

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

森 廣 政

近畿大学医学部形成外科学教室

抄 録

生分解性ポリマーを自家移植モデルに用いた場合、軟骨再生は不良であるが、その原因は未だ解明されていない。そこで、われわれは、新型ポリマー (PGA-P(LA-CL)) の開発を行ない、自家移植モデルにおけるヒト耳介形状軟骨の再生誘導を試みた。新型ポリマーは、PGA 含有量の異なる 2 種類の生分解性ポリマー (Group 1: PGA 0.2 g-P(LA-CL) 0.05 g および Group 2: PGA 0.4 g-P(LA-CL) 0.05 g) を用いた。実験 1 では、軟骨細胞・ポリマー複合体をヌードマウスに移植した。移植 5 週目に標本摘出を行い、組織学的に検討した。実験 2 では、複合体を自家移植 (イヌ) した。移植 2 週目および 5 週目にて標本摘出し、組織学的検索、抗 CD3 抗体染色および透過型電子顕微鏡を用いた炎症反応の検討を行った。実験 1 の結果より、ヌードマウスモデルでは、新型ポリマーにより軟骨再生の早期誘導を認めた。一方、実験 2 の結果では、軟骨再生は不良であった。炎症性細胞の定量解析を行った結果、PGA 含有量が高い場合、強い炎症性細胞の浸潤が認められた。さらに、抗 CD3 抗体染色および透過型電子顕微鏡による検討から、炎症性細胞の主体は、リンパ球および好中球であると判明した。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た。今後、生分解性ポリマーの炎症反応を阻止する新技術の開発が必要であると考えられた。

Key words: Tissue engineering, 自家移植, 生分解性ポリマー

緒 言

一般的に、軟骨組織の再生誘導では、播種細胞、scaffold, サイトカイン, 血行の 4 因子が重要と考えられている。播種細胞である軟骨細胞に関しては、軟骨細胞の分化・増殖が、軟骨誘導型サイトカイン (bFGF, IGF, TGF- β など) によって調節され、近年、これらサイトカインの種類と順序に関する詳細なプログラムが解明された¹⁻³。また、軟骨基質 (主に collagen type II や aggrecan などの高分子基質) の産生に伴い、その容積が増大することが判明した⁴。したがって、軟骨再生および再生組織における 3 次元形状維持には、これらの軟骨細胞の増殖・分化過程を促進させ、さらに軟骨基質の早期誘導を可能とする構造、分解速度、物理的強度を有し、かつ操作性の優れた scaffold の開発が不可欠と考えられる。

軟骨再生の足場としての scaffold の設計におい

ては、(1)細胞接着が良好である、(2)生分解性ポリマーの分解産物による組織障害や細胞毒性が生じない、(3)scaffold の 3 次元構造が容易に再現性できる、(4)播種細胞への栄養拡散を考慮して、90%以上の多孔性を有する、(5)生体内吸収性である、(6)分解速度が目的に応じて調節できる。などの諸条件を満たす必要があると考えられる⁵。そこで本研究では、これらの条件を満たす至適な生分解性ポリマーとして、PGA⁶ に P(LA-CL) をブレンドした新型ポリマー (PGA-P(LA-CL)) を開発した。この新型ポリマーを用いて、(1)小動物レベル (ヌードマウスモデル) での、ヒト耳介形状軟骨の再生誘導、および(2)大動物レベル (自家移植モデル) におけるヒト耳介形状軟骨の再生誘導を行い、新型ポリマーの有用性について検討した。

方法と材料

生分解性ポリマーの作製

ヒト耳介形状を有する鋳型（1歳女児より採型，長径32×横径20 mm，体積5 cm³）に，PGA 繊維を均一に詰めた．次に，1% poly L-lactide-co-poly ε-caprolactone (P(LA-CL)) ポリマー溶液（溶媒として1,4-dioxaneを使用）を泡立てないように，駒込ピペットにて鋳型に注入した．P(LA-CL)溶液とPGAを混和した鋳型を−40°Cの冷凍庫へ移し，1時間静置した．次に，ポリマーを鋳型より取り出し，40 Pa，−40°C，12時間の条件下に凍結乾燥（TF10-80ATA，宝製作所，東京）処理した．最後に，真空乾燥（70°C，12時間）にてモノマーおよび溶媒除去を行った．

本研究では，PGA量の異なるヒト耳介形状生分解性ポリマー（PGA-P(LA-CL)）を作製した．実験群として，Group 1（低PGA含有群：PGA 0.2 g-P(LA-CL) 0.05 g），およびGroup 2（高PGA含有群：PGA 0.4 g-P(LA-CL) 0.05 g）の2群を設定した．作製したPGA-P(LA-CL)ポリマーの分子量は68,500 Da，空隙率は97%，生体内での分解速度は4～6週となるよう調整した．走査電子顕微鏡（JSM-5800LV，JOEL，東京）を用いて観察したところ，ポリマーの内部は2種類の線維が絡み合った網状の線維構造を示した．また，PGA線維（直径約10～20 μm）は，P(LA-CL)線維（直径約5 μm）によって架橋されていた（図1）．

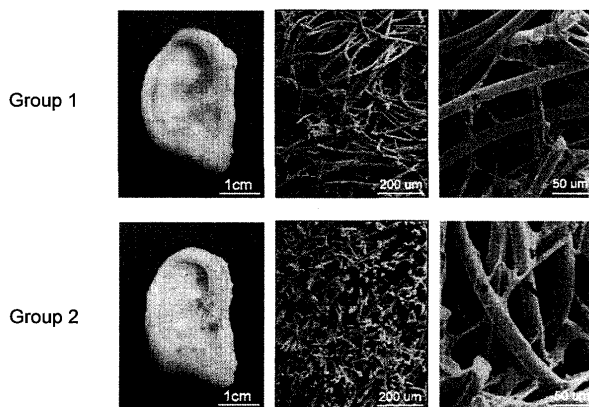


図1 ヒト耳介形状ポリマーの肉眼所見と走査電子顕微鏡所見

上段は，低PGA含有群(Group 1: PGA 0.2 g-P(LA-CL) 0.05 g)．下段は，高PGA含有群 (Group 2: PGA 0.4 g-P(LA-CL) 0.05 g)．

左列：生分解性ポリマーの肉眼所見

中央列：生分解性ポリマーの走査電顕所見 (弱拡大)

右列：走査電顕所見 (強拡大)．2種類のポリマー線維が絡み合った構造を示していた．

(* : PGA線維 (直径約10～20 μm)，矢印 : PGA線維を架橋するP(LA-CL)線維 (直径約5 μm)．

軟骨採取および軟骨軟骨細胞・ポリマー複合体の作製

睡眠導入は，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行なった．次に，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)を用いて静脈麻酔を行った．イヌ耳介から皮膚，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⁷⁾，採取軟骨は，5×5 mmの大きさに細切し，0.3%コラゲナーゼ(collagenase type II, Worthington, Lakewood, NJ)にて酵素処理(37°C，12時間)した．ナイロンメッシュ(pore size: 300 μm)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)を加えて酵素反応を停止させた．得られた細胞浮遊液は，Ca⁺⁺，Mg⁺⁺不含リン酸緩衝液(10X-PBS(-), Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, Grand Island, NY)を用いて3回洗浄・遠心(4°C，2000 rpm，10分)した．軟骨細胞数は，色素排除法を用いて測定した．まず，0.4%トリパンブルー液(Gibco, Grand Island, NY)を用いて染色した後，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．

次に，ヒト耳介形状を有する生分解性ポリマーにイヌ耳介軟骨細胞を播種して，複合体を作成した．軟骨細胞の播種濃度は，100×10⁶個/mlに調節し，ピペットにて生分解性ポリマーに播種した．細胞をポリマー表面に接着させるため，複合体をインキュベーター内(37°C，5% CO₂)にて約4時間静置した．その後，細胞培養液(F-12，アスコルビン酸50 μg/ml，ペニシリン100 units/ml，ストレプトマイシン100 μg/ml，アンホテリシンB 0.25 μg/ml，10% FBS)を加え，インキュベーター内(37°C，5% CO₂，1週間)で培養した．培養液の交換は週2回行った．

実験1：ヌードマウスモデルにおける再生耳介形状軟骨の検討

実験動物

実験動物は，BALB/c Slcヌードマウス(4～6週齢，雄，日本クレア株式会社，静岡)を用いた．ヌードマウスの飼育環境は，クリーンラック内にて，室温22°C，湿度50%，12時間の明暗周期とした．飼育は，放射線(3 mG)にて滅菌された固形飼料(CL-2，日本クレア株式会社，静岡)を与え，また，飲料用水道水は制限なく与えた．

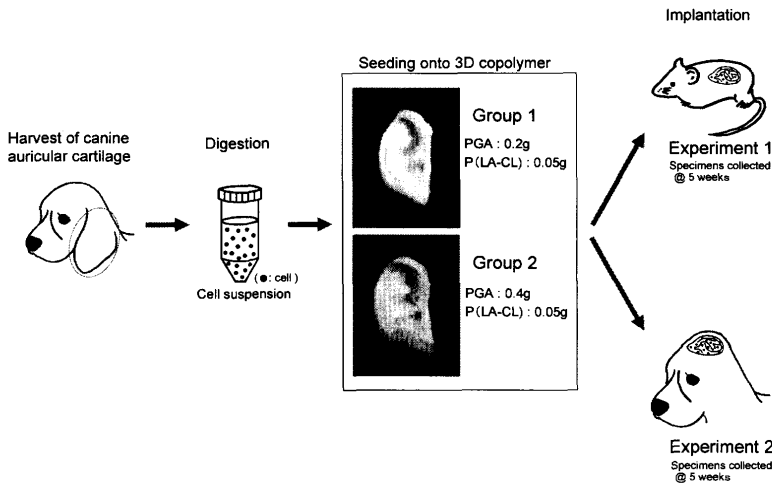


図2 実験プロトコール

実験方法

複合体をヌードマウスの背部皮下に移植した。移植操作では、まずエーテル吸入による深麻酔を行った。次に、ヌードマウスの背部をポピドンヨード（イソジン®、明治製薬株式会社、東京）にて消毒し、ヌードマウス背部に約2 cmの切開を加えた。皮下剥離して形成したポケット内に複合体を挿入した。5-0ナイロン縫合糸（シグマ、東京）を用いて閉創を行った。移植後5週目（n=3）に標本を採取して、再生耳介形状軟骨の形状計測、組織学的検討、RT-PCRを行った（図2）。

形状計測：耳長（耳上点と耳下点間を結ぶ長さ、40 mm）、耳幅（上耳底点と下耳底点とを結び、それに直交して最大の幅となる長さ、24 mm）、耳輪（6 mm）および耳甲介腔の厚さ（3.5 mm）を計測した。

組織学的検討：摘出標本を10%ホルマリンにて浸漬固定し、エタノール系列により脱水した後、パラフィン切片（厚さ4 μm）を作成した。染色は、一般的な組織構成および異調染色性（メタクロマジー）を評価するため、toluidine blue 染色を施した。

RT-PCR：凍結保存した組織に ISOGEN®（和光純薬、大阪）を加え、POLYTORON®(PT-MR300, Kinematica AG, Switzerland)にてホモジナイズした。ホモジナイズした溶液1 ml に対し、0.2 ml の chloroform を加えて15秒攪拌・3分静置（室温）後、遠心（4℃, 12000 rpm, 15分）し、上層を抽出した。さらに、0.5 ml の isopropanol を加えて10分静置（室温）後、遠心分離した（4℃, 12000 rpm, 10分）。得られた沈殿に、70% ethanol を1 ml 加えて洗浄した。75% ethanol を除去し、15分間自然乾燥させ、RNA を抽出した。これを蒸留水（deionized sterile 0.5M EDTA (pH8.0), 和光純薬、大阪）に溶解した。260 nm での吸光度をもとに、吸光度計（U-300 Spectrophotometer, 日立、東京）を用いて RNA

濃度を測定した。RT-PCR は、RT-PCR kit（タカラバイオ株式会社、滋賀）を用いた。抽出した RNA 1 μl に対し、MgCl₂ (2 μl), 10×RT buffer (1 μl), RNase Free dH₂O (3.75 μl), dNTP Mixture (1 μl), RNase Inhibitor (0.25 μl), Reverse Transcriptase (0.5 μl), Oligo dT-Adaptor Primer (0.5 μl) を加えて、総量10 μl に調製した。サーマルサイクラー（T3 thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany）の条件は、30℃で10分間、50℃で30分間、95℃で2分間、5℃で5分間を1サイクルで逆転写反応を行った。次に、反応液に5×PCR Buffer (10 μl), 滅菌水 (28.75 μl), TaKaRa Ex Taq HSTM (0.25 μl), および、sense primer と antisense primer (20 μM, 0.5 μl) を加えて、総量40 μl に調製した。サーマルサイクラーの条件は、PCR 初期活性化ステップが94℃で2分、さらに、3ステップのサイクリング（変性は94℃で30秒、アニーリングは primer ごとに collagen type II が52℃, aggrecan と GAPDH が62℃で30秒、伸長反応は72℃で40秒）を32サイクル、最終伸長反応を72℃で5分とした。primer は、aggrecan では、sense primer : 5'-AGG-CAACCTCCTAGGCGTGC-3', antisense primer : 5'-CTTCTCGGGCTCCGGGACAA-3', collagen type II では、sense primer : 5'-GACATAATCTGTAATCTGTGAAGACATG-3', antisense primer : 5'-GCGCCTTTTTCACCTTTGT-3', GAPDH では、sense primer : 5'-CCTGGTCACCAGGGCTGCTT-3', antisense primer : 5'-GGAGCAGAGATGATGACCCTC-3', に設計（北海道システム・サイエンス株式会社）して使用した。PCR 産物を、エチジウムブロマイド含有アガロースゲルのウェルにいれ、電気泳動（100 V, 20分, Mupid ミニゲル泳動槽, アドバンス, 東京）を行い、バンドを検出（Gel Doc 2000, 日本バ

イオラッド, 東京) した。

実験2: 自家移植モデル (イヌ) における再生ヒト耳介形状軟骨の検討

実験動物

実験動物は, イヌ (ビーグル, 4~6 週齢, 雌, 浜口動物, 兵庫) を用いた。飼育は, 個別ゲージ内で室温23°C, 湿度50%, 12時間明暗サイクルの条件下で行い, 飼料は, 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, 飲料用水は制限なく与えた。

実験方法

イヌ耳介より採取して作成した複合体を, 同一個体の頭頂部 (浅および深側頭筋膜の間) に自家移植した。まず, 塩酸ケタミン (ケタラル®[®], 15 mg/kg, 三共株式会社, 東京) の殿部筋肉注射を行い, 次に, 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) を用いて静脈麻酔を行った。頭部を剃毛後, 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。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, 後頭部に約5 cm の皮膚切開を加えた。浅および深側頭筋膜の間を剥離し, 複合体を移植した。5-0ナイロン縫合糸 (シグマ, 東京) にて閉創した。移植2週目 (n=3) および5週目 (n=3) に標本を採取し, 組織学的検討および透過型電子顕微鏡を用いて軟骨組織の再生誘導過程を検討をした。

組織学的検討: 実験1と同様に, 摘出標本を10%ホルマリンにて浸漬固定し, エタノール系列により脱水, パラフィン切片 (厚さ4 μ m) の作成, toluidine blue 染色を行った。さらに, 炎症性細胞 (特にリンパ球) について評価するため, 抗CD3抗体 (A0452, Dako Cytomation, Denmark) による免疫染色を施した。

透過型電子顕微鏡による検討: 採取組織を2.5%グルタルアルデヒド液および1%四酸化オスミウムにて浸漬固定 (4時間) し, 0.5%酢酸ウラン水溶液にてブロック染色を行った。エチルアルコール系列にて脱水した後, プロピレン・エポキシ樹脂混合液にて包埋したものをマイクロトームで薄切して切片を作成した。切片には, 酢酸ウランおよび鉛による二重染色を施し, 透過型電子顕微鏡 (H-7100, 日立製作所, 東京) にて観察を行った。

統計処理

実験1では, 摘出標本の4箇所 (耳長, 耳幅, 耳輪および耳甲介腔の厚さ) を計測し, 平均値と標準偏差を算出した。実験2では, toluidine blue 染色した組織標本より, 無作為に10視野 (1視野: $9 \times 10^4 \mu\text{m}^2$) を選択し, リンパ球, マクロファージ, および好中球の細胞数を測定し, その平均値および標準偏差を算出した。計測したデータはKruskal-Wallis test を行い, 続いてScheffe's F test による多重比較検定を用いて統計学的有意差を検討した。

結 果

ヌードマウスモデルにおける再生耳介形状軟骨の検討

肉眼的所見: 肉眼的に, ヒト耳介形状軟骨に認められる複雑な立体構造の再現性を評価した。その結果, Group 1 (低PGA含有群) およびGroup 2 (高PGA含有群) の両群において, 摘出した複合体は白く光沢のある外観を呈していた。また, ヒト耳介特有の形状的特徴は, 突出部 (耳輪, 対耳輪など) および陥凹部 (舟状窩, 三角窩・耳甲介腔など) に

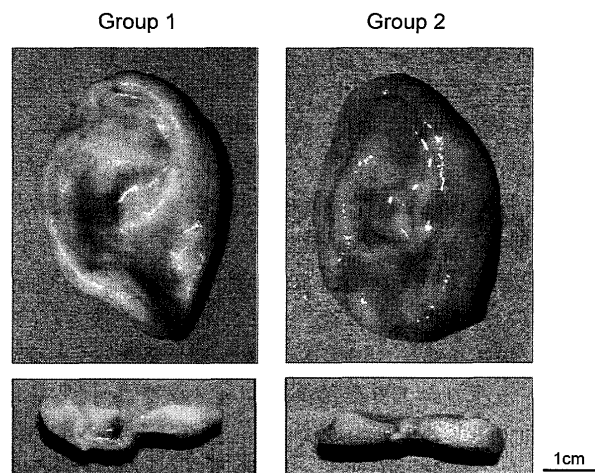


図3 ヌードマウスを用いたヒト耳介形状再生軟骨の肉眼所見
移植5週目のヒト再生耳介形状軟骨の標本全体像 (上段), および断面像 (下段) を示す。ヒト耳介特有の形状的特徴は, 比較的良好に維持されていた。

表1 ヌードマウスモデルを用いたヒト耳介形状再生軟骨の形状計測結果

	Length (mm)	Width (mm)	Thickness (mm)	
			Helix	Concha
Group 1	44.5 \pm 2.4	22.4 \pm 1.6	6.7 \pm 0.9	2.6 \pm 0.4
Group 2	43.0 \pm 2.0	25.7 \pm 1.0	6.7 \pm 0.6	2.6 \pm 0.3

Values are expressed as mean \pm S.E. (n=3)

において、比較的良好に維持されていた (図 3)。

形状計測：設定した 4 箇所の計測点 (耳長, 耳幅, 耳輪および耳甲介腔の厚さ) において, Group 1 (低 PGA 含有群) と Group 2 (高 PGA 含有群) の間に有意な差は認められなかった。しかし, Group 2 (高 PGA 含有群) では, Group 1 (低 PGA 含有群) に比較して, 耳長が短く, 耳幅は広くなる傾向を認めた (表 1)。厚さにおいて, 明らかな変化は認められなかった。

組織学的所見：toluidine blue 染色による移植後 5 週目の摘出標本では, 両群において複合体辺縁部に強い異調染色性が観察された。強い染色性を示す領域のさらに外側には, 異調染色性が弱く, 主に線維成分から構成される膜様構造を認めた。Group 2 (高 PGA 含有群) では, Group 1 (低 PGA 含有群) に比較し, 軟骨の再生誘導はより良好であった。この結果から, 新型ポリマーによる軟骨組織の再生誘導は, ノードマウスモデルにおいて極めて良好であ

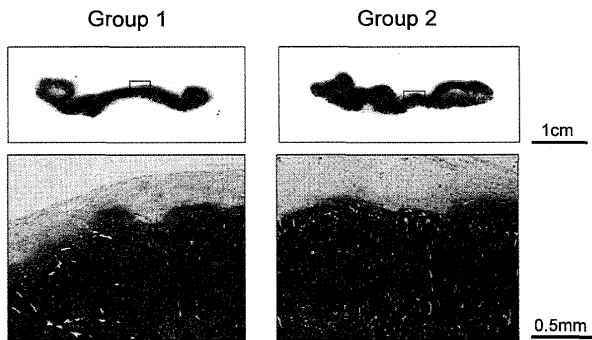


図 4 ノードマウスを用いたヒト耳介形状再生軟骨の組織所見
移植 5 週目の組織所見を示す。上段は断面像 (toluidine blue 染色, 1×), 下段は拡大組織像 (toluidine blue 染色, 200×)。両群において複合体辺縁部に強い異調染色性が観察された。高 PGA 含有群では, 低 PGA 含有群に比較して軟骨の再生誘導は良好であった。

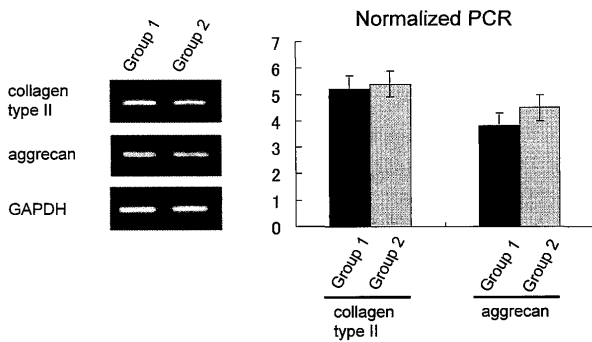


図 5 RT-PCR
RT-PCR 法および Real time RT-PCR 法を用いて, 移植 5 週目のヒト耳介形状再生軟骨における aggrecan および collagen type II の遺伝子発現を検討した。(n=3)。

り, 特に PGA 含有量が高いほど, より早期の軟骨組織の再生誘導が生ずることが判明した (図 4)。

RT-PCR：RT-PCR を用いて, 軟骨マーカーである collagen type II および aggrecan の遺伝子発現を検討した。その結果, collagen type II および aggrecan の遺伝子発現は, いずれの群においても良好な発現を示した。また, Group 2 (高 PGA 含有群) において, 遺伝子発現は up regulation される傾向が認められた (図 5)。

自家移植 (イヌ) モデルにおける再生耳介形状軟骨の検討

肉眼所見および組織学的所見：移植後 5 週目の摘出標本の肉眼所見では, Group 1 (低 PGA 含有群) および Group 2 (高 PGA 含有群) の両群において, 複合体は厚い被膜に覆われ, ヒト耳介形状特有の 3 次元構造を維持していなかった (図 6 上)。toluidine blue 染色による組織所見を図 6 に示す。複合体は, 全体的に弱い異調染色性を示し, 軟骨組織の再生誘導は極めて不良であった。しかし, Group 1 (低 PGA 含有群) および Group 2 (高 PGA 含有群) とともに,

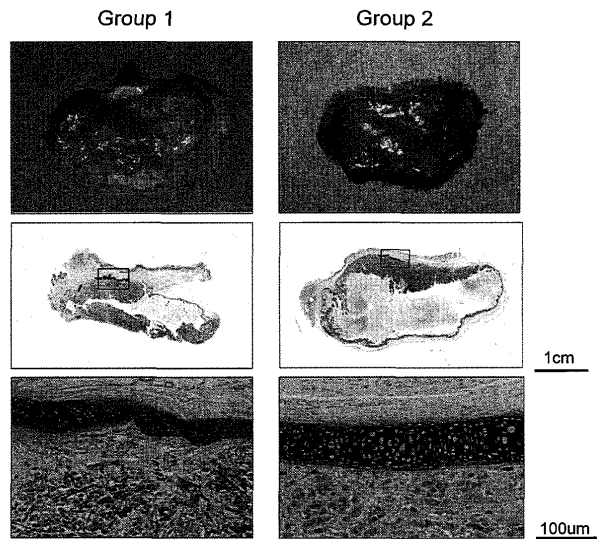


図 6 自家移植モデルを用いた細胞・ポリマー複合体の肉眼所見および組織所見
上段：細胞・ポリマー複合体の肉眼像
中段：細胞・ポリマー複合体 (toluidine blue 染色)
下段：toluidine blue 染色, 100倍。
標本の摘出は移植 5 週目で行った。肉眼所見では, 複合体は厚い被膜に覆われ, ヒト耳介形状特有の 3 次元構造を維持していなかった。また, 全体的に弱い異調染色性を示し, 軟骨組織の再生誘導は極めて不良であった。複合体には PGA 線維が残存し, その周囲には多数の多核巨細胞と炎症性細胞の浸潤が認められた。

複合体の表層の一部においてのみ、lacunae を有する円形の軟骨様細胞が認められた。また、その周囲には異調染色性を示す領域が観察された (図6中)。両群の複合体には PGA 線維が数多く残存し、その周囲には多数の多核巨細胞と炎症性細胞の浸潤が認められた。多核巨細胞が PGA 線維を取り囲んでいることから、この反応は、PGA に対する貪食作用であると考えられた (図6下)。Group 2 (高 PGA 含有群) では、複合体に残存する PGA 量が比較的少なく、有意に高い炎症性細胞の浸潤と豊富な線維成分が観察された (図7)。また、複合体への細胞浸潤をさらに詳細に検討するため、抗 CD3 抗体による免疫染色を行った。抗 CD3 抗体染色では、リンパ球の細胞表面マーカーが特異的に染色されることから、Group 2 (高 PGA 含有群) の複合体に浸潤している多数の炎症性細胞は、抗 CD3 抗体染色に陽性を示すリンパ球であることが判明した (図7)。これらの結果より、PGA 含有量が高くなる場合、炎症反応は増強し、生分解性ポリマーの分解・貪食が促進され、その結果、生分解性ポリマーが線維組織に置換された過程が推測された。

透過型電子顕微鏡所見：透過型電子顕微鏡を用いて、複合体における炎症性細胞の浸潤および炎症反応について検討した。その結果、Group 2 (高 PGA 含有群) および Group 1 (低 PGA 含有群) の両群において、PGA 線維は多核を有する巨大細胞に取り囲まれていた。巨大細胞の微細構造を検討したところ、不均一な細胞形状を示し、核周囲にクロマチンが存在していた。細胞質は豊富で、核の直径は約 5~10 μ m であった。これらの形態学的特徴から、巨大細胞はマクロファージ由来の異物巨細胞と考えられた。さらに複合体の内部には、小円形で、クロマチンが豊富な核を持ち、細胞質量が少なく、直径約 5~8 μ m の細胞が浸潤していた。この細胞はリンパ球と考えられ、Group 1 (低 PGA 含有群) に比較して、Group 2 (高 PGA 含有群) において数多く観察された (図8)。

炎症性細胞の定量解析：移植 2 週目および 5 週目において、複合体に存在する炎症性細胞数 (リンパ球、マクロファージ、および好中球) を計測した。リンパ球数の変化では、Group 1 (低 PGA 含有群) において、経時的に有意な減少が認められた。一方、

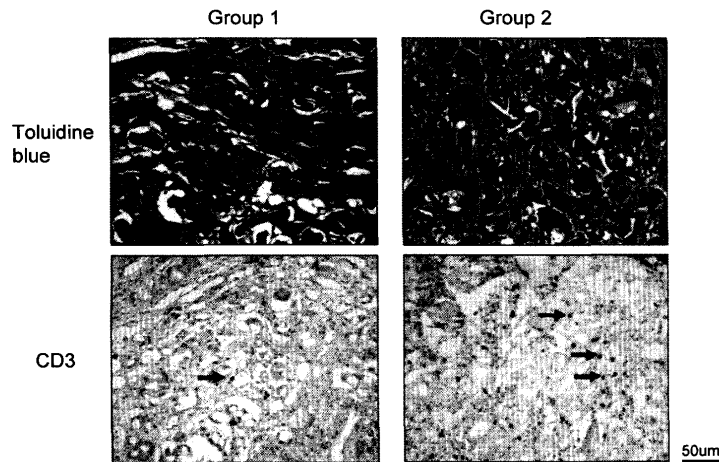


図7 toluidine blue 染色および抗 CD3 抗体染色を用いた細胞・ポリマー複合体の組織所見 (上段：toluidine blue 染色、200倍、下段：抗 CD3 抗体染色、200倍) toluidine blue に濃染した PGA 線維 (*) を認める。その周囲に PGA 線維を取り囲む様にマクロファージ (多核巨細胞) を認めた。また、抗 CD3 抗体染色で陽性を示すリンパ球 (矢印) が確認された。抗 CD3 陽性細胞は、高 PGA 含有群では、低 PGA 含有群に比較して有意に高い浸潤を示した。

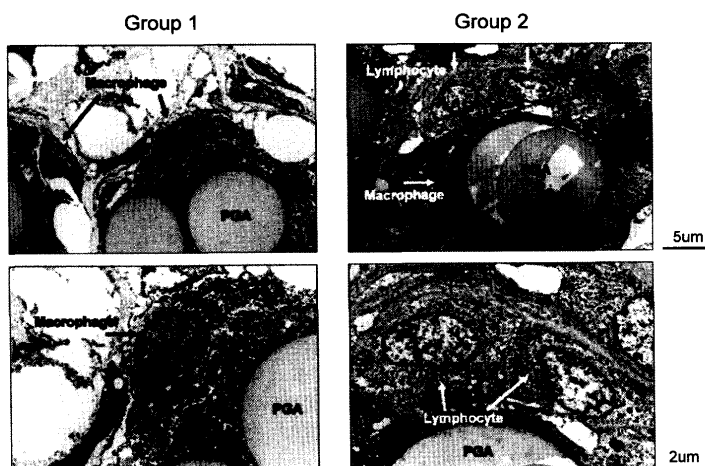


図8 細胞・ポリマー複合体における炎症性細胞浸潤の検討 (上段：1500倍、下段：3000倍) 透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、複合体の炎症性細胞浸潤を検討した。PGA 線維を取り囲む多核を有する巨大細胞は、形態学的特徴からマクロファージ由来の異物巨細胞と考えられた。さらに、リンパ球と考えられる細胞が浸潤していた。その細胞は、低 PGA 含有群に比較して、高 PGA 含有群において数多く観察された。

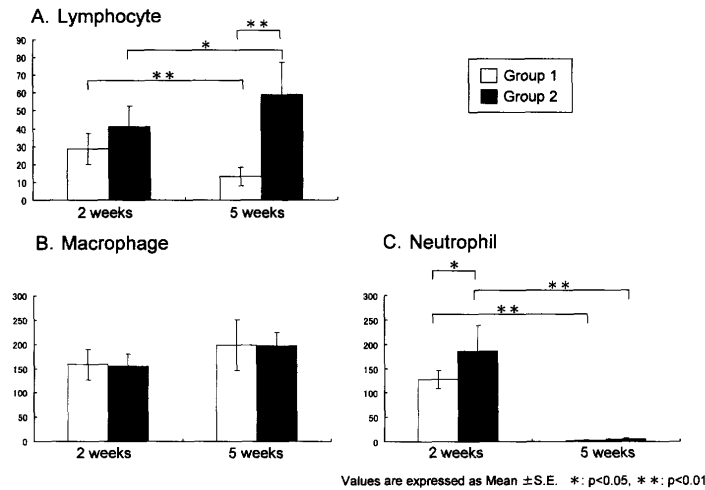


図9 細胞・ポリマー複合体のリンパ球，マクロファージおよび好中球の定量解析
 移植2週目および5週目において，複合体に存在する炎症性細胞数を計測した(A：リンパ球数，B：マクロファージ数，C：好中球数)．移植5週目において，高PGA含有群におけるリンパ球数は，低PGA含有群と比較して，有意に高い値を示した．好中球数は，移植2週目において，高PGA含有群は，低PGA含有群と比較して有意に高い値を示した．しかし，移植5週目では，両群ともに好中球数は著明に減少していた．グラフの値は平均値±標準誤差で示す (n=10)
 * : p<0.05, ** : p<0.01 (有意差検定は，各群における移植2週目と5週目の間，移植2週目および5週目におけるGroup 1 (低PGA含有群) と Group 2 (高PGA含有群) の間で行った.)

Group 2 (高PGA含有群) では，有意なリンパ球数の増加が認められた．また，移植5週目において，Group 2 (高PGA含有群) におけるリンパ球数は，Group 1 (低PGA含有群) に比較して，有意に高い値を示した．マクロファージ数の変化では，両群ともに経時的に増加する傾向を示した．しかし，両群間において有意な差は認められなかった．好中球数の変化では，移植2週目において，Group 2 (高PGA含有群) が，Group 1 (低PGA含有群) に比較し，有意に高い値を示した．しかし，移植5週目では，両群ともに好中球数は著明に減少していた (図9)．

考 察

1997年Caoらは，生分解性ポリマー (poly glycolic/poly lactic acid, PGA/PLA) に軟骨細胞 (仔牛関節より採取) を播種して軟骨細胞・ポリマー複合体 (以下，複合体と略す) を作成した．これをヌードマウス皮下に移植して，ヒト耳介特有の形態を有する軟骨組織を再生した．しかし，この研究では，3次元形状維持にステントを必要とし，ポリマー単体による長期的な形状維持は不可能であった⁸．2004年Isogaiらは，細胞接着性，伸縮性，物理的強度，分解速度を考慮した新しい生分解性ポリマー (poly(L-lactide-ε-caprolactone), P(LA-CL)) を開発して，これまで困難とされてきたヒト耳介形状軟骨の長期的形状維持をヌードマウスモデルで可能とした⁹．

一方，自家移植モデルでヒト耳介形状軟骨の再生誘導を試みた結果が，近年報告されるようになった．2000年Saimらは，hydrogel (Pluronic F-127) を用いて軟骨再生を試みた．しかし，軟骨再生および3次元形状維持は不良であった¹⁰．2004年Shiehらは，3種類の生分解性および非生分解性ポリマー (PGA, PCL, P-4HB) を導入して軟骨再生を試みたが，軟骨再生および形状維持ともに不良であった¹¹．また，2004年Kamilらは，生分解性ポリマーと軟骨細胞を組み合わせた複合体を，特殊加工した鋳型 (金製) の中で培養して軟骨再生を試みた．しかし，この研究においても，ヒト耳介形状軟骨の長期形状維持は不可能であった¹²．これらの実験結果から明らかのように，ヌードマウスモデルを用いた場合には，臨床的に必要な大きさと複雑な3次元形態を長期的に維持する耳介軟骨の再生は可能となった．しかし，自家移植モデルにおいては，未だに，立体的な軟骨組織の再生誘導に成功した報告は認められていない．このため，自家移植モデルを用いた軟骨再生誘導に関与する諸因子の再検討が，現在，重要な研究課題となっている．

PGAは，一般に細胞接着が良好であるが，不織布のため，ヒト耳介特有の3次元構造を作りやすく，外力に対し弱い欠点が指摘されている．また，分解速度が早い (4~6週) ため，再生組織の長期的形状維持は困難である⁸．一方，PLLAは，高い力学的強度を持ち，3次元構造を作ることが容易である．

しかし、細胞接着は不良であり、分解速度は2年以上と極めて遅い¹³。PCLは、弾力性に富み、それらの中間速度で分解される¹⁴。これらの生分解性ポリマーは、単体のみでなく組み合わせることで、おのおのの特徴をポリマーに付加することができる¹⁵。今回試作した新型ポリマーは、細胞接着の点から軟骨再生に至適な性状を有するPGAに、加工が容易で長期的形状維持を可能とするP(LA-CL)を加え、物理的結合を強化して作製した。

実験1では、この新型ポリマーを用いて、ヌードマウスモデルにて軟骨再生を行った。移植5週目において、再生誘導された耳介形状軟骨組織は、肉眼的、組織学的に正常の耳介軟骨組織に近似していた。また、遺伝子発現の検討では、collagen type IIおよびaggrecanの良好な発現を認めた。従来の生分解性ポリマーを用いたヒト耳介形状軟骨の再生誘導に要する期間は、移植後12週であった^{8,9,11,16,17}。一方、今回試作した新型ポリマーでは、再生軟骨組織が移植後早期(5週)に再生誘導されることがわかった。さらに、PGA含有量が高いほど細胞外基質の産生は良好であることが判明した。このことから、軟骨組織を再生誘導する上で、PGAは至適な生分解性ポリマーであり、PGAの含有量は軟骨再生において、促進的に作用することが示唆された。

一方、実験2では、実験1と同様の生分解性ポリマーを使用して軟骨再生を試みた。しかし、摘出組織にわずかな再生軟骨組織を認めるのみで、軟骨再生は不良であった。摘出組織には、リンパ球、好中球、およびマクロファージの浸潤を認めたため、軟骨再生が不良となる原因として、生分解性ポリマーに対する炎症反応が考えられた。細胞・ポリマー複合体の移植時における炎症反応を、Jamesら¹⁸は3つのPhaseに分類して報告した。Phase1では、主に好中球が複合体に遊走する。これは移植組織に対する炎症反応であり、この過程は約2週間と報告されている。Phase1では、好中球およびリンパ球量がピークを迎える。Phase2では、好中球およびリンパ球量は漸減し、代わりにマクロファージ量が増加する。マクロファージは複合体を貪食し、生分解性ポリマーの分解を促す。Phase2の過程は、生分解性ポリマーの分解速度に比例するため、分解速度の早い生分解性ポリマー(例えば、PGA)ではPhase2が短く、PLLAやPCLなどの分解速度の遅い生分解性ポリマーでは、Phase2が遷延する。Phase3では、マクロファージ量は漸減し、線維芽細胞量が増加する。Phase2で分解されたポリマーの間隙は、Phase3における繊維化により置換される。そのた

め、Phase3の過程は、ポリマー分解産物の残存量に影響される。

摘出標本における複合体の好中球数、リンパ球数、およびマクロファージ数を計測したところ、移植2週目(Phase1)において、好中球数は、Group2(高PGA含有群)において有意に増加していた。また、同時にリンパ球数も増加する傾向を示した。移植5週目(Phase2)では、好中球は急激に減少したが、これに対してリンパ球数は有意な増加を示した。これらの結果より、Group2(高PGA含有群)では、強い炎症反応が生じ、遷延する組織反応に伴ってリンパ球が増加したと考えられた。自家移植モデルにおいて生じた炎症反応は、軟骨再生を抑制すると考えられた。また、炎症反応の強さは、生分解性ポリマーに含まれるPGA量と正の相関を示すことが示唆された。

近年、生分解性ポリマー(特にPGAおよびPLA)による炎症反応が、組織再生の誘導過程を障害する因子として問題化している。2005年Rotterらは、PGA-PLAをscaffoldとして、自家移植モデル(ブタ)で軟骨の再生誘導を行った。その結果、複合体組織にIL-1 α が増加したことから、IL-1 α により軟骨の再生誘導が抑制されることを示唆した¹⁹。また、2006年Ceonzoらは、ネズミ腹腔内にPGAを注入した。注入したPGAは加水分解される際に、補体活性化経路を刺激し、その結果、局所での炎症反応を引き起こされる可能性について報告した²⁰。さらに、2006年Martinらは、ネズミの背部皮下にPLGAを挿入すると、好中球の浸潤量が増加することを報告した²¹。本研究では、ヌードマウスモデルにおいて、PGAは良好な軟骨再生を誘導するが、一方、自家移植モデルでは、リンパ球を主体とした炎症反応を引き起こし、軟骨の再生誘導を抑制する因子の一つとなることが示唆された。自家移植によるヒト耳介形状軟骨の再生誘導を円滑に導くためには、生分解性ポリマーによる炎症反応を阻止するための新技術の早急な開発が必要であると考えられた。

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. 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
2. 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
3. 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
 4. Lee V, Cao L, Zhang Y, Kiani C, Adams ME, Yang BB (2000) The roles of matrix molecules in mediating chondrocyte aggregation, attachment, and spreading. *J Cell Biochem* 79 : 322-333
 5. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, Langer R (1994) Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Bio/technology* 12 : 689-693
 6. Freed LE, Marquis JC, Nohria A, Emmanuel J, Mikos AG, Langer R (1993) Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 27 : 11-23
 7. Klagsburn M (1979) Large-scale preparation of chondrocytes. *Meth Enzymol* 58 : 560-564
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP (2004) Tissue engineering auricular reconstruction: in vivo and in vitro studies. *Biomaterials* 25 : 1545-1557
 12. 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
 13. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Martin DP, Daebritz S, Mayer JE Jr, Vacanti JP (2000) Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. *ASAIO J* 46 : 107-110
 14. Yang S, Leong KF, Chua CK (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 7 : 679-689
 15. Brodbeck WG, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats NP, Anderson JM (2002) Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine* 18 : 311-319
 16. Kamil SH, Vacanti MP, Vacanti CA, Eavey RD (2004) Microtia chondrocytes as a donor source for tissue-engineered cartilage. *Laryngoscope* 114 : 2187-2190
 17. Baek CH, Ko YJ (2006) Characteristics of tissue-engineered cartilage on macroporous biodegradable PLGA scaffold. *Laryngoscope* 116 : 1829-1834
 18. James AM, Matthew SS (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 28 : 5-24
 19. Rotter N, Ung F, Roy AK, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA, Bonassar LJ (2005) Role of interleukin 1 α in the inhibition of chondrogenesis in autologous implants using polyglycolic acid-poly(lactic acid) scaffolds. *Tissue Engineering* 11 : 192-200
 20. Ceonzo K, Gaynor A, Shaffer L, Kojima K, Vacanti CA, Stahl GL (2006) Polyglycolic Acid-induced inflammation: Role of hydrolysis and resulting complement activation. *Tissue Eng* 12 : 301-308
 21. Martin R, Matthias WL, Dominik J, Carlos C, Alexander S, Rolf M, Nils-Claudius G, Michael DM (2006) Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold of mice. *Biomaterials* 27 : 5027-5038