

氏名	はら だ やす じ 原 田 恭 治
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2511 号
学位授与の日付	平成 14 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	The use of controlled mechanical stimulation in vivo to induce a cartilage layer formation on the surface of osteotomized bone. (生体内力学刺激による軟骨組織層状構造の誘導に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 中村孝志 教授 清水慶彦 教授 堤 定美

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背景】

再生治療においては、再生中の組織への適切な力学刺激の供与が重要であると指摘されている。我々は関節軟骨の再生に必要な力学環境の設定を目的とした研究を進めており、今回はその基礎的検討として、ラットの尾椎骨切り部に曲げまたは滑り運動を持続的に与え、新生した軟骨組織を組織学的に評価した。

#### 【材料と方法】

22匹のF344ラット(雄, 7週齢)を用いて実験を行った。ラットの第11尾椎中央部にボーンソーを用いて横骨折を作成した後、この手術部に独自に作成したラット尾部屈伸運動付加装置を設置した。試験群には最大時角度25度の屈伸運動を、角速度毎分100度で4週間持続的に与えた。試験群は運動方法によって2群に分類し、Group Iには骨折部と運動中心との距離が1mmでの運動を、Group IIには骨折部と運動中心との距離を3.5mmと離して骨折部にすべりが生じるような運動を与えた。対照群には同様の手術を施し、尾部屈伸運動付加装置を設置した後、運動は与えずに4週間飼育を行った。試験期間終了後に尾椎矢状面での組織切片を作成し、各群の比較を行った。組織の微細構造は透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。なお、この尾部屈伸運動付加装置は小型、軽量であるためラットは活動を拘束されることはなく、体重の増加率も標準値と近似していた。

#### 【結果】

組織学的検査の結果、Group Iの4頭中4頭の組織からSafranin-OおよびToluidine Blue染色に強く染色性を示す、硝子軟骨様組織の新生が認められた。この組織は頭側および尾側椎体の仮骨と連続した組織構造を示し、免疫染色においてcollagen type IIに陽性を、Collagen type Iに陰性を示した。また、Group IIの6頭中4頭の組織からはGroup Iと同様の組織化学的性質を示す硝子軟骨様組織の新生が認められ、そのうち3例では、表面および関節軟骨と同様の層状構造を有する組織の新生が観察された。電子顕微鏡を用いた観察では、細胞周囲基質の存在や細胞内での活発な基質産生が認められた。表層の細胞は扁平で、コラーゲン線維は表面と平行な配行を、中層では細胞は円形で、コラーゲンは等方性の配行を示した。この組織の上・中層部の形態学的特徴は正常な軟骨と極似していたが、深層部にはTide-markが認められず石灰質層における様相は若干異なっていた。4週間後の対照群の組織からは3頭中1例においてSafranin-OおよびToluidine Blue染色に弱く染色性を示す軟骨組織の新生が認められたが、その組織は肥大化した細胞により構成されていた。

#### 【考察】

従来より圧縮応力または静水圧が軟骨細胞の基質産生に影響を及ぼす事が報告されている。今回試験群に施した手術手技では、細胞の移植を行わなかったため、新生した軟骨組織は骨髓あるいは骨膜由来の間葉系前駆細胞から分化したものと考えられる。Group IIの組織にのみ層状の構造が認められたため、軟骨組織の層状構造の構築には滑り運動刺激が強く関与していると考えられた。我々はこの様な層状構造を導き出した力学刺激の要素について、①剪断応力分布の影響、②コラー

ゲン線維束の配行構造の影響, ③組織内液の移動の影響, を仮定し追加調査を行っているが, どの要素が影響を及ぼしているかは未だ不明である。本研究で開発した装置は生体内における局所の動きと応力とを比較的正確に設定することができるため, 生体内力学刺激の分析的研究に有用であろうと思われる。

#### 論文審査の結果の要旨

荷重支持組織の再生治療法においては, 再生中の組織への適切な力学刺激の供与が重要であると指摘されている。本研究では *in vivo* において再生中の組織に運動刺激を加え, かつ動物に与えるストレスを低減した動物モデル及び装置を考案している。これらの実験モデルを用いてラットの尾椎骨切り部に4週間の運動刺激を加えた結果, 頭側および尾側の仮骨と連続した硝子軟骨様組織の新生が認められた。この組織は Safranin-O および Toluidine Blue 染色に強く染色性を示し, 免疫染色においては type II collagen に陽性を, type I collagen に陰性を示した。また, 骨切り部にすべりが生じるように刺激を加えた組織では, 上記と同様の組織化学的性質を示す硝子軟骨様組織が関節軟骨に類似した層状構造を有していた。また, コラーゲン線維束などの超微細構造も正常関節軟骨と類似していた。このことから, 組織内層状構造の構築にはすべり運動にもとづく力学刺激が強く影響していると考えられた。

以上の研究は, 力学的刺激が再生組織に及ぼす影響の究明に貢献し, 関節軟骨の再生治療法の開発に寄与するところが多い。

したがって, 本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。なお, 本学位授与申請者は, 平成14年3月20日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。