博 士 論 文

軟骨再生医療における効率的な細胞回収と培養法に関する研究

米永　一理

目次

１．　　要旨

２．　　序文

３．　　方法

４．　　結果

５．　　考察

６．　　結論

７．　　謝辞

８．　　引用文献

図説

1.　要旨

本研究は、安定した軟骨再生医療を提供するためのプロトコール作成の一環として、ヒト耳介軟骨からの軟骨細胞単離におけるコラゲナーゼ処理濃度・時間および単離後の播種濃度の最適化を図り、より効率的な細胞培養の方法の確立を行った。結果、客観的な軟骨細胞数の評価として、自動測定器の有用性が明らかになり、その上で 250～1,000μm の軟骨片から軟骨細胞を単離するための最適な条件は、コラゲナーゼ濃度 0.3%24 時間、または 0.6%6 時間で浸漬し、細胞播種密度を 3,000～10,000 細胞/ cm^2 の範囲で培養することであった。さらに、初代培養時に発生する浮遊細胞を用いると、通常培養のみ場合と比べ約 1.5 倍の細胞数を確保できることを解明した。

2.　序文

現在、先天奇形や、組織損傷に対する再生医療工学の研究・開発が進んでいる。その中でも軟骨の研究は、整形外科領域における自家培養軟骨移植術（autologous chondrocyte implantation：ACI）が 1990 年代より実用化され(1)、形成外科・美容外科領域においては、2006 年に自家培養軟骨細胞を含む懸濁液を鼻中隔上の皮下に注入する移植術などが報告されている(2)。われわれの施設では、0.1g 程度の耳介軟骨から軟骨細胞を単離・培養して、大型の 3 次元形状と力学的強度を有するインプラント型再生軟骨の作製を試みている。この再生軟骨により、小耳症、口唇口蓋裂、鼻変形症、変形性関節症等の治療への応用を考えている。耳介軟骨の利用は、軟骨の中で採取方法が比較的簡便であり、採取の際は耳介後方部の局所麻酔のみで、短時間に施行可能であるため、患者および医療者両方にとって負担が少なくて済むメリットがある(3)。この再生軟骨の作成のためには、当施設での従来法（100 万細胞）よりも大量の軟骨細胞（1 億細胞以上）が必要となることが予想された。この再生軟骨作成の過程では、細胞の単離の際に、十分量の細胞を、短時間で安全に回収することができ、初代培養において、できるだけ多くの細胞を確実に培養できることが望ましい。しかし、軟骨は、単に軟骨細胞からのみからなるのではなく、豊富なコラーゲンを基質とするマトリックスを含んでいるため(4, 5)、コラゲナーゼの浸漬処理による消化を必要とする。よって、軟骨を軟骨細胞に単離することは容易ではない(6)。コラゲナーゼ処理は、軟骨細胞の活性を減少させ、増殖、分化を抑制するため(4)、適切な濃度・時間での処理が必要である。また、軟骨細胞は継代数が増えるほど、脱分化を起こし、基質産生能を失うことが知られている(7)。このことは、正常な再生軟骨を作成

できないことを意味する。さらに、継代操作そのものも、再生組織の細菌汚染や取り違え事故のリスクを増加させる。したがって、コラゲナーゼ処理による細胞単離により、できるだけ多くの細胞を確保し、必要最低限の細胞播種濃度で培養し、最大限の細胞数を獲得することで、継代数を極力減らす必要がある。

軟骨再生医療に取り組んでいる各研究室では、それぞれの経験や知見に応じて、様々なプロトコールを組み立てて研究をすすめている。その中で軟骨片から軟骨細胞を単離・培養することは、各研究室が行う上では問題なく、一定の結果を得られているかもしれない。しかしながら、安定した軟骨培養の結果を出し、再生軟骨を広く臨床応用するためには、標準化されたプロトコールが必要である。

プロトコール作成のためには、まず軟骨片から軟骨細胞を単離した際の細胞数のカウントが、正確である必要性があると考えた。従来の軟骨細胞を単離・継代する際の血算板を用いた目視による細胞数のカウントは、安価であり、汎用性があるものの、煩雑であり、正確かつ精密な測定結果を得るには、限界がある(8, 9)。再生医療において簡便で再現性があることは重要であり、細胞数を正確に把握できれば、客観的な評価だけでなく、効率的な細胞培養にも繋がるため、測定機械の検討が不可欠である。そこで、線維芽細胞などの培養細胞の細胞数カウント、および細胞生存率測定法として研究室レベルで最も実績のある自動細胞測定器 NucleoCounter®に注目した(10, 11)。この自動測定器が、軟骨細胞数のカウントにも適しているか、特に軟骨片から軟骨細胞を単離した際の、軟骨膜などの不純物を含んでいる懸濁液中の細胞数もカウントできるか不明であった。よって、自動測定器のカウント結果に正確さと精密さがあるかを調べ、妥当性を明らかにすることで、再生軟骨医療における臨床的意義があるかを解明できると考えた。

次に耳介軟骨細胞単離時における至適コラゲナーゼ濃度を検証し、さらに、軟骨細胞単離後のバイアビリティー（生存率）の検証と共に、至適初代軟骨細胞播種濃度を検討の必要性を考えた。コラゲナーゼは酵素であり、軟骨単離のためにはコラゲナーゼ処理が必須であるが、軟骨細胞にとっては細胞障害作用もあるため、長時間の処理は好ましくない。軟骨細胞の単離のためのコラゲナーゼ濃度および浸漬時間は、様々な施設の研究報告に記載されているが、その値は幅広い(表１)。報告されているコラゲナーゼ濃度は、0.03%から 0.6%（1,150 単位/ml 未満）の範囲で、浸漬時間は 2〜20 時間の範囲で報告があった(1, 2, 12-37)。また、先行研究では、軟骨 1g からコラゲナーゼ処理で生存軟骨細胞を 1×10^6 個未満の量を回収できたとの報告がある(28, 33)。これは、われわれの施設の結果と同様であったが、ヒトの細胞は、単離された軟骨細胞の数よりも 100 倍以上である約 1×10^8 細胞/g を含有すると考えられており(38)、回収効率を改善させる必要性があると考えられた。また、われわれの施設では、培養時の軟骨細胞播種濃度を 40,000 細胞/cm^2 で行っていたが、経験上この濃度で培養した際に、まれに細胞が凝集し、まったく生着（接着）せず、培養できないことがあった。細胞培養時の細胞播種密度は、初代培養における細胞の生存率および増殖に大きな影響を与える。つまり、低密度での播種では、細胞増殖因子であるオートクリン/パラクリン系が働きにくくなる(39)。一方で、高密度での播種では、培養細胞が十分に培養皿に接着することができず、分裂増殖するスペースが確保できない(39)。よって、軟骨片から軟骨細胞を単離する際のコラゲナーゼ濃度と、軟骨細胞の初代培養のための最適な細胞播種密度を決定することは重要と考えた。

さらに、軟骨細胞単離時のコラゲナーゼ処理の濃度・時間および単離後の播種濃度の最適化以外に、効率的な細胞培養を行う方法として、培養細胞を確実に無駄なく回収することを考えた。その中でも簡便な方法として、浮遊細胞に着眼し

た。浮遊細胞とは、培養皿に接着していない浮遊した細胞のことである。軟骨細胞の培養液を交換する際には、細胞培養のための播種濃度が適切であっても交換前の培養液中には、多くの浮遊細胞を含んでいることが顕微鏡にて明らかであった。しかしながら、どの程度浮遊細胞はあるのか、なぜ浮遊細胞が存在するのか、浮遊細胞と生着細胞（接着細胞）との違いはあるのか不明であった。このことより、浮遊細胞の存在や性質を解析し、浮遊細胞の活用の可能性を検討することで、貴重な培養細胞を有効に活用できる。つまり、従来の培養法では破棄されていた浮遊細胞の特性を明らかにすることで、より効率的な細胞培養法が確立できるのではないかと考えた。

以上のように、これまで軟骨細胞の単離・播種・培養法の最適条件に関して体系的な分析をされた報告はない。**<u>本研究では、安定した軟骨再生医療を提供するためのプロトコール作成の一環として、ヒト耳介軟骨からの軟骨細胞単離におけるコラゲナーゼ処理濃度・時間および単離後の播種濃度の最適化を図り、より効率的な細胞培養の方法を確立することを目的</u>**とした。検証は、①自動測定器NucleoCounter®の耳介軟骨細胞における有用性の検討、②軟骨細胞の至適コラゲナーゼ濃度と播種濃度の検討、③軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討の 3 項目に分けて行った。

3. 方法

当研究におけるすべての実験および操作は、東京大学医学部附属病院の研究倫理委員会の承認（承認番号 622）を受けて行った。

<u>**自動測定器 NucleoCounter®の耳介軟骨細胞における有用性の検討**</u>

はじめに、NucleoCounter®（ChemoMetec, Allerod, Denmark）と、従来目視カウントで使用していた Live/Dead® Viability Assay（Thermo Fisher Scientific, MA, USA）による計測値の相関性を、不純物のないすべて生細胞（生存細胞）である Passage 3（P3）のヒト軟骨細胞を用いて確認した。P3 軟骨細胞とは、継代を 3 回行った軟骨細胞のことである。P3 細胞を用いたのは、最終的な測定目標とする回収時の細胞懸濁液は不純物が多く**(図 1)**、経験的に正確な目測測定が困難であり、NucleoCounter®の正確な性能評価を難しくするためである。

まず、10cm の培養皿 2 枚分の軟骨細胞を回収し、正確に 3 倍希釈液（3ml）とし、よく撹拌して、その中からエッペンチューブに 500µl とった。その後、残りの 2.5ml を倍希釈の 5ml とし、同様に別のエッペンチューブに 500µl とった。その後さらに残りの 4.5ml を 10ml とし、これを基準溶液として、Live/Dead® Viability Assay にて目測によるカウントを 3 回おこなった。この平均値を基準値とした。この基準溶液からもエッペンチューブに 500µl とった。さらに、基準液から 26 倍希釈液を作り、エッペンチューブに 500µl とった。つまり、基準値を中心として、0.169 倍、0.405 倍、1 倍、26 倍希釈（最高濃度を 1 倍すると 1 倍、2.4 倍、5.9 倍、154 倍）溶液とした。計 4 本エッペンチューブに入った 500µl 溶液の細胞量を Nucleocounter® と、Live/Dead® Viability Assay を用いてそれぞれ 3

回ずつ測定した。なお、測定時にはよく撹拌し、細胞懸濁液を中間層から採取した。

具体的には、NucleoCounter®では、まず全細胞数を計測するため、軟骨細胞溶液 100µl を別のエッペンチューブにとり、細胞処理試薬 Reagent A100 と Reagent B を 100µl ずつ加え、計 300µl とし、カセット（NucleoCassette®）にサンプルを吸引し、NucleoCounter®にセットし測定した。結果の値を 3 倍にして全細胞数とした。死細胞数は軟骨細胞をエッペンチューブに 300µl とり、カセットにサンプルを吸引し、NucleoCounter®にセットし測定した。結果の値を死細胞数とした。生細胞数は全細胞数から死細胞数を引くことで求め、生存率は NucleoCounter®に付属する計算ソフトの NucleoView®を用いて求めた。

また、Live/Dead® Viability Assay では、軟骨細胞等の条件に従い、まずアッセイ試薬を常温に戻し、 calcein AM 2µl + EthD-1 1.6µl に 400µl PBS を加えて希釈し、希釈したアッセイ試薬 10µl を、軟骨細胞溶液 90µl に加えた。30 分間 室温でインキュベート後、サンプルを計算盤に移し、蛍光･コンフォーカル顕微鏡で観察した。その際の条件は、蛍光フィルターとして CalAM: N2.1、Eth: L5 を用い、励起範囲は CalAM では 500nm～560nm（FITC）、Eth では 620nm～700nm（Texas Red）とした。全細胞数計算は、［計算板の四隅（A+B+C+D）］/ 4 x 1.11x（希釈量）x 10^4 細胞とし、生存率は四隅の緑色蛍光（生細胞）と赤色蛍光（死細胞）の割合〔(生細胞数）/（生細胞数+死細胞数)〕で測定した。

次に、当施設の各実験において、ヒト耳介軟骨を単離・回収し、細胞数と生死の測定機会があるごとに NucleoCounter®と Live/Dead® Viability Assay による測定を行い、細胞数、生存率、そして生細胞数を比較検討した。これを計 18 例に対し行った。なお、正確をきすために、測定は同一人物が行い、Live/Dead® Viability Assay による測定時には、写真に記録し、盲目的かつランダムに測定を

実施した。さらに、当時の軟骨回収時の単離法である 0.15%コラゲナーゼ溶液にて 24h 振盪した溶液を、細胞数測定前の状態で 1 週間 37℃でインキュベートして、この軟骨全細胞数、生細胞数、生存率を NucleoCounter®を用いて 3 人の研究者が測定した。同時に、別の 3 人の研究者により、不純物を含んだ同溶液中の全細胞数、生細胞数、生存率を Live/Dead® Viability Assay にて 3 回計測し Coefficient of Variation（CV）値を比較した。

軟骨細胞の至適コラゲナーゼ濃度と播種濃度の検討

軟骨細胞の単離

ヘルシンキ宣言に則り、十分なインフォームドコンセントの上、3 名（8-9 歳）の小耳症の患者から手術時に摘出された遺残耳介軟骨を提供頂いた。まず、検体の軟骨片を、250～1,000μm程度の大きさになるまでハサミやピンセットを用いて細切した**(図 6 A)**。5 mL のチューブ（BD Falcon, Benford, MA, USA）に 0.15%、0.3%、0.6%、そして 1.2%の濃度のコラゲナーゼ（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）3 mL を注入した。各濃度のチューブを 4 本ずつ用意し計 16 本のチューブを準備した。そのチューブにそれぞれ細切した軟骨片を約 0.05g ずつ入れ、37℃のウォーターバスを用いて、150 サイクル/分で各チューブを振盪した。各濃度における 2、4、6、および 24 時間後の全細胞数、生細胞数、および細胞生存率を NucleoCounter®で測定した。

軟骨細胞の培養

生細胞を、1 型コラーゲンでコーティングされた 6.4 mm のプラスチック培養皿（96 ウェルプレート）に播種した。初代培養の最適な細胞播種密度を評価するため細胞を 30,000、10,000、3,000、1,000、300、100 細胞/cm^2 の密度で播種し

た。その後 2-3 日毎に培養液を交換し、1 週間後の細胞増殖状況の記録と細胞数の測定をした。また、3 週間後まで各密度で播種した細胞を培養し、細胞増殖状況を記録した。遺伝子発現の分析のためには、1 型コラーゲンでコーティングした 35mm のプラスチック培養皿（6 ウェルプレート）を使用し、軟骨細胞を培養した。培養液は、5% ヒト血清を含んだ Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM（Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA） に、線維芽細胞成長因子-2（Kaken Pharmaceutical Co, Ltd, Tokyo, Japan）100 ng/mL と、インスリン（MP Biomedicals, Irvine, CA, USA）5 μg/mL を混和したものを使用した (40)。

Real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction analysis (PCR)分析

サプライヤーのプロトコールに従って ISOGEN（Wako Pure Chemical Industries）を使用し、軟骨細胞から Total RNA を抽出した。精製した RNA 1μg から RT-PCR Kit Perfect Real Time（Takara Shuzo, Shiga, Japan）を用いて cDNA を得た。PCR により、標的遺伝子の PCR amplicon 配列を含む cDNA を、pCR-TOPO Zero II または pCR-TOPO II ベクター（Thermo Fisher Scientific）を用いてクローニングし、増幅した。RT-PCR では、QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix（Thermo Fisher Scientific）により、ABI 7700 Sequence Detection System を用い、初回変性を 94℃で 10 分間後、94℃で 15 秒後に 60℃で 1 分間を 40 サイクル反応させた。使用したプライマーの配列は、p53 として 5′-CCAGCCAAAGAAGAAACCAC-3′と 5′-CTCATTCAGCTCTCGGAAC -3′、TNF-α として 5′-CCCCAGGGACCTCTCTCTAATC-3′ と 5′- GGTTTGCTACAACATGGGCTACA-3′、IL-1β として 5′- CCTGTCCTGCGTGTTGAAAGA-3′ と 5′-GGGAACTGGGCAGACTCAAA-3′、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase と

して 5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA-3′と 5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′を用いた(41-44)。

ELISA 法を用いた一本鎖 DNA の定量によるアポトーシスの検出

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 5,000 細胞ずつ軟骨細胞を取り分け、5 分間 200×g で遠心分離した。その後培養液を除去し、PBS 入りの 80% メタノール 200μL を各マイクロウェルに添加し固定した。その固定液を除去した後、30 分間 37℃でインキュベートし、マイクロプレートへの軟骨細胞の付着を可能にするために 1-2 時間室温下に置いた。アポトーシスは、一本鎖 DNA ELISA キット（CHEMICON® International Inc., MA, USA）のプロトコールに則って評価した。ELISA は、マイクロプレートリーダーの吸光度を 405 nm として測定した。

<u>軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討</u>

軟骨細胞の単離と単層培養

前検討を踏まえて、同様に 3 名の小耳症の患者から手術時に摘出された遺残耳介軟骨を提供頂き、この軟骨片を細切後、0.3%の濃度のコラゲナーゼ（Wako Pure Chemical Industries）により 24 時間処理し、軟骨細胞を単離した。初代耳介軟骨細胞培養では、1 型コラーゲンでコーティングした 35mm のプラスチック培養皿を使用し（n=36）、5,000 細胞/ cm^2 で播種した。培養液は、前検討と同様なものをそれぞれ 2ml 使用した(25, 26)。

この 36 の培養皿を 3 つのグループに分けた（n=12/グループ）。各グループは初回の培養液の交換を、培養後 1 日目、2 日目、3 日目の 3 つとした。通常は廃棄される回収した培養液から、浮遊細胞を採取した(**図 12**)。各グループはさ

らに遠心分離（5 分間 430×g）をして培養液を交換する群と、遠心分離をせずに培養液を交換しない 2 つのサブグループに分けた。培養液を交換する群では、細胞数を NucleoCounter®を使用してカウントした(45)。初代培養の 1、2、または 3 つの培養皿（計 6 つの培養皿）から得られた細胞を、それぞれ別の 1 型コラーゲンでコーティングした 35mm のプラスチック培養皿に播種した。これらの浮遊細胞を培養した細胞は、初代培養細胞播種した生着細胞の回収日と同じ 7 日目に回収した。播種した細胞は、生着細胞のみを培養した場合（A）、生着細胞および浮遊細胞を同等に混合し培養した場合（F+ A）、浮遊細胞のみを培養した場合（F）の、3 つの群に分けた**(図 12)**。これらを 2.5×10^3 細胞/ cm^2 で再播種し、1 週間後、I 型コラーゲン αI 鎖（COL1A1）および II 型コラーゲン αI 鎖（COL2A1）の遺伝子発現を評価した。継代の際には、トリプシン-EDTA 溶液を使用した。

ペレット培養

培養した軟骨細胞を 10^7 細胞/ mL の密度で 0.8%アテロコラーゲン溶液（Kawaken Fine Chemicals, Tokyo, Japan）中に懸濁させ、可溶性因子を含む DMEM/ F12 を加え、さらに recombinant human bone morphogenetic protein-2（rh-BMP-2, kindly provided by Astellas Pharma, Tokyo, Japan）, rh-インスリン（MP Biomedicals）, and L-3, 3′, 5-triiodothyronine（T3, EMD Biosciences, Inc., CA, USA）を使用した。各因子は、以前の報告に基づいて、rh-BMP-2 を 200 ng/mL、rh-インスリンを 5 μg/mL、T3 を 100 nmol/L 使用した(46-55)。ペレット培養とし、3 週間培養後、組織学的、生化学的分析を行った。

RT-PCR 分析

前検討と同様に分析した。使用したプライマーの配列は、COL1A1 として 5′-CTCCTCGCTTTCCTTCCTCT-3′ and 5′-GTGCTAAAGGTGCCAATGGT-3′、COL2A1 として 5′-GAGTCAAGGGTGATCGTGGT-3′ and 5′-CACCTTGGTCTCCAGAAGGA-3′、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) として 5′-GAAG GTGAAGGTCGGAGTCA-3′ and 5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′ を用いた。

Glycosaminoglycan (GAG)の測定

硫酸化 GAG 含有量は、アルシアンブルーアッセイ（Wieslab AB, Lund, Sweden）を用いて測定した。37℃で 1 時間、コラゲナーゼ濃度 0.3％で軟骨細胞を含むアテロコラーゲンペレットを処理後、不純物を 30 分間の遠心分離（6,000×g）によって除去した。上澄み中の GAG は、アルシアンブルー溶液を用いて沈殿させ、沈殿物を 15 分間 6,000×g での遠心分離によって、4mol/ L の GuHCl-33％のプロパノール溶液に再溶解した。混合物の分光度は吸光度を 600nm として測定した。

ELISA 法を用いた一本鎖 DNA の定量によるアポトーシスの検出

前検討と同様に分析した。

4.　結果

自動測定器 NucleoCounter®の耳介軟骨細胞における有用性の検討

P3 軟骨細胞を用いた NucleoCounter®と Live/Dead® Viability Assay による細胞数の測定を比較した結果は、**図 2** に示すように階層的重解析値である R2 乗が 0.9999 を示した。次に、不純物を含む軟骨細胞単離直後の細胞数を測定した結果では、NucleoCounter ®による値に対する Live/Dead® Viability Assay による値は、全細胞数の R2 乗が 0.9601 **(図 3 A)**、生細胞数の R2 乗が 0.9638**(図 4 A)**、細胞生存率の R2 乗が 0.9107 であり高い相関性を示した**(図 5 A)**。これらのことより、NucleoCounter® により Live/Dead® Viability Assay と近似した細胞数、生存率を測定できることがわかった。Nucleocounter®の値の違いは、Live/Dead® Viability Assay と比べ有意に低値であり、バラツキが少ない、精度の高いデータが得られたことがわかった。一方で個々人の Live/Dead® Viability Assay によるカウントは、同じ検体にもかかわらず、検者間で、また、1 回目、2 回目、3 回目でかなりのバラツキがあった**(図 3 B C, 4 B C, 5 B C)**。

軟骨細胞の至適コラゲナーゼ濃度と播種濃度の検討

軟骨片の単離時のコラゲナーゼ濃度および浸漬時間の関係は、浸漬時間が増加するにつれて、全てのコラゲナーゼ濃度において、軟骨片の体積が減少した**(図 6 B)**。コラゲナーゼ濃度 0.15%で処理した場合は、24 時間浸漬後にも軟骨片の残存が若干見られたが、コラゲナーゼ濃度 0.3%以上で処理した場合は、軟骨片はほぼ完全に消失していた**(図 6 B)**。軟骨片の消失時間は、コラゲナーゼ濃度 0.6%では 6 時間、コラゲナーゼ濃度 1.2%では 4 時間であった**(図 6 B)**。

コラゲナーゼ濃度 1.2%で 24 時間浸漬した場合を除いた全てのコラゲナーゼ濃度で、細胞の総数および生細胞数は、浸漬時間の増加に伴って増加した**(図 7 A, B)**。約 0.05g の軟骨片から得られたる生細胞の最大数は、4~5×10^5 細胞であり、コラゲナーゼ濃度 1.2%では 4 時間、コラゲナーゼ濃度 0.6%では 6 時間、コラゲナーゼ濃度 0.3%では 24 時間の浸漬で達した。しかしながら、コラゲナーゼ濃度 0.15%では 24 時間浸漬しても、軟骨片の遺残があり、3×10^5 未満の細胞しか回収できなかった**(図 7 A, B)**。コラゲナーゼ濃度 0.15%で 24 時間、コラゲナーゼ濃度 0.3%で 24 時間、コラゲナーゼ濃度 0.6%で 6 時間浸漬した際の全細胞数および生細胞数は、各コラゲナーゼ濃度で 2 時間浸漬した際よりも有意に多かった**(図 7 A, B)**。一方でコラゲナーゼ濃度 1.2%で 24 時間浸漬した際は、全細胞数および生細胞数ともに減少した**(図 7 C)**。これらより、最大限の生細胞数を得ることができる最短の浸漬時間は、コラゲナーゼ濃度 0.15%および 0.3%では 24 時間、コラゲナーゼ濃度 0.6%では 6 時間、コラゲナーゼ濃度 1.2%では 4 時間であった**(図 7 C)**。

次に、コラゲナーゼ濃度毎の細胞培養時の最適な細胞播種密度を調べた**(図 8)**。上述のように、最大限の生細胞数を得ることができる最短の浸漬時間に基づき単離した軟骨細胞を、100 から 30,000 細胞/cm^2 の密度で播種した。10,000 細胞/ cm^2 で播種した場合、いずれのコラゲナーゼ濃度でも 1 週間でコンフルエントになった。3,000 細胞/ cm^2 で播種した場合、コラゲナーゼ濃度 0.3%24 時間、コラゲナーゼ濃度 0.6%6 時間では、いずれもコンフルエントになったが、コラゲナーゼ濃度 0.15%24 時間、コラゲナーゼ濃度 1.2%4 時間の一部でコンフルエントにならないことがあった**(図 8 B)**。30,000 細胞/ cm^2 で播種した場合、コラゲナーゼ濃度 0.6%6 時間とコラゲナーゼ濃度 1.2%4 時間の半分（50%）で凝集塊が形成され、培養できないことがあった**(図 8 A, B)**。1 週間培

養した後に回収できる細胞数は、コラゲナーゼ濃度 0.3%24 時間、コラゲナーゼ濃度 0.6%6 時間で 3,000～10,000 細胞/ cm^2 で播種した場合に最大に達することがわかり**(図 9 A)**、**図 8** を補足することができた。しかし、1,000 細胞/ cm^2 で播種した場合でも、いずれも 2 週間以上の培養でコンフルエントとなり**(図 9 B)**、培養期間を十分にとればいずれは一定数の細胞を確保することができることが判明した。

コラゲナーゼ処理の各条件下での軟骨細胞のアポトーシスと炎症性サイトカインの遺伝子発現は、**図 10** に示すように、コラゲナーゼ濃度が増加するにつれてアポトーシス関連因子 P53 が増加する傾向を認めた。また、炎症性サイトカインである TNF-α および IL-1β は、コラゲナーゼ濃度 0.15%および 0.3%では 24 時間で処理した軟骨細胞ではほとんど検出されなかったものの、コラゲナーゼ濃度 0.6%以上では増加する傾向にあり**(図 10)**、高濃度のコラゲナーゼが細胞の生存性や代謝に影響を与えるうることを示唆した。実際、アポトーシスアッセイの結果も、0.6%または 1.2%とコラゲナーゼ濃度が高い場合は、浸漬時間の延長に伴い、アポトーシスが増加する傾向を示した**(図 11)**。対照的に、コラゲナーゼ濃度が 0.15%または 0.3%と低くい場合は、細胞の生存率**(図 7 C)**と P53 の発現**(図 10)**と同様に、浸漬時間の延長に伴うアポトーシスの増加は認めず、24 時間浸漬した場合が最低値となった**(図 11)**。

軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討

培養後 1、2、3 日に回収した培養液中の浮遊細胞を計測すると、いずれも生細胞数は 1 つの培養皿あたり、25 万から 30 万で特に有意な差はなかった**(図 13)**。次に、浮遊細胞を培養 1、2、3 日で回収し、培養液を交換せずにそのまま使う群と、新しい培養液に交換する群に分け、培養皿 1 つ分（約 25 万細胞）、2 つ分

（約 50 万細胞）、3 つ分（約 75 万細胞）を、新しい培養皿に播種した**(図 14)**。培養後 1 日で回収した細胞の方が 2、3 日で回収した細胞と比べて、培養期間が長いため、初代培養細胞と同じ回収時には、より多くの細胞が増殖した**(図 15)**。浮遊細胞を再播種するにあたり、遠心分離をして新しい培養液に交換すると生着細胞と同様な増殖を示し、遠心分離をせずに培養液を交換しなかった場合は増殖が不十分であり、凝集し細胞を確保できないこともあった**(図 14)**。COL1A1 と COL2A1 の mRNA の Real-time RT-PCR を用いた測定では、浮遊細胞のみを用いて継代した場合、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合、生着細胞のみを用いて継代した場合いずれでも発現に有意な差はなかった**(図 16)**。さらに、3 週間ペレットにて培養した軟骨の組織学的、生化学的分析においても、いずれの場合も有意な差は認めなかった**(図 17)**。

5.　考察

本研究により、自動測定器であるNucleoCounter®が、ヒト耳介軟骨細胞の測定に有用であることが示された。また、軟骨片から軟骨細胞を単離する最適な条件は、コラゲナーゼ濃度0.3%24時間、またはコラゲナーゼ濃度0.6%6時間で浸漬し、細胞播種密度を3,000～10,000細胞/ cm^2 の範囲で培養することであることを解明した。さらに、軟骨細胞培養時には浮遊細胞が生じていることを発見し、その浮遊細胞は、生着細胞と同様な性質を持ち、効率的な培養法として利用できることが明らかにした。以上のことを踏まえ、各検討項目に関して考察する。

<u>**自動測定器NucleoCounter®の耳介軟骨細胞における有用性の検討**</u>

今回のNucleoCounter®とLive/Dead® Viability Assayによる測定では、全細胞数、細胞生存率、生細胞数ともに近似値を示し、高い相関性が認められた。また、NucleoCounter®による計測値の一定性は高く、バラツキも少なかった。一方で、P0の個々人のLive/Dead® Viability Assayによるカウントは、同じ検体にもかかわらず、検者間で、また同一検者による複数回の測定でもかなりのバラツキがあった。これは、不純物を多く含んだ懸濁液中の細胞の判別が難しく、さらにその細胞の生死の判定は一層煩雑であること、検者間で経験や判定基準が異なること、測定するまでに希釈操作が必要なことなどが原因と考えられる(56)。つまり、目測によるカウントは、正確さ、精密さ共に欠けることが示唆された。よって、われわれの施設での従来の軟骨細胞播種濃度である40,000細胞/ cm^2 は、正確な細胞数でなかったことが考えられ、培養による細胞増殖の確

実さが乏しかった一因といえる。これらのことより、NucleoCounter®は、不純物を含む懸濁液からでも細胞数とその生死を測定可能であり、Live/Dead® Viability Assay 法と比べ、簡便で客観的であるため、正確、精密かつ効率的な軟骨生細胞数、および軟骨細胞の生存率測定法として有用であると考える。

軟骨細胞の至適コラゲナーゼ濃度と播種濃度の検討

様々なコラゲナーゼ濃度と浸漬時間で、回収できた生細胞数の結果より、コラゲナーゼ濃度 0.3%では 24 時間、コラゲナーゼ濃度 0.6%では 6 時間、コラゲナーゼ濃度 1.2%では 4 時間の浸漬により、0.05g の軟骨片から約 5×10^5 細胞を回収できたが、コラゲナーゼ濃度 0.15%では、24 時間の浸漬では約 3×10^5 細胞と十分な細胞を回収することができなかった(図 7 B)。このことは、生細胞数が最大になる軟骨片のコラゲナーゼ浸漬時間は、軟骨片が完全に消失した時点に相当し、コラゲナーゼ濃度 0.15%では軟骨片の残存がみられたことから、24 時間では最大の細胞回収量に達しなかったためと考えられる。また、浸漬時間が 2 時間で回収した細胞の生存率は、その後に回収した細胞の生存率よりも低い傾向にあった(図 7 C)。このことは、コラゲナーゼ処理の最初は、軟骨片の細切したことでダメージをうけた表面の細胞から単離されるため、浸漬時間が短いと、結果的に生細胞が少なく生存率が低くなると考えられる。この傾向は、アポトーシスアッセイの結果によっても確認できた。特に 0.15%または 0.3%の低濃度のコラゲナーゼ濃度では、浸漬時間が短い方がアポトーシスがより起こっている傾向にあった(図 11)。一方で、軟骨片を高濃度のコラゲナーゼに長時間浸漬することは、軟骨細胞への傷害性があることが、コラゲナーゼ濃度 1.2%で 24 時間浸漬した細胞から明らかになった。さらに、本研究では軟骨か

ら採取できる軟骨細胞の最大数は、約 1×10^7 個/ g であることがわかった。この細胞数は、当施設での今までの細胞回収量の 10 倍である。

　コラゲナーゼ濃度 0.6%および 1.2%で浸漬した細胞を 30,000 細胞/ cm^2 で播種すると、**図 8** に示すように一部で細胞が凝集することより、播種濃度が高すぎることも培養には適さない。これは、細胞凝集は細胞と細胞を介在する細胞外マトリックスが多くあることで促進されるため、高濃度播種ではコラゲナーゼ処理後の軟骨細胞の周りに残存する細胞外マトリックスが、軟骨細胞を凝集させることとによる(57)。軟骨片を短時間で完全に軟骨細胞に単離し、コラゲナーゼの浸漬時間を短時間とするためには、コラゲナーゼ濃度が高いほうが良い。一方で、培養時の播種密度が 30,000 細胞/ cm^2 の高濃度では、細胞外マトリックスの影響による細胞凝集をおこす可能性があり、3,000〜10,000 細胞/ cm^2 では、全ての濃度で良好な接着および増殖を示し、1,000 細胞/ cm^2 以下では**図 9 B** に示すように、培養期間が 1 週間以上必要である。つまり、軟骨細胞の培養において、低濃度（1,000 細胞/ cm^2 以下）の播種でも、時間をかければコンフルエントになる傾向にあった。このことは、適切な細胞増殖のためには、パラクリン/オートクリンシグナルが必要とされているが、細胞播種密度低いと、隣接細胞からのパラクリン/オートクリンのシグナルを十分に感受できないため、増殖に時間を要することによる(39)。コンフルエントになるまでの時間が延びれば、継代数を減らすことができ、脱分化や基質産生能の低下をより防ぐことができる可能性がある。しかしながら、再生軟骨医療を安定的に提供するためには、移植までの時期が予測できることが重要である。予測が困難な長期間の培養は、適切な細胞増殖しているか否かの判断が難しいこと、少量な軟骨片から短期間で十分な培養細胞量を確保することにはならないことなどから望ましいとは言えないと考える。対して、高濃度（30,000 細胞/ cm^2 以上）の播種

では1週間以内の短期間でコンフルエントにできるが、凝集してしまうリスクや、継代数が増え脱分化のリスクが増えてしまう。つまり細胞増殖の為には適当な細胞間スペースが必要であり、細胞は1週間程度でコンフルエントに到達する細胞密度が望ましいと考える。

コラゲナーゼ処理による軟骨組織のマトリックス構造の分離は、軟骨細胞がアポトーシス、および脱分化を引き起こす誘因となりうる。そこで、コラゲナーゼ処理の各条件下での軟骨細胞のアポトーシスと炎症性サイトカインの遺伝子発現を調べた。p53は細胞恒常性の維持に関与し、アポトーシスを誘導する(42)。TNF-αおよびIL-1βは、感染または組織の破壊に反応して自然免疫細胞によって合成される炎症性サイトカインである(44, 45)。これらのアポトーシス関連遺伝子、炎症性サイトカインの遺伝子の発現と、アポトーシスアッセイより、コラゲナーゼ濃度が低いと細胞への損傷が減少することを明らかにした。この細胞の損傷は、コラゲナーゼが消化酵素の一種であり、細胞毒性があることによると考える。

したがって、サイズが250〜1,000μmである軟骨片から軟骨細胞を単離するための最適な条件は、コラゲナーゼ濃度0.3%24時間、またはコラゲナーゼ濃度0.6%6時間で浸漬し、細胞播種密度を3,000〜10,000細胞/ cm^2 の範囲で培養することである。この条件により、少量の軟骨片から最大限の軟骨細胞を単離し、短期間に大量の軟骨細胞を培養回収することができるようになる。

<u>軟骨細胞における浮遊細胞を用いた培養法の検討</u>

今回の結果より、培養皿に生着せず浮遊している細胞にも十分な増殖能があり、また通常の生着細胞との違いがないことがわかった。浮遊細胞ができる理由として、細胞はある一定の間隔を保って生着しており(58, 59)、そこでうまく

培地に接着できなかった細胞があることによると考える。細胞培養時の増殖過程を顕微鏡にて観察すると、培養 24 時間後には生着した細胞から細胞突起の進展が見られた。文献では軟骨細胞はセルセルコンタクトではなく、セルマトリックスコンタクトをする傾向がある(60)。したがって、細胞の一部である細胞突起が占拠している平面より、容器が露出している平面のほうが接着しやすい可能性もあると推測される。また、細胞分裂の際に細胞は培地との接着性が低下し、一部浮遊するメカニズムも考えらる。つまり、細胞周期により、生着できなかった浮遊細胞であっても、新たな培養皿に適切な濃度で播種することで、生着細胞と同様な細胞として増殖を期待することができる。

遠心分離しなかった細胞では、いずれも細胞の培養皿からの剥離が見られた。遠心分離しないということは、培地交換をしないということであり、定期的な培地交換の必要性を改めて認識させられた。

この浮遊細胞を用いた培養法を用いると通常培養のみ場合と比べおよそ 1.5 倍の細胞数を確保することができ、初代培養の播種濃度の検討の結果と合わせると、およそ 0.1g の軟骨片から、およそ 100 万細胞を回収することができる。これらを、3,000-10,000 細胞/cm²で播種すると継代前（P 0）でおよそ 1000 万細胞を確保することができ、さらに P1 でおよそ 1 億細胞を確保できる。この 1 億細胞は、われわれが想定する移植再生軟骨の必要細胞数であり、およそ 2-3 週間で患者への利用が可能となる。このことにより、継代を繰り返すことによる脱分化や、細胞変性のリスクを減らし、より安全・確実な再生軟骨移植片を作製することができる。

また、この浮遊細胞を用いた培養法は、初代培養だけでなく、継代の際にも用いることができると考えられ、短期間に大量の培養細胞数を確保する一旦を担うと考える。加えて、浮遊細胞を用いた培養法は、軟骨細胞以外の生着細胞

にも広く利用できると考えられ、今後様々な細胞培養システムでの応用も期待できる。

今後の展望

　軟骨再生医療における効率的な細胞回収と培養法の妥当性を見出した本研究内容は、現在東京大学で治験が行われているヒト耳介軟骨を用いた再生軟骨の臨床応用において、実際に利用されている技術の一部である(61)。さらに、本研究内容は様々な細胞培養法の開発に応用できると考える。効率的で再現性のある細胞培養法の確立は、再生医療において幅広く必要な技術である。今後、培養液中に増殖細胞から放出される成長因子やサイトカインなどの関係を明らかとし、様々な細胞の培養技術の向上に努めていき、より安心・安全で、費用対効果の高い再生医療を提供がきるよう研究を進めていきたい。そして、細胞分裂や増殖、および癌化のメカニズムを解明するなど、生命科学の発展に寄与していきたいと考える。

6.　結論

本研究では、軟骨再生医療における効率的な細胞回収と培養法の確立を行った。具体的には、客観的な軟骨細胞数の評価として、自動測定器 NucleoCounter®の有用性を明らかにした。その上で、サイズが 250〜1,000μm である軟骨片から軟骨細胞を単離するための最適な条件は、コラゲナーゼ濃度 0.3%24 時間、またはコラゲナーゼ濃度 0.6%6 時間で浸漬し、細胞播種密度を 3,000〜10,000 細胞/ cm^2 の範囲で培養することである。さらに、初代培養時に発生する浮遊細胞を用いると、通常培養のみ場合と比べおよそ 1.5 倍の細胞数を確保することができることが明らかになった。これにより軟骨片採取後、およそ 2-3 週間で再生軟骨を患者へ移植することが可能となる。

7.　謝辞

　本研究を進めるにあたり、ひとかたならぬご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の東京大学大学院医学系研究科　外科学専攻　感覚・運動機能医学分野　口腔外科学講座　高戸　毅　教授に篤く御礼申し上げます。また、研究・実験を進めて行くにあたり、様々なご助言、ご指導を賜りました同講座　星　和人　准教授をはじめ、教室員の皆様、軟骨・骨再生医療寄付講座の皆様、そして多くの仲間の皆様に支えて頂きました。本稿を終えるにあたり、改めて心より感謝申し上げます。

8. 引用文献

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331:889-95.

2. Yanaga H, Yanaga K, Imai K, Koga M, Soejima C, Ohmori K. 2006. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. Plast Reconstr Surg 117:2019-30.

3. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. J Biol Chem. 278:41227-36.

4. Svoboda KK. 1998. Chondrocyte-matrix attachment complexes mediate survival and differentiation. Microsc Res Tech 43:111-22.

5. Eyre DR. 2004. Collagens and cartilage matrix homeostasis. Clin Orthop Relat Res 427:118-22.

6. Huckle J, Dootson G, Medcalf N, McTaggart S, Wright E, Carter A, Schreiber R, Kirby B, Dunkelman N, Stevenson S, Reiley S, Davisson T, Ratcliffe A. 2003.

Differentiated chondrocytes for cartilage tissue engineering. Novartis Found Symp 249:103-12.

7. Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, Mori Y, Takato T, Hoshi K. 2009. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A 15:1109-18.

8. Gareau DS, Bargo PR, Horton WA, Jacques SL. 2004. Confocal fluorescence spectroscopy of subcutaneous cartilage expressing green fluorescent protein versus cutaneous collagen autofluorescence. J Biomed Opt 9:254-58.

9. Jones KH, Senft JA. 1985. An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide. J Histochem Cytochem 33:77-79.

10. Shah D, Naciri M, Clee P, Al-Rubeai M. 2006. NucleoCounter—An efficient technique for the determination of cell number and viability in animal cell culture processes. Cytotechnology 51:39-44.

11. Mascotti K, McCullough J, Burger SR. 2000. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. Transfusion 40:693-96.

12. Ruszymah BHI, Lokman BS, Asma A, Munirah S, Chua K, Mazlyzam AL, Isa MR,

Fuzina NH, Aminuddin BS. 2007. Pediatric auricular chondrocytes gene expression analysis in monolayer culture and engineered elastic cartilage. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 71:1225-34.

13. Ruszymah BHI, Chua KH, Mazlyzam AL, Fuzina NH, Aminuddin BS. 2005. Formation of in vivo tissue-engineered human hyaline cartilage in the shape of a trachea with internal support. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 69:1489-95

14. Park SS, Jin HR, Chi DH, Taylor RS. 2004. Characteristics of tissue-engineered cartilage from human auricular chondrocytes. Biomaterials 25:2363-69.

15. Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA. 1999. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. Plast Reconstr Surg 103:1111-19.

16. Kamil SH, Woda M, Bonassar LJ, Novitsky YW, Vacanti CA, Eavey RD, Vacanti MP. 2003. Normal features of tissue-engineered auricular cartilage by flow cytometry and histology: patient safety. Otolaryngol. Head Neck Surg 129:390-96.

17. Kamil SH, Rodrigruez A, Vacanti CA, Eavey RD, Vacanti MP. 2004. Expansion of the number of human auricular chondrocytes: recycling of culture media containing floating cells. Tissue Eng 10:139-44.

18. Kamil S, Kojima K, Vacanti M, Zaporojan V, Vacanti C, Eavey R. 2007. Tissue-

engineered cartilage: utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol 71:71-75.

19. Kamil SH, Vacanti MP, Vacanti CA, Eavey RD. 2004. Microtia chondrocytes as a donor source for tissue-engineered cartilage. Laryngoscope 114:2187

20. Cao YL, 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.

21. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. 2002. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. J Bone Joint Surg Br 84:571-78.

22. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. 2002. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. Biomaterials 25:1545-57.

23. Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA. 2001. Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 127:1248-52

24. Yoo SA, Park BH, Yoon HJ, Lee JY, Song JH, Kim HA, Cho CS, Kim WU. 2007. Calcineurin modulates the catabolic and anabolic activity of chondrocytes and participates in the progression of experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum 56:2299-

311.

25. Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, Chung UI, Yamaoka H, Asato H, Nakamura K, Takato T, Hoshi K. 2007. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. J Biol Chem 282:20407-15.

26. Takahashi T, Ogasawara T, Asawa Y, Mori Y, Uchinuma E, Takato T, Hoshi K. 2007. Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. Tissue Eng 13:1583-92.

27. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, Koshima I, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. 2006. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. J Biomed Mater Res A 78:1-11.

28. Van Osch GJ, Van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HL. 2001. In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. Plast Reconstr Surg 107:433-40.

29. Moskalewski S, Thyberg J. 1981. Reversible changes in nuclear and cell surface topography in cells exposed to collagenase and EDTA. Cell Tissue Res 220:51-60.

30. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage

defects treated with autologous cultured chondrocytes. 1996. Clin Orthop 326:270-83.

31. Naumann A, Dennis JE, Aigner J, Coticchia J, Arnold J, Berghaus A, Kastenbauer ER, Caplan AI. 2004. Tissue engineering of autologous cartilage grafts in three-dimensional in vitro macroaggregate culture system. Tissue Eng 10:1695-706.

32. Johnson TS, Xu JW, Zaporojan VV, Mesa JM, Weinand C, Randolph MA, Bonassar LJ, Winograd JM, Yaremchuk MJ. 2004. Integrative repair of cartilage with articular and nonarticular chondrocytes. Tissue Eng 10:1308-15.

33. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjögren-Jansson E, Lindahl A. 2000. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. Clin Orthop 374:212-34.

34. Hayes AJ, Hall A, Brown L, Tubo R, Caterson B. 2007. Macromolecular organization and in vitro growth characteristics of scaffold-free neocartilage grafts. J Histochem Cytochem 55:853-66.

35. Melero-Martin JM, Dowling MA, Smith M, Al-Rubeai, M. 2006. Expansion of chondroprogenitor cells on macroporous microcarriers as an alternative to conventional monolayer systems. Biomaterials 27:2970-79.

36. Chia S, Homicz M, Schumacher B, Thonar E, Masuda K, Sah R, Watson D. 2005. Characterization of human nasal septal chondrocytes cultured in alginate. J Am Coll Surg

200:691-704.

37. Alexander T, Sage A, Schumacher B, Sah R, Watson D. 2006. Human serum for tissue engineering of human nasal septal cartilage. Otolaryngol Head Neck Surg 135:397-403.

38. Bassermann F, Frescas D, Guardavaccaro D, Busino L, Peschiaroli A, Pagano M. 2008. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. Cell 134:256-67.

39. Olney RC, Wang J, Sylvester JE, Mougey EB. 2004. Growth factor regulation of human growth plate chondrocyte proliferation in vitro. Biochem Biophys Res Commun 317:1171-82.

40. Tanaka Y, Ogasawara T, Asawa Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Mori Y, Takato T, Hoshi K. 2008. Growth factor contents of autologous human sera prepared by different production methods and their biological effects on chondrocytes. Cell Biol Int 32:505-14.

41. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. 2000. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. Cell 102:849-62.

42. Kinnally KW, Antonsson B. 2007. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. Apoptosis 12:857-68.

43. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 104:487-501.

44. Morgan MM, Clayton CC, Heinricher MM. 2004. Dissociation of hyperalgesia from fever following intracerebroventricular administration of interleukin-1beta in the rat. Brain Res 1022:96-100.

45. Yonenaga K, Nishizawa S, Akizawa M, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. 2010. Utility of NucleoCounter for the chondrocyte count in the collagenase digest of human native cartilage. Cytotechnology 62:539–45.

46. Grigoriadis AE, Aubin JE, Heersche JN. 1989. Effects of dexamethasone and vitamin D3 on cartilage differentiation in a clonal chondrogenic cell population. Endocrinology 125:2103–10.

47. Kato Y, Gospodarowicz D. 1984. Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. J Cell Physiol 120:354–63.

48. Malinin TI, Hornicek FJ. 1997. Response of human chondrocytes cultured in vitro to human somatotropin, triiodothyronine, and thyroxine. Transplant Proc 29:2037–39.

49. Maor G, Segev Y, Phillip M. 1999. Testosterone stimulates insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I-receptor gene expression in the mandibular condyle--a model of endochondral ossification. Endocrinology 140:1901-10.

50. Monsonego E, Halevy O, Gertler A, Hurwitz S, Pines M. 1995. Growth hormone inhibits differentiation of avian epiphyseal growth-plate chondrocytes. Mol Cell Endocrinol 114:35–42.

51. Rodd C, Jourdain N, Alini M. 2004. Action of estradiol on epiphyseal growth plate chondrocytes. Calcif Tissue Int 75:214–24.

52. Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y. 1998. Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. Exp Cell Res 241:1–11.

53. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. 2005. Synergistic effects

of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. Cell Transplant 14:683–93.

54. Wroblewski J, Edwall-Arvidsson C. 1995. Inhibitory effects of basic fibroblast growth factor on chondrocyte differentiation. J Bone Miner Res 10:735–42.

55. Yasuda T, Poole AR. 2002. A fibronectin fragment induces type II collagen degradation by collagenase through an interleukin-1-mediated pathway. Arthritis Rheum 46:138–148.

56. Al-Rubeai M, Welzenbach K, Lloyd DR, Emery AN. 1997. A rapid method for evaluation of cell number and viability by flow cytometry. Cytotechnology 24:161–68.

57. Steck E, Br Bun J, Pelttari K, Kadel S, Kalbacher H, Richter W. 2007. Chondrocyte secreted CRTAC1: a glycosylated extracellular matrix molecule of human articular cartilage. Matrix Biol 26:30-41

58. Bakker VM, Johnston LE Jr. 1985. The effect of Class II elastic forces on craniofacial growth in rats. J Dent Res 64:44–47.

59. Freitas PH, Kojima T, Ubaidus S, Suzuki A, Li M, Yoshizawa M, Oda K, Maeda T, Kudo A, Saito C, Amizuka N. 2007. Histochemical examinations on cortical bone regeneration induced by thermoplastic bioresorbable plates applied to bone defects of rat calvariae. Biomed Res 28:191–203.

60. Hoshi K. 2008. Present state and prospects of cartilage regenerative medicine. Clin Calcium. 18:1701-06.

61. Hoshi K. 2015. Bone Cell Biology Assessed by Microscopic Approach. Regenerative medicine of cartilage. Clin Calcium. 25:1499-1504.

図説

図 1：耳介軟骨細胞単離時の位相差顕微鏡像

コラゲナーゼ処理し初回に単離した軟骨細胞（左）と、第 2 継代時の軟骨細胞（右）を示す。

図 2．NucleoCounter®を用いて標準軟骨細胞サンプルの細胞数を測定した結果

第 3 継代のサンプル（2×10^4 細胞/mL, 5.2×10^5, 1.28×10^6 and 3.08×10^6）を、NucleoCounter®で 1 人のオペレータによって 3 回測定した結果を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

図 3. NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットを用いたコラゲナーゼ処理後の全細胞数の比較

(A) 一人のオペレータによって、NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 18 サンプルを測定した結果。各サンプルは、一度だけ測定した。

(B) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、1 人のオペレータによって NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 3 回測定した結果。

(C) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、3 人のオペレータによって NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 1 回だけ測定した結果。

図 4. NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットを用いたコラゲナーゼ処理後の生細胞数の比較

(A) 一人のオペレータによって、NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 18 サンプルを測定した結果。各サンプルは、一度だけ測定した。

(B) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、1 人のオペレータによって NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 3 回測定した結果。

(C) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、3 人のオペレータによって NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 1 回だけ測定した結果。

図 5. NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットを用いたコラゲナーゼ処理後の

細胞の生存率の比較

(A)　一人のオペレータによって、NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 18 サンプルを測定した結果。各サンプルは、一度だけ測定した。

(B)　コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、1 人のオペレータによって NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 3 回測定した結果。

(C)　コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、3 人のオペレータによって NucleoCounter®と LIVE/DEAD®キットの両方を使用して 1 回だけ測定した結果。

図 6.　A　剪刀・攝子を用いて手技にて細切後の軟骨片像

軟骨片のサイズ（n=100）は 643±381μm（平均値±標準偏差）（右が低倍率、左が高倍率）。

B　コラゲナーゼ処理後の軟骨残存片像

上段：コラゼナーゼ浸漬時間は 2-24 時間で、すべてのコラゲナーゼ濃度で軟骨片のサイズが減少していた。

下段：表は軟骨片の消化の程度を示す（多く残っている+、多少残っている±、ほぼ残っていないー）。

図 7.　コラゲナーゼ処理後の細胞数および生存率

全細胞数（**A**）、および生細胞数（**B**）は、コラゲナーゼ濃度 1.2%以外では、浸漬時間の増加に伴って増加した。細胞生存率（**C**）は、コラゲナーゼ濃度 0.6%では、浸漬時間 6 時間で最大に達し、コラゲナーゼ濃度 0.15%および 0.3%では、24 時間で最大となった。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差、統計は Dunnett’s 検定（* $P<0.05$、コラゲナーゼの各濃度における 2 時間浸漬した際の値との比較）で示している。

図 8.　至適な細胞播種密度の検討

(A)　3,000～10,000 細胞/ cm^2 の密度で播種した細胞は、1 週間以内にすべてのコラゲナーゼ濃度で十分に増殖した。30,000 細胞/ cm^2 では細胞の凝集塊ができる傾向にあり、一方で 1,000 細胞/ cm^2 以下では細胞が十分に増殖することができなかった。

(B)　細胞増殖の程度を示す表。十分増殖○、増殖不十分△、増殖せず×

図 9.　十分な細胞数を得るための至適な細胞播種密度

(A)　1 週間の培養期間で、播種密度が 3,000～10,000 細胞/ cm^2 が場合に、

最大の細胞数に達した。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差を示している。

(B) 軟骨片をコラゲナーゼ濃度 0.3%で 24 時間浸漬単離した後 3 週間培養した。播種密度が 1,000 細胞/ cm^2 以下では 2 週間以上要して十分な増殖となった。

図 10. アポトーシス関連因子と炎症性サイトカイン因子の遺伝子発現

アポトーシス関連因子の p53 と、炎症性サイトカイン因子の TNF-α および IL-1β の遺伝子発現は、コラゲナーゼの濃度が濃くなればなるほど増加傾向を示した。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差を示している。

図 11. アポトーシス ELISA の結果

アポトーシスは、有意に 24 時間コラゲナーゼ濃度 1.2%で処理後に増加した。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差、統計は Dunnett's 検定（* P<0.05、コラゲナーゼの各濃度における 2 時間浸漬した際の値との比較）で示している。

図 12. 浮遊細胞を用いた研究のデザイン

上段 : 従来の培養法では、生着細胞のみを継代し、培養液中に含まれる浮遊細胞は廃棄していた。

下段 : 浮遊細胞を分離し、浮遊細胞のみを用いて継代した場合（F)、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合（F+A)、生着細胞のみを用いて継代した場合（A）の 3 つの条件に分けて細胞継代培養した。

図 13. 培養液中の初代細胞播種後 1 日目、2 日目、3 日日目の生存浮遊細胞の数

どの時点で細胞を回収しても細胞数に有意差はなかった。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差で示している。

図 14. 浮遊細胞の採取日と播種密度別の細胞増殖の状況

培養液中の浮遊細胞を初代培養後 1 日目、2 日目、または 3 日目に、1、2、または 3 つの培養皿から回収し、遠心分離して培養液を交換し新しい培養皿に播種した場合と、培養液を交換せずそのまま新しい培養皿に播種した場合とで、細胞増殖の状態を比較した。生着細胞は、培養液を 1 日目、2 日目、または 3 日目のどのタイミングで交換しても 7 日目には十分に増殖していた（赤枠)。浮遊細胞は、遠心分離して培養液を交換した方が接着や増殖が良好であった（青枠)。

図 15.　培養 7 日目の細胞数

(A)　従来の軟骨細胞培養では、浮遊細胞を 1 日目、2 日目、または 3 日目のいつ回収しても、7 日目に約 5×10^4/ cm^2 の細胞を回収できた。

(B)　1 日目に、培養皿 1 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合、7 日目に 2.8×10^4/ cm^2 の細胞を回収できた。培養皿 2 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合、7 日目に 4.2×10^4/ cm^2 の細胞を回収できた。培養皿 3 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合、7 日目に 4.8×10^4/ cm^2 の細胞を回収できた。2 日目に回収した場合も細胞数が減少傾向であったが、ほぼ同様な結果となった。しかしながら、3 日目に回収した場合は、十分な細胞数を確保できなかった。

(C)　従来の軟骨細胞と浮遊細胞を合わせた最大収量は、培養皿 1 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合であった。

すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差で示している。

図 16.　COL1A1 と COL2A1 の mRNA の発現

Real-time RT-PCR を用いた測定では、浮遊細胞のみを用いて継代した場合（F）、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合（F+A）、生着細胞のみを用いて継代した場合（A）いずれでも発現に有意な差はなかった。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差で示している。

図 17.　3 週間ペレットにて培養した軟骨の組織学的、生化学的分析

(A)　上段：ペレット培養後の軟骨のマクロ像、下段：培養軟骨のトルイジンブルーO 染色後の組織像。スケールバーは 1mm.

(B)　GAG、COL1 と COL2 タンパク質の発現は、浮遊細胞のみを用いて継代した場合（F）、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合（F+A）、生着細胞のみを用いて継代した場合（A）いずれでも有意な差はなかった。すべての値は 3 サンプルの平均±標準偏差で示している。

表 1. 文献で報告されている軟骨細胞の単離のためのコラゲナーゼ濃度の比較

－はデータなし。

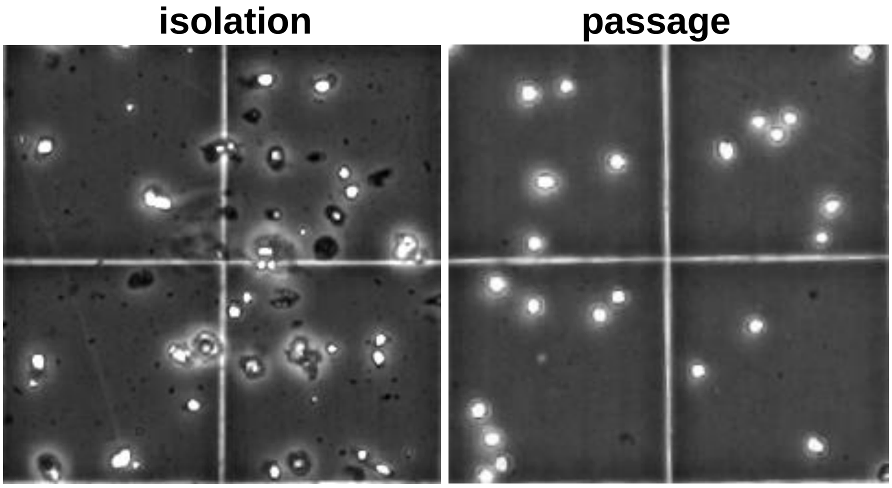


図1：耳介軟骨細胞単離時の位相差顕微鏡像
コラゲナーゼ処理し初回に単離した軟骨細胞(左)と、第2継代時の軟骨細胞(右)を示す。

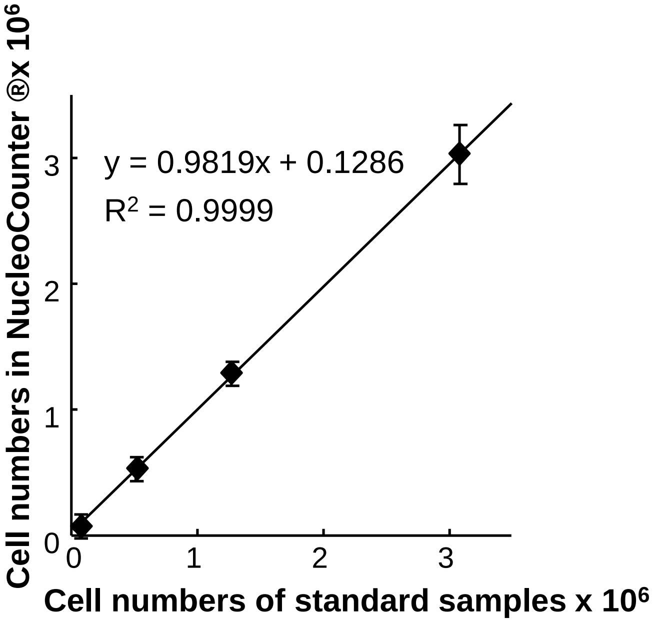
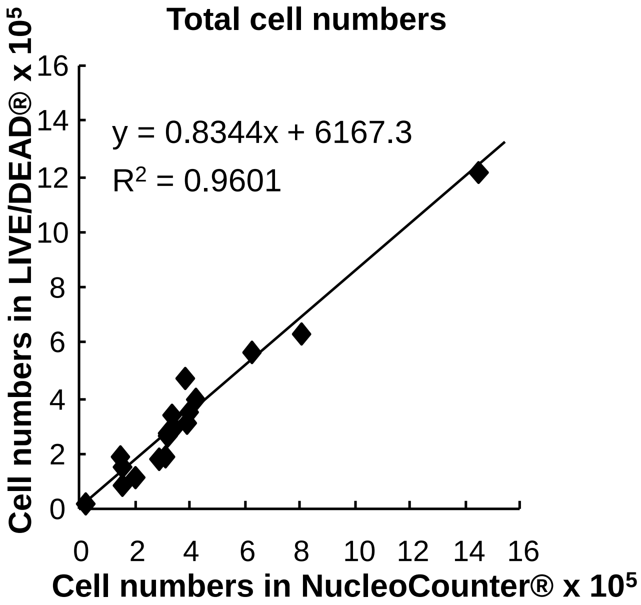


図2. NucleoCounter®を用いて標準軟骨細胞サンプルの細胞数を測定した結果

第3継代のサンプル(2 x 10^4 細胞/mL, 5.2 x 10^5, 1.28 x 10^6 and 3.08 x 10^6)を、NucleoCounter®で1人のオペレータによって3回測定した結果を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

A



B

	NuceloCounter®	Live/Dead®
Average	288,000	223,000
SD	6,000	26,300
%CV	2.09	11.8

C

	NuceloCounter®	Live/Dead®
Average	294,000	242,000
SD	7,500	105,000
%CV	2.55	43.4

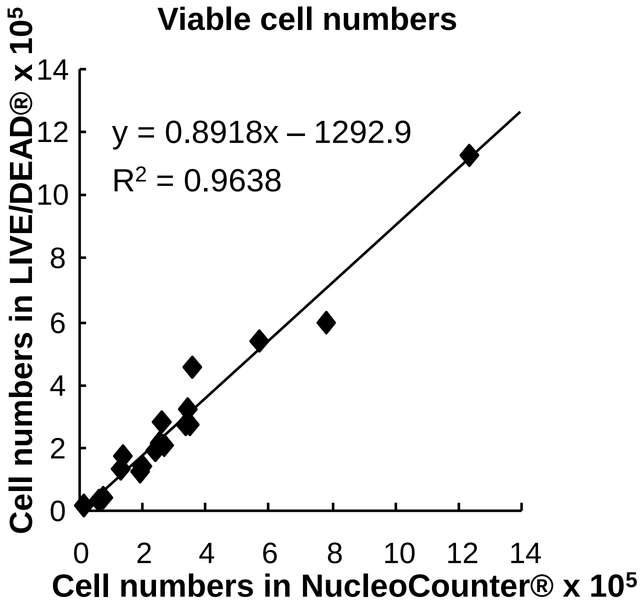
図3. NucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットを用いたコラゲナーゼ処理後の全細胞数の比較

(A) 一人のオペレータによって、NucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して18サンプルを測定した結果。各サンプルは、一度だけ測定した。

(B) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、1人のオペレータによってNucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して3回測定した結果。

(C) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、3人のオペレータによってNucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して1回だけ測定した結果。

A



B

	NuceloCounter®	LIVE/DEAD®
Average	**199,000**	**143,000**
SD	**4,160**	**26,300**
%CV	**2.04**	**17.5**

C

	NuceloCounter®	LIVE/DEAD®
Average	**200,000**	**169,000**
SD	**5,690**	**74,800**
%CV	**2.85**	**44.3**

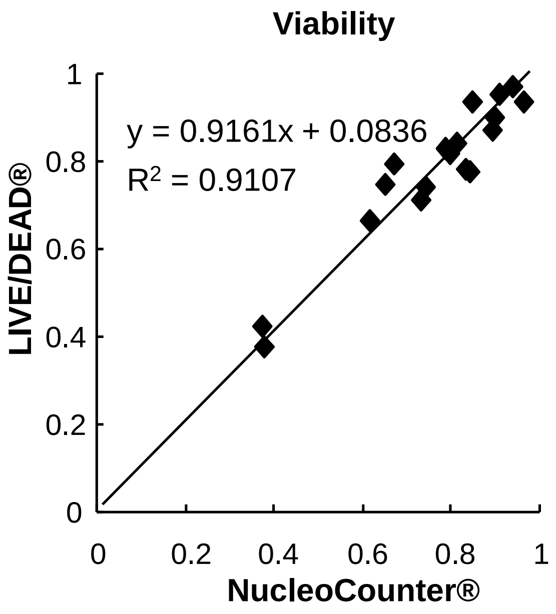
図4. NucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットを用いたコラゲナーゼ処理後の生細胞数の比較

(A) 一人のオペレータによって、NucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して18サンプルを測定した結果。各サンプルは、一度だけ測定した。

(B) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、1人のオペレータによってNucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して3回測定した結果。

(C) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、3人のオペレータによってNucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して1回だけ測定した結果。

A



B

	NuceloCounter®	Live/Dead®
Average	**67.8**	**64.0**
SD	**0.00394**	**5.08**
%CV	**0.581**	**7.95**

C

	NuceloCounter®	Live/Dead®
Average	**67.8**	**70.5**
SD	**0.569**	**12.4**
%CV	**0.840**	**17.5**

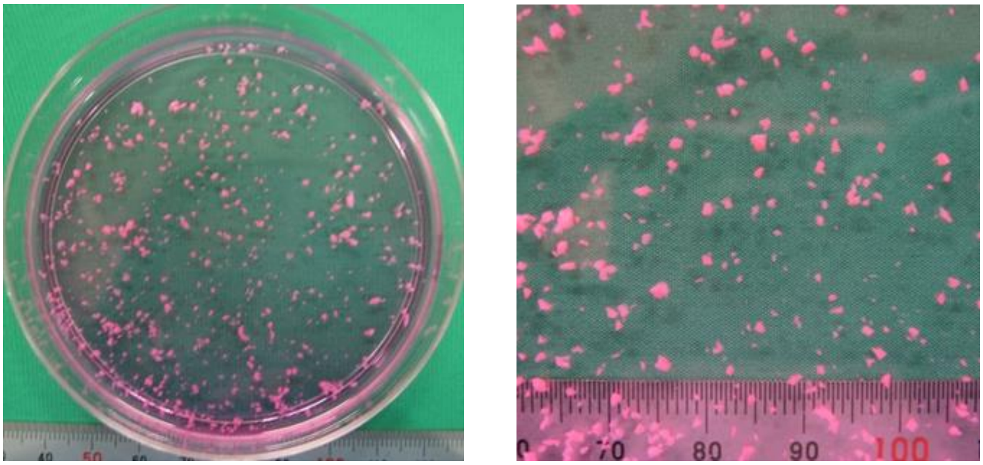
図5. NucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットを用いたコラゲナーゼ処理後の細胞の生存率の比較

(A) 一人のオペレータによって、NucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して18サンプルを測定した結果。各サンプルは、一度だけ測定した。

(B) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、1人のオペレータによってNucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して3回測定した結果。

(C) コラゲナーゼ処理後の同じサンプルを用いて、3人のオペレータによってNucleoCounter®とLIVE/DEAD®キットの両方を使用して1回だけ測定した結果。

A



B

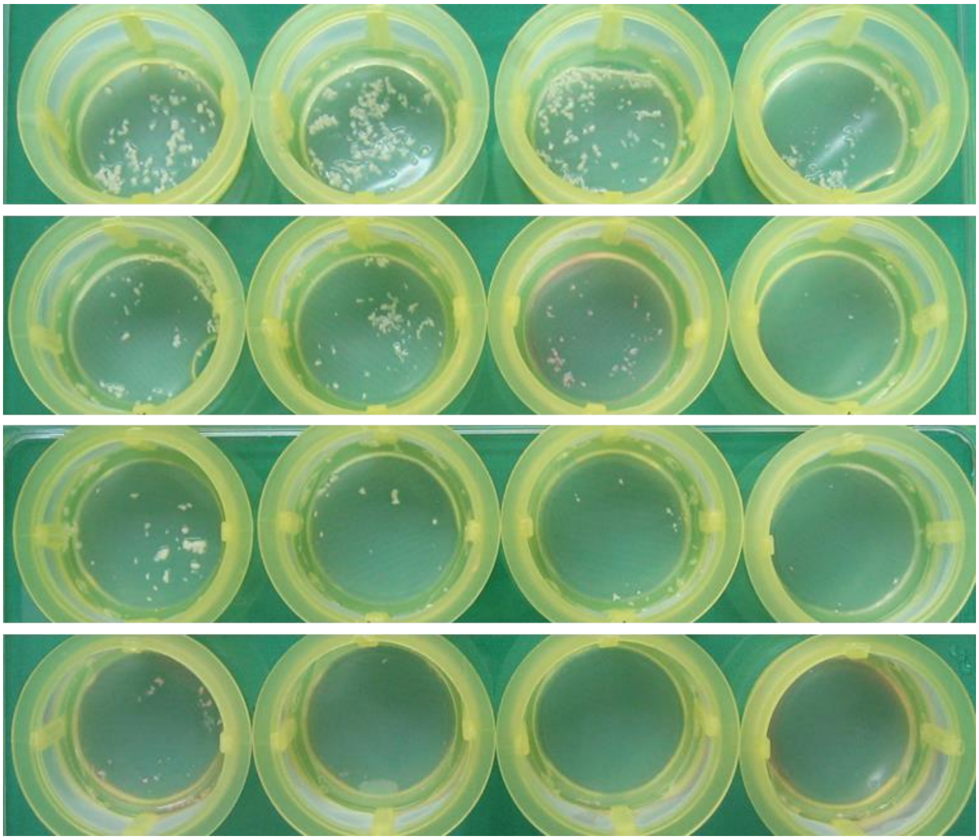
0.15% 0.3% 0.6% 1.2%

2 h

4 h

6 h

24 h



	0.15%	0.3%	0.6%	1.2%
2 h	＋	＋	＋	±
4 h	＋	＋	±	ー
6 h	＋	±	ー	ー
24 h	±	ー	ー	ー

図6. A 剪刀・攝子を用いて手技にて細切後の軟骨片像

軟骨片のサイズ(n=100)は643±381μm(平均値±標準偏差)(右が低倍率、左が高倍率)

B コラゲナーゼ処理後の軟骨残存片像

上段:コラゼナーゼ浸漬時間は2-24時間ですべてのコラゲナーゼ濃度で軟骨片のサイズが減少していた。

下段:表は軟骨片の消化の程度を示す。多く残っている+、多少残っている±、ほぼ残っていないー。

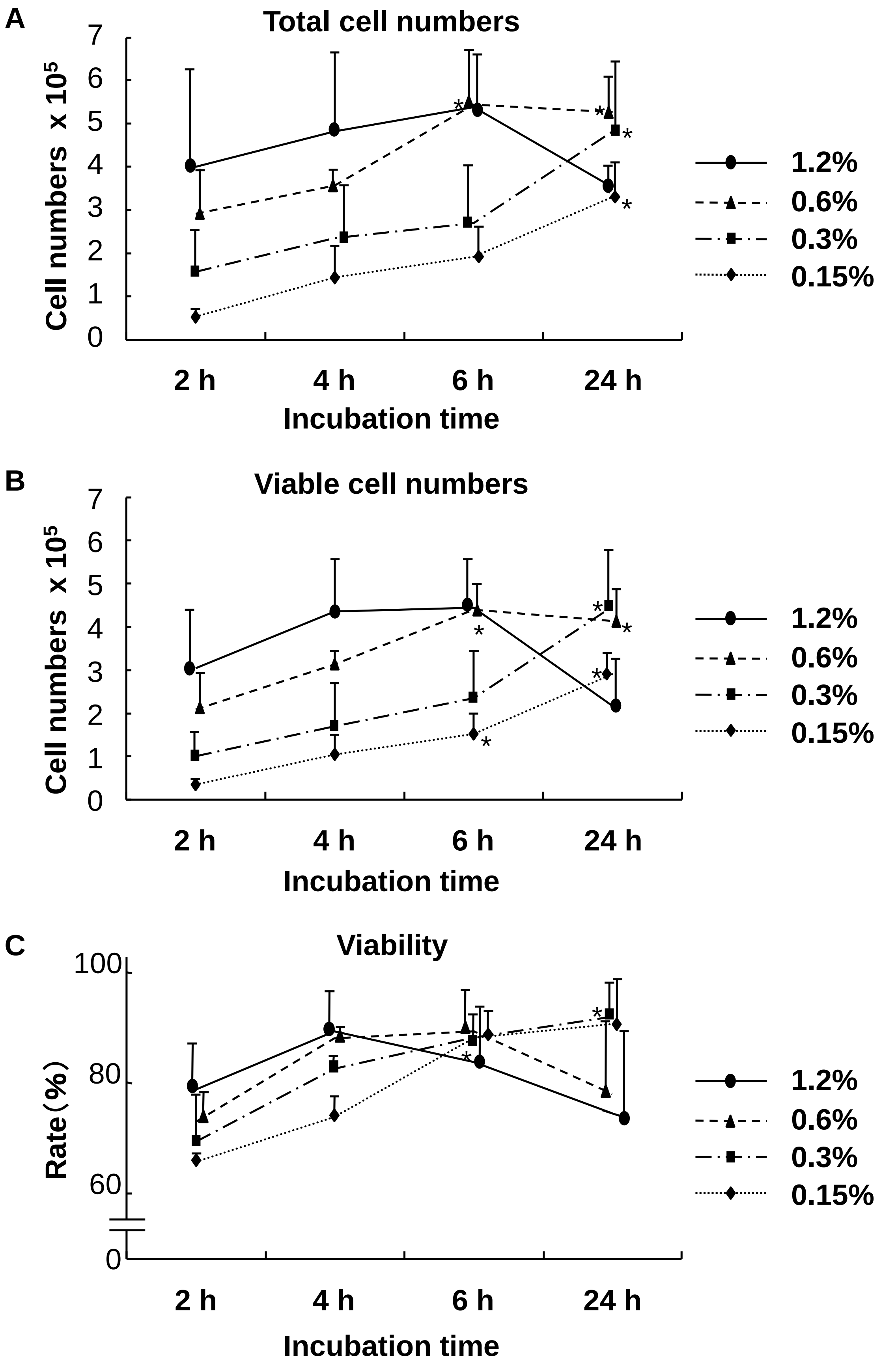
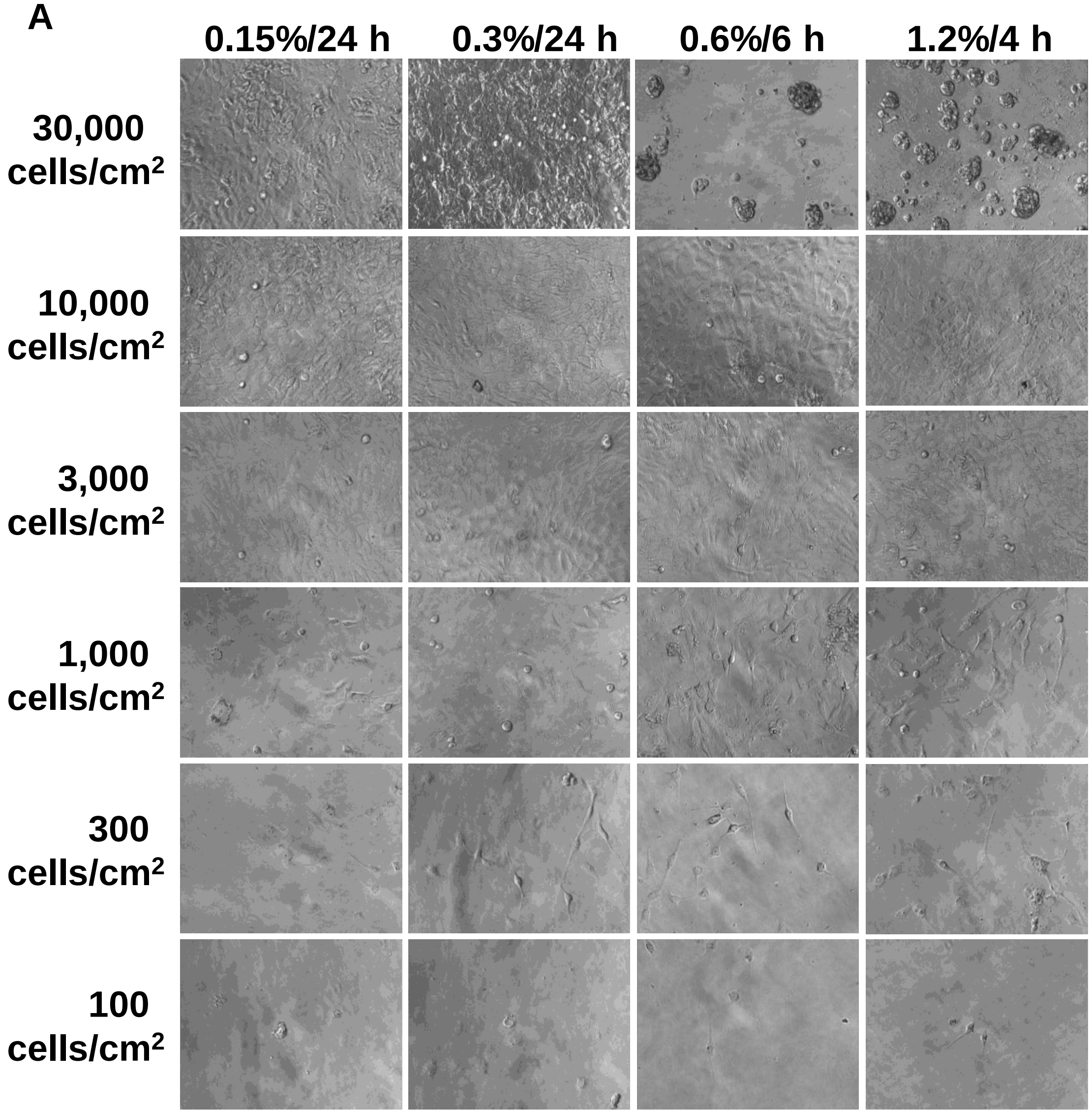


図7. コラゲナーゼ処理後の細胞数および生存率

全細胞数（A）、および生細胞数（B）は、コラゲナーゼ濃度1.2%以外では、浸漬時間の増加に伴って増加した。細胞生存率（C）は、コラゲナーゼ濃度0.6%では、浸漬時間6時間で最大に達し、コラゲナーゼ濃度0.15%および0.3%では、24時間で最大となった。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差、統計はDunnett's検定（* $P<0.05$、コラゲナーゼの各濃度における2時間浸漬した際の値との比較）で示している。

A



B

	0.15%/24h	0.3%/24h	0.6%/6h	1.2%/4h
30,000	○	○	×	×
10,000	○	○	○	○
3,000	○	○	○	○
1,000	△	△	△	△
300	△	△	△	△
100	△	△	△	△

図8. 至適な細胞播種密度の検討

(A) 3,000～10,000細胞/ cm^2の密度で播種した細胞は、1週間以内にすべてのコラゲナーゼ濃度で十分に増殖した。30,000細胞/ cm^2では細胞の凝集塊ができる傾向にあり、一方で1,000細胞/ cm^2以下では細胞が十分に増殖することができなかった。

(B) 細胞増殖の程度を示す表。十分増殖○、増殖不十分△、増殖せず×

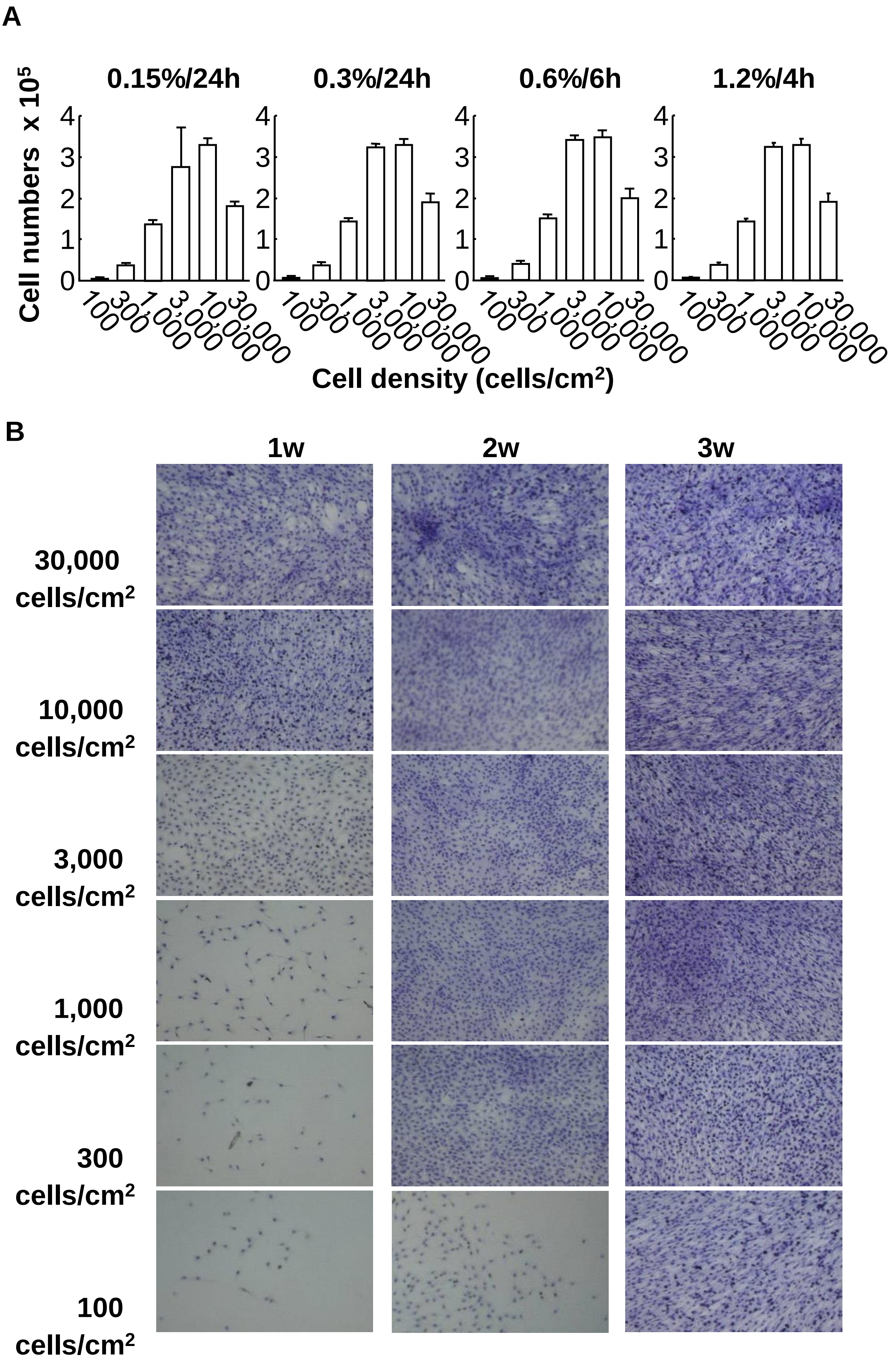


図9.　十分な細胞数を得るための至適な細胞播種密度

(A)　1週間の培養期間で、播種密度が3,000～10,000細胞/ cm^2が場合に、最大の細胞数に達した。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差を示している。

(B)　軟骨片をコラゲナーゼ濃度0.3%で24時間浸漬単離した後3週間培養した。播種密度が1,000細胞/ cm^2以下では2週間以上要して十分な増殖となった。

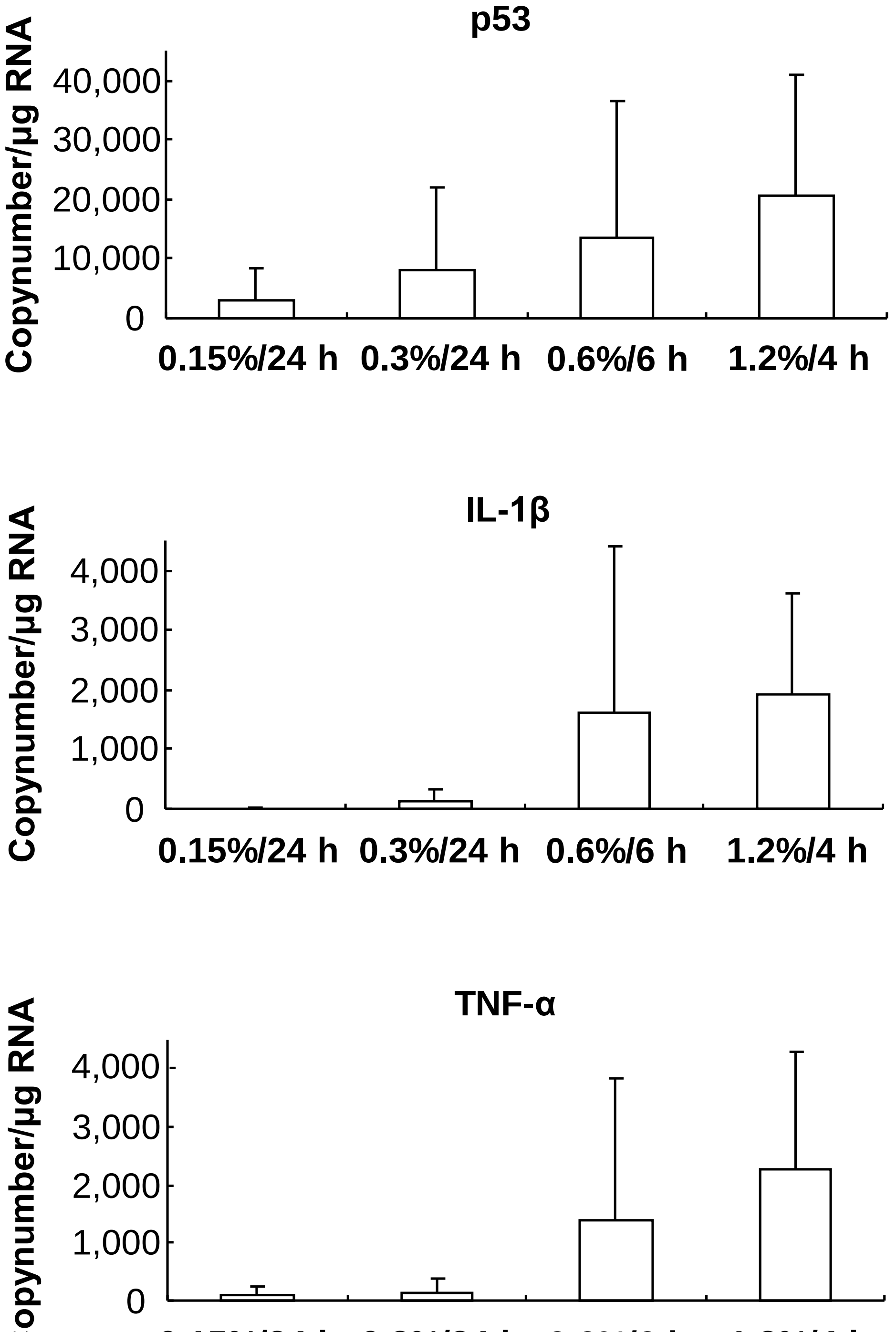


図10. アポトーシス関連因子と炎症性サイトカイン因子の遺伝子発現

アポトーシス関連因子のp53と、炎症性サイトカイン因子のTNF-αおよびIL-1βの遺伝子発現は、コラゲナーゼの濃度が濃くなればなるほど増加傾向を示した。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差を示している。

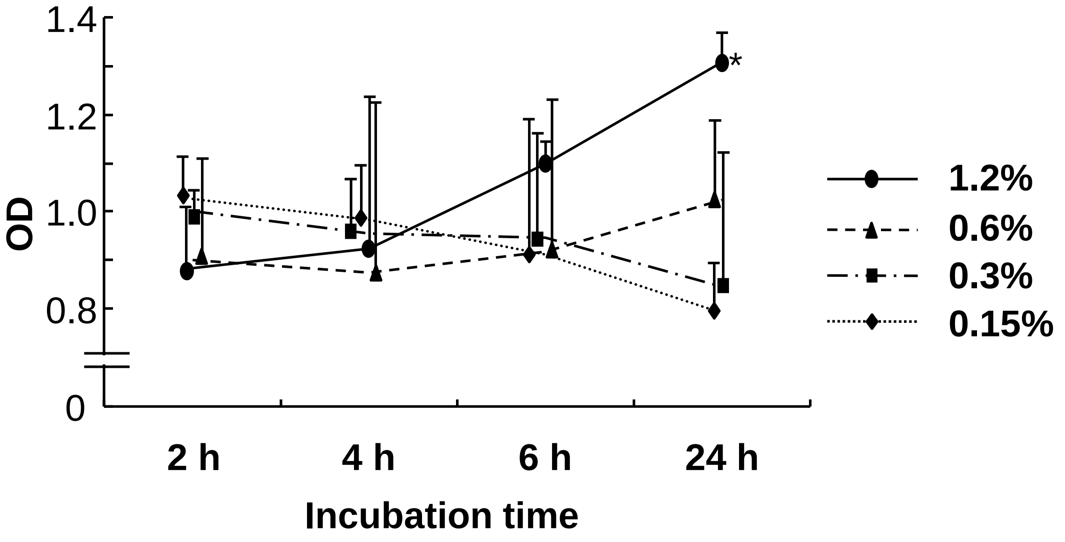


図11. アポトーシスELISAの結果

アポトーシスは、有意に24時間コラゲナーゼ濃度1.2%で処理後に増加した。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差、統計はDunnett's検定（* P<0.05、コラゲナーゼの各濃度における2時間浸漬した際の値との比較）で示している。

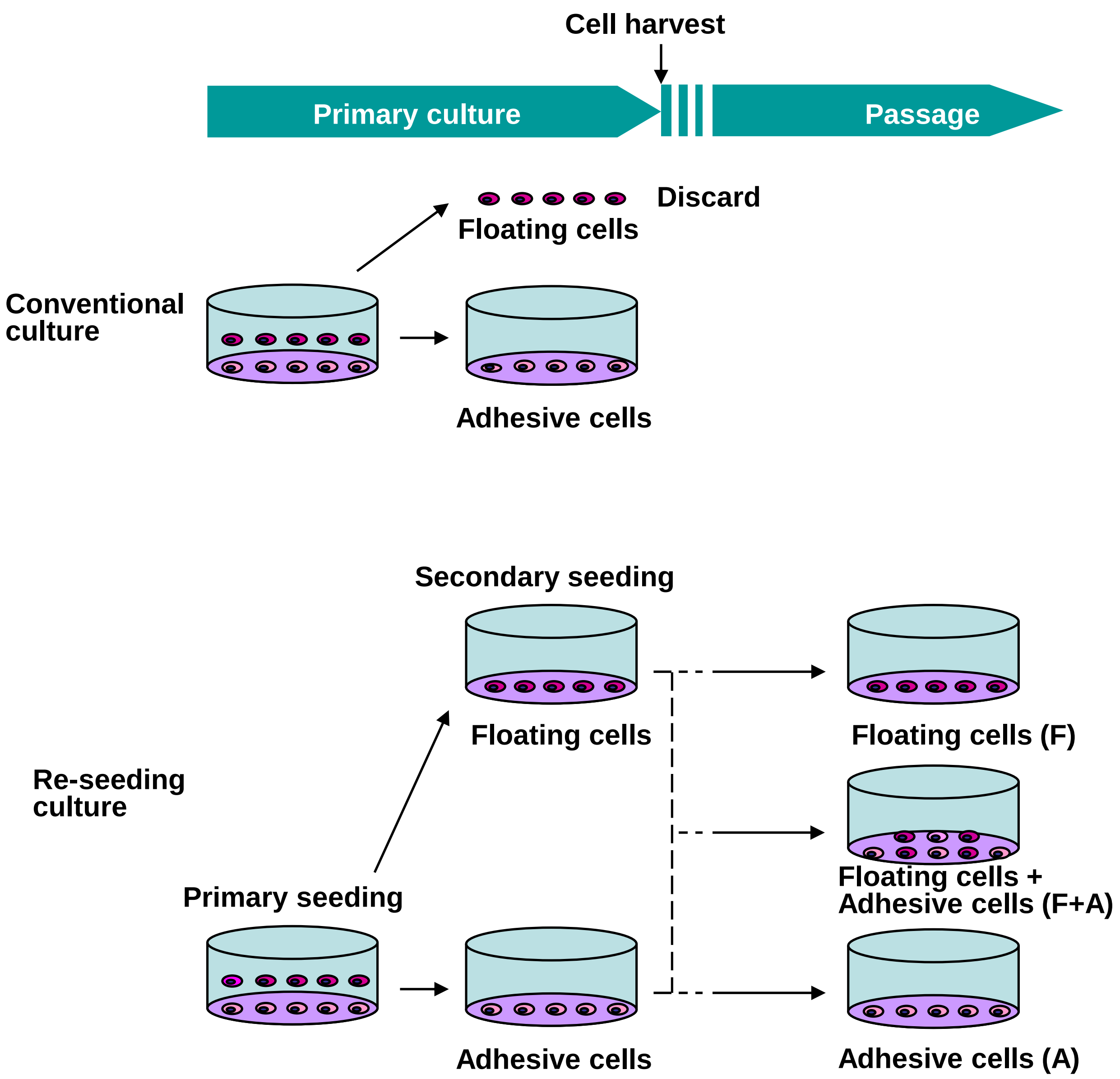


図12. 浮遊細胞を用いた研究のデザイン

上段：従来の培養法では、生着細胞のみを継代し、培養液中に含まれる浮遊細胞は廃棄していた。

下段：浮遊細胞を分離し、浮遊細胞のみを用いて継代した場合(F)、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合(F+A)、生着細胞のみを用いて継代した場合(A)の3つの条件に分けて細胞継代培養した。

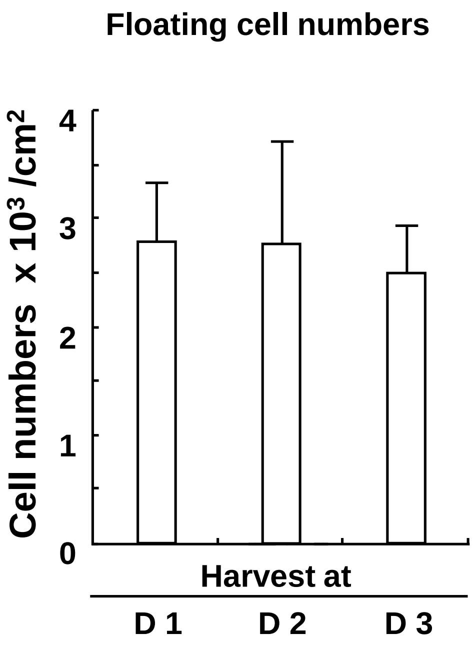


図13. 培養液中の初代細胞播種後1日目、2日目、3日日目の生存浮遊細胞の数

どの時点で細胞を回収しても細胞数に有意差はなかった。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差で示している。

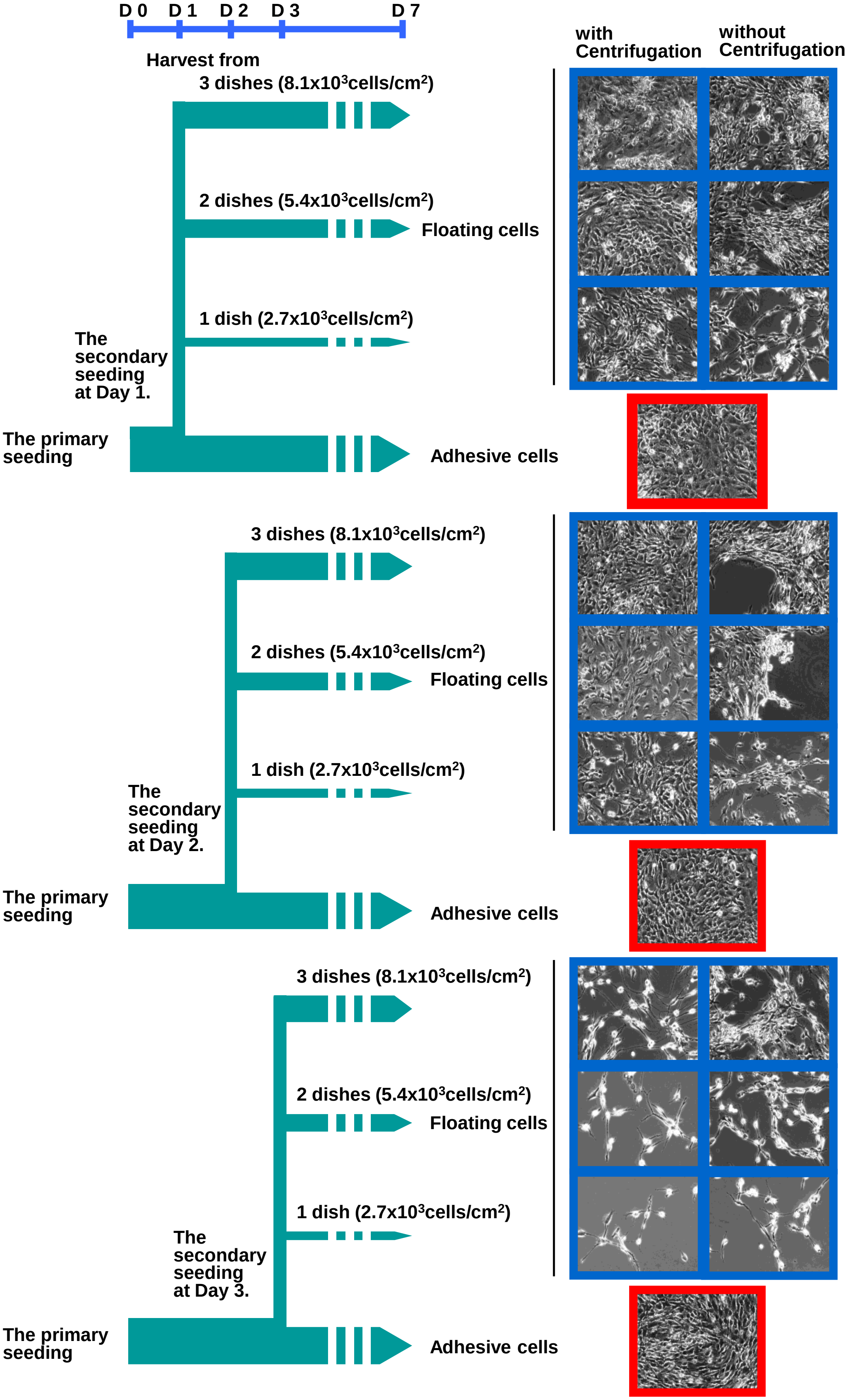


図14.　浮遊細胞の採取日と播種密度別の細胞増殖の状況

培養液中の浮遊細胞を初代培養後 1日目、2日目、または3日目に、1、2、または3 つの培養皿から回収し、遠心分離して培養液を交換し新しい培養皿に播種した場合と、培養液を交換せずそのまま新しい培養皿に播種した場合とで、細胞増殖の状態を比較した。生着細胞は、培養液を1日目、2日目、または3日目のどのタイミングで交換しても7日目には十分に増殖していた(赤枠)。浮遊細胞は、遠心分離して培養液を交換した方が接着や増殖が良好であった(青枠)。

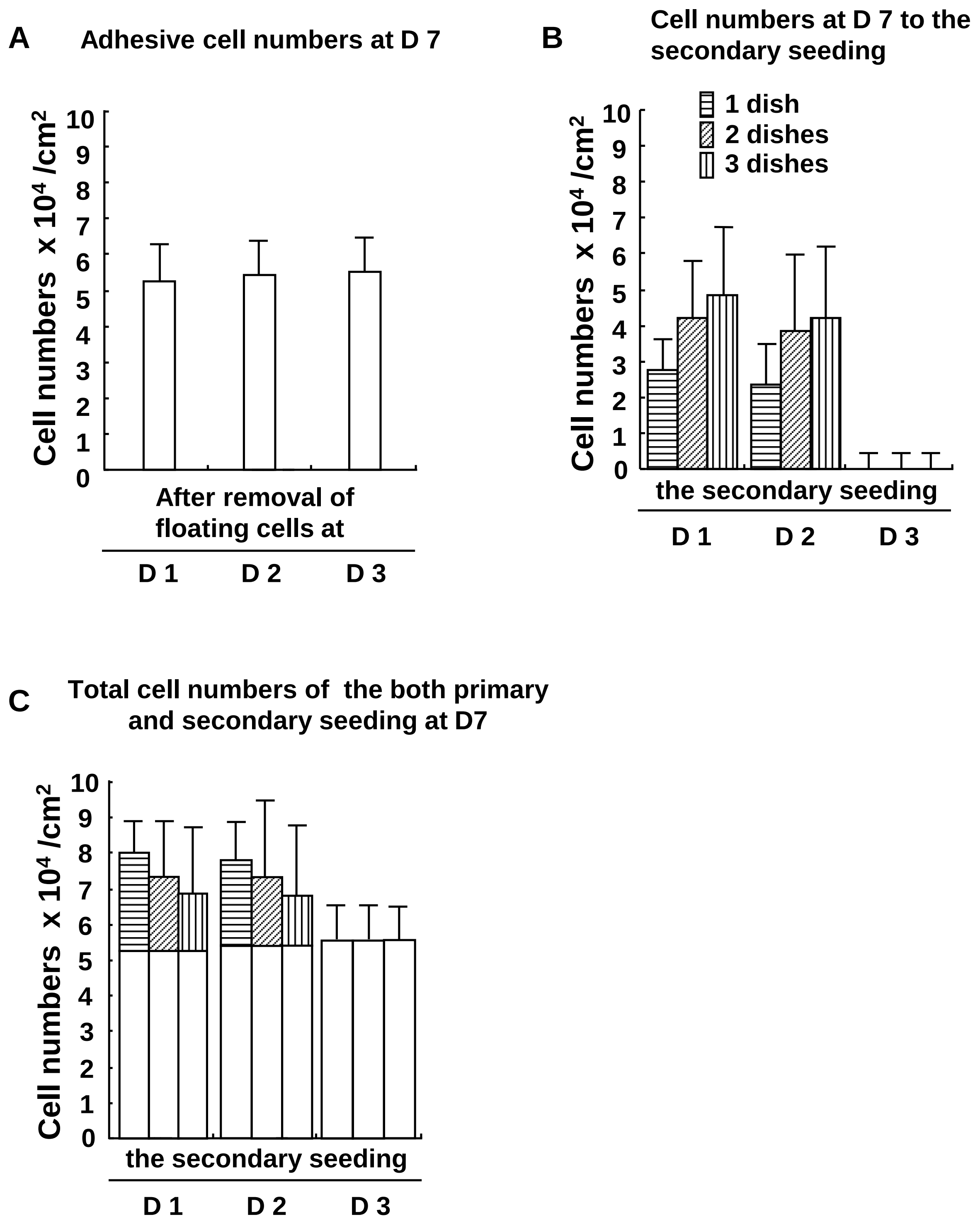


図15.　培養7日目の細胞数

(A)　従来の軟骨細胞培養では、浮遊細胞を1日目、2日目、または3日目のいつ回収しても、7日目に約 5×10^4/ cm^2の細胞を回収できた。

(B)　1日目に、培養皿1 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合、7日目に2.8×10^4/ cm^2の細胞を回収できた。培養皿2 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合、7日目に4.2×10^4/ cm^2の細胞を回収できた。培養皿3 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合、7日目に4.8×10^4/ cm^2の細胞を回収できた。2日目に回収した場合も細胞数が減少傾向であったが、ほぼ同様な結果となった。しかしながら、3日目に回収した場合は、十分な細胞数を確保できなかった。

(C)　従来の軟骨細胞と浮遊細胞を合わせた最大収量は、培養皿1 つ分の浮遊細胞を回収し播種した場合であった。

すべての値は3サンプルの平均±標準偏差で示している。

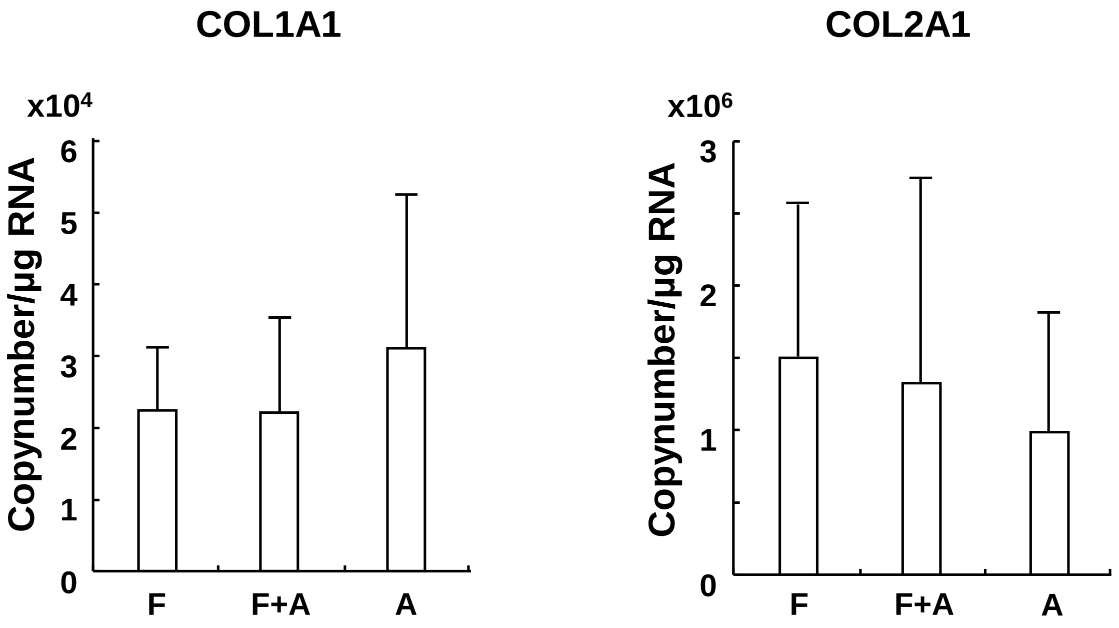


図16. COL1A1とCOL2A1 のmRNAの発現

Real-time RT-PCRを用いた測定では、浮遊細胞のみを用いて継代した場合(F)、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合(F+A)、生着細胞のみを用いて継代した場合(A)いずれでも発現に有意な差はなかった。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差で示している。

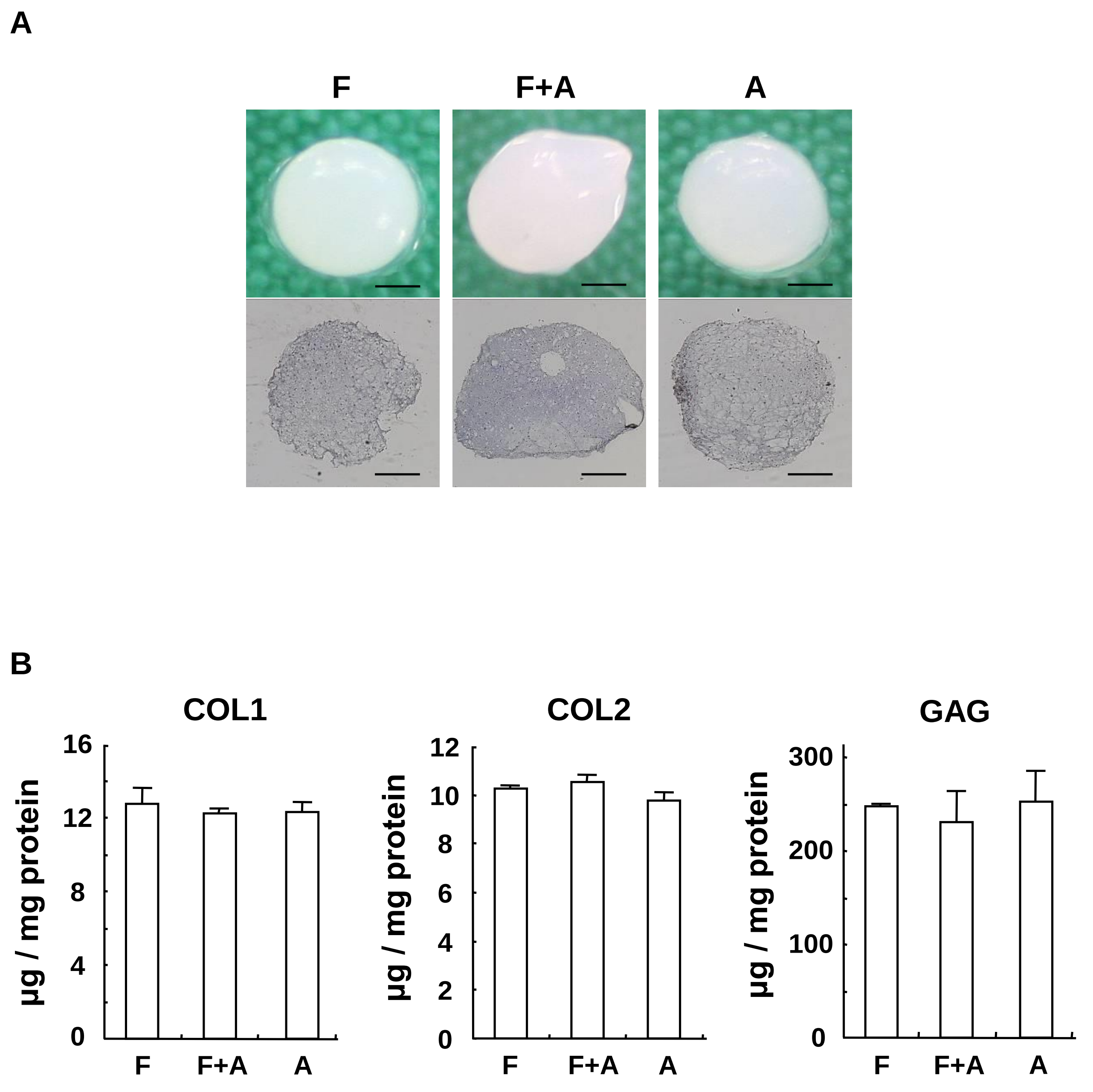


図17.　3週間ペレットにて培養した軟骨の組織学的、生化学的分析

(A)　上段：ペレット培養後の軟骨のマクロ像、下段：培養軟骨のトルイジンブルーO染色後の組織像。スケールバーは1mm.

(B)　GAG、COL1とCOL2タンパク質の発現は、浮遊細胞のみを用いて継代した場合(F)、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合(F+A)、生着細胞のみを用いて継代した場合(A)いずれでも有意な差はなかった。すべての値は3サンプルの平均±標準偏差で示している。

Collagenase concentoration	Unit (u/ml)	Time (hours)	Collagenase subtype	Origin of cartilage	Digested cartilage	references
0.6%	-	12	Type 2	human	nasal	12, 13
0.5%	1150	6 - 8	Normal	human	auricular	14
0.3%	690	4	Normal	human	auricular	2
0.3%	690	8 - 12	Normal	human	auricular	15
0.3%	690	8 - 12	Type 2	human	auricular	16-19
0.3%	690	12 - 18	Normal	Cow	articular	20
0.25%	575	4 - 6	Normal	human	articular	21
0.2%	460	8	Type 2	human	auricular	22
0.2%	460	10 - 14	Type 2	human	nasal	23
0.2%	-	4	Type 2	human	articular	24
0.15%	291	0ver-night	Normal	human	auricular	25-27
0.15%	-	0ver-night	Type B	rabbit	auricular	28
0.1%	-	2	Type 1	rabbit	auricular	29
0.1%	-	3	Type A	rabbit	articular	30
0.1%	230	12	Type 2	human	Nasal auricular	31
0.1%	230	14 - 16	Type 2	Pig	Nasal auricular articular	32
0.1%	-	16	-	human	articular	1
0.08%	960	16 - 20	Normal	human	articular	33
0.07%	100	3	Type 2	Goat	articular	34
0.04%	-	0ver-night	-	human	articular	35
0.03%	-	12 - 18	Type P	human	nasal	36
0.03%	-	16	Type P	human	nasal	37

表 1. 文献で報告されている軟骨細胞の単離のためのコラゲナーゼ濃度の比較

ーは文献中に記載なし。