

もつモデル表面を調製し、それらの上で培養した細胞の挙動変化を様々な角度から観察することにより材料表面特性と細胞挙動変化との関連性を検討する。また、得られた結果から、材料に求められる生体適合性の条件や評価指標についての考察を行う。

今年度は、細胞の恒常性維持に重要な役割をもつ細胞間連絡機能に着目し、各種材料モデル表面がその機能に及ぼす影響についての検討を行った。

B. 研究方法

1. 自己組織化単分子膜を利用したモデル表面の調製

金蒸着表面への自己組織化単分子膜形成を利用した官能基モデル表面作製方法を以下に記す。

基材は、マツナミ社製の円形カバーガラス (15 mm 径、厚さ 0.2 mm) の片面に 3 nm のチタン層をコートした後に 25 nm の金属をコートしたものをを用いた (村中医療器製)。

この基材を、Pirahna 溶液 (濃硫酸と過酸化水素水を 3 対 1 で混合した溶液) 及び純水で洗浄、乾燥後、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販の decanethiol 類と反応させることでモデル表面を調製した。本研究では、以下に示す 6 種類の官能基試薬を使用して検討を行った。

1) メチル基、2) カルボキシル基、3) アミノ基、4) 水酸基、5) リン酸基、6) 硫酸基

これらの試薬を溶解した 1 mM エタノール溶液に基材を 24 時間浸漬後、洗浄、乾燥を行うことでモデル表面を調製した。メチル基とその他の官能基からなる 2 官能基

モデル表面は、1 mM の decanethiol (メチル基用試薬) エタノール溶液に他の試薬 1 mM 溶液を種々の比率で混合した溶液に基材を浸漬することで調製した。今年度使用した 2 官能基モデル表面時の調製条件は、メチル基に対する他官能基の混合比を 0:1 (0%)、1:4 (20%)、2:3 (40%)、1:1 (50%)、3:2 (60%)、4:1 (80%) 及び 1:0 (100%) の 6 種類とした。なお、調製したモデル表面特性を評価する目的で、モデル表面の水に対する接触角を Sessile drop 法で、表面に存在する元素を Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) で測定した。

2. 代謝協同阻害試験

調製したモデル表面上における細胞挙動変化については、細胞の恒常性維持に必須な機能である細胞間連絡機能を指標に用いて検討した。今年度は、細胞間連絡機能を評価する手段として Chinese hamster 由来の繊維芽細胞である V79 とその変異体を利用した簡便な手法である代謝協同阻害試験を選択した。この試験は、変異体が代謝できない 6-thioguanine を V79 が代謝して細胞毒性物質を生成し、その物質が細胞間連絡機能により変異体に移動して変異体の生育を妨げることを利用したものである。その機能阻害が生じていると結果的に変異体のコロニー形成が促進されるため、生成コロニー数から阻害程度を推定することができる。この試験で各種モデル表面上での代謝協同阻害率を測定することにより、官能基表面が細胞間連絡機能に与える影響について検討した。具体的には、まず、モデル表面材料を、70 %エタノールに一晩浸漬後清浄なリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することで滅菌した。その後、材料を 24-well plate に入

れ、V79 を 10,000 個、その変異体 TG1 を 50 個懸濁した M05 培地 (Earle の平衡塩類溶液培地に非必須アミノ酸, ピルビン酸ナトリウム (0.11 g/l), L-グルタミン (0.292 g/l), 炭酸水素ナトリウム (2.2 g/l), ペニシリン・ストレプトマイシン及び FCS 5 % を含んだ培地) を 1 ml 添加して細胞を播種した。4 時間培養した後、変異体が代謝できない 6-thioguanine を添加し、1 週間後に形成された変異体のコロニー数を計測することで細胞間連絡機能の阻害程度を判断した。

なお、TG1 のみを播種して同様の検討を行うことでモデル表面の細胞毒性を、V79 を播種した 1 日後の細胞写真を ImageJ 1.429 (NIH, USA) による画像処理で細胞 1 個あたりの細胞占有面積を算出し、これらについてのモデル表面特性との関連についても検討した。

C. 研究結果

過去の検討と同様に、メチル基を含む様々な 2 官能基表面を調製しその接触角を測定したところ、水酸基、カルボキシル基、リン酸基を用いた場合にはそれらの官能基比率が増えるに従って、メチル基単独表面の接触角約 95° から速やかに低下していく傾向が確認された。一方、アミノ基を用いた場合には、反応時の仕込み比に関わらず、いずれの場合でもアミノ基単一表面と同程度の接触角 (約 65°) を示すことが確認された。また、硫酸基を用いた場合には、アミノ基とは逆に、仕込み比に関係なくメチル基が存在する場合にはメチル基単独表面と同程度の接触角を示し、硫酸基単一表面での接触角は 30° 程度を示すことが確認された。

接触角と反応時の仕込み比との間に関連が見られなかったメチル基/アミノ基表面とメチル基/硫酸基表面の元素分析を ESCA で行ったところ、前者における窒素元素は反応時にアミノ基が存在していればアミノ基溶液の混合比に関係なく同程度のシグナルが検出され、後者における酸素元素は 100 % 硫酸基で反応した表面でしか検出されなかった。

今回、6 条件の官能基混合比で調製を行った 5 種類の 2 官能基モデル表面上全てで代謝協同阻害試験を行ったが、その際、同時に接着一日後の細胞占有面積比率及び細胞毒性も検討した。なお、細胞占有面積のコントロールとしては通常の細胞培養用ディッシュに播種した V79 の面積を使用し、それを 100 % と換算して図に示した。それらの結果を、表面の物理化学的特性指標である表面の接触角に対してプロットした結果を示す (図 1、2、3)。図 1 には細胞占有面積比率と接触角との関連性を示した。なお、若干のはずれ値は存在するものの、参考までに結果に対する近似線を補助的に図に示す。従来からの報告と同様、接触角が 65° 前後でその面積は最大を示し、表面の接触角が減少 (親水性)、あるいは増大 (疎水性) するに従って小さくなっていくことが明らかとなった。

細胞毒性に関しては、特に接触角との関連性を見いだすことは出来なかった (図 2)。しかしながら、同程度の接触角をもつ表面上であっても、その官能基に応じて細胞毒性結果が大きく異なることも認められた。特に、水酸基及びアミノ基を含む表面ではその傾向が強いことが示唆された。

今回、特に着目した細胞間連絡機能と接

触角との関連については、一見、細胞占有面積比率と同様その関連性が示唆された結果であるが、占有面積での結果と比較してその外れ値の多さが見受けられる結果となっていた (図3)。

代謝協同阻害試験は、V79 とその変異体との間で細胞間連絡機能が発揮できるよう両者がある程度の確率で接触できることが必要である。よって、この試験で材料上での阻害活性を評価する場合、化学物質の評価とは異なり、材料上に細胞が接着した後のその占有面積が結果を左右する因子の一つとなる。そこで、代謝協同阻害試験で得られた結果を細胞占有面積比率に対してプロットし直してみた (図4)。ここでも、細胞培養用ディッシュ上で得られた結果をコントロールとして用い、その値を 100 % に換算して図示した。その結果、細胞占有面積比率が低下するに従い、細胞間連絡機能も低下する傾向が認められた。

D. 考察

細胞の接着や接着直後の遺伝子発現変化においては、材料表面の水に対する接触角に影響されることが既に報告されている^{1,2)}。また、細胞の分化挙動については、表面官能基の種類に影響を受けることが明らかとなっている。用いる官能基の種類に応じてその接触角も変化するため、異なる官能基上で観察された細胞挙動変化は、官能基、あるいは接触角いずれにより影響を受けているのかが明確でない。すなわち、細胞挙動変化の機構を明らかにするためには、官能基・細胞間相互作用と接触角 (表面自由エネルギー)・細胞間相互作用のいずれが、あるいは両者がどの程度の割合でその変化

を支配しているのか、を明らかにしなければならない。そこで、上述したような、メチル基とそれ以外の官能基を種々の比率で含む 2 官能基表面を調製して検討を行えば、細胞挙動に対する接触角の影響を検討することができると考えた。なお、それらの検討結果を比較検討することで、表面の化学特性が細胞に与える影響を同時に考察することも可能となるであろうと考え、そのような材料の調製と使用を試みて検討を行った。

上述した考えの元、メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬を混合した溶液を用いて、2 官能基モデル表面を調製しその特性解析を行った。これまでの検討から、ある程度 2 種類の官能基は均一に分散して存在すること、水酸基、カルボキシル基及びリン酸基を用いた場合には、仕込み比に依存した接触角及び表面元素存在量の変化も認められており、本研究においても同様の結果が認められていることから、今回用いた 2 官能基モデル表面は本研究を行うにあたって適切だと判断される。その一方、調製した種々のアミノ基/メチル基混合表面での接触角測定及び ESCA による窒素元素解析により、アミノ基の仕込み比 20% で調製されたモデル表面であっても表面を占める官能基の大部分がアミノ基であることが示され、アミノ基用試薬の金への反応性がメチル基よりも高いことが示唆された。逆に、硫酸基/メチル基混合表面の解析からは、硫酸基用試薬の金との反応性が低いことも示唆された。よって、種々の組成を持つこれらの 2 官能基表面を調製するためには、来年度に詳細な反応条件の検討を行う必要がある。さらに、その結果を基に調製

したモデル表面を用いた同様の検討を行って、アミノ基及び硫酸基が細胞に及ぼす影響について再検討しなければならない。

しかしながら、今年度調製したモデル表面に関して、物理化学的指標である表面の接触角に対する影響を中心に検討することは可能である。そこで、接触角に対する細胞挙動変化、特に代謝協同阻害試験を利用した細胞間連絡機能変化についての検討を行った。

代謝協同阻害試験においては、接着した細胞の占有面積が大きく結果を左右するため、その占有面積による効果と官能基による効果とを区別しなければならない。細胞の初期接着機構、あるいは細胞の伸展機構は材料表面の自由エネルギーに影響を受けることが報告されてきている。図1に示したように、細胞の占有面積と表面自由エネルギーと関連した接触角との間に相関性が示され、その官能基組成に関わらず、65°前後で占有面積は最大となることが明らかとなった。この結果は、過去の報告¹⁾と一致するとともに、表面の化学組成は大きな影響を与えないことも示唆している。さらに、この結果は、モデル表面上での代謝協同阻害試験結果に表面の接触角が間接的な影響を与え得る可能性を示唆している。すなわち、細胞占有面積の減少に伴う見かけ上の代謝協同阻害が生じ得る(疑陽性)可能性を留意しなければならない。図3では、モデル表面上における細胞間連絡機能とその接触角との関連性を示唆しているように見えるが、機能が最も保持されている表面の接触角が細胞占有面積で最大を示した接触角と同程度であること、加えてその傾向から外れている値も多く見受けられることか

ら、表面特性と細胞間連絡機能との関連を違う角度から検討する必要があると考えられる。そこで、図4に示したように、細胞占有面積に対するモデル表面上の細胞間連絡機能を検討してみた。なお、予備検討において、V79細胞播種数が本実験の90%程度までは代謝協同阻害が認められていなかったことに加え

- 1) 単純に細胞占有面積と代謝協同阻害検出確率とが比例すると仮定
- 2) 細胞占有面積と細胞播種数が比例すると仮定

した場合に想定される細胞間連絡阻害仮定値を補助線として図4に示した。この補助線と比較しても、細胞間連絡機能は明らかに細胞占有面積が低下するに従って阻害され、特定の占有面積より小さくなると阻害が増大していくと考えることができる。あくまでも参考ではあるが、補助線の位置を踏まえながら図4を見ると、そのプロット位置から、硫酸基、リン酸基及びカルボキシル基を含むモデル表面では、その傾向よりも大きく細胞間連絡機能が阻害されていることが予想された。この確認は、翌年度における重要な検討課題である。また、細胞毒性試験の結果から、同程度の接触角をもつ表面であっても異なる細胞毒性を示した表面が存在することから、細胞毒性においては表面の化学構造、すなわち化学的特性がより影響することが予想される。このように、モデル表面の物理化学的特性と化学的特性各々が細胞挙動に与える影響を検討することが可能であることが示唆された。よって、来年度は、これらの予想を確認するための検討を、今年度用いた手法に加えて他の手法を用いて、また別の指標候補を

選択しての検討を行い、表面特性が細胞挙動に与える影響をより詳細に検討していく予定である。

なお、細胞間連絡機能の低下が示された官能基のうち、硫酸基及びリン酸基に関しては、単一官能基表面の場合には骨芽細胞の分化を促進することが確認されている。従来、我々は細胞間連絡機能を阻害する材料は好ましくないのではないかと仮定してきたが、用いた細胞は異なるものの、今回見られたような機能低下は分化のスイッチが入った結果の現れである可能性も考えられる。この点については、来年度より慎重な検討が必要と考えている。

E. 結論

材料表面特性による細胞挙動への影響を別々に考慮するために、2種類の官能基からなるモデル表面を自己組織化膜により調製し、その上でV79線維芽細胞の機能変化を観察した。細胞の接着挙動と関連する播種1日後の細胞占有面積と接触角との間にはその相関が示唆されたことから、初期の接着挙動においては表面の物理化学特性（表面自由エネルギー）が影響することが示唆された。一方、細胞毒性と細胞間連絡機能に対しては、物理化学的特性の影響は少なく、表面の化学構造が影響を与える可能性が示唆された。このように、着目した細胞挙動に応じて表面における2つの特性が与える影響の度合いは異なり、それらの影響のバランスが重要であることが考えられた。もちろん、この2つ以外の要因も考慮する必要があるが、少なくとも表面特性の影響程度を化学的及び物理化学的特性に分けて詳細に検討することが、材料と相互

作用した生体に引き起こされる様々な反応の機構を解明する上で重要であり、その検討手段として自己組織化膜を利用したモデル表面は非常に有用であることが本研究において示唆された。

参考文献

1. Y. Tamada and Y. Ikada. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 783-789 (1994).
2. S. Kato, T. Akagi, K. Sugimura, A. Kishida and M. Akashi. Evaluation of biological responses to polymeric biomaterials by RT-PCR analysis IV: study of c-myc, c-fos and p53 mRNA expression. *Biomaterials*, **21**, 521-527 (2000).

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ryusuke Nakaoka, Yoko Yamakoshi, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya. Effects of surface chemistry prepared by self-assembled monolayers on osteoblast behavior. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **94A**, 524-532 (2010).

2. 学会発表

- 1) 中岡竜介、松岡厚子「種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について (3):種々の官能基組成による細胞機能への影響」、第32回日本バイオマテリアル学会大会、広島、2010年11月
- 2) 中岡竜介「再生医療に適用可能な技術の国際標準化の現状 - ISO/TC

194/SC 1の活動」、第10回日本再生医療学会総会、東京、2011年3月

- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1. メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面上で培養したV79細胞接着1日後の細胞占有面積と表面接触角の関係

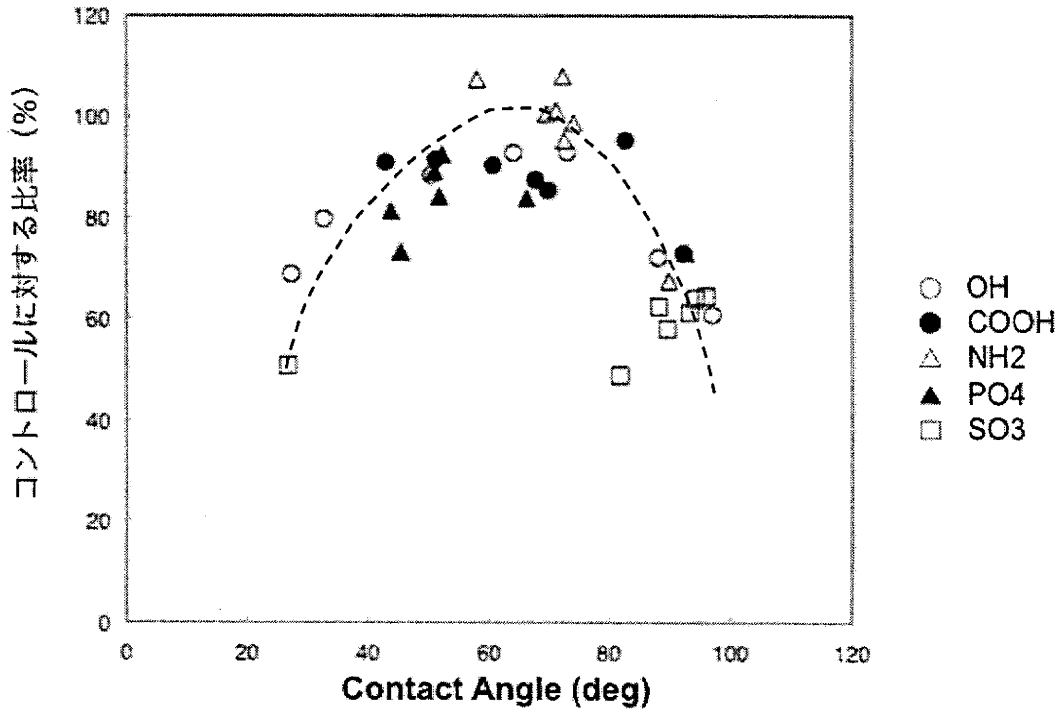


図2. メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面の接触角に対する細胞生存率

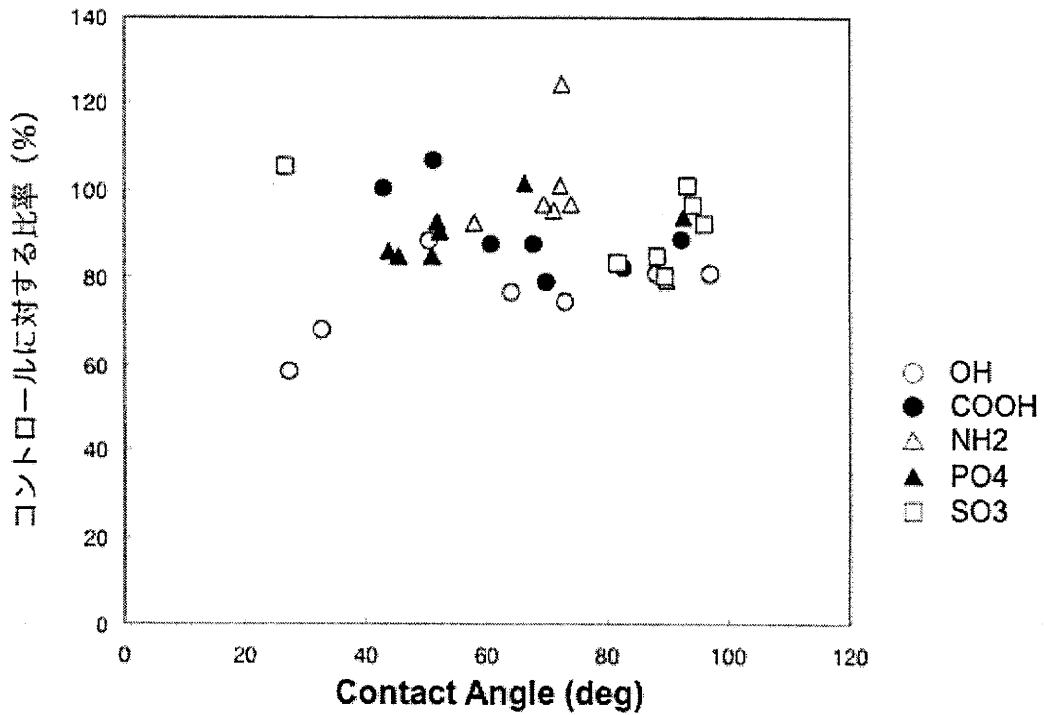


図3. メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面の接触角に対する代謝協同阻害

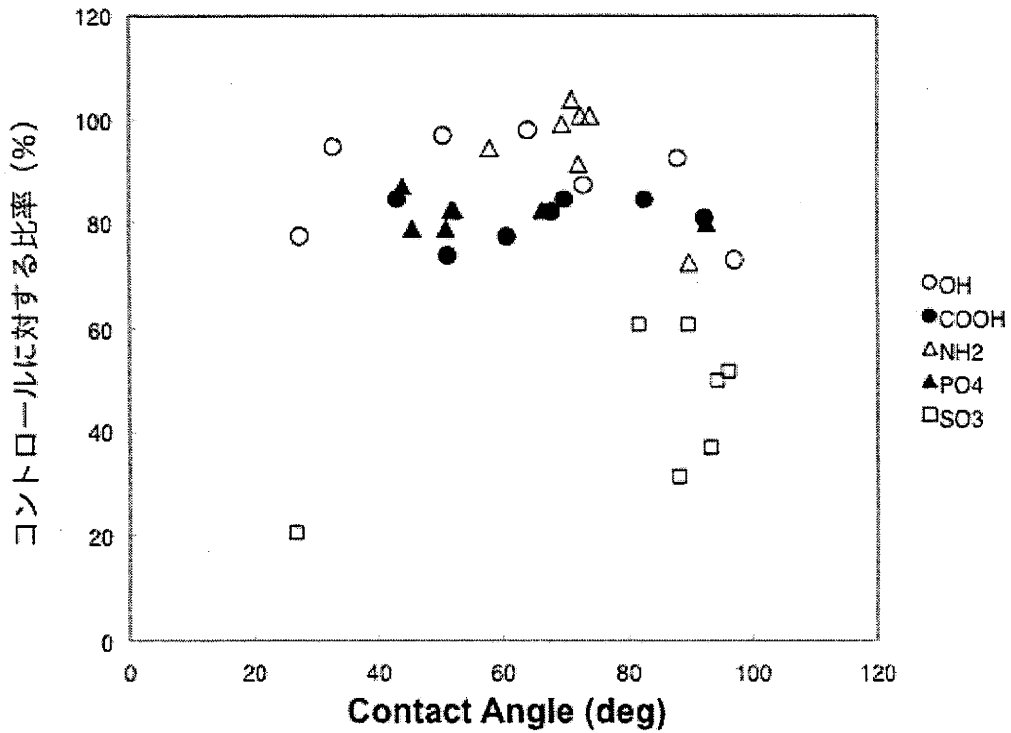
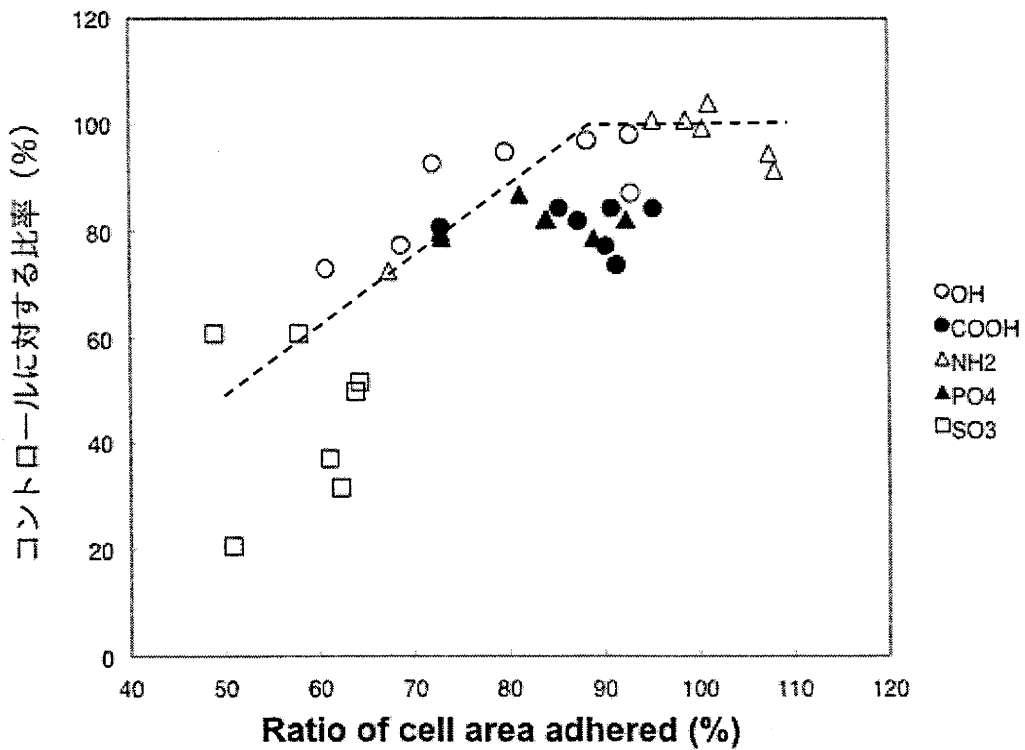


図4. モデル表面上での代謝協同阻害に対する細胞占有面積の影響



分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析

研究分担者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第四室長

研究協力者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 研究員

研究要旨：アパタイト形成能が高い材料は、生体骨と直接結合でき、骨系埋植医療機器への応用が期待できる。我々は、チタンに高いアパタイト形成能を付与するために、NaOH 処理後に CaCl_2 処理又は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理を施して、材料表面にカルシウムを導入した。それらを擬似体液に浸漬し、浸漬初期及びアパタイト形成期におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの試料表面への吸着量を調査した。その結果、擬似体液浸漬初期において、リンの吸着量は、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理、 CaCl_2 処理、NaOH 処理の順に増加の割合が高かった。また、NaOH 処理及び CaCl_2 処理したチタンは浸漬 5 日からカルシウム量及びリン量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。一方、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理したチタンは浸漬 2 日からカルシウム量及びリン量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理したチタンの高いアパタイト形成能は、早期のリン酸イオンの吸着に起因していると考えられた。

A. 研究目的

整形外科領域で使用される骨系埋植医療機器には、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髄内釘、人工関節などがあり、高齢者人口の増加等によってこれら骨系医療機器の使用は年々増加している¹⁾。しかし、構造の複雑化や使用期間の長期化などによって、これらの機器の不具合は増加傾向にある²⁾。特に、埋植初期に見られる機器の破損や埋植部位近傍の骨折は、埋植した機器と骨との接

着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した医用材料が開発されてきた。その代表例として、アルカリ加熱処理を施したチタン合金が開発され、これを実用化した人工股関節は平成 19 年 10 月に製造販売承認された³⁾。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成することが知られている。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材

料は、埋植後に生体骨と早期に直接結合することが期待できる^{4,5)}。我々は、擬似体液としてハックス平衡塩溶液を用いて、フーリエ変換赤外光音響分光法 (FT-IR/PAS) によるアパタイト形成能の定量的評価法を検討し⁶⁾、高いアパタイト形成能を付与するためにカルシウムを導入したチタン及びチタン合金のアパタイト形成能を評価した⁷⁾。その結果、水酸化カルシウムによりカルシウムを導入したものは、塩化カルシウムによりカルシウムを導入したものに比べて、高いアパタイト形成能を示し、カルシウム導入量とアパタイト形成能との相関が認められた⁷⁾。

金属材料等へのイオンの吸着挙動は、アパタイト形成や蛋白質吸着を支配すると考えられている。そこで、本研究は、チタン及びチタン合金等へのイオンの吸着挙動とアパタイト形成能との関係を解析することを目的とする。今年度は、アルカリ処理及びカルシウム導入処理を施したチタンの擬似体液浸漬初期及びアパタイト形成期におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの吸着量の推移を調査した。

B. 研究方法

1. 試験材料

株式会社高純度化学研究所製のチタン片 (純度: 99.9%、サイズ: 5 mm×5 mm×t 1 mm) を用いた。試験材料は、酢酸エチル、アセトン、エタノール及び超純水の順に、超音波洗浄した後に使用した。

2. 表面処理

試験材料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (和光純薬工業株式会社) 3.5 mL を加え、温度 60°C で 24 時間静置した (NaOH 処理)。

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1 mol/L 塩化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、温度 60°C で 24 時間静置した (CaCl₂ 処理)。

前述の CaCl₂ 処理とは別に、NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01 mol/L 水酸化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、温度 60°C で 24 時間静置した (Ca(OH)₂ 処理)。

表 1 ICP-MS 測定におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの分析精度

Element	Ca	Mg	P
Mass number (m/z)	43	24	31
Detection limit ^a (µg/L)	1.22	0.107	0.301
Determination limit ^b (µg/L)	4.07	0.355	1.00
Background equivalent concentration (µg/L)	67.2	3.94	10.7

^a Three times of the standard deviation of a blank.

^b Ten times of the standard deviation of a blank.

3. 擬似体液浸漬

表面処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液（GIBCO #14025、インビトロジェン株式会社）7 mL を加え、温度 37°C に設定したインキュベータ内に静置した。ハックス平衡塩溶液は一日おきに新鮮なものと交換した。

4. 吸着イオンの定量

擬似体液浸漬後の試料を超純水で洗浄し、10%硝酸に 37°C で 2 時間浸漬し、吸着したイオンを溶解した。その後、超純水で 2 倍に希釈し、5%硝酸溶液とした。

溶解液中のカルシウム、マグネシウム及びリンの濃度は、誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）により定量した⁸⁾。ICP-MS 装置には、Agilent 7500ce ORS ICP-MS（アジレント・テクノロジー株式会社）を使用した。ICP-MS の測定条件は、

高周波出力：1500 W

プラズマガス流量：15 L/min

キャリアガス流量：0.7 L/min

メイクアップガス流量：0.33 L/min

ヘリウムガス流量：5 mL/min

サンプリング位置：7.8 mm

スプレーチャンバー温度：2°C

積分時間：1 sec/element

測定回数：3 times

とした。また、各元素の測定質量数 (m/z) は、

カルシウム：43

マグネシウム：24

リン：31

とした。

検量線作成用の混合標準液は、カルシウム、マグネシウム及びリンの各 1000 mg/L 標準液（和光純薬工業株式会社）を用いて調製し、5%硝酸を用いて段階希釈した。

C. 研究結果

1. ICP-MS 分析の精度

5%硝酸（ブランク）及び段階希釈した混合標準液を用いて、ICP-MS 測定におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの検出下限値、定量下限値及びバックグラウンド相当濃度を求めた（表 1）。これらの定量下限値から、今回の測定条件

表 2 表面処理後の試料表面のカルシウム、マグネシウム及びリン量

Sample	Surface density (nmol/cm ²)		
	Ca	Mg	P
Untreated	9.33	0.218	0.126
NaOH treated	8.33	5.70	0.185
CaCl ₂ treated	164	6.32	0.198
Ca(OH) ₂ treated	452	8.42	0.222

において定量可能な試料 1 cm² 当たりのカルシウム、マグネシウム及びリンの下限値は、それぞれ 145、20.9 及び 46.3 pmol/cm² と算出された。

2. 表面処理によるカルシウム導入量

表面処理後の試料表面のカルシウム、マグネシウム及びリン量を表 2 に示した。CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理によ

ってチタン表面にカルシウムが導入されたことが確認できた。また、Ca(OH)₂ 処理によるカルシウム導入量は、CaCl₂ 処理によるカルシウム導入量の 2.75 倍であった (表 2)。

3. 擬似体液浸漬初期のイオン吸着挙動

擬似体液浸漬後 15 分から 480 分までの初期における未処理、NaOH 処理、

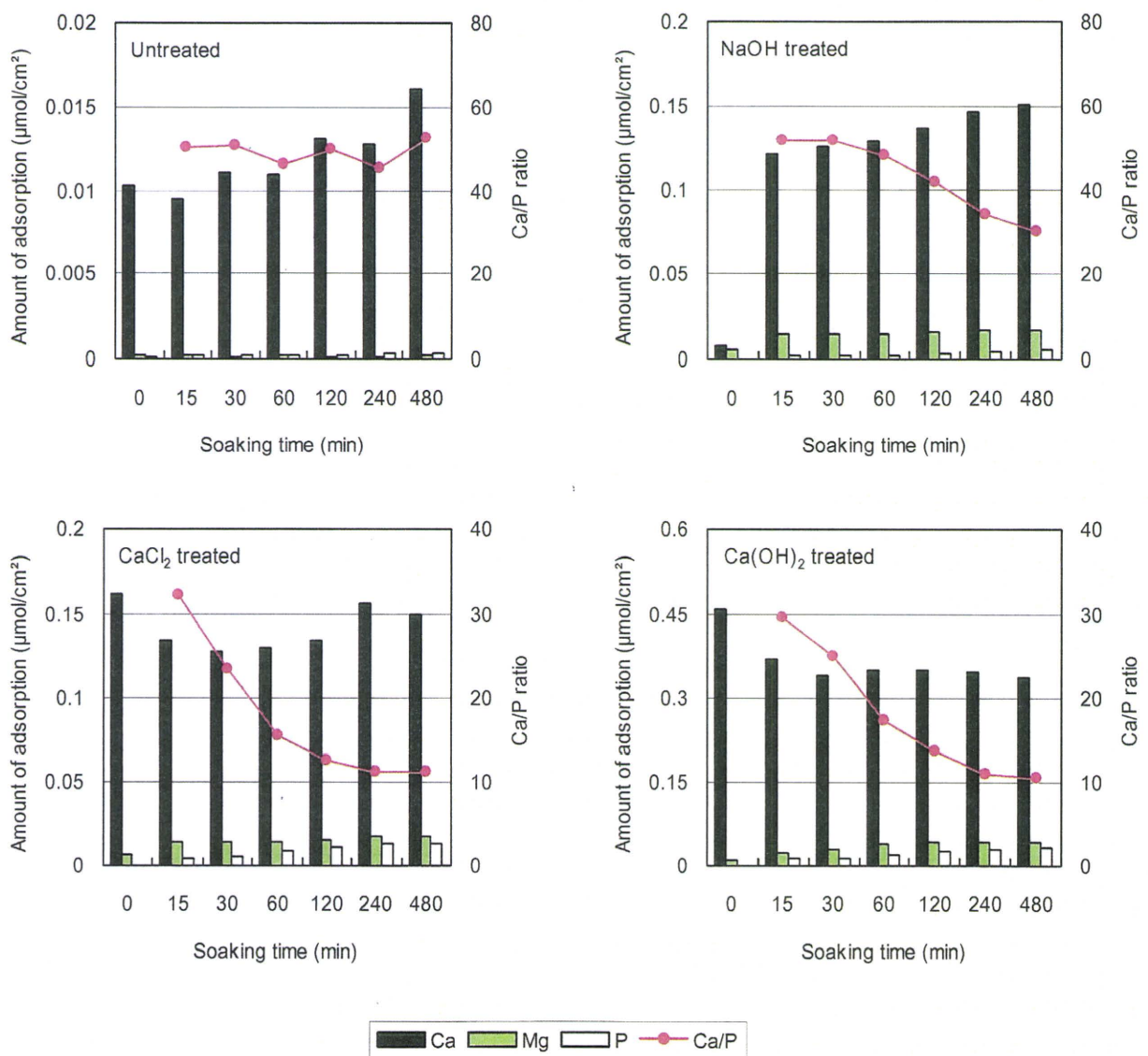


図 1 擬似体液浸漬初期における各試料のイオン吸着量及び Ca/P 比

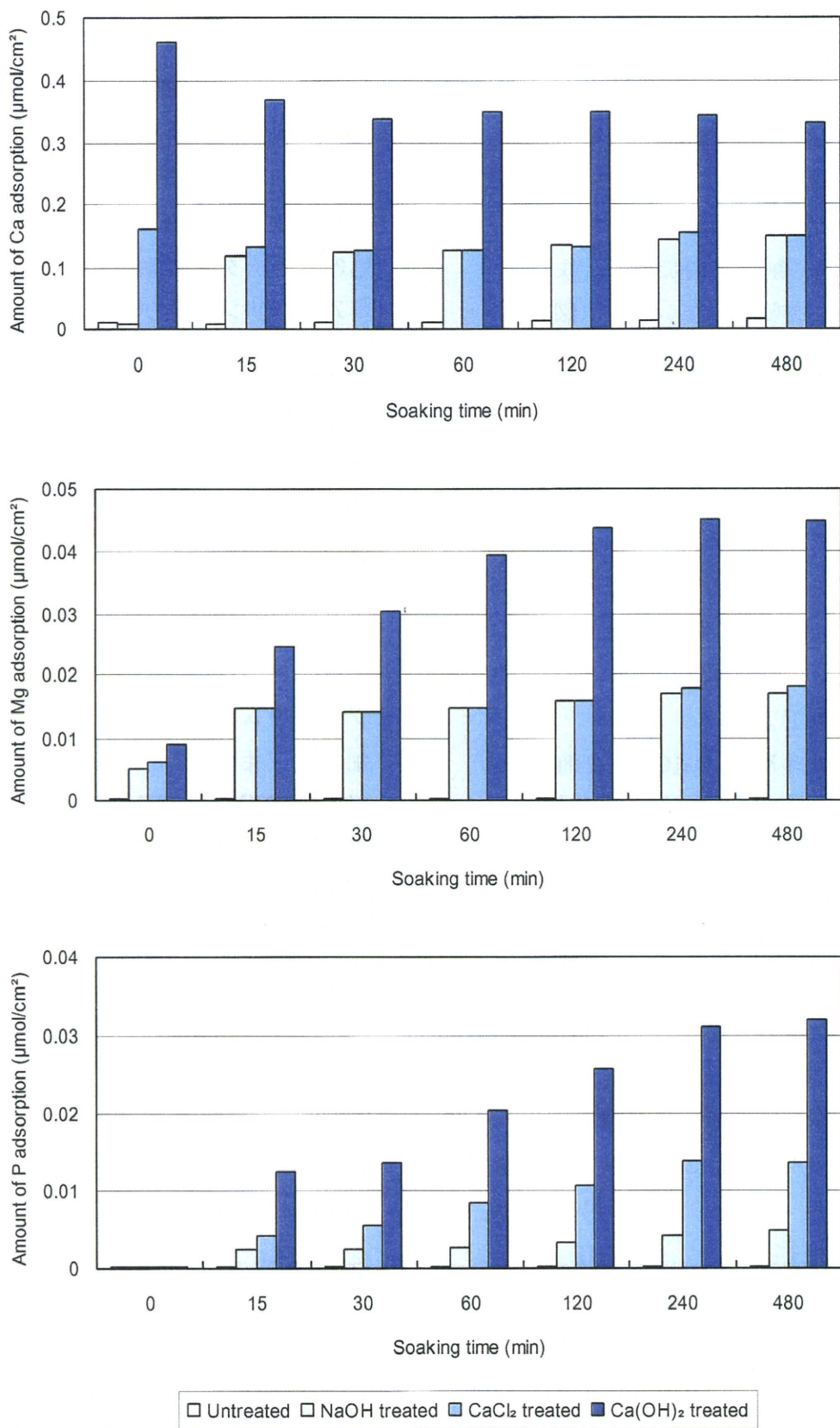


図2 擬似体液浸漬初期におけるカルシウム、マグネシウム及びリン量の変化

CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したチタンのカルシウム、マグネシウム及びリン量並びに Ca/P 比を図 1 に示した。

未処理のチタンは、浸漬時間に伴ってカルシウムの吸着量が徐々に増加した。Ca/P 比は浸漬時間に係わらず 50 前後を推移し、リンの吸着量はカルシウムの吸着量と同じ割合で増加した。また、マグネシウムは吸着しなかった (図 1)。

NaOH 処理したチタンは、浸漬 15 分までに速やかにカルシウムを吸着し、その後、浸漬時間に伴ってカルシウムの吸着量が徐々に増加した。また、浸漬時間に伴ってマグネシウム及びリンの吸着量も増加した。さらに、浸漬 15 分後に約 50 であった Ca/P 比は、浸漬時間に伴って減少し、浸漬 480 分後には約 30 になった (図 1)。

CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したチタンは、浸漬によってカルシウム量にほとんど変化は無かった。また、どちらの試料も浸漬時間に伴ってマグネシウム及びリンの吸着量が増加した。さらに、浸漬 15 分後に 30 前後であった Ca/P 比は、浸漬時間に伴って減少し、浸漬 480 分後には 11 前後になった (図 1)。

表面処理間で擬似体液浸漬によるカルシウム、マグネシウム及びリン量の変化を比較した (図 2)。カルシウム量は、浸漬時間に係わらず、Ca(OH)₂ 処理したチタンは NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンの約 2.5 倍程度であった。また、マグネシウム量は、Ca(OH)₂ 処理したチタンは NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンに比べて顕著に増加した。さらに、リン量は、Ca(OH)₂ 処理、

CaCl₂ 処理、NaOH 処理の順に増加の割合が高かった。

4. アパタイト形成期のイオン吸着挙動

擬似体液浸漬後 0.5 日から 7 日までのアパタイト形成期における未処理、NaOH 処理、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したチタンのカルシウム、マグネシウム及びリン量並びに Ca/P 比を図 3 に示した。

未処理のチタンは、浸漬時間に伴ってカルシウム及びリンの吸着量が徐々に増加したが、マグネシウムは吸着しなかった。また、Ca/P 比は 50 前後を推移し、浸漬時間に伴う変動は無かった (図 3)。

NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンは、浸漬 5 日以降にカルシウム、マグネシウム及びリンの吸着量が急速に増加した。また、Ca/P 比は、どちらの試料も浸漬時間に伴って減少し、浸漬 5 日以降は 2 前後になった (図 3)。

Ca(OH)₂ 処理したチタンは、浸漬 2 日以降にカルシウム、マグネシウム及びリンの吸着量が急速に増加した。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って減少し、浸漬 2 日後に 2.38、浸漬 7 日後に 1.46 になった (図 3)。

表面処理間で擬似体液浸漬によるカルシウム、マグネシウム及びリン量の変化を比較した (図 4)。カルシウム、マグネシウム及びリン量は、Ca(OH)₂ 処理したチタンは NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンに比べて浸漬 2~3 日で顕著に多く、浸漬 5 日以降も最も多かった。

D. 考察

チタン合金に骨結合性を付与する表面処理法として、アルカリ加熱処理技術が開発され、人工股関節に応用されている³⁾。さらに、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討されている⁹⁾。チタン合金は、水酸化ナトリウム処理により、チタン酸水素ナトリウムの

層が材料表面に形成される¹⁰⁾。その後、塩化カルシウム溶液に浸漬すると、ナトリウムイオンがカルシウムイオンと置換してチタン酸水素カルシウムに変化し、アパタイト形成能がより高くなる⁹⁾。我々は、アルカリ性条件下でカルシウムへの置換が可能な水酸化カルシウム溶液によるカルシウム導入法について検討した⁷⁾。その結果、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理は、

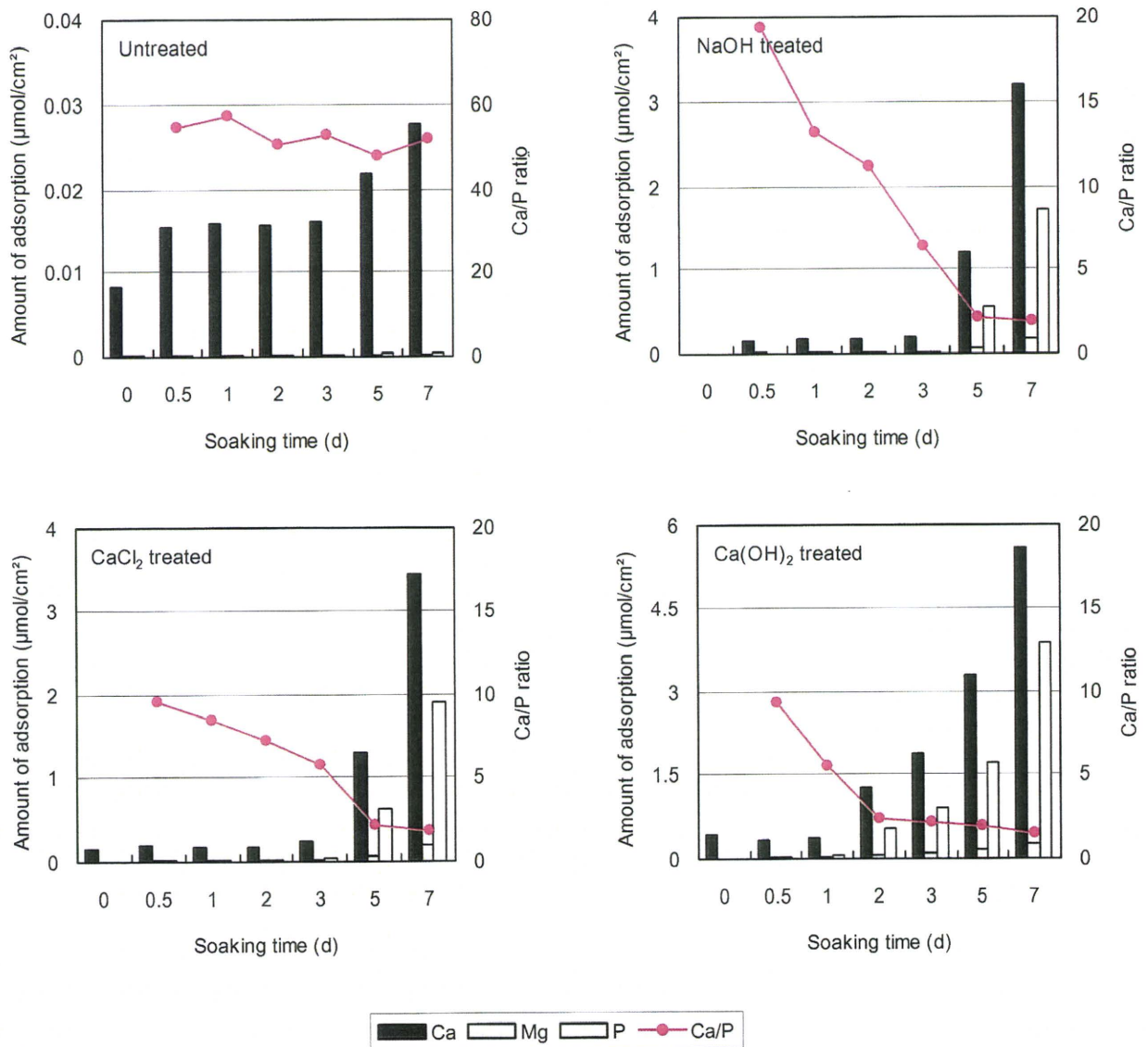


図3 アパタイト形成期における各試料のイオン吸着量及び Ca/P 比

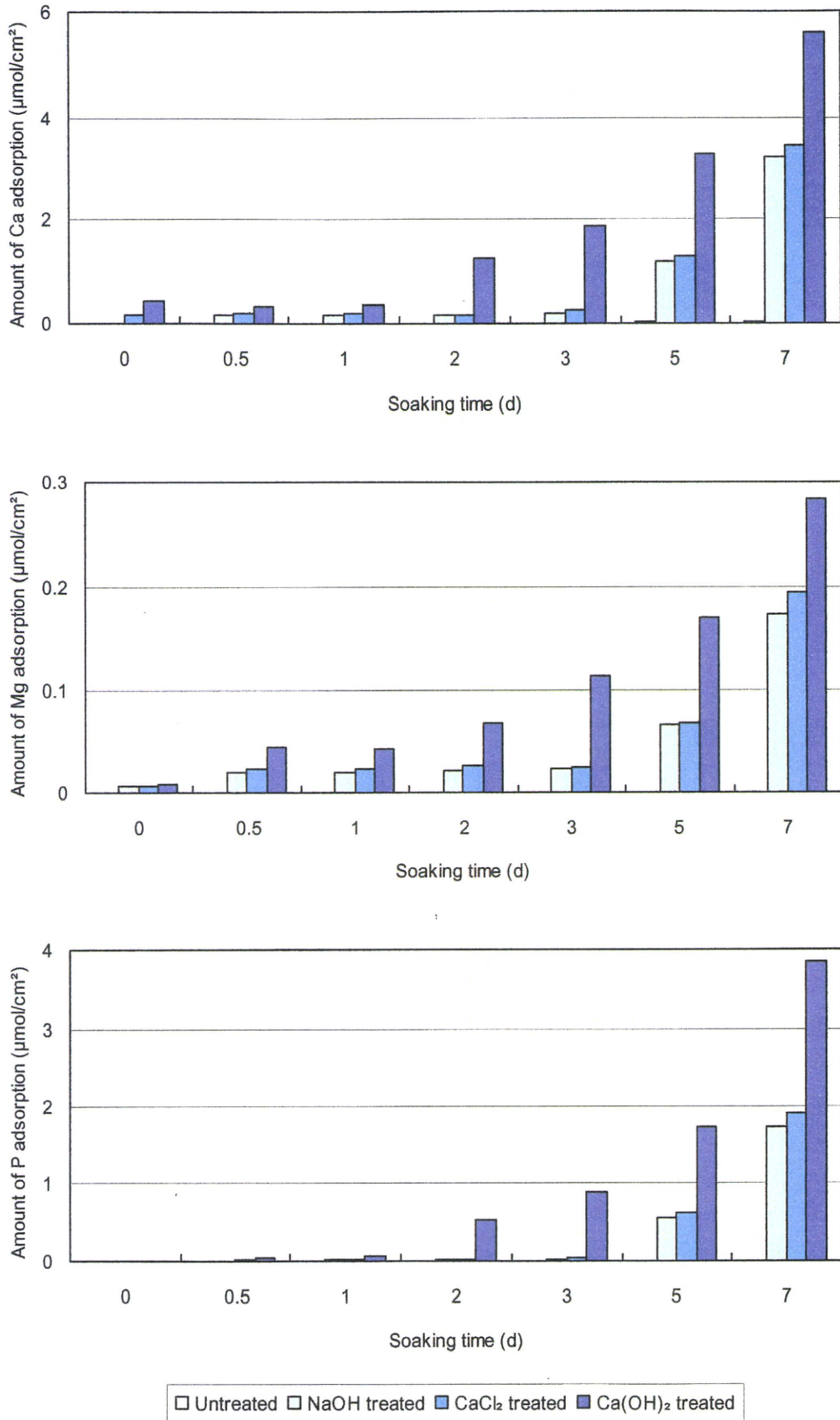


図4 アパタイト形成期におけるカルシウム、マグネシウム及びリン量の変化

CaCl₂ 処理に比べて、材料表面へカルシウムを多く導入することができ、高いアパタイト形成能を示した⁷⁾。今回の ICP-MS 法でも、Ca(OH)₂ 処理は CaCl₂ 処理よりカルシウムを多く導入できることが示され (表 2)、Ca(OH)₂ 処理がチタンへのカルシウム導入法として優れていることが確認された。

未処理のチタンは擬似体液に浸漬してもアパタイトを形成しにくいことが知られている¹⁰⁾。今回の結果も浸漬時間に伴ってカルシウム及びリンが徐々に吸着したものの、それらの吸着量はわずかであり、また、浸漬時間に係わらず Ca/P 比が 50 前後であったことから、浸漬 7 日までにアパタイトは形成されないことを支持している (図 1 及び 3)。

NaOH 処理したチタンを擬似体液に浸漬すると、浸漬 15 分までにナトリウムイオンがカルシウムイオンに置換し、カルシウム量は CaCl₂ 処理したチタンのカルシウム量と同程度になった (図 2)。NaOH 処理したチタンがアパタイト形成能を獲得するのは、カルシウムイオンを早期に取り込むためである^{10,11)}。また、NaOH 処理と CaCl₂ 処理では浸漬 15 分以降のカルシウム及びマグネシウム量はほぼ同じ吸着挙動を示したが (図 2 及び 4)、浸漬初期のリンの吸着量は CaCl₂ 処理したチタンの方が多かった (図 2)。CaCl₂ 処理によって塩化物イオンが導入され、擬似体液中のリン酸イオンと置換したためであると考えられる。一方、Ca(OH)₂ 処理したチタンは、擬似体液浸漬初期からマグネシウム及びリン量が増加した (図 2)。リンの

吸着量は、Ca(OH)₂ 処理、CaCl₂ 処理、NaOH 処理の順に増加の割合が高く (図 2 及び 4)、Ca/P 比の減少を導いた (図 1 及び 3)。Ca(OH)₂ 処理したチタンの高いアパタイト形成能は、早期のリン酸イオンの吸着に起因していると考えられる。また、Ca(OH)₂ 処理したチタンの浸漬 7 日の Ca/P 比は 1.46 となり、ハイドロシキアパタイトの化学量論的 Ca/P 比の 1.67 より小さく、マグネシウムを含んだ生体アパタイトが形成されたものと考えられる。

擬似体液中でのアパタイト形成能は、生体内での骨結合性をよく再現することが動物実験によって確認されている¹²⁾。Ca(OH)₂ 処理によりカルシウムを効率よく導入したチタンは、アパタイト形成能が高く、優れた骨系医用材料として期待できる。

E. 結論

チタンに高いアパタイト形成能を付与するために、NaOH 処理後に CaCl₂ 処理又は Ca(OH)₂ 処理を施して、材料表面にカルシウムを導入した。それらを擬似体液に浸漬し、浸漬初期及びアパタイト形成期におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの試料表面への吸着量を調査した。その結果、擬似体液浸漬初期において、リンの吸着量は、Ca(OH)₂ 処理、CaCl₂ 処理、NaOH 処理の順に増加の割合が高かった。また、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンは浸漬 5 日からカルシウム量及びリン量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。一方、Ca(OH)₂ 処理し

たチタンは浸漬 2 日からカルシウム量及びリン量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。Ca(OH)₂ 処理したチタンの高いアパタイト形成能は、早期のリン酸イオンの吸着に起因していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) R. Nakaoka, Y. Yamakoshi, K. Isama, T. Tsuchiya: Effects of surface chemistry prepared by self-assembled monolayers on osteoblast behavior, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **94**, 524-532 (2010)
- 2) B. Hexig, K. Isama, Y. Haishima, Y. Inoue, T. Tsuchiya, T. Akaike: Self-organization of the compositional gradient structure in hyaluronic acid and poly(N-isopropylacrylamide), *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **21**, 1957-1970 (2010)

2. 学会発表

- 1) A. Matsuoka, Y. Matsuda, K. Isama, H. Sakoda: Polyploidy induction by polystyrene particles with specific diameters in a Chinese hamster cell line, *Nanotheranostics: Fabrication & Safety Concerns* (2010.4, Ayia Napa, Cyprus)
- 2) K. Isama, T. Kawakami, T. Tsuchiya, A. Matsuoka: Apatite-forming ability of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys, 23rd

European Conference on Biomaterials (2010.9, Tampere, Finland)

- 3) 伊佐間和郎、河上強志、土屋利江、松岡厚子：カルシウム導入したチタン合金等のアパタイト形成能と細胞毒性、日本金属学会 2010 年秋期大会 (2010.9、札幌市)
- 4) 伊佐間和郎、河上強志、土屋利江、松岡厚子：カルシウム導入した Ti-Zr-Nb 合金の骨芽細胞適合性、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010.11、広島市)
- 5) 齧島由二、長谷川千恵、伊佐間和郎、松岡厚子：表面処理を施したチタンプレートに吸着する蛋白質の網羅的比較定量解析、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会 (2010.11、広島市)

参考文献

- 1) 岡崎義光：整形外科用金属材料にみる標準化のメリット、*バイオマテリアル*、**22**、343-349 (2004)
- 2) 佐藤道夫：金属材料の物理的安全性評価手法の開発、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2005)
- 3) 松下富春、鈴木順、小林尚博：アルカリ加熱処理技術の実用化研究と人工股関節への適用、*バイオマテリアル*、**27**、24-31 (2009)
- 4) T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*,

- 24, 331-343 (1990)
- 5) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 721-734 (1990)
- 6) 伊佐間和郎：骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2008)
- 7) 伊佐間和郎：骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発、平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2009)
- 8) 千賀暢子：ICP-MS による 29 元素同時定量、和歌山市衛生研究所報、**13**、78-82 (2001)
- 9) T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, T. Kokubo: Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment, *Acta Biomater.*, **6**, 2836-2842 (2010)
- 10) H-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Nakamura: Apatite-forming ability of alkali-treated Ti metal in body environment, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **105**, 111-116 (1997)
- 11) H. Takadama, H-M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura: An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 185-193 (2001)
- 12) S. Fujibayashi, M. Neo, H.M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura: A comparative study between in vivo bone ingrowth and in vitro apatite formation on $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$ glasses, *Biomaterials*, **24**, 1349-1356 (2003)

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

分担研究課題名

遺伝子発現の網羅的解析を利用した

医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験

研究分担者 澤田留美 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部

研究要旨

医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験として、遺伝子発現の網羅的解析を利用して検討を行った。今年度は、医用材料として純チタン (Ti)、細胞としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) に着目し、骨再生医療製品等を想定して検討を行った。純 Ti 上にて hMSC を培養して DNA マイクロアレイ解析を行い、hMSC の遺伝子発現に与える純 Ti の影響について網羅的に解析した。その結果、hMSC を純 Ti 上で培養する事により G1 期→S 期への移行が抑制される Cell Cycle arrest の状態となり、さらに骨芽細胞分化や破骨細胞分化において重要な役割を果たす因子の発現が上昇することがわかった。このことから、hMSC を純 Ti 上で培養する事により、細胞の増殖が止まり、hMSC が骨へと分化する方向へ変化する可能性が示唆された。

A. 研究目的

チタン (Ti) 及び Ti 合金は軽量、耐食性、低アレルギー性などの優れた生体適合性を持つ事が知られ、さらに骨と直接結合するという他の金属系バイオマテリアルにはない特性を有している。Ti の表面特性として、生体内において Ti 表面にはリン酸カルシウム (アパタイト) 相が形成され、このリン酸カルシウム (アパタイト) 形成速度は、他の金属系バイオマテリアルよりも速く、Ti の優れた骨適合性の一因とされている。このため、人工骨をはじめ、ボーンプレート、ボーンスクリュー、歯根などの医用材料として

広く利用されている。

一方、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、さらには神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を越えた分化も報告されているため幅広い再生医療分野での利用が期待されている。また、その採取技術及び *in vitro* での培養技術も確立されていることから、間葉系幹細胞は細胞組織医療機器の材料として現段階で最も実用に近いものの一つであると考えられる。

本研究では、医用材料上で培養した細胞の生化学的・生物学的試験として、遺伝子発現の網羅的解析を利用して検討を行