

れぞれ実験段階ではあるが、方法と得られている結果を報告する。

B. 研究方法

1. ヒト耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て、4人の小耳症患者と拘縮耳患者、鼻翼欠損患者の全6例から手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。尚、拘縮耳の症例は耳介軟骨を弁状にし、耳輪部の再建しており、そのトリミングで生じた余剰耳介軟骨を供与いただいた。鼻翼欠損患者は耳輪部を全層で楔状に採取し、composit graftとして鼻翼部の再建に用いた。その際のトリミングで生じた余剰耳介軟骨を供与いただいた。提供されたヒト耳介弾性軟骨は、軟骨膜組織、軟骨組織の間を実体顕微鏡下でエレバトリウムを用い鈍的に剥離した。

2. イヌ耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

試験動物は健康なビーグル (TOYO Beagle, 5ヶ月齢, オス) を3頭用いた。実験動物の飼育と管理はボゾリサーチセンター(株)に委託した。まず検体採取にあたり、獣医師指導のもと「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和48年10月1日法律第105号, 最終改正平成18年6月2日法律第50号), 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成18年4月28日環境省告示

第88号), 「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 2006年6月1日)を遵守した麻酔処置を実施した。

いずれの手術日も、動物は前日から一夜絶食後、麻酔前処置を施し、軟骨摘出手術時はペントバルビタールナトリウム(20~30 mg/kg)を静脈内投与し、術中の麻酔深度を適度に維持した。再移植手術時は塩酸ケタミン(ケタラール筋注用, 第一三共(株))と5%ブドウ糖液(日本薬局方, (株)大塚製薬工場)を1:50の割合に混合(0.1%液)し、微量点滴により術中の麻酔深度を適度に維持する。術前及び術後管理として感染防止目的で結晶ペニシリンGカリウムと硫酸ストレプトマイシン(明治製菓(株))の混合液を術中に使用した。また、術前後の予防投薬としてアジスロマイシン(ファイザー製薬(株))を用いた。術後創処置はイソジン外用薬(明治製菓(株))を用いた。縫合部の生着が確認できるまで1日1回処置した。

全個体において両側外耳介を採取し、無菌的に皮膚を剥離した。得られた検体のうち脂肪や血管、他の組織を剪刀で取り除いた。その後、軟骨組織から軟骨膜を剥離し、軟骨実質と軟骨膜に分けた。

3. 耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の培養

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、

基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は 100 μ m の Cell Strainer (BD Falcon)で濾過し、遠心分離(1500 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)した。上清を除去後、10% Fetal Bovine Serum (GIBCO; 以下 FBS), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA)を添加した Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium(SIGMA; 以下 D-MEM/F-12)で洗浄し、遠心分離(1500 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)を行った。この操作は 2 回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ(FALCON)あるいは 60 mm 細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。細胞は気相条件を 37 $^{\circ}$ C, CO₂濃度 5%に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington)を含有する D-MEM/F-12(SIGMA)を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で 20~30 分 静置し、1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)を加え、ピペッティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1500 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5 min)を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種濃度は 1200 cells/cm²の密度としコンフルエントに達した際に同様

に継代をするという操作を繰り返した。

4. 積層化培養と軟骨分化誘導

耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞を用いた積層化培養によって軟骨細胞へ分化誘導を行った。軟骨細胞は *in vitro* における二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており、単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとの形質である Collagen II 産生能を培養 4 継代後には失うという報告がされている。そのため、ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三次元での培養・軟骨分化誘導が試みられてきた。そこで本研究においても細胞を 3 層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を 2.5×10^4 cells/cm² に調整し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後 2 日間、10% FBS (GIBCO), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養し、細胞の接着を促した後、軟骨分化誘導培地を用いて 5 日間培養した。軟骨分化誘導培地は、基本的には 10% FBS(GIBCO), 1% Antibiotic Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate (WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline Growth Factor- I (SIGMA), basic Fibroblast Growth Factor (科研製薬)を含有する D-MEM/F-12

medium(SIGMA)を使用した。ただし、医薬品を用いた分化誘導培地の検討においては異なる組成の物を使用している(後述)。軟骨分化誘導培地を用い 7 日間培養を行った後、別に用意した細胞を 5×10^4 cells/cm² に調整し、上から播種し積層化した。2 層目を播種後、1 層目と同様に 2 日間は 10 % FBS(GIBCO), 1 % Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養を行い、その後軟骨分化誘導培地を用いて 5 日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返し、計 3 層に重層化した。なお、細胞の培養はすべて、気相条件を 37°C, CO₂ 濃度 5% に設定したインキュベーター内で行った。

5. 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討

前述の積層化により軟骨分化誘導をかけるに当たり、**research use** のものではなく、臨床応用を念頭に入れて医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討を行った。培地の組成は 1% Antibiotic Antimycotic Solution, Ascorbic Acid(ビタミン C 注 10% PB®; 日新製薬), Dexamethasone(デキサート注射液®; 富士製薬工業株式会社), basic Fibroblast Growth Factor (フィブロラストスプレー®; 科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium(SIGMA)とした。血清は検討条件により使用しないか、10%

FBS(GIBCO)を添加した。

6. 重症免疫不全マウスへの皮下移植実験

積層化し軟骨分化誘導のかかっている細胞群を用いた。実験に使用したマウスは 6 週齢の雌の重症免疫不全マウス(NOD/SCID)で、三協ラボサービスより購入した。実験動物の飼育は横浜市立大学医学部動物実験センターに委託した。また、本大学の倫理審査を受け、取り扱いに関してはそれに則り研究を行った。

分化させた各細胞は、セルスクレイパー(IWAKI)を用いて剥離した。剥離した細胞は 23 G 注射針(テルモ)を装着した 2.5 ml シリンジ(テルモ)その産生基質とともにシリンジに回収し、背部の除毛を行った重症免疫不全マウス(NOD/SCID)の背部皮下に注入した。

7. 大動物(イヌ)への皮下移植実験

イヌにおいても積層化し軟骨分化誘導のかかっている細胞群を用いた。皮下移植の際の周術期管理は、抗菌薬や麻酔法などそれぞれ耳介採取時のものと同様に行った。移植法としては、麻酔下に背部皮下を剥離した後にポケットを作成し、その部位にシリンジに吸引してある細胞を直接注入した。ポケットと皮膚はそれぞれ縫合し、閉鎖した。皮下移植後 3 カ月で検体を摘出し組織学的に検討した。

C. 研究結果

1. 大動物(イヌ)における実験

現在 3 検体施行している。イヌの耳介から採取された軟骨細胞，軟骨細胞ともに良好に増殖し，軟骨分化誘導を施行できた。現在，皮下移植で得られた組織を組織学的に検討中である。今後，さらに条件検討を重ねたうえで例数を重ねる必要がある。

2. 医薬品を用いた軟骨分化誘導培地の検討

現在得られた検体のうち 2 症例の検体に関して軟骨分化誘導をかけている段階である。近日中に重症免疫不全マウスへ皮下移植を行い軟骨組織の再構築能の有無を検討していく方針である。

D. 考察

再生医学の概念は 1990 年代より広まり，その概念は定着して久しいと言える。再生医学は，少ない侵襲で組織・細胞を採取し，増殖させ，相対的に高い治療効果を得る，というところに目標を置いて研究・検討が繰り返されている。その際に，増殖効率の高い細胞群として，各種幹細胞やそれに準じた細胞群が用いられることが多い。しかし，そういった細胞群を使用するにあたっては，高い倫理的配慮や計画性が必要となるため，厚生労働省から「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年 7 月 3 日告示第 425 号，平成 22 年 11 月 1 日改正第 380 号）が告示されており，それらを臨床応用する

にあたってはこの指針に準ずるものでなければならない。そのため，高い安全性を確保できる環境整備とプロトコールがなければ幹細胞やそれに準じた細胞群を臨床応用することはできない。

本学付属病院は病院内に CPC を建設・設置した。当院 CPC は同区画内に作業スペースを 2 ヶ所設計しており，それぞれ CP1 と CP2 としている。そして，CP1 にはクラス 100 の空気清浄度を保持できるアイソレーターを設置している。当アイソレーターは空気清浄度を高く保つ機能の他に，アイソレーター内を過酸化水素で燻蒸，殺菌することが可能であり，高い衛生度と滅菌性に優れている。しかも，検体採取する手術室は同一施設内であり，とくに中央手術室は同一の階層にあるため採取された検体の滅菌性が高いまま処理することが可能であると期待している。

また臨床応用に際して，取扱う細胞自体やその生成物を最終産物として体内に注入・移植することになるが，その最終産物自体の安全性も高く保たなければならない。そのためには GMP に準拠した基準のもと全ての行程を管理しなければならない。つまり，製造管理として培養行程，品質管理として原料や資材から製品の保管，試験行程などの管理を行い，それを明記するプロトコールと手順書の作成しなければならない。現在，当院で保有するアイソレーターの能力を最大限に活用したプロト

コールを作成段階である。

尚、現在当院でプロトコールの作成に着手している計画は当科のものしかない。しかし、その一方で様々な計画を同時に運用することも可能であり、その場合は複数の計画とプロトコールが干渉してはならない。そのため、当院では再生細胞治療センター運営委員会(以下 CPC 運営委員会)が存在し、全職員を対象とし定期的に講習会を施行している。その場で相互の計画を周知し、プロトコールが干渉することのリスクを低減するように努めている。そのため、CPC 運営委員会主催の講習会において当科も発表を複数回行っている。具体的には、CPC 運営に関する事項を運営委員会側から院内に周知すると同時に当科のプロトコールを提示し周知している。(別添資料①参照)

今後は、前述のプロトコールの作成を進めるとともに、大動物実験や医薬品を用いた培地の検証なども進めていかなければならない。まず、大動物実験に関しては皮下移植で得られた組織を組織学的に検討中であるが、さらに条件検討を重ね、臨床応用に則した形での検討を施行していきたい。具体的には移植細胞量と再構築される軟骨組織量の相関関係や新規足場材料の検討を行うことを計画している。医薬品を用いた培地の検証に関しても、現段階では検討を重ねている段階であるが、**research use** の物と比べると分化の程度に差があると言わざるを得ない。

こちらに関してもさらに条件検討を重ね、場合によっては各添加物の適性濃度をそれぞれ検証していかなければならない。

E. 結論

われわれは、本学付属病院内に建設・設立された再生細胞治療センターにおいて、軟骨・軟骨膜由来細胞の培養技術を臨床応用することを目指している。それにあたり、Good Manufacturing practice (GMP)に準拠したプロトコールの作成と厚生労働省への申請、プロトコールの妥当性を示すための基礎実験とその報告が必要である。今回、当科としてのプロトコール作成の方向性を報告するとともに、大動物(イヌ)における耳介軟骨・軟骨膜細胞培養とそれらの軟骨再構築能の検討を行っていることを報告した。また、医薬品を用いた軟骨分化誘導に関して検討を行っているが、いずれもさらなる条件検討と例数を重ねる必要がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書に記載の通り。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

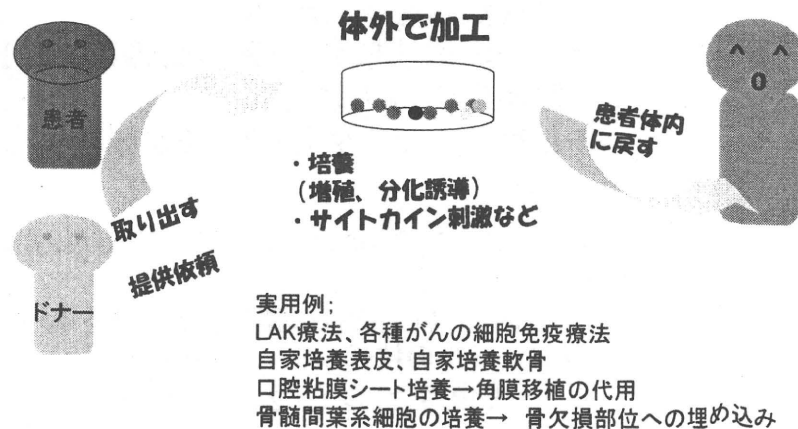
なし

本プロジェクトの目的

- (1) 先端医科学研究センターから生まれた研究成果を元に、横浜市立大学附属病院にて患者を対象とした臨床研究を行うこと、すなわち、**本格的なTR (translational research)**の実践のために必要な再生細胞治療センターの基盤をさらに強化し、TR拠点を確立すること
- (2) 再生医療や細胞治療に関わる臨床研究の実施にあたり必須となる、当院再生細胞治療センター(以下、CPC)を**GMP(Good Manufacturing Product)準拠レベル**で運営するために必要な情報を集積し、本学関係者に提供し、還元するシステムを構築すること

再生医療と細胞治療

- 1) 今までにない、新しい概念の治療
- 2) TR (translational research) 実践の場



『ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関わる指針』 に該当する対象疾患

対象疾患は下記要件に適合するものに限定されている

- (1) 重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患
又は一定程度身体 機能若しくは形態を損なうことにより
QOL(生活の質)を著しく損なう疾患であること
- (2) ヒト幹細胞臨床研究による治療の効果が、
現在可能な他の治療と比較して優れていると
予測されるものであること。
- (3) 被験者にとってヒト幹細胞臨床研究の治療により得られる利益
が、不利益を上回ると十分予測されるものであること。

→ 大学病院でなければ、実践出来ない医療

細胞治療・再生医療を 『患者診療』として健全に行うためには

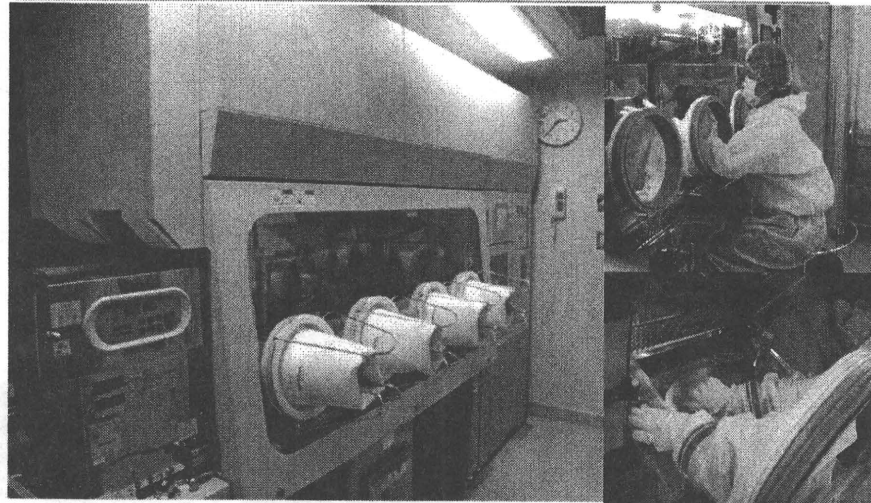
- ・専用設備と手順の規定
- ・教育訓練を受けた人員
- ・細胞の取り違え、交叉汚染の徹底防止
- ・感染症伝搬の防止
- ・全行程のモニタリング、経過観察

→ GMP (Good Manufacturing Product)準拠

病院内に 製薬会社の薬品製造工場を造るような
高いレベルの技術&ノウハウが要求される。

+各種指針、ガイドラインの厳しい規制

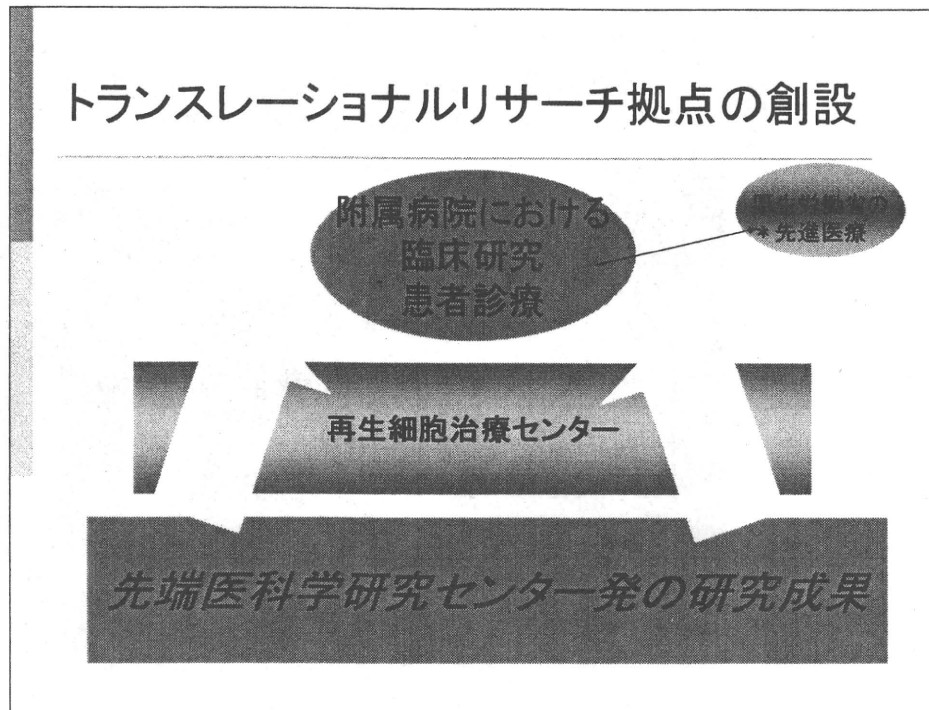
附属病院4階:
再生細胞治療センター内:細胞取り扱い作業エリア
アイソレーターシステム(第二世代)の導入



細胞の処理、加工、培養という一連の作業を一つの滅菌閉鎖空間内で、実施可能

神奈川県内公的病院唯一の
セルプロセッシングセンターとしての取り組み

- (1) 本研究成果で得られた全てのノウハウを本学の「知的財産」として、運用するための基盤を整備する
- (2) 本学関係者の再生医療、細胞治療等の実施希望者に対して、実地での教育訓練の場を提供する
(例:アイソレーターシステムの使用方法、臨床研究の実施に関わる院内システム)
- (3) CPC運営、再生医療に関する情報や各種ガイドライン・通達を集約し、情報を提供する



Clinical needs in plastic and reconstructive surgery

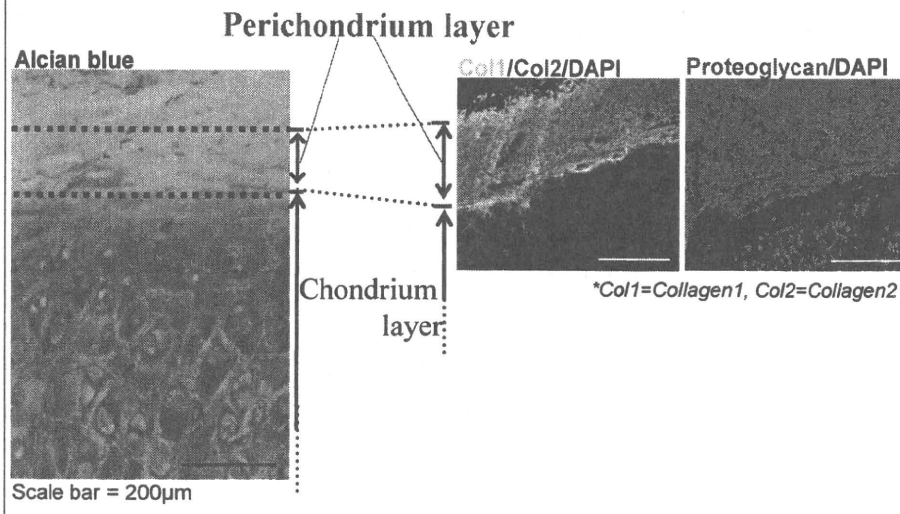
- Post-traumatic deformity
 - Midface fracture, Panfacial fracture
- Congenital deformity
 - Microtia, Treacher Collins syndrome
 - Cranial and /or facial hypoplasia
 - Facial clefts
- Aesthetic field

第1章 第4 対象疾患等

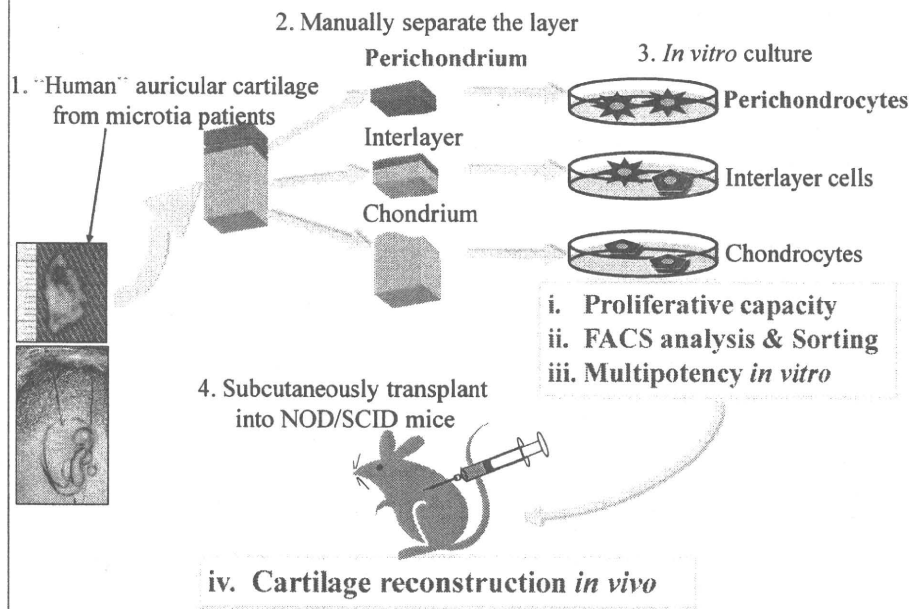
ヒト幹細胞臨床研究の対象は、次に掲げる要件に適合するものに限る。(1) 重篤で生命を脅かす疾患、身体の機能を著しく損なう疾患又は一定程度身体の機能若しくは形態を損なうことによりQOL(生活の質)を著しく損なう疾患であること。(2) ヒト幹細胞臨床研究による治療の効果が、現在可能な他の治療と比較して優れていると予測されるものであること。(3) 被験者にとってヒト幹細胞臨床研究の治療により得られる利益が、不利益を上回ると十分予測されるものであること。

ヒト軟骨膜細胞を利用した軟骨再生医療

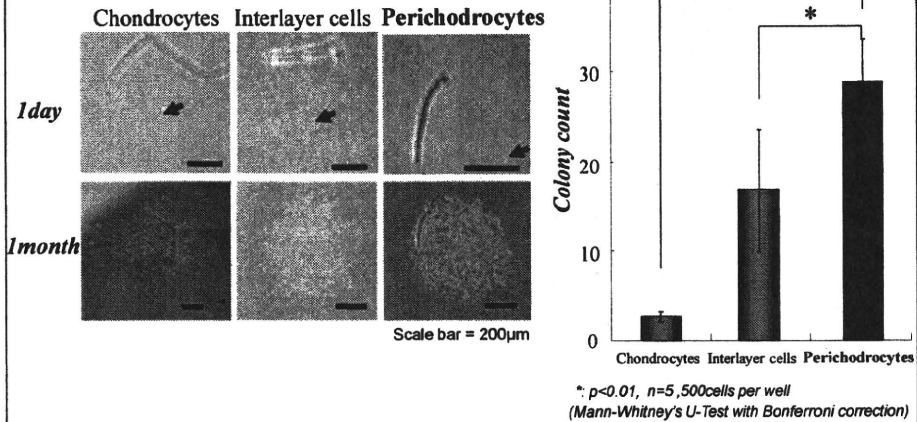
The normal structure of "human" auricular (ear) cartilage



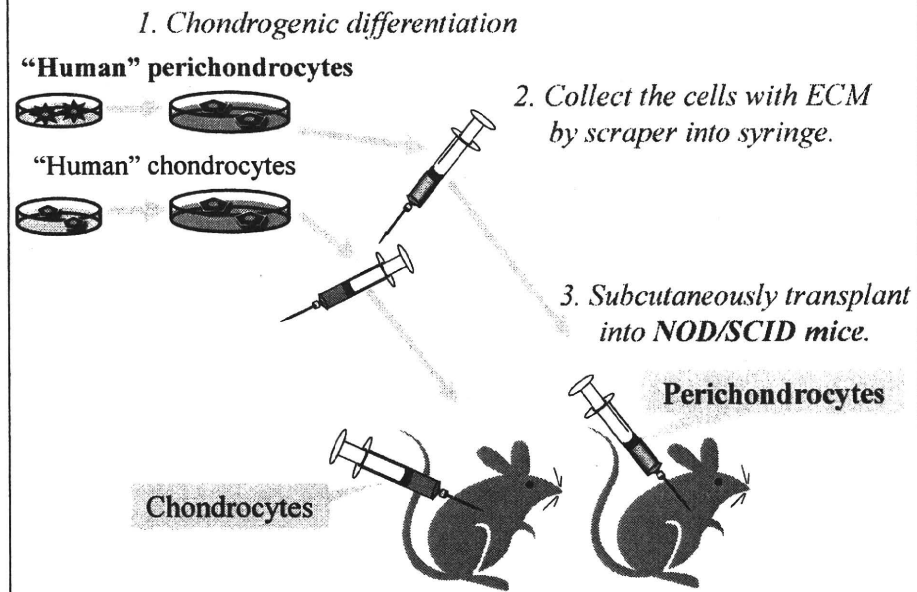
Methods



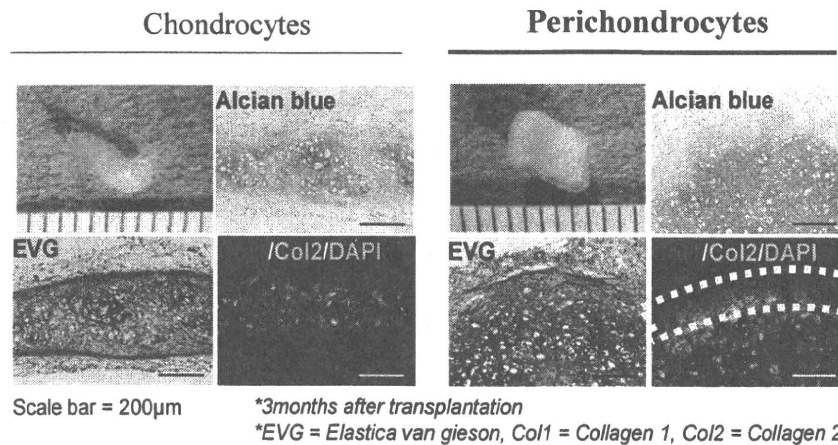
The highest colony forming capacity of human perichondrocytes



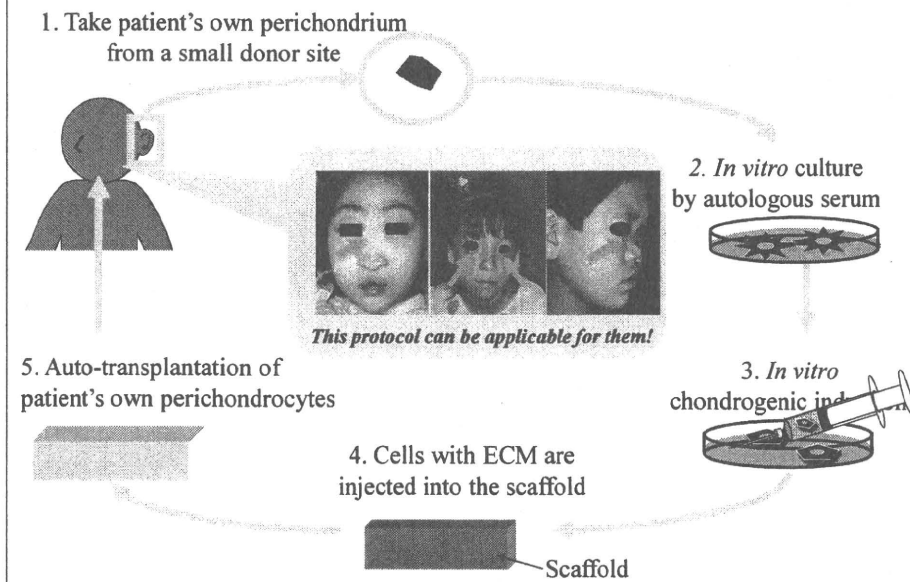
Methods of cartilage reconstruction *in vivo*



Elastic cartilage reconstruction capability of human perichondrocytes *in vivo*



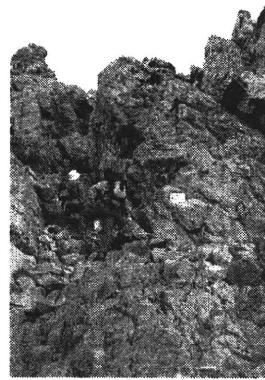
Schematic diagram of clinical application



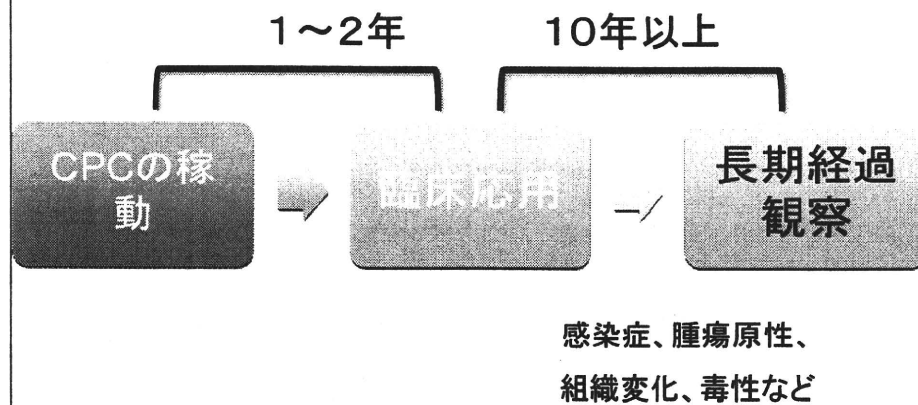
ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針

平成18年7月3日 厚生労働省

- ・ GMP準拠
- ・ 限定された疾患
- ・ 倫理的配慮
- ・ 安全性の確認
- ・ 記録保持（10年間）
- ・ 長期フォローアップ
- ・ 事故への対応



今後の展開



厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」を用いた軟骨再生療法の開発

・ヒト軟骨膜細胞の自家血清を用いた培養法の検証・

研究協力者 矢吹雄一郎

分担研究者 前川二郎

研究要旨

われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した細胞を用いた軟骨組織の再構築に関して検証している。重症免疫不全マウスにおける皮下移植実験において再構築される組織には軟骨膜と言える組織を認めており、長期形態維持能が高いと予想している。今後、ヒト耳介軟骨膜細胞の臨床応用を目指しているが、他種血清を使うことによって生じる感染症や免疫反応の問題が臨床的課題となっていた。そのため、軟骨膜細胞の自家血清を用いた培養法の検証を行った。

その結果、現段階では自家血清を用いた培養法は細胞増殖に関して他家血清と同等かそれ以上であることが示唆されている。また、自家血清のみを用いて増殖させた軟骨膜細胞の移植実験においても弾性軟骨の再構築が確認された。今後は、自家血清を用いた増殖能の検討条件を再検討し、例数を重ねる必要がある。加えて、軟骨誘導分化の定量的解析も必要と考えている。

A. 研究目的

現在、Tissue engineering を基礎とした培養再生軟骨や間葉系幹細胞を用いた椎間板再生に関する研究がなされており、それぞれ臨床応用されつつある。そして、培養再生軟骨は先天性頭蓋顎顔面奇形や外傷性高度顔面変形などへの臨床応用も期待されている。その一方で、培養に際して使用する血清の問題や再構築し移植した細胞群・組織の長期結果に関する検討が臨床的には不十分であると言わざるを得ない。

われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した細胞の中にヒト弾性軟骨幹/前駆細胞を同定している。それらを含む細胞群を用いて重症免疫不全マウスに対する皮下移植実験を行ったところ、それにより再構築された組織には軟骨膜様組織を認めた。そのため、軟骨膜細胞を用いて再構築された軟骨、およびその周囲組織は長期形態維持能が高いと予想している。今回、ヒト耳介軟骨膜細胞を臨床応用するにあたって、他種血清を使うことによって生じる感染症や免疫反応の問題を

考慮し、自家血清を用いた培養法の検証を行った。

B. 研究方法

1. ヒト耳介軟骨組織からの軟骨膜、軟骨組織の分離

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て、4人の小耳症患者より手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。提供されたヒト耳介弾性軟骨は、軟骨膜組織、軟骨組織の間を実体顕微鏡下で鈍的に剥離した。

2. ヒト耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞の培養

実体顕微鏡下で軟骨膜部・軟骨実質部の2層に分離された組織を、剪刀やメスを用いて細切した。その後、Collagenase type II (SIGMA) に懸濁・振蕩し、基質を分解し細胞を分離した。各組織の細胞懸濁液は Cell Strainer (BD Falcon) で濾過し、遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 min) した。上清を除去後、血清(濃度や種類は検討条件による)、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (SIGMA; 以下 D-MEM/F-12) で洗浄し、遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 min) を行った。この操作は2回繰り返して行った。各細胞は、35 mm イージーグリップ細胞培養ディッシュ (FALCON) あるいは 60 mm 細胞培養ディッシュ (FALCON)

に播種した。細胞は気相条件を 37°C, CO₂ 濃度 5% に設定したインキュベーター内で培養を行った。

細胞の継代は、0.2% Collagenase type II (Worthington) を含有する D-MEM/F-12 (SIGMA) を用いて行った。培地を除去したディッシュに上記の 0.2% Collagenase 溶液を注入し、インキュベーター内で 20~30 分静置し、1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を添加した D-MEM/F-12 medium (SIGMA) を加え、ピペッティングし細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離 (1500 rpm, 4°C, 5 min) を行い、洗浄を行った後、ディッシュに播種し再び培養した。尚、播種濃度は 1200 cells/cm² の密度としコンフルエントに達した際に同様に継代をするという操作を繰り返した。

3. 積層化培養と軟骨分化誘導

耳介軟骨膜細胞、軟骨細胞を用いて積層化培養によって軟骨細胞へ分化誘導を行った。軟骨細胞は *in vitro* における二次元培養により軟骨基質を産生する形質を失いやすいことが知られており、単層の細胞と三次元組織で形質に大きな差がある。成熟軟骨細胞はもともとの形質である Collagen II 産生能を培養4継代後には失うという報告がされている。そのため、ゲルによる包埋培養やスキャフォールドを用いた三次元での培養・軟骨分化誘導が試みられてきた。そこで本研究においても細胞を3層に積層化して培養・軟骨分化誘導を行った。各細胞を

2.5×10^4 cells/cm² に調整し細胞培養ディッシュ(FALCON)に播種した。播種後2日間, 10%各種血清(種類は検討条件による), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養し, 細胞の接着を促した後, 軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養した。軟骨分化誘導培地は, 1% Antibiotic Antimycotic Solution, L-ascorbic acid 2-phosphate(WAKO), Dexamethasone(SIGMA), Insuline Growth Factor- I(SIGMA), basic Fibroblast Growth Factor (科研製薬)を含有する D-MEM/F-12 medium(SIGMA)とし, 血清は用いなかった。軟骨分化誘導培地を用い7日間培養を行った後, 別に用意した細胞を 5×10^4 cells/cm² に調整し, 上から播種し積層化した。2層目を播種後, 1層目と同様に2日間は10%各種血清(種類は検討条件による), 1% Antibiotic Antimycotic Solution(SIGMA)を添加した D-MEM/F-12 medium(SIGMA)で培養を行い, その後軟骨分化誘導培地を用いて5日間培養を行った。この操作をもう一度繰り返し, 計3層に重層化した。なお, 細胞の培養はすべて, 気相条件を 37°C, CO₂濃度5%に設定したインキュベーター内で行った。

4. 血清濃度に関して

血清の種類と濃度に関しては検討条件によって振り分けた。まず, 初代培養時にウシ胎児血清; Fetal Bovine

Serum, 以下 FBS(GIBCO) で検証する群と自家血清で検証する群, 他家血清で検証する群の3群に分け, それぞれの血清を最終濃度10%となるように基礎培地に添加し使用した。それによって増殖を得た細胞群を MTT assay もしくは積層化分化誘導へと用いた。

5. 自家血清の調製

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て耳介弾性軟骨を供与いただいた同一患者から血液を採取した。

まず当院では術前にスクリーニングとして全例血液検査を行っている。その際の血液検査所見において貧血傾向の有無を確認した。貧血傾向の無い症例のみ血清作成目的の採血を施行した。血液は全例, 空腹時朝の血液を採取した。具体的には, まずは耳介形成術の麻酔導入の際に確保した末梢静脈路から採取を試みた。その末梢静脈路から十分採血できないと判断した際は, 即時その部位からの採血は中止し, 全身麻酔導入後大腿動脈を23G針で穿刺し採血した。その際は血腫などの合併症を回避すべく十分圧迫止血した。止血が確認されたのちもガーゼとテープで軽度圧迫固定しながら術中に複数回穿刺部を直接観察し, 確認した。また, 採血量は体重に対し 1.0ml/kg を越える採血は行わないようにした。ただし, 今回血液を供与いただいた4症例はいずれも貧血傾向認めず, 体重も 30kg 以上であった

ので、4 症例とも 20ml 採血を行った。

採取された血液は、本学先端医科学研究センターヒト組織プロセッシング室で処理した。まず、30min 静置し、その後遠心分離 (2500rpm, 4°C, 10min) を行った。上清を分注し、血清とした。得られた血清は恒温槽を用いて 56°C の状態で 20 分間静置し、非動化した。その後、0.22 μ m フィルター (FALCON) で濾過し、4°C で保存した。

6. MTT assay

軟骨膜細胞の増殖能を定量化するにあたり、MTT assay を施行した。試薬は Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いた。48 穴 well に 400 cells ずつ播種し、7 日に一回培地を交換した。血清の種類は FBS, 自家血清, 他家血清の 3 種とした。培地の血清濃度はそれぞれ 0%, 1%, 2%, 5%, 10% と条件を振った。播種 24 時間後から 72 時間毎、計 6 点で観察した。MTT assay を行う well は培地を吸引後、1 % Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を添加した D-MEM/F-12 (SIGMA) で洗浄し、同培地を 500 μ l 添加した。その後さらに Cell Counting Kit-8 を 50 μ l 添加し、気相条件を 37°C, CO₂ 濃度 5% に設定したインキュベーター内で 3 時間培養を行った。培養上清を 100 μ l ずつ採取し、450nm の吸光度を測定した。

7. 軟骨膜細胞、軟骨細胞の移植

実験に使用したマウスは 6 週齢の雌

の重症免疫不全マウス (NOD/SCID) で、三協ラボサービスより購入した。実験動物の飼育は横浜市立大学医学部動物実験センターに委託した。また、本大学の倫理審査を受け、取り扱いに関してはそれに則り研究を行った。

分化させた各細胞は、セルスクレイパー (IWAKI) を用いて剥離した。剥離した細胞は 23 G 注射針 (テルモ) を装着した 2.5 ml シリンジ (テルモ) その産生基質とともにシリンジに回収し、背部の除毛を行った重症免疫不全マウス (NOD/SCID) の背部皮下に全量注入した。移植後 4 カ月目に摘出を行い、組織学的に検討した。

8. 組織化学染色

移植後 4 ヶ月目に摘出した組織は、10% ホルマリン溶液 (Wako) を用いて、室温で 24 時間以上浸漬固定した。その後、OCT Compound (Sakura Finetechnical) で包埋し、液体窒素で凍結を行い、組織法埋ブロックを作成した。組織包埋ブロックは -80°C で保存した。組織包埋ブロックをクライオスタット (LEICA CM 1950) で 5 μ m の厚さに薄切し、組織切片を作成した。作成した組織切片を流水で洗浄して OCT Compound を除去後、H&E 染色、Toluidine Blue 染色 (武藤化学薬品)、Elastica Van Gieson 染色 (武藤化学薬品) を行った。

9. 倫理面への配慮

前述検体の供与に関して、当院の倫理委員会の承認を得て施行した。また、

患者へは目的と方法、および想定される合併症とその対処法を説明し、文章による同意を得た。さらに倫理面へ配慮し、研究への参加は個人の意思を尊重した。得られたデータに関してもID や氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った。

C. 研究結果

1. MTT assay

48 穴 well に播種した細胞はそれぞれ生着した。まず適性な自家血清(以下AS)濃度を検証すべく濃度別の比較を試みた。各濃度で培養液を調製し培養した結果、肉眼的には0%, 1%はほとんど増殖を得られなかった。10% AS 含有培地で培養した細胞群は最も良好な増殖を得ることができ、肉眼的には15日目程度でコンフルエントとなった。ただし、n=1 であることもあり、正確な doubling time は算出されなかった。(Fig.1)

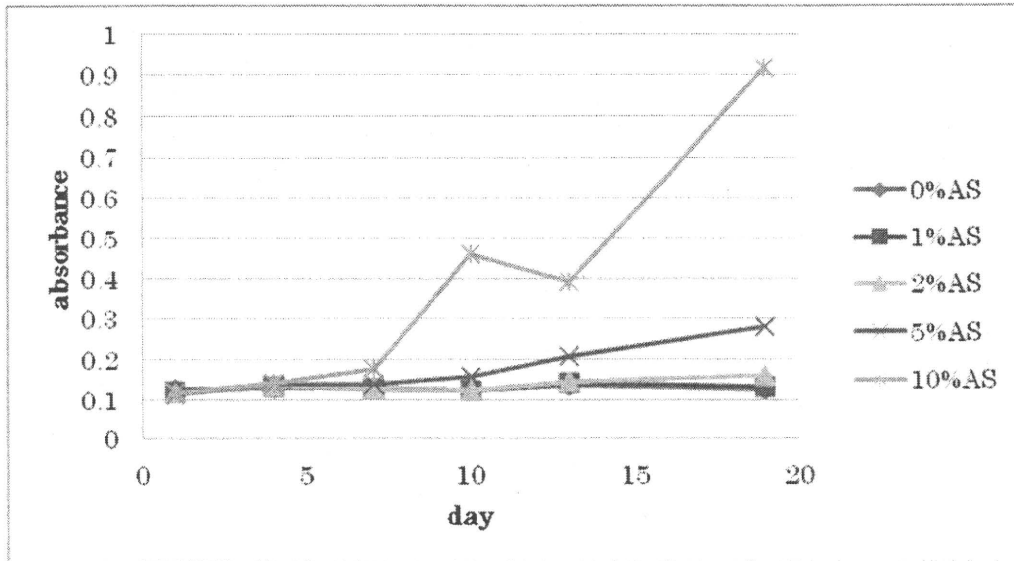
つづいて、各種血清による比較を行った。この assay を施行した検体とそのASにおいては10%AS使用群がもっとも増殖した、という結果を得た。こちら、n=1 であり、正確な

doubling time は算出されなかった。(Fig.2)

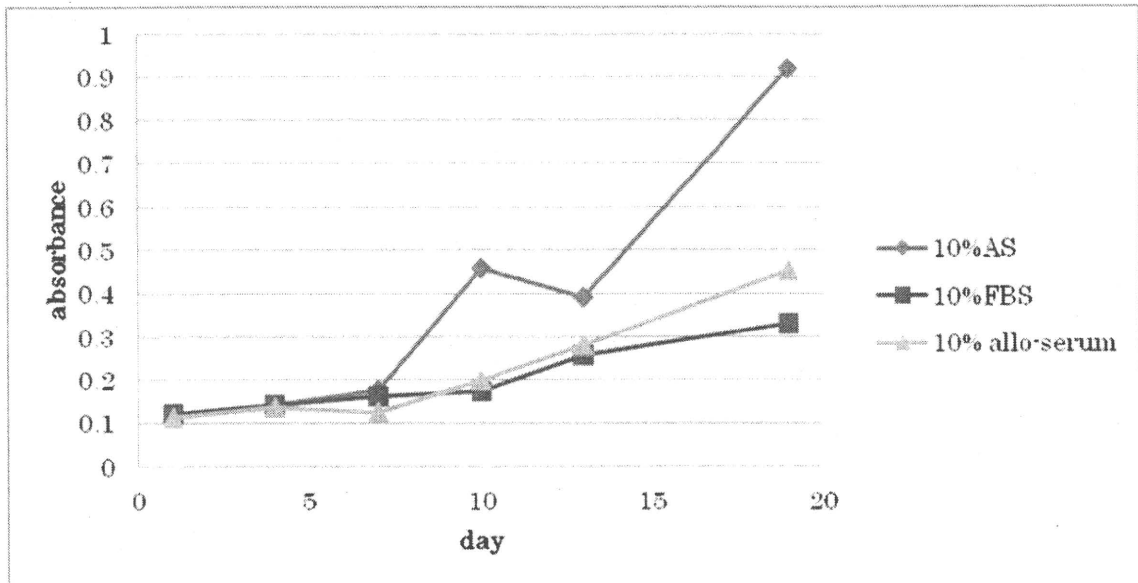
2. 重症免疫不全マウス皮下移植

小耳症残存耳介軟骨膜より採取された細胞を、初代培養より10%FBS含有培地か10%AS含有培地を用いて増殖させた。それぞれ10cm ディッシュに3層の積層化培養し、軟骨分化誘導をかけた。積層化の1層目第一継代のものを使用し、2, 3層目のものは第二継代のものを使用した。軟骨分化誘導は血清を含まない培地を用いた。6週齢のNOD SCID マウス背部皮下へ移植し、4カ月後に採取した。移植した細胞数はそれぞれ約 $1.5 \sim 3.0 \times 10^6$ 、移植時は細胞がディッシュ内で産生した基質を含めた状態で約1mlであった。軟骨膜細胞を用いた2群をn=2、加えて比較対象として軟骨細胞をFBSで増殖させた群をn=1施行した。以下代表的検体の各種染色像を提示する。(Fig.3-5)

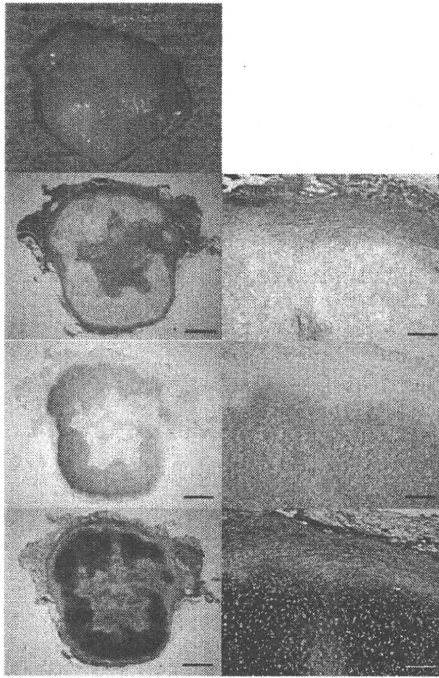
(Fig.1) 各濃度の自家血清含有培地における軟骨膜細胞増殖の比較(n=1)



(Fig.2) 各種血清 10%含有培地における軟骨膜細胞増殖の比較(n=1)



(Fig.3) 10%AS 含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の皮下移植実験



| | |
|---|---|
| a | |
| b | c |
| d | e |
| f | g |

a: 肉眼所見

5×4×1.5mm 円盤状, 34.6mg

b: Hematoxylin & Eosin 染色, 弱拵

c: Hematoxylin & Eosin 染色, 強拵

d: Toluidine blue 染色, 弱拵

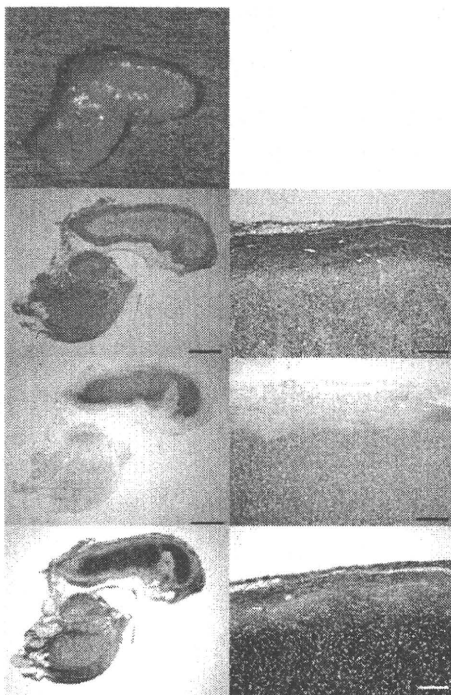
e: Toluidine blue 染色, 強拵

f: Elastica van Gieson 染色, 弱拵

g: Elastica van Gieson 染色, 強拵

Scale bar: 弱拵/1 mm 強拵/200μm

(Fig.4) 10%FBS 含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の皮下移植実験



| | |
|---|---|
| a | |
| b | c |
| d | e |
| f | g |

a: 肉眼所見

4×4×1.5mm , 不整形, 25.4mg

b: Hematoxylin & Eosin 染色, 弱拵

c: Hematoxylin & Eosin 染色, 強拵

d: Toluidine blue 染色, 弱拵

e: Toluidine blue 染色, 強拵

f: Elastica van Gieson 染色, 弱拵

g: Elastica van Gieson 染色, 強拵