

図4 超音波スケーラー摩耗試験後の試料表面

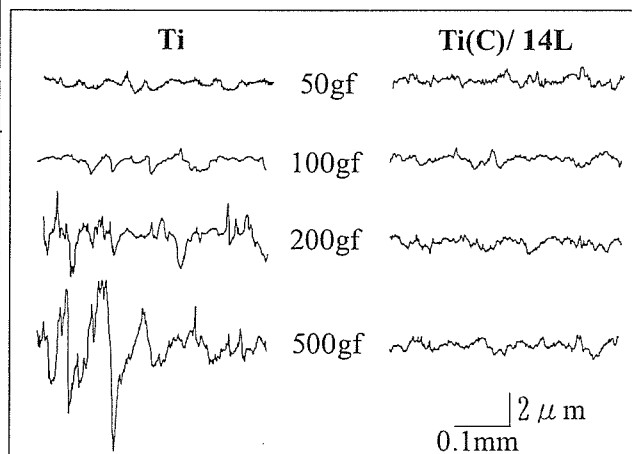


図5 図3の摩耗痕の断面プロファイル

チタン表面には明瞭な条痕が形成されるのに対し、1400℃炭化試料では荷重 50gf まで条痕が認められず、100gf 以上でも純チタンに比べ痕跡深さは浅く、1000gf に対しチタンでは約 28 μ m、炭化チタンでは 17 μ m であり、炭化チタン層を母材チタンと強固に固着し形成されていることが確認された。また超音波スケーラーによる磨耗試験において、図4の写真では同様に摩耗痕のように見えるが、図5の断面プロファイルから Ti では荷重 50gf でもか増大しているが、TiC (14L) では 50-500gf

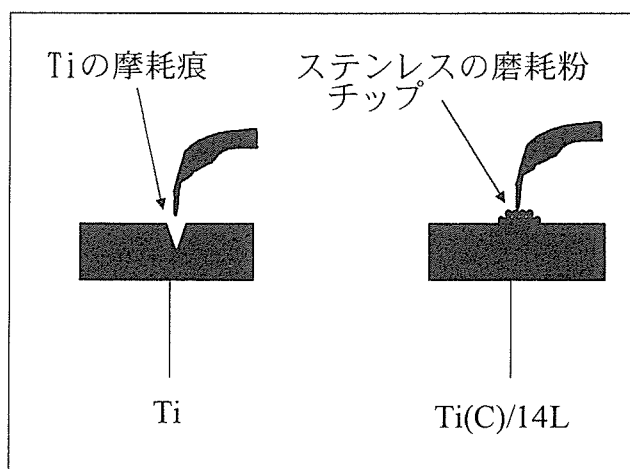


図6 図4、5の摩耗痕の形成機構の模式図

でも試験前とほとんど表面粗さは変わらず、スケーラーによる磨耗が極めて少ないが分かった。この原因として図6のように、純チタンではチタン自身が削られ溝が形成されるが、表面炭化チタンでは試料は削られず、ステンレスチップのほうが磨耗するためと考えられる。臨床使用時に想定される 50gf 程度の荷重では 1400℃試料の表面の摩耗痕は認められなかったことから、ステンレス製チップを使用した操作に対しても試料表面の損傷はほぼ起こさないと予測された。

4. 【結論】

高周波加熱浸炭処理法によりチタン表面への炭化層(TiC)形成が可能となった。1400℃の試料表面に緻密で平滑な炭化チタン層を形成され、炭化チタンのビッカース硬さは約2000と純チタンの約15倍の硬さを有することが確認された。マルテンズ引っかけ試験及び超音波スケーラーによる磨耗試験による炭化チタン層を母材チタンと強固に固着し形成され、きわめて高い耐摩耗性を有し、一般的臨床使用条件(50gf)では試料表面の損傷はほぼないものと予測される。表面炭化したチタンの耐摩耗性に優れたインプラント材料としての可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 朱 禹赫、下妻光夫、近藤英臣、横山敦郎、宇尾基弘、大川昭治、王蔚、亘理文夫：炭化・窒化表面改質したチタンの特性評価と傾斜化、傾斜機能材料論文集 FGM2004, 155-159, 2005
- 2) Yuhe Zhu, M.Shimozuma, M.Uo, W.Wang, T. Akasaka, F.Watari: Surface carbide formation on titanium for abrasion resistant implant material, Archives of BioCeramics Reseach 5, 368-371, 2005
- 3) Yuhe ZHU, Fumio WATARI: Surface carbonization of titanium for abrasion resistant implant materials, Dental Materials Journal. (in press)

人工関節磨耗粉により生じるオステオライシスにおける MIF (マクロファージ遊走阻止因子)の関与およびこれを標的とした治療戦略

北海道大学大学院医学研究科運動機能再建医学分野

○小野寺伸、遠山晴一、安田和則

人工関節置換術後に生じるインプラント周囲骨溶解（オステオライシス）において、マクロファージは主として摺動面より発生する異物磨耗粉を貪食し骨吸収性因子（TNF- α 、IL-1 β 、PGE2等）を放出することにより、中心的に関与する。マクロファージ遊走阻止因子（MIF）はマクロファージを主要な source とし、炎症の場において early-responseive に放出され、様々な炎症の病態において中心的関与を示すことが知られている。われわれは異物磨耗粉により生じるオステオライシスの現象においても MIF が重要な役割を果たしているとの仮説のもと検討を行い、以下の知見を得た。

1. 人工股関節ゆるみの再置換術における偽滑膜・interface membrane を採取し、免疫組織学的および RT-PCR により MIF の発現を検討したところ、すべての偽滑膜において単核・多核のマクロファージ様細胞の細胞質において MIF が陽性であり、これらの細胞は高頻度にポリエチレン磨耗粉を貪食していた。偽滑膜組織における MIF mRNA の発現は正常滑膜より亢進していた。

2. マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に各種濃度の 0.75 μ m 径蛍光ラテックスビーズを添加し、貪食量をフローサイトメトリーにより定量、またこのときの培養上清中 MIF 濃度を ELISA により定量したところ、蛍光ビーズ添加濃度に比例した貪食量が観察され、また培養上清中 MIF 濃度は蛍光ビーズの濃度依存的に増加した。

3. 12 週令野生型および MIF ノックアウトマウス（BALB/C）を用い、マウス頭頂骨上にチタン粉 30mg を埋植して 10 日後に頭頂骨を摘出し、組織切片に TRAP 染色を施行した。野生型マウスでは骨とチタン粉との界面に多数の TRAP 陽性細胞が出現したが、MIF ノックアウトマウスではこれをほとんど認めなかった。

以上より MIF は他の骨吸収性サイトカインと同様に、磨耗粉の貪食により放出され、破骨細胞形成・骨吸収に重要であることが示唆された。MIF それ自身は RANKL を up-regulate したり破骨細胞形成を促すなどの骨吸収因子としての活性はないと報告され、かつ、サイトカインカスケードにおいて上流に位置するとみなされており、異物磨耗粉に起因するオステオライシスにおいても他のサイトカインの“総元締め”として中心的役割を果たしていると推測される。近年 MIF を抑制するいくつかの試みが報告されており、これをオステオライシスモデルマウス・ラットに導入し、オステオライシス治療/予防効果を検討する予定である。

Interaction of technically relevant nanoparticles with cells and a small model organism

M. Gelinsky^{1*}, A. Springer¹, Th. Hanke¹, D. Wersing¹, M. Iwe², S. Bastian², H. Ikonomidou²,
D. Kühnel³, W. Busch³, S. Scholz³, K. Schirmer³, R. Holke⁴, T. Meißner⁴, V. Richter⁴,
A. Potthoff⁴, K. Zirpel⁵, J. Hofinger⁵, W. Pompe¹

¹Max Bergmann Center of Biomaterials, Technical University Dresden, Institute of Materials Science, Budapesterstr. 27, D-01069 Dresden, Germany ²Department of Paediatric Neurology, University Children's Hospital, Technical University Dresden, Germany ³Helmholtz Centre for Environmental Research (UFZ), Leipzig, Germany ⁴Fraunhofer Institute for Ceramic Technologies and Systems (IKTS), Dresden, Germany ⁵Namos GmbH, Dresden, Germany. * Dr. Michael Gelinsky, e-Mail: gelinsky@tmfs.mpgfk.tu-dresden.de

In the framework of a cooperative project, funded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF), we are investigating the interaction of technically relevant nanoparticles (NP) with cells, using physico-chemical, biochemical and molecular biological methods as well as microscopical techniques. In detail, we are quantifying cell attachment and proliferation, investigating cytotoxicity, analysing several markers for cellular events like apoptosis on protein and RNA level and characterise changes of cell morphology due to interaction with NP with SEM, TEM and fluorescence microscopy. Finally, we also want to shed light upon uptake into and distribution of the NP inside the cells. We have started our study using tungsten carbide nanoparticles (WC – Fig. 1a) which are produced for cutting tools at industrial scale – and single wall carbon nanotubes (SWCNT – Fig. 1b) on several primary cells and cell lines from humans, rats and fish.

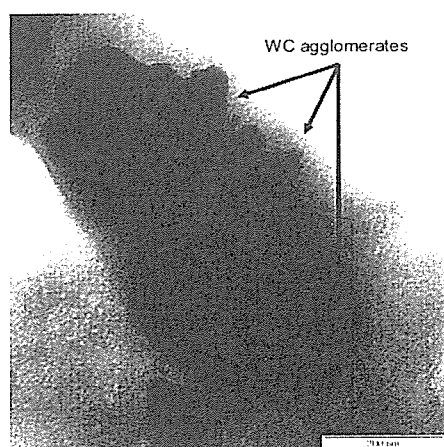


Fig. 1a: WC nanoparticles (embedded in epoxy resin, ultra thin cut/50 nm; TEM)

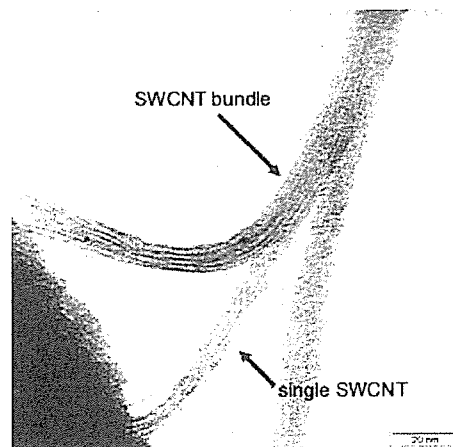
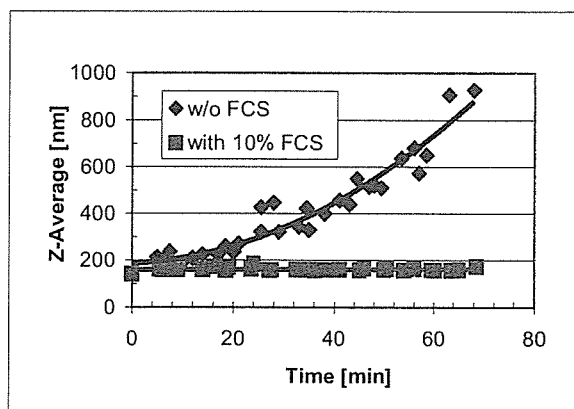


Fig. 1b: SWCNT (embedded in epoxy resin, ultra thin cut/50 nm; TEM)

A critical property of NP-cell (or tissue) interaction is their size, which has been shown by several studies in the last years. Due to the propensity of NPs to agglomerate in aqueous media this seems to be a serious issue for cell culture experiments with NPs. Investigating the agglomeration behaviour of WC nanoparticles in DMEM cell culture medium we found that addition of 10% foetal calf serum (FCS) – a common additive for cell culture – prevents agglomeration effectively. Fig. 2 shows the change of averaged agglomerate size of WC NPs over time in DMEM without and with 10% FCS by comparison.

Fig. 2: Agglomeration behaviour of WC nanoparticles, suspended in DMEM cell culture medium at 25°C without and with 10% foetal calf serum (FCS), respectively. It is obvious that presence of FCS stabilises WC nanoparticles and prevents agglomeration. No change of Z-average could be observed in the presence of 10% FCS, even after several hours of incubation. Instrument used: Zetasizer Nano ZS.



We have investigated cytotoxicity of WC NPs in several cell culture models, adding the particles as suspensions on top of adherent cells. Whereas no significant effects were detected with primary rat neurons, a slight cytotoxicity was found using oligodendroglia cells (cell line OLN 93, rat) at WC concentrations of 10 µg/ml (Fig. 3).

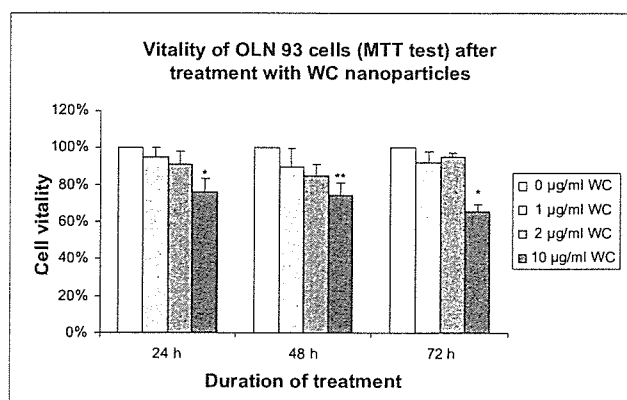


Fig. 3: Vitality of oligodendroglia cells (cell line OLN 93, rat) after treatment with WC nanoparticles in suspension. Results of a MTT-test. Cell vitality was normalised to those of samples without WC (= 100%).

The results are supported by an additional quantification of cell vitality, using the CCK-8 assay, but differences are less pronounced in this test.

[* p < 0.05 ** p < 0.01 – student t-test]

Quantification of apoptotic cells using the TUNEL assay revealed that WC NPs have a slight effect on apoptosis – more pronounced for neurons than for the oligodendroglia cell line OLN 93.

Using scanning electron microscopy (SEM), WC nanoparticles could be visualised on top of the cells. Fig. 4 shows oligodendroglia cells (OLN 93), 3 d after seeding and incubation with 10 µg/ml WC NP for 1 h. The left image (4a) is the micrograph, taken with the secondary electron detector (SE-detector), whereas the right one (4b) shows the backscattered electrons (BSE-detector). Applying a high acceleration voltage of 15 kV each, elements with high atomic numbers like tungsten appear lighter. The white spots on top of the cell membrane correspond therefore to the WC NPs. TEM investigations concerning NP distribution inside the cells are just under way. Additional experiments have been performed using primary astrocytes and neuronal stem cells (both from rats), CaCo-2 (human colon cell line), HaCaT (human dermal keratinocyte cell line), A549 (human lung cell line), PAC2 (embryonic cell line from zebra fish) and RTgill-W1 (gill cell line of the rainbow trout) – also with SWCNT.

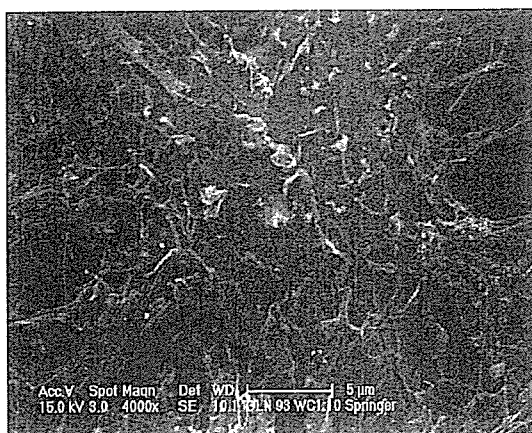


Fig. 4a: OLN 93 cells, incubated with 10 µg/ml WC NP for 1 h. SE-detector image (4000×)



Fig. 4b: OLN 93 cells, incubated with 10 µg/ml WC NP for 1 h. BSE-detector image (4000×)

In a second approach, we are investigating at the Max Bergmann Center interaction of NPs with a small model organism – *C. elegans*, a worm from the nematode family, which is used as model system in biology since decades. The advantage of using a living animal is that NPs will interact with organised tissues, especially the skin and intestine, instead of single cells. This is of course a situation much closer to the exposure of humans to NPs. However, *C. elegans* is still small enough to follow the NPs up to the cellular level. We have started using defined gold NPs (clusters and rods) and Q-dots; the latter to be also able to visualise the uptake processes by video fluorescence microscopy. Fig. 5a shows as example a SEM image (BSE-detector) of Au NPs inside of *C. elegans* after three days of exposure. Fig. 5b is a fluorescence micrograph, showing Q-dots (red fluorescence) inside the intestine, also after 3 days of exposure.

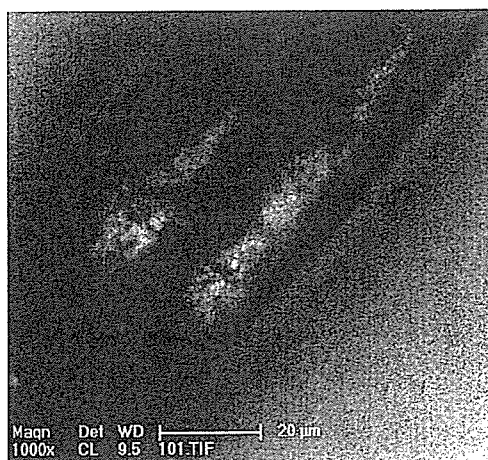


Fig. 5a: SEM micrograph of a worm after three days of feeding with Au NP. BSE-detector image, 30 kV

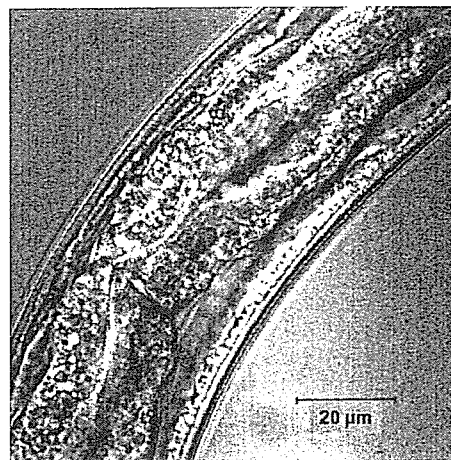


Fig. 5b: Fluorescence micrograph, showing Q-dots (red fluorescence) inside the intestine of *C. elegans*

After localisation of NP uptake with fluorescence and scanning electron microscopy, TEM investigations will be performed to look into the cellular and sub-cellular distribution.

The authors thank the GERMAN FEDERAL MINISTRY OF EDUCATION AND RESEARCH (BMBF) for funding and MG is grateful for receiving a travel grant from the MINISTRY OF HEALTH AND LABOUR OF JAPAN.

歯根象牙質表面へのbone morphogenetic protein 2 (BMP-2) 塗布による 硬組織形成と象牙質吸収

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○菅谷 勉、宮治裕史、天雲太一、本郷哲也、川浪雅光

1. 目的

歯は口の中に露出している歯冠部と、歯肉、骨に埋入している歯根部に分けられる。歯根は骨の中に埋入しているが骨と直接接しているわけではなく、歯根膜という靭帯に類似した組織によって結合しており、さらに歯根膜と歯根の象牙質とはセメント質という骨に類似した組織によって結合している。歯周病は、これらの歯を支えている組織が炎症によって徐々に破壊され、やがて歯が動揺して脱落する疾患で、日本人が歯を失う原因の約半分が歯周病とされている。歯周病で失われた骨、歯根膜、セメント質を再生する治療法は、現在でもいくつかの方法が臨床応用されているが、抜歯せざるを得ない進行した歯周病では、機能を回復するほど十分な量の組織が再生できないのが現状である。

そこで我々はより多くのセメント質を象牙質表面に再生する目的で、bone morphogenetic protein (BMP) を用いて研究を行ってきた。これまでの研究で、象牙質表面を脱灰してBMPを塗布し、その上で線維芽細胞を培養すると付着した細胞の石灰化能が上昇し、象牙質表面にBMPが付着して機能することが明らかとなった。さらに、BMPを塗布した象牙質片を口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されるとともに象牙質表面が吸収されたことから、BMPには硬組織誘導作用だけでなく硬組織吸収も活性化することが明らかとなった。本研究では、BMPを根面に塗布する際に前処置として行う象牙質の脱灰液の種類や塗布するBMPの濃度、さらにビスフォスフォネートによる破骨細胞の抑制が、象牙質表面の硬組織形成や象牙質吸収にどのような影響を及ぼすかを検討した。

2. 実験方法

1) 脱灰液と BMP 濃度の影響

ラットより採取した歯牙より象牙質片(1×1×0.3mm)を作製し、EDTA群(24%, pH7)、塩酸テトラサイクリン群(200mg/ml, pH2)、クエン酸群(飽和, pH1)、非脱灰群の4群に分け、各溶液で3分間脱灰した。その後、象牙質片を0、100、400 μg/mlのリコンビナントヒトBMP-2(アステラス製薬)に10分間浸漬した。

ウィスター系雄性ラット(10週齢)を全身麻酔下にて硬口蓋粘膜を部分層弁で剥離し、結合組織内に脱灰、BMP処理した象牙質片を移植して弁を復位縫合した。2、4週の観察期間後、10%ホルマ

リン固定、10%EDTA (PH7.0)にて脱灰、パラフィン包埋を行い、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行って、光学顕微鏡にて病理組織学的に観察した。また、象牙質片上に形成された硬組織の形成率と象牙質の吸収率を計測した。

2) 破骨細胞抑制の影響

同様に、ラット象牙質から象牙質片を作製し、EDTA (24%, pH7) で3分間脱灰して0、100、400 $\mu\text{g/ml}$ のBMP-2溶液に10分間浸漬した。実験群はウイスター系雄性ラット (10週齢) の腹腔内にインカドロネート (アステラス製薬) を1 $\mu\text{g/kg}$ /日、3回/週、観察期間終了まで投与し、対照群は生理食塩水を投与した。

投与開始2週後に、ラットの口蓋結合組織内に脱灰、BMP-2処理した象牙質片を移植し、2、4、8週後に組織標本を作製して、象牙質上に形成された硬組織形成率、象牙質表面の吸収率、TRAP陽性細胞率を計測した。さらに、硬組織形成率は象牙質面が一旦吸収されてから形成された硬組織と、象牙質面は吸収されずに形成された硬組織を分けて計測を行った。

3. 結果

1) 脱灰液とBMP濃度の影響

象牙質面を脱灰しなかった場合やBMP-2を塗布しなかった場合には、硬組織の形成は見られなかったが、脱灰してBMP-2を塗布した場合には、いずれの群でも硬組織形成と象牙質吸収の両方が観察された (図1)。

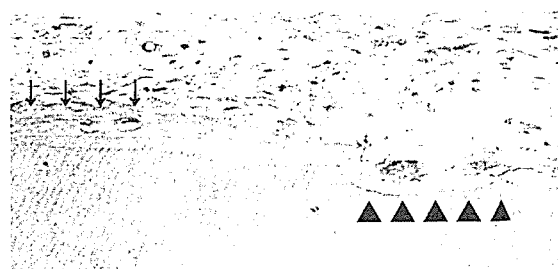


図1 EDTA脱灰 BMP400 $\mu\text{g/ml}$ 処理 (2週後) 硬組織形成 (↓) と象牙質吸収 (▲) が見られる

4週後の硬組織形成率は、EDTA群が他の3群と比較して有意に多かった (図2)。一方、象牙質吸収率は、塩酸テトラサイクリン群が他の3群と比較して有意に多かった (図3)。またBMP濃度が高くなると硬組織形成率が低下して象牙質吸収率が高くなる傾向がみられた。

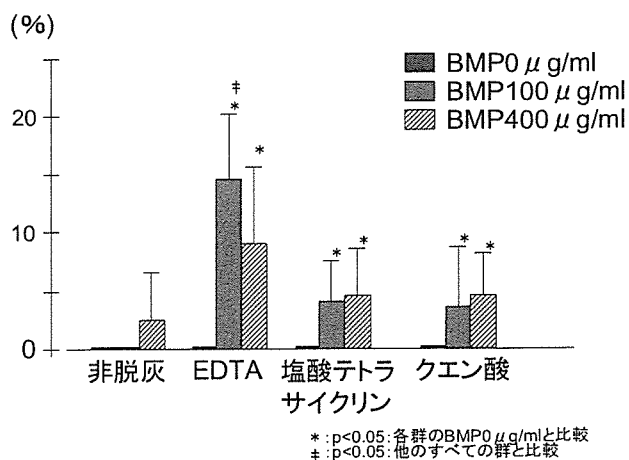


図2. 4週後の硬組織形成率

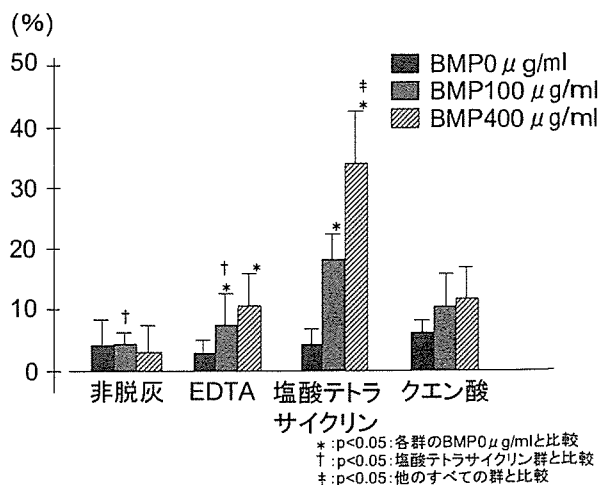


図3 4週後の象牙質吸収率

2) 破骨細胞抑制の影響

象牙質吸収率は、ビスフォスフォネートで破骨細胞の機能を抑制した実験群が、対照群に比較して有意に低かった ($p < 0.01$) (図4)。

硬組織形成率は、実験群が対照群に比べて有意に低い値となった ($p < 0.01$) (図5)。また、硬組織形成率を象牙質吸収面に形成されたものと非吸収面に形成されたものを分けて計測した結果、両群とも吸収面に形成されたものの方が多かった (図5)。ビスフォスフォネートで破骨細胞の機能を抑制した実験群は、対照群と比較して象牙質吸収面に形成された硬組織の量は著しく低下したが、非吸収面に形成される硬組織形成率はあまり変わらなかった (図5)。

4. 考察

根面を脱灰してコラーゲン線維が露出した象牙質表面にBMP-2を塗布すると、硬組織が形成されたことから、象牙質表面はBMP-2の担体として機能していたと考えられた。さらに、根面にBMP-2を塗布する前の

脱灰液が異なると、硬組織形成と象牙質吸収に影響を及ぼした。この原因として、クエン酸や塩酸テトラサイクリンはpHが低く、脱灰と同時に露出したコラーゲン線維を変性させるが、EDTAは中性のキレート剤でコラーゲン線維を変性することなくアパタイトを除去することから、露出したコラーゲン線維の変性程度がBMP-2の担体としての機能の違いになったと考えられた。すなわち、コラーゲン線維の変性程度はBMP-2の付着量、細胞の付着や増殖、分化などに影響するのと考えられた。また、塩酸テトラサイクリンは象牙質のカルシウムと結合して根面に残ることが知られており、塩酸テトラサイクリンはBMP-2の活性に影響を及ぼす可能性も考えられた。

一方、BMP-2の濃度が高くなると硬組織形成の活性が低下し、象牙質の吸収率が増加する傾向がみられた。これは、一般に成長因子の活性には至適濃度があるとされているが、BMP-2は硬組織形成の至適濃度より象牙質吸収の至適濃度が高いためと思われた。

また、ビスフォスフォネートを投与し破骨細胞機能を抑制すると、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制されることが明らかになり、BMP-2による象牙質表面への硬組織形成には破骨細胞と骨芽細胞のカップリングが深く関与していると考えられた。さらに、ビスフォスフォネートを投与しない対照群では、形成された硬組織の約30%が非吸収面に、約70%が吸収面に形成されたこ

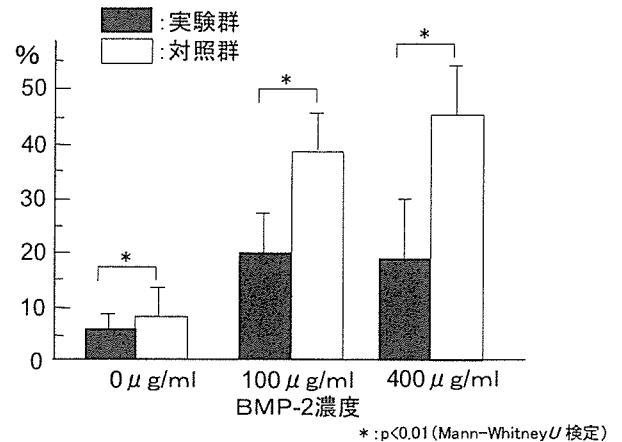


図4. 象牙質吸収率 (8週後)

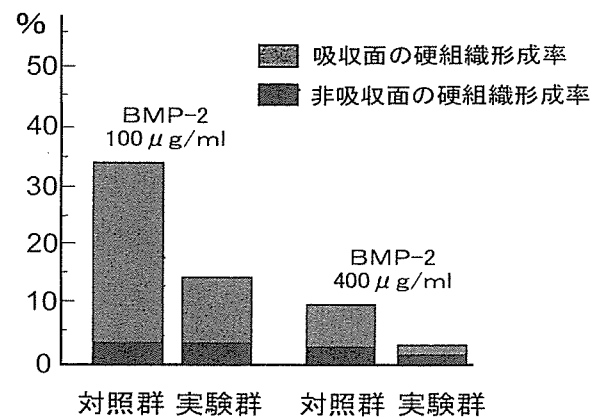


図5. 象牙質吸収面と非吸収面の硬組織形成率 (8週後)

とから、BMP-2の硬組織誘導作用は直接骨芽細胞を活性化するより、破骨細胞を活性化してカップリングを向上させる作用の方が大きいと考えられた。

歯周組織再生には象牙質の吸収を最小限に抑制して硬組織を表面に誘導することが重要であり、そのためには硬組織形成と象牙質吸収におよぼす因子の解明がきわめて重要と考えられる。これまでの結果から、象牙質表面にBMP-2を塗布して硬組織形成を誘導する場合には、脱灰液の種類やBMPの濃度など多くの因子が関与していることが明らかとなった。しかし、硬組織の形成と象牙質の吸収が同一の組織標本のきわめて近傍で観察されたことから、さらに歯根表面のきわめてわずかな性状の違いなど、他の要因が関与している可能性が高いのではないかと考えている。

参考文献

- 1) Zaman KU, Sugaya T, Kato H: Effect of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and bone morphogenetic protein-2 application to demineralized dentin on early periodontal ligament cell response. *J Periodont Res*; 34: 244-250, 1999.
- 2) 宮治裕史、菅谷 勉、加藤 熙：rhBMP-2で処理した象牙質が歯肉線維芽細胞のアルカリ性フォスファターゼ活性と石灰化物形成に及ぼす効果。 *日歯周誌*、42 (4) : 247-254, 2000.
- 3) Miyaji M, Sugaya T, Miyamoto T, Kato K, Kato H: Hard tissue formation on dentin surfaces applied with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the connective tissue of the plate. *J Periodont Res*, 37; 204-209, 2002.
- 4) 伊部敬介、宮治浩史、菅谷 勉、川浪雅光：BMP-2の歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生。 *日歯周誌*、46 (4) : 278-287, 2004
- 5) 天雲太一、宮治裕史、菅谷 勉、川浪雅光：象牙質表面処理剤の違いがBMP-2による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響。 *日歯周誌*、47 (4) : 269-279, 2005
- 6) Miyaji H, Sugaya T, Kato K, Kawamura N, Tsuji H, Kawanami M. Dentin resorption and cementum-like tissue formation by bone morphogenetic protein application. *J Periodont Res*; 41: 311- 315. 2006.
- 7) 石塚良介、宮治裕史、菅谷 勉、川浪雅光：BMP-2とコラーゲンハイドロゲルの歯根象牙質表面への塗布による歯周組織再生。 *日歯周誌*、48 (4) : 255-266, 2006.
- 8) 本郷哲也、宮治裕史、菅谷 勉、川浪雅光：BMP-2処理した象牙質表面におけるセメント質様硬組織形成のビスフォスフォネートによる抑制。 *日歯周誌*、48 (4) : 285-296, 2006.

カチオン性ポリペプチドの脂質二分子膜透過とその観察

徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部 (薬学系)

○植野 哲、嶋林 三郎

[緒言] 生物由来のある種の正荷電を持つペプチドは、膜透過性ペプチド (CPP or MTP) と称され細胞外より、遺伝子、タンパク質並びにナノパーティクル等を細胞内に輸送する能力を有している。膜透過性ペプチドの細胞膜透過経路は、主にエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスによる。しかし、低温条件下または、阻害剤共存条件下においても膜透過が報告されており、エンドサイトーシス以外の経路を使って膜を透過する能力を併せ持っていると考えられている。このエンドサイトーシス以外の経路による膜透過機構は、細胞や人工脂質膜を用いた研究においても十分には解明できていない。我々は、膜透過性ペプチド類似の正荷電を持つポリペプチドが細胞膜モデルとしてのリポソーム膜を透過しリポソーム外水相から内水相へ移行することを見だし報告してきた。本研究では、正荷電を持つ合成ポリペプチドの表面に負荷電を持つ大豆レシチン (SBPL) ジャイアントリポソーム (GV) 膜透過現象を共焦点レーザー顕微鏡によって直接観測し、併せて蛍光分光測定中心とした測定によって透過の詳しいプロセスを検討したのでこれを報告する。

[実験] アルギニンとトリプトファンの 4:1 のランダムコポリマー copoly (Arg Trp) は fluorescein 誘導体でラベルした。標識率は 1.3 (fluorescein/peptide 分子)であった。リポソームは、大豆レシチン(SBPL)を用いて調整した(10mM Tris/HCl 緩衝液(pH 7.4))。蛍光スペクトルは、励起波長 488nm を用い、蛍光波長 500~600nm の範囲を測定した。

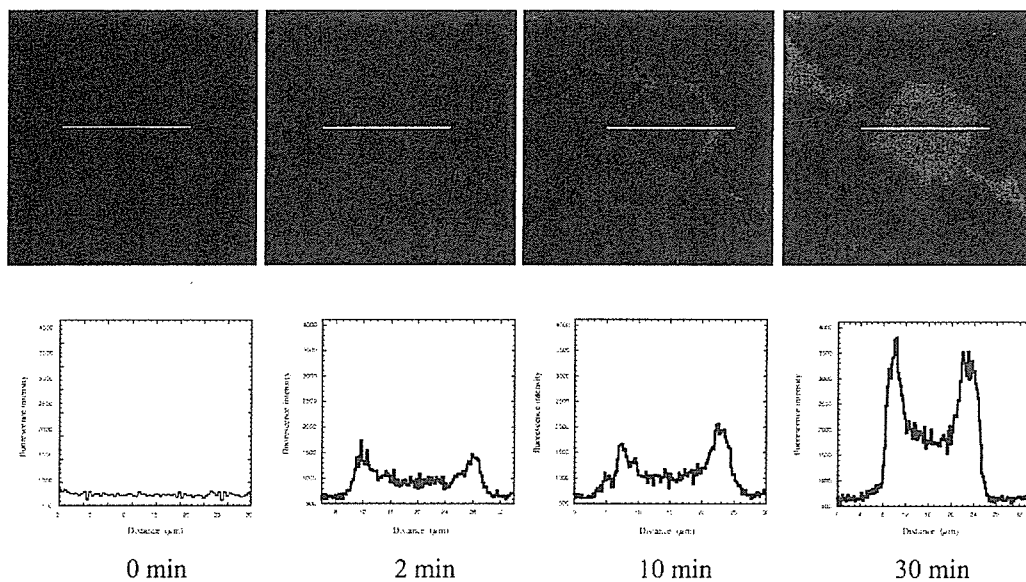


Fig. 1 Time-course of the liposome images and its fluorescence intensity profile.

[結果と考察] copoly (Arg Trp) のリポソーム膜透過現象の共焦点レーザー顕微鏡を用いた直接観察 : SBPLリポソームに fluorescein 誘導体でラベルした copoly (Arg Trp) を作用させると、初めにリポソームの輪郭が光り始め、時間の経過とともに、リポソーム内部が光る過程が観測された (Fig. 1)。観察された画像において、リポソーム表面と、内部の増光の過程は、それぞれに異なっており Fig. 1 に示された画像は、 copoly (Arg Trp) のリポソーム膜透過過程を可視化したものといえる。

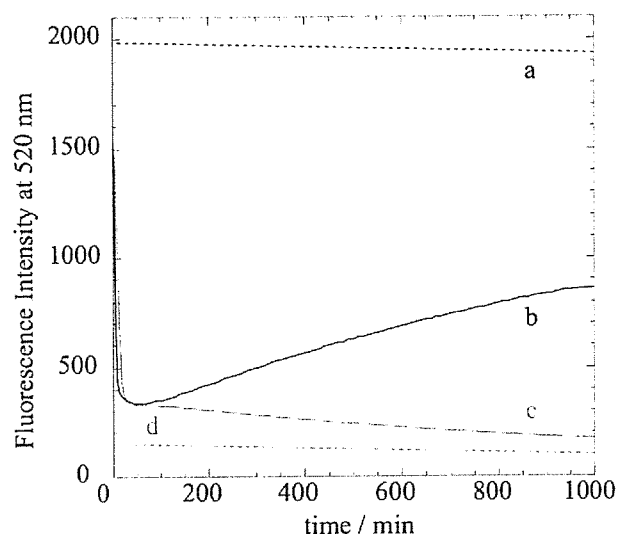


Fig. 2 The time-course of the fluorescence intensity of copolymer in the absence or presence of quencher (NaI). a : copolymer in buffer solution, b : copolymer penetrated into liposomal membrane, c : copolymer with quencher in the interior aqueous phase of the liposomes and d : copolymer in the presence of quencher.

蛍光分光法を用いた copoly (Arg Trp) のリポソーム膜透過現象の観察 : Fig. 2a,b は、SBPLリポソーム共存下及び非共存下の fluorescein 誘導体でラベルした copoly(Arg Trp) の 520nm における蛍光強度の時間変化を示す。緩衝液にコポリマーを添加した SBPL リポソーム非共存下での蛍光強度は、長時間経過後においてもほとんど変化せず 1000min において 5%以下であるが (Fig. 2a)、リポソーム共存下では、初期の蛍光強度の急激な減少とその後の緩やかな増大が

おこり、二相性が観測された (Fig. 2b)。さらに、リポソーム共存下でのみ蛍光スペクトルの極大波長 (λ_{max}) およびスペクトルの半値幅の経時的な変化が観測された。リポソーム系におけるスペクトル強度、 λ_{max} および半値幅の経時変化は、 copoly (Arg Trp) の局在状態の変化によると考えられる。リポソーム系における局在化部位として 1: 水相、2: 脂質極性部、3: 膜の疎水性コア部の 3つの部位が考えられる。 fluorescein 誘導体でラベルした copoly (Arg Trp) の 520nm における蛍光強度は、有機溶媒/緩衝液混合系を用い系の誘電率を変化させた実験から誘電率の低下に伴い減少することが示された。この結果から、Fig. 2b に見られる蛍光強度の二相性は、 copoly (Arg Trp) が外水相から、誘電率の低い脂質極性部~膜の疎水性コア部に移行した後再び親水性の環境に移行することを示している。リポソーム内水相に消光剤である NaI を内封した状態では、初期の蛍光強度の急激な減少は観測されるが、Fig. 2b に見られるその後の緩やかな増大が観測されない (Fig. 2c)。この結果は、 copoly (Arg Trp) が膜の疎水性コア部に移行した後にリポソーム内水相に移行することを示している。

生体に投与した各種金属微粒子の体内動態のイメージング

北海道大学大学院歯学研究科

○阿部薫明、赤坂司、宇尾基弘、亘理文夫

北海道大学名誉教授、(株)高研バイオサイエンス

久保木芳徳

1. 目的

一般に生体親和性を持つといわれている材料でも、そのサイズがマイクロ・ナノレベルになると細胞に対して刺激性を持つことがある。例えば、人工関節やインプラントなどの長期使用により磨耗粉(微粒子)が生じ、体内に取り込まれる可能性は否定できない。また、医薬・化粧品や日用品といった分野でもマイクロ・ナノ微粒子が広範囲に使用されてきている。それ故、我々は日常生活の中で知らないうちにマイクロ・ナノ微粒子に曝されている可能性がある。そこで本研究では、生体内に取り込まれた金属微粒子の体内での循環・滞留・排泄の挙動を調べた。また投与された金属微粒子の生体内での全身動態を可視化するために投与方法、投与量など実験条件の検討を行った。

2. 実験方法

各種金属微粒子(TiO_2 , Fe, Ni など)をマウス(ICR系オス)に投与し、一定期間経過を観察した。その後、適宜、エーテルにより安楽死させて開腹し、肺・肝臓・脾臓などの一部を摘出した。各臓器の切片をエックス線分析顕微鏡(XSAM)・SEM-EDSを用いて観測、投与した金属微粒子の体内での分布・滞留の状態を確認した。またXSAMを用いてマウスの全身像を観察し、投与した微粒子の体内動態の可視化を試みた。

3. 結果と考察

・金属微粒子の投与方法、及びXSAM観察に適した投与量の検討

気管挿管による肺への直接噴霧(ミスト・粉体)、尾静脈注射の各方法について、投与量(TiO_2)を変化させて、XSAMでの観察に適した投与量・濃度などの条件の検討した。ミストでの肺への噴霧を行った場合、投与試料液の濃度・容積に制限がかかるため、今回検討した条件ではXSAMでの観察に適する量の微粒子を投与することが困難であった。一方、尾静脈注射の場合、10 mg/mL のけん濁液を用い、総量で6 mg 程度投与することにより、XSAMでの観察に適した試料が得られた。現在は、前述濃度の試料液を0.3 mLずつ2回に分けて投与を行っている。また、粉体を用いた肺への直接投与の投与条件については、現在検討中である。

・金属微粒子の各臓器への到達・滞留状況の観察

総投与量が6 mgになるようにマウス尾静脈より TiO_2 を投与したところ、投与後3時間で TiO_2 の肺・肝臓への到達が観測された。蛍光エックス線の相対強度は肺が肝臓の10倍程度であった。投与後1日経過を観察した個体では、肺に滞留している TiO_2 の濃度が減少し、肺・肝臓への滞留微粒子の強度差は数倍程度になった。また、 TiO_2 の脾臓への到達も確認された。4週間経過を観察した場合は、肺からの TiO_2 の蛍光エックス線は殆ど観察されず、肝臓・脾臓のみから TiO_2 が検出された。また現在のところ、投与した TiO_2 の腎臓への到達・蓄積は確認されていない。

Feを投与した場合も同様に、投与1日で肺・肝臓への到達が確認された。また、脾臓から非常に強いFeの蛍光エックス線が検出された。

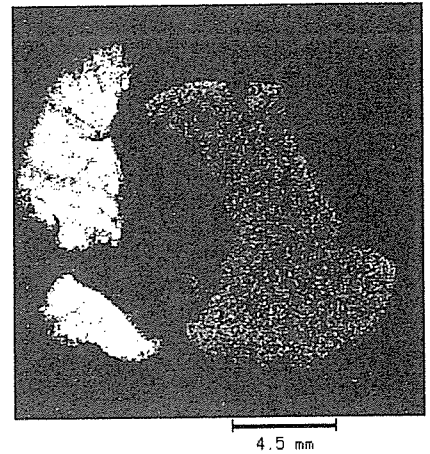


図1. TiO_2 投与3時間後のマウス肺(左)、肝臓(右)のXSAM観察像(Ti)

・体内動態の可視化

次に、 TiO_2 を投与したマウスの全身像の観察を行い、 TiO_2 の体内動態の可視化を試みた。前項で金属微粒子を投与し、各種臓器の一部を摘出したマウスを観察対象として用いた。投与後数分では肺のみから TiO_2 が観測される(図2b)。一方、3時間経過すると、肺のみならず、肝臓からも投与微粒子の蛍光エックス線が観測されている(図2c)。

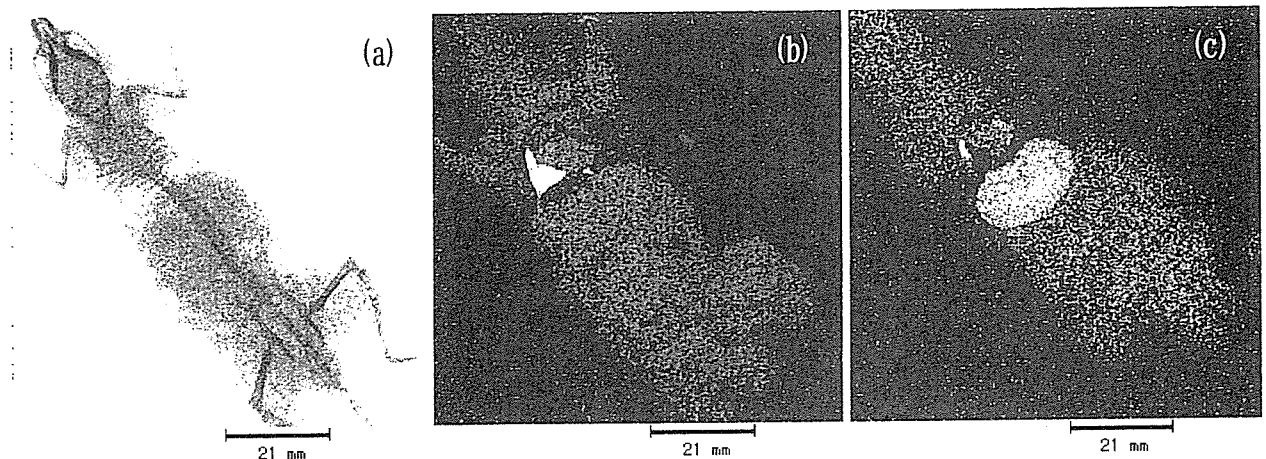


図2. TiO_2 を投与したマウスのXSAM観察像(Ti) :

(a) 透過エックス線像, (b) 投与5分後, (c) 3時間後

電界型 X 線の細胞照射効果—ナノ放射線医療へ向けて

○奥山 文雄¹⁾、中里 智治²⁾

1) 名工大院、2) 名市大医院

Biological effects of field emission x-rays—toward nanotechnology-based
x-ray therapy

F. Okuyama¹⁾, T. Nakazato²⁾

1) Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya,
Japan

2) Graduate School of Medical Science, Nagoya City University, Nagoya, Japan

趣旨：電界型 X 線源においては、カーボンナノチューブ（CNT）から電された電子をターゲットに衝突させて X 線をつくる。F E X 線源の最大のメリットは、線源の超小型化である。この所謂“ミニチュア X 線源”（MXS）は、内視鏡との一体化により、体腔内腫瘍の直接 X 線照射（intracavity radiography）治療の可能性を秘める。この、“ナノ放射線治療”とも言うべき次世代ガン治療を実現するには、何よりもまず、F E X 線が、実際にガン細胞を死滅させる効果をもつか否かを確かめなければならない。当研究の趣旨である。

結果：用いた F E エミッターは、パラジウム（Pd）細線上に平行成長させた CNT である（Fig. 1）。¹⁾ これらの CNT 群を電子源とする線源からの X 線を、マウスの 3SB 細胞に照射し（表参照）、FE 型 X 線が、熱電子 X 線と同様に、1) DNA の損傷（DNA double-strand breaks）、2) 細胞サイクルチェックポイントの活性化、及び 3) ガン細胞のアポプトシスを誘起することを確認できた（Fig. 2）。²⁾ これらの事実は、FEX 線がガン細胞を死滅させることの確たる証拠であり、MXS が、初期ガンの標的 X 線照射に道を拓くであろう事を示唆する。ナノテクを中核とする、新たな放射線治療の展開が予想される。

管電圧（kV）	50	X スペクトル	特性
電流（mA）	1	線源—試料間距離（mm）	125
ターゲット材	W	ドーズ率（Gy/min）	3.3
窓材	Be	ドーズ変動量	<10%

表 X 線照射条件

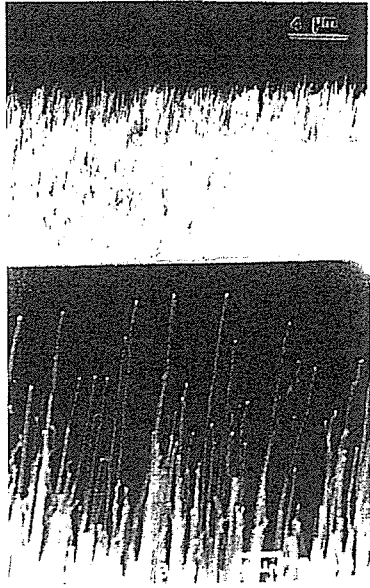


Fig. 1 . Pd 細線上の CNT s

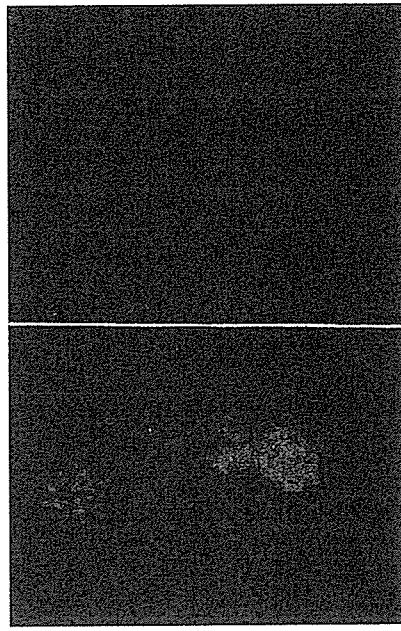


Fig. 2 . FEX 線照射による γ -H2AX の変化

References

- 1) S. Senda, M. Tanemura, Y. Sakai, Y. Ichikawa, S. Kita, T. Otsuka, A. Haga, and F. Okuyama, Rev. Sci. Instrum. 75(2004)1366.
- 2) T. Nakazato, M. Nakanishi, S. Kita, F. Okuyama, Y. Sibamoto, and T. Otsuka, J. Radiat. Res. in press.

「ゾウリムシの接合過程に対するコバルトフェライト および酸化チタンの影響」

○阿部大基¹⁾, 芳賀信幸¹⁾

1) 石巻専修大

Effect of cobalt ferrite and titanium oxide on conjugation process in *Paramecium caudatum*

○Taiki ABE¹⁾, Nobuyuki HAGA¹⁾

1) Senshu University of Ishinomaki, Ishinomaki, Japan

[背景] ゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) は約5億4千万年前に起こった真核生物の大出現（真核生物のビッグバン説）の際に、哺乳類や高等植物などと期を同じくして出現したとされている単細胞性の真核生物である。生態系においては、バクテリアを主な餌とし、酵母やクロレラなどの植物性単細胞生物やナノサイズの微粒子も積極的に細胞内に取り込む。また、大型の原生生物や小型の節足動物、稚魚などの餌となるため、食物連鎖では重要な位置を占めていると考えられている。

[目的] 本研究では、コバルトフェライトと酸化チタンのゾウリムシの接合過程に対する影響を調べることによって、有性生殖によって生じる次世代細胞への細胞毒性を評価することを目的とする。

[方法] 乳鉢で良く磨り潰したコバルトフェライトおよび酸化チタンをゾウリムシの生理食塩水（K-DS: NaをKで置き換えたDryl氏液）で1 mg/mlの濃度に調製し、これを原液とした。次に、原液をK-DSで10, 100, 1000倍に希釈し、冷蔵保存した。使用時には、溶液が均一に分散するように超音波処理を行った。細胞分裂速度は培養液にナノ粒子分散液を加えたものを用いて、単離培養法で細胞数をカウントすることによって算出した。接合過程への影響は、相補的な接合型の細胞を用い、接合を誘導した後で、接合対を単離し、所定の時間にナノ粒子分散液中に入れて細胞への取り込みを促し、その後の生存率などを調べることによって評価した。

[結果と考察] コバルトフェライトおよび酸化チタンは1–100 $\mu\text{g/ml}$ の分散液では細胞分裂に対する影響はまったく認められなかった。また、接合中の細胞に対する影響を調べた実験でもこれらのナノ粒子の細胞毒性は認められなかった。しかし、接合を完了して個々の細胞に分かれた接合完了体に対しては、興味深い影響が現れた。相補的な接合型の2つの系統による接合では、接合完了体に対する影響はほとんど認められなかったが、BHIIIに自系接合を誘導した接合完了体を用いた場合、100 $\mu\text{g/ml}$ のコバルトフェライト分散液中で培養した実験群では、次世代の細胞の核となる大核の形成が完全に阻害された。しかし、この実験群の細胞は死んだわけではなく、親の代の核が再生するという現象が起きて、細胞そのものは接合する前の状態で増殖を続けたのである。これは一つの細胞の中に共存する2種類の核のうち、次世代の核となるべき大核の形成が抑制された重要な知見である。

カーボンナノ物質に対する生体反応 - 生体材料への応用と生体内分布 -

北海道大学大学院歯学研究科

○ 横山敦郎・青木尚史・山本悟・大堀ことは・野田坂佳伸・赤坂司・宇尾基弘・亘理文夫

北海道大学エネルギー変換マテリアル研究センター

坂口紀史

東北大学大学院環境科学研究科

佐藤義倫・田路和幸

ブルカー・ダルトニクス株式会社

荻澤 崇

1. 緒言

カーボンナノチューブ (CNTs) を始めとするカーボンナノ物質は、物理的、化学的、電気的特性から多くの分野で注目され基礎研究がなされている。バイオ領域においても、DDSや遺伝子治療における担体や生体材料として研究が進められている。しかし、その安全性については、最近、細胞毒性などの報告があるものの、未だ十分に明らかにされているとはいえない。また、生体材料への応用についても、単にその靱性や形態を利用するものが主であり、カーボンナノ物質のもつ生物学的な性質を利用した研究は、ほとんど行われていないのが現状といえる。我々は、数年来カーボンナノ物質に対する生体反応について、主に皮下組織での反応を組織学的および超微細構造学的に検索するとともに、細胞培養用のスキャホールドへの応用について研究を行っている。今回の発表では、皮下組織長期埋入後の経過、CNTsを固着したスキャホールド上での骨芽細胞様細胞の培養、さらにラット肝臓へ注入したフラーレンのマッピングについて報告する。

2. 材料および方法

1) 生体適合性および生体内分解性試験

濃硫酸と濃硝酸の混合液 (3 : 1) 中での超音波処理で切断し、濾過によって長さを調整した多層カーボンナノチューブ (MWCNTs) とハット積層型カーボンナノファイバー (H-CNFs) を、異なる結晶構造を有するカーボンナノ物質として研究に用いた (東北大学環境科学研究科田路研究室より供与)。平均長さ825nm (825CNTs) と220nm (220CNTs) のMWCNTsおよび平均長さ1200nm (1200CNFs) と590nm (600CNFs) のH-CNFsを、6週齢雄性ウィスター系ラットの胸部皮下に埋入し、1, 4, 16週および1年後に周囲組織とともに摘出し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にて観察した。

2) 細胞培養用スキャホールドの開発

多層カーボンナノチューブ (MWCNTs), 単層カーボンナノチューブ (SWCNTs) をポリカーボネート (PC膜) に吸引濾過にて固定化することにより細胞培養用スキャホールドを作製し, SEM観察およびタンパク吸着試験を行うとともに, 骨芽細胞様細胞であるSaOS2を培養後, 細胞形態観察, 細胞数計測, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性試験を行った. 対照としてPC膜, グラファイト (GP) を用いて, 比較検討した. また, チタン板に固定化したカーボンナノチューブについてもSaOS2の培養を行い, 細胞の形態についてチタン板と比較検討した.

3) カーボンナノ物質の生体内での分布

C₆₀に糖 (ガラクトースおよびグルコース) をつけ, ラットの肝臓に注入し, 分布をMassマッピングにより行った.

3. 結果と考察

1) 生体適合性試験および生体内分解性について

MWCNTsおよびH-CNFsは, 埋入1週後, 肉芽組織に被包されており, その一部はマクロファージや線維芽細胞に貪食されていた. MWCNTs周囲組織の炎症は, H-CNFsに比較して強く, またサイズが長いカーボンナノ物質でやや強い傾向を示したが, 変性や壊死などの強い炎症反応は観察されなかった. 経時的に周囲組織の炎症反応は消退し, カーボンナノ物質を貪食したマクロファージの集積と線維性結合組織による被包が観察された. 埋入1年後, H-CNFsでは, サイズによる反応の差は認められず, 軽微な炎症が存在するものの基質化が進んでいた. 825CNTs周囲の炎症は, 埋入16週までは220CNTsに比較して強く, 異物巨細胞が多数認められ肉芽腫性炎を呈していた. MWCNTsにおいても埋入1年後ではサイズの影響は認められなかったが, 炎症の程度は, H-CNFsに比較し強い傾向を示した. TEM観察では, 埋入1週後において, 600CNTsは, 貪食細胞の細胞質内で円形に集合しており, ライソゾーム内にも観察された. 1200CNTsは, 1週ではライソゾーム内に認められなかったが, 16週以降では観察された. また, いずれのサイズにおいても, 埋入16週および1年後に短縮や結晶構造の変化を示唆する像が観察された. 220CNTsは, 埋入1週後よりライソゾーム内に凝集した状態で観察され, 1年後においてもチューブ状の形態には変化が認められなかった. 825CNTsは, 埋入1週後では, その多くが細胞間に観察されたが, 一部は細胞質内に認められた. 凝集の程度は, 220CNTsに比較し強い傾向を示した. 16週以降では, ライソゾーム中にも観察されたが, 220CNTs同様に, その特異的なチューブ状の構造には変化が認められなかった. 凝集の程度は, 1年間の長期埋入により弱くなることが示された. これらの結果から, カーボンナノ物質の結晶構造やサイズは, 起炎性や生体内での挙動に影響を及ぼすことが示唆された.

2) 細胞培養用スキャホールドの開発について

タンパク吸着量は, SWCNTs, MWCNTs, PC, GPの順であった. 細胞増殖, 総ALP活性はSWCNTsがMWCNTs

に比較し、高い傾向を示したが、ともに対照であるPCおよびGPより高い値を示した。これらの結果から、CNTsの物理的構造に加え化学的性質が細胞の増殖や機能に影響することが示唆され、骨芽細胞培養用スキャホールドとしての可能性が示された。

チタンに鍍金処理したCNTs上で細胞培養を行うと、その形態はチタン上での培養と同様に平坦に伸展していたが、細胞辺縁の仮足の長さは、チタンの約2倍であり、CNTsのメッシュ構造に絡んでいるのが観察された。この結果から、CNTsを細胞に対する特性を維持したままチタンへの表面処理が可能であることが示され、チタンに対する表面処理方法としての可能性が示唆された。

3) カーボンナノ物質の生体内での分布

凍結標本作製時に問題があり、新たな方法により凍結標本を作製し、現在分析中である。

4. 今後の展望

これまでの結果から、皮下組織内においてCNTsおよびCNFsの長期埋入に関しての安全性およびCNTsの骨芽細胞培養用スキャホールドとしての可能性が示された。今後は、カーボンナノ物質の体内での分布と排出機構について検討するとともに、スキャホールドの再生医療を目的とした*in vivo*, *ex vivo*の実験系への応用を行う予定である。

5. 参考文献

- 1) Yokoyama, A., Sato, Y., Nodasaka, Y., Yamamoto, S., Aoki, N., Shindoh, M., Kohgo, T., Akasaka, T., Uo, M., Tohji, K., Watari, F. Tissue response to carbon nanosubstances: Comparison between carbon nanotubes and hat-stacked carbon nanofibers by transmission electron microscopy. *Extended Abstracts ISETS05*. 625-628, 2005
- 2) Yokoyama, A., Sato, Y., Nodasaka, Y., Yamamoto, S., Kawasaki, T., Shindoh, M., Kohgo, T., Akasaka, T., Uo, M., Tohji, K., Watari, F. Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats. *Nano Letters*. 5:157-161, 2005
- 3) 横山敦郎. カーボンナノチューブの細胞内挙動. *生体材料*24 : 324-332, 2006
- 4) Aoki, N., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Akasaka, T., Uo, M., Watari, F. Sato, Y., Tohji, K. Cell culture on a carbon nanotube scaffold *J. Biomedical Nanotechnology* 1:402-405, 2005
- 5) Aoki, N., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Akasaka, T., Uo, M., Watari, F. Sato, Y., Tohji, K. Strikingly extended morphology of cells grown on carbon nanotubes. *Chem. Lett* 35:508-509, 2006
- 6) Aoki, N., Akasaka, T., Watari, F., Yokoyama, A., Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions. *Dent Mater J*: in press
- 7) Aoki, N., Yokoyama, A., Nodasaka, Y., Akasaka, T., Uo, M., Watari, F. Sato, Y., Tohji, K. Carbon nanotubes deposited on titanium implant for osteoblast attachment. *J Bionanoscience*: in press.