

In vivo evaluation of collagen-based scaffold reinforced by chitin fibres for bone tissue engineering.

Xiaoming Li^{1,2}, Qingling Feng², Fuzhai Cui² and Fumio Watari¹

¹ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Japan; ² Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, China (x.li@den.hokudai.ac.jp)

Introduction

Tissue engineering is an increasingly popular method for repairing bone defects^[1]. However, repair of bone defects over 30 mm using tissue engineering methods is a difficult clinical problem^[1-3]. In this study, we used a goat shank model to evaluate the bone-regenerating efficacy of a novel nano-hydroxyapatite/collagen/PLLA (nHACP) composite reinforced by chitin fibres.

Materials and Methods

Materials: Synthesis of nHACP composite^[1,2] and nHACP reinforced by chitin fibres^[2] had been reported previously. The compressive strength of the reinforced implants is about three times as that of nHACP. The porosities of pure PLLA, nHACP and the reinforced nHACP are approximately the same. The diameter of the dry samples was 8.5mm and the height was 7mm.

Animal experiment: Forty healthy adult male goats, weighing approximately 50 kg, were used. A 40 mm segmental osteoperiosteal defect was created in the shank with a mini-oscillating saw. Forty adult male goats with the 40 mm shank defects at the same position were divided into four groups. Nothing was implanted in the defect of the four goats in the first group (defect group). The twelve goats in the second group were implanted with pure porous PLLA. The twelve goats in the third group were implanted with porous nHACP. The twelve goats in the fourth group were implanted with porous nHACP reinforced by chitin fibres.

Radiographic examination and bone mineral density (BMD): All harvested tissues were fixed with 10% neutral formalin and then radiographed with a soft X-ray apparatus (MX-20 Faxitron, Torrex and Micro Focus Systems, Wheeling, IL). BMD was determined by dualenergy X-ray absorptiometry (DXA) using an animal densitometer (PIXImus, Lunar Corp., Madison, WI). In scans of the excised bones, the region-of interest (ROI) was positioned over the whole implant area (IP-CHA) on the anterior-posterior view, not including host bone or bone that developed outside the implant. BMD was determined using the image analysis software provided with the instrument.

Mechanical evaluation: Compression tests were performed using AUTOGRAPH AG-10KNI (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), with a compression speed of 1 mm/min. Testing was performed vertically towards the specimen.

Histological evaluation: One of the four tissue samples from each group was demineralized with 50 % formic acid and 10 % sodium citrate, dehydrated through an ethanol series and embedded in paraffin wax. Sections (thickness, 5 mm) were cut, stained with hematoxylin and eosin, and examined under a light microscope.

Results

Radiographic evaluation: In the defect group, new bone was hardly observed by fifteen weeks. In the PLLA group, although a minimal amount of new bone was observed by fifteen weeks, the defect was not repaired. In the nHACP group, some parts were radiopaque at both ends of the implant by fifteen weeks, but the new bone did not connect, indicating that the defect size was too big for this implant. In contrast, in the reinforced group, continuous callus can be observed by five weeks. It is interesting that continuous new cortical bone and a marrow cavity came forth by ten weeks in this group. After another

five weeks, the radiodensity of the implants had further increased, and excess newly formed bone outside the implants had been remodeled to form a smooth repair (Fig.1).

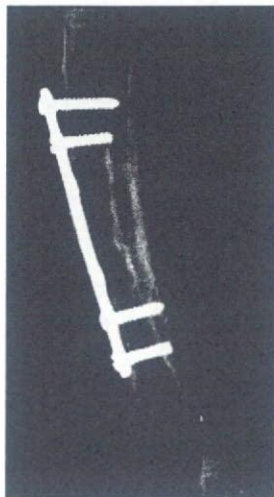


Fig1. Radiographs in the reinforced nHACP group at fifteen weeks after surgery

Histology: In the defect group, the defect was mainly filled with fibrous connective tissue, suggesting that no callus emerged. In the PLLA group, after fifteen weeks, a small amount of fibrous callus, but no osseous callus, appeared. Meanwhile, a big amount of neutrophilic granulocyte and mononuclear cells existed in the plants, suggesting that immunologic rejection had taken place. In the nHACP group, by fifteen weeks, a big amount of osseous callus and a small amount of implants existed in the defects. But neither bone lacunas nor bone cells in the bone lacunas could be found, suggesting that no mature new bone generated. In contrast, in the reinforced group, large amounts of osseous callus appeared by ten weeks. It is most interesting that bone lacunas, as well as the bone cells in them, can be observed by fifteen weeks, which suggests that mature new bone appeared.

BMD: In the defect group, BMD hardly increased at fifteen weeks after implantation. In PLLA, nHACP and the reinforced group, BMD all increased gradually with time. But at each point of time, the reinforced implants group had a higher mean BMD than the other two groups. Meanwhile, nHACP group had a higher mean BMD than pure PLLA group at each point of time. At fifteen weeks after implantation, the mean BMD of the reinforced implants group was about twice as that of nHACP group.

Mechanical compression test: At five weeks after implantation, the mean breaking load in the reinforced group is higher than that in both nHACP and pure PLLA groups. Furthermore, the mean breaking load of the reinforced group increased much faster from five to ten weeks and from ten to fifteen weeks than that of nHACP group. Similarly, mean increased breaking loads of nHACP group by ten weeks and fifteen weeks were greater than that of pure PLLA group. By fifteen weeks, the mean breaking load in the reinforced implants group was about twice as that in nHACP group and about three times as that in pure PLLA group.

Discussion and Conclusions

We demonstrated that a new porous scaffold, nHACP reinforced by chitin fibres, could completely repair a 40 mm defect in goat shank with appropriate strength. Meanwhile, we used pure PLLA and nHACP as comparisons to repair the same defect. These two implants cannot repair this defect completely, although nHACP showed better results than pure PLLA. Therefore, the reinforced scaffold might be a candidate for bone tissue repair.

References

1. Xiaoming Li, Qingling Feng, Yunfeng Jiao and Fuzhai Cui. Collagen-based scaffolds reinforced by chitosan fibres for bone tissue engineering. *Polymer International*, 2005, 54(7): 1034-1040.
2. Xiaoming Li, Qingling Feng, Wenjie Wang, Fuzhai Cui. Chemical characteristics and cytocompatibility of collagen-based scaffold reinforced by chitin fibres for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 2005, 77B (2): 219-226.
3. Xiaoming Li, Qingling Feng, Xinhui Liu, Wei Dong, Fuzhai Cui. Collagen-based implants reinforced by chitin fibres in a goat shank bone defect model. *Biomaterials*, 2006, 27 (9): 1917-1923.

ゾウリムシにおける銀粒子の細胞毒性試験

石巻専修大学大学院理工学研究科

○阿部大基・芳賀信幸

1. 目的

我々はナノマテリアルの毒性を細胞レベルで評価するために、ゾウリムシを用いた細胞毒性試験を行ってきた。カーボンナノチューブに関しては、高分散液中での毒性発現など基礎的なデータを集積し、ゾウリムシはナノ粒子の毒性試験に適した材料であることを確認している (Haga and Haneda, 2007)。本研究ではゾウリムシにおけるナノマテリアルの安全基準値を設定することを目的とし、今回は銀粒子 (17nm・21nm・28nm) の細胞毒性について検討した。

2. 方法・結果

2-1. 株と培養

本実験に用いた株は金沢で採集されたKNZシリーズ (syngen 3、金沢大学・遠藤) のかけ合わせの子孫であるTAZ0460 (O³) とTAZ0462 (E³) である。培養はレタスジュース法で行った (Hiwatashi, 1968)。

銀粒子分散液は24時間脱イオン水に対して透析処理を行った試料をK-DS (NaをKに置き換えたDryl氏液) で1 mg/mlに調整したものを原液とした。原液は冷蔵保存し、使用時は約30分の超音波処理の後K-DSで希釈した。

2-2. 生存率と生存曲線

はじめに分散度の異なる銀粒子分散液 (1~100 μg/ml) を用いてゾウリムシ (n=10cells) の生存率を調べ、生存曲線を作成した結果、24時間までに実験に用いた全てのゾウリムシは死亡した。銀粒子の分散量が多いほど毒性は強くなり、同じ分散量でも粒子サイズが小さくなるほど毒性は強く表れた事より、銀粒子の細胞毒性は粒子サイズに依存する事が明らかになった (図1)。銀粒子分散液中では、ゾウリムシは正常な遊泳行動を停止し、後退遊泳や尾部を支点とした回転運動を行い、細胞の変形の後に死亡した。

次に透析処理を行った際の外液を用いてゾウリムシ (n=10cells) の生存曲線を求めた。透析は24時間ごとに外液を交換しながら約2週間行ったが、透析

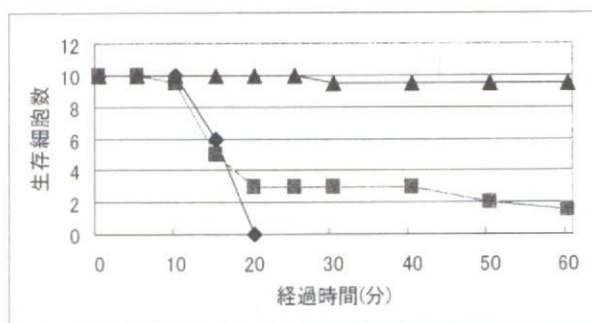


図1. 平均粒子サイズの異なるAg粒子懸濁液 (10 μg/ml) 中での生存曲線。◆: 平均粒子サイズ17 nm、■: 21 nm、▲: 28 nm。横軸の最大目盛りは60分である。

1日目と2週間後に24時間の透析をしたどちらの外液の場合でも実験に用いたゾウリムシは全て死亡した。

2-3. BSA (ウシ血清アルブミン) の解毒効果

銀粒子の細胞毒性を緩和させる物質としてBSAを発見した。銀粒子(17nm)分散液50 μ g/ml中ではゾウリムシは約10分間で死亡したが、BSA加えた場合死亡するまでの時間は10分以上に延長される事が確認された。BSA濃度が40 μ g/ml以下では10分以内に死亡したが、80 μ g/mlでは30分で死亡し、300 μ g/mlを超えると1時間以上経過しても生存しており、解毒効果はBSA濃度に依存することがわかった(図2)。しかしBSA存在下でも24時間経過した場合にはゾウリムシは死亡した。透析外液の場合でもBSAの効果は同様に確認されたが、透析外液の場合には24時間経過してもゾウリムシは生存していた。

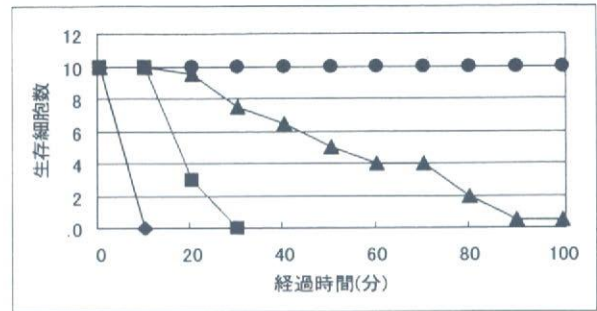


図2. BSAのAg粒子毒性に対する解毒効果。Ag粒子懸濁液(50 μ g/ml)にBSAを加えた場合の生存率を表す。◆: BSA 0 μ g/ml、■: 80 μ g/ml、▲: 100 μ g/ml、●: 300 μ g/ml。横軸の最大値は100分。

3. 考察

今回用いた透析膜の平均ポアサイズは50Åなので銀粒子が膜を通過することは考えられない。従って、ゾウリムシを死亡させる要因は銀粒子自身と銀粒子と水分子もしくは他の溶存物質との相互作用によって生じた透析可能な物質によるものの2通りであると考えられる。我々は、活性酸素(O_2^-)とAg粒子のイオン化が毒性発現と関連しているのではないかと考えている。

また、BSAによる細胞毒性緩和実験では、透析外液の場合は24時間経過してもゾウリムシは生存したが、銀粒子分散液の場合は24時間経過するとゾウリムシはすべて死亡した。BSAの作用機構として毒性要因との相互作用を仮定すると、銀粒子分散液にBSAを加えた場合はすでに存在している原因物質にBSAが作用して無毒化させるが、BSAとの結合が飽和状態に達すると後から銀粒子によって生産された物質に対しては対応できなくなるのではないかと考えられる。一方、透析外液にBSAを加えた場合はすでに存在している毒性要因はBSAにより無毒化され、その後は銀粒子は存在しないので毒性要因は生産されず24時間後でもゾウリムシは生存できると考えられる。BSAの毒性緩和作用のメカニズムは今後の重要な課題である。

[文献]

Hiwatashi, K. 1968 Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. *Genetics* 58, 373-386.

Haga, N. and Haneda, K. 2007 *Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effects of carbon nanofibers on proliferation and survival. *Jpn. J. Protzool.* 40. No. 2 139-14.

BMP2修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨再生能

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○岡崎正之・平田伊佐雄

1. 緒言

高齢者のような骨再生能力の衰えた患者に対する再生医療にとって、細胞やスカフォールドに加え、サイトカインの存在は欠かせない。我々は、これまで細胞の3次元培養可能な多孔性の炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジスカフォールドを創製し、形態保持を容易にするため周囲に多孔性のアパタイト・フレームをハイブリッド化することを試みてきた。今回、さらに骨増殖因子としてのrhBMP2を添加したところ、興味ある知見を得たので報告する。

2. 材料および方法

無機フィラーとしては、骨アパタイトに類似した結晶性と組成を有する炭酸アパタイトを合成したものを用いた。Ca側溶液として100 mmol/L 酢酸カルシウム溶液0.5 LおよびP側溶液として60 mmol/L 炭酸アンモニウムを含む60 mmol/Lリン酸アンモニウム溶液0.5 Lを、攪拌中の1.3 mol/L 酢酸アンモニウム緩衝溶液中に同一速度で供給することにより60°C、pH7.4で合成を行った。次に、得られた粉末結晶試料を、0.5wt%コラーゲン溶液と混合し、ポーラスなアパタイト円筒状フレーム中に流し込んだ後、凍結乾燥することによりスポンジスカフォールドとフレームのハイブリッド試料を作成した(図1)。これら試料を4 hr-UV照射により不溶化後、マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を含む血清添加懸濁液で培養実験を行ない、スポンジ内部への細胞の侵入挙動につき、それぞれSEM観察並びにHE染色法により検討した。また、ラット頭蓋骨骨膜下に rhBMP2 (Peprotech Ltd.) を含浸させたハイブリッド試料を埋入することにより、骨形成能を検討した。

3. 結果と考察

試作した炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、0.1-0.3mm程度の貫通孔を有し、細胞の遊走には適当なサイズと思われた。マウスMC3T3-E1骨芽細胞様細胞を用い細胞培養実験を行なったところ、フレーム強化したハイブリッド試料では、スポンジの収縮は抑制され、細胞の内部への侵入も良好であった。また、rhBMP2とともにラット頭蓋骨骨膜下に埋入した際には、生体親和性は良好で、一ヶ月目で旺盛な新生骨の形成が認められた(図2)。

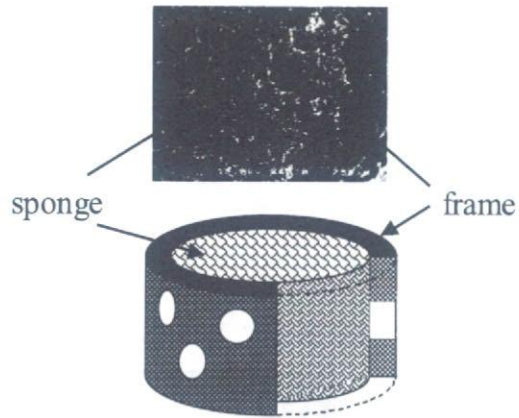


図1. 試作フレーム強化炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールド

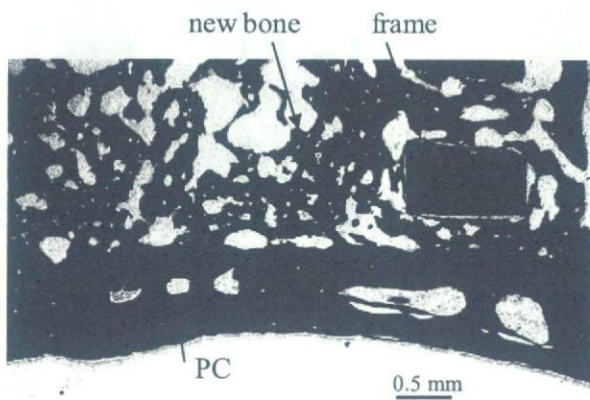


図2. rhBMP2修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨再生能
 (ラット頭蓋骨骨膜下1ヶ月後の組織学的所見 PC:頭蓋骨)

EXPEEMによる表面観察ー Ni₂Pの2ドメインの識別の可能性

北海道大学触媒化学研究センター

○朝倉清高・宮本剛志

1. 序

EXPEEM (Energy selected X-ray photoemission electron microscopy) は、X線により励起された光電子の運動エネルギーが表面に存在する元素や化学状態により異なることから、運動エネルギーを選別し、拡大投影することで、表面の化学マッピングを可能にする手法である。われわれは、この手法の高感度化と容易な取り扱いを目指して、多極子 Wien filter を持つ EXPEEM 装置の開発を進めてきた。その結果 EXPEEM 装置により、元素選別マッピングに成功した。本稿では、この装置を Ni₂P 表面に適用した例について述べたいと思う。

2. 実験方法

図1に装置を示す。Al K α ターゲット回転対陰極から放出されたX線は多層膜分光器で分光、集光されて試料表面に集まる。試料表面における光子数は 10^{11} photons /s /mm² となった。このX線により放

出される電子を試料下部にある磁場型対物レンズで集め、インพุットレンズに投入する。インพุットレンズ上部にある多極子 Wien filter 型エネルギー分析器である。Wien filter は図2に示すような構成になっている。電場と磁場を直交して印加することで、電子にクーロン力とローレンツ力を逆向きにかける。ローレンツ力は、電子の運動エネルギーに比例するので、電子の速度により、電子が磁場から受ける力は異なる。このため、 $E = v \times B$ の条件 (Wien 条件) が満たされたときのみ、電子は直進する。Wien

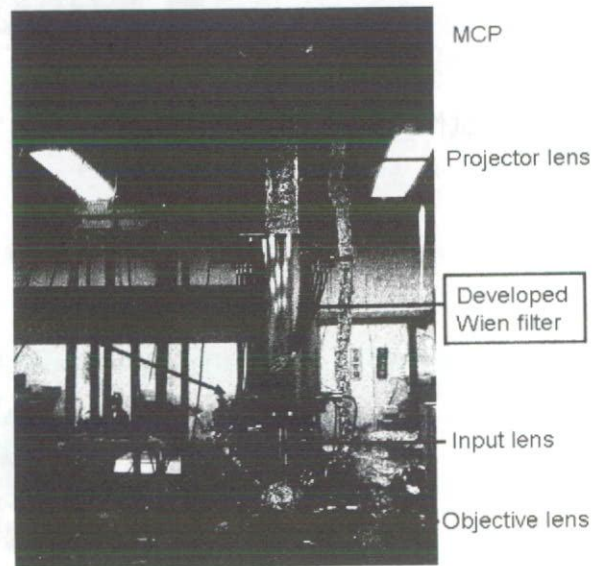


Figure 1 EXPEEM instrument



Figure 2 Principle of Wien filter.

filterの出口にスリットを置くことで、電子を選別することができるようになる。しかし、一般には、口径が小さいため、感度が低い。そこで、大口径化すると共に、多極子化して、filter内の収差を減らした。Wien filterの後段に投影レンズをもうけ、結像条件を選択することで、表面の像を得ることができる。電子の運動エネルギーにより選別された像(EXPEEM像とよぶ)は、表面の化学状態を反映した物になり、表面化学マッピングが可能となる。また、従来の装置と異なり、サンプルから結像面まで直線配置をとることができる。

3. 結果

図3にAuをTa上に蒸着したもののEXPEEM像をしめす。左は金の光電子で画像化したものであり、右はTaの光電子で画像化したものである。それぞれ、元素選別して測定することができる。

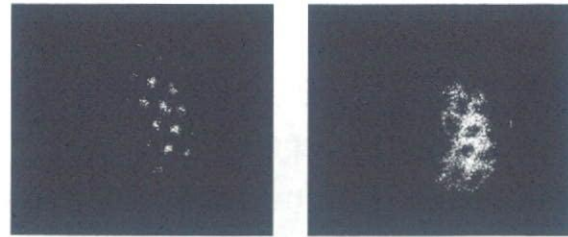


Figure 3 EXPEEM pictures of Au on Ta
Left frame : Au 4f photoelectrons.
Right frame: Ta 4f photoelectrons

さて、Ni₂Pは近年の排気ガス中の硫黄分を減らすため、開発された脱硫触媒である。この触媒作用については、2種類のNiのうち、1コのNiが働いているといわれている。そこで、われわれは、Ni₂P(0001)単結晶表面を対象に、その2種類のNiを区別できるか

EXPEEM測定を行ってみた。Ni₂P(0001)は図4に示すようにNi₃P₂とNi₃P₁の構造の異なる2つの層が重なってできている。この層構造には、異なるNiがそれぞれ露出している。理論計算によると、それぞれの層の仕事関数が異なる。そこで、仕事関数の変化による層識別が可能であるかを検討した。

その結果図5に示すようにコントラストの差が観測され、Ni₃P₁とNi₃P₂であると考えられる。温度を上げていくとNi₃P₂に変化していくことが観測できた。

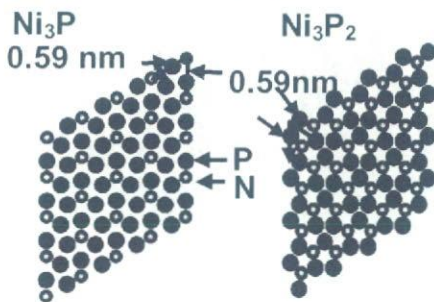


Figure 4. Two terminated surface of Ni₂P (0001)

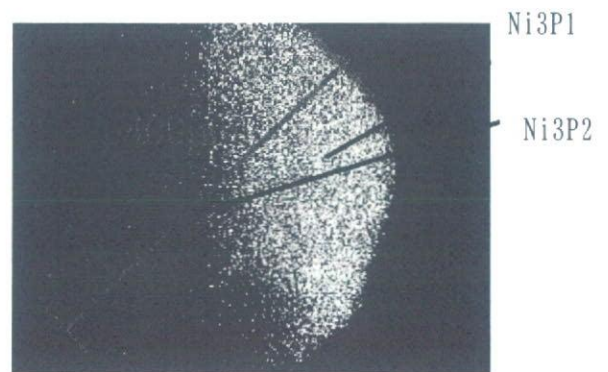


Figure 5 Ni₂P (0001)のPEEM像

カーボンナノチューブコートしたシリコーン・ラバーでの細胞接着

北海道大学大学院歯学研究科

○松岡真琴・赤坂司・戸塚靖則・亘理文夫

株式会社名城ナノカーボン

橋本剛

1. 目的

シリコーン・ラバーは柔軟性のある生体インプラント材料として広く使用されており、組織反応性が低く拒絶反応が起こりにくいなどの利点をもつ。しかしながら、シリコーン・ラバーには細胞接着性がないため、周囲組織での繊維性皮膜の形成や、上皮の陥入がおこるなどの問題点を持つ。

一方、カーボンナノチューブ (CNT) はその機械的、電気的特性から様々な分野での応用が期待されており、バイオ分野ではCNTを用いたスキャホールド上での培養など様々な研究が行われている。

われわれの研究グループでは、CNTスキャホールド上でヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) の培養を行い、良好な増殖を認めている¹⁾。

そこで本研究では、CNTの生体親和性に着目し、シリコーン・ラバーをCNTでコートすることによる細胞接着性の向上について検討をおこなった。

2. 実験方法

シリコーン・ラバーのコートニングは、CNT (名城ナノカーボン製 SWNT) をエタノール中に超音波で分散させ、シート状のシリコーン・ラバー上に塗布し乾燥させ固着させた。表面CNT濃度の異なる2種類のシリコーン・ラバー ($10 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$ および、 $2.5 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$) を作製した。

コートニングした表面構造の観察は走査型電子顕微鏡により行った。

つぎに、作製したシートをそれぞれ $20\text{mm} \times 25\text{mm}$ に切断しこれを細胞培養スキャホールドとし細胞培養を行った。培養にはヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (Saos2) を用いた。

作製したシートを $\phi 35\text{mm}$ culture dish の底面に置き、それぞれのdishに 2×10^4 個のSaos2を播種し、DMEMに10%FBSと1%PSNを添加したものを培地として用い、 37°C 5% CO_2 条件下で6日間培養を行った。コントロールとしてCNTをコートしていないシリコ

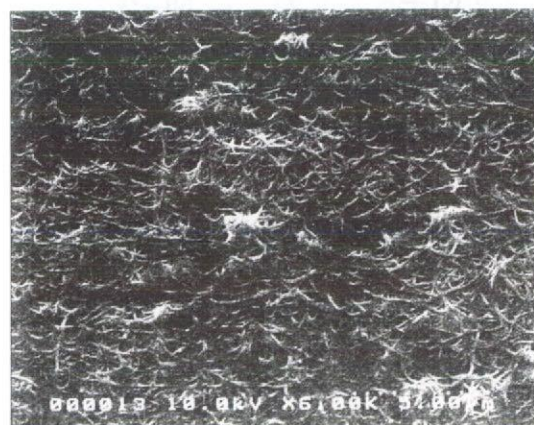


Fig1 $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ CNTコートしたシリコーン・ラバーの表面構造

ーン・ラバー上でも同様に培養を行った。

形態観察および細胞数の計測のため、培養した細胞をグルタルアルデヒドで固定し、サンプルを2つに分割した。形態観察用サンプルはエタノールでの段階的脱水後、乾燥させ、走査型電子顕微鏡による観察を行った。

計測用サンプルは、DAPIによる染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。3種類それぞれのシートで12か所 (n=3) 細胞数を計測し、培養細胞数を比較した。

3. 結果と考察

作製したスキャホールドを走査型電子顕微鏡で観察した結果、CNTが網目状にシリコーン・ラバーを覆っているのが観察された。

培養した細胞を走査型電子顕微鏡で観察した結果、CNTでコートしたシリコーン・ラバー上ではコートしていないシリコーン・ラバーに比べ細胞が良く伸展して増殖しているのが認められた。また、表面CNT量が少ないシリコーン・ラバー ($2.5 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$) では接着してはいるが伸展してない細胞を多く認め、表面CNTの多いシリコーン・ラバー ($10 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$) では、接着した細胞がより良好に伸展している傾向があった。

接着細胞数を計測した結果、 $2.5 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$ シリコーン・ラバー、 $10 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$ シリコーン・ラバー、コートしていないシリコーン・ラバーの順に細胞数が多かった。

これらの結果より、シリコーン・ラバーにCNTをコートすることで細胞接着が向上することが示唆された。また、いずれのCNT濃度 ($10 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$, $2.5 \mu\text{gCNT}/\text{cm}^2$) でも細胞接着を認めたが、走査型電子顕微鏡写真の所見より、表面CNT量の増加が細胞の伸展、増殖に良好な影響を与えるものと考えられた。これは、CNTが付着することによる表面構造の物理的な変化や、CNTによるタンパクの吸着による影響と考えられる。

以上より、シリコーン・ラバーにCNTをコートすることで、シリコーン・ラバーの細胞接着性の向上が示された。



Fig2 培養細胞のSEM像

白金ナノフラワーを用いた生体関連物質のLDI-MS測定

(改行)

東京大学 大学院理学系研究科 化学専攻

関西大学 化学生命工学部

○米澤 徹、川崎英也、荒川隆一

(改行)

1. はじめに

ナノ粒子は様々な分野で興味を持たれている材料である。¹⁾一方、物質の質量分析は、合成化合物の同定のみならず、ナノマテリアルの均一性評価、薬物・毒物の検定など幅広く応用されている分野である。特に、レーザー脱離イオン化(LDI-MS)は、適切な有機マトリックスの力を借りて、大きな分子のソフトイオン化を可能とし、比較的高分子量のものの質量分析を可能とした(MALDI-MS)。²⁾今やMALDI-MSはポストゲノム時代の分析機器の一つの中心機器である。このMALDI-MSにおいて従来は、レーザーのエネルギーを吸収し、イオン化させるために有機マトリックスが多く用いられてきたが、最

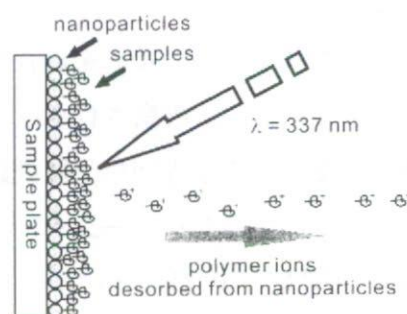


Figure 1. Schematic illustration of SALDI-MS with inorganic nanoparticles.

最近、前の講演で触れたとおり、無機マトリックスとしていくつかのナノ粒子が検討されている。³⁾また、LDI-MSの有効なサンプル基板として、ポーラスシリコンが用いられるケースもある(DIOS法)。⁴⁾さらには、金属蒸着したメソポーラスアルミナなどについて報告が見られる。⁵⁾一方、ナノ粒子を塗布する手法によって凹凸のある基板を形成しそれを用いてソフトイオン化する方法は、これまでと同様の手法で通常の基板で作業できるメリットがあり、今後普及していくと期待される。その中で、本研究では新しく白金ナノ構造体のLDI-MSへの応用について報告する。

2. 実験

本研究で用いる白金ナノ構造体は、常温で塩化白金(IV)酸の水溶液に水素化ホウ素ナトリウムを添加して作成した。SALDI-MSに使用するため、作成時に高分子などの保護剤は添加していない。そのため、しばらく攪拌していると沈殿を生じる。得られた黒色沈殿をろ過し、Milli-Q水 ($> 18 \text{ M}\Omega$) で複数回洗浄して、残余のイオンなどの付着をできる限り取り除き、一晩、常温で真空乾燥した。電子顕微鏡観察は、HR-TEM (日立HF-2000、200 kV) とHR-SEM (JEOL JSM-7401FNT) を用いて行なった。白金分散液は15 mg/mLで調製し、マトリックスとしては1 μL をプレート上に滴下した。SALDI-MS測定は島津製作所製AXIMA-CFR (レーザー波長337 nm) TOF-MS装置を用いて通常のLDI-MS法により測定した。

3. 結果と考察

塩化白金酸水溶液に還元剤である NaBH_4 を導入することにより、黄色のイオン溶液は、黒色に変化し、還元されたことが分かる。本研究では、保護剤となる高分子や界面活性剤を添加していないため、次第に沈殿が

見られるようになる。この沈殿をろ過・乾燥して得られた白金ナノ構造体は黒色粉末である。そして、本粉末を水に分散させて使用した。黒色であるため、どの波長のレーザー光にも対応できると考えられる。得られた白金ナノ構造体のHR-SEM写真をFig. 2に示す。写真から分かるとおり、得られた構造体は、いわゆる球状のナノ粒子粉末の2次凝集体ではなく、表面に突起をもった特殊な構造体であることが見受けられる。さらに、この突起部分についてHR-TEMならびにAFM観察した結果、非常に薄い薄片状の突起であることがわかった。

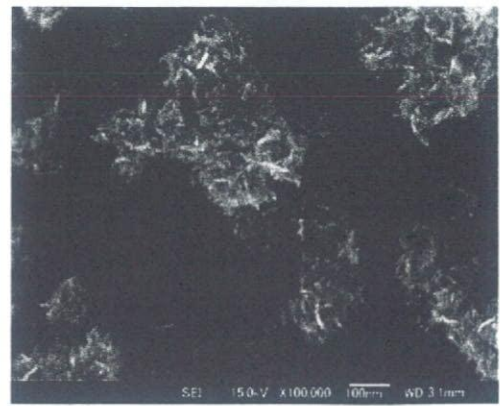


Figure 2. HR-SEM image of Pt nanomaterials prepared from H_2PtCl_6 .

この白金ナノ構造体を水に分散させ、LDS-MS用ステンレスプレートに所定量滴下したのちに減圧乾燥し、さらにサンプル・イオン化剤を滴下して減圧乾燥した後、プレートをLDI-MS装置に導入して、SALDI-MS測定を行なった。本手法で得られた4つの典型的なペプチドサンプルのスペクトル例をFig. 3に示す。いずれの場合も、プロトン付加体のピークが得られており、白金ナノ構造体がSALDI-MSマトリクスとして有効にペプチド分子をソフトイオン化することに成功していることが分かる。

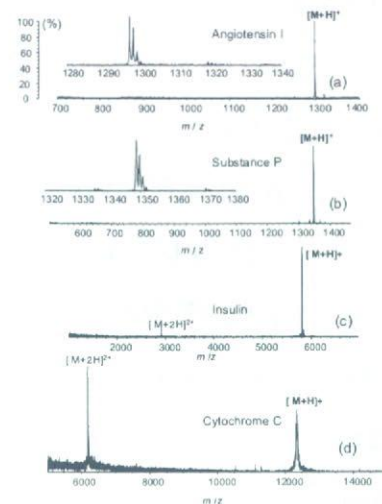


Figure 3. The mass spectra of (a) angiotensin I, (b) substance P, (c) human insulin, and (d) cytochrome C obtained from Pt nanomaterials as SALDI-MS.

この白金ナノ構造体を使用したSALDI-MSでは、有機マトリクスを用いたMALDI-MSと異なり、感度の均一性が良好で、いわゆる有機マトリクスとサンプルとの混晶による「スイートスポット」の問題が大きく抑制できる。また、この白金ナノ構造体をマトリクスとして用いた場合、感度が非常に向上することが見出された。一方、蒸着した白金薄膜上からはこのようにペプチドをイオン化できないことから、イオン化効率は、ナノ構造に起因すると理解することができる。また、有機マトリクスに起因する妨害ピークも殆ど観察されないという利点も示された。

本白金ナノ構造体を用いて、同様の手法でリン脂質などのソフトイオン化にも成功しており、本手法によって調製された白金ナノ構造体がSALDI-MSの良好なマトリクスになることが示された。

【参考文献】 ¹⁾M. A. El-Sayed, *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *34*, 257; M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.*, **2004**, *104*, 293. ²⁾R. Arakawa, S. Okuda, Y. Wada, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **2004**, *52*, 33; M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299; K. Tanaka, H. Eaki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151. ³⁾C.-T. Chen, Y.-C. Chen, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 1453. C.-H. Teng, K.-C. Ho, Y.-S. Lin, Y.-C. Chen, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 4337. ⁴⁾J. Wei, J. M. Buriak, G. Siuzdak, *Nature*, **1999**, *399*, 243; S. Okuno, R. Arakawa, K. Okamoto, Y. Matsui, S. Seki, T. Kozawa, S. Tagawa, Y. Wada, *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 5364; S. A. Trauger, E. P. Go, Z. Shen, J. V. Apon, B. J. Compton, E. S. P. Bouvier, M. G. Finn, G. Siuzdak, *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 4484. ⁵⁾和田芳直・柳下崇・益田秀樹, 第55回質量分析討論会, 1P-04-A04 (2007).

【謝辞】 本研究の遂行にあたって、ご支援頂いた西原寛教授(東大院理)に感謝する。

シロイヌナズナ T87 培養細胞に対する CNTs の影響

北大環境科学院・北大歯学研究科

○林 春・古月文志・亘理文夫

1 背景

本研究は、植物培養細胞を用いたナノ素材の毒性評価、すなわち、「ナノ・ファイト・トキシコロジー」に関する研究である。ナノ素材、とりわけ日本発のナノ素材であるカーボンナノチューブの産業応用開発が進められている。カーボンナノチューブは、これまで、燃料電池や電子エミッターのような電子分野で主に使用されていたが、最近は、「カーボンナノチューブ加工衣料用繊維(日本経済新聞、2007年10月7日第1面)」といった衣料にも利用されるようになり、ナノ素材が身近な消費財として広く広がってきた。カーボンナノチューブ等のナノ素材が工業用品・日常用品に広く使われることに伴い、その環境への流出も強く懸念されている。排水や排気中に含まれるナノ素材は、植物と接する機会は、言うまでもなく、動物と接する機会よりも多い。しかし、「植物が介入したナノ素材の生態系への拡散・侵入」といったルートに関する研究は殆ど行なわれていない。そこで、今回は植物培養細胞を用い、ナノ素材の安全性について評価実験を行った。植物培養細胞としては、理研バイオリソースセンターが保存提供を続けているシロイヌナズナ(T87、2000年に植物として始めて全ゲノム塩基配列が解読され、モデル植物として広く使われている)を用いた。

2 実験材料・方法

炭素ナノ素材としては、多層タイプのカーボンナノチューブ(MWCNTs)を選んだ。また、対照のナノ素材としては、カーボンブラックおよびアスベストを用いた。表1は今回の実験に用いたMWCNTsの物性および処理方法を示す。

3 結果および考察

3.1 光学顕微鏡によるT87/CNTs相互作用に関する検討

未処理のカーボンナノチューブ(P-MWCNTs)、超音波処理したカーボンナノチューブ(U-MWCNTs)および界面活性剤を用いた分散処理したカーボンナノチューブ(D-MWCNTs)をそれぞれ培養液に添加し、シロイヌナズナ細胞T87に対する暴露実験(懸濁培養)を行った。カーボンナノチューブの細胞表面への付着に起因すると思われる暗所が数多く観察された(右の図1)。しかし、アスベスト(ASB)暴露実験(図1、右図)で観察された細胞壁の破損に伴うミトコンドリアや葉緑体の流出、いわゆる、細胞壁/膜の損傷に起因

する典型的細胞死のような状況には至らなかった。

3.2 重量測定法による細胞増殖に対するCNT影響の評価

シロイヌナズナ細胞T87の増殖量(ドライウェイト)を測定した。その結果、カーボンナノチューブの培養液への添加(添加量、10 mg/L)に起因すると思われる増殖量の減少が見られた。図2は、移植後7日目の細胞増殖量を示す。コントロールサンプル(通常の条件下での培養、Ctrl)の増殖率を100% とすると、P-MWCNTs、U-MWCNTs およびD-MWCNTsを添加した場合、その増殖率は、それぞれ、80.3%、74.2%、83.3%であった。T87増殖率の減少は、カーボンブラックを添加した場合(増殖率、66.7%)と比べ顕著な差が見られなかった。ここで、特筆すべきことは、カーボンナノチューブはアスベスト(増殖率、50%)と比べ、そのT87細胞の増殖に対する抑制力が遥かに弱いものであった。

3.3 TTC法による細胞生存率の測定

TTC法を用い、シロイヌナズナ細胞T87の生存率を測定した。その結果は図3に示す。カーボンナノチューブの添加によるT87の生存率の減少が見られた。しかし、その減少量は、アスベストと比べ遥かに少ない(カーボンブラックよりも少ない)。また、分散剤として用いた両性イオン界面活性剤はシロイヌナズナ細胞T87の成長周期に対して影響するものの、その生存率に対する影響が見られなかった。

3.4 濃度依存性に関する評価

カーボンナノチューブおよび対照ナノ素材(カーボンブラックおよびアスベスト)の添加量を変化させ(添加量、5 mg/L; 10 mg/L; 50 mg/L)、ナノ素材の添加量の影響について調べた。シロイヌナズナ細胞T87の生存率はナノ素材の添加量の増加と共に、ほぼ直線的に減少することがわかった。

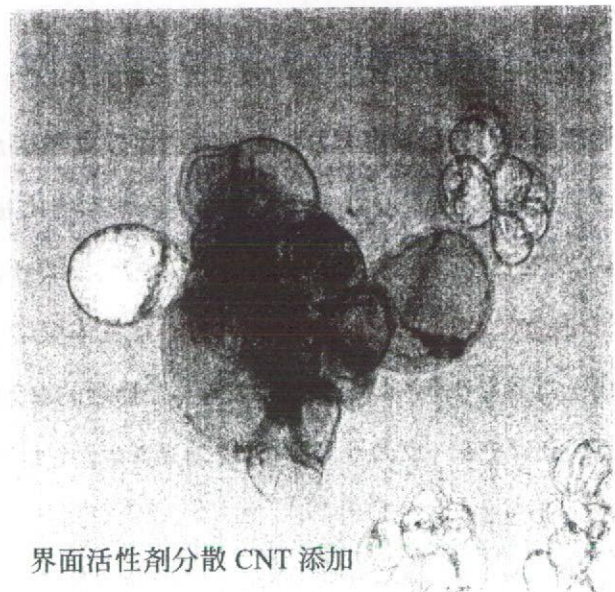
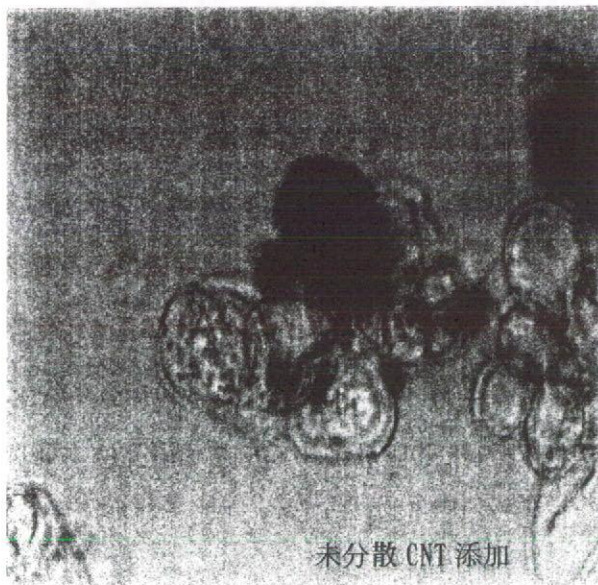
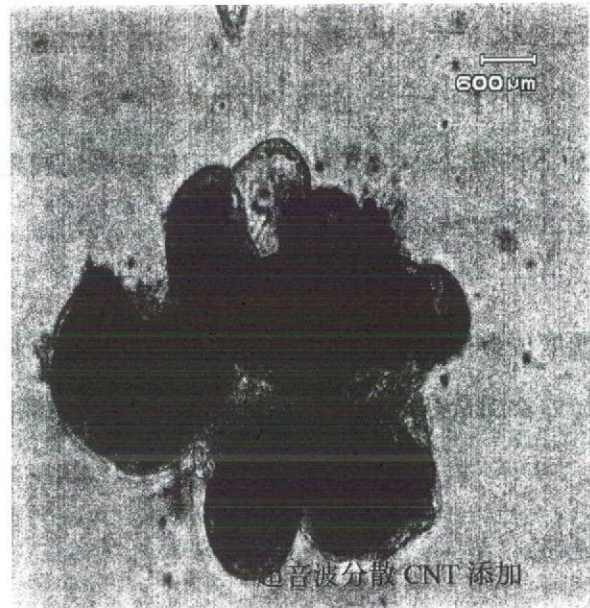
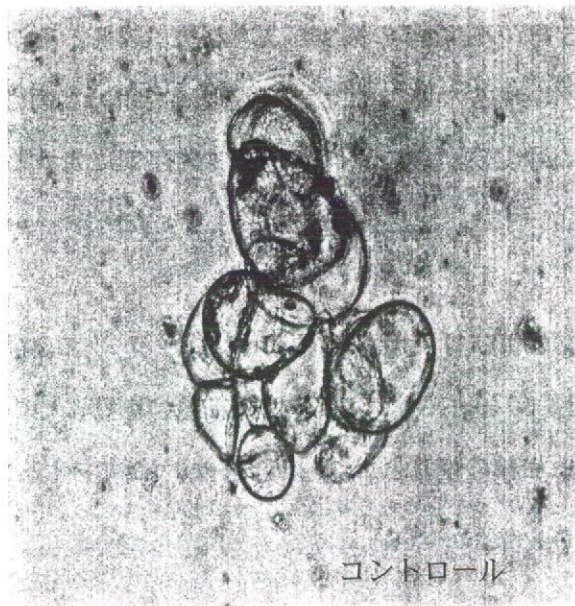
4 結論

カーボンナノチューブはシロイヌナズナ細胞T87に対して、いわゆる「ネガティブ的な効果」があったことは、形態観察、重量測定および生存率測定の実験結果から結論することができる。しかし、いわゆる「カーボンナノチューブ毒性」は、その程度はアスベストと比べ極めて低いこと、ある意味ではカーボンブラックよりも低いことを言える実験データが得られた。また、カーボンナノチューブのような炭素ナノ素材がその製造技術の進化により、これまでに知られていた生体反応で支配的な触媒効果又はイオン溶出に基づく化学的効果とは異なり、サイズ・形状に依存した物理的な効果に基づく生体効果が発現することになるであろう。カーボンナノチューブのサイズ・形状効果を生かした植物分野におけるCNT応用に関する研究は本研究室で行なわれている。

Table 1 MWCNTs and concentrations of the selected metal elements found in the samples extracted from the CNTs with 17% HCl aqueous solution.

MWCNTs	P-MWCNTs	U-MWCNTs	D-MWCNTs
Average diameter	9.5 nanometers		
Average Length	1.5 micrometers		
Carbon Purity	90%		
Specific Surface area	250-300 m ² /g		
Al	3.64%	3.3%	0.801%
Ni	0.011%	0.001%	0.009%

P-MWCNTs denote the primary MWCNTs, U-MWCNTs, the dispersed MWCNTs by ultrasonication, D-MWCNTs, the dispersed MWCNTs with surfactant as the dispersant.



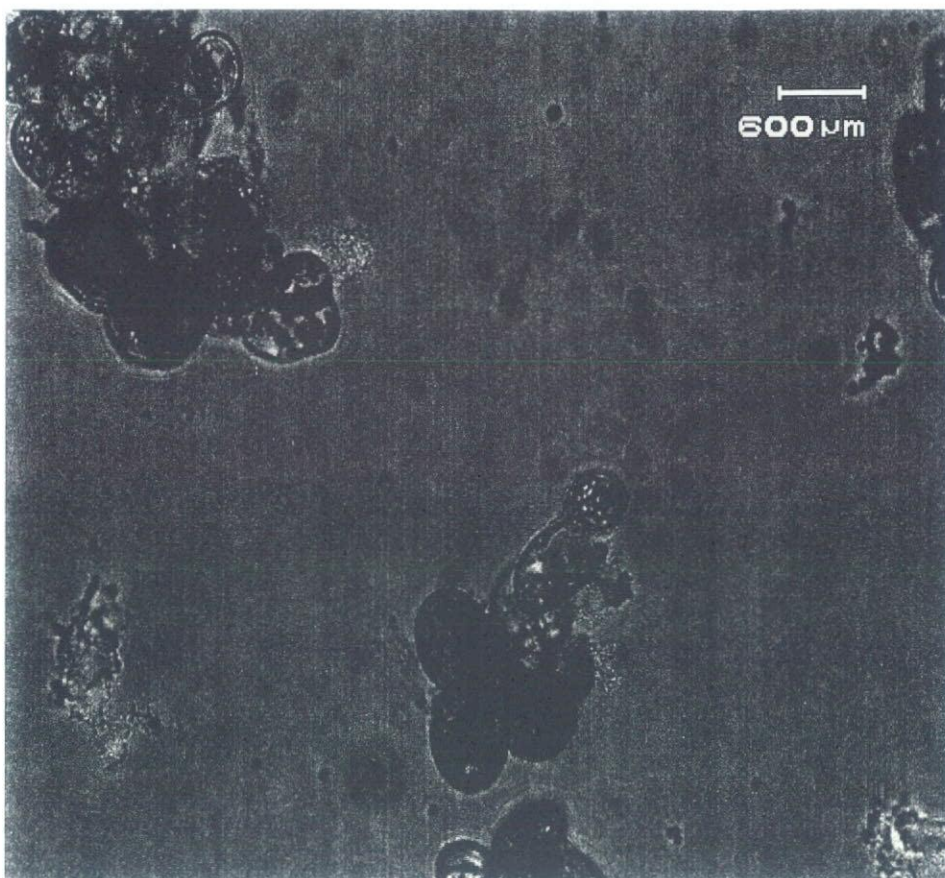


Figure 1 Observation of the suspension cultured T87 cells using light microscopy.

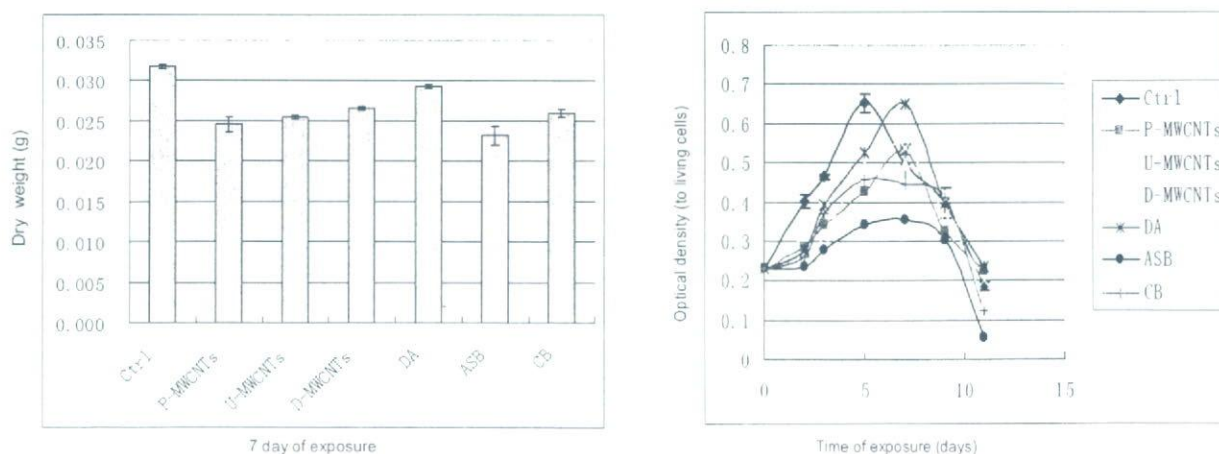


Figure 2 Dried weights (average values of three measurements) of the suspension cultured T87 for the control samples (Ctrl) and those with addition of P-MWCNTs, U-MWCNTs, D-MWCNTs, carbon blacks (CB), the zwitterionic dispersant (DA), and asbestos (ASB), respectively (left-figure).

Figure 3 Viability measurements ($n = 3$) obtained using triphenyl-tetrazolium reduction assay. The suspension cells were incubated with TTC for 24 h at 25 °C in the dark. The samples were then centrifuged for 5 min at 500rpm , TTC solution was aspirated and cells were subsequently incubated in 1 ml of 98% ethanol for 20 h at 55 °C. After centrifugation for 5 min at 8800rpm , the absorbance of supernatant was read at 485 nm (right-figure).

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

(課題番号 : H18-化学-一般-006)

平成19年度冬期

第4回研究成果発表会

(平成19年度第4回研究会議)

日時 : 平成20年2月25日～26日

場所 : 苫小牧市「ホテル ニドム」

平成 19 年度研究組織

[主任研究者]

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 教授

[分担研究者]

田路 和幸 東北大学大学院環境科学研究科 教授
戸塚 靖則 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
横山 敦朗 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 教授
北川 善政 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
森田 学 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 教授
朝倉 清高 北海道大学触媒科学研究センター 教授
古月 文志 北海道大学大学院地球環境科学院 教授
大貫 惣明 北海道大学大学院工学研究科 教授
遠山 晴一 北海道大学大学院医学研究科 准教授
石川 邦夫 九州大学大学院歯学研究科 教授
岡崎 正之 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 教授
浅岡 憲三 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

[研究協力者 (順不同)]

大森 守 東北大学 エネルギー安全科学国際研究センター 研究支援者
橋田 俊之 東北大学大学院工学研究科 教授
矢田 慶治 東北大学 名誉教授
奥山 文雄 名古屋工業大学 名誉教授
久保木 芳徳 北海道大学 名誉教授
芳賀 信幸 石巻専修大学大学院理工学研究科 教授
水野 峰男 (財) ファインセラミックスセンター 主席研究員
橋本 雅美 (財) ファインセラミックスセンター 副主任研究員
市野瀬 英喜 (独) 理化学研究所
竹内 あかり 九州大学大学院歯学研究科 助教
植野 哲 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
米澤 徹 東京大学 大学院理学系研究科 准教授
林 靖彦 名古屋工業大学都市循環システム工学専攻 助教
佐藤 義倫 東北大学大学院環境科学研究科 助教
蕨澤 崇 ブルカー・ダルトニクス株式会社
田中 信夫 名古屋大学大学院工学研究科 教授
平田伊佐雄 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 助教
山下菊治 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
坂口 紀史 北海道大学エネルギー変換マテリアル研究センター 准教授

小野寺 伸	北海道大学大学院医学研究科	運動機能再建医学分野	助教
川浪 雅光	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	教授
菅谷 勉	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	准教授
八若 保孝	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	教授
加我 正行	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	准教授
宇尾 基弘	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	准教授
赤坂 司	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	助教
阿部薫明	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	助教
高師 則行	北海道大学大学院歯学研究科	口腔病態学講座	助教
野田坂佳伸	北海道大学大学院歯学研究科	中央研究部	助教
天雲 太一	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	歯科医師
朱 禹赫	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	専門研究員
Xiaoming Li	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	外国人特別研究員
阿部 大基	石巻専修大学大学院理工学研究科	大学院生	
寺田 典子	北海道大学大学院歯学研究科	口腔病態学講座	大学院生
石川 紘佑	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	大学院生
伊藤 佐智子	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	大学院生
松岡 真琴	北海道大学大学院歯学研究科	口腔病態学講座	大学院生
平田 恵理	北海道大学大学院歯学研究科	口腔機能学講座	大学院生
江崎 光恵	北海道大学大学院歯学研究科	口腔健康科学講座	大学院生
林 春	北海道大学 大学院地球環境科学研究所	大学院生	
藤井 明洋	北海道大学 大学院地球環境科学研究所	大学院生	
譚 曉明	北海道大学 大学院地球環境科学研究所	大学院生	
高廣 充	北海道大学 大学院地球環境科学研究所	大学院生	

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」 (H18-化学-一般-006)

平成 19 年度冬期 第 4 回研究成果発表会プログラム

(平成 19 年度第 4 回研究会議)

平成 20 年 2 月 25 日 (月)

13:00~13:15

研究組織の紹介

研究全般について

「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」

北海道大学大学院歯学研究科生体理工学教室

亘理 文夫

13:15~13:25

「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と金属への応用」

○寺田典子¹⁾, 宇尾基弘²⁾, 北川善政¹⁾, 亘理文夫²⁾

1) 北大院・歯・口腔内科、2) 北大院・歯・理工

13:30~13:40

「元素分析走査プローブ顕微鏡-XANAM-の開発」

北海道大学触媒化学研究センター

鈴木秀士、○朝倉清高

13:45~13:55

「細菌における多層カーボンナノチューブの毒性評価」

北海道大学大学院地球環境科学研究院

○高廣 充・古月文志

北海道大学大学院歯学研究科

亘理文夫

14:00~14:10

「ゾウリムシにおける銀ナノ粒子の細胞毒性試験Ⅱ」

石巻専修大学・理工

阿部大基、羽田紘一、○芳賀信幸

14:15~14:25

「正常および癌肝細胞培養におけるCNT添加の影響」

北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座小児・障害者歯科学教室

伊藤佐智子、八若保孝

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

赤坂司、○亘理文夫