

【要約】

Age-related response against partial thickness cartilage defect in rats is usable in evaluating efficacy of interventions on cartilage repair  
(ラット部分軟骨損傷の週齢による反応の差異は治療の効果判定に使用が可能)

千葉大学大学院医学薬学府

先進医療科学専攻

(主任：高橋 和久 教授)

赤津 頼一

【目的】変形性膝関節症(OA)は日常生活動作に影響を与え、管理や治療にも高い費用がかかり、特に長寿国では社会的な問題となっている。部分軟骨損傷(PTCD)は修復困難で OA に進行するため、治療が大切だが、治療介入の効果判定に有効な動物モデルはなく、治療薬の開発は進んでいない。また全層軟骨損傷(FTCD)に対し、間葉系幹細胞(MSCs)と多血小板血漿(PRP)が有効と言われているが、PTCD に対する関節内注射の効果は未だ不明である。そこで今回の目的は①様々な週齢の SD rat に PTCD を作成し(PTCD model)、週齢による軟骨修復の差異を調べ、自然修復が困難になる週齢を明らかにすること、②各週齢の軟骨修復度を指標とすることで、PTCD model に対し MSCs と PRP を関節内投与した場合の軟骨修復度を評価することである(自然経過との対比)。

【方法】実験①雄性 SD rat 3, 6, 10, 14 週齢、各週齢 30 膝の大腿骨内側顆荷重部に  $100\mu\text{m}$  のメスを使用し、PTCD を作成した。PTCD 後 1 日, 1, 2, 4, 12 週で Safranin O/fast green 染色と II 型コラーゲンの免疫染色による組織学的評価を行った。実験②自然修復が困難だった 14 週齢の SD rat を用いた。4 匹から各 10ml 採血後、1500G で 10 分間遠心分離を行い、PRP を作成した。MSCs には、膝蓋下脂肪体を採取し、14 日間培養した細胞(passage=2)を用いた。検討項目として、血小板数を測定することで、PRP の濃縮率を算出し、培養細胞については抗ラット CD11b/c, CD45, CD90 抗体を用いて、フローサイトメトリーで表面マーカーについて調査した。①と同様に PTCD を作成し、関節包を縫合後に PBS  $50\mu\text{l}$ , PRP  $50\mu\text{l}$ , MSCs  $1\times 10^6$  + PBS  $50\mu\text{l}$ , MSCs + PRP  $1\times 10^6$  + PBS  $50\mu\text{l}$  のいずれかを関節内注射した。その後 4 週で各群 6 膝を組織学的に評価した。

【結果】実験①6 週齢まで自然修復された。10 週齢と 14 週齢は PTCD 後 12 週で変性へと進行していた。PTCD 後 4 週と 12 週では、各週齢の軟骨修復度に同様の傾向を認めた。そこで、自然修復が困難な 14 週齢に治療介入を行った後、4 週で効果判定が可能と考え実験②を施行した。実験②PRP は 6.4 倍に濃縮されていた。培養細胞の表面マーカーは CD11b・45 が陰性、CD90 が陽性であり、MSCs として矛盾はなかった。PBS 群の軟骨修復度は 14 週齢、PRP 群は 10 週齢、MSCs 投与群は共に 6 週齢の自然経過の軟骨修復度と同等だった。

【考察】ラットのように骨端線が開存し続ける動物では、軟骨の成熟度や修復能を検討することが大切と言われているが、詳細は不

明だった。本研究では PTCD に対する SD rat の自然修復能を示すことができた。PRP について軟骨修復に貢献するという論文がある一方で、無効という論文もある。本研究では PTCD に対し、僅かな効果を有するが、変性を抑制する程強い効果はなかった。MSCs は軟骨修復能を有していると報告されているが、PTCD に対する関節内注射の報告はなかった。本研究では MSCs の関節内注射により変性を抑制することが可能であり、PTCD に対する有効性を証明することが出来た。現在、PTCD や OA の治療薬(DMOADs)の開発が試みられているが、有効な評価法はなく、成功していない。今回の PTCD model では、治療介入後 4 週と早期に効果判定が可能であり、介入の有効な評価法となり得るため、DMOADs の開発に役立つと考えられる。

**【結論】** 今回週齢が異なる SD rat の PTCD の自然経過を比較検討することにより、指標化することが出来た。そのデータを使用し、14 週齢の PTCD model に治療介入することで、その軟骨修復力を評価することが可能だった。この model は今後 DMOADs の研究に役立つと考えられる。

Osteoarthritis and Cartilage

平成 27 年 2 月 投稿中