

ORIGINAL ARTICLE

Masato Tamai, PhD · Kazuo Isama
Ryusuke Nakaoka, PhD · Toshie Tsuchiya, PhD

Synthesis of a novel β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties

Abstract To promote the osteogenic properties of osteoblasts, we synthesized a hydroxyapatite (HAp) with β -tricalcium phosphate (β -TCP) biphasic calcium phosphate containing Nb ions (NbTCP/HAp). NbTCP/HAp was prepared by annealing precipitates obtained by coprecipitation of an aqueous solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and a mixture of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and aqueous Nb solution. The precipitates can be regarded as a calcium-deficient HAp, the PO_4 sites of which are partly occupied by Nb ions. NbTCP/HAp was successfully synthesized by thermal decomposition of the precipitates. NbTCP/HAp enhanced the calcification of normal human osteoblasts (NHObst), and the amount of calcified tissue increased in proportion to the Nb ion concentration in the NbTCP/HAp. The alkaline phosphatase (ALP) activity of NHObst was also enhanced by NbTCP/HAp. Because Nb ions significantly enhance the ALP activity of NHObst, calcification by NbTCP/HAp is considered to be due to enhancement of ALP activity induced by Nb ions dissolved from NbTCP/HAp. These results indicate that NbTCP/HAp can be an effective bone repair material.

Key words Tissue engineering · Bone · Osteoblasts · Calcium phosphate · Nb ions

Introduction

Bone tissue engineering offers a promising alternative strategy for healing severe bone injuries by utilizing the body's natural biological response to tissue damage in conjunction with engineering principles. Osteogenic cells, growth factors, and biomaterial scaffolds form the foundation of the many bone tissue engineering strategies employed to achieve regeneration of damaged bone tissue. An ideal bio-

material scaffold will provide mechanical support to an injured site and also enhance osteogenic differentiation to encourage bone growth.¹ To develop biomaterial scaffolds with optimal performance, understanding the interactions between osteoblasts and scaffolds is extremely important.

Hydroxyapatite [HAp , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] and related calcium phosphate ceramics, e.g., β -tricalcium phosphate [β -TCP, β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], have good biocompatibility with bone tissue because their chemical compositions are very similar to the mineral phase of human bone. It is well known that these calcium phosphate ceramics can be biologically bonded to natural bone. In fact, it has been reported that porous materials composed of HAp, β -TCP, or β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate are useful for bone tissue regeneration because of their osteoconductivity.^{2–6} It has also been reported that β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate shows better osteoconductivity than HAp or β -TCP alone.^{7,8} Therefore, this material has been actively studied for use as a scaffold for bone tissue regeneration.

In a previous study, Nb ions were reported to lower cytotoxicity⁹ (IC_{50} of Nb ions for L929 fibroblasts is 3.63×10^3), and we reported that Nb ions significantly promoted the calcification of normal human osteoblasts (NHObst).¹⁰ Furthermore, we succeeded in synthesizing a hydroxyapatite containing Nb ions (NbHAp) and showed that NbHAp has the potential to promote alkaline phosphatase (ALP) activity, an important factor in the generation of new bone, in NHObst.¹¹ In this study, to further promote the cell activity of osteoblasts, we synthesized β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate containing Nb ions and investigated interactions between β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate and NHObst in vitro.

Materials and methods

Synthesis and characterization of β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate containing Nb ions¹

Reagent grade $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, and NbCl_5 (Wako, Osaka, Japan) were used without purification. NbTCP/HAp

Received: May 26, 2006 / Accepted: September 28, 2006

M. Tamai · K. Isama · R. Nakaoka · T. Tsuchiya (✉)
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
Tel. +81-3-3700-4842; Fax +81-3-3707-6950
e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

samples were prepared by annealing precipitates obtained from coprecipitation of an aqueous solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ with a mixture of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and an aqueous solution of Nb as described below. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ and $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ were completely dissolved in distilled water. The aqueous Nb solution was prepared by mixing distilled water and NbCl_5 dissolved in 5% hydroxyacetone and 5% 2-aminoethanol.¹² A 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ aqueous solution was combined with 0.01 M NbCl_5 and stirred with a magnetic bar at Nb/(Nb + P) molar ratios of 0.0000, 0.0167, or 0.1667. The pH of the mixture was adjusted to 10 using 1 N NaOH throughout the reaction, and 0.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ was slowly dropped into the mixture (20 ml/min). The amount of 0.2 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solution was adjusted to a Ca/(Nb + P) molar ratio of 1.6 in order to synthesize β -TCP/HAp biphasic calcium phosphate, followed by stirring the suspension for 24 h at room temperature. The precipitates were centrifuged at 3600 rpm for 5 min and washed with distilled water. The resulting precipitates of Nb/(Nb + P) with molar ratios of 0.0000, 0.0167, and 0.1667 were named NbHAp-0, NbHAp-I, and NbHAp-II, respectively. These precipitates were then annealed at 800°C for 2 h (temperature increase: 5°C/min) and named NbTCP/HAp-0, NbTCP/HAp-I, and NbTCP/HAp-II, respectively. The NbTCP/HAp samples obtained were characterized by X-ray diffraction analysis (XRD, Rint2000, Rigaku, Tokyo, Japan) with $\text{Cu K}\alpha$ radiation (40 kV, 50 mA). The XRD profiles of 2θ angles between 20° and 60° with a step interval of 0.01° were collected at a scanning rate of 4°/min. Also, measurement of the lattice parameter was carried out using the 211, 112, and 300 planes of HAp, and data for the lattice parameter were collected with a scan rate of 0.025°/min. The observed interplanar spacing was corrected using elemental Si as a standard material.

Concentrations of Ca, P, and Nb ions in the precipitate were estimated by inductively coupled plasma analysis (ICP, HP4500, Hewlett-Packard, CA, USA) after the precipitate was dissolved in HNO_3 solution. Microstructural evaluation of the precipitates was performed by scanning electron microscopy (SEM, JSM-5800LV, JEOL, Tokyo, Japan; acceleration voltage: 25 kV) and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) (LV5800, JEOL).

Osteogenic effects of NbTCP/HAp

NbTCP/HAp pellets were fabricated to investigate their effects on the osteogenic function of osteoblasts. In total, 100 mg of powdered NbTCP/HAp was put into a stainless steel mold and uniaxially pressed at 30 MPa for 1 min to form a pellet 0.5 mm in thickness and 12 mm in diameter. The pellets were sintered at 800°C for 2 h (temperature increase: 5°C/min).

NHOst were purchased from BioWhittaker (Walkersville, MD, USA) and maintained in d-minimum essential medium (α MEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA) containing 10% fetal calf serum (FCS, Kokusai Sinyakyu, Tokyo, Japan) in incubators at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO_2 . All assays were performed using α MEM containing 10% FCS supplemented with 10 mM β -glycerophosphate.

Cells were seeded on the pellets as described below. Each NbTCP/HAp pellet was immersed in 1 ml culture medium in a well of a 24-well cell culture plate (Corning, Corning, NY, USA) and incubated at 37°C for 24 h. After discarding the medium, 300 μ l of new culture medium was put into each well, followed by 1 ml of NHOst suspension (4×10^4 cell/ml), and incubation was carried out for 4 h. Finally, the cell-seeded NbTCP/HAp pellet was transferred to a new well of a 24-well plate with 1 ml of the test medium and incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 for 7–14 days.

Extracts from various NbTCP/HAp samples were prepared to investigate their effects on dissolved ions. NbTCP/HAp powder (100 mg/ml) was added to the culture medium (α MEM) containing 10% FCS and immersed at 37°C for 24 h. After changing the medium, the suspensions were stirred by a shaker at 200 rpm for 72 h at 37°C. The suspension was centrifuged at 3600 rpm for 5 min, and the supernatant was collected to use as an extract for an osteogenesis test in vitro. The atomic concentrations of Nb in the extract were measured by ICP.

An NHOst suspension (4×10^4 cells/ml) was added to culture wells and incubated for 4 h. After the NHOst had adhered to the well, the suspension medium was discarded and 1 ml of the extract supplemented with 10 mM β -glycerophosphate was added. The NHOst were incubated at 37°C in a saturated humid atmosphere with 5% CO_2 for 7–14 days.

We also examined the effect of Nb ions on the osteogenesis of NHOst. A solution of 0.2 μ M NbCl_5/α MEM and serial dilutions were prepared. In addition to the experiment using the extracts indicated above, NHOst were cultured in NbCl_5/α MEM supplemented with β -glycerophosphate for 7–14 days.

Proliferation of NHOst cells in each experiment was estimated by a TetraColor One assay (Seikagaku, Tokyo, Japan), which incorporates an oxidation–reduction indicator based on detection of metabolic activity. After a 7-day incubation, the culture medium was discarded and 2% TetraColor One/ α MEM solution was added to each well and was incubated for 2 h. The absorbance of the supernatant at 450 nm was measured using a μ Quant spectrophotometer (Bio-tek, Winooski, VT, USA) to estimate the proliferation of the test cells. After estimating the proliferation, the cells were washed with phosphate-buffered saline [PBS(-)], followed by the addition of 1 ml of 0.1 M glycine buffer (pH 10.5) containing 10 mM MgCl_2 , 0.1 mM ZnCl_2 , and 4 mM *p*-nitrophenylphosphate sodium salt. The absorbance of the added buffer at 405 nm after 5 min incubation at room temperature was detected to evaluate the ALP activity of the test cells. After measurement of ALP, the NHOst cultured in the extract were washed with PBS(-) three times and the calcium phosphate deposited by NHOst was estimated. The amount of deposited calcium phosphate dissolved in 0.1 N HCl solution was determined by a Wako Calcium C test kit (Wako), which is based on the *o*-cresolphthalein complex color development method. The NHOst in all assays were stained in 5% Giemsa solution and observed by light microscopy (Nikon, Eclipse TE300, Tokyo, Japan) to confirm

Table 1. Chemical composition and characteristics of the precipitates prepared in this study

Sample	Phase	Annealing temperature	Theoretical composition ^a		Measured composition ^a		Color of precipitate	Lattice parameter ^b	
			Ca/(P + Nb)	Nb/(P + Nb)	Ca/(P + Nb)	Nb/(P + Nb)		a-axis (nm)	c-axis (nm)
NbHAp-0	HAp		1.60	0.000	1.60	–	White	–	–
NbHAp-I	HAp		1.60	0.017	1.56	0.013	Pale yellow	–	–
NbHAp-II	HAp		1.60	0.167	1.56	0.077	Buff yellow	–	–
NbTCP/HAp-0	β -TCP + HAp	800°C	1.60	0.000	1.60	–	White	0.939	0.687
NbTCP/HAp-I	β -TCP + HAp	800°C	1.60	0.017	1.56	0.013	White	0.942	0.689
NbTCP/HAp-II	β -TCP + HAp	800°C	1.60	0.167	1.56	0.074	White	0.943	0.690

HAp, hydroxyapatite; NbHAp, hydroxyapatite containing Nb ions; TCP, tricalcium phosphate

^aMolar ratio

^bLattice parameter for HAp

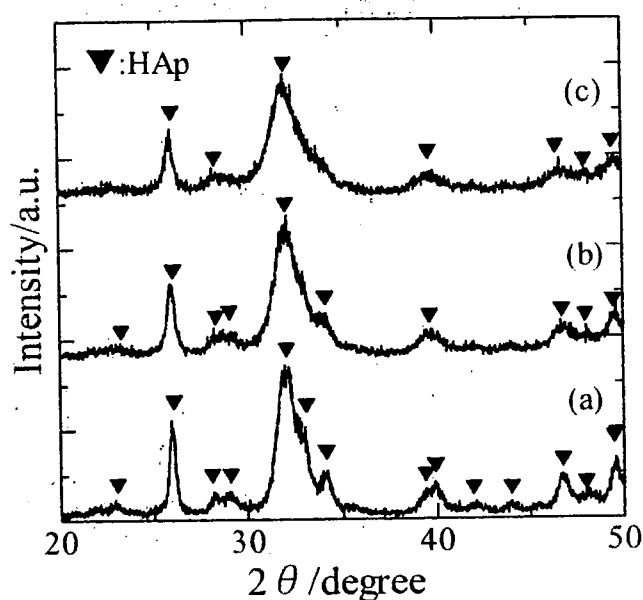


Fig. 1. X-ray diffraction (XRD) patterns of the precipitates with a Ca/(P + Nb) molar ratio of 1.50: a, Nb/(Nb + P) = 0; b, Nb/(Nb + P) = 0.0167; and c, Nb/(Nb + P) = 0.1667. Triangles represent XRD peaks due to the crystal structure of hydroxyapatite (HAp)

their proliferation. All results were expressed as mean values \pm SD and were analyzed statistically with Student's *t* test.

Results

XRD patterns of the precipitates prepared in this study are shown in Fig. 1. The XRD indicated that precipitates with Nb/(Nb + P) molar ratios from 0 to 0.167 had a monolithic apatite structure, irrespective of the Nb/(Nb + P) molar ratio of the starting solution, although the level of crystallite decreased as the Nb content increased. XRD patterns of the precipitates with various Nb/(Nb + P) molar ratios annealed at 800°C are shown in Fig. 2. The level of crystallites of the precipitates was high due to the annealing, and their diffraction peaks were composed of those of both HAp and

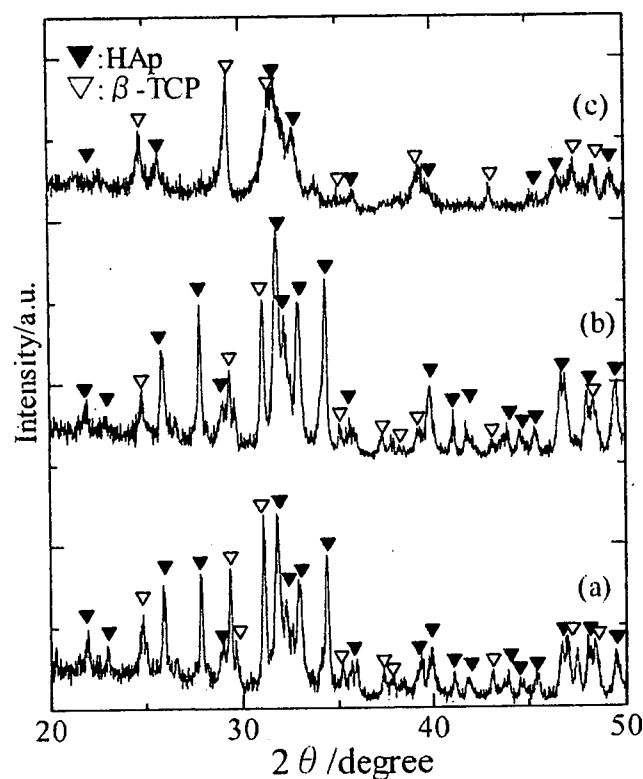


Fig. 2. XRD patterns of the annealed precipitates with a Ca/(P + Nb) molar ratio of 1.50: a, Nb/(Nb + P) = 0; b, Nb/(Nb + P) = 0.0167; and c, Nb/(Nb + P) = 0.1667. These precipitates were annealed at 800°C. β -TCP, β -tricalcium phosphate

β -TCP. Interestingly, the crystallite level decreased when the Nb level increased.

The chemical compositions and characteristics of the precipitates prepared in this study are summarized in Table 1. Both the Ca/(Nb + P) and the Nb/(P + Nb) molar ratios in precipitates measured by ICP approximately agreed with their theoretical values, except for the Nb/(P + Nb) molar ratio of NbTCP/HAp-II: the measured Nb/(P + Nb) molar ratio of NbTCP/HAp-II was 0.074, which is lower than the theoretical value of 0.167. The lattice parameter of the HAp phase in NbTCP/HAp increased with increasing Nb content.

Fig. 3. Scanning electron microscopy–energy-dispersive X-ray spectroscopy spectra of NbTCP/HAp-II annealed at 800°C (a) and their mapping images from P-K α , Ca-K α , and Nb-M α lines (b)

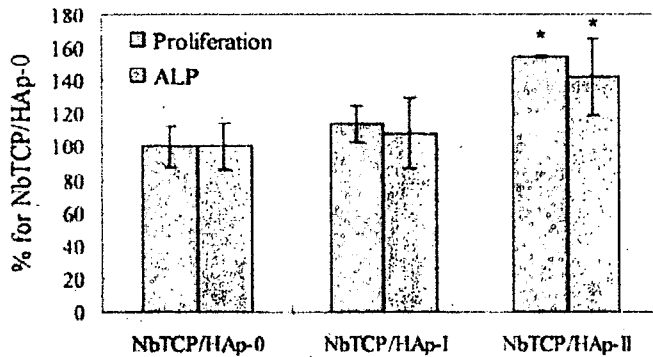
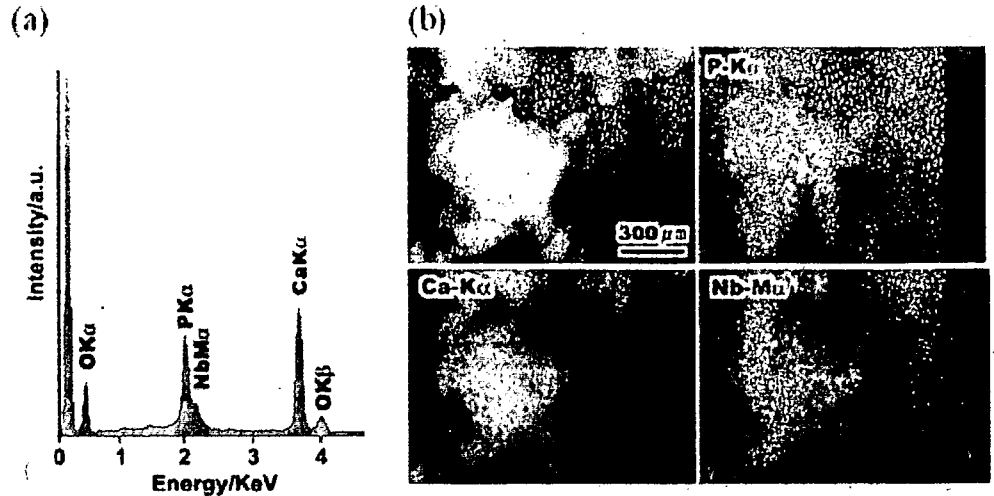


Fig. 4. Proliferation and alkaline phosphatase (ALP) activity of normal human osteoblasts (NHOst) cultured on various kinds of NbTCP/HAp pellets. * $P < 0.01$ against NbTCP/HAp-0 (without Nb ions)

The lattice parameters of NbTCP/HAp-0 without Nb ions were 0.939 nm for the a -axis and 0.687 nm for the c -axis, while those of NbTCP/HAp-II were 0.943 nm for the a -axis and 0.690 nm for the c -axis. In addition, the color of the precipitates became dark yellow as the Nb/(P + Nb) molar ratio increased, while the annealed precipitates of NbTCP/HAp were white.

SEM observation of the precipitates before annealing revealed that all precipitates were present as aggregates composed of primary particles of less than 1 μ m in diameter, irrespective of the Nb/(P + Nb) molar ratio. Figure 3a shows SEM-EDX spectra of NbTCP/HAp-II. The EDX spectrum of Nb M α was separated from the P K α line and could be observed at 2.17 KeV, although its intensity was weak. The mapping images of the P-K α , Ca-K α , and Nb-M α lines are shown in Fig. 3b: As shown in Fig. 3b, Nb ions were present at the same site as the Ca and P ions, suggesting that the Nb ions were homogeneously distributed in the aggregates.

The proliferation and ALP activity of NHOst cultured on various kinds of NbTCP/HAp pellets is shown in Fig. 4. The proliferation of NHOst cultured on NbTCP/HAp-II pellets was approximately 60% higher than that on NbTCP/HAp-0 without Nb ions ($P < 0.01$). As shown in Fig. 5, many

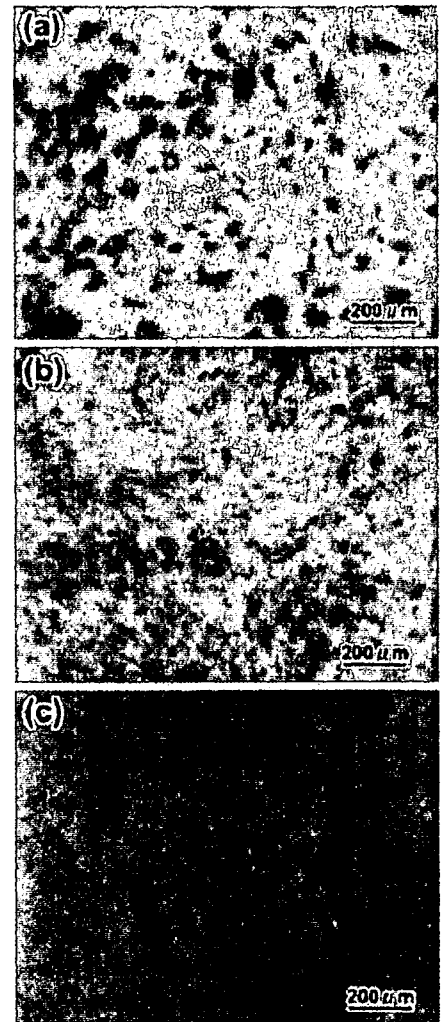


Fig. 5. Light microscopic images of NHOst cultured on various NbTCP/HAp samples for 7 days: a, NbTCP/HAp-0; b, NbTCP/HAp-I; and c, NbTCP/HAp-II. NHOst were stained by Giemsa solution

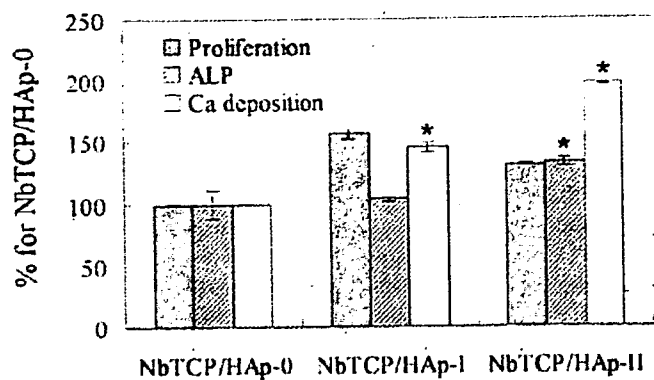


Fig. 6. Osteogenic properties (proliferation, ALP activity, and Ca deposition) of NHOst cultured in extracts from various NbTCP/HAp samples for 14 days. * $P < 0.01$ against NbTCP/HAp-0 (without Nb ions)

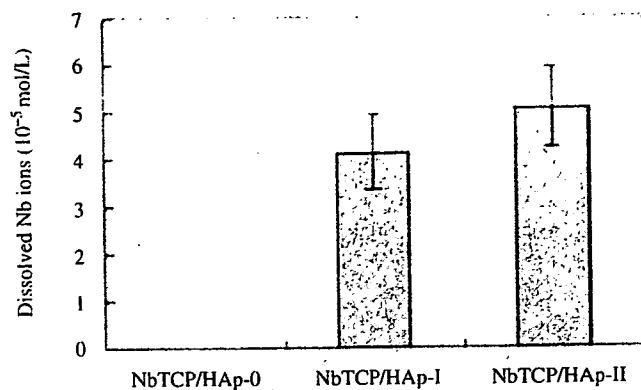


Fig. 7. Concentrations of Nb ions in extracts from various NbTCP/HAp samples. The concentration of Nb ions in cell culture medium was measured by inductively coupled plasma analysis

NHOst adhered to and spread on NbTCP/HAp-I and -II, while little spreading of NHOst was observed on HAp. In addition, as shown in Fig. 4, NHOst cultured on the NbTCP/HAp-II pellets expressed high ALP activity, compared with those cultured on NbTCP/HAp-0. Figure 6 shows the proliferation, ALP activity, and Ca deposition of NHOst cultured in extracts from various NbTCP/HAp samples for 14 days. Like the NHOst cultured on pellets, NHOst cultured in the extract from NbTCP/HAp-II expressed higher ALP activity than those in the extract from NbTCP/HAp-0. Furthermore, the amount of deposited calcium from NHOst increased with increasing Nb ion concentration in NbTCP/HAp, and the calcium deposition in the extract from NbTCP/HAp-II was twice that in the extract from NbTCP/HAp-0.

Figure 7 shows the concentration of Nb ions in extracts from NbTCP/HAp samples. It was found that Nb ions were released into the cell culture medium at concentrations of the order of 1×10^{-5} mol/l. To investigate the effect of Nb ions on NHOst function, NHOst were cultured in a medium containing Nb ions. The dependence of osteogenesis by NHOst on Nb ion concentration is shown in Fig. 8. Nb ions did not affect the proliferation of NHOst, but the ALP activity and Ca deposition of NHOst proceeded proportionally when the concentration of Nb ions was more than 1×10^{-5} mol/L.

Discussion

Characterization of NbTCP/HAp biphasic calcium phosphate ceramics

As summarized in Table 1, before annealing the precipitates, the NbHAp samples were hydroxyapatite with low levels of crystallite. The hydroxyapatite structure is known to be very tolerant of ionic substitution.¹² Ca^{2+} ions, PO_4^{3-} ions, and OH^- ions can be replaced, partly or completely, by various cationic or anionic ions. Notably, as shown in Table 1, the lattice parameter of HAp increased when the

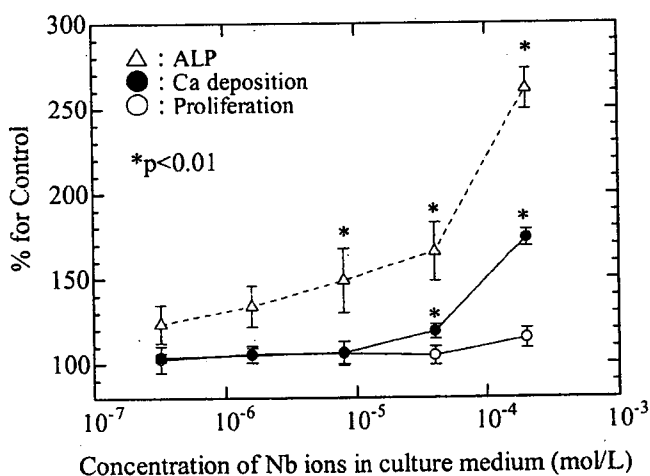


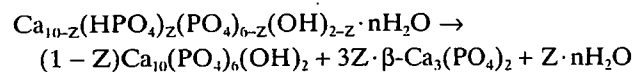
Fig. 8. Relationship between concentration of Nb ions in culture medium and osteogenic properties of NHOst. * $P < 0.01$ against cell culture medium without Nb ions

Nb content in NbTCP/HAp was high. This fact suggests that Nb ions are taken into the apatite lattice. If a substitution of an Nb^{5+} ion for a Ca^{2+} ion in HAp occurred, the lattice parameter should decrease, since the ionic radius of Ca^{2+} and Nb^{5+} are 0.1 nm and 0.064 nm, respectively. Therefore, the possibility of substitution of Nb ions for Ca ions is low. On the other hand, although the structure of Nb ions in aqueous solution is not fully understood at present, it has been reported that Nb ions in solution are not present as Nb^{5+} but as niobiumate acid, $\text{H}_x\text{Nb}_6\text{O}_{19}^{(8-x)-}$ ions ($x = 0, 1, 2$) for basic conditions,^{14,15} and the niobiumate acid cluster ($\text{H}_x\text{Nb}_6\text{O}_{19}^{(8-x)-}$) was polymerized or dissociated depending on the pH and ion concentration.¹⁵ According to these reports, $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ anionic monomer can exist in basal and low Nb concentrations (< 0.08 M). Since the Nb concentration in this study was 0.01 M, Nb ions would exist as $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ anionic monomers. $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ may be substituted at the PO_4 site since the PO_4 site in HAp can be replaced by anionic

atomic groups. In addition, the ionic radius of the $\text{H}_4\text{NbO}_6^{3-}$ monomer and PO_4 are approximately 0.30 nm and 0.23 nm, respectively, suggesting that an increase in lattice parameter of NbTCP/HAp is ascribed to the substitution of PO_4 sites by this monomer in HAp. Furthermore, the fact that both the $\text{Ca}/(\text{Nb} + \text{P})$ and $\text{Nb}/(\text{P} + \text{Nb})$ molar ratios of the precipitates, as measured by ICP, approximately agreed with their theoretical values may support this hypothesis. Despite the theoretical $\text{Nb}/(\text{Nb} + \text{P})$ ratio being 0.1667, the $\text{Nb}/(\text{Nb} + \text{P})$ molar ratio in NbTCP/HAp-II was about 0.07, which suggests that the maximum amount of substituted Nb ions at the PO_4 site is around 0.07.

The $\text{Ca}/(\text{P} + \text{Nb})$ molar ratio in the NbHAp obtained in this study was lower than that of the stoichiometric value of 1.67 for HAp. Hydroxyapatite having a lower Ca/P molar ratio is known as calcium-deficient hydroxyapatite [Ca-def HAp, $\text{Ca}_{10-Z}(\text{HPO}_4)_Z(\text{PO}_4)_{6-Z}(\text{OH})_{2-Z}$, $Z = 0-1$]. Therefore, NbHAp can be regarded as a Ca-def HAp in which the PO_4 sites are partly occupied by Nb ions.

Ca-def HAp decomposes to stoichiometric HAp and β -TCP at temperatures above 600°C according to the following reaction:^{16,17}



The above thermal decomposition reaction occurred during the annealing of NbHAp, resulting in a lower Ca/P molar ratio than the stoichiometric value of HAp because of partial β -TCP formation. In addition, the homogeneously distributed Nb ions in NbTCP/HAp may result from thermal diffusion of Nb ions during the thermal decomposition process.

Osteogenesis of NHOst cultured on NbTCP/HAp

In this study, NbTCP/HAp showed potential to promote calcification of NHOst. This study indicated that osteogenic behavior of NHOst cultured on NbTCP/HAp pellets was consistent with that of NHOst cultured in extracts from the pellets, suggesting that dissolved ions from the NbTCP/HAp pellets affect calcification of NHOst. As shown in Fig. 7, Nb ions were apparently released from NbTCP/HAp and dissolved in the medium at concentrations of the order of 1×10^{-5} mol/l. When 4×10^{-5} mol/l of NbCl_5 was added to the culture medium, Ca deposition clearly increased (Fig. 8). Therefore, the enhancement of Ca deposition is considered to be due to the dissolved Nb ions. One possible mechanism for enhancement of calcification is discussed below.

ALP is known to play an important role in the calcification of bone.¹⁸⁻²⁰ Generally, the calcification of bone mineral occurs in the matrix vesicles budding from the surface of osteoblasts.²¹ The nucleation of biological apatite, which is the initial stage of calcification, occurs due to the reaction between inorganic PO_4^{3-} ions produced by the ALP and calcium ions in matrix vesicles.

NHOst cultured on the NbTCP/HAp pellets containing Nb ions expressed high ALP activity compared with those

cultured on HAp without Nb ion. Similarly, it was found that NHOst cultured in an extract from NbTCP/HAp containing Nb ions expressed higher ALP activity than those in the extract from HAp without Nb ions. These results suggest that Nb ions affect the enhancement of ALP activity. Based on the above calcification mechanism in matrix vesicles, the enhancement of calcification might result from the enhancement of ALP activity due to dissolved Nb ions from NbTCP/HAp. The enhancement of ALP activity increases the production of inorganic PO_4^{3-} ions, and then the inorganic PO_4^{3-} ions produced may be taken into the matrix vesicles. The subsequent nucleation of biological hydroxyapatite occurs due to a reaction of Ca ions and inorganic PO_4^{3-} ions, followed by calcification. Although we cannot deny that Nb ions directly promote calcification by NHOst unrelated with ALP expression, the essence of the calcification enhancement by NbTCP/HAp may be the enhancement of ALP activity by Nb ions dissolved from NbTCP/HAp. The biological effect of Nb ions on NHOst is under investigation. Although further studies are necessary to clarify the mechanism of enhanced calcification by Nb ions, this study strongly suggests that NbTCP/HAp is a more promising material for use as a bone tissue engineering scaffold than HAp.

Conclusion

In order to promote the osteogenicity of osteoblasts, we synthesized a combination of HAp and β -TCP biphasic calcium phosphate containing Nb ions (NbTCP/HAp). The NbTCP/HAp samples were prepared by annealing precipitates obtained by coprecipitation of an aqueous solution of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ with a mixture of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and aqueous Nb solution. The precipitates obtained by the coprecipitation process can be identified as Ca-def HAp, the PO_4 sites of which are partly occupied by Nb ions. NbTCP/HAp samples were successfully obtained by thermal decomposition of the precipitates.

NbTCP/HAp enhanced calcification of NHOst. The enhancement of calcification of NbTCP/HAp was ascribed to the enhancement of ALP activity due to the dissolved Nb ions from NbTCP/HAp.

Acknowledgments This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Advanced Medical Technology from the Ministry of Labour, Health and Welfare of Japan, and a Grant-in-Aid from the Japan Health Sciences Foundation.

References

1. Service FR. Tissue engineers build new bone. *Science* 2000;289:1498-1500
2. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002;59:110-117
3. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan IA. Heterotopic osteogenesis in porous ceramics induced by marrow cells. *J Orthop Res* 1989;7:568-578

4. Cheung SH, Haak HM. Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study. *Biomaterials* 1989;10:63-67
5. Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W. Growth of bone marrow cells on porous ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res* 1987;21: 1-10
6. Ohgushi H, Okumura M. Osteogenic capacity of rat and human marrow cells in porous ceramics. *Acta Orthop Scand* 1990;61: 431-434
7. Schopper C, Ziya-Ghazvini F, Goriwoda W, Moser D, Wanschitz F, Spassova E, Lagogiannis G, Auterith A, Ewers R. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation - a long term histological study. *J Biomed Mater Res B* 2005;74B:458-467
8. Yuan H, Van DDM, Shihong L, Groot BV, Bruijn DDJ. A comparison of the osteoinductive potential of two calcium phosphate ceramics implanted intramuscularly in goats. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:1271-1275
9. Yamamoto A, Honma R, Sumita M. Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblast and osteoblastic cells. *J Biomed Mater Res* 1998;39:331-340
10. Isama K, Tsuchiya T. *Bull Natl Inst Health Sci* 2003;121:111
11. Tamai M, Nakaoka R, Isama K, Tsuchiya T. Novel calcium phosphate ceramics: the remarkable promoting action on the differentiation of normal human osteoblasts. *Key Eng Mater* 2006; 309-311:97-100
12. Ohya T, Ban T, Ohya Y, Takahashi Y. Preparation of concentrated, halogen-free aqueous titanium solution. *Ceram Trans* 2001;112: 47-52
13. Elliott CJ. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Tokyo: Elsevier, 1994
14. Cotton AF, Wilkinson G. *Advanced inorganic chemistry*. Tokyo: Baifukan, 1994
15. Jehng JM, Wachs IE. Niobium oxide solution chemistry. *J Raman Spec* 1991;22:83-89
16. Tamai M, Nakamura M, Isshiki T, Nishio K, Endoh H, Nakahira A. A metastable phase in thermal decomposition process of Ca-deficient hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14: 617-622
17. Gibson IR, Rehman I, Best SM, Bonfield W. Characterization of the transformation from calcium-deficient apatite to beta-tricalcium phosphate. *J Mater Sci Mater Med* 2000;11:533-539
18. Genge RB, Sauer RG, Wu YLN, McLean MF, Wuthier ER. Correlation between loss of alkaline phosphatase activity and accumulation of calcium during matrix vesicle-mediated mineralization. *J Biol Chem* 1988;263:18513-18519
19. Sowa H, Kaji H, Yamaguchi T, Sugimoto T, Chihara K. Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T-E1 cells. *J Bone Miner Res* 2002;17: 1190-1199
20. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner HU, Millan LJ. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 2000;15:1879-1888
21. Anderson CH. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop* 1995;314:266-280

ナノ粒子の有害性評価とリスク対策

技 術 情 報 協 会

- 中村 彰一 大塚電子(株) 医用・分析機器事業部 営業技術グループ
グループリーダー 主査・・・・・・・・・・・・・・・・(第4章1節[5](3))
- 藤野 聡 東京ダイレック(株) 研究開発部 部長・・・・・・・・(第4章1節[5](4))
- 木下 健 (株)島津製作所 分析計測事業部 応用技術部 試験計測グループ
京都カスタマーサポートセンター 主任・・・・・・・・(第4章1節5)
- 後藤 雄一 (独)交通安全環境研究所 環境研究領域 環境研究領域長 工学博士
技術士(機械部門)・・・・・・・・・・・・・・・・(第4章1節[6])
- 土屋 利江 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 部長 農学博士・・・(第4章2節[2])
- 増野 匡彦 共立薬科大学 医薬品化学講座 教授 薬学博士・・・・(第5章1節[1])
- 中村 成夫 共立薬科大学 医薬品化学講座 准教授 薬学博士・・・・(第5章1節[1])
- 佐藤 義倫 東北大学 大学院 環境科学研究科 助教 工学博士・・・(第5章1節[2])
- 田路 和幸 東北大学 大学院 環境科学研究科 教授 理学博士・・・(第5章1節[2])
- 亘理 文夫 北海道大学 大学院 歯学研究科 口腔健康科学講座 生体理工学教室
教授 工学博士・・・・・・・・・・・・・・・・(第5章1節[5])
- 小林 隆弘 東京工業大学 統合研究院ソリューション研究機構 特任教授 理学博士
・・・・・・・・・・・・・・・・(第5章2節,第7章1節)
- 柳下 皓男 ナノテクノロジービジネス推進協議会 事務局 事務局長代理
・・・・・・・・・・・・・・・・(第6章3節)
- 竹村 誠洋 (独)物質・材料研究機構 国際室 室長・・・・・・・・(第7章2節,第7章3節)
- 明星 敏彦 産業医科大学 産業生態科学研究所 労働衛生工学研究室 准教授
工学博士・・・・・・・・・・・・・・・・(第8章1節)
- 柳内 衛 (株)重松製作所 社長付海外情報担当 主任部員 工学博士
・・・・・・・・・・・・・・・・(第8章2節)

[2] in vitro

はじめに

粒子には、有機物質からなる粒子、たとえば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸やポリカプロラクトンなどや、それらの共重合体があげられる。これらの粒子については、重合度の違いにより、分子量が異なる。分子量が100万を超えるものから1000程度までであるが、分子量が高い粒子ほど、エステル分解に時間がかかり、その結果、分解物の培地への溶解速度が異なる。残留する粒子は、細胞の貪食能により、細胞にとりこまれるが、試験に使用する細胞の大きさによっても異なる。通常5ミクロン以下がとりこまれる。われわれの実験では、2ミクロン近辺がもつとも細胞に取り込まれた。ナノレベルの粒子としては、フラーレンに代表される粒子がある。フラーレンをin vitroの系で試験する場合には、培地などにどのように均一に分散させて試験するかが、問題となる。我々は、ポリビニルピロリドンに分散させて、試験をおこなっている¹⁾。最近では、ポリビニルピロリドン以外の分散剤が使用されているが、その場合には、分散剤単独の影響も評価し、対象粒子の毒性を明らかにする必要がある。

無機粒子については、単一金属粒子、金属酸化物、アルミナ、酸化チタンのようなセラミックス、アスベストなど、各種粒子が知られている。各粒子も、化学構造式は、同一でも、球状粒子、針状粒子、結晶構造の違い、粒子サイズにより、毒性強度が異なるので、試験をする前に、顕微鏡観察や各種物理化学的性質などを調べておく必要がある。

また、同様な形状を示し、化学構造が同一でも、製造メーカーが異なる場合には、製造工程などから由来する微量の不純物等によって毒性試験の結果が異なることもある。

1. 試験系への適用方法

粒子をどのようにin vitroで試験するか、はじめに悩むところである。通常の水溶性の培地に均一に分散しない粒子や、凝集しやすい粒子がある。In vitroで粒子の毒性を評価するために、細胞をプレートに播種後、粒子を培地に添加し、試験しようとしても、粒子が培地の上層に浮いてしまって評価できないことがある。粒子の細胞への影響を評価するためには、まず、粒子が細胞と接触することが必要である。

沈む粒子については、細胞と接触するため、細胞をプレートに播種した後、粒子を添加する方法で試験できる。しかし、粒子が軽い場合には、培地の上層に浮遊してしまい、細胞に接触しないため、粒子が細胞へ与える影響を評価できない。

このような場合、粒子をあらかじめプレートに播種し、プレートに接着させた後、細胞を懸濁させた培地を添加して評価している。この場合、粒子が底面から剥離して浮遊しないようにする工夫が必要である。

粒子を予め、プレートにコーティング後、細胞を播種した場合の細胞の増殖阻害や細胞機能阻害と、細胞を播種後、粒子を添加して、粒子に接触した細胞の増殖阻害や細胞機能阻害への影響の度合いは、異なることが明らかになった²⁾。

2. 毒性試験の種類

粒子の毒性を評価する *in vitro* 試験として、細胞毒性試験、代謝協同阻害試験、形質転換試験、胎児の中脳細胞を用いた神経分化阻害試験、および胎児の肢芽細胞を用いた軟骨分化阻害試験がある。各試験法について紹介する。

3. 細胞毒性試験（コロニー形成阻害試験）

細胞毒性試験にも様々な試験法があるが、我々は、医用材料の細胞毒性試験としてガイドラインに使用されているコロニー形成阻害試験で評価している。

(1) 細胞を播種後、接触した粒子の影響を評価するコロニー形成阻害試験法

細胞はコロニー形成を良好に示すことから V79 細胞を使用している。

試験方法の詳細は、「医療機器の生物学的安全性評価のための試験法について：第 1 部 細胞毒性試験」に記載されているので参照するとよい³⁾。

- ① 培地 (MO5) の作製方法は、Eagle の MEM で Earle の平衡塩類溶液を含む培地に、MEM 非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (0.11g/L)、L-グルタミン (0.292g/L)、炭酸水素ナトリウム (2.2g/L)、および、牛胎児血清 (5% v/v) を加える。細胞に影響を及ぼさない濃度で抗生物質を添加している。
- ② V79 細胞を継代した細胞を、トリプシン処理して、単離細胞を調製し、培地に懸濁する。
- ③ 希釈した細胞懸濁液を 60mm シャーレには、100～200 個(培地 4～8mL)、35mm シャーレには、50～100 個 (1～3mL)、12 穴または 24 穴プレートには、40～50 個 (0.5～2mL) の出現コロニーになるように細胞を播種する。
- ④ シャーレ (またはプレート) を 37℃ の炭酸ガス培養器内に入れ、4～24 時間静置し、細胞をシャーレの底面に接着させる。
- ⑤ 培地を捨て、粒子を均一に懸濁した種々の濃度の試験液を、60mm シャーレには 4～8mL、

35mmシャーレには1～3mL, 12穴プレートには1～2mL, 24穴プレートには0.5～1mLを加える。

- ⑥ 各同一濃度の試験液について, 3～8穴あるいは3～8枚ずつのシャーレを使用する。
- ⑦ 試験液を加えたシャーレ (またはプレート) は, 直ちに, 炭酸ガス培養器内に入れ, 静置して培養する。
- ⑧ 培養期間は, 使用する細胞株により異なる。V79細胞は6～7日間培養を行う。
- ⑨ 培養終了後, 培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後, メタノールまたは10%ホルマリン溶液等を加えて固定する。
- ⑩ ギムザ染色液 (市販) は, 使用直前にリン酸緩衝液 (M/15, pH6.4) で約20倍に希釈して使用する。
- ⑪ 固定後, 希釈したギムザ染色液を加え, コロニーを染色する。
- ⑫ コロニーが良く染色されたのを確認後, 染色液を捨て, 各シャーレ (又は各穴) のコロニー数を数える。
- ⑬ 迅速な判定法として, コロニーカウンターを用いたコロニー数測定も可能である。機械での測定結果の精度等に注意する。
- ⑭ 本試験法と異なる固定, 染色法やマイクロプレートリーダー等を使用した試験法も可能である⁴⁾。

(2) 結果の提示

- ① 各シャーレ (または各穴) 内の染色されたコロニー数を数える。コロニーは, 実体顕微鏡で観察し, 細胞が50個以上集まっている集落について数える。
- ② 新鮮培地のみで培養したシャーレ (または穴) をコントロール群とする。コントロール群に播種した細胞数と実際に形成されたコロニー数からコロニー形成能 (形成したコロニー数/播種した細胞数) を求める。コントロール群でのコロニー数の平均値を100%として, 種々の濃度の粒子懸濁液で形成されたコロニー数を百分率で示す。
- ③ 実験結果は, 縦軸がコロニー形成率 (コントロール群のコロニー数の平均値を100%とする) を, 横軸が試験した粒子懸濁液濃度をグラフ上にプロットする。グラフより, コントロール群のコロニー数を50%阻害する試験液の粒子濃度 (%) を求めIC₅₀ (%) とする。
- ④ 統計理論式から得られるIC₅₀ を, コンピュータを利用して計算することもできる。
- ⑤ IC₅₀ (%) の値を, 試験粒子の細胞毒性強度の指標とする。

(3) 結果の評価

以下に記載する内容を満たした試験において, 粒子の細胞毒性を正しく評価できる。

- ① コントロール群での良好なコロニー形成能を確認する。

- ② 陰性対照粒子で試験した時、各シャーレ（又は各穴）で形成されたコロニー数は、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- ③ 溶媒を使用した時は、使用溶媒濃度で試験した結果、各シャーレ（又は各穴）で形成されたコロニー数が、コントロール群のコロニー数と同程度である。
- ④ 必要に応じて、陽性対照粒子の細胞毒性強度（IC50）を調べ、試験系の検出感度および精度評価の参考とする。

(4) 粒子をプレートにコーティング後、細胞を播種し、粒子との直接接触法によるコロニー形成試験

試験可能な粒子について以下の試験を行う。

- ① 粒子の調製を行う。粒子は、滅菌されたものを、滅菌された溶媒中に懸濁する。均一になるように、懸濁液を調製する。
- ② 35mm のシャーレ、又は、12 穴、24 穴プレートのいずれかに粒子懸濁液をコーティングする。
- ③ 溶媒を無菌下で飛散させる。
- ④ 溶媒対照プレートも同様に準備する。
- ⑤ 陰性対照粒子および陽性対照粒子を、試験粒子と同様に準備し、コーティングする。
- ⑥ 粒子は、シャーレ（又は穴）によく密着させる。
- ⑦ 粒子をコーティングした 35mm シャーレには 50～100cells（培地 2～3mL）、12 穴プレートには 40～50cells（培地 1～2mL）、又は、24 穴プレートには 40～50cells（培地 0.5～1.0mL）を加える。
- ⑧ 陰性対照粒子および陽性対照粒子は、試験粒子と同様に細胞および培地を加える。
- ⑨ シャーレ（又はプレート）を 37℃の炭酸ガス培養器内に入れ、6～7 日間静置して培養する。
- ⑩ 培養終了後、培地を捨てる。平衡塩類溶液で洗った後、試験材料に適した固定液で固定する。
- ⑪ ギムザ染色液（市販）は、使用直前にリン酸緩衝液（M/15, pH6.4）で約 20 倍に希釈して使用する。
- ⑫ 固定後、使用直前に希釈されたギムザ染色液を加え、コロニーを染色する。
- ⑬ コロニーが良く染色されているのを確認後、染色液を捨て、各シャーレ（又は穴）のコロニー数を数える。
- ⑭ 培養用シャーレ（又は穴）に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数をコントロール群としその平均値を 100%とする。
- ⑮ 試験粒子に直接細胞をまいた時に形成したコロニー数を数え、コントロールのコロニー数に対する割合（%）を求める。
- ⑯ 陰性対照粒子および陽性対照粒子のコロニー形成率（%）を求める。

4. V79 代謝協同阻害試験

代謝協同は、ギャップ結合細胞間連絡機能を評価する試験法である。ギャップ結合機能は、細胞の恒常性機能維持や細胞分化にも関連し、その重要性が注目されている。ASTMにおいて、ギャップジャンクションの機能測定が、医療材料や、再生医療品の生体適合性指標および安全性指標として期待され、文書作りのためのプロジェクトが組織された。著書がプロジェクトリーダーとなっている。このギャップ結合蛋白は、コネキシンからなる。コネキシンは、ほとんど全ての細胞に存在している。コネキシン6分子が集まって、コネキソンを形成し、コネキソンが膜で集合し、隣接した細胞膜中のコネキシンと結合して、ギャップ結合細胞間連絡機能 (gap junctional intercellular communication : GJIC) が発現する。粒子と接着した細胞の長期間安全性評価をする上で、このコネキシン機能の果たす役割を明らかにし、その有用性が明らかになれば、長期間の安全性評価を迅速に判断できる。その結果、新規粒子の開発、選別の段階で役立つばかりでなく、試験法が簡便なため、低コストで評価可能である。開発費のコストダウンと、安全性と有効性の高いバイオマテリアル・粒子の市場化を促進することを目的として、数年間以上、コネキシン研究を行っている。

ギャップ結合タンパク質コネキシン機能を調べる方法として、いくつかの方法が知られている。ここでは、特別な装置がなくても試験できる V79 代謝協同阻害試験法を紹介する。この方法は、Yotti らが、1979 年に開発した方法⁵⁾ であるが、著者は、12 穴のプレートおよび 22mm のシャーレを用いて試験できる方法に改変し、より少量の培地および粒子量で評価可能である。

本試験系は、細胞毒性と代謝協同に及ぼす影響、すなわち細胞間連絡阻害活性の 2 種の試験を行って判定する。細胞毒性の影響がない条件でのみ、細胞間の連絡機能の有無を判定できる。

(1) V79 代謝協同阻害試験法

- ① V79 細胞(野生株)8 万個と TG1 細胞(変異株)100 個の細胞をプレート内に 5 時間接着させる。
- ② 6-thioguanine (6-TG) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度下で、37°C 炭酸ガス培養器で 7 日間培養する。
- ③ 培養期間終了後、前述した希釈ギムザ染色液でコロニーを染色し、カウントする。
- ④ 統計処理を行う。
- ⑤ コントロール群に比べて、有意に変異株が増加した場合を代謝協同阻害活性があると判断する。
- ⑥ 再現性を確認する。
- ⑦ 最終評価は、物質の濃度に応じて少なくとも 2 濃度で、有意に変異株の増加を認めたときを陽性、1 濃度のみ変異株の増加を認めたときは、擬陽性、いずれの濃度でも変異株の増加を認めなかったときは陰性と判定した。

(2) 解説

培養過程で、野生株は、6-TG を代謝して細胞毒性のある物質に変換し、自分自身細胞死を招く。接触し細胞間を連絡している変異株にも毒性物質がギャップ結合を介して渡すため、渡された細胞も死ぬ運命となる。ギャップ結合が阻害され、変異株に毒性物質が到達しなかったとき、変異株自身には、6-TG を毒性物質に変換する酵素が欠損しているため、そのまま生きて、コロニーとなる。変異株のコロニーが増加すればするほど、細胞間連絡機能の阻害作用は強い。

(3) 注意点

試験の原理上、細胞毒性が強い条件では、変異株のギャップと結合する隣接した野生株の細胞数が少ないため、6-TG は、毒性物質に変換されにくく、変異株に毒性物質が到達しないため、有意に高いコロニー数を観察することになる。この原因は、ギャップ結合機能の阻害ではなく、判断を誤らないようにすることが重要である。

5. Balb 3T3 細胞トランスフォーメーション試験

国際的に、*in vitro* 発癌試験として、評価されている方法⁶⁾である。

(1) 粒子の発癌作用を主に検出するための試験

- ① 培地は、Eagle MEM-10% FCS 培地を使用する。
- ② マウス胎児由来の細胞である A3111 細胞を 6cm プレートに 1 万個まき、炭酸ガスインキュベーターで、37℃で培養する。
- ③ 翌日試験する粒子を加える。
- ④ 4 日目に試験粒子を含む培地を捨て、新しい培地を加える。
- ⑤ その後、3～4 日ごとに、培地交換し、通常 6 週間培養して終了する。
- ⑥ 判定：細胞が癌化し形態を示しているかどうかは、ギムザ染色による染色性、形態、大きさにより判別する。
- ⑦ 試験粒子の細胞毒性試験も同時に行う。その原理は、コロニー法である。細胞数は、前述したコロニー法に従って、プレートに播種する。
- ⑧ 細胞毒性試験における試験粒子の添加は、細胞播種した翌日に添加し、4 日目に培地を新鮮培地に交換後、更に 6～8 日間培養する。全体で培養期間は、10 日～12 日間となる。
- ⑨ 培養終了後、前述した希釈ギムザ溶液で染色し、形成したコロニー数をカウントする。
- ⑩ コントロール群でのコロニー数の平均値を 100% として、試験粒子のコロニー形成率 (%) を求める。

(2) 注意点

- ① 粒子は、固体であり、分解しない粒子は、細胞に取り込まれた後、細胞が死滅し、あるいは培地中に排泄されない限り、新鮮培地で交換しても、細胞内あるいは細胞表面に存在し続けることとなり、粒子の影響は持続する。
- ② 粒子を培地に添加すると、培地の上層に浮いてしまう粒子については、あらかじめ、工夫して粒子をコーティングしたプレートを調製する必要がある。
- ③ アスベストは、ヒトで発癌性が報告されている。また、酸化チタンは、ラットでの吸入実験で肺癌の発生が報告⁷⁾されている。この形質転換試験系では、発癌性リスクの高いアスベストであるクリソタイルおよびアナターゼ型酸化チタン粒子で有意な形質転換活性を認めている。

酸化チタンは、近年、様々な分野で、使用頻度が高まっていることから、適用される用途などを十分に吟味し、使用しても安全性上の問題はないのかリスク分析・リスク評価・リスク管理を行うことが重要である。

6. ラット胎児中脳細胞および肢芽細胞の細胞分化および増殖に及ぼす影響

この試験法は、従来、催奇形性の *in vitro* 試験として、用いられている試験法であり、胎児の中脳や肢芽の初代細胞を用いた微小集積培養 (micromass culture) 法^{8,9)} である。

この培養法は、通常単層に細胞を培養する方法と異なり、小さなスポット内に、細胞が接触するように高密度に培養する。いわば、三次元に近い状態で、細胞を培養し、スポット内に発現した分化の程度を、生化学あるいは、形態計測的な指標を用いて測定する方法である。

(1) 試験に必要な動物、試薬、器具など

- ① 妊娠 12 日のラット (plug = 0 日) 3 ~ 4 匹。
- ② Tyrode-CMF (Ca²⁺, Mb²⁺を除いた Tyrode 液), Ham の F12 培養液 + 10% ウシ胎児血清 (FBS)。
- ③ PBS, ホルマリン, ヘマトキシリン染色液, 0.5% アルシヤンブルー染色液。
- ④ 各種ピペット, 24 ウェル (Corning) のプレート, 10cm のプラスチックまたはガラスシャーレ, 15ml あるいは, 50ml 遠心管, 眼科用ハサミ, 眼科用ピンセット, ナイロンメッシュ (20 μm)
- ⑤ 解剖用具一式: エーテル麻酔または炭酸ガス吸入装置, 70% アルコール, ハサミ, ピンセット。

(2) 試験方法

- ① ラットをエーテル麻酔あるいは、炭酸ガス吸入処理後、腹部の体表を 70% アルコールで消毒し、無菌的に開腹する。
- ② ついで、子宮を摘出し、あらかじめ Tyrode 液をいれたシャーレに入れる。つぎに、子宮を新

しい Tyrode 液の入ったシャーレに移しかえる。この操作を 2～3 回くり返して、血液をよく洗い流す。

- ③ 子宮壁にハサミで切れ目を入れ、胎児をつぶさないようにピンセットで摘みだす。胎児の周りを覆っている羊膜もきれいに実体顕微鏡下で取り除く。以上の操作は Tyrode-CMF の入ったシャーレの中で行う。
- ④ 胎児の中脳および前肢芽を眼科用ハサミで切りだし、それぞれをプラスチック遠心管に集める。
- ⑤ 妊娠ラット 3～4 匹分から、胎児の中脳および前肢芽を、同様に集め、2～3 回 Tyrode-CMF で洗った後、1%トリプシン液を加えて、37℃で、15 分間保温し、血清を加えて反応を停止させる。各組織片を Ham の F12 + FBS 培養液で洗い、ピペッティングした後、ナイロンフィルターで濾過して、細胞浮遊液を得る。血球計算盤にて細胞数を算定する。
- ⑥ 中脳は 5×10^6 個 / ml, 前肢芽は 2×10^7 個 / ml の細胞密度になるように、培養液を加えて調整する。つぎに、24 ウェルプレートの各ウェルに、調整した各細胞浮遊液を、20 μ l ずつスポットする。スポット操作には、通常、細胞培養液に使用するピペッターを用いている。
- ⑦ 炭酸ガスインキュベータに 2 時間静置し、細胞をプレートに接着させる。
- ⑧ 各ウェルに F12 + 10% FBS 培養液を 0.5ml ずつ加える。また、試験する粒子を含む培養液も同様に加える。
- ⑨ 5 日間培養した後、培養液を捨て、中脳細胞はホルマリン固定後、ヘマトキシリン染色を、肢芽の細胞は、アルシアンブルー染色を行う。
- ⑩ 中脳細胞は分化して神経細胞フォーカスを形成し、フォーカスは、ヘマトキシリンで濃く染まる。肢芽の細胞は、分化して、軟骨細胞フォーカスを形成し、アルシアンブルーで染まる。
- ⑪ 実体顕微鏡下で、各細胞スポット内のフォーカスの数を算定する。
- ⑫ 対照のフォーカスの数を 100%とし、各試験物質濃度処理群で生成したフォーカスの数を百分率で表わす。用量反応曲線より 50%阻害濃度 (IC50) などを求める。

(3) 注意点

- ① プレートの種類については、35mm シャーレ、24 ウェル、および 96 ウェルが用いられており、さらに、表面処理 (プライマリア, コラーゲン) を施したものを使用している場合もある。われわれは、Corning 製の 24 ウェルを使用している。
- ② 再現性のよいデータを得るためにも、プレートから、細胞がはがれないように培養する。そのためには、生存率の高い細胞を得ること、また、接着後の細胞に培養液を静かに加えることに、とくに注意する。また、培養後の染色操作においても、細胞がはがれないように、十分に注意しながら処理をする。

- ③ 分化形質の定量的な測定法として、肢芽細胞では、分化して生成する軟骨型プロテオグリカンをアルシアンブルー染色し、酢酸で洗浄後、4M グアニジン塩酸塩でアルシアンブルーと結合したプロテオグリカンを溶出し、600nm での吸光度を測定する方法がある¹⁾。
- ④ 細胞の分化の尺度として、フォーカスの算定に比べ、より定量的な方法といえる。
- ⑤ 胎児細胞での微小集積培養は、検索する粒子の胎児細胞に対する直接作用を検出できる点で優れている。

7. あとがき

細胞培養を用いた *in vitro* 試験系は、動物代替法の重要性が国内外で叫ばれている中、ISO TC194 の医療機器の生物学的評価の各パートに使用されている試験法において、動物代替法が、提言され、文書化のためのプロジェクトが進んでいる。

各種細胞培養法は、低経費、操作の簡便性、さらには画像処理装置やコンピュータなどの周辺機器を駆使することにより、迅速性にも優れている。食品や、家庭用品および医用材料中の化学物質、環境汚染物質などの安全性評価試験の一環として、また、製薬会社、医療機器メーカーでは、薬品や医療機器の開発段階でプレスクリーニングとしても応用されはじめている。

微粒子に関する試験を行った国立医薬品食品衛生研究所 療品部の中岡竜介主任研究官に深謝する。

文 献

- 1) T. Tsuchiya, Y. Nakajima Yamakoshi and N. Miyata, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 885-894, 1995
- 2) 中岡竜介, 土屋利江, “月刊バイオインダストリー” 2002年7月号, p.14-20
- 3) 厚生労働省医薬局審査管理課事務連絡(医療機器審査 No.36) “生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について” 2003, p.2-14
- 4) T. Tsuchiya, Y. Ikarashi, T. Arai, J. Ohhashi and A. Nakamura, *J. Applied Biomaterials*, 5, 361-367, 1994
- 5) L.P. Yotti, C.-C. Chang, and J. E. Trosco, *Science*, 206, 108901091, 1979
- 6) T. Tsuchiya, R. Nakaoka, H. Degawa and A. Nakamura, *J. Biomed. Master. Res.* 1996, 31, 299-303

- 7) K. P. Lee, H. J. Trochimowicz and C. F. Reinhardt, *Toxicol. Applied Pharmacol.* 79, 179-192, 1985
- 8) T. Tsuchiya, A. Takahashi, S. Asada, F. Takakubo, N. Yamashita- Ohsumi and K. Eto, *Teratology*, 43, 319-324, 1991
- 9) T. Tsuchiya, A. Nakamura, Y. Ohshima et al., *Tissue Engineering*. 4, 197-204, 1998

細胞組織利用医療機器に用いられる幹細胞の品質及び安全性評価について

澤田留美,* 伊藤友実, 土屋利江

Safety Evaluation of Tissue Engineered Medical Devices Using Normal Human Mesenchymal Stem Cells

Rumi SAWADA,* Tomomi ITO, and Toshie TSUCHIYA

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received January 17, 2007)

Several recent studies demonstrated the potential of bioengineering using somatic stem cells in regenerative medicine. Adult human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow have the pluripotency to differentiate into cells of mesodermal origin, e.g., bone, cartilage, adipose, and muscle cells; they, therefore, have many potential clinical applications. On the other hand, stem cells possess a self-renewal capability similar to cancer cells. For safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal hMSCs, in this study, we investigated the expression levels of several genes that affect cell proliferation in hMSCs during *in vitro* culture. We focused on the relationship between the hMSC proliferation and their transforming growth factor β (TGF β) signaling during *in vitro* culture. The proliferation rate of hMSCs gradually decreased and cellular senescence was observed for about 3 months. The mRNA expressions of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β receptor type I (TGF β RI) in hMSCs increased with the length of cell culture. The mRNA expressions of Smad3 increased, but those of c-myc and nucleostemin decreased with the length hMSCs were in *in vitro* culture. In addition, the expression profiles of the genes which regulate cellular proliferation in hMSCs were significantly different from those of cancer cells. In conclusion, hMSCs derived from bone marrow seldom underwent spontaneous transformation during 1-2 months *in vitro* culture for use in clinical applications. In hMSCs as well as in epithelial cells, growth might be controlled by the TGF β family signaling.

Key words—human mesenchymal stem cells; tissue engineered medical devices; proliferation; transforming growth factor β

1. はじめに

様々な疾病などに起因した組織や器官の機能不全に対して、組織再生又は機能回復を目指した「再生医療」が、現在注目されている。その手段としてこれまでに、幹細胞や人工素材を用いた医療機器の開発や細胞治療などについて多くの研究がなされている。胚性幹細胞 (ES 細胞) は全能性を持つが受精卵を用いることから倫理的問題が大きいのに対し、体性幹細胞は ES 細胞のような倫理的問題がない点が再生医療や細胞治療のツールとして利用されている大きな理由であろう。中でも骨髄に含まれる間葉

系幹細胞、造血幹細胞、血管内皮前駆細胞は、様々な臨床分野での応用が期待されている。また、骨髄や臍帯血中には間葉系幹細胞や造血幹細胞よりもさらに上の段階で多くの細胞系への分化能を持った細胞 (multipotent adult progenitor cells; MAPCs) が存在することも報告されている。¹⁾ さらに骨髄中だけでなくそれぞれの組織に特異的な幹細胞 (肝, 心筋, 神経, 上皮など) の存在も知られている。骨髄由来の間葉系幹細胞は骨, 軟骨, 脂肪, 筋肉へ分化可能な細胞として広く知られている¹⁻⁵⁾が, さらに, 神経細胞³⁾や肝細胞,^{1,6)} 心筋,^{7,8)} 皮膚など胚を越えた分化も報告されており, 整形外科の分野のみならず動脈硬化症, 心筋梗塞, 肝硬変, 糖尿病などの治療への応用も期待されている。骨髄間葉系幹細胞は採取も比較的容易で *in vitro* での培養技術も確立されているため, 細胞組織利用医療機器の材料と

国立医薬品食品衛生研究所療品部 (〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1)

*e-mail: rsawada@nihs.go.jp

本総説は, 日本薬学会第 126 年会シンポジウム S4 で発表したものを中心に記述したものである。