

氏 名	中川 浩輔
(ふりがな)	(なかがわ こうすけ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 1131 号
学位審査年月日	令和2年1月29日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Histological analysis of the wrapping treatment for meniscal horizontal tears in rabbits.  (半月板水平断裂に対するラッピング治療の組織学的検討—日本白色家兎を用いた研究)
論文審査委員	(主) 教授 佐浦 隆一 教授 廣瀬 善信 教授 近藤 洋一

### 学位論文内容の要旨

#### 《目的》

半月板の機能は荷重分散、衝撃吸収、潤滑、関節の安定化などであり、相対する関節軟骨に対して重要な役割を持つ。半月板断裂には断裂部が外縁に多い縦断裂と、内縁に多い放射状断裂および水平断裂がある。半月板の外縁は血流が豊富であるが内縁は血流に乏しいことから、縦断裂は自己修復も期待されるのに対し、放射状断裂、水平断裂は自然治癒が困難である。半月板断裂に対する手術治療には切除と縫合がある。半月板部分切除術は広く行われている術式であるが、長期的には半月板の機能低下を招き、相対する関節軟骨変性の一因となる。一方、半月板機能温存を目的とした半月板縫合術では再断裂の可能性があり、特に内縁の断裂に対する再手術率は高い。そのため、内縁の断裂である水平断裂では、断裂部の修復が期待できないので半月板部分切除術が選択されることも多いが、水平

断裂は放置しても半月板部分切除術を行っても、経年的に半月板機能が低下して相対する関節軟骨にも変性変化が生じるので、新規治療の開発が望まれてきた。近年、半月板断裂に対するコラーゲンシートを用いたラッピング治療が開発され、臨床的に良好な治療成績が報告されているが、ラッピング治療が行われた半月板水平断裂の修復過程を組織学的に検討した報告はない。

そこで、本研究ではラッピング治療が行われた半月板水平断裂の修復過程と相対する関節軟骨の変性変化の有無を組織学的に評価した。

## 《方 法》

ラッピング材料には人工硬膜として臨床使用されているポリグリコール酸 (polyglycolic acid: PGA)、ポリ乳酸 (poly-L-lactic acid: PLA)、ポリカプロラクトン (polycaprolactone: PCL) を含む SEAMDURA<sup>®</sup> を選択した。

内側半月板に水平断裂を作製した日本白色家兎 15 羽の左右 30 膝を未処置群とシートで断裂部を覆ったラッピング群のどちらかに無作為に割り付けて、環境がコントロールされたケージ内で飼育し、それぞれ、8、12、16 週目で犠牲死とした。半月板の形態は肉眼的に評価し、半月板断裂部および周囲の組織は Safranin-O/Fast green 染色、HE 染色、ピクロシリウスレッド染色による組織学的検討を実施した。また、抗 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 抗体、抗 Ki67 抗体、抗 II 型コラーゲン抗体を用いた半月板断裂部組織の免疫染色によりその修復過程を調べ、相対する大腿骨側関節軟骨は Safranin-O/Fast green 染色により変性の有無や程度を組織学的に評価した。なお、半月板断裂部の組織修復・変性および大腿骨側関節軟骨組織の変性の程度はそれぞれ modified Pauli score、OARSI score を用いて検討した。

## 《結 果》

8 週目のラッピング群では肉眼的にシートが残存していたが、12、16 週では吸収されていた。8 週目の半月板の Safranin-O/Fast green 染色では未処置群、ラッピング群ともに

断裂部外縁の修復が観察されたが、12週目ではラッピング群のみ断裂部内縁の修復を認め、16週目ではラッピング群は断裂部がほぼ修復し、modified Pauli score もラッピング群は8.8点と未処置群5.2点より有意に高かった。16週目の半月板断裂部のHE染色では、どちらの群にもマクロファージや異物巨細胞の明らかな浸潤は見られず、未処置群は紡錘状細胞が、ラッピング群は円形細胞が観察された。また、細胞数の変化を検討したところ、8週では未処置群に比較してラッピング群で半月板断裂部の細胞数の有意な増加（未処置群3660/mm<sup>2</sup>、ラッピング群6000/mm<sup>2</sup>）を認めたが、ラッピング群では経時的に細胞数は減少した。免疫組織学的検討では8週のラッピング群の断裂半月板の外縁、内縁および表層に抗iNOS抗体による染色性の増加を認めた。また、8週と12週のラッピング群では、断裂半月板の外縁、内縁、表層に抗Ki67抗体による高い染色性を示した。半月板修復の有無を検討するため、ピクロシリウスレッド染色と抗II型コラーゲン抗体を用いた免疫染色を行ったところ、16週のラッピング群ではピクロシリウスレッド染色下での網目構造と抗II型コラーゲン抗体による染色陽性を認めた。一方、大腿骨側関節軟骨のSafranin-O/Fast green染色では、未処置群では16週まで経時的に軟骨の菲薄化と染色性の低下を認めたが、ラッピング群では8週で同様の変化を認めたものの、16週では8週と比較しても変化はなかった（OARSI score：未処置群 8週7.0点、16週14.0点、ラッピング群 8週7.0点、16週6.8点）。

#### 《考 察》

本研究は、我々の渉猟し得た範囲では、ラッピング治療が実施された半月板水平断裂部の変化を組織学的に観察した初めての研究である。本研究の結果から、ラッピング治療は半月板水平断裂部の組織学的修復を促し、相対する大腿骨側関節軟骨の変性の進行を抑制する可能性が示された。

半月板の正常組織では内縁に核の周囲が染色されない円形の軟骨様細胞が存在し、II型コラーゲンが発現していることが報告されている。今回の研究でもラッピング群では内縁に円形細胞と抗II型コラーゲン抗体による染色陽性を認めた。また、ラッピング群断裂部の

外縁および内縁には抗 iNOS 抗体、抗 Ki67 抗体による染色性の発現を認めた。

半月板の治癒メカニズムには辺縁の血流豊富な組織に存在する半月板の前駆細胞様の細胞による **Extrinsic repair** と断裂部での自己組織による **Intrinsic repair** の2つがあるとされる。これまでに外縁の半月板縦断裂ではラッピング治療が **Intrinsic repair** を促す可能性が報告されているが、本研究ではラッピング群で内縁や半月板表層にも炎症反応の存在を示唆する抗 iNOS 抗体による染色性や細胞の増殖反応を示唆する抗 Ki67 抗体による染色性の発現が見られたことから **Intrinsic repair** だけでなく **Extrinsic repair** による修復も生じた可能性は否定できない。また、半月板水平断裂は軟骨変性の原因となることが報告されているが、ラッピング群では水平断裂によって引き起こされたと考えられる大腿骨側関節軟骨の変性が一定以上進行しなかったため、ラッピング治療がラッピングによる直接作用、あるいはラッピング治療の結果得られた半月板断裂修復を介して、半月板機能の低下抑制、あるいは機能維持をもたらしたと推察した。

以上、ラッピング治療は半月板水平断裂の組織学的修復促進と相対する大腿骨側関節軟骨の変性進行抑制に資する治療法である可能性が示された。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

半月板断裂の治療では、半月板切除術後に関節軟骨の変性が経年的に進行し、変形性膝関節症の発症リスクが上昇することが報告され、半月板縫合術が推奨され、さまざまな手術器具や方法が開発されている。しかし、半月板縫合術後の再断裂の頻度は小さくなく、特に、半月板の内縁は外縁と比較して血流に乏しく、創傷治癒機転が働きにくいので、内縁の断裂が多い水平断裂や複合断裂では半月板縫合術の治療成績は芳しくなく、半月板断裂の治癒機転を促す工夫や組織移植を含む半月板組織の再生などの新規治療の開発が待たれる。半月板断裂の治癒機転を促す工夫のひとつとして、半月板断裂部をコラーゲン製の薄膜でラップする治療法の臨床的有用性が報告されているが、その治癒機転について組織学的には検討されていなかった。

そこで、申請者は臨床的に使用されている人工硬膜と家兎半月板水平断裂モデルを用いて、半月板断裂に対するラッピング治療の治癒過程と半月板に相対する大腿骨側関節軟骨に対するラッピングおよび断裂後半月板の影響を検討した。

その結果、ラッピング治療により半月板水平断裂部の修復が組織学的に確認できた。また、相対する大腿骨側関節軟骨も当初は変性が生じるが、ラッピング治療によりその後の変性の進行が抑制されることが明らかとなった。

今回の知見は、すでに人体に対する安全性が担保されている人工硬膜を用いた半月板断裂に対するラッピング療法の可能性を示すものであり、ラッピング材の工夫など半月板水平断裂に対する新たな治療法や治療材料の開発の一助になる可能性がある。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Cartilage : 2020, in press

doi: 10.1177/1947603519870838