

---

幹細胞導入による頭蓋顎顔面領域の  
機能的再生外科学の創生

---

1 5 3 9 0 5 4 2

平成 15 年度～平成 18 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (B)) 研究成果報告書



平成 19 年 4 月

研究代表者 野崎幹弘  
東京女子医科大学医学部教授



## は し が き

治療目標とする組織再生のためには、生分解性ポリマーやハイドロゲル、成長因子、細胞ソースなどさまざまな選択肢があり、いまだ一定の指針は定まっていない。そこで、今回われわれは、複雑な組織再生を頭蓋顎顔面外科への応用するための基礎研究を立案し、さまざまな選択肢を考慮する際の指針となるべき成果が得られたので報告する。

## 研 究 組 織

研究代表者：野崎幹弘（東京女子医科大学医学部教授）

研究分担者：桜井裕之（東京女子医科大学医学部助教授）

研究分担者：岡野光夫（東京女子医科大学先端生命医科学研究所教授）

研究分担者：大和雅之（東京女子医科大学先端生命医科学研究所助教授）

海外研究協力者：Joseph P. Vacanti（ハーバード大学マサチューセッツ  
総合病院外科、ティッシュエンジニアリング研究室）

## 交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	3,300	0	3,300
平成16年度	3,100	0	3,100
平成17年度	3,100	0	3,100
平成18年度	3,100	0	3,100
総計	12,600	0	12,600

## 研究発表

### （1）学会誌等

寺田伸一、野崎幹弘他. 細胞による三次元培養耳介軟骨作成の試み. 形成外科. 47, 975-982, 2004

副島一孝、野崎幹弘他. 培養細胞・PDWGF (platelet derived wound healing factor) 併用による tissue engineered flap について. 形成外科. 47, 875-881, 2004

Sakurai H, Nozaki M, et al. Reconstruction of the pharyngoesophagus with voice restoration. *Int J Clin Oncol.* 10, 243-246, 2005

Tanabe Y, Nozaki M, et al. Intraoperative application of three-dimensional imaging for breast surgery. *Scand J Plast Surg Hand Surg.* 39, 349-352, 2005

桜井裕之、野崎幹弘. 咽頭頭切除後の音声再建. *医学のあゆみ*. 別冊 510-513, 2006

野崎幹弘、桜井裕之他. 頭頸部再建手術の標準化に向けて—マイクロサージャリーの役割と今後に求められる展開—. *日本マイクロ会誌.* 19, 281-289, 2006

大和雅之、岡野光夫.細胞シート工学. *Medical Science Digest.* 30, 476-477, 2004

小林純、岡野光夫.再生医療におけるナノバイオテクノロジー. *ファルマシア.*40, 1018-1022, 2004

大和雅之、岡野光夫.組織再生、細胞シートとDDS. *Pharm Tech Japan.* 21, 2042-2044, 2005

増田信奈子、岡野光夫.細胞から臓器を蘇らせる技術—細胞シート工学による臓器再生—. *Biophilia.* 1, 15-21, 2005

大和雅之、岡野光夫他.上皮幹細胞と組織再生. *ティッシュエンジニアリング* 2006. 50-55, 2006

大和雅之、岡野光夫.細胞シート工学を用いた再生医療. *実験医学.* 24, 17-22, 2006

岡野光夫. ティッシュエンジニアリングのための新しいテクノロジー. *臨床看護.* 32, 1105-1112, 2006

大和雅之、岡野光夫. 細胞シート工学. *Urology View.* 4, 17-25, 2006

大和雅之、岡野光夫. 再生医療への応用-温度応答性培養皿を活用する細胞シート工学-. *日本臨床.* 64, 335-341, 2006

## (2) 口頭発表

岡野光夫, 大和雅之他, 医学・医療の進歩を世界へ向けて 治療の最前線 人工臓器 再生医療と人工臓器. *日本医学会総会 26 回会誌.* 3, 26, 2003

寺田伸一, 野崎幹弘他, ティッシュエンジニアリングによる耳介型軟骨誘導法の検討. *日本頭蓋*

顎顔面外科学会誌. 19, 57-58, 2003

桜井裕之, 野崎幹弘他, 頭頸部再建における移植組織静脈圧モニタリングの有用性. 頭頸部腫瘍.

29, 348, 2003

野崎幹弘. 外傷における形成外科の役割. 東日本整形災害外科学会雑誌, 15, 367, 2003

佐々木健司, 野崎幹弘他. がん外科治療における形成再建手技の最前線 胸壁,腹壁全層欠損再

建の手術手技の確立. 日本医学会総会 26 回会誌. 3, 21-22, 2003

副島一孝, 野崎幹弘他. PDWHF,培養細胞を併用した人工真皮による創傷治療. 日本創傷治癒学

会第 33 回プログラム・抄録集, 41, 2003

副島一孝, 野崎幹弘他, 人工真皮と分層植皮の同時施行の経験. 熱傷. 30, 212-213, 2004

桜井裕之, 野崎幹弘. 下咽頭・食道の再建 下咽頭・頸部食道癌切除後の再建術式. 頭頸部腫瘍.

30, 127, 2004

田幡雅彦, 桜井裕之他. 腸管をキャリアーとした Prefabricated Flap の基礎的研究. 炎症・再生.

25, 375, 2005

桜井裕之, 野崎幹弘. Flow-through 型皮弁移植における血流増強効果. 日本血管外科学会雑誌.

14, 466, 2005

寺田伸一, 野崎幹弘他. 耳介型ポリマーによる再生軟骨の誘導と自家移植の実験的検討. 日本形

成外科学会誌. 25, 835, 2005

山本有祐, 野崎幹弘他. 皮弁モデルにおける supercharge による皮弁内静脈圧変動に関する検討.

日本マイクロサージャリー学会誌. 19, 240, 2006

野崎幹弘. 頭頸部再建手術の標準化に向けて マイクロサージャリーの役割と今後の展開. 日

本マイクロサージャリー学会誌.19, 164, 2006

寺田伸一, 野崎幹弘他. 絹たんぱく質によるスキャホルドの開発と in vitro での軟骨再生. 日

本創傷治癒学会第 36 回プログラム・抄録集, 64, 2006

## 【はじめに】

悪性腫瘍切除後の再建外科にとって、患者自身に対して再建材料としての健全組織（骨、筋肉、皮下組織、皮膚を含む）を提供させる犠牲を強要してきた。このため、手術侵襲は時間的にも、肉体的にも2倍以上を費やし、時として合併症に苦しめられている。そこで、術前もしくは術中に患者自身の組織や骨髄などに存在する細胞を分離し、新たな再建材料を提供することができれば、患者自身に対するドナーの犠牲が最小限となり、患者のQOLの向上に有用である。このような臨床医学の発展に重要である最小侵襲外科となるべき機能的再生外科を目指す。

本研究は元来の組織内細胞に加え、多能性を持つ幹細胞あるいは前駆細胞の利用も目指す。これらの細胞は成長因子などの細胞シグナル制御により、骨や軟骨、筋、神経など特定の機能を持つ細胞に分化誘導されることが知られている。分化誘導の場として、下顎体や顎関節、耳介、顔面神経、顔面表情筋、咽喉頭、口蓋、舌など再建目標として、三次元形状を有するモデルとなる生体吸収性ポリマーを準備し、再建材料を効率よく再生し、再建外科に臨床応用することが目標である。そのための生体吸収性高分子ポリマー生成技術および、三次元培養技術、細胞シグナリング制御技術の三大要素の至適適合条件を検討する。

現在、幹細胞として胚性幹細胞の培養分化技術も確立されつつあるが、マウス由来 feeder cell を必要とする上、患者自身の細胞を使用できないため、異種 + 同種細胞移植となり、臨床応用にはいまだ現実的ではない。そこで、本研究では feeder cell を必要とせず、患者自身から採取できる自己細胞をターゲットとしている。本研究では細胞増殖後に三次元ポリマー内で効率よく目的組織に分化誘導する条件を最適化する。これには細胞がポリマー内部に効率よく浸透し、保持されるようなハイドロゲル（プルロニック、メチルセルロース、コラーゲンゲルなどを含む）や細胞の分化を誘導する成長因子をポリマー内で長期間徐放するドラッグデリバリーシステムに関して検討する。

頭蓋顎顔面領域での形成外科の治療ターゲットは、下顎骨、顎関節、耳介、頬骨、外鼻、鼻咽腔、口蓋、舌など多岐にわたる。これらはいずれも複雑な立体形状を呈している。そこで、立体形状再現法としては、マニュアルモデル作成法だけでなく、三次元 CT や MRI などの画像診断装置から取得したデータに基づき、紫外線硬化樹脂を用いた光造形法をも採用し、精密な鋳型を作成する。また、細胞がポリマー内部に浸入するためのマイクロポア（微小孔）構造を保持するための技術、および、疎水性のポリマー表面を、親水性で細胞浸透性や接着性が良好な界面に改善する方法を検討する。

生体吸収性高分子ポリマー生成技術および、三次元細胞培養技術、細胞シグ

ナリング制御技術の三大要素の適合条件を吟味する。幹細胞の分化誘導シグナルとして成長因子だけでなく、圧力や伸展などの機械的刺激をも考慮し、バイオリアクターシステム内 *in vitro* での再建組織の再生を目指す。

*in vitro* で再生した再建組織を無胸腺マウス（異種移植）や細胞を採取した元の動物（自家移植）へ移植し、再生組織のバイアビリティと機能的長期成績に関して検討していく。

## 【実験手順】

1. ハイドロゲルの至適化
2. 三次元形状の検討
3. 骨髄幹細胞、前駆細胞、組織内細胞の比較検討
4. 物質透過性の検討
5. 移植による病理組織学的検討

1. ハイドロゲルの至適化

### 〔方法〕

#### a) 細胞採取と増殖培養

家兎耳介軟骨から軟骨片（5mm 大）を採取し、細切したのち、2% II 型コラゲナーゼ溶液内で 37°C の恒温振盪槽で軟骨細胞を 3~4 時間かけて分離した。セルストレイナー（100  $\mu$  m）で溶液を濾したのち、1500rpm5 分間遠心分離した。上澄みを吸引除去し、沈殿した細胞を再度増殖用培養液（Ham's F12 + 10%FBS）で再浮遊させ、75cm<sup>2</sup> フラスコに移し、5%CO<sub>2</sub> 環境下の 37°C の incubator で培養した。細胞がコンフルエントに達したのち、継代培養を行った。2% II 型コラゲナーゼ溶液を加え、細胞を剥がし、TripleFlask（500cm<sup>2</sup>）に移し替え、同じ条件で再増殖させた。

#### b) ハイドロゲル

生分解性ポリマースポンジに増殖した培養細胞を播種した直後に、ポリマースポンジからの脱落細胞を最小限にとどめるために、細胞をハイドロゲルによってスポンジ間隙内をとどめることが重要である。利用可能なハイドロゲルとして4種類を比較検討した。I型コラーゲン、アルギン酸、メチルセルロース、プルロニックF127である。増殖した培養軟骨細胞とポリ乳酸フェルトシート (PGA) を使って、細胞外基質産生能を比較した。すべてのハイドロゲルは細胞播種直前に準備した。

#### c) 生分解性ポリマー

ポリグリコール酸 (PGA) の細線維で合成されたフェルトシートを1cm<sup>2</sup>大に切除し、滅菌したのち、水酸化ナトリウムでポリマー表面を修飾し、I型コラーゲン溶液でコーティングした。

#### d) 分化誘導

軟骨細胞がTripleFlask内で再びコンフルエントに達したのち、再度細胞を浮遊させた。PBSで洗浄したのち、2% II型コラーゲン溶液を加え、30分間37°Cで細胞をフラスコ底面より剥離させた。1500rpm5分間で遠心分離し、細胞沈渣を作成した。これにPGAシートを入れ、増殖した細胞に分化誘導刺激を与えるために無血清培養液に変更し、成長因子を2種類添加した。無血清でDMEM/F12培養液に

TGF-beta2 (5ng/ml) およびdes(1-3)IGF-I(5ng/ml)、ITS+premix、ascorbic acid 2-phosphate、dexamethasoneを添加した。

[評価法]

a) 透過型電子顕微鏡

ハイドロゲル内に浮遊している軟骨細胞をPGA Karnovsky's KII solution(2.5% glutaraldehyde, 2.0% paraformaldehyde, and 0.025% calcium chloride in a 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4)を用いて4°Cで一晩固定したのち、オスミウムで後固定し、エポンで包埋した。その後、60°Cで一晩重合し、クエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡(Philips 301)で観察した。

b) 病理組織学的検索

分化培養開始後 6 週間の検体をリン酸緩衝ホルマリンで固定したのち、モバットペンタクロム染色を用いて光学顕微鏡で観察した。

c) DNAおよび細胞外基質の定量解析

分化培養開始後 3 週と 6 週の検体を凍結乾燥後に乾燥重量を測定し、55°C、16 時間プロテイナーース K 溶液内で分解した。H33258 dye で DNA を染色したのち、吸光度計で計測した。検量線は牛甲状腺 DNA を基準とした。

残りの検体を 4°C、48 時間かけて 4 M グアニジン溶液内で分解し、透析膜でグアニジンを濾過したのち、グルコサミノグリカン(GAG)および I 型コラーゲン

を、Blyscan dye(656nm、Biocolor)および Sircol dye(540nm、Biocolor)で定量評価した。また、検体を再び凍結乾燥したのち、4°C、24 時間かけてペプシン溶液でさらに分解し、II型コラーゲンを Sircol dye で定量した。

#### 〔結果〕

透過型電子顕微鏡による観察から、I型コラーゲンゲル内の細胞は紡錘形を呈していた(図 1B)が、その他のハイドロゲル内の細胞は円形であった(図 1 A,C,D)。そのうち、アルギン酸では細胞内小胞にカルシウムの取り込みを認め、カルシウムの取り込みが多い細胞はアポトーシスに陥った細胞が観察された。

モバットペンタクロム染色による観察では、いずれの実験群においても、PGA+ハイドロゲル+軟骨細胞の試料の軟骨再生はごく表面にとどまっていた。その中でもI型コラーゲンは一番厚みがあった(図 2 B)。プルロニック F127 では、軟骨再生の分布は表面近傍で薄かったが、再生密度が均一であった(図 2 D)。アルギン酸では軟骨再生分布は不均一で、脆弱であった(図 2 A)。メチルセルロースでは不規則で渦状の細胞外基質の沈着を認めた(図 2 C)。免疫染色ではメチルセルロースでの細胞の渦状構造はI型コラーゲンで染まることがわかった。ハイドロゲルを用いないPGAのみの実験群では軟骨再生は最小限であった(図 2 E)。

分化培養3週間後の試料のDNA定量ではアルギン酸、メチルセルロース、ハ

イドロゲルを用いないコントロールより、I型コラーゲンとともに播種した実験群がもっともDNA含有量が多かった(図3)。3週間と6週間では各実験群間で有意な違いは認めなかった。6週間後の試料ではDNA量は他のどの実験群よりI型コラーゲンにおいてDNA含有量が多かった。

分化培養3週間後の試料のGAG定量では、アルギン酸で他のどのハイドロゲルより有意に多く認められた(図4)。しかし、3週間後では他のハイドロゲルでのGAG分泌能が改善され、6週間ではすべての実験群においてGAGは正常軟骨組織と同じ値になった。

分化培養3週間におけるII型コラーゲン量は、すべての実験群において正常軟骨組織より低値を示した。6週間経つと、すべての実験群で有意に改善された(図5)。6週間ではアルギン酸よりプルロニックが有意に高値を示した。

I型コラーゲン量はII型コラーゲン量のおよそ10%を占めていた(図6)。3週間においてI型コラーゲンでもっとも高値を示した。これは最初にI型コラーゲンを使用したことを反映している。しかし、6週間経つとアルギン酸がI型コラーゲンを上回ることが明らかになった。

細胞外基質の割合を経時的に観察すると、6週間の培養におけるI型コラーゲン/II型コラーゲン比(図7)およびGAG/II型コラーゲン比(図8)ではアルギン酸が他のハイドロゲルより有意に高値を示した。また、有意差はないものの、

ハイドロゲルを使用しないコントロールが高値を示す傾向にあった。

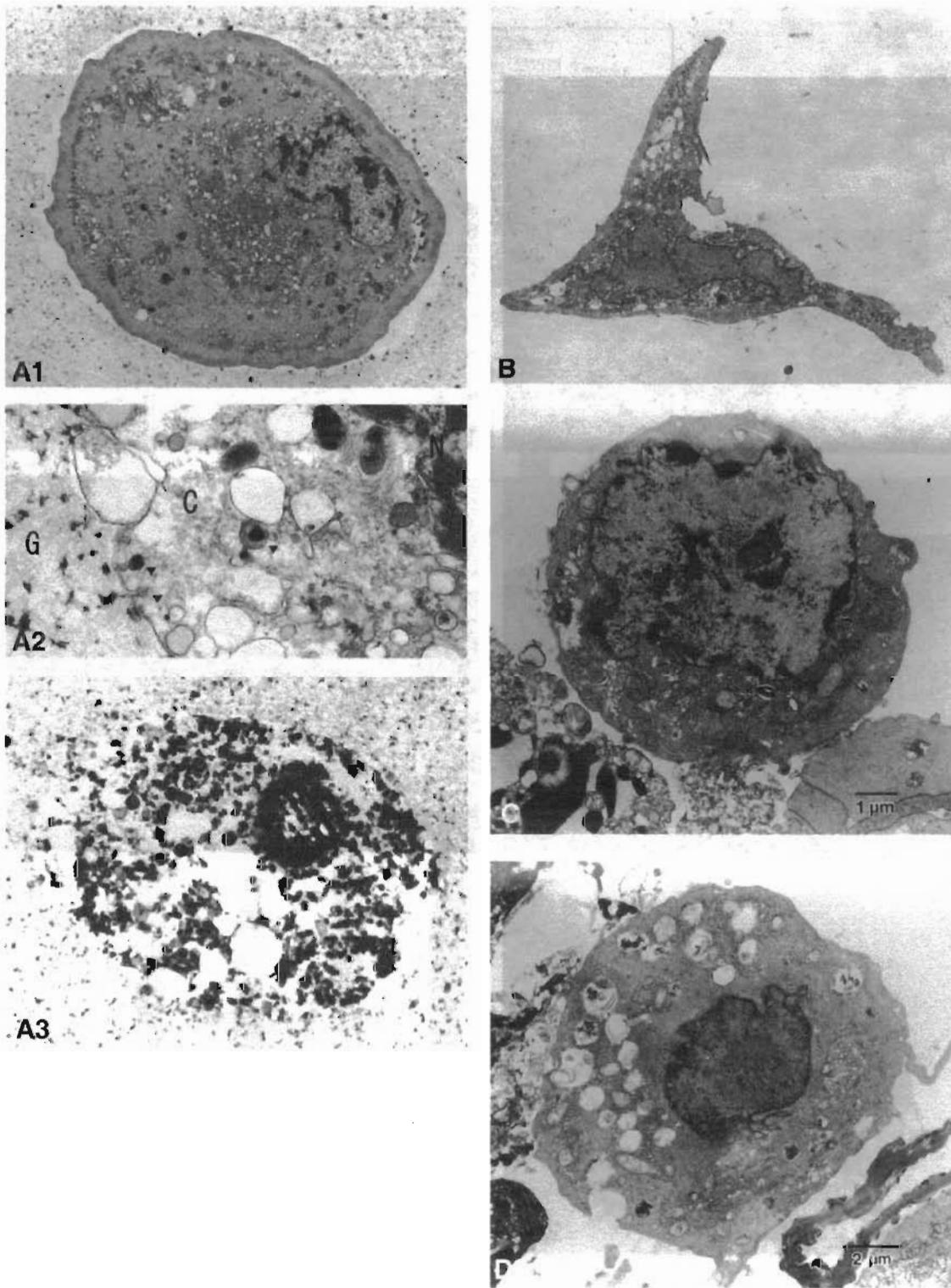


図1 透過型電子顕微鏡所見 (A : アルギン酸、B : I型コラーゲン、C : メチルセルロース、D : プルロニック F127)

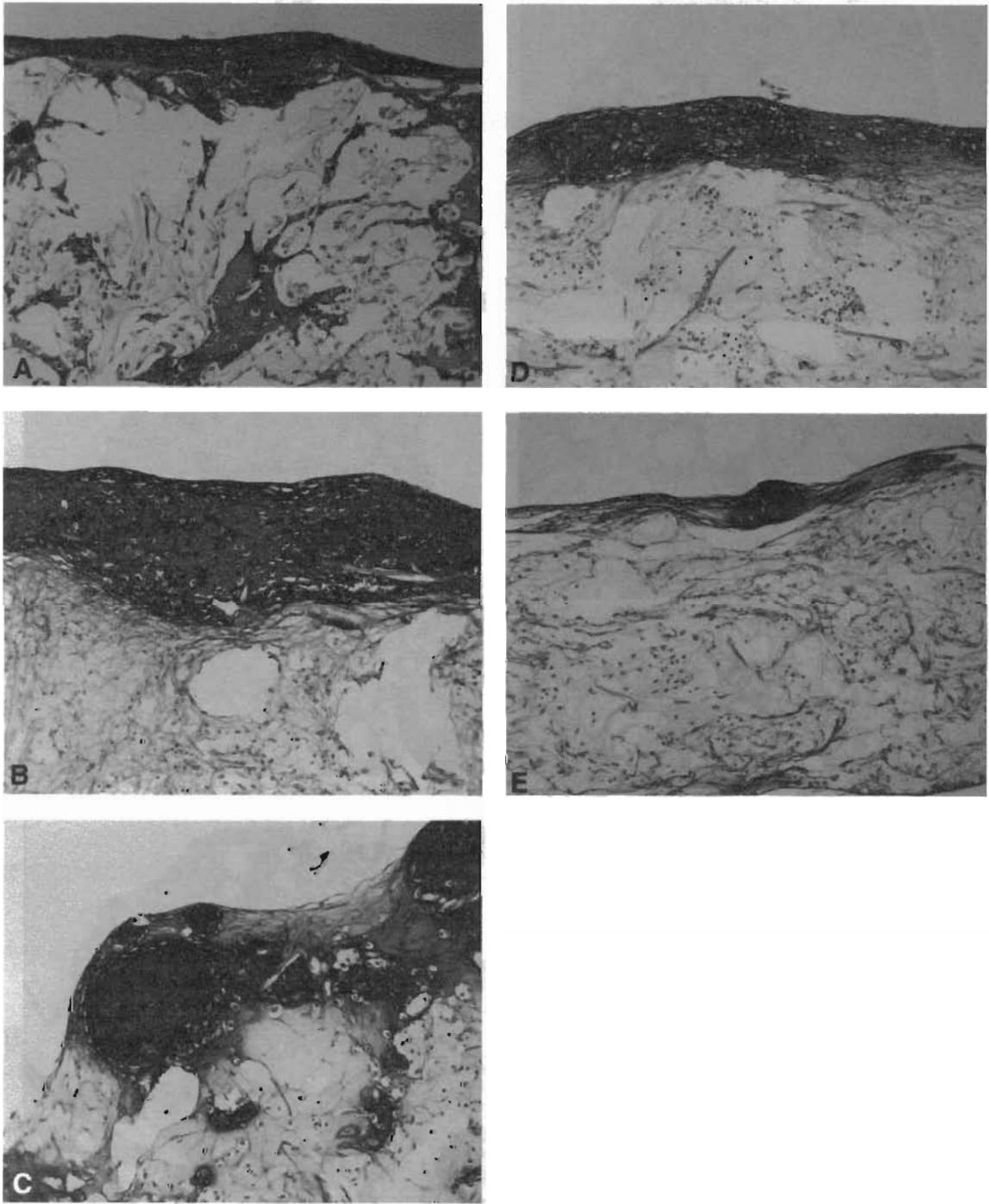


図2. 病理組織学的所見 (A: アルギン酸、B: I型コラーゲン、C: メチルセルロース、D: プルロニック F127、x100))

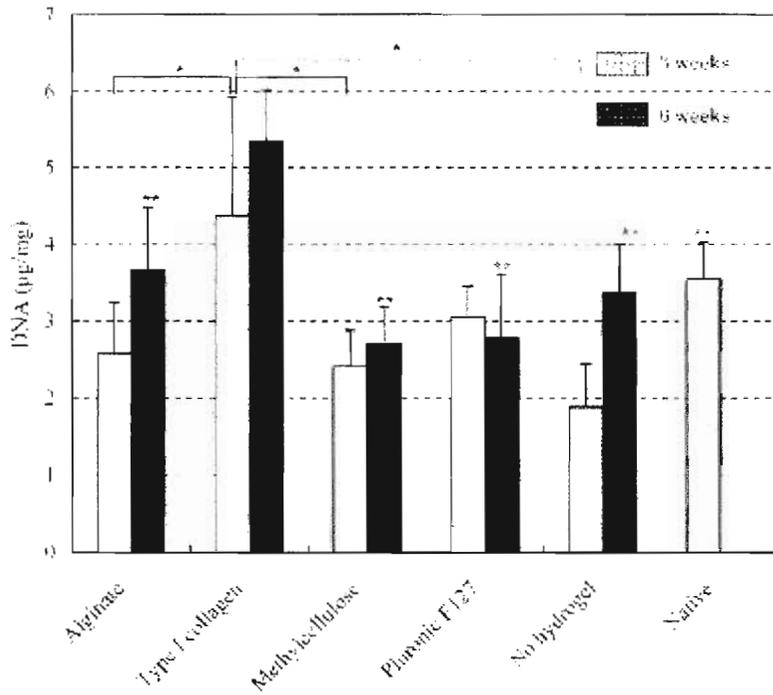


図3 DNA量 (µg/mg)

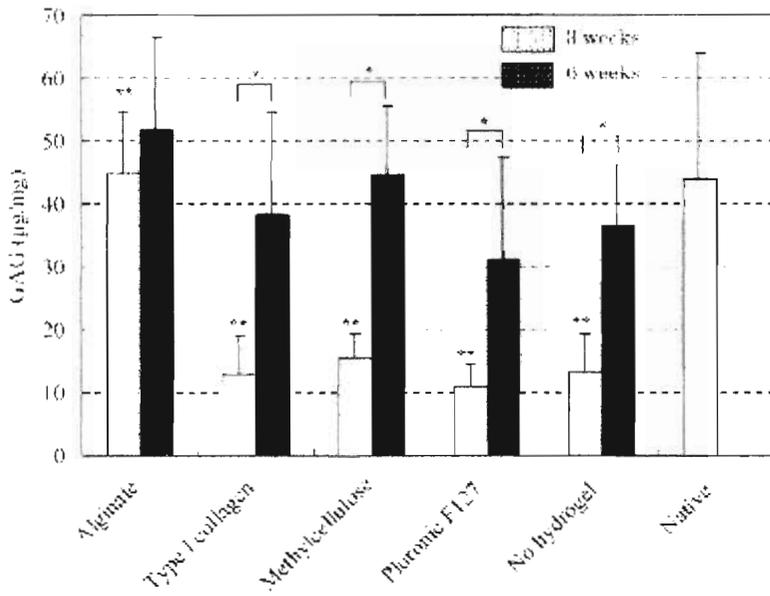


図4 グリコサミノグリカン (GAG) 量 (µg/mg)

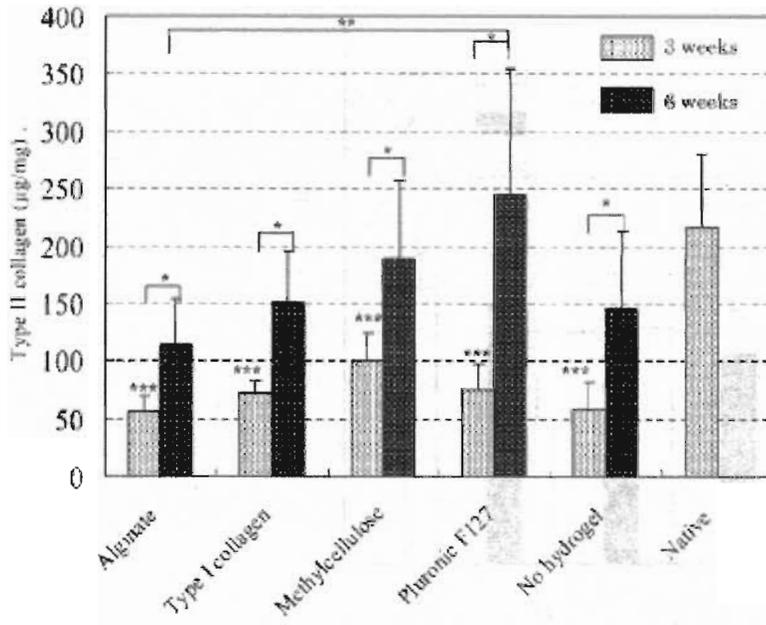


図5 II型コラーゲン量 (µg/mg)

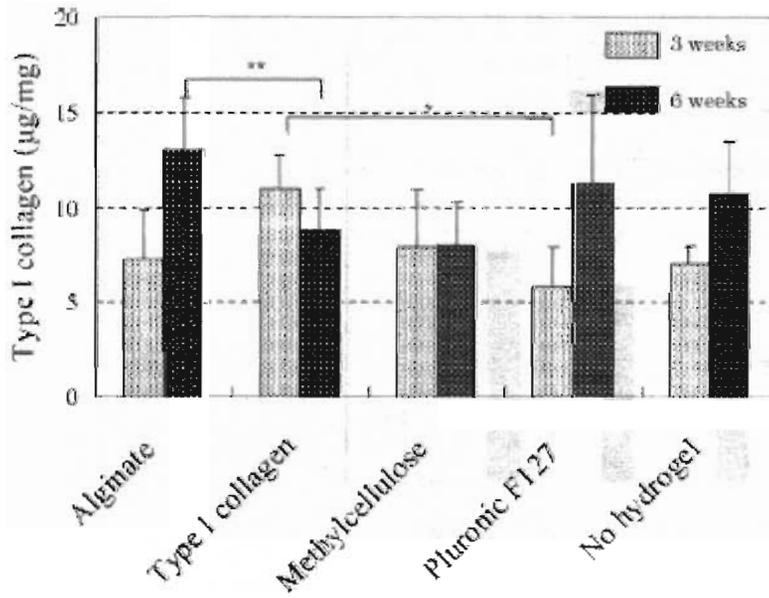


図6 I型コラーゲン量 (µg/mg)

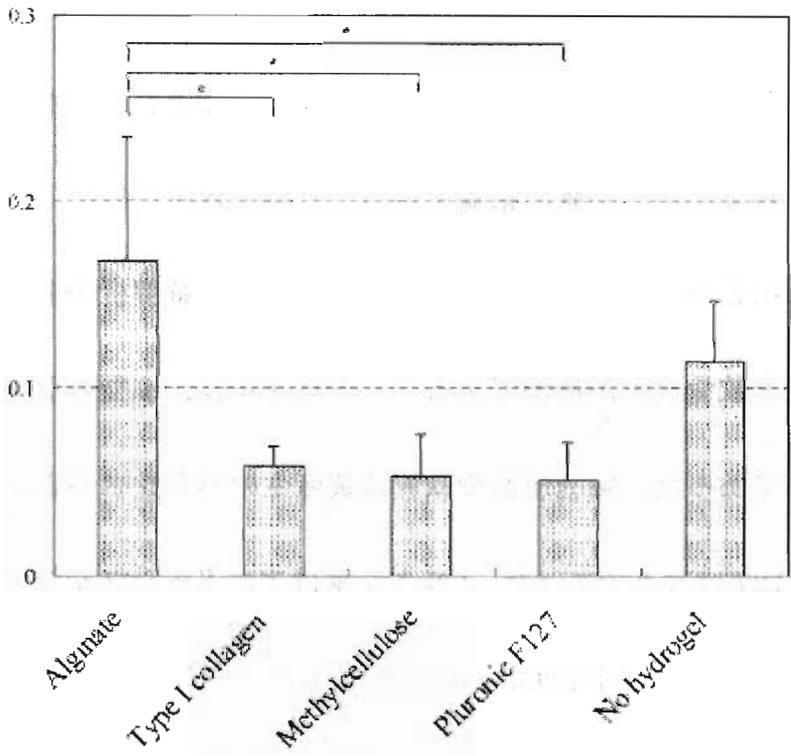


図7 I型コラーゲン/II型コラーゲン比

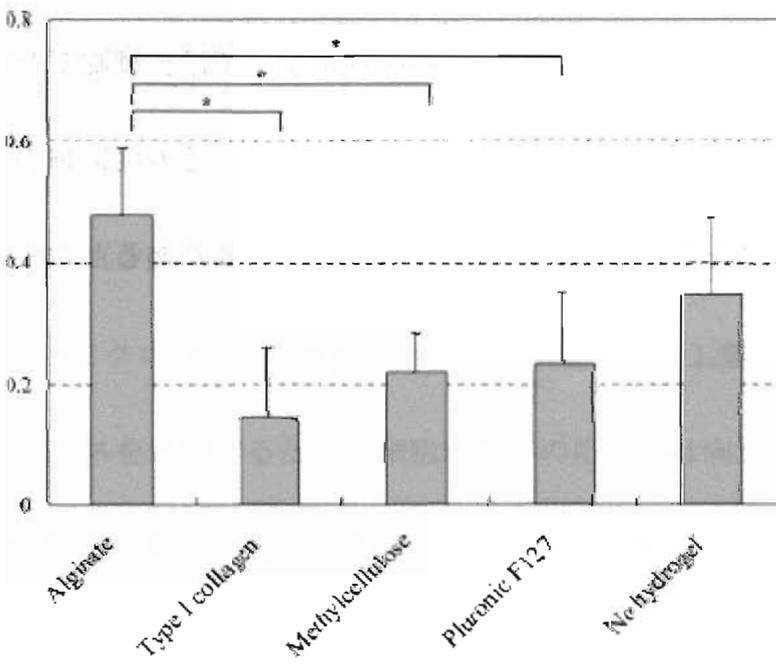


図8 GAG/II型コラーゲン比

#### [考察および結論]

細胞外基質の分析から、PGA フェルトシート内で、軟骨細胞と、どのハイドロゲルを組み合わせたらよいか、明確な結論を得ることはできなかった。しかしながら、電顕や光顕など病理組織学的検討、細胞外基質の定量解析から、三次元培養での細胞増殖と軟骨再生が最善であるハイドロゲルは、I型コラーゲンとメチルセルロースであった。細胞形態や軟骨基質産生のバランスがよいことからプルロニック F127 は次点であった。アルギン酸はアポトーシスを誘導し、細胞外基質産生のバランスを崩す可能性が示唆された。

ハイドロゲルは培養細胞が基質産生を始めて、細胞周囲に沈着するまでの一時的な細胞外基質となり、細胞の脱落や散逸を防ぐだけでなく、細胞の機能を改善させる作用がある。しかし、ハイドロゲルの特性によっては、細胞ごとにネガティブに作用したり、ポジティブに作用したりするため、その度に細胞の機能を最大限に引き出すことができるのかどうか検討する必要があると考えられる。

## 2. 三次元形状の検討

### 〔方法〕

従来、特殊な形態を持たない生分解性ポリマーを目的とする複雑な三次元形態に再現する製造技術にはいくつかある。従来法の代表は手作業の溶媒鑄造—顆粒溶出法 (solvent casting – particulate leaching、SC-PL 法) である。まず、目的形状で立体モデルを歯科用印象材で作成し、その鑄型から溶媒に溶出する顆粒 (溶媒が水なら、蔗糖や塩) で立体形状を再現する。次にポリマーを有機溶媒に溶解した溶液に立体形状を再現した顆粒塊を投入し、ポリマー溶液が顆粒塊中に十分に浸み込んだら、取り出して乾燥させる。出来上がった顆粒／ポリマーの立体構造体を水中に入れると、顆粒が溶け出し、ポリマーのスポンジ構造が残ることになる。昨今ではコンピュータ上で作成した三次元データ (CAD) を元に、自由に立体形状を再現できるコンピュータ制御の三次元プリンター (3 DP) が実現された。使用する粒子サイズによってかなり細かい構造を 10 ミクロン単位で操作できるようになった。工業用 3 DP では造形用粒子にワックスを使用するため、細胞培養への応用には向かなかったが、塩や蔗糖の微小顆粒を使用することで解決することができた。それぞれの方法で作成したスキャホールドの形態などを比較検討した。

### 1. SC-PL 法

#### a) 蔗糖

粒径が不均一な蔗糖のサイズを一定にするために、薬用播粉木で粉碎し、250–500  $\mu\text{m}$  のふるいにかけて、選別した。円柱形および耳型を歯科用印象材から作成し、鑄型を用意した。蔗糖対水分を 40 : 1 の重量比で混合し、よく振ると、粘り気があるくっつきやすい蔗糖が準備できた。これを鑄型の中に押し固めることによって、蔗糖円柱や耳介が出来上がった。ポリカプロラクトンなどの生分解性ポリマーを 5%濃度でクロロホルムなどの有機溶媒に溶解した溶液中に、蔗糖塊を投入し、吸引機で粒子間の空気を脱気し、溶液を浸透させた。そこから取り出して、強制乾燥後、水中で蔗糖などを溶解すると、ポリマースポンジが完成した。細胞と使用する前に EOG ガス滅菌を行った。

#### b) 塩

同様の方法での用意を試みたが、水分を混合した時点で塩顆粒が溶解してしまったため、形態を保つことはできなかった。

## 2. 3DP 法

#### a) 塩

##### i) TheriForm (図 1 4)

本研究ではコンピュータ上で T 字型を作成した (図 1 3)。微小な塩顆

粒をポリマーでコーティングしたパウダーを準備した。希望の形状を打ち抜いた金型を用意した。T字の空隙にパウダーを敷き詰め、バインダーとして有機溶媒をスプレーすることによって塩顆粒同士を接着させた。金型の厚み分ステージが下に下がり、再び金型を乗せ、T字の空隙にパウダーを敷き詰め、固める操作を繰り返すことによって、三次元形状が再現された。出来上がった塩／ポリマーは水中で塩を溶解し、連通路を有する立体ポリマーを得た（図15, 16）。

#### ii) Z printer (図19)

金型を準備する必要がなかった。数十ミクロンの塩顆粒を用意し、バインダーを水溶性天然ゴムを使用して、塩顆粒同士を接着させた。一層ごとに固めて、ステージが下がることで、立体形状が再現された。SC-PL法と同様にポリマー溶液に投入してから、乾燥後、水中で塩を溶解し、ポリマースポンジを得た。また、壁面に孔が空いたチューブをCADでデザインし、複雑な立体構造の再現性を検討した。

#### b) 蔗糖

##### i) Z printer

100–200 ミクロンの蔗糖顆粒を用意し、バインダーとして水を使って、蔗糖顆粒同士を接着させた。塩顆粒と同様であった。一層ごとに固めて、

ステージが下がることで、立体形状が再現された。後処理は SC-PL 法と同様であった。

〔結果〕

## 1. SC-PL 法

### a) 蔗糖

円柱形および耳介型が再現された (図 9)。ポリマーへの置換も良好にできた。軟骨細胞を使って軟骨再生を 2 ヶ月間で誘導することができた (図 10)。しかし、内部が中空構造になることが明らかになった (図 11, 12)。

### b) 塩

完成できなかった。

## 2. 3DP 法

### a) 塩

#### TheriForm

単純な形ではあるが、精度の高い T 字型が再現できた。耳介軟骨膜にある軟骨前駆細胞を播種して、成長因子添加無血清培養液で軟骨を誘導したところ、軟骨再生を認めた (図 17)。構造体深部の軟骨再生はポリマーの間隙が狭いため、表面に比較して劣っていた (図 18)。

## Z printer

数 10 ミクロン (図 2 0) と数 100 ミクロン (図 2 1) の 2 種類の塩顆粒で円柱形状を再現した。顆粒の大きさが大きくなると、表面が荒い構造の円柱形が再現された。ポリマー溶液に浸すと、顆粒が小さい方が細かい形状が再現されていたが、水中で脱塩後は形状を維持することはできなかつた (図 2 2)。どちらも内部にポリマー溶液が侵入できなかつたため、中空構造であつた (図 2 3)。薄い構造であるチューブは良好に形状が再現された (図 2 4)。

## b) 蔗糖

### Z printer

蔗糖顆粒の大きさを数 10 ミクロンレベルに細かくすることはできなかつたため、数 100 ミクロンで耳型を作成した (図 2 5、2 6)。予想外に細かい形状再現は困難であることがわかつた。とくに外周より内部構造の再現が困難であり、微調整を要した。

### [考察および結論]

ポリマースポンジへの細胞進入は数百ミクロンの連通孔が必要である。従来  
の SC-PL 法での形状再現と軟骨再生は比較的良好であつたが、内部構造が中空  
となることが明らかになつた。コンピュータによる立体形状再現は、粒子が細

かい場合は良好であるが、軟骨再生は必ずしも良好ではない印象を受けた。粒子が粗くなると、細かい形状再現性が著明に低下した。さらに検討を重ねる必要があると考えられた。

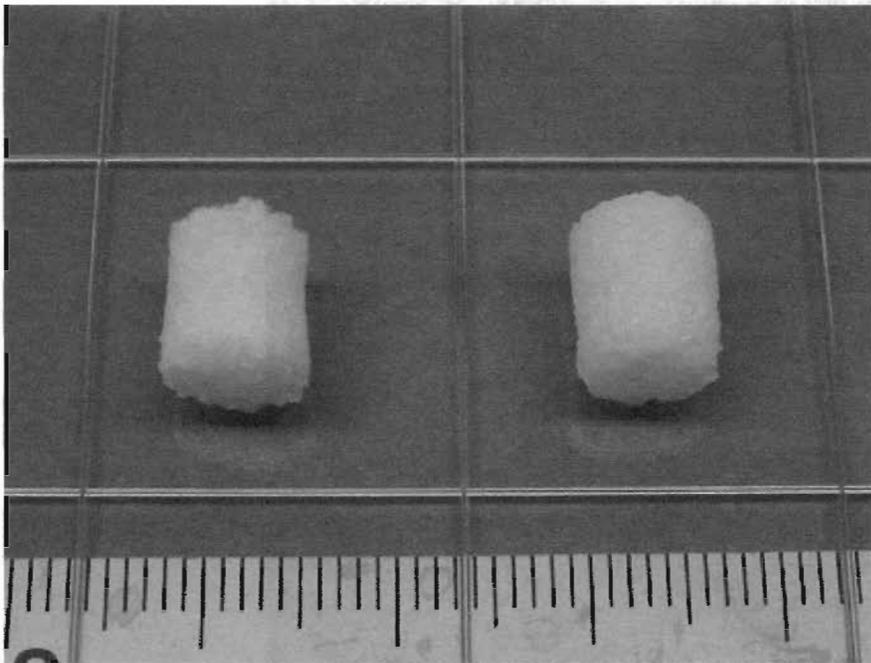


図9 ポリカプロラクトンによる円柱形スポンジ

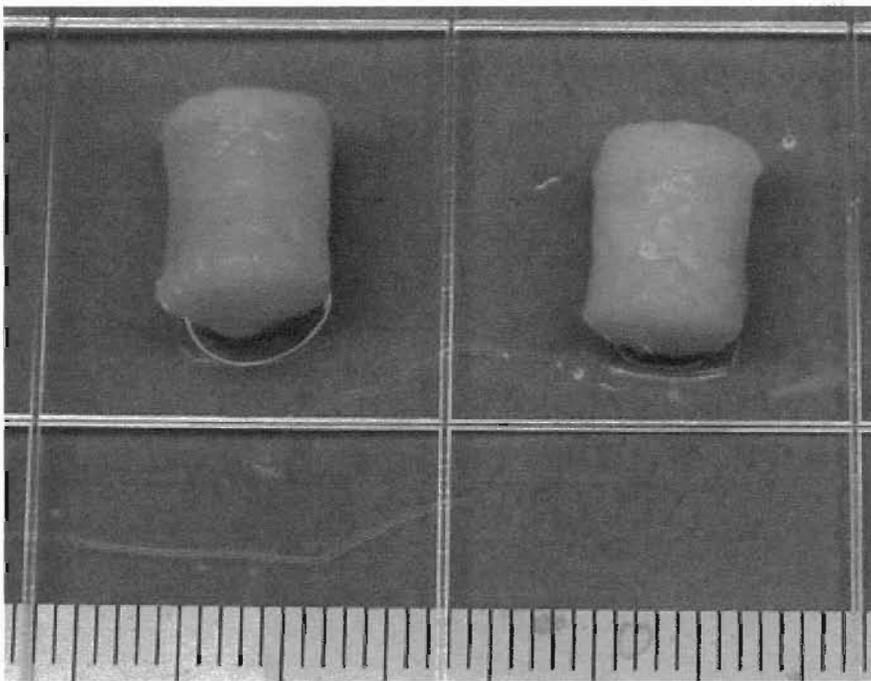


図10 軟骨細胞播種後、2ヶ月で軟骨再生

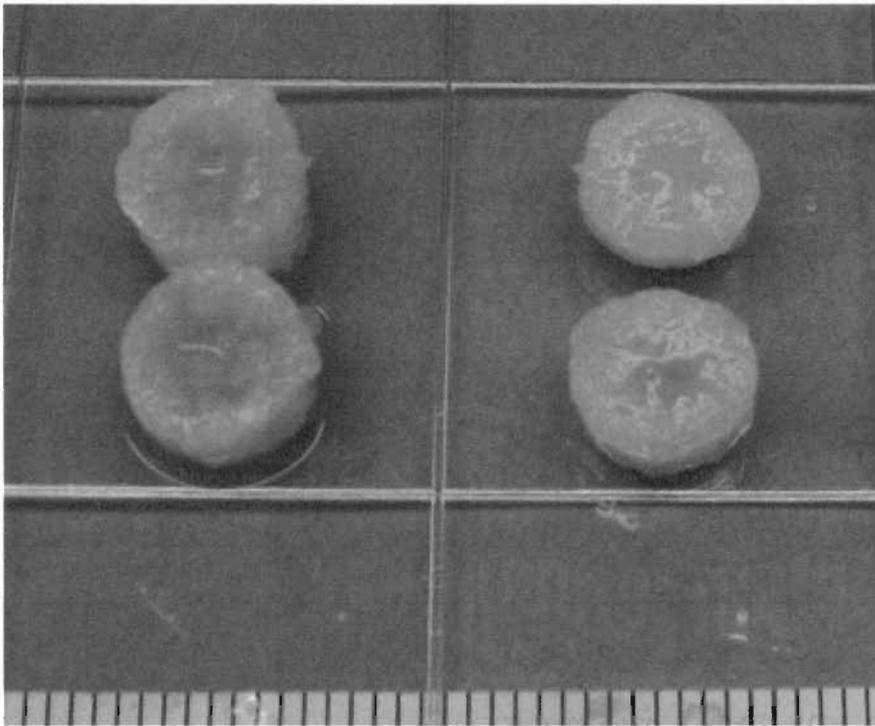


図 1 1 断面で中空構造



図 1 2 病理組織所見：表面 2,3mm レベルで軟骨再生が旺盛

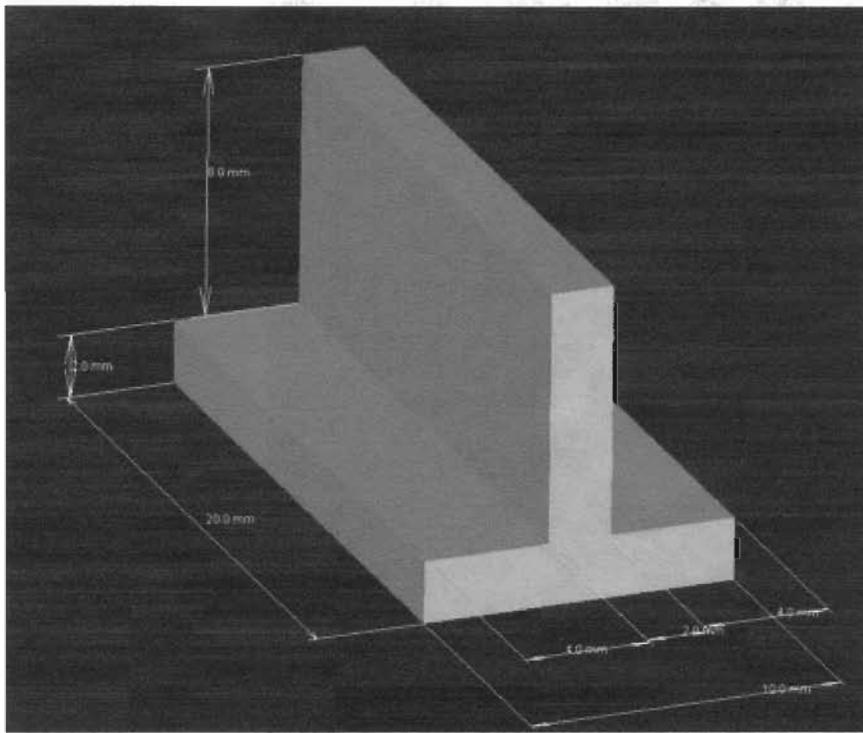


図 1 3 CAD モデル : T 字型のデザイン

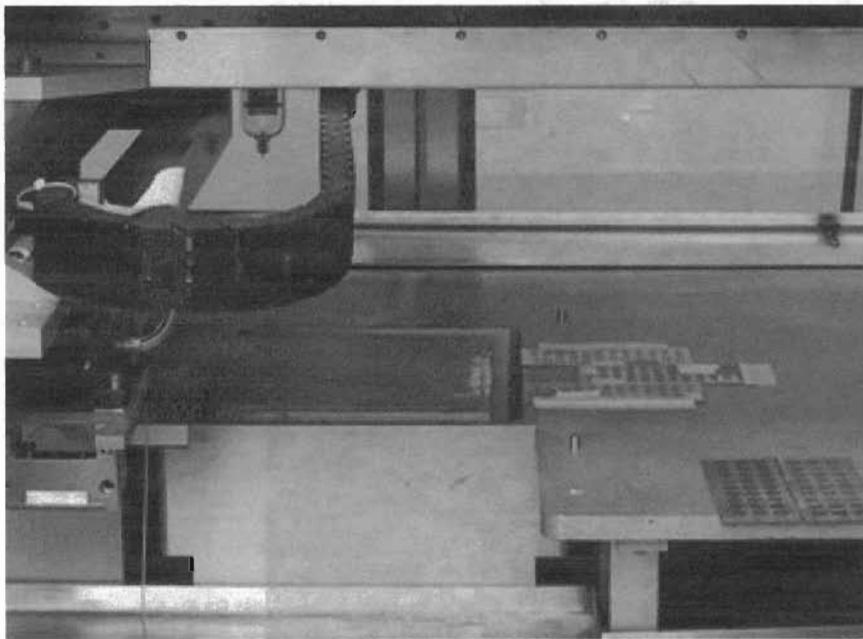


図 1 4 TheriForm : 半自動型三次元プリンター

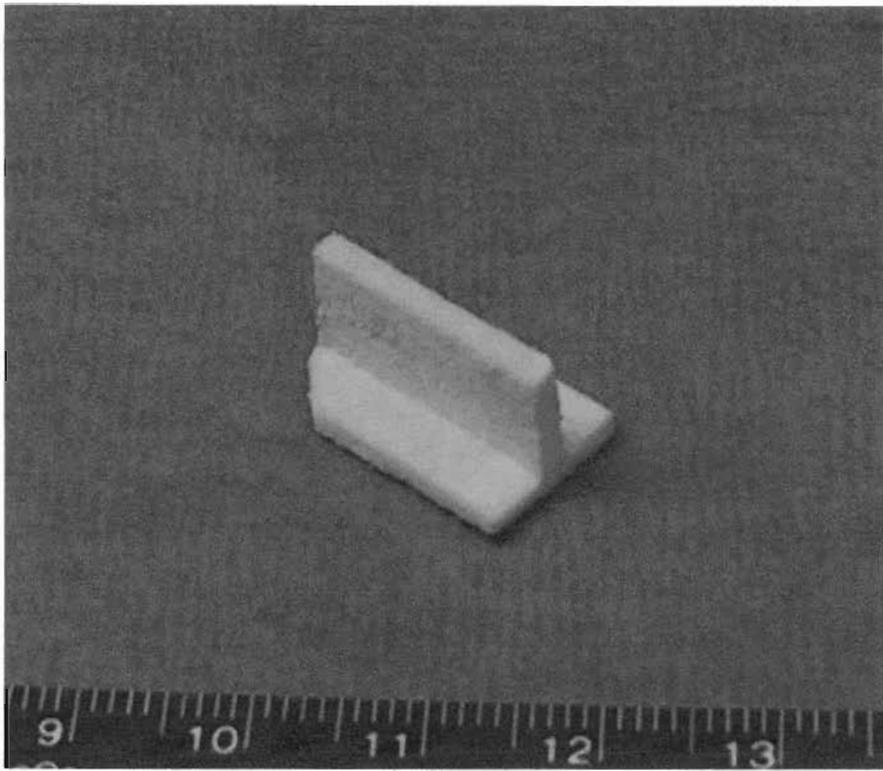


図15 再現されたT字型ポリマー

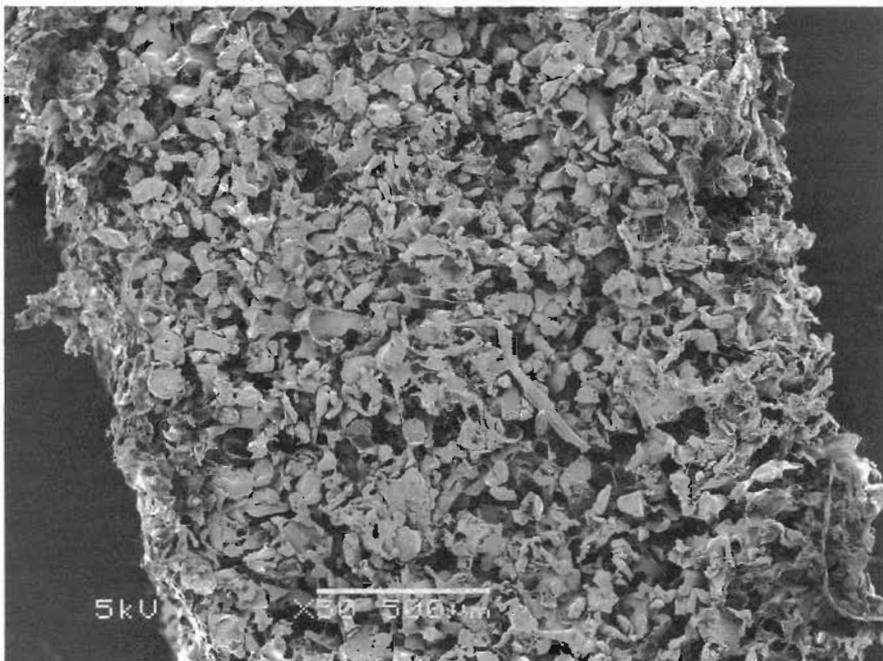


図16 走査電顕写真 内部まで連通孔が細かくできている。

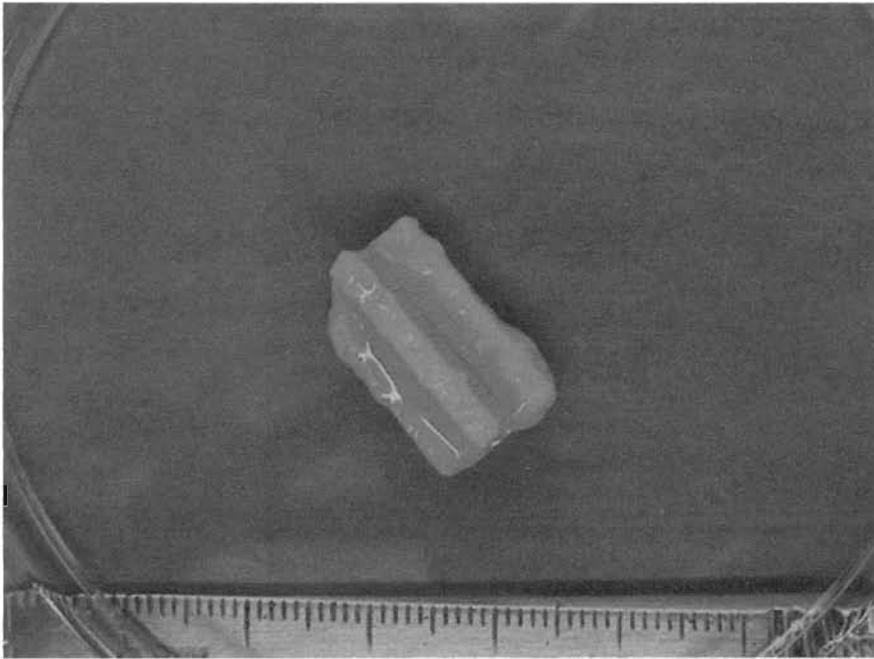


図 1 7 軟骨前駆細胞を使った軟骨再生の誘導

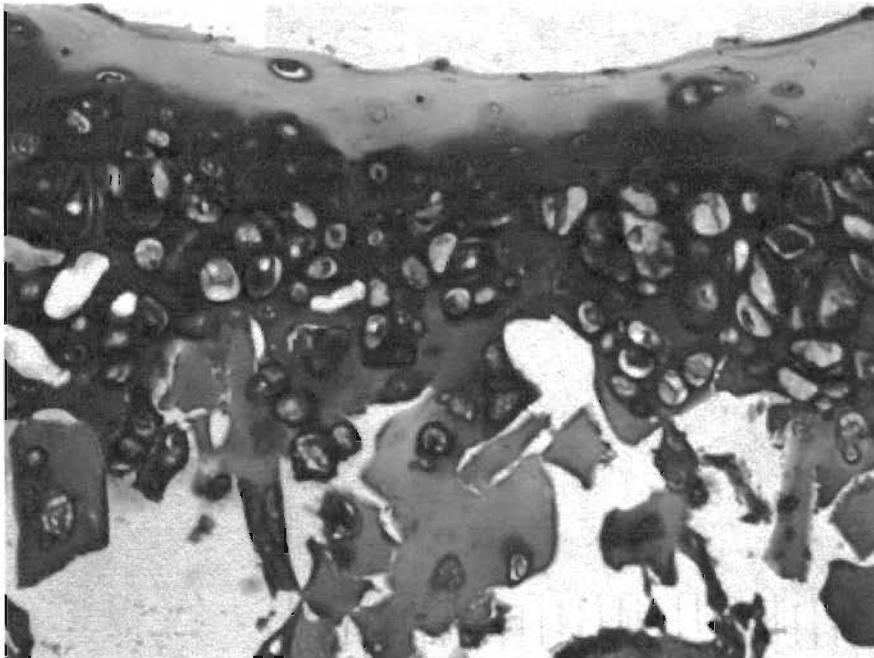


図 1 8 病理組織所見：モバットペンタクロム染色



図 19 Z printer

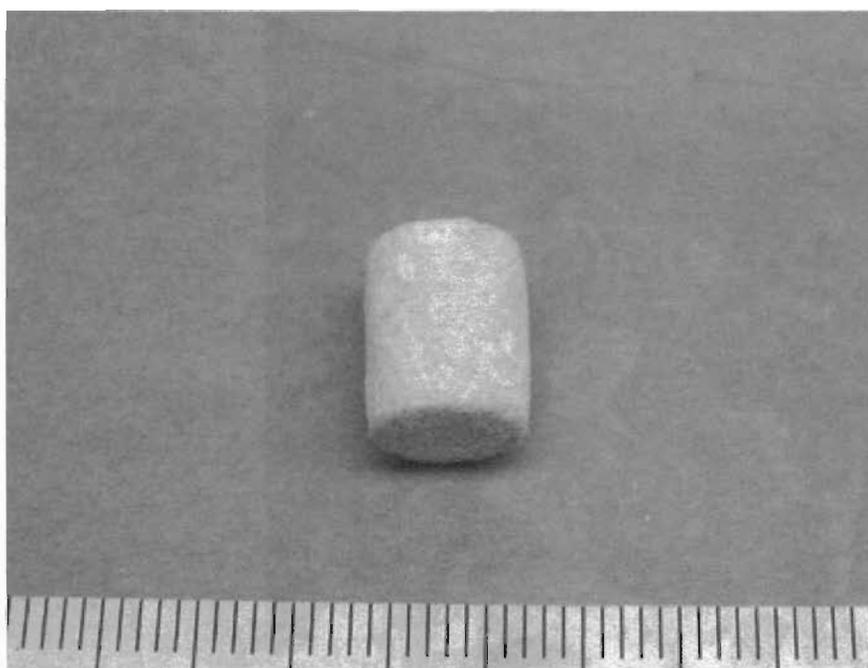


図 20 細かい塩顆粒での立体形状再現



図 2 1 粗い塩顆粒での立体形状再現

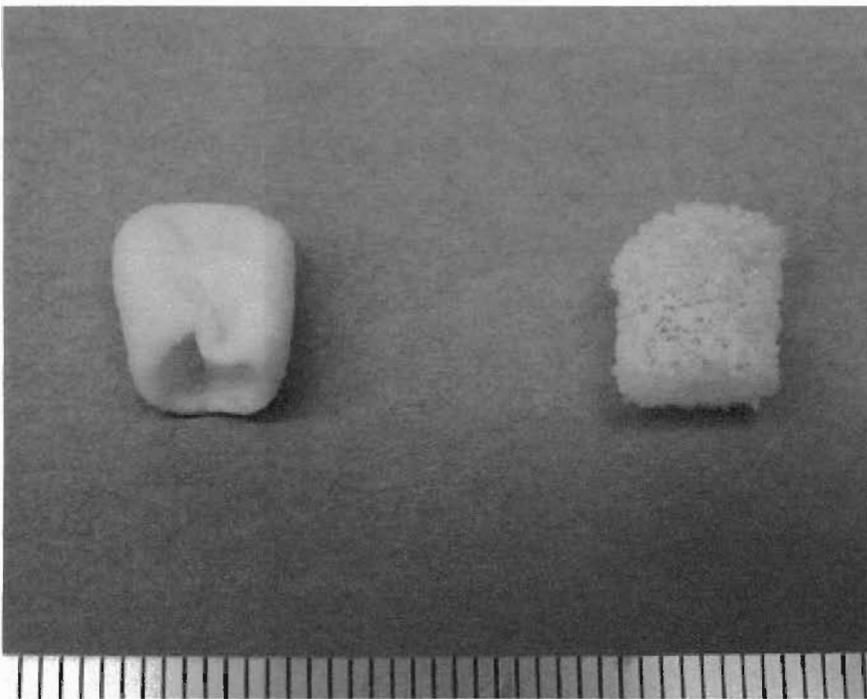


図 2 2 ポリマーへの置換し、脱塩後の形状変化

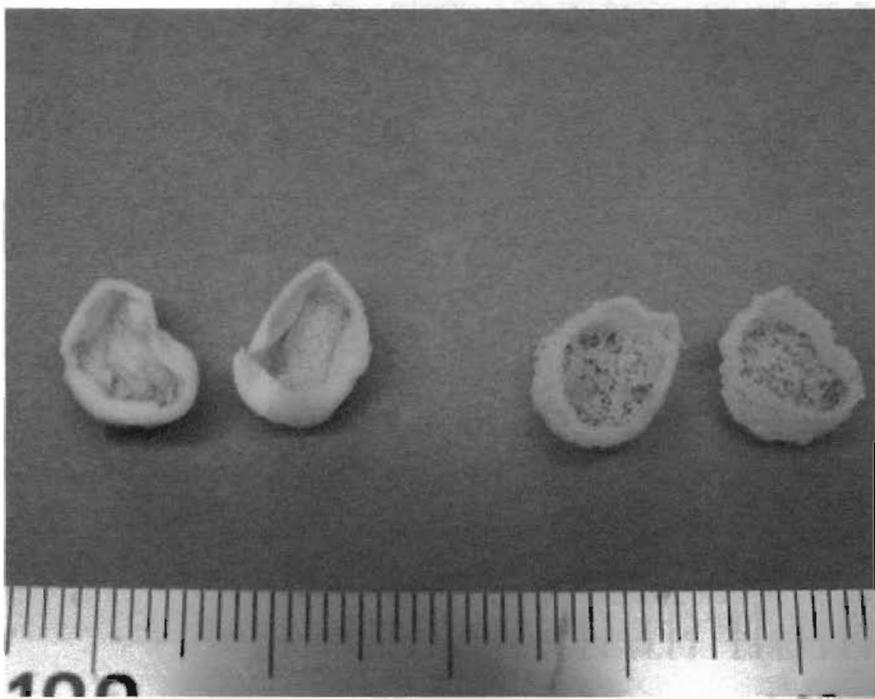


図 2 3 断面構造は中空

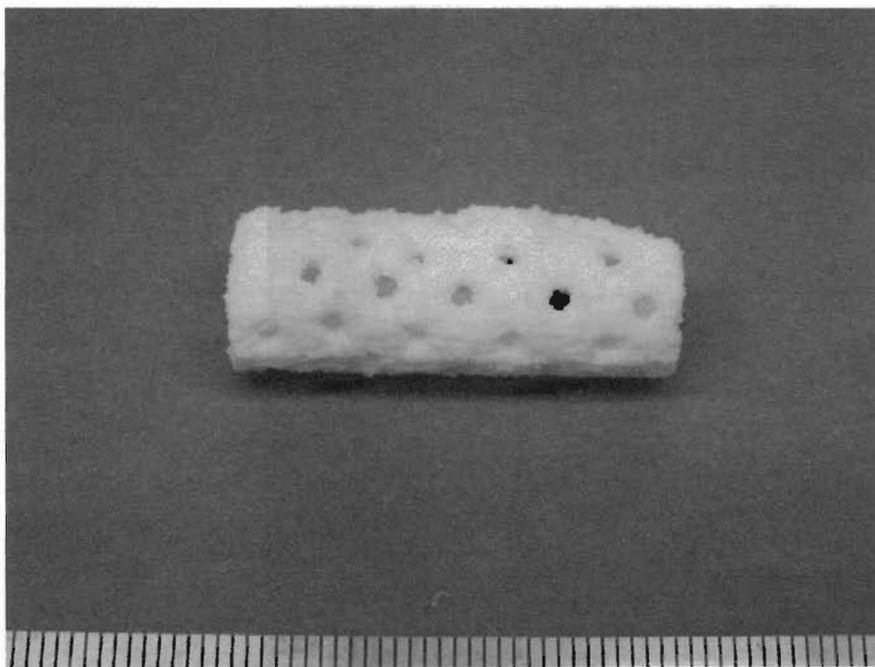


図 2 4 複雑なチューブ構造の再現

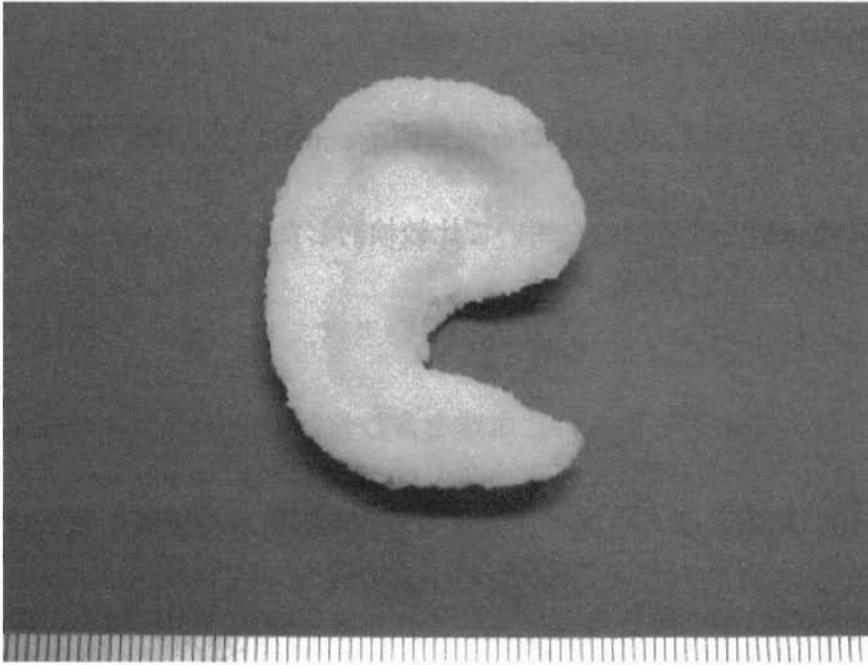


図 2 5 3DP による蔗糖製耳介型

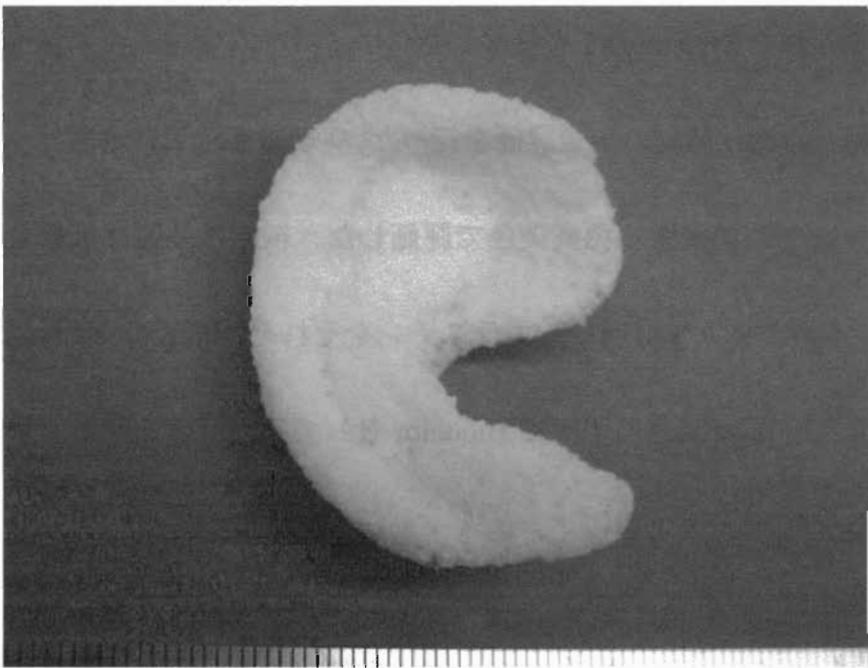


図 2 6 3DP による耳介型ポリマースポンジ

### 3. 骨髄幹細胞、前駆細胞、分化型細胞の比較検討

細胞の種類によって再生時間、必要となる成長因子、再生した組織に差が生じるのか、骨髄間質幹細胞と軟骨細胞を用いて比較検討した。

#### [方法]

骨髄細胞は頸骨骨髄の穿刺から得られた血球を含む骨髄液からフラスコ底面に付着する細胞を 10%FBS+高グルコース含有 DMEM 培養液で増殖させた。通常の軟骨細胞は前述の通り増殖させた。それぞれコンフルエントに達したのち、PGA シートにスピナーフラスコを用いて播種し、回転培養を 3 ヶ月間行った。分化用成長因子として TGF-beta1 を投与した。

病理組織学的検討と細胞外基質の定量評価を行った。病理組織は HE 染色と、I 型および II 型コラーゲンに対する免疫染色で評価した。細胞外基質は II 型コラーゲン、グリコサミノグリカン (GAG)、エラスチンをそれぞれ Sircol assay、Blyscan assay、Fastin assay kit (すべて Biocolor 社) で吸光度計を用いて検量線と比較して定量化した。

## 〔結果〕

3ヶ月と時間がかかったが、骨髄間質幹細胞から軟骨は再生された。Ⅱ型コラーゲンの免疫染色で、軟骨細胞から再生された軟骨とほぼ同等に検出された。

Ⅰ型コラーゲンは主に再生軟骨の表層に分布していた（図27）。

細胞外基質の定量評価では BMSC から再生された軟骨では GAG が多く分泌される傾向が認められた（図28）。Ⅱ型コラーゲン（図29）とエラスチン（図30）の分泌は軟骨細胞から再生された軟骨より劣っていた。

## 〔考察と結論〕

前駆細胞や幹細胞を用いた軟骨誘導では、軟骨細胞を用いた軟骨誘導よりも三次元培養にかかる時間が長くなる傾向があり、それに伴い誘導に要する成長因子の投与量も多くなる傾向があった。さらなる検証が必要ではあるが、ターゲットとする臓器（例えば軟骨）によっては前駆細胞や幹細胞からの組織再生より、元来の分化した細胞からの方が効率よく組織再生を誘導できる可能性があり、必ずしも前駆細胞や幹細胞がベストな選択とはいえない場合もあることが示唆された。

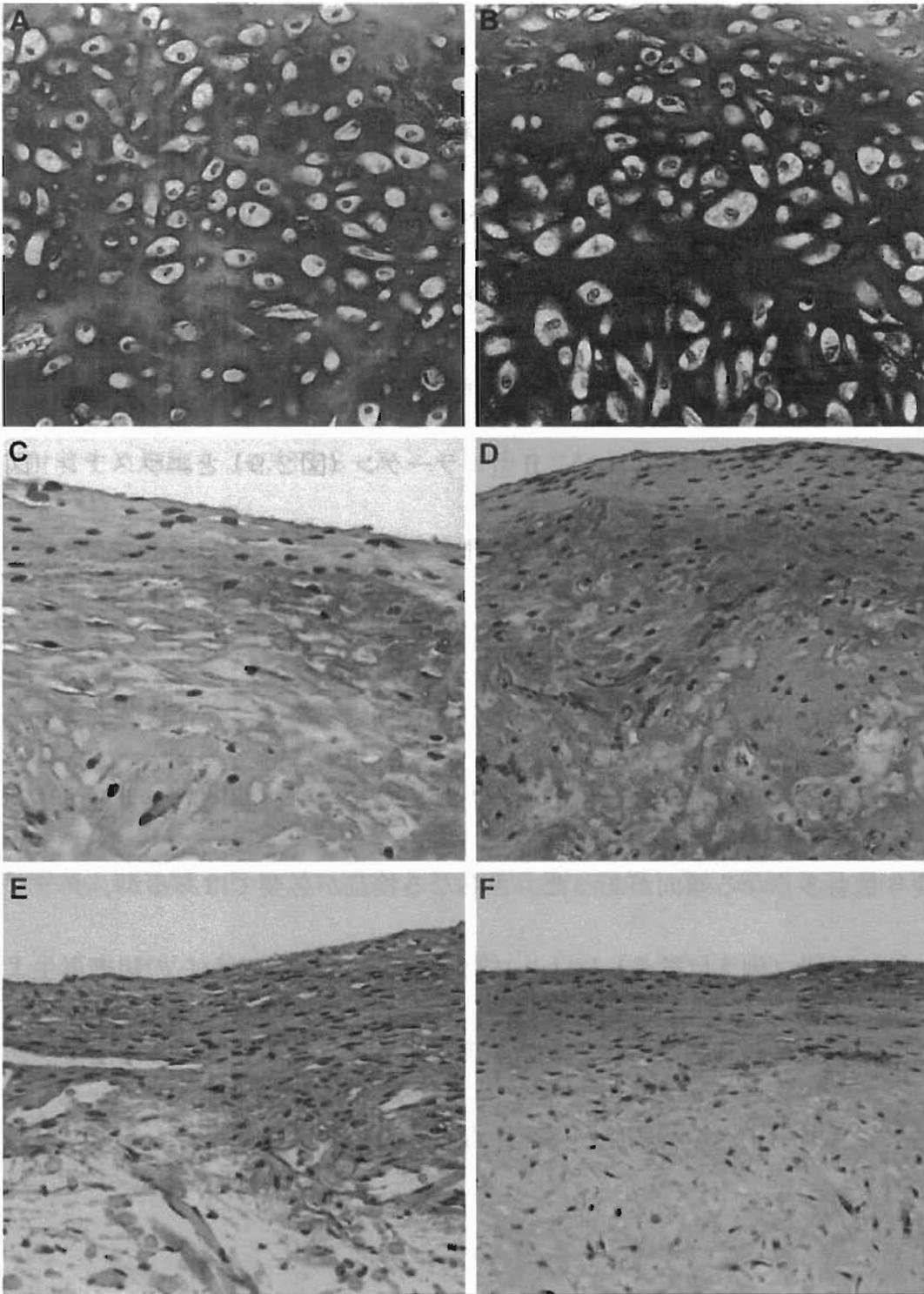


図 2 7 病理組織顎検討 (A,C,E:骨髄間質幹細胞、B,D,F:軟骨細胞、A,B:HE  
 染色、C,D:Ⅱ型コラーゲン免疫染色、E,F:I型コラーゲン免疫染色)

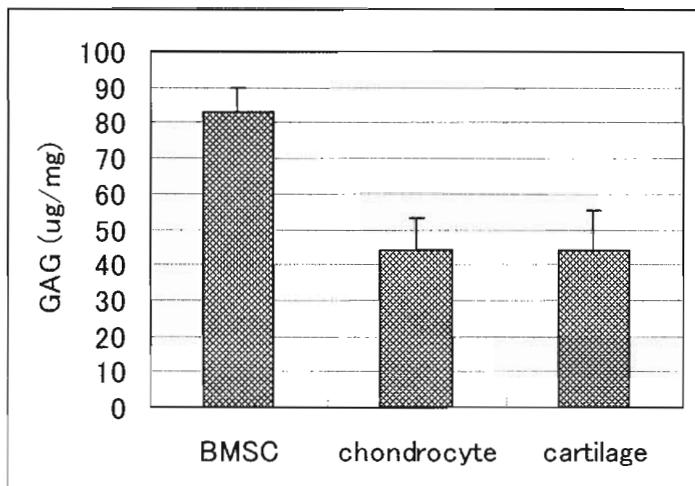


図 2 8 G A G 定量検査

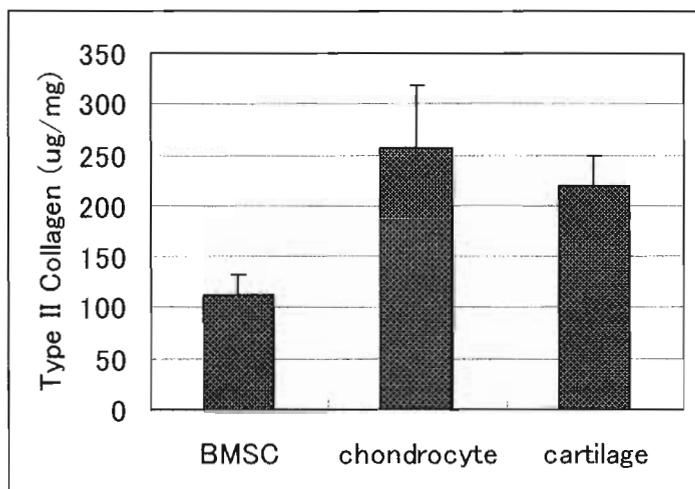


図 2 9 II 型コラーゲン定量検査

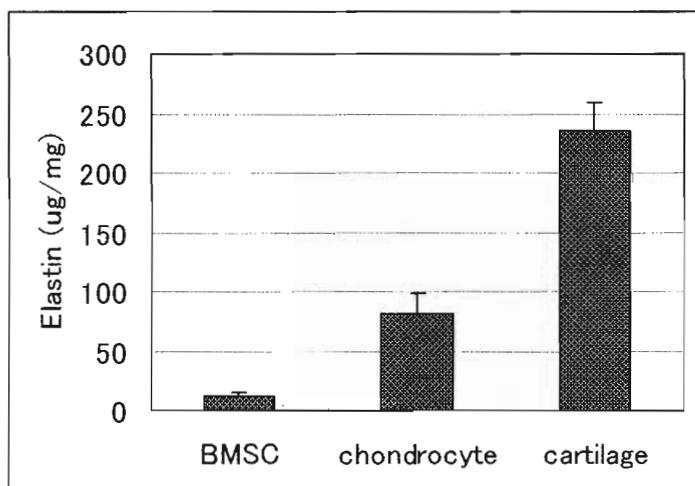


図 3 0 エラスチン定量検査

#### 4. 物質透過性の検討

再生軟骨が中空構造になることが明らかになったため、その原因を検討した。

ポリマーに原因があるかどうかを、ハイドロゲルであるフィブリン糊だけを用いて比較検討した。その結果に基づき、物質透過性を有する天然系ポリマーを新たに採用し、三次元構造再現や軟骨再生に関して検討した。

##### 〔方法〕

a) 従来のポリマースポンジのみ、ポリマースポンジ+フィブリン、フィブリンのみの実験群に分け、軟骨細胞からの軟骨再生を誘導し、病理組織学的に検討した。

b) 酸素透過性が認められる天然系ポリマーを用いて、スポンジ構造を再現し（図34）、軟骨細胞から再生軟骨を誘導し、病理組織学的に検討した。

##### 〔結果〕

a) 2ヶ月間の培養で軟骨が再生した（図31）。ポリマー+フィブリン群での再生した軟骨の厚みをもっとも厚く、**2mm**以上あった。一方、フィブリン群でも中空構造を呈した（図32、33）。

b) 2ヶ月間の三次元培養でポリマー内部まで軟骨再生を認めた（図35）。

##### 〔考察および結論〕

ポリマー自体の物質透過性が、ポリマー深部での再生組織に影響を与えてい

ることが明らかになった。とくに軟骨では、再生した軟骨が硬くなれば硬くなるほど、物質の透過性を阻害すると推測した。このため、ポリマー構造がないフィブリン糊だけを使った実験群でも、内部の細胞は壊死となり、軟骨が再生されなかったと考えられた。一方、酸素透過性を認める天然系ポリマースポンジでは、スポンジのネットワークを通して、酸素などが透過し、内部まで軟骨が再生しえたと推測した。



図 3 1 再生軟骨（左から PCL, PCL+fibrin, Fibrin）の外観

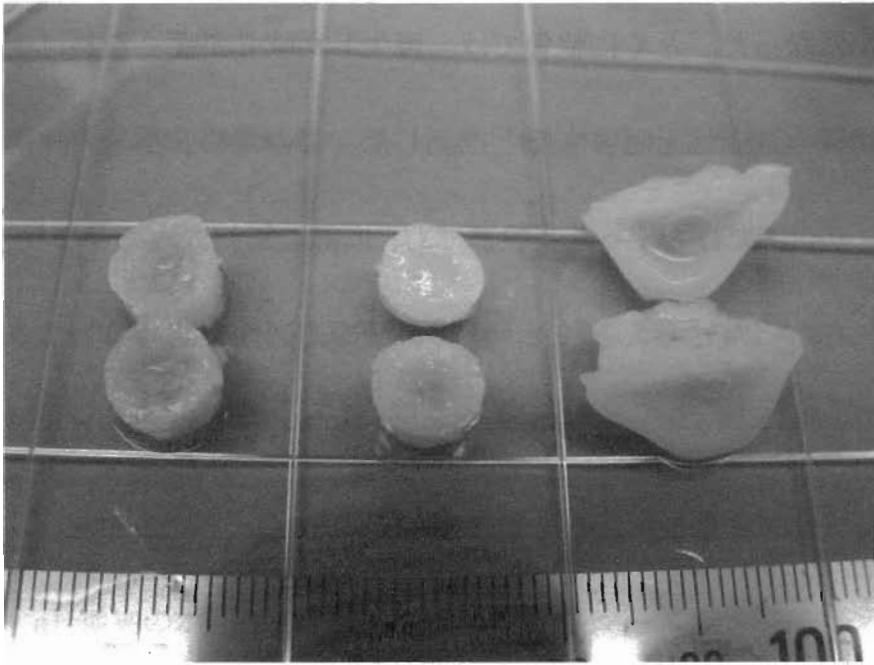


図 3 2 再生軟骨の断面

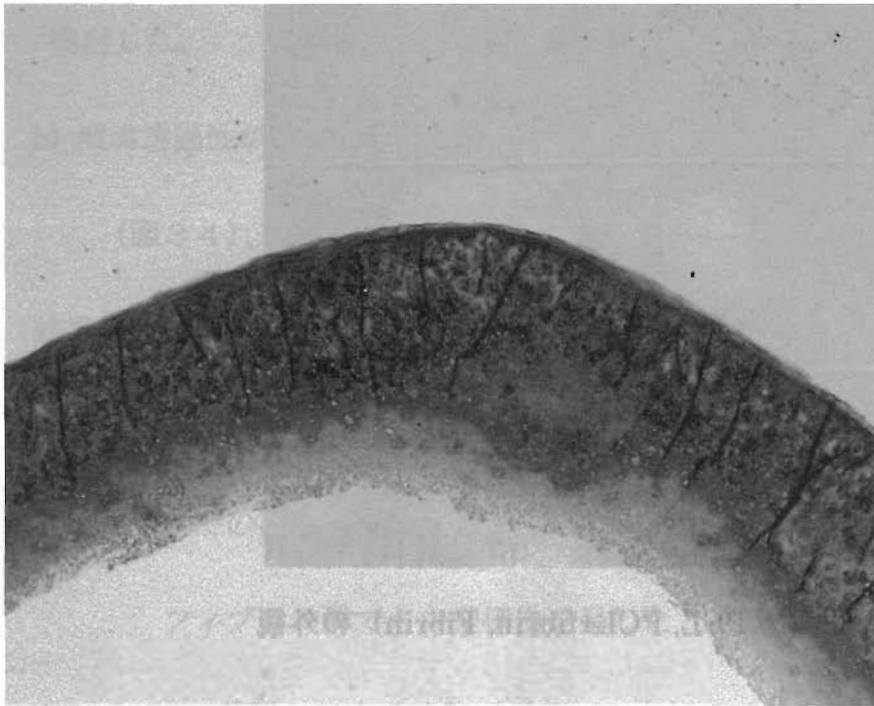


図 3 3 フィブリン糊を用いた再生軟骨 (x 40)

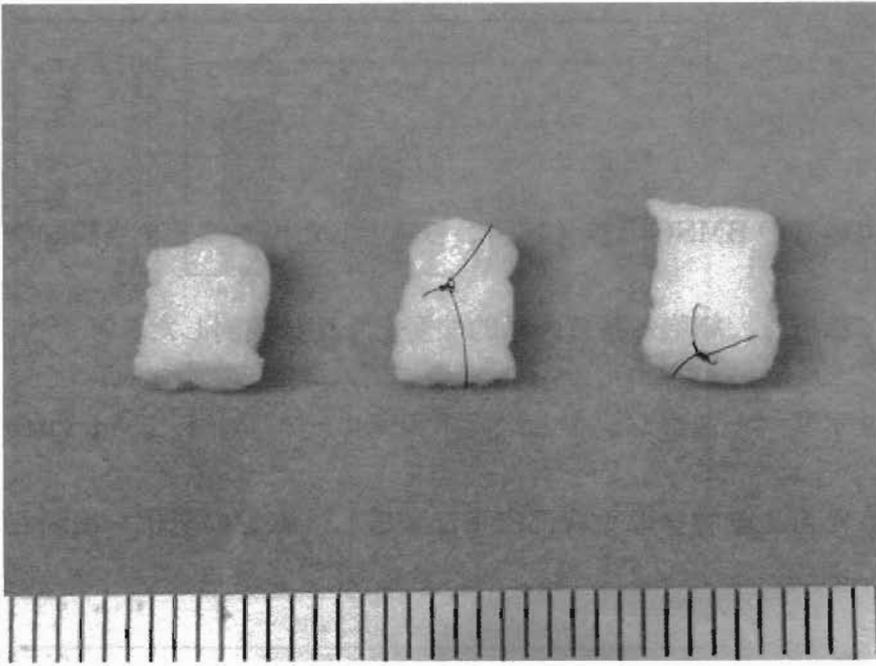


図 3 4 天然系ポリマースポンジの外観

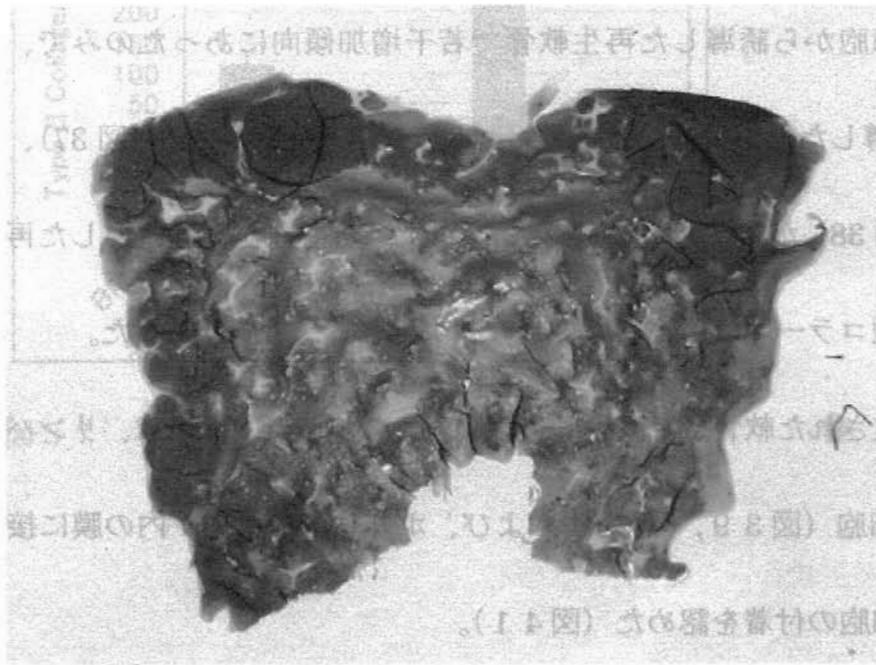


図 3 5 天然系ポリマースポンジでの再生軟骨断面 (x 1)

## 5. 移植

### 〔方法〕

- c) 前述の実験3の BMSC と軟骨細胞から誘導した再生軟骨を当該動物の皮下に移植し、細胞外基質の量的な変化を比較検討した。
- d) 生分解性ポリマースポンジを三次元スキャホールドとして *in vitro* で誘導した再生軟骨を家兎背部皮下に移植し、軟骨の変化を検討した。

### 〔結果〕

- a) GAG が軟骨細胞から誘導した再生軟骨で若干増加傾向にあったのみで、BMSC から誘導した再生軟骨では GAG (図 36)、II 型コラーゲン (図 37)、エラスチン (図 38) がすべて減少していた。また、軟骨細胞から誘導した再生軟骨でも II 型コラーゲン、エラスチンの減少はさらに著明であった。
- b) *In vitro* で再生された軟骨量は減少し、ポリマースポンジ内に単球、リンパ球などの炎症細胞 (図 39, 40)、および、ポリマースポンジ内の膜に接して、多核巨細胞の付着を認めた (図 41)。

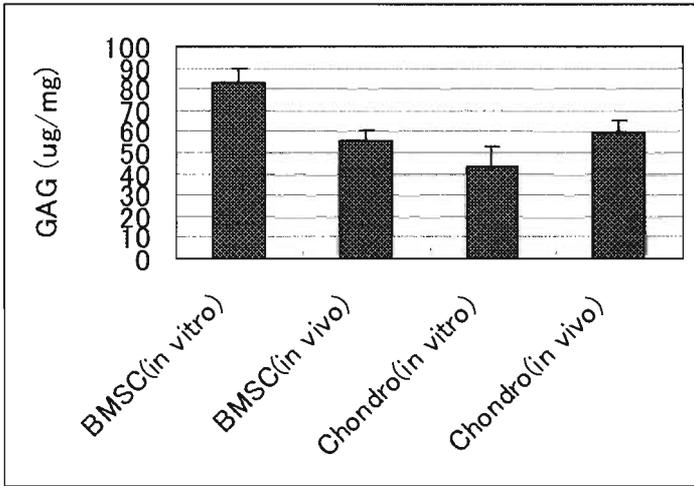


図 3 6 G A G 定量検査

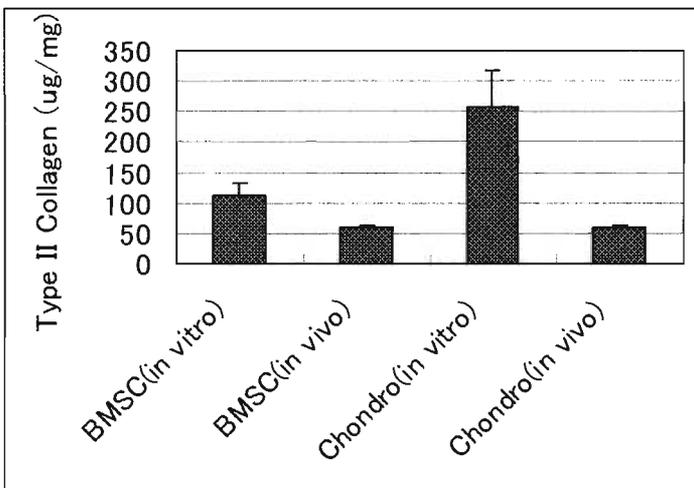


図 3 7 II 型コラーゲン定量検査

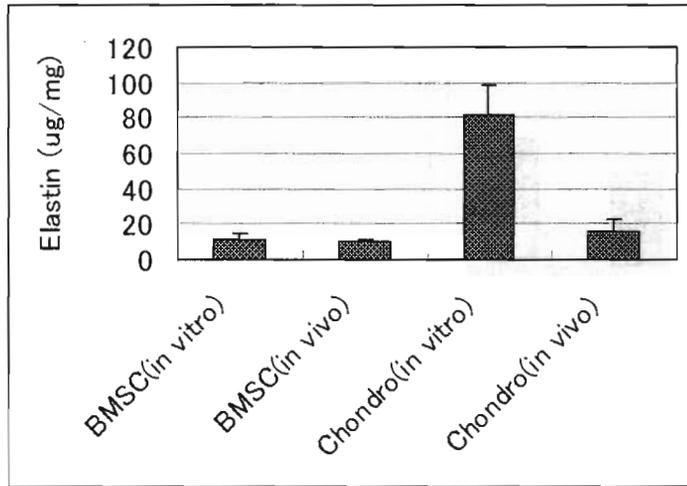


図38 エラスチン定量検査

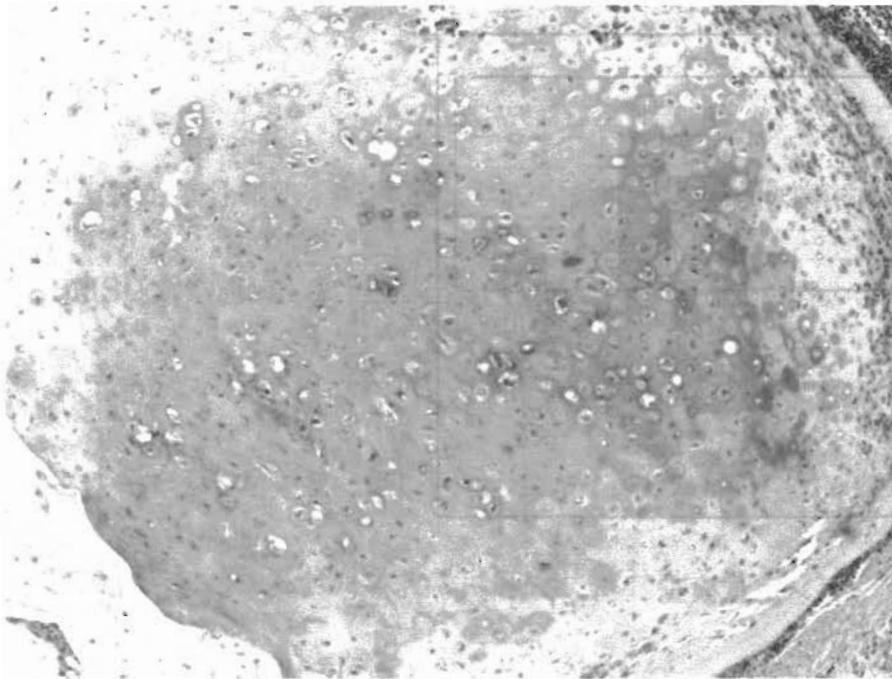


図39 移植した再生軟骨



図 4 0 移植した再生軟骨

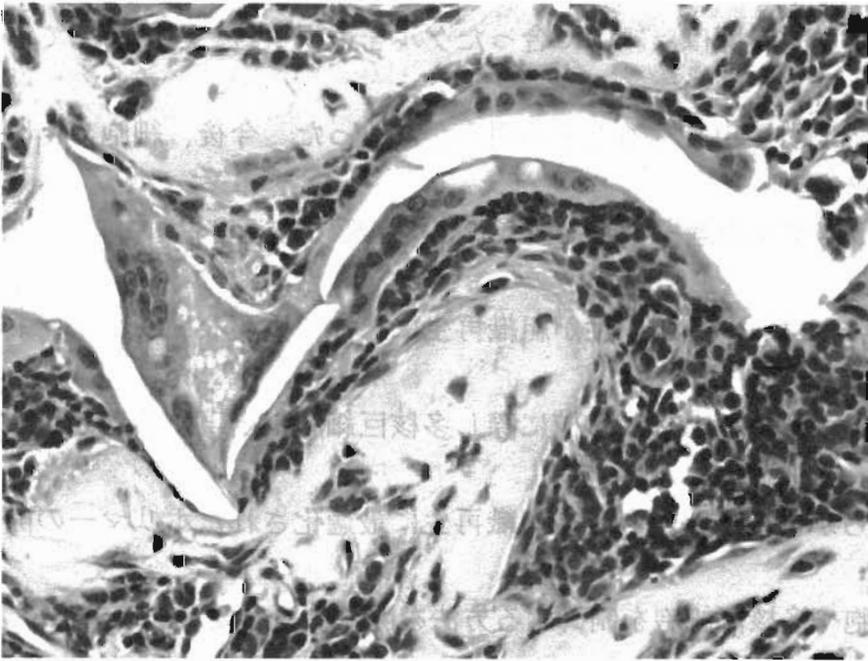


図 4 1 ポリマーに接する面に認められた多核巨細胞

## 【結語】

再生医療の研究は多岐にわたり、さまざまな選択肢があるが、どの細胞や材料が最適であるかはまだ不明な点が多い。本研究では細胞の種類、ハイドロゲル、生分解性ポリマーによる再生組織の品質を検討し、頭蓋額顔面領域の形成外科手術に応用する際に最も効率の良い治療を行うための基礎研究を行った。

培養細胞では、成長因子や組織誘導時間を考慮すると、幹細胞や前駆細胞が必ずしもベストな選択肢ではない場合もあることが示唆された。今後さらに比較検討を重ねる必要がある。

ハイドロゲルを利用する際は、細胞に合ったゲルを選択することによって、細胞の機能を最大限に引き出しうることが明らかになった。今後、細胞ごとに最適化されたハイドロゲルを選択するための研究が必要である。

生分解性ポリマーでは、物質透過性が組織再生にとって重要なキーポイントになる可能性が示唆されたことや、移植に際し多核巨細胞が出現することが問題となることが明らかになった。今後、組織再生に最適化されたポリマーの開発および、炎症細胞や多核巨細胞を制御する方法を開発する必要がある。

**【謝辞】**

1. 大阪産業大学工学部システム情報科 丸谷洋二教授
2. 東京農工大学工学部生命工学科 朝倉哲郎教授
3. 国立病院機構災害医療センター 臓器再生研究室室長 寺田伸一