Effect of surface charge on rat bone marrow cell differentiation

学 ○古谷 桂樹 (同志社大) 正 森田 有亮 (同志社大)
 正 田中 和人 (同志社大) 正 片山 傳生 (同志社大)
 正 仲町 英治 (同志社大)

Keiju FURUYA, Doshisha University, 1-3 Tatara-Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto

Yusuke MORITA, Kazuto TANAKA, Tsutao KATAYAMA and Eiji NAKAMACHI, Doshisha University

1 緒 言

現在、骨欠損の一般的な治療法として骨置換材を用いた人工骨移植術が用いられている。人工骨移植術は、術後の回復に時間を要するため、治療期間の短縮が求められている。骨細胞の増殖や骨置換材への接着を向上させることによって骨形成を促進させるため、骨置換材の表面性状や材料構造などの改良が試みられている。一方、骨の圧電特性および骨内で生じる流動電位が骨代謝に寄与していることから、物理刺激として電気刺激を用いて骨細胞の接着と増殖を向上させる研究が行われてきた。このことから、骨置換材への電気特性の付与が骨形成を促進させる有効な手段であると考え、骨置換材として無鉛圧電材料チタン酸バリウム(BTO)に着目した。BTOを骨置換材として用いるため、表面電荷が骨髓細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす影響を評価する必要があると考えられる。本研究の目的は繰り返し圧縮ひずみを負荷した BTO 表面に発生した電荷が骨髓細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす影響を評価することである。

2 実験方法

F344 フィッシャーラットの大腿骨より採取した骨髓細胞を 3.0×10^4 cells/well で培養 dish に播種して培養を行った。培養 dish は両端の SUS316 プレートと細胞を培養するための溝を設けたポリカーボネイト(PC)で構成されている。BTO 基材に片振りの繰り返し圧縮ひずみを負荷すると、BTO 表面に両振りの電位が生じる。そのため、本研究では、表面電荷密度 σ_{p-p} として $(-2.1)-1.5$ 、 $(-4.2)-2.9$ および $(-6.3)-4.4$ $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ に帯電させた BTO 基材上で骨髓細胞の培養を行うために、BTO 基材に 68, 180 および 235 $\mu\text{ε}$ の繰り返し圧縮ひずみを疲労試験機により負荷した。過去の研究において、細胞の接着や増殖に細胞が接着している材料のひずみが影響することが報告されている。本研究で与えたひずみの影響を調べるため、培養 dish の片側の well に BTO 基材を設置し、もう一方には BTO 基材を設置せず PC 上で骨髓細胞を培養した。培養液には骨髓細胞の骨芽細胞への分化を促進させるため、抗生物質、10%牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium に 10^{-8} M のデキサメサゾン、10 mM の β -グリセロリン酸および 82 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸を加えた分化培地を用いた。培養液の交換は 2 日毎に行い、10 日間培養した。培養終了後、界面活性剤 nonidet(300 $\mu\text{l}/\text{well}$) により細胞およびその生成物を回収した。回収したサンプルの DNA 量、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、Ca 量をそれぞれ測定した。

3 結果および考察

図 1, 2 に BTO 基材上および PC 上で培養を行った DNA

量、単位 DNA 当りの ALP 活性および Ca 量の測定結果を示す。圧縮ひずみを与えた BTO 基材および PC 上で培養した骨髓細胞の DNA 量、単位 DNA 量当りの ALP 活性および Ca 産生量は、それぞれ刺激を与えない場合の値で正規化した。Nakamura らは、分極処理した HA の表面電荷が骨細胞を刺激し、活性化すると報告している。本研究において、電荷刺激を与えた骨髓細胞の ALP 活性および Ca 産生量ともに、電荷刺激を与えない場合より上昇している。このことから、BTO 基材表面に生じた電荷が骨髓細胞を活性化し、骨芽細胞への分化を促進することが示唆された。一方、福永らは 1000-3000 $\mu\text{ε}$ のひずみが骨髓細胞を活性化させると報告している。このことから、本研究においても BTO 基材のひずみが骨髓細胞の骨芽細胞への分化に影響を及ぼす可能性が考えられる。180 $\mu\text{ε}$ のひずみを与えた PC 上で培養した骨髓細胞の ALP 活性値がひずみを与えなかった場合に比べ 10%上昇したものの、いずれのひずみにおいても電荷刺激を与えた骨髓細胞の ALP 活性は PC 上で培養した場合より上昇している。180 $\mu\text{ε}$ および 235 $\mu\text{ε}$ のひずみを与えた PC 上で培養した Ca 産生量は、ひずみを与えなかった場合に比べ 8 および 19%上昇した。しかし、ALP 活性と同様にいずれの場合も電荷刺激を与えた場合の Ca 産生量が PC 上で培養した場合より上昇した。このことから、BTO 基材に生じた表面電荷が骨髓細胞の骨芽細胞への分化を促進することが示唆された。

参考文献略

Fig. 1 DNA amount, ALP activity and Ca amount for bone marrow cells cultured on BTO plate for 10 days cultivation.

Fig. 2 DNA amount, ALP activity and Ca amount for bone marrow cells cultured on PC for 10 days cultivation.