論 説

軟骨の組織培養と移植の研究(第1報)

鳥取大学整形外科教室
(主任:西尾篤人教授)

吉 川 暢 一
長 谷 川 淳

The Experimental Studies of Articular Cartilage by Means of Tissue Culture in Vitro and Joint Transplantation

by

Y. Kikkawa and K. Hasegawa

Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine,
Tottori University (Direct.: Prof. A. Nishio)

緒 言

軟骨組織は独特の組織構造を示し、他の生体組織にとつて最も重要な栄養供給路である血管組織を欠いている。此の為、関節軟骨の栄養、再生に関する研究は数多いが、現在尚断定し難い段階である。吾々は此等の問題を究明せんが為に関節軟骨の移植と骨軟骨の組織培養法による体外培養を採り上げ実験的研究を施行した。

I. 鶏胚脚原基の体外培養

近来、整形外科の研究分野に於いて、組織培養法による研究は多くその記載を見る様になつた。関節軟骨の栄養を中心として、その生物科学的特性を究明せんが為、今回は関節軟骨の栄養供給源としての関節滑液

の重要性和特異性に関し、関節滑液を培地として骨軟骨の培養を試みた。

実 験 方 法

1) 培養鶏胚軟骨; 38°C で孵化した入卵第9日目の鶏胚脚軟骨を無菌的に採取し軟部組織を可及的綺麗に除去する。

2) 培養液; 固形成分として雄鶏のヘパリン血漿を使用。液体成分として、塩類溶液 (pH 7.6 に修正した Tyrode 氏液), 人血清, 鶏胚抽出液, 人関節滑液, Hyaluronidase, 鶏血清等を組合せ9種類の培地を作製した(表1)。関節滑液は正常関節液は応用出来ず, 14才男子の膝関節ロイマの病的関節液を応用, その pH=7.6~7.8, 粘稠度は 9.2 である (Hess-Erma 血

表 1 培 地 の 種 類 と 組 成

種 類 組 成	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉
塩 類 溶 液	6	6	6		10				
人 血 清	2	2				10	5		
鶏 胚 抽 出 液	2		2				5		
人 関 節 滑 液		2	2	10					
人 関 節 滑 液 Hyaluronidase								10	
鶏 血 清									10

表 2 卵殻内に於ける鶏胚大腿骨、脊骨の平均発育率

	孵 化 日 数							平均発育率 $\Sigma xy / \Sigma x^2$
	8	9	10	11	12	13	14	
大 腿 骨	4.3	5.9	7.0	7.8	10.0	11.1	13.8	1.442
脛 骨	5.3	7.1	8.8	10.3	13.1	14.8	16.3	1.851
								1.646

液粘稠度計による測定値)。関節滑液粘稠度低下には Hyaluronidase 200u./cc 加え、粘稠度は血清のそれと等しく 2.0 とした。

3) 培養方法；円型廻転管 1 本に 1 ケの鶏胚大腿骨又は脛骨を移植し、1 時間 15 回転にて廻転培養を連続 6 日間施行す。培地交新は 3 日目に一回施行した。

4) 検査方法；24 時間毎に軟骨の長径成長を測定し、発育率は直線回帰係数の $\Sigma xy / \Sigma x^2$ を応用した。

5) 対象；卵殻内生理的狀態に於ける鶏胚脚軟骨の長径を孵化第 9 日より 1 週間測定し、毎日平均値を算定し、その発育率を対象とした。(表 2)

実 験 結 果

9 種類の培地による体外培養の平均発育率は表 3 に示す如く、最高は $M_4 = 0.401$ mm/day で、最低は 0.024 mm の M_5 である。発育順位は $M_4, M_3, M_7, M_1, M_6, M_2, M_9, M_8, M_5$ である。

表 3 各種培地による培養成績

培 地 別	平均発育率 $\Sigma xy / \Sigma x^2$
卵殻内生理的狀態	1.646 mm/day
M_1	0.305
M_2	0.269
M_3	0.374
M_4	0.401
M_5	0.024
M_6	0.300
M_7	0.334
M_8	0.108
M_9	0.214

考 察

Osteochondritis dissecans に於て関節腔内に遊離した軟骨片が永く生存し、又軟骨下骨組織の壊死があつてもその上の関節軟骨は生存すると言う事実は関節

軟骨の栄養に関して滑液の意義が大なることを示すものであるが、今回の培養実験に於て、関節滑液を培地とした場合の発育率は卵殻内発育にはるかに及ばないにせよ、9 種の培地の中では最良である。これに反し塩類溶液のみによる培地にては鶏胚脚軟骨は全く発育しないばかりか、早期に萎縮を起す。又、人血清のみによる培地では中等度に発育はするが M_4 に及ばない。此のことは関節滑液が軟骨の絶好の培養基であることを示している。関節軟骨が血液と関節滑液の両者から栄養を受けることは諸家の認めるところであるが、物理化学的性状の異なる両者を同一視することは適当でなく、又両者の優劣は簡単には決められない。

関節滑液の特性にその粘稠性がある。Barnett はその粘稠度を低下させた上で関節運動を強制すれば関節軟骨に損傷を見たて記載している。しかしこれを単なる機械的因子のみにて説明しづけるのは不適當であり、滑液の物理化学的変化が関節軟骨に対し易損傷状態をもたらすのではないかと言う事が推定出来る。Hyaluronidase を加え粘稠度を低下した関節滑液による培養では発育率が著明に悪くなるが、これは滑液中の Hyaluron 酸等の多糖類の濃度と Depolymerization と関節軟骨の栄養との関連性を想起させる。

此等の諸点と、人関節軟骨の培養条件とを関節軟骨の栄養を中心として追求し、変形性関節症等の予防と治療の面に有用なる様に致したい。

Ⅱ. 関節軟骨の移植

角膜は軟骨同様、無血管組織ながら同種移植可能である。関節軟骨移植の障害は移植軟骨の栄養不全と抗原抗体反応が考えられる。

実 験 方 法

1.5 kg 前後の家兎大腿骨下端の多少海绵質を含む関節軟骨を切除し移植し、免疫学的、レ線学的、組織学的に検索した。

免疫学的検索に於いては3羽を1群とし、10群を行つた。抗原は移植骨を採取した家兎の全身より軟骨を採取し、周囲軟部組織等を十分切除し、軟骨組織のみを取り出し、之を十分細粉し1日冷蔵庫に保ち、ホモゲナイザーにて更に細粉し、冷アセトンを加え自然乾燥し、生理的食塩水を加え軟骨蛋白成分を抽出せるものを使用した。抗体は前述の如く施術せる家兎の耳朶より経過に従つて、週1回6週に渡つて採血し分割した血清を用いた。沈降反応は、血清稀釈重層法を用い、判定は室温に於いて、途中の経過を参考にして終末判定を5時間後に行つた。

組織学的検索に於いては、経日的に術後1週、2週、3週、4週、8週、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月を経過したものを用い、ホルマリン固定、脱灰ツエロイジン包埋、後ヘマトキシリンエオジン染色、銀染色、ワンギーソン染色を施行し観察した。

実験結果

免疫反応は自家関節軟骨移植に於いては全く認められなかつた。同種関節軟骨移植に於いても著明な反応は認められなかつたが、少数例に於いて反応を示したのがあり、その値は非常に低く10倍程度で、術後大体2週頃に現われたものが殆んどであつた。又この反応は一過性に現われたもので術後3週には全例消失している。

レントゲン所見

移植骨中極端に於いては、術後2週頃より仮骨形成を認め、大体、術後5～6週で骨癒合の像が認められる。これに反して、関節軟骨接合部では仮骨形成及び骨癒合は著しく遷延され、術後1～2ヶ月を経過しても尚その徴候は認められず、骨癒合は大体6ヶ月を要する。又移植骨と母床との癒合の良好なものでは関節変形も認められず、骨癒合も早期に完全に営まれる。

組織学的所見

術後1～2週では移植骨と母床とは明かに区別され、その接合部に幼若結合組織の増殖が著明に認められる。又該部には著明な出血巣が認められるが、炎症所見は全然認められない。関節軟骨細胞は、染色性も良好で、変形も認められず、大体正常像を示している。

術後1～2ヶ月になると移植骨と母床との境界は次第に不明瞭となり、母床よりの線維組織の介入が著明となり、特に移植骨中極端に於いて結合組織の増殖著しく、線維性仮骨の像も認められるが、関節軟骨接合部

では尚、仮骨の形成は認められない。

術後6ヶ月頃になると、両者の境界は全く不明瞭となり、骨梁も完全に連合している。移植骨中極端に於いては、境界は全く認められないが、関節軟骨接合部では癒合尚不十分で間隙を残し、周囲より結合組織の介入を認めるのみで、軟骨自身の癒合は認められない。

考 按

古来軟骨組織の再生、治療機転及び移植に関する研究は数多くなされて来たが、尚定説がなく、軟骨自身に再生増殖を認めるもの、それを否定するもの、軟骨膜のみにそれを認めるもの、両者共に認めるもの、両者共に否定するもの等種々あり、移植に関しては、その移植骨の種類、部位、力学的条件、機械的刺戟、移植片への栄養、抗体産生等種々の因子が考えられて来た。

一般に同種組織移植による抗原抗体反応は起らないと考えられているが、柴野は骨移植に於いて、西川は角膜移植に於いて反応を示したとのべており、本実験に於いても一過性に非常に低い反応を示したものがあつたが、その免疫学的価値は疑わしい。レ線像に於いては比較的良好な成績を示したが、今井も指摘している如く母床との関係が深く、移植骨と母床とが完全に密着しているものは、関節変形も見られず、早期に骨癒合を営むが、然らざる場合には関節変形を来し、骨癒合も著しく遷延される。組織学的に海綿質を比較的多く含む移植骨中極端より仮骨形成が著明に認められる。自家関節軟骨移植と同種移植とを比較した場合、前者の方が多少早期に骨癒合を営む様に考えられる。

結 語

1) 9種類の培地による鶏胚脚体外培養に於いて、関節滑液の培地 M_4 が平均発育率は最高であり、塩類溶液 M_5 が最低であつた。

2) 滑液培地に Hyaluronidase を加え、その粘稠性を低下させる時にはその発育率は著明に減退する。

3) 家兎関節軟骨移植に於ける免疫反応は殆んど認められない。

4) 関節軟骨移植に関し、母床との関係が深く移植骨と母床とを密着させる必要がある。

5) 関節移植に於て骨癒合は営まれるが関節軟骨自身の再生力は認められない。

6) 自家関節軟骨移植の方が、同種移植より良い成績を得た。

(恩師西尾教授の御指導, 御校閲に深謝す)

文 献

- 1) 木村 廉; 組織培養, 南条書店, 1947.
- 2) 勝田 甫; 組織培養法, 納谷書店, 1955.
- 3) Ekholm, R. & Norbäck' B.; Acta. Scandinavica. 21, 82, 1951.
- 4) D. E. Holmdahl & B. E. Ingelmark; Acta. Orth. Scand. 20, 156, 1915.
- 5) Sunblad, L.; Acta. Orth. Scand. 20, 105, 1950~51.
- 6) B. S. Blumberg; Rheumatism. 14~2, 37, 1958.
- 7) J. W. Landells; J. Bone & Joint Surg. 37-B. 548~562, 1957.
- 8) G. A. Bennett & W. Bauer; J. Bone & Joint Surg. 17, 141~150, 1935.
- 9) 立岩; 日整会誌, 30~5, 593, 昭 31.
- 10) 立岩・吉沢・清水; 日整会誌, 31~2, 99, 昭 32.
- 11) 立岩日整会誌, 31~2, 昭 32.
- 12) 清水; 日整会誌, 34~1, 21, 昭 35.
- 13) 鶴海; 日外宝, 27, 1461, 昭 23.
- 14) 朝田; 中部整災外会誌, 2, 5, 1195, 昭 34.
- 15) G. A. Bennett & W. Bauer; J. Bone & Joint Surg. 18-A, 1936.
- 16) C. H. Barnett; J. Bone & Joint Surg. 38-B, 567, 1956.
- 17) R. B. Salter & P. Field; J. Bone & Joint Surg. 42-A, 1, 31, 1950.
- 18) B. E. Ingelmark; Acta. Orth. Scand. 20, 144, 1951.
- 19) Sylvén B.; J. Bone & Joint Surg. 29-3, 745, 1947.
- 20) Sylvén B.; J. Bone & Joint Surg. 29-3, 746, 1947.
- 21) Sylvén B.; J. Bone & Joint Surg. 30-1, 158, 1946.
- 22) 天児・城間; 外科の進歩, 第6集別冊.
- 23) 神中; 整形外科科学, 183. 188.

質 問

九大整形 竹 光 義 治

1. 軟骨移植後, 抗原抗体反応が見られたとのべられたが, 軟骨基質中の主要成分である Chondroitin sulfate には抗原性がないと云うことになっているので, その反応は軟骨中の如何なる物質によつて起つたと考えられますか.

2. 軟骨の生活力, 変性状態を最も如実に表わすものは, S^{35} の uptake に turn over ratio であると考えますが, その様な測定は行つておられませんか.

答

鳥取大学整形外科 吉 川 暢 一

① 関節軟骨移植に於いて一過性に抗原抗体反応を認めたが, 無視出来る程度のものであつた.

② S^{35} 使用についての研究は現在実験中ですので結果はまだ出ていません.