

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

和田 充 弘

近畿大学医学部形成外科学教室

抄 録

本研究では、播種細胞の漏出を抑制して播種効率を向上させるため、生体吸収性の合成高分子 (PGA) と天然高分子 (フィブリン) を複合化する技術を開発した。複合化した分解性高分子を試用して自家移植モデルの軟骨再生を試み、異なる移植部位における複合化高分子の有用性について検討した (実験A)。さらに本モデルに塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) 徐放システムを導入して、b-FGF による軟骨再生の促進効果と軟骨再生における新生血管の役割について検討した (実験B)。実験Aでは、移植3週目以降の軟骨組織において、正常耳介軟骨と極めて近似する組織構造が観察された。また、移植後5週目から、軟骨組織の周囲に明瞭な新生血管網が形成された。本法を導入した結果、大動物を用いた自家移植モデルにおいて、軟骨の再生誘導は可能であることが示唆された。実験Bでは、b-FGF 徐放システムを複合化高分子 (スカフォールド) に組み込んだ結果、軟骨再生は著しく促進した。また免疫組織化学的検討の結果、b-FGF 徐放システムによって径の大きい血管から形成される血管網が誘導されることが判明した。生体吸収性の合成高分子と天然高分子を複合化することにより、力学的強度と生体親和性を兼ね備えたスカフォールドを作製することが可能と考えられた。今後、本技術を用いてヒト耳介に特有な3次元形状を有する軟骨組織の再生誘導実験を予定している。

Key words : 生分解性高分子, 自家移植, 軟骨再生, b-FGF, 徐放システム

緒 言

1988年、幹細胞を用いた革新的な組織再生技術が Vacanti, Langer らによって考案された。この技術は、組織・臓器の性質や形状に合わせて成形した生分解性高分子に幹細胞を播種して、体外もしくは体内で人工的に三次元組織を再生誘導する技術、tissue engineering 法、として報告された¹。この tissue engineering 法は、高度な機能をもつ3次元組織・臓器再生を可能とする21世紀の新しい治療法として、今後の発展が注目されている。

“耳介の再生”では、高度な3次元形状の再現を必要とするが、比較的単純な組織構造が単一化細胞 (弾性軟骨細胞) によって構築されているため、tissue engineering のモデルケースとして理想的であると考えられてきた。この耳介軟骨の再生誘導を実現するため、これまで主に小動物 (ヌードマウス) を用いてヒト耳介形状軟骨の再生誘導が試みられてき

た。その結果、細胞操作技術²、細胞供給源の探索³、生分解性高分子の改良⁴、軟骨再生における形態形成制御機構と成長因子の関与⁵などの基盤技術の開発や臨床応用化に関する研究が系統的に数多く報告されてきた。これら一連の研究結果²⁻⁷から、弾性軟骨の組織性状と複雑な3次元形状を有する薄い軟骨再生は可能であり、ヒト耳介特有の3次元形状は長期間維持されることが判明した。さらに、細胞外マトリックスに含まれる弾性線維によって、耳介は特有の柔らかい性状を保持していることがわかった。しかし、臨床応用を目指して行った大動物 (例えば、ブタ、羊など) 実験において、ヒト耳介形状軟骨の再生誘導が試みられた^{8,9}が、未だに成功例は報告されていない。

近年、大動物もしくはヒトにおいて、生分解性高分子と細胞を制御して、膀胱および大血管の3次元構築を組織誘導した臨床応用例が報告された。Atala らは、合成高分子 PGA にヒト膀胱細胞を播

種して作成した細胞・高分子複合体を、ヒト腹腔に移植して膀胱再生を試みた。この複合体をヒト腹腔内に移植する際に、複合体と大網を天然高分子フィブリンで接着させた結果、膀胱の再生誘導が可能となったと報告した¹⁰。また、Shin'oka らは、合成高分子 PGA/P (LA-CL) に骨髄幹細胞を播種して、ヒト体内で大血管を作成した。大血管を天然高分子フィブリンで補強した後に血管移植した結果、肺動脈の再生誘導が可能となったと報告した¹¹。このように、生体吸収性の合成高分子と天然高分子を複合化することにより、大動物もしくはヒトにおいて組織の再生誘導が可能となることが示唆された。しかし、その複合化に関する基本技術および組織再生の機序は明らかとされていない。

播種細胞の足場となる高分子 (スカフォールド) には、高い細胞親和性、力学的強度、多孔性、連通性、設計した 3 次元形状に成形できる加工性、組織形成に伴って分解される生体吸収性が要求される¹²。生分解性高分子の中でも特に合成高分子 (PGA, PLA, PCL など) は、力学的強度が高く加工性に優れている。しかし、疎水性であるため、細胞がスカフォールド内部に浸透しにくく、いったん浸透した播種細胞はスカフォールドに接着することなく漏れ出すため、播種効率が低下する点が大きな問題として残されている。一方、天然高分子であるフィブリンは、高い細胞接着性と細胞増殖活性を持つが、力学的強度と加工性の点で劣っている。そこで、これらの弱点を克服するために、両方の高分子を複合化する新技術を開発した。

本研究では、播種細胞の漏出を抑制して播種効率を向上させるための高分子複合化技術について報告し、本法を導入して大動物の異なる移植部位において軟骨組織の再生誘導を試みた。さらに、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) を複合化高分子 (スカフォールド) に組み込むことにより軟骨再生が促進される可能性について組織学的に検討した。

材料および方法

本研究では、自家移植モデルにおいて軟骨再生を可能とする目的で、天然高分子フィブリンと生分解性合成高分子から構成される複合化高分子を試用して自家移植モデルの軟骨再生を試み、異なる移植部位における複合化高分子の有用性について検討した (実験 A)。さらに、自家移植モデルにおける軟骨再生を促進するための至適技術を開発する目的で、実験 B を行った。実験 B では、本モデルに b-FGF 徐放システム⁵を導入して、b-FGF による軟骨再生の促進効果と軟骨再生における新生血管の役割について

検討した。

実験動物

ビーグル犬 (60 匹, 4 ~ 6 週齢, 雌, 浜口動物, 兵庫) を用いた。飼育は、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。飲料用水は制限せず、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 与えた。

生分解性合成高分子

シート状 (長さ 2 cm, 幅 2 cm, 厚さ 150 μ m) に加工した PGA 不織布 (ネオパール[®], 線維径 15 μ m, グンゼ株式会社, 京都) を用いた。

軟骨細胞の単離

まず塩酸ケタミン (ケタラール[®], 15 mg/kg, 三共株式会社, 東京) の殿部筋肉注射にて睡眠導入を行い、次に、ペントバルビタール (ネンプタル[®], 25 mg/kg, 大日本製薬株式会社, 大阪) を用いて静脈麻酔を行った。イヌ耳介を切断後、耳介より皮膚、皮下組織、筋肉、軟骨膜を除去し、耳介軟骨を無菌的に採取した。Klagsbrun の方法に準じて¹³, 採取軟骨は、2 \times 2 mm の大きさに細切し、0.3% コラゲネース (collagenase type II, Worthington, Lakewood, NJ) にて酵素処理 (37°C, 12 時間) を開始した。ナイロンメッシュ (pore size: 300 μ m) を用いてろ過した後、10% 仔牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含む F-12 培養液 (Ham's F-12, Gibco, Grand Island, NY) を用いて酵素反応を停止させた。Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 不含リン酸緩衝液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, Grand Island, NY) を用いて、単離した軟骨細胞を 3 回洗浄および遠心 (4°C, 2,000 rpm, 10 分) した。細胞数の測定には、色素排除法を用いた。0.4% トリパンブルー液 (Gibco, Grand Island, NY) を用いて細胞を染色した後、倒立顕微鏡 (Model TMS, Nikon, 東京) を用いて、血球計算盤上の細胞数を算定した。

実験 A: 異なる移植部位における複合化高分子の有用性 (図 1)

細胞・高分子複合体の作成: ピペットにて、イヌ耳介軟骨細胞を PGA 不織布に播種して、細胞・高分子複合体を作成した。軟骨細胞の播種濃度は、100 \times 10⁶ 個/ml に調節した。複合体をインキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) に 4 時間静置して、軟骨細胞を生分解性高分子に接着させた。

天然高分子フィブリンによる複合化: フィブリン (ボルヒール[®], 化学及血清療法研究所, 熊本) を散

布して、細胞・高分子複合体を複層化した。フィブリンの散布には、スプレーキット（ボルヒールスプレーキット，化学及血清療法研究所，熊本）を用い、

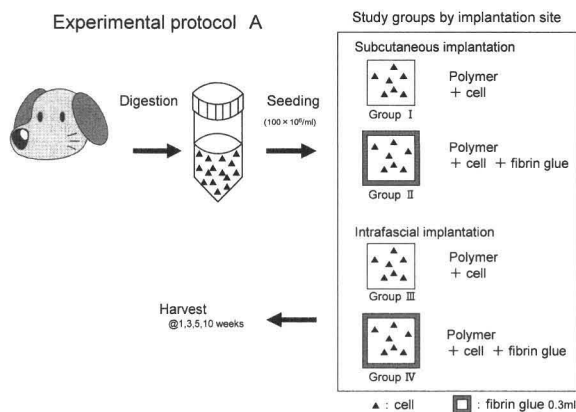


図1 実験プロトコールA

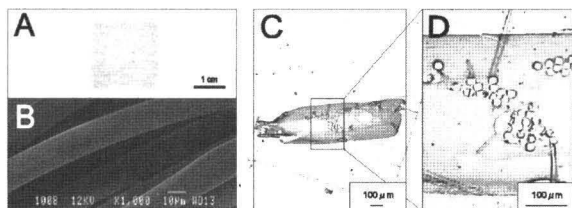


図2 天然高分子フィブリンによる複合化

A：肉眼所見（Bar=1 cm）

B：走査電顕像（Bar=10 μm）

C：toluidine blue 染色（Bar=100 μm）

D：toluidine blue 染色（Bar=100 μm）

スプレーキットの使用により、合成高分子（PGA）は、均一な厚さ（約100～120 μm）のフィブリン膜によって複合化された。

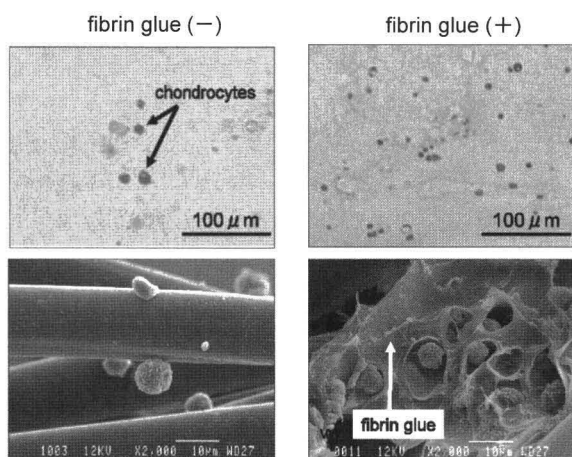


図3 細胞・高分子複合体

上段：toluidine blue 染色（Bar=100 μm）

下段：走査電顕像（Bar=10 μm）

天然高分子フィブリンによる複合化処理を施した後は、合成高分子 PGA 内に数多くの播種細胞が接着する様子が観察された。

送気圧を0.75 kgf/cm² に調整し、複合体から30 cm 離してフィブリンを散布した。その結果、複合体は、均一な厚さ（約100～120 μm）のフィブリン膜によって複合化された（図2）。また、走査電顕像によって、天然高分子フィブリンによる複合化処理を施した後は、合成高分子 PGA 内に数多くの播種細胞が接着する様子が観察された（図3）。

複合体の移植：複合化された複合体は、細胞採取を行った同一個体に自家移植した。塩酸ケタミン（ケタラール[®]，15 mg/kg，三共株式会社，東京）の殿部筋肉注射による睡眠導入の後、ペントバルビタール（ネンプタール[®]，25 mg/kg，大日本製薬株式会社，大阪）による静脈麻酔を行った。移植部位を剃毛した後、ポピドンヨード（イソジン[®]，明治製薬株式会社，東京）にて消毒した。設定した切開線に沿って10万倍希釈エピネフリン添加塩酸リドカイン（エピレナミン含有キシロカイン1% E[®]，アストラゼネカ株式会社，大阪）による局所麻酔を行い、皮膚切開を加えて複合体を移植した。移植部位は、皮下（兎径部）および筋膜間（浅および深側頭筋膜の間）の2部位を選択した。移植後、5-0ナイロン縫合糸（シグマ，東京）にて閉創した。

実験群の設定：移植部位および複層化の有無によって、次の4つの実験群を設定した。

Group I（細胞・高分子複合体を皮下移植した群，n=3）

Group II（複合化した細胞・高分子複合体を皮下移植した群，n=3）

Group III（細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群，n=3）

Group IV（複合化した細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群，n=3）

移植した複合体は、移植後、週目，3週目，5週目および10週目に標本採取し，組織学検討および免疫組織学的検討をおこなった。

実験B：塩基性線維芽細胞増殖因子（b-FGF）含有徐放化ゼラチン微粒子が軟骨再生に及ぼす影響（図4）

ゼラチン微粒子の作成：b-FGF 徐放システムでは、生体内分解吸収性高分子微粒子としてゼラチンを使用した。オリーブオイル5 ml（40℃）に、あらかじめ作成した10%ゼラチン水溶液0.2 ml（等電点5，牛骨ゼラチン，新田ゼラチン株式会社，大阪）を加え，静置（40℃，1時間）した。攪拌後4℃で冷蔵し粒子化したゼラチン周囲に付着したオリーブオイルをアセトン1.5 ml にて洗浄した。得られた溶液をファルコンチューブ（Becton Dickinson，Franklin Lakes，NJ）に回収し，遠心分離（4℃，5,000

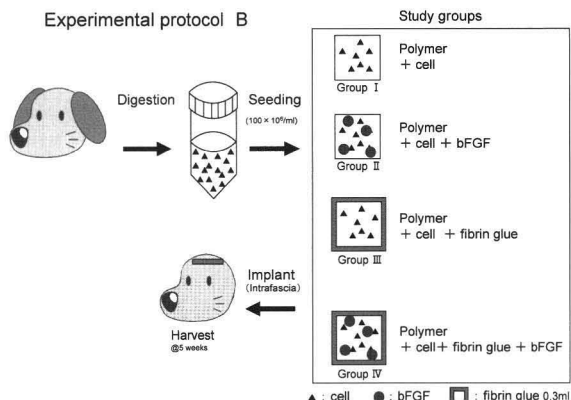


図4 実験プロトコル B

rpm, 5 分間) を行った。再度, アセトンにて洗浄 (4 °C にて 3 回洗浄) した後, 冷蔵庫内 (4 °C) で 1 週間乾燥させ, 沈殿物であるゼラチン粒子を得た。次にゼラチン粒子の架橋を行うため, ゼラチン粒子 1 mg に対し, 0.1% polyoxyethylene sorbitan monooleate を 1 ml, 25% glutaraldehyde を 5 μ l 加え, 攪拌 (4 °C にて 24 時間) した。溶液を遠心分離 (5,000 rpm, 5 分間) し, 沈査のゼラチン粒子に glycine 溶液を加え, 常温にて 1 時間攪拌した。その後, 蒸留水を加えて遠心分離 (5,000 rpm, 5 分間) を 3 回行い, 洗浄した。得られたゼラチン粒子に超純水を加え, 液体窒素で凍結させた。真空凍結乾燥を行い, 直径約 10 μ m のゼラチン微粒子を作成した。凍結乾燥したゼラチン微粒子は, エチレンオキサイドガスを用いて滅菌した。

b-FGF 徐放システム: b-FGF 100 μ m (trafermin, 科研製薬, 東京) を Ca^{++} , Mg^{++} 不含リン酸緩衝液 60 μ l (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco) に溶解した後, ゼラチン微粒子 10 μ g と混和し, 4 °C 下に静置して b-FGF 含有徐放化ゼラチン微粒子を作成した。

複合体の移植: 実験 A と同様に, シート状に加工した PGA 不織布に, イヌ耳介軟骨より単離した軟骨細胞を播種した。さらに, b-FGF 含有徐放化ゼラチン微粒子を複合体へ直接塗布させた後, フィブリンによる複合体の複合化を行った。b-FGF 徐放システムを導入して複合化された複合体は, 細胞採取を行った同一個体の浅および深側頭筋膜間に自家移植した。

実験群の設定: b-FGF 徐放システムおよびフィブリンを用いた複合化処理の有無によって, 次の 4 群を設定した。

Group I (細胞・高分子複合体を移植した群, n=3)

Group II (b-FGF 徐放システムを施した細胞・高分子複合体を移植した群, n=3)

Group III (フィブリンによる複合化処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群, n=3)

Group IV (b-FGF 徐放システムおよびフィブリンによる複合化の両処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群, n=3)

移植した複合体は, 移植後 5 週目に標本採取し, 組織学的検討および免疫組織学的検討をおこなった。

組織学的検討

採取した標本は 10% ホルマリンで固定し, パラフィン包埋後, 4 μ m の厚さで薄切した。切片には, toluidine blue 染色 (キシレン: 5 分 \times 3 回, 100% エタノール: 5 分間 \times 5 回, 90% エタノール: 3 分間, 80% エタノール: 3 分間, 流水水洗および純水水洗, 0.05% toluidine blue 液: 15 分, 水洗, イソプロピルアルコール: 30 秒 \times 3 回, キシレン: 10 分間 \times 4 回) を施し, 組織性状および異調染色性 (メタクロマジー) の有無について検討した。

さらに, Elastic Van Gieson 染色 (70% エタノール: 3 回, レゾルシン・フクシン液: 30 分間, 流水水洗: 2 分間, 70% エタノール: 5 回, カラッチのヘマトキシリン液: 30 分間, 流水水洗: 10 分間, ピクリン酸: 3 回, ワンギーソン液: 5 分間, イソプロピルアルコール: 30 秒間 \times 4 回, キシレン: 30 秒間 \times 7 回) を施し, 弾性線維および膠原線維について検討した。

免疫組織化学染色

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検討するため, 第 8 因子関連抗原 (vWF, von Willebrand Factor) の免疫染色を行った。10% ホルマリンで固定した標本のパラフィン包埋後に, 4 μ m の切片を薄切した。脱パラフィン後, 1 ml の PBS (Gibco) に 0.5 mg プロテアーゼ (protease Type XXIV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を溶解 (室温, 10 分間) して調整したプロテアーゼ溶液にて, タンパク分解酵素処理を行った。次に, 0.3% 過酸化水素加メタノールを用いて, 内因性ペルオキシダーゼを不活化した (30 分間)。一次抗体は, 抗ヒト第 VIII 因子関連抗原ウサギポリクローナル抗体 (A0082, DAKO cytometion, Carpinteria, CA) を 1,000 倍希釈して反応させた (4 °C, 8 時間)。非標識の一次抗体を検出するため, 二次抗体として, 500 倍希釈したビオチン化抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体 (E0432, DAKO) を反応させた (室温, 30 分間)。ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ (P0397, DAKO) を用いて標識 (室温, 30 分間) させた後, DAB 溶液 (組成:

diaminobenzidine 20 mg, 30% 過酸化水素水, PBS100 ml) にて発色させ (室温, 5 分間), ヘマトキシリンで核染色した。

統計処理

採取組織の断面10箇所を無作為に選択して, 軟骨様組織および線維性被膜の厚さを測り, その平均±標準誤差を求めた。計測したデータは, One-factor ANOVA および Kruskal-Wallis test を行った後, 多重比較検定 (Post-hoc test) を行い, 統計学的有意差を検討した。

結果

実験 A: 異なる移植部位における複合化高分子の有用性

皮下移植群 (Group I および II) における経時的变化: Group II (フィブリンを用いて複合化処理した細胞・高分子複合体を皮下移植した群) では, 移植後 5 週目において, 白色, 半透明を呈する, 薄い軟骨様組織が観察された。toluidine blue 染色による摘出標本断面における組織学的検討では, 移植 1 および 3 週目において異調染色性は観察されなかったが, 移植 5 週目 (図 5) において, 複合体内部に散在性異調染色を示す島状領域が出現した。島状領域は, 細胞形状の異なる大小不同の軟骨細胞によって構成されていた。移植後 10 週目 (図 6) において, 採取組織はさらに薄く脆弱となり, 支持性が極めて

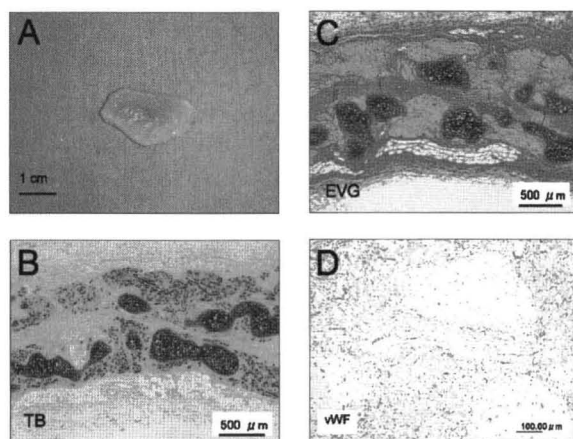


図 5 複合化した細胞・高分子複合体を皮下移植した群 (移植 5 週目) における肉眼所見および組織所見

A: 肉眼所見 (Bar=1 cm)
B: toluidine blue 染色 (Bar=500 μm)
C: Elastica Van Gieson 染色 (Bar=500 μm)
D: vWF 免疫組織化学染色 (Bar=100 μm)
複合体内部に, 細胞形状の異なる大小不同の軟骨細胞が認められた。また, 散在性異調染色を示す島状領域が認められた。

乏しい組織に変化した。組織学的検討から, 移植 5 週目に観察された島状領域は消失していた。Elastica Van Gieson 染色を用いた組織学的検討より, 複合体内部の島状領域は, 膠原線維によって置換されていた。Group I (細胞・高分子複合体を皮下移植した群) では, 全ての観察時期において, 組織学的に異調染色性は観察されず, 軟骨再生は認められ

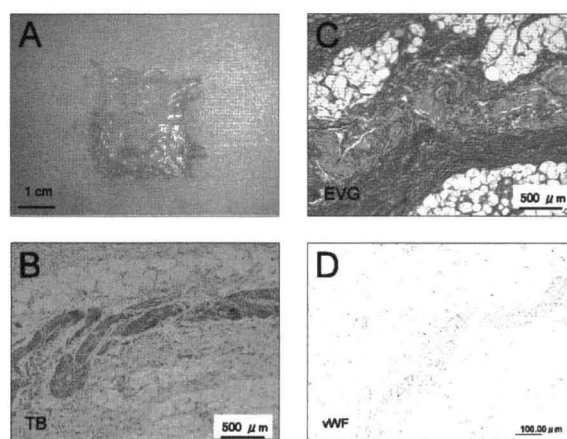


図 6 複合化した細胞・高分子複合体を皮下移植した群 (移植 10 週目) における肉眼所見および組織所見

A: 肉眼所見 (Bar=1 cm)
B: toluidine blue 染色 (Bar=500 μm)
C: Elastica Van Gieson 染色 (Bar=500 μm)
D: vWF 免疫組織化学染色 (Bar=100 μm)
移植 5 週目に観察された島状領域は消失し, 複合体内部の島状領域は, 膠原線維によって置換されていた。

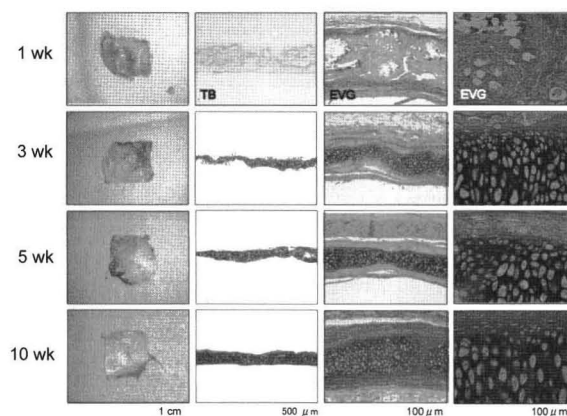


図 7 細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群の肉眼所見および組織所見

肉眼所見 (Bar=1 cm), toluidine blue 染色 (Bar=500 μm), Elastica Van Gieson 染色 (Bar=100 μm, Bar=100 μm) を示す。移植 3 週目において, 白色で薄い軟骨様組織が観察された。複合体は全体が強い異調染色性を示し, 軟骨形成を認めた。形成された軟骨組織は経時的に厚く変化した。

なかった。これらの結果から、皮下（鼠径部）は移植部位として不適切であることが示唆された。

筋膜間に移植した群（Group IIIおよびIV）における経時的变化：Group III（細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群、図7）では、移植3週目において、白色で薄い軟骨様組織が観察された。軟骨様組織は、薄い被膜に覆われていた。toluidine blue 染色による摘出標本断面における組織学的検討では、移植3週目において、複合体全体が強い異調染色性を示し、軟骨形成を認めた。複合体の表層に位置する軟骨細胞は、小型で紡錘形の細胞が層状に配列していた。一方、複合体深部では、軟骨小腔が観察された。また、その中には、大きな細胞質を有する円形の軟骨細胞が一つないし数個認められた。Elastica Van Gieson 染色を用いた組織学的検討では、移植1, 3, 5週目において、新生軟骨の形成とともに高分子は分解・吸収された。この経時的变化に伴い、複合体内部に認められた膠原線維は急激に減少した。複合体周囲では、しだいに成熟する線維性組織が観察された。一方、Group IV（フィブリンを用いて複合化処理を施した細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群、図8）では、移植1週目において、白色で薄く脆弱で、部分的に不透明な軟骨様組織が観察された。軟骨様組織は、半透明の薄い被膜に覆われていた。移植3週目では、より支持性の高い軟骨膜様組織が観察された。toluidine blue 染色による

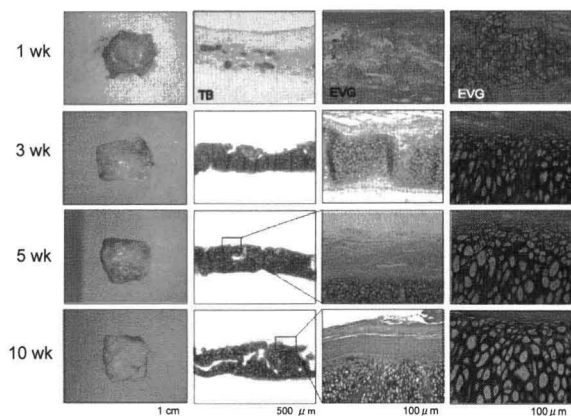


図8 複合化した細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群の肉眼所見および組織所見
肉眼所見 (Bar=1 cm), toluidine blue 染色 (Bar=500 μ m), Elastica Van Gieson 染色 (Bar=100 μ m, Bar=100 μ m) を示す。
移植1週目において、白色で薄く脆弱で、部分的に不透明な軟骨様組織が観察された。複合体内部には部分的な軟骨形成が認められた。移植3, 5, 10週目において、複合体全体に強い異調染色性を示す領域が認められた。形成された軟骨組織は経時的に厚く変化した。

摘出標本断面における組織学的検討では、移植1週目において異調染色性を示す島状領域が出現し、複合体内部において部分的な軟骨形成が認められた。さらに移植3, 5, 10週目において、強い異調染色性を示す領域は複合体全体に拡大し、形成された軟骨組織は経時的に厚く変化した。移植3週目以降において、複合体の表層では小型扁平な軟骨細胞が配列し、深層では規則的な柱状配列が認められた。この所見は、正常耳介軟骨の組織構造と極めて近似していた。Elastica Van Gieson 染色を用いた組織学的検討では、移植1週目において複合体内部に膠原線維を認めた。移植3週目以降では、Group IIIと同様に、軟骨組織の形成とともに高分子は分解・吸収され、膠原線維は著明に減少した。複合体周囲では、移植5週目以降に線維性組織の厚さが増加し、新生軟骨組織と密に接触していた。また Group IIIおよびIVの両群において、形成された軟骨組織の内部には弾性線維が認められ、軟骨細胞を取り巻く網状構造として観察された。

新生軟骨の定量的評価(図9)：標本摘出時期における軟骨の厚さを検討した。その結果、全ての観察時期において、Group IIIに比較して Group IVの軟骨組織は統計学的有意に厚いことが判明した ($p < 0.01$)。このため、フィブリンを用いて複合化処理を施した細胞・高分子複合体では、軟骨形成が促進されることが判明した。さらに、Group IIIおよびIVにおける軟骨の厚さの経時的变化を比較検討した。その結果、両群において、移植3週目に比較して移植10週目の軟骨組織の厚さは有意に増加していた ($p < 0.05$)。

軟骨形成過程における新生血管の関与(図10)：血管系マーカーである von Willebrand Factor

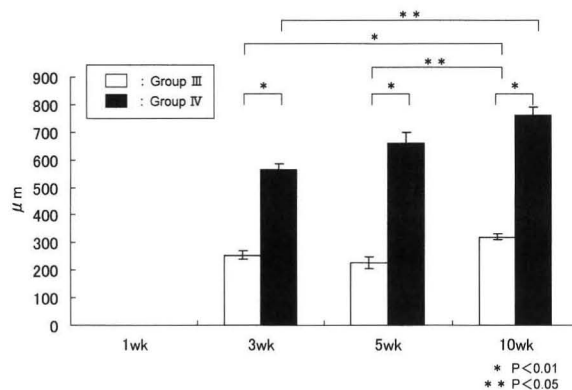


図9 新生軟骨の定量的評価

Group IIIに比較して Group IVの軟骨組織は、全ての観察時期において、統計学的有意に厚いことが判明した ($p < 0.01$)。両群において、移植、週目に比較して移植10週目の軟骨組織の厚さは有意に増加していた ($p < 0.05$)。

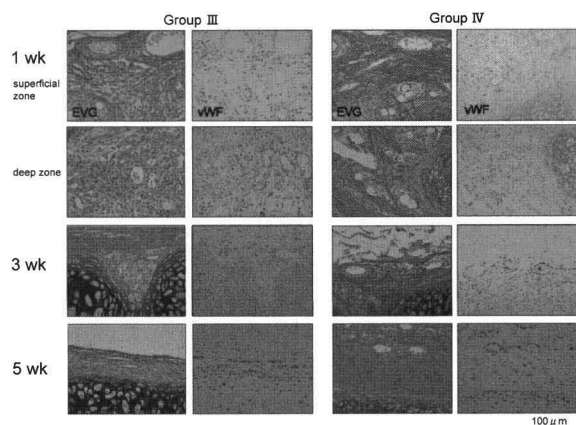


図10 新生軟骨における新生血管の経時的変化
Elastica Van Gieson 染色 (Bar=100 μm),
右側: vWF 免疫組織化学染色 (Bar=100 μm) (各 Group) を示す。
Group IIIでは, 移植1週目において, 複合体の表層部および深部では, 径が大小不同の血管が数多く観察された。一方, Group IVでは, 移植, 週目において, 複合体の表層部では比較的径が大きい血管が数多く観察されたが, 深部では径の小さい血管が少数観察された。

(vWF)の免疫組織化学染色を行い, 軟骨再生過程における新生血管の関与について検討した。Group IIIでは, 移植1週目において, 複合体の表層部および深部では, 径が大小不同の血管が数多く観察された。移植3週目において, 複合体では軟骨形成とともに残存する高分子が観察された。軟骨形成部位において血管浸潤は認められなかったが, 残存高分子の周囲では明瞭な血管浸潤を認めた。移植5週目において, 複合体に形成された軟骨組織を取り囲む薄い線維性組織内に, 径の小さな血管が多数観察された。一方, Group IVでは, 移植1週目において, 複合体の表層部では比較的径が大きい血管が数多く観察されたが, 深部では径の小さい血管が少数観察された。移植3週目において, 複合体に形成された軟骨を取り囲む薄い線維性組織内に, 径の大きな血管が観察された。移植5週目以降では, 厚い線維性組織の周囲に, 径の大きな血管からなる血管網が認められた。いずれの実験群においても, 軟骨組織内には明らかな血管形成は認められなかった。

実験B: 塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) 含有徐放化ゼラチン微粒子が軟骨再生に及ぼす影響

b-FGF 徐放化システムによる軟骨再生促進作用 (図11): 細胞・高分子複合体における b-FGF 徐放システムによる軟骨再生促進作用を組織学に検討するため, Group I (細胞・高分子複合体を移植した群) と Group II (b-FGF 徐放システムを施した細胞・高分子複合体を移植した群) を比較検討した。また, フィブリンを用いて複合化処理を施した細胞・高分子複合体における軟骨再生促進作用を検討するため, Group III (フィブリンによる複合化処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群) と Group IV (b-FGF 徐放システムおよびフィブリンによる複合化の両処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群) を比較検討した。その結果, b-FGF 徐放システムを施した群 (Group IIおよびIV) の摘出標本は, 薄い被膜に覆われていた。また, b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group IおよびIII) に比較して, b-FGF 徐放システムを施した群 (Group IIおよびIV) では厚みおよび支持性は著しく増加していた。toluidine blue 染色による摘出標本断面における組織学的検討では, すべての群において複合体全体に強い異調染色性が観察され, 軟骨形成が認められた。Elastica Van Gieson 染色を用いた組織学的検討では, すべての群において複合体周囲に線維性組織が観察された。

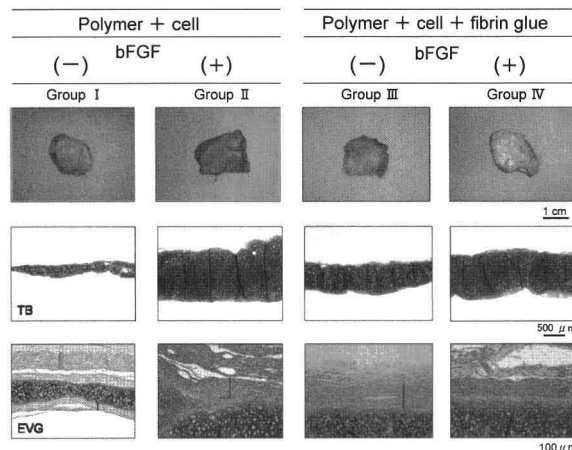


図11 筋膜間に移植した群における肉眼所見および組織所見

上段: 肉眼所見 (Bar=1 cm)

中段: toluidine blue 染色 (Bar=500 μm)

下段: Elastica Van Gieson 染色 (Bar=100 μm)

b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group IおよびIII) に比較して, b-FGF 徐放システムを施した群 (Group IIおよびIV) は薄い被膜に覆われ, 厚みおよび支持性が著しく増加していた。組織学的検討では, すべての群において軟骨形成が認められ, 複合体周囲には線維性組織が観察された。

細胞・高分子複合体における軟骨再生促進作用を検討するため, Group III (フィブリンによる複合化処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群) と Group IV (b-FGF 徐放システムおよびフィブリンによる複合化の両処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群) を比較検討した。その結果, b-FGF 徐放システムを施した群 (Group IIおよびIV) の摘出標本は, 薄い被膜に覆われていた。また, b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group IおよびIII) に比較して, b-FGF 徐放システムを施した群 (Group IIおよびIV) では厚みおよび支持性は著しく増加していた。toluidine blue 染色による摘出標本断面における組織学的検討では, すべての群において複合体全体に強い異調染色性が観察され, 軟骨形成が認められた。Elastica Van Gieson 染色を用いた組織学的検討では, すべての群において複合体周囲に線維性組織が観察された。

複合体の軟骨組織性状 (図12): すべての群において, 複合体の表層では小型扁平な軟骨細胞が層状配列していた。また, 深層では軟骨小腔が観察され, その内部に大型, 円形の軟骨細胞が規則的な柱状配列を示していた。b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group IおよびIII) に比較して, b-FGF 徐放システムを施した群 (Group IIおよびIV) では細胞密度が高い傾向を示した。これらの結果から, 正常

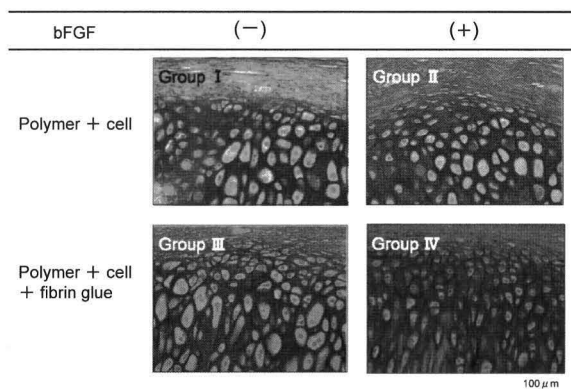


図12 複合体の軟骨組織性状 (Elastica Van Gieson 染色 (Bar=100 μm))
すべての群において、複合体の表層では小型扁平な軟骨細胞が層状配列していた。また、深層では規則的な柱状配列を示していた。b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group I および III) に比較して、b-FGF 徐放システムを施した群 (Group II および IV) では細胞密度が高い傾向を示した。

表 1

study groups	thickness(μm)
Group I : PGA+cell	226.4±21.8
Group II : PGA+cell+bFGF	1158.6±31.7
Group III : PGA+cell +fibrin glue	658.8±41.9
Group IV : PGA+cell+bFGF+fibrin glue	1116.4± 9.0

Values were given as mean±S.E..

* P<0.01

耳介軟骨と同様な組織構造を示す軟骨再生は可能であり、b-FGF 徐放システムの導入によって、再生誘導過程を著しく促進できうことが判明した。

新生軟骨の定量的評価(表 1)：各実験群における軟骨の厚さを比較検討した。その結果、b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group I および II) に比較して b-FGF 徐放システムを施した群 (Group II および IV) では、統計学的有意に厚い軟骨組織が形成されることが判明した ($p<0.01$)。また、フィブリンによる複合化処理を施さなかった群 (Group I) に比較してフィブリンによる複合化処理を施した群 (Group III) では、統計学的有意に厚い軟骨組織が形成されることが判明した ($p<0.01$)。しかし、b-FGF 徐放システムを施した Group II と Group IV の間には、軟骨組織の厚さにおいて統計学的有意差は認められなかった。

von Willebrand Factor (vWF) の免疫組織化学染色を用いた新生血管の関与 (図13)：b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group I および III) では、複合体を取り囲む線維性組織の内部もしくは外部に、比較的径の小さな血管からなる血管網が形成

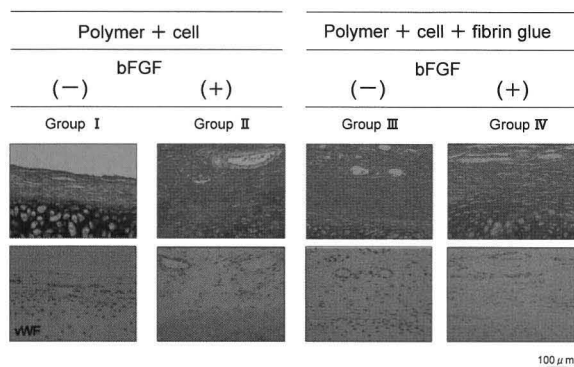


図13 新生軟骨における新生血管 (移植 5 週目)
上段：Elastica Van Gieson 染色 (Bar=100 μm)
下段：vWF 免疫組織化学染色 (Bar=100 μm)
b-FGF 徐放システムを施さなかった群 (Group I および III) では、複合体を取り囲む線維性組織の内部もしくは外部に、比較的径の小さな血管からなる血管網が形成されていた。一方、b-FGF 徐放システムを施した群 (Group II および IV) では、複合体を取り囲む線維性組織の周囲に、明らかに径の大きい血管からなる血管網の形成が観察された。

されていた。Group III (フィブリンによる複合化処理を施した群) において観察された血管は、Group I (細胞・高分子複合体を移植した群) に比較して、やや大きな血管径を有していた。b-FGF 徐放システムを施した群 (Group II および IV) では、複合体を取り囲む線維性組織の周囲に、明らかに径の大きい血管からなる血管網の形成が観察された。再生軟骨組織内では、いずれの実験群においても明らかな血管網の形成は認められなかった。

考 察

本研究では、播種細胞の漏出を抑制して播種効率を向上させるため、生体吸収性の合成高分子 (PGA) と天然高分子 (フィブリン) を複合化する技術を開発した。生体吸収性合成高分子として、PGA, PLLA, PCL などが広く知られている。特に PGA は、高い力学強度と細胞接着性を示し、早い分解・吸収によって優れた生体適合性を有している。このため、小動物を用いた種々の 3 次元組織の再生誘導実験において、理想的な支持体として応用されている。しかし、大動物を用いた自家移植モデルでは、PGA 含有量と炎症反応の強さは正の相関を示し、惹起された強い炎症反応によって、軟骨組織の再生誘導は阻止されることが近年報告された¹⁴。そこで本研究では、PGA 含有量を 20 mg と低く設定し、軟骨の再生誘導過程の初期に生ずる炎症反応を抑制した。

一方、天然高分子としては、コラーゲン、ヒアルロン酸、フィブリンなどの生体内組織が知られている。この中で、フィブリンは、血液凝固機序として生ずるフィブリノーゲンとトロンビンによるフィブリン形成作用を利用している。フィブリンは、注入充填が可能なハイドロゲルスcaffoldとして有用であり、すでに3次元培養用scaffoldとして試用されている。一方、tissue engineeringに用いるscaffoldは、種々の形状への成形が可能であり、その複雑な3次元形状が生体内で維持されなくてはならない。フィブリンは、生体内分解速度が数日～数週間と早い特徴がある。そのため単一のscaffoldとして試用する場合、物理的強度の不足、短い吸収期間、体積減少などの問題点を補う必要がある。そこで本研究では、フィブリンの欠点を補う目的で合成高分子と組み合わせて複合化した。複合化された高分子では、合成高分子の支持性によりscaffoldの3次元構造が維持され、その表面をフィブリンで被覆することによって、生体親和性、細胞接着性、細胞増殖促進活性などの付加が可能となった。

この場合、合成高分子に強固に天然高分子を固定化する技術、さらには固定化した天然高分子機能を十分に発揮できる固定化の手段が必要と考えられる。本研究では、合成高分子表面にフィブリンを強固に固定する目的で、スプレーキットの送気圧を0.75 kgf/cm²に調整してフィブリンを散布した。この結果、合成高分子PGAを、均一な厚さ（約100～120 μm）のフィブリン膜によって強固に複合化することが可能となった。また、天然高分子フィブリンによる複合化処理を施すことにより、播種細胞はscaffoldから漏れ出すことなく、高濃度の細胞接着が可能となった。

フィブリンによる生体炎症反応および組織再生に及ぼす影響に関する報告は様々であり、一定の見解を見ていない。Hallersらの報告によると、フィブリンは生体炎症反応を遷延させ、反応の終息後には厚い線維性被膜が残存すると報告した¹⁵。一方、Murirahらは、PLGA (poly (lactic-co-glycolic-acid)) にフィブリンを含浸させて複合化し、in vitroにおいて軟骨の再生誘導を試みた。その結果、複合化処理によって、軟骨の再生誘導過程が促進されることを報告した¹⁶。さらに、同様の方法を用いて、移植実験（ヌードマウス）を行ったところ、移植2週目で炎症反応は生じることなく、軟骨形成が認められたと報告した¹⁷。この結果から、フィブリンによる複合化処理によって、生体炎症反応は生じず、軟骨再生誘導が促進されることが示唆された。しかし、免疫応答

反応のないヌードマウスを用いたこれらの小動物異種移植実験では、移植初期におけるフィブリンの炎症反応や組織再生への関与について、詳細に調べることは困難であった。本研究では、フィブリンをscaffoldとして使用せず、至適量のフィブリン（フィブリン量：0.3 ml/高分子）をスプレー散布して合成高分子を被覆した後、大動物に自家移植した。このフィブリンによる複合化処理によって、移植早期から軟骨再生誘導が生じ、厚い軟骨が形成された。これらの結果から、大動物もしくはヒトにおいて軟骨組織の再生誘導を行う上で、フィブリンによる複合化処理は極めて有効な方法であると考えられた。今後、本技術の導入により、scaffoldに最適な3次元形状を持たせ、同時に、天然高分子によって播種細胞の播種効率や増殖・分化に配慮した高性能scaffoldの作成が可能となることが示唆された。

血管網の発達は、軟骨形成に密接に関連していると考えられるが、これまで再生誘導された軟骨における血管網の形成過程を明らかにした報告は認められない。内軟骨性骨化では、通常、骨形成の前段階として、間葉系組織から軟骨細胞が分化し軟骨形成が生ずる。間葉系組織には毛細血管網が多数分布しているが、軟骨分化に先立って血管網は退縮し、無血管の軟骨性骨原基が形成されることが報告されている¹⁸。軟骨性原基が形成された後には、血管侵入を阻止する種々の抑制因子（ChM-1, TIMP など）が放出され、周囲に発達した血管網があるにも関わらず、軟骨は無血管に保たれることが知られている¹⁹⁻²¹。骨化する際には、血管新生の抑制因子と促進因子のバランスは変化し、主に肥大軟骨細胞から発現される促進因子（VEGF）によって、軟骨性原基は骨へ置換する^{22,23}。本研究の von Willebrand Factor (vWF) を用いた免疫組織化学的検討から、tissue engineeringによって再生誘導した軟骨においても、同様な血管網の形成過程が生じると考えられた。すなわち、移植早期には大小不同の新生血管が複合体内部に形成されるが、軟骨形成に伴い複合体内部の新生血管は退縮する。その後、形成された軟骨の内部に新生血管は存在しないが、軟骨を取り巻く厚い線維性組織の周囲には、径の大きな新生血管網が形成される機序が示唆された。また、フィブリンを用いて複合化処理を施した細胞・高分子複合体では、移植後早期から軟骨周囲に明瞭な新生血管網が形成された。フィブリンによる血管誘導作用については極めて興味深いと考えられ、今後検討していく予定である。

本研究では、塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF)

を複合化高分子（スカフォールド）に組み込むことにより軟骨再生が促進されうる可能性について組織学的に検討した。b-FGF は、in vivo 環境下に長期間、安定して供給するため、生体吸収性高分子であるゼラチンを用いた薬物送達システム（drug delivery system, DDS）を応用した。ゼラチンは、グルタルアルデヒドを用いて化学架橋させ分解速度を調整した。次に、b-FGF をゼラチンに含浸させて b-FGF 含有徐放ゼラチン微粒子を作成した。これまでの研究から、等電点 9.5 で正電荷を持つ b-FGF と、等電点 5.0 で負電荷を持つ酸性ゼラチンは静電的に相互作用して収着するため、b-FGF はゼラチンに固定化されることがわかっている^{24,25}。また、ゼラチンに固定化された b-FGF の徐放は、ゼラチンの分解速度に一致することが報告されている²⁶。In vitro において、軟骨細胞増殖を促進する b-FGF 濃度は 10 ng/ml と報告されている^{27,28}。一方、Tabata ら²⁴は、b-FGF 濃度を 1 mg/ml としたときに最も強い血管新生が認められることを報告した。そこで本研究では、軟骨細胞増殖作用と新生血管誘導作用を同時に引き出すため、b-FGF 濃度は 1 mg/ml に設定した。

軟骨再生において細胞増殖因子として働く b-FGF は、同時に、強力な血管新生因子として機能することが知られている²⁴。血管新生には、組織血流の回復に寄与しない未熟な新生血管と組織血流の回復に寄与する成熟した「機能的」新生血管があることが知られている³¹。b-FGF は、血管内皮細胞と血管平滑筋に同時に働き、これらを増殖させ、さらに、VEGF, HGF の両因子の発現を調節して血管新生をおこす。この b-FGF によって誘導される血管は、通常の血管新生 angiogenesis によって形成される血管よりも、さらに太く、裏打ち構造のある、比較的構造の整った血管と考えられている²⁹⁻³²。実験 B において b-FGF 徐放システムを施した群（Group II および IV）では、再生軟骨組織は著しく厚く変化していた。また、複合体を取り囲む線維性組織の周囲に、明らかに径の大きい血管からなる発達した血管網の形成が観察された。この組織学的検討結果から、b-FGF は軟骨組織の増殖因子のみでなく、機能的血管を誘導する強力な血管新生誘導因子として作用したと考えられた。このことは、b-FGF が組織還流能を持つ機能的血管の形成を促進する、とするこれまでの報告と一致した。また、実験 B において、b-FGF 徐放システムを施した群 Group II（b-FGF 徐放システムを施した細胞・高分子複合体を移植した群）と Group IV（b-FGF 徐放システムおよびフィブリンによる複合化の両処理を施した細胞・高分子

複合体を移植した群）の間には、軟骨組織の厚さにおいて統計学的有意差は認められなかった。この理由として、b-FGF 徐放システムに用いるゼラチン微粒子の物質性状の関与が考えられた。ゼラチン微粒子は、含水ゲルの性質を持つためゲル膜を形成する。そのため、合成高分子の表面はゼラチンゲル膜で被覆され、フィブリン膜と同様の組織再生効果が促進的に生じたと推測された。

一般に、軟骨は間葉細胞が軟骨芽細胞に分化することによって発生する。軟骨芽細胞は増殖・分化し、その結果、軟骨基質と軟骨間質が産生される。軟骨芽細胞は、しだいに細胞間質によって 1 個ずつ取り囲まれ、軟骨小腔と呼ばれる区画の中に閉じこめられる。こうして成熟した細胞は軟骨細胞と呼ばれ、その機能は軟骨基質の維持とされている³³。一方、間葉細胞は線維芽細胞にも分化し、これが軟骨を包む軟骨膜を形成する。軟骨膜の構造については、層構造が 1 層とするものから 3 層とするものまで様々な報告がみられる³⁴⁻⁴⁰。軟骨膜には、軟骨芽細胞に分化しうる軟骨形成細胞が存在する。軟骨形成細胞は、軟骨芽細胞に分化し軟骨の付加成長に関与する。これまで tissue engineering によって再生誘導された軟骨の成長に関する報告はない。現在、再生軟骨の周囲を覆う軟骨膜様線維性組織内に軟骨芽細胞が存在しうる可能性について検討している。また、今後、成長を可能とする軟骨再生を行うため、軟骨膜を再生誘導する技術開発が重要であると考えている。

本研究では、自家移植モデルにおいて軟骨の再生誘導を試みた。生体吸収性の合成高分子と天然高分子を複合化処理する技術に b-FGF 徐放システムを組み合わせて生体内に導入することによって、軟骨再生誘導を促進し、再生軟骨組織を栄養する機能的血管を同時誘導する効率的な手法を確立することができた。今後、本法を応用して、薄くて複雑な 3 次元形態を特徴とするヒト耳介形状軟骨の再生誘導を予定している。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました磯貝典孝教授に深謝いたします。

文 献

1. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R (1988) Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 23: 3-9
2. 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
3. Isogai N, Kusuhashi H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ (2006) Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng* 12: 691-703
 4. Isogai N, Asamura S, Higashi T, Ikada Y, Morita S, Hillyer J, Jacquet R, Landis WJ (2004) Tissue engineering of an auricular cartilage model utilizing cultured chondrocyte-poly (L-lactide-epsilon-caprolactone) scaffolds. *Tissue Eng* 10: 673-687
 5. 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
 6. 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
 7. Kusuhashi H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ, Isogai N (2008) Tissue engineering a model for the human ear: Assessment of size, shape, morphology and gene expression following seeding of different chondrocytes. *Wound Repair Regen* (accepted)
 8. 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
 9. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP (2004) Tissue engineering auricular reconstruction: in vivo and in vitro studies. *Biomaterials* 25: 1545-1557
 10. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB (2006) Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367: 1241-1246
 11. Shinoka T, Shum-Tim D, Ma PX, Tanel RE, Isogai N, Langer R, Vacanti JP, Mayer JE Jr (1998) Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115: 536-545
 12. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R (1994) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 12: 689-693
 13. Klagsburn M (1979) Large-scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol* 58: 560-564
 14. 森 廣政 (2007) ヒト耳介形状軟骨の再生誘導における PGA-P (LA-CL) ポリマーの有用性. *近畿大医誌* 32: 233-241
 15. Hallers EJ, Jansen JA, Marres HA, Rakhorst G, Verkerke GJ (2007) Histological assessment of titanium and polypropylene fiber mesh implantation with and without fibrin tissue glue. *J Biomed Mater Res A* 80: 372-380
 16. Sha'ban M, Kim SH, Idrus RB, Khang G (2008) Fibrin and poly (lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold promotes early chondrogenesis of articular chondrocytes: an in vitro study. *J Orthop Surg* 3: 3-17
 17. Munirah S, Kim SH, Ruszymah BH, Khang G (2008) The use of fibrin and poly (lactic-co-glycolic acid) hybrid scaffold for articular cartilage tissue engineering: an in vivo analysis. *Eur Cell Mater* 15: 41-52
 18. Hallmann R, Feinberg RN, Latker CH, Sasse J, Risau W (1987) Regression of blood vessels precedes cartilage differentiation during chick limb development. *Differentiation* 34: 98-105
 19. Hiraki Y, Inoue H, Iyama K, Kamizono A, Ochiai M, Shukunami C, Iijima S, Suzuki F, Kondo J (1997) Identification of chondromodulin I as a novel endothelial cell growth inhibitor. Purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 272: 32419-32426
 20. Moses MA, Sudhalter J, Langer R (1990) Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 248: 1408-1410
 21. Ohba Y, Goto Y, Kimura Y, Suzuki F, Hisa T, Takahashi K, Takigawa M (1995) Purification of an angiogenesis inhibitor from culture medium conditioned by a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. *Biochim Biophys Acta* 1245(1): 1-8
 22. Zelzer E, Olsen BR (2005) Multiple roles of vascular endothelial growth factor (VEGF) in skeletal development, growth, and repair. *Curr Top Dev Biol* 65: 169-187
 23. Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR (2004) VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 131: 2161-2171
 24. Tabata Y, Hijikata S, Ikada Y (1994) Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels. *J Control Release* 31: 189-199
 25. Tabata Y, Ikada Y (1998) Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 31: 287-301
 26. Tabata Y, Nagano A, Ikada Y (1999) Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 5: 127-138
 27. Arevalo-Silva CA, Cao Y, Vacanti M, Weng Y, Vacanti CA, Eavey RD (2000) Influence of growth factors on tissue-engineered pediatric elastic cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 1234-1238
 28. Arevalo-Silva CA, Cao Y, Weng Y, Vacanti M, Rodriguez A, Vacanti CA, Eavey RD (2001) The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Eng* 7: 81-88
 29. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tani M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K (2002) Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth

- factor-2. *Circ Res* 90 : 966-973
30. Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K (2002) Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res* 91 : 923-930
 31. Yonenitsu Y, Sueyoshi K (2004) FGF-2 regulating multiple angiogenic factors in hierarchical mode of action. *J Jpn Coll Angiol* 44 : 151-156
 32. Tabata Y, Nagano A, Ikada Y (1999) Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 5 : 127-138
 33. Victor P. Eroschenko (2000) di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations -ninth edition. Canada, Lippincott Williams & Wilkins, p 44
 34. Junqueira LC, Carneiro J, Contopoulos AN (1977) Cartilage, Basic histology (2nd ED). Los Altos, Lange Medical Publications pp 111-118
 35. Williams PW, Warwick R (1980) Osteology, Gray's Anatomy (36th ED), Edinburgh, Churchill Livingstone, pp 245-252
 36. 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
 37. 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
 38. 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
 39. 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
 40. Ohlsén L, Widenfalk B (1983) The early development of articular cartilage after perichondrial grafting. *Scand J Plast Reconstr Surg* 17 : 163-177