

ノート

歯周組織再生療法のための閉鎖系細胞培養用デバイスの開発

石井 恭子*¹⁾ 柚木 俊二*²⁾ 西岡 秀展*¹⁾ 紋川 亮*²⁾金城 康人*²⁾ 本田 雅規*³⁾

Development of closed cell culture devices for periodontal tissue regeneration

Kyoko Ishii*¹⁾, Shunji Yunoki*²⁾, Hidenori Nishioka*¹⁾, Akira Monkawa*²⁾,Yasuhito Kinjo*²⁾, Masaki J. Honda*³⁾

キーワード: 歯周病, 歯周組織再生, 再生医療, 細胞培養, 閉鎖系

Keywords: Periodontal disease, Periodontal tissue regeneration, Regenerative medicine, Cell culture, Closed system

1. 緒言

幹細胞を用いて組織・器官を再生させる「再生医療」の実現に期待が寄せられている。細胞治療に想定される幹細胞としては胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの多能性幹細胞, あるいは成体に存在する成体幹細胞や前駆細胞がある。後者の場合, 細胞は患者から採取され, 適切に増殖・分化して再び患者に戻される。

治療の安全性を確保するため, 細胞の採取と取り扱いは無菌的環境で実施されるのでセルプロセッシングセンター (CPC) の開発が進められている。しかし, CPC は一般に高額のため (数千万～数億円/機以上), 初期投資と維持管理にコストがかかり一部の総合病院のみの運用が想定される。

CPC の小型化・低価格化も検討されているが, 個人病院への普及は難しいと考えられている。

CPC を用いずに個人病院での細胞の採取と保存が可能になれば, 将来的な再生医療の普及に貢献できると考えられる。

臨床応用が期待される再生医療の一つとして, 歯小囊細胞を用いた「歯周組織再生療法」に着目した。歯小囊とは歯の発生時期においてエナメル器と歯乳頭を取り囲む結合組織であり, 前駆細胞や幹細胞からなる細胞集団 (歯小囊細胞) を含み⁽¹⁾, 最終的には歯周組織を形成する。したがって, 歯小囊細胞が歯周組織再生療法の有効な細胞源となることが期待されている。

本研究では, CPC や細胞培養設備を保有しない歯科医院での歯小囊細胞の採取と培養を可能にする培養デバイスを開発した。

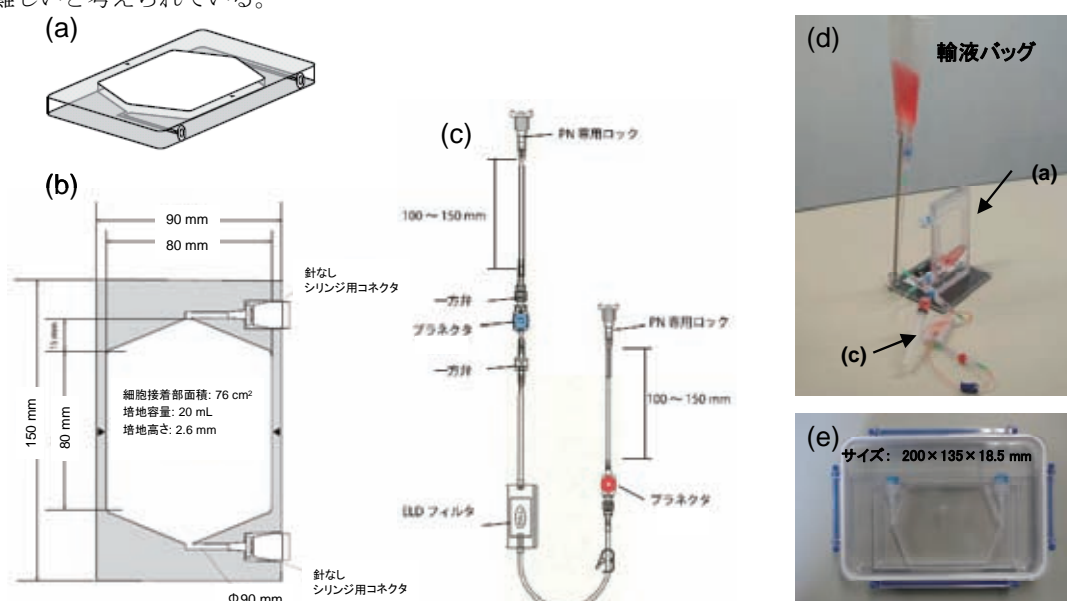


図1. 閉鎖系細胞培養デバイス

(a) 培養容器の全体図, (b) 培養容器の上面図, (c) 培地・細胞交換ライン, (d) 培地交換時の閉鎖系培養デバイスの全体像 (密閉容器を除く), (e) 培養容器 (a) を入れた密閉容器像。細胞培養時, 培養容器は密閉容器内に閉じこめる。CO₂ 発生剤により, 容器内の CO₂ 濃度が一定に保たれる。

* 1) コアフロント株式会社

* 2) ライフサイエンスグループ

* 3) 日本大学歯学部

2. 実験の材料と方法

2.1 閉鎖系細胞培養デバイスの作製 ①培養容器, ②密閉容器, ③培地・細胞交換ライン, ④CO₂発生剤, の4要素から構成される培養デバイスを作製した。デバイスの模式図を図1に示す(密閉容器を除く)。各構成要素に要求される性質と採用した素材を表1に示す。

表1. 閉鎖系細胞培養デバイスに求められる性質

構成要素	求められる性質	採用した素材
①培養容器	細胞接着性、透明性、CO ₂ 透過性	ポリスチレン
②密閉容器	気密性、透明性	アクリル樹脂
③培地・細胞交換ライン	柔軟性、滅菌フィルター	シリコンゴム(送液) ナイロン66フィルター
④CO ₂ 発生剤	即効性、CO ₂ 濃度の持続性	重炭酸ナトリウムその他

2.2 CO₂発生剤による密閉容器内のCO₂濃度制御 CO₂発生剤として、重炭酸ナトリウムと酒石酸の顆粒状複合体を用いた。密閉容器内の区画に所定量の水を入れ、そこにCO₂発生剤を加えて速やかに蓋をした。容器内のCO₂濃度をCO₂センサー(㈱スカイネット)により測定した。

2.3 培養デバイスを用いた歯小囊細胞の培養

(1) ブタ下顎骨からの歯小囊細胞の単離 公知の方法に従い⁽²⁾, ブタ下顎骨の歯冠形成期歯胚から歯小囊細胞を単離後、シングルセルクローニング法によりクローン化した歯小囊細胞を得た。

(2) 歯小囊細胞の培養 CO₂濃度を維持した密閉容器内で歯小囊細胞を培養した。比較として、培養容器を密閉容器から取り外してCO₂インキュベーター内で培養を行った。容器内の細胞数はトリプシンで細胞を回収した後、血球計算盤を用いて測定した。

3. 結果と考察

図2に完成した培養デバイスの外観を示す。デバイス開発のポイントは以下の4点である; 1) 外環境に対して閉鎖系で細胞培養できること, 2) CO₂インキュベーター無しでCO₂濃度管理ができること, 3) 歯小囊細胞が接着・増殖すること, 4) 歯小囊細胞の分化を制御できること。このうち, 4) については現在, 共著者らが細胞接着基質の分化への影響について研究を進めている。本研究では, 1) ~3) を設計指針として閉鎖系培養デバイスを作製した。

要求項目1)については, "ポジダイ"ナイロン66膜をもつ輸液フィルター(ELDフィルター)を利用することで目的を達成した(図1(c)参照)。このフィルターは微細な孔(孔径0.2 μm)により菌体を除去するとともに, エンドトキシンの静電吸着除去効果を持つ。培地バッグをラインの一方に取り付けると, ELDフィルターを通過した培地が培養容器(図1(a), (b)参照)に流入する。

培地交換はプラネクタからシリンジで吸引して行う。ラインは培地交換ごとに新品に交換する。

細胞懸濁液の培養容器への注入にはフィルターを用いることが出来ない。そこで, 滅菌した後にシリンジ用コネクタ(図1(b)参照)から注入する方法を用いて, 細胞培養時のコンタミネーションを回避することが可能となった。

要求項目2)については, 密閉容器(容積500cm³)内に設置した培養容器とCO₂発生剤を共存させた。CO₂濃度は発生剤を溶解する水の量に影響される。30mLの水に溶解した時にCO₂濃度が細胞培養に適した5%となり, 5%への到達時間は僅か10分であった。また, CO₂濃度は4-5%の範囲が約7日間持続した。

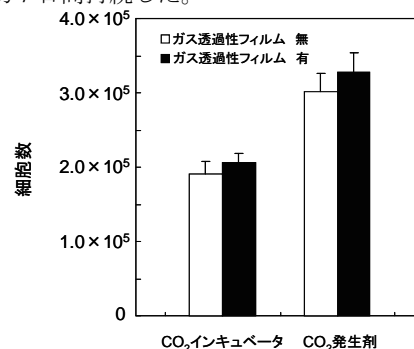


図2. 培養容器内での歯小囊細胞の増殖
CO₂濃度制御はCO₂インキュベーターおよびCO₂発生剤で行った。

要求項目3)については, コロナ放電処理によりポリスチレン(PS)への細胞接着性を改善させ, 容器上面をガス透過性PSフィルムにすることでCO₂の交換を可能にした。図2は培養7日目の細胞数を示す。歯小囊細胞が増殖することを確認できたことで, ガス透過性フィルムがCO₂の交換を阻害していないことがわかった。

CO₂発生剤を用いた場合, 細胞増殖能はCO₂インキュベーターよりも高かった。培地のpHは前者で8.0, 後者で7.4だったことから, 歯小囊細胞の増殖がpH8で促進されたと推定された。

今後は歯小囊細胞の分化維持を評価する。分化維持が確認されれば, 本デバイスにより, 歯周組織再生療法に必要な細胞源を小病院, 歯科医院から供給でき, 再生療法の普及促進が可能になる。

謝辞

本研究は科学技術振興機構の地域イノベーション創出総合支援事業, 平成20年度「地域ニーズ即応型」の研究費補助金を受けた。

(平成22年7月2日受付, 平成22年9月3日再受付)

文 献

- (1) Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH: "Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth" Matrix Biology, Vol.24, No.2, p.155 (2005)
- (2) Tsuchiya S, Honda MJ, Shinohara Y, Saito M, Ueda M: "Collagen type I matrix affects molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells", Cell and Tissue Research, Vol.331, No.2, p.447 (2008)