

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560091

研究課題名(和文) 骨細胞再生のためのポリ乳酸・圧電材料3次元構造スキャホールドの開発

研究課題名(英文) Development of three-dimensional polylactic acid-piezoelectric material scaffold

研究代表者

片山 博生 (KATAYAMA TSUTAO)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：70161065

研究成果の概要(和文)：

BaTiO₃ (BTO) の圧電効果の影響を検討するために、疲労試験機に取付けひずみを負荷しながら材料表面上で骨髄細胞を培養できる培養器を開発した。繰り返し圧縮ひずみを負荷した BTO 基材上で骨髄細胞を培養すると、BTO 表面に発生した電荷刺激により骨髄細胞の 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た。これより、BTO 表面に生じた電荷が骨髄細胞を活性化し、骨芽細胞への分化を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

A cultivation system was designed to evaluate piezoelectric effects of the BaTiO₃ (BTO) ceramics on bone marrow cells, and rat bone marrow cells seeded on surfaces of the BTO ceramics were cultured in culture medium. ALP activity on the charged BTO surface was slightly higher than that on the non-charged BTO surface. The amount of calcium on the charged BTO surface was also higher than that on the non-charged BTO surface. These results showed that the electric charged BTO surface enhanced osteogenic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料・材料力学

キーワード：①生体材料 ②圧電材料 ③足場材料 ④骨髄細胞 ⑤骨分化

1. 研究開始当初の背景

関節疾患や骨折等の骨損傷に対し広く使用される人工関節材料や骨代替材に対して、骨再生を促進させる表面形態や表面処理の開発が進んでいる。しかし、患者の早期社会復帰を考えると骨欠損部の再生をさらに短期間に行うという現実的な要求があり、生体

内の骨欠損部に移植する組織再生用足場(スキャホールド)に対する開発要求は非常に高い。これらの骨芽細胞活性促進のためのスキャホールド開発における主要課題のひとつは、生体内から供給される骨髄細胞から骨芽細胞への分化促進と骨芽細胞の活性向上を生体骨の持つ生理学的特性より理解し、その

特性を反映した再生促進機能を有するスキャホールドの開発にある。骨の再生はミクロとマクロの間であるメゾスケールの骨芽細胞・破骨細胞の動的再構成運動により、定常的に促進されている。PLA やハイドロキシアパタイト (HAp) を用いたスキャホールドの試作と *in vitro* 実験による細胞再構成運動の実験観察は数多く見受けられ、PLA・HAp・コラーゲン複合材料をスキャホールドとする骨細胞層増殖・置換の基礎的実験研究が行なわれている。HAp を混合することで、骨芽細胞の密着性を良くする生体活性効果を狙ったものであるが、能動的な骨細胞増殖を狙ったものではない。一方、骨再生の促進を能動的に活性化しようとする研究としては、繰返し荷重負荷の効果を検討するもの、あるいは固定具による骨折部の治療の際に外部から骨折部へ電界負荷を行い、骨欠損部の再生促進の効果を検討するものなどが存在する。また、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。しかし、日常運動に伴う材料からの電氣的刺激による骨芽細胞分化促進に対する系統的な研究はなされていない。

2. 研究の目的

(1) 繰返し圧縮負荷培養装置の開発

圧電材料を用いた 3 次元スキャホールドの開発のためには、*in vitro* においてひずみを圧電材料に負荷しながら材料上で細胞培養が可能な培養装置が必要となる。本課題の目的は、細胞培養に適した環境を維持し、細胞を播種した圧電材料に繰返しひずみを負荷することが出来る培養装置を開発することである。

(2) 骨髄細胞の骨芽細胞分化に及ぼす電荷刺激の影響

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、表面電荷が骨髄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。本課題の目的は繰返し圧縮荷重を負荷した BTO 表面に発生した電荷が骨髄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。

3. 研究の方法

(1) 繰返し圧縮負荷培養装置の開発

BTO 基材に細胞を播種し、基材に繰返し圧縮荷重を負荷しながら培養するために、培養 dish および培養器を製作した。培養 dish の概略図を図 1 に示す。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。骨髄細胞の増殖および骨分化へ BTO 基材の圧縮ひずみの影響が及ぶ可能性が考えられる。

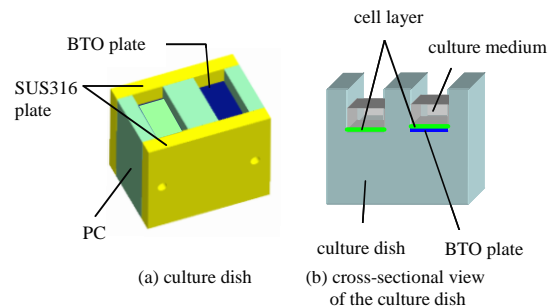


図 1 培養 dish の概略図

そこで、本実験で与えたひずみの影響を調べるため、培養 dish の 2 つの well の片側に BTO 基材を設置し、もう一方には BTO 基材を設置せず、well に細胞を播種して実験を行なえるよう設計した。培養 dish を図 2 に示すように培養器の上段および下段へ 3 つずつ設置する。

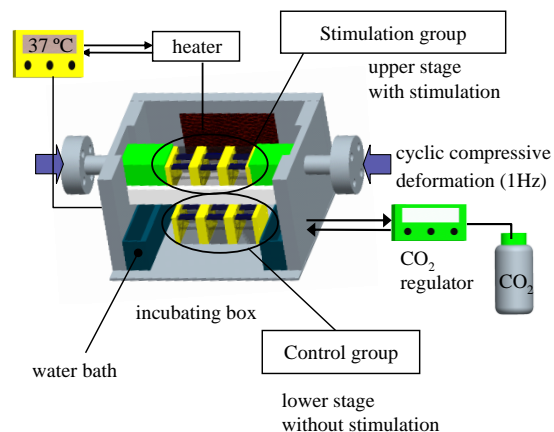


図 2 培養器の概略図

上段の培養 dish には油圧式横型疲労試験機 (SHIMADZU) を用いて繰返し圧縮荷重を負荷しながら、また下段に設置した培養 dish では圧縮荷重を負荷せず、骨髄細胞を培養する。培養 dish に繰返し圧縮荷重を負荷することで細胞を播種した BTO 基材に圧縮ひずみを与える。培養器内の環境は、市販の CO₂ インキュベータと同様に 37°C、CO₂ 5%、湿度約 100% に維持する。

培養 dish および培養器の細胞培養環境を検証するために、培養 dish に細胞を播種し、自作培養器と市販の培養器 (MC0-18AIC, SANYO) で培養を行い、細胞の増殖を比較した。また、自作培養器の上下位置により細胞の増殖に影響がないことを確認するために、上段と下段における骨髄細胞の培養を行った。生

後7週齢の雄フィッシャーラットの大腿骨より採取した骨髓細胞を用いた。培養 dish に 5.0×10^5 cells/well の細胞密度で骨髓細胞を播種し、圧縮負荷は加えず8日間培養を行った。培養液の交換は2日毎に行った。骨分化培養液として10 nM デキサメサゾン、10 mM β -グリセロリン酸および82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸を添加した培養液を用いた。培養終了後、界面活性剤を用いて細胞およびその生成物を回収しDNA量を測定した。

(2) 骨髓細胞の骨芽細胞分化に及ぼす電荷刺激の影響

細胞を播種する基材として圧電特性を有するBTO焼結材(村田製作所)を用いた。BTO基材形状は横10 mm, 縦20 mm, 厚さ1 mmとした。圧電定数 d_{31} は-44 pm/V, 弾性率Eは104 GPaであった。

生後7週齢の雄フィッシャーラットの大腿骨より採取した骨髓細胞を用いた。

BTO基材に片振りの繰り返し圧縮荷重を負荷すると、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} (-2.1)-1.5, (-4.2)-2.9および(-6.3)-4.4 $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ に帯電した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負荷した。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。本研究で与えたひずみの影響を調べるため、培養dishの2つのwellの片側にBTO基材を設置し、もう一方にはBTO基材を設置せず、wellに 3.0×10^4 cells/well で骨髓細胞を播種して実験を行った。培養液には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 nM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、界面活性剤を入れ、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。

4. 研究成果

(1) 繰り返し圧縮負荷培養装置の開発

本研究で開発した培養器を用いてラット骨髓細胞を培養し、本装置の培養環境の検証を行なった。開発した培養器の上段および下段と市販の培養器で培養した8日間後のDNA量の測定結果を図3に示す。自作の培養器上段および下段と市販の培養器で培養した骨髓細胞のDNA量に有意な差はなかった。これより、開発した培養器内の環境は細胞の増殖を阻害せず、本装置を用いて適切に圧電材

料の電荷刺激が骨髓細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を評価できることがわかった。

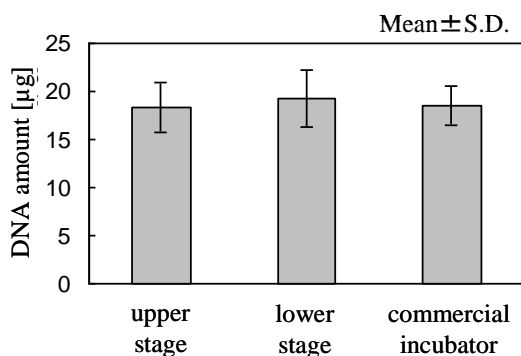


図3 培養器および市販インキュベータで8日間培養したラット骨髓細胞のDNA量

(2) 骨髓細胞の骨芽細胞分化に及ぼす電荷刺激の影響

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量の測定結果を図4および図5に示す。

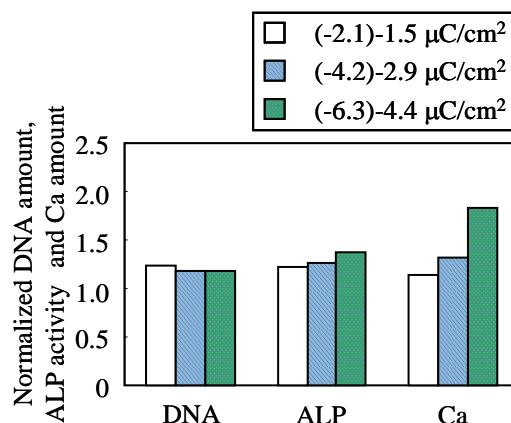


図4 BTO上で10日間培養したラット骨髓細胞のDNA量、ALP活性およびCa量

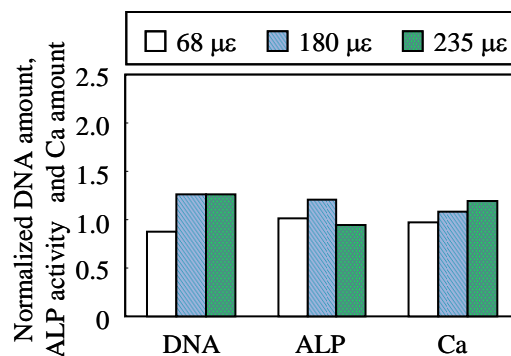


図5 ポリカーボネイト上で10日間培養したラット骨髓細胞のDNA量、ALP活性およびCa量

圧縮負荷を与えた BTO および PC 上で培養した骨髄細胞の DNA 量, 単位 DNA 量当りの ALP 活性値および Ca 産生量を, 圧縮負荷を与えない場合の値でそれぞれ正規化した. 本研究において, 電荷刺激を与えた骨髄細胞の 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 表面に生じた電荷が骨髄細胞を活性化し, 骨芽細胞への分化を促進することが示唆された. 一方, PC 上で培養した骨髄細胞の ALP 活性値は 180 $\mu\text{ε}$ のひずみを与えた場合, ひずみを与えなかった場合に比べ 10% 上昇した. しかし, BTO 上で培養した場合, いずれの場合も PC 上で培養した場合より上昇している. また, 180 $\mu\text{ε}$ および 235 $\mu\text{ε}$ のひずみを負荷した PC 上で培養した Ca 産生量は, ひずみを負荷しない場合に比べ 8 および 19% 上昇した. しかし, BTO 上で電荷刺激を与えた場合, ALP 活性と同様にいずれの場合も PC 上で培養した場合より上昇した. このことから, BTO 基材に生じたひずみよりも BTO 基材に生じた表面電荷が骨髄細胞の骨芽細胞への分化を促進することが示唆された.

これらの結果より, 既存の骨置換材や scaffold に BaTiO₃ 薄膜コーティングを施すことで, 生体内において骨置換材と生体骨との接着が促進されることが期待される.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 古谷桂樹, 森田有亮, 田中和人, 片山傳生, 仲町英治, ラット骨髄細胞の骨分化に及ぼす表面電荷の影響, 日本機械学会関西支部第 86 期定時総会講演会, 2011 年 3 月 19 日, 京都府京都市
- ② K. Furuya, Y. Morita, K. Tanaka, T. Katayama, E. Nakamachi, Acceleration of osteogenesis by using barium titanate piezoelectric ceramic as an implant material, International Society for Photo-optical Instrumentation Engineers(SPIE) Smart Structures/NDE, 2011/3/8, San Diego, USA
- ③ 古谷桂樹, 森田有亮, 田中和人, 片山傳生, 仲町英治, 骨置換材の表面電荷によるラット骨髄細胞の骨分化促進に関する研究, 第 23 回バイオエンジニアリング講演会, 2011 年 1 月 8 日, 熊本県熊本市
- ④ Y. Tateyama, Y. Morita, K. Tanaka, T. Katayama, E. Nakamachi, Effects of BaTiO₃ piezoelectric thin film coating on bone marrow cell, Asian Pacific Conference for Materials and Mechanics, 2009/11/14, Yokohama
- ⑤ 立山優貴, 森田有亮, 古谷桂樹, 田中和人,

片山傳生, 仲町英治, BaTiO₃ 圧電薄膜が骨髄細胞に及ぼす影響, 日本機械学会 2009 年度年次大会, 2009 年 9 月 14 日, 岩手県盛岡市

- ⑥ Y. Tateyama, Y. Morita, K. Tanaka, T. Katayama, E. Nakamachi, Effects of BaTiO₃ piezoelectric thin film coating on activity of rat bone marrow cell, Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress, 2009/9/8, Munich, German
- ⑦ 立山優貴, 森田有亮, 田中和人, 片山傳生, 仲町英治, 圧電材料チタン酸バリウムが骨髄細胞の活性に与える影響, 2009 年度砥粒加工学会, 2009 年 9 月 2 日, 埼玉県行田市
- ⑧ 古谷桂樹, 立山優貴, 森田有亮, 田中和人, 片山傳生, 仲町英治, 骨誘導促進のための BaTiO₃ 圧電薄膜の生体適合性評価, 日本機械学会関西学生会学生員卒業研究発表会, 2009 年 3 月 15 日, 大阪府東大阪市小若江 3-4-1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 傳生 (KATAYAMA TSUTAO)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 70161065

(2) 研究分担者

仲町 英治 (NAKAMACHI EIJI)
同志社大学・生命医科学部・教授
研究者番号: 60099893

田中 和人 (TANAKA KAZUTO)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号: 50303855

森田 有亮 (MORITA YUSUKE)
同志社大学・生命医科学部・准教授
研究者番号: 80368141

(3) 連携研究者

なし