

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

ゾウリムシのX線顕微鏡による観察—CT観察及び元素分析

研究協力者 矢田慶治、東北大学名誉教授
研究協力者 安倍大樹 石巻専修大学理大学院博士コース学生
分担研究者 芳賀信幸 石巻専修大学理教授

研究要旨 分解能が0.1ミクロン程度のX線顕微鏡でゾウリムシを観察し、在来行われてきた光学顕微鏡および走査電子顕微鏡(SEM)による知見との比較研究を行ってきた。試料は通常の方法で培養したゾウリムシをオスミウム酸固定後凍結乾燥したものである。前年度までに明らかになった特徴的なことを列挙する。(1)自然乾燥試料のX線像はきわめてコントラストが悪く、1.04 nmのL α 線を出すGeターゲットを使って僅かに内部構造及び繊毛を認めることが出来た。(2)グルタルアルデヒド若しくはオスミウム酸で固定後臨界乾燥や凍結乾燥をした試料では、形態がよく保存され、SEMで網目状表面構造、繊毛等が綺麗に観察された。(3)これら固定を試料のX線像ではコントラストが向上し、特にオスミウム酸固定ではAuターゲットを使用しても十分な程度のコントラストがつく。(4)X線像では体表面の網目構造及び繊毛にコントラストがあまりつかないが、それに代わってオスミウム酸固定の場合には特に、光学顕微鏡では観察できないトリコシスト(毛胞)と思われる構造が見られた。(5)X線像で内部器官の存在が明確に認められた。本年度ではCT観察と元素分析を行い、(a)CT断層像でゾウリムシの内部器官が現れては消えて行く様子を観察できた。(b)元素分析はEDSを用いたが、Si, Os, Pのピークが現れるのが殆どであった。Osは固定剤からのもの、Pは核酸からのものと考えられるので残りの大部分はSiであることが判った。AgとCo-ferriteのナノ粒子の懸濁液で処理した試料ではそれらが個体内部に取り込まれている明確な証拠を得ることが出来なかった。

A. 研究目的

前年度までの研究で、投影型のX線顕微鏡でゾウリムシを観察し、固定、凍結乾燥など試料の作製法が適切であれば、内部構造が良く保存され、今まで光学顕微鏡では観察できなかったトリコシスト(毛胞)なども観察できることを報告した[1]。ここでは、その後に行ったオスミウム酸固定の試料について行ったCT観察と元素分析の結果について述べる。

B. 研究方法

(a) CT 観察 用いた試料は、オスミウム酸固定後

厚さ3ミクロンのマイラー膜に載せてトブチルアルコール置換凍結乾燥をしたものである。これをCT装置のTohken-Skyscan 2011を用いてCT像を撮影した。撮影に当たっては、0.8度の角間隔で回転し、185度に渡って231枚の投影像が得られた。これらの像についてCT像の計算を行い、250nmの厚さの断層像572枚を得た。図1は、それらの断層像のうち、それぞれ220, 250, 270, 290番目の断層像を示す。内部構造の見え方が次第に変わり、大核(Mac)やvoidが現れては消えていく様子が見られる。図2は、在来

想定されていた内部構造のイラスト (a)、内部構造が良く見える断層像 (b)、X線投映像 (c) を比較して示す。内部器官がかなり良く対応が見つかることが知られた。

(b) ゾウリムシ個体の元素分析

ゾウリムシをAg及びCo-ferriteのナノ粒子の懸濁液に入れた場合にそれらのナノ粒子が個体内に取り込まれるかどうかを確認することは重要である。このためEDS (Energy dispersive spectroscopy) を備えたSEMで観察を行った。図3は、Co-ferrite (平均粒径 300 nm) 懸濁液に30分漬けてからオスミウム酸固定後凍結乾燥した試料のSEM像とX線像である。個体Bは一部体表面がめくれ内部が見えている。それを図4のステレオ写真で示す。内部の大核が立体的にしかもスパイラル状に巻いて見える。同時に、非常にコントラストの強い小さい粒子が多数見える。これらがどのような元素から成るかをEDSで調べたのが図5である。SEM像は同一部位であるが、機種が違うのでコントラストが違って見えている。このうち4箇所について元素分析を行ったが下に示したようなほぼ同じSi, Os, Pのスペクトルが得られた。Osは固定剤からのもので、Pは少量であるが、核酸からのものと考えられる。驚いたことに大部分がSiから成り立っている。勿論C, Oも多く含まれているはずであるが、用いた装置では検出されない。他の幾つかの個体についても調べたが、Siが大部分で、その他にAlとCuが検出されたものがあった。Co-ferrite懸濁液につけた試料で試した今度の結果では個体内にCoのスペクトルが4箇所とも得られなかった。

尚、ここで用いた写真上の記号は、下記の意味で使われた。Mc:macronucleus (大核), c:cilia (繊毛), v: vacuole (空胞), t:trichocyst (毛胞)。

C. 考察及び結論

最近の高分解能CTX線顕微鏡でオスミウム酸で固定後凍結乾燥をしたゾウリムシを観察した結果、CT断層像でゾウリムシの内部器官が現れては消えていく様子を詳細に観察できることが判った。まだ観察例が極めて少ないが、観察例を増す事によって内部器官の形状をより明確化することが出来るであろう。

ゾウリムシ個体の元素分析はあまり例が無いように思われるが、今回の結果では、Si, Os, Pが定期的に見出された。他にC, Oがあると思われるが、使用した装置では検出されない。Osは固定剤からのもので、Pは少量で大核内の核酸からのものと思われる。残るSiが極めて大きな比率を占めていることは大きな驚きであった。SiO₂なのかその他の化合物なのか現状では不明である。その他に、AlやCuが検出された例があるが、今のところ、成分が不純物かは不明である。

Ag若しくはCo-ferriteのナノ粒子懸濁液を作用させたゾウリムシは繊毛が抜けるなどの形態的な変化を示すことを以前の実験で見出したので[1]、それらのナノ粒子が個体内に取り込まれているどうかを確かめようとしたが、十分な観察例が無くまだ結論を出すにいたっていないがステレオ写真の観察からは特に微小な粒子は個体内に取り込まれているように見えるものもあった。

生きたゾウリムシの動的観察は、液体の中でのゾウリムシの動きを少なく抑える方法があると聞くので、固定剤によるコントラストの付加は望めないがGeターゲットで波長10.4nmのX線が利用できるので、可能性があると思われる。今後に残された大きな課題である。

今回述べた実験結果の(a)のCT観察の結果は「ナノトキシコロジーアセスと微粒子・ナノチューブのバイオ・環境応用」国際シンポジウムで発表された[1]。(b)の元素分析はそれ以後の新しい結果である。この元素分析を東北大多元物質研究所技官釜谷隆氏にいただいた。記して謝意を表す。

D. 研究発表

1. 論文発表

1. K. Yada, T. Abe and N. Haga, "Studies of *Paramecium caudatum* by means of scanning electron microscope and projection X-ray microscope" Bio-Medical Materials and Engineering, 1-6 (2009) in press

2. 学会発表

なし

E. 知的所有権の取得状況

なし

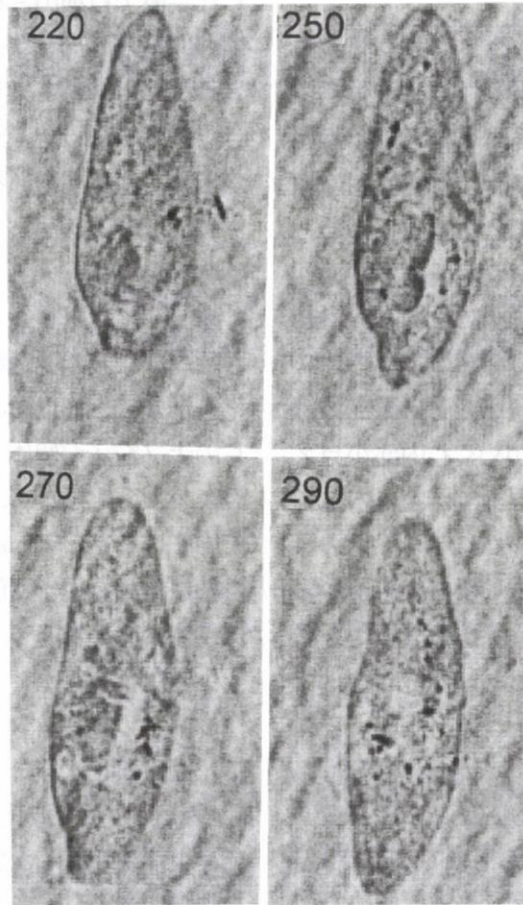


図 1

paramecium
 A oral groove;
 B cilia;
 C nucleus;
 D contractile
 vacuole;
 E food
 vacuole

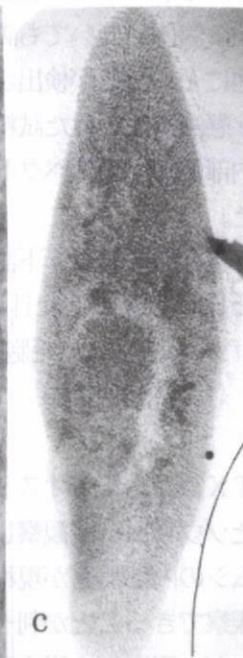
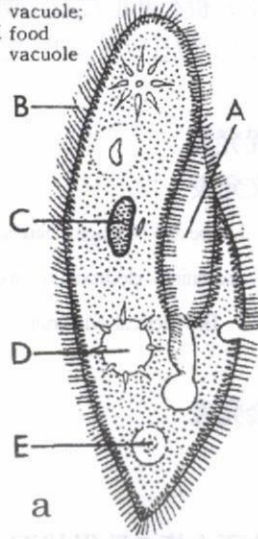


図 2

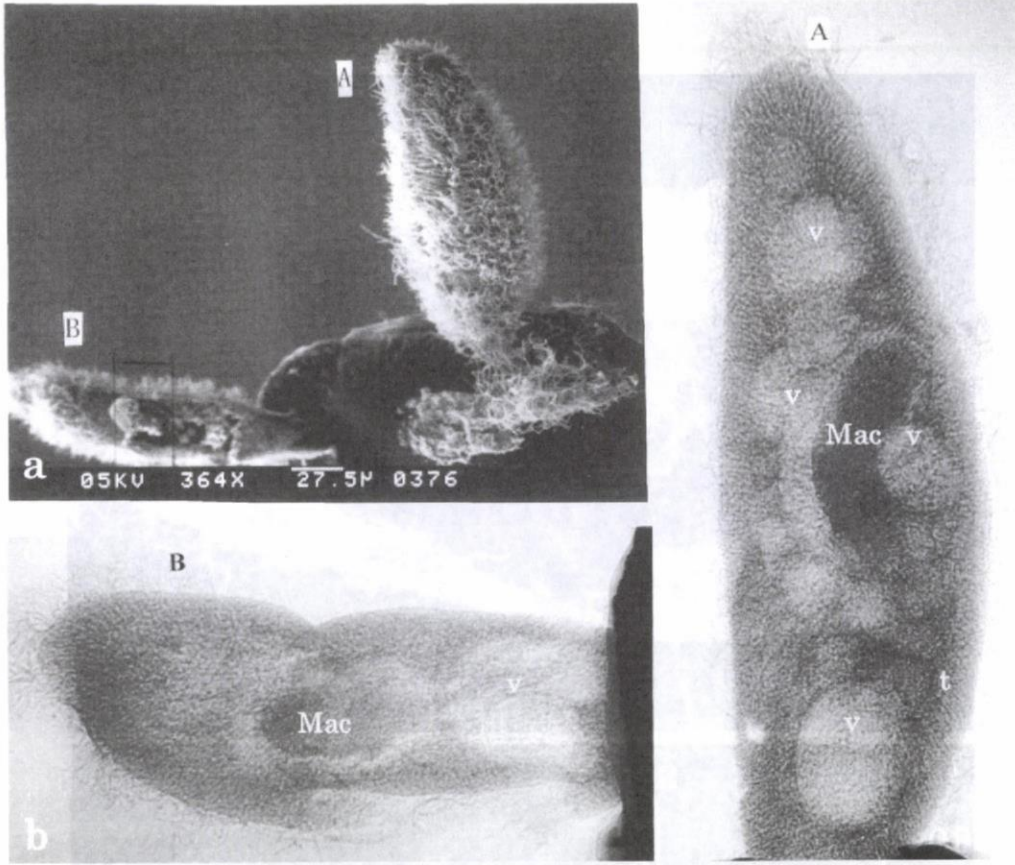


图 3

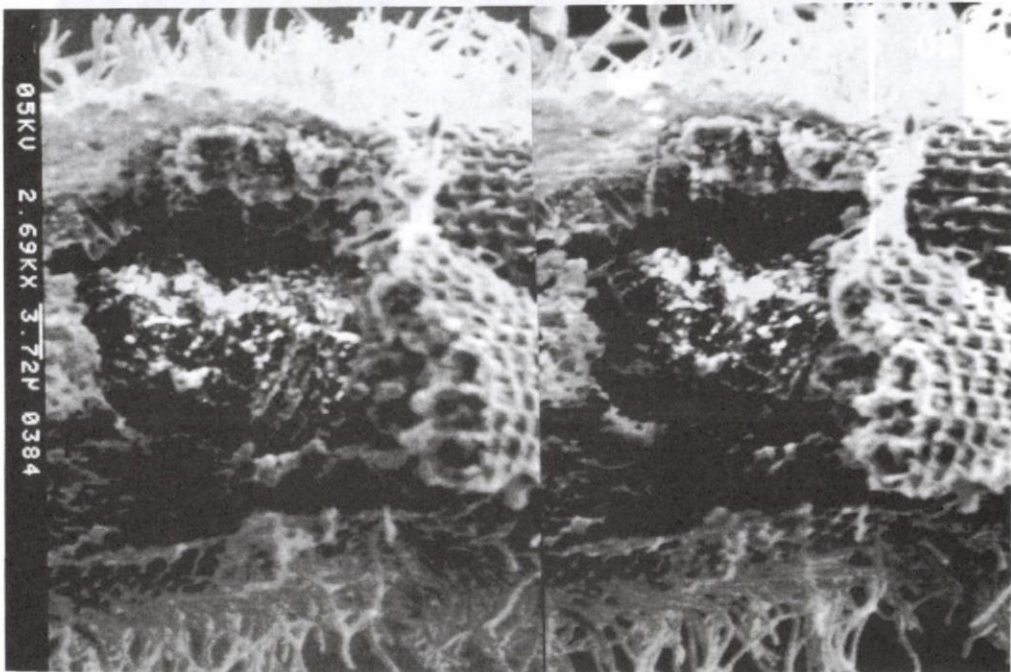


图 4

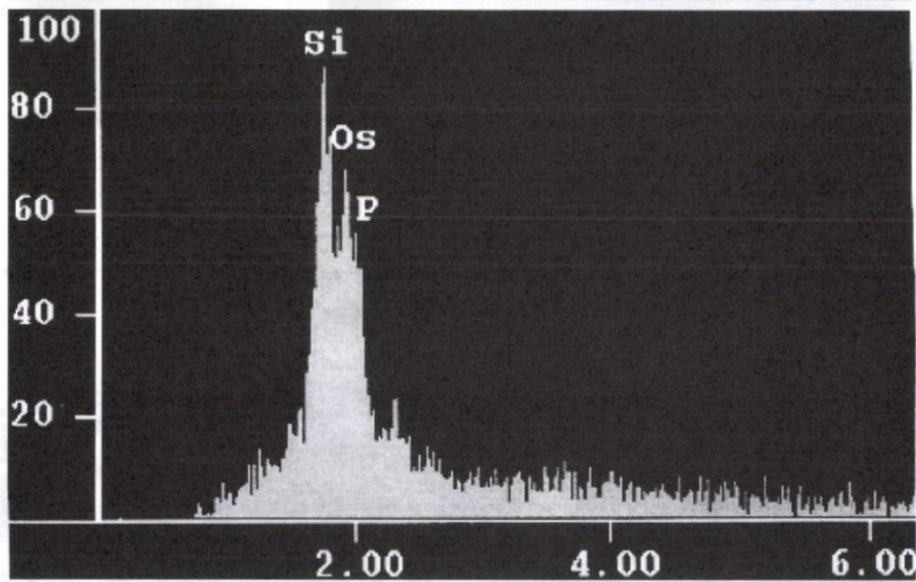
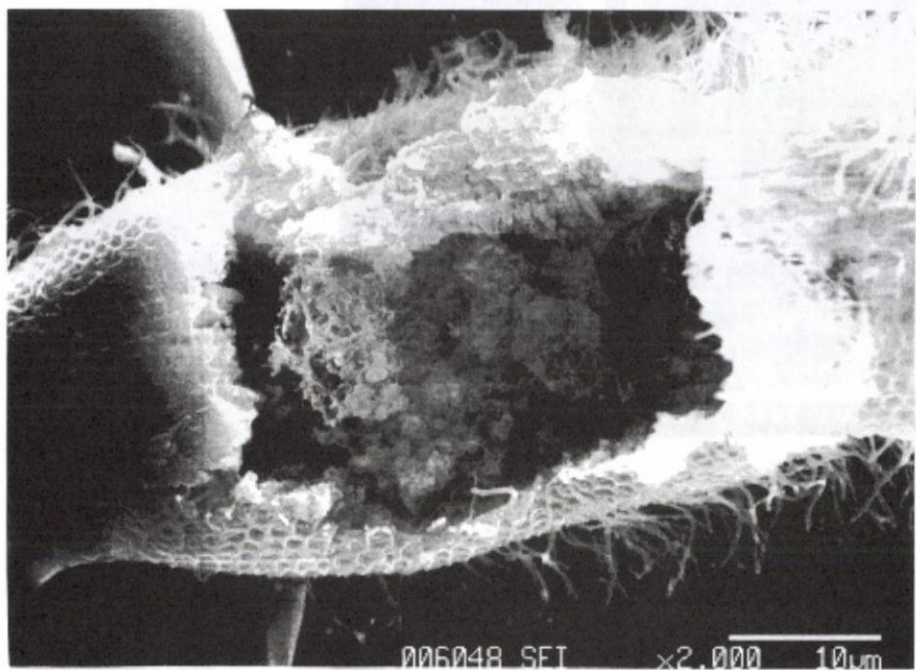


图 5

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

細胞培養におけるカーボンナノチューブ膜の影響

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
分担研究者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助教
研究協力者	阿部勲明	北海道大学歯学研究科助教

研究要旨 本研究においては、ナノ微粒子としてカーボンナノチューブを取り上げ、細菌として *S. mutans* との相互作用および SaOs-2 を主体とした各種細胞培養への影響を検討した。

S. mutans とカーボン材料での沈降実験では、ナノサイズ効果および凝集能力により 30-MWNTs が最も沈降率が高かった（低濃度 0.17mg/ml において、活性炭の約 8 倍の沈降率）。また、細いナノチューブ（SWNT, 30-MWNTs）においては、新規な捕捉様式である細菌表面に彎曲しながら絡みつく様子が観察された。以上の結果より、カーボンナノチューブを経口投与した場合には、口腔内細菌や腸内細菌とも相互作用する可能性が示された。

細胞培養へのカーボンナノチューブコートの影響を検討した結果、細胞種による効果の程度はあるもののカーボンナノチューブコートは各種細胞の細胞増殖を促進させた（SWNT において SaOs-2 は 1.2 倍、HeLa は 1.3 倍の促進）。また、今回検討した細胞種においては、MWNTs よりも SWNTs の方がより細胞増殖を促進することが明らかとなった。以上より、カーボンナノチューブを基材表面にコートした場合、強い毒性を示さず、逆に細胞増殖に対し良好な効果を示すことが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、最も注目されている材料の 1 つにカーボンナノチューブ（CNT）が挙げられ、エレクトロニクス分野やエネルギー分野を中心に集中的な研究が進行中である。一方で、CNT のバイオ分野への応用研究も開始されており、AFM の探針、タンパク質の結晶化、バイオセンサーへの応用が注目を集めている。

本研究ではナノ微粒子としてカーボンナノチューブを取り上げ、体内との初期接触の際に重要となる細菌との相互作用を検討した。そこで口腔内細菌の一つである *Streptococcus mutans* を選び、沈降および捕捉挙動を検討することとした。

また一方で、我々の研究グループでは、世界に先

駆けカーボンナノチューブ膜を細胞培養のスクアールドとして使用し、骨芽細胞様細胞（SaOs2）の培養を検討したところ、①良好な細胞増殖、②強い細胞接着、③細胞の進展、④トリプシンによる細胞剥離の耐性、⑤細胞の仮足とカーボンナノチューブの絡み合い、⑥アルカリフォスファターゼ活性の向上など興味ある特性を見出した。以上の細胞培養におけるカーボンナノチューブの特性は本来の利点や特性の一部であると推測され、カーボンナノチューブの毒性とともにさらなる詳細な検討が望まれている。本研究では、カーボンナノチューブ薄膜を作製し、表面形状および骨芽細胞様細胞（SaOs-2）または他種の細胞を用いて細胞培養に対するカーボンナノチュ

ープの影響を検討した。

B. 研究方法

カーボンナノチューブは、精製度の高い単層カーボンナノチューブ（純度 90%以上、名城ナノカーボン製 FH-P）および 6N 塩酸にて精製した直径約 30nm 多層カーボンナノチューブ（純度 80%以上、NanoLab 製、30-MWNTs）、直径約 200nm 多層カーボンナノチューブ（MTR Ltd., 200-MWNTs）を使用した。粒径約 20・m の活性炭素（関東化学社製）を選択し、塩酸処理により触媒を除去精製した。その後、60℃にて乾燥させた後、除菌および殺菌効果の検討に使用した。

う蝕の原因菌の一つとして *Streptococcus mutans* JC2 をハートインフュージョン (HI) 液体培地にて増殖させ、遠心集菌し、 1.4×10^8 CFU の懸濁液を作製した。

菌懸濁液に対して一定の濃度 (0.1mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml) の CNT 分散液をそれぞれ添加し、攪拌 (200rpm、5min)、遠心分離 (700rpm、20分) を行った。その後、上澄液を採取し、UV-vis 吸光度測定器にて濁度 (700nm) を測定した。次に、相互作用の観察のため、上澄み液はスライドガラス上に滴下し風乾させ、沈降物は、通法に従い 2.5% グルタルアルデヒドによる固定、段階脱水、臨界点乾燥後、走査型電子顕微鏡 (SEM Hitachi S4000) にて観察した。

カーボンナノチューブ薄膜は、CNTs 分散液を 6cm のポリスチレンディッシュ (for suspension culture, Corning 社製) に薄層コートし作製した。その後、乾燥、UV 滅菌し培養に使用した。

ヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞である SaOs-2 を用い、DMEM に 10%FBS および 1%PSN を添加した培地にて、37℃で 5%CO₂ 環境下にて増殖させ、対数増殖期にある細胞をトリプシン処理により回収し、細胞接着および細胞増殖試験に使用した。その後、同様な条件下にて培養した。

細胞増殖試験は、カーボンナノチューブ薄膜に対して、SaOs2 細胞 (1,000 個/cm²) を播種し、DMEM に 10%FBS および 1%PSN を添加した培地にて、37℃で 5%CO₂ 環境下にて所定時間培養を行った。その後、PBS にて洗浄し、グルタルアルデヒドによる固定を行い、付着している細胞数を測定した。

細胞数は光学顕微鏡 (ギムザ染色) にてのカウン

トにより行った。

細胞形態の観察には、培養後、PBS にて洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド、オスミウム酸による二重固定した。その後、エタノールによる段階的脱水を行い、臨界点乾燥にて乾燥させた。走査型顕微鏡にて観察するため、Pt-Pd により表面コートした。

また、多種の細胞の影響を検討するため、MC3T3-E1 (マウス頭蓋骨骨芽細胞)、ST2 (マウス骨髄間葉系幹細胞)、RPC-C2A (ラット歯髄細胞株)、KB (口腔扁平上皮がん)、HeLa (ヒト子宮頸部類上皮がん)、HEK293 (ヒト胎児上皮細胞)、NIH-293 (マウス胎児皮膚繊維芽細胞) を用い、個々の適切な細胞培養条件下にて培養し、増殖細胞数を測定した。

(倫理面への配慮)

なし

C. 研究結果

CNT および活性炭の *S. mutans* に対する沈降挙動を比較した結果 (図 1a と b)、添加したいずれのカーボン材料も濃度が濃くなるに伴い上澄み液の吸光度が低下した。また、使用したカーボン材料の中では、直径 30-MWNTs が最も効率よく上澄みの吸光度を低下させ、特に低濃度 (0.17mg/ml) において、約 80% の吸光度の低下が観察された。

上澄み中における *S. mutans* およびカーボン材料の状態を観察した結果 (図 2)、コントロールの PBS 添加系に比較し、いずれのカーボン材料においても吸光度の減少に対応した、菌の存在が確認された。また、200-MWNTs および活性炭においては、上澄み中に一部の沈降せずに浮遊しているカーボン材料が認められた。

次に、上澄み液中の生細菌数を測定したところ (図 3)、SWNTs や活性炭より MWNTs が高く、30-MWNT および 200-MWNT では、それぞれ 92% および 96% の減少率であった。

続いて、相互作用の検討のため沈降物の SEM 観察を行った (図 4)。その結果、活性炭では粒子状の表面に細菌が付着するのに対し、SWNT および 30-MWNTs では、菌体の表面に対し彎曲しながら絡みつく様子が観察された。一方、200-MWNTs ではナノチューブの繊維上に沿う形で接触している様子が観察された。

次に、カーボンナノチューブ薄膜の走査型電子顕

顕微鏡による観察およびAFMによる表面粗さ(Ra)の結果(図5)を示した。走査型電子顕微鏡観察では、カーボンナノチューブ薄膜であるSWNT0.5(0.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)は表面にカーボンナノチューブバンドルのネットワークを形成するコート量であるのに対し、SWNT5(5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$)はほぼ一面が覆われるコート量であった。表面粗さはいずれも約7nmおよび16nmであった。AFMによる表面性状の観察の結果(図6)では、SWNT5コート表面は平滑な表面(Ra = 16nm)を示すのに対し、MWNT5コートは、比較的粗い表面(Ra = 45nm)を示した。

SWNT-coated dish 上にて、SaOs-2 を培養後 SEM 観察を行った結果(図7)、細胞の義足がカーボンナノチューブネットワークの上に接触している様子が観察された。各種細胞種による違いを検討した結果(図8)、カーボンナノチューブコートによりほとんどの場合にて細胞増殖率の向上が観察された。また、その効果は、細胞種に大きく依存し、SaOs-2、HeLa、HEK293、NIH-3T3 では、市販細胞培養用ディッシュよりもSWNT-coated dishの方が高い増殖率を示した。傾向として、MWNTsよりもSWNTsの方が、増殖率を向上させる効果が高かった。

D. 考察

生体にカーボンナノチューブを投与した際に、接触することが予測される細菌との相互作用を検討のため、*S. mutans* に対する沈降および相互作用の様子を観察した。*S. mutans* と各種カーボン材料を混ぜ、沈降を検討した結果、いずれのカーボン材料の添加量の増加に従い、菌の沈降量も増加した。これらのことは、主にファンデルワールス力により菌体と付着し、凝集体を形成することで沈降したものと考えられる。30-MWNTs および200-MWNTs では、さらにナノサイズの効果により凝集が促進したものと考えられる。また、200-MWNTs や活性炭では一部が沈降せずに浮遊する減少が観察され、菌の沈降量を減らす原因に寄与していると考えられた。一方、SWNTs の場合、凝集力が強すぎるため菌との相互作用する以前にSWNTs 同士による凝集体形成が起こるためと考えられる。

これらカーボン材料による *S. mutans* の捕捉様式を観察するため、凝集体のSEM観察を行った。活性炭の場合は20 μm 粒子表面に付着しているのに対し、

SWNTs や30-MWNTs では菌体表面に彎曲している様子が観察された。このような彎曲した捕捉様式は、200-MWNTs では観察されないことより、細いナノチューブの持つ柔軟性によるものと考えられる。この柔軟性による細菌の捕捉は、ナノサイズの効果であると考えられ、捕捉後の細菌の生育や除法に影響すると考えられる。

以上の結果より、カーボン材料はいずれも細菌を沈降させる機能があるが、適度な分散性およびナノサイズを持つことにより30-MWNTs が強い沈降活性を示すことが判明した。また、細い直径をもつSWNTs や30-MWNTs では、直径200nmのMWNTs やマイクロサイズを持つ活性炭では発現しなかった彎曲しながら捕捉することが判明した。

次に、ナノ微粒子のひとつとしてカーボンナノチューブを選び、細胞毒性を検討することとした。本研究では、カーボンナノチューブを表面コートした状態での影響を検討するため、カーボンナノチューブコートディッシュを作製し、各種細胞培養へ与える影響を検討した。CNT-coated dish の表面形状をAFMにて観察した結果(図5)より、SWNT-coated dish の表面粗さは、16nm以下と平坦であった。このことは、細胞培養への粗さの影響を低減できる材料と考えられる。一方、MWNT-coated dish 表面(図6)は、45nm以下と比較的平坦であるもののSWNTと比較するとより粗い表面を示した。このことは、SWNTよりもMWNTの方が剛直であり、MWNTコートした表面により、細胞培養へより大きく凹凸の影響が出る可能性を示していると推測される。

各種細胞を用いて、増殖率の比較を行った結果(図8)、カーボンナノチューブコート基材はコートしていない基材に比べ明らかな増殖率の向上が観察された。カーボンナノチューブコート自体は細胞の増殖率に対しプラスに働く、細胞に対して強い毒性を示さないことが分かった。また、SWNTコートの方がMWNTコートよりも増殖率を向上させた。これはSWNTの持つタンパク吸着能力や平坦性が影響しているものと考えられる。しかしながら、その効果は細胞の種類により大きく影響した。このことよりある一定の培地条件において、細胞が求める足場材料の因子(タンパク吸着性、濡れ性、表面粗さなど)がそれぞれの細胞で異なり、そのためSWNTやMWNTコートに対する応答が異なったものと考えられる。今後は、

より多くの細胞種での検討や CNT コートの種類を増やし細胞増殖を検討するとともに、CNT が細胞増殖を促進する機構の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

本研究においては、ナノ微粒子としてカーボンナノチューブを取り上げ、細菌として *S. mutans* との相互作用および SaOs-2 を主体とした各種細胞培養への影響を検討した。

S. mutans とカーボン材料での沈降実験では、ナノサイズ効果および凝集能力により 30-MWNTs が最も沈降率が高かった（低濃度 0.17mg/ml において、活性炭の約 8 倍の沈降率）。また、細いナノチューブ（SWNT, 30-MWNTs）においては、新規な捕捉様式である細菌表面に彎曲しながら絡みつく様子が観察された。以上の結果より、カーボンナノチューブを経口投与した場合には、口腔内細菌や腸内細菌とも相互作用する可能性が示された。

細胞培養へのカーボンナノチューブコートの影響を検討した結果、細胞種による効果の程度はあるもののカーボンナノチューブコートは各種細胞の細胞増殖を促進させた（SWNT において SaOs-2 は 1.2 倍、HeLa は 1.3 倍の促進）。また、今回検討した細胞種においては、MWNTs よりも SWNTs の方がより細胞増殖を促進することが明らかとなった。以上より、カーボンナノチューブを基材表面にコートした場合、強い毒性を示さず、逆に細胞増殖に対し良好な効果を示すことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Akasaka T, Watari F Capture of bacteria by flexible carbon nanotubes, *Acta Biomaterialia*, 5: 607-612, 2009.
2. Akasaka T, Yokoyama A, Matsuoka M, Hashimoto T, Abe S, Uo M, Watari F, Adhesion of human osteoblast-like cells (Saos-2)

to carbon nanotube sheets, *Bio-Medical Materials and Engineering* 2009, in press.

3. Akasaka T, Nakata K, Uo M, Watari F, Modification of the dentin surface by using carbon nanotubes, *Bio-Medical Materials and Engineering* 2009, in press.

2. 学会発表

1. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 亘理文夫, “単層カーボンナノチューブ透明導電性薄膜上での骨芽細胞様細胞の培養”, 第 51 回日本歯科理工学会学術講演会要旨集, P168 神奈川, 鶴見大学 2008
2. 赤坂 司, 阿部薫明, 宇尾基弘, 亘理文夫, “単層カーボンナノチューブ透明導電性薄膜上での細胞培養”, 第 52 回日本歯科理工学会学術講演会要旨集, P392 大阪, 千里ライフサイエンスセンター 2008
3. Tsukasa Akasaka, Atsuro Yokoyama, Makoto Matsuoka, Takashi Hashimoto, Shigeaki Abe, Motohiro Uo, Fumio Watari, “Human osteosarcoma cell adhesion onto carbon nanotubes sheets”, ISNT abstract, P37, Sapporo, Hokkaido university 2008.
4. Tsukasa Akasaka, Keiko Nakata, Motohiro Uo, Fumio Watari, “Modification of dentin surface by coating of carbon nanotubes”, ISNT abstract, P64, Sapporo, Hokkaido university 2008.
5. 赤坂 司, 横山 敦郎, 松岡 真琴, 阿部 薫明, 宇尾 基弘, 亘理 文夫, 佐藤 義倫, 田路 和幸, 橋本 剛, “カーボンナノチューブによる細菌吸着と細胞培養”, 厚労省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」H18-化学一般-006 第 5 回研究成果報告会 抄録集, P20 苫小牧, ホテル ニドム 2009

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案取得

なし

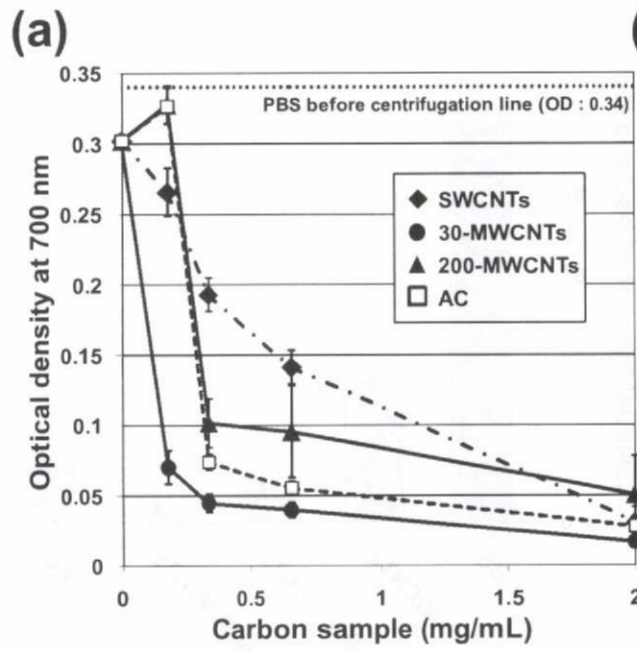


図1 *S. mutans* 懸濁液へのカーボン材料添加による沈降挙動

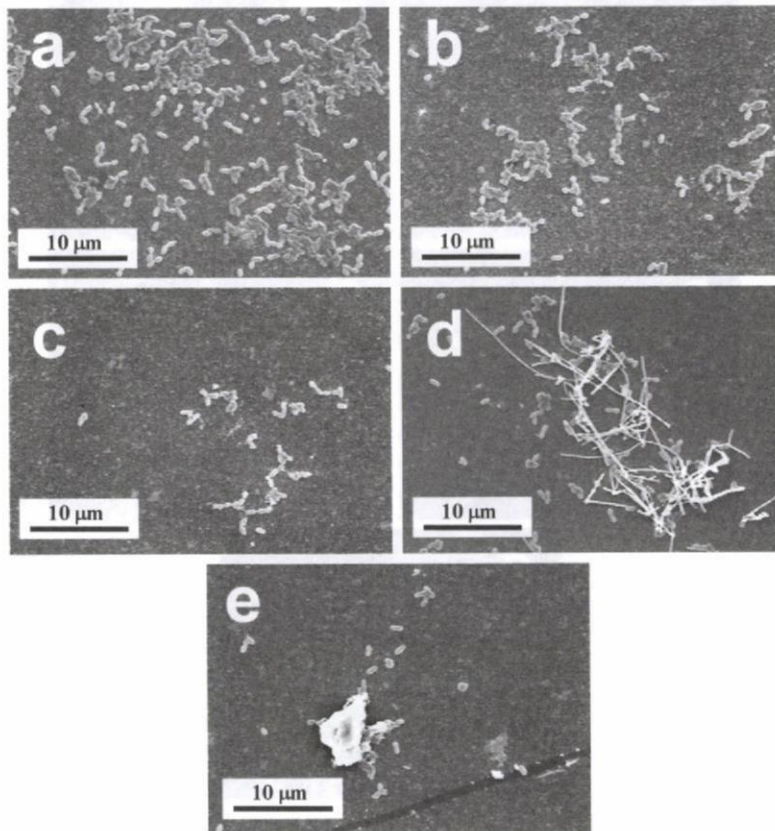


図2 *S. mutans* 懸濁液へのカーボン材料添加後の上澄み乾燥物の SEM 像
 (a) PBS、(b) SWNTs、(c) 30-MWNTs、(d) 200-MWNTs、(e) 活性炭

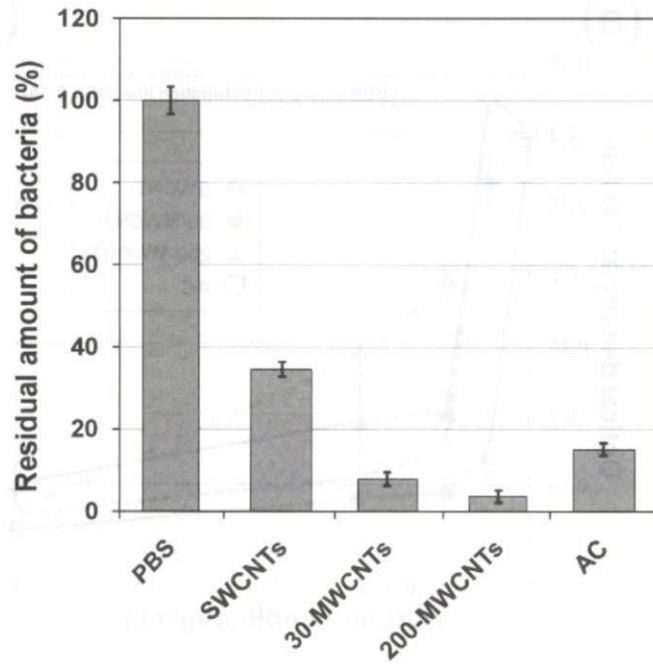


図3 カーボン材料添加後の上澄み中の *S. mutans* の生細胞数

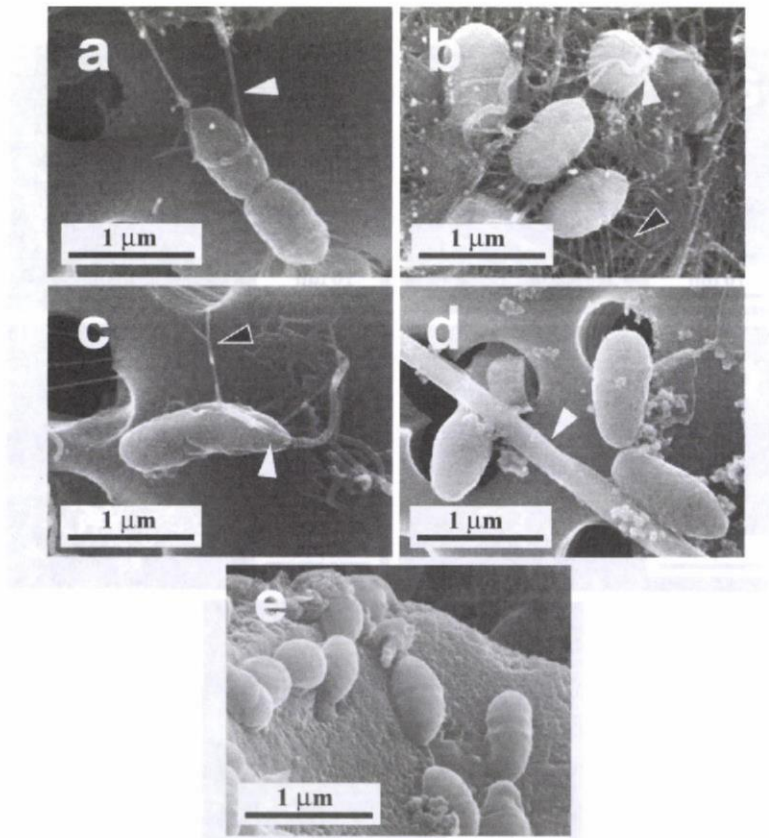
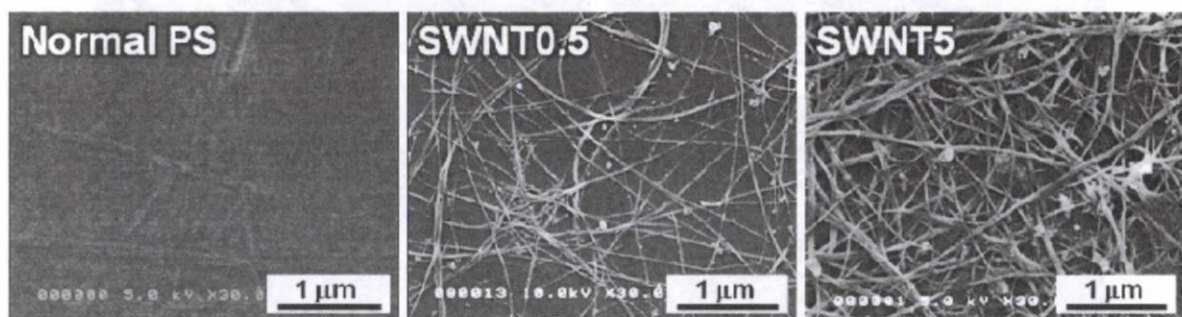


図4 カーボン材料添加後の沈降物のSEM像

(a, b) SWCNTs、(c) 30-MWNTs、(d) 200-MWNTs、(e) 活性炭



	Normal PS	SWNT0.5	SWNT5
$\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0	0.5	5
R_a (nm)	2.2 ± 0	7.1 ± 0.6	15.8

図5 カーボンナノチューブコートディッシュ表面のSEM像および表面粗さ (R_a)
 (左: 無処理ポリスチレンディッシュ Normal PS、中: SWNT-coated dish ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、
 右: SWNT-coated dish ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$))

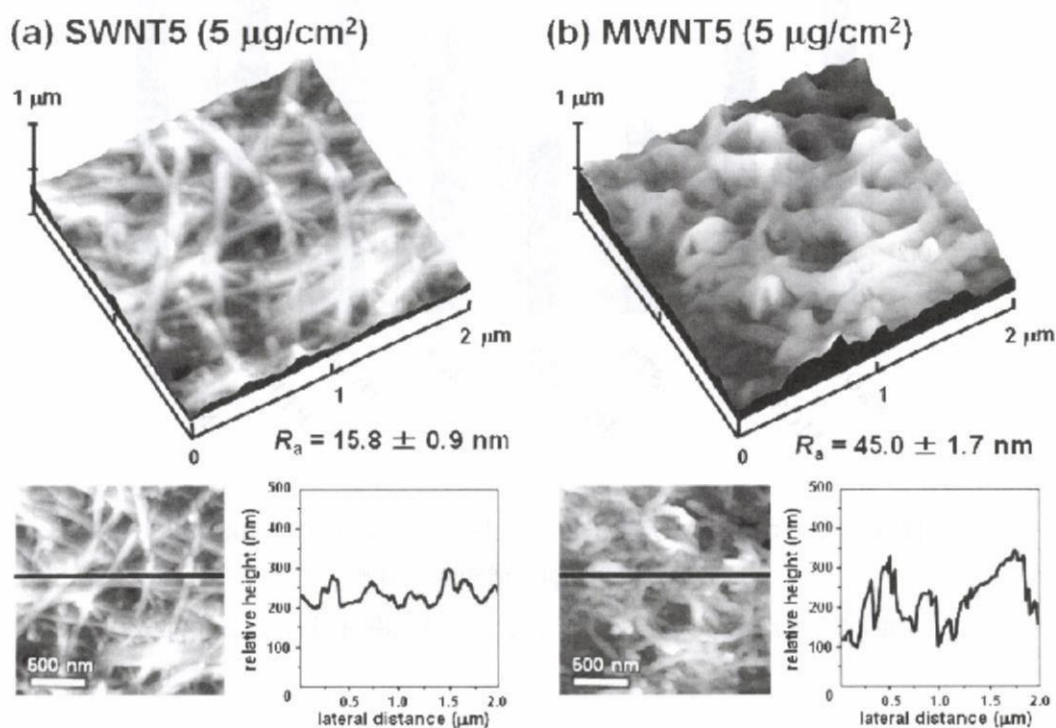


図6 カーボンナノチューブコートディッシュのAFM像
 (a) SWNT-coated dish ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)、(b) MWNT-coated dish ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)

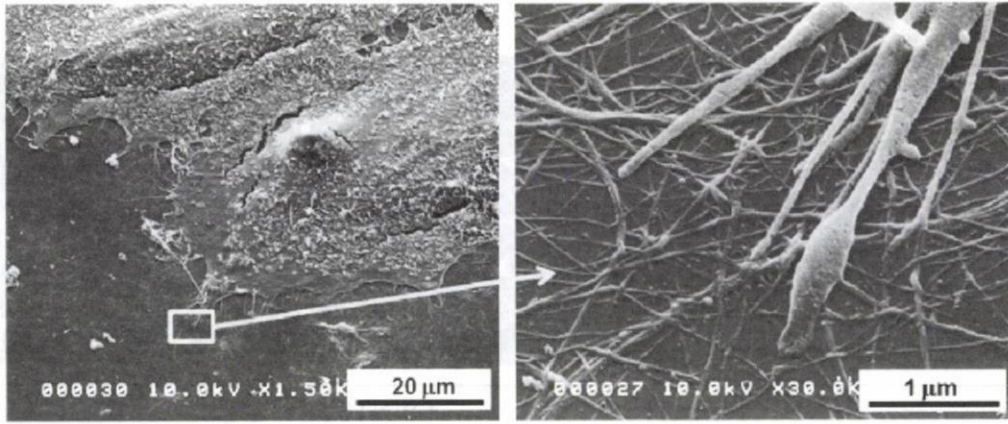


図7 単層カーボンナノチューブコートディッシュ ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 上での SaOs-2 細胞の SEM 像
(左：弱拡大像、右：強拡大像)

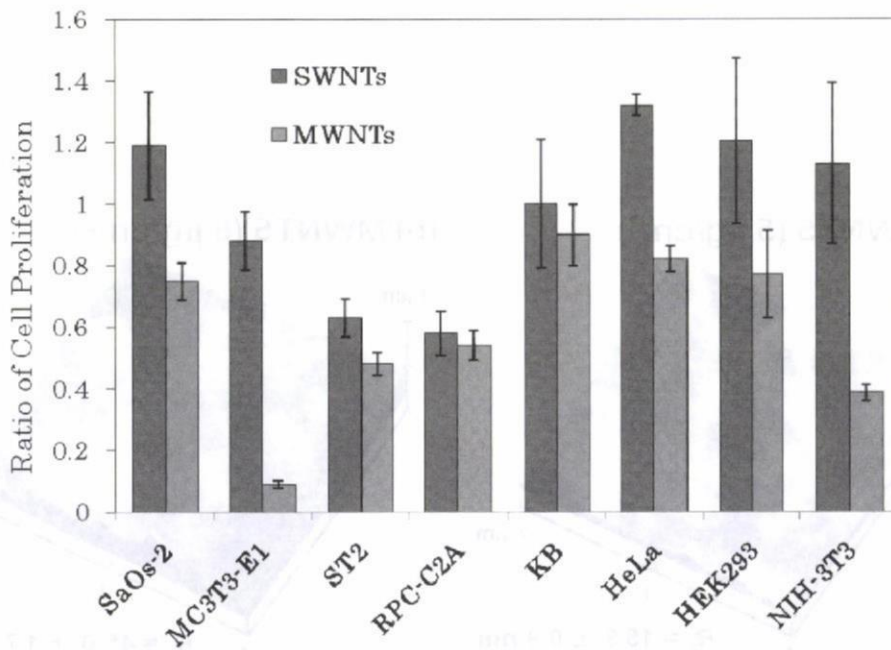


図8 カーボンナノチューブコートディッシュ ($0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) 上での各種細胞の増殖率の比較
(*細胞培養用ポリスチレンディッシュを増殖率を1として比較)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜と BMP を用いた異所性骨形成に関する
研究

主任研究者	亘理文夫	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	川浪雅光	北海道大学大学院歯学研究科教授
研究協力者	菅谷 勉	北海道大学大学院歯学研究科准教授
研究協力者	天雲太一	北海道大学病院保存系歯科医員

研究要旨 本研究では、ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜（nHAC）を用いて、ナノハイドロキシアパタイトの含有量の違いが BMP による骨形成に影響を与えるかを検討した。まず、ナノハイドロキシアパタイト(nHAp)の含有量の異なる nHAC 複合体を添加する中性リン酸緩衝溶液ならびに CaCl₂ の量を減らして湿式法にて製作し、加熱して nHAp とコラーゲンの比率を求めた。その結果、nHAp/コラーゲン比を 70/30、66/34、56/44 と、添加する中性リン酸緩衝溶液ならびに CaCl₂ の量を変えることで nHAp/コラーゲン比が変化することが確認された。また、製作した nHAC を FT-IR、X 線回析および SEM で微細構造を観察した結果、精製した nHAp はハイドロキシアパタイトであり、その結晶サイズはナノサイズであることが確認された。次いで、nHAp/コラーゲン比を 70/30、66/34、56/44 に調整した nHAC 膜に 100 μg/ml rhBMP-2 を含浸し、ラット背部皮下結合組織に移植、2、4 週後、組織学的観察を行った。2 週後は 70/30 群で、4 週後は 70/30 群、66/34 群で硬組織の形成が観察された。以上の結果から、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が多いほど硬組織形成に有利であることが示唆された。

A. 研究目的

現在、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、いくつか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。

我々は bone morphogenetic protein (BMP) を用いて硬組織再生の研究を行ってきたが、これまでの研究成果から、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こと、硬組織の形成と吸収はきわめて近傍で生じることなどから、リン酸カルシウムの濃度が BMP によ

る組織反応に強く影響を及ぼしている可能性があると考えている。

そこで本研究ではナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を使い、ナノハイドロキシアパタイトの含有量の違いが BMP の活性に与える影響を検討する目的で、まずハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜を精製し、次に精製したハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜をラット皮下結合組織に移植して組織反応を検討した。

B. 研究方法

1) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異

なる nHAC 複合体膜の精製

Bradt らの方法⁹⁾に従い精製した。すなわち、アテロコラーゲンを塩酸に溶解して塩酸 1 型コラーゲンを精製し、Ca:P 比が 5:3 になるように中性リン酸 buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) (9, 6.75, 4.5mmol/l) と、 CaCl_2 (5.4, 4.05, 2.7mmol/l) をそれぞれ加え 37 度で 12 時間インキュベートした。その後、吸引濾過し、1%EDC で 1 時間架橋した。1%グリシンで架橋反応を停止し、水洗、凍結乾燥した(図 1)。その後、精製膜を 700°C で焼却することで、ハイドロキシアパタイト/コラーゲンの比率を割り出した。また X 線回析、FT-IR 分析および SEM にて微細構造を観察した。

2) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異なる nHAC 複合体膜に BMP-2 を含浸させた場合の組織反応の評価

(i) 1) で精製した nHAC 膜を 4×4mm にトリミングし、phosphate-buffered saline (PBS) にて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000 μg/ml streptomycin 含有 PBS に 24 時間浸漬した。その後、100 μg/ml に調整した rhBMP-2(R&D)に、10 分間浸漬した。

(ii) 手術方法

動物実験は 8 週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。なお、本実験は北海道大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を経て同ガイドラインに従って行った。ラットにペントバルビタール(ソムノペンチル®共立製薬株式会社)の腹腔内投与(7.0×10⁻⁴ml/体重 g)による全身麻酔を行い、背部皮下結合組織内に BMP-2 を含浸させた nHAC 膜を移植した。

(iii) 病理組織学的観察

2,4 週の観察期間後に、移植 nHAC 膜と周辺組織を一塊として摘出し、10%ホルマリン (pH7.4) にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ 5 μm の連続切片を作製し、ヘマトキシレン・エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。

C. 研究結果

1) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異

なる nHAC 複合体膜の X 線解析及び SEM 観察

700°C で焼却した結果、リン酸緩衝溶液および、 CaCl_2 の添加量を減らすことでナノハイドロキシアパタイト/コラーゲン比が 70/30、66/34、56/44 とナノハイドロキシアパタイトの含有量が減少することが認められた(表 1)

X 線回析では回析パターンがハイドロキシアパタイトと類似したパターンを示していた(図 2)。FT-IR 分析ではアミド I と P-O にピークが認められた(図 3)。SEM 観察では均一なナノハイドロキシアパタイト粒子が散在し、コラーゲンの露出が多く観察された(図 4a,b,c)。

4) ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン比の異なる nHAC 複合体膜に BMP-2 を含浸させた場合の組織反応

2 週では、70HA/30CG 群では nHAC は小片に分解され、その周囲に硬組織の形成が広範囲に確認され、骨芽細胞様細胞や多核巨細胞が観察された。硬組織と nHAC の境界は不明瞭であった。66HA/34CG、56HA/44CG 群ではともに nHAC は小片に分解され硬組織の形成は観察されなかった。

周囲にはリンパ球を主体とする炎症性細胞とわずかに多核巨細胞の浸潤が認められた。

4 週では、70HA/30CG 群では nHAC はほとんど観察されず、骨髄様構造を呈した骨形成に置換されていることが確認された(5a)。66HA/34CG 群では nHAC が小片に分解され周囲に硬組織の形成が確認され、骨芽細胞様細胞及び多核巨細胞が観察された(図 5b)。硬組織と nHAC の境界は不明瞭であった。56HA/44CG 群では nHAC は小片に分解され硬組織の形成は観察されなかった。周囲は結合組織で被覆され、線維芽細胞様細胞の浸潤が観察された(図 5c)。

D. 考察

本研究ではナノハイドロキシアパタイトの含有量の違いが BMP の活性に与える影響を検討するため、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が異なるナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体の製作を検討した。まず、添加する中性リン酸 Buffer と CaCl_2 を換えて湿式法で複合体膜を製作し、700°C で焼却した結果、ハイドロキシアパタイト/コラーゲン

比が70/30、66/34、56/44と、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が減少することができた。また、X線回折及びFTIRのパターンはハイドロキシアパタイトと類似していたことから、添加するリン酸緩衝溶液及び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、量のみを減らすことができることが明らかとなり、BMPの活性にリン酸カルシウムの含有量が及ぼす影響を検討するには、有効な材料と考えられた。

病理組織学的観察からはハイドロキシアパタイトの含有量が大きいほど、早期に新生骨が形成されていた。その理由として、一つにBMP-2はコラーゲンよりもハイドロキシアパタイトに吸着しやすいこと、もう一つはカップリング作用の亢進が考えられた。すなわち、BMPが直接骨芽細胞に分化誘導しただけでなく、複合体膜の周辺には多核巨細胞が観察されていたことから、BMPが破骨細胞を活性化してnHACを吸収分解することで、Caの局所濃度が上昇したことからカップリング作用の亢進して骨芽細胞を活性化した可能性が考えられた。一方、形成された硬組織は分解された複合体膜の周囲に直接形成されており、その境界は不明瞭であった。このことから複合体膜が核となって新生骨に置換、形成された可能性もある。しかし、移植したnHACが吸収されるのか、核となって新生骨に取り込まれるのかなど、詳しいメカニズムについては今後の研究が必要である。

E. 結論

ナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜はBMPの担体として有効であり、ナノハイドロキシアパタイトの含有量が多いほどBMPの活性が高くなることが明らかとなった。

研究発表

1. 研究会発表

1. Taichi Tenkumo, Tsutomu Sugaya, Akira Tanaka, Hiroki Tamagawa, Masamitsu Kawanami, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Fumio Watari, "The effect of nanohydroxyapatite-collagen composite foil by BMP-2 application" International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application 北海道、札幌市、2008

2. 天雲 太一, 菅谷 勉, 川浪 雅光, 亘理 文夫, "rhBMP-2 に関するハイドロキシアパタイト含有量の違いによる影響の研究" 第21回代用臓器再生医学研究会総会、北海道、札幌市、2009

3. 天雲 太一, 菅谷 勉, 田中 陽, 川浪 雅光, 宇尾 基弘, 赤坂 司, 亘理 文夫, "ハイドロキシアパタイト含有量の異なるナノハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体膜のBMP担体としての有効性" 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」、第5回研究成果発表会要旨集、北海道、苫小牧市 2009

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
無し
2. 実用新案取得
無し

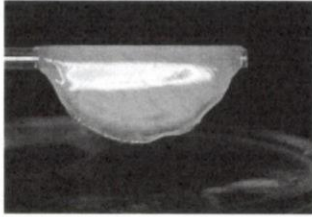


図1. 作製したハイドロキシアタパイトー
コラーゲン複合体膜。水分を含むと軟性を示す。

	Starting material			Product		abbreviation
	Acrosable Collagen aq	Et2DPA /Et2DPA	CaCl2	Hydroxyapatite Collagen(%)		
A	0.5mg/ml	9mmol/l	5.4mmol/l	70	30	70HA/30CG
B	0.5mg/ml	6.75mmol/l	4.05mmol/l	66	34	66HA/34CG
C	0.5mg/ml	4.5mmol/l	2.7mmol/l	66	44	66HA/44CG

表 1

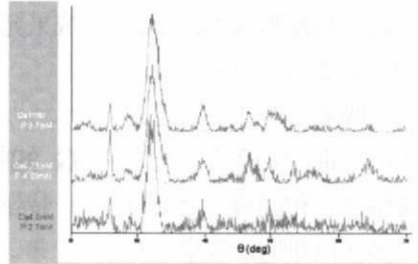


図 2 X線回折

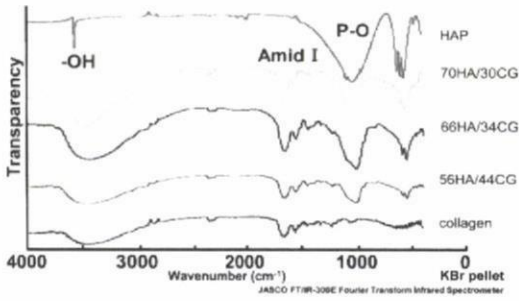
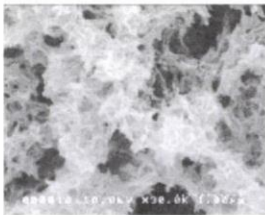
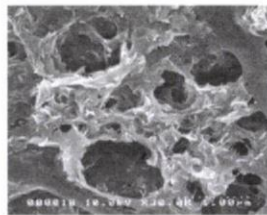


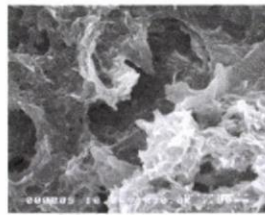
図 3 FTIR



a:70/30 群



b:66/34 群



c:56/44 群

図 4 SEM

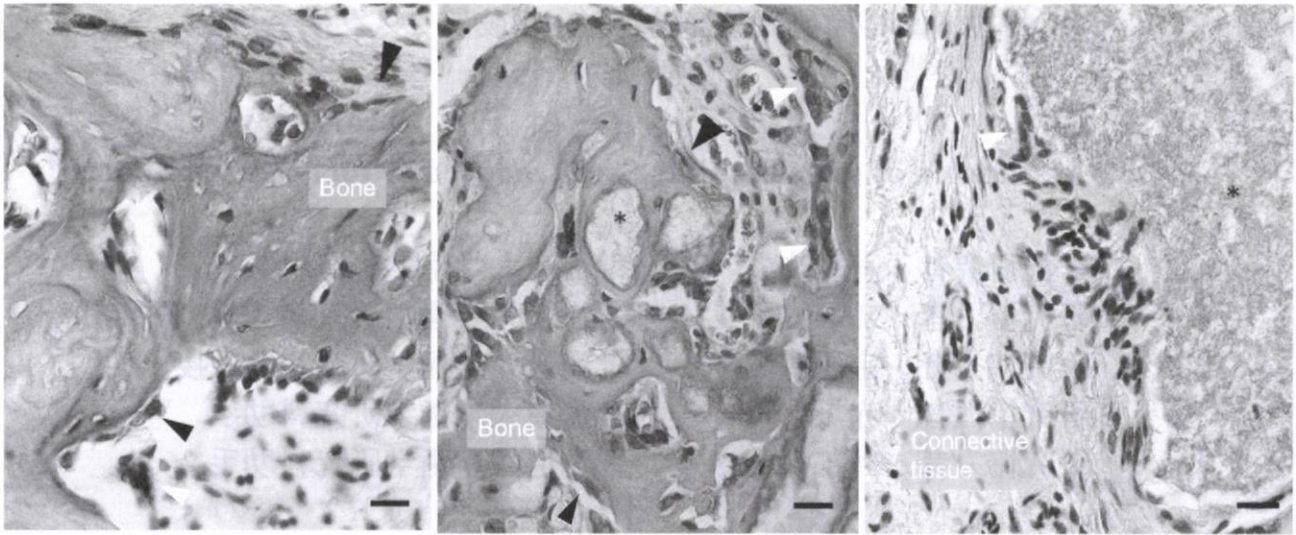


図5 4週 結合組織内

a:70/30 群

b:66/34 群

c:56/44 群

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) Jens-Hilmar Bradt, Michael Mertig, Angelika Teresiak , Wolfgang Pompe : Biomimetic Minerlization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation. *Chem.Mater.*, Vol 11, No.10, 1999

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

Maturation of osteoblast-like SaoS2 induced by carbon nanotubes

分担研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	Xiaoming LI	北海道大学歯学研究科 JSPS 研究員
研究協力者	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科助教授
研究協力者	赤坂 司	北海道大学歯学研究科助手
研究協力者	阿部薫明	北海道大学歯学研究科助手

研究要旨 Osteogenic maturation of the osteoblast is crucial for bone formation. In this study, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and graphite (GP) were pressed as compacts. Higher ability of carbon nanotubes to adsorb proteins, comparing with graphite, was shown. Human osteoblast-like SaoS2 cells were cultured and the cell response to the two kinds of compacts, were compared *in vitro*. Meanwhile, we used cell culture on the culture plate as a control. Assays for osteonectin, osteopontin, osteocalcin gene expression, total protein amount (TP), alkaline phosphatase activity (ALP), DNA of cells cultured on the samples were done. During the conventional culture, significantly higher osteonectin, osteopontin, osteocalcin gene expression level, ALP/DNA, TP/DNA on carbon nanotubes were found. To confirm the hypothesis that the larger amount of specific proteins adsorbed on the carbon nanotubes was crucial for this, we made the compacts pre-soaked in culture medium having additional recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) before cell culture. Comparing with on GP, osteonectin, osteopontin, osteocalcin gene expression level, ALP/DNA, TP/DNA of the cells tested increased more on the MWCNTs after the compacts were pre-soaked in culture medium with rhBMP-2. The results indicated that the carbon nanotubes might induce osteogenic maturation of the osteoblast by adsorbing more specific proteins.

A. 研究目的

A scaffold is one of the key components in the tissue engineering paradigm in which it can function as a template to allow new tissue growth and also provide temporary structural support while serving as a delivery vehicle for cells and/or bioactive molecules. Since nanotechnology embraces a system whose core of materials is in the range of nanometers (10^{-9} m), there are many similarities between nanophase materials and components of biological organs. So nanomaterials should logically have a significant impact on tissue engineering.

Carbon nanotubes (CNTs), one of the most

representative nanomaterials, possess exceptional mechanical, thermal, and electrical properties, facilitating their use as reinforcements or additives in various materials, such as plastics, metals, and ceramics, to improve properties of the materials and introduce novel functionalities. At present, carbon nanotubes have been extensively studied for use in biomaterials applications and biomaterials using CNTs are expected to be developed for clinical use. A lot of studies have been carried out on the interaction between CNTs and a variety of cells including osteoblasts, showing CNTs to be excellent substrates for cellular attachment and growth. But few (if any) studies have elucidated the effect

of CNTs on the differentiation and maturation of the attached cells, although these processes are even more important for tissue repair.

It has been suggested that nanostructures of the biomaterials are critical to start the differentiation of cells. In other words, the microenvironment around the cells may be crucial. Park JW, et al suggested that a nanostructured Ca coating of Ti surfaces may be used as a potentially effective method to enhance osseointegration of the implants, by accelerating the proliferation and differentiation of osteoblast cells on their surfaces in the early bone healing phase. Popat KC, et al presented osteogenic differentiation of C57 BJ mice marrow stromal cells on nanoporous alumina surfaces, suggesting the ability of nanostructured biomaterials to enhance cell differentiation. Yim EKF, et al reported the nanopatterns, reproduced on poly (dimethylsiloxane) (PDMS) using soft lithography on the nanoimprinted poly (methyl methacrylate) (PMMA)-coated Si master mold, played an important role in directing differentiation of adult stem cells into neuronal lineage. Ou KL, et al reported that formation of nanohydrates by cathodization and oxidation by anodization are believed to promote biocompatibility and improve bone-to-interface contact, accelerating initial osseointegration and re-osseointegration.

In this study, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and graphite (GP) were pressed as compacts. Human osteoblast SaoS2 cells were cultured on the two kinds of compacts with and without adsorbing recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). The cell differentiation and osteogenic maturation on the two kinds of compacts were respectively compared *in vitro*. Meanwhile, we used cell culture on the culture plate as a control.

B. 研究方法

Materials

MWCNTs used in this study were obtained from NanoLab (Brighton, MA USA). The MWCNTs of curled shape with about 90 nm in diameter were produced by the chemical vapor deposition (CVD) method. The raw MWCNTs were refluxed in hydrochloric solution and then washed thoroughly with deionized water and

completely dried. The GP particles used in this study were about 4.5 μ m in diameter.

Fabrication of compacts

MWCNTs and GP were separately compacted serially in a steel-tool die via a uniaxial pressing cycle (0.09GPa for 2min, then 0.22GPa for 3min, finally 0.36GPa for 3min) at room temperature. The compacts were washed ultrasonically with acetone, 70% ethanol and deionized water for 15minutes and then dry at 60 $^{\circ}$ C. All the compacts were sterilized by ultraviolet radiation for 48 hours prior to experiments with cells. The morphology of the compacts was examined by scanning electron microscopy (SEM; S-4000, Hitachi, Japan).

Evaluation of protein adsorption on the compacts

Before cells culture, ability of protein adsorption of the compacts was evaluated. At first, 0.25% fetal bovine serum (FBS; Biowest) (250ul FBS in 100ml 25ppm NaN₃ solution) was sterilize with 0.22 μ m filter. After immersing the compacts respectively for 1, 4 and 7days, the left protein content percent (P_1) of the FBS solution (3ml per sample, n=5) was mensurated with the QuantiPro™ BCA Assay Kit (TaKaRa BIO INC, Japan) according to the guideline of the company. The adsorbed protein (P_a) was determined by the formula of $(0.25\% - P_1)/0.25\%$

Conventional cell culture on the samples

The compacts were placed in the cell culture plates. Then SaoS2 cells were respectively seeded on the compacts with a cell density of 3.0×10^4 per sample. Then the samples were put into an incubator at 37 $^{\circ}$ C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and 95% air for 4 hours. Finally, 2.5 ml culture medium, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma) with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (100 U/ml penicillin, 10 μ g/ml streptomycin), was added into the wells of the plates and then, the plates were put back to the incubator. The culture mediums were refreshed twice a week.

DNA, Alkaline phosphatase (ALP) and total protein analyses

After cell culture, the samples with cells were washed by phosphate buffered saline (PBS) for three times after the cultured medium was totally removed. Then the samples were stored in the freezer at -80 $^{\circ}$ C for at least 12 hours for the biochemical analyses. As soon as the plates were taken