再生骨石灰化促進における力学刺激効果を評価する簡易光システムの開発

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: 杉浦, 直樹, 田中, 茂雄
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/17002

再生骨石灰化促進における力学刺激効果を評価する簡易光システムの開発

杉浦直樹[1]，田中茂雄[2]
[1]金沢大学工学部人間・機械工学科
[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
N. Sugiura and S.M. Tanaka

Developement of a compact optical sensing system to evaluate mechanical stimulation effect for the promotion of osteoblastic calcification in tissue-engineered bone

1. 緒言

骨の再生医療において，培養再生骨の石灰化を促すためにさまざまな刺激が試みられている．しかしながら，培養下における再生骨の石灰化反応は遅いため刺激の効果を知るには数週間の時間を要する．培養開始より最適な刺激条件で効率的な骨再生促進を行うためには，短時間で刺激効果を評価できる方法の確立が必要である．刺激に対する骨芽細胞の骨形成反応においては，刺激直後に起こる細胞内 Ca^{2+}濃度変化がセカンドメッセンジャーとなり刺激情報の細胞内伝達が起こることが知られている．そこで，刺激効果を短時間で評価する指標として骨芽細胞内の Ca^{2+}動態に着目した．本研究では，発光ダイオード（LED）とフォトダイオード（PD）を利用することで，小型で簡易的な再生骨用細胞内 Ca^{2+}動態観察システムを作製し，同システムを用いて力学刺激に対する再生骨の骨芽細胞内 Ca^{2+}動態を観察することを目的とした．

2. 細胞内 Ca2+動態観察システム

図 1 に本法の原理を示す．骨芽細胞を含む再生骨が，カルシウム蛍光プローブを添加した培地で満たした培養チャンバー内に設置され，LED と PD が再生骨直下に並置されている．LED から照射された励起光により細胞内 Ca^{2+}と結合した蛍光プローブが蛍光を発し，この蛍光を PD が検出する．Ca^{2+}濃度に応じて蛍光強度が変動するため，検出信号の強度変化から細胞内 Ca^{2+}動態がわかる．PD 上にはフィルタが設置され，これにより反射された励起光を遮断して蛍光のみを透過させるように工夫した．本システムでは，蛍光プローブに Fluo4-AM（同仁化学）の使用するため，LED は波長 490nm の光を発するものを，また，フィルタは波長 500 nm 以上の光透過性を有するものを採用した．図 2 にシステム全体の概略を示す．LED の発光強度と発光時間の制御および PD の検出信号の転送は，AD/DA ボードを介して Visual Basic により記述されたプログラムにより行った．図 3 は，本システムの検証のために行ったモデル実験の結果である．実験では 0 ～ 100 μM に調整した $CaCl_2$水溶液と 3 μM の Fluo4 で満たされた培養チャンバー内に担体（I 型コラーゲンスポンジ）を置き，本システムにより蛍光強度の計測を行った．同図に示すように，0 ～ 60 μM の範囲において $CaCl_2$濃度と蛍光強度の正の線形関係が確認され，これと同濃度範囲において本システムの使用が可能であることが検証された．

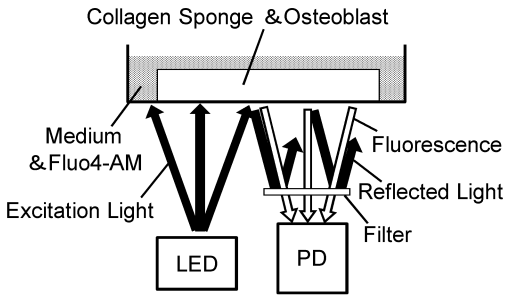

図 1　細胞内 Ca^{2+}動態観察の原理

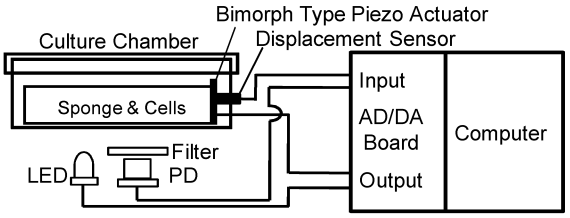

図 2　細胞内 Ca^{2+}動態観察システム

3. 力学刺激により生じる細胞内 Ca^{2+} 動態の観察

マウス頭蓋骨から樹立された骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞をⅠ型コラーゲンスポンジ担体(L 20×W 16×t 2 mm, 孔径約 100 μm) に約 1×10^6 個播種することで再生骨を作製した. 培養 1 日後, 8 μM の Fluo4-AM を添加し 3 時間培養し, その後, 本システムを用いて力学刺激を与えた際に生じる蛍光強度変化を調べた. なお細胞への力学刺激は, ピエゾアクチュエータを用いて最大 0.2%の圧縮変形を正弦波状 (0.8 Hz) に 25 秒間再生骨へ与えることで行った. 図 4 に測定結果の代表例を示す. 刺激開始直後から蛍光強度が上昇し, 約 2 秒後に刺激開始前のレベルにもどる様子が観察された.

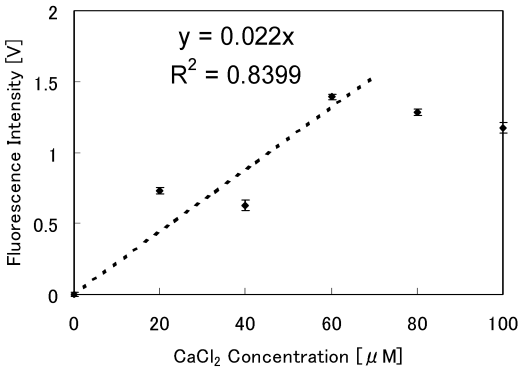

図 3　$CaCl_2$ 濃度と蛍光強度の関係

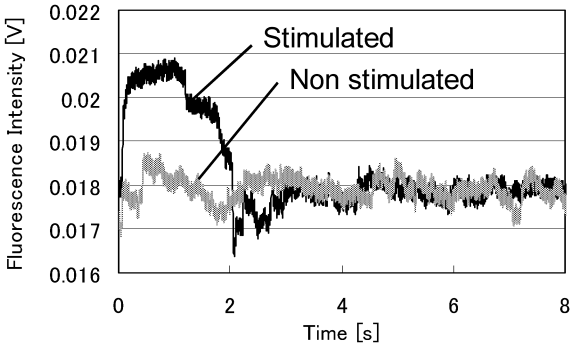

図 4　力学刺激にともなう再生骨の骨芽細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

4. 結言

本研究では,LED と PD を利用した小型で簡易的な再生骨用細胞内 Ca2+動態観察システムを開発した.そして, 本システムを用いることにより, 力学刺激に対する再生骨の反応として骨芽細胞内 Ca2+濃度変化を観察することができた.

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).