

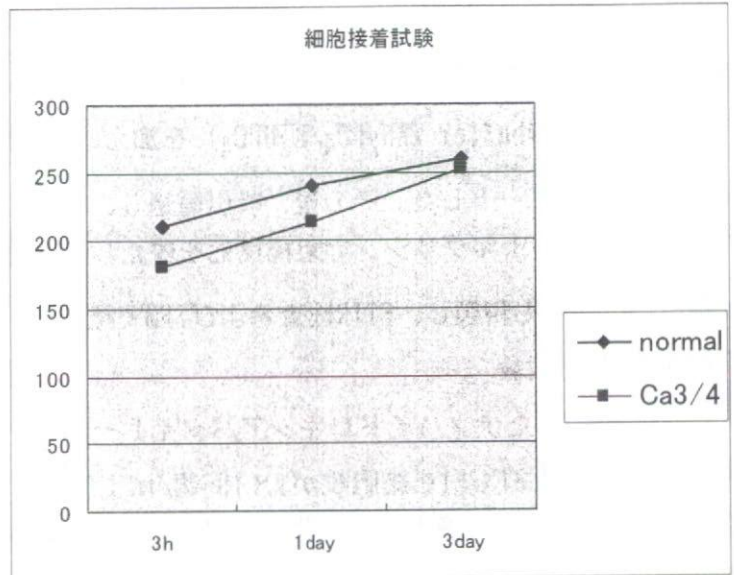
2) 細胞毒性試験

培養試験の結果を右に示す。

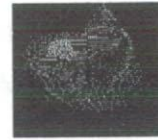
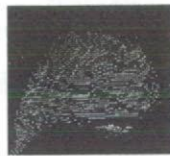
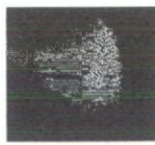
3時間後、1日後、3日後では

付着細胞数は増加する傾向があった。

2群間で有意差は認められなかった。



3) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のBMP活性への影響：軟X線検査

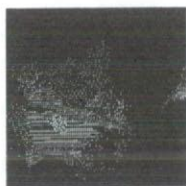


BMP群

9mM CaCl₂ (皮下)

6.75mM CaCl₂ (皮下)

9mM CaCl₂ (筋)



PBS群 9mM CaCl₂ (皮下)

6.75mM CaCl₂ (皮下)

9mM CaCl₂ (筋)

9mM CaCl₂では、皮下結合組織および筋のいずれに移植した場合も、BMP群は部分的に針状の不透過像が認められたのに対し、PBS群は顆粒状の不透過像が観察され、BMP群の方が不透過性はわずかに増していた。

6.75mM CaCl₂ではBMP群、PBS群の間に不透過性の違いは見られなかった。

4. まとめ

1. ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜は表面のほとんどがナノハイドロキシアパタイト粒子で覆われており、添加するCaCl₂の量を減らすことで、ナノハイドロキシアパタイト粒子の大きさを変えず、量を減らすことができることが明らかとなった。
2. ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜へのMC3T3-E1細胞の付着増殖は良好で、

CaCl₂量を変えてもが細胞増殖にはほとんど影響はなく、生体材料として使用可能と考えられた。

3. ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜にBMPを含浸させて生体内に移植すると、CaCl₂量が多い方が軟X線の不透過性が高くなったことから、ナノハイドロキシアパタイトの含有量がBMPによる硬組織誘導に影響を及ぼす可能性が示唆された。

5. 今後の方針

今後は、実験数を増やし、ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜をBMPの担体に使用した場合のナノハイドロキシアパタイトの量が硬組織形成にどのような影響を及ぼすかを、組織学的に評価する。

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.
- 9) Bradt, J. H., Mertig, M., Teresiak, A. &Pompe, W. :Biomimetic mineralization of collagen by combined fibril assembly and calcium phosphate formation. Chemistry of Materials II :2694-2701

収束型電界X線源の現状と将来の展望

名古屋工業大学大学院工学研究科

○奥山 文雄

1. 総論

カーボンナノチューブ (CNTs) を電子源とする電界X線源への関心は、除じよに広がりつつある。その理由は、1) 室温でも作動し、線源をミニチュア化できる、及び2) 電子の電磁収束により、ナノサイズの焦点サイズが期待される、の二点にある。特に後者は、多くの研究者、技術者が関心をもつところであり、電界X線機器の開発も第二段階に入ったように思われる。筆者が把握している関連研究グループと、それぞれの成果は、Table 1に示す通りであり、あと一息で、ナノ焦点径が得られる状況となった。

Institution	Focusing mode	Focal spot size (μm)	Spatial resolution (μm)
NIT	• Electro-static (*)	~50	-----
	• magnetic	~30	-----
Korea Advanced Inst.	• magnetic	~5	-----
Mie Univ.	• magnetic	~0.5	~0.7
Univ. of North Carolina	• magnetic	~250	----- (CT mode)

Table 1. Research groups working on focusing-type field-emission x-ray sources and recent results. For (*), see Fig. 1.

2. 結果の一例

Fig. 1に、Table 1の(*)に対応する実験結果を示す。テストチャートのX線像プロファイルから算出された焦点径は、約 $50\mu\text{m}$ である。焦点サイズはエミッターの形状に決定的に左右される。高収束、かつ、大電子電流エミッターの開発が急がれる。

3. 付言

軟組織からなる生体試料の立体構造を観る有力な手法は、位相差X線CTである。近年、この手法に適用できる、コンパクトなX線ビーム発生システムが求められる気運にあり、電界X線源の次なる目標になるとおもわれる。当日、これにかかる筆者の提案を紹介したい。

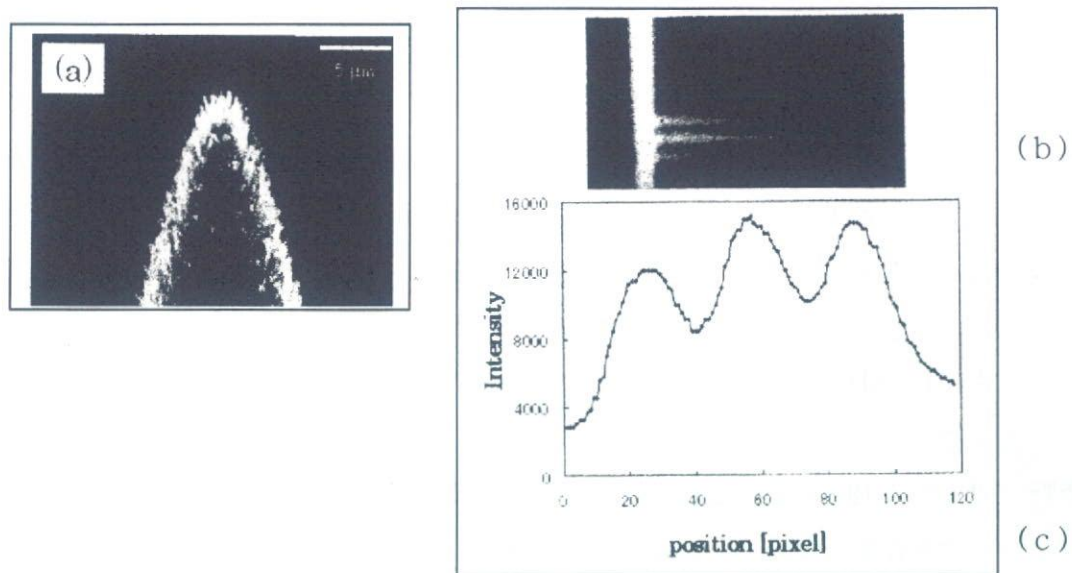


Fig. 1. Details of the experiments for (*) in Table 1. (a) Emitter used (SEM image), (b) x-ray image of a test chart recorded with the emitter in (a), and (c) intensity profile along lines vertical to chart stripes. Stripe separation: 8 lp/mm.

チタン磨耗粉によって惹起されるオステオライシス発生機序におけるMIF (マクロファージ遊走阻止因子)の機能解析

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重要な役割を果た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が関与しているとの仮説のもと、マウスオステオライシスモデルを作製して検討し以下の知見を得た。

1. 12週令野生型マウス (Balb/C♀) 頭頂骨上にチタン粉30mgを埋植して7日後に頭頂骨を摘出し、
1) パラフィン切片を作製し免疫染色、TRAP染色を施行したところ、骨とチタン粉との界面に肉芽腫性癒痕組織が形成され、多数のTRAP陽性細胞が出現した。この癒痕組織は免疫組織学的にMIF陽性であった。2) 液体窒素凍結後total RNAを抽出しMIFおよび炎症性サイトカインであるTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、およびRANKL mRNAに関しリアルタイムPCRにて解析したところ、いずれにおいてもシャム手術群に比べチタン粉埋植群において発現が有意に亢進していた。

2. 12週令野生型 (WT) およびMIFノックアウトマウス (MIF-KO, Balb/C) を用い上記モデルにて反応を比較検討した。1) WTマウスに認められたTRAP陽性細胞の出現はMIF-KOではほとんど認めなかった。またWTのチタン粉-頭頂骨界面にける肉芽腫性癒痕組織は免疫組織学的にIL-1 β およびRANKL陽性であったが、これらの染色性はMIF-KOでは弱かった。2) 同様に摘出頭頂骨のリアルタイムPCR解析においてIL-1 β およびRANKL mRNA発現はMIF-KOはWTに比べ有意に低かった。3) 摘出した頭頂骨をMMAにて包埋後非脱灰標本作製し、矢状縫合部を除いた、チタン粉を含む界面の肉芽腫性癒痕組織と接する頭頂骨表面における、単位面積あたりの骨吸収面・破骨細胞数・および破骨細胞面を比較したところ、いずれもWTに比べMIF-KOでは有意に低値であった。

以上よりMIFは異物磨耗粉により誘導される骨吸収において重要な役割を果たすことが示された。MIFそれ自身に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認めないが、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。

人工股関節から発生した摩耗粉の形態解析

(財) ファインセラミックスセンター

○橋本雅美、水野峰男、北岡諭

1. 緒言

人工股関節置換術において、超高分子量ポリエチレン (PE) 摩耗粉により引き起こされる骨吸収は深刻な問題である。この骨吸収が原因で人工関節の弛みが発生し、患者のQOL (Quality of Life) を著しく低下させている。現状では、PE摩耗粉による炎症や骨吸収に関して完全に解明されていないが、摩耗粉のサイズ、量および形態により細胞応答の大きさが異なると考えられている。

そこで本研究では、ヒップシミュレーターを用いた摩耗試験を行い、潤滑液の種類が摩耗特性および摩耗粉の形態に与える影響を調べた。

2. 実験

摩耗試験用部材のライナーには、PEライナーを用い、骨頭には、直径26 mmの酸化ジルコニウム (ZrO₂) 骨頭を使用した。摩耗試験は、MTS社製のヒップシミュレーターを用いて行った。試験条件はISO 14242-1に準じ、潤滑液には0.1%のアジ化ナトリウム (NaN₃) と20 mMのエチレンジアミン四酢酸三ナトリウム (3Na-EDTA) を含有する蛋白質量の異なる2種類の25%牛血清(表1)を用い、液量約750 mlで、毎秒1回の歩行周期 (1 Hz) に183と280 kgfの 2つのピークをもつDouble Peak Paulの歩行条件で、最大500万サイクルの摩耗試験を行った。

まず摩耗特性に関しては、50万サイクル毎にライナーの乾燥重量の変化を計測した。

次に、摩耗粉の形態観察に関しては、500万回試験後の潤滑液から摩耗粉を抽出し、走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。コンピューター支援による画像解析を用いて、その形状や粒径分布の定量的評価を実施した。

Table 1 Compositions of serums used to lubricate wear tests

	Protein (Total)	Albumin	Globulin			Alb/G	Cholesterol
			α-G	β-G	γ-G		
(mg/ml)							
Serum A	18.3	8.4	2.7	3.4	3.8	0.85	0.91
Serum B	15.5	7.8	2.3	4.0	1.4	1	1.99

Na, P, Cl, Ca and P concentration : SerumA ≐ SerumB

3. 結果と考察

PEライナーの摩耗特性は血清の種類により大きく異なり、Alb/G比が大きく、コレステロール濃度が大きい程(血清B)、ライナーの重量減少は小さいことがわかった(図1)。具体的には、初期摩耗率および定常摩耗率は、血清Aの場合、それぞれ27.9および41.41 mg/10⁶ cyclesであるのに対し、血清Bの場合には、それぞれ16.93および12.82 mg/10⁶ cyclesであった。一方、骨頭の摩耗率は、血清AおよびBの場合、それぞれ0.13および-0.02 mg/10⁶ cyclesであった。血清B中での骨頭重量の増加は、血清中の成分が骨頭表面に吸着したためと考えられる。

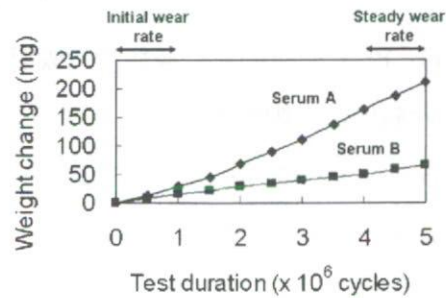


Fig.1 Weight loss of PE cups in sera A and B

摩耗粉の形状および粒径分布に関しては、何れの血清の場合もほぼ同じであった(表2および3)。

Table 2 Size and shape descriptors of UHMWPE wear debris in Serum A

	N	ECD (μm)	AR	E	R
Fiber	56,550	0.54 ± 0.49	3.66 ± 1.53	1.95 ± 2.05	0.34 ± 0.11
Flake	38,100	0.29 ± 0.19	2.74 ± 0.65	0.87 ± 0.51	0.56 ± 0.05
Granule	118,725	0.21 ± 0.11	2.25 ± 0.45	0.59 ± 0.27	0.84 ± 0.10
Total	213,375	0.31 ± 0.31	2.71 ± 1.08	1.00 ± 1.24	0.66 ± 0.24

Table 3 Size and shape descriptors of UHMWPE wear debris in Serum B

	N	ECD (μm)	AR	E	R
Fiber	12,675	0.60 ± 0.73	4.17 ± 1.99	2.14 ± 2.73	0.34 ± 0.11
Flake	11,400	0.31 ± 0.22	2.88 ± 0.71	0.85 ± 0.55	0.59 ± 0.05
Granule	34,350	0.26 ± 0.14	2.14 ± 0.55	0.63 ± 0.30	0.85 ± 0.09
Total	58,425	0.34 ± 0.39	2.73 ± 1.34	1.00 ± 1.44	0.69 ± 0.23

N: Number, ECD: Equivalent Circle Diameter, AR: Aspect Ratio, E: Elongation, R: Circularity

生体に投与した各種マイクロ・ナノ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・化粧品の分野でもマイクロ・ナノ粒子が広範囲に使用されてきている。それ故、我々は知らず知らずのうちにマイクロ・ナノ粒子に曝されている。そこで本研究では、生体内に取り込まれた無機粒子の体内での循環・滞留・排泄の追跡とその可視化を試みた。

2. 実験方法

各種マイクロ・ナノ無機粒子(TiO_2 , Pt, Fe_2O_3 など)を生理食塩水に10 mg/mLの濃度で分散させ、マウス(ICR系オス)の尾静脈より0.6 mL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・脾臓などを摘出した。各臓器を誘導結合プラズマ発光分析装置(ICP-AES、以下ICPと略記)、エックス線分析顕微鏡(XSAM)を用いて分析し、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。ICP測定用の試料は、各臓器を全て摘出して800°Cで灰化した後、硝酸で溶解した。XSAM測定の際には臓器をホルマリン固定した後、約2 mm厚の切片を作成し観察を行なった。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

・投与したマイクロ・ナノ無機粒子の体内動態の追跡

[ICPを用いた投与粒子の追跡]

粒径: 1-2 μm のPt粒子を投与したところ、体内から検出されたPtの総量は経時的に減少する傾向が示された。また、投与直後には肺・脾臓・心臓・腎臓など様々な臓器への到達が確認された。しかし投与後1日~4週のマウスでは、Pt粒子の体内分布に局在化が起こり、検出されたPtの大半は

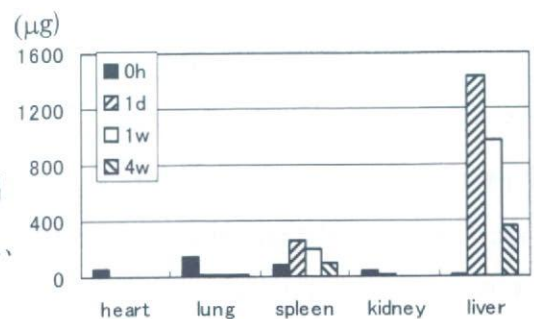


図1. Pt粒子投与マウスの各臓器内のPt重量(μg)

肝臓・脾臓に存在していた。これらの結果は、投与されたPt粒子が、体内で血流に乗り一旦各臓器に到達・滞留するが、数時間で流出し、肝臓・脾臓へと集積され、これらの臓器からも徐々に排泄される事を示していると考えられる。但し、血液中のPt濃度は低い(1-2 ppm程度)。現在のところ、投与粒子の脳への到達は確認されていない。体外へと排泄される可能性を考慮して、投与後の飼育期間中の糞・尿の回収を検討している。現在、他の無機粒子についても、同様の手法での追跡を行っている。

[XSAMによる追跡]

TiO₂を投与したところ、投与直後から数時間は肺から強いTi元素の特性エックス線が観察された。その後、肺からのエックス線は相対的に減少し、肝臓・脾臓からのエックス線強度の増加が観測された。またこの体内での分布状態の経時変化は、粒子系への依存性が観測された。粒径 1-2 μmの粒子を投与した場合、1-2週かけて肺からの信号の減少が見られた。一方、0.5 μmの場合、数日で肺からの信号が大きく減少した。この結果から、尾静脈から投与されたTiO₂粒子が、心臓から肺へと流入した後、肺の組織内にトラップされ、その後、粒径の小さなTiO₂粒子は相対的に速やかに肺の組織内から流出、肝臓・脾臓へと到達しているものと考えられる。

一方、粒径 1-2 μmのPt粒子を投与した場合、投与直後には各臓器へと分散しているが、3時間後以降は、ほぼ肝臓と脾臓へと局在化している様子が観察された。他のマイクロ無機粒子を投与した際にも、この傾向は観察された。これらの結果は、1) 化学種による違い、2) 粒子径の効果、の2つの因子が、マイクロ・ナノ粒子の体内動態に影響することを示していると考えられる。

・体内動態の可視化

無機粒子を投与したマウスを開腹し、XSAMにより全身の動態の可視化を試みた。TiO₂粒子投与直後には、肺のみからTiO₂が観測される。一方、1日経過した個体では、肺のみならず、肝臓からも投与粒子の蛍光エックス線が観測されている。1週間後には、肺からの信号は殆ど観測されず、肝臓から強いTi元素の信号が観察されている。これらの結果は、上述の摘出臓器に対する実験結果と一致しており、投与無機粒子の体内動態の可視化の成功例と考えられる。他の無機粒子についてもXSAMによる可視化には成功しており、現在、他の測定法を用いた動態の可視化法も検討中である。

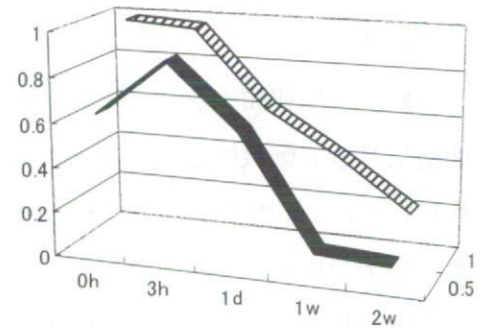


図2. 粒子径の異なるTiO₂粒子を投与したマウス肺内のTiO₂の経時変化

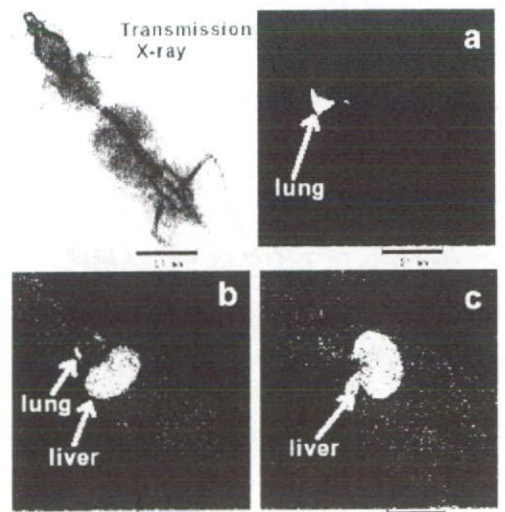


図3. TiO₂投与マウスのXSAM観察像(Ti) : (a) 透過エックス線像, (b) 投与5分後, (c) 1日後, (d) 1週間後

Effects of multi-wall carbon nanotubes on rice cells in *in vitro* culture system

北海道大学大学院環境科学研究科
○譚 曉明・古月文志・亓理文夫

Introduction

Rapid development in nanotechnology has led to predication of great benefits but also great dangers to humanity and the eco-environments. In fact, studies on nano-toxicity have suggested that the nano-materials may have some adverse effects on human beings and animals. We have investigated the possible toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNTs, which typify the tubular nanomaterials) towards plant using rice as the target. Studies were carried out by callus induction, followed by cell suspensions of rice in the presence of MWCNTs in the incubation media.

Materials and Methods

Matured embryos of rice (*Oryza sativa L.*) seeds were used for callus induction. The sterile seeds were placed on callus induction N6 solid medium or Murashige and Skoog (MS medium) solid medium. After three months with several generates' subculture, the friable and well-growing calli were selected, transferred to liquid medium for cell suspension culture. After ten days, MWCNTs were added to the liquid medium and dispersed by ultra-sonication. Three groups of five 10 ml samples were prepared: group A containing 0.05g/l MWCNTs, group B, 0.1g/l MWCNTs, and group C, the control, which having no MWCNTs. These three groups of five samples were placed on a rotary shaker at 120 rpm in the dark. After 4 days of incubation, the samples were examined using light microscopy; cell density was also determined using hemocytometer. For density determination, the cells in each sample were counted five times, and the greatest and smallest values ignored. Three values were thus used to determine the average density for each sample. Comparison studies were conducted using carbon blacks (these partial-like materials have been the industrially utilized structural or conductive filler in plastics) as the reference samples. The possible reminded catalytic metals in the samples were removed by refluxing the carbon nano-materials in 4 M hydrochloric acid for approximately 20 hours.

Results and Discussion

The cell density in groups A and B was much lower than in control group C (Table 1). Moreover, as the concentration of MWCNTs increased from 0.05 g/l to 0.1 g/l (two-fold), the cell density was reduced from 38 to 27 (71%). Light microscopy revealed many black clumps in the samples in groups A and B, as well as cells that were not associated with MWCNTs (Figure 1, left-photo). Scanning electron microscopy (SEM) images confirmed that these black clumps were MWCNTs that were tightly wrapped around and associated with the cells (Figure 1, right-photo). The number and the size of the black clumps in sample B were much greater than in sample A, and the percentage of the area of the cells covered by MWCNTs ranged from 0 to 100%; in some instances, the covered area was greater than 100% due to multiple layers of MWCNTs (see Figure 1). It also seemed that once cells were associated with MWCNTs, further association was more likely until finally an aggregate or precipitate formed. In other words, when MWCNTs were added to the culture medium, all the cells in suspension would theoretically have an equal probability of making contacting with them. However, only part of the cell population interacted with MWCNTs, and the

cells that first associated with MWCNTs were then more likely to form even more associations until they were covered completely. As the cells combined with MWCNTs, the size of the cell/MWCNT aggregates (i.e. the black clumps) became larger until the aggregates were precipitated from the cell culture.

The reference materials, namely, carbon blacks have also shown some adverse effect; this, however, was smaller than MWCNTs. The cell density in Group R1 (carbon blacks, 0.05 g/l) and Group R2 (carbon blacks, 0.10 g/l) was 45 and 36 cell/ μl , respectively. On the other hand, for MWCNTs, the cell density was 38 and 27 cell/ μl , respectively, under the identical situations. Very few black clumps (cells interacted with carbon black particles) were also observed, the percentage of the area of the cells covered by carbon blacks however, ranged from 0 to 20%.

Table 1 The effects of MWCNTs on the density of cultured rice cells grown in suspension. Carbon blacks were used as the reference for comparison.

Density cells/ $1 \mu\text{l}$	1	2	3	4	5	Average density
Group A ^a	45	41	36	38	29	38
Group B ^b	25	78	28	15	28	27
Group R1 ^c	52	31	50	34	86	45
Group R2 ^d	47	30	72	17	32	36
Group C ^e	69	31	93	65	130	76

^a Group A: 0.05 g/L MWCNTs. ^b Group B: 0.10 g/L MWCNTs. ^c Group R1: 0.05 g/L carbon blacks. ^d Group R2: 0.1 g/L carbon blacks. ^e Control samples (Group C): no MWCNTs. For each sample (5 samples/group), five density measurements were done. The largest and smallest values were ignored, and the three remaining values were used to calculate the average value (columns 1-5). These average values were used to calculate the average cell density for the group (rightmost column).

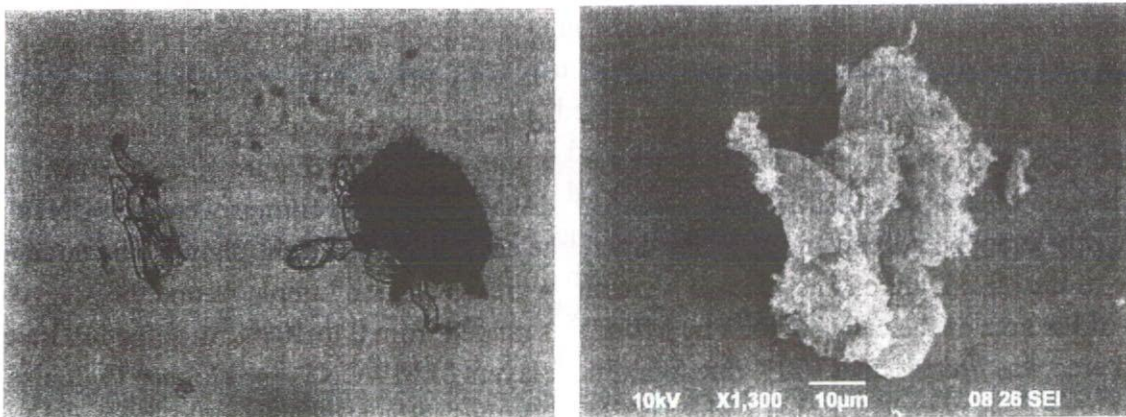


Figure 1 Observation of cells in suspension incubation using light microscope (right-photo) and those after the sample-treatment using SEM (left-photo)

ナノ物質の生体内挙動について

-皮下および骨膜下での反応とフラーレンの体内移行-

○平田恵理¹⁾, 野田坂佳伸¹⁾, 佐藤義倫²⁾, 葦澤 崇³⁾, 赤坂 司¹⁾, 宇尾基弘¹⁾,
大堀ことは¹⁾, 亘理文夫¹⁾, 田路和幸²⁾, 横山敦郎¹⁾

- 1) 北海道大学大学院歯学研究科
- 2) 東北大学大学院環境科学研究科
- 3) ブルカーダルトニクス

Biological Behavior of Carbon Nanosubstance Tissue Reaction in Subcutaneous Tissue and Subperiosteal Tissue, and Distribution of Fullerene

○ Eri HIRATA¹⁾, Yoshinobu NODASAKA¹⁾, Yoshinori SATO²⁾, Takashi NIRASAWA³⁾,
Tsukasa AKASAKA¹⁾, Motohiro UO¹⁾, Kotoha OHORI¹⁾, Fumio WATARI¹⁾,
Kazuyuki TOHJI²⁾, Atsuro YOKOYAMA¹⁾

- 1) Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan
- 2) Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Sendai, Japan
- 3) Bruker Daltonics K.K. Yokohama, Japan

最近、カーボンナノ物質の生体材料への応用が注目されている。しかしながら、カーボンナノ物質に対する生体適合性や体内での臓器への移行に関する研究は少なく、特に生体材料の開発に必須である動物を用いた研究は、わずかである。

本研究の目的は、長期間皮下へ埋入したカーボンナノ物質の生体適合性、カーボンナノチューブを固着したポリカーボネート(PC)膜を骨欠損部に応用した場合の骨修復への影響、および静脈から注入したフラーレンの臓器移行を明らかにすることである。

Hat-stacked Carbon Nanofibers (H-CNFs) と、 Multi-wall Carbon Nanotubes (MWCNTs) の二種類のカーボンナノ物質をラット皮下組織に埋入し、2年間経時的に、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡にて観察を行った。MWCNTs を固着したPC膜でラット頭頂骨に形成した骨欠損部を被覆し、8週後の骨形成について組織計量を行った。また、水溶性フラーレン溶液をラット尾静脈から注入し、1時間後および24時間後の肝臓、脳、脾臓、肺、腎臓への移行を検索した。

皮下組織内埋入においては、強い炎症反応は観察されず、MWCNTs は、その構造に変化が認められなかったが、H-CNFs は体内での短縮が示唆された。MWCNTs を固着した膜で骨欠損部を被覆した場合、PC膜に比較し骨形成量は同等であったが、光顕的にはMWCNTs が直接骨組織と接しているのが観察され、骨組織に対するMWCNTsの生体適合性が確認された。フラーレンの体内臓器移行については現在標本を作製中である。

生物試料の投影型X線顕微法に関する2, 3の話題

株式会社東研 X線開発部

矢田慶治

投影型X線顕微鏡の分解能が最近かなり改善され、 $0.1\mu\text{m}$ を切るようになった。その対象も多岐にわたり、X線の高い透過力を生かせる厚くて重い金属などの場合も多いが、生物試料や微細な半導体の構造物などは透過がよすぎてコントラストがつきにくい。このような場合、長波長のX線、例えば、Geの $L\alpha$ 線： 10.4\AA を使い、X線経路の空気をHeガスで置換すること[1]が有効であることを筆者は見出している。最近、東研ではこの方法の実用化を図り、低加速電圧、高分解能、高コントラスト、元素分析可能の装置開発を進めている。その仕様を述べると加速電圧は7-80kV、分解能 $0.04\mu\text{m}$ 、ZrO/W(100) thermal field emitter 使用、元素分析の空間分解能15-20 μm 、分析範囲Na-Uである。現状で $0.1\mu\text{m}$ の分解能が得られている。図1はその概観写真である。

次に、X線源としてのSORは、X線管に較べ、はるかに高い輝度と単色性を持っている。そこでSOR光を用いて投影型X線顕微鏡像を得る試みを東海大、千葉大のグループが長年かけて行ってきた。同グループは波長15-17 \AA のSOR光X線をコンデンサー用のFZPで一度集光し、更に対物用FZPとピンホールで微小なX線の焦点を作りそれによる投影拡大像を得ている。この場合、上述のように単色長波長のX線であるためFresnel回折が顕著に起こり、一見極めてボケた像になる。そこでこのFresnel回折効果を補正することが試みられた。図2はその1例で、コンピュータによるiteration操作によって元の像にかなり近いところまで戻っていることが解る。このくらい戻るとCT像にすることが出来るので、その試みが行われている。

最後に、投影X線顕微法で元素分析をする方法について述べる。第1の方法は明大の吉村研究室で行われたもので、分析しようとする元素の周期律表上で近い複数の元素のターゲットで夫々像を撮影し、吸収端の性質を利用した減算(除算)を行って目的の元素の像を残す方法である。この方法は特に高価な分析器を使用しなくてもよい利点があるが、複数のターゲットを真空を破らずに交換することが必要で吉村研ではそれをうまく解決した。例として図3にボウフラの内部にある鉄分の分析を行い、 $1\mu\text{m}$ の空間分解能で約 $1\mu\text{m}$ の厚さの微粒子の検出に成功した。

第2の方法は上述の東研の装置に組み込む予定のEDS(Si-detector)を使うものである。まだ完成していないが空間分解能15-20 μm 、蛍光X線を使ってNa-Uの分析が出来る予定である。この分析法は技術的には確立しているが、投影型のX線顕微鏡に使われるのは最初である。

文献

[1] X線顕微鏡—投影X線顕微鏡法の生物学への応用 細胞 23 (7) 246 (1991); High Resolution Projection X-Ray Microscopy "Multidimensional Microscopy" ed. by P. C. Cheng, T. H. Lin, E. L. Wu, J. L. Wu, Springer-Verlag (1994) pp133-150

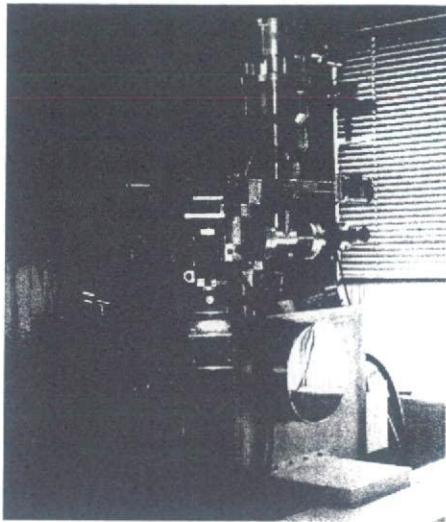
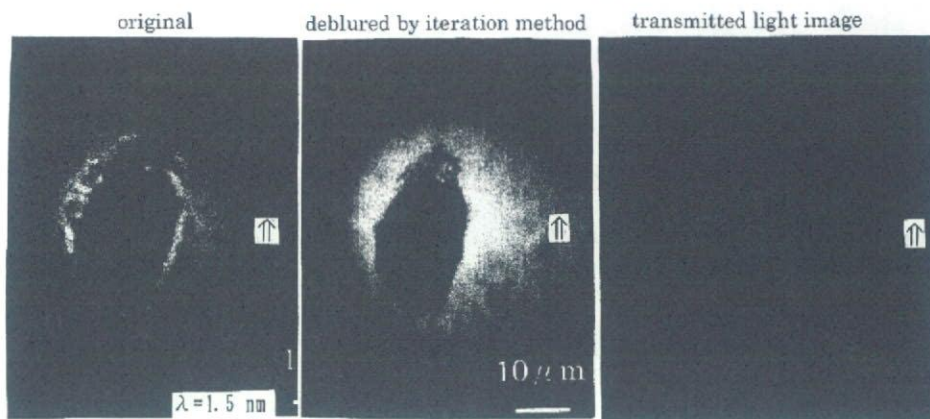


図1 高分解能低加速電圧X線顕微鏡

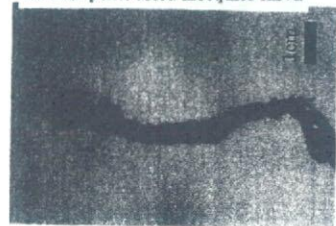
HeLa cell by SOR X-rays and light



by T. Honda et al., Chiba University
2007

図2 フレネル回折の補正例

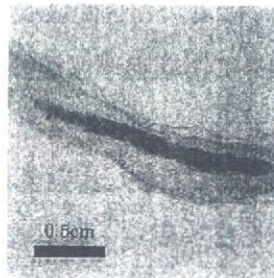
Critical point dried mosquito larva



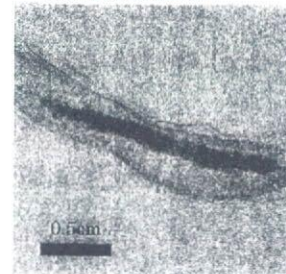
X-ray image

図3 ポウフラ内の鉄分の検出例

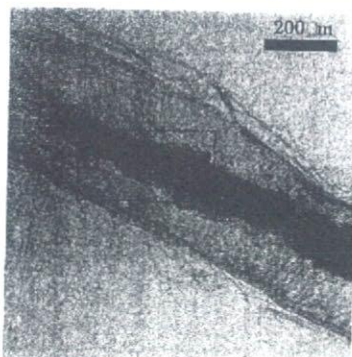
Ni target, 5 μm, 16kV



Co target, 4 μm, 16kV



Distribution of iron in mosquito larva



3μm 程度の粒子



コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした細胞培養担体の開発

北海道大学大学院歯学研究科
寺田 典子、○宇尾 基弘、北川 善政、亘理 文夫

1. 緒言

近年、青木らの研究などによりカーボンナノチューブに生体親和性があると報告されており、コラーゲンとも親和性が高いことが判明している。また、現在の細胞培養用ディッシュはコラーゲンコートされた担体が高い細胞付着性を持つことから、細胞培養に頻用されている。そこで、コラーゲンコートされたディッシュに親和性のあるカーボンナノチューブを吸着させ、細胞培養担体の開発し、金属への応用を目的とした研究を行った。

2. 実験方法

1. コラーゲンコートディッシュへのMWCNTsのコーティング条件の検討

- a) MWCNTs (CNT Inc.) を 500℃×90分酸化処理し塩酸洗浄して精製し親水基を付与^{*}した。
(*Haiqing Peng, et al. J. am. Chem. Soc. 2003; 125 (49))
- b) 1%コール酸ナトリウム溶液 (東京化成) に、MWCNTsが1~1000pmとなるように調整し90分間超音波をかけた (以後、MWCNTs分散液と呼ぶ)。
- c) コラーゲンディッシュ (φ35mm、IWAKI) にMWCNTs分散液を注ぎ、1~6時間静置し、洗浄・乾燥した (以後MWCNTsコートディッシュと呼ぶ)。またコラーゲンコートカバーガラス (φ25mm、IWAKI) にも同様の処理を施した (以後MWCNTsコートカバーガラスと呼ぶ)。
- e) 得られたCNTコートディッシュ (カバーガラス) 表面のMWCNTs付着状態をSEM (日立製作所 S-4000) にて観察した。

2. 細胞形態観察、細胞増殖、細胞活性、細胞の付着性の検討

- a) MWCNTsコートディッシュに、ラット線維芽細胞様細胞 (MC3T3-E1細胞) を 1×10^5 cells/dish 播種し、37℃、5%CO₂にて1~3日間培養した。
- c) 経時的 (培養1~3日) に①細胞形態観察②細胞活性、細胞増殖率、細胞付着を確認した。
 - ①細胞形態観察
 - i) 光学顕微鏡：通法にてギムザ染色し観察した。
 - ii) SEM観察：通例に従い固定・臨界点乾燥後、観察した。
 - ②細胞活性、細胞増殖率
 - i) 細胞活性：Alamer blue (BIOSOURCE) を用いた比色測定を行った。
 - ii) 細胞増殖率：通法に従い固定、ギムザ染色後、光学顕微鏡観察により細胞数を数え求めた。

③細胞付着性：コンフレントになるまで培養し、0.1%および0.02%トリプシン溶液を2ccずつ作用させ、細胞数の変化を経時的に観察した。

3. 金属への応用

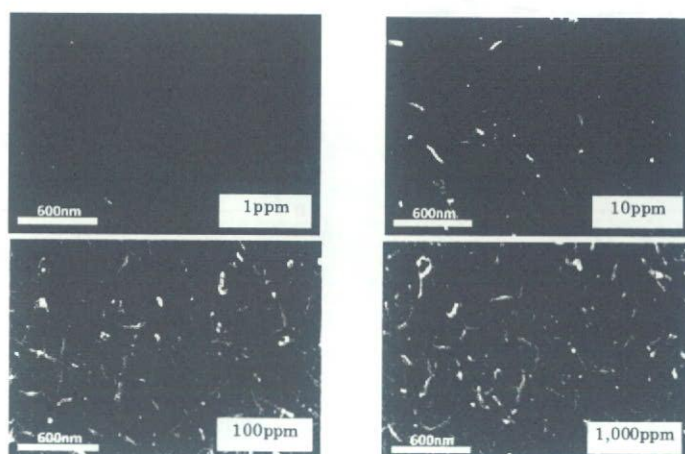
a) チタン線へのコラーゲンとMWCNTsのコーティングの検討

鏡面研磨したチタン線 (1.0mm, Nilaco) を0.1%アテロコラーゲン (KOKEN) に塗布し、実験1にて確定したコラーゲンへのMWCNTsの付着最適条件でチタン線に作用させた (以後Ti-collagen-MWCNTsと呼ぶ)。

3. 結果

1. MWCNTsの最適コーティング条件

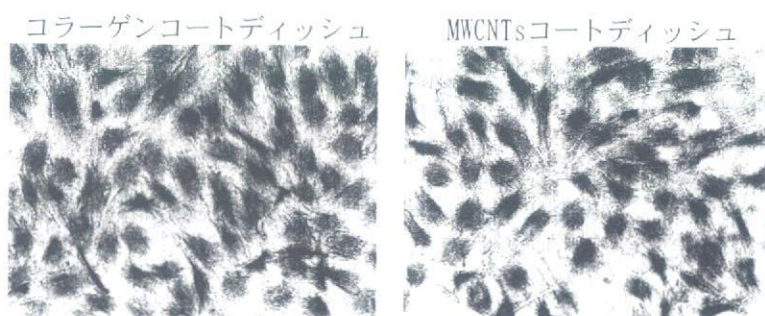
MWCNTs分散液の濃度が濃くなれば、付着量は増えるが100ppm以上では飽和状態となった。



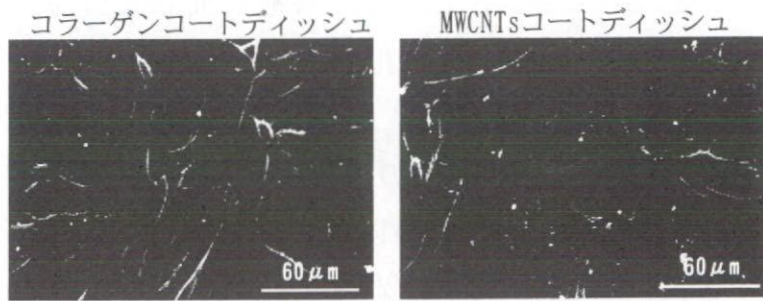
2. MWCNTsコートディッシュ上での細胞培養試験

①形態観察

i) 光学顕微鏡：MWCNTsコートディッシュでの細胞はコラーゲンコートディッシュと比較して細胞数が少なく、細胞1個1個の大きさも小さかった。

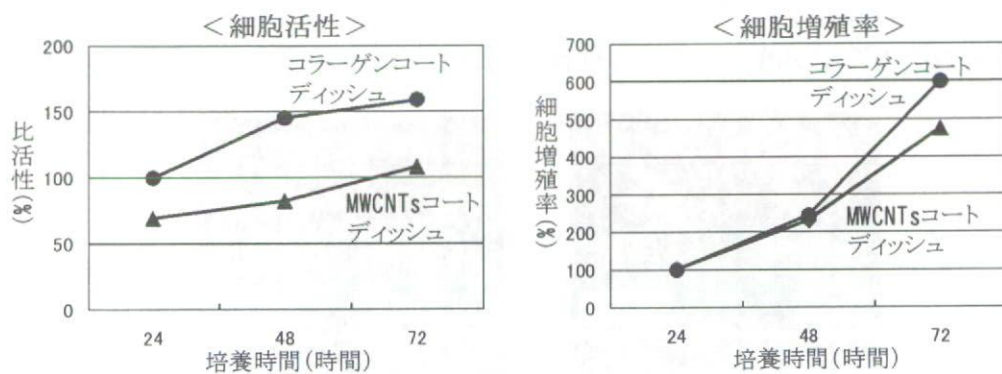


ii) SEM観察：光学顕微鏡観察と同様に、MWCNTsコートディッシュ上の細胞は対照と比較して細胞数が少なく、細胞1個1個の大きさも小さかった。

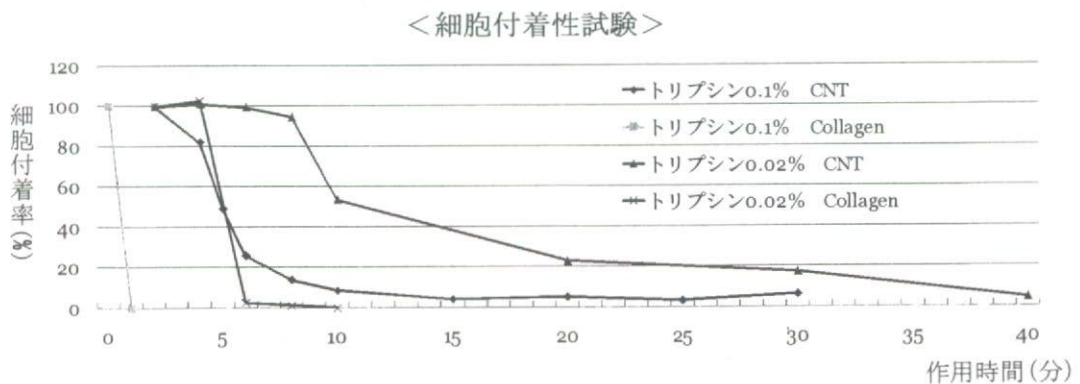


②細胞活性、細胞増殖率

細胞活性は初期からMWCNTsコートディッシュの方がやや低く、細胞増殖率は対照と比べてやや低い。

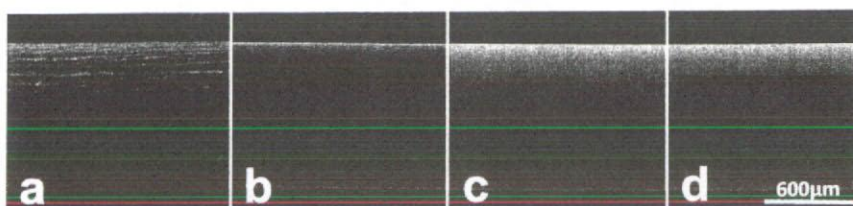


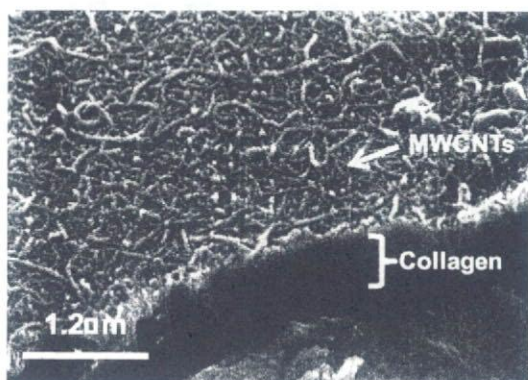
③細胞付着性：MWCNTsコートディッシュ上の細胞は、コラーゲンコートディッシュの細胞より長時間付着していた。



3. 金属への応用

チタン上に一層コラーゲンを付着させたことにより、MWCNTsを付着させることができた。また、MWCNTsディッシュと同様にMWCNTsを均一に付着させることができた。





Application to Titanium

- a: 粗研磨 b: 最終研磨 c: Ti-collagen MWCNTs
d: Ti-collagen-MWCNTs一部剥離
E: dの拡大

4. まとめ

水溶液への分散が困難であるCNTsを均一に分散させ、コラーゲン上に均一に付着させられたのがSEM観察で確認された。その最適条件はMWCNTs分散液100ppmであった。

コラーゲンに付着したMWCNTsは、洗浄や培養でも剥離することなく安定に付着していた。

青木らの報告*などでCNTsと細胞の親和性が高いことが知られており、本研究の結果も同様の傾向を示した。（*Aoki, et al. J. Biomed. Nanotechnol. 2005; 1(4)）

コラーゲンは本来、非常に高い細胞親和性を有することから、MWCNTsコートディッシュもほぼ同等の細胞親和性を持つと考えられた。

MWCNTsコートディッシュ上の細胞は、トリプシン処理を行っても剥離しにくく、高い細胞付着性を持っていることが明らかとなった。

チタンに均一にMWCNTsコートすることは、コラーゲンを介することにより可能であった。

5. 今後の方針

今後は、MWCNTsコートディッシュの特徴を持つTi-collagen-MWCNTsをインプラントなどに応用していく。

現在は、Ti-collagen-MWCNTsにて動物実験を行っている。

歯科材料・口腔内組織の高分解能透過電子顕微鏡観察と雰囲気制御TEM観察

○宇尾 基弘、亘理 文夫（北大院 歯学研究科）

橋本 直幸、奥寺 公也、浜田 弘一、大貫 惣明（北大院 工学研究科）

1. 目的

チタンは耐食性や生体適合性に優れていることから歯科や整形外科用インプラントとして用いられているが、一部の試料では溶出に起因すると思われる二酸化チタンが周囲組織から検出されることがある。右図は実際の歯科用インプラント周囲組織中のチタンのXANESスペクトルであり、組織中のチタンがアナターゼ（二酸化チタン）であることがわかった。このアナターゼの由来としてはチタン表面の酸化皮膜の脱落と溶出したチタンの酸化の両面が考えられるため、高分解能TEMを用いてチタンの形状の観察を行った。またTEM用雰囲気制御セルを用いて石膏粉末の温度、雰囲気による変化を観察した。

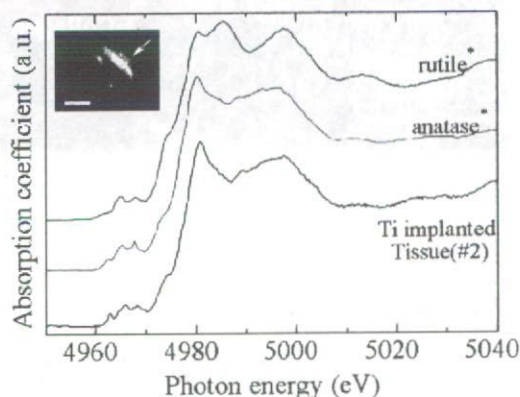


図1 Ti含有組織のXANESスペクトル

2. 方法

上記のチタン含有ヒト歯肉組織を樹脂包埋、薄切したものを透過電子顕微鏡（JEM-2010、200kV）で観察した。また歯科用石膏（普通石膏、ノリタケ製）粉末を雰囲気制御セル中で温度、雰囲気（真空 or 大気）を変化させて観察を行った。

3. 結果及び考察

図2に酸化チタン含有組織のTEM像を示す。粒径数十nmの均一な粒子が観察され、回折像からアナターゼであることが推測された。また同粒子のEDSスペクトルでも明瞭なチタンのピークが観測され、図1で示した組織中のアナターゼの形状が判明した。これらの粒子は均一な粒径であることから、インプラント体表面からの脱落などではなく、生体内で溶解したチタンから析出したものと推測され、生体内で生成した微粒子が観測できた例として興味深いと思われる。

図3は雰囲気制御セル中で普通石膏を真空下で加熱した状態（126℃）、図4はその後に大気暴露し、室温まで冷却した状態でのTEM像と回折像を示している。石膏は大気中では160～170℃で二水石膏から半水石膏に分解（ $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O} + 3/2\text{H}_2\text{O}$ ）する。加熱真空下と室温大気下で回折像の違いは見られず、現状で分解・水和反応のその場観察には至っていない。その理由として雰囲気制御セルが同一粒子を連続観察しているとセルの透過性が徐々に低下するため、視野を変えながら観測する必要があることが上げられる。今後、観察条件などを検討し、水和・分解反応のその場観察を試みる。

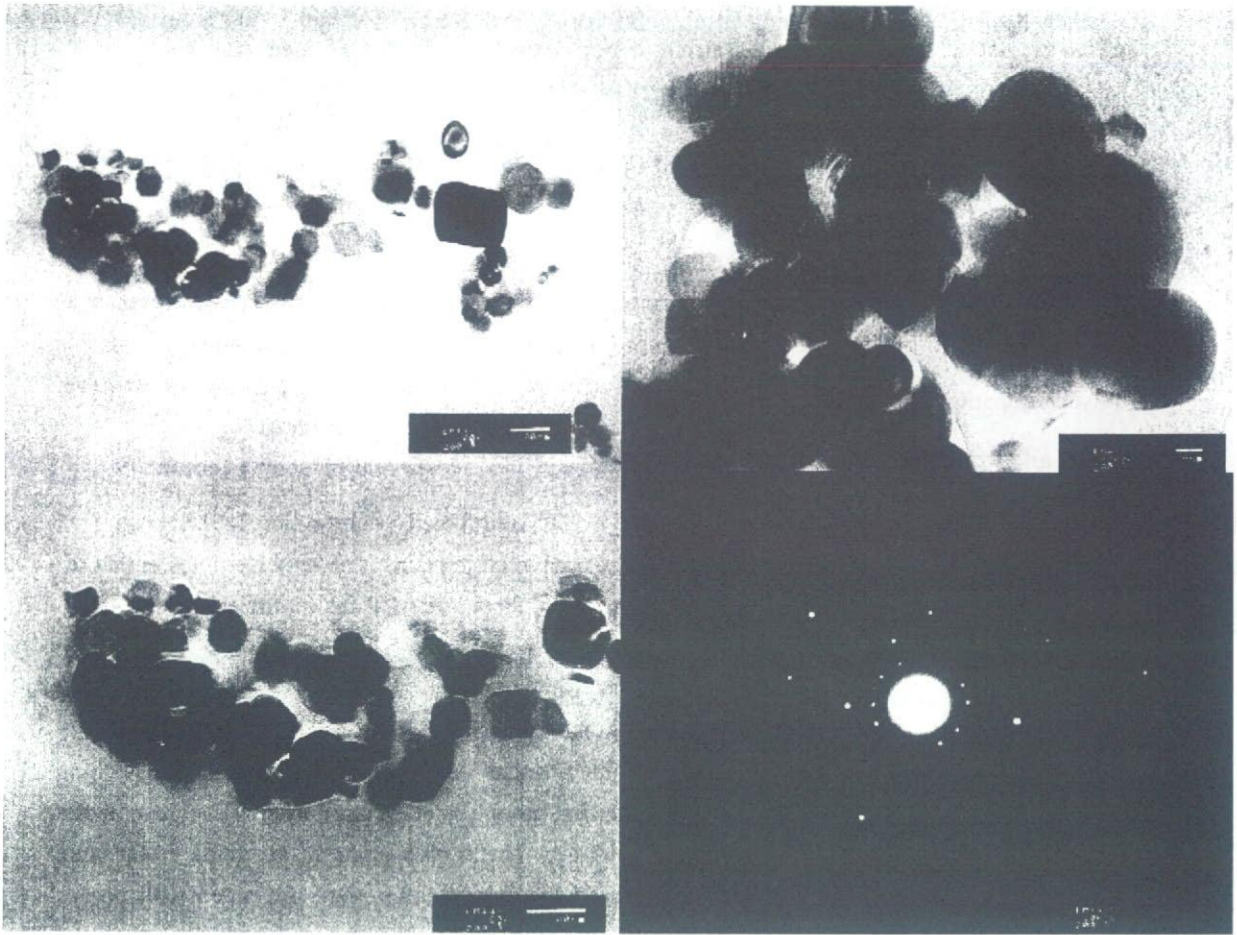


図2 酸化チタン含有組織のTEM像

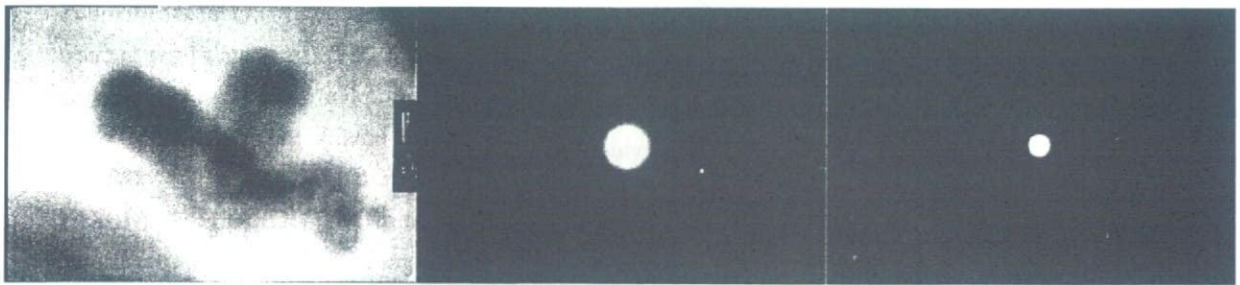


図3 普通石膏の真空下、126℃でのTEM像

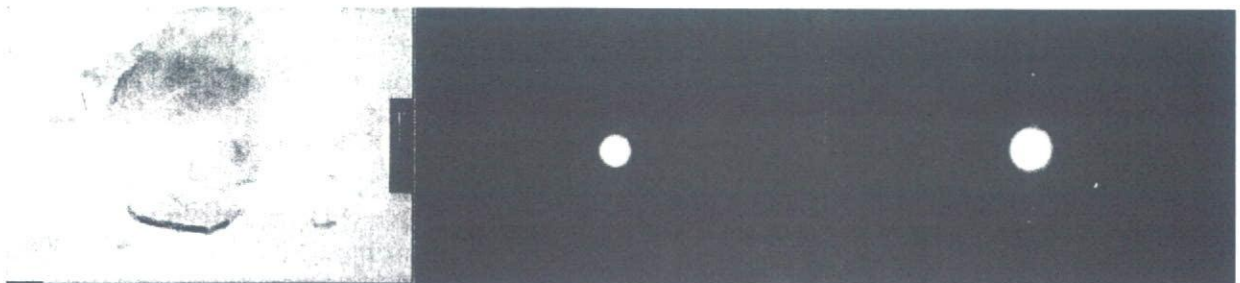


図4 普通石膏の大気環境下、室温でのTEM像