

キーンベック病の新しい治療法の開発と  
その基礎的研究

2008

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

小川 健

筑波大学

博士（医学）学位論文

# 目次

第1章 序論	3
1-1. 本研究の背景	4
1-1-1. 骨壊死について	4
1-1-2. キーンベック病について	4
1-1-3. 骨髄血移植について	7
1-1-4. 低出力超音波療法について	9
1-2. 本研究の目的	11
第2章 骨壊死動物モデルによる基礎的研究	12
2-1. 骨壊死動物モデルの作製	13
2-1-1. 本モデル作製における背景	13
2-1-2. 対象および方法	13
2-1-3. 結果	14
2-1-4. 考察	15
2-1-5. 小括	16
2-2. 壊死骨に対する骨髄血移植の有効性の検討	17
2-2-1. 実験方法	17
2-2-2. 結果；肉眼的評価、組織学的評価	17
2-2-3. 考察	18
2-2-4. 小括	20
2-3. 壊死骨に対する低出力超音波の有効性の検討	21
2-3-1. 実験方法	21
2-3-2. 結果；肉眼的評価、組織学的評価	21
2-3-3. 考察	22
2-3-4. 小括	24

2-4. 本研究の限界と今後の課題	25
第3章 骨髄血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用したキーンベック病 の新しい治療法	26
3-1. 背景	27
3-2. 対象	27
3-3. 方法	27
3-4. 結果	28
3-5. 考察	29
3-6. 本治療法の適応と今後の課題	32
第4章 総括	33
4-1. 本研究の限界と今後の展望	34
4-2. 結論	37
図	38
表	60
謝辞	64
学会発表	65
引用文献	67
参考論文	

# 第 1 章

## 序論

## 1-1. 本研究の背景

### 1-1-1. 骨壊死について

特発性骨壊死は、全身のどの骨にでも発症しうるが、臨床的に問題となるのは、大腿骨頭や上腕骨頭のような骨端が広範囲に障害されるタイプ(骨端骨壊死)とキーンベック病を代表とする手根骨や足根骨などの小骨に発症するタイプ(小骨骨壊死)に分けられる。その発症機序は、骨端骨壊死がステロイドやアルコール、外傷などによるのに対し、小骨骨壊死は、慢性外傷や反復される機械的刺激による血流障害と考えられている(1, 2)。手根骨などの小骨骨壊死を発症する解剖学的特徴としては、周囲を関節軟骨に囲まれており、かつ可動性が大きいいため、血流の進入する部位が靭帯付着部に限られていることである。その血流が障害されると、骨幹端部と海綿骨続きである大腿骨頭壊死とは異なり、血流の進入経路が乏しいため、治療に対する考え方や戦略も多少異なる。すなわち、小骨骨壊死では骨端骨壊死のような周囲の海綿骨の骨髄血細胞は乏しく、特に血流進入部に解剖学的な障害があると、より治癒が困難な骨壊死が発症しうる。

特発性骨壊死の動物実験モデルとして大腿骨頭壊死症に関しては、股関節脱臼などによる手術的阻血(3)、液体窒素による凍結(4)、副腎皮質ステロイドなどの薬物投与(5, 6)、自然壊死発症動物の使用(7, 8)など多くの報告があるが、小骨骨壊死に関しては少ない(9, 10)。

### 1-1-2. キーンベック病について

手根骨の1つである月状骨が外傷後もしくは特発的に壊死してしまう月状骨軟化症は、1910年、オーストリアの放射線科医である Robert Kienböck により最初に報告され(11, 12)、現在では広くキーンベック病と呼ばれている。本邦では2.5%の発症者率であるとの報告があり(13)、また、成・壮年期の男性で重労働者、マニュアルワーカーに多く、日常生活に重要な運動器である手関節

および手部に大きな機能障害を残す難治疾患である。月状骨の解剖学的特性は、手根骨の中央に位置し、周囲の大部分を軟骨と皮質骨に囲まれた骨で、血管の流入は手関節掌側と背側の靭帯付着部に限られるということである(14, 15)。そのため一度壊死に陥った月状骨組織は自発的再生が得られにくく、圧潰が起こり、手根骨全体の並びが崩れるため、手関節機能に大きく影響を与える。その原因や病態については、解剖学的な血流障害(16)や骨折の遷延治癒状態(11, 12)、反復微小外力に伴う月状骨内圧の上昇(17)、橈尺骨長不均衡による月状骨への応力集中(18)等、諸説が提唱されているが、いまだ未解明な部分も残され結論に至らない。また、進行性の疾患であり、単純 X 線においてその病期が分類されている(Lichtman 分類)。初期の stage I では臨床的に疼痛を認めても、特に変化が見られない。stage II になると月状骨の変形はないが骨萎縮または骨硬化像が出現してくる。さらに stage III では月状骨の圧潰または分節化が起こり、stage IV では変形性関節症に進行していく(図 1, 2)。さらに stage III は、他の手根骨の配列に異常がない III a と、手根骨の配列異常をきたす III b に分けられている(19)。

治療の目的は、この圧潰の防止と血流の回復であり、保存療法には限界がある。自然経過例とギプスによる保存療法例の比較について Kristensen らは、非治療群で 77%、ギプス固定群は 83%で疼痛が消失もしくは重労働でのみ出現したと述べている。しかし、単純 X 線所見に関しては、月状骨の圧潰が全例で進行し、関節症性変化が 67%に出現したと報告している(20)。また、藤沢らは、20 例の保存または放置例を平均 15 年 8 ヶ月で評価し、血行再開は 20%で認めるものの、手関節の OA は必発であり、運動時痛が 60%で残ったと報告している(21)。このように、疼痛が軽減する症例があるものの、保存療法では月状骨圧潰、変形性関節症への進行を防ぐことは困難であると考えられている。一方、現在行われている手術的治療は、①月状骨の再血行化、②月状骨への応力負荷の軽減、③月状骨の摘出・置換、④進行例に対する salvage 手術、の 4 つに大

別される。術式の選択は、基本的には単純 X 線所見による病期分類(Lichtman 分類)に基づく。stage I, II に対しては、①を目的とした骨穿孔術や、②を目的とした創外固定が、比較的low侵襲の手術治療として試みられてきた。穿孔術の成績について、井上らは、疼痛は一時的に軽減するが再発し、機能的改善も得られないため穿孔術は良くないと結論づけている(22)。国下らは、一定の除痛効果はあるが単純 X 線上月状骨の圧潰は進行し、変形性関節症性変化も進行したと述べている(23)。また、創外固定単独での成績について、古月らは、stage I に適応があるが、stage II では一時的に改善するも再発したと述べている(24)。このように比較的low侵襲の手術治療では、一時的な除痛効果はあるものの、効果は十分でなく圧潰の進行と再発が問題である。一方、stage I~III に対して、①を目的とした血管束移植(25, 26)、血管柄付き骨移植(27, 28)が、②を目的とした橈骨骨切り術(29, 30)が行われ、どれも概ね良好な臨床成績が得られ、特に橈骨骨切り術は現在も広く行われている。しかし、どの方法も侵襲性が高く、手技的にも高度な技術を要するという欠点がある。また、stage III b や stage IV に対しては、月状骨の温存は困難であり、③を目的とした手根骨間固定術(31)、腱球移植術(32-34)、人工月状骨挿入術(19, 35)が、さらに進行し、病変が月状骨以外の手根骨や橈骨にまで及ぶ例に対しては、④を目的とした近位手根列切除(36-38)といった術式が行われている。

現在では MRI の普及により、比較的早期にキーンバック病と診断されることが多くなってきた。一般に骨壊死に伴う MRI 所見は壊死の進行とともに変化する。正常の月状骨の髄内は大半が脂肪髄であり、それを反映し、T1 強調像で高信号、T2 強調像で中間信号を呈する。壊死の初期には骨髓浮腫を反映し、T1 強調像で低信号、T2 強調像で高信号となり、壊死に陥ると T1 強調像、T2 強調像とも低信号に、壊死が進行し硬化や分節化が生じるとさらに信号強度が低下するといわれている(39, 40)。しかし、キーンバック病術後の MRI 所見を詳細に評価した報告は少なく、その治療成績と MRI での信号回復所見との相関は得



られていない。松木らは、橈骨骨切り術後、T1 強調像, T2 強調像ともに信号輝度が改善した症例で治療成績が良好な傾向にあったと報告しが、T1 強調像で信号が回復した、つまり脂肪髄の回復を認めた症例は 16 例中 5 例(31%)にとどまっている(40)。よって、今後のキーンベック病治療に期待されることは、より早期に診断し、既存の手術治療に匹敵する治療成績で、かつ壊死した月状骨の再生が得られる低侵襲な方法といえる。

### 1-1-3. 骨髄血移植について

近年、再生医療の細胞源として“幹細胞”の有用性が数多く報告されている。幹細胞の定義は、①自己複製能、②多分化能、③障害された組織を再生できる能力、の 3 つの能力を持つことである(41)。幹細胞には胚性幹細胞(ES 細胞)と組織幹細胞(体性幹細胞)が存在する。骨髄由来の組織幹細胞に関する研究の歴史としては、1974 年に Friedenstein がコロニーを形成する線維芽細胞として報告した研究(42)以来、骨髄由来の自己増殖能を有する細胞の存在が注目されることとなった。1989 年に Ohgushi らは、ラット皮下にヒドロキシアパタイトブロックを挿入し、そこに骨髄由来の接着細胞を移植すると骨軟骨組織が形成されたと報告した(43)。その後 1999 年 Pittenger により単一コロニー由来の細胞から骨・軟骨・脂肪への分化能が証明された(44)。

1989 年 Connolly らがウサギの腸骨から骨髄血を採取し単純遠心分離で濃縮したものを、チャンバーにつめ、腹腔、偽関節部に挿入したところ十分に骨新生を起こし、従来 of 海綿骨移植より局所での定着性がよく有用であったと報告した(45)。その後、ヒト脛骨偽関節部に経皮的に骨髄血を注入し、良好な骨癒合が得られた報告が散見されるようになった(46, 47)。Healey も、同様の臨床報告をし、骨髄血は骨形成、骨折治癒に必要な osteoprogenitor cells の起源だと述べた(48)。

一方、Asahara らは、成人末梢血中に血管内皮細胞の特徴を有し、培養に

より血管様構造を構築する細胞 (Endothelial Progenitor cell: EPC) が存在すること、およびこの EPC により血管発生型の血管新生が生体内で起こっていることを明らかにした (49)。また、EPC は血液中の CD34 陽性細胞分画に多く含まれると考えられているが、末梢血中の CD34 陽性幹細胞は 0.2% 程度 (骨髄の 1/10) しか含まれていない (50)。このため、細胞移植に用いる自己 EPC の起源として骨髄が注目された。室原らは骨髄血には血管新生作用のみならず血管形成作用もあることを示し、虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症の治療に応用した (51)。2000 年より最初に日本で始められた重症末梢血管疾患に対する自家骨髄細胞移植の効果は Tateishi-Yuyama E らが Lancet に報告しており、有効性と安全性が確認されている (52)。移植された細胞の一部が血管内皮細胞に分化するのか、あるいは移植された細胞が崩壊する際にサイトカインを放出して 2 次的に血管内皮細胞の動員をもたらすことによるものなのかは明らかではない。また多くの症例で下肢血管造影による術前後の改善は認められない。細胞移植により新生された血管は非常に細径であり、通常の血管造影では確認できない (53)。

骨壊死に対する骨髄血移植は、1997 年 Hernigou が大腿骨頭壊死に対する有効性を最初に報告した (54)。その後 Gangji らも同様の報告をしている (55)。我々のグループでも 2002 年より大腿骨頭壊死症に対する骨髄血移植を行っており、その成績や移植骨髄血の解析、細胞分離方法などについて報告してきた (56-58)。本法は、培養を介さないことから比較的簡便で、感染の危険が少なく、壊死組織の再生が得られるという利点を有している。一方、キーンベック病治療に対して骨髄血移植を用いた報告は、動物実験において散見される。Huang らは、ウサギの月状骨を摘出した位置に培養骨髄細胞を担体に含ませ移植した実験において、月状骨様の組織再生が起こったことを報告した (59)。Ikeguchi らは、イヌの舟状月状骨偽関節モデル (10) を用い、血管柄付き骨移植に加え、培養骨髄細胞を移植することで、より良好な骨再生が起こったことを報告した (60)。これらはすべて、培養骨髄血細胞を用いたものであり、また骨髄血移植

単独での効果を確認した報告はない。そして、大腿骨頭壊死で臨床的に行われているドリリングと自家骨髄血移植による治療が、骨端骨壊死ではなく小骨骨壊死においても有用であるか否かの検討も行われていない。

#### 1-1-4. 低出力超音波療法について

超音波は一種の機械的刺激であり、非侵襲的に生体局所に刺激を与えることが可能であり、骨折治療への応用は古くに試みがあった。1983年、ブラジルの Duarte らがウサギの骨切りモデルを用いて種々の条件を検討した結果、極めて出力の弱い超音波をパルス状にして与えれば骨折治癒過程を促進することを発見し、同年には臨床において 27 例に使用したところ、正常な骨折修復過程が加速され、また難治性骨折の治癒も誘導し得ることを報告した(61)。その後、Heckman らは脛骨骨幹部の新鮮骨折に対して(62)、Kristiansen らは橈骨遠位部新鮮骨折を対象として多施設予見的無作為二重盲検プラセボ比較臨床試験(DBT)を行い、骨癒合期間を 40%短縮し、遷延癒合を抑制することを報告した(63)。難治性骨折に対する DBT は国内外のいずれにおいても実施されていないが、前向き臨床試験において癒合成功率は 80~100%と、概ね良好な結果が報告されている(64-67)。現在使用されている LIPUS の照射条件は、周波数 1.5MHz、繰り返し周波数 1.0kHz、超音波強度 30mW/cm<sup>2</sup>、パルス幅 200 $\mu$ s、照射時間 20 分/日であり、この条件のみが、多数の動物実験および DBT にて骨折治癒促進に有効性が示され、安全性が確保された唯一のものである。日本では、1998 年より難治性骨折にのみ使用が可能となり、水野らによりその多施設臨床試験の結果が報告された。その骨癒合成功率は、遷延治癒骨折 85% (46/54 骨折)、偽関節 55% (24/44 骨折)であった(68)。我々が行った症例数において日本最大の LIPUS 市販後使用成績調査でも、その骨癒合成功率は遷延治癒骨折 76.2% (109/143 骨折)、偽関節 60.6% (20/33 骨折)とほぼ同様の結果であった(69)。

Azuma らは、骨折治癒過程を 3 期(炎症反応から骨膜性骨化期、軟骨形成期、

内軟骨性骨化から骨改変期)に分け、ラット大腿骨骨折に対する LIPUS の効果を比較検討したが、照射時期に関係なく骨折治癒を促進したことから、これらのすべての骨折治癒過程で促進効果があることが考えられた(70)。

細胞、分子レベルでの研究も現在盛んに行われている。骨芽細胞に対する LIPUS の作用は、1999 年 Kokubu らが最初に報告し、骨芽細胞の COX-2(Cyclooxygenase-2)産生を刺激し、内因性のプロスタグランジン E2 産生を誘導したと述べた(71)。COX-2 産生は、骨芽細胞分化早期の反応であるが、最も早期の反応と考えられる Runx2(Runt-related gene 2)産生にも LIPUS 照射が刺激しているとの報告もある(62-75)。また、オステオポンチン、オステオネクチン、さらには成熟骨芽細胞が産生するオステオカルシンなどの骨基質蛋白産生をも刺激し、骨芽細胞の分化を広く促進させる効果をもつと考えられる(76)。LIPUS 照射は、骨形成を促進するといわれる NO 産生も促進し、その際、インテグリンを介して、LIPUS の機械的刺激を細胞内シグナルへと伝達していることが報告されている(77)。

骨壊死に対する LIPUS の効果は不明である。特発性膝骨壊死に対して使用した報告では、疾患発症の早期に LIPUS を使用すれば、臨床症状を改善し、陥没の進行を抑制することができる可能性を示唆した(78)。中尾らは、キーンベック病(Lichtman 分類 stage II, III a, III b)の 8 例に保存療法として LIPUS を使用したが、臨床的評価および単純 X 線上において病期の進行を好転させる効果は認めなかったと報告した(79)。特に月状骨のような小骨では、血管の流入も限られ、長管骨のような豊富な骨髄との連続性もないため、骨壊死に陥った際、LIPUS の機械的刺激に反応する細胞が存在しない。よって、LIPUS 単独では、骨壊死再生効果は少ないと考えられる。

## 1-2. 本研究の目的

我々のグループでは、stage II, IIIのキーンベック病に対して、骨髄血移植・LIPUS・創外固定を併用した治療を試み、その短期成績を報告してきた(80, 81)。この治療法をさらに洗練させ、広めていくためには、動物を用いた基礎的な研究が不可欠である。しかし、キーンベック病はヒト特有の疾患であり、病態を忠実に再現した動物モデルが存在しない。本研究の目的は、以下の3つである。

- ①月状骨のように血流が入りにくい小骨での重度の骨壊死で、かつ周囲の劣悪な血流状況の動物モデルを作製する。
- ②そのモデルを使用し、自家骨髄血移植やLIPUSの効果を観察する。
- ③キーンベック病の臨床例を広く検討することにより、診断や病態を考えた上で、骨髄血移植・LIPUS・創外固定を併用した治療の適応と限界を検討する。

## 第 2 章

### 骨壊死動物モデルによる基礎的研究

## 2-1. 骨壊死動物モデルの作製

### 2-1-1. 本モデル作製における背景

小原らは、ウサギの第4足根骨を用い、液体窒素に浸して壊死させた後、同ウサギの膝関節内に移植するモデルを開発した(82)。ウサギ第4足根骨はヒト立方骨と同様の解剖学的位置、すなわち足根部前外側に存在し、約1cm<sup>3</sup>の立方形に近い形をしている(図3)。概ね、近位と遠位、内側の3面が軟骨面であり、上面と下面、外側の3面が皮質骨面である。本研究では、血流が入りにくい小骨での重度の骨壊死で、さらにドリリングや骨髄血移植の効果を観察しやすい動物モデルを作製することが目的の一つである。そのため、小原らのモデルを参考に、ウサギの第4足根骨を“関節内”ではなく、力学的負荷がかかりにくく、血管の誘導が期待できる“皮下”に移植するモデルを試みることにした。

### 2-1-2. 対象および方法

12週齢日本白色家兎15羽の両側の第4足根骨を摘出し、液体窒素に5分間浸すことで壊死させた(82)。その後、常温の生理食塩水内で解凍し、体幹背部皮下に移植した。手術は、ケタミン(10-20 mg/kg)とキシラジン(8-12 mg/kg)の混合液を筋注麻酔し行った。2, 4, 8, 12, 20週で3羽ずつ屠殺し、組織学的評価を行った。新生骨評価のため、骨蛍光標識としてカルセインを用い、屠殺2週前と2日前に皮下投与を行った(2, 4週群は屠殺1週前と2日前)。摘出検体は、中央部で2分割し、片方を脱灰組織標本、もう一方を非脱灰硬組織標本とした。脱灰組織は、10%中性ホルマリン固定、EDTA溶液にて脱灰、パラフィン包埋し、厚さ5 $\mu$ mの薄切標本作製し、HE染色を行った。硬組織標本は、70%、4 $^{\circ}$ Cアルコールにて固定後、GMA樹脂包埋にて作製し、トルイジンブルー染色、ALP染色、TRAP染色を行い、検体中央部のスライスで骨形態計測を行った。計測方法は、日本骨形態計測学会が提唱する方法に準じて行い

(83, 84)、以下の 3 項目を検討した。骨石灰化面は、トルイジンブルー染色の暗視野にてカルセイン標識面の長さを計測し、明視野の骨梁表面の長さで除して算出し、100 倍、5 視野の平均とした (Labeled Surface/ Bone Surface; Lb. S/BS (%))。骨芽細胞面は ALP 染色陽性細胞の存在する骨梁面の長さを計測し、全骨梁表面長で除して算出 (Osteoblast Surface/ Bone Surface; Ob. S/BS (%))。破骨細胞数は TRAP 染色陽性の細胞を全視野でカウントした (Number of Osteoclast; N. Oc. (n))。統計は two factor ANOVA Tukey-Kramer Post-hoc test を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

### 2-1-3. 結果

#### <肉眼的評価>

肉眼的には、20 週を通して白色調で軟骨面や皮質骨面は吸収されることなく維持され、原型を留めていた。また、そこを通じた骨内への血管侵入も認めなかった (図 4a, b)。

#### <組織学的評価>

HE 染色標本において、2 週では骨細胞の核は一部残存していたが、4 週で完全に empty lacunae となり、脂肪髄も消失した。8, 12 週では、軟骨は保たれているものの、皮質骨は部分的に骨吸収を受け、欠損部も認めた。20 週では、軟骨面は保たれているものの菲薄化し、皮質骨の骨吸収も進み、肉芽組織や血管侵入がわずかに認められたが、添加骨形成や脂肪髄の出現は認めず、empty lacunae の存在も持続していた (図 4c, d、図 5)。硬組織標本における骨形態計測でも、骨石灰化面、骨芽細胞面、破骨細胞数ともに 8 週でわずかな増加を認めるも、以降 20 週にかけて増加することはなかった。本実験の計測結果は、後述の実験におけるコントロール群として示す (図 7~10, 12、表 1)。



#### 2-1-4. 考察

手根骨の骨壊死モデルの報告は少ない。Aspenberg はサルの上腕骨を摘出し、再挿入することでキーンベック病モデルの作製を試みたが、1年後には上腕骨はわずかに圧潰するも再血行化を認め、新生骨形成も出現していたと報告した(9)。Sunagawa らは、イヌの上腕骨を液体窒素で壊死させた後、再挿入するモデルを作製している。これを舟状骨偽関節モデルとして、血管柄付き骨移植の有効性を示した(10)。今回我々は、手根骨のような小骨で、ドリリングや骨髓血移植の有効性を評価しやすい骨壊死モデルを作製した。生体と連続性がある状態では、完全な壊死骨を作ることは難しい。また、完全に摘出した骨を関節内に戻すモデルでは、力学的負荷による影響が加わっているため、ドリリングや骨髓血移植による効果を観察し難い。そこで完全に壊死させた後、皮下に移植することを試みた。体幹背部皮下移植は、大串らが行ったラットにハイドロキシアパタイトブロックを皮下移植し、培養骨髓血幹細胞を移植したモデル(43)に倣い、皮下を鈍的に剥離しスペースを作り、第4足根骨を挿入した。

本モデルで組織学的に観察された4週で完全に empty lacunae となり脂肪髄も消失するという変化は、Malizos らのイヌ大腿骨頭壊死モデル(4)や小原らのウサギ関節内骨壊死モデル(82)と同様の変化である。Malizos らは、イヌ大腿骨頭壊死作製後24週では、壊死骨の残存は10%以下と報告した(4)。小原らは、ウサギ関節内骨壊死モデル作製後20週までMRIの脂肪信号比を計測し、経時的に増加したと報告している(82)。我々のモデルにおいて、20週では軟骨部は菲薄化し、皮質骨は部分的に骨吸収を受け欠損部も認め、同部より肉芽組織や血管侵入がわずかに認められた。しかし、骨形態計測上は、8週で骨石灰化面、骨芽細胞面がわずかに増加したが、以後20週にかけて骨石灰化面、骨芽細胞面ともに増加することはなく、脱灰組織(HE染色)においても、脂肪髄の回復や添加骨形成も認めず、empty lacunae の存在も20週まで持続していた。髄内に線維性組織が増加していたため、さらに長期の経過を見れば、骨吸収が進行

し、新生骨の増加が見られる可能性もあるが、ドリリングや骨髄血移植の効果を観察するためのモデルとしては、本モデルが有効であると考えられた。

#### 2-1-5. 小括

ウサギの第4足根骨を用い、液体窒素浸漬後、皮下移植する本モデルは、小骨の骨壊死モデルとして有効であり、少なくとも20週までは組織学的に骨壊死の状態が持続している。

## 2-2. 壊死骨に対する骨髓血移植の有効性の検討

### 2-2-1. 実験方法

12 週齢日本白色家兎 60 羽の両側の第 4 足根骨を用い、液体窒素に 5 分間浸した後、3 面ある皮質骨面に 1 箇所ずつ 3 箇所に直系 2mm のドリリングのみを行うドリル群(図 6)、そのドリル孔から末梢血移植を行う末梢血移植群、そのドリル孔から骨髓血移植を行う骨髓血移植群の 3 群に分け、それぞれ 2, 4, 8, 12, 20 週で評価した。移植末梢血は同家兎の左右耳介動脈より 3ml ずつ採取し、移植骨髓血は同家兎の左右腸骨より 3ml ずつ採取し、皮下に挿入した第 4 足根骨の 1 つのドリル孔から全量注入した。壊死骨内には 0.5ml ほどしか留まっていなかったため、あらかじめ 1 つのドリル孔に 18G 針を刺入した状態で閉創しておき、その 18G 針より骨髓血または末梢血を注入した際、壊死骨外に溢れた分は皮下に pouch 状に貯留した状態とし、18G 針を引き抜くようにした。

新生骨評価のため、骨蛍光標識としてカルセインを用い、屠殺 2 週前と 2 日前に皮下投与を行った。硬組織標本は、70%, 4°C アルコールにて固定後、GMA 樹脂包埋にて作製し、トルイジンブルー染色、ALP 染色、TRAP 染色を行い、検体中央部のスライスで骨形態計測を行った。コントロール群として前項の液体窒素に浸漬したのみのモデルを用い、4 群間を 2, 4, 8, 12, 20 週それぞれで比較検討した。統計は one factor ANOVA Tukey-Kramer Post-hoc test を用い、p 値 0.05 未満を有意とした。

### 2-2-2. 結果

#### <肉眼的評価>

ドリル群は、12 週までは白色調で軟骨面や皮質骨面は維持され、原型を留めていたが、20 週では、わずかに縮小化したもの、骨硬化を認めるもの、12 週までと同様なものと一定の所見ではなかった。末梢血移植群は、2 週では移植骨は血腫に包まれたようになっていたが、4 週には血腫は吸収され、血管の増

生をわずかに認めた。8週以降は、コントロール群、ドリル群と同様であった。一方、骨髄血移植群では、2週より移植骨周辺の血管増生が多く、4週で全体的に赤色調になり、8週で軟骨面の部分的な不整を認め、原型がわずかに崩れてきていた。12週では、軟骨面は不整で全体的に原形を留めず、軟化し、扁平化していた。20週では、移植骨周囲の血管増生は少なくなり、灰白色調に扁平化しているも、弾性の増強を認めた(図7)。

#### 〈組織学的評価〉

2週では、4群とも骨蛍光標識はほとんど認められなかったが、4, 8, 12, 20週では、骨髄血移植群でのみカルセインで標識される新生骨が観察できた(図8)。骨形態計測において、骨石灰化面は、4, 8, 12, 20週で骨髄血移植群が、他の3群に対し、有意に多かった。コントロール群、ドリル群、末梢血移植群の間には有意差は認めなかった(表1、図8, 9)。骨芽細胞面と破骨細胞数は、4, 8, 12週と骨髄血移植群が他の3群に対して、有意に多く存在していたが、20週では有意差はなくなった(表1、図9~13)。

#### 2-2-3. 考察

本研究においては、ドリリングのみを行った場合、ドリル孔を通じての細胞や肉芽組織の進入は認めたものの、20週まで骨新生はほぼ出現しなかった(表1)。骨穿孔による効果は、血管や細胞進入の経路を作り、骨破砕によって局所のBMP放出を促す効果もあると言われている(86, 87)。しかし、本モデルのドリル群の結果が示すように壊死部分に骨前駆細胞が供給されない状態では、血管の進入を認めても、骨形成や骨吸収は生じない。

末梢血内には、血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)やVEGF(vascular endothelial growth factor)が存在し、その血管新生作用が証明され(88)、四肢虚血性疾患に対し、臨床応用した報告が散見される(89)。し

かし、末梢血に含まれる EPC は、骨髄と比較し非常に少なく、臨床の場においては、G-CSF(granulocyte colony-stimulating factor)を事前投与し、EPC 数を確保する試みもされている。また、EPC は CD34 および CD133 や VEGF を共発現しており、これらの因子が血管新生を惹起しているとも考えられており、効果的な EPC 数の検討とともに今後の研究課題とされている。本実験の末梢血移植群は、骨形成にかかわる評価項目において、コントロール群やドリル群と有意な差は認めなかった。また、肉眼的に血管の増生が特に多いということもなく、組織学的所見においても顕著に血管が多いということはない。よって、末梢血に含まれる血小板やサイトカインなどが存在しても、骨前駆細胞が存在しなければ、骨新生は起こらないと考えられる。しかし、本実験では、単核細胞層の分離や培養は行っておらず、全血を 3ml のみ直接移植しているため、EPC が移植した末梢血内に存在しなかった可能性も高く、現時点では結論に至らない。

これに対し、骨髄血移植群は、4 週以降の継続した骨形成と骨吸収が観察でき、今回観察した 20 週まで続いていた。壊死部分に骨前駆細胞が供給される状態を作り出し、そこに血管が誘導された結果と考えられる。骨髄血移植の骨再生に対する効果は、骨前駆細胞の供給以外にも、移植細胞によるサイトカインや成長因子産生、血小板含有の成長因子などによる複合的作用の結果と考えられている(57, 90)。すなわち、移植する間葉系幹細胞数と骨新生効果に関しては、相反する意見がある。Connolly らは、偽関節に対し、ドリリングに加え自家骨髄血を注入した研究において、採取した骨髄血を遠心分離にて単核細胞層のみを分離したものとしなもので、その骨癒合に与える効果に有意な差はなかったと述べている(46)。一方、大串らは、HA ブロックをラットの背中に皮下挿入し、その周囲に培養した骨髄血幹細胞を移植した。移植細胞数が多いほど良好な骨形成を生じ、少なれば骨形成は生じなかったと報告している(43)。本研究では、濃縮や培養を加えていない骨髄血を直接、3ml 程移植したため、

間葉系幹細胞数は、ごく少数である(44)。本モデルで利用した第4足根骨は自家骨であり、HAブロックのように骨形成の足場となるだけでなく、それ自体が骨吸収されるという生体活性を有している。さらに骨髓血中に含まれる間葉系幹細胞以外のサイトカイン、血小板等との相互作用が加わることで、良好な骨形成と骨吸収が生じたと考えられる。

さらに、12週では骨が扁平化し軟化が出現していたが、これは、遊離皮質骨移植時に見られるような、初期の再生過程で起こる骨吸収に偏った high turnover が原因と考える。Ennekingらは、イヌの部分腓骨移植実験において、6週から6ヶ月までは移植骨の強度が低下し、約1年で正常レベルに回復したと報告している(91)。我々の結果では、8週までは原型を保っていた壊死骨が、12週の時点では扁平化していたことから、8~12週で壊死骨の強度が低下したと言える。20週では、壊死骨の変形が進行することはない、ある程度扁平化した状態で形態を維持していた。本実験では、骨破断強度等は測定しておらず、20週時点で骨強度が回復しているかは証明できず、骨強度の回復していく期間については今後の研究課題である。

#### 2-2-4. 小括

血流が入りにくい小骨での重度の骨壊死モデルで、ドリリング+骨髓血移植の骨再生効果を確認した。骨髓血移植は本モデルでの骨再生には必須である。

## 2-3. 壊死骨に対する低出力超音波の有効性の検討

### 2-3-1. 実験方法

#### [実験 1]

12 週齢日本白色家兎 18 羽の両側の第 4 足根骨を用い、第 2 章(2-2)のごとく壊死モデルを作製し、コントロール群、ドリル群、骨髓血移植群を各 6 羽ずつとした。第 4 足根骨を背部皮下に挿入する際は、左右離れた位置になるよう注意を払った。すべてのウサギに対し、右側のみ LIPUS を照射した。照射時は、ミダゾラム(0.3mg/kg)とメデトミジン(0.03mg/kg)の混合液を筋注麻酔し鎮静させた。その照射方法は、プローブ固定用のベルトを体幹に巻き、プローブに専用ゼリーを塗り、壊死骨直上にセットし、ヒトで使用するときと同様にした。照射条件も、周波数 1.5MHz、繰り返し周波数 1.0kHz、超音波強度 30mW/cm<sup>2</sup>、パルス幅 200  $\mu$ s、1 日 20 分とヒトに使用されているものと同じものを使用し、週 6 日間で 8 週間継続した。

組織学的評価は第 2 章(2-2)に準じて行った。統計は、各群において LIPUS 照射群と非照射群間については、t 検定を用いて、p 値 0.05 未満を有意とした。

#### [実験 2]

12 週齢日本白色家兎 12 羽を用いて、前述と同様の骨壊死モデルにおいて骨髓血移植群のみを作製し、LIPUS の照射期間を 4, 12 週間とし、6 羽ずつ行った。LIPUS 照射群と非照射群間を Student's t-test を用いて統計処理し、p 値 0.05 未満を有意とした。

### 2-3-2. 結果

#### [実験 1]

<肉眼的評価> 3 群とも LIPUS 照射群と非照射群の間に、肉眼的な差異は認めなかった。コントロール群、ドリル群は、共に周囲は被膜に被われ、わずか

な血管増生を認め、原型は維持されていた。骨髄血移植群では、LIPUS 照射群と非照射群とも壊死骨が扁平化するように変形し、壊死骨に連続するように異所性骨化を認めるものもあった(図 14)。

〈組織学的評価〉 コントロール群、ドリル群、骨髄血移植群の 3 群間の差は、第 4 章と同様で、骨形成面、骨芽細胞面、破骨細胞数ともに骨髄血移植群で有意に高く、コントロール群、ドリル群の間に差はなく、この 2 群は LIPUS 照射群と非照射群の間にも有意な差を認めなかった。骨髄血移植群では、骨石灰化面が LIPUS 照射群で有意に高かった( $p=0.049$ )が、骨芽細胞面、破骨細胞数は LIPUS 照射群で非照射群より高い傾向にあるが統計学的には有意差は認めなかった( $p=0.31$ ,  $p=0.17$ ) (図 15、表 2)。

## [実験 2]

〈肉眼的評価〉 LIPUS 照射群と非照射群で、明らかな違いは認めなかった。壊死骨の周囲の血管増生は少ないものの、皮下から壊死骨周囲の被膜に向かう比較的直径の太い数本の血管が存在していた。両群とも壊死骨自体はわずかに潰れた形で、形態を保っていた(図 16)。

〈組織学的評価〉 両群とも、良好な骨新生を認め、12 週では、内部は線維性組織とともに脂肪髄も存在した。皮質骨面は部分的に骨吸収され、軟骨面も一部に吸収像を認めたが、血管や組織進入の隔壁となっていた(図 17)。4 週ではカルセインにて二重される領域はなかったが、12 週では二重染色される領域も多く、骨形成が繰り返されていることが分かる(図 18)。骨形態計測上は、LIPUS 照射群と非照射群間に有意差はなかった。しかし、4 週では実測値にほとんど差がなかった( $p=0.41$ ,  $p=0.69$ ,  $p=0.91$ )のに対し、12 週では有意差はないものの、骨石灰化面、骨芽細胞面、破骨細胞数すべてにおいて LIPUS 照射群が優る傾向にあった( $p=0.47$ ,  $p=0.35$ ,  $p=0.16$ ) (表 2)。



### 2-3-3. 考察

難治性骨折に対する LIPUS の効果は、一旦骨癒合への細胞反応が停止した状態（いわゆる偽関節）よりは、治癒過程が停滞している状態（遷延治癒）の方が得られやすいと推察されている(92)。我々が行った LIPUS 使用状況についての多施設臨床試験においても、遷延癒合骨折に対し、より早期から LIPUS を使用した方が、明らかに良好な骨癒合が得られていた(69)。壊死骨は細胞反応が完全に停止した状態であり、特に月状骨のような小骨では、血管の流入も限られ、長管骨のような豊富な骨髄との連続性もないため、LIPUS の機械的刺激に反応する細胞が存在しない。よって、LIPUS 単独では、骨壊死再生効果は期待出来ないと考えられる。本実験 1 において、コントロール群では、8 週間の LIPUS 照射に全く反応を示さず、この仮説を裏づける結果となった。また細胞進入の経路を作製したドリル群においても同様で、LIPUS の機械的刺激に反応する細胞が存在しなければ、骨形成や骨吸収も促進することはない。一方、骨髄血移植群は、骨再生の起源となる細胞が存在している状態であり、LIPUS による効果が期待できる。LIPUS 刺激は、骨芽細胞の分化を促進させるが、その増殖効果は確認されていない。また、破骨細胞に与える影響については、相反する意見がある。一般に、骨芽細胞は骨形成のみならず、破骨細胞の分化を制御することにより骨吸収にも関与する。成熟した骨芽細胞に LIPUS を照射すると、破骨細胞を誘導する RANKL(receptor activator NF $\kappa$  B ligand)の産生刺激効果が認められるとする報告(93)の一方で、RANKL は消滅するという報告(94)もあり、LIPUS が破骨細胞に対してどのような影響を及ぼしているかは、結論に至っていない。本実験においては、4 週では骨形態計測上の差はほとんど認めなかったが、8 週間の LIPUS 照射群で、骨石灰化面は有意に高く、骨芽細胞面、破骨細胞数も有意差はないものの高い値を示した。また、12 週間の LIPUS 照射でも、骨石灰化面の有意差はなくなったものの、すべての評価項目において LIPUS 照射群で高い値を示していた。Greizal(76)が述べた LIPUS 刺激

は、骨芽細胞の分化を促進させるがその増殖効果は認めないという理論を支持すれば、本実験結果は、LIPUS 刺激が骨芽細胞の増殖は促さないため、骨芽細胞面の増加がなく、分化を促進したため骨石灰化面の増加が 8 週では顕著であったと考えられる。そして、骨芽細胞分化に与える影響は、より未分化な細胞の多い早期(4 週)から持続的(12 週)に続いているという結果は、Azuma ら(70)の述べる LIPUS は骨折のすべての治癒過程において有効であるという結果を支持するものと考ええる。前項の結果から壊死骨に骨髄血を移植することで、8 週から 12 週にかけて軟化が出現し、骨形成と骨吸収のパラメーターも高値を示したが、20 週では特に骨吸収のパラメーターが低下しており、細胞の分化・増殖といった活動性が停滞したと考えられる。本項の実験においては、細胞の活動性が停滞するという変化が、8 週から 12 週にかけて出現しており、LIPUS 刺激が細胞反応を活性化させ、骨再生過程が早まったため、12 週から 20 週にかけての変化が前倒しされ出現したとも考えられる。

Saito らは、セラミック人工骨(beta-tricalcium phosphate)上で培養した未分化間葉系細胞に、LIPUS 刺激を加えると、骨型架橋パターンが早期に誘導され、生理的架橋の数も増加させることを報告している(95)。さらに、ヒト再建膝十字靭帯由来細胞に LIPUS 刺激を加えると、靭帯特有の架橋パターンを変えることなく生理的架橋の数を高めることを見出している(96)。本実験では検証できていないが、壊死骨に対して骨髄血移植に加え LIPUS を照射することは、より生理的な架橋パターンをもった骨再生が出現している可能性がある。

#### 2-3-4. 小括

血流が入りにくい小骨での重度の骨壊死モデルにおいて、LIPUS 単独での骨再生効果は認めない。骨髄血移植に LIPUS を追加することで、骨再生が促進する可能性が示唆された。

#### 2-4. 本研究の限界と今後の課題

骨壊死動物モデルに関しては、皮下の非荷重環境に壊死骨を挿入しているため、関節内にある本来の月状骨の環境とは異なっているという限界がある。しかし、本研究の目的は壊死骨に対する骨髄血移植や LIPUS の効果を観察することであるため、この目的は達成できたと考える。

移植骨髄血に関しては、臨床に即して採取した骨髄血を直接移植したため、細胞の選別や標識や培養細胞の移植などは行っていない。また、LIPUS の実験においても、分子細胞レベルでの検討は行っていない。組織学的には良好な骨再生が得られ、骨髄血移植と LIPUS が効果的に作用していることは確認できた。しかし、LIPUS 照射実験では、週 6 日間で 8~12 週間麻酔をかけ続けたことによるストレス反応も考慮すると、LIPUS にどこまで骨再生過程の前倒し作用があるかは、言及できない。

さらに、壊死骨の力学的強度の計測ができれば、創外固定期間の目安にすることもできるが、骨脆弱性は壊死の程度や周囲の力学環境により、その程度や増加時期が異なる可能性があり、その点においては本動物実験には限界がある。さらに本実験に用いた小骨は凹凸のあるキューブ状の骨であり、再生骨には弾性も加わるため、現実的には非常に難題である。

## 第 3 章

骨髄血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用した  
キーンベック病の新しい治療法

### 3-1. 背景

現在、キーンベック病 (stage II, III) の手術治療成績は、比較的良好であるが、広く行われている橈骨短縮骨切り術、血管柄付き骨移植術、手根骨間固定術、月状骨摘出+腱球移植術といった術式は、侵襲も大きく手技も煩雑である。よって、これらの手術治療に匹敵する治療成績で、かつ壊死した月状骨の再生を得る低侵襲な方法が期待されている。当グループの落合は、キーンベック病 (stage II, III) に対して、骨髓血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用した新しい方法を考案し、4 例の比較的良好な短期成績を報告した(80)。以降、我々は症例を積み重ね、詳細に評価した。ここに問題点や今後の展望を検討する。

### 3-2. 対象

症例は、2000 年 5 月～2006 年 7 月まで当院および関連病院にて手術を行ったキーンベック病患者 18 例 18 手 (男性 10 例 10 手、女性 8 例 8 手)、手術時年齢は 19～68 (平均 43.6) 歳であった。手術は全例同一術者が行った。術前単純 X 線は stage II が 4 手、III a が 11 手、III b が 3 手で、術後経過観察期間は 15～84 (平均 42.7) ヶ月であった。

### 3-3. 方法

〈治療方法〉 手術は、全身麻酔下に行った。Bridge 型創外固定器装着のため第二中手骨と橈骨骨幹部に 2 本ずつピンを立て、その際、橈骨のドリル孔より骨髓血を 2～3ml 採取する。透視下に月状骨の背側から 3 箇所直径 2mm のドリリングを行い、骨髓血を可及的緩除にかつドリル孔からあふれるまで注入する (図 19)。手関節を軽度牽引した状態で創外固定器を固定する。術後 4 週目より LIPUS を 1 日 20 分、4 ヶ月以上継続した。創外固定器は 8 週間で除去した (図 20)。

〈評価〉 治療成績は、臨床評価と単純 X 線評価を点数化し総合評価とする中村の治療成績判定基準(97) (表 3) を用いた。単純 X 線にて月状骨圧潰の程度を評価する Ståhl's Index (以下、SI) は側面像、Carpal Height Ratio (以下、CHR) は正面像にて、図 21 に示すごとく計測した。MRI は、プロトン密度強調 (Proton Density Weighted; PDW) の冠状断像で、経時的に評価した。

### 3-4. 結果

最終調査時、疼痛は、全くなしが 12 例、重労働で出現が 6 例、軽労働で出現する例はいなかった。握力は全例で改善し、健側比で 90% を超えるものが 7 例と最も多かった。可動域も術前より 20 度以上改善したものが 9 例、悪化例は 3 例のみであった (表 4)。単純 X 線では、SI, CHR は、悪化した例がそれぞれ 13 例、12 例であった。しかし、SI は 0.38→0.32 (平均)、CHR は 0.53→0.51 (平均) と、軽度の圧潰にとどまっていた。総合評価では、excellent 2 例, good 11 例, fair 5 例, poor 0 例であった。MRI では、月状骨全体の信号が改善したものが 9 例、部分的に改善したものが 2 例、不変が 7 例であり、改善症例は 11 / 18 例で 61% であった。術前 X 線 stage と成績との関係は、stage II が 4 例中 3 例で good 以上、stage III a が 11 例中 9 例で good 以上、と良好な傾向であるのに対し、stage III b では 3 例中 2 例が fair であった。また、MRI の改善しない症例でも、成績良好な例は認められたが、fair の 5 症例は、全例 MRI の改善は認めなかった。

#### 【症例供覧】

症例 6: 44 歳男性、術前 stage III a。X 線上、SI (0.45→0.28), CHR (0.54→0.54) と圧潰の進行はわずかで stage は不変。総合評価は good で、MRI では、経時的に信号の回復を認める (図 22)。

症例 5: 68 歳男性、術前 stage III a。X 線上、SI (0.47→0.33), CHR (0.58→0.53) と圧潰の進行はわずかで stage は不変。総合評価は good であるが、MRI での信

号回復は認められない (図 23)。

症例 11:50 歳女性、術前 stage III a。X 線上、SI (0.40→0.42), CHR (0.53→0.46) と圧潰の進行はわずかで stage は不変。総合評価は good で、MRI では、経時的に信号の回復を認める (図 24)。

### 3-5. 考察

月状骨温存を目的としたキーンベック病の治療において、骨穿孔単独 (23, 98)、創外固定単独 (24) では、疼痛の軽減は一時的であり、再発や圧潰の進行を認めたと報告されている。また、創外固定に海綿骨移植 (99)、血管束移植 (100)、血管柄付き骨移植 (101) を追加した方法や、橈骨骨切り術 (29, 30, 97) での治療成績はおおむね良好であるが、壊死した月状骨の再生を得る有効な治療法として確立したものはなく、手技的にはどれも煩雑で、その侵襲性は決して少なくない。

我々は、骨穿孔、骨髄血注入、低出力超音波療法、創外固定を組み合わせた治療を考案し行ってきた。結果は、総合評価において、excellent 2 例, good 11 例, fair 5 例, poor 0 例であり、橈骨短縮骨切り術、血管柄付き骨移植術など既存の治療法に決して劣らない成績であった。臨床成績の中で最も顕著であったのは疼痛の改善である。今回調査した時点で、全例疼痛は改善傾向にあった。X 線所見では、著明に圧潰したものや骨折に至ったものはなく、CHR (0.53→0.51), SI (0.38→0.32) とともにわずかな低下にとどまった。橈骨短縮骨切り術において、Koh らは CHR が 0.52→0.51、SI は 0.31→0.28 (30)、Iwasaki らは CHR が 0.48→0.49、SI は 0.29→0.29 (29)、と報告している。Aspenberg はサル の月状骨を摘出し、再挿入した preliminary な実験 (n=1) において、1 年後には月状骨はわずかに圧潰した状態で再血行化を認め、新生骨形成も出現していた。このことから再血行化が起こる際に圧潰が出現する可能性があると考えしている (9)。第 2 章で述べた動物実験においても、骨髄血を移植し血管が誘

導され、骨形成と吸収が持続的に出現した 8~12 週で、移植した壊死骨は圧潰し扁平化した。しかし、圧潰した後も骨形成は持続して出現していたことから、臨床的にも月状骨の再血行化が起こり壊死の状態から回復するには、わずかに圧潰が進行することは必然とも考えられる。

また、MRI での改善例は 61%に認め、創外固定に海綿骨移植を追加した Zelouf らの 50% (99)、橈骨骨切り術を行った松木らの 31% (40)を上回っている。T1 強調像での信号回復は、脂肪髓の回復を意味しており、骨の再血行化を反映していない(102)。しかし、長田らはキーンベック病の T2 強調像は術前より多彩な変化を示し、予後の指標にすることは難しいと述べている(103)。一方、松木らは、術後成績と一致はしないものの、成績良好例に MRI 改善例が多く、成績不良例に MRI 非改善例が多い傾向があると報告した(40)。自験例でも、この傾向は強く認められた(表 4)。

本法では橈骨より採取した骨髓血をそのまま移植している。培養や細胞分離といった術野外での操作を一切伴わないため、簡便かつ安全である。移植細胞の数に関しては、ヒト骨髓血中の間葉系幹細胞は骨髓有核細胞の 0.001%~0.01%と報告されている(44)が、これらの報告は腸骨骨髓血由来の細胞である。自己骨髓血の採取は橈骨に創外固定を設置する際のドリル孔より吸引採取しているが、橈骨骨幹部の骨髓血中に存在する間葉系幹細胞数については報告がなく、どれだけの間葉系幹細胞が存在しているのか確認されていない。Hernigou らは、腸骨骨髓中には平均 1160 個/ml の骨前駆細胞が存在し、濃縮し平均 4900 個/ml の骨前駆細胞を、大腿骨頭壊死症に対して 30ml 注入している。その結果、骨再生領域は MRI で評価し 1 年で 7cm<sup>3</sup>に達したと報告している(104)。Majors らは、1 個の骨芽細胞は、最低 16~17 回分化を繰り返し、5000μm<sup>3</sup>の骨器質を産生すると報告し(105)、新生骨 1ml 中には 200 x 10<sup>6</sup> 個の骨芽細胞が存在するという報告もある(Frost)。よって、腸骨より採取した 1ml の骨髓血からは、単純計算でも (1160 x 2<sup>16</sup> = 76 x 10<sup>6</sup> 骨芽細胞)約 0.4ml の新生骨が産生されるこ



とになる。本法で実際に移植できた骨前駆細胞は、橈骨より採取しているため、さらに少ないと考えられるが、月状骨の体積が約 2cm<sup>3</sup>、骨髓腔はさらに小さいことを考慮すると、骨形成においては効果的であると言える。ドリル孔を通じた血管誘導も考慮すれば、注入骨髓血中に細胞分化の起源である間葉系幹細胞が 1 個でも含まれていれば、月状骨壊死の再生には有効であるとも考えられる。大腿骨頭壊死症に対する骨髓細胞移植の治療効果として、より多くの細胞を移植したほうが効果的であるとの報告もある(104)が、月状骨をターゲットと考えた場合、骨髓血中に含まれるサイトカインや血小板、成長因子の相乗効果(46, 57, 58)も加味すると、骨髓血全血を直接移植する本法も理に適っている。

LIPUS に関しては、中尾らの報告(79)や、第 2 章の動物実験の結果からも、キーンベック病に対し、単独での使用では効果がないものと考えられる。また、骨穿孔と LIPUS の併用でも同様に効果がなく、骨穿孔と骨髓血移植に併用することで、8 週では壊死骨の新生骨形成において有意に促進的に作用していた。しかし、12 週ではその有意性はなくなっていた。諸家の報告からも、LIPUS は骨芽細胞の分化を促進するが、増殖作用はないため、より早期において効果が高いものと考えられる。本法では、術後(骨髓血移植後)4 週より LIPUS を使用し、最低 4 ヶ月間継続している。本動物実験や先行研究を参考にすれば、4 週よりも早期の開始がより望ましいものと考えられる。

### 3-6. 本治療法の適応と今後の課題

術前の分節化が高度であった 2 例(症例 12, 14)は、いずれも軽度の疼痛が残存し、成績は fair、分節化の改善は認められなかった。建部らは、橈骨骨切り術後の分節化の改善と臨床成績を検討している。術前に分節化を認めた 23 例中 11 例と約半数で骨癒合を認めるものの、骨癒合の有無により臨床成績に有意な差はみられず、X 線側面像の中央部で分節化している症例で成績は有意に劣ったと報告している(106)。我々の 2 症例も中央部での分節化であり、このような分節化が高度な症例に対しては、本法の適応外ではないかと考えている。よって、本法のよい適応は、分節化のない stageⅢまでの症例と言える。

月状骨再生、再血行化の評価は MRI のみで行われているが、実際の組織学的所見と MRI が一致しているか否かについては、議論が分かれる。Trumble らは、biopsy した組織において、MRI と組織の一致を報告している(107)。一方、Hashizume らは、MRI の解像度の問題のため、部分的な不一致があると報告している(108)。我々は、47mm マイクロスコープコイル(Philips 社製 全身用 1.5T MRI 装置)を用い、より鮮明な画像を得ることで、詳細に組織像を予測できるのではないかと考えている。現在、本法の適応外で、月状骨摘出術を行った症例の摘出月状骨を脱灰の後、術前の MRI(冠状断)と同レベルのスライスにし、その組織像と MRI の比較検討を行っている(109) (図 25~27)。現在までの症例 5 例での、PDW はその組織学的所見をよく反映しているが、T2(FFE, STIR)では血管の有無を反映することはなく関連性は見出せていない。しかし、今後もマイクロスコープコイルを用い、骨髓血移植術前後の評価を注意深く続け、また月状骨が温存できない症例ではその組織像も合わせて検討することで、MRI を用い再生過程の組織像の変化や術前の予後予測が可能になるか検討を続けていく予定である。

## 第 4 章

### 総括

#### 4-1. 本研究の限界と今後の展望

治療法に関する検討課題として、①移植骨髄血の分析、②創外固定の装着期間、③LIPUS の開始時期および継続期間、が挙げられる。

①移植骨髄血の分析であるが、本法では橈骨より採取した骨髄血をそのまま移植している。培養や細胞分離といった術野外での操作を、一切伴わないため、簡便かつ安全である。しかし、橈骨骨幹部の骨髄血中に存在する間葉系幹細胞数については報告がなく、どれだけの間葉系幹細胞が存在しているのか確認されていない。また、採取できる量も 3-5ml と限界がある。ヒト骨髄血中の間葉系幹細胞は骨髄有核細胞の 0.001%–0.01%と報告されている(44)が、これらの報告は腸骨骨髄血由来の細胞に関してである。骨髄血採取の部位による間葉系幹細胞数の違いに関していくつかの報告がある(110,111)。McLain らは、ヒトの腸骨と腰椎椎体での間葉系幹細胞数の違いに関して 20 例の患者を対象に行い、腰椎椎体の骨髄血のほうがより多くの間葉系幹細胞が存在すると報告した(110)。我々のグループでは同じ骨壊死である大腿骨頭壊死に対して腸骨から採取した自己骨髄血移植を行い良好な治療成果を得るとともに、その成分や分化能に関しても詳細な報告をしてきた(56-58)。少なくとも細胞数に関しては橈骨骨髄血より腸骨骨髄血中のほうが多いと予想され、大量の採取が可能である。また、腸骨骨髄血採取は経皮的穿刺吸引採取であり、侵襲性は低く、今後さらなる治療成績向上を考え、移植骨髄血の採取を腸骨から行うことを計画した。さらに橈骨と腸骨の骨髄血に含まれる増殖分化能を持った細胞数を比較する目的で、臨床研究を開始している。本法実施時に移植する骨髄血以外に、橈骨と腸骨から骨髄血を 3ml ずつ採取し、単純培養と骨分化培養を行い、細胞形態や集合様式、接着細胞数を ALP 染色、crystal violet 染色にて観察していく。現在、1 例のみ行った結果を示す(図 28)。ALP 染色陽性の骨細胞に分化していく細胞、crystal violet 染色にて固定されている接着細胞ともに、腸骨由来のものが橈骨由来のものより明らかに多いことが分かる。

②創外固定の装着期間については、骨強度の回復時期が問題になる。本研究では骨強度に関しては調査できておらず、創外固定を用いたあるいは併用した過去の報告でも、その装着期間は3週から13週と多岐に渡り、明確な結論に至っていない(24, 99-101)。本研究の結果を参考にするならば、壊死骨に骨髓血を移植すると8週から12週にかけて軟化が出現し、骨形成と骨吸収のパラメーターも高値を示し、その活動性が高いと言える。しかし、20週では特に骨吸収のパラメーターが低下しており、細胞の活動性が落ち着いていると考えられる。LIPUSを追加した実験においては、この12週から20週にかけての変化が、8週から12週にかけて出現しており、LIPUS刺激が細胞反応を活性化させ、骨再生過程が早まったとも考えられる。現行の8週間で創外固定を除去することは、壊死骨再生過程で最も骨吸収に傾いている時期に除圧できないことになってしまう。一方、12週以上の創外固定装着は、臨床的には感染や骨萎縮、手関節機能低下という合併症を招く危険がある。骨脆弱性は壊死の程度や周囲の力学環境により、その程度や増加時期が異なる可能性があり、その点においては本動物実験には限界がある。しかし、今後はHinge付きの創外固定を用いることによって、8週間は完全固定し、その後4週間は手関節に軽度牽引をかけた状態で可動域訓練できるようにすることを考慮している。

③LIPUSは現行では術後4週から4ヶ月以上という方針にしている。しかし、LIPUSには細胞反応のより早期からの効果が確認されていること、MRIでの脂肪髄の回復が1年以上かかっていることなどを考えると、創部の癒合した2週間から1年間継続という方針にすることを考慮している。

キーンバック病は比較的症例数も少なく、倫理的にもDBTによる臨床研究は不可能と考えられ、後向きの比較対象試験を行っていくしかない。1999年より2007年まで8年間、方針を統一し本治療法で行ってきた。第2章での基礎研究を元に2008年より、一部治療方針を変更し、骨髓血移植(橈骨→腸骨)、創外固定期間(8→12週間)、LIPUS(4週～4ヶ月以上→2週～1年)として、今後臨床

例を積み重ねたいと考えている。合わせて、移植骨髄血の分析を進め、この治療をさらに発展させていきたい。

#### 4-2. 結論

骨髄血移植・LIPUS・創外固定を併用したキーンベック病の治療法は、低侵襲でありながら、より侵襲的な既存の治療法に劣らない臨床成績が得られる。

ウサギの第4足根骨を用い、血流が入りにくい小骨での重度の骨壊死モデルを作製し、有効因子の検討を行ったところ、ドリリング+骨髄血移植では骨再生効果が確認できるが、LIPUS 単独では骨再生効果を認めないことから、骨髄血移植は本モデルでの骨再生には必須であり、さらに LIPUS を追加することは、より質の高い骨再生が得られる可能性を秘めている。

図 1 : Lichtman 病期分類

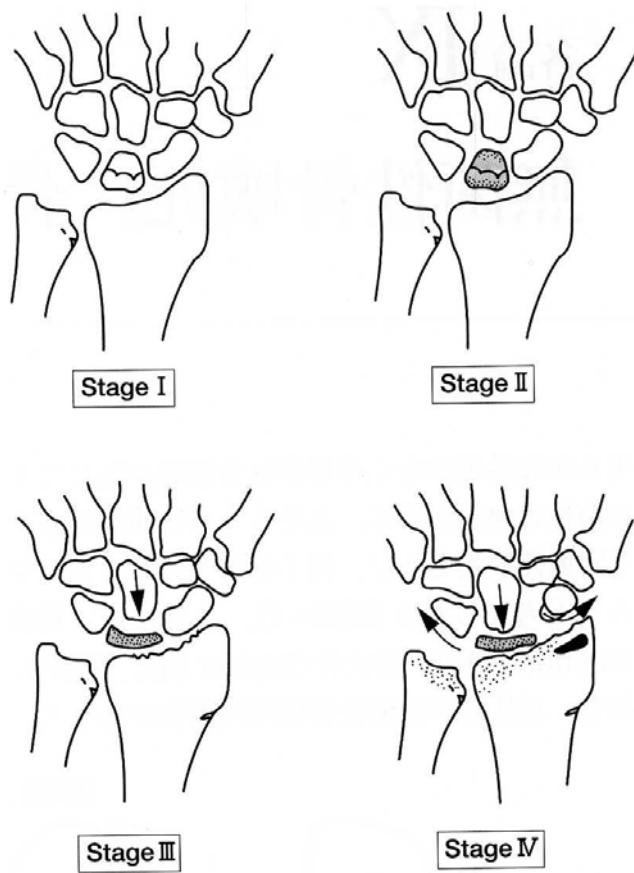
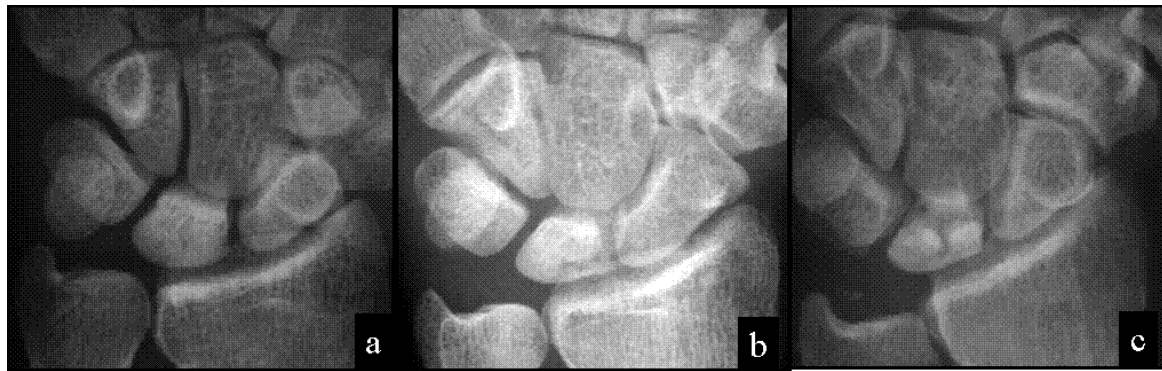


図 2



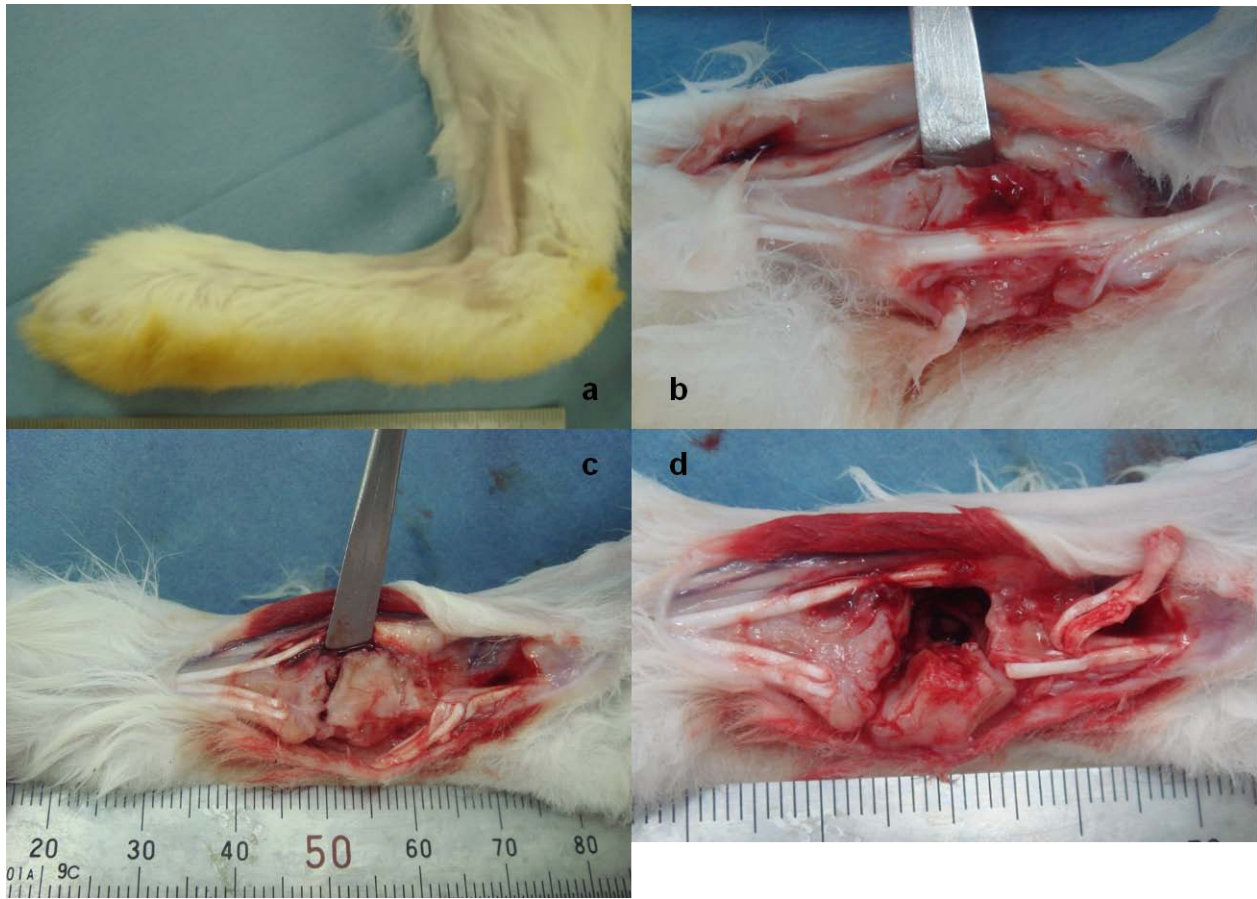
a: stage II : 月状骨の硬化像を認める

b: stage III a : 月状骨の圧潰を認めるも、手根骨配列は保たれている

c: stage III b : 月状骨の圧潰、分節化を認め、舟状骨の掌屈回旋も認める



図 3 : ウサギ第 4 足根骨摘出手順

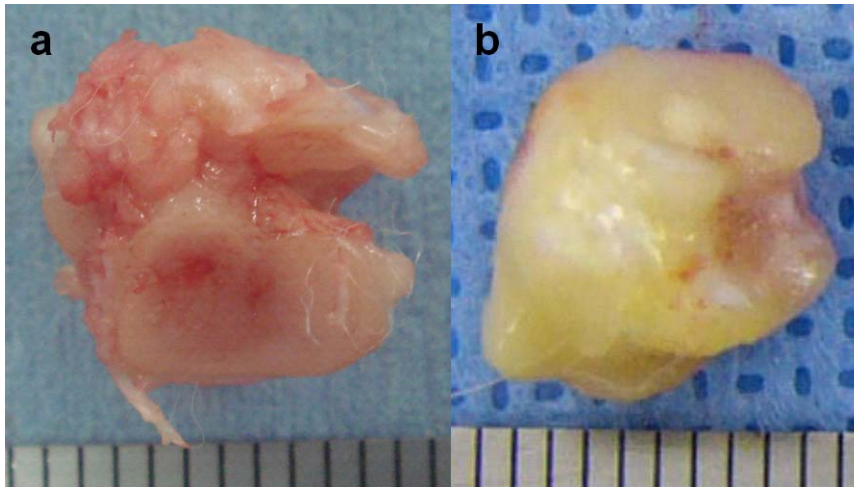


a;ウサギ足部外側

b, c;エレバトリウムを関節面に挿入し、愛護的に操作

d;摘出時

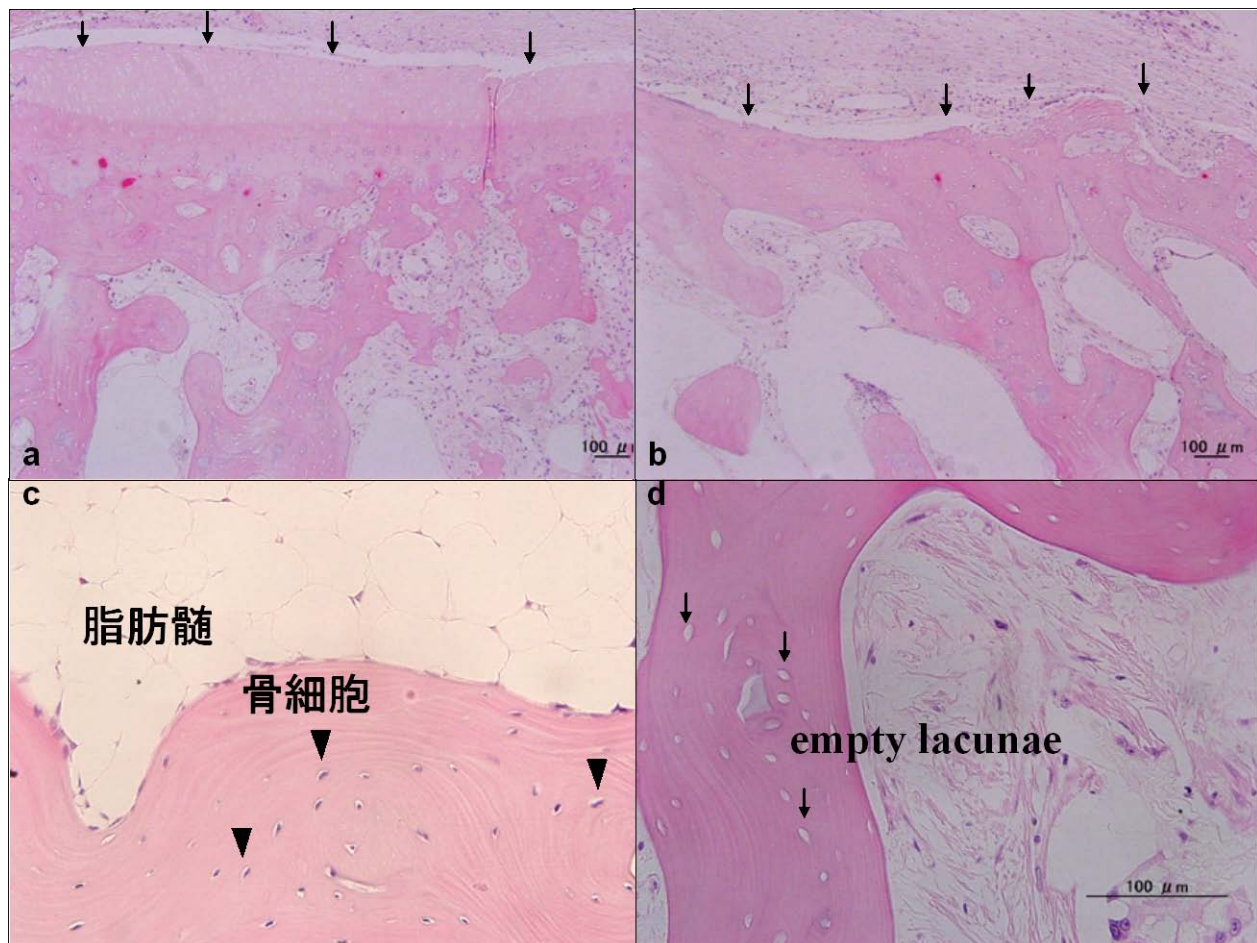
図 4：ウサギ第 4 足根骨



a: 移植前

b: 骨壊死モデルとして移植後 20 週（背部皮下より摘出時）. 軟骨面は維持されている。

図 5



a: 移植後 12 週、脱灰組織標本 (H E 染色,  $\times 100$ ). 軟骨面 (矢印) は保たれている。

b: 移植後 12 週、脱灰組織標本 (H E 染色,  $\times 100$ ). 皮質骨面 (矢印) は一部吸収されている。

c: 正常脱灰組織標本 (H E 染色,  $\times 400$ ). 骨細胞 (矢頭) の核は良く染まり、脂肪髄を認める。

d: 骨壊死モデル移植後 20 週、脱灰組織標本 (H E 染色,  $\times 400$ ). 骨細胞は empty lacunae (矢印) であり、骨髓腔に脂肪髄の形成はなく、線維性組織が存在する。

図 6(a~d) : 約 45° ずつ回転させた写真を示す。\*印は、皮質骨面のドリル位置を示している。

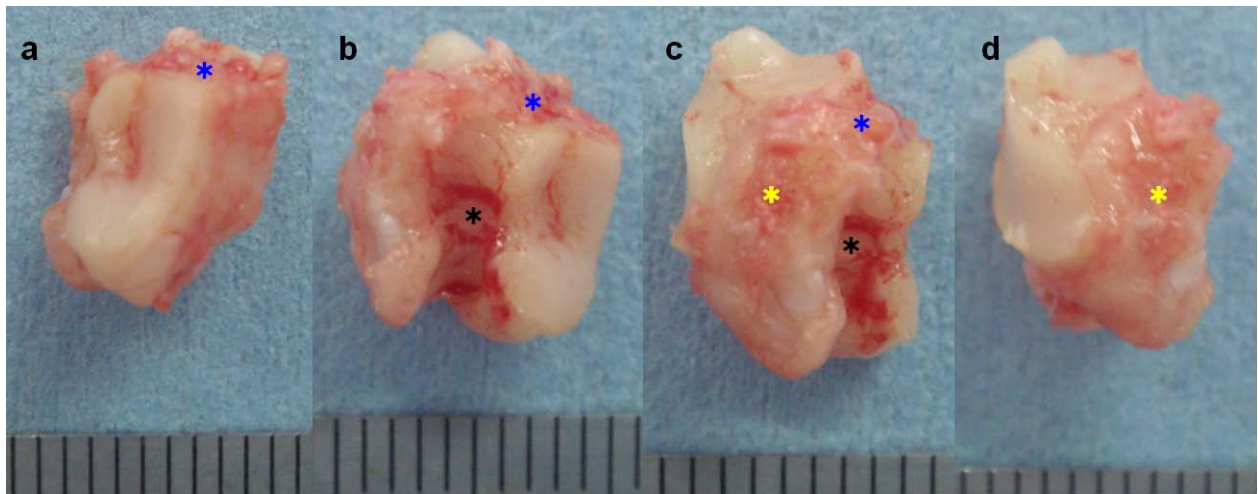
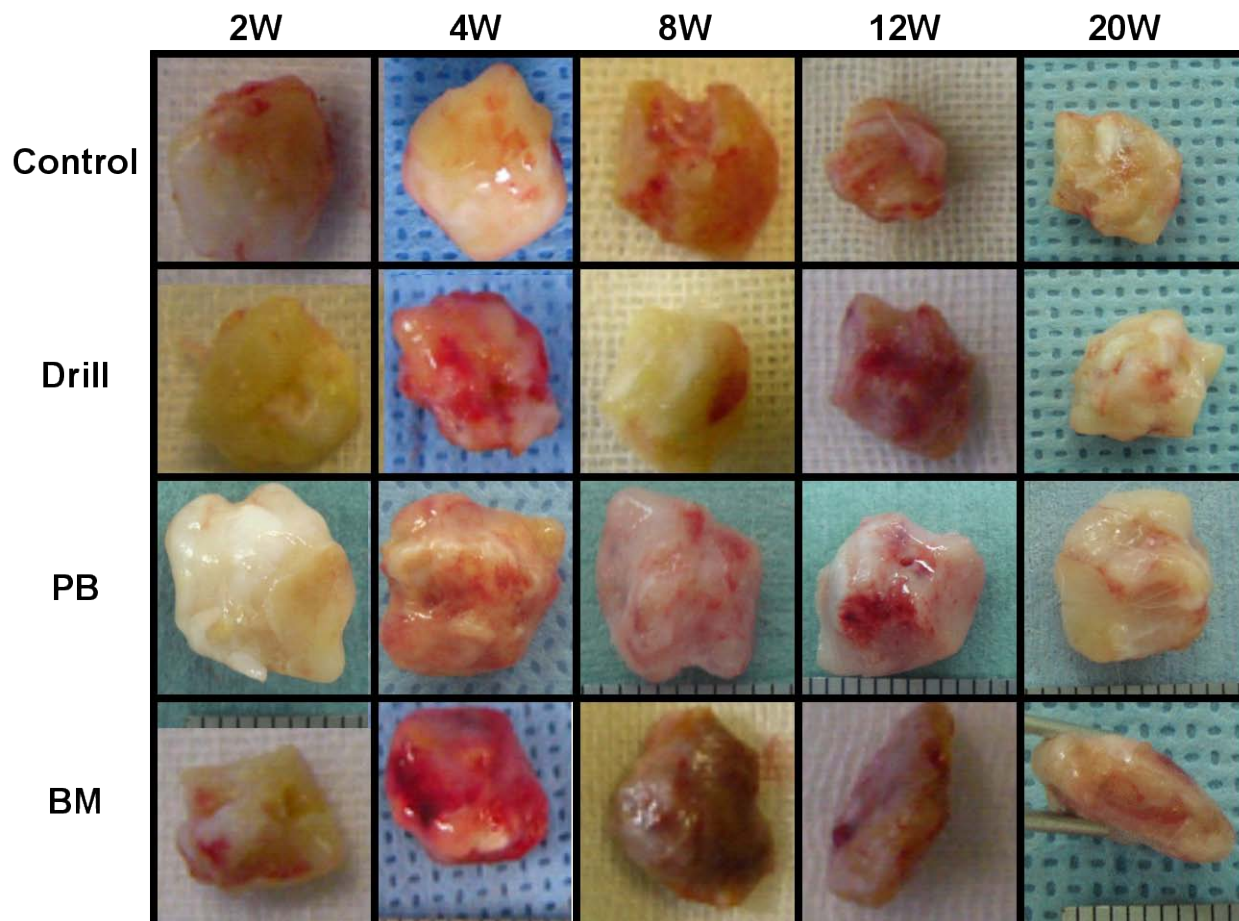


図 7 : 2～20 週の肉眼的所見



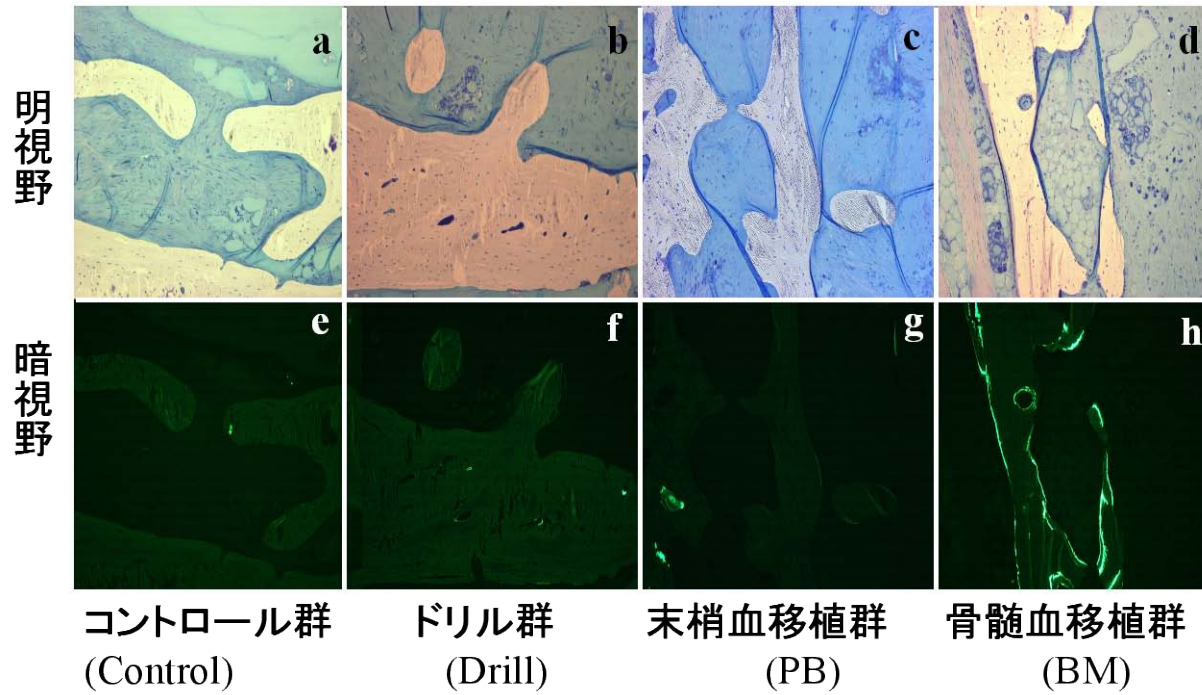
Control: コントロール群

Drill: ドリル群

PB: 末梢血移植群

BM: 骨髓血移植群

図 8 : 12 週、トルイジンブルー染色 (×40)



a-d; 明視野

e-h; 暗視野

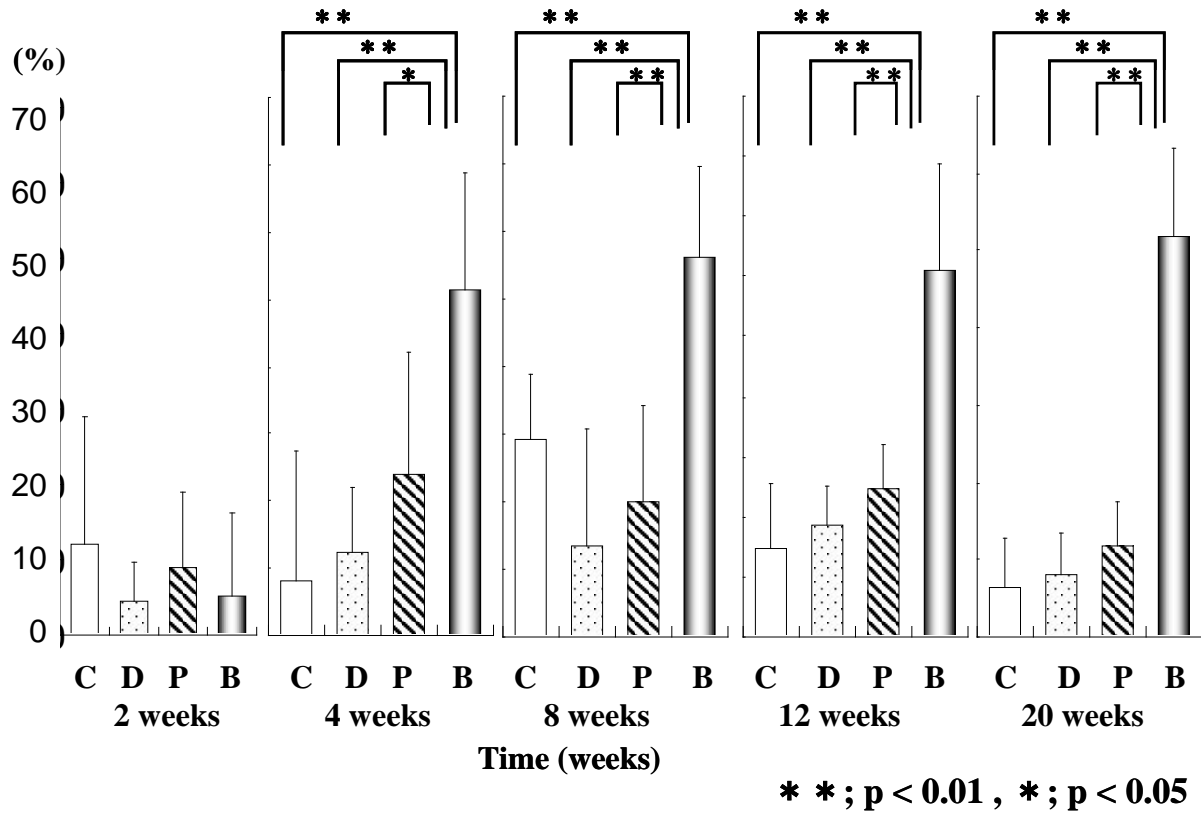
a, e; コントロール群

b, f; ドリル群

c, g; 末梢血移植群

d, h; 骨髄血移植群

図 9：骨石灰化面



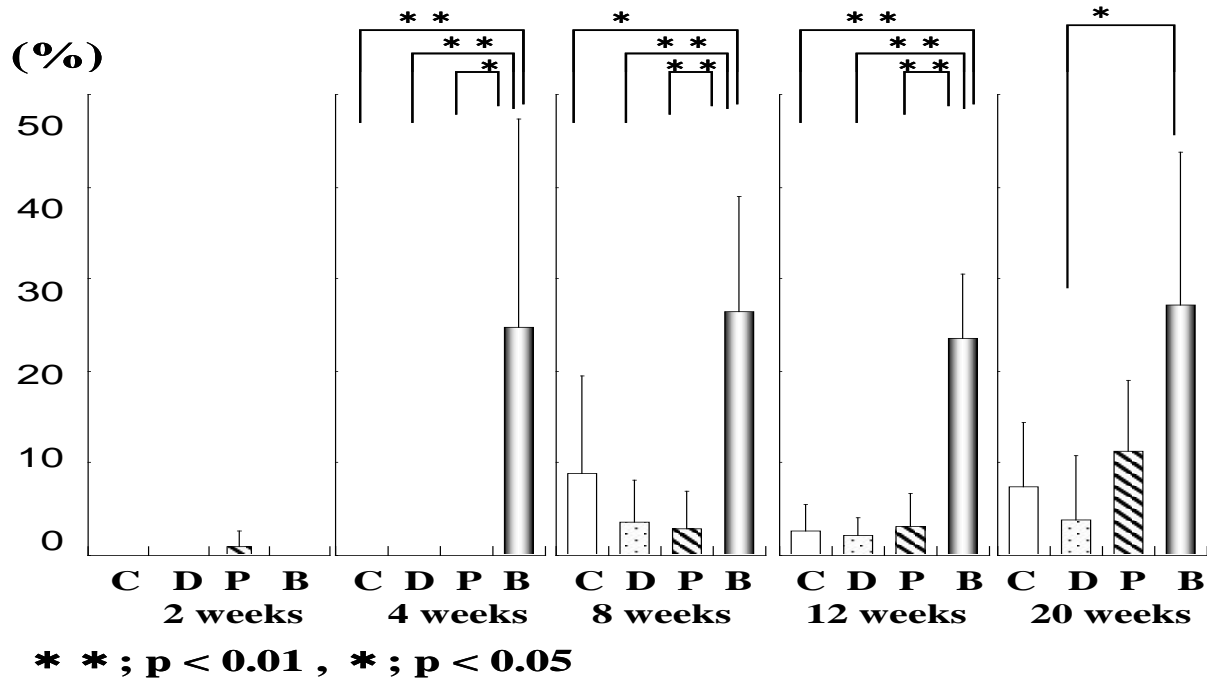
C: コントロール群

D: ドリル群

P: 末梢血移植群

B: 骨髄血移植群

図 10 : 骨芽細胞面



C: コントロール群、D: ドリル群、P: 末梢血移植群、B: 骨髄血移植群

図 11 : ALP 染色. a; 100 倍. b; 400 倍 (矢印 ; 骨芽細胞)

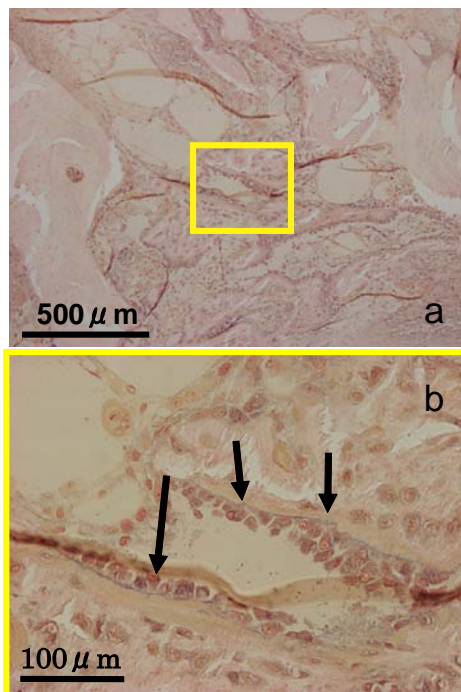
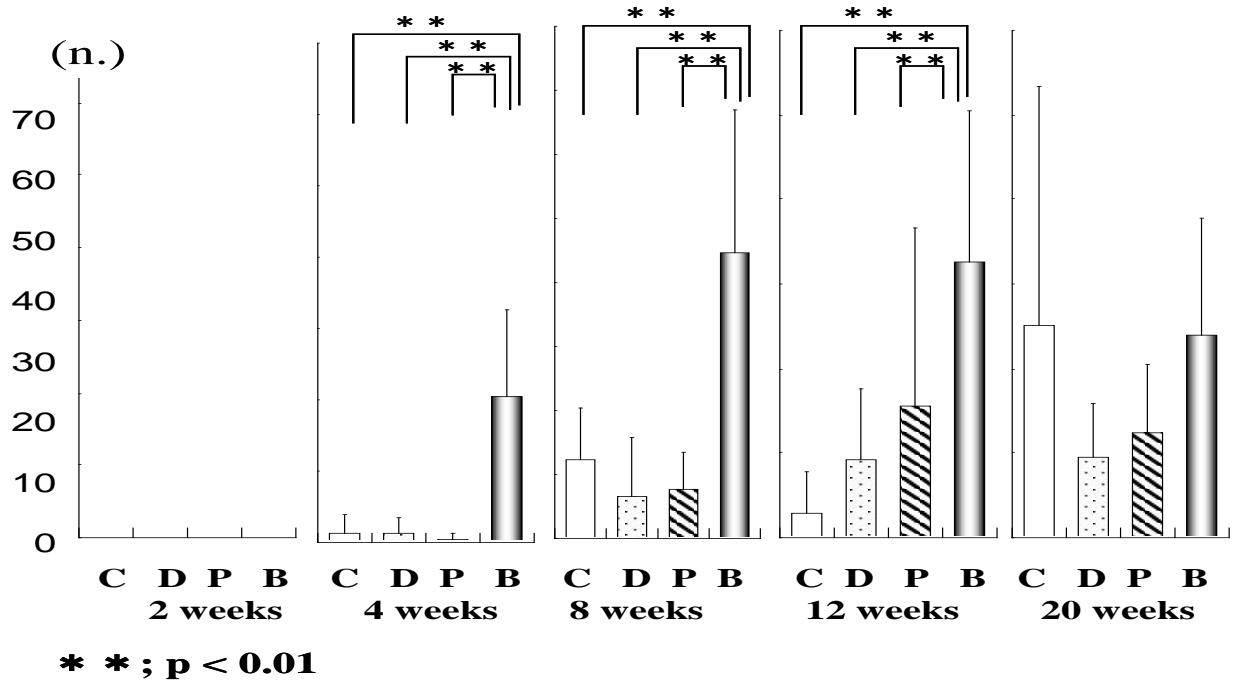




図 12 : 破骨細胞数



C: コントロール群、D: ドリル群、P: 末梢血移植群、B: 骨髄血移植群

図 13 : TRAP 染色. a; 100 倍. b; 400 倍. (矢印 ; 破骨細胞)

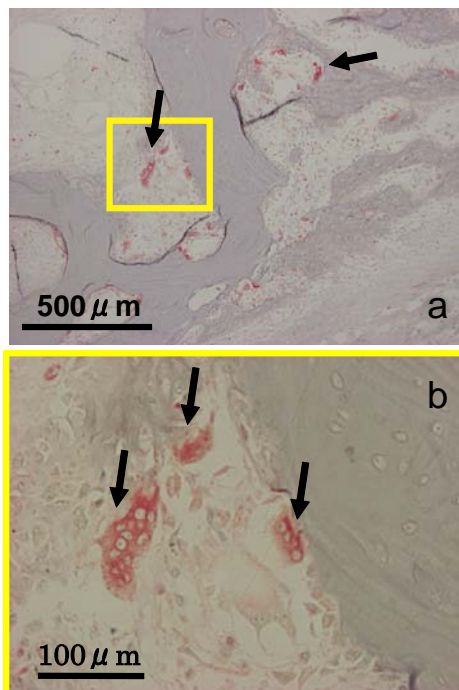
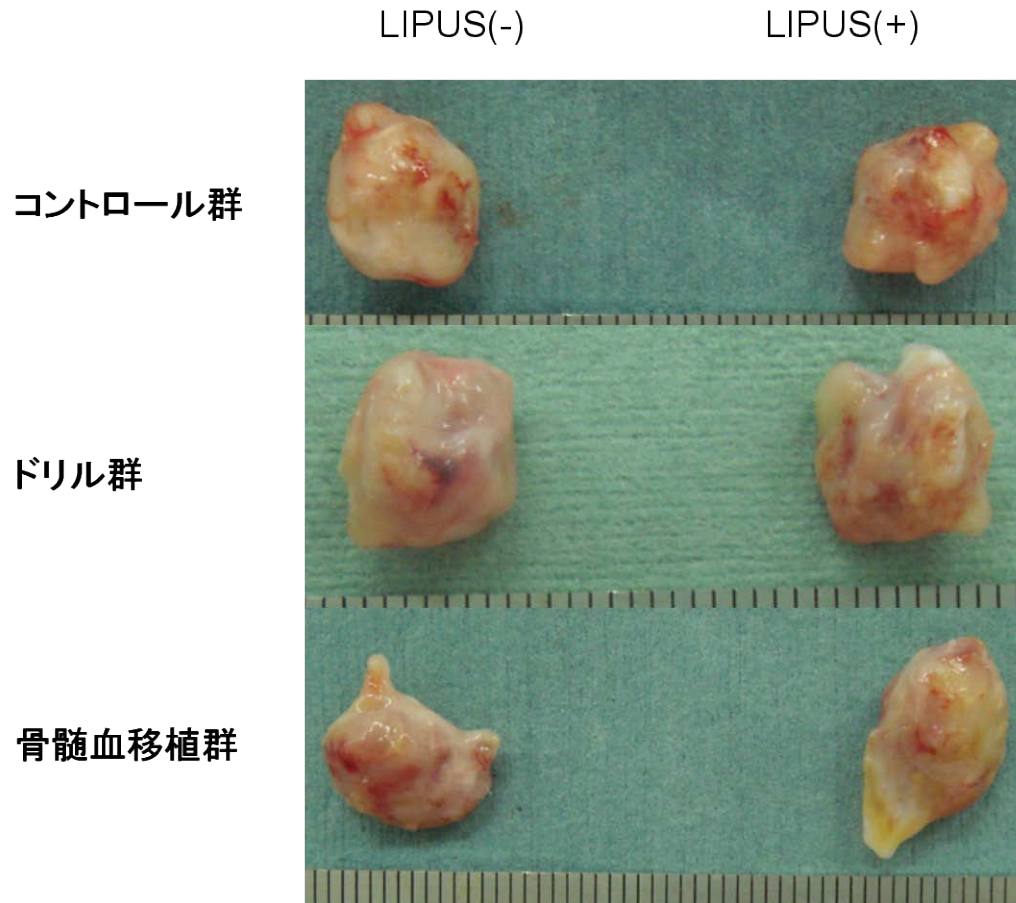


図 14 : 肉眼所見 LIPUS 8 週

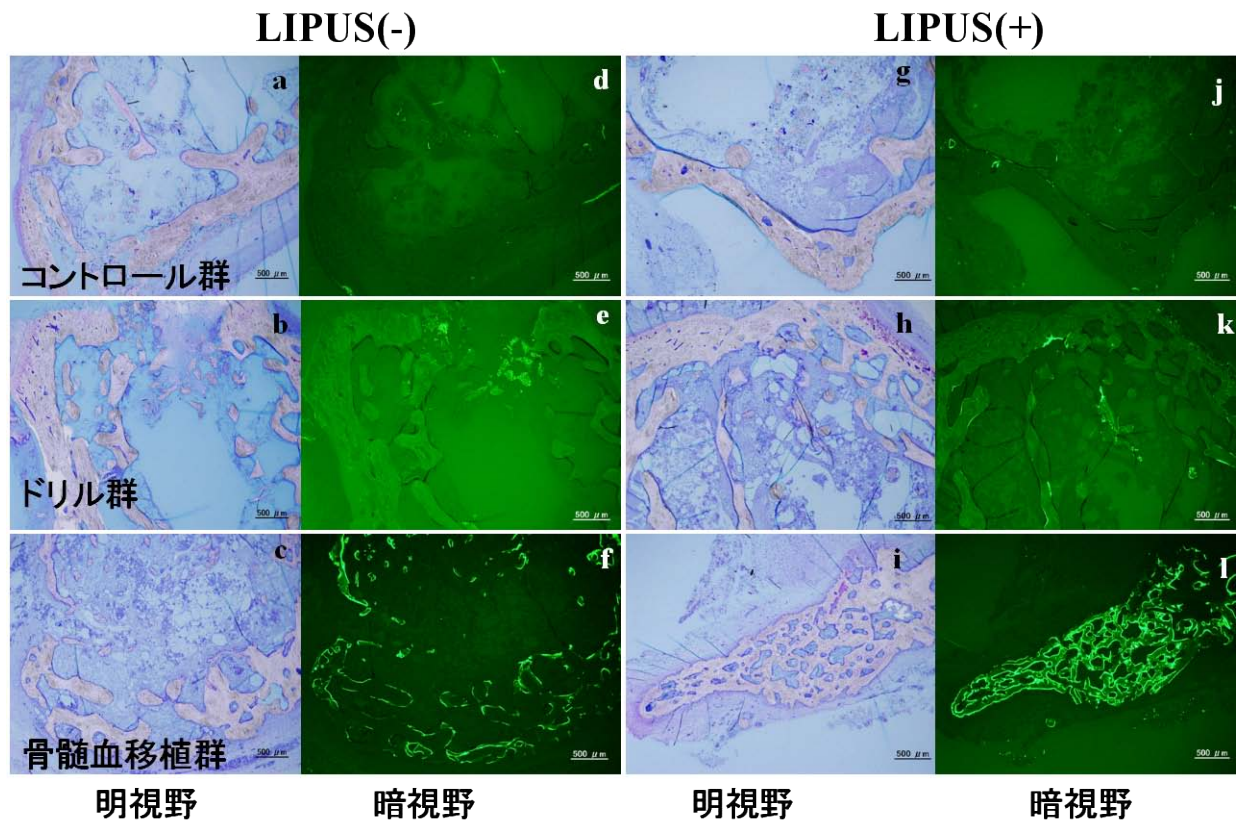


LIPUS(-) : LIPUS 非照射群

LIPUS(+) : LIPUS 照射群

コントロール群、ドリル群ともに、形体は維持されている。骨髄血移植群では、壊死骨は扁平化している。この変化は両群とも同様であった。

図 15：組織学的所見 LIPUS8 週（トルイジンブルー染色、40 倍）



LIPUS(-) : LIPUS 非照射群

LIPUS(+): LIPUS 照射群

a, d, g, i(上段); コントロール群

b, e, h, k(中段); ドリル群

c, f, i, l(下段); 骨髄血移植群

a-c, g-i; 明視野

d-f, j-l; 暗視野

骨髄血移植 + LIPUS 照射群 (i, l) で、扁平化が強く、旺盛な骨形成が起きていることがわかる。

図 16 : 肉眼所見. LIPUS 4, 8, 12 週

4 週では原型を留め、8 週で扁平化を認める.

12 週でもその形体は維持されている.

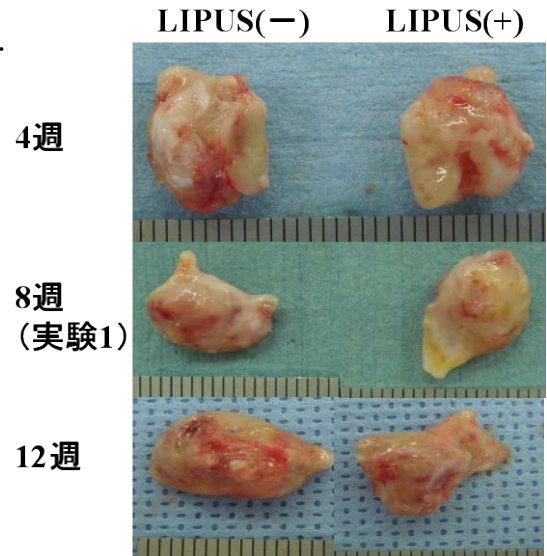
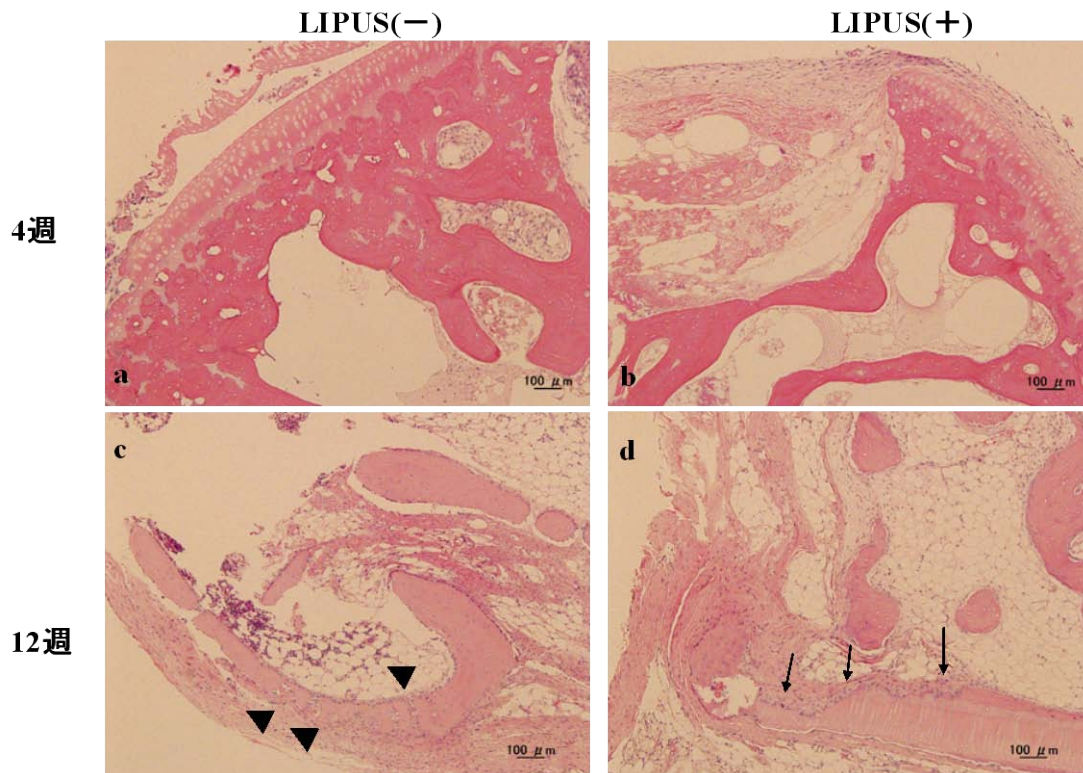


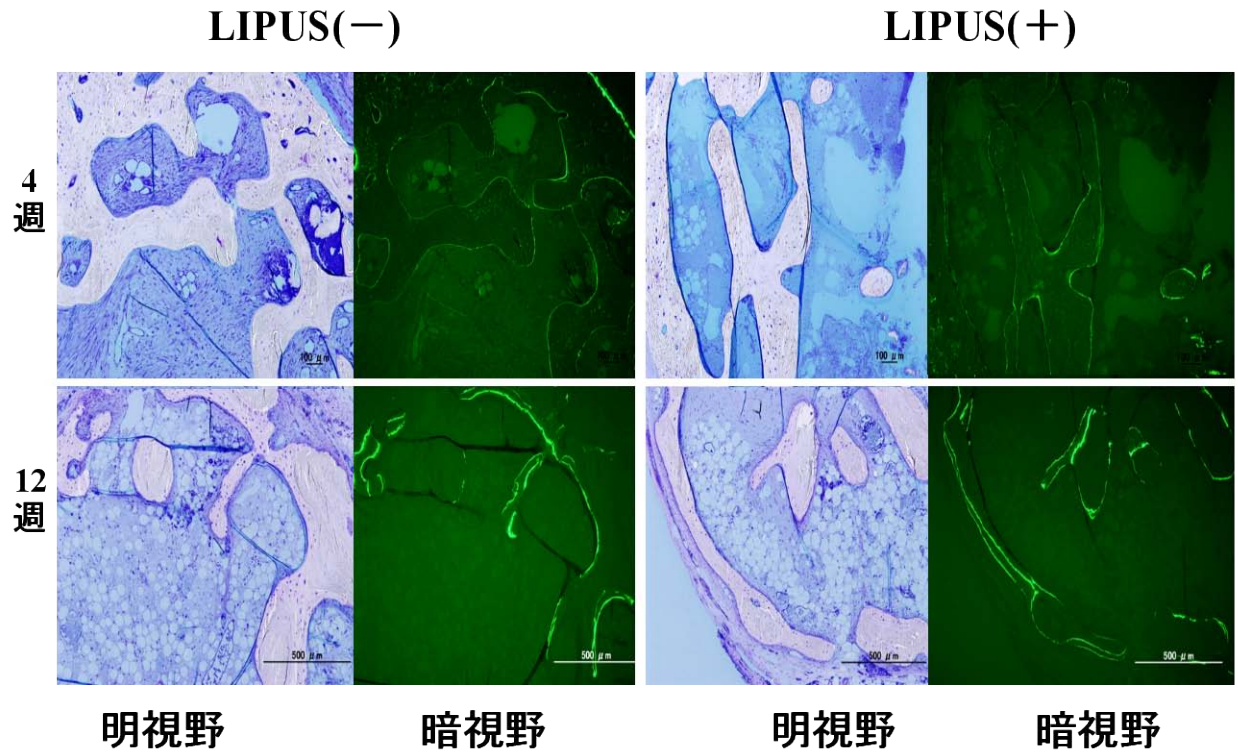
図 17 : 組織学的所見. LIPUS 4, 12 週



a, b; 4 週. c, d; 12 週. a, c; LIPUS 非照射群. b, d; LIPUS 照射群.

(矢頭); 骨皮質の吸収部、(矢印); 軟骨の吸収部

図 18 : 組織学的所見 LIPUS12 週 (トルイジンブルー染色、100 倍)



a-d; 4 週

e-h; 12 週

a, b, e, f; LIPUS(-)

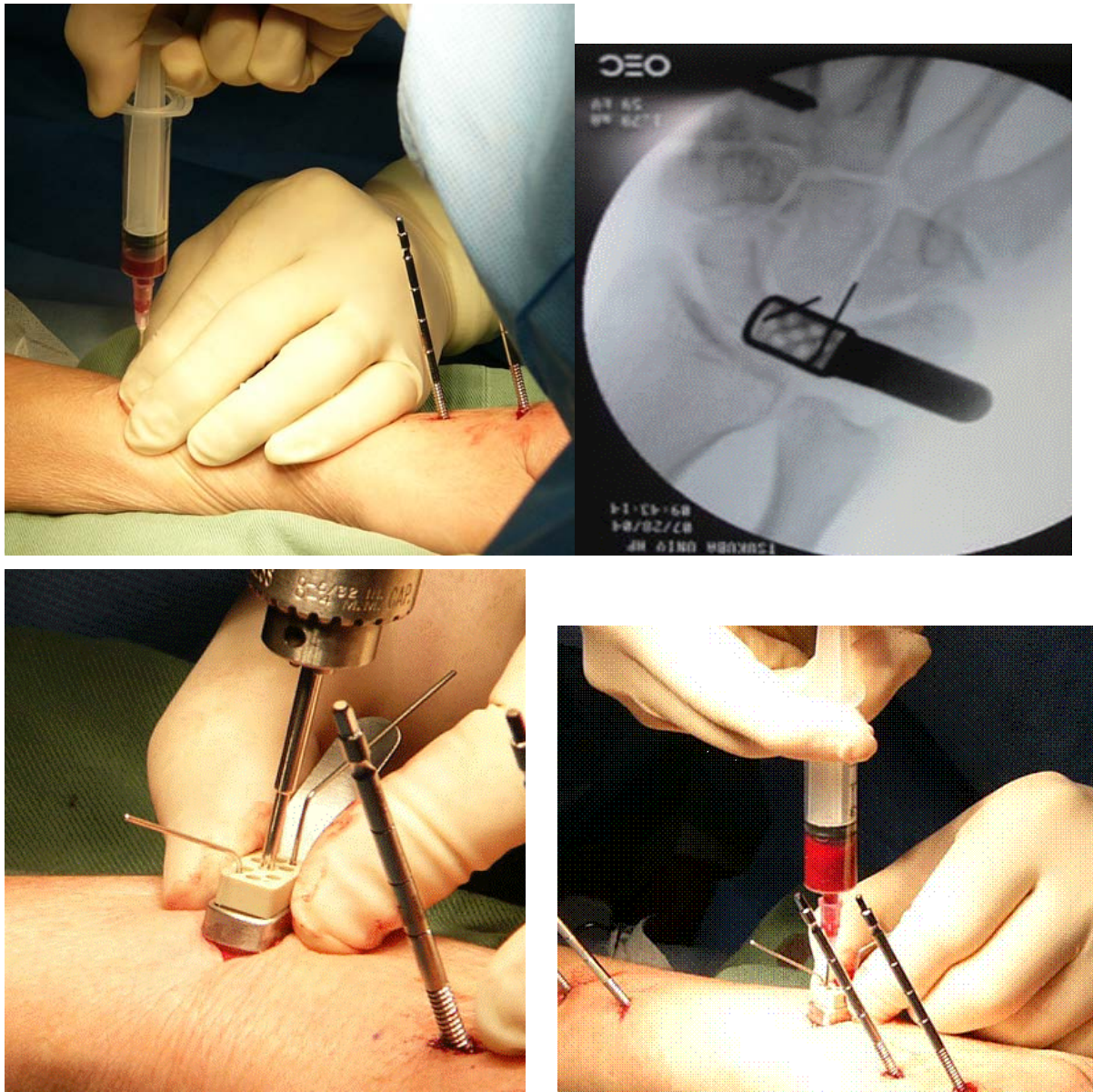
c, d, g, h; LIPUS(+)

a, c, e, g; 明視野

b, d, f, h; 暗視野

12 週では、両群とも、カルセインにて二重染色される領域も多く、骨形成が繰り返されていることが分かる (暗視野)

図 19：手術方法



- a. 骨髓血採取(橈骨より吸引採取)
- b. ドリルガイド設置(X線透視下に確認)
- c. 月状骨ドリリング(ストッパー付の専用ドリル使用)
- d. 骨髓血注入

図 20



a

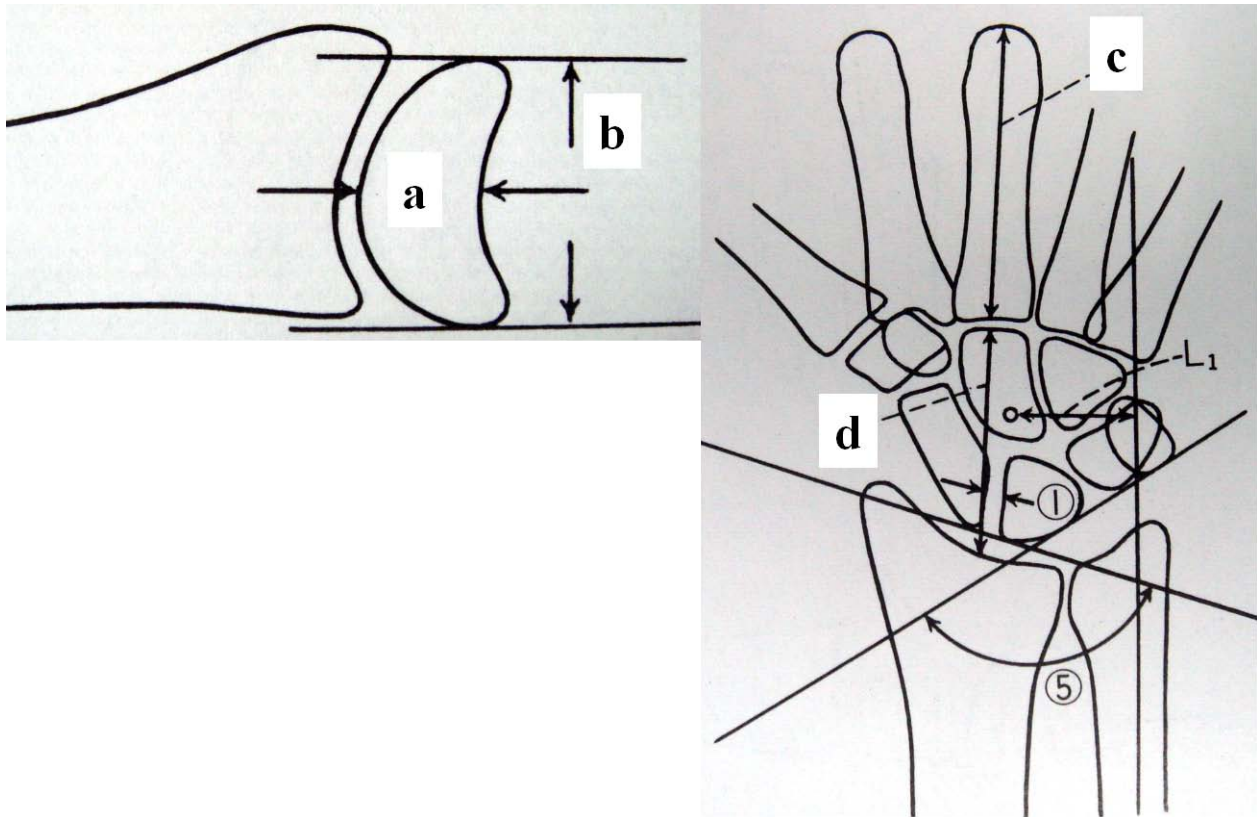


b

a: 創外固定器装着後

b: 実際使用する LIPUS 器台

图 21

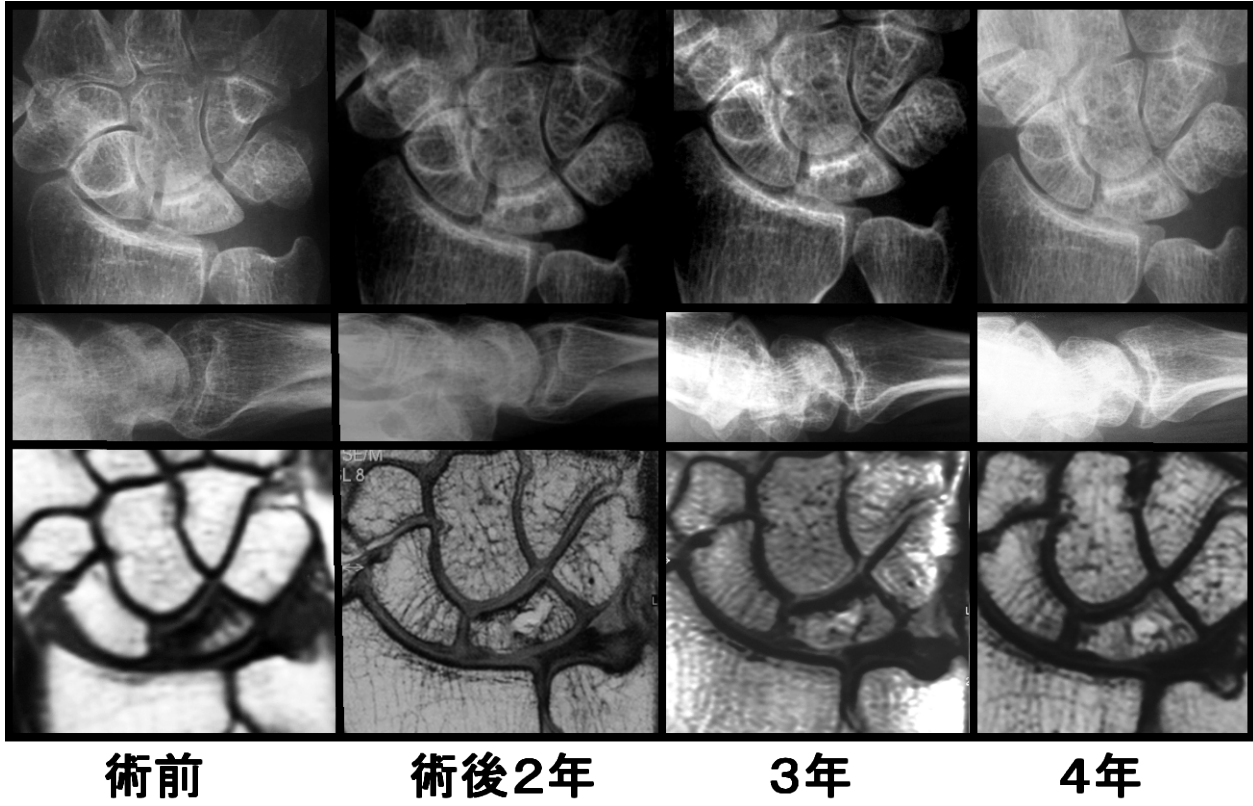


**Ståhl's Index** =  $a/b$

**Carpal Height Ratio** =  $d/c$



図 22 : 症例 6

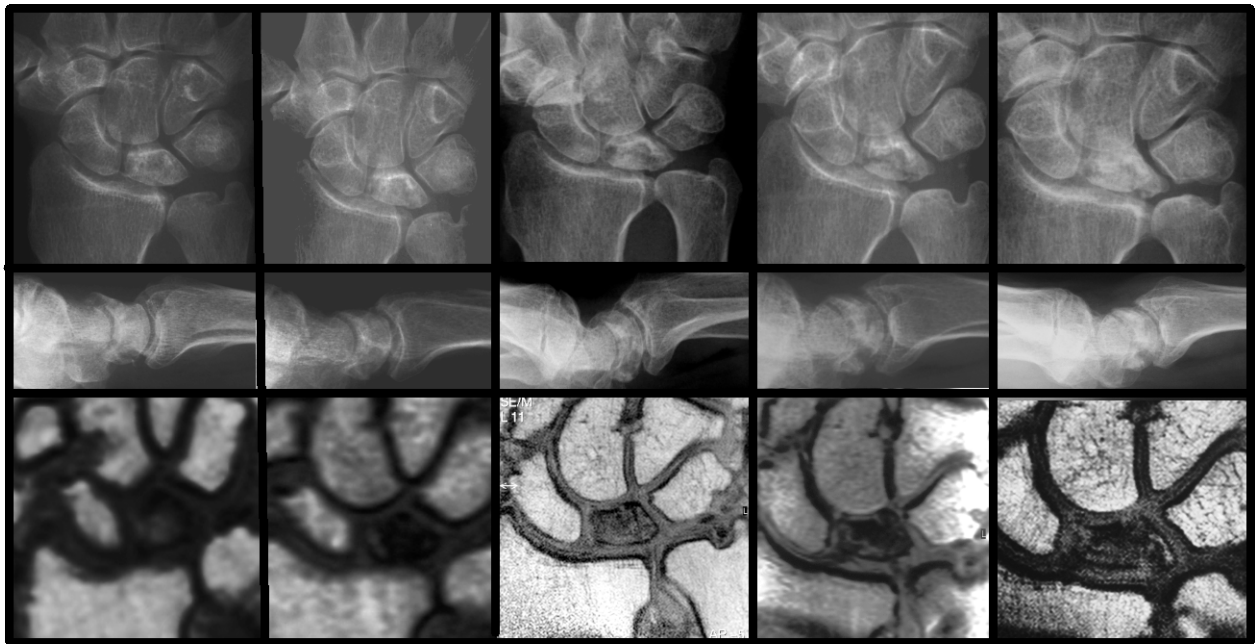


上段：単純 X 線正面像

中段：単純 X 線側面像

下段：MRI (PDW)

図 23 : 症例 5



**術前**

**6ヶ月**

**1年半**

**3年**

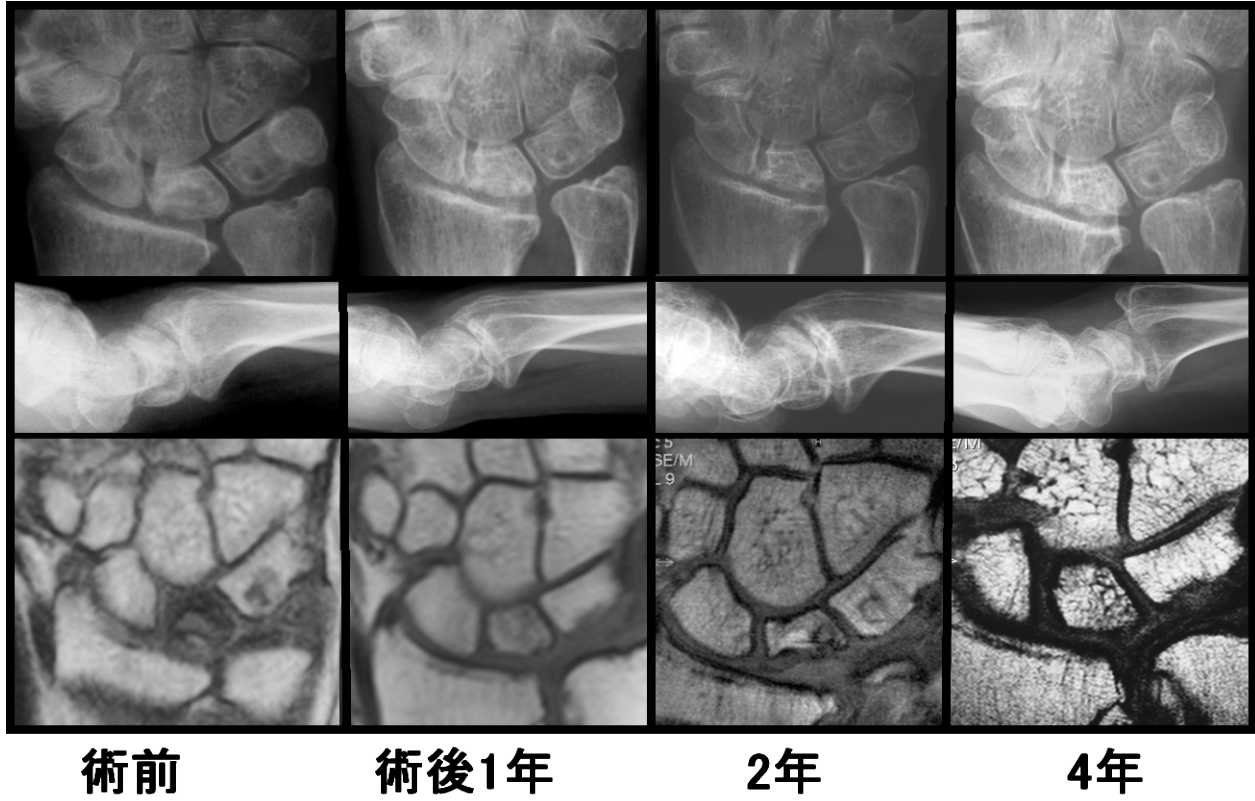
**5年**

上段：単純 X 線正面像

中段：単純 X 線側面像

下段：MRI (PDW)

図 24：症例 11



上段：単純 X 線正面像

中段：単純 X 線側面像

下段：MRI (PDW)

図 25. MRI(左 : PDW) 背側と掌側の一部で高信号領域を認める、右 : FFE)

上段 : MRI (PDW).

下段 : MRI (FFE). 高輝度領域は、PDW と完全には一致していない

図 26 : 上記 MRI とほぼ同じレベルのスライス (HE 染色. x1)

図 27 : 上記組織 2, 5, 8 の強拡大 (HE 染色. x400)

2; 脂肪髄(+), 骨細胞核(+).

5; 脂肪髄消失, empty lacunae(+).

8; 脂肪髄(+), 骨細胞核(+).

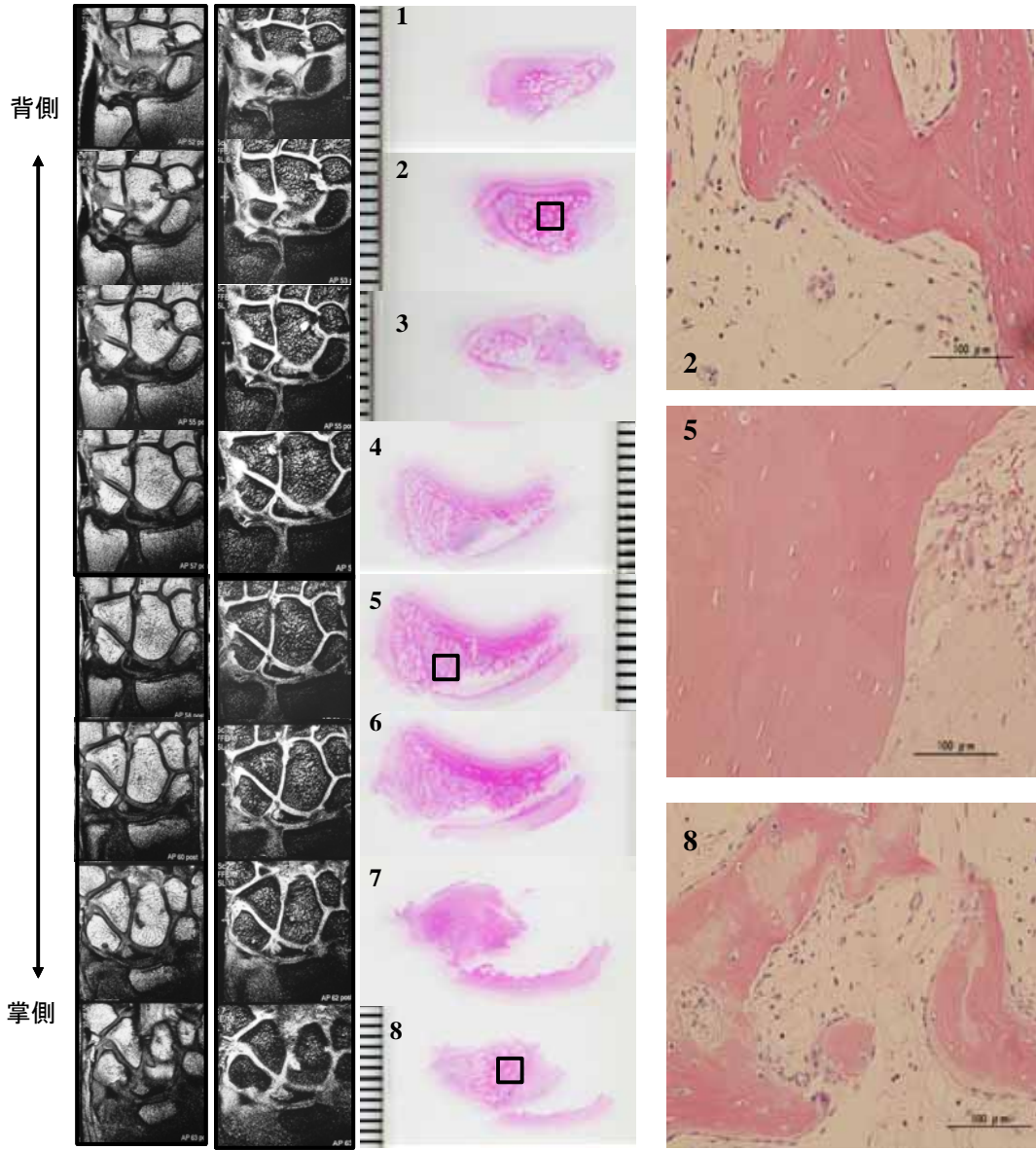
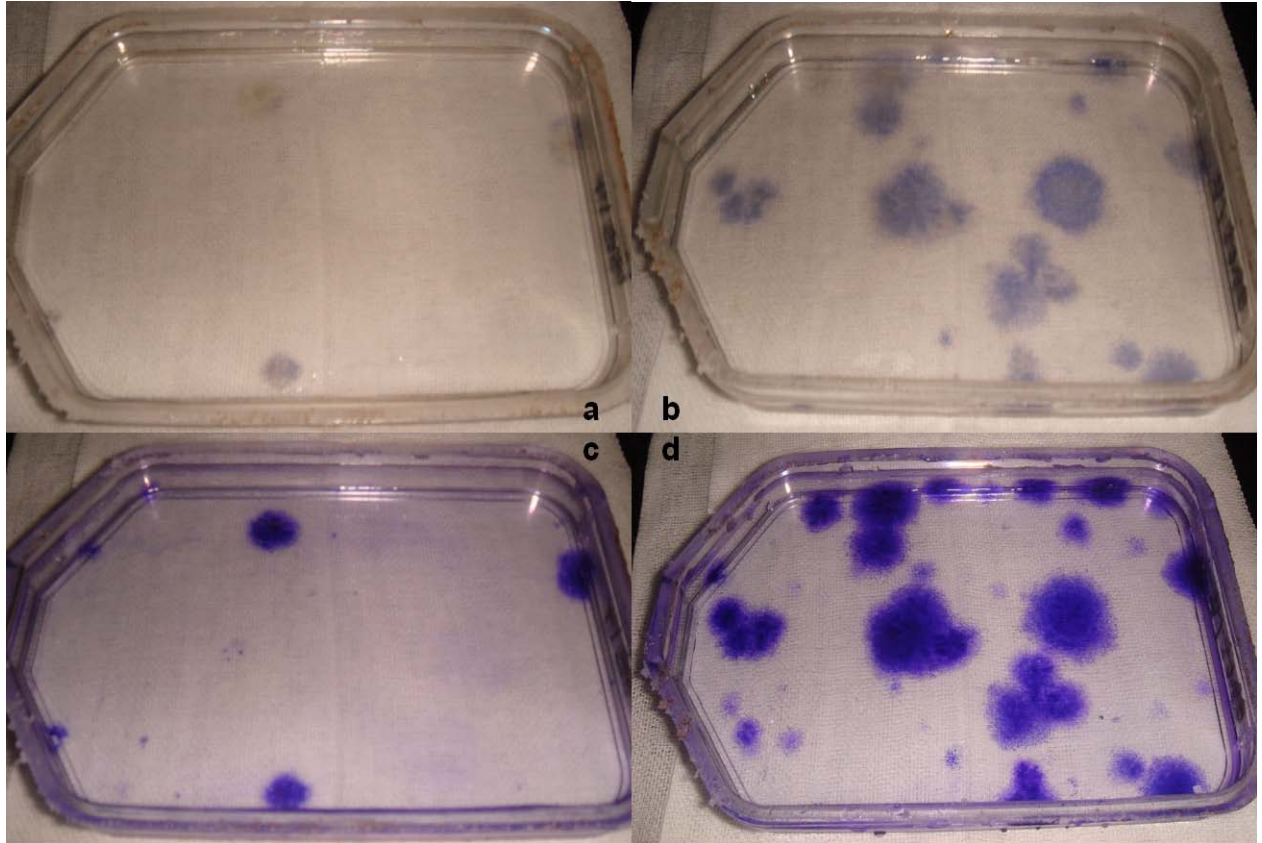


図 28



a: 橈骨骨髓血, ALP 染色

b: 腸骨骨髓血, ALP 染色

c: 橈骨骨髓血, crystal violet 染色

d: 腸骨骨髓血, crystal violet 染色

表 1：骨形態計測データ

		2週	4週	8週	12週	20週
骨石灰化面 Lb.S/BS(%)	コントロール	12.1±16.9	8.0±19.5	29.3±9.4	14.6±11.1	6.4±6.3
	ドリル	4.4±5.2	12.4±9.6	13.3±17.3	18.4±6.7	8.0±5.4
	末梢血移植	8.8±10.0	26.8±24.1	23.0±21.0	29.6±17.6	11.7±5.7
	骨髓血移植	5.2±11.1	51.3±17.6**	56.0±13.7**	60.9±18.1**	52.0±11.4**
骨芽細胞面 Ob.S/BS(%)	コントロール	0±0	0±0	8.8±10.7	2.5±3.1	7.4±7.0
	ドリル	0±0	0±0	3.6±4.7	2.2±1.9	3.8±7.2
	末梢血移植	1.0±1.5	0±0	3.0±3.9	3.1±3.6	11.2±7.6
	骨髓血移植	0±0	24.8±22.4**	26.4±12.7*	23.5±7.0**	27.0±16.6
破骨細胞数 N. Oc.(n)	コントロール	0±0	0±0	11.2±8.1	1.5±2.3	12.5±14.2
	ドリル	0±0	1.0±2.4	7.2±12.0	12.2±7.6	4.8±3.2
	末梢血移植	0±0	0.3±0.8	7.8±5.6	15.7±21.0	6.2±4.2
	骨髓血移植	0±0	11.2±17.4**	63.3±70.6**	26.8±14.8**	12.0±6.9

\*\*； p < 0.01（対コントロール群）

表 2：骨形態計測データ

		4週	8週	12週
骨石灰化面 Lb.S/BS(%)	コントロール, LIPUS(-)		23.1±17.1	
	コントロール, LIPUS(+)		25.3±19.5	
	ドリル, LIPUS(-)		13.7±12.0	
	ドリル, LIPUS(+)		30.4±16.7	
	骨髄血移植, LIPUS(-)	64.8±23.2	63.9±11.6	42.0±15.6
	骨髄血移植, LIPUS(+)	75.1±18.5	77.7±9.6*	50.1±22.0
骨芽細胞面 Ob.S/BS(%)	コントロール, LIPUS(-)		4.7±5.3	
	コントロール, LIPUS(+)		2.3±4.6	
	ドリル, LIPUS(-)		0.1±0.4	
	ドリル, LIPUS(+)		1.8±4.3	
	骨髄血移植, LIPUS(-)	7.8±14.2	38.7±12.5	25.1±15.5
	骨髄血移植, LIPUS(+)	5.2±7.0	52.1±27.9	32.1±8.2
破骨細胞数 N. Oc.(n)	コントロール, LIPUS(-)		4.8±8.7	
	コントロール, LIPUS(+)		13.0±24.3	
	ドリル, LIPUS(-)		4.3±7.0	
	ドリル, LIPUS(+)		4.2±3.0	
	骨髄血移植, LIPUS(-)	12.3±19.2	66.7±28.7	23.3±14.8
	骨髄血移植, LIPUS(+)	13.6±21.4	95.8±39.2	42.3±27.0

\* ; p < 0.05 (対 LIPUS(-) 群)



表 3：中村の治療成績判定基準

臨床評価 21点	疼痛	全くなし	10点
		重労働で中等度	7
		軽労働で中等度	4
	握力(健側比)	90%以上	5
		80%	4
		70%	3
		60%	2
		50%	1
	可動域の改善	20度以上	6
		10～19度	5
5～9度		3	
単純×線評価 9点	硬化像	改善	0
		不変	1
	嚢胞	改善	0
		不変	1
	分節化	改善	0
		不変	1
	Stahl's Index	増加	3
		不変	1
	Carpal Height Ratio	増加	3
不変		1	
総合		30点満点	

症例	性別	手術時 年齢	経過 観察 期間	疼痛		握力 術後 健側比	背屈/掌屈		arc 改善	Stähli's Index		CHR		Lichtman 分類		中村 評価	MRI (PDW) 改善
				術後	術前		術前	術後		術前	術後	術前	術後				
1	M	56	36	なし		82	40/50	40/30	-10	0.20	0.22	0.46	0.51	III b	III b	good	一部改善
2	F	66	58	なし		88	45/30	60/45	40	0.43	0.44	0.56	0.55	II	III a	excellent	改善
3	F	62	58	なし		92	45/30	60/75	40	0.43	0.33	0.56	0.50	II	III a	good	改善
4	F	24	84	なし		100	70/60	50/60	-20	0.41	0.30	0.50	0.51	III a	III a	good	改善
5	M	68	60	なし		84	20/25	40/45	40	0.47	0.33	0.58	0.53	III a	III a	good	不変
6	M	44	60	なし		100	30/30	50/40	30	0.45	0.26	0.54	0.54	III a	III a	good	改善
7	F	65	47	軽度		62	30/35	35/45	15	0.36	0.28	0.55	0.55	II	III b	fair	不変
8	F	19	21	軽度		86	40/30	60/40	30	0.35	0.27	0.45	0.47	III a	III b	good	一部改善
9	M	27	49	なし		71	45/15	60/50	50	0.33	0.24	0.60	0.48	III a	III a	good	不変
10	F	50	48	なし		100	45/35	15/40	-15	0.40	0.42	0.53	0.46	III a	III a	good	改善
11	M	26	41	軽度		66	40/30	35/40	5	0.40	0.45	0.59	0.48	III a	III a	fair	不変
12	F	60	36	軽度		83	50/30	55/35	10	0.40	0.32	0.53	0.53	III a	III a	fair	不変
13	M	16	25	なし		69	40/30	60/45	35	0.37	0.33	0.49	0.47	III a	III a	good	改善
14	M	26	36	軽度		708	30/50	30/60	10	0.31	0.28	0.48	0.46	III b	III b	fair	不変
15	M	41	24	なし		100	60/50	60/55	5	0.47	0.42	0.57	0.60	II	III a	good	改善
16	M	53	36	なし		95	65/55	80/65	25	0.42	0.27	0.64	0.63	III a	III a	good	改善
17	M	22	36	なし		107	45/40	45/55	15	0.33	0.26	0.51	0.56	III a	III a	excellent	改善
18	F	61	15	軽度		50	35/25	55/35	30	0.35	0.35	0.49	0.47	III b	III b	fair	不変
平均		43.67	42.78			83.66			18.61	0.38	0.32	0.54	0.52				

表 4

## 謝辞

本論文の作成にあたり、ご指導、御校閲を賜りました落合直之教授に心より感謝いたします。先生の幅広い知識と経験、そして向学心より生まれた一見奇想天外な、しかし理に適った治療法が、私の研究のきっかけとなりました。さらに、実験に行き詰ったときも叱咤激励して下さり、ここまで導いてくださいました。また、先端応用医学専攻運動器系制御医学分野の石井朝夫准教授、西浦康正講師、三島初講師のご指導、ご助言、ご協力に対してここに改めて感謝いたします。さらに実験をするにあたり、多大なるご協力をいただいた筑波大学大学院 西野衆文先生、渡辺新先生、整形外科医学博士 酒井晋介先生に厚く御礼申し上げます。

## 学会発表

### 1. 第48回日本手の外科学会学術集会

2005年4月21日(木)・22日(金) 海峡メッセ下関

骨髄血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用したキーンベック病の新しい  
治療法とその短期成績について

小川 健、西浦康正、田中利和、許表楷、落合直之

### 2. 第11回イリザロフ法研究会

2005年9月17日(土) フォーシーズンホテル東京 椿山荘

外傷性中手骨部分欠損に対してイリザロフ法骨延長を試みた1例

小川 健、石井朝夫、横井直幸、落合直之

### 3. 第9回超音波骨折治療研究会

2006年1月21日(土) ハービス大阪

多施設での低出力超音波パルス(LIPUS)使用状況調査 ー適応と効果の検討ー

小川 健、石井朝夫、落合直之

### 4. 第55回東日本整形災害外科学会

2006年9月15日(金)・16日(土) ラディソン都ホテル東京

低出力超音波パルス治療における骨癒合不良因子の検討

小川 健、石井朝夫、落合直之

### 5. 第17回日本臨床スポーツ医学会学術集会

2006年11月2日(木)・3日(金) 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

疲労骨折に対する低出力超音波パルスの有効性の検討

小川 健、石井朝夫、平野篤、向井直樹、上牧裕、落合直之

6. 29th American Society of Bone Mineral Research (ASBMR 2007)

2007年9月16日(日)・19日(水) Honolulu, Hawaii

An Experimental Rabbit Model of Lunate-like Osteonecrosis: Is Transplantation of Bone Marrow Effective for Remodeling of Necrotic Bone?

Ogawa T, Ishii A, Mishima H, Sakai S, Watanabe A, Ochiai N.

7. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会

2007年10月25日(木)・26日(金) アクトシティ浜松

家兎骨壊死モデルにおける骨新生の評価-骨壊死に対する骨髄血移植の有効性-

小川 健、石井朝夫、三島初、酒井晋介、渡辺新、落合直之

8. 第22回東日本手の外科研究会

2008年1月25日(金) 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

MRIと組織学的所見が比較できたキーンベック病の1例

小川健、西浦康正、落合直之

9. 第51回日本手の外科学会学術集会

2008年4月17日(木)・18日(金) エポカルつくば

骨髄血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用したキーンベック病の新しい治療法とその基礎的研究

小川 健、西浦康正、石井朝夫、田中利和、落合直之

10. 第31回日本骨・関節感染症学会

2008年6月27日(金) ホテルテラスザガーデン水戸

サルモネラ骨髄炎の2例

小川健、上牧裕、星忠行、中島宏、埜口博司、小松満、落合直之

## 引用文献

- 1) 松野丈夫. 大腿骨頭壊死症. 標準整形外科学(第7版); 506-514, 1999
- 2) 荻野利彦. 手の骨壊死. 標準整形外科学(第7版); 381-382, 1999
- 3) Norman D, et al: Vascular deprivation-induced necrosis of the femoral head of the rat: an experimental model of avascular osteonecrosis in the skeletally immature individual or Legg-Perthes disease. *Int J Exp Pathol* 79: 173-181, 1998
- 4) Malizos KN, et al: An experimental canine model of osteonecrosis: characterization of the repair process. *J Orthop Res* 11: 350-357, 1993
- 5) Yamamoto T, et al: Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits with Shwartzman reaction. *Clin Orthop Relat Res* 316: 235-243, 1995
- 6) Ichiseki T, et al: Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 9: 509-515, 2004
- 7) Hirano T, et al: Osteonecrosis of the femoral head of growing, spontaneously hypertensive rats. *Acta Orthop Scand* 59: 530-535, 1988
- 8) Murata M, et al: Osteonecrosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of glucocorticoid. *J Orthop Sci* 12: 289-295, 2007
- 9) Aspenberg P, et al: Experimental osteonecrosis of the lunate. Revascularization may cause collapse. *J Hand Surg* 19B: 565-569, 1994
- 10) Sunagawa T, et al: Role of conventional and vascularized bone grafts in scaphoid nonunion with avascular necrosis: A canine experimental study. *J Hand Surg* 25A: 849-859, 2000
- 11) Kienböck's R: Über traumatische Malazie des Mundbeins und ihre

- Folgezustände: Entertungsformen und Kompressionsfrakturen.  
Fortschr Röntgenstr 16: 77-103, 1910
- 1 2) Kienböck's R: Concerning traumatic malacia of the lunate and its consequences: Degeneration and compression fractures. (Reprinted in Clin Orthop Relat Res 149: 4-8, 1980
  - 1 3) 清重佳郎ほか: Kienböck 病の疫学: 日手会誌 8-2: 299-302, 1991
  - 1 4) Gelberman RH, Gross MS. The vascularity of the wrist. Identification of arterial patterns at risk. Clin Orthop Relat Res 202: 40-49, 1986
  - 1 5) Freedman DM, et al: Vascularity of the carpus: Clin Orthop Relat Res 383: 47-59, 2001
  - 1 6) Marek FM, et al: Avascular necrosis of the carpal lunate. Clin Orthop Relat Res 10: 96-107, 1957
  - 1 7) Schiltenswolf M, et al: Further investigations of the intraosseous pressure characteristics in necrotic lunates (Kienböck's disease). J Hand Surg 21A: 754-758, 1996
  - 1 8) Hultén O: Über anatomische variationen der Handgelenkknochen. Acta Radiol Scand 9: 155-168, 1928
  - 1 9) Lichtman DM, et al: Kienböck's disease: Update on silicon replacement arthroplasty. J Hand Surg 7A: 343-347, 1982
  - 2 0) Kristensen SS, et al: Kienböck's disease -late results by non-surgical treatment. J Hand Surg 11B: 422-425, 1986
  - 2 1) 藤沢幸三: Kienböck 病における保存的治療または放置症例に対する長期遠隔調査. 整・災外 29: 1209-1218, 1986
  - 2 2) 井上禎三: Kienböck 病の病理学的ならびに臨床的研究. 日整会誌 44: 1035-1061, 1970

- 2 3) 国下正英, 他 : Kienböck 病に対する穿孔術の効果の検討. 臨整外 13: 860-864, 1978
- 2 4) 古月顕宗, 他 : 創外固定牽引を用いたキーンベック病の治療経験. 日手会誌 15: 648-652, 1999
- 2 5) Hori Y, et al: Blood vessel transplantation to bone. J Hand Surg 4A: 23-33, 1979
- 2 6) 毛利知満, 他 : Kienböck 病の治療—壊死骨の血行再生に関する研究—. 整形外科 28: 1556-1560, 1977
- 2 7) Moran SL, et al: The use of the 4 + 5 extensor compartmental vascularized bone graft for the treatment of Kienböck's disease. J Hand Surg 30A: 50-58, 2005
- 2 8) 重松浩司, 他 : Kienböck 病に対する橈骨からの有茎血管柄付き骨移植術. 新 OS now 23: 40-45, 2004
- 2 9) Iwasaki N, et al: Radial osteotomy for late-stage Kienböck's disease; wedge osteotomy versus radial shortening. J Bone Joint Surg 84B: 673-677, 2002
- 3 0) Koh S, et al: Surgical outcome of radial osteotomy for Kienböck's disease—Minimum 10 years of follow-up. J Hand Surg 28A: 910-916, 2003
- 3 1) Takase K, et al: Lunate excision, capitate osteotomy, and intercarpal arthrodesis for advanced Kienböck disease. Long-term follow-up. J Bone Joint Surg 83A: 177-83, 2001
- 3 2) Ishiguro T: Experimental and clinical studies of Kienböck disease; excision of the lunate followed by packing of the free tendon. J Jpn Orthop Assoc 58: 509-522, 1984
- 3 3) Ueba Y, et al: An operative procedure for advanced Kienböck's disease. Excision of the lunate and subsequent replacement with a



- tendon-ball implant. J Orthop Sci 4: 207-215, 1999
- 34) 石田治, 他: キーンベック病に対する骨核入り筋膜球置換術. 日整会誌 82: 28-33, 2008
- 35) 鈴木克侍, 他: Kienböck 病に対するセラミック人工月状骨置換術. 日手会誌 20: S19, 2003
- 36) 市川誠, 他: 近位手根列切除術の長期成績の検討. 日手会誌 15: 677-681, 1999
- 37) Croog AS, et al: Proximal Row Carpectomy for Advanced Kienböck's Disease: Average 10-Year Follow-Up. J Hand Surg 33A: 1122-1130, 2008
- 38) Inglis AE, et al: Proximal-row carpectomy for diseases of the proximal row. J Bone Joint Surg 59A: 460-463, 1977
- 39) Schmitt R, et al: Imaging and staging of avascular osteonecroses at the wrist and hand. Eur J Radiol 25: 92-103, 1997
- 40) 松木浩, 他: Kienböck 病に対する橈骨骨切り術前後の MRI 所見と治療成績. 日手会誌 22: 146-148, 2005
- 41) Loeffler M, et al: Stem cell and cellular pedigrees - a conceptual introduction. In: Stem cells(ed. by Potten, CS). Academic press, New York: 1-27, 1997
- 42) Friedenstein AJ, et al: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 4: 267-274, 1976
- 43) Ohgushi H, et al: Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. J Orthop Res 7: 568-578, 1989
- 44) Pittenger MF, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147, 1999
- 45) Connolly JF, et al: Development of an osteogenic bone-marrow preparation. J Bone Joint Surg 71A: 684-691, 1989

- 4 6) Connolly JF, et al: Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. Clin Orthop Relat Res 355 Suppl: 257-266, 1998
- 4 7) Hernigou P, et al: Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. J Bone Joint Surg 87A: 1430-1437, 2005
- 4 8) Healey JH, et al: Percutaneous bone marrow grafting of delayed union and nonunion in cancer patients. Clin Orthop Relat Res 256: 280-285, 1990
- 4 9) Asahara T, et al: Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. Circ Res 85: 221-228, 1999
- 5 0) Bender JG, et al: Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. Blood 77: 2591-2596, 1991
- 5 1) 室原豊明, 他: 骨髓細胞による血管再生療法 血管を作る骨髓細胞. 血管医学 2: 481-487, 2001
- 5 2) Tateishi-Yuyama E, et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet 360: 427-435, 2002
- 5 3) 東幸仁, 他: 血管新生療法と血管内皮機能. 治療学 39: 737-740, 2005
- 5 4) Hernigou P, et al: Bone-marrow transplantation in sickle-cell disease. Effect on osteonecrosis: a case report with a four-year follow-up. J Bone Joint Surg 79A: 1726-1730, 1997
- 5 5) Gangji V, et al: Treatment of osteonecrosis of the femoral head

- with implantation of autologous bone-marrow cells. Surgical technique. J Bone Joint Surg 87A Suppl 1: 106-112, 2005
- 5 6) 赤荻博, 他: 大腿骨頭壊死に対する自家骨髄細胞移植の短期成績. Hip Joint 32: 169-175, 2006
- 5 7) 酒井晋介ら: 末梢血および骨髄血における骨形成に関与する成長因子濃度の検討. 日整会誌 80: S968, 2006
- 5 8) Sakai S, et al: Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. Acta Orthop 79: 445-448, 2008
- 5 9) Huang JI, et al: Lunate arthroplasty with autologous mesenchymal stem cells in a rabbit model. J Bone Joint Surg 88A: 744-52, 2006
- 6 0) Ikeguchi R, et al: Regeneration of osteonecrosis of canine scapho-lunate using bone marrow stromal cells: possible therapeutic approach for Kienböck disease. Cell Transplant 15: 411-422, 2006
- 6 1) Duarte LR: The stimulation of bone growth by ultrasound. Arch Orthop Trauma Surg 101: 153-159, 1983
- 6 2) Heckman JD, et al: Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. J Bone Joint Surg 76A: 26-34, 1994
- 6 3) Kristiansen TK, et al: Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound. J Bone Joint Surg 79A: 961-973, 1997
- 6 4) Nolte PA, et al: low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of nonunions. J trauma 51: 693-703, 2001
- 6 5) Pigozzi F, et al: Low-intensity pulsed ultrasound in the conservative treatment of pseudoarthrosis. J Sports Med Phys Fitness

- 44: 173-178, 2004
- 6 6) Gebauer D, et al: Low-intensity pulsed ultrasound; effects on nonunions. *Ultrasound Med Biol* 31: 1391-1402, 2005
- 6 7) Rutten S, et al: Use of low-intensity pulsed ultrasound for posttraumatic nonunions of the tibia; a review of patients treated in the Netherlands. *J Trauma* 62: 902-908, 2007
- 6 8) 水野耕作, 他: 超音波骨折治療器の遷延癒合・偽関節に対する多施設臨床試験. *整・災外* 46: 757-765, 2003
- 6 9) 小川健, 他: 低出力超音波パルス治療における骨癒合不良因子の検討. *東日本整災外会誌* 19: 123-128, 2007
- 7 0) Azuma Y, et al: Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Mineral Res* 16: 671-680, 2001
- 7 1) Kokubu T, et al: Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 284-287, 1999
- 7 2) Warden SJ, et al: Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 443-450, 2001
- 7 3) Sant' Anna EF, et al: Effect of low intensity pulsed ultrasound and BMP-2 on rat bone marrow stromal cell gene expression. *J Orthop Res* 23: 646-652, 2005
- 7 4) Sena K, et al: Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells. *Ultrasound Med Biol* 31: 703-708, 2005

- 75) Takayama T, et al: Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS17/2.8 cells. *Life Sci* 80: 965-971, 2007
- 76) Gleizal A, et al: Transcriptional expression of calvarial bone after treatment with low-intensity pulsed ultrasound; an *in vitro* study. *Ultrasound Med Biol* 32: 1569-1574, 2006
- 77) Tang CH, et al: Ultrasound induces hypoxia-inducible factor-1 activation and inducible nitric-oxide synthase expression through the integrin/integrin-linked kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway in osteoblasts. *J Biol Chem* 282: 25406-25415, 2007
- 78) 成瀬康治, 他: 特発性膝骨壊死に対する低出力超音波パルスの治療効果の検討. *東日本整災外会誌* 19: 223, 2007
- 79) 中尾悦宏, 他: 手の外科領域における低出力超音波の使用経験 -Kienböck病、舟状骨骨折の治療の試みを中心に-. 第3回超音波骨折治療研究会抄録: 13, 2000
- 80) 落合直之, 他: 骨壊死に対する低出力超音波治療の役割. 第6回超音波骨折治療研究会抄録: 30, 2003
- 81) 小川健, 他: 骨髄血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用したキーンベック病の新しい治療法とその短期成績について. *日手会誌* 22: 807-812, 2005
- 82) 小原由紀彦, 他: 関節内骨壊死の実験的研究(第1報) MRスペクトロスコピーを用いた早期壊死骨髄内水脂肪信号変化. *日手会誌* 23: S200, 2006
- 83) Parfitt AM, et al: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2: 595-610,

1987

- 8 4) Recker RR, et al: Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. *J Bone Miner Res* 3: 133-44, 1988
- 8 5) 小原由紀彦ら: MR スペクトロスコピーによる関節内骨壊死の検討(第 2 報) 長期経過観察, 回復期脂肪水信号比の測定. *日手会誌* 24: S214, 2007
- 8 6) Bernick S, et al: Cellular events associated with the induction of bone by demineralized bone. *J Orthop Res* 7: 1-11, 1989
- 8 7) Lewandrowski KU, et al: Improved osteoinduction of cortical bone allografts: a study of the effects of laser perforation and partial demineralization. *J Orthop Res* 15: 748-56, 1997
- 8 8) Isner JM, et al: Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 103: 1231-6, 1999
- 8 9) 矢嶋淳, 他: 重度四肢虚血疾患に対しての末梢血幹細胞移植の可能性. *移植* 43: 98-106, 2008
- 9 0) Hernigou P: Growth factors released from bone marrow are promising tools in orthopedic surgery. *Rev Rhum Engl Ed* 65: 79-84, 1998
- 9 1) Enneking WF, et al: Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg* 57A: 237-252, 1975
- 9 2) 神宮司誠也: 低出力超音波パルス. *The Bone* 18: 713-717, 2004
- 9 3) Lirani-Galvão AP, et al: Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg* 24: 735-740, 2006
- 9 4) Maddi A, et al: Long wave ultrasound may enhance bone regeneration by altering OPG/RANKL ratio in human osteoblast-like cells. *Bone* 39:

- 283-288, 2006
- 9 5) Saito M, et al: Hypergravity and low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) accelerate in vitro osteogenic matrix accumulation in marrow stromal cell / three dimensional beta-tricalcium phosphate composites. Transaction of ORS: 846, 2006
- 9 6) 斎藤充, 他: ヒト再建前十字靭帯由来細胞の産生するコラーゲンの成熟過程に及ぼす低出力超音波パルス刺激の影響. 日整会誌 80: S817, 2006
- 9 7) Nakamura R, et al: Radial wedge osteotomy for Kienböck disease. J Bone Joint Surg 73A: 1391-1396, 1991
- 9 8) 柏木大治, 他: Kienböck 病の手術的療法. 整形外科 20: 196-201, 1969
- 9 9) Zelouf DS, et al: External fixation and cancellous bone grafting for Kienböck's disease: a preliminary report. J Hand Surg 21A: 746-753, 1996
- 1 0 0) 矢島弘嗣, 他: Kienböck 病に対する血管束移植術. 日整会誌 82: 28-33, 2008
- 1 0 1) 池上博泰, 他: Stage III, IV の Kienböck 病に対する単支柱式創外固定の応用. 日本創外固定・骨延長学会誌 14: 53-57, 2003
- 1 0 2) Sowa DT, et al: Application of magnetic resonance imaging to ischemic necrosis of the lunate. J Hand Surg 14A: 1008-1016, 1989
- 1 0 3) 長田夏哉, 他: Kienböck 病の MRI. 日手会誌 18: 798-802, 2001
- 1 0 4) Hernigou P, et al: The use of percutaneous autologous bone marrow transplantation in nonunion and avascular necrosis of bone. J Bone Joint Surg Br 87B: 896-902, 2005
- 1 0 5) Majors AK, et al: Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. J Orthop Res 15: 546-557, 1997

- 1 0 6) 建部将広, 他 : Kienböck 病に対する橈骨骨切り術の成績 月状骨分節  
部位による検討. 日手会誌 23: 473-475, 2006
- 1 0 7) Trumble TE, et al: Histologic and magnetic resonance imaging  
correlations in Kienböck's disease. J Hand Surg 15A: 879-84, 1990
- 1 0 8) Hashizume H, et al: Histopathology of Kienböck's disease.  
Correlation with magnetic resonance and other imaging techniques. J  
Hand Surg 21B: 89-93, 1996
- 1 0 9) 小川健, 他 : MRI と組織学的所見が比較できたキーンベック病の 1 例.  
東日本手の外科研究会 22: 92, 2008
- 1 1 0) Mclain RF, et al: Aspiration of osteoprogenitor cells for  
augmenting spinal fusion: comparison of progenitor cell  
concentrations from the vertebral body and iliac crest. J Bone Joint  
Surg 87A: 2655-2661, 2005
- 1 1 1) Risbud MV, et al: Osteogenic potential of adult human stem cells  
of the lumbar vertebral body and the iliac crest. Spine 31: 83-89,  
2006



## 参 考 论 文

参考論文については学術雑誌掲載論文から構成されていますが、著作権者(出版社、学会等)の許諾を得ていないため、筑波大学では電子化・公開しておりません。

なお、下記リンクのあるものについては電子ジャーナルとして出版社から公開されています。契約している場合は全文を読むことができます。詳しくは下記のリンク先をご覧ください。

論文 1) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhsb.2006.08.010>

論文 2) 「骨髄血移植・低出力超音波療法・創外固定を併用した Kienbock 病の新しい治療法とその短期成績について」日本手の外科学会雑誌別冊 2005, 22 巻 6 号

論文 3) 「他施設での低出力超音波パルス使用状況調査：効果と骨癒合不良因子の検討」東日本整災会誌 2007, 19 巻