

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業

フィブロインのcell delivery 機能を利用した若年者重度関節症に
対する新しい治療法の開発

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 中川 晃一

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

- フィブロインのcell delivery 機能を利用した若年者重度関節症に対する新しい治療法の開発 ----- 1
中川晃一

II. 分担研究報告

1. 研究材料の適正化と解析に関する研究 ----- 3
玉田 靖
2. フィブロイン上の軟骨細胞の細胞凝集体形成に関する研究 ----- 6
富田直秀
3. 大型動物モデルを用いたフィブロインによる関節軟骨修復効果に関する研究 ----- 8
中島 新
4. 変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術後の軟骨修復に関する研究 ----- 10
齋藤知行

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 13

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
（総括）研究報告書

フィブロインのcell delivery機能を利用した若年者重度関節症に対する新しい治療法の開発

主任研究者 中川 晃一 東邦大学医学部整形外科 教授

研究要旨

フィブロインを用いた新しい軟骨再生治療の確立に向けて、フィブロインスポンジの最適化、フィブロイン内での細胞凝集形成・基質合成、大型実験動物を用いた軟骨欠損モデルでの軟骨修復効果に関する研究を中心に行った。同時にフィブロインの品質・安全性の評価、臨床治験体制の整備に着手した。

研究分担者

齋藤知行 横浜市立大学整形外科 教授
富田直秀 京都大学工学研究科 教授
玉田 靖 信州大学繊維学部 教授
中島 新 東邦大学整形外科 准教授
鈴木昌彦 千葉大学フロンティアメディカルセンター 教授
和田佑一 帝京大学整形外科 教授

A. 研究目的

フィブロインスポンジは分担研究者の玉田らによって、絹糸からさらに精製されたフィブロインタンパク質を原料とし、多孔質構造の片側表面に強靱な膜を付加することで開発された。このフィブロインスポンジを用いて分担研究者の富田らはフィブロインスポンジ内に軟骨細胞を播種し移植すると、その近傍に良好な軟骨再生がおこることを見出し軟骨再生医療への応用研究を進めてきた。

本事業における新しい軟骨再生技術の近い将来の臨床試験を考慮し、培養過程を経ない自家骨髄細胞を移植細胞とし、フィブロインスポンジに播種させて軟骨欠損部に移植することによって軟骨再生を期待する技術開発に着手した。

本年度は主に、(1) 企業製造によるフィブロインスポンジの軟骨再生と最適化設計、(2) フィブロイン上での軟骨細胞動態、(3) 大型動物実験モデル（膝関節軟骨欠損）におけるフィブロインの軟骨修復効果、を明らかにするための研究を行った。

B. 研究方法

本年度に行った主な研究は以下の3つである。

- 1) 企業にて製造されたフィブロインの軟骨再生評価と適正化
- 2) フィブロイン上における軟骨細胞の細胞凝集形成、基質合成
- 3) 大型動物（イヌ）膝軟骨欠損モデルの作成と軟骨修復効果

方法の詳細は各分担研究報告書に譲る。

C. 研究結果

- 1) 企業製造のフィブロインの軟骨再生評価と適正化

製品製造を念頭とした企業製造のフィブロインスポンジは、従来試料と同等以上の軟骨再生効果を認めた。

動物評価の結果、フィブロインスポンジの薄膜部の強度、特に引き裂き強度の向上が必要であった。

- 2) フィブロイン上における軟骨細胞の細胞凝集形成、基質合成
フィブロイン上に播種された軟骨細胞は

他の素材（コラーゲン、フィブロネクチン）よりも細胞1個あたりのGAG（軟骨基質の一種）産生量が高かった。

3) 大型動物（イヌ）膝軟骨欠損モデルの作成と軟骨修復効果

11～13か月齢雄のビーグル犬を用い、対照（軟骨欠損のみ）、骨髄刺激、骨髄刺激＋フィブロイン、の3群を作成し、術後4、12週で軟骨修復効果を検討した。肉眼所見のみの検討しか行っていないが、骨髄刺激後にフィブロインで欠損部を被覆した群では他の群と比較して修復が良好であった。

D. 考察

本事業で用いられるフィブロインスポンジは、近い将来の臨床治験を視野にしていることから企業による製造が課題であった。本年度の研究結果から企業製造のフィブロインでも従来のもものと遜色ない結果が得られたことは今後の本事業の展開にとって大きな前進であった。滅菌方法に関しても従来オートクレーブに加えγ線滅菌でも同等の効果が得られることが確認できた。その反面、今後の課題としてフィブロインの強度、特に薄膜部の強化が必要であることが判明した。製造工程はやや煩雑となるが、次年度はエレクトロスピンニングによる薄膜の繊維強化を試みる予定である。

フィブロイン上の軟骨細胞動態に関する研究では、播種された軟骨細胞が比較的高速でフィブロイン内を移動し、凝集体を形成することが観察された。フィブロインの軟骨基質合成促進作用のメカニズムとして、播種された軟骨細胞の凝集体形成が関与するのではないかと考えている。次年度以降、細胞集合と基質合成の関係を検討し、cell delivery system の設計指針を模索する予定である。

イヌの膝関節軟骨欠損モデルでは、フィブロインが軟骨修復に対して何らかの促進的な役割を果たすことが示されたが、詳細なメカニズムは不明である。また、細胞ソースとなる骨髄細胞の回収、供給系の確立が今後の課題である。次年度以降、骨髄由来間葉系細胞のフィブロインへの播種方法、軟骨再生促進のメカニズム、再生軟骨の定量・質的評価について検討を進める予定である。

E. 結論

フィブロインを用いた、細胞培養を必要とし

ない細胞移植による軟骨再生技術の開発に着手した。現在のフィブロインで軟骨再生を期待できるが、強度面での改善、細胞供給系の確立など、今後の課題点は残されている。近い将来の臨床試験を見据え、次年度以降、フィブロインの品質・安全性の評価、臨床治験体制の整備も進めながら着実に課題を解決していく必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表
0件
2. 学会発表
0件

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
0件
2. 実用新案登録
0件

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
（分担）研究報告書

研究材料の適性化と解析に関する研究

分担研究者 玉田 靖 （独）農業生物資源研究所ユニット長

研究要旨

製品製造を念頭とした企業製造のシルクフィブロインスポンジは、従来試料と同等以上の軟骨再生効果があることを確認し、製品基本型として使用できることを確認した。フィブロインスポンジの薄膜部の強度向上についての検討を行い、工程は増えるが繊維強化型の手法の検討に着手した。

A. 研究目的

シルクフィブロインスポンジを関節軟骨再生材料として重度関節症に対する新しい治療システムに利用するために、動物評価等の疑似臨床検討を通して抽出される課題を解析し、本事業により開発される治療システムに適正化したシルクフィブロインの改良を行い、臨床的に実用可能なシルクフィブロインスポンジの基本を決定する。

本年度は、実用製品化を視野にして、製品製造企業となる予定の企業により作製されたシルクフィブロインスポンジの軟骨再生評価と本年度の動物評価で顕在化したシルクフィブロインスポンジの強度向上についての検討を進めた。

B. 研究方法

1) 軟骨再生評価

従来の生物研での製造手法を基に企業研究所においてシルクフィブロインスポンジを作製し、うさぎ関節軟骨細胞による軟骨再生評価を実施した。細胞は、京都大学富田研究室で採取された細胞を使用した。従来までの手法による条件に従い培養し、所定時間後の組織標本による評価を行った。同時にコントロールとして、生物研で作製したシルクフィブロインスポンジについても同様の実験を行い、比較対象とした。

2) フィブロインスポンジの適正化

新しい治療システムに利用予定のシルクフィブロインスポンジは、片面に薄膜を持った

た多孔質構造体からなる構造を有している。多孔質面の弾性率は軟骨欠損面への接着や軟骨再生挙動に影響を与える危険性があると推察されるので、まずは、薄膜面の強度向上の検討を実施した。

薄膜面は、スポンジ形成時の界面現象として自然に形成されるため、原料となるフィブロイン水溶液と接する材料の表面エネルギーを変化させることで、界面のエネルギー状態を変えて、形成される薄膜の厚み等の制御が可能か検討した。具体的には、スポンジ形成時に使用するモールドの材質を高い表面エネルギーをもつ金属から低い表面エネルギーを持つテフロン等へ材質を変化させて、フィブロインスポンジを形成し、得られたスポンジの薄膜の厚さやスポンジの力学物性を評価した。

また、エレクトロスピンニングによる微細シルクフィブロインファイバーをスポンジ薄膜表面に融合することによる、薄膜の強度向上についての検討を開始した。

C. 研究結果

1) 軟骨再生評価

企業により製造されたフィブロインスポンジ内において、従来の手法に従いウサギ関節軟骨細胞を培養し、3、7、14日でサンプリングし、軟骨組織基質であるコンドロイチン硫酸量の定量、および、培養7日目の組織像について、Safranin-O、HE染色、およびコラーゲンタイプIとIIの免疫染色を行った。

コンドロイチン硫酸産生量を図1に、染色結果を図2に示した。それぞれ、従来の生物研で作製した試料 (NIAS)、企業で作製した試料、および、製品化に向けての滅菌手法の予備検討としてγ線滅菌試料についての結果を示している。図1に示したように、企業で製造されたシルクフィブロインスポンジにおいても、従来生物研で作製した試料と遜色なく、より多くの軟骨基質が産生されていることがわかる。また、図2の組織観察からも、従来と同等の組織像が得られており、企業で作製した試料においても、軟骨再生が問題なく生じることが明らかとなった。

さらに、従来のオートクレーブ滅菌とγ線滅菌による滅菌処理による顕著な相違も観察されず、製品形態に応じた滅菌手法が採用できることが分かった。

これらの結果から、企業により製造されたシルクフィブロインスポンジ試料は、今までの検討結果を再現することが確認されたため、今後本事業における基本的な評価には、企業が製造した試料を用いることとする。

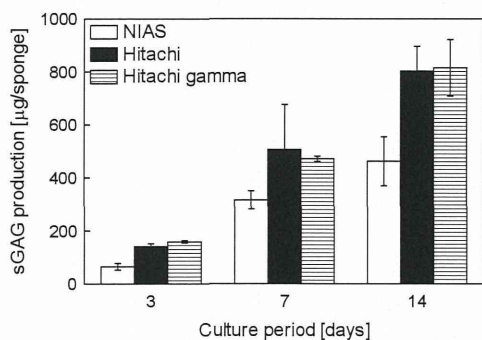


図1 フィブロインスポンジ内に産生されたコンドロイチン硫酸量

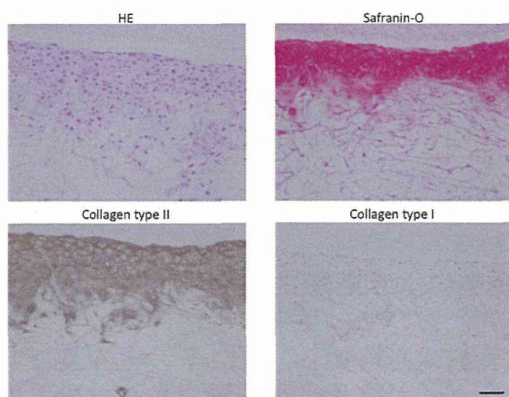


図2 軟骨細胞培養7日後のフィブロインスポンジの組織像観察、試料は企業製造良好な軟骨組織の形成が観察される。

2) フィブロインスポンジの適正化

動物評価の結果、シルクフィブロインスポンジの薄膜部の強度、特に引き裂き強度の向上が必要であることが判明した。フィブロインスポンジの薄膜は、フィブロイン水溶液の表面エネルギーとモールド表面の表面エネルギーのギャップを解消するために、界面活性を有するタンパク質であるフィブロインが膜を形成するというメカニズムが推察できる。薄膜の強度向上のためには、膜厚の増大が有効な手段であると考えられるため、この表面エネルギーのギャップを大きくすることで、より厚い薄膜が形成する可能性があることが考えられる。

そこで、表面エネルギーの異なる数種の材質のモールドにより、定法に従いスポンジを作製し、形成された薄膜の厚みを測定した。また、得られたスポンジの引っ張り物性を測定した。結果を表1にまとめた。

表1 モールド材質と薄膜形成

	Teflon	Acryl	Urethane	Stainless
Surface E, mN/m	18	38	48	700
Thickness, um	17±2.54	4.2±0.092	3.0±0.121	1.1±0.131
Strength, N	0.59±0.056	0.46±0.032	0.52±0.025	0.48±0.017

表1に示したように、モールドの表面エネルギーが小さくなるほど薄膜が厚くなることが観察された。フィブロイン水溶液の表面エネルギーが水の表面エネルギー (72mN/m) と仮定すると、水との表面エネルギー差が大きいほど、厚い薄膜が形成されることとなり、理論的な考察と一致する。一方、ステンレス等の金属は大きな表面エネルギーを持つが、水のそれよりも大きいため、その表面が水で覆われるために、エネルギーギャップが小さく、水との表面エネルギー差が大きいにも関わらず、薄い薄膜が形成されたと推察できる。

一方で、得られたスポンジの引っ張り強度には薄膜厚の増加により、若干の強度の増加が観察されたが、顕著な増加は観察されず、実用的には難しいことが予想された。

そこで、さらに実用的な強度を得るために、繊維強化の手法の検討を開始した。

微細ファイバーを得る手法として、エレクトロスピニング手法の検討を行った。現時点

の技術では、フィブロイン単独での紡糸が困難であるため、ポリエチレングリコールを助剤としての紡糸を試みた。図3に示すように、フィブロイン水溶液 5%濃度程度から紡糸ができ、得られる繊維もサブミクロン径であることから、薄膜との融合が有効にできれば、繊維強化型の薄膜として強度向上が期待できる。次年度以降、エレクトロスピンニング条件等や複合化プロセスの検討を行い、治療プロセスに有効な強度を持つフィブロインスポンジ材料の開発を進める予定である。

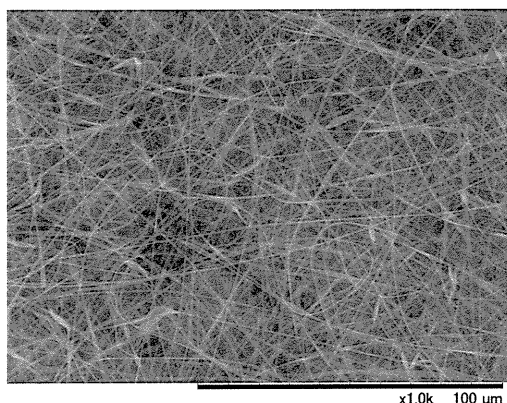


図3 エレクトロスピンニングにより形成したフィブロイン微細ファイバー

D. 考察

本事業により検討が行われる重度関節症の治療に対応できる軟骨再生治療システムに有効に利用できるシルクフィブロインスポンジの適性化を目的に検討を進めた。治療システムの完成後に、臨床実用を視野においた製品の開発が必要であることから、企業による製造を当初からの検討課題とした。本年度、企業により製造されたシルクフィブロインスポンジによる軟骨再生評価を実施し、現在までの研究成果との比較を行ったところ、軟骨再生状態等、従来の成果と遜色ない結果が得られ、今後の本事業で用いる評価に使用できることが確認できた。今後、このシルクフィブロインスポンジを基本形として、治療システムに有効な製品の開発を進める。さらに、本年度は滅菌手法の検討も同時に進め、従来のオートクレーブ滅菌法に加え、線滅菌法によっても同等の効果が得られることが確認でき、今後、製品形態に合わせた滅菌工程が可能であることを見出した。

動物による疑似臨床評価において、フィブロインスポンジの強度、特に薄膜部、が必要

である事が判明した。術中の試料の軟骨欠損面への固定や術後の荷重による安定性の向上のためにも重要な課題である。本年度は、製品製造の工程の簡素化の観点から、界面現象を利用しての薄膜の強度向上を目指した。理論的な予想通りに薄膜の厚さの向上には成功したものの、残念ながら顕著な強度の向上には至らなかった。そこで、製造工程の複雑化となってしまいが、エレクトロスピンニング法によるシルクフィブロイン微細繊維による薄膜の繊維強化手法を試みることにした。本年度は、フィブロイン微細繊維の作製が可能であることを確認できたので、次年度以降、スポンジ試料との複合化の検討を進める。

E. 結論

製品製造を念頭とした企業により製造されたシルクフィブロインスポンジは、軟骨再生材料として有効に働くことを確認した。フィブロインスポンジの薄膜の強度向上には、自然形成手法では限界があることを確認し、課題解決のために繊維強化型の強度向上を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表
0件
2. 学会発表
0件

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
0件
2. 実用新案登録
0件
3. その他

フィブロイン上の軟骨細胞の細胞凝集体形成に関する研究

分担研究者 富田直秀 京都大学工学研究科 教授

研究要旨

フィブロイン上に播種された軟骨細胞の細胞凝集、基質合成について検討した。フィブロイン上では軟骨細胞一個あたりの GAG（軟骨基質の一種）産生量が対照群と比較して有意に増加した。次年度以降、細胞凝集と組織形成との関連について検討し、フィブロインの cell delivery system としての設計指針を模索する。

A. 研究目的

我々は、絹糸の主要成分であるフィブロインをスポンジ状に加工し、軟骨細胞を播種することによって、その近傍に層状構造を有する軟骨組織が形成されることを見出し、軟骨再生医療への応用研究を進めている。フィブロイン上において、軟骨細胞は比較的高速度で移動し、細胞凝集体を形成しやすい 1) ことが定量的にも明らかになっているが、そのメカニズムは未だ不明である。

B. 研究方法

野生型の家蚕 (*Bombyx mori*) が産生した絹糸より抽出したフィブロイン溶液を培養皿にコートした。また、フィブロネクチン (Sigma 製) を培養皿上にコートした。これら基質上に 4 週齢の日本白色家兎から採取した継代数 1 の軟骨細胞を 1.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、播種後 24 時間後における接着細胞数および各基質上の軟骨細胞の 1 細胞当たりの GAG 産生量を算出した。

C. 研究結果および考察

図 1 に示すように、フィブロイン上における軟骨細胞一個あたりの GAG（軟骨基質の一種）産生量が高いことが明らかとなった。大高らは Cell Sociology の概念を提唱して、細胞が集合して機能的な組織を形成する過程を定量的に研究する様々な手法を提案している 1,2)。これまでも、ボロノイ分割法を用いた細胞領域の不均一性 (Area Disorder) の算出し、フィブロイン上においては軟骨細胞が細胞凝集体を形

成しやすいことを定量的に示してきた。

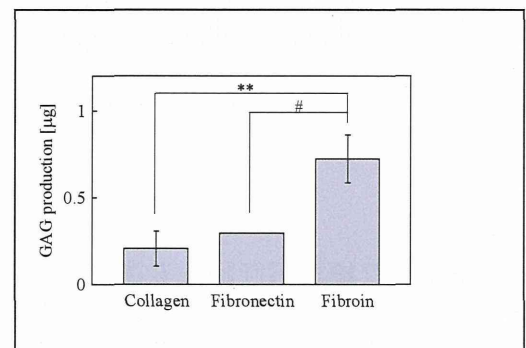


図 1 The amount of GAG production per cell cultured on collagen, fibronectin and fibroin Data is shown in the form: means \pm SD. Asterisks indicate significant differences (**: $p < 0.01$, #: $p < 0.05$: two-sided Student's t-test).

また、フィブロイン上では、軟骨細胞が球状形状を保ちながら比較的高速で移動し、凝集体を形成しやすいことが確かめられている。現時点においては想像の域を超えないが、フィブロインが凝集体を形成させることが、その周囲に基質を形成する重要な要素となっている可能性が示唆される。今後さらに、細胞集合と組織形成、さらにその臨床における効果との関係性を調査し、cell delivery system の設計指針を模索する予定である 5,6)。

参考文献

- (1) E Hirakara et al. EORS 2010 abstract
“Patellofemoral arthroplasty using fibroin based cell-delivery system”
- (2) Kawakami et al. Chondrocyte Distribution and Cartilage Regeneration in Silk Fibroin Sponge, Bio-Medical Materials and Engineering: 21(1), 53-61, 2011
- (3) 島田康弘, 京都大学大学院工学研究科修士論文, 2009
- (4) A Otaka, et al., Tissue Engineering, in press
- (5) 富田直秀, 貼って治す軟骨再生治療(フィブロインスポンジの cell-delivery 機能). NIAS シンポジウム第 5 回「フィブロイン・セリシンの利用」研究会(アグリヘルスの展開に向けて)抄録: 1-6,2011
- (6) 富田直秀, FAQ 質問コーナー貼って治す軟骨再生治療技術が開発されたそうですが?. STAFF newsletter: 22(3), 5,2011

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
（分担）研究報告書

大型動物モデルを用いたフィブロインによる関節軟骨修復効果に関する研究

分担研究者 中島 新 東邦大学医学部整形外科 准教授

研究要旨

イヌ膝関節に軟骨欠損を作成し、欠損部にフィブロインスポンジを移植して軟骨修復に及ぼす影響を検討した。肉眼所見では、フィブロインスポンジを移植した群では対照群に比較して軟骨修復が良好であった。次年度以降、組織学、生化学的、力学的解析によって再生軟骨の定量的、質的評価を行う。

A. 研究目的

研究分担者の富田、玉田らは絹糸の主要成分であるフィブロインをスポンジ状に加工し、軟骨細胞を播種することによって、その近傍に軟骨組織が形成されることを見出し、軟骨再生医療への応用研究を進めてきた。しかしこれまでの動物実験はウサギで行われており、細胞移植に必要な軟骨細胞は培養過程を経て大量生産する必要があった。培養軟骨細胞を用いた軟骨再生治療はこれまでも多数報告があるが、安全性やコスト面から特殊設備を有する限られた施設でしか実施できないのが現状である。我々は、本事業における軟骨再生技術を近い将来、円滑に臨床試験へと進めるため、培養過程を経ない自家骨髄細胞を移植細胞のソースとし、フィブロインスポンジに浸み込ませて軟骨欠損部に移植することによって軟骨再生を期待する技術の開発に着手した。

本年度は、骨髄細胞移植の予備実験として骨髄刺激によって流出する骨髄細胞を細胞供給源とする実験モデルを用いた。実験動物には将来の臨床試験を見据え、大型動物のイヌを選択した。膝関節に軟骨欠損を作成し、骨髄刺激後、欠損部にフィブロインスポンジを移植し、局所刺激性、軟骨再生、血液・生化学的検査に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) 動物実験モデルの作成

11～13 ヶ月齢雄のビーグル犬を用い、対照(C)群（軟骨欠損のみ）、骨髄刺激(BS)群、骨

髄刺激+フィブロインスポンジ(BS+F)群の3群を作成した（各群 n = 8）。右膝蓋骨内側縁を切開し、膝蓋骨を外側に脱臼させ、大腿膝蓋関節の大腿骨側関節面に軟骨欠損（矢状方向: 12 mm x 冠状方向: 12 mm 程度）を作成した。その後、対照群を除く各群ではキルシュナーワイヤー（直径: 1.0 mm）を用いて深さ 5 mm の骨孔を等間隔で9ヶ所(3 x 3)作成した（骨髄刺激）。骨髄刺激後、軟骨欠損部をフィブロインスポンジで被覆した。最後に脱臼させた膝蓋骨を整復し、閉創した。

手術後4週、12週に屠殺し（それぞれ各群 n = 4）、再生軟骨の肉眼所見、局所状態、血液・生化学的検査を行った。

2) 血液学的検査

手術前、術後2週、屠殺時（4週または12週）に橈側皮静脈より血液を採取した。赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、血小板数(PLT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)、白血球数(WBC)、白血球分画（リンパ球、好中球、好酸球、単球）、網状赤血球比率(RET)、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノーゲン濃度(Fbg)を測定した。

3) 血液生化学的検査

同様にAST, ALT, ALP, CK, 総コレステロール(T-Cho)、トリグリセリド(TG)、総タンパク(TP)、尿素窒素(UN)、クレアチニン(CRE)、

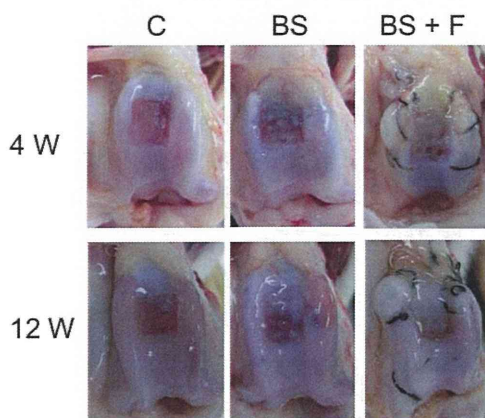
総ビリルビン(T-Bil)、ブドウ糖(Glu)、無機リン(IP)、カルシウム(Ca)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、塩素(Cl)、タンパク分画、A/G 比、アルブミン(Alb)を測定した。

C. 研究結果

1) 歩行状態

いずれの群も術後より疼痛による歩行障害を認めたが、C 群、BS 群では術後 14～19 日で正常に回復した。一方、BS+F 群は正常な歩行回復までに 24 日を要した。24 日以降はいずれの群でも歩行異常は認められなかった。

2) 軟骨欠損部の修復所見



C: 軟骨欠損のみ, BS: 骨髄刺激, BS+F: 骨髄刺激+フィブロイン

術後 4 週では、軟骨欠損のみの対照(C)群ではほとんど修復を認めないが、骨髄刺激(BS)群では骨孔部に軟骨再生が認められた。骨髄刺激+フィブロイン(BS+F)群では欠損部は薄い再生軟骨で修復されていた。

術後 12 週では、C 群では 4 週と同様にほとんど軟骨修復を認めなかったが、BS 群では骨孔部周囲の軟骨欠損部にも軟骨再生が認められた。BS+F 群では 4 週に比べ厚い再生軟骨で修復されていた。

3) 血液・生化学的検査

いずれの項目も各群間で有意差は認めなかった。また、いずれの項目とも異常値は認めなかった。

D. 考察

本研究の結果から、イヌなどの大型動物においても、フィブロインが関節軟骨の修復に

何らかの促進的な役割を果たしていることが示唆された。分担研究者の富田らの研究成果から、軟骨細胞はフィブロインの中で細胞凝集体を形成し、基質合成を行うことが明らかにされた。本動物モデルでも、骨髄刺激によって流出した骨髄細胞がフィブロイン内で軟骨細胞に分化し、細胞凝集体を形成して基質合成を行い、軟骨修復を促進した可能性がある。しかしながら詳細なメカニズムは不明であり、再生軟骨の定量的、質的評価は成されていない。

また、より高い修復効果を期待するには骨髄内の未分化間葉系細胞を濃縮してフィブロイン内に効率よく播種し、欠損部へ移植する必要がある。次年度以降、骨髄由来間葉系細胞のフィブロインへの播種方法、フィブロインによる軟骨修復促進のメカニズム、再生軟骨の定量・質的評価について検討を進める予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表
0 件
2. 学会発表
0 件

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
0 件
2. 実用新案登録
0 件

変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術後の軟骨修復に関する研究

分担研究者 齋藤 知行 横浜市立大学医学部整形外科

研究要旨：シルクフィブロインスポンジを変形性膝関節症の関節軟骨再生に応用する際には、高位脛骨骨切り術を併用して行う予定である。対象症例を選択し、治療ガイドラインを作成するために、高位脛骨骨切り術後の関節軟骨欠損部の修復について検討した。高位脛骨骨切り術単独で、欠損部が修復組織で完全被覆されたのは、146膝中47膝（32%）であった。それ以外の症例には、軟骨再生医療の併用が必要と考えられた。

A. 研究目的

現在、比較的若年の重症変形性膝関節症に対して行われる治療として、高位脛骨骨切り術がある。今後シルクフィブロインスポンジを関節軟骨再生に応用する際には、高位脛骨骨切り術と併用する形で、治療システムを確立していく予定である。どのような症例がシルクフィブロインによる軟骨再生治療の対象となりうるかを決定し、治療ガイドラインを作成していくためには、高位脛骨骨切り術後の関節軟骨欠損部の修復経過について検討する必要がある。

平成25年度以降の治療システム確立およびガイドライン作成を視野に入れ、変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術後の軟骨修復について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 対象

内側型変形性膝関節症に対し、高位脛骨骨切り術（high tibial osteotomy, HTO）を施行した115例（女性96例、男性19例）、146膝（女性121膝、男性25膝）を対象とした。手術時年齢は、平均65才（47-80才）、術後経過期間は平均24か月であった。

2) 手術方法

脛骨近位外側を楔状に骨切りして内反変形を矯正する、closing wedge high tibial osteotomy (CWHTO)を施行した。これに

より、荷重線は膝内側から膝外側を通るようになり、骨軟骨の変性の強い内側コンパートメントにかかる荷重が大幅に軽減される（図1）。

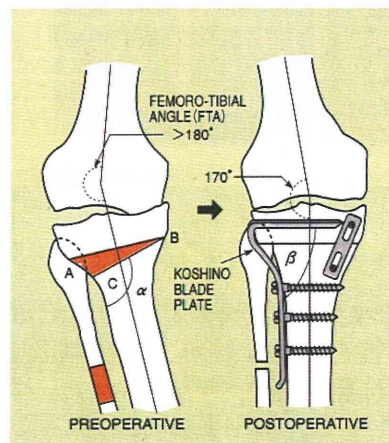


図1 高位脛骨骨切り術

3) 術前関節軟骨変性の評価

術前的大腿骨内側顆荷重部関節軟骨の状態は以下の分類に従って評価した（Grade4cが最も変性の進んだ状態）。

Grade1: 軟骨表層の黄色変色

Grade2: 軟骨表層の不整、柔軟化

Grade3: 軟骨表層の線維化、磨耗

Grade4a: 軟骨部分欠損

Grade4b: 軟骨完全欠損（軟骨下骨露出）

Grade4c: 軟骨下骨の象牙化

4) 術後関節軟骨修復の評価

術後の関節軟骨修復過程は以下の分類に従って評価した(図2)(Stage5が最も修復の進んだ状態)。

- Stage1: ピンクまたは黄色の線維性組織
- Stage2: 白色線維性組織の散在
- Stage3: 白色線維性組織による部分被覆
- Stage4: 白色の線維軟骨様組織増生
- Stage5: 白色の線維軟骨様組織による平滑な被覆

また、修復組織の一部を生検して組織学的な検討を行なった。

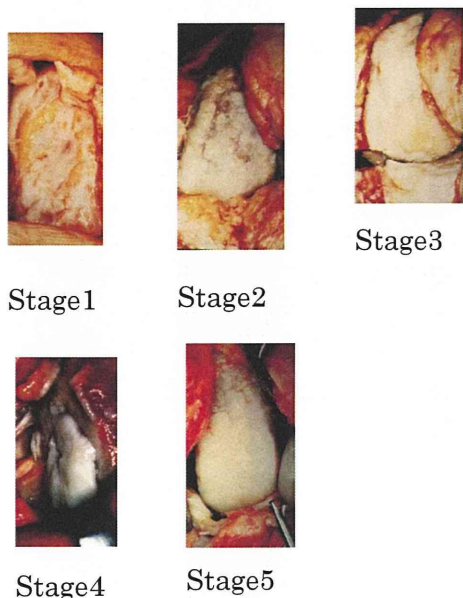


図2 術後関節軟骨修復の評価

C. 研究結果

1) 膝内反変形の矯正

荷重線は、術前は膝中心より内側を平均 $38.9 \pm 16.2\text{mm}$ の部位を通過していたが、術後は膝中心より外側を平均 $12.2 \pm 9.3\text{mm}$ の部分を通っていた。また、大腿骨と脛骨の骨軸のなす角(Femurotibial angle, FTA)は、術前平均 183 度から、術後平均 170 度へ改善していた。代表症例を図3に示す。

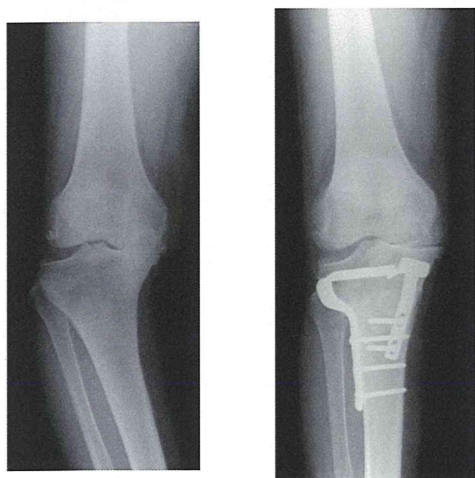


図3 術前 術後

73 歳女性、FTA 198 度から 171 度に改善

2) 術前の関節軟骨変性

術前の関節軟骨編変性に関しては、Grade1: 0 膝、Grade2: 3 膝、Grade3: 5 膝であり、残りの 138 膝は関節軟骨の欠損を有する Grade4 であった。その中では、Grade4a: 12 膝、Grade4b: 48 膝、Grade4c: 78 膝であり、高位脛骨骨切術の対象となった症例のほとんどで、大腿骨内側顆荷重部の関節軟骨欠損が認められた。

3) 術後の関節軟骨修復

骨切り部の固定に用いた内固定材料(金属プレート)を抜去する際に評価した関節軟骨の修復状態は、Stage1: 2 膝、Stage2: 36 膝、Stage3: 49 膝、Stage4: 31 膝、Stage5: 16 膝であった。軟骨欠損部が白色線維性組織により完全に覆われ、部分的に線維軟骨様組織が認められた Stage4 以上の完全被覆例は、146 膝中 47 膝、32% であった。残りの症例では、軟骨欠損部の被覆は一部にとどまっていた。完全被覆例の中には、組織像にて一部に硝子軟骨様の組織も確認された(図4A)。一方、部分被覆例の修復組織の組織像は、線維性癒痕組織ないしは線維軟骨組織であった(図4B)。

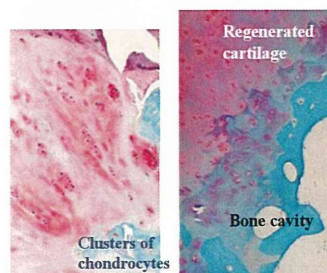


図4A 完全被覆例の組織像

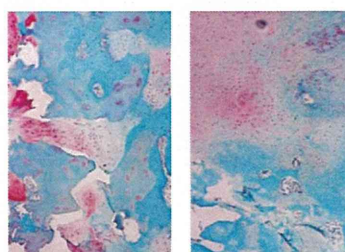


図4B 部分被覆例の組織像

D. 考察

関節軟骨は一旦損傷されると修復する

ことは困難であり、経年的に変性が進んで変形性関節症へと移行する。変形性関節症が進行して重症の関節症となった場合、高齢者に対しては、人工関節置換術が行われることが多い。活動性の高い若年者に対する手術療法としては、(人工関節の緩みを生ずる可能性高くなるため)人工関節置換術ではなく、高位脛骨骨切り術が主に選択される。これは、骨切りによって関節軟骨変性の強い内側にかかる力学的負荷を減少させ、症状を緩和させる方法である。

今回の検討により、高位脛骨骨切り術後に、32%の症例で軟骨欠損部の完全被覆がみられることが明らかとなった。しかしながら、残りの症例では、欠損部は部分的にしか修復されていなかった。したがって、少なくとも残りの68%の症例に対しては、軟骨再生法の併用が望ましいと考えられた。さらに、一部の症例において行った組織学的検討の結果では、修復組織のほとんどは線維軟骨組織であり、硝子軟骨様組織は完全修復例の一部にみられたのみであった。

軟骨再生治療としては、近年自家培養軟骨細胞移植術や骨髄、滑膜などから採取した間葉系幹細胞を用いた方法が開発され、欧米ではすでに臨床応用されている。しかし、このような対外での細胞培養が必要な治療法は、安全性やコスト面など様々な問題があり、一般的な普及にはかなりの時間を要すると思われる。さらにこれらは、外傷性の比較的小さい軟骨欠損に対しての治療であり、変形性関節症症例の広範な軟骨欠損には適応とならない。我々が開発しているフィブロインを利用した軟骨再生法は、体外での細胞培養を必要とせず、広範囲軟骨欠損にも対応できる点で有用と考えられる。

現時点で、フィブロインを利用した軟骨再生の適応症例として、

- 1) 従来の骨切り術で良好な軟骨再生が期待できない症例
- 2) X線上、荷重部の関節裂隙が2 mm以下、またはMRIにて推定される軟骨損傷範囲が10 cm²以上
- 3) 骨切り術のみで補正不可能な関節面不整形を有する
- 4) 年齢60才未満または活動性の高い患者などを考えている。

平成25年度以降にはさらに検討を加えて、適応症例を含めた治療ガイドラインを作成していく予定である。特に、上記の1)の項目における「骨切り術で良好な軟骨再生が期待できない症例」の定義が重要となる。今後はさらに、年齢や術前軟骨変性の程度と軟骨修復の関係や、軟骨修復と長期臨床成績との関係を検討し、治療ガイドラインに反映させていく必要がある。

E. 結論

シルクフィブロインスポンジを関節軟骨再生に応用する際に併用する高位脛骨骨切り術に関し、本術式施行後の軟骨修復について検討を行った。32%の症例で軟骨欠損部の完全被覆がみられたが、残りの症例では、欠損部は部分的にしか修復されず、組織学的にはほとんどが線維軟骨組織であった。これらの症例に対しては、高位脛骨骨切り術に加えて、さらに軟骨再生を促す治療を加えることが望ましいと考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
0件
2. 学会発表
0件

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
0件
2. 実用新案登録
0件
3. その他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

