

図 2-1 微粒子添加 24 時間培養後の細胞活性の粒子濃度依存性

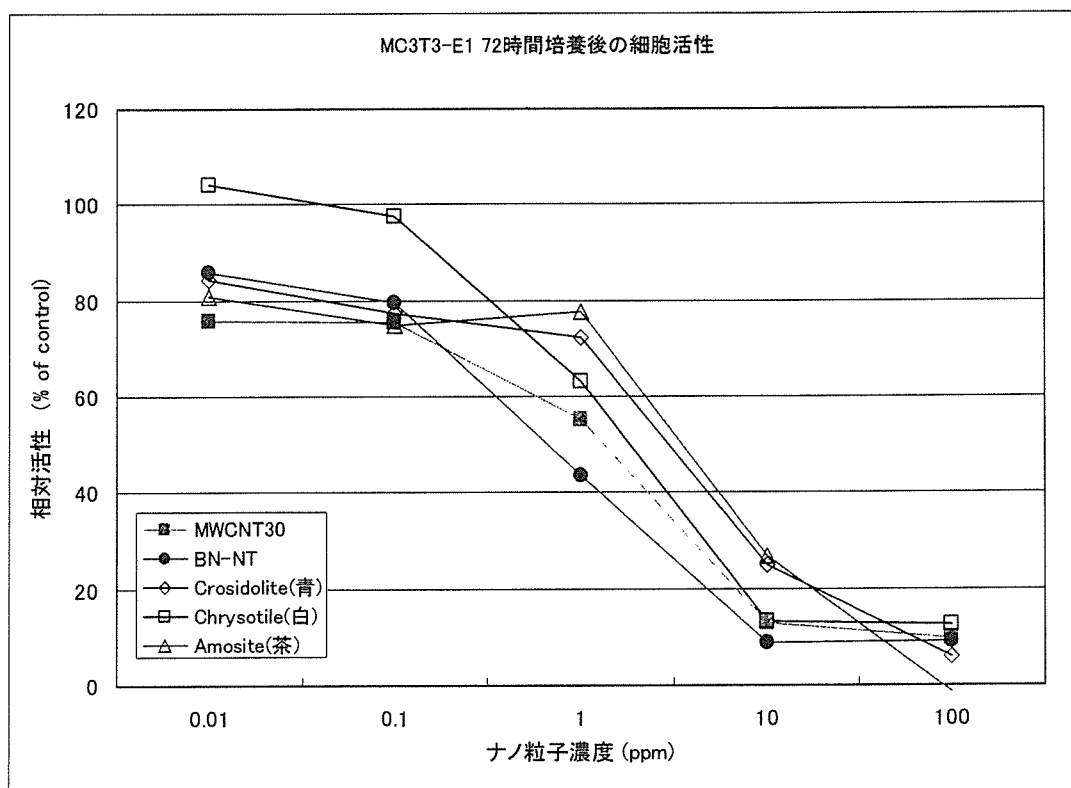


図 2-2 微粒子添加 72 時間培養後の細胞活性の粒子濃度依存性

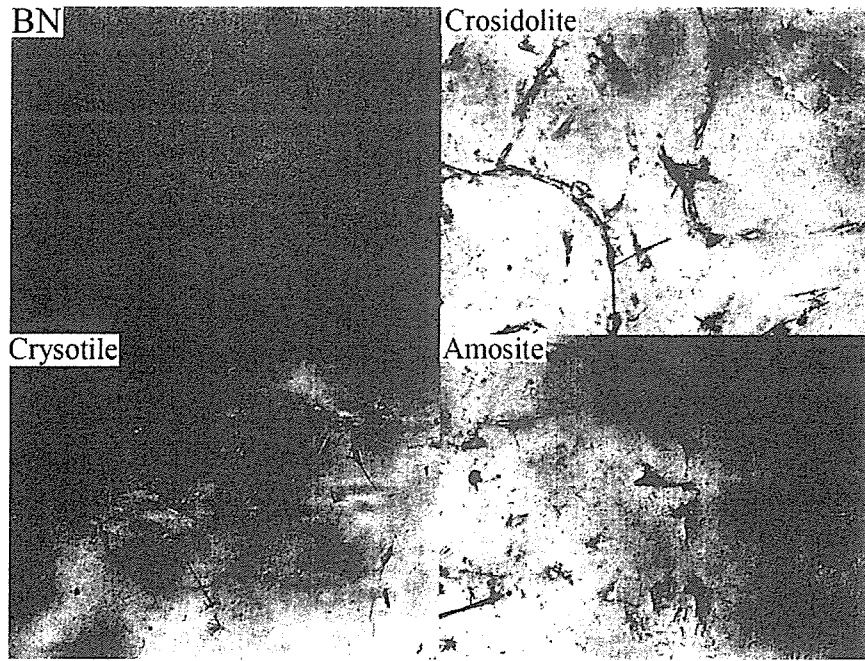


図3 BN 及びアスベスト類を培養した細胞の光学顕微鏡写真 (48 時間培養後)

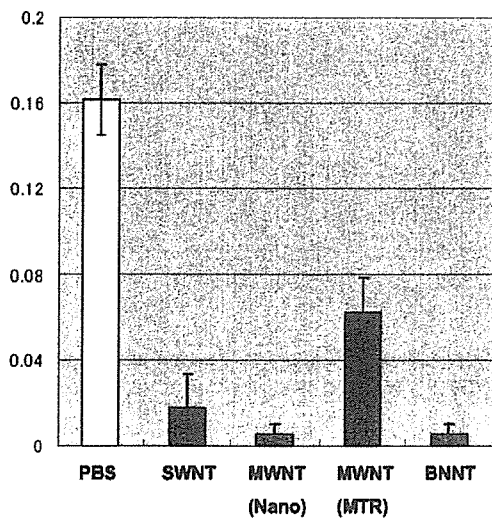


図4 BN 及びアスベスト類の光学顕微鏡像及び SEM 像

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした
細胞培養担体の開発に関する研究

分担研究者	北川善政	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科助教授
研究協力者	久保木芳徳	北海道大学名誉教授 高研バイオサイエンス研究所
研究協力者	寺田典子	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 カーボンナノチューブは、青木らの研究により生体親和性があると確認されており、コラーゲンとも親和性が高いことが判明している。他方では、現在の細胞培養用ディッシュはコラーゲンコートされた担体が高い細胞付着性を持つことから、細胞培養に頻用されている。そこで、コラーゲンコートされたディッシュに親和性のあるカーボンナノチューブを吸着させ、1. コラーゲンコートディッシュへの MWCNTs のコーティング条件（界面活性剤の種類、MWCNTs の濃度、ディッシュへの作用時間の影響）を確立させ、2. 細胞毒性、細胞活性、細胞の SEM 観察、細胞の付着性を解析した。その結果 1. MWCNTs の分散性を高めることによりコラーゲンディッシュに付着し、界面活性剤の種類により凝集体が除去できることが分かった。2. カーボンナノチューブコートディッシュでの細胞培養は細胞活性、細胞増殖率ともコラーゲンコートディッシュにやや劣るものの、ほぼ同等の細胞増殖能が認められた。3. カーボンナノチューブコートディッシュ上の細胞は通常は細胞が剥離するトリプシン溶液でも剥離しにくく、高い細胞付着性を持つことが示された。以上のことから、カーボンナノチューブコートディッシュ特徴的な新しい細胞培養用担体としての可能性が示唆された。今後は、上記カーボンナノチューブコートディッシュの細胞培養における特性を更に検討すると共に、他の材質（例えば金属など）へコラーゲンと MWCNTs の複合コーティングによる、培養担体やインプラントなどへの応用を検討する予定である。

A. 研究目的

カーボンナノチューブは、生体親和性があると確認されており、コラーゲンとも親和性が高いことが判明している。他方では、現在の細胞培養用ディッシュはコラーゲンコートされた担体が高い細胞付着

性を持つことから、細胞培養に頻用されている。

この2つ性質から我々はコラーゲンコートされたディッシュに親和性のあるカーボンナノチューブを吸着させ、特徴的な細胞培養担体が作れないかと担体開発を目的とした研究を行った。

B. 研究方法

1. コラーゲンコートディッシュへのMWCNTsのコーティング条件の検討(界面活性剤の種類、MWCNTsの濃度、ディッシュへの作用時間の影響)

- a) MWCNTs(CNT Inc.)を500°C×90分酸化処理し塩酸洗浄して精製した。一部試料については分散性を高めるため、親水基を付与して使用した。(親水基付与についてはH. Peng, et al., JACS, 125, p.15174, 2006に基づく)
- b) 界面活性剤としてTRIRON X-100 (Sigma)、コール酸ナトリウム(東京化成)の0.1%、0.5%、1%水溶液を用いた。
- c) TRITON 溶液、コール酸ナトリウム溶液 MWCNTsが1~1000pmとなるように調整した(以降、MWCNTs分散液と呼ぶ)。
- d) コラーゲンディッシュ(φ35mm、IWAKI)にMWCNTs分散液2ccを注ぎ、1~6時間静置にしてMWCNTsをディッシュ表面に吸着させ、洗浄・乾燥した。(これを以降CNTコートディッシュと呼ぶ。)また一部SEM観察用にコラーゲンコートカバーガラス(φ25mm、IWAKI)にも同様の処理を施した。(以降CNTコートカバーガラスと呼ぶ)
- e) 得られたCNTコートディッシュ(カバーガラス表面のMWCNTs付着状態をSEM(日立製作所S-4000)にて観察した)。

2. 細胞毒性、細胞活性、細胞のSEM観察、細胞の付着性の検討

- a) CNTコートカバーガラス表面に、ラット線維芽細胞様細胞(MC3T3-E1細胞)を 1×10^5 cells/dishとなるよう播種した。培地は α -MEM(Minimum Essential Medium, GIBCO™)+10%FBS(biowest)を用い、37°C、5%CO₂にて1~3日間培養とした。
- c) 経時的(培養1、2、3日)に①細胞毒性の評価②SEMでの観察③細胞付着性を解析した。(①細胞毒性(培養後、ギムザ染色(Giemsa's solution(MERCK))を行い形態観察も同時に行った。)
 - i) 細胞活性: Alamer blue (BIOSOURCE)を用いた比色測定で、 $\lambda=570\text{nm}$ と $\lambda=600\text{nm}$

の吸光度差を測定した。

- ii) 細胞数・細胞質被覆率: 通法に従い固定、ギムザ染色後、光学顕微鏡観察により、細胞数を数え、細胞数と細胞被覆率を求めた。

- ②SEMでの観察: 通例に従い固定・臨界点乾燥を行い、SEM観察を行った。

- ③細胞付着性: コンプレントになるまで培養した状態で、トリプシン0.1%と0.02%のPBS溶液を2ccずつCNTコートディッシュと対照としてのコラーゲンディッシュに作用させ、細胞数の変化を経時的に観察した。

C. 研究結果

1. コーティング条件によるMWCNTsの付着状態の変化と最適コーティング条件についての結果。

- a) MWCNTsの濃度の影響(Fig.1): 付着量も凝集体量も濃度依存性であった。
- b) 界面活性剤の影響(Fig.2): 界面活性剤は濃度が低いほど分散性が悪く凝集体が目立ち、コラーゲンへの付着が悪かった。また、TRITONよりコール酸ナトリウムの方が、分散性が高かった。
- c) 作用時間の影響(Fig.3): 付着量も凝集体量もほぼ時間依存性であった。作用時間が長くなれば付着量が多くなるが、凝集体も多くなった。

2. CNTコートディッシュ上での細胞培養試験の結果。

- a) 細胞増殖、細胞活性、細胞質被覆率(Fig.4-1,2,3,4): CNTコートディッシュでの細胞数と対照ディッシュでの細胞数はほぼ変わらないと思われた。しかし、CNTコートディッシュの細胞活性が対照ディッシュと比較して初期からやや活性が低く、細胞質被覆率も同様であった。
- b) 細胞の形態: 光学顕微鏡(Fig.5-1,2): CNTコートディッシュでの細胞は対照ディッシュの細胞と比較して細胞個数が少なく、細胞1個1個の大きさも小さかった。細胞被覆率との相関性が疑われた。SEM像(Fig.6-1,2): 光学顕微鏡と同様に、対照ディッシュの細胞と比較して細胞個数が少な

く、細胞1個1個の大きさも小さく細長かった。また、細胞の体表に対照と比較して多くの偽足が出ていた。

- c) 細胞付着性試験 (Fig.7,8) : トリプシン0.1%、0.02%にて細胞の付着性を確認したところ、CNT コートディッシュ上のMC3T3-E1 細胞の方が有意に高い付着性を示した。

D. 考察

1. MWCNTs の分散性を高めることによりコラーゲンディッシュに付着し、界面活性剤の種類により凝集体が除去できることが分かった。
2. 1%コール酸に 500℃×90 分酸化処理し塩酸洗浄により精製させ水酸基を付加した 100ppmMWCNTs を溶解した溶液が最適コーティング条件であることが判明した。
3. CNT コートディッシュでの細胞培養は細胞活性、細胞増殖率ともコラーゲンコートディッシュにやや劣るものの、ほぼ同等の細胞増殖能が認められた。
4. CNT コートディッシュ上の細胞は通常は細胞が剥離するトリプシン溶液でも剥離しにくく、高い細胞付着性を持つことが示された。
5. 今後、CNT コートディッシュの細胞培養における特性を更に検討すると共に、他の材質 (例えば金属など) ヘコラーゲンと MWCNTs の複合コーティングによる、培養担体やインプラントなどへの応用を検討する必要がある。

E. 結論

CNT コートディッシュは新しい細胞培養用担体として使用可能であることが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kyan M, Onodera Y, Iizuka T, Notani K, Kohgo T, Kitagawa Y, Shindoh M: N-acetylglucosaminyltransferase V expression is implicated in malignant phenotype of human tongue squamous cell carcinoma. Oral Medicine & Pathology 10: in press, 2006.

2. Minowa K, Sakakibara N, Yoshikawa H, Omori K, Kitagawa Y, Inoue N, Totsuka Y, Nakamura M: CT and MRI findings of the intraosseous Schwannoma of the mandible: a case report. Dentomaxillofacial Radiology: in press, 2006.

3) Ogasawara T, Miyoshi N, Sano K, Kitagawa Y, Yamada T, Ogawa T, Miyauchi K, Kinoshita H: Influence of administration methods on the accumulation of ALA-induced Pp-IX in mouse tongue tumors. Oral Dis 12(4): 415-419, 2006.

4) Yamazaki Y, Satoh C, Ishikawa M, Notani K, Nomura K, Kitagawa Y: Remarkable response of juvenile diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible to pamidronate. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod: in press, 2006.

5) Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Kitagawa Y.: Specific expression of substance P in synovial tissues of patients with symptomatic, non-reducing internal derangement of the temporomandibular joint: Comparison with clinical findings. Br J Oral Maxillofac Surg. In press, 2006.

2. 学会発表

1. 山崎 裕, 佐藤 明, 野谷健一, 鄭 漢忠, 戸塚靖則, 滝波修一, 中村太保, 北川善政: 口腔扁平上皮癌頸部リンパ節転移における FDG-PET と CT の診断能に関する比較研究. 第24回日本口腔腫瘍学会総会 (シンポジウム3) 口腔癌と PET. 2006年1月26日, 小倉.

2. 齊藤正晃, 北川善政: 口腔癌における PET 診断. 平成18年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業. 2006.5.16. 支笏湖

3. Yamazaki Y, Kitagawa Y., Saito M, Notani K, Tei K., Totsuka Y, Takinami S, Tamaki N: Comparative study of FDG-PET with CT in assessment of cervical lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma” Society of nuclear medicine 53rd annual meeting, June 4, 2006, San Diego.

4. Y. Kitagawa, K. Sano, M. Nakamura, T. Ogasawara, H. Okazawa, Y. Fujibayashi, N. Sadato, Y. Yonekura: FDG-PET to Evaluate Response to Intraarterial Chemoradiotherapy for Organ Preservation in Oral Squamous Cell Carcinoma. Society of nuclear medicine 53rd annual meeting. June 5, 2006., San Diego.

5. 齊藤正晃, 山崎 裕, 佐藤 明, 野谷健一, 鄭 漢忠, 戸塚靖則, 佐藤隆文, 滝波修一, 中村太保, 北川善政: 頭頸部癌頸部リンパ節転移における FDG-PET と CT, US の診断能に関する比較研究. 第30回日本頭頸部癌学会. 2006.6.15. 大阪.

6. Yamazaki Y, Kitagawa Y, Saito M, Notani K, Totsuka Y, Takinami S, Tamaki N: Preoperative lymph node staging of oral cancer using

FDG-PET. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons
88th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition. Oct 5, 2006,
San Diego.

7. 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖
則、北川善政：頭頸部癌におけるMET-PETの有用性の検討。第51
回日本口腔外科学会総会。2006.10.12. 北九州

8. 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖
則、滝波修一、北川善政：頭頸部癌におけるMET-PETの有用性

の検討。第33回北海道頭頸部腫瘍研究会。2007.2.17. 札幌

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案取得
無し

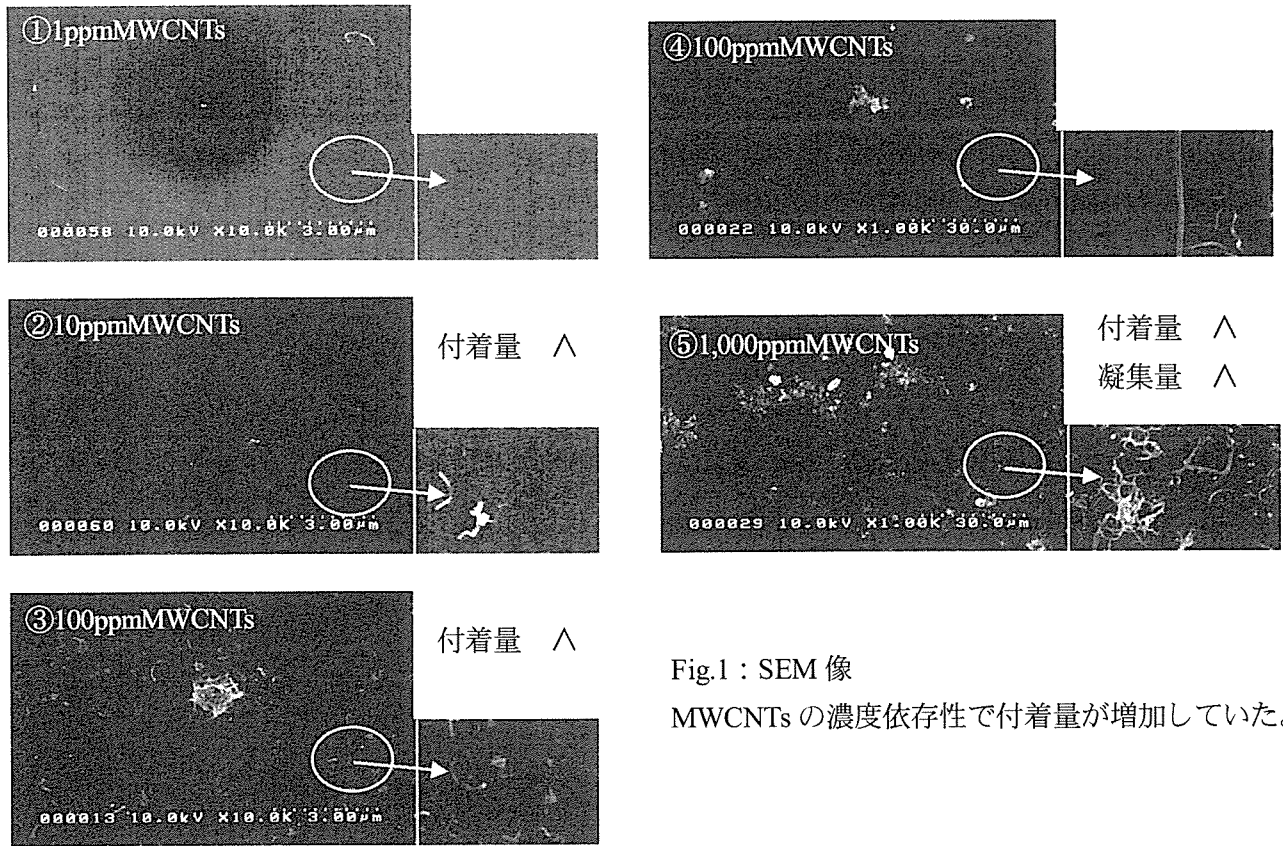
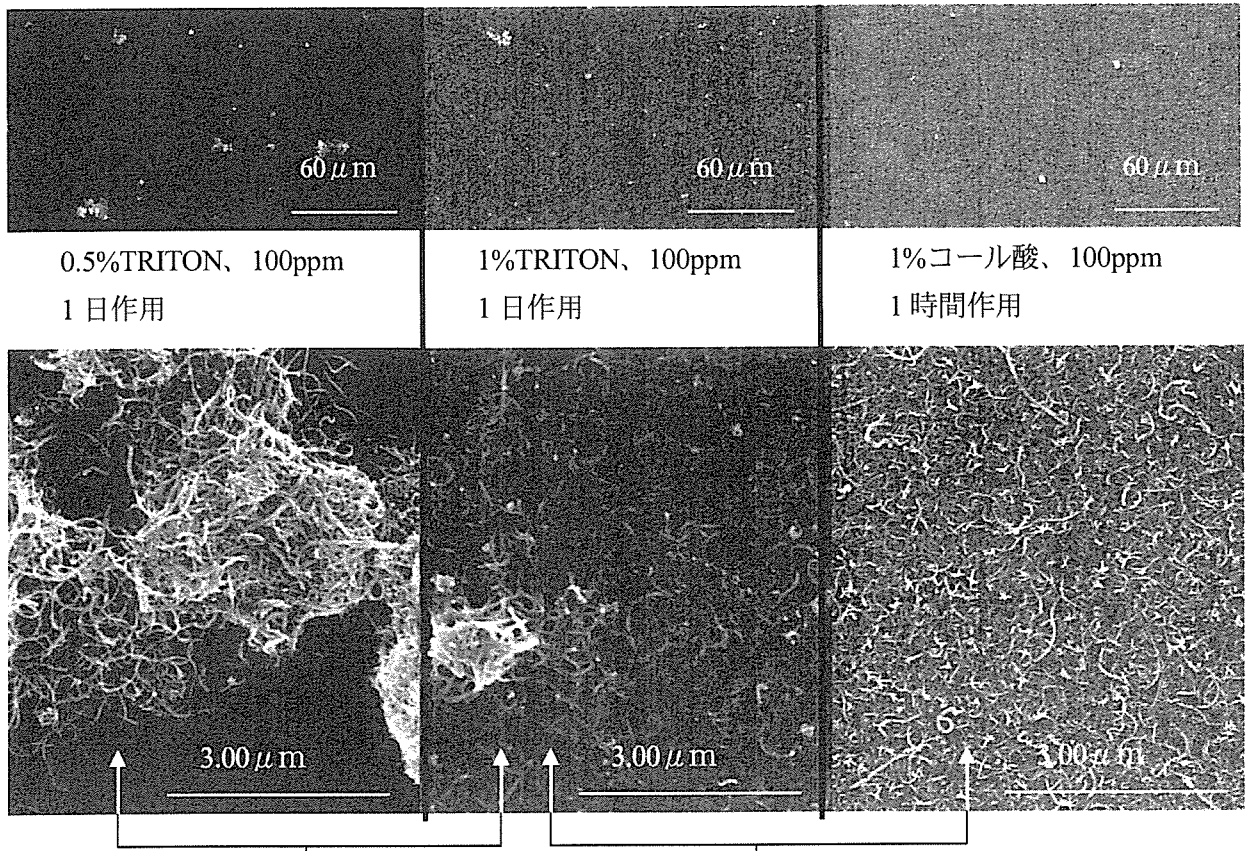


Fig.1 : SEM 像

MWCNTs の濃度依存性で付着量が増加していた。

Fig.2



界面活性剤の濃度が低いほど凝集体ができやすく、付着量も少なかった。

作用時間に関わらず、TRITON よりもコール酸の方が、凝集体も少なく、付着量も多かった。

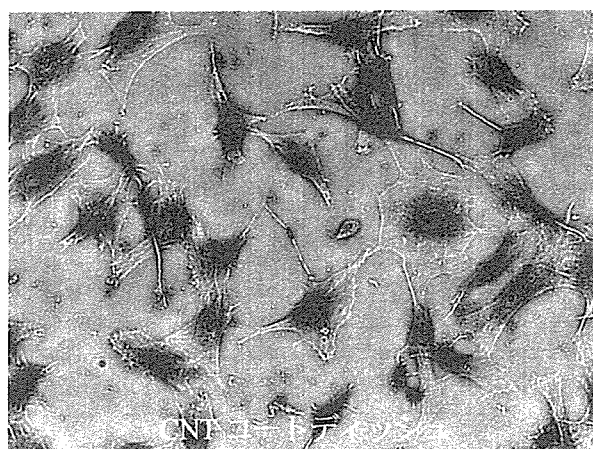
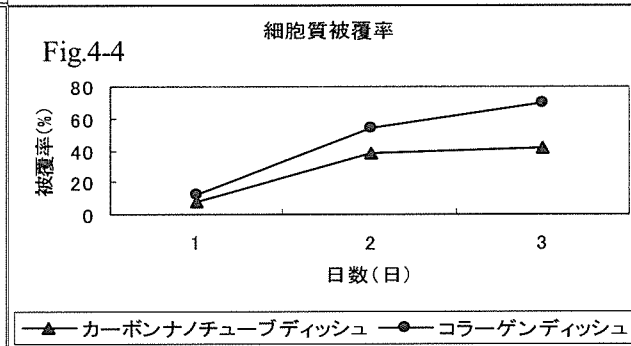
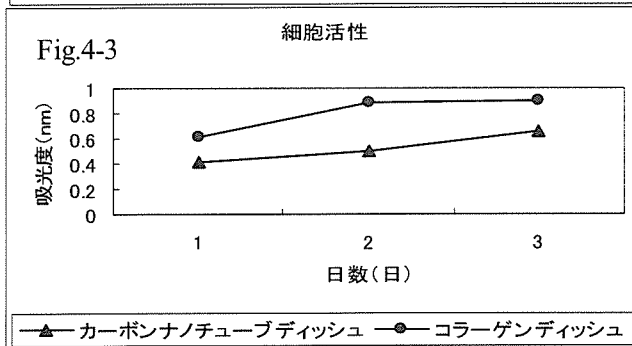
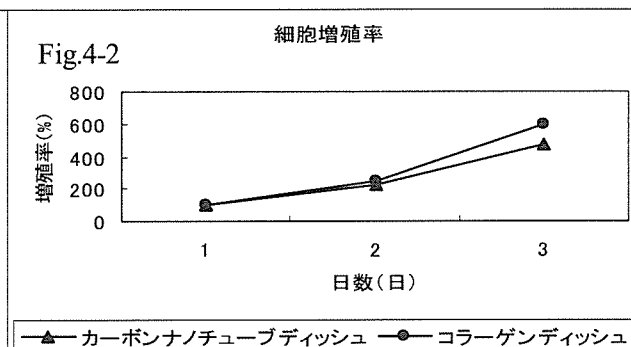
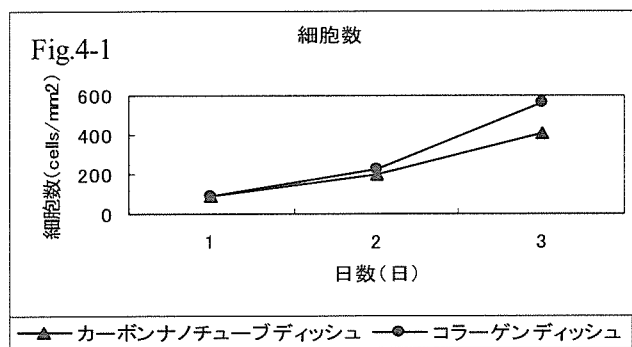
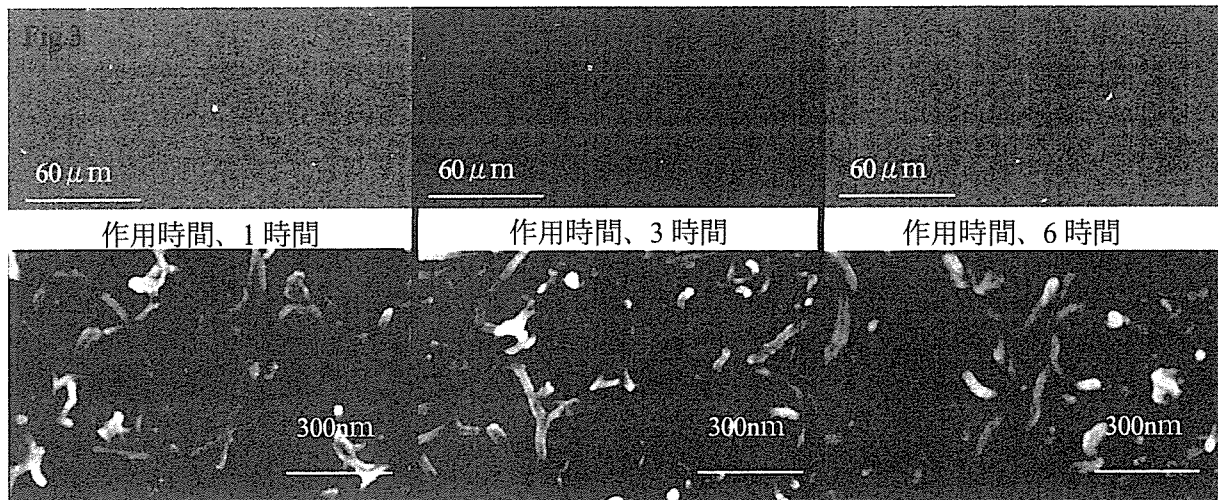
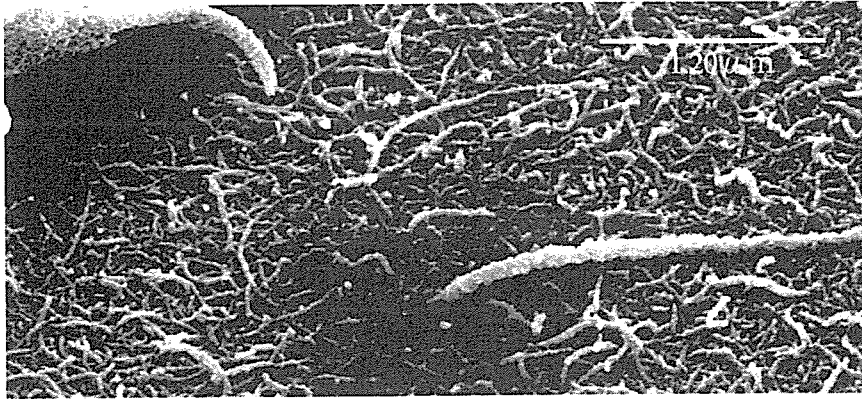


Fig.5-1



Fig.5-2



CNT コートディッシュ

Fig.6-1

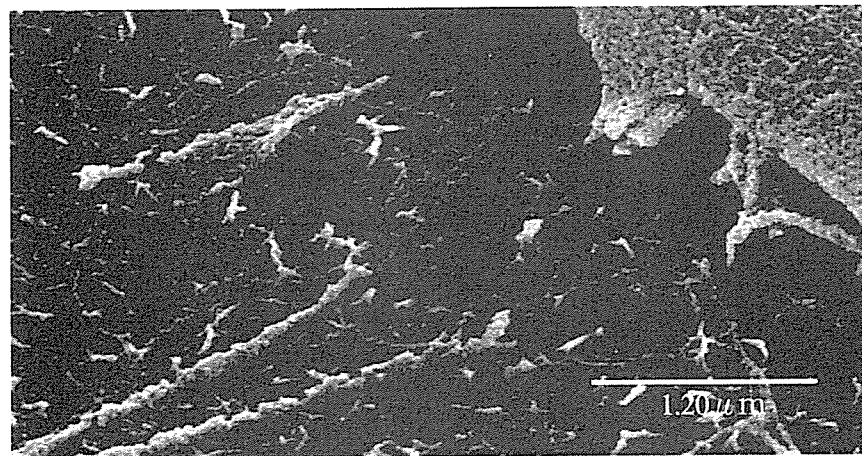


Fig.6-2
コラーゲンディッシュ

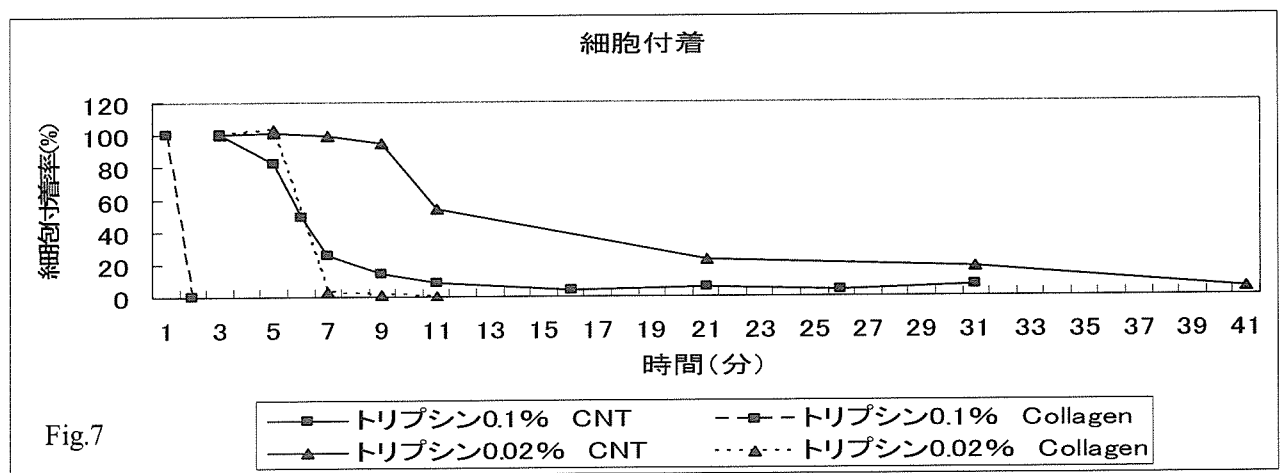
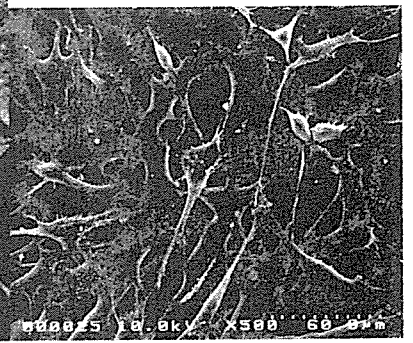
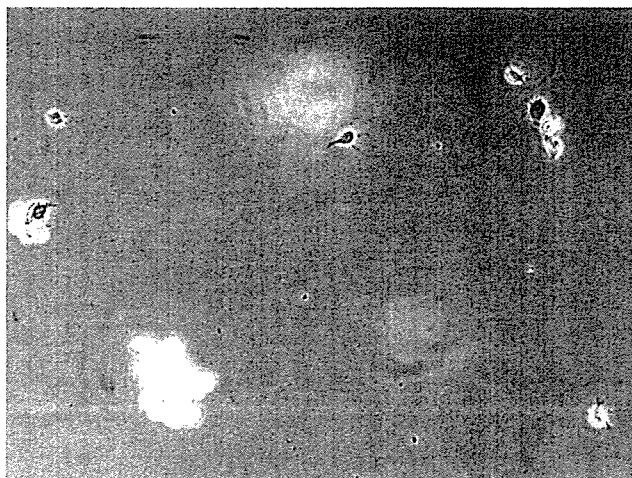
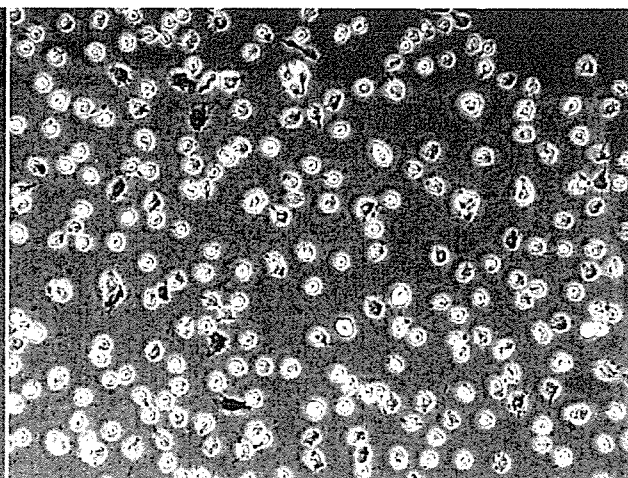


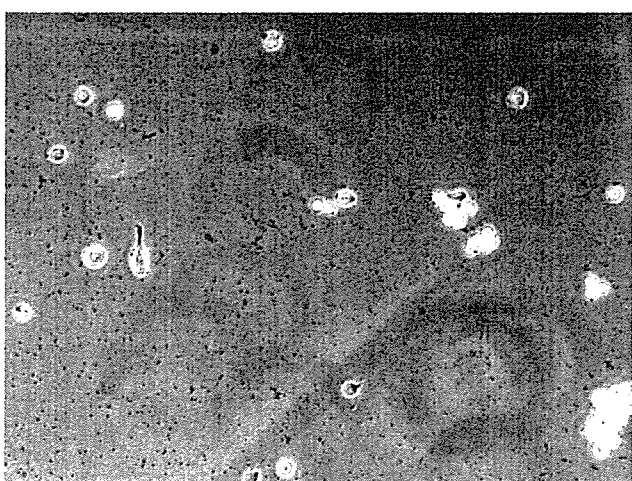
Fig.8



コラーゲンディッシュ、トリプシン 0.002%
作用時間 6分



CNTコートディッシュ、トリプシン 0.002%
作用時間 6分



CNTコートディッシュ、トリプシン 0.002%
作用時間 40分

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ミクロンからナノ・オーダーへの「人工細胞外マトリックス幾何学」の提唱：
ハニカム状長軸構造を持つ β -TCP の血管・骨の新生誘導能に関する研究

分担研究者	北川善政	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	久保木芳徳	北海道大学名誉教授 高研バイオサイエンス研究所
研究協力者	高山満利子	(株)パイロットプレシジョン
研究協力者	寺田典子	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 私たちは、「人工細胞外マトリックスの幾何学」を提唱し、再生医療へのその重要性を強調してきた。組織の再生には、①細胞、②細胞外マトリックス (ECM)、③制御因子、④栄養供給、⑤力学刺激という 5 大要素の統合が必要であるが、そのうち ECM については、物理、化学、生化学的性質が詳しく追究されてきた一方、「人工 ECM の幾何学的性質」の分析が等閑にされてきた。私たちはこの点に着目し、同一材料でも幾何構造によって組織の分化、成長に多大な影響を与えることを実証・報告（してきた。Kuboki Y, et al. : Journal of Bone & Joint Surgery, 83: 105-115, 2001）常に運動を行っている口腔の機能回復のためには、1 日でも早い骨の再生が求められ、骨補填材の改良、開発に期待がかかっている。そこで、多数の直線状トンネルを有するハニカム構造が、骨・軟骨・血管の再生医療に極めて有効である可能性が考えられたため、ハニカム構造を持った β -TCP を用いて研究を開始した。現在までの研究の結果、このハニカム β -TCP は①吸収性の骨補填剤として有効であり、従来品に無い多くの特徴をもつのみならず、②血管新生と骨新生の相互関係研究に有用である可能性を見出した。今後は、違う形態、制御因子の種類の変更、埋入期間の延長による経時的変化の確認、実際の市販骨補填剤との比較を行うなど比較検討をしていく必要がある。

A. 研究目的

組織工学あるいは再生医療の分野において、いかにして効率よく組織形成を促進できるかは最大の課題である。その理論的、実践的追及の過程で、私たちは「人工細胞外マトリックス幾何学」を提唱し、再生医療への重要性を強調してきた。その根幹は次の通りである。組織の再生には、①細胞、②細胞外マトリックス (ECM)、③制御因子、④栄養供給、⑤

力学刺激という 5 大要素の統合が必要であるが、そのうち天然ならびに人工の ECM に関しては、(1) 物理、(2) 化学、(3) 生化学的性質が詳しく追究されてきた一方、(4) 幾何学的性質の研究が等閑にされている。そこで、我々は、現在までに開発されてきた人工マトリックス幾何構造を、10 種類に分類し、それぞれの特徴を解析してきた。

今回は、その 10 種類分類の中で、直線的

トンネル構造に着目し、この構造を骨補填材として多く用いられ、生体内吸収性を持つ素材である β -TCP によって作製することに成功した。このハニカム状の直線的トンネルを持つ β -TCP に BMP を配合し、ラットの皮下に埋植したところ、トンネルを持たない β -TCP の場合と比較し、トンネルに沿って血管と骨が直線的に迅速に成長できることがわかった。今後、この実験系におけるミクロンオーダーのトンネルを利用することで、さらにナノ・オーダーの幾何構造の違いが、組織の成長にどう影響するかを解析できる可能性を追求する。

B. 研究方法

使用担体：

直径 3mm、厚さ(高さ) 1mm または 4mm、長軸方向に直径 300 μ m のトンネルを 37 個保有しているハニカム状 β -TCP (β -TCP、パイロットプレジジョン製、(Fig.1) に、BMP-7 (0.5 μ g / 2.5 μ l) と等量のコラーゲン(高研セルゲン)を (7.5 μ g / 2.5 μ l) を混合した溶液を含浸させ、凍結乾燥した。この試料を“BMP 含浸ハニカム状 β -TCP37” とした。

対照として、ハニカム状 β -TCP と同じ容積で、トンネルを持たない立方体 (2.65 x 2.65 x 1 mm) の β -TCP (無トンネル性 β -TCP、パイロットプレジジョン製) に、BMP 含浸ハニカム状 β -TCP と同様にゲルを含浸、凍結乾燥させた。これを“BMP 含浸無トンネル性 β -TCP” とした。

使用動物

体重が 70g~85g の健康な 4 週齢の Wistar King AH 系雄ラットを用いた。動物に対する全身麻酔には、ペントバルビタールナトリウム(商品名：ネンブタール、大日本住友製薬)を生理的食塩水にて 10 倍希釈し、体重 1 kg 当たり 7.1 ml (ペントバルビタールナトリウ

ムに換算すると体重 1 kg 当たり 35g) にて腹腔内注射を行った。各試料は、ラットの背部を剃毛し、デスポーザルメス#11 を用い皮膚切開を加え、皮下に埋入した。埋植 2 週間後に試料を摘出し分析に供した。

生化学分析

摘出試料中のアルカリフォスファターゼ (ALP) の活性は、摘出した担体を、ステンレス製の杵を用いてエッペンドルフ・チューブ内で磨砕し、500 μ l の 0.2% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich Co., USA)/10mM/Tris-HCl/1 mM MgCl₂ pH 7.4. を用いて抽出し Bessey-Lowry 法にて分析した。

組織学的観察

摘出した担体を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) にて固定後、パラフィン包埋し組織切片を作製し、HE 染色を行った。

倫理面への配慮

北海道大学では動物実験倫理を高い水準で維持するため、ここで実施される全ての実験の倫理面を厳しく規制している。関連法規に従い、全ての研究計画の妥当性について、動物実験倫理問題検討委員会で審議している。本研究の動物実験は、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部動物実験に関する指針に基づき行った。

C. 研究結果

摘出時：担体は被膜で覆われ、周囲から血管が誘導されてきているのが認められた。また、細トンネルの中にも血管が貫通しているのが認められた (Fig.2)。

ALP 活性の結果：Fig.3 に示すように BMP 含浸ハニカム状 β -TCP は BMP 含浸無トンネル性 β -TCP よりも ALP 活性が高かったことが分かった。

組織学的所見: Fig.4 は埋入 2 週後のハニカム状 β -TCP37 の弱拡大と強拡大の組織学的所見です。弱拡大で見られる白い部分が β -TCP の壁で、壁と壁の間を強拡大で示しました。壁と壁の間の中央に内皮細胞で形作られた 1 本の血管が通っており、その両側に骨組織が競うようにして直線的に成長しています。Fig.5 は埋入 2 週間後の BMP 含有無トンネル性 β -TCP の弱拡大の組織所見である。ハニカム状と比較してトンネルが直線的ではなく、不規則であるのが分かる。また、担体の外側から骨が不規則に形成され、トンネル内腔には未分化幹細胞、脂肪細胞が認められ、二次骨形成の存在、血管の所在が分かりにくくなっている。適切な直径の円柱状のトンネルであれば、同心円状に 1~2 本の血管に伴って骨が形成されていくが、不適切な大きさの不規則なトンネルであると血管形成が難しく骨形成をハニカム状のものよりも遅滞する可能性が推測できる。

D. 考察

BMP 含有ハニカム状 β -TCP は、BMP 含有無トンネル性 β -TCP よりも骨形成が著明であったと考えられる。これは、BMP 含有ハニカム状 β -TCP が無トンネル性のもよりも骨形成に必要な血管形成に適した幾何学的構造を伴っていたためだと考えられる。

また、Fig.4 のような像は、従来の人工 ECM では報告がなく、血管と骨との関係を明らかにするための新しい実験系になるとも考えている。

現在はまだ実験が始まったばかりだが、今後は、担体の長さを変化させた違う形態 (Fig.6)、制御因子の種類の変更、埋入期間の延長による経時的変化の確認、実際の市販骨補填剤との比較を行うなど比較検討をしていく予定である。

E. 結論

従来のトンネルを持たない β -TCP の場合と比較し、トンネルに沿って血管と骨が直線的に迅速に成長できることがわかった。ハニカム状 β -TCP は吸収性骨補填材として、臨床応用の可能性があり、また、血管と骨との関係を明らかにするための新しい実験系の可能性もある。今後、この実験系におけるマイクロオーダーのトンネルの壁にカーボンナノチューブなどにより、各種のナノ構造を利用することで、さらにナノ・オーダーの幾何構造が、組織成長に如何なる影響を与えるかを解析可能になった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) George, J., Kuboki, Y., and Miyata, T. 2006, *Biotech. Bioeng.* 95, 404
- 2) 久保木芳徳, 滝田裕子, 吉本良太, 賀来亨: 人工細胞外マトリックスの幾何学, ティシュエンジニアリング 2006, 田畑泰彦, 岡野光夫, 編集, 日本医学館, 東京, 24-33.
- 3) 久保木芳徳, 郁小兵, 滝田裕子, 吉本良太, 賀来亨: 人工細胞外マトリックスの幾何学の統一原理, 再生医療 3: 20-30, 2006
- 4) 阿蘇雄, 久保木芳徳, 宮田輝夫: コラーゲンを素材にした幾何学的スキャホールドの製造とその組織誘導, 再生医療, 5: 31-37, 2006.
- 5) 菊池佑二, 菊池裕子, 高橋正行, 矢澤道生, 西泰治, 久保木芳徳: 微細加工空間構造内での、培養細胞の増殖・分化, 再生医療, 5: 46-72
- 6) Y. Kuboki, R. Yoshimoto, H. Kato, D. Li, T. Kaku, and H. Takita (1 番目) (ほか7名): A New Paradigm of Titanium-Bone Bonding: Creation of the Collaboration Zone between the both Substances by Use of 3-D Titanium Web, which is attached to the Titanium Bulk by Vacuum Sintering. *Archives of Bioceramics Research*, Vol. 5: 146-149, 2005
- 7) Jansen JA, Vehof JW, Ruhe PQ, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, Hedberg EL, Mikos AG. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J Control Release*. 2005 Jan 3; 101(1-3):127-36
- 8) R. Yoshimoto, H. Takita, K. Nemoto, and Y. Kuboki: Attempts to Arrest the Cartilage Stage in Endochondral Ossification by Geometrical Devices of an Artificial ECM. *Archives of Bioceramics Research*, Vol. 5: 404-407, 2005
- 9) T. Nakade, N. Egashira, R. Yoshimoto, H. Kato,

H. Shiota, Y. Seki and Y. Kuboki: Dental Implant System based on Titanium Web-Equipped Titanium Rod (TWT) Induced Collaboration Zone between Bone and Rod of Implant in Beagle Mandibles. Archives of Bioceramics Research, Vol. 5: 277-280, 2005

10) D. Li, S. Iku, K. Nemoto, Y. Kokai, T. Odajima, R. Yoshimoto, T. Kaku, H. Katoh, H. Shiota, Y. Seki, N. Ogura, Y. Abiko, Y. Kuboki: Geometry of artificial ECM: Three-Dimensional Structure of Titanium-Web (TW) Promotes Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells into Osteoblasts. J. Hard Tissue Biol. 14: (2) 333-334, 2005.

11) 久保木芳徳、滝田裕子： FGFとBMPは歯科に何をもちたらすか、歯科臨床研究、2: 18-27, 2005

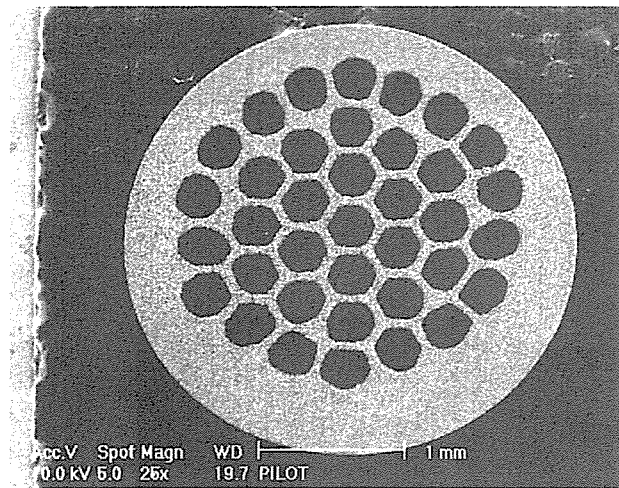


Fig. 1 直径 3 mm、高さ 1 mm、トンネル口径 0.3mm の β -TCP 37 の SEM 写真。トンネルの数と大きさ、高さは自在に設計できる。

2週後の異所性骨形成能

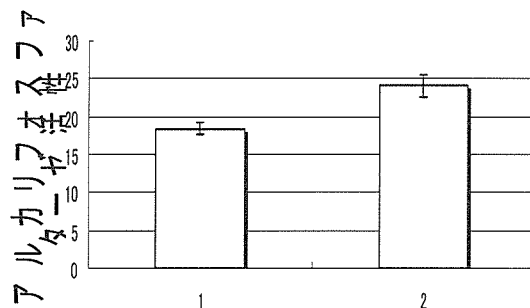


Fig. 2 ハニカム構造を持たない β -TCP と、ハニカム β -TCP 37 と、の骨形成能の差

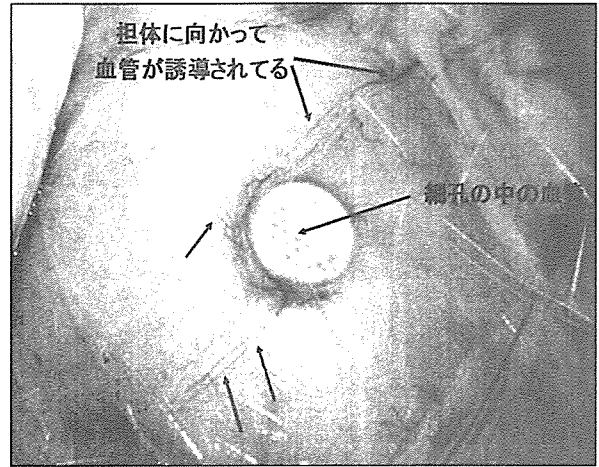


Fig. 3 ハニカム β -TCP37 (直径 3 mm、厚さ 1 mm、トンネル口径 0.3mm) をラットの皮下に埋植して 2 週後に、埋植物の周囲に血管が集まっていることを示す写真。細い矢印は血管を示す。

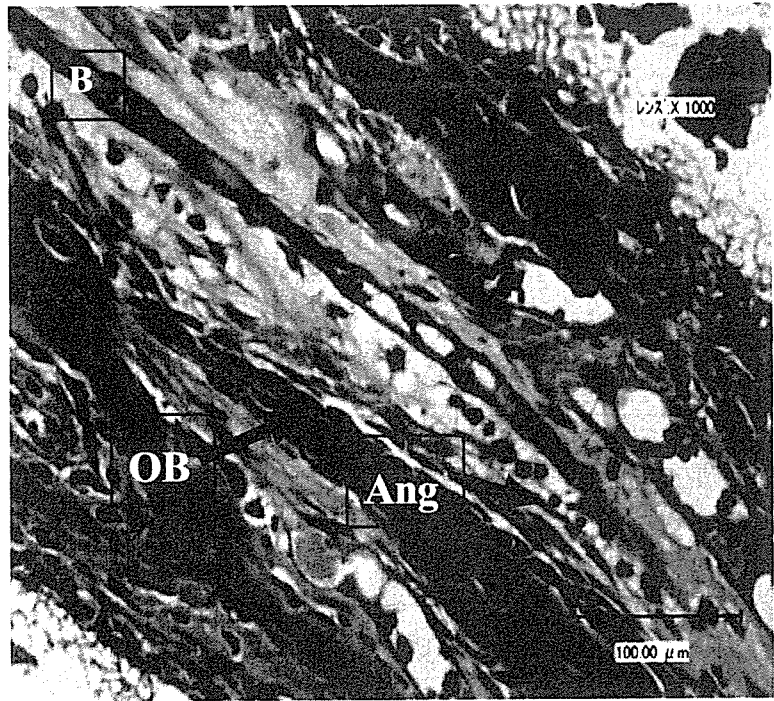


Fig. 4: 直径3mm、長さ4mmのBMP含浸ハニカム β -TCP37を埋植して2週後の骨と血管の旺盛な成長。 β -TCPの壁面に挟まれて骨と血管が競うように伸びているのが判る(A: 弱拡大)。強拡大(B)では、骨芽細胞(OB)と、内皮細胞の前駆細胞らしき細胞(Ang)が観察される。

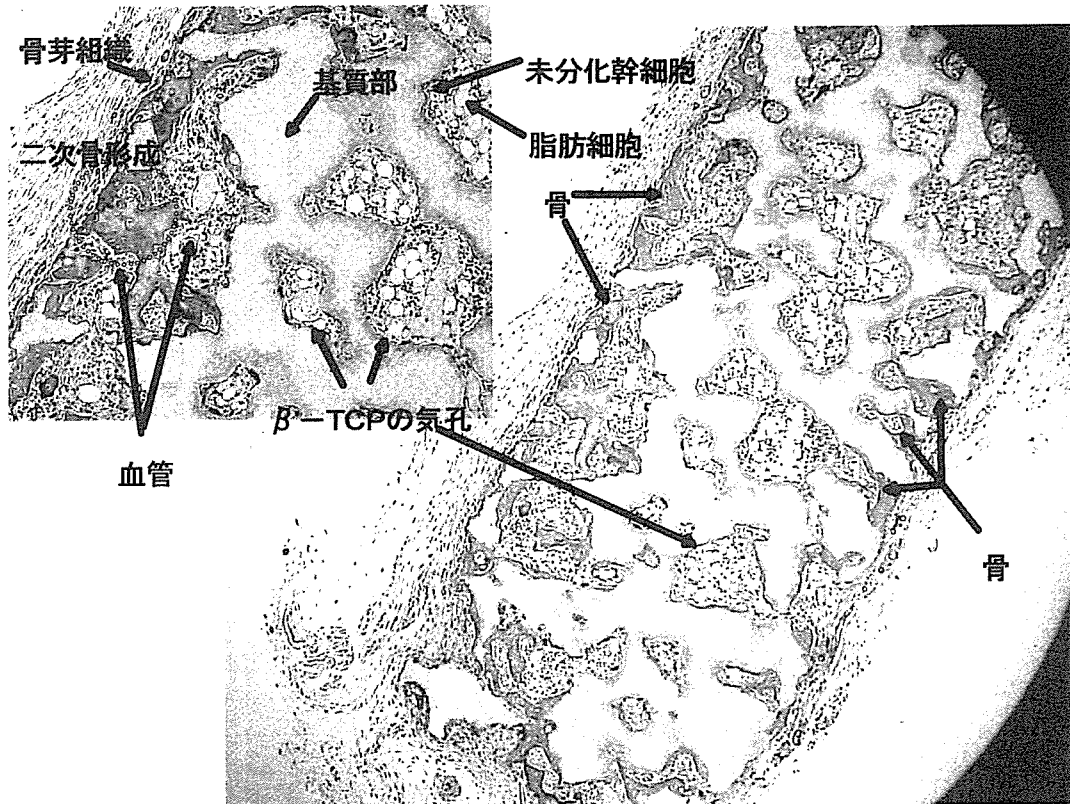


Fig. 5: トンネル構造を持たない β -TCPのブロック(2.69 x 2.69 x 1mm)をラットの皮下に埋植して、2週間後の組織像。不規則な β -TCPポアの壁面に、骨は形成されているが、方向性はなく、成長方向はランダムである。Aは、Bの強拡大像。血管は横断面が多いので、その走行方向は明瞭ではない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

生体内物質動的化学マッピング技術の開発

分担研究者 朝倉清高

北海道大学触媒化学研究センター教授

研究要旨 本研究においては、化学マッピングが可能な X 線光電子放出顕微鏡 (EXPEEM) の開発を行った。本装置の特徴は、多極子 Wien filter を用いることで、光軸を直線に保ちながら、顕微像を測定し、化学状態を分析できることになる。この多極子 Wien filter は、内部の電磁場を調整することで、filter の収差を 3 次の項まで補正できるものであり、感度、分解能が向上する。また、放射光のような大型な加速器を必要としないように、実験室規模高輝度 X 線源を作り、これを用いて、元素分析像の取得を試みた。

その結果、Au/Ta のテストサンプルで、元素マッピング像の取得に成功した。今後は、生体物質のようなソフトマテリアルサンプルの画像化を試みる。

A. 研究目的

DDS をはじめとするナノテクノロジーのバイオ医用応用は 21 世紀高齢社会における個人の健康・QOL 実現に必須の課題である。一方で、その安全性を確認することは重要であり、それに対して必須である体内挙動を解明するために、化学分析可能でかつダメージの少ない X 線光電子顕微鏡を開発し、ナノ粒子の挙動を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

光電子顕微鏡 (PEEM) は、光を照射し、飛び出す電子を用いて、結像拡大することで、物質の動的画像化をする手法である。しかしながら、化学識別性が小さい。そこで、PEEM と X 線光電子分光装置を組み合わせることで、化学的なマッピングをしながら、表面の情報を得る手法の開発を行った。すなわち、X 線を用いることで、内殻光電子を励起して、

表面から外部に取り出させる。このときに、電子の持つ運動エネルギーは、含まれる元素の種類や化学状態のより変化するので、この運動エネルギーを分析して、画像化することで、元素の種類や化学状態の分布をナノオーダーで知ることができる。この手法をわれわれは EXPEEM (Energy-filtered X-ray photoemission electron microscopy) と呼ぶ。この方法は、従来、放射光のような大きな加速器を必要とした。又単純に XPS と PEEM を組み合わせたことから、XPS で通常使われる半球型エネルギー分析器をそのままのせたため、光軸が曲がってしまい、電子顕微鏡の調整には不向きであるという欠点がある。われわれは、図 1 に示すような Wien filter 型エネルギー分析器を用いた EXPEEM 装置の開発を行っている。Wien filter 型エネルギー分析器では電場と磁場を直交して印加することで、電子にクーロン力とローレンツ力を逆向きにかける。ローレンツ力は、電子の

運動エネルギーに比例するので、電子の速度により、電子が磁場から受ける力は異なる。このため、 $E = v \times B$ の条件 (Wien 条件) が満たされたときのみ、電子は直進する。Wien filter の出口にスリットを置くことで、電子を選別することができるようになる。Wien filter の後段に投影レンズをもうけ、結像条件を選択することで、表面の像を得ることができる。電子の束縛エネルギーで決定される運動エネルギーにより選別された像(EXPEEM 像とよぶ)は、表面の化学状態を反映した物になり、表面化学マッピングが可能となる。また、従来の装置と異なり、サンプルから結像面まで直線配置をとることができる。

単純な Wien filter エネルギー分析器では、一般に暗い。これは、磁極として鉄心が用いられており、これが、filter の大部分の空間を占有するため、電子が通る行路面積が小さくなるためである。そこで、われわれは、Wien filter を大口径化し、そのときに生じる収差を多極子化することにより取り除いた。

Wien filter は、光軸をもち、光軸を中心に円筒座標により展開することができる。すなわち、

$$\begin{aligned}\phi(x, y) &= \phi_0 - \phi_{1c}x - \phi_{2c}(x^2 - y^2) \\ &\quad - \phi_{3c}x(x^2 - 3y^2) - \phi_{4c}(x^4 - 6x^2y^2 - y^4) - \Lambda \\ \mu_0\Psi(x, y) &= -\psi_{1m}y - 2\psi_{2m}xy - \psi_{3m}(3x^2 - y^2) \\ &\quad - 4\psi_{4m}(x^2 - y^2) - \Lambda\end{aligned}$$

ここで、 Φ, Ψ はそれぞれ、電場および磁場のス

カラーポテンシャルである。また、各式の ϕ_{ic}, ψ_{im} は i 次の静電場および静磁場係数である。

また、電場および磁場は z 軸上で一様であるという近似を用いた。この電磁場中を電子が運動する際に、電子の運動方程式は以下のラグランジアンにより表すことができる。

$$F(u, \bar{u}, u', u') \sqrt{\phi(u, \bar{u})[1 + |u'|^2]} - \sqrt{\frac{e}{2m}} A_z(u, \bar{u})$$

ここで、 u は、座標の複素数表示であり、

$$u = x + iy \text{ と表せる。また、 } u' = \frac{\partial u}{\partial z} \text{ である。}$$

$$\bar{u} = x - iy \text{ である。}$$

したがって、Euler Lagrangian

$$\frac{d}{dz} (\nabla_{u'} F) - \nabla F = 0$$

を解いて、電子の軌道を求めることができる。しかし、複雑な関数系をしているので、 u の多項式として、 F を展開する。

$$F_1 = -\frac{1}{4\phi_0^{1/2}} (\phi_{1c} - v_0\psi_{1m}) 2x,$$

$$\begin{aligned}F_2 &= -\frac{1}{32\phi_0^{3/2}} [\phi_{1c}^2 (4x^2) - 16\psi_{2m}^2 (x^2 + y^2) \\ &\quad + 8\phi_0 (\phi_{2c} - v_0\psi_{2m}) 2(x^2 - y^2)]\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}F_3 &= -\frac{1}{128\phi_0^{5/2}} [\phi_{1c}^3 (8x^3) + 8\phi_0\phi_{1c}\phi_{2c} 4x(x^2 - y^2) \\ &\quad - 16\phi_0^2\phi_{1c} 2x(x^2 + y^2) \\ &\quad + 32\phi_0^2 (\phi_{3c} - v_0\psi_{3m}) 2(x^3 - 3xy^2)]\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}F_4 &= -\frac{1}{2048\phi_0^{7/2}} [5\phi_{1c}^4 16x^4 + 48\phi_0\phi_{1c}^2\phi_{2c} 8x^2(x^2 - y^2) \\ &\quad + 64\phi_0^2\phi_{2c}^2 2(x^2 - y^2) + 128\phi_0\phi_{1c}\phi_{3c} [x(x^3 - 3xy^2) \\ &\quad + 32\phi_0^2\phi_{1c}^2 4x^2(x^2 + y^2) \\ &\quad + 256\phi_0^3\phi_{2c} (x^2 - y^2)(x^2 + y^2) \\ &\quad + 512\phi_0^3 (\phi_{4c} - v_0\psi_{4m}) 2(x^4 - 6x^2y^2 + y^4)]\end{aligned}$$

まず、低次の展開として、2次までとる。

$$F = F_0 + F_1 + F_2$$

とにおいて、Euler Lagrangian をとくと、その軌道は u_s として与えられる。

$$u'' + \frac{1}{\phi_0} \left(\frac{\phi_{1c}^2}{8\phi_0} (u + \bar{u}) + (\phi_{2c} - v_0 \psi_{2m}) \bar{u} \right) \\ = -\frac{1}{2\phi_0} (\phi_{1c} - v_0 \psi_{1m})$$

このときにこの式の右辺は

$$(\phi_{1c} - v_0 \psi_{1m})$$

項を含んでいる。この項はローレンツ力とクーロン力の釣り合いを表す式であり、先に述べた、Wien filter の直進条件は、

$$\phi_{1c} - v_0 \psi_{1m} = 0$$

として与えられる。

さて、左辺に目を転じると、 u と \bar{u} に対して対称ではない。このままでは、 x と y 軸方向で同じ焦点を結ぶ stigmatic 条件を満たしていないことになる。非点収差を取り除くことが必要となるが、その条件は、

$$\phi_{2c} - v_0 \psi_{2m} = -\frac{1}{8\phi_0} \phi_{1c}^2$$

として与えられる。

さて、この条件を次の規格化した電場、磁場であらわすと、以下のような簡単な式になる。

$$e_2 - b_2 = -1/4$$

ただし、

$$e_2 = \frac{E_2}{E_1} R_0, b_2 = \frac{B_2}{B_1} R_0$$

$$e_3 = \frac{E_3}{E_1} R_0^2, b_3 = \frac{B_3}{B_1} R_0^2$$

$$e_4 = \frac{E_4}{E_1} R_0^3, b_4 = \frac{B_4}{B_1} R_0^3$$

である。

ここで、 $R_0 = L/(\pi\sqrt{2})$ 、 L はフィルタ長である。

以上が1次軌道を与え式であるが、このときにスチグマティック条件をみたすためには、電場あるいは磁場の少なくとも一方に4重極成分をもたせることが必要である。

さらに近似の精度をあげ、

$$F = F_0 + F_1 + F_2 + F_3$$

までいれて、解析すると、式は以下のような物になる。

$$u'' + \frac{\phi_{1c}^2}{8\phi_0^2} u = \frac{1}{\phi_0^{1/2}} [\nabla_u F_3 - (\nabla_u F_3)]$$

この式を解くと、2次の収差 $\Delta u_2, \Delta u_2'$ を得ることがができる。すなわち、

$$\Delta u_2(z_i) = \frac{1}{\phi_0^{1/2}} \int (\Delta_{u'_0} F_3^{\text{int}}) dz$$

$$\Delta u_2'(z_i) = \frac{1}{\phi_0^{1/2}} \{ [\Delta_{u'_0} F_3^{\text{int}}]_{z_0}^{z_i} - \int (\Delta_{u_0} F_3^{\text{int}}) dz \}$$

である。ここで、 F_3^{int} は相互作用表示の場合の3次のラグランジアンであり、

$$F_3^{\text{im}} = F_3(u_0 g(z) + u'_0 h(z), \bar{u}_0 g(z) + \bar{u}'_0 h(z), \\ u_0 g'(z) + u'_0 h'(z), \bar{u}_0 g'(z) + \bar{u}'_0 h'(z))$$

となる。ここで、 $g(z), h(z)$ は1次軌道の2つの基本解である。すなわち、初期値として、

$$g(z_0) = 0 \\ g'(z_0) = 1 \\ h(z_0) = 1 \\ h'(z_0) = 0$$

をもつ。ここで、 z_0 は、filter入り口における位置を表す。

これらの式を用いて、1次軌道からのずれを2次収差 Δu_2 と定義し、それを z_0 すなわち、サンプル入り口での座標の複素数で展開し、その係数 C_{pqrs} であらわすと、

$$\Delta u_2 = \sum_{p+q+r+s=2} C_{pqrs} u_0^p \bar{u}_0^q u'_0 r \bar{u}'_0 s$$

となるが、この係数 C_{pqrs} を電場磁場の関数として、以下の式で表すことができる。

$$C^2_{2000} = -\frac{2}{3R_0} b_2 \\ C^2_{1100} = -\frac{1}{3R_0} (3 + 4b_2) \\ C^2_{0200} = -\frac{2}{R_0} (b_2 + 2(e_e - b_3)) \\ C^2_{0020} = -\frac{2R_0}{3} (3 + 4b_2) \\ C^2_{0011} = -\frac{4R_0}{3} (3 + 4b_2) \\ C^2_{0002} = -8R_0 (b_2 + 2(e_3 - b_3))$$

2次収差 Δu_2 が消えるには、上で与えた収差係数がすべて0になればよい。すなわち、

$$e_2 = -1 \\ b_2 = -3/4 \\ e_3 - b_3 = 3/8$$

である。この条件はRoseらにより導かれた条件と一致する。

われわれは、さらに計算を進めて、3次収差を0にする係数をもとめた。すなわち、4次のラグランジアン展開をこない、

$$F = F_0 + F_1 + F_2 + F_3 + F_4$$

3次の収差に関する方程式を得た。

$$\phi^{1/2} \Delta u_3'' + \frac{\gamma \phi'}{2\phi^{1/2}} \Delta u_3' + \frac{\gamma \phi'' + \eta^2 B^2}{4\phi^{1/2}} \Delta u_3 \\ = D_2(\nabla_u F_3) - [D_2(\nabla_u F_3)]' \\ + \nabla_u F_4 - (\nabla_u F_4)'$$

ここで、

$$D_2 = \Delta u_2 \frac{\partial}{\partial u} + \Delta \bar{u}_2 \frac{\partial}{\partial \bar{u}} + \Delta u_2' \frac{\partial}{\partial u'} + \Delta \bar{u}'_2 \frac{\partial}{\partial \bar{u}'}$$

$$\eta = \sqrt{e/2m_0} \\ \gamma = 1 + 2\varepsilon\phi \\ \varepsilon = e/2m_0 e^2 \\ \phi = \phi(1 + \varepsilon\phi)$$

である。この式をとくと、2つの項に分けることができる。

$$\Delta u_{3A}(z_i) = \frac{1}{\phi_0^{1/2}} \int D_2^{\text{int}} (\nabla_{u_0} \cdot F_3^{\text{int}}) dz,$$

$$\Delta u_{3B}(z_i) = \frac{1}{\phi_0^{1/2}} \int (\nabla_{u_0} \cdot F_4^{\text{int}}) dz$$

ここで、

$$D_2^{\text{int}} = \Delta u_2^{\text{int}} \frac{\partial}{\partial u} + \Delta \bar{u}_2^{\text{int}} \frac{\partial}{\partial \bar{u}}$$

$$+ \Delta u_2^{\text{int}} \frac{\partial}{\partial u'} + \Delta \bar{u}'_2^{\text{int}} \frac{\partial}{\partial \bar{u}'}$$

である。

ふたたび、この収差を収差係数をつかって、3次の項まで含んで展開する。さらに、Wien filter 入り口では、点であると仮定して、 C^3_{00rs} のみの項を考えると、以下のような式になる。

なお、前半の項は上の式3Aに関する収差係数であり、後半の項は上の式の3Bに関する収差係数である。

$$C^3_{0030} = \frac{\pi R_0}{24\sqrt{2}} (3 + 4b_2)(3 + 40b_2 + 60(e_3 - b_3))$$

$$- \frac{\pi R_0}{8\sqrt{2}} (3 + 20b_2 + 12e_3)$$

$$C^3_{0021} = \frac{\pi R_0}{24\sqrt{2}} (21 + 66b_2 + 140b_2^2 + 360(e_3 - b_3)^2)$$

$$- \frac{\pi R_0}{2\sqrt{2}} (5 + 6b_2 + 6b_2^2)$$

$$C^3_{0012} = \frac{\pi R_0}{8\sqrt{2}} (3 + 4b_2)(3 + 40b_2 + 60(e_3 - b_3))$$

$$- \frac{3\pi R_0}{8\sqrt{2}} (3 + 20b_2 + 12e_3)$$

$$C^3_{0003} = \frac{\pi R_0}{\sqrt{2}} (3 + 10b_2)(b_2 + 2(e_3 - b_3))$$

$$- \frac{3\pi R_0}{\sqrt{2}} (b_2 + b_2^2 + 2e_3 + 4(e_4 - b_4))$$

2次の収差係数を0にしたまま、これらの係数を0とするには、

$$e_2 = -1$$

$$b_2 = -3/4$$

$$e_3 = 0.555$$

$$b_3 = 0.188$$

$$e_4 - b_4 = -0.180$$

以上のような電場、磁場を制御することで、3次収差までを0にすることができる。

これを表にまとめると表1のようになる。

ここで、e,b は先に定義した規格化電場、磁場であり、Stigmatic とは批点収差のみ取り除いた条件、Rose は2次収差をのぞいた条件という意味である。3次は3次収差補正条件まで、考慮して求めたことを示している。