

別記様式第6号（第16条第3項，第25条第3項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	露口 勇輔
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 The Benefit of Minced Cartilage Over Isolated Chondrocytes in Atelocollagen Gel on Chondrocyte Proliferation and Migration (アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片の単離軟骨細胞に対する細胞増殖能、遊走能における有用性の検討)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	杉山 英二	
審査委員	講師	味八木 茂	
〔論文審査の結果の要旨〕 <p>関節軟骨は一度損傷すると修復が困難であり，関節軟骨の損傷は変形性関節症を惹起し，関節機能の低下や疼痛の原因となる。そのため，損傷した軟骨に対する適切な治療が求められており，Brittebergらは広範な軟骨損傷に対する治療法として自家培養細胞軟骨移植術（以下ACI）を初めて報告した。Ochiらは，アテロコラーゲンゲルを足場として3次的に培養軟骨様組織を作製する，第3世代ACIを開発した。この手法はBrittebergらの方法で懸念された移植部からの細胞漏出や不均衡な細胞分布という問題点を解決し，良好な臨床成績が報告されている。しかし，この手法にも改善点が存在し，軟骨の採取と移植という二次的手術を必要とする点，軟骨細胞を単離するため細胞障害性のある酵素を用いた処理を必要とする点，軟骨細胞を単離するため正常の軟骨基質を破壊する点が挙げられる。</p> <p>本研究では，アテロコラーゲンゲルを足場として細切軟骨を包埋した群と単離した軟骨細胞を包埋した群における，ゲル内への細胞遊走能，細胞増殖能，基質産生能を比較検討することで，細切軟骨を用いた軟骨治療法が広範な軟骨損傷に対する新規治療法としての可能性を見極めることを目的とした。</p> <p>変形性膝関節症に対して人工膝関節置換術（以下TKA）を施行した7例（全例女性，平均年齢79.1歳）から軟骨を採取し，それぞれメスを用いて軟骨片が1mm³となるように軟骨を細切した。12.5mgの細切軟骨を100μlのゲルに包埋した群をM1群，25mgの細切軟骨を100μlのゲルに包埋した群をM2群とした。また，単離した軟骨細胞2×10⁵個を100μlのアテロコラーゲンに包埋した群を作製し，isolated chondrocyte group(以下IC群)とした。それぞれ3週間培養後に評価を行った。</p> <p>HE染色，サフラニンO染色を施行し，Bern scoreおよび細胞数の計測により，軟骨細胞の遊走能，増殖能，基質産生能を評価した。また，Ki-67，LECT-1，TGF-β，Type1・Type2コラーゲンを免疫組織学的に染色した。軟骨基質の評価として，グリコサミノグリカン（以下GAG）/DNA ratioを測定した。</p>			

軟骨細胞数は、IC 群では平均 15.2 個、M1 群で平均 24.9 個、M2 群で平均 35.4 個であり、全群間で有意差を認めた。Bern score は、IC 群で平均 2.3、M1 群で平均 3.9、M2 群で平均 4.4 であり、全群間で有意差を認めた。Ki-67 陽性細胞率は、IC 群で平均 58.1%、M1 群で平均 89.6%、M2 群で平均 94.9%であった。IC 群と比較して M1 群、M2 群とも有意差をもって陽性細胞率が高かったが、M1 群、M2 群間では有意差を認めなかった。TGF- β および LECT-1 の免疫染色において、LECT-1、TGF- β とも全群で発現を認め、IC 群と比較して M1 群、M2 群のほうがより強く染色された。Type1 コラーゲン染色について、アテロコラーゲンゲルは良好に染色されたが、細切軟骨片は染色されなかった。一方、Type2 コラーゲン染色では、Type1 と対照的に軟骨片が良好に染色された。ゲル内の軟骨細胞も Type2 コラーゲンにて染色されていた。また、M2 群において GAG-to-DNA ratio が 3 群の中で最も高く、IC 群よりも M1 群で高く、それぞれ有意差を認めた。

本研究において、単離した軟骨細胞をアテロコラーゲンゲルに包埋した群に比べて、細切軟骨片をアテロコラーゲンゲル内に包埋した群は、軟骨細胞の増殖、遊走、軟骨基質の産生について優れていることが示された。つまり、アテロコラーゲンゲルに細切軟骨片を包埋する手法は、単離した軟骨細胞を包埋する手法に比べて、軟骨欠損を修復するためにより良い特徴を有することが証明された。

酵素処理し単離した軟骨細胞を包埋したゲルと比較して、細切軟骨片を包埋したゲルでは有意差をもって多くの軟骨細胞を認め、より多くの Ki67 陽性細胞を認めた。この結果はトリプシンやコラゲナーゼによる酵素処理の工程が軟骨細胞に損傷を与えることを示し、酵素を用いる必要がない細切軟骨片群ではより良い細胞増殖能が保たれ、より広い範囲の軟骨欠損の修復に有効である可能性が示唆された。

また、本研究の結果より、細切軟骨片を用いる手法は従来 ACI と比較してより広い範囲の軟骨修復が可能であることが証明された。IC 群では、 2×10^5 個の軟骨細胞を 100 μ l のアテロコラーゲンゲル内に包埋した。これまでの研究結果より、TKA の症例から採取した軟骨片 100mg 中には平均 2×10^5 個の軟骨細胞が含まれているため、IC 群では 100 μ l 中に 100mg の軟骨片が含まれていると考えられる。最も細胞増殖能および Bern score が優れていた M2 群は 100 μ l のアテロコラーゲンゲル内に 25mg の細切軟骨を含み、これは IC 群に用いられた軟骨の量の 1/4 であった。つまり、アテロコラーゲンゲルに包埋した細切軟骨片は従来の ACI と同量の軟骨片を用いた場合、4 倍広い範囲の軟骨欠損を覆うことができる可能性が示唆された。

本研究において、アテロコラーゲンゲルに包埋した細切軟骨片は単離した軟骨に比べて良好な細胞遊走や細胞増殖を認め、多くの GAG を含み、アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨移植が一次的な新規軟骨治療法となる可能性が示された。

以上の結果から、本論文は細切軟骨片をアテロコラーゲンゲルに包埋する手法が、一次的な新規軟骨治療法として有用と示唆し、今後、臨床応用できる可能性があり、整形外科領域の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が露口勇輔に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	露口 勇輔
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 The Benefit of Minced Cartilage Over Isolated Chondrocytes in Atelocollagen Gel on Chondrocyte Proliferation and Migration (アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片の単離軟骨細胞に対する細胞増殖能、遊走能における有用性の検討)			
最終試験担当者			
主査	教授	今泉 和則	印
審査委員	教授	杉山 英二	
審査委員	講師	味八木 茂	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判定合格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成31年2月7日の第78回広島大学研究科発表会（医学）及び平成31年2月1日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
<ol style="list-style-type: none">1. 軟骨片を包埋し培養するうえで、細胞の形質を維持するための工夫はあるか2. 自家培養軟骨細胞移植術で用いる軟骨様組織に評価基準はあるか3. アテロコラーゲンゲル内に遊走した細胞は本当に軟骨細胞なのか4. 基質を産生しない軟骨細胞を用いた実験に意義はあるか5. 本研究の臨床応用			
これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			