

骨延長部における培養骨膜由来細胞の
骨形成促進に関する実験的研究

多久嶋 亮彦

①

論文題目

骨延長部における培養骨膜由来細胞の骨形成促進
に関する実験的研究

氏名

多久嶋亮彦

目次

I. 緒言

II. 材料及び方法

1. 実験動物

2. 方法

- 1) 骨延長手術及び骨膜採取
- 2) 骨膜由来細胞の準備及び培養
- 3) 培養細胞の移植

3. 評価方法

- 1) 軟X線撮影
- 2) 骨延長部における新生骨の定量的分析
- 3) 組織学的検索 (H.E.染色及び Azan-Mallory 染色)
- 4) 免疫組織学的検索 (BrdU 染色)

III. 結果

1. 軟X線像

2. 骨延長部における新生骨の定量的分析

3. 組織像

1) 細胞移植群

- a. 移植後1日目
- b. 移植後3日目
- c. 移植後1週間目
- d. 移植後2週間目
- e. 移植後4週間目

2) コントロール群

IV. 考察

1. 本実験の背景について
2. 実験モデルについて
3. 移植細胞およびその培養について
4. X線及び組織学的検索結果について
5. 新生骨の定量分析について
6. 今後の展開について

V. 結語

1. 緒言

機能的、器質的に傷害あるいは欠損した組織を修復させることは再建外科学において最も困難な、かつ重要な課題の一つである。現在行われている組織移植という手段は自家移植、他家移植にかかわらず臨床上多方面において画期的な成果を上げている^{1,2)}。しかしながら自家移植においては採取部位の組織が犠牲になること、他家移植においてはドナーの不足などが問題となっている^{3,4)}。さらに移植手術自体に関しては時間、及び経費のかかることが周知の事実であり、今後の見通しは必ずしも明るいことばかりではない。これに対して、近年新しい組織形成の手段の一つとして Tissue Engineering の研究が行われつつある。Tissue Engineering とは生物学と生命科学技術を駆使して組織の機能的、器質的な代用品を作り出すことである^{5,6)}。現在、あらゆる分野においてその手技が考えられているが、培養細胞を利用した Tissue Engineering の研究がその柱となっている。例えば免疫担当細胞の通ることができないポリマーを膜とするマイクロカプセルに培養されたウシやブタ由来の肝細胞をいれ、これを人体に大量に移植し肝臓の代用をさせようといった試みなどである⁷⁾。形成外科領域においては皮膚、軟部組織、及び骨、軟骨などの硬組織を再建することが重要な課題であるが、現在、臨床的にも応用されつつある培養表皮細胞移植も Tissue Engineering のひとつといえよう⁸⁾。

Tissue Engineering において肝要なことは利用する細胞の分化と増殖のコントロールをいかに行うかということと、培養された細胞をどのような形で移植す

るか、すなわちいかなる足場 (scaffold) を用いるかという点にある。前者の細胞のコントロールに関しては、培養技術の発達により細胞培養を行う際に細胞が脱分化をしないように実質細胞を増殖させることが可能なこととなってきた⁹⁾。しかし生体に培養細胞を移植した後に、確実に viability を保持したまま培養細胞に機能的な分化を行わせることは難しい。この問題に対してレシビエント側の移植部位に培養細胞を受け入れる環境の整った場があれば移植した細胞による新しい組織形成がおこなえる可能性がある¹⁰⁾。

一方 Ilizarov、De Bastiani らによって開発された骨延長手術は、近年の創外固定器の発達に伴ない急速に普及してきた^{11), 12), 13), 14)}。骨移植を要しないこの方法は少ない侵襲で、かつ安全に骨の再建が行えるものであるが、骨新生の遅延のため長期の延長器の装着を余儀なくされたり、延長後に骨折を生じたりすることもある^{15), 16)}。骨延長の際に骨新生に大きくかかわっているのは骨膜であるとされている¹⁷⁾。古くから骨膜の骨形成能に関する報告は多く、骨膜における骨形成能を持った細胞の存在も指摘されていた^{18), 19), 20), 21), 22)}。近年、細胞培養の技術の発達に伴い骨膜よりの細胞の分離、及び培養が可能となっている^{23), 24)}。特に Nakahara らは生後1週の子鼠の脛骨膜由来の細胞を分離、培養増殖した後、継代の際に高密度にシャーレに培地と共に播種を行ったところ骨形成が見られたものの、低密度に播種したものでは分化が見られなかったことを報告している²⁵⁾。このことは骨膜由来の培養細胞が骨形成能を潜在的に保持しており、ある特定の条件下においては分化傾向を示すことを表わしている。

本実験はこれらのことを踏まえ、白色家兎の脛骨を用いて骨延長部の仮骨不良モデルを作製し、そこに培養増殖された骨膜由来細胞の移植を行い骨新生が誘導できるかどうかを評価する実験を行った。

II. 材料及び方法

1. 実験動物

生後 12 週、体重 1.6~2.2 kg の白色家兎、32 羽を用いて実験を行った。白色家兎の下腿において、脛骨のほぼ中央で腓骨は脛骨に癒合しており、この部位は tibio-fibular junction と呼ばれる (図 1)。

2. 方法

1) 骨延長手術及び骨膜採取

麻酔は耳介皮下静脈よりのネンブタール静脈注射 (30 mg/kg) により導入し、マスクによる GOF 麻酔で維持を行った。まず両側下腿前面を剃毛した後、家兎を仰臥位に固定した。左側下腿前面に約 20mm の縦切開を加え、脛骨周囲を全周性に剥離した (図 2)。次に骨切り予定部である tibio-fibular junction 直下を中心に上下 1cm ずつ骨膜を全周性に剥離除去した (図 3)。下腿外側より脛骨軸に対し垂直に、骨切り部より上に 2 本、下に 2 本、計 4 本の Orthofix M-100® のスクリューを経皮的に刺入後、脛骨を junction 直下で電動ドリルにて横断骨切りを行った。骨切り部を整復した後、創外固定器 Orthofix M-100® を装着した (図 4)。筋膜を吸収糸で縫合後、ナイロン糸にて皮膚を縫合し創を閉鎖した。同時に右側の下腿前面を切開し、脛骨前内側面より 5×20 mm の大きさを骨膜を剥離し採取した。家兎はケージ内で自由に行動させ固形飼料で飼育し、骨切

りを行った左側脛骨は3日間の待機期間の後、1日2回、1mm/1回(1日2mm)の割合で10日間の延長(合計20mm)を行った。

2) 骨膜由来細胞の準備及び培養

骨膜由来細胞の培養は Nakahara らの報告した方法に準じて行った²⁹⁾。まず採取された骨膜はタイロード液(Sigma社)で2回洗浄後、5mlのコラゲナーゼ液(0.25% of 410 units/ml, CLS; Worthington Biochemical, Freehold, New Jersey)にて37°Cのインキュベーター内で2時間消化させた。その間30分おきに約10秒間攪拌を行った。消化後同量の10%ウシ血清(Gibco, Grand Island, New York)加、Ham's F-12 培地(Gibco)で酵素反応を抑制した後、金網に通し大きな雑物を除去し、1200回転、5分間の遠心分離を行った。これを10%ウシ血清加、Ham's F-12 培地10mlで100mmシャーレ内に播種した。細胞は37°C、5%炭酸ガスインキュベーター内で培養を行った(図5)。培地交換は3日おきに行った。7日間の培養で細胞はシャーレの約80%の面積を占めるまでに増殖する(サブコンフルエント)のでこれをトリプシン処理により継代を行った。まず0.25% trypsin-EDTA 1mlを加えて洗浄し、直ちに廃棄後もう一度0.25% trypsin-EDTA 4mlを加えて37°Cでインキュベートした。5~10分間のインキュベートで細胞がシャーレより剥がれて単離していることを確認した後、4mlの10%ウシ血清加、Ham's F-12 培地を加えトリプシンの反応を止めた。これを遠心管に移し1200回転、5分間の遠心分離を行った後、細胞沈渣を5mlのHam's F-12 培地で攪拌した。これを1mlづつ5つの100mmシャーレに分け、それぞれに9mlのHam's F-12 培地を加え1対5の割合で継代培養を行った。3~4

日後にはほぼサブコンフルエントとなるので同様の継代方法を用い、1対3の割合で継代を行った。2継代目の培養細胞はほぼ3日後にはコンフルエントの状態になるため、術後13日目、延長が終了した時点で、2回継代された15のシャーレの細胞が準備できたことになった(図6)。

3) 培養細胞の移植

実験に供した家兔を培養細胞移植を行う細胞移植群16羽と、骨延長のみを行うコントロール群16羽の2群に分けた。術後死亡したものや、ピン刺入部の感染を生じたものは除外し、同数を補充した。細胞移植群では、15のシャーレの細胞を継代培養の時と同様のトリプシン処理を行ってすべて採取し(約 5×10^7 個の細胞数)、これに同量のウシ血清を添加し、トリプシンを不活化した。これを1200回転、5分間遠心分離した後、ウシ血清の影響をなくすためにさらに培養細胞をタイロード液にてビベッティングして洗浄した。これをもう一度1200回転、5分間遠心分離し、上清液を吸引後、1mlのHam's F-12培地を加え、一塊となった細胞を攪拌した。最後にこれを1mlシリンジに移した後、22-Gの注射針を用いて骨延長が終了した部位に注射した(図7)。この際、まずあらかじめ針に湾曲をつけておき、下腿前面の骨欠損部の中央から皮膚面に垂直に針を刺入する。脛骨周囲の軟部組織、筋肉を貫いた時点で針先を上に向けて進め、脛骨端に当たったら針を引きながら局注を行い、中央部まで来たら今度は針先を下に向け同様に脛骨端から針を引きながら局注を行うようにした。

コントロール群では移植群と条件を揃えるため、骨膜採取を同様に行ったが、

採取した骨膜は破棄した。またコントロール群では 1ml の Ham's F-12 培地の
みを同様の方法で骨欠損部に局注した。

実験のプロトコールは図 8 に示す。

3. 評価方法

1) 軟X線撮影

20 羽の家兎において（細胞移植群 10 羽、コントロール群 10 羽）骨延長終了
時より週に一度毎に 4 週まで軟X線撮影を行い骨新生を観察した。撮影は家兎
をネブタール静脈注射（20mg/kg）で全身麻酔した後、左側臥位として延長
器をフィルムより 1cm のところにフィルムと平行に固定し行った。撮影には
Softex CSM-2[®]（ソフテックス(株)）を使用し、フィルムには FR[®]（Fuji X-ray
film(株)）を用いた。条件は 40kvp、30mA で 30 秒の照射を行った。

2) 骨延長部における新生骨の定量的分析

骨間隙における新生骨の定量的分析のため free computer software system であ
る NIHImage1.55 を用いた^{27),28)}。まず 50mm マクロレンズを用い焦点距離 22.8cm
（使用したマクロレンズにおける最小焦点距離）に固定の上、Fujichrome film
を用い軟X線写真を撮影し、35mm スライドにマウントした。これを 35mm Film
Scanner LS-1000[®]（ニコン(株)）を用いて、Nikon Control Version 2.0[®]（ニコン(株)）
上に digitized gray scale image として取り込んだ。このファイルを NIH image に
取り込み、まず白黒を反転した後、ファイル間での条件の差が生じないように、
延長器の一部を指標にしてキャリブレーションを行った。次にまず骨端部を含

めた大きめの範囲の計測を行い、ここから本来の脛骨部分を差し引き、純粋な骨延長部位である骨切り断端間における新生骨の定量を行った。NIH image では各々のポイントでの濃度がピクセルとして表わされるため、骨間隙のトータルの値を積分値として知ることができる。

例として培養細胞移植後1週目の状態(図 11 b.に示す)の NIH image を用いた測定を示す(図 9, 図 10)。図 9 はキャリブレーションを行った後の画像ファイルであるが、まず測定範囲を決定する(実線に囲まれた部分)。図 10 はこの決定した範囲の surface plots を示しており、脛骨の長軸は左上方から右下方に沿っている。各々のポイントにおける骨塩量が山の高さとして表示されている。この図から上方の \longleftrightarrow の部分は本来の脛骨であることが明らかなためこの部分を除外する。下方も同様に本来の脛骨部分を除外する。この操作により純粋な骨延長部における新生骨を定量することができる。

3) 組織学的検索 (H.E.染色及び Azan-Mallory 染色)

組織学的検索のため延長終了後より1日、3日、1週間、以後1週毎に4週目まで、細胞移植群と、コントロール群より1羽づつ(合計6羽づつ)を屠殺した。屠殺後まず、下腿皮膚を剥離し、70%エタノールで固定した。この際できるだけ組織の収縮を抑えるため24時間は延長器をつけたままで固定した。固定後10日間EDTAにて脱灰し、これをパラフィン包埋した。サンプルは延長器固定用のピンを刺入した場所を結ぶように縦に切りH.E.染色及びAzan-Mallory染色を行った。

4) 免疫組織学的検索 (BrdU 染色)

移植細胞の同定のため BrdU 染色を用いた。BrdU は核酸合成を行っている細胞の検出のため用いられ、本来 cell kinetics の情報を得るために開発されたものである^{29),30)}。ここでは培養細胞をラベルすることにより、培養細胞が移植後に生存していること、およびその局在を調べるために用いた。

まず移植の1日前に最終濃度が $50\mu\text{M}$ となる様に培地に BrdU を加えた。細胞移植後 1、3、7 日後に屠殺後、70%エタノールで固定した。EDTA を用いて 10 日間脱灰し、パラフィン包埋後に $3\mu\text{m}$ の厚さで切片を作った。次にキシレンで脱パラフィン後に、Vectastain ABC Kit[®] (Vector Laboratories, Burlingame, USA)を用いて Avidin Biotin peroxidase complex 法により染色した³¹⁾。この方法により茶褐色の核を持つ細胞は移植された培養細胞であることが確認できた。

III. 結果

1. 軟 X 線撮影像

細胞移植群、コントロール群共に延長終了時点においては、骨間隙に骨新生はほとんど見られない。延長終了後 1 週間目では、コントロールにおいて骨端部においてわずかに骨新生が見られるのみである。しかし細胞移植したものでは延長終了後 1 週間目で骨端より欠損部に向かって早くも骨新生が見られる。また骨切り術を行う際にピン刺入のため脛骨周囲を剥離したが、局注した細胞がこの脛骨と周囲の筋肉の間隙にもれるためか、脛骨の周囲での骨化による横径肥大がみられる。コントロールにおいては延長終了後 2 週目以降には延長部

における骨新生領域の増大は見られない。また脛骨自体の横径肥大も見られない。細胞移植したものでは、2週目以降も骨間隙の骨新生領域は増大しており、4週目ではほぼ脛骨上端よりの骨化と下端よりの骨化が接触する直前の状態にまでなっている（図 11.12.）。

2. 延長部における新生骨の定量的分析

NIH image により求めた骨間隙における新生骨量を、細胞移植群と、コントロール群と比較した（図 13）。この測定では新生骨量はピクセル数として表わされる。この値を元に Student t 検定を行ったところ、移植後 1 週間目より 4 週目まですべての週にわたって両者の間には統計学的な有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

3. 組織像

1) 細胞移植群

a. 移植後 1 日目

H.E.染色、Azan-Mallory 染色にて脛骨端部よりの骨新生はまだ見られない（図 14 a, b）。骨欠損部中央ではエオジン好性の円形の核を持った細胞が集塊をなしており、BrdU 陽性であることよりこれらが移植細胞であることが確認できる。また、BrdU 染色にて骨端間だけでなく、脛骨と筋組織の間にも移植細胞が存在するのがわかる。

b. 移植後 3 日目

Azan-Mallory 染色にて細胞集塊の周辺部より骨化が始まっているのが見られ

る (図 15)。強拡大像では、集塊中央部の移植細胞の核は円形であるが、周辺部に近づくに従って扁平となり膠原線維のなかに埋もれるように存在しているのがわかる。そのすぐ周囲には骨化がみられる。同部位の BrdU 染色では中心部では円形である核が、膠原繊維が集積した集塊の周辺部では核が扁平となっていくのがみられる。組織上、骨組織へと移行していく境界では BrdU 陽性細胞はわずかながら見られるものの、完全に骨化した組織のなかでは BrdU 陽性細胞は検出できない。

c. 移植後 1 週間目

細胞移植群では細胞集塊が小さくなっており、脛骨骨端部と細胞集塊を介するように骨化が見られる (図 16)。

d. 移植後 2 週間目

移植した細胞はかなりばらばらになってきて集塊がはっきりしなくなっている (図 17)。残った集塊の中央部においてもエオジン好性の移植細胞と共に、蜂巣状に骨化が見られる。

e. 移植後 4 週間目

移植した培養細胞は判然としない。上下の脛骨骨端よりの新生骨が中央で接近する組織像が見られる (図 18)。

2) コントロール群

図 19 はコントロール群における延長終了後 2 週間目の組織像である。骨欠損部において膠原繊維の存在は見られるものの細胞成分に乏しく骨新生もあま

り見られない。強拡大で膠原繊維が骨延長の方向に規則正しく配列しているのがわかる。

IV. 考察

1. 本実験の背景について

腫瘍摘出後や、外傷後の大きな骨欠損に対する治療にはあらゆる手段が考えられ、また実践されてきたにもかかわらず、今だに整形外科、形成外科を含めた再建外科医にとって大きな課題の一つである。血管柄付き骨移植術は、移植骨の中に存在する osteogenic cells を生存させたまま移植することができるため、現在用いられている方法のなかでは比較的確実な再建方法といえる³⁵⁾。しかし、移植床に吻合が可能な血管が必要なことや採骨部の合併症など問題点も多い³⁹⁾。また近年、allogeneic bone の移植やハイドロキシアパタイトなどの biomaterial を用いた再建の研究も行われているが、感染の可能性や、骨誘導に問題点があり、長幹骨のような力学的負荷がかかるような部位での実用化にはさらに研究を重ねる必要がある^{34),35),36)}。特に顎顔面領域のような力学的負荷が余りかからない部位においては、ハイドロキシアパタイトがしばしば用いられているが、これも常に感染と隣り合せであることは否めない^{37),38)}。

最近このような骨欠損に対して仮骨延長法を利用する方法が行われつつある^{11),12),13),14),39)}。またさらに仮骨延長法を応用した segmental bone displacement を行い骨欠損部を再建する報告も見られる⁴⁰⁾。これらの方法は手術自体は比較的安全、かつ侵襲の少ないものではあるが、放射線療法、化学療法、外傷などに伴

う骨や周囲組織に対する損傷が強い場合に、骨新生が遅れ、延長が失敗に終わることもまれではない^{15),16)}。また、頭蓋、顎、顔面領域でも骨延長の臨床応用が行われ始めているが、本来膜性骨由来であるためか骨新生は長幹骨に比較して遅く、延長に時間がかかったり、骨移植を追加することもある^{41),42)}。骨延長の際に骨新生に大きくかかわっているのは骨膜、ひいては骨膜に存在している骨形成能を持った細胞の存在であるとされている¹⁷⁾。このため骨形成能を持った細胞が量的に少ないことが骨延長部における骨新生不良の原因の一つと考えられる。

一方、培養細胞を利用して新しい組織形成を行う Tissue Engineering の技術を応用し、骨形成を行う研究もなされている^{43),44),45),46)}。現在最も実現性が高いと評価されている Vacanti らのグループでは、生体内で吸収されるポリグリコール酸で作られた scaffold に培養した牛、肩甲骨骨膜由来の細胞を組み込み、生体内（ヌードマウス皮下）に戻したところ骨組織の形成が見られたことを報告している⁴⁶⁾。しかしこの研究はヌードマウスでしか成功しておらず、ウサギなどを用いた自家移植のモデルでおこなった場合は骨新生は良好ではなかったとのことであった（personal communication）。この原因は自家移植のモデルでは、ポリグリコール酸に対する炎症のために、培養細胞が分化することができなかったからだと考えられる。このように Tissue Engineering において問題となっているのは培養細胞をどのような素材で造られた鋳型（scaffold）に組み込めば viability と分化能を損なわずに移植することができるかという点である。そこでわれわれはこの Tissue Engineering の技術と骨延長の技術を組み合わせれば、

このような鋳型を使わず局所注射のみで細胞移植をすることが可能であり、骨欠損を修復する可能性がさらに広がるのではないかと考えこの実験をおこなった。

2. 実験モデルについて

Kojimoto らは、家兎脛骨を用いた骨延長の基礎的実験において、骨膜を除去し、一日 0.5mm のスピードで延長したものでは、延長後 1 週目においてほとんど骨新生を見なかったと報告している¹⁷⁾。今回の実験でも脛骨骨膜を全周性に除去することにより、骨形成不良の骨延長モデルを作成し、これをコントロールとした。しかしこのコントロール群においても、延長されたギャップに全く骨新生が見られないわけではなく、細い柱状の骨髄由来の骨形成能を持った細胞より生じたと考えられる骨新生が見られた(図 12 a-d)。このことは骨膜除去により骨形成能を持った細胞が不足しているため骨新生は不良であるものの、この間隙には骨形成能を持った細胞の分化を促す機械的、化学的因子は存在していることを示していると考えられる。予備実験において、われわれは延長によって作製した間隙ではなく、手術的に脛骨骨幹部を摘出することにより作製した骨欠損に培養細胞を移植してみたが、ほとんど骨形成を誘導ことはできなかった。これはこの骨欠損部が手術後、血腫によって埋められ、そこに移植された培養細胞は viability を保つことができなかったためと考えられる。また別の予備実験において、骨延長が終了して一カ月後に培養細胞を移植したモデルを作製したが新しい骨形成をほとんど見ることはできなかった。これは骨切り手術、骨延長といった侵襲によって放出された種々の骨形成を促すサイトカイ

ン⁴⁷⁾が一月後の時点ではあまり放出されていないためではないかと考えられる。

結果的に今回著者がコントロールとして設けた骨欠損部は臨床的にも骨延長手術の際にしばしば見られる、骨形成不良の状況とほぼ一致していると思われる。

3. 移植細胞およびその培養について

骨形成能を持つ細胞は骨膜、及び骨組織内に存在しているが、このうち骨膜に存在している細胞はより未分化な osteogenic cell と考えられている²⁵⁾。この実験では骨膜由来の細胞を用いたが、これは生体外において培養を行う際、より未分化な細胞のほうが増殖能力が活発であり、また通常の骨延長の際に大きく関わっているのは骨膜とされているためである¹⁷⁾。骨膜由来細胞は、分離、培養後もその骨形成能力を保持していると報告されている²⁵⁾。Nakahara らは生後 1 週目のチキンの脛骨骨膜より細胞を分離、培養した後、ヌードマウスの背部皮下に局注したところ骨組織の形成を見たことを報告した²⁶⁾。しかし、われわれの追試試験では培養した家兎脛骨骨膜由来細胞を、皮下や筋肉内に注射して自家移植を行ったものでは骨形成を見ることはできなかった。

一方、Goshima らは家兎脛骨骨髓由来の細胞、或いはその培養細胞の cell suspension を皮下に移植して、自家移植を行ったところ骨形成を見なかったが、アパタイトの中に移植された培養細胞からは骨組織が生じたと報告している⁴⁸⁾。これらの骨新生が行われなかった原因は、正常の皮下や筋肉内に培養細胞を受け入れる足場となるような組織がないことや、培養細胞を分化させる物理的、

化学的因子がなかったためと考えられる。ヌードマウスを用いて行った実験で骨形成を見ることができたのは、前述した Vacanti らの Tissue Engineering の実験でも同様であるが、免疫学的な反応の違いなどが理由としてあげられる。

本実験でわれわれは培養液として標準的な Ham's F 12 のみを用い、分化誘導因子とされるアスコルビン酸や、グリセロリン酸を加えなかった²⁵⁾。これは、培養を行う際に細胞が分化せずに、増殖のみを行わせるためである。一旦分化し始めた培養細胞は増殖能力をほとんど失うとされており、このためわれわれは培養中にできるだけ分化をおこなわず、増殖のみを行うような培養方法を選択した²⁶⁾。その結果、増殖後生体内に戻した後に、培養細胞は骨間隙で分化因子に曝露され、骨形成を促進することができたと考えられる。

培養細胞の形態は培養中、全過程を通じて fibroblast 様の紡錘形をしており、偏光顕微鏡下で観察するかぎりは単一の細胞の集族に見える。しかし骨膜より分離される細胞が単一の種類の細胞とは考えにくく、また培養された細胞がすべて同じ character を持った同種の細胞かどうかは今回の家兎を用いた実験では判然としない。今後、骨膜に含まれている細胞の characterization に関する vitro での研究を行う必要がある。尚、培養細胞の増殖能力は非常に活発で、 $5 \times 20 \text{ mm}$ の大きさの骨膜より分離した細胞は2週間で約 5×10^7 個の細胞数となった。

Nakahara らはチキンより採取した骨膜由来細胞をアパタイトの中に封入し、ヌードマウスに移植する実験の中で、3 継代目までは確実に分化能力を持っており、 $5 \times 10^7 \text{ cell/ml}$ の高濃度で播種したものが一番骨形成が良好であったと

報告している¹⁰⁾。このため今回の実験でも培養は2回の継代を行い、約 5×10^7 個の細胞数に増殖させ、1mlの培養液に懸濁して移植した。

4. X線及び組織学的検索結果について

骨延長終了時のX線写真上、培養細胞移植群、コントロール群共に脛骨周囲に骨膜反応様の脛骨の横径肥大となるような新生骨は見られない。これは骨膜を除去していることもあり当然といえる。しかし、培養細胞移植群では1週目以降のX線写真で骨膜反応のような新生骨が脛骨周囲に確認される。組織学的にはBrdUで染色された細胞が脛骨と周囲組織の間に存在することが確認されるため(図14 a, b)、この脛骨周囲に見られる骨化は培養細胞が誘導したものであると考えられる(図11 b)。

培養細胞移植後3日目の組織切片上、移植された培養細胞は集塊の中心部では大きな円形の核を持つ細胞であるが、周辺にいくに従ってAzan-Mallory染色で青染する膠原線維の中に埋もれていくように扁平となっている像が見られた。そしてその密になった膠原線維の周囲において骨化が始まっているのが観察された(図15)。移植細胞の集塊と骨組織の間の膠原線維が密になっている部分ではBrdU染色に陽性の細胞が見られたが、完全に骨化した組織の中ではBrdU陽性の細胞は見られなかった。このため、新生骨組織中のosteoblast様細胞が培養細胞由来であるのかどうかは今回の実験では判明しなかった。コントロールの骨延長部位には細胞成分そのものに乏しくosteoblast様細胞もほとんど全く存在しないため、骨組織中のosteoblast様細胞が培養細胞由来でないとしても、培養細胞がosteoblast様細胞を誘導し、ひいては骨新生を誘導しているこ

とは間違いないと思われる。

また、この膠原線維が密になった層と骨組織の間には軟骨細胞、軟骨組織の介在は認められなかった。骨膜由来の培養細胞は軟骨細胞、骨芽細胞の両方に分化する potential を持っているとしており、Nakahara らは培養細胞の移植実験では内軟骨性骨化を示したと報告している²⁸⁾。一方骨延長の骨新生に関しては、内軟骨性骨化を示したとの報告と²⁹⁾、膜性骨化が主体であったとする報告があり³¹⁾、骨化様式は種々の条件に左右されるようである。骨延長部位における osteoblast 様細胞はどこ由来のものなのか、どのような経緯をたどって骨化を示すのかといった骨化のメカニズムに関する研究は今後の課題として残される。

5. 新生骨の定量分析について

骨塩量の定量については臨床的には dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) がしばしば用いられるが、ここでは画像解析ソフトである NIH image を用いて新生骨の定量を行った。方法としては、ゲル電気泳動のバンドパターンを数値化する方法を応用した。この NIH image を用いて、指定した領域のレントゲン透過量を数値化することができる。この過程において唯一人為的操作が入るのは脛骨骨切り部と骨欠損部の境目を決定する点である。しかしこの点においても本実験モデルでは図 10 に見られるような surface plots から境目の座標点を知ることが明らかなため実験結果を損なうものではないと考えられる。また NIH image によって得られるパラメーターはピクセルであるため真の骨塩量を示しているわけではない。しかしこの実験で必要なのはコントロールとの差を知る

ことであり、この点においてもこの NIH image による定量分析は DXA などによるものではないと考えられる。

6. 今後の展開について

本実験では移植した培養細胞によって骨新生が誘導されるかどうかを X 線上明らかにするため、培養細胞の移植を一回のみ、骨延長が終了した時点で行った。結果的に骨切り部の遠位端と近位端の骨癒合を見るには至らなかったが、今後は一回に移植する培養細胞数を増やす、又は移植する回数を増やすなどの処置を行い、さらに骨新生を促す条件を検索していきたい。また、骨癒合を見るには至らなかった原因として、培養細胞を移植する前に、骨欠損部には既に瘢痕組織が形成されているためとも考えられる。この意味では骨膜由来培養細胞の移植の時期も重要な要素といえる。おそらく移植に最も適した時期は骨切り手術が終って延長を開始するまでの時点ではないかと思われる。これは骨切りの手術を行った時が骨への分化を促すサイトカインなどが放出され始める時期であり⁴⁷⁾、また骨延長部の骨新生を阻害する瘢痕組織がまだ生じていない時期でもあるためである。しかし実際の臨床応用を考えた場合、延長部の骨新生が遅れている様な症例に対して培養細胞の移植が有効と考えられる。このため、本実験ではある程度骨間隙が存在している状態での移植実験を行うべきと考え、細胞移植を骨延長が終了した時点で行った。

V. 結語

傷害を受けた、あるいは機能的に欠損の見られる組織に対する新しい修復方法として培養細胞を利用した組織形成、即ち Tissue Engineering の研究が進めら

れている。著者も骨形成の不良な骨延長部において培養細胞を利用して骨新生を促進させることができないかと考え本実験を行った。骨形成の不良な骨延長部のモデルとしては白色家兎脛骨における骨延長手術の際に、骨膜除去を行いさらに速いスピードで延長を行うことにより実験モデルを作製した。そして、培養増殖された骨膜由来の細胞は骨形成能を持つことが知られているが、これを骨延長で作製した骨間隙に移植することにより以下の結果を得た。

1. 本実験モデルにおいて、コントロール群、及び培養細胞移植群共に骨延長を終了した時点ではX線上、骨延長した間隙にほとんど骨新生は見られなかった。
2. 培養細胞移植群ではX線上、延長終了後（培養細胞移植後）1週目より骨延長した間隙に骨新生が見られ始め、その後その量は増大して行く像が見られた。しかし延長終了後4週間経過した時点でも脛骨の癒合は見られなかった。
3. コントロール群では延長終了後4週経過しても、骨延長した間隙にほとんど骨新生は見られなかった。
4. 骨延長した間隙における骨新生量をX線写真をもとに NIHImage を用いて定量したところ、コントロール群と培養細胞移植群との間に有意差（Student t 検定、 $p < 0.01$ ）が見られた。
5. 骨延長した間隙を組織学的に検索したところ、培養細胞移植群では骨間隙において培養細胞が生存し、経過を追うことにより骨新生が生じている像

がH.E.染色、Azan-Mallory 染色で見られた。

6. コントロール群では、組織学的検索において骨延長した間隙が細胞成分に乏しく膠原線維が延長方向に配列している像が見られた。
7. BrdU 染色法を用いて移植した骨膜由来の培養細胞の生存、及び局在を明らかにした。
8. その結果培養細胞は骨組織周辺の膠原線維中には存在することが確認されたが、骨組織中には BrdU 陽性細胞は見られなかった。

以上のように本実験では、骨膜由来の培養細胞を骨新生の不良な骨延長部位に移植することにより骨新生を促進することが可能であった。近年、あらゆる培養細胞を治療に利用することが考えられているが、本実験は Tissue Engineering の手法を臨床応用していく上で、一つの方向を示したと考える。

参考文献

- 1) Harii K: Microvascular tissue transfer (Fundamental techniques and clinical applications). Tokyo: Igaku-shoin, 1983.
- 2) Makuuchi M, Kawasaki S, Noguchi T, Hashikura Y, Matunami H, Hayashi K, Harada H, Kakazu T, Takayama T, Kawarasaki H: Donor hepatectomy for living related partial liver transplantation. *Surgery* 113:395-402, 1993.
- 3) Weiland AJ: Current concepts review: vascularized free bone transplants. *Journal of Bone & Joint Surgery (American)* 63: 166-169, 1981.
- 4) Wight C, Cohen B: Organ shortages: maximising the donor potential. *British Medical Bulletin* 53: 817-828, 1997.
- 5) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 260: 920-6, 1993.
- 6) Langer R, Vacanti JP: Artificial organs. *Scientific American* 273: 130-3, 1995.
- 7) Lanza RP, Borland KM, Staruk JE, Appel MC, Solomon BA, Chick WL: Transplantation of encapsulated canine islets into spontaneously diabetic BB/Wor rats without immunosuppression. *Endocrinology* 131: 637-642, 1992.

- 8) Gallico GD, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H: Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *New England Journal of Medicine* 311: 448-451, 1984.
- 9) 組織培養の技術 (第二版) 日本組織培養学会, 編. 東京: 125-171, 1988.
- 10) Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 269: 274-283, 1991.
- 11) Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 238: 249-281, 1989.
- 12) Ilizarov GA: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 239: 263-285, 1989.
- 13) De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi BL, Trivella G: Limb lengthening by callus distraction (callotaxis). *Journal of Pediatric Orthopedics* 7: 129-134, 1987.
- 14) Nakamura K, Ooi Y: Modification of the Wagner lengthener to permit dynamic axial loading. *Archives of Orthopaedic & Trauma Surgery* 110:49-50. 1990.

- 15) Dahl MT, Gulli B, Berg T, Velazquez RJ, Bell DF, Armstrong PF, Babyn P, Tibshirani R: Complications of limb lengthening. A learning curve. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 301:10-18, 1994.
- 16) Velazquez RJ, Bell DF, Armstrong PF, Babyn P, Tibshirani R, Dahl MT, Gulli B, Berg T, Chadha DJ, Malde HM, Gantous A, Phillips JH, Catton P, Holmberg D, Ruszkowski K, Hemmadi SS, Parihar ML, Bhosale PB, Kedar RP, Korzinek K, Barbarossa V, Vazquez Rueda F, Blanco Lopez F, Ayala Montoro J, Gutierrez Canto M, Valdivieso Garcia JL, Ocana Losa JM, Tjernstrom B, Olerud S, Karlstrom G: Complications of use of the Ilizarov technique in the correction of limb deformities in children. *Journal of Bone & Joint Surgery (American)* 75:1148-1156, 1993.
- 17) Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y: Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *Journal of Bone & Joint Surgery (British)* 70: 543-549, 1988.
- 18) Ritsila V, Alhopuro S, Rintala A: Bone formation with free periosteum. An experimental study. *Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery* 6: 51-56, 1972.
- 19) Uddstromer L, Ritsila V: Osteogenic capacity of periosteal grafts. A qualitative and quantitative study of membranous and tubular bone periosteum

- in young rabbits. *Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery* 12: 207-214, 1978.
- 20) Uddstromer L: The osteogenic capacity of tubular and membranous bone periosteum. A qualitative and quantitative experimental study in growing rabbits. *Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery* 12: 195-205, 1978.
- 21) Uddstromer L, Ritsila V: Healing of membranous and long bone defects. An experimental study in growing rabbits. *Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery* 13: 281-287, 1979.
- 22) van den Wildenberg FA, Goris RJ: Free revascularised periosteum transplantation: an experimental study. *British Journal of Plastic Surgery* 37: 226-235, 1984.
- 23) Uchida A, Kikuchi T, Shimomura Y: Osteogenic capacity of cultured human periosteal cells. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 59: 29-33, 1988.
- 24) Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, Caplan AI: Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11: 181-188, 1990.
- 25) Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI:

- In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Experimental Cell Research* 195: 492-503, 1991.
- 26) Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI: In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 259: 223-232, 1990.
- 27) Gatlin CL, Schaberg ES, Jordan WH, Kuyatt BL, Smith WC: Point counting on the Macintosh. A semiautomated image analysis technique. *Analytical & Quantitative Cytology & Histology* 15: 345-350, 1993.
- 28) Black VH, Rosen S: COSAS 2.0--a Macintosh-based stereological analysis system. *Journal of Structural Biology* 116: 176-80, 1996.
- 29) Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW: Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell & Tissue Kinetics* 17: 427-436, 1984.
- 30) Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 5573-5577, 1983.
- 31) Hsu SM, Raine L, Fanger H: A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying

polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. American Journal of Clinical Pathology 75: 734-738, 1981.

- 32) Taylor GI, Miller GD, Ham FJ: The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. Plastic & Reconstructive Surgery 55: 533-544, 1975.
- 33) Nakatsuka T, Harii K, Yamada A, Ueda K, Ebihara S, Takato T: Surgical treatment of mandibular osteoradionecrosis: versatility of the scapular osteocutaneous flap. Scandinavian Journal of Plastic & Reconstructive Surgery & Hand Surgery 30:291-298, 1996.
- 34) Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Bos GD, Heiple KG: Bone grafting: role of histocompatibility in transplantation. Journal of Orthopaedic Research 3: 389-404, 1985.
- 35) Mankin HJ, Doppelt S, Tomford W: Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. Clinical Orthopaedics & Related Research 174: 69-86, 1983.
- 36) Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A: A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. Clinical Orthopaedics & Related Research 188:252-262, 1984.

- 37) Salyer KE, Hall CD: Porous hydroxyapatite as an onlay bone-graft substitute for maxillofacial surgery. *Plastic & Reconstructive Surgery* 84: 236-244, 1989.
- 38) Satoh K, Nakatsuka K: Simplified procedure for aesthetic improvement of facial contour by maxillary augmentation using a porous hydroxyapatite graft for maxillofacial deformity. *Plastic & Reconstructive Surgery* 97: 338-344, 1996.
- 39) Ilizarov GA: Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 250: 8-26, 1990.
- 40) Tsuchiya H, Tomita K, Shinokawa Y, Minematsu K, Katsuo S, Taki J: The Ilizarov method in the management of giant-cell tumours of the proximal tibia. *Journal of Bone & Joint Surgery (British)* 78: 264-269, 1996.
- 41) Sugawara Y, Hirabayashi S, Sakurai A, Harii K: Gradual cranial vault expansion for the treatment of craniofacial synostosis: a preliminary report. *Annals of Plastic Surgery* 40: 554-565, 1998.
- 42) Takato T, Harii K, Hirabayashi S, Komuro Y, Yonehara Y, Susami T: Mandibular lengthening by gradual distraction: analysis using accurate skull replicas. *British Journal of Plastic Surgery* 46: 686-693, 1993.

- 43) Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B Vacanti CA: Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* 25: 223-228, 1996.
- 44) Crane GM, Ishaug SL, Mikos AG: Bone tissue engineering. *Nature Medicine* 1: 1322-1324, 1995.
- 45) Reddi AH: Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. *Journal of Cellular Biochemistry* 56: 192-195, 1994.
- 46) Vacanti CA, Vacanti JP: Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolaryngologic Clinics of North America* 27: 263-276, 1994.
- 47) Mundy GR: Inflammatory mediators and the destruction of bone. *Journal of Periodontal Research* 26: 213-7, 1991.
- 48) Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 262: 298-311, 1991.
- 49) Nakahara H, Goldberg VM, Caplan AI: Culture-expanded periosteal-derived

cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 276: 291-298, 1992.

- 50) 廣島和夫: 脚延長の基礎. 日本整形外科学会雑誌 63: 593-605, 1989.
- 51) Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 250: 422-434, 1990.

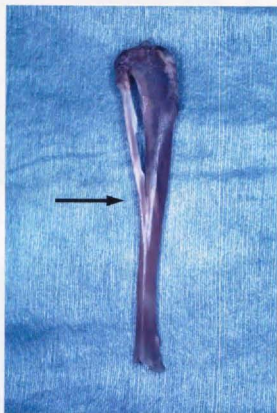


図 1. 家兎下腿中央において腓骨は脛骨に癒合しており（矢印）、この部位は tibio-fibular junction と呼ばれる。

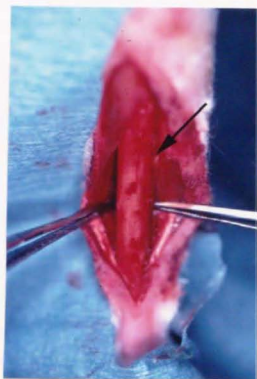


図 2. 脛骨（矢印）周囲組織を全周性に剥離したところを示す。

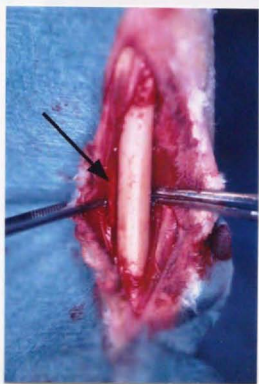


図 3. 骨切り予定部である tibio-fibular junction 直下（矢印）を中心に上下 1cm ずつ骨膜を全周性に剥離除去した。



図 4. 脛骨を電動ドリルで横断骨切り（矢印）した後、創外固定器 Orthofix M-100® を用いて脛骨を固定した。

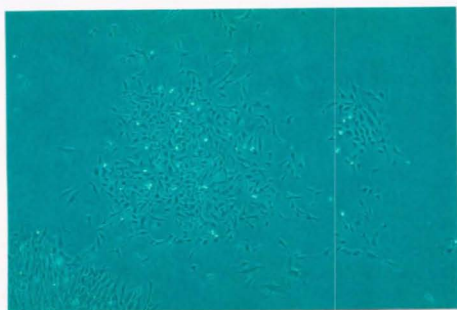


図 5. 培養開始後3日目の状態。Fibroblast 様の細胞がコロニーを形成し、増殖している。



図 6. 移植直前の骨膜由来の培養細胞。敷石状に密に増殖している。

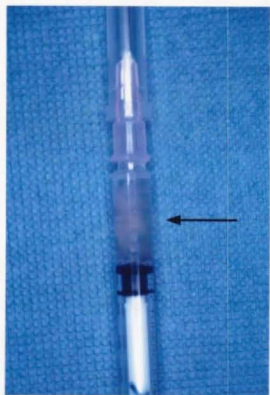


図 7. シリンジ内の培養細胞を示す。

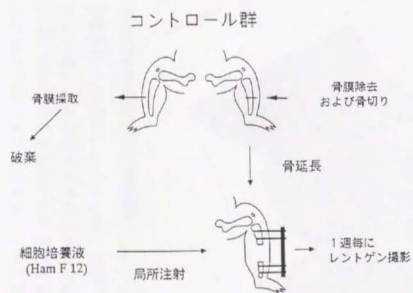


図 8 b.

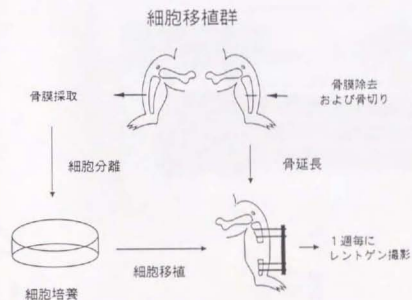


図 8 a.

図 8a,b. 実験のプロトコールを示す。

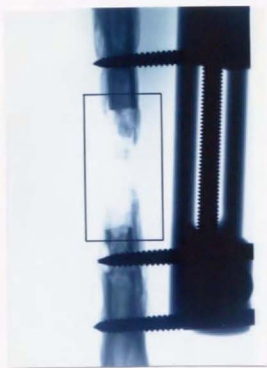


図 9. 測定を行う前の画像ファイル。骨切りを行った脛骨端を含んで（実線で囲んだ部分）定量を行った。

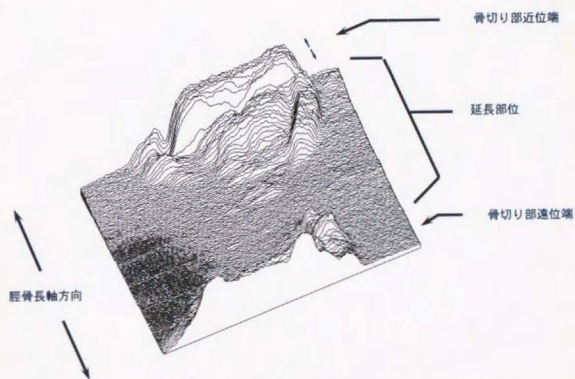
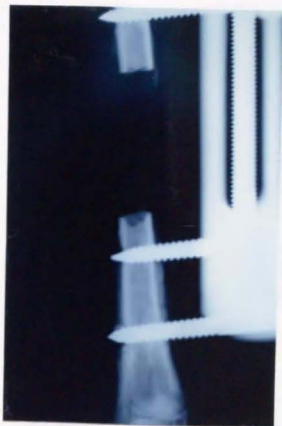


図 10. 定量を行った部分の surface plots。脛骨の長軸は左上方から右下方に向かっている。各々のポイントにおける骨塩量が山の高さとして表示されている。この図から上方の \longleftrightarrow の部分は本来の脛骨であることがあきらかなためこの部分をカットする。下方も同様に本来の脛骨部分をカットする。残った部分が純粋な骨延長部における骨塩量になる。



a. 延長終了後、細胞移植前。



b. 細胞移植後、延長終了後1週目。

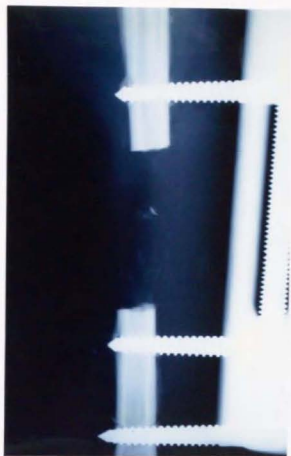


c. 細胞移植後、延長終了後2週目。

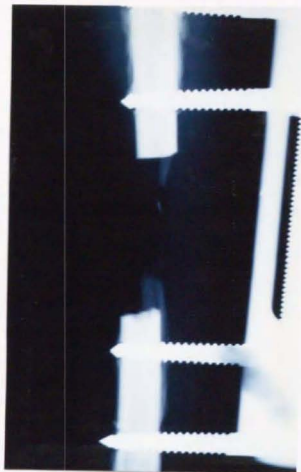


d. 細胞移植後、延長終了後4週目。

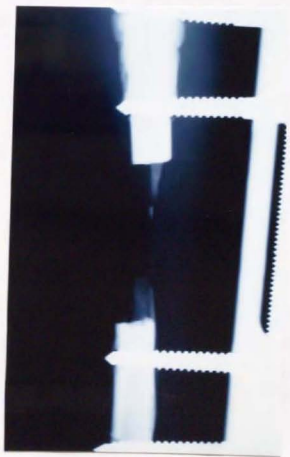
図 11. 培養細胞移植群におけるX線写真像を示す。



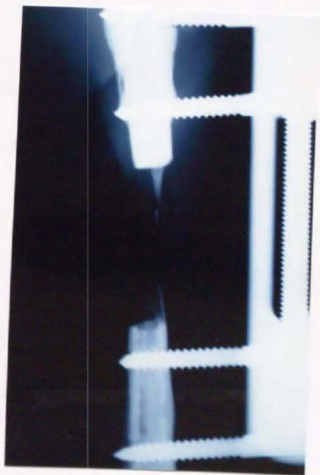
a. 延長終了後。



b. 延長終了後 1 週目。



c. 延長終了後 2 週目。



d. 延長終了後 4 週目。

図 12. コントロール群における X 線写真像を示す。

延長部における骨新生量

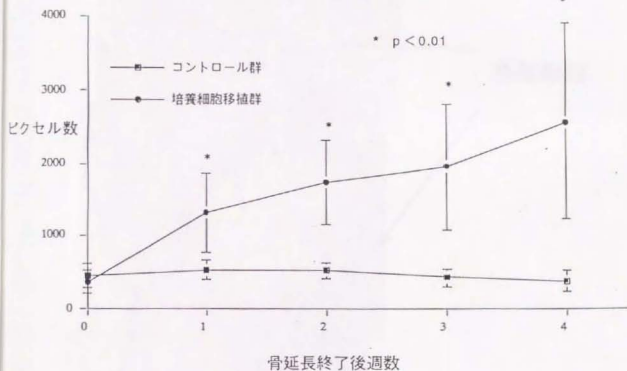


図 13. 細胞移植群とコントロール群の各週における新生骨量をグラフに示す。

新生骨量はピクセル数として表されている。移植後1週間目より4週目まですべての週にわたって両者の間には統計学的に有意の差が認められた (student t 検定)。



図 14 a. 細胞移植後1日目の組織像を示す。HE 染色により骨欠損部中央でエオジン好性の移植細胞が集塊を形成しているのがわかる。

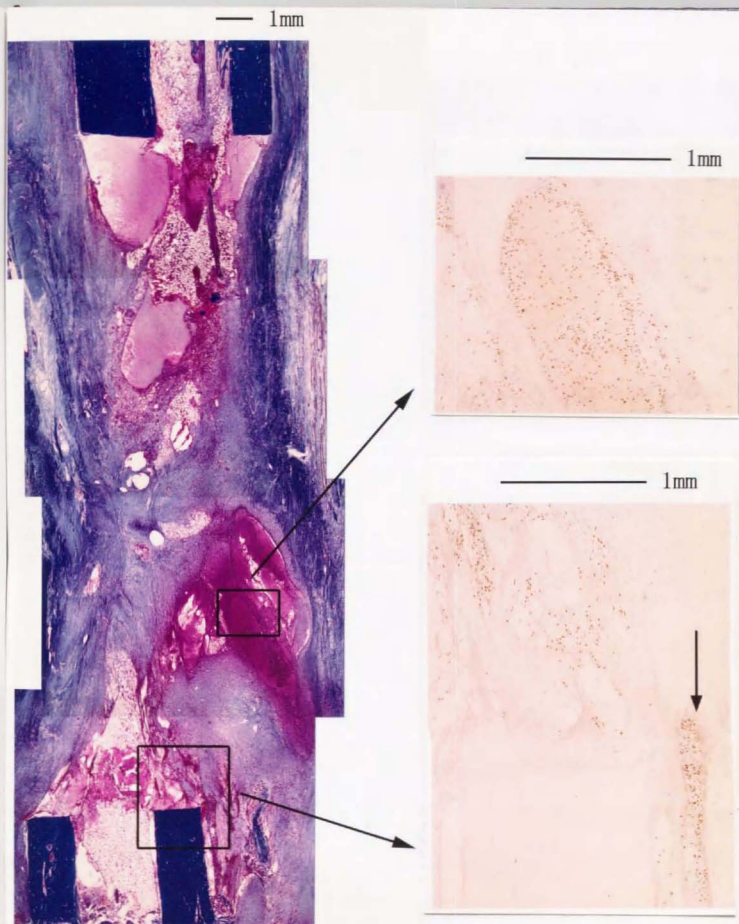


図 14 b. 同標本の Azan-Mallory 染色および BrdU 染色。脛骨骨切り部よりの骨新生はまだない。細胞集塊は BrdU 陽性であることよりこれらが移植細胞であることが確認できる。また脛骨と筋組織の間に移植細胞（矢印）が存在するのがわかる。



— : 移植細胞周囲の骨化

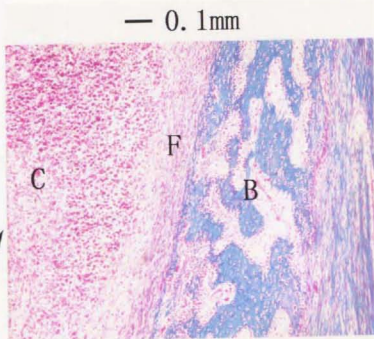


図 15. 移植後3日目の組織像を示す。Azan-Mallory 染色により細胞集塊の周辺部より骨化が始まっているのが見られる。強拡大像で、集塊中央部の移植細胞は核が円形であるが、周辺部に近づくに従って膠原線維のなかに埋もれるようにして扁平となっていくのがみられる。同部位の BrdU 染色では中心部では円形である核が、膠原繊維が集積した集塊の周辺部では核が扁平となっていくのがみられる。完全に骨化した組織のなかでは BrdU 陽性細胞は見られない。

C:培養細胞 F:扁平化した培養細胞 B:骨組織

— 1mm



図 16. 移植後1週間目の組織像を示す (Azan-Mallory 染色)。細胞移植群では細胞集塊が小さくなっており、脛骨骨端部と細胞集塊を連続させるように骨化が見られる

C:培養細胞 B:骨組織 T:脛骨骨端部

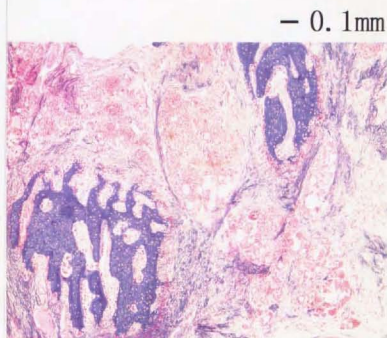


図 17. 移植後 2 週間目の組織像を示す (Azan-Mallory 染色)。集塊として存在していた移植細胞ははっきりしなくなっている。強拡大にて骨延長の中央部でエオジン好性の移植細胞と共に、蜂巢状に骨化が見られる。

T:脛骨骨端部

— 1mm

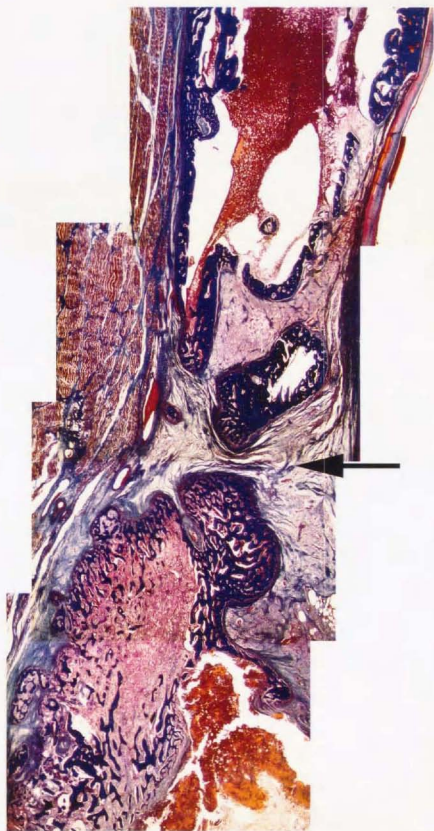


図 18 移植後 4 週間目の組織像を示す (Azan-Mallory 染色)。上下の脛骨骨端よりの新生骨が中央で接近する組織像が見られる

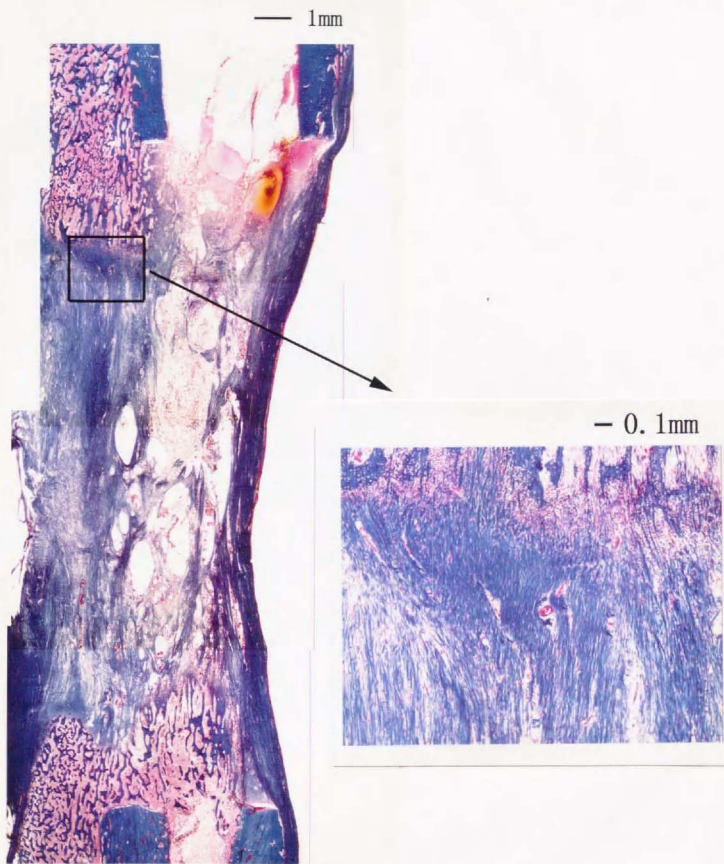


図 19 コントロール群における延長終了後2週間目の組織像を示す。骨欠損部において膠原繊維の存在は見られるものの細胞成分に乏しく骨新生もあまり見られない。強拡大で膠原繊維が骨延長の方向に規則正しく配列しているのがみられる。

