

論文内容要旨

論文題目

家兔膝関節骨軟骨欠損モデルにおいて 骨髄由来多血小板フィブリンは骨軟骨修復を促進する

責任講座： 整形外科学 講座
氏 名： 五十嵐 貴宏

【内容要旨】(1,200 字以内)

【目的】現在の骨軟骨病変の治療には課題がある。多血小板フィブリン (PRF) は血液をガラス製採血管で抗凝固剤を加えずに遠心分離して作製されるフィブリン塊で、成長因子を含み足場の機能を有する。筆者らは骨髄血から PRF を作製できることを報告したが、骨軟骨修復能については不明である。本研究の目的は家兔膝関節骨軟骨欠損に対する末梢血由来 PRF (P-PRF) と骨髄由来 PRF (BM-PRF) の効果を比較することである。

【方法】

P-PRF と BM-PRF の作製: P-PRF は耳介動脈から採取した末梢血 3 ml を遠心分離 (1600 g, 10 分間) して作製した。BM-PRF は腸骨 (骨髄血 3 ml) から作製した。

In vitro 実験: 月齢 4 か月の家兔 3 羽より P-PRF と BM-PRF を作製し, 1, 3, 7, 10, 14 日目に TGF- β 1 濃度を ELISA で測定した。また P-PRF と BM-PRF を 14 日間培養し, PRF 内の単核細胞の有無を観察した。さらに各 PRF との 5 日間の共培養による家兔 MSC への細胞増殖効果を評価した。

In vivo 実験: 月齢 4 か月の家兔 36 羽を対照群, P-PRF 群, BM-PRF 群の 3 群に分けた (各群 $n=12$)。対照群では膝蓋骨溝に骨軟骨欠損 (直径 4 mm・深さ 3 mm) を作製した。P-PRF 群と BM-PRF 群では各 PRF を欠損部に移植した。術後 4 週と 12 週に膝関節を摘出した。micro-CT 解析では術後 12 週の総軟骨下骨量を評価した。組織学的解析では、術後 12 週の骨軟骨修復状況についてサフラニン O 染色を行い Niederauer スコアで評価し、術後 4, 12 週の膝蓋下脂肪体滑膜の炎症程度については HE 染色を行い Krenn スコアで評価した。また術後 4 週の骨軟骨欠損部の TGF- β 1 発現について免疫組織化学を行い定量的に評価した。

統計学的分析: t 検定, one-way ANOVA, Tukey 検定, Kruskal-Wallis 検定, Steel-Dwass 多重比較を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

【結果】*In vitro* 実験: BM-PRF から徐放された TGF- β 1 濃度は P-PRF に比べ 3, 7, 10 日目で有意に高かった。BM-PRF の培地内に単核細胞の増殖を認めたが、P-PRF では細胞は存在しなかった。また BM-PRF との共培養により家兔 MSC の細胞増殖は促進した。*In vivo* 実験: micro-CT では BM-PRF 群の総軟骨下骨量は他 2 群よりも有意に多かった。組織学的評価では対照群と比較し、BM-PRF 群は 12 週の Niederauer スコアが有意に高く、4 週の Krenn スコアが有意に低かった。また、BM-PRF 群の TGF- β 1 染色陽性率は他 2 群よりも有意に高かった。

【考察】P-PRF と比較し BM-PRF は単核細胞を含有し、骨軟骨修復能や抗炎症効果を有する TGF- β 1 を高濃度に徐放し、MSC に対する高い増殖効果を示した。BM-PRF を骨軟骨欠損部に移植した結果、欠損部では TGF- β 1 が高発現し、骨軟骨修復が促進され、硝子様軟骨で修復した。また、術後早期の滑膜の炎症程度が低いことから、BM-PRF は高い抗炎症効果を有し、早期から修復期やリモデリング期に移行して高い骨軟骨修復効果を示したと考えられた。BM-PRF は骨軟骨欠損治療に寄与できる可能性が示唆された。

2024 年 7 月 9 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名：五十嵐 貴宏

論文題目：家兎膝関節骨軟骨欠損モデルにおいて骨髄由来多血小板フィブリンは
骨軟骨修復を促進する

審査委員：主審査委員

伊藤 吏



副審査委員

佐藤 慎哉



副審査委員

川岸 久太郎



審査終了日： 2024 年 7 月 8 日

【 論文 審査 結果 要 旨 】

現在、臨床で行われている骨軟骨欠損の治療法には課題があり、新たな治療法が求められている。これまでに末梢血をガラス製採血管で抗凝固剤を加えずに遠心分離して作製する多血小板フィブリン (PRF) による治療が報告されており、この PRF は成長因子と足場の機能を有し、骨軟骨欠損の新しい治療法となる可能性が報告されている。筆者らはさらに、骨髄血から作製した PRF には成長因子と足場に加え、細胞も含めた再生に必要な三要素が含まれ、より効果的な骨軟骨欠損の治療効果が得られるという仮説を立て、家兎膝関節骨軟骨欠損モデルに対する末梢血由来 PRF (P-PRF) と骨髄由来 PRF (BM-PRF) の効果について、In vitro 実験および In vivo 実験で比較した。

In vitro 実験では、BM-PRF から放出された TGF- β 1 濃度は P-PRF に比べ 3、7、10 日目で有意に高い値を示した。また、BM-PRF の培地内には単核細胞を認め、培養 14 日目では 31 ± 13 CFU-F/ウェルの増殖を認めたのに対し、P-PRF では 14 日目でも CFU-F は存在しなかった。さらに、BM-PRF および P-PRF と外因性家兎間葉系幹細胞 (MSC) との共培養を比較すると、培養 5 日目の dsDNA 測定では BM-PRF 群が有意に高い数値を示し、BM-PRF は MSC の増殖を促進していた。

In vivo 実験において、micro-CT では BM-PRF 群の総軟骨下骨量はコントロールおよび P-PRF 群よりも有意に高かった。組織学的評価ではコントロール群と比較し、BM-PRF 群は硝子軟骨の修復状況を示す Niederauer スコアが 12 週で有意に高く、膝蓋下脂肪体の増生、炎症を示す Krenn スコアが 4 週で有意に低かった。また、BM-PRF 群の TGF- β 1 染色陽性率はコントロール群、P-PRF 群よりも有意に高かった。

本研究では、P-PRF と比較した BM-PRF は単核細胞を含有し、骨軟骨修復能や抗炎症効果を有する TGF- β 1 を高濃度に徐放することを明らかにした。さらに、BM-PRF を骨軟骨欠損部に移植した結果、欠損部では TGF- β 1 が高発現し、骨軟骨修復が促進され、硝子様軟骨で修復されることを確認した。また、術後 4 週の滑膜炎の程度が低いことから、BM-PRF は炎症期から修復期やリモデリング期への円滑な移行を促す可能性が考えられた。以上のことより、BM-PRF は P-PRF に比較し、骨軟骨欠損治療へより効果的に寄与できる可能性が示唆された。

本研究のテーマである BM-PRF による骨軟骨修復効果についての研究は、新規性も高く、臨床応用にも直結するテーマで社会的意義も高いと評価された。審査会で一部指摘された、In vitro 実験での標本数の取扱い、ならびに In vivo 実験での肉眼的評価である国際軟骨修復協会 (ICRS) スコアの妥当性について再考、修正することが可能であれば、本研究論文は博士 (医学) の学位授与に値すると判定した。