

ポリグリコール酸-ポリプロピレン複合体スキャ ホールドは b-FGF 徐放性ゼラチンによる 自家軟骨再生を促進する

上原真紀

近畿大学医学部形成外科学教室

抄 録

b-FGF 徐放システムとフィブリン散布法は自家移植モデルにおいて生分解性ポリマー内部の再生軟骨の誘導を改善した。しかし、ヒト耳介のような複雑な三次元形状の再現性には課題が残った。そこで、本研究では再生軟骨の物理的強度を向上させる目的でポリグリコール酸 (PGA) とポリプロピレン (PPP) を複合体としたスキャホールドに軟骨細胞を播種し、同一犬に自家移植を行った。実験 1 として平板型スキャホールドで b-FGF 徐放システムの有用性を検討した。実験 2 として耳介型スキャホールドで PGA の多層構造の有用性を検討した。移植後 5 週間で多面的な評価を行った。実験 1 では b-FGF を徐放した方が厚い軟骨が再生し、折り曲げ応力が有意に増加していることがわかった。実験 2 では中間層がある PGA 3 層モデルの方が軟骨再生量は多く、内部まで血管新生を認めた。また Sox5 陽性細胞を認め、軟骨芽細胞の誘導が示唆された。自家移植モデルにおいてポリグリコール酸-ポリプロピレン複合体スキャホールドの自家軟骨再生における有用性が示唆された。

Key words : 再生医療, 軟骨, ポリマー, 自家移植, ポリグリコール酸, ポリプロピレン, b-FGF

緒 言

1988年, Vacanti らは, 生分解性ポリマーであるポリグリコール酸 (PGA) に単離軟骨細胞を播種し, 免疫不全マウス皮下に移植して硝子軟骨の再生誘導に成功し, Tissue engineering として提唱した¹。1997年, Cao らはヒト耳介型軟骨を再生誘導し², 耳介形成手術における新しいオプションとして, Tissue engineering が将来重要な役割を果たすことを示唆した。

しかし, 本技術をヒトへ臨床応用するためには, 大動物を用いた自家移植モデルの確立が急務であるが, その実験成績は極めて不良であった³⁻⁵。小動物 (免疫不全マウス) に有用であった組織再生誘導の基盤技術が大動物 (イヌ) に応用できない理由として, (1)播種細胞の細胞分布, 接着性, 生存率, (2)軟骨細胞増殖や基質産生を誘導するサイトカイン, (3)スキャホールドの力学的強度, 多孔性, 連通性, 組織親和性などの諸問題が推測され, これらを再検討する

必要があると考えた。そこでわれわれは, 高い細胞接着性と細胞増殖活性を有するフィブリンで被覆することによって, 播種細胞を PGA スキャホールドに効率よく接着させて, 細胞播種濃度を高める新技術を開発した。この結果, 大動物の自家移植モデルにおいて良好な軟骨再生が可能になった⁶。しかし, PGA は生体内分解速度が比較的早い⁷ため, 物理的強度不足や体積減少などの問題点が残る。そこで, 生体親和性と力学的強度をかね備えた非分解性ポリマーであるポリプロピレン (PPP) を PGA の支持体として組み合わせることで, これまで困難であった複雑な三次元形状を生体内で維持できる技術を新規に開発することを目的として研究を行った。

本研究では, この異種ポリマー複合体に単離軟骨細胞, 塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) 徐放システム, およびフィブリン薄膜散布法を応用し, 自家移植におけるヒト耳介型再生軟骨の①細胞播種効率向上, ②軟骨基質の早期誘導, ③三次元形状の維持について検討した。

材料および方法

近畿大学の動物実験委員会で実験プロトコルの承認を得たのち、本研究を遂行した。

耳介軟骨細胞の採取

ビーグル犬 (36匹, 4~6 週齢, 雌, 浜口動物, 兵庫) を用いた。飼育環境は, 個別ゲージ (室温 23°C, 湿度 50%, 12 時間明暗サイクル) で行った。飼育繁殖固形飼料 CD55 α (日本クレア株式会社, 東京) を 1 日 1 回約 300 g と与え, 飲料用水は制限なく与えた。

全身麻酔下で, 耳介を切断し, 耳介から皮膚, 皮下組織, 筋肉, 軟骨膜を除去して耳介軟骨を採取した。採取軟骨は 2×2 mm の大きさに細切し, Klagsbrun の方法⁷ に従い, 軟骨細胞を単離した。軟骨細胞は 70~150×10⁶ 個/ml の採取であった。

ポリマー複合体スキャホールドの作成

非分解性ポリマーとして, PPP (プロリオンメッシュ[®], 繊維径 100~150 μ m, 厚さ 500 μ m, エチコン, 東京) を, 生分解性ポリマーとして, PGA (ネオベール[®], 繊維径 15~20 μ m, 厚さ 150 μ m, グンゼ, 京都) を準備した。

平板型スキャホールド: 平坦な PPP シート (2 cm×2 cm×500 μ m) の表面と裏面を, 同サイズの PGA シートで被覆し, 5-0 ポリグラクチン 910 (バイクリル, エチコン, 東京) で縫合固定した。

耳介型スキャホールド: PPP シートを重ねてベースフレームや耳輪, 対耳輪, 上行脚を別々のパーツとして作成した。固定は 5-0 PPP 糸 (プロリオン, エチコン, 東京) で縫合した。次に, 各部位を立体的に組み合わせ, 耳介型 PPP を形成し, その表面および裏面を PGA で被覆した (図 1)。耳介型 PPP の内部に PGA を含まない PGA 2 層型 (構造: PGA/PPP/PGA), および耳介型 PPP の内部に PGA を含む PGA 3 層型 (構造: PGA/PPP/PGA/PPP/PGA) の 2 種類を作成した。

b-FGF 徐放システム

田畑らが開発したゼラチンを用いた b-FGF 徐放システムを応用した⁸。10%ゼラチン水溶液 0.2 ml (等電点 5, 牛骨ゼラチン, 新田ゼラチン, 大阪) から沈殿物であるゼラチン粒子を得たのち, 0.1% polyoxyethylene sorbitan monooleate および 25% glutaraldehyde を用いてゼラチン粒子を架橋した。

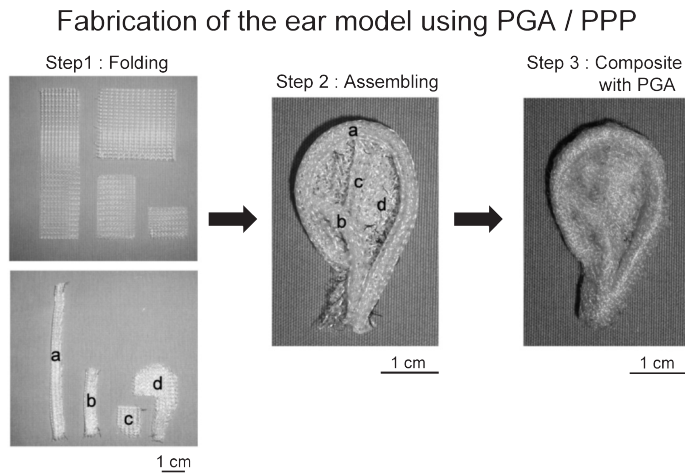


図 1 耳介型スキャホールドの作成方法

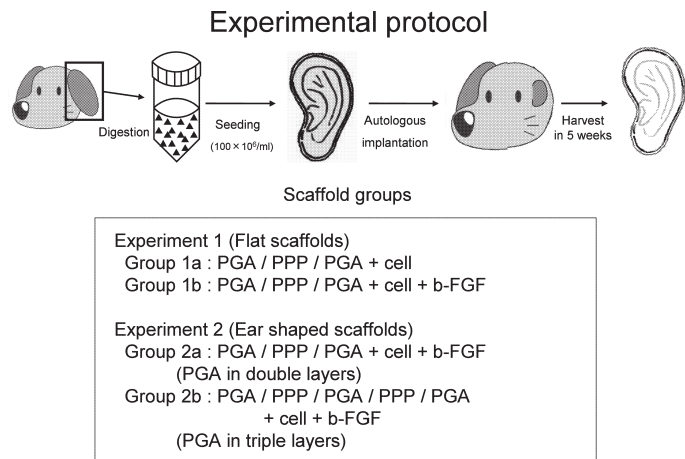


図 2 実験プロトコール

これに glycine 溶液を添加した後、蒸留水を加え、真空凍結乾燥を行い、直径約10 μm のゼラチン微粒子を作成した。b-FGF 100 μg(フィブラスト®, 科研製薬, 東京)は Ca, Mg フリーリン酸緩衝液60 μl に溶解し、ゼラチン微粒子10 mg を加えて含浸した。

実験プロトコール (図2)

イヌ耳介軟骨細胞を100×10⁶ 個/ml に調節したのち、ピペットでスキャホールドに播種して、PGA-PPP ポリマー複合体に細胞を浸みこませた。

次に、フィブリン(ボルヒール®, 化学及血清療法研究所, 熊本) をスプレーキットで複合体表面に散布して、薄膜を作り、播種細胞がスキャホールドから脱落するのを防止した。平板型スキャホールド表面の細胞密度を求めるために、走査型電顕を用いて、任意の100領域における単位表面あたり (10⁴ μm²) の細胞数を計測した。また、透過型電顕で、播種した耳介軟骨細胞とフィブリンネットを観察した (図

Fibrin spray method to increase seeding density

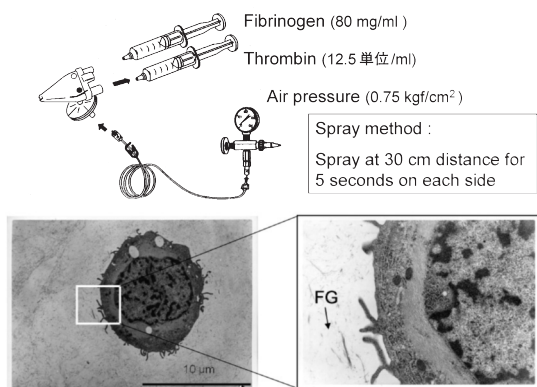


図3 フィブリン散布方法 (FG: Fibrin glue) スプレーキットにてフィブリンを散布すると、透過型電顕で、軟骨細胞表面にフィブリンの薄膜が観察された。

3)。

実験1では平板型スキャホールドでの軟骨再生効果を検討するために1 a群 (PGA/PPP/PGA, n=6) および1 b群 (b-FGF 徐放型 PGA/PPP/PGA, n=6) を設定した。次に、実験2では耳介型スキャホールドでの軟骨再生におけるPGAの有効性を検討するために2 a群 (PGA 2層型, PGA/PPP/PGA, n=6) および2 b群 (PGA 3層型, PGA/PPP/PGA/PPP/PGA, n=6) を設定した (図4)。

すべての実験群で耳介軟骨細胞を採取した個体と同一個体に自家移植を行った。全身麻酔後、頭頂から側頭部に切開を加え、筋膜間 (浅および深側頭筋膜間) にフィブリン薄膜を施した細胞を播種したPGA-PPP ポリマー複合体 (実験1および2) を自家移植した。移植後5週目に標本を採取し、肉眼的、組織学的および力学的に検討した。

病理組織学的および免疫組織化学的検討

採取した標本は HE 染色, Safranin O 染色, Elastica Van Gieson 染色および免疫染色で解析を行った。

免疫組織化学的に4種類の抗体で検討した。軟骨細胞外基質であるII型コラーゲンに対して、抗II型コラーゲン抗体 (F-57, 第一ファインケミカル: 100倍希釈) を用いた。また、スキャホールドによる異物反応を検討するため、リンパ球の表面マーカーに対する抗CD3抗体 (A0452, Dako: 50倍希釈) を用いた。さらに、b-FGF 徐放システムの導入による軟骨再生の促進効果と血管新生の関係を調べるため、抗第8因子関連抗原 (von Willebrand Factor) 抗体 (A0082, Dako: 1000倍希釈) を用いた。再生軟骨およびその周囲を被覆する軟骨膜様線維組織内に軟骨芽細胞の有無を検討するために、抗Sox5抗体 (ARP33323-P050, AVIVA, SYSTEM BIOLOGY) を用いた。

Study groups

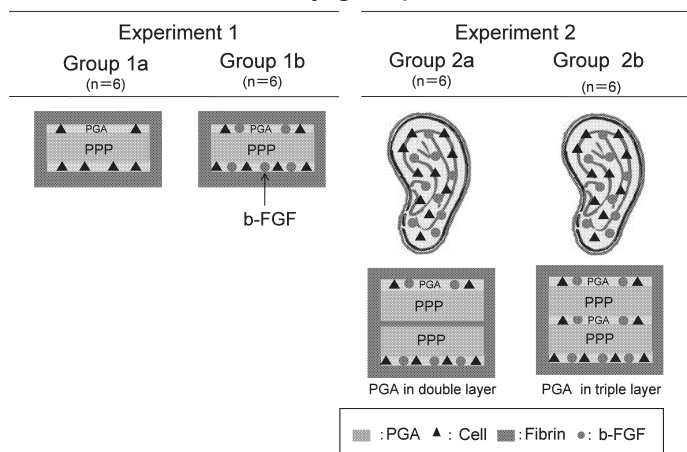


図4 実験群

- 1 a群: 平板型スキャホールド
- 1 b群: b-FGF 徐放平板型スキャホールド
- 2 a群: PGA 2層耳介型スキャホールド
- 2 b群: PGA 3層耳介型スキャホールド

力学的検討

再生軟骨の弾力性を評価するため、Roy らの方法⁹に従い、オートグラフ (AG-IS, 島津製作所, 京都) で再生した平板型再生軟骨の折り曲げ試験力を計測した。PPP および正常イヌ耳介軟骨をコントロールとした。グリップ間距離を 1 cm に調整した後、それぞれの標本 (20×5 mm) を台座に固定した。垂直板を 0.02 mm/sec の速度で下降させて最大試験力を計測した (図 5)。あらかじめ計測した標本の厚さから、折り曲げ応力を算出した (折り曲げ応力 = FL/4Z, $Z = bt^2/6$, F: 試験力, L: 支点間の距離, b: 試験片の幅, t: 試験片の厚さ)。

統計処理

播種細胞濃度は Mann-Whitney's U test を用い検定した。平板型再生軟骨の折り曲げ応力の計測値に関しては、Mann-Whitney's U test (1 a, 1 b 群間), Kruskal-Wallis test で検定を行った。危険率 5% 未満を統計学的に有意差がある, 危険率 1% 未満を統計学的に極めて有意差があると判定した。

結 果

実験 1: 平板型 PGA-PPP スキャホールド

平板型スキャホールド表面の播種細胞濃度は、フィブリン未散布群では平均 $1.4/10^4 \mu\text{m}^2$ 個であった。一方、フィブリン散布群は $4.6/10^4 \mu\text{m}^2$ 個であり、極めて有意に播種細胞濃度は改善していた ($P < 0.01$) (図 6)。

肉眼所見では 1 a 群および 1 b 群の両群ともに、移植前の形状は良好に維持され、表面は白色で光沢を呈していた (図 7, 図 8)。特に 1 b 群では、表面の白色調がより濃く、厚く変化し、弾力性に富んでいた (図 8 A, B)。

病理組織学的には、1 a 群と 1 b 群ともにプロテオグリカンが陽性であり、スキャホールド全体に沈着を認めた。1 b 群で断面はより厚みを増し、全体的に均一な分布が認められた (図 7 C, 8 C)。また 1 b 群では、不規則に分布する小型円形軟骨細胞が多数観察された (図 8 D)。

免疫組織化学的検討では Safranin O 染色で赤色～オレンジ色の陽性領域に一致して、抗 II 型コラー

Mechanical testing setup

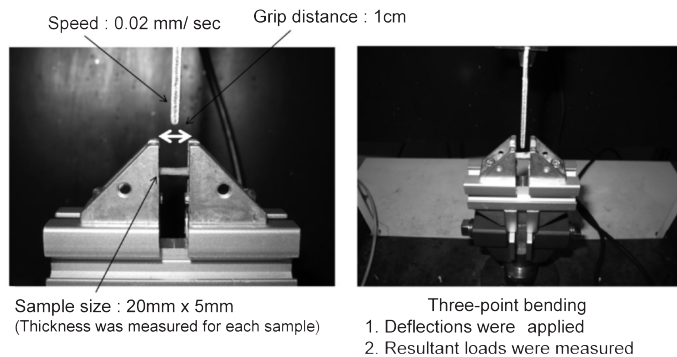


図 5 力学的検査方法

Seeding density

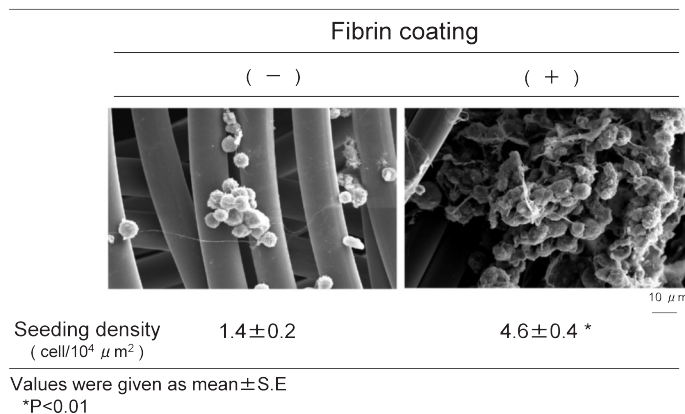


図 6 スキャホールド表面の電顕像
フィブリン散布群の方が、明らかな播種細胞増加を認めた。

Gross morphology and histology
(Group 1a)

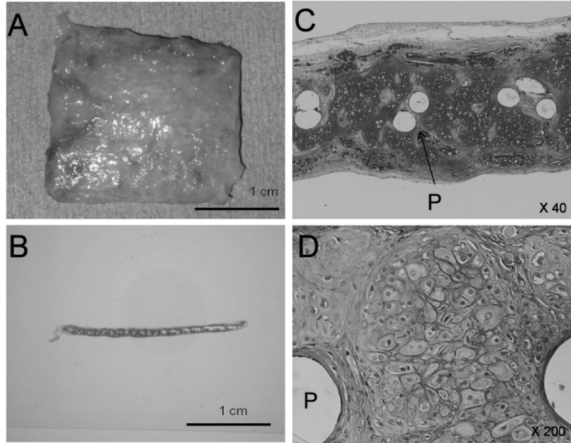


図7 平板型スキャホールド群の肉眼および病理組織所見 (P: PPP)
A: 肉眼所見
B: Safranin O 染色 (Bar=1 cm)
C: Safranin O 染色 (×40)
D: HE 染色 (×200)
平板型スキャホールド全体に軟骨形成を認めた。

Gross morphology and histology
(Group 1b)

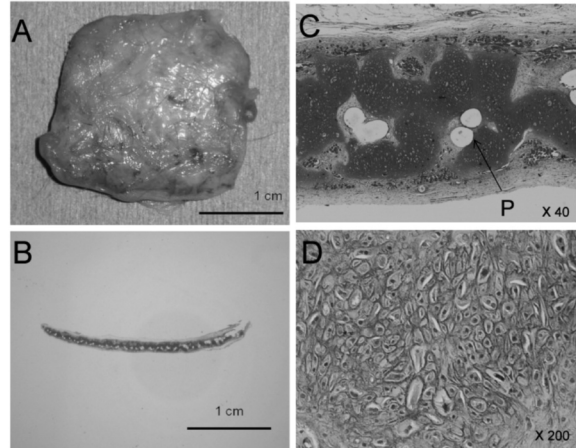


図8 b-FGF 徐放平板型スキャホールド群の肉眼および病理組織所見 (P: PPP)
A: 肉眼所見
B: Safranin O 染色 (Bar=1 cm)
C: Safranin O 染色 (×40)
D: HE 染色 (×200)
平板型スキャホールド群より厚い軟骨形成を認め、やや小型の軟骨細胞も多数観察された。

Immunostaining

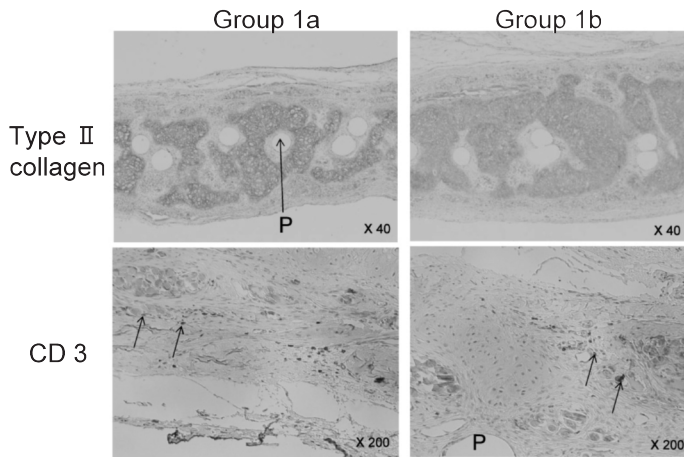


図9 平板型スキャホールドの免疫染色 (P: PPP)
上段: II型コラーゲン染色 (×40)
下段: CD 3 染色 (×200)
II型コラーゲン染色では、Safranin O 染色と一致して陽性領域を認めた。CD 3 染色では、残存した PGA 周囲にわずかに陽性領域を認めるのみであった。

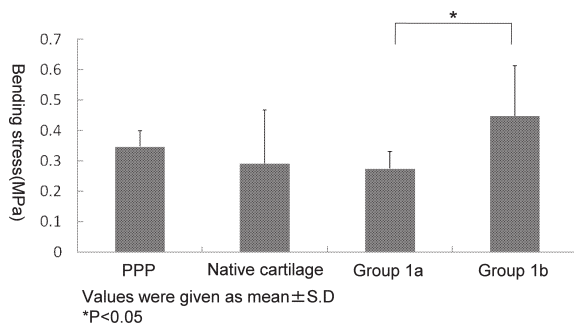


図10 平板型再生軟骨の折り曲げ応力
1 a (平板型スキャホールド) 群の折り曲げ応力 0.276 ± 0.023 MPa に対し、1 b (b-FGF 徐放平板型スキャホールド) 群の折り曲げ応力は 0.449 ± 0.067 MPa であり、有意に高値を示した ($P < 0.05$)

ゲン抗体にも陽性に染色された。抗 CD3 抗体による免疫染色で、スキャホールド表面に PGA 繊維が残存していたが、両群ともにその周囲に CD3 陽性リンパ球の浸潤が認められた。一方、スキャホールド内部の PPP 周囲には CD3 陽性リンパ球は認められなかった (図 9)。

オートグラフを用いた機械的強度の検討では、コントロール群である PPP は 0.347 ± 0.018 MPa、イヌ正常耳介軟骨は 0.292 ± 0.062 MPa であった。一方、1 a 群の折り曲げ応力は 0.276 ± 0.023 MPa であり、1 b 群の折り曲げ応力 (0.449 ± 0.067 MPa) は有意に高値であった ($P < 0.05$) (図 10)。

Gross morphology and histology

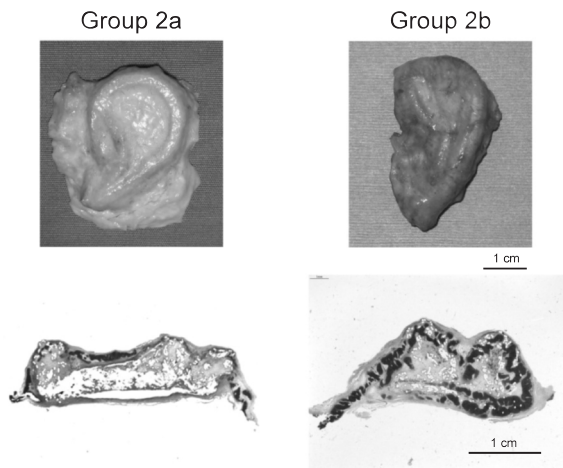


図11 耳介型スキャホールドの肉眼および病理組織所見
 上段：肉眼所見
 下段：Safranin O 染色 (Bar=1 cm)
 表面は同様な白色を呈しているが、Safranin O 染色では、PGA 2 層耳介型スキャホールド群より PGA 3 層耳介型スキャホールド群の方が、耳介型の凹凸が明瞭であった。

Histology (Group 2b)

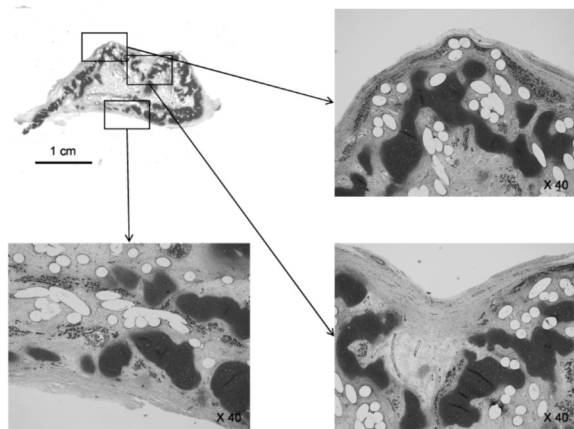


図13 PGA 3 層耳介型スキャホールド群の組織学的所見
 左上：Safranin O 染色 (Bar=1 cm)
 左下：Safranin O 染色 (X40)
 右上：Safranin O 染色 (X40)
 右下：Safranin O 染色 (X40)
 PGA 2 層耳介型スキャホールド群に比べると全周性に軟骨形成を認め、肉厚であった。

Histology (Group 2a)

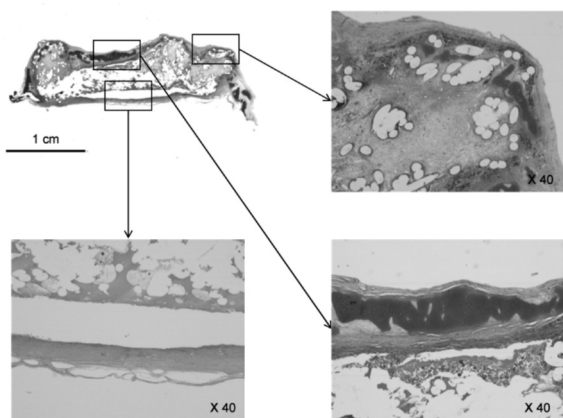


図12 PGA 2 層耳介型スキャホールド群の組織学的所見
 左上：Safranin O 染色 (Bar=1 cm)
 左下：HE 染色 (X40)
 右上：Safranin O 染色 (X40)
 右下：Safranin O 染色 (X40)
 表面の凹部表面での軟骨形成は認めしたが、裏面での軟骨形成は乏しかった。

Elastic cartilage

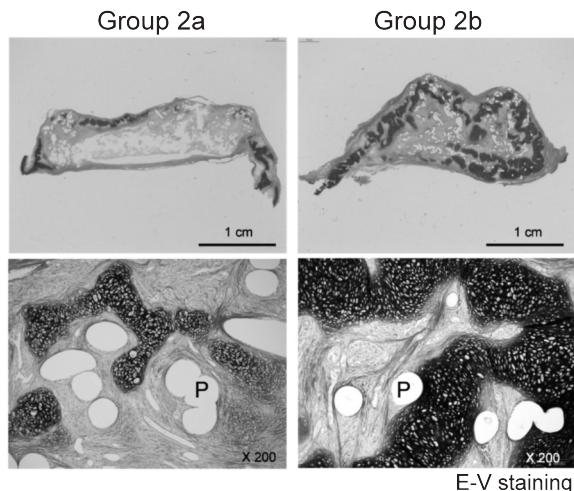


図14 耳介型スキャホールドの弾性線維染色
 上段：Elastica Van Gieson 染色 (Bar=1 cm)
 下段：Elastica Van Gieson 染色 (X200)
 形成された軟骨は、弾性線維に富む弾性軟骨である。

Immunostaining

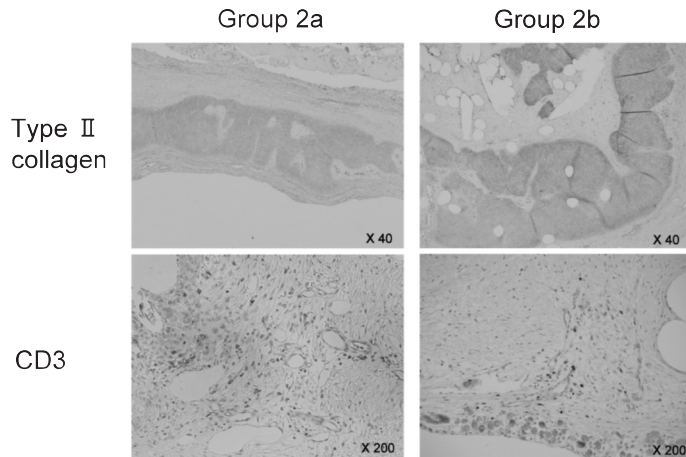


図15 耳介型スキャホルドの免疫染色
 上段：II型コラーゲン染色（×40）
 下段：CD 3 染色（×200）
 II型コラーゲン染色では Safranin O 染色に一致して陽性領域を認め、また CD 3 染色では、PGA 周囲を中心に陽性領域を認めた。

Angiogenesis

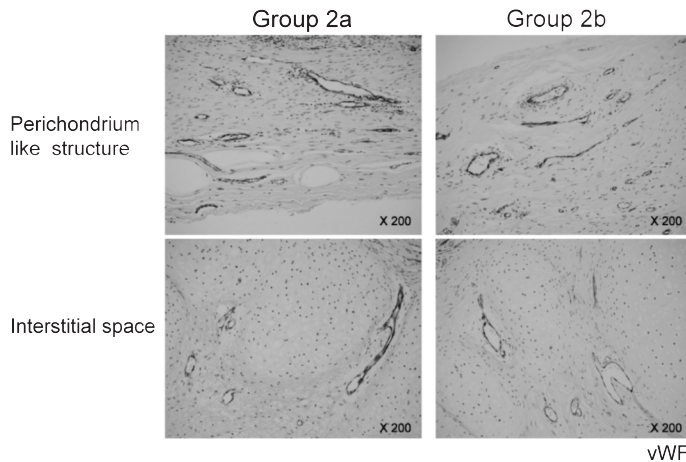


図16 耳介型スキャホルドの新生血管
 von Willebrand Factor 染色（×200）
 耳介型スキャホルドの表層から内部にかけて多数の微小血管を認めた。

実験 2：耳介型スキャホルド

肉眼的に両群ともに表面は白色光沢を帯びた軟骨組織で覆われていたが、表面形状は 2 b 群の方が 2 a 群より凹凸が明瞭であった (図11)。

病理組織学的に 2 a 群の表面凹部の表層では、軟骨組織の再生が観察されたが、凸部では、結合組織の増生と軽度なリンパ球浸潤が認められた。裏面で、軟骨形成は認めなかった (図12)。2 b 群では、表面凹部や凸部だけでなく、裏面においても、より厚く、均一な軟骨形成が認められた (図13)。両群共に内部には結合組織の増生のみ観察された。Elastica Van Gieson 染色と Safranin O 染色の陽性領域が一致しており、再生軟骨は弾性軟骨であった (図14)。

II型コラーゲンに対する免疫染色では、2 a 群および 2 b 群とも Safranin O 染色に一致して陽性領域を認めた。また、リンパ球表面抗原 CD3 に対する免疫染色では、平板型スキャホルドの場合と同様で、PGA 周囲を中心に陽性領域を認めた (図

15)。vWF に対する免疫染色では、両群ともに表層から内部にかけて、大小不同の微小血管が多数観察された。(図16)。また、Sox5 に対する免疫染色では陽性細胞が 2 b 群の再生軟骨辺縁において多く観察された (図17)。

考 察

多数の研究者が in vivo における耳介型再生軟骨の誘導研究に取り組んできた。Siam らのハイドロゲルを用いた軟骨再生の三次元形状保持は不良であった³。Shieh らは、3 種類の短期および長期分解性ポリマーを導入して軟骨再生を試み、長期分解性ポリマーにおいて、耳介型形状保持が改善することを報告した⁴。Kamil らは、ハイドロゲルと軟骨細胞を組み合わせた複合体ポリマーを、特殊加工した鋳型 (金製) の中に流し込んだ状態で、耳介型軟骨を誘導したが、長期形状維持は不可能であった⁵。

磯貝らは、新しい生分解性スキャホルドとして

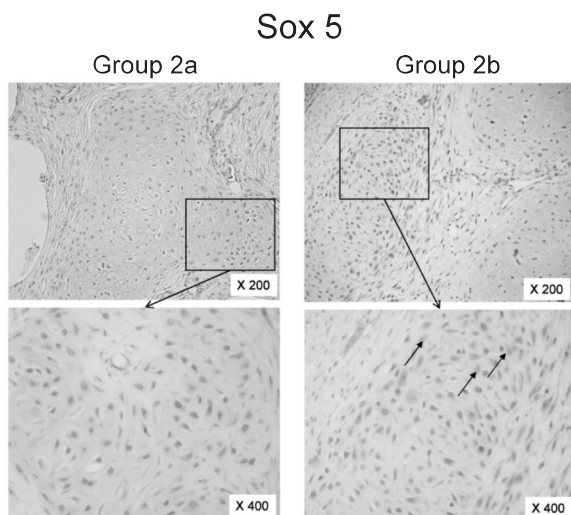


図17 耳介型スキャホールドの Sox5 染色
 上段：×200 下段：×400
 PGA 2層耳介型スキャホールド群，PGA 3層耳介型スキャホールド群ともに幼弱な軟骨細胞に陽性を認めるが，PGA 3層耳介型スキャホールド群に多く陽性領域を認めた。

スポンジ構造を持つポリ乳酸-カプロラクトンコポリマーを用いて三次元形状の長期形態維持が可能であることを免疫不全マウスを用いて示した¹⁰。

しかし，自家移植モデルにおいて臨床的に必要な大きさと複雑な三次元形状を維持できる耳介軟骨の再生誘導に成功した報告は認められていない。これは，生分解性ポリマーのスポンジ構造は，三次元構造を維持する上では適しているが，播種細胞への栄養拡散が不十分であり，播種細胞の脱分化の原因になる点や，分解したポリマーが炎症反応を惹起する点が問題であった¹¹。そこで本研究では，①フィブリン散布法を導入した効率的な細胞播種，②b-FGF徐放システムによる軟骨基質の早期誘導，③PPPをフレームワークとした三次元形状の維持，の3点に焦点を絞って研究を進め，新たな組織再生誘導システムの確立を目指した。

①フィブリン散布法

播種細胞の足場となるスキャホールドは一般的に疎水性ポリマーであるため，細胞が内部に浸透しにくく，たとえ浸透しても細胞はスキャホールドに接着することなく漏れ出してしまう。このため，播種効率が低下する点が問題であった。近年，軟骨細胞をフィブリンと混和して細胞接着性および播種細胞濃度を高めようとする工夫が報告されている¹¹⁻¹⁵。本研究でも，フィブリン散布法により，脱落する細胞は減少し，播種できた細胞濃度は約3倍に向上した。

②b-FGF徐放システム

小動物の免疫不全モデルから，大動物の自家移植モデルへの展開では，低酸素・低二酸化炭素環境に打ち勝ち，播種した軟骨細胞の増殖・分化過程を促進し，軟骨基質を早期に誘導することが三次元形状の維持に不可欠と考えられる。一般的に，軟骨細胞の分化・増殖および軟骨基質の産生は，軟骨誘導型サイトカイン (b-FGF, IGF, TGF- β など) によって調節されている¹⁶⁻²¹。本研究では，b-FGF を選択し，ゼラチンを担体とする b-FGF 徐放システム⁸ は軟骨の再生誘導および成熟過程を加速すると同時に，軟骨組織を栄養する機能的血管も誘導することが明らかになった。

③PPPによるフレームワーク

移植後に生じる皮膚収縮による三次元形状の変形を阻止するため，再生軟骨が十分な強度と弾力性を獲得するまでの期間形状維持できるような新たな仕組みを開発する必要があった。今回開発したスキャホールドでは，非分解性ポリマーである PPP の支持性により，最適な三次元構造を維持し，その表面を軟骨細胞への親和性が高い生分解性ポリマーである PGA を用いて被覆した。PPP は，すでにヘルニア手術の標準術式に採用されている。近年，Omori らによってチューブ状の PPP が気管再建に臨床応用された²²。その結果，PPP は異物反応を示さず，良好な組織適合性が認められた。また，Kawaguchi らによっても気管フレームワークとしての支持性は良好で，正常気管軟骨と同様な力学的強度が得られることが報告された²³。支持性の高いスキャホールドは硬く，細胞を播種した際の edge 効果が問題となる。播種細胞の分布が不均一となり辺縁に集簇するため，再生軟骨はスキャホールド周囲に限定して形成され，中央部が壊死化する¹¹。そこで，本研究では，PPP と PGA の多層構造体 (multiple layer) を作成し，厚みのあるスキャホールド中央部の細胞播種濃度を高める工夫を行った。その結果，耳介型スキャホールドの全体に良好な軟骨再生が観察された。今後，さらに移植期間を延長し，再生軟骨の変形や吸収などの影響を観察する必要がある。また，すでにスキャホールドの pore size が 200 μm 以下の場合，三次元スキャホールドへ侵入する新生血管の数が減少することが報告されている²⁴。本研究で用いた PGA および PPP ともに pore size は 200 μm 以上あり，スキャホールド内部への血管侵入は容易となり，播種細胞への栄養供給は良好であったことが推察される。

一般的に，軟骨は間葉細胞が軟骨芽細胞に分化したのち，軟骨芽細胞が増殖し，軟骨細胞に分化する。その結果，軟骨基質が産生されることが知られてい

る²⁵。一方、間葉細胞は線維芽細胞にも分化し、これが軟骨表層を包む軟骨膜を形成する。この軟骨膜に、軟骨芽細胞に分化しうる軟骨形成細胞が存在する²⁶⁻³²。これまで tissue engineering によって自家細胞から再生誘導された自家軟骨の長期維持や成長に関する報告はなかった。これまでの基礎研究より、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化を制御する転写因子として、Sox5, 6, 9 が広く知られている³³。Sox9 は、未分化間葉系細胞の凝集およびその後の軟骨細胞への分化過程に必須である。一方、Sox5 および 6 は、Sox9 により誘導され、前軟骨細胞より軟骨芽細胞への分化を決定づける。Sox5 および Sox6 欠損マウスでは、II 型コラーゲンは発現するが、アグリカンの基質産生がほとんど認められないことが報告されている³⁴。本研究結果においては、再生軟骨細胞塊の周囲には Sox5 陽性細胞の分布が認められ、軟骨芽細胞の誘導が示唆された。今後、再生した新生軟骨と前駆細胞の相互関係は詳細な研究が必要となるであろう。

以上より自家移植モデルにおいて PPP フレームワークは異物反応を起こさず、PGA を細胞キャリアとした三次元スキャホールドにおける b-FGF 徐放システムとフィブリン薄膜における軟骨再生を促進できることが結論付けられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました近畿大学医学部形成外科学教室磯貝典孝教授、寺田伸一非常勤講師に深甚な謝意を捧げます。

文 献

- Vacant JP, Morse MA, Saltzman WM, Dumb AJ, Perez-Stayed A, Langer R (1988) Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 23: 3-9
- Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA (1997) Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 100: 297-302
- Saim AB, Cao Y, Weng Y, Chang CN, Vacanti MA, Vacanti CA, Eavey RD (2000) Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold. *Laryngoscope* 110: 1694-1697
- Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP (2004) Tissue engineering auricular reconstruction: in vivo and in vitro studies. *Biomaterials* 25: 1545-1557
- Kamil SH, Vacanti MP, Aminuddin BS, Jackson MJ, Vacanti CA, Eavey RD (2004) Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold. *Laryngoscope* 114: 867-870
- 和田充弘 (2008) 天然高分子 (フィブリン) と合成高分子 (PGA) の複合化技術を導入した自家移植モデルにおける軟骨再生. *近畿大医誌* 33: 271-282
- Klagsburn M (1979) Large-scale preparation of chondrocytes. *Meth Enzymol* 58: 560-564
- Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, Munakata H, Tabata Y, Ikada Y, Kamiishi H (2005) Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed Mater Res* 74: 408-418
- Rani Roy, Sean S. Fohles, Victor Zaporozhan v, Peretti GM, Randolph MA, Xu J, Bonassar LJ (2004) Analysis of bending behavior of native and engineered auricular and costal cartilage. *J Biomed Mater Res* 68A: 597-602
- Kusuhara H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ, Isogai N. (2009) Tissue engineering a model for the human ear: Assessment of size, shape, morphology and gene expression following seeding of different chondrocytes. *Wound Repair & Regeneration* 17: 136-148
- Lee CR, Grad S, Gorna K, Gogolewski S, Goessl A, Alini M (2005) Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis. *Tissue Eng* 11: 1672-1573
- Hannouche D, Terai H, Fuchs JR, Terada S, Zand S, Nasser BA, Petite H, Sedel L, Vacanti JP (2007) Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 13: 87-99
- Chen G, Sato T, Ushida T, Ochiai N, Tateishi T (2004) Tissue engineering of cartilage using a hybrid scaffold of synthetic polymer and collagen. *Tissue Eng* 10: 323-330
- Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, Diduch DR (2003) The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials* 24: 2653-2660
- Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessmar J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T (2007) In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Eng* 13: 2007-2018
- Iwamoto M, Jikko A, Murakami H, Nakashima K, Iwamoto M, Takigawa M, Baba H, Suzuki F, Kato Y (1994) Changes in parathyroid hormone receptors during chondrocyte cytodifferentiation. *J Biol Chem* 269: 17245-17251
- Pei M, Seidel J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002) Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 149-154
- Richmon JD, Sage AB, Shelton E, Schumacher BL, Sah RL, Watson D (2005) Effect of growth factors on cell proliferation, matrix deposition, and morphology of human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer.

- Laryngoscope 115 : 1553-1560
19. Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I (2001) Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem* 81 : 368-377
 20. Stoddart MJ, Ettinger L, Häuselmann HJ (2006) Generation of a scaffold free cartilage-like implant from a small amount of starting material. *J Cell Mol Med* 10 : 480-492
 21. Chubinskaya S, Hakimiyan AA, Rappoport L, Yanke A, Rueger DC, Cole BJ (2008) Response of human chondrocytes prepared for autologous implantation to growth factors. *J Knee Surg* 21 : 192-199
 22. Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, Tanaka S, Magruffov A, Ito J, Shimizu Y (2005) Regenerative medicine of the trachea : the first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114 : 429-33
 23. Kawaguchi S, Nakamura T, Shimizu Y, Masuda T, Takigawa T, Liu Y, Ueda H, Sekine T, Matsumoto K (2001) Mechanical properties of artificial tracheas composed of a mesh cylinder and a spiral stent. *Biomaterials* 22 : 3085-3090
 24. Karageorgiou V, Kaplan D (2005) Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26 : 5474-5491
 25. Victor P, Eroschenko. (2000) di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations -ninth edition. Canada : Lippincott Williams & Wilkins, 44
 26. Junqueira LC, Carneiro J, Contopoulos AN (1977) Cartilage. *Basic histology* (2nd ED). Lange Medical Publications : 111-118
 27. Williams PW, Warwick R (1980) Osteology. Gray's Anatomy (36th ED), ed. By Gray. Churchill Livingstone : 245-252
 28. Shin DH, Mark EJ, Suen HC, Grillo HC (1993) Pathologic staging of papillary carcinoma of the thyroid with airway invasion based on the anatomic manner of extension to the trachea : a clinicopathologic study based on 22 patients who underwent thyroidectomy and airway resection. *Hum Pathol* 24 : 866-870
 29. Lopez Aguado D, Monserrat JR, Perez Piñero B, Campos Bañales ME, Gutierrez R, Diaz Flores L (1992) Neochondrogenesis in the septal area after submucous cartilaginous resection. *Acta Otolaryngol* 112 : 539-544
 30. Engkvist O, Skoog V, Pastacaldi P, Yormuk E, Juhlin R (1979) The cartilaginous potential of the perichondrium in rabbit ear and rib. A comparative study in vivo and in vitro. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13 : 275-280
 31. Engkvist O (1979) Reconstruction of patellar articular cartilage with free autologous perichondrial grafts. An experimental study in dogs. *Scand J Plast Reconstr Surg* 13 : 361-369
 32. Ohlsén L, Widenfalk B (1983) The early development of articular cartilage after perichondrial grafting. *Scand J Plast Reconstr Surg* 17 : 163-177
 33. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes dev* 16 : 2813-2828
 34. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V (2001) The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell* 1 : 277-290