

器官培養法を用いて保存したウサギ骨軟骨の同種移植実験

近藤 浩之

- 1) 器官培養法を用いて保存したウサギ骨軟骨の同種移植を行い、組織学的に検討した。
- 2) 新鮮移植群を対照群とした移植群においては、全体的に24週目に最も安定した結果となった。以降は生着安定していくか、もしくは吸収される結果となった。
- 3) 同種移植を行う場合、器官培養による保存を4週以上行った群に好結果が得られた。

(平成7年10月2日採用)

A Histological Analysis of Osteochondral Allografts After incubated by in Vitro Organ Culture

Hiroshi KONDO

1) This study was undertaken to examine the fate of rabbit articular cartilage in "osteochondral allografts" after incubated by in vitro organ culture. The histologic-histochemical grades of the grafts was evaluated by histological study at 4, 8, 12, 24, and 48 weeks after transplantation.

2) In the allograft group, the highest histologic-histochemical grades appeared at 24 weeks after transplantation. Afterward, the fate of the graft followed either very good course or absorbed by rejection.

3) Our findings showed that osteochondral tissue should undergo incubated by organ culture for over four weeks. (Accepted on October 2, 1995) *Kawasaki Igakkaishi* 21(3):163-173, 1995

Key Words ① Osteochondral allografts ② Organ culture
③ Histology

はじめに

整形外科領域における骨移植の歴史は古く、300年以上にもさかのぼるといわれている¹⁾。近年、自家骨移植はもとより、ハイドロキシアパタイトや recombinant BMP (Bone Morphogenetic Protein) 等の骨誘導に対する基礎的研究も進められ、骨移植の臨床応用は長足の進

歩をとげている。一方、軟骨移植は、未だ積極的な臨床応用が行われているとはいいがたいのが現状である。

移植に用いる組織の保存方法として、現在のところ凍結乾燥保存法が広く用いられている。この方法の欠点は凍結、解凍に伴う細胞の破壊であり、検討の余地がある²⁾。

今回、ウサギの骨軟骨を器官培養法を用いて保存したものを同種移植し、組織学的に検討し

た。

実験材料と方法

骨軟骨片の採取：川崎医科大学医用実験センターで飼育中の体重 2.5~3 kg の成熟白色日本家兎から摘出した軟骨下骨付の硝子軟骨を器官培養法により保存し、70膝に対する同種移植を行った。

移植に用いた骨軟骨は主に、donor の大腿骨頭、膝関節、及び膝蓋骨の軟骨面より無菌的に採取した。得られた軟骨片は直径 3 mm、軟骨下骨の厚さが 2~3 mm の円柱状になるように内径 3 mm の打抜き器を用いて成形した。次いでこれらの骨軟骨片を器官培養法で、それぞれ 2 週、4 週、8 週、12 週、16 週保存したのち、移植した。

器官培養法：培養シャーレ（住友ベークラフト社製）に、培養液（Table 1）を入れ、CO₂ インキュベーター内で骨軟骨片を器官培養した（37°C、5% CO₂）。培養液の交換は 1~2 日おきに行った。2 週、4 週、8 週、12 週、16 週間器官培養した軟骨片を、それぞれ大腿骨膝蓋面に移植した。

骨軟骨移植：耳介静脈から経静脈的に静脈麻酔（pentobarbital 0.8 mg/kg~1.0 mg/kg）を行った。麻酔不十分な例にはマスクによる吸入麻酔（笑気+酸素）を追加した。笑気と酸素の割合は症例により適宜増減した。

膝関節内側の皮膚を縦切開し、関節包に内側傍膝蓋切開を加え、膝蓋骨を外側に翻転した。次に大腿骨・膝蓋骨関節部の大腿骨膝蓋面に直径 3 mm のドリルを用いて孔を作製し、移植床とし、一定期間器官培養を行った軟骨片を移植した（Fig. 1）。

移植後、4 週、8 週、12 週、24 週、48 週に移植部を中心とした骨軟骨標本を採取した。屠殺法は、経静脈的に pentobarbital 製剤を血管痛を感じないように緩やかに注入し、瞬目反射が消失したことを確認したのち急速に 10 ml 注入し、心停止を確認した後摘出した。

母床を含む移植片は、光学顕微鏡を用いて組織学的に比較、検討を行った。まず、中性ホルマリンで最低 1 週間固定を行い、脱脂、脱灰、脱水を行い、パラフィンに包埋した（Table 2）。切片は厚さ 5 μm になるように作製した。染色方法は Safranin O fast green iron hematoxylin

Table 1. Organ culture medium

MEM Eagle medium
10 % Fetal Bovine Serum
dexamethazon 10 ⁻⁶ mol
insulin 10 μg/ml

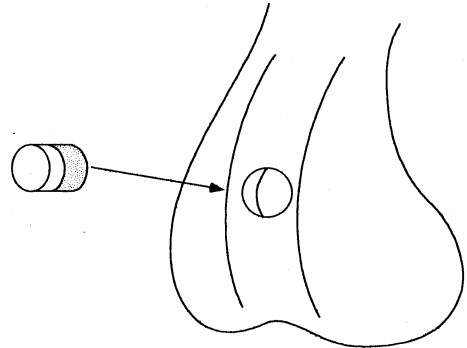


Fig. 1. A 3 mm diameter hole on the patellar surface, and graft with an osteochondral tip.

Table 2. Technique of degrease, decalcification and dehydration

Degrease
70 % ethanol 12 hours
90 % ethanol 12 hours
95 % ethanol 12 hours
99 % ethanol 12 hours
95 % ethanol 3 hours
90 % ethanol 3 hours
70 % ethanol 3 hours
H ₂ O

Decalcification
HCl 8.5 ml + 100 % HCOOH 5 ml + AlCl ₃ 7g + H ₂ O 100 ml
(bone 1 g/100 ml)

Dehydration
70 % ethanol 24 hours
90 % ethanol 24 hours
95 % ethanol 24 hours
99 % ethanol 24 hours
Isoamil acetate

染色を用いた。この染色方法は HE 染色と比較して、酸性ムコ多糖類に特異的に染色する Safranin O に、fast green と iron hematoxylin を用い、細胞その他の形態的变化を鮮明に表すことができた³⁾ (Table 3)。

組織学的な評価基準は、Table 3 に示す通りである。光

学顕微鏡を用いた組織評価は、先に Mankin らによって行われた変形性関節症軟骨の組織学的評価を参考とした⁴⁾。今回の組織評価は、1. 軟骨基質の染色性、2. 軟骨細胞の形態的变化、3. 軟骨表面の変化、4. tide mark の連続性、5. tide mark 以下の染色性、以上 5 項目で、full score は 15 点満点となる (Table 4)。

control 群として、新鮮骨軟骨片を摘出日に同種移植した群を用いた。

結 果

培養、移植群での組織評価を (Fig. 2)、(Table 5) に示す。まずそれぞれの器官培養日

Table 3. Staining

Safranin O fast green iron hematoxylin stain	
1. deparaffinization	
2. Weigert iron hematoxylin	4 min
3. rinse	
4. 0.02 % fast green water solution	5 min
5. 1 % acetic acid water solution	
6. 0.1 % Safranin O water solution	7 min
7. dehydration	
8. xylol incidification	
9. balsam mount	

数による組織学的な検討を行う。移植後の明らかな感染により全廃したと思われる例は今回の組織評価から除外してある。

1) 新鮮同種移植群 (コントロール群) (Fig. 3)

この群では移植後 4 週目に比較的高値を示しており、その後経時的に組織点数が低下し 24 週目を境にして 48 週目には極端に減少していた。この群では 15 膝を観察した。

2) 2 週器官培養移植群 (Fig. 4)

移植後 4 週目より組織評価は低値であった。その後も組織点数はほとんど不変であり、一旦 24 週目で組織点数は低下しており、48 週目には軽度上昇していた。この群では 10 膝を観察した。

Table 4. Histological-histochemical grading

1. safranin-O staining (matrix, upper layer from the tide mark : tangential zone, transitional zone, radial zone)		3. surface	
normal	4	normal	2
slight reduction	3	irregularities	1
moderate reduction	2	disappeare	0
severe reduction	1	4. tide mark integrity	
no dye noted	0	intact	2
2. cells		irregularities	1
normal	3	crossed by blood vessels	0
slight hypocellularity	2	5. safranin-O staining (matrix, under layer from the tide mark : calcified zone)	
hypocellularity	1	normal	4
scar	0	slight reduction	3
		moderate reduction	2
		severe reduction	1
		no dye noted	0

Serial histological sections, cut at five micrometers and stained with hematoxylin and eosin and safranin-O-fast green-iron hematoxylin, were analyzed for abnormalities in structure, cell population, safranin-O stain distribution, and scores assigned as the histologic-histochemical grade.

Histological score

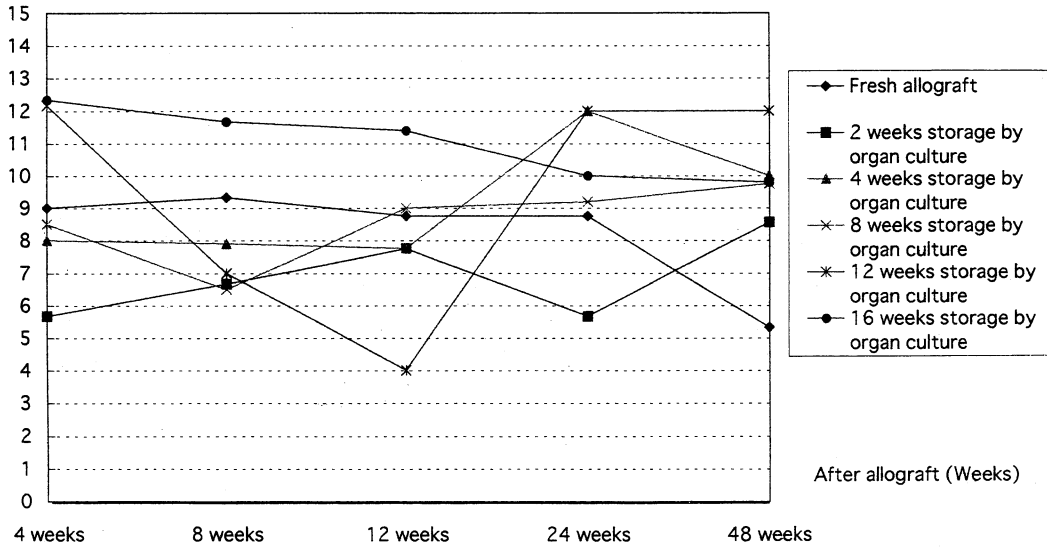


Fig. 2. This graph shows the relation of the term of in vitro organ culture, the duration of transplantation, and histological-histochemical grading.

Table 5. The term of in vitro organ culture, the duration of transplantation, and histological-histochemical grading.

	4 weeks after allograft	8 weeks after allograft	12 weeks after allograft	24 weeks after allograft	48 weeks after allograft
Fresh allograft	9	9.33	8.75	8.75	5.33
allograft, 2 weeks organ culture	5.67	6.67	7.75	5.67	8.56
allograft, 4 weeks organ culture	8	7.9	7.75	12	10
allograft, 8 weeks organ culture	8.5	6.5	9	9.2	9.75
allograft, 12 weeks organ culture	12.17	7	4	12	12
allograft, 16 weeks organ culture	12.33	11.67	11.4	10	9.8

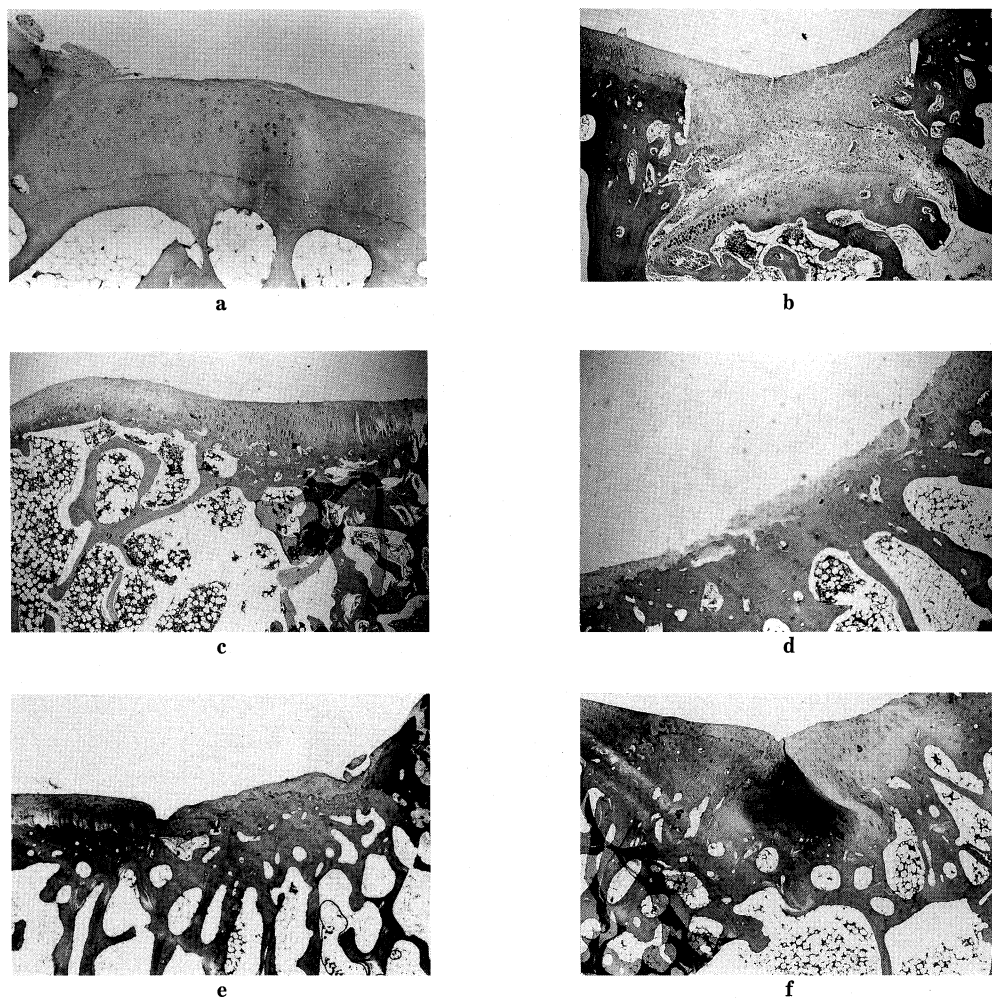


Fig. 3. Control group (Fresh Allograft)

- a) F-4w : Fresh allograft, 4 weeks after transplantation. The upperlayer of the tide mark of the allograft tip staining shows moderate reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 50$)
- b) F-8w : Fresh allograft, 8 weeks after transplantation. Impact case. The hole is filled with collagen fiber. The lower layer of the tide mark staining shows slight reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- c) F-12w : Fresh allograft, 12 weeks after transplantation. Staining of the allograft tip shows slight reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- d) F-24 w : Fresh allograft, 24 weeks after transplantation. The allograft tip is rejected. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- e) F-48 w. 1 : Fresh allograft, 48 weeks after transplantation. The allograft tip is irregular, and the stain is reduced from the edge. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- f) F-48 w. 2 : Fresh allograft, 48 weeks after transplantation. The allograft tip is absorbed by the recipient. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)

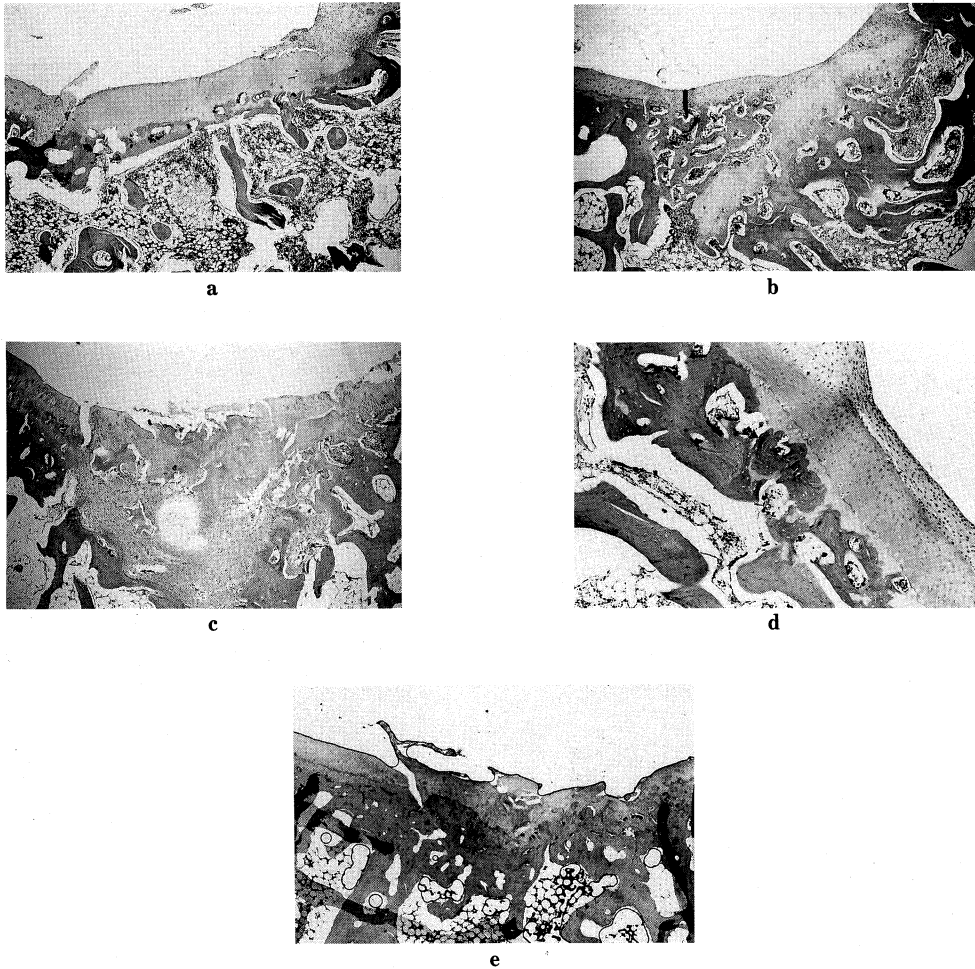


Fig. 4. Allograft group, with 2 weeks incubated by organ culture.

- a) 2 W-4 w : 2 weeks incubated by organ culture, and grafted, 4 weeks after transplantation. The upper layer of the tide mark of the allograft tip staining shows severe reduction, the under layer is normal. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- b) 2 W-8 w : 2 weeks incubated by organ culture, and grafted, 8 weeks after transplantation. Impact case. staining shows severe reduction, the under layer is normal. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- c) 2 W-12 w : 2 weeks incubated by organ culture and grafted, 12 weeks after transplantation. The allograft tip is irregular, but the staining shows good. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- d) 2 W-24 w : 2 weeks incubated by organ culture and grafted, 24 weeks after transplantation. The upper layer of the tide mark of the allograft tip staining shows slight reduction, the under layer is severe reduction. Surface is covered with collagen tissue, and rejecting from superficial layer. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 50$)
- e) 2 W-48 w : 2 weeks incubated by organ culture and grafted, 48 weeks after transplantation. The allograft tip is irregular, and shows slight reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)

3) 4週器官培養移植群

移植直後より組織点数は低値であるが、24週

目にこの群では最高であり、48週目に軽度低下していた。この群では10膝を観察した。

4) 8週器官培養移植群 (Fig. 5)

移植後4週目から8週目まで軽度組織点数が

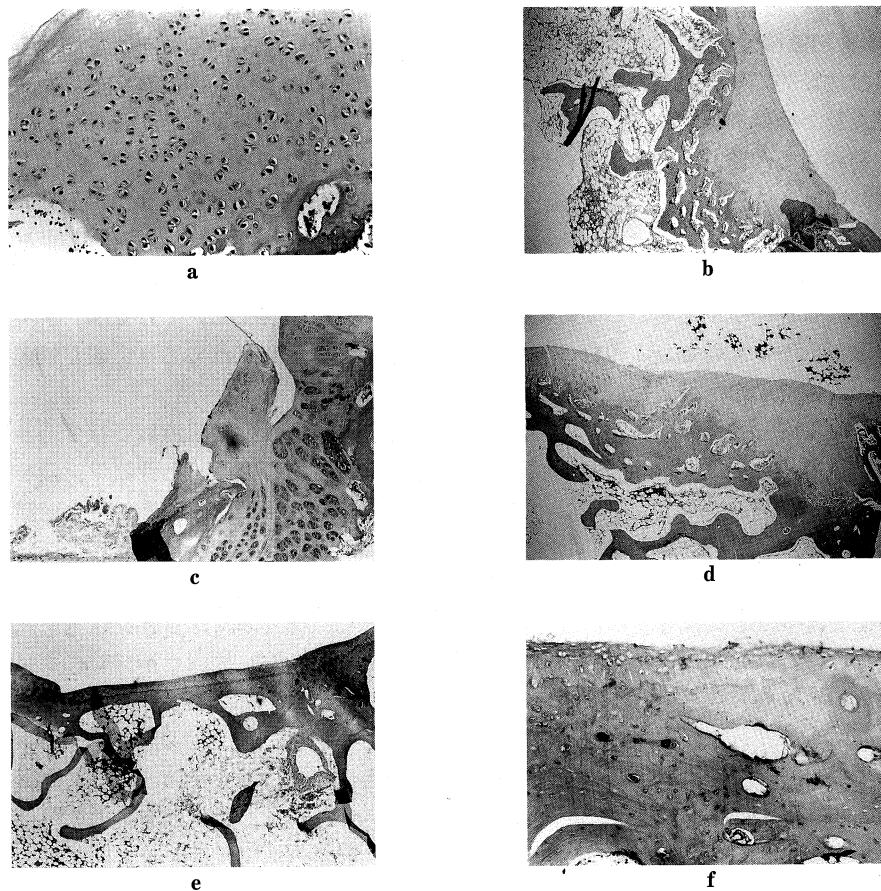


Fig. 5. Allograft group, with 8 weeks incubated by organ culture.

- a) 8 W-4 w : 8 weeks incubated by organ culture and grafted, 4 weeks after transplantation. Staining of the allograft tip shows slight reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 100$)
- b) 8 W-8 w : 8 weeks incubated by organ culture and grafted, 8 weeks after transplantation. The allograft tip is impacted, and surface is covered with collagen tissue, rejecting from superficial layer. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- c) 8 W-12 w : 8 weeks incubated by organ culture and grafted, 12 weeks after transplantation. The right side is allograft tip. The allograft tip is irregular. The upper layer of the tide mark shows slight reduction, the under layer shows moderate reduction. (Safranin O-fast green)
- d) 8 W-24 w : 8 weeks incubated by organ culture and grafted, 24 weeks after transplantation. The allograft tip is impacted, and surface is covered with collagen tissue, rejecting from superficial layer. But the under layer of the tide mark of the allograft tip staining shows slight reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 50$)
- e) 8 W-48 w. 1 : 8 weeks incubated by organ culture and grafted, 48 weeks after transplantation. Staining of the allograft tip shows slight reduction, but perichondrium shows normal. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- f) 8 W-48 w. 2 : 8 weeks incubated by organ culture and grafted, 48 weeks after transplantation. Staining of the allograft tip shows severe reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 50$)

低下しているが12週目に上昇し、それから24週、48週と組織点数はほとんど不変であった。この群では13膝を観察した。

5) 12週器官培養移植群

移植直後は比較的高値であったが8週目、12週目と組織点数が極端に低下している。その後は24週目、48週目と高値であった。この群では9膝を観察した。

6) 16週器官培養移植群 (Fig. 6)

この群の特徴は、全体的にみて平均的な組織点数が高値であるが移植後4週目から経時的に組織評価点数が低下していた。この群の48週目は2例ある。1例は染色性、細胞形態、などで高値を示したが1例では低値だった。この群では13膝を観察した。

考 察

骨軟骨移植を行うことにより関節機能を回復させようとする試みは1900年代初頭から行われており、様々な実験的、あるいは臨床的な研究が報告されている。

Lexerらは1908年、新鮮なヒトの遺体から初めての同種間全関節移植及び半関節移植を行い、歩行可能まで回復した、当時としては驚くべき良好な結果を残している⁵⁾。1952年、Hendersonらは、イヌの膝関節を用いた同種間全関節移植を行っており、同種の全関節移植は最終的に完全な崩壊に陥る事を組織学的に報告している⁶⁾。その後、より基礎的な免疫学的研究が進められ、1960年代になり再び骨軟骨移植は脚光を浴び始め、現在に至っている。

骨、骨軟骨移植の目的は、2つに大別される。

ひとつは外傷による骨欠損、変形性関節症の変化、骨腫瘍切除後、などに対する骨軟骨欠損部での補填であり、他は骨髄炎、偽関節、など骨形成、骨癒合の促進目的としての利用である。

そして移植の方法、材料に関しても様々な試みがなされてきた。自家骨移植の場合は、腸骨、腓骨、肋骨などの体内でも比較的応力のかからない骨をある程度の量採取し、使用することが

できる。しかし大関節、あるいは広範な骨軟骨移植の必要な場合は体内に供給源を求めることができないので、自家関節、自家軟骨の移植は現実的に不可能である。そこで同種関節、同種軟骨を用いた方法、手技が必要になる。さらに実用的な観点から見ると、保存骨軟骨を用いた移植が便利である。

新鮮移植や凍結保存法を用いた軟骨移植の実験的研究はこれまでも多数報告されているが^{7)~12)}、新鮮群においてはその免疫性が問題となり、凍結保存群においては凍結、解凍時の細胞損傷の報告がなされており、未だ検討の余地がある。

著者は新鮮骨軟骨組織および2週から16週におよぶ器官培養を行った骨軟骨組織をそれぞれ同種移植し、移植後48週まで軟骨組織を観察した。その結果はほとんどの器官培養移植群において、移植後の組織評価は、24週をピークにして、それ以後は非常に良好な経過をたどり移植片は宿主と共存していくか、もしくは徐々に吸収されるかのどちらかの運命をたどるという結果となった。

今回は白色日本家兎間の免疫系の調査は行っておらず移植片に対する宿主の免疫反応により拒絶されていく可能性を考えねばならない。川辺は¹³⁾大腿骨膝蓋面に軟骨欠損部を作製し、培養軟骨細胞 disk を移植しフィブリンで固定を追加する実験を行った。結果は3週までは良く生着したが6~9週で多くは拒絶されたと報告しており、移植後3週目までは拒絶されにくいといえよう。今回の実験は移植から標本採取までの最短期間は4週間であり、全例において少なからず拒絶の影響は存在したものと考えられる。

移植後4週群の組織評価では Table 4 に示す通り、器官培養12週群及び16週群の長期培養群では組織点数が12点以上と良好な結果であった。しかし新鮮移植群(器官培養0週群)から器官培養8週群までの比較的短期間培養群では、長期培養群と比較して、器官培養2週群の5.67点を筆頭に、組織点数は8~9点台と明らかに低下していた。以上の結果より、今回の実験におい

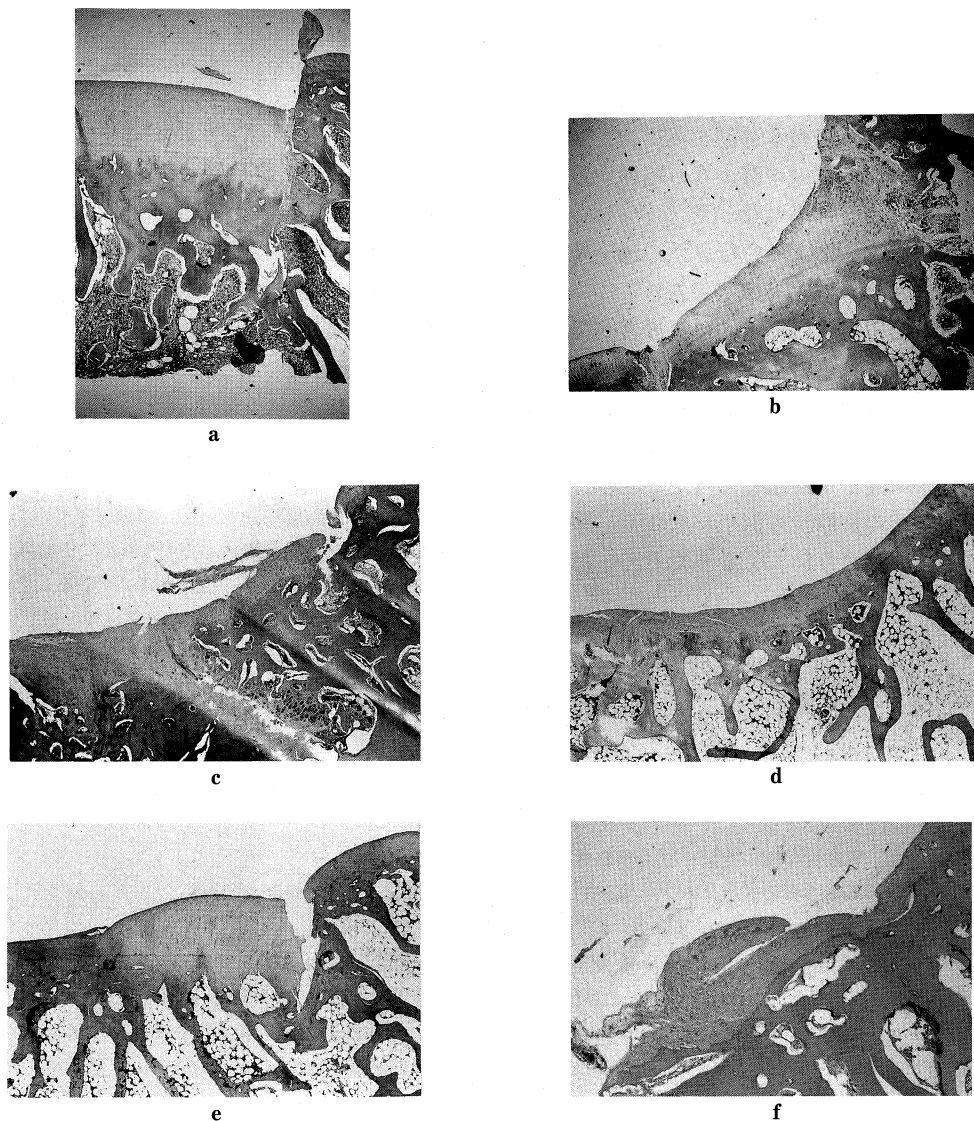


Fig. 6. Allograft group, with 16 weeks incubated by organ culture.

- a) 16 W-4 w : 16 weeks incubated by organ culture and grafted, 4 weeks after transplantation. The allograft shows good course. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 50$)
- b) 16 W-8 w : 16 weeks incubated by organ culture and grafted, 8 weeks after transplantation. Both the upper and lower layers of the tide mark of the allograft tip staining show slight reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- c) 16 W-12 w : 16 weeks incubated by organ culture and grafted, 12 weeks after transplantation. The allograft tip staining shows severe reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- d) 16 W-24 w : 16 weeks incubated by organ culture and grafted, 24 weeks after transplantation. The upper layer of the tide of the allograft tip is moderate reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)
- e) 16 W-48 w. 1 : 16 weeks incubated by organ culture and grafted, 48 weeks after transplantation. The upper layer of the tide mark shows normal. But recipient is moderate reduction. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 50$)
- f) 16 W-48 w. 2 : 16 weeks incubated by organ culture and grafted, 48 weeks after transplantation. The allograft tip is collapsed. (Safranin O-fast green and hematoxylin $\times 30$)

でも移植後4週目ですでに拒絶による影響が存在しているといえよう。

次に器官培養期間と移植免疫における拒絶の関係であるが器官培養8週群を境に12, 16週群ではむしろコントロール群よりも組織点数が上昇しているという結果となった。

組織の保存方法による免疫原性の低下及び移植による拒絶については諸家が報告しており^{14),15)}, 保存を行った組織では経時的に抗原性が低下することが期待される。今回の実験において4週間以上の器官培養を行った群では、新鮮移植を行った群よりも組織点数が高いという結果となった。器官培養による保存を一定期間以上行うことで移植片の抗原性の低下が起こり、宿主に対する拒絶が起こりにくくなったものと思われる。

ま と め

新鮮移植群をコントロール群とし、器官培養を2, 4, 8, 12, 16週まで行った骨軟骨片の同種移植を行い、移植後4, 8, 12, 24, 48週に採取した86膝の標本を組織学的に評価した。

結果は新鮮移植群(コントロール群)と比較して器官培養を4週間以上行ったのち移植した群で好結果が得られた。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜った川崎医科大学整形外科 渡辺 良教授に謹んで感謝いたします。また同時にご協力をいただいた、組織培養センター、医用実験センター、当教室員の方々ならびに組織標本作製室の吉田、若林両技術員、整形外科学教室、生本直美研究補助員に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第14回日本骨、関節、軟部組織移植研究会(平成7年9月、京都)において発表した。

文 献

- 1) 山本 真: 骨軟骨移植の歴史. 別冊整形外科 No. 8: 2-5, 1985
- 2) 下野広俊: 関節軟骨の保存に関する実験的研究. 京府医大誌 97: 1357-1364, 1988
- 3) 廣谷早人: 軟骨のサフラニンO染色について. 臨整外 11: 1112-1116, 1976
- 4) Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A: Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteoarthritic human hips. J Bone Joint Surg 53: 523-537, 1971
- 5) Lexer E: Joint transplantation and arthroplasty. Surg Gynecol Obstet 40: 782-809, 1908
- 6) Henderson CH, Chase SW: Experimental studies in the transplantation of whole joints. J Bone Joint Surg 45-A: 1021, 1952
- 7) 渡部仁吉: 大腿骨頭骨軟骨殻の同種移植実験. 日整会誌 58: 703-718, 1985
- 8) 草山 毅: 同種骨軟骨移植の実験的研究. 日整会誌 60: 349-359, 1986
- 9) Oakshott RD, Frainel, Pritzker KPH, Langer F, Gross E: A clinical and histologic analysis of failed fresh osteochondral allografts. Clin Orthop 233: 284-294, 1988
- 10) Stevenson S, Dannucci GA, Sharkey NA, Pool RR, Davis D: The fate of articular cartilage after transplantation of fresh and cryopreserved tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts dogs. J Bone Joint Surg 71-A: 1298-1307, 1989
- 11) Czitrom AA, Keatings, Gross AE: The viability of articular cartilage in fresh osteochondral allografts after clinical transplantation. J Bone Joint Surg 72-A: 574-581, 1990
- 12) Beaver RJ, Mahomed M, Backstein D, Davis A, Zukor DJ, Gross AE: Fresh osteochondral allograft for posttraumatic defects in the knee. J Bone Joint Surg 74-B: 105-110, 1992
- 13) 川辺直己: 培養軟骨細胞による関節軟骨の修復. 日整会誌 59: S95-96, 1985
- 14) 岡田陽生: 同種半関節移植に関する実験的研究. 京府医大誌 97: 1015-1026, 1988

- 15) Mankin HJ, Doppole S, Tomford W : Clinical experience with allograft implantation. Clin Orthop
174 : 69-86, 1983