

細胞シートの顕微鏡画像を用いた非侵襲的特性評価に関する基礎検討

研究協力者 谷川 待子 防衛医科大学校 医用工学講座 研究員
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：本研究では、同種細胞シート移植のための技術開発に関する研究の1つとして、「製造工程の異なる種々のヒト細胞シートの非侵襲的特性評価」に関する第2年目の研究成果として報告する。移植に用いる細胞シートそのものを非侵襲的に評価することで再生医療のバリデーション実施が可能となるが、本研究では、昨年度構築したハイパースペクトル顕微鏡システムのうち、基本構成で汎用されている倒立顕微鏡で獲得した画像で細胞シートの評価の可否を基礎的に検討した。スペクトル等の新規のパラメータの導入が特に軟骨細胞シートの評価に必要であることが判明した。

A. 研究目的

移植に用いる細胞シートは非侵襲的に評価される必要がある。そこで、研究用倒立顕微鏡を用いて様々な状態の細胞の画像を取得した。取得した細胞画像は生の状態とは異なるが、そこには膨大な情報が埋まっている。その情報を引き出すための便利なツールが画像解析ソフトである。まず、汎用性の高い画像処理ソフトウェアで解析を試みた。

B. 研究方法

本研究では、アメリカ国立衛生研究所（NIH：National Institute of Health）関連の研究施設により Mackintosh 向けに開発された画像処理ソフトウェア“NIH

Image”の後継として開発された“Image J”で検討した。

Image JはNIHが無償配布しているため、<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>において誰でも簡単に入手可能である。扱えるファイルの種類が多く使い勝手がよいことから、医用画像の解析などに頻繁に用いられている。

今回は細胞画像を用いた最も基本的な解析として、Cell count（所定面積内の細胞数の測定）を実施した。

B-1. Image Jによる解析



図1 アイコン

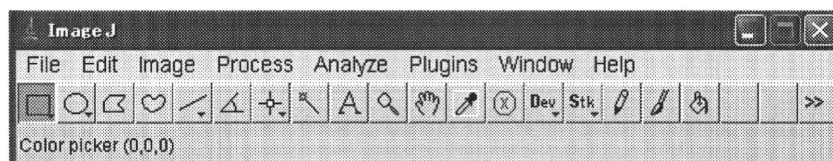


図2 Image Jの起動画面

- ① “Image J” を起動する。
- ② [File]→[Open] で細胞画像を開く。

細胞画像使用例：培養軟骨細胞を Hoechst33342 (核染, $\lambda_{ex}=352\text{nm}$ 励起波長,
 $\lambda_{em}=461\text{nm}$ 観察波長)で染色した顕微鏡画像

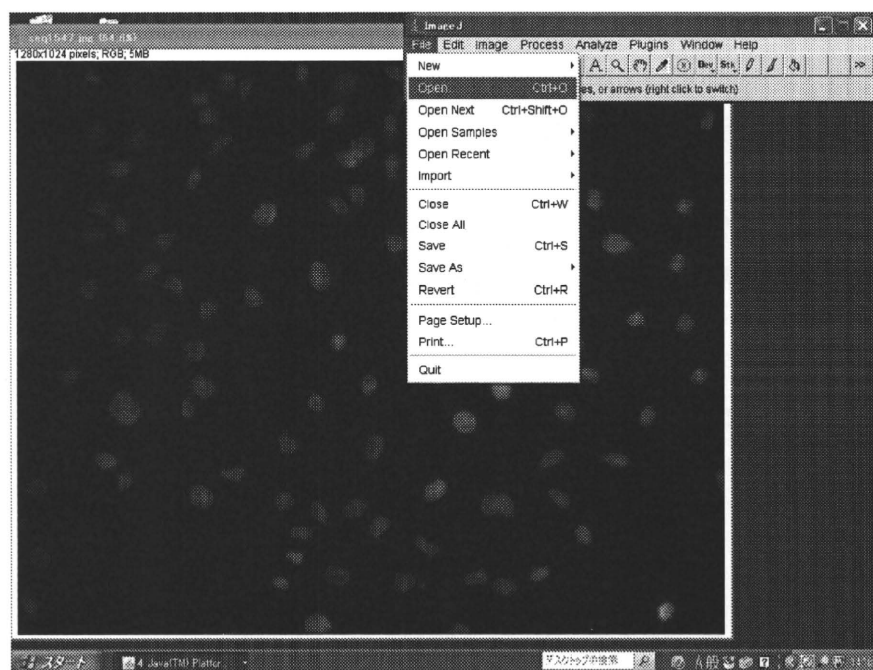


図3 Image Jで細胞画像を開く

③ [Image]→[Color]→[Split Channels]を選択する。

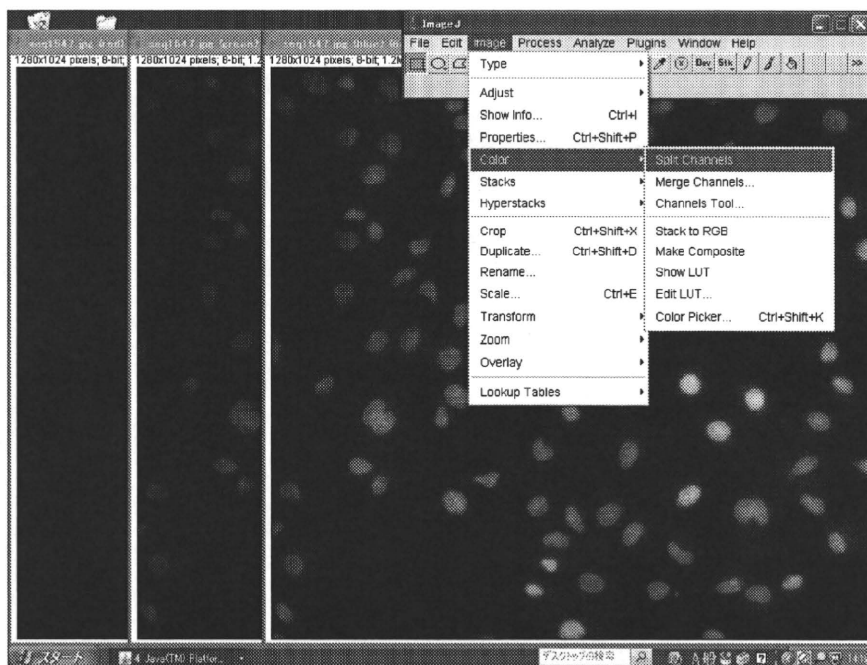


図4 Image Jで選択画像を2階調化する

④ [Image]→[Adjust]→[Threshold]を選択する。

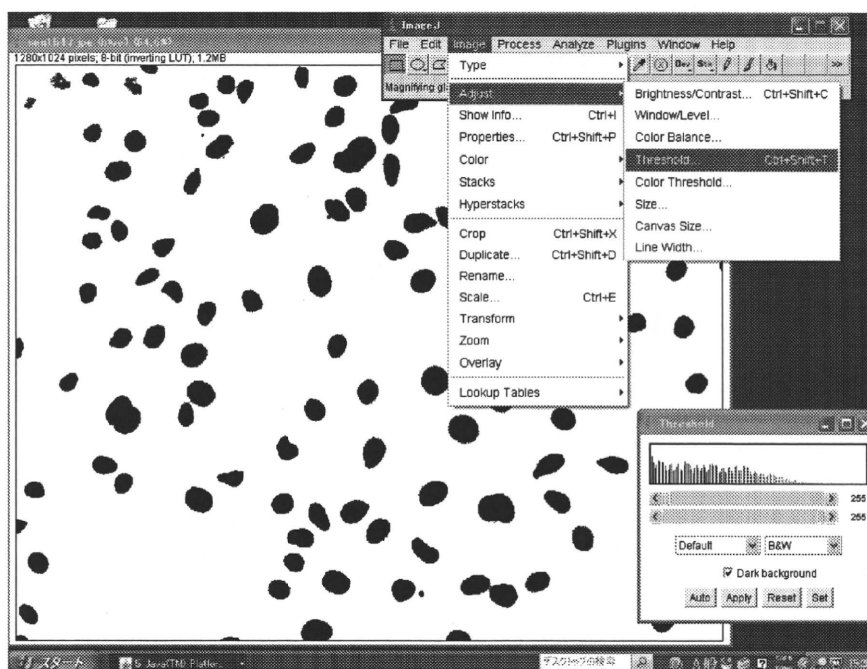


図5 選択画像の強度(明るさ)でしきい値を決める

⑤ [Analyze] → [Analyze Particles] を選択する。

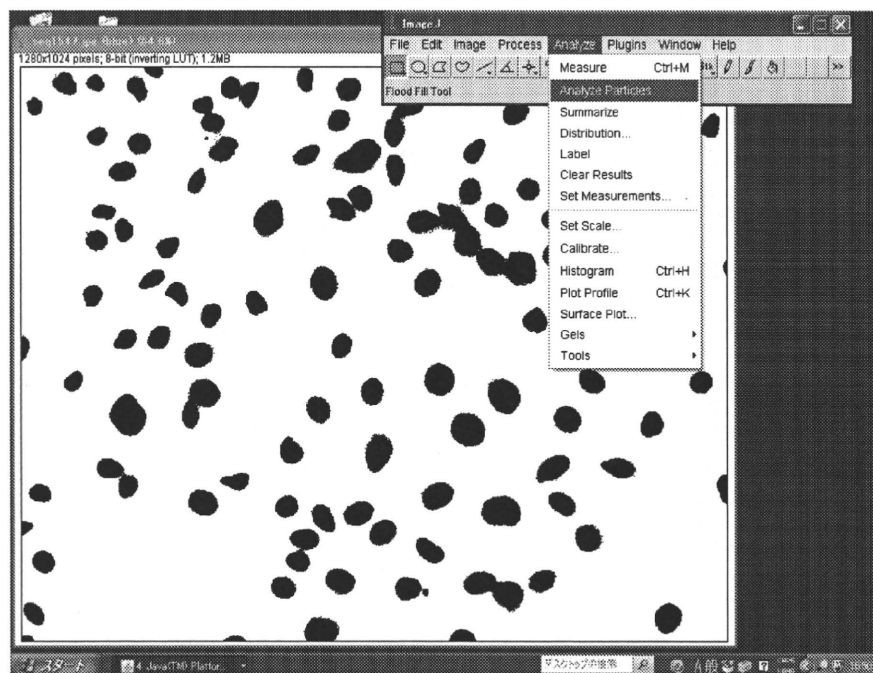


図 6 設定したしきい値に基づいて解析

⑥ Analyze Particles の設定画面より、カウントしたい細胞の [Size] や [Circularity] を設定する（Circularity：円形率）

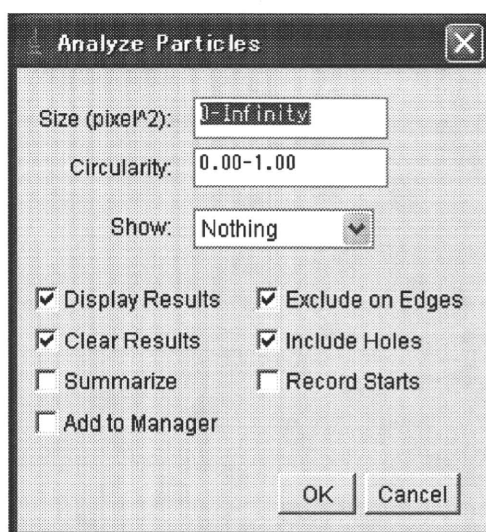


図 7 細胞の大きさや形に関する入力

⑦最後に[OK] ボタンをクリックすると、解析結果が表示される（図 14 参照）。

C. 結果

画像解析用にハイパースペクトル顕微鏡

システムの基本構成品である倒立顕微鏡を用いて以下の画像を取得し解析を試みた。

C-1. 単層培養した軟骨細胞

顕微鏡：Nikon ECLIPSE Ti-E

レンズ：Ph 20x

光源：ハロゲンランプ

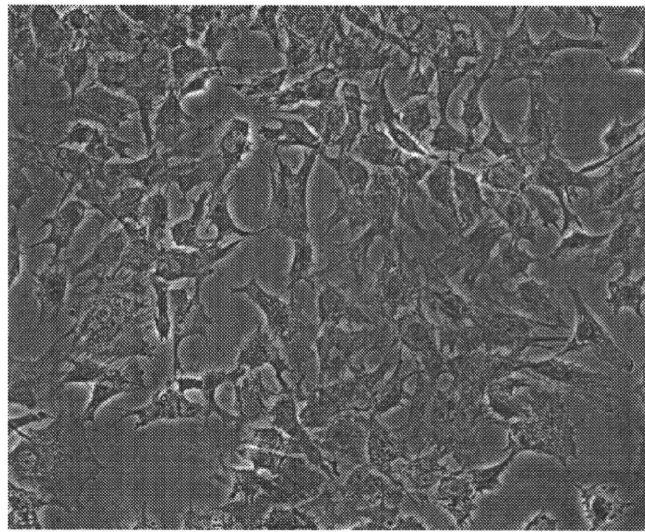


図8 培養軟骨細胞（白色家兎）Ph 20x

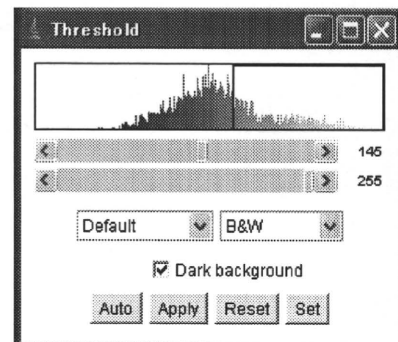
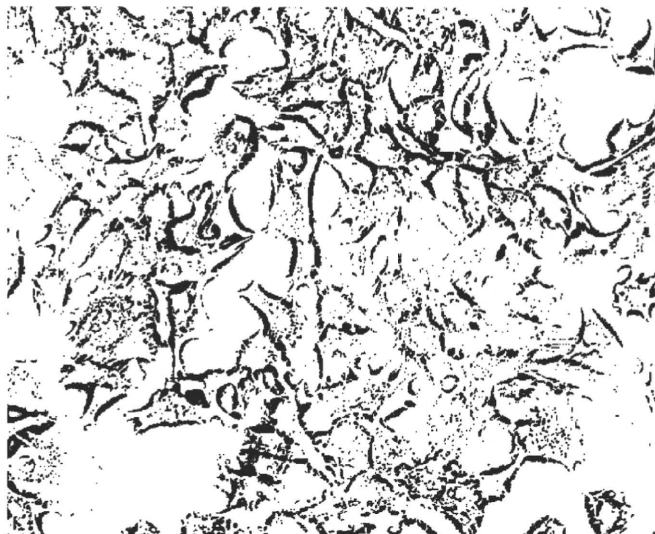


図9 培養軟骨細胞（図8）の解析結果1

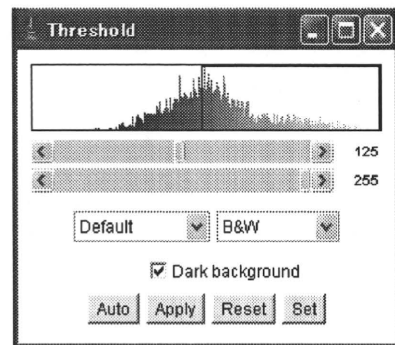
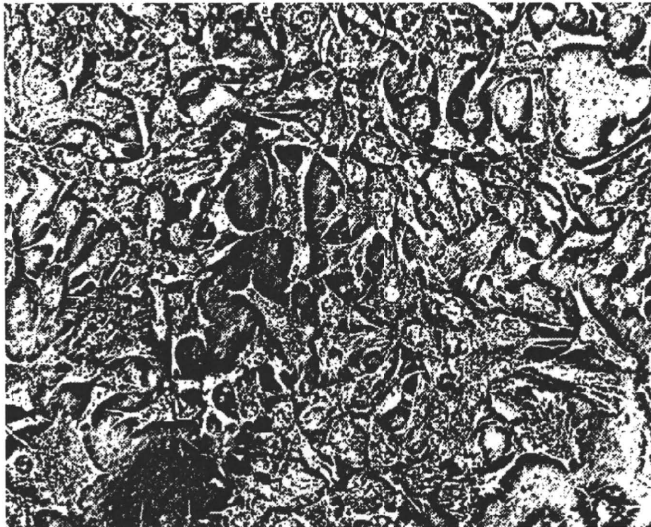


図10 培養軟骨細胞（図8）の解析結果2

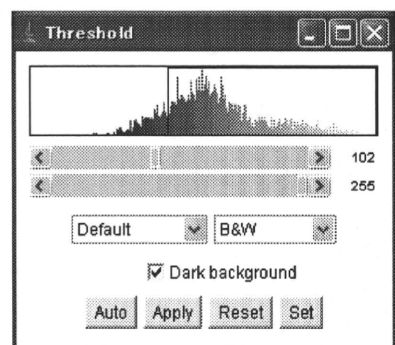
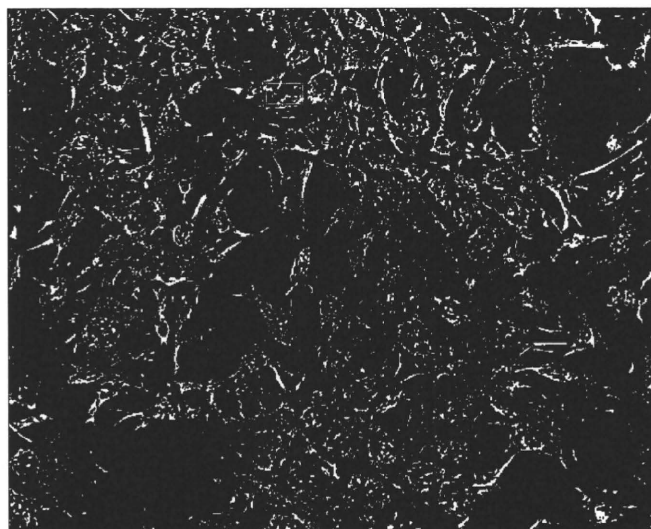


図11 培養軟骨細胞（図8）の解析結果3

図9-図11からわかるように Threshold で細胞の領域をうまく設定できないので解析できなかった。そこで、Threshold で設定できる例として、コントラストをつけるために、Hoechst33342

で核染した細胞画像で、本法のプロトコルを確認した。

C-2. 単層培養した軟骨細胞を Hoechst33342 で染色

顕微鏡：Nikon ECLIPSE Ti-E

光源：水銀ランプ

フィルター：DAPI

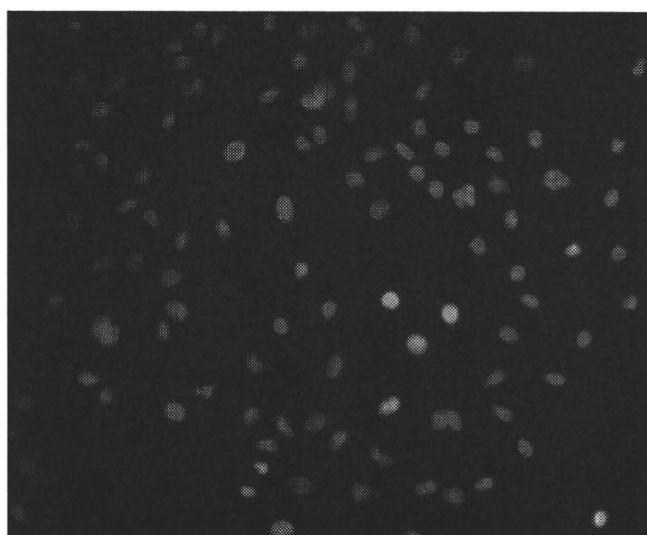


図 12 培養軟骨細胞（白色家兎）Hoechst33342 染色

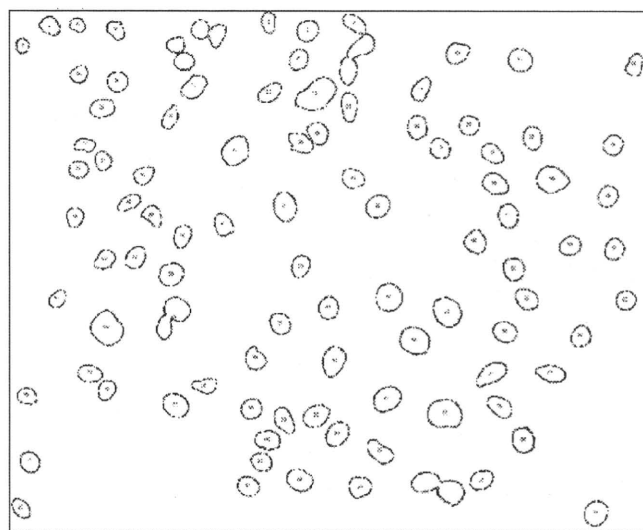
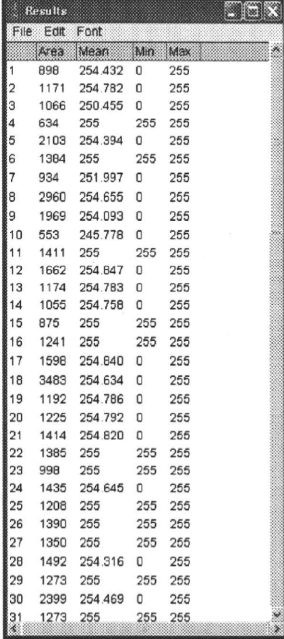


図 13 培養軟骨細胞 Hoechst33342 染色（図 12）の解析結果



	Area	Mean	Min	Max
1	898	254.432	0	255
2	1171	254.782	0	255
3	1066	250.455	0	255
4	634	255	255	255
5	2103	254.894	0	255
6	1384	255	255	255
7	934	251.997	0	255
8	2960	254.655	0	255
9	1969	254.093	0	255
10	553	245.778	0	255
11	1411	255	255	255
12	1662	254.847	0	255
13	1174	254.783	0	255
14	1055	254.758	0	255
15	875	255	255	255
16	1241	255	255	255
17	1598	254.840	0	255
18	3483	254.634	0	255
19	1192	254.786	0	255
20	1225	254.792	0	255
21	1414	254.820	0	255
22	1385	255	255	255
23	998	255	255	255
24	1435	254.645	0	255
25	1208	255	255	255
26	1390	255	255	255
27	1350	255	255	255
28	1492	254.316	0	255
29	1273	255	255	255
30	2399	254.469	0	255
31	1273	255	255	255

Area : 選択領域の面積
Mean : 輝度値の平均
Min : 最小輝度値
Max : 最大輝度値

図 14 培養軟骨細胞 Hoechst33342 染色の解析結果 (図 13) の数値データ

C-3. 白色家兎の軟骨細胞を単離して作成した細胞シート

顕微鏡 : Nikon ECLIPSE Ti-E

レンズ : Ph 20x

光源 : ハロゲンランプ

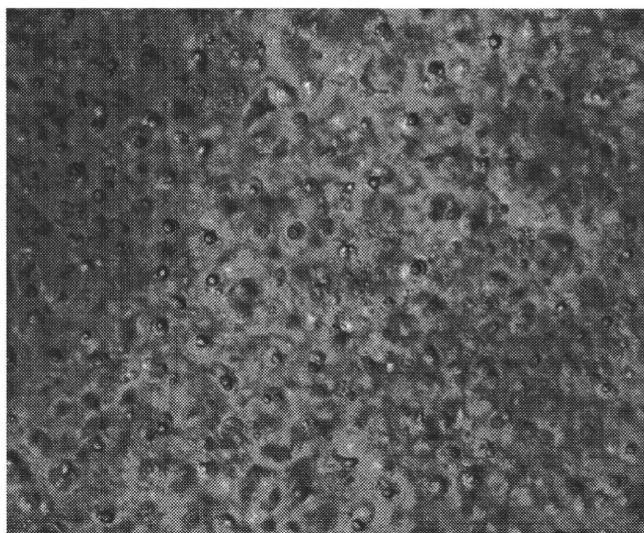


図 15 軟骨細胞シート（白色家兎） Ph 20

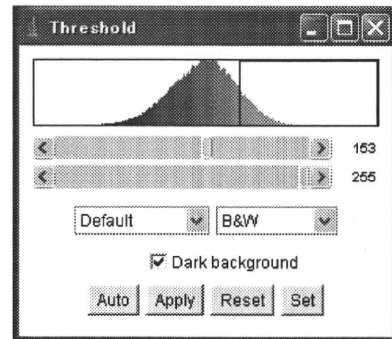
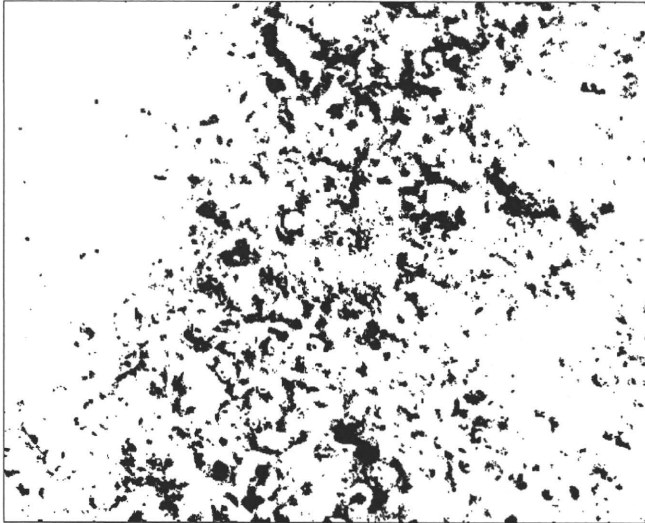


図 16 軟骨細胞シート（図 15）の解析結果 1

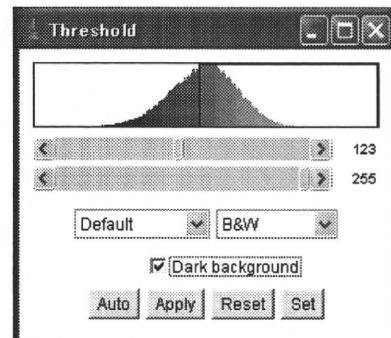
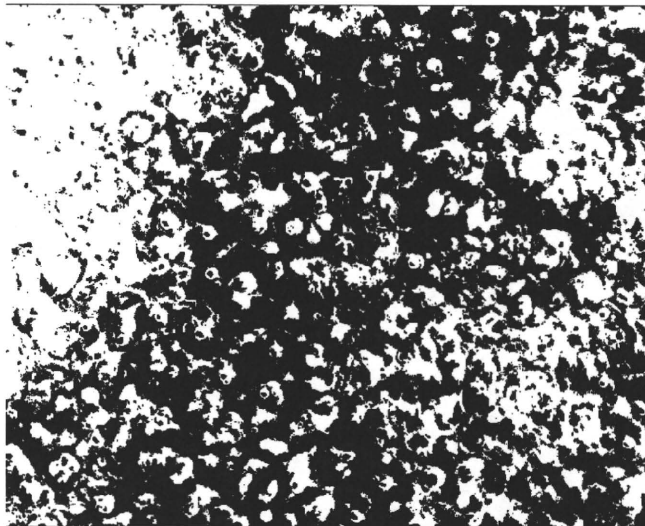


図 17 軟骨細胞シート（図 15）の解析結果 2

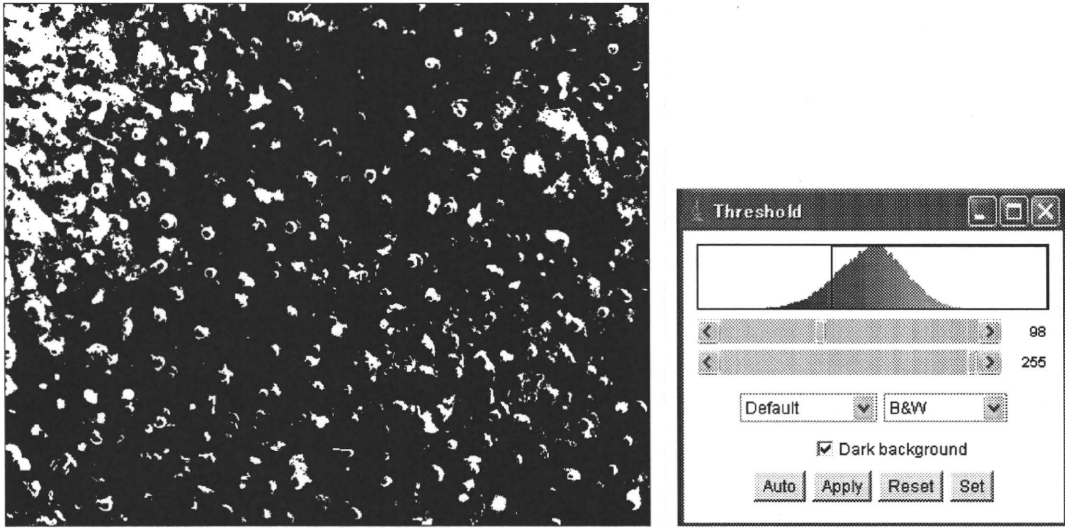


図 18 軟骨細胞シート（図 15）の解析結果 3

図 8-図 11 と同様に **Threshold** で細胞の領域をうまく設定できないので解析が出来なかった。

C-4. 白色家兎の軟骨細胞を単離して作成した細胞シートを **Hoechst33342** で染色
顕微鏡：Nikon ECLIPSE Ti-E
光源：水銀ランプ
フィルター：DAPI

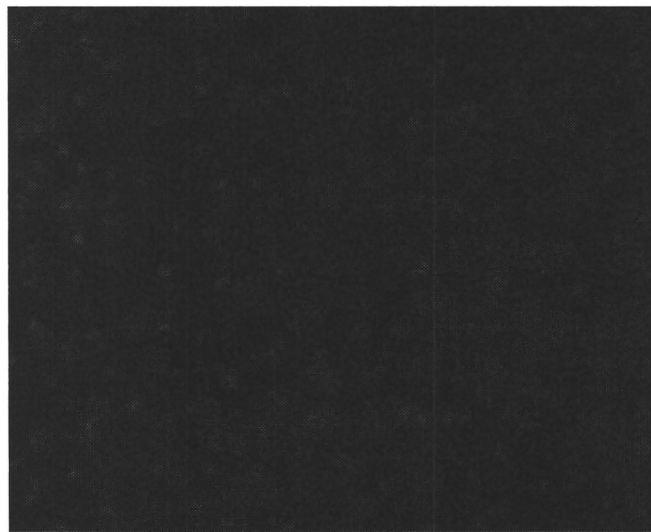


図 19 軟骨細胞シート（白色家兎）Hoechst33342 染色

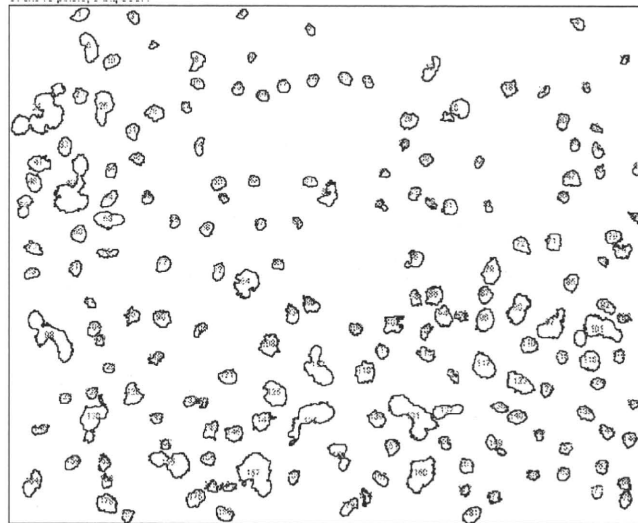


図 20 軟骨細胞シート（図 19）Hoechst33342 染色の解析結果

	Area	Mean	Min	Max
1	182	255	255	255
2	71	255	255	255
3	120	255	255	255
4	129	255	255	255
5	82	255	255	255
6	396	255	255	255
7	50	249.900	0	255
8	219	255	255	255
9	62	255	255	255
10	191	252.330	0	255
11	52	255	255	255
12	233	255	255	255
13	137	255	255	255
14	113	255	255	255
15	97	255	255	255
16	117	255	255	255
17	137	255	255	255
18	189	255	255	255
19	123	255	255	255
20	55	255	255	255
21	1268	252.386	0	255
22	69	255	255	255
23	178	255	255	255
24	111	255	255	255
25	455	253.319	0	255
26	358	253.575	0	255
27	80	255	255	255
28	215	255	255	255
29	221	255	255	255
30	151	253.311	0	255
31	156	255	255	255

Area : 選択領域の面積
 Mean : 輝度値の平均
 Min : 最小輝度値
 Max : 最大輝度値

図 21 軟骨細胞シート Hoechst33342 染色の解析結果（図 20）の数値データ

D. 考察

実験結果をまとめると以下のような表になる。細胞の形状だけで解析するのは難しく、核にコントラストがある状態であればある程度の精度が軟骨細胞シートでも維持できる。細胞画像内の細胞数によっても判別率が異なることを確認した。しかし、細胞が密になるほど、判別は困難になる。

今回の解析においては、よりきれいな画像を取得するのがポイントになる。つまり、どの細胞でも核はある程度大きさや形が一定なので画像解析の際、細胞の設定が可能であるが、細胞の状態というより、細胞画像によって、判別率が左右される可能性があることがわかった。

隣合わせの細胞質は重なっても核が重なる割合は低いので、細胞全体を指標にするより核を目安にする方が有効であった。細胞シートの場合、個々の細胞の判別が困難であった。細胞が何層にも重なっているため、細胞画像として、どの箇所でも撮影できるとは限らなく、今回は顕微鏡下で解析場所を吟味した。

以上から、汎用性のある手法では実用性がなく、独自の手法が必要であることが確認できた。すなわち、ハイパースペクトル法を用いた方法が優位であることと結論づけられた。

表 1 実験結果まとめ (○：解析可能 (判別率) ×：解析 (判別) が困難)

	無染色	Hoechst33342 による核染色
培養軟骨細胞	×	○(~80%)
軟骨細胞シート	×	○(~70%)

E. 結論

移植に用いる細胞シートを非侵襲的に評価でき、再生医療のバリデーションの1つの手段になる手法を開発するために、ハイパースペクトル顕微鏡を構築した。今年

度は、最も簡便な評価手法でその可能性を検討したが、スペクトル等の新規のパラメータの導入が特に軟骨細胞シートの評価に必要であることが判明した。今後は、有効な励起光との組み合わせを模索する。

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

- 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—レ

ーザー技術の臨床への橋渡し—, 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 コンファレンス: 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

同種異関節における細胞相互作用の検討 ～共培養法を用いた軟骨細胞シートの特性～

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
三谷 玄弥 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
杓名 寿治 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
研究協力者 内山 善康 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師
繁田 明義 東海大学医学部外科学系整形外科学・講師

研究要旨：関節軟骨部分損傷では修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足するため自然治癒しないことがわかっている。我々は温度応答性培養皿 UpCell™ を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨損傷部分に接着し組織修復に寄与することを、動物実験で確認し、その特性解析から、軟骨保護作用を有していることを確認した。また、温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養法により、細胞増殖能に個体差の大きいヒト細胞によって、より短期間で軟骨細胞シートを回収することを報告した。今回、2種類の細胞を非接触状態で培養できるという、インサートの特性を生かし、ヒト軟骨細胞を同種の凍結滑膜細胞を用いて共培養を行い、その増殖能の変化と作製したシートの特性評価を比較検討した。その結果、同種異関節由来の滑膜細胞との共培養法においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することが可能であり、自己由来細胞の共培養法と同様に軟骨細胞シートの特性を維持していた。

A. 研究目的

関節軟骨は滑液で育てられる無血管組織である。また豊富な細胞外基質を持つため、修復機転に動員される細胞数が絶対的に不足することが原因となり、自然治癒しないことが分かっている。現在、関節軟骨全層欠損においては、人工関節(TKA, UKA)骨切り術(HTOなど)除去術(Debridement, 半月板除去、滑膜除去)移植術(骨軟骨移植、細胞移植)など、様々な治療法が行われている。軟骨細胞移植術においては、1994年にBrittbergら(N Engl J Med 1994)が初めて臨床応用した自家軟骨移植法(Autologous Chondrocyte Transplantation, ACT)が周知であり、ACTによるOAの治療は欧米や韓国では臨床的に用いられている方法であ

る。国内でも非荷重部の関節軟骨から単離した軟骨細胞や、MSCを用いて組織工学的に軟骨を作製し、骨軟骨全層欠損例には臨床応用が開始されている。しかし、これらは外傷性の骨軟骨損傷や離断性骨軟骨炎であり、軟骨欠損範囲が元々小さな症例に適応とされており、高齢者に発生する広範な軟骨の変性と初期段階の部分欠損を伴うOAの治療には踏み込めていない。現段階において、関節軟骨部分損傷に関して、現状では明確な治療方針がなく、対症療法的(骨髄液誘導、関節内注射、抗炎症薬(内服, NSAIDなど)に治療されている。我々は温度応答性培養皿を使用することで、組織修復パッチとして積層化軟骨細胞シートを作製し、関節軟骨損傷に対する細胞シートに

よる関節軟骨の修復再生を目指している。金城らは、温度応答性培養皿 UpCell®を用いて作製した積層化細胞シートが関節軟骨の損傷部分に接着し組織修復作用を有することを動物実験から見出した(BBRC 2006)。単層細胞シートと積層化シートの特性を比較解析したところ、積層化シートに軟骨保護作用の優位な結果を得ている(Eur Cell Mater 2007)。

軟骨の培養時には、軟骨細胞の増殖能が乏しく、また、単層培養を行うと急速に脱分化するため、組織作製までの培養時間ができる限り短くすることが必須となる。一般に *in vitro* で細胞増殖を促進するために、培地への成長因子の添加や、フィーダーセルの利用といった方法が取られている。一方、生体内において、関節軟骨は、滑膜が分泌する関節液から栄養を得ている。

我々は、軟骨細胞と滑膜細胞を共培養することによって、関節内部の様に、軟骨細胞が滑膜細胞から栄養の供給を受け、増殖が促進し、より短期間で確実に軟骨細胞シートを作製することを自己由来軟骨細胞、滑膜細胞を共培養することによって可能とした。

無血管組織である軟骨は免疫原性が低いとみられており、将来、同種細胞での軟骨再生を目標とし、今回、他家由来細胞を共培養することによって、自己由来と同様に軟骨細胞の増殖を促すことが可能か検討した。

B. 研究方法

ヒト軟骨細胞とヒト滑膜細胞

本学臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと東海大学病院で肩関節制動術時に得られた 13 例 13 膝 19 歳から 36 歳(平均 29 歳、男性 11 人、女性 2 人)の軟骨滑膜細胞は、ACL 再建術時に採取した 10 例 10 膝 15 歳から 42 歳(平均 29 歳、男性 7 人、女性 3 人)の滑膜組織を酵素的に単離後継代し、P0、P1、P2 各点で凍結保存した細胞を用いた。

軟骨細胞、滑膜細胞の分離と培養

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分し、0.016% Collagenase Type I (Worthington, NJ, USA) を含む DMEM/F12 で 2 時間、スターラーで攪拌しながら 37°C、5%CO₂ 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 (Wakojunyakukougyou 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 で維持後凍結し、各継代数において凍結保存したものを解凍して使用した。全ての培養は 37°C ,5% CO₂ and 95% air 下で行っ

た。初代培養、継代培養共に 10,000cells/cm² で播種し、P0 to P1 間は 7 日間、P1 to P2 間は 5 日間の培養期間で継代し P1, P2 サンプルを作製した。

温度応答性インサート内で軟骨細胞のみ培養を行う群(S 群) Companion Plate, Notched for use with Cell Culture Insert (BD Falcon™) に滑膜細胞を、インサート内に軟骨細胞を播種し、インサートを介して共培養を行う群(C 群) を作製した。同時に温度応答性インサートを用いて共培養を行い、培養 14 日目に 3 層に積層化し、7 日間培養した群(CL 群) を作製した。全ての実験において培養は軟骨細胞の維持と同じ培地、手順で行った。

温度応答性培養皿

細胞シート作製のための培養皿として、Cell Seed 社の温度応答性インサートを使用する。これは、UpCell® 同様、温度応答性ポリマー(PIPAAm) をインサートのメンブレン表面に固定化したインサートで、これにより器材表面は 32°C を境に可逆的に疎水性(細胞接着表面) から親水性(細胞遊離表面) に変化する。そのため、トリプシン等、細胞に損害を与える酵素を一切用いることなく、温度を 20°C ~ 25°C にして 10 分 ~ 30 分待つだけで無傷な細胞がシート状に回収することができる。回収した細胞シートは細胞外マトリックスを保持しているため、移植の際に縫合が一切不要である。また、細胞外に発現しているタンパク質なども低損傷のため、細胞シート同士を重ねた 3D

培養も容易である。現在、角膜再生シート、口腔粘膜再生シート、心筋再生シートといった多方面での臨床応用が期待されている器材である。

評価

増殖能、形質発現に関して、それぞれ以下の方法で比較検討した。

- ① S 群、C 群の軟骨細胞増殖度を経時的(培養 3, 5, 7, 9, 11, 14 日目) に MTT Assay で計測した。
- ② 播種からサンプリングまで、培養期間を合わせた S 群、CL 群自己細胞間で共培養を行い CL 群と同様に積層化させた (s) CL 群の 3 群間をの各々の mRNA を Type2collagen(COL2), SOX9, MMP3, MMP13, Type1collagen(COL1), Type27collagen(COL27), ADAMTS5, Aggrecan-1(AGC1), TIMP-1, Fibronectin-1(FN1) について評価した。normalize samples として、Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) を用いた。
- ③ 積層化軟骨シートの COL2 及び、接着因子 FN1 の局在について、免疫染色で確認した。

C. 結果

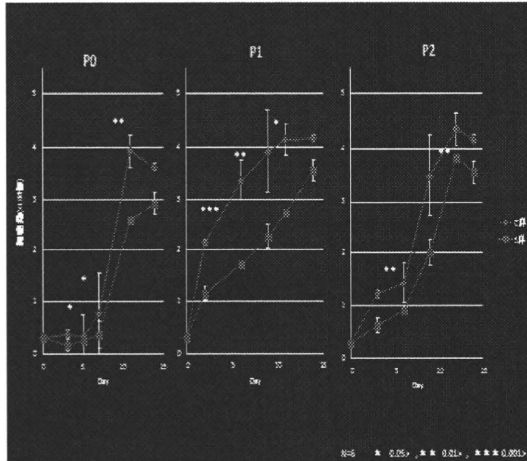
1. MTT Assay

S 群と比較して C 群の細胞増殖活性は全ての継代数において培養 3 日目に約 2 倍と優位に増加し、早いもので 11 日目にコンフルエントに達した。

その結果、P0 細胞で平均 2 週間早く軟骨細

胞シートを作製することが可能であった。
 (Fig.1)

Fig.1



2. 免疫組織染色

免疫組織染色では、CL 群において、COL2、FN の発現がシート全体で確認された。(Fig.2)

3. real-time PCR

mRNA の発現量は、CL 群は S 群と比較し、COL2、AGC1、SOX9、TIMP1 といった、関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現の高い値が得られた。一方、MMP3、MMP13、ADAMTS5 の発現は 0.8 以下に抑制された。その値は (S)CL 群と同等の値であった。(Fig.3)

Fig.2

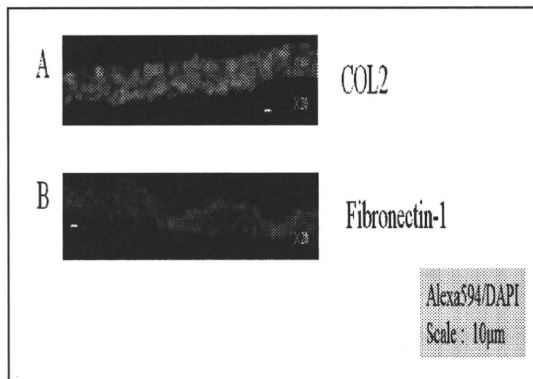
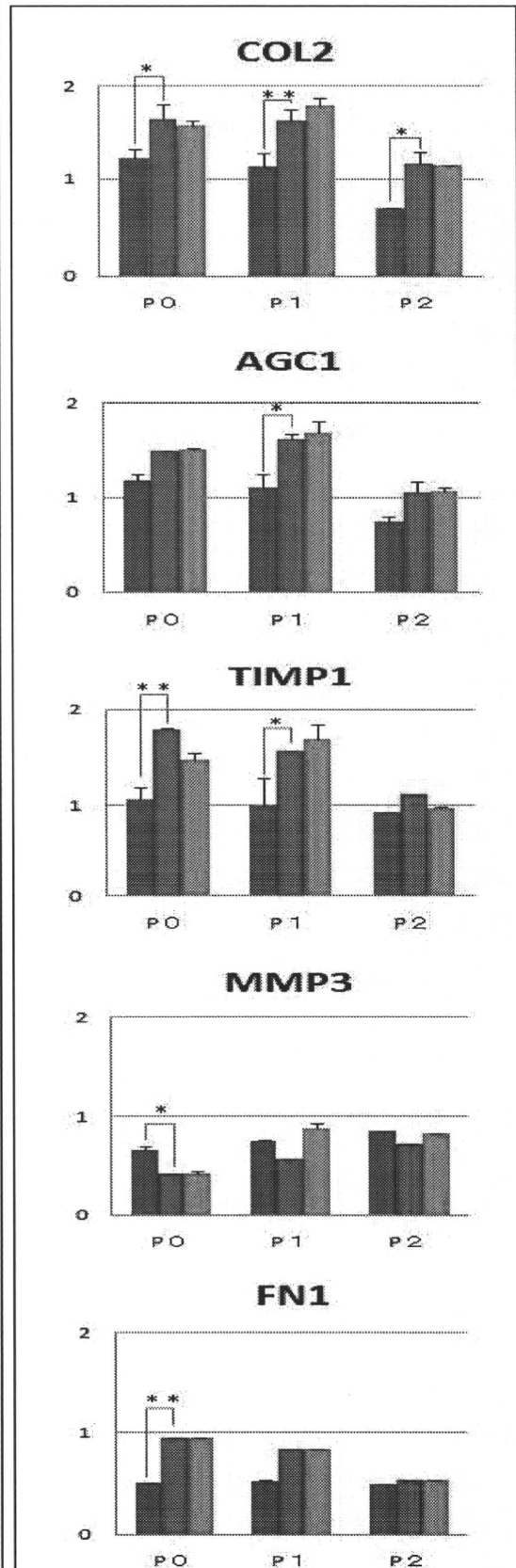
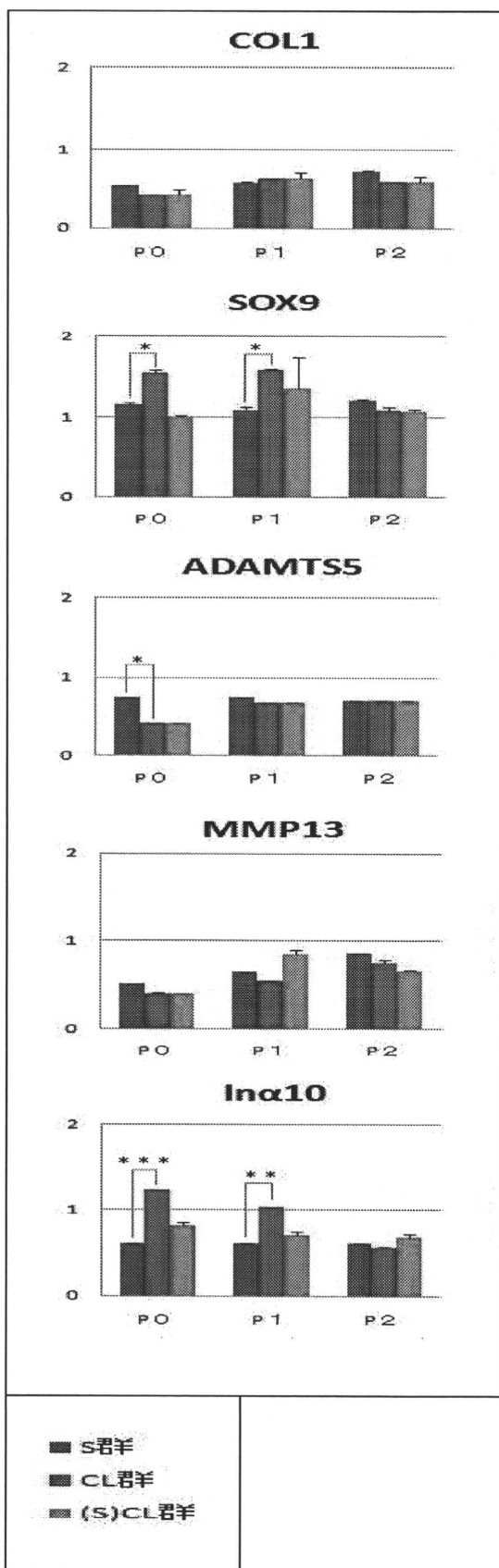


Fig.3





D. 考察

正常関節内において、滑膜は、関節液を分泌し、関節軟骨へ栄養を運んでいる。RA、OAのIn Vitro モデルとして、炎症性滑膜細胞と正常軟骨細胞の共培養法が用いられており、その細胞相互作用が数多く報告されている。今回我々は、慢性炎症のない滑膜組織から採取された凍結滑膜細胞とインサートを介して共培養を行った。その結果、滑膜細胞との共培養による細胞増殖活性は継代数に関わらず有意に増加し、より短時間で軟骨細胞シートを作製することが可能であった(Fig.1)。これは、軟骨細胞が関節内の軟骨組織のように、通常の培地だけでは得られない、滑膜細胞から分泌される栄養分を、インサートを介して得ることで、その結果、軟骨細胞の増殖促進につながったと推察された。

今回、共培養積層化細胞シート(CL群)では、単層細胞シートと比較して、COL2, AGC1等の関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現は維持されていた。またその差はP0,P1において明らかであった。CL群ではAGC1, TIMP1の高発現、MMP3, MMP13, ADAMTS5の抑制がP1までは優位に見られたものの、P2においては他の2群と同等の発現となった。しかし、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)。

一般に軟骨細胞はその増殖過程で軟骨固有の性質を失い、線維芽細胞様に変化する。この変化には、プロテオグリカン産生が低下、分泌コラーゲンの2型から1型への変

化を伴う。

Yoonらは第3継代までは2型コラーゲンが測定でき、第4継代目以降からは典型的な脱分化の状況となったと報告した。今回、mRNA比較においてCL群において、AGC1, TIMP1といった関節軟骨形質維持に重要な遺伝子発現の高い値が得られた。一方、MMP3, MMP13, ADAMTS5といったカタボリックファクターの発現はP1までは優位に抑制された。これは、積層化によって、軟骨細胞に適した培養環境を作り出すことができたと推察される。

これは、全ての継代数においてCOL2高発現、COL1低発現といった特性を示した(Fig.3)ことから推察される。しかしながら、P2においては他の2群と有意な差は得られなかった。これは、単層培養で継代を重ねたことにより、軟骨細胞が脱分化への傾向を示したと考えられる。これらの結果は臨床応用に向け、初期培養細胞が最も適しているということをも示唆している。

細胞シートの接着性を免疫染色にて行った結果、シート全体に強くFNの発現が見られたことから、移植部分に細胞シートが接着し、修復に関与する可能性が示唆された。(Fig.2)

温度応答性インサートを使用した同種異関節由来滑膜細胞との共培養法においても、液性因子を介した細胞間相互作用により、より早く軟骨細胞シートを作製することができまた積層化によって軟骨分化並びに形質維持に重要な遺伝子の増加を認め、接着性とバリア機能に優れた

軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。同種異関節由来滑膜細胞との共培養法は自己由来細胞の共培養法と同様に、増殖活性にばらつきがあるヒト細胞においても、短期間で軟骨細胞シートを回収することを可能にし、積層化細胞シートの遺伝子発現は自己由来細胞の共培養法で作製したものと同等の発現であった。この結果から、臨床応用へ向け、アロの細胞を用いることで、低侵襲でACIを実行することができるということが推察された。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Kokubo M, Ebihara G, Ohta N, Mochida J. Intravenous administration of anti-vascular endothelial growth factor humanized monoclonal antibody bevacizumab improves articular cartilage repair. *Arthritis Res Ther*. 2010 Sep 24;12(5):R178. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- 1) 小久保舞美, 佐藤正人, 持田讓治. 関節軟骨細胞の初代培養におけるAscorbic acidの影響. 第54回日本リウマチ学会, 口演 W-2-K-5, 神戸, 2010

- 2) 三谷玄弥, 小久保舞美, 佐藤正人, 持田讓治. ヒト膝関節内組織における Tenomodulin, Scleraxis の発現状況. 日本膝関節学会(JOSKAS)雑誌, 査読無, (1884-8842)第 35 卷 4 号, Page136[II-3-O-38-2], 2010
- 3) Lee J, 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, 日本整形外科学会雑誌, 査読無, (0021-5325)84 卷, 8PageS1060[1-4-14], 2010
- 4) 三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 宿南知佐, 持田讓治. 再生医療に向けた前十字靭帯、滑膜由来細胞シートの検討. 第 25 回日本整形外科学会, 日本整形外科学会雑誌, 査読無, (0021-5325)84 卷 8 号, PageS1219[2-3-5], 2010
- 5) 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の液性因子の解析. 第 25 回日本整形外科学会, 日本整形外科学会雑誌, 査読無, (0021-5325)84 卷 8 号, PageS1059[1-4-11], 2010
- 6) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 小久保舞美, 海老原吾郎, 太田直司, 持田讓治. 抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体(Bevacizumab)投与による骨軟骨修復効果の検討. 第 25 回日本整形外科学会, 日本整形外科学会雑誌, 査読無, (0021-5325)84 卷 8 号, PageS1062 [1-4-18], 2010
- 7) 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 繁田明義, 持田讓治. 関節軟骨細胞初代培養時の ascorbic acid の影響. 第 25 回日本整形外科学会, 日本整形外科学会雑誌, 査読無, (0021-5325)84 卷 8 号, PageS1142[1-Pd-14], 2010
- 8) Kokubo M, Sato M, Mitani G, Uchiyama Y, Handa A, Kutsuna T, Hamahashi K, Ohta N, Ebihara G, Itoh S, Ukai T, Sakai H, Mochida J. Evaluation of characteristics of chondrocyte sheets using co-culture method with allogeneic synovial cells. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.01, Long Beach
- 9) Toshihiro N, Sato M, Kutsuna T, Itoh S, Kokubo M, Mochida J. Repair of articular cartilage with anti-VEGF antibody bevacizumab. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2011.01, Long Beach
- 10) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 海老原吾郎, 伊藤聡, 小久保舞美, 鶴養拓, 持田讓治. 血管新生阻害剤 (Bevacizumab) 静脈内投与による関節軟骨修復の検討. 第 10 回日本再製医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京
- 11) 浜橋恒介, 佐藤正人, 小久保舞美, 三谷玄弥, 長井敏洋, 海老原吾郎, 杓名