

厚生労働科学研究費補助金
(再生医療実用化研究事業)

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シート
を用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 上羽 智之
(奈良県立医科大学 整形外科学講座)

平成25(2013)年3月

目次

．総括研究報告

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シートを用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究 上羽智之

A. 研究目的	1-1
B. 研究方法	1-2
1. 細胞シート作製条件の検討	1-2
2. ノードラット大腿骨偽関節モデルの作製	1-2
3. 細胞シート注入法の確立	1-2
4. 倫理面での配慮	1-3
C. 研究結果	1-3
1. 細胞シート作製条件	1-3
2. ノードラット大腿骨偽関節モデルの作製	1-3
3. 細胞シート注入法の確立	1-3
D. 考察	1-4
E. 研究発表	1-4
F. 知的財産の出願・登録状況	1-4
G. 参考文献	1-4

．分担研究報告

生体内における細胞シートの骨形成能および細胞シートの注入法 上羽智之

A. 研究目的	2-1
B. 研究方法	2-2
1. ヒト骨芽細胞シートの作製方法	2-2
2. ヒト骨芽細胞シート注入法の検討	2-2
3. 注入型骨移植法（ヒト骨芽細胞シート注入）による人工骨への骨形成能の付与	2-2
4. 皮下への注入型骨移植法による骨形成能の評価 スキャフォールドフリー ヒト骨芽細胞シートの注入移植による骨形成能の評価	2-3
5. 倫理面での配慮	2-3
C. 研究結果	2-3
1. レントゲン撮影による骨形成評価	2-3
2. 組織像による新生骨形成の評価	2-3
D. 考察	2-3
E. 研究発表	2-4

F.	知的財産の出願・登録状況；	2-4
G.	参考文献	2-4
H.	図	2-6

ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討 赤羽学

A.	研究目的	3-1
B.	研究方法	3-2
	1. ヒト骨髄間葉系細胞	3-2
	2. 細胞シート作製条件の検討 (in vitro での検討)	3-2
	3. 細胞シート作製条件の検討 (in vitro での検討)	3-2
	4. 細胞シートの骨形成能の評価 (in vitro での検討)	3-3
	5. 移植標本の骨形性能の評価	3-3
	6. 測定結果の統計学的検討	3-3
	7. 倫理面での配慮	3-3
C.	研究結果	3-3
	1. in vitro での細胞シート作製条件の検討結果	3-4
	2. 生体内での細胞シートの骨形成能の検討結果 (組織像)	3-4
	3. 細胞シートの骨形成能の生化学的検討結果	3-4
D.	培養条件の検討結果	3-4
	1. ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製における細胞培養条件	3-4
E.	考察	3-4
F.	研究発表	3-5
G.	知的財産の出願・登録状況	3-6
H.	参考文献	3-6
I.	図	3-8

ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立 上羽智之

A.	研究目的	4-1
B.	研究方法	4-2
	1. ヌードラット偽関節モデルの作製	4-2
	2. 移植標本の骨形性能の評価	4-2
	3. 移植標本の骨形性能の評価	4-2
	4. 3点曲げ力学的評価による偽関節の確認	4-2
C.	研究結果	4-3

1.	レントゲン画像による骨形成の維持的評価	4-3
2.	組織像	4-3
3.	力学試験結果	4-3
D.	考察	4-3
E.	研究発表	4-4
F.	知的財産の出願・登録状況	4-4
G.	参考文献	4-4
H.	図	4-6

ヒト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方法の検討

森田有亮

A.	研究目的	5-1
B.	研究方法	5-1
1.	ラット大腿骨を用いた力学試験方法の検討	5-2
2.	偽関節モデルの作製	5-3
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	5-3
4.	μ CT撮影による偽関節の評価方法の検討	5-3
5.	力学試験結果の統計学的検討	5-3
C.	研究結果	5-3
1.	μ CT撮影による偽関節の評価結果	5-3
2.	偽関節モデルの3点曲げ試験による力学的評価の結果	5-3
D.	考察	5-3
E.	結論	5-3
F.	研究発表	5-3
G.	知的財産の出願・登録状況	5-3
H.	参考文献	5-4
I.	図	5-5

・研究発表に関する一覧表

6

・研究発表に関する参考資料

7

**厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
代表者総括報告書**

難治性骨折（偽関節）に対するヒト骨髄細胞シートを用いた低侵襲治療手技の開発に関する研究

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

本研究の目的は難治性骨折（偽関節症）に対する低侵襲治療法を確立することである。本研究課題では、我々が動物実験で確立してきた細胞シートを scaffold free で注入移植し新生骨形成を得る「注入型骨移植法」の手技を、将来ヒト骨髄細胞を用いた臨床例に応用できるように発展させるための基礎研究を行う。

一般的に、偽関節臨床例に対しては骨移植術と強固な再内固定が行われており、近年は低出力超音波法も併用され成績が向上している。しかし、中には長期間骨癒合が得られず日常生活に支障をきたす症例もある。低侵襲でしかも既存の治療法と併用できる新たな骨癒合促進手技が確立されれば、難治性骨折（偽関節症）の治療成績は飛躍的に向上するため、社会的ニーズは高い。

本研究の特色は、骨形成能をもつ細胞シートを偽関節部に注入移植し、骨癒合を促進させる点である。細胞シート注入は X 線透視下に偽関節部を確認し、scaffold free で行う（X 線透視下注入型骨移植）ため、scaffold による弊害がなく、低侵襲で既存の治療法にも併用できるという利点があり、偽関節が完成する前の状態（遷延治癒等）にも早期から応用できる点で独創性が高い。

期待できる成果は、難治性骨折（偽関節症）の治療成績が飛躍的に向上すると同時に、患者負担が軽減できる点である。本研究は、得られた成果を他疾患（骨壊死症や先天性下腿偽関節症等）にも応用でき、社会に還元できる運動器再生医療技術の早期臨床応用を目指す革新的治療技術開発を目指した研究である。

初年度はヒト骨髄細胞を用いて、細胞シート作製に適した培養条件を見つけ出し、その骨形成能を免疫不全動物（ヌードラット）で検証した。また今後利用する偽関節モデルヌードラットを作製した。次年度は、ヌードラットの大腿骨に作製した偽関節に対して、ヒト骨髄細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植を行い、効果を検証する。

A . 研究目的

我々はこれまでの動物実験により未分化骨髄間葉系幹細胞（以下 MSC）から骨形成能を有する細胞シートを作製する方法を考案している¹⁻³。本研究ではヒト MSC で作製した細胞シート移植で、難治性骨折（偽関節）の治療が可能であるか免疫不全動物を用いて検証する。細胞シートを X 線透視下に偽関節部に注入し骨癒合を得る低侵襲な治療法を確立する。我々はラットを用いた動物

実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で移植し、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」を確立し報告してきた^{4,5}。

H24 年度の本研究課題では、ヒト骨髄細胞シートの効率的な作製方法を検討し、その骨形成能の評価を免疫不全動物（ヌードラット）で行う。次年度ヌードラット大腿骨の偽関節にヒト細胞シートを注入するためにヌードラット大腿骨に偽関節を安定的に作製する

手技を確立する。また、確立した方法で作製したヒト細胞シートを注入することで骨形成が得られるかを検証する。

B . 研究方法

B . 1 . 細胞シート作製条件の検討

本研究では、ヒト骨髄細胞を Lonza 社から購入し研究をおこなった。ヒト MSC を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) で 2 週間初期培養後、35 mm 培養皿 (Falcon 35-3001, BD) にデキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で 14 日間培養した。播種する細胞数 (1×10⁴cell/cm² あるいは 0.5×10⁴cell/cm²) とデキサメサゾン濃度 (10 nM あるいは 100 nM) をそれぞれの組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を見出すこととした。

アスコルビン酸添加量は従来通りの 82 µg/ml とし、培養液の交換は 2 あるいは 3 日ごとに行った。

In vitro で検討した 2 つの条件で細胞シートを作製し、それらを人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 検リン酸 3 カルシウム -TCP : ペンタックス社) と組み合わせて、ヌードラットの背部皮下に移植し、生体内での骨形成能の検討を行った。細胞シートは、*In vitro* での条件検索の結果を受けて、細胞数を 0.5×10⁴cell/cm² とし、10cm ディッシュ (100 mm ディッシュ ; Falcon, BD) を用いてデキサメサゾン濃度を 10 nM と 100 nM の 2 種類で作製した。採取した細胞シートで人工骨を包むようにして作製した細胞シート・人工骨複合体をヌードラットの背部皮下に移植し、2 か月で標本を摘出し、組織学および生化学的に骨形成量を評価した。

B . 2 . ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製

本研究では、12 週齢の雄ヌードラット (Fischer344 ラット ; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いた。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入した。大腿骨の骨幹部中央をボーンソーで骨切りした後、大腿骨の転子部から顆部に付着する筋群を骨膜とともに大腿骨から剥離した後、大腿骨から全周性に切除する。さらに大腿骨骨髄も転子部から顆部まで注射針で十分に搔爬、洗浄し、骨折部の固定は K-wire (径 0.8mm) を用いた髓内釘固定を行い、これを偽関節群とした。一方、健側の大腿骨を対照群とし、比較検討を行った。評価はレントゲン、組織学および力学的に行った。

B . 3 . 細胞シート注入法の確立

7 週齢ヌードラット背部皮下へあらかじめ人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 -リン酸 3 カルシウム -TCP : ペンタックス社) を移植し、生体内の骨形成の検討を行った。移植した人工骨に 10 cm 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを注入移植した。さらに 6cm 培養皿で作製した細胞シートを 1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。注入法は 1ml 注射器にヒト MSC から作製したヒト骨芽細胞シートを吸入しシリンジ内に充填し、0.5ml の PBS を注射器で吸引し細胞シートと混和させた。14G アンギオキャス注射器に装着しヌードラット背部皮下へ刺入する。アンギオキャスの外筒だけ皮膚に刺したまま残し、内針とともに注射器をいったん取り除く。内針を注射器から取り外し、皮膚に刺したままの外筒に注射器を装着後、ゆっくりシリンジを加圧し、ヒト骨芽細胞シートを皮下へ注入移植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出しレントゲン、組織学的に骨形成を評価した。

B . 4 . 倫理面での配慮

本研究は市販されているヒト骨髄間葉系幹細胞を使用し、作製した骨芽細胞シートはヌードラットに移植しているため、倫理的な問題は少ない。動物実験に関しては、「動物実験施設利用者説明会」をすでに受講しており、本学の動物実験に関する規約に準じて行った。

C . 研究結果

C . 1 . 細胞シート作製条件

In vitro で細胞シートを作製時のデキサメタゾン濃度を $10\mu\text{M}$ と $100\mu\text{M}$ とを比較すると、デキサメタゾン $10\mu\text{M}$ のほうが $100\mu\text{M}$ よりもオステオカルシン分泌量が多い。播種細胞密度を $1 \times 10^4 \text{cell}/\text{cm}^2$ と $0.5 \times 10^4 \text{cell}/\text{cm}^2$ とを比較すると、オステオカルシンの増加する傾向はほぼ同じであった。*In vivo* で TCP と細胞シートを組み合わせた組織像では、デキサメタゾンの濃度によらず、いずれも良好な骨形成が見られた。摘出した TCP と細胞シートの組み合わせでは、TCP 単独で移植したものより ALP およびオステオカルシンのいずれも高値を示した。デキサメタゾンの濃度で比較すると 10 nM で作製した細胞シートとの組み合わせのほうが 100 nM で作製した細胞シートとの組み合わせより高い値を示した。

以上により培養条件は播種細胞密度： $0.5 \times 10^4 \text{cell}/\text{cm}^2$ 、デキサメタゾン濃度： 10 nM 、アスコルビン酸濃度： $82 \mu\text{g}/\text{ml}$ で 21 日間の 2 次培養が好ましいと考えられる。

C . 2 . ヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製

経時的なレントゲン像で、偽関節群は術後 12 週まで骨性架橋は認められなかった。組織像でもレントゲン像と同様に偽関節群では骨折部の骨性架橋を認めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後 12 週では骨切り部の皮質骨の萎縮を認めた。また μCT 画像でも骨切り部周囲に新生骨を認めず、骨切り部の骨癒合を認めなかった。

3 点曲げ試験による力学試験では、偽関節の最大曲げ荷重は健側群と比べて有意に低かった。以上によりヌードラットの大腿骨に安定して偽関節を作製する手技を確立できた。

C . 3 . 細胞シート注入法の確立

注入移植後 2 か月目に摘出した TCP のレントゲン像では、注入移植した細胞シートによって形成された新生骨によると考えられる人工骨周囲の石灰化は明らかでなかった。

組織像ではデキサメタゾンの濃度による骨形成の差は認められず、いずれも良好な骨形成が確認できた。また、 10 cm 培養皿や 6 cm 培養皿で作製した細胞シートを注入移植しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた。細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell}/\text{cm}^2$ とし、デキサメタゾンの濃度による骨形成の差を比較したが、組織像からは両群（デキサメタゾン濃度を 10 nM あるいは 100 nM ）に大きな差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。細胞シートの大きさによる比較も行ったが、 6 cm 培養皿で作製した細胞シートを注入しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた。

D . 考察

我々はこれまでにラットの細胞を用いて、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、注入による移植で異所性に骨形成を認め、また皮下に移植した人工骨へ細胞シートを注入すると、人工骨周囲に骨形成を認めたことを報告している^{4,5}。

本研究では、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて細胞シートを作る条件を検討したところ、ラットなどの実験動物とは異なる条件であることが判明した。その条件で作製した細胞シートと人工骨を組み合わせてヌードラットに移植すると、明らかな骨形成が認められた。また、注入による細胞シートの移植でも人工骨内部に骨形成が認められた。しかし、いずれもラットなど実験動物で見られた人工骨周囲の骨形成は認められなかった。これは、本研究では100mmディッシュを用いて作製した骨芽細胞シート1枚を人工骨と組み合わせて免疫不全動物(ヌードラット)の皮下に移植ため、通常の動物実験で用いる自家移植モデルと条件が異なることも少なからず影響していると考えられる。また、注入という行為が細胞シート自体にダメージを与えてしまうために、細胞活性が低下している可能性があるため、注射針の径を大きくするなど注入方法について、今後検討する必要があると考える。

今回の実験により、ヌードラット大腿骨偽関節モデルが確立できた。この偽関節モデルを使用することによりヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することが可能となると考えられる。今回作製したヌードラット大腿骨偽関節モデルは、今後の偽関節治療開発に有用であり、scaffold freeで偽関節部へ骨芽細胞シートを注入し骨形成が得られるかの検討が必要である。

E . 研究発表

1 . 論文発表 なし

2 . 学会発表

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 老齡ラットにおける骨芽細胞シートの有用性 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13-14日 パシフィコ横浜

F . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得 なし

2 . 実用新案登録 なし

3 . その他 なし

F . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得 なし

2 . 実用新案登録

なし

3 . その他

なし

G . 参考文献

1. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site-. J Tissue Eng Regen Med. 2(4):196-201, 2008.
2. Hideki Shigematsu, Manabu Akahane, Yoshiko Dohi, Akifumi Nakamura, Hajime Ohgushi, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka. Osteogenic Potential and Histological Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Sheet/Hydroxyapatite Constructs. The Open Tissue Eng Regen Med Journal, 2009 Oct;2: 63-70.
3. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸顕、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 Orthopaedic Ceramic Implants 2009, 29:15-18
4. Manabu Akahane, Hideki Shigematsu, Mika Tadokoro, Tomoyuki Ueha, Tomohiro Matsumoto, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka : Scaffold-free cell injection results in bone formation. J Tissue Eng Regen Med. 2010; 4: 404-411.
5. M.Akahane, T.Ueha, T.Shimizu, H.Shigematsu, A.Kido, S.Omokawa, K.Kawate, T.Imamura, Y.Tanaka : Cell Sheet Injection as a Technique of osteogenic Supply.Int J of Stem Cells. Vol. 3, No. 2, 2010.

**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**

生体内における細胞シートの骨形成能および細胞シートの注入法

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究分担者 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

我々はこれまでにラットを用いた動物実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で注入移植することで、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」として報告している。本手技は scaffold free で注入を行うため scaffold による弊害がなく、低侵襲で実施でき、既存の治療法に併用できるため、偽関節が完成する前の状態（遷延治癒等）にも早期から応用できる。

本研究ではヒト骨髄間葉系幹細胞(Human Mesenchymal stem cells; hMSCs)を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討にて確立した培養条件で作製したヒト細胞シートが、生体内で骨形成が得られるかどうかを検証した。ラットを用いた動物実験で注入による細胞シートの移植法を考案し検証してきたが、ヒト細胞シートを生体内に注入によって移植をすることで骨形成が得られることを検討した。

ヌードラット背部皮下へあらかじめ円盤状人工骨（ β -リン酸3カルシウム： β -TCP）を移植しておき、注射器で人工骨の表面へ細胞シートを注入することで、骨形成が得られるかを組織学的に検討した。ヒト細胞シートを注入することにより人工骨の気孔内に骨形成を認めた。これによって、ヒト骨芽細胞シート注入による「注入型骨移植法」が、これまで行ってきた動物細胞と同様に可能であることが示唆された。

今回の検討では、人工骨へヒト細胞シートを注入移植したが、今後は、偽関節部への scaffold free でのヒト骨芽細胞シート注入移植でも骨形成および骨癒合が得られるかの検討も必要である。

A . 研究目的

我々はこれまでに、動物実験により未分化骨髄間葉系幹細胞（以下 MSC）から骨形成能を有する細胞シートを作製する方法を考案している¹⁻³。さらに、我々はラットを用いた動物実験で、骨芽細胞シートを scaffold free で移植し、新生骨が得られることを確認し「注入型骨移植法」として確立し、報告してきた^{4,5}。

本研究課題ではヒト MSC で作製した

骨芽細胞シートが生体内で骨形成能を有するのか検証する。H24 年度の本研究課題では、ヒト細胞シートを用いた X 線透視下注入型骨移植法の基礎的主義を確立するために、まず免疫不全動物（ヌードラット）の背部皮下に注入移植することにより、異所性に新生骨形成が得られるかを検討することを目的とする。

B . 研究方法

B . 1 . ヒト骨芽細胞シート の 作製 方法

本研究で使用したヒト MSC は、Lonza 社から購入した市販のヒト骨髄細胞である。ヒト MSC (P3) を T75 フラスコ (75cm² culture flask, Falcon, BD) でリバイブ 9 日後、6cm 培養皿 (60 mm ディッシュ; Falcon 35-3002, BD) と 10 cm 培養皿 (100 mm ディッシュ; Falcon 35-3003, BD) にそれぞれ 0.5 × 10⁴ cell/cm² の細胞密度で播種した。2 次培養期間中にアスコルビン酸 (VC:82µg/ml) とデキサメタゾン (Dex) を添加し培養を行った。Dex の濃度は、10 nM と 100 nM の 2 種類の条件とした。3 週間培養を行いコンフルエントに達した後スクレーパー (住友ベークライト MS-93100) を用いてヒト骨芽細胞シートを採取した。

ヒト骨芽細胞シート作製の条件は、本研究課題の分担研究の一つとして検討を行っているが、皮下に細胞シートと人工骨を組み合わせてその骨形成能を検討した結果と相反する傾向が見られないかを本研究でも検討するために、デキサメサゾン濃度をあらためて 2 種類で細胞シートの作製を行い、それぞれ骨形成能を評価した。

B . 2 . ヒト骨芽細胞シート注入法の検討

1ml 注射器にヒト MSC から作製したヒト骨芽細胞シートを吸入しシリンジ内に充填し、0.5ml PBS (Gibco, Invitrogen, USA) を注射器で吸引し細胞シートと混和させた。14G アンギオキャス (内径 1.73 mm 外径 2.1 mm 内針 16G) を注射器に装着し、ヌードラット背部皮下へ刺入する。アンギオキャスの外筒だけ皮膚に刺したまま残し、内針とも

に注射器をいったん取り除く。内針を注射器から取り外し、皮膚に刺したままの外筒に注射器を装着後、ゆっくりシリンジを加圧し、ヒト骨芽細胞シートを皮下へ注入移植する。

図 1 は、外筒だけ皮膚に刺したまま残したアンギオキャスの外筒内に、注射器を装着しヒト骨芽細胞シートを注入する際の写真である。細胞シートがシリンジ内にとどまることがあるので、PBS を混和させることで、注入するヒト骨芽細胞シートを余ることなく押し出す効果がある。

B . 3 . 注入型骨移植法 (ヒト骨芽細胞シート注入) による人工骨への骨形成能の付与

7 週齢ヌードラット背部皮下へあらかじめ人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 -リン酸 3 カルシウム -TCP: ペンタックス社) を移植し、生体内でのヒト骨芽細胞シートによる骨形成の検討を行った。あらかじめ皮下に移植しておいた人工骨に、10 cm 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを注入移植した。

さらに 6cm 培養皿で作製したヒト骨芽細胞シートを、1 つの人工骨に対して 2 枚注入移植した。

移植後 2 カ月で標本を摘出し 2 日間ホルマリン固定し、2 日間脱灰後 TCP の円盤状面に平行にサンプル中央で組織切片を作製し、H-E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行い、組織学のおよびレントゲン撮影によって骨形成を評価した。

B . 4 . 皮下への注入型骨移植法による骨形成能の評価

- スキャフォールドフリーヒト骨芽細胞シートの注入移植による骨形成能の評価

7 週齢ヌードラット背部皮下へスキャフォールドフリーで、ヒト骨芽細胞シートの注入移植を行い、生体内でのヒト骨芽細胞シートのみによる骨形成の検討を行った。

B. 5. 倫理面での配慮

本研究は市販されているヒト骨髄間葉系幹細胞を使用し、作製した骨芽細胞シートはヌードラットに移植しているため、倫理的に問題となることはない。本研究では、ヒト骨髄細胞から作製する骨芽細胞シートは免疫不全動物へ移植して、生体内での骨形成性能の評価に用いるため、直接患者あるいは細胞提供者に健康被害が発生することはない。

動物実験に関しては、「動物実験施設利用者説明会」をすでに受講しており、本学の動物実験に関する規約に準じて行った。

C. 研究結果

C. 1. レントゲン撮影による骨形成評価

移植後 2 か月目に摘出した人工骨をレントゲン撮影した。レントゲンでは、人工骨はその輪郭がはっきりとしているものの、注入移植した細胞シートによって形成された新生骨によると考えられる人工骨周囲の石灰化像は明らかではなかった(図 2)。

C. 2. 組織像による新生骨形成の評価

図 3 に移植後 2 カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ とし、デキサメタゾンの濃度による骨形成の差を比較したが、組織像からは両群(デキサメタゾン濃度を 10 nM あるいは 100 nM) に大きな

差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。細胞シートの大きさによる比較も行ったが、6cm 培養皿で作製した細胞シートを注入しても、人工骨内に良好な骨形成が認められた。

D. 考察

我々はこれまでにラットやラビットの細胞を用いて、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その高い骨形成能を利用したいろいろな使用方法の可能性を報告してきた。細胞シートの注入による移植では、皮下のような異所性への移植であっても新生骨形成を認め、細胞シートの高い骨形成能によると考えられる^{4, 5}。

また、あらかじめ皮下に移植しておいた人工骨に対し、骨芽細胞シートを注入すると、人工骨周囲に骨形成を認めたことを報告している⁵。

今回、ヒト骨髄細胞で作製した細胞シートを皮下にあらかじめ移植しておいた人工骨周囲に注入し、人工骨気孔内に骨形成が見られた。しかし、人工骨表面には骨形成は見られなかった。これは注入という行為が細胞シート自体にダメージを与えたために、細胞活性の低下を招いた可能性が大きいと考えられ、その結果全体としての骨形成量が減少し、人工骨気孔内のみで骨形成が確認できたのではないかと考えられる。現在は市販の注射針を利用してはいるが、注射針の径を大きしたものなどを使用した注入方法についても再度検討する必要があると考える。

ほかの理由として継代培養によるヒト MSC の骨形成能の低下の可能性も考えられる。これまでの動物実験での検討では、数代にわたる継代培養を繰り返すことで、骨形成能は著明に低下していた⁶。今後は、継代数が少ないヒト MSC を用いた研究やあらためて市販の

ヒト骨髄細胞を購入し、細胞ソースを変えて同様の検討をする必要があると考えられる。また、注入移植後2カ月経過してサンプルの摘出を行ったため、形成された骨組織が吸収されてしまった可能性も考えられる。人工骨に対するヒト骨芽細胞シート注入では、2か月後のサンプルでも人工骨内に新生骨形成が認められており、スキャフォールドフリーでの注入移植の影響による可能性も考えられる。本研究課題が目指す「X線透視下注入型骨移植」法は、X線で骨折部・偽関節部を確認して正確にその部位に注入するため、スキャフォールドフリー皮下移植とは条件が異なり、骨折部や偽関節部に存在する自家骨がスキャフォールドとなり注入した骨芽細胞シートが維持され、形成された骨組織も維持されるのではないかと考える。来年度は、この点に着目した検討を実施する予定である。

細胞シートの注射と異なり、細胞浮遊液の注入では、注入された細胞が流出する可能性がある。移植した場にとどまりその後新生骨の形成をもたらす点に関しては、骨芽細胞シートを用いることの有用性を示す点であると考ええる。

今後は scaffold free で偽関節部へ骨芽細胞シートを注入し骨形成が得られるかの検討が必要である。また、新たにヒト骨芽細胞の注入用に太い注射針を作製することも必要ではないかと考えられる。

E . 研究発表

1 . 論文発表 なし

2 . 学会発表

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 老齢ラットにおける骨芽細胞シートの有

用性 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 2012年10月26-27日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月13-14日 パシフィコ横浜

F . 知的財産権の出願・登録状況

1 . 特許取得 なし

2 . 実用新案登録 なし

3 . その他 なし

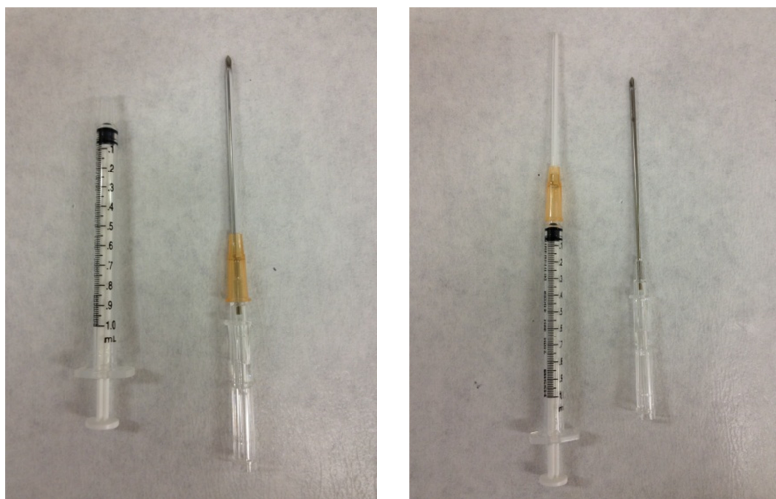
G . 参考文献

1. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site-. J Tissue Eng Regen Med. 2(4):196-201, 2008.
2. Hideki Shigematsu, Manabu Akahane, Yoshiko Dohi, Akifumi Nakamura, Hajime Ohgushi, Tomoaki Imamura and Yasuhito

- Tanaka. Osteogenic Potential and Histological Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Sheet/Hydroxyapatite Constructs. *The Open Tissue Eng Regen Med Journal*, 2009 Oct;2: 63-70.
3. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸顕、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 *Orthopaedic Ceramic Implants* 2009, 29:15-18
 4. Manabu Akahane, Hideki Shigematsu, Mika Tadokoro, Tomoyuki Ueha, Tomohiro Matsumoto, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka : Scaffold-free cell injection results in bone formation. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010; 4: 404-411.
 5. M.Akahane, T.Ueha, T.Shimizu, H.Shigematsu, A.Kido, S.Omokawa, K.Kawate, T.Imamura, Y.Tanaka : Cell Sheet Injection as a Technique of osteogenic Supply. *Int J of Stem Cells.* Vol. 3, No. 2, 2010.
 6. M.Akahane, T.Ueha, T.Shimizu, Yusuke Inagaki, Akira Kido, Tomoaki Imamura, Kenji Kawate, Yasuhito Tanaka. Increased osteogenesis with hydroxyapatite constructs combined with serially-passaged bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Discovery* 2, 133-140, 2012.

図1 ノードラットへ骨芽細胞シート注入移植法

A 骨芽細胞シートの注入に使用した注射針とシリンジ



B ノードラットの背部皮下への注入

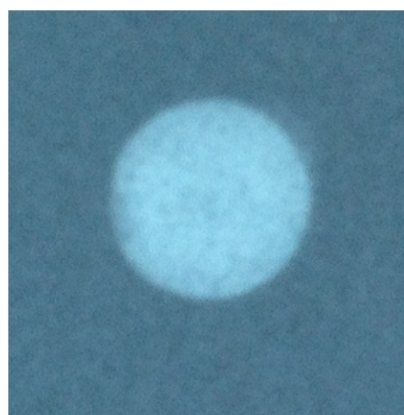


図2 摘出した人工骨のレントゲン写真

A 注入型骨移植を行った摘出人工骨（10 cm培養皿で細胞シート作製）

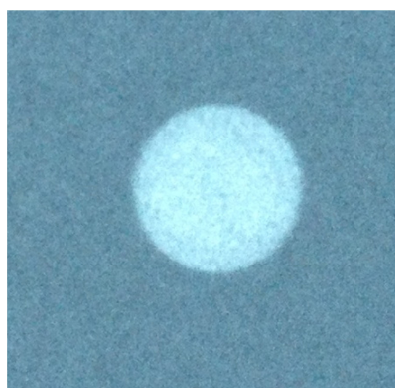


(Dex 100nM)

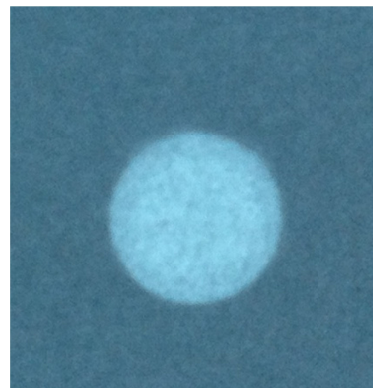


(Dex 10nM)

B 注入型骨移植を行った摘出人工骨（6cm 培養皿で細胞シート作製）



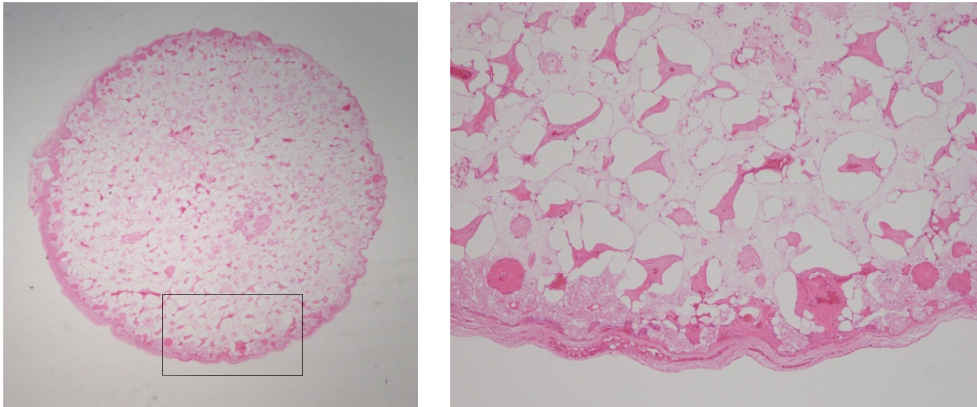
(Dex 10nM)



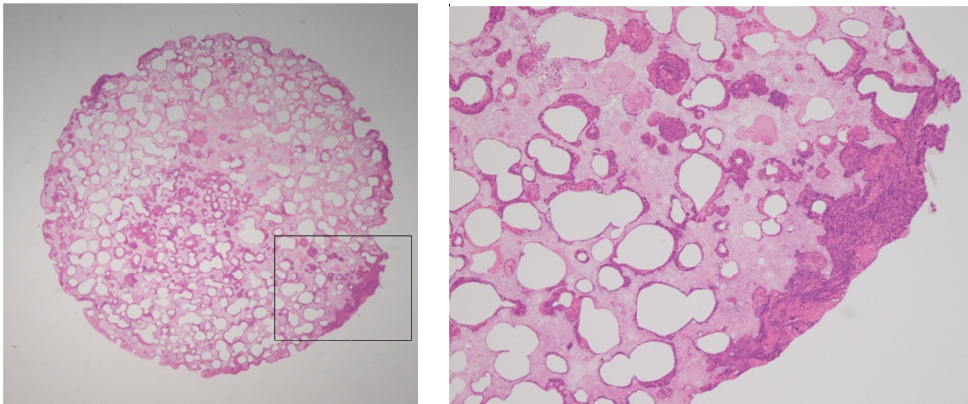
(Dex 100nM)

図3 注入移植による細胞シートの骨形成能の検討結果（組織像）

A 10 cm細胞シートを注入した人工骨の組織像

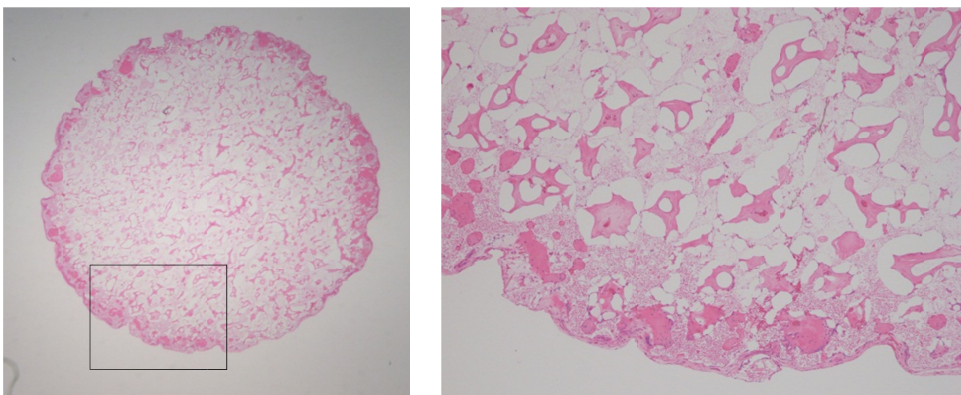


(Dex 10nM で細胞シート作製)

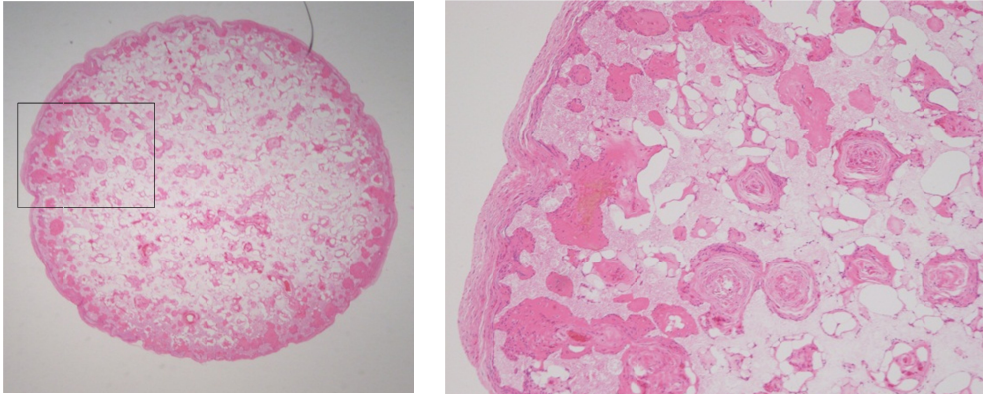


(Dex 100nM で細胞シート作製)

B 6 cm細胞シートを注入した人工骨の組織像



(Dex 10nM で細胞シート作製)



(Dex 100nM で細胞シート作製)

|

**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**

ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製の培養条件の検討

分担研究者 赤羽 学 奈良県立医科大学 健康政策医学講座 准教授

分担研究者 城戸 顕 奈良県立医科大学 整形外科 学内講師

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

骨髄間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells; MSCs）は、デキサメサゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸を添加した培地で骨分化誘導を行うことで、骨芽細胞に分化させることが可能である。我々はこれまでに、ラットやラビットなどの実験動物を用いて、培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その骨形性能を検証してきた。本研究課題では、将来の臨床応用を見据えた研究として、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞シートを作製する培養条件の検討を行った。

本研究では、2種類のヒト細胞を用いて研究を行った。一つは、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞である Lonza 社のヒト骨髄間葉系幹細胞であり、もう一つは患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞である。まず、Lonza 社のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行い、その後骨芽細胞シート作製条件の検討を行った。播種する細胞密度の検討では、従来動物実験で用いてきた細胞密度よりも少ない細胞数でも十分骨形成が得られることが明らかとなった。細胞シート作製時に骨芽細胞へと分化を誘導するが、それに用いるデキサメサゾン濃度は従来動物実験で用いていた濃度で（デキサメサゾン濃度：10 nM）で骨形成マーカーであるオステオカルシン分泌量の増加が見られた。以上のことから、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて硬組織再生を目指す際の細胞シート作製（骨芽細胞シート）条件は、播種細胞密度： $0.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$ 、デキサメサゾン濃度：10 nM、アスコルビン酸濃度：82 $\mu\text{g/ml}$ で21日間の2次培養が好ましいと考えられる。

この条件で作製したヒト骨芽細胞シートを免疫不全動物（ヌードラット）に移植したところ、明らかな新生骨形成が見られた。今後はより大きな細胞シートを作製して細胞シート移植時に特徴的な骨形成パターンが見られるかの検討も必要であると考えられる。また、今回の検討では人工骨に組み合わせて生体に移植したが、偽関節部への骨芽細胞シートのみ移植（スキャフォールドフリーでの骨芽細胞シート移植）でも骨形成が得られるか、壊死骨と組み合わせた場合にも十分な新生骨形成が得られるかなどの検討も必要であると考えられる。

A . 研究目的

間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells; MSCs）は骨髄内をはじめ様々な

部位に存在し、デキサメサゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸を添加した標準培地で骨分化誘導を行うことで、骨芽細胞に分化させることが可能

である¹⁻³。我々はこれまでに、ラットやラビットなどの実験動物を用いて、培養骨髄細胞と人工骨を組み合わせた「培養人工骨」の作製方法を報告してきた^{4,5}。さらに、培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その骨形成能を検証してきた⁶⁻⁸。

H24年度の本研究課題では、将来の臨床応用を見据えた研究として、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞シートを作製する培養条件の検討を行った。

B . 研究方法

B . 1 . ヒト骨髄間葉系細胞

本研究では、2種類のヒト細胞を用いて研究を行った。一つは、市販のヒト骨髄間葉系幹細胞である Lonza 社の細胞であり、もう一つは手術患者から同意のもとに提供を受けた骨髄細胞である。

本研究課題で用いた Lonza 社の市販ヒト骨髄細胞は、20歳の女性の細胞であり、2010年8月に凍結保存された細胞 (PT-2501、0F3853) である。

また患者から提供された細胞は、後で述べるような倫理的配慮を行い、奈良県立医科大学倫理委員会であらかじめ承認を得たうえで、患者に目的を説明し同意を得た方から手術中に採取した骨髄細胞である。

B . 2 . 細胞シート作製条件の検討 (*In vitro* での検討)

まず、Lonza のヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、ヒト細胞の培養に適した条件の検討を行った。その後、骨芽細胞シート作製条件の検討を行った。

動物モデルにおける細胞シート作製は、 1×10^4 cell/cm² の細胞密度で播種

した細胞を通常用いる培養ディッシュ (35mmディッシュ; Falcon 35-3001, BD) にデキサメサゾン、アスコルビン酸添加培地で、21日間培養後、スクレーパー (住友ベークライト MS-93100) で機械的に細胞を回収し細胞シートとして採取する。

本研究では、培養に用いるディッシュの種類やスクレーパーは動物実験と同じものを使用することとし、播種する細胞数 (1×10^4 cell/cm² あるいは 0.5×10^4 cell/cm²) とデキサメサゾン濃度 (10nM あるいは 100nM) をそれぞれの組み合わせで検討し、細胞シート作製に適した条件を見出すこととした (n = 4)。

アスコルビン酸添加量は従来通りの 82 µg/ml とし、培養液の交換は2あるいは3日ごとに行った⁸。

B . 3 . 細胞シート作製条件の検討 (*In vitro* での検討)

In vitro で検討した2つの条件で細胞シートを作製し、それらを人工骨 (スーパーポア、直径 5 mm・高さ 2 mm の円盤状 円リン酸 3 カルシウム 円 TCP: ペンタックス社) と組み合わせ、ヌードラットの背部皮下に移植し、生体内での骨形成能の検討を行った。細胞シートは、*In vitro* での条件検索の結果を受けて、細胞数を 0.5×10^4 cell/cm² とし、10cm ディッシュ (100 mm ディッシュ; Falcon, BD) を用いてデキサメサゾン濃度を 10nM と 100nM の2種類で作製した。図1に実験条件の組み合わせを示す。

採取した細胞シートで人工骨を包むようにして作製した細胞シート・人工骨複合体をヌードラットの背部皮下に移植した (n = 4)。ヌードラットは7週齢の雄を使用した。図2にヌードラットへの移植のモデル図を示す。

移植後2か月で標本を摘出し、組織

学的小および生化学的に骨形成量を評価した。

B . 4 . 細胞シートの骨形性能の評価 (*In vitro* での検討)

本研究における細胞シート移植の目的は硬組織再生であるため、骨形性能が高いことが目的にかなうものであると考え、*In vitro* でそれぞれの培養条件で作製した骨芽細胞シートの骨形性能を評価した。

骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) とオステオカルシンの mRNA 発現をリアルタイム PCR で定量し、さらに培養液中の分泌オステオカルシン量の定量を行った。

リアルタイム PCR 用のプライマーは、Applied Biosystems 社の TaqMan® Gene Expression Assays キットを使用して行った (ALP : Hs01029144、OC : Hs01587814、GAPDH : Hs02758991)。

分泌オステオカルシンの定量は、ELIZA キット (Takara MK128) を使用して定量した。

B . 5 . 移植標本の骨形性能の評価

移植後 2 か月で標本を摘出し、組織学的小および生化学的に骨形成量を評価した。

摘出標本を 2 日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、 β -TCP の円盤状面に平行にサンプル中央で組織切片を作製し、H E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行い組織学的に骨形成の確認を行った。生化学的評価として、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定とオステオカルシン含有量の測定を行った。

B . 6 . 測定結果の統計学的検討

それぞれの実験群の測定結果を比較するために、SPSS (IBM SPSS

Statistics Ver. 20) を用いて、ANOVA テストを行い、その後の検定を Bonferroni で実施し各群の比較を行った。p < 0.05 で統計学的有意差の検定を行った。

B . 7 . 倫理面での配慮

本研究では、2 種類のヒト骨髄細胞を用いた研究を行った。一つは市販されているヒト骨髄間葉系幹細胞であるが、もう一つは手術患者から提供を受けた骨髄細胞である。

患者から提供を受けるヒト細胞を用いた研究に関しては、本学の倫理委員会に申請し承認をうけた後に行った。研究に協力していただく方々に骨髄細胞採取方法やその合併症などに関する十分な説明を行い、理解していただいた上での書面による同意を得ており (インフォームドコンセント)、協力者の人権や個人情報の取り扱いおよび提供していただいた細胞を扱う上での生命倫理には十分に慎重に配慮した。

なお本研究課題では、作製した骨芽細胞シートはヌードラットに移植してその骨形性能を評価するため、骨髄細胞の提供に協力していただいた患者自身に何らかの健康被害をもたらすことはない。

C . 研究結果

C . 1 . *In vitro* での細胞シート作製条件の検討結果

図 3 にヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて作製した骨芽細胞シートの外観を示す。スクレーパーではがしても細胞シートとしての形態は保持されており、ピンセットでつまんでスキャフォールドフリーで移植することも可能である。

図4に、*In vitro*でのそれぞれの培養条件下で測定された分泌オステオカルシン量の継時的結果を示す。デキサメサゾン濃度を10nMと100nMを比較すると、デキサメサゾン10nMの方が100nMよりもオステオカルシン分泌量が多い。通常の骨分化誘導を行った群（デキサメサゾン、アスコルビン酸、グリセロリン酸添加培地での培養）とほぼ同等量のオステオカルシンが測定されていた。播種細胞密度を $1 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ と $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とを比較すると、オステオカルシンの増加する傾向はほぼ同じであった。

C. 2. 生体内での細胞シートの骨形成性能の検討結果（組織像）

図5に、移植後2カ月で摘出したサンプルの組織像を示す。*In vitro*で細胞播種密度を $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ とすると選択していたので、デキサメサゾン濃度による骨形成の差を比較したが、組織像からは両群（デキサメサゾン濃度を10nMあるいは100nM）に大きな差はなく、いずれも良好な骨形成が確認できた。

C. 3. 細胞シートの骨形成性能の生化学的検討結果

図6に移植後2カ月で摘出したサンプルのアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の測定とオステオカルシン含有量測定結果を示す。

-TCPのみを移植した対照群に比べて、デキサメサゾン濃度を10nMと100nMで作製した骨芽細胞シートを組み合わせた -TCPのアルカリフォスファターゼ活性値は統計学的に有意に高かった。このことから両群で複合体内に骨形成が認められていると考えられた。しかし、デキサメサゾン濃度を10nMで作製した骨芽細胞シートを -TCPに

組み合わせた群のほうが、デキサメサゾン濃度100nMで作製したシート群に比べてアルカリフォスファターゼ活性値は高かった。

オステオカルシン含有量も、アルカリフォスファターゼ活性値と同様の傾向を示したが、デキサメサゾン濃度を10nMと100nMの比較では、その差はさらに大きくなっていた。

D. 培養条件の検討結果

D. 1. ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いた骨芽細胞シート作製における細胞培養条件

以上のことから、ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて硬組織再生を目指す際の細胞シート作製（骨芽細胞シート）条件は、播種細胞密度： $0.5 \times 10^4 \text{cell/cm}^2$ 、デキサメサゾン濃度：10nM、アスコルビン酸濃度：82 $\mu\text{g/ml}$ で21日間の2次培養が好ましいと考えられる。

患者から同意のもとに提供された骨髄細胞を用いた研究でもLonza社の細胞を使用した場合とほぼ同様の結果が得られた。

E. 考察

我々はこれまでにラットやラビットなどの実験動物を用いて、骨髄培養細胞をシート状に培養した「骨芽細胞シート」を作製し、その骨形成性能を報告してきた⁶⁻⁸。培養細胞の浮遊液を人工骨に組み合わせた「培養人工骨」は、生体に移植すると4週間には人工骨気孔内に新生骨形成が見られる。骨芽細胞シートを組み合わせた場合には、人工骨気孔内だけでなく人工骨表面にも新生骨の形成が見られる。これは骨芽細胞シート移植の特徴的骨形成である

ことを報告している⁷⁾。

今回、本研究ではヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて細胞シートを作る条件を検討したところ、ラットなどの実験動物における条件と異なることが判明した。その条件で作製したヒト骨芽細胞シートを人工骨に組み合わせてヌードラットに移植したところ、明らかな骨形成が人工骨内に認められた。我々はこれまでにヒト骨髄間葉系幹細胞の浮遊液を人工骨に組み合わせて免疫不全動物に移植し骨形成を評価したことがあるが、その標本に比べても骨形成量は多い印象であった。これは細胞シートを組み合わせたことが浮遊液を組み合わせることよりもより多くの細胞を人工骨に搭載できることによると考えられる。

しかし、本研究で得られた組織像では人工骨気孔内の骨形成所見だけであり、人工骨表面での骨形成は見られなかった。これは、本研究では10 cmディッシュを用いて作製した骨芽細胞シート1枚を人工骨と組み合わせて免疫不全動物(ヌードラット)の皮下に移植するため、通常の動物実験で用いる自家移植モデルと条件が異なることも少なからず影響していると考えられる。

今後、人工骨に搭載する細胞量を増やすことで、従来の骨芽細胞シート移植後の骨形成の特徴がみられるかの検討は必要であると考えられる。あるいは、複数の顆粒状人工骨をヒト骨芽細胞シートで包み込むようなモデルで人工骨間を骨性に架橋できるかを評価するモデルも検討する。

しかし、通常よりも少ない細胞数でも十分な骨形成が見られたことは、硬組織再生における骨芽細胞シートの有用性を示すものであるとも言える。

次年度は、10 cmディッシュも使用し、これまでの動物実験で得られていた特徴的な骨形成がヒト骨芽細胞シートでも起こるかの検討は必要であると考え

られる。さらに、一般的な細胞シートの作製方法である温度応答性培養ディッシュを使用して、本研究で得られた結果と同様の結果が得られるかの検討は今後必要であろうと考える。我々が用いた細胞シート作製法はスクレーパーを使用する機械的な採取方法であるため、採取時の細胞に対するダメージがあることも懸念される。温度応答性ディッシュを使用する場合でも、培養中に骨芽細胞への分化を誘導するステップは重要であろうと推測する。つまり、機械的に細胞シートを採取するか温度応答性ディッシュを利用して採取するかだけでなく、ヒト骨髄間葉系幹細胞を分化させずに細胞シートを作るか分化誘導を行う培養条件で細胞シートを作製するかが非常に重要であろうと考える。この点は、今後検討を要する点である。

また、今回の検討では人工骨に組み合わせて生体に移植したが、偽関節部への骨芽細胞シートのための移植でも骨形成が得られるか、壊死骨と組み合わせた場合にも十分な新生骨形成が得られるかなどの検討も必要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、川手健次、田中康仁 冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの骨形成評価 第32回整形外科バイオマテリアル研究会 2012年12月1日 東京慈恵会医科大学

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 老齢ラットにおける骨芽細胞シ

ートの有用性 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小畠康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁 Fibronectin をコートした TCP の骨形成能 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

藤間保晶、土肥祥子、大串始、谷掛洋平、高澤伸、赤羽学、田中康仁 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 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、森田有亮、面川庄平、小畠康宣、村田景一、中野健一、上羽智之、藤間保晶、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治癒過程の特徴 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨

形成 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

稲垣有佐、上松耕太、赤羽学、小川宗宏、藤間保晶、倉智彦、粥川陽介、森田有亮、川手健次、田中康仁 骨形成細胞シートによる家兎移植健骨孔間治療の促進 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

中野健一、村田景一、清水昌隆、赤羽学、藤間保晶、小畠康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 13-14 日 パシフィコ横浜

G . 参考文献

1. Ohgushi H, Dohi Y, Katuda T, et al. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *J Biomed Mater Res* 32: 333-340, 1996.
2. Ohgushi, H. and Caplan, A.I. (1999) Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 48,913-927.
3. Sonal, R., Jackson, J.D., Brusnahan, S.K., O' Kane, B. J.

- and Sharp, J.G. (2012) Characterization of a mesenchymal stem cell line that differentiates to bone and provides niches supporting mouse and human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Discovery*, 2, 5-14.
4. Kawate K, Yajima H, Ohgushi H, et al. Tissue-engineered approach for the treatment of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: transplantation of autologous mesenchymal stem cells cultured with β -tricalcium phosphate ceramics and free vascularized fibula. *Artif Organs* 30: 960-962, 2006.
 5. Manabu Akahane, Tomoyuki Ueha, Yoshiko Dohi, Takamasa Shimizu, Yasuaki Tohma, Akira Kido, Kenji Kawate, Tomoaki Imamura, Yasuhito Tanaka. Secretory osteocalcin as a non-destructive osteogenic marker of tissue engineered bone. *J Orthop Sci.* 2011 Sep;16(5):622-628.
 6. Akahane M, Nakamura A, Ohgushi H, Shigematsu H, Dohi Y, Takakura Y. Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site-. *J Tissue Eng Regen Med.* 2(4):196-201, 2008.
 7. Hideki Shigematsu, Manabu Akahane, Yoshiko Dohi, Akifumi Nakamura, Hajime Ohgushi, Tomoaki Imamura and Yasuhito Tanaka. Osteogenic Potential and Histological Characteristics of Mesenchymal Stem Cell Sheet/Hydroxyapatite Constructs. *The Open Tissue Eng Regen Med Journal*, 2009 Oct;2: 63-70.
 8. 上羽智之、赤羽学、重松秀樹、内原好信、清水隆昌、城戸顕、藤間保晶、川手健次、今村知明、田中康仁 培養細胞シートを用いた培養人工骨の骨形成 *Orthopaedic Ceramic Implants* 2009, 29:15-18

図1 培養条件の検討の組み合わせ

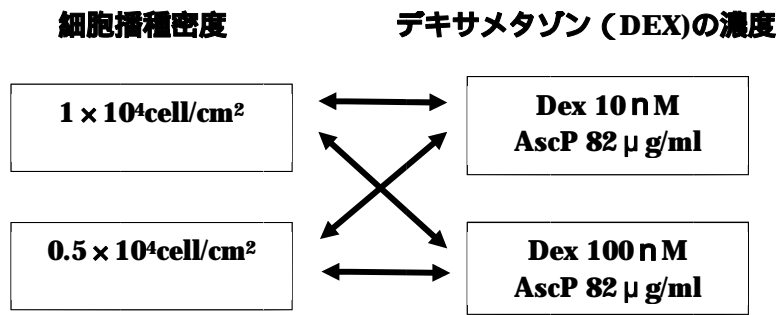


図2 ノードラットへの移植実験のイメージ図

-TCP (PENTAX)にヒト細胞シートをラップし7週齢ヌードラット背部皮下へ移植

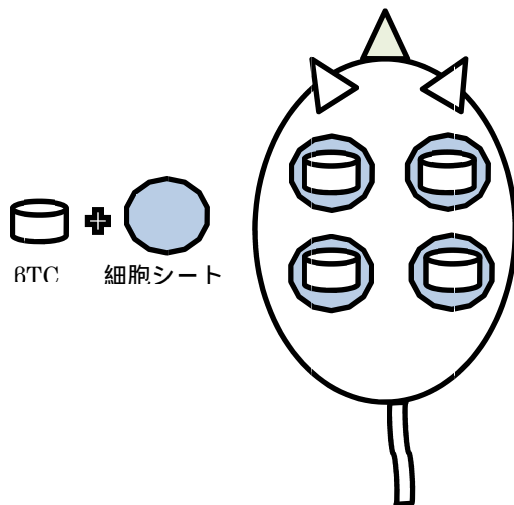


図3 ヒト骨髄間葉系幹細胞から作製したヒト骨芽細胞シート

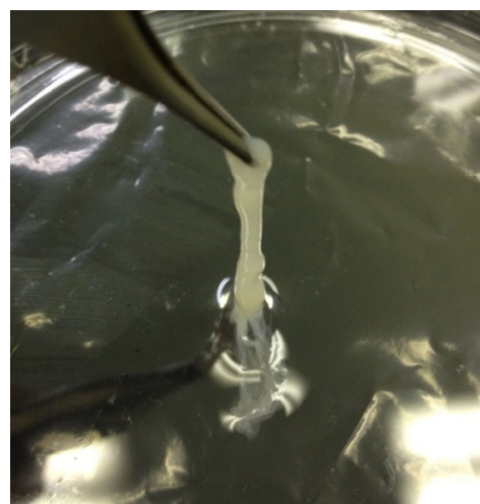
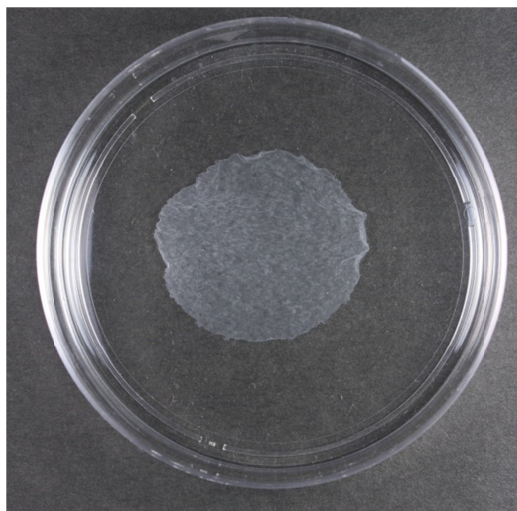
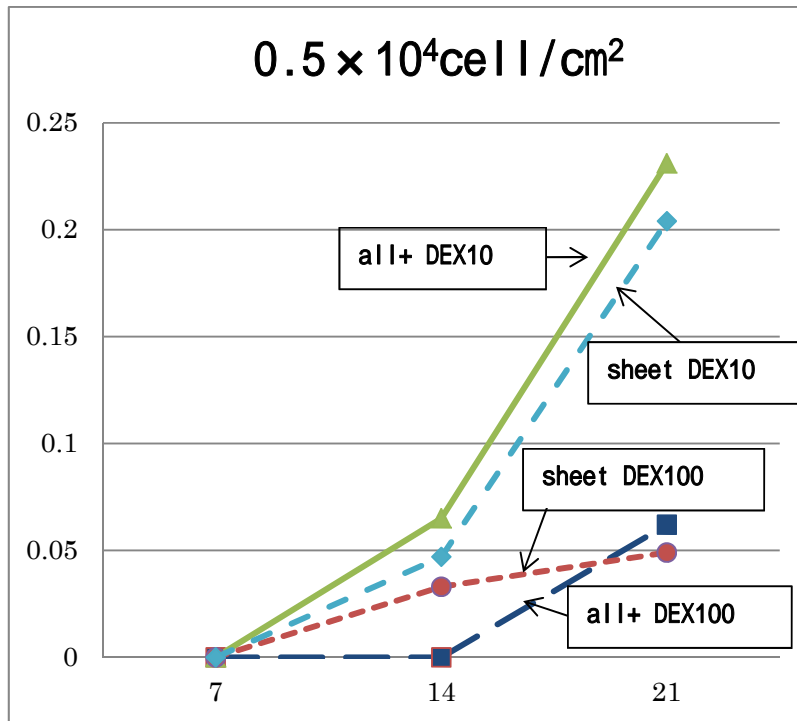
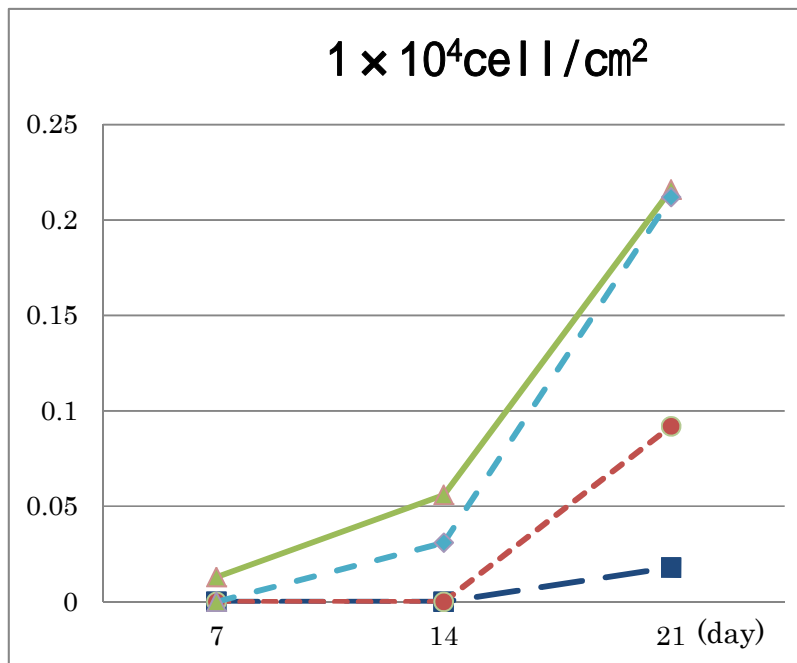


図4 分泌オステオカルシン量の経時的変化 (*In vitro*)

A. 低細胞密度での播種



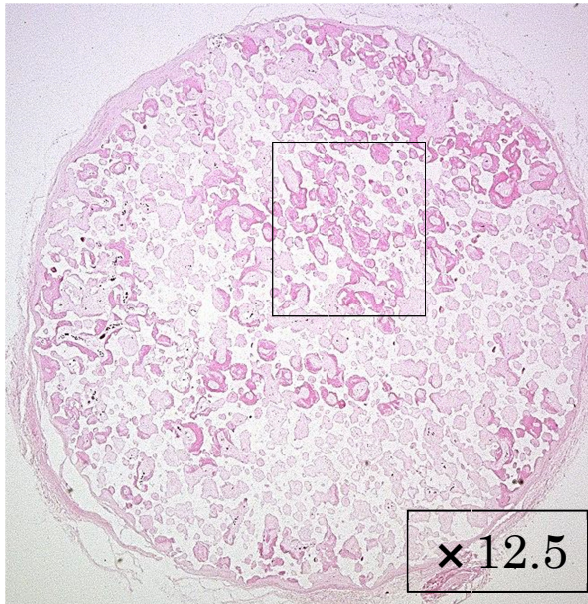
B. 高細胞密度での播種



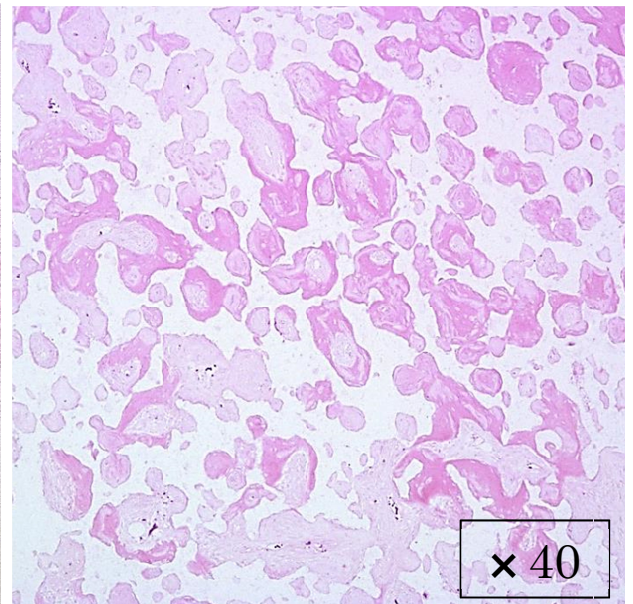
all+ : DEX+ AscP+ GP、
 sheet: DEX+ AscP (骨芽細胞シート)
 DEX10: デキサメサゾン 10nM、
 DEX 100 : デキサメサゾン 100nM

図5 生体内での細胞シートの骨形成性能の検討結果（組織像）

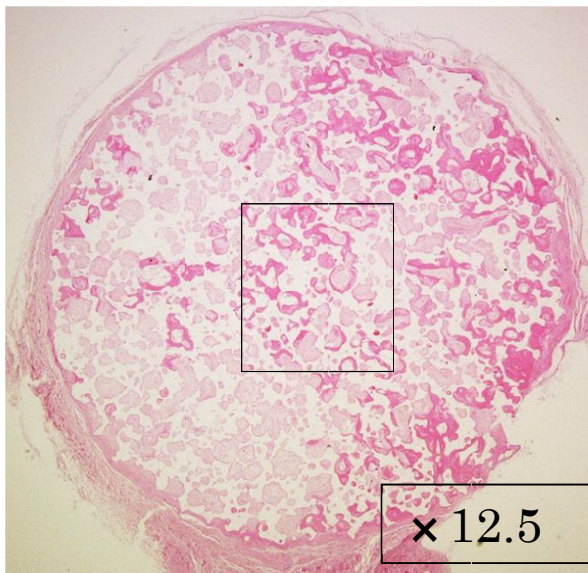
A. デキサメサゾン：10nM



B. 左図の枠内の拡大写真



C. デキサメサゾン：100nM



D. 左図の枠内の拡大写真

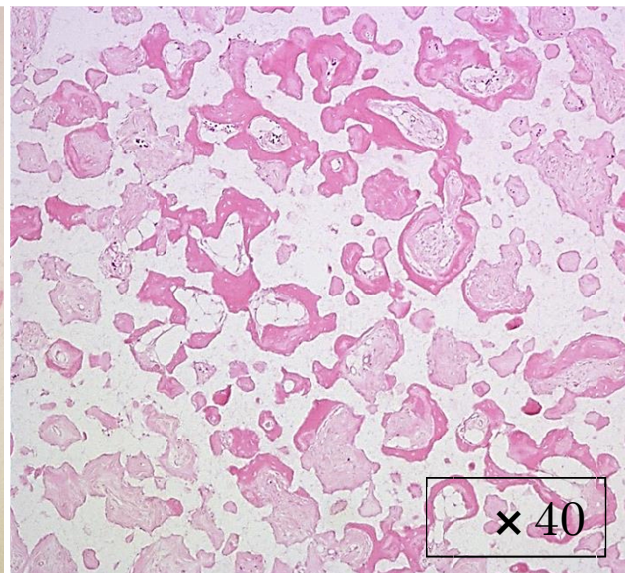
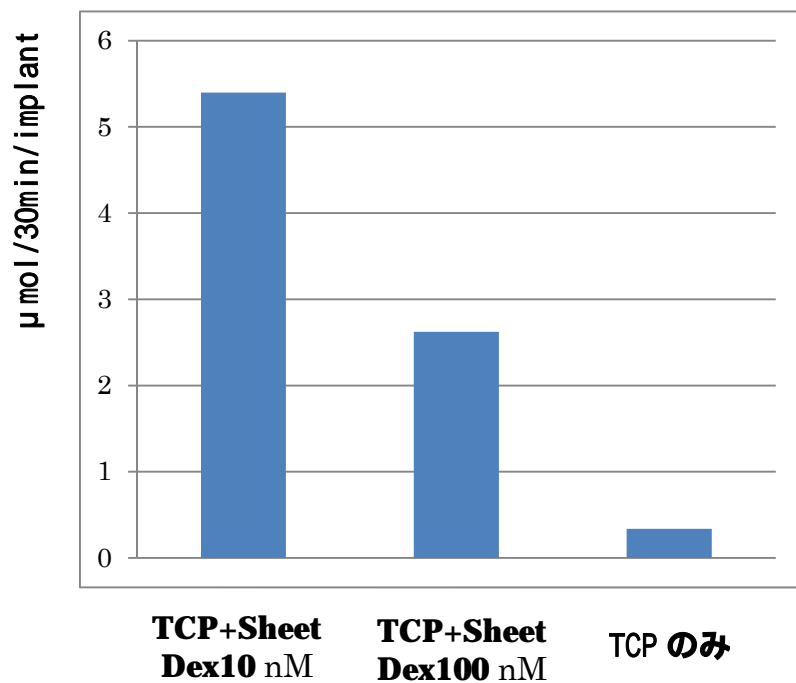
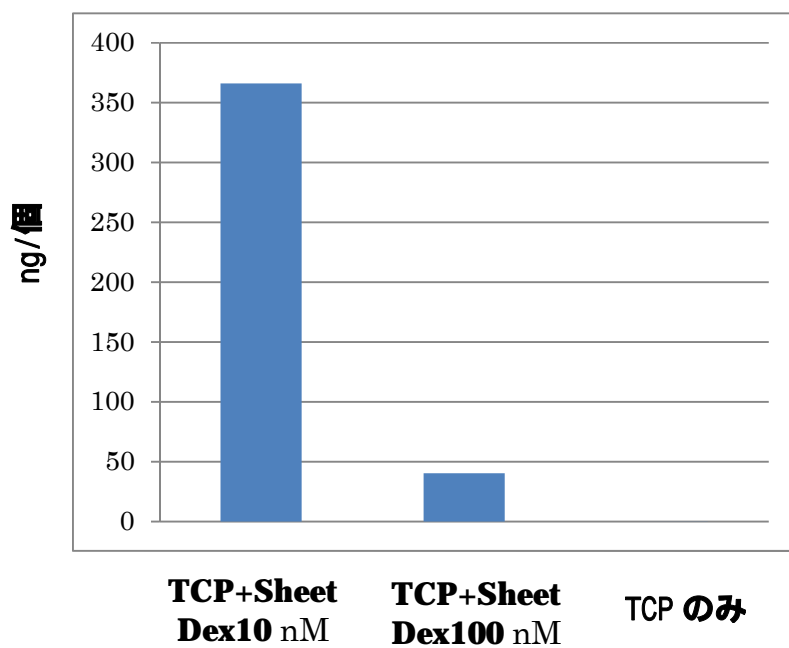


図6 生体内での細胞シートの骨形性能の検討結果（生化学的評価）

A. アルカリフォスファターゼ活性



B. オステオカルシン含有量



厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）
研究代表者分・分担研究報告書

ヌードラット大腿骨偽関節モデルの確立

研究代表者 上羽智之 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究分担者 森田有亮 同志社大学 生命医科学部 教授

研究分担者 田中康仁 奈良県立医科大学 整形外科 教授

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向いているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者のADLは低下し、それに伴いQOLが非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living boneではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が6cm以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合はliving boneである血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者のADL改善につながり、臨床上也非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨芽細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨芽細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間（本研究では骨切り後12週間）に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨芽細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

A. 研究目的

これまでも実験動物を用いた偽関

節モデルは報告されている。しかし、中・大型の動物が主であり、ラットにおける偽関節モデルは必ずしも十分な

ものが確立されているとは言えない。ヒト骨髄細胞を用いて、硬組織再生の研究、特に偽関節モデルに対する骨癒合の研究を進めるうえで、免疫不全動物であるヌードラットの偽関節モデルは重要である。ヌードマウスやスキッドマウスも免疫不全動物として広く用いられているが、大腿骨は非常に小さく、骨折や骨壊死のモデルを研究する上では扱いにくい。そこで、本研究では通常のラットとほぼ同じサイズで免疫不全動物であるヌードラットを用いて大腿骨の偽関節モデルを作製することを目的として、実験を行った。

ラット大腿骨偽関節モデルは様々なものが報告されているが、髄内釘を用いた方法は簡便で有用性が高い。偽関節を作製するために骨折部の骨膜の熱処理が一般的に行われているが¹、個体間で均一な骨膜の熱処理を行うことは手技的に困難である。また、骨折治癒には周囲の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells ; MSCs) が骨芽細胞などに分化し骨癒合を促す必要があるが²、このMSCsの供給源として、骨膜³、骨髄⁴、周囲の筋肉⁵、周囲の血管⁶などが挙げられる。

骨膜のみを処理するモデルでは、骨膜を除くその他の部位からMSCsが供給される可能性が存在するため、骨折部が経過によって確実に偽関節となるとは言い難く、また実際の臨床で遭遇する骨形成能を失った偽関節にならない可能性も考えられる。

今回我々は、骨膜を熱処理する代わりに、骨膜と周囲の筋肉組織を含めて広範囲に骨折部の軟部組織を切除したうえで、さらに大腿骨骨髄の搔爬を追加する骨折部を作製することで、簡便で再現性の高いヌードラット大腿骨偽関節モデルの作製を行った。

B. 研究方法

B.1. ニードラット偽関節モデルの作製

本研究では、12週齢の雄ヌードラット (Fischer344ラット; F344/N Jcl-rnu/rnu) を用いた。

右大腿外側に皮膚切開し大腿骨に進入した。大腿骨の骨幹部中央をボーンソーで骨切りした後、大腿骨の転子部から顆部に付着する筋群を骨膜とともに大腿骨から剝離した後、大腿骨から全周性に切除する。さらに大腿骨骨髄も転子部から顆部まで注射針で十分に搔爬、洗浄し、骨折部の固定はK-wire (径0.8mm)を用いた髄内釘固定を行い、これを偽関節群とした (図1)。

一方、健側の大腿骨を対照群とし、両群 n=12 で比較検討を行った。

B.2. 移植標本の骨形性能の評価

術後4、8、12週でレントゲン画像を撮影し、継時的に骨形成の状態を観察した。

B.3. 移植標本の骨形性能の評価

骨癒合状態を評価するため、組織像も継時的に評価した。摘出標本は2日間ホルマリン固定し、数日間脱灰した後、骨折部が観察できるように大腿骨骨軸に平行にスライスし、中央で組織切片を作製し、H E (ヘマトキシリン・エオジン) 染色を行い組織学的に骨形成の確認を行った。

B.4. 3点曲げ力学的評価による偽関節の確認

分担研究者・森田が作製したラット用の専用ジグを使用し、評価を行った。

C. 研究結果

C.1. レントゲン画像による骨形成の 継時的評価

図 2 に継時的なレントゲン像の結果を示す。偽関節群では、レントゲン画像で骨切り部周囲にわずかな仮骨形成を認めるものの、術後 12 週まで骨性架橋を認めなかった。

C.2. 組織像

図 3 に、骨切後 4、8、12 週で摘出した大腿骨の組織像を示す。X 線画像と同様に、偽関節群では骨折部の骨性架橋を認めなかった。骨折部には繊維性組織が介在しており、骨切り後 12 週では骨切部の皮質骨の萎縮を認めた。

これらは、偽関節の組織像と一致した所見であった。

C.3. 力学試験結果

正常大腿骨に比べて、有意にその強度は失われており、レントゲン結果や組織像の結果と同じく、偽関節であることが明らかであった。

D. 考察

骨折の治療法は近年進歩し、骨癒合率は比較的に向いているが、現在においても骨癒合を得られず偽関節となる症例が少なからず存在する。偽関節に陥ると、痛みのため患者の ADL は低下し、それに伴い QOL が非常に損なわれる。

偽関節に対する治療は、骨折部に介在する癒痕組織を切除した後、骨折部に生じた骨欠損の大きさに合わせて海綿骨移植が行われるが、一度生物学的活性を失い偽関節に陥ると、living

bone ではない海綿骨移植のみでは骨癒合を得られない可能性が高まる。このような状態に陥ると、複数回の手術を行っても骨癒合が得られず、骨折部周囲の組織は損傷され、感染などの合併症併発も危惧される。骨折部を骨形成能が残存している部位まで切除および搔爬を行うと、大きな骨欠損が生じる。

一般的に、骨欠損部が 6cm 以上を超えると海綿骨移植では骨癒合が得られにくいとされ、このような場合は living bone である血管柄付き骨移植術などが必要となり、手技的に難易度が増すことになる。このような状況に陥る前に、新しい方法で、骨折部または偽関節部の骨癒合が得られれば、患者の ADL 改善につながり、臨床上も非常に有用性が高い。

本研究では、ヒト骨芽細胞シートの臨床応用を視野に入れた研究をするために、臨床に近い偽関節モデルをヌードラットの大腿骨で作製し、今後のヒト細胞を用いた研究を効率よく進めるための基礎研究を目的としている。生物学的活性を有したヒト由来の骨芽細胞シートを注入し、偽関節部位の骨癒合が得られるかを検討するための偽関節モデルである為、偽関節モデル作製後、自然経過で骨癒合が起こらず、ある程度の経過観察期間（本研究では骨切り後 12 週間）に、確実に偽関節となるモデルを作製することを目的とする。

今回の実験から、確実にヌードラット大腿骨偽関節が作製できる方法が確立できた。この偽関節モデルを使用することで、ヒト骨芽細胞シート移植による骨癒合の効果を評価することができると考えられ、ヒト骨芽細胞によって骨癒合を得られることを証明することが可能となると考えられる。

本研究で我々が確立したモデルは、骨膜の熱処理の代わりに、大腿骨周囲の骨膜および筋肉組織を広範囲に切除し、さらに大腿骨骨髓を搔爬すること

で偽関節を作ることが可能であった。骨膜の熱処理をせず、骨癒合に影響を与える MSCs を効果的に除去することで、高い再現性をもって偽関節作製が可能であった。我々の作製したヌードラット大腿骨偽関節が、今後の偽関節の治療法開発に有用であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

清水隆昌、赤羽学、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、川手健次、田中康仁 冷凍保存骨髄間葉系幹細胞由来細胞シートの骨形成評価 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

上羽智之、赤羽学、清水隆昌、中野健一、倉智彦、川手健次、田中康仁 老齢ラットにおける骨芽細胞シートの有用性 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第 32 回整形外科バイオマテリアル研究会 2012 年 12 月 1 日 東京慈恵会医科大学

谷掛洋平、中島弘司、林宏治、加藤宣伸、藤間保晶、大串始、土肥祥子、赤羽学、高澤伸、川手健次、田中康仁 Fibronectin をコートした TCP の骨形成能 第

27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、森田有亮、面川庄平、小島康宣、村田景一、中野健一、上羽智之、藤間保晶、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シートを用いたラット大腿骨偽関節治癒過程の特徴 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

内原好信、赤羽学、上羽智之、清水隆昌、倉智彦、藤間保晶、川手健次、田中康仁 培養骨芽細胞シートを用いた放射線照明白家処理骨の骨形成 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

中野健一、村田景一、清水隆昌、赤羽学、藤間保晶、小島康宣、仲西康顕、面川庄平、川手健次、田中康仁 骨芽細胞シート移植を併用した血管柄付き人工骨作製 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 2012 年 10 月 26-27 日 名古屋国際会議場

清水隆昌、赤羽学、上羽智之、森田有亮、粥川陽介、藤間保晶、面川庄平、城戸顕、川手健次、田中康仁 細胞シートを用いた注入型骨移植による偽関節治療 第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 13-14 日 パシフィコ横浜

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

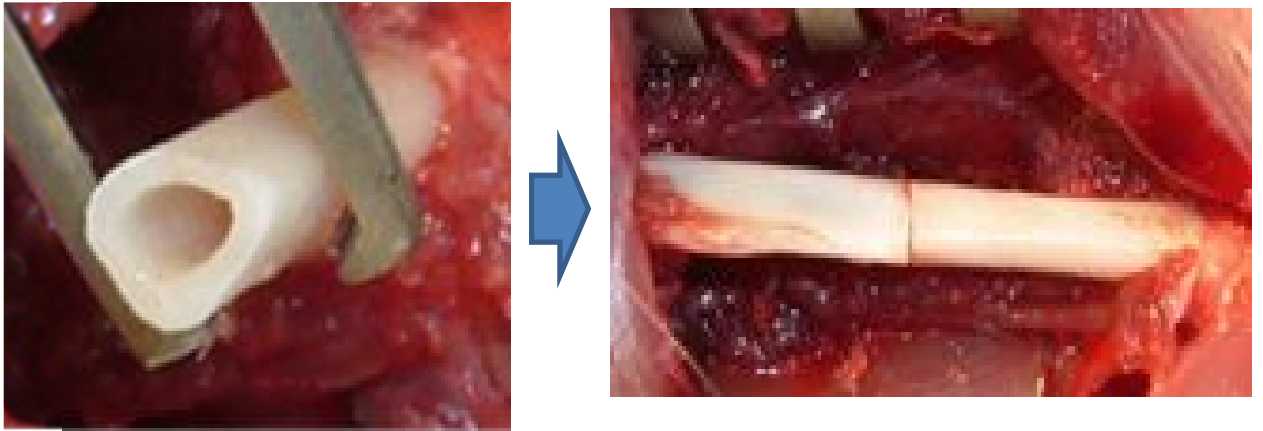
**2. 実用新案登録
なし**

**3. その他
なし**

G. 参考文献

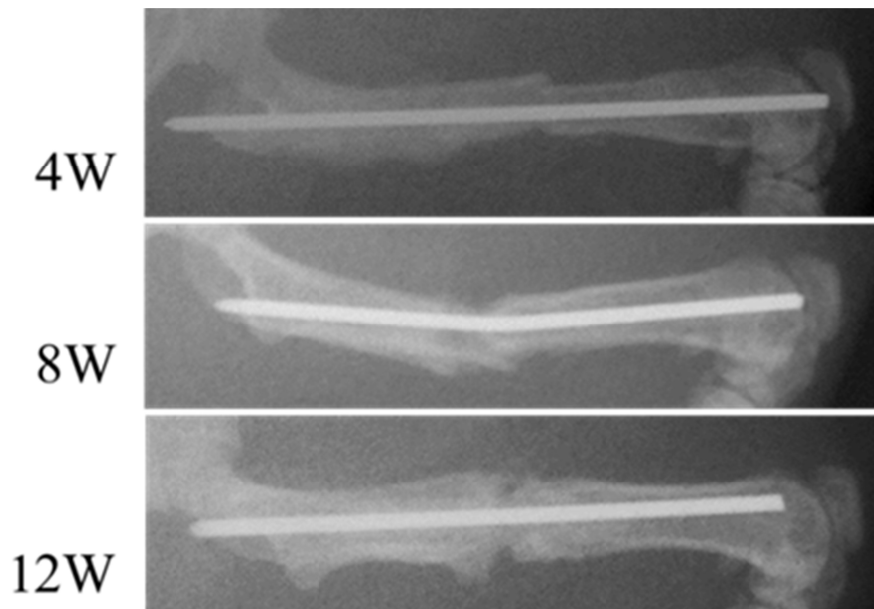
1. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH. Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res.* 2003 May;21:503-10.
2. Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, Izumi T, Shida JI, Tsuneyoshi M, et al. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res* 1997;12:96-102.
3. Malizos KN, Papatheodorou LK. The healing potential of the periosteum. Molecular aspects. *Injury* 2005;36(Suppl 3):S13-9.
4. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-16.
5. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel D, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med* 2005;352:1959-66.
6. Rumi MN, Deol GS, Singapuri KP, Pellegrini Jr VD. The origin of osteoprogenitor cells responsible for heterotopic ossification following hip surgery: an animal model in the rabbit. *J Orthop Res* 2005;23:34-40.

図1 大腿骨偽関節モデルの作製



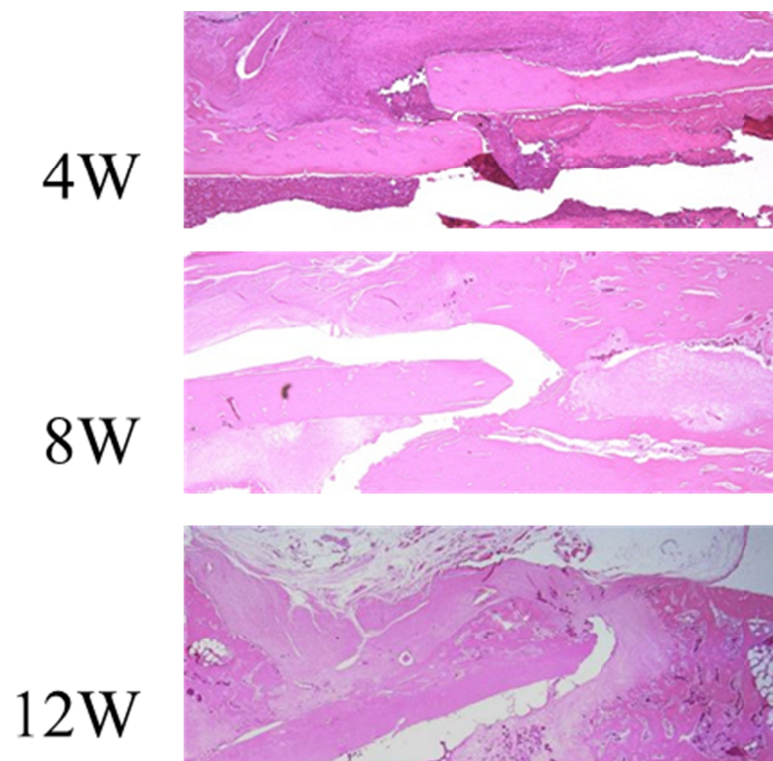
大腿骨の周囲の骨膜を可及的に切除し、さらに髓腔内を搔把・洗浄する。その後、骨髓腔内に鋼線を入れて髓内固定を行う。骨膜の切除だけでなく、髓腔内の搔把・洗浄を十分に行うことが確実な偽関節モデル作製のポイントであることが分かった。

図2 経時的レントゲン撮影による骨折部の状態の評価



12週経過しても骨折部に骨癒合は見られなかった。組織像や力学試験結果からも骨癒合が得られていない結果であり、偽関節と判断した。

図3 経時的な骨折部の組織像



骨癒合は得られておらず、軟部組織の介在が確認された。

**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**

**ヒト骨芽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方法の
検討**

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 人工関節・骨軟骨再生医学講座 教授

研究協力者 清水隆昌 奈良県立医科大学 整形外科 医員

研究要旨

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を、ヒト骨髄細胞から作製したヒト骨芽細胞シート移植で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、力学的強度の測定を正確に行うための評価方法を検討した。

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に骨癒合を認めないことを確認したサンプルの力学試験を行い、偽関節モデルの対照群である正常大腿骨の力学強度の測定結果と比較したところ、その強度は有意に低下していた。

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芽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 で作製したヒト骨芽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、ヒト骨芽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の検討

ヌードラットの大腿骨は小さく、これでは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行うこととした。F 3 4 4 ラットの大腿骨を摘出し、正常大腿骨の強度をどのように測定するか検討したところ、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明らかとなった。

そこで、同ラットの大腿骨に偽関節を作製し、その強度を専用ジグを用いて測定し比較した。なお、ラットの大腿骨偽関節作製方法は我々がこれまでに確立している方法を応用した^{1, 2}。

骨癒合が得られず、曲げ破壊が生じなかった場合においては、正常大腿骨の破壊時の平均押し込み量である 1.2 mm を押し込んだ時の荷重値を最大曲げ荷重値として評価することが適切であることも通常のラットを用いた予備検討で判明した。

B - 2 . 偽関節モデルの作製

12 週齢のヌードラットを用いて大腿骨偽関節モデルを作製した。ヌードラットにおける偽関節モデル作製方法は、本研究課題の他の分担研究で確立した方法を用いた。その方法を簡潔に述べると、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)。

偽関節モデル作製の 2 か月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。対照群として、ヌードラットの正常大腿骨の強度も合わせて測定した。

B - 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 . 力学試験結果の統計学的検討

正常大腿骨と偽関節モデル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 - 6 . 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髄細胞を扱うものではない。

C . 研究結果

C - 1 . μ CT 撮影による偽関節の評価結果

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 . 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4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。

D . 考察

μ CT撮影により骨切り部での骨癒合を認めなかったことを確認するとともに、3点曲げ試験によって偽関節群での力学強度が正常大腿骨と比べて有意に低下していることを確認した。これより、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

μ CT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 ノードラットにおける偽関節モデルの作製

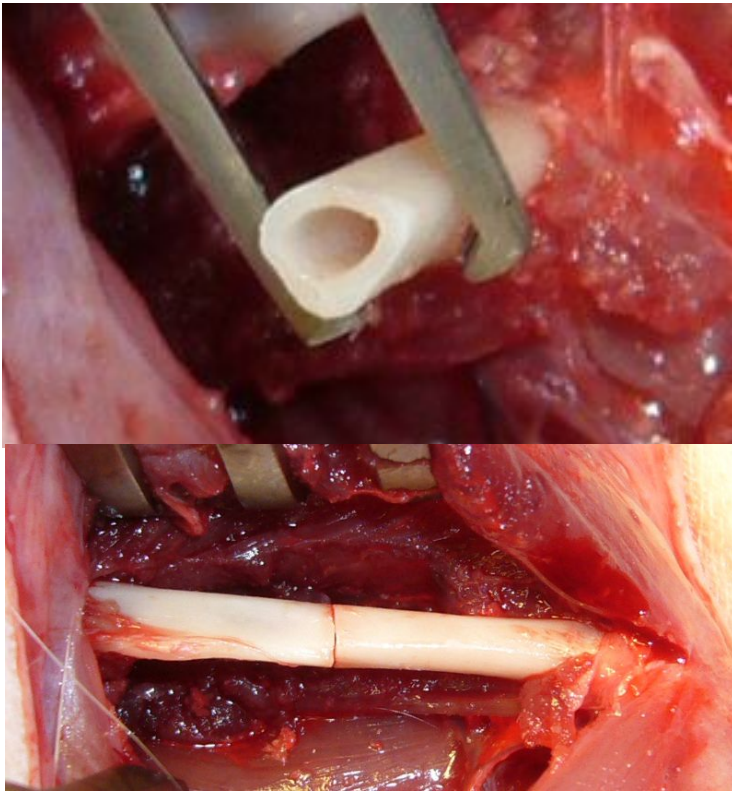


図2 専用ジグによる3点曲げ試験（力学的評価）

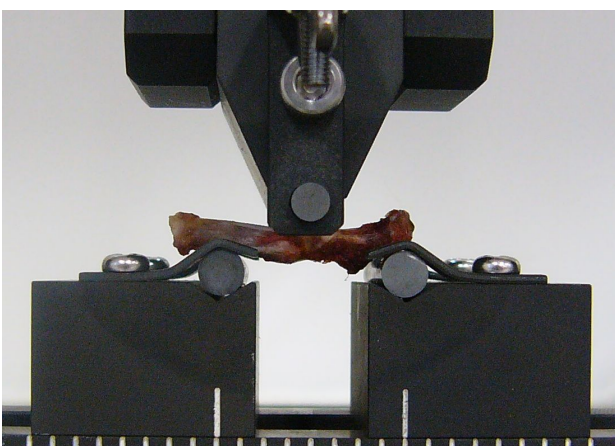
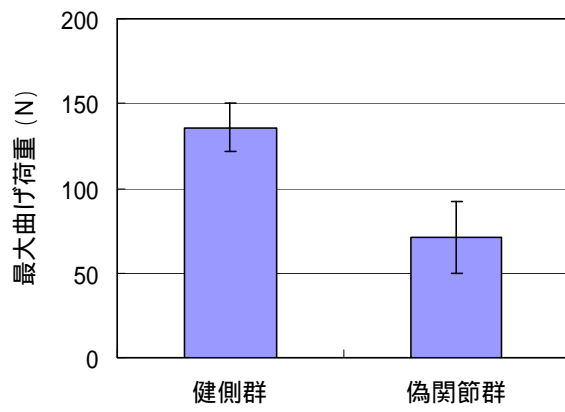


図3 偽関節群の μ CT画像



図4 3点曲げ試験の結果



研究発表に関する一覧表

	発表者氏名	演題	学会名	日付	場所
1	清水隆昌、赤羽学、 面川庄平、小島康宣、 村田景一、中野健一、 川手健次、田中康仁	冷凍保存骨髄間葉 系幹細胞由来細胞 シートの骨形成評 価	第 32 回整形外科 バイオマテリア ル研究会	2012/12/01	東京慈恵会医科大学 (東京)
2	上羽智之、赤羽学、 清水隆昌、中野健一、 倉智彦、川手健次、 田中康仁	老齡ラットにおけ る骨芽細胞シート の有用性	第 32 回整形外科 バイオマテリア ル研究会	2012/12/01	東京慈恵会医科大学 (東京)
3	中野健一、村田景一、 清水隆昌、赤羽学、 藤間保晶、小島康宣、 仲西康顕、面川庄平、 川手健次、田中康仁	骨芽細胞シート移 植を併用した血管 柄付き人工骨作製	第 32 回整形外科 バイオマテリア ル研究会	2012/12/01	東京慈恵会医科大学 (東京)
4	谷掛洋平、中島弘司、 林宏治、加藤宣伸、 藤間保晶、大串始、 土肥祥子、赤羽学、 高澤伸、川手健次、 田中康仁	F i b r o n e c t i n を コ ー ト し た T C P の 骨 形 成 能	第 27 回日本整形 外科学会基礎学 術集会	2012/10/26- 27	名古屋国際会議場 (名古屋)
5	藤間保晶、土肥祥子、 大串始、谷掛洋平、 高澤伸、赤羽学、田 中康仁	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	第 27 回日本整形 外科学会基礎学 術集会	2012/10/26- 27	名古屋国際会議場 (名古屋)
6	清水隆昌、赤羽学、 森田有亮、面川庄平、 小島康宣、村田景一、 中野健一、上羽智之、 藤間保晶、川手健次、 田中康仁	骨芽細胞シートを 用いたラット大腿 骨偽関節治癒過程 の特徴	第 27 回日本整形 外科学会基礎学 術集会	2012/10/26- 27	名古屋国際会議場 (名古屋)

7	内原好信、赤羽学、 上羽智之、清水隆昌、 倉智彦、藤間保晶、 川手健次、田中康仁	培養骨芽細胞シートを用いた放射線 照明白家処理骨の 骨形成	第 27 回日本整形 外科学会基礎学 術集会	2012/10/26- 27	名古屋国際会議場 (名古屋)
8	稲垣有佐、上松耕太、 赤羽学、小川宗宏、 藤間保晶、倉智彦、 粥川陽介、森田有亮、 川手健次、田中康仁	骨形成細胞シート による家兎移植健 骨孔間治療の促進	第 27 回日本整形 外科学会基礎学 術集会	2012/10/26- 27	名古屋国際会議場 (名古屋)
9	中野健一、村田景一、 清水昌隆、赤羽学、 藤間保晶、小島康宣、 仲西康顕、面川庄平、 川手健次、田中康仁	骨芽細胞シート移 植を併用した血管 柄付き人工骨作製	第 27 回日本整形 外科学会基礎学 術集会	2012/10/26- 27	名古屋国際会議場 (名古屋)
10	清水隆昌、赤羽学、 上羽智之、森田有亮、 粥川陽介、藤間保晶、 面川庄平、城戸顕、 川手健次、田中康仁	細胞シートを用い た注入型骨移植に よる偽関節治療	第 11 回日本再生 医療学会総会	2010/06/13- 14	パシフィコ横浜 (横浜)

・ 研究発表に関する参考資料

添付資料参照