

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 24 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16676

研究課題名（和文）再生医療の基盤となる自然治癒しない動物腱変性モデル作製技術の確立

研究課題名（英文）Creating an Animal Model of Tendinopathy for regenerative medicine

研究代表者

三木 慎也（Miki, Shinya）

帝京大学・医学部・助手

研究者番号：70647982

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、独自に開発した加熱装置を用いてウサギのアキレス腱を加熱し、自然治癒しない腱変性の作製を試みる計画であった。加熱時間を変えて腱変性の有無を調査することにより、腱変性モデル作製における至適加熱時間を明らかにすることを第一段階の目的とした。このため、申請者らは株式会社SI設計（埼玉県入間市）と協力して独自の腱加熱装置を設計した。しかし、本装置の製作段階において、加熱装置と針の連結がうまくいかず、針先を一定の温度に保つことが実現できず、本装置を完成させることができなかった。従って、腱変性モデルの作製を実現できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床の場においては、手術療法を行ったにもかかわらず症状が残存する腱症の症例が少なからず存在する。近年、腱症に対する再生医療の有効性が報告されてきているが、腱症モデルの妥当性に問題があり、その有効性は確立されていない。そのような現状の中、本研究は整形外科臨床に直結する意義のある研究である。本研究により腱症モデルの作製法が確立すれば、腱症の診断・治療に劇的な進歩をもたらすことが期待できる。東京オリンピックを控え、健康増進のために余暇をスポーツ活動にあてる国民が増加する中、本研究を基盤とした、難治性腱症に対する再生医療による新しい効果的な治療法が開発されれば、大きな社会貢献につながる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we planned to heat rabbit Achilles tendons using a heating device we had developed and attempt to produce tendon degeneration that would not heal spontaneously. The first objective of this study was to determine the optimal heating time for the creation of tendon degeneration models by investigating the presence or absence of tendon degeneration at different heating times. For this purpose, the applicants designed their own tendon heating device in cooperation with SI Sekkei (Iruma City, Saitama). However, during the fabrication stage of the device, the connection between the heating device and the needle did not work properly, and it was not possible to maintain the needle tip at a constant temperature. Therefore, the fabrication of the tendon degeneration model could not be realized.

研究分野：整形外科学

キーワード：腱症 再生医療 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腱症とは、継続的にかかる過剰な負荷によって「腱の変性」が起こった状態であり、自然治癒しないことが知られている。近年、腱変性に対する再生医療が注目されてきており動物腱変性モデルを用いた基礎研究が散見される。しかし動物モデルにおいて、既存の方法で人為的に作成した腱変性は、しばしば自然治癒してしまう事が明らかになった。つまり、現時点において、腱変性に対する再生医療の効果を正確に判定する動物モデルはない。我々は腱変性の病態であることが示唆されている腱負荷時の温度上昇に着手した。本研究では、独自に開発した加熱装置を用いてウサギのアキレス腱を加熱し、自然治癒しない腱変性の作製を試みる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腱内部を加熱することにより自然治癒しない腱変性を作製できるか否かを明らかにし、難治性疾患である腱変性の診断・治療法の開発に必須である「動物腱変性モデルを確立すること」である。本研究の独自性は、腱変性モデルの作製に加熱装置を用いる点にある。前述のように、過去の研究では腱ヘコラゲナーゼを注射することで変性モデルを作製しており、加熱による腱変性モデルの作製を試みた研究はない。この研究により、腱変性の病態解明および治療における大きな進歩が期待できる。腱変性モデル作製技術の確立によって、腱変性に対する診断・治療技術の基盤が確立され、再生医療の発展に寄与できると考えられる。

3. 研究の方法

平成30年度

動物アキレス腱変性の作製に必要な加熱時間の検討

腱変性の発生には腱内部の温度上昇が深く関与しているとされている。しかし、加熱時間をどのくらいにすると腱変性が生じるかは知られていない。本研究では、加熱時間を変えて腱変性の有無を調査することにより、腱変性モデル作製における至適加熱時間を明らかにする。このため、申請者らは株式会社SI設計（埼玉県入間市）と協力して独自の腱加熱装置を設計した。これは、注射器型の本体と加熱装置で構成される。本体の先端にある10mmの針を、超音波ガイド下に腱内部へ刺入する。本体と加熱装置を連結して針に電流を流し、針の先端2mmのみを加熱する。ウサギにおけるアキレス腱の厚みは3mm程度であるため、確実に腱のみを加熱することが可能となる。

実験は以下の手順で行う。

1. ウサギ10羽20後肢を対象とする。そのうち9羽18後肢に対し全身麻酔下に、両後肢アキレス腱附着部から3cm近位で加熱装置の針をアキレス腱内に挿入し、腱中央まで進める。加熱温度を45度に設定し、腱を加熱する。加熱時間は10分：6肢、20分：6肢、30分：6肢とする。一方、ウサギ1羽2後肢をコントロールとする。
2. 全個体とも処置後4週で動物実験倫理委員会規定に従い安楽死させ、アキレス腱を採取して変性部の組織学的評価を行い、変性が生じているかどうかを確認する。ま

た、各群を比較し、加熱条件による変性の違いを明らかにする。変性の評価は、HE染色標本により細胞数、血管新生および線維配列の乱れの程度を、コラーゲン免疫染色によりタイプ およびタイプ コラーゲンの発現を確認することで行う。これらはすべて、コントロールにおける同部位アキレス腱の組織学的所見と対比することにより厳密に行う。この手技により、変性に必要な至適加熱条件を確定する。

平成31年度以降

加熱およびコラゲナーゼにより作製した腱変性モデルの組織学的検討
動物腱変性モデルは、従来から腱へのコラゲナーゼ注射により作製されてきた。しかし、薬剤による腱変性は本来の変性と機序が異なることが報告されている。本過程では、加熱およびコラゲナーゼ注射により作製された動物腱変性モデルにおける組織学的な相違を明らかにする。

実験は以下の手順で行う。

1. ウサギ5羽10後肢を対象とする。全身麻酔下に、5肢には加熱装置を用いて、5肢にはコラゲナーゼ注射を用いて、アキレス腱付着部から3cm近位に変性モデルを作製する。加熱による腱変性作製においては、研究計画 で明らかになった至適な加熱条件を適用する。コラゲナーゼ投与量は、ウサギのモデル作製において過去の研究で報告されている250IUとする。
2. 全個体とも処置後4週で動物実験倫理委員会規定に従い安楽死させ、アキレス腱を採取して組織標本作製する。HE染色標本により細胞数、血管新生および線維配列の乱れの程度を、コラーゲン免疫染色によりタイプ およびタイプ コラーゲンの発現を確認し、変性の評価を行う。加熱による変性モデルとコラゲナーゼによる変性モデルを比較し、両者組織学的な違いを明らかにする。

加熱による腱変性が自然治癒しないことの検証

コラゲナーゼにより作製された腱変性は、動物によっては約4週間で自然治癒することが報告されている。本研究は安定して自然治癒しない動物腱変性モデルの作製技術を確立することが目的であるため、加熱により作製した腱変性が自然治癒しないことを確認する必要がある。

実験は以下の手順で行う。

1. ウサギ9羽18後肢を対象とする。全身麻酔下に、加熱装置を用いて、アキレス腱付着部から3cm近位に変性モデルを作製する。加熱による腱変性作製においては、研究計画 で確認した至適な加熱条件を適応する。
2. 処置後、それぞれ4週・8週・12週で、動物実験倫理委員会規定に従いイヌを安楽死させ、アキレス腱を採取して組織標本作製する。個体の内訳は、4週：6肢、8週：6肢、12週：6肢とする。HE染色標本により細胞数、血管新生および線維配列の乱れの程度を、コラーゲン免疫染色によりタイプ およびタイプ コラーゲンの発現を確認し、変性の評価を行う。これにより、変性が治癒せずに持続していることを証明する。

—

1 年目（平成 30 年度）において、まず加熱装置の作製に着手した。装置の概要は完成したが、ウサギの腱の加熱実験を行う段階には至らなかった。

機器の検収には至らなかったため費用は発生しなかった。

2 年目（令和元年度）は作製した加熱装置の試作を用いて問題点を検証した。当初は針の先端 2mmのみを加熱する計画であったが、加熱装置と針との連携がうまくいかず、針先を一定の温度に保つことが出来ず、本年においても動物実験を行う段階には至らなかった。機器の検収には至らなかったため費用は発生しなかった。

3 年目（令和 2 年）にいたっても、針との連結の問題が解消されず、動物実験を行う段階には至らなかった。機器の検収には至らなかったため費用は発生しなかった。（完成しない機器のため設計業者より支払いが不要との申し出があった。）

本研究は、この加熱装置の完成がなければ研究の遂行が出来ない。今後においても機器の完成のめどが立たなかったため、本研究は一時凍結する事として、終了報告を作成した。今後は加熱装置の作製等を含めた研究計画を見直して、再度研究の方向を検討したい。

本研究は目的を達成出来なかったが、加熱装置等の作製において問題点が明らかになった。本研究では、ウサギのアキレス腱の厚みが通常 2-3mm であることから、径 0.5-0.7mm の針を加熱装置に用いた。しかし、この径の針に加熱装置、温度センサーなど複数の機器を連結することは、技術上きわめて困難であると言わざるを得ない。技術者と検討した結果、径 2mm を超える針ならば、これらの装置を連結できる可能性がわずかに見いだせた。しかし前述のとおり、ウサギのアキレス腱の厚みは 2-3mm であるため、この径の針を確実に腱内に留置することが極めて困難であると予想される。よって次期研究を行う場合は、径 2mm 以上の針を用いること、そしてこれに対応したアキレス腱の厚みを持つ動物を選択することが、今後の研究課題として明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------