

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16987

研究課題名(和文) Induced membrane法を用いた遊離軟骨移植の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic study of the autologous cartilage graft with the induced membrane method

研究代表者

妹尾 貴矢 (Senoo, Takaya)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90509465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：自家軟骨移植後の長期的安定性向上、組織吸収抑制を目的として、既に一般化している骨移植におけるinduced membrane法の軟骨への応用を試みた。作成したinduced membraneにおいて、周囲の血管新生並びにVEGFの発現を確認した。induced membrane法を用いた肋軟骨移植では短期的にⅡ型コラーゲンの残存が多くなる印象があったが、長期的なCT画像および組織学的変化においては、induced membrane法の効果は認められなかった。一方、軟骨膜の存在は明確に軟骨組織の吸収抑制に働いており、膜様構造に軟骨膜類似の機能を付加させる重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種再建治療の材料の一つに自身の軟骨があり、特に外表面見の形を維持するため用いられる。しかし、移植組織は一部が吸収されるため、時に形態の維持が困難となる事が問題であった。今回、既に骨移植治療で実用化されているinduced membrane法を応用し、軟骨の長期安定性向上を試みた。当初期待された軟骨吸収抑制効果は明らかにできなかったが、容易にinduced membraneの誘導は可能であり、また軟骨膜組織の有効性は明らかであったため、両者の機能・構造解析を今後も進めることで、簡便安価で効果的な軟骨保護材料獲得を実現できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of improving long-term stability and suppressing tissue absorption after autologous cartilage graft, we attempted to apply the induced membrane method, which has already been generalized in bone graft, to cartilage graft. In the prepared induced membrane, surrounding angiogenesis and VEGF expression were confirmed. There was an impression that type II collagen remained more in the short term in costal cartilage graft model using the induced membrane method, but the effect of the induced membrane method was not observed in long-term CT images and histological changes. On the other hand, the presence of perichondrium clearly acts to suppress the absorption of cartilage tissue, suggesting the importance of adding a function similar to perichondrium to the membranous structure.

研究分野：形成外科

キーワード：induced membrane 軟骨移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は形成外科領域で一般的な再建材料であり、小耳症手術におけるフレーム形成や隆鼻術などに広く利用されている。

しかし、異所性に移植された軟骨組織が経時的に変性、吸収されることも多く、ドナーの組織量も豊富とは言えないため、軟骨を用いた再建は、その生着及び長期間にわたる安定性を得ることが非常に重要であった。

対して整形外科領域では、インプラント周囲に形成される induced membrane を用いた低侵襲で簡便な骨再生促進法が近年注目されており、既に報告者の名前を取り Masquelet 法として骨欠損再建の一選択肢として確立されている。この Induced membrane 法を遊離軟骨移植にも応用して、移植軟骨組織の長期安定性が得られるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は induced membrane 法の有効性を遊離軟骨移植において確認し、軟骨の様々な移植形態における相乗効果を検証することである。

3. 研究の方法

(1) ラットにおける Induced membrane の作成

8 週齢 Wistar ラットの背部皮下にシリコン製インプラントを留置し、インプラント周囲へ induced membrane を形成させる。インプラント留置期間を 1 週、2 週、4 週、6 週、8 週に設定し各群より induced membrane を採取した。

ヘマトキシリン・エオジン染色による組織学的評価ならびに、VEGF、PPAR- の発現を免疫組織染色にて評価し、軟骨移植に適した induced membrane 作成期間を求めた。

(2) ラット induced membrane 内への軟骨移植

(1) で求めたインプラント留置期間をもとに以下の手順にてラットへの induced membrane 内への軟骨移植実験を行った。

8 週齢 Wistar ラットの右背部皮下へ棒状のシリコンインプラントを挿入し induced membrane を誘導

induced membrane 作成後、自家肋軟骨を採取し、インプラントと置換して移植

Negative control として、対側背部皮下へ直接軟骨移植術

移植後 8 週で移植組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン染色、サフラニン O 染色による組織学的評価および型コラーゲンの存在を免疫組織染色にて評価

(3) 軟骨移植形態による相乗効果および長期留置モデルにおける実験

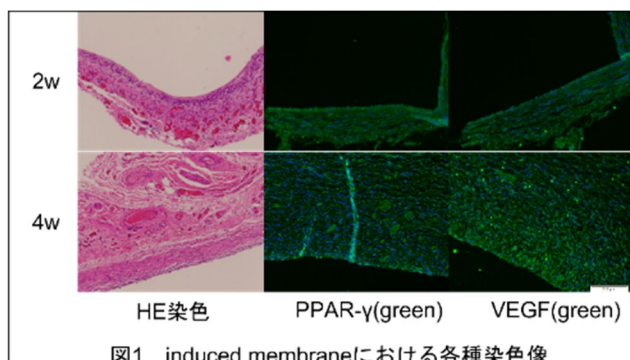
軟骨移植手順は(2)に準拠、移植部位の安定性および易観察性のため、ラット前額部へ移植部位を変更した。軟骨の移植形態として、(1群)軟骨膜温存、(2群)軟骨膜除去、(3群)軟骨膜除去後再被覆、(4群)軟骨膜温存&切除混在の処置を各肋軟骨に施し多状態で移植した。

移植後 1, 2, 4, 12, 24 週において X 線 CT 断層撮影を用いて移植軟骨の形態・体積変化を追跡、移植後 24 週で組織採取を行い、ヘマトキシリン・エオジン染色、サフラニン O 染色での組織学的評価および型コラーゲン及び軟骨膜マーカーとしての CD34、CD90 免疫組織染色を行い、軟骨組織の質的評価を行った。

4. 研究成果

(1) ラット背部皮下に棒状のインプラント(シリコン製点滴チューブ)を挿入し実験施行

図 1 のごとく、組織学的評価ではヘマトキシリン・エオジン染色にて、薄い皮膜(induced membrane)周囲に血管増生を認め、皮膜周囲の血流増加が示唆された。また PPAR- および VEGF



を対象とした免疫組織染色にて同発現を確認した。またこれらは先行研究と同様の反応であった。induced membrane 作成のシリコンインプラント留置期間については 1-2 週の短期では皮膜としての強度が十分ではなく、軟骨移植腔の維持に不足していた。留置期間 4 週以上では部位により皮膜の厚さにばらつきが見られたものの皮膜強度は十分と思われる実験に要する期間を考慮し、(2)以降の実験ではインプラント留置期間を 4 週に設定した。

(2) ラット背部皮下における induced membrane 内軟骨移植実験

図2のごとく、8週例 Wistar ラット背部への時価肋軟骨移植実験を行った。

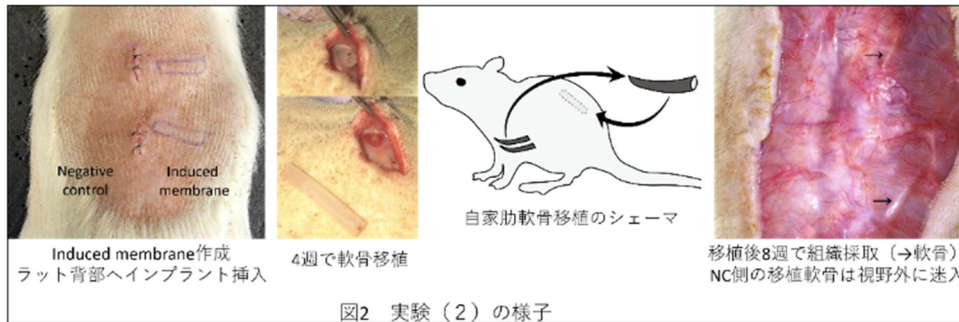


図2 実験(2)の様子

移植後 8 週で組織を回収した時点で肉眼的に移植軟骨組織の縮小が疑われたが、重量変化は附着組織除去時に軟骨破損を伴い測定困難であった。

軟骨横断面の組織学的変化では、図3に示すように induced membrane 内移植群と negative control 間で、2型コラーゲン免疫染色での蛍光強度が強い傾向が見られたが、n=8の実験において有意差は認めなかった。

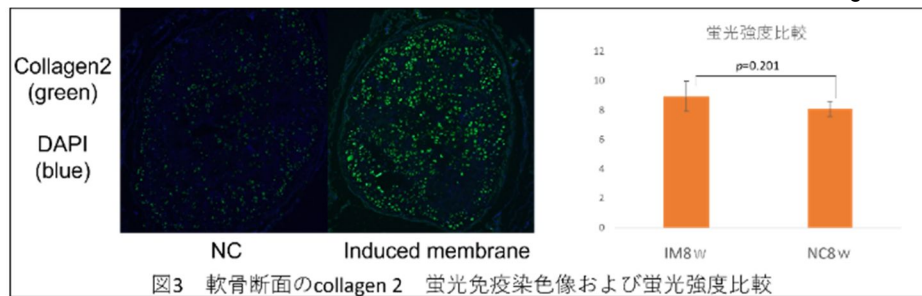


図3 軟骨断面のcollagen 2 蛍光免疫染色像および蛍光強度比較

(3) ラット前額部における移植軟骨形態別および長期移植実験

実験は CT 撮影における観察部位の位置的安定性のため、移植部をラット前額面に変更して行った。図4に実験のシェーマ並びに手技の代表的写真を示す。

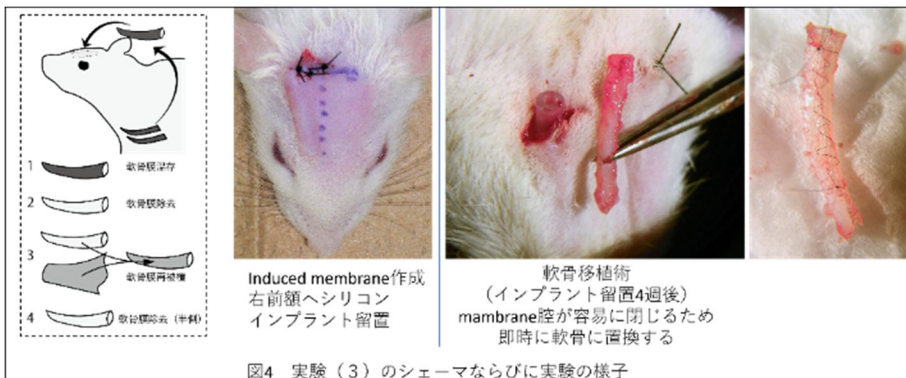


図4 実験(3)のシェーマならびに実験の様子

X線CTの3次元再構築画像を用いた計測で軟骨体積を追跡したところ、図5-1に示すように、軟骨膜を有する群(1群、3群)グラフ上体積値の増大が見られた。これは体積計測を行う際に、軟骨組織として定義したCT値のしきい値設定が低かったため、周囲組織のX線透過性低下も含めて軟骨と認識した結果と考えられた。しかし、体積の変化傾向は各群間で異なる動きを見せており、軟骨膜を除去した2群のみ体積減少の傾向が認められた。

しかし、各群内における induced membrane の有無においては有意な差を示すことはできなかった。

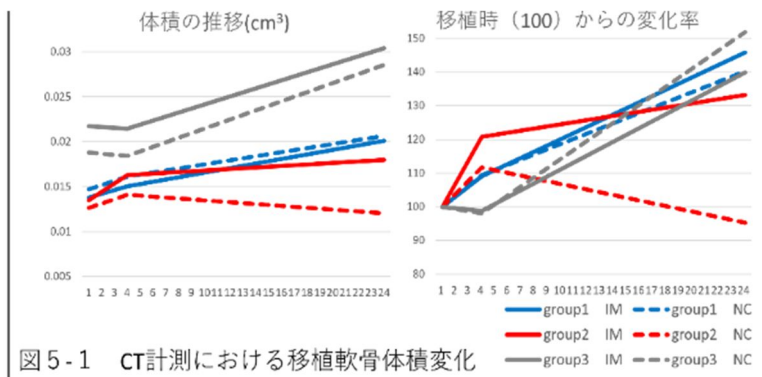


図5-1 CT計測における移植軟骨体積変化

視覚的評価として CT 画像の 3 次元再構成像を作成し、比較した。

各群の代表的個体画像を
図 5-2 に示す。

それぞれの組織採取時の
肉眼像 (図 5-3) と比較し
て、3 次元再構成画像は、実
際の移植軟骨の形態と一致
した形状を再現できてい
た。

移植軟骨の経時的形態変
化においては、全体におい
て軟骨の辺縁の鈍角化、凹
面の平坦化の傾向が見られ
た。

特に軟骨膜を除去した 2
群で軟骨の劣化が顕著で

あり、これは induced membrane を作成した側でも抑制されなかった。

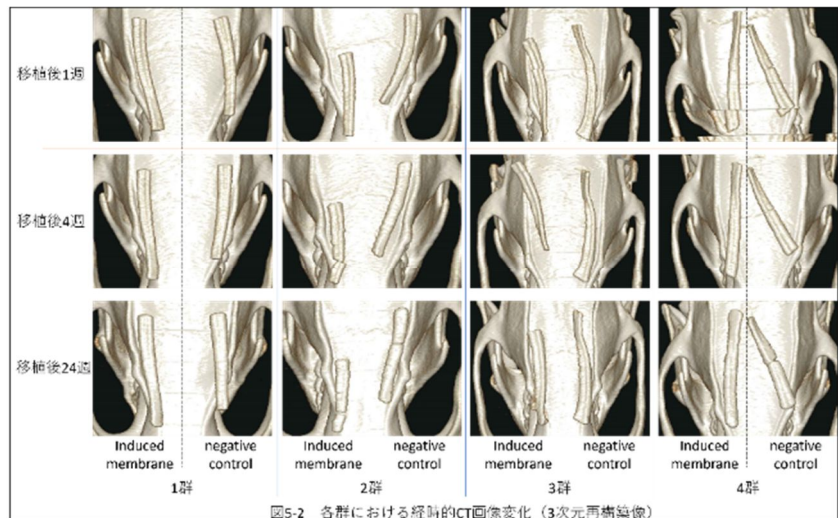


図5-2 各群における経時的CT画像変化 (3次元再構成像)

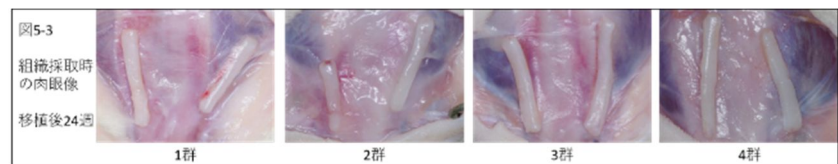


図5-3
組織採取時
の肉眼像
移植後24週
1群 2群 3群 4群

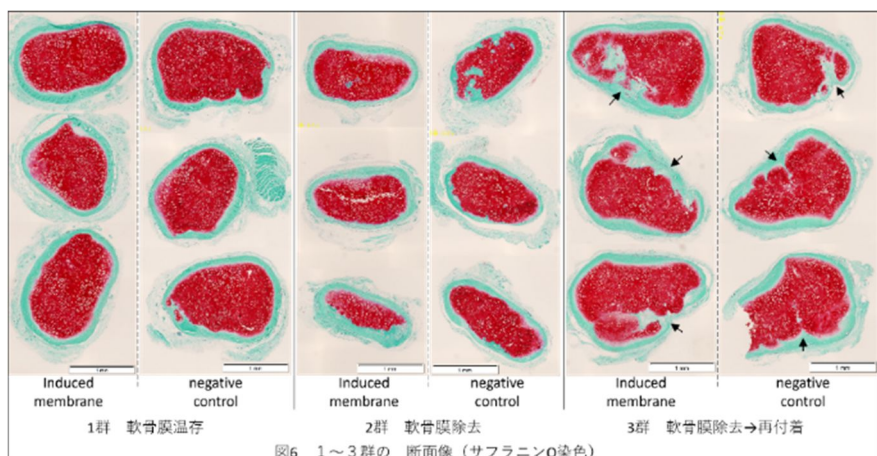


図6 1～3群の断面像 (サフランinO染色)

組織学的評価では
図 6 に示すように軟
骨膜を除去した 2 群
でおおきく組織の
萎縮と軟骨基質の
現症を認めた。また
軟骨膜を温存した 1
群では軟骨組織の
吸収は殆ど見られ
なかったが、軟骨膜

を剥離 & 再被覆した 3 群では矢印 () に示すように、軟骨の一面に軟骨基質の吸収される部分を認めた。これは、軟骨膜剥離部の切開による実験手技の影響か、または再被覆した軟骨膜の合わせ目 (軟骨膜の切れ目) による組織欠損の影響が考えられた。

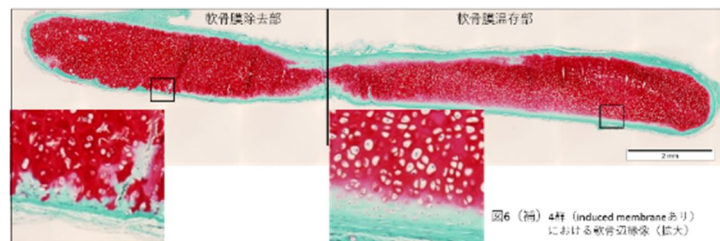


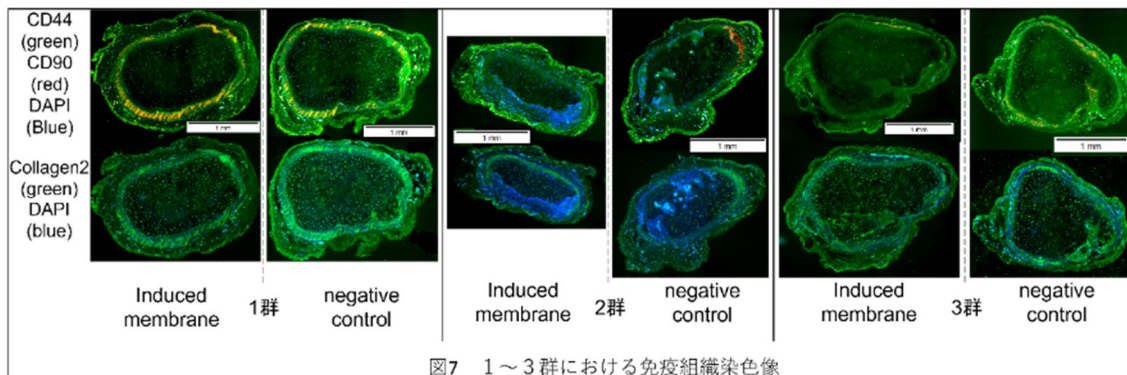
図6 (補) 4群 (induced membraneあり) における軟骨辺縁部 (拡大)

免疫組織染色では軟骨膜を CD44、CD90 の共陽性部分として染色同定し、軟骨吸収部位との関係性を評価した。

1 ~ 3 の 3 群における代表的組織像を図 7 に示す。軟骨膜を完全温存した 1 群においては全周にわたり、CD90 陽性部分が確認された。2 群においては CD90 発現部分は存在せず、軟骨膜が失われ、再生もしていないことが示唆された。2 群の negative control において一部のみ発現を認め、同部の軟骨吸収が抑えられていたが、おそらく、実験時の軟骨膜残存によるものと思われた。

3 群については軟骨膜を剥離後即時に再被覆しているが、CD90 陽性範囲が 1 群に比べ非常に限

定されていた。しかし陽性部分と軟骨吸収部または非吸収部との位置的关系性は明らかではなく、軟骨膜の質的变化が示唆されるものの、それが軟骨吸収とは関与していない可能性が示唆された。



いずれの組織像においても、induced membraneの有無による差異は明らかでなかった。

本研究においては、induced membrane法により、新生血管を豊富に有する膜用構造物を得られるが、長期的な軟骨吸収抑制効果については差を示すことができなかった。軟骨吸収においては軟骨膜の存在が重要であり、これは軟骨温存または剥離した軟骨膜の再被覆でもほぼ同等の効果があることが示唆された。軟骨膜とinduced membraneの相乗効果については認められなかった。

Induced membraneの誘導手技は非常に簡便ではあるが、当初期待した軟骨の長期吸収抑制の効果は示されなかった。軟骨組織の長期安定には、より軟骨膜に質的に近い組織の構築が必要であると判断し、軟骨膜組織の解析と、人工的構築に向けて研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	木股 敬裕 (Kimata Yoshihiro)		研究指導(研究全般)
研究協力者	徳山 英二郎 (Tokuyama Eijiro)		技術指導(組織解析)
研究協力者	渡部 聡子 (Watanabe Satoko)		技術指導(統計解析)
研究協力者	中桐 僚子 (Nakagiri Ryoko)		技術指導(動物実験)

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------