

学位論文題名

A Cellular Implantation System Using  
an Injectable Ultra-purified Alginate Gel for Repair of  
Osteochondral Defects in a Rabbit Model

(ウサギ骨軟骨欠損モデルにおける高純度アルギン酸ゲルを用いた軟骨再生)

学位論文内容の要旨

【目的】軟骨は一度損傷すると自然治癒することがほとんどなく、関節痛を引き起こし日常生活に支障をきたす。近年、軟骨損傷の治療として自家培養軟骨細胞移植が行われてきたが、従来の手術方法 (drilling, microfracture, mosaicplasty など) に比べて良好な成績を残しているとはいえない。その臨床成績が良くない原因として関節切開を要する多数回手術や煩雑な手技などの欠点が考えられる。われわれはこの点を克服するために高純度アルギン酸ゲルを scaffold として軟骨再生に応用した。様々な形状の欠損に充填でき、そのままの形状で瞬時に硬化するため骨膜で覆う必要がなく、関節鏡下で injectable に移植可能であるという利点がある。従来アルギン酸には細胞毒性を示す成分を含み、異物反応を起こしていたが、われわれは精製した高純度アルギン酸を使用することにより、異物反応がなく、臨床応用が可能で、生体内で良好な軟骨再生が期待できる。本研究の目的は、高純度アルギン酸ゲルの臨床応用に向け、*In vitro*での軟骨分化誘導能、ウサギ骨軟骨欠損における軟骨再生能を従来のアルギン酸ゲルと比較し証明することである。

【方法】*In vitro*評価：高純度アルギン酸ゲル (purified alginate, 商品名 Sea Matrix, 持田インターナショナル, エンドトキシン 75950 EU/g 含有) と従来のアルギン酸ゲル (commercial grade alginate, Wako, エンドトキシン 5.8 EU/g 含有) に日本白色家兔 (2.6~2.9kg) の骨髄間葉系細胞 (以下 BMSCs, 脛骨近位より穿刺吸引採取した骨髄液を播種し接着細胞を継代したもの) を包埋しアルギン酸ビーズを作成した。DMEM+10% FBS で培養し、0, 1, 2, 3, 7 日後に生細胞を cell counting kit-8 (Dojindo) で測定した。また軟骨細胞誘導培地 (TGF- $\beta$ 3 含有) で培養 3, 4 週後に HE 染色、サフラニン O 染色、免疫染色による組織学的評価を行った。さらにアルギン酸ゲルを 50mM EDTA で溶解し細胞の RNA を抽出し、real time RT-PCR による遺伝子発現の定量を行った。*In vivo*評価：日本白色家兔 (2.6~2.9kg) の膝関節の大腿骨滑車に  $\phi$ 5x3mm の骨軟骨欠損を作成し、BMSCs ( $2.5 \times 10^7$  cells/ml) を包埋したアルギン酸ゲルを注射器により欠損部に injectable に充填し、表層を 100mM 塩化カルシウムで硬化させた。これにより表層から瞬時に硬化し安定して欠損部に留まる。術後 4w、12w に安楽死させ、再生組織の肉眼的所見をスコア化し、HE 染色、サフラニン O 染色、抗

type I/II/X collagen 抗体で免疫染色したものを組織学的にスコア化した。また再生組織の硬度を indentation test にて測定した。実験群は defect 群, commercial grade alginate 群, commercial grade alginate + BMSCs 群, purified alginate 群, purified alginate + BMSCs 群の 5 群に分けた。

【結果】 *In vitro* 評価：アルギン酸ビーズを DMEM+10% FBS で培養した 1, 3, 7 日目において purified alginate 群は commercial grade alginate 群に比較してアルギン酸ゲル内の BMSCs の生細胞数が有意に多かった。アルギン酸ゲル内で軟骨誘導した BMSCs は培養 3, 4 週目には細胞周囲にサフラニン O で染まり、抗 type II collagen 抗体陽性の豊富な細胞外器質を認め、軟骨細胞に分化していることが認められた。real time RT-PCR では purified alginate 群で type II collagen と aggrecan の遺伝子発現が有意に増加しており、一方で type I collagen は有意に減少した。*In vivo* 評価：defect 群では欠損部に表面不整の癒痕組織を認めた。周囲の正常軟骨にも変性を起こしていた。commercial grade alginate を移植した 2 群では欠損部の深部にアルギン酸ゲルが残留しており、その周囲に炎症細胞の浸潤も認めた。purified alginate 群においてはそのような所見は認めなかった。commercial grade alginate 群では一部に軟骨細胞外器質を有する軟骨様組織の産生を認めた。BMSCs を移植した 2 群のほうが BMSCs を移植していない群にくらべて軟骨下骨の形成が良好であった。purified alginate + BMSCs 群では表面平滑で細胞外器質が豊富な軟骨修復像を示した。力学試験では compression modulus が purified alginate + BMSCs 群で最も強度が高く、正常軟骨の 75%まで達していた。4w にくらべて 12w のほうが強度が高かった。BMSCs を移植した群のほうが BMSCs を移植していない群にくらべて強度が高かった。12w における再生組織の肉眼所見のスコアは順に 1.86、2.50、3.00、4.57、5.71 であった。組織所見のスコアは順に 6.57、7.75、11.75、15.00、16.71 であった。ともに purified alginate + BMSCs 群で最も高得点であった。

【結論】 *In vitro*、*In vivo* ともに commercial grade alginate 群に比較し purified alginate 群が良好な軟骨再生を示した。また軟骨再生の臨床応用に向けて新たな移植方法を開発した。今までの治療方法で必要であった骨膜の被覆などが不要で移植が非常に容易である。purified alginate gel は関節鏡下で移植可能な injectable gel として軟骨再生に有用である可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 山 本 有 平

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

## A Cellular Implantation System Using an Injectable Ultra-purified Alginate Gel for Repair of Osteochondral Defects in a Rabbit Model

(ウサギ骨軟骨欠損モデルにおける高純度アルギン酸ゲルを用いた軟骨再生)

本研究の目的は、軟骨再生の臨床応用に向け開発した低エンドトキシン高純度アルギン酸ゲルの *In vitro* での軟骨分化誘導能を確認することと、ウサギ骨軟骨欠損における軟骨再生能を従来のアルギン酸ゲルと比較することである。*In vitro* の実験では高純度アルギン酸ゲルと従来のアルギン酸ゲル (commercial grade alginate) に日本白色家兎の骨髄間葉系細胞 (以下 BMSCs) を包埋しアルギン酸ビーズを作成した。培養 0, 1, 3, 7 日後に生細胞を測定したところ、1, 3, 7 日目に高純度ゲル群で有意に細胞数増加を認めた。軟骨細胞誘導培地 (TGF- $\beta$ 3 含有) で培養したところサフラニン O 染色、抗タイプ II コラーゲン抗体で濃染する細胞外器質産生を認め、RT-PCR ではタイプ II コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現を確認し軟骨分化しているのを確認した。*In vivo* の実験では日本白色家兎の大腿骨滑車骨軟骨欠損モデルを用いた。アルギン酸ゲルを注射器により欠損部に injectable に充填し、表層を 100mM 塩化カルシウムで硬化させる新たな移植方法を用いた。高純度アルギン酸に BMSCs を移植した群では表面平滑で細胞外器質が豊富な軟骨修復像を示した。力学試験でも最も強度が高く、正常軟骨の 75%まで達していた。

これらの結果から高純度アルギン酸ゲルは従来のアルギン酸に比較し良好な軟骨再生を示すことがわかった。新たに開発した移植方法も骨膜の被覆などが不要で移植が非常に容易である。高純度アルギン酸ゲルは関節鏡下で移植可能な injectable gel として軟骨再生に有用である可能性がある。

審査にあたり副査山本教授から移植した骨髄細胞が残留し軟骨修復に関与しているのかについての質問があった。申請者は蛍光標識した細胞が欠損部に残留していることを過去の報告と予備実験で行った実験結果からを引用し回答した。無細胞移植群でも軟骨修復している点から遊走した細胞も軟骨修復に寄与していることにも言及し回答した。次いで主査安田教授からカルシウムイオンの毒性についての質問と骨髄細胞の同定方法についての質問と力学試験の詳細に関して質問があった。申請者はカルシウムイオンの毒性に関しては濃度依存性の毒性を示した予備実験を

引用し説明した。また独自の移植方法はカルシウムの使用量を極力減らしている特徴があることを説明した。申請者は骨髄細胞の同定方法に関して、フローサイトメトリーにより細胞表面抗原の確認が必要であることを説明した。また今回の実験では骨髄間葉系幹細胞でなく骨髄液を平面培養して接着細胞を回収した骨髄間葉系細胞を使用したことを説明した。最後に副査三浪教授からアルギン酸がヒアルロン酸の関節内注射にとって代わりうる可能性があることを述べた。またアルギン酸の生体内での代謝は不明で、今後の検討が必要であることを申請者に助言した。

この論文は、アルギン酸ゲルの臨床応用に向けた実験で、その修復組織を肉眼的、組織学的、力学的に評価した論文であり、新たなマテリアル、新たな移植方法を開発した独創的な研究である。臨床応用により、よりよい軟骨再生が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。