



Title	骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討
Author(s)	徐, 亮
Description	配架番号 : 2536
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14071号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14071
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/84580
Type	doctoral thesis
File Information	Liang_Xu.pdf



学 位 論 文

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髓穿刺濃縮細胞併用移植の検討
(Therapeutic effect of ultra-purified alginate gel containing bone marrow aspirate
concentrate on osteochondral defects in a rabbit model)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

徐 亮

Liang Xu

学 位 論 文

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髓穿刺濃縮細胞併用移植の検討
(Therapeutic effect of ultra-purified alginate gel containing bone marrow aspirate
concentrate on osteochondral defects in a rabbit model)

2020 年 3 月

北 海 道 大 学

徐 亮

Liang Xu

目 次

発表論文目録及び学会発表目録	1-2 頁
要旨	3-5 頁
略語表	6 頁
緒言	7-8 頁
方法	9-17 頁
結果	18-27 頁
考察	28-30 頁
総括及び結論	31 頁
謝辞	32 頁
利益相反	33 頁
引用文献	34-39 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Xu Liang, Urita A., Onodera T., Hishimura R., Nonoyama T., Homan K., Hamasaki M., Liang DW., Gong JP., Iwasaki N.

Therapeutic Effect of Ultra-Purified Alginate gel Containing Bone Marrow Aspirate Concentrate on Osteochondral Defects in a Rabbit Model

《Biomaterials》

本研究の一部は以下の学会に発表した。

- 1.徐亮、瓜田淳、小野寺智洋、菱村亮介、濱崎雅成、梁大偉、宝満健太郎、岩崎倫政

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討

第 137 回北海道整形災害外科学会、札幌、口演

2. Liang Xu, Atsushi Urita, Tomohiro Onodera, Ryosuke Hishimura, Masanari Hamasaki, DaweiLiang, Kentaro Homan, Norimasa Iwasaki.

Therapeutic Effect of Ultra-Purified Alginate gel Containing Bone Marrow Aspirate Concentrate on Osteochondral Defects in a Rabbit Model

15th International cartilage repair society World Congress 2019

05 - 08, October, 2019/ Vancouver, Canada, Poster

- 3.徐亮、瓜田淳、小野寺智洋、菱村亮介、濱崎雅成、梁大偉、宝満健太郎、岩崎倫政

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討

第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会、横浜、口演

4. 徐亮、瓜田淳、小野寺智洋、菱村亮介、濱崎雅成、梁大偉、宝満健太郎、岩崎倫政

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討

第 39 回 整形外科バイオマテリアル研究会、札幌、口演

5. Liang Xu, Atsushi Urita, Tomohiro Onodera, Ryosuke Hishimura, Masanari Hamasaki, Dawei Liang, Kentaro Homan, Norimasa Iwasaki.

Therapeutic Effect of Ultra-Purified Alginate gel Containing Bone Marrow Aspirate Concentrate on Osteochondral Defects in a Rabbit Model

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2020

08 - 11, February, 2020 / Phoenix, Arizona, USA, Poster

6. 徐亮、瓜田淳、小野寺智洋、菱村亮介、濱崎雅成、梁大偉、宝満健太郎、岩崎倫政

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討

第 33 回日本軟骨代謝学会、岐阜、口演

要旨

【背景と目的】関節軟骨には、血管新生がなく、細胞分裂活性の低い軟骨細胞が極めて少ないため、自然治癒能力が非常に限られている。軟骨組織再生に必要な生物学的環境には幹細胞、成長因子、および生物学的足場が不可欠である。我々はこれまで、生物学的足場として、軟骨細胞分化誘導能を有するアルギン酸から夾雑物を可能な限り排除した、高純度アルギン酸 (Ultra-purified alginate: UPAL) ゲルを開発し、その有用性を示してきた。一方、幹細胞要素として、骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow derived-mesenchymal stem cells: MSCs) は細胞分化能と再生組織内でのパラクライン効果を有するために、軟骨や骨組織再生に対する再生医療のための細胞源として着目されている。我々はこれまで UPAL ゲルと MSCs との併用移植による軟骨再生実験において、UPAL ゲルは MSCs に対して細胞増殖および軟骨細胞分化を促進させ良好な軟骨再生を誘導することを示した。しかしながら、十分量の MSCs を移植するためには、生体外で細胞増殖培養を行う必要があるため、二期的な治療を要するという問題点が考えられる。

この問題点を解決するため、我々は術中に作成できる骨髄穿刺濃縮細胞液 (Bone marrow aspirate concentrate: BMAC) に着目した。BMAC は、骨髄液の遠心分離により軟骨再生に重要な働きをする MSCs と液性成長因子を含有した濃縮細胞液である。BMAC は骨髄液の遠心操作だけで作成することができるため生体外の細胞培養を必要としないため、一期的な治療に使用することができる。我々は、MSCs に対する細胞増殖能および軟骨分化誘導能に優れた UPAL ゲルと BMAC を組み合わせることにより一期的かつ効果的に軟骨再生を誘導できる可能性があると考えた。本研究の目的は骨軟骨欠損に対する UPAL ゲルと BMAC の併用移植による軟骨及び軟骨下骨の再生効果を検討することである。

【対象と方法】動物欠損モデルとして、日本白色家兔(雄、24 週齢)の膝関節に対して、大腿骨滑車部に骨軟骨欠損(直径 5mm×深さ 2mm)を作成した。BMAC は術中に腸骨から穿刺採取した骨髄液を遠心分離して作成した。各膝を無治療群 (Defect 群)、UPAL ゲル単独移植群 (UPAL 群)、UPAL ゲルと他家 MSCs 併用移植群 (UPAL+MSC 群)、UPAL ゲルと自家 BMAC 併用移植群 (UPAL+BMAC 群) の 4 群に無作為に振り分けた。術後 4 週と 16 週における欠損部の修復について肉眼的評価 (ICRS スコア, n=10)、組織学的評価 (Niederauer スコア, n=10)、軟骨下骨の再生について Micro-CT 評価 (軟骨下骨の骨量, n=10) を行った。術後 16 週において、II 型コラーゲンの組織学免疫染色及び HE 染色組織検体を用いて偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性の評価 (n=10) と修復組織における力学強度の評価 (n=6) を行った。統計学的検討には Steel-Dwass 検定を用いた。

【結果】肉眼的評価では、術後 4 週においては、Defect 群では欠損の辺縁部のみに

僅かな不透明な線維様組織が見られた。UPAL 群、UPAL+MSC 群では欠損部は部分的にやや不透明な組織で修復され、修復組織の表面には大きな陥凹や亀裂が見られた。UPAL+BMAC 群では表面やや平坦な半透明な硝子軟骨様修復組織で満たされていた。全体的なスコアリングでは UPAL+BMAC 群がほかの三群に比べ有意に優れていた。術後 16 週においては、Defect 群では部分的な不透明な線維組織修復は見られた。UPAL 群と UPAL+MSC 群では全体的には修復されたが、半透明な修復組織表面は小さな陥凹や亀裂も見られた。一方で、UPAL+BMAC 群では周囲正常組織とほぼ同じ性状のある表面平滑な組織により覆われ、主に硝子様軟骨組織で修復されていた。全体的なスコアリングでは術後 4 週のものと同様に UPAL+BMAC 群は他群に比べ、有意に優れていた。

組織学的評価では、術後 4 週においては、Defect 群ではほぼ Safranin-O に染色されない線維性の癒痕組織で修復され、UPAL 群と UPAL+MSC 群では修復組織に Safranin-O に染色された硝子様軟骨組織が一部見られ、UPAL+BMAC 群では Safranin-O に染色された硝子様軟骨組織が多く見られた。拡大像において、Defect 群では修復組織に中等度の炎症細胞浸潤を認めたことに比べ、ほかの三群ではほぼ炎症所見を認めていなかった。全体的なスコアリングでは、UPAL+BMAC 群は他群に比べ、有意に優れていた。術後 16 週においては、Defect 群では修復組織に硝子様軟骨組織は一部見られたが、半分以上は Safranin-O に染色されない線維組織であり、欠損部周囲の正常軟骨部の Safranin-O 染色も減少しており変性が示唆された。UPAL 群と UPAL+MSC 群の修復組織では半分～半分以上に Safranin-O に染色された硝子様軟骨が占めていた。それに対して、UPAL+BMAC 群では欠損部周囲正常軟骨とほぼ同じ性状と厚さのある Safranin-O に強く染色された硝子様軟骨組織で覆われていた。また拡大像所見において、全群では、明らかな炎症所見を認めなかった。軟骨下骨の修復において、Defect 群ではほぼ見られていなかったが、UPAL 群及び UPAL+MSC 群では、部分的な軟骨下骨の修復が見られた。一方で、UPAL+BMAC 群では、広範囲な軟骨下骨の修復が見られていた。

Micro-CT を用いた軟骨下骨の骨量の評価においても、UPAL+BMAC 群では修復された軟骨下骨の骨量では、術後 4 週と 16 週とも Defect 群と UPAL 群に比べ、有意に高かった。同様に術後 16 週において、UPAL+BMAC 群の修復部におけるコラーゲン配向性、力学強度も他群に比べ有意に優れていた。

【考察】本研究では UPAL ゲルと BMAC の併用移植することにより、ウサギモデルを用いて、大きな骨軟骨欠損に対して良好な軟骨及び軟骨下骨組織の修復があることを示した。BMAC は MSCs も含める豊富な細胞成分と液性因子を含み、scaffold と併用することで良好な軟骨分化能を示すと報告がある一方で、単独投与の治療効果は確実ではないとの報告もあるから、BMAC 移植に最適な Scaffold を選別することが重要と考えられている。なお、過去の検討結果において、UPAL ゲルは MSCs の細胞増殖能及

び軟骨分化能を促進することがあるから、BMACと併用することで、BMAC内に含まれる豊富なMSCsに対して軟骨形成を促進することが考えられた。また、BMAC中に含まれるTGF- β 、PDGF、BMP-2、BMP-7などの液性因子は、MSCsに対する軟骨細胞及び骨細胞への分化誘導能もあるから、MSCsの良好なscaffoldとするUPALゲル内で、細胞と液性因子の相乗効果により、同時に良好な軟骨及び軟骨下骨再生が得られたことに従って、良好な力学特性のある再生組織が得られたと考えられた。

【結論】UPALゲルとBMACを併用することにより、大きな骨軟骨欠損に対して良好な軟骨及び軟骨下骨の修復効果があることを示した。移植したBMAC内に含まれる豊富なMSCsが足場であるUPALゲル内で軟骨や軟骨下骨に分化することで軟骨および軟骨下骨が修復したと考えられた。本法を用いることで細胞移植を要する大きな骨軟骨欠損に対して一期的に治療できる可能性を示した。本検討は、従来法では治療することが困難であった重度関節軟骨障害に対する、新たな低侵襲治療法を提案するものであり、本検討結果は、その実現可能性を充分に実証するものである。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

BMAC	Bone Marrow Aspirate Concentrate
BMS	Bone Marrow Stimulate
BV	Bone Volume
GAG	Glycosaminoglycan
HE	Hematoxylin and Eosin
MSCs	Bone marrow derived-mesenchymal stem cells
OAT	Osteochondral Autograft Transplantation
PLM	Polarized Light Microscope
Saf-O	Safranin - O
SD	Standard deviation
UPAL gel	Ultra-purified alginate gel

緒言

関節軟骨には、血管新生がなく、細胞分裂活性の低い軟骨細胞が極めて少ないため、自然治癒能力が非常に限られている (Hunziker EB et al., 2002)。関節軟骨損傷が一旦発生すると、関節機能低下及び変形性関節症 (OA) の発症につながる後続の軟骨病変を回避するために、関節表面の修復及び機能の回復を目指して、外科的治療が基本的に必要である (Hunter W et al., 1743; Mankin HJ et al., 1982)。関節軟骨を修復するために、デブリドマン、微小骨折、骨膜および軟骨膜移植などのさまざまな技術が実施されたが (Clarke HD et al., 2003; Steadman JR et al., 2001; Ritsila VA et al., 1994)、これらの技術はしばしば修復が線維軟骨を伴うことが報告された (Gobbi A et al., 2006; Giannini S et al., 2004)。

近年、軟骨損傷に対する治療において、自体軟骨細胞移植 (ACI) や間葉系幹細胞 (MSCs) 移植など細胞移植ベースの治療法が広く行われて、良好な硝子軟骨の修復が得られたことを報告されている (Kon E et al., 2009; Wakitani S et al., 1994; Roberts S et al., 2003; Peterson L et al., 2010)。しかし、正常組織に侵襲を加えなければならないことや二期的手術を要することなどの問題点も報告されている (Bekkers JE et al., 2009; Henderson I et al., 2005; Peterson L et al., 2010)。これらの問題点を解決するためには、適切な細胞源と細胞の足場を使用して低侵襲かつ有効的一期的な治療の開発が求められる。

当科では低エンドトキシン高純度アルギン酸ゲル (Ultra-purified alginate gel: UPAL ゲル) を開発し、研究を重ねてきた (Igarashi et al., 2010; Sukegawa et al., 2012)。このマテリアルは、精製過程で従来の商業ベースのアルギン酸の持つ毒性の 1 万分の 1 以下まで低下させたもの (Endotoxin level: 5.76 EU/g) であり、従来のものに比べて、生体外実験により MSCs に対する高い細胞増殖及び軟骨分化誘導能を持つことを明らかにしている (Igarashi et al., 2010)。また、生体内実験においても、ウサギおよびビーグル犬の骨軟骨欠損モデルに対して UPAL ゲル単独投与が硝子様軟骨再生を促進させたことを報告している (Igarashi et al., 2010; Igarashi et al., 2012)。さらに他の術式とのコンビネーションとして、UPAL ゲルと骨髄刺激法を併用することで、単独投与より良好な軟骨修復効果が示されたことも報告している (Baba et al., 2015)。これらの成果から、MSCs は UPAL ゲル移植と併用するのに適した細胞源となりうる可能性がある。

しかし、大きな欠損に対して十分な組織再生を得るためには、多くの細胞を移植する必要がある。そのため、これまでの MSC 移植では、細胞採取後に生体外において数週間の細胞培養操作が必要であり、採取および移植の 2 回に分けた手術が必須であった。また、生体外における細胞培養操作には、細胞脱分化や汚染を引き起こすリスクや、コスト面での問題も懸念される (Holtzer H et al., 1960; Abbott J et al., 1966; Bekkers JE et al., 2009)。

これらの細胞移植の欠点を克服するために、我々は骨髄穿刺濃縮細胞液(Bone marrow aspirate concentrate; BMAC)に着目した。BMAC は術中で腸骨から骨髄液を採取し遠心分離して簡単に作成した濃縮細胞液として、MSCs も含める豊富な細胞成分と液性因子を含み(Fortier LA et al.,2011; Mariani E et al.,2014; Saltzman BM et al.,2016)、軟骨損傷や変性に対して良好な臨床成績が得られることや Scaffold と併用することで良好な軟骨分化能を示すことが報告されている(Roberto B et al.,2010; Gobbi A et al.,2014; Gobbi A et al.,2017)。BMAC は採取・精製を術中に全て行うことが可能であり、生体外での細胞培養期間が不要なため、一期的治療が実現可能となる。また、濃縮操作を行うことで十分な細胞数を移植可能であることから、重度軟骨損傷例に対しても対応可能となる可能性を有する。これらの過去の報告および我々の成果から、UPAL ゲルに BMAC を併用することで、骨軟骨損傷に対する修復を促進できるのではないかと着想した。本研究の目的は、兔の骨軟骨欠損に対して UPAL ゲルと BMAC 併用移植による軟骨および軟骨下骨の修復効果を組織学的及び生体力学的に検討することである。

実験方法

1. 家兔欠損モデルの検討と予備実験

実験に用いる兎は、24 週齢の雄の日本白色家兎を日本(三協ラボ, Japan) より購入した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り、北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて、実験を行った。

本研究では、UPAL ゲルと BMAC の併用移植と、UPAL ゲル単独移植との治癒能力を比較検討する必要があるため、UPAL ゲル単独移植だけでは十分な軟骨再生効果が得られないような損傷モデルを作成する必要があると考えた。その条件を満たすためには、1. 修復能力に乏しい高齢個体を使用すること、2. 十分な修復効果の得られない損傷範囲あるいは損傷部位を選択すること、の 2 点によって、UPAL ゲル単独投与では十分な治療効果が得られない重度損傷モデルを設計した。まず、使用する家兎の週齢に関しては、自己修復能力の乏しい高齢個体(Poole et al., 2010)が望ましいと考えた。しかし、生後 1 年間を超えてしまうような高齢ウサギでは変形性関節症(OA)の要素を含む可能性があることや、これまでの過去の軟骨再生に関連する研究においても高齢のウサギは多く用いられていないことから、過去の類似研究(Hou et al., 2015; Maruyama et al., 2017; Hishimura et al., 2019)に追従した 6 カ月齢成熟兎モデルを選択した。次に、骨軟骨欠損の部位および範囲に関しては、同じく軟骨変性の影響を受けずに、かつ可能な限り大きな欠損の作成を試みた。当初は临床上によく見られる荷重部である大腿骨顆部に欠損の作成では、これまで自己修復が得がたいとされる 4 mm 以上の大欠損を作成できないことや、術後荷重によって再生軟骨に変性を来してしまう可能性を考慮し、非荷重部ではあるが、大きな面積の欠損が作成可能である大腿骨滑車部に損傷を作成することに決定した。

また、今回の移植実験の一次的な細胞源としては、BMAC の精製手技及び性質の評価について予備実験を行った。まず、骨髓液の採取部位について検討した。ヒトから骨髓液を採取する場合、腸骨から採取する方法が一般的である。動物実験では、腸骨以外には大腿骨から骨髓液を採取する方法も散見された(Eça LP et al., 2009)。両手法による骨髓穿刺及び骨髓液採取を試みた結果、穿刺操作の難易度や骨髓液の採取量の観点から腸骨穿刺法を採用した。次に BMAC の精製については、BMAC 作製キットとして製品化されている BioCUE™ Mini Platelet Concentration System (Zimmer Biomet)の使用を検討した。しかし、ウサギからは本製品の必要最低骨髓量である 20ml が得られないため、BMAC 精製の成功率が低く、また、収量の損失が起こることを考慮し、Manual での作製法の確立を目指した。临床上 BMAC 作製 Protocol(Chahla J et al., 2017)に準じて、麻酔導入後(pentobarbital を 0.05 mg/kg で静脈投与した)、0.5ml ヘパリン入り(Novo-heparin 5000 units/5 mL, Mochida Pharma.

Co. Ltd., Tokyo, Japan) の 18G 針付きシリンジを用いて、兔の両側腸骨から骨髓液を採取し、そして骨髓液中の凝固血を除去するため、孔径 200 μ m の Strainer を通した。濾過した骨髓液から 5ml を取り移し、800g、5min、4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、ピペットチップを用いて、中間層の単球細胞層 (Buffy coat) を中心にすぐ上方の血漿成分 (PRP) も少し含めてできる限りに下方の RBC を吸い込まないように十分に注意を払いながら、細胞液を吸い出した。それから、作製した BMAC の品質を評価するため、Colony Forming Unit assay (CFU assay) (図 1) に従って、DMEM-High Glucose (044-29765, WAKO) に 10% FBS (10828028SP, Gibco) と抗生物質 (penicillin G: 100 U/ml と streptomycin: 0.1 mg/ml) を添加し、調整した MSC medium を用いて、10 mm dish で 12 日平面培養し、形成した MSCs の colony に対して crystal violet 染色した後、colony の数を計測した (Zhao GH et al., 2013)。

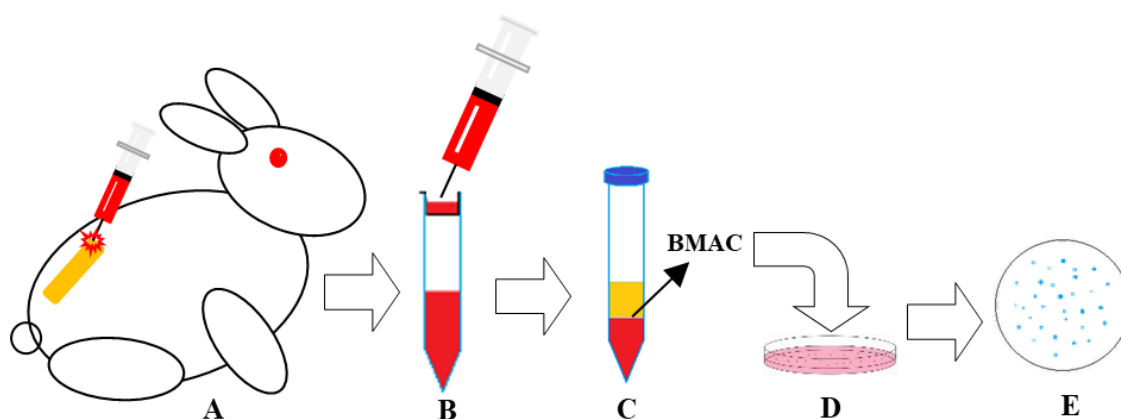


図1. Colony Forming Unit (CFU) assay の模式図

A. 兔の腸骨から骨髓液を採取する。B. 採取した骨髓液を孔径 200 μ m の strainer を通して濾過する。C. 800g, 5 min, 4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、BMAC を精製する。D. MSC medium を用いて、約 12 日間平面培養する。E. PBS で洗浄後、crystal violet 染色し計測する。

2. UPAL gel の調整、準備

本研究では当科の過去の類似研究 (Baba et al., 2015; Hishimura et al., 2019) に追従し、分子量 1700 kDa の高純度アルギン酸ゲル (Sea Matrix®; Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) (Endotoxin level: 5.76 EU/g) に対してそれぞれ生理食塩水により溶解させて、一晚 4 $^{\circ}$ C 冷蔵庫に静置し、2% と 4% のアルギン酸溶液として滅菌状態で冷蔵保存した。

3. 移植用細胞(MSCs)及び BMAC と UPAL の混合移植液の調整、準備

移植用他家 MSCs において、上記 CFU assay と同様な方法で、精製した BMAC を MSC medium を用いて、平面培養により、増殖培養を行った。この細胞は 2 回継代増殖後、移植用 MSCs (Passage 3) として、使用された。上記 MSCs を UPAL+BMAC 群の MSCs 濃度と同じように UPAL と混ぜて調整し(最終 MSCs 濃度は 2×10^4 cells/ml に、最終 UPAL 濃度は 2%にする)、UPAL+MSC 群の移植液として、欠損部に移植(他家移植)した。

移植用 BMAC において、上記方法 1. 記載の通り、精製した BMAC 細胞液と同等量の 4%の UPAL と混ぜて(最終 UPAL 濃度は 2%にする)、UPAL+BMAC 群の移植液として欠損部に移植(自家移植)した。

4. 兎手術モデルの作成手順

52 羽(104 膝)の 24 週齢の日本白色家兎に対し、全身麻酔下(pentobarbital を 0.05 mg/kg で静脈投与した後、酸素 3L に isoflurane 1L を混入し、吸入で麻酔効果を維持した)に 3.0cm の皮膚切開で、内側傍膝蓋骨アプローチを用いて膝蓋大腿関節及び大腿骨滑車部を露出させた。滑車部の中央に直径 5.0mm の電動ドリルで深さが 2.0mm になるように専用のスリーブを使いながら、生理食塩水で冷却しながら骨軟骨欠損を作成した。各膝を無治療群(Defect 群)、UPAL 単独移植群(UPAL 群)、UPAL と MSCs 併用移植群(UPAL+MSC 群)と UPAL と BMAC 併用移植群(UPAL+BMAC 群)の 4 群にランダムに振り分けた(図 2)。

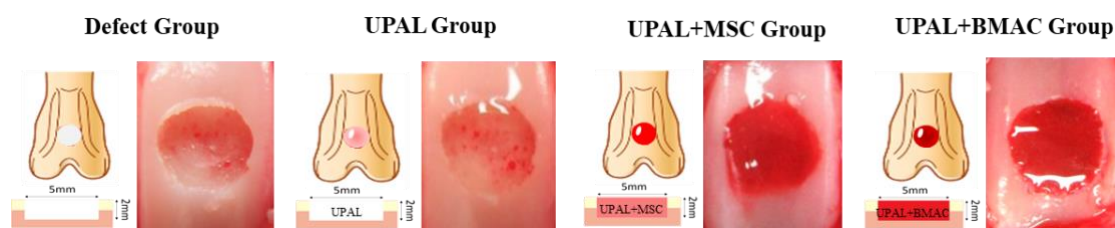


図2. 骨軟骨欠損手術モデル各群の模式図と肉眼写真

UPAL群、UPAL+MSC群、UPAL+BMAC群では18G針を用いて、移植液を欠損部に移植部周囲の軟骨と同じ高さになるように注意を払って充填し、塩化カルシウム溶液を表面に30-40秒滴下することで、アルギン酸の表面をゲル化させた。術野を生理食塩水で十分に洗浄し、4-0ナイロン糸で関節包、皮膚を各々縫合し手術終了した。麻酔覚醒後は特に制限なくケージ内を自由に動くことを許容した。術後4週および16週でpentobarbitalの静脈投与により安楽死させ膝を摘出した。4週において各群10

膝において肉眼的、組織学的評価を行った。また軟骨下骨の修復量評価のため micro-CT による測定を行った。術後16週において、4週と同じ評価に加えて、各群10膝に対して免疫組織学的評価とコラーゲン配向性の評価を行った。さらに術後16週において、各群6膝に対して力学特性評価を行った。

5. 肉眼的・組織学的・免疫組織学的評価の方法

術後4 週及び16週において安楽死後に、大腿骨滑車部を含める膝関節を切り出し、欠損部をデジタルカメラで撮影し、各群の修復組織は肉眼的にICRSスコアリング (Brittberg M et al., 1998) (表1)を用いて評価した (n=10)。

表1. ICRS Macroscopic Score (Brittberg M et al., 1998)

Degree of defect repair	
In level with surrounding cartilage	4
75% repair of defect depth	3
50% repair of defect depth	2
25% repair of defect depth	1
0% repair of defect depth	0
Integration to border zone	
Complete integration with surrounding cartilage	4
Demarcating border < 1mm	3
3/4th of graft integrated, 1/4th with a notable border > 1mm width	2
1/2th of graft integrated, 1/2th with a notable border > 1mm width	1
From no contact to 1/4th of graft integrated with surrounding cartilage	0
Macroscopic appearance	
Intact smooth surface	4
Fibrillated surface	3
Small, scattered fissures or cracks	2
Several small or few, but large, fissures	1
Total degeneration of grafted area	0

同じ検体を組織学的評価に用いるため、10 %パラホルムアルデヒドでサンプルを固定し、10%EDTA で脱灰処理後に、欠損部の中央を通る矢状断面で厚さ5 μ mのパラフィン切片を作成した。切片はHematoxylin Eosin (HE) 染色及びSafranin-O (Saf-O) 染色を施し、各群の修復組織は組織学的にNiederauerスコアリング (Niederauer et al., 2000) (表2)を用いて評価した (n=10)。

術後16週において免疫組織学的評価ではII型コラーゲン抗体 (FujiPharma Co., Ltd., Toyama, Japan) を用いて染色した。

表2. Histological Score (Niederauer GG et al., 2000)

Nature of the predominant tissue	
Hyaline cartilage	4
Mostly hyaline cartilage	3
Mixed hyaline and fibrocartilage	2
Mostly fibrocartilage	1
Some fibrocartilage, mostly nonchondrocytic cells	0
Structural characteristic	
Surface regularity	
Smooth and intact	3
Superficial horizontal lamination	2
Fissures	1
Severe disruption, including fibrillation	0
Structural integrity, homogeneity	
Normal	2
Slight disruption	1
Severe disintegration, disruption	0
Thickness	
100% of adjacent cartilage	2
50 – 100% of normal cartilage	1
0 – 50% of normal cartilage	0
Bonding to adjacent cartilage	
Bonded at both ends of graft	2
Bonded at one end or partially at both ends	1
Not bonded	0
Freedom from cellular changes of degeneration	
Hypocellularity	
Normal cellularity	2
Slight hypocellularity	1
Moderate hypocellularity or hypocellularity	0
Chondrocyte clustering	
No clusters	2
< 25% of the cells	1

25 – 100% of the cells	0
Freedom from degenerative changes in adjacent cartilage	
Normal cellularity, no clusters, normal staining	3
Normal cellularity, mild clusters, moderate staining	2
Mild or moderate hypo/hypercellularity, slight staining	1
Severe hypocellularity, poor or no staining	0
Subchondral bone	
Reconstruction of subchondral bone	
Normal	3
Reduced subchondral bone reconstruction	2
Minimal subchondral bone reconstruction	1
No subchondral bone reconstruction	0
Inflammatory response in subchondral bone region	
None/mild	2
Moderate	1
Severe	0
Safranin-O staining	
Normal or near normal	3
Moderate	2
Slight	1
None	0

5. 偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性の評価方法

術後16週においてHE染色切片を偏光顕微鏡 (polarized light microscope: PLM) を用いて観察し、修復組織のコラーゲン配向性を評価した (Roberts et al., 2009; Ross et al., 2013)。コラーゲン配向性は、関節軟骨の力学強度に関連する報告もある (Rieppo et al., 2003)。修復された軟骨組織のコラーゲン配向性を確認するために、設置した組織切片自体を0°、45°、90°と回転させて微細な変化も観察した。デジタルカメラ (DS-5M-L1; Nikon) で撮られた画像に対して、それぞれにPLM 定性スコアリングシステム (Changoor et al., 2011) (表3) を用いて評価した (n=10)。

表3. The Polarized Light Microscopy Qualitative Score (Changoor et al., 2011)

Score	Description
0	Evidence of fiber organization, seen as sparse bright patches throughout the

	specimen. These patches do not have parallel alignment at the surface of the specimen nor perpendicular alignment in the deep zone (DZ), but are randomly oriented in the specimen.
1	Birefringent tissue of the expected orientation in the DZ with fibers oriented mainly perpendicular ($\pm 30^\circ$) to the cartilage–bone interface and occupying less than ~50% of the thickness of the noncalcified tissue on average. Little additional evidence of birefringent tissue is apparent, other than randomly oriented patches. Birefringent tissue may have inconsistent thickness and intensity of birefringence across the lateral direction of the specimen. The specimen texture may be smooth, patchy, or granular.
2	Identical to a score of 1 except that the DZ occupies more than ~50% of the thickness of the noncalcified tissue. Alternatively, a second region of birefringent tissue may be present above the DZ that may have any orientation (parallel to the articular surface, obliquely oriented to the articular surface, or multiple orientations) except for vertical. In this case, the DZ may then occupy <50% of the thickness of the noncalcified tissue.
3	Zonal organization with birefringent tissue in the DZ perpendicular to the cartilage–bone interface ($\pm 30^\circ$), and birefringent tissue at the articular surface that is either aligned parallel to the surface or that has multiple orientations. These two zones are separated by a third nonbirefringent region that is appropriate to the species from which the specimen was taken; for example, in human articular cartilage, it may be a thin nonuniform region that is difficult to distinguish compared with the consistent dark band observed in equine articular cartilage. Alternatively, the two birefringent zones are separated by a birefringent region with orientation that is neither parallel nor perpendicular. Zonal thicknesses are heterogeneous across the lateral direction of the specimen. The specimen texture may be smooth, patchy, or granular.
4	Identical to a score of 3 except that the orientation in the superficial zone (SZ) must be parallel to the surface and the transitional zone (TZ) must be appropriate to the species from which the specimen was taken; for example, in human articular cartilage, it may be a thin nonuniform region that is difficult to distinguish compared with the consistent dark band observed in equine articular cartilage. In addition to these characteristics, each zone should approximate the zonal proportions for the species from which the specimen was taken; for example, in human articular cartilage, the DZ

	should be the largest, occupying >50% of the total thickness of noncalcified tissue. The transitional and SZs are smaller and the TZ may be larger than the SZ.
5	Displays birefringence patterns of young adult hyaline articular cartilage with distinct, superficial, and deep zones with uniform birefringence, indicating parallel and perpendicularly oriented fibers, respectively, separated by an appropriate TZ. Zonal thicknesses are appropriate for the species and location from which the specimen was taken and are relatively homogeneous across the lateral direction of the specimen. Overall, the specimen birefringence has a uniform smooth texture and is neither granular nor patchy.

6. Micro-CT による軟骨下骨修復量の評価方法

上記の切り取った膝Sampleを上記5の記載したように、肉眼的評価をした後、修復組織の軟骨下骨修復状況の評価するために、術後4週と16週においてmicro-CT (R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan)により軟骨下骨の骨量に対して定量的に計測した (n=10)、各膝Sampleについて検体のCT撮影を行った。撮影手法や条件は当科の先行研究 (Baba et al., 2015; Hishimura et al., 2019) に準じて行った。得られた画像のうち、実際に作製した欠損部 (直径5mm、深さ2mm の円柱状) の骨軟骨欠損をターゲット領域に設定し、その範囲内に石灰化骨の骨量を軟骨下骨の修復量 (Bone Volume、以下BV) (mm³) とし、Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて算出した。

8. 力学特性の測定方法

術後16週において各膝Sample欠損部の修復組織の力学特性の測定するため、当研究施設が持つ力学試験器 (Autograph AG-X, Shimadzu Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した (Sadia et al, 2016)。各膝Sampleは測定する圧子 (直径2mm の半球状) に対して垂直に面するように歯科用常温重合レジン (PMMA) を土台にして固定 (Wada et al., 2016) し、その状態で測定部位に圧子を0.5mm/分のスピードで押し込む方法で測定した (図11 A)。測定部位として修復組織の中央部に加えて、測定値の基準値としての欠損部より近位の正常軟骨部も測定した (図11 B)。上記において荷重－変形曲線をplotし、測定組織表面の微小変形を反映するこの曲線の最初に形成した直線に近似した部分の傾きはStiffness (N/mm) として算出した。各Sampleにおいて、算出したStiffnessは正常軟骨部を基準とした百分率表記に換算し直して標準化Stiffnessとして

比較検討した。

9. 統計解析

過去に当科でUPAL gel を利用した類似研究(Igarashi et al., 2010; Sukegawa et al., 2012)を基準にして、必要なサンプルサイズを決定した。データは平均値±標準偏差 (Standard Deviation、以下SD)として表記した。4 群間のデータ比較にはSteel-Dwass 検定を、2 群間ではMann-Whitney U 検定を用いた。解析は統計解析ソフトJMP Pro 14.1 (SAS Institute, Cary, NC)を用いて行い、有意水準は0.05未満とした。

実験結果

1. 予備実験の結果

当科の兔膝モデルを用いたUPALゲルに関する軟骨再生の先行研究 (Hishimura et al., 2019; Baba et al., 2015; Igarashi et al., 2010; Sukegawa et al., 2012) では、大腿骨滑車部において直径4~5mm の円形の骨軟骨欠損を作成していたが、骨軟骨欠損部位としては臨床的には荷重部である大腿骨顆部が一番理想的であるが、先行研究の検討経験及び実際の膝各部位の最大幅の計測結果(顆部の幅は3~4mmであり、滑車部の幅は6mmであった)において、かつ作製難易度も検討しており、滑車部で欠損の作成が確実であった(図3)。今回の研究の目的は骨軟骨欠損に対する移植再生効果の評価のため、再生中に荷重による軟骨変性の影響を除去することも含めて、荷重部である大腿骨顆部モデルではなく、大腿骨滑車部欠損モデルを採用した。

BMACの精製量及び性質を判定するため予備実験を行った。骨髓液の穿刺部位について、日本白色家兔6匹(12膝)を用いて、腸骨(n=6)と大腿骨(n=6)から骨髓液の穿刺採取を検討した。大腿骨からの採取量は 2.23 ± 1.20 mlであったに比べて、腸骨からは 7.32 ± 0.60 mlであった(図4)。上記において、骨髓液の採取量や安定性及び操作難易度の面から、穿刺部位は腸骨に決定した。

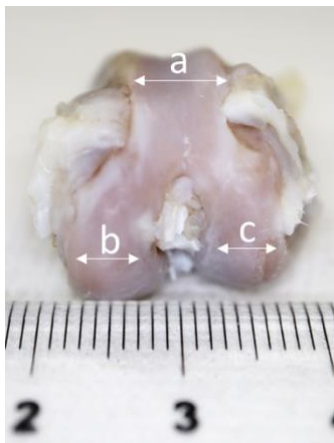


図3. 兔膝検体の各部位の幅
果

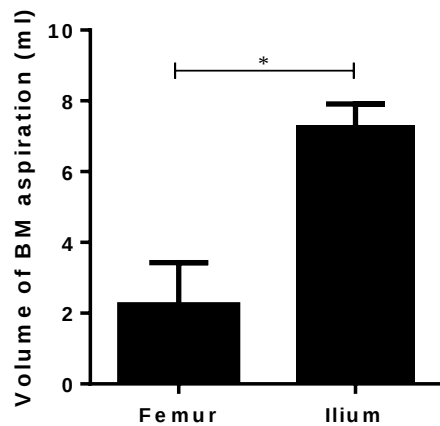


図4. 骨髓液の採取部位における検討結果

図3. 滑車部幅(a) と両顆部幅(b, c)を示す

図4. 大腿骨と腸骨から採取した骨髓液量に対する平均値と標準偏差である。

*は $P < 0.01$ を示す。

上記方法1の記載の通り、臨床上BMAC作製Protocol(Chahla J et al., 2017)に準じて、10匹日本白色家兔を用いて、全身麻酔導入後、両側腸骨から合計6～7mlの骨髓液を採取し、孔径200 μ mのStrainerを通した後、5mlを取り移し、800g、5min、4°Cで遠心分離し、ピペットチップを用いて、中間層の単球細胞層(Buffy coat)を中心にすぐ上方の血漿成分(PRP)も少し含めてできる限りに下方のRBCを吸い込まないように十分に注意を払いながら、50 μ lのBMAC細胞液を吸い出した(図5 A)。このBMAC液に対して、CFU-assayを用いて、BMAC中にactivityのあるMSCsの数量を計測した(図5 B-D)。結果としては1ml骨髓液中のMSCsの数量は 411 ± 109 MSCs/mLであり、5mlの骨髓液から50 μ lのBMACを作成したことから換算すると1mlのBMAC細胞液中にMSCsの細胞数は約 4×10^4 であった。

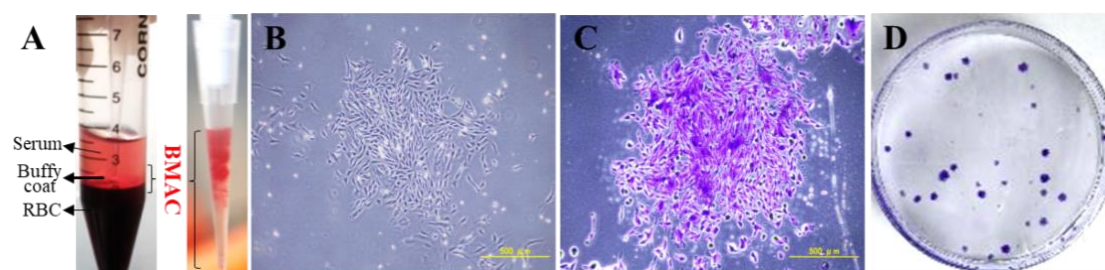


図 5. 骨髓液からBMACの遠心精製及びCFU-assayの結果

A. 遠心分離後、ピペットチップを用いて、BMAC液を吸い出す。B. CFU-assayにおいて、培養10日に未染色のMSC colonyの顕微鏡所見を示す。C. CFU-assayにおいて、培養10日にCrystal Violet染色のMSC colonyの顕微鏡所見を示す。D. CFU-assayにおいて、培養10日目に肉眼的所見(10mm-dish)を示す。Scale barは500 μ mである。

上記方法5.の記載の通り、他家移植用MSCsをPassage 3まで継代培養した(図6)。

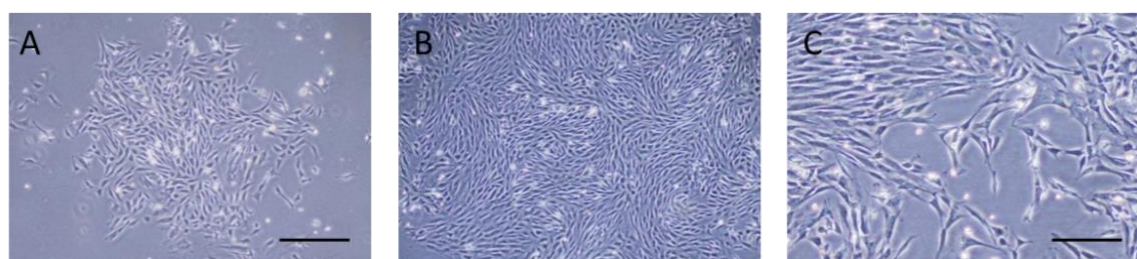


図6. 移植用MSCsにおける増殖培養の顕微鏡所見

A. CFU-assayにおいて、Day10にMSCsのcolonyが形成する。B. Day15まで培養し

つつ、約80%Confluentになった状態を示す(×20)。Scale barは500 μmである。C. 移植直前の細胞形態所見を示す(×50)。Scale barは200 μmである。

2. 肉眼的評価の結果

4週、16週 においても各群のSampleでは術後感染を示唆する所見は認めなかった。

術後4 週においてDefect 群の欠損部は陥凹しており、表面不整で不透明な線維組織で不完全に覆われていた(図7 A)。UPAL群とUPAL+MSC群の欠損部はやや平坦になったが、表面又は周囲融合部に亀裂や小陥凹が見える半透明な組織で部分的に覆われていた(図7 B, C)。UPAL+BMAC群では欠損部がほぼ平坦であり、表面に軽度の亀裂が見える程度の半透明な硝子軟骨様組織で完全に覆われていた(図7 D)。全体的な肉眼的スコアリング(ICRS score)ではDefect群(mean±SD: 1.7 ± 1.06 , $P < 0.01$)、UPAL群(5.1 ± 1.45 , $P < 0.05$)とUPAL+MSC群(5.5 ± 1.35 , $P < 0.05$)に比べて、UPAL+BMAC群(8.0 ± 1.83)で有意に高値であった(図7 E)。

術後16 週においてDefect 群の欠損部はやや平坦になったが、表面又は周囲融合部に大きな亀裂や陥凹が見える不透明な組織で修復された(図7 F)。UPAL群とUPAL+MSC群の欠損部はほぼ平坦になり、表面に小亀裂や小陥凹が見える半透明な組織で完全に覆われていた(図7 G, H)。UPAL+BMAC群では欠損部がほぼ周囲正常軟骨と同様な形状になり、表面に平滑透明な硝子軟骨様組織で完全に覆われていた(図7 I)。全体的な肉眼的スコアリング(ICRS score)では4週の同様にUPAL+BMAC群(11.20 ± 0.63)はDefect群(4.30 ± 1.42 , $P < 0.01$)、UPAL 群(7.9 ± 1.29 , $P < 0.01$)とUPAL+MSC群(9.2 ± 1.03 , $P < 0.01$)に比べて、有意に高値であった(図7 J)。

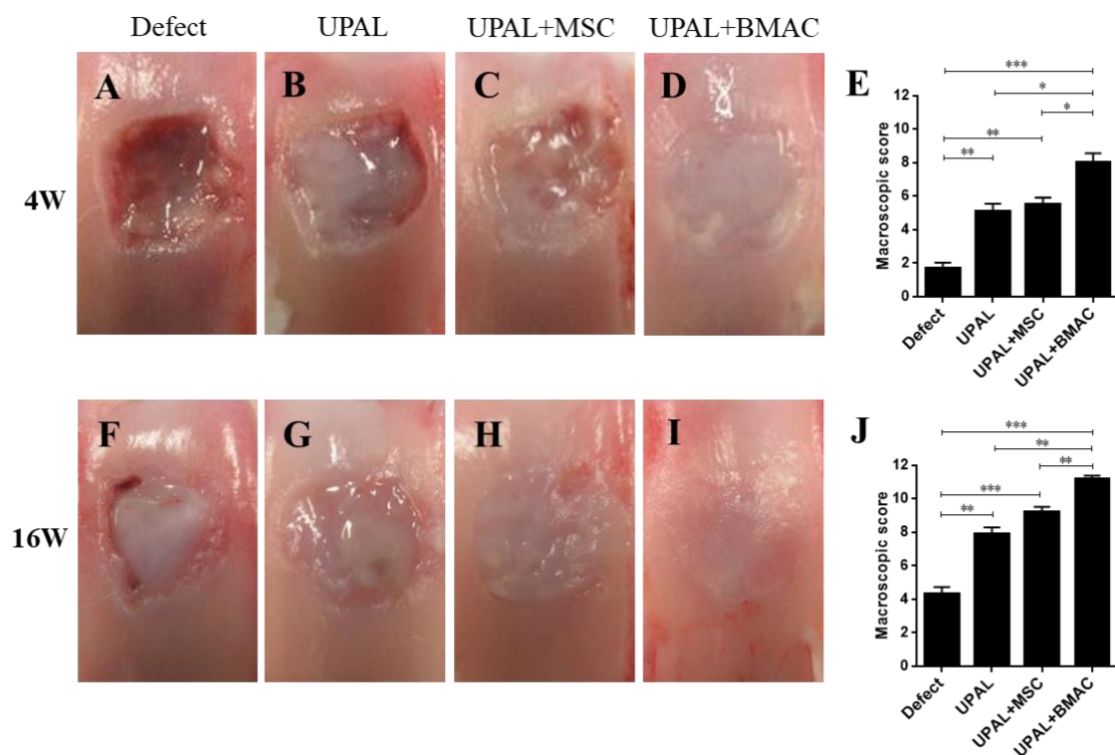


図7. 術後4週(A-D)と16週(F-I)における各群の代表的な肉眼的所見及びICRS scoreの結果(E, J)スコアに対して各群の平均値と標準偏差である。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ を示す。

3. 組織学的評価の結果

術後4週において、Defect群では欠損部に線維性癒痕組織がみられていた (図8 A)。UPAL群とUPAL+MSC群では欠損部に部分的にSafranin-Oに染色された硝子様軟骨組織が見られた(図8 B, C)。一方で、UPAL+BMAC群では欠損部に周囲よりやや厚さのあるSafranin-Oの染色性が良好な硝子様軟骨組織が見られた(図8 D)。拡大像($\times 100$)所見において、Defect群では修復組織内に中等度な炎症細胞浸潤を認めたことに比べ、UPAL群、UPAL+MSC群、UPAL+BMAC群では、炎症初見をほぼ認めなかった(図7 E-H)。Niederauer scoreでは、UPAL+BMAC群(16.70 ± 1.83)はDefect群(4.70 ± 1.89 , $P < 0.001$), UPAL群(10.0 ± 3.33 , $P < 0.01$)とUPAL+MSC群(12.2 ± 2.90 , $P < 0.05$)に比べ、有意に高値であった(図8 I)。

次に術後16週においては、Defect群では術後4週より修復組織に硝子様軟骨組織は見られたが、半分以上はSafranin-Oに染色されない線維組織であり、欠損部周囲の正常軟骨部のSafranin-O染色も減少しており変性が示唆された(図8 J)。UPAL群とUPAL+MSC群の修復組織では半分～半分以上にSafranin-Oに染色された硝子様軟

骨が占めていた(図8 K, L)。それに対して、UPAL+BMAC群では欠損部周囲正常軟骨とほぼ同じ性状と厚さであるSafranin-Oに強く染色された硝子様軟骨組織で覆われていた(図8 M)。また拡大像(×100)所見において、全群では、明らかな炎症所見を認めなかった。Defect群、UPAL群、UPAL+MSC群の修復組織では中等度～軽度的に高密度な紡錘形細胞や細胞クラスターの形成が見られたことに比べ、UPAL+BMAC群では正常密度の類円形細胞で満たされて、細胞クラスターはほぼ見られなかった。そのほか、軟骨下骨に修復において、Defect群ではほぼ見られていなかったが、UPAL群及びUPAL+MSC群では、不十分な軟骨下骨の修復や非常に不規則な軟骨/軟骨下骨の境界面が見られており、UPAL+BMAC群では、広範囲的かつ軟骨/軟骨下骨の境界面が規則的な軟骨下骨の修復が見られていた(図8 N-Q)。Niederauer scoreでは、UPAL+BMAC群(24.40±1.65)はDefect群(9.00 ± 3.65, $P < 0.001$), UPAL群(14.20 ± 3.88, $P < 0.01$)及びUPAL+MSC群(16.30 ± 3.62, $P < 0.01$)に比べ、有意に高値であった(図8 R)。組織学的スコアの項目別結果を示した(表4)。

表 4. Mean Histological Scores

Histological score by Niederauer	4 weeks				16 weeks			
	Defect	UPAL	U+M	U+B	Defect	UPAL	U+M	U+B
Nature of the predominant tissue	0.3	1.3	1.7 ^a	2.7 ^{a,b,c}	1.0	1.2	1.7	3.3 ^{a,b,c}
Surface regularity	0.6	1.4	1.8 ^a	2.0 ^{a,b}	1.4	1.9	2.1 ^a	2.4 ^a
Structural integrity, homogeneity	0.0	0.6 ^a	0.6 ^a	1.3 ^a	0.3	0.7	0.8	1.7 ^{a,b,c}
Thickness	0.2	0.6	1.0	1.7 ^a	0.4	1.0	1.0	1.9 ^{a,b,c}
Bonding to adjacent cartilage	0.0	0.4	0.2	1.0 ^{a,c}	0.4	0.8	1.1	1.8 ^{a,b,c}
Hypocellularity	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	1.0	1.1 ^a	2.0 ^{a,b,c}
Chondrocyte clustering	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.8 ^a	0.9 ^a	1.2 ^a
Adjacent cartilage degeneration	1..6	1.8	1.9	1.9	1.4	1.9	2.0	3.0 ^{a,b,c}
Reconstruction of subchondral bone	0.7	0.6	1.4 ^b	1.6 ^{a,b}	0.9	1.7	2.1 ^a	2.7 ^{a,b}
Inflammatory response	1.0	1.7	1.7	1.9 ^a	1.9	2.0	2.0	2.0
Safranin-O staining	0.3	1.2	1.7 ^a	2.7 ^{a,b,c}	0.8	1.2	1.5	2.4 ^{a,b,c}
Total score	4.7	10.0 ^a	12.2 ^a	16.9 ^{a,b,c}	9.0	14.2 ^a	16.3 ^a	24.4 ^{a,b,c}

UPAL+MSC: U+M; UPAL+BMAC: U+B

^a $P < 0.05$ vs Defect group at the same time.

^b $P < 0.05$ vs UPAL group at the same time.

^c $P < 0.05$ vs UPAL+MSC group at the same time.

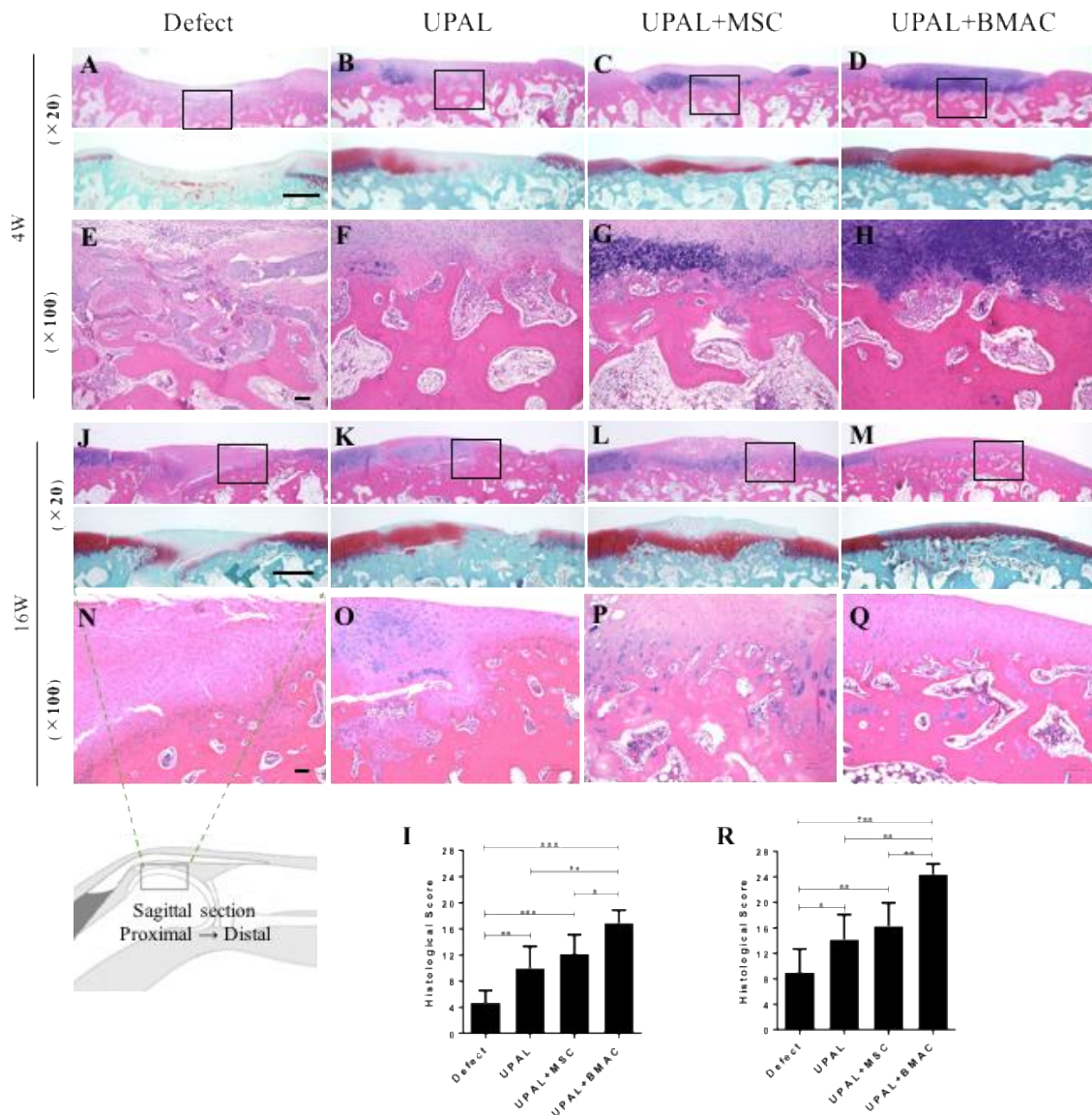


図8. 術後4週と16週における組織学的所見とNiederauer score結果。
術後4週の顕微鏡所見(×20) (A-D) 及び拡大像所見(×100) (E-H)を示す。術後16週の顕微鏡所見(×20) (J-M)及び拡大像所見(×100) (N-Q)を示す。術後4週 (I)と16週 (R)組織学的スコアに対して各群を平均値と標準偏差で示し、*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ を示す。Scale barは 1mm を示す。

4. コラーゲン配向性の評価結果

術後16週において、各群の修復組織に対して「実験方法5.」の通りにPLM定性scoreを用いて評価した。Defect群では深層の垂直配列とほかの2層配列はほとんど見られな

かった(図9 E, I, M)。UPAL群とUPAL+MSC群では、深層の垂直配列は部分的に見られ、ほかの2層も少しみられたが、各層の厚さは不規則的に見られた(図9 F, J, N and G, K, O)。その一方で、UPAL+BMAC群では、各層の厚さがやや規則的である垂直配列の深層と移行帯及び水平配列の表層が見られた(図9 H, L, P)。スコアリングでは、UPAL+BMAC群(2.00 ± 0.82)はDefect群(0.20 ± 0.63 , $P < 0.01$)とUPAL群(0.70 ± 0.67 , $P < 0.01$)に比べて、有意に高値であった。UPAL+MSC群(1.40 ± 1.07 , $P = 0.73$)と有意差がなかった(図9 Q)。

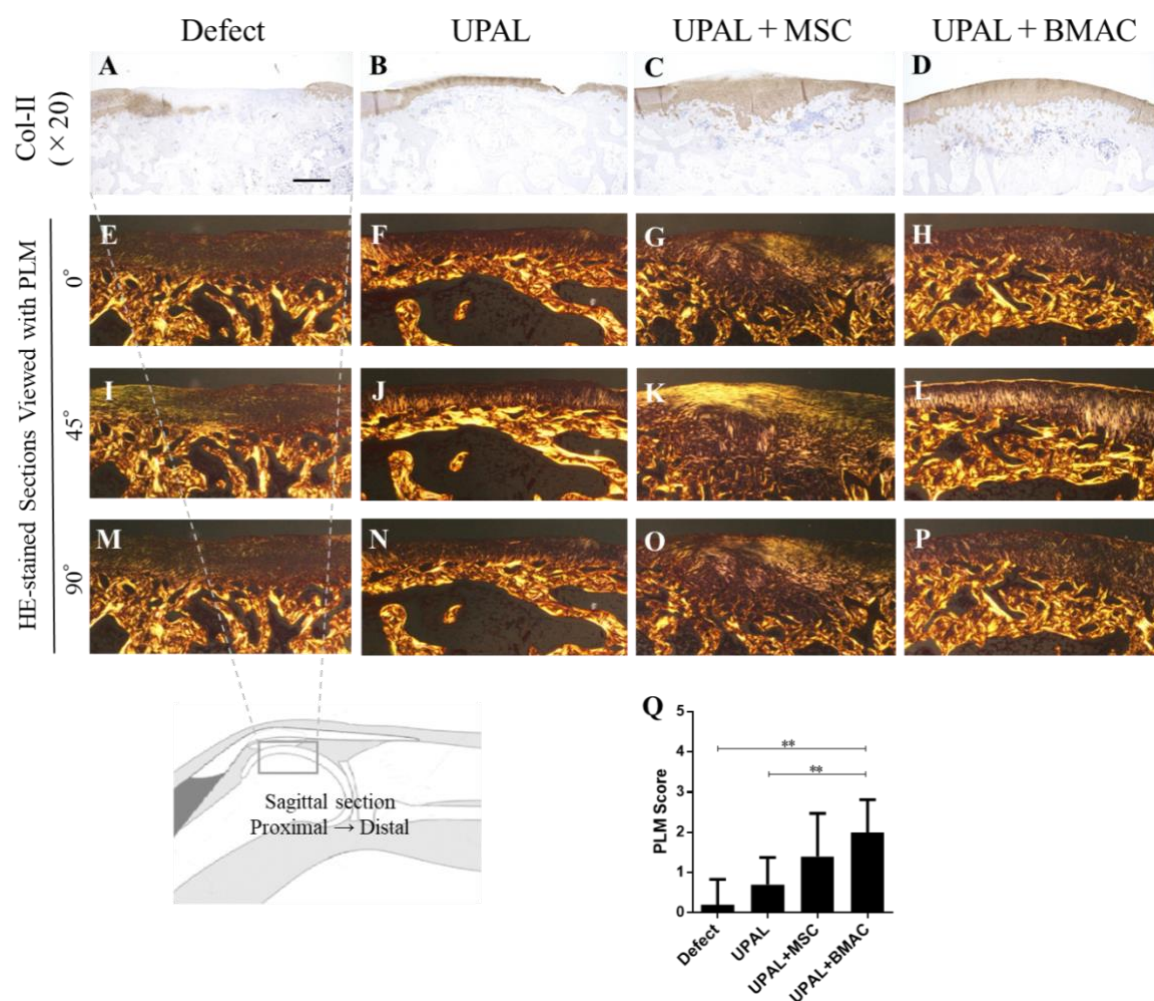


図9. 術後16週における修復組織のコラーゲン配向性の評価

A-D. 抗II型コラーゲン免疫染色された組織切片である。Scale barは 1mmを示す。E-PはHE染色組織切片をPLMで、0度、45度、90度に回転して撮影したものである。Q. は修復組織の変性変化に対する各群の平均値と標準偏差である。* *は $P < 0.01$ を示す。

5. 軟骨下骨修復量の結果

術後4週において、軟骨下骨の修復はDefect群ではほぼ見られず、UPAL群とUPAL+MSC群では僅かまたは部分的しか見られなかった。UPAL+BMAC群では少し亀裂が残る程度に大部分に修復されていた(図10 A-D)。Micro-CTを用いて、定量的に測定した軟骨下骨の修復量では、UPAL+BMAC群($6.28 \pm 1.98 \text{ mm}^3$)はDefect群($2.68 \pm 0.89 \text{ mm}^3$, $P < 0.01$)とUPAL群($3.59 \pm 0.88 \text{ mm}^3$, $P < 0.05$)に比べ有意に高かった。UPAL+MSC群($4.59 \pm 1.56 \text{ mm}^3$, $P = 0.387$)間において明らかな差は認めなかった。全群の軟骨下骨の修復量は正常群(図10 E)と比べ、明らかな差を認めた(正常群: $18.17 \pm 0.17 \text{ mm}^3$, 全群 $P < 0.01$)(図10 F)。

術後16週において、軟骨下骨の修復はDefect群とUPAL群では大欠損または中等欠損が残る部分的な修復は認めた。UPAL+MSC群では軟骨下骨は小亀裂が残る程度の修復は認めた。それらに対して、UPAL+BMAC群の軟骨下骨はほとんど修復され、周囲の軟骨下骨との連続も良好な再生骨構造を認めており骨癒合していると考えられた。全ての検体において、骨の過剰形成は認めなかった(図10 G-J)。軟骨下骨の修復量の定量測定では、4週時点と同様にUPAL+BMAC群($17.28 \pm 0.77 \text{ mm}^3$)はDefect群($11.37 \pm 1.20 \text{ mm}^3$, $P < 0.01$)とUPAL群($12.92 \pm 1.50 \text{ mm}^3$, $P < 0.01$)に比べ有意に高かった。UPAL+MSC群($15.24 \pm 2.67 \text{ mm}^3$, $P = 0.579$)より、平均骨量の増強傾向が認めたが、両群間において明らかな有意差は認めなかった。また、正常群($18.17 \pm 0.17 \text{ mm}^3$)と比べ、Defect群($P < 0.01$)、UPAL群($P < 0.01$)、UPAL+MSC群($P < 0.05$)では4週結果と同様に有意に低かったが、UPAL+BMAC group($17.28 \pm 0.77 \text{ mm}^3$, $P = 0.12$)と正常群の群間有意差が消失した(図10 K)。

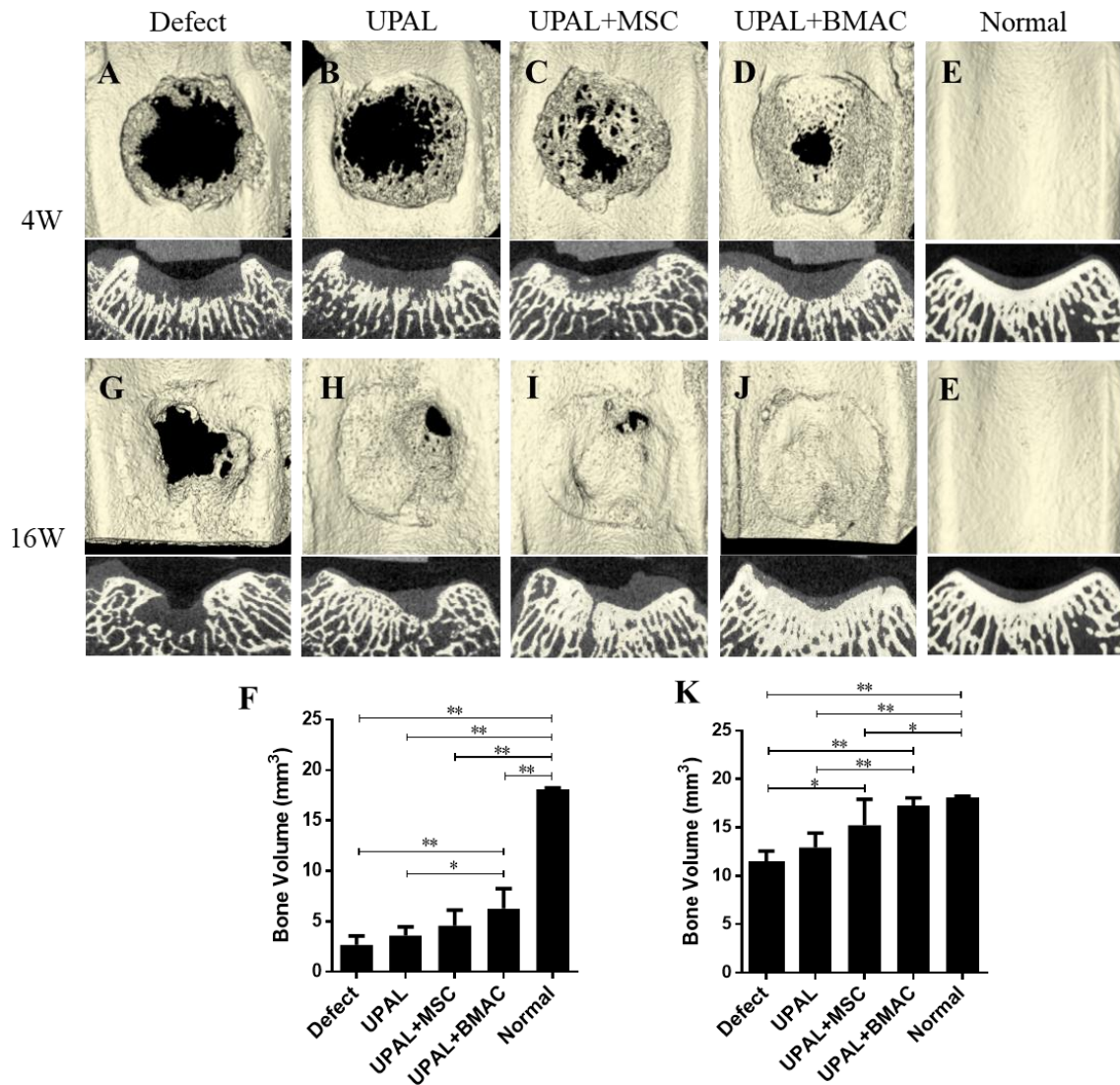


図10. 術後16週におけるmicro-CTを用いた軟骨下骨の修復量評価

A-D は術後4週における各群の再構築された2D (Axial)と3D-CT合成像である。G-J は術後16週における各群の再構築された2D (Axial)と3D-CT合成像である。F. 術後4週とK. 術後16週における各群の修復された軟骨下骨量(BV)の平均値と標準偏差である。*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$ 、***は $P < 0.001$ を示す。

6. 力学特性の評価結果

術後16週において、修復組織の力学特性を評価するため、押し込み試験機を用いて、力学試験を行った。各群の修復組織における代表的な圧入－変形曲線を示した(図11 C)。各々の剛性値(stiffness: N/mm)はこの曲線においてその傾きが最初に一定になった領域(0-0.08 mm)から算出し、前述のように標準化した(Defect群 $R_2 =$

0.986 ± 0.018、UPAL群 $R_2 = 0.995 \pm 0.004$ 、UPAL+MSC群 $R_2 = 0.996 \pm 0.001$ 、UPAL+BMAC群 $R_2 = 0.987 \pm 0.018$ 。標準化された剛性値(stiffness%)ではDefect群(20.70% ± 3.71%, $P < 0.05$)、UPAL群(34.19% ± 4.63%, $P < 0.05$)、UPAL+MSC群(42.89% ± 7.43%, $P < 0.05$)に比べてUPAL+BMAC群(70.69% ± 5.75%)で有意に高値であった(図11 D)。

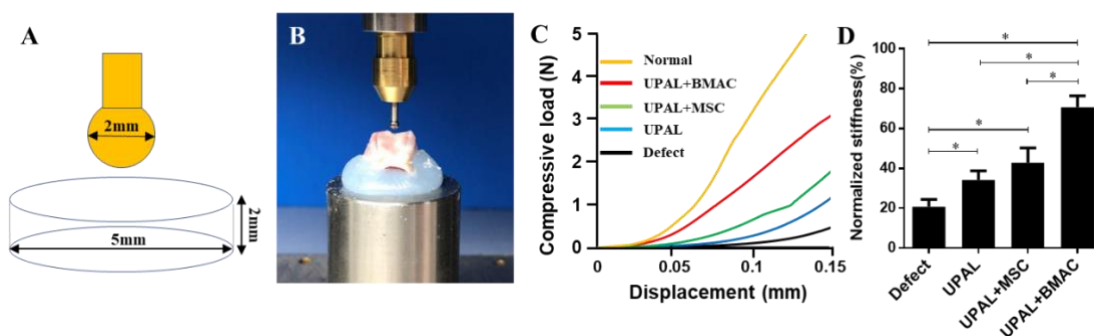


図11. 術後16週における力学特性の評価

A. は力学的テストの模式図。先端は2mmの半球状の形状をしている。B. 押し込み試験機の外観である。C. は各群から算出された修復組織における代表的な圧入－変形曲線である。D. は修復組織における各群の標準化された剛性値の平均値と標準偏差である。*は $P < 0.05$ を示す。

考察

本研究の主要な目的は骨軟骨欠損に対してUPALゲルとBMACの併用移植した治療法の有効性について兎モデルにおいて明らかにすることであった。肉眼的、組織学的、力学的な観点では、UPAL単独群、UPALゲルとMSCs併用群に比べ、UPALゲルとBMACの併用群の修復組織は有意に改善されていた。これらの結果からUPALゲルとBMACの相乗効果により、併用移植した場合はより良好な硝子様軟骨及び軟骨下骨による修復が促進されることが示唆された。

UPALゲルに関する各研究において、Igarashiら (Igarashi et al.2012a; Igarashi et al.2012b) はUPALゲルと高濃度なMSCsの併用移植により、大サイズ欠損のウサギ及び犬モデルを用いて、良好な硝子軟骨の修復が見られたことを報告している。この結果は、UPALゲルと十分量のMSCsの併用移植治療法では、大サイズの骨軟骨欠損に対して良好な治療効果がある可能性を示している。そこで本研究では、高濃度MSCsの代わりに大量なMSCsを一期的に使用可能なBMACの応用を試みた。BMAC中に含んだすべての単核細胞から見るとMSCsは低い割合であることが報告されている (Martin et al.,2002)。しかし一方で、Zhaoら (Zhao et al.,2013) は単位体積内で、BMAC中に含んだMSCsの数が骨髄刺激 (BMS) 後に回収された骨髄中のMSCsの数の約100倍であったことを報告している。また、Zhaoらは、関節軟骨の修復能に関して、BMACと高濃度MSCs (1×10^6) において、ほぼ同様の治療効果が得られたことを報告している。本研究の結果においても、BMAC中のMSCs数は約 4×10^4 MSCs/ml であり、単位体積の腸骨から採取した骨髄液中のMSCs数の約100倍であった。これは、Zhaoらの結果とほぼ一致しており、BMAC内に含まれる豊富な細胞が今回の併用療法において良好な組織再生が得られた一因と考えられた。

また、本研究結果では、各群の組織学的なスコアにおいて、UPAL+BMAC群はUPAL群だけではなく、UPAL+MSC群に比べても優れた結果を示した。これはBMACの中に含まれる細胞以外に、液性因子でも重要な役割を果たしている可能性を示した。BMACには、TGF- β 、PDGF、BMP-2、BMP-7などの成長因子が含まれており、これらは軟骨分化誘導能 (Felicia et al.,2008; Indrawattana et al.,2004)、生体内anabolic作用および抗炎症作用 (McCarrel et al.,2009; Schnabel et al.,2007) を持つことがよく知られている。またアルギン酸にも、MSCsの軟骨分化誘導能や抗炎症作用を有することが報告されている (Igarashi et al.,2010)。本研究において、UPALゲルとBMACの併用移植では、UPALゲルとBMAC中に含まれる成長因子との相乗効果により、単純な軟骨修復だけではなく、組織学的に質の向上に寄与したことが考えられた。

BMACの臨床応用に関して、以前の研究では、関節軟骨損傷に対する治療法として自家BMACの関節内注射の有効性が報告されていたが (Kristin et al.,2018; Kim et al.,2014; Shapiro et al.,2017)、液状であるBMACは流動性があり、欠損部位に直接に

移植しても接着せず、関節の運動とともに流れてしまうことが考えられた。BMAC移植する治療に関して、欠損部位に良好な付着性及び固定性を求めるため、BMACと各種の生体材料の組み合わせた研究も散見され、それらの併用移植により、優れた軟骨修復が得られた報告もある(Gobbi et al.,2011; Cavallo et al.,2013)。しかし、BMACと併用移植した場合、生体材料は手術中で軟骨欠損の形状に合わせるための形状調整や欠損部への固定などの工夫が必要である。したがって、一期的に液状であるBMACと併用移植の治療を実現させるため、使用された生体材料には高い構造適合性が求められる。

本研究に使用したUPALゲルは欠損部に簡単に注入でき、ゲルの表面はCaCl₂との接触により迅速にゲル化を形成し、その後欠損部位にしっかりと固定される性能がある。この構造的特徴により、UPALゲルとBMACの組み合わせは、液状のBMACが漏れることなく、欠損の形状に問わず、簡単に注入及び固定できる。したがって、UPALゲルは、軟骨及び骨軟骨欠損に対する治療において、BMACの生体足場材料としてより適していると考えた。

以前の報告では、UPALゲルと骨髄刺激法(BMS)の併用療法は軟骨修復を促進したが、軟骨下骨の修復に関しては有意な促進効果が認められなかった(Baba et al.,2015)。一方本研究では、UPALゲルとBMACの併用療法が軟骨だけではなく、軟骨下骨の修復も促進した。この結果を起した原因の一つとして、BMAC中に含んだMSCsの数がBMSによって導入される細胞数より約100倍多いことが考えられた。過去の報告でも、高濃度のMSCs移植では軟骨下骨の再生が得られることが示されていた(Igarashi et al.,2010; Shimomura et al.,2014)。二つ目の原因として、UPAL+BMAC群では、軟骨下骨への早期の炎症細胞浸潤が抑制されたことが軟骨下骨の再生を促した可能性が考えられた。これは、アルギン酸が抗炎症作用を持つことや、BMACに含まれるサイトカインにも抗炎症効果を有する分子が含まれることが原因である可能性がある。これらの相乗効果によって、軟骨下骨への炎症細胞の浸透を抑制し、軟骨下骨の再生を果たした可能性が考えられた。三つ目の原因として、BMACには、BMP-2やBMP-7などMSCsの骨分化誘導能をもつサイトカインが含まれていることが考えられた。これらの骨形成因子によって軟骨下骨の形成が有効的に促進されたと考えられた(McCarrel et al.,2009; Schnabel et al.,2007)。以上により、UPALが持つMSCsに対する増殖能及び分化能に加えて、BMACに含まれる豊富なサイトカインによる骨及び軟骨分化誘導能の組み合わせにより、軟骨下骨と硝子軟骨の二層構造の同時再生が可能となったと考えられた。

UPALゲルの特徴のもう一つとしては、移植後に表面だけがゲル化し、ゲルの内部は液状のままであることが挙げられる。この特性により、UPALゲル内部の液体環境の中に、BMAC中のすべての細胞と成長因子は、直接的に物理的接触またはパラクリンシグナル伝達を含む作用が働き、MSCsがより適切に軟骨及び軟骨下に分化し、二層

構造をもつ良好な修復組織が得られた。そのため、UPALゲルとBMACの併用移植は、骨軟骨欠損における軟骨と軟骨下骨の両方の修復を促進し、その結果として、より良い力学特性をもつ修復組織が得られたと考えられた。

本研究の臨床的意義は、優れた組織再生修復能をもつBMACと同じく優れた軟骨分化誘導能を持ち、局所に注入が可能な生物材料であるUPALゲルを併用することにより、大きな関節軟骨または骨軟骨損傷に対して有効な、一次的治療の可能性を示したことである。また、本治療法は、本邦では重度の軟骨あるいは骨軟骨欠損に対する主な治療法である自家骨軟骨細胞移植術(ACI)または自家骨軟骨柱移植術(AOT)の代わりとして、関節鏡視下に一次的手術が可能な新たな治療法となりうる。

本研究にはいくつかのlimitationがある。まず、本研究の評価は、ウサギ膝の骨軟骨欠損モデルから得られた結果に基づいて行ったので、このモデルでは、臨床的に実際に遭遇した関節欠損状況の再現ができない。本治療法は今後臨床応用に適応させるには、大型動物モデルを使用した非臨床試験が必要と考える。次に、臨床的観点から、軟骨損傷は荷重部位である大腿骨顆部によく観察されるが(Curlet al.,1997)、次いで、本研究では、負荷によって引き起こされる軟骨変性の影響を最小限にするために、非荷重部位である膝蓋骨滑車部に欠損を作成したことが挙げられる。荷重部位に欠損を作成した方が、実際の臨床に即したモデルであるが、実際の臨床では荷重制限や可動域制限を設けることが可能であるため、非荷重部欠損モデルにも十分な有用性があると考えている。最後、BMACに含まれる細胞の数と成長因子の濃度は、精製プロセスや、骨髄穿刺部位や、患者の性別や、年齢などによって異なる可能性がある(Chahla et al.,2016)。安定な品質及び一致な効能をもつBMACを得るためには、精製法の改良や精製基準の確立が求められる。本検討はこれらの限界を有するものの、従来法では治療困難であった重度関節軟骨障害に対する、新たな低侵襲治療法を提案するものであり、本検討結果は、その実現可能性を十分に実証するものと考えられた。

総括及び結論

- UPALゲルとBMACの併用移植することにより、大きな骨軟骨欠損に対して、良好な硝子軟骨の修復が認められた。
- UPALゲルとBMACの併用移植することにより、大きな骨軟骨欠損に対して、良好な軟骨下骨の修復が認められた。
- 修復軟骨において良好なコラーゲン配向性が得られた。
- 良好な軟骨及び軟骨下骨の修復により、修復組織の力学特性が優れた。
- 本研究の成果により 大きな骨軟骨損傷に対して、一期的に有効な治療法を実現する可能性が示された。

本検討は、従来法では治癒することが困難であった重度関節軟骨障害に対する、新たな低侵襲治療法を提案するものであり、本検討結果は、その実現可能性を十分に実証するものである。

今後は、大動物を用いた前臨床試験、および臨床治験を実施することで、本治療戦略の臨床応用実現を目指す。

謝辞

本研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に深い謝意を表明いたします。

本研究を行うにあたり、高純度アルギン酸ゲルのご提供並びに使用に関するご助言を頂きました持田製薬株式会社の伊佐次三津子様をはじめ、多くの職員の方々に深い感謝の意を表します。

また、力学試験に関してご指導及び装置の使用許可をいただいた北海道大学大学院先端生命科学研究院先端融合科学研究部門ソフト&ウェットマター研究室・Jian Ping Gong 教授、同・野々山貴行特任助教に深く御礼申し上げます。

本研究全般にわたりご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・小野寺智洋講師深い謝意を表します。また、直接のご指導を頂きました北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・瓜田淳助教と元北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・菱村亮介医員をはじめとした整形外科学分野の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

本研究に関連し、使用した高純度アルギン酸ゲル及び部分的な研究費は持田製薬株式会社より提供を受けたものである。

引用文献

Abbott J, and Holtzer H. (1966). The loss of phenotypic traits by differentiated cells. III. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. *J Cell Biol* 28, 473–487.

Baba R, Onodera T, and Iwasaki N. (2015). Bone A Novel Bone Marrow Stimulation Technique Augmented by Administration of Ultrapurified Alginate Gel Enhances Osteochondral Repair in a Rabbit Model. *Tissue Eng Part C Methods*. Dec 21(12), 1263-73.

Bekkers JE, Inklaar M, and Saris DB. (2009). Treatment selection in articular cartilage lesions of the knee: a systematic review. *Am J Sports Med* 37 (Suppl 1), 148S-55S.

Brittberg M, and Peterson L. (1998). Introduction to an articular cartilage classification. *ICRS Newsletter* 1, 5-8.

Cavallo C, Desando G, and Grigolo B. (2013). Chondrogenic differentiation of bone marrow concentrate grown onto a hylauronan scaffold: rationale for its use in the treatment of cartilage lesions. *J Biomed Mater Res A*. Jun 101(6), 1559-70

Changoor A, Tran-Khanh N, and Méthot S. (2011). A polarized light microscopy method for accurate and reliable grading of collagen organization in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 19(1), 126-135

Chahla J, Mannava S, and LaPrade RF. (2017). Bone Marrow Aspirate Concentrate Harvesting and Processing Technique. *Arthrosc Tech*. Apr 10 6(2), e441-e445.

Chahla J., Dean C.S., Moatshe G., Pascual-Garrido C., Serra Cruz R., and LaPrade R.F. (2016). Concentrated bone marrow aspirate for the treatment of chondral injuries and osteoarthritis of the knee: A systematic review of outcomes. *Orthop J Sports Med*. Jan 13, 4(1), 2325967115625481

Clarke HD, and Scott WN. (2003). The role of debridement: Through small portals. *J Arthroplasty* 18, 10–13.

Curl WW, Krome J, and Gordon ES. (1997). Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. Aug 13(4), 456-60.

Doube, M, Kłosowski, MM, and Arganda Carreras. (2010). I. BoneJ: Free and extensible bone image analysis in ImageJ. *Bone* 47(6), 1076-1079.

Eça LP, Ramalho RB, and Oliveira IS. (2009). Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cir Bras*. Sep-Oct 24(5), 400-4.

Felicia Ng, and Shayne Boucheret. (2008). PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood* 112 (2), 295-307.

Gobbi A, Francisco RA, Lubowitz JH, Allegra F, and Canata G. (2006). Osteochondral lesions of the talus: Randomized controlled trial comparing chondroplasty, microfracture, and osteochondral autograft transplantation. *Arthroscopy* 22, 1085–1092.

Giannini S, and Vannini F. (2004). Operative treatment of osteochondral lesions of the talar dome: Current concepts review. *Foot Ankle Int* 25, 168–175.

Gigante A, Cecconi S, and Enea D. (2012). Arthroscopic knee cartilage repair with covered microfracture and bone marrow concentrate. *Arthrosc Tech*. Sep 14, 1(2), e175-80.

Gobbi A, Karnatzikos G, and Grigolo B. (2011). One-Step Cartilage Repair with Bone Marrow Aspirate Concentrated Cells and Collagen Matrix in Full-Thickness Knee Cartilage Lesions: Results at 2-Year Follow-up. *Cartilage* Jul 2(3), 286–299.

Gobbi A, Karnatzikos G, and Sankineani SR. (2014). One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee. *Am J Sports Med*. Mar 42(3), 648-57.

Hangody L, Kish G, and Ka' rpa' ti Z. (1997). Autogenous osteochondral graft technique for replacing knee cartilage defects in dogs. *Orthop Int Ed* 5, 175-181

Hernigou P, Homma Y, Flouzat-Lachaniette CH, Poignard A, Chevallier N, and Rouard H. (2013). Cancer risk is not increased in patients treated for orthopaedic diseases with autologous bone marrow cell concentrate. *J Bone Joint Surg Am* 95, 2215-2221.

Hishimura R, Onodera T, and Iwasaki N. (2019). Osteochondral Autograft Transplantation Technique Augmented by an Ultrapurified Alginate Gel Enhances Osteochondral Repair in a Rabbit Model. *The American Journal of Sports Medicine* e47(2), 468–478

Holtzer H, Abbott J, Lash J, and Holtzer S. (1960). The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. I. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl AcadSci USA* 46, 1533–1542.

Hou H., Zheng K., and Jiang Q. (2015). Influence of Intra-Articular Administration of Trichostatin A on Autologous Osteochondral Transplantation in a Rabbit Model. *BioMed Research International* 1-8.

Hunter W. (1743). On the structure and diseases of articulating cartilage. *Philos Trans RsocLond B Biol Sci* 9, 277.

Hunziker EB. (2002). Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463.

Igarashi T, Iwasaki N, and Minami A. (2010). A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *J Biomed Mater Res Part A* 94A, 844-855

Igarashi T, Iwasaki N, and Minami A. (2012). Repair of articular cartilage defects with a novel injectable in situ forming material in a canine model. *J Biomed Mater Res Part A* 100A, 180–187.

Indrawattana N, Chen G, and Bunyaratvej A. (2004). Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun*. Jul 30, 320(3), 914-9.

Iwasaki N, Kato H, Kamishima T, Suenaga N, and Minami A. (2007). Donor site evaluation after autologous osteochondral mosaicplasty for cartilaginous lesions of the elbow joint. *Am J Sports Med* 35(12), 2096-2100.

Karobi, SN, Sun, TL, and Kurokawa, T. (2016). Creep behavior and delayed fracture of tough polyampholyte hydrogels by tensile test. *Macromolecules* 49, 5630-5636.

Kim J, Lee G, Jung G, Kim C, Kim T, and Park J. (2014). Outcome of autologous bone marrow aspirate concentrate (BMAC) injection in degenerative arthritis of the knee. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 24, 1505-1511.

Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, and Marcacci M. (2009). Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med* 37(1), 33-41.

Kristin S. Oliver, Matt B, David M.C, and Emma B. (2018). Autologous Bone Marrow Concentrate-Clinical Efficacy in the Treatment of Knee Osteoarthritis. *Recent Adv Arthroplast* 2(2), 75-81.

Mankin HJ. (1982). The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 64(3), 460-6.

Maruyama, M., Satake, H., Suzuki, T., Honma, R., Naganuma, Y., Takakubo, Y., and Takagi, M. (2017). Comparison of the Effects of Osteochondral Autograft Transplantation With Platelet-Rich Plasma or Platelet-Rich Fibrin on Osteochondral Defects in a Rabbit Model. *The American Journal of Sports Medicine* 45, 3280-3288.

McCarrel T, and Fortier L. (2009). Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res* 27, 1033–1042.

Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, and Baker HJ. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 30, 879–886.

Niederauer GG, Slivka MA, and Kieswetter K. (2000). Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. *Biomaterials* 21, 2561–2574.

Qinghua Zhao, Shouguo Wang, and Zhenkai Wu. (2013). Combination of bone marrow concentrate and PGA scaffolds enhance bone marrow stimulation in rabbit articular cartilage repair *J Mater Sci: Mater Med* 24, 793–801

Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, and Lindahl A. (2010). Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am J Sports Med* 38(6), 1117-24.

Ritsila VA, Santavirta S, and Osterman K. (1994). Periosteal and perichondral grafting in reconstructive surgery. *ClinOrthopRelat Res*, 259–265.

Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, and Richardson JB. (2003). Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: Monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther* 5(1), R60–R73.

Sadia Nazneen Karobi, T.L.S., Takayuki Kurokawa, Takayuki Nonoyama, and Jian Ping Gong (2016). Creep Behavior and Delayed Fracture of Tough Polyampholyte Hydrogels by Tensile Test. *Macromolecules* 49, 5630-5636.

Schnabel LV, Mohammed HO, and Miller BJ. (2007). Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 25, 230–240.

Shapiro SA, Kazmerchak SE, Heckman MG, Zubair AC, and O’Conner M. (2017). A prospective, single-blind, placebo-controlled trial of bone marrow aspirate concentrate for knee osteoarthritis. *Am J Sports Med* 45, 82-90.

Shimomura K, Moriguchi Y, and Nakamura N. (2014). Osteochondral repair using a scaffold-free tissue-engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells and a hydroxyapatite-based artificial bone. *Tissue Eng Part A*. Sep 20(17-18), 2291-304

Steadman JR, Rodkey WG, and Rodrigo JJ. (2001). Microfracture: Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *ClinOrthopRelat Res* S362–S369.

Sukegawa A, Iwasaki N, Kasahara Y, Onodera T, Igarashi T, and Minami A. (2012). Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A* 18(9-10), 934-945.

Wada S, Kitamura N, and Nonoyama T. (2016). Hydroxyapatite-coated double network hydrogel directly bondable to the bone: Biological and biomechanical evaluations of the bonding property in an osteochondral defect. *Acta Biomater*. Oct 15, 44, 125-34.

Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, and Goldberg VM. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large fullthickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76, 579–592.