

201408014B

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24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 中川 晃一

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 44
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 45

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

研究代表者 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、フィブロイン内におけるヒト培養軟骨細胞の軟骨分化・形成、イヌ膝関節軟骨欠損部へのフィブロイン被覆（一部細胞移植を含む）を行った。さらに将来本治療システムの応用が期待さ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い、臨床試験に向けた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。我々は平成 24 年度から 26 年度の 3 年間に渡って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。

平成 24 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、

（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、を明らかにするための研究を行った。その結果、（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。

平成 25 年度はこれらの課題を解決するための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。その結果、臨床応用に向けてフィブロインの強度面での改善に進歩はみられているが、手術操作に耐えうるものかどうか課題が残った。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、自家骨髄間葉系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も要検討と考えられた。

平成 26 年度は、骨髄間葉系細胞を効率良くフィブロインスポンジへ播種させる手段として遠心播種を試みた。また、せん断方向の力学刺激が培養軟骨細胞の軟骨形成に及ぼす影響、ヒト軟骨細胞および骨髄細胞のフィブロインスポンジ内での軟骨分化、軟骨形成能を検討した。さらに、本治療法の導入が予想される高位脛骨骨切り術の関節軟骨修復を予測する関節液マーカーについて探索を行った。近い将来、本治療システムを臨床試験へ進めることを見据えて、臨床治験体制、ガイドラインの策定も行った。

B. 研究方法

平成 24 年度に行った主な研究は以下の 4 つである。

- 1-1) 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
- 1-2) 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
- 1-3) 大型動物（イヌ）膝軟骨欠損モデルの作成と軟骨修復効果
- 1-4) 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

- 1-1) 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

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。

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。

- 1-2) 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

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。

1-3) 大型動物(イヌ)膝軟骨欠損モデルの作成と軟骨修復効果

動物実験モデルの作成

11~13ヵ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: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(3x3)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。

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

(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。

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。

1-4) 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

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。

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B-1)。

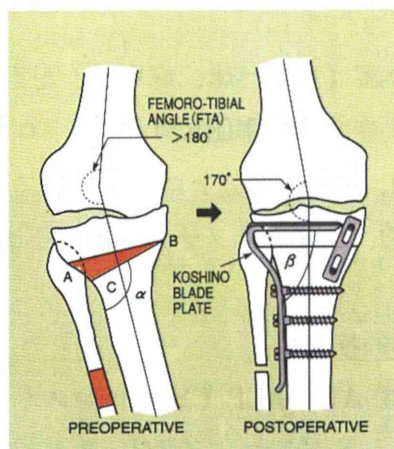


図 B-1 高位脛骨骨切り術

術前関節軟骨変性の評価

術前の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 (Grede 4c が最も変性の進んだ状態)。

- Grade 1: 軟骨表層の黄色変色
- Grade 2: 軟骨表層の不整、柔軟化
- Grade 3: 軟骨表層の線維化、磨耗
- Grade 4a: 軟骨部分欠損
- Grade 4b: 軟骨完全欠損 (軟骨下骨露出)
- Grade 4c: 軟骨下骨の象牙化

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 B-2) (Stage 5 が最も修復の進んだ状態)。

- Stage 1: ピンクまたは黄色の線維性組織
- Stage 2: 白色線維性組織の散在
- Stage 3: 白色線維性組織による部分被覆
- Stage 4: 白色の線維軟骨様組織増生
- Stage 5: 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検討を行った。

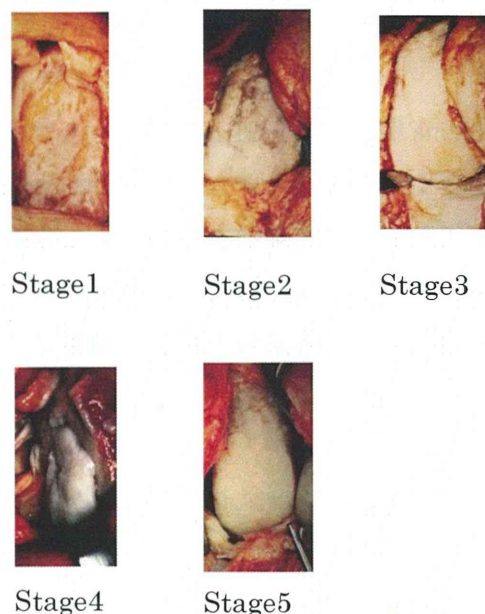


図 B-2 術後関節軟骨修復の評価

平成 25 年度に行った主な研究は以下の 4 つである。

- 2-1) 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
- 2-2) 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
- 2-3) 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リン内への骨髄由来細胞播種の効果
- 2-4) 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

2-1) 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 フィブリン微細ファイバー

絹糸より、フィブロインスポンジ作製に用いるものと同様のフィブリ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、20kVの印加電圧での電場において、紡糸を実施した。

微細ファイバー複合化

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

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。

フィブロイン上での細胞培養

フィブロインスポンジ作製の原料となるフィブロイ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。

- 2-2) 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

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。

各種フィブロインスポンジ培養担体

まず全筋と同様の方法で、フィブロイン水溶液を作製し、終濃度が2.0wt/Vol%, 4.0wt/Vol%, 6.0wt/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1Vol%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°Cから-3.5°C/hの割合で5時間かけて-20°Cまで低下させた。その後-20°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、表 B-1 のように命名する。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。

表 B-1. 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

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。

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。

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-β3 (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) を添加したものをを用い、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。

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。

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。

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 Volocity Visualization (PerkinElmer 製) 64) 及び、3D 解析ソフトウェアである Volocity 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 μm^3 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 μm^3 より大きいもの、及び 100 μm^3 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。

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。

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、 n 個の点 (n は 1 から n 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 (i, j) に着目し、線分 ij 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 i を含む方の領域を $V(i)$ と定義する。この $V(i)$ は、点 i の方が点 j より近い領域であると言える。点 i とそれ以外の $n-1$ 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 n 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 i が全要素のうち最も近い点となることが分かる。つまり、

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

としたとき、 $V(i)$ は点 i の最近隣領域となる。この領域のことを母点 i 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。

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

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 σ_A は面積の標準偏差、 A_{av} 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 μm 以内に存在する細胞のみを解析対象とし、その範囲を 20 μm 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。

2-3) 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

2-3-1) 骨髄刺激+フィブロイン被覆法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 B-3）。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。

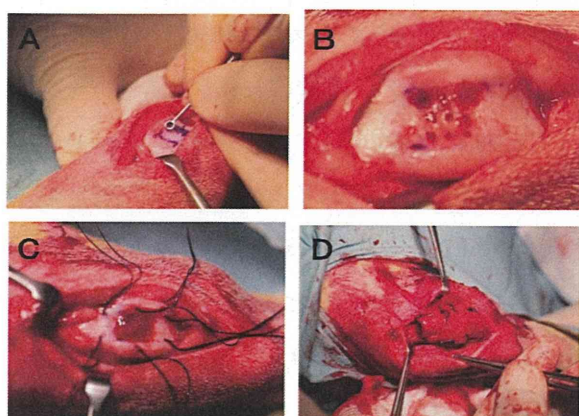


図 B-3. 術中所見 A: 関節軟骨欠損作製 B: 骨髄刺激 C: 縫着用の骨孔作製 D: フィブロインによる関節軟骨欠損部の被覆

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。

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。

組織学的検討

術後 4 週および 12 週の時点で屠殺した動物の膝より、関節軟骨欠損部（大腿骨滑車）とその対側にあたる膝蓋骨を採取して、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。欠損部の組織は ICRS（International Cartilage Repair Society）の Grading System により半定量的な評価を行った。

2-3-2) 骨髄間葉系細胞播種+フィブロイン被覆法

フィブロインの改良

前年度（平成 24 年度）の実験で、術中にフィブロインスポンジが縫合糸により裂けてしまうケースがあり、また、4 週の解剖時にすでに剥がれてしまっていたことから、固定操作や関節摩擦に対する強度の改善が必要と考えられた。そこで強度を増す目的で、フィブロインスポンジとフィブロインナノファイバーの複合化を行った（分担者玉田の研究報告書参照）。

これに伴い、フィブロインスポンジの厚みを 3mm から 1.5mm に変更した。細胞が入り込むのはフィブロインスポンジの表面 0.3mm 以内に限定されるため、細胞を保持するためには十分な厚さと考えられた。

骨髓由来間葉系幹細胞の採取

11～13 ヶ月齢雄のビーグル犬を用い、全身麻酔下に上腕骨近位に 16G の針を刺入して骨髓液 10ml を採取した。これを骨髓由来間葉系幹細胞分離デバイス (Kaneka) を通して、を採取した。細胞は細胞培養液で 0.5ml の細胞浮遊液とした後、フィブロインスポンジ上に滴下して播種した。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。

関節軟骨欠損モデルの作製

11～13 ヶ月齢雄のビーグル犬を用い、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: 12 mm x 冠状方向: 12 mm 程度) を作成した。

フィブロインによる関節軟骨欠損部被覆

関節軟骨欠損部の周囲に骨孔を 6 つ作成し、これらに糸を引き抜く形で、前述の改良型フィブロインスポンジ (X 陽性糸を表層のナノファイバー層下に 1 本留置) を、軟骨欠損面に縫着した。細胞を播種していないフィブロインスポンジで被覆した対照群を F 群、骨髓由来間葉系幹細胞を播種したフィブロインスポンジで被覆した群を F+BMC 群とした。創を十分洗浄後、脱臼させた膝蓋骨を整復し、閉創した。

術後 3 日、1 週、2 週、4 週、12 週で右膝側面像単純 X 線撮影を行った。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を行った。

血液学的検査、血液生化学的検査

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

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。

2-4) 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

対象

OA の診断で OWHTO を行った 84 例 114 膝 (平均年齢 66 歳、男性 39 膝、女性 75 膝) である。本術式の適応として、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。

術式

脛骨近位内側で関節面より 3.5mm の部位から近位脛腓関節へ向かう斜め骨切りを行った。骨切り部は目標に矯正角度まで楔状に開大し、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 (図 B-4)。

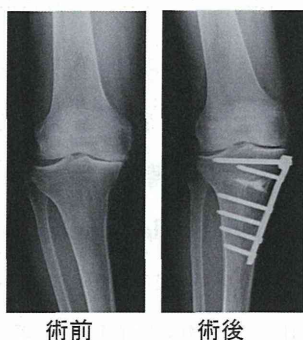


図 B-4. Opening wedge HTO

評価

臨床的評価として術前・術後の日本整形外科学会膝疾患治療成績判定基準 (JOA スコア) および立位膝単純 X 線正面像における膝外側角 (femorotibial angle, FTA) を調査した。

関節軟骨の評価は術前および術後抜釘時に関節鏡にて行った。術前の軟骨変性は International Cartilage Repair Society (ICRS) の grade 分類で評価した。術後の軟骨修復は以下の分類に従って評価した (図 B-5)。

Stage 1: 修復の変化が全くないか、あってもごくわずかな変化のみ観察されるもの

Stage 2: 軟骨欠損部を部分的に被覆するもの

Stage 3: 軟骨欠損部を全体的に被覆するもの



Stage 1 Stage 2 Stage 3

図 B-5. 関節軟骨修復の Stage 分類

平成 26 年度に行った主な研究は以下の 6 つである。

3-1) フィブロインスポンジへの遠心播種条件等の評価

3-2) せん断方向の力学刺激が培養軟骨細胞の軟骨形成に及ぼす影響

3-3) ヒト軟骨細胞および骨髄細胞のフィブロインスポンジ内での軟骨分化、軟骨形成能の検討

3-4) イヌ膝関節軟骨欠損モデルを用いたフィブロインによる関節軟骨修復効果

3-5) 本治療法の導入が予想される高位脛骨骨切り術の関節軟骨修復を予測する関節液マーカーについての探索

3-6) 本治療法の臨床試験導入に向けて、ガイドラインの策定

3-1) フィブロインスポンジへの遠心播種条件等の評価

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、濃度 2, 4, 6% からフィブロインスポンジを作製した。試料は厚み 1.5mm で φ8mm に打ち抜き、円盤状とし、オートクレーブ滅菌後に実験に供した。

遠心播種

試料のフィブロインスポンジを 1.5ml マイクロチューブに設置した (写真 1)。



写真 1 遠心播種セットアップ

マイクロチューブの内径が傾斜していることを利用して、フィブロインスポンジを一定位置に固定した。スポンジ上部に NIH3T3 細胞浮遊液を 1×10^5 個/0.5ml で入れ、遠心機 (日立、CR105) により、50g, 100g, 200g の遠心力で 5 分間遠心播種を行った。遠心播種後にフィブロインスポンジを取り出し、所定時間培養後評価した。

遠心播種したスポンジ内に存在する細胞数は、1 時間培養後、0.5% Triton-X100 で細胞を可溶化後、LDH 活性を測定することで定量した。また、遠心播種後の細胞のスポンジ内の分布を確認するために、3 時間培養後、ホルマリン固定し、組織切片の作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

iPS 細胞培養

フィーダー細胞として SNL 細胞上で継代培養をしているマウス iPS 細胞 (iPS20D、理研 BRC) を使用した。フィブロインをコーティングした培養ディッシュ上で iPS 細胞を培養し、形態や未分化状態を観察した。未分化の確認は、未分化細胞で発現している Nanog-GFP の発現を蛍光顕微鏡で観察することで行った。

3-2) せん断方向の力学刺激が培養軟骨細胞の軟骨形成に及ぼす影響

フィブロインスポンジは、滅菌水中にてオートクレーブ滅菌し、4°C、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (nacalai tesque, 以下 D-PBS) 中で保存した。

本研究では 4 週齢の日本白色家兎より採取した関節軟骨細胞を使用した。日本白色家兎はジエチルエーテルを過剰量吸引させることで安楽死させ、上腕骨、大腿骨、脛骨を採取した。これらの骨端より軟骨薄片を切り出し、Dulbecco's modified Eagle's medium (nacalai tesque, 以下 DMEM) 中に保存した。採取完了後、D-PBS を用いて二度洗浄した。そして、一羽分の軟骨薄片あたり 5 ml の 0.25 % Trypsin/1 mM-EDTA 溶液

(nacalai tesque) を加えた後、37°C の条件下で 30 分間トリプシン処理を行った。トリプシン処理後 D-PBS を用いて二度洗浄し、一羽分の軟骨薄片あたり 15 ml, 0.25 wt% タイプ II コラゲナーゼ溶液を加えた。0.25 wt% タイプ II コラゲナーゼ溶液は DMEM 15 ml 中に 37.5 mg のタイプ II コラゲナーゼ (Worthington Biochemical Corporation) を溶解し作製した。そして、37°C の条件下で 6 時間酵素処理を行い細胞外マトリクス中のコラーゲン線維を分解した。コラーゲン線維が分解されたことを目視で確認した後に、Cell Strainer (BD Falcon) を用いて軟骨細胞を単離した。単離後 D-PBS を用いて二度洗浄し、セルバンカー (日本全薬工業) 中に懸濁した。この懸濁液をクライオバイアル (Nalgene) に分注し、-80°C で冷凍保存した。

採取した軟骨細胞を一度 2 次元培養で増殖し、再生軟骨組織を作製した。冷凍保存してい

た軟骨細胞を 37 °C で半解凍後、平面培養液を 1 ml 加えよく攪拌した。そして遠沈管に回収し、1500 rpm, 4 °C の条件下で 5 分間遠心し、上清と軟骨細胞に分離した(以下この操作を遠心操作と呼称する)。遠心操作後、上清のみを吸引し D-PBS を用いて 2 度洗浄した。そして、平面培養液を加えて 5.2×10^4 cells/ml に調整した細胞懸濁液を作製した。その後、細胞懸濁液 15 ml を 75 cm² ベントキャップフラスコ (IWAKI) に滴下、軟骨細胞を播種した。播種後は 7 日間 2 次元培養を行い、平面培養液の交換は培養 3, 5 日目に行った。

フィブロインスポンジへの軟骨細胞播種では、まず、培養担体となる厚さ 1 ± 0.2 mm のフィブロインスポンジを、生検トレパンを用いて直径 8 mm にくり抜いた。その後、フィブロインスポンジ内部の D-PBS を置換するために、組織培養液に浸して 37 °C, 100 %湿度のインキュベータ内で 3 時間静置した。その間に 2 次元培養を行っていた軟骨細胞を、D-PBS を用いて 2 度洗浄した。ここに 0.25 % Trypsin/1 mM EDTA 溶液を加えてトリプシン処理を行い、軟骨細胞をベントキャップフラスコより剥離した。そして、剥離した軟骨細胞を遠沈管に回収、遠心処理し、軟骨細胞を単離した。その後、組織培養液を加えて 1.67×10^7 cells/ml の細胞懸濁液に調整し、これをフィブロインスポンジに滴下することで軟骨細胞を播種した。細胞播種の際には、まずフィブロインスポンジを滅菌デューゼの上に 40 秒程度置くことで余分な水分を除去した。そしてこれを 24 well 組織培養プレート (IWAKI) に設置し、細胞懸濁液を 30 μ l 滴下して軟骨細胞を播種した。37 °C, 100 %湿度のインキュベータ内で 1 時間静置した後に、組織培養液を 1.6 ml 滴下して組織培

養を開始した。

相対すべり刺激を与えた培養するためにマグネティックスターラー (HP70100, VARIOMAG 製) とそのコントロールユニット (40B, VARIOMAG 製)、および直径 60 mm のテフロン製円盤型マグネット回転子から構成される、培養装置を用いた(図 B-6、図 B-7)。中心から同一距離となるように、回転子の中心から 23.7 mm の円周上に直径 8.7 mm の縦穴を 12 個開け、その縦穴の中に細胞播種面を下にして試料を設置、試料の上にステンレスメッシュ (15 mg) 2 枚を乗せ浮き上がらないようにした。培養は poly(MPC) がグラフトされたディッシュ (SANSYO, Lipidure Coat Dish) 内で行い、組織培養液を 19.2 ml (1 試料当たり 1.6 ml) 滴下した。回転子は使用直前に酸化エチレンガス法により 40 °C で約 22 時間ガス滅菌を施した。ステンレスメッシュは 121 °C で 20 分間オートクレーブ滅菌を施した。

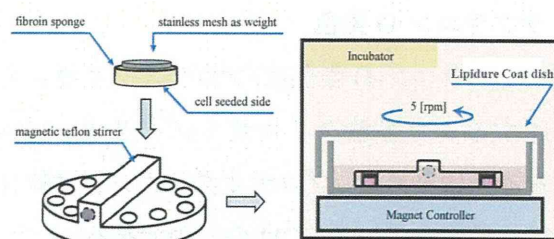


図 B-6. Schematic viewing of sliding culture



図 B-7. Photograph of the device for sliding culture. (a) Magnetic stirrer, (b) control unit and (c) poly(MPC) coated dish

組織培養液は2日に1度交換し、播種時と同じ24 well 組織培養プレート内で21日間培養したものを静置培養試料(No sliding)とした。上記の操作を行ったフィブロインスポンジに軟骨細胞を播種しなかったものをControl試料とした。

相対すべり刺激は、上述の装置を用いて培養日数それぞれ10日目(10th), 12日目(12th), 14日目(14th), 16日目(16th), 18日目(18th), 20日目(20th)に24時間与えた。これら刺激を与えた6群を、相対すべり刺激試料(以下、〇〇日目刺激試料と表記)とした。

再生組織のECM成分の変化を組織学的に評価するためにサフラニン-O染色, タイプIIコラーゲン免疫染色, タイプIコラーゲン免疫染色を行った。染色した試料は顕微鏡により観察した。

参考:

サフラニン-O染色

サフラニン-O染色は、プロテオグリカンを構成するムコ多糖グリコサミノグリカン(GAG)を赤色に染める。プロテオグリカンとは軟骨組織を構成しているECMの一つである。

タイプIIコラーゲン染色

タイプIIコラーゲンに対する特異抗体を反応させ、抗原抗体反応を用いて特異抗体と標識酵素の免疫複合体を形成し、最終的に標識酵素の発色反応によって標識を行った。タイプIIコラーゲンは軟骨組織を構成しているECMの一つである。

3-3) ヒト軟骨細胞および骨髄細胞のフィブロインスポンジ内での軟骨分化、軟骨形成能の検討

3-3-1) フィブロインスポンジにおけるヒ

ト軟骨細胞培養

対象

当院において変形性膝関節症に対して施行した人工膝関節置換術症例より採取した軟骨片から単離した軟骨細胞をフィブロインスポンジで培養した。

培養条件

軟骨片を0.2% Pronase および0.025%collagenase 処理し、軟骨細胞を単離した。細胞培養用100mm²ディッシュに軟骨細胞を播種し、D-MEM/F12/20%FBSを用いて37°C、5%CO₂の条件下に30日間培養を行った。その後、細胞を回収し、フィブロインスポンジ上に軟骨細胞1x10⁶個/スポンジを直接播種し、28日間セルカルチャーインサート内で軟骨分化誘導用培地(D-MEM High Glucose: 500mL, BSA: 1.25mg/ml, Penicillin-Streptomycin: 1%, L-proline: 0.35mM, L-Ascorbic Acid 2-Phosphate Trisodium Salt: 0.17mM, Insulin: 5μg/ml, Transferrin: 5μg/ml, Selenious Acid: 5ng/ml, Dexamethasone: 0.1μM, TGF-β 10ng/ml)を用いて37°C、5%CO₂の条件下に培養した。BMP-2を添加したBMP-2添加群(200ng/ml)と非添加群に分け、4週間培養した。

評価方法

形成された培養軟骨組織の組織学的評価および遺伝子発現の評価を行った。

ア) 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、3μm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 (immunohistchemistry: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。

イ) 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、 $\Delta\Delta CT$ 法を用いて2群間の遺伝子発現を比較した。

3-3-2) ヒト骨髄細胞播種フィブロインスポンジの軟骨分化

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。

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 μm 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 $\times 10^7$ 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 (5×10^5) 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%CO₂、37°Cインキュベータ内で3週間培養を行った。

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。

3-4) イヌ膝関節軟骨欠損モデルを用いたフィブロインによる関節軟骨修復効果 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。

関節軟骨欠損モデルの作成と処置

平成 24、25 年度と同様に 13~15 カ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)。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、組織標本を作製後、組織学的検討を行った。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。

3-5) 高位脛骨骨切り術の関節軟骨修復を予測する関節液マーカーについての探索

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。

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。

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

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-1 β 、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-1 β 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。

3-6) 本治療法の臨床試験導入に向けて、ガイドラインの策定

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平成 25 年度の本研究年次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

1-1) 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

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 C-1 に、染色結果を図 C-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 C-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 C-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した。

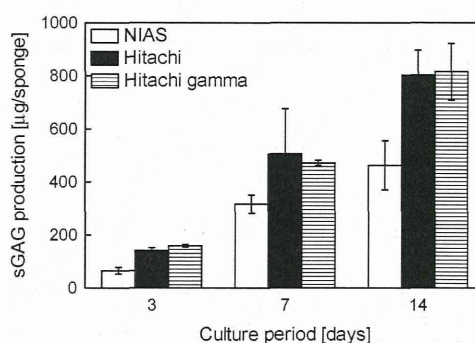


図 C-1. フィブロインスポンジ内に産生されたコンドロイチン硫酸量

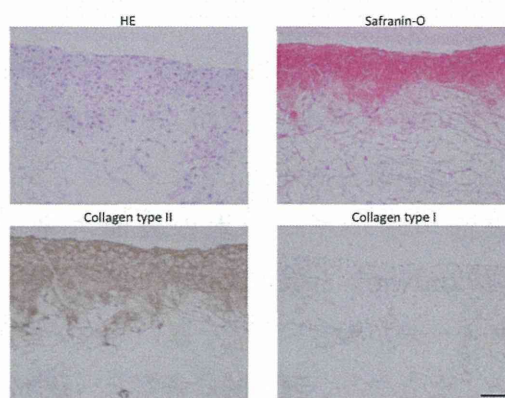


図 C-2. 軟骨細胞培養 7 日後のフィブロインスポンジの組織像観察、試料は企業製造。良好な軟骨組織の形成が観察される。

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 C-1 にまとめた。

表 C-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, μm	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 C-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 C-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。

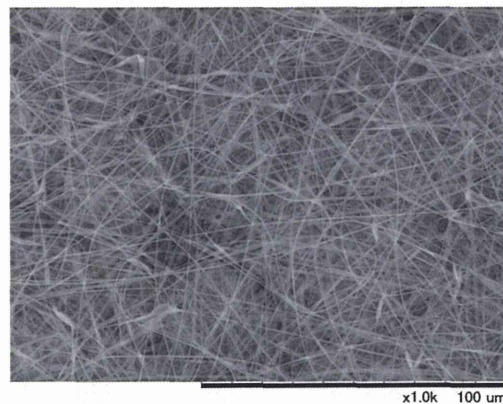


図 C-3. エレクトロスピニングにより形成したフィブロイン微細ファイバー

1-2) 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

図 C-4 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。