

表6. 染色体異常試験結果

スルホン化処理 時間 (min)	倍数体 (%)	構造異常細胞 (%)						Total
		ctg	ctb	cte	f	csb	cse	
0	3	1	1	0	0	0	0	2
240	7	2	1	0	0	0	0	3

表7. 細胞毒性試験結果

スルホン化処理 時間 (min)	コロニー数	平均±SD
0	102, 73, 79	84.7±15.3
240	83, 89, 76	82.7±6.5

## 2. ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とする リスクアセスメント手法開発

松岡 厚子

## ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

分担研究者：松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所療品部第三室室長

協力研究者：松田良枝 国立医薬品食品衛生研究所療品部

招へい外国人研究者：Agneta Önfelt ストックホルム大学環境化学部准研究員

### 研究要旨

市販および複数の研究者からナノマテリアルを入手し、生物試験への材料分散液の調製法の検討および分散液中の粒子径と細胞毒性の関連について検討した。分散法としては、卓上型超音波洗浄機およびメノウ乳鉢による粉碎を行なった。その結果、材料によっては、粒子径 100 nm レベルまで粉碎できたものもあったが、ほとんどが $\mu\text{m}$  レベルの粒子が残っている状態であった。分散がまだ不十分な状態であったが、粒子径測定と細胞毒性試験を平行して実施した結果、粒子径が小さい方が強い細胞毒性を示す傾向がみられた。また、共焦点顕微鏡観察により、蛍光標識ビーズ（直径  $2\mu\text{m}$ ）が細胞内へ取込まれていることを確認することができた。

### A. 研究目的

ナノマテリアルは近年、その開発が活発となり様々な分野での応用が考案されてきている。医療分野ではドラッグデリバリーシステム、遺伝子導入ベクター、細胞培養用スキャフォールド等である。製品への応用がすすみ、我々の身の回りでも使用される機会が増えることが予想され、結果としてそれらに暴露されることも多くなる。ナノマテリアルのヒトの健康への影響は未知の部分が多く、その安全性を確認しておくことは、アスベスト被害を経験している日本社会では特に、慎重に対応しなければならない問題と考えられる。毒性に関しては、いまだ議論があるところではあるが、国際機関 (ISO/TC 229) および各国行政当局では、ナノマテリアルの標準化がはすすめられている。またナノマテリアルの安全性については、これまでも、材料を開発したグループによって実施されてきている場合もあるが、試験法が一定ではなく、さらに、試験に供した分散液中の粒子に関する情報を提供しているものが少なく、結果を

材料間で直接比較することが困難な場合が多い。そこで、本研究では、比較的簡便な方法で、ナノマテリアルの生物活性を測定でき、どのような材料にも応用できる手法を開発し、ナノマテリアル全般の細胞毒性をスクリーニングできる手法を提案したいと考えている。

ナノマテリアルと一言にいても、化学組成、結晶構造、形状、サイズの異なるものが開発されてきている。また、親水性のものもあれば、疎水性のものもあり、水への分散様式も異なる。本年度の研究では、おもに、卓上型超音波洗浄機とメノウ乳鉢での粉碎を用いて、ナノマテリアルを粉碎、あるいは分散させることを試みたが、まだ  $\mu\text{m}$  レベルの粒子が残っている状態である。従来の化学物質の試験とは異なり、ナノマテリアルの生物試験では分散液中の材料の物理化学的特性を何か一つ指標として加える必要があると考えている。

### B. 研究方法

## 1. ナノマテリアル

1-1. 水熱合成チタニア・チタネートナノチューブ (図 1、大阪府立大学 中平敦教授提供)

合成後の洗浄方法が異なる4種のサンプルおよび対照材料

Sample 1: エタノール洗浄

Sample 2: 水洗浄

Sample 3: 水—塩酸 (pH7) 洗浄

Sample 4: 水—塩酸 (pH4) 洗浄

対照材料:  $K_2Ti_4O_9$  高純度化学研究所

1-2. 二酸化チタン ( $TiO_2$ , 純度>99.9%, ルチル 20–40%, アナターゼ 80–60%, 平均粒子径 80 nm、和光純薬)

1-3. 単層カーボンナノホーン (図 1、NHAs および NHox (開孔)、JST&NEC 湯田坂雅子先生提供)

1-4. フラーレン (図 1、 $C_{60}$ , nanom purple N60-S, 純度>99%, 平均粒子径 0.7 nm、フロンティアカーボン社)

1-5. 二酸化珪素 ( $SiO_2$ , 純度>99.9% 和光純薬)

1-6. クリソタイル B (UICC, 日本パイオアッセイ研究センター 浅倉真澄先生提供)

## 2. 細胞

当研究室で維持している、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL) を用いた。医薬品をはじめとする各種化学物質の非臨床安全性試験に繁用されている細胞株である。細胞は 10%牛胎児血清添加 MEM 培地で、5%炭酸ガス、37°C 条件下で培養した。

## 3. 細胞毒性試験

24-well プレートに、50 細胞/well の CHL 細胞を播種し、翌日、ナノマテリアルを添加し、そのままさらに 7 日間培養を続け、形成されたコロニーをメタノールで固定、ギムザ染色を行なった後カウントした。コントロー

ル群のコロニー数を 100%とした時の、処理群の相対コロニー数 (Survival %, 平均値±SD, n=4) で細胞毒性を表示した。

## 4. ナノマテリアル分散液の調製

秤量したナノマテリアルをそのまま培地に懸濁する方法と、ナノマテリアルをメノウ乳鉢で 3.5 分間粉碎 (乾式粉碎) する方法を用いた。また、後者については、培地を少量添加した状態で 3.5 分間粉碎 (湿式粉碎) する方法も試みた。いずれの分散液も、最後に 20 秒間、卓上型超音波洗浄機 (W-113MK-II, 爆洗, 110 W、本多電子株式会社) にかけて。

## 3. 分散液中のナノマテリアルの粒子径測定

動的光散乱法を測定原理とする DLS-7000 (大塚電子製、測定粒子径範囲 3 nm–3  $\mu$ m、測定波長 632.8 nm (He-Ne レーザ))を用いた。12 mm  $\phi$  のセルで測定した。

## 4. 蛍光標識ビーズの細胞内への取込みの可視化

共焦点顕微鏡 (Olympus Fluoview FV1000) を用いて、2  $\mu$ m  $\phi$  蛍光標識ビーズ (FluoSpheres, Molecular Probes) の細胞への接着等の観察を行ない、三次元断面を再構築することにより、細胞内への粒子の取込みを確認した。

カバーガラス底の 3.5 cm  $\phi$  プラスチックシャーレ (MatTek Corporation) に CHL 細胞を播種し、翌日蛍光標識ビーズを添加、一定時間後 formalin で固定、Triton X-100 処理、DAPI を含むグリセリン液で封入後観察した。

## 5. 研究結果

### 5-1. 予備細胞毒性試験

各材料について、培地懸濁、乾式および湿式粉碎の3種の分散液を調製し、CHL 細胞を処理した。その結果、図 3 に示すように、

細胞毒性が分散液調製法による影響を強く受けるもの（例：sample 2）から、ほとんど影響を受けないもの（例：TiO<sub>2</sub>, NHAs, NHox,）までであった。図2に sample 2 の実際のプレート上でのコロニーおよび高濃度での材料の付着の様子を示す。また、参考材料クリソタイル B では、調製法による差は認められなかったが、他の全ての試験試料とは大きく異なる強い細胞毒性を示した。

### 5.2. 細胞毒性と粒子径の比較

図4に、細胞毒性試験と平行して粒子径測定を実施した材料の結果を示す。粒子径測定に DLS-7000 を使ったが、まだ、分散方法が適切ではなく、目視できるくらい大きな粒子が残っており、DLS-7000 では正確に測定できていない可能性が示唆された。絶対値としての粒子径を記載することは、困難と考えられるが、相対的にどちらの粒子径分布の方が大きいかは比較できると考えている。Sample 1 と sample 2 では、培地懸濁したものと湿式粉碎したものとを比較したが、いずれの材料も後者の方が粒子径が小さくなっており、培地懸濁よりも細胞毒性は強くでている。その他の4種の材料については、超音波処理の時間の長短で比較したが、粒子径に大きな差はなく、それらを使った細胞毒性試験でも、超音波処理の長短による差は認められなかった。

### 5.3. 蛍光標識ビーズの細胞内への取込み

ナノマテリアルを含め不溶性の微粒子を細胞に処理した時、各試験系でそれぞれの指標が観察されるが、この時ナノマテリアルが細胞内部に取込まれているか否かを確認する必要がある。観察された指標がナノマテリアルが外部から細胞を物理的に刺激することによって誘発されたのか、細胞内に取込まれた結果、誘発されたのかを確認するためである。通常の蛍光顕微鏡では細胞とナノマテ

リアルの垂直方向の位置関係を観察することは困難である。そこで、招へい外国人研究者 Dr. Önfelt に共焦点顕微鏡による観察を分担してもらった。

細胞内への粒子取込みを確実に観察するために、細胞質を FITC（緑）、核および染色体を DAPI（青）で染色し、ビーズは赤色の蛍光で標識されているものを用いた。

細胞に付着してみえるビーズの数は処理時間とともに増加し、細胞の表面に乗っているものから、一部細胞膜に埋もれて見えるものまで様々であった。

図5は、細胞内にとりこまれているビーズを示したものである。a-e は、同一細胞の一部または全体である。d は細胞を手前斜上からみた俯瞰図である。細胞の上、こちら側に4個、頂上から奥に向かって5個のビーズが乗っているのがわかる。a-c は順に上から底面へ水平方向に切断した断面の写真である。a では矢印の先には、ビーズはないが、b（中間の水平面）では赤いビーズがはっきり観察され、底面 c では見えなくなる。e ではこの細胞内にあるビーズを、細胞を手前から切断していった垂直方向断面でとらえることができる。この結果、矢印のビーズは細胞内に取込まれていることが確認された。

## 6. 考察

sample 1 から sample 4 は、TiO<sub>2</sub> から水熱合成したナノチューブである[1]。合成後の洗浄処理の違いで、最終製品としての多層壁の間に残るイオンの種類が異なり、それが機能に影響を及ぼすのではないかと考えられている[2]。その他、各種ナノマテリアルが開発されているが、ナノマテリアルは、製造時には図1に示すように、nm 単位の一次粒子からなるが、手元に入手したものは白色または黒色の粉末で、 $\mu\text{m}$  レベルの凝集体となっている。今回の分散手技は、まだ未熟なものであるが、凝集体のサイズを小さくすることは容易で

はないことを実感した。分散液を細胞に処理することを目的としているため、できるだけ分散剤を使わないで、むしろ物理的な手法で凝集体の粒子径を小さくしたいと考えている。分散剤自体の細胞毒性も試験しなければならないこと、また、ナノマテリアルと分散剤の複合効果が生じる恐れもあるからである。サイズの小さい安定した分散液の調製が優先課題であり、本研究のキーポイントであると考えている。

宮脇らは、NHAsの染色体異常試験をCHL細胞を使って実施している[3]。1%カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 溶液に懸濁して分散液を調製したことは記載されているが、分散液中の粒子の様子は記載されていない。また、濃度設定予備試験で、50%増殖抑制濃度が2.5 mg/ml以上であったとしている。本研究での、 $IC_{50}$ は図4より、約0.4 mg/mlと推定できるが、試験法が異なるため、直接に比較はできない。宮脇らの染色体異常試験は2.5 mg/mlまで実施した結果、陰性と報告されている。今後、本研究でも1%CMC-Naでの分散液との比較も行ないたいと考えている。

粒子径だけでなく、分散液中の粒子の物理化学的特性には、比表面積、形状、結晶型、表面活性、Z電位等があるが、いずれもその測定、評価には専門の知識を持った研究者が必要で、本研究では分野を横断した研究者の協力が必要であると考えられる。

毒性が観察された材料も、その構造等を修飾することによって同じ機能を持つ毒性の少ない材料を開発することは、工学分野の研究者には可能であると考えられ、正確な毒性を把握する事は、私達の健康を守るだけでなく、ナノマテリアルの開発を進め、日本の産業界の発展にも寄与するものと考えられる。

また、環境中での製品の劣化等により nm レベルの材料が飛散してもすぐに凝集することが予想され、安全性評価においても 100

nm サイズまでの粒子についての評価が行えればよいのではないかと考えている。従って次年度は、少なくとも 100 nm の粒子を含む分散液を調製することを目標としたいと考えている。

謝辞 DLS-7000 での、粒子径測定については、当研究所薬品部阿曾主任研究官にご指導いただきました。また、データ解析については、大塚電子株式会社 田中克治 様に御指導いただきました。ここに、厚くお礼申し上げます。

## 7. 結論

ナノマテリアルの安全性評価法を探索する目的で、本年度は、卓上型超音波洗浄機およびメノウ乳鉢による粉碎で調製した分散液について、その細胞毒性と粒子径分布の比較を行なった。分散液中にはまだ $\mu\text{m}$ サイズの粒子が残っている状態であったが、同じ材料でも小さな粒子径の分散液の方が細胞毒性が強い傾向がみられた。このことから、100 nm サイズまでの粒子が存在する分散液調製法を考案し、その分散液を用いて生物試験を実施する必要性がより明確になった。ナノマテリアルの安全性評価には、安定した分散液調製法の考案と、分散液中の粒子の情報を少なくとも一つ提供する必要があると考えられる。

## 8. 研究発表

1. 論文発表  
なし。

### 2. 学会発表

松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、配島由二、伊佐間和郎、久保敬、中平敦、湯田坂雅子、飯島澄男、土屋利江：ナノ材料の粒度分布と細胞毒性

第29回バイオマテリアル学会(平成19年11

月 27 日)

A. Matsuoka, Y. Matsuda, A. Nakahira, T. Kubo, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya: Search for an in vitro screening method for biological safety evaluation of nanomaterials

1<sup>st</sup> Asian Conference on Environmental Mutagens and 36<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (November 29, 2007)

松岡厚子: ナノマテリアルの粒子径分布と細胞毒性

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金医薬品・医療機器レギュラトリーサイエンス総合事業研究成果発表会 (平成 20 年 2 月 7 日)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 文献

- [1] J. Yang et al. Study on composition, structure and formation process of nanotube  $\text{Na}_2\text{Ti}_2\text{O}_4(\text{OH})_2$ , Dalton Trans. (2003) 3898-3901.
- [2] T. Kubo, A. Nakahira. Local structure of  $\text{TiO}_2$ -derived nanotubes prepared by the hypothermal process, J. Phys. Chem. C, 112 (2008) 1658-1662.
- [3] J. Miyawaki et al. Toxicity of single-walled carbon nanohorns, ACS Nano (2008) in press.

### 3. 骨系材料の骨結合能による リスクアセスメント手法開発

伊佐間和郎



## 骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

分担研究者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所主任研究官

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。そして、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる。そこで、フーリエ変換赤外光音響分光法を用いて、擬似体液中でのアパタイト形成能の評価を試みた。ハンクス平衡塩溶液浸漬によって、純金属である Ti、Zr 及び Al はアパタイトを形成したが、Nb はアパタイトを形成しなかった。また、Ti-Zr もハンクス平衡塩溶液浸漬によってアパタイトを形成した。さらに、Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、ハンクス平衡塩溶液浸漬によって、Nb 含量の増加と共にアパタイト形成量が減少した。Ti-Zr-Nb 合金にアパタイト形成能を付与するための表面処理法の開発が望まれる。

### A. 研究目的

整形外科領域で使用される骨系埋植医療機器には、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 $\gamma$  ネイル、髄内釘、人工関節などがある。これら骨系医療機器の使用は年々増加しており、構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって、不具合の報告件数も増加傾向にある<sup>1,2)</sup>。そのため、有効性及び安全性を高めるための研究が活発に展開されている。特に、埋植初期に見られる機器の破損や埋植部位近傍の骨折は、埋植した機器と骨との接着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した材料が開発されている。現在、骨系医用材料の骨結合能は、主に動

物実験によって評価されているが、費用や時間、動物愛護などの観点で問題がある。したがって、動物実験に頼らず、臨床実態を反映するような骨系医用材料の骨結合能の評価法の確立が強く望まれている。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。そして、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる<sup>3,4)</sup>。昨年、擬似体液を用いるアパタイト形成能の評価法が、ISO 23317:2007: Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials として国

際標準化された。この評価法では、材料表面に形成したアパタイトを、走査型電子顕微鏡及び薄膜 X 線回折法を用いて経時的に測定するだけである。そこで、試料の形態を選ばず、定量的な解析も可能なフーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) を用いて、アパタイト形成能の評価を試みた。

従来から骨系医療機器に使用されている Ti-6Al-4V は、構成元素のひとつである V に強い細胞毒性があることから<sup>5)</sup>、最近ではその安全性が疑問視されている<sup>6)</sup>。また、我々は、Ti-6Al-4V は V による骨芽細胞の増殖阻害に加え、Al による分化阻害を起こす可能性があることを明らかにした<sup>7,8)</sup>。近年、構成元素に V を含まない Ti 合金や、V と Al を両方とも含まない Ti 合金が数多く開発されている。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、細胞毒性が無く、さらに、骨芽細胞適合性が高い<sup>9)</sup>。また、骨に埋植しても炎症反応を起こさず、骨組織適合性にも全く問題が無いことから、生物学的安全性及び有効性の高い骨系医用材料として期待されている<sup>10)</sup>。そこで、Nb を添加した Ti-Zr 基合金の擬似体液中的でのアパタイト形成能について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試験材料

Ti-Zr 基合金として、Ti と Zr の原子比が 1:1 である Ti-Zr 並びに主成分である Ti と Zr の原子比を 1:1 に固定し、それに β 相安定化元素のひとつである Nb を添加した Ti-Zr-4Nb、Ti-Zr-8Nb、Ti-Zr-16Nb 及び Ti-Zr-24Nb を用いた。各 Ti-Zr 基合金の化学組成を表 1 に示した。また、純金属として、Ti、Zr、Nb 及び Al を用いた。

いずれの試料も直径 1.0 mm、長さ 7.0 mm のロッド状に加工した後、#400 (Al のみ #1200) のエメリー紙を用いて、側面をほぼ同じ表面粗さに研磨仕上げした。その後、酢酸エチル、アセトン、エタノール、超純水の順に超音波洗浄した。

### 2. 擬似体液浸漬

内径 6 mm のテフロンチューブを用いて、試料の両端面を固定した後、テフロンチューブごと容量 50 ml のポリプロピレン製遠沈管に入れ、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハंक ス平衡塩溶液 (GIBCO 14025、インビトロジェン) 40 ml を加えた。遠沈管を温度 37.0°C に設定したインキュベータ

表 1 Ti-Zr 基合金の化学組成

Alloy	Chemical composition, mol% (mass%)		
	Nb	Ti	Zr
Ti-Zr	0	50.0 (34.4)	balance
Ti-Zr-4Nb	4.0 (5.3)	48.0 (32.6)	balance
Ti-Zr-8Nb	8.0 (10.4)	46.0 (30.8)	balance
Ti-Zr-16Nb	16.0 (20.3)	42.0 (27.4)	balance
Ti-Zr-24Nb	24.0 (29.7)	38.0 (24.2)	balance

内に 4 週間静置した。ハंकス平衡塩溶液は週 3 回の頻度で新鮮なものと交換した。

### 3. デジタル顕微鏡観察

デジタルマイクروسコープはキーエンス VH-8000C を使用し、ズームレンズ VH-Z25 又は高倍率ズームレンズ VH-Z450 を装着した。ハंकス平衡塩溶液浸漬後の試料表面を観察した。

### 4. 走査型電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡は日本電子 JSM-5800 を使用した。試料は常法に従って金蒸着した後、加速電圧は 15 kV で観察した。

### 5. フーリエ変換赤外光音響分光分析

フーリエ変換赤外分光光度計は日本電

子 JIR-SPX200 を使用し、光音響検出器は MTEC Model 300 を使用した。スキャンスピードは 0.4 mm/s、分解能は  $8\text{ cm}^{-1}$ 、補間は 7 ポイント、スキャン回数は 256 回で測定した。試料を導入した後、試料セル内を乾燥空気で十分にパージして水蒸気を除去した。また、カーボンブラック薄膜をリファレンス材料として用いた。

## C. 研究結果

### 1. デジタル顕微鏡観察

純金属である Ti、Zr、Nb 及び Al のハंकス平衡塩溶液浸漬後のデジタル顕微鏡観察像を図 1 に示した。Ti 及び Zr 表面では、どちらも長軸と垂直な方向に走る研磨痕に沿って、薄い析出物が観察された (図 1a 及び図 1b)。一方、Nb 表面では析出物は観察されず、研磨痕が

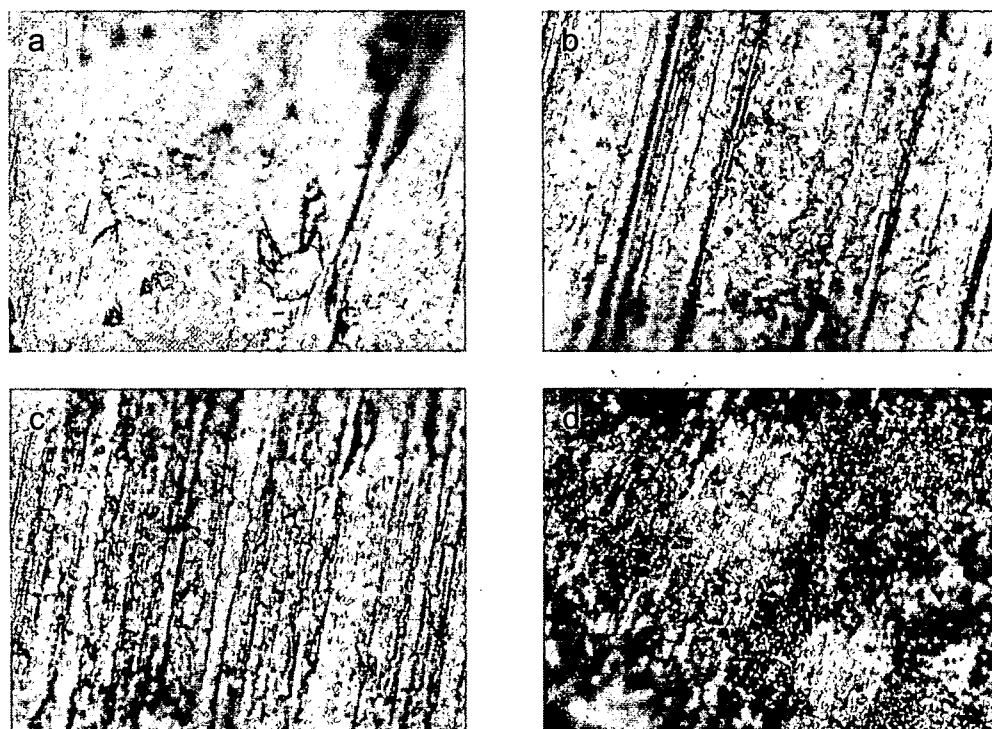


図 1 ハंकス平衡塩溶液浸漬後の Ti (a)、Zr (b)、Nb (c) 及び Al (d) 表面のデジタル顕微鏡観察像 (x1500)

はっきりと確認できた (図 1c)。また、Al 表面ではスポット状に析出物が観察され (図 1d)、肉眼でも観察される程大きな析出物も一部に見られた (図 2)。

Ti-Zr 基合金のハンクス平衡塩溶液浸漬後のデジタル顕微鏡観察像を図 3 に示した。Ti-Zr 表面では研磨痕に沿って析出物が観察された (図 3a)。Ti-Zr-4Nb 表面でも研磨痕に沿って析出物が観察されたが (図 3b)、Nb 含量の増加と共に析出物が少なくなる傾向がみられ



図 2 ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Al 表面の析出物

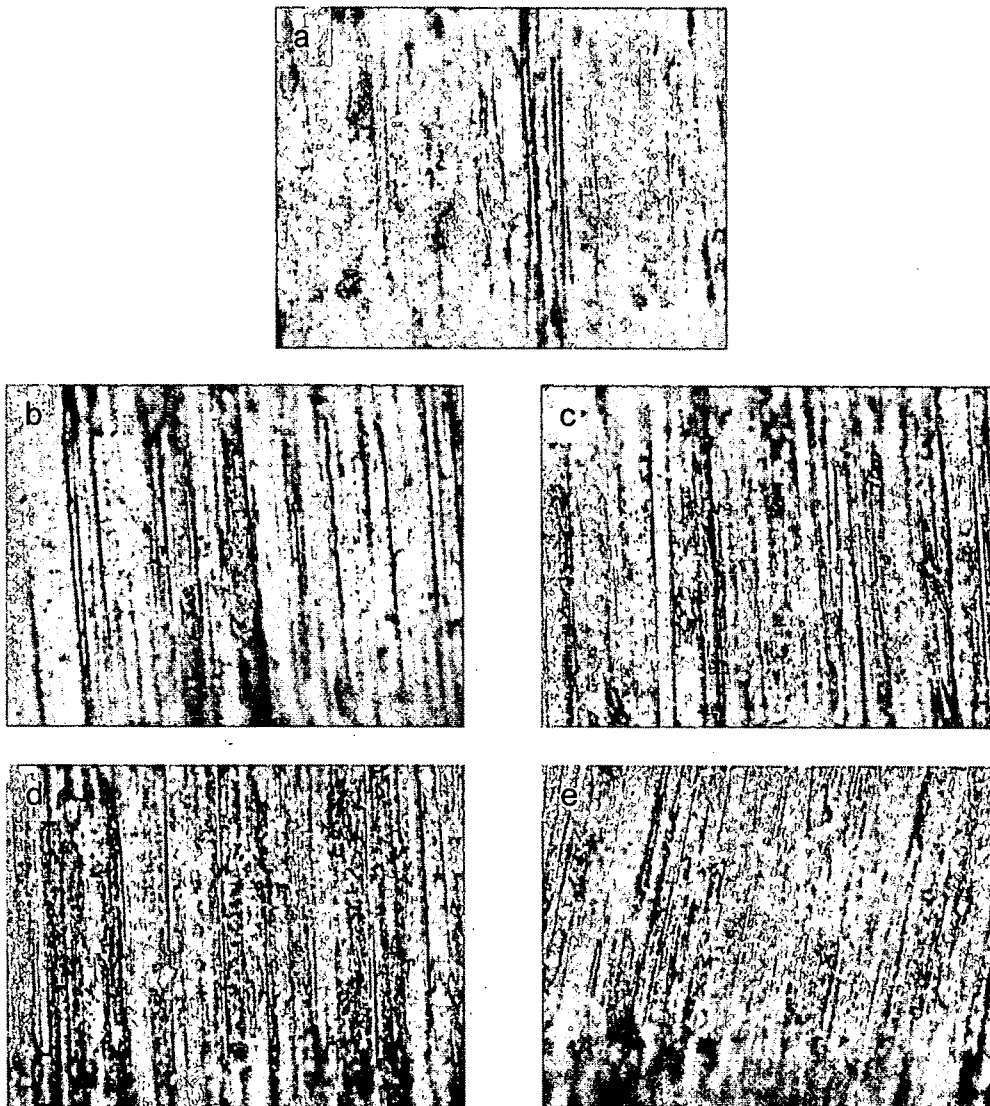


図 3 ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Ti-Zr ( a )、Ti-Zr-4Nb ( b )、Ti-Zr-8Nb ( c )、Ti-Zr-16Nb ( d ) 及び Ti-Zr-24Nb ( e ) 表面のデジタル顕微鏡観察像 ( x1500 )

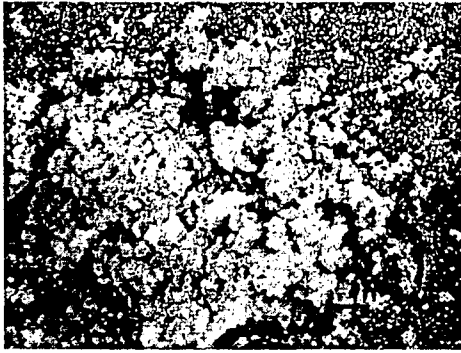


図4 ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Al 表面の析出物の電子顕微鏡観察像 (x3000)

(図 3c、3d)、Ti-Zr-24Nb 表面では析出物は観察されなかった (図 3e)。

## 2. 走査型電子顕微鏡観察

ハンクス平衡塩溶液浸漬後に Al 表面で観察された析出物を走査型電子顕微鏡で観察した (図 4)。直径 0.3-1  $\mu\text{m}$  程度の球状結晶が積み重なって大きな塊を形成しており、擬似体液中で形成する結

晶性の低いアパタイトに特徴的な構造を示していた。

## 3. フーリエ変換赤外光音響分光分析

ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Al 表面及び未焼成ハイドロキシアパタイト (宇部マテリアルズ) の FT-IR/PAS スペクトルを図 5 に示した。Al 表面に形成された析出物のスペクトルには、HAp のスペクトルに認められる水酸基及びリン酸基によるピークの他に、炭酸基によるピークも認められ、この析出物は擬似体液中で形成する骨類似アパタイトであると同定された。

ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Ti-Zr、Ti-Zr-8Nb 及び Ti-Zr-24Nb 表面の FT-IR/PAS スペクトルを図 6 に示した。Ti-Zr 表面ではハイドロキシアパタイト類似のスペクトルが観察されたが (図 6a)、Ti-Zr-8Nb 表面ではピーク強度が減少し (図 6b)、さらに Ti-Zr-24Nb 表面では

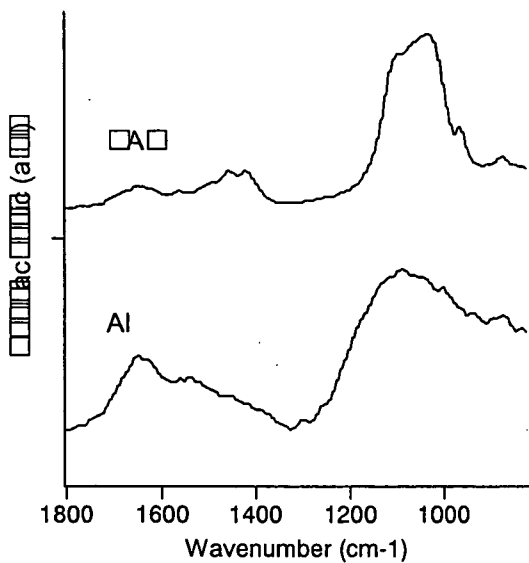


図5 ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Al 表面及びハイドロキシアパタイト (□) の FT-IR/PAS スペクトル

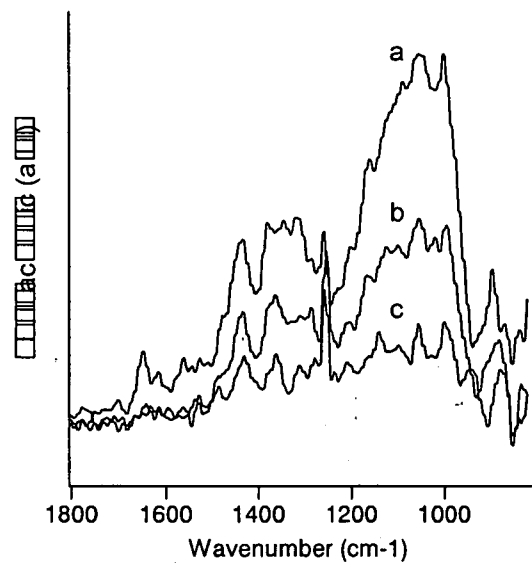


図6 ハンクス平衡塩溶液浸漬後の Ti-Zr (a)、Ti-Zr-8Nb (b) 及び Ti-Zr-24Nb (c) 表面の FT-IR/PAS スペクトル

ピークがほとんど観察されなかった（図 6c）。ハックス平衡塩溶液浸漬後の Ti-Zr 基合金におけるリン酸基による  $1050\text{ cm}^{-1}$  付近のピーク強度を図 7 に示した。ハックス平衡塩溶液浸漬後の Ti-Zr-Nb 合金表面のリン酸基は、Nb 含量の増加に従って減少した。

#### D. 考察

我が国の整形外科領域で使用されている医用材料は、重量ベースでは Co-Cr 合金が最も多く、次いで Ti 合金が多い。その他の医用材料は 1 割以下である。一般に金属は、骨組織との界面に軟組織が存在することが知られており、セラミックスのように骨組織と直接結合しない。そこで、骨の無機成分に類似したアパタイトコーティングや表面改質などにより、金属に骨と直接結合するような性質を付与する研究が活発に行われている。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にア

パタイトを形成する。そして、擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる<sup>3,4)</sup>。昨年、擬似体液を用いるアパタイト形成能の評価法が、ISO 23317:2007: Implants for surgery -- In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials として国際標準化された。擬似体液中でのアパタイト形成能は、生体内での骨結合性をよく再現できることも確認されている<sup>11)</sup>。

ISO 23317:2007 で用いる擬似体液は、調製が複雑な上、作製した擬似体液の長期保存もできない。そこで、今回は市販のカルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液を擬似体液として用いた。有機成分であるグルコースを含む点で、ISO 23317:2007 で用いる擬似体液と大きく異なる。

ISO 23317:2007 では、材料表面に形成したアパタイトを、走査型電子顕微鏡及び薄膜 X 線回折法を用いて経時的に測定する。しかし、走査型電子顕微鏡では定量的な解析ができない。また、薄膜 X 線回折法で定量的に解析するためには試料形状が制限され、凸凹がある試料では定量性が著しく劣る。そのため、ISO 23317:2007 においても、試料形状が直径  $10\pm 2\text{ mm}$  及び厚さ  $2\pm 1\text{ mm}$  の円盤状、または、一辺  $10\pm 2\text{ mm}$  及び厚さ  $2\pm 1\text{ mm}$  の板状で、平滑な表面が要求されている。

フーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) は試料の前処理を必要としない非破壊的表面分析法であり、試料の形態にも制限がない。また、干渉計の可動鏡速度や変調周波数を変化させることで、深さ方向の分析も可能である<sup>12)</sup>。その

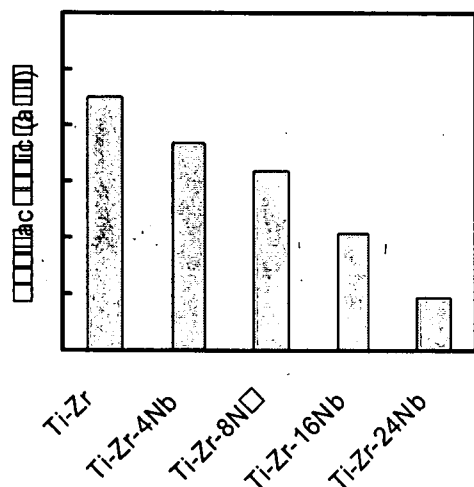


図 7 ハックス平衡塩溶液浸漬後の Ti-Zr 基合金表面のリン酸基のピーク強度

ため、様々な形態の材料について、擬似体液に浸漬して表面にアパタイトを形成させたり、材料の上で骨芽細胞を培養して骨様石灰化物を形成させたりした後に、アパタイトの構造を完全に維持した状態のまま分析することができる。さらには、表面に形成したアパタイト量を正確に見積もった材料を、他の評価系の試料としたり、生体内に埋植したりすることも可能である。そこで、FT-IR/PAS法を用いて、材料表面に形成したアパタイトを定量するための基礎的な検討を行った。

ハンクス平衡塩溶液浸漬によって、純金属であるTi、Zr及びAlはアパタイトを形成したが(図1a、1b、1d)、Nbはアパタイトを形成しなかった(図1c)。また、Ti-Zrもハンクス平衡塩溶液浸漬によってアパタイトを形成した(図3a)。Ti、Zr及びTi-Zrはアパタイトを形成したが、いずれも形成量は少なく、FT-IR/PASで辛うじて検出可能な程度であった。今回用いた試料は、いずれもアルカリ・加熱処理などのアパタイト形成能を付与するための表面処理を施さなかったためであろう。

Nbを添加したTi-Zr基合金は、ハンクス平衡塩溶液浸漬によって、Nb含量の増加と共にアパタイト形成量が減少した(図7)。純Nbにおいてアパタイトが形成しなかった結果とよく一致した。Ti-Zr-Nb合金にアパタイト形成能を付与するための表面処理法の開発が望まれる。

Ti-Zr基合金は、1~5 mol%のNbを添加すると、 $\alpha$ - $\beta$ 二相組織が得られ、力学的強度が増し<sup>13)</sup>、8 mol%以上のNbを添加すると、 $\beta$ 単相組織が得られ、弾

性率が小さくなる<sup>14)</sup>。このように、Ti-Zr基合金は、Nbの添加量で力学的性質を制御できるという特徴を有している。また、Ti-Zr-Nb合金に含まれているZrおよびNbは、合金の不動態皮膜中で安定な酸化物となって、不動態皮膜をより強固にする働きがあり、耐腐食性も向上する<sup>1,15)</sup>。

我々は今までに、Nbを添加したTi-Zr基合金について、チャイニーズハムスター由来線維芽細胞V79を用いた細胞毒性試験<sup>9)</sup>、正常ヒト骨芽細胞NHOstを用いた骨芽細胞適合性試験<sup>9)</sup>及びラット大腿骨への埋移による骨組織適合性試験<sup>10)</sup>を実施してきた。直接接触法によるコロニー法を用いた細胞毒性試験において、Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金には細胞毒性が認められなかった<sup>9)</sup>。正常ヒト骨芽細胞NHOstの増殖および分化に及ぼす影響を指標とする骨芽細胞適合性試験において、Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金は骨芽細胞の増殖および分化を促進させた<sup>9)</sup>。また、骨芽細胞の分化レベルを、Nbを添加したTi-Zr基合金は増加させた<sup>9)</sup>。さらに、ラット大腿骨埋植試験を実施し、Nb含量にかかわらずTi-Zr基合金は、いずれも組織に炎症反応が無く、窩洞部の骨形成にも相違は見られず、骨組織適合性に問題は無いことを確認している<sup>10)</sup>。今後、アルカリ・加熱処理などの表面処理を施して、アパタイト形成能を付与できれば、安全性及び有効性の高い骨系医用材料として有望である。

## E. 結論

Nbを添加したTi-Zr基合金の擬似体液中でのアパタイト形成能を、フーリエ

変換赤外光音響分光法を用いて評価した。ハックス平衡塩溶液浸漬によって、純金属である Ti、Zr 及び Al はアパタイトを形成したが、Nb はアパタイトを形成しなかった。また、Ti-Zr もハックス平衡塩溶液浸漬によってアパタイトを形成した。Nb を添加した Ti-Zr 基合金は、ハックス平衡塩溶液浸漬によって、Nb 含量の増加と共にアパタイト形成量が減少した。Ti-Zr-Nb 合金にアパタイト形成能を付与するための表面処理法の開発が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Masato Tamai, Kazuo Isama, Ryusuke Nakaoka, Toshie Tsuchiya: Synthesis of novel  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties, *Journal of Artificial Organs*, 10, 22-28 (2007)

### 2. 学会発表

- 1) 賀喜白乙、伊佐間和郎、齋島由二、土屋利江：自己組織化方法により温度応答性 PIPAAm と多糖の組織傾斜複合材料の開発、第 6 回日本再生医療学会総会（2007 年 3 月 13 日、横浜）
- 2) 伊佐間和郎、小園知、小林郁夫、石水敬大、土屋利江：Ti-Zr-Nb 合金の骨組織適合性評価、第 29 回日本バイオマテリアル学会大会（2007 年 11 月 26 日、豊中）
- 3) 岡野理紗、齋島由二、伊佐間和郎、松岡厚子、長谷川千恵、松田良枝、村

松和明、土屋利江：スルホン化プレート上で培養したヒト正常骨芽細胞の増殖・分化挙動の解析、第 29 回日本バイオマテリアル学会大会（2007 年 11 月 26 日、豊中）

- 4) 中岡竜介、山越葉子、伊佐間和郎、土屋利江：種々の官能基がヒト骨芽細胞に与える影響、第 29 回日本バイオマテリアル学会大会（2007 年 11 月 26 日、豊中）
- 5) Kazuo Isama, Yuji Haishima, Toshie Tsuchiya: Evaluation of proliferation and differentiation of normal human osteoblasts on collagen scaffolds, 1st Asian Biomaterials Congress (2007 年 12 月 6 日、つくば)
- 6) 伊佐間和郎：合金材料の骨適合性評価法の開発、平成 19 年度医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業研究成果発表会（2008 年 2 月 7 日、東京）

## G. 参考文献

- 1) 岡崎義光：整形外科用金属材料にみる標準化のメリット、*バイオマテリアル*、22、343-349 (2004)
- 2) 佐藤道夫：金属材料の物理的安全性評価手法の開発、平成 16 年度厚生労働科学研究報告書 (2005)
- 3) T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 331-343 (1990)
- 4) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Solutions



- able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 721-734 (1990)
- 5) A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita: Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, *J. Biomed. Mater. Res.*, **39**, 331-340 (1998)
- 6) 松村英雄、柳田廣明、米山隆之：チタン合金の歯科補綴への応用、バイオマテリアル、**20**、403-407 (2002)
- 7) 伊佐間和郎、土屋利江：遺伝子発現を指標とする化学物質の安全性評価法に関する研究：金属製医用材料のヒト骨芽細胞の骨分化機能に及ぼす影響評価、国立衛研報、**121**、111-112 (2003)
- 8) 伊佐間和郎、土屋利江：金属イオン等と骨分化、医療材料・医療機器の安全性と生体適合性（土屋利江編集）、シーエムシー出版、東京、230-234 (2003)
- 9) 伊佐間和郎：金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究、平成 17 年度厚生労働科学研究報告書 (2006)
- 10) 伊佐間和郎：金属材料の化学的及び生物学的安全性評価手法の開発に関する研究、平成 18 年度厚生労働科学研究報告書 (2007)
- 11) S. Fujibayashi, M. Neo, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura: A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$  glasses, *Biomaterials*, **24**, 1349-1356 (2003)
- 12) 杉浦英樹：PAS-FTIR による高分子膜の深さ方向分析、Ricoh Technical Report、**24**、35-42 (1998)
- 13) E. Kobayashi, S. Matsumoto, H. Doi, T. Yoneyama, H. Hamanaka: Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 943-950 (1995)
- 14) 高橋正史、小林郁夫、土井寿、米山隆之、浜中人士：ニオブを添加した生体用  $\beta$  型チタン-ジルコニウム基合金の相安定性と力学的性質、日本金属学会誌、**64**、1120-1126 (2000)
- 15) Y. Okazaki, E. Gotoh: Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro, *Biomaterials*, **26**, 11-21 (2005)

4. 人工心臓弁機能不全の  
リスクアセスメント手法開発

澤田 留美

分担研究報告書  
厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
「医療機器・医用材料のリスクアセスメント手法開発に関する研究」

分担研究課題名  
人工心臓弁機能不全のリスクアセスメント手法開発

分担研究者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所療品部

人工心臓弁を体に埋植した際の機能不全の主な原因と考えられる血栓形成やパンプス形成について、その原因となる日本人の遺伝子多型を探索することを目的として人工心臓弁の機能不全の患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて SNP タイピングを行う。

#### A. 研究目的

心臓弁膜症は、心臓病の最大の原因の一つとして挙げられ、その治療として人工弁置換手術が行われている。現在、臨床的に用いられている人工弁は、機械弁、異種生体弁、凍結保存同種弁であるが、現在国内外で最も多く利用されている人工弁は機械弁である。しかしながら、人工心臓弁の機能不全についての報告もあり、その主な原因としては、血栓形成とパンプス（心臓弁の周辺に発育する線維性の自己組織）形成が挙げられている。大動脈弁の置換術後における人工弁機能不全は、患者の生命を危機に曝す重大な問題である。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために置換手術後は生涯にわたり抗血液凝固薬及び抗血小板凝集薬服用が必要となるが、薬の作用の個体差により血栓が形成された場合には急速な人工心臓弁機能不全を招く恐れがある。また、パンプスの形成についてはそのメカニズムは未だ明らかにされていない。一方

で、人工心臓弁置換手術技能によって機能不全が起こることも考え得るが、異物に対する生体反応等に個体差がある可能性も否定できない。

そこで本研究では、人工心臓弁を体に埋植した際の血栓やパンプスの形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的として、人工心臓弁使用者の中で人工心臓弁の機能不全が認められる患者および人工弁の不具合が認められない患者の血液を用いて両者を比較検討していく。

#### B. 研究方法

##### 1) 血液採取及び DNA 抽出

大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科において、人工心臓弁置換手術を過去に施された患者から採血し、その後同機関にて DNA を抽出する。検体として採取した血液は、大阪大学医学系研究科外科学講座心臓血管外科において患者の自由意志に基づくインフォームド・コンセントが得

られた患者より定期検診日に提供されたものである。

## 2) SNP タイピング

血栓形成の原因となり得る遺伝子多型を探索するために、まずは、抗血液凝固薬であるワーファリンの薬効に関連する遺伝子として SERPINE1、CYP2C9、プロトロンビン、凝固因子第 7、凝固因子第 9、凝固因子第 10、 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼの 7 遺伝子について、これまでに日本人で報告されている SNP を中心に計 23SNP と、さらに炎症反応に関わる遺伝子として VAMP8、TGF $\beta$ 1、TGF $\beta$ レセプター I (TGF $\beta$ RI)、TGF $\beta$ レセプター II (TGF $\beta$ RII) の 4 遺伝子で、計 6SNP を選択し、総計 29SNP についてタイピングを行う。

さらに、illumina BeadArray SNPs ジェノタイプングにて網羅的解析を行い、血栓形成およびパナヌス形成の原因となり得る遺伝子多型の探索を行う。

## C. 研究結果

SNP タイピングを行う 29SNP を表 1 に示す。

今年度は、国立医薬品食品衛生研究所及び大阪大学医学部にてそれぞれの倫理審査委員会へ申請し、現在審査中であるため、患者血液由来の DNA を用いた SNP タイピングを行う事ができなかった。両機関の倫理審査委員会での承認が得られ次第、解析を開始する予定である。

## D. 考察

心臓弁膜症の治療の一つとして、現在人工弁置換手術が行われているが、人工心臓弁の機能不全は直ちに患者の生命を危機にさらす重大な問題である。機能不全の原因

としてこれまでに血栓形成とパナヌス形成などが挙げられている。機械弁を用いた場合、血栓形成を抑えるために、置換手術後は抗血液凝固薬及び抗血小板薬を服用し続けなければならないが、服用していても機能不全につながる血栓が形成されることもある。それは個人の遺伝的背景の違いによって、薬に対する感受性の違いが見られるのかもしれない。また、パナヌス形成についてはその原因は未だ明らかにされておらず、血栓形成と同様な個体差による可能性も否定できない。

そこで本研究は、人工心臓弁の機能不全を未然に防ぐ方法の確立を目指して、血栓形成やパナヌス形成の原因となり得る遺伝子多型を探索することを目的とした。人工心臓弁を現在使用している患者の血液を用いて、抗血液凝固薬として人工弁置換術後服用するワーファリンの薬効関連遺伝子や、生体における免疫系、創傷治療や発癌など様々な環境下で重要な役割を果たしている TGF $\beta$ やそのレセプターなど 11 遺伝子を対象とし、計 29SNP を選択しタイピングを行うこととした。これまでの我々の研究からすでに日本人の健常人 (100 名) 由来の DNA を用いた上記 29SNP のタイピングデータはとってあるため、これを対照として比較検討する予定である。

今年度は、倫理審査等の手続きを進めており、承認され次第解析を開始する予定である。人工心臓弁の不具合の有無や原因(血栓形成によるものかパナヌス形成によるものか等)によってアレルの頻度に差が出てくる SNP が特定できれば、血栓形成やパナヌス形成による人工心臓弁機能不全の原因となり得る遺伝的背景を探る手がかりとなるであろう。人工心臓弁機能不全発症の分子メカニズムは未知であり、予防法も開発