HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	自家骨軟骨柱移植術に高純度アルギン酸ゲル（UPALゲル）移植を併用した治療法の開発
Author(s)	菱村, 亮介
Description	配架番号：2476
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13462号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13462
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74727
Type	doctoral thesis
File Information	Ryosuke_Hishimura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

自家骨軟骨柱移植術に高純度アルギン酸ゲル（UPAL ゲル）移植を併用した治療法の開発

（The development of a combination technique in osteochondral autograft transplantation using an ultra-purified alginate gel）

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

菱村 亮介
Ryosuke Hishimura

学 位 論 文

自家骨軟骨柱移植術に高純度アルギン酸ゲル（UPAL ゲル）移植を併用した治療法の開発

（The development of a combination technique in osteochondral autograft transplantation using an ultra-purified alginate gel）

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

菱村 亮介
Ryosuke Hishimura

目　　次

発表論文目録及び学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1 頁

要旨 ・・4-5 頁

略語表 ・・ 6 頁

諸言 ・・ 7-8 頁

方法 ・・ 9-16 頁

結果 ・・ 17-24 頁

考察 ・・ 25-27 頁

総括及び結論 ・・ 28-頁

謝辞 ・・ 29 頁

利益相反 ・・ 30 頁

引用文献 ・・ 31-35 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hishimura R., Onodera T., Hontani K., Baba R., Homan K., Matsubara S. Joutoku Z., Kim WY., Nonoyama T., Kurokawa T., Gong JP., Iwasaki N.

   Osteochondral Autograft Transplantation Technique Augmented by an Ultrapurified Alginate Gel Enhances Osteochondral Repair in a Rabbit Model

   The American Journal of Sports Medicine (in press)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 菱村　亮介　小野寺智洋　本谷和俊 馬場力哉　宝満健太郎　松原新史　上徳善太　金　佑泳　岩崎倫政

   自家骨軟骨移植術に高純度アルギン酸ゲルを併用した治療効果の検討

   第 30 回日本軟骨代謝学会　2017 年 3 月 3－4 日、京都、口演

2. Hishimura R., Onodera T., Hontani K., Baba R, Homan K., Matsubara S. Joutoku Z., Kim WY., Iwasaki N.

   Effects of autologous osteochondral transplantation augmented by ultrapurified alginate gel in rabbit model
   Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017
   March 19-22, 2017/ San Diego, USA, poster

3. 菱村　亮介　小野寺智洋　本谷和俊 馬場力哉　宝満健太郎　松原新史　上徳善太　金　佑泳　岩崎倫政

自家骨軟骨移植術に高純度アルギン酸ゲルを併用した治療効果の検証

第 32 回日本整形外科基礎学術集会 2017 年 10 月 26－27 日、那覇、口演

4. 菱村　亮介　小野寺智洋　本谷和俊 馬場力哉　宝満健太郎　松原新史　上徳善太　金　佑泳　岩崎倫政

自家骨軟骨移植術に高純度アルギン酸ゲルを併用した治療効果の検証

第 31 回日本軟骨代謝学会 2018 年 3 月 2－3 日、名古屋、口演

5. Hishimura R., Onodera T., Hontani K., Baba R, Homan K., Matsubara S. Joutoku Z., Kim WY., Iwasaki N.

Effects of mosaicplasty augmented by ultrapurified alginate gel in a rabbit osteochondral defect model

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018
March 10-13, 2018/ New Orleans, USA, poster

6. Hishimura R., Onodera T., Hontani K., Baba R, Homan K., Matsubara S. Joutoku Z., Kim WY., Iwasaki N.

Effects of autologous osteochondral mosaicplasty augmented by ultrapurified alginate gel in a rabbit model

14th International cartilage repair society World congress 2018
April 09-12, 2018/ Macau, China, poster

7. 菱村　亮介　小野寺智洋　本谷和俊 馬場力哉　宝満健太郎　松原新史　上徳善太　金　佑泳　近藤　英司　岩崎倫政

自家骨軟骨移植術に高純度アルギン酸ゲルを併用した治療増強効果-

第 10 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 2018 年 6 月 14－16 日、福岡、口演

8. 菱村　亮介　小野寺智洋　本谷和俊 馬場力哉　宝満健太郎　松原新史　上徳善太　金　佑泳　濱崎　雅成　徐　亮　岩崎倫政

自家骨軟骨移植術に高純度アルギン酸ゲルを併用した治療効果の検討

第 33 回日本整形外科基礎学術集会 2018 年 10 月 11－13 日、奈良、口演

9. 菱村　亮介　小野寺智洋　本谷和俊 馬場力哉　宝満健太郎　松原新史　上徳　善太　金　佑泳　濱崎　雅成　徐　亮　岩崎倫政

骨軟骨柱移植術に高純度アルギン酸ゲル（UPAL ゲル）移植を併用した治療効果の検討

第 40 回日本バイオマテリアル学会大会　2018 年 11 月 12－13 日、神戸、口演

要旨

【背景と目的】自家骨軟骨柱移植術（Osteochondral Autograft Transplantation :OAT）は、一期的に骨 - 軟骨複合体として硝子軟骨による局所修復が得られる術式であり広く利用されている。しかしその一方で、移植用の骨軟骨柱（graft）の採取によるドナー側の術後の痛み（donor site morbidity）が懸念される。また graft 移植部周囲の間隙は硝子様軟骨ではなく線維性軟骨として修復される。よって graft 採取は最小限にとどめることが望ましいが、反面、graft 移植部周囲の間隙拡大による再生組織の質の低下も問題となる。このジレンマを克服するための手段として、この間隙に対して足りない分をバイオマテリアルで補填する方法に思い至った。我々は数あるバイオマテリアルのうち、軟骨再生治療における scaffold として利用されているアルギン酸の併用に着目し、過去に研究を重ねてきた。当科では通常のアルギン酸ゲルでは問題となる細胞毒性を極限まで低下させた高純度アルギン酸ゲル（Ultra-purified alginate gel :UPAL gel）を開発し、軟骨再生の足場として優れた軟骨分化誘導能と高い構造適合性をもつことを報告してきた。そこで今回我々は、OAT に UPAL gel 移植を併用することで、従来よりも少ない graft 使用量においても良好な軟骨修復が得られるのではないかという仮説を立てた。本研究の目的は日本白色家兎の大腿骨骨軟骨欠損モデルを用いて、本術式の治療効果を検討することである。

【対象と方法】動物手術モデルとして、生後 24 週齢の日本白色家兎の膝関節（大腿骨滑車部）に直径 5 mm、深さ 2mm の骨軟骨欠損を作成した。OAT 施行群では反対側から採取した直径 2.5 mm の graft を移植した。群分けは 3 群とし以下のものとした。無治療群（Control 群）、OAT 単独群（OAT 群）、OAT＋UPAL gel 併用群（Combined 群）とし、術後 4 及び 12 週における欠損部の修復について肉眼的、組織学的（n＝10）に評価した。OAT 群及び Combined 群については、さらに graft 周辺部に着目した肉眼的、組織学的評価を行い、graft 自体の軟骨変性についても詳細に評価した。術後 12 週においては、HE 染色組織検体を用いて偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性の評価（n=10）と修復組織と graft における力学強度の評価（n=5）を行った。再生された軟骨下骨の骨量については Micro-CT により評価した。移植 graft の生着に関しては Micro-CT と組織学的所見から評価した。

【結果】まず肉眼的評価をみる。術後 4 週においては、Control 群及び OAT 群では部分的には修復組織はみられるものの亀裂も見られた。Combined 群では大部分は修復組織で満たされていた。全体的なスコアリングでは Combined 群が他の群よりも有意に優れていた。Graft 周辺部のスコアリングにおいても Combined 群が OAT 群よりも有意に優れていた。術後 12 週においては、Control 群では十分な組織修復は得られず、OAT 群では全体的には修復されているものの、graft 周囲の間隙は主に不透明な線維性組織で満たされていた。一方で、Combined 群では表面が均一で半透明な組織により覆われ、主に硝子様軟骨組織で修復されていた。全体的及び Graft 周辺部のスコアリングでは術後 4 週のものと同様に Combined 群は他群に比べ、有意に優れていた。次に組織学的評価に移る。術後 4 週においては、Control 群では繊維性の瘢痕組織が少し見られる程度であった。OAT 群では graft 周囲において硝子様軟骨組織はわずかであった。Combined 群では硝子様軟骨組織は graft 周囲に一部見られるものの不十分であった。全体的なスコアリングでは Combined 群及び OAT 群がともに Control 群に比べて有意

に優れていたものの、前者 2 群間には有意差はなかった。Graft 周辺部のスコアリングにおいても Combined 群は OAT 群よりも高い傾向はあるものの、有意差はなかった。術後 12 週においては、Control 群では硝子様軟骨による組織修復は見られなかった。OAT 群では graft 周囲の硝子様軟骨組織は少なく、周囲の正常軟骨部に変性変化を認めた。Combined 群では graft 周囲はやや薄いながらも硝子様軟骨組織で満たされており、周囲軟骨の変性変化もわずかであった。全体及び Graft 周辺部のスコアリングでは、ともに Combined 群が他群に比べ有意に優れていた。Graft の軟骨変性は術後 4 週では両群間に差はなかったが、術後 12 週においては Combined 群が OAT 群よりも有意に少なかった。修復部と graft におけるコラーゲン配向性は Combined 群が他群に比べ有意に優れていた。同様に力学強度でも、正常軟骨部の強度と比べるとやや弱いものの Combined 群が他群に比べ有意に優れていた。軟骨下骨の再生骨量と graft 生着率は OAT 群と Combined 群においてほぼ同等であった。

【考察】本研究では OAT に UPAL gel 移植を併用することで、OAT 単独のものと比較し、良好な軟骨修作用を示した。これは graft 周囲間隙に投与された UPAL gel が骨髄間葉系幹細胞をリクルートする足場となり、そこに停留させたことで軟骨再生が促進されたものと考えた。ここで、UPAL gel が骨再生に対して阻害的に作用する可能性も考えたが、OAT 単独群と Combined 群の両群間において再生された骨量に特に有意な違いはなかったことから、UPAL gel は軟骨下骨の修復に対しては悪影響を与えないものと考えられた。また graft の軟骨変性については、経時的にみると Combined 群で OAT 群に比べ変性が抑制されていたが、この考えられうる要因として 2 点考えられた。1 つ目は、UPAL gel により graft 間隙の修復が促進されたことで graft 自体にかかる圧が分散、低減された可能性である。2 つ目としては、UPAL gel 自体の持つ軟骨変性抑制作用である。当科における過去の動物研究では高純度アルギン酸の関節内投与により軟骨変性を抑制したと報告しており、本研究でも同様の治療効果が示されたのではないかと推察された。

【結論】OAT に UPAL gel 移植を併用することで、軟骨下骨の修復を阻害することなく、良好な軟骨修復及び graft 保護作用を示した。これにより OAT における donor site morbidity のリスクを軽減しながらも、十分な良好な組織修復が得られる可能性がある。また、これまで OAT 単独では治療できなかった広範囲軟骨欠損に対しても、適応が拡大できる可能性が考えられた。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

BV	Bone Volume
GAG	Glycosaminoglycan
HE	Hematoxylin and Eosin
OAT	Osteochondral Autograft Transplantation
PLM	Polarized Light Microscope
Saf-O	Safranin – O
SD	Standard deviation
UPAL gel	Ultra-purified alginate gel

緒言

自家骨軟骨柱移植術（Osteochondral autograft transplantation; OAT）は関節面の欠損部に対して硝子軟骨で被覆可能な一般的な手術方法である(Hangody et al., 2010; Hangody and Fules, 2003; Hangody et al., 2008; Paul et al., 2012; Scranton et al., 2006)。近年この方法は有症状の骨軟骨病変へ広く適応があると考えられている。OAT の基本操作としては骨軟骨欠損部に対して同一個体の膝関節内の非荷重領域より採取した複数の円柱型の骨軟骨柱（graft）を移植する方法である。過去の報告では術後良好な成績を得るためには、欠損部に対してできるだけ高い graft 被覆率になるようにすべきであると言われている(Hangody et al., 2004; Robert, 2011)。Roberts らは graft による欠損部の被覆率を少なくとも 80%以上に保つべきであると論じている(Robert, 2011)。よって、大きな骨軟骨欠損部に対しては良好な硝子軟骨による修復を獲得するためにはなるべく多くの graft が必要となる。

OAT を行う際に無視できない欠点の一つに、graft 採取部における悪影響が存在する。過去の研究によると、採取部でできた骨孔は術後 6 週で瘢痕組織により埋まり始め、8 から 12 週で繊維軟骨によって置換されると言われている(Bodo et al., 2000)。岩崎らは上腕骨小頭における離断性骨軟骨炎の治療の際の graft 採取部を術後 MRI で評価し、繊維組織で覆われていたことを報告している(Iwasaki et al., 2007)。Reddy らは健常な膝関節部において graft 採取した場合、術後の膝機能が低下した症例がみられたと報告している(Reddy et al., 2006)。そこで、ドナー膝に生じる悪影響を抑えるためには、術者は採取する graft をなるべく少なく、小さいものにすべきであると考えられる。しかしながら、graft 使用を制限すればするほど、その反面、欠損部の被覆率が低下するため graft 周囲の間隙においては繊維性軟骨による不十分な修復となってしまう(Smyth et al., 2013)ことも無視できない。このジレンマを解決しうる治療戦略としては、graft で被覆しきれない隙間においてもバイオマテリアルなどを補填することで硝子様軟骨が形成できる方法が理想的と考える。

当科では低エンドトキシン高純度アルギン酸ゲル（Ultra-purified alginate gel；UPAL gel）を開発し研究を重ねてきた(Igarashi et al., 2010; Sukegawa et al., 2012)。このマテリアルは、精製過程で従来の商業ベースのアルギン酸の持つ毒性の 1 万分の 1 以下まで低下させたものであり、従来のものに比べて、未分化細胞に対する高い軟骨分化誘導能を持つこともわかっている(Igarashi et al., 2010)。実際に動物実験としても、兎とビーグル犬の骨軟骨欠損に対して UPAL gel 単独投与が硝子様軟骨再生を促進させたことを報告している(Igarashi et al., 2012a; Igarashi et al., 2012b)。この成果を受けて、OAT に UPAL gel を併用することで、グラフト間隙の修復を促進できるのではないかという仮説に至った。本研究の目的は、兎の骨軟骨欠損に対して OAT に UPAL gel を併用した

治療効果を組織学的及び生体力学的に評価し、またこの治療法が従来の OAT 単独のものと比べてどのような治療効果を有するかを明らかにすることである。

実験方法

１．予備実験と家兎 OAT 移植モデルの検討

実験に用いる兎は、24 週齢の雄の日本白色家兎を日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。動物の取り扱いについては「北海道大学動物実験に関する規程」に則り，北海道大学の動物実験倫理審査の承認を受けて行った。使用するうさぎの週齢としてはなるべく自己修復困難な十分成熟した(Poole et al., 2010)生後 8~9 か月のものを検討したが、費用、生育時間が多くなる面で現実的には準備が困難であったため断念し、過去の類似研究(Hou et al., 2015; Maruyama et al., 2017; Smyth et al., 2013)に追従し、24 週齢を選択した。OAT 移植兎膝関節モデルについては、当初は荷重部（大腿骨顆部）での作成を試みた。しかし、うさぎの大腿骨顆部は小さすぎるために OAT モデル作成は困難であり、ここよりも広い面積である大腿骨滑車部に作成する方針とした。また今回の治療実験の意義としては、従来の方法よりも少ない graft 使用を目指すものであったために、1 本ではなく複数の graft 移植を目指したが、この場合 graft 移植する際に作成される縦穴も複数になるため、移植母床の安定性が失われてしまい、移植した graft がぐらぐらな不安定な状態となるため、生着が期待できるほどの初期固定性が得られなかった。よって、複数の移植は断念し graft 移植は 1 本のみとした。また UPAL gel の治療効果判定をできるだけ明瞭化しやすいようなモデルを目指し、欠損に対して graft が占める割合がかなり小さい、「過酷な」モデルをあえて作成した。移植 graft 採取のためのデバイスの決定についても様々な器具を模索し、予備実験をおこなった。今回は検体が兎であるため、通常ヒトから採取する時よりも細い graft の採取は技術的に難しく、試行錯誤の末、直径としては 2.5mm の graft 採取が最も再現性高く適当と結論続けた。この 2.5mm 径の graft 採取用デバイスについては国内では皮膚科領域で主に用いられている生検パンチ（カイインダストリーズ株式会社）及び個人的に交渉し試作いただいた生検パンチ（インパクト株式会社）の 2 つを比較検討した末に、前者の生検パンチを使用する方針とした。

2.　UPAL gel の調整、準備

本研究では当科の過去の類似研究(Baba et al., 2015)に追従し、分子量 1700 kDa の高純度アルギン酸ゲル（Sea Matrix® ; Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan）(0.102g／1 バイアル）に対して生理食塩水 4.998ml により溶解させて、1 時間 380 回毎分で撹拌し調整し、2%のアルギン酸溶液として滅菌状態で冷蔵保存した。

3.　兎手術モデルの作成手順

75 羽の 24 週齢の日本白色家兎に対し、全身麻酔下に 4.0cm の皮膚切開で、内側傍膝蓋骨アプローチを用いて膝蓋大腿関節及び大腿骨滑車部を露出させた。その中央に直径 5.0mm の電動ドリルで深さが 2.0mm になるように専用のスリーブを使いながら骨軟骨欠損を作成した。OAT 施行群では欠損部中央にさらに直径 2.5mm で深さ 2mm の縦穴を追加した。ドリル作業は生理食塩水で冷却しながら行った。移植する graft は反対側の大腿骨滑車部より直径 2.5mm、長さ 4.0mm で生検パンチ（カイインダストリーズ株式会社）を用いて採取した。この後、以下の 3 群に分類した。特に graft 移植を行わない無治療群（Control 群）、OAT のみ行う群（OAT 群）、OAT に加えてその周囲に UPAL gel を包埋する群（Combined 群）とした（**図 1**）。OAT 群、Combined 群では graft 移植の際に移植部周囲の軟骨と同じ高さになるように最大限の注意を払って操作を行った。Combined 群では移植した graft 周囲に UPAL gel を包埋した（**図 2**）。

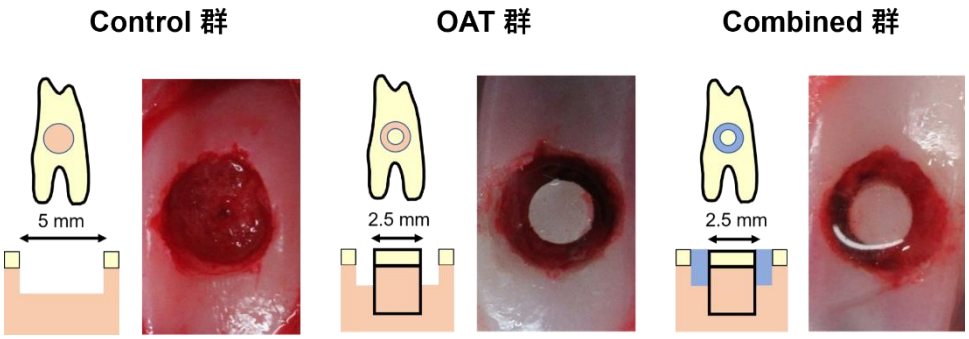


図 1. 骨軟骨欠損手術モデル各々の模式図と肉眼写真

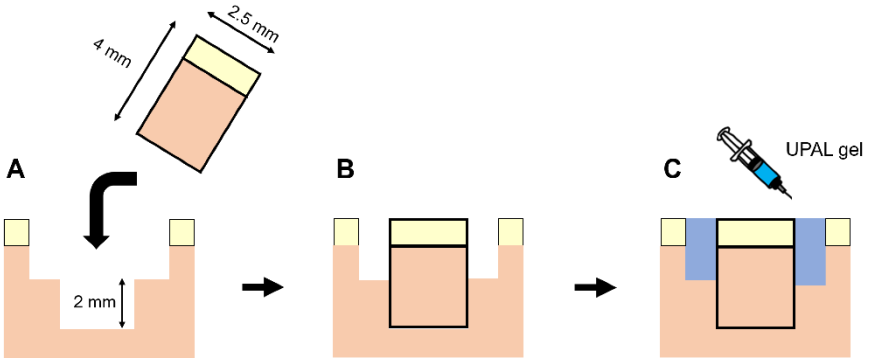


図 2. graft 周囲への UPAL gel 包埋の模式図
A. 移植する graft と同じ直径で graft の長さ分だけ穴を掘り、移植用のソケットを作成
B. ソケットへ graft を移植する
C. graft と周囲の間隙を UPAL gel で満たす

術野を洗浄後、4-0 ナイロンで関節包、皮膚を各々縫合し手術終了。兎が麻酔覚醒した後は特に制限なくケージ内を自由に動くことを許容した。術後は 4 週と 12 週で pentobarbital の静脈投与により安楽死させ検体摘出した。各 time point において各群 10 膝において肉眼的及び組織学的評価を行った。術後 12 週には以下の評価も追加した。各群 10 膝に対して、免疫組織学的評価とコラーゲンオリエンテーションの評価を行い、また軟骨下骨の修復量評価のため micro-CT による測定を行った。OAT 群並びに Combined 群では graft 生着の確認では組織学的及び micro CT 所見から検討した。同様に各群 5 膝に対しては力学特性の評価も行った。

4. 肉眼的・組織学的・免疫組織学的評価の方法

術後 4 週及び 12 週において安楽死後に、欠損部をデジタルカメラで撮影し肉眼的評価を行った。その後同じ検体を組織学的評価に用いるため、大腿骨滑車部のみ取り出し、10 %パラホルムアルデヒドでサンプルを固定、10%EDTA で脱灰処理後に、欠損部の中央を通る矢状断面で厚さ 5 μm のパラフィン切片を作成した。切片は Hematoxylin Eosin（HE）染色及び、Safranin-O（Saf-O）染色を施した。各群の修復組織は肉眼的及び組織学的に各々を Niederauer らの軟骨修復スコアリングシステム (Niederauer et al., 2000)を用いて評価した。これらは「全体的な」スコアとして使用した。さらに、graft 移植を詳細に評価するために、別のスコアリングシステムも使用した（**表 1、2**）(Kock et al., 2011; Smyth et al., 2013)。これらは「graft に関連した」肉眼的

及び組織学的スコアとした。免疫組織学的評価ではⅠ型及びⅡ型コラーゲン抗体（Fuji Pharma Co., Ltd., Toyama, Japan）を用いて染色した。また graft 自体の変性変化を評価するために、O'Driscoll ら(O'Driscoll et al., 1988)のものを改変したスコアリングシステムを用いた（**表 3**）。

表 1.　graft に関連した肉眼的スコアリングシステム (Smyth et al., 2013)

Degree of defect repair	
In level with surrounding cartilage	4
75% repair of defect depth	3
50% repair of defect depth	2
25% repair of defect depth	1
0% repair of defect depth	0
Integration to border zone	
Complete integration with surrounding cartilage	4
Width of border is within 1/4 of primary gap width	3
Width of border is from 1/4 to 1/2 of primary gap width	2
Width of border is from 1/2 to 3/4 of primary gap width	1
Width of border is more than 3/4 of primary gap width	0
Macroscopic appearance	
Intact smooth surface	4
Fibrillated surface	3
Small, scattered fissures or cracks	2
Several small or few, but large, fissures	1
Total degeneration of grafted area	0

表 2.　graft に関連した組織学的スコアリングシステム(Kock et al., 2011)

Graft level with surrounding cartilage	
Level	4
< 50% of graft cartilage thickness – below	3
< 50% of graft cartilage thickness – raised	2
> 50% of graft cartilage thickness - below	1
> 50% of graft cartilage thickness - raised	0
Graft cartilage thickness	

75-100% of adjacent cartilage	2
50-75%	1
< 50%	0
Cartilage integration	
Bonding through cartilage like tissue	3
Fissure fully filled with fibrous tissue	2
Fissure partially filled with fibrous tissue	1
Empty fissure	0
Degenerative changes at cartilage edges	
Normal cellularity, no clusters, normal staining	3
Mild hypocellularity, some clusters, moderate staining	2
Moderate hypocellularity, slight staining	1
Severe hypocellularity, poor or no staining	0
Changes in tidemarks at cartilage edges	
Both normal	2
One damaged or abnormal	1
Both damaged or abnormal	0
Integration of adjacent subchondral bone	
Fully osseous integration	4
Fully integrated with partial fibrous tissue	3
Fully integrated only fibrous tissue	2
Partially integrated	1
No integration	0
Subchondral cavity formation	
No cavities	3
Small cavities	1
Large cavity	0

表 3. graft 自体の変性評価に対する改変 O'Driscoll 組織学的スコアリングシステム (O'Driscoll et al., 1988)

Nature of the predominant tissue	
Cellular morphology	
Hyaline articular cartilage	4
Incompletely differentiated mesenchyme	2

Fibrous tissue or bone	0
Safranin-O staining of the matrix	
Normal or nearly normal	3
Moderate	2
Slight	1
None	0
Structural characteristic	
Surface regularity	
Smooth and intact	3
Superficial horizontal lamination	2
Fissures – 25 to 100% of the thickness	1
Severe disruption, including fibrillation	0
Thickness of the graft cartilage	
100% of normal cartilage	2
50 – 100% of normal cartilage	1
0 – 50% of normal cartilage	0
Cellular change of degeneration	
Cellularity	
Normal cellularity	3
Slight hypocellularity	2
Moderate hypocellularity	1
Severe hypocellularity	0
Chondrocyte clustering	
No clusters	2
< 25% of the cells	1
25 – 100% of the cells	0

5. 偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性の評価方法

術後 12 週において HE 染色切片を偏光顕微鏡（polarized light microscope: PLM）により観察し、修復組織のコラーゲン配向性を評価した(Roberts et al., 2003; Roberts et al., 2009; Ross et al., 2013)。コラーゲン配向性は、その組織の力学強度に関連することも報告されている(Rieppo et al., 2003)。評価すべき部位に最も多く占めるコラーゲン配向性

を確認するために、設置した組織切片自体を 0°、45°、90°と回転させて微妙な変化も見落とさぬよう配慮した。デジタルカメラ（DS-5M-L1; Nikon）を通じて得られた画像は PLM 定性スコアリングシステム(Changoor et al., 2011)を用いて評価した。各群 10 膝について、評価部位は元の欠損部における遠位 1/4 側と近位 1/4 側で行い、両者のスコアを平均し算出した。さらに OAT 群及び Combined 群では、同様の評価を graft 軟骨部に対しても行った。

6. Micro-CT による軟骨下骨修復量の評価方法

手術の際に削り取った軟骨下骨の修復量の評価のために、術後 12 週において micro-CT（R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan）により定量評価をおこなうため、各群 10 膝について検体の撮影をおこなった。撮影手法や条件は馬場ら(Baba et al., 2015)に準じて行った。得られた画像のうち、実際にできた欠損分、つまり直径 5mm、深さ 2mm の円柱状の骨軟骨欠損を関心領域に設定し、その範囲に石灰化骨として得られたものを軟骨下骨の修復量（Bone Volume、以下 BV）（mm^3）とし、Image J software（National Institutes of Health, Bethesda, MD）を用いて算出した。

7. graft 生着の評価方法

OAT 群と Combined 群の両群では graft とその周囲組織の癒合を組織学的及び micro-CT の所見からその有無を評価した。組織学的所見で graft が沈降した場合や、軟骨部が変性していた場合でも、micro-CT で欠損部中央に対して凸状に隆起していれば生着有りとした。

8. 力学特性の測定方法

術後 12 週の各検体において、修復組織の力学特性の測定の際には当研究施設が持つ力学試験器（Autograph AG-X, Shimadzu Co., Tokyo, Japan）を用いて測定した(Sadia Nazneen Karobi, 2016)。摘出膝検体は測定する圧子（直径 0.5mm の半球状）に対して垂直に面するように歯科用常温重合レジン（PMMA）を土台にして固定(Wada et al., 2016)し、その状態で測定部位に圧子を 0.5mm/分の速度で押し込む方法で測定した（**図 8A**）。測定部位としては欠損部遠位 1/4 側、欠損部中央部（graft 部）、欠損部近位 1/4 側に加えて、測定値の基準値としての欠損部より近位の正常軟骨部を選択した（**図 8B**）。測定値から圧入－変形曲線を plot し、その曲線における直線に近似した部分の傾きから剛性値（N/mm）を算出した。各々の部位で得られた剛性値は正常軟骨部を基準と

した百分率表記に換算し直して比較検討した。修復組織の剛性値は、欠損部遠位 1/4 側と近位 1/4 側の剛性値の平均として算出した。

9. 統計解析

得られたデータは平均値±標準偏差（Standard Deviation、以下 SD）として表記した。過去に当科で UPAL gel を利用した類似研究(Baba et al., 2015; Igarashi et al., 2010; Sukegawa et al., 2012)を基準にして、必要なサンプルサイズを決定した。3 群間のデータ比較には Steel-Dwass 検定を、2 群間では Mann-Whitney U 検定を用いた。解析は統計解析ソフト JMP Pro 13.1（SAS Institute, Cary, NC）を用いて行ない、有意水準は 0.05 未満とした。

実験結果

1.予備実験結果

当科の同じ日本白色兎を用いた軟骨再生の先行研究(Baba et al., 2015; Igarashi et al., 2010; Sukegawa et al., 2012)では、大腿骨滑車部において直径 4~5mm の円形の骨軟骨欠損を作成していたが、OAT モデルとしては臨床的には荷重部である大腿骨顆部への移植が理想的であり、当初はこの部位での手術操作を考慮し予備実験おこなった。実際に手術を行ってみたところ大腿骨顆部は滑車部に比べるとかなり狭く、従来の大きさの骨軟骨欠損自体の作成が困難であった（**図 3**）。欠損の直径を小さくすることも検討したが、採取可能な graft の直径の上限が 2.5mm であったため、graft 間隙に UPAL gel を移植することを考慮すると、欠損自体の大きさをある程度の範疇には保つ必要があるため、これに対して適正な直径には至らないものと判断し、大腿骨顆部モデルは断念し、大腿骨滑車部を採用する方針とした。

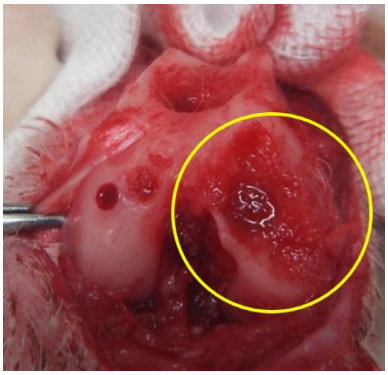


図 3. 大腿骨顆部での骨軟骨欠損作成の実際
欠損孔が大きすぎて、顆部がすでに破壊されている。

次に、複数の graft 移植が可能かどうかについて検討した。大腿骨滑車部に作成可能な骨軟骨欠損としては直径 5mm が限界であったため、直径 2.5mm の graft を複数移植するモデルとしては、いわゆる「民主党シンボルマーク」型を考えた（**図 4A**）。実際に手術をして検証したところ、graft 移植する際に作成する縦穴も複数作ると、移植母床自体の安定性が保てず、graft を移植しても著しく不安定であり、OAT モデルとしては許容できなかった（**図 4B**）。

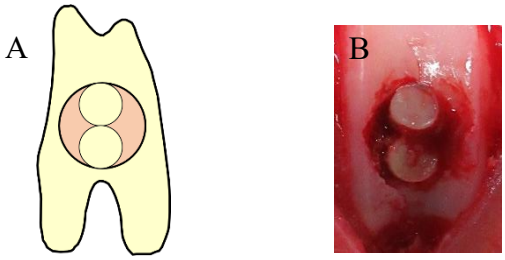


図 4.　graft2 本移植モデル
移植後の graft は容易に浮き沈みするほど不安定であった（B）。

これらの結果を踏まえて、実験手技の正確性、妥当性を鑑みて、骨軟骨欠損は大腿骨滑車部に直径 5mm で作成し、graft は反対側の膝の同部位から直径 2.5mm で採取し移植する方針に決定し本実験に移行した。

2. 肉眼的評価の結果

いずれの time point においてもすべての検体で術後感染を示唆する所見は認めなかった。術後 4 週において Control 群と OAT 群の欠損部の修復は局所的であり、全体に粗雑な印象であった（**図 5A,B**）。一方、Combined 群では部分的な修復認め、軟骨下骨の大部分は再生組織で覆われていた（**図 5C**）。全体的な肉眼的スコアリングでは Control 群（mean ± SD; 1.3 ± 0.8, P = .0004）と OAT 群（2.7 ± 1.4, P = .016）に比べて、Combined 群（4.8 ± 1.4）で有意に高値であった（**図 5G**）。グラフトに関連したスコアリングでは OAT 群（4.1 ± 1.2, P = .016）に比べて、Combined 群（6.4 ± 2.3）で有意に高値であった（**図 5H**）。

術後 12 週において Control 群では修復組織は租で部分的であった（**図 5D**）。OAT 群では、グラフト間隙の修復は不透明な繊維組織で不完全に覆われていた（**図 5E**）。Combined 群ではグラフト間隙含めて再生組織の多くの部分は硝子軟骨様の半透明な組織で覆われていた（**図 5F**）。全体的な肉眼的スコアリングでは Control 群（1.8 ± 1.8, P = .001）と OAT 群（3.1 ± 1.5, P = .003）に比べて、Combined 群（6.2 ± 1.5）で有意に高値であった（**図 5I**）。グラフトに関連したスコアリングでは OAT 群（5.1 ± 2.2, P < .001）に比べて、Combined 群（9.5 ± 1.8）で有意に高値であった（**図 5J**）。

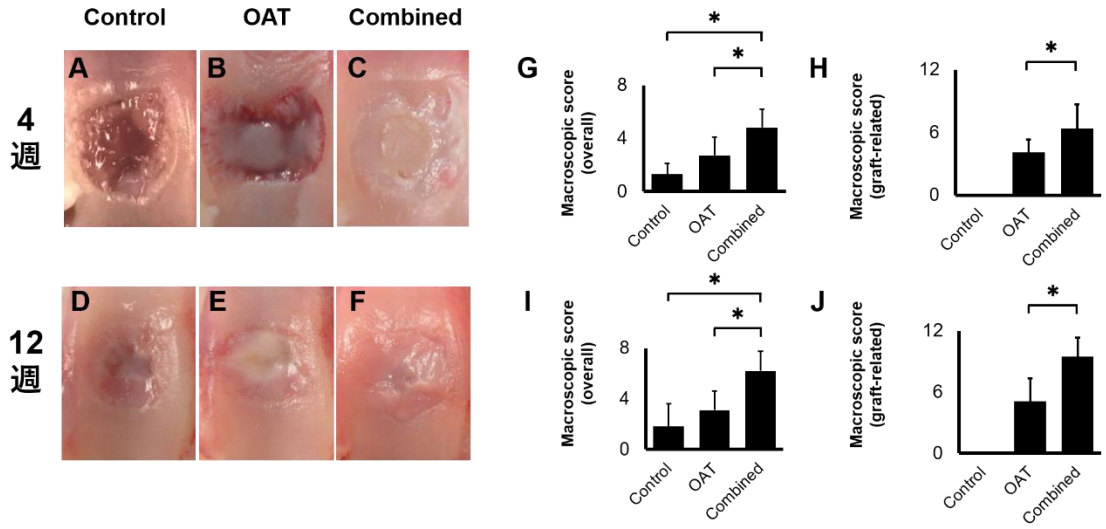


図 5.　術後 4 週（A-C）と 12 週（D-F）における肉眼的所見とスコアリング結果（G-J）
G,I は全体的なスコア、H,J はグラフトに関連したスコアに対して各群の平均値と標準偏差である。＊は $p < 0.05$ を示す。

3. 組織学的評価の結果

術後 4 週において、Control 群では欠損部に繊維性瘢痕組織がみられていたが中央部は凹んでいた（**図 6A**）。OAT 群では graft 周囲にはほとんど硝子様軟骨組織は見られなかった（**図 6B**）。一方で、Combined 群では同部位に部分的にではあるが、硝子様軟骨組織がみられた（**図 6C**）。全体的なスコアリングでは、Control 群（6.2 ± 1.25, $P < .001$）に比べて OAT 群（11.9 ± 1.89）と Combined 群（13.7 ± 1.87）で有意に高値であった（**図 6G**）。OAT 群と Combined 群の両者には明らかな有意差は認めなかった（$P = .139$）。また graft に関連したスコアリングでは有意差はないものの、Combined 群（13.5 ± 1.52）が OAT 群（12.7 ± 1.00, $P = .259$）に比べて高い傾向であった（**図 6H**）。

次に術後 12 週においては、Control 群では術後 4 週と同様に修復組織に硝子様軟骨組織は見られなかった（**図 6D**）。OAT 群では graft 周囲間隙には部分的に硝子様軟骨組織が見られるものの、多くは Glycosaminoglycan （以下 GAG）をほとんど含まない紡錘形細胞が占めていた（**図 6E**）。また欠損部周囲の正常軟骨部の細胞密度はやや減少しており変性が示唆された。移植 graft の軟骨の厚みは正常軟骨と比べて少し菲薄化していた（**図 6E**）。Combined 群では graft 周囲間隙にはやや平坦ながら硝子様軟骨組織で広く覆われており、GAG を多く含んだ類円形細胞で満たされていた（**図 6F**）。欠損部周囲の正常軟骨部の細胞密度は正常に近く、移植 graft の軟骨の厚みも比較的保た

れていた（**図 6F**）。全体的なスコアリングでは、Control 群（7.55 ± 2.07, P＜.001）と OAT 群（13.8 ± 4.80, P＝ .0272）に比べて Combined 群（21.4 ± 5.72）で有意に高値であった（**図 6I**）。また graft に関連したスコアリングでは OAT 群（12.5 ± 1.47, P＜.001）に比べて、Combined 群（18.2 ± 2.05）で有意に高値であった（**図 6J**）。さらにこのスコアリングを詳細に分析すると、graft 間隙における修復スコアは OAT 群（2.0 ± 0.47, P＜.05）に比べて、Combined 群（2.55 ± 0.643）で有意に高値であり、また欠損部周囲の正常軟骨部の変性スコアでも同様に、OAT 群（1.9 ± 0.39, P＜.01）に比べて、Combined 群（2.65 ± 0.337）で有意に高値となっていた。

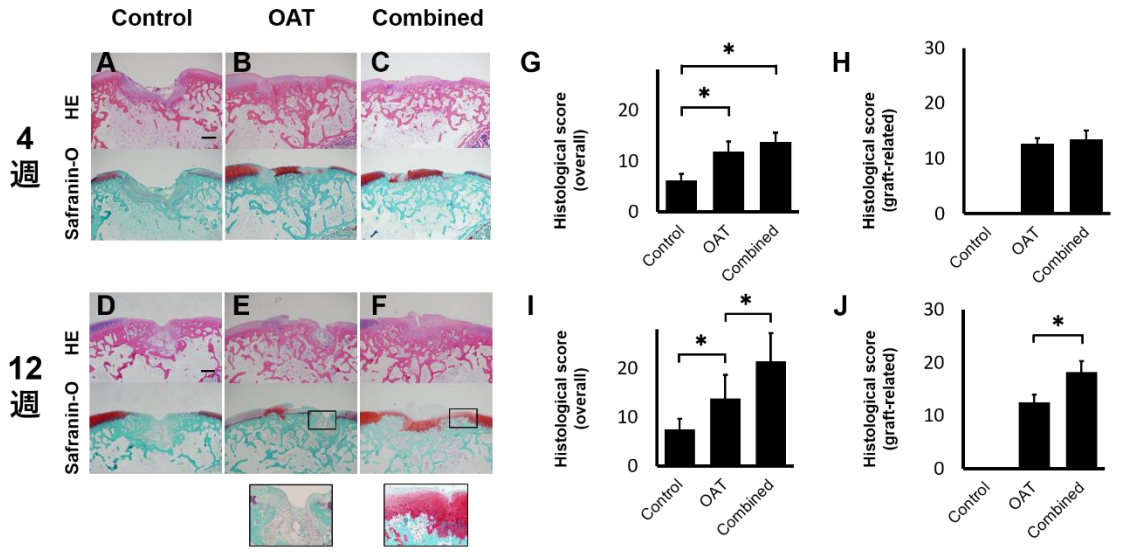


図 6. 術後 4 週（A-C）と 12 週（D-F）における組織学的所見とスコアリング結果（G-J）
スケールバーは 1mm を示す。
G,I は全体的なスコア、H,J はグラフトに関連したスコアに対して各群の平均値と標準偏差である。＊は p＜0.05 を示す。

OAT 群と Combined 群においては、graft 自体の変性変化に対して改変 O'Driscoll 組織学的スコアリングを用いて評価した。術後 4 週では両群間にほとんど差のない結果であった（OAT 群 14.0 ± 0.942, Combined 群 14.5 ± 1.08, P＝ .323）。その一方で、術後 12 週では OAT 群（6.80 ± 2.20, P＝ .0023）に比べて、Combined 群（12.6 ± 3.50）で有意に高値であった（**図 7E**）。さらに各項目毎に比較すると、術後 12 週では OAT 群に比べて Combined 群で graft 軟骨の厚みと表面形状、細胞密度、Saf-O 染色度の項目で有意に高い結果であった（**表 4**）。これらの結果から、Combined 群では graft

間隙の修復が促進されたことで欠損部周囲の軟骨や graft 自体の軟骨変性が抑えられたものと示唆された。

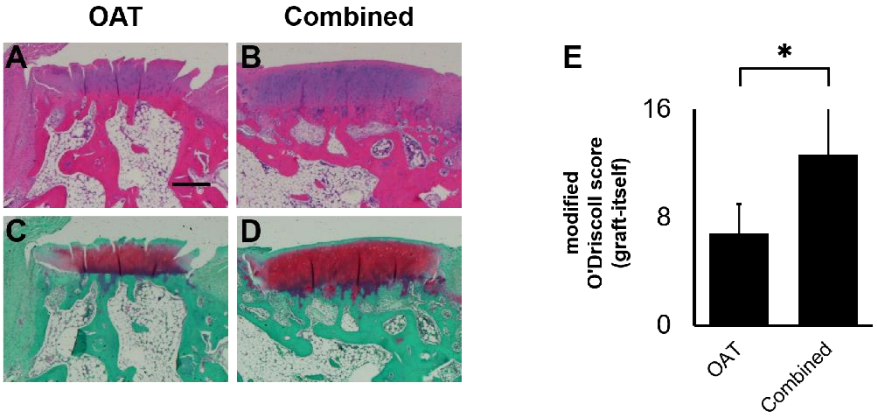


図 7.　術後 12 週における移植 graft の組織学的所見とスコアリング結果

A,B は HE 染色を、C,D は Saf-O 染色された組織切片である。スケールバーは 500 μm を示す。

E は graft 自体の変性変化に対する各群の平均値と標準偏差である。＊は $p < 0.05$ を示す。

表 4　術後 12 週の改変 O’Driscoll 組織学的スコアリングの項目別の平均値

	OAT	Combined
Nature of the predominant tissue		
Cellular morphology	3.2	3.7
Safranin-O staining of the matrix	1.2	2.4[a]
Structural characteristic		
Surface regularity	1.0	2.5[a]
Thickness of the graft cartilage	0.2	1.0[b]
Cellular change of degeneration		
Cellularity	0.6	1.8[a]
Chondrocyte clustering	0.6	1.2
Total score	6.8	12.6[b]

[a] $P < .01$ vs OAT group

[b] $P < .05$ vs OAT group

4. コラーゲン配向性の評価結果

術後 12 週において、各群の修復組織において前述した PLM 定性スコアリングシステムを用いて評価した。正常軟骨のコラーゲン配向性としては 3 層構造で形成されているのだが、浅層は水平配列、中間層は移行帯、深層は垂直配列のように層ごとに違いがあることがよく知られている(Julkunen et al., 2009)。Control 群と OAT 群では深層の垂直配列は少しみられるものの、ほかの 2 層はほとんど見られなかった(**図 8G, J, M, H, K, N**)。その一方で、Combined 群ではその多くの例において深層の垂直配列とやや不完全ではあるものの、移行帯及び水平配列が見られた（**図 8I, L, O**)。スコアリングでは Control 群（0.10 ± 0.211, P < .001）と OAT 群（0.65 ± 0.626, P = .021）に比べて Combined 群（1.75 ± 0.89）で有意に高値であった（**図 8P**)。同様に、OAT 群と Combined 群では graft 軟骨についてもスコアリングを行った。OAT 群（1.3 ± 1.16, P = .043）に比べて、Combined 群（2.5 ± 1.18）で有意に高値であった（**図 8Q**)。

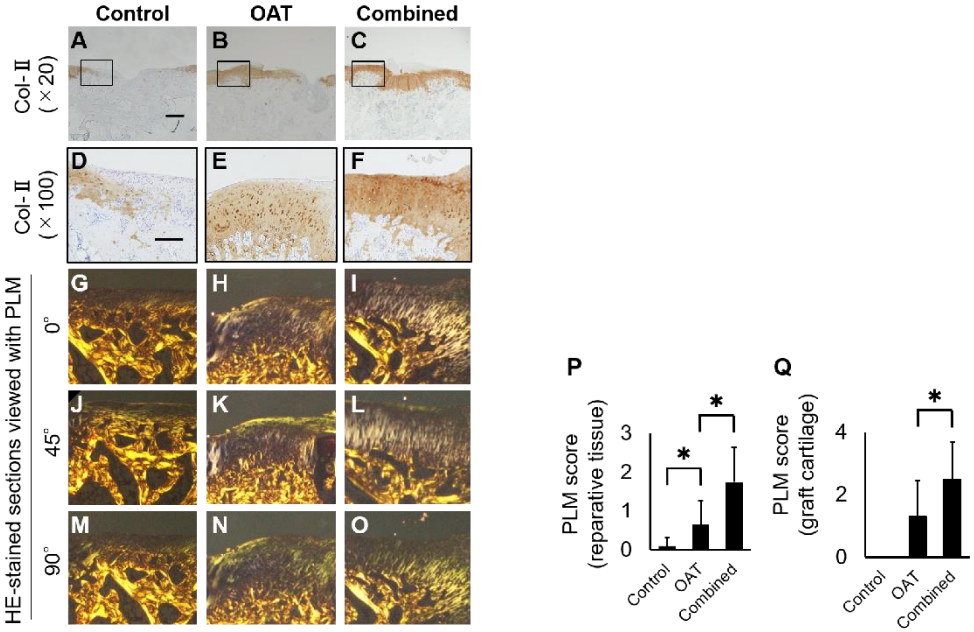


図 8. 術後 12 週における修復組織のコラーゲン配向性の評価

A,B,C は抗Ⅱ型コラーゲン免疫染色された組織切片である。スケールバーは 1mm を示す。D,E,F はこれらの拡大像であり、スケールバーは 200 ㎛を示す。G-O は HE 染色組織切片を PLM で 0 度、45 度、90 度に回転して撮影したものである。
E は graft 自体の変性変化に対する各群の平均値と標準偏差である。＊は $p < 0.05$ を示す。

5. 軟骨下骨修復量の結果

術後 12 週において、軟骨下骨の欠損の大部分は OAT 群（**図 9B,E**）と Combined 群（**図 9C,F**）ともに修復されていた。周囲の軟骨下骨と graft の境界面では連続した骨量構造を認めており骨癒合しているように見うけられた。各群間において軟骨下骨の修復量に明らかな差は認めなかった（Control 群　12.3 ± 3.55 mm^3、OAT 群　14.2 ± 1.97 mm^3、Combined 群　16.1 ± 3.94 mm^3）（**図 9G**）。

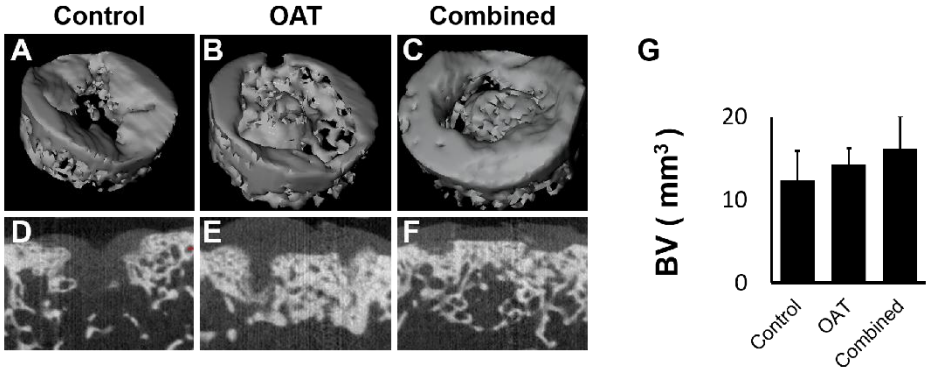


図 9.　術後 12 週における micro-CT を用いた軟骨下骨の修復量評価
A,B,C は各群の再構築された 3D-CT 像である。
D,E,F は各群の矢状断における CT 像である。
G は各群における修復された軟骨下骨量（BV）の平均値と標準偏差である。

6.　graft 生着の評価結果

OAT 群と Combined 群の両群において graft 生着に関して組織学的及び micro-CT の所見から評価した。術後 4 週の組織検体を見ると、OAT 群の 9 例（90%）と Combined 群の全例で表層に硝子様軟骨を保持した graft 生着が確認できた。OAT 群の 1 例では graft 表層の硝子様軟骨が消失していた。また術後 12 週の組織検体においては、OAT 群の 7 例（70%）と Combined 群の 9 例（90%）に同様の graft 生着を認めた。残りの例（OAT 3 例、Combined 1 例）では graft 表層の硝子様軟骨が消失していた。しかし、maicro-CT による評価では OAT 群、Combined 群の全サンプルにおいて欠損部底面に対して凸状の円柱を認めていたことから（**図 9E,F**）、どちらの time point においても graft 生着は得られていたと結論づけた。

7.　力学特性の評価結果

術後 12 週において、押し込み試験機を用いた力学試験をおこなった。各群の修復組織における代表的な圧入ー変形曲線を示す（**図 10C**）。各々の剛性値（N/mm）はこの曲線においてその傾きが最初に一定になった領域（0-0.05 mm）から算出し、前述のように標準化した（Control 群　R^2 ＝0.986 ± 0.020、OAT 群　R2 ＝0.986 ± 0.018、Combined 群　R2 ＝0.993 ± 0.00566）。標準化された剛性値では Control 群（9.14 ± 2.5%, P ＝ .0326）と OAT 群（12.4 ± 4.02%, P＝ .0326）に比べて Combined 群（34.7 ± 14.8%）で有意に高値であった（**図 10D**）。（修復組織の実測値は以下の通りである；Control 群　40.9 ± 24.1 N/mm、OAT 群　32.3± 24.2 N/mm、Combined 群　95.9 ± 46.3 N/mm。正常軟骨部の実測値は以下の通りである；Control 群　436 ± 203 N/mm、OAT 群　250± 118 N/mm、Combined 群　279 ± 82.4 N/mm。）同様にして、OAT 群と Combined 群では graft 部における剛性値も測定し、標準化した（OAT 群　R2 ＝0.982 ± 0.0123、Combined 群　R2 ＝0.979 ± 0.0192）。標準化された剛性値では OAT 群（11.7 ± 3.92%, P＝ .0163）に比べて Combined 群（48.7 ± 30.7%）で有意に高値であった（**図 10E**）。

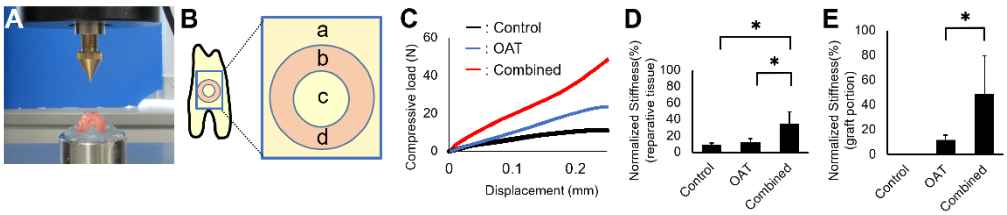


図 10.　術後 12 週における力学特性の評価

A は押し込み試験機の外観である。先端は 0.5mm の半球状の形状をしている。B は測定部の略図である。(a)正常軟骨部、(b)近位の graft 間隙部、(c)graft 部、(d)遠位の graft 間隙部。C は各群から算出された修復組織における代表的な圧入ー変形曲線である。D は修復組織のおける各群の標準化された剛性値の平均値と標準偏差である。E は graft 部における群の標準化された剛性値の平均値と標準偏差である。＊は $p < 0.05$ を示す。

考察

本研究の主要な目的はOATにUPAL gel移植を併用した治療法の有効性について兎モデルにおいて明らかにすることであった。肉眼的、組織学的、力学的な観点ではOAT単独に比べてUPAL gel併用で全て改善されていた。これらの結果からOATを行う際にはUPAL gel併用により硝子様軟骨による修復が促進されることが示唆された。

本研究の手術モデルでは、欠損部に対するgraft被覆率はわずかに約25%であった。これに対して過去の類似した動物モデルを用いた研究では直径10mmの骨軟骨欠損に対して6mm径のgraft移植（被覆率は約36%）を行ったところ、不十分な修復しか得られなかったと報告している(Burks, 2006)。一方で、骨軟骨欠損部に対して細胞移植なしでUPAL gelのみ投与した場合では、主に周囲の骨髄間葉系細胞によって軟骨分化、再生が促進され、硝子様軟骨による修復が得られたという報告がある(Igarashi et al., 2010; Igarashi et al., 2012a; Igarashi et al., 2012b)。これを踏まえると、graft周囲間隙に対してUPAL gelを補填することで修復能が促進され、全体として硝子様軟骨による修復が期待される。

また本研究の肉眼的、組織学的所見ではUPAL gelがgraft自体と周囲の正常軟骨の変性を抑制したことを示唆する結果であった。以下にUPAL gelにより生じえた変性抑制効果の要因を考察する。第一に、graft軟骨と周囲軟骨部におけるcontact stressの軽減効果である。OAT群とCombined群の両群において graft自体と周囲の正常軟骨の変性は術後4週時点では差がないものの、術後12週ではCombined群で有意に変性が抑制されていた。このことから、UPAL gel併用により治癒が促進された修復組織が、術後12週間という比較的長い継続的なcontact stressに対する負担を軽減できたためであると推察された。つまり、UPAL gelの投与により損傷部局所において硝子様軟骨による修復が生じたことで、損傷部全体にかかるstressが分散化され、その結果graft自体や周囲の正常軟骨部へかかるcontact stressも減じたということである。第二に、UPAL gel自体のもつ軟骨保護作用である。高純度精製し低エンドトキシン化したアルギン酸をうさぎとビーグル犬の膝関節内に投与したものでは、軟骨変性抑制作用を示した（(Igarashi et al., 2012b; Tsukuda et al., 2015)ことがわかっている。これをふまえると、本研究ではUPAL gelが損傷部の軟骨再生を促進しただけでなく、この物質自体が軟骨変性に対しても抑制作用を示した可能性も考えられる。以上から、OATへのUPAL gel併用はOAT単独に比べて、損傷部全体に対する治療効果向上に寄与するものであると結論できる。

本研究のもつ臨床的に重要な意義として、従来の方法よりも使用するgraftを最小限に抑えられることで、graft採取部における悪影響、つまりdonor site morbidityのリスク減少につながることが期待される。過去の報告をみると、OATの治療効果を向上す

るためには前述したように、欠損部に対してできるだけ graft による被覆率を大きく保つべきである(Hangody et al., 2004; Robert, 2011)とされているが、これは裏を返すと donor site morbidity の影響が大きくなることでもある。Iwasaki らは graft を採取した大腿骨滑車部外側部を術後 MRI で評価したところ、繊維性組織で置換されていたと報告し(Iwasaki et al., 2007)、Barber らは OAT 術後の経過評価時に行った関節鏡検査において肉眼的に繊維性組織による修復を確認している(Barber and Chow, 2001)。また Ahmad らは、graft 採取部は力学的に弱い繊維性組織に置換されることを示している(Ahmad et al., 2002)。彼らは比較的荷重がかからない部位で graft を採取しているが、その一方で cadaver を用いたある研究では、この部位においても無視できない程度の接触圧は生じていると論じており(Simonian et al., 1998)、Nishida らは CT osteoabsorptiometry 法を用いて、この接触圧を画像解析し、一定の圧が生じていることを示している(Nishida et al., 2012)。このように graft 採取する部位が非荷重部だとしても、繊維性組織による修復は不十分なものであり、また膝機能に少なからず関与する部位であるため、常に donor site morbidity については危惧する必要があると思われる。実際に OAT 術後の患者において、Reddy らは 11 例中 4 例において術後患者評価尺度（Lysholm knee scale）が乏しい評価であったと報告している(Reddy et al., 2006)。また Valderrabano らは OAT 術後に 12 例中 6 例においてドナー膝の痛みを訴えたとも報告している(Valderrabano et al., 2009)。以上のことから、本研究で用いた UPAL gel の併用法により donor site morbidity のリスクは軽減され、より安全な手術治療が可能になることが期待される。

UPAL gel を骨軟骨欠損部に移植する際に、これ自体が軟骨下骨の再生を阻害する可能性が危惧された。過去の研究では、すでに UPAL gel は特に軟骨下骨の修復を阻害しないと報告している(Baba et al., 2015; Igarashi et al., 2012a)が、本研究では移植された graft が生着するためには周囲の軟骨下骨との融合することが重要であると考えられたため、本研究でもこの評価をおこなった。得られた結果からは、先行研究と同様に UPAL gel には軟骨下骨の再生阻害は持たないことが示唆された。また、OAT 群に比べて Combined 群で graft 部の力学特性は優れていた。Igarashi らは骨軟骨欠損への骨髄間葉系幹細胞（BMSCs）を UPAL gel とともに移植した場合は、BMSCs 単独移植と比べて軟骨再生及び軟骨下骨の再構築がともに促進されたと報告している(Igarashi et al., 2012a)。これをふまえると、UPAL gel が graft とその周囲の軟骨下骨の間に入り込み、骨癒合を阻害するどころかむしろ促進する方向に作用した可能性もあるかもしれない。

以下に本研究の限界を述べる。第一に、本研究の手術モデルは現実の手術概要とは異なっている点である。つまり、うさぎの膝はとても小さいために移植部位も本来治療対象となることの多い荷重部である大腿骨顆部ではなく、大腿骨滑車部を用いている点や、複数の graft 移植ではなく 1 本だけの移植が余儀なくされている点である。解決策としては大動物で同様の研究を行う手段が考えられる。第二に、組織学的検討が

大腿骨滑車部のみであり、膝蓋骨軟骨面では行っていない点である。肉眼的には膝蓋骨軟骨面は明らかな変性変化は認めていなかったものの、組織学的には評価しなかったことは悔やまれる。第三に、骨成熟がまだ完了していない週齢の検体を使用している点である。臨床的な観点からは、OAT は骨成熟した成人に対して行うことが一般的ではあるため、骨成熟したものを用いることが望ましいことは確かである。しかし今回の OAT モデルは前述したように graft 被覆率が 25%と小さく、かなり過酷な環境下のモデルであった。損傷部の修復評価を最優先すべく、術後に生じえる変性変化を最小限に抑えることが肝要であると考えたため、今回はなるべく変性の起こりにくい比較的若い週齢を用いた。

以上のように本研究はいくつかの課題は残るものの、OAT への UPAL gel 併用は損傷部において硝子様軟骨修復を促進しうる優れた方法であると考えられた。また、採取する graft を従来の方法よりも少なく抑えることができれば、donor site morbidity のリスクを低減させることにつながるため、この点でも有益なものであると考えられた。

総括及び結論

- OAT に UPAL gel 移植を併用することで、軟骨下骨の修復を阻害することなく、良好な軟骨修復を認めた。

- OAT への UPAL gel 併用により、移植 graft 自体に対する保護作用が認められた。

- 修復軟骨と移植 graft において良好なコラーゲン配向性と力学特性が得られた。

- 本研究の成果により OAT の適応拡大につながる可能性がある。

現在のところ、欠損面積が比較的広範囲の軟骨欠損の治療に対しては、自家軟骨培養移植が適応になる場合があるが、手術可能な施設が限定されており、また二度に分けた手術が必要、軟骨培養に費やされる医療費が高価など課題もある。したがって、これよりも安価で施設非限定的な別の治療法の開発は重要な意味を持つと考えられる。本研究では OAT の適応拡大につながる可能性が見いだされたため、今後この方法が実際にヒトに対する臨床研究を経て、その実用性と安全性を確認していくという流れが予想される。

今後の課題としては、まずは当科で研究開発してきた UPAL gel の実際の臨床での使用の許可を得ること（UPAL gel 単独投与は北大病院にて治験の最終段階であり、現在各症例について術後評価の途中である）である。そして実際の OAT 術中に UPAL gel を用いる際には関節鏡視下で行うことが望ましいため、本術式を関節鏡視下で行えるような手術器具の調整、開発が必要になると想定される。

謝辞

稿を終えるにあたり，研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に深い謝意を表明いたします.

本研究を行うにあたり、高純度アルギン酸ゲルのご提供並びに使用に関するご助言を頂きました持田製薬株式会社の清水賢様をはじめ、多くの職員の方々に深い感謝の意を表します。また、力学試験に関してご指導及び装置の使用許可をいただいた北海道大学大学大学院先端生命科学研究院先端融合科学研究部門ソフト＆ウェットマター研究室・Jian Ping Gong 教授、同・黒川孝幸教授、同・野々山貴行特任助教に深く御礼申し上げます。

本研究全般にわたりご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・小野寺智洋講師に深い謝意を表します．また，直接のご指導を頂きました元北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・馬場力哉医員をはじめとした整形外科学分野の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

本研究に関連し，使用した高純度アルギン酸ゲルは持田製薬株式会社より提供を受けたものである。

引用文献

Ahmad, C.S., Guiney, W.B., and Drinkwater, C.J. (2002). Evaluation of donor site intrinsic healing response in autologous osteochondral grafting of the knee. Arthroscopy *18*, 95-98.

Baba, R., Onodera, T., Momma, D., Matsuoka, M., Hontani, K., Elmorsy, S., Endo, K., Todoh, M., Tadano, S., and Iwasaki, N. (2015). A Novel Bone Marrow Stimulation Technique Augmented by Administration of Ultrapurified Alginate Gel Enhances Osteochondral Repair in a Rabbit Model. Tissue Engineering Part C: Methods *21*, 1263-1273.

Barber, F.A., and Chow, J.C. (2001). Arthroscopic osteochondral transplantation: Histologic results. Arthroscopy *17*, 832-835.

Bodo, G., Hangody, L., Szabo, Z., Peham, C., Schinzel, M., Girtler, D., and Sotonyi, P. (2000). Arthroscopic autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of subchondral cystic lesion in the medial femoral condyle in a horse. Acta Vet Hung *48*, 343-354.

Burks, R.T. (2006). The Use of a Single Osteochondral Autograft Plug in the Treatment of a Large Osteochondral Lesion in the Femoral Condyle: An Experimental Study in Sheep. Am J Sports Med *34*, 247-255.

Changoor, A., Tran-Khanh, N., Méthot, S., Garon, M., Hurtig, M.B., Shive, M.S., and Buschmann, M.D. (2011). A polarized light microscopy method for accurate and reliable grading of collagen organization in cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage *19*, 126-135.

Hangody, L., Dobos, J., Balo, E., Panics, G., Hangody, L.R., and Berkes, I. (2010). Clinical Experiences With Autologous Osteochondral Mosaicplasty in an Athletic Population: A 17-Year Prospective Multicenter Study. The American Journal of Sports Medicine *38*, 1125-1133.

Hangody, L., and Fules, P. (2003). Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. J Bone Joint Surg Am *85-A Suppl 2*, 25-32.

Hangody, L., Rathonyi, G.K., Duska, Z., Vasarhelyi, G., Fules, P., and Modis, L. (2004). Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. J Bone Joint Surg Am *86-A Suppl 1*, 65-72.

Hangody, L., Vásárhelyi, G., Hangody, L.R., Sükösd, Z., Tibay, G., Bartha, L., and Bodó, G. (2008). Autologous osteochondral grafting—Technique and long-term results. Injury *39*, 32-39.

Hou, H., Zheng, K., Wang, G., Ikegawa, S., Zheng, M., Gao, X., Qin, J., Teng, H., and Jiang, Q. (2015). Influence of Intra-Articular Administration of Trichostatin A on Autologous Osteochondral Transplantation in a Rabbit Model. BioMed Research International *2015*, 1-8.

Igarashi, T., Iwasaki, N., Kasahara, Y., and Minami, A. (2010). A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. Journal of Biomedical Materials Research Part A *9999A*, NA-NA.

Igarashi, T., Iwasaki, N., Kawamura, D., Kasahara, Y., Tsukuda, Y., Ohzawa, N., Ito, M., Izumisawa, Y., and Minami, A. (2012a). Repair of articular cartilage defects with a novel injectable in situ forming material in a canine model. Journal of Biomedical Materials Research Part A *100A*, 180-187.

Igarashi, T., Iwasaki, N., Kawamura, D., Tsukuda, Y., Kasahara, Y., Todoh, M., Tadano, S., and Minami, A. (2012b). Therapeutic Effects of Intra-Articular Ultrapurified Low Endotoxin Alginate Administration on Experimental Osteoarthritis in Rabbits. Cartilage *3*, 70-78.

Iwasaki, N., Kato, H., Kamishima, T., Suenaga, N., and Minami, A. (2007). Donor site evaluation after autologous osteochondral mosaicplasty for cartilaginous lesions of the elbow joint. Am J Sports Med *35*, 2096-2100.

Julkunen, P., Harjula, T., Iivarinen, J., Marjanen, J., Seppänen, K., Närhi, T., Arokoski, J., Lammi, M.J., Brama, P.A., Jurvelin, J.S.*, et al.* (2009). Biomechanical, biochemical and structural correlations in immature and mature rabbit articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage *17*, 1628-1638.

Kock, N.B., Hannink, G., van Kampen, A., Verdonschot, N., van Susante, J.L.C., and Buma, P. (2011). Evaluation of subsidence, chondrocyte survival and graft incorporation following

autologous osteochondral transplantation. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc *19*, 1962-1970.

Maruyama, M., Satake, H., Suzuki, T., Honma, R., Naganuma, Y., Takakubo, Y., and Takagi, M. (2017). Comparison of the Effects of Osteochondral Autograft Transplantation With Platelet-Rich Plasma or Platelet-Rich Fibrin on Osteochondral Defects in a Rabbit Model. The American Journal of Sports Medicine *45*, 3280-3288.

Niederauer, G.G., Slivka, M.A., Leatherbury, N.C., Korvick, D.L., Harroff, H.H., Ehler, W.C., Dunn, C.J., and Kieswetter, K. (2000). Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats. Biomaterials *21*, 2561-2574.

Nishida, K., Iwasaki, N., Fujisaki, K., Funakoshi, T., Kamishima, T., Tadano, S., and Minami, A. (2012). Distribution of Bone Mineral Density at Osteochondral Donor Sites in the Patellofemoral Joint Among Baseball Players and Controls. The American Journal of Sports Medicine *40*, 909-914.

O'Driscoll, S.W., Keeley, F.W., and Salter, R.B. (1988). Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. J Bone Joint Surg Am *70*, 595-606.

Paul, J., Sagstetter, M., Lämmle, L., Spang, J., El-Azab, H., Imhoff, A.B., and Hinterwimmer, S. (2012). Sports Activity After Osteochondral Transplantation of the Talus. The American Journal of Sports Medicine *40*, 870-874.

Poole, R., Blake, S., Buschmann, M., Goldring, S., Laverty, S., Lockwood, S., Matyas, J., McDougall, J., Pritzker, K., Rudolphi, K.*, et al.* (2010). Recommendations for the use of preclinical models in the study and treatment of osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage *18*, S10-S16.

Reddy, S., Pedowitz, D.I., Parekh, S.G., Sennett, B.J., and Okereke, E. (2006). The Morbidity Associated With Osteochondral Harvest From Asymptomatic Knees for the Treatment of Osteochondral Lesions of the Talus. The American Journal of Sports Medicine *35*, 80-85.

Rieppo, J., Töyräs, J., Nieminen, M.T., Kovanen, V., Hyttinen, M.M., Korhonen, R.K., Jurvelin,

J.S., and Helminen, H.J. (2003). Structure-Function Relationships in Enzymatically Modified Articular Cartilage. Cells Tissues Organs *175*, 121-132.

Robert, H. (2011). Chondral repair of the knee joint using mosaicplasty. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research *97*, 418-429.

Roberts, S., McCall, I.W., Darby, A.J., Menage, J., Evans, H., Harrison, P.E., and Richardson, J.B. (2003). Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. Arthritis Res Ther *5*, R60-73.

Roberts, S., Menage, J., Sandell, L.J., Evans, E.H., and Richardson, J.B. (2009). Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. The Knee *16*, 398-404.

Ross, K.A., Williams, R.M., Schnabel, L.V., Mohammed, H.O., Potter, H.G., Bradica, G., Castiglione, E., Pownder, S.L., Satchell, P.W., Saska, R.A.*, et al.* (2013). Comparison of Three Methods to Quantify Repair Cartilage Collagen Orientation. Cartilage *4*, 111-120.

Sadia Nazneen Karobi, T.L.S., Takayuki Kurokawa, Takayuki Nonoyama, and Jian Ping Gong (2016). Creep Behavior and Delayed Fracture of Tough Polyampholyte
Hydrogels by Tensile Test. Macromolecules *49*, 5630-5636.

Scranton, P.E., Jr., Frey, C.C., and Feder, K.S. (2006). Outcome of osteochondral autograft transplantation for type-V cystic osteochondral lesions of the talus. J Bone Joint Surg Br *88*, 614-619.

Simonian, P.T., Sussmann, P.S., Wickiewicz, T.L., Paletta, G.A., and Warren, R.F. (1998). Contact pressures at osteochondral donor sites in the knee. Am J Sports Med *26*, 491-494.

Smyth, N.A., Haleem, A.M., Murawski, C.D., Do, H.T., Deland, J.T., and Kennedy, J.G. (2013). The Effect of Platelet-Rich Plasma on Autologous Osteochondral Transplantation. The Journal of Bone and Joint Surgery (American) *95*, 2185.

Sukegawa, A., Iwasaki, N., Kasahara, Y., Onodera, T., Igarashi, T., and Minami, A. (2012). Repair of Rabbit Osteochondral Defects by an Acellular Technique with an Ultrapurified

Alginate Gel Containing Stromal Cell-Derived Factor-1. Tissue Engineering Part A *18*, 934-945.

Tsukuda, Y., Onodera, T., Ito, M., Izumisawa, Y., Kasahara, Y., Igarashi, T., Ohzawa, N., Todoh, M., Tadano, S., and Iwasaki, N. (2015). Therapeutic effects of intra-articular ultra-purified low endotoxin alginate administration on an experimental canine osteoarthritis model. Journal of Biomedical Materials Research Part A *103*, 3441-3448.

Valderrabano, V., Leumann, A., Rasch, H., Egelhof, T., Hintermann, B., and Pagenstert, G. (2009). Knee-to-Ankle Mosaicplasty for the Treatment of Osteochondral Lesions of the Ankle Joint. The American Journal of Sports Medicine *37*, 105S-111S.

Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Kurokawa, T., Gong, J.P., and Yasuda, K. (2016). Hydroxyapatite-coated double network hydrogel directly bondable to the bone: Biological and biomechanical evaluations of the bonding property in an osteochondral defect. Acta Biomaterialia *44*, 125-134.