

分担研究報告書

マウス変形性関節症（OA）モデルを用いた関節潤滑機構改善効果の検討

分担研究者 川口 浩（東京大学医学部附属病院 准教授）
茂呂 徹（東京大学大学院医学系研究科 特任准教授）

研究要旨：変形性関節症（OA）は、高齢者の関節疾患中で最も頻度の高い疾患の一つであり、高齢者の生活の質（QOL）を低下させ、生活寿命を短縮させる重大な生活習慣病である。我々は、この運動器疾患の克服を目指し、優れた生体適合性と潤滑特性を発揮するリン脂質材料・2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine を用いた生体内解離性ハイドロゲル（MPC ポリマーゲル）を創出した。本研究では、この新しいマテリアルを関節内投与剤として臨床応用するための基礎検討を行った。

今年度の研究では、まず Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用いて経時的な検討を行い、ヒアルロン酸と MPC ポリマーの至適混合比を検索した。この結果、1% ヒアルロン酸 2% MPC の混合比の水溶液において静摩擦係数、動摩擦係数とも最も改善されることが明らかとなった。また、この 1% ヒアルロン酸 2% MPC の混合比の水溶液を昨年度確立したマウス変形性関節症（OA）モデルに用いて検討を行い、関節面の潤滑機構の改善効果、関節面の保護機構を確認した。さらに、来年度の検討のため、新たにヒアルロン酸-MPC 共重合体を創出し、Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用いて基礎検討を行ったところ、ヒアルロン酸と MPC ポリマー混合液より摩擦係数が改善されることを明らかとなった。

以上の結果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を推進しうるものであり、MPC ポリマーゲルの関節機能改善剤としての臨床応用が期待できる。

A. 研究目的

変形性関節症（OA）は、高齢者の関節疾患中で最も頻度の高い疾患の一つであり、膝関節や股関節等の主要な荷重関節に好発することから、高齢者の生活の質（QOL）を低下させ、生活寿命を短縮させる重大な生活習慣病である。変形性関節症の中で、臨床症状を伴い、日常生活で問題となるものは膝関節に多くみられ、年間約 90 万人もの新たな発病者がいる。したがって、高齢者者の ADL・QOL を低下させ、医療費の高騰、

労働力の低下の一因となる変形性膝関節症の治療法を確立することは、緊急の課題である。我々は、生体の関節軟骨表面に存在するナノメーター単位のリン脂質層（図 1）が関節面の潤滑機構の改善と保護に寄与していることに着目し、この問題の解決のための新規治療法として、優れた生体適合性と潤滑特性を発揮するリン脂質ポリマー・2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine を用いた生体内解離性ハイドロゲル（MPC ポリマーゲル）を創出した。こ

これは、MPC とメタクリル酸、ブチルメタクリレート、ビニルフェニルポロン酸の共重合体を組み合わせたもので、1) 患部・術野にあわせて瞬時に成形できること、2) ナノ単位の小孔を有する三次元構造からなり液性因子の透過を妨げないこと、3) 表面に細胞の接着が起きないため癒着する可能性が少ないこと、4) 生体の異物反応を惹起しないこと、5) 潤滑性に優れること、6) 生体内の解離速度を制御可能であること、が判明している

(Biomaterials 26:6853,2005)。本研究の目的は、この MPC ポリマーゲルを変形性関節症治療のための関節内注射剤として臨床応用するために必要な基礎的検討を完成させることである (図 2)。



図 1. 軟骨表面のナノメートル単位のリン脂質層 (黒染部)

昨年度の検討では、MPC ポリマー、ヒアルロン酸 (HA) を添加した潤滑液を用いたときの摩擦係数について Ball-on-Flat 型摩擦試験機により評価し、1) MPC ポリマー水溶液単剤、MPC ポリマー水溶液+ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の静摩擦係数は、蒸留水と比し、改善傾向がみられること、2) MPC ポリマー水溶液単剤、MPC ポリマー水溶液+ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の動摩擦係数は、蒸留水と比し、約 40%改善すること、を明らかにした。また、C57Black/6J マウスを用い、関節の半月

板切除と靭帯切離を組み合わせることにより重傷度が異なる 4 種類の OA を再現するマウス変形性関節症 (OA) モデルを確立した。そこで今年度は、MPC ポリマー水溶液+ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の混合比の条件をかえて摩擦係数を測定し、至適な混合比を検索し、マウス OA モデルに用いてその関節潤滑機構改善効果を検討した。また、新たに HA-MPC 共重合体を創出し、これらについても基礎検討を行った。

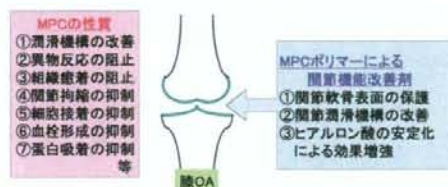


図 2. MPC ポリマーの性質と期待される効果

B. 研究方法

1. 摩擦試験

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の濃度は、現在製品として市販されているものと同様にし、1%の濃度に固定した。1%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液単剤 (HA)、1%MPC ポリマー水溶液単剤 (MPC)、1%HA と 1%MPC の混合液 (HA: MPC=1:1)、1%HA と 2%MPC の混合液 (HA: MPC=1:2)、1%HA と 5%MPC の混合液 (HA: MPC=1:5)について、Ball-on-Flat 型摩擦試験機 (Tribostation 32, 新東科学 (株)) を用い、10 サイクル、100 サイクルの時点で計測した (図 2)。すべり速度 50 mm/min、すべり距離 25 mm、荷重 0.98 N、運動周波数は 1 Hz とした。また、Ball にはコバルトクロム (Co-Cr) 合金、Flat には超高分子量ポリエチレンを用いた。



図 3. Ball-on-Flat 摩擦試験機

2. マウス変形性関節症モデルにおける検討

昨年度に確立したマウス変形性関節症モデルのうち、初期の変形性股関節症の病像を呈する、Medial model を用いて検討した (図 4)。

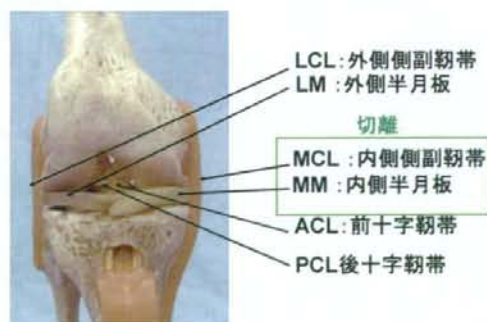


図 4. Medial model のシェーマ

マウスは C57Black/6J マウス (8 週齢・

オス・18-22 g) を使用した。マウスの全身麻酔には、pentobarbiturate (0.5 mg/ 10 g body weight, Sigma, St. Louis, Missouri) の腹腔内注射を用いた。手術には微小外科技術・微小外科 (マイクロサージャリー) 用顕微鏡を使用した右膝関節を正中縦切開によって前方より展開し (図 5)、膝蓋靭帯を切離した。



図 5. 膝関節の展開

関節内に進入し、前十字靭帯 (ACL)、後十字靭帯 (PCL)、外側側副靭帯 (LCL) を温存し、内側側副靭帯 (MCL) の切離を行った。また、外側半月板 (LM) を温存し、内側半月板 (MM) の切除を行った (図 6)。



図 6. 内側半月板の切除

関節内を洗浄した後、MPC 群では1.の実験で至適条件を確立した1%HAと2%MPCの混合液(HA:MPC=1:2)を加え、コントロール群では生理食塩水を加えた後、皮膚縫合した。手術中は関節軟骨を損傷せぬよう、十分に注意した。左膝関節については皮膚切開のみを行い、Sham手術とした。手術後マウスはゲージ内を自由に運動できるようにした。

組織学的解析のためにマウスは6週で安楽死させた。固定液(リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド、pH7.4)を用いて灌流固定し、膝関節を一塊として摘出した後、固定液で4℃にて4時間浸漬固定した。検体は脱灰液(10% ethylene-diamine tetraacetic acid; EDTA; pH7.4)に浸漬し、4℃にて2週間脱灰を行った。その後エタノールにて脱灰し、キシレンにて透徹した後、パラフィン・ブロックはマイクロトームを用いて、4μmの厚さで薄切し、シリコンコーティング・スライドに載せ乾燥させた。その後、冠状断で脛骨内側の関節軟骨をすべて薄切し、連続切片とした。組織切片はキシレンにて脱パラフィン後エタノール置換して親水化し、Hematoxilin・Eosin(HE)染色、Safranin O染色を行った。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準総理府告示」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

1. 摩擦試験

1) MPCポリマー水溶液+ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の至適混合比の検討

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の濃度は、現在製品として市販されているも

のと同様に設定し、1%の濃度に固定した。1%ヒアルロン酸ナトリウム水溶液単剤(HA)、1%MPCポリマー水溶液単剤(MPC)、1%HAと1%MPCの混合液(HA:MPC=1:1)、1%HAと2%MPCの混合液(HA:MPC=1:2)、1%HAと5%MPCの混合液(HA:MPC=1:5)について、静摩擦係数および動摩擦係数を、10サイクル、100サイクルの時点で計測した。

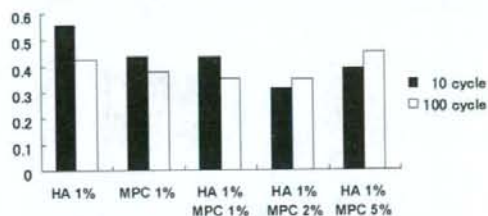


図7. 静摩擦係数

この結果、静摩擦係数は10サイクルでは、1%HA, 2%MPC < 1%HA, 5%MPC < 1%HA, 1%MPC < 1%HAの順に、100サイクルでは1%HA, 2%MPC < 1%HA, 1%MPC < 1%HA < 1%HA, 5%MPCの順に低値を示し、いずれのサイクルにおいても、1%HA, 2%MPCの群で最も低値を示した(図7)。

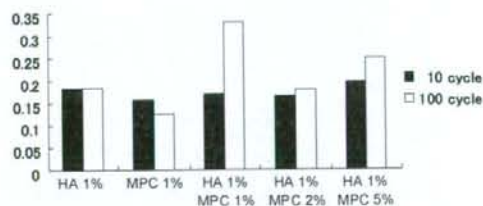


図8. 動摩擦係数

また、動摩擦係数は10サイクルでは、1%MPC < 1%HA, 2%MPC < 1%HA, 1%MPC < 1%HA < 1%HA, 5%MPCの

順に、100 サイクルでは 1% MPC < 1% HA, 2% MPC < 1% HA < 1% HA, 5% MPC < 1% HA, 1% MPC の順に低値を示した (図 8)。このため、下記 2. のマウス変形性関節症モデルでの実験では、この 1% HA, 2% MPC の混合比の水溶液を使用することとした。

2) HA-MPC 共重合体水溶液の検討

平成 21 年度の検討のため、HA-MPC 共重合体を作製し、濃度の条件を振って、摩擦係数を測定した。HA-MPC 共重合体水溶液濃度を 0.5%、1%、2% とし、それぞれの静摩擦係数および動摩擦係数を、10 サイクル、100 サイクルの時点で計測した。

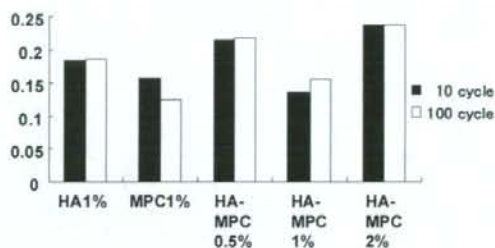


図 9. 静摩擦係数

この結果、静摩擦係数は 10 サイクルでは、HA-MPC 1% < MPC 1% < HA 1% < HA-MPC 0.5% < HA-MPC 2% の順に、100 サイクルでは MPC 1% < HA-MPC 1% < HA 1% < HA-MPC 0.5% < HA-MPC 2% の順に低値を示し、いずれのサイクルにおいても、共重合体の中では HA-MPC 1% の群で最も低値を示した (図 9)。

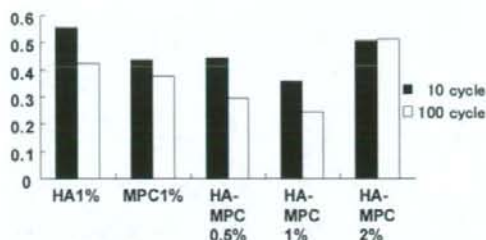


図 10. 動摩擦係数

また、動摩擦係数は 10 サイクル、100 サイクル、いずれのサイクル数の時点でも HA-MPC 1% < HA-MPC 0.5% < MPC 1% < HA 1% < HA-MPC 2% の順に低値を示した (図 10)。また、これらの数値を上記 1% HA, 2% MPC の混合比の水溶液の群と比較すると、いずれも共重合体の群でより低値を示しており、より関節潤滑機能改善効果を期待できる結果となった。

2. マウス変形性関節症モデルにおける検討

図 11 に術後 6 週の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色像を、図 12 に術後 6 週 Safranin O 染色像を示す。

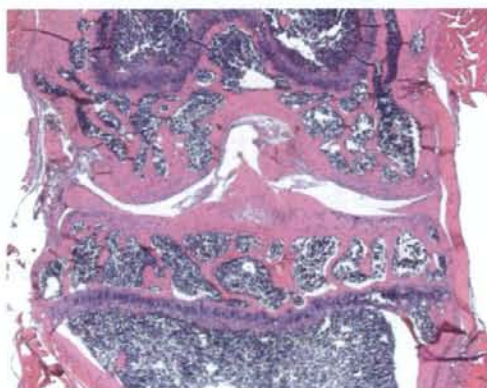


図 11-1 MPC 群の HE 染色像 (x 3,000)

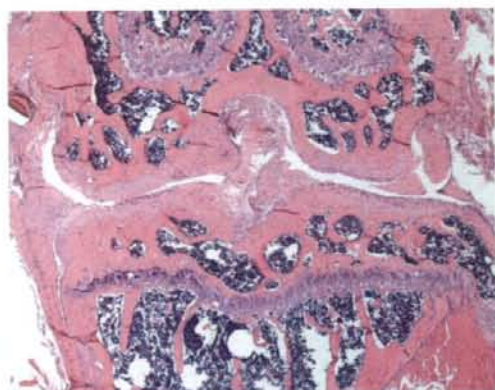


図 11-2 コントロール群の HE 染色像
(x 3,000)

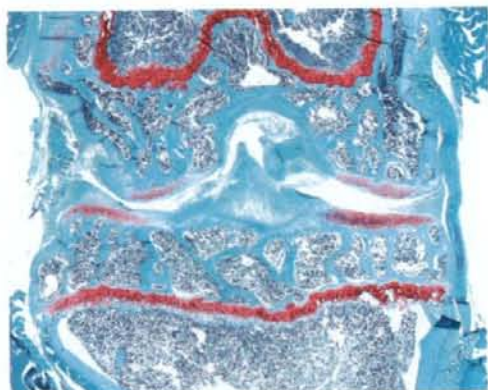


図 12-1 MPC 群の
Safranin O 染色像 (x 3,000)

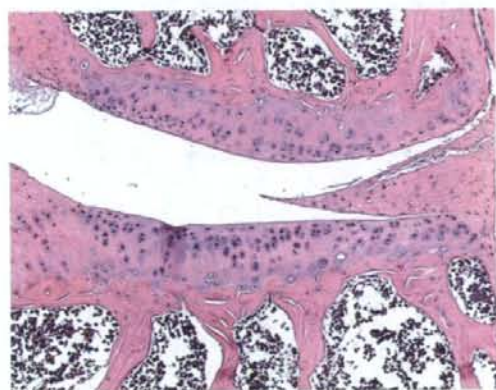


図 11-3 MPC 群の HE 染色像
(x 10,000)

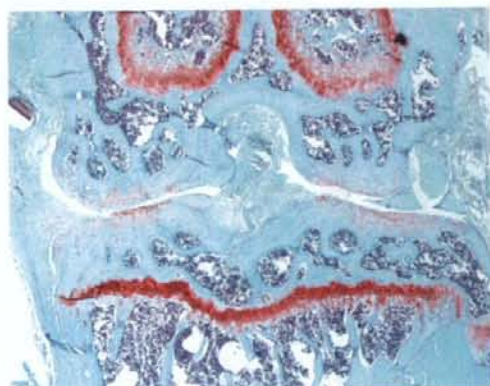


図 12-2 コントロール群の
Safranin O 染色像 (x 3,000)

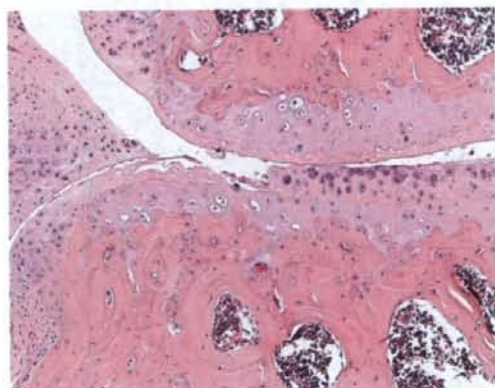


図 11-4 コントロール群の HE 染色像
(x 10,000)

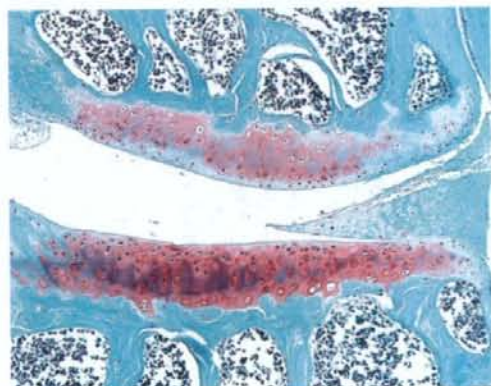


図 12-3 MPC 群の
Safranin O 染色像 (x 10,000)

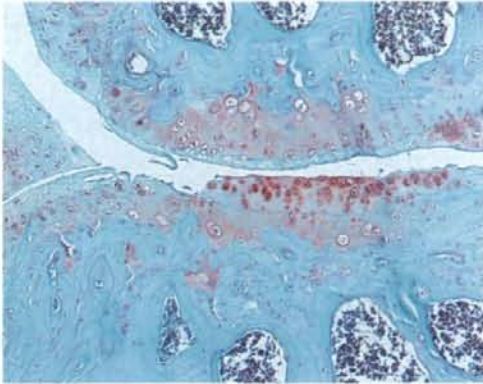


図 12-4 コントロール群の
Safranin O 染色像 (x 10,000)

1% HA と 2% MPC の混合液 (HA: MPC=1:2)を加えた MPC 群では、膝関節軟骨は滑らかな表面を保ち、染色性は均一で、基質の破壊像や欠損像はみられなかった。関節軟骨の superficial zone では、扁平な軟骨細胞が関節表面と平行して配列して 2 ないし 3 層を形成していた。Tidemark よりも表層の middle zone では円形の軟骨細胞が柱状配列を形成していた。これらの組織学的所見は、手術侵襲を加えていない正常膝関節軟骨のものと同様と考えられた。生理食塩水を加えたコントロール群では軟骨破壊が進んでおり、ヒトの初期変形性関節症 (OA) にきわめて近い病像を呈していた。

D. 考察

変形性膝関節症の治療は、保存療法と手術療法に大別できるが、保存療法、特に薬物療法の果たす役割は大きい。薬物療法では一般的に、消炎鎮痛剤の経口投与や外用が頻用されているが、これらの治療が十分な効果を得られない場合、軟骨組織の粘弾性、関節液の粘稠度を保つ働きがあるヒアルロン酸の関節内への注入が行われている。この治療法は汎用される一方で、1) 長期の効果を得ることが難しい、2) OA が進行した症例や高齢者

ではその効果は少ないという問題点が指摘されている。そこで我々は、関節軟骨表面にナノメートル単位のリン脂質層があり、軟骨表面の保護と関節の潤滑機構の改善に寄与することに着目し、生体内で安全かつ安定に長期間効果を発揮するリン脂質を投与すれば効果を発揮できると考え、今回の研究を創案した。本研究では、MPC ポリマー自体による軟骨表面の保護、関節潤滑機構の改善とともに、MPC ポリマーの多糖、タンパク質の保護作用による HA の安定化・効果発現時間の延長も期待できる。

昨年度の検討により、MPC ポリマーゲル、ヒアルロン酸の投与により関節面の静摩擦係数、動摩擦係数がともに改善すること、その効果は添加剤を加えても影響を受けないこと、を明らかにした。そこで今年度は Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用いてヒアルロン酸と MPC ポリマーの至適混合比を検索した。この結果、1% HA, 2% MPC の混合比の水溶液がもっとも摩擦係数を低下 (改善) させることが明らかとなった。そこでこの混合比の水溶液をマウス変形性関節症モデルに用いて検討を行い、関節面の潤滑機構の改善効果、関節面の保護機構を確認できた。また、来年度の検討のため、新たにヒアルロン酸-MPC 共重合体を創出し、Ball-on-Flat 型摩擦試験機を用いて基礎検討を行った。この結果、摩擦試験機においては、1%のヒアルロン酸-MPC 共重合体が最も摩擦係数を改善すること、この改善効果は、ヒアルロン酸と MPC ポリマー混合液より大きいこと、が明らかとなった。次年度は、今年度の試験結果の解析を継続することに加え、病期・重傷度の異なる OA モデル (Severe model, Moderate model, Mild model) にこれらの水溶液を加え関節潤滑機構改善効果を検討する予定である。また、ヒアルロン酸-MPC 共重合体も OA モデルに用い、その有効性を評価する予定である。

E. 結論

今年度の検討においては、Ball-on-Flat型摩擦試験機を用いてヒアルロン酸とMPCポリマーの至適混合比を検索し、この水溶液をマウス変形性関節症モデルに用いて、関節面の潤滑機構の改善、関節面の保護機構を確認した。また、新たにヒアルロン酸-MPC共重合体を創出し、摩擦試験機においては、ヒアルロン酸とMPCポリマー混合液より摩擦係数を改善させることを明らかにした。以上の結果は、新しいマテリアル創製を基盤とする運動器疾患治療法の開発を推進しうるものであり、MPCポリマーゲルの関節機能改善剤としての臨床応用が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Konno T, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K: Enhanced wear resistance of orthopaedic bearing due to the cross-linking of poly (MPC) graft chains induced by gamma-ray irradiation. *J Biomed Mater Res B* 84: 320-327, 2008.
- 2) Kawasaki Y, Kugimiya F, Chikuda H, Kamekura S, Ikeda T, Kawamura N, Saito T, Shinoda Y, Higashikawa A, Yano F, Ogasawara T, Ogata N, Hoshi K, Hofmann F, Woodgett JR, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Phosphorylation of GSK-3 β by cGMP-dependent protein kinase II promotes hypertrophic differentiation of murine chondrocytes. *J Clin Invest* 118: 2506-2515, 2008.
- 3) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K: Effect of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine concentration on photo-induced graft polymerization of polyethylene in reducing the wear of orthopaedic bearing surface. *J Biomed Mater Res A* 86: 439-47, 2008.
- 4) Sato S, Kimura A, Ozdemir J, Asou Y, Miyazaki M, Jinno T, Ae K, Liu X, Osaki M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Kawaguchi H, Haro H, Shinomiya K, Karsenty G, and Takeda S: The Distinct role of the Runx proteins in chondrocyte differentiation and intervertebral disc degeneration: Findings in murine models and in human disease. *Arthritis Rheum* 58: 2764-2775, 2008.
- 5) Shinoda Y, Ogata N, Higashikawa A, Manabe I, Shindo T, Yamada T, Kugimiya F, Ikeda T, Kawamura N, Kawasaki Y, Tsushima K, Takeda N, Nagai R, Hoshi K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Krüppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 283: 24682-24689, 2008.
- 6) Oka H, Muraki S, Akune T, Mabuchi A, Suzuki T, Yoshida H, Yamamoto S, Nakamura K, Yoshimura N, and Kawaguchi H: Fully automatic quantification of knee osteoarthritis severity on plain radiographs. *Osteoarthritis Cartilage* 16: 1300-1306, 2008.
- 7) Kawaguchi H: Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse

- models. *Mol Cells* 25: 1-6, 2008.
- 8) Koyama Y, Miyashita M, Irie S, Yamamoto M, Karita T, Moro T, Takatori Y, Kazuma K: A study of disease management activities of hip osteoarthritis patients under conservative treatment. *J Orthop Nurs* 12: 75-83, 2008.
 - 9) Kawaguchi H: Regulation of osteoarthritis development by Wnt- β -catenin signaling through the endochondral ossification process. *J Bone Miner Res* 24: 8-11, 2009.
 - 10) Higashikawa A, Saito T, Ikeda T, Kamekura S, Kawamura N, Kan A, Oshima Y, Ohba S, Ogata N, Takeshita K, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: Identification of the core element responsive to runt-related transcription factor 2 in the promoter of human type x collagen gene. *Arthritis Rheum* 60: 166-178, 2009.
 - 11) Chikuda H, Seichi A, Takeshita K, Shoda N, Ono T, Matsudaira K, Kawaguchi H, and Nakamura K: Radiographic analysis of the cervical spine in patients with retro-odontoid pseudotumors. *Spine* 34: E110-114, 2009.
 - 12) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Hashimoto M, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, and Ishihara K. Effects of mobility/immobility of surface modification by 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer on the durability of polyethylene for artificial joints. *J Biomed Mater Res A* (in press).
 - 13) Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, Fujihara Y, Chung UI, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, and Hoshi K: Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A* (in press).
 - 14) Kyomoto M, Moro T, Iwasaki Y, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K. Superlubricious surface mimicking articular cartilage by grafting poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) on orthopaedic metal bearings. *J Biomed Mater Res A* (in press).
 - 15) Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Ohba S, Kawamura N, Ogasawara T, Kawasaki Y, Saito T, Yano F, Ikeda T, Nakamura K, Chung UI, and Kawaguchi H: C/EBP β promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57^{Kip2}. *PLoS ONE* (in press).
 - 16) Muraki S, Oka H, Akune T, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Suzuki T, Yoshida H, Ishibashi H, Yamamoto S, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: The ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage* (in press).
 - 17) Muraki S, Akune T, Oka H, Mabuchi A, En-yo Y, Yoshida M, Saika A, Nakamura K, Kawaguchi H, and Yoshimura N: Association of occupational activity with

- radiographic knee osteoarthritis and lumbar spondylosis in the elderly of population-based cohorts: The ROAD study. *Arthritis Rheum* (in press).
- 18) Ushita M, Saito T, Ikeda T, Yano F, Higashikawa A, Ogata N, Chung UI, Nakamura K, and Kawaguchi H: Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* (in press).
- 19) Moro T, Kawaguchi H, Ishihara K, Kyomoto M, Karita T, Ito H, Nakamura K, and Takatori Y: Wear resistance of artificial hip joints with poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) grafted polyethylene: Comparisons with the effect of polyethylene cross-linking and ceramic femoral heads. *Biomaterials* (in press).
2. 学会発表
- ① 国内学会
- 1) 石山典幸、茂呂徹、三浦俊樹、大江隆史、川口浩: 生体適合性ポリマーハイドロゲルによる癒着防止効果の検討. 第51回日本手の外科学会学術集会. 2008. 4. 17-18 (つくば)
- 2) 茂呂徹、高取吉雄、石原一彦、山本基、荻田達郎、伊藤英也、金野智浩、京本政之、山脇昇、中村耕三、川口浩: 人工股関節のポリエチレンライナーにMPC処理を加える範囲が摩耗抑制効果に与える影響. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (札幌)
- 3) 川口浩、村木重之、岡敬之、阿久根徹、馬淵昭彦、中村耕三、吉村典子: 変形性関節症の大規模臨床統合データベースの構築と、これを用いた観察疫学・ゲノム疫学研究. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (札幌).
- 4) 延興良夫、吉田宗人、吉村典子、村木重之、岡敬之、馬淵昭彦、中村耕三、川口浩: 頸椎症における高位別有病率と頸部痛との関係 - Research on Osteoarthritis against Disability (ROAD) プロジェクト -. 第81回日本整形外科学会学術総会. 2008. 5. 22-25 (札幌).
- 5) 川口浩: 変形性関節症: その病態解明・診断・治療の最前線. 福岡県臨床整形外科医会. 2008. 6. 7 (博多).
- 6) 川口浩: 変形性関節症: 研究・診療の現状と問題点 (シンポジウム: 骨粗鬆症と変形性関節症: 研究と診療の最前線). 第50回日本老年医学会学術集会・総会. 2008. 6. 19-21 (千葉).
- 7) 川口浩: 変形性関節症研究の現状と問題点 (シンポジウム: プロテオーム解析技術の新展開: 創薬ターゲット/臨床マーカー発見を目指して). 日本ヒトプロテオーム機構第6回大会. 2008. 7. 29-30 (大阪).
- 8) 川口浩: 変形性関節症 up-to-date: 診断と治療の最前線. 第1回TCOA(東京都臨床整形外科医会) up-to-date セミナー. 2008. 8. 30 (東京).
- 9) 川口浩: 変形性関節症 - その病態解明・診断・治療の最前線 (ランチョンセミナー). 第36回九州リウマチ学会. 2008. 9. 6-7 (佐賀).
- 10) 京本政之、茂呂徹、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: MPCポリマーによる高潤滑インターフェイスが長寿命型人工関節を実現する. 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム. 2008. 9. 23 (東京)
- 11) 雑賀健一、京本政之、茂呂徹、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦: 高潤滑性ポリマーを用いた光開始グラフト重合法による長寿命

- 型人工関節の開発. 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム, 2008. 9. 23 (東京)
- 12) 石山典幸、茂呂徹、三浦俊樹、大江隆史、伊藤祥三、森崎裕、金野智浩、吉河美都奈、大山但、石原一彦、中村耕三、川口浩: 組織癒着防止効果を有する生体適合性 MPC ゲルの開発. 東京大学生命科学研究ネットワークシンポジウム, 2008. 9. 23 (東京)
- 13) 川口浩: 変形性関節症: その病態解明・診断・治療の最前線. 平成 20 年度 堺市医師会整形外科医会講演会, 2008. 10. 4 (大阪).
- 14) 村木重之、岡敬之、阿久根徹、馬淵昭彦、中村耕三、川口浩、吉村典子: 高齢者では腰椎椎間狭小化と腰痛との関連は女性の方が男性よりも強い - ROAD プロジェクト -. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. 23-24 (京都).
- 15) 村木重之、岡敬之、阿久根徹、馬淵昭彦、中村耕三、川口浩、吉村典子: 変形性膝関節症における骨棘形成および関節裂隙狭小化の膝痛への影響 - ROAD プロジェクト -. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. 23-24 (京都).
- 16) 石山典幸、茂呂徹、三浦俊樹、大江隆史、中村耕三、川口浩: 腱癒着防止効果を有する生体内解離性 MPC ゲルの開発. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. 23-24 (京都).
- 17) 茂呂徹、川口浩、石原一彦、京本政之、山本基、苅田達郎、伊藤英也、齊藤貴志、中村耕三、高取吉雄: 人工股関節ライナー表面の MPC グラフト処理による摩耗抑制効果: ライナーの架橋の有無および骨頭の材質による比較. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. 23-24 (京都).
- 18) 深井厚、河村直洋、東川晶朗、齋藤琢、菅哲徳、平田真、川崎洋介、大島寧、鄭雄一、中村耕三、川口浩: Akt1 は軟骨内骨化における軟骨細胞の石灰化を維持して骨格成長を制御する. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. 23-24 (京都).
- 19) 岡敬之、阿久根徹、村木重之、吉村典子、中村耕三、川口浩: 変形性膝関節症におけるレントゲン上の外側関節裂隙狭小は膝痛増悪予測因子である - 重症度自動計測システム KOACAD を用いた縦断研究 -. 第 26 回日本骨代謝学会, 2008. 10. 29-31 (大阪).
- 20) 阿久根徹、村木重之、岡敬之、中村耕三、川口浩、吉村典子: 変形性膝関節症の X 線学的重症度と膝症状および下肢機能との関連 - ROAD (Research on Osteoarthritis against Disability) プロジェクト -. 2008. 10. 29-31 (大阪).
- 21) 吉村典子、村木重之、岡敬之、中村耕三、川口浩、阿久根徹: 変形性膝関節症および変形性脊椎症とメタボリック症候群との関連; ROAD (Research on Osteoarthritis against Disability) プロジェクト. 第 26 回日本骨代謝学会, 2008. 10. 29-31 (大阪).
- 22) 吉村典子、阿久根徹、村木重之、岡敬之、川口浩、中村耕三、Lau Edith、Kwok Anthony、Leung Ping-chung: アジア諸国における脊椎椎体骨折有病率の比較: The Asian Vertebral Osteoporosis Study (AVOS). 第 10 回日本骨粗鬆症学会, 2008. 10. 31-11. 2 (大阪).
- 23) 石山典幸、茂呂徹、三浦俊樹、大江隆史、伊藤祥三、森崎裕、大山但、吉河美都奈、金野智浩、中村耕三、川口浩、石原一彦: 生体内解離性ポリマーハイドロゲルの癒着防止効果の組織学的・分子生物学的検討. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 2008. 11. 17-18. (東京)
- 24) 京本政之、茂呂徹、岩崎泰彦、宮路史

- 明、金野智浩、川口浩、高取吉雄、中村耕三、石原一彦：リン脂質グラフトポリマーによる超潤滑性Co-Cr-Mo合金表面の創製。日本バイオマテリアル学会シンポジウム2008。2008.11.17-18。(東京)
- 25) 伊藤英也、苅田達郎、高取吉雄、茂呂徹、齊藤貴志、中村耕三：セメントレス臼蓋コンポーネントによる人工股関節再置換術の長期成績。第35回日本股関節学会。2008.12.5-6。(大阪)
- 26) 伊藤英也、苅田達郎、高取吉雄、茂呂徹、齊藤貴志、中村耕三：セメントレス臼蓋コンポーネントによる人工股関節再置換術の長期成績。第35回日本股関節学会。2008.12.5-6。(大阪)
- 27) 高橋寛、赤坂嘉之、伊藤英也、茂呂徹、門野夕峰、河野博隆、苅田達郎、高取吉雄、中村耕三：非典型的な画像所見を示した滑膜骨軟骨腫症に対する人工股関節全置換術の経験。第49回関東整形外科災害外科学会。2009.3.20-21。(東京)
- ② 国際学会
- 1) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Konno T, Kyomoto M, Yamamoto M, Karita T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H: Grafting of biocompatible polymer on the liner surface for extending longevity of artificial hip joints. 8th World Biomaterials Congress (WBC) 2008. 5. 28-6. 1 (Amsterdam, The Netherlands)
- 2) Kyomoto M, Moro T, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Nanometer-scale high lubricious surface modification extends the durability of artificial joint. 8th World Biomaterials Congress (WBC) 2008. 5. 28-6. 1 (Amsterdam, The Netherlands)
- 3) Ishiyama N, Moro T, Miura T, Ohe T, Ito S, Konno T, Yoshikawa M, Ohyama T, Ishihara K, Nakamura K, Kawaguchi H: Investigation of biodissociated phospholipid polymer hydrogel that prevents tissue adhesion without impairing healing. 8th World Biomaterials Congress (WBC) 2008. 5. 28-6. 1 (Amsterdam, The Netherlands)
- 4) Moro T, Takatori Y, Kyomoto M, Ishihara K, Nakamura K, Kawaguchi H: Biocompatible phospholipid polymer grafting on liner surface of artificial hip joints enhances the wear resistance independently of liner cross-linking of femoral head material. 2008 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2008. 9.18-21 (Rome, Italy).
- 5) Akune T, Muraki S, Oka H, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Association of radiographic severity of knee osteoarthritis with symptomatic parameters: The ROAD study. 2008 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2008. 9.18-21 (Rome, Italy).
- 6) Oka H, Akune T, Muraki S, Nakamura K, Yoshimura N, Kawaguchi H: Lateral joint space narrowing on radiographs predicts pain progression in knee osteoarthritis patients: Application of fully automatic KOACAD system to OAI public data. 2008 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2008. 9.18-21 (Rome, Italy).
- 7) Morita M, Yamada H, Yoshimura N, Date H, Oka H, Muraki S, Akune T, Ichinose H, Kawaguchi H, Nakamura

- K: Evaluation of the usefulness of biomarkers in knee osteoarthritis or lumbar spondylosis in mass cohort study of Japan. 2008 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2008. 9.18-21 (Rome, Italy).
- 8) Fukai A, Kawamura N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Akt1 contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. . 2008 World Congress on Osteoarthritis (OARSI). 2008. 9.18-21 (Rome, Italy).
- 9) Kawaguchi H: Transcriptional regulation of osteoarthritis progression (Symposium: Update on Osteoarthritis: from Bench to Bedside -APLAR-OARSI Co-Sponsored Symposium). The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008). 2008. 9.23-27 (Yokohama, Japan).
- 10) Akune T, Muraki S, Oka H, Nakamura K, Kawaguchi H, Yoshimura N: Association of radiographic severity of knee osteoarthritis with symptomatic parameters: The ROAD study. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008). 2008. 9.23-27 (Yokohama, Japan).
- 11) Oka H, Akune T, Muraki S, Nakamura K, Yoshimura N, Kawaguchi H: Lateral joint space narrowing on radiographs predicts pain progression in knee osteoarthritis patients: Application of fully automatic KOACAD system to OAI public data. The 13th Congress of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology (APLAR 2008). 2008. 9.23-27 (Yokohama, Japan).
- 12) Moro T, Takatori Y, Ishihara K, Kyomoto M, Karita T, Ito H, Nakamura K, Kawaguchi H: The effect of biocompatible polymer grafting onto polyethylene liner surface: Improvement of lubricity regardless of the characteristics of bearing materials. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2009. 2.22-25 (Las Vegas, USA)
- 13) Ishiyama N, Moro T, Miura T, Ohe T, Ito S, Konno T, Yoshikawa M, Ohyama T, Ishihara K, Nakamura K, Kawaguchi H: Anti-adhesion effect without impairing healing of biocompatible phospholipid polymer hydrogel. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2009. 2.22-25 (Las Vegas, USA)
- 14) Kyomoto M, Moro T, Miyaji F, Kawaguchi H, Takatori Y, Nakamura K, Ishihara K: Brush-like structure only gives high durability to cross-linked polyethylene among various surface-modified layers with MPC polymer. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS). 2009. 2.22-25 (Las Vegas, USA)
- 15) Higashikawa A, Saito T, Kamekura S, Ikeda T, Kan A, Moro T, Ohba S, Ogata N, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H: Transcriptional Regulation of Type X Collagen Expression and Hypertrophic Differentiation of Chondrocytes by Runx2 during Osteoarthritis Progression. The 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ORS).

2009. 2. 22-25 (Las Vegas, USA)

③ シンポジウム

- 1) 茂呂徹、川口浩、石原一彦、金野智浩、京本政之、山脇昇、橋本雅美、苅田達郎、伊藤英也、齋藤貴志、中村耕三、高取吉雄：MPC ポリマーの表面処理による低摩耗型人工関節. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008. 2008. 11. 17-18. (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称：「組織癒着防止材および関節拘縮防止材」

発明者：石原一彦、金野智浩、茂呂徹、石山典幸、川口浩、中村耕三、大山但、吉河美都奈

出願番号：PCT/JP2008/071168

出願日：平成 20 年 11 月 14 日

分担研究報告書

屈筋腱損傷モデルを用いた組織癒着防止効果の検討

分担研究者 茂呂 徹（東京大学大学院医学系研究科 特任准教授）
金野智浩（東京大学大学院工学系研究科 助教）

研究要旨：本研究の目的は、生体適合性と操作性に優れた 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーゲルを外傷・手術後の組織癒着防止材として臨床応用するための基礎的検討を完成させることである。

MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果を検討するため、昨年度の研究ではラットアキレス腱損傷モデルを確立し、このモデルを使用してゲルの有効性を確認した。今年度の研究では、生体工学的評価においてラットのモデルと比較しより有効なウサギの趾屈筋腱損傷モデルを確立し、このモデルを使用して有効性の検討を行った。MPC ポリマーゲルで腱縫合部を被覆した群では、被覆しないコントロール群と比較し、腱を周囲組織から遊離するために要する切離回数が少なく、また、組織標本における癒着グレードおよび生体力学試験における趾屈曲仕事量も低値であり、癒着が有意に抑制されていた。一方、縫合した腱の最大破断張力は MPC ポリマーゲルで被覆した群とコントロール群との間で有意な差がなく、ゲルによる修復の阻害はみられなかった。

以上の結果は、MPC ポリマーゲルが組織修復を妨げることなく癒着を防止することを示唆するものであり、この新しいマテリアルを組織癒着防止材として臨床応用するための研究開発をさらに推進しうるものであった。

A. 研究目的

長寿と生活の質 (QOL) の維持・改善の両立は、支援や介護を要する高齢者が急激に増加してきているわが国において、希求の問題である。QOL を極めて低下させる自立喪失へ高齢者が陥る過程は次のように二分される。一つは、変形性関節症等の慢性疼痛による廃用症候群として徐々に自立喪失に陥る例、もう一つは骨折等の外傷や手術、その後の関節拘縮・組織癒着により急激に自立喪失に陥る例である。この問題解決のため、我々は新規治療法として、優れた生体適合性と潤滑特性を発揮する高分子材料で

ある 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを用いた生体内解離性ハイドロゲル (MPC ポリマーゲル) を創出した。本研究の目的は、この新規のマテリアルを外傷や手術後の組織癒着の防止材として臨床応用するために必要な基礎的検討を完成させることである。組織癒着は組織の可動性 (例えば、腱であれば滑走運動、筋であれば収縮運動、腸管であれば蠕動運動) を損ない、ときに関節拘縮等の著しい機能障害を惹起する。しかも、組織癒着は一度発生すると外科的処置を用いなければ、通常は解消困難である。このた

め、これまでに様々な組織癒着防止材の研究が行われてきた。これらは合成高分子材料と生体吸収性材料に大別できるが、液性因子の透過性がないため損傷部の修復に悪影響を及ぼす、生体親和性が低く異物反応を惹起する、解離速度の制御ができない等の理由で、運動器疾患に使用できる有効な組織癒着防止材はこれまでに国内外で実用化されていない。そこで我々は、分担研究者の石原らが開発した MPC ポリマーゲルを新規組織癒着防止材に応用することを創案した。この MPC ポリマーゲルは、MPC・ブチルメタクリレート・ビニルフェニルボロン酸の共重合体 (PMBV) 溶液 (A 液) とポリビニルアルコール (PVA) 溶液 (B 液) を混合して形成するものである。MPC ポリマーは生体細胞膜類似構造を有するため生体親和性も高く、様々な医療材料に臨床応用されている。また、今回の MPC ポリマーゲルは、ナノメートル単位の小孔を持つ蜂巢状の三次元微細構造を有するため、組織の修復に必要な液性因子の透過が期待できる一方、表面へのタンパク吸着や細胞接着を抑制するため癒着防止効果も期待できる。さらに、分担研究者の金野らの昨年度の研究において、このゲルが生体内で A 液と B 液の 2 剤に解離し、その速度が制御可能であることが明らかとなっている。生体内解離性も有するものである。

今年度の本研究の目的は、MPC ポリマーゲルの *in vivo* での組織癒着防止効果を昨年度に引き続きさらに評価することである。このゲルが「損傷組織の修復を妨げずに、周囲組織との癒着を防止する」ことを明らかにするため、ウサギ屈筋腱損傷モデルを確立し、肉眼および組織所見のほか、生体力学所見も評価し、検討を行った。

B. 研究方法

1) ウサギ趾腱損傷モデルの確立

- a) 麻酔・前処置・体位：麻酔薬として塩酸ケタミン (50 mg/ml) とキシラジンを (20 mg/ml) を 2:1 にて混合した薬物を準備し、これを筋注 (1 ml/kg) することで麻酔を行った。右後肢をバリカンで剃毛し、抗生剤のエンフロキサシン (5 mg/kg) を皮下注したうえで大腿部に巻いた空気止血帯に送気して止血した (図 1)。さらに右後肢を 0.5% ビピテン水溶液にて消毒後、ウサギを腹臥位として手術野以外を滅菌布にて被覆した。



図 1. ウサギ右後肢の剃毛・止血

- b) 屈筋腱鞘の切除：手術用顕微鏡下に右足第 2 趾および第 4 趾の趾屈筋腱直上を皮膚切開後、腱鞘を切除した (図 2)。



図 2. 第 2 趾の屈筋腱鞘切除



図 4. 深趾屈筋腱の縫合

- c) 趾屈筋腱の損傷・縫合：ヒトの指において腱癒着が問題となりやすい Zone II に相当する部位において、趾屈筋腱を剪刀にて切断した（図 3）。



図 3. 趾屈筋腱の切断

癒着評価用（第 4 趾）は深趾屈筋腱の半切断のみ行ない、修復評価用（第 2 趾）は全切断した。非吸収性の 6-0 ポリエステル糸を用いて Kessler 法にて深趾屈筋腱をコア縫合し、非吸収性の 8-0 ナイロン糸を使用して周囲縫合を追加した（図 4）。

- d) 閉創：創内を生理食塩水にて洗浄後、6-0 ナイロン糸にて皮膚縫合し、閉創した。
e) ギプス固定・覚醒：閉創後、左脚をギプス固定（図 5）した上で麻酔からの覚醒を待ち、以後はケージ内で自由に運動させた。



図 5. ウサギ右後肢のギプス固定

- f) 腱癒着と修復の評価：腱の連続性が回復する術後 3 週で、術後の腱組織の癒着および修復の状態を以下の 2)、3) で評価することとした。
- 2) MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果についての検討

MPC ポリマーゲルの原材料である PMBV ポリマーと PVA ポリマーの溶液濃度は、昨年度の研究結果に

て最も効果が高い組み合わせであった PMBV:PVA[%]=5.0:2.5 として、組織癒着防止効果を検討した。

腱縫合後に、MPC 群では MPC ポリマーゲルを創内に 100 μ l 滴下し、腱縫合部周囲を含む腱全体をゲルで被覆し、対象群では生理食塩水 100 μ l を創内に滴下した。

上記 1) の術後 3 週の時点で、第 4 趾の手術創を再切開し、まず創内を肉眼的に評価した。次に、癒着の程度を評価するため、腱周囲を全周性に鉗子先で鈍的に剥離した後、残存した繊維性癒着組織を剪刀で切離 (図 6) し、この回数を癒着の程度を表す指標として測定した。



図 6. 繊維性癒着の切離

また、組織標本は縫合部を含めて採取した腱を Hematoxylin および Eosin (H-E) にて染色し、7 段階に分類する癒着グレード (癒着が最も弱い場合が 0、最も強い場合が 6) を評価した。

さらに、生体力学的に評価するため、レオメーターシステム (図 7) を用いて、趾屈曲仕事量を測定した。



図 7. レオメーターシステム

屈曲仕事量は、屈筋腱を近位方向へ 20 mm/min の速度牽引して関節を屈曲させる際にかかる負荷 (力) と腱の滑走距離 (長さ) の積で求めた。したがって、この仕事量が大きいほど屈筋腱の癒着が強いと考えられ、組織癒着の指標として統計学的に検討した。

3) MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての検討

第 2 趾の深趾屈筋腱を周囲組織から切離後に、腱縫合部より遠位に 15 mm 長、近位に 20 mm 長の範囲で採取し、レオメーターシステムを用いて縫合部より近位・遠位それぞれ 5 mm の部位をエアチャックで把持し、遠位方向へ 35 mm/min の速度で腱が破断するまで牽引し、腱破断張力を測定した (図 8)。

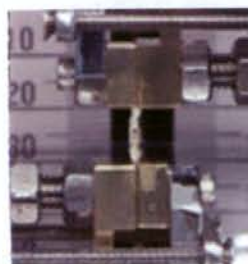


図 8. 腱破断張力の測定

この際の最大破断張力を組織修復の指標として測定し、統計学的に検討した。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は「動物の保護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準総理府告示」、「東京大学医学部動物実験指針」に従って、東京大学医学部倫理委員会の承諾の下で行った。

C. 研究結果

1) ウサギ趾屈筋腱損傷モデルの確立

麻酔による術中・術後死例はなく、麻酔からの覚醒も安定していた。手術用顕微鏡を用いた慎重な操作により、出血のコントロールも良好であり、手術行程を妨げたり、生命の危険が心配されたりするような出血量はなかった。

肉眼での観察では、術後3週において、腱切断部の連続性は良好で、腱の再断裂・縫合部の離解や菲薄化・創部感染等は特にみられなかった。また、腱周囲の癒着は著明にみられ、鉗子による鈍的剥離のみでは腱を周囲組織から遊離させることは困難で、剪刀による鋭的切離を必要とした(図6)。

以上より、このウサギの腱損傷モデルは今回の研究において適当であると考えられたため、以後の実験でも使用することとした。

2) MPC ポリマーゲルの組織癒着防止効果についての検討

1)のウサギの腱損傷モデルにおいて、図9に腱縫合部の肉眼所見を、図10に腱癒着切離回数の結果を示す。趾屈筋腱を縫合後、縫合部を含めた腱全体をMPCポリマーゲルで

被覆したMPC群(n=5)では、ゲルを使用しなかったコントロール群(n=5)と比較し、線維性癒着の切離回数が有意(p<0.05)に低値であった。



図9-a. ウサギ深趾屈筋腱 (コントロール、術後3W)



図9-b. ウサギ深趾屈筋腱 (PMBV:PVA=5.0:2.5、術後3W)

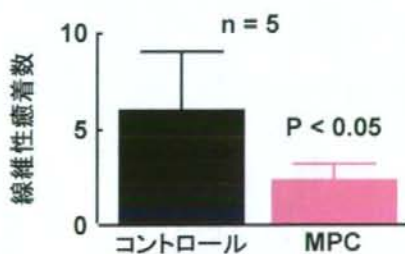


図10. 腱の線維性癒着数

また、図 11 に腱縫合部の組織所見を、図 12 に癒着グレード測定の結果を示す。MPC 群 (n=5) では、コントロール群 (n=5) と比較し、癒着グレードが有意 ($p < 0.05$) に低値であった。

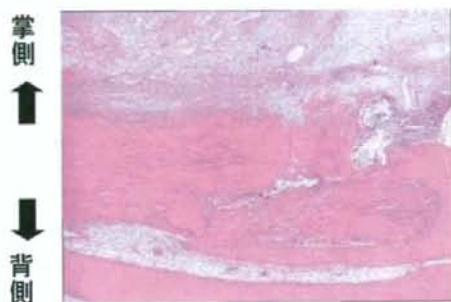


図 11-a. ウサギ深趾屈筋腱 (コントロール、術後 3 W、H-E 染色)

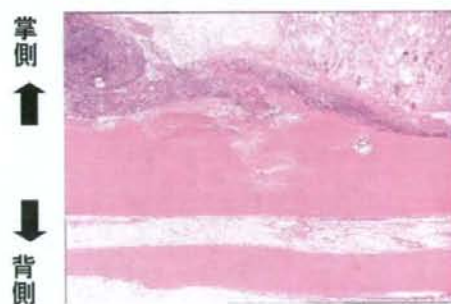


図 11-b. ウサギ深趾屈筋腱 (MPC、術後 3 W、H-E 染色)

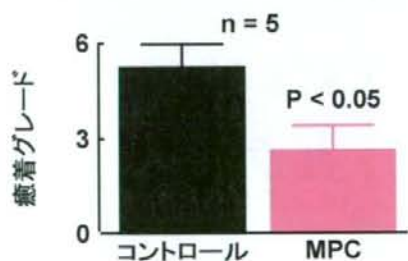


図 12. 腱の癒着グレード

さらに、図 13 に趾屈曲仕事量の結果を示す。MPC 群 (n=7) では、コントロール群 (n=7) と比較し、癒着グレードが有意 ($p < 0.05$) に低値であった。

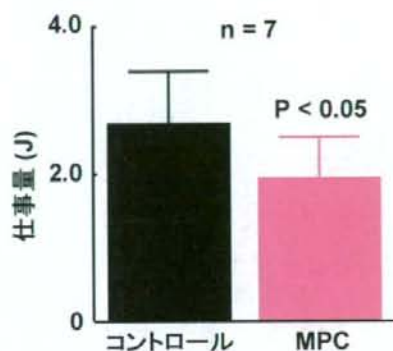


図 13. 趾屈曲仕事量

3) MPC ポリマーゲルの組織修復への影響についての検討

腱破断張力測定の力学試験において、最大破断張力はコントロール群 (n=5) と MPC 群 (n=5) の間で、有意な差を認めなかった (図 14)。

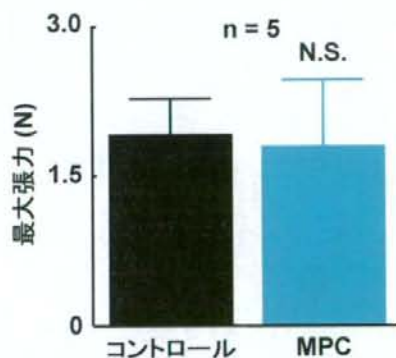


図 14. 腱の最大破断張力

D. 考察

今年度の研究では、新たにウサギ趾腱損傷モデルを確立し、昨年度の研究