

Promotion of in vitro osteogenesis of tissue-engineered bone by strain-induced fluid flow

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/2297/30177

ひずみ誘導型液体流動刺激による培養再生骨の石灰化促進

垣尾雅文¹, 田中茂雄²

¹金沢大学大学院自然科学研究科

²金沢大学環日本海域環境研究センター生体機能計測研究部門

Masafumi Kakio, Shigeo M. Tanaka

Promotion of in vitro osteogenesis of tissue-engineered bone by strain-induced fluid flow

1. 緒言

従来、骨欠損部の補填や人工関節置換術に使用される人工骨には、セラミックスや金属などが用いられている。しかし、これらの人工骨は移植後も長期にわたり体内に残留し、人工股関節の場合は金属性ステムと大腿骨の機械的特性の違いに起因するゆるみ・摩耗を生じるなど生体適合性や力学的適合性の点で問題を抱えている。これらの諸問題を克服すべく組織再生技術を骨へ応用した再生骨の確立が試みられている。再生骨は患者の自家骨芽細胞を医用生体材料からなる足場材料に播種して作製され、生体骨に近い移植材として期待されるが、いまだ実用段階には至っていない。一方、力学的刺激は骨形成促進効果があることから、培養下の再生骨の石灰化度を促進する方法として有効であると考えられる。我々は、再生骨の石灰化を促進させるための刺激として生体骨内で生じる力学刺激形態であるひずみ誘導型液体流動に着目した。同刺激はひずみ単体よりも骨芽細胞を刺激することが報告されている⁽¹⁾。しかし、同刺激による再生骨の石灰化反応を観察した例はない。

そこで本研究では、ピエゾアクチュエータを用いた刺激装置によりラット初代培養骨芽細胞とコラーゲンスポンジ担体からなる再生骨に対してひずみ誘導型液体流動を負荷し、同刺激により促進される石灰化の様子を観察した。

2. 実験方法

2. 1 力学的刺激

ラット (Sprague-Dawley, 雌, 10 週齢) 6 匹の左右大腿骨・脛骨より採取した間葉系幹細胞を osteogenic medium ⁽²⁾ 内で培養することで骨芽細胞を得た。得られた骨芽細胞を 0.9×10^6 個ずつ I 型コラーゲンスポンジ担体 (Zimmer Dental, L 20 mm × W 16 mm × t 2 mm, 孔径: 約 $100 \mu\text{m}$) に播種したものを再生骨として実験に使用した。力学刺激システムはピエゾアクチュエータ、渦電流型非接触変位センサ、および制御用コンピュータ (PC) で構成されており、変位センサの信号を利用してピエゾアクチュエータの変位がフィードバック制御される⁽³⁾。ピエゾアクチュエータによりコラーゲンスポンジに繰り返しの負荷を与えることでスポンジ内にひずみが生じ、これにより培養液の繰り返し流動が起こる (図 1)。本実験ではスポンジに対し 0.2% の最大圧縮変形を周波数 0.8 Hz で正弦波状に与えた。刺激は、1 日 1 回 3 分間で、これを播種後 35 日目まで毎日与えた。なお、刺激培養群 (刺激群) と静置培養対照群 (コントロール群) のサンプル数は、ともに 4 個とした。

2. 2 石灰化モニタリング

培養再生骨の石灰化状態は、近赤外光を利用した再生骨の非破壊的石灰化モニタリングシステム^(4,5)を用いて観察した。本システムでは、再生骨が置かれた培養チャンバ直下に四つの近赤外光 LED (波長 850 nm) と一つ的光ダイオード (PD) が並置されている (図 2 a)。LED の照射光強度 (I_0) を増加させた際の再生骨からの反射・散乱光強度 (I) の変化を PD で検出することで $I_0 - I$ 曲線を得

る (図 2b). この I_0-I 曲線の傾きから再生骨の石灰化度を評価する. LED の照射光強度は PC により電流制御され, PD で検出した反射・散乱光強度信号はアンプによる増幅後, PC へ転送される. LED の発光制御と PD の検出信号の取得は, Visual Basic で記述したプログラムによって 16 bit の分解能を持つ AD/DA インターフェースボードを操作することで行った. なお, 石灰化度計測は毎日 1 回行った. 本研究では, I_0-I 曲線の傾きと再生骨の石灰化度の関係を以下のように調べ, 両者の関係式を本システムの校正曲線として用いた. 2. 1 と同様の方法により 22 個の再生骨を作製し, それに対し最長 35 日間の培養を行った. 培養 1, 4, 7, 14, 21, 28, および 35 日目において本システムにより I_0-I 曲線の傾きを求めた後, 分光光度計 (HITACHI, U-1900) と血液検査用カルシウムキット (Wako, カルシウム E-テストワコー) を用いた比色定量法 (MXB 法) により Ca の担体体積当りの含有量 (以下, Ca 含有率, mg/cm^3) を求めた. なお, 培養期間の経過に伴う再生骨の収縮を考慮するために, 再生骨の体積は正面と側面の接写像から求めた. I_0-I 曲線の傾きと Ca 含有率の関係は次式で表すことができた ($r^2 = 0.892$, 図 3).

$$\text{Slope} = 0.111 \times \ln(\text{CC}) + 0.124 \quad \dots \quad (1)$$

ここで, Slope は I_0-I 曲線の傾きで, CC は Ca 含有率である.

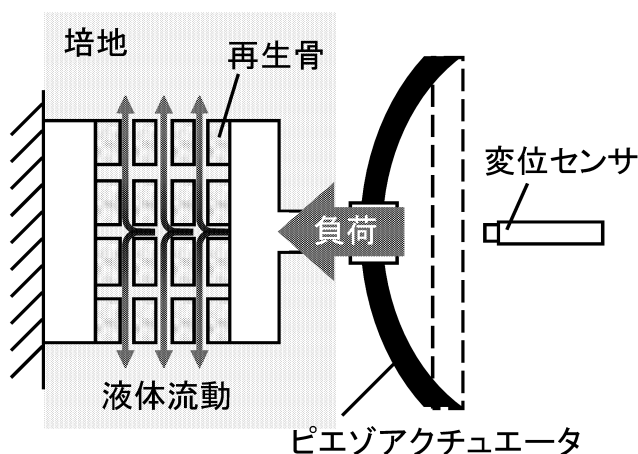


図 1 再生骨へのひずみ誘導型液体流動の負荷

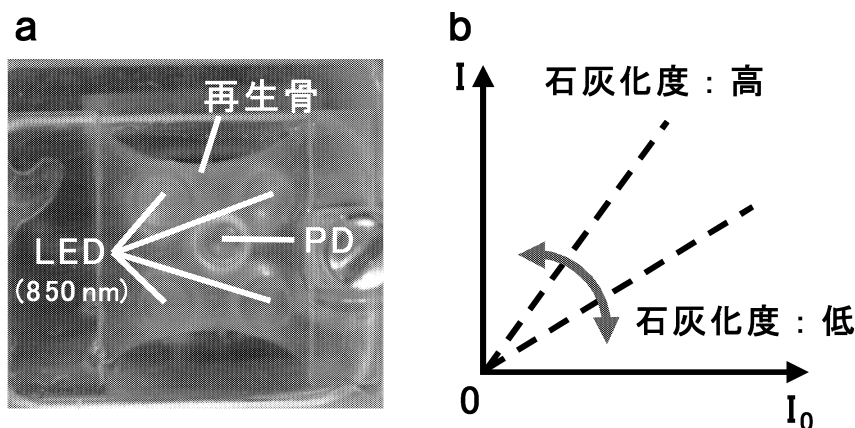


図 2 近赤外光を用いた石灰化モニタリングシステム. (a) LED と PD の配置, (b) I_0-I 曲線

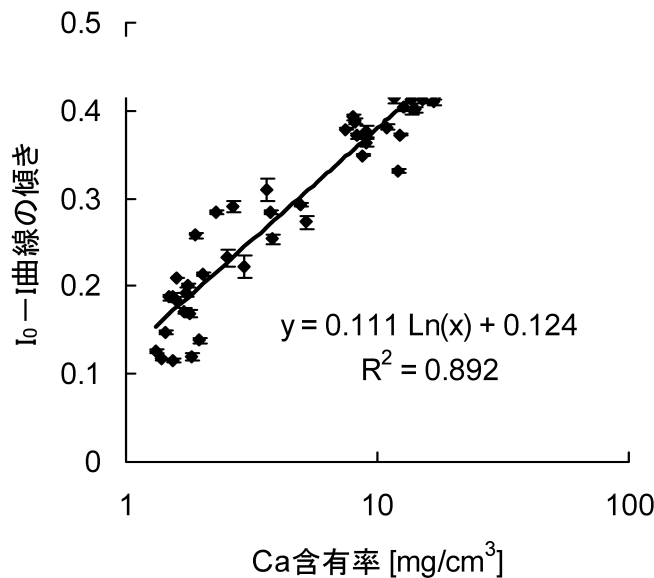


図3 再生骨のCa含有率とI₀-I曲線の傾きの関係

3. 実験結果

図4は、非破壊的石灰化モニタリングシステムにより計測した再生骨のCa含有率の培養期間に伴う変化である。両群ともに培養期間が長くなるに従ってCa含有率が増加するものの、培養7日目以降において刺激群の方がコントロール群に比べてより大きく増加することが確認できた。刺激群では培養12日目以降はほぼ全ての計測日において培養1日目とくらべて有意に増加していた。一方、コントロール群では培養35日目のみで有意なCa含有率の増加が見られた。両群のCa含有率の違いは、培養35日目の時点で約2.5倍（刺激群：3.74 mg/cm³、コントロール群：1.50 mg/cm³）となった。

図5は、培養10、20、および30日目の再生骨の表面上の形態を撮影した接写像である。両群ともに培養期間が長くなるに従い石灰化領域と思われる白濁した領域が増大した。刺激群では、培養10日目において既にこの白濁領域が見られ、その後の培養20日目、30日目において同領域の面積と濃さが増大する様子が確認できた。一方、コントロール群では白濁領域の増大は遅く、培養30日目のみにおいて再生骨縁部で同領域が確認できた。

4. 考察

以上の結果は、ひずみ誘導型液体流動による力学刺激が再生骨の石灰化促進に有効であることを示唆している。今後、同刺激による石灰化促進メカニズムの解明を進めるとともに、刺激群の再生骨で見られた石灰化の不均一性について検討する必要がある。しかしながら、培養中に細胞の引張力によりコラーゲンスポンジ担体の収縮が起こるため、液体流動と石灰化の関係を調べることは容易ではないと思われる。また、移植材として利用可能な程度に高石灰化した再生骨を得るためには、より効果的に石灰化を促進する刺激パターンの探索が必要である。

5. 結言

本研究では、ピエゾアクチュエータを用いた力学刺激装置によりラット初代培養骨芽細胞とI型コラーゲンスポンジ担体からなる再生骨に対してひずみ誘導型液体流動を負荷し、同刺激による石灰化

促進効果を確認した。

6. 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金、基盤研究（C）（課題番号：20560070）の支援により行われた。

参考文献

- (1) Tanaka, S.M., et al., Calcified Tissue International, Vol. 76, No. 4, pp. 261-271, 2005
- (2) Maniopoulos, C., et al, Cell and Tissue Research, Vol. 254, pp. 317-330, 1988
- (3) Tanaka, S.M., et al., Journal of Biomechanics, Vol.36, No.1, pp.73-80, 2003
- (4) 垣尾雅文, その他, 日本臨床バイオメカニクス学会誌, Vol.29, pp.187-192, 2008
- (5) Tanaka, S.M., et al., Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 3, No. 3, pp. 332-342, 2008

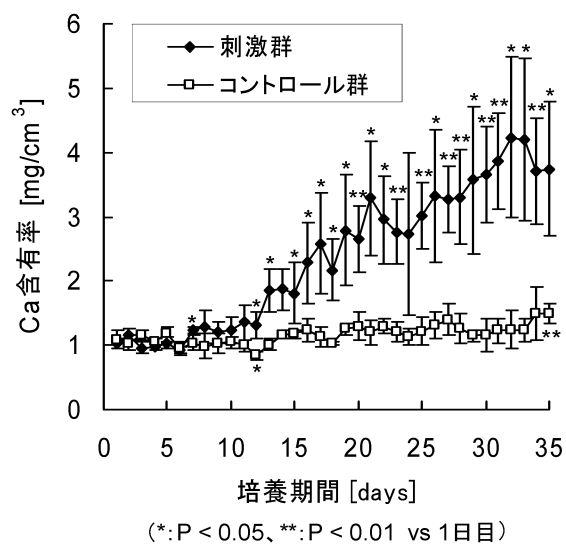


図4 再生骨のCa含有率の変化

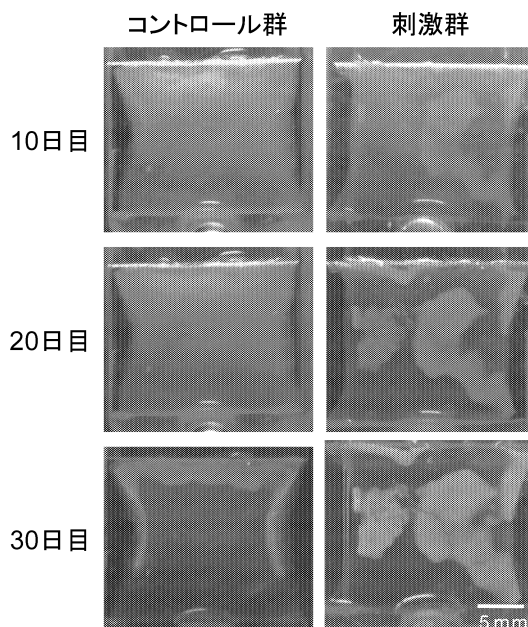


図5 培養10, 20, 30日目の再生骨の接写画像