8I-11 圧縮負荷を受ける再生軟骨モデル内の物質輸送と組織形成

Material transport and tissue development in engineered cartilage model culture under cyclic compression

正 ○澤江 義則 (九州大学) 正 渡部 正夫 (北海道大学)
正 小俣 誠二 (東北大学) 正 村上 輝夫 (九州大学)

Yoshinori SAWAE, Kyushu University, Motoooka744, Nishi-ku, Fukuoka
Masao WATANABE, Hokkaido University
Seiji OMATA, Tohoku University
Teruo MURAKAMI, Kyushu University

Key words : Engineered Cartilage, Diffusion, Advection, Cyclic Compression, Chondrocyte

1. 緒言

膝や股といった可動関節の表面を覆う関節軟骨は、代表的な無血管組織であり、軟骨組織内部に包埋されている軟骨細胞への物質供給は、拡散等による組織表面から組織深部への物質輸送に頼っている。特に下肢関節面の場合、歩行時に繰り返し荷重を受けるため、それによる組織の圧縮と除荷に起因する移流効果が、組織内の物質輸送の促進と恒常性維持に大きく貢献していると考えられている。

足場材料内にて軟骨細胞を培養し、再生軟骨組織を形成する場合も、培地から足場材料内部の細胞へ十分な物質供給が行われることが、限られた期間に健全な組織を得るために不可欠な要素と考えられる。特に、より大規模な再生軟骨組織の形成を目指す場合には、足場材料内の物質輸送を確保し、培養軟骨細胞に十分な物質供給を行う技術が重要となる。培養中の再生組織への周期的圧縮負荷は、再生組織の形成促進に効果的であることが実験的に示され、実際の再生医療への応用も試みられている。これには、周期的圧縮変形による足場材料内の物質輸送促進効果も、大きく寄与していると考えられる。

本研究では、アガロースゲルを再生軟骨用足場材料のモデルとし、ゲル表面から内部への物質輸送現象を可視化することで、モデルに与えられた圧縮変形が、モデル内での物質輸送に及ぼす影響を定量的に評価することを試みた。また、同様にアガロースを足場材料とし、軟骨細胞を3次元培養した再生軟骨モデルについて、培養期間中に周期的圧縮変形を負荷した結果を併せて示し、圧縮負荷による物質輸送への影響が、足場材料内部での軟骨細胞による組織形成に及ぼす効果について考察した。

2. 実験

2.1 拡散・移流による物質輸送の可視化と定量評価

ここでは、アガロース (Sigma, Ttype VII) 濃度を4wt%に調整した5mm×5mm×5mmの立方体ゲルを再生軟骨モデル試験片とした。この試験片内および周囲液体との界面における物質輸送現象を可視化するため、Fluoresceinで蛍光標識された分子量3kDaのデキストランを用いた。試験片および周囲を満たしたリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 内の蛍光デキストラン分布を、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により得られた蛍光画像から求め、その経時変化から、試験片からのデキストランの流出および試験片への流入を評価した。

ゲルからの流出実験では、まず蛍光デキストラン5μlを含むPBSに試験片を48時間浸漬し、ゲル内部にデキストランを飽和させた。この試験片を蛍光デキストラン無添加のPBSに浸漬し、単純拡散によるゲル内からPBSへのデキストラン流出過程を観察した。ここでは、時系列に取得したCLSM画

像より、ゲル内およびPBS内の輝度分布を求め、その経時変化を関数近似することによりゲル内の拡散係数を導出した⁽¹⁾。また試験片内を積分区間とした輝度値の積分値を求め、浸漬開始時の積分値との差を、試験片から流出したデキストラン量の代表値とした⁽¹⁾。次に、蛍光デキストランを含んだゲルに対し、無添加PBSに浸漬すると同時に20%の圧縮変形を与え、同様の測定を行った。その結果から、圧縮負荷に伴う移流が、試験片からのデキストラン流出量に与える効果を評価した。

ゲルへの流入実験では、蛍光デキストラン5μlを含むPBSに、無処理の試験片を浸漬し、単純拡散によるPBS中からゲル内へのデキストラン流入過程を観察した。ここでは流出実験と同様の手法により、単純拡散によるデキストラン流入時のゲル内拡散係数と、デキストラン流入量を評価した。次に、事前に20%の圧縮変形を与えた試験片をデキストラン添加PBSに浸漬し、浸漬60秒後に圧縮を除荷し、試験片内へのデキストラン流入量に対する圧縮除荷の影響を評価した。

いずれの実験においても、圧縮変形の負荷および除荷には、顕微鏡の試料ステージ上に設置したマイクロ力学試験機⁽²⁾を用いた。

2.2 再生軟骨モデルの圧縮負荷培養

牛中指骨遠位端の軟骨組織から酵素処理によって単離した軟骨細胞を、アガロース (Sigma Type VII) 1wt%ゲルに初期細胞濃度 10^7 cells/mlにて播種し、直径4mm、厚さ2.5mmの再生軟骨モデル試験片を作製した。作製した試験片はすべて、37℃、5%CO₂のインキュベータ内にて24時間静置培養した後、負荷培養群と対照群の二群に分割し実験に用いた。

負荷培養群には、CO₂インキュベータ内に設置した2軸負荷培養装置⁽³⁾を用い、試験片軸方向に15%の圧縮ひずみを周期1Hzにて1日6時間与えながら培養した。6時間の負荷終了後は、圧子が試験片上面に接触した状態を保持し、ひずみを与えない状態で培養を継続した。圧子の試験片上面への接触による影響を評価するため、対照群は試験片上面に別の圧子を接触させた状態で静置培養した。培地にはダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に牛胎児血清 (FBS) を20%添加したものを用い、培養期間中2-3日ごとに交換した。

培養により形成された再生組織の力学特性に対し、培養中の圧縮負荷が与えた影響を評価するため、培養1, 8, 15, 22日目に試験片の圧縮試験を行った。圧縮試験では、円柱形試験片を0.5mm/minの速度にて軸方向に10%圧縮し、得られた応力-ひずみ曲線のひずみ5-10%の領域から最小二乗法により求めた回帰直線の傾きより、接線弾性率 (Tangent modulus) を求めた。また、試験片から切り出した厚さ1mmの切片について、その内部のⅡ型コラーゲンおよびケラタン硫酸を抗体染色法により蛍光標識し、CLSMを用いて形成された再生組織

の形態観察を行った。

3. 結果および考察

図1は、蛍光デキストランの流出実験および流入実験により得られた、単純拡散による試験片内の拡散係数の比較である。流出時と流入時に求めた拡散係数は概ね一致しており、2つの実験で同様な物質輸送特性が得られることを示している。

図2は、単純浸漬による流出実験におけるデキストラン流出量の経時変化と、圧縮負荷を与えた流出実験におけるデキストラン流出量の経時変化を比較したものである。試験片への圧縮負荷から180秒程度の間、圧縮負荷を与えた実験における流出量が、単純浸漬実験での値を上回っており、圧縮変形に起因する移流により、ゲルからのデキストラン流出が促進された事を示している。流入実験における、圧縮除荷の有無によるデキストラン流入量の相違を図3に示す。浸漬開始から除荷までの結果より、事前に20%の圧縮変形を与えられた試験片へのデキストラン流入量は、無負荷試験片への流入量と比較し小さくなる事がわかる。しかし、除荷と同時に流入量が大きく増加し、その後は単純拡散と同様の傾向を示

Fig.1 Comparison of diffusion coefficient inside the engineered cartilage model between Outflow and Inflow experiments.

Fig.2 Effect of compressive loading on the amount of dextran outflow from the engineered cartilage model.

Fig.3 Effect of unloading on the amount of dextran inflow to the engineered cartilage model.

した。

図4はPBSへの浸漬と同時に圧縮負荷を与え、その後30秒間隔で圧縮変形の負荷と除荷を繰り返した際の、デキストラン流出量の経時変化を、単純浸漬時の結果と比較したものである。この様に、デキストラン流出量は負荷時よりも、むしろ除荷時に著しく増加していることがわかる。これは、除荷により周囲のPBSが試験片内に流入するため、見かけ上のデキストラン流出量が増加した結果と考えられる。この様に、再生軟骨モデルへの周期的圧縮負荷は、圧縮時にモデルからの物質の排出を促すとともに、除荷時に外部からモデル内への物質導入を促進し、結果としてモデル内の物質輸送量を著しく増加させることが実験的に示された。

再生軟骨モデルの培養実験において、培養後の再生軟骨モデルの接線弾性率を、圧縮負荷培養群と対照群の間で比較した結果を図5に示す。対照群では、培養日数の増加に伴う有意な弾性率の上昇が認められなかったのに対し、15%圧縮負荷培養群では、培養に伴う有意な弾性率の上昇が認められ、培養22日目において負荷培養群の接線弾性率が、対照群と比較し優位に高くなった。この時、圧縮負荷培養群のモデル内部では、対照群と比較しコラーゲン線維によるネットワーク構造が顕著に発達していることが蛍光観察により確認された。ここで示した2つの実験の間では、ゲル濃度や負荷条件に違いがあるものの、圧縮負荷による再生軟骨モデル内の物質輸送の促進は、圧縮負荷培養後のモデルに見られた組織構造の発達にも何らかの寄与を与えたと考えられる。

本研究は科研費(20360078)の助成を受けたものである。

参考文献

(1) 野林 他：第21回バイオエンジニアリング講演会論文集、(2009) 199-200. (2) 坂井 他：日本臨床バイオメカニクス学会誌、Vol. 26 (2005) 59-63. (3) 花木 他：日本機械学会 2005年度年次大会講演論文集 Vol. 5、(2005) 211-212.

Fig.4 Effect of cyclic compression on the amount of dextran outflow from the engineered cartilage model.

Fig.5 Effect of 15% cyclic compression loading during the culture period on the tangent modulus of engineered cartilage models.