

氏名(本籍)	野内隆治(茨城県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第3776号		
学位授与年月日	平成17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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	広範囲関節軟骨全層欠損モデルにおける軟骨修復 -力学的環境と骨髄間葉系細胞移植の影響-		
主査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学教授	医学博士	長澤俊郎
副査	筑波大学講師	博士(理学)	依馬正次
副査	筑波大学講師	博士(医学)	坂根正孝

## 論文の内容の要旨

### (目的)

関節軟骨は、豊富な細胞外基質を有し血管が存在しないため、修復能に乏しい組織である。部分的な欠損で修復が見られる場合には、骨髄由来の間葉系細胞が軟骨前駆細胞として働くことや、関節運動が軟骨修復を促すことが知られている。しかし一般的には軟骨損傷は自己修復困難であり、周囲の軟骨も進行性に変性し変形性関節症に至ることが多い。部分的な軟骨損傷に対する治療として、骨髄血の誘導、組織・細胞移植など種々の試みが行なわれているが、現在まで広範囲な軟骨欠損の治療は困難である。

本研究では広範囲軟骨欠損の動物実験モデルを確立する試みとして、家兎膝関節の脛骨関節面全面に亘る広範囲軟骨欠損を作成した。創外固定器により関節運動・関節牽引を制御し、力学的環境が軟骨再生に与える影響を評価するとともに、自家骨髄間葉系細胞移植の影響も検討した。

### (対象と方法)

16週齢以降の日本白色家兎45羽を用いた。麻酔下に、蝶番関節付き創外固定器を膝関節に装着した後、脛骨高原の関節面全面に軟骨全層欠損を作成した。欠損作成時の関節間隙が短縮しないようにした牽引群と、短縮荷重させた荷重群、牽引群で関節運動を制限した固定群の3群を作成した。さらに、培養自家骨髄間葉系細胞移植を行う移植群も作成した。軟骨欠損作成時に、大腿骨から骨髄血を約2ml吸引採取し、接着性細胞を3週間培養した。得られた骨髄間葉系細胞を、アテロコラーゲンゲルに包埋して $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、関節内に0.3ml注入した。対照となる担体群はアテロコラーゲンゲルのみを同量注入した。

牽引群は1, 3, 6, 12週で安楽死させ、経時的な組織学的評価を行った。その他の群は12週で安楽死させ、組織学的評価、免疫組織学的評価、組織点数表を用いた定量評価、再生軟部組織の面積の定量評価を行なった。

組織学的評価にはサフラニンO染色を行い、その結果をInternational Cartilage Repair Societyの組織点数表を用いて点数化した。免疫染色は軟骨に特異的であるII型コラーゲンと線維性軟骨に見られるI型コラーゲンの染色を行った。また、組織切片上の再生軟部組織面積とサフラニンO染色陽性領域、II型コラーゲン陽性領域の面積を測定し定量評価した。

## (結果)

牽引群では、欠損作成後1週で関節腔に露出していた骨髓腔を閉鎖するような形で関節面に新生骨が形成され、3週では、軟骨細胞が高密度に認められ、軟骨基質の産生を伴っていた。6週では、一部に軟骨細胞の柱状配列傾向が見られ始め、12週では、軟骨細胞は柱状や房状配列となり、I型コラーゲン陰性、II型コラーゲン強陽性の硝子様軟骨が観察される例もあった。

荷重群の再生軟骨組織は非荷重面が中心で、牽引群と比較しサフラニンO染色陽性領域の面積も狭い傾向があった。大腿骨顆部が接触する荷重面では、骨組織が関節面に露出している傾向があった。再生軟骨組織は、抗I型コラーゲン抗体と抗II型コラーゲン抗体で染色される線維軟骨組織が主であった。

固定群に見られる再生組織は、抗I型コラーゲン抗体で染色されるが、抗II型コラーゲン抗体で染色されない線維組織が主体であり、サフラニンO陽性領域や抗II型コラーゲン抗体陽性領域は、有意に小さかった。

移植群は、担体群より組織点数表の軟骨基質形態と細胞配列の2つのクライテリアで点数が高く、再生組織のサフラニンO染色領域も有意に大きかった。

## (考察)

本研究では関節運動や牽引が可能な創外固定器を装着した状態で、これまで行なわれていなかった広範囲な軟骨欠損モデルを作成した。牽引群でこれまで不可能と考えられていた広範囲軟骨欠損の自家修復が観察されたことは、臨床的にも有意義な結果であると考えられる。固定群や荷重群では、牽引群に比べ修復が悪かった。骨髓間葉系細胞が関節内で軟骨細胞に分化して行くのに、関節運動と関節牽引による欠損部の除圧あるいは増殖分化する空間の形成が必要であることが示唆される。

軟骨欠損が大きくなると修復が困難となる原因として、欠損部の骨髓間葉系細胞の数が足りなくなる可能性が指摘されている。本研究では、自家骨髓間葉系細胞を培養増殖させ、関節内に注入移植する実験を行なった。自家骨髓間葉系細胞培養移植は、軟骨修復に促進的に働くことが明らかとなった。

## (結論)

広範囲軟骨欠損モデルを作成した。関節運動や牽引が可能な創外固定器を用い、関節の免荷・運動の力学的環境を同時に制御することで広範囲軟骨再生が可能となった。さらに培養自家骨髓間葉系細胞の関節内注入移植は、広範囲軟骨再生を促進させることを確認した。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、関節運動や牽引が可能な創外固定器を装着した状態で家兔に広範囲軟骨切除モデルを作成し、牽引と関節運動によって広範囲切除された軟骨の再生も可能となることを明らかにしている。また、このモデルを用いて、軟骨の再生に対する骨髓間葉系細胞の移植の効果についても検討している。再生軟骨の International Cartilage Repair Society による組織学的評価の点数は充分とは言えないが、将来的には変形性関節症などの新しい治療法の開発に繋がることが期待される重要な基礎研究であると評価される。

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。