

- cells transfected with the transforming growth factor  $\beta$ 1 gene. *Biomed. Mater* 2006;1:206-215.
45. Fan H, Liu L, Zhu R, et al. Comparison of chondral defects repair with in vitro and in vivo differentiated mesenchymal stem cells. *Cell Transplant* 2007;16:823-832.
  46. Tateishi K, Ando W, Higuchi C, et al. Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSCs: Potential feasibility for clinical applications. *Cell Transplant* 2008;17:549-557.
  47. Yew TL, Huang TF, Ma HL, et al. Scale-up of MSCs under hypoxic conditions for allogeneic transplantation and enhancing bony regeneration in a rabbit calvarial defect model. *J Orthop Res* 2012;30:1213-1220.
  48. Huang YC, Zhu HM, Cai JQ, et al. Hypoxia inhibits the spontaneous calcification of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2012;113:1407-1415.
  49. Hachisuka H, Mochizuki Y, Yasunaga Y, et al. Flow cytometric discrimination of mesenchymal progenitor cells from bone marrow-adherent cell populations using CD34/44/45(-) and Sca-1(+) markers. *J Orthop Sci* 2007;12:161-169.
  50. Koga H, Muneta T, Ju YJ, et al. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 2007;25:689-696.
  51. Horie M, Sekiya I, Muneta T, et al. Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009;27:878-887.
  52. Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects—a porcine model. *Stem Cells* 2007;25:2964-2971.
  53. Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T, et al. Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R206.
  54. Sugioka T, Ochi M, Yasunaga Y, Adachi N, Yanada S. Accumulation of magnetically labeled rat mesenchymal stem cells using an external magnetic force, and their potential for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2008;85:597-604.
  55. Kobayashi T, Ochi M, Yanada S, et al. A novel cell delivery system using magnetically labeled mesenchymal stem cells and an external magnetic device for clinical cartilage repair. *Arthroscopy* 2008;24:69-76.
  56. Motoyama M, Deie M, Kanaya A, et al. In vitro cartilage formation using TGF-beta-immobilized magnetic beads and mesenchymal stem cell-magnetic bead complexes under magnetic field conditions. *J Biomed Mater Res A* 2010;92:196-204.
  57. Pi Y, Zhang X, Shi J, et al. Targeted delivery of non-viral vectors to cartilage in vivo using a chondrocyte-homing peptide identified by phage display. *Biomaterials* 2011;32:6324-6332.
  58. Park SH, Choi BH, Park SR, Min BH. Chondrogenesis of rabbit mesenchymal stem cells in fibrin/hyaluronan composite scaffold in vitro. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1277-1286.
  59. Kamarul T, Ab-Rahim S, Tumin M, Selvaratnam L, Ahmad TS. A preliminary study of the effects of glucosamine sulphate and chondroitin sulphate on surgically treated and untreated focal cartilage damage. *Eur Cell Mater* 2011;21:259-271.
  60. Tay LX, Ahmad RE, Dashtdar H. Treatment outcomes of alginate-embedded allogenic mesenchymal stem cells versus autologous chondrocytes for the repair of focal articular cartilage defects in a rabbit model. *Am J Sports Med* 2012;40:83-90.
  61. Kamarul T, Selvaratnam L, Masjuddin T, et al. Autologous chondrocyte transplantation in the repair of full-thickness focal cartilage damage in rabbits. *J Orthop Surg (Hong Kong)* 2008;16:230-236.
  62. Soon MY, Hassan A, Hui JH, Goh JC, Lee EH. An analysis of soft tissue allograft anterior cruciate ligament reconstruction in a rabbit model: A short-term study of the use of mesenchymal stem cells to enhance tendon osteointegration. *Am J Sports Med* 2007;35:962-971.
  63. Cao L, Liu G, Gan Y, et al. The use of autologous enriched bone marrow MSCs to enhance osteoporotic bone defect repair in long-term estrogen deficient goats. *Biomaterials* 2012;33:5076-5084.
  64. Koga H, Shimaya M, Muneta T, et al. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R84.
  65. Shi J, Zhang X, Zeng X, et al. One-step articular cartilage repair: Combination of in situ bone marrow stem cells with cell-free poly(l-lactic-co-glycolic acid) scaffold in a rabbit model. *Orthopedics* 2012;35:e665-e671.
  66. Zhang X, Zheng Z, Liu P, et al. The synergistic effects of microfracture, perforated decalcified cortical bone matrix and adenovirus-bone morphogenetic protein-4 in cartilage defect repair. *Biomaterials* 2008;29:4616-4629.
  67. Shao X, Goh JC, Huttmacher DW, Lee EH, Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue Eng* 2006;12:1539-1551.
  68. Ho ST, Huttmacher DW, Ekaputra AK, Hitendra D, Hui JH. The evaluation of a biphasic osteochondral implant coupled with an electrospun membrane in a large animal model. *Tissue Eng Part A* 2010;16:1123-1141.
  69. Shimomura K, Ando W, Tateishi K, et al. The influence of skeletal maturity on allogenic synovial mesenchymal stem cell-based repair of cartilage in a large animal model. *Biomaterials* 2010;31:8004-8011.
  70. Jin CZ, Cho JH, Choi BH, et al. The maturity of tissue-engineered cartilage in vitro affects the reparability for osteochondral defect. *Tissue Eng Part A* 2011;17:3057-3065.
  71. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:199-206.
  72. Tohyama H, Yasuda K, Minami A, et al. Atelocollagen-associated autologous chondrocyte implantation for the

- repair of chondral defects of the knee: A prospective multicenter clinical trial in Japan. *J Orthop Sci* 2009;14: 579-588.
73. Takazawa K, Adachi N, Deie M, et al. Evaluation of magnetic resonance imaging and clinical outcome after tissue-engineered cartilage implantation: Prospective 6-year follow-up study. *J Orthop Sci* 2012;17:413-424.
74. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med* 2010;38:1110-1116.
75. Tanaka Y, Mima H, Yonetani Y, Shiozaki Y, Nakamura N, Horibe S. Histological evaluation of spontaneous osteonecrosis of the medial femoral condyle and short-term clinical results of osteochondral autografting: a case series. *Knee* 2009;16:130-135.
76. Xu Y, Shang P, Chen A. Autologous osteochondral transplantation under arthroscope to treat cartilage defect. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2006;20:620-622 [in Chinese].
77. Li M, Zhang C, Ai Z, Yuan T, Feng Y, Jia W. Therapeutic effectiveness of intra-knee-articular injection of platelet-rich plasma on knee articular cartilage degeneration. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2011;25: 1192-1196 [in Chinese].
78. Kasemkijwattana C, Kesprayura S, Chaipinyo K, Chanlalit C, Chansiri K. Autologous chondrocytes implantation for traumatic cartilage defects of the knee. *J Med Assoc Thai* 2009;92:648-653.
79. Kasemkijwattana C, Kesprayura S, Chaipinyo K, Chanlalit C, Chansiri K. Autologous chondrocytes implantation with three-dimensional collagen scaffold. *J Med Assoc Thai* 2009;92:1282-1286.
80. Kasemkijwattana C, Hongeng S, Kesprayura S, Rungsinaporn V, Chaipinyo K, Chansiri K. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells implantation for cartilage defects: Two cases report. *J Med Assoc Thai* 2011;94:395-400.
81. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:226-231.
82. Teo BJ, Buhary K, Tai BC, Hui JH. Cell-based therapy improves function in adolescents and young adults with patellar osteochondritis dissecans. *Clin Orthop Relat Res* 2012;471:1152-1158.
83. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5:146-150.

## アスリートの関節軟骨損傷, その病態と治療の overview

杉田憲彦<sup>\*1</sup>, 中村憲正<sup>\*2</sup>

### はじめに

関節軟骨損傷は単独,あるいは半月板損傷,靭帯損傷に合併し,アスリートのパフォーマンスの低下も関与しうる傷害である。保存療法でいったんは臨床症状が軽減する場合もあるが,時間とともに軟骨変性が進行し,症状が再燃する経過をたどることも少なくない。関節軟骨損傷の頻度は比較的高く,近年のメタアナリシスの結果,関節鏡手術の約60%で認めるとされている<sup>1,2)</sup>。また単独損傷も認められるが,半月損傷,靭帯損傷,膝蓋骨脱臼,骨軟骨炎に合併することが多い。

本項ではアスリートにおける関節軟骨損傷の病態と種々の治療法について述べる。

### 軟骨損傷の病態・分類

急性軟骨損傷は高負荷,急な減速・旋回,方向転換を必要とするような競技で起こりやすく,瞬間的な軟骨に対するシアストレスもしくは圧負荷が受傷機転となる。半月板損傷や,ACL損傷などの急性外傷による関節内血腫が合併すると,IL-1, TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの分泌が,プロスタグランジン・一酸化窒素の上昇と相まって軟骨分解酵素を活性化し,軟骨破壊が加速する<sup>3-5)</sup>。また軟骨損傷に加えて急性ACL損傷

の80%以上に,痛みと軟骨変性の原因になりうる軟骨下骨の骨挫傷を合併しているという報告もある<sup>6)</sup>。健康なアスリートと若年者における関節軟骨への適度な圧負荷と関節軟骨機能(関節軟骨量と厚み)には正の相関関係を認める<sup>7)</sup>ことからわかるように,正常関節軟骨は,荷重に対して,適応する能力を有する。他方,この正の相関関係には閾値があり,閾値を超えた負荷は逆に関節軟骨の減少を引き起こす<sup>8)</sup>。オーバーユースによる関節軟骨損傷では関節の不安定性,アライメントの不整が基となり,過度の負荷が繰り返しかかることによる微細な外傷により,軟骨のアポトーシスが誘導される<sup>9)</sup>。

いずれの受傷機転にせよ,軟骨量と硬度の喪失により,さらに関節軟骨に対する圧負荷が高まり,炎症性サイトカイン,軟骨分解酵素などの科学的要因も加わって,関節軟骨欠損に至ることが多い。

軟骨損傷の分類としては,深度によるICRS分類<sup>10)</sup>が広く用いられている(図1)。軟骨下骨を損傷しないGrade3までの軟骨損傷では関節液中,あるいは滑膜由来の間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)が増加,遊走し<sup>11)</sup>,軟骨欠損部への凝集が認められ,主たる修復機転をなしている<sup>12)</sup>。軟骨下骨に損傷が及ぶ場合(ICRS Grade4)では骨髄からのMSCおよび成長因子の流入が主たる修復機転となる。関節軟骨は血行に乏しく,細胞の密度が疎で硬い細胞外マトリックスに覆われており,神経,リンパ組織もないことによ

\*1 大阪大学医学部整形外科

\*2 大阪保健医療大学保健医療学部

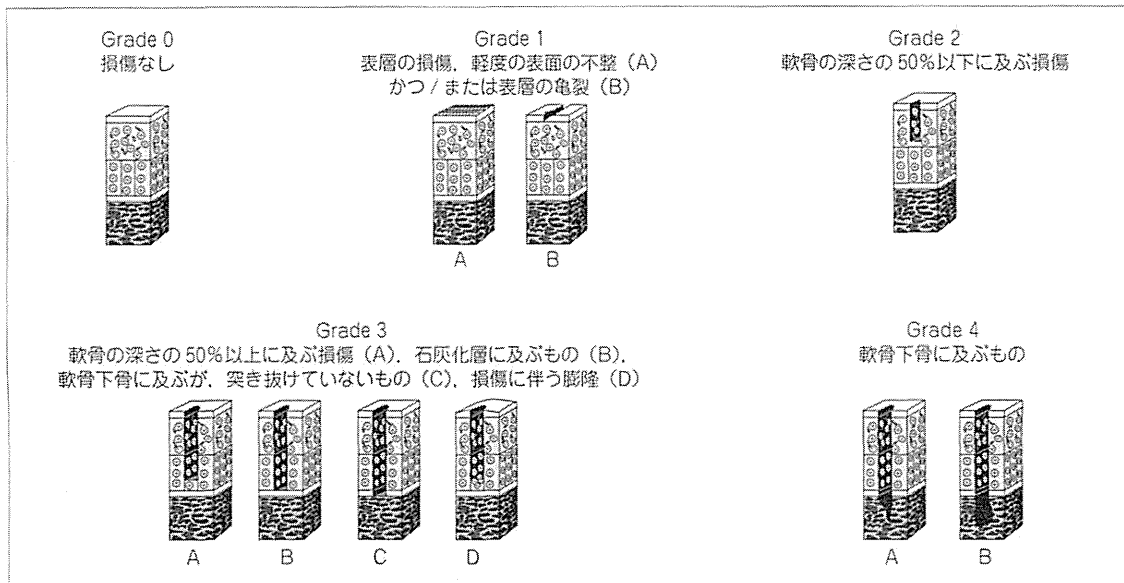


図1 ◆ICRS 分類

軟骨損傷の深度により、1~4 までの Grade に分類する。  
(文献 10 より引用)

り、Grade 1~3 損傷では自己修復にはなかなか至らない<sup>13,14)</sup>。

### 関節軟骨損傷に対する治療

関節軟骨損傷の治療は長年困難であるとされてきた。しかし最近の知見から、受傷早期ではエビデンスを伴ういくつかの治療が確立されつつある。観血的治療、保存的療法の双方の進歩により、以前では放置されていた軟骨損傷でも、軟骨の修復、再生に対していくつかの治療の選択肢を提示できるようになってきている。

#### 1. 保存療法

##### a. 無治療

関節軟骨損傷が変形性関節炎に至るメカニズムについて多くの研究がなされているが、特にアスリートにおいては、いまだに軟骨損傷の自然経過についての前向き臨床研究のデータは限られている。Messner ら<sup>15)</sup>は荷重域に軟骨欠損を認めた若い 28 人のアスリートについて、未治療での診断から 14 年後の膝の機能は比較的保たれており、43%には関節症変化を認めなかったと報告している。

##### b. 内服治療

各種サプリメント(コンドロイチン、グルコサミン、アボカド大豆不飽和化合物など)を用いた治療については、変形性関節症(OA)を対象としたものが多いが、大規模試験が多数行われている。コンドロイチン、アボカド大豆不飽和化合物については、軟骨再生効果や、疼痛・機能改善効果が示されている<sup>16~19)</sup>一方で、グルコサミンについては有効性の一致をみていない<sup>20)</sup>。

##### c. 関節内注射

ステロイドの関節内注射は関節炎症症状の急速な緩和目的に用いられ、短期での症状改善は認められるものの、全身、局所の副作用も多い<sup>21,22)</sup>。また組織修復能、代謝回転を低下させるため慎重な投与が望まれる。

ヒアルロン酸も軟骨損傷膝に対して短期的に用いられ、OAにかかわるサイトカインと酵素の遺伝子発現を抑えることによる軟骨保護作用と抗炎症作用の2つの作用を有する<sup>23)</sup>。ステロイドの関節内注射にみられるような副作用もほとんどないが、約8%の患者に可逆性の偽炎症反応が起こるとされている<sup>24)</sup>。

d. パルス電磁場療法

パルス電磁場により, 軟骨細胞の増殖・プロテオグリカンの産生の促進, 軟骨変性の予防, 滑液中の炎症誘発サイトカイン産生と放出の抑制が報告されている。関節鏡による治療後に用いると, 副作用なく, 炎症を抑え, 回復までの時間が短縮できることが報告されており<sup>25)</sup>, 種々の治療と組み合わせることによる相乗効果が期待できる。

2. 手術療法

患者の要求, 症状, 軟骨欠損サイズ・深さ, 付随する事象(関節のアライメント, 靭帯・半月損傷の有無, 骨挫傷の有無など)を踏まえ総合的に判断し, 術式を選択する必要がある。合併損傷がある場合は, 軟骨損傷に対する治療の前もしくは同時に治療を行うべきである。

a. デブリドマン手術

関節鏡下の損傷軟骨のデブリドマン, 超音波による焼灼は疼痛を改善するが, 硝子軟骨での再生は得られず, また軟骨表面の張力を担う軟骨浅層のコラーゲン線維を除去するため, 軟骨の機能が損なわれる可能性がある<sup>26)</sup>。したがって, これらは小さなフラップ状の軟骨損傷において第一選択となる。

b. 骨髄刺激法

侵襲が少なく, リハビリテーション期間が短いことからアスリートの軟骨損傷の治療として選択される機会も多い。線維軟骨様組織の形成がみられ, 時に機能と疼痛の改善を認めることもあるが<sup>27)</sup>, 時間経過とともに変性の進行を認める<sup>28)</sup>。スポーツ選手においては50%しか受傷前のレベルに復帰できなかつたとする報告があり, 40歳以下, 軟骨損傷のサイズが2cm<sup>2</sup>以下, 術前に症状があった期間が12ヵ月以下など, 症例を慎重に選べば良好な成績を得られる可能性が報告されている<sup>29)</sup>。

c. 自家骨軟骨移植 (osteochondral autograft transplantation : OATS)

非荷重部から採取した骨軟骨柱を欠損部に移植することにより, 硝子軟骨様の軟骨再生が可能である。ドナーサイトの傷害が問題とされるが, 長期に及ぶ合併症の発生率は高くない<sup>30)</sup>。アスリートに対する効果としては, 複数の前向き研究

において, knee function scores, ICRS score, MRI評価でそれぞれ95%, 84%と94%でgoodからexcellentという良好な結果が報告されている<sup>31~33)</sup>。競技復帰率は61~93%で, 6~9ヵ月の間に可能であった。術前の長い有症期間と30歳以上という年齢が, スポーツへの復帰率の低下に関係していた。海外ではアスリートに対する同種骨軟骨移植も行われており, 良好な臨床成績が報告されている<sup>34)</sup>。

d. 自家培養軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation : ACI)

Petersonらによって最初に行われた方法で<sup>35)</sup>, 非荷重部の関節軟骨より分離した軟骨細胞を培養により増やし, 骨膜にてパッチした軟骨欠損部に移植するというものである。複数の研究者による軟骨全層欠損の患者に対する移植でも, 硝子軟骨様の軟骨再生が得られ, 長期間のフォローアップでも関節機能が保たれていたと報告されている<sup>36,37)</sup>。しかし, 原法では2回の手術を要し, 骨膜採取部位および骨膜パッチの変性, 培養中に軟骨細胞が脱分化するという問題があった。その問題を解決するため, 細胞の足場, スキャフォールドを用いた第2, 3世代ACIが開発された。これにより, 移植軟骨細胞の状態が安定し, 手術手技も簡略化され, 現在では関節鏡下に手術が行われている。第2, 3世代ACIは若いアスリートで欠損サイズが大きな表層欠損に良い適応であると思われる。加えて膝蓋大腿関節においても良好な結果が得られている<sup>38)</sup>。術前の有症期間が12ヵ月以下, 年齢25歳以下であることが予後に重要で, 付随するアライメントの矯正や, 関節の安定化といった手術歴はアスリートの競技復帰には影響がなかったと報告されている<sup>39)</sup>。他方, 軟骨欠損が4cm<sup>2</sup>以上, 骨髄刺激法の既往があると成績が悪いとの報告があり<sup>26)</sup>, 軟骨下骨の状態は軟骨組織の修復に重要であることが示唆されている。

培養中に軟骨細胞が脱分化してしまうことの対策としては, *in vivo*で軟骨形成を促す遺伝子マーカーのプロファイルの発現と細胞の表現型で特徴づけられるサブグループを移植する試みがなされており, 骨髄刺激法との比較で, 構造的, 組

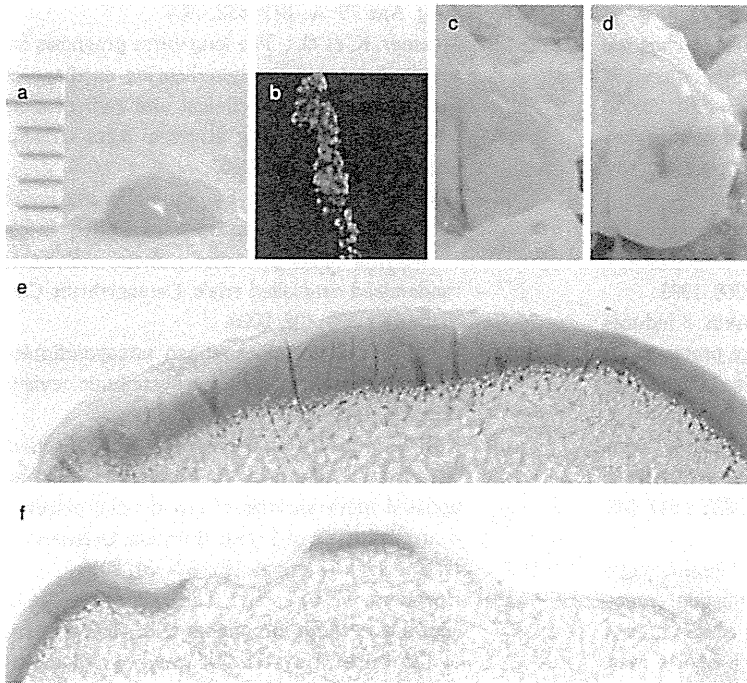


図2 →TECを用いた家畜ブタ膝軟骨修復実験

a TECのマクロ像, b TECの免疫染色(fibronectin), c, e 大腿骨の軟骨単独欠損にTECを移植後6ヵ月, d, f 軟骨欠損未治療群  
(文献46より引用一部改変)

織的に優れた軟骨再生が得られ、臨床成績も良好であったとの報告がある<sup>40)</sup>。

また、体外での軟骨細胞の培養を要さない方法も検討されている。非荷重部より採取した健常軟骨を粉碎し、そのままスキャフォールドに包埋し移植する方法では、細断した軟骨片から軟骨細胞がスキャフォールド内に再分布し、6ヵ月で硝子軟骨様の再生組織が得られたとの報告がある<sup>41)</sup>。この場合手術は1回で行うことが可能である。

#### e. 間葉系幹細胞を用いた治療

近年各組織由来のMSCを用いた治療も検討されている。MSCは自己複製能と多分化能(脂肪、骨、軟骨分化)を有し、適切な環境下で培養されれば、軟骨細胞に分化しうる<sup>42)</sup>。よって軟骨細胞移植において指摘されている高齢者におけるドナー組織の質の問題、細胞増殖能の低さと、培養中の脱分化などの問題をクリアできる利点がある。MSCを用いた軟骨再生については多くの研究がなされているが、まだ臨床での報告は少ない<sup>43,44)</sup>。

我々はアスコルビン酸存在下に滑膜由来MSC

を高密度培養することによって形成されるMSCとその細胞外マトリックスのみからなるスキャフォールドフリー3次元人工組織(tissue-engineered construct: TEC)を用いた軟骨再生に取り組んでいる。TECはファイブロネクチンを発現しており軟骨欠損部に接着するため<sup>45)</sup>、移植の際に固定の必要がなく、スキャフォールドの使用によってしばしば問題となる免疫反応の可能性も少ない。ブタの軟骨欠損モデルにて硝子軟骨様の組織修復を認め、力学的試験でも良好な結果を報告している(図2)<sup>46)</sup>。平成24年度より厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究を開始している。

#### おわりに

膝関節軟骨損傷に対する治療法は発展してきたが、いまだゴールドスタンダードとなる治療法は確立されていない。病態のメカニズム解明の進歩、さらには早期診断技術の開発による、新規治療法の開発、早期治療および科学的エビデンスに基づいたリハビリテーションプログラムの導入が今後期待される。

文 献

- 1) Flanigan, D. C. et al. : Prevalence of chondral defects in athletes' knees: a systematic review. *Med. Sci. Sports Exerc.* 42 : 1795-1801, 2010.
- 2) Curl, W. W. et al. : Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 13 : 456-460, 1997.
- 3) Amin, A. R. et al. : The role of nitric oxide in articular cartilage breakdown in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10 : 263-268, 1998.
- 4) Pettipher, E. R. et al. : Interleukin 1 induces leukocyte infiltration and cartilage proteoglycan degradation in the synovial joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 8749-8753, 1986.
- 5) Saklatvala, J. : Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 322 : 547-549, 1986.
- 6) Johnson, D. L. et al. : Articular cartilage changes seen with magnetic resonance imaging-detected bone bruises associated with acute anterior cruciate ligament rupture. *Am. J. Sports Med.* 26 : 409-414, 1998.
- 7) Jones, G. et al. : Effect of physical activity on cartilage development in healthy kids. *Br. J. Sports Med.* 37 : 382-383, 2003.
- 8) Kiviranta, I. et al. : Articular cartilage thickness and glycosaminoglycan distribution in the canine knee joint after strenuous running exercise. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 283 : 302-308, 1992.
- 9) Lohmander, L. S. et al. : Temporal patterns of stromelysin-1, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury to the cruciate ligament or meniscus. *J. Orthop. Res.* 12 : 21-28, 1994.
- 10) International Cartilage Repair Society: <http://www.cartilage.org/>
- 11) Sekiya, I. et al. : Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J. Orthop. Res.* 30 : 943-949, 2012.
- 12) Hunziker, E. B. et al. : Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J. Bone Joint Surg. Am.* 78 : 721-733, 1996.
- 13) Jackson, D. W. et al. : Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83-A : 53-64, 2001.
- 14) Buckwalter, J. A. et al. : Articular cartilage. part II : degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration, and transplantation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 79-A : 612-632, 1997.
- 15) Messner, K. et al. : The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop. Scand.* 67 : 165-168, 1996.
- 16) Christensen, R. et al. : Symptomatic efficacy of avocado-soybean unsaponifiables (ASU) in osteoarthritis (OA) patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* 16 : 399-408, 2008.
- 17) Ernst, E. : Avocado-soybean unsaponifiables (ASU) for osteoarthritis - a systematic review. *Clin. Rheumatol.* 22 : 285-288, 2003.
- 18) Hochberg, M. C. : Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthritis Cartilage* 18(suppl. 1) : S28-31, 2010.
- 19) Hochberg, M. C. et al. : The rate of decline of joint space width in patients with osteoarthritis of the knee: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of chondroitin sulfate. *Curr. Med. Res. Opin.* 24 : 3029-3035, 2008.
- 20) Henrotin, Y. et al. : Is there any scientific evidence for the use of glucosamine in the management of human osteoarthritis? *Arthritis Res. Ther.* 14 : 201, 2012.
- 21) Habib, G. S. : Systemic effects of intra-articular corticosteroids. *Clin. Rheumatol.* 28 : 749-756, 2009.
- 22) Habib, G. S. et al. : Local effects of intra-articular corticosteroids. *Clin. Rheumatol.* 29 : 347-356, 2010.
- 23) Wang, C. T. et al. : High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14 : 1237-1247, 2006.
- 24) Goldberg, V. M. et al. : Pseudo-septic reactions to hylan viscosupplementation: diagnosis and treatment. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 419 : 130-137, 2004.
- 25) Zorzi, C. et al. : Effects of pulsed electromagnetic fields on patients' recovery after arthroscopic surgery: prospective, randomized and double-blind study. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 15 : 830-834, 2007.
- 26) Minas, T. et al. : Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous

- treatment with marrow stimulation techniques. *Am. J. Sports Med.* 37 : 902-908, 2009.
- 27) Steadman, J. R. et al. : Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19 : 477-484, 2003.
  - 28) Saris, D. B. et al. : Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am. J. Sports Med.* 36 : 235-246, 2008.
  - 29) Mithoefer, K. et al. : High-impact athletics after knee articular cartilage repair: a prospective evaluation of the microfracture technique. *Am. J. Sports Med.* 34 : 1413-1418, 2006.
  - 30) Gudas, R. et al. : Ten-year follow-up of a prospective, randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint of athletes. *Am. J. Sports Med.* 40 : 2499-2508, 2012.
  - 31) Hangody, L. et al. : Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints : ten years of experimental and clinical experience. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A (suppl. 2) : 25-32, 2003.
  - 32) Kish, G. et al. : Osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral lesions of the knee and talus in the athlete. *Rationale, indications, techniques, and results. Clin. Sports Med.* 18 : 45-66, vi, 1999.
  - 33) Gudas, R. et al. : A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy* 21 : 1066-1075, 2005.
  - 34) Krych, A. J. et al. : Return to athletic activity after osteochondral allograft transplantation in the knee. *Am. J. Sports Med.* 40 : 1053-1059, 2012.
  - 35) Brittberg, M. et al. : Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331 : 889-895, 1994.
  - 36) Peterson, L. et al. : Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am. J. Sports Med.* 38 : 1117-1124, 2010.
  - 37) Greenberg, D. D. et al. : Biochemical effects of two different hyaluronic acid products in a culture model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14 : 814-822, 2006.
  - 38) Gobbi, A. et al. : Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with second-generation autologous chondrocyte implantation: results at 5 years' follow-up. *Am. J. Sports Med.* 37 : 1083-1092, 2009.
  - 39) Mithoefer, K. et al. : Functional outcome of knee articular cartilage repair in adolescent athletes. *Am. J. Sports Med.* 33 : 1147-1153, 2005.
  - 40) Saris, D. B. et al. : Treatment of symptomatic cartilage defects of the knee : characterized chondrocyte implantation results in better clinical outcome at 36 months in a randomized trial compared to microfracture. *Am. J. Sports Med.* 37(suppl. 1) : 10S-19S, 2009.
  - 41) Lu, Y. et al. : Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J. Orthop. Res.* 24 : 1261-1270, 2006.
  - 42) Sudo, K. et al. : Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells* 25 : 1610-1617, 2007.
  - 43) Wakitani, S. et al. : Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 10 : 199-206, 2002.
  - 44) Sekiya, I. et al. : Articular cartilage regeneration with synovial mesenchymal stem cells. *Clin. Calcium* 21 : 879-889, 2011.
  - 45) Ando, W. et al. : In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng. Part A* 14 : 2041-2049, 2008.
  - 46) Ando, W. et al. : Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28 : 5462-5470, 2007.
  - 47) Gobbi, A. et al. : Decision making in professional athletes with cartilage lesions. *Cartilage Repair Clinical Guidelines.* 185-208, 2012.
  - 48) Mithoefer, K. et al. : How to treat articular cartilage lesions in the football (soccer) player. *Cartilage Repair Clinical Guidelines.* 209-220, 2012.



## 半月板変性に対する治療法：国際的現況

Current status on the preserving intervention of degenerative menisci

中村 憲正\*,\*\* 小泉 宏太\*\*

Nakamura Norimasa

Koizumi Kota

抄録 ▶ 膝関節の恒常性を維持するためには半月板は必要不可欠であるが、変性断裂した半月板に対しての有効な治療法は確立されていない。国際的には半月板機能の回復のために研究レベルで多くの生物学的アプローチやバイオマテリアルの開発、さらに臨床では同種半月板移植が数多く応用されている。本稿ではこれらの治療研究の現況について紹介する。

### Key Words

半月板, 変性, 修復, 成長因子, バイオマテリアル, 同種半月板移植

\*大阪保健医療大学保健医療学部

\*\*大阪大学大学院医学系研究科 器官制御外科学（整形外科）

### はじめに

これまで述べられてきたように、半月板は膝の安定性に寄与し、衝撃吸収機能や荷重分散機能を担う。半月板の血流供給は辺縁1/3までしか認めず、したがって無血管野に損傷が生じると十分な生体修復反応は得られない。

この無血管野に生じた断裂、とりわけ半月板の変性を基盤として生じた断裂は高頻度に切除される。しかし生体力学的な解析により、たとえ部分切除であっても関節の接触圧が有意に上昇することが明らかとなっている<sup>1)</sup>。さらに、半月板を全切除すると、関節の接触面積は約50%に減少し、衝撃吸収機能は約20%にまで減少するとされている<sup>2)</sup>。さらに、これまで多くの動物実験や臨床報告から、半月板の部分切除もしくは全切除により二次性に変形性関節症が進行することが示唆されている。その意味で半月板の温存のための治療戦略は重要である。

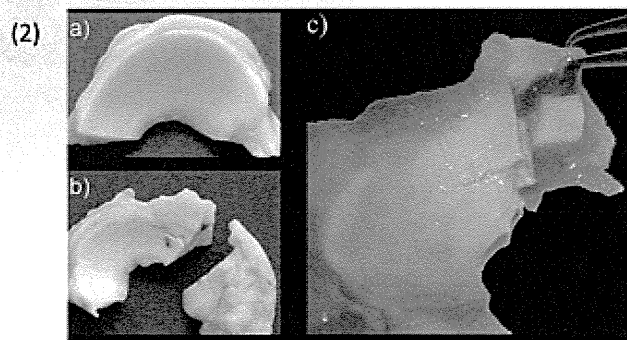
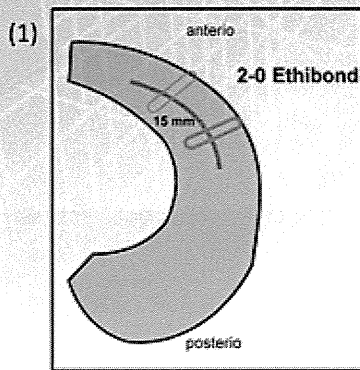
本稿では現在臨床および研究の場において試

みられている半月温存のためのアプローチについて紹介する。

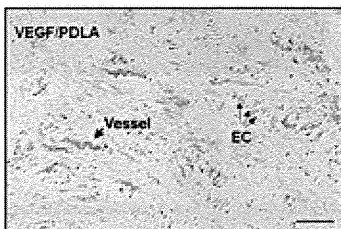
### 半月板修復の augmentation

自然治癒能力に乏しい無血管領域の半月板を単純に縫合するだけでは縫合部に十分な修復反応は生じず、長期的な治療効果は期待できない。そこで半月板の修復能を向上させることを目的として、サイトカインを用いた修復向上を狙った研究が報告されている。

成田らはウサギ半月板辺縁に関節外から作製した水平断裂部にFGF-2(Fibroblast growth factor-2)を添加したgelatin hydrogelを留置することで、術後4週間にわたって細胞増殖の促進と細胞死の抑制が認められ、結果として修復部の細胞密度が上昇し、組織修復が促進されたことを報告した<sup>3)</sup>。Heらは、ウサギ半月板の無血管領域から採取・培養した線維性軟骨細胞にCTFG(connective tissue factor)を添加するとI型・II型コラーゲンおよびVEGF(vascular en-



(3)



(表1)

	Ethibond (N = 6)	PDLLA (N = 6)	VEGF/PDLLA (N = 6)
No healing	3 (50%)	4 (66.7%)	5 (83.3%)
Partial healing	3 (50%)	1 (16.7%)	1 (16.7%)
Complete healing	0	1 (16.7%)	0

図1 ヒツジの半月板縫合術においてVEGF/PDLLAコーティング縫合糸による治療成績への影響の検討実験

(1) 断裂・縫合モデル

(2) 手術2カ月後の各群での典型的な肉眼所見

a) 正常半月板, b) EthibondもしくはPDLLAコーティング縫合糸群, c) VEGF/PDLLAコーティング縫合糸群: 縫合糸周囲に組織が溶解したようなゼラチン様組織がみられる。

(3) 手術2カ月後のVEGF/PDLLAコーティング縫合糸周囲組織の第Ⅷ因子免疫染色: 他群より有意に血管内皮細胞の増生がみられた。

(表1) 手術2カ月後の各群での治癒率: VEGF/PDLLAコーティング縫合糸群で有意に治癒率が低かった。

(文献5より引用)

dothelial growth factor)の産生が上昇することを示し, またウサギ半月板に縦断裂を作製後, 縫合処置にCTFGを添加したfibrin glueを加えることで, 損傷部周囲のI型・II型コラーゲンおよびVEGFの発現が上昇し, 組織修復が促進されたと報告している<sup>4)</sup>。また, Petersenらはヒツジ半月板の無血管領域に縦断裂を作製し, 血管内皮細胞増殖因子であるVEGFをコーティング加工した縫合糸(エチボンド)の修復効果を検討したが, VEGFコート群ではかえって修復が抑制され, 血管新生のみならず局所炎症反応の惹起が修復組織の質を低下させることが示唆された(図1)<sup>5)</sup>。

PRP (Platelet-rich plasma)により複数のサイ

トカインを介して組織反応を惹起させる研究も報告されている。石田らはPRPが濃度依存性にウサギ半月板由来細胞の生存率と硫酸プロテオグリカンの産生を向上させ, ウサギ半月板部分欠損の修復を有意に促進させることを報告している<sup>6)</sup>。しかしPRPは作成方法により品質特性が異なり, 高濃度のPRPでは半月板細胞の増殖が逆に阻害されるという報告もある<sup>7)</sup>。以上に示したようにPRPを含めたサイトカイン治療は, 投与の目的と異なりanabolicな反応よりもcatabolicな反応が優位に惹起されてしまう危険性がある。投与方法や投与量によってそのバランスが変化する可能性があり, 安定した治療効果の予測は現状では困難で, そのためか, いま

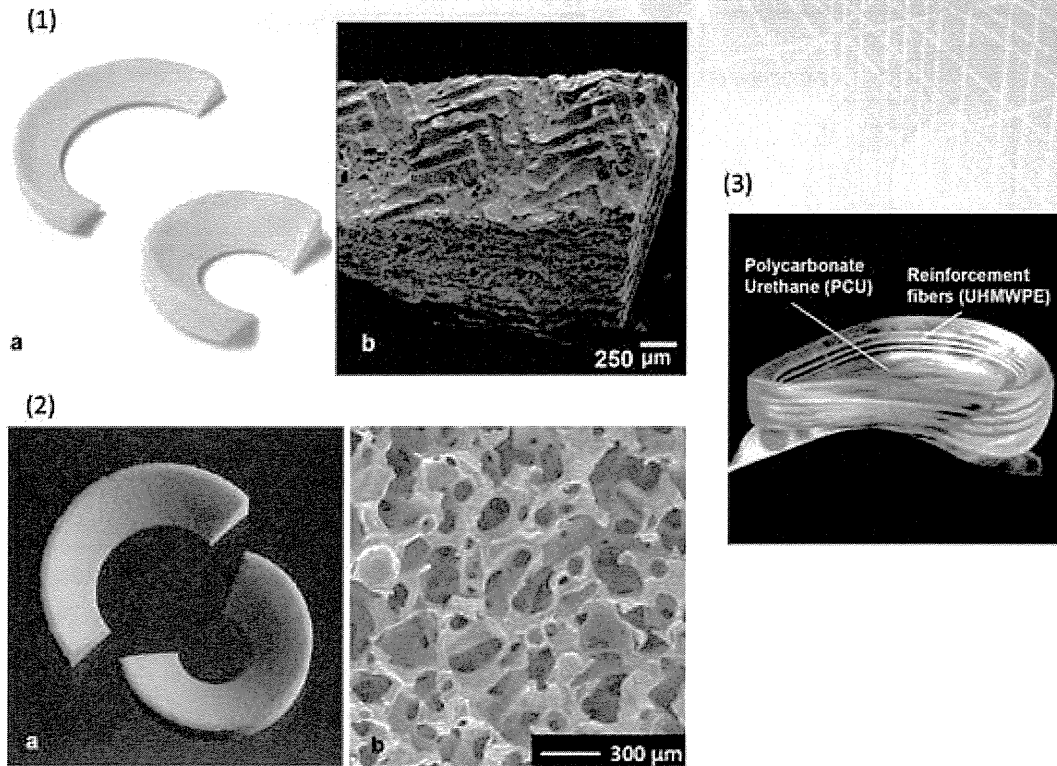


図2

- (1) a : CMI®外観：内側(左)，外側用(右)  
 b : 電子顕微鏡像，薄層の重層構造
- (2) a : Actifit®外観：内側(左)，外側用(右)  
 b : 電子顕微鏡像，連通孔をもつ多孔性の構造
- (3) NU surface®：内側半月板全切除症例に使用。円盤状でFT関節に留置し，固定しない。  
 (Int Orthop 37 : 291-299, 2013より引用)

だヒト半月板修復への臨床応用の報告はみられない。

実際の臨床の場合においては，自己末梢血より作成できるfibrin clotが，血小板由来のサイトカインを含有することに加え，fibrin由来マトリックスが修復の足場となりうることから，半月板縫合のaugmentationとして併用されている。van Trommelらは，辺縁部にまで達する外側半月の横断裂を認めた5症例(平均年齢20歳)に対して，関節鏡視下にfibrin clotを断裂部に挟むようにしてoutside-in法で水平縫合したところ，その全例が術後4カ月の再鏡視検査で修復反応を示し，術前と同様のスポーツレベルまで復帰したと報告している<sup>8)</sup>。またHenningらは，半月板縫合時にfibrin clotを併用した群ではfailure

rateが8%であり，使用しなかった群の41%に対して有意に低かったと報告している<sup>9)</sup>。

### 人工半月板移植術

これまで，polyvinyl alcohol-dydrogelやpolyurethaneから成る人工半月板を用いた動物実験がいくつか報告されているが<sup>10,11)</sup>，現在のところ半月板部分断裂症例に対して諸外国で臨床応用の機会を得たdeviceには以下の2つがある。ともに生体分解性の多孔体であり，1つはウシアキレス腱由来I型コラーゲンからなるCMI®(collagen meniscus implant 現在はMenaflex®に改名；ReGen Biologics)(図2-1)であり，もう1つはpolycaprolactone(80%)とurethane(20%)からなるActifit®(Orteq)(図2-2)である。直視

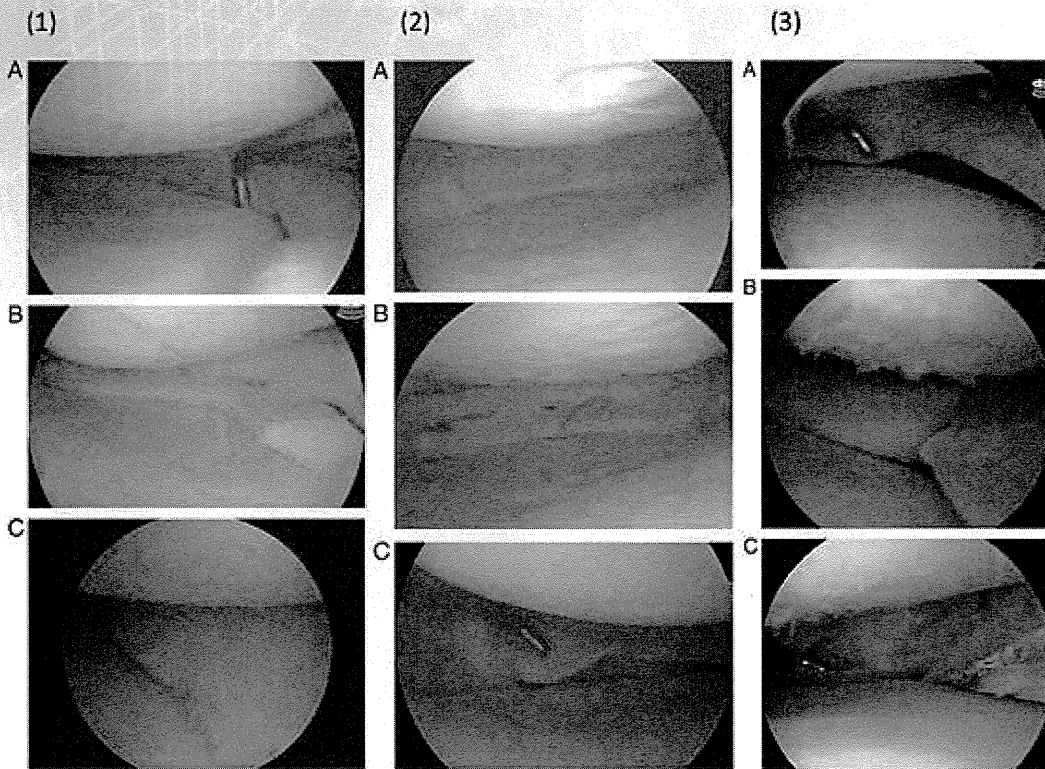


図3 関節鏡所見

A：初回手術時(移植前)

B：初回手術時(移植後)

C：再鏡視手術時(時期については後述)

(1) Actifit使用 5カ月後：充填率50%以上，(2) Actifit使用 10カ月後：充填率ほぼ100%

(3) Menaflex使用 2.5年後：充填率50%未満  
(文献10より引用)

下もしくは関節鏡視下に半月板欠損のサイズを計測し、それに合ったサイズのimplantと残存半月板とを縫合糸で端端縫合して移植する。

Rodkeyらは311例の内側半月板損傷例を無作為にCMI移植群と半月板部分切除群とに群分けし、平均59ヵ月後にそれぞれの治療成績を比較した。術後1年での再鏡視所見では、移植群で有意に移植半月板への組織充填率が高く、移植部をBiopsyした組織学的検査では、全例で周囲組織から移植片へのintegrationや、移植片内部に半月板様の線維軟骨組織が認められた。また臨床的には、慢性期症例においてのみ有意な活動性(Tegner index)の改善がみられた<sup>12)</sup>。Zaffagniniらは内側半月板損傷例に対して、CMI

を移植した群と部分切除術を行った群のうち、10年以上follow-up(平均133ヵ月)可能であった33症例(移植群：17例，部分切除群：16例)について検討している。無作為試験でない点や、急性期・慢性期症例に分けていない点がRodkeyらとは異なるが、移植群では有意に臨床成績が良好で、またXpでの内側関節裂隙の患健側差が有意に小さかったと報告している<sup>13)</sup>。しかし、術後10年以後に撮影されたMRIでは、4例に移植片の縮小、2例に消失が認められた。Spencerらは内側半月板に限定せず、内外側半月板損傷例に対してMenaflexもしくはActifitを移植した症例の術後成績を報告している<sup>10)</sup>。術後平均19.4ヵ月〔Menaflex群(18～27ヵ月)、Actifit群

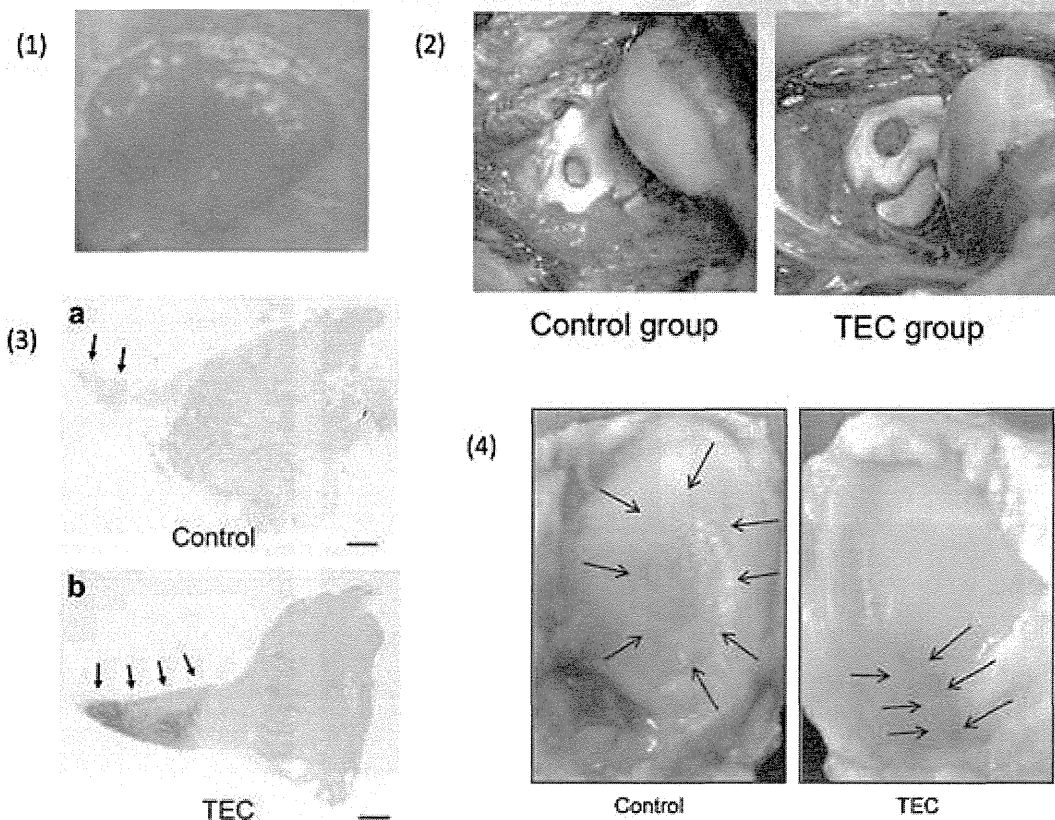


図4 TECによるウサギ半月板再生実験

- (1) TEC外観
- (2) 内側半月板前角に作成した径4mmの欠損(左:欠損のみ, 右:TEC移植)
- (3) 手術6カ月後の組織学的所見:TEC群では正常と同様の線維軟骨再生がみられる。
- (4) 手術6カ月後の脛骨内側プラトーの軟骨損傷の肉眼所見:TEC群で有意に抑制できた。(文献23より引用)

(12～18カ月)時点で、両群合わせた23例中21例(91.3%)で臨床スコアの改善がみられ、群間には差がなく、また両群ともにMRIで軟骨損傷の進行もみられなかったと報告している。しかし、術後平均12.8カ月で施行した再鏡視所見では移植片の50%以上に組織の充填を認めたものはActifit群で5例中4例であったが、Menaflex群では9例中4例のみであった(図3)。Menaflex・Actifitともに短・中期的な安全性と有効性が示されつつあるが、その適応は限定的であり、今後長期追跡を含むさらなる検証が必要である。

最近では、この人工半月板に骨髓穿刺濃縮細胞(BMAC: Bone Marrow Aspiration Concentrate)を含ませて移植するといった、細

胞治療とのHybridな治療方法も紹介されており(Verdonk P: ICRS Focus Meeting, 2013)、今後の成果が望まれる。

また、半月板全切除症例に対して、polycarbonate urethane製の非解剖学的なNU surface®というインプラントが現在開発されている(図2-3)。この形態は半月板の解剖学的形態とは異なりdisc状で、周囲組織と固定はせずに大腿脛骨関節内に留置するだけという全く新しいコンセプトに基づいたインプラントである。ヒツジの内側半月板と置換した前臨床試験(この試験では、解剖学的なpolycarbonate urethane製インプラントを使用)で安全性を確認した後、現在臨床試験が行われている<sup>15)</sup>。



## 半月板移植術

諸外国では他家半月板移植術が1984年にMilachowskiらによって始められて以来<sup>16)</sup>、広く行われている。移植半月板の殺菌・保存方法として主に凍結乾燥法(lyophilized graft)や低温保存法(cryopreserved graft)急速冷凍法(deep frozen graft)があげられているが、総じて凍結乾燥された移植片の成績は不良で<sup>17)</sup>、最近はこの方法による処理は行われずfresh allograftが広く用いられている。また、生体力学的な研究により適切でないサイズの移植片を移植することは接触圧の増加に繋がることが判明しており<sup>18)</sup>、適切なサイズの選択が必須である。こうした殺菌・保存方法や術式(移植片のサイズ選択など)といった複合的な因子を加味して検証する必要があるが、低温保存処理されたfresh allograftを用いた移植術後の中～長期的な調査では、臨床的にはおおむね有意な症状の改善が報告されており、画像的にも術後10年で変形性関節症の進行がみられないことを報告した論文もあり、その有効性が確かめられてきている<sup>19,20)</sup>。しかし、allograftでは有害事象としてウィルスや異常プリオン蛋白感染の危険性がある。これまでallograft半月板移植による感染症の報告はなされていないが、整形外科領域においても他家移植組織によるHIVやHCVといったウィルス感染症の報告は過去に存在する。本邦ではこうした安全性の担保に加え、倫理的問題が加味され組織バンキングシステムの整備が遅れている。マトリックス組成を考えた場合Allograftはある意味究極の組織工学製品であり、わが国においても早期の導入が待たれるところである。

## 組織工学による半月板修復

半月板治療に対する細胞治療も動物実験ではいくつかの報告がなされている。詳細は他稿に譲るが、自家もしくは他家半月板由来細

胞や間葉系幹細胞などがcell sourceとして使用されている<sup>21,22)</sup>。われわれは、滑膜由来の間葉系幹細胞と、それ自身が産生する細胞外基質のみから構成される3次元人工組織TEC(Tissue engineered construct)を開発し、骨成熟ミニブタ半月板欠損モデルに対しての治療効果を検討した<sup>23)</sup>。内側半月板の前角に作製した径4mmの円柱状の半月板欠損に対して、TEC移植群と非移植(無治療)群とで半年後の治療成績を比較したところ、移植群で組織学的に有意に良好な半月板の再生が得られ、脛骨プラトーへの軟骨損傷の程度を有意に軽減させることを確認した(図4)。スキャフォールドを使用しないことにより長期の安全性や作成コストの点で従来の組織加工製品より有利であると考えられる。われわれは現在、TECを用いて、厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究により軟骨損傷に対する治療研究を行っている(研究概要：<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=search&action=input> 検索ID：UMIN000008266)。今後は半月板治療への臨床応用の拡大が計画されている。

## 文 献

- 1) Fukubayashi T, Kurosawa H : The contact area and pressure distribution pattern of the knee. A study of normal and osteoarthrotic knee joints. Acta Orthop Scand 51 : 871-879, 1980
- 2) Voloshin AS, Wosk J : Shock absorption of meniscectomized and painful knees:a comparative in vivo study. J Biomed Eng 5 : 157-161, 1983
- 3) Narita A, Takahara M, Tabata Y et al : Biodegradable gelatin hydrogels incorporating fibroblast growth factor 2 promote healing of horizontal tears in rabbit meniscus. Arthroscopy 28 : 255-263, 2012
- 4) He W, Liu YJ, Wang N et al : Enhancement of meniscal repair in the avascular zone using connective tissue growth factor in a rabbit model. Chin Med J (Engl) 124 : 3968-3975, 2011
- 5) Petersen W, Pufe T, Becker R et al : The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. Arch Orthop Trauma Surg 127 : 235-240, 2007

- 6) Ishida K, Kuroda R, Miwa M et al : The regenerative effects of platelet-rich plasma on meniscal cells in vitro and in vivo application with biodegradable gelatin hydrogel. *Tissue Eng* 13 : 1103–1112, 2007
- 7) Casati MZ, de Vasconcelos Gurgel BC, Sallum EA et al : Platelet-rich plasma does not improve bone regeneration around peri-implant bone defect –a pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg* 36 : 132–136, 2007
- 8) van Trommel MF, Simonian PT, Wickiewicz TL et al : Arthroscopic meniscal repair with fibrin clot of complete radial tears of the lateral meniscus in the avascular zone. *Arthroscopy* 14 : 360–365, 1998
- 9) Henning CE, Lynch MA, Decker KA et al : Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop* 252 : 64–72, 1990
- 10) Kobayashi M, Chang YS, Oka M : A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* 26 : 3243–3248, 2005
- 11) Maher SA, Rodeo SA, Warren RF : Evaluation of a porous polyurethane scaffold in a partial meniscal defect ovine model. *Arthroscopy* 11 : 1510–1519, 2010
- 12) Rodkey WG, DeHaven KE, Briggs KK et al : Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* 90 : 1413–1426, 2008
- 13) Zaffagnini S, Marcheggiani Muccioli GM, Marcacci M et al : Prospective long-term outcomes of the medial collagen meniscus implant versus partial medial meniscectomy: a minimum 10-year follow-up study. *Am J Sports Med* 39 : 977–985, 2011
- 14) Spencer SJ, Saithna A, Spalding T et al : Meniscal scaffolds: Early experience and review of the literature. *Knee* 19 : 760–765, 2012
- 15) Zur G, Linder-Ganz E, Shterling A : Chondroprotective effects of a polycarbonate-urethane meniscal implant: histopathological results in a sheep model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 19 : 255–263, 2010
- 16) Milachowski KA, Weismeier K, Kohn D et al : Meniscus transplantation and anterior cruciate ligament replacement—results 2-4 years postoperative. *Sportverletz Sportschaden* 4 : 73–78, 1990
- 17) Binnet MS, Akan B, Kaya A : Lyophilised medial meniscus transplantations in ACL-deficient knees: a 19-year follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 20 : 109–113, 2012
- 18) Dienst M, Greis PE, Burks RT et al : Effect of lateral meniscal allograft sizing on contact mechanics of the lateral tibial plateau: an experimental study in human cadaveric knee joints. *Am J Sports Med* 35 : 34–42, 2007
- 19) Hutchinson ID, Moran CJ, Rodeo SA : Restoration of the Meniscus: Form and Function. *Am J Sports Med* 22, 2013
- 20) Verdonk R, Almqvist KF, Verdonk PC et al : Meniscal allografts: indications and outcomes. *Sports Med Arthrosc* 15 : 121–125, 2007
- 21) Weinand C, Peretti GM, Gill TJ et al : An allogenic cell-based implant for meniscal lesions. *Am J Sports Med* 34 : 1779–1789, 2006
- 22) Zellner J, Mueller M, Angele P et al : Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A* 94 : 1150–1161, 2010
- 23) Moriguchi Y, Kosuke T, Hideki Y et al : Repair of meniscal lesions using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from allogenic synovial MSCs in a miniature swine model. *Biomaterials* 34 : 2185–2193, 2013

\* \* \*

## Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model

Hirotsugu Honda · Noriyuki Tamai ·  
Norifumi Naka · Hideki Yoshikawa ·  
Akira Myoui

Received: 25 December 2012 / Accepted: 1 May 2013 / Published online: 23 May 2013  
© The Japanese Society for Artificial Organs 2013

**Abstract** Concentrated growth factor (CGF) is an autologous leukocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) bio-material termed “second-generation platelet concentrate”. CGF contains autologous osteoinductive platelet growth factors and an osteoconductive fibrin matrix. The purpose of this study was to assess the ability of CGF combined with bone marrow stromal cells (BMSCs) to heal critical-size rat calvaria defects in vivo and to modulate the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro. In the in-vivo study, the CGF group regenerated bone better than the control group, and combined therapy with CGF and BMSCs almost completely repaired critical-size bone defects within 12 weeks after surgery. In the in-vitro study, the CGF extract, at concentrations between 1 and 10 %, promoted proliferation, osteogenic maturation, and mineralization of hTERT-E6/E7 human MSCs in a dose-dependent manner but had an inhibitory effect at higher concentrations. In conclusion, a CGF extract promoted the proliferation, osteogenic maturation, and mineralization of mesenchymal stem cells in vitro, and combination therapy with CGF and BMSCs

resulted in excellent healing of critical-size bone defects in vivo.

**Keywords** Concentrated growth factors · Bone tissue engineering · Rat calvaria defect · Bone marrow stromal cells · hTERT-E6/E7

### Introduction

Interest has recently been focused on stem or progenitor cell therapy to replace or repair damaged or lost tissue (because of disease or injury) by tissue engineering. Cell therapy for bone regeneration requires an osteoconductive scaffold and growth factors for osteoinduction. Platelets contain a variety of autologous growth factors, including platelet-derived growth factors (PDGF), transforming growth factors  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), vascular endothelial growth factors (VEGF), and insulin-like growth factors (IGF), which are of crucial importance in bone healing. Platelets also secrete fibrinogen, and the extensive cross-linking of fibrin  $\alpha$ -chains during clot formation strongly enhances the mesenchymal cell migration essential for tissue regeneration [1–5].

In 1998, Marx et al. [6] found that platelet-rich plasma (PRP), a concentrated preparation of platelets now termed “first-generation platelet concentrate”, had a positive effect on bone regeneration and wound healing, for which it functioned as a source of autologous growth factors. Since then, PRP has been widely used in many fields including dentistry, dermatology, orthopedics, cosmetics, and cardiothoracic surgery [7]. In general, this large body of PRP studies demonstrated that PRP stimulates the proliferation and differentiation of fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes, and mesenchymal stem cells, although some contradictory

---

H. Honda · A. Myoui (✉)  
Medical Center for Translational and Clinical Research,  
Department of Medical Innovation, Osaka University Hospital,  
2-15 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan  
e-mail: myoi@hp-mctr.med.osaka-u.ac.jp

H. Honda  
e-mail: hhonda@ort.med.osaka-u.ac.jp

N. Tamai · N. Naka · H. Yoshikawa  
Department of Orthopaedics, Graduate School of Medicine,  
Osaka University, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871,  
Japan



results have been reported [8–10], probably because of the diversity of procedures used to isolate PRP.

Concentrated growth factor (CGF) is an autologous leukocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) biomaterial termed “second-generation platelet concentrate” [11]. (Unlike PRP, CGF is obtained by single centrifugation of venous blood by use of a specially programmed centrifuge [12]). CGF contains autologous osteoinductive growth factors derived from platelets and an osteoconductive fibrin matrix. One of the main differences between CGF and most PRP preparations is that CGF production does not require addition of other reagents, i.e. it does not use anticoagulant during blood harvesting or heterozoic thrombin and calcium chloride for platelet activation and fibrin polymerization. Instead of using these reagents, CGF itself slowly polymerizes during centrifugation in a manner similar to natural polymerization *in vivo*. Such polymerization is crucial for proper three-dimensional (3D) organization of a fibrin network. A CGF-derived fibrin structure is favorable for cytokine enmeshment and cellular migration (because of the 3D organization of a fibrin network) and slowly releases platelet growth factors for at least 7–10 days [13, 14]. These combined observations suggest that combination therapy of CGF with bone marrow stromal cells (BMSCs) may provide all the necessary features (osteo-productive cells: BMSCs, osteoinductive scaffold: fibrin matrix, osteoconductive growth factors: platelet growth factors) for induction of bone growth and regeneration.

The purpose of this study was to determine the effect of the second-generation platelet concentrate, CGF, on human mesenchymal stem cells (hTERT-E6/E7) [15] *in vitro* and the feasibility of combined therapy of CGF with BMSCs for bone regeneration in a critical-size rat calvaria-defect model *in vivo*. Our study revealed that CGF promoted the proliferation, osteogenic maturation, and mineralization of mesenchymal stem cells *in vitro*, and combination therapy of CGF with BMSCs enabled excellent healing of a critical-size bone defect *in vivo*.

## Materials and methods

### CGF preparation

This research was approved by the institute’s committee on human research and the protocol was found acceptable by them. The experimental protocol was approved (approval number 09140(758-4)-5, date of approval July 28, 2010) by the Institutional Review Board of Osaka University. For the *in-vitro* experiments, CGF was prepared from human venous blood obtained from three healthy male volunteers (age range 26–37 years). All subjects enrolled in this research gave informed consent. Venous blood was taken,

without anticoagulants, directly into a sterile 10-ml tube and was immediately centrifuged in a special centrifuge device (Medifuge<sup>®</sup>; Slifadent srl, Sofia, Italy) for 13 min. This centrifuge device used a program with the characteristics: 2,700 rpm 2 min, 2,400 rpm 4 min, 2,700 rpm 4 min, and 3,000 rpm 3 min.

For the *in-vivo* experiments, donor rats were anesthetized by intramuscular injection of a mixture of midazolam (4 mg/kg), medetomidine (1 mg/kg), and butorphanol (5 mg/kg). Blood was collected, by cardiac puncture, without anticoagulants, into a sterile 10-ml tube and was immediately centrifuged by use of a Medifuge<sup>®</sup> for 13 min. CGF from rats was prepared in the same way as that from humans.

### Preparation of a CGF extract

Immediately after CGF preparation, CGF was transferred into a syringe and was gently compressed in the syringe so that it divided into a solid fibrin membrane and a liquid fraction (CGF extract) (Fig. 1).

### Cell culture

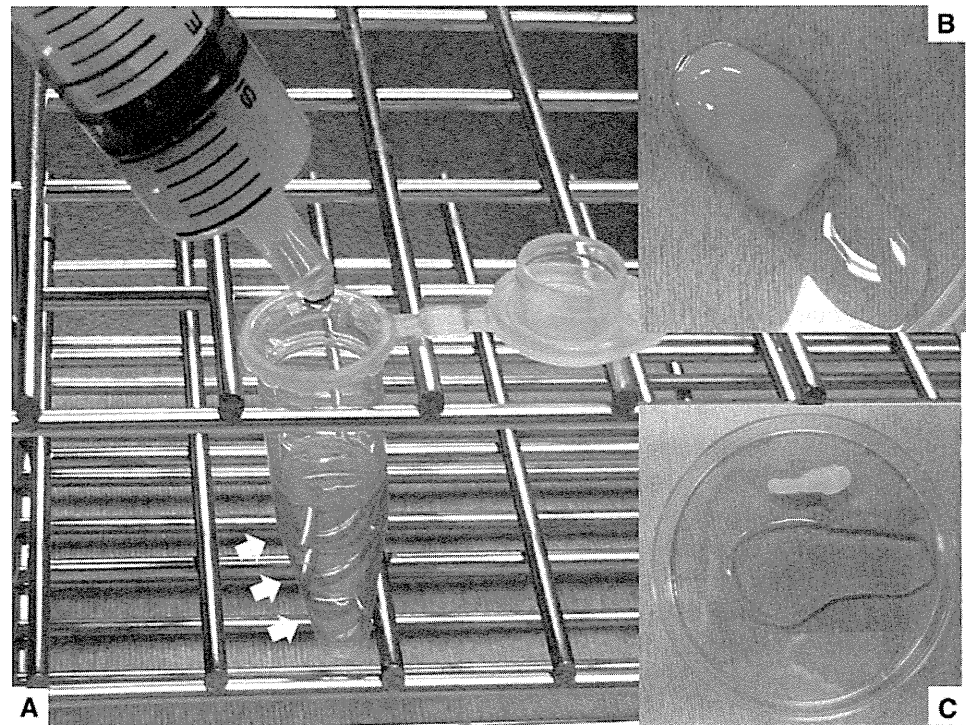
Cells of a human mesenchymal stem cell line, hTERT-E6/E7, were provided by Dr Junya Toguchida (Kyoto University, Japan). The cells were grown in  $\alpha$ -minimum essential medium ( $\alpha$ -MEM; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1 % antibiotics (penicillin–streptomycin; Invitrogen) and 10 % fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Road Logan, UT, USA) (growth medium) at 37 °C under a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. Before each assay, the hTERT-E6/E7 cells were plated and pretreated in pretreatment medium ( $\alpha$ -MEM containing 1 % FBS and 1 % antibiotics) for 12 h, and, after attachment, the medium was changed to differentiation medium ( $\alpha$ -MEM containing 1 % FBS, 1 % antibiotics, 50  $\mu$ M ascorbic acid (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA), 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma–Aldrich), and 100 nM dexamethasone (Sigma–Aldrich)). The medium was changed every three days.

In the *in-vitro* proliferation assay and the differentiation assay, we used the human mesenchymal stem cell line, hTERT-E6/E7 because we assumed that using established cell line might produce stable experimental results, even though we needed to use freshly prepared CGFs from different volunteers in each experiment.

### Proliferation assay

hTERT-E6/E7 cells were seeded in 6-well plates at a density of  $5.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> in pretreatment medium. After attachment, the pretreatment medium was changed to

**Fig. 1** Preparation of a CGF extract. **a** CGF was transferred into a syringe and was gently compressed in the syringe so that a liquid fraction (the CGF extract is indicated with *white arrows*) was separated from a solid fibrin membrane. **b** CGF **c** solid fibrin membrane (*upper*) and CGF extract (*lower*)



differentiation medium containing 0, 1, 3, 5, 10, or 20 % CGF extract or serum for 24 h. The number of cells was counted after detachment of the cells by use of 0.25 % trypsin EDTA (Invitrogen). All experiments were performed three times, with duplicates.

#### Alkaline phosphatase (ALP) staining

hTERT-E6/E7 cells were seeded in 24-well plates at a density of  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After incubation for 12 h in pretreatment medium, the medium was changed to differentiation medium containing 0, 1, 3, 5, 10, or 20 % CGF extract or serum for 4 days. For ALP staining, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS; Sigma–Aldrich) and fixed for 5 min with 10 % formalin at room temperature. After fixing, the cells were incubated with the BCIP/NBT color development substrate (Promega, Madison, WI, USA) for 1 h at 37 °C. After staining, plates were digitally photographed and the acquired images were analyzed.

#### ALP activity

To measure ALP activity, cells were washed twice with PBS then lysed in mammalian protein extraction reagent (M-PER; Pierce, Rockford, IL, USA) in accordance with the manufacturer's procedure. ALP activity was measured by use of LabAssay ALP (Wako Pure Chemicals Industries, Osaka, Japan) with *p*-nitrophenylphosphate as

substrate. To normalize enzyme activity, the protein content of the solution was measured by use of a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce).

#### Alizarin red staining

hTERT-E6/E7 cells were seeded in 24-well plates at a density of  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After incubation for 12 h in pretreatment medium, the medium was changed to differentiation medium containing 0, 1, 3, 5, 10, or 20 % CGF extract or serum for 21 days. The cells were then washed twice with PBS, fixed in 10 % formalin for 10 min, and then stained with alizarin red S (Sigma–Aldrich) at pH 6.3 for 1 h. After discarding the alizarin red S solution and washing the cells three times with distilled water, the bound alizarin red was dissolved in 200  $\mu$ l 100 mM hexadecylpyridinium chloride (Sigma–Aldrich) and the absorbance of the supernatant was measured at 570 nm.

#### Von Kossa staining

hTERT-E6/E7 cells were seeded in 24-well plates at a density of  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After incubation for 12 h in pretreatment medium, the medium was changed to differentiation medium containing 0, 1, 3, 5, 10, or 20 % CGF extract or serum for 21 days. The cells were washed twice with PBS, fixed in 10 % formalin for 10 min, then 2 ml freshly prepared 1 % silver nitrate was added to each well and the wells were incubated under UV light for 30 min.

The plates were washed with distilled water, fixed using 5 % sodium thiosulfate for 5 min, then washed thoroughly with distilled water to terminate the reaction. Macro photographs of mineral deposits were then recorded.

#### Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated from cells by use of the RNeasy mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by use of the SuperScript III First-Strand synthesis system (Invitrogen). This cDNA was then analyzed by real-time PCR analysis by use of the 7900HT fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). The SYBR green assay with SYBR Premix EX taq (Tli RnaseH plus; TaKaRa Bio, Otsu, Japan) was used for amplification of all target transcripts. Expression values were normalized to GAPDH. The sequences of the specific primers used are shown in Table 1.

Measurement of platelet growth factor (PDGF-BB, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) levels in CGF, PRP (2,400 rpm 10 min, 3,600 rpm 15 min), and serum were assayed for typical growth factors using commercially available Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). We incubated CGF in centrifuge tubes containing 1,000  $\mu$ l PBS and stored for 13 days at 37 °C. The PBS in the tubes was replaced every 2 days and collected for ELISA.

#### BMSC isolation and culture

Bone marrow cells were obtained by flushing the bone marrow cavity of rat femoral and tibial bones with 5 ml saline. For BMSC isolation and expansion, the flushed bone marrow fluid was first passed through 90- $\mu$ m pore strainers for isolation of bone spicules. Next, filtrates containing bone marrow cells were plated in a plastic

culture dish in growth medium that had been screened for optimum BMSC growth. After incubation for 24 h, non-adherent cells were removed by means of 2 or 3 PBS washing steps. After 2–3 weeks of culture in this growth medium, the adherent cells were used as BMSCs for in-vivo assays.

#### Preparation of CGF with BMSCs

BMSCs ( $5.0 \times 10^5$ ) suspended in 20  $\mu$ l PBS were injected into CGF (average weight  $39.1 \pm 1.99$  mg) by use of a 1-ml syringe with a 26-gauge needle.

#### The rat calvaria critical-size bone defect model

Twenty-seven male Sprague–Dawley (SD) albino rats (10–12 weeks old, average weight 300–350 g) were randomly divided into three groups:

1. unfilled defect (control);
2. CGF alone; and
3. CGF + BMSCs.

All animals were housed in cages with free access to food pellets and water. The experimental protocol was approved (Approval Number 21-063-0) by the Animal Experiment Committee of Osaka University, and the experiments were carried out in accordance with the Osaka University guidelines for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize suffering. General anesthesia was induced by intramuscular injection of a mixture of midazolam, medetomidine, and butorphanol. An incision was made midline from the supraorbital glabella to the occiput. This incision was continued through the periosteum, which was elevated from the underlying bone and retracted laterally. Two calvarial defects, 5 mm in diameter, were created symmetrically on the bilateral sides of the midline in each rat by use of a trephine bur

**Table 1** Sequences of the primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Product size	Primer	Sequences(5' → 3')
RUNX2	96	Forward	TCCAACCCACGAATGCACTATC
		Reverse	TGGCTTTGGGAAGAGCCG
OSX	92	Forward	GCTGCGGCAAGGTGTAT
		Reverse	GAAGAGCCAGTTGCAGACG
ALP	91	Forward	GAGATAACAAGCACTCCCCTTCAT
		Reverse	TGTTCTGTTCAGCTCGTACT
OPN	88	Forward	CCCATCTCAGAAGCAGAATCTCCTA
		Reverse	ATCATCCATATCATCCATGTGGTCA
COL1A1	86	Forward	AGGGCCTAAGGGTGACAG
		Reverse	GGCCAGTCAGACCACGGA
GAPDH	96	Forward	TCAATGGAAATCCCATCACCATCTT
		Reverse	CGCCAGTGGACTCCACGA

without dura perforation. A sterile saline solution was used to keep membranes moist and to thoroughly remove bone debris. The CGF ± BMSCs were applied directly into the defect sites. The skin was closed with 5–0 nylon.

Microfocus computed tomography

Formation of new bone in each calvaria sample was evaluated by use of a microfocus computed tomography (micro-CT) system (SMX-100CT-SV; Shimadzu, Kyoto, Japan). Each sample was scanned at 50-μm intervals at 30 kV and 175 μA. After scanning, 3D CT images were reconstructed and the calcified volume of newly formed bone in the calvarial defect was measured by use of Tri/3D Bon software (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan).

Histological analysis

Samples were fixed in 10 % neutral formalin and were decalcified with ethylenediaminetetraacetic acid (pH 7.4). After decalcification, the samples were dehydrated in a graded ethanol series, cut along the coronal plane at the midline of the defect, and embedded in paraffin. Sections (3 μm thick) were each mounted on to individual slides and stained with H&E for observation under a light and polarized light microscope (Eclipse 90i; Nikon, Tokyo, Japan).

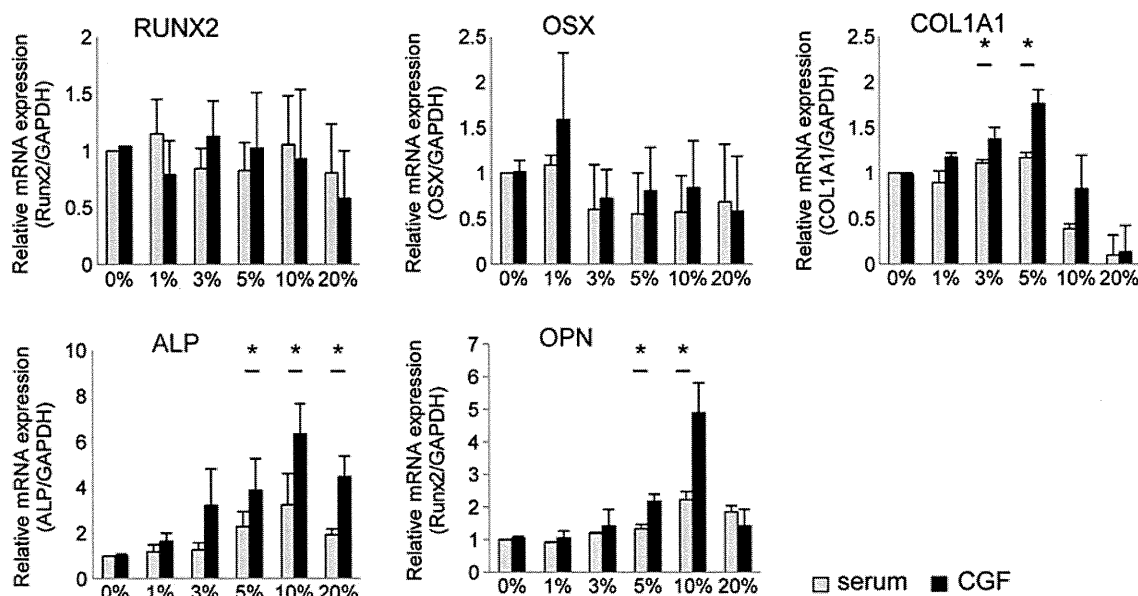
Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SD and a minimum of three independent experiments were performed for each assay. A two-sided unpaired Student’s *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test for multiple comparisons were used for statistical analysis of differences between groups. A statistical difference between experimental groups was regarded as significant when the *p* value was <0.05.

Results

Quantitative real-time PCR analysis of the effect of CGF extracts on expression of osteoblast-related genes

hTERT-E6/E7 cells were treated with CGF extract at concentrations of 1, 3, 5, 10, or 20 % in the culture medium for 3 days and CGF effects on osteoblastic gene expression were assessed by use of quantitative real-time PCR. Gene expression of ALP and osteopontin (OPN) was significantly increased by treatment with CGF extract (5–20 and 5–10 %, respectively) compared with treatment with the same concentration of serum (Fig. 2). Gene expression of Type 1 collagen alpha 1 (COL1A1) was also increased by treatment with 3–5 % CGF extract, but a high



**Fig. 2** Quantitative real-time PCR analysis of the effect of CGF extract on expression of osteoblast-related genes. Cells of the human mesenchymal stem cell line hTERT-E6/E7 were treated with different concentrations of a concentrated growth factors (CGF) extract or serum control for 3 days and mRNA expression of the indicated genes

was evaluated by use of quantitative RT-PCR. Expression of each gene was normalized to GAPDH expression. All data are mean ± SD from three independent experiments (each experiment used CGF from a different volunteer), each performed in duplicate. (\**P* < 0.05 compared with the serum group of the same concentration.)