

氏 名	尾田 和広
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 乙 第 4 0 6 号
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 授 与 年 月 日	平成26年 9月10日
学 位 論 文 題 目	Comparison of repair between cartilage and osteocartilage defect in rabbits using similarly manipulated scaffold-free cartilage-like construct (ウサギにおける scaffold-free cartilage-like construct を用いた軟骨欠損と骨軟骨欠損の修復比較)
審 査 委 員	主査 教授 清水 猛史 副査 教授 小島 秀人 副査 教授 一杉 正仁

論文内容要旨

※整理番号	410	(ふりがな) 氏 名	尾田 和広
学位論文題目	Comparison of repair between cartilage and osteocartilage defect in rabbits using similarly manipulated scaffold-free cartilage-like construct (ウサギにおける scaffold-free cartilage-like construct を用いた 軟骨欠損と骨軟骨欠損の修復比較)		
<p>【目的】関節軟骨は自然治癒能力が乏しく、その修復方法は未だ確立されていない。今回、ウサギ関節軟骨より、軟骨細胞を採取して高濃度培養を行い、scaffold-free cartilage-like construct (以下 construct) を作製し、この construct の <i>in vitro</i> での軟骨様移植組織としての適正と、<i>in vivo</i> で軟骨欠損および骨軟骨欠損に適応した際の関節軟骨修復における有用性などを検討した。</p> <p>【方法】日本白色家兎の関節軟骨より軟骨細胞を単離し、単層培養後に高濃度三次元培養を行って construct を作製した。作製後の construct に対して、トルイジンブルー染色、コラーゲン I、II およびフィブロネクチン免疫染色を行い <i>in vitro</i> での軟骨様移植組織としての適正評価を行った。<i>In vivo</i> では、日本白色家兎の一侧の膝において、膝蓋骨溝中央に直径 4 mm の円柱状欠損を 1 個作製した。欠損は、肉眼的血液滲出を認めない軟骨欠損と血液滲出を認める骨軟骨欠損の 2 種類を作製した。各々の欠損底部に直径 4 mm、厚さ 0.6 mm にトリミングした construct を移植し、これを移植群 (I 群) とした。肉眼的血液滲出を認めない軟骨欠損群 (CI 群) と血液滲出を認める骨軟骨欠損群 (OI 群) との 2 群に分けた。また、対側の膝は、移植を行わない同様の欠損のみを作製し、対照群 (CC 群および OC 群) とした。各欠損群を 24 羽ずつ作製し、処置後 2、4、8、12 週間時に 6 羽ずつ屠殺し、肉眼的、組織学的評価を行った。組織学的評価基準には Wakitani's score を用いた。</p> <p>【結果】<i>In vitro</i> において、作製した construct は、トルイジンブルー染色、コラーゲン II およびフィブロネクチン免疫染色で濃染し、コラーゲン I 免疫染色では染色性を認めなかった。<i>In vivo</i> では、対照群において、CC 群では自然修復像が認められなかったのに対して、OC 群では不完全ながら欠損辺縁での自然修復が確認された。一方、移植群である CI 群では、移植後 12 週間経過時まで construct は染色性を維持しながら欠損部に生着していたのに対し、OI 群に移植された construct は、移植後 4 週間経過時より周囲に多数のマクロファージの存在を認め、徐々に消退して移植後 12 週間経過時には、ほぼ消失していた。4 群間の軟骨修復状況を比較したところ、移植後 8 週間経過時における CI 群の Wakitani's score が、同時期の対照群および OI 群より有意に良好であった。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

【考察】我々の作成した construct は、プロテオグリカンに富み、コラーゲンⅡを多く含み、コラーゲンⅠの乏しい性質を示した。これは、硝子軟骨の性質と一致していた。また、作製した硝子軟骨様組織は、フィブロネクチンの発現に富んでおり、周囲組織との良好な接着能力を示唆しており、移植に適した軟骨様組織が作製されたと考えられた。また、この移植組織は、scaffold-free であるため、scaffold を用いた場合に生じる異物反応などの種々の問題が生じ無いという利点も有している。この construct を用いた *in vivo* 実験では、一般に自然修復に重要な役割を果たすと言われる骨髄由来細胞の供給が乏しく、修復が困難であるとされる軟骨欠損において、良好な修復が確認された。一方、比較的修復されやすいとされる骨軟骨欠損においては、移植組織は徐々に消退し、最後には消失して、欠損部に不完全な修復しか認められなかった。欠損容積に占める construct の割合の他、construct を栄養していると考えられる関節液の供給状態、欠損下部の骨髄よりもたらされる細胞や増殖因子などの液性因子の供給量、移植組織とそれを取り囲む周囲組織との細胞間連絡状況などといった要因が、construct を用いた関節軟骨修復では重要な役割を果たしていると考えられる。また、浅い軟骨欠損の修復の際に問題となる移植組織の安定性についても、今回作製した construct は良好な接着性を有しているため、脱落することなく、良好な関節軟骨修復が得られたと考えられる。本研究の長期成績の評価とともに理想的な軟骨修復条件の設定が今後の課題である。

【結論】今回、我々がウサギ関節軟骨より作製した scaffold-free cartilage-like construct は、*in vitro* で硝子軟骨様組織像を示し、この組織を用いた関節軟骨修復 *in vivo* 実験では、一般的に修復されにくいとされる軟骨欠損において、良好な欠損修復を示した。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	410	氏名	尾田 和広
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体11ポイント、600字以内で作成のこと。)</p> <p>ウサギ軟骨細胞より scaffold-free cartilage-like construct (以下 SFC) を作製し、SFC の <i>in vitro</i> での軟骨様移植組織としての適正と、<i>in vivo</i> で軟骨欠損 (浅い欠損) および骨軟骨欠損 (深い欠損) 修復へ適応した際の有用性について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 高濃度培養で作製した SFC の染色性は、関節軟骨 (硝子軟骨) と同様の染色性を示した。しかし、組織構造は、本来の軟骨基質が豊富な層状構造とは違い、びまん性に細胞が密な構造を示した。また、SFC 表層のフィブロネクチン (接着因子) の強い発現が、移植した際の SFC の早期脱落を防ぐと考えられた。 2. SFC を用いることにより、一般に修復されにくいとされる軟骨欠損において、良好な修復を認めた。一方、修復されやすいと考えられる骨軟骨欠損では、SFC は早期に消失してしまい、自然修復と変わらない経過を示した。 3. 修復組織の機能的評価がないこと、骨軟骨欠損で SFC が消失した原因の解明、さらに同種移植ではなく自家移植を行った場合はどのような結果が得られるか、などの検討課題が残った。 <p>本論文は、修復されにくい軟骨欠損において、SFC により良好な修復状態が得られることを示した点で、新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 599 字)</p>			
(平成26年9月2日)			