

氏 名	村 上 友 彦
(ふりがな)	(むらかみ ともひこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成30年7月11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	Establishment of novel meniscal scaffold structures using polyglycolic and poly-L-lactic acids (ポリグリコール酸およびポリ-L-乳酸を用いた新規半月板 scaffold の開発)
論文審査委員	(主) 教授 佐 浦 隆 一 教授 高 井 真 司 教授 寺 井 陽 彦

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究の目的》

半月板の大部分は無血管組織であるため自己修復能に乏しく、その治療には断裂半月板の切除術や半月板形成術が選択されることが多い。しかし、半月板切除後には関節症性変化が進行することが明らかとなり、近年、半月板修復術や再建術が推奨されているが、半月板修復術や再建術に使用する人工材料について安定した成績を示すものはない。

そこで、本研究では、すでに臨床応用されている医療材料である polyglycolic acid (PGA) および poly-l-lactic acid (PLLA) に着目し、新規半月板 scaffold としての可能性を検討した。

《方法》

まず、PLLA sponge (*s*-PLLA)、PGA-coated PLLA sponge (*p*-PLLA)、PGA lamination

(*f*PGA)、P (LA/CL)および caprolactone film coated PGA lamination (*f*PGA)の 4 種類の scaffold を用意し、力学的検討を行うために圧縮試験を行った。また、in vivo 試験として、日本白色家兎の内側半月板前節に生検パンチで直径 2mm 大の全層欠損モデルを作製し、欠損部に各 scaffold を移植した 4 群と sham 群、欠損群の 6 群、各 3 羽、合計 18 羽 36 膝を用いて以下の検討を行った。なお、評価は移植 8、12 週後に屠殺し実施した。

移植部分を含む半月板および半月板組織の評価は Image J を用いた肉眼的表面積の計測と Safranin-O/Fast green 染色後の Ishida スコアを用いて行った。また、抗 I 型コラーゲン抗体、抗 II 型コラーゲン抗体、抗 X 型コラーゲン抗体を用いて半月板再生組織の免疫組織学的検討を行い、scaffold 移植組織に対する炎症反応の評価は、抗 inducible nitric oxide synthase (iNOS)抗体を用いた免疫組織学的検討、肉眼的滑膜炎の有無と H.E.染色後のリンパ球および異型多核巨細胞数のカウントにより行った。また、半月板機能評価として scaffold を移植した半月板に接する部分の大腿骨側関節軟骨の状態を Modified Mankin OA scores を用いて評価した。

《結果》

圧縮試験では *f*PGA および *f*PGA 製 scaffold が *s*-および *p*-PLLA 製 scaffold に比して有意な強度を有していた。

次に、in vivo 試験では、半月板の表面積および Ishida score で移植後 12 週の *f*PGA 群が欠損群に比して有意に修復されていた。また、移植後 8 週で *f*PGA 群で欠損群に比して抗 II 型コラーゲン抗体での染色性が増強していた。

一方、炎症反応の評価では、移植後 8 週で *s*-PLLA 群、移植後 12 週で *p*-PLLA 群の肉眼的滑膜炎の程度、抗 iNOS 抗体による免疫染色態度とリンパ球の発現が増強しており、免疫反応によると推測される炎症所見を認めた。また、PLLA scaffold 移植 8 週後に異型多核巨細胞の出現を多く認めた。

移植後 12 週では *f*PGA 群の Mankin OA score は欠損群に比して有意に低く、*f*PGA scaffold 移植が変形性関節症の進行を遅らせていた可能性が示された。

《考察》

本研究の結果から、*f*PGA scaffold は良好な強度を持ち、有意な炎症反応を起こすことなく、半月板修復を促すばかりではなく、関節軟骨保護も可能とする人工材料であることが示された。

我々は先行研究で I 型コラーゲンを材料とする人工真皮は半月板 scaffold として良好な組織再生を促すことを報告したが、水に濡れると操作性が低下するので関節鏡視下手術には不向きと判断した。そして、臨床的に関節内手術ですでに用いられている PGA および PLLA に注目した。

PGA は多孔性構造のため優れた細胞遊走性を持つことが知られているが、その強度向上には構造上の工夫が必要であった。我々は積層体構造を採用し film コーティングを行うことにより適切な強度と形状を獲得することができた。

また、scaffold 内に遊走した細胞が半月板組織を再構築しているか否かを検討したところ、PLLA および PGA 移植群ではともに欠損群よりも正常に近い大きさの半月板類似組織が再生され、その組織は抗 I 型、抗 II 型、抗 X 型コラーゲン抗体に対する強い染色性を示し、特に術後 8 週目の *f*PGA 群ではこれらの抗コラーゲン抗体に対する有意な染色性の増強を認めた。

組織置換型の scaffold 移植では免疫応答による炎症反応を抑えることが重要である。PLLA 移植群では肉眼的滑膜炎、リンパ球や異物多核巨細胞の出現、抗 iNOS 抗体に対する染色性が増強していたが、PGA 移植群、特に *f*PGA 群ではこれらの炎症反応を認めなかった。

以上より、PLLA および PGA とも scaffold として有用であるが、炎症反応の惹起という面から考えると *f*PGA が scaffold として最も有用であると考えた。

《結論》

*f*PGA scaffold は優れた力学的強度を示し、良好な組織学的修復、少ない炎症反応に加え、軟骨保護効果の点で半月板損傷へ有用な基材である可能性を示し、今後、新たな治療

材料になりうると考えられた。

論文審査結果の要旨

半月板は自己修復能が低いため、これまでその治療は損傷半月板の部分切除術が行われてきたが、半月板切除は変形性膝関節症のリスクとなることが認識されはじめた。本邦では半月板損傷に対しては縫合術または切除術しかないため、複雑な断裂や変性した半月板では縫合を断念する症例も多い。そのため新規半月板 scaffold の開発により、縫合困難であった半月板損傷例の温存手術の可能性が高まることが期待できる。

そこで申請者はすでに臨床応用されている生体吸収材料であるポリグリコール酸 (polyglycolic acid : PGA)、ポリ-L-乳酸 (poly-L-lactic acid : PLLA) に注目し、これを用いた 4 種類の新規半月板 scaffold の材料としての可能性を検討した。

まず、PGA scaffold が PLLA scaffold に比して有意な強度を有しており、特に P (LA/CL) および caprolactone film でコーティングされた PGA scaffold (*f*PGA) は有意な変形性関節症の進行遅延効果を持つことを明らかにした。

次に半月板の表面積の計測および組織学的スコアより、*f*PGA scaffold は有意な修復能を持つことを示した。

最後に、PLLA scaffold では抗 iNOS 抗体に対する免疫染色の増強と H.E. 染色でのリンパ球の浸潤および肉眼的滑膜炎所見といった炎症所見を認めたが、PGA scaffold では炎症反応が軽度であることを示した。

これらの結果から申請者は *f*PGA scaffold が優れた力学的強度を示し、良好な組織学的修復、少ない炎症反応に加えて軟骨保護効果を持ち、半月板損傷修復の治療で有用な基材になり得ることを明らかにした。

今回の知見は、本邦での半月板損傷の新規治療法開発の一助になる可能性が大きい。

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)

Journal of Biomaterials Applications 32(2): 150-161, 2017