

脊椎骨欠損部における脂肪由来幹細胞の骨形成促進効果

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-03-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Inoue, Kei メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00050409

脊椎骨欠損部における脂肪由来幹細胞の骨形成促進効果

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻機能再建学

(旧講座名:整形外科学)

(主任:土屋弘行教授)

井 上 啓

脊椎腫瘍に対する腫瘍脊椎骨全摘術 (total en bloc spondylectomy, TES) のような巨大な骨欠損を生じる手術では、より早く確実に骨癒合する椎体再建方法が求められる。本研究では、動物実験モデルにおいて脂肪由来幹細胞 (Adipose derived regenerative cells: ADRCs) を椎体再建材料として用い、移植骨の骨形成への関わりを骨形態学的に評価した。犬の第13胸椎TESモデル12例を用い、ADRCs群と対照群に分けた。対照群は自家骨を、ADRCs群は自家骨と犬の背部脂肪組織から抽出したADRCsを用いて椎体を再建した。各群術後2週と4週に検体を回収し、ヴィラネバ骨染色した後、正中矢状断の非脱灰研磨切片を作製した。光学偏光顕微鏡で骨形態計測を行い比較検討した。ケージに占める線維性結合組織の割合は、2週対照群27.5%/ADRCs群65.5%、4週対照群58.3%/ADRCs群86.6%、新生骨に占める層板骨の割合は、2週対照群7.9%/ADRCs群47.5%、4週対照群63.3%/ADRCs群96.4%であった。骨形成速度 ($\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{day}$) は、2週対照群0.06/ADRCs群0.31、4週対照群0.66/ADRCs群1.95であった。脂肪由来幹細胞を用いると線維性結合組織の増生に始まる移植骨の一連のリモデリング量が増加し、骨形成が促進されると考えられた。

Key words bone formation, adipose derived regenerative cells, total en bloc spondylectomy

当科では原発性脊椎悪性腫瘍や脊椎転移癌に対し、脊椎機能を温存しつつ腫瘍の局所根治を目指した腫瘍脊椎骨全摘術 (total en bloc spondylectomy, TES) を世界に先駆けて行ってきた。本術式は脊椎腫瘍に対して局所根治性の高い手術と考えられている¹⁾²⁾。一方、この手術では罹患脊椎を摘出するため、脊椎の連続性が完全に途絶され、脊柱は完全に不安定な状態となる。したがって脊柱再建には強固な初期固定と同時に早期の骨癒合を獲得する必要があり、腫瘍脊椎骨切除後の脊柱再建は本術式の非常に重要な要素となっている。

我々は現在まで、チタン製のケージ内に大量の自家腸骨を充填し、これを前方の椎体再建に用いてきた。しかし大きな骨欠損を伴うTES後の脊柱再建は、骨癒合に時間を要すること、自家骨移植では採取できる量に限界があること、採骨にかかわる出血や採骨部痛などの問題がある³⁾。このため、早期から生物学的な固定が得られ、かつ自家骨採取部位の犠牲が可能な限り少ない再建方法が求められている。

組織の再生医療は、近年あらゆる生体部位で試みられている。その中には、造血幹細胞や骨髄間葉系幹細胞と

いった組織幹細胞が挙げられ、将来的にはES細胞やiPS細胞などの幹細胞株の利用が期待されている。しかし、体外でヒトの細胞を培養、分化させることには、操作上の問題や倫理的問題が存在する。一方、脂肪組織の中には、未分化な多能性細胞が存在することが明らかになっている⁴⁾。その一部に多方向に分化する幹細胞が確認され、脂肪由来幹細胞と呼ばれる。これは、脂肪、軟骨、骨、骨格筋、神経、血管などへ分化誘導できる可能性が示されている⁴⁾。脂肪由来幹細胞は他の幹細胞と比べ、大量かつ容易に採取が可能であり、再生医療で問題となる培養操作を行わなくても十分な移植細胞数が得られる。現在までに、乳房再建や腸瘻に対する臨床応用が始まっているが⁵⁾⁶⁾、脊椎外科領域での臨床報告はない。実験的には、これまでに自己脂肪由来幹細胞を用いた骨折後の治癒促進の報告はあり、我々も仮骨延長術後の小さな骨欠損に対して骨形成の促進を確認しているが⁷⁾、脊椎の巨大な骨欠損に対する再建材料として自己脂肪由来幹細胞を用いた骨再生に関する検討は国内外で存在しない。脂肪幹細胞の分離は手技的に安定しており、その有効性を示すことで、早期の臨床応用の可能性が広がる。また、

平成29年7月7日受付, 平成29年9月7日受理

Abbreviations: ADRCs: adipose derived regenerative cells, DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, FBS: fetal bovine serum, TES: total en bloc spondylectomy, T-saw: thread wire saw

その他の再生医療と比較して、分離のみで行える脂肪幹細胞移植は一般の施設でも行える有望な治療法と期待される。

本研究の目的は、TESの動物モデルを作成し、自己脂肪由来幹細胞を用いた骨癒合促進が可能となるのかを明らかにすることである。

【材料および方法】

I. 実験動物

実験動物としての生後12か月のビーグル犬（ナルクビーグル，三共ラボ，体重9-12kg，雌）12頭を用い，チタンケージ内に自家骨を移植した群（対照群）とチタンケージ内に自家骨および自己脂肪由来幹細胞（adipose-derived regenerative cells: ADRCs）を移植した群（ADRCs群）に分けた。

本実験は「脊椎全摘術後の椎体再建に関する脂肪幹細胞を用いた実験的研究」として，金沢大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けた（承認番号：第101794号および第111982号，第122523号，第132848号，第143051号）。

II. 脊椎骨全摘モデルの作成

ビーグル犬をメドミジン（ $3\mu\text{g}/\text{kg}$ ）およびミダゾラム（ $3\text{mg}/\text{kg}$ ）で鎮静し，パンクロニウムを経静脈的に投与後，6.0mmのカフ付きチューブを挿管し，人工呼吸器（R-10，AIKA社製，東京）に接続して50/50%の酸素/笑気混合気で調節呼吸を行った。維持麻酔にはプロポフォル（ $10\text{mg}/\text{kg}/\text{hr}$ ）を用い，非動化にはパンクロニウムの静脈内投与を適宜行った。麻酔導入後，セフトリアキソン（ロセフィン®，中外製薬，東京）1gを静脈注射した。動物を腹臥位とし，背側正中切開で第10胸椎から第3腰椎の椎弓を露出した。第11，12胸椎，第1，2腰椎椎体の横突起基部から対側の椎体側面に向けて直径5.0mmのスクリュー（M8 pedicle screw®，Medtronic，USA）を各々挿入，直径5.5mmのロッドで脊柱を固定した。次に第12胸椎椎弓の尾側半分と第13胸椎椎弓を切除し硬膜を露出した。第13胸髄神経根は両側とも結紮・切除した。腸腰筋と壁側胸膜を椎体から剥離した後，T-saw（Thread wire saw）（プロメディカル，金沢）を用いてT12/13，T13/L1椎間板を切除し，第13胸椎を一塊として切除した。上下隣接椎体の軟骨終板を鋭匙で完全に除去し血流を有する母床を作成した。切除した椎体から鋭匙を用いて可能な限りの海綿骨を取り出し，不足分は皮質骨を粉碎して混ぜ，移植骨とした。直径12mm，高さ約15mmのチタンケージ（Harms cage®，DePuy Synthes，USA）に，対照群は自家骨とフィブリン糊を混合したものを，ADRCs群は自家骨とADRCsを含む抽出液（次項参照），フィブリン糊を混合したものをそれぞれ充填した。チタンケージを椎体欠損部に挿入した後，第12胸椎と第1腰椎に挿入した椎弓根スクリューをロッドに沿ってスライドさせ，ケージに適度な圧力を加えた。椎弓根スクリュー刺入側に圧力が集中することで生じる側弯を避けるため，対側側面に

プレートを当て直径2.7mmのスクリューで留めた後，ケージにさらに圧迫力を加えて椎体再建部の固定を強固なものとした（図1）。このようにして欠損部をチタンケージで再建する第13胸椎TESモデルが完成した。

III. ADRCsの抽出

ADRCsは，手術時に背部より皮下脂肪組織を約10g採取し，0.12%コラゲナーゼI内で45分振盪した後，ウシ胎児血清（fetal bovine serum, FBS）入りダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM）で中和し，フィルター（ $40\mu\text{m}$ ）を通して遠心を行い，沈殿したstromal-vascular fractionを採取するというZukら⁴⁾の方法に基づき抽出した。ADRCsが含まれる抽出液をそのまま椎体再建時の移植材料として用いた。抽出液の培養や骨分化誘導は行わなかった（図2）。

IV. 蛍光標識剤の投与

蛍光標識剤としてカルセイン（ $10\text{mg}/\text{kg}$ ）もしくはテトラサイクリン（ $50\text{mg}/\text{kg}$ ）を屠殺の9日前および2日前に頸部背側の皮下組織に投与した。

V. 検体の回収

各群それぞれ術後2週と4週に3頭ずつ屠殺した。背側正中切開で第10胸椎から第3腰椎までを露出し，T10/11およびL2/3椎間板をT-sawで切離して第11胸椎から第2腰椎までを一塊として摘出した。摘出した検体は70%エタノールを満たした容器に入れた。

VI. 組織標本の作成（ヴィラネバ骨染色）

検体は70%エタノールを交換しながら7日間固定した。その後ダイヤモンドカッター（BS-3000，EXAKT，Germany）を使用し，第12椎体下縁や第1腰椎上縁，腹側の軟部組織，背側の脊髓など，接した組織を残したままチタンケージ部分を摘出した。ヴィラネバ骨染色液に7日間浸透させた後，エタノールによる脱水を行い，次いでアセトン，メチルメタクリレートモノマーの1対2の混合液を含んだメチルメタクリレートモノマー樹脂に浸透させ，非脱灰で重合した。重合したブロックをチタンケージの正中矢状断方向にボーンソーで200ミクロンの厚さに切断し，プラスチック製のスライドに貼り付け，研磨機を用いてさらに20ミクロンの厚さにまで研磨した。これによりチタンケージを含んだ正中矢状断の非脱灰研磨切片を作製した。

VII. 組織学的評価

ヴィラネバ骨染色は一枚の切片で自然光，偏光，蛍光の3種の観察ができ，骨組織学的評価に適した染色法である。主として自然光下では細胞の観察を行い，偏光下に層板構造を，蛍光下に石灰化と骨標識を観察した。

1. 組織像およびケージ全体に占める結合組織領域の割合

術後2週から4週にかけてチタンケージ内の移植骨に生じる変化を観察し，骨芽細胞による骨形成が優位な領域（骨形成領域）と破骨細胞による骨吸収が優位な領域（骨吸収領域），移植骨が無反応のまま残存している領域（無反応領域）に分けた（図3）。さらに，骨形成領域と骨

吸収領域を含み結合組織が広範に浸潤する領域を結合組織領域として、その面積 (μm^2) をケージ全体の面積 (μm^2) で除し全体に占める割合を求めた。

2. 骨形態計測

移植骨の骨形成に関連した以下の4項目を計測し評価した。

1) 結合組織に含まれる血管の長径の和

結合組織中の径 $10\mu\text{m}$ 以上の管腔構造を有するものを血管とし、その長径の総和 (μm) を求め、結合組織量 (μm^2) で除した。

2) 移植骨量に対する破骨細胞の割合

骨吸収領域において骨に接する破骨細胞のみならず遊走する破骨細胞も数え上げ、吸収される移植骨量 (μm^2) で除した。

3) 新生骨に占める層板骨の割合、類骨面に並ぶ骨芽細胞の割合

骨形成領域で形成された骨の内、偏光下に層板構造を有する骨の割合を求めた。層板骨を重要視する観点から、骨芽細胞を数える際には無秩序に集簇し幼若な線維骨を形成するものを除外し、類骨面に整然と並ぶもののみを数えた。

4) 骨形成速度

骨形成領域において蛍光下に標識面を検出し、一重標識面 (μm) と二重標識面 (μm) を計測した (図4)。二重になった標識面の間隔は7日あたりの石灰化速度 (μm) であり、以下の式を用いて骨形成速度 ($\text{mm}^2/\text{mm}/\text{day}$) を求めた。

式) 骨形成速度 = 石灰化速度 \times (一重標識面 \div 2 + 二重標識面) \div 骨面

なお、標本が巨大で各領域全域に渡った計測が困難であったため、各領域より10視野ずつを抽出し計測した。

統計学的にはStudentのt検定を用いた。P<0.05を有意差ありと判定した。

【結 果】

I. ケージ内移植骨にみられる組織学的変化の全体像

自然光下に弱拡大にて組織の全体を観察すると、移植骨がそのまま取り残されている箇所 (無反応領域) と移植骨の周囲に結合組織を認める箇所 (結合組織領域) とに大別できた。無反応領域は主としてケージの中心部から腹側にかけて認められ、移植骨以外にADRCsを含めて細胞成分を認めなかった。無反応領域の移植骨には骨細胞を有する骨小腔と有さない骨小腔が混在していた。一方、結合組織領域は両端の上下椎体に隣接した部位から背側の硬膜に近接した部位にかけて連続した領域として認められ、線維性の結合組織や様々な細胞成分で満たされていた。その内部には辺縁が吸収されたり石灰化層が生じたり、何らかの変化を認める移植骨が散見された。

ケージ内面積 (μm^2) に占める結合組織面積 (μm^2) の割

合は、2週対照群27.5% / ADRCs群58.3%, 4週対照群65.5% / ADRCs群86.6%と2週から4週にかけて各群で増加し、ADRCs群で有意に大きかった (2週p=0.023, 4週p=0.015) (図5)。

辺縁に石灰化層を生じた移植骨を含む領域 (骨形成領域) は、両群ともに2週では上下椎体に隣接して観察され、4週では上下椎体からケージ内側に向かって形成された新生骨の周囲に観察された。吸収や貪食を受けた移植骨を含む領域 (骨吸収領域) は、2週、4週ともに骨形成領域のさらにケージ内側に認められた。骨吸収領域とケージ中心の無反応領域との間には、移植骨が結合組織に囲まれながら骨形成も骨吸収も認められない領域があった。

対照群4週の1例、ADRCs群4週の2例においては、上下椎体に接していない背側の硬膜に近い領域で骨吸収を認めた。同部位には全体的に線維性の結合組織が増生していた。それらの結合組織は硬膜周囲にある同様の組織と連続しており、線維方向はケージの中心に向かっていった。移植骨の一部には破骨細胞による骨吸収が認められた。ADRCs群4週の1例では、背側移植骨の一部に骨芽細胞による層板骨の形成も認められた。

II. 骨形態計測結果

1. 結合組織に含まれる血管の長径の和

線維性の結合組織を走行に沿って強拡大で観察すると結合組織が流入する隣接椎体とケージ端との間から、骨形成領域、骨吸収領域を経て、移植骨がそのまま残存する領域に至るまで結合組織とともに管腔構造が認められた。その内部が無数の血球成分で満たされていることから、管腔構造は血管であると考えられた。これら血管の走行は結合組織の増生する方向にほぼ一致していた。ケージ中心の結合組織が到達していない領域には同様の管腔構造は認められなかった (図6)。

視野面積 (μm^2) に対する血管長径の総和 (μm) の比は、2週対照群0.00294 / ADRCs群0.00483, 4週対照群0.00347 / ADRCs群0.00680であり、2週、4週ともにADRCs群で有意に大きかった (2週p=0.040, 4週p=0.024) (図7)。

2. 移植骨量に対する破骨細胞の割合

結合組織が広がる領域の中で骨吸収を主体とする領域は、骨形成が盛んな領域よりややケージの中心寄りに認められた。移植骨の辺縁は内側に向かう窪みが連続して鋸歯状を呈していた。窪みの中心に多数の核を有する巨大な細胞が多く存在し、破骨細胞とその吸収窩であると考えられた。移植骨の周囲には大小様々な血管が認められ、血管と移植骨の間は結合組織のみならず無数の細胞成分が存在し、多数の破骨細胞も認められた。

吸収過程の移植骨量 (μm^2) に対する破骨細胞数の比 (cell number / μm^2) は、2週対照群0.00900 / ADRCs群0.01516, 4週対照群0.00824 / ADRCs群0.01681であり、2週、4週ともに両群間で有意差を認めなかった (図8)。

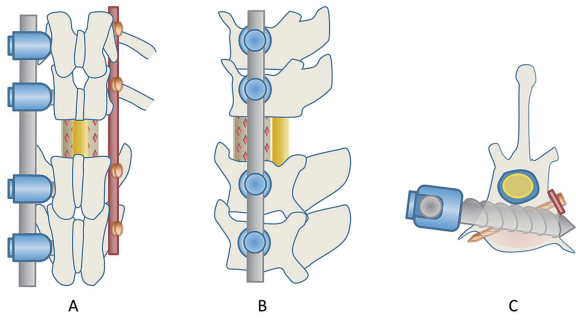


Fig.1. Canine model of total en bloc spondylectomy at 13th thoracic vertebra. For spinal fixation, pedicle screws for human were inserted to vertebral bodies (2 each) above and below the 13th thoracic vertebra, and connected with rod on one side. Plate and small screws were used for additional fixation on the other side. (A) Posterior view (B) Lateral view (C) Cross-sectional view

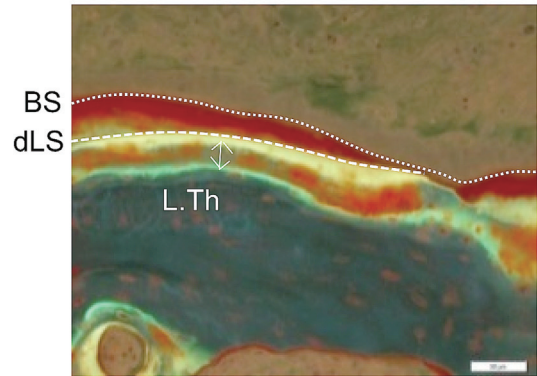


Fig.4. Fluorescence microgram of newly formed bone in ADRC group 4 weeks after surgery. The orderly labeled line indicated the mature lamellar structure. (BS) Bone surface (dLS) double labeled surface (L.Th) thickness between labeled surface indicated the volume calcified in 7 days. Villanueva bone staining. White bar, 50µm.

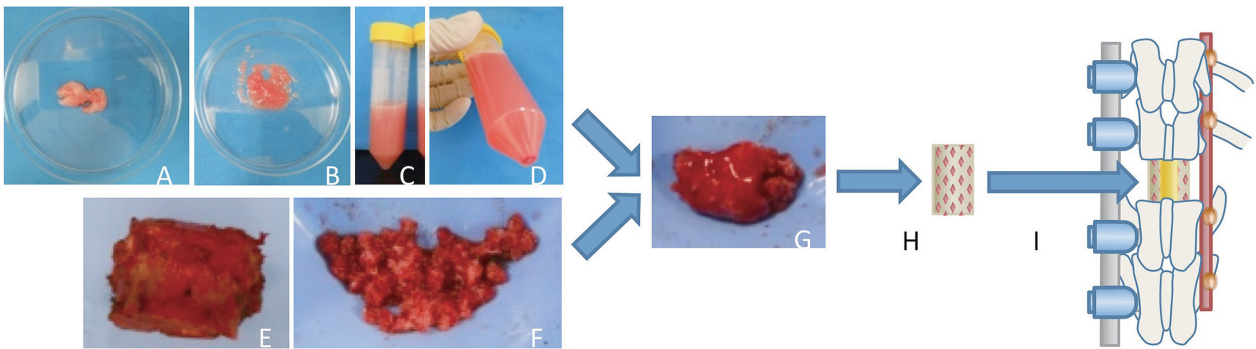


Fig.2. Packing adipose derived regenerative cells (ADRCs) into the cage with bone graft. (A-D) Isolation process of ADRCs. (A, B) Adipose tissue was harvested from the neck, and was finely cut. (C) Treatment with collagenase 1 (D) After centrifugation, ADRCs were shown at bottom of the tube. (E, F) 13th thoracic vertebra was resected, comminuted into pieces. (G, H) ADRCs and autograft with fibrin glue were packed into a titanium cage. (I) Spinal reconstruction was performed.

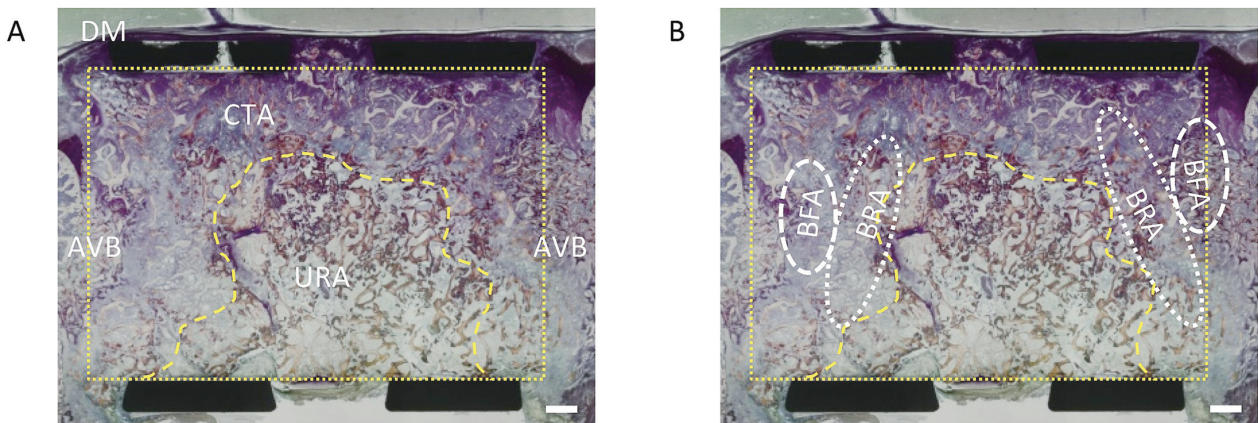


Fig.3. Light microgram of longitudinal section 2 weeks or 4 weeks after surgery. The area inside a titanium cage was surrounded by dot-square. (A) (CTA) connective tissue area: The connective tissue expanded inside the cage from both ends toward the center. (URA) unresponsive area: Bone graft was left behind unresponsively. (DM) dura mater. (AVB) adjacent vertebral body. (B) (BFA) bone formation area: The area consist mainly of bone formation with osteoblast. (BRA) bone resorption area: the area consist mainly of bone resorption with osteoclast. Villanueva bone staining. White bar, 1mm.

3. 新生骨に占める層板骨の割合, 類骨面に並ぶ骨芽細胞の割合

上下の椎体に接する領域では, 骨形成を主体とする反応が認められた. この領域で形成された新生骨には2種類あり, 無秩序に集簇した骨芽細胞から形成された線維性骨と整然と並んだ骨芽細胞から形成された層板骨とに分けられた. 層板骨を蛍光下に強拡大で観察すると, 骨

細胞間に多数の骨細管を認めた (図9).

2週対照群では, 新生骨のほとんどが線維性骨であったのに対し, 他の群では層板骨を多く認めた. 新生骨量に占める層板骨の割合 (%) は2週対照群7.9% / ADRCs群63.2%, 4週対照群47.5% / ADRCs群96.4%であり, 2週ADRCs群で2週対照群に比べて有意に層板骨の割合が高い結果となった ($p=0.014$) (図10,11).

類骨面 (μm) に対する骨芽細胞数の比 (cell number / μm^2) は, 2週対照群0.0008 / ADRCs群0.0165, 4週対照群0.0155 / ADRCs群0.0237と, 2週ADRCs群で2週対照群に比べて有意に高かった ($p=0.014$) (図12).

4. 骨形成速度

骨形成領域において, 蛍光下ではカルセインやテトラサイクリンによる標識が鮮明になり, 形成された層板骨に沿って一重もしくは二重の標識面が観察された. 両群ともに2週ではほとんどが一重標識面で, 標識剤がびまん性に沈着する傾向があった. 両群4週では形成された標識面が比較的明瞭な曲線として観察され, 特にADRCs群で二重標識面が多く認められた. 算出した骨形成速度は, 2週対照群0.06 / ADRCs群0.31, 4週対照群0.66 / ADRCs群1.95であり, 術後2週, 4週ともにADRCs群で有意に大きかった (2週 $p=0.035$, 4週 $p=0.030$) (図13).

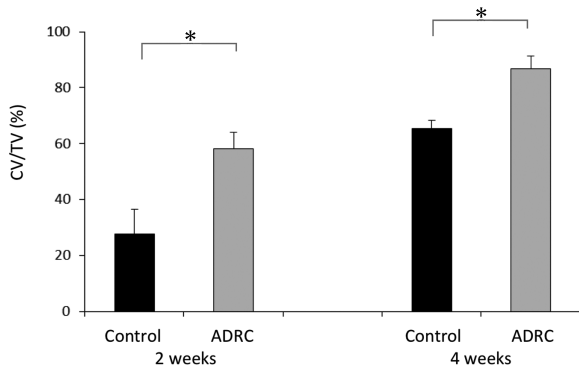


Fig.5. Ratio of the connective tissue volume to the total volume (CV/TV). ■ control group. ■ ADRC group. 2 weeks, 2 weeks after surgery; 4 weeks, 4 weeks after surgery. The ratio of CV/TV was higher in the ADRC group at both 2 and 4 weeks after surgery. * $P < 0.05$

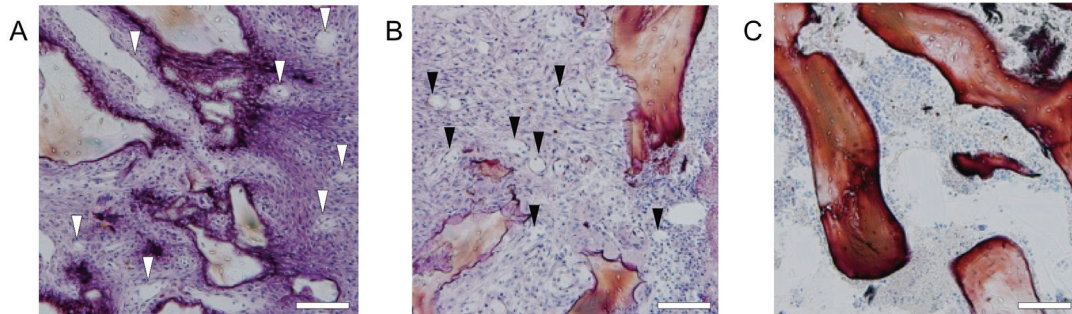


Fig.6. Blood vessels observed in connective tissue. (A) In bone formation area, there were amount of vessels in connective tissue around bone graft (white arrowheads). (B) In bone resorption area, there were many vessels with connective tissue (arrowheads). (C) In the center of the cage (unresponsive area), there were neither connective tissue nor vessels. Villanueva bone staining. White bar, 100 μm .

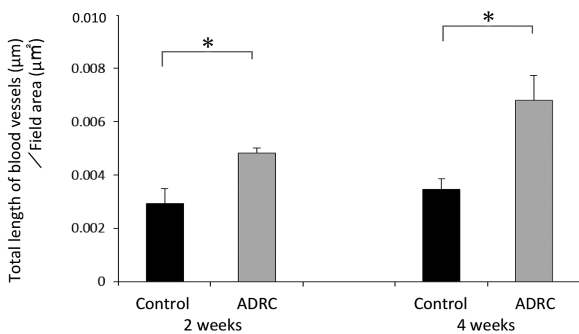


Fig.7. Ratio of the total length of blood vessels to field area. ■ control group. ■ ADRC group. 2 weeks, 2 weeks after surgery; 4 weeks, 4 weeks after surgery. More blood vessels in the connective tissue were observed at 2 and 4 weeks in the ADRC group. * $P < 0.05$

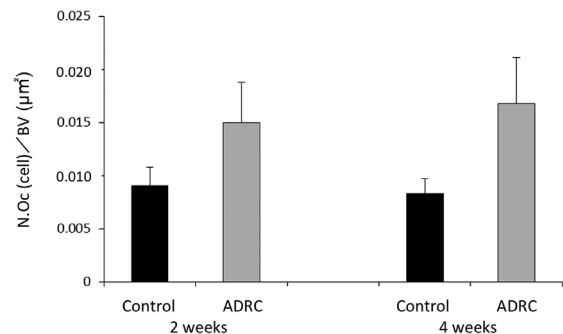


Fig.8. Ratio of number of osteoclast to the bone volume (N.Oc/BV). ■ control group. ■ ADRC group. 2 weeks, 2 weeks after surgery; 4 weeks, 4 weeks after surgery. The ratio of N.Oc/BV was higher in the ADRC group at both 2 and 4 weeks after surgery. * $P < 0.05$

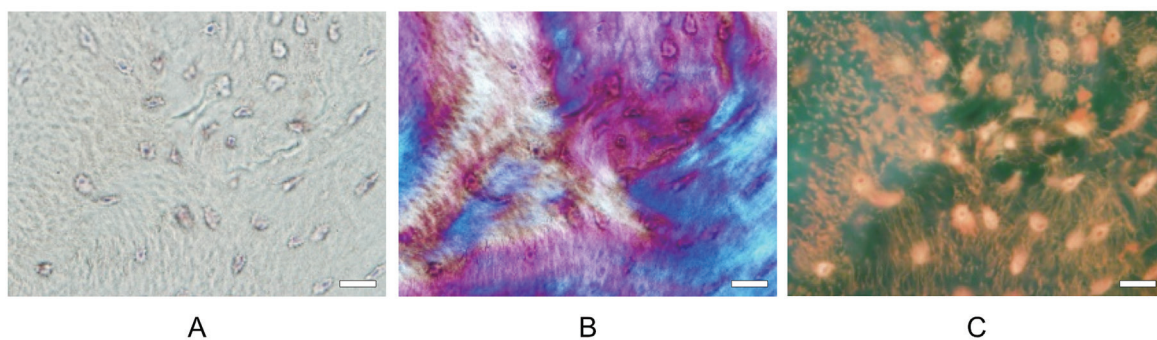


Fig.9. Newly formed lamellar bone. (A) Under natural light (B) Under polarized light: The mature lamellar structure was observed. (C) Under fluorescence: a number of bone canaliculi were observed between bone lacunae. Villanueva bone staining. White bar, 20 μm.

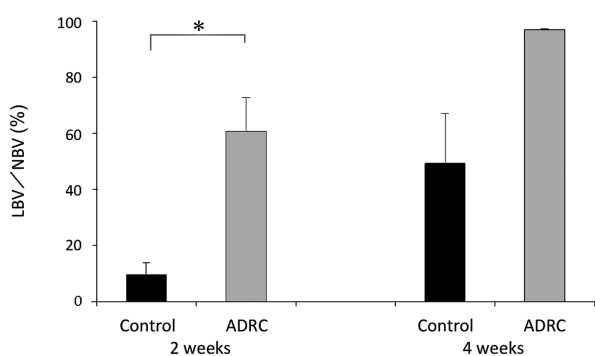


Fig.10. Ratio of lamellar bone volume to new bone volume (LBV/NBV). ■ control group. ■ ADRC group. 2 weeks, 2 weeks after surgery; 4 weeks, 4 weeks after surgery. The ratio of LBV/NBV increased in both groups, especially almost all lamellar bone was formed in ADRC group 4 weeks after surgery. * P < 0.05

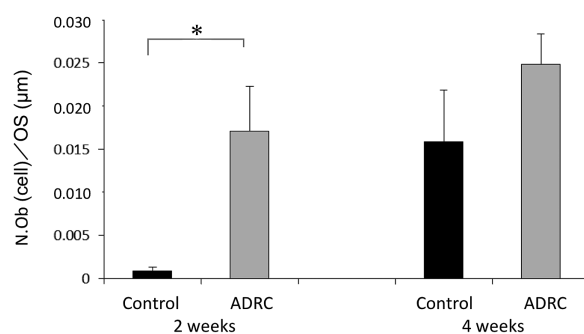


Fig.12. Ratio of number of osteoblasts to osteoid surface (N.Ob/OS). ■ control group. ■ ADRC group. 2 weeks, 2 weeks after surgery; 4 weeks, 4 weeks after surgery. The ratio of N.Ob/OS was higher in the ADRC group at both 2 and 4 weeks after surgery. As a result of increasing in control group, there were no significant differences at 4 weeks after surgery. * P < 0.05

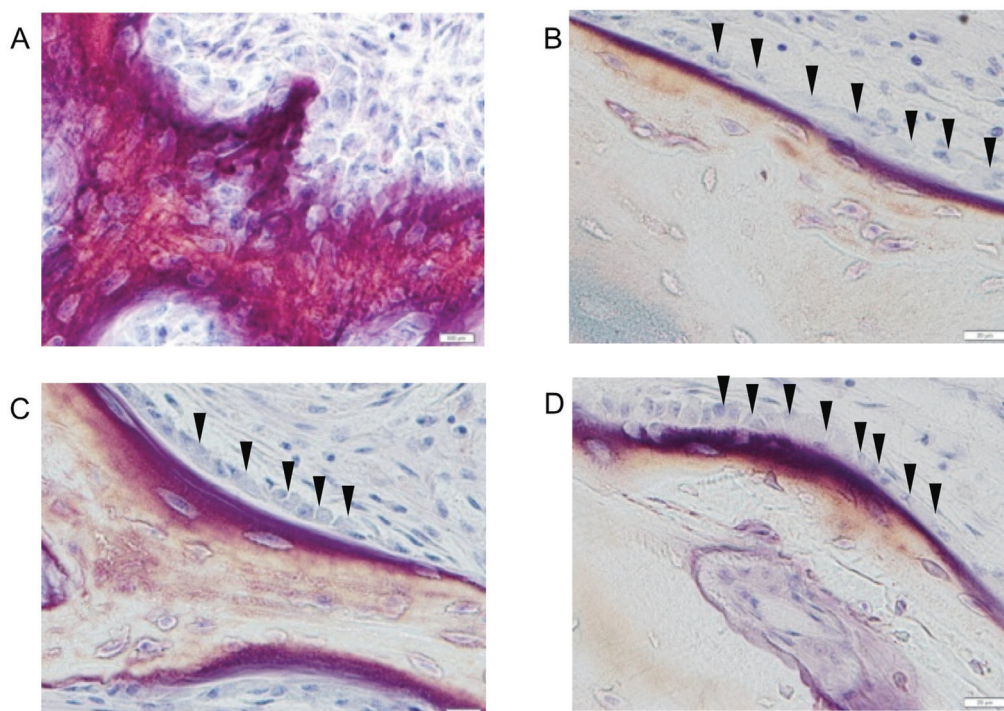


Fig.11. Characteristics of newly formed bone. Arrowheads showed osteoblasts formed a line on the bone surface. (A) 2 weeks in control group: Almost all woven bone was formed. (B) 4 weeks in control group: Immature lamellar bone was formed. (C) 2 weeks in ADRCs group: Lamellar bone was formed. (D) 4 weeks in ADRC group. Villanueva bone staining. White bar, 50 μm.

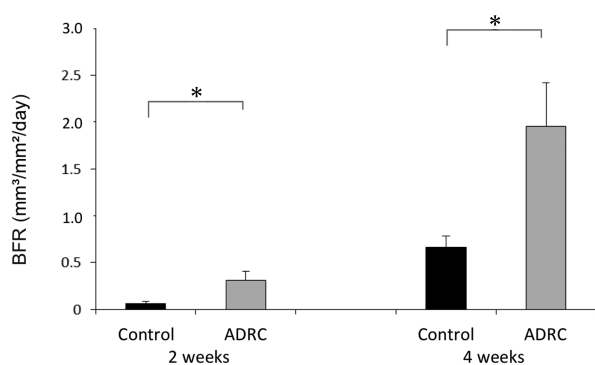


Fig. 13. Bone formation rate (BFR). ■ control group. ■ ADRC group. 2 weeks, 2 weeks after surgery; 4 weeks, 4 weeks after surgery. BFR calculated by using the parameter from the fluorescence labeled line, increased significantly in ADRC group 4 weeks after surgery. Increase in BFR indicated that bone formation was promoted in ADRC group. * $P < 0.05$

【考 察】

脊柱再建を要する手術では骨欠損部や骨癒合を期待する部位に骨移植を行うが、臨床的に移植骨の骨癒合を判定することは容易ではない。一般にX線像やCTを用いて骨癒合を評価することが多いが、特に金属製のケージを用いた脊椎手術においてはアーチファクトの影響が大きくCTでも微細な構造変化を見極めるのに支障を来すことがあり⁸⁾、TESでも画像検査を用いてケージ内部の移植骨の癒合状態を詳細に評価することは困難である。

現在までに、脊椎手術における移植骨の癒合過程に関する研究は散見されるものの、そのほとんどが後側方固定術 (posterolateral fusion: PLF) や後方椎体間固定術 (posterior lumbar interbody fusion: PLIF) などの比較的小さな範囲を対象としており^{9) 10)}、TESのような巨大骨欠損を生じる術式で骨癒合過程が検討された基礎研究は、以前当施設で検討した茂住¹¹⁾からの報告のみである。茂住はビーグル犬を用いたTESモデルにおいて、術後8週で癒合途中であったケージ内の移植骨が16週では完全に骨癒合すると報告した。その中で移植骨は両端の上下椎体に接した部位からケージの中心に向かって骨癒合すると述べている。

本研究では対照群として自家骨をそのまま用い、茂住より早期の骨癒合過程を検討した。対照群の術後2週では、骨形成や骨吸収を認めるのは上下の椎体に隣接したごく限られた範囲であった。一方、上下椎体の辺縁から流入する結合組織はケージ内に広範に増殖しつつ、その線維方向は全体としてケージの中心に向かっていった。結合組織の増生方向が中心に向かっていることは、術後2週から4週にかけて結合組織面積が拡大し、ケージ中心にある無反応領域が縮小したという観察結果からも明らかである。したがって、術後早期では結合組織がケージの中心に向かって増殖し、骨形成が後を追ってケージの中心に向かって進んでいくのではないかと推察した。すなわち、結合組織が骨形成の土台となっている可能性が

あると考えられた。

早期の骨癒合過程が周囲より中心に向かう理由として、TESという術式ではケージ内の移植骨が上下の椎体以外にどの組織とも接することができず血流に乏しく、骨形成に極めて不利な条件下に置かれていることが挙げられる。本研究では、ケージ内に流入した結合組織に含まれる血管 (長径の和) を検討したところ、ADRCs群では、対照群に比べて結合組織内により多くの血管が含まれることが明らかとなった。現在、ADRCsが骨形成を促進する機序は2通り考えられている。ひとつは、ADRCsが増殖し骨芽細胞へ分化して直接骨形成を増加させる補修効果 (repair effect)¹²⁾と、もうひとつはADRCsが液性因子を放出し骨形成にまつわる種々の細胞を活性化させて間接的に骨形成を増加させるパラクライン効果 (paracrine effect)¹³⁾である。本研究で用いたADRCsは抽出液をそのまま用いる方法で、液性因子を放出する効果を生じやすいとされている。特に血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) やケモカイン SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) を産生することが知られており、血管新生に優れている¹⁴⁾。以上よりADRCs群で早期に骨形成が生じた理由として、パラクライン効果により血管新生が導かれたためと推察した。

移植骨に血液が供給されると破骨細胞が遊走し、骨吸収が生じてリモデリングが始まる。本研究では両群ともに骨吸収域において多数の破骨細胞が移植骨を囲み、さらにその周囲の結合組織内や間隙にも破骨細胞が観察された。骨に接していない破骨細胞もリモデリングの担い手と考えられたため計測した。有意差は認められなかったが、ADRCs群で破骨細胞数がより高値であった。

骨癒合早期の過程では破骨細胞によって骨が吸収された後、生じた吸収窩に骨芽細胞が列を成して並び、層板骨を形成する^{15) 16)}。また骨芽細胞が無秩序に集簇し、層板構造を持たない線維性骨を形成することもある。本研究の対照群2週では線維性骨の形成割合が多く、ほとんど層板骨を形成していなかった。対照群4週で層板骨を形成する割合が高くなったのは破骨細胞による骨吸収の後、骨芽細胞が整列して層板骨を形成するというリモデリングの流れが確実に行われるようになったためと考えられる。層板骨の割合はADRCs群でも術後2週から4週にかけて高くなっていったが、着目すべき点はADRCs群では術後2週の時点で対照群4週と同程度であったことである。ADRCs群でこのように早期から層板骨が多く形成された理由として前述の補修効果とパラクライン効果が挙げられるが、補修効果によりADRCsが直接骨芽細胞に分化したのであれば、リモデリングを介さずに骨形成が行われる箇所が認められたはずである。しかし、本研究で骨形成を認めた箇所は骨吸収領域に接した外側に限られており、骨形成領域が中心に向かっていくことを踏まえると、骨吸収に続いて骨形成が生じたと考えられる。すなわちリモデリングを介して骨形成が行われたと

考えられ、ADRCsの補修効果よりもパラクライン効果が発揮された可能性が高い。リモデリングの過程では骨芽細胞が列を成し層板骨を形成するため、リモデリングが促進されたADRCs群で層板骨が早期から多く形成されたと考えるのが妥当である。

骨形成の促進を評価するパラメータとして骨形成速度がある¹⁷⁾。これは層板骨を形成する類骨面の長さ、一定期間に形成された層板骨の厚みを乗じて算出される量である。面積の等しい二重標識された新生骨と一重標識された新生骨があった場合、二重標識されたものの方が形成された骨量は大きく計算される。したがって、早期から層板骨を形成し二重標識面を多く有するADRCs群で骨形成速度が大きくなった。

以上、本研究の結果から、血管を多く含む結合組織が増生して破骨細胞による骨吸収が生じ、骨芽細胞による層板骨形成へとつながる一連のリモデリングの過程がADRCs群で促進されていた。このADRCsを臨床応用した場合、椎体再建部位の骨癒合が早期に確実に得られることで、装具の装着期間の短縮や、家庭や職場への早期復帰が可能となり、さらには骨癒合不全によるインプラントの折損といった術後合併症も減り、TESなど脊椎固定術後患者にとって大きな福音となることは間違いない。

【結 論】

ビーグル犬において、ADRCsを用いた第13胸椎TESの椎体再建を行い以下の結果を得た。

1. 自家骨移植では術後2週から4週の間層板骨が形成され始めていた。
2. ADRCs群では、自家骨単独群と比べて、術後2週の時点で高い割合で層板骨が形成されていた。
3. ADRCs移植によって組織学的に血管を多く含む結合組織が増加し破骨細胞による骨吸収が生じ、骨芽細胞による層板骨形成へとつながるリモデリングが促進された。

以上から、ADRCsには骨形成促進作用があり、TESにおける椎体再建において自家骨のリモデリングを促進し、骨癒合に至るまでの期間を短縮させる効果が期待できる。

【謝 辞】

稿を終えるにあたり、御指導、御高聞を賜りました恩師土屋弘行教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関し終始直接の御指導を賜りました村上英樹准教授、出村論講師に心から感謝致します。そして本実験の遂行に多大な御助言と御協力を戴きました金沢大学整形外科の諸先生方に深謝致します。さらに組織学・骨形態計測学的検討にあたり御協力を戴きました株式会社伊藤骨形態計測研究所の伊藤明美代表に感謝の意を表します。

【文 献】

- 1) Tomita K, Kawahara N, Baba H, Tsuchiya H, Nagata S, Toribatake Y. Total en bloc spondylectomy for solitary spinal metastases. *Int Orthop* 18 : 291-298, 1994
- 2) Tomita K, Kawahara N, Baba H, Tsuchiya H, Fujita T, Toribatake Y. Total en bloc spondylectomy. A new surgical technique for primary malignant vertebral tumors. *Spine* 22: 324-

333, 1997

- 3) Silber JS, Anderson DG, Daffner SD, Brislin BT, Leland JM, Hilibrand AS, Vaccaro AR, Albert TJ. Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 28: 134-139, 2003
- 4) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue : implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228, 2001
- 5) Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer (CAL) for cosmetic breast augmentation : supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthe Plast Surg* 32: 48-55, 2008
- 6) Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 52: 79-86, 2009
- 7) Nomura I, Watanabe K, Matsubara H, Hayashi K, Sugimoto N, Tsuchiya H. Uncultured autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation during distraction osteogenesis in rats. *Clin Orthop Relat Res* 472: 3798-3806, 2014
- 8) Cizek GR, Boyd LM. Imaging pitfalls of interbody spinal implants. *Spine* 25: 2633-2636, 2000
- 9) Abe Y, Takahata M, Ito M, Irie K, Abumi K, Minami A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model. *Bone* 41: 775-785, 2007
- 10) Huang B, Zou X, Li H, Xue Q, Bünger C. Short-term alendronate treatment does not maintain a residual effect on spinal fusion with interbody devices and bone graft after treatment withdrawal: an experimental study on spinal fusion in pigs. *Eur Spine J* 22: 287-295, 2013
- 11) 茂住宜弘. 骨形成蛋白質を用いた腫瘍脊椎骨全摘術後の椎体再建. *十全医会誌* 117: 130-138, 2008
- 12) Wilson SM, Goldwasser MS, Clark SG, Monaco E, Bionaz M, Hurley WL, Rodriguez-Zas S, Feng L, Dymon Z, Wheeler MB. Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine. *J Oral Maxillofac Surg* 70: 193-203, 2012
- 13) Schubert T, Xhema D, Vériter S, Schubert M, Behets C, Delloye C, Gianello P, Dufrane D. The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 32: 8880-8891, 2011
- 14) Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 61-66, 2009
- 15) Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 35: 413-417, 1996
- 16) 金谷文則, 佐藤栄, 棚原豊. 実験的脊椎椎体間骨移植の骨癒合過程: MRIおよび組織所見の比較. *琉球医学会誌* 16: 195-201, 1996
- 17) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610, 1987

Enhancement of bone formation with adipose-derived regenerative cells in large spinal defects Kei Inoue, Department of Orthopaedic surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640, Pediatrics. Juzen Med. Soc., **126**, 88 – 96 (2017)

Key words bone formation, adipose derived regenerative cells, total en bloc spondylectomy

Abstract

After total en bloc spondylectomy (TES) for complete resection of malignant spinal tumors, spinal reconstruction is performed for critical-sized bone defects using a titanium cage filled with bone graft. Reconstruction materials that promote bone healing are needed for strong initial fixation and biological bone healing. Meanwhile, regenerative medicine has evolved recently. Adipose-derived regenerative cells (ADRCs) are easily isolated in large amounts from autologous adipose tissue, safe to use, and simple to apply clinically. We examined whether ADRCs promote osteogenesis of bone graft inside a cage in a canine TES model. We used 12 female dogs with (average weight, 10.5 kg) aged 12 months. The dogs were divided into ADRC (n = 6) and control groups (n = 6). In the ADRC group, about 10 g of adipose tissue was harvested from the neck preoperatively. ADRCs were isolated using a previously reported method. ADRCs and an autograft with fibrin glue were packed into a titanium cage. In the control group, only the autograft with fibrin glue was packed into the cage. TES was performed in the 13th thoracic vertebra. For spinal fixation, pedicle screws were inserted (2 each) above and below the thoracic vertebra. The dogs were given calcein to label the mineralizing bone 9 and 2 days before killing them, and were killed at 2 weeks (3 dogs from each group) or 4 weeks after surgery (3 dogs from each group). Specimens were harvested, fixed in 70% ethanol, stained with Villanueva bone stain, and ground to thickness <20 μm through the cage's long axis. The bones were histomorphologically assessed by using fluorescence polarization microscopy. In all cases, the connective tissue expanded inside the cage from both ends toward the center. The ratio of the connective tissue volume to the total volume (CV/TV) at 2 and 4 weeks was higher in the ADRC group (control group: 27.5% and 65.5%, respectively; ADRC group: 58.3% and 86.6%, respectively). More blood vessels in the connective tissue were observed at 2 and 4 weeks in the ADRC group (ratio of the total length of blood vessels to field area: control group, 0.00294 and 0.00347, respectively; ADRC group: 0.00483 and 0.00680, respectively). The localized area adjacent to the vertebra at either end of the cage had bone formation. Lamellar bone was formed in the ADRC group, whereas almost all woven bone was formed in the control group 2 weeks postoperatively. The ratio of lamellar bone volume to new bone volume (LBV/NBV) increased in both groups 4 weeks after surgery (control group: from 7.9% to 47.5%, ADRC group: from 63.2% to 96.4%). Under fluorescent light, few depositions of calcein were observed in the control group, while diffuse deposition, which showed immature lamellar structure, was observed in the ADRC group 2 weeks after surgery. The orderly labeled line indicates the mature lamellar structure in both groups 4 weeks after surgery. The bone formation rate (BFR), calculated by using the parameter from the fluorescence labeled line, increased significantly in the ADRC group 4 weeks after surgery (control group: from 0.06 to 0.66, ADRC group: from 0.31 to 1.95). In general, bone healing of the autograft follows 4 processes: (1) vascular rich connective tissue extension, (2) resorption, (3) new bone formation, and (4) mineralization. Our results suggest ADRCs confer advantages in processes (1), (2), (3), and (4). Therefore, the use of ADRCs as materials of spinal reconstruction promotes early-stage bone formation of the autograft inside a cage.