Calcification of regenerative bone tissue promoted by electrical stimulation with noise-like waveform

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30091

ノイズ電気刺激による培養再生骨の石灰化促進

瀧本貴友[1]・田中茂雄[2]
[1]〒920-1192　金沢市角間町　金沢大学自然科学研究科
[2]〒920-1192　金沢市角間町　金沢大学環日本海域環境研究センター

Naoki Sugiura[1] and Shigeo Tanaka[2]:
Calcification of regenerative bone tissue promoted by electrical stimulation with noise-like waveform

1. 緒言

電気刺激は骨形成を促進することが知られており、臨床医療において電気刺激による骨形成促進効果がさまざまな形で利用されている。また電気刺激は、培養骨芽細胞の増殖やコラーゲン産生などの活性や石灰化を促進させることも知られている。一般的に電気刺激では、正弦波などの周期的な波形が用いられているが(1)、未だ最適な刺激周波数は見出されていない。一方、我々は後肢懸垂ラットにおける大腿骨の骨量減少が周期的な電気刺激よりもノイズ状の電気刺激により抑制されることを確認した(2, 3)。そこで我々は、このノイズ電気刺激の効果に着目し、それを培養下で効率的な骨組織再生を必要とする再生医療分野へ応用することを着想した。本研究の目的は、ノイズ電気刺激の培養再生骨の成熟化および石灰化に対する促進効果を周期的な電気刺激波形と比較することにより検証することである。

2. 実験方法

2.1　培養再生骨への電気刺激

骨芽細胞をⅠ型コラーゲンスポンジ担体（W 20mm × L 16mm × t 2mm）に 1×10^6 個（1600 cells/sponge）播種・培養することで再生骨を構築した。再生骨を培養ディッシュ内に培地とともに設置し、ステンレス製の板電極により電気刺激を与えた。なお、再生骨が常に電極間中央に位置し同じ方向から電気刺激が与えられるように、再生骨の両端をアクリル製アンカーに固定した。図１に本実験で用いた電気刺激システムを示す。実験グループは、①Control 群、②周期的刺激群、③Noise 刺激群の3群とした。Control 群では電極を培養ディッシュに設置した状態で電気刺激を与えずに培養した。②の群では 1 ms の持続時間を持つ大きさ 20 μA（電流密度で 0.625A/ m^2）の電気パルスをさまざまな繰返し周波数（2 Hz～500 Hz）で与えた。一方、Noise 刺激群では、前述の電気パルスがおよそ 50 Hz から 500 Hz の繰返し周波数でランダムに出現するように設定し与えた。周期的刺激波形の例として 500 Hz を図２a に、Noise 刺激波形の例を図２b に示す。電気刺激は、播種翌日より毎日 1 日 1 回、3 分間与えた。

2.2　アルカリ性ホスファターゼ（ALP）活性評価

電気刺激による培養再生骨の成熟化を評価するために、培養 3 日目に再生骨を取り出して ALP 活性評価を行った。ALP 活性評価は、p-NP（ニトロフェノール）基質法に基づき、単位タンパク量当たりの p-NP 量を分光器により計測した。なおこの評価実験ではマウス頭蓋冠樹立の骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）を用いた。

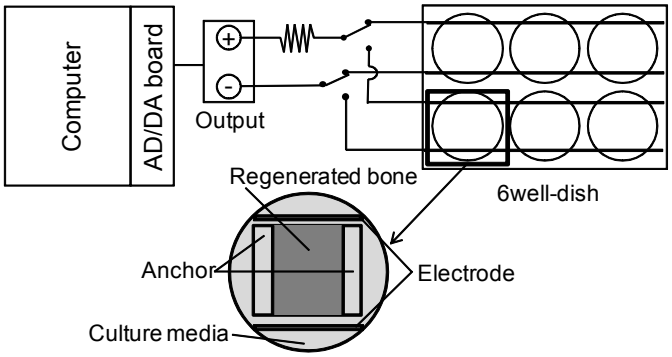

図１　培養再生骨への電気刺激システム

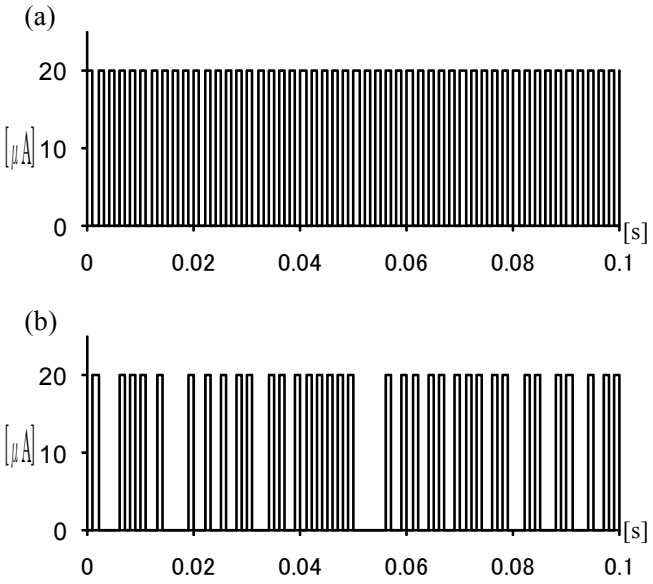

図２　電気刺激波形。(a)周期的刺激波形（500 Hz)、(b)Noise 刺激波

2.3　石灰化評価

23 日間の培養期間において培養再生骨の石灰化度のモニタリングを行い、電気刺激の石灰化促進効果を評価した。石灰化モニタリングは、近赤外光 LED とフォトダイオード（PD）を利用した小型光学装置により非破壊的に行われ、再生骨の石灰化度は外寸体積当たりの Ca 含有量もしくは乾燥重量（担体密度）により評価した[(4)]。なお、この実験では石灰化能に優れた初代培養骨芽細胞を用いており、この細胞は SD ラット（雌、8 週齢）の大腿骨および頚骨より採取した間葉系細胞を分化させることで得た。なお、周期的電気刺激群として 500Hz のものを代表として採用した。

3. 結果および考察

単位タンパク量あたりの p-NP 量（Control 群の平均値で正規化）の各群間での比較を図 3 に示す。Noise 群は Control 群と比べ 13%（$p < 0.001$）増加した。周期的刺激群においては　　2 Hz、333 Hz、500 Hz を除き Control 群との有意差は見られなかった。また、周期的気刺激群と比較すると、Noise 群はどの周期的刺激群よりも高い値を示し、2 Hz、20 Hz、333 Hz を除き有意差が示された（$p < 0.01$）。以上の結果は、ノイズ電気刺激が周期的な電気刺激よりも効果的に培養再生骨の成熟化を促すことを示唆している。

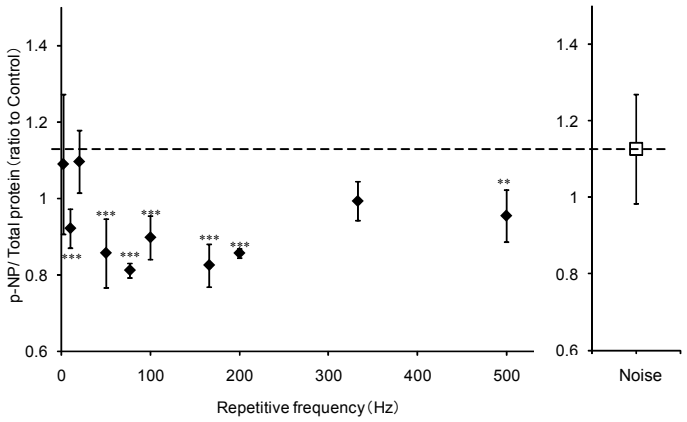

図３　ALP 活性（単位タンパク量当たりの p-NP 量）における周期的刺激群とノイズ刺激群の比較．** p<0.01, *** p<0.001 v.s. ノイズ刺激群

図 4 に石灰化度（Ca 含有量および担体密度）の培養期間に伴う変化を示す。全ての群において培養期間に伴う石灰化度の増加がみられるものの、およそ培養 7 日目より刺激群は Control 群よりも高い石灰化度を示した。特に、Noise 群においては培養 8 日目以降で Control 群より有意に高い石灰化度が観察された。一方、500Hz 群では Control 群との有意差はほとんど見られなかった。培養最終日（23 日目）における各群の Ca 含有量を比較すると、Control 群（1.26mg/cm3）に比べ、500Hz 群（1.35mg/cm^3）では 1.08 倍、Noise 群（2.35mg/cm^3）では 1.87 倍となった。担体密度では、Control 群（22.34mg/cm^3）に比べ 500Hz 群（23.38mg/cm^3）で 1.05 倍、Noise 群（33.01mg/cm^3）で 1.48 倍となった。以上のように、ノイズ電気刺激は周期的刺激波形の刺激よりも培養再生骨の石灰化を促進することを示され、ALP 活性の結果と同様の傾向となった。図５は、細胞播種後 1、7、14、および 21 日目における各群の代表的な再生骨の接写画像である。どの群においても培養期間の経過とともに石灰化領域とみられる白濁領域の面積と濃さが増大していることが分かり、特に、Noise 群の再生骨においてより顕著であった。ノイズ電気刺激の骨芽細胞の成熟化および石灰化促進効果には、ノイズ波形に含まれる高い周波数成分と各成分の出現頻度が関係していると推察される。特にこれに関連して、細胞の刺激に対する鈍感化[5]と刺激感度の周波数依存性[6]の二つの要素は重要な役割を演じていると考えられ、メカニズム解明には両者の調査が必要である。

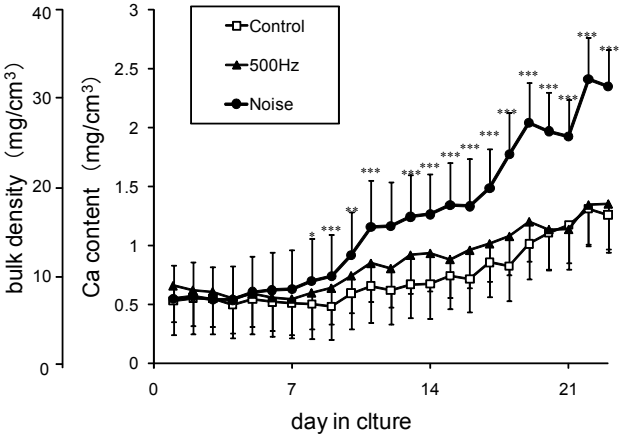

図４　再生骨の石灰化度（Ca 含有率および担体密度）の変化．* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 v.s. Control

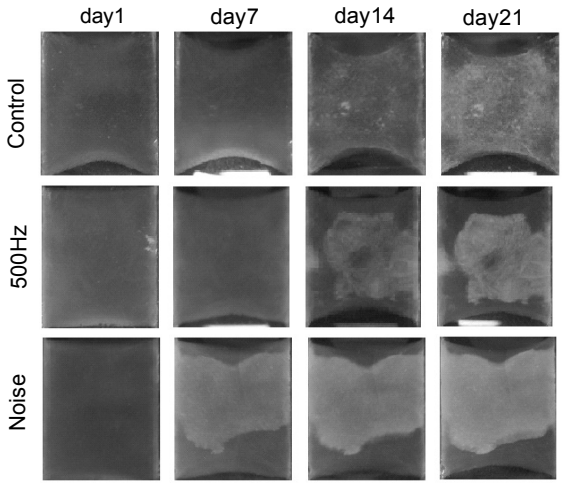

図４　再生骨の接写画像

4. 結言

本研究ではⅠ型コラーゲンスポンジと骨芽細胞より構築した培養再生骨にノイズ電気刺激と周期的刺激を与え、両刺激がもたらす再生骨の ALP 活性と石灰化の促進効果を比較した。その結果、周期的刺激よりもノイズ刺激で ALP が活性化され、また石灰化が促進された。以上より、ノイズ刺激は培養再生骨の成熟化や石灰化を促進させる効果があると結論づけられた。

参考文献

(1) Supronowicz P.R. et al, J Biomed Mater Res 59: 499-506, 2002
(2) 近藤香菜子ら, 日本臨床バイオメカニクス学会誌 29: 199-204, 2008.
(3) 瀧本貴友ら, 臨床バイオメカニクス 30: 21-26, 2009.
(4) Tanaka, S.M., et al., J Biomech Sci Eng 3,332-342, 2008.
(5) Donahue S.W., et al., J Biomech 36: 35-43, 2003.
(6) McLeod K.J., et al., JBJS 74: 920-929, 1992