

mRNA 発現はカルシウム導入処理 (CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理) によって有意に増加し、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理は CaCl<sub>2</sub> 処理と比較して有意に高かった。OCN のタンパク質発現については、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ものの CaCl<sub>2</sub> 処理では影響は見られなかった。以上の結果から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、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。

次に、Ti 表面へのカルシウムイオン導入による hMSC の骨分化誘導作用のメカニズムについて探るために DNA マイクロアレイ解析及びパスウェイ解析を行った。骨分化や骨代謝に関わるいくつかの遺伝子が、Ti の化学処理によって発現が有意に上昇した。IL6R や ITGB1 は NaOH 処理によって有意に上昇した。SPP1 (OPN)、MMP13、ENPP1 は CaCl<sub>2</sub> 処理または Ca(OH)<sub>2</sub> 処理により有意に上昇した。そして Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって、ITGA2、BMP2、PTH1LH が有意に上昇した。さらに 2 種類のカルシウム導入法について比較するために、CaCl<sub>2</sub> 処理と Ca(OH)<sub>2</sub> 処理とを比較したところ、CaCl<sub>2</sub> 処理に比べて Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって hMSC の BMP2、PTGS2 (Cox2)、PTH1LH、SPP1 (OPN) の発現が有意に高かった。これまでに、ラットにおいて Cox2 の機能が骨形成に必須であり、間葉系前駆細胞において Cox2 の誘導を通して骨分化が刺激される事が報告されている。また、骨芽細胞及び間葉系細胞において BMP2 は Cox2 を誘導する。さらに細胞外のカルシウム量の増加が BMP2 の発現を上昇さ

せるという報告もある。その上、カルシウムに関わるシグナル伝達系において Cox2 による PTH の誘導が重要な役割を果たすこともわかっている。以上のことから、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。一方、Smad シグナル伝達系は Ti 表面の化学処理により抑制された。これまでに、noncanonical BMP シグナル伝達系が Cox2 の転写を制御するという報告もあるため、Smad シグナル伝達系とは独立した noncanonical BMP シグナル伝達系により Ca(OH)<sub>2</sub> 処理された Ti 表面上で培養した hMSC の骨分化を調整しているのかもしれない。

IPA によるパスウェイ解析を行ったところ、NaOH 処理によって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 の mRNA 発現が誘導された。また、RANKL decoy receptor である OPG の遺伝子発現が NaOH 処理により 2 倍以上上昇した。CaCl<sub>2</sub> 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 の発現が有意に上昇し、さらにそれに伴い integrin  $\beta$ 3 の発現も誘導された。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって Wnt 及び受容体 Frizzled に加えて Frizzled の共役受容体である LRP5/6 の遺伝子発現が誘導された。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 Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって誘導された。さらに、OPN 及び OCN の遺伝子

発現が上昇した。

間葉系前駆細胞において Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路は、骨分化を制御している。Ti の表面特性がカルシウム依存性の Wnt シグナル伝達経路を介して骨分化を誘導し、Wnt5a が integrin との正のフィードバックを通して骨分化を増強するとの報告もある。これまでに、integrin ファミリーが様々な処理を施された Ti 表面上で骨分化における重要な役割を果たしている事が報告されている。本研究において、カルシウムイオン導入処理により、OPN 発現上昇に伴い integrin  $\beta 3$  の発現誘導が観察された。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促進され、その効果は  $\text{CaCl}_2$  処理よりも  $\text{Ca(OH)}_2$  処理の方が高かった。

本研究において、hMSC の骨分化誘導作用は  $\text{Ca(OH)}_2$  処理の方が  $\text{CaCl}_2$  処理よりも効果的であったが、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ものかもしれない。Ti 表面への  $\text{Ca(OH)}_2$  処理により、1)  $\text{CaCl}_2$  処理に比べて BMP2、Cox2、PTH1LH の発現が上昇し、2) Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達経路が活性化されることによって hMSC の骨分化が誘導されることが示唆された。

カルシウムイオン導入した純 Ti は hMSC の骨分化を誘導することを見出し、2 種類の導入処理法を比較する事によりそのメカニズムの一端を明らかに出来たと考える。

## 2. 生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について

生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について検討するために、

組成比の異なる PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で hMSC を培養し、それぞれの細胞へ与える影響について検討を行った。

播種 24 時間後において、やはり PHEMA100% のコーティング処理したシート上では、hMSC が接着せず、浮遊の状態が存在していた。しかし、PMEA が 25% 以上含まれたコーティング処理のもの (PMEA, M75H25, M50H50, M25H75) では、hMSC は接着していた。この様に、コーティングしたポリマーの組成比を変える事で、hMSC の形態等に変化が見られることが分かった。次に、hMSC が接着した材料 (PMEA / PHEMA コポリマー4 種類と PET) 上で培養した hMSC における遺伝子発現プロファイルについて網羅的に解析した。その結果、PET と比較し、生体親和性高分子材料によって発現が 2 倍以上上昇または誘導された遺伝子群について解析したところ、PMEA, M75H25, M50H50 の材料によって、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。EMT は、TGF- $\beta$ , Notch, Wnt, Receptor tyrosine kinases によって誘導されるため、それぞれのシグナル伝達についてコーティング処理による変化について検討したところ、TGF- $\beta$  及び FGF Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められた。一方、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた。このことから、PMEA の割合が高い方が EMT Pathway が亢進され易い可能性が

示唆された。

EMTは近年、がん細胞の分化度の制御調節機構の一つとして着目されており、EMTの誘導により細胞の運動性の亢進や細胞外基質の蓄積、細胞老化の抑制、幹細胞様機能（未分化性など）の獲得などが示されている。以上より、生体親和性高分子上で培養したhMSCの遺伝子発現プロファイルの変化から、PMEA/PHEMAコポリマーコーティング材料がhMSCの運動性の亢進や未分化性の維持などへ影響を与える可能性が示唆された。

### 3. 生体親和性高分子材料による THP-1 の機能への影響について

組成比の異なる PMEA/PHEMA コポリマーのコーティング処理した表面上で THP-1 を培養し、細胞へ与える影響について検討するために遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析した。各生体親和性高分子材料の THP-1 に与える影響について、THP-1 の遺伝子発現パターンによる階層的クラスタリングを行ったところ、dish と最も類似したパターンを示したのが、M75H25、M50H50、次いで M25H75、PHEMA、PMEA の順であった。また、dish と比較して生体親和性高分子材料によって発現が有意に変化（2倍以上上昇または 1/2 以下に低下）した遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く見られた。一方、コポリマー（M75H25、M50H50、M25H75）は有意に影響を受ける機能は少なかった。この様に、生体親和性高分子材料によるコーティング処理は THP-1 の遺伝子発現に影響を与え、その大きさは PMEA >

PHEMA > コポリマー（M25H75 > M75H25、M50H50）の順であった。このことから、コポリマー（両高分子ポリマーの共重合体）の方が、それぞれの高分子材料のみ（PMEA、PHEMA それぞれ 100%のもの）よりも細胞が影響を受けにくい材料である可能性が示唆された。

### 4. 高分子材料の内皮化評価について—高分子材料による血管内皮細胞（HUVEC 及び TIME-GFP）の機能への影響について

本研究では、医用材料の血液適合性評価の一つとして、血管内皮細胞を用いて材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。

まず、従来材料の *in vitro* における内皮化の評価に使用されていた初代培養細胞の HUVEC と最近開発された不死化させた血管内皮細胞の TIME-GFP を用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討した。3 ロットの HUVEC について検討したところ、材料への接着試験についてロットによる差が大きいことが明らかとなった。一方、TIME-GFP では HUVEC と同様の増殖傾向を示し、独立した 3 回の実験内での差も小さいことが確認された。

次に、TIME-GFP が各ポリマーコーティングしたシートに接着した際に、血管内皮細胞としての機能を保持しているか確認した。一酸化窒素合成酵素 3（Nitric oxide synthase-3；NOS-3）は主に血管内皮細胞で発現しており、この酵素によって合成される一酸化窒素（NO）には血小板凝集を抑制する作用がある。またトロンボモジュリン（Thrombomodulin；TM）は血管内皮細胞表面に存在し、トロンピンと複合体を形成して血液凝固を抑制することが知られ

ている。これら 2 遺伝子が各ポリマー上で培養しても発現しているかどうかについて定量 PCR 法により調べた。Dish 上で、TIME-GFP は NOS-3 及び TM を HUVEC と同程度発現しており、TIME-GFP は HUVEC と同程度の抗血栓作用が予測された。また、各ポリマーコーティングしたシート上でも Dish と比較して、NOS-3 や TM の発現が低下することはなかった。以上の結果により、材料に接着した TIME-GFP の細胞数を測定することで、材料の内皮化及びそれに伴う抗血栓性を予測できることが示唆された。初代培養細胞である HUVEC の場合、ロットによる接着傾向の違いや培養による細胞の変化によって実験の再現性や妥当性が下がる可能性が考えられるが、不死化された TIME-GFP は継代による細胞の変化もあまり見られず、また HUVEC と同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していることから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価において TIME-GFP を用いる有用性が示唆された。

また、TIME-GFP を使用した材料への接着試験の応用について検討した。人工血管の内腔に内皮細胞の接着を促す処理を施した製品が開発されている。このような製品の品質管理として、内腔に目的とする処理がきちんと施されているか調べる必要がある。これは、内腔表面の化学組成等を調べることで可能であるが、一方で、血管内皮細胞の接着数が上昇するか *in vitro* で調べることは直接的で有効であると考えられる。TIME-GFP の材料への接着数を調べることで、ポリマーコーティング処理の割合をどの程度検出できるのか調べるために、面

積の 100%、50% を PME A 処理した PC シートに TIME-GFP を播種し、4 日間培養後の細胞増殖を解析した。その結果、PME A100% と 50% 及び PME A50% と 0% の間の細胞増殖率に有意な差がみられた。以上の結果から、PC シートに PME A を処理した場合、50% の処理の違いは細胞数を測定することで検出できることがわかった。実際に製品に使用する医用材料及びその表面処理において、この試験をバリデーションすることによって品質管理試験として使用できる可能性が示唆された。

高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行った。

PTHFVE 及び PME A はどちらも TIME-GFP が比較的良く接着し、4 日間での増殖率も Dish と同程度であった。PTHFVE では、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は無く、また低下すると予想される機能も少なく、PTHFVE が細胞機能へ与える影響は少ないと考えられた。また、PME A も変化すると予想される機能は少ないものの、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能は「造血前駆細胞の増殖」など 2 種類であり、PME A により血球系の細胞や血小板に影響を与える可能性のある機能の上昇が認められた。

PMe3A 及び PEOEVE はどちらも TIME-GFP 培養 1 日後の接着は PTHFVE や PME A よりも低かったが、4 日後にはどちらも増殖しており、増殖率はむしろ高い傾向を示した。PMe3A では、変化すると予想される疾病及び生体関連機能は 12 種類あり、TIME-GFP の機能へ及ぼす影響は少なくなかった。また、

PEOEVE は変化すると予想される疾病及び生体関連機能は 28 種類と多く TIME-GFP へ与える影響が大きいことが伺われた。さらに、上昇すると予想される疾病及び生体関連機能 3 種類は全て「心血管疾患」に関わる粥状大動脈硬化症などの大動脈疾患に関わる機能であった。今後、実際に PEOEVE によって血管内皮細胞が動脈硬化症等の心血管疾患へとつながる変化を引き起こすのかどうかさらなる検討が必要であろう。

以上の結果から、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上への TIME-GFP の接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFP を用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回の結果からは、TIME-GFP の接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想される PTHFVE が、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

## E. 結論

### 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

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 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。カルシウムイオン導入量及びアパタイト形成量は CaCl<sub>2</sub> 処理に比べて Ca(OH)<sub>2</sub> 処理の方が有意に高かった。hMSC における OPN 及び OCN の発

現の検討から、Ti 表面へのカルシウム導入により hMSC の骨分化へ影響を与える事がわかった。また、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。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。さらに 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。

### 2. 生体親和性高分子材料による hMSC の機能への影響について

hMSC への生体親和性高分子材料 (PMEA / PHEMA コポリマーのコーティング処理) の影響について検討したところ、Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition

(EMT ; 上皮間葉転換) Pathway に関わる遺伝子群が有意に誘導されることがわかった。さらに、TGF- $\beta$ , FGF

Receptor や EGF Receptor を介した経路の誘導による EMT Pathway の亢進は全てのコーティング処理で認められたが、Notch 誘導による EMT Pathway の亢進は、PMEA のみ顕著にみられた。

### 3. 生体親和性高分子材料による THP-1 の機能への影響について

THP-1 への生体親和性高分子材料コーティング処理による遺伝子群の発現変化が疾病関連機能や生体機能に及ぼす影響について調べたところ、PMEA では有意に上昇する機能が多く見られ、反対に PHEMA では有意に低下する機能が多く

見られた。一方、コポリマー (M75H25, M50H50, M25H75) は有意に影響を受ける機能は少なかった。生体親和性高分子材料による影響の大きさは PMEA > PHEMA > コポリマー ( M25H75 > M75H25, M50H50) の順であった。

#### 4. 高分子材料の内皮化評価について—高分子材料による血管内皮細胞 (HUVEC 及び TIME-GFP) の機能への影響について

本研究では、血管内皮細胞を用いて医用材料における内皮化を評価するためのより最適な方法を探索した。

従来、材料の *in vitro* における内皮化の評価に使用されていた初代培養細胞の HUVEC と最近開発された不死化させた血管内皮細胞の TIME-GFP を用いて、高分子材料上で培養し、細胞接着と形態及び内皮化について比較検討したところ、TIME-GFP は継代による細胞の変化もあまり見られず、また HUVEC と同様の接着傾向を示し、さらに材料上でも血管内皮細胞としての機能を保持していることから、血管内皮細胞を用いた材料の内皮化評価において TIME-GFP を用いる有用性が示唆された。

高分子材料による TIME-GFP の機能への影響について、遺伝子発現の網羅的解析も行ったところ、コーティングするポリマーの種類によって血管内皮細胞の機能へ与える影響は異なることがわかった。ポリマーコーティングによる内皮化の評価として、ポリマー上への TIME-GFP の接着や増殖について検討した上で、さらに血管内皮細胞の機能への影響についても考慮する必要があるだろう。TIME-GFP を用いてそれぞれのポリマーについて内皮化の評価を行った今回

の結果からは、TIME-GFP の接着や増殖も比較的良く、細胞の機能へ与える影響が少ないと予想される PTHFVE が、内皮化の評価は高いといえるのかもしれない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kono K., Takada N., Yasuda S., Sawada R., Niimi S., Matsuyama A., Sato Y. : Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*, 43, 146-149 (2015)
- 2) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Okura H., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y. : Characterization of *in vivo* tumorigenicity tests using severe immunodeficient NOD/Shi-scid IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice for detection of tumorigenic cellular impurities in human cell-processed therapeutic products. *Regenerative Therapy*, 1, 30-37 (2015)
- 3) 澤田留美「再生医療等製品開発における動物実験—指針及び評価指標について—」*オベリスク*, 20(1), 25-31 (2015)
- 4) 澤田留美「再生医療等製品とバイオマテリアル, そして評価指標」*バイオマテリアル—生体材料—*, 33(1), 7-8 (2015)
- 5) Sasaki H., Takeuchi I., Okada M., Sawada R., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., and Kato R.: Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. *PLOS ONE*, 9(4), e93952 (2014).

- 6) Kono K., Niimi S., and Sawada R. : Cyclin D2 promotes the proliferation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Marrow Res.*, 2: 136. 1000136 (2013).
- 7) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., and Matsuoka A. : Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 101(9), 2573-85, (2013).
- 8) Ito-Nagahata T., Kurihara C., Hasebe M., Ishii A., Yamashita K., Iwabuchi M., Sonoda M., Fukuhara K., Sawada R., Matsuoka A., Fujiwara Y. : Stilbene Analogs of Resveratrol Improve Insulin Resistance through Activation of AMPK. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(6), 1229-1235, (2013).
- 9) Sato Y., Tsutsumi H., Sawada R., Suzuki T., Yasuda S. : Regulatory science research to facilitate the development of cell/tissue-proceed products. *Bull. Natl. Inst. Health. Sci.*, 131, 16-19, (2013).
- 10) 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価の実際」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 28-37
- 11) 松岡厚子、澤田留美、加藤玲子「次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野—」再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み、シーエムシー出版、東京 (2012) pp. 38-46
2. 学会発表
- 1) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞における細胞分化と LINE-1 の発現について」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 2) 高田のぞみ, 河野健, 安田智, 澤田留美, 新見伸吾, 松山晃文, 佐藤陽治「細胞増殖特性を利用した不死化細胞検出試験法の性能評価」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 3) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 澤田留美, 本多裕之, 清田泰次郎, 加藤竜司「骨髄由来および脂肪組織由来間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化モニタリング」第 14 回日本再生医療学会総会 (2015.3)
- 4) 澤田留美, 河野 健, 比留間瞳, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子材料によるヒト単球細胞の機能の制御について—遺伝子発現の網羅的解析による検討」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 5) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」第 36 回日本バイオマテリアル学会大会 (2014.11)
- 6) Kono K., Niimi S., Sawada R.,; Analysis of Line1 expression in human mesenchymal stem cells, 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2014.6)
- 7) Sasaki H., Okada N., Kanie K., Kiyota Y., Honda H., Sawada R., Kato R.; Image-based profiling of mesenchymal stem cells using non-label images, TERMIS-EU 2014 (2014.6)
- 8) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉

- 系幹細胞の増殖培養過程における品質評価のための遺伝子発現解析」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
- 9) 河野 健, 新見伸吾, 澤田留美「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
- 10) 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 河野健, 野村祐介, 新見伸吾「ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能に対する抗酸化剤の影響評価」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
- 11) 佐々木寛人, 蟹江慧, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「間葉系幹細胞の継代培養における品質劣化の細胞形態と発現プロファイリングとの相関解析」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
- 12) 佐々木寛人, 高橋厚妃, 蟹江慧, 竹内一郎, 澤田留美, 清田泰次郎, 本多裕之, 加藤竜司「細胞画像情報解析による間葉系幹細胞分化能の品質プロファイリング」第 13 回日本再生医療学会総会 (2014.3)
- 13) 河野 健, 澤田留美, 新見伸吾「間葉系幹細胞におけるレトロトランスポジションの解析とその影響に関する研究」第 36 回日本分子生物学会年会 (2013.12)
- 14) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Takada N., Kuroda T., Sawada R., Matsuyama A., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.; Characterization of *in vivo* tumorigenicity test using severe immunodeficient NOG mice for quality assessment of human cell-processed therapeutic products, World Stem Cell Summit 2013 (2013.12)
- 15) 澤田留美, 河野 健, 加藤玲子, 新見伸吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (1): 遺伝子発現の網羅的解析」第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)
- 16) 加藤玲子, 齧島由二, 福井千恵, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾「生体親和性高分子によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響 (2): タンパク質発現の網羅的解析」第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013.11)
- 17) Sawada R., Kono K., Isama K., Haishima Y., Matsuoka A.; The effect of calcium-incorporated titanium surfaces on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)
- 18) Kono K., Sawada R., Matsuoka A.; Overexpression of cyclin D2 promotes cell proliferation of human mesenchymal stem cells, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)
- 19) Kusakawa S., Machida K., Yasuda S., Kuroda T., Sawada R., Tsutsumi H., Kawamata S., Sato Y.; Validation of *in vivo* tumorigenicity test for the process control of cell/tissue-engineered products using severe immunodeficient NOG mice, 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2013.6)

- 20) 澤田留美「再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立を目指して」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)
- 21) 松岡 厚子, 澤田 留美, 加藤 玲子, 河野 健「次世代医療機器評価指標作成事業 —再生医療分野審査 WG 活動報告」日本バイオマテリアル学会 2013 年度第 1 回セミナー (2013.5)
- 22) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野 健、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について—遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 23) 齋島由二、澤田留美、福井千恵、松岡厚子「間葉系幹細胞の増殖に及ぼすエンドトキシンの影響について—蛋白質発現の網羅的解析による検討—」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 24) 河野 健、澤田留美、松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 25) 草川森士、町田一彦、安田智、黒田拓也、澤田留美、伊藤守、堤秀樹、川真田伸、佐藤陽治「細胞・組織加工製品の製造工程管理法としての NOG マウス造腫瘍性試験系のバリデーション」第 12 回日本再生医療学会総会 (2013.3)
- 26) 澤田留美、河野 健、松岡厚子「細胞・組織加工医療機器に用いられる間葉系幹細胞の品質評価—がん化の指標探索のための遺伝子発現解析—」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012.11)
- 27) 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)
- 28) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takahashi, A., Takeuchi, I., Sawada, R., Kiyota, Y., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based prediction of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 3rd TERMIS World Congress 2012 (2012.9)
- 29) 澤田留美、齋島由二、福井千恵、河野 健、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について (2) —遺伝子発現の網羅的解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 30) 齋島由二、福井千恵、澤田留美、松岡厚子「間葉系幹細胞の骨分化に及ぼすエンドトキシンの影響について(1) —蛋白質の網羅的発現解析による検討—」第 11 回日本再生医療学会 (2012.6)
- 31) 佐々木寛人、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「骨髄由来間葉系幹細胞の画像情報解析による劣化度評価」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 32) 佐々木寛人、高橋厚妃、坪井泰樹、澤田留美、清田泰次郎、本多裕之、加藤竜司「間葉系幹細胞画像の情報解析による細胞状態分類法の有効性」第 11 回日本再生医療学会総会 (2012.6)
- 33) Sasaki, H., Matsuoka, F., Takeuchi, I., Sawada, R., Honda, H., Kato, R.; Morphology-based cell quality assessment of differentiation potential of mesenchymal stem cells, 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (2012.6)

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)  
分担研究報告書：平成 24-26 年度（3 ヶ年分）

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

研究分担者	植松美幸	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	齋島由二	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	中岡竜介	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部
研究協力者	瀬川勝智	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部
研究協力者	中野達也	国立医薬品食品衛生研究所医薬安全科学部

### 要旨

体内に埋込む医療機器は生体への高い適合性が求められることが背景にある。新規材料に対して、長期的な埋込みによる生体適合性の評価をすることを考えると、実際の応用までに時間を要するが、材料開発段階でその予測ができれば、材料をより迅速に患者へ普及させることができると考える。その評価指標のひとつとして、本研究ではコンピュータシミュレーションによる評価指標の開発に取り組んできた。本研究では、比較的血液適合性が高いといわれる高分子材料である PMEА (Poly(2-methoxyethyl acrylate)) を対象にどのような条件でシミュレーションを行い、どのような解析によって値を示すことで、不凍水、中間水、バルク水の説明ができる指標となるのか、検討した。

### 背景・目的

研究の目的は医用高分子表面近傍の水和状態に着目し、分子動力的シミュレーションによって中間水の存在可能性を示すことである。

【平成 24 年度】水分子の吸着エネルギーや拡散係数、動径分布関数などによる解析手法を検討した。一方で、中間水の存在をすでに知られている DSC 分析他の手段で調べるために、NMR で PMEА の計測を試みた。

【平成 25 年度】平成 24 年度の NMR での解析結果を受けて、PMEА 中のメキシ基周辺に中間水が存在する可能性が認められた。これから、メキシ基周辺の水分子の振る舞いについて、水分子の存在する個数を求め、メキシ基と水分子との相対速度から中間水を示すことを試みた。

【平成 26 年度】不凍水、中間水、バルク水の差異を示すために、PMEА 中に存在する水分子について、位置、吸着力、変位を数値化した。Adsorption Locator によって官能基への水の吸着力、水の持つエネルギーを示し、吸着させた水の離れやすさを比較することで、高

分子内への水の取込み力を調べ、また、水分子の補足時間を示すことで緩やかに存在する水分子の存在について示すことを試みた。

## 方法

【平成 24 年度】中間水の存在を示すための指標として、分子動力的シミュレーションによって算出させる数値のうち、拡散係数、動径分布関数、吸着エネルギーを用いることで、材料周りの水分子の振る舞いを示す。

6wt%のPMEAを基準として、PMEAと水の比率を算出した。バルクのPMEAの密度が約 $1.2\text{g/cm}^3$ であることから、重合数は50とし、約 $30\text{\AA}$ の立方体セルに3本鎖を配置し、水分子を60個配置した。周期境界条件を設定し、温度が300Kのもとで分子動力的シミュレーションを行った。トータルエネルギーが安定したときの200ps分のtrajectoryを取り出し、材料中の官能基に対する水分子の配置について動径分布関数を求めた。

PMEAの酸素原子に対する水の吸着エネルギーについてAdsorption Locatorモジュールを用いて(Accelrys社)シミュレーションした。50量体のPMEAの1本鎖に対して、20個の水を配置する。ここで、酸素原子は(A)メトキシ基の酸素原子、(B)エステル結合カルボニル酸素原子、(C)エステル結合酸素原子の3つの種類がある。全酸素原子に対して、水を配置させる場合に対して、それぞれの酸素原子に限定的に水を配置させる場合の吸着エネルギー比較を行う。これにより、どこの酸素原子に配置するのが最も安定的となるのか探索した。

固体NMRにてPMEAの計測を行い、材料中に取り込まれている水の存在とその位置推定を行った。(1)  $^1\text{H}$ -NMR、(2)  $^{13}\text{C}$ -NMR / J-DEPT45、(3)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  J-HETCOR、(4)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  J-HETCORのスライスデータ、(5)  $^{13}\text{C}$ -CPMAS、(6) CP-HETCOR、(7) CP-HETCORのスライスデータ、(8) NOESYの結果からPMEA中の水の存在とその位置について可能性を探った。

【平成 25 年度】NMRの結果からPMEAのメトキシ基近傍に存在する水が中間水であるという予測のもと、isotacticとsyndiotacticの構造の違いでメトキシ基周りの水に違いが出るのか検討した。PMEAは水に溶ける材料ではないため、周りに多くの水が存在しないモデルがよいだろうと想定し、0のPMEAに対して、100個の水分子を与えたCell構造を作成してシミュレーションを行った。密度が $1.22\text{g/cm}^3$ に対して、1辺 $23.06\text{\AA}$ であった。Forcite Plusを用いて、Annealingを300Kから500Kで5サイクル行い、Dynamicsを行った。ここでDynamicsはNVTで50,000ステップ(50ps)、NVEで100,000ステップ(100ps)行った。この結果について、解析を進めた。

メトキシ基周辺の水の個数については、Materials Studioに付属するPipeline Pilotを介して、

MaterialsScript API を利用し、自作の Perl のプログラムを併用しながら行った。トキシ基周りに中間水が存在するという仮定のもと、メトキシ基の酸素原子から 1 Å ほどの距離に応じて存在する水の個数を算出し、メトキシ基の酸素原子からの距離に応じて、1 Å ごとに範囲を設定し、その中に入る水分子について、メトキシ基に対する水の相対速度を算出した。

【平成 26 年度】平成 25 年度の結果から、中間水の存在を示すにあたり、メトキシ基と水の相対速度では十分に示せそうにないだろうと考え、PMEA 中の酸素原子に対する水分子の分類を試みた。まず、構造は isotactic に限定し、Conformer を用いてモノメトリックな構造を作成した上で、らせん状になる 50 量体を初期材料として設定した。

材料中の酸素原子へ強制的に 3[Å]となる位置へ水分子を配置する。吸着力の違いを比較することで、水分子の取り込みやすさを調べた。そして、材料中に水を取り込んだ状態を作り出し、周りに飽和状態の水が存在し、分子動力的シミュレーションを行った。平衡状態となったときでも、材料中に最初に取り込んだ水を取込み続けるかについて検討した。

また、分子動力的シミュレーションの結果から、官能基周辺の水分子の補足時間を調べることで、中間水としての振る舞いを示すことを試みた。メトキシ基に対する周りの水分子の距離の時間推移を算出し、全フレームの平均距離が小さいものから順にグラフ化した。このときのシミュレーション条件としては、力場は COMPASS II、温度は 298K で一定とし、温度制御は Nose-Hoover-Langevin (NHL)、Electrostatics terms は Particle-Particle and Particle-Mesh (PPPM)、van der Waals terms は Ewald として、0.25[psec] ごとに 1 フレームとして 50[psec]分出力するとした。

## 結果・考察

【平成 24 年度】シミュレーションの結果から、官能基に対する水の動径分布関数から水素結合の配置位置、拡散係数から水の動きやすさを示した。

自己拡散係数は PHEA、PBA、PMEMA、PHEMA、PEA、PMEA、PPEA の順に低下した。すでに検討したモノマー周りに水を飽和状態に配置させたときの分子動力的シミュレーションの結果によれば、PHEA、PBA、PMEA、PHEMA、PEA、PPEA、PMEA という順であった。水の配位数もこれまでの実験方法とは異なっているので、単純比較はできないが、PMEA、PMEMA の順番に入れ替わりがあるものの、モノマーの場合と今回のオリゴマーのときとではほぼ同じ並びであった。DSC では PMEA のみ中間水の存在が予想されていることから、今回のシミュレーション結果のみから、どこまでが妥当な結果を示しているのか線引きができなかった。また、水が少ないと計算誤差も増えるため比較が難しかったことや、水の拡散係数を基準とした比較用の指標の重要性から、現実的な密度を基準にした水分子の配置より、飽和状態に水分子を配置したモデルの方が、本シミュレーションにはよさそう

であると考えられた。また、分子動力的シミュレーションで中間水の存在を示すには、飽和状態の水に対して、全体の水の拡散係数を算出するよりも、官能基に対する距離に応じた水の動きやすさとしての値を求めることがふさわしいと考え、これを今後の方針とした。また、吸着エネルギーや動径分布関数を用いることで、どの位置に吸着しやすく、官能基からどれぐらいの距離に水分子が存在しているのか示す指標となると考えられた。PMEA と PMEMA については、水の配置位置はほぼ同様であったが、エステル結合のカルボニル酸素原子での水素結合の大きさに違いがあること、また、水の動きやすさとしての拡散係数に差があることから、エステル結合のカルボニル酸素原子周辺の水の動きにくさが影響したものと考えた。今後、中間水の存在をシミュレーションとして示すためには、PMEA と PMEMA のメチル基の有無によって、この水の動きにくさに違いがどのように現れるかに着眼して進めるのがよいと考えた。

高分子材料に含まれる中間水の存在との関係性が示唆された。NMR での計測結果からも、PMEA には高分子に取り込まれた水の存在があると考えられ、それがメトキシ基の酸素原子に存在するものであると推察された。メトキシ基は運動性がよく、そこに取込まれている水をシミュレーションから表現することが本研究の目指すところとなると考えられた。

【平成 25 年度】 MEA を対象とし、これまでの実験、シミュレーションによって予測されたメトキシ基の酸素原子近傍の水分子の振る舞いについて、解析した。isotactic の結果、(syndiotactic の結果について、いずれも 5 回の試行の結果から検討したが、似通った結果もあれば、異なる結果もあった。平均した結果での比較を行うにはサンプル数が十分でないと考え、isotactic のときの水分子の数よりも syndiotactic のときの水分子の数の方が相対的に多いと見受けられた。水分子の平均 2 乗距離変位が時間に対して線形となっている部分を取り出し、Cell 内全体の水分子についての拡散係数を計算し、5 試行数分で平均してみると、isotactic が  $6.7 \times 10^{-6}$  [cm<sup>2</sup>/s]、syndiotactic が  $6.8 \times 10^{-6}$  [cm<sup>2</sup>/s] となった。ただし、取り出す時間幅などによっても結果が異なることに注意は必要である。より多くの試行数で傾向を見ていく必要があるとは思いますが、現在の結果を見ると、水分子全体の動きとしては isotactic と syndiotactic に大きな差異はないと思われた。

また、100ps のデータに対して解析をしたところ、近い距離にあっても、離れた距離にあっても水分子の平均的な速度に違いはなかった。解析前には中間水というのはメトキシ基に対してほぼ固定で大きく外れることなくとどまり続ける水であると考えていた。そのため、酸素原子間の同程度距離関係ある水分子は同じように振る舞うと考え、メトキシ基側の酸素原子からの 1 Å 毎に区切られた範囲での水分子全体をひとまとまりで考えるアルゴリズムを用いた。しかしながら、動画から水分子がメトキシ基の近くに存在しているのを確認することができる。これから、中間水とバルク水との差を示すには全体の水分子の統

計的データによって示すのは難しく、それぞれの水分子の振る舞いについての傾向をグループ化した上で比較検討するのがよいと考えられた。中間水の振る舞いを捉えるために、全フレームの統計的な解析ではなく、官能基に捕捉された時間を見ていくことを提案した。

【平成 26 年度】これまでの結果から、材料中に存在する水分子のグループ化をした上で、その動きを捉えることが、不凍水、中間水、バルク水の違いを示すことにつながると考えていた。PMEA の 50 量体内にある 2 種類の酸素原子について、水分子の吸着力の強さと離れやすさ、とどまりやすさについて比較検討した。エステル結合カルボニル酸素原子への水分子の吸着力が大きいことは、不凍水が存在すること、また、メトキシ基の酸素原子にはより緩やかな吸着になっていることの手掛かりとなると示唆された。

次に、官能基に強制的に水分子を配置させ、周りの水分子が多く存在したときに平衡状態となると、最初に吸着させておいた水分子は外に出て行くか否か、エステル結合カルボニル酸素原子、メトキシ基の酸素原子に対して、平均二乗変位の傾きの差、動径分布関数の時間推移をみたところ、不凍水が存在すると考えられているエステル結合カルボニル酸素原子については、吸着力がより強く、周りの水分子に対しても動きが小さく、拡散しづらい。中間水が存在すると考えられているメトキシ基の酸素原子については、周りの水分子（バルク水）と同化してしまう可能性があると考えられた。

本方法は周辺に存在する水分子が不凍水であるか、他の水であるかの違いにつながる指標として使える可能性はあるが、中間水とバルク水との違いを示す指標とするには難しそうであると考えられた。

そこで、中間水の振る舞いを示すために、官能基に捕捉された時間を算出し、水分子毎に示すことで水の分類を行った。近くにとどまり続ける水分子と遠くに存在しつづける水分子とがあり、これが中間水の特徴を示すためのきっかけと考えられた。メトキシ基の酸素原子も水分子中の酸素原子も運動しているので、値の変動も大きく、波形にスムージングをかけてノイズ除去も試みたが、決め手に欠けている。距離の時間微分によって、水分子が一時的に存在するのか、とどまる状態にあるのかということを示し得ると考えており、とどまる状態がみられたところで、時間積分をすることによって、メトキシ基に対してどれぐらいの距離に水分子が存在しているのか把握できると考えている。今後は中間水が見られないといわれる材料との比較を行いながら、検討を進めていきたい。

## 総括

本研究では NMR によって PMEA 中に含まれる水の存在可能性とその位置を探り、分子動力的シミュレーションによって、中間水の表現を様々なアプローチで試みた。3 年間の結果を受けて導かれたのは次の 2 点である。

- 1) PMEА 中に含まれる酸素原子に対して水素結合を強制的に作ったときの吸着エネルギー比較や吸着させた水分子が周りに拡散していくか検討することで、不凍水としての示し方ができるのではないかとということ。
  - 2) 2) 酸素原子の周りに存在する水分子の捕捉時間を算出することで、中間水としての存在を示す指標となりうるのではないかとということ。
- 今後は中間水の有無に応じて、他の材料との比較を進め、本法の妥当性について検討していきたい。

#### 業績 (論文)

- (1) Muragaki Y, Uematsu M, Iseki H, Umezu M: Analysis of Benefit-risk Balance in Decision-making of the Food and Drug Administration for Premarket Approval of Therapeutic Medical Devices, *Advanced Biomedical Engineering* 2 101-106 2013 年
- (2) Uematsu M, Asato K, Ichihashi T, Umezu M, Nakaoka R, Matsuoka A, Aomi S, Iimura H, Suzuki T, Muragaki Y, Iseki H., A surgical navigation system for aortic vascular surgery: a practical approach, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2013; 2013:5327-30 2013 年

#### 業績 (学会発表)

- (1) M. Uematsu, Y. Haishima, R. Nakaoka, T. Nakano, K. Segawa and S. Niimi : Developing a Biocompatibility Evaluation System Utilizing Molecular Dynamics Simulation of Hydration on Surface of Biomaterials, The 54<sup>th</sup> Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, May 2015 (accepted)
- (2) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 中野達也, 瀬川勝智, 新見伸吾: 分子動力的シミュレーションによる PMEА 分子に存在する水の挙動解析, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集 2014 年 11 月
- (3) 植松美幸, 高橋泰浩, 梅津光生, 中岡竜介, 新見伸吾, 青見茂之, 飯村浩, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋, 岩崎清隆. ユーザビリティを考慮した大血管ナビゲーションの設計開発, *日本コンピュータ外科学会誌*. 16 (3) : 329-330 2014 年 11 月
- (4) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 瀬川勝智, 中野達也: 血液適合性評価のための中間水同定シミュレーション, *日本バイオマテリアル学会大会予稿集* 35th 396 2013 年 11 月
- (5) 植松美幸, 此枝央人, 櫻井裕之, 正宗賢, 中岡竜介, 新見伸吾, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋: 皮弁挙上時の血管走行把握を支援するナビゲーション誤差検討, *日本コンピュータ外科学会誌* 15(2) 202-203 2013 年 8 月

- (6) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 新見伸吾, 中野達也, 瀬川勝智 : 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第 2 報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 42nd 61-62 2013 年 7 月
- (7) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也 : 医用高分子材料の表面近傍における水和状態のシミュレーション的評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム予稿集 2012 355 2012 年 11 月
- (8) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 瀬川勝智, 中野達也 : 医用高分子材料の生体適合性評価指標開発に向けた分子動力的シミュレーション, 人工臓器(日本人工臓器学会) 41(2) S.219 2012 年 11 月
- (9) 岸本眞治, 村垣善浩, 岡本淳, 吉光喜太郎, 鈴木孝司, 伊関洋, 吉澤晋, 梅村晋一郎, 植松美幸, 松岡厚子, 阿部信隆, 仲本秀和, 鍋木正志, 川畑健一, 石井宏志 : 先端医療機器開発における国際標準化の役割, 日本レーザー医学会誌 33(3) 282 2012 年 10 月
- (10) 安里権也, 植松美幸, 市橋琢弥, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋 : 解剖学的特徴点計測における誤差評価についての実験的検討, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 224-225 2012 年 10 月
- (11) 植松美幸, 市橋琢弥, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 飯村浩, 青見茂之, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋 : TAAA Navigator の開発と臨床的評価の実際, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 356-357 2012 年 10 月
- (12) 市橋琢弥, 植松美幸, 安里権也, 梅津光生, 梅津光生, 中岡竜介, 松岡厚子, 東隆, 山崎健二, 鈴木孝司, 村垣善浩, 伊関洋 : 弓部大動脈瘤用ステントグラフト留置過程のデータに基づく可視化に向けた初期的検討, 日本コンピュータ外科学会誌 14(3) 396-397 2012 年 10 月
- (13) 此枝央人, 櫻井裕之, 植松美幸, 佐藤生馬, 上内洋輝, 正宗賢 : 穿通枝皮弁(DIEP flap)挙上時の血管走行可視化の試み, 日本形成外科学会誌 32(7) 535 2012 年 7 月
- (14) 植松美幸, 齧島由二, 中岡竜介, 松岡厚子, 中野達也, 瀬川勝智 : 医用高分子材料表面の水和状態に関する分子動力的解析(第 1 報), 高分子学会医用高分子シンポジウム講演要旨集 41st 61-62 2012 年 6 月

## 分担研究総合報告書

### 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

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。我々は、擬似体液としてハン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、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。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と比べて、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。

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。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。

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。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。

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ックス平衡塩溶液（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。

## 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）

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。

### 2. 表面処理後の表面形状

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。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。

### 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 2 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 2a)。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外に、ナトリウムに由来するピークが認められた (図 2b)。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 2c, d)。

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。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。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、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。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解析の結果、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、それら 2 つのピーク面積の割合も一致した (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

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。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。また、CaCl<sub>2</sub> 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。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 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。

## 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、すでに人工股関節に応用された。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。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。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。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。その結果、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン合金は、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 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。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、Ca(OH)<sub>2</sub> 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。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 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理したチタン表面は、網目形状が観察された。Ca(OH)<sub>2</sub> 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、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 2b)、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 2c, d)。

また、O 1s XPS スペクトルから、NaOH 処理したチタンの O 1s ピークと CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピークは相似しており、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。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。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。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、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、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、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