

図9. 異なる溶媒を用いて調製した4級アミンとリン酸エステル基からなる表面の接触角 (a: 液滴法、b: 水中気泡法)

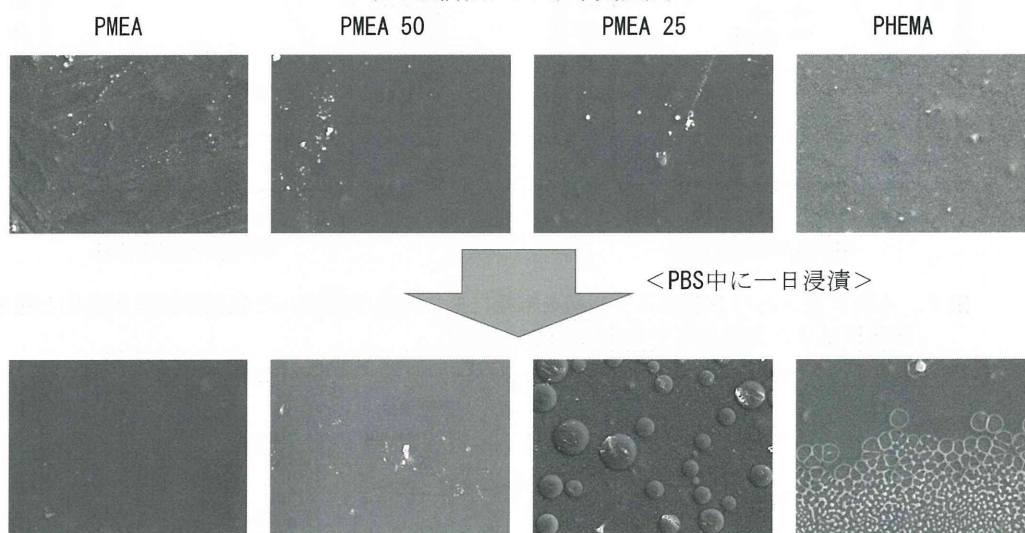


図10. 各種ポリマーコーティング表面におけるPBS一日浸漬前後のSEM観察像 (撮影倍率 x1,000、画像横幅: 132 μm)

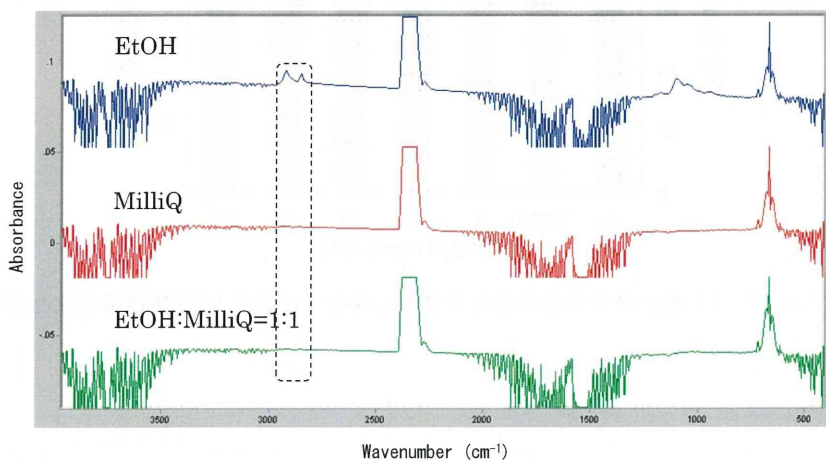


図11. 溶媒を変えて4級アミン:リン酸エステル基試薬を1:1で反応させた表面のFT-IRスペクトル (積算回数 32回)

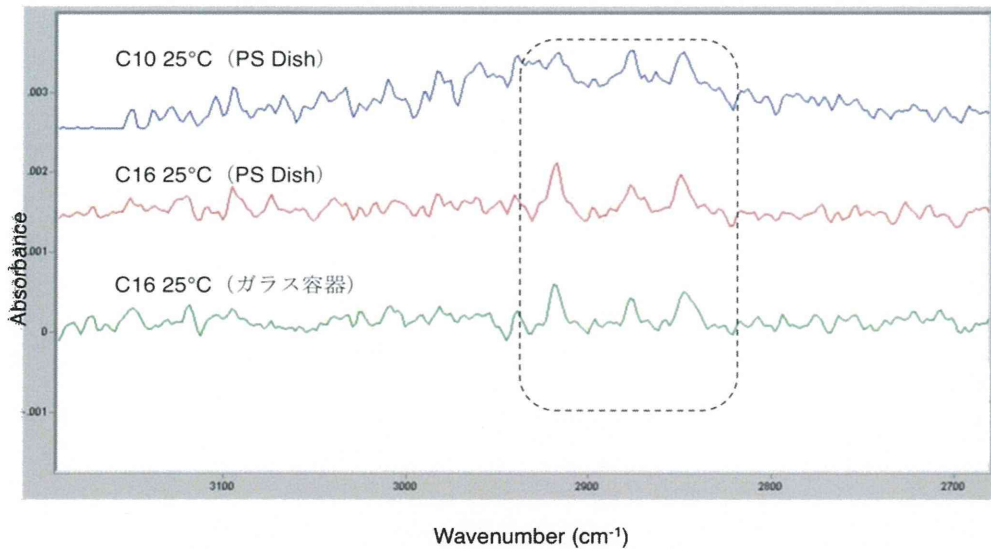


図12. メチレン鎖長の異なる試薬を用いて調製したメチル化 SAM 表面の FT-IR 解析で得られたメチレン鎖伸縮由来スペクトル (積算回数 64回)

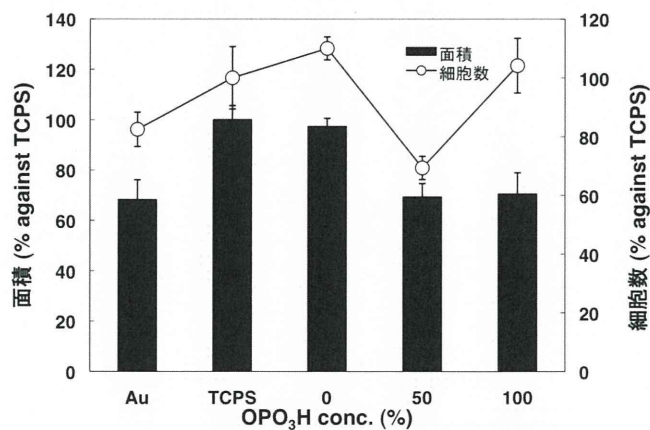


図13. 水：エタノール (1:1) 混合溶媒中で調製した4級アミンとリン酸エステル基からなる表面に播種1日後のV79細胞接着数と細胞占有面積

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  
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名  
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 主任研究官

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、チタンにアパタイト形成能を付与するために、アルカリ処理後に塩化カルシウム又は水酸化カルシウムを用いて、チタン材料表面にカルシウムを導入した。これらの処理を施したチタンの表面形状及び表面化学状態を解析した。さらに、短時間の擬似体液浸漬による表面化学状態変化を解析した。その結果、 $\text{CaCl}_2$  処置及び  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理を施しても、 $\text{NaOH}$  処理によって形成された網目形状が保持されていた。また、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理によってチタン表面にはチタン酸カルシウムが形成されていた。さらに、擬似体液浸漬によって、 $\text{CaCl}_2$  処置したチタンではカルシウムの漏出が示唆されたが、水に不溶性のチタン酸カルシウムが表面に形成された、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタンではリン酸イオンの吸着が示唆された。チタンへの  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理は、チタン酸カルシウムの形成によって、高いアパタイト形成能を発揮したと考えられる。

#### A. 研究目的

整形外科領域で使用される、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 $\gamma$  ネイル、髄内釘、人工関節等の骨系埋植医療機器は、高齢者人口の増加等によって、年々使用量が増加している<sup>1)</sup>。しかし、構造の複雑化や使用期間の長期化等によって、これらの機器の不具合も増加傾向にある<sup>2)</sup>。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、埋植した機器と生体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 月に厚生労働大臣から製造販売の承認を受けた<sup>3)</sup>。

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<sup>4,5)</sup>。我々は、擬似体液としてハ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によるアパタイト形成能の定量的評価法を検討し<sup>6)</sup>、高いアパタイト形成能を付与するために材料表面にカルシウムを導入したチタン合金等のアパタイト形成能を評価した<sup>7)</sup>。その結果、水酸化カルシウムを用いてカルシウムを導入したものは、塩化カルシウムを用いてカルシウムを導入したもの比べて、高いアパタイト形成能を獲得し、カルシウム導入量とアパタイト形成能との間に正の相関が認められた<sup>7)</sup>。

さらに、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)によって、カルシウム導入処理を施したチタン及びジルコニウムの擬似体液浸漬時におけるイオンの吸着挙動とアパタイト形成能との関係を解析した<sup>8,9)</sup>。その結果、水酸化カルシウムを用いてカルシウムを導入したチタン及びジルコニウムは、それぞれの材料の中で最も高いアパタイト形成能を示し、どちらも擬似体液浸漬初期からリン酸イオンの吸着量が経時的に増加したことから、これらの材料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<sup>8,9)</sup>。

また、網羅的遺伝子発現解析から、チタンにカルシウム導入処理を施すことに

よって、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞のWntシグナル伝達経路が活性化され、さらに、骨形成に関する転写因子などの発現が誘導または上昇した<sup>10)</sup>。これらの現象は、チタンのカルシウム導入量及びアパタイト形成能の増加に依存することが示唆された<sup>10)</sup>。

このように、チタンにカルシウム導入処理を施すことによって、高いアパタイト形成能を付与し、さらに、間葉系幹細胞の骨分化誘導が可能になる。今年度は、カルシウム導入処理を施したチタンの表面性状を解析し、表面処理によってもたらされた表面化学状態を明らかにした。さらに、カルシウム導入処理を施したチタンを擬似体液に短時間浸漬した後の表面化学状態の変化を解析した。

## B. 研究方法

### 1. 試験材料

株式会社高純度化学研究所製の純チタン片(純度:99.9%、金属不純物:Al 0.003%、Cr 0.005%、Fe 0.02%、Ni 0.003%、サイズ:5 mm×5 mm×1 mm)を用いた。試料片は、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

#### (1) NaOH 処理

試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、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

## (2) CaCl<sub>2</sub> 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、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

## (3) Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01 mol/L 水酸化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

## 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、37°C に加温したカルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハンクス平衡塩溶液（インビトロジェン株式会社）7 mL を加え、37°C に設定したインキュベータ内に 15 分間または 30 分間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

## 4. ICP-MS

試料表面に導入されたカルシウム量を求めるため、試料を 10%硝酸に 37°C で 2 時間浸漬した後、その浸漬液を超純水で 2 倍に希釈し、5%硝酸溶液とした。その溶液中のカルシウム濃度を ICP-MS 法により測定した。ICP-MS 装置は、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：Ar 15 L/min

キャリアガス：Ar 0.7 L/min

メイクアップガス：Ar 0.33 L/min

コリジョンガス：He 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

測定質量数：m/z 43

とした。

カルシウム 1000 mg/L 標準液（和光純薬工業株式会社）を 5%硝酸で段階希釈したものを、検量線作成用の標準液とした。

## 5. 走査型電子顕微鏡（SEM）観察

イオンスパッタリング装置 JFC-1500（日本電子株式会社）を用いて、試料表面に金を 20 nm の厚さにコーティングした。その後、走査型電子顕微鏡 JSM-5800LV（日本電子株式会社）を使用して、加速電圧 15 kV で試料の表面形状を観察した。

## 6. X線光電子分光分析（XPS）

XPS 装置 ESCA-3200（株式会社島津製作所）を使用して、試料表面の化学状態を分析した。XPS スペクトルの測定条件は、

Pass energy: 75 eV

Excitation anode: Magnesium

Excitation energy: 1253.6 eV

Excitation voltage: 8 kV

Excitation current: 30 mA

Collection step: 0.1 eV

Collection time: 298 ms

とした。

XPS スペクトルの解析には、XI Spectral Data Processor v4.3 (XPS International, LLC) を使用した。なお、結合エネルギーの帯電補正は、炭化水素の C 1s ピーク (285.0 eV) を基準とした。

## C. 研究結果

### 1. カルシウム導入量

表面処理による試料表面へのカルシウム導入量の測定結果を図 1 に示した。CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 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された。また、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によるカルシウム導入量は、CaCl<sub>2</sub> 処理によるカルシウム導入量の 2.75 倍であった (図 1)。

### 2. 表面処理後の表面形状

表面処理後の試料表面の SEM 観察像を図 2 に示した。未処理のチタン表面は、研磨痕を除いて、平坦な形状が観察された (図 2a)。一方、NaOH 処理、CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン表面は、いずれも網目形状が観察され、各処理間に明らかな相違は認められなかった (図 2b-d)。さらに、カルシウム導入処理に使用した水酸化カルシウムの溶解度は低い (0.02 mol/L) が、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン表面に水酸化カルシウムの析出物と考えられるものは観察されなかった (図 3)。

### 3. 表面処理後の表面化学状態

表面処理した試料の XPS スペクトルを図 4 に示した。未処理のチタンの XPS スペクトルには、炭素に由来するピークを除き、チタン及び酸素に由来するピークのみが認められた (図 4a)。また、NaOH 処理したチタンの XPS スペクトルには、未処理のチタンで観察されたピークの他に、ナトリウムに由来するピークが認められた (図 4b)。一方、CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの XPS スペクトルには、ナトリウムに由来するピークに換わって、カルシウムに由来するピークが認められた (図 4c, d)。

表面処理した試料の O 1s XPS スペクトルを図 5a-d に示した。未処理のチタンの O 1s ピークに比べて、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピークは、高結合エネルギー側に化学シフトしていた (図 5b, c)。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s には、少なくとも 2 つ以上のピークが認められた (図 5d)。そこで、カルシウム導入処理に使用した塩化カルシウム水和物及び水酸化カルシウム並びにチタン酸カルシウムの O 1s XPS スペクトルと比較したところ (図 5e-h)、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピークは、チタン酸カルシウムの O 1s ピークと相似していた (図 5g, h)。

Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン及びチタン酸カルシウムの O 1s のピークフィッティング結果を図 6 に示した。どちらもおよそ 530.1 eV 及び 531.7 eV にトッ

プを持つ 2 つにピークに分離された。また、それら 2 つのピーク面積の割合も、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタンとチタン酸カルシウムとの間で一致した (530.1 eV : 46%及び 531.7 eV : 54%)。

#### 4. 擬似体液浸漬後の表面化学状態

表面処理した試料の擬似体液 15 分間及び 30 分間浸漬後の XPS スペクトルを図 7 及び図 8 に示した。未処理のチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬による変化が認められなかった (図 7a 及び図 8a)。NaOH 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬によってナトリウムのピークが相対的に減少し、新たにカルシウムのピークが認められた (図 7b 及び図 8b)。また、 $\text{CaCl}_2$  処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬前には認められなかったナトリウムのピークが認められた (図 7c 及び図 8c)。一方、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬前には認められなかったリンのピークが認められた (図 7d 及び図 8d)。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタンで認められたリンのピークが 30 分間浸漬した方で明瞭に観察されたことを除いて (図 7d 及び図 8d)、いずれの試料においても 15 分間浸漬したものと 30 分間浸漬したものとの間に明らかな差は認められなかった (図 7 及び図 8)。

#### D. 考察

チタン合金に骨結合性を付与するためのアルカリ加熱処理技術が開発され、す

で人工股関節に応用された<sup>3)</sup>。さらに、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム水溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討された<sup>11)</sup>。チタン合金は、NaOH 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<sup>12)</sup>。その後、塩化カルシウム水溶液に浸漬すると、ナトリウムがカルシウムとイオン交換して、チタン酸水素カルシウムに変化する<sup>11)</sup>。我々は、水酸化カルシウム水溶液を用いたアルカリ性条件下で、NaOH 処理したチタン合金にカルシウムを導入する方法を検討した<sup>7)</sup>。その結果、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタン合金は、NaOH 処理及び  $\text{CaCl}_2$  処理したチタン合金に比べて、高いアパタイト形成能を示した<sup>7)</sup>。さらに、擬似体液浸漬時におけるイオンの吸着挙動を解析したところ、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  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ことが示唆された<sup>8)</sup>。そこで、カルシウム導入処理を施したチタンの表面形状及び表面化学状態を解析した。さらに、カルシウム導入処理を施したチタンの擬似体液浸漬時における表面化学状態の変化を解析した。

既報と同様に、NaOH 処理<sup>12)</sup>及び  $\text{CaCl}_2$  処理<sup>11)</sup>したチタン表面は、網目形状が観察された (図 2b, c)。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタン表面も、それらと類似した網目形状が観察され (図 2d)、NaOH 処理後に水酸化カルシウム水溶液で処理を施しても、NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されたものと考え

られる。

XPS スペクトルから、NaOH 処理によって導入されたナトリウムが (図 4b)、CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって完全にカルシウムに置換されたことが確認できた (図 4c, d)。

また、O 1s XPS スペクトルから、NaOH 処理したチタンの O 1s ピーク (図 5b) と CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピーク (図 5c) は相似しており、NaOH 処理によって形成されたチタン酸水素ナトリウム中のナトリウムがカルシウムとイオン交換したことを支持している。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピーク (図 5d) は、それらのピークとは明らかに異なり、むしろチタン酸カルシウムの O 1s ピーク (図 5g) と相似していた。ピークフィッティング解析の結果、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンとチタン酸カルシウムの O 1s ピークは、結合エネルギー及び存在比率が一致するそれぞれ 2 つにピークに分離された (図 6)。これらのことから、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン表面には、チタン酸カルシウムが形成されたことが示唆された。

CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンは、NaOH 処理によって導入されたナトリウムが、塩化カルシウム水溶液で処理することによって、完全にカルシウムと置換していた (図 4c)。しかし、15 分間及び 30 分間の擬似体液浸漬によって、カルシウムの一部が再びナトリウムと置換していた (図 7c 及び図 8c)。CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンのアパタイト形成能が、NaOH 処理したチタンのアパタイト形成能と比べ

て、顕著に向上しないのは<sup>8,11)</sup>、導入されたカルシウムの漏出によるものと考えられる。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンを擬似体液に浸漬してもナトリウムが検出されなかったことは (図 7d 及び図 8d)、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によってチタン表面に水に不溶性のチタン酸カルシウムが形成されたことを支持している。また、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンのみで 15 分間及び 30 分間の擬似体液浸漬によってリンが検出されたことは (図 7)、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの高いアパタイト形成能が早期のリン酸イオンの吸着に起因していること<sup>8)</sup>を支持している。

## E. 結論

CaCl<sub>2</sub> 処置及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理を施しても、NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されていた。また、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によってチタン表面にはチタン酸カルシウムが形成されていた。さらに、擬似体液浸漬によって、CaCl<sub>2</sub> 処置したチタンではカルシウムの漏出が示唆されたが、水に不溶性のチタン酸カルシウムが表面に形成された、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンではリン酸イオンの吸着が示唆された。チタンへの Ca(OH)<sub>2</sub> 処理は、チタン酸カルシウムの形成によって、高いアパタイト形成能を発揮したと考えられる。



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, in press.
- 2) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, in press.

### 2. 学会発表

- 1) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Apatite Formation on Ca-Incorporated Ti-Zr Based Alloys in Simulated Body Fluid, *The 9th World Biomaterials Congress* (2012.3, Chengdu)
- 2) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したジルコニウムのイオン吸着挙動とアパタイト形成能、日本金属学会 2012 年秋期講演大会 (2012.9、松山市)

- 3) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したチタン及びジルコニウムの擬似体液浸漬によるアパタイト形成、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11、仙台市)
- 4) 河野健、澤田留美、伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子：チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11、仙台市)
- 5) 齋島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、伊佐間和郎、松岡厚子：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発 -可塑剤溶出量と溶血性の関係について-、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11、仙台市)

### 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) Kokubo T, Ito S, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T: Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 331-343 (1990)
- 5) Kokubo T, Kushitani H, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T: 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) 伊佐間和郎：アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析、平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書（2011）
- 9) 伊佐間和郎：アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析、平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書（2012）
- 10) 澤田留美：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、平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書（2012）
- 11) Kizuki T, Takadama H, Matsushita T, Nakamura T, Kokubo T: Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment, *Acta Biomater.*, **6**, 2836-2842 (2010)
- 12) Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T: Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 409-417 (1996)

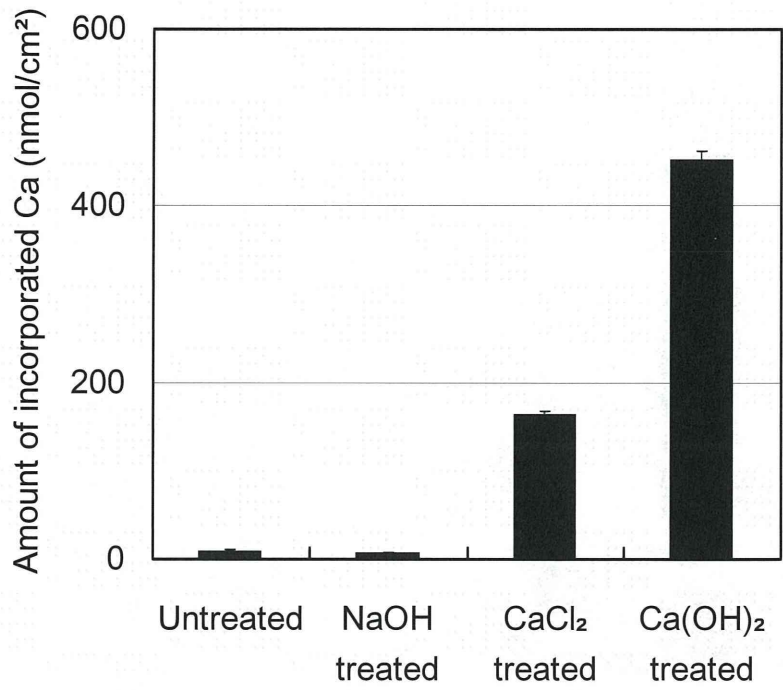


図1 チタン表面へのカルシウム導入量

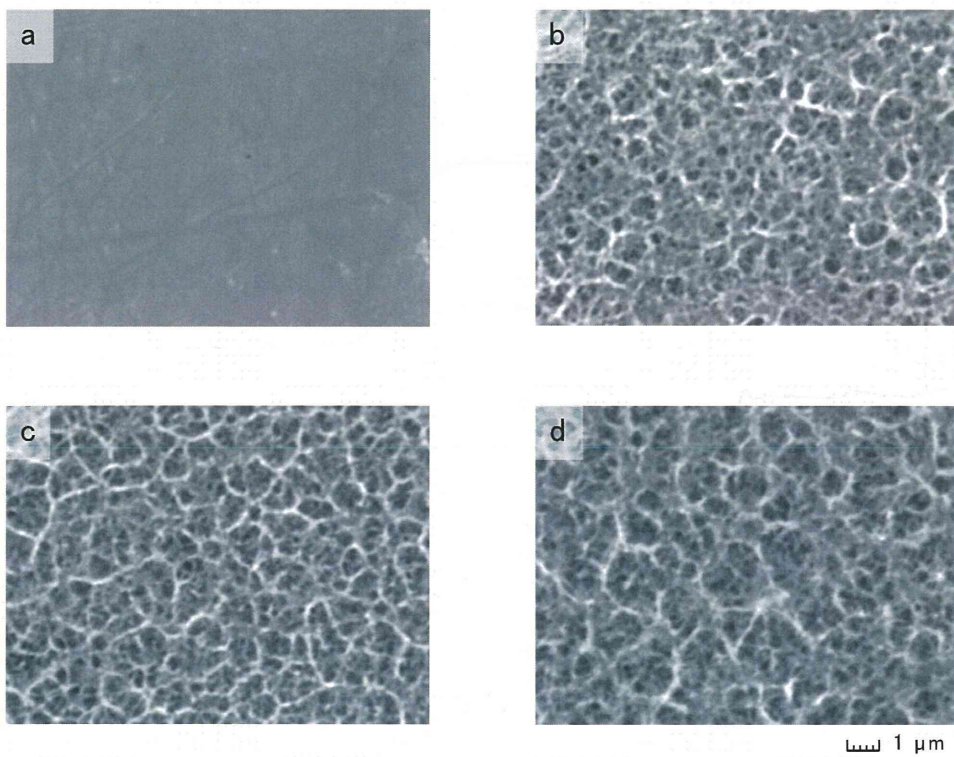


図2 表面処理を施したチタンのSEM観察像  
 a: 未処理、b: NaOH処理、c: CaCl<sub>2</sub>処理、d: Ca(OH)<sub>2</sub>処理

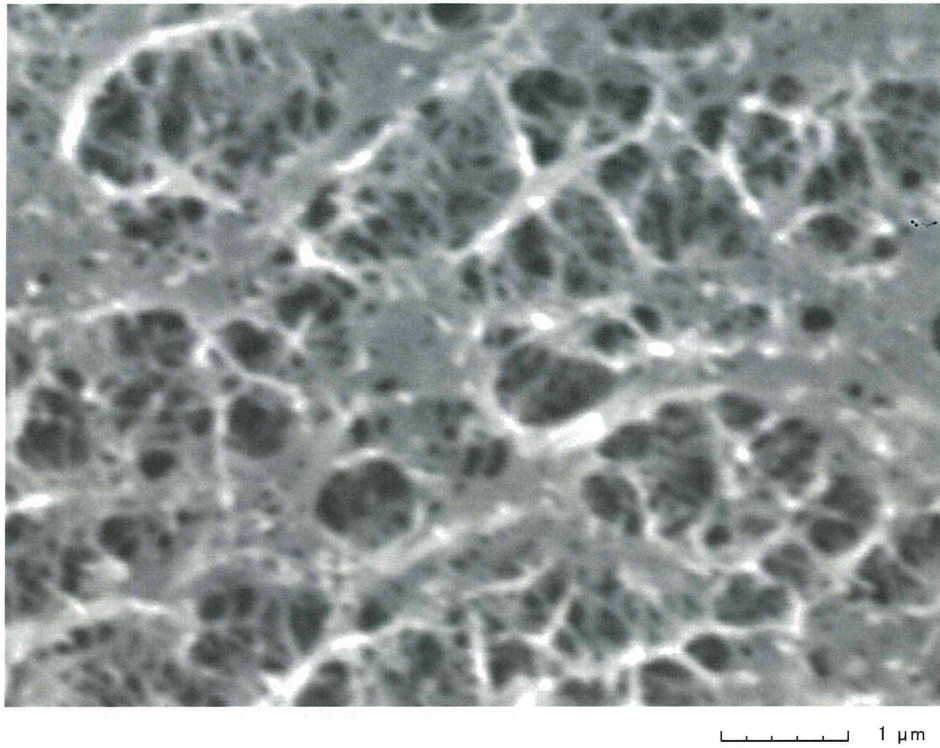


図3 Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの SEM 観察像 (強拡大)

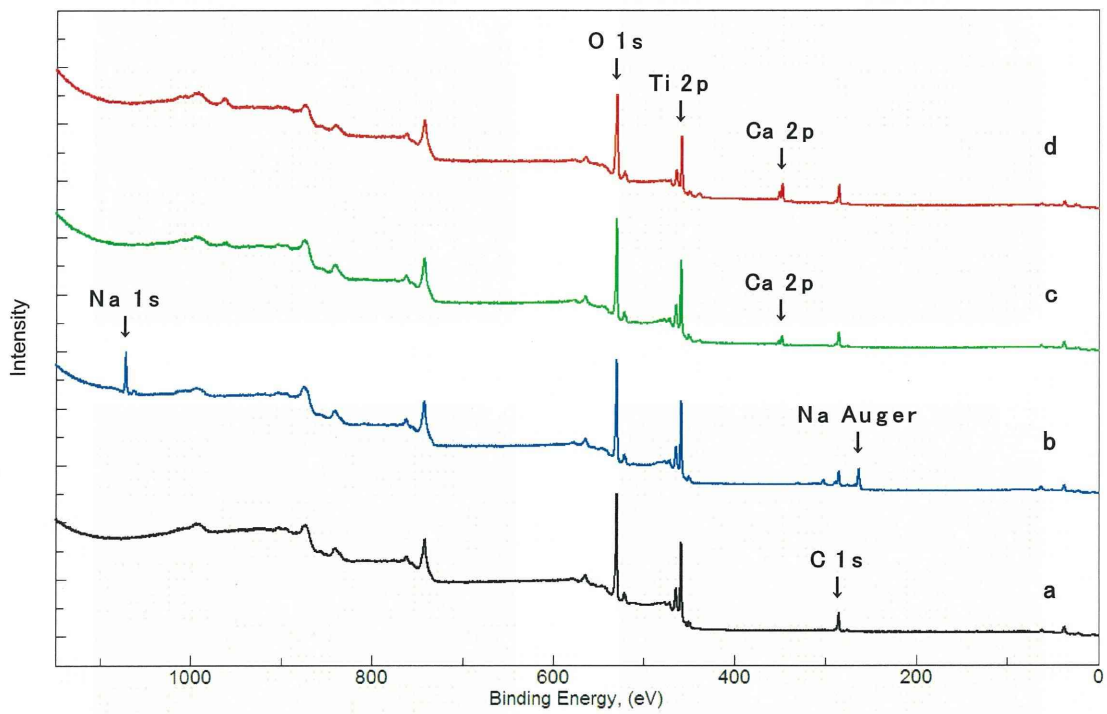


図4 表面処理を施したチタンの XPS スペクトル  
 a: 未処理、b: NaOH 処理、c: CaCl<sub>2</sub> 処理、d: Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

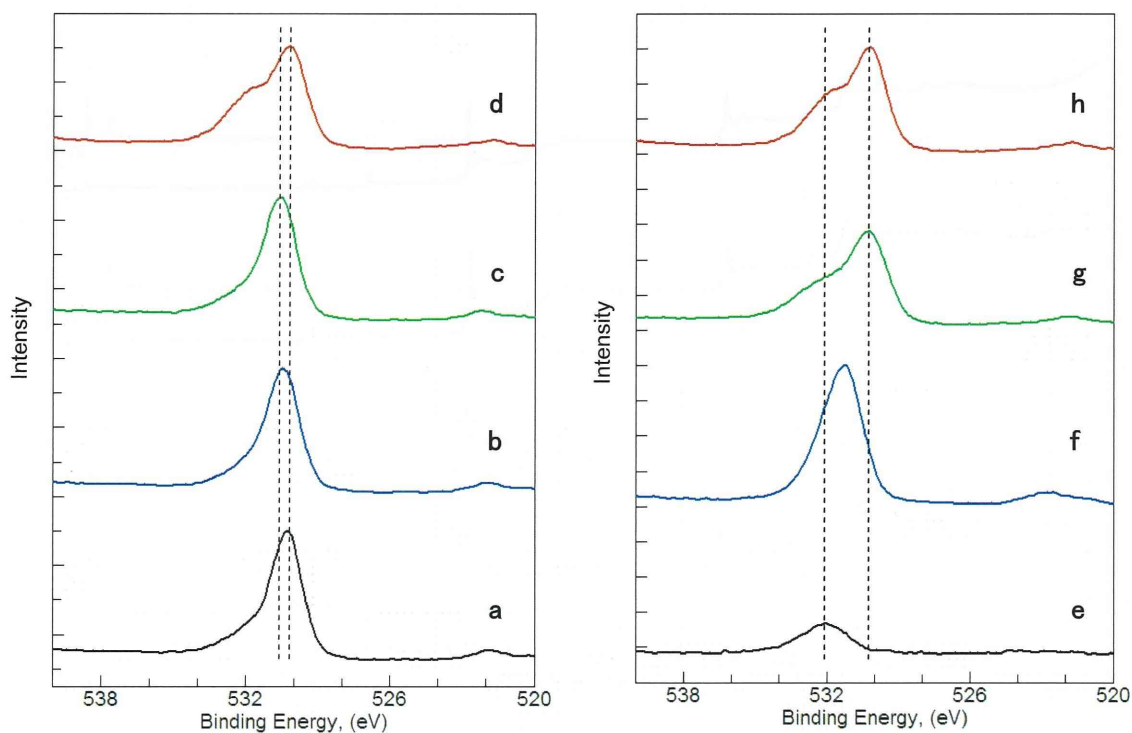


図5 表面処理を施したチタン及びカルシウム塩の O 1s XPS スペクトル

a: 未処理、b: NaOH 処理、c: CaCl<sub>2</sub> 処理、d, h: Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

e: CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O、f: Ca(OH)<sub>2</sub>、g: CaTiO<sub>3</sub>

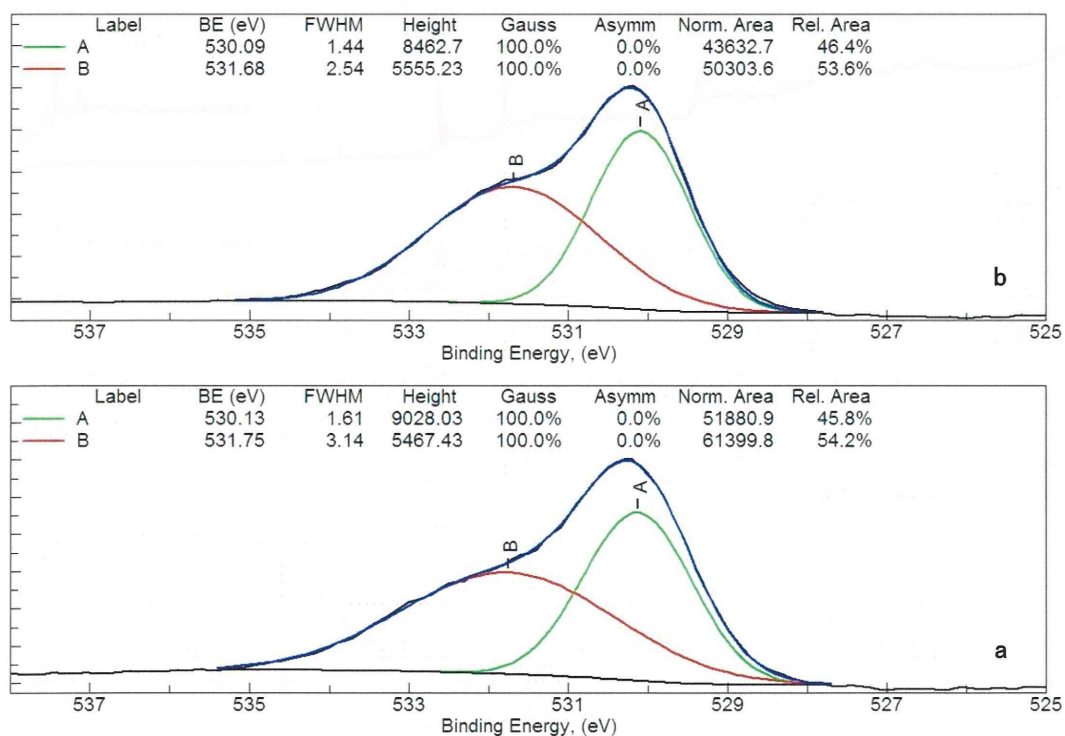


図6 O 1s XPS スペクトルのピークフィッティング

a: CaTiO<sub>3</sub>、b: Ca(OH)<sub>2</sub> 処理チタン

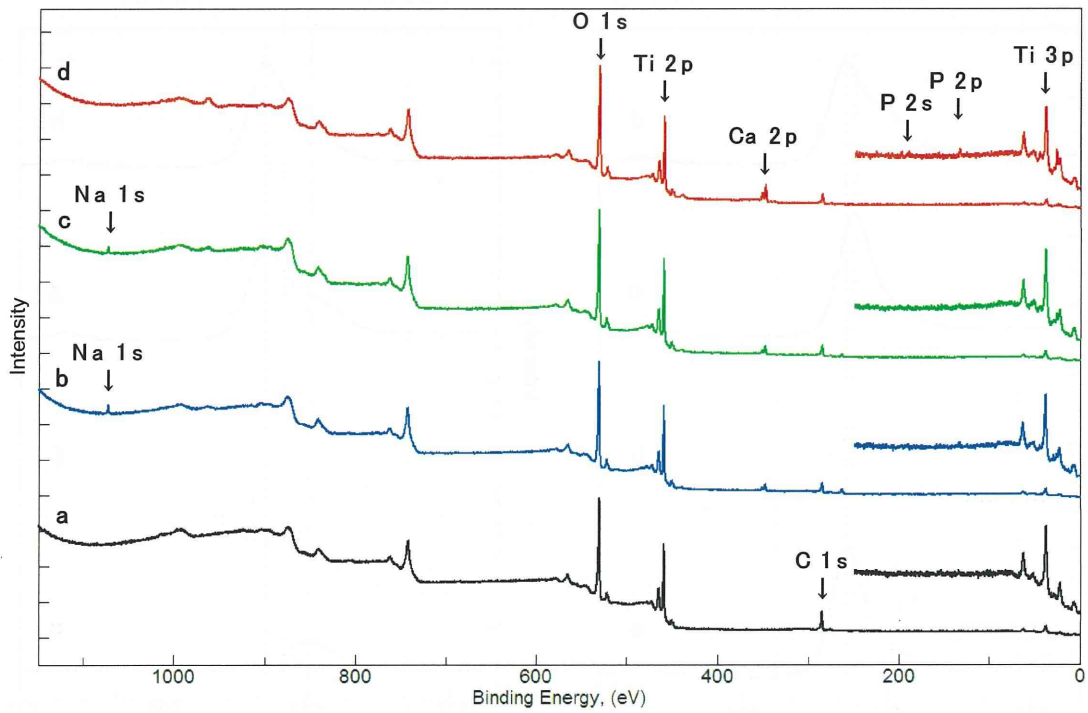


図7 擬似体液 15 分間浸漬後の表面処理チタンの XPS スペクトル  
 a: 未処理、b: NaOH 処理、c: CaCl<sub>2</sub> 処理、d: Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

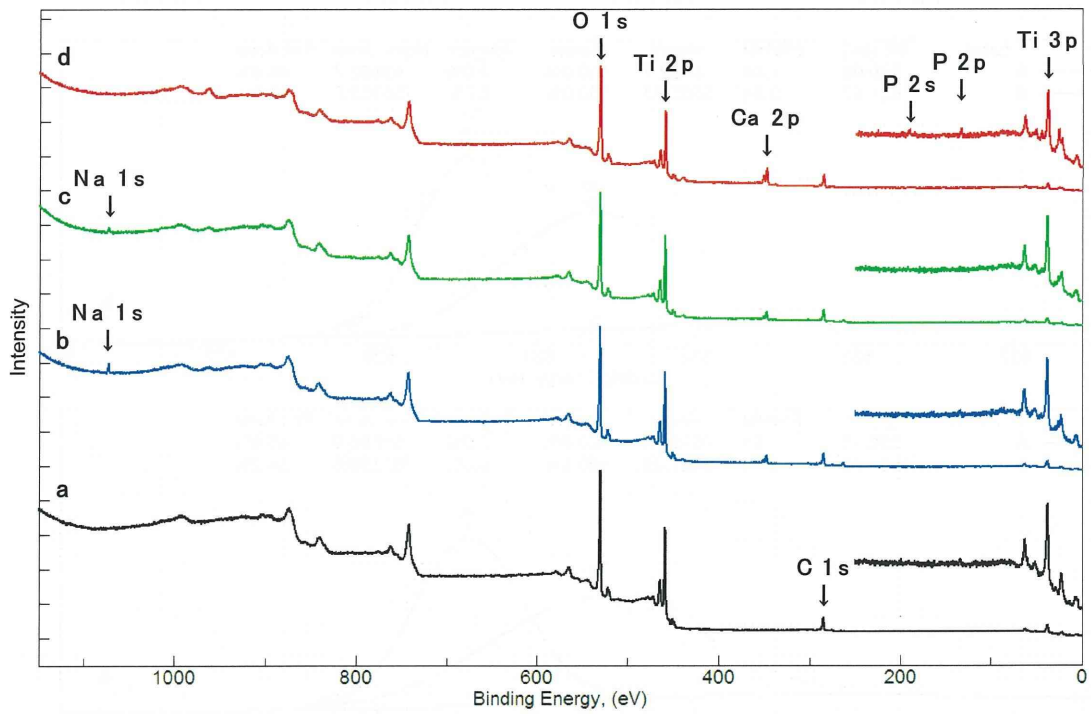


図8 擬似体液 30 分間浸漬後の表面処理チタンの XPS スペクトル  
 a: 未処理、b: NaOH 処理、c: CaCl<sub>2</sub> 処理、d: Ca(OH)<sub>2</sub> 処理



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  
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

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  
研究協力者 河野 健 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

研究要旨

1. 純 Ti 表面の化学処理がヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の骨分化へ及ぼす影響について

純 Ti の表面を化学処理 (NaOH 処理、CaCl<sub>2</sub> 処理、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理) することによってカルシウムイオンの導入や純 Ti 上で培養した hMSC の骨分化へ及ぼす影響について検討した。Ti 表面へのカルシウム導入処理 (CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理) により hMSC の骨分化へ影響を与え、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理は骨分化を誘導するが、CaCl<sub>2</sub> 処理は限られた効果しか示さない事が判明した。さらに、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理による hMSC の骨分化誘導は BMP2、Cox2、PTH1LH の誘導によって引き起こされる可能性が示唆された。また Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系の関与も示唆された。hMSC における Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路も、カルシウムイオン導入処理により活性化され、その効果は CaCl<sub>2</sub> 処理よりも Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の方が高かった。これは両処理間における Ti 表面へのカルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量の違いによる可能性が示唆された。

2. 組成比の異なる PMEA/PHEMA コポリマーのコーティング処理が hMSC へ与える影響について

組成比の異なる PMEA /PHEMA コポリマーでコーティングした表面上で培養した hMSC の形態は、PMEA:PHEMA = 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 でコーティングされたシート状では、未処理のものと比較して大きな差は認められなかったが、PMEA:PHEMA=0:100 でコーティング処理されたものは細胞がシートに接着せず、浮遊の状態が存在している様子が認められた。

A. 研究目的

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) は、骨、軟骨、脂肪、筋肉などへの分化能を

持つ細胞であり、さらに神経細胞や肝細胞、心筋、皮膚など胚葉を越えた分化も可能なため幅広い再生医療分野での臨床

研究の場ですでに利用されている。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。

チタン (Ti) 及び Ti 合金は、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、さらに他の金属系バイオマテリアルには無い特性として骨と直接結合するという性質を有している。Ti の表面特性として、生体内において Ti 表面にはアパタイト相が形成され、この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、人工骨や歯根などの医用材料として広く利用されている。

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等を中心に検討を行う。我々はこれまでに、医用材料として純 Ti、細胞として hMSC に着目し、骨再生医療製品等を想定した検討として、純 Ti 上にて hMSC を培養して DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、純 Ti 表面へ化学処理を施してカルシウムイオンを導入することにより、hMSC の Wnt / $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路が活性化され、さらに骨形成に関する転写因子などの発現が誘導または上昇する事を見出した。このことから、純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入は、hMSC の骨分化を誘導する可能性が示唆された。そこで今年度は、まず純 Ti 表面へ 3 種類の化学処理 (NaOH 処理、CaCl<sub>2</sub> 処理、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理) を行う事によって実際に hMSC の骨分化が誘導されるかどうかを

確認した。さらに化学処理方法による効果の違い等の比較を行い、そのメカニズムについて探ることを目的とした。

今年度はさらに、医用材料としてポリ (2-メトキシエチルアクリレート) (PMEA) とポリ (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (PHEMA) の 2 種類のポリマーに着目した。どちらも血液適合性に優れていると言われており、様々な医療製品のコーティングに利用されている。しかしながらその両者ではそれぞれの表面における中間水の存在の有無の違い等が指摘されており、両者の血液適合性発現のメカニズムは異なると考えられている。そこで本研究では、両者の組成比の異なる PMEA /PHEMA コポリマーのコーティング処理がその表面上で培養した hMSC へ与える影響についても検討を行う事にした。

## B. 研究方法

### 1. 材料

#### 1) 細胞

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 : hMSC (Lonza) を用いた。

#### 2) 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。

#### 3) コポリマーコーティング用シート

pre-coated ポリエステルシート (ダイアホイル) (三菱樹脂株) で厚さ 0.075mm、直径 35mm のものを用いた。

### 2. 純 Ti ディスクの表面処理

#### 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℃で24時間静置した。

#### 2) CaCl<sub>2</sub> 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℃で 24 時間静置した。

#### 3) Ca(OH)<sub>2</sub> 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℃で 24 時間静置した。

### 3. ポリエステルシートへのコポリマーコーティング処理

#### 1) コポリマー溶液の調製

PMEA:PHEMA = 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100 (5種類) を 1 w/v% (メタノール) に調製した。

#### 2) コーティング処理

シートをメタノールで洗浄した後、それぞれの組成のコポリマー溶液を 125uL 滴下し、[1] 500rpm で 5 秒間、[2] 2000rpm で 10 秒間、[3] 4000rpm で 5 秒間の 3 段階でスピコートした。乾燥後、もう一度同条件でスピコートし、一晩乾燥した。

### 4. 純 Ti ディスクの表面観察とカルシウムイオン導入及びアパタイト形成

#### 1) 材料の表面観察

化学処理を施された純 Ti 表面は、Scanning electron microscopy (SEM) にて観察した。

#### 2) カルシウムイオン導入とアパタイト形成

材料表面へのカルシウムイオン導入量

は、硝酸に溶解して Agilent 7500ce ORS ICP-MS にて測定した。

材料表面へのアパタイト形成量は、Hank's balanced salt solution (Life Technologies Co.) に 37℃で 7 日間浸漬した後、硝酸に溶解し、Agilent 7500ce ORS ICP-MS にてカルシウムイオン量を測定した。

### 5. 表面処理をした医用材料上で培養した hMSC の生化学的・生物学的試験

#### 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) で培養した。培養期間中週に 2 回培地交換を行った。

6 ウェルプレート (Corning) に 5 種類のコポリマーコーティングを施したシートまたはコーティングしていないシートを入れて、それぞれに hMSC を播種し、MSCBM に MCGS を加えた培地 (MSCGM) で培養した。

#### 2) 細胞の形態観察及び免疫染色

細胞の形態観察のために、それぞれの純 Ti ディスク上で培養した hMSC を、5 μM CellTracker (Lonza) を添加した培地 (血清無添加の McCoy's medium) で 37℃、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。

Osteocalcin (OCN) のタンパク質発現を検討するために、hMSC を CellTracker で染色し、4%パラホルムアルデヒドにて室温 15 分間で固定後、ブロッキング溶液 [10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 0.1% Triton X-100, 0.01%  $\text{NaN}_3$  in PBS] にて透過させた。hMSC は、一次抗体として anti-OCN 抗体 (Abcam) を用いて 4°C で 16 時間、二次抗体として Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-mouse 抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いて室温で 30 分間染色後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 3) 細胞の増殖

表面処理を行った純 Ti ディスク上で培養した hMSC の増殖については、TetraColor ONE (生化学工業株) を用いて検討した。

### 4) 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。

### 5) Real time (RT) -PCR による mRNA 発現量の定量的解析

抽出した total RNA の cDNA への逆転写は SuperScript III First-Strand Synthesis System for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR; Life Technologies) を用いて行った。そしてそれぞれの細胞の Osteopontin (OPN)、OCN 及び GAPDH の mRNA 発現レベルについて、それぞれライトサイクラー専用ヒト mRNA 定量プライマーセット (Search-LC) を用いて、PCR 条件もこのキットのプロトコールに従って行った。PCR 反応は、Light Cycler Fast

Start DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics) を用いて Roche Light Cycler (version 4.0) で行った。

### 6) 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。

### 7) 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。

## 6. 倫理面への配慮

本研究において用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞は市販品であり、倫理的問題はないと思われる。

## C. 研究結果

### 1. 純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨分化へ及ぼす影響について

化学処理した純 Ti ディスクの表面観察とカルシウムイオン導入及びアパタイト形成について図 1 に示した。3 種類の化学処理によって、純 Ti 表面に多孔性のネットワークが形成されている事が SEM により観察されたが、それぞれの化学処理法による違いは認められなかった (図 1A)。純 Ti 表面へのカルシウムイオン導入量は、未処理及び NaOH 処理では表面へのカルシウムイオン導入は認められなかったが、 $\text{CaCl}_2$  処理ではその両者に比べて有意にカルシウムイオンが導入され、さらに  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理では  $\text{CaCl}_2$  処理より

も有意にその導入量が増加した (図 1B)。純 Ti 表面へのアパタイト形成について検討するために、Ti ディスクを Hank's balanced salt 溶液に 37°C で 7 日間浸漬した結果、3 種類全ての化学処理によりアパタイトが形成されており、その量は NaOH 処理に比べて CaCl<sub>2</sub> 処理の方が多く、さらに CaCl<sub>2</sub> 処理に比べて Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の方が有意に多かった (図 1C)。

表面に 3 種類の化学処理を施した Ti 上で 1, 4, 7 日間培養した hMSC の形態について図 2A に示した。培養 1 日後には、化学処理したものはどれも細胞が小さくなっており、さらに CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では丸くなっていた。培養 4 日後には、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理では、未処理と比べて hMSC の形態に大きな差は見られなくなったが、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においては、細胞の大きさや広がりには差が見られた。培養 7 日後には、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理においても他の処理群と大きな差は見られなくなった。

培養 7 日後の hMSC の細胞数を検討したところ、細胞数は未処理 > NaOH 処理 > CaCl<sub>2</sub> 処理 > Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の順で多く、CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では未処理に比べて有意に減少していた (図 2B)。

次に、hMSC の骨分化へ純 Ti 表面の化学処理が及ぼす影響について検討するために、培養 7 日後の OPN と OCN の mRNA 発現を調べた (図 3)。hMSC における OPN 発現は、CaCl<sub>2</sub> 処理で NaOH 処理と比較して有意に高かった。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理では NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理と比較して有意に高く発現していた (図 3A)。OCN の mRNA 発現は、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理において他の処理に比べて高い傾向が見られた (図 3B)。さらに、

OCN のタンパク質発現についても検討した (図 4)。hMSC 培養 28 日後の発現を観察したところ、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理において OCN 発現が他の処理群と比較して有意に高かった (図 4)。

次に、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 7 日間培養した後 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。未処理と比較して化学処理によって mRNA 発現が有意に (2 倍以上) 上昇した遺伝子のうち上昇比率が高い順に 30 遺伝子をそれぞれの化学処理法について表 1, 2, 3 にまとめた。NaOH 処理によって、骨芽細胞の分化を上昇させる IL6R (interleukin 6 receptor) 及び骨芽細胞分化の過程で重要な働きを担う ITGB1 (integrin, beta 1) が、有意に上昇していた (表 1)。CaCl<sub>2</sub> 処理または Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって、正常な骨のリモデリングに関わる SPP1 (=OPN) と MMP13 (matrix metalloproteinase 13)、また骨芽細胞の分化の促進に関わる ENPP1 (ectonucleotide pyrophosphatase) が有意に上昇していた (表 2, 3)。さらに Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって、骨芽細胞分化の際に重要な役割を担う IL6R、ITGA2 (integrin, alpha 2)、BMP2 (bone morphogenetic protein 2)、PTH1H (parathyroid hormone-like hormone) の有意な上昇が認められた (表 3)。

また、カルシウム導入法の違いによる遺伝子発現へ影響について検討するために、CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理における hMSC の遺伝子発現について比較した。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理した純 Ti 上で培養した hMSC において、CaCl<sub>2</sub> 処理上の細胞と

比較して 2 倍以上発現が上昇した遺伝子は 94 遺伝子であった (data not shown)。IPA による解析により、その内の 6 遺伝子が「formation of bone (骨形成)」に関わる遺伝子と有意 ( $p=3.96 \times 10^{-4}$ ) に重複していた。その遺伝子は、SPP1 (OPN)、PTH1H、FGF1 (fibroblast growth factor 1)、BMP2、PTGS1 (cyclooxygenase 1)、PTGS2 (cyclooxygenase 2) であった (表 4)。

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、骨芽細胞の機能に関して図 5 に示した。骨分化におけるプロモーターである WNT 及びその細胞表面受容体 Frizzled、さらにその下流の Wnt/ $\beta$ -カテニン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 (図 5)。また、RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand) decoy receptor である OPG (osteoprotegerin) の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した (図 5)。次に、Ti 表面の  $\text{CaCl}_2$  処理の影響について、図 6 に示した。 $\text{CaCl}_2$  処理によって、Frizzled、Axin、APC 及び骨分化マーカー BMP と IGF-1 が誘導された。骨マトリックスタンパク質である OPN の

発現が  $\text{CaCl}_2$  処理により有意に上昇した。さらに、OPN の発現上昇に伴い integrin  $\beta 3$  の発現も誘導された (図 6)。純 Ti 表面の  $\text{Ca(OH)}_2$  処理の影響について、図 7 に示した。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  $\text{Ca(OH)}_2$  処理によって誘導された (図 7)。また、BMP、IGF-1、integrin  $\beta 3$  に加えて、破骨細胞分化因子である RANKL が  $\text{Ca(OH)}_2$  処理によって誘導された (図 7)。さらに、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化のマーカーとなる OCN の遺伝子発現が、 $\text{Ca(OH)}_2$  処理により 2 倍以上上昇した (図 7)。

2. 組成比の異なる PMEA /PHEMA コポリマーのコーティング処理がその表面上で培養した hMSC へ与える影響について

それぞれ組成比の異なる PMEA /PHEMA コポリマーでコーティング処理されたシート上で hMSC を培養した際の細胞の形態と細胞数について検討した。

hMSC の培養 1 日後の形態は、PMEA:PHEMA = 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 でコーティングされたシート状では、未処理のものと比較して大きな差は認められなかったが、PMEA:PHEMA = 0:100 でコーティング処理されたものは細胞がシートに接着せず、浮遊の状態で存在している様子が認められた (図 8)。また細胞数 ( $n=1$ ) は、未処理と比較してどのコーティング処理も場合も減少傾向が見られた (表 5)。

## D. 考察

1. 純 Ti 表面の化学処理が hMSC の骨