

厚生労働科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

自家修復能力を用いた軟骨欠損の
修復法の確立に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 糸満盛憲

平成15(2003)年3月

目 次

I. 総括研究報告

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立に関する研究.....	1
糸満盛憲	

II. 分担研究報告

1. 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立に関する研究.....	12
・新しい移植鑄型と細胞源の検討に関する研究・	
糸満盛憲	
2. 同種移植骨の殺菌とウイルス不活化を目的とした	
マイクロ波誘電加熱技術の確立.....	19
馬淵清資	
3. 培養軟骨組織の臨床応用	21
岩本幸英	
4. SOX9 の遺伝子導入による軟骨細胞分化に関する研究.....	27
石黒直樹	
5. 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立.....	31
越智光夫	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	36
--------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 (添付)	
----------------------	--

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
総括研究報告書

自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立に関する研究

主任研究者 糸満 盛憲 北里大学医学部整形外科教授

研究要旨

(I) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：工業用マイクロ波加温装置を利用して、(1)加温処理したウシ皮質骨の力学的強度の検討、(2)マイクロ波加温による 80℃・10 分間の加温処理の殺菌効果の検討をおこなった。前年度までに確立した条件で処理することにより、処理された骨の圧縮強度、最大歪、ヤング率は未処理の骨と有意な差はなかった。また種々の細菌は完全に殺菌された。現在マイクロ電子株式会社と共同し、プロトタイプを作製している。

(II) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：新しい鋳型として感温性ゼラチン poly(N-isopropylacrylamide)-grafted gelatin(PNIPAAm-gelatin)と II 型コラーゲンスポンジの有用性の検討を行った。移植細胞としては、骨髄由来未分化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞、軟骨分化誘導能をもつ転写因子 SOX9 を遺伝子導入した細胞、皮膚繊維芽細胞の有用性を検討した。また軟骨修復にかかわる遺伝子や因子の検討を行った。

分担研究者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

馬淵清資

北里大学医療衛生学部・教授

岩本幸英

九州大学医学部整形外科学・教授

石黒直樹

名古屋大学医学部整形外科学・教授

越智光夫

広島大学整形外科学・教授

法の確立：変形性膝関節症、関節リウマチ、外傷、腫瘍切除術によって生じる骨軟骨欠損を同種あるいは自家骨軟骨組織片移植にて修復する試みがなされているが、いまだ不十分な点が多い。一方自家培養軟骨細胞により補填修復する試みは、関節軟骨から軟骨組織を採取する必要があること、軟骨細胞の単層培養では細胞の形質の維持が困難であること、また移植時に移植細胞が流出する可能性があること、細胞移植部と周囲関節軟骨との間に生化学的および物理学的相違があるなどの問題がある。本研究では、組織工学的手法を用いて適切な鋳型を開発し、この鋳型に軟骨細胞あるいは軟骨細胞の前駆細胞を三次元的に培養し、必要とされる大きさや形状の軟骨組織を作製する。欠損部に軟骨様組織を移植することで自家細胞により軟骨欠損を修復し、かつ長期間再生組織により関節軟骨機能を維持する方法を確立する。本年度は新しい鋳型として感温性ゼラチン poly(N-isopropylacrylamide)-grafted gelatin(PNIPAAm-gelatin)と II 型コラーゲンスポンジの有用性の検討を行った。移植細胞としては、骨髄由来未分化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞、軟骨分化誘導能をもつ転写因子 SOX9 を遺伝子導入した細胞、皮膚繊維芽細胞の有用性を検討した。また軟骨修復にかかわる遺伝子や因子の検討を行った。

A. 研究目的

(I) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：同種骨は人工骨に比べ骨誘導能に優れているが、ウイルスや細菌などの感染性疾患の伝播の危険を有する。また従来の滅菌処理方法では、骨誘導能を損なう可能性がある。本研究の目的は、マイクロ波加温装置を用いて不定形の骨を均一に加温する条件を検討し、適切な加温技術を確立し、骨誘導能を維持しつつ感染性疾患の伝播の可能性のない同種骨の滅菌法を実用可能とすることである。本年度は工業用マイクロ波加温装置を利用して、(1)加温処理したウシ皮質骨の力学的強度の検討、(2)マイクロ波加温による 80℃・10 分間の加温処理の殺菌効果の検討をおこなった。

(II) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復

B. 研究方法

(I) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：
(1) 加温処理した骨の力学的検討。工業用マイクロ波誘電加温装置を用い、昨年度までに確立した条件で処理した。静的荷重試験は精密万能試験機を、硬度試験はビッカース美称硬さ試験機を用いた。(2) 加温処理の殺菌効果の検討。表皮ブドウ球菌、MRSA・Mu50、超球菌 γ 型、黄色ブドウ球菌、大腸菌の懸濁液を装置内に設置し、(1)と同様の方法で処理した。経時的にサンプリングし、培養し菌コロニー数を計測した。

(II) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：(1) 新しい鑄型の検討。A) PNIPAAm-gelatinを用いた *in vitro* での軟骨様組織の再構築を検討した。B) PNIPAAm-gelatinを用いた *in vivo* での関節軟骨修復を検討した。C) II型コラーゲンスポンジを用いた培養による細胞形質維持能及び再分化能の評価と、II型コラーゲン自体の効果を検討した。(2) 移植細胞の検討。A) 軟骨分化誘導能をもつ転写因子 SOX9 を遺伝子導入した骨髄間葉系細胞の応用を検討した。B) 臍帯血由来未分化間葉系細胞の多分化能とその細胞特性を検討した。C) 皮膚繊維芽細胞の多分化能を検討した。D) 骨髄由来未分化間葉系細胞の適切な培養条件を検討した。(3) 軟骨修復にかかわる遺伝子や因子の検討。胎仔軟骨と成体軟骨の修復機所の相違を分析し、修復に関わる遺伝子、因子を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験規則(各大学の動物実験指針)に沿い、実験操作に関しては動物に不必要な不安や苦痛を与えないよう取り扱いに注意している。ヒトの組織細胞を用いて研究を行う場合には病院内の倫理委員会の承認を得て(各大学医学部・病院の研究倫理基準)、提供者の自由意思による同意を得て行っている。臨床応用においては、各病院内の倫理委員会の承認を得る。研究対象者から研究に関する十分なインフォームドコンセントを得た後、本人の自由意志による同意を得て行う。

C. 研究結果

(I) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：
(1) 加温処理した骨の力学的検討。圧縮強度・最大歪・ヤング率は未処理群と比較し差を認め

なかった。ビッカース硬さは未処理群と比較し4.1%低下した。(2) 加温処理の殺菌効果の検討。すべての菌において完全に殺菌された。

(II) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立：(1) 新しい鑄型の検討。A) 単層培養により一旦脱分化傾向にあった軟骨細胞は、PNIPAAm-gelatin 内で培養することにより再分化し、また継続して軟骨の形質を維持した。B) PNIPAAm-gelatin を用いて作製した軟骨様組織を移植し、移植部が硝子軟骨として再生され関節面として機能していること、PNIPAAm-gelatin が生体適合性を持つことが確認された。C) II型コラーゲンスポンジを用い培養することで、軟骨細胞はその形質を維持し、脱分化した軟骨細胞は再分化する傾向を示した。浮遊培養系に II型コラーゲンを投与すると、脱分化した細胞の再分化が促進された。(2) 移植細胞の検討。A) 完全長 SOX9 cDNA を骨髄由来未分化間葉系細胞に遺伝子導入し、この細胞が軟骨に分化し軟骨の細胞外基質を産生することを確認した。この細胞をウサギ軟骨欠損モデルに移植し、良好な軟骨組織の再生を確認した。また肥大軟骨、骨への過分化は起こらず、関節軟骨細胞の性格を保つことが示された。B) 臍帯血由来未分化間葉系細胞が単層培養にて、また特別な分化誘導因子を加えなくても軟骨細胞様細胞に分化しうることを確認した。C) ヒト正常皮膚由来の繊維芽細胞株 NB1RGB は各分化誘導条件により、脂肪細胞様細胞、骨芽細胞様細胞、軟骨細胞様細胞へ分化することを確認した。D) 骨髄由来未分化間葉系細胞から軟骨細胞様細胞に分化誘導する際には、単層培養下での Fibroblast growth factor 添加後、三次元培養下で Transforming growth factor- β , dexamethazone 添加することが良好な硝子軟骨様組織の作製に有効であることが示された。(3) 軟骨修復にかかわる遺伝子や因子の検討。成体に対し胎仔軟骨では *c-fos* 遺伝子発現の持続時間が長いこと、この遺伝子発現のトリガーは ATP であることが示された。またこの ATP により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、周囲の軟骨細胞に刺激が伝播されることが明らかとなった。

D. 考察

(I) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発：

(1) 加温処理した骨の力学的検討。従来の家兔を用いた実験結果とほぼ同様であり、マイクロ波による 80℃・10 分間の加温が力学的強度に与える影響は少ないと考えられた。(2) 加温処理の殺菌効果の検討。マイクロ波加温による殺菌効果は、従来の外部加熱と同様の結果であり、過熱によるたんぱく質の変性が主な作用であると考えられる。

(II) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立: 現在臨床応用されている方法の問題点としては以下のことがあげられる。i) ドナーとして健全な関節軟骨を採取する必要がある。臨床的には軟骨の採取手術と移植軟骨様組織の移植手術と 2 回の手術が必要となる。ii) 採取できる軟骨細胞には限りがあるため、広範囲の軟骨欠損には対応できない。iii) 移植軟骨様組織と周囲の関節軟骨の生化学的及び力学的特性は必ずしも一致していない。iv) 移植軟骨様組織と周囲の関節軟骨との境界の融合が認められないことが多い。v) 移植軟骨細胞自身の細胞活性が重要であるため、高齢者への適応は困難である。これらの問題を解決するために、上記の新しい鑄型の開発は有用であると考えられた。移植細胞としては、上記の細胞が軟骨細胞にかわり応用できる可能性が示された。また軟骨修復に関わる因子が明らかとなり、細胞や組織に適した環境や培養条件の理解に役立つものと考えられた。

E. 結論

(I) マイクロ波を用いた骨加温技術の開発: 80℃・10 分間のマイクロ波加温が骨の力学的強度に与える影響は少ないことが確認された。80℃・10 分間のマイクロ波による加温処理条件により、移植骨は殺菌処理が可能であることを確認した。

(II) 自家修復能力を用いた軟骨欠損の修復法の確立: 新しい鑄型として、PNIPAAm-gelatin、II 型コラーゲンスポンジの有用性が示された。骨髄由来未分化間葉系細胞、臍帯血由来未分化間葉系細胞あるいは SOX9 を遺伝子導入した骨髄細胞、皮膚繊維芽細胞が軟骨欠損の修復に活用できる可能性を示した。軟骨の修復関わる因子とそのメカニズムを検討した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ibusuki S, Iwamoto Y, et al.
Tissue-engineered cartilage using an injectable and *in situ* gelable thermoresponsive gelatin: Fabrication and *in vitro* performances. *Tissue Engineering, in press*

Ibusuki S, Iwamoto Y, et al. System engineered cartilage using PNIPAAm-gelatin as *in situ* formable scaffold: *In vivo* performance. *Tissue Engineering, in press*

Matsuda S, Iwamoto Y, et al. Tibial shaft axis does not always serve as a correct coronal landmark in total knee arthroplasty for varus knees. *J. Arthroplasty, in press*

Matsuda S, Iwamoto Y, et al. A comparison of rotational landmarks in the distal femur and the tibial shaft. *Clin. Orthop. Related Res., in press*

Ide Y, Iwamoto Y, et al. Characterization of the genomic structure and expression of the mouse Apex2 gene. *Genomics, in press*

Tanaka K, Iwamoto Y, et al. A Kruppel-Associated Box-Zinc finger protein, NT2, represses cell Type-Specific promoter activity of the α (XI) collagen gene. *Mol. Cell. Biol., 22(12): 4256-4267, 2002*

Yamashita A, Iwamoto Y, et al. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Immunol., 168: 450-458, 2002*

Maeda T, Iwamoto Y, et al. Involvement of CD4+CD57+T cells in the disease activity of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism, 46(2): 379-384, 2002*

Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al. Possible involvement of the vascular endothelial growth factor-Flt-1-Focal adhesion kinase pathway in chemotaxis and the cell proliferation of osteoclast precursor cells in arthritic joints. *J. Immunology, 168: 5824-5831, 2002*

- Kawano T, Iwamoto Y, et al. Factors affecting patellar tracking after total knee arthroplasty. *J. Arthroplasty*, 17(7): 942-947, 2002
- Jingushi S, Iwamoto Y, et al. Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft. *J. Orthop. Sci.*, 7: 490-494, 2002
- Miyagi T, Iwamoto Y, et al. Changes in patellar tracking after total knee arthroplasty : 10-year follow-up Miller-Galante I knees. *Orthopedics*, 25(8): 811-813, 2002
- Miura H, Iwamoto Y, et al. Prediction of total knee arthroplasty polyethylene wear using the wear index. *J. Arthroplasty*, 17(6): 760-766, 2002
- Kurata K, Iwamoto Y, et al. Influences of newly formed woven bone on tissue stresses in rat dorsal vertebrae subjected to mechanical loading. *JSME Int. J.*, 45(2): 558-566, 2002
- Moro-oka T, Iwamoto Y, et al. Patellar tracking and patellofemoral geometry in deep knee flexion. *Clin. Orthop. Related Res.*, 394 : 161-168, 2002
- Jingushi S, Iwamoto Y, et al. Transtrochanteric valgus osteotomy for the treatment of osteoarthritis of the hip secondary to acetabular dysplasia. *J. Bone Joint Surg. (B)* , 84(4): 535-539, 2002
- Miyaniishi K, Iwamoto Y, et al. Bone marrow fat-cell enlargement and a rise in intraosseous pressure in steroid-treated rabbits with osteonecrosis. *Bone*, 30: 185-190, 2002
- Sakai H, Iwamoto Y, et al. Fibroblasts from the inner granulation tissue of the pseudocapsule in hips at revision arthroplasty induce osteoclast differentiation, as do stromal cells. *Ann. Rheum. Dis.*, 61: 103-109, 2002
- 内山勝文, 糸満盛憲, 氏平政伸, 馬淵清資 : マイクロ波加温による海綿骨および皮質骨の内部温度均一化の検討. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 23:81-86, 2002. 11. 1.
- 酒井利奈, 馬淵清資, 雨尾公暁, 糸満盛憲 : 人工股関節固定部の総接触面積と応力場のカオス生成の関係. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 23:179-184, 2002. 11. 1.
- 馬淵清資, 森田真史, 酒井利奈, 大田未知 : セラミックス人工股関節摩擦面におけるスクイズ流体膜の形成. *日本臨床バイオメカニクス学会誌*, 23:323-328, 2002. 11. 1.
- Mabuchi K, Ujihira M, Sakai R, Ota M: Squeeze-film formation between bearing surfaces of ceramic-on-ceramic total hip prostheses. *Proceedings of International Congress on Biological and Medical Engineering*, CD-ROM, 2002. 12. 4.
- Amao K, Sakai R, Yoshino H, Mabuchi K, Mishina H: Optical stress distribution of the fixation area of a joint prosthesis. *Proceedings of International Congress on Biological and Medical Engineering*, CD-ROM, 2002. 12. 4.
- Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J: Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue-engineering for the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg [Br]* 84(4): 571-578, 2002.
- Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Kataoka H, Kawasaki K, Katsube K, Kuriwaka M: Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 59:201-206, 2002.
- Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Kataoka H, Maniwa S: Effects of different embedding gels on periosteal chondrogenesis in vitro. *APMIS*. 110: 340-346, 2002.
- Yamamoto T, Katoh M, Fukushima R, Kurushima T, Ochi M: Effect of glycosaminoglycan production on hardness of cultured cartilage fabricated by the collagen-gel embedding method. *Tissue Engineering* 8(1): 119-129, 2002.
- Tobita M, Ochi M, Uchio Y, Mori R, Iwasa J, Katsube K, Motomura T: Treatment of growth plate injury by transfer of

autogenous cultured chondrocytes embedded collagen gel into the physical defect with autogenous chondrocytes. A study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 73(3): 352-358, 2002.

Nakanishi T, Kawasaki K, Uchio Y, Kataoka H, Terashima M, Ochi M: AG-041R, a CCK₁ gastrin receptor antagonist, stimulates the repair of osteochondral defect in rabbit model. *Eur J Pharmacol* 439: 135-140, 2002.

Kuriwaka M, Ochi M, Uchio Y, Maniwa M, Adachi N, Mori R, Kawasaki K, Kataoka H. The optimum combination of monolayer and three-dimensional cultures for cartilage-like tissue by tissue engineering. *Tissue Engineering*, 9(1), 41-49, 2003.

Naruse K, Itoman M, et al. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res*, Feb; 18(2): 360-369, 2003

Takahira N, Itoman M, et al. Treatment outcome of two-stage revision total hip arthroplasty for infected hip arthroplasty using antibiotic-impregnated cement spacer. *J Orthop Sci*, 8(1): 26-31, 2003

Fujita M, Itoman M, et al. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, Jun 7; 294(2): 441-447, 2002

Itoman M, et al. Legal situation of tissue transplantation in Japan. *Advance in tissue banking vol. 6*, 45-55, 2002

Tominaga T, Itoman M, et al. The influence of sterilization on the osteoinductive properties of bone in rat bone marrow cell culture. *Advance in tissue banking vol. 6*, 129-145, 2002

Yokoyama K, Itoman M, et al. Orthopaedic managements of skeletal trauma in multiple-injury patients: a retrospective review of 7 years of patients in a Japanese level 1 hospital. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 12: 20-25, 2002

Saita Y, Itoman M, et al. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning

cycles are appropriate? *British J Plastic Surg*, 55: 241-245, 2002

Yokoyama K, Itoman M, et al. Evaluation of functional outcome of the floating knee injury using multivariate analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*, 122: 432-435, 2002

小宮宏一朗、糸満盛憲ら
同種骨移植と骨銀行。 *医学と薬学*、48(6): 921-926, 2002

宮部基、糸満盛憲ら
当科における上腕骨骨幹部骨折に対する非リ
ーミング髓内釘の使用経験。 *骨折*、24(2): 526-529, 2002

占部憲、糸満盛憲
関節の再生医学 *Clinical Calcium* 12(2): 22-28, 2002

Naoki Ishiguro, Toshihisa Kojima, A. Robin Poole. Mechanism of Cartilage Destruction in Osteoarthritis. *Nagoya J Med Sci* 65:73-84, 2002

Shin-ichiro Saito, Seiji Kondo, Shinji Mishima, Naoki Ishiguro, Yukiharu Hasegawa, Linda J. Shandell, Hisashi Iwata. Analysis of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein (CD-RAP) in synovial fluid from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J Bone Joint Surg (Br)* 84:1066-1069, 2002

Hidefumi Inoh, Naoki Ishiguro, Shin-Ichi Sawazaki, Hideki Amma, Motoi Miyazu, Hisashi Iwata, Masahiro Sokabe, Keiji Naruse. Uni-axial cyclic stretch induces the activation of transcription factor nuclear factor κ B in human fibroblast cells. *FASEB Journal* 16:405-407, 2002

Ho-Rim Choi, Seiji Kondo, Kazuyoshi Hirose, Naoki Ishiguro, Yukiharu Hasegawa, Hisashi Iwata. Expression and enzymatic activity of MMP-2 during healing process of the acute supraspinatus tendon tear in rabbits. *J Orthop Res* 20:927-933, 2002

口頭発表

Matsumoto Y, Iwamoto Y, et al. Possible involvement of VEGF-FLT-1-FAK Pathway in the Arthritic Joint Destruction. The 48th Annual Meeting of Orthopaedic Research

Society, Dallas, Texas, Feb. 10-13, 2002

Matsuo A, Iwamoto Y, et al. The bone and joint protective and anti-inflammatory effects of newly developed third-generation bisphosphonate in experimental arthritis. The 48th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Dallas, Texas, Feb. 10-13, 2002

Kawano T, Iwamoto Y, et al. Effect of hyaluronic acid gel sheet as a bioresorbable barrier on adhesion prevention. The 48th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Dallas, Texas, Feb. 10-13, 2002

Nabeyama R, Iwamoto Y, et al. The Accuracy of computed tomography-based image-guided knee replacement. The 2nd Annual Meeting of the International Society for Computer Assisted Orthopaedic Surgery, Santa Fe, New Mexico, USA, June 19-22, 2002

Yamamoto T, Iwamoto Y, et al. Clinicopathologic characteristics of subchondral insufficiency fracture of the femoral head resulting in rapid destruction of the hip joint. The 49th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, New Orleans, LA, Feb. 2-5, 2003

松本嘉寛、田仲和宏、花田麻須大、首藤敏秀、平田剛、神宮司誠也、岩本幸英
発症機序の解析に基づいた関節疾患の抑制法の開発(第1報) 炎症性骨破壊における VEGF による破骨細胞前駆細胞の動員。第1回 Biomatrix Forum、平成14年1月26日(東京)

田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松延知哉、花田麻須大、李旭、山田吉彦、岩本幸英

KRAB ドメインを介する FPM315 による XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子の発現抑制。第15回日本軟骨代謝学会、平成14年3月8日-9日(前橋)

指宿真一、藤井康雄、岩本幸英、松田武久：感温性ゼラチンを用いる軟骨の Tissue Engineering 第15回日本軟骨代謝学会、平成14年3月8日-9日(前橋)

高尾恒彰、岩城徹、前田健、齋藤太一、神宮司誠也、岩本幸英、白澤建蔵：ヒト椎間板および椎間板変性における chondromodulin-I の免

疫組織化学的検討。第15回日本軟骨代謝学会、平成14年3月8日-9日(前橋)

原田洋、首藤敏秀、前田健、中島康晴、馬渡太郎、平田剛、松尾篤、岩本幸英：破骨細胞における ICAM-1、LFA-1 の発現とその機能。第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日-25日(神戸)

山下彰久、米満吉和、中島豊、岩本幸英、長谷川護、居石克夫：血管新生因子 FGF-2 はアジュバント関節炎における関節腫脹、滑膜増生、骨破壊の増悪因子である。第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日-25日(神戸)

松尾篤、首藤敏秀、平田剛、陳維嘉、岩本幸英：アミノビスフォスフォネートの抗炎症効果 - Dexamethasone との比較検討 - 第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日-25日(神戸)

平田剛、首藤敏秀、安田幸一郎、松尾篤、中島康晴、馬渡太郎、前田健、岩本幸英：滑膜細胞培養系における pit formation の程度と手術前後の骨関節破壊の進行に関する検討 第46回日本リウマチ学会総会、平成14年4月22日-25日(神戸)

松本嘉寛、田仲和宏、平田剛、花田麻須大、中谷文彦、松延知哉、崎村陸、李旭、首藤敏秀、松田秀一、岩本幸英：炎症性骨破壊における VEGF-Flt-1-FAK 経路の関与 第2回西日本骨・関節関連疾患懇話会、平成14年7月20日(福岡)

神宮司誠也、占部憲、岡崎賢、平田剛、坂井宏旭、池ノ上貴、陳維嘉、岩本幸英：B-TCP をキャリアーとした BMP-2 による筋組織内異所性骨化を用いた血行を伴って移動可能な移植用自家骨組織誘導の試み。第2回西日本骨・関節関連疾患懇話会、平成14年7月20日(福岡)

馬渡太郎、三浦裕正、河野勤、首藤敏秀、日垣秀彦、岩本幸英：慢性関節リウマチ患者における骨質評価 - 高分解能 CT を用いた in vivo ヒト骨微細構造解析 - 第20回日本骨代謝学会、平成14年7月25日-27日(岡山)

陳維嘉、神宮司誠也、平田剛、松本嘉寛、加藤浩、岩本幸英：Bisphosphonate による BMP-2 誘導骨組織維持の試み。第20回日本骨代謝学会、平成14年7月25日-27日(岡山)

河野勤、三浦裕正、馬渡太郎、諸岡孝明、塚

本伸章、岩本幸英、日垣秀彦、中西義孝：
ヒアルロン酸ゲルシートの間接癒着に対する
防止効果の検討ー第二報ー

第29回日本臨床バイオメカニクス学会、平成
14年9月28日ー29日（幕張）

石川格、村上輝夫、澤江義則、三浦裕正、河
野勤、岩本幸英：変形性膝関節症における関節
軟骨表面性状変化のAFMによる評価。第29回
日本臨床バイオメカニクス学会、平成14年9
月28日ー29日（幕張）

松本嘉寛、田仲和宏、平田剛、花田麻須大、
中谷文彦、松延知哉、崎村陸、李旭、松田秀一、
首藤敏秀、岩本幸英：炎症性骨破壊における
VEGF-Flt-1-FAK 経路の関与

第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成
14年10月11日ー12日（青森）

松尾篤、首藤敏秀、平田剛、松本嘉寛、陳維
嘉、花田麻須大、本村悟朗、岩本幸英：
ビスフォスフォネートの抗炎症作用ーステ
ロイドとの比較検討ー

第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成
14年10月11日ー12日（青森）

中島康晴、松尾篤、首藤敏秀、岩本幸英：ピ
スフォスフォネートによる Periprosthetic
Osteolysis の抑制効果。第17回日本整形外
科学会基礎学術集会、平成14年10月11日
ー12日（青森）

馬渡太郎、三浦裕正、河野勤、諸岡孝明、日
垣秀彦、松田秀一、岩本幸英：変形性膝関節症
に対するリン脂質添加ヒアルロン酸の効果。第
17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成1
4年10月11日ー12日（青森）

中島康晴、神宮司誠也、首藤敏秀、山本卓明、
野口康男、岩本幸英：ハイドロキシアパタイト
（HA）コーティングの生体内での変化ー抜去
インプラントを用いた検討ー

第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成
14年10月11日ー12日（青森）

陳維嘉、神宮司誠也、平田剛、松本嘉寛、加
藤浩、岩本幸英：Bisphosphonate による BMP-2
誘導骨組織維持の試み。第17回日本整形外
科学会基礎学術集会、平成14年10月11日ー
12日（青森）

田仲和宏、松本嘉寛、中谷文彦、崎村陸、松
延知哉、花田麻須大、李旭、山田吉彦、
岩本幸英：II型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子エンハ
ンサー結合因子の同定と解析

第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成
14年10月11日ー12日（青森）

神宮司誠也、占部憲、岡崎賢、平田剛、坂井
宏旭、池ノ上貴、岩本幸英：
血行を伴って移動可能な移植用自家骨組織誘
導の試み。

第38回日本移植学会、平成14年10月17
日ー19日（東京）

陳維嘉、神宮司誠也、平田剛、松本嘉寛、岩
本幸英：Bisphosphonate による BMP-2 誘導骨
組織維持の試み。第21回日本運動器移植・再
生医学研究会、平成14年10月19日（東京）

河野勤、三浦裕正、高杉紳一郎、真鍋尚至、
増本賢治、河野一郎、細川哲、岩本幸英

手指の変形性関節症と generalized
osteoarthritis の関連についての疫学的検討
第104回西日本整形・災害外科学会、平成1
4年11月16日ー17日（熊本市）

内山勝文、長江祐吾、西かおり、氏平政伸、
馬淵清資、仙田和章、姜慶愛、糸満盛憲：マ
イクロ波照射による皮質骨および海綿骨を含
むウシ中足骨の内部温度均一化の検討、日本機
械学会2002年度年次大会、東京、2002.9.25-27、
講演論文集 No.02-4, p. 19-20, 2002.

酒井利奈、雨尾公暁、糸満盛憲、馬淵清資：
人工関節固定部応力場におけるカオス生成。日
本機械学会2002年度年次大会、東京、
2002.9.25-27、発表27、講演論文集 No.02-1、
p. 151-152.

酒井利奈、馬淵清資、糸満盛憲、高平尚伸、
雨尾公暁：人工股関節ステム固定部の不規則応
力振動を励起する因子の推定。第29回日本臨
床バイオメカニクス学会、千葉、2002.9.28-29、
発表28、抄録 p. 69.

雨尾公暁、三科博司、酒井利奈、吉野洋、
馬淵清資：圧力分布の最適化を尺度とした人工
股関節固定法の評価。第29回日本臨床バイオ
メカニクス学会、千葉、2002.9.28-29、発表
28、抄録 p. 71.

酒井利奈、馬淵清資、雨尾公暁、小宮一三：
In silico 解析に基づく人工股関節固定法の理
念。画像電子学会第198回研究会、大阪、
2002.11.22.

Sakai R, Mabuchi K: Identification of the
factors on stress fluctuation around the
fixation site of femoral stem.
International Congress on Biological and

Medical Engineering, Singapore, 2002. 12. 4-7, (12. 6) Abstract p. 94.

Mabuchi K, Ujihira M, Sakai R, Ota M: Squeeze-film formation between bearing surfaces of ceramic-on-ceramic total hip prostheses. International Congress on Biological and Medical Engineering, Singapore, 2002. 12. 4-7, (12. 6) Abstract p. 94.

Amao K, Sakai R, Yoshino H, Mabuchi K, Mishina H: Optical stress distribution of the fixation area of a joint prosthesis. International Congress on Biological and Medical Engineering, Singapore, 2002. 12. 4-7, (12. 6) Abstract p. 95. 5. 1

内山勝文、氏平政伸、高平尚伸、峰原宏昌、小宮宏一郎、馬淵清資、仙田和章、姜慶愛、糸満盛憲. マイクロ波による同種移植骨加温処理法の開発 -移植骨の加温処理条件-. マイクロ波効果・応用国際シンポジウム, 奈良, 2002. 11. 21-23 講演要旨集 P60-61, 2002.

Katsufumi Uchiyama, Naonobu Takahira, Masanobu Ujihira, Kiyoshi Mabuchi, Hiroaki Minehara, Nao Kobayashi, Moritoshi Itoman, Development of Microwave Low-Heating Method for Bone Allografts: Investigation for Heating Condition of Various Bone Allografts during Microwave Heating, 9th International Conference on Tissue Banking Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banks, Korea. 2002. 9. 28-29. Abstract p. 107, 2002.

Ujihira M, Sukegawa Y, Nogawa S, Nagoshi T and Mabuchi K: Effect of Cell Density on Viability of Artificial Tissue after Cryopreservation, Fourth World Congress of Biomechanics, Canada, 2002. 8. 4-9 (8. 5), Proceedings (Index, CD-ROM) p. 31 2002. 8.

Nishikori T, Enomoto K, Kataoka H, Uchio Y, Maniwa S, Kohno T, Ochi M: Factors contributing to signal transductions in cultured chondrocytes. 7th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International (OARSI). Sydney, September 2002.

Kumahashi N, Ochi M, Kataoka H, Uchio Y, Kakimaru H, Enomoto K: Difference in early

expression of c-fos gene via increase of intracellular CA^{2+} ion reflects repair potentials of superficial defects on articular cartilage in fetal and adults rats. 7th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International (OARSI). Sydney, September 2002.

熊橋伸之、越智光夫ほか: ラット胎児軟骨損傷における細胞内カルシウム濃度を介した c-fos 遺伝子の発現. 日整会誌 76(8), S1097, 2002.

古川誠治、越智光夫ほか: 家兎骨髄由来間葉系幹細胞のコラーゲン培養における軟骨基質産生—単層培養時に TGF- β 1、FGF-2 を添加することの影響—日整会誌 76(8), S1106, 2002.

河野大助、越智光夫ほか: ウサギ培養軟骨細胞の細胞増殖における機械的刺激と ATP の効果. 日整会誌 76(8), S1109, 2002.

朴晃正、横山一彦、青木信一、塚本達郎、相川淳、糸満盛憲: 撓骨頭骨折の機能成績. 第 28 回日本骨折治療学会、平成 14 年 7 月 12 日～13 日 (福岡)

内野正隆、横山一彦、脇田隆司、新藤正輝、糸満盛憲: ハイブリッド創外固定器にて加療された脛骨開放骨折の検討. 第 28 回日本骨折治療学会、平成 14 年 7 月 12 日～13 日 (福岡)

青木信一、横山一彦、斉田康之、塚本達郎、内山勝文、糸満盛憲: リーミング・非リーミング髓内釘刺入による健常肺への影響の違いについての実験的研究. 第 28 回日本骨折治療学会、平成 14 年 7 月 12 日～13 日 (福岡)

高垣裕子、青木和広、大谷啓一、糸満盛憲: ラット脛骨近位端近傍の皮質骨において、軽度の運動は PTH のアナボリックな作用に対して相乗的に働く. 第 20 回日本骨代謝学会、平成 14 年 7 月 25 日～27 日 (岡山)

占部憲、糸満盛憲、中西徹、越智光夫、田仲和宏、岩本幸英、鬼頭浩史、石黒直樹: 軟骨欠損治療に対する培養細胞移植術の基礎的研究. 第 1 回日本再生医療学会総会、平成 14 年 4 月 18 日～19 日 (京都)

成瀬康治、占部憲、向井田智之、宮部基、大貫裕子、糸満盛憲: 胎児血由来間葉系幹細胞の分化能の検討. 第 1 回日本再生医療学会総会、平成 14 年 4 月 18 日～19 日 (京都)

小宮宏一郎、那須野秀二、塚本達郎、峰原宏

昌、糸満盛憲：日本における同種骨移植の現状と北里大学骨バンクについて。第1回日本組織移植学会・学術集会、平成14年8月2日（東京）

朴晃正、占部憲、宮部基、相川淳、高崎純孝、糸満盛憲：脛骨顆間隆起骨折術後の関節鏡所見の検討。第51回東日本整形災害外科学会、平成14年10月24日～25日（福島）

高平尚伸、内山勝文、宮部基、占部憲、高崎純孝、糸満盛憲：

感染性人工関節に対する再置換術の工夫。-抗生剤含有セメントスパーサーとビーズの使用-第51回東日本整形災害外科学会、平成14年10月24日～25日（福島）

小宮宏一朗、那須野秀二、高平尚伸、内山勝文、糸満盛憲：人工股関節再置換術における同種骨移植の意義。第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日（青森）

神宮司誠也、糸満盛憲、清水克時、松下隆、富士川恭輔：

整形外科における組織移植の現状。-日整会認定研修施設を対象としたアンケート調査結果-第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日（青森）

成瀬康治、占部憲、向井田智之、大貫裕子、高平尚伸、糸満盛憲：ラット胎児血由来未分化幹細胞の多分化能の検討。第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日（青森）

向井田智之、占部憲、成瀬康治、大貫裕子、高平尚伸、玄丞杰、糸満盛憲：II型コラーゲンスポンジ内における軟骨細胞培養の検討。第17回日本整形外科学会基礎学術集会、平成14年10月11日～12日（青森）

成瀬康治、占部憲、向井田智之、小林菜央、大貫裕子、小宮宏一朗、糸満盛憲：胎児血由来未分化間葉系幹細胞の多分化能の検討。第21回日本運動器移植・再生医学研究会、平成14年10月19日（東京）

横山一彦、中村光伸、脇田隆司、塚本達郎、内野正隆、青木信一、糸満盛憲：重度脛骨開放骨折に対する短縮後骨延長法による治療経験。第50回日本職業・災害医学会、平成14年10月25日～26日（北九州市）

内山勝文、高平尚伸、東計、大川孝、高崎純孝、小沼賢治、糸満盛憲：進行期・末期股関節

症に対する外反屈曲骨切り術後のX線学的経過観察。第29回日本股関節学会、平成14年9月12日～13日（札幌）

高平尚伸、内山勝文、峰原宏昌、大川孝、高崎純孝、東計、本部純子、糸満盛憲：股関節手術の周術期における凝固線溶系マーカーの変動。-THAと骨切り術の比較-

第29回日本股関節学会、平成14年9月12日～13日（札幌）

中村光伸、横山一彦、脇田隆司、斉田康之、大塚宏、糸満盛憲：血管柄付き大腿骨内上顆部骨移植にて左足第1基節骨欠損の再建を行った1例。第29回日本マイクロサージャリー学会学術集会、

平成14年11月21日～22日（沖縄）

塚本達郎、糸満盛憲、小宮宏一朗、脇田隆司、那須野秀二：リン酸カルシウム骨ペーストを使用した9症例の短期経過。第3回バイオアクティブペースト研究会、平成14年11月30日（東京）

高平尚伸、糸満盛憲、東計、内山勝文、宮部基：人工関節におけるpin-sleeve systemを用いた大転子再接合術の臨床成績。第75回日本整形外科学会学術集会、平成14年5月16日～19日（岡山）

新藤正輝、田中啓司、有賀徹、西巻博、糸満盛憲：髓内釘手術と肺脂肪塞栓。

第75回日本整形外科学会学術集会、平成14年5月16日～19日（岡山）

新藤正輝、田中啓司、有賀徹、大和田隆、脇田隆司、糸満盛憲：寛骨臼骨折の治療。-救命救急センターでの経験-第75回日本整形外科学会学術集会、平成14年5月16日～19日（岡山）

占部憲、峰原宏昌、宮部基、相川淳、高崎純孝、朴晃正、善平哲夫、渡邊哲哉、糸満盛憲：人工膝関節における大腿骨コンポーネントのステム長及び径の検討。

-レントゲン正面像における大腿骨骨髓腔幅との検討-

第75回日本整形外科学会学術集会、平成14年5月16日～19日（岡山）

横山一彦、糸満盛憲、脇田隆司、塚本達郎、青木信一：髓内釘横止め法にて加療した大腿骨骨幹部骨折における骨癒合に影響する諸因子の検討。-多変量解析を用いて-

第75回日本整形外科学会学術集会、平成14

年5月16日～19日(岡山)

神宮司誠也、糸満盛憲、清水克時、松下隆、泉敏弘、垣内雅明、長野昭、蜂谷裕道、越智光夫、野口康男、松崎浩己、松末吉隆、富士川恭輔：整形外科における組織移植の現状。

-日整会認定研修施設を対象としたアンケート調査結果-

第75回日本整形外科学会学術集会、平成14年5月16日～19日(岡山)

成瀬康治、高垣裕子、向井田智之、占部憲、糸満盛憲：超音波パルスによるCOX 2およびオステオカルシン発現増加の機序。第6回超音波骨折治療研究会、平成15年1月18日(東京)

Yokoyama K, Itoman M, et al. Time course of superoxide radicals in two ischemia-reperfusion models: Comparison between hindlimb replant model and isolated muscle model. SICOT/SIROT 2002, San Diego, California, USA, Aug. 23-30, 2002

Saita Y, Itoman M, et al. The protective effect of ischemic pre-condition against muscle injury induced by reperfusion: An experimental study in rats. SICOT/SIROT 2002, San Diego, California, USA, Aug. 23-30, 2002

Itoman M, et al. Current status of Tissue Banking in Japan. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep. 28-30, 2002

Takahira N, Itoman M, et al. Application of structural allograft to the extensive bone defect for femoral reconstruction in revision hip arthroplasty. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep. 28-30, 2002

Mukaida T, Itoman M, et al. Investigation in the histological and biochemical characteristics of the cultured chondrocytes seeded in type II collagen sponge. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep. 28-30, 2002

Naruse K, Itoman M, et al. Mesenchymal progenitor cells in fetal rat circulation. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep. 28-30, 2002

Komiya K, Itoman M, et al. Status of bone

allografting in Japan and management of Kitasato University Hospital Bone Bank (KUBB). The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep. 28-30, 2002

Tukamoto T, Itoman M, et al. 170 resonant frequency measurements for fracture healing. The 8th meeting of the International society for fracture repair, Toronto, CANADA, Oct. 9-11, 2002

Itoman M, et al. Valgus-flexion osteotomy for advanced osteoarthritis in middle aged patients. The 24th meeting of the Orthopaedic of Thailand, Pataya, THAILAND, Oct. 20-22, 2002

Itoman M, et al. Allograft reconstruction of acetabular bone defect in revision THR. The 24th meeting of the Orthopaedic of Thailand, Pataya, THAILAND, Oct. 20-22, 2002

Itoman M, et al. Development of new tension band wiring system (AI pin-sleeve system). The 24th meeting of the Orthopaedic of Thailand, Pataya, THAILAND, Oct. 20-22, 2002

Itoman M, et al. Historical review and current status of fracture treatment in Japan.

-With special regard to intramedullary Nailing - 日中医学大会 2002, CHINA, Nov. 3-6, 2002

Takahira N, Itoman M, et al. Two-stage revision total hip arthroplasty for infected hip arthroplasty using antibiotic-impregnated cement spacer. 日中医学大会 2002, CHINA, Nov. 3-6, 2002

Takahira N, Itoman M, et al. Clinical result of reattachment of greater trochanter using pin-sleeve system in hip. The 15th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty, UK, Sep. 25-28, 2002

Yokoyama K, Itoman M, et al. The effect on pulmonary function of reamed or undreamed intramedullary nailing for the femur sheep: Under non-damaged conditions. The 49th Orthopaedic research society,

Minehara H, Itoman M, et al. Difference between anatomical and mechanical axis of normal tibia in TKA. The 13th Korean-Japanese combined orthopaedic symposium, Kangwon Province, Korea, 2002

Urabe K, Itoman M, et al. Analysis by three-dimensional computed tomography images of resected femur according to the theory for total knee arthroplasty. The German-Japanese combined Orthopaedic

symposium, Okayama, Japan, 2002

第 17 回日本整形外科学会 基礎学術集会
青森 2002.10.11-10.12 土屋廣起、鬼頭浩史、
近藤精司、三島真爾、石黒直樹：変形性関節症
治療を目的とした軟骨再生：遺伝子導入による
アプローチ

第 17 回日本整形外科学会 基礎学術集会
青森 2002.10.11-10.12 小嶋俊久、A. R. Pool、
石黒直樹：関節軟骨破壊でのアグリカン代謝

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

軟骨欠損の修復法の確立
—新しい移植担体と細胞源の検討に関する研究—

主任研究者 系満 盛憲 北里大学医学部整形外科学教授

研究要旨

II 型コラーゲンスポンジを開発し、スポンジ内でラット軟骨細胞培養を行った。脱分化軟骨細胞においては再分化作用を示し、また採取直後の軟骨細胞においては形質が維持されることを示した。スポンジの構成成分である II 型コラーゲンの脱分化軟骨細胞に対する再分化作用を示した。また、ラット胎児血に未分化間葉系細胞が含まれ、軟骨細胞様細胞への自動分化能を有することを示した。

A. 研究目的

我々はこれまでに、本来軟骨組織に存在する軟骨基質 (Type II collagen) で作成した鋳型の有用性について検討し、II 型コラーゲンスポンジ内で培養した軟骨細胞が I 型コラーゲンスポンジ内培養や、単層培養した細胞に比して軟骨細胞形質を維持することを示した。また、胎児血由来未分化間葉系細胞 (Fetal circulating blood derived cells; FCBCs) の細胞特性について検討し、FCBCs が特殊な培養環境や分化因子を必要とすることなく骨芽細胞や軟骨細胞に分化する自動分化能を示した。また、FCBCs は脂肪細胞分化因子を含む培養液で培養することで脂肪細胞に分化することを示し、FCBCs は多分化能を有する未分化間葉系細胞であることを示した。本研究の目的は、(1) II 型コラーゲンスポンジ内での軟骨細胞形質維持に有効な培養条件の確立及

び II 型コラーゲンスポンジ内培養における脱分化軟骨細胞の再分化作用の検討 (2) 軟骨細胞外基質である II 型コラーゲンが、脱分化軟骨細胞に及ぼす生化学的作用の検討 (3) FCBCs が自動分化した軟骨細胞についての検討である。

B. 研究方法

(1) ラット肋軟骨から軟骨細胞を酵素処理により採取し、P₀; プラスチック培養皿上に播種し 1 週間培養した細胞、P₁; プラスチック培養皿上に播種し 3 週間継代培養した細胞、P₃; プラスチック培養皿上に播種し 7 週間継代培養した細胞、S-1; II 型コラーゲンスポンジに 1 x 10⁶ 細胞個/3 ml の細胞懸濁液を浸潤させた後、3 週間培養した細胞、S-2; II 型コラーゲンスポンジに 1 x 10⁷ 細胞個/ml の細胞懸濁液を 100 μl 浸潤させた後、3 週間培養した細胞、S_{1r}; II 型コラーゲンスポンジに

1x10⁷ 細胞個/ml の P1 脱分化軟骨細胞懸濁液を 100 μl 浸潤させた後、4 週間培養した細胞、を作製した。P₀, P₁, P₃, S-1, S-2, S_{1r} から total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて GAPDH を基準に COL1A1, COL2A1, COL10A1, COL11A2, Aggrecan の遺伝子発現を観察した。また、S-1, S-2 をパラフィン包埋後組織切片を作製しサフラニン-O 染色による組織学的検討を行った。(2) P₁ 脱分化軟骨細胞をアガロース寒天上にて浮遊培養し、三次元培養を行った。培養液への II 型コラーゲンを添加した a. 添加群と b. 非添加群を作製し、培養後 2, 3 週で採取後固定した。パラフィン包埋後組織切片を作製しサフラニン-O 染色による組織学的検討を行った。(3) 妊娠 19 日目のラット胎児血より FCBCs を採取し、10% FCS を含む α-MEM 培地にて 3 週間継続培養した。継続培養後 2, 3 週で total RNA を抽出した。また、細胞を継続培養後 2 週で継代し、高密度と低密度で播種し 1 週間培養後 total RNA を抽出した。RT-PCR 法にて COL2A1, COL10A1, Aggrecan, SOX9, BMP2 の遺伝子発現を検討した。また、3 週間継続培養した細胞からタンパク抽出液でタンパク抽出し、dot blot 法を用いて II 型コラーゲンの産生を検討した。抗 Type II collagen 抗体を用いて免疫染色を行い、免疫組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、動物実験規則（各大学の動物実験指針）に沿い、実験操作に関しては動物に不必要な不安や苦痛を与えないよう注意している。

C. 研究結果

(1) II 型コラーゲンスポンジ内で培養した S-1, 2 軟骨細胞は単層培養した P₀, P₁ 軟骨細胞と比較して COL1A1, COL2A1, COL10A1, COL11A2, Aggrecan の遺伝子発現は維持されていた。また、P₁P₃ では COL2A1 の Type IIA 発現を認めたが S-1, S-2 では認められなかった。S-1, S-2 の組織学的検討では、ともにポア内に細胞を認め、細胞周囲にサフラニンに濃染する細胞外基質の産生を認めたが、S-1 でより多くの細胞と細胞外基質を認めた。さらに、II 型コラーゲンスポンジ内で培養した脱分化軟骨細胞 S_{1r} は P₁, P₃ 脱分化軟骨細胞に比して COL10A1, COL11A2, Aggrecan の遺伝子を多く発現していた。一方、COL2A1, COL1A1 遺伝子発現は低下を示した。(2) b. 群では培養後 2, 3 週ではサフラニン-O 染色陽性所見は認めなかったが、a. 群では培養後 3 週で陽性を示す領域を認めた。(3) α-MEM 培地で培養した細胞の COL2A1, COL10A1 の遺伝子発現は肋軟骨より採取した肋軟骨細胞とほぼ同等であった。COL2A1, COL10A1, Aggrecan, SOX9, BMP2 の遺伝子発現は 2 週間よりも 3 週間継続培養した細胞が、また、低密度よりも高密度に培養した細胞がより発現していた。3 週間継続培養した細胞は、II 型コラーゲンを産生していた。免疫染色において、3 週間継続培養した細胞は、高密度に多層増殖した部位に抗 Type II collagen 抗体陽性の領域を認めた。

D. 考察

(1) 遺伝子発現および組織学的検討で得られた結果は、II 型コラーゲンスポンジ内培養法により、3 週間培養しても採取直後の軟骨細胞形質を維持できるものと考えられた。また、

本培養法は脱分化軟骨細胞をある程度、再分化の方向へ向かわせる作用を持つものの、他方で採取直後の軟骨細胞に比して COL1A1 発現の増加や COL2A1 の発現低下を示し、完全なる成熟軟骨細胞への再分化は認められなかった。(2) 脱分化軟骨細胞の浮遊三次元培養条件下で培養液中に II 型コラーゲンを添加すると、細胞塊の細胞間基質内にサフラニン-O 染色陽性を示す領域を認めたことは、II 型コラーゲン自身が軟骨細胞の分化調節に関与し、再分化の方向に向かわせる作用を持つ可能性が示唆された。(3) α -MEM 培地で継続培養すると、胎児血由来の細胞は、軟骨細胞様細胞に分化し、特殊な分化誘導因子は必要としなかった。また、細胞は高密度に培養することで、より軟骨細胞の方向へ分化する傾向があった。以上より胎児血由来の細胞は、軟骨細胞自動分化能を有する未分化間葉系細胞を含んでおり、軟骨欠損の修復に用いることのできる細胞源のひとつである、と考えられた。また本研究で得られた胎児血由来細胞は、心筋細胞、神経細胞など他の細胞への分化能を有する可能性があり、今後の tissue engineering において応用範囲が広く発展性が高い。

E. 結論

II 型コラーゲンスポンジは、今後軟骨細胞の移植鑄型として使用し得るものと考えられた。また、胎児血由来の細胞は、多分化能を持つ未分化間葉系細胞を含んでおり、軟骨細胞様細胞に自動分化することを示した。胎児血由来の細胞は、軟骨欠損の修復に用いることのできる細胞のひとつであると考えられた。

I) 健康危険情報

特になし

II) 研究発表

論文発表

- 1) Naruse K, Itoman M, et al. Distinct anabolic response of osteoblast to low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Miner Res*, Feb; 18(2): 360-369, 2003
- 2) Takahira N, Itoman M, et al. Treatment outcome of two-stage revision total hip arthroplasty for infected hip arthroplasty using antibiotic-impregnated cement spacer. *J Orthop Sci*, 8(1): 26-31, 2003
- 3) Fujita M, Itoman M, et al. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*, Jun 7; 294(2): 441-447, 2002
- 4) Itoman M, et al. Legal situation of tissue transplantation in Japan. *Advance in tissue banking* vol. 6, 45-55, 2002
- 5) Tominaga T, Itoman M, et al. The influence of sterilization on the osteoinductive properties of bone in rat bone marrow cell culture. *Advance in tissue banking* vol. 6, 129-145, 2002
- 6) Yokoyama K, Itoman M, et al. Orthopaedic managements of skeletal trauma in multiple-injury patients: a retrospective review of 7years of patients in a Japanese level 1 hospital. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 12: 20-25, 2002
- 7) Saita Y, Itoman M, et al. Protective effect of

ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? *British J Plastic Surg*, 55: 241-245, 2002

8) Yokoyama K, Itoman M, et al. Evaluation of functional outcome of the floating knee injury using multivariate analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*, 122: 432-435, 2002

9) 小宮宏一朗、糸満盛憲ら
同種骨移植と骨銀行。医学と薬学、48(6): 921-926, 2002

10) 宮部基、糸満盛憲ら
当科における上腕骨骨幹部骨折に対する非リ一ミング髓内釘の使用経験。

骨折、24(2): 526-529, 2002

11) 占部憲、糸満盛憲
関節の再生医学
Clinical Calcium 12(2): 22-28, 2002

口頭発表

1) 朴晃正、横山一彦、青木信一、塚本達郎、相川淳、糸満盛憲：撓骨頭骨折の機能成績。第28回日本骨折治療学会、平成14年7月12日～13日（福岡）

2) 内野正隆、横山一彦、脇田隆司、新藤正輝、糸満盛憲：ハイブリッド創外固定器にて加療された脛骨開放骨折の検討。第28回日本骨折治療学会、平成14年7月12日～13日（福岡）

3) 青木信一、横山一彦、斉田康之、塚本達郎、内山勝文、糸満盛憲：リーミング・非リ一ミング髓内釘刺入による健常肺への影響の

違いについての実験的研究。第28回日本骨折治療学会、平成14年7月12日～13日（福岡）

4) 高垣裕子、青木和広、大谷啓一、糸満盛憲：ラット脛骨近位端近傍の皮質骨において、軽度の運動はPTHのアナボリックな作用に対して相乗的に働く。第20回日本骨代謝学会、平成14年7月25日～27日（岡山）

5) 占部憲、糸満盛憲、中西徹、越智光夫、田仲和宏、岩本幸英、鬼頭浩史、石黒直樹：軟骨欠損治療に対する培養細胞移植術の基礎的研究。第1回日本再生医療学会総会、平成14年4月18日～19日（京都）

6) 成瀬康治、占部憲、向井田智之、宮部基、大貫裕子、糸満盛憲：胎児血由来間葉系幹細胞の分化能の検討。第1回日本再生医療学会総会、平成14年4月18日～19日（京都）

7) 小宮宏一朗、那須野秀二、塚本達郎、峰原宏昌、糸満盛憲：日本における同種骨移植の現状と北里大学骨バンクについて。第1回日本組織移植学会・学術集会、平成14年8月2日（東京）

8) 朴晃正、占部憲、宮部基、相川淳、高崎純孝、糸満盛憲：脛骨顆間隆起骨折術後の関節鏡所見の検討。第51回東日本整形災害外科学会、平成14年10月24日～25日（福島）

9) 高平尚伸、内山勝文、宮部基、占部憲、高崎純孝、糸満盛憲：感染性人工関節に対する再置換術の工夫。—抗生剤含有セメントスパーサーとピースの使用— 第51回東日本整形災害外科学会、平成14年10月24日～25日（福島）

10) 小宮宏一朗、那須野秀二、高平尚伸、内山勝文、糸満盛憲：人工股関節再置換術にお

ける同種骨移植の意義。第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 14 年 10 月 11 日～12 日（青森）

11) 神宮司誠也、糸満盛憲、清水克時、松下隆、富士川恭輔：整形外科における組織移植の現状。—日整会認定研修施設を対象としたアンケート調査結果— 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 14 年 10 月 11 日～12 日（青森）

12) 成瀬康治、占部憲、向井田智之、大貫裕子、高平尚伸、糸満盛憲：ラット胎児血由来未分化幹細胞の多分化能の検討。第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 14 年 10 月 11 日～12 日（青森）

13) 向井田智之、占部憲、成瀬康治、大貫裕子、高平尚伸、玄丞侏、糸満盛憲：II 型コラーゲンスポンジ内における軟骨細胞培養の検討。第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 14 年 10 月 11 日～12 日（青森）

14) 成瀬康治、占部憲、向井田智之、小林菜央、大貫裕子、小宮宏一朗、糸満盛憲：胎児血由来未分化間葉系幹細胞の多分化能の検討。第 21 回日本運動器移植・再生医学研究会、平成 14 年 10 月 19 日（東京）

15) 横山一彦、中村光伸、脇田隆司、塚本達郎、内野正隆、青木信一、糸満盛憲：重度脛骨開放骨折に対する短縮後骨延長法による治療経験。第 50 回日本職業・災害医学会、平成 14 年 10 月 25 日～26 日（北九州市）

16) 内山勝文、高平尚伸、東計、大川孝、高崎純孝、小沼賢治、糸満盛憲：進行期・末期股関節症に対する外反屈曲骨切り術後の X 線学的経過観察。第 29 回日本股関節学会、

平成 14 年 9 月 12 日～13 日（札幌）

17) 高平尚伸、内山勝文、峰原宏昌、大川孝、高崎純孝、東計、本部純子、糸満盛憲：股関節手術の周術期における凝固線溶系マーカーの変動。—THA と骨切り術の比較—

第 29 回日本股関節学会、平成 14 年 9 月 12 日～13 日（札幌）

18) 中村光伸、横山一彦、脇田隆司、斉田康之、大塚宏、糸満盛憲：

血管柄付き大腿骨内上顆部骨移植にて左足第 1 基節骨欠損の再建を行った 1 例。第 29 回日本マイクロサージャリー学会学術集会、平成 14 年 11 月 21 日～22 日（沖縄）

19) 塚本達郎、糸満盛憲、小宮宏一朗、脇田隆司、那須野秀二：リン酸カルシウム骨ペーストを使用した 9 症例の短期経過。第 3 回バイオアクティブペースト研究会、平成 14 年 11 月 30 日（東京）

20) 高平尚伸、糸満盛憲、東計、内山勝文、宮部基：人工関節における pin-sleeve system を用いた大転子再接合術の臨床成績。第 75 回日本整形外科学会学術集会、平成 14 年 5 月 16 日～19 日（岡山）

21) 新藤正輝、田中啓司、有賀徹、西巻博、糸満盛憲：髓内釘手術と肺脂肪塞栓。第 75 回日本整形外科学会学術集会、平成 14 年 5 月 16 日～19 日（岡山）

22) 新藤正輝、田中啓司、有賀徹、大和田隆、脇田隆司、糸満盛憲：寛骨臼骨折の治療。—救命救急センターでの経験— 第 75 回日本整形外科学会学術集会、平成 14 年 5 月 16 日～19 日（岡山）

23) 占部憲、峰原宏昌、宮部基、相川淳、高崎純孝、朴晃正、善平哲夫、渡邊哲哉、糸満

盛憲：人工膝関節における大腿骨コンポーネントのステム長及び径の検討。—レントゲン正面像における大腿骨骨髓腔幅との検討—
第 75 回日本整形外科学会学術集会、平成 14 年 5 月 16 日～19 日（岡山）

24) 横山一彦、糸満盛憲、脇田隆司、塚本達郎、青木信一：髄内釘横止め法にて加療した大腿骨骨幹部骨折における骨癒合に影響する諸因子の検討。—多変量解析を用いて—
第 75 回日本整形外科学会学術集会、平成 14 年 5 月 16 日～19 日（岡山）

25) 神宮司誠也、糸満盛憲、清水克時、松下隆、泉敏弘、垣内雅明、長野昭、蜂谷裕道、越智光夫、野口康男、松崎浩巳、松末吉隆、富士川恭輔：整形外科における組織移植の現状。—日整会認定研修施設を対象としたアンケート調査結果— 第 75 回日本整形外科学会学術集会、平成 14 年 5 月 16 日～19 日（岡山）

26) 成瀬康治、高垣裕子、向井田智之、占部憲、糸満盛憲：超音波パルスによる COX 2 およびオステオカルシン発現増加の機序。第 6 回超音波骨折治療研究会、平成 15 年 1 月 18 日（東京）

27) Yokoyama K, Itoman M, et al. Time course of superoxide radicals in two ischemia-reperfusion models: Comparison between hindlimb replant model and isolated muscle model. SICOT/SIROT 2002, San Diego, California, USA, Aug.23-30, 2002

28) Saita Y, Itoman M, et al. The protective effect of ischemic pre-condition against muscle injury induced by reperfusion: An experimental

study in rats. SICOT/SIROT 2002, San Diego, California, USA, Aug.23-30, 2002

29) Itoman M, et al. Current status of Tissue Banking in Japan. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep.28-30, 2002

30) Takahira N, Itoman M, et al. Application of structural allograft to the extensive bone defect for femoral reconstruction in revision hip arthroplasty. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep.28-30, 2002

31) Mukaida T, Itoman M, et al. Investigation in the histological and biochemical characteristics of the cultured chondrocytes seeded in type II collagen sponge. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep.28-30, 2002

32) Naruse K, Itoman M, et al. Mesenchymal progenitor cells in fetal rat circulation. The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep.28-30, 2002

33) Komiya K, Itoman M, et al. Status of bone allografting in Japan and management of Kitasato University Hospital Bone Bank (KUBB). The 9th International Conference on Tissue Banking (APASTB), S.KOREA, Sep.28-30, 2002

34) Tukamoto T, Itoman M, et al. 170 resonant frequency measurements for fracture healing. The 8th meeting of the International society for fracture repair, Toronto, CANADA, Oct.9-11, 2002

35) Itoman M, et al. Valgus-flexion osteotomy

for advanced osteoarthritis in middle aged patients. The 24th meeting of the Orthopaedic of Thailand, Pataya, THAILAND, Oct.20-22, 2002

36) Itoman M, et al. Allograft reconstruction of acetabular bone defect in revision THR. The 24th meeting of the Orthopaedic of Thailand, Pataya, THAILAND, Oct.20-22, 2002

37) Itoman M, et al. Development of new tension band wiring system (AI pin-sleeve system). The 24th meeting of the Orthopaedic of Thailand, Pataya, THAILAND, Oct.20-22, 2002

38) Itoman M, et al. Historical review and current status of fracture treatment in Japan. -With special report to intramedullary Nailing - 日中医学大会 2002, CHINA, Nov.3-6, 2002

39) Takahira N, Itoman M, et al. Two-stage revision total hip arthroplasty for infected hip arthroplasty using antibiotic-impregnated cement spacer. 日中医学大会 2002, CHINA, Nov.3-6, 2002

40) Takahira N, Itoman M, et al. Clinical result of reattachment of greater trochanter using pin-sleeve system in hip. The 15th Annual Symposium of the International Society for Technology in Arthroplasty, UK, Sep.25-28, 2002

41) Yokoyama K, Itoman M, et al. The effect on pulmonary function of reamed or undreamed intramedullary nailing for the femur sheep; Under non-damaged conditions. The 49th Orthopaedic research society, Neworleans, Louisiana, USA, Feb.2-5, 2003

42) Minehara H, Itoman M, et al. Difference between anatomical and mechanical axis of

normal tibia in TKA. The 13th Korean-Japanese combined orthopaedic symposium, Kangwon Province, Korea, 2002

43) Urabe K, Itoman M, et al. Analysis by three-dimensional computed tomography images of resected femur according to the theory for total knee arthroplasty. The German-Japanese combined Orthopaedic symposium, Okayama, Japan, 2002

Ⅲ) 知的所有権の出願・取得状況
特になし