

201132082B

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

平成 22 年度～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 松岡厚子

平成 24 (2012) 年 4 月

目次

I. 総合研究報告

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 1
松岡 厚子

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 57

III. 研究成果の刊行物・別刷り 61

I. 総合研究報告

総合研究報告書
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」

研究代表者 松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部長

研究要旨

1. 実験研究の部

医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。本研究では、材料表面と細胞の界面で観察される事象と、その結果、細胞で観察される事象との比較を行い、従来法より迅速、高感度に医用材料の生体適合性を評価できる新規手法の探索を目的とした。

材料として、ジルコニウム、チタン、自己組織化膜、UHMWPE、PMEA、PEEKなどを用いた。界面では、水和状態、イオン吸着、アパタイト形成、タンパク質吸着及び摩擦係数を、細胞では、遺伝子発現、タンパク質発現及び細胞間連絡機能を観察対象とした。

2年間の研究で、各観察指標についての研究を進めると同時に測定条件設定などが完了し、共通材料調製担当者による材料供給がなされれば、シミュレーションデータの実証実験での確認も含めて、材料の生体適合性を示す新規評価方法の提案のための研究準備ができたと考えられる。

2. 行政研究の部

医療機器の分類命名法「Global Medical Device Nomenclature (GMDN)」の現状について、イタリア及びオーストラリアの規制当局での利用方法を調査した。その結果、各国の個別性に立脚した運用が抱える問題が認められた。

平成15年2月13日付け医薬審発第0213001号「医療用具の製造（輸入）承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」及び平成15年3月19日付け事務連絡医療機器審査No.36「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料」の改正を行い、改正版を平成24年3月1日付け薬食機発0301第20号「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」として発出した。

研究分担者		センター 秦野研究所
薮島 由二	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長	金澤由基子 独立行政法人 医薬品医療 機器総合機構
中岡 竜介	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長	佐藤 秀隆 財団法人 日本食品分析 センター 総合企画部
伊佐間 和郎	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長	坂口 圭介 テルモ株式会社 研究開発本部
澤田 留美	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長	谷川 隆洋 テルモ株式会社 研究開発本部
加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官	安江 靖子 株式会社メニコン 研究企画管理部
迫田 秀行	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官	藤井 道子 独立行政法人 医薬品医療 機器総合機構
植松 美幸	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官	尾崎 正康 キヤノン株式会社 品質本部
石川 格	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 研究員	勝田 真一 財団法人 日本食品分析 センター 千歳研究所
石原 一彦	東京大学大学院工学系研究科 教授	畔上 二郎 財団法人 食品薬品安全 センター 秦野研究所
田中 賢	山形大学大学院理工学研究科 教授	高島 宏昌 財団法人 食品薬品安全 センター 秦野研究所
横井 英人	香川大学医学部附属病院 医療情報部 教授	酒井 良忠 東レ・メディカル株式会社
		オブザーバー
研究協力者		高橋 未明 厚生労働省医薬食品局審査 管理課医療機器審査管理室
井上 祐貴	東京大学大学院工学系研究科 助教	牧村 知美 厚生労働省医薬食品局審査 管理課医療機器審査管理室
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	羽田 幸祐 厚生労働省医薬食品局審査 管理課医療機器審査管理室
長谷川千恵	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部	
中崎 知道	日本医療機器産業連合会	本文で使用される略号
医療機器の生物学的安全性試験法検討会 研究協力者		C-PET: ポリエチレンテレフタレート
山影 康次	財団法人 食品薬品安全	CTA: 三酢酸セルロース
		PEEK: ポリエーテルエーテルケトン
		PMEA: ポリ(2-メトキシエチル-

アクリレート)

PS: ポリスチレン

PSF: ポリビニルピロリドン含有ポリ-
スルホン

PTFE: ポリテトラフルオロエチレン

UHMWPE: 超高分子量ポリエチレン

A. 研究目的

医用材料の生体適合性は、種々の溶出物や残留物質等の毒性、微生物汚染に由来する感染因子のほか、材料表面の物理化学的特性に大きく影響される。これは、医用材料が細胞や組織のような生きた生体システムと接触し、その界面（バイオインターフェース）で起こる分子間相互作用を介して機能を発揮することに由来する。医用材料を生体内に埋植すると、図1に示すように、材料表面に水やイオンが速やかに吸着し、次いで生体タンパク質の吸着が起こる。すなわち、医用材料と細胞は吸着タンパク質層を介して相互作用するため、同タンパク質は材料の機能発現や生体適合性に大きく関与すると考えられている。また、初期のイオン吸着動態はタンパク質吸着のほか、アパタイト形成にも影響すると共に、材料表面の水和状態は血液適合性（抗血栓性）の要因であるタンパク質吸着能や細胞接着能のほか、人工関節の耐摩耗性にも深く関与することが示唆されている。そこで、本研究ではバイオインターフェースの主要因子である材料表面の水和状態、初期イオン吸着及びタンパク質吸着動態のほか、材料上で培養した細胞の遺伝子及びタンパク質発現挙動等を指標として、医用材料の生体適合性を評価する新たな方法を確認することを目指す。

材料としては、チタン系金属、2-メタク

リロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）を初めとした種々の合成高分子及び表面官能基のみが異なる自己組織化膜（SAM）を使用する。初年度は各種材料の合成及び上記の各種指標による既存材料での評価を行った。2年目には、材料の種類をひろげて、各種指標測定のための条件設定を完了させた。2年間に実施した研究分担者の研究材料、細胞及び観察指標を表1に示す。都合により、本研究は2年で終了となったが、材料調製担当者が製造した、特性の異なる一連の共通材料を用いて、すべての指標で評価する研究は次年度継続することになっている。

バイオインターフェースの特性に着目した簡易スクリーニング法を医用材料の機能及び生体適合性評価に応用することは初めての試みである。本研究の目標が達成されることにより、埋植医療機器医用材料の安全性を予測することが可能となると考えられる。また、新規材料の開発を迅速化できると共に、動物を使用した埋植試験を減らすことができる可能性もあることから、本研究の成果は医療機器の開発及び厚生行政に大きく貢献することが期待される。

B. 研究方法

1. 実験研究の部

1-1. 材料と試験方法

1) プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究

純チタンプレート（10 x 10 cm）を#600、#800 及び#1200 の耐水性紙ヤスリで順次研磨した後、図2に示した方法により表面の化学処理を行った。高分子材料としては、10 x 10 cm に裁断した Polysulfone(PSF)、

Polyethyleneterephthalate (C-PET)、Cellulose triacetate (CTA)、Polystyrene (PS)、Polytetrafluoroethylene (PTFE)、Ultra High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE)を用いた。材料表面への蛋白質吸着は、ヒト血清又は血漿中、緩やかに攪拌しながら室温又は 37°C 下 1-4 時間インキュベーションして行った。吸着蛋白質は、同材料を 1 mM PBS で 5 回洗浄し、尿素緩衝液 (尿素 7M, チオ尿素 2M, Tris 30 mM, CHAPS 4%, pH 8.5) により回収した後、濃縮し、冷メタノール沈殿法により精製した。高分子材料吸着蛋白質の解析については、尿素変性ヒト血漿蛋白質を対照試料として使用した。得られた蛋白質試料は、常法に従って還元・アルキル化、トリプシン消化及び脱塩後、DiNa/LTQ-Orbitrap を用いたショットガン解析に供し、i-RUBY ソフトウェアを利用して比較定量した。蛋白質の同定には Mascot/UniProt/Swiss-Prot データベースを利用した。

チタン表面におけるハイドロキシアパタイト (HAp) 形成能は各プレートを 5 x 5 mm 片に裁断し、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)、10% FBS 含有 α MEM 培地及び FBS に 37°C で種々の時間浸漬後、XPS 及び SEM 解析により評価した。XPS 解析、SEM 解析、静的接触角測定及び表面ゼータ電位測定は、それぞれ島津製作所製 ESCA-3200、日本電子製 JSM-5800LV、ERMA 製 G-1-1000 及び大塚電子製 ELSZ-2NPA を用いて行った。

2) 自己組織化膜を利用したモデル表面材料調製と細胞機能を利用した細胞挙動解析

モデル表面調製用の基材として、マツナミ社製の円形カバーガラスの片面に 3 nm のチ

タン層をコートした後に 25 nm の金層をコートしたものをを用いた (村中医療器製)。この基材を、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 SAM からなるモデル表面を調製した。使用した官能基試薬は以下の 6 種類である。

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 時間浸漬させて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させることで調製した。調製したモデル表面の物理化学的特性はモデル表面の水に対する接触角を Sessile drop 法で、化学的特性は表面元素を Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) で測定することで評価した。

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。機能評価には 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用い、各種モデル表面上で培養した細胞の細胞間連絡機能がどの程度阻害されるかを測定した。その結果とモデル表面特性との関連性を検討することで、材料表面特性が細胞挙動に与える影響を考察した。

なお、モデル表面の細胞毒性評価と、播種 1 日後における細胞 1 個あたりの細胞占有面積とを別途行い、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。

3) アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析

1. 試験材料

株式会社高純度化学研究所製の純チタン片及び純ジルコニウム片（サイズ：5 mm×5 mm×t 1 mm）を用いた。

2. 表面処理

試料を 5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を用いて、温度 60°C で 24 時間処理した (NaOH 処理)。また、NaOH 処理した試料を 0.1 mol/L 塩化カルシウム水溶液を用いて、温度 60°C で 24 時間処理した (CaCl₂ 処理)。さらに、前述の CaCl₂ 処理とは別に、NaOH 処理した試料を 0.01 mol/L 水酸化カルシウム水溶液を用いて、温度 60°C で 24 時間処理した (Ca(OH)₂ 処理)。

3. 擬似体液浸漬

試料を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) に、温度 37°C で浸漬した。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 10%硝酸に 37°C で 2 時間浸漬し、試料に吸着したイオンを溶解した後、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 (ICP-MS) 装置を用いて定量した¹⁾。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。

4) 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

1. 材料

1-1. 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti のディスク (直径 33.5 mm、厚さ 2 mm、表面仕上げ：Ra=0.4 程度の研磨仕上げ；ナカシマメディカル(株)) を用いた。

1-2. 細胞

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞：hMSC (Lonza) を用いた。

2. 材料の表面処理

2-1. NaOH 処理

純 Ti ディスクをポリプロピレン製遠沈管に入れ、5mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 (和光純薬(株)) を 100mL 加えて、60°C で 24 時間静置した。

2-2. CaCl₂ 処理

NaOH 処理後の純 Ti ディスクを蒸留水 50mL で 4 回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1mol/L の塩化カルシウム水溶液を 100mL 加えて、60°C で 24 時間静置した。

2-3. Ca(OH)₂ 処理

NaOH 処理後の純 Ti ディスクを蒸留水 50mL で 4 回洗浄後ポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01mol/L の水酸化カルシウム水溶液を 100mL 加えて、60°C で 24 時間静置した。

3. hMSC の遺伝子発現へ及ぼす純 Ti 表面処理の影響について

3-1. 細胞培養

直径 35 mm のディッシュ (IWAKI) に 3 種類の表面処理を行った純 Ti ディスクまたは表面未処理の純 Ti ディスクを入れて、それぞれに hMSC を播種し、Mesenchymal Stem Cell Basal Medium(MSCBM; Lonza) に Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS; Lonza) を加えた培地 (MSCGM) で 7 日間

培養した。培養期間中 2 回培地交換を行った。

3-2. 細胞の形態観察

それぞれの純 Ti ディスク上で培養した hMSC を、5 μ M CellTracker (Lonza) を添加した培地 (血清無添加の McCoy's medium) で 37°C、30 分間培養し、その後培地を MSCGM に取替えてさらに 30 分間培養した。培養後の細胞を PBS(-) で 1 回洗浄し、4% パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3-3. Total RNA の調製

それぞれの純 Ti ディスク上で 7 日間培養した hMSC から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を調製した。

3-4. DNA マイクロアレイ解析

それぞれの total RNA を用いて、Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array にて mRNA 発現を網羅的に測定した。さらに、得られたマイクロアレイデータから GeneSpring GX 11 (Agilent Technologies) を用いて統計学的、生物学的解析を行った。

3-5. パスウェイ解析

DNA アレイ解析による mRNA 発現の網羅的解析の結果から、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてパスウェイ解析を行った。

5) 生体適合性材料の機能と生物学的特性評価に関する検証試験

1. 実験材料

細胞培養用シャーレ (TCPS: IWAKI 社)
純チタンプレート (Ti: ナカシマメディカル社: ϕ 33.5 x 2 mm, 表面研磨仕上げ Ra 0.4)

Ti の化学処理は 1: NaOH 溶液を用いてアルカリ処理のみ、もしくは NaOH 溶液を用

いてアルカリ処理した後、2: CaCl₂ 溶液あるいは 3: Ca(OH)₂ 溶液を用いてカルシウム導入を施した。

2. 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC, LONZA 社) を上記の試験材料上で 5% CO₂、37°C 下で一週間培養した。

3. タンパク質調製

培養した細胞を冷 PBS で洗浄後、常法に従ってトリプシン処理により剥離した。その後、トリプシンの 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄し、Protease inhibitor Mix (GE Healthcare) を含む Protein Extraction Reagent type 4 (SIGMA) に溶解した。

4. タンパク質の同定・定量

得られたタンパク質試料は、常法に従って還元・アルキル化、トリプシン消化後、DiNa/LTQ-OrbiTrap を用いたショットガン解析に供し、i-RUBY ソフトウェアを利用して比較定量した。タンパク質の同定には Masscot/ Swiss-Prot および Masscot/ NCBI データベースを利用した。タンパク質の多変量解析はメディカルプロテオスコープ社製 i-RUBY ソフトウェアを用いて行った。

5. 表面解析

表面構造は JEOL JST-5800LV 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて 3,000 倍で観察した。

表面の水に対する接触角は Sessile drop 法にて測定した。

6) 整形インプラント材料の界面特性に着目した新規評価方法の開発

1. 摩擦係数の評価

摩擦係数は、摺動の状態を知る手がかりとなる、最も重要なパラメータである。摩擦係数の測定のため、二次元摩耗試験機に、摩擦

係数を測定できるシステムを取り付け、摩擦係数の測定を行った。試験材料としては、UHMWPE (GUR 1020)、PEEK (450G)、炭素繊維強化 PEEK (CFR-PEEK、スミプロイ CK4600) を用いた。機械加工により端面が直径 6 mm、12 mm、24 mm となるよう、円筒状のピン試料を作製した (表 2)。なお、PEEK と CFR-PEEK については端面を研磨加工した。

また、PEEK と CFR-PEEK の表面に PMPC コーティングを施した²⁾試料 (PMPC-PEEK および PMPC-CFR-PEEK) も用意した。相手面には 40 mm x 40 mm x 10 mm のアルミナセラミック製プレートを使用した。摺動面は人工関節の骨頭と同様の鏡面仕上げとした。

荷重条件は、2 kg、5 kg、10 kg、20 kg とした。端面の大きさが異なる 3 種類の試料ピンに対して実験を行ったため、公称接触応力 (負荷した荷重を試料端面の面積で割った値) は、0.02 MPa から 6.58 MPa という広範囲となった (表 2)。なお、公称接触応力の計算においては、試験機についているカウンターウエイトによる荷重の増減を加味している。

摺動パターンは長さ 10 mm の単純往復動とし、摺動速度は 4 mm/s であった。

潤滑液には、牛血清水溶液を用いた。ISO 規格³⁾を参考に、牛血清 (三光純薬、Calf serum、CC3017-502、Lot No: 18110827) を蛋白量が 20 g/L となるよう、蒸留水で希釈した。なお、今回使用した牛血清の総蛋白量は 81 g/L であった。カルシウムの沈着を抑制するためにエチレンジアミン四酢酸 (EDTA、2Na、Bio-rad、161-07284 および 4Na、Sigma-Aldrich、09-1510-5) 20 mmol/L を加えた³⁾。また、微生物の繁殖を抑制するために

アジ化ナトリウム (NaN_3 、和光純薬、195-11092) 1 g/L を添加した⁴⁾。試験は生体内を模して 37°C で行った。

荷重を静かに加えた後、往復動を開始した。摩擦力は 100 Hz で記録し、試験はおよそ 5 分間継続した。

PMPC コーティングを施した試料について、コーティングの剥離が疑われる現象が生じたため、摺動面の光学顕微鏡観察を行った。実際の観察には 3 次元測定レーザー顕微鏡 (島津製作所、OLS4000) を使用したが、レーザー測定ではなく、可視光を用いたカラー像による観察を行った。

2. 摩耗量の評価

近年、人工関節用摺動材料の摩耗特性に関する報告では、摩耗量が負であったとの報告が多くあるが、その原因として試験中の水分の吸収や、潤滑液中の脂質などの浸入が原因と考えられる。そこで、潤滑液中における各種材料の重量変化を調べた。

UHMWPE、PEEK、CFR-PEEK より作製した、端面の直径が 6 mm のピン試料を使用した (表 2)。これを前述の潤滑液 (牛血清水溶液、総蛋白量 20 g/L、20 mmol/L EDTA、1 g/L NaN_3) に室温で浸漬した。

これらの試料の重量変化を定期的に測定した。重量測定は電子天秤 (Mettler-Toledo、XP26、最小表示単位 1 μg) を用いた。また、測定の前には洗浄を行った⁵⁾。この洗浄方法は UHMWPE の摩耗量を重量変化により評価するために作られたもので、試料に付着した脂質や蛋白などを除去するための洗剤での洗浄、蒸留水によるすすぎ、付着した水分を除去するためのメチルアルコールによる脱水の行程が含まれる。

試験中の荷重による影響を調べるため、一部の試料（材料毎に $n = 3$ ）については二次元摩耗試験機に装着し、浸漬期間中は 20 kg の荷重を加えた。ただし、摺動は加えなかった。また、重量測定による摩耗量評価に代わる方法として形状測定による方法が考えられるが、その可能性について検討するため、重量測定と同時にピンの長さをマイクロメータ（Mitsutoyo、MDC-25MJ）で測定し、試料の寸法変化について調べた。

7) 分子シミュレーションを用いた材料表面水和状態の検討

【平成 22 年度】ポリマーを構成する基本単位である 1 ユニットの構造に水素基を配置したものを対象として分子動力的シミュレーション（Discovery Studio, Accelrys 社）を行った。比較対象には水を設定し、拘束条件は周期境界条件とした。対象とした材料は次の 11 種類である。PMEA: Poly(2-methoxyethyl acrylate)、PMEMA: Poly(2-methoxyethyl methacrylate)、PHEMA: Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)、PHEA: Poly(2-hydroxyethyl acrylate)、PEEA: Poly(2-phenylethyl acrylate)、PEA: Poly(ethyl acrylate)、PBA: Poly(butyl acrylate)、PEHA: Poly(2-ethyl hexyl acrylate)、PTHFA: Poly(tetrahydrofurfuryl acrylate)、PEEA: Poly[2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate]、PMPC: Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)。平衡状態にある 11 種類の材料に対し、平均 2 乗変位、拡散係数を算出した。

【平成 23 年度】モノメトリックな分子構造からさらに重合度を高めた。市販の高機能デスクトップ型 PC で計算しうる程度で、分子

構造の周期的な規則性を考慮した上で、重合度を 25 に設定した。高分子材料の初期構造は自明ではない。ソフトウェア（ChemDraw, Chem3D: Cambridge Soft 社）で作図した構造とシミュレーテッドアニーリング法による構造の 2 種類について比較した。それぞれの構造に対して、分子動力的シミュレーションを行った。

8) 表面処理を行った整形インプラント材料の潤滑状態の検討

1. 散逸粒子動力学法（DPD）による検討

まず初年度に、DPD によるシミュレーションを試みた。DPD とは、対象となる系の原子・分子をある程度ひとまとめにした仮想の粒子（散逸粒子）を考え、その粒子群の運動を追跡するシミュレーション手法である。この手法は、分子動力学法のように個々の原子・分子を考慮していたのでは計算規模が大きくなりすぎるような、メゾスケール領域の計算対象に用いられる。

本研究での DPD によるポリマーブラシモデルの概略図を図 3(a) に示す。この図は、軸受材料に挟まれた空間に潤滑液の散逸粒子やポリマー鎖を構成する散逸粒子が分散している状態を示している。ポリマーブラシを構成する各ポリマー鎖は、図 3(a) 内に示すように数珠つなぎ状に連結した粒子群としてモデル化される。このようなポリマー鎖を多数表面に付着させることによって、ポリマーブラシを模した構造を計算モデルの中で構成することができる。この特徴のため、多数のポリマー鎖からなるブラシ構造が、潤滑において果たす役割を考察する目的には適した手法であろう。

DPD において各粒子の運動を支配するの

は、各粒子間の相互作用力である保存力・散逸力・ランダム力という3つの力である。これらの力を受けて各粒子が運動方程式に基づいて運動する。そして、それら粒子群の運動を総和的に集計することで、圧力や温度などの状態を知ることができる。

ポリマー鎖を構成する粒子間の連結は、連結した粒子間の保存力を他と異なるものにすることによって保たれている。連結したポリマー粒子間では、保存力はお互いの粒子が一定の距離を保とうとする形で働くものとする。つまり、その一定距離以上に両者が離れると引力が働き、近づくと斥力が働く。一方、それ以外の粒子間の保存力は、互いの距離が近づくとつれて働く斥力のみである。

この手法に基づいて、簡単なポリマーブラシモデルの計算を行った例を図3(b)に示す。鉛直方向の上下面を固体壁境界として、下面に粒子5個からなるポリマー鎖4本があるものとして粒子の運動を計算した際の結果である。流体の粒子を青の粒子で、ポリマー鎖を赤色と黄色の粒子で示している。黄色の粒子はポリマーの付着点の粒子であり、位置を完全に固定している。この計算例では、固体壁境界条件の問題点のため、あるいはポリマー鎖の付着密度が低いため、もしくはその両者によって、計算ステップが進むにつれてポリマー鎖が下面に引きつけられた状態になる様子が観察された。

潤滑シミュレーションを行う上では、上記のシミュレーションに加え次のような点について実装を行う必要がある。

- 適切な固体壁境界条件の設定。
- 摺動のために、スライドする固体壁の実装。
- 粒子の増加による計算規模の拡大に対

応できる計算の効率化。

さらに、このDPDによるモデル化では、次のような点の妥当性を示す必要がある。

- ポリマー鎖を連結した粒子でモデル化することの妥当性。
- 固体壁境界条件の設定手法の妥当性。
- 必要となるパラメータの適切な設定値。

上記の実装を行った上で、これらの課題をクリアするには難しい点が多く、次に示す連続体力学に手法を改めることにした。

2. 連続体力学による検討

連続体モデルは、よりマクロな視点からのモデル化であり、散逸粒子のような粒子はもはや計算モデルの中に存在しない。そのため、ポリマーブラシのブラシ構造をモデルの中で考慮することは難しい。このことは欠点であるが、その一方で、必要となるパラメータがDPDに比べて少なく、さらにそれらを実験的に定めることができる可能性がある。また、潤滑膜厚等の数値がより直接的に得られることから、潤滑状態の考察がしやすい。このようなことから、連続体モデルでのシミュレーションを目指したほうが、より有用な結果が得られる可能性があると考えた。

本研究では、理論的な取り扱いの容易さから、人工股関節を対象として、球とカップの組み合わせからなる摺動面形状(ball-in-socket geometry)を対象とすることにした。図4に計算モデルの模式図を示す。簡単のため、ソケット設置時の傾斜角は考慮しないこととした。図4(a)は表面のポリマーブラシが存在しない従来の人工関節の場合について、図4(b)はポリマーブラシを持つ人工関節の場合についての模式図である。図4(a)のような従来の人工関節については、潤滑シミュレーションに関する

多くの研究がすでに存在している。本研究の特色は、図 4(b)に示すようにカップ表面にポリマーブラシの層を考慮することである。その際、分子レベルのスケールにおけるブラシ状構造は考慮せず、巨視的なポリマーブラシ層の力学的性質のみを考慮する。この層が存在したときに、存在しない場合に比べて潤滑状態がどのように変化するかを調べることが本研究の目的となる。つまり、ポリマーブラシ層の存在が潤滑膜形成に寄与するかどうか、さらに、歩行周期、負荷荷重、粘性係数などの周囲条件の変化に対する潤滑膜の安定性に寄与するかどうかを調べる。その上で、ポリマーブラシが存在する場合での、骨頭径や半径すきま等の設計諸元の最適化への応用などが考えられる。

表面の変形を考慮する必要があることから、この潤滑シミュレーションを行うためには、摺動面の変形が潤滑に与える影響を考慮する弾性流体潤滑(EHL)による必要がある。一般的に EHL シミュレーションは次の方程式群の連立問題になる。

- Reynolds 方程式 (流体潤滑基礎式)
- 軸受材料表面の弾性変形式
- 潤滑液のレオロジー特性式
- 潤滑膜圧力積分値と負荷荷重の釣り合いの式

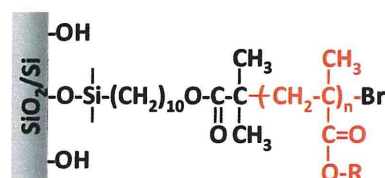
現在までに、これらの式の整理と解法に関する調査を行った。全体として非線形性の高い問題であり、求解は数値計算による必要がある。ポリマーブラシが存在している場合の影響を調べることが本研究の目的であるため、本研究では特に「軸受材料表面の弾性変形式」について、従来の人工関節の研究とは異なる手法を採る必要がある。この変形挙動は解析的に求めることは困難であるため、有限要素

法を応用することによって変形を求める。

9) 材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析

1. ポリマーブラシ表面の構築

シリコン基板、ガラス基板、金基板およびシリカビーズ表面に、表面開始型原始移動ラジカル重合(SI-ATRP)法を用いてポリマーブラシ層を構築した(図 5)。双性イオン性モノマーである MPC (ホスホベタイン型)、*N*-methacryloyloxyethyl *N,N*-dimethyl ammonium- \square -*N*-methyl carboxylate (CBMA) (カルボキシベタイン型)および



Zwitterionic (betaine) monomer



Nonionic monomer



Ionic monomer

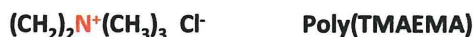


図 5. ポリマーブラシ表面の化学構造

[2-(methacryloyloxy) ethyl] dimethyl-(3-sulfo-propyl) ammonium hydroxide (SBMA) (スルホベタイン型)、カチオン性モノマーである tri(methyl) ammonium ethyl methacrylate (TMAEMA) (トリメチルアンモニウム基)、非イオン性モノマーである 2-hydroxyethyl

methacrylate (HEMA) (ヒドロキシル基)に加えて、非イオン性モノマーの oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (mOEGMA) (オリゴエチレングリコール鎖)を用いた。作製したポリマーブラシ表面の物理化学的な構造および表面特性を X 線光電子分光測定、原子間力顕微鏡(AFM)、分光エリプソメーター、静的・動的接触角測定、および表面ゼータ電位測定により評価した。

2. タンパク質吸着挙動の解析

水晶振動子マイクロバランス(QCM-D)を用いて、ポリマーブラシ表面に対するタンパク質吸着量を定量した。100%のウシ胎児血清(FBS)をタンパク質溶液として用い、接触時間および接触温度を30分間および37℃とした。タンパク質溶液との接触前後の振動数変化を用いて、「タンパク質吸着量(ng/cm^2) = $17.7 \times$ 振動数変化(Hz)」の変換式により、タンパク質吸着量を定量した。

アルブミンを化学的に固定化したカンチレバーを用いて、アルブミンとポリマーブラシ表面との間に働く相互作用力を評価した(図6)。得られたフォースカーブ曲線のアプローチカーブとリトラクトカーブの変位の差の最大値をタンパク質吸着力と定義し、各基板に対し100箇所程度の吸着力の平均値を相互作用力として定量した。

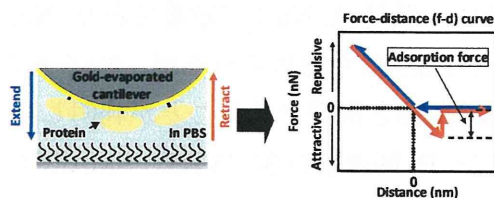


図6. AFMのフォースカーブ測定を用いたタンパク質吸着力解析手法

3. 水和状態の解析

ポリマーブラシ表面近傍の水和状態として、 $^1\text{H-NMR}$ 測定により、磁気緩和時間(T_1 値)および自己拡散係数(D)を定量した(図7)。

ポリマーブラシ層を構築したシリカビーズをNMR管に充填し、様々な様式で水和させ、同サンプル内に含まれる水分子の解析を行った。 T_1 の定量には反転回復法を、 D の定量には勾配磁場測定を用いた。図7に示すように、液体水と接触させたサンプル、水蒸気を接触させたサンプルおよびバルクの水の T_1 値(それぞれ $T_{1\text{liq}}$ 、 $T_{1\text{vap}}$ および $T_{1\text{bulk}}$)から、次式を用いて液体水中のポリマーブラシ層近傍の水和層厚(α)を算出した。 $1/T_{1\text{liq}}$

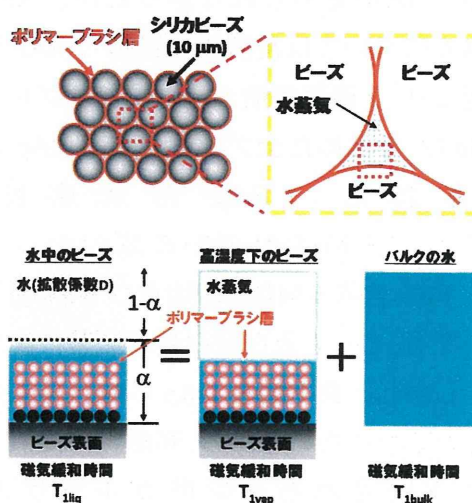
$$= \alpha/T_{1\text{vap}} + (1-\alpha)/T_{1\text{bulk}}$$


図7. シリカビーズを使用したポリマーブラシ近傍の水和状態の評価手法

2. 行政研究の部

平成17年の薬事法改正をはじめとする国内関連規制の改正及び準拠している国際基準ISO 10993シリーズの改正に伴い、平成15年2月13日付け医薬審発第0213001号厚生労働省医薬局審査管理課長通知「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安

全性試験の基本的考え方について」及び平成15年3月19日付け事務連絡医療機器審査No.36厚生労働省医薬局審査管理課「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料」についても、改正の必要が生じた。そこで、「医療機器の生物学的安全性試験法検討会」をたちあげ、改正作業を行った。

C. 研究結果

1. 実験研究の部

1) プロテオミクス解析を利用した医用材料の生体適合性・機能評価に関する研究

1. チタン材料 (図2左)

1-1. HAp 形成能

HBSS 浸漬の場合、4時間及び2日間ではHAp形成が認められなかったが、No.2、No.4-6については浸漬後1週間でHAp形成が起り、2週間浸漬すると未処理プレート (No.1) を含めた全プレート上にHApが形成された。HAp形成速度はNo.2>No.4,5>No.6>No.3,1の順であった。10% FBS含有 α MEM培地及びFBS浸漬においても、Ca、P及び蛋白質が顕著に沈着した。しかし、典型的なHApの粒状結晶は観察されなかったことから、両溶媒に浸漬した際に形成されるリン酸カルシウムはOctacalcium phosphateであることが示唆された。

1-2. 蛋白質吸着挙動

化学処理プレートには、骨形成に関与することが知られているBMP2、FGF2、IGF1、IGF2及びHGF等が有意に吸着した。この吸着は特にNo.2とNo.4プレートに顕著であった。IGF関連蛋白質 (IGFBP1-4)、BMP関連蛋白質 (BMP2K)、HGF関連蛋白質 (HGFAC、HGS、FETUB)、FGF関連蛋白質 (SHISA2)、

TGFスーパーファミリー関連蛋白質 (TGFB1、GDF8) も化学処理プレートに吸着することが認められた。その他、サイトカイン関連蛋白質 (IL18RAP、CXCR3、CXXC5)、IFN関連蛋白質 (INFB1、IRF7、INFG1)、TNF活性阻害/NF- κ B転写抑制因子 (TNIP2、TTRAP、HIVEP3、NUMBL、TAX1BP1)、成長因子関連蛋白質 (GIGYF2、RGNEF、JUNB) 等が化学処理群から有意に検出された。No.2及びNo.4プレートには、エストロゲン受容体蛋白質 (ESR1) が吸着したと共に、ステロイド受容体転写因子 (ESR1)、ステロイドコアクティベータ (NCOA6) 及びNMDA依存的AMPA受容体制御因子 (HIP1) も化学処理群に吸着することが判明した。骨系蛋白質としては、TETN、OGN、LUM、AHSG、CHAD及びPRG4が化学処理プレートに有意に吸着した。TETNとOGNの吸着はNo.2及びNo.4、LUM、AHSG、CHADの吸着はNo.4に顕著であった。グルタミン酸関連蛋白質としては、KMO、GRM6、GRIA2、GRIN1、GRM7、GRIA3、GRIN3Bが化学処理プレートに有意に吸着した。この吸着は、特にNo.2及びNo.4に顕著に認められた。Caチャンネル関連蛋白質としては、IP3受容体活性化因子 (STIM1) のほか、Caチャンネルを形成する幾つかの関連蛋白質が化学処理群に有意に吸着した。STIM1の吸着は、No.4が顕著であり、No.2、No.3、No.5にも認められるが、No.6への吸着量は対照と同等であることが判明した。ビタミンD関連蛋白質 (VDR、SMARCE1、SNW1、GC、CYP2R1) 及びビタミンK関連蛋白質 (GGCX) が化学処理プレートに有意に吸着した。各蛋白質の吸着は、特にNo.2及びNo.4で顕著であり、No.6プレートへの

吸着は SMARCE1 を除き、対照と比較して大きく変動しないことが確認された。金属関連蛋白質として、Fe 結合性蛋白質 (TF、LTF、MFI2)、Cu 結合性蛋白質 (COX17、CUTC)、Mg 輸送関連蛋白質 (ZDHHC13)、Zn 輸送関連蛋白質 (SLC39A12) が No.2-5 プレートに有意に吸着した。HOX 関連蛋白質である HOXA10 及び KDM5A の吸着は No.2 で顕著に認められ、その他の化学処理プレートへの吸着量は対照と比較して大きく変動しないことが確認された。No.2 と No.4 プレートには、その他の HOX 関連蛋白質も吸着するが、No.3、No.5 及び No.6 への吸着パターンはプレート毎に異なっていた。ヘッジホッグ関連蛋白質としては、Gli2 分解阻害能を持つ GLI2 が No.2 と No.4 プレートに顕著に吸着した。細胞外マトリクスとして、コラーゲン、コンドロイチン硫酸、インテグリン、タリン、ビンクリン、テンシン、ヒアルロン酸結合蛋白質、テナスチン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、グリピカンのほか、コラーゲン合成に必須である PLOD2 及び PCOLCE を初めとしたその他の関連蛋白質が検出された。No.2 プレートには、これらの全ての細胞外マトリクスが結合するが、No.4>No.3>No.5>No.6 の順序に従って、吸着する蛋白質の種類が減少した。HSP・アラキドン酸関連蛋白質の吸着パターンは、PITPNM2 及び PLCB4 を除き、No.2/No.4 間及び No.3/No.5 間に相同性が認められた。一方、No.6 プレートの場合、PIK3C2G、ECEL1、PIK3C2A、PIKFYVE 及び MARPKAPK5 の吸着量は有意に増加するが、その他の蛋白質群の吸着量は対照と比較して大きく変動しないことが確認された。Ephrin 関連蛋白質としては、骨吸収に関与する EPHA10 の吸着

量が全ての化学処理プレートで増加した。GABA 関連蛋白質としては、骨形成を抑制する GABARAPL2 のほか、GABRR1 及び GABBR2 が同定された。これらの蛋白質の吸着パターンには、No.2/No.4 間及び No.3/No.5 間に類似性が認められた。BMP 誘導性の転写を活性化する ZBTB24 を初めとした Zinc Finger Protein 関連因子の吸着パターンはプレート毎に異なっており、No.2>No.4>No.3>No.5>No.6 の順序に従って吸着する蛋白質数が減少した。Ras 関連蛋白質、CHD9 (骨分化)、FAM83H (エナメル形成) の吸着挙動は No.2/No.4 間及び No.3/No.5 間に類似性が認められた。

2. 高分子材料 (図 2 右)

2-1. 物理化学特性

各材料の物理化学的特性と表面構造を図 2 右に示した。PVP を含有する PSF には親水性が付与されていたが、その他の材料は全て疎水性表面を持っていた。C-PET、PS、PTFE 及び UHMWPE の表面ゼータ電位は、いずれも -30 mV 台であった。一方、PSF 及び CTA の表面ゼータ電位は、それぞれ -2.40 及び -9.47 mV であり、他の材料と比較して高い値を示すことが確認された。表面ゼータ電位の低い C-PET、PS、PTFE 及び UHMWPE の表面に吸着した血漿蛋白質量は 0.28-0.58 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であったが、PSF 及び CTA の蛋白質吸着量は 9.57 及び 7.59 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、表面ゼータ電位の高い材料は蛋白質を吸着し易いことが示唆された。

2-2. 蛋白質吸着挙動

アルブミンは全ての材料に吸着したが、その吸着量は吸着蛋白質 (AP) / 血漿蛋白質 (PP) 比として 0.01-0.28 倍であり、材料表

面状で濃縮される現象は認められなかった。セロトニントランスポータ、コラーゲン Type XXII α 鎖、ビトロネクチン、インテグリン α 1、補体補助因子 D、リポ蛋白質 (APOE)、ホスホリパーゼ D₅ 及び IL-7 等は、ほぼ全ての材料に AP/PP 比として 2 又は 5 倍を超えて顕著に吸着し、材料上で濃縮されることが確認された。C3 補体の AP/PP 比は 0.29-1.23 であったが、C1 補体は CTA 及び PSF、C8 補体は CTA、PTFE 及び PSF に AP/PP 比 = 2 を超えて吸着した。免疫グロブリンは PTFE、PS 及び PSF、リポ蛋白質は PSF 及び PTFE に吸着し易い傾向が認められた。その他、セロトニン受容体は PS、血液凝固因子は PSF 及び PTFE、フィブロンectin 及び VWF は PTFE、マンナン結合因子は CTA に AP/PP 比 = 2 を超えて吸着した。一方、 α 1-アンチトリプシン、トロンボスポンジン (CTA を除く)、キニノゲン、カリクレイン (PSF を除く)、血小板第 4 因子及び抗凝血作用蛋白質群には、AP/PP 比として 2 倍を超える顕著な吸着が認められなかった。

2) 自己組織化膜を利用したモデル表面材料調製と細胞機能を利用した細胞挙動解析

単独官能基表面の調製に加えて、メチル基を含む様々な 2 官能基表面の調製を行った。それら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 2 官能基表面で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、仕込み比が 10 % 以下の場合には仕込み比に依存した接触角の変化が観察されたが、それ以上の仕込

み比では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、硫酸基試薬の仕込み比が 85 % 以上になるとその仕込み比に依存した接触角の変化が観察され、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。

これらの結果から、各試薬の金表面に対する反応性が異なることが予想されたため、金上に形成される SAM 層の形成速度を測定したが、いずれの試薬においても、反応速度定数に大きな差は認められなかった。

各々の 2 官能基表面における元素分析を ESCA で行ったところ、いくつかの 2 官能基表面では、接触角と表面に存在する酸素元素量との間に相関性が示唆される結果を得た。特に、硫酸基/メチル基からなる 2 官能基表面では、接触角と表面に存在する酸素元素量との間に明確な相関性が認められた。

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による細胞間連絡機能阻害程度、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、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細胞で得られた結果を使用した。

それらの結果、若干のはずれ値は存在するものの、モデル表面上の細胞占有面積は接触角が 65° 前後で最大を示し、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。

次に、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。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。一方、細胞占有面積比率に対する代謝協同阻害程度を検討したところ、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。

代謝協同阻害試験においては細胞占有面積がその結果に影響を及ぼすので、その具体的影響を検討する目的で、「細胞数の減少=細胞占有面積の減少」と仮定し、細胞播種数を変化させることで疑似的に細胞占有面積を変化させた代謝協同阻害試験を行った。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。なお、細胞毒性に関しては、細胞数変化、すなわち細胞占有面積変化との関連性は認められなかった。

3) アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析

1. 表面処理によるカルシウム導入量

チタン及びジルコニウムの表面処理後のカルシウム量、マグネシウム量及びリン量を表 3 及び表 4 に示した。CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理によってチタン及びジルコニウム表面にカルシウムが導入されたことが確認できた。また、チタンに比べてジルコニウムのカルシウム導入量は少なかったが、どちらも CaCl₂ 処理に比べて Ca(OH)₂ 処理により効率よくカルシウムを導入できた。

2. 表面処理チタンの擬似体液浸漬時のイオン吸着挙動

擬似体液浸漬 0.5 日目から 7 日目までの、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 8 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イオン及びリン酸イオンの吸着量が徐々に増加した。また、Ca/P 比は 50 前後を推移した。NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したチタンは、浸漬 5 日目以降にカルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオ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 日目以降は約 2 になった。Ca(OH)₂ 処理したチタンは、浸漬 2 日目以降にカルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオ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 日目に 2.38、浸漬 7 日目に 1.46 になった。

表面処理間で擬似体液浸漬によるカルシウム量、マグネシウム量及びリン量の変化を比較した (図 9)。カルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量は、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 日目で顕著に多く、浸漬 5 日目以降も最も多かった。

3. 表面処理ジルコニウムの擬似体液浸漬時のイオン吸着挙動

擬似体液浸漬 0.5 日目から 9 日目までの、未処理、NaOH 処理、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したジルコニウム表面に吸着したカルシウム量、マグネシウム量及びリン量並びに Ca/P 比を図 10 に示した。未処理のジルコニ

ウムは、浸漬時間に係わらず微量のカルシウムイオンの吸着が認められ、浸漬時間に伴ってリン酸イオンの吸着量の増加傾向が認められた。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って徐々に低下し、浸漬 7 日目以降は約 2 になった。NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したジルコニウムは、浸漬 7 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した。浸漬 9 日目及び 7 日目にはマグネシウムイオンの吸着も認められた。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って徐々に低下し、浸漬 7 日目以降は約 1.5 になった。Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムは、浸漬 5 日目からカルシウムイオン、及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した。浸漬 5 日目からはマグネシウムイオンの吸着量も増加した。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って減少し、浸漬 5 日目以降は約 1.5 になった。

表面処理間で擬似体液浸漬による材料表面のカルシウム量、マグネシウム量及びリン量の変化を比較した (図 11)。カルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量は、Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムにおいて、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したジルコニウムに比べて、浸漬 5 日目以降で顕著に多かった。

4) 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

表面に 3 種類の化学処理を施した Ti 上で 7 日間培養した hMSC の形態について、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理では、未処理と比べて hMSC の形態に大きな変化は見られなかったが、Ca(OH)₂ 処理においては、細胞の大きさや広がりにより多少の変化が見られた。

純 Ti ディスク上での培養による hMSC の mRNA 発現への影響について検討するために、DNA マイクロアレイ解析を行い、通常のディッシュでの培養時と比較検討した。純 Ti 上での培養により発現レベルが 2 倍以上上昇した遺伝子は 262、1/2 以下に減少した遺伝子は 497、また通常のディッシュでの培養では発現していなかったが、純 Ti 上での培養により発現が認められるようになった遺伝子が 675、反対に通常のディッシュでの培養では発現していたが、純 Ti 上での培養により発現が認められなくなった遺伝子が 975 であった。次に、純 Ti ディスクの表面処理が hMSC の mRNA 発現への影響について検討するために、表面を 3 種類の化学処理を施した純 Ti ディスク上で hMSC を培養した後 DNA マイクロアレイ解析を行い、表面未処理の純 Ti ディスク上での培養時と比較検討した。純 Ti の表面処理により発現レベルが 2 倍以上上昇した遺伝子は NaOH 処理で 104、CaCl₂ 処理で 133、Ca(OH)₂ 処理で 219、1/2 以下に減少した遺伝子は NaOH 処理で 296、CaCl₂ 処理で 99、Ca(OH)₂ 処理で 146、また純 Ti の表面未処理の場合は発現していなかったが、表面の化学処理により発現が認められた遺伝子は NaOH 処理で 1240、CaCl₂ 処理で 1397、Ca(OH)₂ 処理で 1409、反対に表面未処理の場合は発現していたが、表面の化学処理により発現が認められなかった遺伝子は NaOH 処理で 1566、CaCl₂ 処理で 1235、Ca(OH)₂ 処理で 1244 であった。また、純 Ti 表面の化学処理により hMSC の発現レベルが有意に変化した遺伝子群が、それぞれの様な生体機能に関わるのかについて IPA にて解析したところ、細胞の増殖や発達に関わる機能への影響、さらに、骨形成や骨の発達

に関わる機能への影響が観察された。

そこで、まず Cell Cycle に関するパスウェイについて、通常のディッシュと比較して純 Ti 上での hMSC 培養による変化について検討した。細胞周期：G1/S チェックポイントの制御及びサイクリンと細胞周期の制御については、TGF- β の上昇及びそれに伴う p16^{INK4A} の上昇が認められ、さらに、Rb 及び E2F が純 Ti での培養により発現が認められなくなった。それに伴い、S 期、G2 期、M 期に関わる遺伝子の発現が全体的に下がっていることも確認された。次に、純 Ti 上での hMSC 培養による骨再生に関連するパスウェイについて検討した。骨芽細胞においては、純 Ti 上での培養により骨分化のマーカの一つであるアルカリフォスファターゼ活性の上昇に関与する IL-6, IL-11, OPG (osteoprotegerin ; TNFRSF11B) の上昇が見られた。また、骨芽細胞の分化に関わる OPN (osteopontin) も上昇していた。さらに骨格系の発達や骨芽細胞の分化に関わる BMP (bone morphogenetic protein) は、通常のディッシュでの培養では発現していなかったにもかかわらず純 Ti 上で hMSC を培養する事により発現が誘導された。破骨細胞においては、破骨細胞の分化に必須とされる M-CSF、同様に破骨細胞分化に必須の転写因子である NFAT の発現が、純 Ti 上での培養により有意に上昇した。

次に、それぞれの純 Ti ディスク上で培養した hMSC の骨形成や骨の発達に関わる遺伝子発現への純 Ti 表面の化学処理の影響について調べるために、骨再生に関連するパスウェイについて検討した。骨芽細胞及び破骨細胞における機能について、それぞれ純 Ti 表面の 3 種類の化学処理の影響について未

処理のものと比較した。まず、純 Ti 表面の NaOH 処理の影響について、骨形成に関わるシグナル伝達系のひとつである Wnt シグナリングにおける Wnt 及びその細胞表面受容体 Frizzled、さらにその下流の Wnt シグナル伝達経路の様々な構成分子を結合させる足場タンパク質である Axin や APC (adenomatous polyposis coli) の mRNA 発現が、未処理の場合には認められなかったのに対し純 Ti 表面の NaOH 処理によって発現が誘導された。そして、破骨細胞形成抑制による骨形成促進に関わる OPG の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した。さらに、破骨細胞分化の制御に関与する NFAT (nuclear factor of activate T cell) の遺伝子発現も誘導された。

次に、純 Ti 表面の CaCl₂ 処理の影響については、NaOH 処理の際にみられた変化に加えて、間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化する過程や石灰化ならびに骨形成に関与するタンパク質である BMP、同様に骨芽細胞への分化に関与する IGF-1 の遺伝子発現が、純 Ti 表面の CaCl₂ 処理によって誘導された。また、骨芽細胞への分化に関与する OPN の遺伝子発現が CaCl₂ 処理により 2 倍以上上昇した。さらに、OPN の発現上昇に伴い integrin β 3 の発現も誘導された。また、CaCl₂ 処理によっても NFAT の遺伝子発現が誘導された。

次に、純 Ti 表面の Ca(OH)₂ 処理の影響については、Wnt 及び受容体 Frizzled に加えて Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現が、純 Ti 表面の Ca(OH)₂ 処理によって誘導された。さらに破骨細胞分化因子である RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) の遺伝子発現が Ca(OH)₂ 処理によって誘導