

人工軟骨－骨組織創製のための組織工学に基づく磁場刺激装置の 開発

Development of magnetic stimulator based on tissue engineering for artificial
cartilage-bone tissue

荒平高章*, 石田敬雄**
Takaaki Arahira* and Norio Ishida**

*福岡歯科大学口腔歯学部, 〒814-0193 福岡県福岡市早良区田村 2-15-1

**ストレックス株式会社, 〒542-0081 大阪府大阪市中央区南船場 2-7-14 大阪写真館

*Department of Dental Engineering, Fukuoka Dental College
2-15-1 Tamura, Sawara-ku, Fukuoka 814-0193 Japan

**Strex Inc.

Osaka Shashin Kaikan, 2-7-14 Minamisemba, Chuo-ku, Osaka, 542-0081 Japan

Abstract

In our study, magnetic stimulator was developed to fabricate artificial cartilage-bone tissue in vitro. Rat bone marrow mesenchymal stem cells (rMSC) were cultured in culture plate under magnetic stimulus at 1 min/day for up to 7 days in order to assess the effect of cell growth behavior. The results of magnetic culture exhibited higher cell number and ALP activity than those of static culture.

Keywords: tissue engineering, magnetic stimulus, bone tissue, cartilage tissue

1. はじめに

近年, 再生医療に関する研究が盛んに行われており, 特に骨・軟骨再生分野では足場材と細胞による人工組織を生体外で構築し, 患部に再生培養骨・軟骨組織を移植する再生療法が臨床応用されている¹⁾²⁾. しかし, 未だ生体外での人工組織構築には時間を要するのが現状であり, いかに短時間で人工組織を構築できるかが重要である. また, 再生培養骨・軟骨組織移植に関する報告はあるものの, 周囲組織の力学特性と同様の組織を構築するには至っておらず, 周囲組織との力学的適合性を有する人工組織の構築も大きな課題となっている. これら2つの問題を解決するためには, 組織工学における3要素「足場材」, 「細胞」, 「成長因子」に対するアプローチが考えられる. 特に, 足場材の高機能化と細胞の高活性化に関する研

究は非常に多くなされており, その一方で成長因子に関する研究の歴史は浅い. 近年, 足場材に骨形成タンパク質や軟骨細胞分化誘導因子を付与する, いわゆるドラッグデリバリー(Drug Delivery System)に関する研究³⁾, 足場材や細胞に「刺激」を与える研究⁴⁾が盛んに行われている.

そこで, 本研究では, 人工軟骨－骨様組織構築のための磁場刺激装置の開発を目的とし, その装置開発と並行して, 人工軟骨－骨様組織構築のための磁場刺激の最適化を行う. 本報告では, 磁場刺激装置の作製とそれを用いた二次元培養実験結果を概説する.

2. 実験方法

2.1 磁場刺激装置の作製

本実験を行うための磁場刺激装置を試作した.

磁場刺激部はインキュベータ内で使用可能にするため、ステンレス製とし滅菌後使用できるようにした。磁場刺激部は直接コイルに接続できるようにしてあり、自由に電流値を変えることで磁場強度を変更できる。磁場刺激部には、培養ディッシュ(35×10 mm)が1枚設置できる。

2.2.2 次元細胞培養実験

作製した磁場刺激培養装置を用いて細胞培養実験を行った。細胞はラット骨髄由来間葉系幹細胞を使用した。培養ディッシュ(35×10 mm)に 1×10^4 播種し、1日間前培養を行い、翌日骨芽細胞分化培地、軟骨細胞分化培地に交換し培養を行った。分化培地に交換後、1, 3, 7日に回収し、プレートリーダーで細胞数を、骨芽細胞分化については3, 7日にALP活性を測定した。分化培地に交換後、1日1分10Vの電圧をかけて刺激を与えた。磁場刺激と比較するため、静置培養をコントロールとした。

3.結果と考察

作製した磁場刺激装置は、細胞培養実験にインキュベータ内(37°C, 5% CO₂)で使用しても問題なく動作していた。特に100%湿潤環境にも十分耐える装置であった。

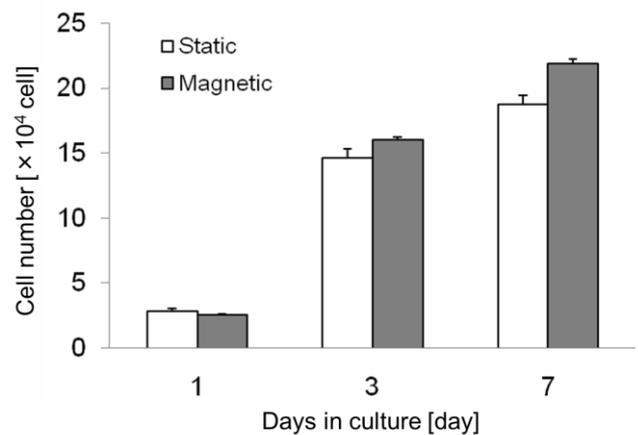
図1に細胞数の結果を示す。骨芽細胞数は培養7日まで増加している。培養群で比較すると、静置培養よりも磁場刺激を与えた群で細胞数が多かった。他方、軟骨細胞数は培養3日で減少傾向を示したものの、培養7日では再び増加した。しかし、軟骨細胞数に関して、静置培養と磁場刺激培養群で有意差はなかった。以上のことから、本実験で採用した磁場強度は、骨芽細胞の増殖に有効であるが、軟骨細胞の増殖には効果を示さなかった。

図2に骨芽細胞培養におけるALP活性の測定結果を示す。ALP活性は初期の骨芽細胞分化指標として様々な研究で測定されている。測定結果より、培養日数経過に伴い、静置培養群、磁場刺激培養群の双方において増加傾向を示していた。しかし、群の間で比較すると静置培養群より磁場刺激培養群の方が高いALP活性値を示しており、磁場刺激が骨芽細胞分化をより促進したと考えられ

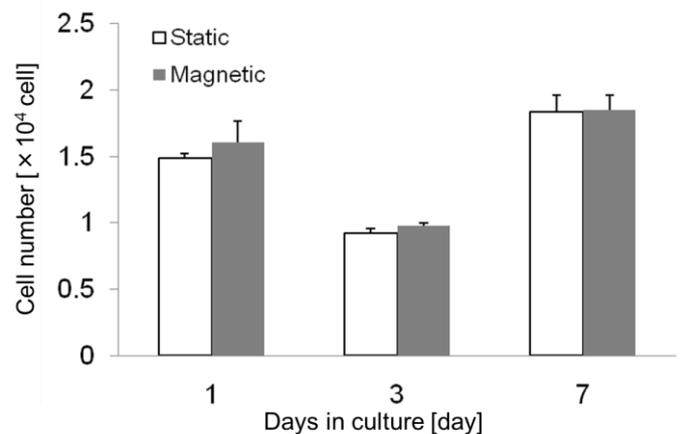
る。

これらの結果より、本実験で用いた磁場強度は骨芽細胞増殖・分化には効果的であるが、軟骨細胞の増殖には効果を示さないことが分かった。

現行装置では磁場強度は制御可能であるが、磁場刺激形態の変更ができない。そこで、磁場刺激部とコイルの間に磁場方向の調節を行えるように制御装置を追加した。今後の方針としては、磁場強度のパラメータを増やし、骨芽細胞だけでなく、軟骨細胞増殖に効果のある磁場強度を探索していきたい。さらに、経時的に磁場刺激方向を変化させることで、細胞への応答を見ていきたい。さらに、2次元培養を3次元培養に拡張し、作製した装置の有用性について継続的に評価していきたい。



(a) Osteoblastic differentiation medium



(b) Chondrogenic differentiation medium

Fig.1 Variation of cell number.

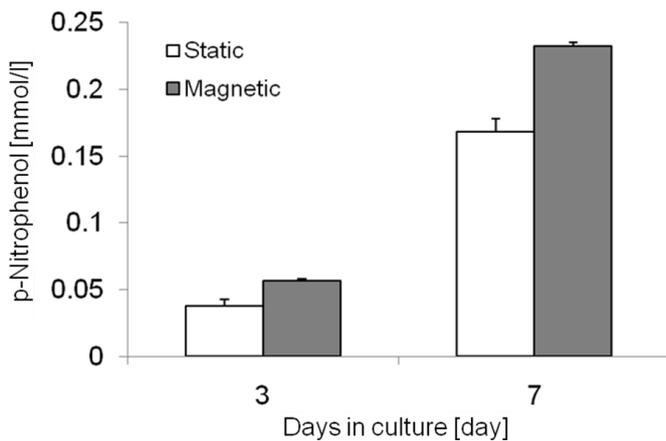


Fig.2 Variation of ALP activity

謝辞

この研究は公益財団法人磁気健康科学研究振興財団の補助を受けて実施したものである。

参考文献

- 1) Morishita T et al.: Tissue engineering approach to the treatment of bone tumors: Three cases of cultured bone grafts derived from patients' mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 30: 115-118, 2006.
- 2) Ichinose S et al.: Comparative sequential morphological analyses during in vitro chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels. *Medical Molecular Morphology* 46: 24-33, 2013.
- 3) Zhang J et al.: RhBMP-2-loaded calcium silicate/calcium phosphate cement scaffold with hierarchically porous structure for enhanced bone tissue regeneration. *Biomaterials* 34: 9381-9392, 2013.
- 4) Liu C et al.: Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials* 33: 1052-1064, 2012.
- 5) Wei K et al.: Fabrication of nano-hydroxyapatite on electrospun silk fibroin nanofiber and their effects in osteoblastic behavior. *J Biomed*