

型環境セルであり、隔膜は20nmのトリアセチルセルロースと50nmのカーボン補強膜が張られた2枚のCuグリッドであった。試料はMgに触媒として1wt.%のNb₂O₅が添加したMg-Nb₂O₅粉末を用いた。試料の酸化を防ぐため、アルゴン雰囲気グローブボックス中で環境セル内に装填し、その後、加速電圧200kVの汎用型TEMを用いて室温の水素雰囲気中で連続的に明視野像と電子線回折パターンの撮影を行った。明視野像においては水素導入前後で粒子形状に変化が見られた。また、電子線回折パターンにおいては水素導入後にMg由来のスポットの強度が低下し、MgH₂由来のスポットが出現したことを確認できた。しかし、Mgのスポットが消滅していないことから水素化の途中の過程であることが推察でき、これは水素圧が低いことと表面にわずかに酸化被膜が存在していることが原因と考えられる。なお、この環境セルでは0.2MPaの気圧でも使用できることが確かめられたため、室温から200℃の範囲であれば大気環境あるいは水蒸気環境での観察は可能と思われる。

References

- [1] T. Yamamoto, H. Inui and M. Yamaguchi: Mater. Sci. Eng. A, 329-331 367-371 (2002)
- [2] T. Nakagawa, T. Ichikawa, R. Iida, H. Leng, N. Takeichi, T. Kiyobayashi, H. Takeshita and H. Fujii: J. Alloys Comp., 430 217-221 (2007)
- [3] P. Marikar, M. B. Brodsky, C. H. Sowers and N. J. Zaluzec: Ultramicroscopy, 29 247-256 (1989)
- [4] P. L. Gai, J. Solid State Chem., 49 25-42 (1983)
- [5] G. Raynerd, J. A. Venables, 23 432-433 (1987)
- [6] I. M. Robertson: Engineering Fracture Mechanics, 68 671-692 (2001)
- [7] T. Akimoto, Y. Hirohata, M. Shimada and H. Sugi: Proceedings of the 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Electron Microscopy, 119 (2001)

カーボンナノ物質の生体内での動態

ラット尾静脈より注入した水溶性フラーレンの生体内分布

○横山敦郎*, 佐藤義倫**, 葦澤崇***, 赤坂司*, 高橋ともみ*, 笠井孝夫*,
田路和幸**, 亘理文夫*

北海道大学歯学研究科*

東北大学環境科学研究科**

ブルカーダルトニクス***

Biodistribution of Carbon Nanosubstances

Distribution of Water-Soluble Fullerene Injected Intravenously in Rat

Yokoyama A.*, Sato Y.**, Nirasawa T.***, Akasaka T.*, Takahashi T.*, Kasai T.*, Tohji K.**,
Watari F.*

Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University*

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University**

Bruker Daltonics K.K.***

1. 緒言

我々は、これまでカーボンナノ物質の *in vitro* および *in vivo* での細胞毒性や生体適合性を検討するとともに、カーボンナノ物質の生物学的特性を利用した生体材料の開発を行い、軟組織埋入時における低い起炎性と細胞培養用のスキャホールドとしての有用性を報告してきた。近年、アスベストに代表される微小物質の安全性が問題となり、カーボンナノ物質についても多くの議論がなされている。カーボンナノ物質が体内に取り込まれた場合の体内での移行と分布については不明な点が多い。今回の研究の目的は、静脈から注入した水溶性フラーレンの体内での移行と分布を明らかにすることである。

2. 方法

2種の水溶性フラーレン (C60(OH)_x_070718_1 および C60(OH)_x_070718_2) を 3mg/ml の濃度に生理食塩水に溶解し、実験用試料とした。実験動物として、ウイスター系雄性ラット (7週齢, 体重 220-250 g) 6匹を用いた。ネンプタールによる全身麻酔下で尾静脈からフラーレン溶液 1ml を注入し、1時間および24時間後、脳、肺、腎臓、肝臓、脾臓を摘出し、凍結切片を作製した。コントロールとして生理食塩水を静注した。切片を凍結乾燥後 MALDI-TOF-MS にてフラーレンを検出した。一部試料については、HE染色を施し組織学的に検索した。

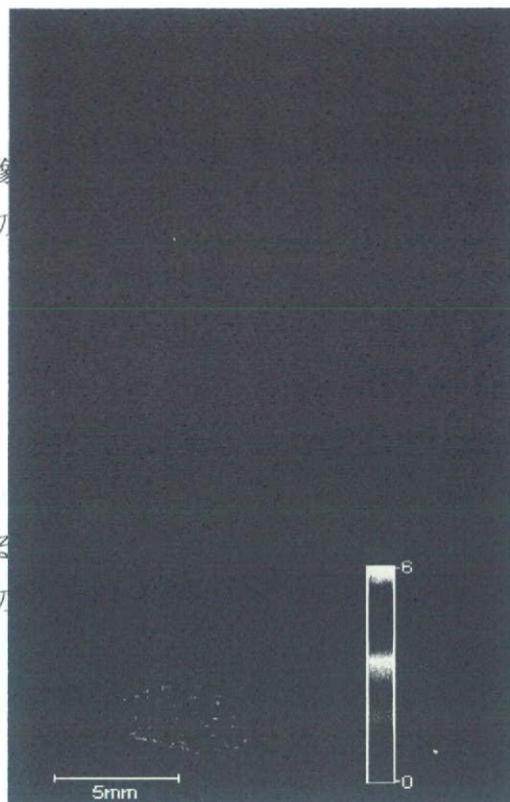
3. 結果および考察

静注1時間後の、肝臓における C60 が観察された。腎臓でも明確ではないがその存在が示唆された。他の臓器には、C60 は、検出されなかった。

右図は、上段がコントロールとして生食
注入1時間後のラットの肝臓のマッピング像
であり下段は、フラーレンを注入1時間後の
肝臓のマッピング像である。C60 の存在が
示唆される。

これらの結果から、静注1時間後に、
フラーレンが肝臓に局在していることが
示唆された。

現在24時間後についても、分析中である
今後、静注の方法を変えて、フラーレンの
体内での分散や蓄積について検討を加える
予定である。



人工関節周囲組織中の金属の状態分析と透過電子顕微鏡観察 及びNi-Ti合金の腐食生成物の状態分析

○宇尾 基弘、亘理 文夫（北大院 歯学研究科）

小野寺 伸（北大院 歯学研究科）

朝倉 清高（北大触媒科学研究センター）

浅岡 憲三（徳島大ヘルスバイオサイエンス）

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

人工関節には各種金属材料が使用されているが、長期間の使用により摩耗粉が発生し、関節周囲組織に沈着する事例が見られる。本研究では人工関節を埋入した関節包にふくまれる金属のTEM観察とXAFS測定を行い、実際の摩耗粉の状態を観察した。またチタン基合金では水素吸蔵による劣化が懸念されており、生体材料として用いられるNi-Ti合金では水素チャージ処理で多量の微粒子が生成することが知られている。そこでNi-Ti合金およびSUS316Lから発生する腐食生成物のXAFSによる状態分析も同時に行った。

2. 方法

人工股関節置換術により摘出された股関節の関節包（2例）をTEM観察すると共に、XAFS測定を行い、ICPにより組織中の金属量を定量した。使用されていた人工股関節の材質は以下の通り。

試料A：ヘッド＝Co-Cr、カップ＝Co-Cr、スクリュー＝Ti（6ヶ月埋入）

試料B：ヘッド＝Co-Cr、カップ＝Ti、スクリュー＝Ti（14年埋入）

さらにNi-TiおよびSUS316Lを0.9%NaCl溶液または疑似体液(SBF)中で水素チャージした後の生成微粒子についてXAFS測定を行って、NiおよびFeの状態分析を行った。

3. 結果及び考察

関節包試料中の各元素濃度（wet重量比、ppm）を右表に示す。Coが顕著に検出されており、試料B（カップがチタン製）ではTiも高濃度に検出されている。

元素濃度 (ppm)	Co	Cr	Ti
試料A	530	8.6	14
試料B	1060	1.6	420

試料BのTEM像をCoのK-edge XANESスペクトルを図1に示す。XANESから同試料中のCoが金属状態と推測され、

TEMからも μm 前後の摩耗粉と思われる粒子が観測される。これより、ヘッド及びカップに由来する摩耗粉が金属状態で関節包に含まれていると考えられる。この傾向は試料Aでも同様であり、含有金属量は埋入期間が長い試料(B)の方が明らかに多い。溶出状態のCoはXANESスペクトルでは検出されていない。

Ni-Ti および SUS316L を 0.9%NaCl 溶液または疑似体液(SBF)中で水素チャージした後の生成微粒子の Ni 及び Fe K-edgeXANES スペクトルを図 2 に示す。Ni-Ti 合金から生成した微粒子中の Ni は水酸化物様のスペクトルを示し、SUS316L からの微粒子中の Fe は FeOOH に類似したスペクトルを示している。Ni-Ti 合金からの生成物については NaCl 溶液と SBF で反応させた場合の顕著な差は見られなかった。いずれの試料でも生成物は水酸化物となっており、今後更に他の合金成分の状態についても検討する必要がある。

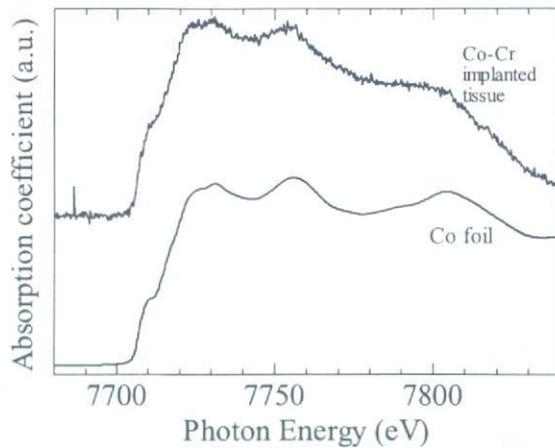


図 1 試料 A 中の金属微粒子の TEM 像と Co K-edge XANES スペクトル

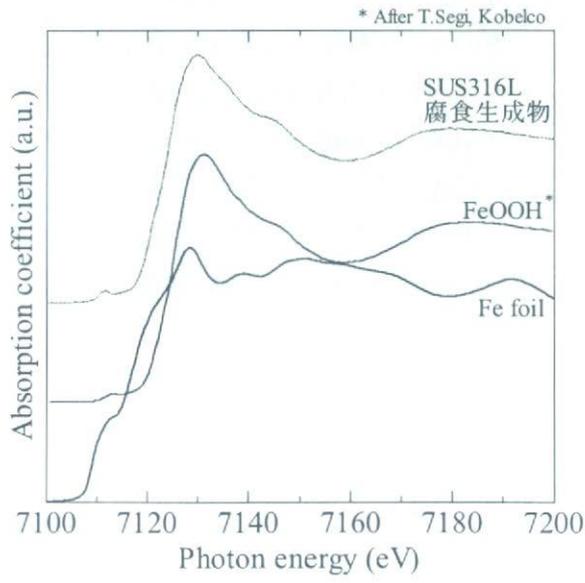
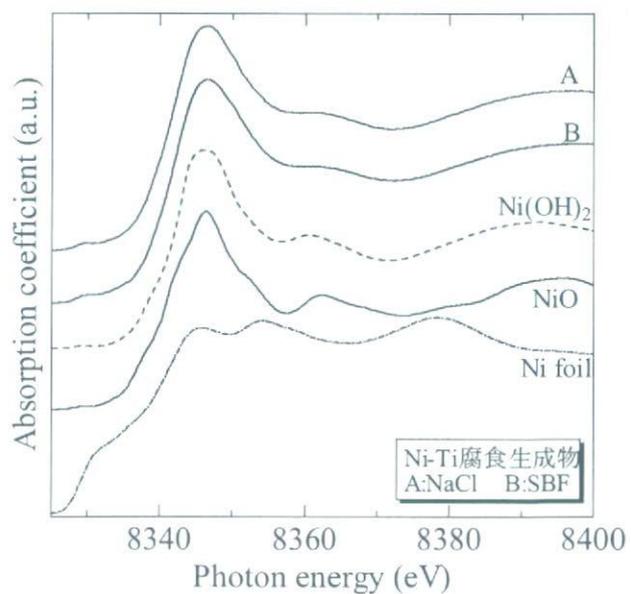


図 2 水素チャージ後の生成微粒子の Ni 及び Fe K-edgeXANES スペクトル
(左 : Ni-Ti 合金、右 : SUS316L)

植物細胞における多層カーボンナノチューブの毒性評価 (Toxicological evaluation of multi-walled carbon nanotubes in plant cells)

北海道大学大学院環境科学院
○藤井明洋・古月文志・亙理文夫

1、背景

ナノテクノロジーは学問的にも産業的にも多くの関心を集め目覚ましい発展を遂げている。ナノテクノロジーの要素となるナノマテリアルは、ナノテクノロジーを利用した商業的製品に導入されてきており私達に身近な存在になりつつある。同時に、その環境・生体への影響に関する懸念から、ナノマテリアルの毒性に関する研究がここ数年で注目を集めている。これらが、使用後に有害性が判明した環境ホルモンやアスベストのように環境問題となる可能性は否定できず、安全性を調べるためにナノマテリアルの生体影響評価が急務である。本研究では、植物細胞におけるカーボンナノチューブの毒性に着目している。カーボンナノチューブ (CNT) はその優れた特質から様々な素材に添加されるようになり、その生産・廃棄の過程で環境中へ一層放出されることが予想される。さらに、植物に関する CNT の毒性評価は先行研究を見ても非常に少なく、また農業など人間が植物に負う部分が多くその被害を防ぐために、植物における影響評価が必要である。これらのことより、本研究では、工業的生産が著しく増えている多層カーボンナノチューブ (MWCNT) と、非生物学的ストレス影響の研究がよく行われているイネとタバコの培養細胞を用いて、細胞レベルでの *in vitro* 毒性評価研究を行った。

2、実験方法と結果

a) 植物材料

イネ 細胞は OS-1 細胞 (*Oryza sativa* L.) を、タバコ細胞は BY-2 (*Nicotina tabacum* L. cv. *Bright Yellow 2*) 細胞を用いた。各々細胞は、MS(Murashige Skoog) 培地、mLS (modified Linsmaier & Skoog) 培地で培養した。MWCNT をこれらの培地に含ませ細胞を培養することで、細胞の MWCNT への暴露とした。

b) カーボンナノチューブ

本研究では、それぞれ提供元が異なる三種類の商業用多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を用いた (①Shinzen Nanotech Port Co. Ltd, China; ② Bayer Material Science, Germany; ③ Nano carbon Technologies Co. Ltd, Japan)。それぞれ太さや長

さが異なることが提供者の分析で確かめられている。さらに、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法（ICP）により MWCNT 中の金属元素（Mg、Al、Mn、Fe、Co、Ni、Cu）を定量した。ICP の分析において、MWCNT①では Ni(0.47%) が、MWCNT②では Mg(0.30%)、Al(0.24%)、Mn(0.28%)、Co(0.35%) が顕著に検出された。以上より MWCNT の種類により構造的特长や金属含有量が異なることが分かった。

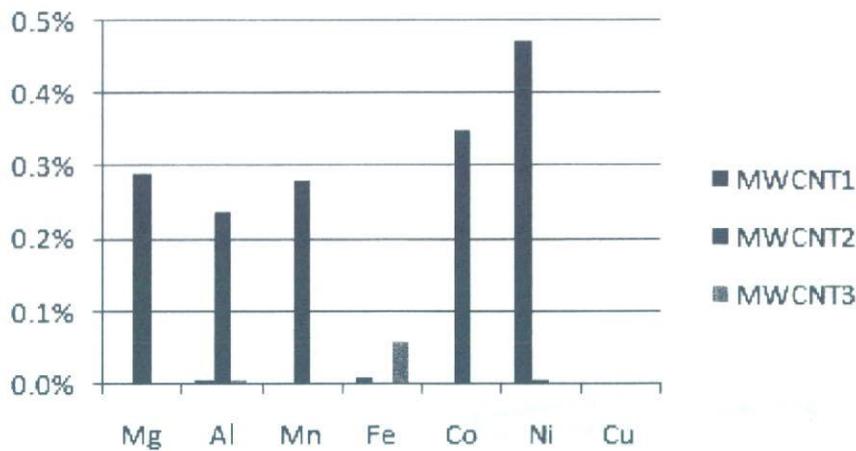


Figure 1. Concentration of selected metals contained in MWCNTs determined by ICP (wt. %)

c) 形態観察

MWCNT に暴露したイネ細胞を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察した。MWCNT がその繊維状の構造を利用して、イネ細胞表面に付着している様子が確認された。また、タバコ細胞を蛍光顕微鏡で立体的に観察したところ、MWCNT はタバコ細胞表面に存在している様子が見て取れた。

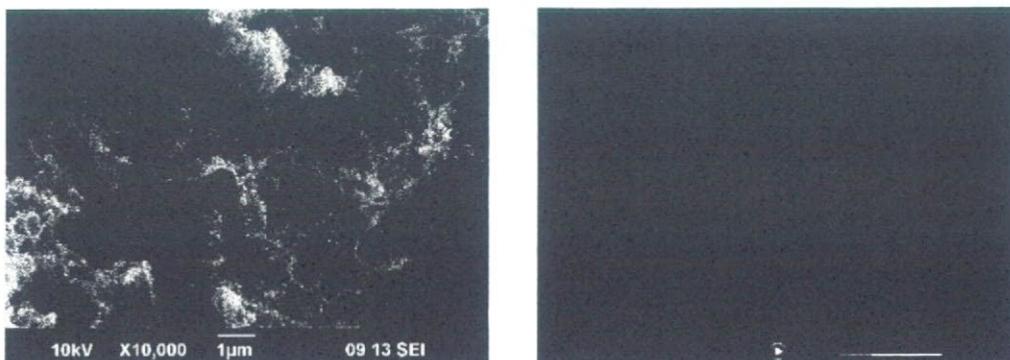


Figure 2. (A) SEM image of rice cells treated with MWCNTs. (B) 3D image of tobacco cells treated with MWCNTs.

d) イネ細胞における影響評価実験

イネ細胞を異なる濃度の MWCNT① と一緒に培養し、その細胞に対する MWCNT の影響評価を行った。MWCNT の細胞の生存に対する影響を測定するため、TTC reduction assay (ミトコンドリアの活性を指標とした細胞生存率の測定)と、フローサイトメーターと PI (Propidium Iodide) による解析 (ネクローシス細胞の割合を測定)を行った。両者の実験において、MWCNT に暴露した細胞と暴露していない細胞の間で、細胞の生存率やネクローシスの割合に顕著な違いは見られなかった。

さらに、MWCNT の細胞の成長度への影響を測定するため、Regrowth assay (MWCNT に暴露した細胞を再び固体培地で培養し成長度を測定) と ECIS(Electrical Cell-Substrate Impedance Sensing) (MWCNT 暴露下で培養される細胞の成長をリアルタイムで測定) による解析を行った。これらの実験においても、MWCNT が細胞の成長に及ぼす顕著な影響は確認できなかった。

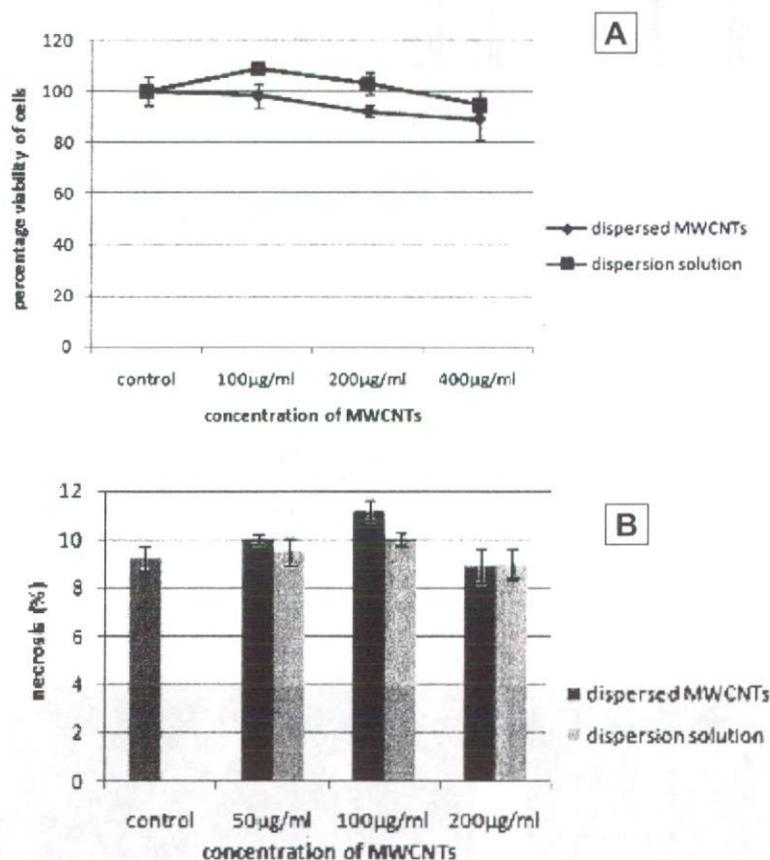


Figure 3. (A) The percentage viability of rice cells detected by TTC reduction assay. (B) The percentage of necrotic cells detected by flow cytometric analysis.

e) タバコ細胞における影響評価実験

この実験では3種類の MWCNT をタバコ細胞に暴露した。MWCNT の細胞の生存に対する影響を測定するため Evans blue assay (Evans blue で染色された死細胞を数え細胞生存率を算出) を行った。さらに、MWCNT の細胞成長能力に対する影響の測定 (培養した細胞の fresh weight を測定・比較) も行った。両者の実験において、MWCNT に暴露した細胞としない細胞の間で生存率と成長度における大きな違いは見られなかった。また、MWCNT の種類に関係なくその影響は見られなかった。

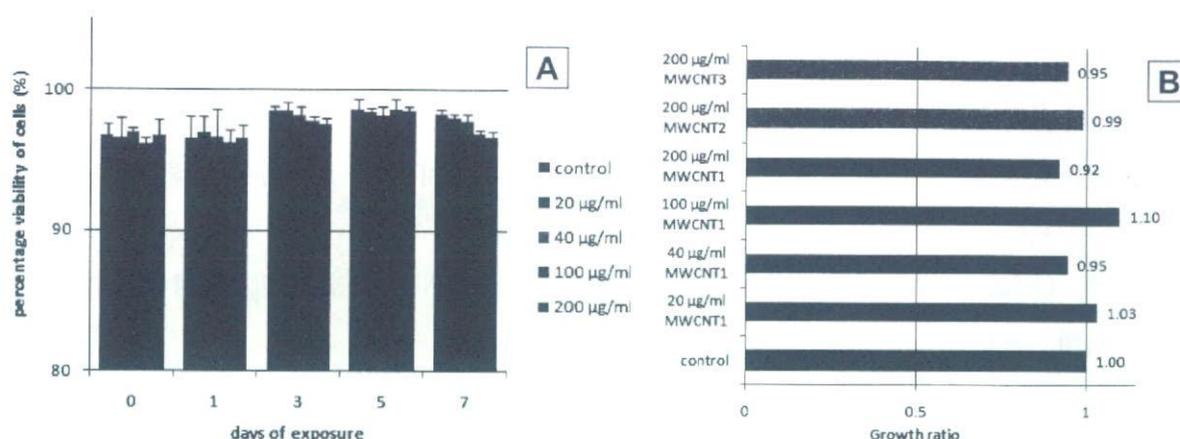


Figure 4. (A) The percentage viability of tobacco cells detected by evans blue assay. (B) Growth ratio of tobacco cells after incubation.

3. 考察

本研究では、形態観察から MWCNT は細胞表面にある程度付着することが観察された。また、MWCNT がイネとタバコの植物細胞における生存と成長に対して毒性的な影響を与えないことが示された。さらに、他者の先行研究において MWCNT がヒト細胞などの動物細胞に対し細胞毒性を及ぼすという報告があり、本研究の植物細胞における結果と大きく異なる。これらのことは植物細胞が持つ自己防御機構が MWCNT からの影響を回避させていることに起因すると考えられる。一つに、植物細胞は周りを細胞壁というセルロースやペクチンなどから成る部分で囲まれている。細胞壁は元来外界からの衝撃を防ぐ役割を持ち、MWCNT の作用も細胞壁で防がれている可能性がある。二つに、CNT に含まれる金属不純物が細胞に悪影響を及ぼすという報告があるが、植物の場合重金属に耐性があることが知られており、この効果が MWCNT に含まれる金属のストレスから細胞を守っていると考えられる。以上のことより、植物細胞は自己防御機構があるため MWCNT に対して耐性があると結論づける。今後の研究課題として、カーボンナノチューブを細胞内に導入しその影響を調べること、さらに他のナノマテリアルに関して網羅的に毒性実験を行っていきたい。

カーボンナノチューブ上での神経細胞の培養

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

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⁾。

本研究では、CNTの生体親和性および電気的特性に着目し、CNTに対する神経細胞の接着性やCNT上での細胞増殖・分化に対する検討をおこなった。

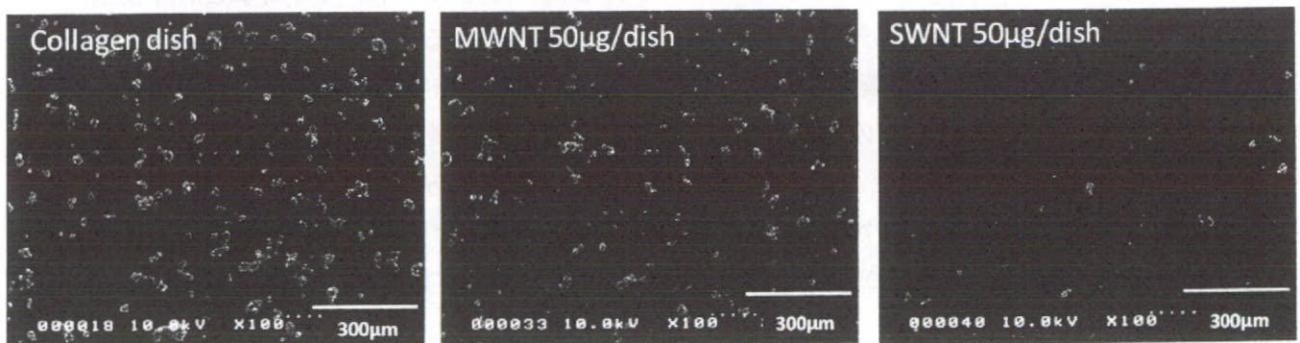
2. 実験方法

ポリスチレンディッシュの表面をSWNT、MWNTでコートした。SWNTは名城ナノカーボン社製単層カーボンナノチューブを用い、MWNTはNanoLab社製多層カーボンナノチューブを用いた。それぞれ表面CNT濃度の異なる3種類のディッシュ (ϕ 60mmディッシュで $10\mu\text{gCNT/dish}$ および、 $50\mu\text{gCNT/dish}$ 、 $100\mu\text{gCNT/dish}$) を作製した。

コーティングしたディッシュの表面構造の観察は走査型電子顕微鏡により行った。

細胞接着実験のため、作製したCNTコートディッシュ、コラーゲンコートディッシュ、PLLコートディッシュ、細胞培養用ディッシュ、無処理ポリスチレンディッシュを用い、比較検討した。

それぞれのディッシュ上にラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫 (PC12) を 1×10^6 個播種し、RPMI 1640に10%HS、5%FBS、1%glutamine、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12時間培養を行った。



培養した細胞をグルタルアルデヒドで固定し、DAPIによる染色を行い蛍光顕微鏡で観察した。それぞれのディッシュで20か所細胞数を計測し、培養細胞数を比較した。

次いで形態観察のため、CNTコートディッシュ (50 μ gCNT/dish) にPC12を 5×10^5 個播種し同様の条件で3日間培養した。培養した細胞はグルタルアルデヒドで固定しエタノールでの段階的脱水後、乾燥させ、走査型電子顕微鏡で観察した。

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ところ、CNTが網目状にポリスチレンディッシュを覆っているのが観察された。SWNTに比べMWNTの方が湾曲した形態をしているため、ディッシュ表面はMWNTの方が凹凸が大きいようであった。

接着細胞数は、PLLコートディッシュが最も多く、次いでコラーゲンコートディッシュが多かった。細胞培養用ディッシュと無処理ポリスチレンディッシュでは細胞はほとんど接着していなかったが、MWNTでコートしたディッシュではコラーゲンコートディッシュの半分程度の接着が認められた。CNTコートしたディッシュでは、MWNT、SWNTともに表面のCNTコート量が多いほど接着細胞数も多い傾向にあり、同じ表面CNT量でもSWNTコートしたディッシュはMWNTと比較すると接着細胞数が少なかった。。

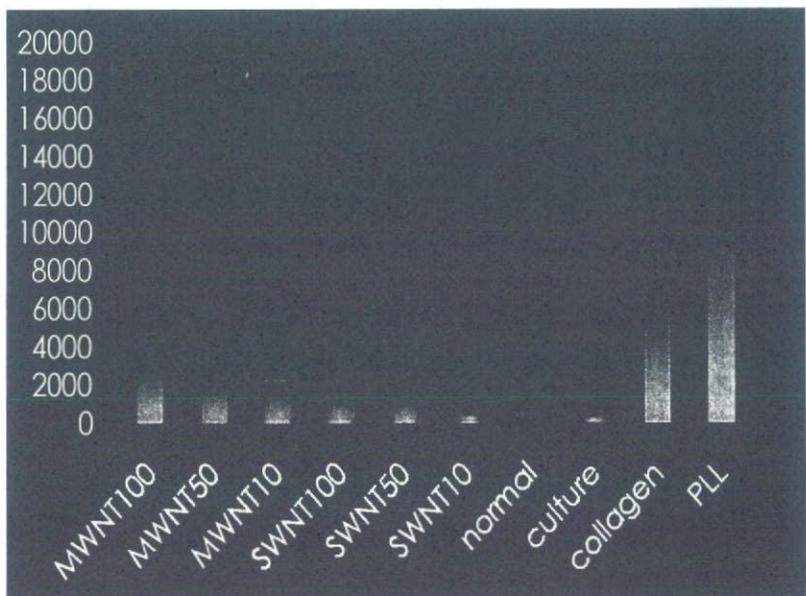
培養した細胞を走査型電子顕微鏡で観察した結果、SWNT上ではほとんど細胞が認められなかったが、MWNTコートしたディッシュ上ではコラーゲンコートしたものより接着数は少ないもののコラーゲンと同様に細胞の接着、増殖が認められた。細胞形態の異常なども特に認められなかった。

これらの結果より、ポリスチレンディッシュをCNTでコートすることで細胞接着が向上することが示唆され、さらに、表面CNT量の増加が細胞の接着に良好な影響を与えるものと考えられる。

同じCNT量でも、SWNTでコートしたディッシュよりMWNTでコートした

ディッシュの方が接着細胞数が向上したのは、表面構造の物理的な変化、つまりMWNTの湾曲した構造が細胞接着により大きな影響を与えていると考えられる。

以上より、CNT上での神経細胞の接着・増殖が確認され、今後、CNT上での細胞分化などについても検討を進めていく予定である。



ナノハイドロキシアパタイトーコラーゲン複合体膜のBMP担体としての有効性

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○ 天雲太一、菅谷 勉、田中陽、福田寛恵、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生体理工学教室

宇尾基弘、赤坂 司、亘理文夫

1. 目的

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

そこで我々はより多くのセメント質を象牙質表面に再生する目的で、bone morphogenetic protein (BMP) を用いて研究を行ってきた。これまでの研究で、象牙質表面を脱灰してBMPを塗布し、その上で線維芽細胞を培養すると付着した細胞の石灰化能が上昇し、象牙質表面にBMPが付着して機能することが明らかとなった。さらに、BMPを塗布した象牙質片を口蓋結合組織内に移植すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されるとともに象牙質表面に吸収窩が観察され、ビスフォスフォネートを投与すると、象牙質の吸収が減少するとともに、硬組織形成も抑制されることが明らかになり、BMP-2の硬組織誘導作用は直接骨芽細胞を活性化するより、破骨細胞を活性化してカップリングを向上させる作用の方が大きいと考えられた。また、BMPを根面に塗布する際に前処置として行う象牙質の脱灰液の種類が異なると、硬組織形成と象牙質吸収に影響を及ぼすことが明らかとなった。しかし、硬組織の形成と象牙質の吸収が同一の組織標本のきわめて近傍で観察されたことから、さらに歯根表面のきわめてわずかな性状の違いなど、他の要因が関与している可能性が高いのではないかと考えている。

そこで本研究ではナノハイドロキシアパタイトーコラーゲン複合体膜を使い、Caの

含有量の違いがBMPの活性に影響を与えるかを検討するため、その第一段階としてこれまでに精製したナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜の物性と細胞毒性を検討してきた。さらに、精製したナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜をラットの筋および皮下結合組織に移植して組織反応を検討したのでその結果を報告する。

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

In vitro study of nano-apatite/collagen composite with chitin fibre reinforced PLLA matrix

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

¹ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University; ² Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, China

Introduction

In this study, we showed that chitin fibres could not only reinforce the nano-apatite/collagen/PLLA scaffold (nHACP), but also improve the biocompatibility of this scaffold.

Materials and Methods

Materials:

Synthesis of nHACP composite^[1,2] and nHACP reinforced by chitin fibres (nHACP/CF, with and without crosslink)^[2] had been reported previously. The diameter and porosity of pure PLLA, nHACP and nHACP/CF are approximately the same.

Compressive strength:

The compressive strength was measured on electronic universal material testing machine. The loading rate was 0.5mm/min. The size of the dry samples was 8.5×15 mm.

Cell culture:

Human mesenchymal cells were isolated from the bone marrow of a fetus. Cultures of mesenchymal cells were established after cell separation on a percoll gradient. The cells were plated at a density of 4,000 cells/cm² on material samples placed in 24-well plates. A volume of 100 μ l of cell suspension was seeded on the entire upper surface of each test sample.

Cells activities on the scaffolds were characterized by SEM, MTT, curve of cells proliferation and total proteins.

Results

The chitin fibres could increase the compressive strength of nHACP about 2.5 times without crosslink, but about 5 times with crosslink. The cells attached and proliferate better on nHACP/CF than on nHACP/CF and PLLA (MTT was showed in fig.1). There is no significant difference between the biocompatibility of nHACP/CF with and without crosslink.

Conclusions

1. The chitin fibres improved the biocompatibility of nano-apatite/collagen/PLLA scaffold (nHACP)
2. Crosslink could make chitin fibres increase compressive strength of nHACP more significantly, however, did not influence the biocompatibility of the scaffolds.

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.

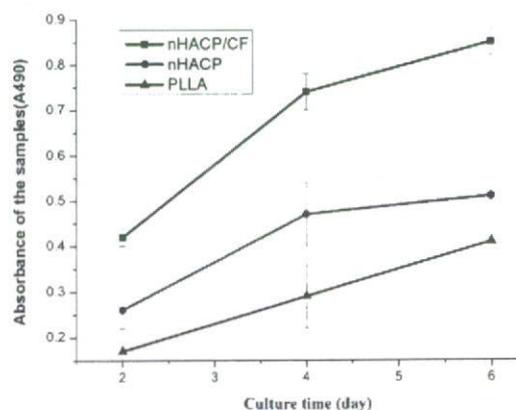


Fig 1. Comparison of growth rates of cells on different material surfaces (MTT assay)

ポリポッド状二相性ナノ結晶子炭酸アパタイトの創製

九州大学大学院歯学研究院

○石川邦夫・下御領良二・竹内あかり

1. 緒言

骨欠損部の再建術式の第一選択は自家骨移植であるが、自家骨採取に伴う健全部位への侵襲、骨量不足等の重篤な問題がある。そのため、アパタイトを中心とする骨補填材が臨床応用されているが、現在臨床応用されているアパタイト焼結体は自家骨と比較すると骨形成能に劣り、骨とは置換されないということが問題点として指摘されている。さらに、顆粒状アパタイト焼結体の場合は骨欠損部からの移動という問題点もある。本研究の目的は、骨リモデリングが最も迅速に行われている海綿骨の組成（成長因子を含むナノ結晶子炭酸アパタイト）と形態（完全連通型骨梁構造）に注目し、セラミックスフォームの調製方法と溶解析出反応、二相制御によってリモデリングに対応した骨置換材を創成することにある。なお、骨補填材移動の抑制方法としてはポリポッド状の形態の有効性を検討した。

2. 実験方法

ポリウレタンフォームをテンプレートとして用い、 α リン酸三カルシウム (α TCP) 懸濁液に浸漬乾燥後、 1500°C で焼成することにより海綿骨と形態が類似する α TCPフォームを作製した。当該フォームを炭酸アンモニウム飽和水溶液にて水熱処理することによって二相性ナノ結晶子炭酸アパタイト (Biphasic carbonate apatite: BCO_3Ap) を調製した。さらに、得られたフォームを軽く粉砕することによってポリポッド状顆粒とした。各種顆粒の形態および組成は走査型電子顕微鏡観察、X線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計によって分析した。処理時間を調整することによって二相性ナノ結晶子炭酸アパタイトを調製した。

3ヶ月前に抜歯したビーグル犬下顎骨片顎を区域切除 ($5 \times 5 \times 10\text{mm}$) し、 α TCP顆粒、 BCO_3Ap 顆粒、 CO_3Ap 顆粒にて骨欠損部を再建した。対照群は血餅だけとした。3、6ヶ月後に屠殺し、非脱灰研磨組織標本（ビルヌーバボーンステイン）、脱灰組織標本（HE染色）を作成し、光学顕微鏡により組織学的評価を行った。

3. 結果

α TCPフォームの炭酸アンモニウム飽和水溶液にて水熱処理時間を90minとすることにより α TCPが CO_3Ap で被覆された二相性ナノ結晶子炭酸アパタイト (Biphasic carbonate apatite: BCO_3Ap) が調整できることがわかった。フォームの気孔径は α TCPフォーム、 BCO_3Ap フォーム、 CO_3Ap フォームのいずれも約 500

μmであった。得られたフォームを軽く粉碎することによってポリポッド状顆粒が調製できることがわかった。ポリポッド状顆粒を直径10mmのサンドペーパーに積層すると4mm高さまで積層できたが、同粒径のアパタイト顆粒の積層高さは2mmであり、ポリポッド状顆粒は成形性が向上していることがわかった。

ビーグル犬を用いた組織学的検討の結果、 CO_3Ap 顆粒および BCO_3Ap 顆粒の場合は、3ヶ月6ヶ月ともに顆粒周囲に骨が形成され、気孔部分への骨の侵入が認められた。また、破骨細胞による吸収像が認められ、リモデリングが進行していることがわかった。一方、 αTCP 顆粒への骨の形成は限定的であった。顆粒の残存率に関して、 αTCP 顆粒の場合は6ヶ月でほとんどの顆粒が吸収されていた。 CO_3Ap 顆粒は経時的に顆粒が吸収されたが、埋入6ヶ月の段階で αTCP 顆粒と比較して倍程度の顆粒の残存が認められた。一方、 BCP 顆粒の場合、埋入3ヶ月目の顆粒の残存率は αTCP 顆粒と CO_3Ap 顆粒の間であったが、埋入6ヶ月目では αTCP 顆粒とほぼ同程度まで吸収されることがわかった。

これらの結果から、ポリポッド状二相性ナノ結晶子炭酸アパタイト (BCO_3Ap 顆粒) は優れた骨置換材となる可能性が高いことが示唆された。

チタンと生体分子との相互作用のナノレベル解析法の開発

広島大学大学院医歯薬学総合研究科

○平田伊佐雄・岡崎正之

1. はじめに

世界の主要国の中で初の超高齢社会を迎える日本において、介護費や医療費の増大はもはや必然の状況である。加えて、近年における『寝たきり老人』の急激な増加は、これらの社会福祉費をさらに押し上げる深刻な問題であり、早急に対処すべき課題となっている。特に、骨・関節の疾患や歯牙喪失は『寝たきり』と強い相関があることが報告されており、今後、これらの硬組織疾患に対する人工関節、人工歯根などのインプラント治療の需要拡大は益々増加するものと予想される。

チタンは生体親和性に優れ、なおかつ硬組織に必要な諸性質を有した生体材料であることから、インプラント医療の場で幅広く用いられている。しかし、チタン表面と生体との間には化学的な結合は起こらないため、一部が粘膜を貫通して生体外とつながった状態になっている口腔インプラント（人工歯根）では、インプラント周囲炎の原因になるなど臨床的にも大きな問題となっている。また、オッセオインテグレーション獲得に必要な治癒期間の短期化も求められているものの、現在行われている材料学的な表面改質のみでは限界がある。以上の経緯から、チタンインプラント表面に長期間安定した生体組織接着性と骨再生能を付与する表面改質法の確立が強く望まれているが、未だ有用な手法は実用化されておらず、今後の進展が期待されている。

近年、組織再生を誘導するチタン表面改質が注目を集めており、チタン表面での生体物質の相互作用をナノレベルで解析できるセンサーが求められている。表面プラズモン共鳴 (SPR) は、表面に吸着した物質の膜厚をnmオーダーで経時的かつ精密に測定できるため、医学・生物学・化学などの学問分野においても応用・研究が行われている。本研究では、チタン表面での生体物質の相互作用をナノレベルで解析するモデルとして、チタンSPRセンサーの設計・作製法と、これを用いた実験法について報告する。

2. チタンSPRセンサーの設計・作成法

SPRは、表面に吸着した物質の膜厚をnmオーダーで経時的かつ精密に測定できるため、医学・生物学・化学などの学問分野や、液晶・半導体などの産業分野においても応用・研究が行われている。一般的なSPRセンサーは、化学的不活性、SPRスペクトルの発生効率の良さから、ガラス基板に蒸着した金の薄膜を採用している。我々の研究においても、1 nmのクロム薄膜を被覆後、49 nmの金薄膜を形成したガラス基板を基本的なSPRセンサーとして用いている。

本研究では、医療用チタンにおける表面での生体物質の相互作用をnmオーダーで解析するモデル

として、チタンSPRセンサーの設計・開発を行った。チタンは casting 後、大気中で表面が酸化される。チタンSPRセンサーも同様に、大気中で表面の金属チタンを酸化させた。これにより、医療用チタンとチタンSPRセンサー表面は同じ状態になると予想される。

真空蒸着で作製したチタン表面は大気中で容易に酸化される。チタンが二酸化チタンになると密度は 4.6 g/cm^3 から 4.0 g/cm^3 へと変化し、これにより膜厚は約1.9倍増加すると考えられる。すなわち、チタン表面が 10 \AA 酸化されると、 19 \AA の酸化チタン層が生じると考えられる。チタンSPRセンサーを設計するために、ベースの金SPRセンサーにチタンを被覆した場合のSPRスペクトルの解析を行った。すると、チタンを 50 \AA 被覆した表面の場合、チタンが酸化するほどSPRスペクトルのピークが鋭くなることが示された。また、チタンを $100, 200 \text{ \AA}$ 被覆した表面の場合では、チタンが酸化してもSPRスペクトルのピークは余り鋭くなく、またSPR角度もかなり高角度側に生じた。タンパク質吸着量はSPR角度の増加と関係することから、SPR角度が高角度側にあることは測定にとって不利となる。よって、これらのシミュレーション解析によりSPRセンサーに被覆するチタンの厚さは 50 \AA が優れていることがわかった。この結果より、 50 \AA のチタンを被覆したSPRセンサーを製作した。

チタンSPRセンサーはシミュレーション設計だけでは実際の表面の酸化被膜の厚みを求めることはできない。そのため、酸化被膜厚は実際に作製したチタンSPRセンサーから求める必要がある。図1は 50 \AA の厚さのチタンを蒸着したSPRセンサーのPBS中におけるSPRスペクトルを示している。酸化被膜の厚さは、測定したSPRスペクトルと計算で求めたSPRスペクトルを比較することにより求めた。図中の点線は、チタンが 7 \AA 、二酸化チタンが 76 \AA の厚さの時のSPRスペクトルの計算結果を示している。これより、このチタン表面は $70\text{--}80 \text{ \AA}$ 近傍の厚さの酸化被膜を有していると考えられる。

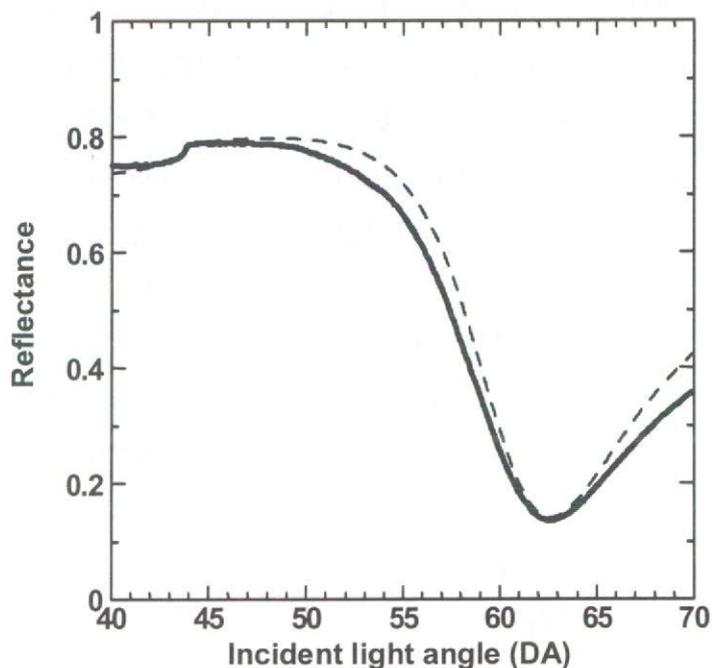


図1 5nmのチタンを被覆したSPRセンサーのSPRスペクトル。実線は測定値、破線は計算値。

3. チタンSPRセンサーのタンパク質感度特性

SPR測定において、表面へのタンパク質吸着量変化は、SPR角度変化より求めることができる。図2はタンパク質がチタンSPRセンサーに吸着したときのSPRスペクトルの変化をシミュレーションした結果を示している。図に示すようにタンパク質が $0, 5, 10 \text{ ng/mm}^2$ とチタン表面に吸着するにつれ

てSPR角度が62617, 63860, 65101 mdegと変化した。このように、SPR角度の変化は表面に吸着したタンパク質の量と関係がある。ある程度の範囲内において、SPR角度変化量とタンパク質吸着量は直線的に比例し、チタンSPRセンサーにおいて以下の関係式が成り立つ。

$$4.02 \text{ (pg/mm}^2\text{mdeg)} \times \text{SPR角度変化量 (mdeg)} = \text{タンパク質吸着量 (pg/mm}^2\text{)}$$

SPR角度は、mdegオーダーで測定することが可能であることより、このチタンSPRセンサーのタンパク質吸着量の感度は原理的には、ピコグラムオーダーであると考えられる。

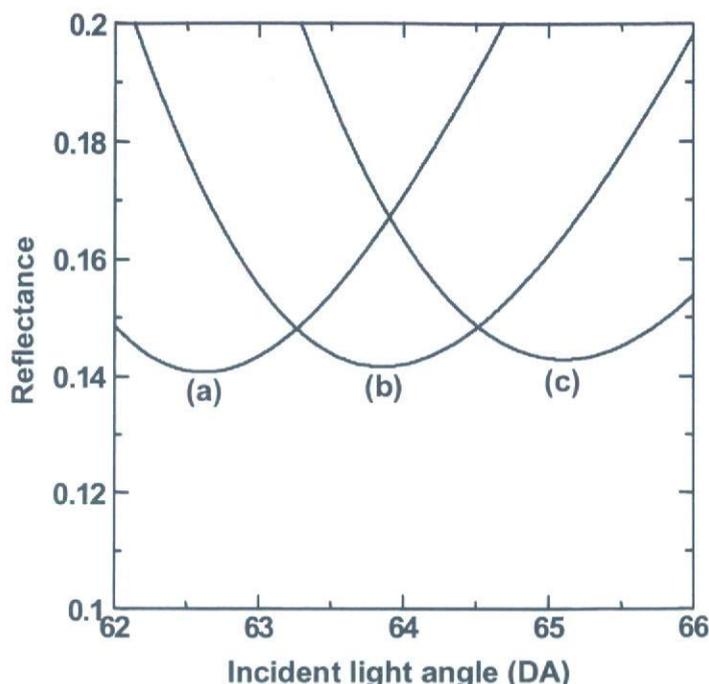


図2 チタンSPRセンサーへのタンパク質吸着に対するSPRスペクトルのシミュレーション。タンパク質の吸着量は (a) 0, (b) 5, (c) 10 ng/mm²

4. チタン表面への分子吸着測定

本研究において設計・開発したチタンSPRセンサーは、チタン表面と生体分子との相互作用を経時的に測定することを目的としている。そこで実際にこのセンサーを用いて、チタン表面への様々なタンパク質の吸着量の測定を行った。この実験に用いたalbumin、 γ -globulin、bFGFの分子量、pI、チタン表面への吸着量を表1に示す。タンパク質溶液の濃度が2 μ g/mlと同じにもかかわらず吸着量に差が出たのは、分子量、pIの差によると考えられる。pH 7.4のPBS中において、チタン表面は負に、 γ -globulinは若干負に、albuminは負に、bFGFは正に帯電している。このことより、 γ -globulinは3つのタンパク質の中でもっとも分子量が大きいことから、このチタン表面に2.85 ng/mm²と一番多く吸着したと考えられ、Albuminはかなり負に帯電していることから、吸着量が0.85 ng/mm²と最小になったと考えられる。bFGFは分子量が γ -globulinと比較して10分の1と小さいにもかかわらず、正に帯電しているため、吸着量が2.08 ng/mm²とアルブミンよりも多くなったと考えられる。

表1 タンパク質の分子量と等電点とチタン表面への吸着量

Protein	Molecular weight	Isoelectric point	Adsorption (ng/mm ²)
Albumin	69000	4.9	0.85 (0.15)*
γ -globulin	158000	5.8-7.3	2.85 (0.24)
bFGF	17000	10.1	2.08 (0.30)

*Standard deviation

また、チタン表面に陽イオン高分子であるポリエチレンジアミン (PEI) と陰イオン高分子であるポリアクリル酸 (PAAc)、そして両性イオン高分子であるゼラチンを吸着させて、その上にbFGFを吸着させると(図3)、どちらのPEIとゼラチンはチタン表面に吸着したが、PAAcは吸着しなかった。また、bFGFはPAAcとゼラチンでは吸着したが、PEIでは吸着しなかった。PBS中で、PAAcは負、PEIは正、gelatinは負に帯電する。このことから、PAAcはチタン表面に吸着せず、bFGFは負に帯電したチタン表面に直接吸着し、PEIはチタン表面に吸着するが、bFGFは正に帯電したPEI被覆表面とは吸着しないと考えられる。ゼラチンは正負どちらの官能基も有しているため、チタン表面とbFGFどちらも吸着できたと考えられる。

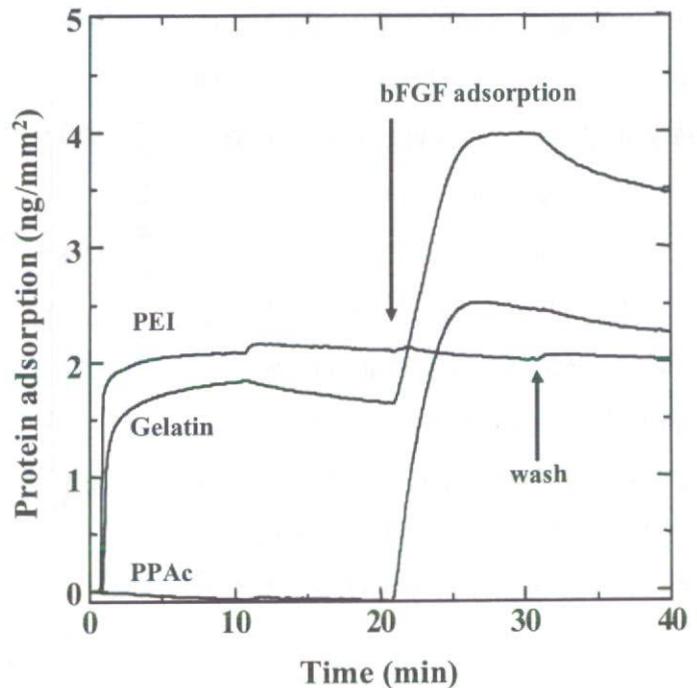


図3 チタン表面への水溶性高分子の被覆とbFGFの吸着

5. まとめ

二酸化チタンを表面に被覆したSPRセンサーは何例か報告があるが、本研究のように大気中で酸化させた金属チタンを表面に有するSPRセンサーの報告は全くない。二酸化チタンを表面に被覆する場合、被覆膜厚、表面の形状・状態を制御しやすく、また光学的にも安定である。それに対して、金属チタンを表面に被覆する場合、大気中で酸化したチタンの酸化数、水酸基の量、結晶構造、表面形状など、制御しがたい因子が多く、このため図2のように、計算値と実測値を厳密にすりあわせることができなくなる。このため、一般的なチタンセンサーは厳密に制御された二酸化チタンを表面に形成しており、大気中で酸化される金属チタンを表面に形成したセンサーの研究は行われなかったと考えられる。

このように、光学・工学的な分野では二酸化チタンSPRセンサーの方が有利ではある。しかし、医学・歯学の分野では人工歯根・人工骨など大気中で酸化された金属チタン表面での生体分子の相互作用を求める必要性があるため、本研究のチタンSPRセンサーの方が有利となると考えられる。本研究で設計・開発・評価を行ったチタンSPRセンサーはnmの領域でのチタン材料の生体適合性の研究に非常に重要な役割を果たすと期待できる。