

犬の骨欠損治療における骨髄間葉系幹細胞と多血小板血漿を用いた注入型培養骨移植法

○宮脇慎吾 長谷川裕基 西岡佑介 高木 充 渡邊一弘 山添和明

岐阜大学応用生物科学部獣医外科学研究室

【はじめに】

近年、獣医臨床においても骨欠損部に対する骨再生治療が求められるようになり、その1つとして、生体外で培養した組織(細胞)を生体に移植する方法が行われている。今回、我々は犬の骨髄液から分離した骨髄間葉系幹細胞(BMSCs)を初代培養から骨分化誘導培地で培養し、多血小板血漿(PRP)と混合してできた培養骨を骨欠損部に注入・移植する方法を行い良好な結果を得たので報告する。

【材料と方法】

ビーグル犬の大転子窩より骨髄生検針を骨髄腔内に刺入し、ヘパリンを入れたシリンジにて骨髄液を約10ml採取した。密度勾配遠心分離法により採取した骨髄液から有核細胞層を分離し、得られた有核細胞をPBSで2回洗浄した。その後、有核細胞を骨分化誘導培地(10%牛胎仔血清、50 μ g/ml²リン酸アスコルビン酸、10mM β -グリセロリン酸、10-8Mデキサメサゾン)を添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)に再懸濁し、2 \times 10⁴/cm²の濃度でシャーレに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、飽和蒸気圧下で単層培養した。1週間に1~2回培養液の交換を行い、細胞が80~90%コンフルエントに達した時点で5 \times 10³/cm²の濃度になるように継代し、2~3継代目のBMSCsを移植に用いた。ついで、移植直前に血液保存液(ACD-A液[®])を入れたシリンジにて頸静脈から20mlの血液を採取し、遠心分離(280G、15分)して得られた血漿をさらに遠心(800G、9分)し、その下層約0.2mlをPRPとして回収した。2継代目のBMSCsを0.25%トリプシンで処理した後、PBSで洗浄して細胞懸濁液0.2mlと前述したPRP 0.2mlに10%塩化カルシウム水溶液0.02mlを加え25ゲージの注射針を用いて骨欠損部位に注入・移植した。さらに3継代目についても同様の方法で注入・移植を行った。

【結果と考察】

BMSCsを骨分化誘導培地で培養・継代した細胞には、ALP活性を示す細胞が多数見られたことから、BMSCsの多くは骨形成細胞へ分化していると考えられた。一方、骨分化誘導培地での培養は細胞増殖率に優れており、少量の採取量においても多くの細胞数を確保することができた。さらに培養細胞とPRPを混合した培養骨はシリンジを用いて低侵襲かつ容易に移植することができ、移植を頻回に行うことが可能であった。以上のことから本方法は、小型犬を含めた小動物臨床に適した方法であると考えられた。

現在、我々の研究室では、小型犬の橈尺骨骨折における癒合不全の症例に対して本方法を適用し、臨床症状の改善と骨折の修復を示唆する所見がみられている。さらに、歯科領域においても、犬の歯周組織再生への応用を試みている。今後、移植細胞の生体内における動向と骨形成に及ぼす影響を組織学的に確認することが必要である。また、培養の至適条件や骨欠損部への注入法などを検討することにより、骨再生療法におけるより効果的な臨床応用が期待される。