

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591751
 研究課題名（和文） 人工コラーゲン・アパタイト複合体と生体活性セメントを用いた骨軟骨欠損の修復
 研究課題名（英文） Repair of osteo-chondral defect using artificial collagen - apatite compound and bioactive cement
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：鈴木 昌彦（SUZUKI MASAHIKO）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：10312951

研究成果の概要：

人工コラーゲン・セメントディスク複合体に白色家兎由来の軟骨細胞を注入して培養すると、軟骨細胞の増殖能とプロテオグリカンの産生能はウシ type II コラーゲン・セメントディスク複合体に軟骨細胞を注入群より良好だった。しかし、実用化には人工コラーゲン・スカフォールドの強度が不十分なことが問題であり、強度が改善できればプリオンなどの感染のリスクのない新規スカフォールドとして利用可能である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床学・整形外科学

キーワード：関節病学 軟骨 再生 セメント

1. 研究開始当初の背景

外傷による骨軟骨欠損、骨壊死による骨軟骨損傷、変形性関節症による軟骨欠損の修復を目的として、マイクロフラクチャー法、自家骨軟骨柱移植術（モザイクプラスチック）、自家培養軟骨移植術等が行われている。しかし、モザイクプラスチックや自家培養軟骨移植術では広範囲は欠損を修復することができなかった。また、広範囲の欠損には軟骨移植のためのスカフォールドが必要であるが、異種コラーゲンを使用するため、プリオンな

どの感染のリスクがあった。

2. 研究の目的

異種コラーゲンを使用せず、人工合成によるコラーゲンスカフォールドを用いて生体に安全な軟骨培養を可能にすることである。また、生体活性セメントディスクを骨欠損部側に用いて、この人工コラーゲンスカフォールドと組み合わせた複合体を作製して、骨軟骨欠損の修復を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 白色家兎より麻酔下に関節軟骨を採取し、軟骨細胞を分離した。この軟骨細胞を人工コラーゲン・生体活性セメントディスク複合体とウシ type II コラーゲン・生体活性セメントディスク (コントロール) に注入して 1 週、2 週、3 週と培養後、トルイジン・ブルー標本を作製した。それぞれで、ヘキストダイによる DNA 量の測定、DMMB 法によるプロテオグリカン含有量の測定を行った。real-time PCR を用いて type II コラーゲン、アグリカンの mRNA の定量を行った。

(2) 生体活性セメントディスクと従来の PMMA セメントディスク (コントロール) 上で骨芽細胞を培養して、3 日、7 日、21 日で osteocalcin、osteopontin、osteonectin、collagen type I の mRNA の定量を real-time PCR で行った。また、培養液と 4-nitrophenyl phosphate 液を用いて ALP 活性を測定した。培養したディスクをアリザリンレッド染色して石灰化度を評価した。

(3) 径 5mm の生体活性セメントディスク上に人工コラーゲンスカフォードを組み合わせた複合体に白色家兎より採取した軟骨細胞を注入して 2 週間培養した。白色家兎の膝関節に径 5mm の骨軟骨欠損部を作製して培養した複合体を移植した。骨軟骨欠損を作製しただけをコントロールとして用いた。

4. 研究成果

(1) 培養実験のトルイジンブルー染色ではウシ type II コラーゲン・セメントディスク複合体に軟骨細胞を注入すると、複体内では 1 週、2 週、3 週と段階的に軟骨細胞が徐々に増殖しているのが確認された。人工コラーゲン・セメントディスク複合体では、1 週の軟骨細胞の生着はウシ type II コラーゲン・セメントディスク複合体より悪かったが、2 週、3 週では顕著な軟骨細胞の増殖が確認できた。

(2) DMMB 法によるプロテオグリカン量の測定では、ウシ type II コラーゲン・セメントディスク複合体は 1-3 週を通じて約 40ug だったが、人工コラーゲン・セメントディスク複合体では 1 週が約 40ug に対して 3 週では約 100ug に増加していた(図 1)。

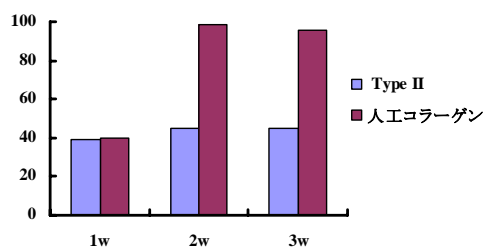


図 1 軟骨細胞のプロテオグリカンの産生 (μg)

ヘキストダイによる DNA 量の測定ではウシ type II コラーゲン・セメントディスク複合体では 1-3 週を通じて変化がないのに対して、人工コラーゲン・セメントディスク複合体では 3 週で 1 週の 3.5 倍に DNA 量が増加していた (図 2)。

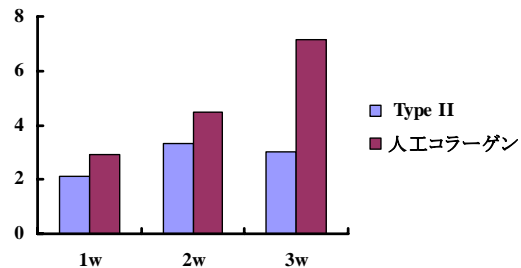


図 2 軟骨細胞の DNA 量 (μg)

Real-time PCR を用いた検討では、培養 3 週の時点で人工コラーゲン・セメントディスク複合体における type II コラーゲン mRNA の発現はウシ type II コラーゲン・セメントディスク複体の約 4 倍に増加していた。また、アグリカン mRNA の発現も培養 3 週で人工コラーゲン・セメントディスク複合体はウシ type II コラーゲン・セメントディスク複体の約 4 倍となっていた。

(2) 骨芽細胞を培養して 3 日、7 日、21 日の時点で、osteocalcin と osteopontin の mRNA の発現が、PMMA ディスクより生体活性セメントディスクで亢進していた。アリザリンレッドによる石灰化は培養後 21 日で、PMMA ディスクより生体活性セメントディスクで亢進していたが、ALP 活性には差が見られなかった。

(3) 人工コラーゲン・セメントディスク複合体に軟骨細胞を注入して白色家兎の膝関節の骨軟骨欠損部に移植したが、人工コラーゲンスカフォードの強度がまだ不十分のため一定の成績を得ることはできなかった。しかし、人工コラーゲン・セメントディスク複体の強度を改善すればプリオンなどの感染のリスクのないスcaフォードとして利用可能と考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Matsuki K, Sasho T, Nakagawa K, Tahara M, Sugioka K, Ochiai N, Ogino S, Wada Y, Moriya H; RGD peptide-induced cell death of chondrocytes and synovial cells. J Orthop Sci., 13(6), 524-32, 2008 査読有り
- ② Moriya T, Wada Y, Watanabe A, Sasho T, Nakagawa K, Mainil-Varlet P, Moriya H; Evaluation of reparative cartilage after autologus chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans: histology, biochemistry, and MR imaging. J Orthop Sci., 12(3), 265-73, 2007. 査読有り
- ③ 荒井桃子、中川晃一、成川雅俊、守屋拓朗、佐粧孝久、和田佑一、高橋和久；3次元培養関節軟骨細胞に対する多血小板血漿 (Platelet-rich plasma) 由来フィブリンゲルの効果 膝、32(1)、5-8、2007 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① 鈴木昌彦、宮城仁、付岡正、小林達也、杉野篤史、大槻主税、高橋和久 Platelet-rich plasma を添加した α -TCP porous ceramic 多孔体の生体活性 (日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 予稿集, 236, 2008 年 11 月 17 日) 東京
- ② 中川晃一、佐粧孝久、荒井桃子、Faloth Louay、鈴木昌彦、鶴岡弘章、守屋拓朗、和田佑一、守屋秀繁、高橋和久 変形性膝関節症患者の軟骨細胞に対する自家多血小板血漿の効果 (日本整形外科学会雑誌 82, S1124, 2008 年 10 月 24 日) 京都
- ③ 鈴木昌彦、森慎一郎、中川晃一、佐粧孝久、遠藤真広、棚田修二、羽石秀昭、高橋和久 整形外科領域における四次元 CT の応用 (日本整形外科学会雑誌 82, S1108 2008 年 10 月 24 日) 京都
- ④ 北原聡太、中川晃一、佐粧孝久、荒井桃子、和田佑一、守屋秀繁、小川哲郎、中島武彦、舩田浩一、Robert LS、高橋和久 骨軟骨欠損治療のための新しい移植用軟膏—人工骨複合体の開発— (日本整形外科学会雑誌 82, S1120, 2008 年 10 月 24 日) 京都
- ⑤ 杉岡佳織、佐粧孝久、中川晃一、松木圭

介、守屋秀繁、高橋和久 アミノ酸配列に依存した RGD ペプチドが誘導する軟骨・滑膜細胞のアポトーシス (日本整形外科学会雑誌 82, S1205, 2008 年 10 月 24 日) 京都

- ⑥ 鈴木昌彦、宮城仁、小林達也、鶴岡弘章、佐藤進一、松浦龍、佐粧孝久、中川晃一、杉野篤史、大槻主税、高橋和久 Platelet-rich plasma を添加した α -TCP porous ceramic の形態学的評価 (日本整形外科学会雑誌 82, S960, 2008 年 10 月 23 日) 京都
- ⑦ 渡辺敦也、中川晃一、鶴岡弘章、山下剛司、大久保敏之、豊根知明、山田晴耕、松木圭介、佐粧孝久、神川康他、和田佑一 三次元培養軟骨の MRI による多角的組織組成評価 (日本整形外科学会雑誌 82, S1018, 2008 年 10 月 23 日) 京都
- ⑧ 渡辺敦也、大久保敏之、守屋拓朗、佐粧孝久、中川晃一、小島隆行、山下剛司、落合信靖、山田晴耕、池平博夫、和田佑一 遅延相軟骨造影 MRI による関節軟骨のグリコサミノグリカン評価 (日本整形外科学会雑誌 82, S951, 2008 年 10 月 23 日) 京都
- ⑨ 守屋拓朗、佐粧孝久、中川晃一、北原聡太、鶴岡弘章、荒井桃子、高橋和久、和田佑一、山下剛司、守屋秀繁 関節軟骨細胞との共培養が滑膜細胞の軟骨分化に与える影響の解析 (日本整形外科学会雑誌 82, S991, 2008 年 10 月 23 日) 京都

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：人工コラーゲンを用いた軟骨培養と
軟骨修復

発明者：鈴木 昌彦

権利者：千葉大学

種類：特許権

番号：特願 2009-112217

取得年月日：平成 21 年 5 月 1 日

国内外：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 昌彦 (SUZUKI MASAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：10312951

(2) 研究分担者

中川 晃一 (NAKAGAWA KOUICHI)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：30400823

(3) 連携研究者

なし