

“骨再生プロジェクト”における骨芽細胞培養試験の立ち上げ

化学・材料系技術班 岡野 聡

1. はじめに

生体内には、骨芽細胞と呼ばれる骨を形成する細胞が存在している。この骨芽細胞は、骨あるいは骨代替材料表面を遊走する（＝動く）ことで、その方向に良質な骨を形成する。つまり、骨芽細胞の遊走方向を制御することが、スムーズな骨組織の形成につながると言える。

2050年には国民全体の40%が65才以上という“超高齢化社会”を迎える日本において、骨粗しょう症に対する骨組織再建についての研究が喫緊の課題となっている。骨粗しょう症や骨折などを起こした場合、Ti合金等の骨代替材料を埋入することが一般的な治療として挙げられる。しかしながら骨代替材料の埋入は、感染症や骨との接着強度の弱さ、材料自体の破損などにより、約20%の患者が埋入から10年以内の再手術・処置が必要であるという現状がある。そのため、骨代替材料を埋入することに加えて、「骨再生を誘発させる技術の開発」が求められている。

骨組織再建材料としてTi合金やハイドロキシアパタイトセラミックス(HAp)が現在すでに実用化されているが、「材料」から細胞へ積極的に働きかけ、骨の高次組織構築を行う技術は確立されていない。H25年度から開始した研究拠点形成プロジェクトである“骨再生プロジェクト”では、「骨再生を材料側から制御する技術の開発」を目指し、各分野の教員をメンバーとして研究が進められている。筆者は本プロジェクト内において、骨芽細胞の培養及び観察・評価する技術の確立を担当した。その様子について報告する。

2. 骨芽細胞の培養及び観察手法の確立

2.1 細胞に関する基礎知識の習得

筆者の細胞培養に関する知識はゼロであったため、細胞の選定、取り扱い方、管理方法、培養方法、必要な物品、場所の確保、観察・評価方法など、すべての情報について論文や参考書、インターネットの情報をかき集めるところから始まった。しかし一つ一つの単語の意味が全く理解できず、この段階でかなりの時間を要した。実験の立ち上げでまず問題となったのが、クリーンベンチやインキュベーターなどの高価な備品の調達、及びその設置場所の確保である。これは、プロジェクトメンバーである教育学部准教授の細胞培養実験室を使わせていただけるということで解決した。

2.2 細胞の培養

今回使用した骨芽細胞はMC3T3-E1というマウスの頭蓋骨から採取した細胞であり、骨芽細胞の中では最もポピュラーなものである。いくつかの書類とともにメーカーに購入希望を出すと、約1～2週間でドライアイスで冷凍保存された状態で納品された。細胞は、高さ約2cm程度のチューブに入っており、その中には約10万個の骨芽細胞が冷凍されていた。これを慎重に室温まで戻し、培養した。

細胞を培養するには、培地と呼ばれる、細胞が成長するための栄養分が含まれた培養液をシャーレ中の細胞に分散させる必要がある。しかし、文献に書かれたものと同じ細胞、同じ培地を使用したとしても、実際に購入した細胞と培地の相性というものがあり、うまく培養されないことが多々ある。これは実際購入してやってみないと分からないらしく、まさに手探り状態で培養を進めていった。今回は運良くスムーズに細胞は増殖していき、培養後2週間で安定した細胞増殖が得られた。

細胞培養で最も重要な作業の一つに、「継代」という作業がある。通常、安定して増殖する細胞は約3～4日で培養用シャーレの底面を覆い尽くしてしまうが、細胞はそれでも分裂を止めないために、最終的に圧迫死を起こし、全滅してしまう。そのため、週に2～3回は細胞の数を意図的に間引きする「継代」操作が必要となる。しかしながら、年末年始などの連休中はこの「継代」作業ができないため、細胞を意図的に全滅さ

せる。そのため、一部の細胞をあらかじめ-80℃のフリーザーで冷凍保存しておき、連休明けに再び細胞を室温まで戻し、増殖させるという作業が必要となる。よって、冷凍保存するための専用フリーザーも購入した。

2.3 細胞の観察及び評価

培養した骨芽細胞の、光学顕微鏡による観察結果を図-1に示す。アメーバ状の骨芽細胞が観察されており、培養が成功したことが確認された。しかしながら骨芽細胞はそもそも透明であるため、光学顕微鏡による細胞の形態及び個数のカウント等の評価は非常に困難であった。

そこで筆者は、細胞の観察に免疫染色法を導入した。免疫染色法とは、細胞を構成する部位ごとに異なる蛍光色素で染め分けそれぞれを蛍光観察する手法であり、部位がどのように存在しているかを明確に観察することができる。そのため、蛍光顕微鏡という特殊な顕微鏡も購入した。図-2に、蛍光顕微鏡による骨芽細胞の観察画像を示す。青い球状の部分が細胞の核であり、放射状に延びている赤い部分が細胞の骨格にあたるアクチンと呼ばれる部位である。それらの合成画像を見ると、核を中心としてアクチンが四方に手足を伸展させ、隣の細胞同士が連結している様子が明確に観察できた。また、蛍光観察によるメリットとして、核やアクチンを個別に観察できることにある。例えば異なる材料上において細胞の増殖率を見る際には、材料上の細胞の数をカウントし、定量的に比較することが必要となる。その際、細胞を光学顕微鏡で観察するよりも、蛍光顕微鏡を用いて核のみを観察することで、細胞数のカウントが極めて容易になるのである。また蛍光色素を使っているので、発光しているところ以外はすべて真っ暗であることも、明瞭な像が得られる一因である。

3. まとめ

骨芽細胞培養環境ならびに骨芽細胞観察・評価環境を整備することができた。また、本細胞を用いた骨代替材料の開発に関する研究も進んでおり、その成果は全国大会（金属学会及びバイオマテリアル学会）で発表予定である。また、今後は医学部や他機関との共同研究体制の中で実験を実施していく予定である。

近年、業務の増加等により、教員が自ら実験を立ち上げることは難しくなっている。例え全くの未経験の分野であったとしても、筆者のような技術職員がそれを担い、管理し、学生に伝え、指導することは、我々の一つの形として成り立つと考える。

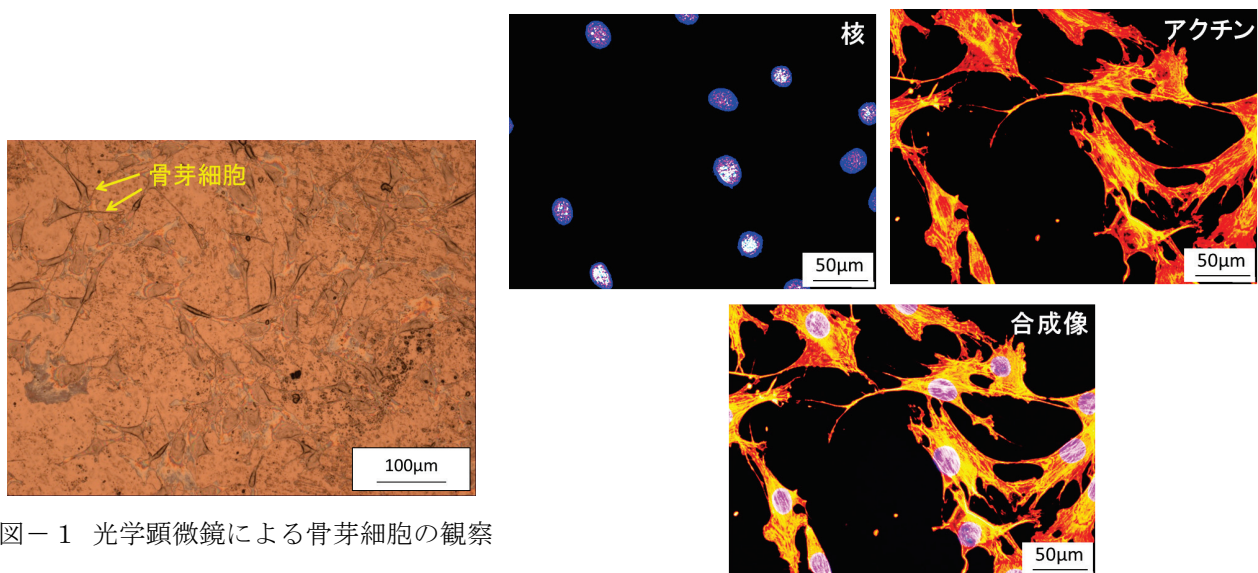


図-1 光学顕微鏡による骨芽細胞の観察

図-2 免疫染色法による骨芽細胞の観察