

ラットを用いた膝軟骨全層欠損モデルの評価系の検討

○ 林田 尚之¹⁾, 榊原 基嗣¹⁾, 水町 涼治¹⁾, 森田 枝美¹⁾, 吉原 佐江子¹⁾, 田代 貴士¹⁾, 片山 誠一¹⁾, 廣中 直行¹⁾, 西 勝英^{1),2)}

1) 株式会社LSIメディエンス, 2) 熊本大学名誉教授

目的

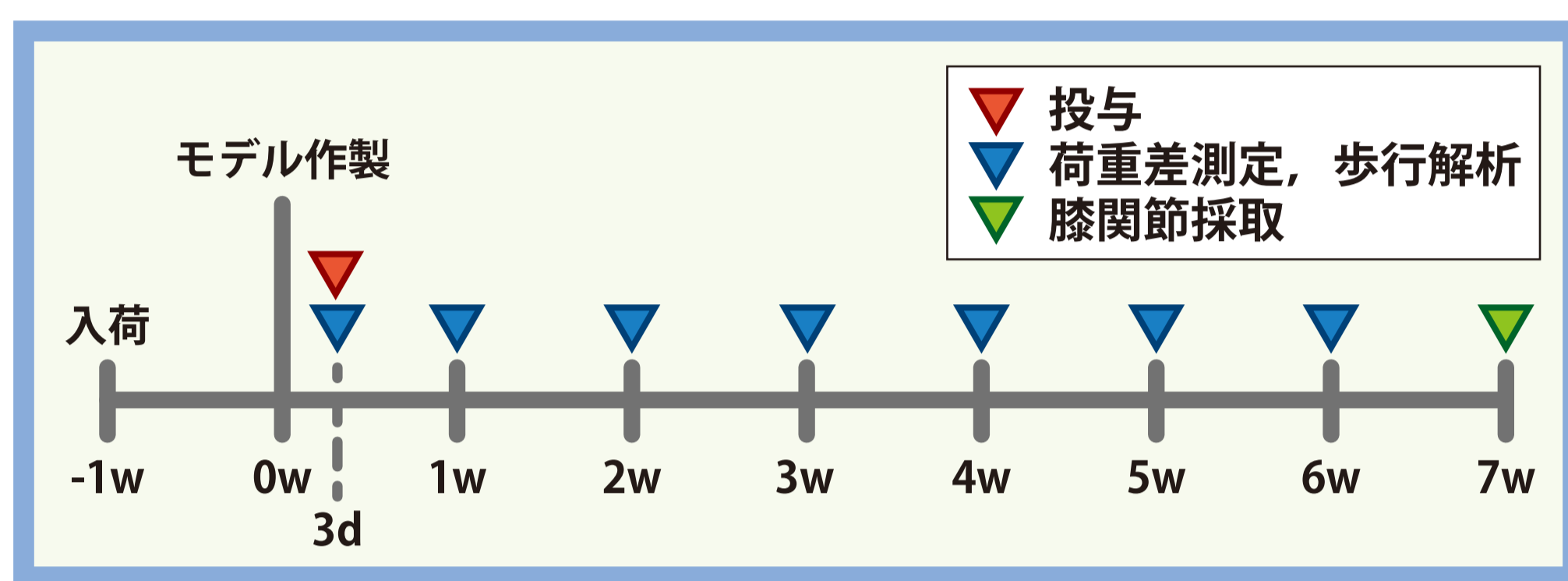
変形性膝関節症は最も一般的な関節疾患の一つであり、事故やスポーツによる外傷、肥満や骨格、遺伝、加齢に伴う関節への過負担などの様々な要因により徐々に関節軟骨が変性する慢性の進行性疾患である。変形性膝関節症は進行すると膝の痛みが強くなり、歩行時の膝の痛みや膝を曲げ辛いといったQOLを著しく損なう症状となる。関節の軟骨は硝子軟骨と呼ばれ、高い粘弾性を示し、体重を支えながら関節の滑らかな動きを可能にする。また、血管やリンパ管、神経を欠く組織であり、軟骨細胞自体の修復能や分裂能に限界がある。このため、一度損傷すると自然修復が困難であることから、関節軟骨の再生医療の実現が待ち望まれている。そこで我々は、ラット膝軟骨全層欠損モデルを作製し、細胞移植および培養液上清の治療効果を検討した。

方法

実験1：移植細胞の有効性評価試験

● 動物：ラット, Crl:CD(SD), ♂, 8ヵ月齢以上 (モデル作製時)

● 実験スケジュール：



● モデル作製方法：

1. ラットを2%インフルラン吸入にて麻酔後、左後肢膝関節内側を切開して軟部組織を剥離後、膝蓋骨をずらして大腿骨膝軟骨をドリルで削り取ることで全層欠損モデルを作製した。
2. 筋肉組織を切開し内側副靭帯を露出させ、内側半月板の上下の位置で内側副靭帯を横切した。
3. 関節膜越しに見える半月板を確認し、前十字靭帯および後十字靭帯を切断した。
4. 半月板にメスを削って数回傷をつけることで損傷させるとともに、大腿骨について脛骨の接触部分を削った。

● 群構成：

試験群	投与量	投与容量	投与経路	投与日 ^a	例数
正常 ^b	0	0.1 mL/site	膝関節腔内	Day 3	3
Control ^b	0	0.1 mL/site	膝関節腔内	Day 3	5
細胞 ^c	1×10 ⁶ cells/site	0.1 mL/site	膝関節腔内	Day 3	5
培養上清 ^d	0	0.1 mL/site	膝関節腔内	Day 3	5

- a. モデル作製日を Day 0 とした。
- b. 細胞培養に使用していない培地を投与した。
- c. SD ラット胎児 (妊娠 18 日目) 大腿骨骨頭由来初代細胞
- d. 予備培養 8 日から 9 日目に使用した培地

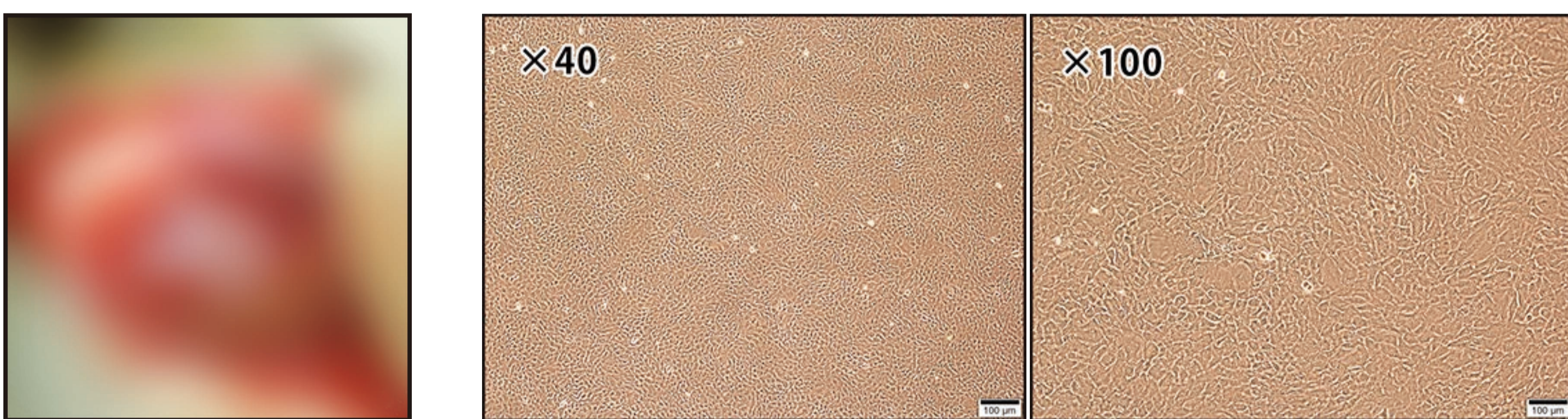
● 細胞培養：

- 培地： 10% FBS-1% ペニシリン-ストレプトマイシン-DMEM
培養条件： 37°C, 5%CO₂
培養： 胎児由来大腿骨骨頭を採取、0.2% コラゲナーゼを用いて骨頭を分散し、細胞を採取、採取後 9 日間予備培養。

● 評価方法：

- 荷重差測定： Incapitance Tester (メーカー：Linton Instrument) を用いて測定
歩行解析： CatWalk XT (メーカー：Noldus Information Technology) を用いて測定

● 膝軟骨全層欠損部位 ● 投与細胞写真 (投与日：採取後 9 日目)



実験2：移植細胞の局在確認検討

● 動物：ラット, Crl:CD(SD), ♂, 8ヵ月齢以上 (モデル作製時)

● モデル作製および細胞移植方法：

1. ラットを2%インフルラン吸入にて麻酔後、左後肢膝関節内側を切開して軟部組織を剥離後、膝蓋骨をずらして大腿骨膝軟骨をドリルで削り取ることで全層欠損モデルを作製した。
2. 全層欠損直後、損傷部位にPKH26で蛍光標識した足場素材および細胞の混合物 (SD ラット胎児 [妊娠 18 日目] 大腿骨骨頭由来初代細胞) を移植した。

● 膝関節採取：モデル作製後 7 週

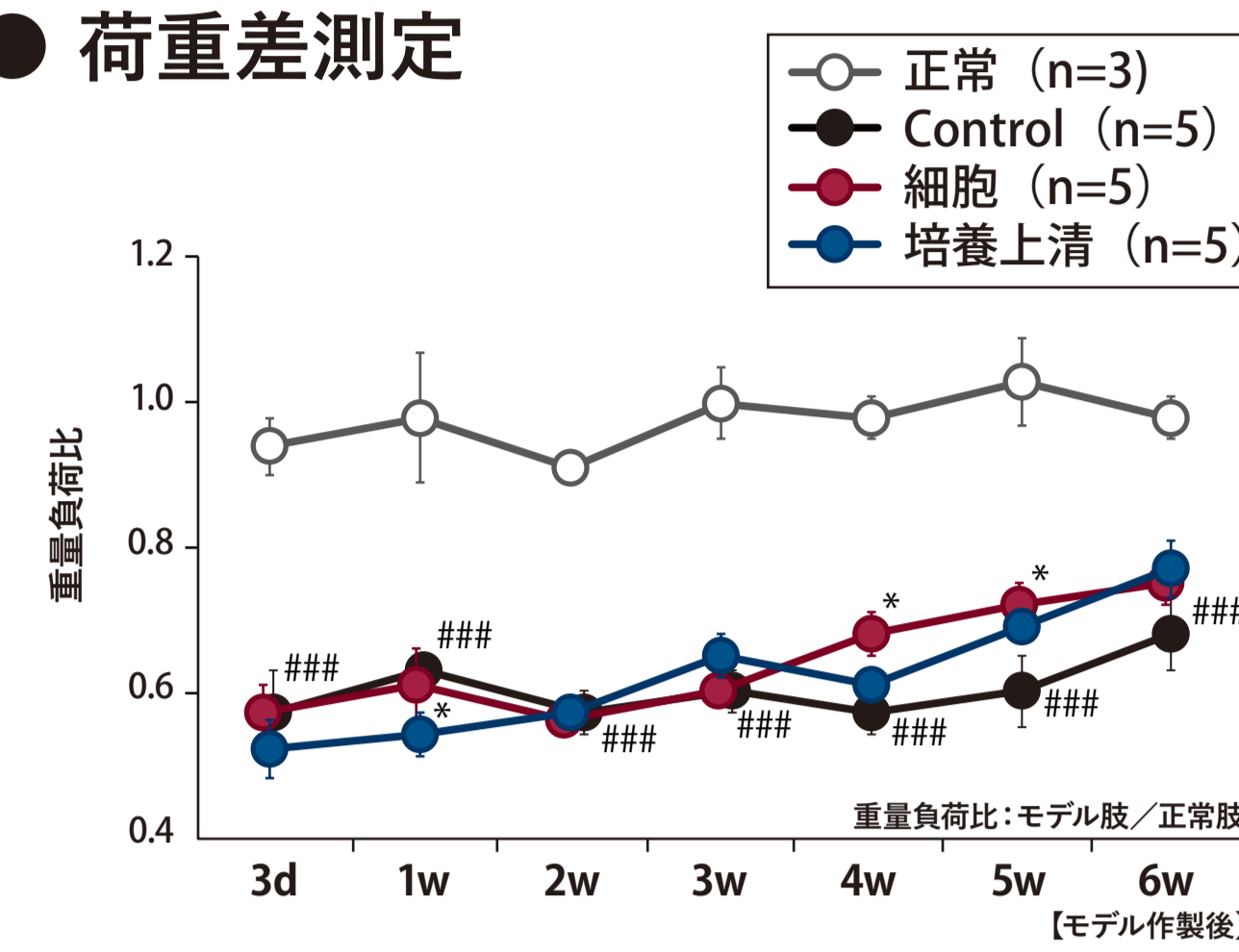
まとめ

- 実験1において、荷重差測定では Control 群 (膝軟骨全層欠損モデル) の特徴的な変化 (モデル肢の荷重値が正常肢より低い) を捉えることができた。また、歩行解析ではモデル作製後 2 週までの時点で本モデルの痛み起因したと考えられる変化を捉えることができた。これは、歩行解析が四肢歩行であることから後肢への負荷が軽減されたことに対し、荷重差測定は、より後肢に荷重負荷がかかっていることから、本モデルの変化を鋭敏に捉えることができたことが示唆された。
 - 実験1の荷重差測定において、細胞群ではモデル作製後 4 週および 5 週で有意な改善効果が認められた。また、培養上清群では、有意差は認められなかったもののモデル作製後 5 週以降で高値を示したことから、細胞または培養上清を投与したことにより、モデル作製に起因した痛みを軽減できた可能性が示唆された。
 - 実験2の移植細胞の局在確認検討では、PKH26 でラベルした移植細胞が損傷部位の底部に局在しており、細胞移植により損傷箇所が軟骨細胞の増殖で補填されていたことが確認できた。
- これらの結果から、本実験条件下において、荷重差測定ではモデル作製 6 週まで本モデルの特徴的な変化を捉えることができ、歩行解析でもモデル作製後 2 週まで痛みに起因したと考えられる変化を捉えることができた。また、細胞または培養上清を投与することでモデル作製に起因した痛みを軽減できた可能性があることから、今後、実験2で採取した膝関節の病理組織学的検査を実施し、損傷した軟骨の修復の程度を確認予定である。

結果

実験1：移植細胞の有効性評価試験

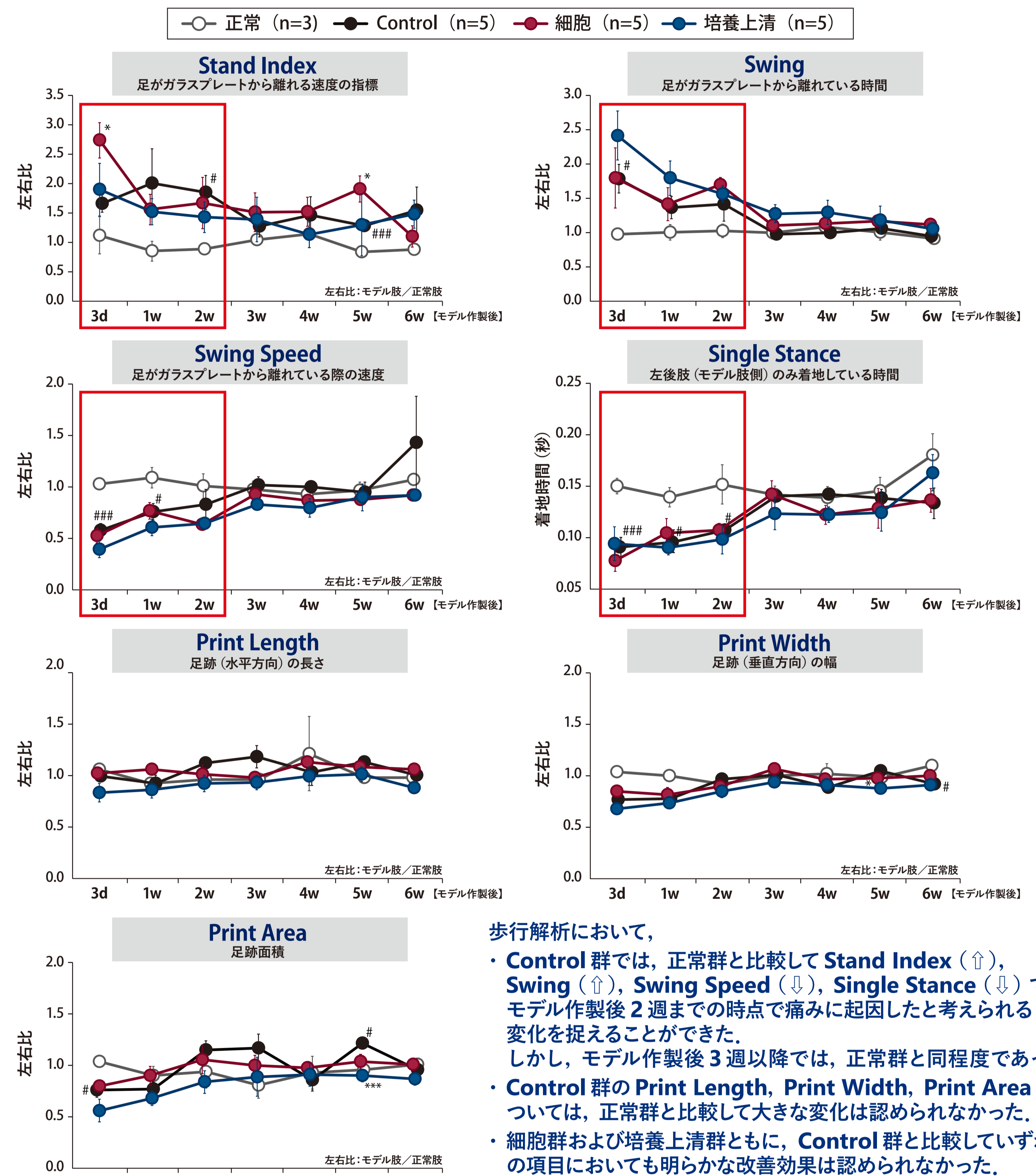
● 荷重差測定



荷重差測定において、
● Control 群では、正常群と比較していずれの時点においても有意な低値を示し、モデルの特徴的な変化 (モデル肢の荷重値が正常肢より低い) を捉えることができた。
● 細胞群では、モデル作製後 4 週および 5 週の荷重差測定で有意な改善効果が認められた。
● 培養上清群では、モデル作製後 5 週以降で高値を示したが、いずれの測定時点においても有意差は認められなかった。

平均値±標準誤差
###: p<0.001, 正常群と比較して有意差あり (Student's t-test)
*: p<0.05, Control群と比較して有意差あり (Student's t-test)

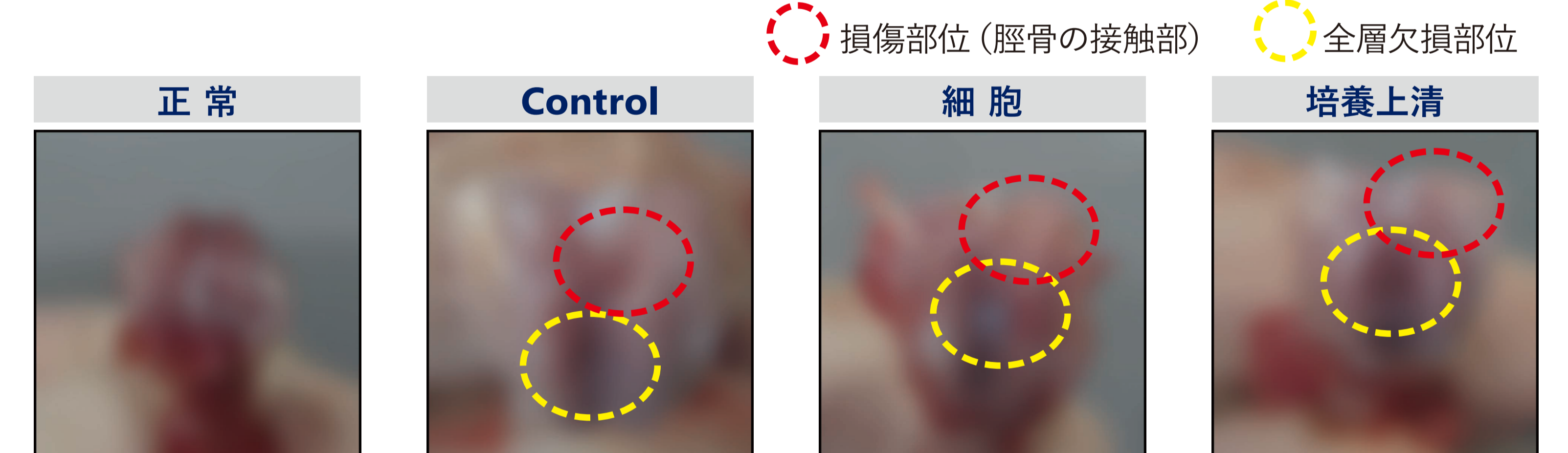
● 歩行解析 (CatWalk)



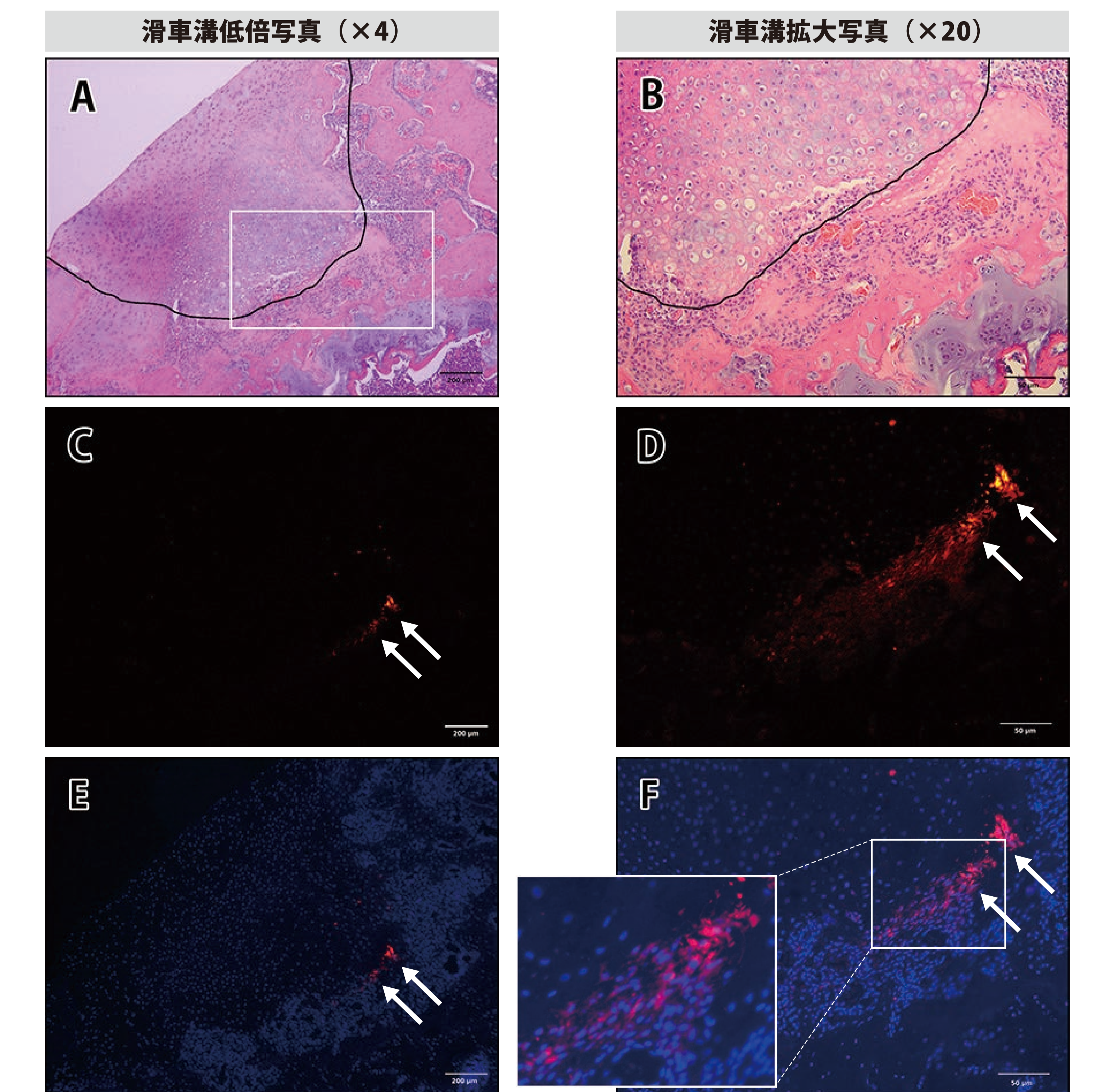
歩行解析において、
● Control 群では、正常群と比較して Stand Index (Ⓢ), Swing (Ⓢ), Swing Speed (Ⓢ), Single Stance (Ⓢ) でモデル作製後 2 週までの時点で痛み起因したと考えられる変化を捉えることができた。しかし、モデル作製後 3 週以降では、正常群と同程度であった。
● Control 群の Print Length, Print Width, Print Area については、正常群と比較して大きな変化は認められなかった。
● 細胞群および培養上清群ともに、Control 群と比較していずれの項目においても明らかな改善効果は認められなかった。

平均値±標準誤差
#: p<0.05, ##: p<0.001, 正常群と比較して有意差あり (Student's t-test)
*: p<0.05, **: p<0.001, Control群と比較して有意差あり (Student's t-test)

● 膝関節採取時の膝写真 (代表例)



実験2：移植細胞の局在確認検討



細胞移植：モデル作製直後に膝軟骨全層欠損部分に移植、膝軟骨採取：モデル作製後 7 週
A, B: HE 写真, C, D: PKH26 蛍光写真, E, F: DAPI 染色 (青色) および PKH26 (赤色) Merge 写真
A, B 黒線: 損傷領域, C~F 白矢印: PKH26 陽性細胞
A, B: 損傷箇所は軟骨細胞の増殖で補填されていた。
C, D: 損傷部位の底部で PKH26 陽性反応が確認された。
E, F: PKH26 の陽性反応と DAPI の Merge 写真より PKH26 でラベルした移植細胞が局在していることが確認された。