

# 一 般 演 題 抄 録

### 13. 延長仮骨形成における血管内皮細胞増殖因子と受容体の発現

森 成志 山口博史 岡田正道 菊山愛一朗 梶村直志 浜西千秋  
近畿大学医学部整形外科学教室

目的 近年、延長仮骨形成における血管新生の機序について様々な報告がなされている。Vascular endothelial growth factor (VEGF) は生理的にも、病因論的にも強力な血管新生促進作用を有する因子として知られており、また近年の研究により本因子の作用は、種々の分野で血管内皮細胞以外の細胞にも認められる事が明らかにされて来ている。今回我々は、延長仮骨形成に認められる VEGF の発現とその受容体の局在を、家兎脛骨脚延長モデルを用い、抗 VEGF 抗体および抗 VEGFR-1 (flt-1) 抗体、抗 VEGFR-2 (KDR/Flk-1) 抗体による免疫染色法にて組織学的に検討した。

結果 延長中および延長終了後2週目までの標本では、膜様骨化部の骨化前線部および成熟骨梁層の骨芽細胞に VEGF の発現を認めた。延長部周辺の軟骨組織では、軟骨組織の周辺の未熟な軟骨細胞に VEGF の発現を認めた。延長終了後3週の時点では、骨新生は減少し、成熟骨梁層の骨芽細胞に弱い

VEGF の発現を認めた。VEGF 受容体は flt-1, KDR/Flk-1 受容体共に類似した局在を示し、骨芽細胞、軟骨細胞および血管内皮細胞にその局在が認められた。また、破骨細胞にも flt-1 受容体の発現を認めた。

考察 今回の結果では、未分化間葉系細胞層に新生血管が形成され、これらの血管内皮細胞は VEGF 受容体を有していた。また延長仮骨中の骨芽細胞および増殖期軟骨細胞は VEGF を産出しており、またこれらの骨形成細胞は VEGF 受容体を有していたことから、延長に伴うストレスにより延長部には局所的な低酸素が生じ、これに反応した骨形成細胞は、VEGF を産生し骨形成の場に血管新生を生じさせるほか、自らの分化増殖を促進している可能性が示唆された。一方、成熟骨梁周囲では破骨細胞が flt-1 受容体を有していたことより延長仮骨形成における破骨細胞による骨吸収の調節の一端にも VEGF が関与している可能性が示唆された。

### 14. Tissue Engineering による耳介軟骨作成の試み

宮里 裕 磯貝典孝 朝村真一 上石 弘 渡辺伸介\*  
水口信行\* 江川賢太郎\* 藤岡厚子\*\*

近畿大学医学部附属病院形成外科 \*近畿大学ライフサイエンス研究所 \*\*近畿大学医学部第2解剖学教室

目的 耳介は特有な凹凸をもつ薄い器官で弾力性があり、頭部に付着する面が細長く、顔面頭蓋から約40度の角度で聳立している。そのため耳介の形成手術は、正常耳介がもつこのような形態の特徴がどの程度備えられたものが形成されるかによって手術成績が左右される。今回我々は、小耳症を代表する耳介外表奇形や外傷後耳介欠損等の治療において、Tissue Engineering の手法を用いて耳介形態の再現を目指すため、培養イヌ軟骨細胞をヒト耳介を鋳型にした生分解性ポリマーに播種し、作成した細胞・ポリマー複合体をヌードマウス皮下に移植することで、三次元形態付与の有無の検討を行った。

方法 6ヶ月齢の自家繁殖犬の肩、膝関節より無菌的に関節軟骨を採取し、0.3% collagenase にて軟骨細胞を分離した。その後、培養シャーレに、初期濃度  $0.5 \times 10^6$  個の細胞を播種し、In vitro で培養した。培養液は、10%子牛血清入りの Ham F12培地に抗生剤、及びアスコルビン酸を添加して用いた。細胞

増殖が confluent に達した後、0.25%トリプシンで細胞分散させ、合計  $100 \times 10^6$ /ml の細胞浮遊液を得た。これをヒト耳介を鋳型にした生分解性ポリマーに播種し、細胞・ポリマー複合体を作成し、In vitro で1週間培養後、ヌードマウス皮下に移植した。実験の評価は、培養軟骨細胞の増殖形態、細胞数の変化及び機能分化、また移植後の細胞・ポリマー複合体の三次元形態付与の検討をおこなった。

結果およびまとめ (1)培養軟骨細胞の形態変化は、培養後2日目では、シャーレ底面に小円球型の軟骨細胞が散在性に付着しており、11日目では底面に付着した細胞は、紡錘型へと活発に増殖変化し、28日目では多角型で敷石状構造の形態へと変化し confluent に達していた。(2)培養軟骨細胞数は、5日目より増え始め対数増殖期を経て、17日目以降は定常期となり基質の分泌を認めた。(3)細胞・ポリマー複合体は移植3週間後、的確な三次元形態を付与した。