

令和 4 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12746

研究課題名(和文) 一軸配向化高靱性合成コラーゲンゲル線維束の生体内再構築に関する適応制御機序の解明

研究課題名(英文) Evaluation of the remodeling process of uniaxially aligned artificial collagen gel fibers

研究代表者

近藤 英司 (Kondo, Eiji)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：60374724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：独自の方法(特開2016-077411、特願2017-215184)を用いて、一軸配向化高靱性コラーゲン線維束を合成し、それを3次元化して合成腱マトリクスを作製した。また比較対照として、既に確立した方法を用いて天然腱マトリクスおよび完全緻密性コラーゲンを作製した。それらを家兎の関節外における生理的負荷環境に移植し、再構築過程を生体力学および組織学的に比較した。一軸配向化高靱性合成コラーゲンゲル線維束では線維方向に細胞配向性が観察された。一部は経時的に吸収され、腱組織への置換が観察されたことより生体内再構築が生じたことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、世界初の生体材料である一軸配向化合成コラーゲン線維束の生体内再構築過程を解明する独創的研究であり、生体医工学領域の重要課題である「腱・靱帯組織の機能的適応制御機構」の一端を解明しようとする学術的な研究である。本研究結果は、今後「生体内で合目的なリモデリングを受け得る合成腱マトリクス」という世界に類を見ない医用生体材料を開発するための重要な基礎情報を与えることに大きな社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：We have developed uniaxially aligned artificial collagen gel fibers with a cell invasion pathway using our continuous molding technology. Uniaxially aligned artificial collagen gel fibers was implanted in a slit prepared in the centre of the rabbit patellar tendon. After 12 weeks after implantation, the artificial tendon was absorbed and replaced to collagen tissue with cellularity. Fibroblasts were sparsely scattered between the collagen fibers.

研究分野：膝関節外科学

キーワード：コラーゲンゲル 生体内再構築 適応制御機序

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一軸配向コラーゲン線維束を主成分とする腱・靭帯マトリクスの生体内再構築現象を制御する機序の解明は、生体医工学領域における生体結合組織の機能的適応制御機序(Wolff)を解明するための重要な課題であり、国内外で多くの研究が行われてきた。研究代表者らは、独自に開発した in situ 凍結解凍処理腱組織(理想化自家腱移植モデル)を用いて、移植された腱マトリクスの適応制御機序を様々な角度から研究し、米国整形外科基礎学会の NIR Award を2回受賞(2008年、2009年)するなど、この領域において世界をリードしてきた。しかし、天然の腱における一軸配向コラーゲン線維束は階層化されており、また様々な高分子も含むため、その再構築現象の本質を解明するためには単純な一軸配向コラーゲン線維束の生体内再構築現象と比較する必要があった。しかし、そのような生体材料が存在しないために、世界の腱マトリクスの生体内適応制御機序に関する研究には行き詰まりが見られていた。

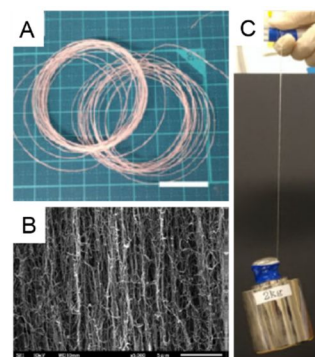


図1A) 一軸配向化合成コラーゲン線維束 B) SEM像 C) 2-Kg荷重下

世界の生体材料学領域において、一軸配向コラーゲン線維を合成しようとする試みは以前より存在した。しかし、ほぼ無配向な線維しか成型されない湿式紡糸が長年に渡り踏襲されており(Shepherd. JBMR-A 2013)、最新の電気化学的手法(Younesi et al. Adv Funct Mater 2014)を用いても配向の程度や破断強度は低く、線維径の制御も困難であった。

そこで研究代表者らは科研費補助金の支援を受けて、後述する世界初の「一軸配向化高靭性合成コラーゲン線維束(図1)」を開発して2件の特許を申請し(特開 2016-077411、特願 2017-215184)、またその学術的成果を報告してきた(JBMR-A 2015, JBMR-B 2018)。この線維束の破断応力は平均 54.5MPa であり、天然の腱・靭帯のそれと近似する。

本研究では、その一軸配向化高靭性コラーゲン線維および天然腱マトリクス(比較対照)を異なる生物学および物理的環境に移植して、それらの生体内再構築現象および影響因子の効果の差を世界に先駆けて明らかにする。さらにその結果は生体医工学領域の最重要課題の一つである「腱・靭帯マトリクスの生体内再構築現象に関する機能的適応制御機序の解明」に貢献する。

2. 研究の目的

生体内の異なる生物学および物理的環境における、線維径の異なる一軸配向化合成コラーゲン線維束(合成腱マトリクス)の再構築現象を、凍結解凍処理腱(天然腱マトリクス)のそれと比較することにより、その適応制御機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 高靭性一軸配向化合成コラーゲン線維束の作製

280 mM の塩化ナトリウムを含むリン酸ナトリウム buffer に溶解したブタ由来アテロコラーゲン(2.5%)を、38 °C の中性リン酸 buffer 中の stainless cylinder (長さ 52 mm, 径 2.0 mm)を通して 2.5 mm/s の速度で剪断力を与えながら持続的に射出し(図2)、EDC を用いた架橋後に乾燥させた。次に再度湿潤化させて一軸配向化合成コラーゲン線維束(線維径 200 μm および 800 μm)を作製し、それらを3次元化して合成コラーゲン束(直径 2 mm)を作製した。

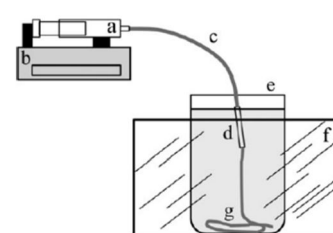


図2 一軸配向化合成コラーゲン線維束の連続成型技術

(2) 凍結解凍処理膝蓋腱(天然腱マトリクス)の作製方法

液体窒素を用いて膝蓋腱を凍結解凍処理し、内在性線維芽細胞を選択的に壊死させて理想化自家腱移植モデル(無細胞腱マトリクス)を作製した。

(3) 移植実験

実験には家兎 30 羽を用いた。研究代表者らが過去の論文で報告している手術モデル(図3)を用いて右膝蓋腱の中央 1/3 を採取し、生理的環境下において内径比率の異なる 2 種類の階層化した配向化合成コラーゲン束を移植した。左膝では凍結解凍処理膝蓋腱を移植して比較対照とした。術後 3、6、12 週で屠殺し、5 羽を生体力学的評価へ 5 羽を組織学的評価に供する。

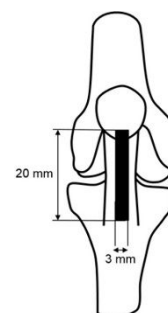


図3. 膝蓋腱中央欠損モデル

生体力学的および組織学的評価

膝蓋骨 腱 脛骨複合体を摘出し、万能試験機に組み込んだ生体軟組織材料試験システムを用いて 37 °C 生理食塩水中での引張試験を行った。更に Micro tensile tester(図4)を用いてコラーゲン fascicle の引張試験を

行った。LD 曲線および SS 曲線から引張強度、弾性率、破断歪みを算出した。

組織学的および超微組織学的観察

HE、トリイズンブルー、および III 型コラーゲン免疫染色薄切片を光学顕微鏡にて観察した。またコラーゲン線維配向の変化を SEM で観察した。更に、配向軸と垂直に超薄切片を作製し、ウラニル・クエン酸鉛染色を行って TEM により Fibril 横断面の超微細構造を解析した。

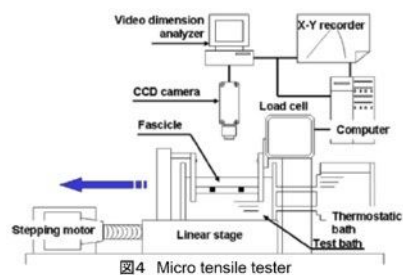


図4 Micro tensile tester

4. 研究成果

(1)高韌性一軸配向化合成コラーゲン線維束の作製

先行研究にて、線維配向性、連続形成性および形状・サイズ可変性を有する独自の配向コラーゲン線維の作製に成功したが、線維間の間隙が少なく細胞浸潤しないことが問題であった。そこで細胞浸潤し得る一軸配向化合成コラーゲン線維束を作製した(図 5)。280 mM の塩化ナトリウムを含むリン酸ナトリウム buffer に溶解したブタ由来アテロコラーゲン(2.5%)を、38 °C の中性リン酸 buffer 中の stainless cylinder (長さ 52 mm, 径 2.0 mm)を通して 2.5 mm/s の速度で剪断力を与えながら持続的に射出し、EDC を用いた架橋後に乾燥させた。次に直径 300 micrometer の紐状コラーゲンゲル 4 本にてねじり紐を作製し、内径 2 mm のシリコンゴムチューブに包埋し再度湿潤させた。最後に -80 °C ディープフリーザーに静置し、一方向性凍結法(Yunoki et al. Materials Letters 2006)を応用し、細胞浸潤チャンネルを付与した。凍結乾燥および熱架橋を行い 3 次元化一軸配向化合成コラーゲン線維束を作製した。

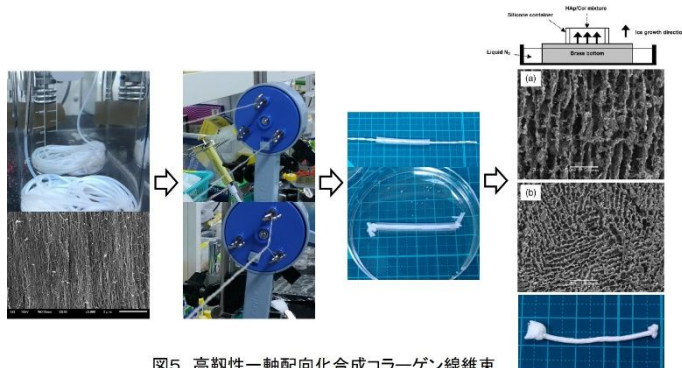


図5. 高韌性一軸配向化合成コラーゲン線維束

SEM による横断面の観察では、人工腱全体に Macro および Micropore が形成されていた(図 6)。内部構造は、fascicle (直径数 10 μ m ~ 数 100 μ m の扁平構造体) および fiber (数 μ m の柱状構造体) 構造が観察された。

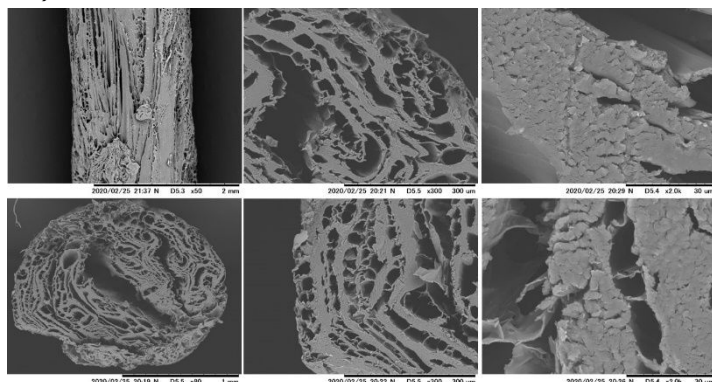


図6. SEM像

湿潤状態における引っ張り試験では、Tensile strength 0.3-0.5MPa、Young 's modulus 2-3MPa であった(図 7)。

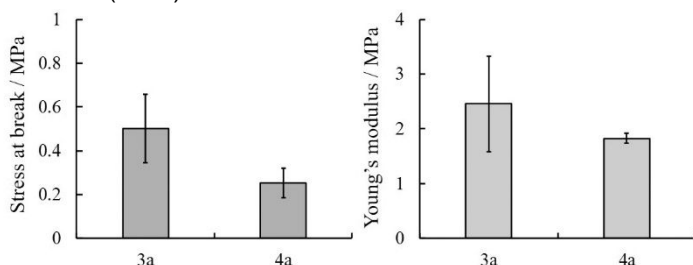


図7. 材料特性

(2) 完全緻密性コラーゲンの作製

細胞侵入性などの評価のため対照として凍結乾燥工程を用いない完全緻密性コラーゲンを作製した。SEM による矢状面での観察では、気孔構造が見られない緻密構造が観察されたが、横断面の観察では一部空隙を持つ層構造が観察された。そのため対照のコラーゲン作製方法を調整 (GA を加えて固定化、EtOH で脱水、t-BuOH 凍結乾燥法で乾燥) し、SEM にて緻密体であることを確認した (図 8)。

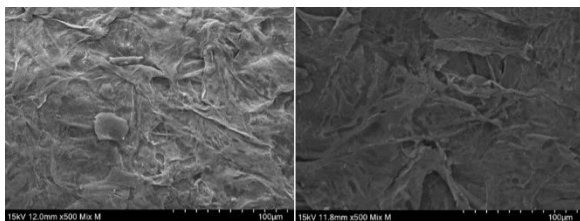


図8. SEM像

(3) 移植実験

日本白色家兎を用いた膝蓋腱中央欠損モデルを用いて合成腱マトリクスの埋植実験を行った。全身麻酔後、膝に縦切開を加え右膝蓋腱の中央 1/3 を採取し、高靱性一軸配向化合成コラーゲン線維束を移植した。左膝には完全緻密性コラーゲンを移植して比較対照とした。術後 3、6、12 週における組織学的観察では、HE 染色にて fascicle 間に紡錘形の核を有する線維芽細胞様細胞が多数観察され、線維方向に配向性が観察された (図 9)。一方、完全緻密性コラーゲンにおいてはコラーゲン内に細胞は観察されなかった (図 10)。両合成コラーゲンともに経時的に吸収され、腱組織への置換が観察された。

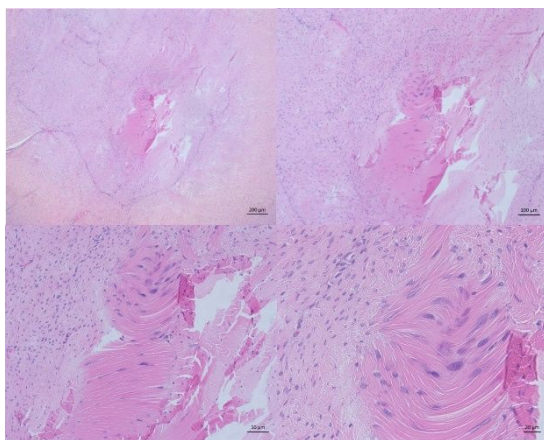


図9. HE染色(高靱性一軸配向化合成コラーゲン線維束)

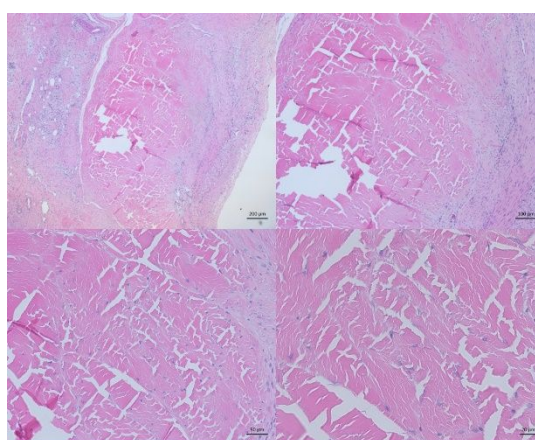


図10. HE染色(完全緻密性コラーゲン)

術後 6 週および 12 週における引張試験では弾性率は、緻密性コラーゲンが合成コラーゲンより有意に高値であったが、引張強度に有意差はなかった (図 11)。いずれのコラーゲンも経時的に力学的強度が高くなる傾向を認めた。両コラーゲンの弾性率および引張強度ともに天然腱マトリクスより有意に低値であった。そのため、今後は GAG や Proteoglycan を階層化したハイブリッド一軸配向コラーゲンゲル線維束の開発が必要である。

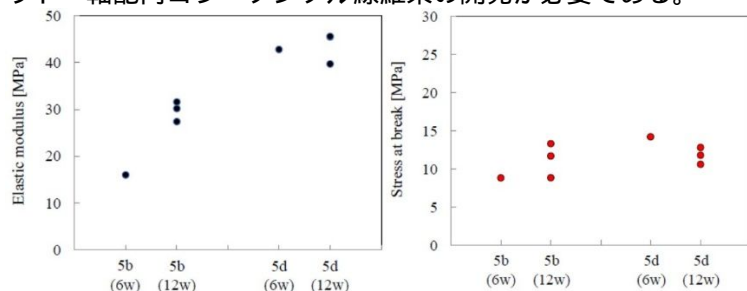


図11. 材料特性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim WY, Onodera T, Kondo E, Terkawi MA, Homan K, Hishimura R, Iwasaki N	4. 巻 48
2. 論文標題 Which contributes to meniscal repair, the synovium or the meniscus? An in vivo rabbit model study with the freeze-thaw method.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Sports Med	6. 最初と最後の頁 1406-1415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki K, Inoue M, Kasahara Y, Tsukuda K, Kawahara H, Yokota I, Kondo E, Iwasaki N, Yasuda K	4. 巻 28
2. 論文標題 Inclination of Blumensaat's line influences on the accuracy of the quadrant method in evaluation for anterior cruciate ligament reconstruction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc	6. 最初と最後の頁 1885-1893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yabuuchi K, Kondo E, Onodera J, Onodera T, Yagi T, Iwasaki N, Yasuda K	4. 巻 8
2. 論文標題 Clinical outcomes and complications during and after medial open-wedge high tibial osteotomy using a locking plate: A 3 to 7-year follow-up study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Orthop J Sports Med	6. 最初と最後の頁 23259671209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kameda T, Kondo E, Onodera T, Iwasaki K, Onodera J, Iwasaki N, Yasuda K	4. 巻 in press
2. 論文標題 Medial open-wedge high tibial osteotomy alters stress distribution patterns predicted with subchondral bone density of patellofemoral joint assessed by a computed tomography osteoabsorptiometry.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Orthop J Sports Med	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki K, Kondo E, Matsubara S, Matsuoka M, Endo K, Yokota I, Onodera T, Iwasaki N	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effect of high tibial osteotomy on the distribution of subchondral bone density across the proximal tibial articular surface of the knee with medial compartment osteoarthritis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Sports Med	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤英司	4. 巻 5020
2. 論文標題 治療法の再整理とアップデートのために 専門家による私の治療 膝靭帯損傷	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本医事新報	6. 最初と最後の頁 45-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤英司	4. 巻 39
2. 論文標題 私の整形外科診療のコツ 第11回膝前十字靭帯損傷	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 関節外科	6. 最初と最後の頁 1258-1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yunoki S, Hatayama H, Ebisawa M, Kondo E, Yasuda K	4. 巻 107
2. 論文標題 A Novel Method for Continuous Formation of Cord-Like Collagen Gels to Fabricate Durable Fibers in Which Collagen Fibrils Are Longitudinally Aligned	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biomed Mater Res B Appl Biomater	6. 最初と最後の頁 1011-1023
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34194	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim W, Onodera T, Kondo E, Kawaguchi Y, Terkawi MA, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Matsubara S, Homan K, Hishimura R, Iwasaki N	4. 巻 47
2. 論文標題 Effects of ultra-purified alginate gel implantation on meniscal defects in rabbits	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Am J Sports Med	6. 最初と最後の頁 640-650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546518816690	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Y, Yasuda K, Kondo E, Kawaguchi Y, Akita K, Yagi T	4. 巻 7
2. 論文標題 Comparison of graft length changes during knee motion among 5 different anatomic single-bundle anterior cruciate ligament reconstruction approaches: A biomechanical study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orthop J Sports Med	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2325967119834933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawaguchi Y, Kondo E, Iwasaki N, Tanaka Y, Yagi T	4. 巻 105
2. 論文標題 Autologous living chondrocytes contained in the meniscal matrix play an important role in in vivo meniscus regeneration induced by in situ meniscus fragment implantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Orthop Traumatol Surg Res	6. 最初と最後の頁 683-690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.otsr.2018.12.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kondo E
2. 発表標題 Impact of the surgical timing on the clinical outcome in anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using hamstring tendon autografts.
3. 学会等名 ACL study group meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤英司
2. 発表標題 膝靭帯再建術の現状と課題：移植腱のリモデリング促進を目指して
3. 学会等名 第5回埼玉東部エリア整形外科フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤英司
2. 発表標題 中高年者のスポーツ障害後の関節温存手術の成績：膝関節を中心に
3. 学会等名 第31回日本臨床スポーツ医学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 近藤英司, 安田和則	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金芳堂	5. 総ページ数 289
3. 書名 パーフェクト 前十字靭帯再建術 (ACL) : 遺残組織を温存した再建術	

1. 著者名 近藤英司, 安田和則, 岩崎倫政	4. 発行年 2019年
2. 出版社 整形・災害外科	5. 総ページ数 5
3. 書名 膝前十字靭帯損傷に対する遺残組織温存再建術 早期のスポーツ復帰を目指して	

1. 著者名 Yunoki S, Kondo E, Yasuda K	4. 発行年 2022年
2. 出版社 IntechOpen, London, UK	5. 総ページ数 28
3. 書名 Mechanical Methods of Producing Biomaterials with Aligned Collagen Fibrils	

〔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	安田 和則 (Yasuda Kazunori) (20166507)	北海道大学・医学研究院・名誉教授 (10101)	
研究分担者	柚木 俊二 (Yunoki Shunji) (20399398)	地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部 開発第二部バイオ応用技術グループ・上席研究員 (82670)	
研究分担者	王 磊 (Wan Rei) (70637975)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------