形成が得られることを検討した。

ヌードラット背部皮下へあらかじめ円盤状人工骨 ( $\beta$ -リン酸 3 カルシウム:  $\beta$ -TCP) を移植しておき、注射器で人工骨の表面へ細胞シートを注入することで、骨形成が得られるかを組織学的に検討した。ヒト細胞シートを注入することにより人工骨の気孔内に骨形成を認めた。これによって、ヒト骨芽細胞シート注入による「注入型骨移植法」が、これまで行ってきた動物細胞と同様に可能であることが示唆された。

今回の検討では、人工骨へヒト細胞シートを注入移植したが、今後は、偽関節部への scaffold free でのヒト骨芽細胞シート注入移植でも骨形成および骨癒合が得られるかの検討も必要である。

A. 研究目的

我々はこれまでに、動物実験により未分化骨髄間葉系幹細胞（以下 MSC）から骨形成能を有する細胞シートを作製する方法を考案している<sup>1-3</sup>。さらに、我々はラットを用いた動物実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で移植し、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」として確立し、報告してきた<sup>4,5</sup>。

本研究課題ではヒト MSC で作製した骨芽細胞シートが生体内で骨形成能を有するのか検証する。H24 年度の本研究課題では、ヒト細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植法の基礎的主義を確立するために、まず免疫不全動物（ヌードラット）の背部皮下に注入移植することにより、異所性に新生骨形成が得られるかを検討することを目的とする。

## B. 研究方法

### B. 1. ヒト骨芽細胞シートの作製方法

本研究で使用したヒトMSCは、Lonza社から購入した市販のヒト骨髄細胞である。ヒトMSC (P3) を T75 フラスコ (75cm<sup>2</sup> culture flask, Falcon, BD) でリバイブ 9 日後、6cm 培養皿 (60 mm ディッシュ; Falcon 35-3002, BD) と 10 cm 培養皿 (100 mm ディッシュ; Falcon 35-3003, BD) にそれぞれ 0.5 × 10<sup>4</sup> cell/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。2 次培養期間中にアスコルビン酸 (VC: 82µg/ml) とデキサメタゾン (Dex) を添加し培養を行った。Dex の濃度は、10 nM と 100 nM の 2 種類の条件とした。3 週間培養を行いコンフルエントに達した後スクレーパー (住友ベークライト MS-93100) を用いてヒト骨芽細胞シートを採取した。

ヒト骨芽細胞シート作製の条件は、本研究課題の分担研究の一つとして検討を行っているが、皮下に細胞シートと人工骨を組み合わせるその骨形成能を検討した結果と相反する傾向が見られないかを本研究でも検討するために、デキサメタゾン濃度をあらためて 2 種類で細胞シートの作製を行い、それぞれ骨形成能を評価した。

### B. 2. ヒト骨芽細胞シート注入法の検討

1ml 注射器にヒトMSCから作製したヒト骨芽細胞シートを吸入しシリンジ内に充填し、0.5ml PBS (Gibco, Invitrogen, USA) を注射器で吸引し細胞シートと混和させた。14G アンギオキャス (内径 1.73 mm 外径 2.1 mm 内針 16G) を注射器に装着し、ヌードラット背部皮下へ刺入する。アンギオキャスの外筒だけ皮膚に刺したまま残し、内針ととも

に注射器をいったん取り除く。内針を注射器から取り外し、皮膚に刺したままの外筒に注射器を装着後、ゆっくりシリンジを加圧し、ヒト骨芽細胞シートを皮下へ注入移植する。

図 1 は、外筒だけ皮膚に刺したまま残したアンギオキャスの外筒内に、注射器を装着しヒト骨芽細胞シートを注入する際の写真である。細胞シートがシリンジ内にとどまることがあるので、PBS を混和させることで、注入するヒト骨芽細胞シートを余ることなく押し出す効果がある。

### B. 3. 注入型骨移植法 (ヒト骨芽細胞シート注入) による人工骨への骨形成能の付与

7 週齢ヌードラット背部皮下へあらかじめ人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 β-リン酸 3 カルシウム β-TCP: ペンタックス社) を移植し、生体内でのヒト骨芽細胞シートによる骨形成の検討を行った。あらかじめ皮下に移植しておいた人工骨に、10 cm 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを注入移植した。

さらに 6cm 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを、1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出し 2 日間ホルマリン固定し、2 日間脱灰後 β-TCP の円盤状面に平行にサンプル中央で組織切片を作製し、H-E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行い、組織学のおよびレントゲン撮影によって骨形成を評価した。

### B. 4. 皮下への注入型骨移植法による骨形成能の評価

一スキャフォールドフリーヒト骨芽細胞シートの注入移植による骨形成能の評価

7 週齢ヌードラット背部皮下へスキヤフォールドフリーで、ヒト骨芽細胞シートの注入移植を行い、生体内でのヒト骨芽細胞シートのみによる骨形成の検討を行った。

## B. 5. 倫理面での配慮

本研究は市販されているヒト骨髓間葉系幹細胞を使用し、作製した骨芽細胞シートはヌードラットに移植しているため、倫理的に問題となることはない。本研究では、ヒト骨髓細胞から作製する骨芽細胞シートは免疫不全動物へ移植して、生体内での骨形成能の評価に用いるため、直接患者あるいは細胞提供者に健康被害が発生することはない。

動物実験に関しては、「動物実験施設利用者説明会」をすでに受講しており、本学の動物実験に関する規約に準じて行った。

## C. 研究結果

### C. 1. レントゲン撮影による骨形成評価

移植後 2 か月目に摘出した人工骨をレントゲン撮影した。レントゲンでは、人工骨はその輪郭がはっきりとしているものの、注入移植した細胞シートによって形成された新生骨によると考えられる人工骨周囲の石灰化像は明らかではなかった (図 2)。

### C. 2. 組織像による新生骨形成の評価

図 3 に移植後 2 カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。細胞播種密度を  $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$  とし、デキサメタゾンの濃度による骨形成の差を比較したが、組織像からは両群 (デキサメタゾン濃

度を 10 nM あるいは 100 nM) に大きな差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。細胞シートの大きさによる比較も行ったが、6cm 培養皿で作製した細胞シートを注入しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた。

## D. 考察

我々はこれまでにラットやラビットの細胞を用いて、骨髓培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その高い骨形成能を利用したいろいろな使用方法の可能性を報告してきた。細胞シートの注入による移植では、皮下のような異所性への移植であっても新生骨形成を認め、細胞シートの高い骨形成能によると考えられる<sup>4, 5</sup>。

また、あらかじめ皮下に移植しておいた人工骨に対し、骨芽細胞シートを注入すると、人工骨周囲に骨形成を認めたことを報告している<sup>5</sup>。

今回、ヒト骨髓細胞で作製した細胞シートを皮下にあらかじめ移植しておいた人工骨周囲に注入し、人工骨気孔内に骨形成が見られた。しかし、人工骨表面には骨形成は見られなかった。これは注入という行為が細胞シート自体にダメージを与えたために、細胞活性の低下を招いた可能性が大きいと考えられ、その結果全体としての骨形成量が減少し、人工骨気孔内のみで骨形成が確認できたのではないかと考えられる。現在は市販の注射針を利用しているが、注射針の径を大きしたものなどを使用した注入方法についても再度検討する必要があると考える。

ほかの理由として継代培養によるヒト MSC の骨形成能の低下の可能性も考えられる。これまでの動物実験での検討では、数代にわたる継代培養を繰り返すことで、骨形成能は著明に低下し

ていた<sup>6</sup>。今後は、継代数が少ないヒト MSC を用いた研究やあらためて市販のヒト骨髄細胞を購入し、細胞ソースを変えて同様の検討をする必要があると考えられる。また、注入移植後2カ月経過してサンプルの摘出を行ったため、形成された骨組織が吸収されてしまった可能性も考えられる。人工骨に対するヒト骨芽細胞シート注入では、2か月後のサンプルでも人工骨内に新生骨形成が認められており、スキャフォールドフリーでの注入移植の影響による可能性も考えられる。本研究課題が目指す「X線透視下注入型骨移植」法は、X線で骨折部・偽関節部を確認して正確にその部位に注入するため、スキャフォールドフリー皮下移植とは条件が異なり、骨折部や偽関節部に存在する自家骨がスキャフォールドとなり注入した骨芽細胞シートが維持され、形成された骨組織も維持されるのではないかと考える。来年度は、この点に着目した検討を実施する予定である。

細胞シートの注射と異なり、細胞浮遊液の注入では、注入された細胞が流出する可能性がある。移植した場にとどまりその後新生骨の形成をもたらす点に関しては、骨芽細胞シートを用いることの有用性を示す点であると考ええる。

今後は scaffold free で偽関節部へ骨芽細胞シートを注入し骨形成が得られるかの検討が必要である。また、新たにヒト骨芽細胞の注入用に太い注射針を作製することも必要ではないかと考えられる。

## E. 研究発表

1. 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 高齢ラットにおける骨芽細胞シートの有用性 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸頭、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13-14日 パシフィコ横浜

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

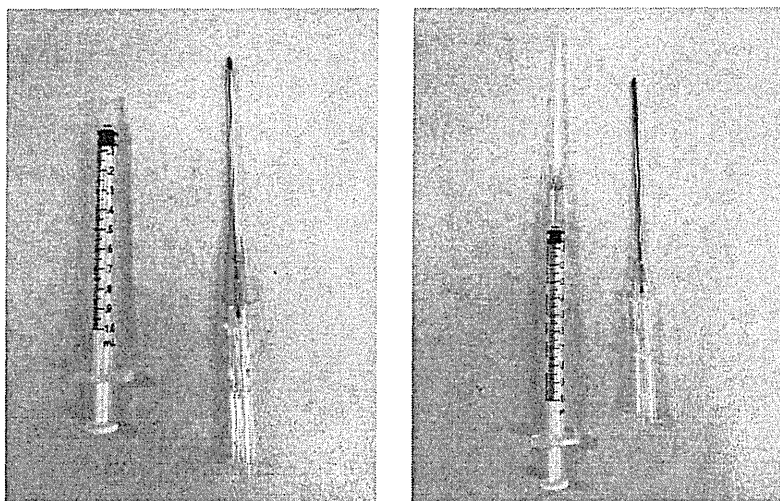
## G. 参考文献

1. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without

- scaffold at an ectopic site-. J Tissue Eng Regen Med. 2(4):196-201, 2008.
2. Hideki Shigematsu, Manabu Akahane, Yoshiko Dohi, Akifumi Nakamura, Hajime Ohgushi, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka. Osteogenic Potential and Histological Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Sheet/Hydroxyapatite Constructs. The Open Tissue Eng Regen Med Journal, 2009 Oct;2: 63-70.
  3. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸颯、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 Orthopaedic Ceramic Implants 2009, 29:15-18
  4. Manabu Akahane, Hideki Shigematsu, Mika Tadokoro, Tomoyuki Ueha, Tomohiro Matsumoto, Yasuaki Tohma, Akira7. Kido, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka : Scaffold-free cell injection results in bone formation. J Tissue Eng Regen Med. 2010; 4: 404-411.
  5. M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu, H. Shigematsu, A. Kido, S. Omokawa, K. Kawate, T. Imamura, Y. Tanaka : Cell Sheet Injection as a Technique of osteogenic Supply. Int J of Stem Cells. Vol. 3, No. 2, 2010.
  6. M. Akahane, T. Ueha, T. Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cell Discovery 2, 133-140, 2012.

図1 ノードラットへ骨芽細胞シート注入移植法

A 骨芽細胞シートの注入に使用した注射針とシリンジ



B ノードラットの背部皮下への注入

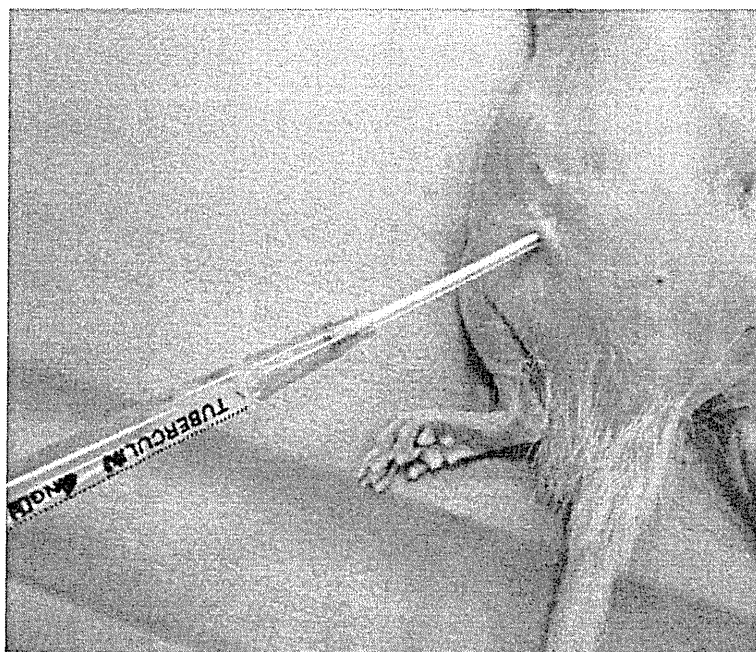
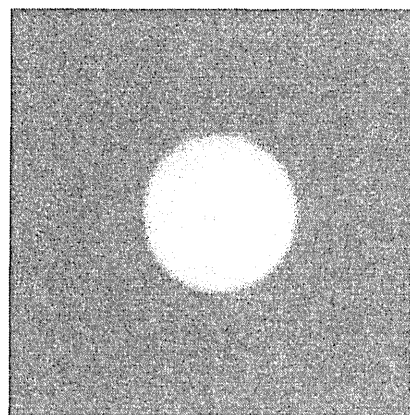
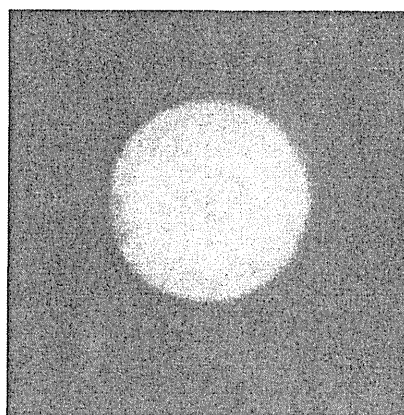


図2 摘出した人工骨のレントゲン写真

A 注入型骨移植を行った摘出人工骨 (10 cm培養皿で細胞シート作製)

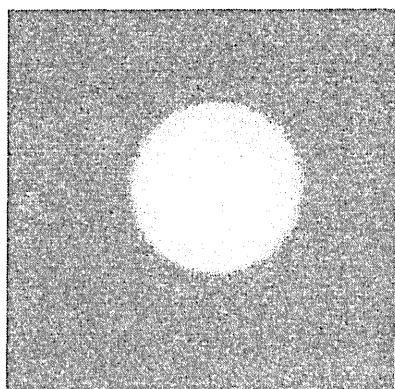


(Dex 100nM)

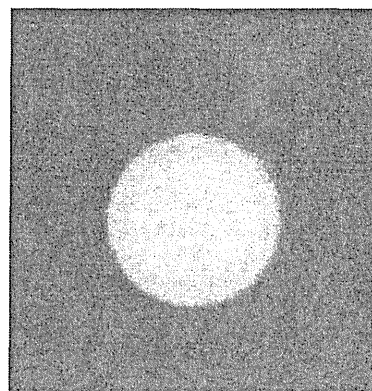


(Dex 10nM)

B 注入型骨移植を行った摘出人工骨 (6cm 培養皿で細胞シート作製)



(Dex 10nM)

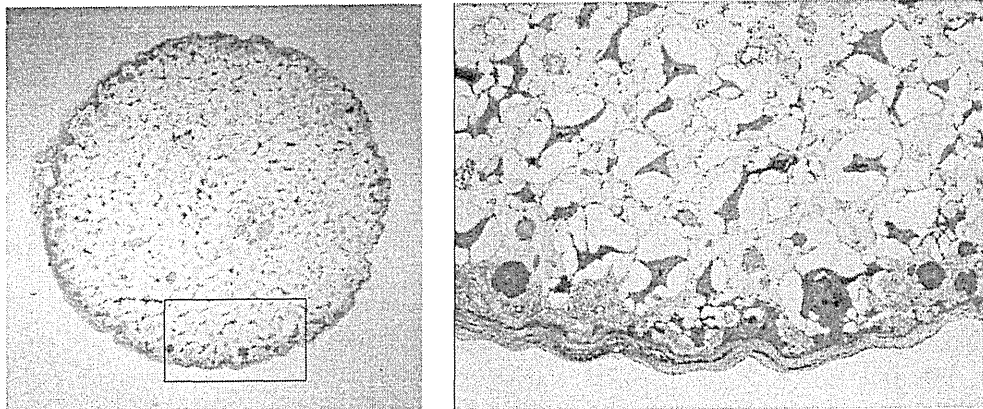


(Dex 100nM)

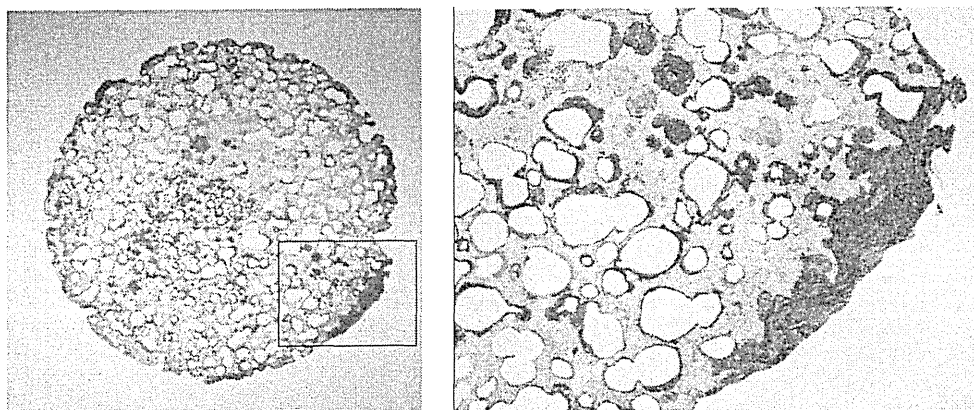


図3 注入移植による細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

A 10 cm細胞シートを注入した人工骨の組織像

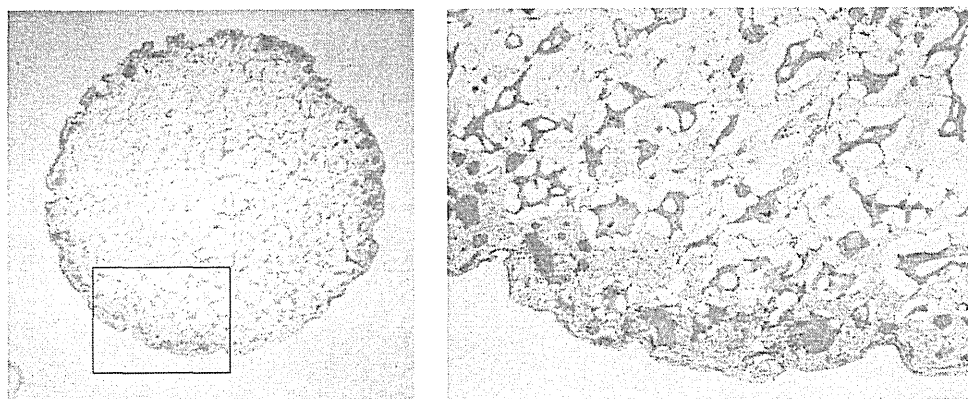


(Dex 10nM で細胞シート作製)

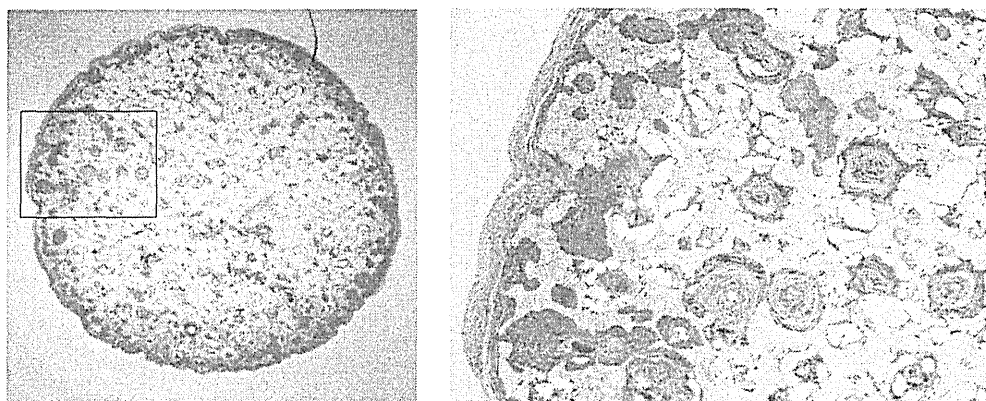


(Dex 100nM で細胞シート作製)

B 6 cm細胞シートを注入した人工骨の組織像



(Dex 10nM で細胞シート作製)



(Dex 100nM で細胞シート作製)

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
研究代表者分・分担研究報告書

ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究分担者 森田有亮 同志社大学 生命医科学部 教授

研究分担者 田中康仁 奈良県立医科大学 整形外科 教授

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向上しているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者のADLは低下し、それに伴いQOLが非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が6cm以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合はliving boneである血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者のADL改善につながり、臨床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨芽細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨芽細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間（本研究では骨切り後12週間）に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨芽細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

A. 研究目的

これまでも実験動物を用いた偽関

節モデルは報告されている。しかし、中・大型の動物が主であり、ラットにおける偽関節モデルは必ずしも十分な

ものが確立されているとは言えない。ヒト骨髄細胞を用いて、硬組織再生の研究、特に偽関節もモデルに対する骨癒合の研究を進めるうえで、免疫不全動物であるヌードラットの偽関節モデルは重要である。ヌードマウスやスキッドマウスも免疫不全動物として広く用いられているが、大腿骨は非常に小さく、骨折や骨壊死のモデルを研究する上では扱いにくい。そこで、本研究では通常のラットとほぼ同じサイズで免疫不全動物であるヌードラットを用いて大腿骨の偽関節モデルを作製することを目的として、実験を行った。

ラット大腿骨偽関節モデルは様々なものが報告されているが、髄内釘を用いた方法は簡便で有用性が高い。偽関節を作製するために骨折部の骨膜の熱処理が一般的に行われているが<sup>1</sup>、個体間で均一な骨膜の熱処理を行うことは手技的に困難である。また、骨折治癒には周囲の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells ; MSCs) が骨芽細胞などに分化し骨癒合を促す必要があるが<sup>2</sup>、このMSCsの供給源として、骨膜<sup>3</sup>、骨髄<sup>4</sup>、周囲の筋肉<sup>5</sup>、周囲の血管<sup>6</sup>などが挙げられる。

骨膜のみを処理するモデルでは、骨膜を除くその他の部位からMSCsが供給される可能性が存在するため、骨折部が経過によって確実に偽関節となるとは言い難く、また実際の臨床で遭遇する骨形成能を失った偽関節にならない可能性も考えられる。

今回我々は、骨膜を熱処理する代わりに、骨膜と周囲の筋肉組織を含めて広範囲に骨折部の軟部組織を切除したうえで、さらに大腿骨骨髄の搔爬を追加する骨折部を作製することで、簡便で再現性の高いヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製を行った。

## B. 研究方法

### B.1. ヌードラット偽関節モデルの作製

本研究では、12週齢の雄ヌードラット (Fischer344ラット; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いた。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入した。大腿骨の骨幹部中央をボーンソーで骨切りした後、大腿骨の転子部から顆部に付着する筋群を骨膜とともに大腿骨から剝離した後、大腿骨から全周性に切除する。さらに大腿骨骨髄も転子部から顆部まで注射針で十分に搔爬、洗浄し、骨折部の固定はK-wire (径0.8mm)を用いた髄内釘固定を行い、これを偽関節群とした (図1)。

一方、健側の大腿骨を対照群とし、両群 n=12 で比較検討を行った。

### B.2. 移植標本の骨形成能の評価

術後4、8、12週でレントゲン画像を撮影し、継時的に骨形成の状態を観察した。

### B.3. 移植標本の骨形成能の評価

骨癒合状態を評価するため、組織像も継時的に評価した。摘出標本は2日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、骨折部が観察できるように大腿骨骨軸に平行にスライスし、中央で組織切片を作製し、H-E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行い組織学的に骨形成の確認を行った。

### B.4. 3点曲げ力学的評価による偽関節の確認

分担研究者・森田が作製したラット用の専用ジグを使用し、評価を行った。

## C. 研究結果

### C.1. レントゲン画像による骨形成の 継時的評価

図 2 に継時的なレントゲン像の結果を示す。偽関節群では、レントゲン画像で骨切り部周囲にわずかな仮骨形成を認めるものの、術後 12 週まで骨性架橋を認めなかった。

### C.2. 組織像

図 3 に、骨切後 4、8、12 週で摘出した大腿骨の組織像を示す。X 線画像と同様に、偽関節群では骨折部の骨性架橋を認めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後 12 週では骨切部の皮質骨の萎縮を認めた。

これらは、偽関節の組織像と一致した所見であった。

### C.3. 力学試験結果

正常大腿骨に比べて、有意にその強度は失われており、レントゲン結果や組織像の結果と同じく、偽関節であることが明らかであった。

## D. 考察

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向かっているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者の ADL は低下し、それに伴い QOL が非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的

活性を失い偽関節に陥ると、living bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が 6cm 以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合は living bone である血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者の ADL 改善につながり、臨床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨芽細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨芽細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間（本研究では骨切り後 12 週間）に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨芽細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

本研究で我々が確立したモデルは、骨膜の熱処理の代わりに、大腿骨周囲の骨膜および筋肉組織を広範囲に切除

し、さらに大腿骨骨髄を搔爬することで偽関節を作ることが可能であった。骨膜の熱処理をせず、骨癒合に影響を与えるMSCsを効果的に除去することで、高い再現性をもって偽関節作製が可能であった。我々の作製したヌードラット大腿骨偽関節が、今後の偽関節の治療法開発に有用であると考えられた。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、川手健次、田中康仁 冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの骨形成評価 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 老齢ラットにおける骨芽細胞シートの有用性 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康

仁 Fibronectinをコートした $\beta$ TCPの骨形成能 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、森田有亮、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、上羽智之、藤間保晶、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治癒過程の特徴 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13-14日 パシフィコ横浜

## F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし

2. 実用新案登録  
なし

3. その他  
なし

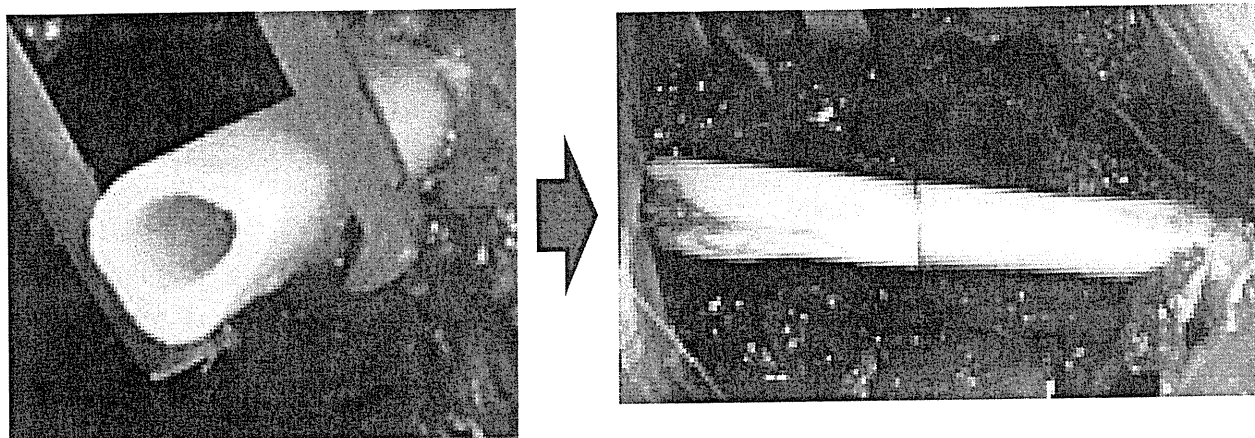
#### G. 参考文献

1. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res*. 2003 May;21:503-10.
2. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, et al. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry.

*J Bone Miner Res* 1997;12:96-102.

3. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S13-9.
4. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-16.
5. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
6. Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini Jr VD. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res* 2005;23:34-40.

図1 大腿骨偽関節モデルの作製



大腿骨の周囲の骨膜を可及的に切除し、さらに髓腔内を搔把・洗浄する。その後、骨髓腔内に鋼線を入れて髓内固定を行う。骨膜の切除だけでなく、髓腔内の搔把・洗浄を十分に行うことが確実な偽関節モデル作製のポイントであることが分かった。

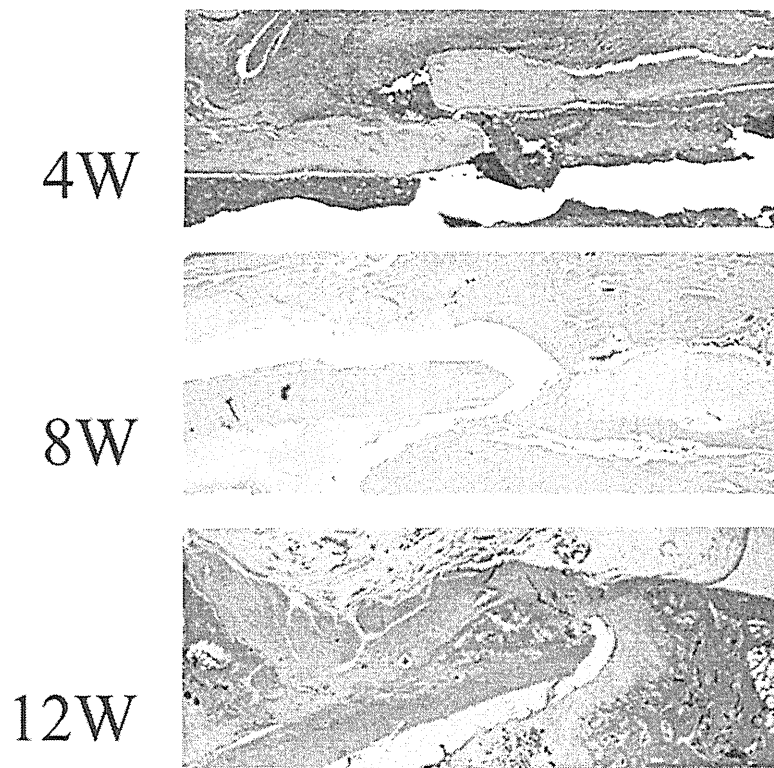
図2 経時的レントゲン撮影による骨折部の状態の評価



12週経過しても骨折部に骨癒合は見られなかった。組織像や力学試験結果からも骨癒合が得られていない結果であり、偽関節と判断した。



図3 経時的な骨折部の組織像



骨癒合は得られておらず、軟部組織の介在が確認された。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）  
分担研究報告書

ヒト骨芽細胞シート移植後のヌードラット大腿骨偽関節部の力学的評価方法の  
検討

研究分担者 森田有亮 同志社大学 生命医科学部 教授

研究分担者 川手健次 人工関節・骨軟骨再生医学講座 教授

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

本研究課題では、ヌードラットを用いて作製した大腿骨偽関節モデルを、ヒト骨髄細胞から作製したヒト骨芽細胞シート移植で骨癒合を得ることができるか検討しているが、本分担研究では骨形成の指標として、力学的強度の測定を正確に行うための評価方法を検討した。

ヌードラットの大腿骨は非常に小さいため、万能試験機（EZ-graph）を用いてどのような評価方法が効果的であるか検討したところ、3点曲げ試験で力学的評価を行うのが効果的であることが判明した。 $\mu$ CT撮影によって、作製したサンプルの偽関節骨切り部に骨癒合を認めないことを確認したサンプルの力学試験を行い、偽関節モデルの対照群である正常大腿骨の力学強度の測定結果と比較したところ、その強度は有意に低下していた。

偽関節モデルにおける骨形成の評価指標の一つとして、力学試験は重要である。臨床においても、骨強度の回復によって荷重負荷が可能となるため、力学試験による正確な骨強度の測定は、偽関節における骨癒合促進研究では重要な評価指標となると考えられる。ラット大腿骨のような小さなサンプルであっても、3点曲げ試験を行うことでその力学的強度の測定が可能であったことから、今後の研究を進めるうえで、重要な定量評価方法が確立できた。

A. 研究目的

偽関節治療では自家骨を用いた手術が標準であるが、健常骨の採取が必要であり患者負担が大きい。そこで本研究課題では、自家骨移植に代わる治療法を確立すべく基礎研究を行っている。ヒト未分化骨髄間葉系幹細胞（MSC）から骨形成能を有するヒト骨芽細胞シートを効果的に作製する条件を検討し、偽関節部に移植し骨癒合を促進させるが、その評価方法の一つとして

力学試験は欠くことができない評価方法である。

本分担研究の目的は、ヒトMSCで作製したヒト骨芽細胞シート移植による難治性骨折（偽関節）の治療の有効性を評価するための適切な力学試験方法を検討することである。免疫不全動物としてヌードラットを用い、大腿骨に作製した偽関節モデルに対して、ヒト骨芽細胞シートを移植した大腿骨の力学的強度を測定できる方法を確立する。

## B. 研究方法

### B-1. ラット大腿骨を用いた力学試験方法の検討

ヌードラットの大腿骨は小さく、これで力学試験方法の検討を行うと費用がかさむため、まず通常のラットの大腿骨を用いて、小さなサンプルにおける力学試験方法の検討を行うこととした。F344ラットの大腿骨を摘出し、正常大腿骨の強度をどのように測定するか検討したところ、ラット大腿骨専用の3点曲げ試験用ジグを作製すれば、力学的強度を測定できることが明らかとなった。

そこで、同ラットの大腿骨に偽関節を作製し、その強度を専用ジグを用いて測定し比較した。なお、ラットの大腿骨偽関節作製方法は我々がこれまでに確立している方法を応用した<sup>1,2)</sup>。

骨癒合が得られず、曲げ破壊が生じなかった場合においては、正常大腿骨の破壊時の平均押し込み量である1.2 mmを押し込んだ時の荷重値を最大曲げ荷重値として評価することが適切であることも通常のラットを用いた予備検討で判明した。

### B-2. 偽関節モデルの作製

12週齢のヌードラットを用いて大腿骨偽関節モデルを作製した。ヌードラットにおける偽関節モデル作製方法は、本研究課題の他の分担研究で確立した方法を用いた。その方法を簡潔に述べると、ヌードラットの大腿部において外側侵入で筋間から大腿骨に達し、転子部から顆部まで骨膜を切除した。femoral medial circumflex arteryから大腿骨へ入る枝を血管鉗で切離し、infra genicular arteryを顆部で切離した。大腿骨骨幹部をボーンソーで骨切りを行った後、髓腔内を18G針でリーミングを行った。このとき髓腔内を生食

20mlで洗浄した。顆部から頸部に向けて0.8mmのキルシュナー鋼線を挿入することで骨折部を固定した(図1)。

偽関節モデル作製の2か月後に大腿骨を摘出し、専用ジグを用いてその力学的強度を測定した。対照群として、ヌードラットの正常大腿骨の強度も合わせて測定した。

### B-3. ニードラット偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価

偽関節部の力学的強度が正常大腿骨と比べて低下しているかを検討するために、術後12週後に万能試験機(EZ-graph, SHIMADZU)を用いて3点曲げ試験を行った。図2に示すように、採取した大腿骨を3点曲げ試験用のジグ上に設置して試験を行った。押し込み速度は、10mm/minuteとした。

健側の正常大腿骨の曲げ破壊時の最大曲げ荷重によって、健側(正常大腿骨)群と偽関節群とを比較した。

### B-4. $\mu$ CT撮影による偽関節の評価方法の検討

X線 $\mu$ CT装置(SMX-160CT-AV3, SHIMADZU)を用いて、作製した偽関節周囲の骨形成を評価した。骨切り部周辺の骨形成を評価するため、12週において $\mu$ CT撮影を行い、その所見から偽関節であることを確認し、力学試験を行った結果と合わせて、偽関節群と健側群を比較した。

X線 $\mu$ CT撮影の結果を加味することで作製したモデルが偽関節モデルであることが確認できる。そのうえで両群を比較することで、より精度の高い比較ができることが分かった。

### B-5. 力学試験結果の統計学的検討

正常大腿骨と偽関節モデルの力学試験結果を比較するために、SPSS(IBM SPSS

Statistics Ver. 20)を用いて、student t-testを行い、 $p < 0.05$ で有意差の検定を行った。

#### B-6. 倫理面での配慮

奈良県立医科大学では、共同研究施設である「総合研究棟動物実験室」を利用するにあたり、「動物実験施設利用者説明会」を受講し、実験動物の扱いなどの動物実験に関する規則を学ばなくてはならない。奈良県立医科大学と本研究を行う研究代表者と分担者は、当該大学の動物実験施設利用者説明会を受講し種々の動物実験を行っており、動物実験に関する規約に準じて行うことに慣れているため動物の扱いに関しては問題がない。

また、本分担研究は奈良県立医科大学で作製した偽関節モデルラットの大腿骨を摘出し搬送してきたものの力学試験を行うため、直接動物や患者から得た骨髄細胞を扱うものではない。

#### C. 研究結果

##### C-1. $\mu$ CT 撮影による偽関節の評価結果

図3に偽関節群の $\mu$ CT画像を示す。偽関節モデルにおいては、術後12週においても骨切り部周囲の新生骨形成を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

通常のレントゲン撮影よりも正確に骨折部の状態が把握できることが明らかとなった。

##### C-2. 偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価の結果

図4に3点曲げ試験より得られた両群の最大曲げ荷重を示す。健側群の最大曲げ荷重は $136.0 \pm 14.4$  Nであり、偽関節群の最大曲げ荷重は $71.1 \pm 21.2$  Nであった。

また、偽関節の最大曲げ荷重は健側群の値と比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ )。

今回作製したラット大腿骨用の専用ジグを用いることで、比較的小さなサンプルであってもばらつきが少ない測定結果が得られることが判明した。

#### D. 考察

$\mu$ CT撮影により骨切り部での骨癒合を認めなかったことを確認するとともに、3点曲げ試験によって偽関節群での力学強度が正常大腿骨と比べて有意に低下していることを確認した。これより、ヌードラットを用いて大腿骨に作製した偽関節の力学試験を実施する手技および専用ジグが確立されたと考えられる。

今回作製したラット大腿骨用の専用ジグを用いることで、比較的小さなサンプルであってもばらつきが少ない測定結果が得られることが判明した。今後、本研究課題を行っていくうえで力学試験結果は重要な指標の一つであるため、本分担研究が目的とする実験は達成できたと考えられる。

#### E. 結論

$\mu$ CT撮影および力学試験より、ヌードラット大腿骨に作製した偽関節モデルの力学試験評価法が確立された。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表  
なし