tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis : suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* **333** : 207-215, 2008
6) Murphy JM *et al* : Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **48** : 3464-3474, 2003
7) Horie M *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* **27** : 878-887, 2009
8) Horie M *et al* : Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *J Bone Joint Surg Am* **94** : 701-712, 2012
9) Horie M *et al* : Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis Cartilage* **20** : 1197-1207, 2012
10) Hara M *et al* : *In vivo* bioimaging using photogenic rats : fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J Autoimmun* **30** : 163-171, 2008

整形・災害外科 *Orthopaedic Surgery and Traumatology* Vol. 56 No. 5 2013

再生医療の現況と最前線

滑膜由来間葉系幹細胞を用いた半月板再生の基礎と臨床への展望

堀 江 雅 史　宗 田 　大　関 矢 一 郎

金 原 出 版 株 式 会 社

整・災外 56：593−601, 2013

再生医療の現状と展望：細胞を用いた再生医療

滑膜由来間葉系幹細胞を用いた半月板再生の基礎と臨床への展望

堀江雅史[*1)] 宗田　大[*1)] 関矢一郎[*2)]

要旨：半月板損傷に対する外科的治療として，修復術や切除術が一般的だが，再断裂や切除後の関節軟骨の変性等の問題があり，よりよい新たな治療法の開発が望まれている。間葉系幹細胞は成体の様々な間葉組織から採取でき，なかでも滑膜由来の間葉系幹細胞（滑膜幹細胞）は，自己血清を用いた培養での増殖能が高く，軟骨分化能が高いことから，半月板再生の細胞源として利用価値が高い。われわれは，動物半月板切除モデルを用いて，滑膜幹細胞移植により半月板の再生が促進されるか検討を行った。その結果，ラット半月板広範囲切除後に滑膜幹細胞を関節内投与すると，12週までの観察において半月板再生を促進する効果がみられた。関節内投与した細胞は膝以外の他臓器へ移動することなく損傷組織に生着し，直接半月板様細胞に分化した。またウサギ半月板無血行野に円柱状欠損を作成後に滑膜幹細胞を局所投与すると，細胞は24週まで欠損部に存在し，1型・2型コラーゲン陽性の半月板様細胞に直接分化し半月板再生を促進した。本手法の臨床応用を目指して今後もさらなる研究を進めていく。

I．背　景

半月板は膝関節の大腿骨と脛骨がなす関節面に存在する線維性軟骨で，荷重分散や関節安定性等の重要な機能を担っている。外傷や加齢性変化によって半月板が損傷した場合，膝関節の痛みやひっかかりなどの症状が生じる。損傷した半月板の条件がよい場合，修復術を行い半月板の温存を目指すが，修復術の適応となる症例は限られ，また再断裂の問題がある。損傷を受けた半月板を切除すると，短期的には半月板の刺激症状は軽快するが，ヒトの半月板は再生能力が低く，長期的には関節軟骨の変性が増悪する。欧米では半月板の同種移植が行われているが，供給数，治癒環境，手術侵襲などの観点から，一般的な治療にまでは普及していない。

間葉系幹細胞は成体の間葉組織から採取でき，自己の細胞を使用できる点から，再生医療の細胞源として期待されている[1)]。間葉系幹細胞は，骨髄由来のものが研究対象として最も普及しているが，脂肪や筋肉等の他の間葉系組織からも採取可能である。なかでも滑膜から分離した間葉系幹細胞（滑膜幹細胞）は，自己血清を用いた培養での増殖能が高く[2)]，軟骨分化能が高いことから[3)〜5)]，

*1) Masafumi HORIE et al，東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科，運動器外科学
*2) Ichiro SEKIYA，同上，軟骨再生学

In vivo animal studies and clinical futures of meniscal regeneration using synovium-derived mesenchymal stem cells

Key words：Meniscus regeneration, Mesenchymal stem cells（MSCs）, Synovium

半月板再生の細胞源として利用価値が高い。

これまで骨髄間葉系幹細胞を動物の膝関節内に投与することにより，切除した半月板が再生されることを示した報告[6]があるが，再生半月部の移植細胞の局在が必ずしも明確ではなく，移植細胞が直接半月板細胞に分化したのか，あるいは関節内注射した細胞が産生する栄養因子により再生が促進されるものなのか，明確ではなかった。また，間葉系幹細胞を関節内投与した後に，移植細胞が増殖するのかしないのか，あるいは関節内にとどまるのか遠隔臓器に移動するのかが不明であった。そのため臨床応用にあたり，必要な細胞数や，投与回数，さらには安全性に関する疑問があった。また半月板損傷に対する滑膜由来の間葉系幹細胞の治療効果についてはほとんどわかっていなかった。

われわれは滑膜幹細胞の臨床応用をめざして，半月板再生に関する種々の研究を行ってきた[7)~9)]。本稿の前半では，ラット半月板広範囲切除モデルにおいて滑膜幹細胞の関節内投与による半月板の再生効果と，移植細胞の動態に関する解析結果について述べる。また後半では，中動物（ウサギ）における半月板無血行野損傷に対する滑膜幹細胞移植の効果について述べる。

Ⅱ．ラット半月板広範囲切除モデルを用いた検討[7]

半月板を広範囲に切除した後に滑膜幹細胞を関節内へ投与すると，半月板の再生が促進される。

1. 方　法

半月板の再生研究を進めるにあたり，マウスでは小さすぎて半月板損傷モデルの作成は困難であるが，ラットではそれが可能である。共同研究者の小林らはルシフェラーゼとLacZの2つの遺伝子を同時発現するトランスジェニック・ラットを開発した[10]。このダブルトランスジェニック・ラット由来の間葉系幹細胞を用いることにより，移植細胞の詳細な動態解析が可能となった。ルシフェラーゼはホタルの発光にかかわる酵素で，ルシフェリンと反応させることにより，レシピエントを生かしたまま移植細胞を発光させ，移植細胞の追跡を可能とする。またLacZは，X-galと反応させることにより移植細胞を青く特異的に染色させることを可能にし，移植細胞の正確な局在を明らかにできる。本研究では，まずこのトランスジェニック・ラットの膝滑膜からルシフェラーゼとLacZ遺伝子を同時に発現する滑膜幹細胞を採取し，以下の実験に用いた。

野生型ラットの両膝関節を切開して，半月板の前方半分を切除摘出（図1A）した後に，ルシフェラーゼとLacZ遺伝子を同時に発現する滑膜幹細胞500万個を含む浮遊液を片側の膝関節へ投与した（MSC群）。比較のため，反対側の膝には細胞投与を行わず（Control群），それぞれの半月板の修復過程を観察した。

2. 結　果

2週後，膝関節を展開しX-galで染色すると，半月板欠損部と，切開後縫合した関節包部に，LacZ陽性細胞が観察された（図1B）。このことは，関節内注射した滑膜幹細胞が組織損傷部に高率に生着することを示している。移植後4週間経過すると，MSC群ではControl群よりも半月板が大きく再生していた（図1C）。12週までの半月板を観察すると，2, 4, 8週で幹細胞を注射したものは，Control群よりも半月板が大きく再生していた（図1D）。また，再生した部位にはLacZ陽性の組織が含まれており，注射した細胞が生着し，半月板を構成する細胞に直接分化することがわかった（図1D）。12週では，Control群でも幹細胞を注射したものと肉眼的には同程度の大きさであったが，組織学的に詳細に検討すると，幹細胞を移植した膝の半月板は，軟骨組織に特徴的なⅡ型コラーゲンを発現している一方，Control群ではⅡ型コラーゲンを発現しておらず，幹細胞の注射により半月板の質が向上することが示された（図2A）。電子顕微鏡による検討では，幹細胞移植後の半月板は正常半月板に近い細胞形態であることがわかった（図2B）。

ルシフェラーゼ陽性の滑膜幹細胞を正常膝（半月板損傷のない膝）の関節内に注射すると，発光強度が時間経過とともに減少し，7日以降では観察できなくなった。他方，半月板を切除したもの

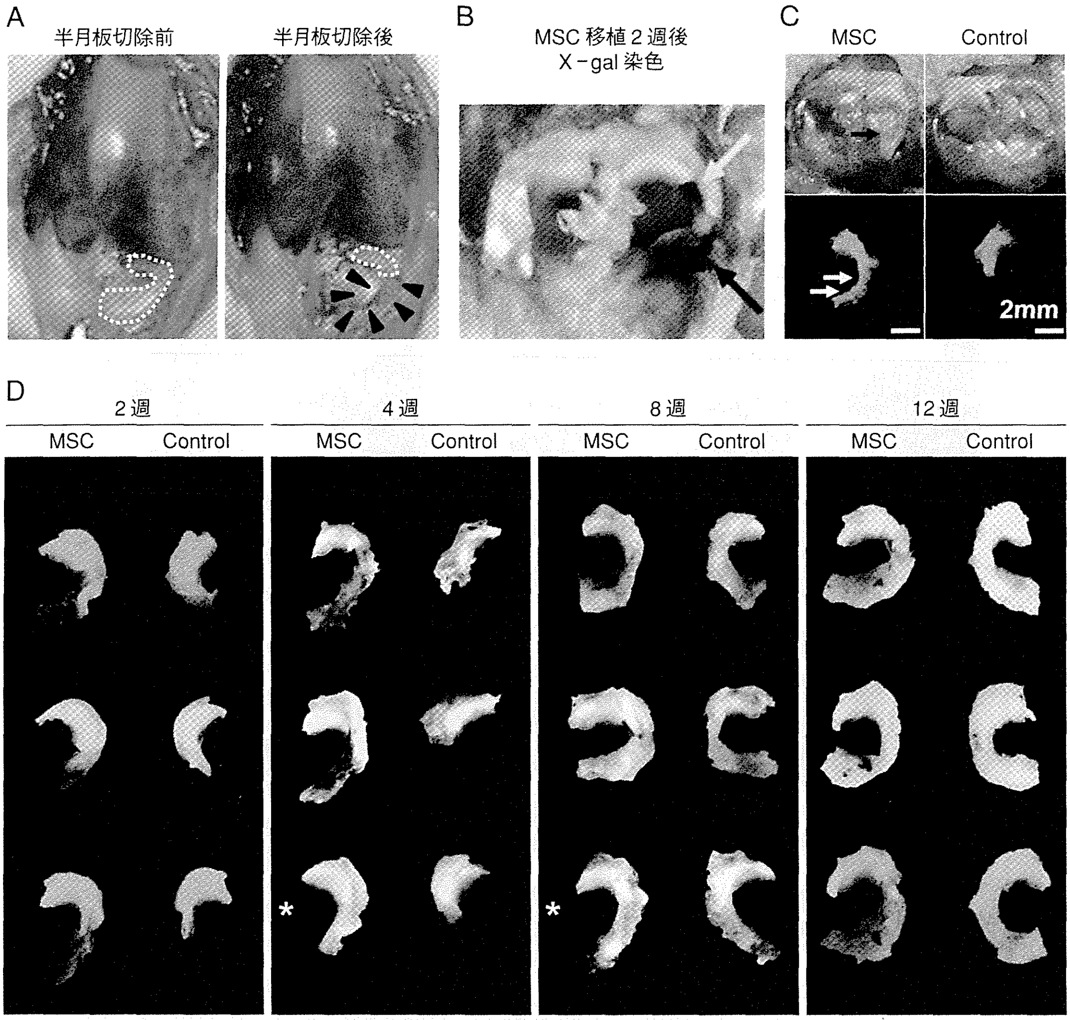


図 1

A　ラット半月板の切除前と切除後の肉眼像。膝関節を切開後に内側半月板を露出させ（左），前方 1/2 を切除した（右）。白点線部は半月板を，黒矢頭部は切除が行われた部位を示す。

B　2 週時の膝肉眼像。LacZ 陽性組織（濃青色の部分）が半月板再生部（黄色矢印）と関節切開部（黒矢印）に認められた。

C　4 週時の肉眼像。MSC 群（左）において半月板は Control 群（右）に比べてより大きく再生していた。矢印は再生した半月板を示す。

D　半月板肉眼像。2, 4, 8 週では MSC 群において半月板は Control 群に比べてより大きく再生していた。LacZ 陽性組織（濃青色の部分）が 12 週まで再生部分に認められた。

に同様の検討を行うと，発光強度は漸増し，3 日でピークに達し，その後，漸減した（図 3）。正常膝では発光は早期に減弱していったのに対して，半月板損傷のある膝では，ルシフェラーゼ発光強度が増す，あるいはルシフェラーゼ陽性細胞の数が一過性に増加したという点は興味深い。また関

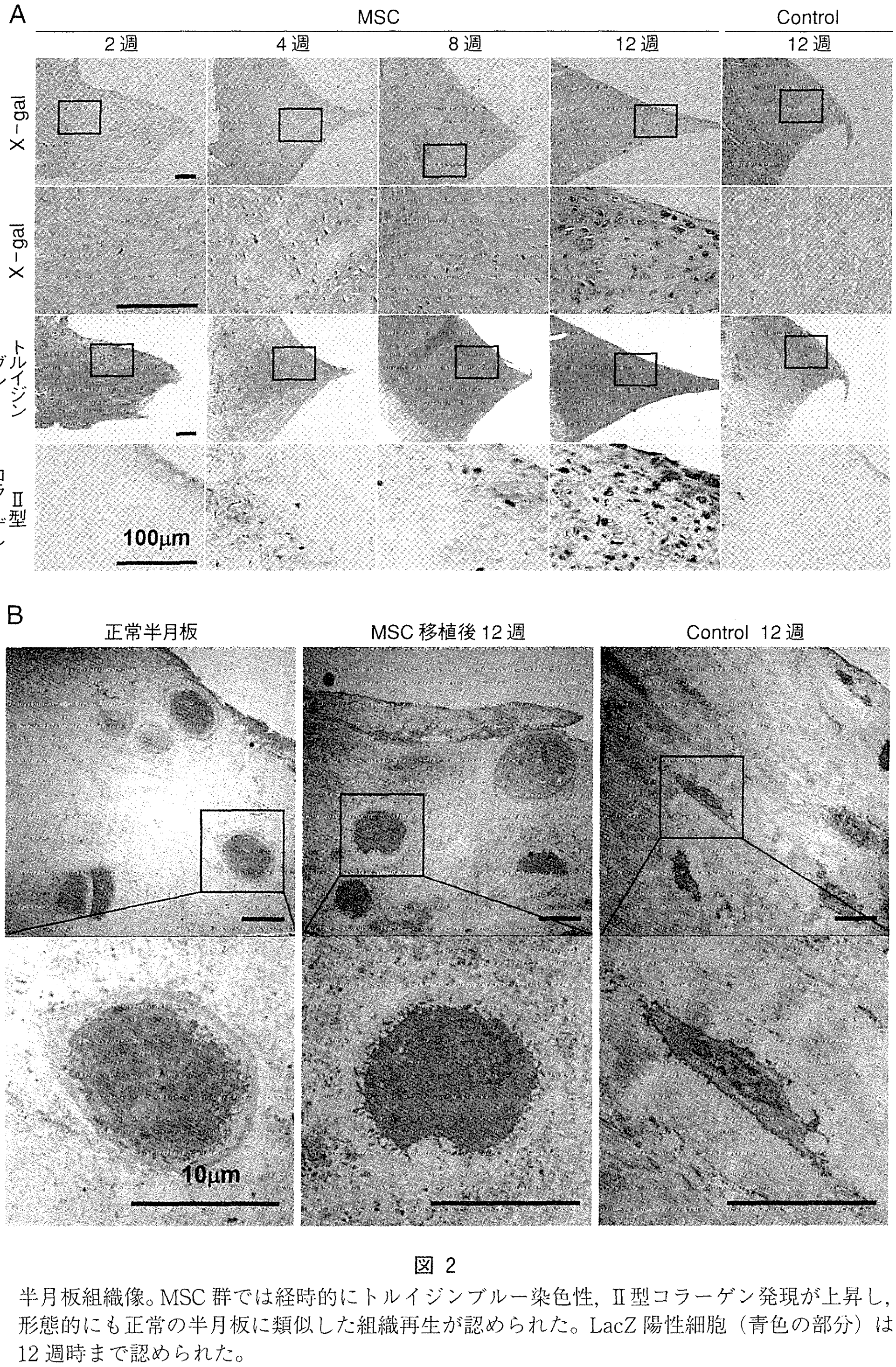


図 2

A　半月板組織像。MSC 群では経時的にトルイジンブルー染色性，Ⅱ型コラーゲン発現が上昇し，形態的にも正常の半月板に類似した組織再生が認められた。LacZ 陽性細胞（青色の部分）は 12 週時まで認められた。

B　12 週時の半月板電子顕微鏡像。MSC 群では，再生組織には正常半月板細胞に類似した円形の半月板様細胞が認められた。Control 群では紡錘形の線維芽細胞が大部分を占めていた。

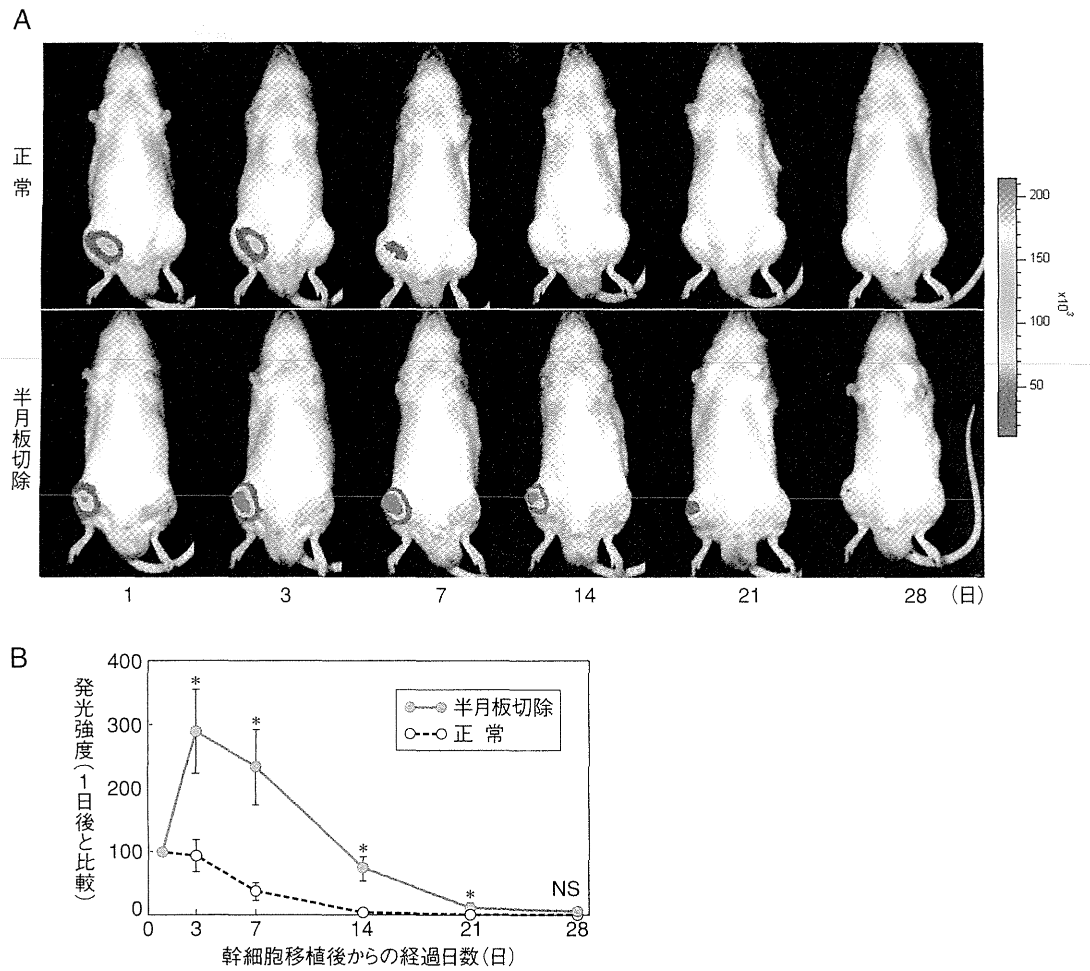


図 3

A　バイオイメージング像。ルシフェラーゼ陽性の幹細胞を正常膝または半月板切除膝に投与した。半月板切除膝では，より長期間発光が認められた。赤は発光強度が強く，青は発光強度が弱いことを示す。

B　ルシフェラーゼ発光の定量評価。正常膝では幹細胞由来の発光は早期に減弱したが，半月板切除膝では一過性に上昇し緩やかに減弱した。

節内に注射した滑膜幹細胞が肺等の膝関節以外の臓器に移動する現象は認められなかった。

本研究によって，滑膜幹細胞を関節内に投与すると切除した半月板の再生が促進されることが示された。ルシフェラーゼとLacZのダブルトランスジェニック・ラットの滑膜由来の幹細胞を使用することにより，注射した細胞が損傷組織に生着し，直接半月板様細胞に分化する機序が存在すること，関節内注射した間葉系幹細胞は一過性に増殖するがその後，漸減すること，注射した細胞は他臓器へ移動しないことが明らかになった。

Ⅲ．ウサギ無血行野部分欠損モデルを用いた検討[8)]

半月板無血行に円柱状欠損を作成した後に滑膜幹細胞を局所投与すると，半月板の再生が促進さ

れる。

1. 方　法

ウサギ内側半月板無血行野に直径 1.5 mm の円柱状欠損を作成（図 4）した後に，GFP あるいは蛍光色素（CM-DiI）で標識した滑膜幹細胞 200 万個を含む PBS 浮遊液を半月板欠損部に局所投与した（MSC 群）。比較のため，反対側の膝には細胞投与を行わず（Control 群），それぞれの半月板の修復過程を 24 週時まで観察し，形態・組織学的解析を行った。

2. 結　果

肉眼的観察においては，Control 群では 4 週，12 週では 5 例中 4 例において欠損部が残存したままであったのに対して，MSC 群では 4 週時に欠損部が残存したものは 1 例のみであり，12 週以降は全例で欠損部が再生組織で覆われていた（図 5）。

図 4　ウサギ半月板部分欠損作成後の肉眼像
ウサギ内側半月板無血行野に直径 1.5 mm の円柱状欠損を作成した（矢印）。

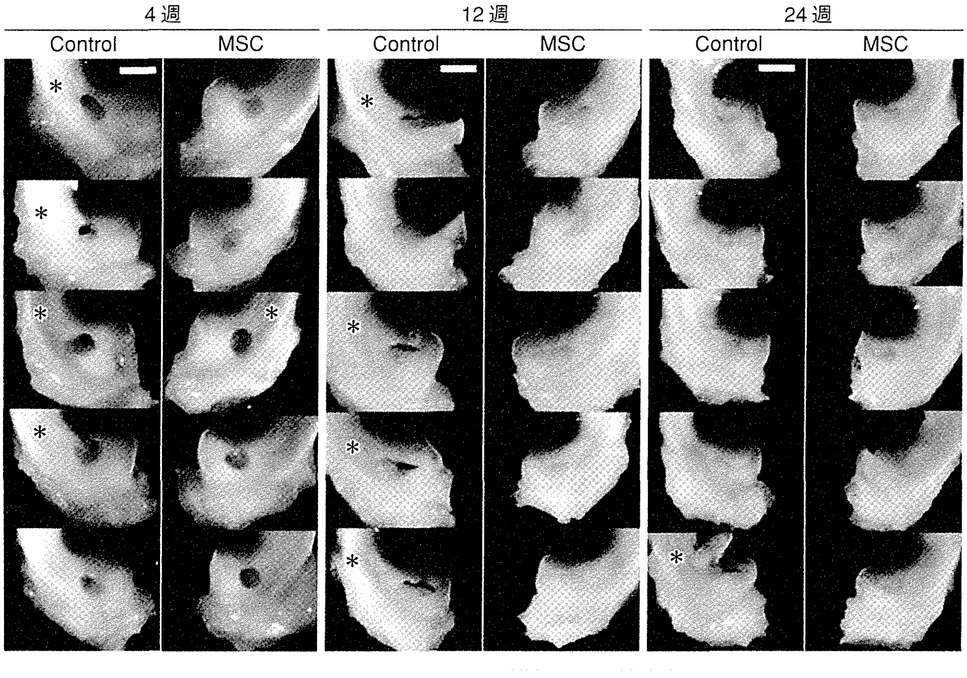


図 5　半月板肉眼像（n=5）
4 週時，Control 群では 5 例中 4 例において欠損部が残存したままであったのに対して，MSC 群では欠損部が残存したものは 1 例のみであった。12 週時，Control 群では 4 例に欠損部が残存していたが，MSC 群では全例で欠損部が再生組織で覆われていた。24 週時，Control 群では 1 例に欠損部が残存していた。（*は肉眼的に確認できる欠損部が残存した例を示す）

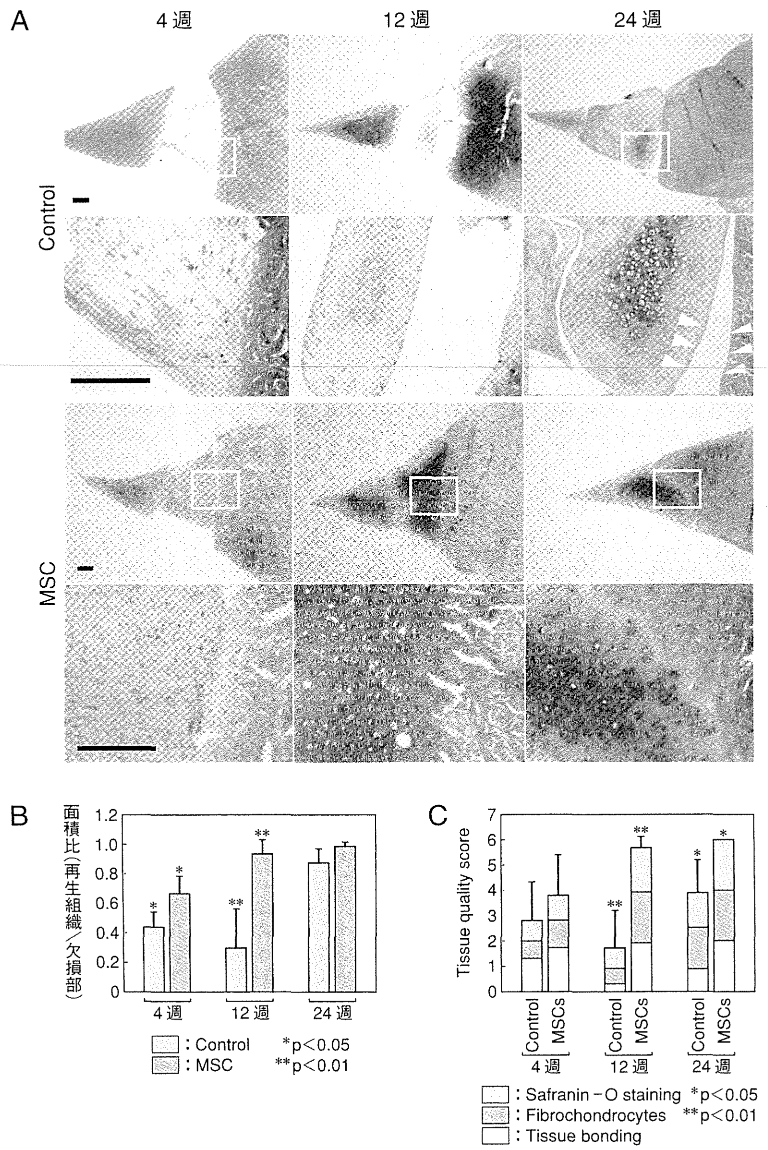


図 6

A　半月板組織像（サフラニン染色）。Control 群では 4 週時は欠損部への細胞流入は疎であり，12 週時になると部分的に軟骨に分化した再生組織が確認できたが，欠損部の充填は不十分で間隙が残存した。24 週になると欠損部は再生組織でほぼ充填されたが，大部分は線維性組織であり，間隙は結合しないまま残存した（矢印）。一方 MSC 群では，4 週時には欠損部は高密度の細胞と豊富な細胞で満たされ，12 週時にはサフラニン染色陽性の基質成分に富んだ軟骨様組織に分化し，境界部の結合性も良好であった。また 24 週時にはさらに成熟した軟骨様組織に分化していた。

B　半月板欠損部の再生面積比（再生組織/欠損部）。4 週，12 週時において MSC 群が有意に大きく再生していた。

C　組織学的スコアによる質的評価。再生組織のサフラニン染色性，細胞形態，組織結合性の 3 項目について，各項目 0～2 点とし（6 点満点）評価した。12 週，24 週時において MSC 群が有意に良好な点数を示した。

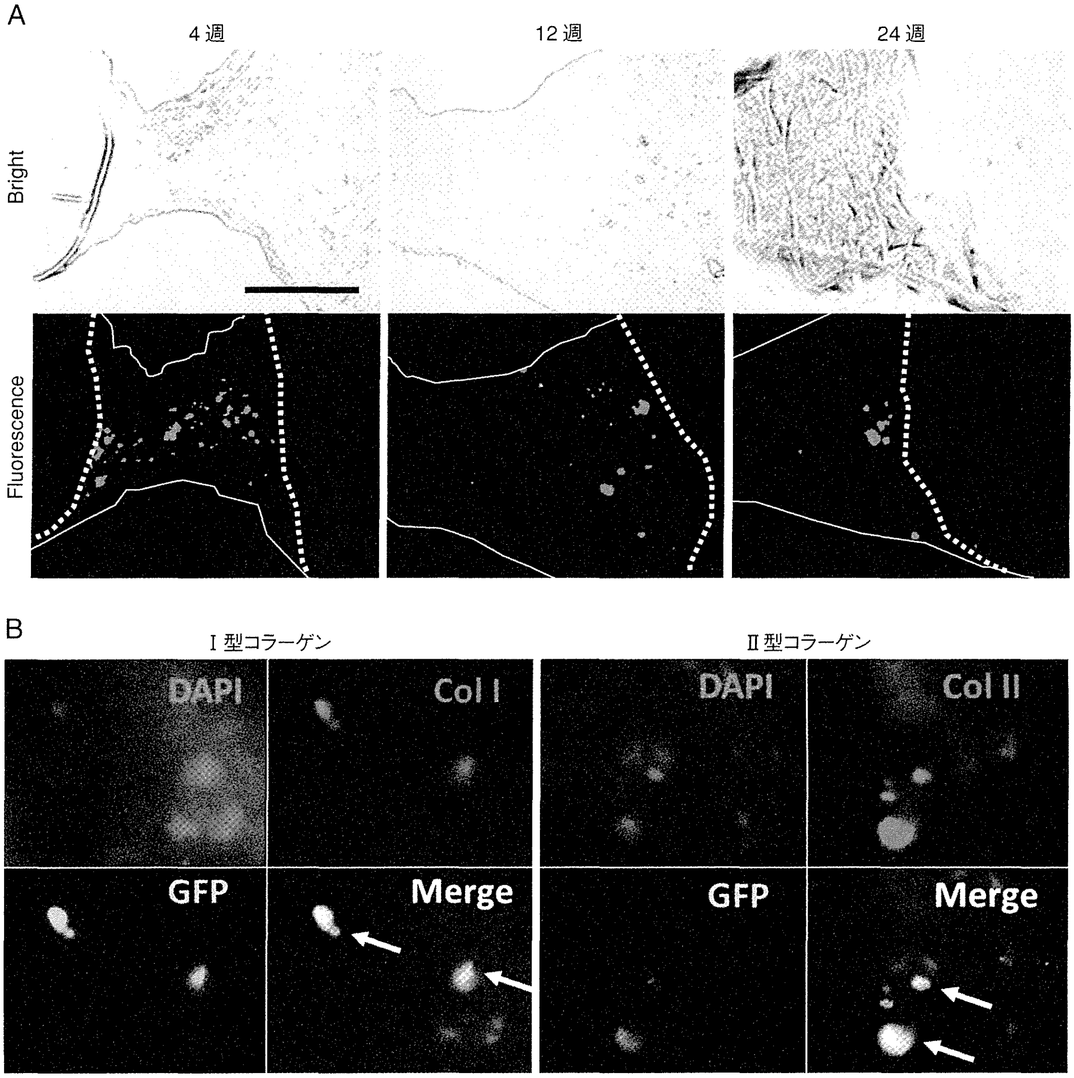


図7

A　CM-DiI 陽性の滑膜幹細胞移植後の蛍光顕微鏡像。CM-DiI 陽性の細胞（赤）は欠損部に集積し 24 週時まで残存していた。また経時的に CM-DiI 陽性の細胞数は減少した。

B　GFP 陽性の滑膜幹細胞移植後 12 週の免疫染色（Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン）。GFP 陽性細胞（緑）は，Ⅰ型・Ⅱ型コラーゲン陽性細胞（赤）に直接分化した。Col Ⅰ：Ⅰ型コラーゲン，Col Ⅱ：Ⅱ型コラーゲン。

組織学的には，Control 群では 4 週時は欠損部への細胞流入は疎であり，12 週時になると部分的に軟骨に分化した再生組織が確認できたが，再生組織と残存半月板との境界は結合せずに間隙が残存したままであった。24 週になると欠損部は再生組織でほぼ充填されたが，大部分は線維性組織であり，間隙は結合しないまま残存した。一方 MSC 群では，4 週時には欠損部は高密度の細胞と豊富な細胞でほぼ充填され，12 週時にはサフラニン染色陽性の基質成分に富んだ軟骨様組織に分化し，

境界部の結合性も良好であった。また24週時はさらに成熟した軟骨様組織に分化していた（図6A）。

組織学的定量評価では4週，12週時において，欠損部の修復面積は4週，12週時においてMSC群が有意に大きく再生しており（図6B），組織学的スコアを用いた質的評価では12週，24週時においてMSC群が有意に良好な点数を示した（図6C）。

細胞追跡を行うために，蛍光色素（CM-DiI）で標識した滑膜幹細胞を投与し，蛍光顕微鏡で観察すると，投与したCM-DiI陽性の細胞は欠損部に集積し24週時まで残存していた。また経時的にCM-DiI陽性の細胞数は減少していくことがわかった（図7A）。さらにGFP陽性の滑膜幹細胞を用いて同様のモデルで観察を行うと，細胞投与後12週時には，GFP陽性の細胞はI型・II型コラーゲン陽性の半月板様細胞に直接分化していた（図7B）。

本研究によって，ウサギ半月板無血行野での半月板欠損に対して，滑膜幹細胞を局所投与すると半月板の再生が促進されることが示された。

IV．今後の展望

筆者らは，滑膜幹細胞の移植により損傷した半月板の再生が促進されることを動物モデル（ラット・ウサギ）で示してきた。臨床応用のためには，よりヒトの構造に近い大動物（ブタなど）での検証や，再生した半月板の強度の検証などが必要であり，現在解析を進めている。

本細胞治療のメリットは，自分自身の滑膜を利用できること，自己血清を用いて細胞を大量に増やせること，関節鏡を用いて低侵襲に細胞を移植できること，などが挙げられる。筆者らは自家滑膜間葉系幹細胞を用いて，膝の関節軟骨損傷に対する再生治療を既に臨床応用している。2008年より開始し，多くの例で軟骨が再生することを確認している。著明な合併症を認めていない。

これまで治療困難であった半月板損傷に対して，本手法が有効な治療手段となることを目指し今後も，さらなる研究を進めていく。

〔本研究は「再生医療の実用化ハイウェイ」と「グローバルCOEプログラム」の支援による。〕

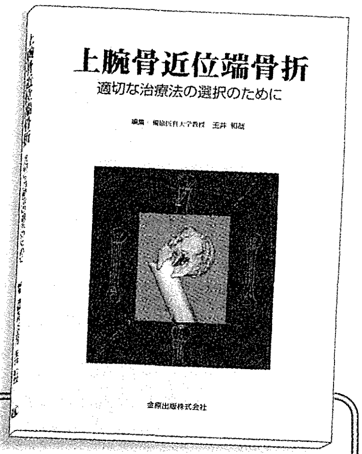
文　献

1) Pittenger MF et al：Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science **284**：143−147, 1999
2) Nimura A et al：Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum；comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. Arthritis Rheum **58**：501−510, 2008
3) Sakaguchi Y et al：Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues；superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum **52**：2521−2529, 2005
4) Yoshimura H et al：Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. Cell Tissue Res **327**：449−462, 2007
5) Koga H et al：Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis；suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. Cell Tissue Res **333**：207−215, 2008
6) Murphy JM et al：Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. Arthritis Rheum **48**：3464−3474, 2003
7) Horie M 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 **27**：878−887, 2009
8) Horie M et al：Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. J Bone Joint Surg **94-A**：701−712, 2012
9) Horie M et al：Intra-articular injection of human mesenchymal stem cells (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. Osteoarthritis Cartilage **20**：1197−1207, 2012
10) Hara M et al：In vivo bioimaging using photogenic rats；fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. J Autoimmun **30**：163−171, 2008

骨折型別の治療方針，症例検討など，
適切な治療法選択に役立つ情報満載の実践書!!

上腕骨近位端骨折
適切な治療法の選択のために

編集 玉井 和哉 獨協医科大学教授



人口の高齢化に伴い増加の一途を辿り，以前にも増して難しい対応が迫られる上腕骨近位端骨折。その歴史的変遷や分類（AO分類/Neer分類），診断から治療原則，保存療法，手術療法，骨折型別の治療方針まで，治療者が知りたい情報を網羅した。また，1症例について3名の著者がそれぞれの対応法を述べた症例検討の章も設け，日常診療で遭遇する疑問に答えうる一冊に。適切かつ合理的な治療法の選択に役立つ，整形外科医，外科医必読の実践書。

B5判 176頁 321図 原色5図 ISBN978-4-307-25149-5
定価7,140円（本体6,800円+税5%）

主な内容

第1章 総 論
❶上腕骨近位端骨折の疫学 ❷上腕骨近位端の機能解剖と骨折発生メカニズム ❸上腕骨近位端骨折の治療と骨密度 ❹上腕骨近位端骨折の画像診断法 ―単純X線，CT・三次元CT，MRI ❺上腕骨近位端骨折後の上腕骨頭壊死 ❻上腕骨近位端骨折治療の歴史的変遷 ❼小児の上腕骨近位端骨折の治療原則 ❽成人の上腕骨近位端骨折の治療原則 ❾治療成績評価法

第2章 分 類
❶上腕骨近位端骨折の分類の歴史的変遷 ❷AO分類の特徴と運用法
❸Neer分類の特徴と運用法 ❹分類の目的と限界

第3章 保存療法
❶徒手整復法 ❷早期運動療法 ❸保存療法の限界 ―どこまで保存的に治療できるか?

第4章 手術療法
❶創外固定 ❷Kapandji法とその変法 ❸All-in-One nail固定 ❹Ender釘固定 ❺髄内釘固定 ❻プレート固定 ❼人工骨頭置換術 ❽手術に伴う合併症とその予防 ❾手術後骨片転位の許容範囲と対処法

第5章 骨折型別の治療方針
❶1-part骨折 ❷2-part大結節骨折 ❸2-part外科頸骨折 ❹3-/4-part骨折 ❺外反嵌入骨折
❻偽関節に対する治療 ❼骨粗鬆化の高度な症例の治療

第6章 症例検討 ―私ならこうする 【症例1】【症例2】【症例3】

読者対象 整形外科医，外科医

2010・11

金原出版 〒113-8687 東京都文京区湯島2-31-14 TEL03-3811-7184（営業部直通） FAX03-3813-0288
振替00120-4-151494 ホームページ http://www.kanehara-shuppan.co.jp/

ISSN 0914-8124
文献略称 M B Orthop.

Monthly Book Orthopaedics

Vol. 26
No. 13 別刷

膝半月板損傷診療マニュアル

2013年 12月 15日発行

株式会社 全日本病院出版会

MB Orthop. 26(13)：73-79, 2013.

特集：膝半月板損傷診療マニュアル

半月板治療の限界と将来展望；滑膜幹細胞による半月板再生

関矢一郎*1　初鹿大祐*2　宗田　大*3

Key words：半月板再生(meniscus regeneration), 滑膜間葉系幹細胞(synovial mesenchymal stem cells)

Abstract　半月板損傷の機能維持治療の第一選択は半月板縫合術だが, 日本では半月板手術全体の10%以下に限定され, また縫合術後は再断裂のリスクを伴う. 縫合術が適応外で広範囲に半月板を切除した場合は, 変形性膝関節症が必発する. 半月板の損傷・変性や機能不全は若年から老年に幅広く認められ, 解決すべき重要な病態である. 我々はこれまで滑膜由来の間葉系幹細胞が自己血清でよく増殖し, 軟骨分化能が高く, 局所投与すると障害部位に接着し, 再生を促進することを多角的に示してきた. ウサギの内側半月板の前方1/2を切除後, 滑膜間葉系幹細胞を関節内注射すると, 半月板切除部周囲に接着し, 半月板の再生が促進される. 今後, 半月板縫合術の適応を広げ縫合後滑膜幹細胞を投与することにより縫合術の成功率を改善させる, さらに半月板が切除された膝に滑膜幹細胞を投与して半月板を再生させる臨床研究を計画している.

半月板治療の限界

半月板損傷の機能維持治療の第一選択は半月板縫合術であるが, その適応は一般的には血行が存在する部位の変性のない縦断裂に限られる. 半月板縫合術の成功率は適応, 前十字靱帯再建術の有無, 術後経過期間, 成功率の定義(再手術を要さないもの, 半月板症状を再発しないものなど)により異なる. Stärke らの review によると, 半月板縫合術の成功率は, 術後3年未満では平均88%であるが, 術後4年以上になると平均72%に低下する(表1)[1]. これは適応を限定した半月板縫合術でも術後4年以上になると約3割で半月板症状が再発することを示す.

*1 Ichiro SEKIYA, 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45　東京医科歯科大学再生医療研究センター, 教授
*2 Daisuke HATSUSHIKA, 同大学大学院運動器外科学分野
*3 Takeshi MUNETA, 同, 教授

平成23年度厚労省社会医療診療行為別調査によると, 日本の半月板手術は年間約3万件であり, そのうち縫合術はわずか8%のみであり, 切除術が92%を占める. 半月板を広範囲に切除した場合は, 変形性膝関節症が必発する. たとえ広範囲でなくても部分的に切除されると, フープ機能が破綻し, 半月板が逸脱するリスクが増す. 半月板切除を受けなくても, 繰り返しの外力や加齢により, 半月板は逸脱, 摩耗, 消失し, 機能が低下する. 半月板の損傷や変性は若年から老年に幅広く分布しており, 超高齢化社会を迎えた日本では, 健康寿命を延伸させるために, 半月板疾患の対応は解決すべき重要な問題である.

広範囲の半月板欠損に対して, 欧米, 韓国などでは同種半月板移植術が行われているが, 移植半月板が確保しにくいこと, 手術侵襲が大きいこと, 長期成績の報告が不十分であることなどの問題点も多い[2]. 日本では法的に許可されていないため, 同種半月板移植術は積極的には行われていな

表 1.
半月板縫合術後の成功率

＜術後 3 年未満＞

報告者	症例数	経過(月)	半月板縫合成功率(%)
Albrecht-Olsen et al.	65	3	75
Cannon and Vittori	90	7	93
Marinescu et al.	68	12	94
Venkatachalam et al.	62	21	78
Barber et al.	89	27	100
Spindler et al.	125	27	88
Noyes and Barber-Westin	30	34	87
平均			88

＜術後 4 年以上＞

報告者	症例数	経過(月)	半月板縫合成功率(%)
Kurosaka et al.	114	54	68
Eggli et al.	52	90	73
Majewski et al.	116	120	76
平均			72

（文献 1 より改変）

い．人工半月板の開発や臨床応用も進められているが，高い評価を得るまでには至っていない．そのため，半月板縫合術の適応を広げ成功率を高める工夫や，半月板消失例，変性半月板に対する新たな治療法の開発が求められている．

滑膜と半月板修復

半月板の修復に周囲の滑膜組織が関与することは古くから報告されている（図 1）[3]．また半月板損傷部位に滑膜組織を有茎移植することにより半月板治癒が促進することを示す報告がある[1]．しかし，これは手技が容易でないことから普及していない．滑膜には間葉系幹細胞が存在する．胚性幹細胞（ES 細胞）や iPS 細胞と比べ，間葉系幹細胞はすべての組織に分化する能力には劣るが，調整が容易で，安全性が高い．我々はこれまで滑膜由来間葉系幹細胞（滑膜幹細胞）は自己血清でよく増殖し[5]，軟骨に分化しやすく[6]，軟骨修復を促進する[7]ことを多くの基礎研究で明らかにしている．

滑膜幹細胞による半月板再生のウサギモデルでの検討

我々は滑膜幹細胞を体外で増殖させ，十分な数の滑膜幹細胞を関節内に投与することにより半月板が再生されることを，ラットを用いた実験で報告している[8][9]．しかしながら，半月板の治癒能は動物の種によって異なるため，より大きな動物に対する検討が必要である．そこでウサギの内側半月板の前方 1/2 を切除し，滑膜幹細胞の関節内投与により半月板再生が促進され，関節軟骨の変性

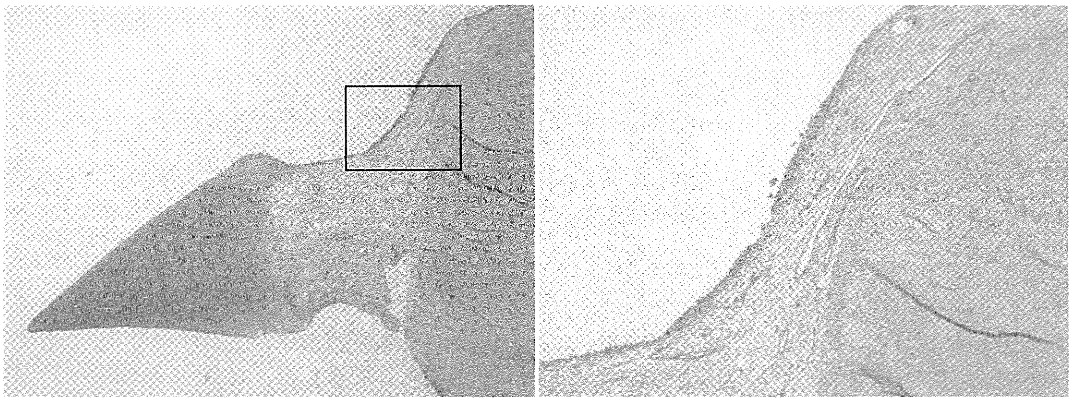


図 1. 半月板の自然修復過程に滑膜が寄与する．ラットの内側半月板に 1 mm の円柱状の半月板欠損を作成し，4 週後に観察したもの．半月板欠損部は軟部組織で充填されており，この軟部組織は滑膜と連続している． a|b
a ：半月板の矢状断像をトルイジン・ブルー染色したもの
b ：半月板を欠損させた部位の大腿骨側関節包側を拡大したもの

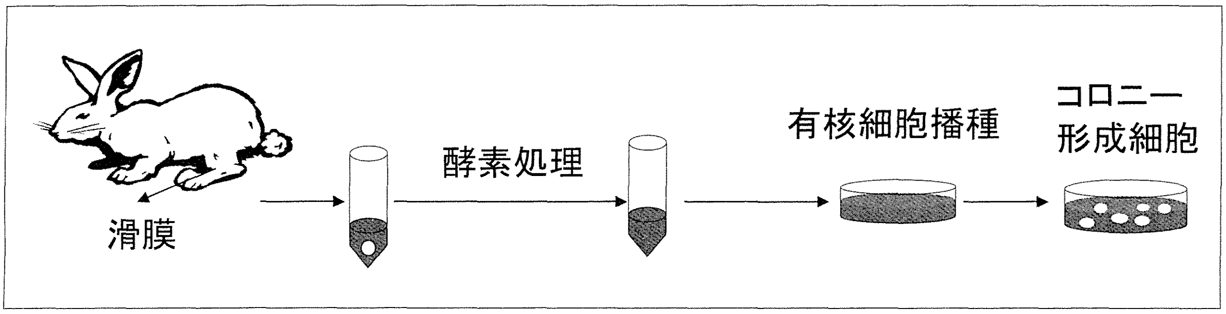


図 2. ウサギの滑膜から間葉系幹細胞を調整する方法
採取した滑膜を酵素処理し，有核細胞を1週間培養し，コロニーを形成する細胞をまとめて回収する．

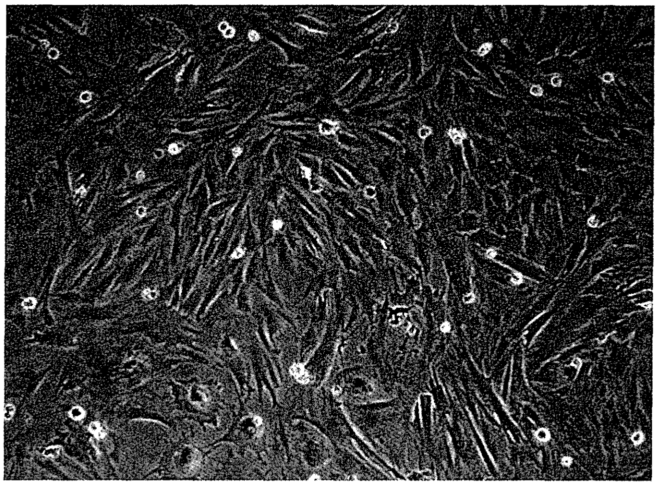


図 3.
ウサギ滑膜幹細胞の形態
小さな円形の光っている細胞は増殖過程のものである．

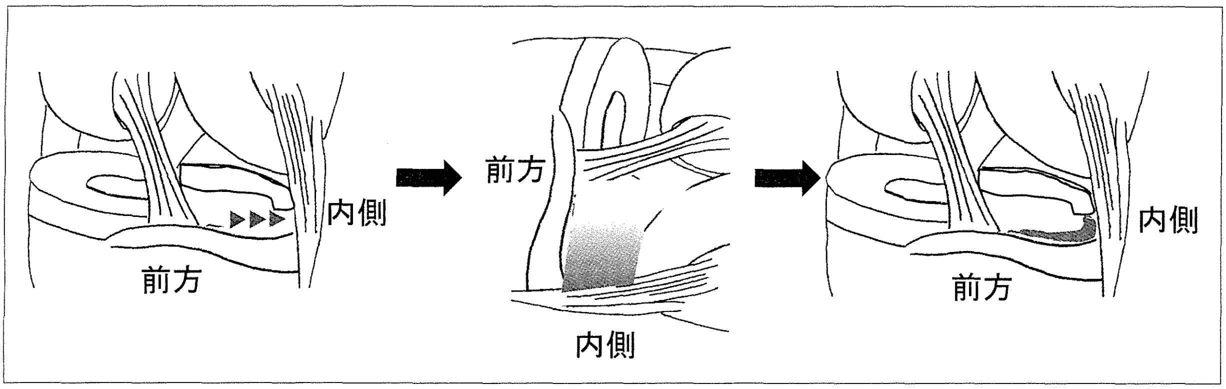


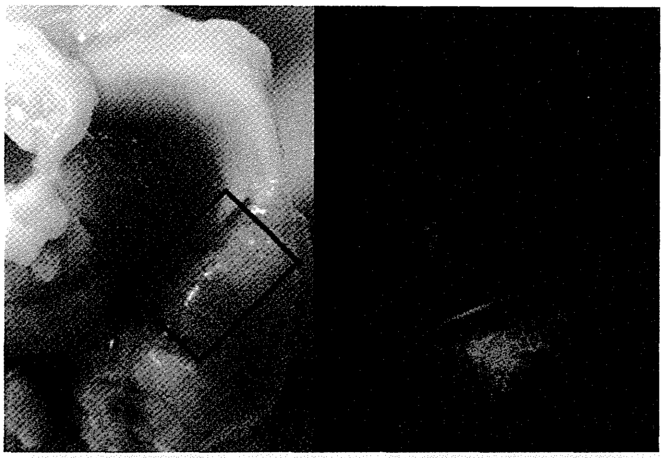
図 4. ウサギ滑膜幹細胞の投与方法
内側半月板前方1/2を切除して2週後に滑膜幹細胞浮遊液を関節内に投与した．投与後，半月板欠損部を下にして側臥位とし，細胞浮遊液が半月板欠損部に浸るようにして，10分間保持した．

が抑制されるかを検討した[10]．

1．方 法

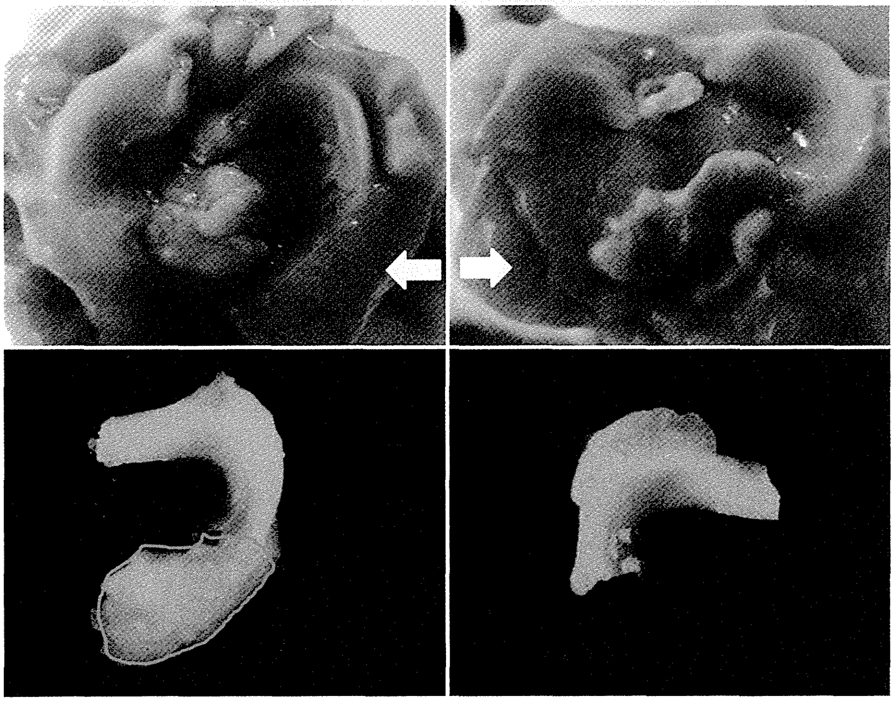
ウサギの膝関節より採取した滑膜を酵素処理後，有核細胞を7日間培養した(図2)．コロニー形成細胞をまとめて回収後，1回継代し，移植に使用した(図3)．これらの細胞はコロニー形成能や *in vitro* での軟骨・骨・脂肪分化能を有し，間葉系幹細胞であることを確認した．

ウサギの内側半月板を内側側副靱帯の前縁で垂直に切断し切除した．2週後，右膝の関節内には，蛍光を照射すると赤く発光するDiI(ダイアイ)で標識した1千万個の滑膜幹細胞を注射し，左膝関節にはコントロールとして同量の生理食塩水を注射した．注射後，半月板欠損部を下にして側臥位



a|b

図 5.
滑膜幹細胞を投与して2週後のマクロ所見
a：四角で示す半月板切除部位が，滑膜組織で覆われている．
b：同部位に蛍光を当て撮影したマクロ像．関節内注射したDiI陽性細胞が，半月板切除部位に観察される．



a/b

図 6.
滑膜幹細胞投与4週後の脛骨関節面と半月板のマクロ像
ウサギの両膝の内側半月板前方1/2を切除して2週後に滑膜幹細胞浮遊液を関節内に注射し，さらに2週後に観察した．
a：幹細胞非投与側は白矢印で示す半月板の欠損が観察されるが，幹細胞投与側は滑膜で覆われている．
b：内側半月板を摘出し滑膜を取り除くと，幹細胞投与側は半月板様組織がすでに形成されている．

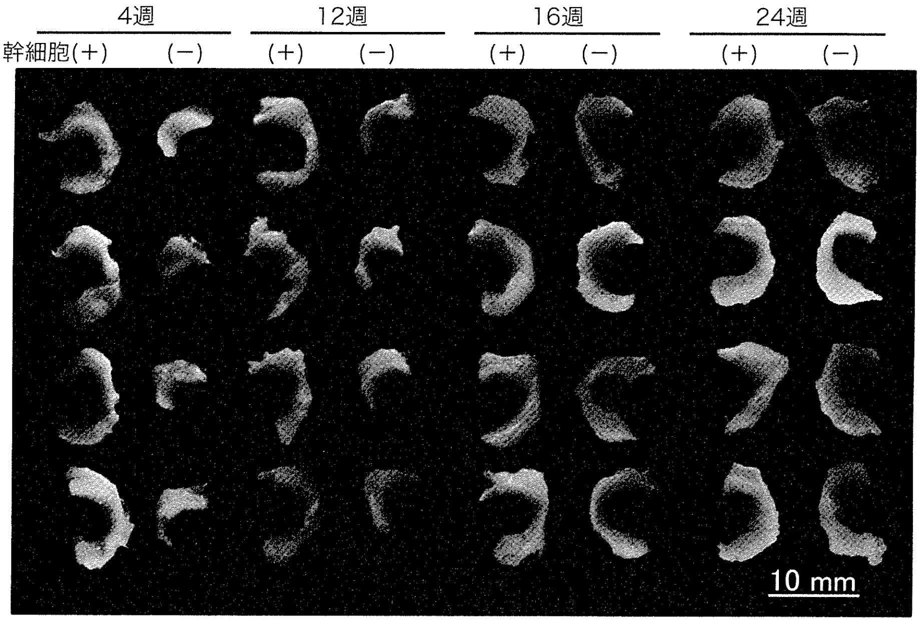
とし，半月板欠損部が細胞浮遊液に浸るようにして10分間静置した(図4)．滑膜幹細胞投与2週後にDiI陽性細胞の局在を観察し，また4，12，16，24週後に，内側半月板および大腿骨を採取し評価した．

2．結　果

滑膜幹細胞を関節内投与した2週後には，半月板切除部位がすでに滑膜組織で覆われ，投与したDiI陽性滑膜幹細胞が同部位に局在することを確認した(図5)．投与4週後，滑膜幹細胞投与側では，半月板切除部位が引き続き滑膜で被覆され，滑膜組織を除去すると半月板様組織が観察された．一方，コントロール膝では半月板が欠損したままであった(図6)．内側半月板は，4週，12週後には滑膜幹細胞投与側のほうがコントロール側より有意に大きくなった(図7)．16週ではコントロール側も半月が増大し，以後2群間で大きさの差を認めなくなった．

再生半月板を組織学的に評価すると，滑膜幹細胞投与4週後の再生組織は辺縁が鈍であり，ラクナのない多数の小細胞を認めた(図8)．12週後，再生組織の輪郭が正常半月板に近づき，細胞密度が減少した．16週後，滑膜幹細胞投与側では再生半月板中央部の細胞にラクナを認め，正常半月板

図 7.
内側半月板のマクロ像
幹細胞を投与して 4, 12, 16, 24 週後の内側半月板マクロ像．両側の半月板をペアにして，4 羽分示している．
（文献 10 より改変）



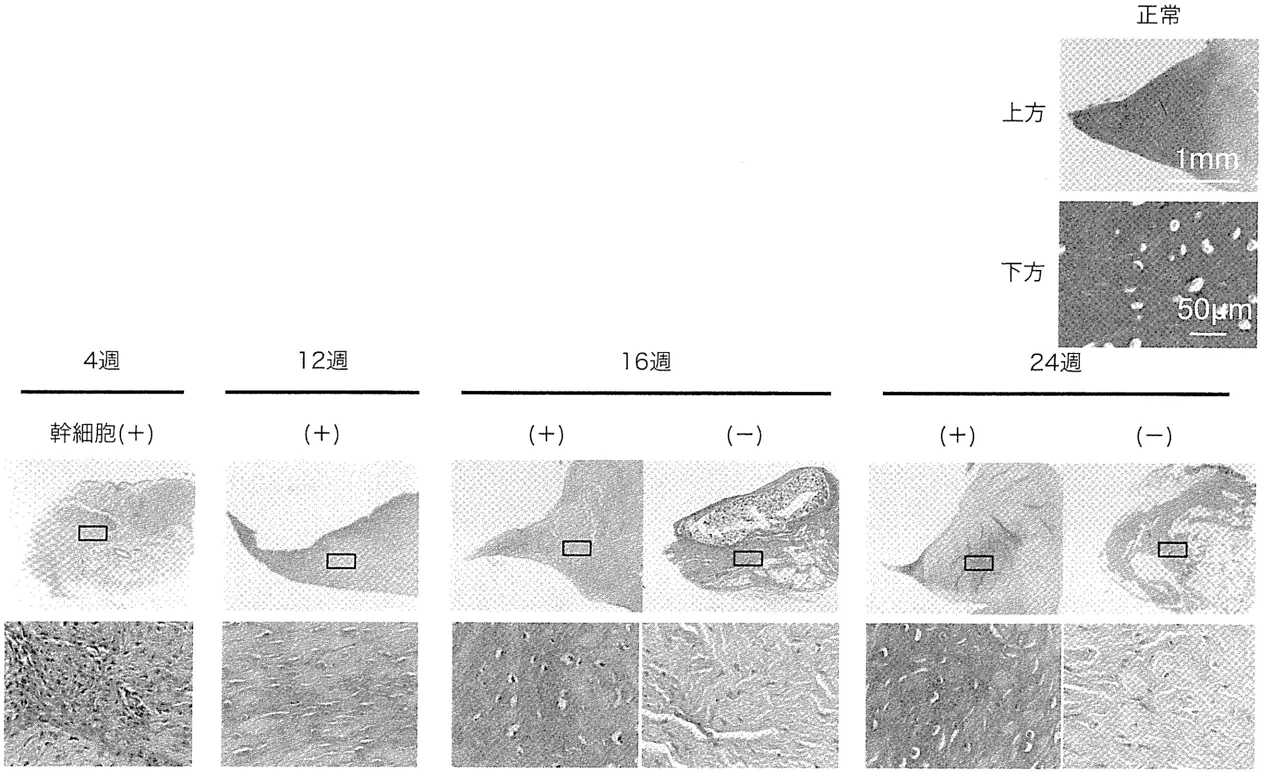


図 8. 内側半月板再生部位の組織像
上方：再生部位の矢状断像をトルイジン・ブルー染色したもの
下方：再生半月の中央部を強拡大したもの．コントロール側の 4, 12 週のものは，軟部組織に覆われず，組織の作成ができなかった．
（文献 10 より改変）

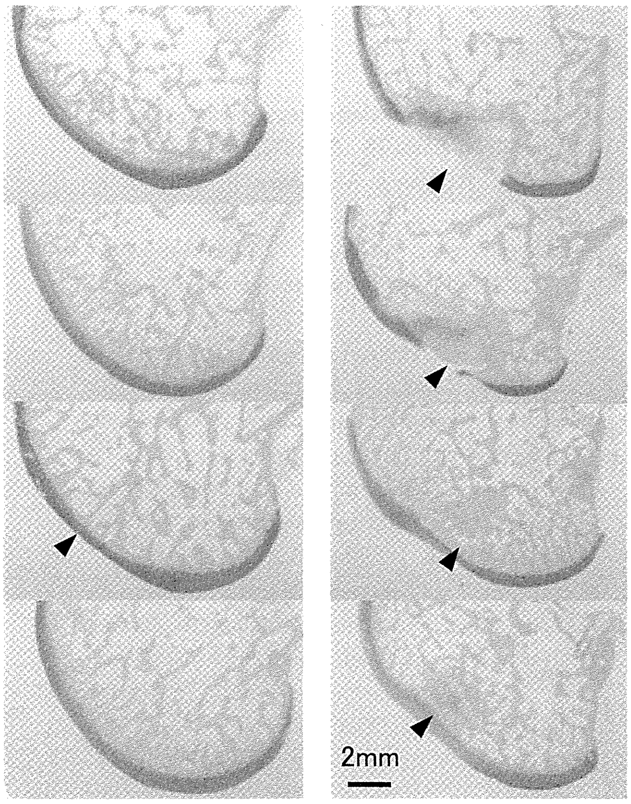


図 9.
幹細胞投与24週後の大腿骨内顆の組織像
矢状断切片をトルイジン・ブルー染色したもの．両側をペアにして4羽分，示している．矢頭は軟骨・骨変化が著明な部位である．
(文献10より改変)

細胞と形態が類似したが，コントロール側では部分的に線維構造を認めるのみであった．24週後，滑膜幹細胞投与側では半月板の輪郭が明瞭となり，トルイジン・ブルーの染色性が増した．しかし，正常半月板と比較するとトルイジン・ブルーの染色性がまだ劣るものであった．コントロール側では表面が不整で，細胞投与側よりも染色性が不良であった．

24週後の大腿骨内顆の組織を評価すると，滑膜幹細胞投与側では1例に関節軟骨の菲薄化を認めたのみであったが，コントロール側では2例に骨軟骨損傷を認め，残りの2例に軟骨下骨の骨硬化と軟骨の菲薄化を認めた(図9)[10]．

考　察

関節内に投与した滑膜幹細胞は2週後，半月板欠損部を覆う滑膜に局在した．滑膜幹細胞投与側では4週後にすでに半月板様組織による再生を認め，24週後にもコントロール側よりも良好な組織学的所見が観察された．これらの結果は滑膜幹細胞の関節内投与は半月板再生を促進することを示唆している．

24週後の大腿骨内顆の組織学的所見で，関節軟骨および軟骨下骨は滑膜幹細胞投与側のほうが良好に保たれていた．この結果には2つの理由が考えられる．1つ目は4週，12週の時点で半月板のサイズが幹細胞投与側のほうが有意に大きく，組織学的に未熟な半月板であっても，軟骨を保護する効果があった可能性である．2つ目は投与した滑膜幹細胞が栄養因子を分泌し関節軟骨変性を抑制した可能性である．

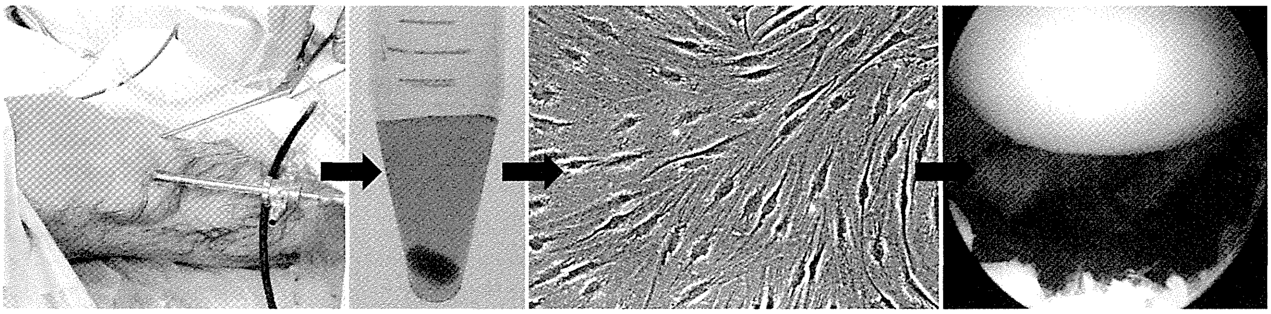


図 10. 今後計画している滑膜幹細胞による半月板再生医療の流れ
外来手術で滑膜を採取し，酵素処理後，10％自己血清を使用して2週間培養後，関節内に滑膜幹細胞を投与する．

滑膜幹細胞の関節内投与は，ウサギの半月板再生の促進には有効であったが，ヒトの臨床に応用するには更なる検討を要する．その理由として，ウサギの半月板はヒトの半月板よりも再生能が優れていること，本実験では半月板の前 1/2 を切除しているが他の損傷モデルでも有効であるかは不明であること，再生半月板の力学的特性を評価していないことなどが挙げられる．

将来展望

我々はミニブタを使用した検討を現在行っており，ウサギとの場合と異なる機序も観察されるが，滑膜幹細胞投与により半月板の再生が促進される感触を得ている．また 2008 年に我々は自己の滑膜幹細胞を使用して，関節軟骨を再生させる臨床研究を開始した．外来手術で滑膜を約 0.5 g 採取し，自己血清を使用して 2 週間の培養を行い，平均約 5,000 万の滑膜幹細胞を回収し，軟骨欠損部に移植する．細胞移植による問題はなく，多くの例で関節軟骨の再生を認めている．すでに細胞培養の方法は確立している．今後，半月板縫合術の適応を広げ縫合後滑膜幹細胞を投与することにより縫合術の成功率を改善させる，さらに半月板が切除された膝に滑膜幹細胞を投与して半月板を再生させる臨床研究を計画している(図 10)．いくつかの課題をこれから解決していく必要はあるものの，滑膜幹細胞の投与により，半月板を温存する治療の発展が期待できる．

文　献

1) Stärke, C., Kopf, S., Petersen, W., Becker, R. : Meniscal repair. Arthroscopy. Sep ; **25**(9) : 1033-1044, 2009. doi : 10.1016/j. arthro. 2008. 12.010. Epub 2009 Feb 26. Review.
2) Harris, J. D., Cavo, M., Brophy, R., Siston, R., Flanigan, D. : Biological knee reconstruction : a systematic review of combined meniscal allograft transplantation and cartilage repair or restoration. Arthroscopy. Mar ; **27**(3) : 409-418, 2011. doi : 10.1016/j.arthro.2010.08.007. Epub 2010 Oct 27. Review.
3) King, D. : The healing of semilunar cartilages. J Bone Joint Surg. **18** : 333-342, 1936.
4) Cisa, J., Basora, J., Madarnas, P., Ghibely, A., Navarro-Quilis, A. : Meniscal repair by synovial flap transfer. Healing of the avascular zone in rabbits. Acta Orthop Scand. Feb ; **66**(1) : 38-40, 1995.
5) Nimura, A., Muneta, T., Koga, H., Mochizuki, T., Suzuki, K., Makino, H., Umezawa, A., Sekiya, I. : Human synovial mesenchymal stem cells increase with human autologous serum ; A comparison to fetal bovine serum and to bone marrow cells. Arthritis Rheum. Jan 31 ; **58**(2) : 501-510, 2008.
6) Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T. : Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues : Superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum. **52** : 2521-2529, 2005.
7) Koga, H., Muneta, T., Ju, Y. J., Nagase, T., Nimura, A., Mochizuki, T., Ichinose, S., von der Mark, K., Sekiya, I. : Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. Stem Cells. Mar ; **25**(3) : 689-696, 2007.
8) Horie, M., Sekiya, I., Muneta, T., Ichinose, S., Matsumoto, K., Saito, H., Murakami, T., Kobayashi, E. : 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. Apr ; **27**(4) : 878-887, 2009.
9) Horie, M., Driscoll, M. D., Sampson, H. W., Sekiya, I., Caroom, C. T., Prockop, D. J., Thomas, D. B. : Implantation of allogenic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. J Bone Joint Surg Am. Apr 18 ; **94**(8) : 701-712, 2012. doi : 10.2106/JBJS.K.00176.
10) Hatsushika, D., Muneta, T., Horie, M., Koga, H., Tsuji, K., Sekiya, I. : Intraarticular Injection of Synovial Stem Cells Promotes Meniscal Regeneration in a Rabbit Massive Meniscal Defect Model. J Orthop Res. Apr 17. 2013.