



## Comparison of various mixtures of $\beta$ -chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴木, 大介 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/373">http://hdl.handle.net/10271/373</a>

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 504号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	鈴木 大 介		
論文題目	<p>Comparison of various mixtures of <math>\beta</math>-chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes  (家兎軟骨細胞三次元培養のための担体としての<math>\beta</math>-キチンとキトサンの種々の混合物の比較)</p>		

博士(医学) 鈴木 大 介

## 論文題目

Comparison of various mixtures of  $\beta$ -chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes

(家兎軟骨細胞三次元培養のための担体としての $\beta$ -キチンとキトサンの種々の混合物の比較)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

関節軟骨である硝子軟骨は、無血管組織であり、修復されにくい。その修復法として軟骨細胞培養移植が有用であり、臨床応用されているが、単層培養では細胞の表現型変化、基質産生能が低下する。それに対し、三次元培養では表現型が保たれるので、それに向けて種々の担体を用いた研究がされている。

キチンは自然界に多く存在する生体材料である。キトサンはキチンの脱アセチル化物であり、同じキチン質である。しかし、結晶構造が異なり、若干性質が異なる。キチンには、 $\alpha$ -キチンと $\beta$ -キチンがあり、 $\beta$ -キチンの方が結晶結合が弱く、水に溶けやすい、柔らかい、水を含みやすいなどの特徴がある。過去に我々は $\beta$ -キチンの方がより軟骨細胞培養の担体として優れていると考え、 $\beta$ -キチンが軟骨細胞培養に適した材料であると報告した。一方、キトサンも軟骨細胞培養での有効性が報告されており、中でも脱アセチル化度が高い方が優れているとされている。

キチンとキトサンのうち、どちらがより軟骨細胞培養に適しているか、また、混合することにより相乗効果が得られるか、その結果には種々の要因が影響すると考えられる。これまで、担体を作製する基となるキトサンゲルは性質の不安定なものしか作れなかったが、最近になり新しいキトサンゲル精製方法が報告され、キチンとキトサンの混合が容易となった。 $\alpha$ -キチンとキトサンについて検討した報告があるが、我々は新しいキトサンゲルを用いて、 $\beta$ -キチンとキトサンの軟骨細胞培養における担体としての有用性を比較検討した。

### [方法]

$\beta$ -キチン、キトサンのゲルをそれぞれ単独、および $\beta$ -キチンとキトサンを3:1, 1:1, 1:3に混合し、凍結乾燥により円柱状スポンジ(直径5 mm、高さ10 mm)を作製した。体重約2 kg、10週齢の日本白色家兎24羽の各関節より軟骨を採取し、酵素処理により軟骨細胞を単離した。軟骨細胞と10%牛血清+ダルベッコ変法イーグル培地を混合し、軟骨細胞濃度を $5.0 \times 10^7$  個/mlとした。その混合液40  $\mu$ lをスポンジに逆行性に吸収させ、培地を加え、4週間培養した。

評価は、スポンジ気孔サイズ、細胞接着率、基質産生量としてコンドロイチン4硫酸及び6硫酸量、全コンドロイチン硫酸量と6硫酸量/4硫酸量の比、ハイドロキシプロリン量、組織染色(HE、サフラニンO及びトルイジンブルー染色、I・II型コラーゲン及びアグリカン免疫染色)により行った。統計解析には、ANOVAを用いた。

### [結果]

気孔サイズは50-150  $\mu$ mで5群間で同等であった。細胞接着率も98%前後で同等であった。コンドロイチン硫酸量は、4硫酸量、6硫酸量、全量ともに5群間で有意差が無かったが、どのスポンジにおいても6

硫酸/4硫酸の比が1より高かった。ハイドロキシプロリン量は、 $\beta$ -キチンのみのスポンジが培養4週後で他のスポンジより有意に多かった。組織染色では、どのスポンジにおいても基質が染色され、II型コラーゲン、アグリカンで染色される硝子軟骨様組織が形成された。II型コラーゲン染色では $\beta$ -キチンのみのスポンジがより正常軟骨に近かった。I型コラーゲン染色では、どのスポンジも染色されなかった。

#### [考察]

細胞接着率は良好であったが、これはキチン、キトサン共通の陽電荷の性質と孔質な担体の形態によるものと考えられる。

グリコサミノグリカン量の指標となるコンドロイチン硫酸量は、どのスポンジも6硫酸優位で関節軟骨と同様の成熟したプロテオグリカンを産生していたが、 $\beta$ -キチンとキトサンはプロテオグリカン産生に関して差が無かった。コラーゲン量の指標となるハイドロキシプロリン量は、全てのスポンジで培養期間中に産生されていたが、 $\beta$ -キチンのみのスポンジが他のスポンジよりコラーゲン産生に関して優れていた。

組織学的評価では、どのスポンジにおいてもほとんどの細胞形態が維持され、また基質が染色され、硝子軟骨様組織が形成されていることが確認された。II型コラーゲン染色の結果では、 $\beta$ -キチンのみのスポンジが他のスポンジより正常軟骨に近く、 $\beta$ -キチン単独のスポンジは、生化学的検討と合わせて考えると、コラーゲン産生量がより豊富であり、軟骨細胞培養の担体として他のスポンジより適していると考えられた。

Kuoらの報告では $\alpha$ -キチン含量の多い担体が細胞増殖、基質産生量ともに優れており、本研究とは異なっていた。この違いは、キチンの種類、脱アセチル化度、キトサングル精製法の違いなどが原因と考えられる。また、彼らは、担体に架橋剤の使用やアパタイトコーティングをしており、これらが結晶構造などに影響を与える可能性があると考えられる。

本研究は、 $\beta$ -キチンとキトサンの軟骨細胞培養における担体として比較した初めての報告であり、 $\beta$ -キチンのスポンジは、コラーゲン産生に関して他のスポンジよりも優れていた。

## 論文審査の結果の要旨

関節軟骨の修復に培養軟骨細胞移植の有効性は証明されており、特に三次元培養では種々の担体を用いた研究がある。キチンは甲殻類の殻、昆虫表皮と菌類細胞壁にある自然多糖である。キチンとその脱アセチル化誘導体であるキトサンは、その特性と安価であることから培養軟骨材料として注目されている。 $\alpha$ -キチンは、甲殻類の殻から得られ、溶けにくく、反応性に劣る。 $\beta$ -キチンはイカ軟骨から採取され $\alpha$ -キチンより柔らかさと親水性に富む。キチンとキトサンはどちらがより有用であるか、混合による相乗効果はあるかは、キチンの型、キトサンの脱アセチル化比率、混合法等に影響されると考えられる。従来キチンとキトサンの混合ハイドロゲルは分子量、粘性、抗菌活性などから、室温での維持が困難であったが、最近それらを室温で精製する方法が確立された。そこで申請者は、純 $\beta$ -キチン、純キトサン、 $\beta$ -キチンとキトサンの種々の混合物を作り担体としての有用性を比較検討した。対象と方法は以下の通りである。

①純 $\beta$ -キチン、② $\beta$ -キチン-キトサン比3:1、③ $\beta$ -キチン-キトサン比1:1、④ $\beta$ -キチン-キトサン比1:3、⑤純キトサンの5群で比較した。これらのハイドロゲルは、円柱状（5mm直径×10mm高さ）

のスポンジを形成するために、凍結、24時間真空乾燥し、スポンジの気孔寸法は走査型電子顕微鏡で測定した。日本白色家兎24羽から採取された軟骨細胞と①～⑤のスポンジより5つの軟骨細胞-スポンジ複合物が作製された。培養後2週と4週の各軟骨細胞-スポンジ複合物のコンドロイチン硫酸(CS)、コンドロイチン4-硫酸(C4S)、コンドロイチン6-硫酸(C6S)含有量はHPLCで測定し、ハイドロキシプロリン含有量をアミノ酸分析システムで測定した。組織化学的および免疫組織化学的評価は、H&E、サフラニン O、トルイジンブルー、抗Type II コラーゲン抗体、抗Type I コラーゲン抗体と抗アグリカン抗体で行った。

#### [結果]

各気孔寸法は、50～150 $\mu$ m大で、細胞接着率も98%前後で同等であった。C6S/C4S比率の平均値は、培養後2週と4週で異ならなかった。ハイドロキシプロリン量は、培養後4週で培養後2週より増加した。培養後2週ではハイドロキシプロリン量に差異はなかったが、培養後4週では純 $\beta$ -キチンスポンジで他の4つより有意に大きかった( $p<0.05$ )。

免疫組織化学染色では細胞層のType II コラーゲンが陽性だったが、Type I コラーゲンはすべて陰性であった。Type II コラーゲンは正常ウサギ軟骨では全層均一だったが、純 $\beta$ -キチンスポンジ以外では、軟骨様層の細胞周辺に制限されていた。Type II コラーゲンにより純 $\beta$ -キチンスポンジの細胞層は、他のタイプのスポンジより正常ウサギ軟骨に類似していた。アグリカン染色は、培養後2週と4週で陽性であった。アグリカン染色は、正常ウサギ軟骨では細胞周辺で主に染色されるが、全5種類のスポンジの細胞層においても同様だった。

#### [考察と結論]

スポンジの軟骨細胞接着率は約98%に達し、各群の細胞支持接着能力に差異がなかった。各群のハイドロキシプロリン量は、培養2週より4週で増加した。培養後2週ではハイドロキシプロリン量の違いは5群間で有意差がなかったが、培養4週では純 $\beta$ -キチンスポンジで有意に多量であった。これはコラーゲン合成能力が純 $\beta$ -キチンスポンジは他のタイプのスポンジより優れていることを示す。

免疫組織化学的分析で、Type II コラーゲンとアグリカン染色は陽性であったが、Type I コラーゲンは陰性であった。従って、ハイドロキシプロリンの増加は、軟骨細胞がType II コラーゲンを合成することを意味しており、組織学的観察では、Type II コラーゲンは特に純 $\beta$ -キチンスポンジで染色され、他のスポンジと比較して正常ウサギ軟骨により近かった。

申請者はこれらの結果に基づいて、純 $\beta$ -キチンスポンジは、担体としてキトサン含有スポンジより適切であることを見いだした点を、審査委員会は高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問をおこなった。

- 1) 線維軟骨と硝子軟骨の違いは何か
- 2) キチン、キトサンはどのようにして作成したか
- 3) 4週で作成した軟骨は、実用に適しているか
- 4) 軟骨は表層にしかできないか
- 5) キチン、キトサンの滅菌はどのようにしたのか
- 6) 担体は生体内で、どのようなになるのか
- 7) 末端基とpHの関係は、問題にならないか

- 8) 軟骨細胞の幹細胞は、どこにあるか
- 9) ハイドロゲル作成の改良点はどこか
- 10) 脱アルカリ度は高い方が良いが、どこまで高くできるのか
- 11) 培養時、軟骨細胞以外が混入することはないのか
- 12) 動物実験の3Rの原則とはなにか
- 13) 医療用キチン、キトサンは、何に利用されているか
- 14) コラーゲンスポンジの作成時間と、実用になる量産は可能か

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員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	橋 本 賢 二	
	副査	堀 内 健太郎	副査 小 川 法 良