

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289029

研究課題名(和文) 極低摩擦生体類似摺動組織の形成および機能評価技術の構築

研究課題名(英文) Development of biomimetic super-low friction articulating tissue and evaluation of its mechanical and tribological function

研究代表者

澤江 義則 (Sawae, Yoshinori)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10284530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、軟骨細胞を足場材に播種し培養する過程において、足場材表面にガラスローラーを接触させ転がり滑り運動を与えることにより、足場材内部に歩行時の軟骨組織内部と類似の複数応力成分からなる不均一な力学場を再現し、関節軟骨類似の極低摩擦特性を示す高機能摺動組織を形成させる手法を探究した。また形成された摺動組織表面の摩擦特性を高精度に評価するための試験システムを合わせて開発した。ここでは、組織表面の摩擦係数を計測すると共に、組織内部の細胞に生じる機械的歪みを定量可能とすることにより、細胞が経験する力学的負荷と形成される組織構造およびその力学的機能との関連を定量的に議論することを目指した。

研究成果の概要(英文)：The novel culture method for cartilage regeneration was explored to obtain highly functional articulating tissue with the cartilage-like super-low friction characteristic by reproducing the loading condition within the cartilage tissue under walking and exposing chondrocytes being cultured in the scaffold to it. A glass roller was indented into the flat scaffold surface and make a rolling-sliding motion to exert inhomogeneous and transient stress and strain field in the scaffold, which thought to be essential to simulate the mechanical condition inside the cartilage tissue under walking. The experimental system for evaluating the frictional characteristic of elaborated articular tissue was also developed. This system was enabled to measure the deformation of each chondrocyte in the cultured tissue during sliding test since the relationship between the cellular deformation caused by friction at the tissue surface and subsequent functional development of cultured tissue quantitatively.

研究分野：バイオトライボロジー

キーワード：低摩擦 細胞・組織 関節軟骨 トライボロジー 再生医療

1. 研究開始当初の背景

膝をはじめとする生体可動関節は、歩行をはじめとする日常動作により 10 MPa を超える高い接触面圧にさらされながら、摩擦係数 0.001 程度の極低摩擦を維持する理想的な軸受システムである。この卓越したトライボロジー特性は多くの研究者の興味を集め、その潤滑メカニズムについて数多くの研究が行われてきた。現在では生体関節の持つ潤滑機構が複数の潤滑メカニズムを階層的に組み合わせたものであること、さらに主要な潤滑メカニズムの一部は、関節表面を覆う関節軟骨組織の組成と構造に由来することが明らかにされている。つまり、関節軟骨は不均一で複雑な組織構造の中に複数の低摩擦維持機能を内包する高機能摺動材であると見なすことが出来る。

このように高度な機能性を有する軟骨組織は、組織内部に存在する軟骨細胞により産生される細胞外基質 (ECM) により形成され、その恒常性が維持されている。この軟骨細胞による ECM 産生は、外部から組織に加わる力学的負荷により制御され、それによって組織を周囲の力学的環境に適応させている。また一部の研究では、関節運動に伴い軟骨表面が摩擦されることにより、特に潤滑性の高いルブリシンと呼ばれる糖タンパク複合体が表面近傍に産生されることが報告されている。これら先行研究の結果は、関節軟骨組織の持つ潤滑機能が、個体の発生時から備わるのではなく、成長の過程で組織に加わる摺動負荷に対し、組織表面の恒常性を維持するため、内部の細胞が組織の組成と構造を調整、最適化した結果として獲得されたものであることを強く示唆している。

本研究の代表者は、軟骨組織における潤滑機能発現に関する上記の考察を検証するため、ローラーの転がり運動により歩行時の関節運動を模擬し、培養中の再生組織モデル表面に摺動負荷を加える「摺動負荷培養法」を提案し、軟骨細胞による組織形成に対する摺動負荷の影響を実験的に評価した。その結果、摺動負荷を加えることでモデル内部の軟骨細胞による ECM 産生量が増加し、さらにモデル表面近傍にコラーゲン線維とプロテオグリカンを豊富に含む表層構造が形成される傾向が示された。

代表者らのこれまでの研究では、主に実験に用いる細胞種の制限と実験手技の複雑さから、必ずしも再現性の良い結果が得られておらず、培養細胞による ECM 産生に対する摺動負荷の影響について、統計的な有意性を示すことが出来ていなかった。本研究では、摺動負荷培養技術を更に深化させ、極低摩擦特性を有する生体類似摺動組織を人工的に培養・形成する技術として確立することを目指し、そのために必要となる培養および評価技術と、その基盤となる生体力学的知見の蓄積を目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、足場材料内に播種した軟骨細胞に摺動負荷を加えることで、生体類似摺動組織を形成する摺動負荷培養技術を確立することを第一の目的とし、まず培養装置 (バイオリアクター) の開発と最適負荷条件の探索を行った。ここでは、培養組織表面に加えた摺動負荷により組織内部に生じる応力場を弾性理論より推定し、培養細胞が経験する力学条件と細胞による ECM 産生との関係、応力分布と形成させる組織構造の関連を明らかにし、基礎メカニズムの理解に基づいた培養手法設計を目指した。

また、得られた培養組織の力学特性、およびその表面の摩擦特性を明らかにするための評価システム構築を第二の目標とした。ここでは、柔らかく脆弱な培養組織であってもバルクの物性と表面の摩擦係数を精度良く測定することが可能な計測装置の開発を進めた。またこの評価システムでは、組織表面の摩擦特性と組織内部の力学状態の関係を実験的に明らかにするため、組織内に生じる歪み分布、および個々の細胞に生じる機械的な歪みを計測可能とした。

3. 研究の方法

(1) 摺動負荷培養実験

① 摺動負荷培養用バイオリアクター

本研究において作成した摺動負荷培養用バイオリアクターの外観を図 1 に示す。本装置は、培地に浸漬した矩形の培養組織試験片に対しガラスローラーを接触させ、両者の間に転がり滑り運動を与えることにより培養組織表面に摺動負荷を与えるものである。ここで、ガラスローラーの幅を培養組織試験片の幅よりも十分に大きくすることにより、ローラーとの接触により培養組織試験片内に生じる応力分布を、線接触に関するヘルツの二次元接触理論により記述可能な楕円分布となるようにした。



図 1 摺動負荷培養用バイオリアクター外観

この装置では、培養組織試験片を含む培養皿を試料台上に固定後、これを上昇させることで上方に固定したガラスローラーと組織モデル上面を接触させ、そこから任意の初期押し込み量を与える。次にローラーと試料台をそれぞれ個別のサーボモーターにより揺動および往復動させることで、培養組織表面に対しローラーを任意の滑り率にて転がり

滑り運動させ、培養組織表面に摺動負荷を与える。全ての動作は、制御ボードを介してパソコンから AC サーボモーターに指令を送ることで制御した。バイオリアクター本体は 37 °C、二酸化炭素濃度 5 %に調整した CO₂ インキュベーター内に設置し、PC、サーボコントローラ等の制御装置は外部に設置した。

②培養組織試験片

本研究では、牛中指骨遠位端の軟骨組織から単離した初代軟骨細胞を、足場材であるアガロースゲル (Sigma Type VII) に播種し、培養組織試験片とした。食肉処理の際に余剰となった牛の蹄部を死後 24 時間以内に入手し、その中指骨遠位端から採取した関節軟骨組織を酵素消化することにより内部の軟骨細胞を単離した。単離した細胞を新しい培地に分散させて細胞濃度 2×10^7 cells/mL の細胞懸濁液を調整し、等量のアガロース 2 % 溶液と混合した。これをポリカーボネート製の専用培養皿内に設置した成形用モールドに注ぎ、そのまま 4°C で 30 分間冷却することで、初期細胞濃度 1×10^7 cells/mL、アガロース 1 %、長さ 30 mm、幅 10 mm、厚さ 2 mm の培養組織試験片を作成した (図 2)。この際、あらかじめ培養皿底面を多孔質ポリスチレンシートにより覆っておき、そこに混合溶液を流しゲル化することにより、組織試験片底面と多孔質ポリスチレンを複合化した。これにより、培養中の試験片底面への培地供給を確保し、比較的大型の培養組織内部での細胞生存率工場を目指した。



図 2 専用培養皿内に固定された培養組織試験片

③実験方法

摺動負荷時のローラーによる初期押し込み量を、試験片厚さの 5%、10%、15%の三水準とした実験を行い、培養組織内部に生じる応力分布の相違と組織形成との関係を調査した。

全ての実験では、作成した培養組織試験片をまず 1 週間 CO₂ インキュベーター内にて静置培養し、その後バイオリアクターにより摺動負荷を加えながら更に 1 週間培養した。ここでは摺動負荷として、振幅 1.6 mm、滑り率 0 の純転がり往復摺動を 1 Hz にて培養組織表面に加えた。摺動負荷は 1 日 1 時間与え、残りの時間は培養組織表面からローラーを離し、試験片を培地中で静置培養した。また摺動負荷を与えず、インキュベーター内にて静

置培養を更に 1 週間継続した試験片を対照群とした。

培地には、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に、20vol%ウシ胎仔血清、L-グルタミン、ペニシリン、アンフォテリシン B、ストレプトマイシン、HEPES を加えたものに、さらに L-アスコルビン酸 2-リン酸 (A2P) 2 mM を添加したものをを用いた。培養期間中、培地は 24 時間毎に交換した。

④評価方法

培養後の培養組織試験片について、まず光学顕微鏡を用いて表面観察を行った後、生研トレパンを用いて直径 5 mm の分析用サンプルを複数個採取した。摺動負荷群の試験片については、表面観察によりローラーと接触した摺動部を確認し、摺動部内と摺動部外からそれぞれサンプルを採取した。

採取したサンプルの一部を用い、培養中に軟骨細胞により産生され培養組織内に蓄積された ECM 量を定量評価した。ここでは、評価対象成分をコラーゲンおよびプロテオグリカンの構成成分であるグリコサミノグリカン (GAG) とした。ECM 定量用のサンプルは、EDTA 9 mM、塩酸システイン 2.8 mM を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浸漬し、70°C で 1 時間加熱し溶解した。その後遠心分離により上澄み液と沈殿物に分離し、この上澄み液に Dimethylmethylene Blue (DMMB) を加え、マイクロプレートリーダーを用いて 525 nm における吸光度を計測した。得られた吸光度はコンドロイチン硫酸を用いた濃度測定用標準溶液と比較され、その結果からモデルに含まれていた GAG 量を比色定量した。一方沈殿物については、Sircol Collagen Assay キットを用い、上記と同様の比色定量手法により含まれるコラーゲン量を定量した。

培養後の試験片について、軟骨細胞により産生され試験片内部に蓄積された ECM 成分の内、II 型コラーゲンと GAG の一種であるケラタン硫酸を抗体染色法により蛍光標識し、走査型共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により観察することで、培養組織内に ECM により形成された組織の形態を評価した。

(2) 顕微鏡視野下における培養組織の摩擦・変形特性評価

①倒立型 CLSM 組み込み型小型摩擦・変形評価システムの開発。

本研究では、顕微鏡視野下において摩擦試験を行うことが可能な実験システムを開発した。これは、柔らかい培養組織表面の摩擦特性を明らかにすると共に、摩擦下の組織内に生じる歪み分布、および組織内に存在する個々の細胞の変形を計測し、培養組織のマクロな物性と変形異方性、更にそこで細胞に与えられる力学的負荷を実測することを目的としたものである。システムの概略を図 3 に示す。倒立型 CLSM の観察ステージ上に、二軸の力計測部と二軸駆動機構とを組み合わせた摩擦試験機を設置した。力計測部は 2 組

の平行板バネから成り、試験片間に加わる押付荷重と表面間に生じる摩擦力を同時に計測する。評価対象となる培養組織は非常に柔らかく脆弱であることから、摩擦試験は極軽荷重下で行う必要があり、発生する摩擦力も極めて小さくなると想定される。そこで、小さな押付荷重および摩擦力を精度良く計測するため、平行板バネの剛性を小さくすると共に、レーザー変位計を用いて板バネの変位を高精度に測定することとした。

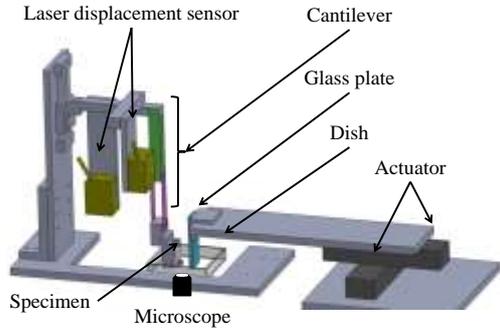


図3 倒立型 CLSM 上に組み込んだ小型摩擦・変形評価システムの概略図

②顕微鏡視野下における摩擦試験

試験片取り付け部周辺の拡大図を図4に示す。培養組織試験片とガラスプレートとの間の摩擦試験を、培地を満した専用ガラスボトム培養皿の中で行った。培養組織試験片は、2対の平行板バネ先端に設けた多孔質ポリスチレン製の試料保持部に取り付け、試験片の一端が培養皿底部のカバーガラスに接触するように設置した。次に二軸駆動機構の先端に取り付けた負荷アームにガラスプレートを取り付け、これを培養組織試験片に押し付けることにより、培養組織試験片に所定の圧縮変位を与えた。その後、変位を固定し応力緩和挙動を計測し、十分に応力緩和が行われた後にガラスプレートを接線方向に変位させ、培養組織試験片とガラスプレート間の摩擦係数を測定した。

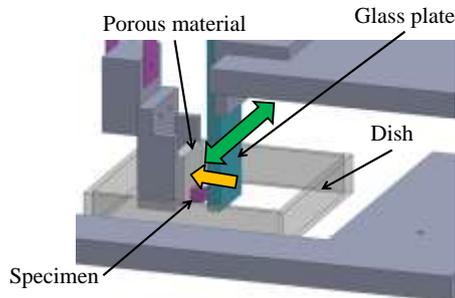


図4 試験片取り付け部周辺の拡大図

摩擦試験に先立ち、培養組織試験片内の軟骨細胞をカルセイン AM により蛍光染色した。摩擦試験中は培養皿底面のカバーガラスを通し、CLSM により組織試験片断面の蛍光画像を 0.2 秒間隔で取得した。組織内の歪み分布を求める場合には、低倍率 (×4) の対物レ

ンズを使用し、時系列に取得した画像データから流体解析ソフト「FlowNizer 2D」による画像相関解析により蛍光染色した細胞の動きを定量し、その結果から組織内の歪み分布を求めた。また組織内にある個々の細胞の変形を定量する場合には、高倍率 (×60) の対物レンズにより細胞の蛍光画像を取得し、その形状変化から細胞に生じた歪みを求めた。

4. 研究成果

(1) 摺動負荷培養実験

ガラスローラーの押し込みにより培養組織試験片内に生じる応力分布を、ヘルツの接触理論式を用いて計算した結果を図5に示す。ここでは、ローラー軸方向の応力変化は無視した二次元の応力分布を仮定し、接触中心における表面から深さ方向への応力分布を示した。計算結果は、ローラーとの凸面接触により培養組織内に不均一な応力分布が生じることを示しており、特に接線方向応力は表面から深部にかけて急激に減少し、表面近傍に選択的に大きな応力が働いていることがわかる。またローラーの初期押し込み量を 5% から 15% へと増加させることで、高い応力が発生する領域が深部へと広がることが示されている。

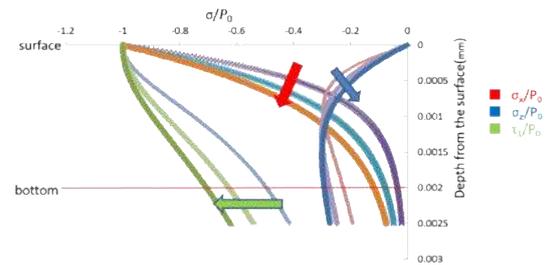
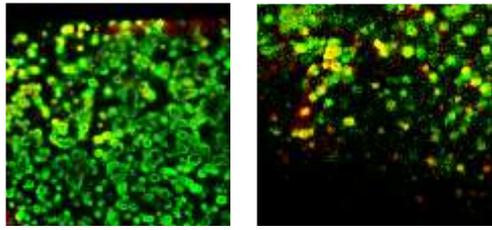


図5 培養組織内部の応力分布と初期押し込み量の影響

初期押し込み深さ 5%にて摺動負荷培養を行った培養組織試験片について、表面近傍と深部から取得した断面蛍光画像の代表例を図6に示す。これらの画像中では、コラーゲン線維が緑、ケラタン硫酸が赤の蛍光色素で標識されており、深部と比較し表面近傍で組織内のコラーゲン線維量が多くなっていることが形態的にも明らかである。得られた断面蛍光画像から、緑の蛍光強度の平均値を算出し、摺動負荷群の接触部、非接触部、および対照群の間で、それぞれ表面近傍と深部の値を比較した結果を図7に示す。対照群では表面と深部の間に違いが見られないのに対し、摺動負荷群では接触部、非接触部共に深部と比較し表面近傍で蛍光強度が高くなった。これは、大きな接線方向応力を経験する表面近傍において、コラーゲン線維網の発達がより促進されたことを定量的に示している。このように、摺動負荷において組織内に生じる不均一な応力分布は、産生された ECM により形成される組織構造にも不均一性を

もたらしている。



(a) 表面近傍 (b) 深部

図 6 摺動負荷培養により形成された培養組織断面の蛍光画像

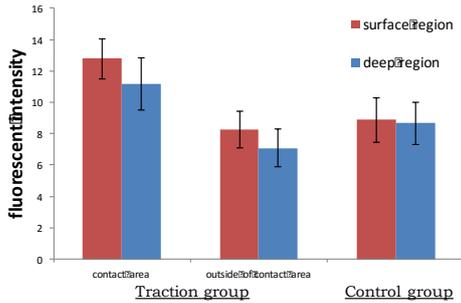


図 7 蛍光断面画像の緑色蛍光強度の比較

初期押し込み深さの異なる摺動負荷による組織形成状態の相違について、培養組織断面の蛍光画像により比較した (図 8)。初期押し込み量にかかわらず、対照群と比較し摺動負荷群ではコラーゲン線維網の形成が顕著であることがわかる。また初期押し込み量を増加させることで、コラーゲン線維網が発達した領域がより深部にまで及んでいる。この傾向は、押し込み量を増やすことにより、より深部まで高い接線方向応力が生じるとした応力計算結果と一致した。

培養組織内に蓄積されたグリコサミノグリカン (GAG) およびコラーゲンの定量結果を図 9 に示す。グリコサミノグリカン量には摺動負荷および初期押し込み量の影響が認められないのに対し、コラーゲン量は初期押し込み量を 10%以上とした摺動負荷群において、対照群に対する増加が認められた。またコラーゲン量は初期押し込み量を増加させることにより増加する傾向が認められた。

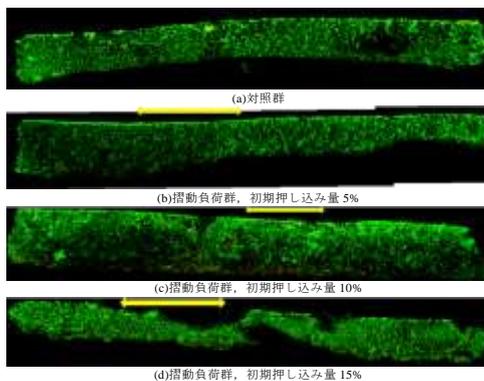
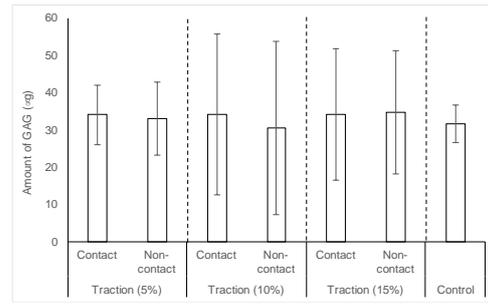
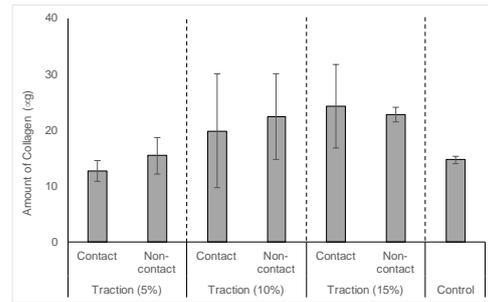


図 8 異なる初期押し込み量を与えた培養組織試験片断面の蛍光画像比較



(a) GAG



(b) コラーゲン

図 9 ECM 定量結果

開発した CLSM 組み込み型小型摩擦・変形評価システムにより、5%から 15%の圧縮負荷を与えた培養組織試験片内において、細胞に生じる圧縮歪みを定量した。その結果、試験片内部での細胞の歪みは、試験片全体に与えた歪みの 50%程度にすぎないことが明らかとなった。摺動負荷培養実験では比較的大型の培養組織試験片を用いる必要があり、試験片深部の細胞への物質輸送を維持するため、アガロース濃度 1%の極めて低濃度のアガロースゲルを足場材として用いている。そのためアガロースゲルの弾性率が細胞の弾性率に対して相対的に小さくなり、その結果内部の細胞に伝達される機械的歪みが減少したものと考えられる。このため、初期押し込み量 5%では細胞に与えられる歪みが極めて小さく、摺動負荷の効果が表面近傍付近に限定され、比色定量結果では ECM 量の増加を捉えられなかったと考えられる。

(2) 顕微鏡視野下における培養組織の摩擦・変形特性評価

摺動負荷培養実験に用いた培養組織試験片について、開発したシステムによる摩擦・変形特性の評価を試みたものの、機械的強度の不足によりデータを取得することが出来なかった。そこで、アガロース濃度を 2%まで増加させたアガロースゲルを足場材とした培養組織試験片を用意し、これを静置培養したものを評価対象とした。ここでは、最長 3 週間の培養を行い、培養の進行に伴う摩擦特性と変形特性の変化を評価した。

まず厚さ 5 mm の立方体形状の試験片に 20%の圧縮歪みを与え、30 分間の応力緩和挙動を

計測し、これを応力緩和式にフィッティングすることで弾性率、透水率をはじめとする各種物性値を求めた(表1)。培養と共にヤング率、せん断弾性率共の上昇したのに対し、透水率は培養2週間までは減少し、その後の2週から3週では変化が認められなかった。これは産生されたECMが試験片内に蓄積され組織構造を形成した結果と考えられる。

表1 応力緩和挙動より算出した物性値

試験片	2%アガロース	1週培養組織	2週培養組織	3週培養組織
せん断弾性率 G [Pa]	4023	5511	6402	9101
浸透弾性率 K [Pa]	799	501	474	1197
透水係数 K [m ² /Ns]	7.81E10 ⁻¹¹	6.34E10 ⁻¹¹	6.79E10 ⁻¹²	6.35E10 ⁻¹²
協同拡散定数 D [m ² /s]	4.81E10 ⁻⁸	4.98E10 ⁻⁷	6.40E10 ⁻⁷	8.32E10 ⁻⁸
ヤング率 E [Pa]	4509	3544	5645	6654
緩和時間 t_{rel} [s]	75	147	777	755

30分の応力緩和後に行った摩擦試験により得られた摩擦係数を図10に示す。摩擦係数は培養1週目の試験片で最も小さくなり、培養の進行と共に増加した。しかし、培養1週目においても摩擦係数の値は0.11程度であり、この値は足場材として用いた2%アガロースゲルよりも小さいものの、生体軟骨組織と比較すると遙かに大きな値である。この結果は、静置培養では低摩擦特性を獲得することが困難であることをよく示している。

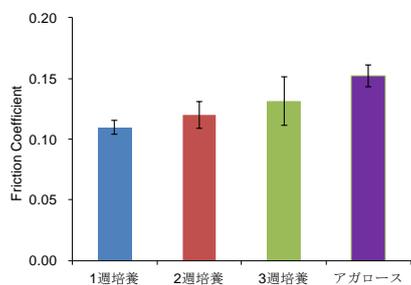


図10 培養組織試験片表面の摩擦係数

画像相関法により得られた培養組織内のせん断変形分布を図11に示す。培養期間にかかわらず、組織内のせん断変形分布は深さ方向に一様であった。これは静置培養では組織変形の異方性が生じないことを示している。

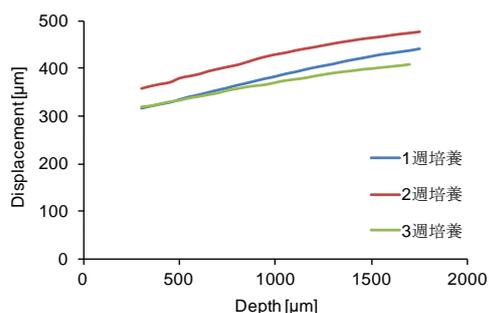


図11 培養組織試験片深さ方向へのせん断変形分布

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11件)

- ① Nečas, D., Sawae, Y., Fujisawa, T., Nakashima, K., Morita, T., Yamaguchi, T., Vrbka, M., Krupka, I., Hartl, M., The Influence of Proteins and Speed on Friction and Adsorption of Metal/UHMWPE Contact Pair, *Biotribology*, 査読有り, 2017, in press.
 - ② Zhang, L., Sawae, Y., Yamaguchi, T., Murakami, T., Yang, H., Effect of radiation dose on depth-dependent oxidation and wear of shelf-aged gamma-irradiated ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE), *Tribology International*, 査読有り, 89, 2015, 78-85.
- 他 9件

[学会発表] (計31件)

- ① K. FUKUDA, Y. SHIGYO, H. ARIURA, S. OMATA, T. MORITA, T. YAMAGUCHI, Y. SAWAE, Relationship between dynamic stress field and ECM production in regenerated cartilage tissue, 27th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2016.11., Nagoya, Japan
 - ② K. FUKUDA, S. OMATA, Y. SAWAE, Influence of the traction loads on ECM production and distribution in regenerated cartilage tissue, 3rd International Conference on BioTribology, 2016.9, London, UK.
- 他 29件

[図書] (計1件)

- ① 澤江義則, 人工関節のトライボロジーの展開, *トライボロジー設計マニュアル*, テクノシステム, 2015, 711-716.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤江 義則 (SAWAE Yoshinori)
九州大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 10284530

(2) 研究分担者

山口 哲生 (YAMAGUCHI Tetsuo)
九州大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 20466783

森田 健敬 (MORITA Takehiro)
九州大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 70175636