

審査の結果の要旨

氏名 大谷 祐之

本研究は Tissue Engineering の技術を用いた軟骨再生におけるゼラチン/ β -TCP 複合体足場の有用性と、徐放性 b-FGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)の至適投与量の検討を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 近交系 C57BL/6J マウス(3 週齢)の耳介軟骨を摘出し、酵素処理を行い弾性軟骨細胞を分離、単層培養にて増殖させた。ゼラチンスポンジと 25% β -TCP の複合体足場を作製し、b-FGF 量 0,10,100,500,1000,2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ で徐放化した。軟骨細胞を 10×10^6 cells/ cm^3 の細胞密度で足場に播種し、同系マウスの皮下に移植し、2,4,6 週後に移植片を回収した。

再生組織の大きさは移植 4 週以降、徐放化 b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上でもとの足場より大きくなった。重量はいずれの週も b-FGF 用量依存性に増加し、b-FGF を投与しない群と比較し徐放化 b-FGF 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で重量に有意差を認めた。

2. 組織像において、移植 4 週以降 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放で、移植片内部にトルイジンブルー/サフラニン O で染色される軟骨基質の領域が観察された。

またグリコサミノグリカンおよび 2 型コラーゲン定量において、移植 2 週から 4 週にかけて産生量が増加していた。移植 4 週以降徐放化 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で非投与群に比べ有意に基質産生量が多く、11 週齢マウス耳介軟骨組織よりも高値であった。

これらのことから、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放化投与によって、主に移植 4 週以降に軟骨基質産生量が増加し、軟骨再生がなされたと考えられた。

3. 移植片の総細胞数の指標として、再生組織の総 DNA 量測定を行った。DNA 量は、いずれの週も b-FGF 用量依存性に増加し、それぞれの b-FGF 徐放群で移植 2 週後に最大値となり 4 週後に減少し、6 週後は同等であった。再生組織 1mg あたりの DNA 量は、移植片の細胞密度に相当し、b-FGF 徐放各群で移植 2 週後に最大値となり、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で非投与群に比べ有意に高値だった。

マクロファージのマーカーである F4/80 の免疫組織化学的染色では、b-FGF の増量によって F4/80 陰性の軟骨細胞・線維芽細胞等の増加と同様に、マクロファージ細胞数も増加していた。

移植早期に b-FGF の軟骨細胞増殖作用で *in vivo* の高密度培養環境を構築させることが最も重要と考えられた。

4. マウス耳介弾性軟骨の単離増殖細胞における、ゼラチンスポンジ/ β -TCP 複合体足場材料への徐放化 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与により、移植 4 週で軟骨が再生可能であった。

b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の徐放投与で、本来の足場とほぼ同じ大きさの再生組織が得られ、それ以上の b-FGF 徐放化投与群との間で、軟骨基質産生量に有意差はなかった。本実験系において b-FGF の徐放化至適量は、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ が適当であると考えられた。

以上、本研究では足場材料にゼラチン／ β -TCP 複合体を用い、軟骨再生過程ならびに b-FGF 徐放化至適量を検討した。本研究は、再生気管軟骨を用いた小児気道疾患治療の臨床応用、そして今後の再生医療の発展に重要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。