

天然多糖類の高機能化と生医学材料への応用

阿部康次、長幡操、石黒達也、寺本彰
信州大学繊維学部 機能高分子学科

1. 緒言

近年、細胞を生体外で三次元的に培養し、組織を再生させるという再生医療が注目されている。このためには、細胞の分化・増殖を平面的に制御するだけでなく、細胞が分化・増殖できるスペースの空間的制御が可能な基材の開発が強く望まれている。そこで本研究では、細胞の機能を制御することが期待される、三次元的な細胞の足場となる多糖類系高分子電解質錯体(PEC)スポンジを作製し、その物性評価を行うと共に、*in vitro*、*in vivo*において硬組織再生用基材としての有用性を評価した。

2. 実験方法

カチオン性多糖類[キトサン:CS]とアニオン性多糖類[硫酸化キチン・カルボキシメチル化キチン・リン酸化キチン・ヒアルロン酸・硫酸化ヒアルロン酸]の水溶液を所定の割合(重量比で2:1)で混合し、PECを形成させた(硫酸化キチンを有するPECをSPECとし、以下順にCMPEC・PPEC・HAPEC・SHAPECとする)。凍結乾燥後、NaOH処理により不溶化させ、洗浄を十分に行った後に再び凍結乾燥することでPECスポンジを得た。物性評価として、スポンジのポアサイズ、表面状態の観察、吸水率、Electron Probe Microanalyzer (EPMA)による元素分析を行った。また、*in vitro*評価として、スポンジに株化骨芽細胞(MC3T3-E1)を播種し、1週間培養した後、SEMによる細胞の形態観察、増殖の指標としてのタンパク質量、初期分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALPase)活性の測定を行った。さらに、*in vivo*評価として、ラット(12週齢)の大腿骨に開けた直径約3mmの穴にPECスポンジを埋めこみ、経時的に組織反応と骨の再生をH.E.染色により観察した。

3. 結果と考察

作製したスポンジのポアサイズは、PECの種類に

よらず200 μ m以下であり、吸水性に富んでいた。

Fig.1に、MC3T3-E1を各PECスポンジ中で所定時間培養した後のタンパク質量を示した。7日間培養しても、PECの種類に依存せず初期のタンパク質量とほとんど違いは見られなかった。細胞は、細胞外マトリックスの成分タンパク質などを細胞外に分泌するが、一般的にタンパク質量と細胞数には比例関係が得られる。すなわち、本実験条件下で培養したPECスポンジ中のMC3T3-E1は、どのスポンジ中でもほとんど増殖していないと考えられる。一般的に、*in vitro*において骨芽細胞を培養すると、分化に伴い増殖が抑制され、コラーゲン合成と共に細胞の凝集塊である石灰化noduleを形成し、石灰化が行われる事が知られている。従って、PECスポンジ上で培養した細胞も、増殖停止に伴い分化が進んでいる可能性が考えられる。

Fig.2に、PECスポンジ中で所定期間培養したMC3T3-E1のミトコンドリア活性を示した。ミトコンドリア活性は、どのPECスポンジにおいても、1日目に比

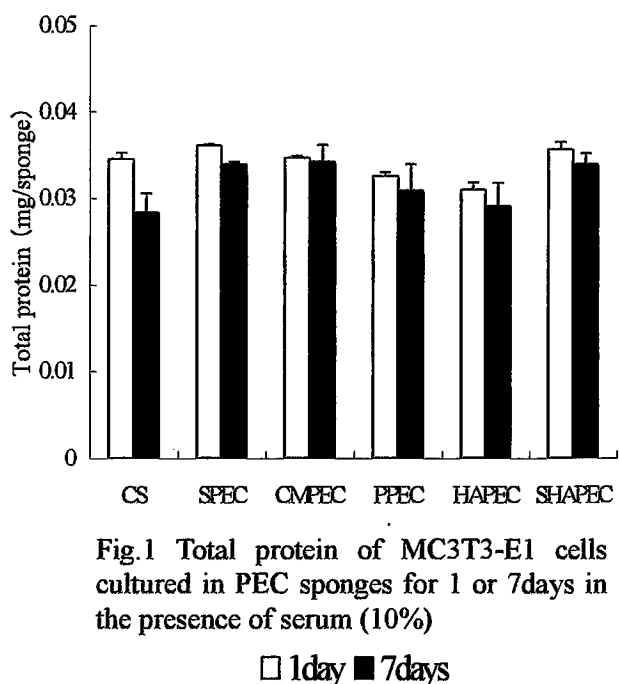


Fig.1 Total protein of MC3T3-E1 cells cultured in PEC sponges for 1 or 7days in the presence of serum (10%)

□ 1day ■ 7days

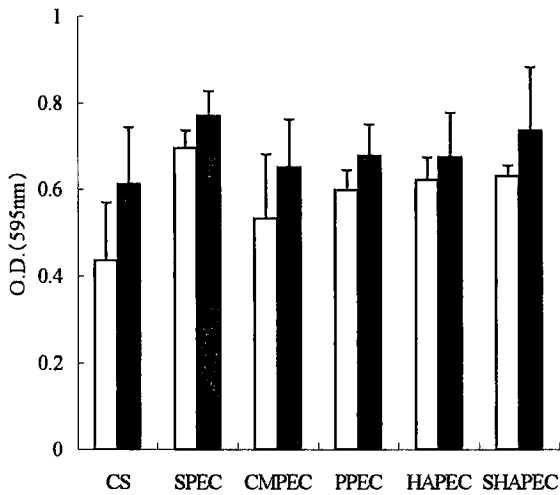


Fig.2 Mitochondrial activity of MC3T3-E1 cells cultured in PEC sponges for 1 or 7 days

□ 1 day ■ 7 days

べ7日目で増加していた。また、どのPECスポンジもCSのみのスポンジよりも大きな値であり、特に硫酸基を有するSPEC、SHAPECは、他のサンプルに比べ大きな値であった。タンパク質量の結果より、細胞はほとんど増殖していないと考えられるので、MTT活性値の増加は、個々の細胞のミトコンドリア活性値が増加したためであると考えられる。硫酸基を有するPECスポンジでMTT活性が高かったのは、PECスポンジ中の硫酸化多糖類が、血清中および細胞自らが分泌したFGFなどの細胞増殖因子と相互作用し、細胞の活性を上昇させたためではないかと思われる。

Fig.3に、MC3T3-E1を各PECスポンジ中で所定期間培養した後の、ALPase活性の測定結果を示した。7日目のALPase活性値は、CSスポンジが一番

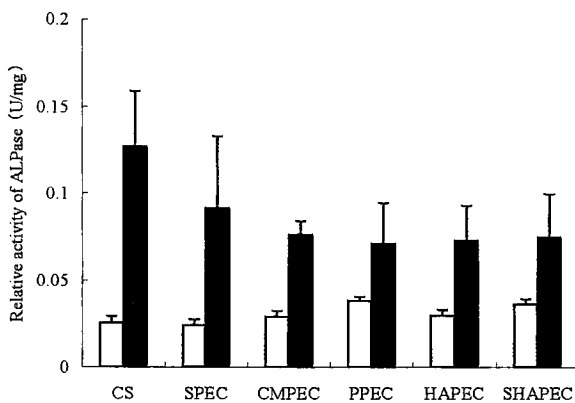


Fig.3 Relative activity of ALPase of MC3T3-E1 cells cultured in PEC sponges for 1 or 7 days

□ 1day ■ 7days

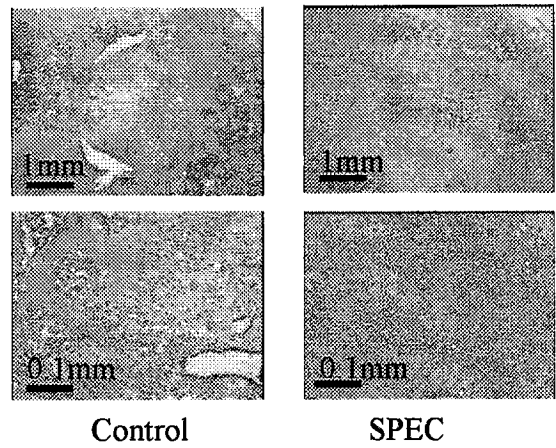


Fig.4 Histological observation of the PEC sponge in the femur after 3 weeks of implantation (H.E. staining)

大きな活性値であったが、いずれのPECスポンジ中で培養しても1日目の2倍位の活性値を示した。細胞の増殖は停止していると考えられるため、PECスポンジ中で培養したMC3T3-E1は、増殖の停止と共に分化していることが示唆された。

Fig.4に、SPECスポンジを埋入したラット大腿骨を3週間後に摘出し、H.E.染色した骨欠損部の写真を示した。初期にわずかに確認された異物反応は、3週目ではほとんど観察されなかった。さらに、SPECスポンジではコントロールに比べ、多くの骨芽細胞・破骨細胞が観察され、界面からの骨再生が活発に起きていることがわかった。すなわち、PECスポンジを構成している硫酸化キチンが骨組織と相互作用し、早期の骨再生が起きていると考えられた。また、スポンジの分解速度については、*in vitro*ではどのスポンジにおいても、3週間では20%程度の分解率であったが、*in vivo*ではかなり分解が進んでおり、3週目でスポンジの形状はほとんど確認できなかった。

4. 結果と考察

*in vitro*評価では、PECスポンジを用いることにより、骨芽細胞の三次元培養が可能であることが明らかとなった。*in vivo*評価では、硫酸化多糖類を有するPECスポンジを骨欠損部に埋入した場合、活発な骨の再生が見られるなどの興味深い性質が多数得られた。すなわち、今後改良を進めることでPECスポンジの骨再生用材料として応用が現実のものとなることが期待される。