

| | |
|-----------|--|
| Title | Osteoblastic Cell Proliferation with Uniform Distribution in a Large Scaffold Using Radial-Flow Bioreactor |
| Author(s) | 荒野, 太一 |
| Journal | 歯科学報, 111(5): 504-505 |
| URL | http://hdl.handle.net/10130/2635 |
| Right | |

| | |
|---------|--|
| 氏名(本籍) | あらのたいち 荒野太一 (茨城県) |
| 学位の種類 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第1804号(甲第1075号) |
| 学位授与の日付 | 平成21年3月31日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 学位論文題目 | Osteoblastic Cell Proliferation with Uniform Distribution in a Large Scaffold Using Radial-Flow Bioreactor |
| 掲載雑誌名 | Tissue Engineering 第16巻 6号 1387~1398頁 2010年 |
| 論文審査委員 | (主査) 佐藤 亨教授 (副査) 櫻井 薫教授 井上 孝教授 下野 正基教授 |

論文内容の要旨

1. 研究目的

近年、広範囲な組織欠如部位に対する治療法として、生体外で細胞を三次元的に培養し、生体に移植する方法が行われている。組織再生を目指した三次元培養を行う装置として、様々なバイオリアクターが開発され用いられている。その中でもラジアルフロー型バイオリアクターは広範囲な組織欠損に対する三次元培養を行う装置としてその優位性が報告されている。しかしながら、大きな骨欠損の治療に対するこの装置の有効性を調査した報告はない。今研究の目的は、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いることにより、直径18mm、高さ10mmの比較的大きな scaffold に骨芽細胞様細胞を均一に増殖させることが可能であるかを検討することである。

2. 研究方法

気孔径70-110 μ m, 気孔率80-95%, 厚さ3mmのタイプ1コラーゲン sheet 1枚に対してマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を 5×10^5 個播種した。その後、細胞を生着させるために、リアクター外にて初期培養を行った。適正な初期培養時間を決定し、三次元培養を行った。初期培養を行った sheet は6枚重ねでリアクター内に組み込み、リアクターが十分に scaffold で満たされるようにした。37 $^{\circ}$ C, pH7.4, DO値6.86ppm, 培養液灌流速度3ml/min, 培養液交換量200ml/dayの環境下で1週間培養を行ったものを動的培養群とした。培養液の灌流を行わず、培養液を毎日交換し、1週間培養を行ったものを静的培養群とした。バイオリアクターには組み込まずに sheet 1枚を1週間培養したものを単層培養群とした。24時間ごとに採取した培養液からグルコース消費量を測定し、経時的な細胞増殖の評価に用いた。培養後、scaffold を半分に分けた。一つはDNA含有量から細胞数を算出し、細胞増殖、細胞分布の評価に用いた。もう一方は、組織学的解析を行った。試料はHE染色と免疫組織化学染色を行った。試料を光学顕微鏡下で観察し、HE染色試料は細胞分布の評価に用いた。免疫組織化学染色では細胞の三次元培養後の特性の評価に用いた。

3. 研究成績および考察

動的培養群では培養期間中にグルコース消費量は増加した。また、細胞数は播種時と比較すると5倍以上に増殖しており、scaffold内の細胞分布は全体に均一であった。静的培養群においては細胞の分布は均一であるもののグルコース消費量、細胞数ともに変化が見られなかった。単層培養群においては細胞が播種時と比較し

て均一に増加しているものの動的培養と比較すると有意に少なかった。この結果の違いには以下の二つの理由が挙げられる。一つは動的培養群において培養液が灌流することにより酸素や栄養素の運搬が効率よく行われたということ、もう一つは培養液の灌流による機械的刺激が骨芽細胞に加わり、その増殖能を高めたということが考えられる。また、免疫組織化学染色の結果から、動的培養後の細胞は骨芽細胞様細胞の特性を持つことが分かった。

4. 結 論

骨芽細胞様細胞はラジアルフロー型バイオリアクターを用い、培養液を還流させて培養を行うことにより比較的大きな scaffold に均一に増殖した。この結果はラジアルフロー型バイオリアクターを用いた培養は骨芽細胞様細胞の三次元培養に有効な方法であることを示唆している。

論 文 審 査 の 要 旨

組織再生を目指した三次元培養を行う装置として、様々なバイオリアクターが開発され用いられている。中でもラジアルフロー型バイオリアクターは広範囲な組織欠損に対する三次元培養を行う装置としてその優位性が報告されている。本研究はラジアルフロー型バイオリアクターを用いることにより、直径18mm、高さ10mmの比較的大きな scaffold に骨芽細胞様細胞を均一に増殖させることが可能であるかを検討することを目的とした。本研究ではコラーゲン sheet に対し細胞播種を行う際にリアクター外にて初期培養を行った。初期培養時間の評価を行い、適正な時間を設定した後に三次元培養を行った。初期培養を行った sheet は6枚重ねでリアクター内に組み込み、リアクターが十分に scaffold で満たされるようにした。培養液の灌流下で培養を行ったものを動的培養群とした。培養液の灌流を行わず、培養液を毎日交換し、1週間培養を行ったものを静的培養群とした。バイオリアクターを用いずに細胞を播種した sheet 1枚を1週間培養したものを単層培養群とした。24時間ごとに採取した培養液からグルコース消費量測定し、経時的な細胞増殖の評価に用いた。培養後、scaffold を半分に分け、一つはDNA含有量から細胞数を算出し、細胞増殖、細胞分布の評価に用いた。もう一方は、組織学的解析を行った。HE染色を行った試料は光学顕微鏡下で観察し、細胞分布の評価に用いた。免疫組織化学染色を行った試料にて培養後の細胞の特性の評価を行った。1週間の培養後では、動的培養群、静的培養群、単層培養群全てに細胞は均一に分布しているものの、動的培養群では細胞が増殖し、静的培養群では増殖が見られず、単層培養群は増殖しているものの動的培養と比較すると有意に細胞数が少ないという結果となった。これは、培養液の灌流により栄養の運搬や老廃物の除去が効率よく行われたということと、機械的刺激による骨芽細胞増殖能の活性化がなされたという二つの理由が考えられる。また免疫化学染色の結果より動的培養後の細胞が骨芽細胞の特性を持つことが証明された。以上より、ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた培養は骨芽細胞様細胞の三次元培養に有効な方法であることが示唆された。

本審査委員会では、1) 対照群の設定について、2) 統計処理の方法、3) 結果の表現、4) 培養条件などについて質疑がなされたが、概ね妥当な回答が得られた。また、論文内容について構成や表現方法などの要望がなされ、それぞれに対応した修正を行った。その結果、本研究で得られた知見は、歯学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。