

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02090

研究課題名（和文）脱細胞化組織を用いた膝前十字靭帯再建大動物実験による生体内靭帯化に関する研究

研究課題名（英文）Study on in vivo ligamentization of decellularized tissue in knee anterior cruciate ligament reconstruction using large animal models

研究代表者

岩崎 清隆 (Kiyotaka, Iwasaki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20339691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000 円

研究成果の概要（和文）：研究代表者が開発した脱細胞化処理および滅菌処理を施したウシ腱を用いてヒツジの膝前十字靭帯再建実験を行い、脱細胞化組織に生体内で自己細胞が浸潤し、コラーゲン線維も体内で創られ組織再生が起こることが組織学的に明らかになった。また、組織の破断強度は、再建後3ヶ月と比較して1年で顕著に増加することが明らかになった。

本研究から、脱細胞化腱組織は、再建後に体内で自己細胞が浸潤し、組織学的および力学的にも組織再生、いわゆる生体内リモデリングが起き、画期的特徴を有することが明確となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、大動物の膝前十字靭帯再建で、脱細胞化処理した腱に体内で自己細胞が浸潤し、組織再構築、いわゆる生体内リモデリングが起きることを定量的に明らかにした初めての研究である。脱細胞化腱は、生体内で再生するこれまでにない画期的治療機器になり得る。現在、膝前十字靭帯再建の治療に現在用いられている自家腱と比較して、患者自身の腱を採取する必要がなく低侵襲で、かつ、自家腱では成し得ない太い腱を使用することができる。さらに、自家腱に依存した治療における“自家腱の不足”という問題を解決し、再断裂や複合靭帯損傷等においても治療ができ、新たな治療の選択肢を提供する画期的医療技術となりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Throughout animal experiments of ovine anterior cruciate ligament reconstructions using bovine tendons which were decellularized and sterilized using the original methods, it was histologically revealed that the decellularized tendon were re-cellularized and collagen fibers of the decellularized tendon were regenerated in vivo. Moreover, mechanical strength of the decellularized tendons implanted for 1 year became higher compared with those for 3 months. This study demonstrated that the decellularized tendon provided breakthrough features that the tissue was repopulated with own cells and the tissues were histologically and mechanically regenerated or so-called “remodeled”.

研究分野：生体医工学

キーワード：脱細胞化組織 組織再生 膝前十字靭帯

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膝前十字靭帯断裂再建治療の現状と課題

膝前十字靭帯は、大腿骨と脛骨を連結する組織であり、膝の安定した運動には欠かせない組織である。膝前十字靭帯の損傷の多くはスポーツ時に起こり、膝前十字靭帯再建術は整形外科領域で最も多い治療の1つである。膝前十字靭帯損傷に対する再建術は、国内では1万7千件程度、米国では10万~17.5万件程度行われていると報告されている。膝前十字靭帯損傷を放置してスポーツ活動を継続すると機能不全はさらに悪化し、二次的に半月板損傷、軟骨損傷を、そして将来的には変形性膝関節症を引き起こす要因となる。したがって、膝前十字靭帯を損傷した患者の多くは膝前十字靭帯再建術の適応となる。

膝前十字靭帯再建術のグラフトとして自家腱を用いるのがゴールドスタンダードであるが、グラフト径が8mm以下の場合、再断裂率が上昇すると近年報告されている。したがって、再建用の太い腱が求められるが、患者自身から採っても問題ない太い腱はなく、半腱様筋腱等を2重折または4重折した自家腱が使用されており、必然的に限界がある。

また、膝靭帯再建術全般において自家腱を採取する治療上の課題として、以下が挙げられる。

正常組織採取による侵襲

自家腱の採取に伴う術後の筋力低下、神経障害、痛みの残存

再断裂症例に対する再再建手術や膝複合靭帯再建術の際に使用できる自家腱の不足

自家腱の採取による手術時間の延長

このような課題があることから、臨床的に求められる十分な径と強度を有し、安定供給可能で、自家腱に置き換わる人工靭帯の開発が望まれている。合成繊維を用いた人工靭帯が開発された歴史はあるものの、5年後断裂率が約50%程度で、摩耗による炎症等で摘出を余儀なくされることが報告されており、国内外で臨床ニーズに適合する製品は存在しない。

したがって、上記臨床的課題を解決するため、臨床治療上必要な径と強度を有し、生体適合性に優れた自家腱に置き換わる再建組織の開発が望まれている。

(2) 開発している膝前十字靭帯再建に用いる脱細胞化腱

脱細胞化組織は、細胞成分を除去した細胞外マトリクスからなる組織である。生きた細胞を利用するものではないため、医療機器に分類される。生体本来の組織構造を兼備しているという、人工的に合成、製造する手法では成し得ない特徴を有している。膝前十字靭帯の再建治療に用いる組織には力学的強度が必須であり、脱細胞化腱は本来の組織構造を有しているという点で再建組織としての期待は大きく、生体内で細胞が浸潤し、自己組織化が期待できるというこれまでにない画期的な特徴を有する新しい治療機器となり得る。

動物由来組織を再生の足場として治療応用する実用化を目指した研究で最大の課題は、拒絶反応の原因となる細胞成分を除去し、かつ、組織を損傷せずコラーゲン・弾性線維等の組織骨格を保持するという、相反する2点を両立させることである。我々は、

(1) 水分子の共振現象を利用したマイクロ波(2.45GHz)照射

(2) 生体内の拍動血圧と血流環境で細胞膜を溶解する界面活性剤を循環

の2つの処理を同時に行う技術を開発している。径10mm以上、長さ20cm以上の腱においても、腱本来の構造を維持し、組織強度を保持したまま細胞成分を除去することができる。

また、医療機器として製品化するにあたっては適切な滅菌が必要となり、滅菌工程で強度低下を抑制するための組織の力学的強度を保持する滅菌が重要となる。我々は、特定の糖溶液を脱細胞化組織に浸透させて凍結乾燥し、エチレンオキサイドガス滅菌した組織を開発している。再水和した組織の破断強度は、滅菌によって低下しないことがわかっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が開発した脱細胞化処理および滅菌処理を施したウシ腱を用いてヒツジの膝前十字靭帯再建実験を行い、術後13週および52週時に行う組織学的評価、力学的評価から、脱細胞化腱が生体内で細胞浸潤し、組織再構築、が起こるかを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 脱細胞化組織への生体内での細胞浸潤に関する評価

膝前十字靭帯再建後、13週および52週でヒツジを犠牲死し、術肢および健肢の膝関節を摘出した。膝関節ごと再建組織を4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて固定した後、脱灰を経てパラフィンブロックを作成し組織切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、骨間組織の中枢部6箇所認められる細胞数を測定し、平均値で評価した。

(2) コラーゲン線維の生体内での再生に関する評価

摘出した組織をグルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムで固定し、脱水後樹脂包埋し、1-2 μ mの準超薄切片を作製した。その後、トルイジンブルーで染色し、90-100nmの超薄切片を作製し、酢酸ウラン、クエン酸鉛で染色した。透過型電子顕微鏡を用いて、コラーゲン線維の密度(計測範囲の全面積に対するコラーゲン線維の総面積の比)とコラーゲン線維の直径を測定した。

(3) 再建した組織の力学的特性評価

再建した脱細胞化組織が付着している大腿骨および脛骨を5自由度を有する膝関節固定治具に取り付け、大腿骨および脛骨に付着した状態で再建組織の軸方向に定速で引張負荷を作用させて破断荷重を測定し、力学的観点から組織の生体内再構築に関して評価した。

4. 研究成果

(1) 脱細胞化組織への生体内での細胞浸潤に関する評価

術後13週の脱細胞化腱中の細胞浸潤数は、正常なヒツジ膝前十字靭帯組織内の細胞数と同程度であった。また、術後52週においても、ヒツジ前十字靭帯に含まれる細胞数と同程度であった。以上から、開発中のウシ由来脱細胞化腱は自己の細胞が体内で浸潤するこれまでの人工材料にはない優れた生体適合性を有することがわかった。

(2) コラーゲン線維の生体内での再生に関する評価

摘出組織を透過型電子顕微鏡を用いて定量的に評価した結果、ヒツジ膝前十字靭帯再建術後13週では脱細胞化腱のコラーゲン線維密度は減少するが、術後52週では膝前十靭帯組織に近い値まで増加した。以上より、我々の技術で脱細胞化した組織は、生体内でコラーゲン線維、すなわち組織が再生することが示された。また、未処理のヒツジ膝前十字靭帯のコラーゲン線維の直径分布と比較した分析から、術後1年では生体内組織リモデリングは途中であると考えられた。

(3) 再建した組織の力学的特性評価

大腿骨および脛骨に付着した状態で再建組織の軸方向に定速で引張負荷を作用させて破断荷重を測定し、力学的観点から脱細胞化組織の生体内再構築に関して評価した。その結果、植込み期間13週と比較して、52週で有意に破断荷重が増加し、ヒツジの膝前十字靭帯組織の約70%に達することが明らかとなった。したがって、開発中の脱細胞化腱は生体内で力学的にも組織再構築が起こることが明確になった。

以上、本研究から、脱細胞化腱組織は、再建後に体内で自己細胞が浸潤し、組織再構築、いわゆる生体内リモデリングが起きることが明らかとなり、自己組織で置き換わる画期的特徴を有することが明確となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 S. Imai, J. Hongxiao, M. Ito, A. Yasaka, M. Umezu, K. Iwasaki
2. 発表標題 Study on the Effects of Aeration and Lyophilization on Sterile Residues and Sterile Secondary Products of Decellularized Tissue After Sterilization
3. 学会等名 17th International Conference on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎清隆
2. 発表標題 膝前十字靭帯再建に用いる生体由来 脱細胞化腱の開発
3. 学会等名 第17回医療機器フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤匡史, 岩崎清隆, 岡崎賢, 梅津光生
2. 発表標題 膝前十字靭帯再建手術に用いる脱細胞グラフトの開発
3. 学会等名 ARIA 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎清隆
2. 発表標題 医療機器開発, 効果的使用法の基盤となる非臨床試験の開発とTWIns共同大学院の取り組み
3. 学会等名 ARIA 2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎清隆
2. 発表標題 未来医療創造への挑戦：医工学研究の進展
3. 学会等名 第60回日本脈管学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M Ito, K Iwasaki, Y Yagi, J. Hongxiao, K Okazaki, M Umezu
2. 発表標題 Evaluation of in vivo tissue regeneration of decellularized tendon in ovine anterior cruciate ligament reconstruction
3. 学会等名 第10回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M Ito, K Iwasaki, Y Yagi, J. Hongxiao, K Okazaki, M Umezu
2. 発表標題 Evaluation of in vivo tissue regeneration of decellularized tendon in ovine anterior cruciate ligament reconstruction
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩崎清隆, 伊藤匡史, 奥田慶也, 岡村昭慶, 八木優大, 江虹暁, 井樹浩貴, 高野和也, 岡崎賢, 梅津光生
2. 発表標題 ヒツジ膝前十字靭帯再建実験による脱細胞化腱の生体内組織再生の評価
3. 学会等名 第45回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎清隆, 伊藤匡史, 奥田慶也, 岡村昭慶, 八木優大, 江虹暁, 井柘浩貴, 高野和也, 岡崎賢, 梅津光生
2. 発表標題 脱細胞化腱を用いたヒツジ膝前十字靭帯再建実験による生体内組織再生に関する評価
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤匡史, 岩崎清隆, 梅津光生
2. 発表標題 膝前十字靭帯再建術に用いる異種生体組織由来クラフトの実用化への課題に関する研究 ラットでの移植実験
3. 学会等名 第16回医療機器に関するレギュラトリーサイエンス研究会・日本生体医工学会専門別研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江虹暁, 伊藤匡史, 奥田慶也, 岡村昭慶, 八木優大, 岡崎賢, 梅津光生, 岩崎清隆
2. 発表標題 脱細胞化組織を用いたヒツジ膝前十字靭帯再建後の膝関節安定性に関する研究
3. 学会等名 第41回日本バイオレオロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎清隆, 伊藤匡史, 井柘浩貴, 高野和也, 岡村昭慶, 奥田慶也, 八木優大, 吉本伸之, 梅津光生
2. 発表標題 脱細胞化腱を用いたヒツジ膝前十字靭帯による生体内での細胞浸潤の評価
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田慶也, 伊藤匡史, 岡村昭慶, 八木優大, 梅津光生, 加藤善治, 岡崎賢, 岩崎清隆
2. 発表標題 ヒツジ膝前十字靭帯再建に3ヶ月使用した脱細胞化ウシ組織のコラーゲン線維の生体内リモデリングの解明に向けた研究
3. 学会等名 第28回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩崎清隆, 伊藤匡史, 井枘浩貴, 高野和也, 岡村昭慶, 奥田慶也, 八木優大, 梅津光生
2. 発表標題 脱細胞化組織を用いたヒツジ膝前十字靭帯再建実験による生体内での細胞浸潤に関する検討
3. 学会等名 第40回日本バイオレオロジー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田慶也, 岡村昭慶, 八木優大, 軽部裕代, 梅津光生, 岩崎清隆
2. 発表標題 脱細胞化処理及び滅菌処理が組織のコラーゲンに及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第40回日本バイオレオロジー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八木優大, 岡村昭慶, 奥田慶也, 梅津光生, 岩崎清隆
2. 発表標題 脱細胞化処理溶液への浸透時間が脱細胞化腱と靭帯の力学特性に及ぼす影響検討
3. 学会等名 第40回日本バイオレオロジー学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩崎清隆
2. 発表標題 先進的医療機器開発の迅速化とリスクマネジメントを促進する非臨床評価法
3. 学会等名 第30回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川村 公一 (Kawamura Koichi) (00091801)	早稲田大学・理工学術院総合研究所（理工学研究所）・客員 上級研究員（研究院客員教授） (32689)	
研究分担者	伊藤 匡史 (Ito Masafumi) (10328429)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	