

201432008A

厚生労働科学研究委託事業

再生医療実用化研究事業

バイオ3Dプリンタを用いた高度変性半月板損傷に
対するあたらしい再生医療の開発

平成26年度

委託業務成果報告書

研究代表者 中山 功一

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究委託事業

再生医療実用化研究事業

バイオ3Dプリンタを用いた高度変性半月板損傷に
対するあたらしい再生医療の開発

平成26年度 総括・分担成果報告書

研究代表者 中山 功一

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（再生医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人佐賀大学学長 佛淵孝夫が実施した平成26年度「バイオ3Dプリンタを用いた高度変性半月板損傷に対するあたらしい再生医療の開発」の成果を取りまとめたものです。

2014年10月10日現在

佐賀大学 再生医療実用化研究事業

目 次

I. 総括成果報告	
「バイオ3Dプリンタを用いた高度変性半月板損傷に対するあたらしい再生医療の開発」	5
研究代表者 中山 功一	
佐賀大学大学院工学系研究科先端融合専攻 教授	
II. 分担成果報告	
1. 中大動物への移植の検討と術式の最適化	18
松田 秀一 京都大学医学部整形外科 教授	
2. 動物への移植技術および評価方法の研究	29
三角 一浩 鹿児島大学共同獣医学部 獣医学科 教授	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	43

I. 統括研究報告

厚生労働科学研究委託事業(再生医療実用化研究事業)
総括研究成果報告書

「バイオ3Dプリンタを用いた高度変性半月板損傷に対する
あたらしい再生医療の開発」

研究代表者

中山 功一 佐賀大学大学院工学系研究科先端融合専攻 教授

研究要旨

膝関節部半月板には、外傷などによる損傷、断裂や膝関節部分の変性により半月板損傷が起こる。膝部分の消耗などによる半月板部分の変性、スポーツによる外傷、様々な要因で起こる半月板損傷治療法として、現状では損傷、断裂部分への縫合術や切除術が主流となっている。また、膝関節部分の衝撃を緩衝する役割をもつ半月板の切除を行うと、膝関節部分軟骨へ直接的な負荷がかかるため、膝軟骨部分がすり減り、変形性関節症を引き起こすリスクが高くなるとされている。そのため半月板損傷の新たな治療法が、高齢者のみならず、アスリートなどの若年層のスポーツ者にも望まれている。

我々は、半月板の機能再生を行う新規の治療法の確立を目指している。これまで、構造体組織構築の足場を必要としないスキヤフォールドフリーのバイオ3Dプリンタ(3次元細胞積層システム)を企業共同開発し、この装置をもちいて細胞だけで構築された立体的な細胞構造体の作製に成功している。本研究では、移植可能な強度をもった半月板型インプラント様細胞構造体の作製に成功した。さらに独自のバイオリアクターを開発し、異なる強度を持った構造体の作製に成功し、ウサギやブタなどの中・大動物へ移植する非臨床試験を実施した。今後これらの成果をもとにさらなる条件の検討を行い半月板治療のための新規の治療法として臨床応用を目的とした非臨床POC取得を目指す。

A.研究目的

膝関節部半月板には、外傷などによる損傷、断裂や膝関節部分の変性により半月板損傷が起こる。膝部分の消耗などによる半月板部分の変性、スポーツによる外傷、様々な要因で起こる半月板損傷治療法として、現状では損傷、断裂部分への縫合術や切除術が主流となっている。また、膝関節部分の衝撃を緩衝する役割をもつ半月板の切除を行うと、膝関節部分軟骨へ直接的な負荷がかかるため、膝軟骨部分がすり減り、変形性関節症を引き起こすリスクが高くなるとされている。痛みを伴う変形性関節症は、半月板切除後の患者さんや高齢者に見られやすく、症状が悪化すると日常的な生活を行う妨げとなり、さらに重症化すると人工膝関節全置換などの治療を余儀なくされる。これらの治療法として行われる置換手術は、感染や置換した人工膝関節の耐久性や安全性などの様々なリスクが伴うのが現状である。しかしながら、これらに対する抜本的な治療法がなく、将来的なリスク軽減のための半月板の温存を取る方法を取る一方で、半月板損傷の新たな治療法が、高齢者のみならず、アスリートなどの若年層のスポーツ者にも望まれている。

我が国では変形性膝関節症の症状を有する者は年間で3000万人を超えと言われ、高齢化社会の中での高騰する医療費を圧迫する要因

になると予想されている。我々は、半月板の機能再生を行う新規の治療法の確立を目指している。これまで、構造体組織構築の足場を必要としないスキヤフォールドフリーのバイオ 3D プリント(3次元細胞積層システム)をサイフューズ社と共同開発し、この装置をもちいて細胞だけで構築された立体的な細胞構造体の作製に成功している。このシステムを利用することにより、複雑な形状を持ち、用途に合わせた形状の細胞構造体の作製が可能となる。現在、移植可能な高い硬度をもった半月板型インプラント様細胞構造体の作製を進めている。また、研究期間中に、中・大動物へ移植する非臨床試験を実施し、半月板治療のための新規の治療法として臨床応用を目的とした非臨床 POC 取得を目指す。

(1)移植可能な強度を持つ構造体を作製

従来の再生医療・組織工学の手法では強度を持った立体的な構造体を細胞だけで作成するのは不可能とされ、ポリマーやハイドロゲルといった生体材料(スキヤフォールド)との混和が必須とされていた。そのため、本研究では細胞だけで一般的な外科医が手術で扱える程度の強度を持った構造体がバイオ3Dプリンタから出力して作成可能か検討した。

(2)中動物への移植試験

作成された構造体が生体内で有害な作用を起こさないか、および半月板としての機能を発揮・

維持できるか検討した。

一般的に動物実験で使用されるマウスやラットでは関節が小さすぎるため、日本白色家兎を用いて移植の検討・実施を行った。

(3)大動物への移植試験

実際の半月板は生体の体重を受け止めているが、マウスから兎までは直立する状態が皆無であり、力学的な荷重分布がヒトとは大幅に異なる。そのため比較的ヒトに近い荷重状態を維持しているミニブタを用いて移植試験の検討・実施を行った。

B. 研究方法

移植可能な強度を持つ構造体を作製

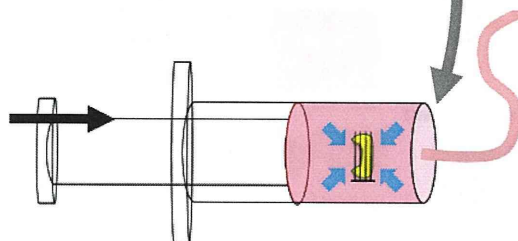
細胞ソースの再検討

従来間葉系幹細胞を未分化のままバイオ3Dプリンタで積層を行っていたが、移植手術に耐えうるほどの十分な強度を得るには不安定であった。そのため京都大学整形外科より iPS 細胞由来の間葉系幹細胞入手、軟骨分化誘導培地で培養し、バイオ3Dプリンタで積層を行えるか検討した。また陽性コントロールとして未熟家兎の正常関節軟骨細胞を購入し同じくバイオ3Dプリンタで積層した。その結果、未熟家兎から作成した半月板様構造体をもっとも強度が高く、未分化間葉系幹細胞で作成した構造体をもっとも柔らかかった。iPS 由来の間葉系幹細胞は軟骨への分化誘導が不十分でさらなる分化誘導条件の検討が必要と思われた。

力学的負荷を加えた培養装置の設計、試作

細胞培養部に 50mL テルモシリンジ、モーター部にシリンジポンプ、また、その他の連結や固定台に、ゴムチューブ、スタンドおよびムッフを使用し、静水圧刺激装置を開発した。シリンジポンプの圧力でテルモシリンジ内の半月板様構造体に静水圧を

加える構造とした (図)。



静水圧 P は、以下に示す 3 つの式より算出した。

$$Q = v \times \phi$$

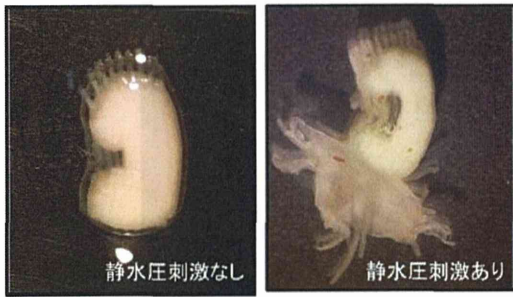
$$v = (2 \cdot g \cdot H)^{1/2}$$

$$P = H \times 10^{-4}$$

半月板様構造体に加える圧力は 3.86×10^{-3} MPa とした。

細胞培養

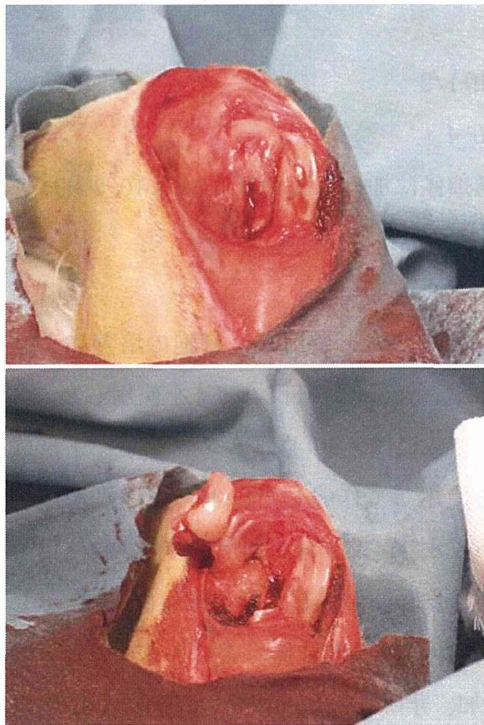
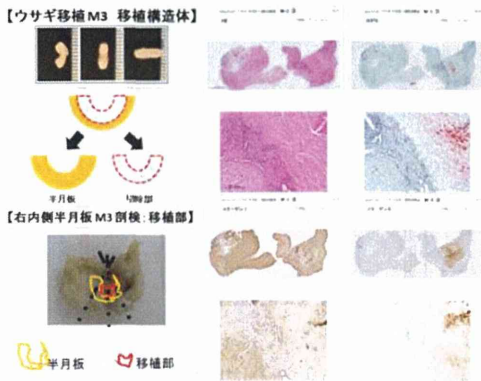
細胞はウシ軟骨細胞を使用し、細胞の培養および継代は、PBS、TrypLE、10%FBS/DMEM を使用した。スフェロイド作成には、96 ウェルスフェロイド形成プレートを使用して作成した。半月板様構造体の作製にはバイオ3Dプリンタを用いて行い、使用した 3D データおよび作製した構造体は図 3 に示した。作製した半月板様構造体はアスコルビン酸 (以下 Asc) 添加、非添加の状態それぞれ 1, 2, 3 週間培養した。静水圧刺激は 1 日 3 時間行い、2 週間培養した。



中動物への移植と非臨床 POC の取得

日本白色家兎の膝関節を展開し移植方法の確立を試みた。

右内側半月板の全置換を目指し解剖学的な観点から術式を再検討した。



大動物への移植の検討と術式の最適化

家兎での術式は元来の骨のサイズの問題で技術的には非常に高度な手術テクニックが求められ、かつ、ヒトと関節の荷重分布がことなることが軟骨再生医療の分野で古くから指摘されていたことも相まって、ブタでの移植を行うこととした。

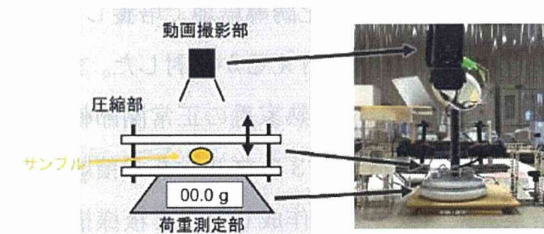
鹿児島大学獣医学部附属病院でブタの膝関節を展開し、家兎と同様の骨切りを試みた。

(倫理面への配慮)

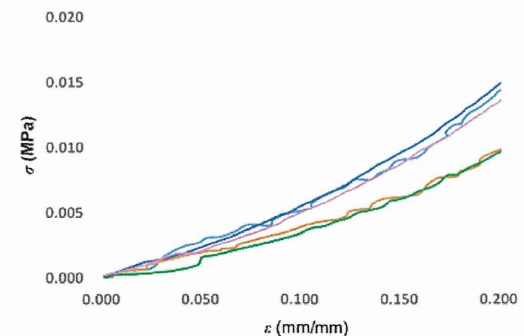
本研究は佐賀大学および鹿児島大学の動物実験施設で行われた。

各大学の動物実験に関する倫理委員会に審査され、規定に沿って動物に過度な苦痛を与えないよう十分な麻酔・鎮静鎮痛剤を用いて行っており、倫理的に十分な配慮を行っている。

C. 研究結果

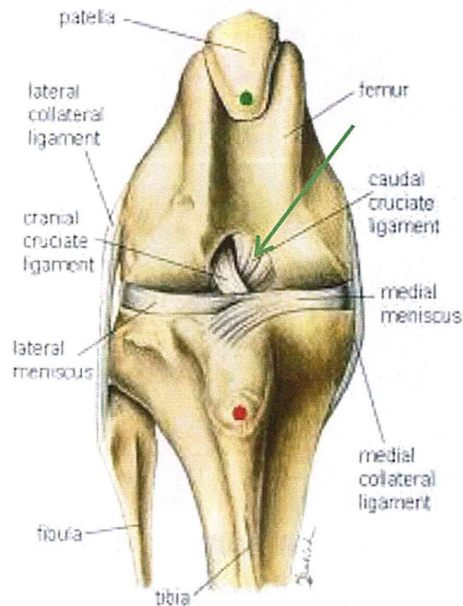
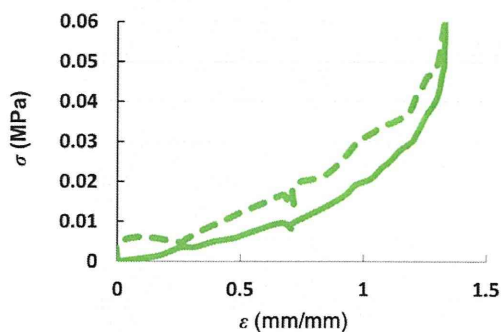
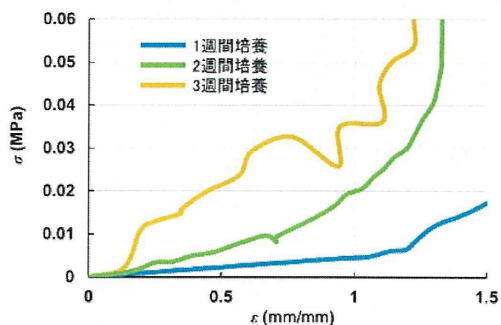


開発した測定装置の精度を調査するために果汁グミ (株式会社 明治) の測定を行い、応力-歪み曲線を作成した。



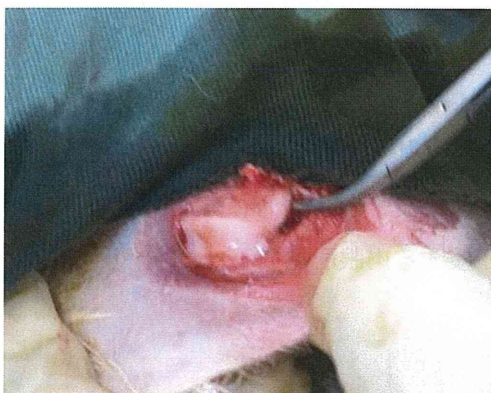
また、培養期間変化による半月板様構造体の強度への影

響および Asc 添加による半月板様構造体の強度への影響を開発した測定装置を用いて評価した。測定結果から半月板様構造体の応力-歪み曲線を作成した。刺激を加えた半月板様構造体も同様に測定を行い、Asc 添加して培養した半月板様構造体と比較した。

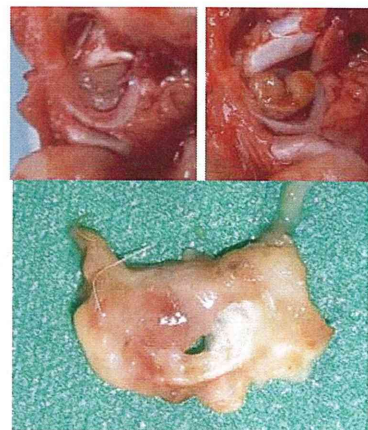


中動物への移植と非臨床 POC の取得

関節裂隙が非常に狭いため、内側側副靭帯 (MCL) および後十字靭帯 (PCL) を切除して関節の展開を試みた。しかし、それでも十分な視野および術野が確保できなかった。



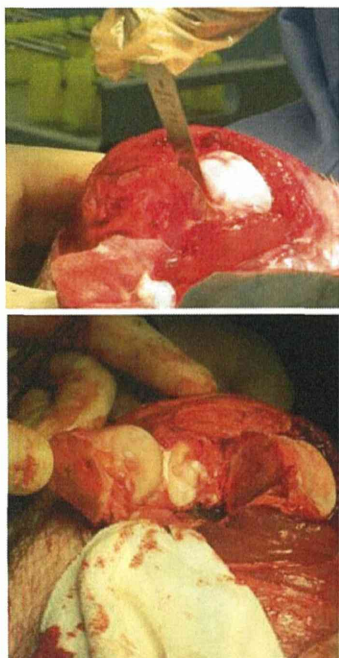
そこで大腿骨内顆に MCL を付着させたまま骨切りしたところ、十分な視野が確保できた。



露出した内側半月板と摘出後の概観

大動物への移植の検討と術式の最適化

内顆の顆間部にある PCL 前方を一部切除することで、家兎と同様の術野が得られた。

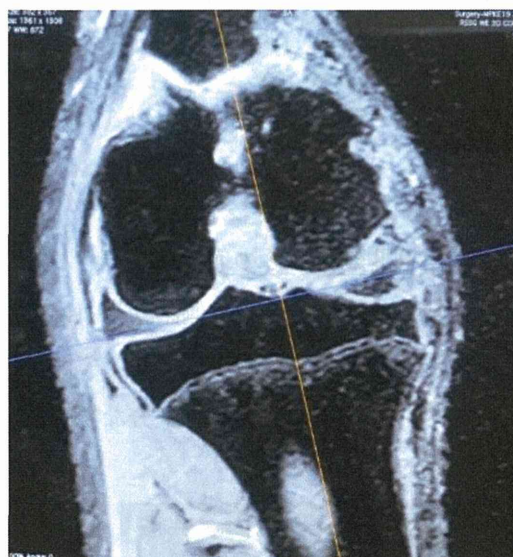
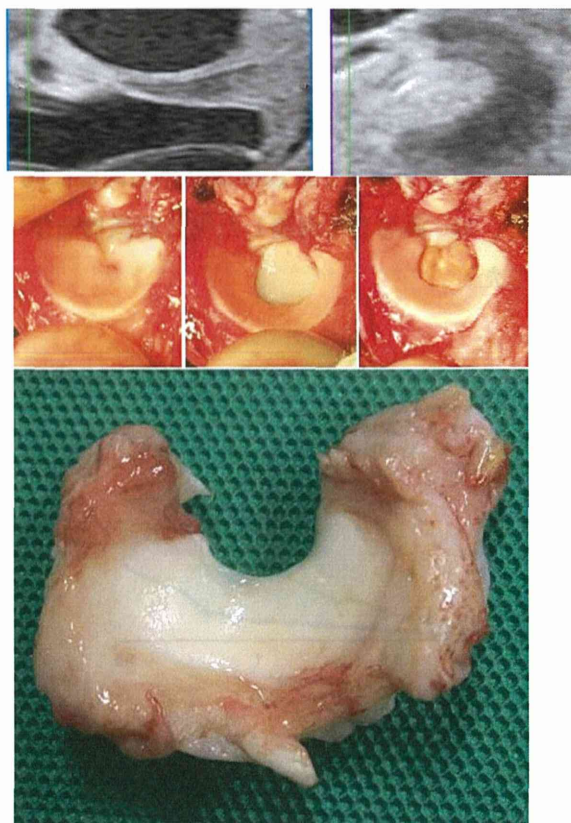


半月板を部分的に切除し細胞構造体を移植、骨切り部を整復し海綿骨螺子2本で固定した。固定性は良好であった。術後1か月に抜釘し、CT およびMRI で骨切り部および移植部を観察した。

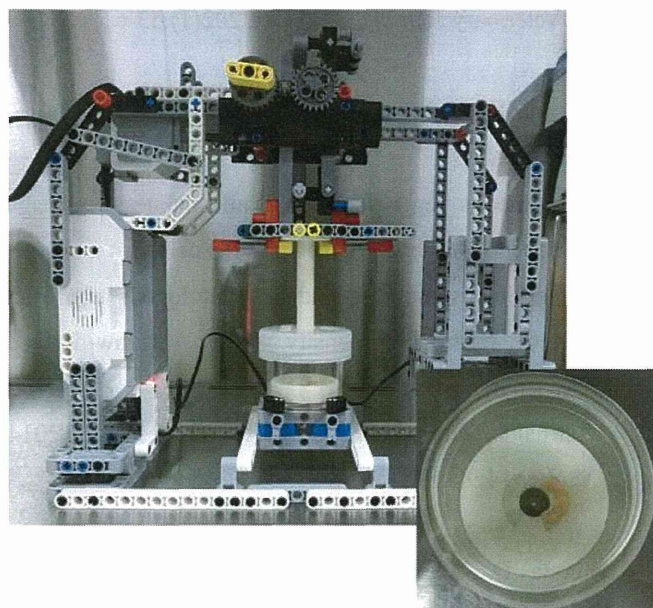
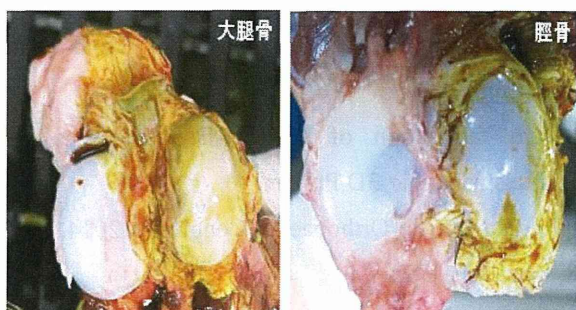
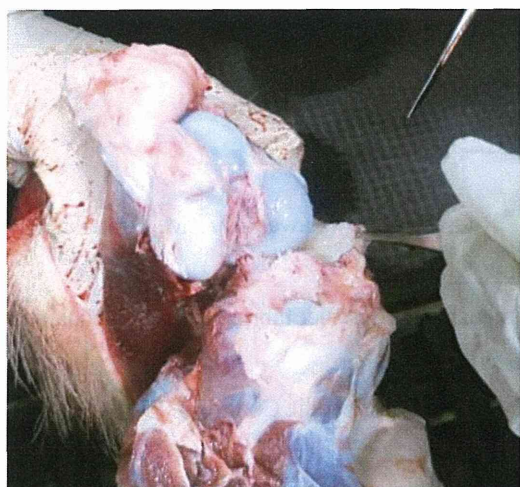
CT、MRI ともに骨切り部の癒合は良好で、あきらかな骨壊死は認められなかった。MRI でも滑らかな関節面が維持できると推測され、ブタは安楽死させずにそのまま経過観察とした。



移植から2か月目に安楽死し、骨切り部、および移植部を展開・露出した。骨切り部は非常に滑らかに治癒しており、一部切り込んだ関節面も滑らかな修復されていた。



また、大腿骨および脛骨にあきらかな変形性関節症を示唆するような関節面の不整や骨棘などは認められなかった。細胞を移植した半月板は一部分修復を示唆する肉眼所見であった。



ウサギおよびミニブタへの移植方法は臨床の場面では使用することはないと思われるが、今後の非臨床研究においては有用な術式であると思われる。

D. 考察

測定装置は複数回の測定の間での互のばらつきが小さいことから精度は高いといえ、再現性をとることができると考えられる。半月板様構造体は、培養期間が長いほど傾きが大きくなることが確認され、このことから、培養期間が強度に影響を与える要因となっていると考えられる。また、Asc 添加、非添加での傾きの変化は確認されなかったことから、細胞増殖因子によるコラーゲン合成の活性化および細胞外マトリックスの成熟では強度の増加は見込みにくいと考えられる。2週間培養した刺激有無の半月板様構造体を比較すると、刺激有の傾きが大きいことがわかるため、強度は刺激を加えた細胞構造体のほうが大きく向上していることがわかる。よって、細胞構造体に刺激を加えることは、強度の向上につながると考えられる。今後は、刺激を加える方法や、刺激の強さなどを変化させ、細胞構造体の強度変化をみていく。

E. 結論

我々は細胞だけで正常半月板と類似した形状の細胞構造体を作成することに成功した。

また、ウサギおよびミニブタへの移植も行った。さらなる研究が必要であるが本研究は我が国の国民のQOL向上、および医療費の削減に貢献できると思われる。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報はない

G. 研究発表

1. 論文発表

Murata D, Miyakoshi D, Hatazoe T, Miura N, Tokunaga S, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived

from synovial fluid.

The Veterinary Journal, 2014 Oct, 202(1):53-61,

Ishihara K, Nakayama K, Akieda S, Matsuda S, Iwamoto Y.

Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Journal of Orthopaedic Surgery and Research, 2014 October 14;9(1):98

Murata D, Tokunaga S, Tamura T, Kawaguchi H, Miyoshi N, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K.

A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free 3-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.

Journal of Orthopaedic Surgery and Research 2015, 10:35

中山 功一

細胞だけで立体的な構造体を作製する Scaffold-free 3D Biofabrication System の開発

シーエムシー出版刊 Bio Industry Vol. 31(1) pp.20-27 Jan 2014

川勝美穂、大嶋利之、田中麻衣、中山 功一

細胞だけで立体的な構造体を作製するバイオリピッドプロトタイピングシステムの開発

遺伝子医学 MOOK 別冊 pp. 190-194 Feb, 2014

川勝美穂、大嶋利之、中山 功一

バイオ 3D プリンティング技術を用いた立体的細胞構造体の作製

一般社団法人 日本印刷学会 日本印刷学会誌 Vol.51 pp.18-22 2014

2. 学会発表

a) 国際

Iwasaki R, Oshima T, Kawakatsu M, Tanaka M, Nakayama K.

Three dimensional construct fabrication and mechanical pressure culture enhance.

ICJR Pan Pacific Orthopaedic Congress 2014.7.16-18, Kona, HI, USA

Oshima T, Iwasaki R, Kawakatsu M, Tanaka M, Nakayama K.

In vitro fabrication of scaffold-free meniscus-like constructs using bio-3D Printer.

ICJR Pan Pacific Orthopaedic Congress 2014.7.16-18, Kona, HI, USA

Nakayama K

A new approach for 3D tissue & organ fabrication inspired from Orthopedic Surgery.

The 1st International Conference & Exhibition for Nanopia 2014.11.13-14, Pusan, Korea

Nakayama K

A new approach for 3D tissue & organ fabrication inspired from orthopedic surgery.

International Bioprinting Congress 2014.7.24-25, Singapore

Nakayama K

A new approach for 3D tissue & organ fabrication inspired from orthopedic surgery.

International Conference on Bioprinting and Biofabrication 2014.10.21-22, Moscow, Russian Federation

Nakayama K

A new approach for 3D tissue & organ fabrication inspired from Orthopedic surgery.

The 5th meeting of Asian Cellular Therapy
Organization 2014.11.10-12, Osaka, Japan

b) 国内

中山功一

バイオ 3D プリンタを用いた臓器の再生とその応用について

日本安全性薬理研究会 2014.2.14, 東京

中山功一

スフェロイド積層型 Scaffold free バイオ 3D
プリンタの開発とその応用について
第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3.6, 京都

大嶋利之、川勝美穂、田中麻衣、岩崎倫士、

松田秀一、中山功一

バイオ 3D プリンタを用いた半月板様構造体作製の細胞種の探索

第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3, 京都

川勝美穂、大嶋利之、田中麻衣、岩崎倫士、

松田秀一、中山功一

バイオ 3D プリンタを用いて作製した半月板様構造体の強度増強に関する検討

第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3, 京都

中山功一

バイオ 3D プリンタを用いた立体的臓器再生の試み

酵素工学研究会 第 71 回講演会 2014.4.26, 福岡

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ 3D プリンタの開発について

日本組織培養学会 第 87 回大会 (東京)
2014.5.29-31, 東京

中山功一

A New Approach for 3D Tissue & Organ Fabrication
Inspired From Orthopedic Surgery

慈恵会医科大学(Jikei symposium for Frontier in Cardiovascular Regulation and Regeneration) 2014.5
東京

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ 3D プリンタの開発について

日本実験動物代替法学会 第 27 回大会
2014.12.5-7, 横浜

中山功一

新しい再生医療技術のご紹介

テルモ(株)研究開発向け講演会 2014.6.4, 神奈川

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ 3D プリンタの開発について
高分子同友会 2014.6.6, 東京

中山功一

バイオ 3D プリンタの開発について
第 5 回次世代創薬研究者育成塾講演会 2014.6.11,
熊本

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバイオ 3D プリンタの開発について
応用物理学会・有機分子バイオエレクトロニクス分科会 2014.7.12, 東京

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療と

バイオ 3D プリンタの開発
第 7 回三菱ケミカルホールディングス
THE KAITEKI FORUM 2014.7.8, 東京

中山功一

臓器再生を目指したバイオ 3D プリンタの開発
FITS 2014 2014.7.11, 福岡

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療と
バイオ 3D プリンタの開発
生物学若手研究者の集い 夏のセミナー
2014.7.12, 神戸

村田大紀, 徳永暁, 宮越大輔, 島添孝,
三浦直樹, 藤木誠, 中山功一, 三角一浩.
ウマ滑液由来間葉系幹細胞の培養とその性質
第 157 回日本獣医学会 2014.9.9-12, 札幌

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバ
イオ 3D プリンタの開発について
第 2 回カルディアックリサーチミーティング
2014.9.17, 名古屋

中山功一

生きた細胞を材料とした造形技術～バイオ 3D プ
リンタの開発
デジタルものづくり研究会「3D プリンタとものづ
くり革新のゆくえ」2014.10.1, 福岡

中山功一

創造力が切り開く未来
先端デジタルものづくりセミナー「創造力が切り
開く未来」2014.10.15, 金沢

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバ
イオ 3D プリンタの開発について
第 52 回日本人工臓器学会大会 2014.10.17-19,
北海道

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバ
イオ 3D プリンタの開発について
ニューセラミックス懇話会 バイオ関連セラミッ
クス分科会 第 47 回研究会 2014.10.24, 大坂

中山功一

骨折の治療から着想したあたらしい再生医療とバ
イオ 3D プリンタの開発について
CBI 学会 2014 大会 2014.10.28-30, 東京

中山功一

脂肪由来幹細胞を用いた骨軟骨再生
第 24 回 MRS 年次大会・第 3 回日本 MRS 講演会
2014.12, 横浜

中山功一

骨折治療から着想した新たな再生医療とバイオ 3D
プリンタの開発
第 5 回神戸医療イノベーションフォーラム
2015.2.8, 神戸

中山功一

あたらしい再生医療とバイオ 3D プリンタの開発
について～骨折治療からの着想
サイエンスカフェ in Saga 2015. 2, 佐賀

大嶋利之, 川勝美穂, 田中麻衣, 村田大紀,

三角一浩, 松田秀一, 中山功一

強度測定装置を用いた細胞構造体の力学的症状の

解析

第 14 回日本再生医療学会総会 2015.03.19-21, 横浜

大嶋利之、中野正貴、村田大紀、三角一浩、

中山功一

3D プリンタを用いた靱帯様の細胞構造体の作製

第 14 回日本再生医療学会総会 2015.03.19-21, 横浜

中山功一

スキャフォールドフリーバイオ 3D プリンタを用いた器官・臓器作成の試み

第 14 回日本再生医療学会総会 2015.03.19-21, 横浜

中山功一

大型細胞構造体作製を目指した、構造体内部細胞動態の解析

京都大学再生医科学研究所

「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」

平成 26 年度 共同研究報告会 2015. 3.24, 京都

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

N o.	特許番号・出願番号	発明の名称	特許権者・出願人	出願国
1	特許第 4122280 号	組織ブラッグの製造方法	九州大学	日本
2	PCT/JP 2007/07 5343	細胞移植用器具	岩本幸英、 ○中山功一、日本メ	米、欧、日、 中、印

			ディカルマテリアル㈱	
3	特許公開 2008-20726	深さ調整用ドリル	日本メディカルマテリアル㈱、九州大学	日本
4	PCT/JP 2008/05 6826	細胞の立体構造体の製造方法	九州大学	米、欧、日、 中、印など 10 カ国
5	特願 2011-023348	移植用ガイドおよび移植用器具	佐賀大学 ○中山功一	国内出願に続き、 PCT 出願予定
6	特願 2011-030043	細胞塊の培養システム	佐賀大学 ○中山功一、下戸健	国内出願に続き、 PCT 出願予定
7	特願 2011-140111	細胞の立体構造体製造装置	佐賀大学、サイフューズ、澁谷工業 ○中山功一、米田健二、坂本匡弘、越田一朗、所村正晴、深村功	国内出願に続き、 PCT 出願予定
8	特願 2013-544343	細胞の立体構造体作製用の支持体を作製するための装置	佐賀大学、サイフューズ ○中山功一	米、欧、 日、中
9	特願 2015-023228	細胞培養用治具	永田昌博、高橋洋一、 <u>中山</u>	国内出願に続き、 PCT 出願

			功一、口石 幸治、田村 忠士	予定
--	--	--	----------------------	----

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究委託事業(再生医療実用化研究事業)
分担研究成果報告書

「バイオ3Dプリンタを用いた高度変性半月板損傷に対する
あたらしい再生医療の開発」

中大動物への移植の検討と術式の最適化

分担研究者

松田 秀一 京都大学医学部整形外科 教授

研究要旨

スキャフォールドフリーのバイオ3Dプリンタ(3次元細胞積層システム)で開発された半月板様細胞構造体を実際の患者に届けるにはいくつかのハードルを越える必要がある。その中でも特に重要なのが非臨床試験と考えられる。ヒトと同様の荷重パターンを持つとされるウマなどの大動物に初期段階で移植試験を行うのは費用対効果で無駄があるため、通常マウスやラットなどで実証を重ね、徐々に大型の動物へ移行していく場合が多い。しかし、マウスやラットの膝関節は顕微鏡下での手術操作が必要となるため、現実的ではない。そのため、本研究ではウサギおよびブタでの膝関節を露出し、内側半月板全置換術における解剖学的な要素から再現性の高い移植実験が行えるか検討した。その結果、論文などで散見される内側側副靭帯切離だけでは後縦靭帯のため十分な視野が確保できないことが判明した。そこで大腿骨関節面膝蓋骨溝から内顆へ移行する部分を骨切りし、内側側副靭帯を切離せずに内顆を翻転することで、十分な内側半月板を露出させることに成功した。さらに半月板置換後に骨を整復し、海綿骨裸子で固定したところ、良好な固定性と整復が得られた。一か月後塗擦後に骨切り部および大腿骨および脛骨の関節面を観察したが良好な骨癒合がみられ、骨壊死や変形性関節症を示唆するような関節面の不正や骨棘などは認められなかった。本手術法は半月板全置換の非臨床試験に非常に有用な術式であると思われた。

A. 研究目的

膝関節部半月板には、外傷などによる損傷、断裂や膝関節部分の変性により半月板損傷が起こる。膝部分の消耗などによる半月板部分の変性、スポーツによる外傷、様々な要因で起こる半月板損傷治療法として、現状では損傷、断裂部分への縫合術や切除術が主流となっている。また、膝関節部分の衝撃を緩衝する役割をもつ半月板の切除を行うと、膝関節部分軟骨へ直接的な負荷がかかるため、膝軟骨部分がすり減り、変形性関節症を引き起こすリスクが高くなるとされている。痛みを伴う変形性関節症は、半月板切除後の患者さんや高齢者に見られやすく、症状が悪化すると日常的な生活を行う妨げとなり、さらに重症化すると人工膝関節全置換などの治療を余儀なくされる。これらの治療法として行われる置換手術は、感染や置換した人工膝関節の耐久性や安全性などの様々なリスクが伴うのが現状である。しかしながら、これらに対する抜本的な治療法がなく、将来的なリスク軽減のための半月板の温存を取る方法を取る一方で、半月板損傷の新たな治療法が、高齢者のみならず、アスリートなどの若年層のスポーツ者にも望まれている。

我が国では変形性膝関節症の症状を有する者は年間で3000万人を超えと言われ、高齢化社会の中での高騰する医療費を圧迫する要因になると予想されている。我々は、半月板の機能再生を行う新規の治療法の確立を目指している。これまで、構造体組織構築の足場を必要としないスキャフォールドフリーのバイオ3Dプリンタ(3次元細胞積層システム)をサイフューズ社と共同開発し、この装置をもちいて細胞だけで構築さ

れた立体的な細胞構造体の作製に成功している。このシステムを利用することにより、複雑な形状を持ち、用途に合わせた形状の細胞構造体の作製が可能となる。現在、移植可能な高い硬度をもった半月板型インプラント様細胞構造体の作製を進めている。また、研究期間中に、中・大動物へ移植する非臨床試験を実施し、半月板治療のための新規の治療法として臨床応用を目的とした非臨床POC取得を目指す。

移植手技の開発

スキャフォールドフリーのバイオ3Dプリンタ(3次元細胞積層システム)で開発された半月板様細胞構造体を実際の患者に届けるにはいくつかのハードルを越える必要がある。その中でも特に重要なのが非臨床試験と考えられる。ヒトと同様の荷重パターンを持つとされるウマなどの大動物に初期段階で移植試験を行うのは費用対効果で無駄があるため、通常マウスやラットなどで実証を重ね、徐々に大型の動物へ移行していく場合が多い。しかし、マウスやラットの膝関節は顕微鏡下での手術操作が必要となるため、現実的ではない。そのため、本研究ではウサギおよびブタでの膝関節を露出し、内側半月板全置換術における解剖学的な要素から再現性の高い移植実験が行えるか検討した。

B. 研究方法

日本白色家兎の膝関節を展開し移植方法の確立を試みた。

関節裂隙が非常に狭いため、内側側副靭帯(MCL)および後十字靭帯(PCL)を切除して関節の展開を試みた。しかし、それ