培地中のアスコルビン酸濃度が再生軟骨組織の 力学特性に与える影響*

小 俣 誠 二^{*1}, 澤 江 義 則^{*2}, 村 上 輝 夫^{*3}

Influence of Ascorbic Acid (AsA) Concentration in Culture Medium on Mechanical Property of Regenerated Cartilage

Seiji OMATA^{*4}, Yoshinori SAWAE and Teruo MURAKAMI

^{*4} Department of Intelligent Machinery and Systems, Graduate School of Engineering, Kyushu University,
744 Motooka, Nishi-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka, 819-0395 Japan

The chondrocyte-agarose construct has been employed as an experimental model in the cartilage tissue engineering context. We studied the influence of L-Ascorbic acid (AsA) concentration in culture medium on mechanical property of regenerated cartilage. Cylindrical chondrocyte-agarose constructs with a diameter of 4 mm and a height of 2.5 mm were prepared as test specimens. Chondrocytes isolated from metacarpal-phalangeal joint of steers were seeded in 1 wt% agarose (type VII, Sigma) to give an initial cell density of 1×10^7 cells/mL, and cultured in sterile culture medium (DMEM+20%FBS) within a humidified tissue culture incubator. We cultured by using levels of five AsA concentrations, 0.64, 2.2, 3.2 and 6.4 $\mu\text{mol}/10^9$ cells and without AsA. Culture medium was exchanged every two days. After culture periods of 1, 8, 15 and 22 days, tangent modulus of the cultured constructs and glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis were evaluated by the unconfined compression test and the demethylmethyle blue (DMMB) assay, respectively. The structural organization of the elaborated tissue was also examined morphologically by the confocal laser scanning microscope (CLSM). Results indicated that the tangent modulus of the cultured constructs increased with increasing the AsA concentration in culture medium. In addition, the growth rate of the tangent modulus was proportional to the AsA concentration. The increased amount of AsA would contribute to the accelerated self-assembly of the collagen fiber network and resultant improvement in the mechanical property, since the reduction ability of AsA could enhance the procollagen expression in cultured chondrocytes.

Key Words: Regenerated Cartilage, Chondrocyte, Ascorbic Acid, Agarose Gel, Tangent Modulus, Type II Collagen, Glycosaminoglycan

1. 緒 言

関節軟骨は関節面において骨表面を覆い、その荷重支持能や潤滑性等により可動関節の運動機能を支えている。その力学的機能は、軟骨細胞周囲に存在する細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) に強く依存している^(1,2)。ここで、軟骨組織の ECM は主に、II 型コラーゲンとグリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan: GAG) から構成されている。一方、関節軟骨に大きな衝撃が加わったり、過剰な繰返し応力が負荷されると、骨・軟骨骨折や離断性骨軟骨炎等の軟骨損傷や、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) 等を発症する。しかし、軟骨組織中には血管網が存在せず、OA 等の関節疾患に対す

る自己治癒能力が不足している。このため、損傷した軟骨組織を修復する方法の一つとして再生軟骨置換術が注目されている⁽³⁾。再生軟骨置換術の課題の一つは、生体関節軟骨の持つ力学的機能を短期間の内に再建することであり、このためには、コラーゲン線維網が十分に発達した再生軟骨組織を培養する必要がある。なぜならば、組織中のコラーゲン線維網は、軟骨組織が持つ力学的機能を再建する上で、重要な役割を担っていると考えられるためである。

コラーゲン線維の合成過程では、コラーゲン前駆体のプロコラーゲン-ポリペプチド鎖中のプロリン (Pro) が水酸化され、ヒドロキシプロリン (Hyp) になることで、3 本鎖プロコラーゲンが生成される。その後、プロコラーゲンの両末端を酵素を用いて切断することにより、コラーゲンが合成される。この過程において、Pro の水酸化には、触媒作用をする酵素のプロリルヒドロ

* 原稿受付 2009 年 5 月 27 日。

^{*1} 正員, 九州大学大学院工学府知能機械システム専攻(〒819-0395 福岡市西区元岡 744)。

^{*2} 正員, 九州大学大学院工学府知能機械工学部門。

^{*3} 正員, フェロー, 九州大学大学院工学府知能機械工学部門。
E-mail: s-omata@mech.kyushu-u.ac.jp

キシラーゼが必要とされる。

Fe^{2+} がこの酵素に結合し、 Fe^{3+} に酸化されることにより、Pro を水酸化するが、コラーゲン合成を継続させるには、 Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元し、酵素を再活性化しなければならない。このため、 Fe^{3+} を還元するビタミン C であるアスコルビン酸 (L-Ascorbic acid: AsA) が必要となる^(4,5)。

コラーゲンを中心とした ECM 産生量は、培地中のビタミン C 濃度に依存することが知られている^(6,7)。Freyria らは、胎児牛由来軟骨を用いて高密度 (0.6×10^6 cells/cm²) の 2 次元培養を行い、AsA 濃度を増加させた所、II 型コラーゲン遺伝子発現量が増加することを示した。しかし、I 型コラーゲンの発現も増加していることから一部の細胞は脱分化を経験してしまうと報告している⁽⁶⁾。Clark らは、モルモット由来軟骨細胞を用いて軟骨組織の転写・翻訳規則の評価を 2 次元培養系にて行っている。AsA 濃度を増加させることにより、II 型コラーゲン遺伝子の発現が促進され、アグレカン遺伝子の発現量も増加の傾向を示している。しかし、硫酸基数は増加していなかった⁽⁷⁾。

以上より、これまでに行われている再生軟骨組織形成に対する AsA の影響に関する多くの研究は、2 次元培養された単離細胞を対象としていた。しかし、再生軟骨の様な 3 次元培養組織の力学特性に対する影響については、これまで検討されていない。そこで本研究では、代表的なビタミン C である AsA に着目し、*In vitro* にて培養された再生軟骨組織モデルの力学特性に対する培地中の AsA 濃度の影響を調べた。さらに、培養時間に対する再生軟骨組織モデルの弾性率変化への AsA 濃度の影響について評価を行った。

2. 実験方法

2.1 試験片作成と試験条件 牛中指骨遠位端の軟骨組織をメスで切り出し、37℃ 恒温槽中にて酵素処理することにより軟骨細胞を単離した。この酵素処理は、プロテアーゼ溶液 (Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma, 25 unit/mL in culture medium) に 3 時間浸漬した後、コラーゲナーゼ溶液 (Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Sigma, 200 unit/mL in culture medium) に 18 時間浸漬した。単離した軟骨細胞を足場材料であるアガロースゾル (Sigma Type VII Agarose) に混合し、アガロース濃度 1wt% に調整した溶液をアクリル樹脂とガラス平板からなるモールドに注ぎ、これを 4℃ に冷却しゲル化させることで、形状のそろった円

柱状の再生軟骨組織モデルを作製した。播種後の細胞密度は 10^7 cells/mL とした。試験片の形状は、直径 4mm、高さ 2.5mm の円柱形とした。作成した試験片は、それぞれ 24 ウェルプレートに収納し、37℃、5%CO₂ にて培養した。培地には、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に、20vol% ウシ胎仔血清 (FBS) と 2 mM L-Glutamine, 100 unit/mL Penicillin, 50 mg/mL Streptomycin, 20 mM HEPES を添加したものをを用いた。これに、AsA を最終濃度にて、0.64, 2.2, 3.2, 6.4 pmol/ 10^9 cells (以下、AsA(0.64), AsA(2.2), AsA(3.2), AsA(6.4)) となる様に添加し、培養組織の力学特性に対する影響を評価した。また、AsA を含まない培地 (AsA(-)) についても実験を行った。培地は各試験片に 1mL ずつ与え、2 日ごとに交換した。

2.2 力学特性測定 培養後の再生軟骨組織モデルの力学的評価として、単軸圧縮試験による弾性率の計測を行った。本計測には汎用精密万能試験機を用い、室温下において圧縮速度 0.5mm/min にて、10%の圧縮ひずみを円柱形試験片の軸方向に与えた。培地に浸漬した試験片に圧子を徐々に接近させると、圧子はまず培地の表面張力による引力を受け、その後接触による斥力を受ける。そこで、荷重開始位置は、圧子が培地から受ける表面張力 (10^{-1} mN のオーダー) と、ゲルへの圧縮荷重が釣り合った位置とした。これより得られた応力-ひずみ曲線について、5-10%ひずみ区間にて最小二乗法により直線近似し、その傾きを接線弾性率 (Tangent modulus) とした。

2.3 グリコサミノグリカン (GAG) 定量 培養後の再生軟骨組織モデルおよび培地内に含まれる GAG 量について、Dimethylmethylene Blue (DMMB) Assay を用いて、比色定量を行った⁽⁸⁾。培養後の再生軟骨モデルは、1mL のダイジェストバッファー (2.8 mM EDTA, 9 mM cysteine hydrochloride in PBS) に浸漬し、70℃ にて一時間加熱し溶解した。その後室温に戻し、3U Papain (Papain from *Carica papaya*, Fluka) と 10U agarase (β -Agarase, Wako) を加え、インキュベータ内にて 37℃ で一晩保温した。その後、60℃ に加熱し酵素を失活させ、室温に戻した。5 分間、回転数 10000rpm にて遠心分離を行った後に、上澄み液をサンプルとした。回収した使用済みの培地は同様の遠心分離を行い、上澄み液をサンプルとした。各サンプルを DMMB にて染色した後、Bio-Rad 製マイクロプレートリーダーを用いて、525 nm における透過光学密度 (Optical Density, OD) を計測した。濃度測定用の標準溶液としてコンドロイチン硫酸 (Chondroitin sulfate A sodium salt from bovine trachea, Sigma, C9819) 溶液を用いて比色定量を行った。

Fig. 1 Comparison of tangent modulus. Error bar means standard error($n=7-19$); *= ES>1, $P<0.01$, **= ES>2, $P<0.01$.

Fig. 2 Comparison of normalized tangent modulus.

2.4 培養軟骨組織モデルの蛍光観察

2.4.1 ECM形態観察 抗体染色法を用い、培養した再生軟骨組織モデル内に形成されたII型コラーゲンおよびGAGの一種のケラタン硫酸の形態観察を行った⁽⁹⁾。培養後の試験片を厚さ1mmにスライスし、ブロッキング剤としてBSA溶液(Bovine Serum Albumin, Wako)に浸漬した。PBSで数回洗浄した後、1次抗体にそれぞれアンチコラーゲン溶液(Anti-Collagen Type II, Mouse-Mono(2B1.5), MS-235-R7, Funakoshi)およびアンチケラタン硫酸溶液(Ab-Keratan Sulfate, 270427, Seikagaku)を用いて浸漬させた。その後、PBSで3回洗浄し、2次抗体にAlexa488-IgG複合体(Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Molecular Probes, Ex/Em=495/520 nm)を用いて蛍光標識した。染色後の試験片は、それぞれ共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて内部に形成されたECM組織の形態観察を行った。

2.4.2 生死細胞の観察 蛍光染色法を用い、培養した再生軟骨モデル内の軟骨細胞の生死判定を行った。培養後の試験片を厚さ1mmにスライスし、PBSで洗浄した後に、生細胞をカルセインAM(calcein

(a) Stored in construct

(b) Released from construct into culture medium

(c) Total amount

Fig. 3 Comparison of GAG biosynthesis; (a)stored in construct, (b)the amount of GAG released from construct into culture medium, and (c)the total amount of GAG synthesis during culture. Error bar means standard error($n=3-13$); *= ES>1, $P<0.01$, **= ES>2, $P<0.01$.

Fig. 4 Immunofluorescence images of type II collagen molecules. Culture period was 22 days. Scale bar represents 50 μ m.

Fig. 5 Immunofluorescence images of keratan sulfate. Culture period was 22 days. Scale bar represents 50 μ m.

AM, Molecular Probes, Ex/Em=490/515 nm), 死細胞をエチジウムホモダイマー (ethidium homodimer-1, Molecular Probes, Ex/Em=528/617 nm) にて蛍光染色した。PBS にて洗浄後, 各試験片は, 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて蛍光観察した。

2.5 統計解析 本研究で得られた計測値の比較を次の様に行った。それぞれの AsA 濃度間において, Cohen の効果量 (Effect size, ES) が 1 以上となり, ウェルチの t 検定にて両側検定で危険率 0.01 以下の時に有意な差と判定した。

3. 結 果

3.1 接線弾性率への影響 図 1 に各培養時間後の接線弾性率 (E) を示し, 異なる AsA 濃度間での接線弾性率の変化を比較した。培地に AsA を加えることによって, AsA(-) に対して, 再生軟骨組織モデルの接線弾性率が有意に上昇した。さらに, AsA 濃度の増加に伴い, 接線弾性率が上昇した。また, 再生軟骨組織モデルの弾性率の変化を評価するに当たり, 足場材料の影響を打ち消す必要がある。図 1 において, 1 日目の弾性率 (E_0) がゲル担体の弾性率 (12.5 ± 0.9 ($n = 10$)) と同等であった。このため, 各 AsA 濃度の弾性率をそれぞれの 1 日目での弾性率 (E_0) にて正規化した弾性率 (E/E_0) を求めた (図 2)。これより, AsA 濃度を高くすると, 弾性率の増加率が上昇することが分かる。

3.2 GAG 産生量への影響 図 3 に培地中の AsA 濃度に対する培養軟骨細胞による GAG 産生量の関係を示す。図 3(a) に再生軟骨組織モデル中に蓄積された GAG 産生量を示す。再生軟骨モデル中の GAG 蓄積量については, 一部有意な差はあるものの, AsA 濃度によ

る顕著な影響を確認することが出来なかった。図 3(c) に GAG の総産生量を示す。AsA を添加することにより, AsA(-) に比べて GAG 産生量が有意に増加していることが確認された。しかし, AsA を添加したグループ同士では, 総産生量に有意な差はあるものの, AsA 濃度に対する相関は見られなかった。

3.3 再生軟骨組織の蛍光観察 図 4 および図 5 に, 各 AsA 濃度における 22 日目の II 型コラーゲン線維分布およびケラタン硫酸 (GAG の一種) 分布を示す。AsA 濃度の上昇に伴い, コラーゲン線維網および GAG が広く分布していた。また, AsA(2.2) 以上では, 細胞間のコラーゲン線維網が接触し絡み合っていることが確認出来た。それに伴って, ケラタン硫酸についても同様に視野全体に広がり, 広範囲に ECM が形成されていることを確認した。

4. 考 察

4.1 弾性率への影響 多くの研究により, 培地中のビタミン C 濃度を増加させれば, コラーゲン線維の合成が促進されることが知られている^(5-7, 10-12)。これに加え, 図 4 より, AsA 濃度を増加させた時, 組織の主な強化線維となるコラーゲン線維がより多く合成され, 産生されたコラーゲン線維網による自己組織化的な構造形成が促進されていることを確認した。このため, 図 2 の様に, 再生軟骨組織モデル全体の弾性率が非線形的に上昇したのと考えられる。

この様な, ゲルの弾性率の変化の非線形な振舞いは, 一般的なゲルのゾル-ゲル相転移点近傍での力学的特性と類似している⁽¹³⁾。特に, 鵜田らは, アガロースゲルのゲル化点近傍における弾性率を測定し, 弾性率がゲ

ル濃度 ρ とゲル化濃度 ρ_c との差 $|\rho - \rho_c|$ のべき乗に比例することを示した。ゲル化点近傍では、架橋点が少ない希薄な網目構造をしたゲルが形成され、架橋点を結ぶ高分子鎖は長くなるため、ゾル-ゲル相転移点近傍ではエントロピー弾性が支配的になるためと考えられている⁽¹⁴⁾。

以上より、軟骨組織を培養することにより、軟骨細胞からコラーゲン線維が産生され、産生量の増加とその分布(ネットワークの広がり)がゲル濃度を増加させるため、再生軟骨組織モデルの弾性率は、 $E \propto |\rho - \rho_c|^\lambda \propto t^\nu$ の様に培養時間 (t) のべき乗に比例すると考えられる。このため、再生軟骨組織モデルの正規化した弾性率は、次式の様に培養時間のべき乗に比例すると推察される。

$$\frac{E}{E_0} \propto t^\nu \quad (1)$$

そして、AsA 濃度と弾性率増加率 (ν) の関係を調べるため、各 AsA 濃度における培養時間と正規化した接線弾性率との関係から、式 (1) を用いて弾性率増加率 ν を求めた。図 6 に、式 (1) によって求めた弾性率増加率と AsA 濃度との関係を示す。これより、再生組織の弾性率増加率は、下記の様に AsA 濃度に比例することが示唆された。

$$\nu \propto (\text{AsA 濃度}) \quad (2)$$

一方、AsA(0.64)における弾性率増加率の上昇が見られなかった。AsA はコラーゲン産生の補酵素としての機能の他に、プロコラーゲン遺伝子の転写を促進させ、プロコラーゲン-mRNA を安定化することが知られている^(10,11)。このため、少量の AsA 添加では、プロコラーゲン遺伝子発現を安定化させることしか望めないため、図 4(b) に示すように、コラーゲンネットワークの発達が十分に促進されず、弾性率の上昇には至らなかったものと推測できる。

また、AsA(6.4)での弾性率増加率 ν は、十分な増加が見られず、式 (2) の比例関係から外れてしまった。図 7 に AsA(6.4) の 22 日目における低倍率での再生軟骨組織モデルの蛍光観察結果を示す。再生組織の角部(図中の矢印部)において、生細胞、II 型コラーゲンおよびケラタン硫酸を確認することが出来なかった。一方、高 AsA 濃度では、線維芽細胞に対する細胞毒性があることが知られている⁽¹²⁾。Sommer らは、AsA 濃度に対する硝子体細胞の増殖性を調べ、高濃度での毒性を示した⁽¹⁵⁾。本実験においても培地の影響を特に受けやすい角部での軟骨細胞が死亡し、分解されたものと思われる。また、Clark らは発現されたコラーゲン中のカルボニル基数を計測することで、AsA 濃度に対する酸化による損傷の評価を行っている。AsA 濃度を増やすと、コラーゲンの損傷も増加していた⁽⁷⁾。このため、高 AsA

Fig. 6 Relationship between AsA concentration and the growth rate of tangent modulus.

濃度では、細胞毒性とコラーゲンの損傷のため、再生組織構築を行うことが出来ず、弾性率の上昇が抑えられ、その結果、弾性率増加率が式 (2) の比例関係から外れたものと考えられる。

4.2 GAG 産生量への影響 図 3 より、AsA を添加することによって、AsA(-) に比べて有意に GAG 産生量が増加していた。GAG の合成は、一般にコアたんぱく質(アグレカンやパルカン等)合成の後に、コアたんぱく質中のグリシン-セリン配列を基点として、キシロース残基が結合し、4 糖鎖を糖転換酵素にて結合する。この後に、GAG の前駆体となる多糖構造を 2 種類の糖転移酵素の協調作用により形成し、所定の位置へ硫酸基転移酵素を作用させることにより、硫酸化グリコサミノグリカンが生成される^(16,17)。この過程において、コアたんぱく質を生成するための転写安定性に AsA が関与することが知られている^(10,11)。しかし、その後の GAG 合成過程に AsA は関与していないと考えられる。さらに、Clark らの報告においても同様に、AsA 濃度上昇に対して、アグレカン発現は増加しているものの、GAG 中の硫酸基に変化は見られていない⁽⁷⁾。このため、AsA(-) に比べて有意に GAG 産生量が増加していたが、AsA を投与したグループの GAG 産生量に AsA 濃度に対する相関が現れなかったものと思われる。

一方、GAG 等のムコ多糖類(硫酸基を持つ二糖類構造の繰り返しにより構成される)は、糖の負の解離基と水酸基の負電荷により、周囲の水分子を引きつけ、水分子が配向し構造化(束縛された状態)されることが知られている⁽¹⁸⁾。図 3(c)において、AsA の添加により GAG 総産生量も増加しているため、GAG による水の結合量が増加し、水分子の構造化が促進され、保水能力が増加したと考えられる。このため、水分子の流出を妨害することになるので、AsA を添加することは、再生軟骨組織モデルの弾性率向上に寄与するものと思われる。

Fig. 7 Immunofluorescence images of AsA(6.4) after 22 days culture: (a)live cells, (b)death cells, (c)type II collagen and (d)keratan sulfate. At the corner of regenerated cartilage tissue, no live cells and ECM (collagen type II and keratan sulfate) could be observed. Scale bar represents 1 mm.

5. 結 言

本研究では、培地中の Ascorbic acid(AsA) 濃度が培養した再生軟骨組織モデルの力学特性へ与える影響について調べた。この結果、AsA 投与量を増加させることにより、培養後の再生軟骨組織の接線弾性率が、AsA 無投与に対して有意に増加した。これは、AsA 投与量を増加させたことにより、コラーゲン産生が促進される速さが増加し、コラーゲン線維網の自己組織化が進み、ゲル濃度が増加したためと考えられる。そして、弾性率増加率は AsA 濃度に比例することが示された。一方、GAG 産生に関しては、AsA を投与することにより、無添加と比較して GAG の産生量が有意に増加した。しかし、GAG 産生量と AsA 濃度に対する 相関は見られなかった。

文 献

- (1) V. C. Mow and W. M. Lai. Mechanics of animal joints. *Annual Review of Fluid Mechanics*, Vol. 11, (1979), pp. 247-288.
- (2) T. A. Schmidt and R. L. Sah. Effect of synovial fluid on boundary lubrication of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 15, No. 1, (2007), pp. 35-47.
- (3) S. Wakitani. Present Status and Perspective of Articular Cartilage Regeneration (in Japanese). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, Vol. 127, No. 5, (2007), pp. 857-863.
- (4) S. Ikeda, M. Sato, and R. Yoshinaka. Role of Vitamin C in Collagen Formation of Fish. *Vitamins*, Vol. 57, No. 8, (1983), pp. 433-449.
- (5) D. Fujimoto, ed. *Bioscience and Biotechnology of Extracellular matrix (in Japanese)*, (1990), pp. 5-47. Industrial Publishing & Consulting.
- (6) M.-C. Ronzière, J. Farjanel, A.-M. Freyria, D. J. Hartmann, and D. Herbage. Analysis of types I, II, III, IX and XI collagens synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 5, No. 3, (1997), pp. 205-214.
- (7) A. G. Clark, A. L. Rohrbaugh, I. Otterness, and V. B. Kraus. The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pig articular cartilage explants. *Matrix Biology*, Vol. 21, No. 2, (2002), pp. 175-184.
- (8) R. W. Farndale, D. J. Buttle, and A. J. Barrett. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Vol. 883, No. 2, (1986), pp. 173-177.
- (9) Y. Sawae, J. Honda, E. Suzuki, Y. Morita, M. Watanabe, T. Sanada, and T. Murakami. Experimental characterization of regenerated cartilage model cultured under cyclic compression. In *Proc. of the ATEM'07 on CD-ROM, JSME-MMD, FUKUOKA, JAPAN*, (2007).
- (10) S. Tajima and S. R. Pinnell. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. ascorbic acid increases type I procollagen mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 106, No. 2, (1982), pp. 632-637.
- (11) B. L. Lyons and R. I. Schwarz. Ascorbate stimulation of pat cells causes an increase in transcription rates and a decrease in degradation rates of procollagen mRNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 12, No. 5, (1984), pp. 2569-2579.
- (12) R. Hata and H. Senoo. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 138, No. 1, (1989), pp. 8-16.
- (13) M. A. V. Axelos and M. Kolb. Crosslinked biopolymers: Experimental evidence for scalar percolation theory. *Physical Review Letters*, Vol. 64, No. 12, (1990), pp. 1457-1460.
- (14) M. Tokita and K. Hikichi. Mechanical studies of sol-gel transition: Universal behavior of elastic modulus. *Physical Review A*, Vol. 35, No. 10, (1987), pp. 4329-4335.
- (15) F. Sommer, K. Kobuch, F. Brandl, B. Wild, C. Framme, B. Weiser, J. Tessmar, V.-P. Gabel, T. Blunk, and A. Goepferich. Ascorbic acid modulates proliferation and extracellular matrix accumulation of hyalocytes. *Tissue Engineering*, Vol. 13, No. 6, (2007), pp. 1281-1289.
- (16) H. Kitagawa. Biosynthetic Mechanism of the Bioactive Sulfated Glycosaminoglycans (in Japanese). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, Vol. 122, No. 7, (2002), pp. 435-450.
- (17) M. E. Taylor, K. Drickamer, S. Nishimura, and K. Monde. *Introduction to Glycobiology (in Japanese)*, (2005), pp. 67-71. Kagaku-Dojin Publishing Company.
- (18) P. Mentré, S. Tuji, S. Nakanishi, M. Ochiai, and T. Ooka. *Water in the cell (in Japanese)*, (2006), pp. 64-67. University of Tokyo Press.