

氏名(本籍)	あか おぎ ひろし 赤 萩 博(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3429号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	骨髄由来自己フィブリンゲル-骨髄細胞混合体を用いた軟骨全層欠損修復の試み
主査	筑波大学教授 医学博士 高橋 智
副査	筑波大学教授 理学博士 久野 節二
副査	筑波大学助教授 医学博士 鬼塚 正孝
副査	筑波大学助教授 医学博士 峯岸 直子

## 論文の内容の要旨

### (目的)

骨髄由来自己フィブリンゲルと骨髄細胞との混合体の、ウサギ膝関節軟骨全層欠損の組織修復における有効性を検討することを目的とした。

### (対象と方法)

本研究は、14から16週齢の日本白色家兎81羽を用いて行った。大腿骨顆部膝蓋大腿関節面に直径5mmの軟骨全層欠損を作成し、欠損を作成しただけのコントロール群と、自己骨髄由来のフィブリンゲルだけを移植したゲル群、骨髄細胞を混合した細胞+ゲル群の3群で比較した。組織学的評価に各群6羽(6関節)ずつを使用した。遺伝子発現の評価と、再生組織の生化学的評価に両側膝を用いたものを各グループ3羽ずつ作成し、片側を遺伝子発現の評価に、もう一方を生化学的評価に用いた。

ペントバルビタールによる静脈麻酔の後にウサギ大腿骨から抗凝固剤(ACD-A液)を2ml含んだシリンジを用い、大腿骨から骨髄血を約8ml吸引採取した。遠心分離で血漿と血球に分け、血球成分は更に比重遠心法で白血球のみを分離採取した。はじめに分離してある血漿の一部とトロンビンを混和してゲルを作成した。フィブリンゲルと骨髄細胞の混合体は、血漿の一部と、分離した白血球を混和した細胞懸濁液にトロンビンを加えて作製した。

骨髄血を採取したウサギに再び麻酔をかけ、大腿骨顆部に直径5mmの軟骨全層欠損を作成した。作成した欠損部に、ゲル、及びゲルと骨髄細胞の混合体を移植した。4, 8, 12週で安楽死させ、組織学的評価、生化学的評価、遺伝子発現の評価をそれぞれ行った。

組織学的評価にはsafranin-O/fast green染色を行った。更にその結果をO'Driscollらの組織点数表を用いて点数化し、定量評価した。免疫染色は軟骨に特異的であるII型コラーゲン、線維性軟骨に見られるI型コラーゲンの染色を行った。生化学的評価には細胞外基質の主成分であるglycosaminoglycanを測定した。その値をDNA量で除して単位DNAあたりのglycosaminoglycan量として比較した。遺伝子発現解析にはI型コラーゲンとIIコラーゲンのmRNA発現をReal time PCRを用いて評価した。mRNAの発現量の比較にはComparative Ct法を行い、18S mRNA発現量との差を求めて比較した。

## (結果)

8週までの時点では細胞+ゲル群で、良好な組織修復像が観察された。組織像を点数化して比較すると、その値は他の2群と比較して有意に高値を示した。しかし12週では欠損部は線維性組織で充填され、safranin-O染色の染色性は低下し、他の2群との顕著な差はなかった。

Glycosaminoglycan産生、2型コラーゲン遺伝子発現は8週までの時点でゲル群、ゲル+細胞群で高い値を示す傾向にあった。

## (考察)

近年、いわゆるTissue Engineeringと呼ばれる研究分野の発展はめざましく、組織工学的手法を用いた再生医療に関する研究が盛んに行われている。更にその臨床応用も始まっている。しかし、その一方で安全面、経済面、倫理的面での問題点も指摘されている。培地中の成長因子、培養環境が細胞に与える影響は未知の部分が多く、培養細胞の安全性についてはまだ議論の段階で、結論は出ていない。培養操作は、セルプロセッシングセンタなどの特殊設備内で、厳しい製品管理の下で行われることが要求されるが、設備の維持管理に要する経済的負担は決して少ないものではない。

本研究で、遠心分離で分離濃縮した骨髄細胞をフィブリンゲルに混和したものを用いても、短期ではあるが、軟骨組織修復が良好に行われることが示された。このことは先の培養細胞を用いることに関連する問題点の解決につながる可能性があり、その意義は大きいと考える。

担体に用いた自己フィブリンゲルは生体吸収性素材であり、それ自体が生物活性を有し、成長因子との相互作用を有するなどの特徴を持つ。本研究で、ゲルを用いた2群において、修復組織中のGlycosaminoglycan量、II型コラーゲンmRNA発現が高い傾向にあったこと、ゲル+細胞群で組織修復が良好であったことから、自己フィブリンゲルは軟骨組織修復に対して有用な物質と考えられた。

また、ゲル+細胞群では、修復組織は軟骨表面から軟骨下骨に至るまで組織構築が良好であったが、細胞を用いなかった他の2群では線維性組織の介在、関節表面の亀裂及び陥没などを認めた。このことより組織修復において、良好な組織を構築するためには細胞が必要であると考えた。

ゲル+細胞群の組織像は8週までの時点で良好であったにもかかわらず、12週の時点で他の2群との差がなくなっていた。これは、修復組織が力学的に脆弱で12週までに劣化し、他の2群と差がなくなった、あるいは、力学的刺激が軟骨の組織外基質産生に影響を及ぼすことから、8週以降の修復組織に対する力学的環境が、修復組織の維持に適切でなかったためではなかったかと推察した。

## (結論)

修復組織を維持する方法を工夫することで、自己骨髄由来のフィブリンゲルと骨髄細胞の混合体を用いる本方法は軟骨損傷治療において有用な方法の一つになる可能性がある。

## 審査の結果の要旨

軟骨組織は血管が進入しない特性を有しており、再生が起こりにくいことが知られている。中でも軟骨組織の全層欠損は、組織修復が起こらず、外科手術の適応となっている。本研究は、一般的な総合病院での適応を考慮した、現状でも実現可能な軟骨全層欠損の修復方法を検討している。用いている方法論的には新規性は無いが、目的に添った解析が行われており、提出論文は非常に丁寧に作成されている。本論文で検討されている骨髄由来自己フィブリンゲルと骨髄細胞混合体法は、再建術施行後8週間までは非常に良好な成績を示しているが、残念ながら12週間後には効果が認められなかった。今後、長期にわたる効果の持続法の開発が、臨床応用に向けての課題であると考えられる。臨床応用に向けて更なる検討を期待したい。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。