



Cartilage-scaffold composites produced by bioresorbable β -chitin sponge with cultured rabbit chondrocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 阿部, 雅志 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1268

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 1 5 号	学位授与年月日	平成 1 6 年 3 月 2 3 日
氏 名	阿 部 雅 志		
論文題目	<p>Cartilage-scaffold composites produced by bioresorbable β-chitin sponge with cultured rabbit chondrocytes (生体吸収性材料である β-chitin スポンジを用いたスポンジ内家兔軟骨細胞培養による軟骨スポンジ複合体の作製)</p>		

論 文 題 目

Cartilage-scaffold composites produced by bioresorbable β -chitin sponge with cultured rabbit chondrocytes

(生体吸収性材料である β -chitin スポンジを用いたスポンジ内家兔軟骨細胞培養による軟骨スポンジ複合体の作製)

論 文 の 内 容 の 要 旨

[はじめに]

関節軟骨は損傷されると本来の硝子軟骨では修復されない。これに対し、近年、scaffold (骨組) 内で軟骨細胞を三次元培養し、細胞の形質を保ったまま軟骨様組織を *in vitro* で作製し、損傷部位へ移植する試みがされている。培養軟骨を移植するにあたっては担体が必要となり、できれば、それは生体吸収性材料であることが望ましい。我々は、生体吸収性材料である β -chitin を材料としたスポンジを作製し、これを用いて軟骨細胞を三次元培養してスポンジ表層に軟骨様組織を有する円柱状の軟骨スポンジ複合体を作製し、その有用性を検討した。

[材料ならびに方法]

イカ軟甲より採取した β -chitin 粉末に蒸留水を加えて、攪拌しながら膨潤させた後、凍結乾燥し、直径 5mm、高さ 8mm の円柱状 β -chitin スポンジを作製した。

日本白色家兔より採取した軟骨を酵素処理し、軟骨細胞を単離した。培養法は、 5.0×10^7 個/ml の細胞とダルベッコ変法イーグル培養液 (DMEM) の混合液を 40 μ l ずつプレート上に滴下し、この上に β -chitin スポンジの表面が下を向くように乗せ、細胞層がスポンジ表面にできるように混合液を吸い上げた。37 度、CO₂25%にて 30 分培養後、FBS10%を含んだ DMEM 培地を加え、アスコルビン酸を添加し、培養した。24 時間後、スポンジを横向きに別のプレートへ移し、4 週間培養した。

24 時間培養後、別のプレートへ移動時の細胞残存数から細胞吸着率を計算し、DNA 量は 0 週を加え、1、2、3、4 週でのスポンジ内のコンドロイチン硫酸量、ハイドロキシプロリン量を測定した。RT-PCR で type I collagen、type II collagen、aggrecan の発現を確認した。作製した組織のヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色、サフラニン O 染色、type I collagen、type II collagen の免疫染色を行った。また、走査電子顕微鏡での形態的評価を行った。

[結果]

細胞吸着率は 99.7%であった。DNA 量は 3 週まで経時的に増加し、4 週で培養前の 2.5 倍になった。コンドロイチン硫酸量はコンドロイチン 6 硫酸 (C6S) 優位に経時的に増加し、DNA あたりの全コンドロイチン硫酸量も 2 週以降増加した。コラーゲン量を反映するハイドロキシプロリン量は 2 週以降急激に増加した。RT-PCR では、2 週から 4 週まで type II collagen および aggrecan の発現が認められたが、3 週、4 週では type I collagen の発現も認めた。

スポンジ表層に白色の軟骨様組織を有する軟骨スポンジ複合体を作製でき、この軟骨様

組織部分の組織染色は、2週では、サフラニン O で染色されるプロテオグリカンには乏しかったが、4週では豊富なプロテオグリカンにより濃染し、免疫染色で、type II collagen が良好に染色された。ほとんどの細胞は円形であったが、最表層の細胞には紡錘形の変化がみられた。走査電子顕微鏡で観察すると、1週で β -chitin に接着した円形の軟骨細胞がみられ、4週では、豊富な細胞外基質に囲まれてる胞を形成した軟骨細胞を認め、軟骨様組織が観察された。

[考察]

β -chitin はリゾチームで分解されるため生体吸収性である。今回の結果で、 β -chitin スポンジは細胞の吸着性がよく、スポンジ内で細胞は増殖して細胞外基質を産生し、硝子様軟骨を形成した。 β -chitin はプラス電荷を帯びており、軟骨細胞が産生するマイナス電荷を持つアグリカンとは電気的な親和性が高い。また、その膨潤性と細胞吸着性により、逆行性に軟骨細胞を含んだ培養液を吸引し、その表層に均一に細胞を播種することができた。さらに、このスポンジは、生体に有害な可能性のある化学的な架橋を必要とせず、簡単に様々な形を形成することができる。このように β -chitin スポンジは軟骨細胞培養に適した材料と考えられる。スポンジ表層に均一に作製した軟骨様組織の評価では、未成熟または変性した aggrecan である C4S に比べ、成熟した aggrecan である C6S が優位に増加し、ヒドロキシプロリン量も増加した。また、染色や RT-PCR、走査電子顕微鏡での観察から、スポンジ表層に形成した組織は硝子軟骨様であった。しかし、RT-PCR にて type I collagen の発現が認められたため、完全には硝子軟骨とは言えなかった。

[結論]

β -chitin スポンジを用いて、軟骨細胞を三次元培養し、スポンジ表層に硝子軟骨様組織を有する円柱状の軟骨スポンジ複合体を作製した。

β -chitin スポンジは *in vitro* において軟骨様組織を形成させるのに適した材料であった。

論文審査の結果の要旨

損傷された関節軟骨は本来の硝子軟骨では修復されない。近年、scaffold(骨組)内で軟骨細胞を三次元培養して細胞の形質を保ったまま軟骨様組織を *in vitro* で作製し、損傷部への移植が試みられている。培養軟骨を移植するには骨組となる担体が必要であり、担体は吸収性材料が望ましい。申請者らは生体吸収性材料である β -chitin を材料としてスポンジを作製し、このスポンジを担体として軟骨細胞を三次元培養して円柱状の軟骨スポンジ複合体を作製し、移植における有用性を実験的に検討した。

[材料ならびに方法]

スポンジの作製：イカ軟甲から採取した β -chitin 粉末を用いて、粉碎、膨潤、凍結乾燥の工程を経て直径 5mm、高さ 8mm の円柱状 β -chitin スポンジを作製した。

軟骨スポンジ複合体の作製：日本白色家兎から採取した軟骨から軟骨細胞を単離し、 5.0×10^7 個/ml の細胞とダルベッコ変法イーグル培養液(DMEM)の混合液を $40 \mu\text{l}$ ずつプレート上に滴下し、その上に円柱状の β -chitin スポンジを立て、細胞と DMEM 液をスポンジに吸い上げた。37℃、CO₂ 25%で 30 分培養後、FBS 10%を含んだ DMEM 培地にアスコルビン酸を添加して培養した。24 時間後、スポンジを横向きにして別のプレートへ移し 4 週間

培養した。

評価方法：24 時間培養後の細胞吸着率、DNA 量を 0～4 週に、スポンジ内のコンドロイチン硫酸量、ヒドロキシプロリン量を 1、2、3、4 週目に測定した。RT-PCR で type I collagen、type II collagen、aggrecan の発現を確認した。作製した組織のヘマトキシリン・エオシン染色、サフラニン O 染色、type I および II collagen の免疫染色、走査電子顕微鏡で形態評価を行った。

[結果]

細胞吸着率：99.7%、DNA 量：0 週から増加し、4 週までに 2.5 倍に増加した。コンドロイチン 6-硫酸量：2 週以降増加。ヒドロキシプロリン量：2 週以降急激に増加。type II collagen、aggrecan は 2～4 週に発現、type I collagen は 3、4 週に発現した。組織染色では 2 週目プロテオグリカンが乏しかったが、4 週目には濃染された。免疫染色では type II collagen が良好に染色された。走査電顕像では 1 週目は β -chitin に接着した円形細胞が見られ、4 週目には豊富な細胞外基質に囲まれて濾胞を形成した細胞を認め、軟骨様組織が観察された。

[考察と結論]

軟骨細胞を種々の担体で三次元的に培養した研究はみられるが、本研究では単離された軟骨細胞が β -chitin スポンジの中に吸い上げられて、スポンジ内で細胞が播種するような scaffold を考案したことはユニークであり、この担体の中で十分に増殖して細胞外基質が産生されて、硝子様軟骨を構築した。申請者は β -chitin スポンジが in vitro で軟骨様組織を形成させるのに適した材料であると結論した。

審査委員会は、申請者が軟骨スポンジ複合体を作製したこと、軟骨細胞を均一にスポンジの中に播種させて三次元的に培養に成功し、これが硝子軟骨であることを確認したこと、軟骨スポンジ複合体を損傷部に合わせて埋め込むことができる利点があることなどがオリジナルな研究結果であり、軟骨移植の可能性を高めるものであると高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 硝子軟骨が損傷されたときの組織修復過程
- 2) 軟骨細胞の単層培養と三次元培養の相違点
- 3) 線維軟骨と硝子軟骨の相違点
- 4) β -chitin を選択した理由
- 5) L-アスコルビン酸を DMEM 液に添加した理由
- 6) chitosan と β -chitin の相違点、軟骨細胞培養における利点、欠点
- 7) コンドロイチン 4- および 6-硫酸の軟骨における意義
- 8) 軟骨細胞の抗原性
- 9) 自家移植でないといけない理由
- 10) この研究で移植を実行するに解決すべき問題点

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中 村 達

副査 堀 内 健太郎 副査 永 田 年