

320 再生骨の光センシング

Optical Sensing in Tissue-Engineered Bone

○ 正 田中茂雄 (金沢大)、学 垣尾雅文 (金沢大)
学 杉浦直樹 (金沢大)、正 山越憲一 (金沢大)

Shigeo M. TANAKA, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa
Masafumi KAKIO, Kanazawa University
Naoki SUGIURA, Kanazawa University
Ken-ichi YAMAKOSHI, Kanazawa University

【背景と目的】

骨芽細胞と担体により構成される再生骨において、培養下での石灰化を促進するために力学刺激などのさまざまな刺激が試みられている^(1,2)。しかしながら現在、刺激の石灰化促進効果を確認するためには再生骨を培養チャンバーから取り出し、破壊的に計測する必要がある。そのため、長期の培養期間における刺激の効果を観察する場合、数多くのサンプルを準備する必要があり、実験効率が著しく損なわれる。そこで筆者らは、再生骨の石灰化度をチャンバー外より非破壊的にセンシングできる簡易的な光学システムを開発した⁽³⁾。本研究では、同システムを用いて再生骨石灰化の長期モニタリングを試みた。

【石灰化度センシングシステム】

図1は、本システムでの石灰化度検出原理を示したものである。培養チャンバー直下に設置したLEDより波長850 nmの近赤外光を再生骨へ照射し、その際、再生骨内で反射・散乱した光をLEDに隣接して設置したフォトダイオード(PD)で検出する(図1a)。LEDの発光強度(I_0)を増加させた場合、PDでの検出強度(I)が増加し、図1bに示すような I_0 -I曲線が得られる。 I_0 -I曲線の傾きの大きさは再生骨の石灰化度と関係しており、高い石灰化度の再生骨では大きな傾きを示す。本システムでは、この I_0 -I曲線の傾きを利用して再生骨の石灰化度を定量評価する。

図2は、本システムを用いた再生骨の石灰化度計測のようである。再生骨は、コラーゲンスponジに骨芽細胞を培養することで構築したものであり、培地ともに培養チャンバー内に設置されている。同システムは、一つのPDとその周りを取り囲む4つLEDで構成されており、カバーガラスを介して再生骨直下に設置されている。LEDの発光強度はパソコン用コンピュータ(PC)により電流制御され、同時に、PDにより検出された反射・散乱光強度信号がアンプを介してPCへ転送される。以上のLEDの発光制御およびPDの検出信号の取得は、Visual Basicで記述したプログラムによりAD/DAインターフェースボード(分解能16 bit)を操作することを行った。

【HA沈着担体を用いたシステム校正】

ハイドロキシアパタイト(HA)を沈着させたI型コラーゲンスponジ(Zimmer、Cola Coat, W 20mm × L 16mm × t 2mm)担体を用いて本システムの校正実験を行った。コラーゲンスponジへのHA沈着は、スponジを0.5 Mの塩化カルシウム水溶液と0.5 M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により行った⁽²⁾。両水溶液への浸漬回数を増やすことでHAの沈着量が増加し、本研究では、浸漬回数を0、1、2、4回と変えることによる異なる石灰化度のHA沈着担体(計12個)を作製した。本システムを用いて各担体の I_0 -I曲線を求め、得られた I_0 -I曲線の傾きと担体の石灰化度の関係を調べた。なお本研究では、担体の石灰

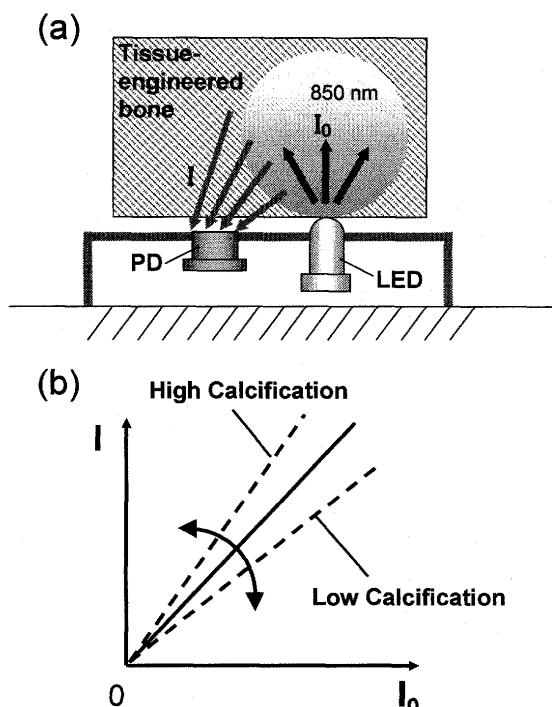


Figure 1 Optical sensing of calcification of tissue-engineered bone in culture. (a) A scaffold is irradiated with near-infrared light (I_0) by LEDs at 850 nm and diffuse reflectance light (I) is detected by a PD. (b) I_0 -I curve, in which the slope represents the degree of calcification of scaffold.

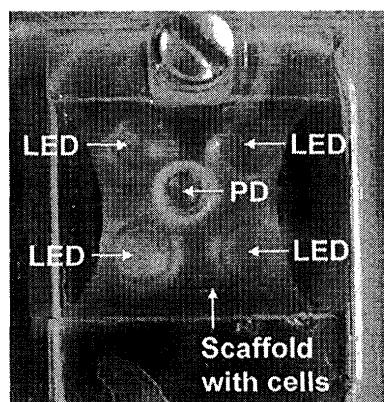


Figure 2 The top view of a set of four LEDs and a PD for sensing *in vitro* osteogenesis, on which a tissue-engineered bone composed of a collagen sponge scaffold and osteoblasts (MC3T3-E1) is placed.

化度を、担体の外寸法と乾燥重量より求められる担体密度 (Bulk density, mg/cm^3) により評価している。図 3a は、HA 沈着担体の代表的な I_0 -I 曲線を示したものである。どの担体密度においても I_0 -I 曲線はほぼ直線であり、また担体密度の増加に伴いその傾きが増加した。図 3b は、 I_0 -I 曲線の傾きと担体密度の関係を示したものである。両者の関係は次式により良好に近似できた ($R^2 = 0.927$)。

$$BD = 6.86 e^{5.6S} \quad \dots \quad (1)$$

ここで、BD は担体密度、S は I_0 -I 曲線の傾きを示している。(1)式を用いて再生骨の石灰化度評価を行った。

【再生骨石灰化の長期モニタリング】

本システムを用いて、前述のコラーゲンスポンジ担体に骨芽細胞を培養することで構築した再生骨の石灰化モニタリングを実施した。実験で用いた細胞は、樹立系骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞とラット骨髄幹細胞由来の初代培養骨芽細胞である。両者ともに、スponジ 1 枚当たりに 0.5×10^6 個播種し、10%ウシ胎児血清と 1%抗生物質を含む α-MEM 培地で培養した。なお後者では、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化促進因子 (10^{-8} M デキサメサゾン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸、および 10mM β グリセロ磷酸) を培地に添加して培養した⁽⁴⁾。石灰化度の評価は、播種後 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42 日目において担体密度を求めるこによつて行った。各測定日での測定担体数は 4 とした。

図 4 は、 I_0 -I 曲線の傾きと(1)式を用いて算出した再生骨密度の培養期間に伴う変化である。本実験結果は、両細胞の石灰化能の明らかな違いを示した。MC3T3-E1 細胞では、培養期間を通して密度増加は確認できなかった。一方、ラット初代培養骨芽細胞では、播種後 3 日目以降において培養期間の増加とともに密度が増加し、播種後 42 日目で約 $55 \text{ mg}/\text{cm}^3$ の密度に達した。この違いはそれぞれの細胞の培養環境に依存していると言える。すなわち、ラット初代培養骨芽細胞の高い石灰化能は、アスコルビン酸と β グリセロ磷酸の石灰化促進作用に由来していると考えられる⁽⁵⁾。一方、MC3T3-E1 細胞では、同因子が与えられなかつたため、ほとんど石灰化が起らなかった。なお、同因子の存在下においても MC3T3-E1 細胞の石灰化能は弱く、正常な石灰化が起らぬことが知られている⁽⁵⁾。

【まとめ】

本研究では、再生骨の石灰化度を非破壊的にセンシングできる光学システムを用いて、再生骨石灰化の長期モニタリングを試みた。MC3T3-E1 細胞とラット初代培養骨芽細胞を用いた再生骨に対し、最長 42 日間の長期モニタリングを行うことができた。また得られた結果より、両細胞の石灰化能の違いを確認することができた。

【謝辞】

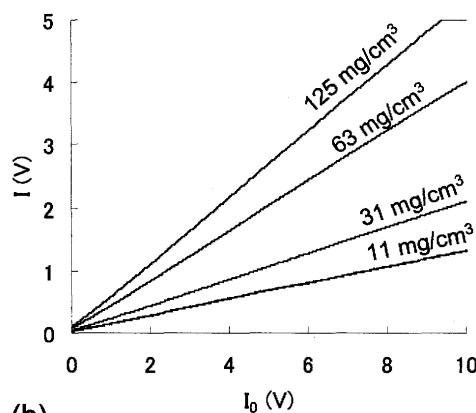
本研究は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C)(一般)の助成を受け行われた(課題番号: 18500343)。

【参考文献】

- (1) Tanaka SM, et al., J Biomech., Vol. 36, pp. 73-80, 2003
- (2) Tanaka SM, et al., Calcif Tissue Int., Vol. 76, pp. 261-271, 2005
- (3) 垣尾雅文ら, 日本生体医工学会誌生体医工学, Vol. 45, Suppl. 1, p. 108, 2007

- (4) Maniatopoulos C., et al., Cell Tissue Res., Vol. 254, pp. 317-330, 1988
- (5) Bonewald LF., et al., Calcif Tissue Int., Vol. 72, pp. 537-547, 2003

(a)



(b)

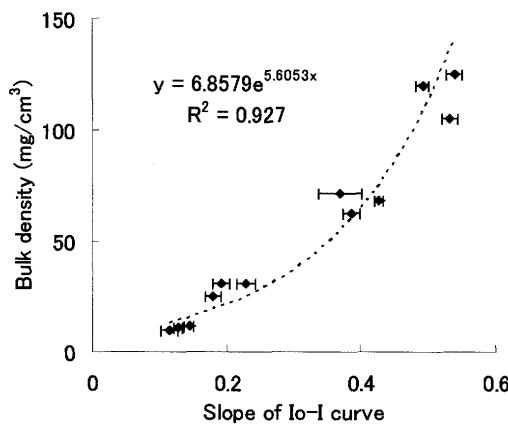


Figure 3 (a) I_0 -I curves for HA-deposited collagen sponge scaffolds with varied bulk density. (b) Relationship between the slope of I_0 -I curve and the bulk density of HA-deposited collagen sponge scaffold.

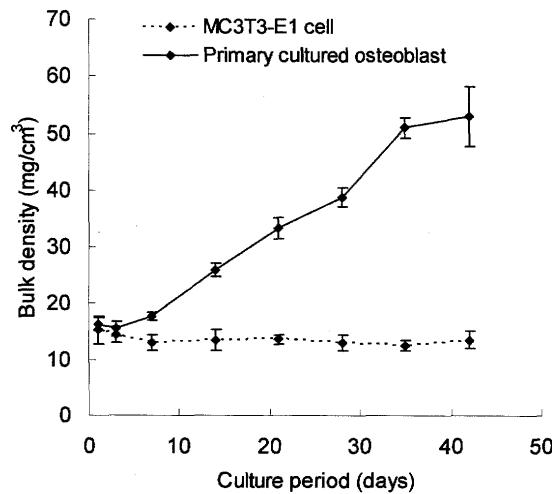


Figure 4 Change in the bulk density of tissue-engineered bone with culture period monitored by the optical sensing system.