

近赤外光を用いた培養骨芽細胞の石灰化モニタリングシステムの開発

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/2297/16948

近赤外光を用いた培養骨芽細胞の石灰化モニタリングシステムの開発

垣尾 雅文¹、山越憲一²、田中茂雄³

¹ 金沢大学工学部人間・機械工学科

² 金沢大学大学院自然科学研究科

³ 自然計測応用研究センター人間計測制御研究部門

1. 緒言

近年、再生医工学やティッシュ・エンジニアリングと呼ばれる技術により、患者から採取した細胞を培養し、組織を再生して患者へと移植する試みが注目されている。この技術を骨に応用した場合、従来の人工生体材料の抱える生体適合性や力学的適合性といった諸問題を克服できる可能性があるが、現状では培養下において十分な石灰化度の再生骨を得ることは難しい。そこで我々は、培養再生骨の石灰化度に応じて刺激間隔を制御することで石灰化を促進させる培養システムの構築を試みている。本研究では、試作した石灰化度モニタリングシステムの有効性についてコラーゲンスポンジ担体に三次元培養したラット幹細胞由来の骨芽細胞を用いて検討した。

2. 近赤外光を用いた石灰化度評価

本研究では、石灰化度検出手法として近赤外光を利用した強度分解法を用いた。強度分解法では、測定試料に対して近赤外用の LED とフォトダイオード (PD) を並べて設置する (図 1a)。LED から照射された入射光は試料内で反射・散乱し、その光を PD で検出する。入射光強度 I_0 を増加させたときの反射・散乱光強度 I を検出し、 I_0-I 曲線を求める (図 1b)。

I と I_0 の関係は次式のランバートベールの法則で表すことができる。

$$I = I_0 \cdot e^{-\mu_t \cdot L(I_0)} \quad \dots \quad (1)$$

この式中の μ_t は測定試料の反射における減衰係数、 L は代表光路長である。再生骨の石灰化度が高い場合は減衰係数が小さいため、 I_0-I 曲線の傾きは大きくなる。一方、石灰化度が低ければ減衰係数は大きく、 I_0-I 曲線の傾きは小さくなる。すなわち、 I_0-I 曲線の傾きを用いて石灰化度の評価が可能であると考えられる。

3. 石灰化モニタリングシステム

強度分解法による石灰化度評価の有効性を確認するため、図 2 に示すような石灰化モニタリングシステムを構築した。本システムでは、LED (850 nm, Epitex, L850-35) と PD (Judson, J16-5SP-R03M-SC) を $\phi 35$ mm のペトリディッシュ直下に設置し、ディッシュ内で三次元培養される骨芽細胞の石灰化をモニタリングする。LED の発光はコンピュータ (PC, Dell Inspiron 2200) からの信号により電流制御される。電流値を 0 から 31 mA まで連続的に変化させることで、LED の発光強度を線形に増加させた。PD

からの反射光強度信号はPD用アンプ（浜松フォトニクス、c9329）により増幅し、16 bit の分解能を持つAD/DA インターフェース・ボード（National Instruments、DAQ Card-6036E）を介してPCへ転送し、 I_0 – I 曲線を得た。なお、LED の発光制御およびPD の検出信号の取得と処理などは Visual Basic で記述したプログラムをPC上で実行することにより自動的に行われる。

以上のように得られる I_0 – I 曲線の傾きと試料の石灰化度が相関していることを確認するため、次のような石灰度の異なる模擬試料を使った実験を行った。模擬試料として 0.5M の塩化カルシウム水溶液と 0.5M のリン酸水素二ナトリウム水溶液に交互に浸漬することでハイドロキシアパタイト（HA）を沈着させたコラーゲンスポンジ（W 20mm×L 16mm×t 2mm）を用いた⁽¹⁾。

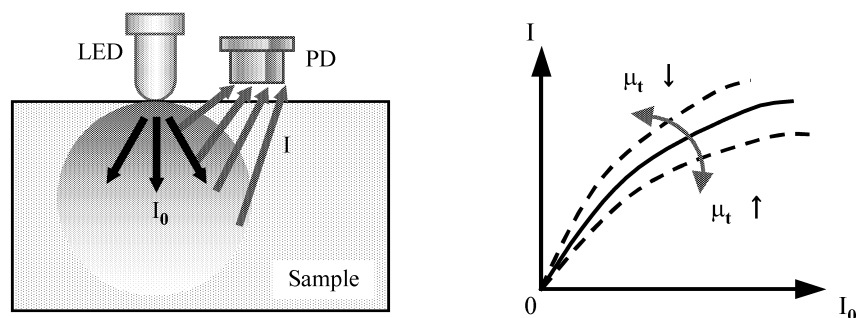


Fig.1 Intensity-resolved photospectroscopy. (a) Measurement setup with a LED and a PD. (b) I_0 – I curve.

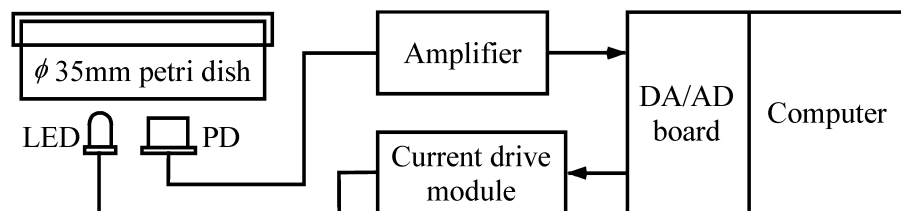


Fig.2 Optical monitoring system of osteoblastic calcification in vitro using near-infrared light.

浸漬回数を 0、1、2、4 回と変えることで異なる石灰化度の試料を作製した。なおここでは、外寸法と乾燥重量より試料密度を算出し、石灰化度の指標とした。試料密度と I_0 – I 曲線の傾きの関係調べると、良好な正の線形相関が確認でき ($r^2 = 0.896$ 、図 3)、両者の関係は次のような式で表すことができる。

$$\text{Slope} = 0.0074 \times \text{Bulk density} + 0.0599 \quad \dots \quad (2)$$

この式を用いて I_0 – I 曲線の傾きを試料密度へ変換し、石灰化度を評価した。

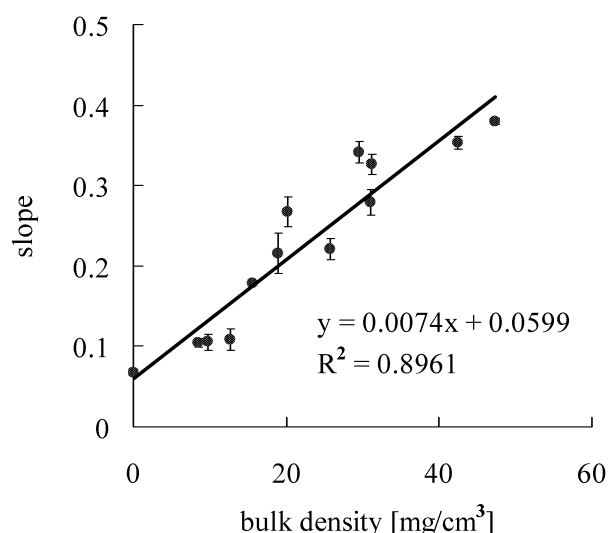


Fig.3 Relationship between sample bulk density and the slope of I_0-I curve.

4. 培養骨芽細胞の石灰化モニタリング

本システムを用いて、前述のコラーゲンスポンジを担体として三次元培養した骨芽細胞の石灰化モニタリング実験を行った。本研究ではラット (SD、メス、12 週齢) の大腿骨から間葉系幹細胞を採取し、それを骨芽細胞に分化・増殖させて実験に用いた。骨芽細胞をスポンジ 1 枚当たりに 0.5×10^6 個ずつ播種し、培養 1、3、7、14、21、28、35、42 日目の石灰化度を本システムにより測定した。なお、各測定日での測定サンプル数は 4 とした。さらに、測定を終えたサンプルのうち 2 個は、組織固定後に石灰化度を調べるための確立した染色法である von Kossa 染色を施し、デジタルカメラによる接写撮影を行った。得られた画像の濃淡を Photoshop により 256 階調のグレースケールへ変換し、平均輝度値より石灰化度を評価した。同染色法より評価された石灰化度と本システムより得られた石灰化度値とを比較することでシステムの有効性を検討した。

図 4 は、 I_0-I 曲線の傾きと (2) 式を用いて算出した試料密度の培養期間における変化を示したものである。播種後 3 日目までは担体密度の増加は検出されなかったものの、その後、培養期間の増加とともに担体密度が増加した。図 5 に培養 1、14、35 日目において von Kossa 染色を施した試料の接写画像を示す。なお、本染色では、石灰化基質の沈着度の増加に伴い茶褐色から黒色へと変化する。同画像から、培養日数の経過に伴い石灰化度が増加していることがわかる。von Kossa 染色された担体の培養日数経過に伴う濃淡変化を示すと図 6 のようになる。担体濃度は、培養開始直後から培養 21 日目まで増加し、それ以降では大きな変化が見られなかった。本システムを用いて I_0-I 曲線の傾きから求められた担体密度と von Kossa 染色された担体の濃淡の関係を調べると図 7 のようになり、両者は、指数関数的に良好に相関していた ($r^2 = 0.798$)。このことは、本システムにより担体の石灰化度が的確に評価されていることを示していると言える。

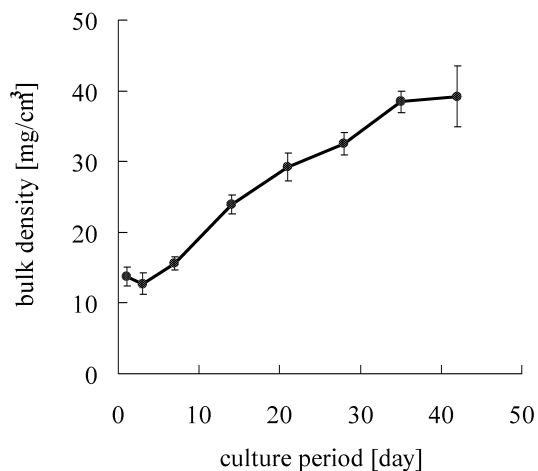


Fig.4 Monitoring of osteoblastic calcification, which is represented by the bulk density of a collagen sponge, by intensity-resolved photospectroscopy.

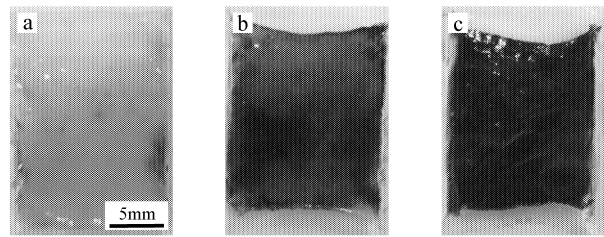


Fig.5 von Kossa stained-collagen sponges with osteoblasts . (a) 1 , (b) 14, (c) 35 days after cell seeding.

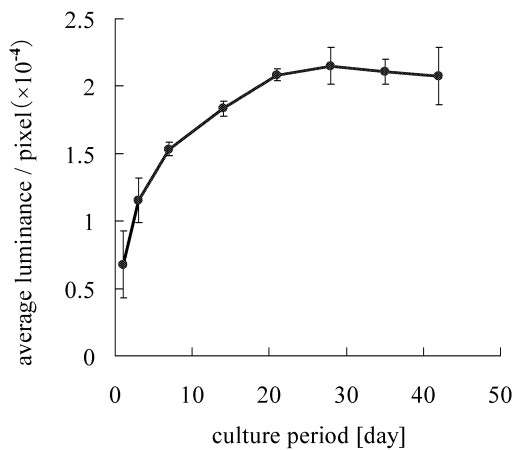


Fig.6 Change in the average luminance of von-Kossa stained collagen sponge with culture period.

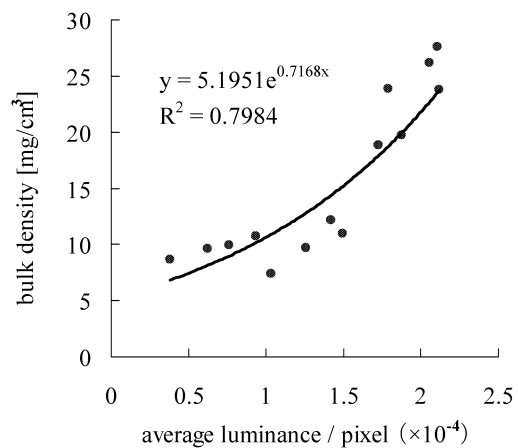


Fig.7 Relation between the bulk density monitored by the intensity-resolved photospectroscopy and the average luminance of von-Kossa stained collagen

5. 結言

本研究では、近赤外光を用いた再生骨石灰化モニタリングシステムを提案・試作し、その有効性をラット幹細胞由来の骨芽細胞とコラーゲンスポンジ担体を用いて確認した。その結果、本システムを用いて培養骨芽細胞の石灰化をモニタリングできることが確認できた。

参考文献

- (1) Tanaka, et al., Calcif Tissue Int, 76(4), pp.261-271, 2005

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費基盤研究（C）の支援を受け行われた（課題番号：18500343）。