

## 超高压脱細胞化骨上での細胞培養

## Cell culture on bone decellularized by high-hydrostatic pressure

○中村奈緒子（東医歯大生材研） 船本誠一（東医歯大生材研）  
 南広祐（東医歯大生材研） 木村剛（東医歯大生材研）  
 岩田博夫（京都大学再生研） 岸田晶夫（東医歯大生材研）

Naoko NAKAMURA<sup>1</sup>, Seiichi FUNAMOTO<sup>1</sup>,  
 KwangwooNAM<sup>1</sup>, Tsuyoshi KIMURA<sup>1</sup>, Hiroo IWATA<sup>2</sup>, Akio KISHIDA<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University  
<sup>2</sup>Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University

**Key Words:**Regenerative Medicine, Tissue Engineering, Biomedical Materials, Scaffold

## 1. 緒言

生体組織の構成成分である細胞外マトリックスは、生体組織の構造を支持するだけでなく、細胞の足場として細胞の増殖、分化などの細胞機能に強く影響を及ぼすことが知られている。また、最近、細胞外マトリックスが構成する三次元構造が細胞機能に重要であることも報告され、三次元構造体を細胞の足場（スキャフォールド）とした細胞機能に関する研究が進められている。

本研究室では、超高静水圧処理により生体組織から細胞を除去した脱細胞化組織のスキャフォールドとしての利用を検討している。脱細胞化組織の調製法としては、界面活性剤による方法が広く用いられているが、界面活性剤の残存が細胞機能に影響すると考えられ、一方、超高静水圧処理は、物理的処理であるため、スキャフォールドとして有用であると考えられる。

本研究では、三次元細胞培養担体としての脱細胞化骨の作製とその脱細胞化骨を用いた invitro 細胞培養について検討した。

## 2. 方法

## 2-1 脱細胞化骨の作製

ブタ肋骨の海綿骨部を直径 8mm、厚さ 3mm に成形した。超高压印加装置を用い、10°C、10,000 気圧の超高压印加を 5 分間行い、細胞を破壊した。その後、DNase 含有生理食塩水に浸漬し、振盪洗浄を 37°C、無菌環境下で 4 週間行い、細胞残渣を除去した。その後、80%アルコール溶液に浸漬し、振盪脱脂した。ヘマトキシリン-エオジン染色、走査型電子顕微鏡観察、および Picogreen による DNA 定量にて脱細胞化を検討した。

## 2-2 細胞培養

得られた脱細胞化骨に間葉系幹細胞 ( $5 \times 10^5$  cells) を播種し、3 週間培養した。ヘマトキシリン-エオジン染色およびアルカリフォスファターゼ染色にて、細胞接着および分化能を検討した。

## 3. 結果と考察

超高压脱細胞化処理にて調製した脱細胞化骨を Fig.1(A) に示す。未処理骨では血液の残存が示されたが、超高静水圧処理および洗浄によって黄色に観察された。超高压脱細胞化処理前後の骨のヘマトキシリン-エオジン染色の結果を Fig.1(B,C) に示す。未処理骨では骨梁、骨髓部にて青く染色された多数の細胞が観察された。一方、脱細胞化骨で

は、骨梁部に関しては完全に細胞が除去されており、骨髓部にては、一部細胞残渣が認められるものの、細胞核の除去が確認された。脱細胞化骨の走査型電子顕微鏡観察 (Fig.1(D)) では、骨梁から細胞が除去されていることが確認できた。残存 DNA 定量では、未処理骨では、 $316 \pm 164$  ( $\mu\text{g/g}$  of sample) であったが、脱細胞化骨では  $0.4 \pm 0.2$  ( $\mu\text{g/g}$  of sample) であり、検出限界値であり、上述のヘマトキシリン-エオジン染色の結果と一致していた。これらの結果は、超高静水圧処理と洗浄による脱細胞化処理にて、ほぼ全ての細胞が除去され、海綿骨部の構造が維持された脱細胞化骨の調製が可能であることを示している。

得られた超高压脱細胞化骨上に間葉系幹細胞を播種し、3 週間培養した。組織学的観察により、間葉系幹細胞が脱細胞化骨の骨髓部に接着していることが確認された。次に、間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を検討するため、アルカリフォスファターゼ活性を染色にて評価した。その結果、主に脱細胞化骨の表面に活性が確認された。以上より、脱細胞化骨が細胞の足場としての機能を果たし、三次元細胞培養担体としての有用性が示された。

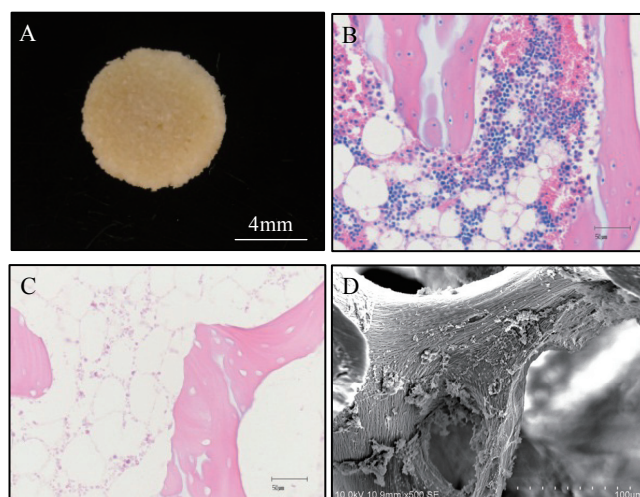


Fig.1(A) Photograph of decellularized bone by high-hydrostatic pressure. Hematoxylin-Eosin staining of (B) native bone, (C) decellularized bone. (D) Scanning electron microscope (SEM) photograph of decellularized bone.