

[ 別紙 2 ]

## 審査の結果の要旨

氏名 星川 淳人

軟骨細胞移植は、従来の治療法では再生が困難とされてきた関節軟骨損傷に対する、細胞工学的手法を用いた代表的な治療法であり、細胞の運搬、局所への保持を目的とした優れた担体の開発は、その治療成績を向上させる上で重要と考えられる。可視光照射により重合することで硬化するスチレン化ゼラチンは、特に *in situ* で硬化するという特徴により、軟骨細胞移植における担体としてこれまでに試みられてきた他の生体材料にない多くの利点を有していると考えられる。本研究は光反応性スチレン化ゼラチンの軟骨細胞移植における担体としての可能性を追求することを目的として、*in vitro* および *in vivo* における基礎的な検討を試みたのものであり、下記の結果を得ている。

1. スチレン化ゼラチンと培養液を 3:7 の重量比で混合し、重合開始剤としてゼラチン重量の 0.1% 相当のカンファキノンを加えた溶液に、可視光（照射強度  $600 \text{ mW/cm}^2$ ）を 2 分間照射することで得られる硬化体の弾性率を静的クリープ試験により測定した。圧迫負荷を加えられた硬化体は、粘弾性体としてふるまい、その弾性率は関節軟骨の約 1/40 であった。また、弾性率はゼラチンに対するスチレン基導入率にほぼ比例して変化した。
2. 各スチレン基導入率のスチレン化ゼラチンによる溶液（スチレン基導入率：90%, 75%, 65%, 50%, 44%, 25%）を、単層培養下の培養液に混合したところ、スチレン基導入率が 65% 以上のゼラチンを加えられた細胞は 24 時間後にはすべて培養皿より剥離した。強い疎水性を示すスチレン基と親水性を示すゼラチンとが共存するスチレン化ゼラチンが一種の界面活性剤として作用したため、細胞膜が傷害を受けた結果、細胞死にいたったものと推測した。
3. スチレン基導入率 44% のスチレン化ゼラチンと培養液を 3:7 の重量比で混合し、ゼラチン重量の 0.1% 相当のカンファキノンを加えた溶液に細胞を包埋

し硬化させた後に培養した。その結果、培養 1 週後に包埋細胞の約 1/4 が生細胞として硬化体内から回収された。

4. スチレン化ゼラチン硬化体内で培養された関節軟骨細胞は、半定量的 RT-PCR の結果、type II collagen、aggrecan core protein などの硝子軟骨特異的な基質タンパク遺伝子 mRNA を発現し続け、その発現量および経時的変化はコラーゲンゲル内で培養された関節軟骨細胞から得られたサンプルとほぼ同様であった。また、組織学的観察により培養 21 日後には、包埋細胞は小腔を形成し、硬化体全体で軟骨基質を産生していた。以上の結果より、*in vitro* においては、スチレン化ゼラチン内で関節軟骨細胞は硬化反応を通じて生存し、細胞形質も維持していたため、担体としての可能性が示されたと考えた。しかし、組織学的にコラーゲンゲルを担体とした場合と比較して、担体中央部における基質の染色性に劣り、その緊密な構造のために硬化体内部への培養液の移動が制限され、栄養供給が十分になされなかったことが原因と考えられた。
5. 12 羽のウサギ大腿骨顆部に作成した径 4mm の軟骨欠損部に、 $5 \times 10^6$  cell/ml の細胞密度でスチレン化ゼラチンに包埋した他家関節軟骨細胞を移植し、*in situ* で硬化させた。移植 4 週後に屠殺した 1 羽に硝子軟骨様組織による再生を認めた。しかし、他の 11 羽の欠損部は線維性組織で充填され、軟骨組織は認めなかった。線維性組織中に内部に細胞の存在しないゼラチンの小片や、ゼラチンと考えられる小粒状物質を胞体内に認める細胞が存在していた。*in vivo* において、軟骨基質の形成がおこらなかった原因として、ゼラチンへの包埋に伴う cell viability の低下に加え、軟骨細胞移植に用いる担体として利用するにはある程度の厚みを有しなければならないため栄養面での問題が重なり、細胞活性の回復が不十分となり、十分な基質を産生できぬまま吸収を受けてしまったためと考えた。

光反応性スチレン化ゼラチンの持つ *in situ* で硬化し移植直後から移植片自体が強度を有するという特性は、軟骨細胞移植の担体として臨床応用の面から考慮した場合非常に有益なものであるが、*in vivo* では満足すべき結果を得ることができず、材料の改良などにより細胞や生体への適合性を改善し、さらなる検討を重ねていく必要がある。本論文は、基礎的な検討により軟骨細胞移植における担体としての、スチレン化ゼラチンの現時点における到達点と限界、問題点を明らかにしたものであり、その臨床応用に向けた研究の端緒として重要な位置を占めるものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。