

価および遺伝子発現の評価を行った。

1. 組織学的評価

培養軟骨組織を Alcian blue 染色と S100 免疫染色を行った。

培養軟骨組織を半分に縦割後に中和ホルマリンで固定したものを、パラフィン包埋ブロック (FFPE) を作製、 $3\mu\text{m}$ に薄切し染色を行った。

軟骨の染色は酸性ムコ多糖の硫酸基とカルボキシル基に特異的に結合する Alcian Blue 染色を行った。アルシアン青 (pH2.5) 染色液を用い染色後、ケルンエヒテロートで核染色を行っている。また、S-100 は主に神経系のマーカーとして知られているが、神経組織以外に軟骨細胞にも認められることが広く知られている。S-100 蛋白の染色は免疫組織化学法 (immunohistochemistry:IHC) でおこなった。抗体は DAKO の抗ウサギポリクローナル抗体を用いポリマー法 (DAKO:Envision) にて DAB 発色させ評価を行った。

2. Real-time PCR による遺伝子発現評価

培養軟骨組織の残り半分より Trizol[®] (Life technology) を用いた Acid Guanidine thiocyanate-Phenol-Chloroform (AGPC) 法にて RNA 抽出を行い、SuperScript VIL0 MasterMix[®] (Invitrogen) を用いて逆転写を行った。Real-Time PCR は軟骨分化関連遺伝子であるアグリカン (ACAN)、I、II および X 型コラーゲン (COL-1, 2, 10)、SOX9 の発現の評価を行った。

また、フィブロインスポンジへの軟骨細胞播種後の軟骨細胞の遺伝子発現の経時的変化を調べるために、播種後 1、3、7 日目に同様に RNA を抽出し、遺伝子発現を評価した。GAPDH を用

いて補正を行い、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いて 2 群間の遺伝子発現を比較した。

B-2. ヒト骨髄細胞播種フィブロインスポンジの軟骨分化

1) 対象

同意が得られた OA 患者から HTO 手術時に骨髄を採取した。

2) 培養方法

骨髄採取は骨髄穿刺針を用いて腸骨から行い、ヘパリン生食入りシリンジへ合計 10cc 採取した。シリンジ内の骨髄液を $70\mu\text{m}$ nylon mesh cell strainer を通した後、骨髄間葉系幹細胞分離デバイス (Kaneka) にて細胞を分離した。 1.67×10^7 cells/ml の細胞数となるように細胞浮遊液を調整し、直径 8mm のフィブロインスポンジ上へ $30\cdot 1(5\times 10^5)$ 播種した。 37°C インキュベータ内で 1 時間放置した後、軟骨分化誘導培地を加えて $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C インキュベータ内で 3 週間培養を行った。

3) 評価方法

3 週間後にフィブロインスポンジを回収し、組織学的に検討を行った。

C. 結果

C-1. フィブロインスポンジにおけるヒト軟骨細胞培養

1) 組織学的評価 (Fig 1)

フィブロインスポンジを用いたヒト軟骨細胞培養において BMP-2 添加なし群では、alcian blue 染色で染色される組織は認めず、軟骨組織形成はほとんど認めなかった。一方で、BMP2 添加群では、alcian blue 染色にてフィブロイン

スポンジ表層を中心に良好に染色される組織を認め、BMP-2 添加により軟骨組織形成が促されたことが示唆された。

2) 遺伝子発現 (Fig 2, 3)

ACAN、COL2A1、COL10A1 の発現が BMP-2 添加群で有意に高かった。一方で SOX9 と COL1A1 は BMP-2 非添加群で発現が高かった。また、フィブロインスポンジへの軟骨細胞播種後の経時的な遺伝子発現の変化では、播種後 1、3、7 日目ともに COL10A1 を除いた 4 遺伝子ともに BMP-2 添加群の方が発現量は多かった。各遺伝子の経時的変化では、ACAN、SOX9、COL2A1 は 3 日でもっとも発現量が多く、COL1A1 と 10A1 は経時的に発現量が増加していた。

C-2. ヒト骨髄細胞播種フィブロインスポンジの軟骨分化 (Fig 4)

腸骨からヒト骨髄細胞は 10cc 当たり平均 4.7×10^7 個採取された。骨髄細胞をフィブロイン上で培養を試みたが細胞の生着、増殖は得られなかった。単層培養においては間葉系幹細胞

が得られ、また、骨分化誘導培地にて骨分化を確認することができた。

D. 考察および結語

人工膝関節置換術時に軟骨細胞を採取し、フィブロインスポンジ内で培養を行い、病理組織学的評価および遺伝子発現の評価を行った。また、骨髄細胞のフィブロインスポンジ内での軟骨分化誘導を行えるか検討した。高齢者の骨髄細胞では、動物細胞と比べると *in vitro* での軟骨分化誘導は困難であることが判明した。高齢者の骨髄細胞の播種法に関しては、今後検討が必要と思われる。継代培養したヒトの軟骨細胞は、通常の培養ではフィブロイン内に軟骨組織を形成がしにくく、軟骨分化条件+BMP2 の添加により軟骨組織形成することが確認された。

今回の結果よりフィブロインスポンジでヒト細胞を培養することが確認できたが、通常の培養条件では軟骨組織形成が得られにくく、今後ヒトの広範囲軟骨損傷の治療にフィブロインスポンジを臨床応用していく上ではより詳細な培養条件を検討する必要がある。

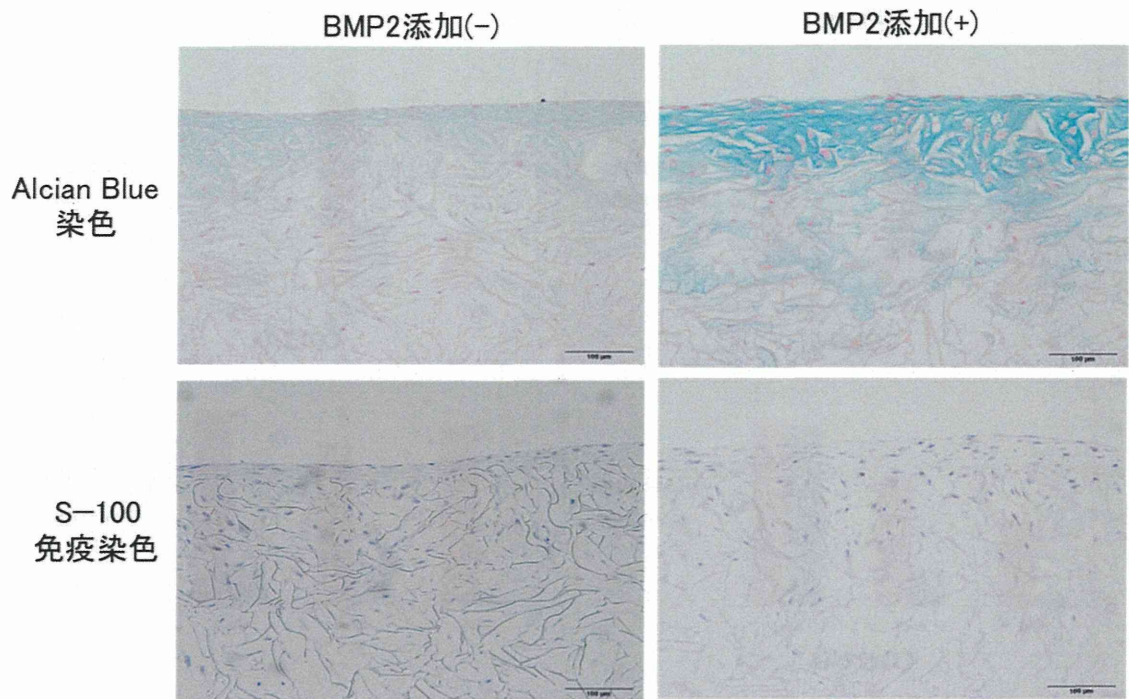


Fig1. フィブロインスポンジにおけるヒト軟骨細胞培養4週の組織像. BMP-2濃度：200ng/mL

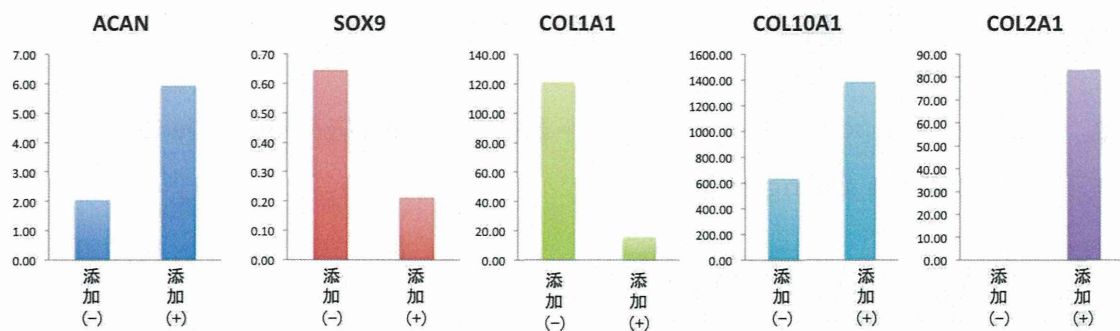


Fig2. フィブロインスポンジにおけるヒト軟骨細胞培養の BMP-2 添加群と非添加群の遺伝子発現. BMP-2濃度：200ng/mL

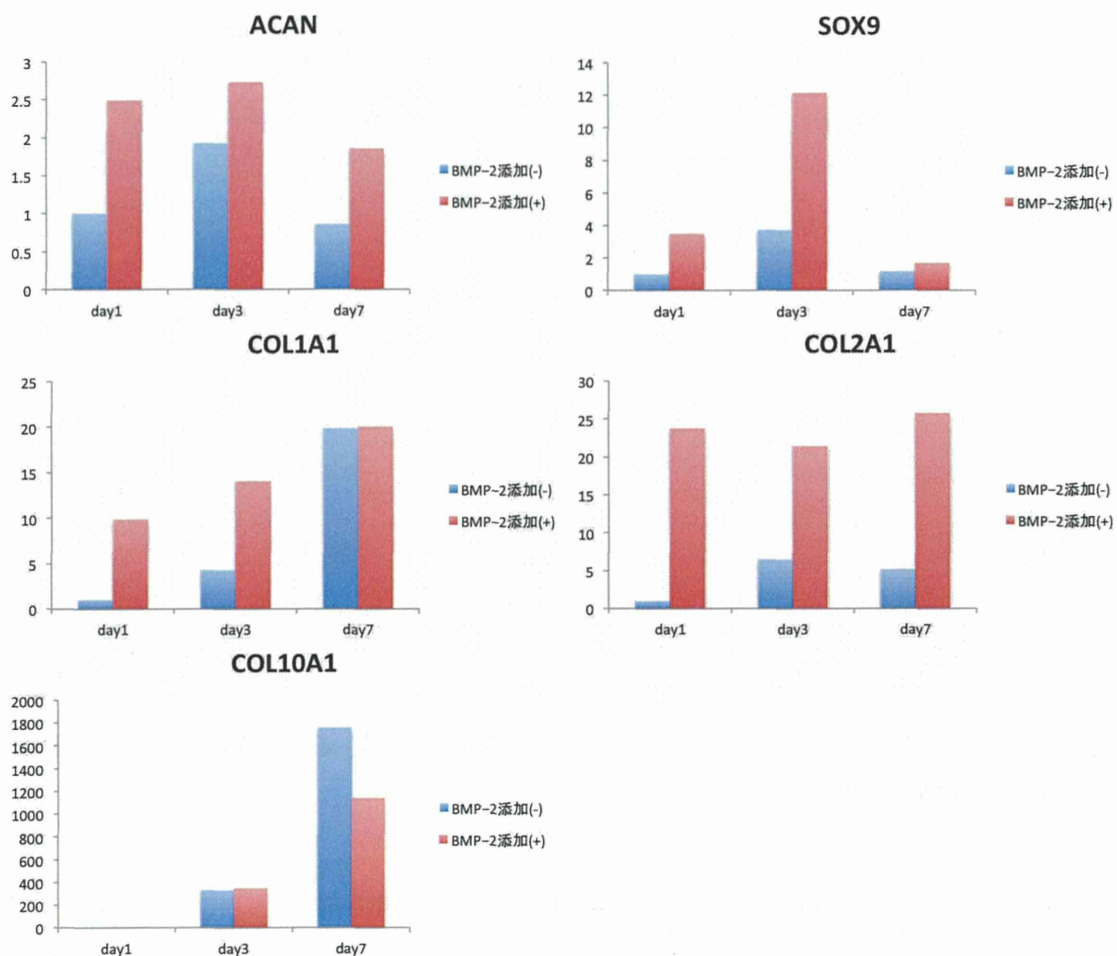


Fig3. フィブロインスポンジにおけるヒト軟骨細胞の遺伝子発現の経時的変化.
BMP-2 濃度 : 200ng/mL

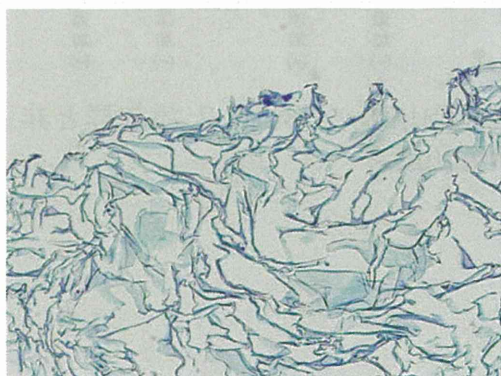


Fig4. 骨髄細胞を播種して3週間培養を行ったフィブロインスポンジの組織像

E. 研究発表

1. 論文発表 1件
1. 中川晃一. 関節軟骨再生医療の現状と将来展望. 東邦医学会雑誌 61(5): 232-236, 2014

2. 学会発表 4件
1. 齋藤雅彦, 中川晃一, 富田直秀, 玉田靖, 柴田孝史, 園部正人, 中島新, 高橋宏, 谷口慎治, 山田学, 平方栄一, 青木秀之, 齋藤知行. 広範囲関節軟骨欠損に対する骨髄刺激とフィブロイン被覆の併用療法の効果. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014. 10.9-10
2. 中川晃一, 富田直秀, 玉田靖, 柴田孝史, 園部正人, 中島新, 齋藤雅彦, 高橋宏, 谷口慎治, 平方栄一, 青木秀之, 齋藤知行. 骨髄刺激とフィブロイン被覆の併用による関節軟骨修復効果の検討. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2014. 9.27
3. 中川晃一. 絹フィブロインスポンジを利用した広範囲関節軟骨修復法の開発. 第40回佐倉病院研究推進談話会, 佐倉, 2015.1.29
4. Saito M, Nakajima A, Sonobe M, Nakagawa R, Taniguchi S, Yamada M, Tomita N, Tamada Y, Nakagawa K. Silk fibroin sponges that cover articular cartilage defects of the knee enhance cartilage repair in a canine model. Orthopaedic Research Society (ORS) 2015 Annual Meeting, Las Vegas, Nevada, USA, 2015. 3.28-31

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

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

研究分担者 中島 新 東邦大学医学部整形外科 准教授

研究要旨

イヌ膝関節に広範囲軟骨欠損を作成し、骨髄刺激後に骨髄細胞を播種したフィブロインスポンジで被覆して軟骨修復に及ぼす影響を検討した。フィブロインは2週で摘出した。一般状態、血液学的検査では、フィブロインによる影響は認められなかった。術後12週の組織学評価では、骨髄細胞添加フィブロインを適用した群で、対照群に比べて線維軟骨による充填が高い傾向が認められた。フィブロイン被覆法は広範囲関節軟骨欠損の修復に有用と考えられた。

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。ウサギを用いた実験では、培養軟骨細胞または骨髄細胞を播種したフィブロインを軟骨欠損部に被覆することで、欠損部が硝子軟骨様組織で修復されることが、明らかとなった。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、フィブロインを用いた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用いた研究に着手した。

平成24年度の本事業では、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。イヌの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た。術後12週の時点で、肉眼的には、フィブロイン被覆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。ただし、組織学的には、ほとんどが線維軟骨の所見であり、一部に硝子軟骨様組織が認められた（平成24、25年度研究報告書）。

平成25年度には、骨髄刺激は行わずに、軟骨欠損部に骨髄細胞（骨髄間葉系幹細胞分離デバイスにて分離したもの）を播種したフィブロインスポンジで被覆して、その効果を検討した。12週の時点で組織修復に明らかな差は認められず、フィブロインに分離した骨髄間葉系幹細胞を播種するだけでは細胞数が不十分であった可能性が考えられた。

そこで、本年度（平成26年度）は、骨髄刺激法と分離骨髄細胞の播種を併用することで得られる軟骨再生効果について検討することを目的としてイヌ関節軟骨欠損モデルを用いた実験を行った。また、フィブロインによる関節面への機械的負荷を軽減する目的で、フィブロイン被覆は短期間とし、術後2週で抜去することとした。

B. 研究方法

1) フィブロインスポンジ

常法に従い絹糸よりフィブロイン水溶液を調製して作製したフィブロインスポンジ（日立化成工業株式会社）を使用した。スポンジの孔径は40~110 μ m、厚み1.5mm、14mm X 14mmのシート状のものを使用した。

2) 骨髄由来間葉系幹細胞の採取

全身麻酔下に上腕骨近位に16Gの針を刺入して骨髄液10mlを採取した。これを骨髄由来間葉系幹細胞分離デバイス（Kaneka）を通して、間葉系幹細胞を採取した。細胞は、蛍光色素であるPKH26（励起波長530-550nm）でラベルした後に、細胞培養液DMEM 0.5mlで細胞浮遊液とした。これをフィブロインスポンジ上に滴下して播種し、10分ほど静置した後に、このスポンジを軟骨欠損部の被覆に用いた。細胞を播種したフィブロインの一部はパラフィン標本として細胞の播種状態を確認した。

3) 関節軟骨欠損モデルの作製と処置

13~15ヵ月齢雄のビーグル犬を用い、骨髄刺激（BS）群、骨髄刺激+フィブロインスポンジ（BS+F）群、骨髄刺激+骨髄細胞を播種したフィブロインスポンジ（BS+BMC-F）群の3群を作成した（各群n=5）。全身麻酔下に、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:12mm x 冠状方向:12mm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:1.0mm）を用いて深さ5mm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。

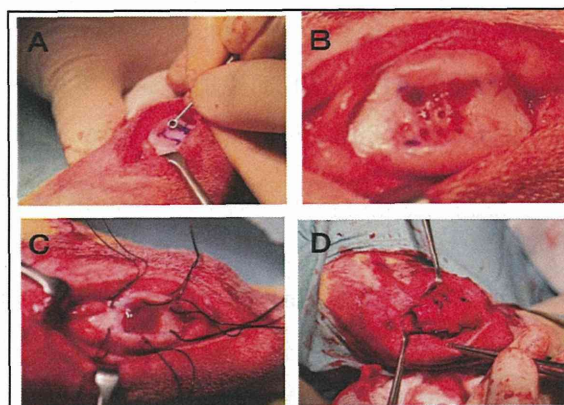


図1 手術の手順 A: 関節軟骨欠損作製 B: 骨髄刺激 C: 縫着用の骨孔作製 D: フィブロインによる関節軟骨欠損部の被覆

手術後2週の時点で、全身麻酔下に再度関節を切開して、被覆したフィブロインを摘出した（BS群では関節切開のみ施行）。その際に、16G針を用いて、軟骨欠損部の一部の針生検を行った。

術後、一般状態観察（毎日）、摂餌量測定（毎日）、体重測定（週1回）、右膝側面像単純X線撮影（術後1週、12週）、血液学的検査および血液生化学的検査（術前、術後2週、4週、12週）を行った。手術後12週で屠殺し（各群n=5）、関節内の観察、軟骨欠損部の肉眼所見の観察を行った。その後右膝を摘出し、組織標本作製後、組織学的検討を行った。

4) 血液学的検査、血液生化学的検査

手術前、術後2週、4週、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

同様に AST, ALT, ALP, CK, 総コレステロール(T-Chol)、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。

5) 組織学的検討

術後 2 週で取り出したフィブロインおよび生検組織は、10%中性ホルマリン液にて固定(生検組織は脱灰)後に凍結切片とし、DAPI による核染色を行った後に蛍光顕微鏡(励起波長 530-550nm)により PKH26 で標識されている細胞を観察した。

術後 2 週で採取した生検組織および、術後 12 週で屠殺した動物の膝関節を採取して、10%中性ホルマリン液にて固定、EDTA にて脱灰後、パラフィン切片を作成し、HE 染色、サフラニンO 染色及び II 型コラーゲンに対する免疫組織染色を行った。

C. 研究結果

1) 一般状態観察

術後 1 日から全例で右後肢の歩行障害が認められた。この状態は、2 週目のフィブロイン除去手術を挟んで初回手術から 26~31 日後まで見られたが、その後回復が認められ 3 群間に明らかな差は認められなかった。その他一般状態に異常は見られなかった。

2) 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。

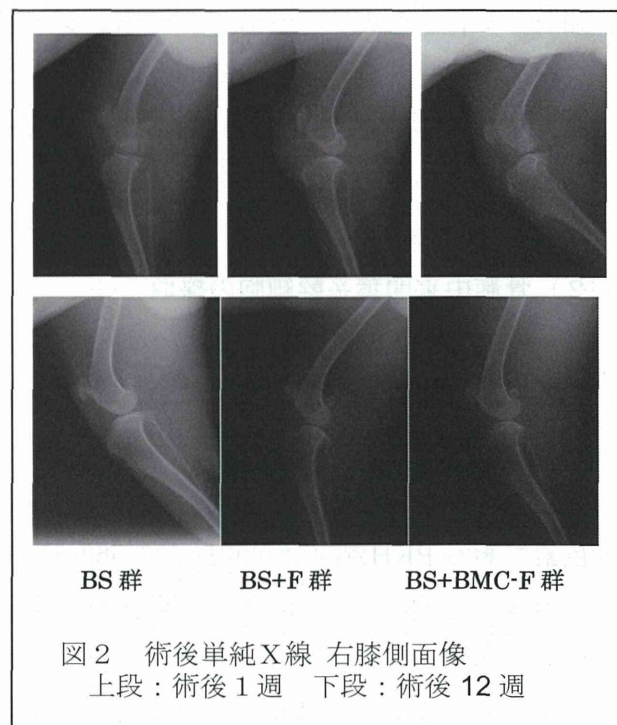


図2 術後単純X線 右膝側面像
上段：術後1週 下段：術後12週

3) X線学的検査

術後 12 週では、BS+F 群、BS+BMC-F 群で膝蓋大腿の大腿骨関節面に軽度の骨硬化性変化を認めた。骨融解像は認められなかった。(図 2)

4) 生検組織の蛍光顕微鏡による観察

術後 2 週目の生検組織を観察すると、PKH26 で標識された細胞が、組織内に存在していることが確認された。その数は関節側に存在する細胞の約 5%程度であった(図 3)

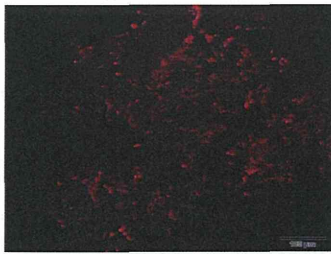
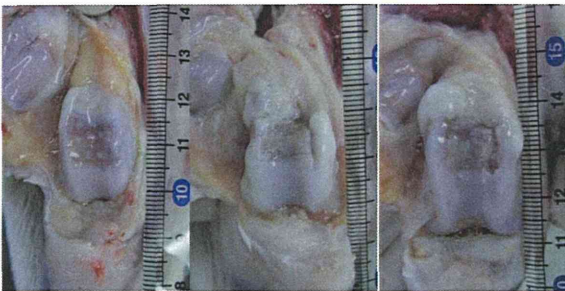


図3
術後2週の生検組織の蛍光顕微鏡像
上：PHK26陽性細胞
(励起波長 530-550nm)
下：DAPIによる核染色
(励起波長 350nm)

5) 軟骨欠損部の肉眼所見

術後12週では、BS群では骨孔部周囲のみに白色の修復組織が認められた。それに対して、BS+F群およびBS+BMC-F群では、欠損部は全体に白色の修復組織で覆われる傾向にあった。(図4)



BS群 BS+F群 BS+BMC-F群

図4 術後12週での軟骨欠損部の肉眼所見

6) 軟骨欠損部の病理組織学的所見

術後12週では、BS群と比較して、BS+F群において、BS+F群およびBS+BMC-F群で軟骨欠損部に線維性および線維軟骨性の組織

が多く認められる傾向にあった。一方、これらの群では、膝蓋上囊の滑膜増生が認められ、また骨髓内にフィブロインと思われる組織の存在が確認された。BS+F群とBS+BMC-F群との比較では、後者でサフラニンO染色、II型コラーゲン免疫染色で染色される修復組織が多い傾向にあった。修復組織は、組織学的にはほとんどが線維軟骨の所見で、一部に硝子軟骨様組織を認めた。BS群では骨孔部にのみサフラニンO染色、II型コラーゲン免疫染色で染色される修復組織が認められた。(図5、表1)

その一方で、BS+F群とBS+BMC-F群では、BS群と比較して関節内に中等度の滑膜増生が起きる傾向を示し、フィブロインによる影響と考えられた。

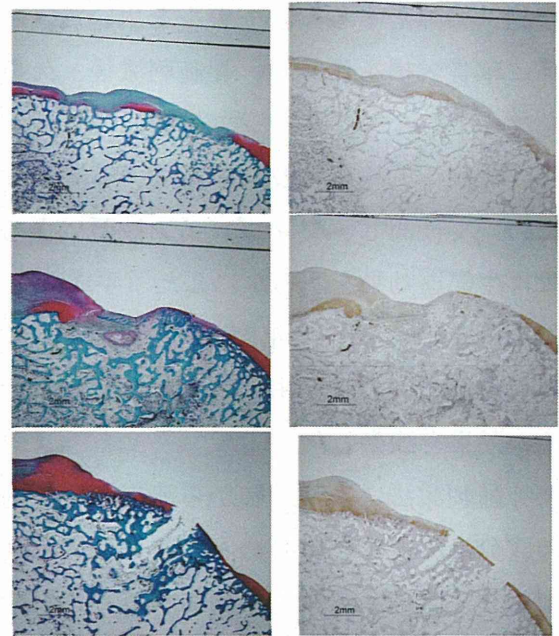


図5 術後12週での軟骨欠損部の組織像
上：BS群 中：BS+F群 下：BS+BMC-F群
左：サフラニンO染色
右：II型コラーゲン免疫染色

D. 考察

我々は、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、そしてこれらの凝集体は生体内で周囲に移動して軟骨組織形成に寄与することを明らかにしてきた（フィブロインの cell delivery 機能）。そして、ウサギを用いた実験で、培養軟骨細胞または骨髄細胞を播種したフィブロインを軟骨欠損部に被覆することで、欠損部が硝子軟骨様組織で修復されることが、明らかとなった。本事業では、将来の臨床試験を見据え、大型動物のイヌを選択し、軟骨欠損部の修復に対するフィブロインスポンジの効果を検討した。

平成 24 年度には、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。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、フィブロイン被覆による軟骨再生促進効果を明らかにした（平成 24、25 年度研究報告書）。本年度は、この方法に培養過程を経ないで骨髄由来幹細胞の添加を行い、その効果を観察した。

骨髄刺激法により骨髄から流出する骨髄液の成分は赤血球をはじめとする血球成分が主であり、間葉系幹細胞も含まれているものの割合は少ない。今回フィブロインに播種した細胞は、間葉系幹細胞分離専用デバイス（Kaneka）により分離した。これにより、骨髄由来幹細胞を高濃度に含んだ（Kaneka 社データで約 90%）細胞分画を局所へ供給することが可能であった。PHK26 による標識で解析した結果、術後 2 週の軟骨欠損部には、フィブロインに播種した骨髄由来幹細胞が存在して

いることが確認された。

今回の検討で、骨髄刺激後のフィブロイン被覆を行った群（BS+F 群）と骨髄刺激後に骨髄細胞を播種したフィブロインで被覆を行った群（BS+BMC-F 群）は、肉眼所見ではほぼ同等の組織修復像を示したが、病理組織学的検討では、BS+BMC-F 群の方が、線維軟骨組織の形成に優れる傾向を認めた。これは骨髄幹細胞を播種した効果であると考えられた。このように、培養過程を経ずに骨髄細胞を播種したフィブロイン被覆法は、広範囲関節軟骨欠損の修復に対して一定の有効性を示したが、硝子軟骨組織による再生までは達成できなかった。将来的には、in vitro で培養した細胞（軟骨細胞、骨髄由来幹細胞、iPS 細胞など）をフィブロインに播種することで、さらに優れた軟骨再生技術の確立をめざしていく必要がある。そのための基礎研究も現在進行中である（他分担研究者の報告書参照）。

今後は、まず培養細胞を用いない方法で、広範囲軟骨欠損に対するフィブロインスポンジ被覆法の臨床応用をめざし、効果と安全性を考慮しながら、培養細胞を用いた再生法に移行していく予定である。

表 1. 軟骨欠損部の組織学的検討

Grade of histopathological findings:

-: none, ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

Group	骨髓刺激				
Number of animals	5				
Grade	-	±	+	2+	3+
Findings					
Application site					
Eburnation	0	3	1	1	0
Fibrous tissue	3	0	1	1	0
Fibrocartilage	0	3	2	0	0
Pannus	0	5	0	0	0
Test substance	5	0	0	0	0
	骨髓刺激+フィブロイン				
Number of animals	5				
Grade	-	±	+	2+	3+
Findings					
Application site					
Eburnation	0	0	2	3	0
Fibrous tissue	0	1	1	3	0
Fibrocartilage	2	2	1	0	0
Pannus	0	0	1	4	0
Test substance	2	0	3	0	0
	骨髓刺激+骨髓細胞 播種フィブロイン				
Number of animals	5				
Grade	-	±	+	2+	3+
Findings					
Application site					
Eburnation	0	0	3	0	2
Fibrous tissue	1	0	3	0	1
Fibrocartilage	0	1	4	0	0
Pannus	0	0	5	0	0
Test substance	2	0	3	0	0

E. 結論

イヌ膝関節に広範囲軟骨欠損を作成し、骨髓刺激後に骨髓細胞を播種したフィブロインスポンジで被覆して軟骨修復に及ぼす影響を検討したところ、対照群に比べて線維軟骨による充填が高い傾向が認められた。フィブロインの cell delivery 機能を利用した フィブロインスポンジ被覆法は関節軟骨修復促進に有用と考えられた。今後は本法の臨床応用を目指しつつ、播種する細胞の種類や条件を変えることで、さらに優れた方法を開発していく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

中川晃一：関節軟骨再生医療の現状と将来展望. 東邦医学会雑誌 61(5): 232-235, 2014

2. 学会発表

4件

1. 中川晃一, 富田直秀, 玉田靖, 柴田孝史, 園部正人, 中島新, 齋藤雅彦, 高橋宏, 谷口慎治, 平方栄一, 青木秀之, 齋藤知行: 骨髓刺激とフィブロイン被覆の併用による関節軟骨修復効果の検討. 第33回日本運動器移植・再生医学研究会, 東京, 2014. 9/27
2. 齋藤雅彦, 中川晃一, 富田直秀, 玉田靖, 柴田孝史, 園部正人, 中島新, 高橋宏, 谷口慎治, 山田学, 平方栄一, 青木秀之, 齋藤知行: 広範囲関節軟骨欠損に対する骨髓刺激とフィブロイン被覆の併用療法の効果. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014. 10. 9-10
3. 中川晃一: 絹フィブロインスポンジを利用した広範囲関節軟骨修復法の開発. 第40回佐倉病院研究推進談話会, 佐倉, 2015. 1. 29
4. Saito M, Nakajima A, Sonobe M, Nakagawa R, Taniguchi S, Yamada M, Tomita N, Tamada Y, Nakagawa K. Silk fibroin sponges that cover articular cartilage defects of the knee enhance cartilage repair in a canine model. Orthopaedic Research Society (ORS) 2015 Annual Meeting, Las Vegas, Nevada, USA, 2015. 3. 28-31

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

高位脛骨骨切り術後の軟骨修復に影響を与える因子の検討とヒト骨髄細胞播種
ファイブロインスポンジの軟骨分化の試み

研究分担者 齋藤知行 横浜市立大学医学部整形外科 教授

研究要旨

変形性膝関節症に対する高位脛骨骨切り術後に関節軟骨の修復がみられる症例は少なく、修復を促進する目的としてファイブロインスポンジ移植は有効な手段に成り得ると考えられる。適応や対象症例の選択を含めた治療ガイドラインを作成するにあたり、高位脛骨骨切り術単独での軟骨修復について評価を行った。今回の検討では術前の sGAG 濃度が軟骨修復を予測する因子の一つになる可能性が示された。

A. 研究目的

変形性膝関節症(OA)に対する関節温存術式である高位脛骨骨切り術(HTO)では一部の症例に関節軟骨の修復反応が観察されるが、修復困難な例も多く存在する。HTO にファイブロインスポンジ移植を併用することで OA 患者の関節軟骨修復を促進することが期待される。治療の対象を含めたガイドライン作成が必要と考え、これまでに HTO 術後の軟骨修復に影響する因子について検討を行ってきたが、今回は関節液に着目し、術前の予測因子になり得るか、さらなる検討を行った。また、ファイブロインスポンジの臨床応用を検討するにあたり、HTO 症例からの骨髄採取を行ってファイブロイン上へ播種し、in vitro での軟骨分化を試みた。

B. 研究方法

1) 対象

OA の診断で Opening wedge 法による HTO を行い、術前・術後に関節軟骨の評価と関節液の採取が可能であった 17 例 18 膝(平均年齢 67 歳、男性 4 膝、女性 14 膝)

である。

2) 術式

Opening wedge HTO 術式の適応として、病変が内側に限局され、かつ術前の膝屈曲拘縮が 15° 未満、矯正角度が 15° 未満の症例を対象とした。脛骨近位内側で関節面より 35mm の部位から近位脛腓関節へ向かう斜め骨切りを行い、骨切り部は目標の矯正角度(膝外側角 170°)まで楔状に開大し、開大部には人工骨のブロックを挿入した。骨切り部の固定は TomoFix プレートを用いた。

3) 軟骨修復の評価

術後抜釘時に関節鏡にて行った。術前に軟骨変性が観察された内側大腿脛骨関節面につき以下の分類に従って評価した。

Stage 1: 修復の変化なしがあってもごくわずかな変化のみ

Stage 2: 軟骨欠損部を部分的に被覆

Stage 3: 軟骨欠損部を全体的に被覆

4) 関節液の解析

HTO 手術時および抜釘時に関節液を採取した。関節液はヒアルロニダーゼ処理を行った後、硫酸化グリコサミノグリ

カン (sGAG)、IL-18、IL-6 を測定した。sGAG の測定にはアンブルー染色法を応用した定量キット (Wieslab) を用いた。IL-18 および IL-6 の測定は、Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を用いてサンドイッチ ELISA 法により行った。

5) フィブロイン上へのヒト骨髄細胞播種と軟骨分化

同意が得られた患者から、HTO 手術時に骨髄を採取した。骨髄採取は骨髄穿刺針を用いて腸骨から行い、ヘパリン生食入りシリンジへ合計 10cc 採取した。骨髄間葉系幹細胞分離デバイス (Kaneka) にて細胞を分離し、 1.67×10^7 cells/ml の細胞数となるように細胞浮遊液を調整し、直径 8mm のフィブロインスポンジ上へ 30 μ l (5×10^5 cells) 播種した。37°C インキュベータ内で 1 時間放置した後、軟骨分化誘導培地を加えて 5% CO₂、37°C インキュベータ内で 3 週間培養を行った。フィブロインスポンジを回収し組織学的に検討を行った。

C. 研究結果

1) 関節軟骨の評価

術後の軟骨修復は、大腿骨側が Stage 1: 4 膝 (22%)、2: 13 膝 (72%)、3: 1 膝 (6%)、脛骨側が Stage 1: 5 膝 (28%)、2: 11 膝 (61%)、3: 2 膝 (11%) に分類された。

2) 関節液の評価

IL-18 は術前および術後ともにわずかに検出されるのみであった。IL-6 濃度は術前平均 35.2 pg/mL から術後抜釘時平均 8.1 pg/mL に有意に減少した。sGAG 濃度は術前平均 67.1 μ g/mL から術後抜釘時平均 81.3 μ g/mL に有意に増加した。(図 1)

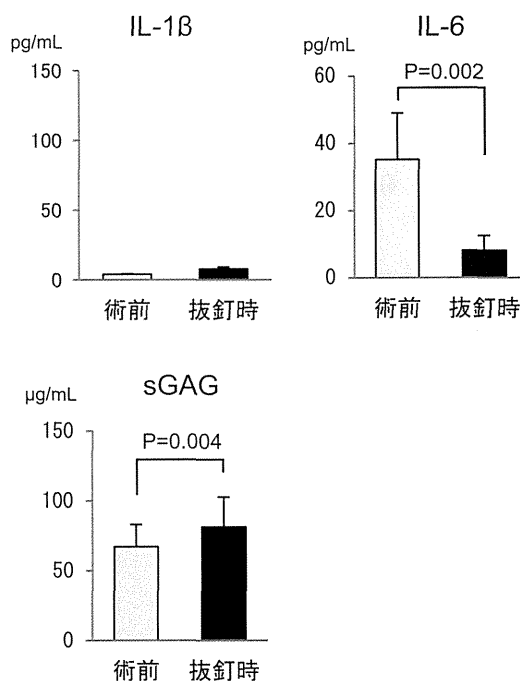


図 1 術前および術後抜釘時の関節液中 IL-18, IL-6, sGAG 濃度

3) 軟骨修復と術前の関節液との関連

関節軟骨の修復について、修復なし (Stage1) と修復あり (Stage2+3) に分類し、術前の関節液中の IL-6 濃度と sGAG 濃度について比較した。

IL-6 濃度は、大腿骨側では修復なし群が平均 35.4 pg/mL、修復あり群が平均 35.1 pg/mL で両群間に有意差はなく、脛骨側では修復なし群が平均 28.9 pg/mL、修復あり群が平均 37.5 pg/mL で、両群間に有意差はなかった。(図 2)

sGAG 濃度は、大腿骨側では修復なし群が平均 54.6 μ g/mL、修復あり群が平均 70.7 μ g/mL で両群間に有意差がみられ、脛骨側では修復なし群が平均 59.0 μ g/mL、修復あり群が平均 70.2 μ g/mL で両群間に有意差がみられた。(図 3)

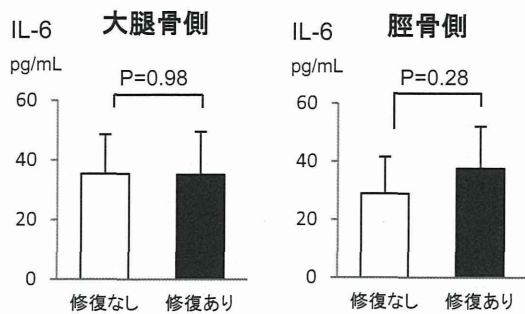


図 2 軟骨修復と術前 IL-6 濃度の関係

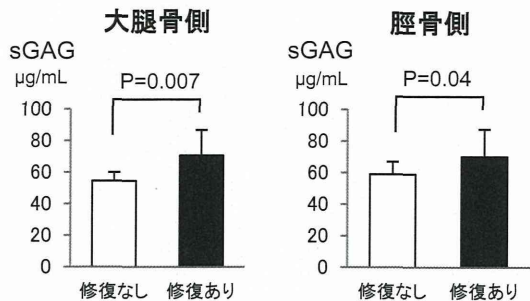


図 3 軟骨修復と術前 sGAG 濃度の関係

4) ヒト骨髄細胞播種フィブロインスポンジの軟骨分化

腸骨からヒト骨髄細胞は 10cc 当たり平均 4.7×10^7 個採取された。骨髄細胞をフィブロイン上で培養を試みたが細胞の生着、増殖は得られなかった (図 4)。単層培養においては間葉系幹細胞が得られ、また、骨分化誘導培地にて骨分化を確認することができた。

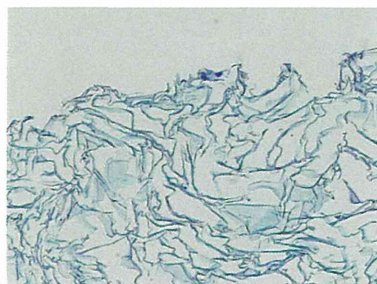


図 4 骨髄細胞を播種して 3 週間培養を行ったフィブロインスポンジの組織像

D. 考察

OA に対する関節液中のマーカーとしてはケラタン硫酸、コンドロイチン硫酸、

COMP、pCOLII-C、MMP、アグリカナラーゼ、IL-1、IL-6、TNF- α 、ヒアルロン酸などがある。これらの関節マーカーは OA の進行度と相関するという報告もある。今回、HTO の術前後で特に炎症性サイトカインの IL-6 に大きな変化がみられた。しかしながら軟骨修復との関連性はみられなかった。一方 sGAG は軟骨修復との関連がみられ、術前の sGAG 濃度は修復あり群で有意に高かった。この結果から軟骨代謝が活発であることが推察され、軟骨修復を予測する因子の一つになる可能性が示された。今後、症例数を増やすとともに他のマーカーとの関連性についてさらなる検討が必要である。

今回、高齢者を対象にして骨髄液を採取し、単層培養を経ずにフィブロインに播種してみたが、細胞の生着は得られなかった。ヒト高齢者の骨髄細胞の播種法に関しては、今後検討が必要である。

E. 結論

これまで行ってきた検討から、Opening wedge HTO 術後の軟骨修復がみられる症例は少なく、修復を促進する目的としてフィブロインスポンジ移植は有効な手段に成り得ると考えられる。修復不良症例に影響する因子について検討した結果をもとに治療ガイドラインを作成する予定である。

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
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
（分担）研究報告書

フィブロインスポンジを用いた関節軟骨再生法の治療ガイドライン策定

研究分担者 齋藤知行 横浜市立大学医学部整形外科 教授
和田佑一 帝京大学医学部整形外科 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
中島 新 東邦大学医学部整形外科 准教授

研究要旨

本治療法の対象となる主要疾患は変形性膝関節症であり、現在本邦で広く行われている高位脛骨骨切り術と併用して行うことを想定している。臨床試験を進めるにあたり、治療ガイドラインの策定を行った。

A. 研究目的

フィブロインスポンジを用いた関節軟骨再生法を臨床試験へと進めるにあたり、本法の第一の対象疾患は変形性膝関節症(OA)を想定している。現在、本邦ではOAに対する関節温存術式として高位脛骨骨切り術(HTO)が広く行われており、比較的良好な治療成績が得られているが、幾つかの問題点が残されている。その一つに関節軟骨修復が挙げられる。HTO術後に一部の症例では関節軟骨の修復反応が観察されるが、一方で修復困難な例も多く存在する。従って臨床試験では、OAに対するHTO施行時に関節軟骨欠損部をフィブロインスポンジで被覆することによって関節軟骨再生を促進する治療効果を期待している。ガイドラインの策定に当たっては、まずHTO術後の軟骨修復を評価し、修復に影響を与える因子について検討することが必要であり、これらの結果を基に本治療法のガイドライン策定を行った。

B. 研究方法

分担研究者の齋藤が横浜市立大学附属病院

整形外科においてOAの診断でOpening wedge法によるHTO（以下OWHTO）を行った84例114膝（平均年齢66歳、男性39膝、女性75膝）に対する治療成績を報告した昨年度の本研究報告書をレビューした。なお、本術式の適応は、病変が内側に限局され、かつ術前の膝屈曲拘縮が15°未満、矯正角度が15°未満の症例であった。

C. 研究結果

術前の軟骨変性(Gradeが進むほど変性が高度)は、大腿骨側がGrade 1:10膝(9%)、2:46膝(40%)、3:58膝(51%)、脛骨側がGrade 1:12膝(11%)、2:52膝(45%)、3:50膝(44%)に分類されていた。術後の軟骨修復(Stageが進むほど修復が良好)は、大腿骨側がStage 1:33膝(29%)、2:63膝(55%)、3:18膝(16%)、脛骨側がStage 1:58膝(51%)、2:49膝(43%)、3:7膝(6%)に分類されていた。

軟骨修復に影響する因子は、年齢、性別、BMI、術前ICRS grade、術後立位FTAの各因子と軟骨修復の影響を検討した。大腿骨側では、

Stage 2 以上の修復は ICRS Grade の進行した症例に多くみられ、Stage 3 は男性に多くみられた。脛骨側では Stage 2 以上の修復は BMI: 25 未満の症例において多くみられた。年齢および術後立位 FTA では有意な差はみられなかった。

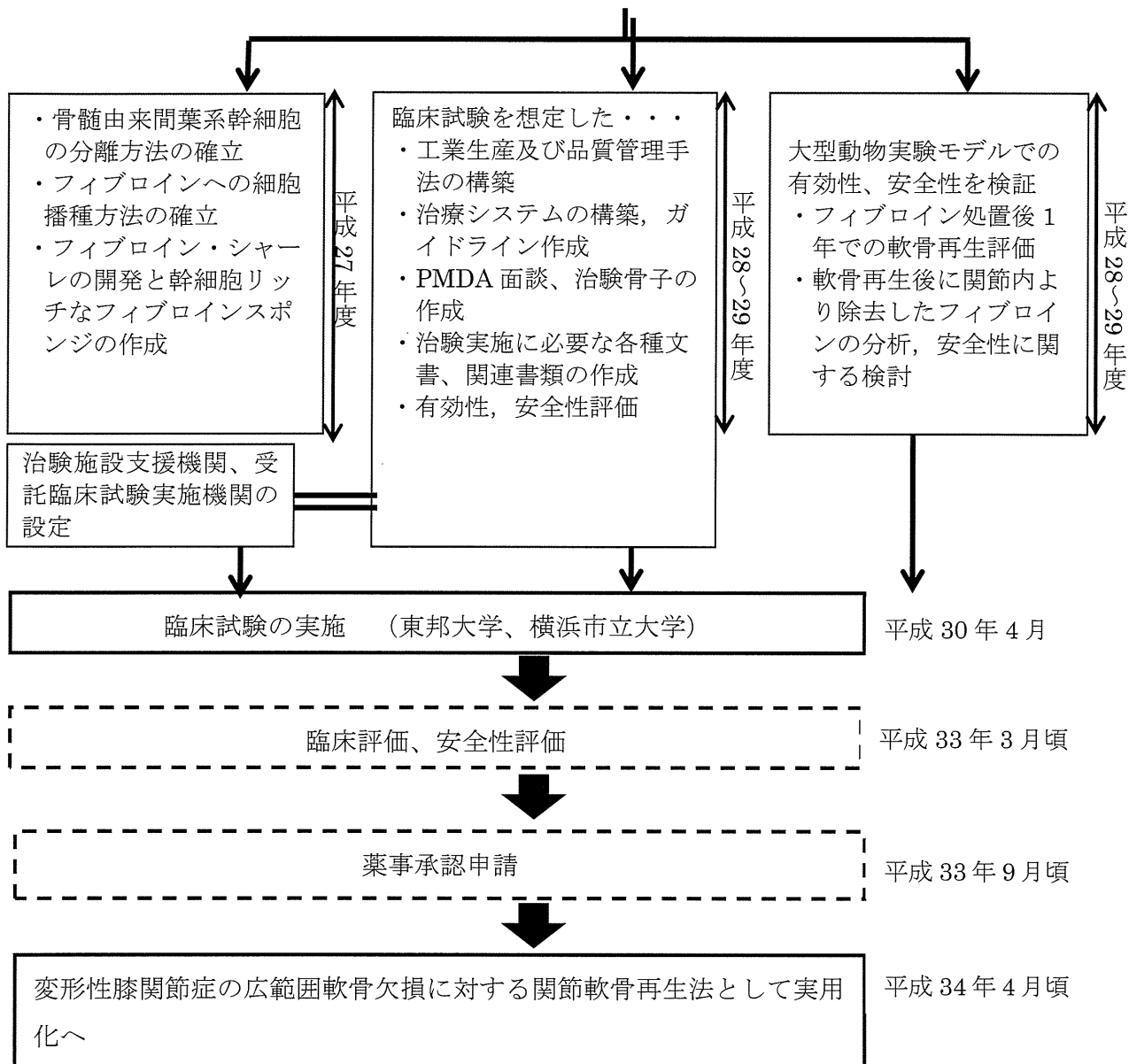
以上の結果より OWHTO 術後の軟骨修復に影響を与える因子は欠損部位、ICRS Grade、性別、BMI であり、年齢や術後 FTA は影響を受けにくいと考えられた。臨床試験では OWHTO 術後、十分な軟骨修復が期待できない症例に対して本関節軟骨再生法を併用すると考えると、1) ICRS grade が早期、2) 女性、3) BMI: 25 以上、が対象症例と考えられるが、いずれにせよ、OWHTO 単独治療では stage 3 の完全修復は大腿骨側で 16% しか認められていないため、対象患者選定においてこれらの因子は勘案しないこととした。また、年齢、術前 FTA は術後の軟骨修復と関連は認められなかったが、ファイブインスポンジは HTO に併用して使用するため、従来 of HTO の適応基準を遵守し、以下の通りとした。

- 1) 年齢 70 歳未満
- 2) K/L 分類 II, III
- 3) 病変が内側に限局
- 4) 屈曲拘縮が 15° 未満
- 5) HTO の矯正角度が 15° 未満
- 6) 糖尿病でない
- 7) アレルギー体質でない
- 8) 免疫抑制治療を受けていない
- 9) 重篤な合併症がない

また、臨床試験（トランスレーショナルリサーチ TR、第 I 相試験）実施に向けて、平成 27 年度日本医療研究開発機構 (AMED) の医療機

器開発推進研究事業への新規申請を予定しており、今後の本治療法実用化までのロードマップは以下の通りである。

【目標】 フィブロインへの細胞播種方法と欠損部への固定法の確と安全性評価後の臨床試験実施に向けた治験体制の構築



D. 考察

本治療法の近い将来の臨床試験に向けてガイドライン策定を行ったが、実用化に向けては企業との連携が必須である。フィブロインスポンジの様々な規格の製品化、滅菌、包装、製品管理、流通、販売などは企業の参入なしでは実現不可能であり、今後は企業との連携、実用化に向けた共同開発に本腰を入れなければならない。商品化に当たっては企業内の様々な事情も考慮しなければならいため、製造・管理、販売・流通などの部門を分けて複数企業の参入も今後検討する必要があると考えている。

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