

## Surface characteristics of chemically treated

### Ti-10Ta-10Nb alloy for dental implant

Min Ho Lee<sup>1</sup>, Fumio Watari<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Dental Biomaterials, Institute of Oral Bioscience and Brain Korea 21, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, South Korea

<sup>2</sup> Biomedical, Dental Materials and Engineering, Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Japan

Using titanium-based alloys as biomaterials is increasing because they have reduced elastic modulus, superior biocompatibility, specific strength, good corrosion resistance, superior strain controlled and fatigue resistance compared to conventional stainless steel and Co-Cr alloy. However, when implanted into human body these metals are problematic because they do not show direct bonding with living bone. A treated surface play an important role in nucleating calcium phosphate deposition on surgical titanium alloys implant. The purpose of this study is to examine whether the precipitation of apatite on Ti-10Ta-10Nb alloy is affected by surface modification in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. Specimens were chemically treated with a solution containing 30 wt% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 80°C for 1 hour, and subsequently heat-treated at 400°C for 1 hour. All specimens were immersed in the SBF (Simulated Body Fluid) with pH 7.4 at 36.5°C for 7 days, and the surface were examined with XRD, SEM, EDX and in vitro test. The microstructure of Ti-10Ta-10Nb alloy after etching with Keller's etchant showed Widmanstätten pattern. The micro vickers hardness number was 236.44 ± 4.99. The surface roughness was increased by surface treatment. The wettability after surface treatment was better than non-treated surface. The resistance of cytotoxicity is decreased by chemical surface treatment (P<0.05).

北海道大学院歯学研究科

赤坂 司, 横山 敦郎, 松岡 貞孝, 阿部 薫明, 宇尾 基弘, 亘理 文夫

東北大学 大学院環境科学研究科 佐藤 義倫, 田路 和幸

株式会社 名城ナノカーボン 橋本 剛

## 1. 目的

近年、最も注目されている材料の一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。

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キキャホ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解明してきた。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、さらなる詳細な検討が望まれる。一方で、カーボンナノチューブの細菌に対する吸着作用も注目を集めている。そこで本研究では、CNTのバイオ分野におけるさらなる応用展開を目指し、(A) カーボンナノチューブと細菌との相互作用、(B) カーボンナノチューブ透明導電性薄膜上での細胞培養を検討した。

## 2. 実験方法 (一部抜粋)

(A) 細菌との相互作用: 沈降実験は、菌懸濁液に対して一定の濃度 (0.1mg/ml, 0.25mg/ml, 0.5mg/ml) の多層カーボンナノチューブ (純度80%以上, NanoLab製) 溶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、上清液を採取し、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、適法に従い2.5%グルタルアルデヒドによる固定後乾燥させ、走査型電子顕微鏡 (SEM Hitachi S4000) にて観察した。

(B) カーボンナノチューブ上での細胞培養: 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) および多層カーボンナノチューブ (純度80%以上, NanoLab製) を分散液に加え超音波処理を十分行い、6cmのポリスチレンディッシュ (Corning社製) に薄層コートした。

細胞培養は、ヒト骨髄腫由来の骨芽細胞様細胞であるSaOs2を用い、DMEMに0.1-20%FBS (通常、10%FBS) および10%PSNを添加した培地にて、37°Cで5%CO<sub>2</sub>環境下にて所定時間行った。細胞数は光学顕微鏡下にてのカウント、またはDNA定量により行った。細胞の観察は、2.5%グルタルアルデヒドによる固定後、一般的な脱水・乾燥条件で行い、走査型電子顕微鏡にて行った。

### 3. 結果と考察 (一部抜粋)

(A)細菌との相互作用: CNTの*S. mutans*に対する沈降挙動を比較するため、菌懸濁液と攪拌した結果、添加するカーボン材料の濃度が濃くなるに伴い菌の残留率も低下した。0.5mg/mlではACの菌残留率が70%であるのに対し、CNTの菌残留率は30%と倍以上の値をとり、CNTの方がより効率的に菌を沈降させた。

次に、CNTと菌との結合様式を明らかにするために、沈降物のSEM観察を行った結果(図)、CNTでは沈降物の凝集体内部において、CNT繊維が菌に絡みついている様子が観察された。一方、活性炭の場合では、活性炭粒子の表面において、菌が付着している様子が観察された。これらの結果より、CNT、活性炭いずれのカーボン材料においても除菌作用があるが、CNTの方がより効率的に菌を吸着することが判明した。菌の沈降への効率化は、CNTのナノ構造による吸着特性、表面積および2次粒子の形態が大ききく影響することが推測される。

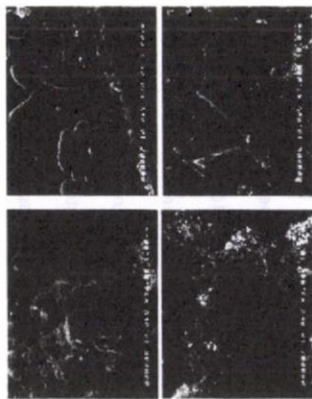


Fig.1. SEM images of *S.mutans* on Carbon Materials

(B)カーボンナノチューブ上での細胞培養: カーボンナノチューブコートによる表面構造が細胞増殖および形態に与える影響を検討した結果(図)、5μg/cm<sup>2</sup> MWNT5以外は良好な細胞の伸展性を示した。AFMによる表面観察の結果、5μg/cm<sup>2</sup> MWNT5の表面粗さは45nmであり、他のコート(16nm以下)よりも粗い表面であることが判明した。SWNT1においてはその柔軟性のために比較的平滑な表面を形成していた。

このことよりカーボンナノチューブコートは、その表面の凹凸により、細胞の形態へ大きく影響し、また、一部細胞増殖率へも影響しているものと考えられる。

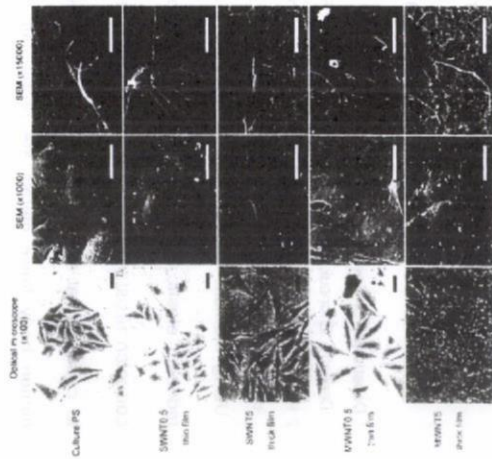


Fig.2. SEM image of *S.mutans* on various dishes.

今後、他の細胞種への影響を検討することにより、CNTコートによる細胞へ与える因子を抽出および精製し、用途に応じたコート種による使い分けを可能としたい。

### ヒップシミュレーション試験により発生したポリエチレン摩耗粉の形態解析

(財)ファイナセンセラックスセンター

材料技術研究所

○橋本雅美、水野峰男、北岡諭

#### 1. 緒言

人工股関節の摩耗特性は、現在ライナーと骨頭を潤滑液中に浸漬し、股関節シミュレーターにより評価される。潤滑液は、国際規格ISOで牛血清を用いることが推奨されている。これは、牛血清を用いた場合に発生する摩耗粉の形状等が、臨床で患者に埋入した際に人工股関節から発生したものと類似しているためである。しかし、摩耗に影響するタンパク質量は牛血清のメーカーやロットにより大きく異なるという点で、多くの研究者の論議の対象となっている。また、摩耗特性のメカニズムを解明する際に用いる潤滑液としても、潤滑液中の成分による摩耗特性の違いを把握することは重要である。

そこで本研究では、ポリエチレン(PE)ライナーと酸化ジルコニウム(ZrO<sub>2</sub>)骨頭の摩耗試験を種々の潤滑液中で行った。その過程で発生する摩耗量および摩耗粉の評価解析を行った。

#### 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26mmの酸化ジルコニウム(ZrO<sub>2</sub>)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(NaCN)と20mMのエチレンジアミン四酢酸三ナトリウム(3Na-EDTA)を含む5種類の液(表1)(平衡塩溶液(BSS)、牛血清アルブミンおよびグロブリンを溶解した平衡塩溶液(A+G-BSS)、A+G-BSSの1.5倍濃度溶液(1.5(A+G)+BSS)、Sigma製牛血清溶液(CS1)およびlowest製牛血清溶液(CS2)を使用し、液量約750mlで、毎秒回の歩行周期(1Hz)に183と280kg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 lubricants used to lubricate wear tests

Lubricant (mg/ml)	NaCl	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	Protein (Total)	Albumin		Globulin	
				α-G	β-G	α-G	β-G
BSS	8	3.58	0	0	0	0	0
A+G-BSS	8	3.58	10.7	7.3	0	0	3.4
1.5(A+G)+BSS	8	3.58	16.2	11.1	0	0	5.1
CS1	1		18.3	8.4	2.7	3.4	3.6
CS2	2		15.5	7.8	2.3	4.0	1.4

\*1 Na 3.38 mg/ml. \*2 Na 3.24 mg/ml

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座  
 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マイクロ・ナノ粒子の体内での循環・滞留・排泄状況の追跡<sup>1,2)</sup>を行い、その可視化法の比較・検討を試みた<sup>3,4)</sup>。また投与方法の検討も行った<sup>5)</sup>。

2. 実験方法

生体内でのマイクロ・ナノ粒子の分布・循環状態を調べるため、マウス(ICR系オス、8W-12W)に対し尾静脈注射(10 mg/mL, 0.6 mL)を行い、投与後一定期間経過観察を行った。その後、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光装置(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、各臓器を全て抽出して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

1) 投与(暴露)方法の検討

a) 血中投与

尾静脈からの血中投与方法に関しては、観測系に対応した投与濃度、投与量についての検討はほぼ終了した。例えば、XSAMでの観察の場合、10 mg/mLの薬液0.6 mLの投与により、測定に十分な体内濃度が得られ、一方で数週間以上の経過観察にも絶え得ることが判った。測定系としてICPを用いる場合には、0.3 mg/mL x 0.6 mLの投与でも十分に体内への滞留状態を観測出来ている。

3. 結果と考察

図1に試験回数にもなるUHMWPEライナーの重量変化を示す。まず潤滑液に平衡塩溶液(BSS)を用いた場合には、ライナーおよび骨頭ともほとんど摩耗しないことがわかった。これは、BSSが摩耗の原因であるタンパク質を全く含まない溶液であるためと考えられる。次にBSSにアルブミンおよびグロブリンを溶解したA+G+BSSおよび1.5(A+G)+BSSを用いた場合には、ライナーおよび骨頭とも摩耗した。特にライナーの摩耗率は、-12および-17 mg/百万回であり、タンパク質の増加にとどまない摩耗量も増加することがわかった。タンパク質は、骨頭とライナーの界面に侵入し、ライナーおよび骨頭に凝着することが報告されている。凝着したタンパク質が微量の場合には、摩耗に対する保護膜としてタンパク質は働くが、量が多くなると凝着摩耗を引き起こす。今回用いたA+G+BSSおよび1.5(A+G)+BSSとも凝着摩耗が生じていると考えられる。さらに、牛血清(CS1およびCS2)を用いた場合には、ライナーの摩耗率はそれぞれ-42および-13 mg/百万回であった。今回実験に用いた潤滑液のタンパク質量はBSS < A+G+BSS < CS2 < 1.5(A+G)+BSS < CS1の順に多くなるため、ライナーの摩耗量は潤滑液中の成分に関わらず、タンパク質量の増加に伴い大きくなることわかった。

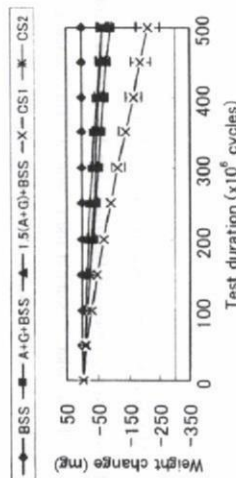


Fig. 1 Plot of accumulative weight change of UHMWPE cups as a function of test duration in five lubricants.

摩耗粉の形状に関しては、潤滑液に1.5(A+G)+BSSを用いた場合のみ、ほとんどが繊維状でアスペクト比が大きかったのに対し(図2)、他の潤滑液の場合は粒状と繊維状のものが混在していた。粒径分布に関しては、何れの潤滑液の場合も、1 μm以上の摩耗粉が殆どであった。

本研究の結果により、摩耗量に関しては潤滑液中のタンパク質量との間に相関があるが、摩耗粉の形状に関しては相関が無く、牛血清中で発生する摩耗粉と同形状のものをアルブミンとグロブリンを含む潤滑液中で発生させることは不可能であることがわかった。



Fig. 2 SEM photograph of UHMWPE debris isolated from the 1.5(A+G)+BSS lubricant after a 3.0 x 10<sup>6</sup>-cycle simulator test.

## 2) 投与粒子の検出・追跡

投与粒子の体内での循環状態の追跡は、経過観察期間ごとの抽出臓器について、XSAM, ICPを用いて、分布の割合や各臓器への滞留量を測定し、その経時変化を観測した。XSAM, ICPでの測定結果については、抽出された粒子の臓器間の比(百分率)について、右

図のような相関が得られた。また、一定期間は特定臓器に滞留し、その後各臓器へと循環していく物質( $TiO_2$ )と、投与直後から各臓器に到達し、その存在比があまり変化しない物質(伊など)とが、存在する事が示された。さらに滞留・循環の速度には、サイズ依存性があることも示された<sup>2,4</sup>。

また全身の分布状態を確認する為に、 $TiO_2$ を投与したマウス(経過観察1日)を樹脂包埋し、 $5\ \mu m$ 厚に切断した試料を作成し、XSAMにより観察を行った(図1)。この場合、投与物質は肺と肝臓のみから検出され、他の臓器への到達は確認されなかった。

## 4. 参考文献

1. S. Abe, C. Koyama, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, and F. Watari, "Internal distribution of several inorganic microparticles in mice", *Key Engineering Materials*, **396-398**, p539-542 (2009)
2. S. Abe, C. Koyama, M. Uo, T. Akasaka, Y. Kuboki and F. Watari, "Time-dependence and visualization of  $TiO_2$  and Pt particle biodistribution in mice", *J. Nanosci. Nanotech.*, (in press)
3. S. Abe, T. Yonezawa, T. Akasaka, M. Uo, F. Uchida, and F. Watari, "Observation of Biodistribution of Indium-Tin Oxide Nanoparticles", *Jpn. J. Appl. Phys.* (submitted)
4. S. Abe, I. Kida, M. Esaki, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, B. Jayadevan, Y. Kuboki, M. Morita, K. Tohji, and F. Watari, "Biodistribution imaging of magnetic nanoparticles in mice compared with X-ray scanning analytical microscopy and Magnetic Resonance imaging", *Bio-Med. Mater. Eng.*, (submitted)
5. S. Abe, C. Koyama, M. Esaki, T. Akasaka, M. Uo, Y. Kuboki, M. Morita, and F. Watari, "In vivo internal diffusion of several inorganic microparticles through an oral administration", *Bio-Med. Mater. Eng.* (submitted)

## 炭酸アパタイト・コラーゲン複合体の骨再生能に関する材料学的考察

広島大学大学院医歯薬学総合研究所

○岡崎正之・平田伊佐雄

### 1. 緒言

骨再生能力の衰えた高齢者のような患者や生体部位に対する再生医療にとつて、細胞やスcaffolds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caffolds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し、さらに高機能性を付与することを目的に骨増殖因子としてのrhBMP2の修飾を試みてきた。本研究では、骨再生に及ぼすナノ炭酸アパタイト結晶中の炭酸含有量の影響や、その最適濃度の検討、並びに血管新生因子としてのSVVYGLRサイトカインの影響を材料学的観点から検討したところ、興味ある知見を得たので報告する。

### 2. 材料および方法

ハイドロキシアパタイトHApおよび炭酸アパタイト $CO_3Ap$ の合成は、 $0.2\ M$ 酢酸カルシウム $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 溶液、 $0.5\ L$ 、並びに $0\ M$ ,  $0.005\ M$ ,  $0.01\ M$ ,  $0.03\ M$ ,  $0.06\ M$ ,  $0.3\ M$ の炭酸アンモニウム $(NH_4)_2CO_3$ を含む $0.12\ M$ リン酸アンモニウム $NH_4H_2PO_4$ ,  $0.5\ L$ を、攪拌中の $1.3\ M$ 酢酸アンモニウム溶液 $CH_3COONH_4$ 溶液、 $1\ L$ 中へ供給することにより $60^\circ C$ ,  $pH\ 7.4$ 一定で行った。

また、炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジは、 $0.8\ mL$ の $0.1\ M$ 水酸化ナトリウム $NaOH$ と $10\ mL$ の $0.1\ wt\%$ アテロコラーゲンを混合ゲル化させ、その中に $243\ mg$ のHApおよび $CO_3Ap$ を混合し、テフロン型に入れ、 $-80^\circ C$ で2時間凍結後、 $-50^\circ C$ で24時間凍結乾燥することにより作製した。得られた各種スポンジ試料を家兎大腿骨へ埋入し、さらには最適炭酸含有量組成の試料に対し血管新生因子SVVYGLRを合成後修飾したスcaffoldsを作製しラット頭骨に埋入することにより、骨形成能を検討した。

### 3. 結果と考察

合成した炭酸アパタイトの結晶性は炭酸含有量とともに低下し、骨と類似した炭酸含有量(4-6wt%)を有する炭酸アパタイトは、骨と同程度の結晶性を示した。試作した炭酸アパタイト・コラーゲンスcaffoldsは、細胞の遊走には適当なサイズの貫通孔を有した。マウスMC3T3-E1骨芽細胞株細胞を用いた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。炭酸含有量の異なる各種スcaffoldsを家兎大腿骨に埋入し、骨面積率を比較したところ、生体骨と類似した結晶性と炭酸

含有量を有するスカフォールドが最も高い骨再生能を示した(図1)。一方、SVVYGLRを修飾したスカフォールドでは、埋入1週目で血管新生が認められた(図2)。

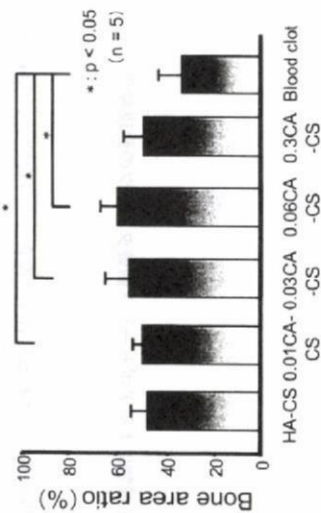


図1. 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨面積率の比較(家兎大腿骨埋入3週間後の値)



VIII factor-staining

図2. SVVYGLR修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの血管新生能(ラット頭骨埋入1週間後の組織学的所見)

## Ti合金の腐食と免疫応答

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 生体材料工学分野  
○田茂 雅博 浅岡 憲三

### 1. 緒言

適切な生体内環境では、歯科矯正用ワイヤー等に活用され耐食性に優れたNi-Ti合金においても水素吸蔵により腐食する可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。このような金属腐食による溶出金属イオンと、それに付随して生成される微粒子については、金属アレルギーをはじめとする粘膜疾患や発癌の原因因子となりうる。そこで本研究では、Ni-Ti合金より得られた腐食生成物微粒子の状態分析を行い、その生体に対する為害性について検討した。

### 2. 材料と方法

#### 2.1 Ni-Ti腐食生成物の作製とXANES分析

表面研磨したNi-Ti線(0.5mmφ)を陰極とし100mlの0.9%NaCl水溶液中で10Vの電圧を負荷し電気分解を行い水素チャージし、発生した腐食生成物を遠心分離にて回収後、リン酸緩衝液で2回洗浄し12℃30分でオートクレープ以下の実験に使用した。また、得られた腐食生成物は乾燥、デンプンで希釈、成形後にKEX-PF BL-9AにおいてTi及びNi K-edge XANESスペクトルを透過法で測定した。

#### 2.2 マクロファージ貪食試験

$\alpha$ -MEM 10%FBSで維持したマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞に、細胞数に対し1:100となるよう腐食生成物数を調整し培地中に添加した。24時間培養後、Wright-Giemza染色を行い顕微鏡下で観察を行った。

#### 2.3 Ni-Ti腐食生成物の細胞増殖への効果

RAW264.7細胞、マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞に対し腐食生成物を培地中に添加し48時間培養を行いMTT assayにて細胞数の計測を行った。

#### 2.3 ウェスタンブロット

腐食生成物を添加し24時間培養後、培養細胞をPBSで2回洗浄後、RIPA bufferにてタンパク質を抽出、以下通法に従いバンドの検出を行った。

### 3. 結果

Ti及びNi K-edge XANESスペクトルより、生理食塩水中でのNi-Ti合金の電気分解により得られた腐食生成物微粒子は主として、TiO<sub>2</sub>とNi(OH)<sub>2</sub>より構成されるものと推察された。

Ni-Ti合金の腐食生成物微粒子はマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞に貪食され(図1)、TNF- $\alpha$ をはじめとする炎症性サイトカインの産生を誘導した。また、マクロファージによる貪食の

みならず、腐食生成物微粒子はマウス骨芽細胞株細胞株MC3T3-E1細胞に対し、細胞表面に接着することが確認された。

このようなNi-Ti合金の腐食生成物微粒子に対する細胞の食反応、接着によって細胞増殖は腐食生成物微粒子の濃度依存的に障害された(図2)。そこで腐食生成物微粒子のアポトーシスシグナル経路に及ぼす影響を検討したところ、微粒子添加によってcaspase 3, 8, 9, PARPの発現上昇が認められ、デスレセプターを介した経路と、ミトコンドリア経路の双方が関与することが示唆された(図3)。

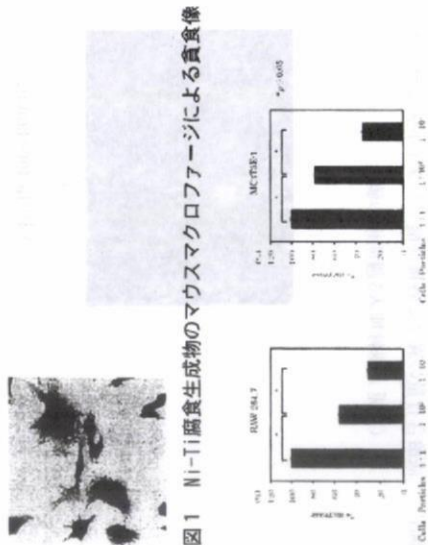


図1 Ni-Ti腐食生成物のマウスマクロファージによる食反応

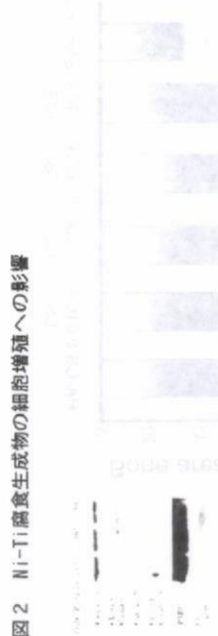


図2 Ni-Ti腐食生成物の細胞増殖への影響

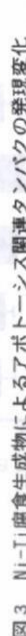


図3 Ni-Ti腐食生成物によるアポトーシス関連タンパクの発現変化

5. 考察、結論

一般に生体安全性が高いとされるTi合金も腐食により微粒子が生成され、マクロファージによる炎症の惹起と骨芽細胞のアポトーシスを誘導し骨破壊を助長しうるものと考えられた。本研究により、さらなる生体材料の開発、安全性の評価に腐食防止の重要性が示された。

謝 辞

本研究でのXANES分析を御協力を戴きました北海道大学 宇尾基弘准教授に深く御礼申し上げます。

1. はじめに

化学物質の細胞生存率曲線を描いた場合、しばしば微量の化学物質を暴露した濃度域で、試料無添加の対照群よりも細胞増殖が僅かながら増加することが数多く観察される。細胞毒性を示す化学物質でも微量の暴露で逆に細胞増殖が認められる現象は、臨床的に口腔組織の積極的な再生への応用も期待される。今回、三次元構築ヒト皮膚モデル(LSE-d, Toyobo)と正常ヒト臍帯静脈内皮由来細胞および正常ヒト新生児包皮繊維芽細胞を用いたヒト血管新生キット(Kurabo)を用いて、微量の金属元素イオン暴露による細胞生存率と、それらの濃度域での血管新生の影響を調べた。

2. 実験材料と方法

1) 試験液の調製

Cu, ZnならびにZnの原子吸光標準試薬を、あらかじめ37°Cに加熱した三次元構築ヒト皮膚モデルの専用培養液(TESTSKIN™ LSE ASSAY MEDIUM)およびヒト血管新生キットの専用培養液(血管新生専用培地-2, Kurabo)でそれぞれ10.5ppm~2.0ppmに希釈し、0.2μmのメンブランフィルターで濾過滅菌した。なお、対照は試料無添加とした。

2) 三次元構築ヒト皮膚モデル(LSE-d)による生存率の測定

あらかじめLSE-dを炭酸ガス恒温器(5%CO<sub>2</sub>, 95%空気, 37°C)中で2時間の前培養を行った。各wellの培養液と各試験液を1mL/wellとを交換し48時間培養した。各wellの試験液を捨て37°CのPBS(-)で洗浄後、MTT(Sigma, USA)で3時間培養後、皮膚モデルの各元素に暴露した中央部を直径8mmのバイオプシーバーで切り取り、0.3mLの酸性イソプロピロアルコールでホルマリンをそれぞれ抽出した。各抽出液を96wellプレートに分注し、マイクロプレートリーダー(SPECTRAMax PLUS, Canada)で570nmの吸光度を測定した。

3) ヒト血管新生キット(Kurabo)による新生血管面積率の測定

上記の炭酸ガス恒温器中で各培養液を試験液500μL/wellと交換し11日間静置培養した。なお、培養4, 7, 9日後にwell内の各試験液を新しい試験液と交換した。培養13日後に、各試験液をピペットで吸引し、各wellをダルベッコリン酸緩衝液で洗浄し、-20°Cの70%Ethanol溶液1mL/wellで30分間室温固定した。固定液を吸引し、1%BSAを含むダルベッコリン酸緩衝液1mL/wellを入れて再度洗浄した後、血管内皮細胞で強く発現しているIgスーパージェンに属する分子の血小板、内皮細胞接着分子(PECAM-1)であるmouse anti-human CD31を1次抗体として、また2抗体としてgoat anti-mouse IgG AikP conjugateを

1 大阪医科大学歯理工学講座, 2 同 麻酔学講座  
○今井弘<sup>1</sup>, 百田義弘<sup>2</sup>, 武田昭二

九州大学大学院 歯学研究所  
 ○都留寛治・石川邦夫  
 岡山大学大学院 自然科学研究所  
 城崎由紀・早川 聡・尾坂明義

1. はじめに

超高齢化社会を迎える我が国において、インプラントの高機能化は高齢者の生活の質 (QOL: Quality of life) を向上させる有効な手段である。我々はこれまでに、医用金属チタンの表面改質を検討し、ナノ起伏/結晶構造を有する酸化チタン層が得られること<sup>1)</sup>、得られた酸化チタン層は体液と接触すると自発的に骨石灰化層が形成すること<sup>2)</sup>、血小板が表面に付着しにくいこと<sup>3)</sup>等を明らかにした。これらの結果は金属チタン表面に形成させた酸化チタン層が生体に対して有効に働きかけることを示唆している。今回は、この種の酸化チタン層が金属チタン表面に形成する処理条件とメカニズムについて紹介する。

2. 実験方法

10x10x0.1mmの大きさに切り出した金属チタン試片を1-10mass%の過酸化水素水溶液(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)20mlに浸漬し、60℃で1-12時間保持した。金属チタン試片を反応溶液から取り出し、蒸留水にて5分間超音波洗浄した後、室温で乾燥させた。処理溶液は過酸化水素水濃度(n重量%)よりHn溶液と表記した。その後400℃に保持した電気炉で1時間熱処理した試片は過酸化水素水濃度と化学処理時間(m時間)よりHn/mh試片と表記した。処理後の試片表面の結晶構造は薄膜X線回折装置(TF-XRD)を用いて調べた。これらの試片の骨伝導性を*in vitro*環境で評価するために、試片を擬似体液(SBF, pH7.4 36.5℃<sup>4)</sup>)に浸漬し、表面にアパタイトが自発的に析出するか否かをTF-XRDおよび走査型電子顕微鏡(SEM)で調べた。

3. 結果と考察

処理後の試片のTF-XRDパターンより、H1試片は処理時間の増加に従って酸化チタン層の形成量が増加して、処理12時間にアナーゼ型結晶構造のX線回折ピークが検出された。H6試片でも同様の傾向が観察されたが、酸化チタン層の形成速度はH1試片に比べて増加した。しかし、6から12時間の間にピーク強度の減少が観察された。処理溶液のpH変化および処理溶液中に溶出したTiイオンの量から併せて考えると、この時間域において、以下の反応式(1)に示す酸化チタン層の過酸化反応により、酸化チタン層の溶解が優先的に進行したと考えられる。

用いて管腔構造を染色した。そして、デジタルカメラを取り付けた顕微鏡を用いて画像データを取り込み、血管新生定量ソフト(Kurabo)にて形成した管腔様構造の面積率を測定した。

3. 結果と考察

1) 三次元構築ヒト皮膚モデル(LSE-d)による生存率

Cu, Ti, Znの各イオンの0.5ppm暴露群で、Cuで131%、Tiで133%、Znで127%といずれも対照群より大きな細胞増殖が認められた。1.0ppm暴露群でCuイオンとZnイオンがいずれもさらに大きな値を示し、1.5ppm暴露群でCuイオンが対照群の178%を示したが、TiとZnでは逆に低下傾向を示した。なお、2.0ppmではCuイオンで135%であったがTiイオンで99%、Znイオンで97%と対照より小さな値に留まった。

2) ヒト血管新生キット(Kurabo)による新生血管面積率

0.5ppm群、1.0ppm群、1.5ppm群でいずれもCuイオンで123%~130%と対照群より大きな面積率を示した。Znイオンでも0.5ppm群が142%と最も大きな値を示したが、暴露濃度が高くなるに従って面積率は低下した。一方、Tiイオンでは1.0ppm群で110%と対照群よりやや大きな値が認められたが、すべての濃度域で対照群と有意差が認められなかった。なお、2.0ppm群ですべて対照群より小さな面積率を示した。

今回の2つの*in vitro*での結果から、3種の金属イオンで、微量のCuイオンが最も広い暴露濃度域で、細胞増殖と血管新生の両方の増加が認められた。微量のZnイオンでも0.5ppmでさらに大きな血管新生の影響が認められたが、暴露濃度域が0.5ppmから暴露濃度が上昇するにしがたがって新生血管面積の増加率は低下したことから臨床的に溶出濃度の制御が難しい可能性が考えられる。

以上の結果から、補綴物からの微量金属イオンの僅かな溶出を積極的に制御できれば、補綴物の周囲組織の再生に活用できる可能性も考えられる。従来からの基本的な考え方は、補綴用合金は口腔内で腐食による組成金属イオンは溶出しにくいことが理想的であった。しかし、周囲組織再生の観点から積極的に金属イオンの溶出制御を行う可能性も提案できる。そのためにナノマテリアル技術を用いた金属イオン溶出制御技術の開発に期待される。

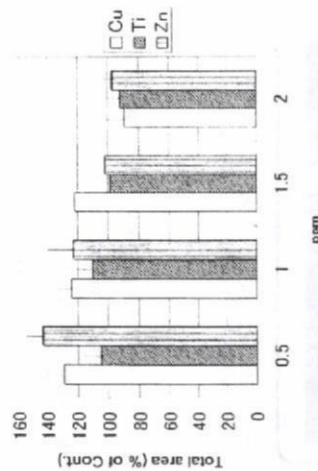


Fig. Total area of tubule-like structures with human angiogenesis kit



SBFを用いて、処理試料のアパタイト形成能を評価した結果、酸化チタンの形成量が多い試料ほど、アパタイト形成能が高まる傾向が見られた。メッシュ状金属チタンを60℃に保持した6%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で3時間化学処理した後(H6/3h)、SBFに3日間浸漬し試料表面をSEMで観察した様子を図1に示す。メッシュ表面全体が析出したアパタイト層で覆われていた。この手法でアパタイトコートコーティングした三次元金属チタン不織布は高い骨伝導性を持つことが動物実験により確かめられている<sup>1)</sup>。

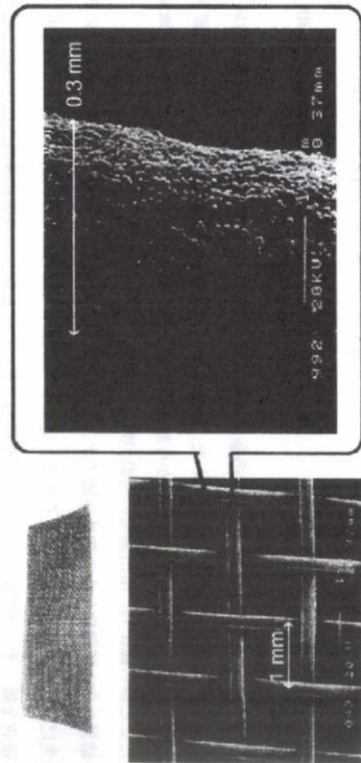


図1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理を施したメッシュ状金属チタン(H6/3h)をSBFに3日間浸漬した後の表面の様子。試料表面全体が析出したアパタイト層で被覆されている様子が観察された。

#### 4. 結論

金属チタン表面とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応では、酸化チタン層の形成と酸化チタン層の溶解反応が競争的に進行する。今回の実験条件では3mass%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で6-12時間、6mass%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で3-6時間処理した試料においてアナターゼ型酸化チタン層が形成し、SBF中で3日以内にアパタイトを自発析出することが分かった。

#### 5. 参考文献

- 1) J-M Wu *et al.*, *Scripta Materialia*, **46** (2002) 101-106.
- 2) X-X Wang *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54** (2001) 172-178.
- 3) X-X Wang *et al.*, *Biomaterials*, **23** (2002) 1353-1357.
- 4) A. Osaka *et al.*, *Phosphorus Research Bulletin*, **17** (2004) 130-141.
- 5) S. Takemoto *et al.*, *Biomaterials*, **25** (2004) 3485-3492.
- 6) T. Kokubo *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24** (1990) 721-734.
- 7) Y. Kuboki *et al.*, *Archives of BioCeramics Research*, Vol.5 (2005) p.146.

## コラーゲン内に形成される石灰化微粒子の検出

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
○山下菊治・石川達夫・角田佳折・阿部佳織・三宮雅美・北村清一郎

### 1. 序論

骨組織中に認められるナノレベルの微粒子としては、骨の細胞外基質中に形成される基質小胞（マトリックスベジクル）がある。この基質小胞は骨芽細胞が形成分泌したコラーゲンの石灰化の引き金となるべく骨芽細胞が分泌する膜性顆粒である。この基質小胞は、直径が40~200nmの脂質二重膜で囲まれた構造物で、ALP、アネキシン、フォスファチジルセリンなどの酵素や生理活性物質が含まれる。この基質小胞は初期石灰化の核となり、小胞内にヒドロキシアパタイトの結晶様構造物が現れる。結晶様の構造物は増大し、やがて小胞膜を断裂する。更に石灰化は小胞膜へと広がり、石灰化球になる。大型化した石灰化球は、周囲のコラーゲン繊維に到達する。石灰化領域はコラーゲン繊維に沿って進行するコラーゲン性の石灰化によって拡大する。しかし、我々の研究からコラーゲンの再石灰化には、骨芽細胞も基質小胞も介さない球状石灰化が存在する事を見いだした。そこで、本研究ではコラーゲンの再石灰化としての、基質小胞よりも更に微細なナノ粒子としての石灰化結晶粒子の組織学的検出を試みた。

### 2. 材料と方法

- ・熱変性骨基質ゼラチン (BMG) の作製  
200μlのSD系ラット（生後2週齢）の大腸骨と脛骨の骨幹部を洗浄抽出し、クロロホルム：メタノール(1:1)で長時間脱脂後0.6N塩酸 48時間、2M塩化カルシウム 24時間、0.5N EDTA 4時間、8M塩化リチウム 24時間、55℃蒸留水中で長時間処理して骨基質ゼラチン (BMG) を作製した。このBMGを粉砕して、75-500μmの骨片を集め、150℃ 30分間で2回熱処理を行った。
- ・熱変性脱炭素の作製  
30匹のSD系ラット（生後18日齢）の下顎骨から歯根未完成の第一大臼歯を取り出し、歯髄を抽出し、クロロホルム：メタノール(1:1)で1時間脱脂後、0.6N塩酸で10日間脱炭素後洗浄し、凍結乾燥を行った。この脱炭素骨基質ゼラチンと同様に150℃30分間で2回熱処理を行った。
- ・架橋コラーゲンの作製  
ウシタイプIコラーゲン（アナコシ）を37℃にてCa、Mg不含のリン酸緩衝液で線維状ゲルとし、6000rpm、30分間で遠心分離を行い洗浄した。このコラーゲンを0.15N NaCl含有の0.2%グルタールアルデヒドにて2週間処理を行い、洗浄後凍結乾燥した。



### ・移植及び観察

90匹のSD系ラット（生後5週齢）を3群に分け、麻酔下で各群に2.0mgの熱変性BMC、熱変性脱灰歯、架橋コラーゲンを同側の腹直筋内に移植した。移植後、1、3、5、7、10、14日後に定法に従って光学顕微鏡、透過型および走査型電子顕微鏡にて観察を行った。

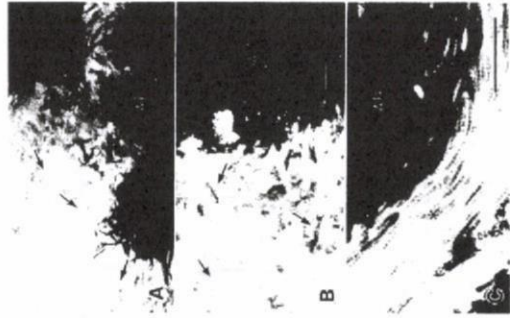
### 3. 結果と考察

熱変性BMCでは移植後3日目にアリザリンレッド強陽性な球状石灰化物が多数出現し、辺縁部に多く、中央部はまばらで小さいものが多かった。球状石灰化物は経時的に増加し、癒合して不規則な形態を示した。熱変性脱灰歯でも3日目からエナメル質側の象牙質表層から球状石灰化物が散在性に認められ、次第に歯髄側へと広がり、14日目では象牙質の全層が癒合した球状石灰化物で占められていた。架橋コラーゲンに関しても、やはり3日目から辺縁のコラーゲン線維束に散在性に石灰化領域が認められ、コラーゲンの長軸に沿って石灰化領域は広がり、また隣接するコラーゲン線維にも拡大し、相互に融合していた。

透過型電子顕微鏡にて観察すると、熱変性BMCでは3日目で直径1~5 $\mu$ mの球状石灰化物が散在していた。熱変性脱灰歯では、結晶石灰化粒子の形態は3日目では不明瞭で、5日目では直径4~8 $\mu$ mの球状石灰化物が散在性に観察された。

架橋コラーゲンでは、3日目では細片線維様の石灰化物の集合する石灰化領域が非石灰化コラーゲン線維間に散在するのが観察された。さらに、初期の結晶石灰化粒子を観察すると熱変性BMCでは直径20~40nmで長さ100~200nmの針状結晶が密集して形成されていた。(図1A)熱変性脱灰歯では、直径10~20nmで長さ100~200nmの針状結晶が密集して形成されていた。(図1B)周囲のコラーゲンは同様の構造変化を示した。一方、架橋コラーゲンの石灰化領域は計測不能なほど細い針状結晶が凝集して形成されていた。石灰化物周囲のコラーゲンの石灰化領域はD周期を持ち走行にほぼ一定の方向性が見られるが、線維の散開はほとんど認められなかった。(図1C)以上の様に石灰化微粒子の観察は電子顕微鏡を用いれば形態的に検出が容易であり、アパタイト形成を引き起こすような処理をしたカーボンナノチューブなどのナノ微粒子が開発されれば可視化が可能ではないかと推測される。

図1. コラーゲンの結晶石灰化粒子



### イメージング質量分析を用いた生体組織観察 (5)

ブルカー・ダルトニクス株式会社

○重澤 崇

東北大学 大学院環境科学研究科

佐藤 孝倫・田路 和幸

フラレン誘導体の修飾部位であるsp<sup>3</sup>結合にエネルギーを与えると、「フラレン」と「誘導体」に解離することに注目し、フラレンが質量イメージング分子として使用できることを提案してきた。前回は、水溶性フラレン (C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>) を注入したラットの1時間後と24時間後の臓器の切片をイメージング質量分析することにより、C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>の各臓器に対する分布を測定した。その結果から、C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>を注入したラットの1時間後の肝臓の切片の質量イメージングとその質量スペクトルから、720 m/z にC<sub>60</sub> (質量数720) に相当するピークを検出し、フラレン構造が壊れるときの特有な解離フラグメントC<sub>2</sub> (24 Da) ロスも確認されたことから、肝臓にC<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>が存在することが示唆された。本報告では、さらに注入量を増加させたC<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>注入ラットの1時間後と24時間後の各臓器の切片をイメージング質量分析し、かつ統計解析を報告する。

図1はC<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>を注入したラットの1時間後の肝臓の切片の質量イメージングとその質量スペクトルである。肝臓の切片の質量スペクトルから、C<sub>60</sub> (質量数720) に相当するピークを検出された。一方、C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージングとピーングとその質量スペクトルから (図2)、C<sub>60</sub> (質量数720) に相当するピークを検出し、また肝臓切片のすべての場所にもC<sub>60</sub>がイメージングされていることから、C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>が満遍なく肝臓に存在することが明らかになった。さらにC<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージングにおいて、質量数720での受信者動特性曲線 (ROC 曲線) \* を描いた結果、確位差のある曲線が得られ、確かにC<sub>60</sub>が肝臓に存在することが示唆された。また主成分解析 (PCA) における主成分1および主成分2のローディングプロットでも、質量数720がアウトライアとして現れていることから、C<sub>60</sub>が肝臓組織に元々存在しないものであることを示した。

以上から、TOF-MS 質量イメージングを用いることにより、C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>を注入した24時間後のラットの肝臓でのC<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>の存在を確認した。当日は他の臓器のTOF-MS 質量イメージングを報告する予定である。

\* receiver operating characteristic curve: 縦軸を真の陽性率 (感度)、横軸を偽陽性率 (1-特異度) としたプロットした尺度曲線。プロットが左上隅にあるほど、対象値の精度が高く優れていると判断される。

## 肝細胞の増殖におよぼすカーボンナノチューブの影響について

北海道大学大学院薬学研究科

伊藤 佐智子, 赤坂 司, 〇八 若保孝, 巨理 文夫

肝臓の正常細胞および癌細胞を用いて、カーボンナノチューブ (CNT) 存在下において細胞の増殖、成長に与える影響を検討した。正常細胞、癌細胞をそれぞれ37℃、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養し、その後CNTを添加させた培養液にてさらに培養を続け、CNT無添加のコントロール群と比較した。CNTは硝酸にて酸処理を行ったものと同様で、細胞形態に変化はみられなかった。また、CNTをあらかじめコーティングしたディッシュにて細胞を播種、培養し、コラーゲンディッシュ上で培養を行った場合と比較した。コラーゲンディッシュ上には細胞播種直後より細胞の付着がみられたがCNTディッシュではほとんどみられなかった。

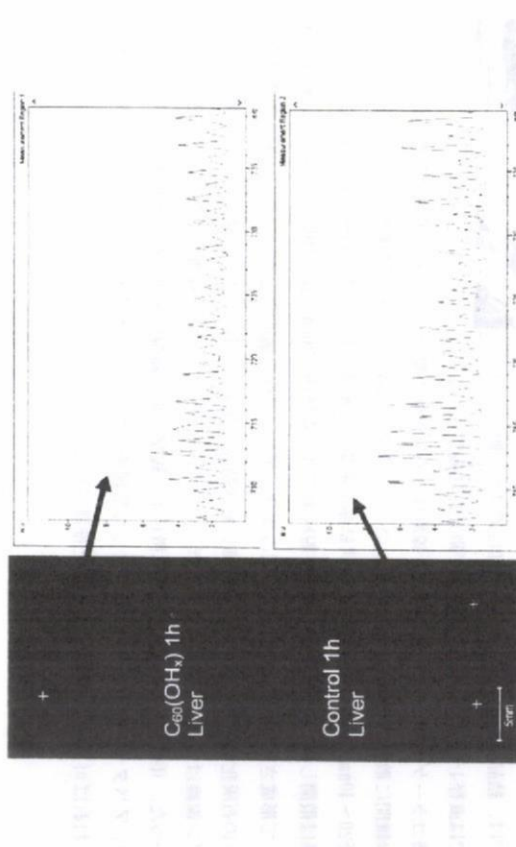


図1 Ce<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>を注入したラットの1時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。上部: Ce<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>を注入したラット切片, 下部: コントロール切片。

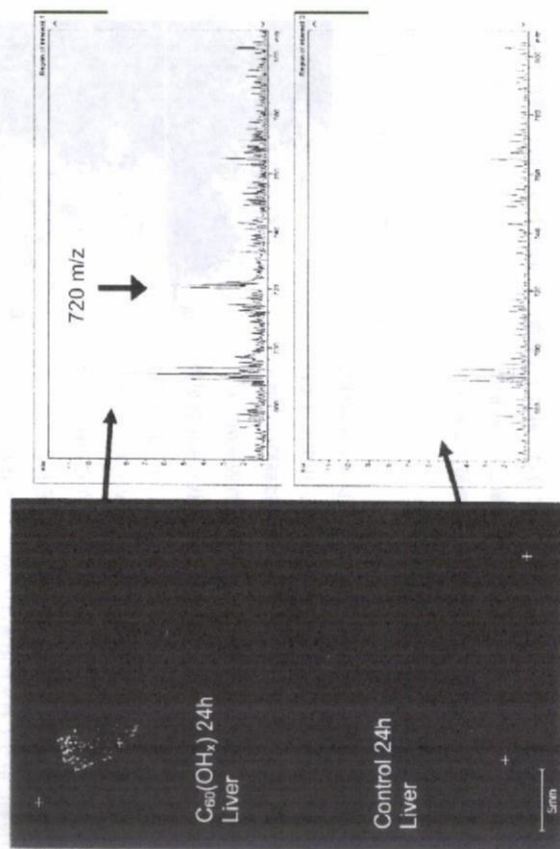


図2 Ce<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>を注入したラットの24時間後の肝臓の切片の質量イメージマッピングとその質量スペクトル。上部: 水酸化Ce<sub>2</sub>切片, 下部: コントロール切片。

## X線化学顕微鏡の開発

北海道大学触媒化学研究センター

○朝倉清高・宮本剛志・新美大伸・鈴木秀士

### 1. 序

表面や生体研究においては、電子線によるダメージ等が問題となる場合がある。X線は物質との相互作用が弱いので、一般にダメージが小さい。また、X線は内殻を励起するのに十分なエネルギーを持っていることから、元素選別を行うことも可能である。そこで、ソフトマテリアルの化学マッピング可能なX線光電子放出顕微鏡(EXPEEM)とX線励起走査探針顕微鏡(XANM)の開発を行った。

### 2. EXPEEM(energy filterend X-ray photo emission electron microscopy)

X線を用いて、飛び出してくる光電子のエネルギーを分析しながら拡大投影するEXPEEM装置は、光電子エネルギー分析器として半球型のエネルギーアナライザが用いられてきたため、光軸が曲がる。そこで、本研究では、高感度な多極子Wien filterを用いることで、光軸を直線に保ちながら、顕微像を測定し、化学状態を分析できる新しいシステム開発に取り組んだ。図1に装置写真を示す。

数分で測定可能

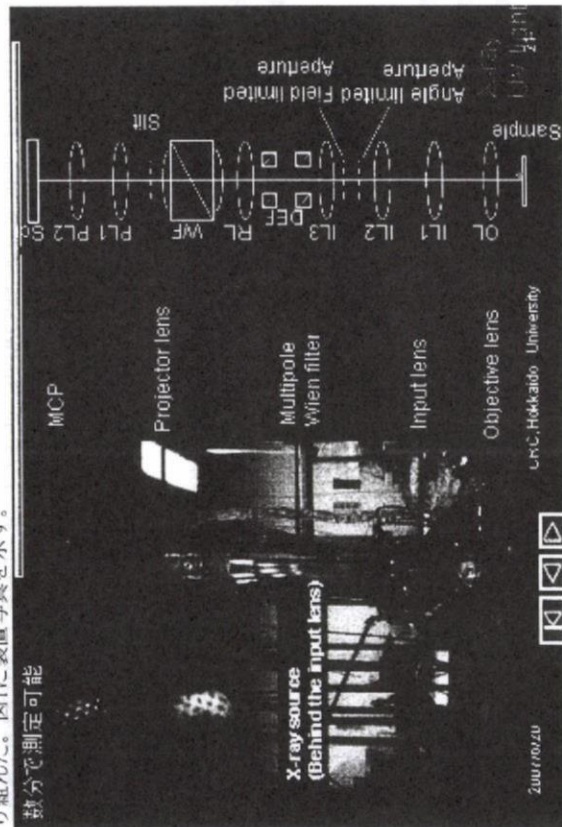


図1 Wien filter型EXPEEM装置

Wien filterでは、電場と磁場を直交させて光電子に印加する。するとWien条件  $eE = ev \times B$  を満たしたとき、電子は直進し、それ以外のエネルギーでは電子が曲がってしまうため、Wien filter出口にスリットをおくことで、特定のエネルギーを選別することができる。この多極子Wien filterは、内部の電磁場を調整することで、filterの収差を3次の項まで補正できるものであり、10-100倍の感度が向上し、100 nmの空間分解能を達成でき、Au/TiやNi<sub>2</sub>Pの顕微観察を行った。また、放射光のような大型な加速器を必要としないように、実験室規模高輝度X線源を作り、これを用いて、元素分析像の取得を行った。

### 3. XANM(x-ray aided non-contact atomic force microscopy)

XANM法は、NC-AFMと放射光を組み合わせることで原子レベル元素マッピングを行う技術である。X線の吸収端付近の波長を掃引して入射させながら、NC-AFMで力の強さを測定すると、図2に示す吸収端でカンチレバーと表面との相互作用が特異的に変化する現象を観測した。この現象を利用して、図3に示すようにAuの画像を取得した。X線を照射することで、Au領域の凹みが増えている。また、AuのL吸収端だけでなく、NiなどのK吸収端においても放射光による力の変化を観測し、汎用性を示すことができた。

### Au L<sub>3</sub> Absorption Edge

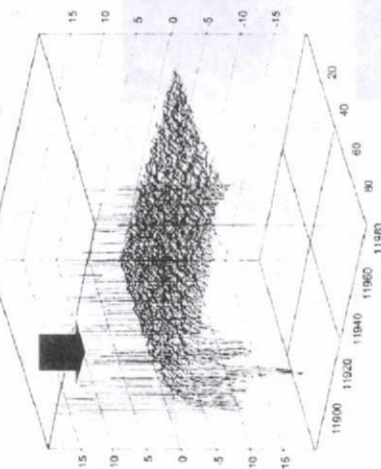


図2 カンチレバーのエネルギー依存スペクトル

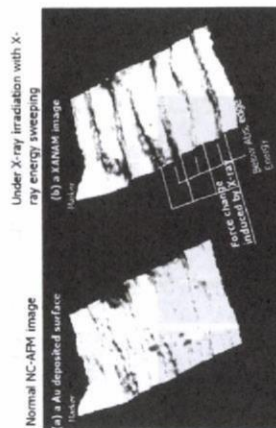


図3 a) 通常のNC-AFMとb) XANM

## カーボンナノチューブコートした3次元培養担体の作製と評価

- 平田恵理<sup>1</sup>、宇尾基弘<sup>2</sup>、亘理文夫<sup>2</sup>、横山敦郎<sup>1</sup>  
1)北海道大学大学院歯学研究科口腔機能補綴学講座  
2)北海道大学大学院歯学研究科生体理工学講座

### 1. 緒言

我々はこれまでカーボンナノチューブ(CNTs)を細胞培養担体に応用する研究を行っており、CNT膜上での骨芽細胞の培養において良好な細胞の増殖や付着性を報告してきた。このような特徴を生かした上で3次元培養担体の利点である培養面積の増加と立体的な骨構造の構築を付与するためCNTを表面にコートした3次元培養単体を作製し骨移植用のスキヤポールドへの応用を目指して、その評価を行った。

### 2. 実験方法

#### I. CNTコートしたコラーゲンスポンジの作製

精製・親水化処理した多層カーボンナノチューブ(MWCNTs:直径20~50nm, CNT Co.Ltd, Korea)を界面活性剤水溶液(コラーゲナトリウム:0.1wt%)に100ppmになるよう分散させた。同分散液中にコラーゲンスポンジハニカム(ポアサイズ100~300 $\mu$ m直径9mm, 厚さ2mm; AteloCell<sup>®</sup>, Koken Co., Ltd)を浸漬し、1時間振とうさせた後、洗浄しCNTコートスポンジを作製した。

#### II. MC3T3E1細胞の培養

マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を含む細胞懸濁液( $3.0 \times 10^4$  cells/ml)を各200 $\mu$ l播種し、適法にて4週まで培養した。その後SEMにてスポンジ表面での細胞の付着状態、光学顕微鏡にて内部への細胞の伸展を観察すると共にアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定し、同担体の細胞培養特性を評価した。

#### III. *in vivo*における生体適合性の評価

6週齢のwistar系ラット皮下組織に、対照群としてコラーゲンスポンジを、実験群としてCNTコートスポンジをそれぞれ埋入した。術後1,4週に試料を含む皮下組織を摘出し、固定した後HE染色し光学顕微鏡にて観察を行った。

#### IV. *ex vivo*への応用

Maniapolisの方法に準じてラット骨髄細胞を採取し、初代培養後デイッシュに付着する細胞を回収し各スポンジ上で骨芽細胞へ分化誘導しながら培養し、4週後ラット皮下組織に埋入した。術後4週で試料を含む皮下組織を摘出し異所性の骨形成を観察した。

### 3. 結果

図1は得られたCNTコートスポンジ表面のSEM像を示す。MWCNTsは、コラーゲンスポンジ表面を均一に被覆しており、MWCNTs特有の繊維状構造を持ち、コラーゲンスポンジの細孔構造は保たれていた。

図2は1週培養後の同スポンジ表面のSEM像を示す。細胞はその表面で特徴的な付着状態が見られた。さらに光学顕微鏡による観察では、細胞はスポンジ内部へ侵入している状態が観察された。コラーゲンスポンジと比較しCNTコートスポンジではDNA量は有意に高くALP活性では有意差はみられなかった。

両スポンジを皮下埋入した1週後、周囲組織には肉芽組織やマクロファージ等の食細胞が観察された。炎症の程度はコラーゲンスポンジの方が軽微であったが、CNTコートスポンジ周囲にもどやどやや壊死のような強い炎症反応は認められなかった。4週後にはコラーゲンスポンジはほとんど吸収されていたが、CNTは吸収されず同部に残存し、その周囲では弱い炎症反応が認められた。また、分化誘導されたラット骨髄細胞が付着したCNTスポンジ埋入後4週では、内部にわずかに骨が形成していたが、コラーゲンスポンジの方がより多くの骨形成が観察された。

### 4. 結論

本研究ではMWCNTs分散液を用いてMWCNTsをスポンジ表面に均一にコートした3次元培養単体の作製が可能となった。CNTコートスポンジは細胞が良好に増殖し、コラーゲンスポンジと同程度の活性が見られた。さらに、変性や壊死のような強い炎症反応はCNTコートスポンジの周囲では認められないことが明らかとなった。以上よりCNTsコートスポンジは、CNTsのもつ高い細胞付着性や電気・機械的特性などを付与した新たな3次元培養単体への応用が期待できると考えられた。

### 5. 参考文献

- 1) Hirata E, Uo M, Takita H, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A. Development of a 3D collagen scaffold coated with multivalued carbon nanotubes. J Biomed Mater Res B. *in press*

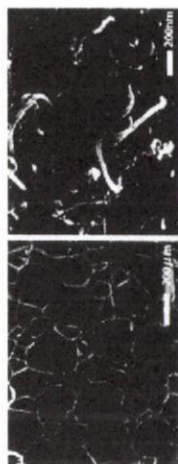


図1: CNTコートスポンジ表面のSEM像

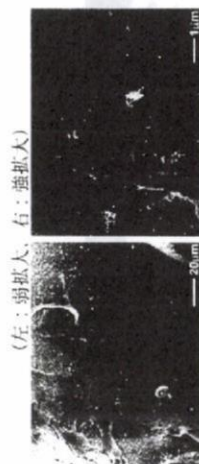


図2: CNTコートスポンジ表面の1細胞SEM像

(左:弱拡大, 右:強拡大)

## ナノ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ーラーゲン複合体のBMP担体としての有効性

北海道大学大学院薬学研究科

○天雲太一・菅谷勉・川浪雅光・豆理文夫

#### 1. 目的

BMPには硬組織誘導作用だけでなく硬組織吸収も活性化することが報告されている。これはリン酸カルシウムの含有量が強く影響を及ぼしている可能性があり、本研究ではナノハイドロキシアパタイトコーラーゲン(nHAC)複合体のナノハイドロキシアパタイト(nHA)の含有量の違いが、BMPによる骨形成に及ぼす影響を組織学的に検討した。

#### 2. 実験方法

##### 1) ナノハイドロキシアパタイトコーラーゲン複合体の精製と物性の検討

アテロコーラーゲンを塩酸に溶解した塩酸1型コーラーゲンに、Ca:P比が5:3になるように中性リン酸buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (9, 6.75, 4.5mmol/l) と、CaCl<sub>2</sub> (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(1-エチル-3-(3-カルボジイミド塩酸塩)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。精製した複合体膜(以下nHAC膜)を500℃で焼却することで、ナノハイドロキシアパタイト/コーラーゲンの比率を割り出した。またX線回折、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ーラーゲンの異なるnHAC複合体膜にBMP-2を含有させた場合の組織反応

(1) 1)で精製したnHAC膜を4×4mmにトリミングし、PBSにて数回洗浄し、1000U/ml penicillin, 1000U/ml streptomycin含有PBSに24時間浸漬した。その後、100ng/mlに調整したrhBMP-2(B&D)に、10分間浸漬した。次いで、8週齢のウィスター系雌性ラットの背部皮下結合組織内にBMP-2を含有させたnHAC膜を移植した。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抽出し、10%ホルマリン(pH7.4)にて固定、10%EDTA(pH7.0)にて脱灰後、適法に従いパラフィン包埋を行った。その後、厚さ5μmの連続切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。

#### 3. 結果

##### 1) ナノハイドロキシアパタイトコーラーゲンの異なるnHAC複合体膜のX線回折およびSEM観察

700℃で焼却した結果、リン酸緩衝溶液および、CaCl<sub>2</sub>の添加量を減らすことでナノハイドロキシアパ

タイト/コーラーゲン比が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。またX線回折(図1)、FT-IR分析(図2)およびSEM像の結果、精製したnHAC膜はナノハイドロキシアパタイトとコーラーゲンの複合体膜であると判断した。

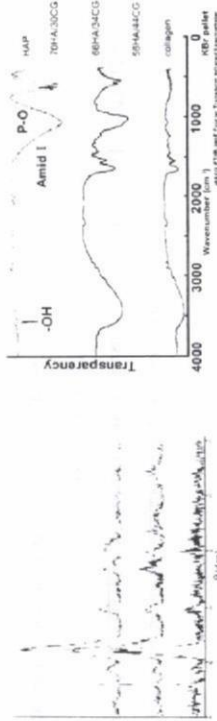


図1 X線回折

図2 FT-IR

2) ナノハイドロキシアパタイトコーラーゲンの異なるnHAC複合体膜にBMP-2を含有させた場合の組織反応

2週, 4週ともに重篤な炎症性反応は認められなかった。2週ではHA/コーラーゲン比が70/30の場合で、分解されたnHAC膜内に新生骨が確認されたが、ほかの群では認められなかった。4週において、HA/コーラーゲン比が70/30の場合、nHACがほとんど消失して新生骨に置換されていた(図3a)。64/36の場合、nHACの小片が残存し、その周囲に新生骨の形成が観察された(図3b)。56/44の場合では、新生骨は観察されなかった。(図3c)

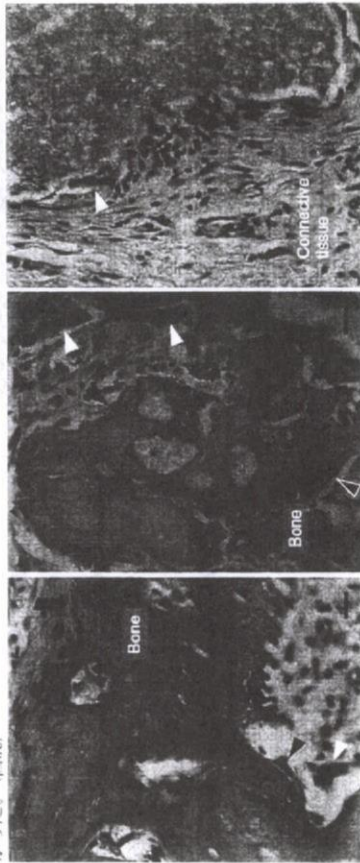


図3 4週後の組織像

a 70/30

b 66/34

c 56/44

#### 4. まとめ

ナノハイドロキシアパタイトコー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。

## SALDI-MSに適した新規白金ナノ構造体

東京大学 大学院理学系研究科  
○米澤 徹

### 1. はじめに

高分子の素性を理解したり、その劣化や安定化について語るときに、質量分析を行うことは非常に多い。また、生体系高分子の機能解析においても質量分析の役割はきわめて大きいといえる。そのなかで最近着目されている手法としてレーザー脱離イオン化分析法があげられる。そのなかでも、マトリクスと呼ばれる有機分子を添加して、パルスレーザーを照射することによって、サンプル分子を分解することなく脱離・イオン化させることをMALDI-MS法という。しかしながら、MALDI-MSの場合、マトリクスに対してはLDIの状態であるので、マトリクス分子の脱離・分解・イオン化が生じて、雑ピークを沢山示してしまう。それに対し、有機マトリクス分子を用いずに、対象物をレーザーによって脱離・イオン化することを促進するよう無機固体表面を利用するレーザー脱離イオン化法をSALDI-MS (表面支援LDI-MS) という。<sup>1)</sup> 本手法のメリットは、低分子量領域のスペクトル解析が容易になることと、感度の場所依存性 (スイートスポット) が小さくできるという利点がある。前者は、分解生成物の同定が容易になることと、後者はマスマッピングが可能となるという点でメリットが大きい。

本発表では、筆者らがこれまでSALDI-MS法に適したナノ構造体について検討を重ねた結果を報告する。いくつかの金属のなかで白金が適していることが知られているので、本研究では白金の特殊な構造体の形成とそのSALDI-MSへの応用について検証した結果を述べたい。

### 2. 実験

本研究では、SALDI-MS法に適したナノ構造体として、これまでの研究結果から白金を選択した。<sup>2)</sup> 原料として塩化白金(IV)酸を用いて水中で半酸を還元剤として還元した。還元温度は常温である。反応によって、半酸は二酸化炭素に変わりとされている高温で半酸還元すると球状の白金ナノ粒子が得られるが、常温で反応させることによって異方性粒子を得ることができる。得られた白金ナノ構造体のSEM写真を図1に示す。球状ではなく、針状の

結晶が見られるのが分かる。こうして得られた針状白金ナノ構造体を水に分散させ、ステンレスのサンブルプレート上に塗布し、SALDI-MS用サンブル台とした。プロトン付加材料としてクエン酸を用いた。これによってナトリウム付加体、カリウム付加体を効率よく除くことができる。SALDI-MSは、窒素パルスレーザー(337 nm)を用いた島津 AXIMA-CFRを用いて測定した。

### 3. 結果

図1のように得られた白金ナノ構造体を用いてSALDI-MS測定を行った。いずれの生体系高分子もよくイオン化されることが見出された。図2に示すようにアンジオテンシンIが検出されることがわかった。また、低分子量領域にフラグメントが殆ど見られないという優れた特徴を有している。さらに、高分子量のペプチド、蛋白質である、サブスタンスP、インシュリン、チトクロームC、トリプシノーゲンなどのイオン化にも成功し、現状では、SALDI-MSでもっとも高分子量の有機化合物をいおんかできると考えている。

これは、針状の構造によって、対象有機物の吸着が比較的容易になったことが影響していると考えられる。

さらに針の形状が長い白金構造体の調製にも成功した。それを用いた場合には、高分子量の物質のイオン化がさらに有効に進むことが見受けられ、ナノ構造が有機化合物の脱離・イオン化に大きく影響することが見出された。

### 参考文献

- [1] J. Wei, J. M. Buriak, and G. Siuzdak, *Nature*, 399, 243 (1999).
- [2] H. Kawasaki, T. Yonezawa, K. Nishimura, and R. Arakawa, *J. Phys. Chem. C*, 111, 16278 (2007).
- [3] 米澤 徹, マテリアルライズ, 20(3), 125-130 (2008).
- [4] T. Yonezawa, H. Kawasaki, et al., *Anal. Sci.*, in press.

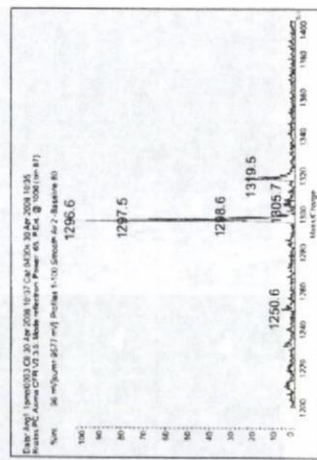


図2 アンジオテンシンIのSALDI-MSスペクトル

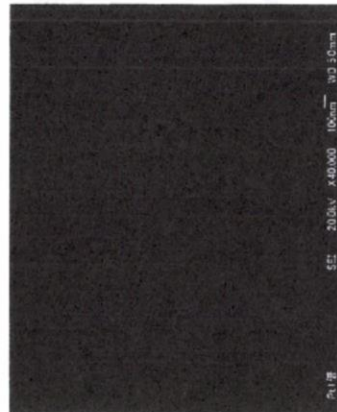


図1 白金ナノ構造体のSEM像

## ポリエチレン微粒子により惹起される異物性炎症反応の バイオイメージングによる可視化に関する研究

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

### 1. 研究目的

人工関節置換術後に磨耗微粒子によって誘発されるインプラント周囲の骨溶解(オステオライシス)は最も重要な合併症の一つであり、インプラントの耐用年数や臨床成績に大きな影響を及ぼす。このオステオライシスの原因として、近年、バイオロジカルな機序が注目されている。すなわち、人工関節の主として摺動面より生じた磨耗微粒子が滑膜の細胞(主にマクロファージ)を刺激して、TNF- $\alpha$ やIL-1などの骨吸収性サイトカインや、COX-2の誘導を介してのプロスタグランジンE<sub>2</sub>の産生をうながし、これらは骨芽細胞・ストロマ細胞のRANKL発現を介した破骨細胞分化を促して、インプラント周囲の、関節液・磨耗粉がアクセスしうる部位でのオステオライシスを生じさせるといえる。

Nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B) は炎症をつかさどる転写調節因子としてその地位は確立している。LPSや炎症性サイトカイン・フリーラジカル等に代表される炎症刺激シグナルが細胞に入る時、細胞内シグナル伝達経路をへて核外にあるNF $\kappa$ B complexよりI $\kappa$ Bが解離し、遊離したNF $\kappa$ Bは核内に移行して、たとえば炎症性サイトカインのゲノムDNAのプロモーター領域にあるNF $\kappa$ B結合領域に結合し、下流の配列のmRNAへの転写を促す。現在ほとんど炎症性サイトカインはNF $\kappa$ Bにより何らかの転写制御を受けることが判明しており、またマクロファージが磨耗粉刺激に応じて炎症性サイトカインを産生・分泌するメカニズムにもNF $\kappa$ Bは必須であると報告されている。さらに、これら炎症性サイトカインの刺激を受けて骨芽細胞やストロマ細胞がRANKLを産生する機序、および単球・マクロファージ等の破骨細胞前駆細胞が破骨細胞に分化する機序にもNF $\kappa$ Bは大きく関与していると考えられており、磨耗粉によって生じるオステオライシスのカスケードのあらゆる段階においてNF $\kappa$ Bは重要な役割を果たすと言える。

近年、GFPの蛍光やLuciferaseによる化学発光を高感度で検出することが可能な装置の開発が進み、またマウスの遺伝子改変技術の普及により、マウスを屠殺することなくin-vivoでこうした発光を検出・定量するイメージング技術が急速な進歩を遂げている。われわれは、磨耗粉に誘発されるオステオライシスにおいてNF $\kappa$ Bが重要な役割を果たすことに着目し、NF $\kappa$ B/luciferaseトランスジェニックマウス(以下NF $\kappa$ B/lucマウス)に磨耗粉を投与することにより、生じる炎症反応を可視化する可能性を着想した。本研究の目的はこの可能性の検証、および可視化した発光の定量値

が実際の炎症反応を反映するかを検討することである。

### 2. 実験方法

#### 1. マウス

NF $\kappa$ B/lucマウスはNF $\kappa$ Bの結合サイトを5回繰り返した配列の下流にluciferase cDNAを結合したconstructをtransgeneとしこれを過剰発現させたマウスで、炎症性疾患モデルの発症に伴い炎症部位が化学発光する性質を有する。本マウスは米国 Caliper Lifesciences 社より購入した。本実験はすべて北海道大学医学研究科動物実験プロトコールに準拠して施行された。

#### 2. マウス頭頂骨磨耗粉負荷モデル

ポリエチレン磨耗粉として、Ceridust 3615 (Clariant Japan, 平均粒径7 $\mu$ m)を、75%エタノールにて48時間処理後真空乾燥させて用いた。  
生後7-8週間のNF $\kappa$ B/lucマウスを用い、腹腔内ネブタール麻酔(50mg/kg)後、頭部に5mm長の縦切開を加えたのち骨膜を剥離して、ポリエチレン磨耗粉5mgを散布後、5-0ナイロン糸にて皮膚を縫合した。皮切・骨膜剥離のみ行い磨耗粉負荷を行わないマウスをSHAM群とした。

マウスはdールシフェリン溶液(10mg/ml)を200 $\mu$ l尾静脈より注射後、2分にてIVIS imaging system (200 series, XENGEN)により頭部の化学発光の検出を行った。イメージングした発光領域をカバーするROI (range of interest)を設定し付属ソフトウェアにより発光量の定量を行った。化学発光検出後、マウスを安楽死させ頭頂骨を摘出し、一部はルシフェラーゼ活性検出キット(Picogene)によりルシフェラーゼ活性を、一部は全RNAを抽出後リアルタイムPCRにより骨吸収性因子(TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , RANKL, COX-2)およびGAPDHのmRNAを定量した。mRNA相対量はGAPDH値により補正した。骨形態計測は、摘出頭頂骨の矢状面中央部にて前縁面の非脱灰研磨標本を作製し、Villanueva bone stain染色を施したのち破骨細胞数、破骨細胞面、eroded surfaceの算定を行った。

統計学的には群間の比較にはANOVAを用い、相関の検討には相関分析を用いた。いずれもp<0.05をもって有意差ありとした。

#### 3. 結果

①ポリエチレン粒子5mg負荷後7日目のマウスの頭頂骨を組織学的に検討したところ、中央部前縁断面像において矢状面中心とした線維性の肉芽組織の形成を認め、これは主に骨表面に接した部位での破骨細胞の形成を伴っていた。ポリエチレン磨耗粉負荷後7日目にバイオイメージングで検討したところ、頭部に化学発光を認めた。定量評価では2mg以上の負荷により発光量は有意に増加し、5mg投与群が最も発光量が多かった。また5mg負荷後経時的に発光量を追跡したところ、SHAM群と比べ負荷後3日目より発光量は有意に増加し、発光量は負荷後7日目で最大であった。

②経時的に化学発光を定量した後、頭頂骨を摘出し、矢状面にて縦に2分割し一方よりルシフェラーゼ活性を検出。また一方より全RNAを抽出して骨吸収性サイトカインmRNA定量を行った。IVIS

による化学発光の定量値と実際の頭頂骨のルシフェラーゼ活性は有意な相関を認め、発光定量値はルシフェラーゼ活性を反映していることが確かめられた。

③骨吸収因子のmRNAは、すべて経時的に有意な上昇を示した。発現量のピークは、TNF- $\alpha$ で負荷後10日であり、IL-1 $\beta$ 、RANKL、およびCOX-2では負荷後8日目であった。これら骨吸収因子のmRNA発現量と化学発光のイメージング定量値の相関を検討したところ、いずれも正の相関を認め、発光定量値は骨吸収因子mRNA発現量を反映することが示された。

④破骨細胞数(NOc/BS)、破骨細胞面(OCs/BS)、eroded surface (ES/BS)はすべて負荷ポリエチレン量に量依存的に増加した。これらはすべて化学発光のイメージング定量値と正の相関を認め、発光定量値は骨吸収量を反映することが示された。

#### D. 考察

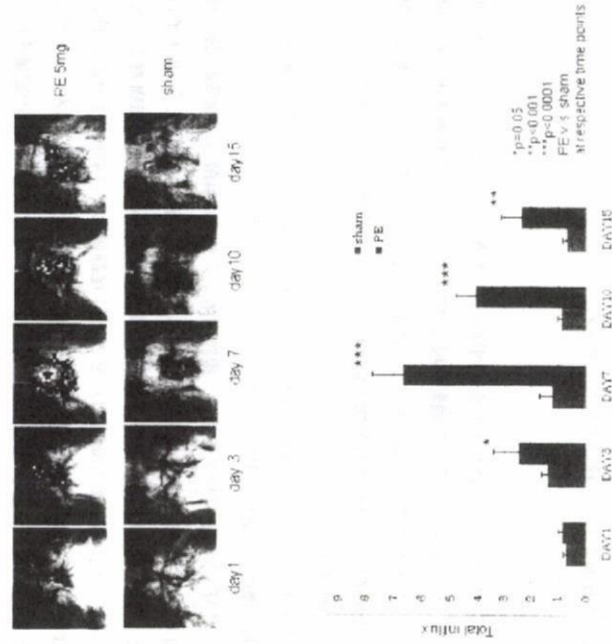
摩耗粉により生じるオステオライシスに関する評価実験系として、in-vitroではマクロファージなどの培養細胞に摩耗粉を添加して培養上清中の骨吸収性サイトカイン濃度を計測するなどの手法が主である。また小動物を用いた in-vivoのモデルではマウスやラットを用い、皮下エアバウチに骨片及び摩耗粉を置く、ないしは頭頂骨上に摩耗粉を負荷するなどして、骨に生じた溶解組織学的に評価する系が主流である。近年オステオライシスを予防すべく器動面の素材をポリエチレン以外の材料(セラミックや金属など)に替える、また予防薬としてビスホスホネート製剤や炎症性サイトカインに対するインヒビター(抗体やデコイレセプターなど)等を用いるなどの検討が in-vivoレベルで盛んになされている。こうした実験の評価は主として組織学的ないしは分子生物学的解析を行うのが一般的であり、たとえば経時的解析を行うに当たり、実験動物は多数屠殺せざるを得ず、また同一個体における経時変化をリアルタイムに観察するのは困難であった。

In-vivoバイオイメージングは、生体内で起こる炎症・再生・血管新生そのほかあらゆる現象に、レポーター遺伝子の反応を応用して生きたままリアルタイムで可視化する技術であり、今日、各種疾患モデルの評価に、多岐にわたって用いられている。NF $\kappa$ B/lucマウスは2002年に初めて報告されたが、関節炎、関節炎、紫外線誘発皮膚炎、肺炎などの評価に用いられた実績があり、炎症の評価系として極めて有用であると思われる。本研究ではポリエチレン摩耗粉を用いて化学発光を検出できたが、これには、たとえば炎症部位の体内深部に伴う減衰や、摩耗粉の色・量による減衰などの考慮も必要である。たとえば白色は減衰に比較的抵抗性であるが黒色では減衰が生じやすいとされ、マウス頭頂骨オステオライシスモデルで汎用されるチタン粉等はこの系での評価には不適当であろうと推測される。またポリエチレン負荷量5mgに比べ10mgでは発光が弱かったが、文献的にはこの量では実際の炎症には差はないかと思われる。おそらくポリエチレン粉の過剰負荷による厚みで減衰が生じたのではないかと推測される。このように、摩耗粉の種類や負荷量と、実際のルシフェラーゼ活性や炎症性サイトカイン発現量との比較により、この評価系の限界に関する検討も必要である。

摩耗粉負荷の結果実際に生じる骨吸収の量と化学発光量との相関の検討は現在進行中である。また、たとえば炎症性サイトカインに対する抗体を用いてオステオライシスを抑制することは実験的には可能とされているが、このような薬物治療効果をイメージングにて観察することが可能かどうかも未だ検討中の段階である。今後さらに研究を進め、この系が摩耗粉誘発性オステオライシスの評価・スクリーニングにどの程度有用であるか見極める必要がある。

#### E. 結論

摩耗粉粒子によって生じるオステオライシスのモデルにおいて、摩耗粉負荷により生じる炎症反応の可視化を目指し、NF $\kappa$ B/luciferaseトランスジェニックマウスを用いたバイオイメージングを行った。ポリエチレン摩耗粉負荷により同マウスの頭部は経時的に化学発光を呈し、この発光は7日をピークに漸減した。この発光は実際のルシフェラーゼ活性、各種の骨吸収因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、RANKL、COX-2)のmRNA発現量、および骨吸収量と正の相関を示した。バイオイメージングはマウスを殺すことなく生体反応や各種薬剤による予防・治療効果などをモニターできる優れたシステムである。この系を用いることで、摩耗粉誘発性オステオライシスにおける分子メカニズムの解析や予防・治療効果の検討への応用が期待できるものと考えられた。







ガス導入前には点状の回折とリング回折があるが、導入後はリング回折のみとなり、その径もやや大きくなった。この変化は、 $\text{NH}_3 + \text{LiH} \rightarrow \text{LiNH}_2 + \text{H}_2$ の反応に対応すると判断した。

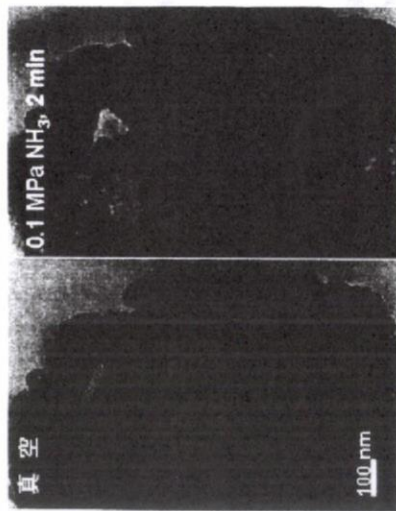


Fig. 3 Outline and diffraction patterns for NaH before and after hydrogenation

NaHの場合の結果をFig. 3に示す。これもLiHとほぼ同様の挙動を示したことから、 $\text{NH}_3 + \text{NaH} \rightarrow \text{NaNH}_2 + \text{H}_2$ の反応が生じたと判断した。

### 3.2 ガス圧依存性

Fig. 4はNaHにおけるガス導入前後の外形変化を示す。これによると面積で11~12%の増加が見られた。特に0.1MPaの場合は急激な体積膨張がLiH、NaHともに認められ、0.01MPaまで減圧すると、この体積膨張はゆっくりと進行し、30分程度でほぼ飽和した。以上の結果より、LiHとNaHの0.1MPaの $\text{NH}_3$ ガス反応のその場観察は可能であることが示された。今後はこの変化量の時間依存と温度依存からその反応機構を検討することにした。

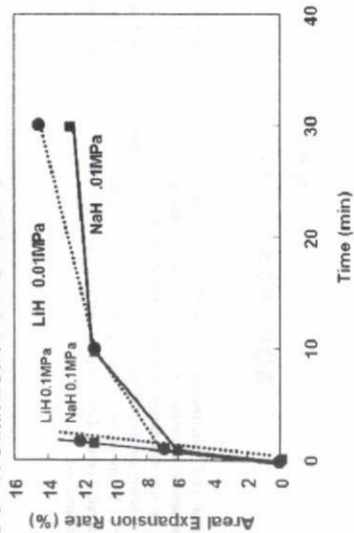


Fig. 4 Volume expansion of NaH and LiH in Ammonia gas at different pressure

なお、この環境セルでは0.2MPaの圧力でも使用できることが確かめられたため、室温から200°C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。

### 3.3 超高压電顕での環境セルのデザイン

以上のように汎用型電子顕微鏡で積み上げつつあるECの技術をもとに、高分解能での観察を期待できる超高压電顕にECを構築するべく、その設計に取りかかっている。Fig. 5はその概略である。



Fig. 5 Concept of environmental cell for HVEM

超高压電子顕微鏡の場合、電子線の透過能は大きい。薄膜の厚さは大きな問題ではないが、高真空の確保とガスリーク時の放射の保護が大きな課題であり、微量リークディテクターとゲートバルブの安全回路が重要であり、この確保に多額の経費を要する。一方、温度制御機構は広いレンジギャップのため比較的容易であると推定されている。

### References

- [1] P. Marikar, M. B. Brodsky, C. H. Sowers and N. J. Zaluzec: *Ultramicroscopy*, 29 247-256 (1989)
- [2] P. L. Gai, J. Solid State Chem., 49 25-42 (1983)
- [3] G. Raynerd, J. A. Venables, 23 432-433 (1987)
- [4] I. M. Robertson: *Engineering Fracture Mechanics*, 68 671-692 (2001)
- [5] T. Yamamoto, H. Inui and M. Yamaguchi: *Mater. Sci. Eng. A*, 329-331 367-371 (2002)
- [6] T. Nakagawa, T. Ichikawa, R. Iida, H. Leng, N. Takeichi, T. Kiyohayashi, H. Takeshita and H. Fujii: *J. Alloys Comp.*, 430 217-221 (2007)

## MWCNT induced oxidative stress and vacuolar structure changes to *Arabidopsis* T87 suspension cells

北海道大学大学院地球環境科学院

Chun Lin, Bunshi Fugeitsu

雲南農業大学

○Youbou Su

北海道大学大学院歯学研究所

Fumio Watari

**Abstract:** *Arabidopsis* T87 suspension cells were used as the model cells for study the reactivity of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) toward the plant cells. Our results have shown that both the as-received MWCNTs and the HCl-purified MWCNTs were capable of decreasing the cell viability and the mitochondrial membrane potential ( $\Delta \psi$ ) of the *Arabidopsis* T87 suspension cells. Bio-chemical analysis of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) gave high levels for cells after being incubated in media containing MWCNTs. Activity depletion was observed for catalase (CAT), peroxidase (POD) and glutathione (GSH), the three essential anti-oxidative enzymes; and this was appearing in a time-dependent manner rather than the concentration-dependent. Changes on vacuolar structures were also observed for cells treated with MWCNTs. These experimental data suggest that the oxidative stress due to the ROS accumulation is responsible for causing the damages to the *Arabidopsis* T87 suspension cells by MWCNTs.

**Introduction:** Serious concerns have been raised regarding whether carbon nanotubes (CNTs) are toxic to environmental surroundings. Studies on effects of CNTs on plants, as being carried out by CAN'AS et al. (2008) showed that CNTs can affect plant root elongation. On the other hand, the studies of Lin and Xing' indicated that CNTs did not exhibit any toxicity to plant seed germination and root growth. Those diverging results evoke the need for further investigation on their toxicity toward the plants. In our previous study, we showed that MWCNTs are toxic to *Arabidopsis* suspension cells, but the exact mechanisms to plant were still not fully understood. The aim of this study was to investigate whether low metal content CNTs are toxic to *Arabidopsis* cells, along with *in vitro* assay for ROS production and anti-oxidants depletion, and also observation of vacuolar structure changes after MWCNTs 48 h exposure.

**Materials:** The as-received MWCNTs and the MWCNTs purified with 6 N HCl for 18 h at 100°C, were used.

The amounts of metallic elemental contamination of CNTs in both samples were analyzed using inductively coupled plasma spectrometry (ICP-9000). Plant *Arabidopsis* cell T87 line was offered by RIKEN.

### Results and discussion:

#### Cell viability assay

Cell viabilities were estimated using the triphenyl-tetrazolium chlorime (TTC) reduction assay method during the time courses of cell cultivation (Figure 1). Cell viabilities ratio has been significantly affected with the first 3 days exposure of MWCNTs and carbon black. Interestingly, this inhibition, however, persist for 4 days only in the impurity MWCNTs untreated with HCl. As about 50% cells already died at the day 3. Thus studies of toxicity mechanisms should be mainly focus on the first 2 days.

#### ROS production and anti-oxidant depletion

After MWCNT exposure, ROS levels increased significantly in a time-dependent manner but not in a concentration-dependent manner in the beginning of 3 days (Figure 2). The highest level of ROS was found at day 3 in the presence of MWCNTs, which was almost 1.5 times higher than that of control. The anti-oxidative enzyme CAT activities have been depleted significantly with addition of MWCNTs from day 1 to day 2 in a concentration-dependent manner. The GSH and POD activities also shows the same trend as that of CAT in a time-dependent manner. Between PRMWCNTs and PUMWCNTs treatments, only CAT activity present significant differences indicating that CAT activity may related with removable metallic elements.

#### Membrane damages

Lipid peroxidation, a signature of ROS damage, can be detected by analysis of malondialdehyde (MDA). As shown in the Figure 3, the content of MDA did not change significantly in 24 h exposure to various MWCNTs concentrations. After 48 h exposure, large changes occurred. MDA content in 50 and 100 mg/l of MWCNTs treated cells was significantly higher than that of the control. After MWCNTs exposure, mitochondrial membrane potential ( $\Delta \psi$ ) decreased significantly compared with that of the control cells after 48 h incubation.

#### Observation of vacuole structure

As the biggest organ in the plant cells, the vacuole plays a critical role in its regulation under stress conditions (Figure 4). From large amount of observation, we have found that application of CNTs induced bulb-like structures appeared in a number of cells which account for about 20 to 30% of the whole cells after 48 h exposure. It is, however, difficult to found the same bulb-like structure in control cells. These data

indicate that MWCNTs may induce cell death via modification of the vacuolar structure to induce vacuolar membrane disintegration into bulb-like structure.

#### DNA analysis and MWCNTs Raman spectrometry determination

Bulb-like structure is one of phenomena in cell programmed cell death, which also can be identified by genomic DNA degradation. Thus, DNA analysis was performed to judge whether oxidative stress can cause genomic DNA degradation. From DNA gel profile, no any of DNA ladder could be observed, excepted for a slight smear (Data not shown), which indicate random cleaving nuclear DNA of the necrosis feature.

Raman spectroscopy provides a useful method to broadly evaluate the extent of defects present in CNTs. According to Fengjio et al. report in 2008, defects are also one of the major factors governing the toxic potential of CNTs. The  $I_D/I_G$  ratio of MWCNT increased about 0.036 from 0.639 to 0.675 after HCl purification at 100 for 18 hours, indicating that this treatment did modify the content of the defects in the tested samples. However, these modified defects are not enough to change CNT toxicity as shown in TTC and ROS determination.

#### Conclusion:

MWCNTs can induce Arabidopsis cell ROS production and anti-oxidants depletion, which can cause cell membrane disintegration and cellular organs structure change such as bulb-like vacuole that can interfere with cell cycle. Consequently, it can cause reduction of cell viability or cell death.

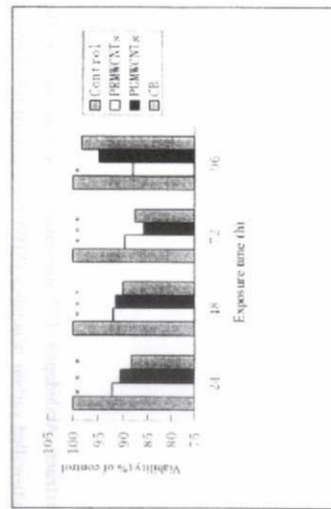


Figure 1 TTC assay in Arabidopsis T87 suspension cells after exposure to multi-walled CNTs and carbon black at the concentration of 50 mg/l in time course period. Results are the means of 3 replicates. Asterisk (\*) denote significant different from control cell culture ( $p < 0.05$ ).

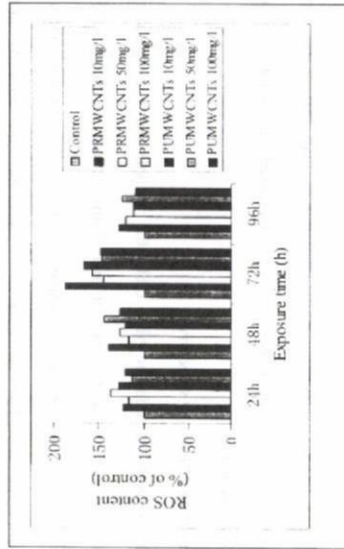


Figure 2 Time-dependent effects of different concentration MWCNTs on ROS generation in Arabidopsis T87 cells at the beginning 3 days. From day1 to day4, ROS contents in the treated cells were significantly different from controls. The results are mean  $\pm$  S.E.M. of three independent experiments. Asterisk (\*) denote significant different from control cell culture ( $p < 0.05$ ).

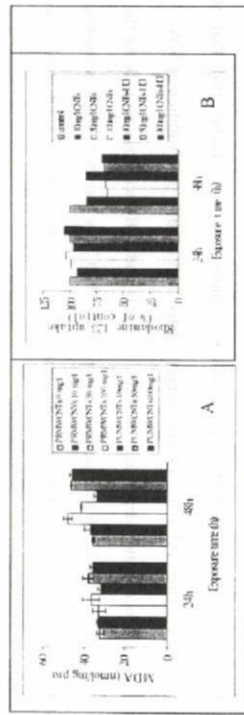


Figure 3 Effect of MWCNTs on contents of MDA and mitochondrial membrane potential ( $\Delta \Psi_m$ ) of Arabidopsis cells. (a) MDA contents in the treated cells were no significantly different from controls in 24 hours. However, MDA contents in the treated cells were significantly different from controls after 48 hours. (b) The  $\Delta \Psi_m$  was evaluated by the capacity of Arabidopsis T87 cells to take up the fluorescent cationic dye Rhodamine 123 from day1 to day2 exposed to MWCNTs.  $\Delta \Psi_m$  in the treated cells were significantly decreased compare with that of controls. These results indicate that membrane system seriously has been affected in cells. Vertical bars indicate mean  $\pm$  S.E.M. of three replication.