

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282125

研究課題名(和文) 無細胞化技術と生体組織滅菌技術による自己組織化する前十字靭帯再建デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of a tissue with in vivo regeneration capability for reconstruction of anterior cruciate ligament using decellularization and tissue-sterilization technologies

研究代表者

岩崎 清隆 (Iwasaki, Kiyotaka)

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：スポーツ等で損傷する膝の前十字靭帯の治療では、患者自身の健常な腱を採取して再建に用いている。本研究では、新しい再建組織として腱特有の構造を有するブタ腱を対象とし、脱細胞化処理する手法と滅菌する手法を確立した。異種の動物であるヒツジの膝前十字靭帯再建実験で3ヶ月間機能することを確認し、脱細胞化組織の中枢部まで生体内でヒツジの自己細胞が浸潤し、微小血管が構築されることを明らかにした。また脱細胞化ブタ由来組織の破断荷重は、ヒツジ自家アキレス腱と同程度に維持されることが明らかとなった。本研究で、患者自身の腱の採取を必要とせず治療が可能となる医療機器を開発する道を拓くデータを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In the treatment of knee anterior cruciate ligament (ACL) ruptured in sports and so on, patient's own tendon is harvested and used. In this study, as a new tissue substitute, porcine tendon was used, and decellularization and sterilization technologies of tissues were established. Experiments of reconstruction of ovine knee ACL using decellularized and sterilized porcine tendons revealed that the decellularized tissues were functioned 3 months. The tissues were repopulated in vivo with ovine autologous cells and vessels were formed. Ultimate tensile loads after 3 months implantation were comparable between decellularized porcine tissues and autologous Achilles tendons. This study opened a new way to develop a novel medical device to treat ACL without need of harvesting patient's own tendon.

研究分野：人工臓器学、組織工学

キーワード：脱細胞化組織 膝前十字靭帯再建 組織再生 生体内組織構築

1. 研究開始当初の背景

スポーツ等で断裂する膝の前十字靭帯は、大腿骨と脛骨を固定している組織であり、再建治療が必要となる。膝前十字靭帯再建術は、国内でおよそ 19,000 件/年、米国で 300,000 件/年程度行われている確立した治療である。医療機器として合成繊維を用いた人工靭帯があるものの、治療復帰後に 5 年で約半数で断裂するという課題があり、現状ではほとんどの症例で健常な患者の靭帯を腿部等から採取して使用する侵襲の高い治療が行われている。複数の靭帯を損傷した場合には、患者自身の健常な靭帯にも限りがあるため、治療が十分にできない状況も生じる。このような状況の中で、患者の靭帯の採取を必要としない、生体組織特有の粘弾性と強度を有する人工靭帯の開発が望まれている。研究代表者は、ヒトと組織の大きさが同等の動物由来組織から拒絶反応の原因となる細胞成分を完全除去した各組織固有の微細構造を維持した組織を応用し、再建後に生体内で自己細胞が入り込み自己治療能力で自己組織化が期待できる再生促進型移植組織の開発研究を推進している。

2. 研究の目的

本研究では、

- (1) ブタ靭帯を対象として、無細胞化処理及び強度保持を実現する乾燥・滅菌時の組織保護条件を確立
- (2) 靭帯の使用環境を踏まえた生体組織特有の粘弾性特性評価手法を確立
- (3) 整形外科の下肢領域のデバイス開発で米国 FDA で推奨されている膝関節に人間に似た負荷が作用するヒツジで、前十字靭帯を再建した無細胞化靭帯への細胞浸潤・炎症と組織強度を 3 ヶ月の移植実験で解明することを目的とした。

3. 研究の方法

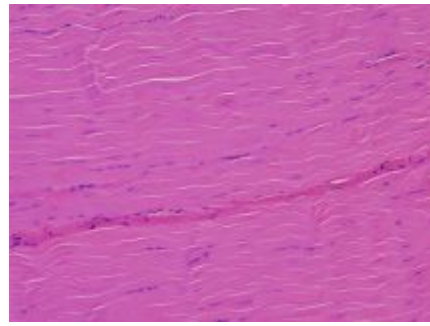
- (1) 無細胞化処理及び強度保持を実現する乾燥・滅菌時の組織保護条件の確立

動物靭帯の無細胞化処理

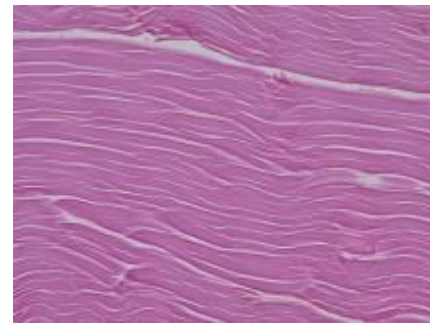
ブタ靭帯の強度保持を実現する無細胞化処理条件と凍結乾燥・滅菌時の前処理条件の確立に関して、研究を推進した。具体的には、長さ約 12cm、扁平様の断面の長軸径が約 8mm 短軸径が約 5mm のブタ靭帯を対象とし、デオキシコル酸溶液を拍動循環させつつマイクロ波を照射する脱細胞化処理を行い、その後、核酸分解酵素を組織に浸透させて処理を行い無細胞化靭帯を作製した(図 1)。無細胞化処理後の DNA 残存量を PicoGreen dsDNA Assay Kit を用いて測定した。

脱細胞化靭帯の滅菌処理

ブタ靭帯を無細胞化処理後に、水との結合に着目して開発した組織前処理法を用い、凍結乾燥およびエチレンオキサイド滅菌処理した。



(a) 未処理ブタ靭帯組織(黒い粒が細胞核)



(b) 脱細胞化処理したブタ靭帯組織(細胞核が除去されている)

図 1 脱細胞化処理したブタ靭帯組織の組織染色像

- (2) 靭帯の使用環境を踏まえた生体組織特有の粘弾性特性評価手法を確立

生体組織の力学的特性に関して精度の高いデータを取得するため、均一でない生体組織の断面積を正確に測定して引張試験を行うシステムを開発した。引張試験装置に取り付けた組織に対して周方向からレーザーで組織までの距離を測定し、厚さを測定するシステムを構築した。また、ヒツジ膝前十字靭帯再建後の組織の力学的特性を検証するため、膝関節固定治具を開発した。具体的には、並進 3 自由度、膝関節屈曲方向の回転、骨の軸周りの回転の計 5 自由度を有する治具を開発した。

- (3) 無細胞化靭帯を用いたヒツジ膝前十字靭帯再建実験

本研究は、早稲田大学動物実験審査委員会の承認を得て行った。ブタ靭帯を無細胞化処理および滅菌処理し、ヒツジの膝前十字靭帯再建実験を行った。ブタ伸筋靭帯は 2 つ折りにして再建した。3 ヶ後に摘出した組織について再建後に生体内で無細胞化組織にヒツジの自家細胞が浸潤しているかを組織染色を行い検証した。また、開発した組織固定治具を用いて力学的特性試験を行い、ヒツジの自家アキレス靭帯を用いた再建術によるデータと比較評価した。

4. 研究成果

- (1) 無細胞化処理条件の確立

無細胞化処理後の DNA 残存量は、一般的な脱細胞化の指標である 50ng/mg と比較して顕

著に除去でき、ブタ由来の腱でも無細胞化できることを実証できた。研究代表者が有する組織を無細胞化する技術を用い、残存 DNA の量という点からは安全な無細胞化腱を作製することができた。

(2) 滅菌条件の確立

組織前処理法を用いて凍結乾燥および滅菌処理した無細胞化ブタ腱について、粘弾性特性の1つの指標である応力緩和率は未処理組織と同等に保持できることがわかった。

(3) 生体腱組織の力学的評価法の開発

断面積が一樣でない生体組織について、引張試験装置にチャックした状態で組織断面積をレーザーを用いて計測可能なシステムを開発できた。ガイドレールの真円度を 0.02 としたシステムを開発し、測定を 1° 間隔で計 360 回 (360°) 行い、扇形の面積を積算して組織の断面積を計測するシステムを構築できた。本システムの計測誤差は 1% であり、これまでにない高い精度を有する生体組織の断面積測定システムを開発できた。開発した計測システムを用い、脱細胞化および滅菌処理したブタ腱の応力緩和率、繰り返し一定荷重負荷時のエネルギー散逸、破断応力を定量的に評価する試験法を確立した。本試験法を用いて、無細胞化条件、凍結乾燥における組織保護条件が組織の力学的特性に及ぼす影響を定量的に比較し、ブタ腱について最適な処理条件を選定することができた。

(4) 無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評価

ヒツジは手術当日に立ち上がり、3 ヶ月間問題なく歩行等を行うことを確認できた。摘出した組織の外観は良好であり、炎症の所見は認められなかった。摘出した再建組織についてヘマトキシリン・エオジン染色を行い、細胞核の有無を確認したところ、ヒツジの自己細胞が体内で組織の中核まで浸潤していることが明らかとなった。本研究から、異種動物由来無細胞化組織が機能し、体内で細胞が浸潤することを、ヒツジを用いた大動物実験で初めて明らかにすることができた。また、微小血管が脱細胞化組織内に体内で構築されており、自己細胞の浸潤により生体内で組織が構築され自己組織化していく特徴を有することを本実験で明らかにできた。

(5) 無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組織強度の評価

無細胞化腱を用いて膝前十字靭帯再建後の組織を大腿骨および脛骨とともに摘出し、開発した膝関節固定治具を用いて破断強度を検証した結果、無細胞化腱の破断強度は、ヒツジ自家腱を用いて再建した3ヶ月後の組織と同等に保持できることが明らかになった。ヒトと近い膝関節運動を有し、歩行等に

より負荷が作用するヒツジを用いた実験において自家腱と遜色ない強度を保持できることが明らかとなったことから、本脱細胞化腱の開発をさらに進めていくことにより、患者自身の健全な腱を他の部位から採取する必要がなく、複数の靭帯を断裂した場合にも治療が可能となる道を拓くデータを取得することができた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計15件)

- (1) 岩崎清隆, 伊藤匡史, 井柵浩貴, 高野和也, 岡村昭慶, 奥田慶也, 吉本伸之, 加藤義治, 梅津光生, 膝前十字靭帯再建術に用いる無細胞化靭帯組織の開発, 第54回日本人工臓器学会大会予稿集, s-127, 鳥取, 2016年11月25日
- (2) 奥田慶也, 伊藤匡史, 井柵浩貴, 高野和也, 岡村昭慶, 梅津光生, 加藤義治, 岩崎清隆, 無細胞化ウシ腱を用いたラット膝前十字靭帯術後の骨孔の組織再構築に関する研究, 第27回日本機械学会バイオフロンティア講演会論文集, pp.99-100, 北海道, 2016年10月23日
- (3) 岡村昭慶, 井柵浩貴, 高野和也, 奥田慶也, 岩崎清隆, 梅津光生, 膝前十字靭帯再建材料に向けた腱および靭帯の動的粘弾性特性の検証, 第27回日本機械学会バイオフロンティア講演会論文集, pp.33-34, 北海道, 2016年10月22日
- (4) 岩崎清隆, 伊藤匡史, 高野和也, 井柵浩貴, 奥田慶也, 岡村昭慶, 吉本伸之, 加藤義治, 梅津光生, 膝前十字靭帯再建に用いる脱細胞化ウシ腱の開発: ラット膝前十字靭帯再建による再生能と炎症反応評価, 第43回日本臨床バイオメカニクス学会プログラム・抄録集, p.94, 北海道, 2016年10月8日
- (5) 岩崎清隆, 伊藤匡史, 井柵浩貴, 岡村昭慶, 高野和也, 奥田慶也, 吉本伸之, 加藤義治, 梅津光生, 膝前十字靭帯再建に用いる動物由来脱細胞化靭帯組織の開発: ヒツジ膝前十字靭帯再建による安定性と強度評価, 第43回日本臨床バイオメカニクス学会プログラム・抄録集, p.94, 北海道, 2016年10月8日
- (6) M. Itoh, K. Iwasaki, H. Imasu, K. Takano, N. Yoshimoto, Y. Kato, Assessment of in vivo cellularization of a novel ligament-substitute "decellularization xenograft" derived from bovine extensor digitorum tendon in a rat model of anterior cruciate ligament reconstruction, 2016 TERMIS-AP Conference, p.46, Taipei, Sep 3, 2016
- (7) 井柵浩貴, 伊藤匡史, 高野和也, 岡村昭慶, 奥田慶也, 梅津光生, 加藤義治, 岩崎清隆, ヒツジ膝前十字靭帯再建術後の

- 自家アキレス腱の力学的特性評価に関する研究, 第 28 回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会プログラム, 1H45, 東京, 2016 年 1 月
- (8) 高野和也, 伊藤匡史, 井栴浩貴, 岡村明慶, 奥田慶也, 梅津光生, 加藤義治, 岩崎清隆, 滅菌済み無細胞化ウシ腱を用いたラット膝前十時靭帯再建術後の経時的な細胞浸潤に関する研究, 第 28 回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会プログラム, 1H46, 東京, 2016 年 1 月
- (9) 岩崎清隆, 伊藤匡史, 井栴浩貴, 高野和也, 奥田慶也, 岡村昭慶, 加藤義治, 梅津光生, 滅菌済無細胞化ウシ腱を用いたラット膝前十字靭帯再建による再生能と炎症反応評価, 第 53 回日本人工臓器学会大会予稿集, 44(2), p.s-139, 東京, 2015 年 11 月
- (10) 井栴浩貴, 岩崎清隆, 高野和也, 岡村昭慶, 奥田慶也, 梅津光生: プタ腱の力学的特性評価のための引張試験用の断面積測定装置の開発, 第 26 回日本機械学会バイオフロンティア講演会講演論文集, pp.147-148, 福岡, 2015 年 10 月
- (11) 高野和也, 岩崎清隆, 伊藤匡史, 井栴浩貴, 加藤善治, 梅津光生: 原子間力顕微鏡を用いた脱細胞化処理したプタ腱とヒト前十字靭帯のコラーゲン線維の圧縮剛性の比較, 第 26 回日本機械学会バイオフロンティア講演会講演論文集, pp.101-102, 福岡, 2015 年 10 月
- (12) 伊藤匡史, 岩崎清隆, 井栴浩貴, 高野和也, 吉本伸之, 加藤義治, 自己治癒能力を引き出す再生促進型腱(無細胞化ウシ腱)を用いたラット前十字靭帯再建実験による再生評価, 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 日本整形外科学会雑誌, 2-2-32 S1722, 89(8), 富山, 2015 年 10 月
- (13) 岩崎清隆, 伊藤匡史, 高野和也, 井栴浩貴, 奥田慶也, 岡村昭慶, 加藤義治, 梅津光生, 無細胞化腱を用いた異種動物の前十字靭帯再建による再性能評価, 第 38 回日本バイオレオロジー学会年会プログラム・抄録集 p.63, 東京, 2015 年 6 月 6 日
- (14) 齋藤竣平, 岩崎清隆, 井栴浩貴, 高野和也, 梅津光生, 前十字靭帯の引張試験のための 5 自由度を有する新規引張治具の開発, 第 27 回日本機械学会バイオエンジニアリング講演会講演論文集, pp.197-198, 新潟, 2015 年 1 月 9 日
- (15) 岩崎清隆, 伊藤匡史, 齋藤竣平, 井栴浩貴, 高野和也, 山野俊明, 加藤義治, 梅津光生, 体組織無細胞化技術と組織滅菌技術による膝前十字靭帯再建デバイスの開発, 第 52 回日本人工臓器学会大会予稿集, 43(2), p.S-58, 札幌, 2014 年 10 月 18 日

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)
名称: 生体組織の固定具及びその取付方法
発明者: 岩崎清隆、齋藤竣平
権利者: 学校法人 早稲田大学
種類: 特許
番号: 特許 2015-002681 号
出願年月日: 2015 年 1 月 8 日
国内外の別: 日本、PCT 出願

名称: 引張試験対象物の断面積測定装置
発明者: 岩崎清隆
権利者: 学校法人 早稲田大学
種類: 特許
番号: 特許願 2015-070866 号
出願年月日: 2015 年 3 月 31 日
国内外の別: 日本、PCT 出願

〔その他〕

新聞報道

- (1) 2016 年 5 月 14 日, 日本経済新聞 電子版, アスリートを科学する人(上) 早大理工学術院教授岩崎清隆氏 プタで人工靭帯, 選手救う, 滅菌対策, ヒントは虫
- (2) 2016 年 05 月 10 日, 日経産業新聞 20 ページ, アスリートを科学する人(上) 早大理工学術院教授岩崎清隆氏 プタで人工靭帯, 選手救う, 滅菌対策, ヒントは虫(働く)
- (3) 2016 年 1 月 18 日, 日本経済新聞 朝刊 15 ページ, 早大, 前十字靭帯の再建にウシの腱使い成功(Science & Tech フラッシュ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 清隆 (IWASAKI, Kiyotaka)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 20339691

(2) 研究分担者

伊藤匡史 (ITO, Masahumi)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10328429

梅津 光生 (UMEZU, Mitsuo)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 90132927

坂口 勝久 (SAKAGUCHI, Katsuhisa)
早稲田大学・理工学術院・准教授
研究者番号: 70468867

加藤 義治 (KATO, Yoshiharu)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00143850