

## 論文の内容の要旨

論文題目 可視光照射により硬化する光反応性ゼラチンの  
軟骨細胞移植における担体への応用に関する研究

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 星川淳人

関節軟骨は自己修復能力に乏しく、傷害を受けた軟骨を硝子軟骨として再建するため、さまざまな細胞工学的手法が試みられている。なかでも軟骨細胞移植は期待される治療法のひとつで、細胞の運搬、局所への保持を目的とした優れた担体の開発は、軟骨細胞移植の成績を向上させる上で重要と考えられる。

担体に求められる条件として 1) 細胞の運搬、局所での保持が確実 2) 最終的に生体に吸収される 3) 良好な組織親和性 4) 物理特性が軟骨に類似し、担体自身が人工軟骨としても機能しうることなどがあげられる。臨床ではコラーゲンゲルなどの生体高分子が使用されることが多いが、従来の担体には強度や隣接軟骨への接着といった物理的な役割は期待しえない。

【目的】可視光照射により重合することで自己硬化するスチレン化ゼラチンでは、これらの条件を満足しうる可能性があり、軟骨細胞移植における担体としての可能性を検討することを目的として、1) 弾性率の測定。2) スチレン化ゼラチン内における cell viability の検討。3) スチレン化ゼラチン内で培養した軟骨細胞の形質の確認。4) ゼラチン内に産生された軟骨基質の定量。5) 動物実験を行った。

【材料】使用したスチレン化ゼラチンは分子量 95000 のゼラチン中のリジン残基にスチレン基を結合させたものである。可視光を照射すると反応開始剤として添加したカンファキノンから発生したラジカルが、スチレン基中の二重結合に付加することによりスチレン基同士が重合することで硬化する。(図 1)

### 【方法】

弾性率の測定

20%FBS を含む DMEM 培地とスチレン化ゼラチンを最終組成が重量比 7:3 となる

ように混合し、さらにゼラチン重量の0.1%相当のカンファキノン(CQ)を添加したゼラチン溶液を作製した。24穴マルチウェルプレート内で混合後、歯科用ハロゲンランプ（照射強度  $600 \text{ mW/cm}^2$ ）を用いて可視光を2分照射しゼラチンを硬化させた。得られた硬化体の弾性率をクリープ試験により測定した。

#### スチレン化ゼラチンへの細胞包埋

ゼラチン溶液  $50 \mu\text{l}$  と培養液  $10 \mu\text{l}$  に懸濁した細胞  $3 \times 10^5$  を96穴マルチウェルプレート内で混合後、ゼラチンを硬化させた。細胞を包埋したゼラチン硬化体を24穴マルチウェルプレート内で培養した。

#### Cell viability の検討

軟骨系株細胞である ATDC5 をゼラチンに包埋し、硬化直後、培養3日後、7日後に硬化体をコラゲナーゼ溶液で溶解し細胞を回収、MTT assay により硬化体から回収された生存細胞数を計測した。

#### スチレン化ゼラチン内で培養した軟骨細胞の細胞形質の検討と産生基質の定量

ウサギ関節軟骨細胞をゼラチン内で3, 5, 7, 14, 21日間培養した検体からRNAを抽出し、軟骨基質関連遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR により調べた。さらに組織学的に軟骨基質産生の有無を観察した。包埋細胞による産生基質量の定量は、ゼラチン内で21日間培養した検体を溶解し、溶解液中のグリコサミノグリカンを沈殿させ、colorimetric method により行った。軟骨細胞をコラーゲンゲル内で培養したものを対照とした。

#### 動物実験

12羽のウサギ大腿骨顆部に作製した径4mmの軟骨欠損部にスチレン化ゼラチンを担体として他家関節軟骨細胞を移植した。移植2, 4週後に屠殺し組織学的に観察した。

#### 【結果】

##### クリープ試験

ゼラチン硬化体は粘弾性体としてふるまった。圧縮弾性率は関節軟骨の約1/40であった。

##### Cell viability

硬化直後に回収される細胞数は包埋した細胞の約半数で、培養3日後には約1/4に減少したが、7日後には細胞数は維持されていた。照射時間の延長、あるいは添加するカンファキノン量の増大により回収される生細胞数は減少した。

## 細胞形質

RT-PCRにより type II collagen、 aggrecan core protein mRNA の発現が確認されたが、 type I collagen mRNA の発現も認めた。 mRNA の経時的変化、 相対的発現量はコラーゲンゲル培養から得られたサンプルとほぼ同様であった。

培養後 1 週の組織像では散在する細胞周囲にメタクロマジーを示す小腔を認めた。次第に小腔は拡大し、内部に含まれる細胞数の増加とともに小腔内の酸性ムコ多頭の沈着も増強していた。3 週では小腔の周囲にもメタクロマジーを示す領域が拡大しゼラチン全体で酸性ムコ多頭の形成を認めた。(図 2) ゼラチン内部における基質の染色性は表面近傍にくらべやや劣っていた。コラーゲンゲルはシュリンケージを起こし縮小していたが、基質の染色性は内部までより均一であった。

包埋細胞による産生されるグリコサミノグリカンの総量、細胞数あたりの産生量は、スチレン化ゼラチンとコラーゲンゲルの間で有意差を認めなかった。

## 動物実験

4 週群の 1 羽に硝子軟骨様組織による再生を認めた。(図 3) 内部に存在する細胞は円形の細胞で周囲に小腔を認めた。隣接する正常軟骨との integration は不十分であった。しかし、他の 11 羽の欠損部は線維性組織で充填され、軟骨組織は認めなかった。線維性組織中に内部に細胞の存在しないゼラチンの小片や、ゼラチンと考えられる小粒状物質を胞体内に認める細胞が存在していた。(図 4)

### 【考察】

従来担体として用いられてきた matrix の濃度は 1%前後であるのに対し、今回のゼラチン溶液の濃度は約 40%ときわめて高い。さらにラジカル反応を利用して硬化するので細胞に傷害を与えることが危惧されたが、約 1/4 から 1/6 の細胞が生存していた。生存した軟骨細胞はその形質を維持し、3 週後にはスチレン化ゼラチン全体に軟骨基質の形成を認めた。軟骨細胞はゼラチン内で本来の形態である円形を維持し、ゼラチンのシュリンケージは起きなかった。これらの結果は、スチレン化ゼラチンの軟骨細胞移植における担体としての可能性を示していると考えられる。

しかしながら、*in vivo* では安定した軟骨再生を得ることができなかった。移植部を充填している線維性組織の中に、ゼラチンを貪食したと考えられる細胞を認めたことから、移植したゼラチンが宿主により吸収されてしまったため軟骨再生がおこらなかったものと考えられた。

産生されるグリコサミノグリカン量はコラーゲンゲルと同様であったが、コラーゲンゲルでは担体全体でほぼ均一に基質産生を認めたのに対し、スチレン化ゼラチンでは、表面近傍に比べて内部における基質の染色性が不均一、不十分であった。十分な硬化を得るために高濃度で用いる必要があるのに加えて重合による硬化であるために、その内部構造は非常に緊密でありゼラチン内部への培養液の移動が制限されてい

たためと考えられた。

ゼラチンそのものは生分解性であるため、基質が産生されなければ宿主に吸収されてしまう。単層培養からゼラチン内という環境変化や硬化反応などによる cell viability の低下に加え、軟骨細胞移植に用いる担体として利用するにはある程度の厚みを有しなければならないため、栄養面での問題が加わることによって細胞活性の回復が不十分となり、十分な基質を産生できぬまま吸収を受けてしまったものと考えられた。

*in vivo* では満足すべき結果を得ることができなかったが、スチレン化ゼラチンの持つ *in situ* で硬化し移植直後から移植片自体が強度を有するという特性は、軟骨細胞移植の担体として臨床応用の面から考慮した場合非常に有益なものと考えられる。材料の改良や新たな材料との混合によって、強度を維持しつつ溶液濃度の低減をはかるなどして細胞や生体への適合性を改善し、今後も検討を重ねていく必要があると考えている。

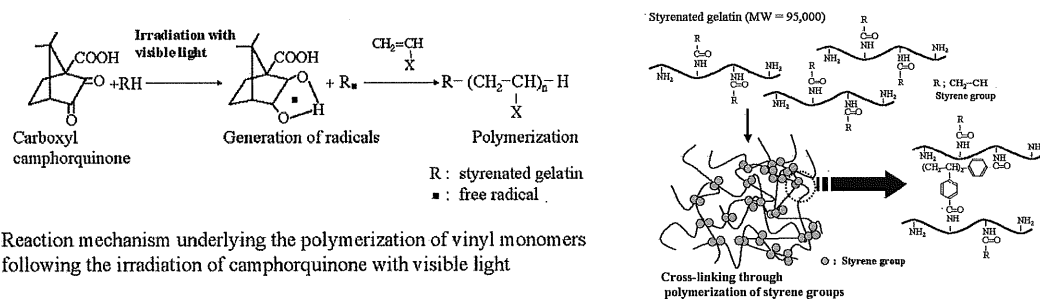
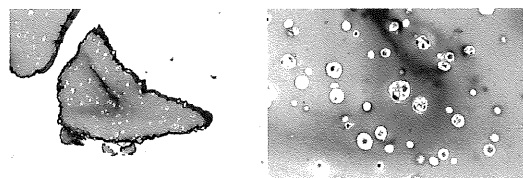


図1 スチレン化ゼラチンの硬化反応

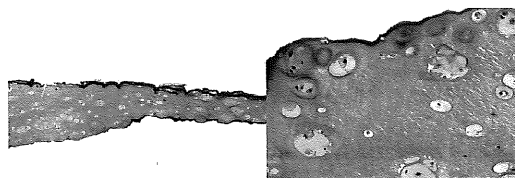
培養 7 日後



×10

×50

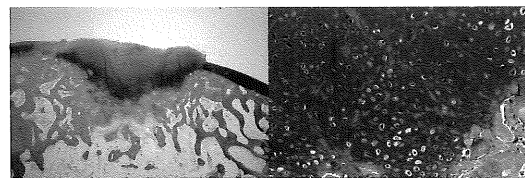
培養 21 日後



×10

×50

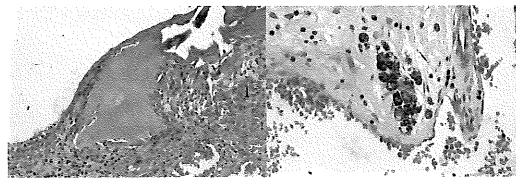
図2 スチレン化ゼラチンで培養したウサギ関節軟骨細胞 (サフラニン・O 染色)



×50

×100

図3 再生した硝子様関節軟骨  
サフラニン・O 染色



×50

×100

図4 吸収されたゼラチン片と貪食細胞  
サフラニン・O 染色