

201308015A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 中川 晃一

平成26(2014)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	----- 4
玉田 靖	
2. フィブロインスポンジ表面近傍における細胞分布に関する研究	---- 9
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	-----18
中島 新	
4. 内側楔状開大式高位脛骨骨切り術後の軟骨修復に関する研究	-----24
齋藤知行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----27

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

フィブロインスポンジを用いた軟骨再生技術の確立に向けて、フィブロインの強度面での改良、フィブロイン表層部分の細胞動態・分布、イヌ膝関節軟骨欠損部へのフィブロイン移植（一部は培養を経ない骨髄由来幹細胞をフィブロインへ播種して移植）を行った。さらに将来本治療システムの応用が最も考えられる高位脛骨骨切り術の術後軟骨修復に関して臨床例の評価を行った。

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。

本研究の目的は、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直接移植することによって関節軟骨修復を促進する軟骨再生技術の確立である。昨年度は主に、（1）企業製造によるフィブロインスポンジの最適化設計と軟骨再生能、（2）フィブロインスポンジ内での軟骨細胞動態、（3）ビーグル犬を用いた膝関節軟骨欠損モデルにおけるフィブロインの軟骨修復効果、に関する検討を行い、それぞれ（1）フィブロインスポンジの強度、（2）フィブロインスポンジ表層部分の細胞動態・分布、（3）修復軟骨の組織学的評価・自家骨髄細胞移植を併用した場合の軟骨修復効果、

に関して課題が残ったため本年度はこれらに関する研究を中心に行った。さらに、本治療システムは変形性膝関節症(Osteoarthritis, OA)に対して本邦で最も多く施行されている関節温存手術である高位脛骨骨切り術(High Tibial Osteotomy, HTO)に併用して施行することを検討しているため、HTOの最近主流の術式である opening wedge（内側楔状開大）法後の軟骨修復に関して臨床症例をもとに評価を行った。

B. 研究方法

本年度に行った主な研究は以下の4つである。

- 1) フィブロイン微細ファイバーとフィブロインスポンジの複合化の検討
- 2) フィブロインスポンジ表面近傍における細胞動態とその分布の定量評価
- 3) ビーグル犬膝関節軟骨欠損部へのフィブロインスポンジ移植による軟骨再生とフィブロイン内への骨髄由来細胞播種の効果
- 4) 内側楔状開大式高位脛骨骨切り術後の軟骨修復と修復に関連する因子の検討方法の詳細は各分担研究報告書に譲る。

C. 研究結果

1) フィブロイン微細ファイバーとフィブロインスポンジの複合化の検討

昨年度の治療システム構築の動物評価において、術中の固定等のハンドリングにおいてシルクフィブロインスポンジの強度の改良が必要であることが指摘されたため、本年度はフィブロイン微細ファイバーの複合化による強度向上の試みと引っ張り強度測定試験による評価を実施した。エレクトロスピンニングによる微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジはフィブロインスポンジのみに比べ、引っ張り強度の向上を認めた。

2) フィブロインスポンジ表面近傍における細胞移動動態とその分布の定量評価

フィブロインスポンジ内では細胞塊が形成されやすいことはすでに報告されているが、フィブロインスポンジ表面上にも細胞塊および膜が形成され、軟骨形成に重要な役割を果たしていると予想される。本年度は共焦点顕微鏡によって、スポンジ最表層部(100 μ m以内)の細胞凝集挙動、深さ方向に対する細胞分布に関する評価を行った。フィブロイン水溶液濃度及び冷却速度を変化させて作製した9種類のフィブロインスポンジを用意した。フィブロインスポンジ内においては、スポンジ種によらず凝集体が形成されていることが定量的に示された。

3) ビーグル犬膝関節軟骨欠損部へのフィブロインスポンジ移植による軟骨再生とフィブロイン内への骨髄由来細胞播種の効果

11~13ヵ月齢雄のビーグル犬を用い、まず対照群、骨髄刺激群、骨髄刺激+フィブロインスポンジ群の3群を作成した。次に、骨髄由来細胞から間葉系幹細胞を分離しスポンジ内に播種させた後、同様の実験群を用いて再生軟骨の評価を行った。組織学評価では、フィブロイン被覆群で有意に優れた組織修復が認められた。さらに、軟骨欠損部に骨髄由来間葉系幹細胞播種したフィブロインを被覆する方法を検討した。この方法では、肉眼所見上、細胞播種群における有意な軟骨修復促進効果は認められなかった。

4) 内側楔状開大式高位脛骨骨切り術後の軟

骨修復と修復に関連する因子の検討

変形性膝関節症(OA)に対する関節温存手術である高位脛骨骨切り術(HTO)後に軟骨修復を促進する目的で軟骨欠損部にフィブロインスポンジ移植を併用することを検討している。昨年度は従来行われてきた closed wedge 法による術後の軟骨修復に関して検討を行ったが、今年度は最近主流の opening wedge (内側楔状開大) 法後の軟骨修復に関して評価を行った。Opening wedge 法では Closed wedge 法に比較して修復は劣っており、修復に関連する因子として、部位、変性 Grade、性別、BMI が抽出された。

D. 考察

本事業で用いられるフィブロインスポンジは昨年度、強度、特に薄膜部の強化が課題であることが判明し、今年度はエレクトロスピンニングによる微細ファイバーマットとの複合化を試み、その強度面の評価を行った。引き抜き試験では強度の改善が確認できたが、複合化による弾性率や伸度の変化も観察されており、実際の手術時に十分な強度を有しているかどうかは未だ検証できていない。今後強度面に関して改良の検討を継続するとともに、軟骨欠損部へのフィブロインスポンジの固定材料、方法に関しても検討が必要である。

フィブロインスポンジ表層部での細胞動態に関する研究では、スポンジ設計の最適化の観点からフィブロイン水溶液濃度及び冷却速度を変えて作成した数種類のフィブロインスポンジを用いて、骨髄由来間葉系幹細胞のスポンジ表層に存在する細胞の動態挙動を検討した。その結果、スポンジの種類によらず凝集体が形成されていることが定量的に確認された。今後はこの手法を用いたフィブロインスポンジ製造条件の最適化を検討する予定である。

ビーグル犬膝関節軟骨欠損部へのフィブロインスポンジ移植による軟骨再生とフィブロイン内への骨髄由来細胞播種の効果に関する研究では、骨髄刺激とフィブロイン被覆を組み合わせた方法において、骨髄刺激によって流出した骨髄細胞がフィブロインスポンジ上で細胞凝集体を形成し、それが軟骨欠損部に白色の修復組織形成を促したと考えられる。より高い軟骨再生効果を期待して骨髄由来間葉系幹細胞をフィブロインスポンジに播種したが、12週の時点では明らかな修復促進効果系細胞の播種だけでは細胞数が十分でなかつ

たことが考えられる。また、関節面の肉眼所見からフィブロインの関節面への長期固定が軟骨下骨の破壊や変形性関節症の進行を招いている可能性が考えられた。今後は骨髄刺激法と併用することで細胞ソースを増やし、移植後早期にフィブロインを抜去して軟骨再生評価を行う必要があると考えている。

E. 結論

フィブロインスポンジを用いた軟骨再生技術の確立に向けて、フィブロインの強度面での改良、フィブロイン表層部分の細胞動態・分布、イヌ膝関節軟骨欠損部へのフィブロイン移植（一部は培養を経ない骨髄由来幹細胞をフィブロインへ播種して移植）を行った。臨床応用に向けてフィブロインの強度面での改善に進展はみられているが、手術操作に耐えうるものかどうか更なる検証が必要である。また、現在のフィブロインで軟骨再生を期待はできるが、フィブロインの固定方法・期間、自家骨髄由来細胞移植の併用など軟骨再生を促進する手法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、最終年度の次年度は臨床治験体制、本治療システムのガイドライン作成など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
1件
2. 学会発表
6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

研究分担者 玉田 靖 信州大学繊維学部教授

研究要旨

昨年度の治療システム構築の動物評価において、術中の固定等のハンドリングにおいてシルクフィブロインスポンジの強度の改良が必要であることが指摘されたため、フィブロン微細ファイバーの複合化による強度向上の試みと引っ張り強度測定試験による評価を実施した。また、フィブロン材料上での細胞挙動を解析するために SNL 細胞による培養評価を実施した。

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、昨年度までの治療システム構築のため評価において、イヌを用いた動物評価で顕在化してきたフィブロインスポンジの強度向上の必要性を解決する目的で、フィブロン微細ファイバーとフィブロインスポンジの複合化の検討を実施した。また、術場での細胞播種プロセスを取り入れた治療システムの構築を視野に入れていることから、フィブロン材料上での細胞挙動についての基礎検討を始めた。

B. 研究方法

1) フィブロン微細ファイバー

絹糸より、フィブロインスポンジ作製に用いるものと同等のフィブロイン水溶液を調製した。微細ファイバーの紡糸は、エレクトロスピニング法により行った。エレクトロスピニングは、紡糸液としてフィブロイン水溶液に補助剤としてのポリエチレングリコール水溶液を添加したものをを用い、20kV の印加電圧での電場において、紡糸を実施した。

2) 微細ファイバー複合化

フィブロン微細ファイバーとフィブロ

インスポンジの複合化を3種のプロセスで検討した。

ア) フィブロインスポンジに直接紡糸して複合化する

イ) モールドに微細ファイバーを形成させ、そのモールドを用いてフィブロインスポンジを作製する

ウ) フィブロン微細ファイバーを破碎して、フィブロン水溶液に混合した後、スポンジを作製する

3) 力学的評価

微細ファイバー複合化フィブロインスポンジの強度、弾性率、伸度について、引っ張り試験（島津、EZ-Test）により評価した。

4) フィブロン上での細胞培養

フィブロインスポンジ作製の原料となるフィブロン水溶液からフィルムを作製し、そのフィルム上で ES 細胞や iPS 細胞のフィーダー細胞である SNL 細胞を培養し、細胞形態の変化を観察した。

C. 研究結果

1) 微細ファイバーの複合化

フィブロインスポンジとの複合化において3種類の複合化プロセスを試みた。ア) 作製されたフィブロインスポンジ上に直接エレクトロスピニングにより紡糸するプロセスは、フィブロインスポンジ上にフィブロン微細ファイバーマットが形成されたが、均一性が不良であり、また、その後の不溶化処理や洗浄過

程において、容易に微細ファイバーマットがスポンジから剥がれてしまうことが判明し、複合化プロセスとしては不適合であることが分かった。

ウ) 作製したフィブロイン微細ファイバーを凍結粉碎やミキサーによる破碎を行い、フィブロイン水溶液に混合してスポンジを形成させて複合化するプロセスでは、フィブロイン微細ファイバーの粉碎とフィブロイン水溶液への分散が困難であり、現状においては複合化プロセスとして確立することが出来なかった。粉碎微細ファイバーのSEM観察では、破碎後の会合による凝集が観察され、微細繊維としての分散が不可能であることが原因であると考察された。理論的には、最も効果が高いと考えられるプロセスなので、再考する必要がある。

イ) あらかじめモールド表面に微細ファイバーマットを形成させ、その上にフィブロイン水溶液を接触させ、スポンジを形成するプロセスは、微細ファイバーとスポンジの界面の融合が期待でき、ア)のプロセスの欠点を解決できる。すなわち、あらかじめモールド表面に形成しておいた微細ファイバーマットに原料であるフィブロイン水溶液を接触させることで、マットの一部が溶解し、フィブロインスポンジとの融合が密になると期待される。作製したフィブロイン微細ファイバー複合化スポンジの走査型電子顕微鏡写真を図1に示す。

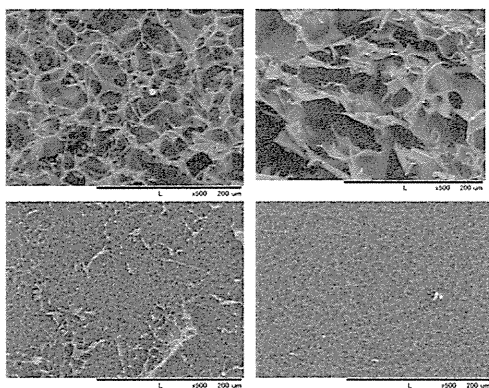


図1. フィブロイン微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジのSEM写真(上)スポンジ面、(下)微細ファイバーマット面

ア)のプロセスに比較して、良好な複合体の形成が可能であったが、やはり、微細ファイバーマットがフィブロインスポンジから剥がれるケースも観察され、今後の改良も必要であることが示唆された。

2) 複合化スポンジの引っ張り試験

イ) のプロセスで作製し微細ファイバーマットとフィブロインスポンジの結合が良好な試料について、引っ張り試験を実施した。図2に微細ファイバーマット複合スポンジ(A)とスポンジのみ(B)の代表的な応力-ひずみ曲線を示した。微細ファイバーマットを複合することで、引っ張り破断強度が向上していることが分かり、複合化による強度向上が可能であることが分かった。

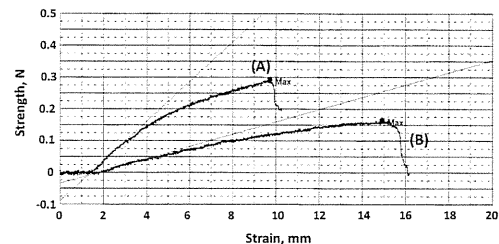


図2. 引っ張り試験による応力-伸長曲線(A)微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジ、(B)フィブロインスポンジ

一方で、微細ファイバーマット複合化により初期弾性率が高く(硬く)なり、伸度が低下した。これは、微細ファイバーマットの弾性的性質が優性となったことと、微細ファイバーマットの破断がスポンジ破断のトリガーになることを示している。

微細ファイバーマット複合化条件や、後処理条件の変更による微細ファイバーマット複合スポンジの力学物性が変化するかどうかを検証した。図3には、エレクトロスピニング時間に対する破断強度と弾性率の変化を示した。エレクトロスピニング時間が長い程、強度と弾性率が高くなる。この結果からも、複合化した微細ファイバーマットの物性が、優性にスポンジの物性を決定していることが分かる。図4には、複合化後の試料の後処理としてのエタノール処理におけるエタノール濃度と複合化スポンジの強度と弾性率の関係を示した。エタノール濃度が高い程、またエレクトロスピニング時間が長い程、強度と弾性率が高くなる。同じ条件で作製した微細ファイバーマット複合化スポンジの引っ張り試験の再現性に関する結果を図5に示した。若干のバラツキはあるが、著しく物性が異なることはないようである。よって、微細ファイバーマット複合化条件により、ある程度の物性のコントロールが可能であることを示す

ている。しかし、実際の臨床使用での目標とする強度は、まだ十分でないと考えられるので、治療システムの検討と密に連携して、プロセスを含め検討を進める必要がある。

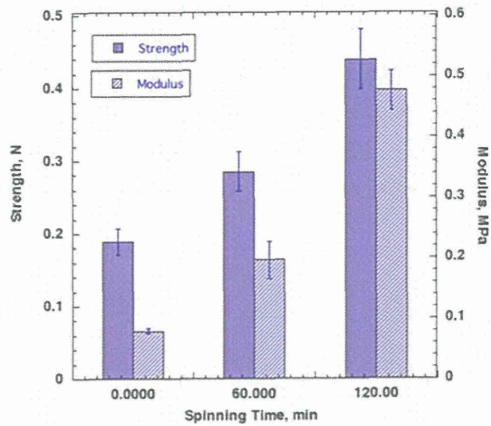


図3. エレクトロスピンニング時間による微細ファイバー複合化スポンジの強度と弾性率の変化

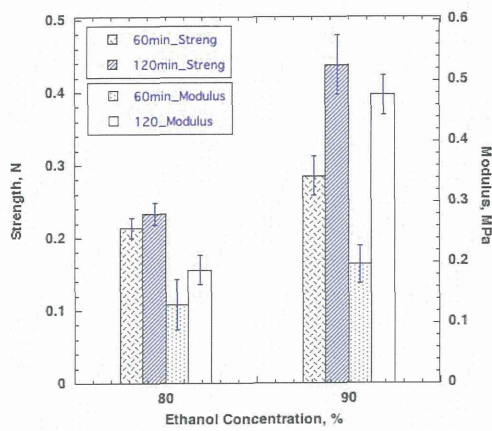


図4. 微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジのエタノール後処理におけるエタノール濃度による強度と弾性率の変化

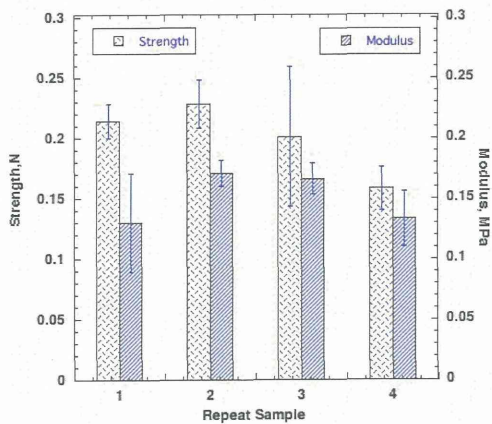


図5. 微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジの力学性質の再現性

3) フィブロイン水溶液中でのエレクトロスピンニング条件の探索

現在の技術においては、シルクフィブロインのエレクトロスピンニングにおいて微細ファイバーを形成するためには、20%近くの高いフィブロイン濃度やポリエチレンオキサイドなどの補助材の使用が必要となっている。しかし、高濃度のフィブロイン水溶液は極めて不安定であり、実用化においては課題となる。また、補助材の使用は、生体内での使用を考えるとできる限り用いないことが望ましい。そこで、10%以下の濃度で補助材を用いることなく、フィブロイン水溶液から紡糸できる技術開発の検討を始めた。

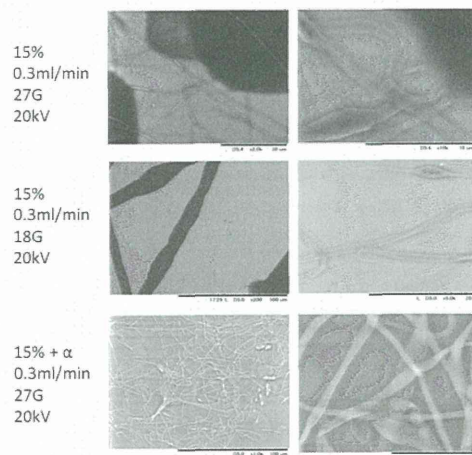


図6. フィブロイン水溶液からの種々の条件でのエレクトロスピンニングの結果。補助材としてのポリエチレンオキサイドを使用しない紡糸。 α は、フィブロイン分子の凝集を惹起すると考えられる溶媒。

低濃度フィブロイン水溶液からのエレクトロスピンニングは、紡糸液の粘度や紡糸中の溶媒の蒸発が重要な要因の一つと考えられる。そこで、紡糸空間の湿度の低下を行ったところ、微細ファイバーの形成が見られるものの、現状では継続的な紡糸までは至らなかった。(図6)そこで、紡糸液のフィブロイン分子をあらかじめ凝集しない程度で会合を促すことを試みた。フィブロインの凝集溶媒を少量紡糸液に添加し、エレクトロスピンニングを行った。その結果、図6に示すように、まだ完全ではないが、微細ファイバーの形成が可能であることが確認された。今後、新たな微細ファイバー複合化技術として検討を進める予定である。

4) フィブロイン上での細胞培養

動物評価において治療システムとして術場での患者さんの骨髄細胞をフィブロインスポンジに播種するプロセスを導入する可能性が検討されている。このプロセスにおいて、フィブロインスポンジ内で細胞がどのように播種、接着、増殖、分化するかの知見は、材料設計上も重要な知見となる。そこで、本年度はその予備検討として、再生医療で検討が進んでいるES細胞やiPS細胞の培養プロセスに用いられるSNL細胞のフィブロインフィルム上での動態を検討した。

図7に示すように、フィブロイン材料上で

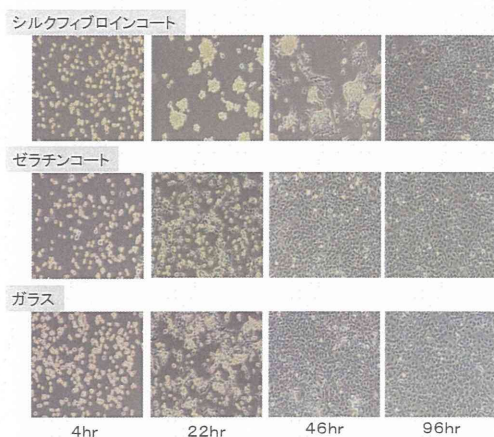


図7. 各種材料表面上でのSNL細胞の培養時間ともなう細胞形態の変化。シルクフィブロイン上では、培養初期において細胞凝集塊の形成が観察される。

は、培養初期には細胞の接着性が他の表面に比較して高くなく、凝集塊を形成する傾向があるものの、培養を継続することで、他の表面と同様に接着・増殖していくことが観察された。細胞の凝集化は、細胞の分化や基質産生に有効に働くことが報告されているので、骨髄由来細胞に対しても、フィブロイン材料に接した細胞の分化に有効に働く可能性が高い。そこで、次年度は骨髄由来細胞を用いて、フィブロイン材料上での接着や増殖、運動、あるいは分化についての検討を行う。

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。動物評価による治療システム構築の検討が進められる中で、フィブロインスポンジの強度の課題が顕

在化し、その課題を解決する目的で、本年度は微細ファイバー複合化によるフィブロインスポンジの改良を試みた。3種類のプロセスで試みた結果、あらかじめモールドに微細ファイバーマットを形成する手法が良好な複合化が可能であった。得られた微細ファイバーマット複合化スポンジの力学試験により、強度の向上が確認できたため、微細ファイバーマットによる複合化が強度改善に有効であることが確認できたが、複合化による弾性率や伸度の変化も観察され、また、臨床使用上で十分な強度であるかの課題もあり、本プロセスの適正化も含めて、動物評価と連携した改良の検討を継続する必要がある。実用製品化を目指して、低濃度フィブロイン水溶液で補助材を使用せず微細ファイバーを形成する検討では、あらかじめフィブロインを適度に会合状態にすることで、微細ファイバー形成が可能であることを見出した。しかし、繊維径や再現性など十分でないので、条件の適正化の検討が必要である。

フィブロイン上でのSNL細胞培養結果は、初期の細胞の凝集傾向とその後の接着増殖というゼラチン表面等とは異なる挙動を示すことが観察された。骨髄由来細胞においても、フィブロイン材料上では特異的な挙動を示すことが推察される。この性質が、フィブロインスポンジを治療システムで用いるときに、他材料ではない特性を発現できる特徴となり得ると考えられる。

E. 結論

エレクトロスピニングによる微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジを作製し、引っ張り強度試験により強度の向上が可能であることを確認した。補助材を使用することなく比較的濃度のフィブロイン水溶液から微細ファイバーを形成できることを見出した。SNL細胞培養では、フィブロイン材料上での特徴的な挙動を確認した。

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
3. その他

フィブロインスポンジ表面近傍における細胞分布に関する研究

研究分担者 富田 直秀 京都大学工学研究科教授

研究要旨

これまでの基礎研究及び動物実験の結果より、フィブロインスポンジ表面上における細胞塊の形成が、早期の軟骨再生に重要であることが示唆されている。本研究では、フィブロインスポンジ表面近傍における細胞移動動態を3次元観察し、その分布の定量評価を試みた。

A. 研究目的

シルクフィブロインスポンジ内では細胞塊が形成されやすいことはすでに報告されているが、フィブロインスポンジ表面上にも細胞塊および膜が形成され、それが早期の軟骨形成に大きな役割を演じていることが示唆されている。よって本年度は最適スポンジ設計の観点から、フィブロイン水溶液濃度及び冷却速度を変化させて作製した9種類のフィブロインスポンジを用い、共焦点顕微鏡によって、スポンジ表層100 μ m以内に存在する細胞挙動の評価を行った。まず、骨髄間質細胞（BMSC）の細胞骨格形成を免疫蛍光染色により定性的に評価した。次に、細胞核の位置を染色により特定し、その位置座標を元に、Voronoi法を用いたスポンジ最表層部の凝集挙動評価、及び深さ方向に対する細胞分布評価を行った。

B. 研究方法 B1 材料

B1-1 骨髄間質細胞

本実験で用いたBMSCは、ラットF344（6週齢、雄）（オリエンタルバイオサービス製）から採取された。ジエチルエーテルを吸引させ安楽死させたラットから大腿骨を摘出し、22ゲージの注射針（テルモ製）を用いて培地を加えながら大腿骨内部を洗浄する事によって、骨髄を採取し遠沈管に保存した。もう片方の大腿骨に対しても同様の処置を施し、ラット1匹につき30mlの細胞懸濁液を作成した。尚、1匹のラットから作成された懸濁液は同一の遠沈管に保存した。これを十分にピペッティングした後、約30秒間静置し、遠沈管底部に

沈殿した不純物が混入しないように注意しながら、約15mlずつ2枚の組織培養用フラスコ（培養面積75cm²，IWAKI製）に播種した。

B1-2 各種フィブロインスポンジ培養担体

まず全節と同様の方法で、フィブロイン水溶液を作製し、終濃度が2.0 wt/Vol%、4.0 wt/Vol%、6.0 wt/Vol%の3種類となるように調整した。また、これらの溶液にはジメチルスルホキシド（DMSO）が終濃度で1 Vol%含まれている。過冷却を生じさせる為、まず、これらのフィブロイン水溶液温度を-4.5 $^{\circ}$ Cから-3.5 $^{\circ}$ C/hの割合で5時間かけて-20 $^{\circ}$ Cまで低下させた。その後-20 $^{\circ}$ Cで8時間冷却し、フィブロインからなるスポンジ構造を得た(41,60)。その際、本実験では周囲との熱伝導率を変化させるため、冷却時に用いる鋳型を、アルミ板、アクリル板（厚さ2mm）、アクリル板（厚さ10mm）の3種類に変化させた。冷却後、室温でフィブロインスポンジを解凍し、蒸留水中に浸漬することでDMSOの除去を行った。尚、蒸留水は12h毎に計6回交換した。以上のように本研究では、スポンジ作製の際に使用するフィブロイン水溶液濃度と鋳型を変化させる事によって、計9種類のスポンジを作製した。尚、本研究で用いたフィブロインスポンジは、農業生物資源研究所のKambeらにより作成された。

以下、各フィブロインスポンジの実験群を、Table 1のように命名する。また、各群のSEM画像をFig. 1～3に示す。得られたフィブロインスポンジは滅菌水中でオートクレーブ

(HVE-25, 平山製作所製)にて滅菌し, 4° C, PBS 中で保存した. 使用直前に, フィブロインスポンジを生検トレパン (BP-80F, アズワン製) を用いて, 直径 8 mm, 厚さ 1 mm にくり抜き, DMEM 中にて 37° C, 湿度 100%, 5%CO₂ 条件下で, 12 時間以上インキュベートした.

Table1. Names of each experimental group.

Mold type	Fibroin aqueous concentration (wt/Vol%)		
	2.0	4.0	6.0
Acrylic board (10mm)	F2_Acr10	F4_Acr10	F6_Acr10
Acrylic board (2mm)	F2_Acr2	F4_Acr2	F6_Acr2
Aluminum board	F2_Alm	F4_Alm	F6_Alm

B2 培養及び観察

B2-1 拡大培養

B1 のように播種された BMSC に対して, 組織培養用フラスコにて, 37° C, 湿度 100%, 5%CO₂ 条件下で 7 日間拡大培養を行った. 但し, 播種後 24 時間後に PBS を用いてフラスコの細胞播種面を 2 度洗浄し, 新たな培地を加えた. その後の培地交換は 2 日毎に行った.

B2-2 生細胞核染色

B1 のように培養した BMSC をトリプシン溶液にてフラスコから剥離し, PBS を用いて 2 回洗浄した. その後, 細胞懸濁液中に Hoechst 34580 (Molecular Probes®製) を 0.5 μl/ml の濃度で添加し, 37°C, 湿度 100%, 5% CO₂ 条件下で 60 分間インキュベートする事によって, BMSC の細胞核を生細胞の状態に染色した. 尚, 蛍光退色を防ぐため, 以後の操作は可能な限り全て暗所で行った.

B2-3 スポンジ培養

B4 節のように細胞核を染めた BMSC を 5.0 × 10⁴ cells/sponge の濃度で各種フィブロイ

ンスポンジ担体に播種した. スポンジ培養に用いる培養液 (以下, 分化培養液) は Sekiya らのプロトコル 61-63) を参考に以下の割合で作成した. すなわち, high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen 製, 以下 high-DMEM) に, 10 ng/ml の TGF-μ₃ (R&D 製), 100 nM の Dexamethasone (Sigma 製), 50 μg/ml の L-ascorbic acid 2-phosphate (Sigma 製), 40 μg/ml の proline (Sigma 製), 100 μg/ml の pyruvate (Sigma 製), 50 mg/ml の ITS + Premix (6.25 μg/ml insulin, 6.25 μg/ml transferrin, 6.25 ng/ml selenious acid, 5.35mg/ml linoleic acid, 1.25 mg/ml bovine serum albumin, Becton Dickinson 製) を添加したのを用い, 37° C, 湿度 100%, 5%CO₂ 条件下でインキュベートした. 分化培養液は 2 日毎に交換した.

B2-4 免疫蛍光染色

BMSC を播種した各種フィブロインスポンジ担体を, 1, 3, 5, 7 日間インキュベートした後, 免疫蛍光染色操作を次のように行った. まず培地を吸引し, 超純水で 25 倍希釈した Large Volume Phosphate Buffered Saline (Lab Vision 製) (以下, 1×PBS) で 3 回洗浄した. 次に, 1×PBS で希釈した 4%パラホルムアルデヒド溶液 (以下, 4%PFA) (武藤化学製) を加え, 室温下で 20 分間放置する事でスポンジ内の BMSC を固定した. 固定後, 超純水で 20 倍希釈した Phosphate Buffered Saline and Tween 20 (Lab Vision 製) (以下, 洗浄液) で 2 回洗浄し, 1×PBS で希釈した 0.1%Triton X-100 (Research Organics 製) 溶液を加え, 浸透化処理を施した. 洗浄液で 2 回洗浄し, 1×PBS で希釈した 1 wt/Vol%牛血清アルブミン (82-045-1, Serological 製) 溶液を加え, 室温下で 30 分間静置しブロッキング処理を行った. その後, Alexa Fluor® 488 Phalloidin (Molecular Probes®製) を加え, 室温下で 60 分間静置した. 静置後, 洗浄液を加え 10 分間静置して洗浄する操作を 3 回繰り返した. 以上の操作で各種フィブロインスポンジ担体中に存在する BMSC の F-アクチンを染色した. 洗浄後, 1×PBS を加えて遮光し, 観察時まで 4° C で保管した.

B2-5 共焦点観察

B6 のように蛍光染色操作を行った各種フィブロインスポンジ担体を, 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV1000-D, BX61W1, オリン

パス製)を用いて観察し、3次元蛍光画像を取得した。観察方法は以下の通りである。レーザー波長は405 nmと473 nmの2種類を用い、それぞれHoechst 34580, Alexa Fluor® 488 Phalloidinを励起させた。その際、Line Sequential スキャンにより各色毎に蛍光画像を取得する事で、クロストークを回避した。各スポンジに対して、表層より100 μmの範囲を5 μm刻みで撮影することにより、21枚の画像を取得した。また、撮影深さ20 μmごとにレーザー強度を変化させ、各画像の条件を可能な限り統一した。以上のような条件で取得した画像のボクセル情報を元に、3次元画像を再構成した。

1つのフィブロインスポンジ担体に対して3か所の観察地点(画像サイズ635 μm×635 μm)を選択し、培養1, 3, 5, 7日目の染色画像を取得した。以下、各種フィブロインスポンジから得られたデータ名はTable 1に準じる。

B3 解析方法

B3-1 細胞位置の抽出

得られた画像から、3DイメージングソフトウェアであるVelocity Visualization(PerkinElmer製)64)及び、3D解析ソフトウェアであるVelocity Quantitation(PerkinElmer製)65)を用い、各蛍光画像の輝度(最大値4096)を元にして、以下の手順で細胞座標を抽出した。

まず、各画像から、青の輝度を持つオブジェクトを抽出し、それぞれのオブジェクト体積が1000 μm³以下となるように、各オブジェクトを分割した。次に、分割したオブジェクトの中で、緑の輝度が600以下のものを除外した。その後、オブジェクト体積が2000 μm³より大きいもの、及び100 μm³未満のものを順に除外し、最後に残ったオブジェクトをBMSCの細胞核として特定した。

B3-2 細胞数の算出

特定された細胞核の個数を計測し、培養1, 3, 5, 7日目において表層から100 μm以内に存在する細胞数を特定した。また、表層からの深さを10 μm刻みで層別して、各層ごとの細胞数を算出した。その値を表層から100 μm以内に存在する細胞数で除すことによって、深さ方向に対する細胞比を算出した。

B3-3 Voronoi 法による細胞分布評価及び有効領域の設定

ボロノイ分割法とは、隣り合う点間を結ぶ直線に垂直二等分線を引き、これをもとに各点の最近隣領域を分割する方法である。

ある平面上に、個の点(は1からまでの整数)の集合が存在すると仮定する。今このうちの2点(但し)に着目し、線分の垂直二等分線を用いて平面全体を2つの領域に分割し、このうち点を含む方の領域をと定義する。このは、点の方が点より近い領域であると言える。点とそれ以外の個の点との組み合わせに対し同様の操作を行ったとすると、これら個の半平面が共通する領域内では、どの座標に着目しても点 が全要素のうち最も近い点となることが分かる。つまり、

$$V(i) = \bigcap_{i \neq j} H(p_i, p_j) \quad (1)$$

としたとき、は点の最近隣領域となる。この領域のことを母点に対するボロノイ領域(Voronoi polygon)と呼ぶ。

観察により得られた細胞分布をもとに、細胞の分布形態評価を行う。平面上に分布する細胞を母点とし、培養平面をボロノイ領域に分割する。この際、観察範囲の周縁に分布する細胞のボロノイ領域欄外に大きく広がった形状を取ることから評価の対象として相応しくない。そのため、与えられた細胞分布の凸包を算出し、ボロノイ分割によって得られた多角形のうち、全ての頂点が赤線で示す凸包領域の内側に存在するもののみを解析対象とした。これらの多角形の事を、以下では有効領域(Effective region)と呼ぶ。

各細胞を母点とするボロノイ領域に対して面積を測定し、それらの値をもとにArea Disorder(以下、AD)を(2)のように算出した。

$$AD = 1 - \left(1 + \frac{\sigma_A}{A_{av}}\right)^{-1} \quad (2)$$

B3-2 細胞数の算出

各細胞を母点(2)はボロノイ領域の面積不均質性を評価する指標である。上式におけるは面積の標準偏差、は面積の標準偏差をそれぞれ示す。このAD値は、全ボロノイ領域間の面積のばらつきが大きいほど1に、ばらつきが小さいほど0に近い値を示す。

この方法で各種実験群の AD を算出した。但し、本章においては表層から $40\mu\text{m}$ 以内に存在する細胞のみを解析対象とし、その範囲を $20\mu\text{m}$ 刻みで 2 層に分類した。その後、各層に存在する BMSC の X, Y 座標のみを用いて、培養 1, 3 日目の AD を算出した。但し、本実験では有効領域数が 20 以上となる群のみを解析対象とした。

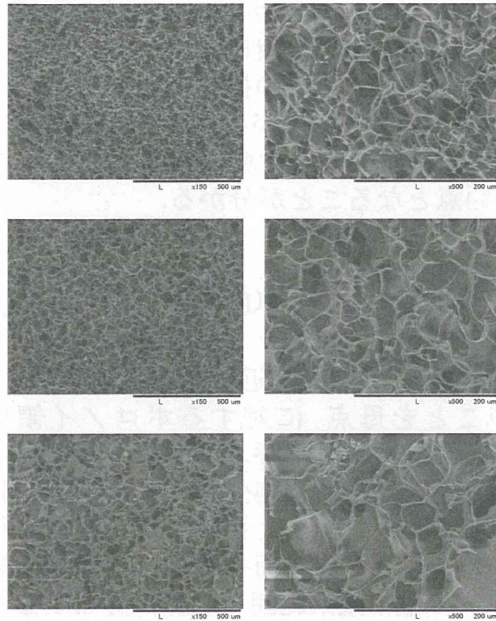


Fig. 1 Scanning electron microscope image of three different fibroin sponges in Acr10 groups at 150-fold (a, c, e) and 500-fold (b, d, f) magnification.

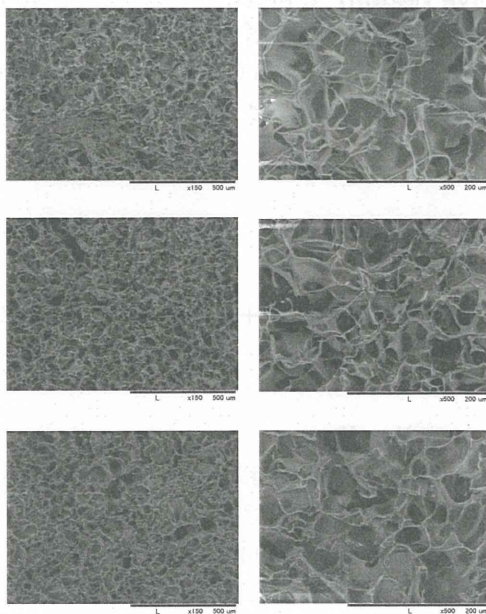


Fig. 2 Scanning electron microscope image of three different fibroin sponges in Acr2 groups at 150-fold (a, c, e) and 500-fold (b, d, f) magnification.

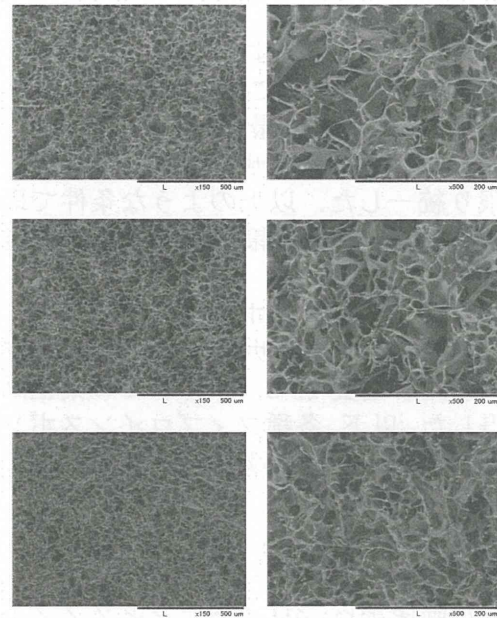


Fig. 3 Scanning electron microscope image of three different fibroin sponges in Acr10 groups at 150-fold (a, c, e) and 500-fold (b, d, f) magnification.

C. 研究結果

各種実験群の培養 1, 3, 5, 7 日目における免疫蛍光染色画像を表層から $100\mu\text{m}$ の範囲に渡って投影したプロジェクション画像を Fig. 4.4-7 に示す。青がフィブロインスポンジ及び細胞核、緑が F アクチンを示している。同一の鋳型で作成されたスポンジ同士を比較した場合、F6 群が最も観察された細胞数が多かった。また、F6 群では全観察日程に渡って、アクチン繊維が束になったストレスファイバーが細胞の対角線上に走っている様子が数多く確認された。F4 群にも F6 群ほどではないものの、ストレスファイバーの発達が確認された。両群と比較すると、F2 群ではストレスファイバーの発達はあまり観察されなかったが、アクチンフィラメントがゲル状の網目構造を形成しているものが多く確認された。また、細胞

形状も球形のものが比較的多かった。

一方、同一のフィブロイン水溶液濃度で作成されたスポンジ同士を比較した場合、特に培養 1, 3 日目において、Alm 群で観察される細胞数が多く、比較的大きな凝集体が形成されていた。Acr2 群においても、F6 群では同様の傾向が見られたが、F2, F4 群では培養 5 日目を除き、観察された細胞数は少なかった。また培養 5 日目を除いて、Acr10 群で観察された細胞数や凝集体は比較的小なかった。

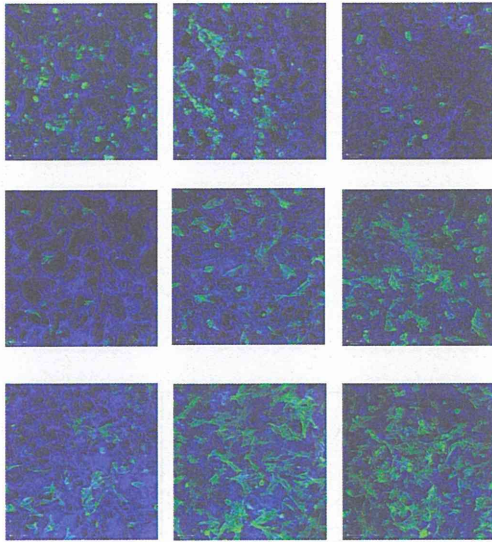


Fig.4 Immunofluorescence staining of nucleus and F-actin of BMSCs in nine different fibroin sponges at 1 day in culture.

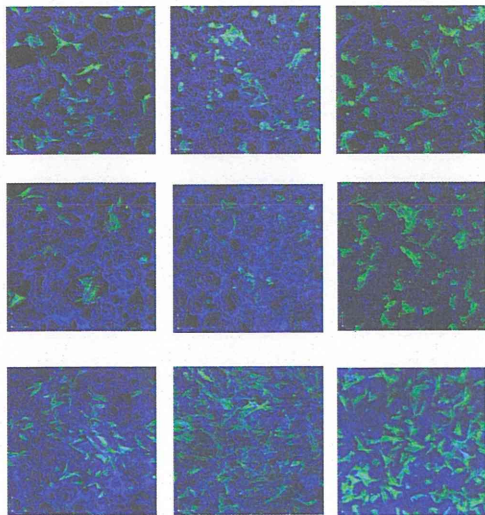


Fig.5 Immunofluorescence staining of nucleus and F-actin of BMSCs in nine different fibroin sponges at 3 days in culture.

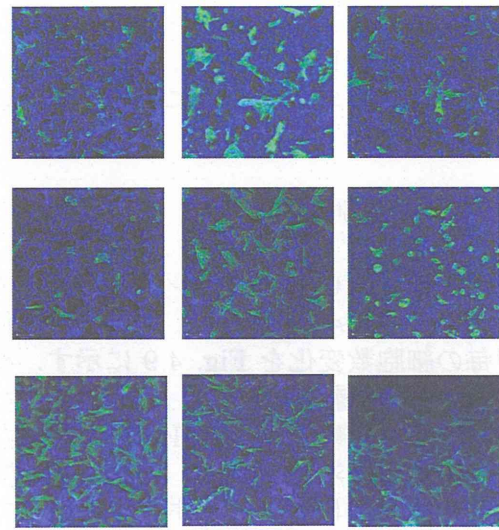


Fig.6 Immunofluorescence staining of nucleus and F-actin of BMSCs in nine different fibroin sponges at 5 days in culture.

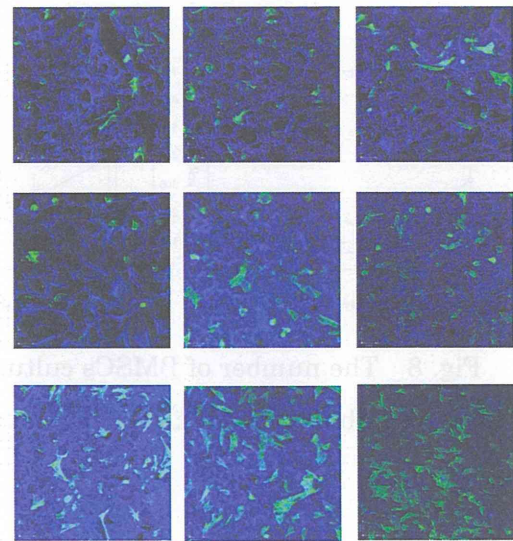


Fig.7 7 Immunofluorescence staining of nucleus and F-actin of BMSCs in nine different fibroin sponges at 7 days in culture.

表層 100 μ m 以内に存在する全細胞数

各種実験群において、スポンジ表層から 100 μ m 以内で特定された細胞数の培養日数に伴う変化を Fig. 4.8 に示す。横軸は培養日数、縦軸は細胞数である。同一の鋳型で作成されたスポンジ同士を比較した場合、多くの観察時点において、F6 群は F2, F4 群に比べ細胞数が高い傾向を示した。また培養 5 日から

7日にかけて、多くの実験群において細胞数が減少する傾向を示した。さらに、Alm 群, Acr2 群と比べ、Acr10 群は全体的に細胞数が低い傾向を示した。

10 μ m 刻みで層別した細胞数

各種実験群において、スポンジ表層からの深さを 10 μ m 刻みで層別した、培養日数に伴う各層毎の細胞数変化を Fig. 4.9 に示す。横軸はスポンジ表層からの深さ、縦軸は表層 100 μ m 以内で観察された細胞数を 1 とした時の、各層毎の相対値である。培養 1 日目では、多くの実験群においてスポンジ表層部で高い値を示し、スポンジ内部に進むほど値が低下する傾向が見られた。F4_Alm 群, F6_Acr2 群においては、同様の傾向が培養 3, 5, 7 日目にも確認された。また培養 7 日目においては、F4_Alm 群, F6_Acr2 群を除いて、細胞数の深さ依存性はあまりみられなかった。

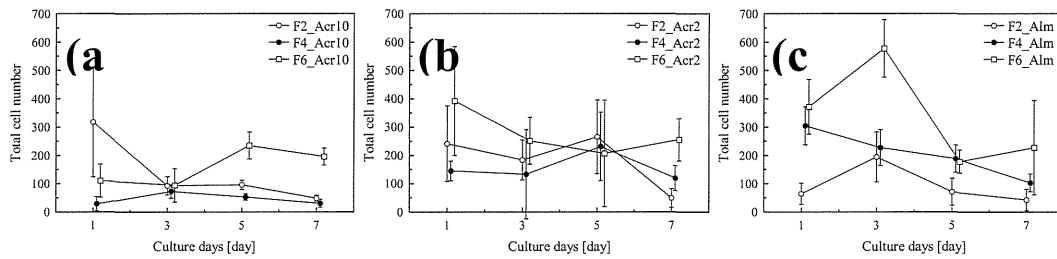


Fig. 8 The number of BMSCs cultured for 1, 3, 5 and 7 days in Acr10 (a), Acr2 (b), and Alm (c) groups. Data represents means \pm S.D.

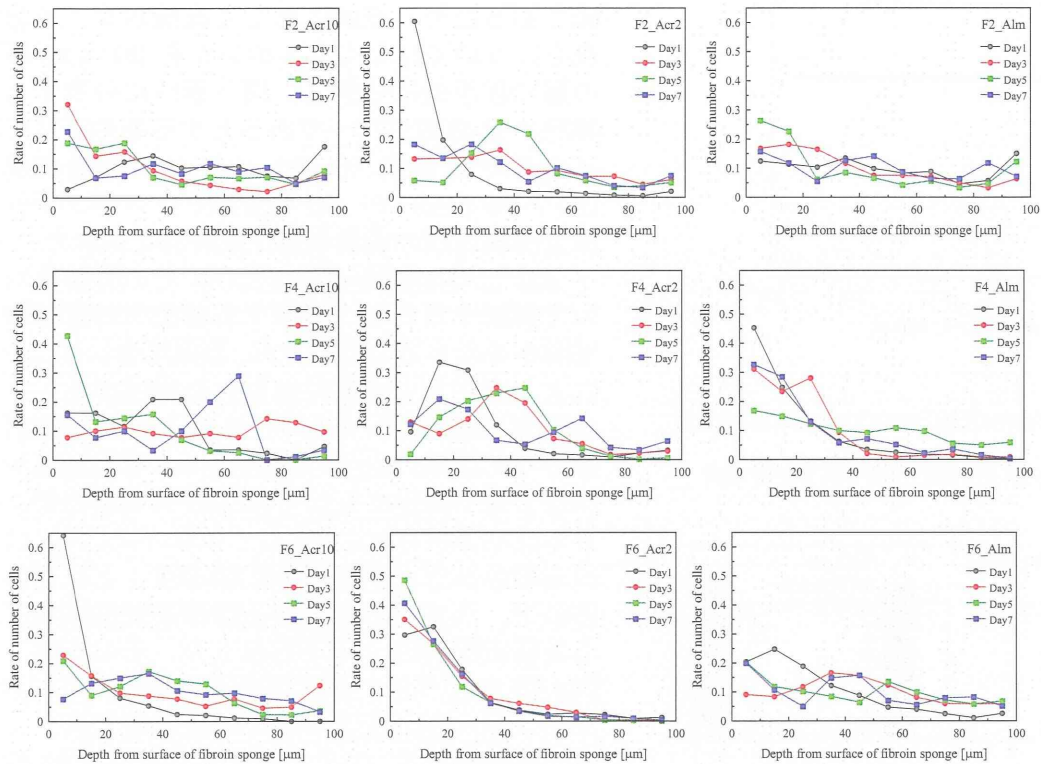


Fig. 9 The depth dependent changes in cell number of BMSCs in nine different fibroin sponges cultured for 1, 3, 5 and 7 days.

Voronoi 法による細胞分布評価

配置点数の変化に伴うシミュレーションモデルの有効領域数と AD の変化を Fig. 10 に示す. 横軸は配置点数, 縦軸はそれぞれ AD (a), 有効領域数 (b) である. 配置点数の増加に伴い, AD は一定値に収束する傾向を示した. また, 有効領域数は増加する傾向を示した. AD と有効領域数の関係を Fig.11 に示す. 有効領域数の増加に伴い AD は上昇し, 一定値に収束する傾向を示した. また, 配置点数 300 における有効領域数の平均値は 235.763, その時の AD の平均値は 0.346 であった. これらの結果から, 本実験ではこの 0.346 をランダムな点配置に対する AD の収束値と仮定した. また, ランダムな点配置を評価した AD の平均値がこの値の 95% である 0.3287 以上となるのは配置点数が 44 以上の時であり, 配置点数 44 における有効領域数の平均値は 20.056 であった. 以上の結果より本研究では, この 20.056 という値を参考にし, 有効領域数が 20 以上のもののみを解析対象とした.

表層 0 - 20 μm , 20 - 40 μm における, 各種実験群の培養 1, 3 日目の AD を Fig.12 に示す. 横軸は培養日数, 縦軸は AD である. 全ての実験群において AD がランダムな配置よりも高い値を示した. また, これらの値はフィブロイン平面上で 24 時間培養した軟骨細胞が示した値よりも高いものがあった.

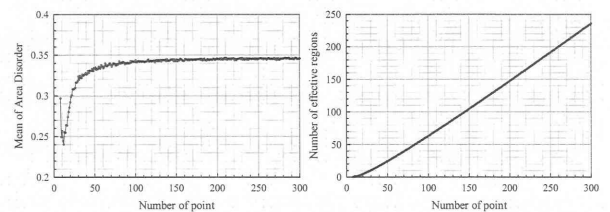


Fig. 10 The relationship between number of randomly-placed points and mean of Area Disorder (a) or number of effective regions (b).

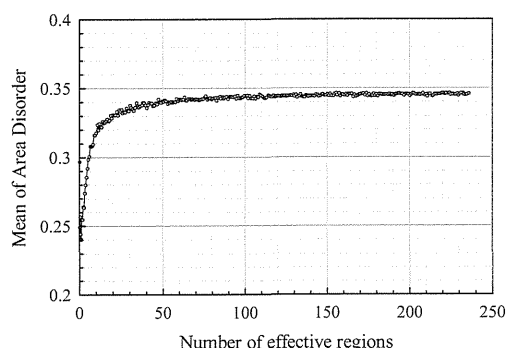


Fig. 11 The relationship between number of effective regions and mean of Area Disorder.

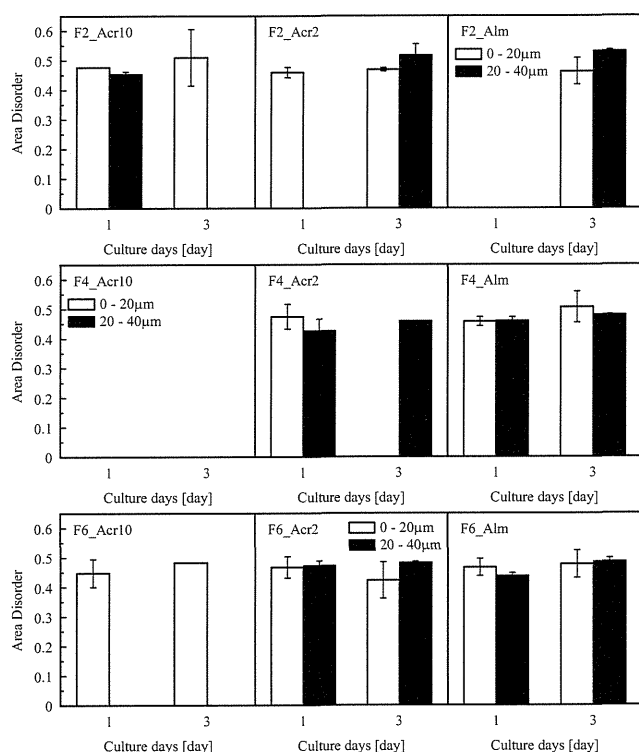


Fig. 12 The depth dependent changes of Area Disorder in nine different fibroin sponges cultured for 1, and 3 days. Blank data of each graph means that there is no data which is not less than 20 in number of effective regions.

E. 結論

有効領域を設定した Voronoi 法を用いたフィブロイン表面近傍における凝集挙動の定量評価を行った。これまで用いていた 2 次元ボ

ロノイ分割の 3 次元への拡張は計算過程が複雑であるため、空間に対して直接ボロノイ分割を行うのではなく、スポンジを $20 \mu\text{m}$ 厚の層に仮想的に分解し、同一層内に分布する細胞の Z 座標が同一であるとする条件下にて、スポンジ最表層 ($0 - 20 \mu\text{m}$) 及び準最表層 ($20 - 40 \mu\text{m}$) の AD を算出し、スポンジ表面近傍表層部の凝集挙動定量評価を試みた。

AD は有効領域の面積及び、その分散を用いて評価するため、解析する画像中の有効領域数が少なすぎる場合には、凝集度合いが AD によって正しく評価できない可能性がある。この点に関してシミュレーションによる検討を行った結果、Fig11 に示す通り、有効領域が少なすぎる画像に対しては、AD が実際の値よりも低く算出された。そこで本章では、Fig. 11 から導かれた「有効領域数 20 以上」という条件の下、スポンジ最表層及び準最表層における各種実験群の AD を評価した。その結果、Fig.12 のように、全ての実験群において AD がランダムな配置よりも高い値を示した。またこれらの値は、フィブロイン平面上で 24 時間培養した軟骨細胞が示した値よりも高いものが多かった。以上の結果から、フィブロインスポンジ内においては、スポンジ種によらず凝集体が形成されていることが定量的に示された。一方、群間の AD に顕著な傾向は見られなかった。

このように、フィブロインスポンジ表面近傍における細胞移動動態を 3 次元観察し、その分布の定量評価が可能となった。今後、この手法を用いたフィブロインスポンジ製造条件の最適化を検討する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1 件

Otaka A., Kachi D. N., Tomita N et al, Observation and quantification of chondrocyte aggregation behavior on fibroin surfaces using Voronoi partition. Tissue Engineering Part C Methods 19(5):396-404,2013.

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
3. その他

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、骨髄刺激後にフィブロインスポンジを被覆して軟骨修復に及ぼす影響を検討した。組織学評価では、フィブロイン被覆群で有意に優れた組織修復が認められた。さらに、軟骨欠損部に骨髄細胞播種したフィブロインを被覆する方法を検討した。この方法では、肉眼所見上、細胞播種群における有意な軟骨修復促進効果は認められなかった。

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。

前年度（平成 24 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、欠損部をフィブロインスポンジで被覆し、局所刺激性、血液学的検査に及ぼす影響、軟骨再生、について検討した。その結果、術後 12 週の時点で、フィブロインの関節内留置による局所の炎症所見や血液学的検査上の異常は認められず、安全性が確認された。軟骨欠損部は、肉眼的には、フィブロイン群のみで白色の修復組織で覆われており、フィブロイン被覆による軟骨再生効果が認められた。

本年度の研究目的は、1. 骨髄刺激とフィブロイン被覆により再生した軟骨組織を組織学的に評価すること 2. 骨髄刺激法ではなく、骨髄液から採取した間葉系幹細胞をフィブロインスポンジに播種して軟骨欠損部を被覆する方法を行い、その安全性と軟骨修復効果を検討すること の2つである。

B. 研究方法

B-1 : 骨髄刺激+フィブロイン被覆法

1) 関節軟骨欠損モデルの作製と処置

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、軟骨欠損部を厚さ 3mm のフィブロインスポンジで被覆し、絹糸で欠損部周囲に縫合した（図 1）。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）、局所状態、血液・生化学的検査、再生軟骨の肉眼所見の観察、および組織学的検討を行った。