

図 C-4. 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).

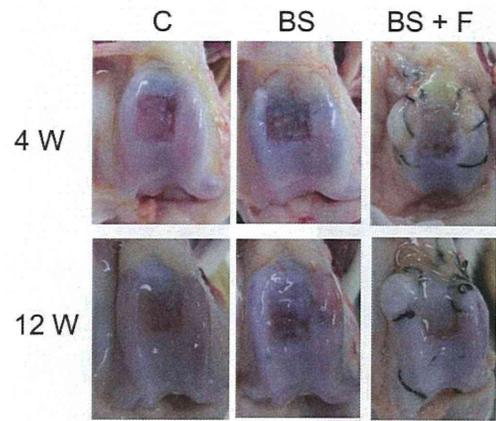


図 C-5. C: 軟骨欠損のみ, BS: 骨髄刺激, BS+F: 骨髄刺激+フィブロイン

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

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。

軟骨欠損部の修復所見

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(図 C-5)。

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。

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。

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

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 $12.2 \pm 9.3\text{mm}$ の部分を通過していた。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 C-6 に示す。



術前

術後

図 C-6. 73 歳女性、FTA 198 度から 171 度に改善

術前の関節軟骨変性

術前の関節軟骨変性に関しては、Grade 1:0 膝、Grade 2:3 膝、Grade 3:5 膝であり、残りの 138 膝は関節軟骨の欠損を有する Grade 4 であった。その中では、Grade 4a:12 膝、Grade 4b:48 膝、Grade 4c: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。

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、Stage 1:2 膝、Stage 2:36 膝、Stage 3:49 膝、Stage 4:31 膝、Stage 5:16 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 Stage 4 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 C-7a)。一方、部分被覆例の修復組織の組織像は、線

維性瘢痕組織ないしは線維軟骨組織であった(図 C-7b)。

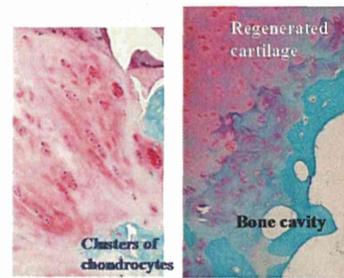


図 C-7a. 完全被覆例の組織像

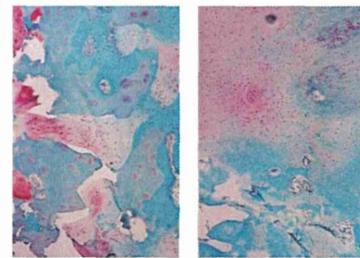


図 C-7b. 部分被覆例の組織像

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 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イ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。

イ) 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砕を行い、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。

ウ) 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 C-8 に示す。

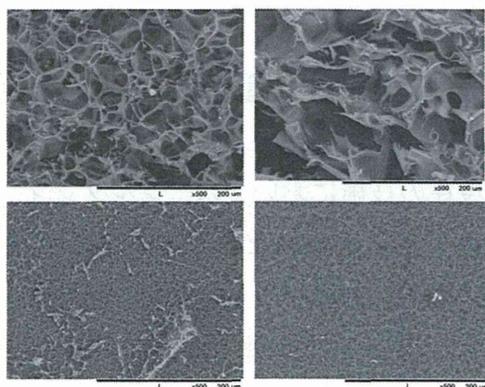


図 C-8. フィブロイン微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジのSEM写真(上)スポンジ面、(下)微細ファイバーマット面

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

ィ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。

複合化スポンジの引っ張り試験

ウ) 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 C-9 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。

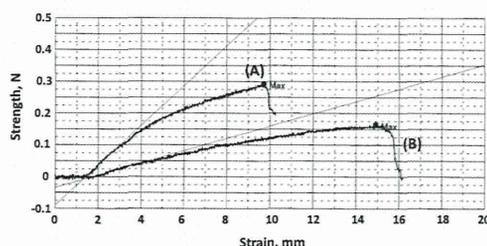


図 C-9. 引っ張り試験による応力-伸長曲線(A)微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジ、(B)フィブロインスポンジ

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 C-10 には、エレクトロスピンニング時間に対する破断強度と弾性率の変化を示した。エレクトロスピン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。

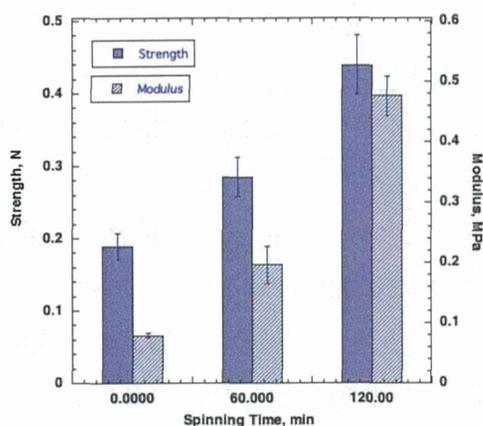


図 C-10. エレクトロスピンニング時間による微細ファイバー複合化スポンジの強度と弾性率の変化

図 C-11 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ンニング時間が長い程、強度と弾性率が高くなることが分かる。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 C-12 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している。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。

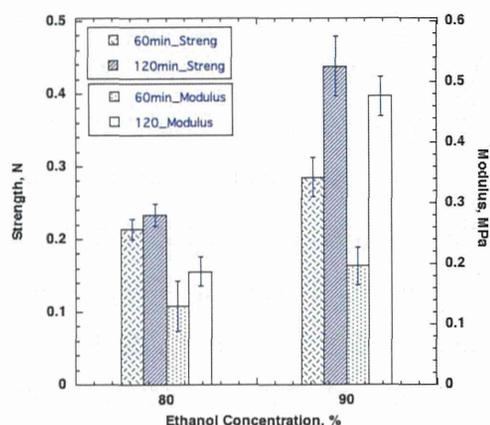


図 C-11. 微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジのエタノール後処理におけるエタノール濃度による強度と弾性率の変化

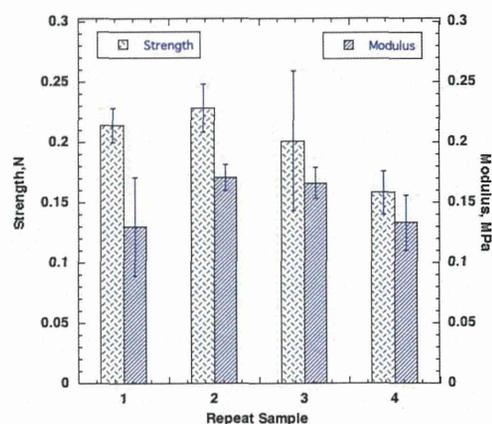


図 C-12. 微細ファイバーマット複合化フィブロインスポンジの力学性質の再現性

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。

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 C-13)

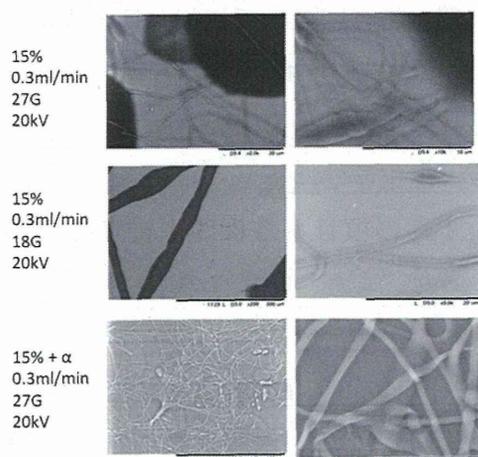


図 C-13. フィブロイン水溶液からの種々の条件でのエレクトロスピンニングの結果。補助材としてのポリエチレンオキシドを使用しない紡糸。 α は、フィブロイン分子の凝集を惹起すると考えられる溶媒。

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 C-14 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。

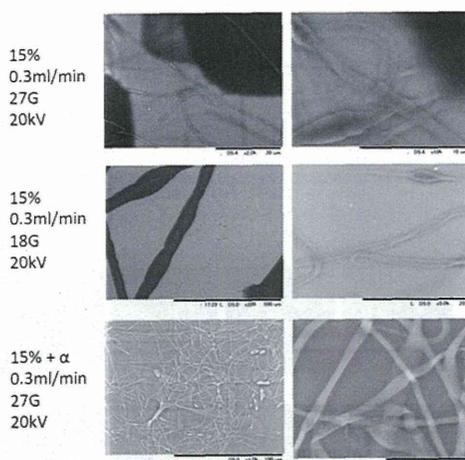


図 C-14. フィブロイン水溶液からの種々の条件でのエレクトロスピンニングの結果。補助材としてのポリエチレンオキシドを使用しない紡糸。 α は、フィブロイン分子の凝集を惹起すると考えられる溶媒。

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 C-15 に示すように、フィブロイン材料上では、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。

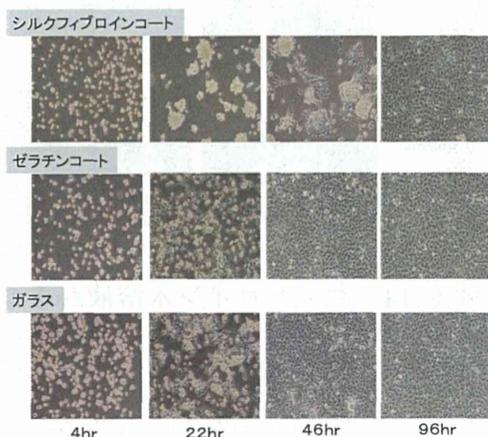


図 C-15. 各種材料表面上での SNL 細胞の培養時間にもなう細胞形態の変化。シルクフィブロイン上では、培養初期において細胞凝集塊の形成が観察される。

2-2) 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。

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 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。

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。

軟骨欠損部の肉眼所見

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)群では骨孔部に白色の修復組織が認められた。骨髄刺激+フィブロイン(BS+F)群では欠損部は全体に白色の修復組織で覆われ、骨孔部分は陥凹している所見が認められた。

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 群では骨孔部周囲を中心に部分的に軟骨様の白色組織による修復が認められた。BS+F 群では、BS 群よりも広い範囲で修復が認められ、4 週時に比べてより厚く光沢のある軟骨様組織で覆われていた。(図 C-16、この結果は前年度の報告書においてもすでに報告済み)

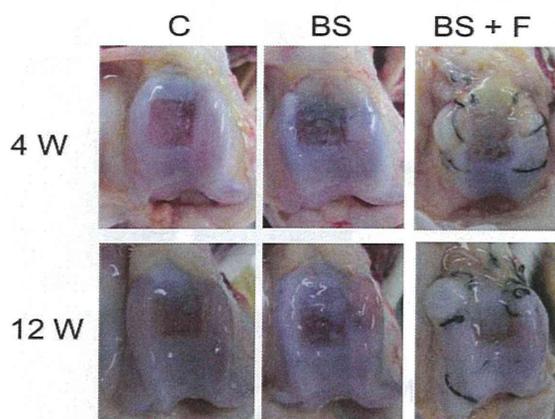


図 C-16. 軟骨欠損部の肉眼所見. C: 対照群, BS: 骨髄刺激群, BS+F: 骨髄刺激+フィブロイン群

軟骨欠損部の組織所見

術後 4 週では、BS+F 群では他の 2 群と比較して軟骨欠損部に修復組織が認められていたが、この修復組織は、サフランin O 染色、II 型コラーゲン免疫染色ともに染色性不良であり、一部に軟骨様組織を認めるのみであった。軟骨欠損のみの対照(C)群では修復組織は認められず、BS 群で骨孔部に認められた白色の修復組織も、サフランin O 染色、II 型コラーゲン免疫染色ともに染色されなかった。(図 C-17)

術後 12 週では、BS+F 群において、サフランin 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。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。C 群では修復は認められず、BS 群では骨孔部にのみサフランin 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 C-17)

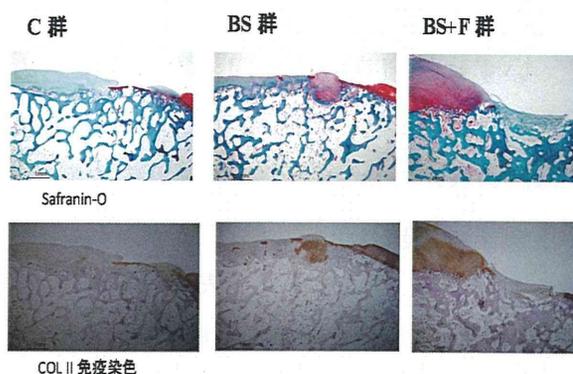


図 C-17. 術後 12 週の軟骨欠損部の組織像
C:軟骨欠損のみ, BS:骨髄刺激, BS+F:骨髄刺激+フィブロイン、上段・中段: サフランin O 染色、下段: II 型コラーゲン免疫

ICRS (International Cartilage Repair Society) の Grading System により半定量的な評価を行ったところ、12 週の BS+F 群において、他群と比較して有意な改善が認められた。

(図 C-18, * $P < 0.05$)。

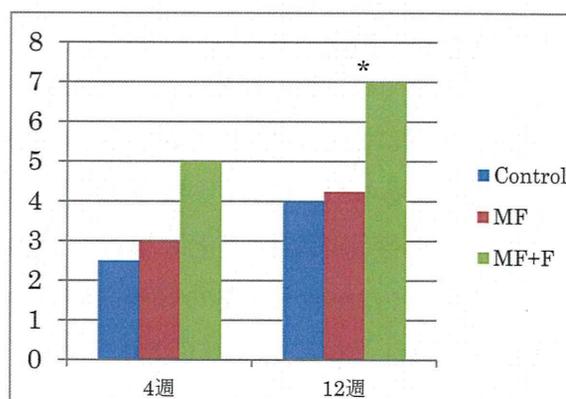


図 C-18. ICRS scale による軟骨欠損部修復の半定量的評価

2-3-2) 骨髄間葉系細胞播種+フィブロイン被覆法

歩行状態

F 群、F+BMC 群とも術後より疼痛による歩行障害を認めたが、術後 21 日以降には歩行異常は認められなかった。

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。

X線学的検査

フィブロインスポンジ表層に縫いこんだX線陽性糸の観察では、F群、F+BMC群とも、4週、12週の飼育期間の間、フィブロインスポンジはほぼ軟骨欠損部上にとどまっていた。しかし、4週くらいから軟骨欠損部の軟骨下骨の融解像が認められるようになり、12週では同部の骨欠損、周囲の硬化像など変形性関節症性の変化が起きていた。

骨髄細胞を播種したフィブロインスポンジの組織像

F+BMC群のフィブロインスポンジ内には骨髄由来細胞が認められた。

軟骨欠損部の肉眼所見

術後4週では、F群比較して、F+BMC群では欠損部に白色の修復組織が多く認められる傾向にあった。しかし、12週時には両群ともに変形性関節症性変化の進行が認められ、肉眼的には軟骨欠損部の修復に明らかな差は認められなかった(図C-19)。

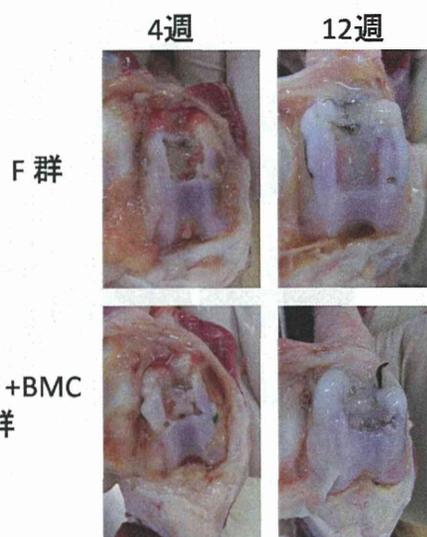


図 C-19. 術後 4 週および 12 週での軟骨欠損部の肉眼所見 F:フィブロイン被覆, F+BMC: 骨髄間葉系幹細胞を播種したフィブロイン被覆

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

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。

3-1) フィブロインスポンジへの遠心播種条件等の評価

遠心播種

マイクロチューブに設置したフィブロインスポンジは、チューブ内径の傾斜により遠心処理を行った後も、初期の状態を保ってお

り、簡便な本手法でも遠心播種が可能であることが分かった。スポンジのチューブ内への安定的な固定のために、チューブ内にフィブロインスポンジを支持するためのガラスフィルターを試作して、スポンジ固定の安定性を試みた。(写真 2) しかし、固いガラスフィルターをチューブ内に設置することが難しく、また、遠心中にガラスフィルターの上においたスポンジが浮き上がる場合も多く見られ、あえて使用する必要はないと判断した。実際に本手法を採用する場合は、マイクロチューブ側にツメを付加する加工で十分に対応できるのではないかとと思われる。



写真 2. 遠心播種スポンジ支持用ガラスフィルター

播種細胞数

前記の遠心播種法により、フィブロイン濃度の異なるスポンジに細胞を播種し、遠心力を変化した場合にフィブロインスポンジ内に播種された細胞数を定量した。今回検討した 2%~6%のフィブロインスポンジは、すべて 200g の遠心力に耐えることが分かった。播種細胞数の結果を図 C-20a に示した。

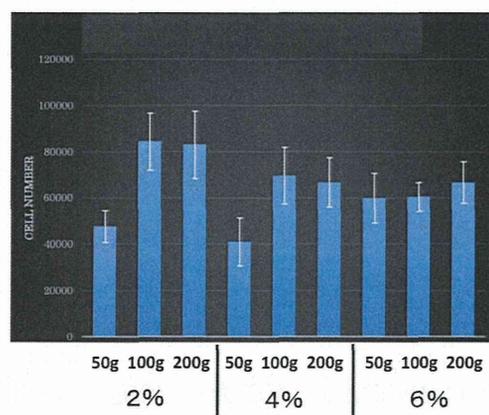


図 C-20a. 濃度の異なるフィブロインスポンジに遠心力が異なる遠心播種をした場合に、スポンジ内に播種される細胞数の変化

6%濃度の硬いフィブロインスポンジでは、50g~200g では、遠心力に依らず、おおよそ播種細胞の約 6 割がスポンジ内に留まっていることが分かる。一方、2%や 4%濃度の比較的柔らかいスポンジでは、遠心力が 50g と低い場合、播種細胞の半分ほどしかスポンジ内に留まっていなかったが、遠心力を 100g 以上に上げることで、7~8 割の細胞がスポンジ内に保持されることが分かった。柔らかいスポンジで遠心力が弱い場合、スポンジ表面に留まった細胞が培養に移行する時に漏れ出たと推察できる。遠心処理による細胞のダメージを出来るだけ抑えるためには、100g の遠心力で播種することで、効果的に細胞が播種できることを意味している。

スポンジ内での細胞分布

遠心播種後のスポンジ内での細胞の分布は、その後の“貼って治す”治療システムの構築のためには重要な知見となる。そこで、濃度の異なるフィブロインスポンジに異なる遠心力で播種した場合のスポンジ内での細胞分布について、播種後のスポンジの切片を観察した。

図 C-20b には、2% スポンジに対して、異なる遠心力で播種した場合の細胞のスポンジ内の分布を示した。50g と 100g では、スポンジ内部には細胞は観察されず、表面近傍に局在化しているようであるが、200g の遠心力では、内部まで浸潤した細胞が観察される。

図 C-20c には、遠心力を 200g と一定にした場合の、濃度の異なるフィブロインスポンジに遠心播種した場合の細胞のスポンジ内での分布を示した。濃度が 2% や 4% のスポンジでは、細胞が内部まで侵入していることが観察されたが、6% スポンジでは、細胞は表面に留まりスポンジ内部では観察されなかった。

本研究課題において目指す治療システムでは、細胞播種したフィブロインスポンジを軟骨欠損部に貼り付けることで、軟骨再生を促す効果を期待している。その場合、スポンジに播種する細胞は、表面近傍に存在する方が効果的であると考えられる。この意味から考えると、6% 程度のフィブロインスポンジを選択し、100~200g 程度の遠心力により遠心播種することで、フィブロインスポンジに効果的に細胞を播種できると推察できる。

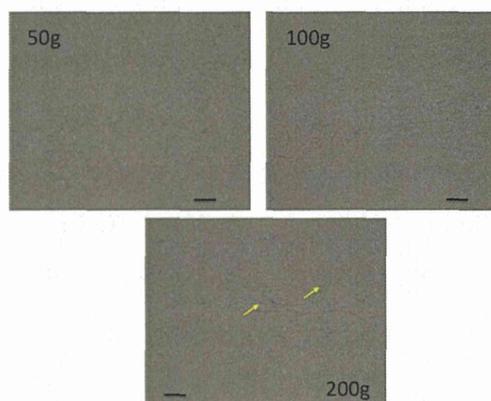


図 C-20b. 2% のフィブロインスポンジに対して異なる遠心力で細胞播種した場合の、スポンジ内での細胞分布。スケールバーは 200 μ m。矢印は内部に侵入した細胞。

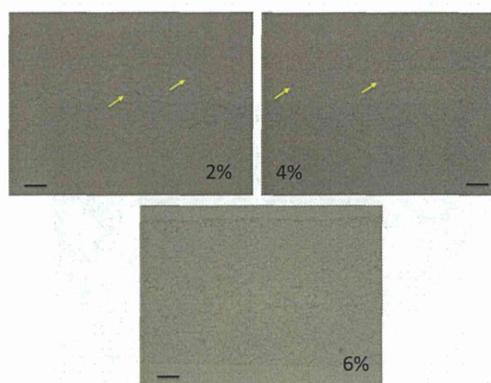


図 C-20c. 異なる濃度のフィブロインスポンジに 200g の遠心力で細胞播種した場合のスポンジ内での細胞分布。スケールバーは 200 μ m。矢印は内部に侵入した細胞。

フィブロイン上での iPS 細胞培養

再生医療における細胞源としての iPS 細胞は、極めて有用な手段であると認識されている。本研究課題においても、iPS 細胞の利用は有用な手法となると期待できる。しかし、シルクフィブロインと iPS 細胞との関連について詳細に検討した報告は見当たらない。そこで、まず、フィブロインフィルム上での iPS 細胞の培養状態についての基礎的知見を得ることを行った。培養ディッシュ上にコーティングしたフィブロイン上で培養した iPS 細胞の形態を図 C-21 に示した。

図より明らかなように、フィブロイン上での iPS 細胞の形態は、細胞培養用ディッシュ上のそれと異なっていることが分かる。培養ディッシュ上では、細胞がディッシュ上に広がり、また無定形な細胞凝集を示しているのに対し、フィブロイン上では、球状のコロニー形状を示している。また、未分化状態を示す蛍光の観察では、フィブロイン上でのコロニー上の細胞塊は強い蛍光を示し未分化状態を維持していると考えられるが、細胞培養ディッシュ上では、蛍光も弱く iPS 細胞が分化してしまっている可能性が示唆される。iPS 細胞の球状コロニーは、多分化能を有している胚葉体組織とされ、種々の組織への分化のためのステップであるとされている。すなわち、フィブロイン表面は、iPS 細胞の胚葉体様組織を形成させる可能性を有していると期待できる。

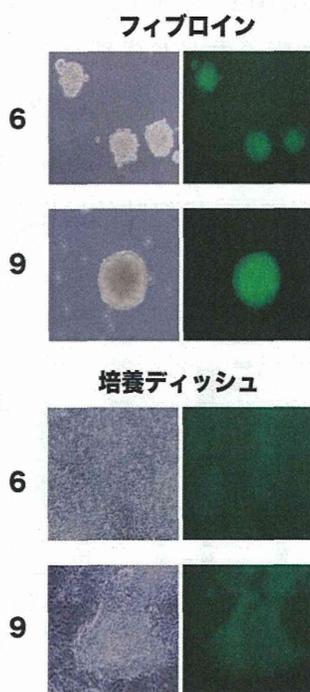


図 C-21. フィブロインフィルムと細胞培養ディッシュ上で培養したマウス iPS 細胞の形態 (左) と蛍光観察 (右)。それぞれ培養 6 日目と 9 日目の状態。

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

サフラニン・O 染色

静置培養試料, 14 日目刺激試料, 18 日目刺激試料, 20 日目刺激試料において染色性が見られた。特に 18 日目刺激試料がより広範囲の染色性を示した。16 日目刺激試料についてはわずかに染色性が見られた。12 日目刺激試料, 10 日目刺激試料については染色性が見られなかった (図 C-22)。

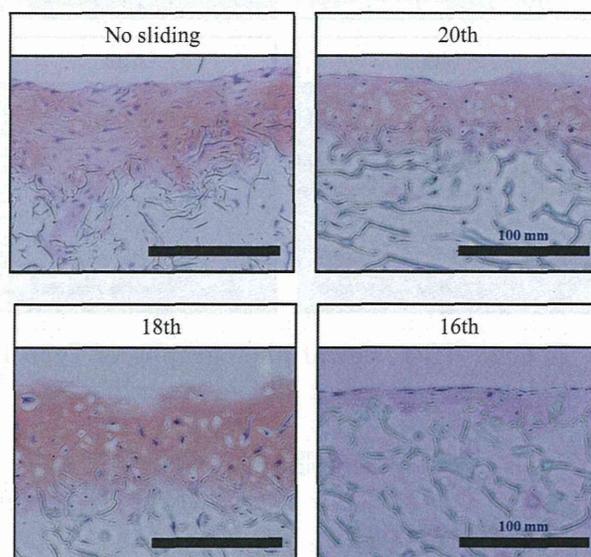


図 C-22. Histological photographs of Safranin-O staining

タイプ II コラーゲン染色

サフラニン・O 染色結果と同様に、静置培養試料, 14 日目刺激試料, 18 日目刺激試料, 20 日目刺激試料において染色性が見られた。16 日目刺激試料についてはサフラニン・O 染色結と違い、ある程度の染色性が見られた (図 C-23)。

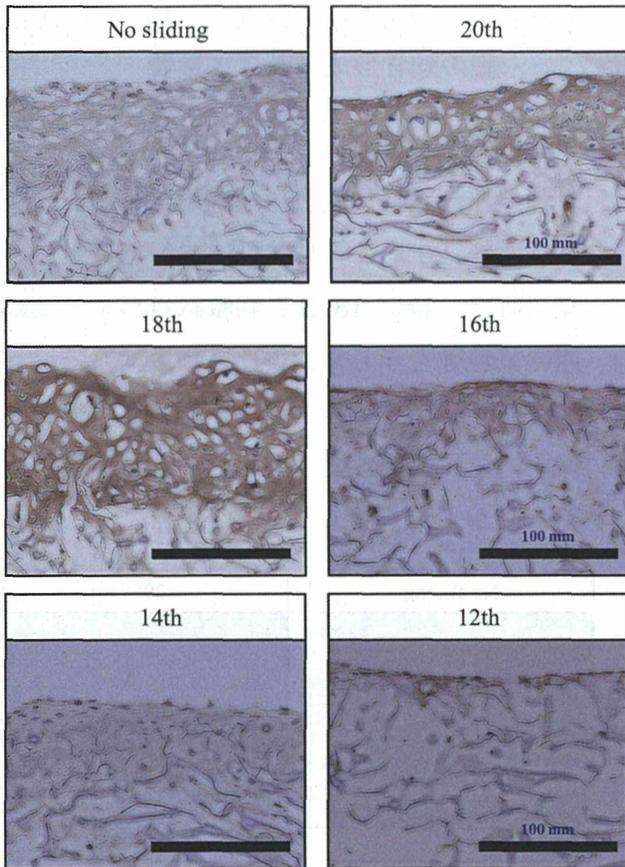


図 C-23. Histological photographs of Type II Collagen staining at 20-fold magnification

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

組織学的評価

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 非添加群では、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(200ng/ml)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。(図C-24)

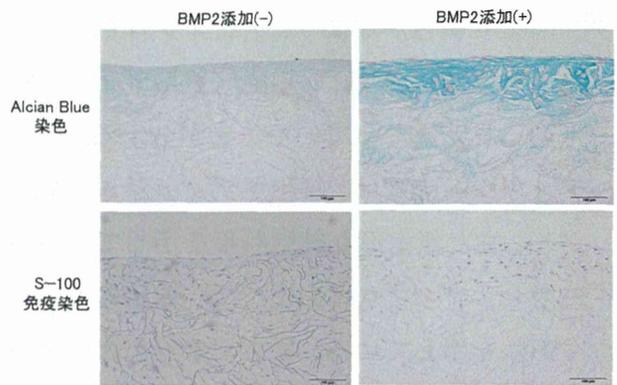


図 C-24. フィブロインスポンジにおけるヒト軟骨細胞培養 4 週の軟骨形成. BMP-2: 200ng/ml.

遺伝子発現

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 (図 C-25)。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 日目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。(図 C-26)

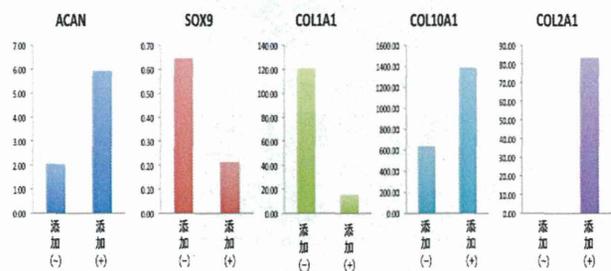


図 C-25. フィブロインスポンジ内の培養ヒト軟骨細胞における軟骨分化関連遺伝子の発現と BMP-2(200ng/ml)添加の影響

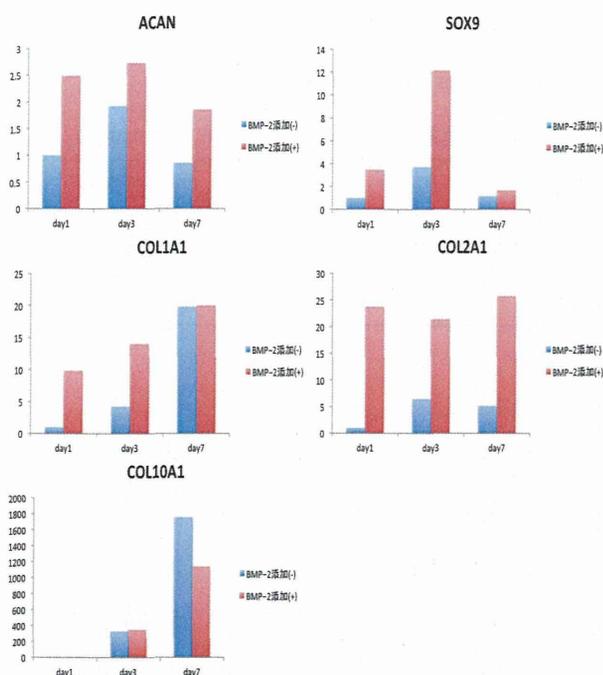


図 C-26. フィブロインスポンジ内の培養ヒト軟骨細胞における軟骨分化関連遺伝子の発現と BMP-2(200ng/ml)添加の影響

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

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。

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

生検組織の蛍光顕微鏡による観察

2 週 of 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 C-27)。

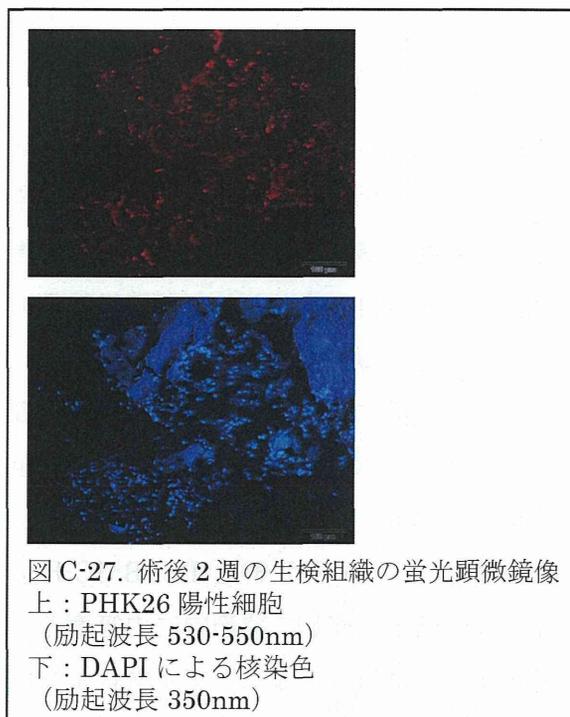
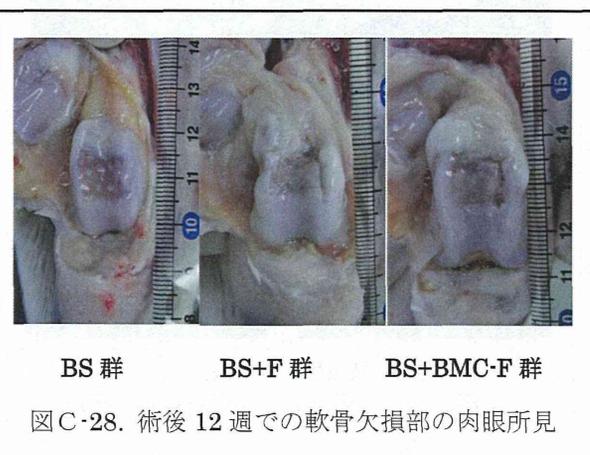


図 C-27. 術後 2 週 of 生検組織の蛍光顕微鏡像
上: PKH26 陽性細胞 (励起波長 530-550nm)
下: DAPI による核染色 (励起波長 350nm)

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 C-28)



BS 群 BS+F 群 BS+BMC-F 群

図 C-28. 術後 12 週 of 軟骨欠損部の肉眼所見

軟骨欠損部の組織学的所見

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、また骨髄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 C-29, 表 C-2)

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。

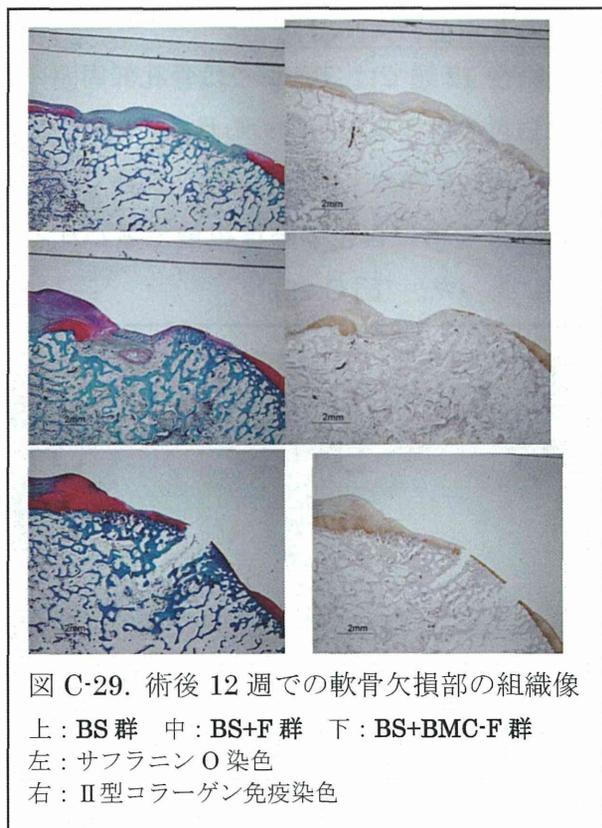


表 C-2. 軟骨欠損部の組織学的検討

Grade of histopathological findings:

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

Group	骨髄刺激				
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
	骨髄刺激+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
	骨髄刺激+骨髄細胞播種 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

3-5) 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

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。

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 35.2pg/mL から術後抜釘時平均 8.1pg/mL に有意に減少した。sGAG 濃度は術前平均 67.1μg/mL から術後抜釘時平均 81.3μg/mL に有意に増加した。(図 C-30)

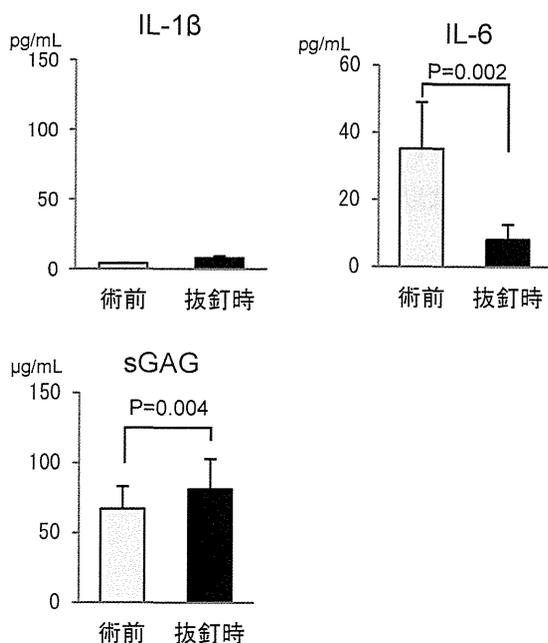


図 C-30. 術前および術後抜釘時の関節液中 IL-18, IL-6, sGAG 濃度

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

35.4pg/mL、修復あり群が平均 35.1pg/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 28.9pg/mL、修復あり群が平均 37.5pg/mL で、両群間に有意差はなかった。(図 C-31)

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

(図 C-32)

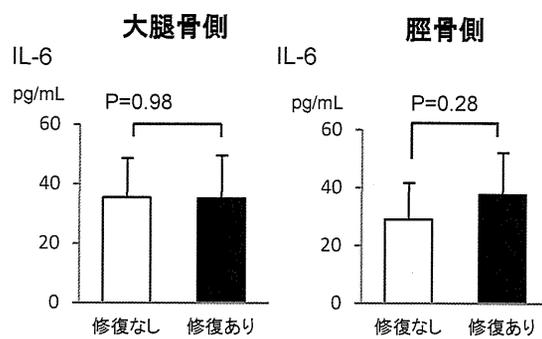


図 C-31. 軟骨修復と術前 IL-6 濃度の関係

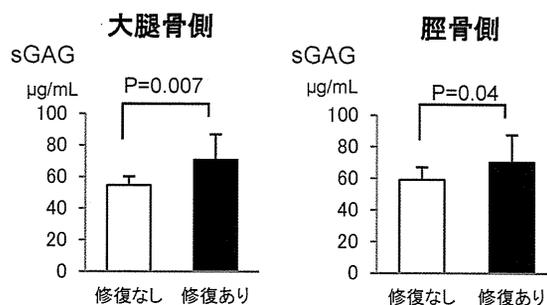


図 C-32. 軟骨修復と術前 sGAG 濃度の関係

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。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。

3-6) 本治療法の臨床試験導入に向けてのガイドライン策定

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。

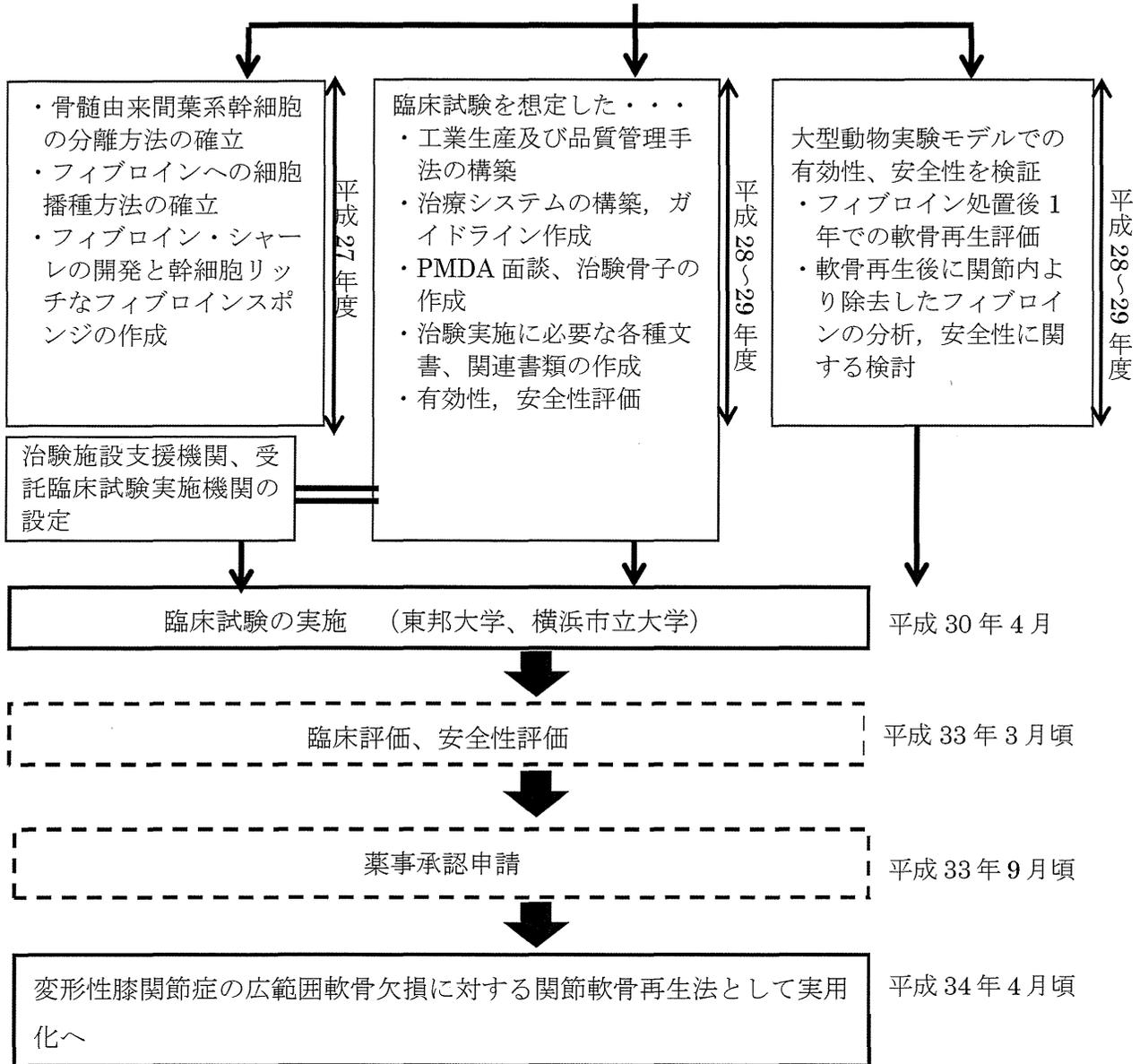
以上の結果より OWHTO 術後の軟骨修復に影響を与える因子は欠損部位、ICRS Grade、性別、BMI であり、年齢や術後 FTA は影響を受けにくいと考えられた。臨床試験では OWHTO 術後、十分な軟骨修復が期待できない症例に対して本関節軟骨再生法を併用すると考えると、1)ICRS grade が早期、2)女性、3)BMI: 25 以上、が対象症例と考えられるが、いずれにせよ、OWHTO 単独治療では stage 3 の完全修復は大腿骨側で 16%しか認められていないため、対象患者選定においてこれらの因子は勘案しないこととした。また、年齢、術前 FTA は術後の軟骨修復と関連は認められ

なかったが、フィブロインスポンジは HT0 に併用して使用するため、従来の HT0 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) HT0 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

1) 研究材料の適性化と解析に関する研究

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。平成 24 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、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と良いと考えられる。さらに、平成 24 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。平成 24 年度は、製品製造の工程の簡素化の観点から、界面現象を利用した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うが、エレクトロス

ピ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必要があると考えられた。

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、平成 25 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と考えられた。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。

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フィブロインスポンジを利用した“貼って治す”軟骨再生治療システムにおいて、手術室でのフィブロインスポンジへの細胞播種が検討されている。細胞播種を行う簡便な手法として遠心播種が考えられる。そこで、種々のフィブロインスポンジへの遠心力を変化させた場合の細胞播種性やスポンジ内での細胞分布について検討を行った。その結果、遠心力としては 100g で十分に播種できることが分かった。また、今回検討した条件では、スポンジ表面近傍に細胞が保持されるため、治療システムで目指す“貼って治す”という目的に対しては、効果的な播種方法である可能性が高いと思われる。比較的フィブロイン濃度が高いスポンジでは、播種性や表面への保持性が高いことが分かった。今後の臨床研究へ向けてのスポンジ設計に有用な知見が得られた。

フィブロイン上での iPS 細胞培養結果は、通常の培養ディッシュ上での iPS 細胞培養状況と異なり、フィブロイン上では、胚葉体様の球状コロニーが発現することが観察された。このコロニーの未分化状態の維持は確認されたものの、多分化能については今後の検討が必要である。しかし、この iPS 細胞培養結果から、本治療システムにおいて遠心播種される骨髄間葉系幹細胞は、フィブロインスポンジ内では未分化状態を維持して貯蔵され、軟骨欠損部に貼付されて軟骨への分化環境に晒されることで、効果的に軟骨細胞に分化し、迅速な軟骨組織再生を実現していることが考えられる。この推測が事実であれば、本事業で目指す“貼って治す”軟骨再生治療

システムにおいて、フィブロインスポンジは、他材料では代替が出来ない特異的な材料であると考えられる。

2) フィブロイン内に播種された軟骨細胞の細胞凝集・分布、および軟骨形成に関する研究

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。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。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。

平成 25 年度は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 μm 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 μm) 及び準最表層 (20 - 40 μm) 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、この手法はフィブロインスポンジ製造条件の最適化設計に有用と考えられた。

平成26年度は、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を検討した。サフラニン-O染色は再生軟骨組織のGAG産生の指標であり、潤滑特性の直接の指標とはならないが、本実験においては、産生された組織の構造にも違いが見られた。静置培養試料に比べて、18日目刺激試料、20日目刺激試料では細胞密度が低く、生体軟骨に特徴的な軟骨細胞窩(Lacunae)に酷似した構造が観察された。さらに、サフラニン-O染色結果を利用した組織学的スコアであるBernスコア(表D-1)を元に、本結果を定量的に評価してみる。Bernスコアは軟骨細胞窩の有無に着目していないが、細胞間距離に着目したスコアである。(ただしBernスコアを用いる際は、薄さ3-4 μm の染色切片が推奨されているが、本実験で用いた染色切片は5-6 μm であるため、スコア値は参考である。)

	No sliding	20th	18th	16th	14th	12th	10th
Bernスコア値	6.00	6.67	7.33	3.33	4.33	0.67	0.33

表 D-1. Results of Bern score

静置培養試料よりも、相対すべり刺激を与えた、20日目、18日目刺激試料の方が、高いスコア値が算出された。よって、相対すべり刺激によって、組織学的に優れた再生組織が産生される可能性が示唆された。また、培養16日目より以前に刺激を与えた試料が、

18日目以降に刺激を与えた試料に比べてより低いスコアを示した。

3) フィブロインスポンジにおけるヒト軟骨細胞培養の効果

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。

4) イヌ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進効果に関する研究

平成24年から行ってきた3年間の動物実験の結果から、イヌなどの中～大型動物においても、フィブロインが関節軟骨の修復に促進的な役割を果たすことが示された。我々は、軟骨細胞はフィブロインの中で細胞凝集体