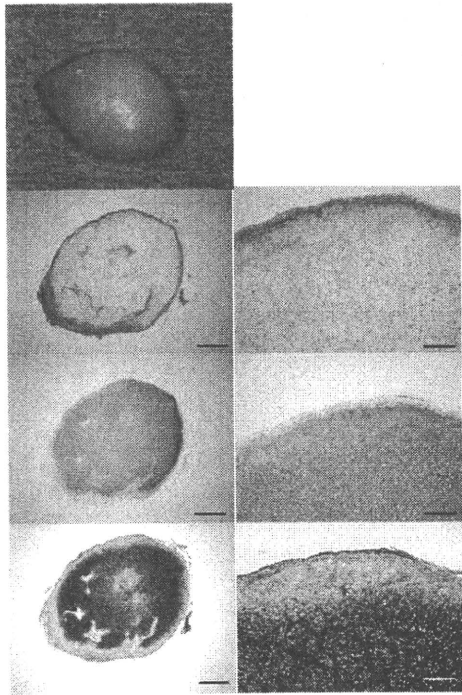


Scale bar: 弱拵/1 mm 強拵/200 $\mu$ m

(Fig.5) 10%AS 含有培地で増殖させた軟骨細胞の皮下移植実験



a	
b	c
d	e
f	g

a: 肉眼所見

4 $\times$ 4 $\times$ 2mm, 円盤状, 38.2mg

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/200 $\mu$ m

#### D. 考察

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の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. 従来, 小耳症などの先天性組織欠損や外傷性陥凹変形に対し, 耳介形成術に代表されるような肋軟骨による再建術や腸骨や筋膜, 真皮脂肪組織などの移植がなされてきた. しかし, 再建材料を得るためには組織採取を必要とし, 時

としてその侵襲の強さが問題となる. また, 再建された組織の長期形態維持性が不安定であることや組織採取量に制限があることなどが克服しがたい臨床的課題であった.

こういった問題を解決するべく, 軟骨細胞へ分化しうる幹細胞に関する研究が広く行われている. われわれは, ヒト耳介軟骨膜細胞中に軟骨幹/前駆細胞を同定し, その臨床応用を目指している. 軟骨幹/前駆細胞を用いることの利点は大きく分けて2点挙げられる. まず一つ目として, 軟骨膜の再構築にある. われわれの先行実験では

軟骨膜細胞の移植実験において、軟骨細胞のみのものと比較すると **Collagen type I** で染色される軟骨膜様組織が再構築されており、その部位に軟骨幹／前駆細胞が再分布していることが分かっている。臨床的には軟骨膜を含めた自家軟骨移植の方が軟骨膜を含めないものより長期形態維持能が高いと言われており、軟骨幹／前駆細胞が含まれる軟骨膜様組織も同様であると期待している。二つ目の利点としては、軟骨以外への分化の可能性にある。間葉系幹細胞や脂肪組織幹細胞は以前より軟骨分化を含めた多分化能が報告されており、特に間葉系幹細胞は椎間板再生や関節軟骨再構築に関して臨床応用が試みられている。しかしその一方で、多分化能のために予期せぬ骨分化や脂肪分化をきたす可能性と危険性は回避できない。その一方、軟骨幹／前駆細胞は多分化能がわれわれの先行研究で確認されているものの、間葉系幹細胞などからはいわゆる下流の細胞であり、軟骨分化へある程度特化していると想像される。そのため、その他の幹細胞を用いる場合と比べると骨分化や脂肪分化の可能性より低く、より安全であると想定している。

一方、培養再生軟骨をヒトに臨床応用するにあたって、細胞を確実に増殖させ、安定した量の最終産物を得ることが重要である。そのため、現在は培養にあたって各種血清が用いられることが多い。血清は自家、他家、他種 (FBS など) に大きく分けられる。それ

ぞれ長所と短所があるが、他家血清や他種血清を用いるときは感染性や免疫反応などの問題がある。とくに **FBS** にはウシ海綿状脳症をはじめとした感染症や異種タンパクに対する免疫反応の危険性が否定できない。これらの問題を回避するために、自家血清を用いる試みがなされている。実際、軟骨実質から採取された細胞を自家血清含有培地で増殖させ、腹部皮下へ移植し軟骨様組織の再構築を誘導し、それを臨床応用している報告がある。加えて、間葉系幹細胞や関節軟骨の領域においては自家血清と他種血清における増殖効率と分化誘導の差を報告するものが散見される。それによると、他種血清よりも自家血清を用いた方が増殖効率が良かったと報告されている。今回われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した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。

まずは軟骨膜細胞の自家血清含有培地における増殖能を評価するに当たり、**MTT assay** を用いた。現在  $n=1$  の例数しか評価し得ていないが、AS 使用群は **FBS** を用いた群と比較し高い増殖を認めた。この結果は、間葉系幹細胞や関節軟骨の報告と一致するものとなった。しかし、**MTT assay** に用いなかった細胞群においては、自家血清を用いた群の増殖効率は個体や **AS** によって異なる。血清と増殖効率に関する個体差が存在することは、

FBSを使用するにあたり lot. check を行うことから容易に想像される。しかし、場合によっては個体内においてもバラつきがあると予想される。今後は採血条件などの条件は一定に保ちながら例数を重ねるとともに、観察点を増やし詳細に評価していく必要がある。

次に、自家血清で培養した軟骨膜細胞に分化能と組織再構築能があるかどうかの検証を試みた。前述のように積層化した状態で軟骨分化誘導をかけたところ、FBSで培養したものと同様に培地の粘性が上昇し、軟骨分化誘導がかかっていることが確認された。それらを重症免疫不全マウスへ皮下移植したところ、約5mm大で弾性硬、白色調組織の構築を認めた。Toluidine blue 染色で紫染されるプロテオグリカンの存在が確認された。加えて、Elastica van Gieson 染色で黒色に染色される弾性線維の存在が豊富に確認された。以上より再構築された組織は軟骨組織と判断された。加えて、HE 染色において、軟骨膜様の線維性組織が軟骨組織周囲に存在することが確認された。その厚さは軟骨細胞を移植した群と比較し厚い傾向にある。以上より、軟骨膜細胞を自家血清含有培地で増殖させても十分軟骨分化誘導がかかり、皮下移植によって軟骨を再構築することが確認された。今後は、FBSで培養した群と詳細に比較するために、軟骨分化誘導の程度を定量的に評価し、比較検討していく必要がある。加えて、軟骨膜の再構築も臨床

上は非常に重要な要素なので、免疫染色など追加し、Collagen Type I の発現やその局在を評価していきたい。

#### E. 結論

今回われわれは、ヒト耳介軟骨膜から採取した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。

軟骨膜細胞の自家血清含有培地における増殖効率を MTT assay で評価したところ、FBS 含有培地を用いた場合より高い増殖を認めた(n=1)。また、自家血清で培養した軟骨膜細胞に分化能と組織再構築能の有無を積層化・軟骨分化誘導と重症免疫不全マウスへの皮下移植実験で試みた。その結果、肉眼的には十分軟骨分化誘導がかかることが確認されたうえ、皮下移植実験においては FBS で増殖させたものと同様に弾性軟骨組織の再構築が認められた。今後は例数を重ねるとともに、軟骨分化誘導の程度を定量的に評価する必要がある。

#### 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

#### 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 |

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
鮑智伸、小林眞司、錦織岳史、前川二郎、府川俊彦	冠状切開を用いない梨状口縁骨切り術を行ったAntley-Bixler 症候群の一例	日本形成外科学会雑誌	31	231-237	2011
小林眞司、谷口英樹	ヒト耳介弾性軟骨間葉系前駆細胞の特性解析	MATERIALS INTEGRATION	23	43-48	2010

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍名	出版社名	ページ	出版年
伊藤進、小林眞司	矢状縫合早期癒合症に対する手術	NS NOW 11	メジカルビュー社	99-105	2010

