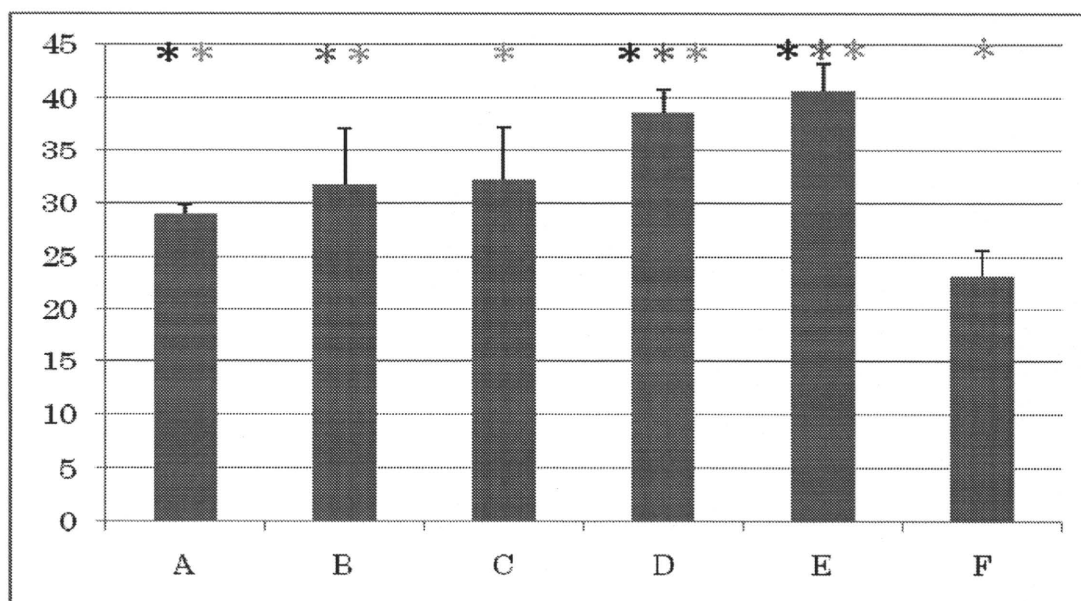


	A	B	C	D	E	F
Ti	2.00±0.8	2.50±1.3	2.75±1.5	3.25±1.0	3.75±0.5	1.75±0.5
Matx	2.50±0.6	2.25±0.5	2.50±0.6	3.25±0.5	3.50±0.6	1.25±0.5
Stru	2.50±0.6	3.25±1.0	3.25±1.0	3.75±0.5	4.25±0.5	2.25±0.5
Clus	2.00±0.0	3.00±0.0	2.75±0.5	3.00±0.0	3.00±0.0	1.75±0.5
Tide	2.25±0.5	2.00±0.8	2.00±1.4	3.75±0.5	4.25±0.5	1.25±0.5
Bform	2.25±0.5	1.75±1.0	2.00±1.2	3.00±0.0	2.25±0.5	1.75±1.0
SurfH	2.00±0.0	1.50±0.6	2.25±0.5	2.75±0.5	2.75±0.5	1.00±0.0
FilH	3.25±0.5	3.75±0.5	4.25±0.5	4.50±0.6	5.00±0.0	3.50±0.6
LatI	2.25±0.5	2.75±0.5	2.25±1.0	2.50±0.6	3.00±0.0	1.75±1.0
BasI	3.50±0.6	4.00±0.0	3.25±1.0	4.00±0.0	4.00±0.0	3.50±0.6
InfH	4.50±1.0	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0	5.00±0.0	3.50±1.0
Hgtot	29.0±0.8	31.8±5.4	32.3±5.0	38.8±2.1	40.8±2.5	23.3±2.4

(Fig9) ICRS grading system 3M, Values are the mean ± SD. The total score range is from 11 (no repair) to 45 (normal articular cartilage).



(Fig10) ICRS grading system 3M, * denotes significance (P<0.05). (*)VS defect, (*)VS SY, (*)VS AC, (*)VS AC+SY 3.0×10^5

細胞シート移植後の動態評価 Bioluminescence による経時的評価 に関する研究

研究分担者 瀬尾 憲正 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・教授
村井 邦彦 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・非常勤講師
研究協力者 高久 裕子 自治医科大学麻酔科学集中治療医学講座・大学院生

研究要旨：東海大学で開発された軟骨細胞シートの移植後の動態評価をするにあたり、実験動物を生かしたまま経時的に評価を行うために、BLI (Bioluminescence Imaging)法の設備・経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、luciferase 遺伝子を発現する各種細胞シートを作製・移植し、さらに関節内に移植された細胞シートに最適化された評価方法の検討後、ラットを用いて細胞シートの膝関節同種移植後の滞在期間を測定したので報告する。軟骨細胞シート群、滑膜細胞シート群、両者併用群の3群においてLuc⁺細胞からの発光は消失することなく22週以上検出された。発光強度は移植4週以降、軟骨細胞シート群>両細胞シート併用群>滑膜細胞シート群の順に強く発光する経過を示した。

A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートの移植後に動物を生かしたまま経時的にグラフトの動態を評価するために、経験のある研究チームを加えた総合的な研究体制を構築し、動物モデルにおけるBLI (Bioluminescence Imaging)法による評価系を決定し、細胞シート膝関節移植後の滞在時間を測定することを目的とした。

近年BLI法による移植細胞のin vivo追跡が盛んに報告されるようになったが、中でもホタルの発光遺伝子Luciferase (Luc)が最も頻用されている。発光基質Luciferinとの反応による発光を高感度CCDカメラで捕捉し、イメージ化することで実験動物を殺すことなく移植細胞の長期追跡が可能である。

本学においてLuciferase遺伝子を導入し

たトランスジェニックラット (Tg Rat)が開発され (Rosa/Luciferase transgenic Lewis rat)、移植細胞追跡の有用なソースとして用いられている。

同時に、細胞シートは軟骨細胞と滑膜細胞の共培養による臨床応用を目指している。軟骨細胞シートと滑膜細胞シート単体移植と両シートを併用した移植の結果、細胞シート滞在期間に差が生じるかについて比較検討を試みることを目的とした。

B. 研究方法

1. 研究チームの構成

東海大学においては研究統括者の佐藤正人らが自治医科大学から提供されたRosa/Luciferase transgenic Lewis rats由来の組織より細胞シートを作製し、自治医科大学にて大腿骨膝関節面に骨軟骨欠損を作製した野生型Lewis ratsに同種移植を行

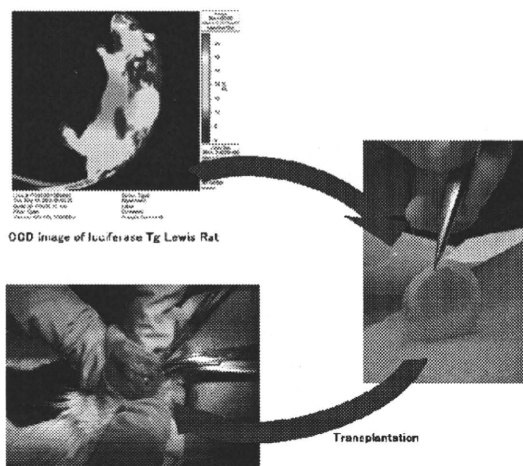
った。

自治医科大学においては麻酔科学集中治療医学講座（竹内譲教授）らが Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats より採取した細胞シートの材料を提供した。

2. 細胞シートの作製・移植

自治医科大学において先端医療技術開発センター先端治療開発部門（小林英司教授）より同部門で開発した 16 週令の luciferase Tg Lewis Rats の提供を受け、ラットを犠牲死して膝関節および股関節より軟骨・滑膜組織を採取し、東海大学にて酵素処理後に発光する Luc⁺細胞シートを作製した。温度応答性培養皿 UpCell を用いて 6 ウェルプレートにて軟骨・滑膜細胞シートを作製した。これらは移植に用いることのできる品質であり、luciferin を加えることで全てのシートが発光することが確認された。自治医科大学でレシピエントとして 16 週令の野生型 Lewis ラットの右膝大腿骨膝蓋面に骨軟骨欠損を作製（φ；3 mm）、同部位に Luc⁺細胞シートを同種移植した。

Fig. 1



3. BLI 法による評価方法

昨年度、静脈内・皮下・膝関節内に投与量の異なる luciferin を投与した場合の BLI の測定結果を同一個体の中で比較することにより、luciferin の至適投与量と測定値のピークタイム・ばらつきなどの投与方法の特性を検討した結果、確実な実験手技、安定した発光強度の測定に適することから、皮下投与 150 mg/kg を最適な luciferin 投与方法と決定した。Luciferin 皮下投与後 CCD カメラを搭載した IVIS システム (Xenogen Corp; Hopkinton, MA, USA) を用いて Luciferase 活性を経時的に Image 化することにより Luc⁺細胞シートの関節内滞在時間を測定した。

4. Luc⁺細胞シートの滞在時間の評価

Luc⁺軟骨細胞シート 1 枚、Luc⁺滑膜細胞シート 1 枚の組み合わせを移植したレシピエントラット (n=4) を長期観察群として作製後、luciferin 投与後 IVIS システムを用いて Luc⁺細胞からの発光を検出し、イメージ化することで、グラフトの膝関節内滞在期間を長期に渡り測定した。

5. 細胞シート滞在時間における軟骨細胞シート、滑膜細胞シートの相互作用の評価

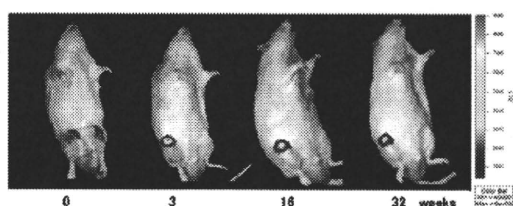
細胞数を可及的同等に揃えるため、Luc⁺軟骨細胞シート 1 枚の移植群 (AC-AC group n=4)、Luc⁺滑膜細胞シート 1 枚の移植群 (SY-SY group n=4)、Luc⁺軟骨細胞シート 1/2 枚と Luc⁺滑膜細胞シート 1/2 枚の移植群 (AC-SY group n=4) の 3 群を作製した。前述のとおり野生型 Lewis ラットへの同種移植後、IVIS システムを用いて

luciferin 投与後の luciferase 発光についてを経時的にイメージ化するとともに発光強度のピークを測定し、軟骨細胞シート、滑膜細胞シート、両細胞併用シートの移植後膝関節内滞在時間、発光強度の推移について比較検討した。

C. 結果

1. 長期観察群細胞シートの関節内滞在時間

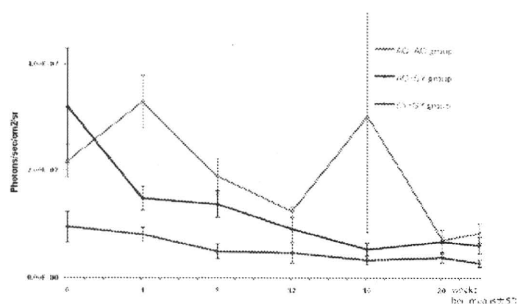
Fig. 2: 右膝から検出されたルシフェラーゼ発光の CCD 画像の経時的变化



32 週以上の長期にわたり、Luc⁺細胞シートを移植した膝関節からの BLI を確認した。

2. 軟骨細胞シートと滑膜細胞シート、両細胞シート併用移植による滞在期間の差の検討

Fig. 3: 3 群間におけるルシフェラーゼ発光強度の経時的变化



3 群において Luc⁺細胞からの発光は消失することなく右膝関節より 22 週以上検出された。発光強度は移植後 4 週以降、軟骨細胞シート群 > 両細胞シート併用群 > 滑膜細胞シート群の順に強く発光する経過を示した。

D. 考察

移植細胞の 8 カ月以上の関節内滞在を BLI によって確認した。細胞シートによる軟骨再生効果は細胞シートによる関節液中の破壊因子からの防御、成長因子の持続供給により、自身の軟骨再生が促されると考えていたが、移植した軟骨細胞シート自身の生着による軟骨再生の可能性が示唆された。また、Luc⁺細胞シートは移植した膝関節内にとどまり、他に移動しないことを BLI によって視覚的に確認することができた。軟骨細胞シートと滑膜細胞シートの移植後滞在時間に関する併用の効果について、細胞シート移植後 3 週間後、軟骨細胞シート、滑膜細胞シート、両シート併用群のルシフェラーゼの発光強度は安定して経過した。生体内では、軟骨細胞は滑膜細胞より栄養されるため、両細胞シートを併用することで、より軟骨細胞生存に適した環境構築への寄与が予想されたが、滞在期間に対する両細胞シート併用の効果は 22 週の時点では不明であった。より長期の観察を要すると考えられた。BLI の発光強度は半定量的に標的の細胞数に比例するが、今回の発光強度の推移からは、22 週の測定期間においてある特定の移植群で明らかな細胞増

殖、あるいは細胞死を示すような発光強度の変化を認めないと考えられた。軟骨細胞および滑膜細胞の個々の *luciferase* 活性は細胞内 ATP などの細胞内環境に左右されるため、BLI の発光強度のみによる軟骨細胞、滑膜細胞の数の比較はできない。今後、各細胞数に応じた *luciferase* 発光に対する検量線の作製などがより詳しい移植細胞の動態の評価に有用と考えられた。

E. 結論

ラットを用いた細胞シートの同種膝関節移植後、細胞シートの長期の関節内滞在を BLI 法を用いて実証した。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし。

3. 学会発表

- 1) 高久裕子、村井邦彦、鶴養拓、伊藤聡、小久保舞美、持田讓治、佐藤正人. 細胞シート膝関節移植後の Bioluminescence Imaging を用いた移植細胞の追跡. 日本

再生医療学会 2011 年 3 月、東京.

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

細胞シートの凍結保存ならびに低温保存に関する研究

研究分担者 長嶋比呂志 明治大学農学部生命科学科発生工学研究室 教授

研究要旨：東海大学で開発された細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、軟骨細胞シートの凍結ならびに低温保存に取り組んだ。哺乳動物初期胚、胎仔組織および成体卵巣組織等の凍結保存に実績のあるガラス化法に改良を加え、細胞シートのガラス化保存に成功した。前年度の研究では、シート構成細胞のガラス化後生存性は維持し得えたが、脆弱な構造体である細胞シートに亀裂が生じることが避けられなかった。今年度のガラス化の改良によって、細胞生存性の維持に加えて、亀裂の発生を抑えることが可能となった。

また、細胞シートの低温保存では、約3週間の冷蔵保存（4℃）が可能であった。保存液への抗酸化物質の添加が、細胞生存性維持に効果があることが示唆された。

以上の結果より、細胞シートの臨床応用に際して、シートを要事調製することに加えて、今後は凍結保存あるいは低温保存したシートを用いる選択肢もあり得ると考えられる。

A. 研究目的

東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって開発された細胞シートによる軟骨再生技術の臨床応用の促進を目的として、細胞シートの凍結および低温保存法を開発することを目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞シートの凍結保存

マウスおよびブタ胚、ブタ胎仔臓器、マウス卵巣、ヒト卵巣組織片等の凍結保存に実績のある MVC ガラス化法(Kuwayama et al.,2005)を、細胞シートの凍結保存に適用した。細胞浸透性凍害保護剤として、平衡液には 10% DMSO および 10% ethylene glycol を、ガラス化液には 20% DMSO および 20% ethylene glycol を用いた。さらに、細胞非浸透性の凍害保護剤として、ガラス化液に 0.5Msucrose および 10% ポリリジン誘導体（カルボキシル基導入ポリリジン）を加えた。ガラス化の際は、細胞シートを

液体窒素蒸気中に保持した。融解は細胞シートを 38.5℃の加温盤上に静置して行った。引き続きシートを 1M、0.5M、0M sucrose を含む 20mM Hepes 緩衝 TCM199（20% FBS 添加）に順次移し、凍害保護剤の希釈ならびに洗浄を行った。

融解後の細胞シートをコラゲナーゼ処理して細胞分散し、細胞の生存性をトリパンブルー染色により判定した。

2. 細胞シートの低温保存

ウサギ膝軟骨細胞（株式会社プライマリーセル）を 100mM アスコルビン酸・10% FBS 添加 RPMI で 9 日間培養し、薄層（1 層）形成を確認した後に保存用培地に置き換え、4℃で 2～3 週間保存した。保存液には、①: 10% FBS 添加ヒト線維芽細胞増殖用完全合成培地（mHFDm-1:機能性ペプチド研究所）、②: 100mM アスコルビン酸・10% FBS 添加 RPMI、③: ②の液に①と同じ抗酸化剤（トコフェロール、グルタ

チオン、葉酸、アスコルビン酸）を添加したもの（RPMI+supl）の3種を用いた。保存期間後にコラゲナーゼ処理により細胞を回収し、細胞の生存性およびアポトーシスをトリパンブルー染色、FACSによって解析した。保存期間後に細胞を37℃で1日培養した後に生存判定する区も設けた。

また、培養中の細胞シートの表面微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した。

C. 結果

1. ガラス化保存された細胞シートの形態変化と細胞生存性

非浸透性凍害保護剤としてポリリジン誘導体(PLL)を用い、さらに液体窒素ガス中でガラス化を誘導する方法を開発し、軟骨細胞シートのガラス化に成功した。

表1および図1～3に示す通り、PLLを用いない場合は、実験に供したすべての細胞シートがガラス化・融解後に著しい損傷（亀裂）を受けたのに対し、10%PLLを含むガラス化液の使用によって、細胞シートは損傷なくガラス化された。細胞シートの構成細胞の生存性は、非ガラス化試料と同等であった。またPLL非使用のガラス化によってシート構造が破壊された場合も、細胞生存性の低下は見られなかった。

ガラス化に供したブタ軟骨細胞シートは、積層化にムラがあり、さらに一部が欠損した状態であったため、ガラス化・融解時に欠損孔を起点として亀裂が生じた。しかし、その破損の程度は、PLL非使用の場合に比してはるかに軽微であった（図3）。

2. 低温保存された細胞シートの生存性

表2-1に示す通り、低温保存2週間後も細胞生存性は高く保たれており保存前と同等であった（94.6～96.5% vs 94.1%）。また、用いた3種の保存液間に細胞生存性の差は見られなかった。しかし、RPMI(4.2%)およびRPMI+supl(2.9%)を用いた保存ではアポトーシス細胞の増加が見られたのに対し、mHFDM-1区ではアポトーシス誘導は低く抑えられた(0.7%)。さらに、mHFDM-1を用いた場合、3週間保存後の細胞生存性(79.5%)は、他の2種の保存液より高い傾向であった(54.9, 64.1%)。

また、表2-2に示す様に、低温保存後に1日間の回復培養を行うことによって、細胞の生存性が向上する傾向が見られた。

図5に示す様に、走査型電顕によって細胞シートに特徴的な微細構造の観察が可能であった。

D. 考察

ポリリジン誘導体を凍害保護剤に用いることでガラス化状態が安定し、ガラス化・融解に伴うシートの破損が顕著に抑制されることが明らかとなった。作製したシートに重層化のムラや欠損孔がある場合は、ガラス化時にシートに亀裂が生じる可能性があるが、良好な構造を持ったシートであれば、本研究で開発した方法により融解後も損傷なく回収可能であると考えられる。本法の特徴は、ポリリジン誘導体の添加によるガラス化状態の安定化に加えて、液体窒

素蒸気中でシートを保存することにある。脆弱な細胞シートと液体窒素との直接の接触を避けることで、シートの損傷を回避することができた。

また、走査電顕像を指標に、低温・凍結保存後のシートの評価を行い得る可能性が示唆された。細胞シートは、特徴的なネットワーク構造を有しており、その構造に対する低温・凍結保存がどのような影響を及ぼすかを見極めることは重要であろう。

E. 結論

本研究より、細胞シートの臨床応用実現化において、シートの中・長期間保存の可能性が示された。今後は、低温・凍結保存後のシートの微細構造ならびに機能の解析が必要である。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

なし

2. 論文発表

なし

3. 学会発表

国際学会

1. Fujishiro S, Mizukami Y, Ishino R, Nishimura T, Matsunari H, Nakano K, Nagashima H, Hanazono Y: The generation of “mouse-type” porcine

induced pluripotent stem cells. Keystone Symposia: Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and Disease (B3): 30 Jan-4 Feb 2011; Santa Fe, New Mexico.

2. Kurome M, Kessler B, Klymiuk N, Wiensch A, Zackhartchenko V, Nagashima H, Wolf E: Large-scale production of cloned transgenic pigs: efficiency and side effects. In: 2011 Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 8-12 Jan 2011; Florida, USA.
3. Honda M, Konishi T, Mizumoto M, Matsunari H, Nagashima H, Aizawa M: Cell proliferation, morphology and differentiation of transgenic-cloned pig calvarial osteoblasts on the silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray-pyrolysis technique. In: 5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials: 10-13 Dec 2010; Cairns, Australia.
4. Nagashima H, Matsunari H, Ikezawa Y, Nakano K, Kurome M, Watanabe M, Umeyama K, Miyagawa S: Necessity and possibility of serial cloning in development of advanced genetically engineered pigs for xenotransplantation. In: 2010 Seoul

- Forum on Xenotransplantation: 20 Nov 2010; Seoul, Korea.
5. Amo A, Hashimoto S, Nagashima H, Takahashi M, Sasayama N, Morimoto Y: A novel vitrification method using a microfiltration membrane(MFM) enables a simple manipulation of human embryos. In: American Society for Reproductive Medicine 66th Annual Meeting: 17-23 Oct 2010; USA.
 6. Ikeda Y, Kagawa N, Kuwayama M, Nagashima H, Silber S, Kato K, Kato O: Increased longevity of old mice after allo-transplantation of young mice ovaries. In: 26th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology: 27-30 Jun 2010; Rome, Italy.
- 国内学会
1. 前原美樹, 松成ひとみ, 中野和明, 落合恵子, 本田香澄, 竹内靖浩, 池澤有加, 池田有希, 長嶋比呂志: 哺乳動物卵・初期胚および組織のガラス化保存について. In: 京都臓器保存セミナー: 19 Mar 2011; 京都.
 2. 水本みのり, 吉川哲史, 小西敏功, 本田みちよ, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: 機械粉碎アパタイトとキトサン溶液を利用したキレート硬化型セメントの作製とその生体適合性. In: 日本セラミックス協会 2011 年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.
 3. 重光勇介, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジ蛍光遺伝子を導入したブタを用いた二極化した細孔構造を備えた b-リン酸三カルシウム多孔体の in vivo 評価. In: 日本セラミックス協会 2011 年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.
 4. 鷹本拓也, 島田愛生, 安富由美子, 本田みちよ, 水本みのり, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジブタ脛骨埋入による高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの生体適合性評価. In: 日本セラミックス協会 2011 年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.
 5. 岩井聡美, 横尾隆, 松成ひとみ, 田中友加, 寺岡義布史, 大段秀樹, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタを scaffold とする腎臓再生: IV.ネコにおけるエリスロポエチン療法の開発. In: 第 10 回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
 6. 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 渡邊将人, 梅山一大, Medin JA, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタを scaffold とする腎臓再生: III. Suicide gene を発現する遺伝子改変ブタの作出. In: 第 10 回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
 7. 横尾隆, 松成ひとみ, 岩井聡美, 松本啓, 辻収彦, 岡野 James 洋尚, 岡野栄之, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタを

- scaffold とする腎臓再生 II : エリスロポエチン(EPO)産生組織の体内発生法の開発. In: 第 10 回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
8. 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司: ブタを scaffold とする腎臓再生: I. クローンブタを利用した腎臓原基の発達能の検証. In: 第 10 回日本再生医療学会: 1-2 Mar 2011; 東京.
9. Watanabe M, Umeyama K, Matsunari H, Takayanagi S, Haruyama E, Nakano K, Fujiwara T, Ikezawa Y, Nakauchi H, Nagashima H: Zinc-finger nucleases(ZFNs) -driven gene disruption can work in porcine primary cultured cells. In: 第 33 回日本分子生物学会年会: 7-10 Dec 2010; 神戸.
10. 正木英樹, 濱仲早苗, 脇山由起子, 山口智之, 長嶋比呂志, 中内啓光: Characterization of transgene-free porcine iPS cell. In: 第 33 回日本分子生物学会年会: 7-10 Dec 2010; 神戸.
11. 本田みちよ, 水本みのり, 小西敏功, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤守: クサビラオレンジブタ頭蓋骨より単離した骨芽細胞の骨分化過程の解析. In: 第 14 回生体関連セラミックス討論会: 3 Dec 2010; 京都.
12. 天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, 長嶋比呂志, 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴: 胚と中空糸膜をユニットとしたヒト胚の超急速凍結. In: 第 13 回日本 IVF 学会: 18-19 Sep 2010; 大阪.
13. 中野和明, 松成ひとみ, 前原美樹, 竹内靖浩, 小川武甲, 藤原主, 池澤有加, 本田香澄, 荻原由以, 笹山典久, 白数昭雄, 大田久由, 高橋昌志, 長嶋比呂志: 中空糸法を用いたブタ MII 期卵及び初期胚のガラス化保存. In: 第 103 回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
14. 本田香澄, 松成ひとみ, 藤原主, 竹内靖浩, 中野和明, 池澤有加, 前原美樹, 梅山一大, 渡辺将人, 長嶋比呂志: トランジェニックブタ凍結精子の卵管内人工授精. In: 第 103 回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
15. 松成ひとみ, 前原美樹, 池澤有加, 中野和明, 落合恵子, 竹内靖浩, 本田香澄, 笹山典久, 白数昭雄, 荻原由以, 高橋昌志, 長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚のガラス化保存. In: 第 103 回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
16. 松成ひとみ, 小林俊寛, 渡邊将人, 梅山一大, 高柳就子, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 須磨崎亮, 中内啓光, 長嶋比呂志: 臓器再生研究に向けた膀胱形成不全トランスジェニックブタの作出. In: 第 103 回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
17. 梅山一大, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 日高龍路, 竹内靖浩,

- 望月寛徳, 関口溪人, 長嶋比呂志: 糖尿病モデルトランスジェニッククローンブタの作出 IV. 変異型ヒト HNF-1a 遺伝子を導入した Dominant-negative 変異体の後代産仔作出. In: 第 103 回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
18. 渡邊将人, 梅山一大, 松成ひとみ, 高柳就子, 春山エリカ, 中野和明, 藤原主, 池澤有加, 中内啓光, 長嶋比呂志: ブタ細胞における Zinc finger nuclease (ZFN)による EGFP 遺伝子のノックアウト (KO). In: 第 103 回日本繁殖生物学会: 1-4 Sep 2010; 十和田.
19. 天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, 長嶋比呂志, 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴: 胚操作性の高い中空糸膜を用いた超急速凍結後のヒト胚の発育能力. In: 第 28 回日本受精着床学会総会・学術講演会: 28-29 Jul 2010; 横浜.
4. 招待講演
海外
1. Nagashima H., Matsunari H., Ikezawa Y., Nakao K., Kurome M., Watanabe M., Umeyama K., Miyagawa S. Necessity and possibility of serial cloning in development of advanced genetically engineered pigs for xenotransplantation., 2010 Seoul Forum on Xenotransplantation, 2010, Seoul, Korea. pp. 53-60.
- 国内
1. 長嶋比呂志: ブタ体細胞クローン技術を基盤とした移植・再生医学への取り組み. In: 第 8 回北関東甲信越肝移植談話会. 15 Jan 2011 東京.
2. 長嶋比呂志. クローンブタの aging 研究への応用の可能性. In: 第 28 回日本受精着床学会総会・学術講演会: 28-29 Jul 2010, 横浜.

図1. ウサギ膝軟骨細胞シート（東海大学にて作製）

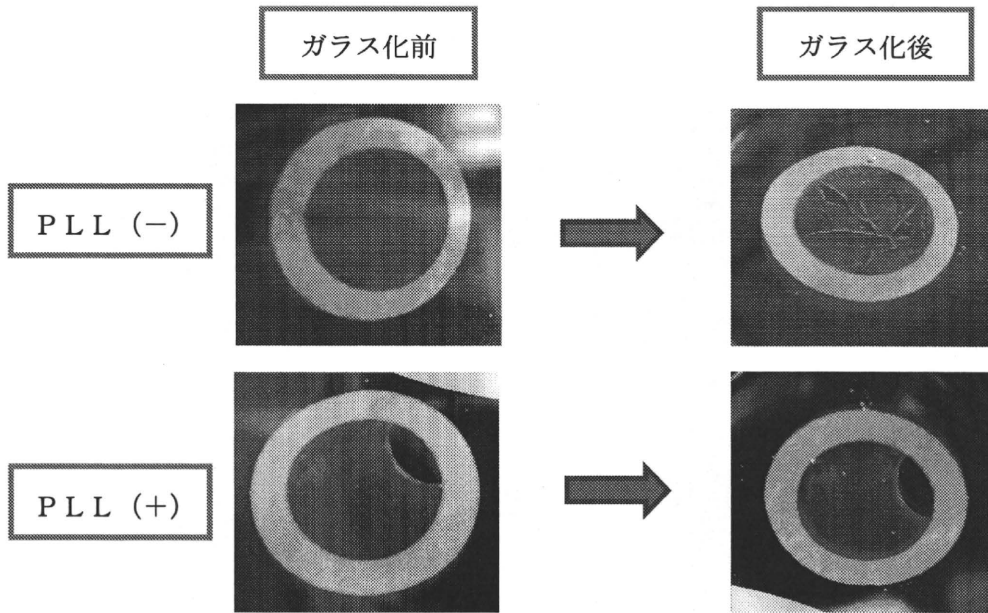


図2. ウサギ膝軟骨細胞シート（明治大学にて作製）

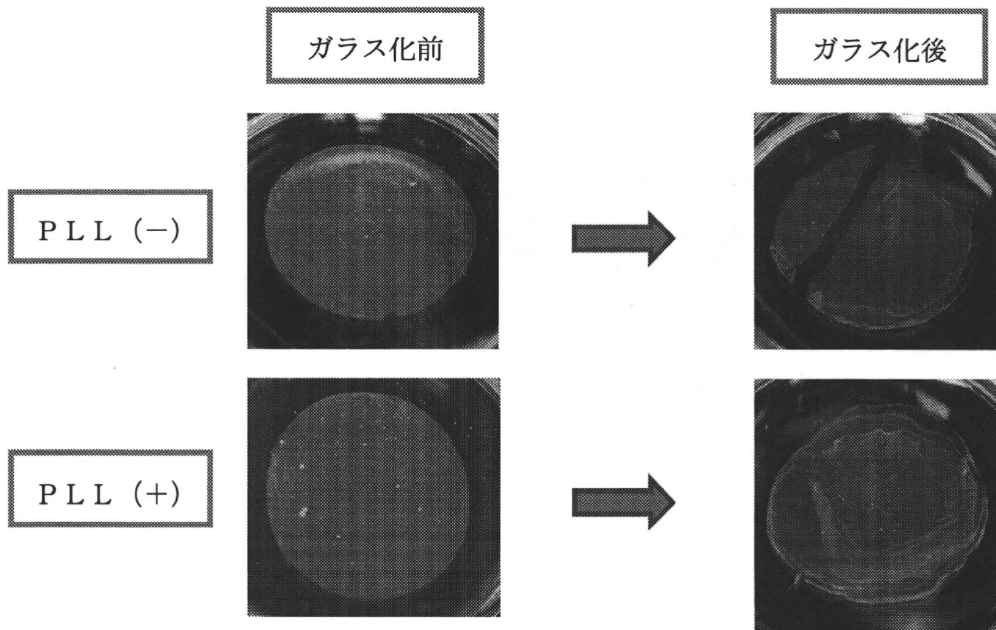


図 3. ブタ膝軟骨細胞シート（東海大学にて作製）

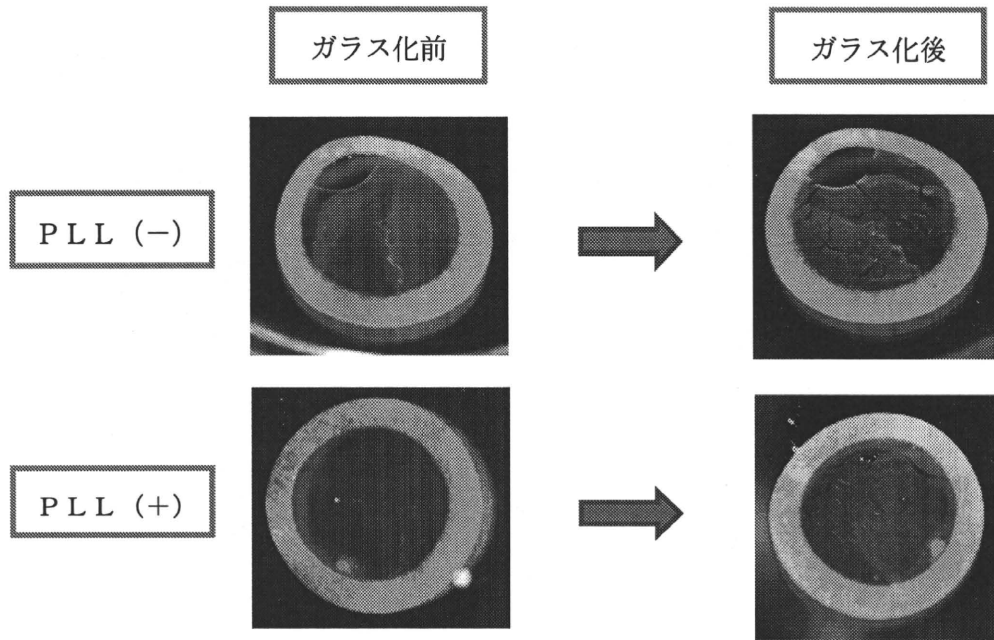
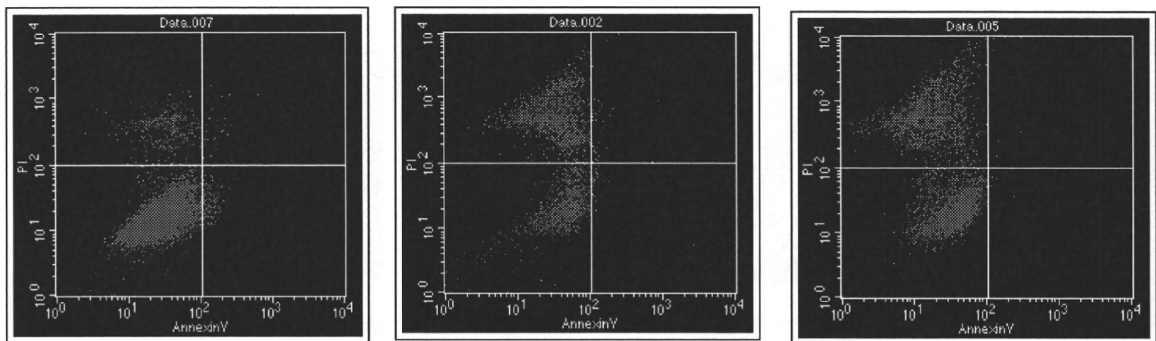


図 4. ウサギ軟骨培養細胞の低温保存後の生存性（保存期間：3 週間）



①mHFD-1

Gated	(%)
UL	4.94
UR	0.41
LL	92.85
LR	1.8

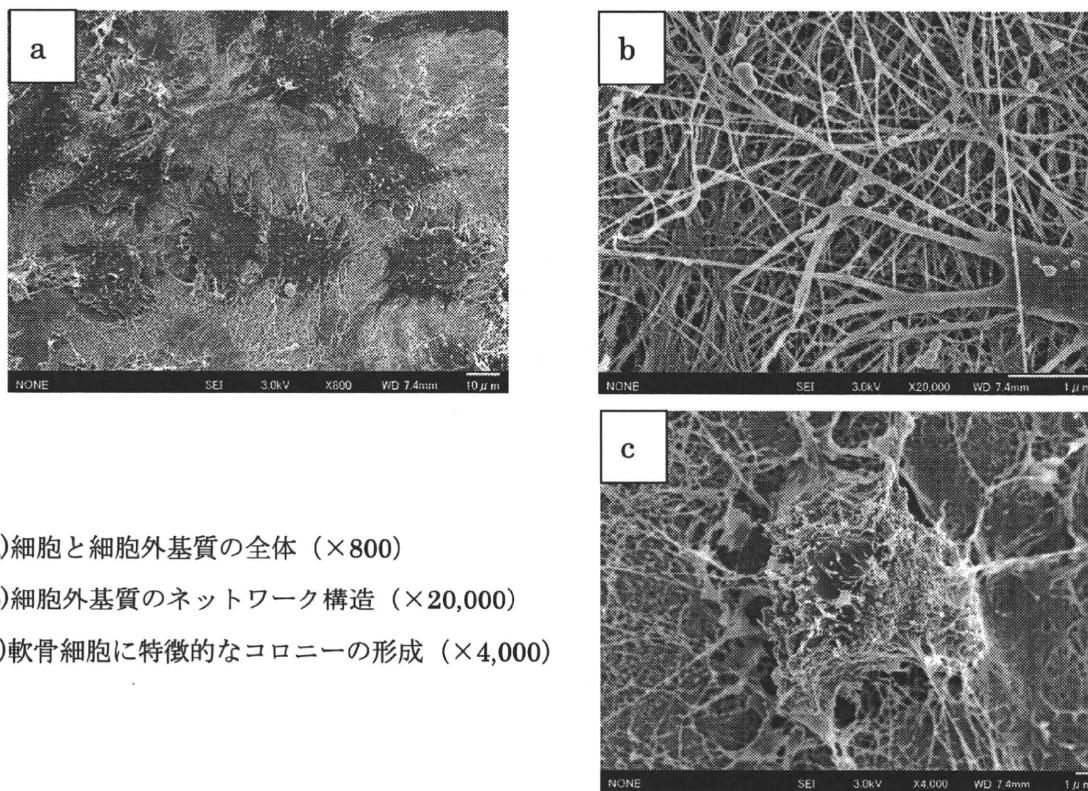
②RPMI

Gated	(%)
UL	58.85
UR	1.63
LL	38.59
LR	0.93

③RPMI+suppl

Gated	(%)
UL	38.57
UR	0.23
LL	61.08
LR	0.12

図 5. ウサギ軟骨細胞シートの走査電顕像（培養 14 日目）



- a) 細胞と細胞外基質の全体 (×800)
- b) 細胞外基質のネットワーク構造 (×20,000)
- c) 軟骨細胞に特徴的なコロニーの形成 (×4,000)

表 1. 細胞シートのガラス化保存後の形状保存と細胞生存性

シートの種類	PLLの有無	ガラス化・融解後の 破損発生頻度	細胞生存率(%)
ウサギ膝軟骨 ^{※1}	非ガラス化 ^{※3}	—	100.0
	+	0/3	93.2
	—	1/1	93.6
ウサギ膝軟骨 ^{※2}	非ガラス化 ^{※3}	—	96.8
	+	0/2	93.5
	—	2/2	94.2
ブタ膝軟骨	非ガラス化	—	98.5
	+	1/1 ^{※4}	89.9
	—	2/2	85.3

- ※1 東海大学で作製。
- ※2 明治大学で作製。プライマリーセル社より購入した CHC02(ウサギ膝軟骨初代培養細胞)を用いて作製した。
- ※3 単層の細胞シートを使用した。
- ※4 初めからシートに欠損部分があり、ガラス化・融解過程でこの欠損部から亀裂が生じた。

表 2-1. ウサギ軟骨細胞の低温保存後の生存性

培地名	2 週間保存 (%)			3 週間保存 (%)		
	生存率	apoptosis	apoptosis + necrosis	生存率	apoptosis	apoptosis + necrosis
mHFDM	96.4	0.7	3.6	35.9	1.4	20.5
RPMI	94.6	4.2	5.4	54.9	2.0	45.1
RPMI+sup1	96.5	2.9	3.5	64.1	0.6	35.9

表 2-2. mHFDM で低温保存したウサギ軟骨細胞の生存性に対する回復培養の影響

	生存率 (%)	apoptosis (%)	Apoptosis + necrosis (%)
2 週間保存	91.3	3.5	8.7
2 週間保存 + 1 日培養	94.2	4.2	5.7
3 週間保存	87.6	1.0	12.4
3 週間保存 + 1 日培養	89.6	4.5	10.4

光音響原理に基づく力学特性計測法を用いて、軟骨シート移植後の 機能回復の評価に関する研究 —基礎的検討としてのヒト変性軟骨診断—

研究分担者 石原 美弥 防衛医科大学校 医用工学講座 准教授

研究要旨：軟骨細胞シートによる関節治療の評価には、シートの移植前後で同じ手法で測定し、同じパラメータで評価する必要がある。我々が独自に開発した光音響原理に基づく力学特性計測法は、対象の組織に害がない非侵襲的で、繰り返し計測が可能であることから、その評価法になりうる。そこで、軟骨細胞シート移植術の評価に有効であるかどうか、その基礎的検討として今年度は変性軟骨を対象に評価法としての有用性を確認した。既に我々が構築した光音響原理に基づく力学特性計測法のプロトタイプ装置を用いて、膝前十字靭帯損傷手術と人工膝関節置換術の際に変性部と正常部で比較して計測した。その結果、軟骨変性の一般的な指標（ICRS グレード）と同じ傾向が得られ、未だ統計処理ができる例数がないが、正常部と変性部を対象にした測定値に違いがあり、軟骨細胞シートによる関節治療の評価法としての可能性が確認できた。

A. 研究目的

軟骨再生医療のバリデーション（再生医療が有効であることを立証すること）のために、我々は既に光音響原理に基づく力学特性計測法を開発している。本研究で軟骨細胞シートによる関節治療の臨床研究を実施した際、軟骨細胞シート移植後に、関節軟骨が所望の機能が回復しているかを開発した光音響原理に基づく力学特性計測法で評価できれば、バリデーションが可能となる。今年度はその事前準備として、ヒト変性軟骨の計測を施行した。

B. 研究方法

光音響原理に基づく力学特性計測法の要素技術は、主にレーザー（光音響信号が効率よく発生する）、超音波センサー（光音響信号を高感度に検出する）、信号処理系（正確に軟骨の力学特性を算出する）の3要素から成る。我々が開発している技術で最もオリジナリティがあり特筆すべき技術は、レーザーを導光する光ファイバーと超音波センサーを一体化したプローブである。

既に開発した可搬式の装置と滅菌可能なプローブを以下に示す（図1～図5）。

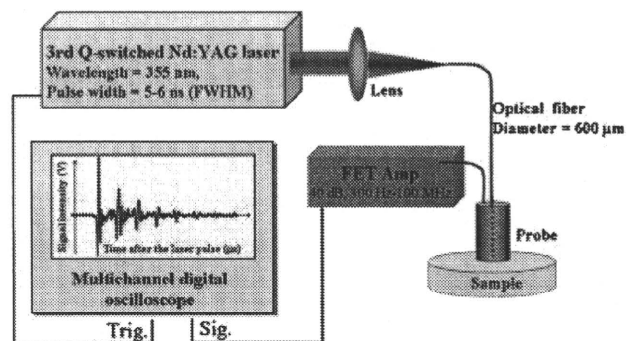


図1 装置の模式図

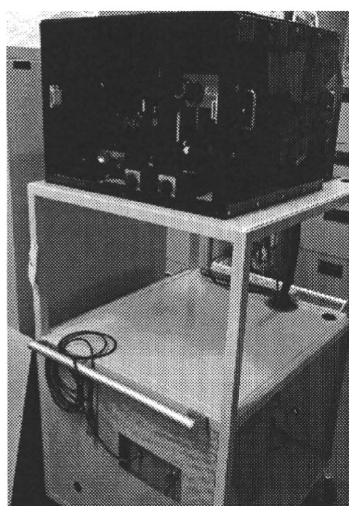


図2 装置の概観図



図3 装置とプローブ図

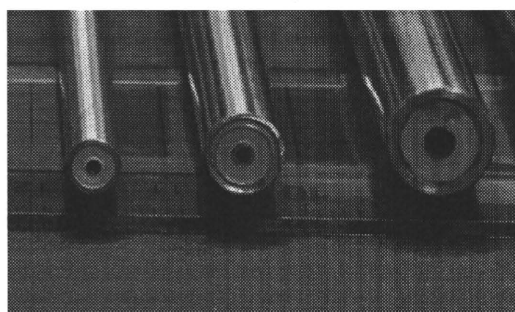


図4 開発したプローブの細径化の過程

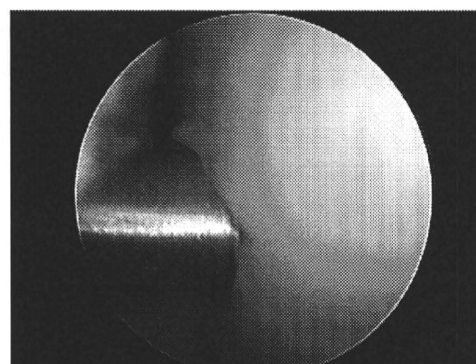


図5 プローブの顕微鏡視下適用

臨床の現場でより使いやすくするために、関節鏡のモニターに光音響原理に基づく力学特性計測法の測定波形がリアルタイムに提示されるように、イメージコンバ

ータとイメージミキサー（UIM：関節鏡モニター画面に異なる2つの映像表示を可能にすることが出来る）を導入して、以下のシステムを構築した（図6）。

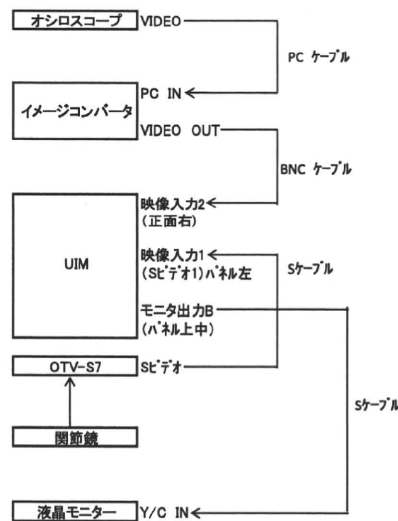


図6 関節鏡にオシロスコープの波形を提示するシステム

本システムを関節鏡視下の膝前十字靭帯損傷手術と人工膝関節置換術の際に変性部と正常部で比較して計測した。正常部

と変性部を比較することで、測定した日による測定値差、個人差が考慮でき、症例数の集積が有効と考える。

C. 研究結果

測定波形（対象：大腿骨内課）の1例を示す。

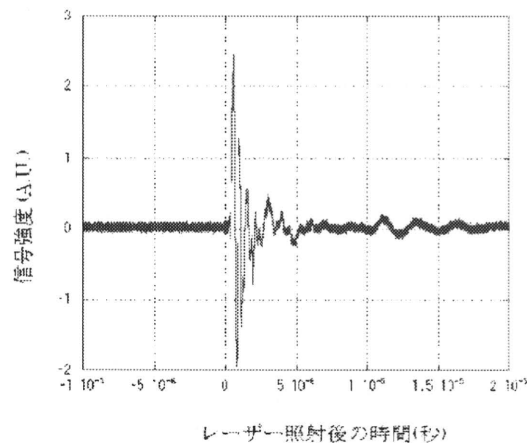


図7 測定波形（対象：大腿骨内課）

表 1 測定結果まとめ

ICRSグレード	測定結果 (ICRS グレード0の値を1として正規化)
0	1
1	1.4
2	1.7
3	2.0

測定波形は、レーザーが光ファイバーを通して軟骨に照射された際に、軟骨表面に発生した光音響波が軟骨内の伝搬と界面での反射を反映している。軟骨の力学特性（硬さ）のうち、弾性率が大きい（正常に近い）と光音響波の減衰は大きく、測定結果は小さい傾向となり、粘性率が大きい（変性が進行している）と光音響波の減衰時間は長くなり、測定結果は大きい傾向となる。

全測定結果を、ICRS (International Cartilage Repair Society) による Outerbridge 分類(Grade I~Grade IV)で分けて表示した。統計処理が出来るほど測定数が多いが、全体的に、ICRS グレードが大きくなるほど、測定結果が大きくなり、すなわち、変性が進行していることが示された。また、その再現性についてであるが、Grade I、Grade II については、繰り返し計測しても、測定日が違っても、測定対象が変わっても測定値はほぼ一定で変化はなかった。逆に、Grade III、Grade IV については、測定値にばらつきがあった。これは、見かけ（見た目）で分類する ICRS グレードでの変性の進行度と力学特性の関係には、ばらつきがある可能性があると考

えられる。

D. 考察

開発した光音響原理に基づく力学特性計測法のシステムで、軟骨変性の評価を非侵襲的にリアルタイムで有効に出来ることがわかった。本測定法は対象組織に侵襲を加えることなく、関節軟骨の機能を評価できるので、軟骨細胞シート移植前後の評価ができる、すなわち軟骨細胞シート移植による関節治療を評価する1つのパラメータとして光音響原理に基づく力学特性計測法を選択することが可能であることが確認できた。

E. 結論

軟骨細胞シート移植術の評価の1つとして、我々が独自に開発した光音響原理に基づく力学特性計測法が適用可能であることを確認した。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 松村耕治, 石原美弥, 栗津邦男(監修).
再生医療の実現に貢献するレーザー
光技術 p.184-192 次世代光医療ーレ
ーザー技術の臨床への橋渡しー, シー
エムシー出版, 2010.11

2. 学術論文

- 2) 平沢壮, 石原美弥, 北垣学, 藤田真敬,
菊地眞. 光音響画像の高分解能化の
ための画像再構成手法の検証 電気学
会研究会資料光_量子デバイス研究会
OQD-10-032 038: p.31-35, 2010
- 3) Kogure S, Inoue K, Ohmori T,
Ishihara M, Kikuchi M, Fujii M,
Sakai M. Infrared imaging of an
A549 cultured cell by a vibration
sum-frequency generation detected
infrared super-resolution microscope
Optics Express 18(13): p.13402-
13406, 2010.06
- 4) Kutsuna T, Sato M, Ishihara M,
Furukawa K, Nagai T, Kikuchi M,
Ushida T, Mochida J. Noninvasive
Evaluation of Tissue Engineered
Cartilage with Time-Resolved
Laser-Induced Fluorescence
Spectroscopy Tissue Engineering
Part C: Methods 16(3): p.365-373,
2010.05
- 5) Ishihara M, Hirasawa T, Tsujita K,
Kitagaki M, Bansaku I, Fujita M,
Kikuchi M. Multifunctional
photoacoustic signals detected by
P(VDF/TrFE) film sensor with a wide

range of frequency Proc. SPIE 7899,
78992, (2011)

- 6) Tsujita K, Ishihara M, Hirasawa T,
Irisawa K, Hirota K, Satoh Y,
Kikuchi M. Effect of the illumination
method on photo-acoustic image
quality with array transducer
based system Proc. SPIE 7899,
78992W (2011)
- 7) Hirasawa T, Ishihara M, Kitagaki M,
Bansaku I, Fujita M, Kikuchi M.
Analysis and verification of
dominant factor to obtain the high
resolution photo-acoustic imaging
Proc. SPIE 7899, 789932 (2011)

3. 学会発表

- 8) 石原美弥. 光音響原理を利用した非
侵襲的診断法 第2回BioOpto Japan
2010 カンファレンス: p.3-1-3-14,
2010.10
- 9) 石原美弥, 平沢壮, 北垣学, 番作勲,
藤田真敬, 菊地眞. 光音響断層画像化
技術による機能診断イメージング 日
本レーザー医学会誌 31(3): p.325-325,
2010.10