HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高純度アルギン酸ゲルを使用した半月板修復治療法の開発［全文の要約］
Author(s)	金, 佑泳
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2452 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13438号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74342
Type	doctoral thesis
File Information	Wooyoung_Kim_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文（要約）

高純度アルギン酸ゲルを使用した半月板修復治療法の開発

(Development of a surgical technique for meniscal wound repair using an ultra-purified alginate gel)

2019年 3月

北 海 道 大 学

金 佑泳

WooYoung Kim

学 位 論 文（要約）

高純度アルギン酸ゲルを使用した半月板修復治療法の開発

(Development of a surgical technique for meniscal wound repair using an ultra-purified alginate gel)

2019年 3月

北 海 道 大 学

金 佑泳

WooYoung Kim

学位論文の要約

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 金 佑泳

学 位 論 文 題 名

高純度アルギン酸ゲルを使用した半月板修復治療法の開発
（Development of a surgical technique for meniscal wound repair using an ultra-purified alginate gel）

【背景と目的】

半月板は、大腿骨と脛骨の間の内・外側に存在する三日月型の線維軟骨組織であり、大腿骨から脛骨にかかる強大な荷重を分散する荷重緩衝作用、および膝関節の安定性保持作用を有する。 若年者ではスポーツ外傷、中高年者では加齢により半月板は摩耗し変性する結果、半月板損傷は青壮年期における関節手術の最も多い原因となっている。厚生労働省 社会医療診療行為別調査によると半月板の手術は年間約 3 万件が行われているが、他の変形性膝関節症や靭帯損傷の合併を考慮すると約 10 万件以上の損傷が存在すると推察される。半月板組織は、辺縁部以外は無血管領域であるため自己修復能に乏しく、損傷すると切除せざるを得ないことが多いのが現状である。しかし、半月板が失われると、時間の経過とともに関節軟骨損傷が起こり、最終的に変形性膝関節症が惹起される。このような問題を解決するため、これまで同種異固体移植、異種異固体移植、細胞入りバイオマテリアル及び生物学的スキャホルドを用いて半月板の組織を復旧または保存を図る研究が行なわれているが、このうち、 生物学的スキャホルドと同種異固体移植が最近の半月板損傷の治療用マテリアルとして脚光を浴びている。固形スキャホルドは力学的強度は優れるが、柔軟性と可塑性(Plasticity)が乏しい。人工スキャホルドの一つのハイドロゲルは充分な水分を含有し、可塑性をもち、反復荷重に耐える点で固形スキャホルドより優れるが、生理活性(bioactivity)が貧弱で未だ臨床に適用できないままである。

当科ではこのようなハイドロゲルの短所を克服する代替剤として UPAL ゲルを開発した。 当科の UPAL ゲルは精製過程でエンドキシンレベルを 5.76 EU/g まで減らしたもので、 市販のアルギン酸の 75,950 EU/g の 1/10000 以下であるので、臨床で移植されたマテリアルに対する免疫反応を防止することができる。

UPAL ゲルは、スキャホルドとして、未分化細胞に対して優れた細胞増殖能、軟骨分化誘導能を持つ。また家兎やイヌの骨軟骨欠損モデルにおいても、骨髄間葉系幹細胞移植を併用することで良好な軟骨修復が得られ、このマテリアルは硝子様軟骨による軟骨修復を促進するのを呈した。これらの硝子様軟骨への研究結果に基づいて、本基材は半月板再生における人工マトリクスとしても用いることができる可能性があると の仮説を立てた。 本研究の目的は①家兎半月板部分欠損モデルにおいて UPAL ゲル移植が半月板修復に与える効果を明らかにすること、②損傷した半

月板の修復組織をなしている組織、細胞がどこから由来したかを in vivo 凍結解凍法（freeze-thaw method）を用いて明かすことである。

①家兎半月板部分欠損モデルにおいてUPALゲル移植が半月板修復に与える効果

【対象と方法】

成熟日本白色家兎43羽86膝を用いた。全身麻酔状態で両膝の内側半月板前節に対して直径2 mmの生検用パンチを用いて円形全層欠損を作製し、左膝を欠損群、右膝をゲル群とした。術後、運動制限はなかった。術後3週、6週、および12週で肉眼的・組織学的定量評価を施行した。また、術後6週及び12週において、0.5 mmのindenter tipを用い変位制御（0.5 mm）による繰り返し負荷試験（cross-head speed 0.1 mm/sec）による力学的評価を行い、正常膝と比較した（n=6）。

【結果】

欠損群の半月板欠損部は、薄い線維性組織で被覆され、12週では10膝中8膝に前節の欠損を認めた。一方、ゲル群では、欠損部には円形の核を有する軟骨細胞が多数観察され、12週ではSaf-O染色に濃染する線維軟骨様組織で充填されていた。肉眼的評価では、全ての週においてゲル群が欠損群より有意に高く（p=0.026）、12週における組織学的評価においても、ゲル群は欠損群より有意に高かった（p=0.016）。修復組織の線形剛性は、ゲル群（6週、12週）では正常半月板より低値であったものの（p=0.015, p=0.022）、欠損群（6週）と比べ有意に高値であった（p=0.006, p=0.015）

②損傷した半月板の修復組織及び細胞の由来の追跡

【対象と方法】

成熟日本白色家兎32羽64膝を用いた。 全身麻酔状態で両膝の内側半月板前節に対して直径2 mmの生検用パンチを用いて円形全層欠損を作製し、4群に分け (n=8)、欠損部にUPALゲルを充填した。A群には凍結解凍をせず、B群には内側半月板全域を、C群には内側半月板周囲の滑膜組織を、D群には内側半月板全域とその周囲の滑膜組織を凍結解凍した。術後、運動制限はなかった。術後1、6週での修復組織を組織学的に評価した。組織学的評価にはZellnerらの方法を用いた。統計学的評価にはJMP proを用い、有意水準は$p<0.05$とした。

【結果】

1週目にはどの群にも線維軟骨組織は殆ど認められず、4群間の組織学的スコアには有意差を認めなかった。 一方、6週目には、AとB群の欠損部は、saf-O染色で濃染する厚い線維軟骨様組織で満たされていた。また、修復組織の細胞は円形、卵円形の核と豊富な細胞質を含んでいた。一方で、C群およびD群の欠損部は、疎な線維

組織で満たされ、線維軟骨様細胞を殆ど認めなかった。滑膜を凍結解凍しなかった群（A、B）は滑膜を凍結解凍した群(C、D)よりスコアが統計学的に有意に高値であった（A群　vs　C群とD群、$P<0.01$；　B群　vs　C群とD群、$P<0.05$）。

【考察】

先行研究で、UPALゲルの単独移植は家兎とイヌの骨軟骨損傷モデルにおいて硝子様軟骨の修復を促進することが示され、これらの結果に基づいて我々はUPALゲルの単独移植が半月板損傷部にも線維軟骨様組織の修復を促進するだろうと仮定した。この仮説を検証するために行なった本研究（①）の結果、UPALゲル移植は線維軟骨様組織による修復を促進し、修復組織の線形剛性を向上させたことが示された。しかし、 再生した組織をなしている線維軟骨様細胞及びマトリクスの源泉はどこであるかは未だ不明であった。それを明かすため行なった本研究(②)の結果、 我らは損傷した半月板の修復に当たって修復組織の再生細胞の主な源泉は半月板より滑膜であると結論づけた。本研究は半月板損傷に対する新しい組織工学的治療技法を提示したという点で意義がある。臨床において、この技法は損傷した半月板を縫合したときに生じた隙間にUPALゲルを埋植することで組織の修復能と強度を向上させることができると期待される。のみならず、向後の半月板損傷の治療に当たって、滑膜および滑膜由来間葉系幹細胞の役割とその効能を向上させる方法に重点を置くのが向後の半月板の再生医療及び組織工学における重要な事項になろうと期待する。

【結論】

本研究から、従来から修復困難とされている半月板損傷に対する治療成績の向上が期待される。また、修復の主な担い手が滑膜であることを明かしたことで向後、半月板の再生医療及び組織工学の研究に重要な方向を提示すると期待される。今後は、UPAL ゲルの安全性と有効性をヒトにおける臨床研究で証明していく必要があり、将来的には、さらに低侵襲な関節鏡下で可能な手術手技となるよう、さらなる手技の開発と研究が必要になると考えられる。