

# BMP を用いた臼蓋・大腿骨近位部巨大骨欠損の修復

## — 犬 THA revision モデル —

大阪市立大学大学院医学研究科整形外科学

星野 雅俊、並川 崇、加藤 相勲  
寺井 秀富、田口 晋、高岡 邦夫

### 抄 録

【目的】我々が開発した骨形成性人工骨ペースト(BMP/polymer/ $\beta$ -TCP複合体)の有用性を犬人工股関節周囲巨大骨欠損モデルで検討すること。

【方法】beagle 犬の、大腿骨近位部を内側 1/2、臼蓋内側を内板まで、臼蓋頭側を骨切除し、犬用人工股関節を設置した。その欠損部に、【A群】rhBMP-2/Polymer/ $\beta$ -TCP【B群】Polymer/ $\beta$ -TCP(各群N=5)を、大腿骨側、臼蓋側に充填した。術後4週毎にX線、CTを行い、12週に屠殺して股関節部を摘出し、肉眼的、X線学的、組織学的評価を行った。

【結果】A群では、大腿骨側、臼蓋側とも術後4週で淡い石灰化像が観察できた。8週でその陰影が増強し、12週の摘出標本では骨欠損部は完全に修復されていた。組織像ではBMP/polymer/TCPは完全に吸収され骨に置換されていた。B群では、骨欠損部に一部骨新生を認めたが、骨修復は得られなかった。CTによる新生骨面積評価では、経時的にBMP/polymer/TCP群で骨面積は増大し、polymer/TCP群に比して、4、8、12週で有意に高値を示した。

【考察】イヌ人工股関節周囲骨欠損モデルにおいて、BMP/polymer/ $\beta$ -TCP複合体は有用であった。この複合体の利点は1)骨誘導能を持つ、2)完全に骨と置換し生体内に残存しない、3)プリオン病などの感染の危険性がない、4)用手操作性に優れる、などである。

### 1. 緒 言

変形性股関節症に対する人工股関節全置換術は除痛効果や関節機能回復の点で手術成績は良好である。しかし、一般にその耐用年数は約15年-20年といわれ、人工股関節の緩みに対して再置換術が必要となり、その際、特に大きな骨欠損を伴うものの再建が問題となる(図1)<sup>1)2)</sup>。人工股関節周囲の巨大骨欠損に対する現在の再建には、人工骨や、同種骨、自家骨が移植されるが、その長期治療成績には疑問があり、未解決の点が少なくない<sup>3)5)</sup>。自家骨移植は骨伝導能、骨誘導能を有するなどの長所があるが、短

所として、採骨量の限界、採骨部痛の発生、神経損傷の危険性、美容上の問題などがあり、なかでも採骨量に限界があるということが人工関節再置換術で使用されない大きな理由である。同種骨、人工骨は量に限界はない。しかし、問題点として、同種骨は、骨誘導能に乏しい、供給のシステムが確立されていない、病原媒介の危険性がある、incorporationが遅いなどがある。また、人工骨は、骨誘導能が無く、大きな骨欠損に単独での使用には不向きである。人工股関節再置換術の理想的目標は、骨再生の活性化により人工関節周囲の骨形成を得ることであ

り、その技術が求められている。骨再生技術のうちの一つが Bone Morphogenetic Protein (BMP)を利用した方法、いわゆるサイトカインセラピーの一つである。BMPは現在、遺伝子組み換え技術によって合成供給され、欧米ではすでに脊椎固定や新鮮開放性骨折、骨折偽関節に臨床応用されている<sup>6)~9)</sup>。我々はBMPを用いて、人工股関節再置換術で遭遇する巨大骨欠損を再建できないかと考え、イヌモデルでその検討を行った。

## 2. 方法

### ・インプラント作成

rhBMP-2 溶液(Wyeth, Cambridge, MA) 100ugおよび $\beta$ -TCP (particle size <100  $\mu$ m)(Olympus Biomaterial Corp., Tokyo, Japan) 200mg. PLA-PEG ポリマー(Poly-D, L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymer, MW; 9100, PLA/PEG molar ratio; LNEO = 60/40)(Taki Chemical Co., Ltd., Kakogawa, Japan) 200mgを約50度で攪拌・混合し、粘土状にして、埋植するまで-30℃で保存する。controlは同様の手技で Polymer/ $\beta$ -TCPのみで作った材料とした。犬用人工股関節(Zimmer Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)は、白蓋側インプラントの外層と大腿骨側インプラントの近位部に、BMP/polymer/TCP複合体を塗布するために、チタン製のメッシュをつけた。

### ・手術手技

ビーグル犬(8ヶ月齢、雄、9-11kg)の右大腿骨近位部および寛骨白蓋に骨欠損(大腿骨:近位部1/2内側を2.5cmの長さで切除、白蓋:頭側を長さ15mm幅15mm深さ10mm切除、内側は内板を直径8mm切除)を作成した。犬用人工股関節を、大腿骨側は遠位部をセメント固定し、白蓋側にはスクリューで設置してから、骨欠損部にBMP/Polymer/ $\beta$ -TCP複合体および Polymer/ $\beta$ -TCP複合体を移植し、12週後に摘出した。(N=5)

### ・評価

4週毎にX線像およびCT像(GE Yokogawa, Tokyo, Japan)を撮影し、その経時の変化を観察した。また reconstruction software (Aze, Tokyo, Japan)を用いて再構築CT像を作成し、新生骨面積を計測した(Scion Image software, Scion Corp., Maryland, USA)。摘出標本は非脱灰硬組織切片(50 $\mu$ m)化したものを、Villanueva染色を行い比較した。統計検定にはStudent's t-testを用い、有意水準0.05とした。

## 3. 結果

### ・放射線学的評価

大腿骨側・白蓋側とも骨欠損部は同様の経過をたどった。X線上、BMP/Polymer/TCP群で、術後4週で骨欠損部に淡い石灰化像が観察でき、8週でその陰影が増強し、12週では完全に修復された(図1)。

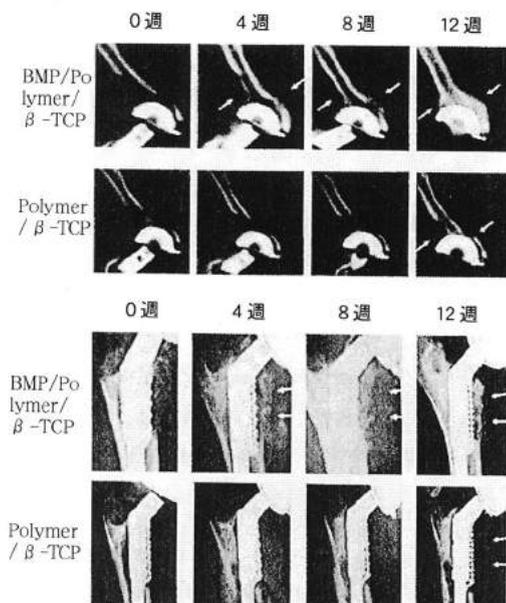
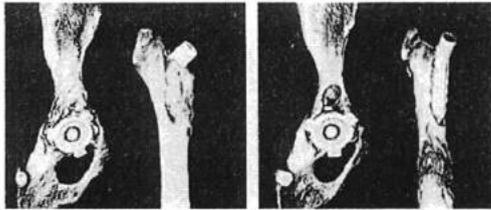


図1

Polymer/TCP群では、骨修復は得られなかった。3D-CT像においても、12週時点においてBMP/Polymer/TCP群で、白蓋側・大腿骨側とも完全に骨修復されていることが確認された。(図2)



BMP/ Polymer/Beta-TCP      Polymer/Beta-TCP

図2

・組織学的評価

非脱灰硬組織標本 Villanueva 染色では、BMP/Polymer/TCP群で豊富な骨新生が認められたが、Polymer/TCP群では線維組織のみであった(図3)。

BMP/Polymer/ β-TCP      Polymer/ β-TCP

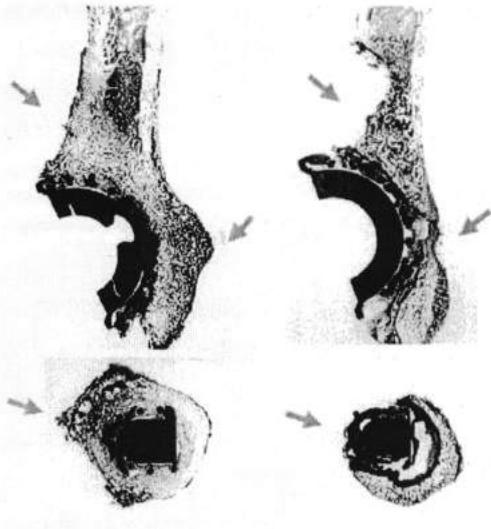


図3

人工関節表面には新生骨の進入が確認された。また、BMP/Polymer/TCP複合体は吸収

されて消失し、新生骨に置換されていた。

・新生骨面積評価

再構築CT像による新生骨面積評価では、経時的にBMP/polymer/TCP群で骨面積は増大し、polymer/TCP群に比して、4、8、12週で有意に高値を示した( $P < 0.05$ )。(図4)

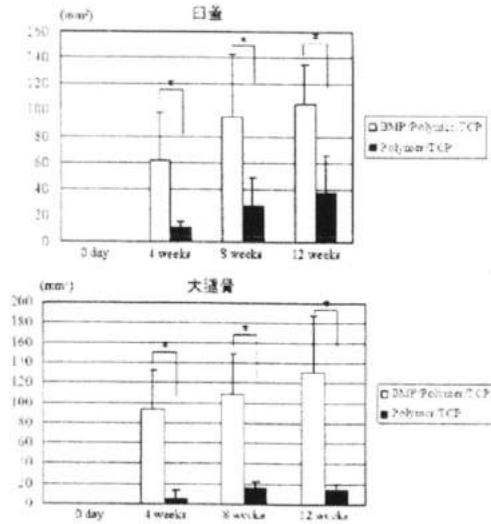


図4

4. 考察

本研究において人工股関節再置換術で遭遇する骨欠損がBMPとその担体によって修復出来ることが示唆された。本研究で作成した骨欠損はAAOS分類で白蓋側はtype III、大腿骨側はtype Iを模した重度の欠損であり、臨床では通常自家骨あるいは同種骨移植を人工骨と組み合わせなければ修復できないものである<sup>10)11)</sup>。本研究で使用した骨形成性人工骨ペースト(BMP/polymer/β-TCP複合体)を用いれば、骨移植が不要で、12週間で、完全に人工合成材料で骨修復が実現でき、さらにはその人工合成材料も吸収されることが判明した。

BMPが生体内で有効に能力を発揮させ骨形成を引き起こすためには担体が必要であることが知られている。現在BMPのdrug delivery system (DDS)としてはウシ由来I型コラーゲ

ンが使われているが、BSEや未知のウイルスなどの病原体伝播の危険性があることや力学的強度に欠け、可塑性に欠けること、免疫原性などの問題点がある<sup>12)~14)</sup>。我々のインプラントは骨形成能を有すること、完全に骨に置換されること、生体内に遺残物を残さないこと、人工合成物であり病原媒介の危険性が無いこと、粘土状であり徒手にて任意の形状に加工可能なこと、が挙げられる。我々は、BMPの担体として生体内分解性を有する人工合成ポリマー(ポリ乳酸ポリエチレングリコール共重合体:PLA・PEG)を開発してきた<sup>15)~18)</sup>。このポリマーは、分子量やPLA/PEG比を変化させること、あるいはPLA segmentに paradioxisanoneをランダムに重合させることで、生体内分解性を調節でき、BMPの徐放速度を制御できる。しかし、このポリマーは常温でゲル状であるため粘着性が強く、手操作的に操作が困難であるという欠点があったため、我々はA-TCP粉末を混合することで用手操作性を向上させた。<sup>19)20)</sup>。

人工股関節再置換術におけるBMPの有効性を検証した臨床研究や基礎研究がいくつか報告されている。Karholm<sup>21)</sup>らはrhBMP-7と同種骨を混合し臼蓋側・大腿骨側骨欠損に移植したが5年追跡の結果ではこの混合体の有効性は見いだせなかったとしている。McGee<sup>22)</sup>らもまた、羊モデルで大腿骨側インプラントの固定性における、rhBMP-7と同種骨混合体の有用性を検討したが、同種骨の吸収が亢進し、有効性はなかったとしている。Barrack<sup>23)</sup>らはrhBMP-7とType I bovine collagenの複合体を、イヌ臼蓋インプラント周囲小欠損に移植し、骨形成とbone in growthが促進したと報告している。Bragdon<sup>24)</sup>らはrhBMP-2とcalcium phosphate複合体をイヌ臼蓋インプラント周囲の骨欠損に移植しbone in growthが促進したと報告している。これらの報告から考えると、同種骨はBMPの担体としては不適であり、われわれの研究で使用したようなpolymerやcalcium phosphateなどが担体としてより良い担体であるかもしれない。

## 5. 結 語

我々の開発した骨形成性・生体分解性骨ペースト(BMP/polymer/ $\beta$ -TCP複合体)は、人工股関節再置換術において、骨移植を併用することなくかつ短期間で骨修復が得られる可能性が示唆された。この複合体を臨床応用するために、ヒトにおける安全性・有効性に関する研究が必要であろう。

## 6. 謝 辞

本研究は、平成17年度財団法人日本股関節研究振興財団の研究助成によるものであります。財団法人日本股関節研究振興財団に深謝いたします。

(尚、本研究はJournal of Orthopedic Researchに掲載されています。Hoshino M, Namikawa T, Kato M, Terai H, Taguchi S, Takaoka K. Repair of bone defects in revision hip arthroplasty by implantation of a new bone-inducing material comprised of recombinant human BMP-2, Beta-TCP powder, and a biodegradable polymer: an experimental study in dogs. J Orthop Res. 2007 Aug;25(8): 1042-51.)

## 文 献

- 1) Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N, Clarke IC. 1992. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. Clin Orthop Relat Res 276:7-18.
- 2) Zicat B, Engh CA, Gokcen E. 1995. Patterns of osteolysis around total hip components inserted with and without cement. J Bone Joint Surg Am 77-A:432-9.
- 3) Hamadouche M, Blanchat C, Meunier A, et al. 2002. Histological findings in a proximal femoral structural allograft ten years following revision total hip arthroplasty: a case report. J Bone Joint

- Surg Am 84-A:269-73.
- 4) Wolfgang GL. 1990. Femoral head autografting with total hip arthroplasty for lateral acetabular dysplasia. A 12-year experience. Clin Orthop Relat Res 255: 173-85.
  - 5) Oonishi H, Iwaki Y, Kin N, et al. 1997. Hydroxyapatite in revision of total hip replacements with massive acetabular defects: 4- to 10-year clinical results. J Bone Joint Surg Br 79-B:87-92.
  - 6) Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 242 : 1528-34.
  - 7) Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, et al. 1990. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 2220-4.
  - 8) Boden SD, Kang J, Sandhu H, Heller JG. 2002. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans : a prospective, randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies. Spine 27:2662-73.
  - 9) Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. 2002. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. J Bone Joint Surg Am 84-A:2123-34.
  - 10) D'Antonio JA, Capello WN, Borden LS, et al. 1989. Classification and management of acetabular abnormalities in total hip arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 243 : 126-37.
  - 11) D'Antonio J, McCarthy JC, Bargar WL, et al. 1993. Classification of femoral abnormalities in total hip arthroplasty. Clin Orthop Relat Res 296: 133-9.
  - 12) Bach FH, Fishman JA, Daniels N, et al. 1998. Uncertainty in xenotransplantation : individual benefit versus collective risk. Nat Med 4:141-4.
  - 13) Butler D. 1998. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. Nature 39 1:320-4.
  - 14) DeLustro F, Dasch J, Keefe J, Ellingsworth L. 1990. Immune responses to allogeneic and xenogeneic implants of collagen and collagen derivatives. Clin Orthop Relat Res 260: 263-79.
  - 15) Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, et al. 1993 . Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer. A new biodegradable synthetic carrier for bone morphogenetic protein. Clin Orthop 294:333-43 .
  - 16) Saito N, Okada T, Toba S, et al. 1999. New synthetic absorbable polymers as BMP carriers: plastic properties of poly-D,L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers. J Biomed Mater Res 47: 104-10.
  - 17) Saito N, Okada T, Horiuchi H, et al. 2001. Biodegradable poly-D,L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone. J Bone Joint Surg Am 83-A (Suppl 1):S92-8.
  - 18) Saito N, Okada T, Horiuchi H, et al. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation. Nat Biotechnol 19: 332-335 2001
  - 19) Namikawa T, Terai H, Suzuki E, et al. 2005. Experimental spinal fusion with recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate

- in a rabbit model. *Spine* 30:1717-22.
- 20) Kato M, Nanrikawa T, Terai H, et al. 2006. Ectopic bone formation in mice associated with a lactic acid/dioxanone/ethylene glycol copolymer-tricalcium phosphate composite with added recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 27: 3927-33.
  - 21) Karrholm J, Hourigan P, Timperley J, Razaznejad R. 2006. Mixing bone graft with OP-1 does not improve cup or stem fixation in revision surgery of the hip: 5-year follow-up of 10 acetabular and 11 femoral study cases and 40 control cases. *Acta Orthop* 77:39-48.
  - 22) McGee MA, Findlay DM, Howie DW, et al. 2004. The use of OP-1 in femoral impaction grafting in a sheep model. *J Orthop Res* 22: 1008-15.
  - 23) Barrack RL, Cook SD, Patron LP, et al. 2003. Induction of bone ingrowth from acetabular defects to a porous surface with OP-1. *Clin Orthop Relat Res* 417: 41-9.
  - 24) Bragdon CI, Doherty AM, Rubash HE, et al. 2003. The efficacy of BMP-2 to induce bone ingrowth in a total hip replacement model. *Clin Orthop Relat Res* 417:50-61.

## 大腿骨頭壊死に対する再生医療の応用

—Scaffold free の細胞シートによる骨再生—

実施責任者：奈良県立医科大学 整形外科 川手 健次  
分担研究者：奈良県立医科大学 大学院 重松 英樹  
奈良県立医科大学 健康政策医学 赤羽 学  
産業技術総合研究所 (AIST) 大串 始

### はじめに

骨髄細胞には、造血系の細胞のほかに骨形成能力を有する細胞が含まれる。近年、自家の骨髄細胞を用いて骨再生を試みる研究が盛んに行われている<sup>1)</sup>。

大串らはラットの大腿骨や脛骨より採取した新鮮な細胞浮遊液を多孔質のヒドロキシアパタイト(HA)と混和し移植することで、異所性にHA気孔内に移植後約3週間で組織学的に骨新生が見られることを報告した<sup>2)</sup>。

その骨形成過程は軟骨を介さず、膜内骨化の形式でHAの表面に直接成熟した層板骨が形成された<sup>3)</sup>。

しかしながら、安定した骨形成を得るには多量の新鮮骨髄細胞を必要とするため、実際に臨床で骨再建に応用するには、骨髄細胞の骨形成能力を増幅させる必要があった。

そこで新鮮骨髄細胞を培養し浮遊細胞を除去し、増殖した骨髄付着細胞(骨髄間葉系細胞)を多孔質HAに含ませることによって、移植後2ないし3週で、骨形成を得ることが可能となり<sup>4)</sup>、形成された骨組織が移植された細胞に由来することも明らかにした。骨髄細胞を培養増殖することで新鮮骨髄細胞の骨再生能力を増幅させることに成功したのである。

しかしながら、継代培養を繰り返すと骨芽細胞への分化能が低下し、細胞の骨形成能力が低下することも明らかになった。

一方 Maniatopoulos らは、骨髄細胞の培養の際にデキサメサゾンと $\beta$ グリセロリン酸を加えることで石灰化した骨様組織が形成され、この石灰化基質は骨形成誘導蛋白(BMP)活性を持つことを報告した<sup>5)</sup>。

この細胞外に形成される石灰化基質は、形態学的には、生体の骨基質ときわめて類似し<sup>6)</sup>、さらにこの培養細胞が、高い骨芽細胞活性を持つことが生化学的、遺伝子発現的に証明された<sup>7)</sup>。

この培養骨をHAと結合させることで高い骨再生能力を持つ人工骨が作製されうることを報告した。

今回我々はscaffoldを用いずに、骨芽細胞からなる細胞シート作成する方法を確立したため、それを利用した新たな人工骨作成が可能かどうかを将来大腿骨頭壊死へ応用することを視野にいれて、検討を行った。

### 材料と方法

実験に使用したHAブロックは珊瑚骨格から作製され、気孔連通性など、海綿骨の骨梁構造に類似した微細構造を持つ。使用したHA

は、直径5mm、厚さ2mmの円柱径 CELLY-ARD HA scaffold (PENTAX社製)であった。このHAを骨芽細胞からなる細胞シートによりくるむことで人工培養骨を作成することを試みた。

細胞シートの作成方法は、7週齢、雄のF344ラット大腿骨から骨髓細胞を採取し、T75フラスコでEagle's minimal essential medium (MEM) に15%牛胎児血清、抗生物質を加えた標準培地で約10日間一次培養を行った。この培養で造血系の浮遊細胞は培地交換時に除去され、付着細胞(間葉系細胞)のみが培養される。骨髓間葉系細胞を増やした後、トリプシン処理を行い10cm Dishに $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup>の濃度で播種した。2次培養は、標準培地に82  $\mu$ g/ml vitamin C phosphate、10m M dexamethasone (以下Dex)を加えて行った。骨基質形成の際、リンを供給して石灰化を促進する $\beta$ -glycerophosphateは今回の2次培養の際には加えなかった。Vitamin C phosphateはコラーゲン繊維の合成を促進し、Dexは、骨形成細胞への分化を促進する効果を持つ。

10日間の2次培養の後、スクレーパーを用いてDishに付着した細胞をはがし細胞シートを得た。この細胞シートでHAを包み同系ラットの背部皮下へ移植した。

コントロールは従来どおりの細胞浮遊液にHAを2時間浸し、その後に同系ラットの背部皮下へ移植した。移植後2週、4週後に摘出し骨形成過程を生化学的、組織学的に検討した。

生化学的分析は骨芽細胞活性に相関するALP活性と、形成された骨量に相関するオステオカルシンを測定して行った。摘出したHAを、0.2% Nonidet P40で粉碎し遠心分離し、上清をALPの酵素液とし、p-nitrophenyl phosphateを基質として測定した。沈殿物より20%ギ酸でオステオカルシンを抽出し、脱塩後、ELIZA法でオステオカルシンを測定した。



図1

## 結果

移植後2週目のALP活性の測定値はシートHA群と細胞浮遊液HA群とを比較すると、前者が後者の約3倍の活性値を示した。移植後4週目のALP活性の測定値は両群ともほぼ同等であった。また、移植後2週目のオステオカルシンの測定値はシートHA群が細胞浮遊液HA群の約1.1倍の値を示した。また、移植後4週目のオステオカルシンの測定値はシートHA群が細胞浮遊液HA群の約1.5倍の値を示した。組織学的には移植後4週目に脱灰しHE染色した。シートHA群はHA気孔内表面に成熟した層板骨がみられ、さらにHAの表面にも層板骨がみられた(図1)。一方細胞浮遊液HA群ではHA気孔内表面に成熟した層板骨がみられるものの、その表面の骨形成は明らかではなかった。