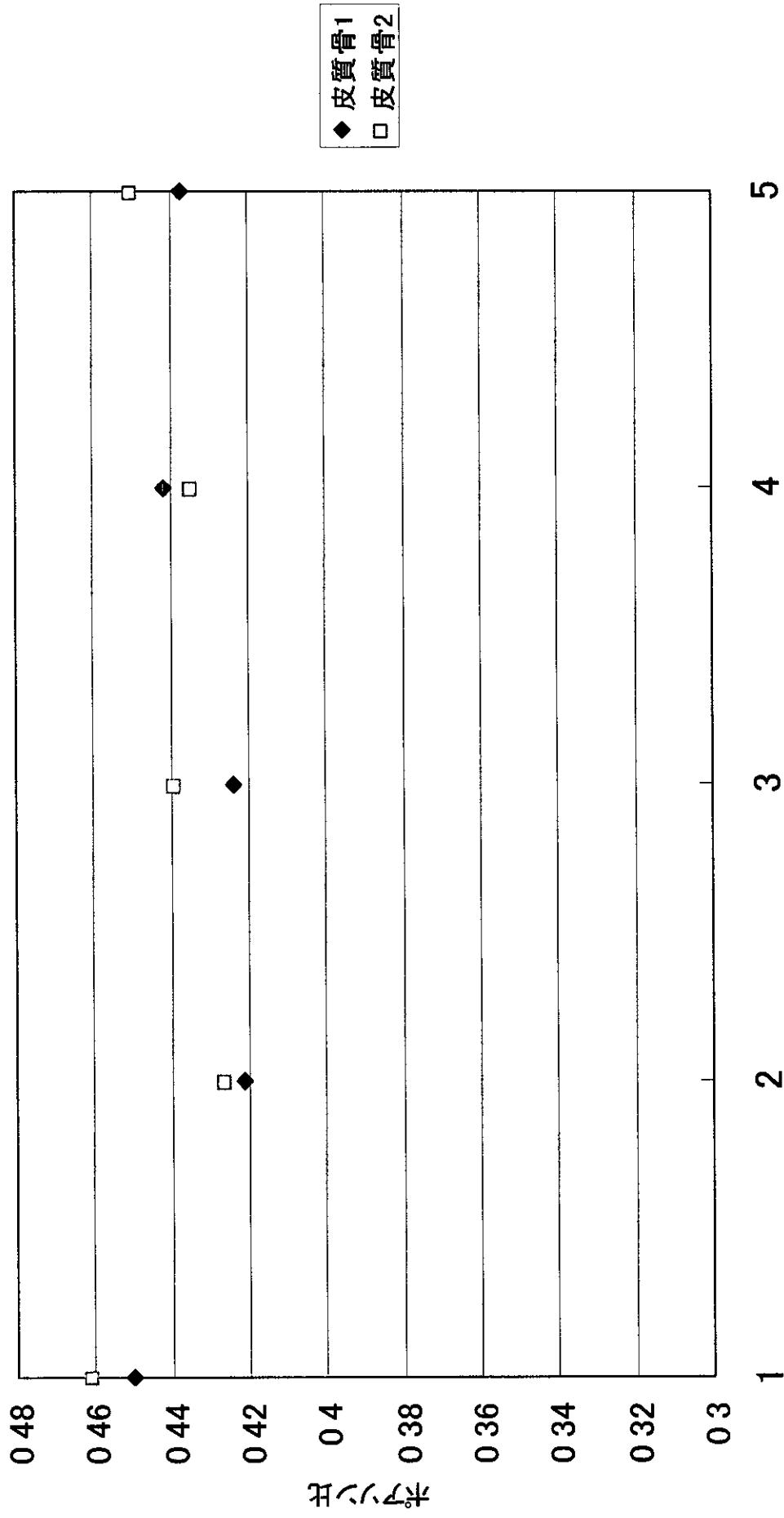


ポアソン比のグラフ



XZモード測定ラインの位

図2-20

密度のグラフ

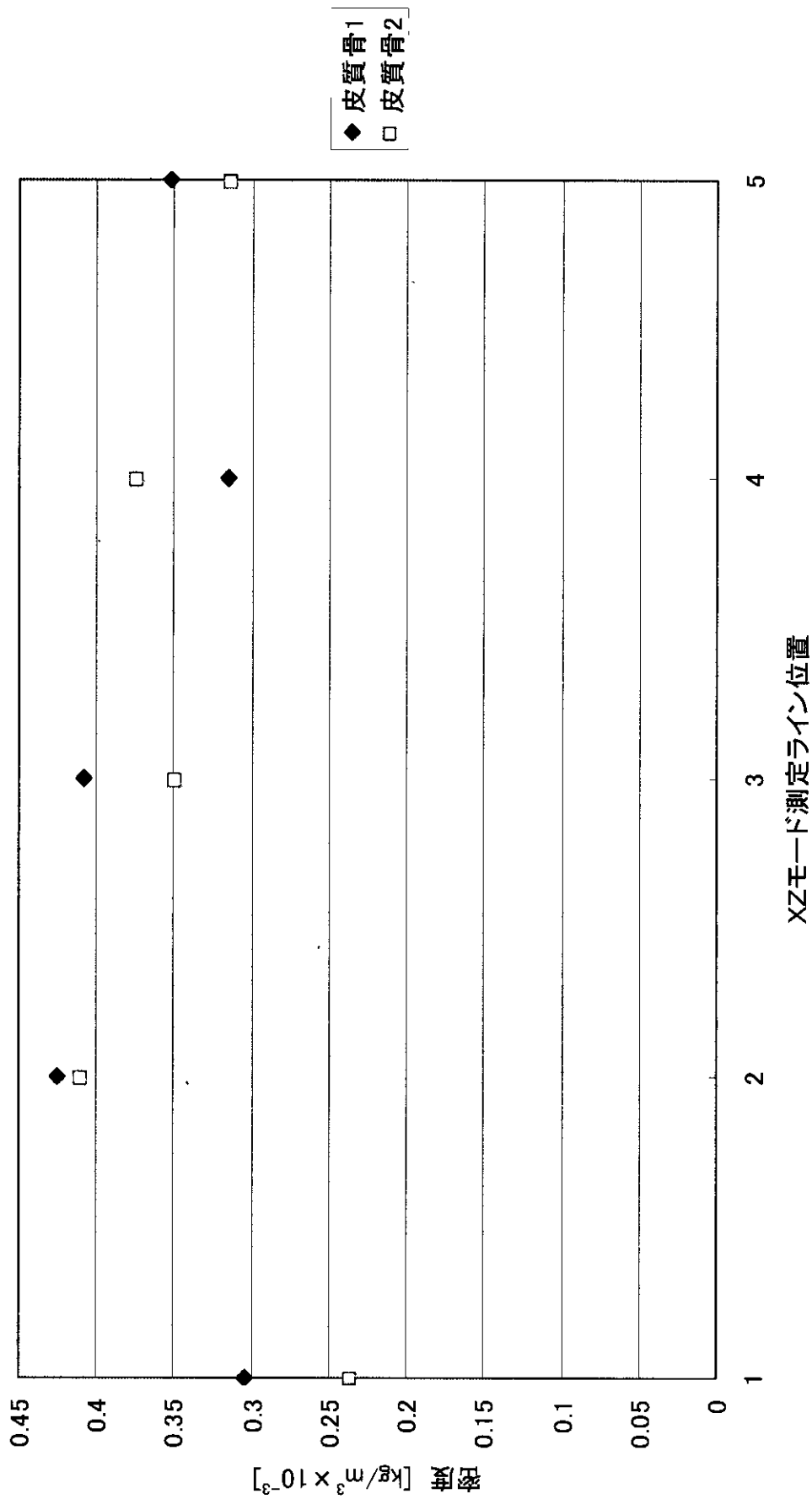


図2-21

② 大腿骨外側皮質骨水平方向

Cモード画像とXZモード測定ライン

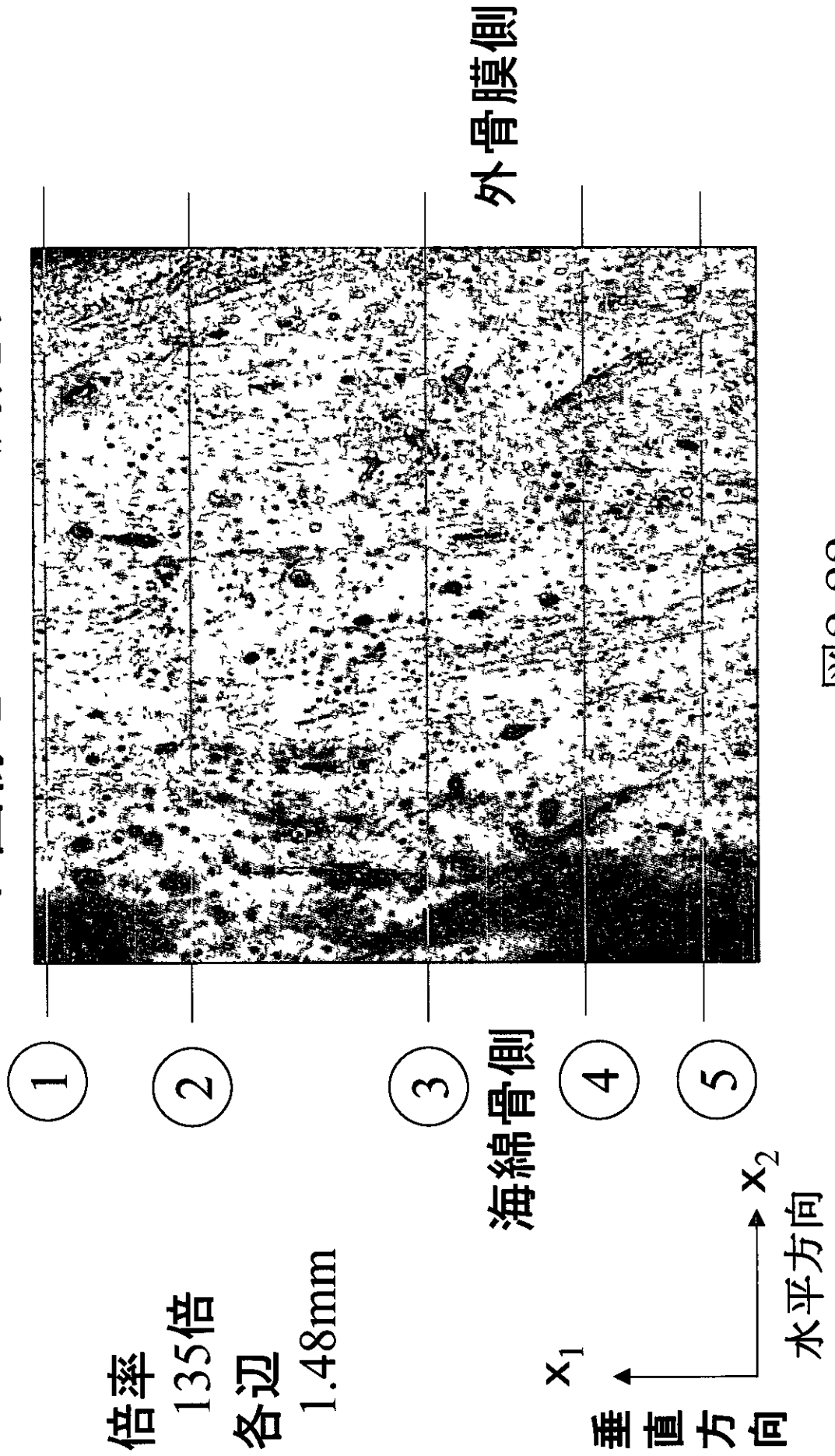


図2-22

表2-3 Voigt平均によるマクロ力学特性

弾性係数 E ポアソン比 ν

$$E = \frac{\sum_i t_i * E_i}{\sum_i t_i}$$

$$\nu = \frac{\sum_i \nu_i * t_i}{\sum_i t_i}$$

	皮質骨 1	皮質骨 2
弾性係数 E_{x1} [GPa]	13.70384	12.30399
ポアソン比	0.43564	0.440287

	皮質骨 2'
弾性係数 E_{x2} [GPa]	9.879671
ポアソン比	0.453705

皮質骨 2' = 皮質骨2 水平方向

表2-4 Reuss平均によるマクロ力学特性

X₁方向の弾性係数 X₂方向の弾性係数

$$Ex_1 = \frac{\sum_i t_i}{\sum_i \frac{t_i}{E_i}}$$

$$Ex_2 = \frac{\sum_i a_i}{\sum_i \frac{a_i}{E_i}}$$

	皮質骨 1	皮質骨 2
弾性係数 Ex ₁ [GPa]	13.28219	11.90912

	皮質骨 2'
弾性係数 Ex ₂ [GPa]	9.09808

皮質骨 2' = 皮質骨2 水平方向

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）

分担研究報告書

大腿骨有限要素モデルによる力学的研究

分担研究者 渡辺 直行(東京都立科学技術大学院工学系研究科助教授),

中土 裕樹(東京都立科学技術大学大学院前期博士課程)

研究要旨

大腿骨頸部骨折の発生機序と骨折防止用プロテクターの開発を支援する目的でヒト大腿骨有限要素法モデルの構築を行った。これまでに報告されているモデルでは、海綿骨と皮質骨を区別していないモデルがほとんどであった。海綿骨と皮質骨は材料特性が大きく異なるため、実際の大腿骨の構造を反映していなかった。このようなことから本研究では海綿骨と皮質骨を分けた二重構造のヒト大腿骨有限要素法モデルを作成した。今後、異方性を考慮した材料定数と転倒を想定した荷重条件をこのモデルに組み込み、解析していくことで、プロテクター開発の支援に役立たせていくことかできる。

A 研究目的

長管骨であるヒト大腿骨では海綿骨と皮質骨はそれぞれ材料特性が大きく異なるため、従来の海綿骨と皮質骨を区別していないモデルでは実際の大腿骨の構造を反映していなかった¹⁾。このため、本研究の目的は海綿骨と皮質骨を分けた二重構造のヒト大腿骨有限要素モデルを作成することであった。

マリン固定した63歳女性の左大腿骨のCT撮影を行った。大腿骨をアクリル樹脂性の水槽内に沈めCT撮影した。CT装置はGE横河メディカル社製 Le mage を用いた。標本の形状データを表1に示す。骨幹軸に垂直な横断面像を骨頭から転子下(小転子の末梢)までをスライス幅1mm、移動幅1mmで撮影し、小転子下より骨幹部、さらに遠位端までをスライス幅1mm、移動幅3mmで撮影した。CT スキャンデータは dicom

B 研究方法

解剖実習用死体標本より摘出し、フォル

献体番号	9941
重さ	484.3g
全長	41cm
骨頭周径	13.8cm
頸部周径	9.0cm
骨幹部周径	8.0cm
転子間	20.2cm
果部周径	22.7cm

表1 ヒト大腿骨について

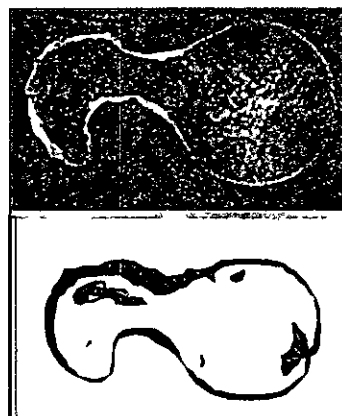


図1 三次元モデルとCT画像

形式で保存した。

三次元モデル構築をするため、三次元医療画像表示解析ソフト Analyze(Mayo Clinic)を用い、CT テータを dicom 形式から volume 形式に変換した上で、CT の閾値を設定し必要となる部分のみを取り出した。ノイズを除去し大腿骨の三次元モデルを構築した。さらに、AutoCAD で取りきれなかったノイズ等を選択し除去した。1 回に撮影できる CT テータの容量が限られているため、作成された三次元モデルも骨頭から小転子下の近位部、骨幹部、および遠位部の 3 つの部分に分割して作成した。各部分の三次元モデルは大腿骨の外表面のみを構築しており、無数の三角形要素からなる。図 1 の上図は骨頭から頸部にかけての CT 画像である。下図は同じ部分の三次元構築したモデルの断面図を示している。この図において、三次元構築されたモデルでは外形を忠実に表しているか、骨髄は除かれてしまっている。以上より、この三次元モデルから有限要素モデルを作成するには以下の 3 つの克服すべき課題が挙げられた。1) 3 分割されて作成された各部分をシームレ

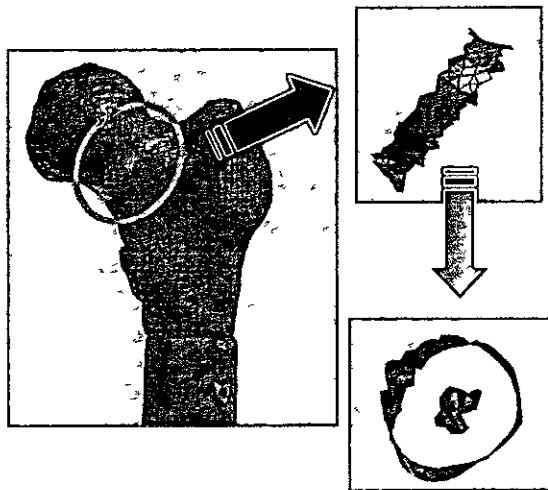


図 2 グループ化

スに接合し一本の大腿骨の三次元モデルとすること。2)三次元モデルの表面の凹凸をできるだけ減らし、凹凸が解析結果に反映しない程度までに滑らかにすること。3)皮質骨と海綿骨の境界を適切な方法で決定すること。上記の 3 課題の解決をめざし、ここでは作成された三次元モデルを修正するのではなく、その三次元座標の情報を用いリモテリンクすることにした。

以下の作業は、解析ソフト Patran(MSC 社製)を用いて行った。まず、分割された近位部、骨幹部、遠位部の 3 つのモデルは基準座標に対し x, y 方向に関しては一致しているため、それぞれの高さ分だけ z 方向に平行移動させて、1 つの大腿骨モデルに組み合わせた。

次に、必要となる断面付近の三角形要素を図 2 左図のように選択し、取り出してグループに分けた。それぞれのグループにおいて外形を構成している三角形要素の頂点をプロットし、点を作成した。その点をスプライン曲線で繋いで曲線を作成し、その曲線に対して平面を作成し、その平面に投影することで 1 スライス断面上に存在する新たな外形曲線を作成した。

続いて、各断面に局所座標を作成し、その局所座標に対してスケール値を設定した。外形曲線を縮小することで皮質骨と海綿骨の境界線となる曲線を作成した。スケール値は、大腿骨近位の骨頭から転子部にかけてと遠位の頸部は皮質骨の厚さが非常に薄いため 0.9、骨幹部は逆に皮質骨の厚さが厚いため 0.5~0.8 とした。形状が複雑で、しかも骨頭から大転子部にかけては皮質骨の厚さが非常に薄いので、面を作成する上で

内側の面か外側の面を飛び出してしまうこと
とあり、実際よりも1~2倍ほど厚くした。

つきに全体を10のセクションに分け、各
断面の外形曲線と境界線曲線を周方向に4
分割し、完全に囲まれた3つ(最上部と最下
部のみ)もしくは4つの曲線を選択して1つ
の面を作成した。さらに完全に囲まれた5
つ(最上部と最下部のみ)もしくは6つの面
を選択して、1セクションか1個の海綿骨
Solid とそれを覆うように4個の皮質骨
Solid となるように二重構造 Solid モデルを
作成した。図3上図は骨頭部分の Solid モ
デルを、下図は骨幹部の皮質骨 Solid を示
している。

この二重構造 Solid モデルに Mesh を作
成していく際に、Solid の形状が極端に歪ん
たところでは六面体要素で Mesh を切ること
かできない場合があるため、4節点の四

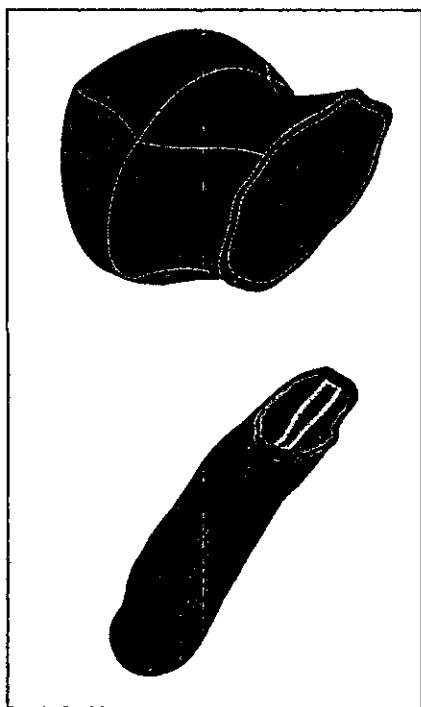


図3 二重構造 Solid モデル

面体要素と8節点の6面体要素を組み合わ
せて有限要素モデルを作成した。その際、
皮質骨部分は厚さ方向に3要素が並ぶよう
にした。作成した有限要素モデルの近位部
付近の断面図を図4に示した。

ここでモデルの妥当性を検証するために、
解析ソルバーABAQUS(ABAQUS, Inc社)を
用いて固有振動数解析を行った。その際に
用いた材料定数は Mourtada²⁾らの値を用
いた(表2)。

C 研究結果

Node 数 9723 個、Element 数 9963 個の
皮質骨と海綿骨の二重構造有限要素モデル
を作成した(図5)。しかし、解析を行った際、
ABAQUS の解析前のチェックプロセスに
おいて、約1%の要素にエラーが見つかり、
固有振動数解析ができなかった。その理由
は海綿骨 Solid を作成する際に、曲率の急
激な変化に対応できなかったため、本来内
部にあるべき海綿骨 Solid が外側の皮質骨

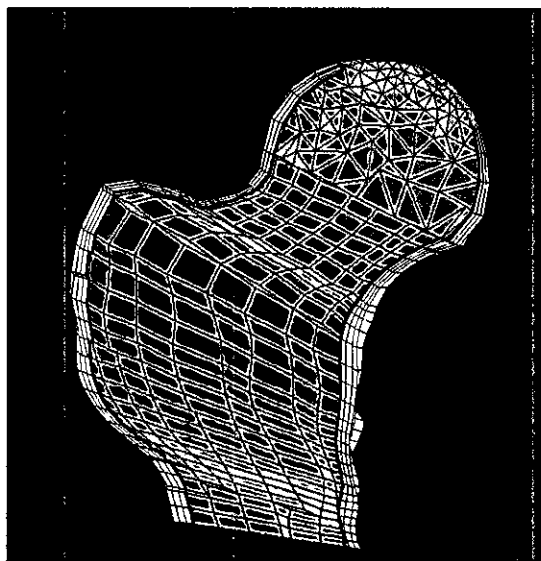


図4 有限要素モデルの断面図

	海綿骨	皮質骨
ヤング率[GPa]	0.4	17
ポアソン比	0.29	0.29
密度[kg/m ³]	500	1880

表2 材料定数について

Solid よりも外に飛び出たためであった。このような部位では海綿骨と皮質骨の境界付近の要素において、前にある面と後ろにある面が交差してしまい、六面体要素を構成できなかつた。

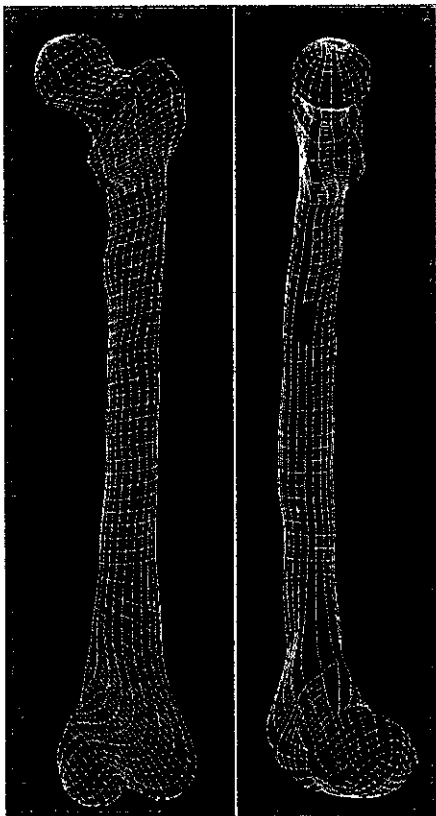


図5 二重構造有限要素モデル

D 考察

最終的な有限要素モデルにおいて、エラーの出た要素に対する解決法として、現在の1セクション1個の海綿骨 Solid を細かく3個または4個に分割して作成することにより曲率の急激な変化を抑えることかできると思われる。

皮質骨と海綿骨の境界線は外形曲線から相似に縮小して作成しているために、実際の形状と異なる場合がある。これに対しては、CT画像から皮質骨の厚さを何点か測定し、実際の断面に近い形状にする必要がある。また、粗鬆化した大転子部の皮質骨の厚さは極端に薄く、厚さが1mmにも満たないところがある。メノシュを切る際に、たとえ薄くても解析上、厚さ方向に最低3層の要素が必要であり、そのため、このような部分では1要素の厚さが0.3mm程度になる。

これは三次元CT装置で撮影した場合の1ボクセルサイズに相当する。ちなみにボクセルサイズ(0.35mmの等方性立方体ボクセル)で骨頭から転子部までメノシュを切った場合、その要素数は数百万のオーダーとなると予想される。それは大腿骨の全体モデルにすると膨大な要素数となる。要素数を1万~2万程度で抑えようとする、皮質骨の厚さが薄いところでは厚さ方向に対する、円周方向と高さ方向の比が非常に大きくなる。さらに皮質骨の厚さの非常に薄い部分のモデルを作成していく際、内部の面と外部の面が重なってしまうという危険性もあるため、モデル構築もかなり難しい。これを解決するために、実際の厚さよりも厚くモデル構築を行い、同部分の物性値で調節することにより、要素の形状も改

善されると思われる。

将来的に三次元 CT 撮影データから有限要素モデル構築の Automation 化をする際には、ボクセルを基準にしたモデル構築を行っていく方法を取り入れることも念頭に入れている。

E. 結論

CT データを用いて、海綿骨と皮質骨を分けたヒト大腿骨二重構造有限要素モデルを構築することができた。しかし、解析段階で全体の約 1% の要素にエラーが出た。その解決法についても考察した。

G. 参考文献

- 1) 吉田郁夫、中土幸男、工藤誠一、森泉哲次、斎藤保典、野村彰夫：振動解析用大腿骨有限要素法モデルの作成と骨の力学的特性評価への応用。医用電子と生体工学 37:285-292, 1999.
- 2) FA Mourada, TJ Beck, CB Ruff, G Bao: Curved beam model of the proximal femur for estimating stress using X-ray absorptiometry derived structural geometry. J Orthop Res 14:483-492, 1996.

要旨

大腿骨の骨梁構造解析と有限要素法解析のための3次元モデル作成を目的とし、2種類の3次元X線CTを用いて大腿骨標本の撮影を試みた。

高分解能（約 $22\mu\text{m}$ の等方向性分解能）を有するCTでは、摘出ヒト大腿骨標本の一部分、コーンビーム3次元X線CTでは標本全体について5回に分けて撮影した。得られたデータは従来のX線CTで得られるものと異なり、等方向性のホクセルデータであること、撮影時間や画像処理時間が大幅に短縮できることなど、骨梁構造の解析および有限要素法解析のための3次元モデル構築に有用であることが確認できた。

研究目的

3次元X線CTで得られる画像について、大腿骨の3次元骨梁解析および有限要素法解析のための3次元モデル作成に用いることの可能性について検討した。

研究方法

- 1 高分解能3次元X線CTによる撮影
ヒト大腿骨標本（72才、女性、左側、全長40cm、重量557g）の下端の一部を切り出しサンプルとし、以下の条件で撮影した。
管電圧 70KV
管電流 $100\mu\text{A}$
FDD 684mm
FOD 63mm
再構成ホクセルサイズ 512 X 512 X 256
ホクセルピッチ $225\mu\text{m}$
階調 16bit
- 2 コーンビーム3次元X線CTによる撮影
ヒト大腿骨標本（63才、女性、左側、全長41cm、重量48kg）を以下の条件で撮影した。
管電圧 120KV
管電流 , 200mA

FOV 256mm

再構成モード SS

再構成ホクセルサイズ 512 X 512 X 256

ホクセルピッチ 0.35mm

階調 16bit

研究結果

- 1 得られた画像データのMIP処理（スライス相当数41、CT値中心468、CT値ウインド幅1985）画像を図1に示す。得られた画像の推定分解能は約 $20\mu\text{m}$ であるか、大腿骨の基本的構成要素である海綿骨、皮質骨や管空部などが明瞭に描出できることがわかった。

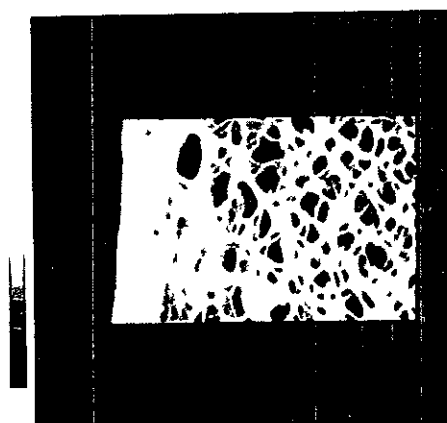


図1 高分解3次元X線CTによるヒト大腿撮影

- 2 大腿骨標本を長軸方向に5回に分けて撮影した。図2に大腿骨頸部の冠状断面（CT値中心 389、CT値 ウィンド幅 1820）

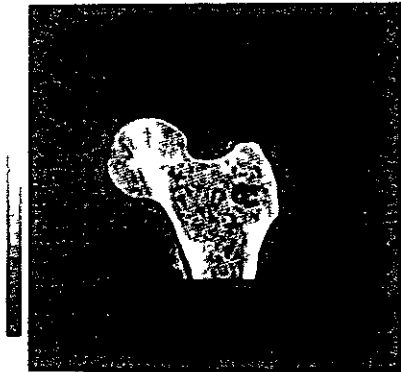


図2 コーンビーム3次元X線CTによるヒト
大腿骨の撮影

考察

この撮影で得られたデータは従来の方法のような二次元データの再構築のよるものではなく、等方向性の分解能を有していることから、データの補間やスムージングなどの処理が不要であり、得られたデータをそのまま用いて三次元の計測、対象領域の抽出、更には骨の三次元構造を直接解析することも可能である。

また、大腿骨の有限要素法解析のための三次元モデルの作成では、0.35mmの分解能での撮影ができた。大腿骨全体の撮影には5回の分割撮影を要したが、1回の撮影時間が1秒であり、従来のヘディカルCTによる撮影に比べて大幅な撮影時間の短縮が可能であった。

結語

2種類の三次元X線CTにより大腿骨の一部および全体の撮影を行い、従来の方法で不可能であった等方向性の分解能を持つホリウムデータが得られ、骨の微細な三次元ネットワーク構造や骨梁パターンの観測が

可能であることを明らかにした。また、人の大腿骨を直接撮影し、有限要素法モデルの構築の可能性も確認できた。

しかしながら、大腿骨全体の撮影によって得られるデータ量はホリウムデータとして約1GBと非常に大きく、通常の画像処理システムではこのデータを扱うことが困難であり、新しい処理手法の開発が課題である。

培養骨系細胞のメカニカルストレス下での反応応答

分担研究者 阿部 康次 信州大学繊維学部教授

長幡 操 国立医薬品食品衛生研究所療品部

研究要旨

低出力超音波パルス(low intensity pulsed ultrasound US)には骨癒合促進効果があるとされ、難治性骨折の治療に応用されている。しかし、細胞レベルにおける作用機構については、未だ明かになっていない。

本研究では、US の骨癒合促進機構を明らかにすることを目的とし、マウス由来骨芽細胞、未分化間葉経細胞を用いて、US が骨系細胞に及ぼす効果について検討を行った。骨芽細胞への US の照射は、細胞の形態、増殖性、分化マーカーの発現に照射群、未照射群の間で差が認められなかった、しかし、人工細胞外基質上で培養した骨芽細胞に対しては US を照射することにより分化機能の促進効果が認められた。これらのごとく、US の骨折治癒促進効果は骨芽細胞単独ではなく、細胞周囲の細胞外マトリックスを含めた組織に対して効果を及ぼす、つまり、人工細胞外基質の存在が重要であることが示された。

A 研究目的

骨は自己修復力の強い組織として知られているが、骨折の自然治癒には数ヶ月、受傷の部位や程度によっては更にそれ以上の期間が必要である。骨折治癒を有効かつ簡便に促進する治療法があれば、患者はギプス固定などの不自由な状態から早期に離脱して日常活動に復帰することかでき、入院日数の減少など医療費削減にもつながる。このような開発背景から、1998 年超音波による機械的刺激(メカニカル・ストレス)によって骨癒合を促進する骨折治療器(セーフス TM、帝人)が発売された。既に、この骨折治療器を用いた臨床試験によって治療期間を約 40%短縮させる効果が立証されている。

骨代謝の研究分野では、古くから「骨の成長・修復は、骨に加えられたメカニカル・ストレスに応答する」という Wolff の法則が知られている。超音波を利用したこの骨折治療器はこの法則に適ったものである。近年、この骨におけるメカニカル・ストレス応答のメカニズム解明が多く試みられている。ラット大腿骨骨折モデルに低出力超音波パルス(US)を照射した結果、骨折七日目の仮骨においてアグリカン mRNA 発現が有意に促進した。また、*in vitro* においては、培養軟骨細胞に US を照射することによって細胞内 Ca^{2+} 量が増加し、その後アグリカンの合成促進が見られた。しかし、培養骨芽細胞に及ぼす US の影響は未だ明らかになっていない。

本研究では、US による骨癒合促進作用の機序を明らかにすることを目的とし、マウス由来骨芽細胞、未分化間葉系細胞を用いて、US が骨系細胞に及

ぼす効果について検討を行った。

B 研究方法

使用した実験器具および試料は全て、オートクレーブ(SS-240 トミー精工)滅菌(121°C、20min)、あるいはマイクロウェーブ照射(SHARP RE-430、500W、3min)滅菌を行った。また、加熱処理できない培地などは、濾過(Membrane filter, pore size 0.22 μ m Geruman Science)滅菌を行った。全ての操作はクリーンベンチ(NIPPON AIR TECH VG-842-L)内で、無菌条件下で行った。

B-1 TCD 上で培養した骨芽細胞に及ぼす US の影響

1) MC3T3-E1 の培養

マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 MC3T3 E1(Riken Cell Bank より購入)、10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO)を含む Alpha Minimal Essential Medium (α MEM、GIBCO)培地を用い、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。2~3 日ごとに通常の継代操作を行った。

2) 低出力超音波パルス装置の開発

低出力超音波パルス装置(US) (設計、北見工業大学)は、平均ピーク圧 150kPa、周波数 1.0MHz、ハースト幅 200 μ sec 繰り返し率 1.0kHz、の超音波

を発信する。Transducer を CO₂ インキュベーターの中に設置することで、細胞を培養しながら US の照射を行った (Fig 1)。

超音波照射装置使用法

【設定方法】

配線 (結線方法は Fig 2 を参照) を確認した後、Oscilloscope (I) → TIME BASE UNIT (II) → Pulse generator (III) → Power Amplifier (IV) の順番で、電源を入れた。次に、以下のように Pulse generator (III) の設定を行った。①を4回押して *burst* を点灯させた。②を押してから、△1を3回押して MHz を点灯させ、②の下のつまみで「10」に合わせた (周波数 10MHz の場合)。②と③を両方押してから、△2を2回・▽3を1回押して「200」にした (ハースト幅 200μ秒の場合)。この状態で 10~20 分ほど暖機した。Transducer はインキュベーターの中に設置した。

【細胞への照射方法】

Power Amplifier (IV) の電源を OFF にした後 Transducer の上に、密着させるためにカンプラント (PANAMETRICS) を塗り、20~30ml の水を張ったハット (ステンレス製) を乗せた。水を張ったハットの上に、サンプルの 35mm dish を底面に空気か入らないように設置した (Fig 3)。Power Amplifier (IV) の電源を ON にし、所定時間 US を細胞に照射した。Oscilloscope (I) のモニターで US が出力されているか確認した。全てのサンプルの照射が終了後、Power Amplifier (IV) → Pulse generator (III) → TIME BASE UNIT (II) → Oscilloscope (I) の順番で電源を切った。

【Hydro phone での超音波照射強度 (平均ピーク圧) の確認方法】

カンプラントを Transducer の上に塗り、水を張ったハットを設置した。培地を入れた dish をハットの中に置き、Hydro phone を浸した。Oscilloscope (I) のモニター画面の目盛から値を読みとった。このとき、Hydro phone の先を dish 底面より 2mm 上にした時の値を測定値として用いた。周波数 1MHz の場合、受派感度は 0.26mV/kPa であることから、測定値を x mV とすると、

$$\text{平均ピーク圧 [kPa]} = \frac{x}{0.26}$$

となる。

US の照射は、細胞を播種して 24 時間後から、1

日 10 時間行った。本実験の照射条件は、培養軟骨細胞に及ぼす US の影響を検討した文献¹⁾の照射条件並びに、超音波骨折治療器 (帝人) の照射条件を参考にした。

3) LDH assay

細胞膜は、傷害を受けると膜内酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) を遊離する 10% FBS を含む α MEM 培地を用いて MC3T3 E1 懸濁液を調製し、組織培養用 35mm dish に細胞密度が 1 × 10⁵ cells/dish になるように播種し、24 時間培養後、周波数 10MHz、又は 15MHz の US を所定時間 (10, 20, 30 分) 照射した。照射後培地中に遊離した LDH を LDH-細胞毒性テストキット (和光純薬) を用いて測定することにより、US 照射による細胞膜傷害性を評価した。障害性と対応する LDH 遊離率を下記の式より求めた。

LDH release ratio (%)

$$= \left\{ \frac{OD_{(s)}}{OD_{(s)} + OD_{(c)}} \right\} \times 100$$

OD_(s) OD_{595nm} in supernatant,

OD_(c) OD_{595nm} in attachment cell)

4) cell proliferation

10% FBS を含む α MEM 培地を用いて MC3T3-E1 懸濁液を調製し、組織培養用 35mm dish に細胞密度が 1 × 10⁴ cells/dish になるように播種し、24 時間培養後、周波数 10MHz、又は 15MHz の US を所定時間 (10, 20, 30 分) 照射を行った。所定時間培養後のタンパク質量を以下の方法にて測定した。培地を除去し、PBS で 3 回洗浄後、0.04% Nomidet P 40 (ナカライテスク) 水溶液を 1mL 加え、37°C、5CO₂% 下で 10 時間インキュベートし、細胞を溶解させた。回収した細胞溶解液 1mL を遠心管 (5mL Nunc) に移し、超音波破碎機 (BH 200P トミー精工) で水冷しながら 30 秒間ホモナイズした。4°C、1000rpm で 10 時間遠心 (KR 2000C KUBOTA) した上澄みをタンパク質量測定のために用いた。この上澄み 200 μL に対し PBS を 600 μL、BIO RAD プロテインアッセイ溶液 (BIO-RAD) を 200 μL 加えた。プレートリーダーを用いて波長 595nm の吸光度を測定し、総タンパク質量に換算した。また、位相差顕微鏡により細胞形態の観察を行った。

5) ALPase activity

ALPase は主に細胞膜に存在し、様々のリン酸モノエステル基質をアルカリ領域で分解する加水分解酵素の 1 つである。ALPase は、骨芽細胞の重要な

初期分化マーカーであり、骨芽細胞の分化(増殖、骨基質の生産および分泌など)に伴い、上昇することか明らかとなっている。細胞増殖挙動の測定で得られた遠心後の上澄み 100 μ L と ALPase の基質緩衝液 [16mM p nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate (生化学用 和光純薬)] 400 μ L を混合し、37°C で 30 分間インキュベートした後、0.2N NaOH 水溶液 500 μ L を加え、酵素反応を停止させた。プレートリーダーを用いて波長 410nm の吸光度を測定した。この吸光度と、増殖挙動で求めた総タンパク質量を用いて、次式より細胞1個あたりの ALP 活性を求めた。

ALPase 活性(U/mg protein) =

$$\frac{\text{O D}_{410\text{nm}}}{16.2 \times 0.1(\text{ml}) \times 30(\text{min}) \times \text{mg protein}} \times 195$$

6) Azo staining

アゾ色素法とは、ナフトール誘導体を基質とし、ALP の酵素作用により遊離したナフトール化合物をシアゾニウム塩で捕捉し、このアゾ色素が酵素活性部位に沈着、発色(濃青色)することにより、ALP 活性部位を評価する方法である。10%FBS を含む α MEM 培地を用いて MC3T3 E1 懸濁液を調製し、35mm 組織培養用ティンシュに 5×10^4 cells/dish になるように播種し、24 培養後、US を照射した。所定日数培養後、培地を除去し、PBS で 3 回洗浄した。10%ホルマリン(Formaldehyde Solution 和光純薬)・PBS 溶液を 1mL 入れ、室温で2時間静置することにより、細胞を固定化し、蒸留水で5回洗浄後、0.5ml/well ALP 染色液[5mg Naphthol AS-BI phosphoric acid sodium salt (和光純薬) in 10ml of 0.05M 2-amino 2-methyl-1,3-propanediol (AMP 和光純薬) buffer (pH9.8)]を注入し、室温で5分間静置後、蒸留水で3回洗浄、95%エタノールにより脱水乾燥させた。また、超音波を5分、10分、20分間つつ照射し、培養6日目に、アゾ染色を行った。

7) Von Kossa staining

Von Kossa 法とは、組織や細胞に沈着したカルシウム塩(リン酸カルシウム、炭酸カルシウム)を重金属で置換し、形成したリン酸銀(あるいは炭酸銀)をさらに還元することにより、黒褐色に染色する方法であり、骨芽細胞による石灰化を可視化することかできる。アゾ色素法と同様の条件にて

MC3T3-E1 を所定日数培養し、固定化、洗浄を行った。5%硝酸銀(和光純薬)水溶液を 500 μ L 入れ、室温で1時間静置後、蒸留水で2回洗浄した。金属銀に還元させるため、5%チオ硫酸ナトリウム(和光純薬)水溶液を 500 μ L 入れ、室温で3分間静置した。蒸留水で2回洗浄し、95%エタノールにより脱水乾燥させた。染色部位を位相差顕微鏡で観察するとともに、写真撮影を行った。

7) Total RNA の抽出と RT-PCR

骨芽細胞は、分化とともに I 型コラーゲン、非コラーゲン性タンパク質(オステオポンチン、オステオカルシンなど)の遺伝子を特異的に発現する。これら遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法により解析することにより分化の程度を判定することかできる。10%FBS を含む α MEM 培地を用いて MC3T3 E1 懸濁液を調製し、35mm 組織培養用ティンシュに 5×10^4 cells/dish になるように播種し、24 培養後、US を照射した。所定日数培養後、培地を除去し、PBS で 3 回洗浄した。以下の方法により mRNA の解析を行った。

① Total RNA の抽出

Total RNA は ISOGEN(遺伝子工学研究用 ニンポニン)を用いて、プロトコールに従って抽出した。

② 逆転写酵素(Reverse Transcriptase RT)反応による cDNA の合成

逆転写酵素反応溶液(RT マスターミックス)を1サンプルあたり以下の組成で調製し、RT 反応を行った。水上で、マイクロチューブ(0.2mL Microtube ASSIST)に 10x Buffer RT(QIAGEN) 2 μ L、5mM dNTP-Mix(QIAGEN) 2 μ L、0.5 μ g/ μ L Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer 1 μ L、10units/ μ L Ribonuclease Inhibitor(QIAGEN) 1 μ L、Omniscript Reverse Transcriptase 1 μ L、DEPC 処理水 33 μ L を入れ、攪拌後、スピンドウンした。調製した RT マスターミックス(10 μ L)と Dnase 処理した RNA 10 μ L を混合し、スピンドウン後、サーマルサイクラー(GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems)にて、37°C で 60 分間、93°C で 5 分間加温後、4°C に冷却することて、First-Strand cDNA を得た。

③ PCR 反応による cDNA の増幅

PCR 反応溶液(PCR マスターミックス)を1サンプルあたり以下の組成で調製し、PCR 反応を行った。

水上で、マイクロチューブ (0.2 mL Microtube ASSIST) に 10×PCR Buffer (QIAGEN) 2.75 μL、10mM dNTP-Mix (QIAGEN) 0.55 μL、25mM Primer- Forward (Sawady Registration) 0.55 μL、25mM Primer Reverse (Sawady Registration) 0.55 μL、Taq DNA Polymerase 5units/μL (QIAGEN) 0.138 μL、DEPC 処理水 21.6 μL を入れ、攪拌後、スピンドウンした。調製した PCR マスターミックス (23 μL) と RT 反応で得た First Strand cDNA を 2 μL 混合し、スピンドウン後、サーマルサイクラーを用い、プライマーごとに PCR 反応を行った。各プライマーの DNA 配列および PCR 反応条件は、以下に示した文献値を参考にし、サワティテクノロジ株式会社にてその合成を依頼した。

a) GAPDH (ポジティブコントロール)
²⁾[Fragment Sizes 267bp]

mouse GAPDH-Forward
5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTCC-3'
mouse GAPDH Reverse
5'-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3'
94 °C, 3min → (94 °C, 30sec, 60 °C, 1min, 72 °C, 1min) 20cycle → 72 °C, 5min

b) type I collagen³⁾[Fragment Sizes 269bp]
mouse collagen α 1 type I -Forward
5'-TCTCCACTCTTCTAGTTCCT-3'
mouse collagen α 1 type I Reverse
5'-TTGGGTCATTTCCACATGC-3'
94 °C, 2min → (94 °C, 30sec, 55 °C, 1min, 72 °C, 1min) 20cycle → 72 °C, 5min

c) osteopontin³⁾ [Fragment Sizes 240bp]
mouse osteopontin Forward
5'-ACACTTTCACCTCCAATCGTCC-3'
mouse osteopontin Reverse
5'-TGCCCTTTCGTTGTTGTCC-3'
94 °C, 2min → (94 °C, 30sec, 55 °C, 1min, 72 °C, 1min) 20cycle → 72 °C, 5min

d) osteocalcin³⁾ [Fragment Sizes 371bp]
mouse osteocalcin Forward
5'-CAAGTCCCACACAGCAGCTT-3'
mouse osteocalcin-Reverse
5'-AAAGCCGAGCTGCCAGAGTT-3'
94 °C, 2min → (94 °C, 30sec, 55 °C, 1min, 72 °C, 1min) 25cycle → 72 °C, 5min

PCR 産物は 2.5% agarose gel (Agarose S NIPPON GENE, 0.5X Tris-Brorate EDTA) によって電気泳動を行い、SYBER Green により染色し、UV イルミネーター (DT-20MP ATTO) により mRNA のバンドを観察するとともに、写真を撮影 (DP 1500II SEIKOSHA) を行った。

B.2 人工細胞外基質上で培養した骨芽細胞に及ぼす US の影響

1) PEC コーティングティンシュの作製

Fig 4 に、本実験で使用したイオン性多糖類の構造を示した。ポリアニオンとして、硫酸化キチン [SCHN], DS=1.55 (DS とは単糖 (1unit) あたりの官能基導入率を示す), MW=20×10⁴、カルホキメチル化キチン [CMCHN, DS=1.0, MW=10×10⁴ カト吉 (株)]、アルキン酸 [Alg, low viscosity]、硫酸化ヒアルロン酸 [SHA, DS=1.05, MW=20×10⁴]、ヒアルロン酸 (HA, MW=30×10⁴ 資生堂)、カルホキメチル化セルロース [CM-C, DS=1.8] を用いた。ポリカチオンとしてキトサン [CS, 脱アセチル化度 100%, MW=40×10⁴ カト吉 (株)] を用いた。各ポリアニオンは蒸留水を用いて荷電基あたり 5×10⁴unit mol/L の溶液 (pH=7.5) に、キトサンは 0.5% 酢酸 (特級 和光純薬)・蒸留水を用いて荷電基あたり 5×10⁴unit mol/L の溶液 (pH=6.0) に調製した。

調製した各ポリアニオン水溶液とキトサン水溶液を組織培養用ティンシュ (TCD, Nunclon™ Delta Surface) 中で等量混合し、PEC を形成させた。なお、混合した各溶液量は、1mL / 35mm dish ずつとした。室温で一晩静置後、上澄みを除去し、乾燥させた。さらに、蒸留水による洗浄、乾燥を二回行うことにより、PEC コーティングティンシュ (SPEC SCHN-CS, CMPEC CMCHN CS, AlgPEC Alg-CS, SHA-CS SHAPEC, HA-CS HAPEC, CM C CS CM-CPEC) を得た。

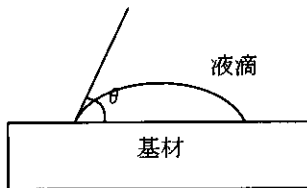
2) cell morphology

10%FBS を含む α MEM 培地を用いて、MC3T3 E1 懸濁液を調製し、PEC コーティング 35mm 組織培養用ティンシュに 5×10⁴cells/dish になるように播種し、通常の条件下で 2~3 日おきに培地交換を行いながら、所定日数培養後、細胞形態を位相差顕微鏡 (Nikon ECHIPSE TS100) にて観察を行った。

3) Total RNA isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction

PEC コーティングディノシュ上で、MC3T3-E1 を所定日数培養後、Col、OP、OC の mRNA の発現を解析した。

4) 水接触角測定による PEC 表面の親・疎水性評価
水などの液滴と固体表面が接する点における液滴面での切線と、固体面との間の角度 θ を、液体のその固体表面上への接触角という(下図参照)。水滴に対する接触角により、基材表面の親・疎水性を評価することができる。各 PEC コーティングディノシュに蒸留水をマイクロシリンジで滴下(約 $5 \mu\text{L}$)し、FACE 接触角計(協和界面化学株式会社、CA-D 型)により接触角を測定した(N=8 の平均値)。



Smoluchowski の式 $U = \varepsilon \zeta / 4 \pi \eta$
(U 電気移動度、 ε 溶媒の誘電率、 η 溶媒の粘度)

4) Atomic force microscopy(AFM)による PEC 表面の微細観察

各 PEC コーティングディノシュを $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ に切断し、AFM (SPI13800 Probe Station, Seiko Instruments Inc)を用いて、走査周波数 10Hz 、走査エリア $15,000\text{nm}$ の条件で PEC 表面の微細構造を観察した。

B-3 軟骨細胞に及ぼす US の影響

未分化間葉系細胞 ATDC-5 細胞を 5%FBS を含む DMEM/F12 培地で 24 時間培養後、US を毎日 10 分間照射し、所定日数培養後、プロテオグリカンの産生をトリインブルー染色によって観察した。軟骨細胞の分化マーカーである type II collagen, Aggrecan の mRNA の発現を RT-PCR 法によって検討した。

C 研究結果

C 1 TCD 上で培養した骨芽細胞に及ぼす US の影響

LDH assay

Fig 5 に US を照射した MC3T3-E1 の LDH 漏出率を示した。未照射の場合、LDH 漏出率は 5% 程度の低い値を示した。超音波を照射した場合、周波数及び照射時間の違いによらず、未照射と同程度の低い LDH 漏出率を示した。

増殖挙動

Fig 6 に骨芽細胞の増殖に対する US の影響を示した。未照射の場合、培養 5 日目まで増殖した後コンフルエントに達し、ほぼ一定の値を示した。US を照射した細胞においても、未照射の場合と同様の増殖挙動を示した。細胞の形態変化を観察したところ、未照射の MC3T3-E1 は、伸展し、培養 3 日目までにシート状になった。US を照射した細胞も、未照射と同様な挙動を示した(Fig 7)。培養 7 日目以降においても、US を照射した細胞の形態変化の差異は観察されなかった。

ALPase 活性の挙動

未照射の場合、ALPase 活性は培養 7 日目まで緩やかな上昇が見られた(Fig 8)。US を照射した細胞の ALPase 活性も、未照射の場合と同様に培養 7 日目まで緩やかに上昇した。

アゾ色素法により ALPase の活性の局在を検討したところ、US 未照射の場合、培養 5 日目まで伸展した細胞全体が薄く青色に染まっていた(Fig 9)。培養 7 日目以降においても、細胞全体に ALPase の発現が観察された。US を照射した場合も、未照射の場合と同様に染色された。照射時間を変えて 6 日間培養した MC3T3-E1 の ALPase 染色写真を Fig 10 に示した。照射時間 5 分、10 分、20 分ともに、同様に染色されたことから、US の照射時間は ALPase の活性に影響を及ぼさないと考えられる。

カルシウム染色 (Von Kossa 法)

Fig 11 に、TCD 上で培養した MC3T3-E1 のカルシウム染色写真を示した。リン酸カルシウムの沈着(石灰化)部位は黒褐色に染色されか、未照射の場合、培養日に関わらず、リン酸カルシウムの沈着はほとんど観察されなかった。また、US を照射した場合も、未照射の場合と同様に、染色部位はほとんど観察されなかった。

遺伝的解析 (RT-PCR 法)

骨芽細胞の分化マーカーである Col, OP, OC の mRNA 発現について検討を行ったところ(Fig 12)、US 未照射の細胞においては培養基間に限らず Col と OP の発現が認められた。OC は、培養 14 日目

降に発現し、21、24 日間培養した細胞に強い発現が認められた。USを照射した細胞の I 型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシンの mRNA 発現も、未照射の場合と同様な発現傾向が示された。

C 2 人工細胞外基質上で培養した骨芽細胞に及ぼす超音波の影響

次に、種々の細胞の分化機能を促進することか明かとなっている PEC を用い MC3T3-E1 cells の培養を行った。当研究室において、硫酸基系 PEC は細胞の増殖を促進し、カルホキシル基系 PEC は細胞の分化を促進することを報告してきた。

形態観察

CMPEC 上で所定日数培養した細胞の形態写真を Fig 13 に示した。US 未照射の場合、培養 3 日目には細胞凝集塊が形成され、培養 14 日目になると増殖とともに凝集塊も大きくなることか観察された。これらの系で US を照射すると、さらに多くの凝集塊が形成された。Fig14 に AlgPEC 上で所定日数培養した細胞の形態写真を示した。当初、大部分の細胞が進展したか、増殖するに連れて、細胞凝集塊が形成された。US を照射すると、CMPEC と同様に、未照射よりも多くの凝集塊が観察され、特に培養 21 日目では、US 照射による細胞の形態変化が顕著に認められた。

硫酸基系 PEC (SPEC, SHAPEC) 上の細胞は、TCD と同様に伸展形態を示し、超音波照射による細胞の形態変化は観察されなかった (Fig 15, 16)。さらに、SHAPEC 上の細胞は、SPEC と同様な挙動を示し (Fig 15)、HAPEC や CM-CPEC 上の細胞は、CMPEC と同様な挙動を示した (Fig 17, 18)。

遺伝的解析 (RT-PCR 法)

ポントィブコントロールとなる GAPDH が確認できた SPEC, CMPEC, AlgPEC 上で培養した MC3T3-E1 の分化マーカー発現について検討を行った (Fig 19)。Col の発現は、US 未照射の場合、基材間に差がなく、US を照射した場合も同様な傾向であった。OP 発現は、US 未照射の場合、基材間に差はなかったか、US を照射すると、カルホキシル基系 PEC (CMPEC 及び AlgPEC) では、未照射よりも強い発現が認められた。一方、TCD および SPEC では、未照射の場合と同様な発現が見られた。OC の発現は、未照射の場合、CMPEC で他の基材よりも強い発現が認められた。US を照射した場合、CMPEC では未照射の場合と同様な発現であった

か、AlgPEC では、未照射よりも強い発現が認められた。一方、TCD および SPEC では、未照射の場合と同様な発現が示された。

PEC 表面の親・疎水性

Fig 20 に、各基材の水接触角の測定結果を示した。各 PEC の接触角を比較すると、PEC のアニオン成分に硫酸基を有する SPEC 及び SHAPEC (以下、硫酸基系 PEC とする) の接触角は、コントロールである TCD と比較すると低い値を示した。一方、PEC のアニオン成分にカルホキシル基を有する CMPEC 及び HAPEC は、TCD より若干疎水性を示した。

AFM による PEC 表面の観察

Fig 21 に、各基材の表面微細構造を AFM により観察した結果を示した。ほぼ平滑に近い表面状態を示す TCD に対して、どの PEC 表面も微細な不均一構造を示した。しかし、PEC の高低差に着目すると、硫酸基系 PEC (SPEC 及び SHAPEC) の高低差は、カルホキシル基系 PEC (CMPEC 及び HAPEC) に比べ、低い傾向を示した。

C 3 軟骨細胞に及ぼす超音波照射の影響

トルイーンブルー染色の結果 (Fig 22)、未照射の場合、培養 7 日目では dish の中心付近が薄く染色され、培養 10 日目になると全体的に染色された。US を照射すると、培養 7 日目では dish の中心部が未照射の場合よりも若干濃く青色に染色された。培養 10 日目になると、未照射と比較して明らかに濃く染色された。

RT-PCR 法による軟骨分化マーカー mRNA の発現を検討した結果、Type II collagen は未照射、照射ともに培養 5 日目から発現が認められた (Fig 23)。しかし、照射のほうか若干、発現量の増加が認められた。Aggrecan の mRNA も培養 5 日目から未照射、照射ともに発現はみられたか、照射の 5 日目特に強い発現が認められた。

D 考察

US の骨癒合促進機構を明らかにすることを目的とし、細胞レベルの反応応答について、骨組織を形成する骨芽細胞を用いて検討を行った。TCD 上で培養した骨芽細胞に US の照射をしたところ、細胞の形態、増殖性、分化マーカーの発現において未照射群、照射群の間に相違は認められなかった。従って、TCD 上で培養した骨芽細胞に対しては、US は影響を及ぼさないことか示された。軟骨細胞に分化する ATDC5 cells に対しては、この条件下