

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℃に一晚置き、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⁽³¹⁾らが発表したものをmodifiedした International Cartilage Repair Society (ICRS) grading scale⁽²²⁾⁽⁴²⁾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日目には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、細胞周囲に一樣に発現していた。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, 8、Table1, 2に示す。移植術後4週でA群は 26.8 ± 3.8 、B群は 25.0 ± 6.2 、C群は 30.5 ± 3.8 、D群は 35.0 ± 4.2 、E群は 35.8 ± 3.8 、F群は 17.0 ± 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 ± 0.8 、B群は 31.8 ± 5.4 、C群は 32.3 ± 5.0 、D群は 38.8 ± 2.1 、E群は 40.8 ± 2.5 、F群は 23.3 ± 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。(9-23)

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。(25)(32)

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。(33)(34)(35)

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、家兔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。(24)

通常、骨軟骨欠損は骨髄由来の修復細胞を誘導する。(36)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。

(8)(37)

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、⁽³⁸⁾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。⁽³⁹⁾越智らはコラーゲンゲルを用いた培養自己軟骨細胞を $10^6/\text{ml}$ 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。⁽⁴⁰⁾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、⁽⁴¹⁾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、荷重に耐えう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 1.8×10^6 であり、B 群は 1.7×10^6 、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⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾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 6.0×10^5 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。今後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。

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. 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 scaffold-free 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, Huibregtse 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.

H. 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, 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, 沓

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, 沓名寿治, 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

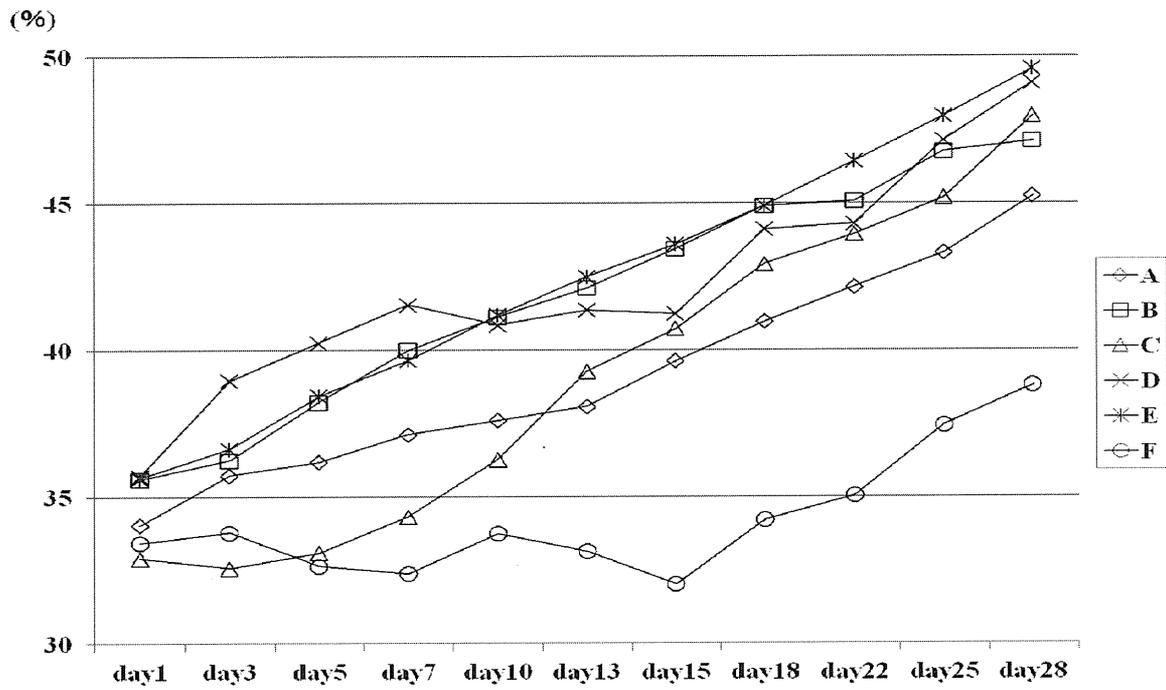
におけるクラゲ由来ムチンとヒアルロン
酸の相互作用の検討. 第24回軟骨代謝学
会, 2011年03月, 福岡

9) 長井敏洋, 佐藤正人, 沓名寿治, 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

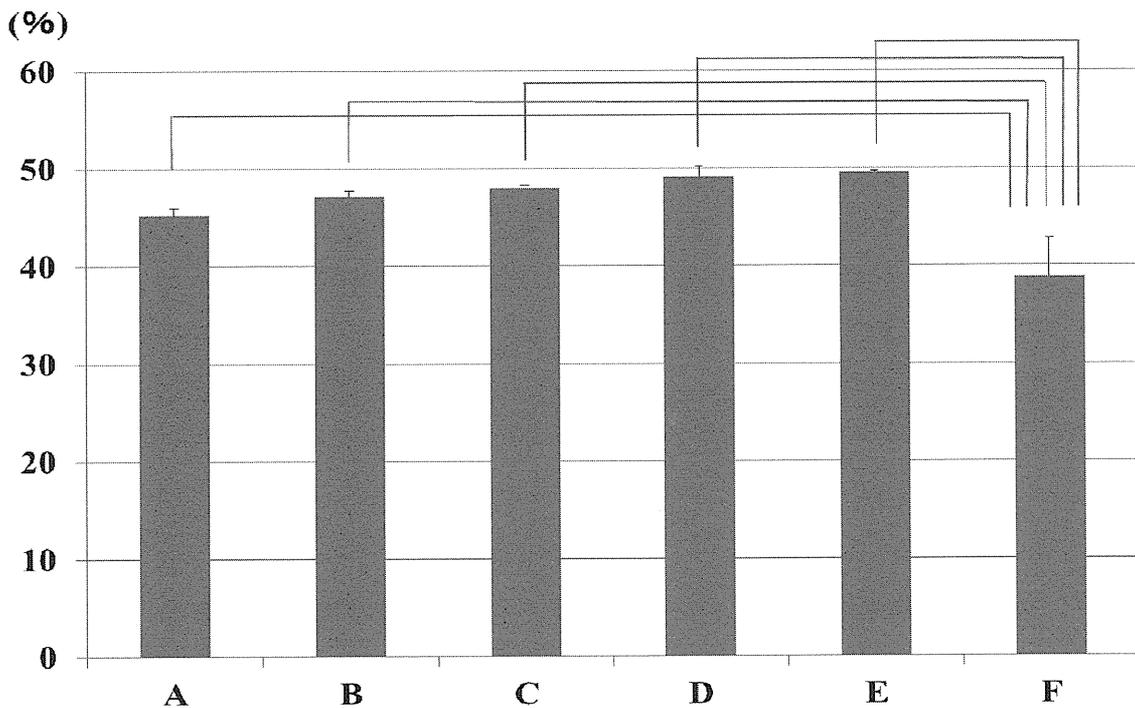
10) 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鶴
養拓, 長井敏洋, 三谷玄弥, 持田讓治. 積
層化軟骨細胞シートと培養滑膜細胞移植
による軟骨修復の検討. 第26回日本整形
外科学会基礎学術集会, 2011年10月, 群
馬

H. 知的財産権の出願・登録状況

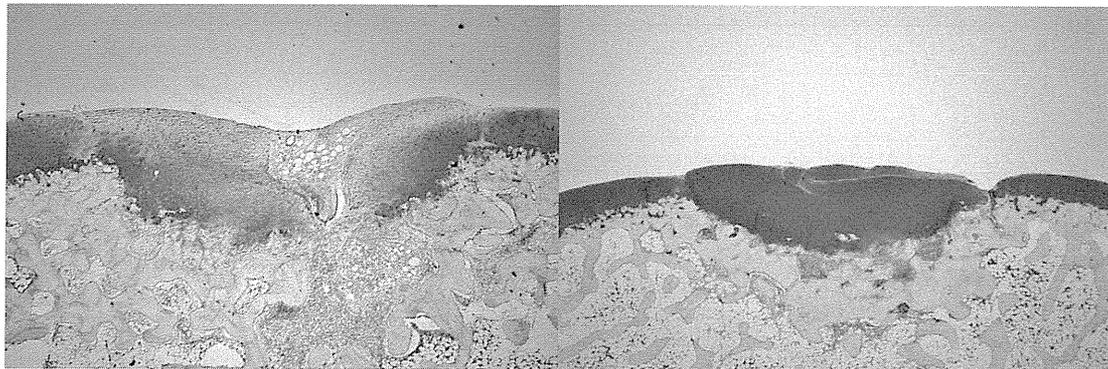
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



(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

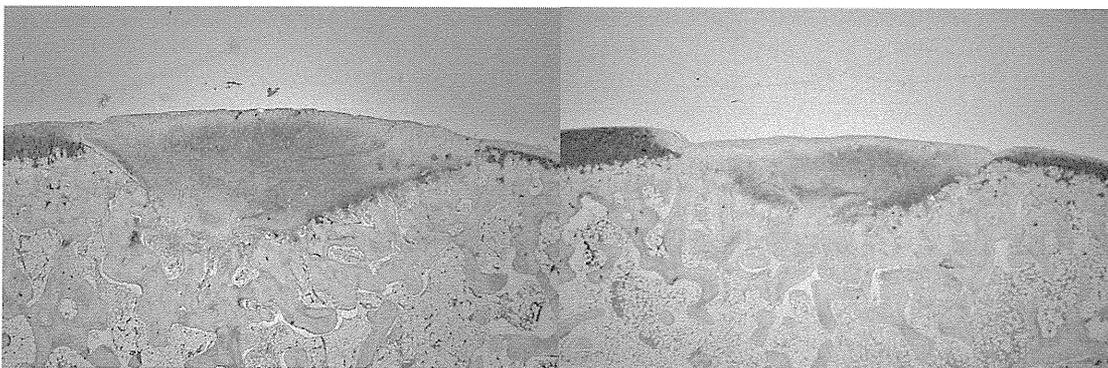


(Fig2) 術後28日目時点での患肢重量配分比 denotes significance ($P < 0.05$). VS defect



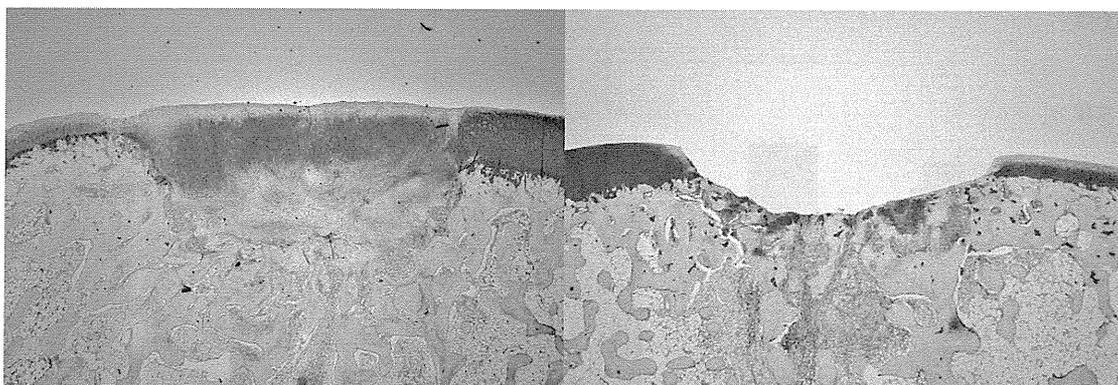
A : SY 1.8×10^6

B : AC 1.7×10^6



C : AC 1.7×10^6 + SY 3.0×10^5

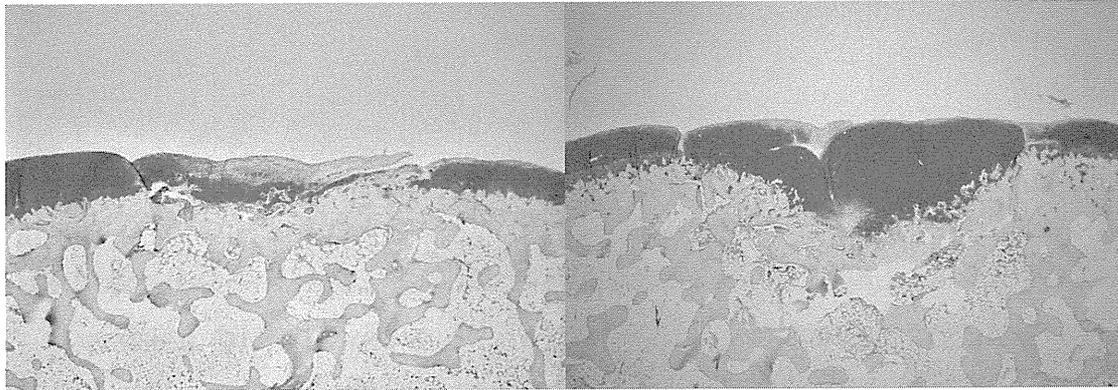
D : AC 1.7×10^6 + SY 6.0×10^5



E : AC 1.7×10^6 + SY 1.2×10^6

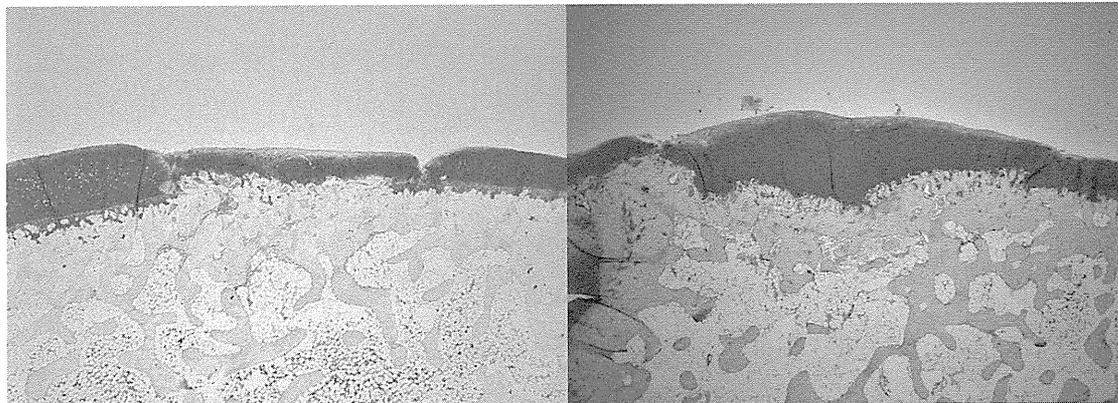
F : defect

(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



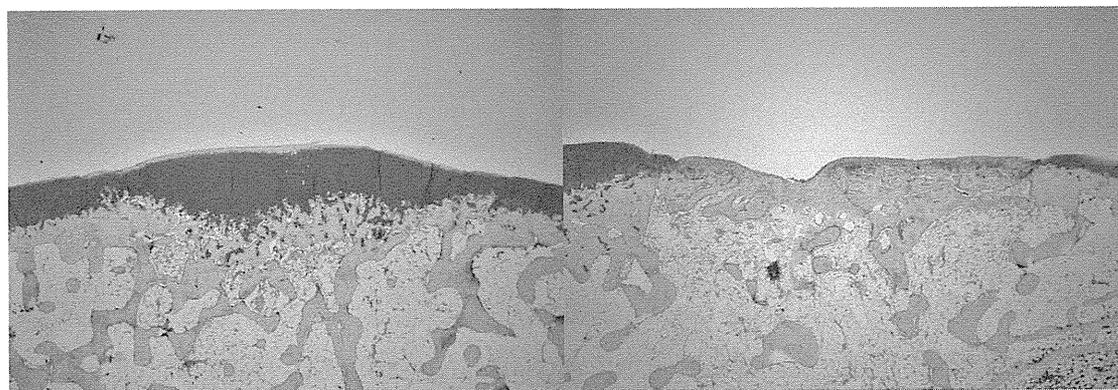
A : SY 1.8×10^6

B : AC 1.7×10^6



C : AC 1.7×10^6 + SY 3.0×10^5

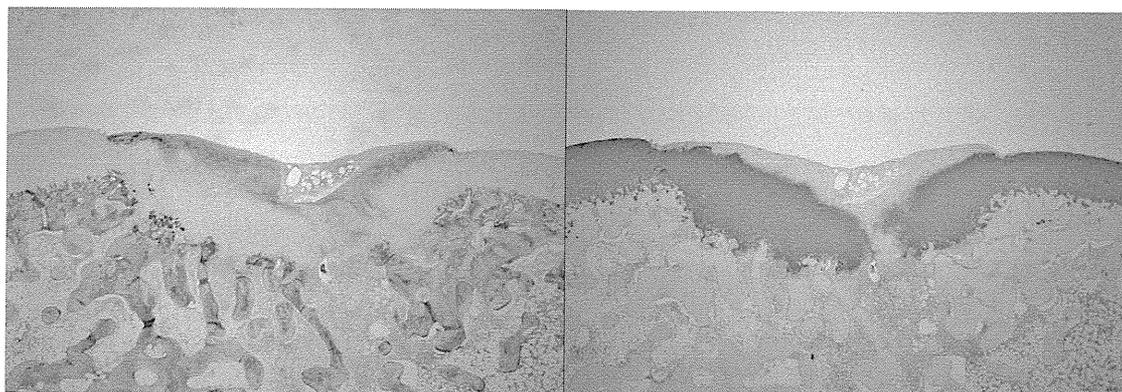
D : AC 1.7×10^6 + SY 6.0×10^5



E : AC 1.7×10^6 + SY 1.2×10^6

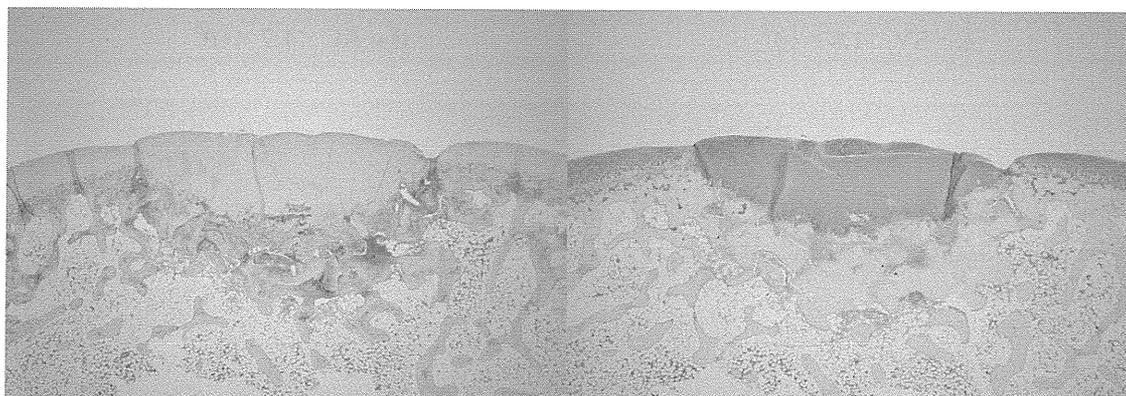
F : defect

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



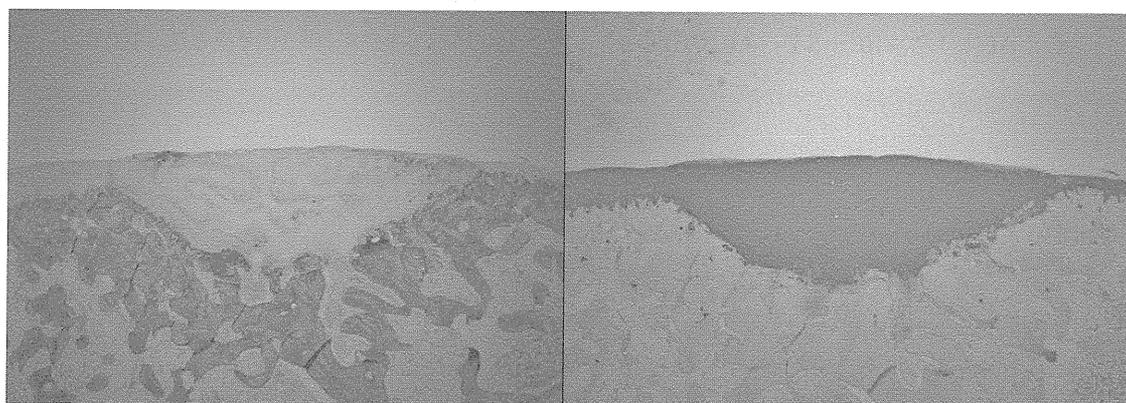
A : SY 1.8×10^6 (Col1)

A : SY 1.8×10^6 (Col2)



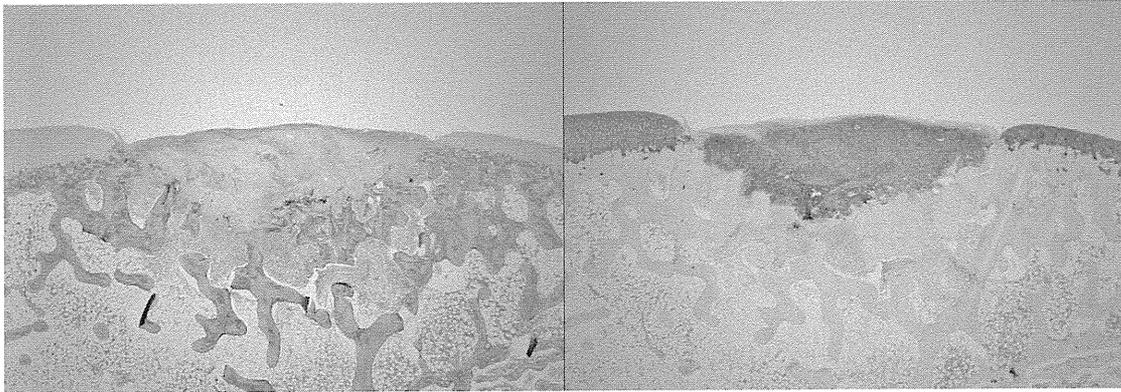
B : AC 1.7×10^6 (Col1)

B : AC 1.7×10^6 (Col2)



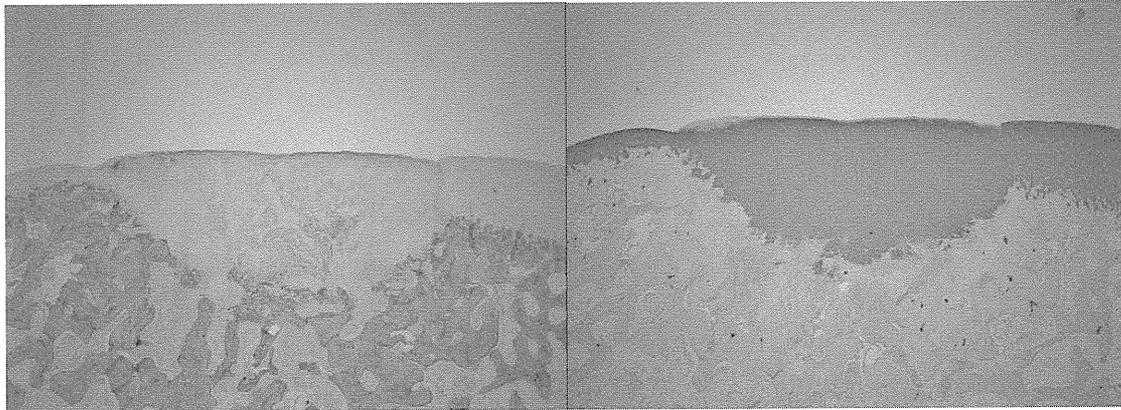
C : AC 1.7×10^6 + SY 3.0×10^5 (Col1)

C : AC 1.7×10^6 + SY 3.0×10^5 (Col2)



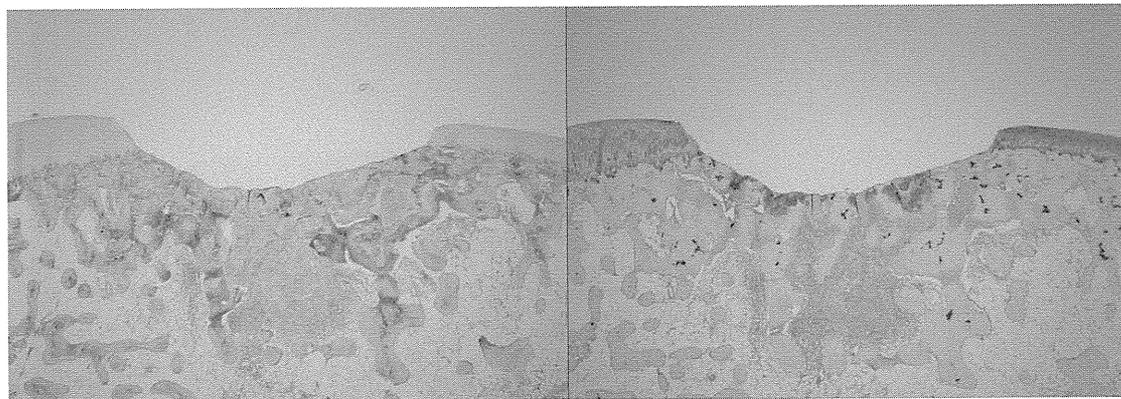
D : AC $1.7 \times 10^6 + SY$ 6.0×10^5 (Col1)

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



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

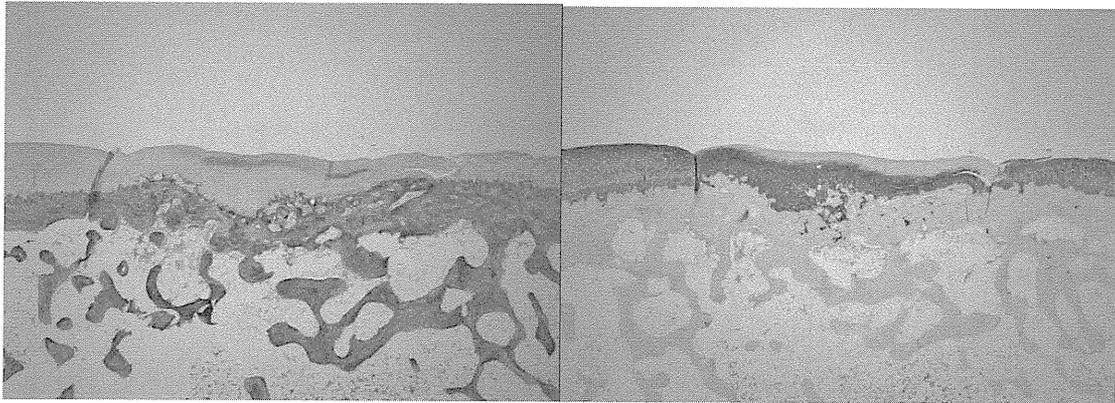
E : AC $1.7 \times 10^6 + SY$ 1.2×10^6 (Col2)



F : defect (Col1)

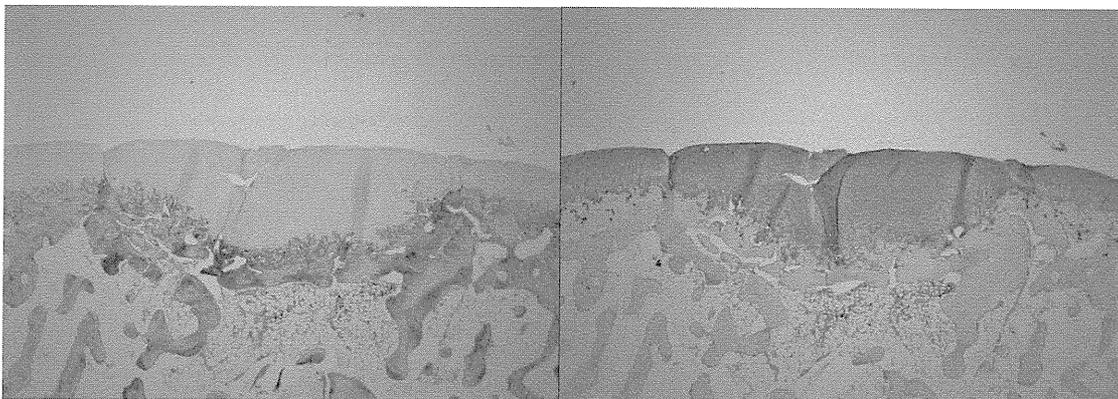
F : defect (Col2)

(Fig5) 移植手術後 4 週、免疫染色を行った修復組織像



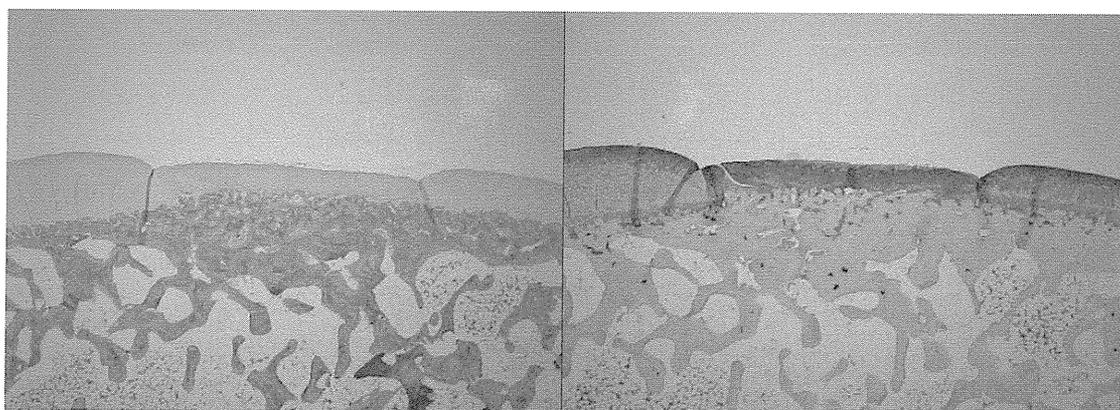
A : SY 1.8×10^6 (Col1)

A : SY 1.8×10^6 (Col2)



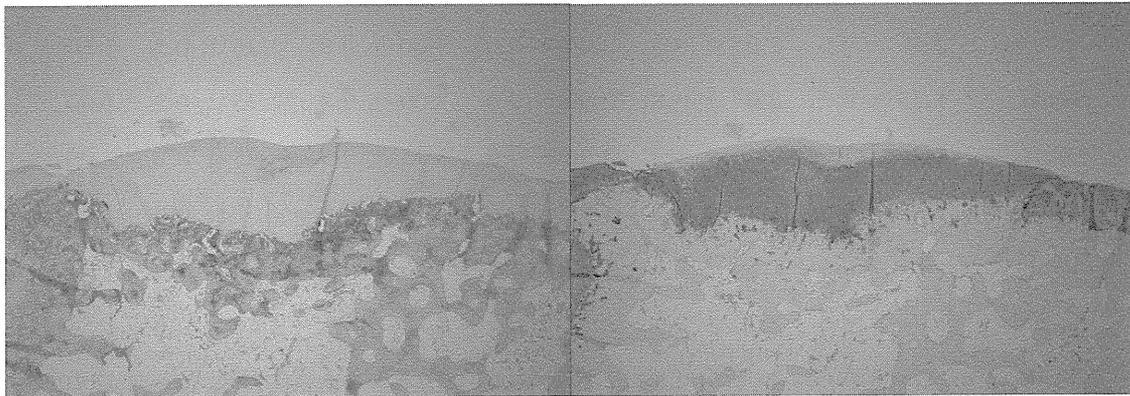
B : AC 1.7×10^6 (Col1)

B : AC 1.7×10^6 (Col2)



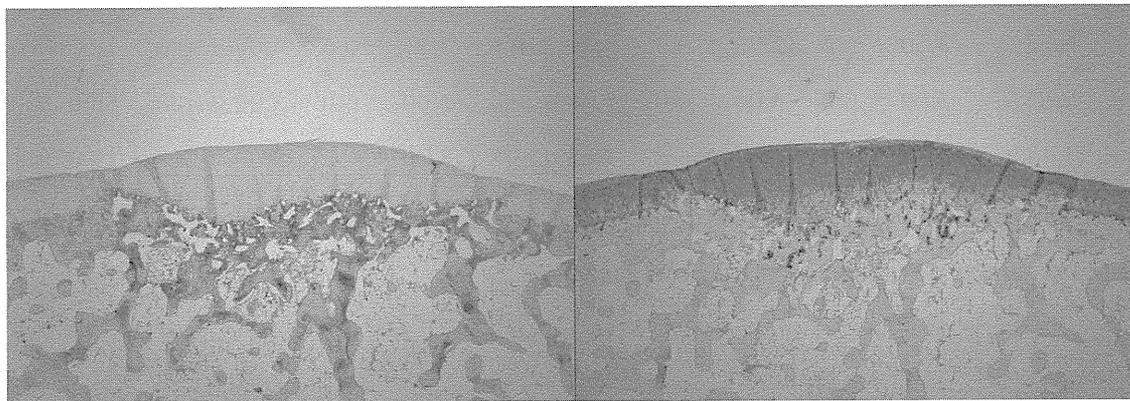
C : AC $1.7 \times 10^6 +$ SY 3.0×10^5 (Col1)

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



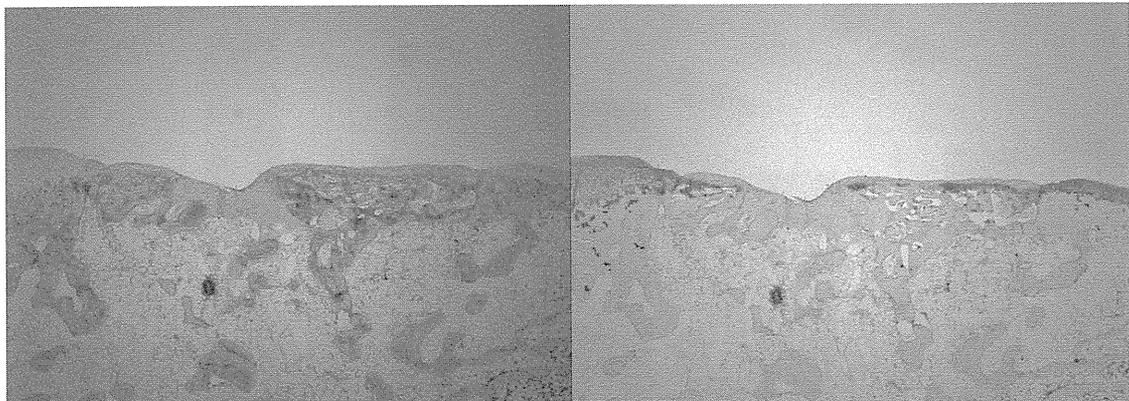
D : AC $1.7 \times 10^6 + SY$ 6.0×10^5 (Col1)

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



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

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



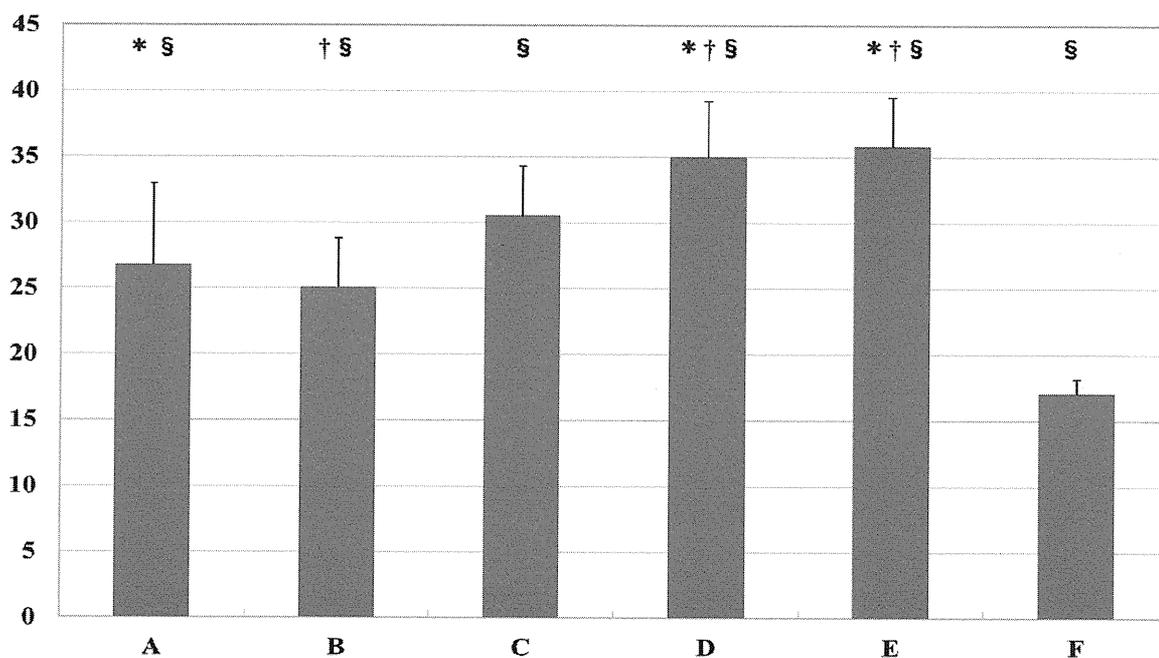
F : defect (Col1)

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

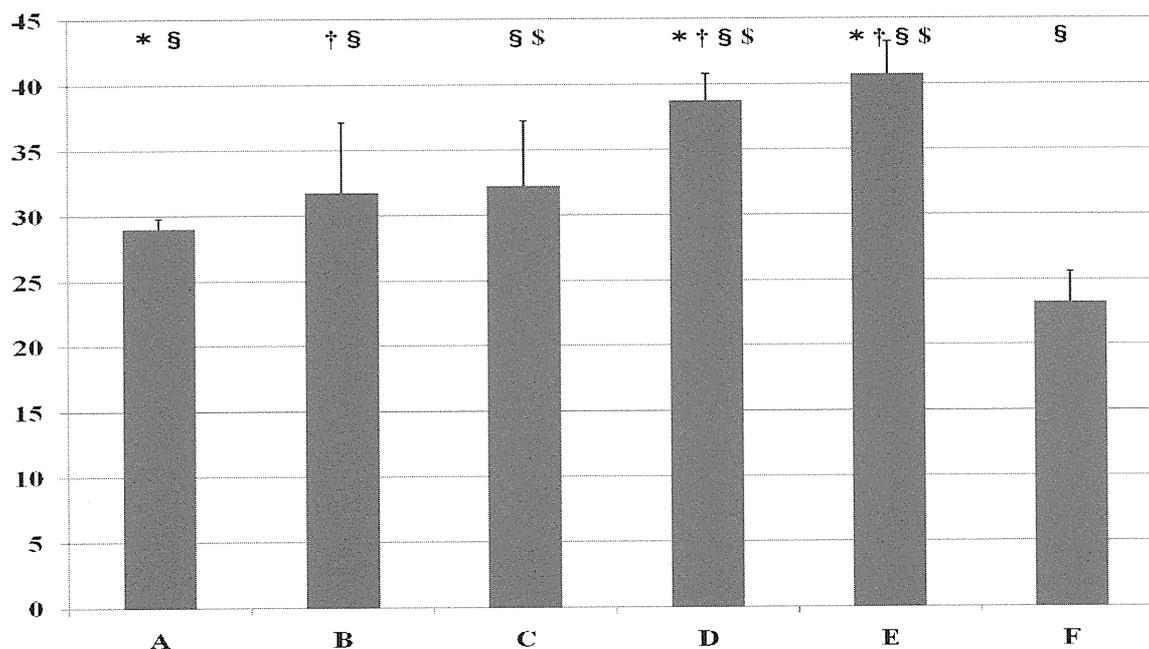
(Table1) ICRS grading system 1M, Values are the mean ± SD. The total score range is from 11 (no repair) to 45 (normal articular cartilage).



(Fig7) ICRS grading system 1M, denotes significance (P<0.05). (§)VS defect, (*)VS SY, (†)VS AC

	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
Latl	2.25 ± 0.5	2.75 ± 0.5	2.25 ± 1.0	2.50 ± 0.6	3.00 ± 0.0	1.75 ± 1.0
Basl	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

(Table2) ICRS grading system 3M, Values are the mean ± SD. The total score range is from 11 (no repair) to 45 (normal articular cartilage).



(Fig8) ICRS grading system 3M, * denotes significance (P<0.05). (§)VS defect, (*)VS SY, (†)VS AC, (§)VS AC+SY 3.0×10^5

Bioluminescence による細胞シート移植後の 移植細胞動態に関する研究

研究分担者 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、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。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18カ月以上検出された。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与える影響について比較検討を試みることを目的とした。

さらに今年度は細胞シート滞在時間に加え、軟骨再生時期の組織像における評価、ならびに細胞シートの局在の検出も研究目標に加えた。

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

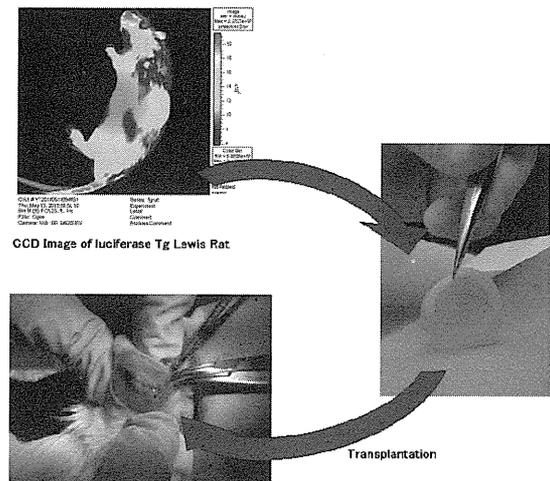
った。

自治医科大学においては麻酔科学集中治療医学講座（竹内護教授）らが Rosa/Luciferase transgenic Lewis rats および Rosa/LacZ transgenic Lewis rats, CAG/GFP 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

初年度、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。静脈内注射の場合には陰茎静脈から投与した。高価な試薬である luciferin が少量で済む利点があるが、発光のピークに瞬時に達するため、計測を逃しやすく、手技にも熟練が必要とされた。関節内投与においてもよく細胞シートの発光が検出されたが、移植直後においては関節からの試薬液のもれを認めた。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。