

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19360087
 研究課題名（和文） 再生軟骨組織発達における輸送現象と物理刺激応答のモデリング
 研究課題名（英文） Modeling of Transport Phenomena and Physical Stimulus Response in Engineered Cartilage Tissue Development
 研究代表者
 渡部 正夫（WATANABE MASAO）
 北海道大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号： 30274484

研究成果の概要（和文）：再生軟骨組織発達における輸送現象の可視化および定量化を行った。細胞が試験片に存在することにより、物質輸送が促進されることが観察された。これは、細胞代謝活動により拡散輸送が増大したためであると考えられる。細胞代謝の結果、負の電荷を有するケラタン硫酸等の細胞外マトリックスを構成する高分子の産出が拡散輸送を制限することがわかった。また、圧縮により発生する移流現象が拡散現象へ及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We visualized transport phenomena in developing engineered cartilage tissues. The promotion of mass transfer due to the existence of cells inside test pieces are observed. The cell metabolism increased the diffusion transport. Generated polymers that consist extra-cellular matrices, such as negatively charged keratan sulfate, restrict diffusion transport. We also clarified the effects of advection transport due to the compression on diffusion transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	11,900,000	3,570,000	15,470,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：再生医療，軟骨細胞，輸送現象，拡散，移流，可視化，モデリング

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節軟骨は日常生活において関節潤滑、荷重緩衝という重要な機能を持つが、著しい欠損に対して自己修復能が極めて低く、自然治癒は期待できない。これらの疾患に対しては、人工関節を用いた治療法が主流ではあるが、再生軟骨を用いた再生医工学が目目され

始めていた。

(2) 再生医工学では自己の体内より正常な軟骨組織を取り出し、体外で細胞をコラーゲン等の高分子を用いた担体内で三次元培養し、軟骨組織を発達させることで生体デバイスを構築する。このデバイスを患部に移植す

ることで、患部の正常な機能を取り戻すことを目的としている。

(3) 再生軟骨の組織発達、および再生軟骨が軟骨母組織と融合し、移植後正常に機能するためには、栄養等の物質輸送が必要不可欠である。軟骨組織は血管やリンパ管を有さず、物質輸送は“拡散”と“移流”によって行われている。移流は圧縮と除荷による水の移動機構(Pumping Mechanism)による流れであり、拡散を補助している。したがって、それらの現象を明らかにすることは、再生軟骨治療の確立のための重要な要素となる。

2. 研究の目的

輸送現象に起因する物理刺激により、再生軟骨において何が生成されるか、どのように担体に変化するか、組織が発達するかを定量化し、輸送現象に着目した再生軟骨発達過程のメソスケール物理モデルを構築することが本研究の目的である。そこで本研究では、以下の2つに着目して研究を行った。

- (1) 再生軟骨発達過程における組織内輸送現象を可視化・定量化し、輸送現象に起因する物理的刺激の定量化
- (2) 物理的刺激による組織（細胞外基質）の発達の定量化。

3. 研究の方法

(1) 再生軟骨の作製

再生軟骨組織は Knight ら、Lee らの手法を用いて再生軟骨モデルを製作した。三次元培養する担体としてアガロースゲルを用いて、その重量濃度及び種類を 1wt% type VII, 4wt% type VII, 4wt% type IX とした。また、軟骨細胞は牛の中足骨遠位端の関節軟骨組織から単離し、ゲル中の軟骨細胞濃度は 10^7 cells/ml に調整した。さらに、細胞を全く含まないアガロースゲルのみの試験片を作製した。この試験片は control 試験片と呼ぶ。これらを比較し、細胞活動で産生された軟骨組織が macroscale 拡散輸送現象に及ぼす影響を調査した。

再生軟骨試験片及び control 試験片はインキュベータ内(温度 37°C, CO₂ 濃度 5%)で培養を行った。培養する期間は 7 日, 14 日, 21 日, 28 日とした。培養が終わった試験片を蛍光標識された dextran 濃度 5 μ l/ml のリン酸緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) 中に 48 時間浸漬することで、蛍光 dextran を試験片中に飽和させた後、観察を行った。蛍光 dextran の分子量は 3k(-), 10k, 10k(-),

70kDa の 4 種類を用意した。(-)は蛍光 dextran 分子が negative charge されていることを表し、無表記は neutral である。

(2) 実験方法

① チャンバ内拡散実験

蛍光 dextran が再生軟骨端面より外部の PBS へ拡散する様子を観察した。まず、浸漬した試験片を拡散チャンバ内に固定して、共焦点走査型レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM) 上に設置した。その後、チャンバ内に PBS を約 1ml/s で灌流し、再生軟骨端面における dextran 濃度ゼロの境界条件を保持した。試験片内部の蛍光 dextran が示す拡散の様子を CLSM により観察した。実験の模式図は図 1 に示す。蛍光像は PBS が試験片断面に触れた瞬間を 0s とし、以後 60s 毎に 300s まで記録した。撮影は試験片の底面から 100 μ m の高さで行った。

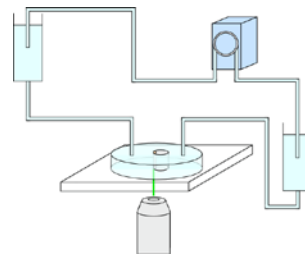


図 1 チャンバ内拡散実験模式図

② Mechanical Pumping 実験

浸漬した試験片に圧縮荷重を加えて、試験片端面から外部に蛍光 dextran が流動する様子を観察した。試験片保持浴に試験片を入れ、圧子と試験片が接触した状態で PBS を注入し実験を行った。本研究では非圧縮での自然拡散実験と圧縮を加えての移流拡散実験を行い、二つを比較することで圧縮の影響を調査した。圧縮の条件は変位量が 1mm で、圧子移動速度は 1mm/sec と 1mm/min の二つを設定した。実験の模式図を図 2 に示す。

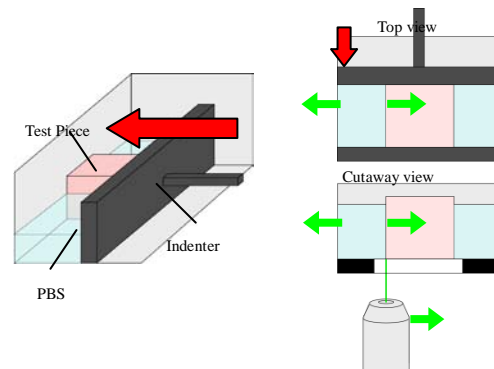


図 2. メカニカルポンピング実験装置概略

(3) 蛍光観察による拡散係数評価

図3は試験片から蛍光 dextran が拡散している画像とその輝度分布である。左側の暗部がPBS領域で、右側が試験片部である。時間の経過とともに、蛍光 dextran がPBS領域に拡散していることが分かる。本研究では得られたこの蛍光像に対して、輝度分布を抽出し、この輝度分布を用い三つの評価方法により移流・拡散現象を評価した。

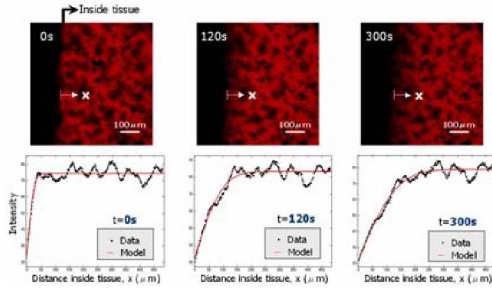


図3 拡散過程の観察例と、
フィッティングプロセス

① 見かけの拡散係数を用いた評価方法

試験片内での拡散方程式とPBS領域での拡散方程式を連立することで試験片内の拡散方程式の解として式(1)を求めた。

$$I(x,t) = I_0 \frac{1}{1 + \sqrt{D_1/D_2}} \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{\sqrt{4D_1t}}\right) \quad (1)$$

PBSが試験片に触れた瞬間を0sとし、60s, 120s, 180s, 240s, 300sの画像を取得し、取得した画像に対して試験片内部方向に輝度分布を抽出した。

式(1)をFitting式として取得画像から得られた輝度分布より見かけの拡散係数を算出した。(1)式中のDを拡散係数とし、拡散係数を各時間ごとに平均した値を試験片の拡散係数とした。 D_1 は試験片の見かけの拡散係数、 D_2 はPBSの見かけの拡散係数である。また、 I_0 は蛍光 dextran 飽和部の輝度値である。ここで、見かけの拡散係数とは物質輸送量とその時刻の関数として算出されると仮定した。

② FRAP法

FRAP法による拡散の観察を行った。FRAP法とはCLSMを用いて、特定の領域にある蛍光物質を強力な励起光で照射することによって不可逆的にブリーチ(消光)させ、その領域の蛍光強度を測定し、その後の同領域の蛍光回復時間を計測することにより拡散係数を算出する方法である。蛍光回復は周辺領域との拡散により行われる。また、FRAP法では豚の大腿骨遠位端の関節軟骨部より採取した生体軟骨を用いて実験を行い、再生軟骨に

おいて得られた拡散係数と比較する。

$$D = \frac{r_0^2 \gamma}{4\tau_{1/2}} \quad (2)$$

ここで r_0 は消光した半径、 $\tau_{1/2}$ は蛍光回復の1/2に達する時間である。

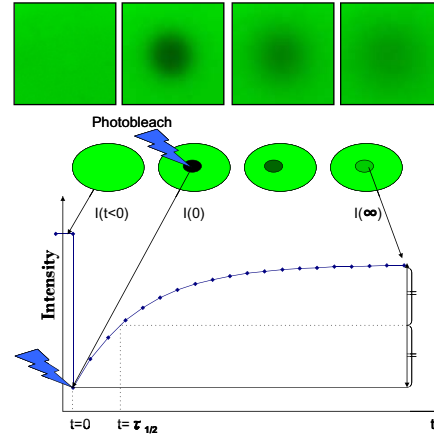


図4 FRAP法の概要

③ 輝度総量を用いた評価方法

得られた輝度分布データを用い、試験片内部を積分区間として積分することで、ある所定の時刻の輝度総量を求めた。求めた輝度総量を0sでの輝度総量から引くことにより流出量の時間変化を算出した。また、同様に時間ごとの輝度総量から0sでの輝度総量を差引き、流入量の時間変化を算出した。

4. 研究成果

(1) チャンバ内拡散係数実験

上述の方法で各時間(60s, 120s, 180s, 240s, 300s)ごとに拡散係数を求め、平均したものをその試験片の拡散係数とした。以下、図5にチャンバ内拡散実験で得られた拡散係数の結果を示す。グラフは縦軸が拡散係数、横軸が培養日数となっており、左から分子量3k, 10k, 10k(-), 70kの蛍光 dextranの拡散係数を示している。

培養日数、アガロースゲルの種類を問わず拡散係数は分子量3kのdextranが最大で、分子量70kのdextranが最小を示した。また、培養日数による変化はそれぞれの担体ごとに異なった結果を示した。1wt%typeVIIでは、day7からday14にかけて減少を示したのに対し、4%typeIXでは同時期に増加を示した。比べて、4%typeVIIは大きな変化は見られなかった。また、同じ分子量10kにおいて、電荷の有無で比較すると、負の電荷を持つ拡散種の方が拡散係数は大きい値を示す傾向が見られた。

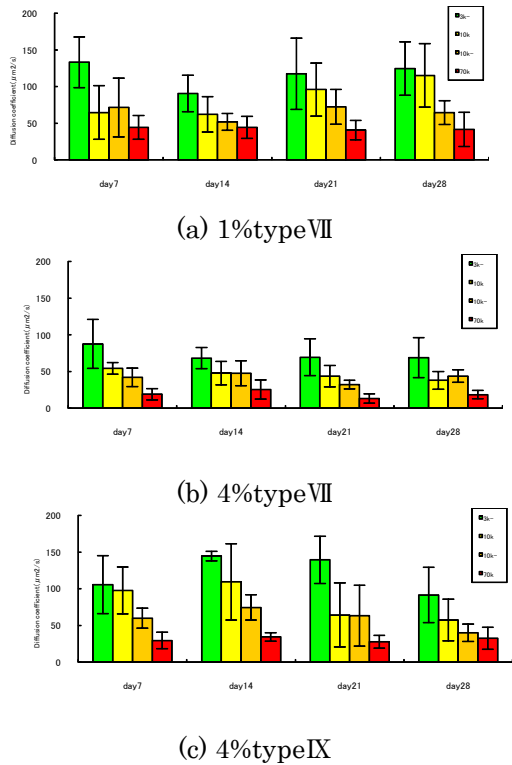


図5 種々の dextran 担体による拡散係数の変化

次に細胞代謝による組織発達のみの影響を考察するために、同種の担体において control 試験片の拡散係数を算出した。さらに、再生軟骨試験片での拡散係数を control 試験片の拡散係数で正規化し、比較した。その結果を Fig. 5 に示す。正規化した値は全て 1 を超えており、細胞代謝による組織発達の影響が現れることを確認した。

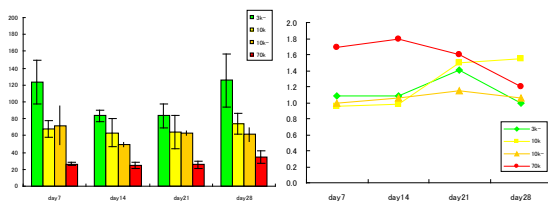


図6 1% type VII アガロース担体内の規格化された拡散係数

(2) FRAP 法を用いた拡散係数

FRAP 法により算出した拡散係数とチャンバ内拡散実験で得た値とを比較し、図 6 のグラフに示した。左側がチャンバ内拡散実験の結果、右側が FRAP 法の結果である。これらの結果はよく一致しており、それぞれ信頼性の高い結果が得られていると考える。

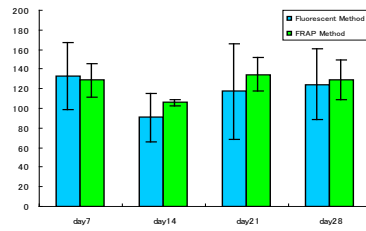


図7 FRAP 法とチャンバ内拡散実験によって得られた拡散係数の比較

(3) 生体軟骨を用いた実験結果

FRAP 法を用いて、生体軟骨で拡散係数を算出し、これまでの実験で得た再生軟骨試験片の拡散係数値と比較した。表 1, 図 8 にその結果を示す。表は生体軟骨の拡散係数データである。実験は 6 回行い、その平均をとったものを生体軟骨の拡散係数としている。グラフは再生軟骨試験片での拡散係数を、算出した生体軟骨の拡散係数で正規化し、示したものである。なお、蛍光 dextran はすべて分子量 3k で比較している。

表 1 実軟骨結果

	Diffusion coef.
1	111.2
2	103.9
3	140.1
4	110.1
5	138.3
6	129.1
Average	122.1
Variance	14.3

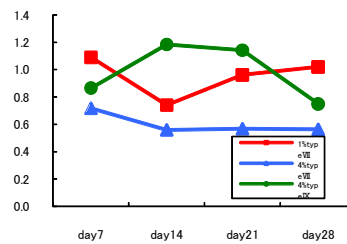


図8 正規化された拡散係数

図 8 より、正規化した値は基本的に 1 付近にあり、拡散係数に関しては、アガロースゲルを用いた再生軟骨は生体軟骨を良く模擬できていると考える。実際の生体軟骨は構造性タンパクであるコラーゲンとグリコサミノグリカン (以下 GAG) から成る。アガロースの線維構造はコラーゲン組織にあたり、隙間には GAG 組織が相当する。強い親水性を示す GAG 組織の存在が拡散性、吸水性を左右している。今回、同じ type VII でも、1%の方が生体軟骨に値が近くなる傾向が観察された。この原因としては、4% type VII は 3 種類のアガロ

ースの中で、最も強度が高く、そのため線維構造が密であるため、隙間が小さくなり GAG 組織の発達が抑制されたためであると考えられる。

次に細胞代謝による組織発達の影響を考察するために、再生軟骨試験片の拡散係数を Control 試験片の拡散係数で正規化したものを図 9 に示す。正規化した値は全て 1 を上回っており、組織発達により拡散係数が増加することがわかる。蛍光 Dextran ごとに見ると、70k の蛍光 Dextran 以外は培養とともに拡散係数は増加傾向にある。組織発達することで小さな分子は拡散が促進されるが、他方大きな分子は密になった組織により拡散が阻害されたためであると考えられる。

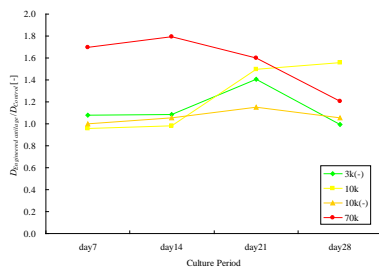


図 9 1%- typeVIIアガロース担体内の正規化拡散係数

(4) 見かけの拡散係数を用いた自然拡散実験と移流拡散実験との比較

図 10 に自然拡散で、図 11 に移流拡散実験で得られた見かけの拡散係数を示す。縦軸は見かけの拡散係数で、横軸は PBS が試験片に接触してからの時間である。図 11 (a) では 50s の画像を撮影後に圧縮を開始し、図 11 (b) では 60s の画像を撮影後に圧縮を開始した。

自然拡散実験では、見かけの拡散係数は時間経過に従い、徐々に減少していく傾向が見られる。移流拡散実験では、どちらの場合も圧縮し終わった後は、見かけの拡散係数は増加するが、自然拡散実験同様、時間とともに減少する傾向にある。本実験のモデルでは境界条件を試験片中央の輝度値が一定としているが、実際には観察している領域において試験片中央の輝度値が減少しているのが分かる。そのため、流出量が多くなるとモデルと実験結果との乖離が大きくなり、時間とともに減少したと考える。

次に圧子移動速度の影響を調べる。図 11 (b) の低速圧縮時よりも図 11 (a) の高速圧縮時の方が見かけの拡散係数は増加する。また、時間が進むにつれてほぼ等しい見かけの拡散係数に収束する。これは、圧縮速度は違うものの圧縮量は同じであるため、等量の蛍光 Dextran が流出し、時間とともに同じ見かけの拡散係数に収束したためと考える。

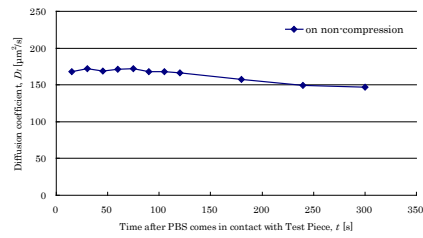
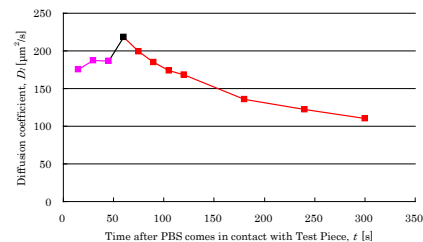
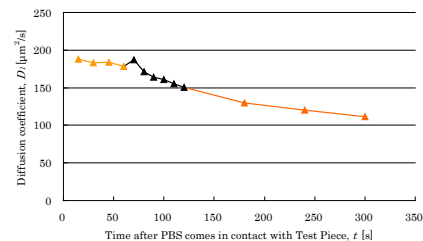


図 10 非圧縮時の拡散係数



(a) 1mm/sec



(b) 1mm/min

図 11 圧縮時の拡散係数

(5) 輝度総量を用いた移流実験の考察

圧縮を加えることで物質輸送が助長されることがわかったので、どの程度移流が拡散に影響を及ぼしているか検討した。図 12 は自然拡散での試験片からの流出量と試験片への流入量を示す。PBS は 50s における画像を撮影後注入した。縦軸は流出量・流入量で、横軸は撮影を始めてからの時間である。流出量よりも流入量が多いが、時間変化の傾向はほぼ同じである。これより二つの場合では拡散のしやすさは同等であることがわかる。

図 13 に自然拡散実験と移流拡散実験における流出量を 0s での輝度総量で正規化したものを示す。正規化をすることで個体差と積分範囲の誤差の影響を小さくすることができる。また、正規化した値はどの程度の蛍光 Dextran が流出したかを示す。実験は 50s の画像を撮影後 PBS を注入し、1mm/sec で圧縮を行った。

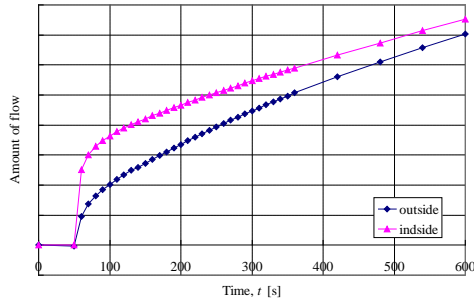


図 12 試験片内部・外部での流量

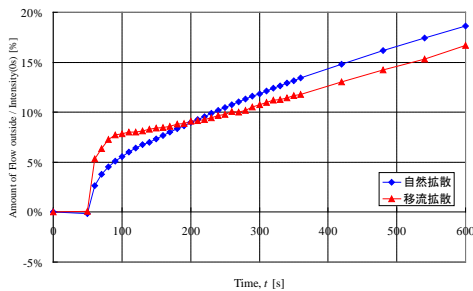


図 13 正規化された外部流量

圧縮後、移流拡散実験の流出量の方が上回るが、時間とともに自然拡散実験の流出量が上回った。これが圧縮による移流の効果であると考えられ、3%程度の増加が見られた。また、時間経過に従って自然拡散実験の流出量が移流拡散実験を上回るが、これは移流によって流出量が増加し、試験片中央において濃度が減少したためだと考える。本研究では、試験片表面を積分範囲としているため、流出の大きい移流拡散実験では流出量評価を過小評価している。実験精度向上のためには、実験スキーム改良による積分範囲の拡張が必要である。

以上

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

- ① Yosuke KITAJIMA, Shoichi SUGINO, Toshiyuki SANADA, Yoshinori SAWAE, Teruo MURAKAMI, Masao WATANABE, Transport Phenomena in Engineered Cartilage with Tissue Development in Agarose Gel, 5th Joint ASME/JSME Fluids Engineering Conference, 2007 年 7 月 31 日, San Diego, CA, USA
- ② 北島洋佑, 渡部将平, 野林真, 澤江義則, 村上輝夫, 渡部正夫, 培養軟骨における

- 拡散と組織発達, 第 18 回バイオフロンティア講演会, 2007 年 10 月 7 日, 福岡市
- ③ 渡部将平, 北島洋佑, 野林真, 澤江義則, 村上輝夫, 渡部正夫, 再生軟骨内における拡散輸送現象, 日本機械学会第 20 回バイオエンジニアリング講演会, 2008 年 1 月 8 日, 東京都江東区
 - ④ 野林真, 北島洋佑, 渡部将平, 澤江義則, 渡部正夫, 再生軟骨内での移流・拡散輸送現象, 日本機械学会 2008 年度年次大会, 2008 年 8 月 4 日, 横浜市
 - ⑤ 野林真, 渡部将平, 野田博敬, 澤江義則, 渡部正夫, 再生軟骨担体ゲル内での物質輸送現象, 日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 2009 年 1 月 23 日, 札幌市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 正夫 (WATANABE MASAO)

北海道大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 3 0 2 7 4 4 8 4

(2) 研究分担者

澤江 義則 (SAWAE YOSHINORI)

九州大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号: 1 0 2 8 4 5 3 0

坂井 伸朗 (SAKAI NOBURO)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 6 0 3 4 6 8 1 4

(H19→H20: 連携研究者)

真田 俊之 (SANADA TOSHIYUKI)

静岡大学・工学部・助教

研究者番号: 5 0 4 0 3 9 7 8

(H19→H20: 連携研究者)

(3) 連携研究者

坂井 伸朗 (SAKAI NOBURO)

九州大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 6 0 3 4 6 8 1 4

(H20~H21)

真田 俊之 (SANADA TOSHIYUKI)

静岡大学・工学部・助教

研究者番号: 5 0 4 0 3 9 7 8

(H20~H21)