

T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J : Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* 33(15), 3846-3851, 2012.

3.学会発表

- 1) 石原美弥, 佐藤正人, 持田譲治, 菊地眞 : レーザーによる軟骨の多角的評価システムの開発. 第48回日本生体医工学会大会, 2009.04.
- 2) 小久保舞美, 佐藤正人, 太田直司, 坂井秀明, 持田譲治 : 滑膜細胞との共培養法を用いた短期間での軟骨細胞シートの作製とその特性評価. 第53回日本リウマチ学会, 2009.04.
- 3) 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 丑田公規, 持田譲治 : クラゲ由来ムチンの関節軟骨に対する影響の検討. 第53回日本リウマチ学会, 2009.04.
- 4) 古川克子, 沓名寿治, 長井敏洋, 佐藤正人, 持田譲治, 牛田多加志 : 旋回培養によるスキャフォールドフリー再生軟骨の構築. 第48回日本生体医工学会大会, 2009.04.
- 5) Nagai T, Sato M, Furukawa SK, Ushida T, Mochida J : Repair of articular cartilage with scaffold-free chondrocyte plates. 8th world congress of the international cartilage repair society, 2009.05.
- 6) 番作勲, 石原美弥, 菊地眞, 佐藤正人, 持田譲治 : 変形性関節症診断用の光音響プローブの改良. 第84回日本医療機器学会大会, 2009.05.
- 7) 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 菊地眞 : 【シンポジウム】光による

関節軟骨の力学特性と性状評価. 第82回日本整形外科学会学術総会, 2009.05.

- 8) 佐藤正人 : 【講演】関節軟骨再生の最新知見—クラゲ由来ムチンと細胞シートによる軟骨再生—, 第8回国際バイオ EXPO, 2009.07.
- 9) 佐藤正人 : 【教育研修講習】変形性膝関節症の保存療法の実際とその限界. 千葉県臨床整形外科医会, 2009.08.
- 10) Ishihara M, Bansaku I, Sato M, Mochida J, Kikuchi M : Multifunctional characterization of engineered cartilage using nano-pulsed laser. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2009.09.
- 11) 佐藤正人 : 【教育研修講演】関節軟骨再生 up to date. 第7回並木整形外科セミナー, 2009.09.
- 12) 李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田譲治 : 【ASIA NOW】関節軟骨修復再生をめざした軟骨滑膜混合細胞体の開発. 第58回東日本整形災害外科学会, 2009.09.
- 13) 佐藤正人 : 【講演】クラゲから採取したムチンの関節治療への応用. イノベーション Japan 2009, 2009.09.
- 14) 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 菊地眞 : 【シンポジウム】光を用いた関節軟骨の機能評価法. 第36回日本臨床バイオメカニクス学会, 2009.10.
- 15) 佐藤正人 : 【教育研修講演】関節軟骨再生に関する研究—変形性関節症の克服を目指して—. 朝霞地区医師会整形外科医会, 2009.11.
- 16) 佐藤正人, 三谷玄弥, 沓名寿治, 長井敏洋, 海老原吾郎, 太田直司, 小久保舞美, 石原美弥, 古川克子, 牛田多加志, 持田譲

治：【シンポジウム】関節軟骨の修復・再生における組織工学的軟骨（軟骨細胞シート/プレート）の役割. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

17) 杓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治：時間分解自家蛍光スペクトル分析による scaffold free 組織工学的軟骨の非侵襲的性状評価. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

18) 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 内山善康, 繁田明義, 杓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 持田讓治：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. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

19) 李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 持田讓治：滑膜細胞と軟骨細胞からなる細胞移植体の作製と評価. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

20) 石原美弥, 佐藤正人, 三谷玄弥, 杓名寿治, 持田讓治, 菊地眞：光技術を用いた軟骨変性・再生の評価法の開発. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

21) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 小久保舞美, 持田讓治：抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体 (Bevacizumab)による軟骨修復効果. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

22) 太田直司, 佐藤正人, 小久保舞美, 馬場崇行, 谷口佳代子, 浦井誠, 丑田公規, 持田讓治：クラゲムチンの関節軟骨に対する影響の検討. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009.11.

23) 番作勲, 石原美弥, 大森努, 佐藤正人,

持田讓治, 菊地眞：高分子圧電フィルムを用いた光音響プローブの改良. 第30回日本レーザー医学会総会, 2009.11.

24) 石原美弥, 佐藤正人, 番作勲, 三谷玄弥, 杓名寿治, 持田讓治, 菊地眞：光音響原理に基づく軟骨変性診断法の開発:原理実証から臨床研究まで. 第30回日本レーザー医学会総会, 2009.11.

25) 杓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治：ナノ秒パルスレーザーによる Scaffold Free 組織工学的軟骨の非侵襲的性状評価. 第30回日本レーザー医学会総会, 2009.11.

26) Ishihara M, Sato M, Matsumura K, Toguchida J, Mochida J, Kikuchi M：【シンポジウム】 Development of the hyperspectral cellular imaging system to apply to regenerative medicine. SPIE West Bios 2010, 2010.01.

27) 佐藤正人：【教育研修講演】関節軟骨再生の最新知見-変形性関節症の克服を目指して-。葛飾臨床整形外科医会, 2010.02.

28) 小久保舞美, 佐藤正人, 三谷玄弥, 内山善康, 繁田明義, 杓名寿治, 太田直司, 海老原吾郎, 持田讓治：同種異関節由来細胞間共培養法を用いた軟骨細胞シートの作製とその特性. 第9回再生医療学会, 2010.03.

29) 李禎翼, 伊藤聡, 小久保舞美, 三谷玄弥, 佐藤正人, 持田讓治：自家軟骨細胞移植法における軟骨細胞と滑膜細胞からなる混合細胞スフェロイドの開発. 第9回日本再生医療学会, 2010.03.

30) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 海老原吾郎, 太田直司, 持田讓治：抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体 (Bevacizumab)

による関節軟骨修復効果. 第 9 回日本再生医療学会, 2010.03.

31) 海老原吾郎, 佐藤正人, 三谷玄弥, 太田直司, 長井敏洋, 沓名寿治, 持田譲治: 積層化軟骨細胞シートの液性因子の解析. 第 9 回日本再生医療学会, 2010.03.

32) 古川克子, 長井敏洋, 沓名寿治, 佐藤正人, 持田譲治, 牛田多加志: BMP2 と物理刺激による scaffold-free 再生軟骨の構築. 第 9 回日本再生医療学会, 2010.03.

33) Kutsuna T, Sato M, Ishihara M, Furukawa K, Nagai T, Ushida T, Mochida J: Noninvasive evaluation of tissue engineered cartilage with time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. 56rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010.03.

34) Ohta N, Sato M, Ushida K, Kokubo M, Baba T, Taniguchi K, Urai M, Kihira K, Mochida J: Jellyfish mucin may have potential disease modifying effects of osteoarthritis of the knee. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010.03.

35) Kokubo M, Sato M, Mitani G, Kutsuna T, Ohta N, Ebihara G, Sakai H, Mochida J: Evaluation of characteristics of chondrocyte sheet constructed of cultured chondrocytes using co-culture method with synovial cells. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2010.03.

36) Nagai T, Sato M, Kutsuna T, Ebihara G, Mochida J: Intravenous administration of Bevacizumab may contribute to better repair of articular

cartilage. 56th Orthopedic Research Society, 2010.03.

37) 小久保舞美, 佐藤正人, 持田譲治: 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, 神戸, 2010.03.

38) 佐藤正人, 太田直司, 馬場崇行, 木平孝治, 丑田公規, 持田譲治: 【シンポジウム】クラゲ由来ムチンを用いた関節治療の可能性. 第 62 回日本細胞生物学会, 大阪, 2010.05.

39) 三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 金城永俊, 宿南知佐, 持田譲治: ヒト膝関節内組織における Tenomodlin, Scleraxis の発現状況. 第 2 回日本関節鏡, 膝, スポーツ整形外科学会 (2nd JOSKAS), 沖縄, 2010.07.

40) 長井敏洋, 佐藤正人, 古川克子, 沓名寿治, 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, 持田譲治: 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.

41) 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, 沓名寿治, 持田譲治: 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基礎学術集会, 京都, 2010.10.

42) 佐藤正人, 石原美弥, 三谷玄弥, 沓名寿治, 芹ヶ野健司, 菊地眞, 持田譲治: 【シンポジウム】ナノ秒パルスレーザーによる関節軟骨の機能評価. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

43) 李禎翼, 佐藤正人, 三谷玄弥, 伊藤聡, 小久保舞美, 持田譲治: 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.

44) 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基礎学術集会, 京都, 2010.10.

45) 伊藤聡, 佐藤正人, 太田直司, 馬場崇行, 木平孝治, 持田讓治: クラゲ由来ムチンとヒアルロン酸の相互作用に関する研究第 1 報. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

46) 三谷玄弥, 佐藤正人, 小久保舞美, 宿南知佐, 持田讓治: ヒト膝関節内組織における Tenomodlin, Scleraxis の発現状況. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

47) 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基礎学術集会, 京都, 2010.10.

48) 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) による骨軟骨修復効果の検討. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

49) 杓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治: 旋回培養法における至適旋回数について時間分解自家蛍光スペクトル測定 (TR-LIFS) による評価. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2010.10.

50) 石原美弥, 佐藤正人, 谷川待子, 松村耕治, 持田讓治, 菊地眞: 軟骨細胞シート評価のためのハイパースペクトル顕微鏡システムの構築. 第 25 回日本整形外科学会基礎

学術集会, 京都, 2010.10.

51) 高久裕子, 村井邦彦, 村上孝, 佐藤正人, 持田讓治: 軟骨再生医療研究における Bioluminescence Imaging の有用性. 第 31 回日本レーザー医学会総会, 愛知, 2010.11.

52) 石原美弥, 佐藤正人, 杓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治, 菊地眞: 【シンポジウム】光音響計測技術の軟骨再生医療への可能性と展開. 第 31 回日本レーザー医学会総会, 愛知, 2010.11.

53) 杓名寿治, 佐藤正人, 石原美弥, 古川克子, 長井敏洋, 牛田多加志, 菊地眞, 持田讓治: 時間分解自家蛍光スペクトル分析による Scaffold Free 組織工学的軟骨の非侵襲的性状評価. 第 31 回日本レーザー医学会総会, 愛知, 2010.11.

54) Sato M: 【特別講演】 Chondrocyte sheet for articular cartilage regeneration. The 4th International Cell Therapy Symposium. Seoul, Korea, 2010.11.

55) 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.

56) 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 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.

57) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 海老原吾郎, 持田讓治: 血管新生阻害薬 (Bevacizumab) 静脈内投与による関節軟骨修復の検討. 第 10 回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.

58) 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.

59) 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鵜養拓, 長井敏洋, 三谷玄弥, 持田讓治: 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. 第10回日本再生医療学会総会, 東京, 2011.03.

60) 佐藤正人, 持田讓治: 【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨治療—臨床応用を目指した取り組み—. 第24回軟骨代謝学会, 福岡, 2011.03.

61) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田讓治, 松岡厚子: *in vitro*における培養軟骨細胞の免疫反応におよぼす影響. 第24回軟骨代謝学会, 福岡, 2011.03.

62) 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 繁田明義, 伊藤聡, 鵜養拓, 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.

63) 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.

64) 鵜養拓, 佐藤正人, 阿久津英憲, 田中麻衣子, 持田讓治: マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析. 第24回軟骨代謝学会, 福岡, 2011.03.

65) Mitani G, Sato M, Kokubo M, Nakamura Y, Mochida J: Investigation of cell sheets derived from anterior cruciate ligaments for tissue engineering. The 3rd Combined Meeting of the Japanese and

American Orthopaedic Societies for Sports Medicine, 2011.03.

66) 佐藤正人: 【教育研修講演】関節治療の現状と軟骨再生医療への期待. 神奈川県臨床整形外科医会, 横浜, 2011.06.

67) 佐藤正人: 【教育研修講演】変形性膝関節症に有効な治療薬 - クラゲ由来ムチンとヒアルロン酸を中心に -. 第24回日本臨床整形外科学会学術集会, 長崎, 2011.07.

68) 佐藤正人: 細胞シートによる軟骨再生医療を目指して. JSPS「再生医療の実用化」に関する研究開発専門委員シンポジウム「オールジャパンで目指す再生医療実用化」, 東京, 2011.07.

69) 佐藤正人: 【ランチョンセミナー】ヒト幹細胞臨床研究への取り組み方 - 軟骨細胞シートの事例から -. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

70) 佐藤正人, 三谷玄弥, 金城永俊, 長井敏洋, 杓名寿治, 高垣智紀, 伊藤聡, 鵜養拓, 小久保舞美, 持田讓治: 細胞シートによる関節治療を目指したトランスレーショナルリサーチ. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

71) 長井敏洋, 佐藤正人, 杓名寿治, 伊藤聡, 鵜養拓, 持田讓治: ウサギ膝関節前十字靭帯切離モデルを用いた抗VEGFヒト化モノクローナル抗体投与による軟骨変性予防効果の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

72) 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鵜養拓, 長井敏洋, 杓名寿治, 三谷玄弥, 持田讓治: 積層化軟骨細胞シートと培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.

73) 佐藤正人: 【特別講演】変形性膝関節症

の診断と治療の進展開. 第 11 回湘南西部リウマチ性疾患症例検討会, 神奈川, 2011.11.

74) Nagai T, Sato M, Ukai T, Kobayashi M, Mochida J : Prevention of osteoarthritis by administration of anti-VEGF antibody Bevacizumab. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, 2012.02.

75) Ukai T, Sato M, Akutsu H, Umezawa A, Nagai T, Kokubo M, Mochida J : Analysis of functions of miR-199a-3p and miR-320c in chondrocytes. 2012 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, California, USA, 2012.02.

76) 小林美由希, 佐藤正人, 小久保舞美, 河毛知子, 鶴養拓, 伊藤聡, 長井敏洋, 持田讓治 : CGH (Comparative Genomic Hybridization)を用いた培養軟骨細胞の安全性評価. 第 25 回日本軟骨代謝学会, 愛知, 2012.03.

77) 佐藤正人 : 【シンポジウム】細胞シートによる関節軟骨再生医療. 第 3 回スーパー特区シンポジウム「細胞シートによる再生医療実現プロジェクト」, 東京, 2012.03.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許

1) 出願人: 株式会社セルシード, 学校法人東海大学, 発明者: 佐藤正人, 坂井秀昭, 発明の名称: 培養細胞シート、製造方法及びその利用方法, 出願番号: 特許出願 2011-175368, 出願日: 2011.7.25, 公開番号: 特許公開 2011-224398, 公開日: 2011.11.10.

2) 出願人: 学校法人明治大学, 学校法人東海大学, 株式会社バイオベルテ, 発明者: 長嶋比呂志, 佐藤正人 外 4 名, 発明の名称: 凍結細胞シートの製造方法, 出願番号: 特許出願 2011-260318, 出願日: 2011.11.29.

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

資料：分担研究報告

ミニブタ関節軟骨損傷モデルを用いた 軟骨細胞シートの修復再生効果

研究分担者 海老原 吾郎 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教
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
長井 敏洋 東海大学医学部外科学系整形外科学・助教

研究要旨：関節軟骨はⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンからなる豊富な細胞外基質が特徴であり潤滑性や荷重時の負担吸収など関節機能に重要な役割を担っている。しかし、栄養血管を保有しておらずまた細胞密度も低いことから自己修復能力に乏しい組織であるため、軟骨変性を確実に抑制し、修復する治療法は未だ確立されていない。軟骨損傷に対する治療は、軟骨細胞移植術、モザイク形成術、**microfracture** 法などがその代表であるが、近年の組織再生工学の進歩とともに様々な細胞移植による関節軟骨欠損修復法が研究されている。そこで我々は温度応答性培養皿をもちいて積層化軟骨細胞シートを作製し軟骨損傷の修復再生に関する基礎的研究を行ってきた。そして家兎関節軟骨部分損傷を用いた研究で、表層部のみを積層化軟骨細胞シートで覆うことにより、良好な組織修復をもたらすことを報告した。本研究では大型動物であるミニブタ関節軟骨全層欠損モデルを用いて関節軟骨の修復再生効果を検討し、さらに組織修復には細胞シートが産生する液性因子も寄与していると推測し、その解析を行ったので報告する。ミニブタ関節軟骨全層欠損モデルの積層化細胞シート移植群では組織学的に **safranin-o** の染色性及び、周辺組織との **integration** も良好であり、十分な軟骨組織の修復、再生が得られていた。しかし、一部の症例で家兎での実験時には見られなかったような、**safranin-o** の染色性が乏しい組織で修復される現象を見出し、それらの軟骨下骨の修復状況はいずれも不良であった。

これらの結果から積層化軟骨細胞シートは関節軟骨修復に寄与すると考えられるが、動物実験モデル、培養条件、移植条件等はさらなる検討を要する。

また、積層化細胞シートの産生する液性因子は軟骨の分化や組織修復に関与する **COL2**、**MIA**、**TGF- β** の分泌が上昇し、**MMP-13** は **0.05ng/ml** 以下と常に抑制されていることを確認した。

これらの結果から軟骨組織修復・再生には積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子との相互作用が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

変形性関節症は軟骨変性を基盤とする運動器疾患であり高齢化社会を迎えるにあたり解決すべき問題である。関節軟骨はⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンからなる豊富な細胞外基質が特徴であり潤滑性や荷重時の負担吸収など関節機能に重要な役割を担っている。しかし、栄養血管を保有しておらずまた細胞密度も低いことから自己修

復能力に乏しい組織であるため、軟骨変性を確実に抑制し、修復する治療法は未だ確立されていない。

関節軟骨損傷に対しては、軟骨細胞移植術 (Brittberg et al., 1994)、モザイク形成術 (Matsusue et al., 1993)、**microfracture** 法 (Steadman et al., 1999)等が行われており比較的安定した治療成績が報告されている。しかし、一方で治療成績不良例に関

する報告も散見されている (Minas and Peterson., 1999; Peterson et al., 2002; Henderson et al., 2003; Marlovits et al., 2004; Ochi et al., 2002)。

軟骨細胞移植術は、1994年に Brittborg と Peterson ら (Brittborg et al., 1994) により報告され、全世界で既に 2 万例以上に行われているが、本手術手技の問題点は、1 か所の傷を治すために軟骨採取部と骨膜採取部の 2 か所を犠牲にする事、骨膜の過形成や周辺組織との適合性等の問題も報告されている (Ochi et al., 2002)。

また、モザイク形成術では健全部軟骨を使用するため採取可能なドナーの数に限界がある事、採取部の障害に関する長期経過観察の必要性などの問題点が指摘され (Matsusue et al., 1993)、さらにマクロフラクチャー法では再生される組織は主に硝子軟骨に比べて力学的強度の弱い線維軟骨であることが報告されている (Gilbert., 1998)。

近年、温度応答性培養皿を用いた再生医療の研究は多方面で報告されており、血管上皮細胞、角膜細胞、肝細胞、腎細胞や心筋細胞などがその代表である。なかでも心筋細胞や角膜細胞シートは既に臨床応用もされている (Nishida et al., 2004)。

そこで 我々は、スキャフォールドを用いずに、短期間の培養で作製でき、接着性に富む積層化軟骨細胞シートを温度応答性培養皿を用いて作製し (図 1a,b)、積層化軟骨細胞シート移植による関節軟骨の変性抑制効果を報告してきた (Kaneshiro et al.,

2006; Sato et al., 2008; Mitani et al., 2009)。

本研究では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した。これは、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。さらにそれら細胞シートは軟骨細胞の正常な phenotype を維持する事、proteoglycan の流出や catabolic factors の流入を防御していることを家兎を用いた実験で報告している (Kaneshiro et al., 2006)。

そこで大型動物であるミニブタ関節軟骨全層欠損モデルを用いて、積層化軟骨細胞シートの組織修復再生効果を検討し、さらに組織修復には細胞シートが産生する液性因子も寄与していると推測し、その解析を行ったので報告する。

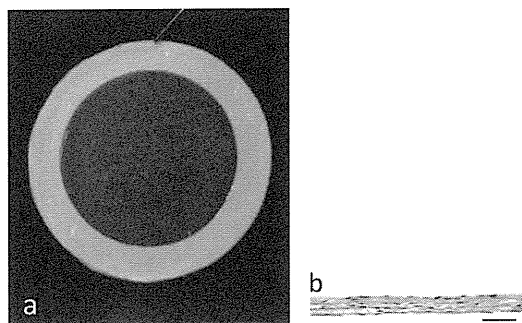


図 1

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)の作製方法を簡潔に述べると IPAAm モノマー溶液を培養皿に塗布後、直ちに電子線を照射して表面に N-イソプロピルアクリルアミドポリマー(PIPAAm)を固定化する。照射後、冷蒸留水で培養皿を洗浄し、残存モノマーおよび培養皿に結合していない PIPAAm を取り除き、ethylene oxide gas を用いて消毒する。

軟骨細胞の採取方法と分離、培養方法

5 頭の子ブタ（月齢 7-8 か月、体重 21.3-21.5kg）の膝関節の大腿側より軟骨細胞を採取した。採取した軟骨細胞は佐藤らの方法により 0.4% Pronase E(Kakenseiyaku Inc.)を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 (D-MEM/F12; Gibco, NY, USA) に 1 時間、5mg/ml collagenase type 1/CLS1 (Worthington Inc., Lake wood, NJ)を含んだ DMEM/F12 に 4 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) と 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA) , 50μg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou Corp., Japan)を加えたもので 1 週間維持した。その後、軟骨細胞(50,000 cells/cm²)を温度応答性培養皿 (Size: 4.2cm² , provided by CellSeed, Tokyo, Japan) に播種し、軟骨細胞が confluence に達したら 25 度の環境下で 30 分おき、金城らの報告に準じてシートを採取した。

軟骨細胞増殖能

前述した方法で単離培養した軟骨細胞 (3.0 × 10⁴ cells) を 24 well plate 上で培養し、MTT assay を用いて吸光度を培養 3, 5, 7 日目に測定した。

軟骨細胞シートの移植方法

移植前に 0.2 mg/kg dormicum (Midazolam 5 mg/1 ml, Astellas Pharma, Tokyo, Japan) と 40 μg/kg medetomidine (Domitor 1 mg/ml, Meiji Seika Pharma Co., Ltd, Tokyo, Japan) を筋肉注射し、吸入麻酔には isoflurane, dinitrogen monoxide, oxygen を用いた。

12 頭の子ブタの左膝を移植群、右膝をコントロール群とした。両群とも Biopsy punch を用いて両側膝関節の大腿骨内顆非

荷重部に直径 6mm、深さ 5mm の軟骨欠損を作製し、左膝にのみ積層化軟骨細胞シートを移植した。軟骨組織の採取は 3 週間後に行い 4% PFA で 1 週間固定し、K-CX Decalcifying Solution (Fujisawa Pharmaceutical, Japan) で 1 週間かけて脱灰した。標本はパラフィンに埋め込み断面を safranin-o 染色した。

軟骨の組織学的評価として ICRS grading system 及び軟骨下骨の評価として ICRS remodeling system を用いた。

(表 1)

Variable	Comment	Variable	Comment	Variable	Comment
T1: Tissue morphology		Bfsm: Subchondral bone formation		Hg10t: Histologic grading system	
4 = Mostly hyaline cartilage		1 = No formation		Some of the histologic variables:	
3 = Mostly fibrocartilage		2 = Slight		tissue morphology (T1), matrix	
2 = Mostly noncartilage		3 = Strong		staining (Mtx), structural integrity (Strs),	
1 = Exclusively noncartilage				cluster formation (Clus), interlock	
Matx: Matrix staining		Surf1: Histologic appraisal of surface architecture		opening (Ild), bone formation (Bfsm),	
1 = None		1 = Severe fibrillation or disruption		histologic surface architecture (Surf1),	
2 = Slight		2 = Moderate fibrillation or irregularity		histologic degree of defect filling (F1ff),	
3 = Moderate		3 = Slight fibrillation or irregularity		lateral integration of defect-filling tissue	
4 = Strong		4 = Normal		(Lat), basal integration of defect-filling	
Strs: Structural integrity		F1ff: Histologic appraisal defect filling		tissue (Bas) and histologic signs of	
1 = Severe disintegration		1 = <25%		inflammation (Infl)	
2 = Cysts or disruptions		2 = 26-50%			
3 = No organization of chondrocytes		3 = 51-75%		Remod: Subchondral bone remodeling	
4 = Beginning of columnar organization of chondrocytes		4 = 76-90%		(loosely textured highly cellular tissue composed of mostly fibroblasts)	
5 = Normal, similar to healthy mature cartilage		5 = 91-100%		1 = No remodeling	
Clus: Chondrocyte clustering in implant		Lat: Lateral integration of implanted material		2 = Discrete cellularity	
1 = 25-100% of cells clustered		1 = Not bonded		3 = Moderate cellularity	
2 = <25% of the cells clustered		2 = Bonded at one end/partially both ends		4 = High cellularity	
3 = No clusters		3 = Bonded at both sides			
T1cd: Intactness of calcified cartilage layer/formation of tidemark		Bas: Basal integration of implanted material			
1 = <25% of the calcified cartilage layer intact		1 = <50%			
2 = 25-49% of the calcified cartilage layer intact		2 = 50-70%			
3 = 50-75% of the calcified cartilage layer intact		3 = 70-90%			
4 = 76-90% of the calcified cartilage layer intact		4 = 91-100%			
5 = Complete intactness of the calcified cartilage layer		Infl: Inflammation			
		1 = No inflammation			
		3 = Slight inflammation			
		5 = Strong inflammation			

表 1

組織学的評価は Mann-Whitney U test を用い、P<0.05 を有意差ありとした。

ヒト軟骨細胞と滑膜細胞の分離と培養

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人工膝関節置換術を行った 4 例、4 膝（女性 3 例、男性 1 例、66-81 歳）で、手術時に採取した軟骨細胞と滑膜細胞を単離後継代し、P0、P1 の細胞を使用した。

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 下でインキュベーターし、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 (Wakojunyakougou 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 日間の培養期間で継代し P1 サンプルを作製した。

細胞シートと、単層培養群の作製

各継代において単層細胞シート、積層化細胞シート、単層培養群を作製した。単層細胞シートはインサート用 6well Companion Plate, Notched for use with Cell Culture Insert (BD Falcon™)に滑膜細胞を 10,000cells/cm²、温度応答性インサート (4.2cm², CellSeed)に軟骨細胞を 50,000cells/cm² 播種し、インサートを介し

て14日間共培養を行った。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をインキュベーターから取り出して25℃で30分間放置し、金城ら報告に準じてシートを回収した。

積層化細胞シートはそれら細胞シートを3層に重ねて作製しシートの浮遊を抑えるために cell strainer(BD Falcon™)を積層化細胞シートの上に設置した。

単層培養群は culture dishes (150cm², BD Falcon™)に 10,000 cells/cm²で播種し sterile cell scraper で回収した。

液性因子の測定法

培地を DMEM / F12 (GIBCO) supplemented with 1% heat-inactivated FBS (GIBCO) and 1% antibiotic-antimycotic mixture (ABAM; 10,000U/ml penicillin G, 10,000µg/ml streptomycin sulfate, and 25µg/ml amphotericin B as Fungizone; GIBCO)にかえて7日間培養し、単層細胞シート群 (ML群)、積層化細胞シート群 (CL群)、および CL群と同細胞数で単層培養を行った群 (M群)を作製した。

各群n=6作製し培養上清を5日間経時的に同量採取し、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)にて Collagen type 1 (COL1)、Collagen type 2 (COL2)、Matrix metalloproteinase-13 (MMP13)、Melanoma inhibitory activity (MIA)、Transforming growth factor-β (TGF-β)の発現状況を比較検討した。測定に

はそれぞれ Human Collagen Typ I ELISA(ACBio, Kanagawa, Japan)、Collagen Type II ELISA(MDB, Zurich, Switzerland)、Activated MMP-13 ELISA (MDB)、MIA ELISA kit96wll Plate(Roche, Mannheim, Germany)、Human TGF-β ELISA kit(R&D, Minnesota, USA)を使用した。

統計学的検討は Tukey-Kramer 法を用い、P<0.05を有意差ありとした。

C. 結果

軟骨細胞シート

軟骨細胞シートは容易にかさねる事ができ3層化シートとして培養継続も可能で、培養3週後の積層化軟骨細胞シートでも形状が維持されている(図1)。これにより軟骨細胞本来の phenotype を維持した round grafts の作製が可能である。

軟骨細胞増殖能

図2に示すように MTT assay を用いて培養3, 5, 7日に測定した。軟骨細胞は培養5日目で約2.4倍に、7日目では約6倍にも増殖しており、良好な細胞増殖能を示していた。

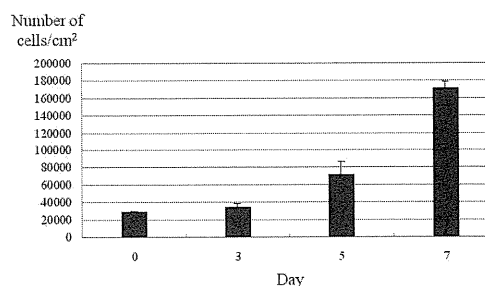


図2

肉眼所見

移植群、非移植群ともに明らかな感染症や手術施行部以外の関節損傷や滑膜増生の所見は見られなかった。欠損部はいずれも白色調の軟骨様組織で充填されていたが、非移植群では欠損部の充填は不十分であった。移植群では表面が平滑で軟骨様な、一見、正常軟骨と類似した色調の組織により置換されているが、非移植群では表面が粗な軟骨様組織により置換され、一部では軟骨下骨の露出も見られていた。（図 3a-d）

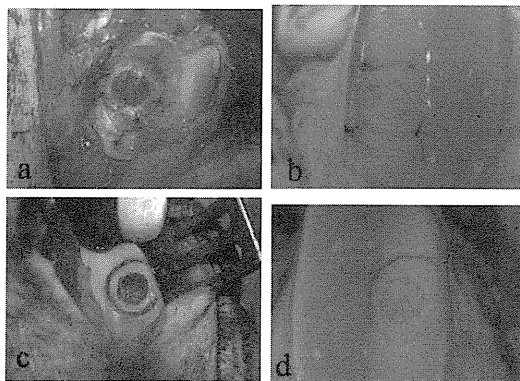


図 3

組織学的所見

移植群は組織学的に safranin-o の染色性及び、周辺組織との integration も良好であり、十分な軟骨組織の修復、再生が得られていると考えられた。一方で非移植群は全例で safranin-o の染色性も乏しく、組織学的にも修復、再生状況は不十分であった（図 4a,b）。

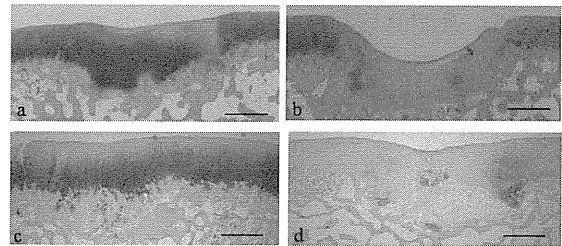


図 4

両群の ICRS(The International Cartilage Repair Society)の scoring を比較すると Histological grading system では移植群で平均 38.3 点、非移植群で 26.3 点であり、統計学的有意差を認めた。また、軟骨下骨の評価として remodeling score を算出すると、移植群で平均 3.2 点、非移植群で 2.4 点であり統計学的有意差を認めた（図 5a,b）。

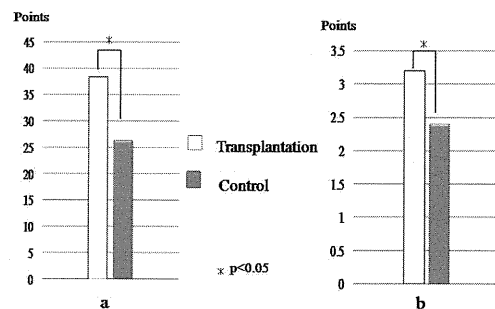


図 5

両群の ICRS score の詳細を表 2 に示す。

Case	Weight (kg)	Age (Month)	Transplantation		Control	
			Hgtot (Points)	Remod (Points)	Hgtot (Points)	Remod (Points)
1	21.6	7	42	4	28	3
2	23.5	7	40	4	22	2
3	24.2	7	40	4	28	3
4	22.9	7	42	4	30	3
5	24.1	8	41	4	26	2
6	24.0	8	40	3	31	3
7	23.0	8	39	3	24	2
8	25.0	8	39	3	24	2
9	24.0	8	39	3	24	2
10	23.0	8	33	2	33	3
11	23.8	8	29	2	23	2
12	21.5	8	35	2	22	2
Average	23.4	7.7	38.3	3.2	26.2	2.4

表 2

また、移植群においてさらに詳細に組織学的検討すると一部の例で組織の充填は認められるが、safranin-o の染色性に乏しく、その軟骨下骨の修復再生状況も不良な例が 12 例中 3 例で見られた (図 5a,b)。

ICRS scoring で比較すると、移植群で軟骨修復が得られた例 (Histological grading system 42 点) では軟骨下骨の修復状況も良好であった (remoderning score 4 点)。しかし、軟骨修復が不十分であった例 (Histological grading system 29 点) では軟骨下骨の修復状況も不十分であった (remoderning score 2 点)。

以上の結果から、軟骨組織修復状況と軟骨下骨の修復状況は同様の傾向を示した (図 4d)。

液性因子の評価

P0 では CL 群において Col-2、MIA、TGF- β の分泌は上昇しており培養 5 日目に優位に高値を示した。また、MMP-13 は 0.05ng/ml 以下と常に抑制されていた (表 3)。

一方、P1 においては CL 群で TGF- β は優位に高い値を示したが Col-2、MIA は経時的に低い値を示していた (表 4)。

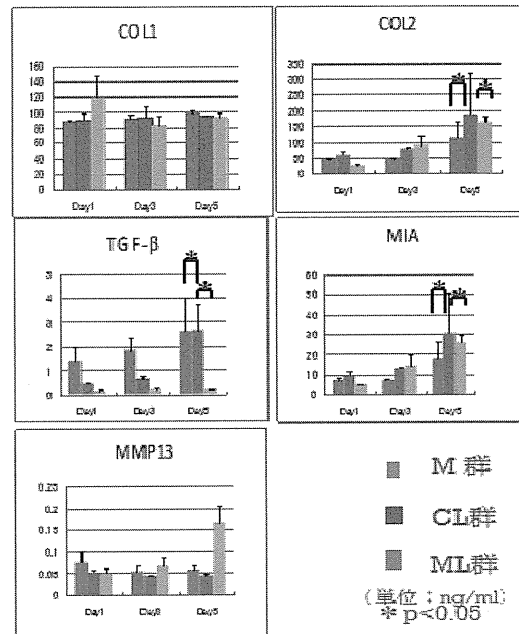


表 3:P0

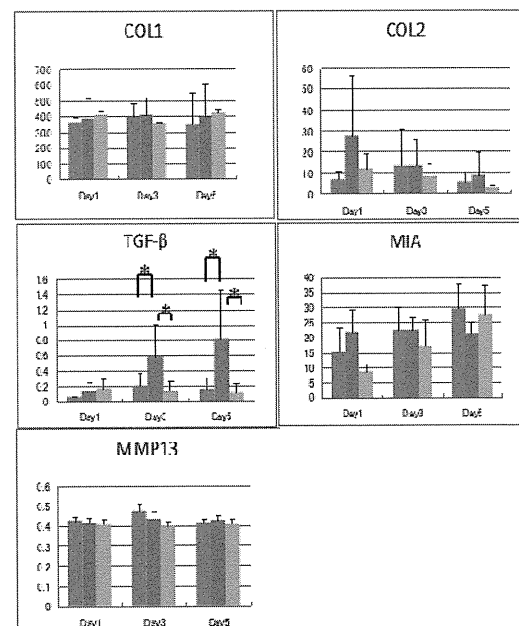


表 4:P1

D. 考察

関節軟骨損傷は変形性膝関節症、関節リ

ウマチ、離断性骨軟骨炎や外傷などにより発症し、高齢化社会の影響やスポーツ人口の増加により罹患者は増加の傾向にある。近年、組織再生工学の進歩とともに様々な細胞移植による関節軟骨欠損修復法が研究されている。軟骨細胞移植がその先駆けであり、すでに欧米で臨床応用されているが、細胞移植であるため浮遊液の状態に移植された軟骨細胞は移植部より漏出する可能性がある事、移植した細胞分布の均等性、ドナーサイトの問題や、臨床成績が *microfracture* 法と変わらないなどの報告 (Knutsen et al., 2004) があり、より有効な治療法の開発が求められている。そこで越智ら (Ochi et al., 2002) は軟骨細胞移植ではなく、軟骨細胞と基質とで三次元的に構築された軟骨様組織を移植するほうが有利と考え、アテロコラーゲンゲル包埋培養軟骨細胞移植を考案し、臨床応用している。また、脇谷ら (Wakitani et al., 2002) は骨髄間葉系細胞の多分化能に着目し、コラーゲンゲル包埋骨髄間葉系細胞移植を考案し、臨床応用している。しかし、いずれも骨膜、スキヤフォールド、骨髄由来細胞、培養軟骨細胞など多数の要素からなる複合体を形成しており、至適な関節軟骨再生のための環境構築は困難と考えられる。

そこで我々は、適切な関節軟骨再生のためには組織修復に適した環境構築こそが最重要と考え、スキヤフォールドも骨膜も用いずに、骨髄由来細胞と培養軟骨細胞からだけでの修復再生に関する基礎的研究を行ってきた。そして、積層化軟骨細胞シート

の遺伝子レベルで解析を行い、*aggrecan*, *collagen type II (COL 2)*, *SOX 9*, *COL27*, など軟骨細胞が保有している *phenotype* が維持され、細胞接着因子である *integrin α 10*, *fibronectin* の発現を確認し、さらに免疫染色において、細胞シート内に *COL2*, *integrin α 10*, *fibronectin* の存在を確認した (Mitani et al., 2009; Kaneshiro et al., 2007)。つまり、積層化軟骨細胞シートは *phenotype* を維持しつつ、優れた接着性とバリア機能も保持していると考えられた。さらに、家兎関節軟骨部分損傷を用いた研究では、表層部のみを積層化軟骨細胞シートで覆うことにより、良好な組織修復をもたらすことを報告してきた (Kaneshiro et al., 2006)。これらの結果は、積層化軟骨シートそのものの機能に加えて、細胞シートが産生する液性因子による効果と推察し解析を行なった。

その結果、細胞シートは多くの液性因子を産生しており、特に積層化細胞シートは P0 において軟骨の分化や組織修復に関与する *COL2*, *MIA*, *TGF- β* の分泌は優位に上昇し、*MMP-13* は 0.05ng/ml 以下と常に抑制されている事を確認した。

MIA は可溶性タンパク質で、悪性メラノーマ細胞と軟骨細胞から分泌され、*COL2* と同様に軟骨分化マーカーとして知られている。また、*TGF- β* は軟骨細胞を刺激して細胞外マトリックスの産生を促し、関節軟骨のホメオスタシスの維持と分裂に重要な役割を持ち、*IL-1* などのカタボリックサイトカインに拮抗する作用がある (E N

Blaney Davidson et al., 2006; Roman-Blas JA et al., 2007)。さらに我々は従来の単層培養と温度応答性培養皿を用いた積層化 3 次元培養との比較を関連因子数より Pathway 解析した結果、積層化 3 次元培養では TGF- β pathway がより活性化されている事を示した。これらの結果から積層化軟骨細胞シートそのものの機能に加えて、シートの産生する液性因子も軟骨を保護し、修復、再生に寄与している可能性が示唆された。

さらに今回、我々は大型動物であるミニブタ軟骨細胞を用いた研究で、培養軟骨細胞が良好な細胞増殖能を保有してことを見出し、その軟骨細胞から作製した積層化軟骨細胞シートがミニブタ関節軟骨全層欠損モデルにおいても、過去の報告と同様に、関節軟骨の修復再生に寄与する事を確認した。

しかし、一部の症例（12 例中 3 例）で家兎での実験時には見られなかったような、safranin-o の染色性が乏しい組織で修復される現象を見出し、それら修復不良群の軟骨下骨の修復状況はいずれも不良であった。Vasara ら(Vasara et al., 2004; 2006)はブタとヤギの膝関節軟骨全層欠損モデルを作製して軟骨細胞移植を行い、組織学的検討を行った結果、軟骨下骨の状態が不良であると、移植細胞の safranin-o の染色性が乏しく、周囲組織との integration も不十分であったと報告している。そこで Musehleman ら(Musehleman et al., 2009)はミニブタの膝関節全層欠損モデルを作製

して軟骨細胞移植を行い risedronate 投与群と非投与群を組織学的に比較検討した結果、投与群の方が優位に移植細胞の safranin-o の染色性が良好で、周囲組織との integration も十分得られたと報告しているが、大型動物では予想外の骨吸収反応が生じる場合があることを報告している。

本研究においても、軟骨下骨の修復不良例では積層化細胞シート移植群において、再生組織の safranin-o の染色性が乏しく、周囲組織との integration も不十分な例がみられており、今後も最適な移植条件を決める場合などで、大型動物モデルを用いる場合は、risedronate 投与を併用するなど、骨吸収抑制のための対策が必要かもしれない。

E. 結語

・積層化軟骨細胞シートは多くの液性因子を産生していた。軟骨組織修復・再生には積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子との相互作用が関与している可能性が示唆された。

・ミニブタ関節軟骨全層欠損モデルにおいて、積層化軟骨細胞シートが組織の修復・再生に寄与することを報告した。

・積層化軟骨細胞シート移植群において軟骨下骨の修復と再生組織の safranin-o の染色性が不良な例があり、移植条件等に関しては今後も検討を要する。

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. 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.
- 2) Ebihara G, Sato M, Yamamoto M, Kutsuna T, Nagai T, Ito S, Ukai T, Kobayashi M, Kokubo M, Okano T, Mochida J. Cartilage repair transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials.* 2012 May 33;15: 3846-3851.

2. 学会発表

- 1) 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巻8号, PageS1059[1-4-11], 2010
- 2) 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巻8号, PageS1062 [1-4-18], 2010

- 3) 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

4) 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

- 5) 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回日本再製医療学会総会, 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

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培養滑膜細胞移植による軟骨修復の検討

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	鷗養 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培養滑膜細胞による軟骨修復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。⁽¹⁾現在OAに対する治療として、骨穿孔術、⁽²⁻⁴⁾ mosaicplasty⁽⁵⁻⁷⁾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。⁽⁸⁾近年、自己軟骨細胞移植術も行われるようになってきた。⁽⁹⁻²³⁾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。⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾

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。⁽²⁴⁾

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。⁽²⁵⁾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サイドガスによって殺菌を行った。⁽²⁶⁾

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

ものの膝関節軟骨細胞、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。(27)

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% 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 (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% CO₂ と95% air 下で行った。軟骨細胞は温度応答性インサート(5.0cm² CellSeed, Tokyo, Japan)、滑膜細胞は温度応答性培養皿(9.6cm² CellSeed, Tokyo, Japan)に共に10,000cells/cm²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ラによって報告された方法で軟骨細胞シートは回収した。(28)

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O₂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 1.8×10^6 個を移植した群、B:積層化軟骨細胞シート 1.7×10^6 のみを移植した群、C:滑膜細胞 3.0×10^5 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 1.7×10^6 を移植した群、D:滑膜細胞 6.0×10^5 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 1.7×10^6 を移植した群、E:滑膜細胞 1.2×10^6 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 1.7×10^6 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。⁽²⁹⁾ 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。

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

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。⁽¹⁹⁾⁽³⁰⁾ 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℃で30分間処理した。切片をPBS(phosphate-buffered saline)で洗浄後、