

**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いているが、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、臨床上也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¹、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²、このMSCsの供給源として、骨膜³、骨髄⁴、周囲の筋肉⁵、周囲の血管⁶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. ニュー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剥離した後、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. 移植標本の骨形成性能の評価

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. 移植標本の骨形成性能の評価

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いているが、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 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

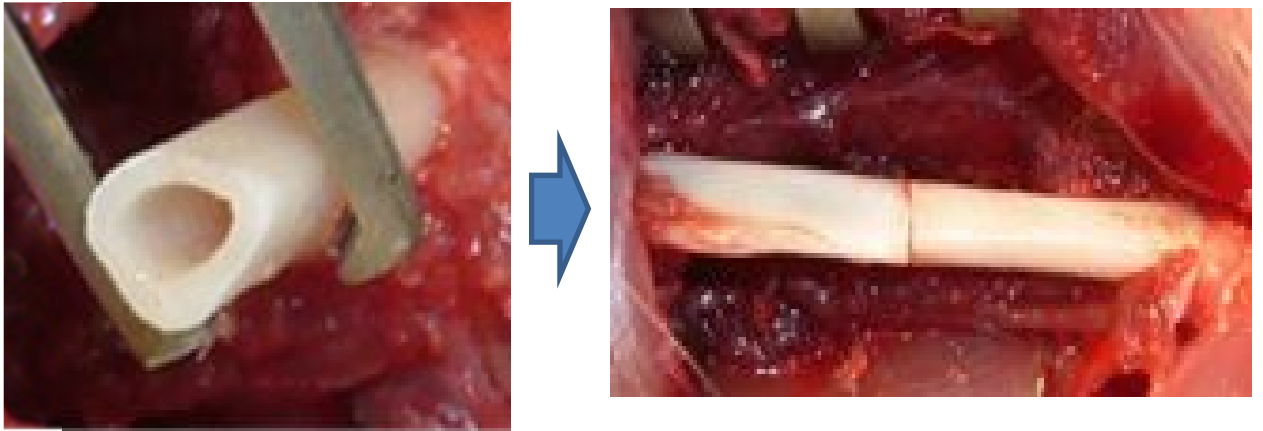
**2. 実用新案登録
なし**

**3. その他
なし**

G. 参考文献

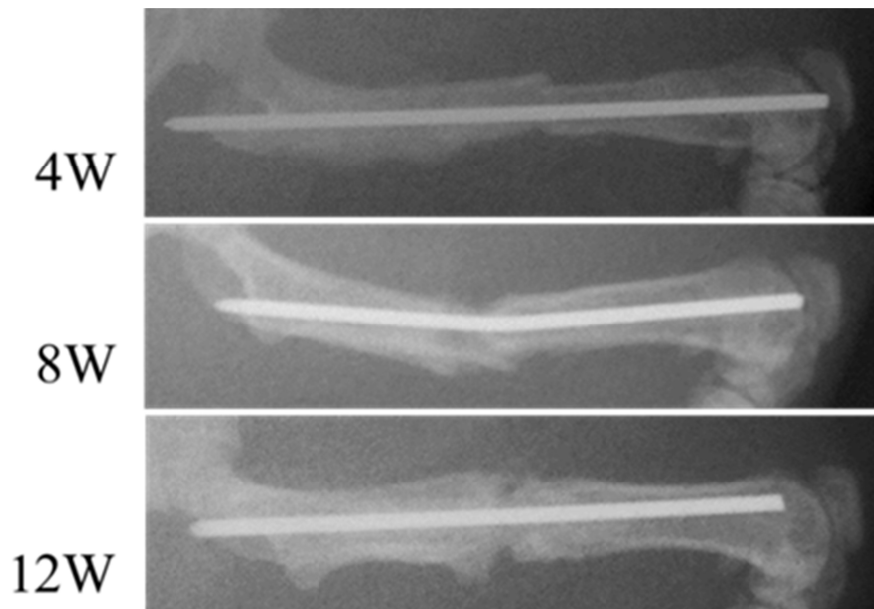
1. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res.* 2003 May;21:503-10.
2. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, et al. Localization and quantification of proliferating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



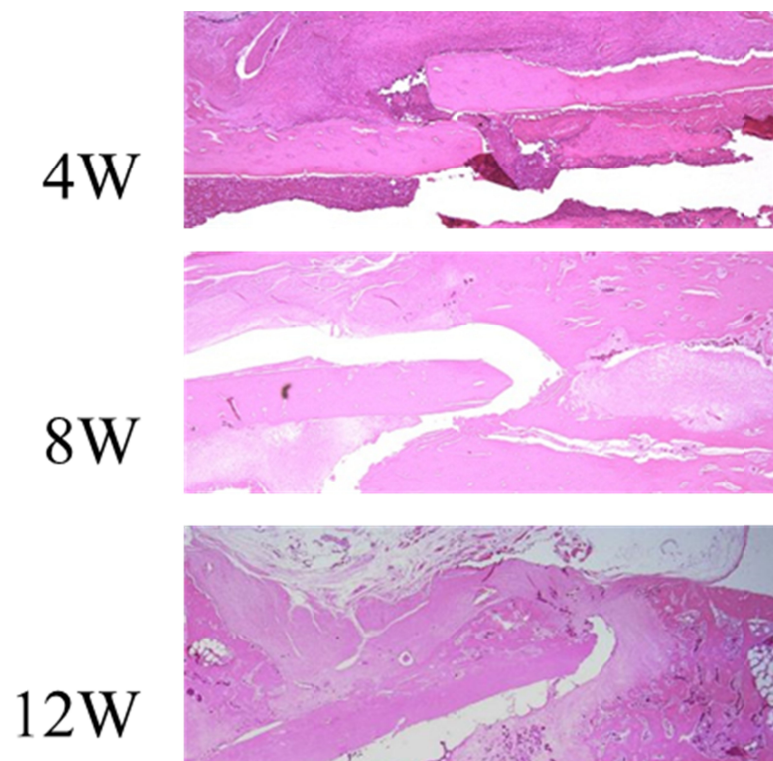
大腿骨の周囲の骨膜を可及的に切除し、さらに髓腔内を搔把・洗浄する。その後、骨髓腔内に鋼線を入れて髓内固定を行う。骨膜の切除だけでなく、髓腔内の搔把・洗浄を十分に行うことが確実な偽関節モデル作製のポイントであることが分かった。

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。