
2-ST-37 細胞シート輸送をめざした保存条件の検討

preservation of cell sheet for transport

赤羽 学 (奈良県立医科大学 健康政策医学)

清水 隆品, 面川 庄平, 今村 知明, 田中 康仁

ラット間葉系幹細胞から作製した細胞シートを6, 12, 24時間、37℃で保存した後、人工骨と組み合わせで皮下移植を行い、その骨形成能を新鮮シートと比較した。4週後の組織像は全群で良好な骨形成が認められ、オシテオカルシン mRNA 発現に有意差は認めなかった。以上のことから、細胞培養センター (CPC) で培養した細胞シートを培養液とともに密閉チューブに入れて保存・輸送し、硬組織再生に応用できる可能性が示唆された。

10. 血管柄付き人工骨作製における骨芽細胞シートの有用性

○中野健一*1, 村田景一*2, 清水隆昌*1, 赤羽学*3, 小島康宣*1, 仲西康顕*1, 吉良務*1, 大西正展*1, 面川庄平*1, 田中康仁*1

*1奈良医大整形外科, *2市立奈良病院四肢外傷センター, *3奈良医大健康政策医学

【目的】我々は培養骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) から作製した高い骨形成能と血管誘導能を有する骨芽細胞シートを用いることで、血管柄付き人工骨 (vascularized tissue-engineered bone:VTEB) が作製可能であることを報告している。今回、VTEB 作製における骨芽細胞シートの有用性を検討した。

【方法】11週齢 Fischer344 ラットの大腿動静脈を挙上し、径 6mm、長さ 10mm、気孔率 75%の β TCP (Superpore®:PENTAX) に作製した側溝 (幅 2mm) に組み合わせた。人工骨に血管束のみ組み合わせた群を control 群、細胞浮遊液搭載型人工骨に血管束を組み合わせた群を cell 群、人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填したものを sheet 群とした (各群 n=16)。術後 2、4 週でサンプルを摘出し、組織像および real time PCR で ALP, OC, VEGF-A の mRNA 発現量を測定し比較検討を行った。

【結果】組織像では、移植後 2 週で全ての群で人工骨内部にわずかな新生血管を認め、control 群および cell 群で骨形成は認めず、sheet 群で血管束周囲に骨形成を認めた。移植後 4 週において control 群および cell 群で人工骨内にわずかな新生血管を認めたが、cell 群では人工骨周縁に骨形成を認めた。一方、sheet 群では血管束から人工骨内へ放射状に旺盛な骨形成および新生血管を認めた。術後 2 週の mRNA 発現量は ALP, OC は cell 群, sheet 群ともに control 群と比較し高値を示した ($p < 0.001$) が、VEGF-A は cell 群が control 群および sheet 群よりも高値を示した ($p < 0.01$)。術後 4 週の mRNA 発現量は全項目で sheet 群が control 群および cell 群より高値を示した ($p < 0.001$)。

【考察】細胞浮遊液を搭載した人工骨と比較し、骨芽細胞シートを人工骨と組み合わせることで血管束周囲に旺盛な血管新生と骨形成を認めた。血管束を骨芽細胞シートが取り巻くことで人工骨内に骨形成能と血管誘導能の両方を促すことが可能と考えられることから、VTEB 作製における骨芽細胞シートの有用性が示された。更に本方法により人工骨中心部から血管新生が促進されることから、様々な形状や大きさの VTEB が作製可能となり、骨欠損治療に対する有用な治療法として期待される。

4月5日(金) /G会場(ホテルアロバーム紀の国 2F 鳳凰の間・西) /15:22~15:57

1-G-G23-4 冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの注入移植による骨形成能の評価

¹奈良県立医科大学 整形外科、²奈良県立医科大学 健康政策医学、

³奈良県立医科大学 人工関節・骨軟骨再生医学講座

○倉 知彦(くら ともひこ)¹、赤羽 学²、清水 隆昌¹、藤間 保晶¹、川手 健次³、
田中 康仁¹

【目的】我々は、骨髄間葉系幹細胞(MSCs)を用いて作製した細胞シートの硬組織再建における有用性を報告してきた。今回、凍結・解凍した細胞シートの骨形成能を評価した。【方法】7週齢ラットの大腿骨から初期培養で獲得したMSCsを10cm培養皿に播種し二次培養した。14日後細胞シートとして採取し、TCプロテクターを用いて-80℃で4週間冷凍保存した。解凍後、細胞シートを同系ラットの背部皮下に注入移植し(冷凍群)、新鮮群と比較した(各群n=6)。移植後4週で摘出しX線及び組織像、リアルタイムPCRでアルカリフォスファターゼ(ALP)及びオステオカルシン(OC)のmRNA発現を測定した。また、ELISA法でOC定量も行った。【結果】冷凍群は、少量の脱落細胞を認めたが、肉眼的には新鮮群と比較し大きな変化を認めなかった。摘出標本では、両群ともX線で石灰化を認め、組織像でも骨組織を認めたが、形成された骨のサイズは冷凍群がやや小さかった。OC量は冷凍群が低値であったが、mRNA発現に有意差はなかった。【考察と結論】我々は新鮮細胞シートの注入移植で壊死骨等に骨形成能を付与できることを報告している。本結果より、新鮮細胞シートと同様に、冷凍細胞シートでも骨形成能を付与できると考えられる。本法は一度の骨髄採取と培養で作製した細胞シートを冷凍保存し、必要時に解凍して利用できるため、繰り返し移植が必要な症例に有用と考える。今後、冷凍保存方法を検討し骨形成能をさらに高める必要がある。

4月5日(金) / G会場 (ホテルアロバーム紀の国 2F 鳳凰の間・西) / 15:22~15:57

一般演題23

座長 村松 慶一

基礎2: 骨・軟骨

1-G-G23-1 骨形成細胞シートによる家兎移植腱骨孔間治癒の促進

¹奈良県立医科大学 整形外科、²奈良県立医科大学 健康政策医学、

³奈良県立医科大学 人工関節・骨軟骨再生医学

○稲垣 有佐 (いながき ゆうすけ)¹、上松 耕太²、赤羽 学²、小川 宗宏¹、川手 健次³、
田中 康仁¹

【目的】本研究では、偽関節モデルにおいて骨癒合促進効果が認められている骨形成細胞シート(OMCS)が、移植腱骨孔間の治癒を促進するか検討した。【方法】16週齢日本白家兎の骨髄間葉系幹細胞(MSC)を初期培養後、 1×10^4 cells/cm²の細胞密度で10cm培養皿に播種し、デキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で2次培養を行い、14日後スクレーパーを用いてOMCSを採取した。脛骨近位に径3mmの骨孔を作製し、そこに近位を大腿骨より切離した長趾伸筋腱を移植した。右脛骨にはOMCS移植を併用し(S群)、左は対照群(C群)とした。移植後3週で組織学的検討(n=3)と力学的評価(n=6)を行った。力学的評価は、マイクロCTを用いて計測した骨孔長で補正を行い、両群の引き抜き強度とした。【結果】S群では移植後3週で移植腱周囲に旺盛な骨形成を認め、その新生骨は移植腱に接着していた。一方、C群の骨形成はS群と比較しわずかであった。脛骨からの移植腱引き抜き強度は、S群(0.77N/mm²)がC群(0.60N/mm²)に比べ、有意に高かった(p<0.05)。

【考察および結論】MSCを用いた再生医療は、近年盛んに報告されている。我々が報告してきたOMCSは Scaffold freeで移植できるため、移植腱骨孔間隙の形状に容易に適合し充填させることができる。本研究によりOMCSによる移植腱骨孔間の治癒促進が示されたため、腱や靭帯再建術への応用が期待できる。



第32回整形外科バイオマテリアル研究会

基礎

12 冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの骨形成能評価

奈良県立医科大学 整形外科¹⁾、奈良県立医科大学 健康政策医学²⁾、
奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座³⁾

○しみず たかまさ 清水 隆昌¹⁾、赤羽 学²⁾、面川 庄平¹⁾、小島 康宣¹⁾、
村田 景一¹⁾、中野 健一¹⁾、川手 健次³⁾、田中 康仁¹⁾

【背景】 冷凍保存した培養細胞搭載型人工骨は、解凍後すぐに使用できることから、再生医療においてその普及に大きく貢献できる。しかし、解凍後骨形成能が低下することが指摘されており、冷凍保存培養人工骨の骨形成能を維持するための研究が広く行われている。我々は、培養骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSCs) から作製した細胞シートが高い骨形成能を有することを報告してきた。冷凍保存した細胞シートが解凍後も高い骨形成能を維持できれば、解凍後に人工骨と組み合わせることで、前述の問題を解決できると考えられる。

【目的】 冷凍保存した細胞シートの生体移植後の骨形成能を評価すること。

【方法】 7週齢 Fischer 344 ラットの大腿骨骨髄を採取し、初期培養で獲得した MSCs を 10cm 径培養皿に播種する。デキサメサゾン (10nM)、アスコルビン酸 (82 μg/ml) を添加した培地で二次培養を行い、細胞シートを採取した。保存期間が 4 週間 (4 週群) と 12 週間 (12 週群) の 2 群を作製。採取後直ちに移植したものを対照群とした (各群 n=6)。冷凍保存液はセルバンカーを用い、冷凍保存は -80℃ のフリーザーで行った。それぞれ細胞シートを円盤状ハイドロキシアパタイト (HA) にラップし、同系ラットの背部皮下に移植する。移植後 4 週目で摘出し、X 線画像および組織像、さらに ALP 活性、OC 含有量 (ELISA) を測定し骨形成を評価した。

【結果】 冷凍保存した細胞シートは、解凍後も細胞シートの形態を維持しており、顕微鏡下の観察でも、4 週群、12 週群ともに対照群と比較しその形態に変化を認めなかった。摘出標本は、3 群とも X 線画像、組織像で HA 周囲に新生骨を認めた。ALP 活性、OC 含有量は、存期間が長期になるにつれ低下する傾向があったが、3 群とも骨形成能を維持していた。

【考察】 本研究によって細胞シートは冷凍保存後も骨形成能が維持できることが示されたことから、冷凍保存培養人工骨の新たな作製方法の一つとして有用であると考えられる。

基礎

13 老齢ラットにおける骨芽細胞シートの有用性

奈良県立医科大学整形外科¹⁾、奈良県立医科大学健康政策医学²⁾、
奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座³⁾

○上羽 智之¹⁾、赤羽 学²⁾、清水 隆昌¹⁾、中野 健一¹⁾、
倉 知彦¹⁾、川手 健次³⁾、田中 康仁¹⁾

【目的】我々はこれまでに7週齢ラットの骨髄間葉系幹細胞(MSC)をシート状に培養しその有用性を報告してきた。今回、1歳齢ラットでも細胞シートが作製可能で骨形成能を有するかどうかを検討したので報告する。

【方法】7週齢(young)と1歳齢(old)F344ラットのMSCを初期培養後、トリプシン処理して作製した細胞浮遊液を6well培養皿に 1×10^4 cells/cm²の細胞濃度で播種した。デキサメタゾン(Dex)とアスコルビン酸(VC)含有培地(sheet群)および β -グリセロリン酸(β GP)を加えた骨形成培地(all+群)で2次培養を行い、生化学的評価を行った。同様の細胞浮遊液を 1×10^6 cell/mlに調整し円盤状 β -TCPに組み合わせた複合体をさらに14日間培養した群(T/C群)と、10cm培養皿で作製した細胞シートを円盤状 β -TCPと組み合わせた群(T/S群)を7週齢F344ラット背部皮下へ移植した。4週間後摘出し、XP、組織学的、生化学的評価を行った。

【結果】7週齢および1歳齢の細胞で作製したsheet群はall+群よりも有意にALP活性値は高値であった。カルシウム量はall+群でsheet群よりも有意に高値であった。7週齢および1歳齢から作製した細胞シートを人工骨に併用すると、両群ともXPでは人工骨周囲に石灰化を認め、組織像では人工骨周囲に骨形成がみられた。young T/S群はyoung T/C群よりも有意にALP活性値は高値であった。old T/S群はold T/C群よりも有意にALP活性値は高値であった。

【考察】老齢ラットにおいても細胞シートの作製が可能で、シート自体に高い骨形成能を持つことが示された。老齢ラットから作製した細胞シートを人工骨に組み合わせることにより従来の培養細胞・人工骨複合体より高い骨形成能が認められた。今回の結果により、細胞活性が落ちていると考えられている老齢ラットにおいても、細胞シートは高い骨形成能を持つことが示され、幅広い世代においても細胞シートは有用であることが示唆された。



第32回整形外科バイオマテリアル研究会

基礎

14 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製

奈良県立医科大学整形外科科学教室¹⁾、奈良県立医科大学健康政策医学教室²⁾、
国立病院機構奈良医療センター整形外科³⁾、奈良県立医科大学人工関節骨軟骨再生医学講座⁴⁾

○中野^{なかの} 健一^{けんいち}¹⁾、村田 田景一¹⁾、清水 隆昌¹⁾、赤羽 学²⁾、
藤間 保晶³⁾、小島康宣¹⁾、仲西康顕¹⁾、面川庄平¹⁾、
川手健次⁴⁾、田中康仁¹⁾

【目的】我々は培養骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) から作製した骨芽細胞シートの有用性を報告してきた。今回、骨芽細胞シートを用いて血管柄付き人工骨の作製を試みたので報告する。【方法】7 週齢 F344 ラットの大腿骨から MSCs を採取し、初期培養を行った。2 週後に 10cm 径培養皿に播種し、デキサメサゾン (10nM)、アスコルビン酸 (82 μ g/ml) 添加標準培地で二次培養 (14 日間) を行い、骨芽細胞シートとして採取した。11 週齢 F344 ラットの大腿動静脈を血管束として挙上し、 β -TCP (径 6mm、長さ 10mm、気孔率 75%:PENTAX 社製 SUPERPORE) に作製した側溝 (幅 2mm) に組み合わせた。人工骨に血管束を組み合わせた血管束単独群と、人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填した骨芽細胞シート群を作製した (各 n=6)。術後 4 週で、移植人工骨を血管束とともに周囲組織から剥離して摘出した。組織像 (各 n=2) で骨形成能の評価を行うとともに、アルカリホスファターゼ (ALP)、オステオカルシン (OC)、血管内皮増殖因子 (VEGF-A) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定し (各 n=4)、両群間で比較した (Student's t-test)。【結果】骨芽細胞シート群では血管束を組み合わせた部位から人工骨内に向けて放射状に新生血管を認め、血管と人工骨の間および人工骨内部に新生骨形成を認めた。一方血管束単独群では血管束と人工骨の間には軟部組織が存在しており、人工骨内の新生骨および新生血管はほとんど認めなかった。骨芽細胞シート群における ALP、OC、VEGF-A の mRNA 発現は、血管束単独群と比較して統計学的に有意に高値であった ($p < 0.05$)。【考察および結論】骨芽細胞シート移植を併用することで、人工骨に骨形成能を付与するだけでなく、血管束から人工骨内部へ新生血管が誘導される事が証明された。本研究から、良好な骨形成能を有する血管柄付き人工骨の作製が可能であることが示された。

2-PB1-9

骨髄由来間葉系細胞搭載人工骨の骨形成能に対するポリ ADP リボースポリメラーゼ阻害剤の影響

藤間 保晶¹ 土肥 祥子² 大串 始³ 谷掛 洋平³
高澤 伸⁴ 赤羽 学² 田中 康仁¹

【目的】ポリ ADP リボースポリメラーゼ(PARP)活性化による細胞死とその病態については各方面で研究されており、PARP 阻害剤の投与により再生遺伝子(Reg gene)が誘導され、Reg 蛋白質-Reg 受容体系による種々の細胞・組織の再生が確認されている。われわれは以前より Reg 蛋白質-Reg 受容体系による骨組織再生を検討してきた。今回、PARP 阻害剤投与による骨髄由来の間葉系細胞(MSC)を搭載したハイドロキシアパタイト(HAp)における骨形成能について検討した。

【方法】骨再生医療の実験手法として確立されているラット皮下移植モデルにて検討した。Fischer 344 ラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、初期培養により骨髄由来 MSC を獲得した。Scaffold には 5 mm 径の HAp disc を用いた。HAp disc に MSC を搭載し同系ラット皮下に移植した。移植時に PARP 阻害剤(3-aminobenzamide)を充填した持続注入浸透圧ポンプを体内に埋入し、2 週間の PARP 阻害剤持続投与を行った群(PI 群)と PARP 阻害剤非投与群(C 群)との骨形成能を ALP 活性および osteocalcin (OC) 測定による評価にて行い、組織学的にも比較検討した。また VEGF-A 遺伝子発現の測定による血管形成促進因子についても併せて検討した。

【結果】移植 4 週間後、PI 群で ALP 活性は有意に高値を認め、OC 値および OC mRNA 発現も同群が C 群と比較し高い傾向を示した。VEGF-A mRNA 発現についても同様に PI 群で高い傾向を示した。組織学的にも PI 群で HAp disc 内により多くの新生骨が認められる傾向にあった。

【考察】第 26 回本学会にて殺細胞同種骨を scaffold とした MSC 搭載同種骨において PARP 阻害剤投与により血管形成およびそれに伴う骨形成の促進が認められることを報告した。今回、scaffold に HAp を用いて検討した結果、同様に骨形成能および血管形成能がともに促進される傾向を認め、PARP 阻害剤が骨形成に寄与する可能性がさらに示された。今後、骨組織での骨再生における PARP 阻害剤の target を特定し、骨組織修復における Reg 発現メカニズムを解明することで、薬剤投与による骨再生の手法の開発が期待される。

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策 ³産業技術総合研究所健康工学 ⁴奈良医大生化学

2-PB2-6

Fibronectin をコートした β TCP の骨形成能

谷掛 洋平¹ 中島 弘司¹ 林 宏治¹ 加藤 宣伸¹
藤間 保晶² 大串 始³ 土肥 祥子⁴ 赤羽 学⁴
高澤 伸⁴ 川手 健次⁴ 田中 康仁⁴

【背景】骨欠損に対する補填材料として近年は scaffold が自家骨組織に置換される β TCP が汎用されている。われわれは骨形成能効率の高い β TCP を開発するため、予め細胞接着因子である fibronectin をコートした β TCP を作製し、その修飾 β TCP に培養間葉系幹細胞を搭載し *in vitro* と *in vivo* で骨形成能を検討したので報告する。

【方法】7週齢 Fischer 344 ラット骨髄細胞を採取、初期培養により間葉系幹細胞(MSC)を増殖させ、修飾 β TCP disk に MSC (2×10^4 cells/disk) を搭載した。MSC/fibronectin/TCP を 12-well のプレート上で Dexamethasone, β グリセロリン酸, Vit C を含む骨誘導培地で二次培養を行った。その後、同系ラット皮下に二次培養後の MSC/fibronectin/TCP disk を移植した。 β TCP に fibronectin (1 μ g/disk) を吸着後、凍結乾燥処理を施した fibronectin/TCP と非吸着の β TCP (コントロール群) の2群について骨形成能を検討した。*in vitro* 骨形成評価として二次培養時の培養上清オステオカルシン(OC)の経時的変化、*in vivo* 骨形成評価として移植後5週までの disk の ALP 活性測定および組織学的検討を行った。

【結果】培養上清 OC 値は MSC/fibronectin/TCP 群で培養開始後 10 日目にピークを示し (533.5 ng/ml)、コントロール群 (291.4 ng/ml) と比較し有意に高値を示した。また移植 5 週後の移植 disk の ALP 活性は MSC/fibronectin/TCP 群で 14.4 μ mol/30 min/disk とコントロール群の 3.1 倍高値を示し、組織学的にも MSC/fibronectin/TCP 群でより広範囲に disk 気孔内部および周囲に骨形成を認めた。

【考察】 β TCP の臨床使用において移植 β TCP の骨組織への置換および β TCP 内における骨分化のばらつきをしばしば経験する。これは β TCP が Hydroxyapatite と比較して細胞接着能力が低いことがその理由と考えられる。われわれは、あらかじめ fibronectin を β TCP 気孔表面に吸着させた修飾 β TCP disk を作製し培養間葉系幹細胞と組み合わせた。その結果 MSC の β TCP への接着性を促すことによって β TCP に高い骨形成能を付加することができたと考える。

¹大手前病院整形外科 ²奈良医療センター整形外科 ³産業技術総合研究所健康工学 ⁴奈良県立医科大学

2-PB1-4

骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治療過程の特徴

清水 隆昌¹ 赤羽 学² 森田 有亮³ 面川 庄平¹
小島 康宣¹ 村田 景一¹ 中野 健一¹ 上羽 智之¹
藤間 保晶¹ 川手 健次⁴ 田中 康仁¹

【目的】われわれは、培養骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)から作製した骨芽細胞シートの偽関節治療における有用性を報告してきた。今回、骨芽細胞シートを注入移植した際の偽関節部の治癒過程を組織学および力学的に検討したので報告する。

【方法】11-14週齢(体重240-300g)のFischer344ラット¹に大腿骨偽関節モデルを作製し、骨切り直後に骨芽細胞シートを注入した(n=24)。骨折部の固定はK-wire(径0.8mm)を用いた髓内釘固定を行った。骨芽細胞シートは、7週齢同系ラットの大腿骨から採取した骨髄の初期培養で獲得したMSCsを、デキサメサゾン(10nM)、アスコルビン酸(82μg/ml)添加培地で14日間二次培養し作製した。注入移植後4, 8, 12週での組織像、力学試験(3点曲げ)、および破断時の骨折線の走行を観察し骨折部の治癒過程を評価した。

【結果】組織像において、骨芽細胞シートを注入移植した骨切り部は、周囲から骨芽細胞シート由来の線維性骨が軟骨を介さず架橋され、内軟骨性骨化とは異なった像が観察された。術後4週で、骨切り部の骨皮質にはempty lacunaを認め壊死骨様であり、線維性骨と壊死大腿骨との間には肉芽組織が介在しており、骨癒合は認められなかった。術後8-12週で、線維性骨と壊死大腿骨の癒合が骨切り部周辺から骨切り部に向けて進み、線維性骨内にはわずかな軟骨組織が認められるのみであった。偽関節部が層板骨によって覆われる頃に、壊死大腿骨の骨皮質内にも新生血管が観察された。力学試験時の骨折線の走行は、治癒過程が進行するとともに骨折部から離れた部位を通る傾向になり、三点曲げによる最大曲げ荷重値(N)も増加する傾向を認めた。

【考察と結論】ラット大腿骨偽関節モデルにおいて、骨芽細胞シートによる骨癒合は周囲から進行しており、血流が最も悪い骨切り部の癒合が一番遅かった。骨芽細胞シートによる骨癒合を促進するためには、骨切り部周囲や髓内の血行を改善する処置も合わせて検討することが必要であると考えられた。

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策医学 ³同志社大生命医科学部医工学科 ⁴奈良医大人工関節・骨軟骨再生医学

2-PB1-3

培養骨芽細胞シートを用いた放射線照射自家処理骨の骨形成

内原 好信¹ 赤羽 学² 上羽 智之³ 清水 隆昌³
倉 知彦³ 藤間 保晶³ 川手 健次⁴ 田中 康仁³

【目的】われわれは骨髓間葉系幹細胞から作製した培養骨芽細胞シートが、人工骨だけでなく放射線照射自家処理骨にも容易に組み合わせることができ、新生骨形成が観察されることを報告した。今回、骨形成を生化学的に評価するとともに、新生骨組織の由来を分子生物学的に同定したので報告する。

【方法】7週齢F344ラット(メス)から摘出した大腿骨骨幹部の骨髓を生理食塩水で除去し、3mm長の円柱状に切断後、放射線照射殺細胞処理(60 Gy)を行った。7週齢ラット(オス)の骨髓細胞を初期培養後トリプシン処理し、 1×10^4 cells/cm²の細胞密度で10cm培養皿に播種した。デキサメサゾンとアスコルビン酸含有培地で14日間培養し、スクレーパーで細胞シートとして採取した。放射線照射骨に、骨芽細胞シートを組み合わせるものをシート群、放射線照射骨のみを移植したものを対照群とした。両群をラット(メス)皮下に移植し、4週後に組織学的に骨形成の有無を観察し(n=4)、リアルタイムPCRで、アルカリフォスファターゼ(ALP)、オステオカルシン(OC)のmRNA発現を評価した(n=3)。また、摘出標本から抽出したDNAを用いてSRY(Sex-determining region Y)遺伝子の有無をPCRで確認した。

【結果】対照群の組織切像は全例壊死骨像であったが、シート群では全例旺盛な新生骨組織が認められた。対照群に比べシート群で、ALP、OCのmRNA発現が有意に高かった(p<0.05)。SRY遺伝子はシート群でのみ認められた。

【考察】オス由来を示すSRY遺伝子が、骨芽細胞シートと組み合わせた放射線照射骨でのみ確認されたことから、移植した細胞シートが生着し新生骨を形成したと考えられる。放射線照射等で殺細胞処理した自家処理骨移植は、骨腫瘍切除後の再建術で用いられることがあるが、その生物学的活性は著しく低下する。殺細胞処理骨に骨形成能を付与する方法として、骨芽細胞シートとの組み合わせが効果的な手技の1つと考えられ、移植床との間で骨性架橋を作り早期に骨癒合が得られるのではないかと考えられる。

¹吉本外科・整形外科病院 ²奈良県立医科大学健康政策医学
³奈良県立医科大学整形外科 ⁴奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座

2-9-26

骨形成細胞シートによる家兎移植腓骨孔間治癒の促進

稲垣 有佐¹ 上松 耕太¹ 赤羽 学² 小川 宗宏¹
藤間 保晶¹ 倉 知彦¹ 粥川 陽介⁴ 森田 有亮⁴
川手 健次³ 田中 康仁¹

【目的】 靭帯再建術症例では、移植腓と周囲骨組織間の固着が得られるまでの一定期間、術後の安静を取った後にリハビリを開始するのが一般的であるが、移植腓骨孔間の固着を早期にえることができれば、早期のリハビリ開始が可能となる。そこで本研究では、偽関節モデルにおいて骨癒合促進効果が認められている骨形成細胞シートを、移植腓骨孔間の固着促進に応用できないか検討した。

【方法】 16週齢日本白家兎の骨髄間葉系幹細胞(MSC)を初期培養後、 1×10^4 cells/cm²の細胞密度で10 cm培養皿に播種し、デキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で二次培養を行い、14日後スクレーパーを用いて骨形成細胞シート採取した。脛骨近位に径3 mmの骨孔を作製し、そこに近位を大腿骨より切離した長趾伸筋腱を移植した。その際に、右脛骨には骨形成細胞シート移植を併用し(S群)、左は併用しない対照群(C群)とした。術後3および12週で組織学的検討(n=6)、術後3週で引張試験による力学的評価(n=6)を行った。力学的評価は、マイクロCTを用いて計測した骨孔長で補正を行い、両群の引き抜き強度とした。

【結果】 S群では術後3週で移植腓周囲に旺盛な骨形成を認め、その新生骨は移植腓に鋳着していた。一方C群の骨形成はS群に比較しわずかであった。術後12週では両群間に明らかな差は認めなかった。脛骨からの移植腓引き抜き強度は術後3週で、S群(0.77 N/mm²)がC群(0.60 N/mm²)に比べ、有意に高かった(p<0.05)。

【考察および結論】 MSCを用いた再生医療は、近年盛んに報告されているが、scaffoldによる免疫反応等の障害も懸念される。本研究で使用した骨形成細胞シートはscaffold freeで移植でき、しかも移植腓骨孔間隙の形状に容易に適合し、充填させることができる。本研究によって、骨形成細胞シートによる移植腓骨孔間の早期の固着が得られる可能性が示されたため、本法は靭帯再建術における術後安静期間を短縮させることができるだけでなく、骨欠損が問題となる再々建症例においても有用であると考えられる。

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策医学講座 ³奈良医大人工関節・骨軟骨再生医学講座 ⁴同志社大学生命医科学部バイオマテリアル研究室

1-5-8

骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製

中野 健一¹ 村田 景一¹ 清水 隆昌¹ 赤羽 学²
藤間 保晶³ 小島 康宣¹ 仲西 康顕¹ 面川 庄平¹
川手 健次⁴ 田中 康仁¹

【目的】われわれは培養骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)から作製した骨芽細胞シートの有用性を報告してきた。今回、骨芽細胞シートを用いて血管柄付き人工骨の作製を試みたので報告する。

【方法】7週齢F344ラットの大腿骨からMSCsを採取し、初期培養を行った。2週後に10cm径培養皿に播種し、デキサメサゾン(10 nM)、アスコルビン酸(82 µg/ml)添加標準培地で二次培養(14日間)を行い、骨芽細胞シートとして採取した。11週齢F344ラットの大腿動静脈を血管束として挙上し、円柱状βTCP(直径6 mm、長さ10 mm、気孔率75%：PENTAX社製SUPERPORE)に作製した側溝(幅2 mm)に組み合わせた。人工骨に血管束を組み合わせた血管束単独群と、人工骨と血管束の間に骨芽細胞シートを充填した骨芽細胞シート群を作製した(各n=6)。術後4週で、移植人工骨を血管束とともに周囲組織から剝離して摘出した。組織像(各n=2)で骨形成能の評価を行うとともに、アルカリホスファターゼ(ALP)、オステオカルシン(OC)、血管内皮増殖因子(VEGF-A)のmRNA発現量をリアルタイムPCRで測定し(各n=4)、両群間で比較した(Student's t-test)。

【結果】骨芽細胞シート群では、血管束を組み合わせた部位から人工骨内に向けて放射状に新生血管を認め、血管と人工骨の間および人工骨内部に新生骨形成を認めた。一方血管束単独群では、血管束と人工骨の間には軟部組織が介在しており、人工骨内の新生骨および新生血管はほとんど認めなかった。骨芽細胞シート群におけるALP、OC、VEGF-AのmRNA発現は、血管束単独群と比較して統計学的に有意に高値であった(p<0.05)。

【考察および結論】骨芽細胞シート移植を併用することで、人工骨に骨形成能を付与するだけでなく、血管束から人工骨内部へ新生血管が誘導されることが証明された。本研究から、良好な骨形成能を有する血管柄付き人工骨の作製が可能であることが示された。

¹奈良医大整形 ²奈良医大健康政策医学 ³国立病院機構奈良医療センター整形 ⁴奈良医大人工関節骨軟骨再生医学

0-32-3

細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療

清水隆昌¹, 赤羽学², 上羽智之¹, 森田有亮³, 粥川陽介³,
藤間保晶⁴, 面川庄平¹, 城戸顕¹, 川手健次⁵, 田中康仁¹

¹ 奈良県立医科大学整形外科, ² 奈良県立医科大学健康政策医学,
³ 同志社大学生命医科学部医工学科, ⁴ 国立病院機構奈良医療セ
ンター, ⁵ 奈良県立医科大学人工関節・骨軟骨再生医学講座

【目的】我々は、培養骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) を細胞シートとして培養する方法を考案し、その有用性を報告してきた。今回、細胞シートを用いた注入型骨移植が偽関節治療において有用であるかを検討した。

【方法】7週齢 Fischer344 ラットの大腿骨から骨髄を採取、初期培養し MSCs を採取した。デキサメサゾン (10nM)、アスコルビン酸 (82 μ g/ml) 添加標準培地で二次培養を行い、細胞シートを採取する一方で、標準培地のみで継代培養した MSCs を採取し、これらを同系ラットの大腿骨偽関節モデルに注入した。細胞シートを注入する S 群、MSCs (Passage2) を注入する C 群 (各群 n=24) の二群を作製し、骨切り部を X 線画像、 μ CT、組織像、三点曲げ試験により最大曲げ荷重値を計測した。

【結果】S 群では、X 線画像で術後 2 週から注入した細胞シートの石灰化を認め、術後 12 週までに全例で骨癒合を認めたが、C 群では、X 線画像、 μ CT で一部仮骨形成を認めるものの、術後 12 週まで骨癒合を認めなかった。組織像では、S 群で骨折部の架橋形成を認めたのに対し、C 群は骨折部の皮質骨が萎縮し線維性組織が介在していた。三点曲げ試験の最大曲げ荷重 (N) は、術後 12 週で両群に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

【考察と結論】MSCs と比較し、細胞シートは偽関節モデルに対して骨形成能を付加し、骨癒合させることが可能であり、「注入型骨移植」による低侵襲な偽関節治療の可能性が示された。

