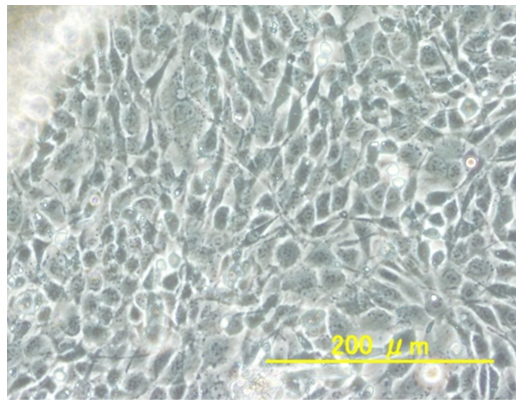
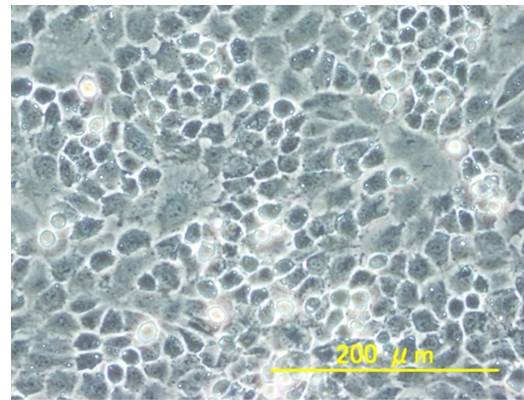


図1 概略

本研究の概略図を示す。



a



b

図 2 単層培養細胞

マウス耳介軟骨組織より分離、単層培養した細胞像.

図 2a: 細胞分離し培養皿に播種後、約 7 日目の継代前の細胞形態(P₀)

図 2b: 第一継代の細胞形態(P₁)

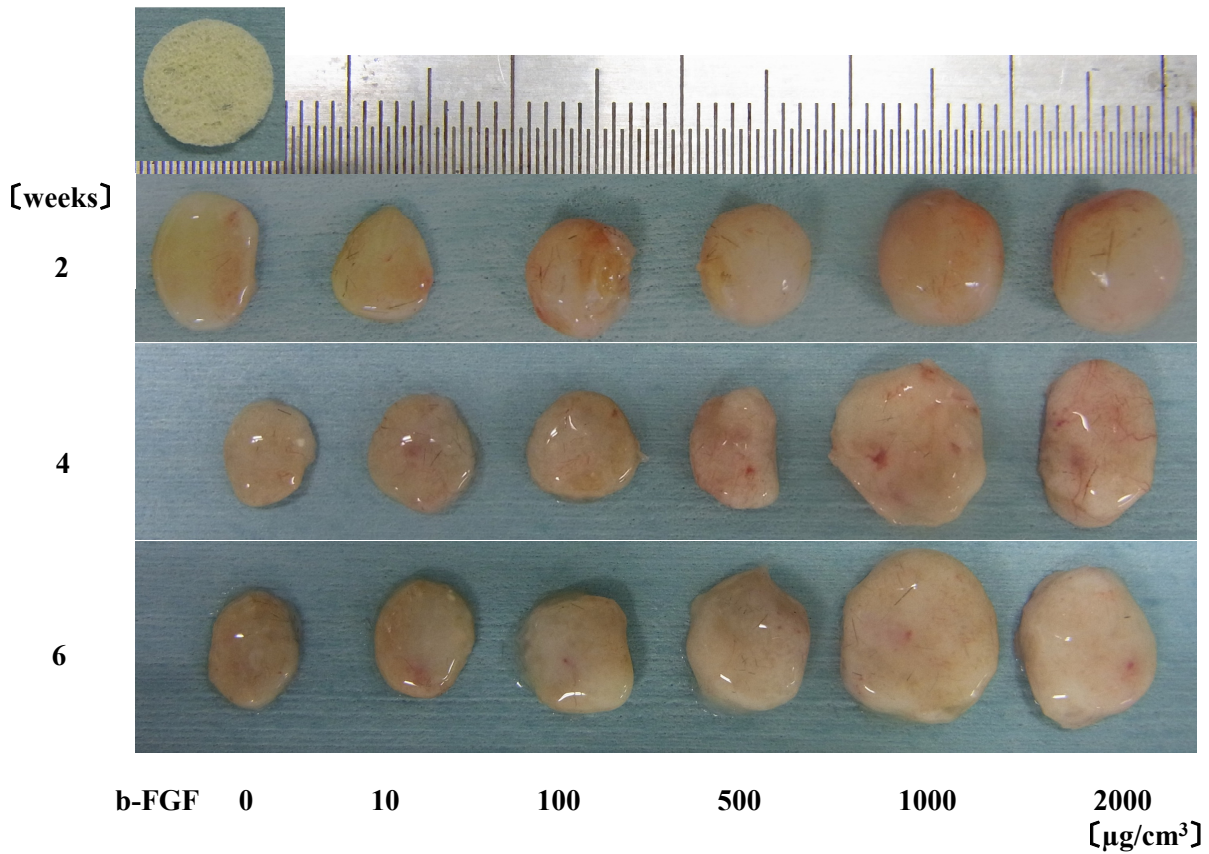


図3 摘出した再生組織（肉眼的形態）

左上に、b-FGF 含浸前のゼラチン/ β -TCP 複合体足場の形態を示す。

b-FGF を 0, 10, 100, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 含浸させ軟骨細胞を播種して、移植 2, 4, 6 週目に再生組織を摘出している。移植 2 週後の再生組織の大きさは、b-FGF 0 と 1000 と 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群で、もとの足場とほぼ同等であった。その他の投与群では、もとの足場の大きさよりも小さくなっていた。移植 4 週および 6 週後には、移植片のサイズは、b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群で足場より大きくなる傾向であった。

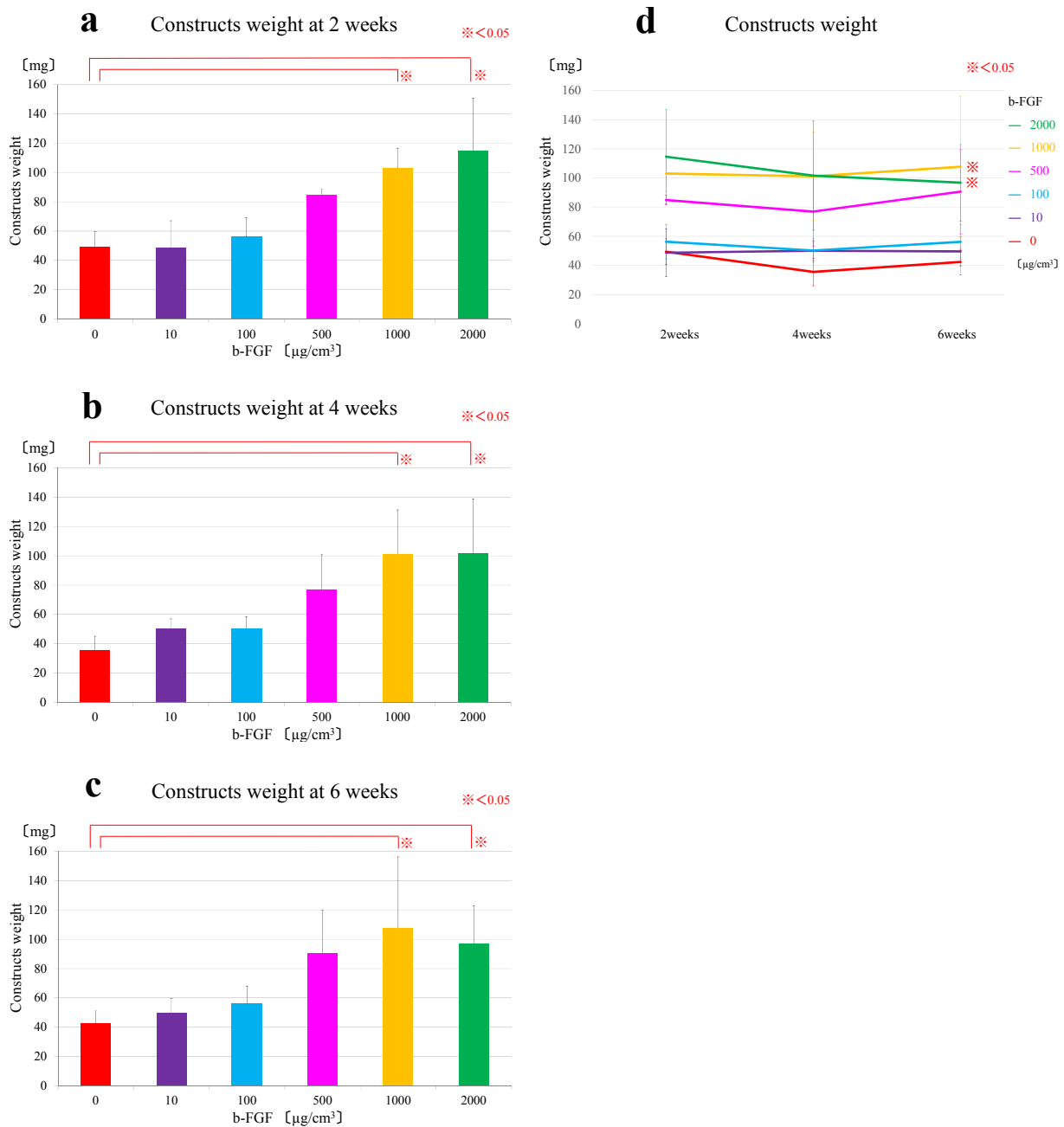
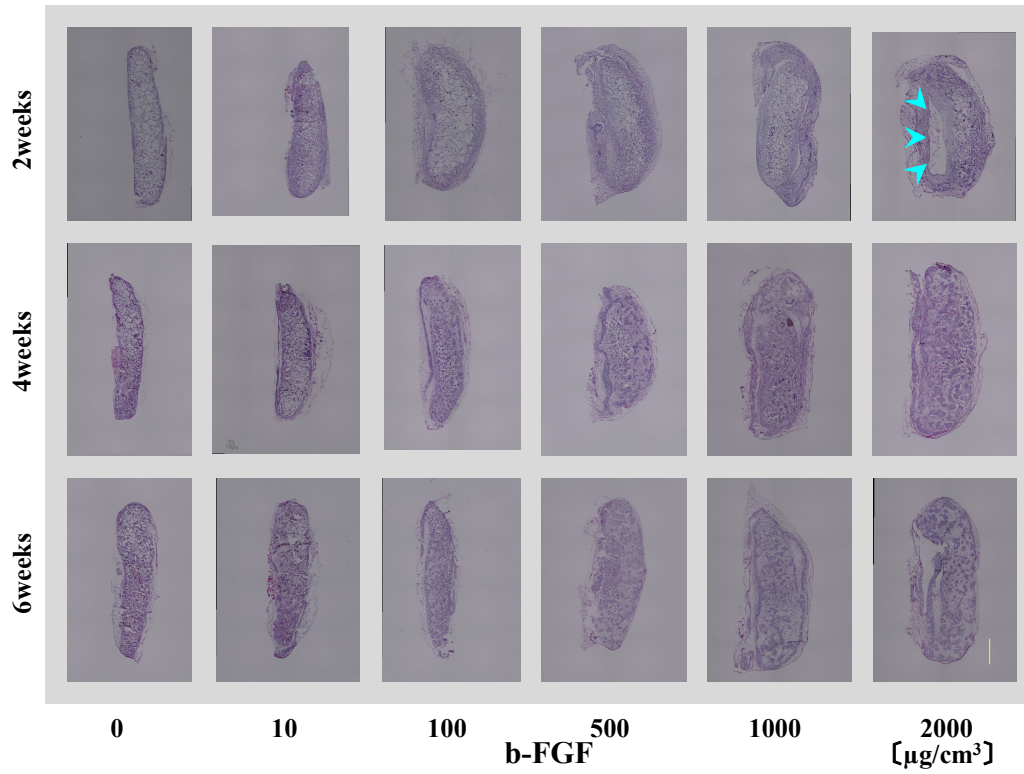
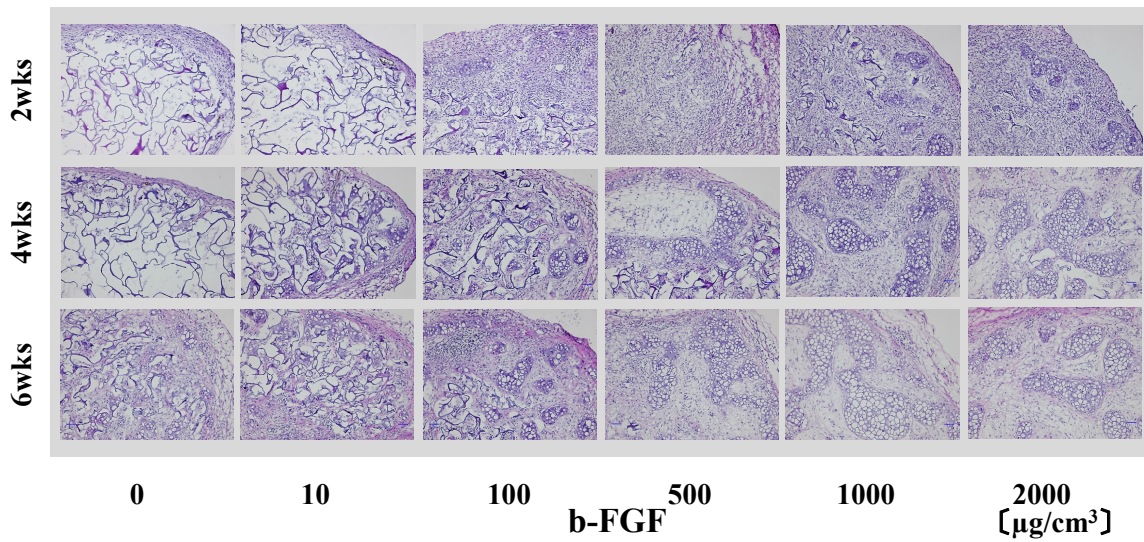


図 4 再生組織の重量

- 図 4a: 移植 2 週後、重量は徐放化 b-FGF 用量依存性に増加していた。
b-FGF 1000 および 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 群で、非投与群との有意差を認めた。
- 図 4b: 移植 4 週後、重量は b-FGF 1000 および 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 群で、非投与群と比較して有意に増加していた。
- 図 4c: 移植 6 週後も、b-FGF 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上投与で非投与群と有意差を認めた
b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 群の重量は 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ よりも低下していた。
- 図 4d: それぞれの徐放群で経時的な重量の変動に有意差はなく、移植 2 週時の重量が維持された。

a**H&E stain (×1.25)****H&E stain (×10)****図 5a H&E 染色**

摘出した再生組織の H&E 染色組織像。

移植 2 週後、b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 徐放群の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(矢頭)。

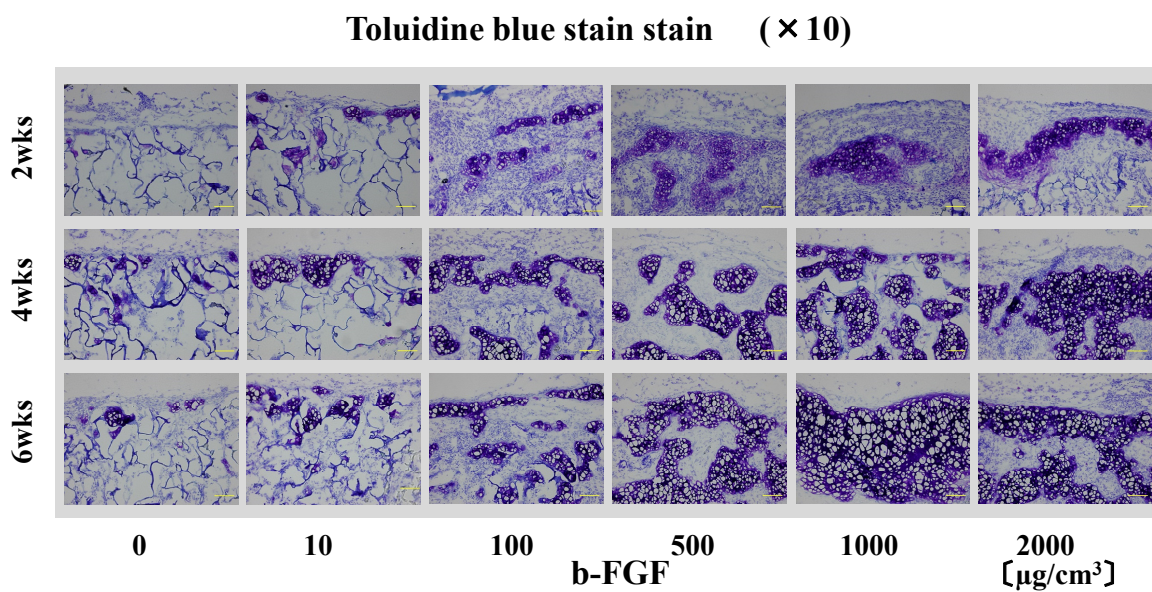
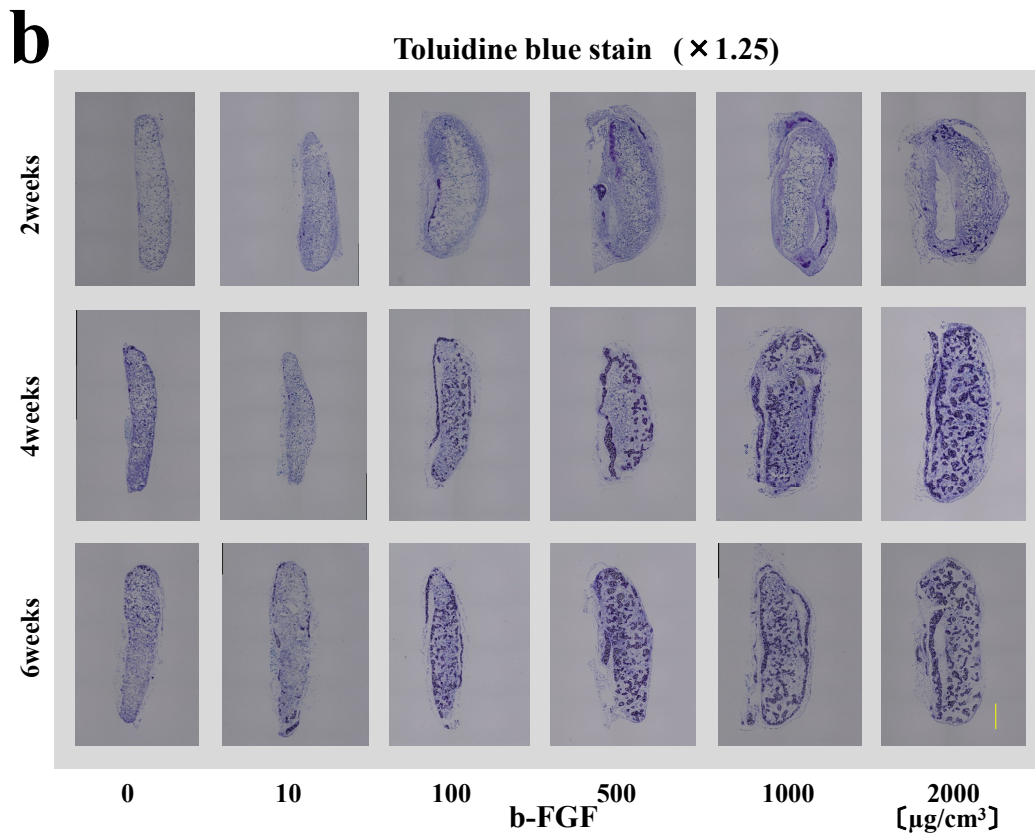


図 5b トルイジンブルー染色

移植 2 週後、b-FGF 100 µg/cm³ 以上の群で、トルイジンブルー染色にて表層付近のごく一部に染色される部分を認めた。移植 4 週以降は、b-FGF 100 µg/cm³ 以上の群で、異染色性の領域が再生組織の中央部にも観察された。

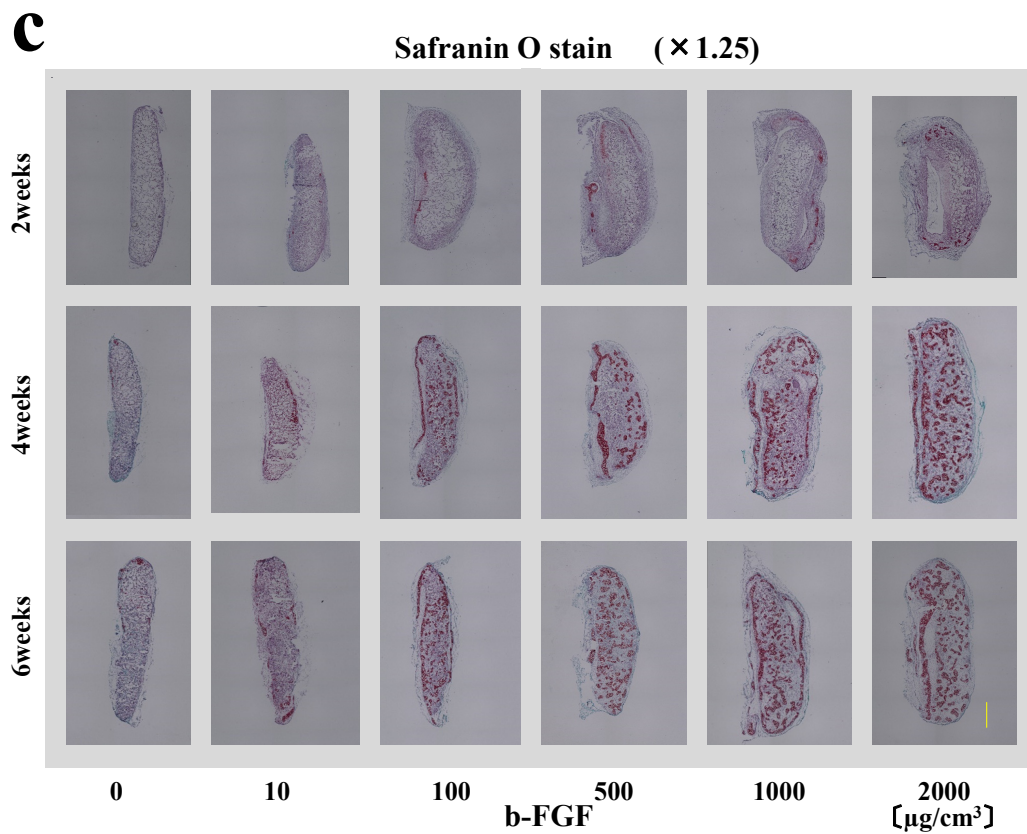


図 5c サフランin O 染色

再生組織のサフランin O 染色組織像を示す。

トルイジンブルー染色で異染色性を呈した領域が、サフランin O でも同様に赤色に染色された。

Immunofluorescence at 6 weeks (×20)

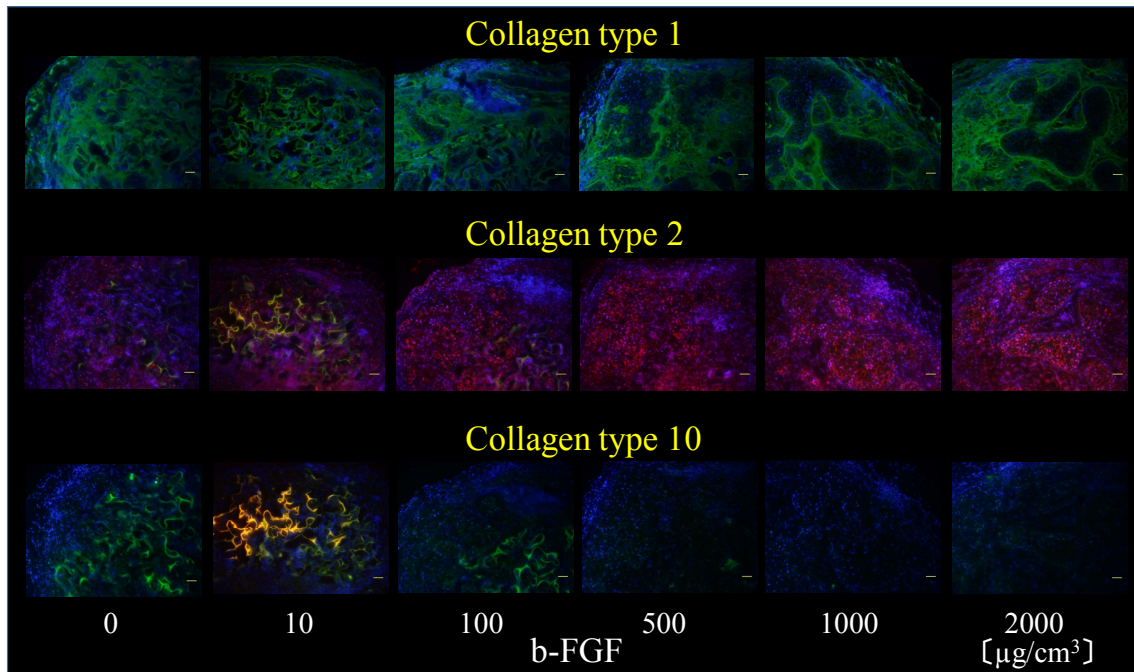


図6 蛍光免疫染色

再生組織の移植6週後1,2,10型コラーゲン蛍光免疫染色像。

移植6週後、再生組織の外側表面は1型コラーゲンにて染色された。軟骨の特異マーカーである2型コラーゲンで染色される領域が、再生組織内に確認された。10型コラーゲンで染色される領域は、b-FGF 100 μg/cm³以下の群で僅かに認められた。

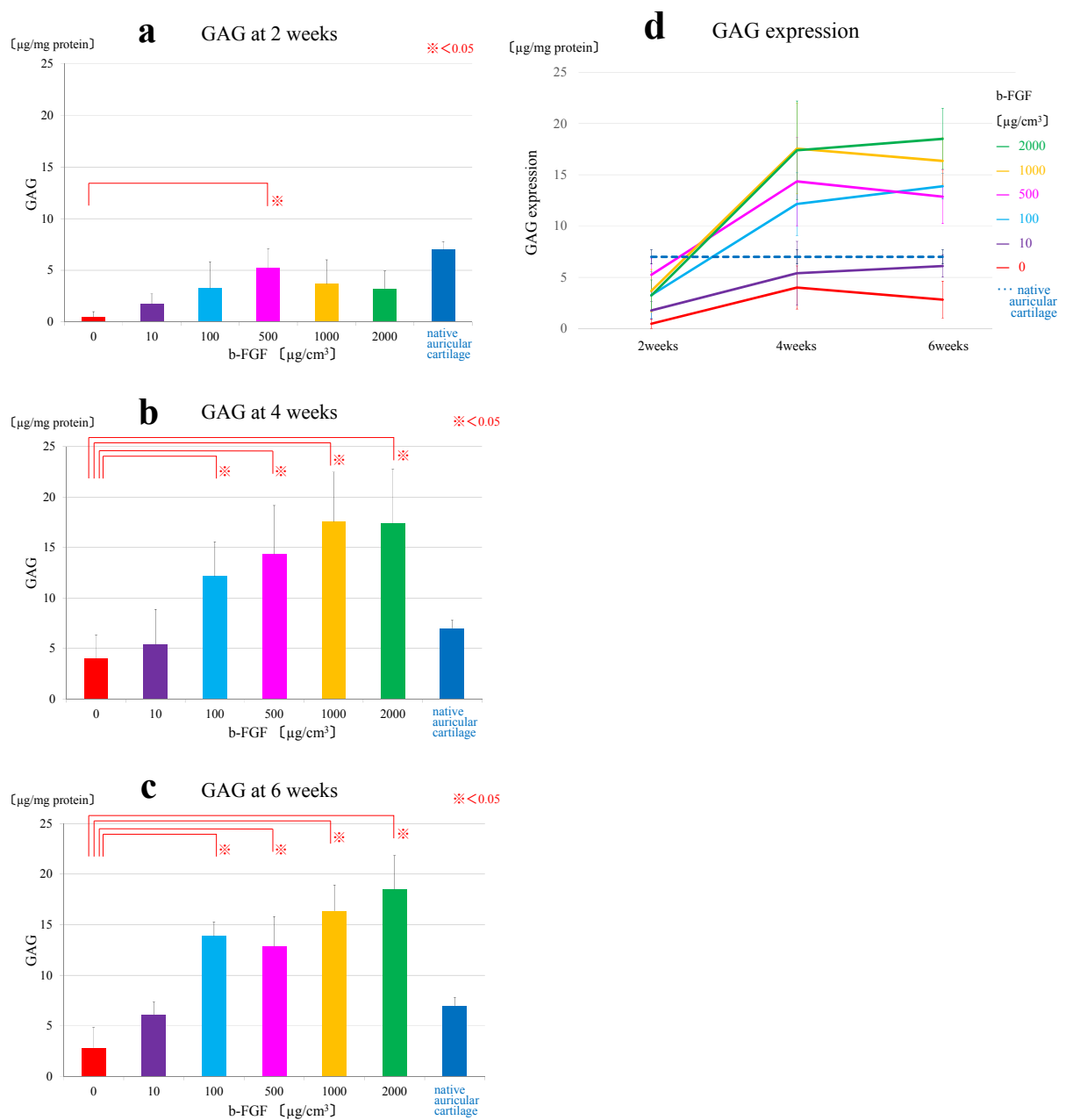


図7 グリコサミノグリカン(GAG)定量

- 図 7a: 移植 2 週後では、GAG 産生量はいずれも少なく、11 週齢マウス耳介軟骨よりも低値だった。
- 図 7b: 移植 4 週後、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の徐放群で b-FGF 非投与群に比べ、有意に高値であった。また b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群でマウス耳介軟骨より GAG 産生量が多かった。
- 図 7c: 移植 6 週後でも同様に、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で、b-FGF 非投与群やマウスの耳介軟骨よりも GAG 産生量が高値であった。
- 図 7d: それぞれの徐放群の経時的変化では、移植 2 週後から 4 週後に GAG 産生量が増加した。

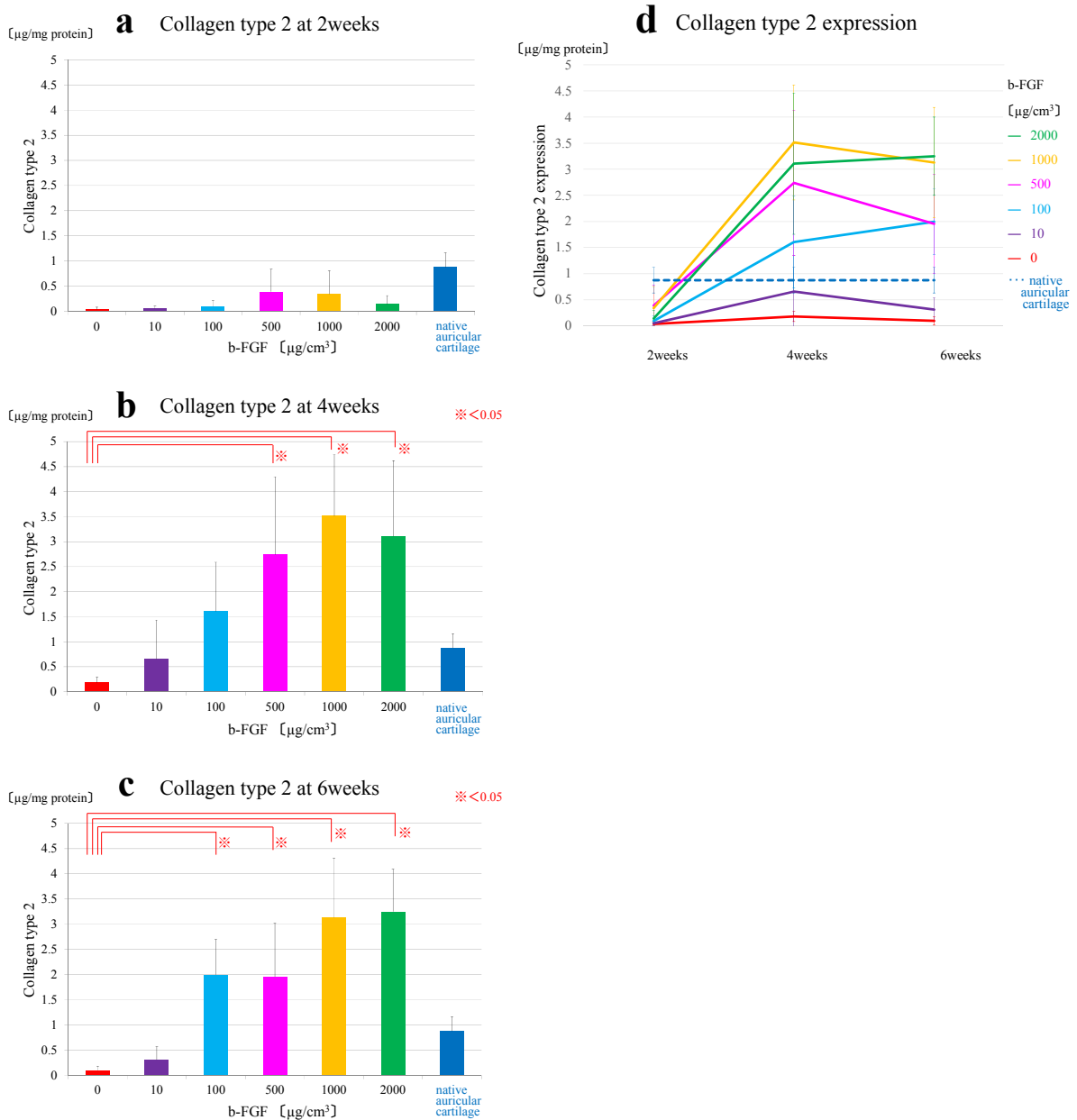


図 8 2型コラーゲン定量

- 図 8a: 移植 2 週後、いずれの b-FGF 徐放群でも 2 型コラーゲンの産生量は極めて微量で、11 週齢マウスの耳介軟骨組織よりも少なかった。
- 図 8b: 移植 4 週後、b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群は、b-FGF 非投与群に比べ、2 型コラーゲンは有意に高値であった。また b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で、マウス耳介軟骨よりも 2 型コラーゲン産生量が多かった。
- 図 8c: 移植 6 週後、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群は、b-FGF 非投与群やマウス耳介軟骨よりも高値を呈した。
- 図 8d: 各群の 2 型コラーゲンの経時変化では、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群で移植 4 週後に増加した。b-FGF 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ と b-FGF 非投与群では耳介軟骨よりも低値の状態が継続した。

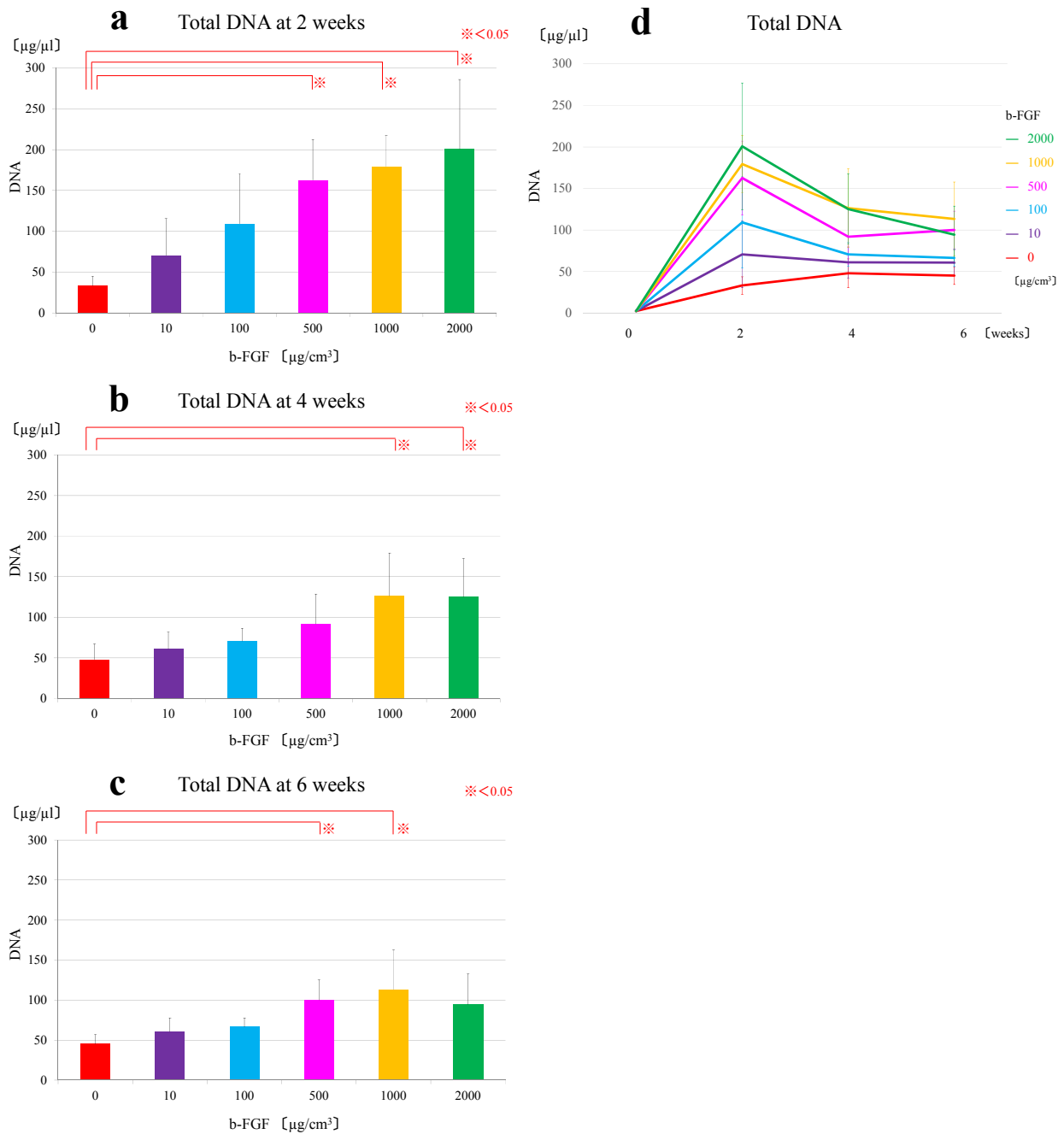


図9 再生組織の総DNA量

図9a: 移植2週後、DNA量は徐放性b-FGFの増量に依存して増加していた。b-FGF 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群は非投与群より有意にDNA量が高値であった。

図9b: 移植4週後、b-FGF 1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上の群は、非投与群に比べ有意にDNA量が高値であった。

図9c: 移植6週後、b-FGF 500と1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の投与群は非投与群より有意に高いが、2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ の群は有意差を認めなかった。

図9d: 経時変化では、非投与群を除くb-FGF徐放各群でDNA量は移植2週で最大値となり、4,6週後に減少した。

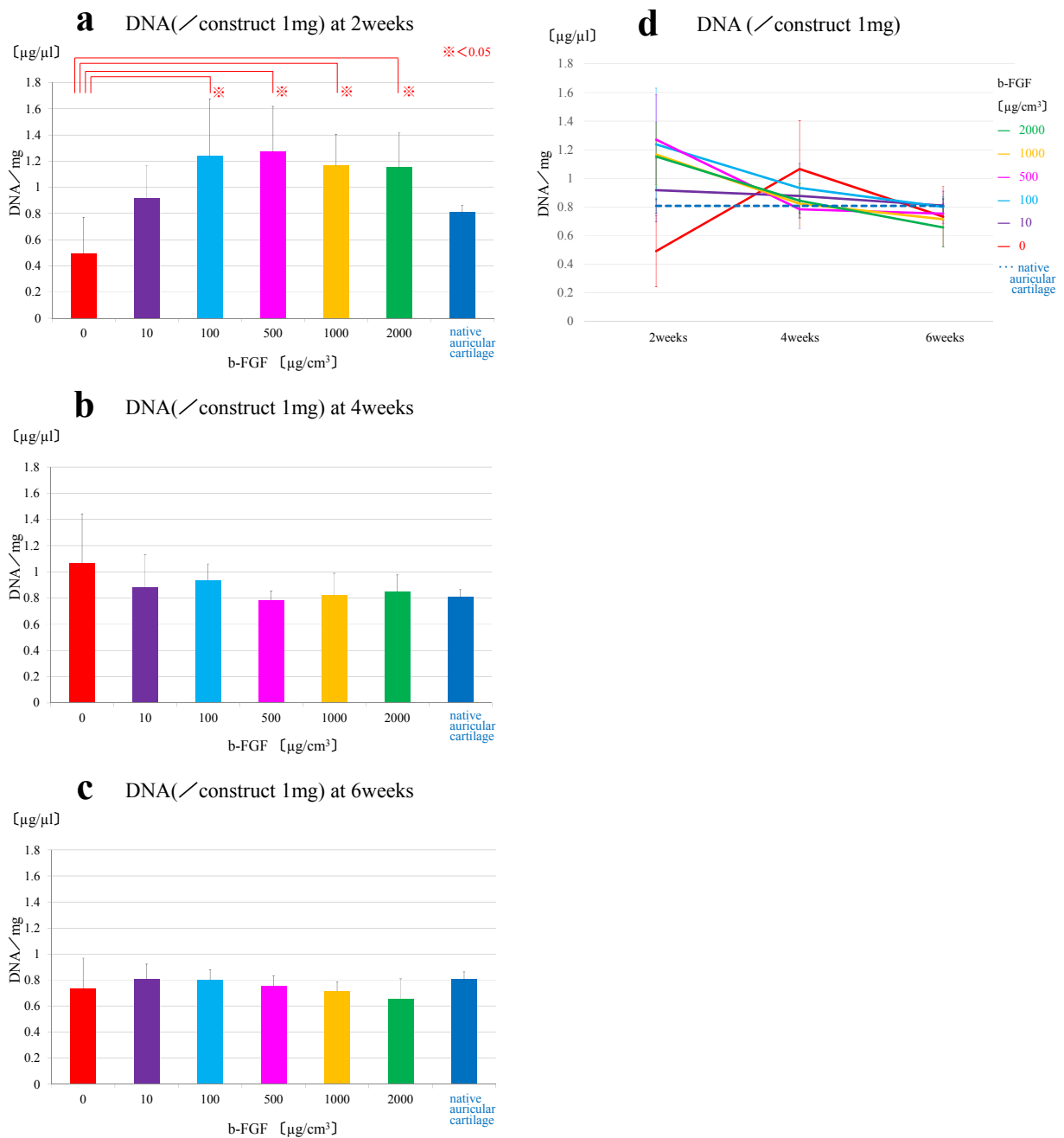


図 10 再生組織 1mg あたりの DNA 量

- 図 10a: 移植 2 週後、b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の徐放群は、再生組織 1mg あたりの DNA 量が、b-FGF 非投与群に比べ有意に高値であった。
- 図 10b: 移植 4 週後、b-FGF 徐放投与群の組織 1mg あたりの DNA 量は 2 週目より減少し、非投与群が最も高値であった。
- 図 10c: 移植 6 週後には、DNA 量は組織 1mg あたりでは、どの群もほぼ同等の量であった。
- 図 10d: 経時的变化では、b-FGF 徐放各群は組織 1mg あたりの DNA 量が移植 2 週後に最大で、非投与群は移植 4 週後に最大となった。

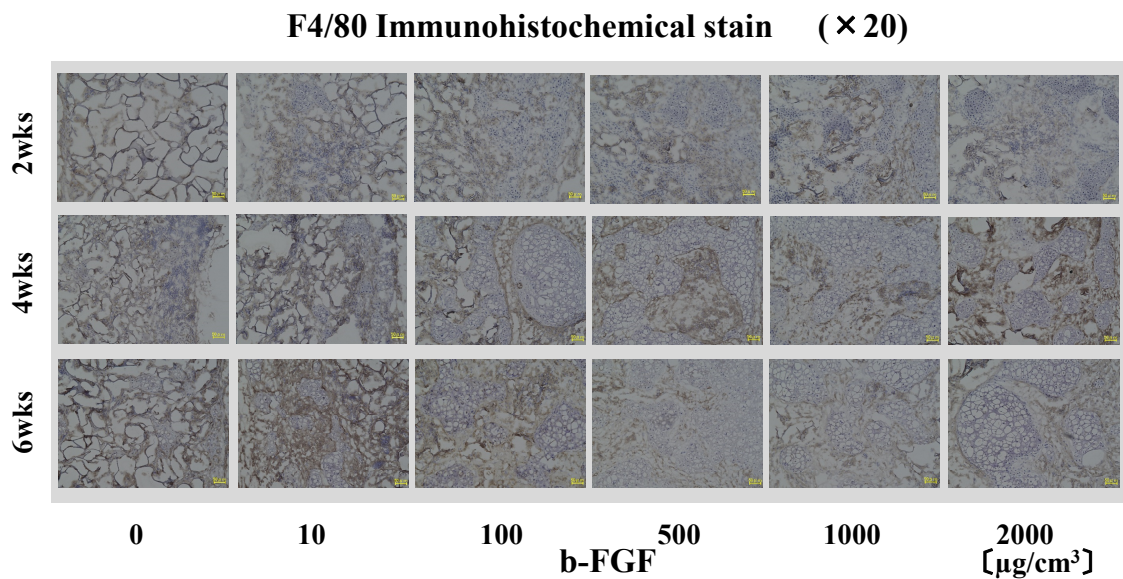
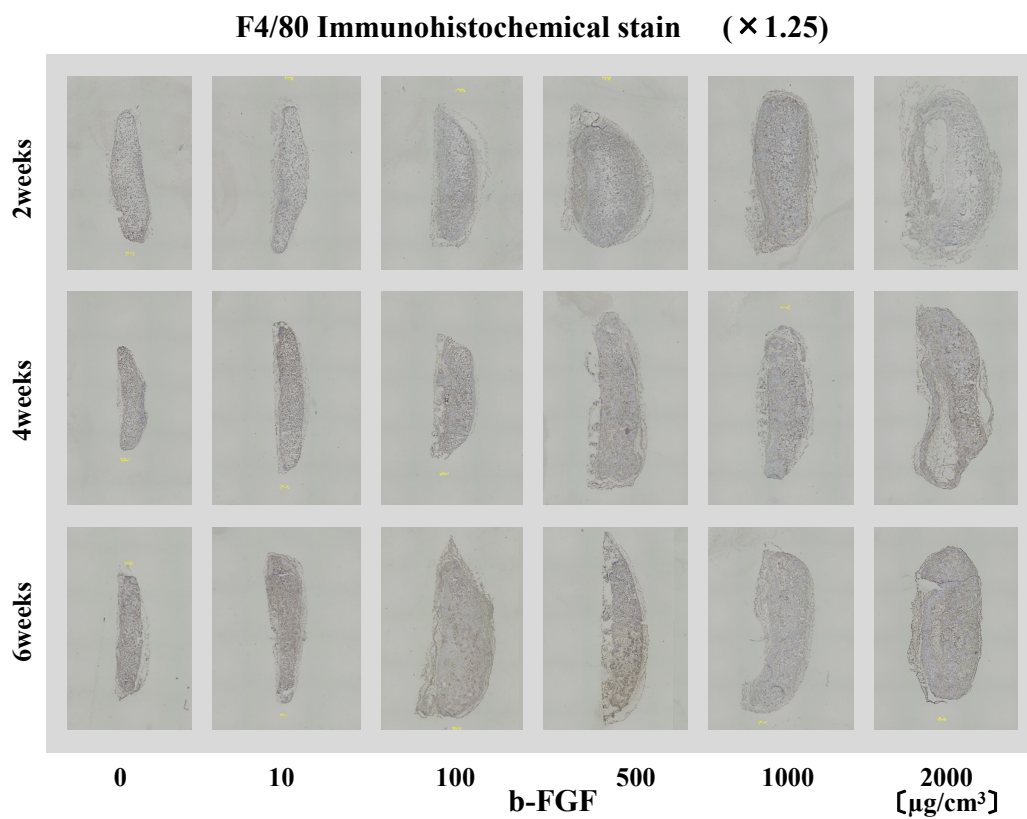


図 11 F4/80 免疫染色像

再生組織の F4/80 免疫組織化学的染色を行った。

各群の強拡大(×20, 722×538 µm) 無作為 4 視野で、領域の染色陽性細胞と陰性細胞をカウントした。

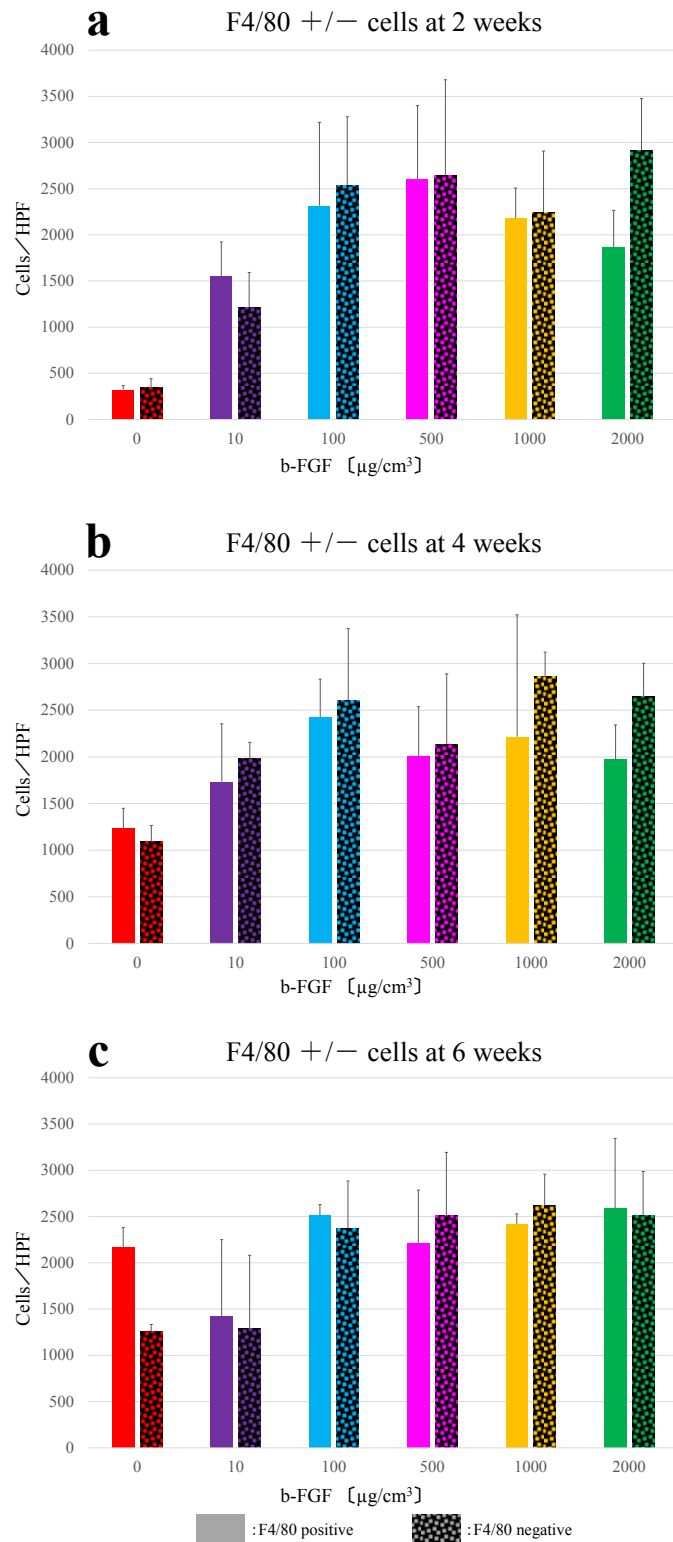


図 12 F4/80 染色陽性／陰性細胞数

移植 2,4,6 週後の F4/80 免疫染色陽性細胞数と染色陰性細胞数を示す。徐放性 b-FGF の増量によって、再生組織内へ F4/80 染色陰性細胞数の増加を認めたが、同様に F4/80 染色陽性細胞数も増加していた。

再生組織の軟骨基質産生の経過

	移植2週	4週	6週
組織学的所見 トリイジンブルー染色 サフラニンO染色	b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 表層 (+)	b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 表層・内部 (+)	b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 表層・内部 (+)
GAG 定量		b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 対照・耳介軟骨 より高値	b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 対照・耳介軟骨 より高値
2型コラーゲン 定量		b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 対照・耳介軟骨 より高値	b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上 対照・耳介軟骨 より高値

図 13 再生組織の軟骨基質産生の経過

トリイジンブルー／サフラニン O 染色では b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で、移植 2 週に表層に、移植 4 週以降内部にも軟骨基質が観察された。GAG／2 型コラーゲンは b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 以上で、移植 4 週以降、対照群やマウス耳介よりも高値であった。

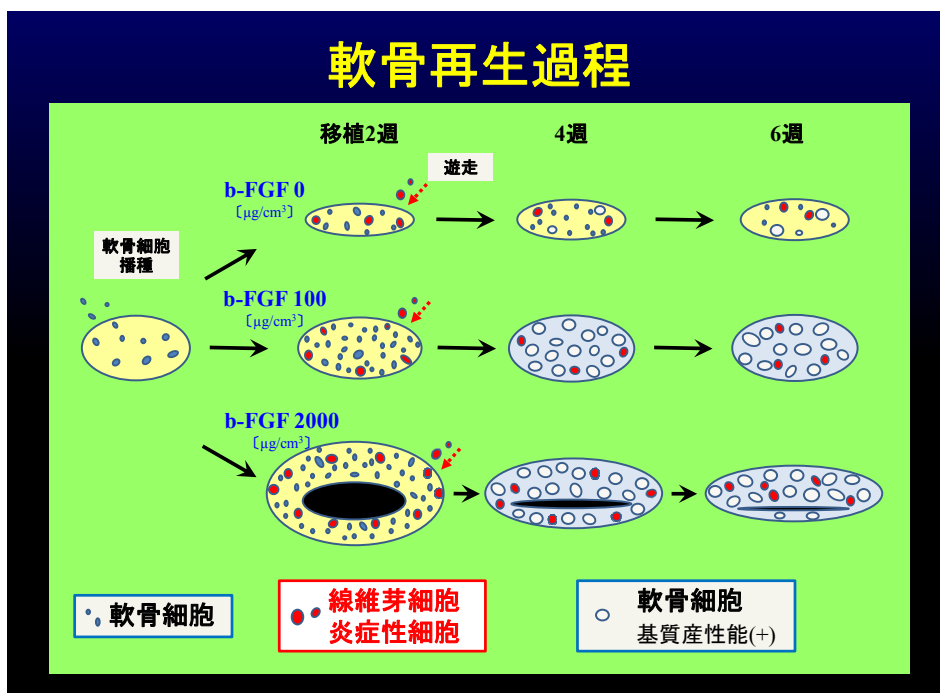


図 14 本実験の軟骨再生過程

b-FGF 0 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ では高密度培養とならず軟骨再生がなされない。b-FGF 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ では細胞が過剰増殖し、再生組織はもとの足場より大きくなる。b-FGF 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 徐放投与で足場とほぼ同等の大きさの再生軟骨が得られた。