

3D バイオプリンタでつなぐ関節治療の再生医工学研究と 関節鏡手術シミュレータ研究の融合

A combination study between tissue engineering and simulator with 3d bio-printer

主任研究員名：花之内 健仁

分担研究員名：澤井 猛、内田 宗志、大槻 周平、森山 博由、森山 麻里子

本研究は、本学工学部機械工学科 澤井猛 准教授、産業医科大学医学部 内田宗志 診療教授、大阪医科大学医学部 大槻周平 講師、近畿大学薬学総合研究所 森山博由 准教授、森山麻里子 准教授のご協力により実現できた研究である。

昨今、平均寿命でなく健康寿命の向上が最重要課題の 1 つであると認識されている。健康寿命に影響する疾患の 1 つが、変形性関節症であり、総人口の 27% を占める高齢者（65 歳以上）の 55% が罹患していると言われている。病態は、関節の動きをスムーズにする軟骨がすり減り、最終的には骨の変形を来し、関節全体に著明な疼痛を生じるものである。変形性関節症のきっかけは、軟骨自身のみならず・関節の安定性をはかるための、半月板・関節唇・靭帯等関節内の軟部組織の損傷が契機で引き起こされることがわかっている。変形性関節症の治療に関して、まずは、薬物療法、運動療法、関節内注射療法など非手術療法が選択され、長期にこれらの治療を継続しても効果がない場合、人工関節に置換する手術が選択される。従来、この非手術治療と、大きな侵襲を伴う手術治療との間の大きな溝をうめる治療が全くない状況であった。これには軟部組織自体に血行が十分でなく、自己再生能力が低いという理由があった。しかし、現在では、自分の組織をいったん体外に取り出し、培養などで成長させ、それを移植するといった再生医療への期待が高まっている。

この人工的に製造された再生組織を損傷した部位に置換するという事を考えた場合、いくつかの課題があることに気づく。まずどのように置換するかということである。これには、今ある組織を採取し、そこから未分化な他の組織に置換できるような細胞、つまり幹細胞にして培養などをして、3D バイオプリンタで細胞を含めた組織として生体に戻すことを想定するが、まだどんな組織が良いかなどの検討が必要である。このため、森山博由先生と森山麻里子先生と共同研究をすることで、組織の分化能について評価する研究を行った。

他の課題としては、再生組織が置換された場合に、経過が良好なのかどうかを把握するためであっても、その組織を生体から取り出すことはできない。なので、生体内で、取り出さずにその組織の状況を把握する必要がある。このため、もとの組織の機械特性を把握しておく必要があるが、そもそも、現在の手術において組織の機械特性を把握できるツールがなかった。なので、これを開発したというのが、私の行った研究となる。

そして、再生医療用の手術としては、当然侵襲の少ない手術方法が選択されるべきで

あったので、整形外科領域においては、内視鏡で行う関節鏡が推奨されるはずである。その手術における機械特性を調査する実験研究を組んだのが、澤井先生、大槻先生、内田先生と共同した研究となる。そしてこれらの研究から得られた知見を基に、非生体材料を用いた生体を模倣した手術対象部位を再現することができれば、現在の手術に適した技能を学ぶことができる手術シミュレータが開発できるはずであると考えた。さらにその非生体材料を、先の森山両先生の研究結果などを参考に、生体材料でシミュレータを作成できれば、再生医療に最適なシミュレータが製造できるはずである。そんな思いで今回の研究を行った。

森山両先生とは、変形性膝関節症が原因で、人工膝関節全置換術を施行された患者様の膝関節から採取した皮下脂肪組織、軟骨組織、滑膜組織、膝蓋下脂肪組織より採取した間葉系幹細胞の軟骨細胞および脂肪細胞への分化誘導の検討をして頂いた。それらの組織から間葉系間質幹細胞を樹立して、一部は、**Chondrocyte Differentiation Medium** および **Adipocyte Differentiation Medium** を用いて軟骨細胞および脂肪細胞への分化を誘導し、その状態を観察した。また、分化誘導から 14 日後の細胞から total RNA を回収し、**Quantitative polymerase chain reaction : qPCR** 法を用いて、遺伝子の発現を確認した。結果から、膝蓋下脂肪体か滑膜より樹立した **MSC** が、軟骨細胞ないし脂肪細胞への分化能力に長けると判断できた。

澤井猛先生とは、再生医療を行うための関節鏡手術シミュレータを作成するにあたり、まずは現在の医療で行われている関節鏡手術がシミュレータで再現できるようにする必要があった。つまり、硬組織である骨に関しては硬さを再現できるように、軟部組織である関節唇・関節包など関節内の組織や、筋肉といった関節外の組織については、牽引した時の弾力性などを再現する必要がある。この中で澤井先生と共同で骨の強度について調査する研究を施行した。エンドミルバーによる骨皮質の掘削では骨にかかるスラスト **5N** 以下であり、これをシミュレータ作成の参考値にできることがわかった。また手術器具の違いについても明らかにできた。

大槻周平先生とは、膝関節の軟部組織である半月板の再生をバイオプリンタで行うことを一つの目標とした場合に、自分の開発したプローブ機器が移植後の半月板の病態把握できるかを確認する目的で、開発したプローブ機器によるブタ半月板の強度計測を行った。結果から半月板をプローブ機器で計測することが可能であり、再生組織を置換したあとの経過 **0** を計測・予測できる可能性が確認できた。

内田宗志先生とは、実際に臨床で行われている股関節鏡手術において、術中の股関節唇の病態把握として、機械特性評価ができるかどうかを、開発したプローブ機器で評価した。結果から、関節唇が損傷している場合には、**5N** 近辺の抵抗力になっており、そうでない場合は **10N** 近辺であることから、損傷の有無を抵抗力によって計測しうることが明らかとなった。得られた値は、今後この組織が再生組織で置換されることを想定した場合の、経過観察をもプローブ機器で評価できる可能性が示唆された。

以上より、一つひとつの研究は、それぞれ小さいことであるかもしれないが、全体としてみた場合に、当初の描く研究体系を前進させることができたと考える。

再生医療を考慮した関節鏡手術における 軟部組織の機械特性を評価できるプローブ機器の開発

花之内 健仁（工学部機械工学科）

主任研究員が分担研究として行った研究は、「再生医療を考慮した関節鏡手術における軟部組織の機械特性を評価できるプローブ機器の開発」である。来るべき再生医療が行われる時代になった場合、再生組織を置換するため、組織の経過を確認するために組織を抽出して調べることができない。荷重関節に置換される軟骨などを代替する再生組織は、組織の機械特性調査が必要であったが、それが現在ではできない状況であったため、上述したプローブ機器開発を行ったというのが経緯である。もちろん従来から行われている関節鏡手術において関節内の軟部組織の病態把握をする場合にも、金属の耳かきのような棒状のもので組織をつついたり、引っ張ったりするが、それでは定性的評価に過ぎず、なんらかの定量的評価が可能なツールがあればと考えていたこともある。

このプローブ装置は、通常関節鏡下プローブの半分の長さ(200mm)のプローブ部分と、プローブ先端の3軸の力を測定するために歪みゲージセンサーが埋め込まれたグリップコンポーネントからなる(Fig.1)。

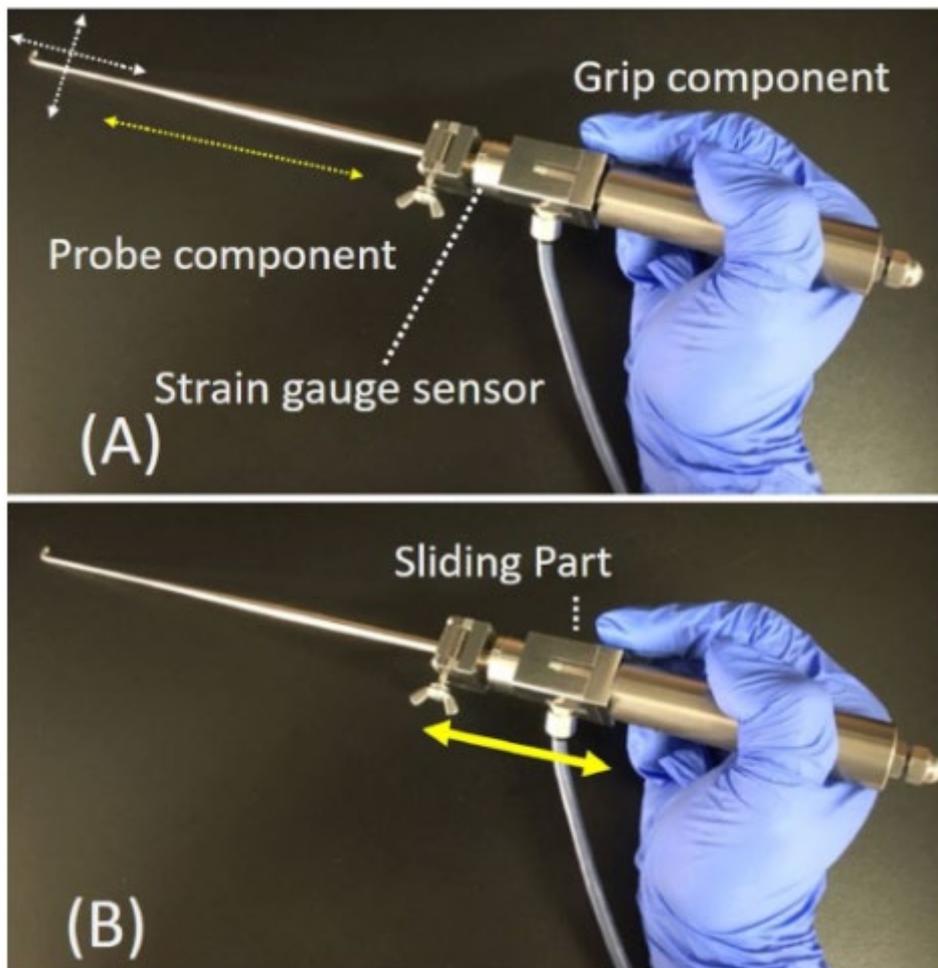


Fig.1 開発したプローブ機器。2つのコンポーネントの間にゆがみセンサーが内蔵されている(A)。手によって把持する部分から前後にスライドできる部分をもつ(B)。

歪みゲージセンサーは、このプローブ専用で作られたものではあるが、x 軸、y 軸、z 軸に対応する 3 つのホイートストーンブリッジが組み込まれており、歪みゲージの抵抗値が、適用さ負荷の大きさに応じて変化することから、ブリッジの midpoint 電圧が変化し、力を電気信号として検出することができるものになる。このプローブデバイスの解像度は 0.005 N で、精度については、既知の重量(50g)を有する商品化重量によっても測定したところ、正確度は 0.013 N、精度は 0.0035 N であった。専用ソフトウェアによって、x、y、z 方向(x は横方向、y は垂直方向(フックの方向)、z はプローブ軸)の 3 つの別々のグラフとして 50Hz の周波数でリアルタイムに測定される。

本研究では、プローブ装置の有用性を評価するために、1 つめとしては、股関節の模型を用いて関節唇の強度を計測し、その関節唇の状況に応じて計測結果に違いが生じる可能性を検討し、2 つめとしては、このプローブ機器で軟骨を模擬した材料の上を滑らすことによって、強度の評価ができるかを検討した。

1 つめの結果としては、通常の間節鏡手術を施行する状況下に股関節唇をプローブで牽引したところ、引張に対する抵抗力は、4.4 N(0.2 N 標準偏差 (SD))、ナイフでカットした場合は 1.6 N(0.1 N SD)、さらに通常の器機で関節唇を縫合した場合 4.6 N(0.7 N SD)であったことがわかった。

2 つめの結果としては、硬さの異なるサンプルで、プローブ機器にてサンプルの硬さを調査したデータと、そのサンプルを圧縮試験器で計測したデータとの相関は、相関係数 $r = 0.965$ で p 値は $p = 0.0044$ であった。

結論として、開発したプローブ機器は、軟組織の機械特性を定量的に測定することができ、関節軟組織の病態を定量的に評価するのに有用であることが示唆された。

股関節鏡手術骨削用ドリルの加工特性

澤井 猛（工学部機械工学科）

本研究は、本学工学部機械工学科 花之内健仁教授の共同研究組織の中で展開された研究である。

再生医療を行うための関節鏡手術シミュレータを作成するにあたり、まずは現在の医療で行われている関節鏡手術がシミュレータ上で再現できるようにする必要がある。このため、組織の一部である骨の強度を再現したい、ついでには手術中の状況に近い状況で骨強度を計測するというを行いたいという希望依頼があったため、共同研究を検討することになった。協議の結果、シミュレータでは、実際の手術器具を用いて練習することが一般的なようであったので、実際の手術器具を用いての評価方法を検討することになった。

対象となる部位は股関節であった。近年、病態の研究が進んできた部分であり、手術手技の一つとして、変形した大腿骨骨頭を球状のエンドミルを用いて、一部を掘削する（Fig.1）ということであったので、このエンドミルを用いて骨を削ることによって得られるデータを、将来のシミュレータづくりに貢献できればと考え、以下のような実験系を組んだ。



Fig. 1, 1 変形している
大腿骨頭



Fig. 1, 2 変形した所
を削った大腿骨頭



Fig. 1, 3 骨を削っている
エンドミル

自身の研究室で所持しているスラストを評価する器械「実験用マイクロドリル加工 2 号機」(Fig.2)を用いて、上方に手術で使用する球状のエンドミル「Stryker 製 5.5mm ランドバー」および「Stryker 製 5.5mm ラウンドダイヤモンドバー」を取り付けて、乾燥骨皮骨に対して、切削速度： $F=6\text{mm}/\text{min}$ 、掘削距離：約 10 ミリで掘削を行い、そのときのスラストを計測した。またエンドミルの回転速度は、8000rpm、10000rpm、12000rpm を用意した。

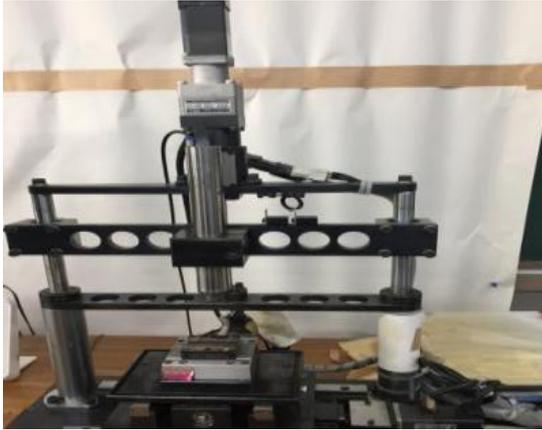


Fig.2 今回使用した機械「実験用マイクロドリル加工2号機」

ラウンドバー8フレートの場合の平均スラストは、8000rpmでは3.7N、10000rpmでは3.5N、12000rpmの時では2.2Nだった。一方、ラウンドダイヤモンドバーの場合の平均スラストは、8000rpmでは4.7N、10000rpmでは3.9N、12000rpmの時では2.9Nだった。

結果から、エンドミルバーによる骨皮質の掘削では骨にかかるスラスト5N以下であり。これをシミュレータ作成の参考値にできることがわかった。また手術器具の違いについても明らかにできた。

期待された以上の研究結果（値がでること、手術器具によつての違いも明らかにしたこと）ができたこと、同一学科での共同研究が実現できたことは大変意義深いものであったと考える。

股関節鏡手術における関節唇の抵抗力評価

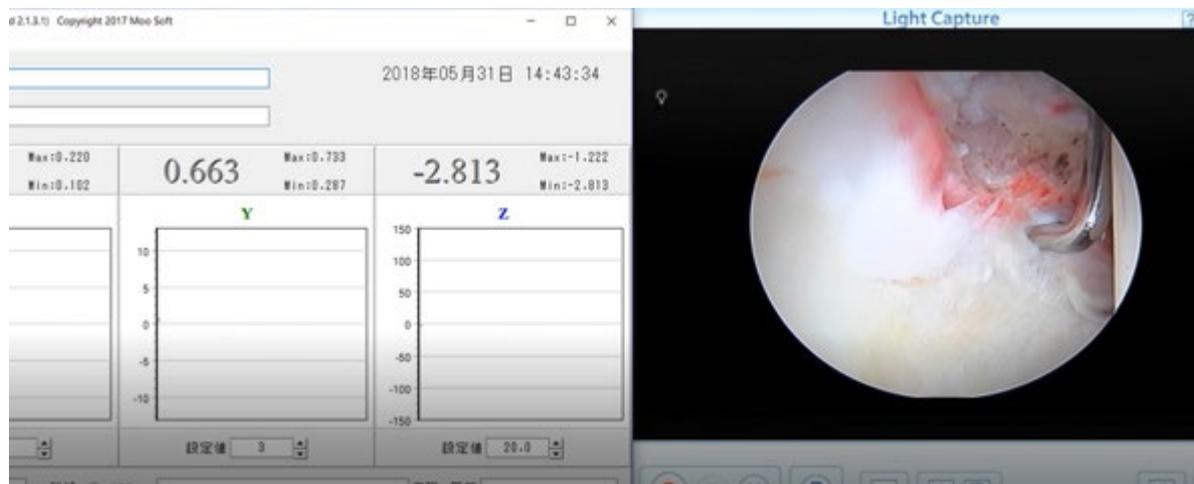
内田 宗志（産業医科大学）

分担研究者は、全ての関節鏡手術に対応できるスポーツ整形外科医である。股関節鏡手術においては、手術症例数が年間 200 例以上の蓄積によって確かな治療体系を確立していることから、今回の共同研究の依頼があった。

本研究は、実臨床での股関節唇の機械特性の評価を行った。股関節唇の病態把握を行えるだけでなく、近い将来行われるはずである関節唇の再生組織製造へとつながる重要な知見になると考えたからである。

計測可能であった症例は、5 症例（年齢幅：28-58 歳）いずれも“大腿骨寛骨臼インピンジメント”といって、大腿骨近位骨頭部分が過形成によって球形を維持できなくなり、股関節の可動時に受けてとなる寛骨臼側に付着する関節唇を損傷する病気に罹患した患者である。

主任研究員の花之内氏が開発・作成した軟部組織の抵抗力を計測できるプローブ機器で、手術中の関節唇損傷部位と考えられる部分を、モニター上では下から上にすくうように、解剖学的には内側から外側に関節唇を牽引することによって、得られる数値を計測した。牽引量はプローブ機器によって、事前に設定することができるので、3mm と固定した。



実際に計測した際のモニターの図

（右の図の金属部分がプローブ機器の先端で、引っ掛けている組織が股関節唇である）

結果：

全ての症例において、関節唇の処置前のプローブ機器による抵抗力を計測できた。

1 症例目： 牽引方向に 5.0N 垂直方向に 2.0N

2 症例目： 牽引方向に 4.2N 垂直方向に 0.5N

3 症例目： 牽引方向に 6.5N 垂直方向に 1.6N

4 症例目（この症例のみ再手術症例で関節唇の損傷はないが計測できた症例）：

牽引方向に 9.8N 垂直方向に 0.46N

5 症例目 牽引方向に 5.5N 垂直方向に 0.1N

であった。

結果から言えることは、関節唇が損傷している場合には、5N 近辺の抵抗力になっており、そうでない場合は 10N 近辺であることから、損傷の有無を力によって計測しうることが明らかとなった。この関節唇損傷の有無による計測値の違いは、以前に花之内氏が米国ユタ大学で新鮮屍体組織を計測した際に得られた数値と近似していたことから、屍体組織での検討は妥当であると考えられる。

他、得られた知見としては、実際の臨床での計測の場合は、プローブ機器が滅菌できないことから、滅菌カバーで対応しないといけない事で手術中の管理が非常に煩雑であること、カバーをすることによって操作感が低下することから、今後この機器を使用する医師に対しては、操作方法を十二分に行う必要があると考えた。

また、実臨床では、実際の手術中に短時間に素早く行う必要があることから、プローブ機器の挿入のスムーズさの検討を重ねていく必要があると考えた。さらには、術者は実際のモニター画面をみることが必須であるため、そこにプローブ機器で計測している数値を表示する画面を同期させていく課題もあると考えた。

研究課題から得られた知見もさることながら、次につなげるための課題も明らかとなり、非常に有意義な研究であったと考える。

豚の膝関節を用いた半月板の強度評価 (プロービング機器および従来法による)

大槻 周平 (大阪医科大学)

分担研究者である私は、スポーツ選手から高齢者まで、膝の痛みを引き起こした患者の治療にあたる膝関節外科を専門とした臨床医であり、また、半月板損傷における縫合不良症例に対して、再生医療に関わる新しい治療法を提案し、その有効性の確かな確立を目指す研究者でもある。その背景から今回共同研究をさせて頂いた。

膝関節の軟部組織である半月板の再生をバイオプリンタで行うことを一つの目標とした際に、花之内氏の開発したプローブ機器が移植後の半月板の状況把握に使用できるかもしれないと考えたため、次の研究を共同で行った。

1 つ目は、豚の膝関節を用いた半月板の強度評価である。開発したプローブというのは、通常関節鏡手術で使用するプローブという、金属の棒で先端 2mm だけが垂直に曲がっている器械を基に作成されたものである。通常のプローブが、手術中に関節内の軟部組織をつついたりひっぱったりして定性的に組織の病態を把握するだけのものであったので、その際の組織の抵抗力を計測できるようにしたのが、花之内氏の開発したプローブ機器になる。通常のプローブ操作（これをプロービングという）の際には、半月板を 5mm 程度牽引して固定性を確認するので、この動作時にどれだけの力がこのプローブ機器によって計測できるかの実験を行った。併せて前十字靭帯の牽引力についても計測を行った（次頁に実験の図）。

右側の豚膝関節の内側ポータルからプローブした際の半月板の後節の抵抗力（3 回連続で計測）は、8.7, 8.2, 9.8N であった。中節は 2.7, 3.1, 2.8N であった。

また、前十字靭帯の牽引力は、内側から 3 回計測した結果は 7.9, 7.2, 7.3N、外側から引っ掛けての計測については、4.0, 3.9, 3.9N であった。

続いて、外側ポータルからの計測（同様に 3 回連続で計測）については、大腿骨側からの後節アプローチは 5.6, 4.8, 4.8N であり、脛骨側からの同部位のアプローチは、5.2, 6.4, 6.3N であった。また、中節へのアプローチでは、抵抗力は、大腿骨側からのアプローチは 3.5, 3.3, 3.3N で、脛骨側からのアプローチでは 2.6, 3.5 であった（3 回目は引っ掛かりがすべったことにより正しく計測できなかつたので含めていない）。

以上、同部位を評価する場合でも、ポータルの違いや、どちらの骨近くからアプローチするかによって数値が異なることがわかった。今後は、個体間の違いについて、評価できれば、データの価値が現在よりも高くなると考えた。

2 つ目としては、半月板の機械特性評価として、切除した半月板を成型し、圧縮試験器にかけて時の応力を評価した。生検用実験機器にて、半月板の中節および後節から径 5mm の小片として、計測を施行した。

結果、中節は 2.14 mm、後節は 3.7 mm で、応力はそれぞれ、2.07, 0.10MPa であった。

このことは、半月板の再生組織を作成するうえでの、貴重なデータになりうると考えた。

まとめ

半月板のプロービング時の組織抵抗力が明らかとなった。これにより、再生組織で全部ないし一部の置換した組織の器械強度を計測・予測できる可能性がでてきた。



膝関節から採取した皮下脂肪組織、軟骨組織、滑膜組織、膝蓋下脂肪組織より採取した間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導の検討と考察

森山 博由 (近畿大学)

(背景)

3D バイオプリンタを用いた組織構築は、現代の組織工学には欠かせない技術要件となっている。特に、変形性関節症など関節症に対する再生医工学分野の競争は激しく、研究成果報告に枚挙の暇が無い。しかしながら、未だゴールドンプロトコールは確立されていないことから、積み残された検討課題は多いことがわかる。「臨床応用に対応する、機能的で堅牢な再生組織製造に必要な 3D バイオプリンティングベースの細胞基材の設定」は、最重要課題のひとつであり、肝要なキーデバイスとも断言して良い。

分担研究員である私は、細胞培養に精通し、ヒト組織を扱える研究者であることから、今回花之内氏から依頼があり、共同研究をさせて頂いた。

本研究では、変形性膝関節症患者から臨床学的に採取した皮下脂肪組織、軟骨組織、滑膜組織、膝蓋下脂肪組織を素材に、それらから間葉系間質幹細胞 (以下、MSC) を採取し、「臨床学的グレードの軟骨再生に資する間葉系間質幹細胞の分取ソースの検討」を試みた。

(材料と方法)

対象は、変形性膝関節症患者 3 名 (69 歳女性、57 歳女性、78 歳男性) で、人工膝関節全置換手術施行時に組織を採取した。より臨床学的に採取された膝滑膜※、皮下脂肪※、軟骨※、膝蓋下脂肪※から、当該研究機関の有する手法により、各 MSC を樹立した。樹立したそれぞれの MSC を軟骨細胞への分化を誘導し、その状態を観察した。また、分化誘導から 14 日後の細胞から total RNA を回収し、いわゆる qPCR 法を用いて、COL10A1, SOX9, COL1A1 遺伝子の発現を確認した。本 qPCR では、精確なハウスキーパー遺伝子同定により UBE2D2 遺伝子を内部コントロールとした。これにより、分化時の発現量と未分化時の発現量を算出し比較した。このとき、数値が 1 を超えている優位なものを軟骨分化度の高いサンプルとして判断した。

(結果および考察)

本研究により、同一患者内での採取組織間における軟骨細胞分化度には、一定性を見出すのが難しく、分化の時間や分化過程の細胞変容も多様なものとなった (Fig1-3)。しかしながら、滑膜から採取した MSC には軟骨細胞への分化能が高いポピュレーション (細胞亜集団) が存在する可能性が示唆された (Fig.1, 2)。他、患者間における軟骨細胞分化度には、一定性は見出せなかった (Fig1-3)。これについては、やはり統計学的な優位数 (N=30~60 以上)、および採取条件の一定性など、数理的解析における必要十分条件の確保と観察像とのマッチング解析が必要と思われた。

Fig.1

口外: 101718

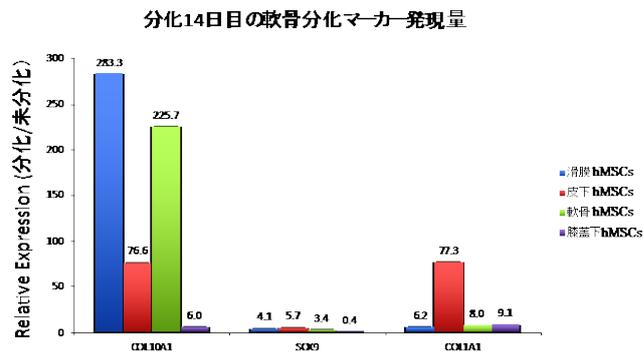


Fig.2

口外: 062718

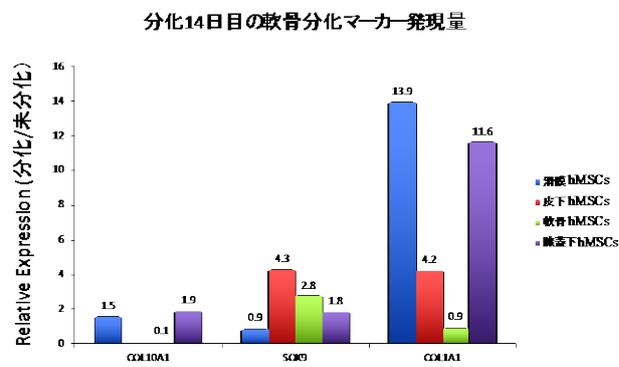
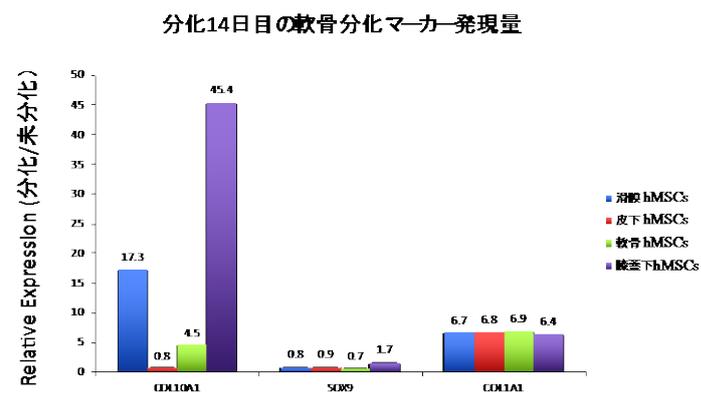


Fig.3

口外: 041818



膝関節から採取した皮下脂肪組織、軟骨組織、滑膜組織、膝蓋下脂肪組織より採取した間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化誘導の検討と考察

森山 麻里子（近畿大学）

（背景）

近年、再生医工学分野の基礎研究から臨床への橋渡し研究が盛んに行われるようになってきた。その1つに、膝関節治療における臨床組織学的の検討がある。「適切な組織を、適切な場所で、適切な機能と堅牢性を有した状態にて組織構築することが必要不可欠である」という考えから、「膝関節組織再建を支える脂肪組織層の考え方」も重要要件の1つであるが、未だゴールドンプロトコールは確立されていない。

分担研究員である私は、細胞培養に精通したヒト組織を扱える研究者であることから、今回花之内氏から共同研究のご依頼があった。

本研究では、変形性膝関節症患者から採取した皮下脂肪組織、軟骨組織、滑膜組織、膝蓋下脂肪組織等を素材に、それらから間葉系間質幹細胞（以下、MSC）を採取し、「臨床学的グレードの脂肪組織の再生につながる間葉系間質幹細胞の脂肪細胞分化に適合する分取ソースの検討」を試みた。

（材料と方法）

対象は、変形性膝関節症患者3名（69歳女性、57歳女性、78歳男性）で、人工膝関節全置換手術施行時に組織を採取した。より臨床学的に採取された膝滑膜、皮下脂肪、軟骨、膝蓋下脂肪から、当該研究機関の有する手法により、各MSCを樹立した。樹立したそれぞれのMSCを脂肪細胞へ分化誘導し、その状態を観察した。また、分化誘導から14日後の細胞からtotal RNAを回収し、いわゆるqPCR法を用いて、COL10A1, SOX9, COL1A1遺伝子の発現を確認した。本qPCRでは、精確なハウスキーピング遺伝子同定によりUBE2D2遺伝子を内部コントロールとした。これにより、分化時の発現量と未分化時の発現量を算出し比較した。このとき、数値が1を超えている優位なものを分化度の高いサンプルとして判断した。

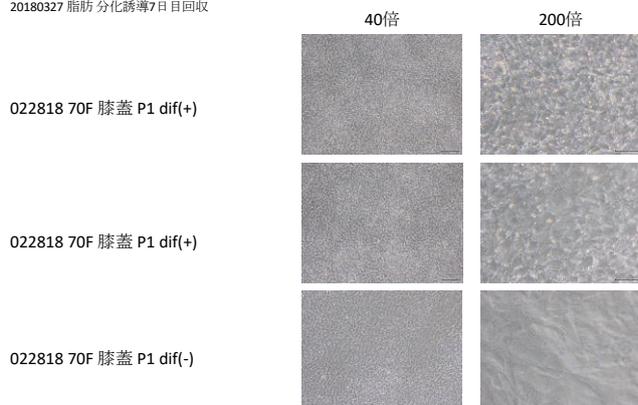
（結果および考察）

結果から分化傾向については、膝蓋下脂肪体より樹立したMSCが滑膜より樹立したMSCより、脂肪細胞への分化能力に長けると判断できた（Fig.1 A~B, Fig.2）。細胞の分化像をタイムラプスでの確認（Fig.1 A~C.）および、プロトコル上での分化期間エンドポイントにおけるトランスクリプトーム解析においても、その分化マーカーの確認がそれを示していた（Fig.2）。ただしこのとき、検体差間での発現量の有意差が伺えるが、肝要なのは脂肪細胞への分化に必要な遺伝子量ではなく、遺伝子発現の有無である。ゆえに、脂肪細胞への分化性は全ての検体で確認できたものとして捉える。これは期待した結果であり、本研究の中心課題の達成のために有用な結果を得ることができた。

Fig.1

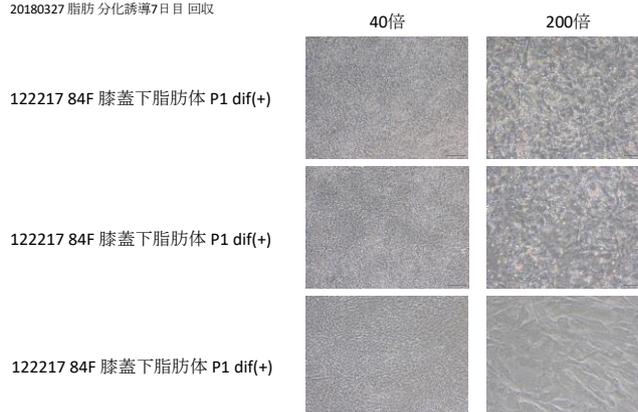
A.

20180327 脂肪分化誘導7日目回収



B.

20180327 脂肪分化誘導7日目回収



C.

20180316 脂肪ストック解凍2日目

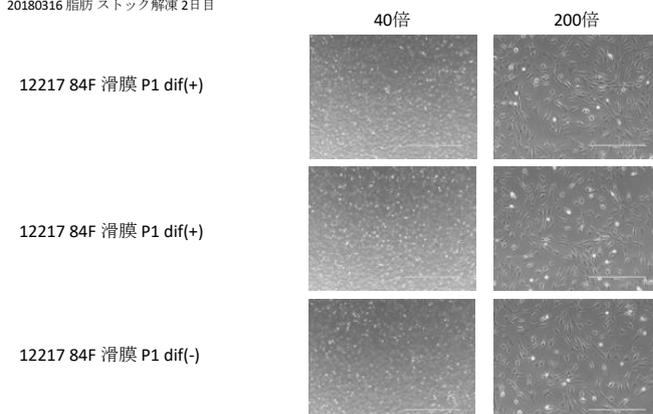


Fig.2

脂肪分化評価の一例 (qPCR)

