

博士論文

論文題目 軟骨再生のための塩基性線維芽

細胞増殖因子(b-FGF)の

徐放化至適量に関する基礎的研究

氏名 大谷 祐之

目次

略語一覧	4
I. 要旨	5
II. 序文	6
III. 方法	
耳介軟骨細胞の単離	15
単層細胞培養	16
ゼラチン／ β -TCP 複合体足場の作製	17
b-FGF の徐放化	18
細胞播種	18
同系移植	19
移植片摘出	19
形態学的・組織学的検討	19
蛍光免疫染色	20
Protein assay	21
DNA 定量	22
F4/80 免疫組織化学的染色	22
統計学的解析	23

IV. 結果

単層培養細胞	24
肉眼的形態所見	24
再生組織の重量	25
組織学的所見	27
蛍光免疫染色所見	29
グリコサミノグリカン(GAG)定量	30
2型コラーゲン定量	31
再生組織の総 DNA 量	32
再生組織 1mg あたりの DNA 量	33
F4/80 免疫組織化学的染色像, 染色陽性/陰性細胞数	34
V. 考察	36
VI. 謝辞	44
VII. 引用文献	46
VIII. 図表	56

略語一覧

b-FGF	basic fibroblast growth factor 塩基性線維芽細胞増殖因子
β -TCP	beta-tricalcium phosphate β -リン酸三カルシウム
PGA	polyglycolic acid ポリグリコール酸
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium ダルベッコ変法イーグル培地
PBS	phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水
H&E	hematoxylin and eosin ヘマトキシリン・エオジン
GAG	glycosaminoglycan グリコサミノグリカン
iPS	induced pluripotent stem cells 人工多能性幹細胞
EOG	ethylene oxide gas エチレンオキシドガス
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole ジアミジノフェニルインドール
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay 酵素結合免疫吸着測定法
ABC	Avidin-Biotinylated enzyme Complex アビジン・ビオチン標識酵素複合体
DAB	diaminobennzidine ジアミノベンジジン

I. 要旨

Tissue Engineering の技術を用いた軟骨再生には、徐放化 b-FGF 投与が有用とされているが、その徐放量に関してはまだ一定の見解が示されていない。本研究では、b-FGF 徐放化ゼラチン/β-TCP 複合体足場の有用性と、軟骨再生過程について検討した。

b-FGF 徐放量は 0,10,100,500,1000,2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ として、近交系マウスの耳介軟骨細胞を分離培養、足場に 10×10^6 cells/ cm^3 で播種し、同系移植した。2,4,6 週後に移植片を摘出した。再生組織内の軟骨基質・細胞数・マクロファージの増加が確認された。徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与により、移植 4 週で再生軟骨が形成可能であった。本研究から b-FGF の徐放化至適量は、100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ が適当であることが示唆された。

II. 序文

1993年、組織工学 Tissue Engineering の概念がアメリカの医師 Vacanti JP と工学博士 Langer らによって提唱された[1]. 細胞・足場・生理活性物質により人工的に組織そして臓器を再生させる、この Tissue Engineering の技術は再生医療に必要不可欠であり、その研究発展は目覚ましく、さまざまな領域の報告がなされている。

再生医療の臨床応用は早々に実現化が進むと考えられ、移植ドナー不足の解消など期待は大きかった。しかし再生医療が産業化され、新たな治療技術として臨床応用されている分野は、現在、皮膚・軟骨・血管などに限定されている。今日の医療技術でも難治性で病悩し続けている患者のためにも、さらなる研究の発展と、臨床応用へ繋げることは、急務である。

当小児外科研究室では、2002年より、再生医療による気管軟骨および気道再生の研究を行ってきた[2-7].

気管の再建を必要とする疾患は、成人では気道外傷や甲状腺癌、抜管困難症などがあり、小児では先天性あるいは後天性の気管狭窄症、重症気管軟化症、気管無形成などが挙げられる。気管気管支を切除する際には、端々吻合あるいは端側吻合を行うことが理想的である。病変部の切除範囲が長い症例では、成人で気管全長の 1/2 以上の端々吻合は不可能とされている[8]. さらに小児では、端々吻合が可能な範囲

は約 1/3 までの気管切除に留まるとされている[9]. 気管狭窄症においては、スライド気管形成術が標準術式ではある. しかしながら気管全長にわたる狭窄や気管分岐部に及ぶ狭窄などの重症例に対しては、様々な術式が工夫されているものの、ゴールドスタンダードな術式確立には至っていない.

気管の切除・端々吻合が困難な場合、気道再建が必要となる. 自己の代替組織を用いたものとして、心膜・骨膜・肋軟骨・筋膜・軟骨組織片・皮下組織などを採取しての patch 再建の報告がみられる[10]. また人工物補填(人工気管・ハイブリッド型人工気管), 気管の同種移植なども試みられてきた. しかしいずれも機能的に十分な気道再建までには至らず、満足される結果は得られていない. 近年、組織工学の技術を用いた再生軟骨や、iPS 細胞をはじめとする細胞療法による治療方法の開発研究がなされている.

組織工学的技術を用いた気道再建については、1994 年に Vacanti CA と Sakata らによって最初に報告された[11]. 彼らは新生仔ウシ関節軟骨を分離培養、Polyglycolic acid(PGA)メッシュに播種し、無胸腺マウス皮下に移植した. さらに再生した軟骨からラット腸管で再生気管を作成し無胸腺ラットの気管に移植している.

最初の臨床応用例としては、Macchiarini らは 2004 年に患者の横紋筋細胞と線維芽細胞を、ブタ腸管を脱細胞化したコラーゲンマトリックス足場に播種させ、気管 patch として移植した[12]. 彼らは 2008 年にも、患者の軟骨分化誘導した骨髄細胞と粘膜上

皮細胞を脱細胞化した屍体気管に播種させ、気管支へ移植したことを報告している [13].

Nakamura, Omori らは非吸収性ポリプロピレン足場を用いた気管 patch に線維芽細胞の遊走と粘膜上皮の再生がみられ、硬さも保持されたことを報告した[14]. さらに甲状腺癌などの気管壁合併切除後の気管 patch として臨床応用されている[15].

当研究室の Komura らは、2008 年に家兎耳介軟骨細胞から組織工学的に再生軟骨を作成した. 耳介軟骨を採取し分離直後の細胞を、PGA メッシュへ 10×10^6 cells/cm³ で播種し、無胸腺マウスに移植した. 移植後 6 週で、軟骨再生を認め、グリコサミノグリカン産生量、ヤング率は、家兎と同等であることを確認している[16].

また、気道再建のための三層構造(L 乳酸とカプロラクトン重合体/PGA/コラーゲンシート)のステント系吸収性足場の開発も報告している[2]. 家兎耳介軟骨を分離培養し、このステント系足場に 50×10^6 cells/cm³ で細胞を播種し、徐放化させた b-FGF と共に気管欠損孔に自家移植した. この移植された気管において長期間気道の開存を認め、3 ヶ月後には移植部位に軟骨再生を確認している.

さらに Komura らは、ヒト気管軟骨細胞の分離培養法も確立した[3]. 臨床研究の承認を得て、喉頭気管分離術の際に不要となった気管軟骨片を採取、分離培養を行い、解析している. この細胞を培養したヒト気管軟骨細胞を PGA メッシュシートに 10×10^6 cells/cm³ で播種し無胸腺マウスに移植、8 週後に再生軟骨を認めている.

気管軟骨再生を臨床応用するためには、Tissue Engineering の三要素(細胞・足場・生理活性物質)[1,17]をそれぞれ十分に検討することが重要であると考える。

① 細胞

細胞組織工学による軟骨再生において、細胞外マトリックス(軟骨基質)生成量は、播種細胞密度に依存するとされている。より良好に軟骨を再生させるためには、三次元スカフォールドに播種する単位体積あたりの細胞数を増加して、*in vivo* 環境で高密度培養を行うことが有利である[18]。播種細胞密度を $0.5 \sim 1 \times 10^6$ cells/cm³ から $50 \sim 100 \times 10^6$ cells/cm³ に上昇させることにより、有意に軟骨が形成されたとの報告もあり[19]、再生に有効な播種細胞数の報告に幅はあるものの、およそ $2 \sim 125 \times 10^6$ cells/cm³ の播種細胞密度が軟骨基質産生に必要とされている[20-22]。我々の研究室では基礎実験より $10 \times 10^6 \sim 50 \times 10^6$ cells/cm³ の播種密度が必要であることを確認している[2,3,16]

しかし大量の細胞数を得るために、いたずらに *in vitro* 単層培養を続ければ、軟骨細胞は線維芽細胞様に脱分化し、軟骨細胞本来の生物学的特性を失ってしまう[3]。脱分化した軟骨細胞は細胞増殖能と遺伝子 *Col2* の発現が低下し、*Col1* 遺伝子発現が増加する。脱分化した細胞は生体に移植し、*in vivo* 環境に入ると再分化誘導が生じるともいわれるが、*in vitro* の培養期間が長期化すると移植後の軟骨基質産生が減量

するとの報告もある[23]. 要素「細胞」においては、少量の組織からの細胞ソースで、軟骨細胞の性質を保ち脱分化を抑制しながら、短期的に増殖させる培養法が重要であると考えられる。

肋軟骨や耳介軟骨組織を摘出して気管へ移植すると大きな欠損部が生じることとなる。そのため気道再生を臨床応用するにあたり、気管軟骨である硝子軟骨を用いた基礎研究を重ねることが理想的である。また小児の気管狭窄症などは、前段階として呼吸管理の為に気管切開術が行われることも多く、その際に細胞ソースとなる微小気管軟骨を採取することができ、細胞を培養増殖させて組織工学の技術を用いて軟骨を再生することが可能である。これらの理由から、当初マウスの気管硝子軟骨を用いた軟骨再生を目指した。しかし *in vitro* での硝子軟骨細胞は増殖効率が不良で、必要細胞数を得るまでの期間が長くなり脱分化が進行し、同系移植後の軟骨再生も微弱であった。また、弾性軟骨細胞・硝子軟骨細胞・線維軟骨細胞の比較から、弾性軟骨細胞の有用性が報告されている[24,25]。そこで我々は、マウス耳介の弾性軟骨を用いて *in vitro* での細胞培養期間を短縮して、徐放性 b-FGF の至適量を求め、臨床応用に向けた基礎的研究を行った。

② 足場

気道再建において、最も重要なことは気道の開存である。内腔の開存性を確保維持

するため、再生気管には呼気・吸気における胸腔／気道内圧の変動においても気道内腔の開存性を保つ「横方向への硬さ」と、頸部の伸展屈曲に対応する柔軟な「縦方向へのしなやかさ」を兼ね備える必要がある[26].

気道を再生軟骨組織で再建するために必要な気管軟骨の大きさは限定されるべきである。必要以上に大きな再生組織が得られれば、気管狭窄などの合併症を引き起こす可能性がある。そのため、準備する足場材料の大きさ・形状と、同等の再生組織が得られるようにすることが、重要と考えている。

さらに、小児の気道再建の場合で、もう一つ重要なことは、再建部位の成長を考慮しなければならないことである。小児では、体の成長に伴って再生組織も成長することが望まれる。人工物、例えば非吸収性の硬い足場素材を用いた場合、移植部位の成長が期待できない。このため小児では生体吸収物質を足場を選択し、成長しうる再生気道を再建する必要がある。

③ 生理活性物質

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF, FGF2)は、1974年、Gospodarowicz らが線維芽細胞の増殖促進物質であることを特定した[27]。さらにb-FGF は肉芽形成促進作用／血管新生作用／上皮細胞・骨芽細胞・神経細胞、そして軟骨細胞を増殖させる作用、などがあることが知られている[28-33].

しかし、b-FGF は生体内では極めて不安定であり、瞬時に拡散・分解され生物活性が失われてしまう。b-FGF の血管内投与の場合、Edelman らは血中半減期 3 分[34]、Lazarous らは 50 分[35]と報告している。また古川らは血管内投与で半減期 1 時間、皮下投与でも 2 時間と述べている[36]。諸家により違いはあるものの、b-FGF の細胞刺激作用は著しく短い時間のうちに効果を失ってしまう。b-FGF の軟骨増殖作用を組織工学的に用い、将来的な臨床応用を見据えた場合、効果持続のための頻回投与は煩雑かつ非現実的である。

この問題点を解消するため、Drug Delivery System の概念が有効であると考えられる[37]。これは薬物を目的部位・濃度・時間 選択的に送達供給し、生物作用を最大限に発揮させるための技術である。本研究へは、*in vivo* 環境で高分子キャリアーが生分解させる中で、局所因子が緩徐持続的にリリースされる、徐放システムを利用する。

ゼラチンは生体適合性・生分解性において優れた足場材料である[38]。さらに牛骨由来コラーゲンのアルカリ処理法による等電点 5 のゼラチンを担体として、b-FGF を静電的に吸着安定させ、ゼラチンの吸収分解に伴って徐放させることが可能である。この技術は、共同研究者の田畑泰彦教授が開発された技術である[37]。

またゼラチンのみで作成した足場が収縮する[39]欠点を補うため、 β -リン酸三カルシウム(β -TCP)と複合体化する技術がある[40,41]。 β -TCP を用いゼラチンスポンジの細孔構造を変化することなく、力学強度を上げることができる。我々は基礎研究の結果より、

最も軟骨再生に適した 25wt% β -TCP のゼラチンスポンジ複合体を、本研究のスカフォールドとして用いることとした。

我が国では b-FGF は、2001 年からヒト b-FGF 遺伝子組換え製剤であるトラフェルミン(フィブラスト[®]スプレー、Kaken Pharmaceutical Co.Ltd., Tokyo, Japan)が認可・製造されている。適応は褥瘡・皮膚潰瘍(熱傷潰瘍・下腿潰瘍)で、表皮形成・肉芽形成・血管新生から創傷治癒の促進効果を目的にしている。本製剤のヒトへの投与は創部の径 6 cm 以内にスプレー1 日 5 噴霧が認められており、その量は 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ である。

徐放化させた場合の b-FGF の投与に関する報告では、Kanda らは皮膚欠損に対するゼラチンスポンジ足場への b-FGF 投与量は 7~14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で有効であり、過剰投与は創傷治癒への有効性を上げない、と述べている[42,43]。当研究グループの Ishimaru らは、気管軟化症の研究で、ラット気管膜様部に b-FGF 5 μg 含浸させたゼラチンスポンジを留置し、気管軟骨輪の増大、軟骨肥厚、強度の増加を報告している[44,45]。

Isogai らは 2005 年に、ゼラチンスポンジと軟骨細胞へ徐放化 b-FGF を用いることで、組織工学的な再生軟骨形成促進がみられたことを、最初に報告している[46]。この報告では 1 コンストラクトあたり、 100×10^6 個の軟骨細胞と b-FGF 100 μg を使用していた。その後、フィブリンコーティングの b-FGF 徐放システム[47]や、PGA-ポリプロピレン複合体を用いた 3D 再生軟骨の研究[48]を行っており、b-FGF を 50~160 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 用

いている.

当研究室の Komura らの家兎気管の組織工学的軟骨再生において、ゼラチンスポンジに用いた b-FGF の量は $1667 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ であった[2].

このように組織工学的技術を用いた軟骨再生において、軟骨細胞増殖と基質産生促進能を持つ b-FGF の徐放化が有用であるが、その b-FGF の徐放量に関しては、まだ一定の見解が認められない.

本研究では、生分解であり力学強度を付与したゼラチン/ β -TCP 複合体を足場として用いた、培養軟骨細胞移植による軟骨再生における、徐放性 b-FGF の投与量についての検討を詳細に行う. またゼラチンスポンジによる b-FGF の有用性を実証し、軟骨細胞に b-FGF がどのように作用しているのか検討を行う.

本研究の目的は、① 軟骨再生の足場として、ゼラチン/ β -TCP 複合体の徐放能の有用性を確認すること、② 軟骨再生に有用な徐放性 b-FGF の至適量を検討すること、③ 軟骨組織の再生過程について、b-FGF がどのように作用しているのか検討すること、である.

Ⅲ. 方法

本研究の概略を[図 1]に示す. 近交系マウス(3 週齢)の耳介軟骨組織を摘出し細切後、酵素処理を行い軟骨細胞を単離した. 単層培養中に一度継代を行い、増殖細胞を回収した. ゼラチン/β-TCP 複合体足場を作製し、b-FGF の徐放化を行った. 播種細胞密度 10×10^6 cells/cm³ で足場に播種し、同系マウスの皮下に移植した. 2,4,6 週後に摘出し、形態学的・組織学的・生化学的解析を行った.

耳介軟骨細胞の単離

本研究は、東京大学大学院医学系研究科の動物実験委員会の承認を受けて行った (医- P11-010). また国の「動物の保護及び管理に関する法律」等の法令に基づき、動物愛護の観点に十分配慮して行った. 動物の虐待を防止し、動物を適正に扱い、専用の動物実験施設を用いた.

近交系マウス C57BL/6J JmsSlc マウス(SLC Co.,Ltd., Shizuoka, Japan), 3 週齢(6 匹)に、100%二酸化炭素過剰投与による安楽死処置を行った. 腹臥位とし、無菌操作によって頭頂皮膚を縦切開し、左右の皮下を剥離して乳白色の後耳介軟骨部に到達、周囲組織を除去しながら頭部から耳介軟骨部を摘出した. さらに耳介軟骨の周囲

結合織を鋭的に除去した後、サージカルブレード No.15(Kai Industries Co.,Ltd., Gifu, Japan)を用いて細切し、耳介軟骨を 1mm³ の小片とした。

力価 350 以上のコラゲナーゼ type2(Worthington Biochemical Corp., Lakewood, USA)を DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)(Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)にて 0.3%に希釈した。細切した軟骨小片を、コニカル型遠沈管(Falcon, Corning Inc., Corning, USA)内のコラゲナーゼ溶液に入れ、37°C恒温槽内で 40 分間強振盪させた。酵素処理後の懸濁液を 100 μm のナイロン製セル・ストレイナー(Falcon, Corning Inc., Corning, USA)にて濾過し、430G 5 分 4°Cで遠心分離した。遠心後、上清を吸引し、Pellet に PBS (phosphate-buffered saline)(Wako Pure Chemical Inds.,Ltd., Osaka, Japan)を加え再度 430G 5 分 4°Cで遠心分離し、上清を吸引して洗浄した。DMEM で希釈した細胞懸濁液から一部を採取して、トリパンブルーにて染色し血球計を用いて生存細胞数をカウントした[2,3]。

単層細胞培養

単層細胞培養では、単離した細胞をコラーゲン type I コートディッシュ 100 mm (IWAKI, AGC TECHNO GLASS CO.,LTD.,Shizuoka, Japan)に、細胞密度 6400 cells/cm² で播き、初代培養を開始した。培地は DMEM/F12(Dulbecco's modified

Eagle medium/fl12) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)に 5%ヒト血清(Sigma), 濃度 100 ng/ml の b-FGF(Kaken Pharmaceutical Co.Ltd., Tokyo, Japan), 5 μ g/ml のインスリン (MP Biomedicals Inc., USA), 50 unit/ml ペニシリン+50 mg/ml ストレプトマイシン (Sigma)を加えたもの[2,3]で行った.

培養期間中、培地は週に 2 回交換した[3,23]. 細胞増殖がディッシュ内で 80%コンフルエントに達した時点で細胞継代を行った. 0.05%トリプシン/EDTA 溶液(Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), 37°C 5%CO₂ で 1~2 分インキュベートした. 細胞の剥離浮遊を確認後、上述の血清を含む培地を加え反応を停止させた. 生存細胞数を計測し、6400 cells/cm² の密度で次のディッシュへ散布し、継代を行った(P₀→P₁).

ゼラチン/ β -TCP 複合体足場の作製

ゼラチン/ β -TCP 複合体足場は、Tabata らの技法[37]に準拠して作製した. β -リン酸三カルシウム(β -TCP) (TAIHEI CHEMICAL INDUSTRIAL CO.,LTD., Osaka, Japan)を含有させたゼラチンスポンジ複合体は、以下のように、グルタルアルデヒド (NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan)にて化学的架橋することで作製した [40,41]. まず 25% β -TCP と 3wt%ゼラチン水溶液(pI 5)(Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan)を、ホモジナイザーを用いて、5000 rpm, 37°C, 3 分間混合した. 続いて 0.16% グルタルアルデヒド溶液を加えた後、ホモジナイザーで β -TCP を含むゼラチンを更に

15 秒ミックスさせた。泡状の形成物を $138 \times 138 \text{ mm}^2$ ポリプロピレン dish へ 5 mm の深さで流延し、 4°C 12 時間静置させ、ゼラチンを化学架橋した。残留アルデヒド基の、未反応のグルタルアルデヒドをブロックするため、架橋スポンジを 100 mM 濃度のグリシン水溶液内に 37°C , 1 時間浸し不活性化処理した。次いで蒸留水で洗浄して、凍結乾燥させた。その後、ゼラチン/ β -TCP 複合体を、エチレンオキシドガス(EOG)を用いて滅菌した。生検用のトレパン(Kai Industries Co.,Ltd., Gifu, Japan)を用いて、直径 8 mm 高さ 1.25 mm のディスク状に成型し、本実験の足場材料とした。

b-FGF の徐放化

徐放化する b-FGF の、ゼラチン/ β -TCP 複合体足場の 1cm^3 あたりの量を 0, 10, 100, 500, 1000, 2000 μg とした。それぞれ蒸留水 10 μl に希釈して、ゼラチン/ β -TCP 複合体に含浸させ、室温 30 分間静置した。

細胞播種

培養増殖させた軟骨細胞を、0.05%トリプシン/EDTA 溶液を用いて継代と同様の手法でディッシュから剥離して回収し、血球計で細胞数を計測した。播種細胞密度は、ゼラチン/ β -TCP 複合体足場の 1cm^3 あたり 10×10^6 個とした[2,3]。濃縮細胞懸濁液

を b-FGF を徐放化させたゼラチン／ β -TCP 複合体足場上に、移植の直前に播種した。

同系移植

同種同系の 7～8 週齢 C57BL/6J マウスに、ハロタン(Takeda Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan)を用いて麻酔管理を行った。腹臥位とし、無菌操作で背部皮膚を縦切開、皮下を剥離してポケットを作製した。b-FGF 徐放化ゼラチン／ β -TCP 複合体足場に、移植直前に培養細胞を播種させたものを 1 個、背部皮下ポケット内に移植した。次いで、皮膚を 3-0 バイクリル(ETHICON, Johnson & Johnson, New Brunswick, USA)にて縫合閉創した。

移植片摘出

同系移植 2,4,6 週後に、移植片を摘出した。動物愛護/倫理に基づき CO₂ を用いて苦痛のないよう犠牲死させ、背部を再切開して、再生組織を回収した。

形態学的・組織学的検討

再生組織の肉眼的形態を観察、重量と組織の縦・横・高さを測定した。移植片を半切して、Tissue-Tek[®] OCT compound 4583 (Sakura Fine Technical Co.Ltd., Tokyo,

Japan)に凍結包埋させた。クリオスタットマイクローム(Leica Biosystems, Nußloch, Germany)を用いて、7.5 µm 厚の組織切片を作成した。H&E 染色、トルイジンブルー染色、サフラニン O 染色にて、組織学的観察を行った。

蛍光免疫染色

組織切片を 4%パラホルムアルデヒド(Wako Pure Chemical Inds., Ltd., Osaka, Japan)で 15 分間固定した。続いて 2%ウシ血清にて 60 分間ブロッキングを行った。一次抗体として、抗マウス 1 型コラーゲン抗体(1:200, Novus Biologicals LLC, Littleton, USA), 抗マウス 2 型コラーゲン抗体(1:200, LSL Co.,Ltd, Tokyo, Japan), 抗マウス 10 型コラーゲン抗体(1:500, Abbiotec LLC, San Diego, USA)を用いて、一晩 4°Cに静置し、一次抗体反応させた。

抗 1 型と抗 10 型コラーゲン抗体にてインキュベートした標本には、二次抗体として Alexa Fluor[®] 488 Dye(1:500, Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を、抗 2 型コラーゲン抗体を用いた標本には、二次抗体として Alexa Fluor[®] 594 Dye (1:500, Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用いて、それぞれ 60 分間インキュベートした。その後、DAPI(Vector Laboratories, Burlingame, USA)を添加して、核染色を行った。

Protein assay

タンパク抽出

半切した再生組織のうち半分を 10 mg/mL ペプシン (Sigma-Aldrich) / 0.05M 酢酸 (Wako Pure Chemical Inds., Ltd., Osaka, Japan) にて 4°C, 48 時間静置、次いで 1mg/mL 胰エラスターゼ / 1×TSB (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) にて 4°C 一晩静置し、溶解した。残渣を除去する為、検体を 9100G, 4°C, 5 分遠心分離した。

グリコサミノグリカン(GAG)定量

硫酸化グリコサミノグリカンを、アルシアンブルー-binding assay 法 (sGAG 比色分析) (Wieslab AB, Lund, Sweden) によって定量した。再生組織と 0.3% コラゲナーゼを含むアテロコラーゲン沈殿物を 37°C, 1 時間消化反応させた後、細胞の破片と不溶解物質を 6000G, 4°C, 30 分遠心分離して除去した。上清に含まれた GAG をアルシアンブルー溶液で析出させ、6000G, 4°C, 15 分遠心分離し、沈殿を 4M GuHCl-33% プロパノール溶液 (Wako Pure Chemical Inds., Ltd., Osaka, Japan) で再溶解させた。混合物の吸光度を波長 600 nm で測定した。

2 型コラーゲン定量

再生組織のコラーゲンタンパクは、ELISA 法による 2 型コラーゲン検出キット (Type II collagen detection kit) (Chondrex, Inc., Redmond, USA) で定量を行った。混合物からコラーゲンタンパクを、ポリクローナル抗ヒト 2 型コラーゲン抗体で捕捉し、ビオチン

化 counterparts とストレプトアビシンによって検出した。OPD と過酸化水素水を加え、混合物の吸光度を波長 490 nm で測定した。

DNA 定量

DNA 量の測定には、PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, USA) を用いた。まず組織片を溶解した。Kit を用いて組織 1mg あたりの DNA 量の測定を行った。また同種同系の 11 週齢の C57BL/6J マウスの耳介軟骨を採取し、同様の方法で組織 1mg あたりの DNA 量を測定し、成熟した弾性軟骨組織の DNA 量のコントロールとした。

F4/80 免疫組織化学的染色

F4/80 の免疫組織染色は酵素抗体法(ABC 法)で行い、VECTASTAIN *Elite* Standard Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA)を用いた。まず切片をアセトン (Wako Pure Chemical Inds., Ltd., Osaka, Japan)にて 10 分間固定し、次いで内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化のため、0.3%家兎血清(VECTOR)を含む PBS で調整した 0.3%過酸化水素溶液に 10 分反応させた。続いて非特異的結合に対し 3%家兎血清(VECTOR)で 30 分間ブロッキング処理を行った。一次抗体として、1%家兎血清で 500:1 に希釈した、ラット抗マウス F4/80 抗体(BMA Biomedicals AG, Rheinstrasse,

Switzerland)を 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、ビオチン標識二次抗体として、同様に 200:1 に希釈した家兎抗ラット IgG 抗体(VECTOR)を、30 分反応させた。

ABC 試薬(アビジン-ビオチン標識酵素複合体、VECTOR)を 30 分間結合させ、PBS で洗浄した。DAB 酵素基質溶液(VECTOR)を加え 10~40 秒発色させ、蒸留水で反応を停止させた。マイヤー・ヘマトキシリンにて対比染色し、エタノール脱水、キシレン透徹し、封入した。

染色標本を弱拡大($\times 4$)にて観察した。各 b-FGF 徐放群($n=3$)、無作為の強拡大($\times 20$)領域($722 \times 538 \mu\text{m}$)の 4 視野で、染色陽性細胞数および陰性細胞数をカウントした。

統計学的解析

コンストラクトの重量に関する統計学的解析は Turkey 検定を、タンパク定量の統計学的解析は Bonferroni 法を、IBM SPSS Statistics 21 software (IBM, Armonk, USA) を用いて行った。P-value は 0.05 未満を有意とした。

IV. 結果

単層培養細胞 [図 2]

マウス耳介軟骨組織よりコラゲナーゼ処理を行い、細胞を分離して、初代単層培養が可能であった。第一継代し培養増殖させて、必要細胞数が得られた。第一継代した細胞は、細胞がやや大きくなった。

肉眼的形態所見 [図 3]

同系マウスへの皮下移植 2,4,6 週後に再生組織の回収を行った。背部正中切開すると、移植片は、いずれの徐放群も同様の線維性癒着を認めたが、剥離摘出は容易であった。

移植 2 週後の b-FGF 0, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群の移植片は、ゼラチン/ β -TCP 複合体足場の色調が透見されるような淡黄色調で、徐放化 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群では淡赤黄色だった。外表は線維性の組織に被われ、平滑であった。移植 4 週後は、主に b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で乳白色調の硬い組織となり、移植 6 週後になると、外形や表面に凹凸が生じる傾向を認めた。

移植 2 週後の、再生組織の大きさは、b-FGF 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ などの群でもとの足場とほぼ同じであった。徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以下の投与群では、移植片が足

場よりも小さめになる傾向であった。移植 4 週後は、b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放投与群で足場より長径・厚さなどが増加して再生組織片は大きくなる傾向があり、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以下の群ではもとの足場より小さいままであった。移植 6 週後も、移植 4 週後と同様の再生組織片のサイズであった。全体に、形はもとの足場材料の円柱状から、宿主マウス頭尾長軸方向に長径のある楕円体になり、体表側が半球状、深部側がより平坦な形状になる傾向にあった。

b-FGF 徐放量および移植週数に応じて、再生組織が大きくなり、色調が白色化し、硬さが増強していた。徐放性 b-FGF が移植片に作用し軟骨組織を成熟させることが、再生組織の大きさに関係していると考えられた。

再生組織の重量 [図 4]

移植 2 週後において、再生組織の重量は徐放化させた b-FGF の増量に伴って、順に増加していた。b-FGF 1000 及び 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 徐放させた群で、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の非投与群と比較して再生組織の重量は有意に増加していた($P < 0.05$)。他方、b-FGF 10 と 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群は、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 群とほぼ同じ重量であった。

移植 4 週後も同様に、徐放化 b-FGF の増量に伴って、再生組織の重量もおよそ増加していた。b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 群に対し 1000 及び 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群で、再生組織の

重量に有意差を認めた. b-FGF 10 と 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群は非投与群と重量がほぼ同等であった.

移植 6 週後も同様に再生組織は、徐放性 b-FGF の増量に応じて重量が増加している傾向であった. b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群の方が 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ より、重量の平均値も偏差もやや低値だったが、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の非投与群との比較では、いずれも有意差を認めた.

b-FGF 徐放投与のそれぞれの群で経時的に再生組織の重量の変化を確認した. 移植 2 週後の再生組織重量が重く、移植 4 週に僅かに減少し、6 週に微増している傾向にあるが、どの徐放群においても経時的な重量の変化に有意差は認められなかった.

移植 2 週後の再生組織重量は、徐放性 b-FGF 用量に反映しており、その後も各群の再生組織重量が保たれた. また b-FGF 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放で、非投与群と有意差を認めた. b-FGF の徐放的刺激が播種した軟骨細胞等の増殖・成熟に作用して、再生組織全体の重量に影響を及ぼしていると考えられた.

組織学的所見

H&E 染色 [図 5a]

移植 2 週後、細胞は再生組織の外側近傍に密集しており、この表層部分の細胞層は b-FGF 500~2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群で厚くなっていた。b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ では、中央部分に液体貯留による組織構造を欠くスペースが形成されていた。この腔の周囲にも細胞層が囲っていた。b-FGF 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 群にも小さいが同様の領域が認められた。

移植 4 週後、b-FGF 0 と 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群は内部の細胞が少ないままで、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群で再生組織内部にも多くの細胞を認めた。b-FGF 1000 と 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群では、さらに細胞密度が高くなっていた。一方、移植 2 週で認められた b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の液体貯留による領域はほとんど消失していた。

移植 6 週後では、細胞密度は移植 4 週後と大差はなく、特に徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で細胞密度の増加が持続していた。b-FGF 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群においても再生組織内の細胞は増加していた。

トリジンブルー染色 [図 5b]

トリジンブルー色素は酸性ムコ多糖類などと結合すると異染性(メタクロマジー)を呈し、軟骨基質産生の程度を視覚的に捉えることができる。移植 2 週後、トリジンブルー染色にて、徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で表層付近のごく一部で染

色される部分が認められたが、b-FGF 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以下の群ではほとんど確認できなかった。

移植 4 週後、メタクロマジーを呈する青紫色の領域は明瞭となり、再生組織の中央部にも点在していた。主に b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で、異染性の領域が投与量とともに広く増加していた。

移植 6 週後も同様に、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群でメタクロマジーを呈している部分が多く観察され、再生組織内に軟骨基質の産生が確認された。全体に点在しているが、軟骨の形成を示す部位は組織の表層近傍に、より多く認められる傾向にあった。

サフラニン O 染色 [図 5c]

塩基性のサフラニン色素は酸性プロテオグリカンと結合して赤く染色されるため、軟骨マトリックスの評価を目的として行った。移植 2 週後では、トルイジンブルー染色と同様で、軟骨形成を示唆する染色部分は殆ど見られなかった。b-FGF 100~2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群でサフラニン O にて染色される部分が、組織外縁より少し内側に微かに点在していた。

移植 4 週後、赤く染色される領域は広く拡大しており、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で、特に領域が増えていた。移植片の宿主マウス深部筋層側に、一層の軟骨基質産生領域が列状に染色されている傾向にあった。

移植 6 週後は、移植 4 週後とほぼ同様の染色所見であった。徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で、軟骨再生を示すサフラニン O で赤く染色されている領域を認めた。b-FGF 0 と 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ は、微かに赤く染色される領域を認めるのみだった。

軟骨基質産生を組織学的に確認するトルイジンブルー／サフラニン O 染色所見では、移植 2 週後に b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放化で細胞増殖と表層の軟骨再生が認められ、2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の投与群で移植片内部の液体貯留が認められた。移植 4 週以降に、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で内部にも多く軟骨基質産生を示す領域が確認された。

蛍光免疫染色所見 [図 6]

移植 6 週後、蛍光免疫染色にて、線維芽細胞や軟骨膜に多く認められる 1 型コラーゲンで染色される部位は、トルイジンブルーとサフラニン O で染まる領域以外の部位であった。また再生組織の外周表面が染色されていた。各 b-FGF 徐放投与群の、

1 型コラーゲン染色領域には、大きな差異はなく、徐放量の増加の影響によって、1 型コラーゲン陽性の領域の差の変化は顕著ではなかった。

トレイジンブルーで異染性となりサフランin O で赤く染色された領域は、蛍光免疫染色の技法で軟骨の特異マーカーである 2 型コラーゲンに陽性であった。徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で、この発色部分が多く、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の対照群と比較しても、2 型コラーゲン陽性の部位が広範囲であった。

軟骨細胞の肥大化や骨化の指標でもある抗 10 型コラーゲン抗体で標識される領域は、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以下の群で僅かに認められた。

グリコサミノグリカン(GAG)定量 [図 7]

移植 2 週後では、GAG 産生量は徐放性 b-FGF 各群いずれも少なく、11 週齢マウス耳介軟骨組織よりも低値であった。b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の対照群では GAG 量は極めて低値であり、最も高値だった b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 群と有意差を認めた。b-FGF 1000 及び 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群はやや減少した。

移植 4 週後、GAG 産生量は徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上投与の群で、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の対照群と比較して、有意に増加していた。また同じく b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で、マウス耳介軟骨の GAG 量よりも高値を示していた。

移植 6 週後においても、移植 4 週後の GAG 産生量と同様に、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で、b-FGF 非投与群やマウス耳介軟骨よりも GAG 測定値が高値であった。

徐放性 b-FGF 投与のそれぞれの群の、移植週数ごとの経時的な GAG 産生量では、移植 2 週から 4 週の間で GAG の産生量が急増して、その後移植 6 週の GAG 量はおよそ横ばいの状態であった。

2 型コラーゲン定量 [図 8]

移植 2 週後、徐放性 b-FGF 投与各群とも 2 型コラーゲンの産生量は極めて微量で、11 週齢のマウス耳介軟骨組織の 2 型コラーゲン量よりも低値であった。b-FGF 徐放群では、500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 投与群の量が、GAG 産生量と同様で最も高値であった。

移植 4 週後、b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放投与群は、非投与対照群と比較して有意に 2 型コラーゲン量が多かった。また b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で、11 週齢のマウス耳介軟骨よりも産生量が高値であった。

移植 6 週後、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群において、b-FGF 非投与群やマウス耳介軟骨よりも、産生量が高値を呈した。

各 b-FGF 徐放それぞれの群の経時的な 2 型コラーゲン産生量の変化では、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で、特に移植 2 週から 4 週にかけて急増しており、b-FGF 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以下の投与群ではマウス耳介軟骨の量以下のままであった。

GAG/2 型コラーゲンのタンパク定量では、移植 2 週から 4 週にかけて産生量が増加していた。移植 4 週以降 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放化で、非投与群や 11 週齢マウス耳介軟骨よりも、細胞外マトリックスが有意に産生されたことが示された。

DNA 定量

再生組織の総 DNA 量 [図 9]

再生組織の総 DNA 量は、細胞周期等にも左右されるが、およそ移植片内に存在する総細胞数に相当する。その細胞には、播種した軟骨細胞由来のものと、遊走してくる宿主由来の線維芽細胞や炎症細胞等が含まれる。徐放性 b-FGF 各投与群の総 DNA 量の検討では、b-FGF 用量依存性にほぼ DNA 量が増加していた。移植 2 週後、b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で、非投与の対照群と比較して有意に総 DNA 量が多かった。移植 4 週後には、対照群との比較で、b-FGF 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で有意に総 DNA 量が多かったが、6 週後では b-FGF 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ で有意差を認め、b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群では有意差はみられなかった。

それぞれの b-FGF 投与群の移植週数ごとの経時的総 DNA 量の推移では、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の対照群を除く、b-FGF 徐放各群で、移植 2 週後に DNA 量が最も多く、移植 4,6 週後に減少していた。

全体に再生組織の総 DNA 量、即ち総細胞数は、いずれの週も b-FGF 用量に依存していた。また徐放性 b-FGF を用いた場合、移植 2 週前後に細胞増殖のピークがあることが示唆された。

再生組織 1mg あたりの DNA 量 [図 10]

再生組織 1mg あたりの DNA 量は、単位重量あたりの細胞数、概して移植片の細胞密度に類推が可能であり、b-FGF 徐放各群での比較検討を行った。移植 2 週後において、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群で、b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の対照群より、1mg あたりの DNA 量は有意に高値を示した。また b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群は、11 週齢マウス耳介軟骨組織よりも 1mg あたりの DNA 量が高値であった。

移植 4 週後、b-FGF 非投与群が僅かに最も高値だが、いずれの b-FGF 徐放群とも有意差はなく、マウス耳介軟骨を含めほぼ同等の量であった。移植 6 週後も移植 4 週後と同様の結果であった。

b-FGF 徐放それぞれの群の経時的な再生組織 1mg あたりの DNA の推移では、b-FGF 徐放投与群では移植 2 週時が最も高値であり、移植 4 週に低下した。b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の対照群のみ、遅れて移植 4 週時にピークを示した。

再生組織の細胞密度に対応する本結果では、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で移植 2 週後に細胞密度が上昇し、その後はどの群もほぼ同等となった。

F4/80 免疫組織化学的染色像, 染色陽性/陰性細胞数 [図 11, 12]

遊走するマクロファージと単球の、膜タンパク質である F4/80 を検出するモノクローナル抗体の、免疫組織化学的染色を行った。即ち、F4/80 染色陽性細胞はマクロファージであり、F4/80 陰性細胞は軟骨細胞や線維芽細胞およびそのほかの細胞、と判別可能である。染色組織所見では、徐放化 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で F4/80 陽性および陰性ともに、多くの細胞の遊走・増殖が確認された。トルイジンブルーやサフラン O で染まる領域は F4/80 陰性細胞であり、F4/80 陽性細胞は、その領域の外周や β -TCP 周囲などに多く観察された。

強拡大視野内($\times 20$, $722 \times 538 \mu\text{m}$)の F4/80 染色陽性細胞数と陰性細胞数のカウントでは、主に b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で、F4/80 染色陰性細胞数の増加を認めたが、同様に陽性細胞数も増加していた。移植早期の b-FGF 投与量が多い群で、陰性細胞数がより優位な傾向にあるが、各 b-FGF 各群で経時的に F4/80 陽性細胞数や陰

性細胞数が著しく増減することはなかった. b-FGF 非投与群では移植 2 週で細胞数が高度に少ないが、週ごとに、特に陽性細胞優位に増加した.

V. 考察

本研究にて、ゼラチン/ β -TCP 複合体足場を用いて軟骨再生を確認した。徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与によって、移植 4 週で再生軟骨が形成可能であった。このシステムにおいて、徐放化 b-FGF の量によって、再生組織内の細胞数と軟骨基質産生量はコントロールされていた。さらに、徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の投与ではもとの足場の大きさとほぼ同等の再生組織が得られ、徐放性 b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与では再生組織が足場以上に増大していた。また、b-FGF の徐放投与によって、再生組織内の細胞数は増加するが、マクロファージも同様に増加することが確認された。

ゼラチンスポンジの足場は、軟骨再生にとって有用と報告されている[49,50]。しかしゼラチンは、足場素材としての力学的強度が弱く、形態維持が困難である[39]。そこで β -TCP を付与して、力学的強度を強化して足場材料とした[40,41]。 β -TCP は生体分解性であり、体の発育とともに成長が求められる部位の再生技法において、有用と考えられる[51]。当研究室においては、Komura らの組織学的検討にて、家兎の耳介軟骨細胞における軟骨再生は、25%の β -TCP 付与によるゼラチン多孔体の足場で最も良好であったことから[6,7]、本研究でも 25% β -TCP 付与ゼラチン多孔体を足場材料として用いた。 β -TCP には骨親和性、骨形成作用があり、骨充填材として整形外科・歯科口腔外科領域等で広く臨床応用されている。主に骨伝導能によって、すなわち隣接

する骨からの骨芽細胞が、表面に沿って遊走し増殖・分化する足場として機能し、吸収置換され自家骨形成がなされる[52,53]. Tabata らの検討では、骨髄間葉系細胞において、50% β -TCP 付与によるゼラチン多孔体の足場材料で、最も骨分化が促進されることが確認されている[40]. 一方、本研究は再生気道における軟骨の再生を目標としており、本実験系においても骨伝導が生じるような、周囲骨環境には暴露されていない. 実際、今回徐放性 b-FGF のいずれの量でも骨化は認められず、マウス耳介軟骨細胞における、ゼラチンスポンジ/25% β -TCP 複合体の足場材料で、軟骨再生が可能であることが示された.

b-FGF の製剤は、ヒト由来遺伝子組換え製剤であるトラフェルミン原末(Kaken Pharmaceutical Co.Ltd., Tokyo, Japan)を用いた. b-FGF は種によってタンパク質のアミノ酸配列も異なっている. 先行予備実験において、Human b-FGF と Murine b-FGF を比較し、マウス軟骨の単離細胞培養での細胞増殖効率に差を認めなかったことから、今回我々はヒト由来の本製剤を用いて至適量検討を行った.

1cm³あたりのゼラチン/ β -TCP 複合体足場に対し、b-FGF 100 μ g を含浸させ徐放化し、軟骨細胞を 10×10^6 個播種することで、移植後 4 週間で耳介弾性軟骨組織とほぼ同等の軟骨基質産生を認めており、同種同系移植下で軟骨再生が成されたと考えている. Isogai らは、軟骨再生にとって徐放化させた b-FGF の投与が有用であると最初に報告し、b-FGF 刺激による血管新生促進と軟骨細胞数増加によるものであった可

能性について言及している[46,47]. 本研究では、経時的に DNA 量を測定し、移植片に含まれる細胞数を推定した. 軟骨再生が良好に認められた b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群の組織片では、移植 2 週の時に DNA 量が、b-FGF 非投与群より有意に増加していた. その後、移植 4 週以降は、細胞密度に有意差は消失している. 軟骨の再生過程において、*in vivo* の生体内でも高密度培養の環境が構築されていることが有利であると推測され[18,19]、移植初期の 2 週間以内に軟骨細胞数を増加させることが、最も重要である可能性が示唆された.

移植 4 週以降、細胞密度には有意差が認められなかったが、一方で軟骨基質産生量(GAG, 2 型コラーゲン量)においては、徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与群で有意差を認めた. これは b-FGF 刺激による、軟骨細胞 1 細胞あたりの細胞外マトリックス産生量の増加によるものである[54]. b-FGF は、軟骨細胞の増殖と軟骨基質産生量の増加作用があるとされており[47]、本研究でも同様の結果が得られた. それ故、ゼラチンによる b-FGF 徐放システムが、効果的に軟骨細胞に作用して、徐放性 b-FGF 投与の量に依存して、効果が発現していた.

徐放性 b-FGF 投与による軟骨組織の再生過程における、組織学的所見、GAG/2 型コラーゲン定量について本実験結果をまとめた[図 13]. トルイジンブルーおよびサフラニン O 染色組織像では、b-FGF を 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上徐放することで、移植 2 週後にまず表層から再生軟骨が観察された. 移植 4 週以降は、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の

徐放で、組織の内部にも軟骨基質が染色された。また GAG/2 型コラーゲンのタンパク定量において、移植 4 週以降に、徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与にて、非投与対照群より有意に細胞外マトリックス産生が高値であった。さらに同じく移植 4 週以降 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で、マウス耳介軟骨組織よりも高い基質産生量を示した。これらのことから、徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の投与によって、主に移植 4 週前後に軟骨基質産生量が増加し、軟骨再生がなされたと考えられる。

本研究では、徐放性 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の投与で、もとの足場の大きさとほぼ同等の組織再生が得られた。b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群では、足場材料よりも大きい再生組織となった。さらに本実験で徐放性 b-FGF の最大量である 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群では、移植片内に粘調性の液体貯留が確認された。組織像において移植 2 週に再生組織の中央部に液体が貯留していたスペースが観察されるが、移植 4 週以降ではこのスペースは認められなくなっている。この粘調な液体は、弾性軟骨細胞で産生された、軟骨再生過程に必要なヒアルロン酸である可能性や[55]、表層部での急速な細胞増殖のため中心部で虚血性壊死のようなメカニズムが生じた可能性がある。2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の徐放量は、細胞の過剰増殖を導き形態変化が著明で、徐放性 b-FGF の過剰投与であった可能性が否めない。徐放システムを用いて足場材料と同等の大きさの再生軟骨を得るためには、徐放 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の投与が有用であると考えられた。徐放性 b-FGF の過剰投与は、再生軟骨形状のコントロールが困難となり、臨床応用する上

で支障を来たす可能性がある。加えて b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放投与群間で軟骨基質産生量には有意差を認めておらず、軟骨再生における徐放性 b-FGF の適正量投与が重要と考えられた。

徐放性 b-FGF の投与によって、再生組織内にマクロファージと単球のマーカである F4/80 の免疫組織化学的染色で、染色陽性細胞の増加を認めた。他方、F4/80 で染色陰性の細胞も増加することが確認された。F4/80 陰性細胞は、播種増殖した軟骨細胞と、b-FGF 刺激による線維芽細胞などの増殖の可能性が考えられる。マクロファージには、貪食作用など急性免疫反応を担い軟骨再生には抑制的な働きとなる M₁ マクロファージと、軟骨形成に有利に作用する M₂ マクロファージがあるとされている。今回の検討では、M₁ と M₂ マクロファージの鑑別までは行っていない。少なくとも b-FGF 投与によるマクロファージの遊走数の増加は、必ずしも軟骨再生に不利には働かず、有効であったと推測される。

本研究結果から推察される、マウス弾性軟骨培養細胞をゼラチン/ β -TCP 複合体に播種、同系移植した場合の、軟骨再生過程をシェーマに示す[図 14]。軟骨細胞を播種した足場を移植すると、炎症反応が惹起されてマクロファージの遊走が生じ、また線維芽細胞の遊走も起こっているものと考えられる。移植 2 週において b-FGF が徐放投与された組織では、軟骨細胞も足場内で増殖しており、その後に軟骨組織が形成される。b-FGF を徐放することで軟骨細胞が増殖し、それと同等数の炎症性細胞が確

認された. 対する b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の非投与群でも F4/80 陽性細胞数と陰性細胞数は同等であった. 従って b-FGF の投与増量によっては、炎症反応は増強されない可能性が考えられる. 移植 4 週では、移植片内の細胞数は減少するが、移植 2 週目までに有効に細胞増殖が生じた b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放において、軟骨基質産生が可能である. 移植 6 週において細胞数・細胞密度は一定化するが、b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上を過量投与すると、もとの足場より大きな組織が再生されることとなる.

以上より、徐放化 b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ を用いた場合に、C57BL/6J マウスの耳介弾性軟骨を分離培養し、細胞密度 10×10^6 cells/ cm^3 でゼラチン/ β -TCP 複合体足場に播種し、同系移植することで、移植 4 週で良好に軟骨組織が再生された. 軟骨基質の GAG 量や 2 型コラーゲン量は、もとのマウス耳介軟骨組織より、高度に有意差をもって産生されていた. b-FGF を投与していない対照群や b-FGF 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ などの低量徐放では、軟骨は殆ど形成されなかった. b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の徐放化は過剰投与の可能性があった.

これらのことから本実験系において、b-FGF の徐放化至適量は、100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ が適当であると考えられる.

臨床応用への最終目標を念頭に、組織工学的技術を用いた再生医療に関する基礎的研究を重ね、その技法の確立を進めることは、極めて重要である. 再生医療の三要素[1,17]それぞれの研究、即ち、要素「細胞」において、純度・増殖能・分化能を維

持増強させる技法，要素「足場」において、細胞やサイトカインを有効に保持する足場素材の選択・デザイン，要素「生理活性物質」として、細胞増殖や分化を有効に誘導するサイトカインの種類や至適量の研究，を進める必要がある．三要素が密接にリンクして再生医療の根幹を成すため、これら各項目の検討は個々の要素の向上研究ではなく、ほかの要素への影響も非常に大きく、全体として再生医療アプローチを発展させるものに他ならない．

本実験系の手法も、多くの学術報告と情報交換、各条件検討の予備実験の積み重ねの中から確立したものであるが、今回の軟骨再生の結果解析をもとに、より効率的な技法の向上へフィードバックすべきである．*in vitro* では細胞の採取・分離法、培養法、コンストラクト作製では細胞播種法、サイトカインや足場の種類と量、そして有効な*in vivo* 環境の条件、などに十分再検討の余地がある．ひとたび生体内に入ると環境となると、極めて複雑で未解明な作用が働き、言わば“Black Box”の状態に入る．本実験系でも例えば、移植直後-1 週-2 週のあいだの細胞動員、2-3-4 週の軟骨形成の超初期、b-FGF 100~2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 間の詳細なターニングポイント、培養細胞由来と宿主由来細胞の解析、M₁ および M₂ マクロファージと免疫反応、など今後の研究課題には枚挙に遑がなく、更なる機序の解明が望まれる．

目標は、微小気管硝子軟骨の分離培養からの組織工学的な再生軟骨を、自家同所移植して気道再生を行う技法の開発である[2,3,6,54]．本研究ではマウス耳介の弾

性軟骨を用い、再生軟骨の確認と b-FGF 徐放化至適量を得た。弾性軟骨細胞から気管硝子軟骨とほぼ同等の力学的強度が得られることは、既の実証している[4]。前臨床研究として大型動物での弾性軟骨細胞を用いた気道再生の研究は可能であると思われる。さらには、我が国では b-FGF は創傷治癒促進効果としては認可されており、安全性や倫理面など臨床導入へのハードルは高くないと考えている。

本研究が目標とする気管軟骨の再生医療は、小児の気管狭窄や難治性気道疾患などに対する小児気道再生、成人領域への拡大へと応用される可能性を持っている。それだけでなく、これらの技法の確立と作用機序解明、例えば b-FGF 徐放化などの Drug Delivery System や軟骨再生技術の発展が、医療に貢献する分野は極めて幅広い。Tissue Engineering の技術による機能的臓器の再生医療の発展は、多くの患者への恩恵をもたらすものとする。

VI. 謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科 生殖・発達・加齢医学専攻 小児医学講座小児外科学教室 前教授 岩中 督先生(現 埼玉県立小児医療センター病院長)に深謝申し上げます。

また実験の直接的な技術指導と研究・論文執筆に多大なる御助言を賜りました、東京大学大学院医学系研究科 特任研究員、小児再生医療研究室の指導主任・前講師である古村 眞先生(現 埼玉医科大学小児外科教授)に篤く御礼申し上げます。

また京都大学再生医科学研究所 田畑泰彦教授、東京大学医学部附属病院テッシュ・エンジニアリング部 高戸 毅教授、星 和人准教授、そして実験の推進において数多くの技術協力を頂いた小児再生医療研究室の古村浩子様、菊地伸敬様、ならびに様々な御協力を頂いた教室員の先生方に謝辞を述べたいと思います。またトラフェルミン(線維芽細胞増殖因子)原末を御提供頂いた科研製薬株式会社様にも、御礼申し上げます。

尚、本研究は、日本学術振興会・科学研究費助成「組織工学的気管軟骨壁を使用した気管形成術の開発」(研究課題番号:18390474), 「複合的成長因子と軟骨細胞移植療法による気管形成術の開発研究」(研究課題番号:23592625), 川野小児医学奨学財団研究助成金 2008「組織工学による気管再生を臨床応用するためのヒト気管軟

骨細胞分離培養法を標準化するための研究」、川野小児医学研究財団若手研究助成金 2010「気管狭窄症を根治するための微小軟骨組織片からの軟骨再生のための研究」により遂行されました。

VII. 引用文献

- [1] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; **260**: 920-926.
- [2] Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T. An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J Pediatr Surg*. 2008; **43**: 2141-2146.
- [3] Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T. Human tracheal chondrocytes as a cell source for augmenting stenotic tracheal segments: the first feasibility study in an in vivo culture system. *Pediatr Surg Int*. 2008; **24**: 1117-1121.
- [4] Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Ohatani Y, Ishimaru T, Sugiyama M, Hoshi K, Iwanaka T. Study of mechanical properties of engineered cartilage in an in vivo culture for design of a biodegradable scaffold. *Int J Artif Organs*. 2010; **33**: 775-781.
- [5] Komura M, Komura H, Konishi K, Ishimaru T, Hoshi K, Takato T, Tabata Y, Iwanaka T. Promotion of tracheal cartilage growth by intra-tracheal injection of

- basic fibroblast growth factor (b-FGF). *J Pediatr Surg.* 2014; **49**: 296-300.
- [6] Komura M, Komura H, Otani Y, Suzuki K, Satake R, Kodaka T, Terawaki K, Yonekawa H, Ikebukuro K, Hoshi K, Takato T, Tabata Y, Komuro H, Iwanaka T. Tracheoplasty with cartilage-engineered esophagus environments. *J Pediatr Surg.* 2015; **50**: 1093-1098.
- [7] Komura M, Komura H, Otani Y, Kanamori Y, Iwanaka T, Hoshi K, Tsuyoshi T, Tabata Y. The junction between hyaline cartilage and engineered cartilage in rabbits. *Laryngoscope.* 2013; **123**: 1547-1551.
- [8] Costantino PD, Nuss DW, Snyderman CH, Johnson JT, Friedman CD, Narayanan K, Houston G. Experimental tracheal replacement using a revascularized jejunal autograft with an implantable Dacron mesh tube. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1992; **101**: 807-814.
- [9] Maeda M, Grillo HC. Effect of tension on tracheal growth after resection and anastomosis in puppies. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1973; **65**: 658-668.
- [10] Grillo HC. Tracheal replacement: a critical review. *Ann Thorac Surg.* 2002; **73**, 1995-2004.
- [11] Vacanti CA, Paige KT, Kim WS, Sakata J, Upton J, Vacanti JP. Experimental tracheal replacement using tissue-engineered cartilage. *J Pediatr Surg.* 1994; **29** :

201-204.

- [12] Macchiarini P, Walles T, Biancosino C, Mertsching H. First human transplantation of a bioengineered airway tissue. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; **128**: 638-641.
- [13] Macchiarini P, Jungebluth P, Go T, Asnaghi MA, Rees LE, Cogan TA, Dodson A, Martorell J, Bellini S, Parnigotto PP, Dickinson SC, Hollander AP, Mantero S, Conconi MT, Birchall MA. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet.* 2008; **372**, 2023-2030.
- [14] Nakamura T, Teramachi M, Sekine T, Kawanami R, Fukuda S, Yoshitani M, Toba T, Ueda H, Hori Y, Inoue M, Shigeno K, Taka TN, Liu Y, Tamura N, Shimizu Y. Artificial trachea and long term follow-up in carinal reconstruction in dogs. *Int J Artif Organs.* 2000; **23**: 718-724.
- [15] Omori K, Nakamura T, Kanemaru S, Asato R, Yamashita M, Tanaka S, Magruffov A, Ito J, Shimizu Y. Regenerative medicine of the trachea: the first human case. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2005; **114**: 429-433.
- [16] 古村 眞. 再生軟骨を用いた気道再建. 治療.2009; **91**: 2520-2524.
- [17] Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg.* 1988; **23**: 3-9.

- [18] Talukdar S, Nguyen QT, Chen AC, Sah RL, Kundu SC. Effect of initial cell seeding density on 3D-engineered silk fibroin scaffolds for articular cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2011; **32**: 8927-8937.
- [19] Yamaoka H, Tanaka Y, Nishizawa S, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. The application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for cartilage tissue engineering and its suitable conditions. *J Biomed Mater Res A*. 2010; **93**: 123-132.
- [20] Ushida T, Furukawa K, Toita K, Tateishi T. Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. *Cell Transplant*. 2002; **11**: 489-494.
- [21] Hannouche D, Terai H, Fuchs JR, Terada S, Zand S, Nasser BA, Petite H, Sedel L, Vacanti JP. Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2007; **13**: 87-99.
- [22] Terada S, Yoshimoto H, Fuchs JR, Sato M, Pomerantseva I, Selig MK, Hannouche D, Vacanti JP. Hydrogel optimization for cultured elastic chondrocytes seeded onto a polyglycolic acid scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2005; **75**: 907-916.
- [23] Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Synergistic effects

- of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant.* 2005; **14**: 683-693.
- [24] Henderson JH, Welter JF, Mansour JM, Niyibizi C, Caplan AI, Dennis JE. Cartilage tissue engineering for laryngotracheal reconstruction: comparison of chondrocytes from three anatomic locations in the rabbit. *Tissue Eng.* 2007; **13**: 843-853.
- [25] Malicev E, Kregar-Velikonja N, Barlic A, Alibegovi A, Drobnic M. Comparison of articular and auricular cartilage as a cell source for the autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res.* 2009; **27**: 943-948.
- [26] Belsey R. Resection and reconstruction of the intrathoracic trachea. *Br J Surg.* 1950; **150**: 200-205.
- [27] Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature.* 1974; **249**: 123-127.
- [28] Quatela VC, Sherris DA, Rosier RN. The human auricular chondrocyte. Responses to growth factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993; **119**: 32-37.
- [29] Klagsbrun M, Smith S. Purification of a cartilage-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1980; **255**: 10859-10866.

- [30] Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev.* 1987; **8**: 95-114.
- [31] Presta M, Moscatelli D, Joseph-Silverstein J, Rifkin DB. Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol.* 1986; **6**: 4060-4066.
- [32] Sprugel KH, McPherson JM, Clowes AW, Ross R. Effects of growth factors in vivo. I. Cell ingrowth into porous subcutaneous chambers. *Am J Pathol.* 1987; **129**: 601-613.
- [33] O'Keefe EJ, Chiu ML. Stimulation of thymidine incorporation in keratinocytes by insulin, epidermal growth factor, and placental extract: comparison with cell number to assess growth. *J Invest Dermatol.* 1988; **90**: 2-7.
- [34] Edelman ER, Nugent MA, Karnovsky MJ. Perivascular and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: vascular and solid organ deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; **90**: 1513-1517.
- [35] Lazarous DF, Shou M, Stiber JA, Dadhania DM, Thirumurti V, Hodge E, Unger EF. Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration

- determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res.* 1997; **36**: 78-85.
- [36] 古川明彦, 弓削卓郎, 中村克広, 長島豊, 淡路敏和. ヒト塩基性線維芽細胞成長因子, KCB-1 のラットにおける血清中濃度推移. *基礎と臨床.* 1996; **30**, : 1579-1589.
- [37] Tabata Y, Nagano A, Ikada Y. Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 1999; **5**: 127-138.
- [38] Tabata Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *J R Soc Interface.* 2009; **6**(Suppl 3): S311-S324.
- [39] Leddy HA, Awad HA, Guilak F. Molecular diffusion in tissue-engineered cartilage constructs: effects of scaffold material, time, and culture conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; **70**: 397-406.
- [40] Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and b-tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 2005; **26**: 3587-3596.
- [41] Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 from biodegradable sponge composed of gelatin and b-tricalcium phosphate. *Biomaterials.* 2005; **26**: 4856-4865.

- [42] Kanda N, Morimoto N, Ayzazyan AA, Takemoto S, Kawai K, Nakamura Y, Sakamoto Y, Taira T, Suzuki S. Evaluation of a novel collagen-gelatin scaffold for achieving the sustained release of basic fibroblast growth factor in a diabetic mouse model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014; **8**: 29-40.
- [43] Kanda N, Morimoto N, Takemoto S, Ayzazyan AA, Kawai K, Sakamoto Y, Taira T, Suzuki S. Efficacy of novel collagen/gelatin scaffold with sustained release of basic fibroblast growth factor for dermis-like tissue regeneration. *Ann Plast Surg.* 2012; **69**: 569-574.
- [44] Ishimaru T, Komura M, Komura H, Otani Y, Komuro H, Sugiyama M, Terawaki K, Suzuki K, Tabata Y, Iwanaka T. Slow release of basic fibroblast growth factor (b-FGF) promotes growth of tracheal cartilage. *J Pediatr Surg.* 2013; **48**: 288-292.
- [45] Ishimaru T, Komura M, Sugiyama M, Komura H, Arai M, Fujishiro J, Uotani C, Miyakawa K, Kakihara T, Hoshi K, Takato T, Tabata Y, Komuro H, Iwanaka T. Slow release of basic fibroblast growth factor (b-FGF) enhances mechanical properties of rat trachea. *J Pediatr Surg.* 2015; **50**: 255-259.
- [46] Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, Munakata H, Tabata Y, Ikada Y, Kamiishi H. Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J*

- Biomed Mater Res A. 2005; **74**: 408-418.
- [47] Morotomi T, Wada M, Uehara M, Enjo M, Isogai N. Effect of local environment, fibrin, and basic fibroblast growth factor incorporation on a canine autologous model of bioengineered cartilage tissue. *Cells Tissues Organs*. 2012; **196**: 398-410.
- [48] Enjo M, Terada S, Uehara M, Itani Y, Isogai N. Usefulness of polyglycolic acid-polypropylene composite scaffolds for three-dimensional cartilage regeneration in a large-animal autograft model. *Plast Reconstr Surg*. 2013; **131**: 335-342.
- [49] Yaylaoglu MB, Yildiz C, Korkusuz F, Hasirci V. A novel osteochondral implant. *Biomaterials*. 1999; **20**: 1513-1520.
- [50] Ponticiello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*. 2000; **52**: 246-255.
- [51] Guo X, Wang C, Duan C, Descamps M, Zhao Q, Dong L, Lü S, Anselme K, Lu J, Song YQ. Repair of osteochondral defects with autologous chondrocytes seeded onto bioceramic scaffold in sheep. *Tissue Eng*. 2004; **10**: 1830-1840.
- [52] LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; **395**: 81-98.

- [53] 澤田育典, 北郷明成, 森田章介. 徐放化塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた上顎洞底挙上術に関する実験的研究. 日本再生歯科医学会誌. 2008; **5**:105-116.
- [54] Le Guellec D, Mallein-Gerin F, Treilleux I, Bonaventure J, Peysson P, Herbage D. Localization of the expression of type I, II and III collagen genes in human normal and hypochondrogenesis cartilage canals. *Histochem J.* 1994; **26**: 695-704.
- [55] Yokoyama A, Muneta T, Nimura A, Koga H, Mochizuki T, Hata Y, Sekiya I. FGF2 and dexamethasone increase the production of hyaluronan in two-dimensional culture of elastic cartilage-derived cells: in vitro analyses and in vivo cartilage formation. *Cell Tissue Res.* 2007; **329**: 469-478.