

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09486

研究課題名(和文)軟骨は移植された後どのような代謝が生じるのか? -糖鎖工学を用いた生化学的検討-

研究課題名(英文)How to be metabolized when the cartilage is transplanted -biochemical research using glycotecnology-

研究代表者

四ッ柳 高敏 (Yotsuyanagi, Takatoshi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70250595

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文):小耳症手術時に生じた余剰肋軟骨に対し、各種染色を行った。10~11歳では、HE染色では全体的に弱いヘマトキシリンへの染色性を示し、被膜マトリックス、小腔周囲マトリックスともに淡い色調で、小腔周囲間マトリックスとの色調のギャップは少なかった。20歳以上では、強いヘマトキシリン染色性を示し、色調ギャップが大きかった。アルシアンブルー染色においてもほぼ同様の所見であったが、染色像の定量解析においては、年齢差は認めなかった。以上より10~11歳の軟骨組織ではグリコサミノグリカンは軟骨基質に均一に存在し、20歳以上では軟骨細胞周囲に集積しており、成長時に軟骨基質の性質が変化することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肋軟骨は、形態の再建に有用な移植材料の一つである。年少児の軟骨では、中央部分は水分を含む空隙が多く構造が疎になっており、成人になると今度は外側から硬化していく。移植された肋軟骨は、時間とともに変形、吸収される症例もあり、特に年少児の未熟な軟骨ではより生じやすいが、そのメカニズムに関しては調査されていない。また、再生医療により形成された軟骨も、移植後容易に吸収されることが知られている。再建形態が数十年単位で維持されることが、特に外表の再建後に求められることであり、吸収の機転の解明のため、軟骨の移植後の代謝を調査することは臨床的意義が大きい。

研究成果の概要(英文):Abundant costal cartilage when achieved microtia operations was researched by various staining. In aged of 10 to 11, H-E stain showed weak staining both in capsule matrix and matrix around loculus. There were no gap in them. In aged over 20, it showed strong staining and there was large gap in them. Alcian blue staining also showed similar findings but age specificity was not appeared in quantitative analysis of the chromatic figure. As a result, cartilage cell in aged of 10 to 11, glycosaminoglycan exists uniformly in the cartilage disposition. In aged over 20, glycosaminoglycan accumulate around cartilage cell. We confirmed that the character of the cartilage disposition will change according to the growth.

研究分野：形成外科学

キーワード：軟骨 移植 吸収 グリコサミノグリカン 代謝 小耳症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

形成外科領域において、移植材料としての硬組織に求められる条件としては、加工に適した硬さ・柔軟性を兼ね備えること、および移植後に形態が変化しないことの2点が挙げられる。肋軟骨は、耳介や外鼻などの複雑な3次元形態の再建に有用な硬的移植材料の一つであるが、しばしば移植後に軟骨の変形を認めることがあり、その傾向は特に小児において、より著明に生じやすいことが経験的に知られている。臨床上、小児においては、外表は望ましい弾性と柔軟性があるものの、断面は均一な構造となっておらず、内側では脆弱な状態となっていることが多い。一方年齢とともに、仮骨化、石灰化が生じることが知られており、高齢者では黄色く変色し、硬く脆くなっているため細工に苦慮することを経験する。しかし、肋軟骨の年齢による組織学的差異について、これまで十分な調査が行われてこなかったのが実情である。

### 2. 研究の目的

肋軟骨は組織学的には硝子軟骨であり、硝子軟骨の分子組成は、60~80%が細胞間水分、15%がコラーゲン分子(主に型コラーゲン)、9%がプロテオグリカン凝集体、5%が多接着性糖タンパク質、3~5%が細胞である。組織学的評価においては、ヘマトキシリンは、硫酸基を持つグリコサミノグリカン(コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸など)の存在により強い染色性を示す。アルシアンブルーは、ヘマトキシリン同様に硫酸基に染色性を示すことに加え、カルボキシル基を有するが硫酸基は有さないグリコサミノグリカン(ヒアルロン酸)も染色するという違いがある。これらの組成に関し、小耳症手術時に得られた余剰肋軟骨片を用いて、年齢により肋軟骨にどのような組織学的な差があるのか調査した。

### 3. 研究の方法

当院にて小耳症手術を行った10歳~22歳の患者6名(男性5名、女性1名)を対象とした。小耳症手術(肋軟骨移植による耳介形成術)にて通常破棄する余剰肋軟骨を検体として用いた。肋軟骨は採取されてから概ね3時間以内に4%パラホルムアルデヒド溶液もしくは10%ホルマリンに浸漬、固定時間は24時間以上とした。その後、脱灰液B(EDTA処方 富士フィルム和光純薬)にて4~10週間脱灰し、パラフィン包埋標本を作成、5 $\mu$ mの厚みで切片を作成してHE染色、アルシアンブルー染色(pH2.5、核染色はケルンエヒトロート)を行った。光学顕微鏡像はKEYENCE BZ-X700にて撮影した。アルシアンブルー染色では軟骨の中心付近の比較的均一に染色されている箇所を、1検体につき3箇所同倍率同面積で( $\times 100$ )撮影し、ImageJにて青色輝度を定量した。なお、今回の実験系においては、手術時に検体を採取するためすべての検体は同日に同一試薬を用いて処理することは不可能であった。また、大きさの違いや年齢による石灰化の程度の違いなどにより、固定期間や脱灰期間にもばらつきがあることから、これらが染色性(定量値)に影響している可能性は否定できない。

### 4. 研究成果

10~11歳の肋軟骨組織像は、HE染色では全体的に弱いヘマトキシリンへの染色性を示し、被膜マトリックス、小腔周囲マトリックスともに淡い色調で、小腔周囲間マトリックスとの色調のギャップは少なかった。一方、20歳以上のHE染色組織像は、被膜マトリックス、小腔周囲マトリックスが強いヘマトキシリン染色性を示し、細胞周囲間マトリックスとの色調ギャップが大きかった。10~11歳の肋軟骨の中には、これらの中間の組織像を示すものも認められた。アルシアンブルー染色においても年齢的な差異はほぼ同様の所見であった。しかし、染色像の定量解析においては、年齢に伴う増加傾向は認めなかった。

この原因としては、年齢が高くなるにつれ軟骨細胞からのプロテオグリカンの分泌量が増加し、均一に存在しきれなくなったプロテオグリカンが軟骨細胞周囲に蓄積していった、もしくは、小児期に軟骨基質中に均一に存在していたものが青年期になるにつれ軟骨細胞近傍に集積した、という、2通りの仮説が考えられる。そこで、アルシアンブルー染色で得られた組織像を定量解析したところ、年齢が上がっても染色面積は増加していなかったことがわかった。結論として、軟骨細胞より分泌されたプロテオグリカンは均一に軟骨基質中に存在し続けるのではなく、成長に伴い分布を変化させることが示唆された。一方、この分の変化がなぜ生じるのか、この変化は機能的にどのような役割を有するのかについては、今後、グリコサミノグリカンの含有量・組成につき、生化学的解析等を行っていく必要があると考える。軟骨細胞の機能に関しては、コンドロイチン硫酸がアルカリフォスファターゼの抑制を介して軟骨細胞自身の分化を抑制すると報告されている。軟骨細胞は成熟して肥大軟骨細胞に分化すると軟骨基質の構成成分であるグリコサミノグリカンやコラーゲンの産生量が減少する。すなわち、ある程度の年齢まで軟骨細胞が分化しないまま存在することが軟骨自体の成熟に必要であり、本調査結果で認められた基質内のグリコサミノグリカン分布の変化は、軟骨細胞の分化を調整するメカニズムと関連している可能性があると考えられた。本調査では脱灰処理を行っているため、化骨や石灰沈着に関する評価はなっていないことから、今後仮骨のメカニズムについても解明していく必要があるもの

と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北愛里紗、四ッ柳高敏、柿崎育子
2. 発表標題 ヒト肋軟骨組織におけるグリコサミノグリカン分布の年齢による違いと皮下埋入後の変化
3. 学会等名 第52回結合組織学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 建  (YAMASHITA Ken)  (30312507)	札幌医科大学・医学部・講師    (20101)	
研究分担者	柿崎 育子  (KAKIZAKI Ikuko)  (80302024)	弘前大学・医学研究科・准教授    (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------