

**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**

ヒト骨形成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

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 奈良県立医科大学 人工関節・骨軟骨再生医学講座 教授

研究分担者 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に対し、ヒト骨髄細胞から作製したヒト骨形成細胞シート移植により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を用いることで細胞シート移植による骨癒合を検討した。

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。μCT撮影によって作製したサンプルの偽関節骨切り部での骨形成を確認した後にサンプルの力学試験を行い、細胞シートを直接移植した群と注射器により注入した群の力学強度の測定結果を比較したところ、その強度には差がないことが確認された。

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形成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 で作製したヒト骨形成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、ヒト骨形成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

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過年度に実施したところ、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判明している。

そこで、本年度は昨年度に作製した専用ジグを用いて、我々がこれまでに確立しているヌードラット大腿骨偽関節モデル^{1, 2}におけるヒト骨形成細胞シートの骨形成能評価を実施した。

B . 2 . 偽関節モデルの作製

過年度に確立したヌードラット大腿骨偽関節モデル作製方法は、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)。

作製した偽関節モデルにヒト MSC による細胞シートを注入し術後 12 週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。細胞シートを注射器により偽関節部に注入した注入群と、直接的に細胞シートを偽関節部に移植したオープン群の力学的強度を測定した。

B . 3 - 3 . ヌ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 . μ CT 撮影による偽関節の評価方法の検討

X 線 μ 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 μ 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 μ 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 . 細胞シート注入を行ったヌードラット偽関節モデルの力学的評価

偽関節部の力学的強度が細胞シート注入により正常大腿骨に近づいた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。曲げ破壊時の最大曲げ荷重によ

て、注入群とオープン群とを比較した。

B . 6 . 力学試験結果の統計学的検討

注入群とオープン群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 . 7 . 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髓細胞を扱うものではない。

C . 研究結果

C . 1 . 偽関節モデルの μ CT 撮影による評価結果

図3に偽関節群の μ 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 . 細胞シート注入を行ったヌードラット偽関節モデルの μ CT 撮影による偽関節の評価結果

図4に注入群の μ CT画像を示す。術後12週において骨切り部周囲に新生骨の形成を認めたものの、骨切り部の良好な骨癒合を認めなかった。また、オープン群においても同様の傾向が観察された。

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 . 3 . 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5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 ± 14.4 Nであり、偽関節群の最大曲げ荷重は 71.1 ± 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。

C . 4 . 細胞シート注入を行ったヌードラット偽関節モデルの力学的評価の結果

図6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。オープン群の最大曲げ荷重は 0.64 ± 0.36 Nであり、注入群の最大曲げ荷重は 0.86 ± 0.40 Nと、有意差は見られなかった。また、正常大腿骨の最大曲げ荷重は 136.0 ± 14.4 Nであり、本研究での両群の力学的強度の値は非常に小さい値であったが、細胞シート注入による骨癒合が力学的強度により評価可能であった。

本研究ように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り、またその治癒状態が弱い状態であっても測定結果が得られることが判明した。

D．考察

μCT 撮影により骨切り部での良好な骨癒合を認められず、3点曲げ試験によって得られた注入群の力学強度は正常大腿骨と比べて有意に低い値となった。しかし、非常に小さい値ではあったものの、オープン群と注入群とで力学的強度の差がないことが評価でき、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

μCT 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

G．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

H．参考文献

1.Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, Tadokoro M, Ohgushi H, Dohi Y, Imamura T, Tanaka Y. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. Bone. 2010 Feb;46(2): 418-424.

2. 清水隆昌、川手健次、赤羽学、森田有亮、面川庄平、田中康仁 注入型骨移植を用いた偽関節治療における生体力学的考察 整形・災害外科 第55巻、11号、1289-1292、2012

図 1 ヌードラットにおける偽関節モデルの作製

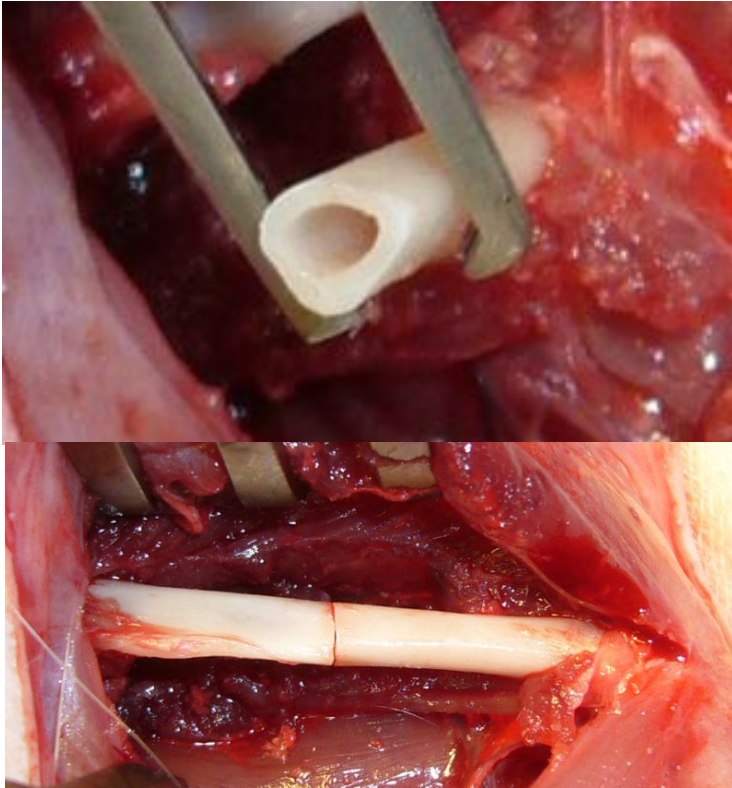


図 2 専用ジグによる 3 点曲げ試験（力学的評価）

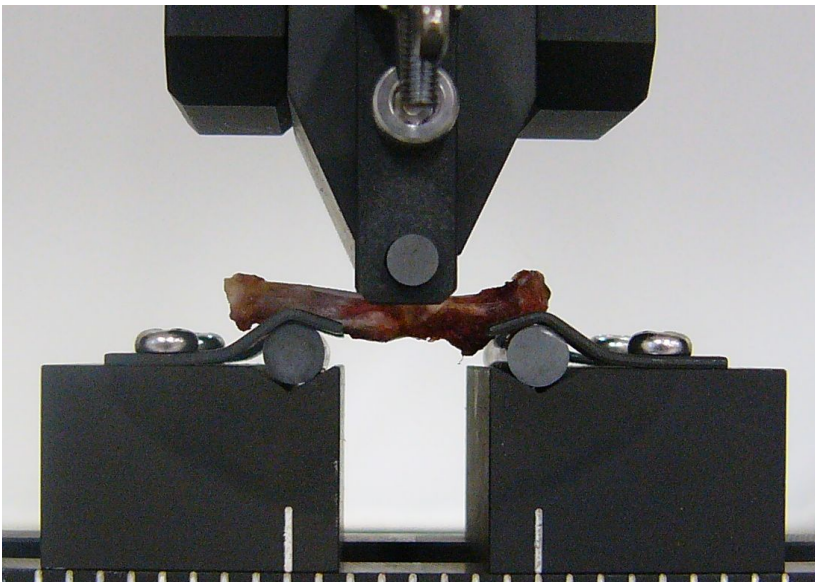


図3 偽関節群の μ CT画像



図4 注入群の μ CT画像



図5 3点曲げ試験の結果

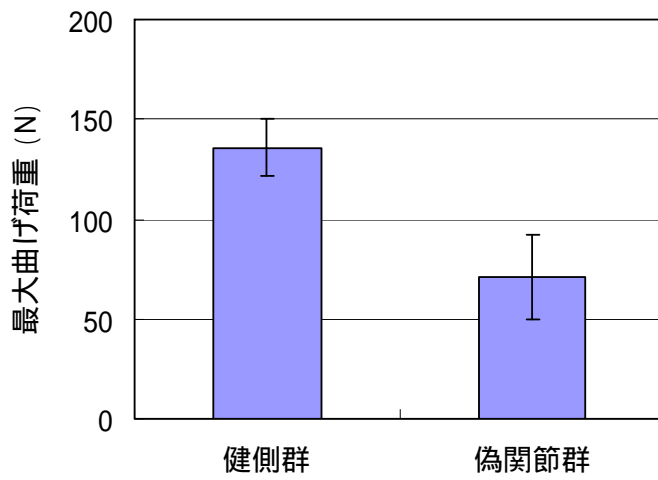


図6 3点曲げ試験の結果

