



Title	In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering
Author(s)	谷, 岳人
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54177
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	谷 岳人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学 位 記 番 号	第 23672 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	In vitro construction of scaffold-free cylindrical cartilage using cell sheet-based tissue engineering (細胞シートを応用した組織工学による生体外での足場を用いない円筒状軟骨の再生)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 福澤 正洋 (副査) 教授 奥村明之進 教授 吉川 秀樹

論文内容の要旨

〔目的〕

重篤な気道病変に対する治療法として気管軟骨再生は有効な方法となり得る。足場にポリグリコール酸やポリ乳酸などを用いてさまざまな気管軟骨再生の研究が行われてきた。しかし、これら生体吸収性ポリマーを足場として用いた気管軟骨再生の動物実験では炎症細胞の浸潤が認められ、軟骨の十分な発育が得られなかった。

近年、足場を用いない組織再生法の一つとして細胞シート工学が注目され、この細胞シート工学による再生組織が臨床応用されつつある。気管軟骨に関しては軟骨細胞シートを作成し、それをウサギの皮下に移植することにより気管に類似した円筒状の軟骨を再生させた動物実験が報告された。しかし、この方法では円筒状の軟骨を作成するまで生体内で長期間を要する。また、再生した軟骨の加工が行いにくいという問題点がある。一方で、生体外の再生軟骨の研究において軟骨細胞に力学的負荷を加えると軟骨基質産生が促進されるという報告がされた。そこで、生体内に移植する前に気管軟骨に類似した円筒状の軟骨が足場を用いずに体外において再生させることができるかどうかを検討した。その際に、円筒状軟骨の再生を力学的負荷のかかるDynamic culture条件下と力学的負荷をかけないStatic culture条件下で行い、再生軟骨の物性や組織学的所見に違いがあるかについても検討を行った。

〔方法ならびに成績〕

実験動物はNew Zealand white rabbitの雌を使用した。ウサギの耳介軟骨を摘出し、耳介軟骨をII型コラゲナーゼで融解させて軟骨細胞を採取した。1継代させたのちに軟骨細胞を $2.0 \times 10^6 / ml$ の高密度で培養皿に播種した。1週間の初期培養を行うと軟骨細胞シートが形成される。その細胞シートをシリコンチャーブに巻き付けて円筒状にした。Dynamic cultureは毎分10回転の速度で回転させることにより負荷を加えた。Dynamic culture群(D群)とStatic culture群(S

群)に分けてそれぞれ6週間培養を継続させた。再生した円筒状軟骨は肉眼的評価、Safranin O染色、II型とI型コラーゲンの免疫染色、グリコサミノグリカンの定量、力学的評価を行った。力学的評価はレオメーター(CR-500DX)で円筒状軟骨の側面より負荷を加えて円筒の内の半分に達するまでに要した圧力を測定した。

6週間培養後の再生円筒状軟骨は十分な弾力と内腔を保持しうる強度を有していた。肉眼的所見ではD群とS群に明らかな差は認められなかった。Safranin O染色では両群とも培養2週間後より再生軟骨のほぼ全体が赤く染色され、4週間後までは両群とも軟骨シートの厚さも増していった。D群では軟骨細胞が再生軟骨の中心に密集していたのに対して、S群では円筒の内腔側に細胞が密集していた。II型コラーゲンの免疫染色では初期培養後より全体が染色され、その後も両群に染色に差は認められなかった。I型コラーゲンの免疫染色では、D群は軟骨の辺縁に膜様にI型コラーゲンの層が認められたが、S群ではほとんど染色が認められなかった。組織学的にはD群の円筒状再生軟骨は、細胞の配置が中心に密集して、再生軟骨の辺縁に膜様のI型コラーゲンの層が認められ、より正常気管軟骨の構造と類似していた。再生軟骨のグリコサミノグリカン含有量は培養期間につれて漸増し、4週間後以降は増加しなかった。それぞれの培養期間でのグリコサミノグリカン含有量は両群間で有意差は認められなかった。培養6週間後のグリコサミノグリカン含有量はウサギ耳介軟骨とほぼ同等まで達したが、ウサギ気管軟骨と比較すると72%であった。力学的評価ではD群とS群はほぼ同等であった。

この円筒状の再生軟骨は、リング状、螺旋状、C型の形状に容易に加工することができた。再生軟骨は加工を行っても立体的構造を保持できた。

[総 括]

細胞シートを応用した組織工学にて、足場を用いない円筒状軟骨を生体外で再生させることができた。この再生軟骨は様々な形状に加工することができ、オーダーメイドの再生軟骨を気管の移植に使用できる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

この研究は、生体外での足場を用いない円筒状軟骨を作成するための新しい方法の開発を試みたものである。ウサギ耳介軟骨より軟骨細胞を採取し、その細胞を高密度で培養することにより軟骨細胞シートを形成させた。そして、そのシートをチューブに巻き付けてさらに6週間培養を行ったところ、十分な弾力と内腔を保持しうる強度を有した円筒状の軟骨を再生させることに成功した。この再生軟骨の組織は、細胞外基質グリコサミノグリカンとII型コラーゲンが組織内の全体に認められ、組織内のグリコサミノグリカン含有量はウサギ耳介軟骨と同程度まで達し、気管軟骨と比較すると72%に達した。更にこの軟骨はリング状やC型などの形状に容易に加工することができた。

生体外で立体構造の軟骨が再生できたとともに、その再生軟骨は様々な形状に加工することができ、オーダーメイドの再生軟骨を気管の移植に使用できる可能性が示された。

以上により学位の授与に値すると考えられる。