

審査の結果の要旨

氏名 田中 庸子

本研究は臨床に応用可能なインプラント型再生軟骨の足場素材として用いる生分解性ポリマー多孔体の開発をすることを目的として、異なる製法にて作製した多孔体を用い、それらの構造や組成について検討することにより、3次元形状と力学的強度を有し、自己組織性に優れた多孔体の構造と組成の決定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 代表的な生分解性ポリマーである poly-L-lactide (PLLA) を用いて、一般的な多孔体の製造法である Sugar-leaching method(SLM)法および3次元造形法の一つである Fused deposition modeling(FDM)法を用いて、異なる気孔径、気孔率を有する様々な構造を持つ8種類の多孔体 (SLM法 P、A、B、C、D および FDM法 1.0 mm、1.5 mm、2.0 mm) を作製した。これらの多孔体を用いて、アテロコラーゲンとの親和性、および力学的特性を評価したところ、圧迫強度は同じ製法で作られた足場素材同士を比べると、高气孔率で低値を示した。弾性定数の計測では、同様の製法の中では気孔径 (開口径) が大きいほど、低い弾性定数を示した。細胞を投与する際に混和するアテロコラーゲンとの親和性に関しては、製法が同じであれば気孔率の高い方が高い吸収性を示す傾向が見られ、特に SLM 法 B で良好であった。

再生軟骨の軟骨特性を、ヌードマウス皮下移植 60 日後の再生軟骨で評価すると、ヌードマウス体表の肉眼所見では、SLM 法および FDM 法の再生軟骨はいずれも、ブロック型をした多孔体の 3 次元形状をほぼ維持されていた。一方、多孔体を使用しない control では、投与時の大きさが大幅に縮小していた。摘出した再生軟骨の色調、表面形状に関しては、SLM 法では B で滑沢、白色を示しており、生理的な軟骨組織に類似した所見を示していた。組織学的に観察すると、いずれの多孔体でも PLLA の骨格・格子部分の間に、トルイジンブルー染色による異染性を示す領域が島状に認められ、軟骨基質プロテオグリカンの集積が示唆された。特に SLM 法 B、FDM 法 1.5 mm に広範にトルイジンブルー異染性領域が観察された。生化学的にも両者に、軟骨基質である II 型コラーゲン、プロテオグリカン (GAG) の集積が見られ、優れた軟骨再生を示した。しかし、肉眼所見の結果では FDM 法 1.5 mm の格子構造が皮膚を刺激するなどの為害性を示す懸念があったため、多孔体の製法および構造としては SLM 法 B を第一選択と考えた。

2. SLM 法 B 多孔体と同じ構造（気孔径 0.3 mm、気孔率 95%）の多孔体を poly(D-lactide) (PDLA MW:200,000)、poly(L-lactide-co-e-caprolactone) (P(LA/CL) 50:50 MW:200,000)、poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA30:70 (MW:100,000(L)、MW:200,000(H)) の 5 種類を検討の対象とし作製した。多孔体の骨格構造に若干の形態の相違はあるものの、いずれも平均気孔径 0.3 mm、気孔率 95% で、ほぼ同様な構造であった。力学的特性では、PLLA および PLGA で圧迫強度や弾性定数が高値の傾向を示した。アテロコラーゲンとの親和性はすべてのポリマーでほぼ同様の値を示した。再生軟骨の軟骨特性を、ヌードマウス皮下移植 60 日後の再生軟骨で評価すると、PLLA、PLA/CL、PDLA ではおおむね多孔体のブロック形状を維持していたが、PLGA は分子量によらずサイズの縮小が見られものの、PLGA を用いた再生軟骨は滑沢、白色で血性色調が他のものに比べて低く、組織学的にもプロテогリカンの集積を示すトルイジンブルー異染性が密に見られ、異染性領域が他のポリマーに比べ広範に連続して観察された。また、PLLA、PLA/CL、PDLA で見られるポリマー遺残物も、PLGA をもちいた再生軟骨では見られなかった。軟骨基質である II 型コラーゲンおよび GAG の含有量は、PLLA および PLGA で増加が著しく、PLA/CL および PDLA に比べ有意に高い傾向が見られた。したがって組成を比較において PLGA を用いた多孔体で良好であると考えられた。

3. 組織反応の主体をなすマクロファージの免疫染色を行ったところ、いずれのポリマーを使った再生軟骨においても、再生軟骨領域にはマクロファージの局在は見られず、その周囲に存在する非軟骨性の結合組織に局在が見られた。マクロファージ数を形態計測学的に評価すると、PLGA は分子量に関わらず、PLLA、PLA/CL、PDLA などの他のポリマーに比べ、マクロファージ数が有意に減少していた。PLGA を用いた再生軟骨では、ポリマーが迅速に吸収されることにより、マクロファージの増加が抑制され、炎症性サイトカインの分泌や組織反応と、それに伴う軟骨に対するカタボリックな作用が抑制されるため、良好な軟骨再生が得られたものと推測された。

以上、本論文は、軟骨再生医療の適応を拡大する上で必要なインプラント型再生軟骨を作製するための足場素材について、構造と素材という点から検討を加え、最適化を図った。本研究は、系統的に検討されていなかった軟骨再生用の足場素材に科学的な洞察をあたえ、軟骨再生医療学の発展に貴重な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。