

京都大学	博士（医学）	氏名	平方栄一
論文題目	Early tissue formation on whole-area osteochondral defect of rabbit patella by covering with fibroin sponge （フィブロインスポンジ被覆によるウサギ膝蓋骨全範囲骨軟骨欠損における早期組織形成）		
（論文内容の要旨）			
【背景】 関節軟骨修復法として自家軟骨細胞移植法、骨軟骨移植法、骨髄刺激法などが臨床に用いられ、良好な成績が報告されている。しかし、修復に必要とされる細胞数や組織の不足、過剰な力学的負荷による修復組織の破綻、手術手技などの問題によって、未だ広範な骨軟骨欠損に用い得る治療方法として確立しているわけではない。 一方において、絹糸より精製・加工されたフィブロインスポンジは強度に優れ、またフィブロインスポンジ上では軟骨細胞が速やかに凝集体を形成して、形質を失わずに増殖、移動して、スポンジ周囲に軟骨様組織を形成する傾向が報告されている。 本研究では、軟骨細胞を含むフィブロインスポンジにて骨軟骨欠損部を被覆し、同スポンジを用いた関節軟骨修復法開発の可能性を検討した。			
【方法】 本実験で用いたフィブロインスポンジは径 8mm、厚さ 3mm のディスク形状を有しており、孔径が 40～80 μm の多孔質構造と共に、片面に厚さ 50 μm の膜を有している。4 週齢雄の日本白色家兎（GFP 蛋白発現+及び-）の関節軟骨よりドナー細胞を採取し、1 週間培養後に 1.5×10 ⁶ 細胞/90 μL をフィブロインスポンジ多孔質面に播種した後、さらに 2 週間の培養を行った。 12 週齢雄の日本白色家兎をレシピエントとして、膝蓋骨全範囲骨軟骨欠損を作成し、フィブロインスポンジ上に形成されていた厚さ 100～200 μm の硝子軟骨様組織が欠損部を覆うように注意をしながらスポンジを縫着した。			
【結果】 骨軟骨欠損作成のみの4例、および骨軟骨欠損部を細胞を含まないフィブロインスポンジのみで被覆した8例においては、移植手術6週後に組織修復が認められなかったのに対し、軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジで骨軟骨欠損部を被覆した8例中、5例において硝子軟骨様組織による修復が認められた。修復組織中にフィブロイン片は含まれず、修復組織はサフラニンO染色、トルイジンブルー染色、Ⅱ型コラーゲン免疫染色に陽性の層状構造を示した。硝子軟骨様修復組織による骨軟骨欠損部の平均被覆率は53%であった。また、GFP蛋白を発現させた家兎をドナーとした例では、修復組織を構成する細胞の平均48%がGFP陽性反応を示した。			
【考察】 多くの関節軟骨修復実験では、欠損周囲に残存する正常軟骨によって欠損部			

は過大な力学的負荷から守られている場合が多い。本研究では、膝蓋骨全範囲骨軟骨欠損を作成したため、欠損周囲に正常軟骨がなく、骨軟骨欠損のみの群では修復に必要な細胞の不足に加えて過剰な力学的負荷による修復組織の破綻が生じたものと考えられる。軟骨細胞を含むフィブロインスポンジで骨軟骨欠損部を被覆した群においては、層状の硝子軟骨様組織による修復が認められた。また、修復組織を構成する細胞の約半数がドナー由来の細胞を起源としていた。これらの結果から、フィブロインスポンジ上に形成された硝子軟骨様組織と膝蓋骨骨髄腔などより供給された細胞の両者が関わって欠損部を修復し、さらにスポンジが修復組織を過剰な力学的負荷から保護したものと考えられる。

【結語】

ウサギ膝蓋骨全範囲骨軟骨欠損を軟骨細胞を含むフィブロインスポンジにて被覆した結果、6 週後に層状の硝子軟骨様組織による修復が認められた。フィブロインスポンジ被覆法は、広範な骨軟骨欠損の早期組織修復方法として有用となる可能性が示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

本研究では、修復に必要とされる細胞数の不足、過剰な力学的負荷による修復組織の破綻等が問題となる広範な骨軟骨欠損に対する新たな治療方法の可能性を検討した。

片面に膜を有する孔径が 40～80 μm のフィブロインスポンジに、4 週齢雄の家兎より採取・培養した軟骨細胞を播種・培養した。12 週齢雄の家兎膝蓋骨に全範囲骨軟骨欠損を作製し、フィブロインスポンジ上に形成されていた軟骨組織様凝集体が欠損部を覆うようにスポンジを縫着した。骨軟骨欠損作製のみの4例及び細胞を含まないフィブロインスポンジのみで被覆した8例においては6週後に組織修復が認められなかったのに対し、軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジで骨軟骨欠損部を被覆した8例中5例において硝子軟骨様組織による修復が認められた。GFP 蛋白を発現させた家兎を軟骨細胞のドナーとした例では、修復組織を構成する細胞の平均 48% が GFP 陽性であった。

以上の研究結果は、フィブロインスポンジ上の軟骨組織様凝集体が関わって欠損部を修復したことを示唆し、広範な骨軟骨欠損の修復方法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28年12月13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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降