

2-2. CNT 複合 PEEK 材の骨組織親和性

2-2-1. 表面に溝を作製したインプラントによる中期骨組織親和性評価

[目的]

骨固定性を向上させるために表面に溝を作製した CNT/PEEK インプラントの中期骨親和性を評価する。溝内への新生骨の再生を評価し、骨固定力の改善を評価する。

[方法]

試験には CNT を 7 重量%複合させた 7% CNT/PEEK を用いた。さらに、骨組織との親和性、骨伝導能を向上させて骨固定力を改善させるため、インプラントに溝を掘ったインプラントを作製した。コントロールとして CNT を複合させない PEEK 材によるインプラント (0%CNT/PEEK) を使用した (図 2-2)。インプラントの滅菌はエチレンオキサイドガスにて行った。

- ①0%CNT/PEEK 溝(-)
- ②0%CNT/PEEK 溝(+)
- ③7%CNT/PEEK 溝(-)
- ④7%CNT/PEEK 溝(+)

の 4 群で比較試験を行った。

日本白色家兔 (日本スエルシー株式会社) (オス、体重 2.5~3.5kg) の大腿骨遠位端 (大腿骨顆部) に PEEK 材のインプラントを埋植し、その骨組織親和性の評価を行った。

手術は無菌条件下で行った。麻酔はネブタール注射液 (ペントバルビタールナトリウム、大日本製薬、30~40mg/kg) を耳静脈注射した全身麻酔を使用した。手術部位の毛刈りを行った後に、イソジン液 10% (Meiji Seika ファルマ株式会社) にて術野を消毒した。手術部位以外は滅菌ドレープ (ホギメディカル) にて覆い、清潔野とした。膝関節を皮膚上から触診し、膝関節裂隙、大腿骨顆部を確認して顆部の外側に大腿骨軸に沿った約 2cm の縦皮膚切開を置いた。大腿外側の筋膜、筋組織を線維方向に切開して大腿骨顆部に達した。径 5.0mm のドリルを用いて大腿骨顆部の外側から内側に向けて骨孔を作製した。骨孔部、創内を無菌の生理食塩水 (大塚製薬) にて洗浄し、ガーゼにて圧迫して止血を行った。止血を確認後にインプラントを骨孔内に挿入した。インプラントは骨内から先端が出ているようにした (図 2-3)。筋膜と皮膚を 4-0 ナイロン糸にて縫合して手術を終了とした。手術は家兔 1 羽につき、両大腿骨にそれぞれ 1 個ずつインプラントを挿入した。

術後 12 週後に家兔を静脈麻酔薬の過剰投与にて安楽死させ、大腿骨を採取後にホルマ

リン固定とし、動物用マイクロ CT (RmCT、Rigaku 社) にてインプラントと骨の状態を観察した。各群 4 羽 (大腿骨 8 本) の手術を行った。

採取した組織親和性試験用インプラント入り的大腿骨はオステオレジン包埋キット (和光純薬、297-56001) を用いてインプラントを取り出さずにメタクリル酸メチルモノマー (MMA) を浸透させて樹脂包埋を行った。樹脂包埋後に標本を硬組織薄切標本作成用ゼーゲミクロトーム (SP1600、Leica Microsystems) を用いて薄切を行った。標本はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行い、光学顕微鏡にて評価を行った。評価は病理組織像にてインプラントと骨の界面を観察し、炎症反応や骨溶解などの有害反応の有無、程度を評価した。標本の観察は顕微鏡観察ソフト ; cellSens Standard ver. 1.8.1 (OLYMPUS Co.) を使用して行い、インプラント周囲の分割病理組織写真の合成も同ソフトにて行った。

[結果]

術後 12 週で家兔を安楽死させ、大腿骨を採取した。手術により作製した骨孔が修復される際にインプラントの表面に再生骨が被ってしまい、再生した新生骨を丸のみ鉗子にて切除しないとインプラントが露出せずに観察できない個体もあったが、インプラントは大腿骨顆部の埋込みをした位置に残存していた。肉眼的には骨とインプラントの境界には骨融解などの明らかな有害所見を認めず、どの群でもインプラントは骨内に残存していた (図 2-4a)。

動物用マイクロ CT による観察の所見 (図 2-4b, c) では、インプラント周囲の骨孔内に再生新生骨の形成を認めた。溝を掘ったインプラントでは 7%CNT/PEEK 群でも 0%CNT/PEEK (コントロール) 群でも同様に、溝内にも骨が形成されている像が観察できた。術後 4 週の CT 像 (昨年度報告) に比べ、インプラント周囲の骨形成が旺盛で、骨形成が進行していることが確認できた。7%CNT 群、0%CNT (コントロール) 群との比較では、インプラント周囲の骨形成に明らかな差を認めなかった。

インプラント入り大腿骨の薄切 HE 染色標本の観察では (図 2-4d)、インプラントの周囲に骨基質および骨髄組織が再生していることが観察できた。大腿骨顆部の骨端線より遠位部、骨端部に埋植したため、軟骨下骨から骨端線にかけての海綿骨の不均一性があり、インプラント周囲の骨再生の量が多い部位と少ない部位を認めるが、表面に再生した骨基質およびインプラント周囲の骨髄組織には炎症

細胞の浸潤などの明らかな炎症像や empty lacunae などの壊死像を認めず、良好な骨形成を呈していた。インプラント周囲の拡大病理組織写真(図 2-4e)では、各群において PEEK 材インプラントの表面に骨基質がほぼ隙間なく密着して形成されていることが観察できた。溝を掘ったインプラントにおいては、溝内にも骨基質が進入して形成されていた。7% CNT/PEEK 群と 0% CNT/PEEK (コントロール) 群において、インプラント周囲の骨形成の組織像では明らかな差異を認めなかった。

[まとめ]

PEEK 材に CNT を 7 重量% 複合させた 7% CNT/PEEK 材のインプラントは、家兎の大腿骨に作成した骨孔内にて、インプラント周囲の新生骨形成を阻害することなく、埋込み 12 週間には良好な骨形成を認めた。インプラント表面に溝を掘ったインプラントにおいても、同様に骨形成が生じ、溝内に新生骨の侵入を認めた。7% CNT/PEEK インプラントは新生骨の形成を阻害することなく、インプラントに密着した骨基質の形成を認めたが、7 重量% の CNT を複合させた CNT/PEEK 材のインプラントでは、コントロールの 0 重量% CNT/PEEK と骨組織親和性において、差を認めなかった。

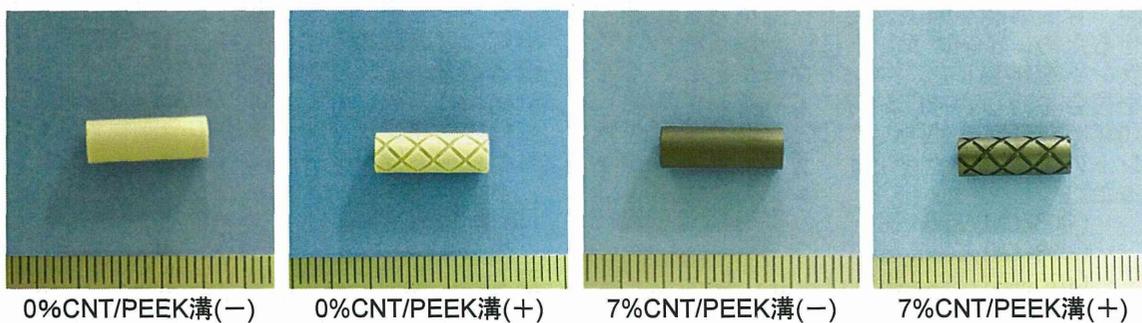


図 2-2 4 群のインプラント

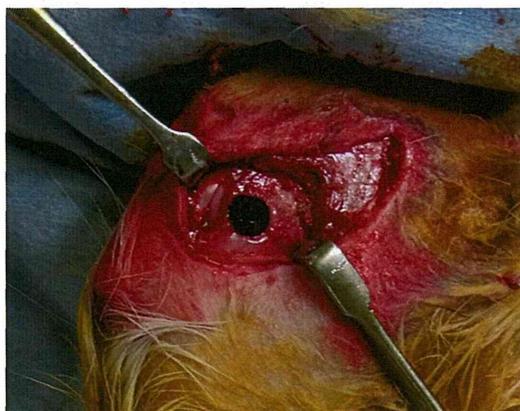


図 2-3 家兎大腿骨への CNT/PEEK 材インプラント埋植手術

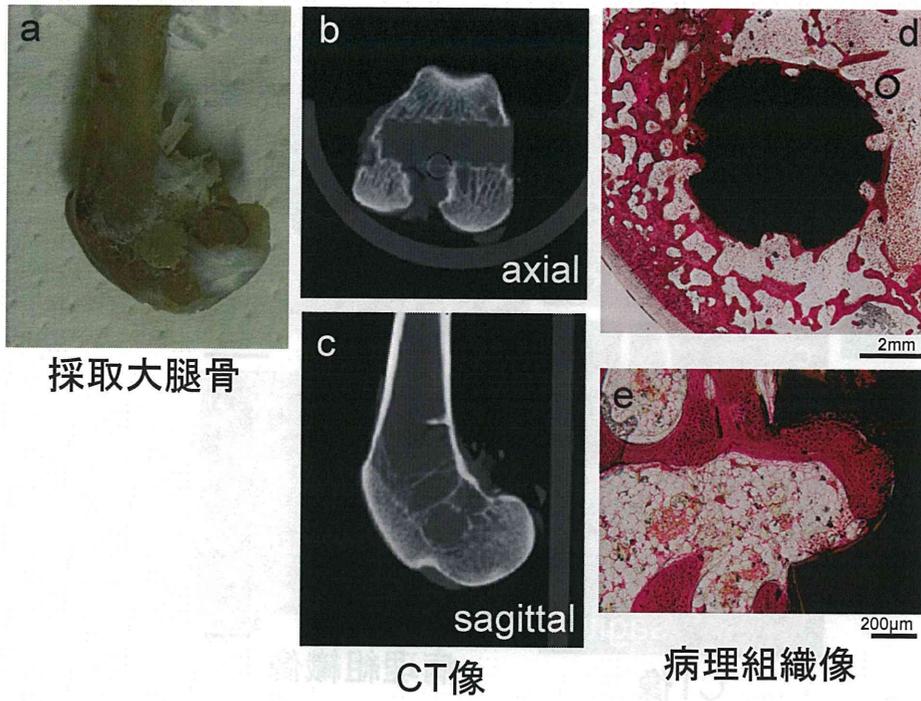


图 2-4 0%CNT-PEEK, 溝(-)

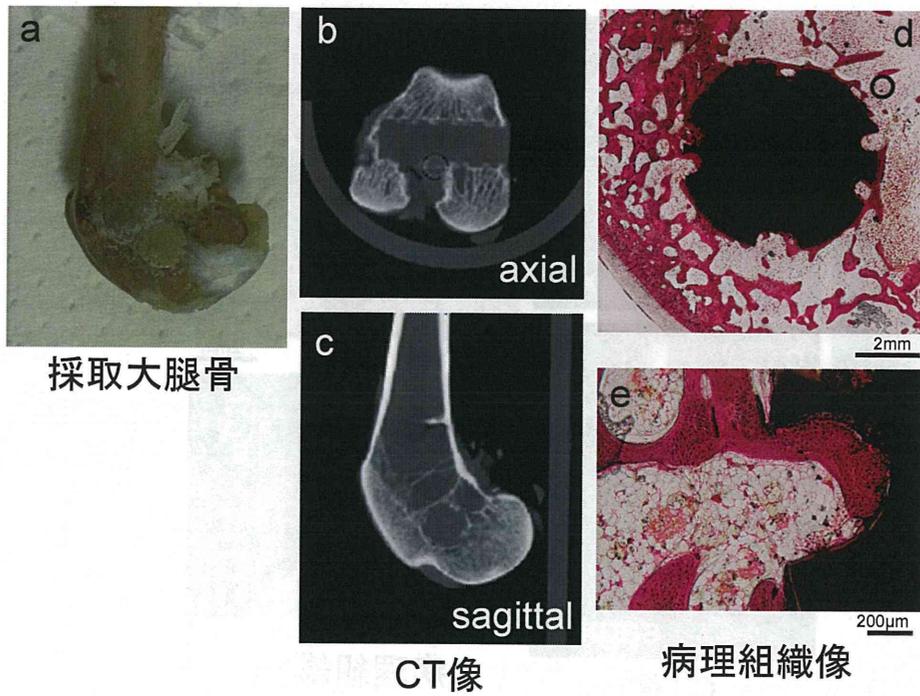


图 2-4 0%CNT-PEEK, 溝(+)

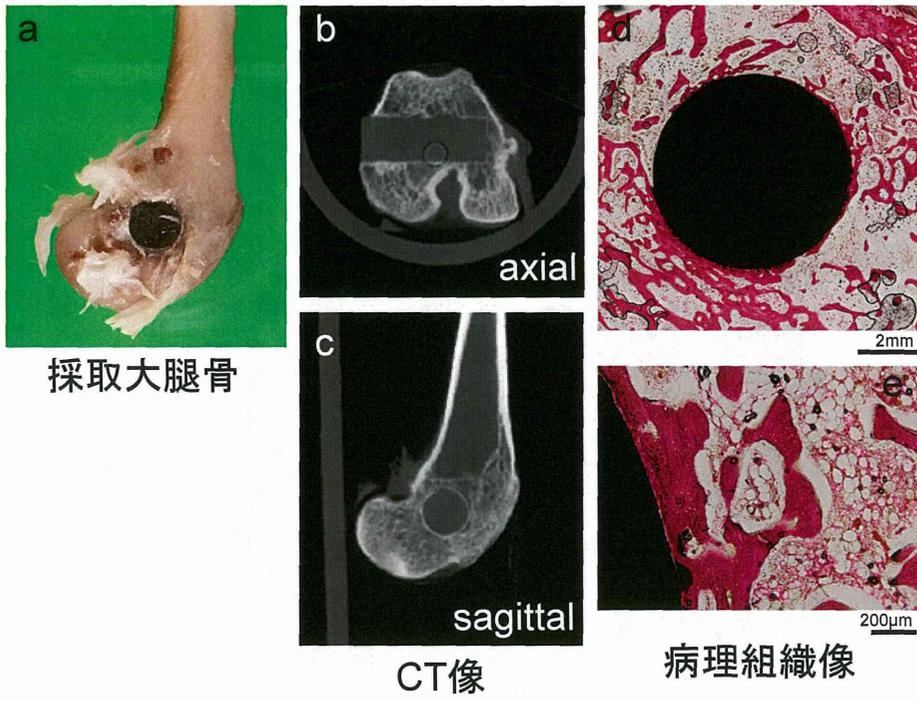


图 2-4 7%CNT-PEEK, 溝(-)

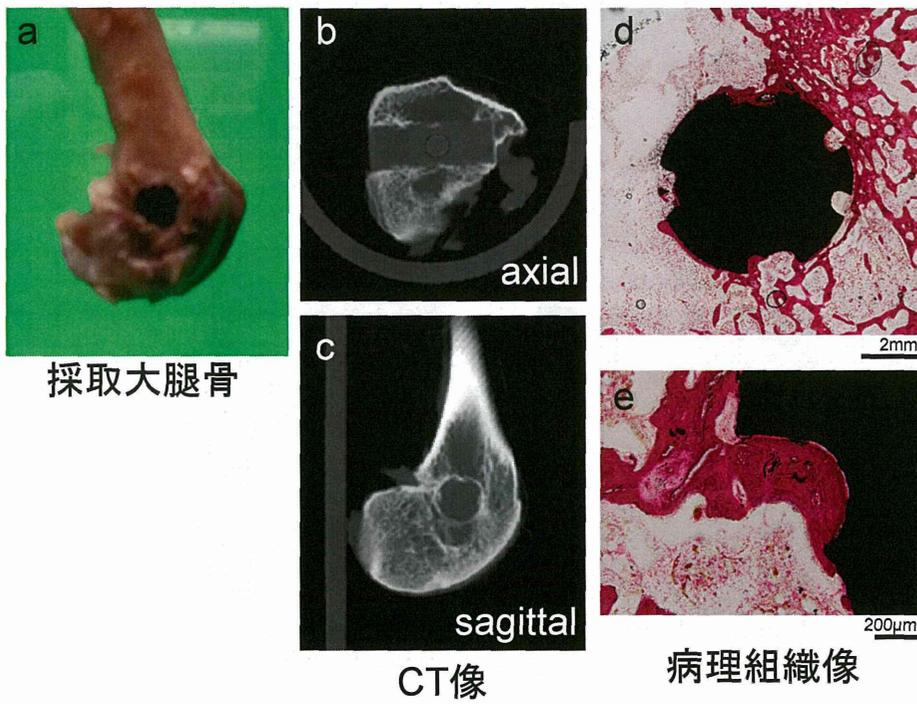


图 2-4 7%CNT-PEEK, 溝(+)

2-2-2. 医療用インプラントグレードの PEEK 材を用い、連通孔を作製したインプラントによる骨組織親和性評価

[目的]

実際に医療用材料として使用されている医療用インプラントグレードの PEEK 材を用い、細胞・組織侵入用の連通孔を追加したインプラントによる骨組織親和性、骨固定力の評価を行う。

生体親和性を向上させるために医療用インプラントグレードの PEEK 材を用いて作成した CNT/PEEK インプラントを作成した。さらに、組織がインプラントにすることにより骨組織との固定力を向上させるため、インプラントには連通孔を作成し、連通孔入り医療用グレード PEEK 材インプラントによる骨組織親和性、骨固定力を評価した。またインプラントの表面処理をボールエンドミルにて行い、表面処理による骨組織親和性の差についての比較も行った。

[方法]

使用したインプラントのサイズはこれまでと同様に 5×14mm の円柱状で、側面に径 0.7mm の連通孔を縦に 7 個、4 方向に穿った (図 2-5)。試験に使用したインプラントは医療用インプラントグレードの PEEK 材で作製した。

CNT/PEEK インプラントの PEEK 材は VESTAKEEP i2P (ダイセルエボニック社) を使用し、CNT 含有量は 7 重量%で、側面の連通孔のサイズは径 0.7mm、インプラント表面の処理はボールエンドミルにて行い、2000rpm、4000rpm、6000rpm にて比較を行った。コントロールとして CNT を含まない医療用インプラントグレードの PEEK 材 (VESTAKEEP i4P、ダイセルエボニック社) で作製した CNT/PEEK インプラントと同形状のインプラントを使用した。コントロールの表面処理はボールエンドミル 2000rpm の物を使用した。インプラントの滅菌はエチレンオキサイドガスにて行った。

手術は 1 群につき 4 羽 (大腿骨 8 本) 行い、組織親和性試験を n=3、骨固定力試験を n=5 として評価を行った。試験のグループは ①コントロール (0 重量% CNT/PEEK)、連通孔

0.7mm、ボールエンドミル 2000rpm

②7 重量% CNT/PEEK、連通孔 0.7mm、ボールエンドミル 2000rpm

③7 重量% CNT/PEEK、連通孔 0.7mm、ボールエンドミル 4000rpm

④7 重量% CNT/PEEK、連通孔 0.7mm、ボールエンドミル 6000rpm

の 4 群で比較試験を行った。

動物試験として日本白色家兔 (日本スエルシー株式会社) (オス、体重 2.5~3.5kg) の大腿骨遠位端 (大腿骨顆部) に PEEK のインプラントを埋植し、その骨組織親和性、骨固定力の評価を行った。この実験では骨固定力の評価は押し込み試験で行うこととしたが、大腿骨顆部に側面から刺入した場合、顆部は距離が長いので、インプラントの端が骨内に入ってしまう可能性が高く、インプラントの両端が確実に骨外に出るように、インプラントは大腿骨遠位骨幹端部で前方から後方に刺入した。

手術は無菌操作で行い、麻酔はネブタール注射液 (ペントバルビタールナトリウム、大日本製薬、30~40mg/kg) を耳静脈注射した全身麻酔を使用した。皮膚上から膝関節、大腿骨を触診し、大腿外側に大腿骨顆部から近位に約 2cm の骨軸に沿った皮膚切開を置いた。大腿の共通筋膜を切開後、膝伸展筋群と屈筋群の筋間を分けて大腿骨外側に達した。外側上膝動静脈を切断して圧迫止血し、骨膜を骨軸方向に切開して大腿骨骨皮質表層を剥離した。膝蓋骨を内側に脱臼させ、大腿骨遠位骨幹部から顆部前方を剖出した。大腿骨遠位骨幹端部に前方から後方に向けて径 5mm のドリルで骨孔を開けた。骨孔内を生理食塩水 (大塚製薬) にて洗浄し、ガーゼにて圧迫止血をした。インプラントを前方皮質から後方皮質まで貫いて埋め込んだ (図 2-6a)。筋膜と皮膚を 4-0 ナイロン糸にて縫合して手術を終了とした。手術は家兔 1 羽について両大腿骨にそれぞれ 1 個ずつ同群のインプラントを埋植した。

術後 4 週で家兔を静脈麻酔薬の過剰投与にて安楽死させ、大腿骨を骨幹部で丸鋸で切断して採取し、ホルマリン固定とした。大腿骨を動物用マイクロ CT (RmCT, Rigaku 社) にて撮影し、骨とインプラント境界の観察を行った。

[結果]

術後4週で家兔を安楽死させ、大腿骨を採取した。4週前に埋植したインプラントは大腿骨骨幹端部の埋込みをした位置に確認でき、肉眼的には骨とインプラントの境界には骨融解などの明らかな有害所見を認めなかった(図2-6b, c)。

動物用マイクロCTによる観察の所見では、インプラント周囲の骨孔内に、孔を開けられた骨皮質から伸びるように再生新生骨が形成されていた。再生した新生骨はインプラントに接していることが観察できた(図2-6d, e)。7%CNT/PEEK群でも0%CNT/PEEK(コントロール)群でも連通路内にまで骨が形成していることは確認できなかった。7%CNT群、0%CNT(コントロール)群との比較では、インプラント周囲の骨形成に明らかな差を認めなかった。ボールエンドミルによる表面処理による比較においても、CTによる骨組織親和性試験には、明らかな差を認めず、それぞれ、インプラント周囲に新生骨の再生を認めた。

[まとめ]

この実験では、①医療用インプラントグレードのPEEK材で作製したインプラントによる評価、②骨組織再生促進を期待した連通路を作製したインプラントによる評価、③ボールエンドミルによる表面処理による骨組織親和性の比較、を行った。医療用インプラントグレードのPEEK材で作製した今回の実験にて、家兔大腿骨の骨孔はインプラントの周囲に骨の再生を認め、良好な骨組織親和性を示したが、これまでの通常のPEEK材から作製したインプラントとの明らかな差を認めなかった。インプラントに追加した連通路に再生骨組織が進入し、強い骨固定力が得られることを期待したが、術後4週のCT像では、連通路内への骨組織の進入は確認できなかった。また、CNT/PEEKのインプラントにおいて、ボールエンドミルによる表面処理(2000rpm、4000rpm、6000rpm)による比較を行ったが、CT像では骨組織の再生において、各群間に明らかな差を認めなかった。

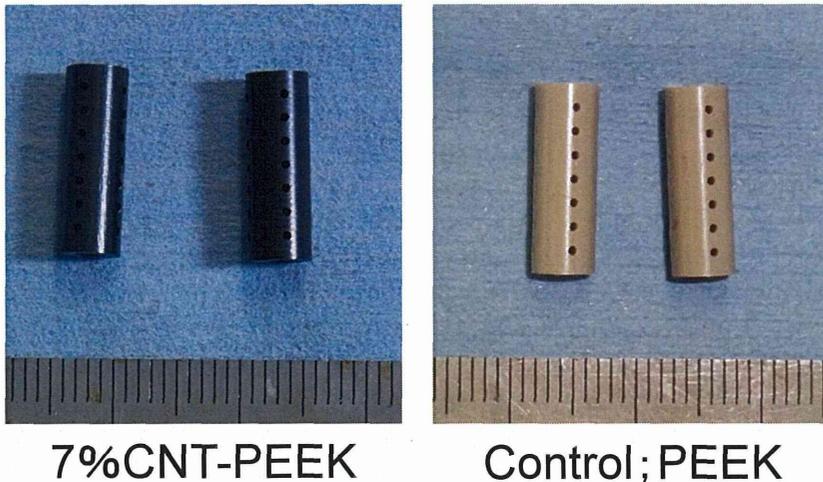


図2-5 医療用インプラントグレードのPEEK材で作製した試験材料

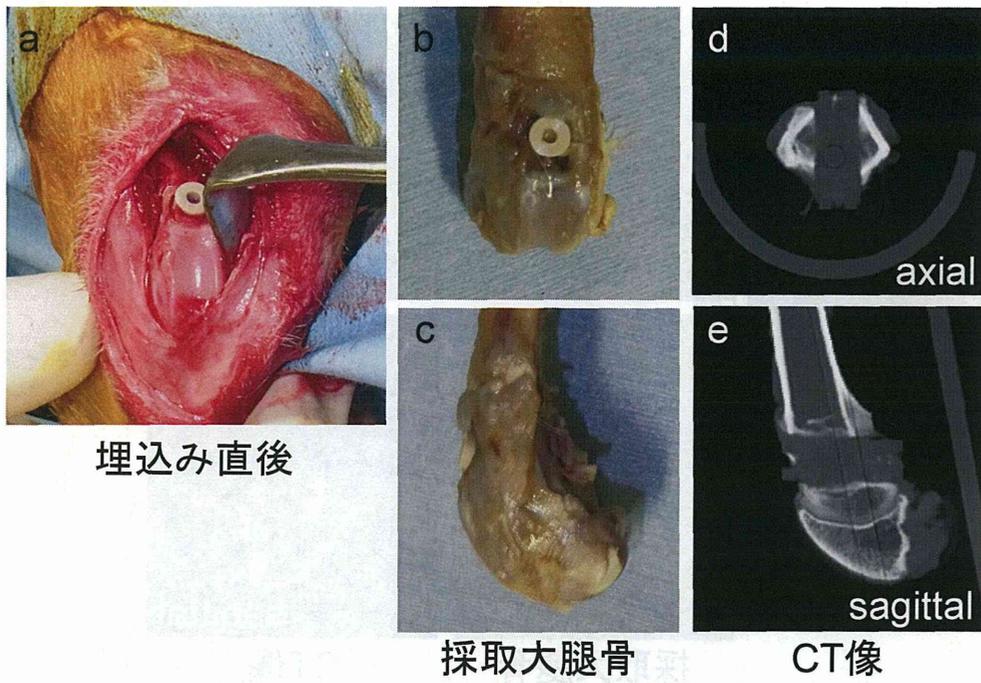


図 2-6 0%CNT-PEEK, 連通孔 0.7mm, ボールミル 2000

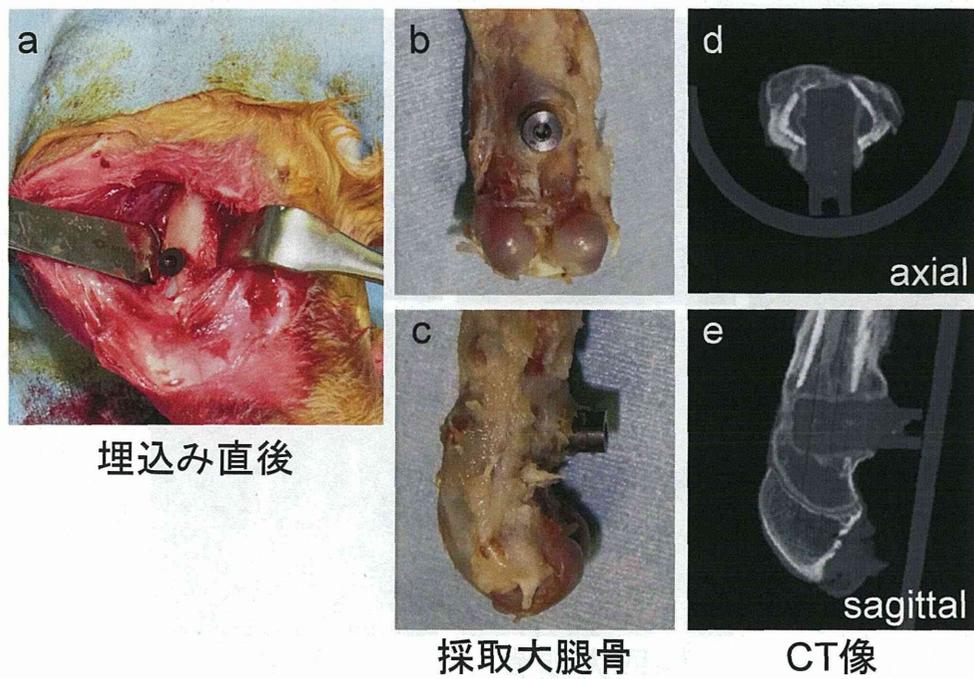


図 2-6 7%CNT-PEEK, 連通孔 0.7mm, ボールミル 2000

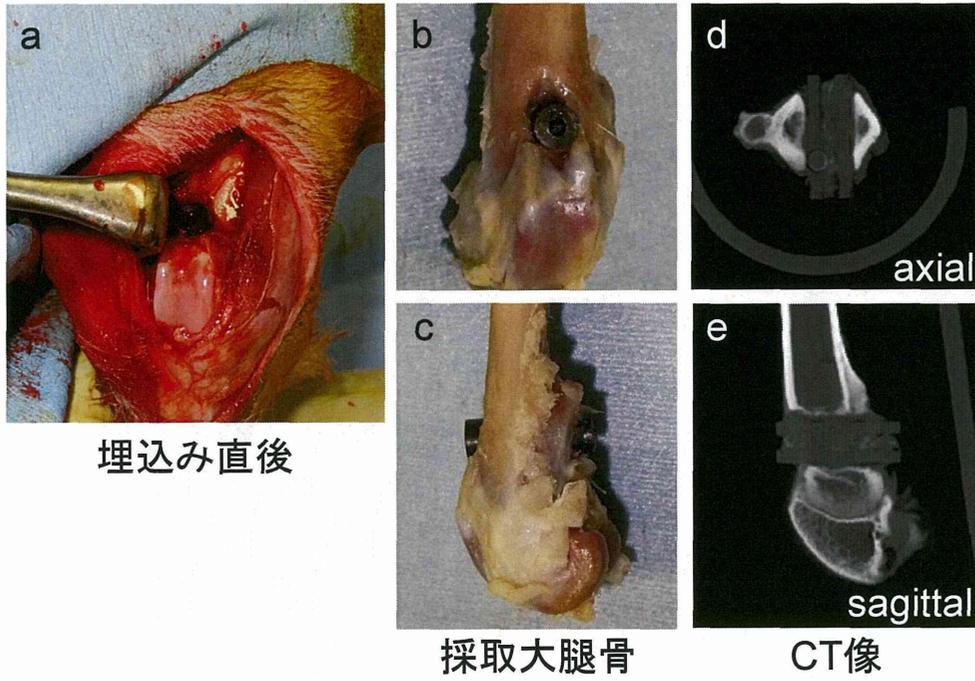


図 2-6 7%CNT-PEEK, 連通孔 0.7mm, ボールミル 4000

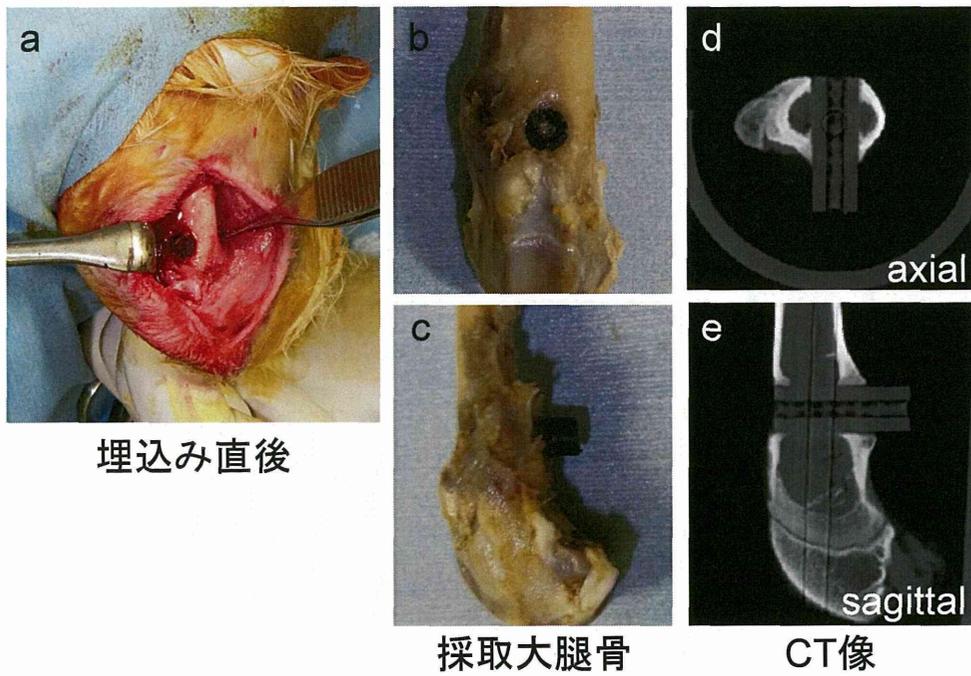


図 2-6 7%CNT-PEEK, 連通孔 0.7mm, ボールミル 6000

2-3. 骨組織親和性評価における Push-out 試験

採取した動物試験片に関しては以下の手順を用いて Push-Out 試験を実施した。概要を図 2-7 に示す。

使用機器：5965 デュアルコラム卓上型万能試験システム（インストロン株式会社）

固定用樹脂：歯科用セメント オストロンⅡ/株式会社 GC

実験に供した手順は以下の通りである。

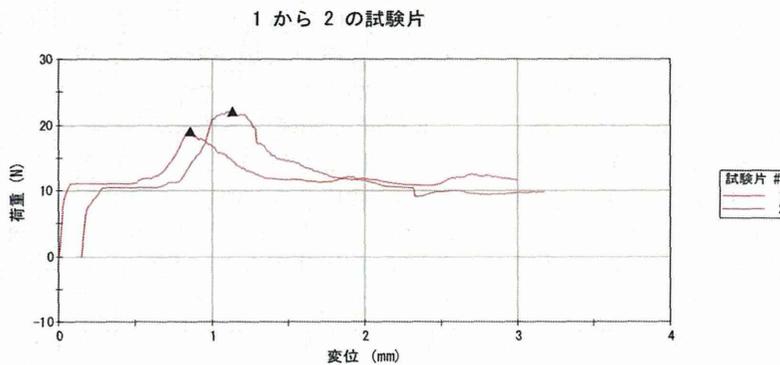
- 1) ミニター、メスを用いて、試験片周囲の不要な組織を取り除く。
- 2) 動物に埋入した試験検体の引き抜き試験を行う。

1. 引き抜き速度 5mm/min にて、大腿骨長軸に対して垂直方向に引き抜きを行い、
2. 検体が固定位置から約 3mm 押し出た時点で、試験終了とする。
3. 最大荷重値を引き抜き強度（骨固定力）とする。

試験を実施した結果、6000rpm のみ Push-out 試験を実施する事が出来た（図 2-8）。その他のサンプルに関しては力学試験前にサンプルが脱落し、試験を実施する事が出来なかった。この原因として、表面加工方法のより詳細な検討、試験片の形状等をより詳細に検討する必要がある。



図 2-7 Push-Out 試験概要



	試験片ラベル	最大荷重 (N)
1	150402 7%nt-peek Φ0.7 6000 1右	19
2	150402 7%nt-PEEK Φ0.7 6000 4右	22

図 2-8 Push-out 試験結果 (1 部)

3. 細胞を用いた生体親和性試験

3-1. CNT 添加 PEEK 材の表面処理による細胞増殖への影響

[目的]

CNT 添加 PEEK 材 (CNT/PEEK) の表面をボールエンドミルで加工し、骨芽系細胞に対する細胞増殖性を評価した上で、同じ処理をした PEEK 材単体との比較を行う。

[材料と方法]

CNT は MWNT-7 (保土谷化学工業)、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) は医療用の i 2 P (Vestakep) を用いた。

CNT/PEEK の CNT 含有量は 7 重量%とし、ボールエンドミルで 2000rpm、4000rpm、6000rpm の 3 種類の速度で表面処理した ϕ 14mm の試験片を用いた (図 3-1)。

細胞は骨親和性などの評価によく用いられる理研理化学研究所から購入した MC3T3-E1 マウス前骨芽細胞系を用いた。細胞培養は α MEM 培地 (ナカライテスク) に 10% となるようウシ胎児血清 (FBS; Biowest) を加えた培地で CO₂ インキュベーターで培養した。週 2 回継代を行い、実験には 14 継代以内の細胞を用いた。

細胞増殖性試験は EOG 滅菌された CNT/PEEK 試験片を 24well plate に CNT/PEEK 試験片をセットしたウェルに MC3T3-E1 細胞を 3×10^4 /cm² になるように蒔いた。細胞増殖性試験として AlamarBlue assay (AB) 法を用いた。本実験における AB 法は 48 時間、細胞を接着させた試験片を別の 24well plate に移した後、10% alamar blue 試薬 (Thermo scientific) 入培地を加えて至適時間培養し、その反応液を 96well black plate に移して蛍光プレートリーダー (Bio-Tek) で Ex/Em=530/590nm で測定した。その後の経時的測定は測定後、反応液をアスピレートし、新鮮な培地に戻して増殖を継続し、同様の操作を繰り返し、2 週

間までの増殖性を調べた。

なお、本実験では前骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞に分化させる目的で細胞接着 48 時間後に石灰化培地と呼ばれている 0.1mg/ml アスコルビン酸 (ナカライテスク) と 5mM β -グリセロリン酸 (ミリポア) 入りの 10% FBS 添加 α MEM 培地で骨芽細胞に分化誘導処理を行った。さらに、より強力な分化誘導を行うために 0.1 μ g/ml BMP-2 (R&D systems) 添加群も加えた。

コントロールの試験片としては ϕ 14mm プラスチックシート (トルエン耐性; 和光純薬) を用いた。

細胞が接着した試験片は JSM-6510LV 走査型顕微鏡 (SEM; 日本電子) で観察した。

[結果]

CNT/PEEK 表面をボールエンドミルで 2000rpm、4000rpm、6000rpm の条件で表面加工した試験片上での細胞増殖能はコントロールと比較し、分化誘導前である day 0 ですすでにどの加工条件でも半分以下になっていた (図 3-2)。その後の石灰化培地での培養でも増殖率に回復傾向はみられるものの高いものでも 6 割弱であった。

ボールエンドミルによる表面処理による増殖性への影響として比較すると 2000rpm > 4000rpm > 6000rpm の順で増殖率は高かった。また、分化誘導を促進する BMP-2 を添加した石灰化培地でも細胞増殖性は群間内での差はあまり見られなかった。

2 週間の増殖性試験後の試験片の SEM 観察では BMP-2 の有無にかかわらず、コントロールは試験片全面に細胞が覆い尽くしているのに対し、表面加工した CNT/PEEK は細胞間に欠落がある部分があり、細胞表面も凹凸していた (図 3-3)。BMP-2 を加えた 2000rpm 処理試験片では試験片表面に多くの析出物が見られたが (図 3-4)、視覚的な差ほど増殖性に差は出ておらず、増殖性に対する影響はほとんどないと判断した。

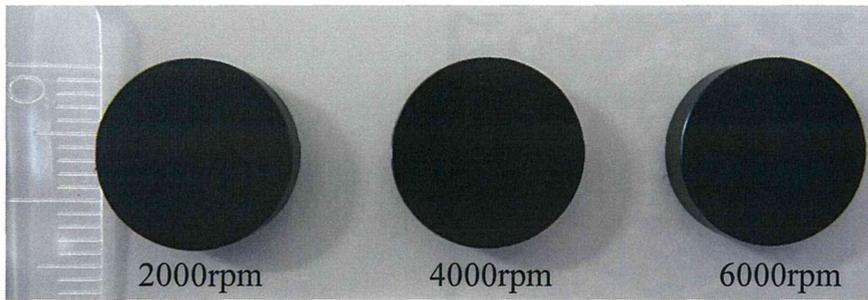


図 3-1 3種類の速度で表面処理したφ14mmの試験片

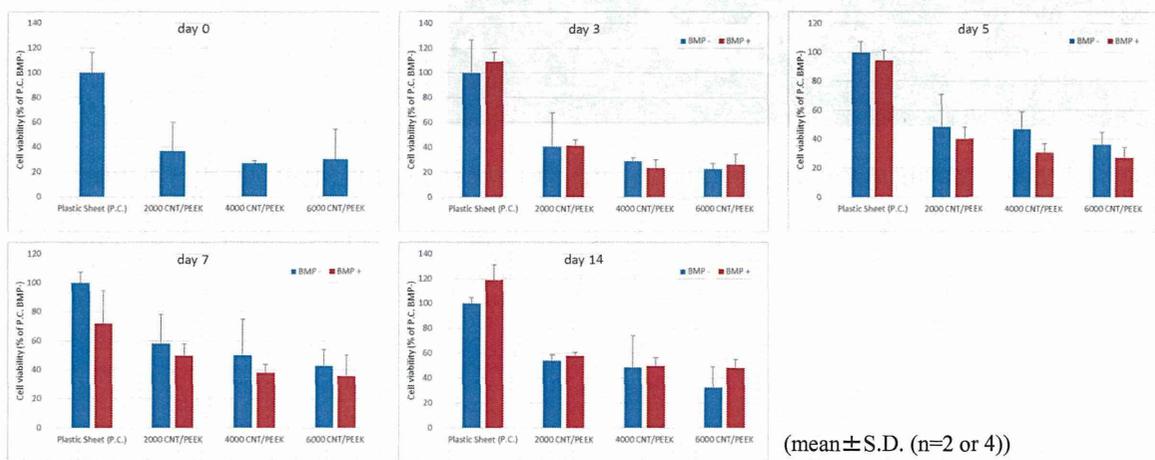


図 3-2 試験片上での細胞増殖能

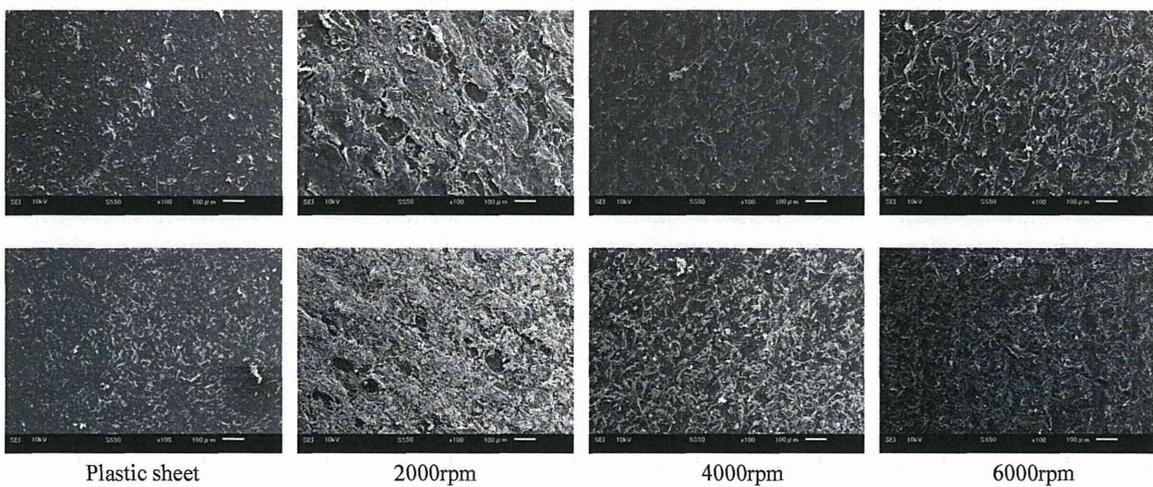


図 3-3 2週間の増殖性試験後の試験片のSEM像

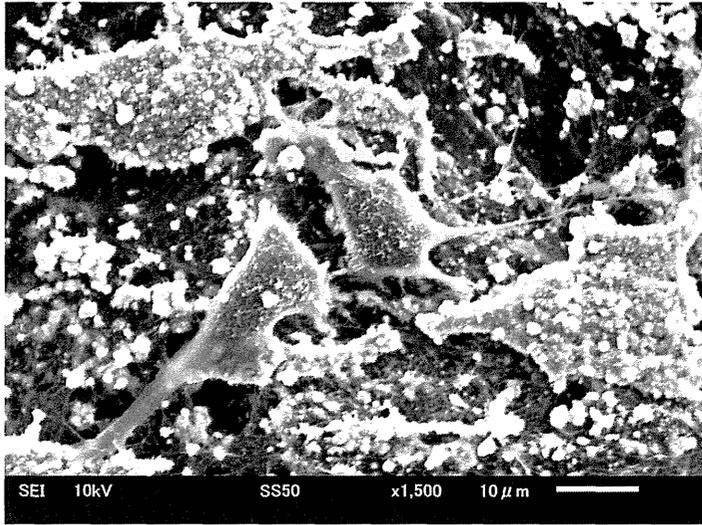


図 3-4 BMP-2 添加培地で培養した 2000rpm 表面加工試験片上の MC3T3-E1 細胞と析出物

3-2. CNT/PEEK の細胞接着性・増殖性評価

[目的]

ボールエンドミルで表面加工をした CNT/PEEK と PEEK 単独試験片の骨芽系細胞に対する細胞接着性と増殖性を比較する。

[材料と方法]

CNT/PEEK の CNT 含有量は 7 重量%とし、ボールエンドミルによる表面加工処理は相対的に最も細胞増殖性が良かった 2000rpm で行った。PEEK 単独試験片は i 4 P (Vestakeep) で作成し、表面に同様の処理を行った (図 3-5)。

細胞は MC3T3-E1 マウス前骨芽細胞系を用い、細胞の継代は 1-2 と同様に行った。細胞接着性・増殖性試験は EOG 滅菌された試験片を 24well plate に CNT/PEEK 試験片をセットしたウェルに MC3T3-E1 細胞を $2 \times 10^4/\text{cm}^2$ 、または $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ になるように蒔いた。細胞接着性試験として 24 時間後の AB 測定を行い、増殖性試験としては 96 時間後の AB 測定結果で評価した。

なお、本実験では純粋に細胞の接着性と増殖性を比較する目的であるため、骨芽細胞の分化によるコラーゲン分泌などの影響を避けるため、細胞の分化処理は行わなかった。

コントロールの試験片としては $\phi 14\text{mm}$ プラスチックシート (トルエン耐性;和光純薬)

を用いた。

[結果]

通常の細胞培養条件である細胞濃度 ($2 \times 10^4/\text{cm}^2$) での MC3T3-E1 細胞の試験片への 24 時間後の細胞接着性はコントロールと比較して PEEK 単独でも有意差はみられず、CNT を加えたことによる効果は確認できなかったものの、CNT 添加が細胞接着性に悪影響を与えるようなことはなかった (図 3-6a)。しかし、4 日目の細胞増殖性評価では試験片のどちらもコントロールと比較すると増殖性は顕著に悪化しており、さらに CNT 添加試験片は PEEK 単独試験片より有意差はないものの低い値となった (図 3-6b)。

次に実際の生体では細胞培養時のような細胞間に隙間の有るような細胞の接着はしないことから、最初から試験片上でコンフルエントに近い状態での細胞の接着性と増殖性を比較した。その結果、細胞接着性では Control と比較し、CNT/PEEK でのみ、有意に細胞の接着性が亢進していた (図 3-7a)。さらに 4 日目の細胞増殖性においても、その有意差は消失しなかった。ただし、増殖性では PEEK 単独試験片でもコントロールと比較し、有意に増殖性の亢進が見られた。PEEK 単独試験片と CNT/PEEK 試験片での細胞接着性・増殖性には有意差は見られなかった (図 3-7b)。

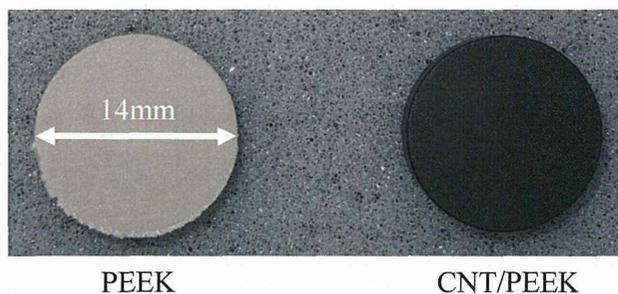


図 3-5 表面加工処理を行った PEEK 単独と CNT/PEEK 複合材の試験片

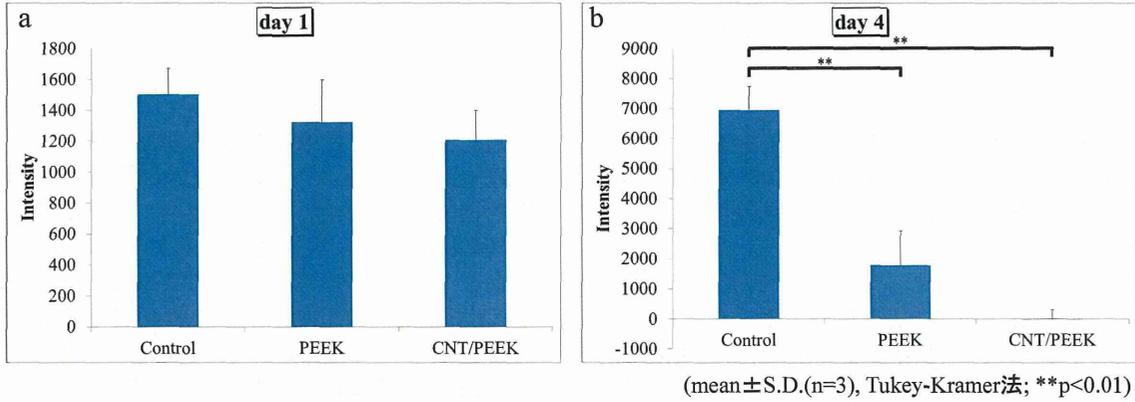


図 3-6 MC3T3-E1 細胞の低細胞密度条件下での PEEK 単独試験片と CNT/PEEK 試験片への細胞接着・増殖性の比較. a) day 1, b) day 4

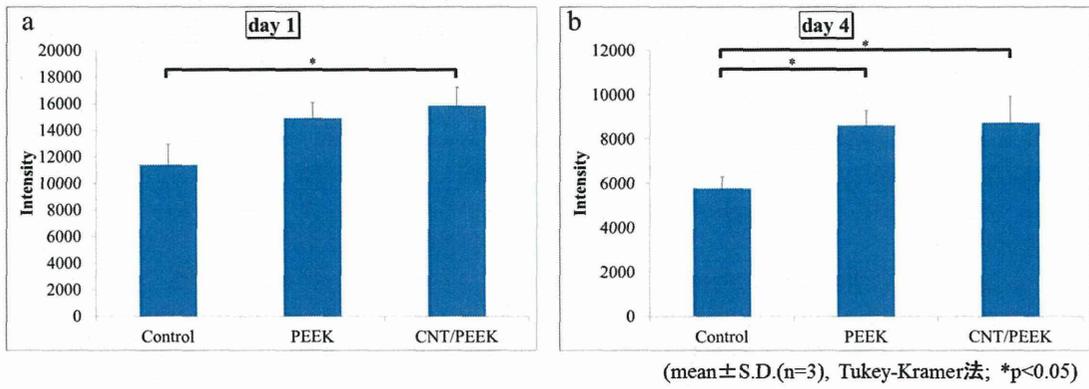


図 3-7 MC3T3-E1 細胞の高細胞密度条件下での PEEK 単独試験片と CNT/PEEK 試験片への細胞接着・増殖性の比較. a) day 1, b) day 4

3-3. CNT/PEEK の細胞分化誘導能

[目的]

ボールエンドミルで表面加工をした CNT/PEEK と PEEK 単独試験片の骨芽系細胞に対する分化誘導能を比較する。

[材料と方法]

細胞分化誘導の試験条件の検討：

最初に骨芽細胞の分化誘導試験は分化誘導刺激を細胞がコンフルエントの状態で行う事になっており、通常、細胞播種後、2, 3 日後に分化誘導を行う。しかし、1-3 の AB 法からの結果では細胞数が増えていない可能性が示唆されたことから、予め、実際に分化誘導能試験で用いるサイズ (ϕ 28mm) の CNT/PEEK 試験片上で細胞のコンフルエント状態が通常の状態で行えるかを検討した。6well plate に 1-2 と同様に 3 種類の表面処理を行った CNT/PEEK 試験片をセットし、 4×10^4 /cm² となるよう細胞を撒き、2 日目と 4 日目の細胞数を測定した。測定は試験片を別のプレートに移した後、トリプシン処理後、培地で浮遊させて直接、自動セルカウンター (図 3-8a; Bio-rad) で細胞数をカウントした。なお、コントロールは細胞を撒いた 6well plate のウェルをそのままコントロールとして扱った。

細胞分化誘導能試験：

CNT/PEEK の CNT 含有量は 7 重量%とし、2000rpm のボールエンドミルによる表面加工処理を行った。PEEK 試験片も同様の処理を行った。細胞は MC3T3-E1 マウス前骨芽細胞系を用い、細胞の継代は 1-2 と同様に行った。

CNT/PEEK の分化誘導能評価は EOG 滅菌された試験片を 6well plate に CNT/PEEK 試験片をセットしたウェルに MC3T3-E1 細胞を 1×10^5 /cm² になるように蒔いた。

細胞の分化誘導は前骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を骨芽細胞に分化させる目的で細胞接着 48 時間後に石灰化培地と呼ばれている 0.1mg/ml アスコルビン酸と 5mM β -グリセロリン酸入りの 10% FBS 添加 α MEM 培地で骨芽細胞に分化誘導処理を行った。さら

に、より強力な分化誘導を行うために 0.1 μ g/ml BMP-2 添加群も加えた。

RNA の抽出は分化誘導能処理日を day0 とし、day (1), 3, 5 で RNeasy mini extractin kit (QIAGEN) でプロトコルに従って抽出した。抽出した RNA サンプルから東洋紡の ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて cDNA を調製した。THUNDERBIRD SYBR qPCR kit (東洋紡) で定量的リアルタイム PCR 装置 (図 3-9 : Eppendorf) を使って骨芽細胞の転写因子である Runx2, Sp7 (osterix)、分化指標マーカーである Bglap1 (Osteocalcin)、Alpl, Spp1 (Osteopontin)、Colla1 の mRNA 発現量を比較した。相対比で比較するためにハウスキーピング遺伝子として Gapdh を使い、PEEK 単独試験片の day0 を 1 として発現比を比較した。各プライマーはタカラバイオの Perfect real time primer セットを購入した。

[結果]

細胞分化誘導の評価条件：

試験片上の細胞数はどの表面処理群でも day4 の方が day2 より細胞が減っており、AB 法による実験結果と一致した (図 3-8b)。コントロールである Plate 群は培養表面積が若干異なるため、細胞数としては直接比較することは難しいが day2 から day4 で約 2 倍に増えていることから、用いた細胞に問題はなく、コンフルエントになってからでも細胞が増殖できることを示している。このため、CNT/PEEK 上で細胞増殖によってコンフルエント状態を作るとは難しく、細胞が接着した段階でほぼコンフルエントになる状態で分化誘導実験をする必要があることが明らかとなった。その指標としては通常の実験で用いている今回のコントロールの day2 のカウント数がコンフルエントと同じ状態と考えられるため、試験片上での細胞密度は 1×10^5 /cm² となるようにすることにした。また、表面処理は細胞数の減少が最も少なく、接着性も問題のなかった 2000rpm が分化誘導評価でも最適と思われるため、この表面加工条件で本実験を行った。

細胞分化誘導能試験：

まず、我々はBMP-2を用いないマイルドな分化誘導でMC3T3-E1細胞を試験片上で分化誘導した(図3-10)。3日目と5日目のRunx2、Sp7、Bglap、Alpl、Spp1の発現量を比較したが、最も早く変化すると考えられる転写因子のRunx2とSp7ともday0が最も高く、経時的に減少していた。BglapとAlplは骨芽細胞の分化マーカーの代表的なものであるが、この2つは増加が見られたが、Bglapが経時的に増加したのに対し、Alplはday3で約2倍に増加し、その後は若干の減少という結果となった。どのマーカーもそれぞれのday0と比較した時、時間経過とともに発現量は有意に変化していたが、PEEKとCNT/PEEKを比較するとSpp1のday3だけ有意差があったが、基本的に発現パターンに違いはなかった。

そこで、BMP-2を加えたより強い分化誘導を行い、さらにより速い段階での発現変化も

見るようにして分化誘導能評価を行った(図3-11)。day1で転写因子であるRunx2、Sp7、そして分化マーカーであるSpp1が最も発現量が増加した。Bglapはday3が最も高かった。面白いことにBMP-2による分化誘導ではどちらの試験片上で培養した細胞もAlplとColla1は時系列による発現の上昇は見られなかった。PEEK単独試験片とCNT/PEEK試験片との比較では、統計上の有意差が見られたのは、Bglapのday5だけであるが、day0のもともとの試験片上の発現量に差があることを考慮して転写因子の発現量変化を見てみると、day1のRunx2ではPEEK単独では1.7倍であるのに対し、CNT/PEEKでは2.6倍であり、Sp7に至ってはPEEK単独では3.1倍であるのに対し、CNT/PEEKでは9.7倍と3倍以上の変化量を示しており、分化誘導に与える影響に違いがあると思われる結果を示した。

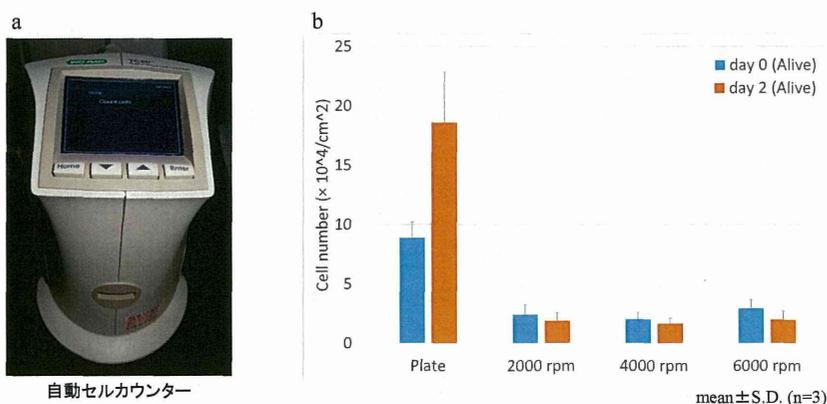


図3-8 細胞分化誘導の評価条件

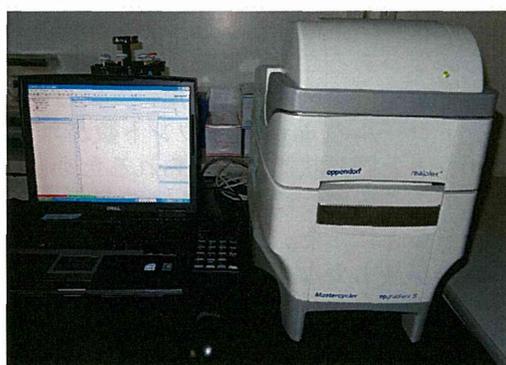


図3-9 定量的リアルタイム-PCR装置

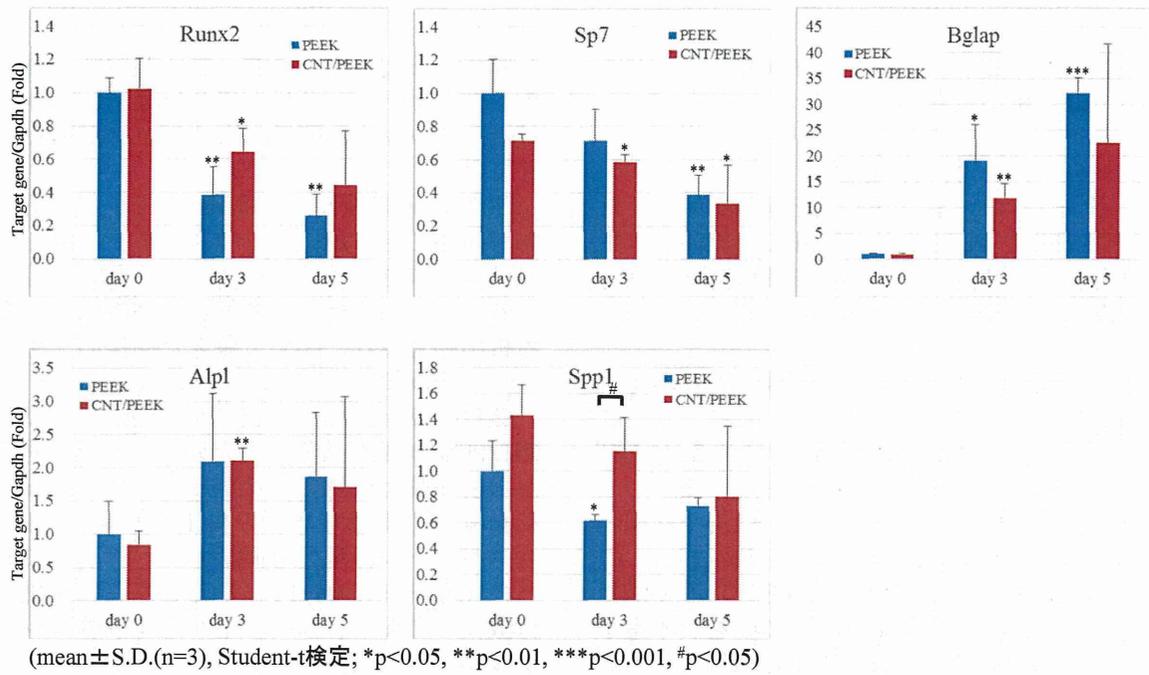


図 3-10 BMP-2 を用いないマイルドな分化誘導による MC3T3-E1 細胞分化誘導能試験

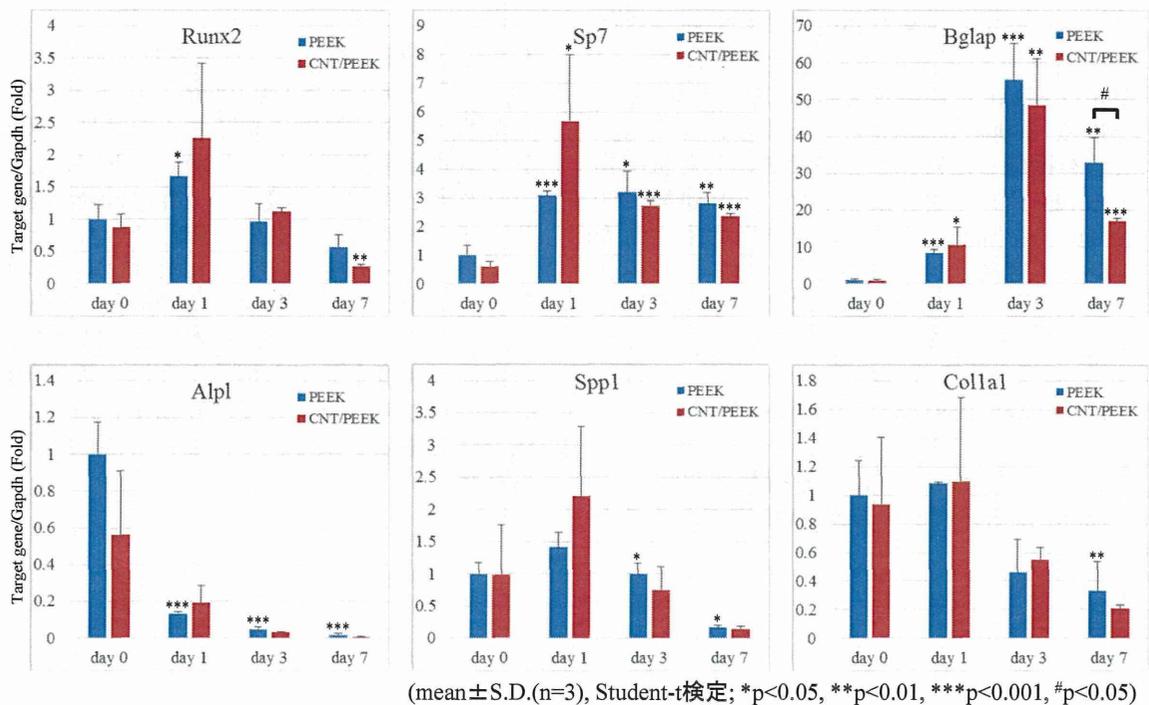


図 3-11 BMP-2 を用いた強い分化誘導による MC3T3-E1 細胞分化誘導能試験

3-4. CNT/PEEK によるハイドロキシアパタイト (HA) 析出試験

3-4-1. 目的、材料、方法

ボールエンドミルで表面加工をした CNT/PEEK と PEEK 単独試験片の上での骨の主成分である HA が析出するかを比較検討する。

HA 析出試験のスキームを図 3-12 に示す。

3-4-2. HA 析出の SEM による観察と元素分析 (EDS)

CNT/PEEK と PEEK 単独試験片は 1-2、および 2-2 で用いた ϕ 14mm の試験片を用いた。試験片を 24well plate にセットし、Akasaka ら (Materials Science and Engineering: C, 2006) が報告した修正疑似体液を 1 mL で満たし、day1, 7, 14 で SEM 観察と EDS を日本電子の JSM-7600F 分析走査型電子顕微鏡で行った。HA の EDS スペクトル確認は象牙を用いた。

3-4-3. HA 析出のカルシウム濃度の測定

3-4-2 で SEM 観察と EDS に用いた試験片をカルシウムの定量に用いた分析後、新しい 24well plate に試験片を移して 0.2% Nonidet P-40 を 200ul/sample となるように加えた。表面を搔破した後、超音波で破碎した析出物を 1.5ml チューブに回収した。20% 蟻酸 200 ul/tube を加えてボルテックスしたものをカルシウム定量サンプルとした。カルシウム E テストワコー (和光純薬) のプロトコルに従って、サンプル 5 ul を使って析出 HA のカルシウムをマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で定量した。

3-4-4. HA 析出の SEM による観察と EDS

EDS によるスペクトルが HA 由来であること

を確認するために、まず、象牙の EDS を行った (図 3-13)。2keV 付近にリン原子、3.7keV 付近にカルシウム原子由来のピークが検出できている。

PEEK 単独試験片上では day7 で小さな析出物が観察できるが、EDS のスペクトルからは HA と判断できるものはなかった (図 3-14)。Day14 になると析出物に針状結晶の様に見える析出物も現れ、EDS で象牙と同様のリンとカルシウムのスペクトルが確認できる。

CNT/PEEK は表面処理を 2000rpm で行った CNT/PEEK 試験片で観察したが、day1 では明らかな析出物は確認できなかったものの、day7 で金平糖のような形状の析出物があり、EDS のスペクトルは象牙と同様のスペクトルであった (図 3-15)。Day14 になるとさらに析出物は成長しており、スペクトルもより強いシグナルが得られた。

これらの結果から、PEEK 材に混ぜた CNT はその表面上の HA の析出を促進する効果があるかもしれない。

3-4-5. HA 析出のカルシウム濃度の測定

3-4-4 で示された CNT/PEEK による HA の析出促進効果を定量的に確認するために、カルシウム濃度を測定した。しかし、day1, 7, 14 で時系列と相関する濃度の上昇は確認できず、サンプル間での有意な差も確認できなかった (図 3-16)。その理由として CNT/PEEK での HA の析出は PEEK より早期でその成長も早い可能性はあるものの、その頻度としては図 3-17 の弱拡大 SEM 像を見ても判るように、析出頻度は高いわけではないので、今回用いた測定方法では正確に定量できていない可能性が考えられた。

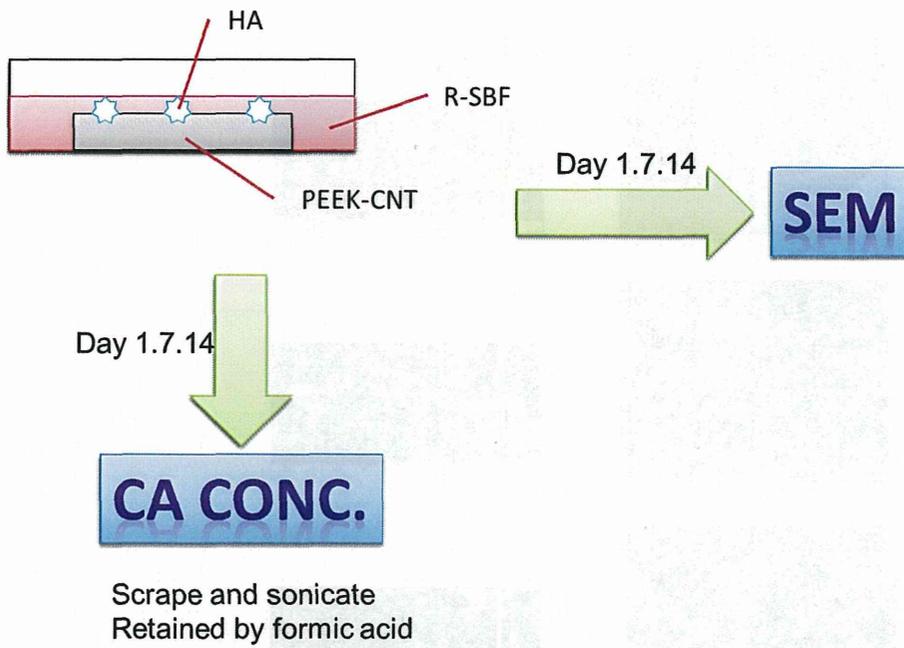


図 3-12 CNT/PEEK による HA 析出試験

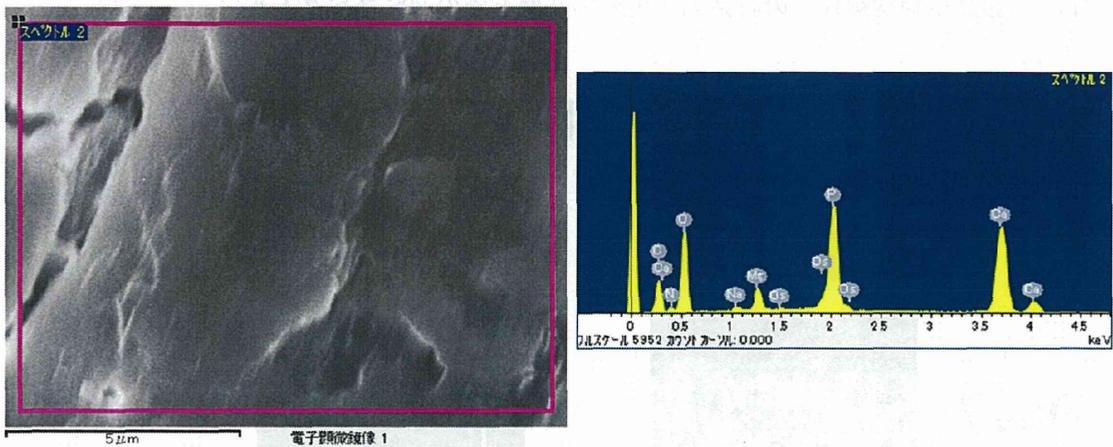


図 3-13 象牙の SEM 像とその EDS スペクトル

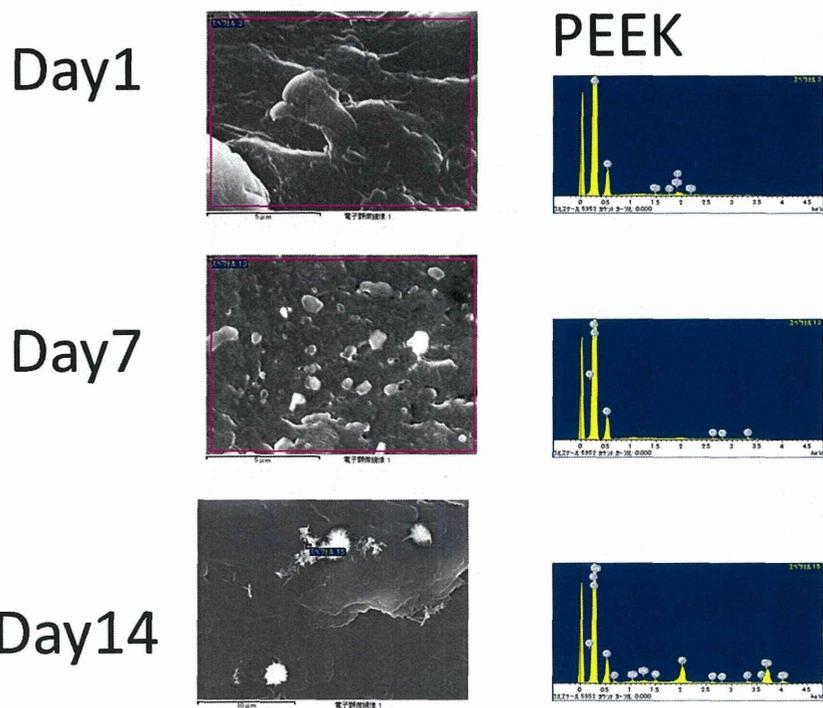


図 3-14 PEEK 単独試験片上の時系列変化の SEM 像とその EDS スペクトル

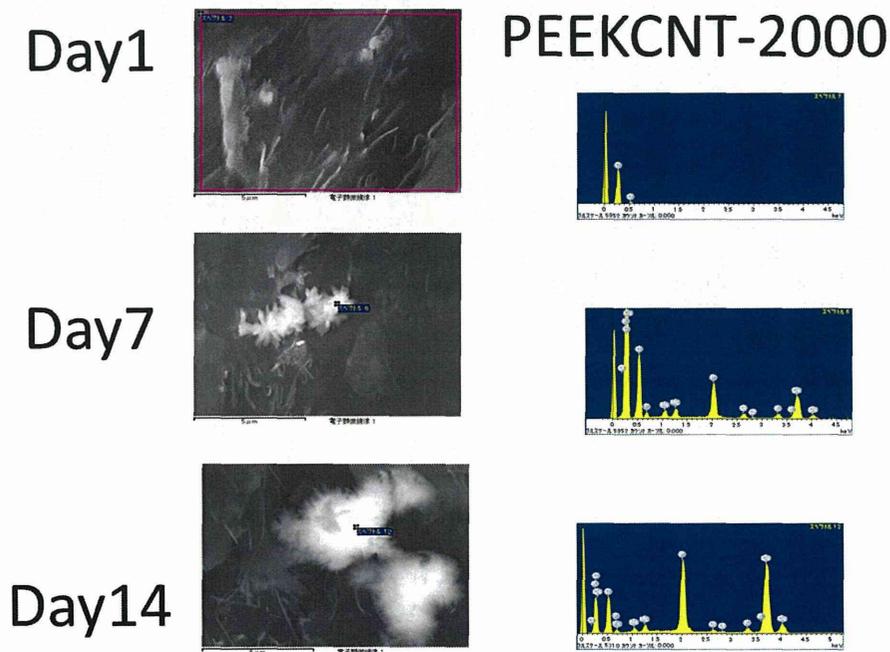


図 3-15 PEEK/CNT 試験片上の時系列変化の SEM 像とその EDS スペクトル