

ウサギ同種骨軟骨殻の保存に関する組織学的研究

林田 武継

ウサギ大腿骨頭の骨軟骨殻 (osteochondral-shell) を器官培養法で保存し、静置および攪拌を加えた場合の二つの条件下で軟骨の組織学的変化を検討した。対照として採取直後の大腿骨頭軟骨を用いた。

対照群の軟骨細胞生存率は平均 85.0% であった。2 週間培養では静置、攪拌ともに差を認めず、また 4・8 週間培養でも有意な差を認めなかった。12 週間培養で静置培養では、軟骨細胞生存率は $75.2 \pm 3.5\%$ 、攪拌培養では、 $86.0 \pm 3.4\%$ で静置群と攪拌群の軟骨細胞生存率の間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。

すなわち、関節軟骨細胞生存率は保存液の攪拌によって上昇し、培養液攪拌は、関節軟骨保存に対して促進的に作用する可能性を示す。
(平成 8 年 8 月 5 日採用)

A Histological Analysis of Osteochondral-Shell after Storage by in Vitro Organ Culture in Rabbit

Taketsugu HAYASHIDA

Adult rabbit osteochondral-shells of the femoral head were stored in an in vitro organ culture under resting and stirring conditions. Fresh articular cartilage of the femoral head was used as control. The mean survival rate of chondrocytes was 85.0% in the control group. There were no significant differences in the survival rates in the resting group and the stirring group at 2, 4 and 8 weeks. It was found that, there was a significant differences in survival rate of chondrocytes between stirring group ($86.0 \pm 3.4\%$) and resting group (75.2 ± 3.5) at 12 weeks. From these results it is suggested that the stirring technique is useful for the storage of articular cartilage. (Accepted on August 5, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(2): 81-89, 1996

Key Words ① In vitro organ culture ② Osteochondral-shell
③ Histological analysis

はじめに

外傷や変性疾患により破壊された関節軟骨を修復する方法として、種々の治療法が行なわれ

ている。手術法として、骨切り術や人工関節などがある一方、軟骨移植によって機能回復をめざす方法もある。小さな軟骨欠損では自家移植が行なわれ、臨床的にも良好な成績が得られているが、大きな軟骨欠損では、供給源の問題か

ら自家移植は不可能なことが多く、同種移植に頼らなければならない。また、軟骨移植においては軟骨基質は宿主側から誘導されないため、基質生産能がある軟骨細胞の生存が必須である。

臨床的に応用する場合、軟骨採取から移植までに時間がかかることがあり、軟骨組織をいかに長期にわたり保存できるかが問題である。軟骨組織の保存法に関しては、器官培養法、低温保存法、凍結保存法などがあり、それぞれについて関節軟骨細胞、成長軟骨細胞を用いた単離細胞レベルでの研究や骨軟骨殻での実験的研究などが行なわれている^{1)~5)}。

本研究では軟骨保存液に攪拌操作という機械的刺激の付加が、保存軟骨組織に与える影響を明らかにするために、同種骨軟骨殻(osteochondral-shell)を静置および攪拌を加えた場合の二つの条件下で器官培養法にて保存し、軟骨の組織学的変化を比較検討した。

方 法

実験材料として、生後6ヵ月日本白色種ウサギにネブタールを経静脈的に1~2ml投与して麻酔し、大腿骨頭を無菌的に採取した。採取した大腿骨頭を直径5.8mmリーマーを用い、軟骨下骨を付けた骨軟骨殻とした(Fig. 1)。

保存液として、MEM Eagle 培養液に、10%小牛血清を入れ、デキサメタゾン 10^{-6} Mと、インスリン $10\mu\text{g/ml}$ を混入したものを作製した。骨軟骨殻の保存は 37°C の培養器内で行ない、培養液の交換は2日ごとに行なった。培養器内で、静置培養と攪拌培養を行なった。静置培養は50ml serum tubeに上記培養液7mlを入れ、骨軟骨殻の軟骨面を上方にして培養した。攪拌培養は、骨軟骨殻と上記培養液7mlを15ml serum tubeに入れ、回転培養器を用いて10秒1回転で培養し、serum tube内で骨軟骨殻が回転する様にした(Fig. 2)。

2, 4, 8, 12週間静置培養、攪拌培養したものをそれぞれ6個づつ(計48個)比較検討した。無処置対照群として、採取直後の大腿骨頭6個

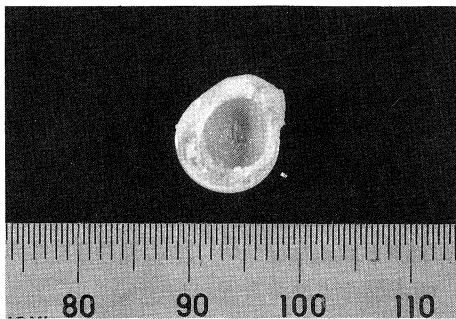


Fig. 1. Adult rabbit osteochondral-shell of the femoral head.

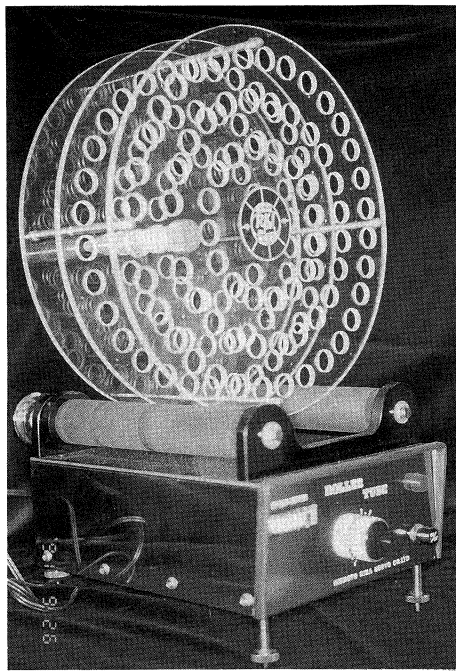


Fig. 2. Rotary culture equipment

を用いた。

所定の期間保存した骨軟骨殻を10%中性ホルマリンで固定し、25%蟻酸緩衝液で脱灰後、パラフィン包埋を行ない、厚さ $6\mu\text{m}$ の薄切切片を作製し、廣谷⁶⁾によるsafranin O fast green iron hematoxylin染色を施し、組織学的、組織化学的变化を観察した(Table 1)。また軟骨細胞の生存率を、各標本で5視野ずつ noncal-cified cartilageの軟骨細胞を100個観察し、そ

Table 1. Staining

I. 固定法	
10% 中性フォルマリン液	
II. 脱灰法	
25% 蟻酸緩衝液	
III. 包埋	
パラフィン包埋	
IV. 切片	
薄切切片 (6 μ)	
V. 染色	
1. 脱パラフィン	
2. Weigert Fe hematoxylin	4分
3. 水洗	
4. 0.02% Fast green水溶液	5分
5. 1% 酢酸水溶液	浸洗
6. 0.1% Safranin O水溶液	7分
7. 脱水	
8. キシロール透徹	
9. バルサム封入	

のうち empty lacuna を呈さず、核が pyknosis となっていないものを生細胞として百分率で表した。有意差検定は Student-t test で行なった。

結 果

対照群では、tangential zone の上皮様細胞、それにつづく transitional zone, radial zone と深部の軟骨細胞の核の染色性もよく、tidemark も認められている。safranin O でグリコアミノグリカン (GAG) が赤色に染められ、iron hematoxylin で軟骨細胞の核が、fast green で骨質が染められている。軟骨細胞、軟骨基質ともに染色性は良好であった (Fig. 3)。

2週間静置培養では、対照群と同様に軟骨細胞、基質ともに染色性は良好であった (Fig. 4a)。攪拌培養では、軟骨表面の上皮様細胞、深部の軟骨細胞の核の染色性も良好で tidemark の分断もなく、明らかな変性は認められない。また軟骨基質の染色性も良好であった (Fig. 4b)。

4週間静置培養では、上皮様細胞の核の数の減少がみられるが、その下層の軟骨細胞の核の染色性は良好で、軟骨基質の染色性も良好であった (Fig. 5a)。攪拌培養では、上皮様細胞の核の数も正常であり、軟骨細胞の核、軟骨基質の染色性共に良好であった (Fig. 5b)。

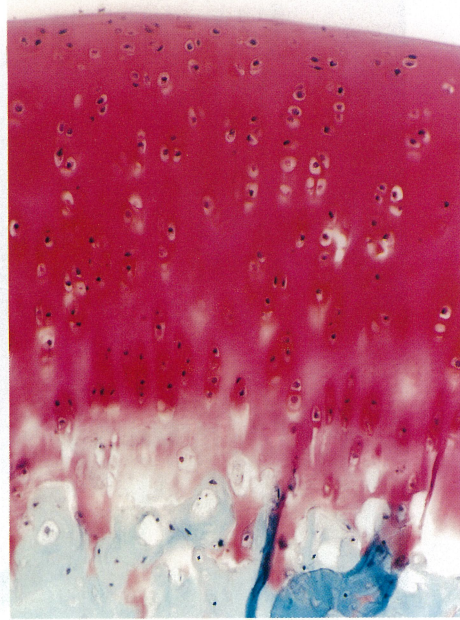


Fig. 3. Control group (fresh)

In the cartilage, the nuclei of the chondrocyte in the epithelioid cells in the tangential - transitional - radial - and deep layer-zone were well stained. The chondrocytes and the cartilage matrix were also well stained. Tidemarks were detected. Glycosaminoglycans (GAG) were detected in the cartilage matrix, and the nuclei of the chondrocytes were stained by fast green iron hematoxylin. (Safranin O - fast green iron hematoxylin $\times 200$)

8週間静置培養では、軟骨細胞の核の染色性がやや低下していた。軟骨基質の染色性は全般的に良好であったが、部分的に染色性が低下している所が観察された (Fig. 6a)。攪拌培養では、軟骨表面の上皮様細胞、深部の細胞の核の染色性はやや低下していたが、軟骨基質の染色性は良好で均一であった (Fig. 6b)。

12週間静置培養では、軟骨細胞の核の染色性は8週間静置培養群とに差を認めなかったが、empty lacuna の数が増加していた。軟骨基質の染色性は、低下した部分が増加しているように観察された (Fig. 7a)。攪拌培養では、静置培養と比べ軟骨細胞の empty lacuna の増加は認

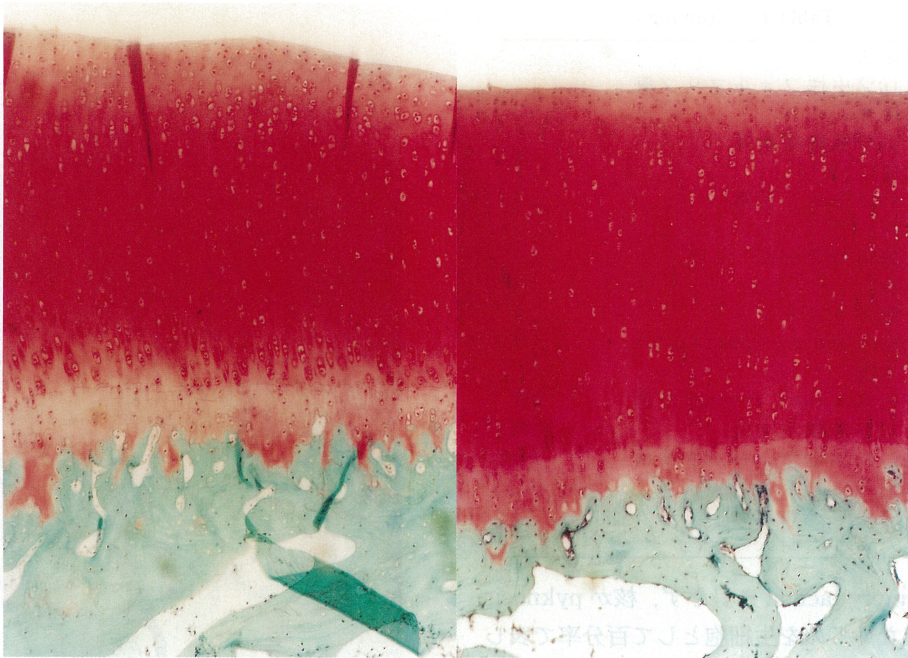


Fig. 4. 2 weeks incubation in organ culture.

a) Resting group

The chondrocytes and the matrix of cartilage were well stained in the same manner those of the control group. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

b) Stirring group

The nuclei of the epithelioid cells in the tangential zone and the chondrocytes in the deep layer were well stained. The matrix of the cartilage was well stained. Tidemarks were detected. No degeneration was recognized in the cartilage. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

めず、軟骨表面の上皮様細胞も含め軟骨細胞の核の染色性も8週間攪拌培養群と同じで、軟骨基質の染色性も良好であった (Fig. 7b).

各保存群の軟骨層の transitional zone, radial zone にわたる軟骨小腔数に対する生細胞数の割合を軟骨細胞の生存率として求めた。無処置対照群の軟骨細胞生存率は平均 85.0% であった。2週間培養では静置と攪拌群の間に差が認められず、また4・8週間培養でも有意な差は認められなかった。しかしながら12週間培養で静置培養群では $75.2 \pm 3.5\%$ 、攪拌培養群では $86.0 \pm 3.4\%$ で有意差が認められた ($P < 0.01$) (Table. 2).

考 察

同種関節移植として従来から新鮮または保存全関節移植、部分関節移植、および薄い骨片を付けた関節軟骨移植の実験的研究が行なわれている^{7,8)}。しかし、移植軟骨の表層は早期から細胞数の減少や safranin O による基質染色性の低下、すなわち基質内グリコアミノグリカン(GAG)の減少がみられ、また ^{35}S を用いた autoradiography にても取り込みが減少するとの報告がある^{9,10)}。移植後のこれらの変化は、移植片の固定性や、軟骨下骨の陥没などの移植片の着床の遅延と、細胞性および体液性免疫反応によるものであることは実験的にも確かめられている¹¹⁾⁻¹³⁾。しかし同種関節軟骨移植の抗原性について Lan-

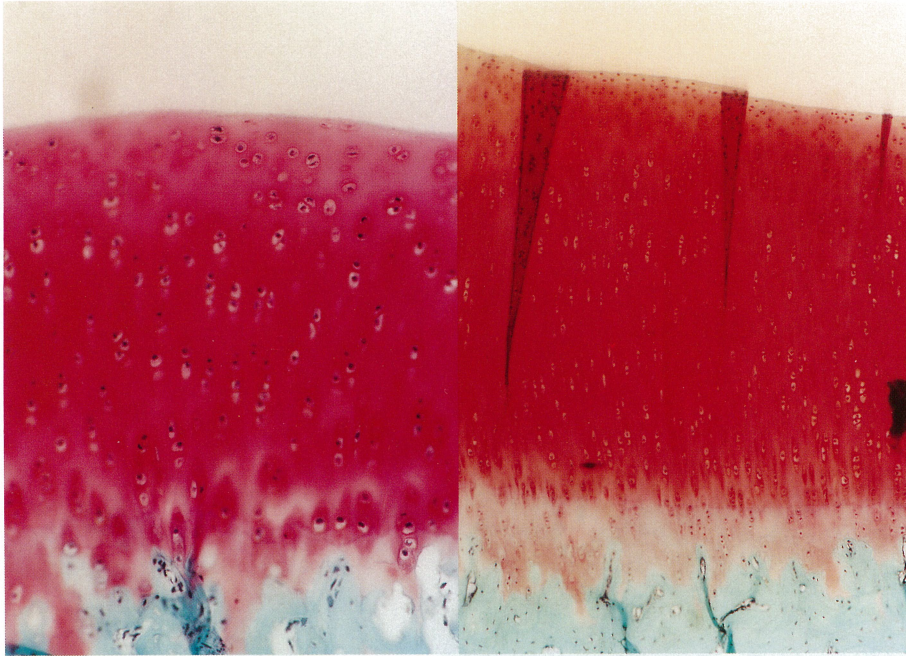


Fig. 5. 4 weeks incubation in organ culture.

a) Resting group

The number of nuclei of the epithelioid cells in the tangential zone was reduced. Those in the transitional zone and the matrix of the cartilage were well stained. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 200$)

b) Stirring group

The number of nuclei of the epithelioid cells in the tangential zone was the same as in the control group. The nuclei of the chondrocytes and matrix in the cartilage were well stained. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

ger and Gross¹⁴⁾ は、分離された関節軟骨の軟骨細胞やシェービングした関節軟骨には抗原性があるが、皮質骨表面の関節軟骨を分離しないままでの同種移植では免疫反応を惹起しないと述べている。また三浪ら¹⁵⁾ は関節軟骨をトリプシンで分離した軟骨細胞を用いた *in vitro* の実験において細胞性、体液性免疫いずれも明らかな抗原性を認めたが、軟骨細胞の同種移植では両者の明らかな免疫反応を認めなかったと報告している。

骨軟骨殻での新鮮同種移植は古くから多数行なわれており、臨床的にも広範囲の骨軟骨移植や軟骨のみの移植にくらべて変性しにくいことが知られている。これは移植骨軟骨殻の固定性がよく、軟骨下骨が圧壊されず完全に置換され、その結果十分な支えを獲得した移植関節軟骨も

長期間生存し得ると考えられている。また渡部¹⁾ が行なった犬の大腿骨頭を用いた新鮮同種骨軟骨殻移植実験によれば、移植軟骨の表層の組織学的所見は早期から empty lacuna の増加、細胞数の減少がみられたが、移植軟骨の厚さを計測した結果、長期においてその厚さをよく保持し、関節機能を十分に発揮させることができたと報告しており、臨床的に関節再建の手段としての有用性を示唆している。

今回の実験において、回転培養器による12週間攪拌培養で tangential zone の上皮様細胞数の減少は認められたが、表面は損傷されておらず、軟骨基質の safranin O による染色性も比較的良好であり、移植に際しての条件が整っていると考える (Fig. 7b)。

軟骨保存に関しては、現在、凍結保存法が主

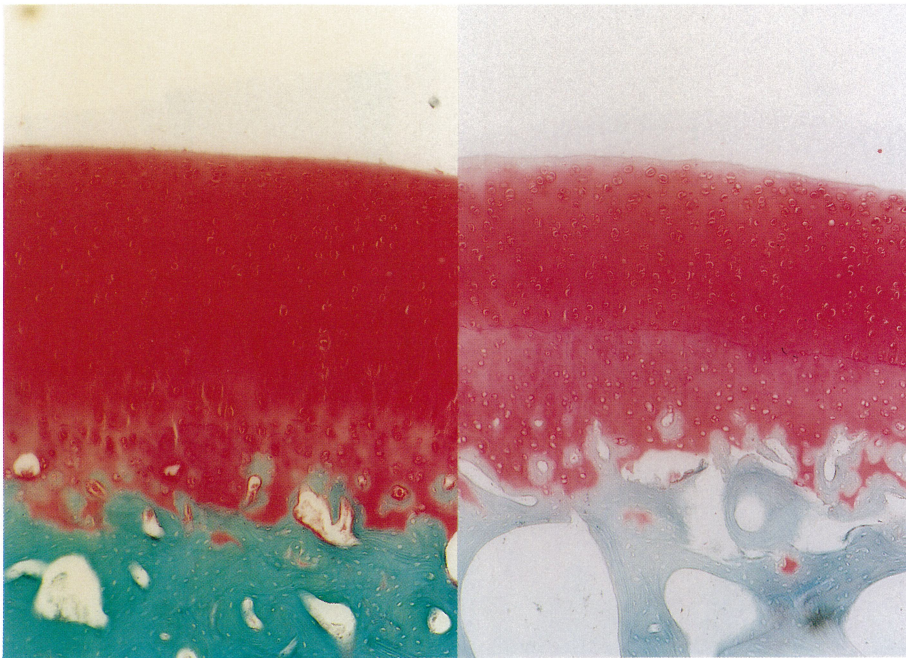


Fig. 6. 8 weeks incubation in organ culture.

a) Resting group

Stainability was reduced in intensity in the nuclei of the chondrocytes. Stainability was slightly reduced in intensity in the matrix of the cartilage. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

b) Stirring group

Stainability was slightly reduced in intensity in the epithelioid cells in the tangential zone and the nuclei of the cartilage in the deep layer. However, the matrix of the cartilage was homogeneously stained. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

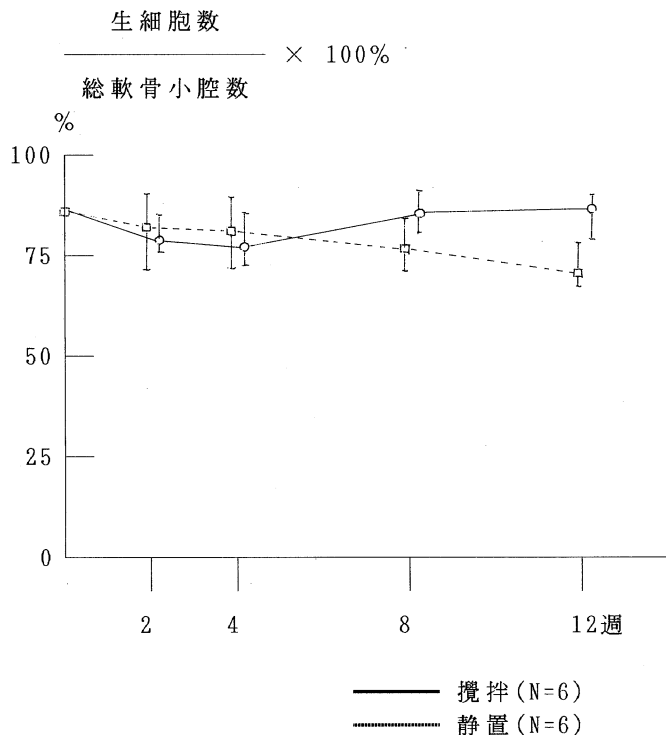
流である。凍結保存は抗原性の低下にはよいが、軟骨細胞は死滅し、移植後軟骨の変性が早期に発生する。凍結保存では、軟骨細胞自身を分離し10% Dimethyl Sulphoxide (DMSO) を凍結保護剤として用いた場合は90%以上の細胞生存率が得られたとの報告がある²⁾。しかし、1979年 Brighton ら³⁾は、ウサギの軟骨片を10% DMSO を用い、凍結速度を変化させて -180°C まで凍結したところ、いずれの条件でも軟骨細胞の生存は認めていない。これは軟骨組織のままでは凍結保護剤が基質に浸透しないためと考えられ、軟骨組織にトリプシン処理を行ない予め基質を部分的に分解し、DMSOの浸透性を高めて、凍結速度、凍結方法などを変化させる種々の実験的研究が行なわれている。現在これらの報告で軟骨細胞生存率は約50%以下であ

る^{4),5),16)~18)}。またこれら凍結保存後の関節軟骨細胞、関節軟骨組織を移植した際には、関節軟骨表面や軟骨基質を損傷し、免疫反応や機械的刺激に対する面で不利と思われる。

器官培養法では、軟骨基質も破壊せず組織として保存でき、軟骨組織内で軟骨細胞の生存率を高い状態で保存できる可能性があり種々の保存法に関する実験的研究が行なわれている。

器官培養法による関節軟骨の保存に関する実験的研究において、1979年に Brighton ら³⁾が培養液に α -トコフェロールを混入し60日間生きさせ得たと報告している。また、保存液に関する種々のビタミンやホルモンなどを添加するなどの工夫がなされており、Handley ら¹⁹⁾は、牛の関節軟骨片を器官培養し、20%小牛血清でプロテオグリカン合成能を高く安定した状態に維

Table 2. Survival rates of chondrocytes.



持できたと報告している。さらに川部ら²⁾は、培養液に α -トコフェロール、ライソゾーム膜の安定化や蛋白合成を促進する作用のあるデキサメタゾン、グルコースの取り込みや酵素、燐酸化の活性化の働きをするインスリンを添加したものを比較し、ビタミンやホルモンが軟骨保存に対して有効に作用することを報告しており、デキサメタゾンとインスリンを加えた器官培養 4 週目の群では autoradiography で約 85% に取り込みが認められたと報告している。また日野²⁰⁾は、MEM Eagle 培養液に、10% 小牛血清、デキサメタゾン 10^{-6} M、インスリン $10 \mu\text{g/ml}$ を混入したものの器官培養法で、軟骨細胞生存率、力学的強度が 4 週間の時点で良好であったと報告している。今回の静置培養の実験でも、軟骨細胞、軟骨基質の状態は 4 週目までは非常に良好であった (Fig. 5a, b)。

成熟動物の生体内における関節軟骨の栄養の大部分は滑液に依存しており、軟骨基質への物質の移動は物理的な拡散により行なわれている

ことが知られている。関節軟骨の物質の透過性に対するメカニズムには、圧勾配によるものと変形によるものがあり、関節軟骨や、関節軟骨移植に対しての機械的刺激や液の流れなどによる変化に関する研究は多数みられる^{11), 21)}。Pap and Krompecher²²⁾は、犬を用いた実験で生理的環境に移植された関節軟骨は、2年半までの長期におよび破壊されることなく正常に近い形状を保つが、生理的刺激の加わらない移植片では早期から骨および軟骨に進行性の吸収が生じることを組織学的に観察し、移植片にとり機械的刺激が不可欠なことを指摘した。しかしながら、関節軟骨保存に対して機械的刺激の及ぼす影響に関する実験は少ない²³⁾。

今回、回転培養器内における 12 週間培養の結果では、組織学的に軟骨細胞の生存率が静置培養では $75.2 \pm 3.5\%$ 、攪拌培養では $86.0 \pm 3.4\%$ と危険率 1% で有意差が認められた (Table 2)。また軟骨基質の染色性も攪拌培養では均一で良好であった (Fig. 7b)。これらの事から生体内において関節軟骨に促進的に働く機械的刺激は、関節軟骨保存においても促進的に作用するものとする。

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 良教授に深く感謝する。また同時にご協力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陽子、若林かずみ両技術員、整形外科教室、生本直美研究補助員に感謝する。

本実験は、川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け (No. 93-205, 1993年)、川崎医科大学の動物実験指針に基づき実施された。

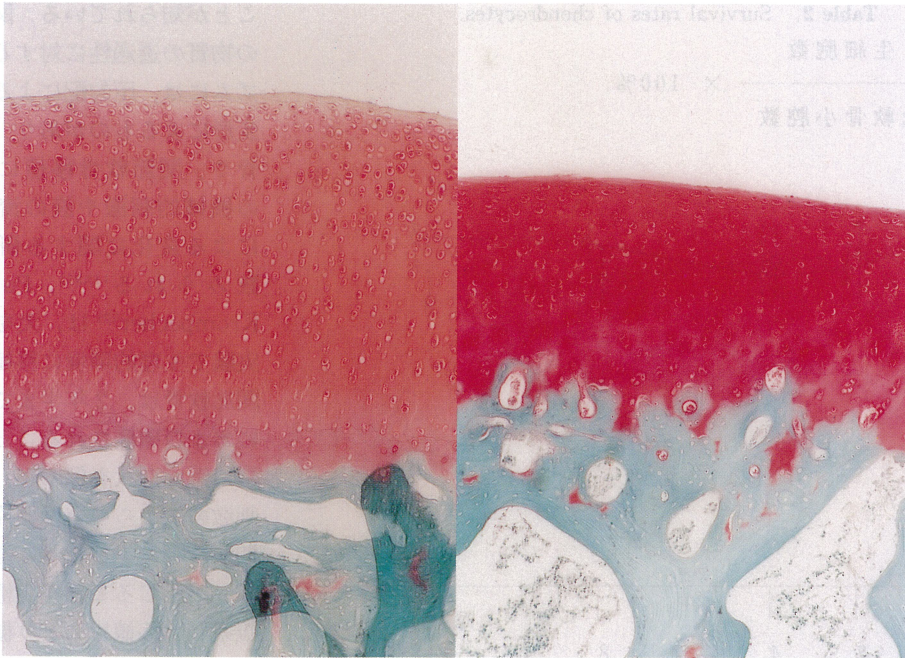


Fig. 7. 12 weeks incubation in organ culture.

a) Resting group

Stainability was slightly reduced in intensity in the nuclei of the chondrocytes in the same manner as those of eight weeks, but, the number of the empty lacuna had increased. The loss of stainability extended in the matrix of the cartilage. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

b) Stirring group

The number of empty lacuna had not increased, and the numbers of epithelioid cells in the tangential zone and the nuclei of the chondrocytes stainability were the as same as those at eight weeks. The matrix of the cartilage was well stained. (Safranin O-fast green iron hematoxylin $\times 100$)

文 献

- 1) 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—718，1984
- 2) 川部直巳，吉直正俊，浪江和生：軟骨の保存法．別冊整形外科 8：210—218，1985
- 3) Brighton CT, Shadle CA, Jimenez SA, Irwin JT, Lane JM, Lipton M：Articular cartilage preservation and storage. Arthritis Rheum 22：1093—1101，1979
- 4) 大井憲二，福田眞輔，本城 昌，勝浦章知，勝田資文，石田哲夫：トリプシン前処理による凍結保存後の関節軟骨の viability の向上．日関外誌 10：481—488，1992
- 5) 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
- 6) 廣谷速人：軟骨のサフラニンO染色について．臨整外 11：1112—1116，1976
- 7) Green WT：Articular cartilage repair behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. Clin Orthop 124：237—250，1977
- 8) 川部直巳，吉直正俊：実験的骨・軟骨および培養細胞移植．別冊整形外科 8：216—221，1985
- 9) DePalma AF, Tsaltas TT, Mauler GG：Viability of osteochondral grafts as determined by uptake of ^{35}S . J Bone Joint Surg 45-A：1565—1578，1963

- 10) 西本裕俊：同種関節軟骨移植に関する実験的研究。中部整災誌 26：1963—1977, 1983
- 11) Campbell CJ, Ishida H, Takahashi H, Kelly F：The transplantation of articular cartilage. An experimental study in dogs. J Bone Joint Surg 45-A：1579—1592, 1963
- 12) Elves MW：As study of the transplantation antigens on chondrocytes from articular cartilage. J Bone Joint Surg 56-B：178—185, 1974
- 13) Heyner S：The significance of the intercellular matrix in the survival of cartilage allograft. Transplantation 8：666—677, 1968
- 14) Langer F, Gross AE：Immunogenicity of allograft articular cartilage. J Bone Joint Surg 56-A：297—304, 1974
- 15) 三浪明男, 荻野利彦, 佐久間隆：同種関節移植と移植免疫。別冊整形外科 8：8—12, 1985
- 16) Kawabe N, Yoshinao M：Cryopreservation of cartilage. Int Orthop 14：231—235, 1990
- 17) Tomford WW：Cryopreservation of articular cartilage. Osteochondral Allografts Biology, Banking, and Clinical Applications. (Friedaender GE, et al), First Edition, Boston, Little Brown and Company. 1983, pp215—217.
- 18) Tomford WW, Bourret LA, Mankin HJ：Investigations in cryopreservation of articular cartilage. Trans Orthop Res Soc 11：111, 1986
- 19) Handley CJ, McQuillan DJ, Campbell MA：Steady-state metabolism in cartilage explants. *In* Articular Cartilage Biochemistry. eds by Knettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC New York, Raven Press. 1986
- 20) 日野洋介：器官培養による関節軟骨超生保存に於ける軟骨の力学的検索。整外基礎科学 10：85—87, 1983
- 21) Glimcher MJ：Experimental study of the transplantation of joints. *In* The hip. St Louis, CV Mosby. 1973, pp164—168
- 22) Pap K, Krompecher S：Arthroplasty of the knee；Experimental and clinical experiences. J Bone Joint Surg 43-A：523—537, 1961
- 23) 福田完二, 西岡栄恵, 齊藤政克, 田中清介：軟骨細胞に対する周期的牽引力の影響。第6回日本軟骨代謝研究会。1993