

## 家兎膝軟骨損傷モデルを用いた 積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討

研究協力者	伊藤 聡	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生
研究分担者	小久保 舞美	東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員
	長井 敏洋	東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
	杓名 寿治	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
	三谷 玄弥	東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
研究協力者	鶴養 拓	東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生

研究要旨：我々は細胞シートによる関節軟骨の修復再生を目指しているが、軟骨細胞は乏しい増殖能のため、組織作製まで多くの時間を要する。本研究において、シート作製までの培養期間を短くするべく、ヒト軟骨細胞をヒト滑膜細胞と共培養し、積層化軟骨細胞シートを作製した。今回我々は、家兎膝軟骨損傷モデルを用いて積層化軟骨細胞シート及び滑膜細胞による治療効果を検討したので報告する。

### A. 研究目的

関節軟骨は無血管組織であり、滑液より栄養されている。成人関節軟骨の自己修復能は乏しく、一度変性もしくは損傷されると修復することは困難となり変形性関節症(OA)をもたらす。<sup>(1)</sup>現在OAに対する治療として、骨穿孔術、<sup>(2-4)</sup> mosaicplasty<sup>(5-7)</sup>人工関節置換術などが行われている。骨穿孔術や、ドリリングは自然修復を促すために骨髄由来の修復細胞を満たす方法である。しかし、欠損部が骨髄由来の修復細胞で満たされた場合、大量の血管浸潤と修復組織が骨と線維性軟骨で置き換わるとされている。<sup>(8)</sup>近年、自己軟骨細胞移植術も行われるようになってきた。<sup>(9-23)</sup>長井らはscaffold freeの軟骨細胞移植術をウサギを用いた動物実験で報告してきた。<sup>(19)(20)</sup>

我々は、温度応答性培養皿から得られた接着性を有する細胞シートによる関節軟骨の治療の臨床応用を目指し、動物実験を継

続している。金城らはウサギを用いて部分欠損モデルを作製し、温度応答性培養皿から得られた接着性を有する細胞シートを移植し良好な成績を得た。<sup>(24)</sup>

本研究の目的は家兎膝軟骨全層欠損モデルを用いて積層化軟骨細胞シート及び滑膜細胞による治療効果を検討することである。

### B. 研究方法

#### 温度応答性培養皿

温度応答性培養皿(provided by CellSeed, Tokyo, Japan)は岡野らによって開発され、その製品の特異性が報告されている。<sup>(25)</sup>簡潔に説明すると、市販の培養皿にN-isopropylacrylamide (IPAAm)モノマー溶液を塗布した後、電子ビームを照射され培養皿表面と結合させ、蒸留水で洗い流されたものである。培養皿はエチレンオキシドガスによって殺菌を行った。<sup>(26)</sup>

## 日本白色家兎から軟骨細胞、滑膜細胞採取

日本白色家兎生後16~18週、体重約3kgのもの膝関節軟骨細胞、滑膜細胞を使用した。軟骨細胞は大腿骨より採取し、滑膜細胞は膝関節内より採取した。酵素的に単離後軟骨細胞は温度応答性インサートに、滑膜細胞は温度応答性培養皿に播種し共培養を行った。佐藤らが報告した方法で培養した。<sup>(27)</sup>

## 温度応答性培養皿による細胞培養

採取した軟骨組織、滑膜組織をそれぞれシャーレ上でハサミを利用して細切し、0.016% Collagenase type1 (Worthington, New Jersey, USA) を含むDMEM/F12で4時間、スターラーで攪拌しながら37°C、5%CO<sub>2</sub>下でインキュベートし、タンパク質分解を行った。その後cell strainer (BD Falcon™) with a pore size of 100 μmに通し、細胞を遠沈回収した。軟骨細胞はDMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) , 4日目以降はさらに50μg/ml ascorbic acid (Wakojunyakougyou Corp., Japan)を加えたもので維持し、滑膜細胞はDMEM/F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics-antimycoticで維持した。全ての培養は37°C ,5% CO<sub>2</sub> と95% air 下で行った。軟骨細胞は温度応答性インサート (5.0cm<sup>2</sup> CellSeed, Tokyo, Japan)、滑膜細胞は温度応答性培養皿(9.6cm<sup>2</sup> CellSeed, Tokyo, Japan)に共に10,000cells/cm<sup>2</sup>で播種し、14日間共培養を行った。

## 細胞シートの回収

2週間培養後、細胞がコンフルエントになった状態で、温度応答性インサートはインキュベーターから取り出され、25°Cで30分間放置し、培地を除去した後、重合ビニリデン・ジフルオリド (PVDF) 膜を使用してヤマトらによって報告された方法で軟骨細胞シートは回収した。<sup>(28)</sup>

手短に説明すると、PVDF 膜を軟骨細胞シート上に置き、シートの端を丸めるように PVDF 膜上に巻き上げた。培養された軟骨細胞シートはこの方法でうまく回収することが可能であった。回収された軟骨細胞シートは積層化を行うために、新たな軟骨細胞シートの上に置き、同様にロールアップした。このロールアップ操作を3回行い、3層の積層化軟骨細胞シートを作製した。積層化軟骨細胞シートが培養液中に浮いてしまうため、細胞濾過器(BD Falcon™)を重石として使用した。積層化軟骨細胞シートは1週間培養を行った。

滑膜細胞は引き続き温度応答性培養皿で培養を行った。

## 滑膜細胞、積層化軟骨細胞シートの移植

生後16~18週、体重約3kgの日本白色家兎48羽を使用した。ウサギはセボフルランとO<sub>2</sub>ガスによって麻酔を行った。片側下肢内側傍膝蓋骨の皮膚を切開した後、膝蓋骨を外側に脱臼させ、ドリルと生検パンチ(Kai Industries, Seki, Japan)を用いて大腿骨膝蓋骨溝に骨軟骨欠損(径5mm、深さ3mm)を作

製した。骨髄からの出血を確認して骨軟骨欠損を作製した。積層化軟骨細胞シート、滑膜細胞は次に示す6つの条件で移植を行った。A:滑膜細胞 $1.8 \times 10^6$ 個を移植した群、B:積層化軟骨細胞シート $1.7 \times 10^6$ のみを移植した群、C:滑膜細胞 $3.0 \times 10^5$ 個を移植した上から骨軟骨欠損を覆うように積層化軟骨細胞シート $1.7 \times 10^6$ を移植した群、D:滑膜細胞 $6.0 \times 10^5$ 個を移植した上から骨軟骨欠損を覆うように積層化軟骨細胞シート $1.7 \times 10^6$ を移植した群、E:滑膜細胞 $1.2 \times 10^6$ 個を移植した上から骨軟骨欠損を覆うように積層化軟骨細胞シート $1.7 \times 10^6$ を移植した群、F:骨軟骨欠損を作製し無処置とした群(コントロール群)。それぞれ4羽、片側4膝に移植を行い、術後すべてのウサギは副木なしでゲージに戻された。

#### 疼痛評価

移植後1日目より、小動物用鎮痛評価装置 Incapacitance Tester (Linton Instrumentation, Norfolk, England)を用いて、健側および患側下肢への荷重配分の推移を疼痛評価の指標とした。Incapacitance Testerは両後肢の重量配分を測定(デュアルチャンネル重量平均法)することによって、自動的に且つ再現性のある鎮痛評価を行うことが可能な装置である。この装置は疼痛改善効果を検討するために広く用いられている。<sup>(29)</sup> Incapacitance Testerに対する馴化として、入荷後7日間毎日、全例動物を本体容器(ホルダー)に入れ5秒間静止させる操作を行った。測定は動物をウサギ用ホルダーに移動し、

動物が静止した状態で測定し、動物をホルダーから取り出した後、再度入れて静止状態で測定し、この操作を10回行った。10回測定した両後足重量配分のそれぞれについて、左右の荷重から患肢重量配分比(%)を次式により算出した。

患肢重量配分比(%)=(患側の荷重(g)/健側の荷重(g)+患側の荷重(g)) $\times 100$

10回算出した患肢重量配分比(%)の平均値を、測定1回当たりの患肢重量配分比(%)と定義した。

移植手術後1、3、5、7、10、13、15、18、22、25、28日の11回測定を行った。

#### 組織学的評価方法

術後4週、12週に過量の静脈内麻酔投与によって犠牲死させ評価検討を行った。

片側大腿骨末端部より移植組織の標本を採取し、1週間4%パラホルムアルデヒドで固定を行い、その後10%エチレンジアミン四酢酸(EDTA)入り蒸留水(pH7.4)を用いて2~3週間脱灰を行った。続いて標本はパラフィンに封埋し、骨軟骨欠損部の中央を通るように切り分け、組織学的評価の為にサフランinOで染色を行った。

以前より用いられている方法で免疫染色を行った。<sup>(19)(30)</sup> 手短に説明すると、切片は免疫染色を行うために標準操作法によって脱パラフィンを行った。切片は0.005% proteinase (type XXIV; Sigma-Aldrich Company, St. Louis, MO, USA)を用いて37°Cで30分間処理した。切片をPBS(phosphate-buffered saline)で洗浄後、室

温で0.3%過酸化水素/メタノール溶液で15~20分間処理し、内因性ペルオキシダーゼ活性を賦活化した。切片をPBSで洗浄後、normal goat serumをPBSで1:20に希釈した溶液で30分間室温で反応させた。ヒト・I型コラーゲン及びII型コラーゲン(Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan)と反応するマウス・モノクローナル一次抗体は、1%ウシ血清アルブミン(BSA; Sigma)PBSで1:200に希釈した。切片を4℃に一晩置き、PBSで10回洗浄後、biotin-conjugated goat anti-mouse 二次抗体を1%BSA/PBSで1:100に希釈し、1時間室温で反応させた。その後切片はstreptavidin でラベルされた horseradish peroxidase (streptavidin HRP)で1時間処理を行った。最後に、0.05% diaminobenzidine (DAB)入り Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 0.005% hydrogen peroxideへ2~4分浸し発色させた。免疫染色後、スライドは細胞の明視化を高めるために、Mayer'sヘマトキシリンで対比染色を行った。

サフラニンO染色はO'Driscoll, Keeley and Salter<sup>(31)</sup>らが発表したものをmodifiedした International Cartilage Repair Society (ICRS) grading scale<sup>(22)(42)</sup>で盲検化状況で3人の検者によってスコアリングを行った。

#### 統計学的解析

術後28日時点の荷重率と International Cartilage Repair Society (ICRS) grading scale の組織学的評価は分散分析(ANOVA)法で解析し、post hoc testにはFisherテストを用いた。

結果は平均±標準偏差mean ± standard deviation (SD) で示し、 $p<0.05$ は統計学的に有意差があるとみなした。

#### C. 結果

##### 荷重率の推移

移植手術後1、3、5、7、10、13、15、18、22、25、28日に測定した患肢重量配分比(平均±標準偏差)をFig1に示した。A群の患肢重量配分比は術直後34.0±1.6%であったが術後28日目に45.2±0.7%まで改善、B群は35.6±1.7%から47.1±0.6%に、C群は32.9±3.4%から48.0±0.3%、D群は35.7±10.1%から49.1±1.0%、E群は35.6±1.1%から49.6±0.1%に改善した。対照的にF群は33.4±2.9%から38.8±4.0%と患肢重量配分比の改善が乏しかった。術後28日目時点での患肢重量配分比をFig2に示す。術後28日目の患肢重量配分比をFig2に示す。分散分析法(ANOVA法)で比較検討を行ったところAからE群とF群の間で有意差がみられた。

##### 修復組織の組織学的評価

移植手術は問題なく行われた。すべてのウサギは移植手術後ゲージに戻され、自由に活動させた。すべてのグループで感染所見は見られなかった。移植手術後4週、12週で各群4膝で評価を行った。移植手術後4週、12週のサフラニンOで染色を行った修復組織の組織像をFig3に示す。移植手術後4週で、A~Eの細胞移植した群は軟骨様修復組織で満たされていた。しかし、F群は修復組織で満たされていないものもみられた。すべ



ての群はサフラニンOで染色を行った。A群はサフラニンOで染色されているが、一部線維性の細胞に置き換わっているものがみられた。周囲の軟骨との連続性は良好であった。移植組織の下部は肥大軟骨細胞を含み、軟骨下骨の形成は不十分であった。B群はサフラニンOで染色されており、表層は一部不正であった。周囲の軟骨とのintegration片側は良好であったが、もう一方は不十分であった。軟骨下骨の形成は不十分であった。C群はサフラニンOで染色されており、周囲の正常軟骨とのintegrationも良好であった。一部肥大軟骨細胞も含むが表層滑らかな凸状の修復が得られた。D群、E群も同様にサフラニンOで染色される凸状の修復組織が得られ、他の群と比して構造の整合性、欠損部の組織充填率、表層の状態が良い傾向を示していた。

移植手術後12週のサフラニンOで染色を行った組織像をFig4に示す。移植手術後12週でも、A～Eの細胞移植した群は軟骨様修復組織で満たされていた。F群は修復組織に軟骨層は見られず、骨に置き換わっていた。A群は表層部で線維性組織が見られたが、軟骨下骨形成は良好であった。B群のサフラニンOで染色された修復組織は表層の一部で線維性組織が見られたが、組織充填率、軟骨下骨、周囲の軟骨層とのintegrationは良好であった。C群は表層部に線維性組織も見られたが、サフラニンOの染色性も良好で、軟骨下骨の形成も良好であった。D群は軟骨層は柱状配列を呈し、良好な修復が得られていた。E群は移植組織の状態、組織の充填率、

軟骨下骨の形成いずれも良好であり、移植軟骨層は柱状配列を呈し、ほぼ正常な硝子軟骨で修復されていた。F群は移植組織は軟骨層を呈しておらず、骨に置換されていた。

#### 免疫組織学的評価

移植手術後4週の免疫染色を行った修復組織の組織像をFig5に示す。移植手術後4週の免疫組織学的評価では、AからE群でサフラニンOで染色された組織はtype II コラーゲンの発現を認め、細胞周囲に様に発現していた。A群では線維性組織に置き換わっている部分にtype II コラーゲンの発現を認めなかった。type II コラーゲンは軟骨修復組織の境界を明瞭にした。対照的にtype I コラーゲンはサフラニンOで染色された部位には発現せず、線維性組織に置き換わっている表層部分や、軟骨下骨の表層で発現を認めた。

移植手術後12週の免疫染色を行った修復組織の組織像をFig6に示す。術後12週でも同様に、A～E群は移植した組織や周囲の正常軟骨細胞周囲にtype II コラーゲンの発現を認め、type I コラーゲンは線維性の表層部や、軟骨下骨の表層で発現を認めた。

#### 修復組織の組織学的スコアリング

我々はO'Driscoll, Keeley and Salterによって開発されたものをmodifiedしたICRS histological grading systemを用いて修復組織を評価した。このシステムはtissue morphology (Ti); matrix staining (Matx); structural integrity(Stru); cluster formation

(Clus); tidemark opening (Tide); bone formation (Bform); histologic appraisal of surface architecture (SurfH); histologic appraisal of the degree of defect filling (FilH); lateral integration of defect-filling tissue (LatI); basal integration of defect-filling tissue (BasI); and histologic signs of inflammation (InfH)の11項目で評価される。トータルスコアは11点から45点であった。術後4週、12週のICRS grading systemの結果をFig7からFig10に示す。移植術後4週でA群は $28.0 \pm 5.0$ 、B群は $26.3 \pm 6.6$ 、C群は $31.3 \pm 4.0$ 、D群は $35.5 \pm 4.4$ 、E群は $35.8 \pm 4.7$ 、F群は $17.0 \pm 1.2$ であった。A群、B群、C群、D群、E群はF群と比較して有意に高いスコアを示した。また、A群とD群、E群、B群とD群、E群の間でも有意差がみられた。項目別にはMatx、FilH、BasIの項目でA-E群はF群と比較して有意に高いスコアを示し、Clus、TideはD群、E群がA群、B群と比較して有意に高いスコアを示した。

移植術後12週でA群は $29.0 \pm 0.8$ 、B群は $31.8 \pm 5.4$ 、C群は $32.3 \pm 5.0$ 、D群は $38.8 \pm 2.1$ 、E群は $40.1 \pm 2.5$ 、F群は $23.3 \pm 2.4$ であった。術後4週と同様に、A群、B群、C群、D群、E群はF群と比較して有意に高いスコアを示し、A群とD群、E群、B群とD群、E群の間でも有意差を認めた。また術後12週では、C群とD群、E群の間でも有意差を認めた。項目別にはMatx、InfHの項目でA-E群はF群と比較して有意に高いスコアを示し、SurfH、FilH、TideはD群、E群がA群、B群と比較して有意に高いスコアを示した。

#### D. 考察

高齢化社会が進むにつれ、変形性膝関節症の予防と対策は重要視されてきている。近年自家軟骨細胞移植法 (Autologous Chondrocyte Implantation ACI)が研究されており、これまでに様々な報告がされている。<sup>(9-23)</sup>

温度応答性培養皿の有用性は岡野らによって報告された。<sup>(25)(32)</sup>

これまでに心筋や角膜などの細胞シートが報告されている。<sup>(33)(34)(35)</sup>

また、金城らによって温度応答性培養皿を用いて積層化軟骨細胞シートを作製することが可能であり、家兎膝軟骨部分欠損モデルに積層化軟骨細胞シートを移植し、良好な結果が得られ、積層化軟骨細胞シートの有用性が報告されている。<sup>(24)</sup>

通常、骨軟骨欠損は骨髄由来の修復細胞を誘導する。<sup>(36)</sup>これは増殖、分化可能な骨髄由来の間葉系幹細胞(MSC)を浸潤させる。MSC由来の軟骨細胞は軟骨内骨化を通して、血管や骨髄の浸潤がみられ、最終的には軟骨下骨に置き換わるとされている。<sup>(8)(37)</sup>

また、滑膜細胞移植による軟骨修復は広く行われており、Hunzikerらは軟骨部分欠損に滑膜細胞移植を行っており、<sup>(38)</sup>古賀らはウサギ膝関節に骨軟骨欠損を作製し、滑膜由来の間葉系幹細胞を移植し骨膜パッチを用いて良好な成績を得たと報告している。<sup>(39)</sup>

越智らはコラーゲンをういた培養自己軟骨細胞を $10^6$ /ml骨軟骨欠損に移植し骨膜

パッチを用いて良好な結果を得たと報告した。<sup>(40)</sup>これまでに横山らは高密度になればなるほど、プロテオグリカンが豊富になると報告し、<sup>(41)</sup>高密度の細胞を移植して軟骨修復を得ている報告が散見される。我々は積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用することで、少量の細胞数での軟骨修復を検討した。

術後 4 週で細胞移植群は非移植群と比較して有意に患肢重量配分比が改善し、疼痛改善効果が示唆された。これは細胞移植によって軟骨欠損が修復され、荷重に耐える状態に改善したことによるものと考えられた。

組織学的評価では、術後 4、12 週で A から E 群と F 群の間に有意差を認め、細胞移植は非移植群と比較して組織学的修復に寄与することが示唆された。また、A 群、B 群と D 群、E 群の間にもそれぞれ有意差がみられ、積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植の併用の有効性が示唆された。我々が A 群で移植した細胞数は  $1.8 \times 10^6$  であり、B 群は  $1.7 \times 10^6$ 、C 群は  $1.7 \times 10^6 + 3.0 \times 10^5$ 、D 群は  $1.7 \times 10^6 + 6.0 \times 10^5$ 、E 群は  $1.7 \times 10^6 + 1.2 \times 10^6$  と、他の滑膜細胞を用いた ACI の報告<sup>(39)(40)</sup>と比較し移植細胞数が少ない。今回我々は少ない滑膜細胞移植でも積層化軟骨細胞シートを併用することで良好な修復が得られた。しかしながら、術後 4、12 週で A 群、B 群と C 群の間には有意差は認めず、C 群と D 群、E 群の間でも有意差を認めなかったが、術後 12 週では C 群と D 群、E 群の間で有意差を認めた。この結果

より、積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞を併用して移植する場合、滑膜細胞を  $6.0 \times 10^5$  以上移植することが有効であるかもしれないことが示唆された。今後、膝関節容積や軟骨欠損部の大きさなどによる移植細胞数の最適化が必要ではあるが、積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞の併用による有効性が示唆された。

#### E. 結論

積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植は軟骨修復に寄与することが示唆された。積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植を併用することで、少ない細胞で軟骨修復が得られる可能性が示唆され、併用の有用性が示唆された。

#### F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

#### F. 参考文献

- (1) Paget J: Healing of cartilage. *Clin Orthop* 1969, 64:7-8.
- (2) Steadman J, Rodkey W, Rodrigo J: Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 2001, 391(Suppl 1):362-369.
- (3) Steadman J, Rodkey W, Briggs K: Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation,

- and outcomes. *J Knee Surg* 2002,15:170-176.
- (4) Mithoefer K, Williams RJ 3rd, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC, Wickiewicz TL, Marx RG: Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006, 88:294-304.
- (5) Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szerb I, Bely M: Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects in dogs. *Orthopedics* 1997, 5:175-181.
- (6) Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G: Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle. *Clin Orthop* 2001, 391 (Suppl):328-336.
- (7) Szerb I, Hangody L, Duska Z, Kaposi NP: Mosaicplasty: long-term follow-up. *Bull Hosp Jt Dis* 2005, 63:54-62.
- (8) Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM: Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1997, 342:254-272.
- (9) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994, 331:889-895.
- (10) Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A: Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003, 85-A(Suppl 2):17-24.
- (11) Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, Nissen C: STAR Study Principal Investigators. : A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defects of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med* 2009, 37:42-55.
- (12) Moseley JB Jr, Anderson AF, Browne JE, Mandelbaum BR, Micheli LJ, Fu F, Erggelet C: Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients. *Am J Sports Med* 2010, 38:238-46.
- (13) Darling EM, Athanasiou KA: Articular cartilage bioreactor and

- bioprocess. *Tissue Eng* 2003, 9:9-26.
- (14) Backwalter JA, Lohmander S: Current concepts review. Operative treatment of osteoarthritis. Current practice and future development. *J Bone Joint Surg Am* 1994,76:1405-1418.
- (15) Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R: Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1994, 28:891-899.
- (16) Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarth Cart* 2001, 10:432-463.
- (17) Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L, Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S: Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005, 435:96-105.
- (18) Crawford DC, Heveran CM, Cannon WD Jr, Foo LF, Potter HG: An autologous cartilage tissue implant NeoCart for treatment of grade III chondral injury to the distal femur: prospective clinical safety trial at 2 years. *Am J Sports Med* 2009, 39:1334-1343.
- (19) Nagai T, Sato M, Furukawa KS, Kutsuna T, Ohta N, Ushida T, Mochida J: Optimization of allograft implantation using scaffold-free chondrocyte plates. *Tissue Eng Part A* 2008, 14:1225-1235.
- (20) Nagai T, Furukawa KS, Sato M, Ushida T, Mochida J: Characteristics of a scaffoldfree articular chondrocyte plate grown in rotational culture. *Tissue Eng Part A* 2008, 14:1183-1193.
- (21) Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP: Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarth Cart* 2001, 9:S6-15.
- (22) Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trub T, Jakob RP, Mainil-Varlet P: Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarth Cart* 2006, 14:1214-1226.
- (23) Park K, Huang J, Azar F, Jin RL, Min BH, Han DK, Hasty K:

- Scaffold-free, engineered porcine cartilage construct for cartilage defect repair—in vitro and in vivo study. *Artif Organs* 2006, 30:586-596.
- (24) Kaneshiro N, Sato M, Ishihara M, Mitani G, Sakai H, Mochida J: Bioengineered chondrocyte sheets may be potentially useful for the treatment of partial thickness defects of articular cartilage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 349:723-731.
- (25) T. Okano, N. Yamada, M. Okuhara, H. Sakai, Y. Sakurai, Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces, *Biomaterials* 16 (1995) 297-303.
- (26) S. Sekiya, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 573-582.
- (27) M. Sato, T. Asazuma, M. Ishihara, T. Kikuchi, K. Masuoka, S. Ichimura, M. Kikuchi, A. Kurita, K. Fujikawa, An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc, *J. Biomed. Mater. Res. A* 64 (2003) 248-256.
- (28) M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, C. Konno, A. Kikuchi, T. Okano, Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by reducing temperature, *Tissue Eng.* 7 (2001) 473-480.
- (29) Mihara M, Higo S, Uchiyama Y, Tanabe K, Saito K: Different effects of high molecular weight sodium hyaluronate and NSAID on the progression of the cartilage degeneration in rabbit OA model. *Osteoarth Cart* 2007, 15:543-549.
- (30) Hayami T, Funaki H, Yaoeda K, Mitui K, Yamagiwa H, Tokunaga K, Hatano H, Kondo J, Hiraki Y, Yamamoto T, Duong le T, Endo N: Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis. *J Rheumatol* 2003, 30:2207-2217.
- (31) O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in

- major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A followup report at one year. *J Bone Joint Surg Am* 1998, 70:595-606.
- (32) T. Okano, N. Yamada, H. Sakai, Y. Sakurai, A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide), *J. Biomed. Mater. Res.* 27 (1993) 1243-1251.
- (33) T. Shimizu, M. Yamato, T. Akutsu, T. Shibata, Y. Isoi, A. Kikuchi, M. Umezu, T. Okano, Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardiomyocyte sheets, *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 110-117.
- (34) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, N. Maeda, H. Watanabe, K. Yamamoto, S. Nagai, A. Kikuchi, Y. Tano, T. Okano, Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface, *Transplantation* 77 (2004) 379-385.
- (35) K. Nishida, M. Yamato, Y. Hayashida, K. Watanabe, K. Yamamoto, E. Adachi, S. Nagai, A. Kikuchi, N. Maeda, H. Watanabe, T. Okano, Y. Tano, Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium, *N. Engl. J. Med.* 351 (2004) 1187-1196.
- (36) Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huijbregtse BA, Goldberg VM, Caplan AI: Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res* 2000, 18:773-780.
- (37) Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ: Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993, 75:532-553.
- (38) Hunziker EB, Rosenberg LC: Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996, 78:721-733
- (39) H Koga , T Muneta , T Nagase , A Nimura , Young-Jin Ju , T Mochizuki, I Sekiya: Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit.

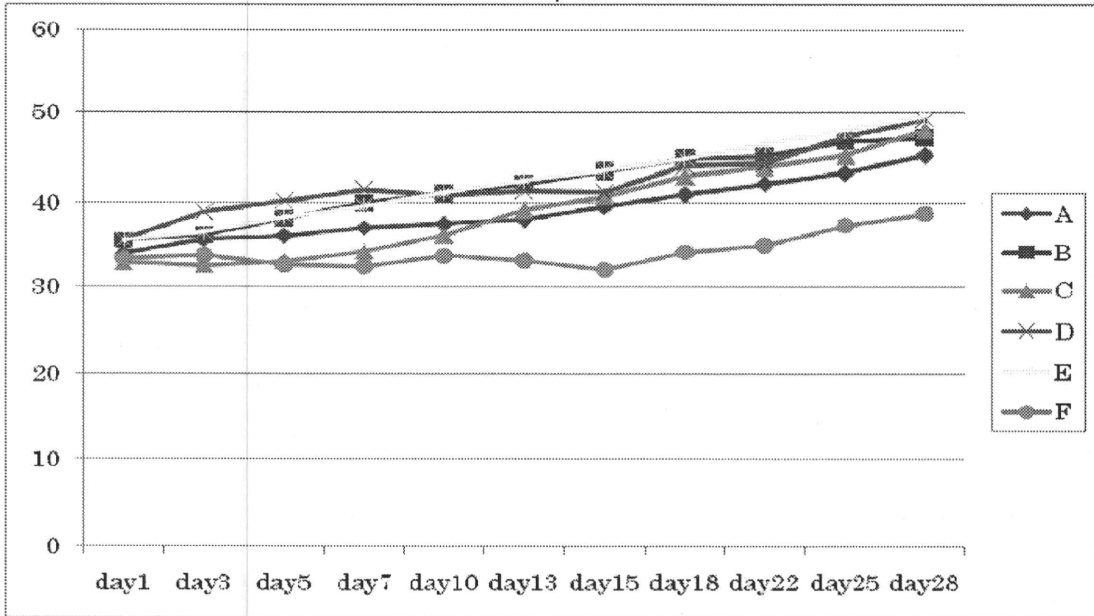
- (40) Kuriwaka M: Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif Organs* 2001, 25:172-179.
- (41) Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T: In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 2005, 322:289-298.
- (42) Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(Suppl 2):45-57.
- G. 研究発表
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表
1. 長井敏洋, 佐藤正人, 古川克子, 杓名寿治, 海老原吾郎, 太田直司, 伊藤聡, 小久保舞美, 鶴養拓, 牛田多加志, 持田讓治 : 血管新生阻害効果による関節軟骨修復の検討. 第29回日本運動器移植・再生医学研究会, 2010.10.
2. 海老原吾郎, 佐藤正人, 小久保舞美, 三谷玄弥, 伊藤聡, 太田直司, 長井敏洋, 杓名寿治, 持田讓治: 積層化軟骨細胞シート中の液性因子の解析. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
3. 李 禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 小久保舞美, 持田讓治: 滑膜細胞と軟骨細胞の複合細胞移植体による軟骨再生効果. 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.
4. Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Ito S, Kokubo M, Mochida J : Repair of articular cartilage with anti-VEGF antibody bevacizumab. 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2011.01.
5. 浜橋恒介, 佐藤正人, 小久保舞美, 三谷玄弥, 伊藤聡, 長井敏洋, 海老原吾郎, 杓名寿治, 持田讓治 : 積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子に関する検討. 第10回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.
6. 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鶴養拓, 長井敏洋, 三谷玄弥, 持田讓治 : 家兔膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討. 第10回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.
7. 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 繁田明義, 伊藤聡, 鶴養拓, 持田讓治 : 軟骨細胞初代培養時におけるアスコルビン酸の影響とその添加時期の検討. 第24回軟骨代謝学会, 福岡 2011.03.



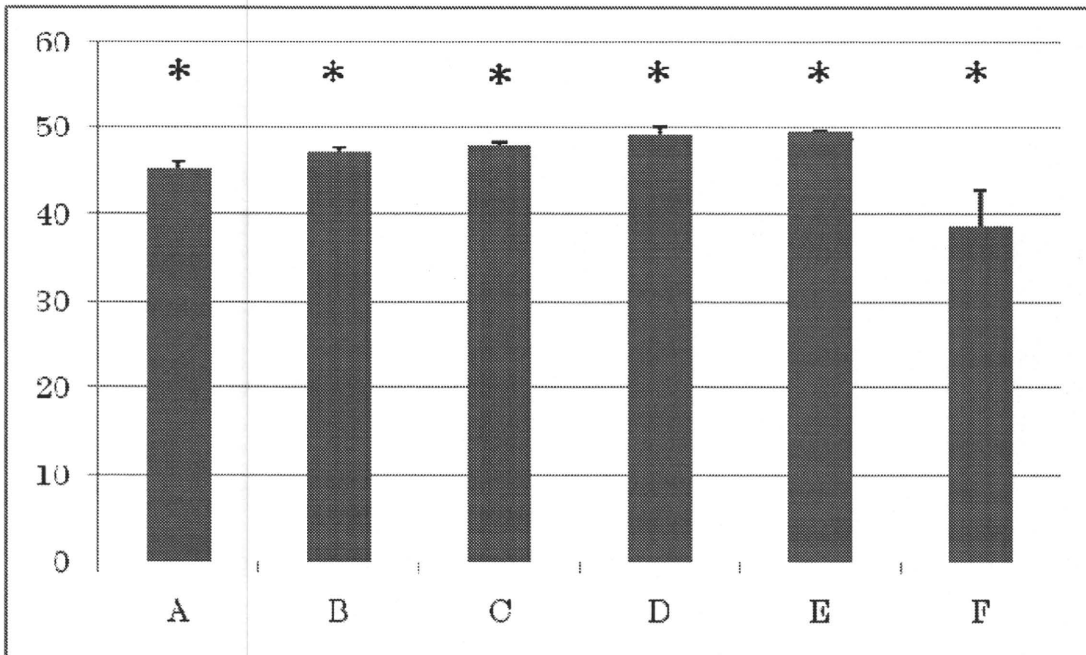
8. 高垣智紀, 佐藤正人, 伊藤聡, 馬場崇行, 木平孝治, 持田讓治: 培養軟骨細胞におけるクラゲ由来ムチンとヒアルロン酸の相互作用の検討. 第24回軟骨代謝学会, 福岡 2011.03.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

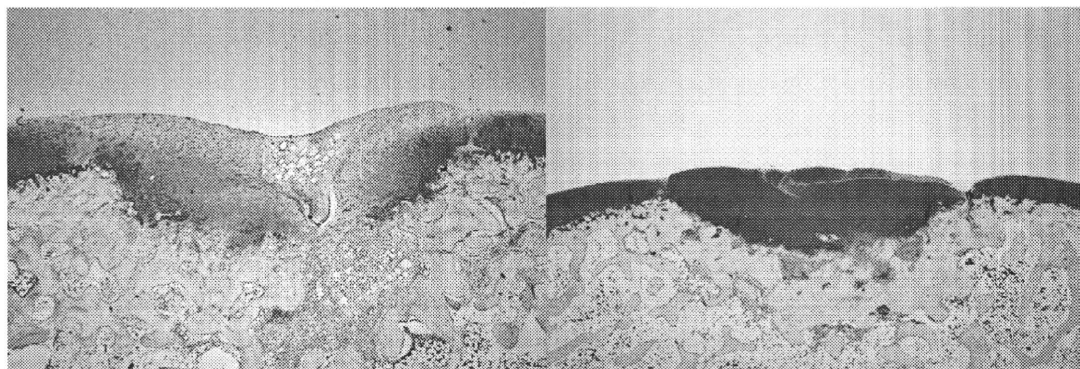


(Fig1) 患肢重量配分比(%)=(患側の荷重(g)/健側の荷重(g)+患側の荷重(g))×100



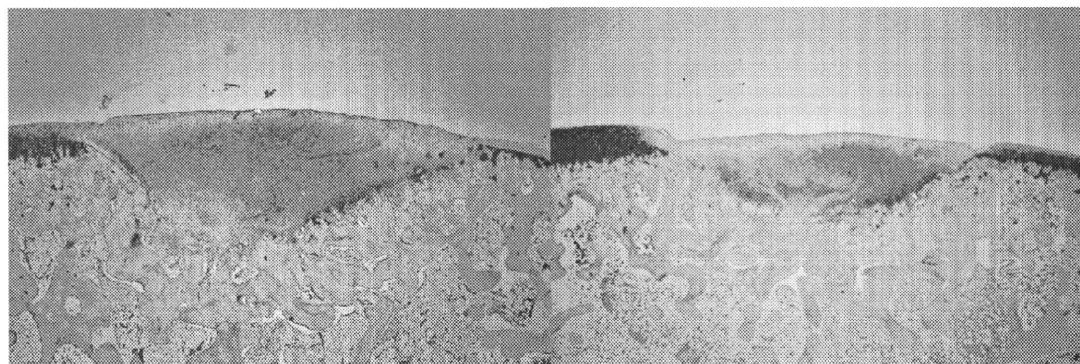
(Fig2) 術後28日目時点での患肢重量配分比 \* denotes significance (P<0.05).

(\* )VS defect



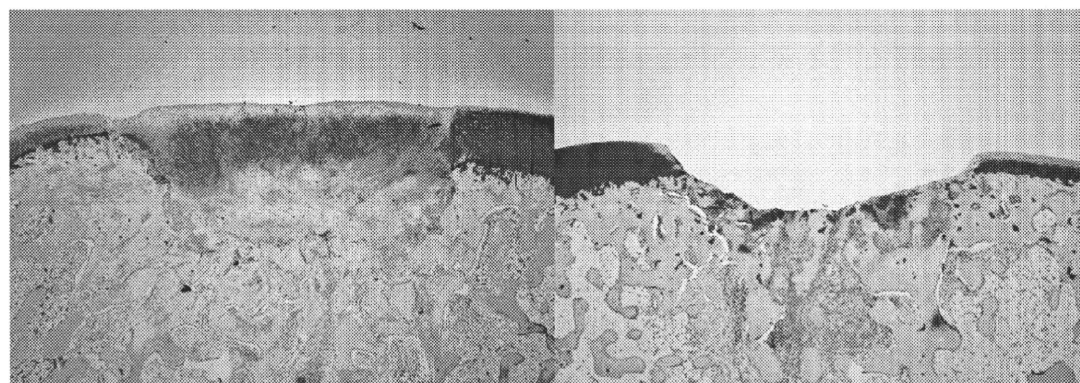
A : SY  $1.8 \times 10^6$

B : AC  $1.7 \times 10^6$



C : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $3.0 \times 10^5$

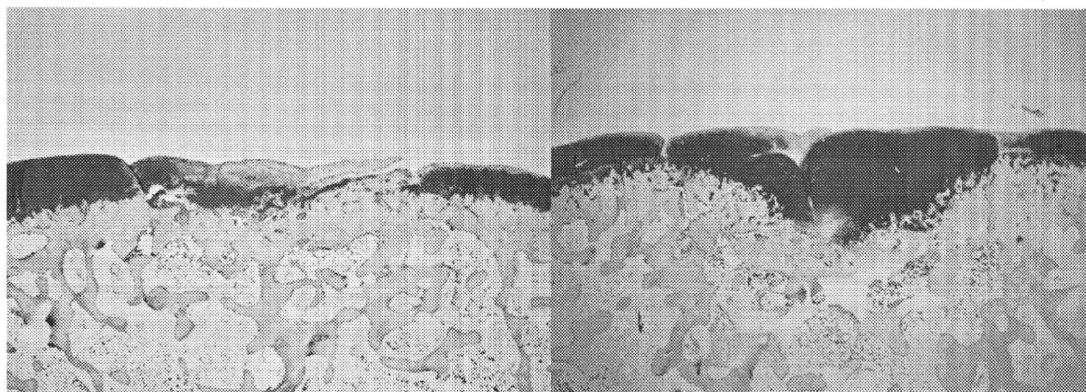
D : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $6.0 \times 10^5$



E : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $1.2 \times 10^6$

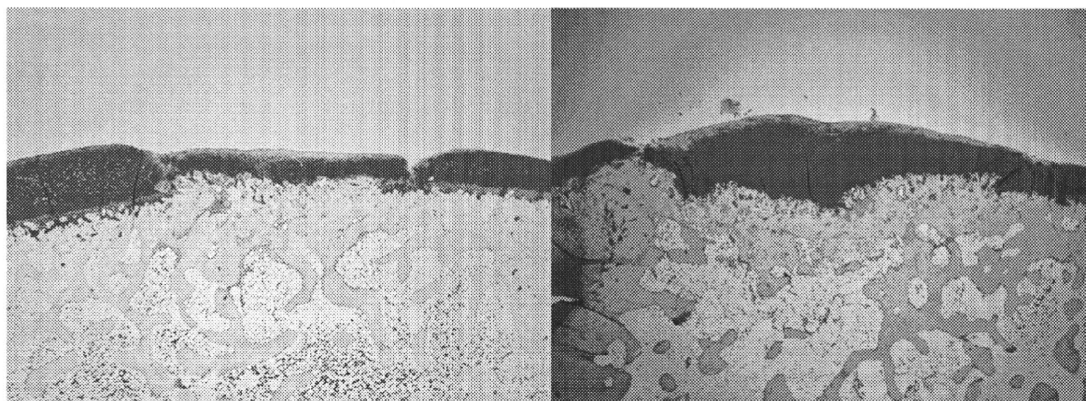
F : defect

(Fig3) 移植手術後4週、サフラニンO染色を行った修復組織の組織学的所見



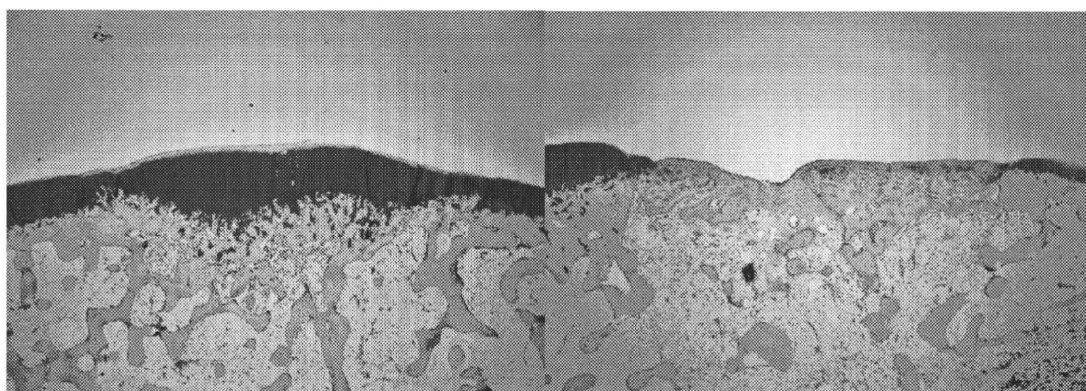
A : SY  $1.8 \times 10^6$

B : AC  $1.7 \times 10^6$



C : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $3.0 \times 10^5$

D : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $6.0 \times 10^5$

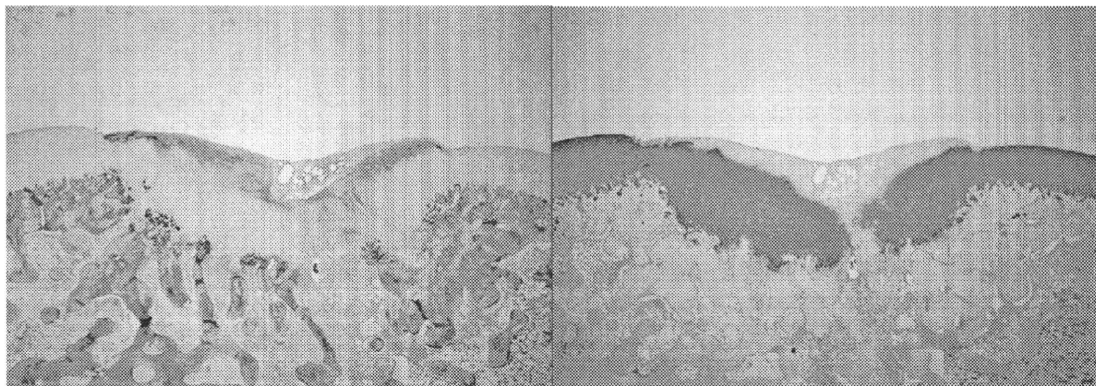


E : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $1.2 \times 10^6$

F : defect

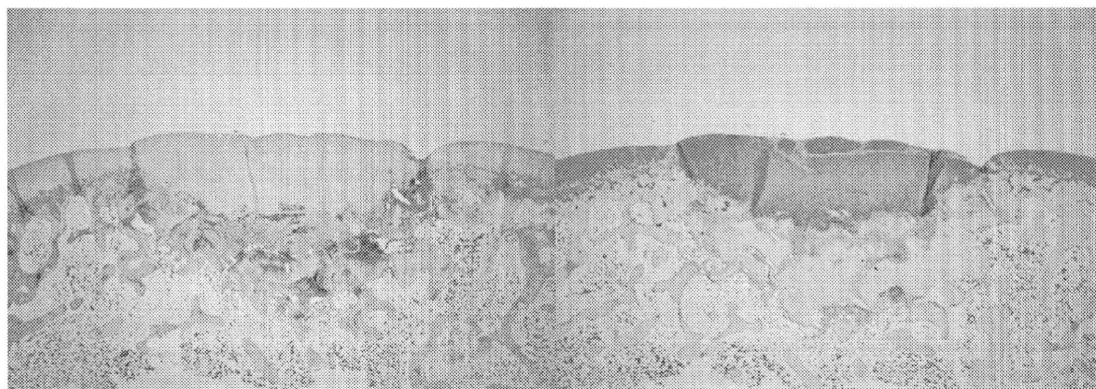
(Fig4) 移植手術後12週、サフランinO染色を行った修復組織の組織学的所見





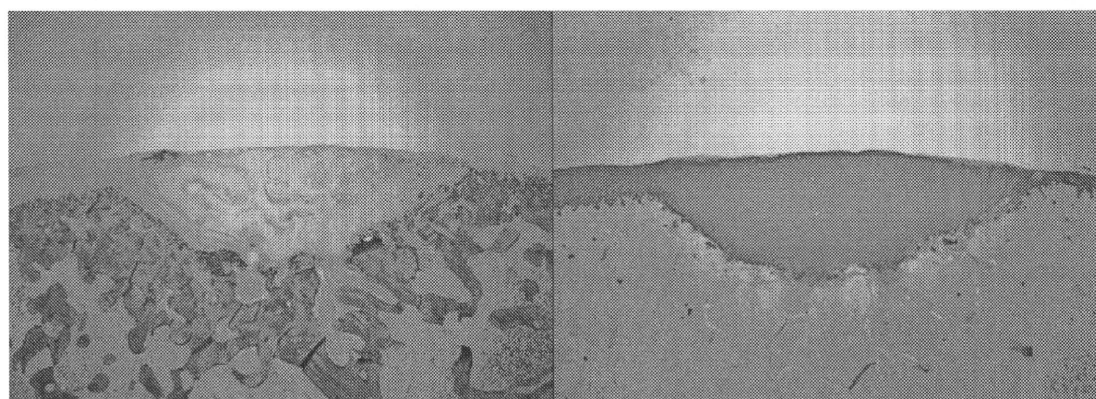
A : SY  $1.8 \times 10^6$  (Col1)

A : SY  $1.8 \times 10^6$  (Col2)



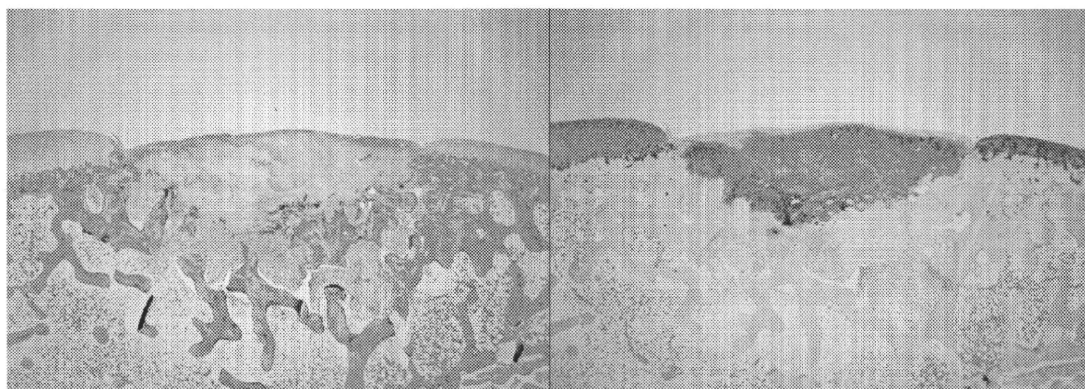
B : AC  $1.7 \times 10^6$  (Col1)

B : AC  $1.7 \times 10^6$  (Col2)



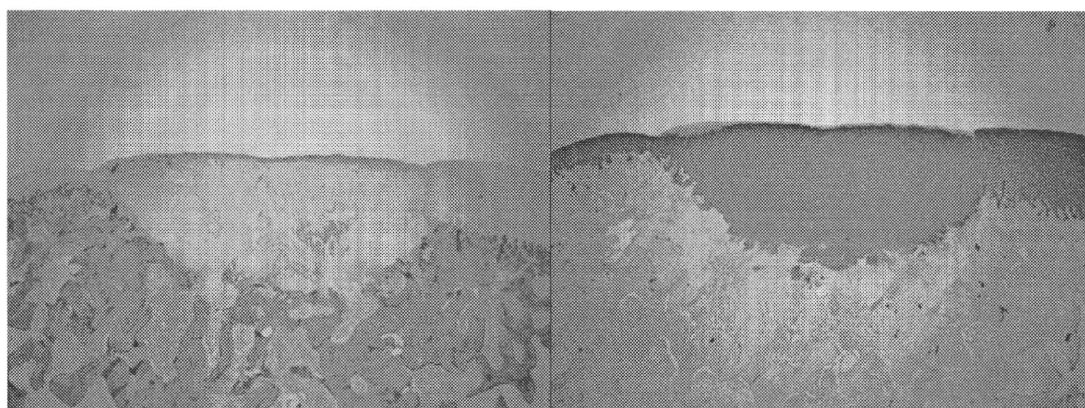
C : AC  $1.7 \times 10^6 + SY 3.0 \times 10^5$  (Col1)

C : AC  $1.7 \times 10^6 + SY 3.0 \times 10^5$  (Col2)



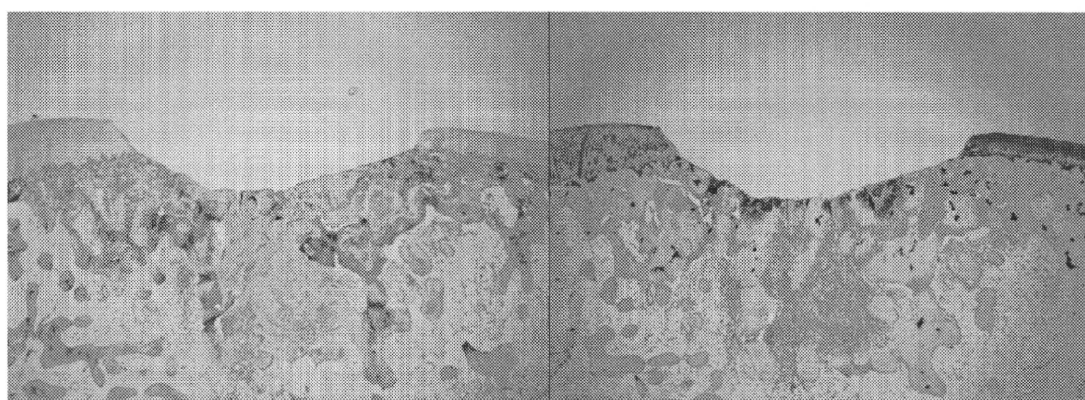
D : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $6.0 \times 10^5$  (Col1)

D : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $6.0 \times 10^5$  (Col2)



E : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $1.2 \times 10^6$  (Col1)

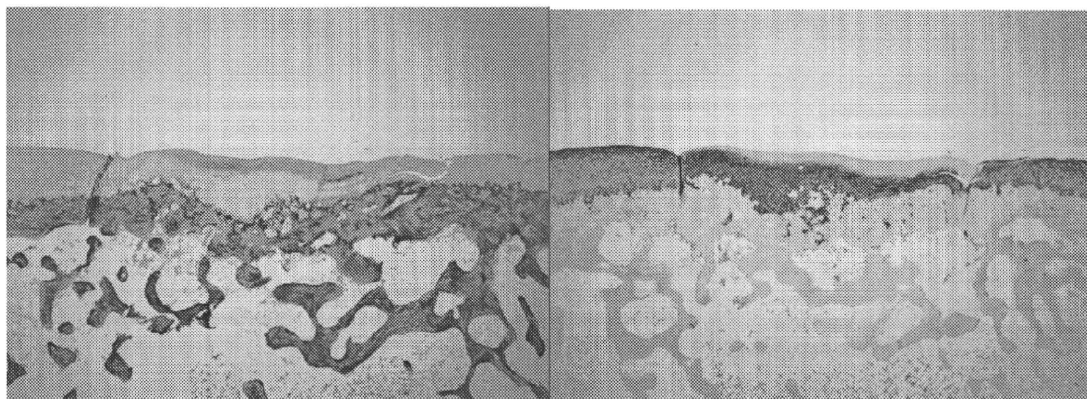
E : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $1.2 \times 10^6$  (Col2)



F : defect (Col1)

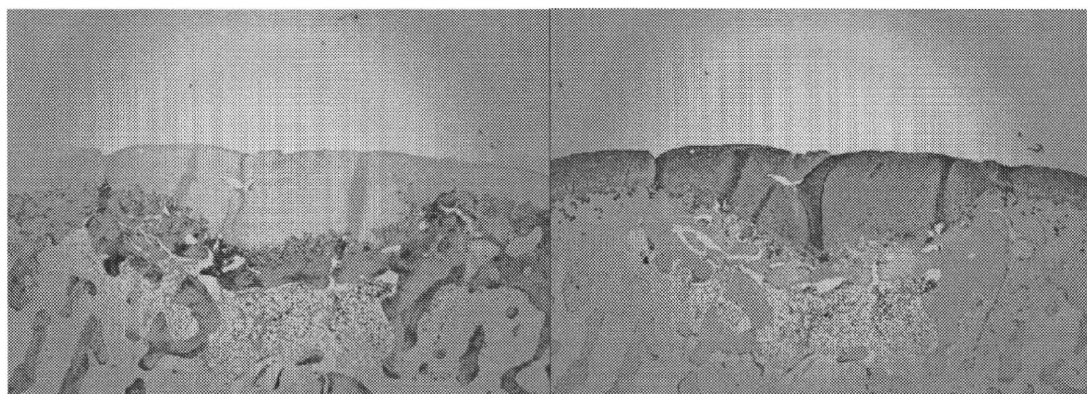
F : defect (Col2)

(Fig5) 移植手術後4週、免疫染色を行った修復組織像



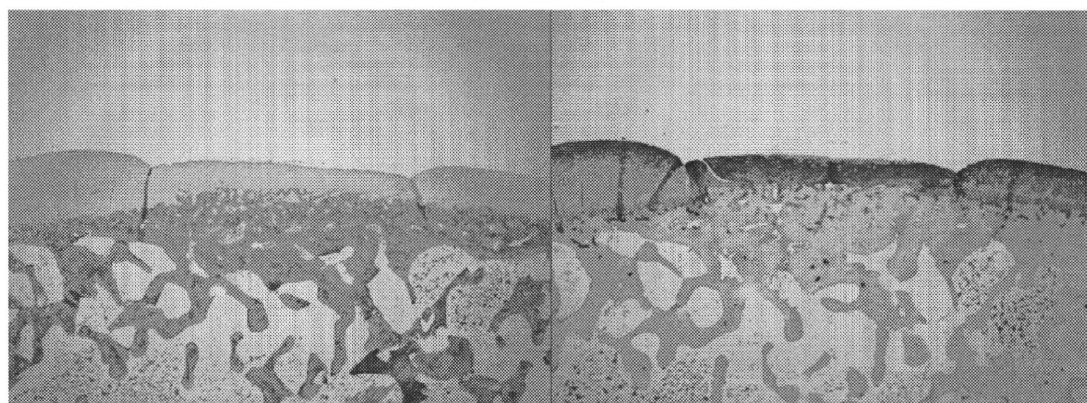
A : SY  $1.8 \times 10^6$  (Col1)

A : SY  $1.8 \times 10^6$  (Col2)



B : AC  $1.7 \times 10^6$  (Col1)

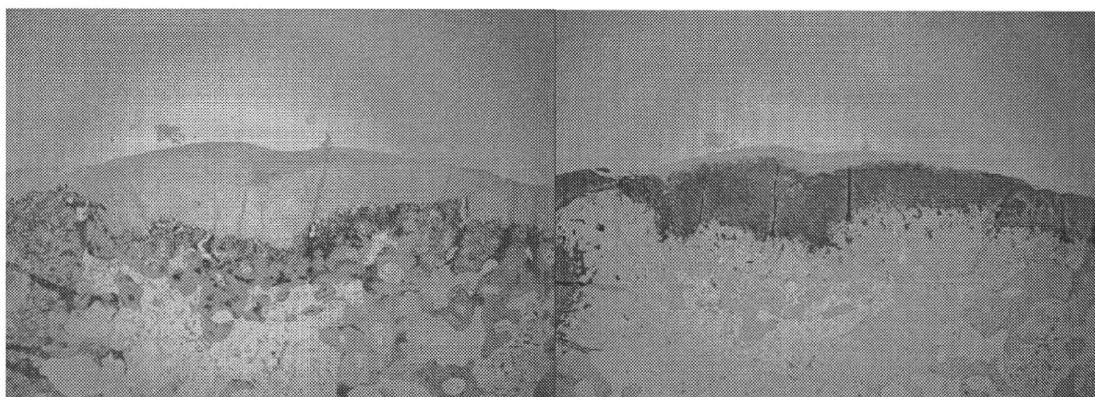
B : AC  $1.7 \times 10^6$  (Col2)



C : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $3.0 \times 10^5$  (Col1)

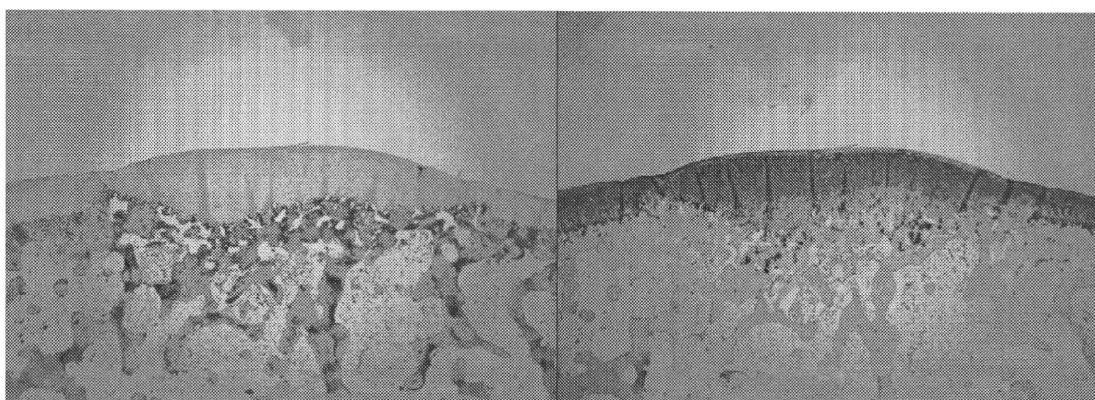
C : AC  $1.7 \times 10^6$  + SY  $3.0 \times 10^5$  (Col2)





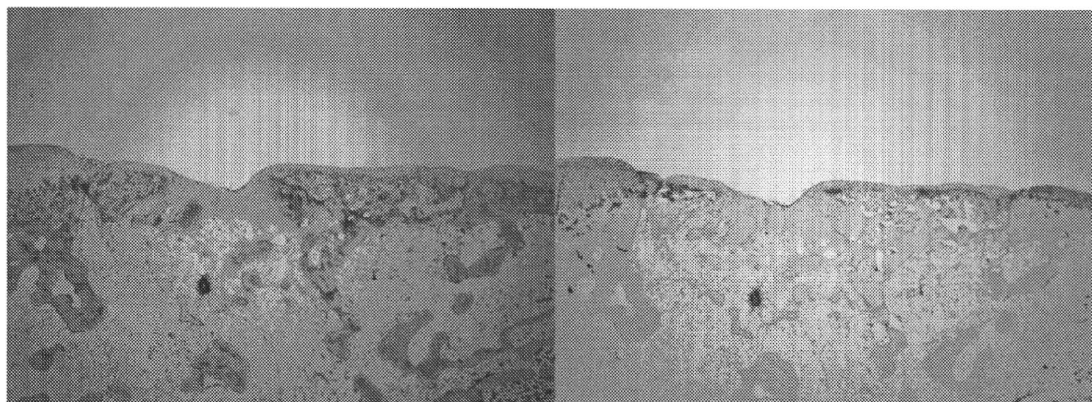
D : AC  $1.7 \times 10^6 + SY$   $6.0 \times 10^5$  (Col1)

D : AC  $1.7 \times 10^6 + SY$   $6.0 \times 10^5$  (Col2)



E : AC  $1.7 \times 10^6 + SY$   $1.2 \times 10^6$  (Col1)

E : AC  $1.7 \times 10^6 + SY$   $1.2 \times 10^6$  (Col2)



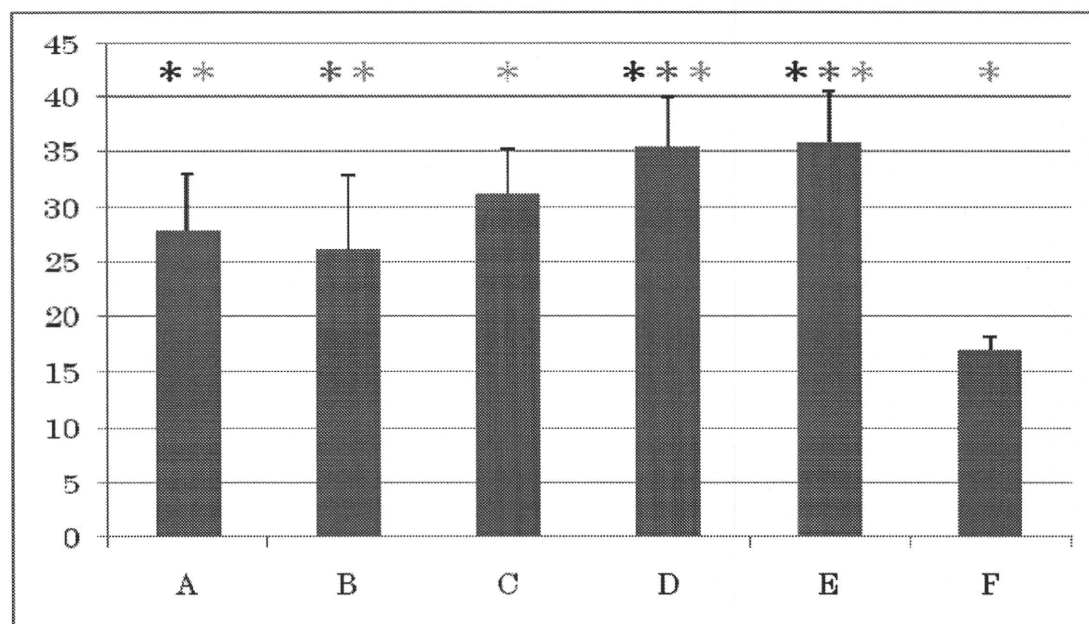
F : defect (Col1)

F : defect (Col2)

(Fig6) 移植手術後 12 週、免疫染色を行った修復組織像

	A	B	C	D	E	F
Ti	2.50±0.6	2.25±0.5	3.00±0.0	3.00±0.8	3.25±0.5	1.50±0.6
Matx	1.25±0.5	2.00±0.8	2.50±0.6	3.00±0.8	2.75±0.5	1.00±0.0
Stru	2.75±1.0	2.50±1.0	3.50±0.6	3.75±0.5	3.75±0.5	2.00±0.0
Clus	1.50±0.6	1.25±0.5	1.50±0.6	2.00±0.0	2.00±0.0	1.00±0.0
Tide	1.25±0.5	1.50±1.0	2.00±0.8	3.25±0.5	3.50±1.0	1.00±0.0
Bform	1.75±0.5	2.00±0.0	2.25±0.5	2.25±0.5	2.50±0.6	1.50±0.6
SurfH	1.75±0.6	2.00±0.8	1.50±0.6	2.25±0.5	2.25±0.5	1.00±0.0
FilH	3.00±0.8	2.25±1.3	3.50±1.3	4.00±0.8	4.00±1.4	1.00±0.0
Latl	2.50±1.0	1.50±0.6	2.25±0.5	2.75±0.5	2.75±0.5	1.00±0.0
Basl	3.50±0.6	2.75±0.5	3.50±0.6	3.75±0.5	4.00±0.0	1.00±0.0
InfH	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0
Hgtot	26.8±3.8	25.0±6.2	30.5±3.8	35.0±4.2	35.8±3.8	17.0±1.2

(Fig7) ICRS grading system 1M, Values are the mean ± SD. The total score range is from 11 (no repair) to 45 (normal articular cartilage).



(Fig8) ICRS grading system 1M, \* denotes significance (P<0.05).(\*)VS defect, (\*)VS SY, (\*)VS AC