A219 力学的刺激により促進される培養再生骨の石灰化 —播種細胞密度と担体素材の影響—

Mechanically-stimulated osteogenesis of regenerated bone *in vitro* —Effect of cell seeding density and scaffold material—

○学 橋 孝平 (金沢大院) 正 田中茂雄 (金沢大院)

Kohei TACHIBANA, Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan
Shigeo M. TANAKA, Kanazawa University

Key Words: Bone, Osteoblast, Calcification, Mechanical stimulation, Tissue engineering

1. 緒言

患者から採取した細胞を用いて作製された培養再生骨は優れた生体適合性と生体骨と同等の力学的特性を有する人工骨としての利用が期待される。しかし、十分な石灰化度の培養再生骨を得るためには長期間の培養が必要であり、現在、自発的な骨芽細胞の石灰化により生体骨と同等の石灰化度を有する培養再生骨を実現出来た例はない。その実現には、培養再生骨の石灰化を高い効率で促進する培養法の確立が必要不可欠と言える。再生骨には骨芽細胞、培養担体、石灰化促成因子の三要素が必要であるが、我々はこれまで石灰化促成因子として力学的刺激に着目し、その力学的刺激が有効な石灰化促進効果があること、また多孔質担体へコラーゲンを充填することでその効果が高められることを示してきた⁽¹⁾。本研究では、力学的刺激の石灰化促進効果を高める因子として播種細胞密度と担体素材に着目し、これらの因子が与える力学的刺激の石灰化促進効果への影響を調べることを目的とした。得られた結果より、どのような細胞密度および担体素材の条件により力学的刺激の効果を高められるかについて検討した。

2. 実験方法

2. 1. 培養再生骨

Sprague-Dawley (SD) ラット (メス、8 週齢) の大腿骨および脛骨より採取した骨髄の中に含まれる間葉系幹細胞を培養し、骨芽細胞へ分化した細胞を回収して実験に用いた。骨芽細胞を濃度 1 mg/ml の I 型コラーゲンゲル (新田ゼラチン、Cellmatrix, Type I-A) に均一に分散させ、これをスポンジ状担体へ浸透させることで再生骨を作成した。播種細胞密度は、1600 cells/mm³ または 6900 cells/mm³ とし、また、担体素材として I 型コラーゲンスポンジ (Zimmer dental, Colla Cote) またはメラミンスポンジ (エー・シーケミカル、AC スポンジ M) を用いた。なお、両担体ともに外寸は L16×W20×t2 mm である。力学的刺激を与える群と与えない群 (コントロール) に分けることで計 8 グループを用意した (表 1)。

2. 2 力学的刺激および石灰化モニタリング

培養再生骨への力学的刺激は、ピエゾアクチュエータを利用した力学的刺激装置⁽²⁾を用いて行った。本研究では、培養期間中 1 日 1 回 3 分間、再生骨に対して最大 0.2% の正弦波状圧縮負荷を 0.8Hz で与えた (図 1)。なお、アクチュエータの変位は、うず電流式変位センサで非接触的に検出される信号を使いフィードバック制御された。培養再生骨の石灰化度の変化は、近赤外光 LED とフォトダイオードを利用した光学装置⁽³⁾を用いて非破壊的にモニタリングした。培養チャ

ンバー直下に設置した装置で検出される、反射・散乱光強度信号から培養再生骨の石灰化度を担体密度 (外寸体積当たりの乾燥重量、mg/cm³) または Ca 含有率 (外寸体積当たりの Ca 含有量、mg/cm³) として評価した。石灰化度評価は 1 日 1 回とし、播種細胞密度が 1600 cells/mm³ の群では 19 日間連続、6900 cells/mm³ の群では 25 日間連続で実施した。

Table.1 Experimental groups

Scaffold material	Physical treatment	Cell seeding density (cell/mm ³)	
		1600	6900
Collagen	Control	CC16 (n=3)	CC96 (n=2)
	Stimulated	CS16 (n=3)	CS96 (n=2)
Melamine	Control	MC16 (n=3)	MC96 (n=2)
	Stimulated	MS16 (n=3)	MS96 (n=2)

Fig.1 Mechanical stimulation to a scaffold populated with rat osteoblasts. The white bar is a scale of 10 mm.

3. 結果

培養期間に伴う各群の石灰化度変化を図 1 に示す。播種細胞密度 1600 cells/mm³ の再生骨では、いずれの群においても培養期間内において顕著な石灰化度の増加は見られなかった (図 1 a)。一方、播種細胞密度 6900 cells/mm³ の再生骨に

おいては、コラーゲンスポンジ担体で8日目以降、メラミンスポンジ担体で培養6日目以降で、刺激群（CS69 および MS69）の石灰化度がコントロール群（CC69 および MC69）のそれに対し有意に増加した（図1b）。また、培養18日目以降で、コラーゲンスポンジ担体を用いた再生骨の刺激群（CS69）の方がメラミンスポンジ担体を用いた再生骨の刺激群（MS69）よりも有意に高い石灰化度を示した。播種細胞密度が1600 cells/mm³の場合、コラーゲンスポンジ担体を用いた再生骨では、力学的刺激を与えることにより最終的にCa含有率が約1.05倍に増加し、メラミンスポンジ担体を用いた再生骨では約1.04倍に増加した（有意差なし）。一方、播種細胞密度が6900 cells/mm³の場合、コラーゲンスポンジ担体を用いた再生骨では、力学的刺激を与えることで最終的にCa含有率が有意に約1.78倍増加し、メラミンスポンジ担体を用いた再生骨では有意に約1.27倍増加した。培養最終日におけるコラーゲンスポンジ担体を用いた再生骨の刺激群のCa含有率は、メラミンスポンジ担体を用いた再生骨の刺激群のそれよりも有意に約1.66倍大きかった。図3に培養20日目における再生骨の代表的な接写画像を示す。播種細胞密度1600 cells/mm³のどの再生骨においても石灰化を示す白色領域がほとんど見られないものの、播種細胞密度6900 cells/mm³の再生骨では刺激群においてより濃い白色領域が確認できた。またどちらの播種細胞密度においても、コラーゲンスポンジは収縮しているのに対してメラミンスポンジは収縮しなかった。

4. 考察

以上の結果は、力学的刺激による石灰化促進効果を得るには一定以上の細胞密度が必要であることを示している。すなわち骨芽細胞の密度が低いと、高い力学的刺激への感度を持つ骨細胞への分化が進まず、力学的刺激の石灰化促進効果が現れにくいと考えられる。播種細胞密度が6900 cells/mm³の群においても、力学的刺激による石灰化促進効果が現れるまでに細胞播種から6日から8日を要しているが、この期間では骨細胞への分化に必要な密度までの骨芽細胞の増殖が起きていると推察される。コラーゲンスポンジ担体を用いた再生骨で見られた収縮は、骨芽細胞の引張り牽引力によるものであり、局所的な細胞密度を高める効果がある。これにより、この再生骨においてより高い力学的刺激効果が得られたと考えられる。一方、メラミンスポンジ担体はコラーゲンスポンジ担体より硬いため、細胞による担体収縮がほとんど見られなかった。このため、担体収縮による細胞密度の上昇が起これず、このことがメラミンスポンジ担体を用いた再生骨における力学的刺激効果が顕著ではなかった原因と考えられる。

5. 結言

本研究では、力学的刺激による培養再生骨の石灰化促進効果に与える播種細胞密度と担体素材の影響を調べた。その結果、播種細胞密度1600 cells/mm³の再生骨では刺激効果が見られず、6900 cells/mm³の密度で刺激効果が見られた。また、メラミンスポンジよりもコラーゲンスポンジを用いた再生骨の方が力学的刺激による石灰化促進効果が高かった。今後、より高い細胞密度や、他の担体素材を用いて本研究結果の検証を行う必要がある。

参考文献

- (1) 田中茂雄, 臨床バイオメカニクス, Vol.36, 2010 *in press*
- (2) Tanaka, S.M., et al., J Biomech, Vol.32: pp.427-430, 1999
- (3) Tanaka, S.M., et al., J Biomech Sci Eng, Vol.3:pp.332-342,

2008

Fig.2 Change in the bulk density and the Ca content of tissue-engineered bone over the culture period. (a) Seeding cell density: 1600 cells/mm³, (b) 6900 cells/mm³. †p < 0.05, ††p < 0.01, †††p < 0.001 (CC69 vs. CS69), ‡p < 0.05, ‡‡p < 0.01 (MC69 vs. MS69). *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (CS69 vs. MS69).

Fig.3 Close-up picture of tissue-engineered bones on day20.