

総説

バイオ 3D プリンティング技術を用いた立体的細胞構造体の作製

Fabrication of Three-dimensional Cell Structures Using Bio-three-dimensional Printing Technology

川勝美穂*・大嶋利之*・中山功一*

Miho KAWAKATSU*, Toshiyuki OSHIMA* and Koichi NAKAYAMA*

*Graduate School of Science and Engineering, Saga University

1, Honjo-machi, Saga-shi, Saga, 840-8502 JAPAN

1. はじめに

医療分野における技術進歩に伴い、プリンティング技術は、これまでと異なる視点から様々な分野に利用の用途を広げながら開発が進められている。

印字印刷などの平面空間への 2D 印刷から、立体的な 3D への印刷という印刷技術の広がりには、印刷業などの産業・工業のみならず、医療や医学研究分野に新たな可能性を与えることとなった。

医療において、臓器・組織が損傷や機能障害・機能不全に陥った場合、臓器移植や機能を補う人工臓器の置換などによる治療法が近年実用化されつつある。しかしながら、これらの治療法の普及には、移植臓器不足や移植後に長期にわたる免疫抑制剤の服用が必要となること、置換した人工臓器の耐久性や長期的な視野からの安全面の保障などの克服すべき問題点が残されている。

今回、最近話題になっている 3D プリンタ技術が、研究または医療の分野で利用されることによって、これらの問題点の解決に寄与していることをわれわれの研究を交えて紹介をする。

2. 印刷技術の多様性

最近、比較的安価な一般用 3D プリンタが市販化され、簡単に 3D 構造体の作製が可能となっている。目的物の構造を反映した 3D データを元に用途に合わせて多種多様な

2013 年佐賀大学大学院工学系研究科非常勤博士研究員。

川勝美穂

Profile



2013 年佐賀大学大学院工学系研究科非常勤博士研究員。

大嶋利之

Profile



2009 年佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻医工学 教授。

中山功一

Profile



佐賀大学大学院工学系研究科
(〒 840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1 番地)

材料・デザインの構造物が作成出来るため、工業用の部品や特殊梱包材など多方面で使用されている。また、無機物のみならず食用の資材を利用した食べられる構造体の作製も可能であり、すでに食品分野でも、砂糖を使用した3D構造物作製などについて報告がされている。その他にも、3Dプリンタを利用した食肉製造法についての報告もされており¹⁾、今後、食品製造分野における3Dプリンタ利用の選択多様化も望めるかもしれない。

このように様々な分野での利用が進められている3Dプリンタ技術だが、研究・医療分野でも、生体内の組織・臓器として代用可能な立体的構造体を作製する取り組みに注目が集まっている。

3. 再生医療への広がり

再生医療分野で、治療困難な症状や失った組織・臓器の治療のため、臓器移植や人工臓器など様々な方法が模索されている。さらに、これまで確立・開発されてきた生命科学分野の基本的実験手技や組織・臓器に関する研究も治療実現の基盤となっている。また、どのような材料を用いて、どのような方法で生体内の組織・臓器様の機能を持つものが作製できるかを解決するため、多様なアプローチがとられている。

すでに再生医療の現場で、関節軟骨などの臨床応用が開始されているものもあり²⁾。近年、岡野らが開発した細胞シートを積層化し、様々な臓器の再生を行う細胞シート工学手法³⁻⁵⁾を用いて作製された角膜^{6,7)}、心臓⁸⁾などで臨床フェーズに入っている。

3.1 生体外での細胞生存環境の模倣と再現

生体は、多種多様な細胞により形作られている。これらの細胞が立体構造をとり、組織・器官を形成して機能することで生命維持活動を行うことが可能となる。また、細胞を正常に維持、機能させることは立体的な構造である組織・臓器の恒常性を保つことにつながる。

細胞で構成された、組織・臓器を正常に維持させるためには、細胞の機能や性質を解明する必要がある。細胞を生体外の人工的環境下で、生存・分化・増殖させることを可能とした細胞培養法の確立により、医療・研究分野でも様々な研究や臨床応用の推進が可能となった。生体外で培養可能な細胞は、一部の細胞を除き、培養容器に接着する接着系細胞と呼ばれる細胞がほとんどである。

とはいえ、単純に細胞が接着しても正常な機能を維持し増殖できるわけではない。生体外環境に適応させ培養する

ためには、生体内環境を模倣し再現する必要がある。生存や増殖を可能とさせる因子（増殖・成長因子）などを補うため、培養用培地成分や培養条件の検討など細胞に合わせた最適な培養方法の改良が進められ、生体外でも安定した細胞培養ができるようになった。その結果、それらを基本手技として利用した実験や研究が可能となったのである。

3.2 組織工学（ティッシュエンジニアリング）

細胞培養法の確立以降、それらを材料として組織・臓器を作製する技術の研究・開発が急速に進められている。組織工学（ティッシュエンジニアリング）という言葉が頻繁に使用されているが、この分野を簡単に説明すると、研究・医療で必要とされている組織・臓器を作製することを示している。ティッシュエンジニアリングの概念は1990年代後半には提唱され⁹⁾、背中にヒト耳形状の立体構造物を生やしたマウスの報告¹⁰⁾以降、多くの研究者がこの分野の研究に参入し、様々な研究が推進されている。

4. 立体的な構造体の作製

一般的にティッシュエンジニアリングの基本的な手技として、細胞、足場（scaffold）、成長因子・遺伝子が必要となる。それぞれに関しては、後述の事項で説明をするが、印刷という観点からすると解りにくい言葉の羅列となっている。よって、印刷におけるインクを細胞、用紙を足場、書体を成長因子・遺伝子に置き換えてイメージすると解りやすいかもしれない。

4.1 用紙に描くように組織・臓器を作る

臨床分野において、ティッシュエンジニアリングの最終目的は、移植可能な組織・臓器の作製である。

どのような方法で、安易、安全、安価、安定的に臓器をつくるかが論点となり、これまで多くの方法でアプローチがなされてきた。人工臓器の置換や臓器移植による治療も行われているが、いまだ抜本的治療には至っていない。そのような中で、新たな治療法として最近注目を浴びているのが印刷技術を用いた組織・臓器の作製法である。

4.2 印刷のインクとティッシュエンジニアリングの細胞

紙印刷の手技として、最も普及しているインクジェット式プリンタは、ドットプロットと呼ばれるノズルからインク球を印刷媒体に噴霧することにより印字・印刷するという方式である。この方式を応用し、インクの代わりに細胞をノズル穴から噴射して組織・臓器を作製する方法が開発

されている。また通常、印刷インクは平面に散布されるため、印刷物は平面的になるが、インクとして使用する細胞をある程度のまとまった数で球状化し大型化、あるいは積層することで立体的なものを作製することも可能となっている。

4.3 印刷の用紙とティッシュエンジニアリングの足場

印刷する際、印字・印刷する用紙などが必要である。最も利用されているものは紙であるが、印刷技術の進歩によって、無機物・有機物様々な素材に印刷が可能となった。ティッシュエンジニアリングにおいて、細胞をインクとして印刷した場合、細胞が接着し生存可能となる環境が必要となる。さらに、細胞は乾燥状態では生存は出来ないため、液性環境下で細胞が接着しその場に留まり、生存できる環境が必要である。このように、細胞が接着して留まり生存するための居場所は、足場(Scaffold)と呼ばれるしており、あらかじめ形状を立体化したものに細胞を留め生存させることなどの方法で、平面から立体的な構造体を作製することが可能となっている。現在、様々な素材・形状の足場素材が開発・研究されている。

4.4 印刷の書体とティッシュエンジニアリングの成長因子・遺伝子

印刷物を作成する際、公文書に使用するなら明朝体、ポスターならゴシック体、あるいは文字の大きさを変えるなど用途に合わせて書体を変更し最適化を行う必要がある。3Dプリンタで構造体を作製する場合も、目的とする組織・臓器のために細胞を最適化することが必要となる。その為に必要なものとして成長因子・遺伝子などがあげられる。

現在、作製時に組織・臓器から得た細胞からそれらを作製するのではなく、間葉系幹細胞から、分化・誘導をすることにより細胞を最適化し、様々な組織・臓器を作製する試みがなされている。近年、間葉系幹細胞のみではなくiPS細胞等を用いた再生医療やティッシュエンジニアリングの進展も望まれている。

5. バイオ3Dプリンタを用いた立体的細胞構造体の作製

簡便に安定的に組織・臓器を作製するため、ティッシュエンジニアリング分野では様々な装置が開発され導入されている。CADなどのシステムを利用した、コンピュータ技術の導入により、光学造形法、粒子体積法、シート堆積法など様々な三次元積層造形法が開発された。そのよう

な中で、近年3Dプリンタの利用用途の広がり注目が集まっている。

われわれも、独自に開発したバイオ3Dプリンタを用いて、細胞のみ(Scaffold-free)で作製した立体的な細胞構造体の作製を行っている。

5.1 バイオ3Dプリンタを用いた細胞凝集塊積層技術の開発

単離した細胞を非接着状態で培養すると細胞間接着による胞凝集塊を形成し、アノイクス(anoikis)を回避する。この細胞凝集現象は(図1)、100年程前には報告されており¹¹⁾、カドヘリン(Cadherin)という細胞間接着分子により起こると考えられ^{12,13)}、下等生物から高等生物まで保存されている。この現象を利用して形成された細胞凝集塊は、ティッシュエンジニアリングの分野ではMulticellular spheroid(スフェロイド)とも呼ばれ、単層培養に比べて細胞が生体に近い機能を発現すると報告されている¹⁴⁾。現在、スフェロイドを用い、構造体の立体化を試みているいくつかのグループは、鋳型にスフェロイドを流し込み、細胞の融合により立体化させる方法を用いている。この方法で、肝臓細胞で厚さ200 μm 程度、軟骨細胞で1~2mm程度の構造体の作製が可能となっている¹⁵⁾。



図1 細胞凝集現象

しかし、臨床応用可能な組織・臓器を作製するためには、さらに大型の構造体を作製する必要がある。そこで、われわれは生け花の剣山状に配置された針にスフェロイドを仮止めし、目的の構造に積層する方法を開発した¹⁶⁾。これは、スフェロイドを仮止めし、数日培養することによりスフェロイド同士を融合させる方法である。スフェロイドの融合後、構造体から針を除去することにより、目的の構造体を維持した立体的細胞構造体の作製が可能となった¹⁶⁾(図2)。



図2 スフェロイド積層による立体的構造体の作製

5.2 バイオ3Dプリンタを用いた細胞積層の自動化

構造体作製に使用するスフェロイドサイズは、極めて小型で、強度についても手作業で作業するには頼りない。なにより、組織・臓器など複雑な構造に合わせてスフェロイドを配置化することは極めて困難で途方もない労力が必要である。そこで、われわれは、安定的で簡便なスフェロイド積層技術としてバイオリピッドプロトタイピングシステム（Bio-rapid prototyping）の開発を行った。

これは、従来工業分野で使用されていたラピッドプロトタイピング（Rapid prototyping）にインスパイアされた方法である。ラピッドプロトタイピングとは、製品開発においてデザインマップに合わせて3次元CADデータを作成し、立体構造体を作製する積層造形法の一つである。これらは、インクジェット法など様々な方法に分類されているが、総称して3Dプリンタと呼ばれるため、われわれの開発したバイオリピッドシステムも厳密にはプリンタではないものの3Dバイオプリンタと位置付けて呼んでいる（図3）。



図3 バイオ3Dプリンタ

われわれの作製したシステムを用いて、作成したデザインマップに合わせて積層を行った立体的構造体の作製が可能となった（図4）。また、細胞種の組合せも可能なため、将来的には、血管網など複雑な構造を持つ組織・臓器を作製することも十分に期待できる。

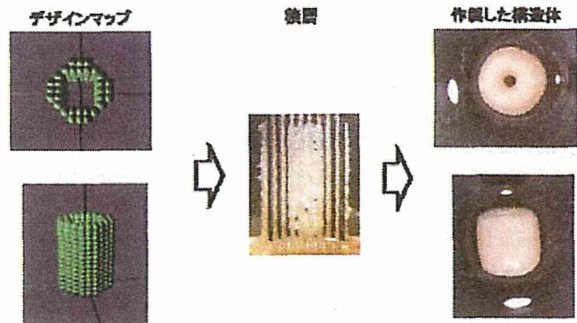


図4 デザインマップに合わせて作製した構造体

6. おわりに

現在、医療・研究分野において、3Dプリンタなどを利用した立体的構造物作製について様々な報告がなされている。細胞を採取培養後、組織・臓器を作製し移植するために（図5）、どのような細胞や方法を用いれば、移植可能な組織・臓器の作製が出来るのかなど、現状では様々な課題が残されている。今後、プリンティング技術の開発やティッシュエンジニアリングの研究により、新たな組織・臓器の作製方法や治療法が確立していくことが望まれている。

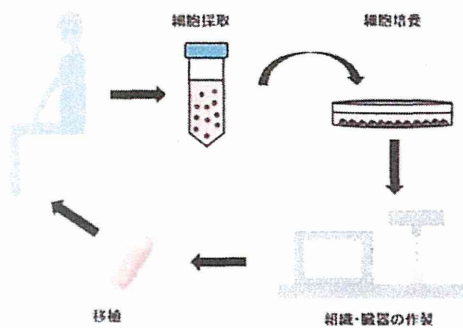


図5 組織・臓器作製の流れ

また、プリンタ技術などを用いて作製した立体的構造体を用いることで、生体外でもより生体に近い研究が行える。可能性が示唆されている。実際、細胞毒性評価や動物実験にかわる有用な手段として応用化が進められている。

われわれも3Dプリンタによる簡単・安定的な組織・臓器の作製を目指し、様々な細胞種を用いて血管様管状構造体や軟骨様構造体作製を行っている。将来的には、安全面や安定供給やコストなどの課題をクリアした、自己細胞か

ら作製された組織・臓器の移植が可能となると期待している。

参考文献

- 1) Jones N, Nature, 468 (7325) : 752-3, 2010.
- 2) Patrascu JM, Freymann U, et al. J Bone Joint Surg Br. 92 (8) : 1160-1163, 2010.
- 3) Yamada N, Okano T, et al. Makromol Chem Rapid Comm. 11 (11) : 571-576, 1990.
- 4) Okano T, Yamada N, et al. J Biomed Mater Res. 27 (10) : 1243-1251, 1993.
- 5) Shimizu T, Yamato M, et al. Tissue Eng. 7 (2) : 141-151, 2001.
- 6) Nishida K, Yamato M, et al. N Engl J Med. 351 (12) : 1187-1196, 2004.
- 7) Ishino Y, Sano Y, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 45 (3) : 800-806, 2004.
- 8) Sawa Y, Miyagawa S, et al. Surg Today. 42 (2) : 181-184, 2012.
- 9) Langer R, Vacanti JP. Science. 260 (5110) : 920-6, 1993.
- 10) Cao Y, Vacanti JP, et al. Plast Reconstr Surg. 100 (2) : 297-302, 1997.
- 11) Wilson H. J Exp Zool. 5 (2) : 245-258, 1907.
- 12) Townes PL, Holtfreter J. J Exp Zool. 128 (1) : 53-120, 1955.
- 13) Steinberg MS. Science. 137 (3532) : 762-3, 1962.
- 14) Chang TT, Hughes-Fulford M. Tissue Engineering Part A. Vol.15, No.3: 559-567, 2009.
- 15) Miyazaki T, Miyauchi S, et al. Tissue Eng Part A. 16 (5) : 1575-84, 2010.
- 16) K. Nakayama: Biofabrication: Micro- and Nano-fabrication, Printing, Patterning and Assemblies, P1-16, ELSEVIER, 2013.

「印刷」の歴史をたどる

Evaluation of bioactivity of alkali- and heat-treated titanium using fluorescent mouse osteoblasts

Masako Tsukanaka · Koji Yamamoto · Shunsuke Fujibayashi · Deepak K. Pattanayak · Tomiharu Matsushita · Tadashi Kokubo · Shuichi Matsuda · Haruhiko Akiyama

Received: 1 July 2013 / Accepted: 5 November 2013 / Published online: 6 December 2013
© The Japanese Society for Bone and Mineral Research and Springer Japan 2013

Abstract Stimulation of osteoblast proliferation and differentiation is important for the *in vivo* bone-bonding ability of biomaterials. Previous *in vitro* studies have used biochemical assays to analyze osteoblast-specific gene expression in cultured osteoblasts. In this study, we generated transgenic mice harboring a monomeric red fluorescent protein 1 transgene under the control of a 2.3-kb fragment of the *Colla1* promoter, which is active specifically in osteoblasts and osteocytes. We established a fluorescent primary osteoblast culture system to allow noninvasive observation of osteoblast proliferation and differentiation on opaque materials *in vitro*. We used this system to evaluate alkali- and heat-treated titanium, which has a strong bone-bonding ability *in vivo*, and we observed a rapid increase in fluorescence intensity and characteristic multifocal nodule formation. A cell proliferation assay and RT-PCR to examine osteoblast-specific gene expression showed increased osteoblast proliferation and differentiation consistent with the fluorescence observations. This mouse model allowed us to use fluorescence intensity to visualize and quantify *in vivo* newly formed bone around implanted materials in femurs. The use of these fluorescent osteoblasts is a promising method for simple screening of the bone-bonding ability of new materials.

Keywords Fluorescence imaging · Bone-bonding ability · Biomaterial evaluation · Osteoblast calcification · *Colla1*

Introduction

Various biomaterials are available for joint implants, bone substitutes, and fixation devices. Many alloys and surface treatments have been developed to improve their affinity with bone tissue. The bone-bonding ability of these biomaterials is usually evaluated using animal experiments in which the biomaterial of interest is implanted into bones of large animals, such as dogs and rabbits, the bonding force is measured mechanically using a detaching test [1], and the material–bone interface is evaluated histologically. In practical terms, large animal experiments are the most valid method for predicting outcomes in humans. However, because of the high cost of the animals, long experimental periods, and time-consuming assay procedures, such models are not ideal for screening a large number of new biomaterials.

To overcome these problems, *in vitro* methods have been introduced to measure proliferation and osteoblastic differentiation of cultured cells on biomaterials. However, there remain several drawbacks. First, to evaluate osteoblastic differentiation by analyzing osteoblast-specific marker genes and protein levels, cell cultures need to be stopped at each examination time point, and this hampers time-lapse observations of the same sample. Second, the cultured cells do not differentiate uniformly on the material of interest, and the positional information is inevitably lost by homogenization of the cells to extract proteins and mRNA. Third, because most biomaterials are not

M. Tsukanaka · K. Yamamoto · S. Fujibayashi · S. Matsuda · H. Akiyama (✉)
Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Shogoinkawahara-cho 54, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan
e-mail: hakiyama@kuhp.kyoto-u.ac.jp

D. K. Pattanayak · T. Matsushita · T. Kokubo
Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University, Matsumoto-cho 1200, Kasugai, Aichi 487-8501, Japan

translucent, cells growing on the material cannot be visualized using standard light microscopy. Fourth, most of the biochemical assay procedures are cumbersome and require many reagents and complex equipment, which introduce the potential risk of contamination and technical errors.

In this study we established a new evaluation system to: (1) simplify the *in vitro* assay procedure to facilitate high-throughput screening and (2) enable serial evaluation of cell differentiation on the same metal sample without losing positional information.

Fluorescent proteins are used widely in noninvasive imaging of living cells. Fluorescence imaging systems are useful in the field of biomaterial evaluation because the opacity and the surface roughness of most biomaterials prevent the use of light microscopy to obtain focused images. High-resolution images from selected depths can be obtained using fluorescence bioimaging with a confocal laser scanning microscope. Several applications of fluorescence bioimaging technology for biomaterial evaluation have been reported. Blum et al. [2] used a rat fibroblastic cell line transfected by retroviral vectors harboring enhanced green fluorescent protein (eGFP) and luciferase expressed through the cytomegalovirus promoter to visualize cells seeded in a hydrogel material and on titanium fiber mesh. Xia et al. [3] visualized cell survival in scaffolds after *in vivo* implantation of human mesenchymal stem cells transfected by retroviral vectors encoding eGFP. These methods are useful for evaluating cell shapes and numbers on materials but they do not provide information about the differentiation status of the cells. To visualize the differentiation of cells grown on biomaterials, it is necessary to restrict the expression of fluorescence to specific stages of cell differentiation.

The 2.3-kb fragment of the promoter of *Coll1a1* is an osteoblast-specific promoter which was reported by Dacic et al. [4] to become active specifically in differentiated osteoblasts and osteocytes [5]. In this study, we generated transgenic mice harboring a monomeric fluorescent protein 1 (*mRFPI*) transgene under the control of the *Coll1a1* 2.3-kb promoter (*Coll1a1(2.3 kb)-mRFPI* mice). Using calvarial osteoblasts harvested from this mouse line, we established a primary osteoblast culture system to visualize osteoblast differentiation on biomaterials.

To validate this system using fluorescent osteoblasts, we evaluated alkali- and heat-treated titanium as a positive control because this surface treatment improves the bone-bonding ability of titanium metal. We have reported excellent bone-bonding ability with this treatment evaluated by mechanical tests using large animals [6] and favorable clinical outcomes of hip implants that have received this treatment [7]. Enhanced osteoblastic differentiation of osteoblasts on titanium plates after alkali and heat treatment has been reported by Isaac et al. [8].

By analyzing the fluorescent images obtained longitudinally from the same samples, we quantified fluorescence as an indicator of gene expression and the development of mineralized nodules. This system revealed a rapid increase in fluorescence intensity and a characteristic multifocal developmental pattern of calcified nodules in cells grown on alkali- and heat-treated titanium plates. We performed *in vivo* evaluations of alkali- and heat-treated titanium used in transgenic mice, and we obtained results similar to those obtained from our *in vitro* evaluation. This is the first report to show: (1) the *in vitro* and *in vivo* use of a fluorescence bioimaging system established from transgenic mice harboring an *mRFPI* transgene under the control of the osteoblast-specific 2.3-kb fragment of the *Coll1a1* promoter for biomaterial evaluation and (2) the pattern of longitudinal nodule development on biomaterials using images obtained noninvasively from the same samples.

Materials and methods

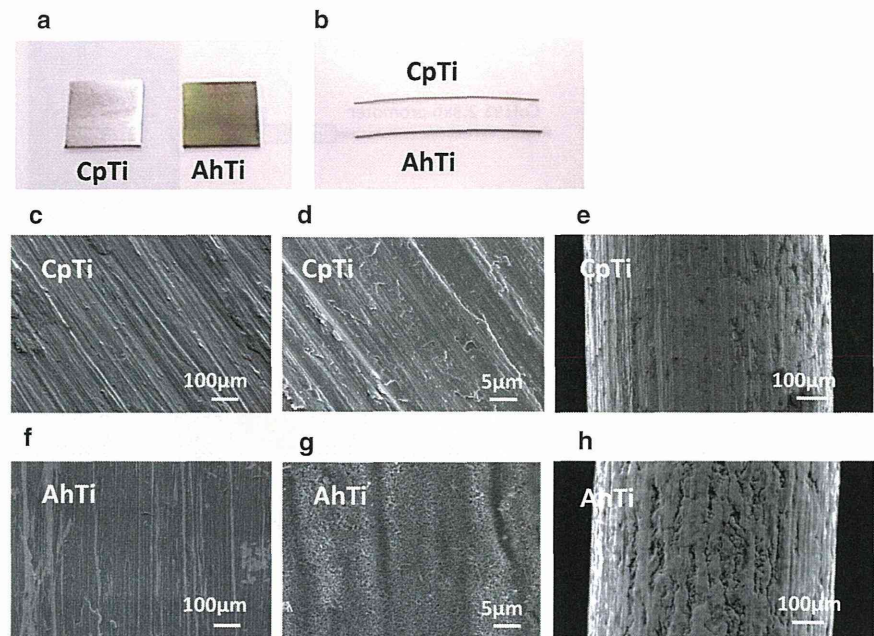
Preparation of titanium materials

Commercially pure (99.5 %) titanium (CpTi) plates (Nilaco Co., Tokyo, Japan) were cut to the sizes of 18 × 18 × 1 mm for 6-well culture plates and 14 × 14 × 1 mm for 12-well culture plates, and the titanium plates were polished with number 400 diamond plate. Alkali- and heat-treated titanium (AhTi) samples were produced as described previously [6]. Briefly, titanium plates were soaked in 5 M NaOH at 60 °C for 24 h and subsequently heated at 600 °C for 1 h. The previously reported mean average surface roughness (Ra) and maximum roughness (Rmax) of the titanium plates were 0.32 and 3.63 μm for CpTi, and 0.35 and 4.13 μm for AhTi, respectively [9]. For *in vivo* experiments, pure titanium wires with a diameter of 0.6 mm (Nilaco Co.) were used. All samples were sterilized in ethylene oxide gas before use. Photographs of these materials are shown in Fig. 1a, b.

Scanning electron microscopy

The materials were observed using a field-emission scanning electron microscope (SEM) (S-4700; Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) at an acceleration voltage of 5 kV. The SEM images of the samples are shown in Fig. 1c–h. To observe the cells on the materials, 2 days after seeding mouse calvarial osteoblasts on CpTi and AhTi plates, the cells were fixed in 2 % glutaraldehyde for 1 h. The plates were rinsed gently with 0.1 M phosphate buffer at pH 7.2, dehydrated in an ethanol series, frozen in tert-butyl alcohol, freeze-dried, and sputter-coated with gold and palladium.

Fig. 1 Images of the materials. **a** Photograph of CpTi and AhTi plates for in vitro cell culture. **b** CpTi and AhTi wires for in vivo experiments. **c** Scanning electron microscope (SEM) image of the surface of a CpTi plate. **d** High-magnification image showing the smooth surface of a CpTi plate. **e** SEM image of a CpTi wire. **f** Low-magnification image of the surface of an AhTi plate is similar to that of a CpTi plate. **g** Submicron rough structures observed on an AhTi plate. **h** SEM image of an AhTi wire



Animals

C57BL/6 transgenic mice harboring the *mRFP1* gene under the control of the 2.3-kb *Colla1* promoter fragment (*Colla1*(2.3 kb)–*mRFP1* mice) were created (Fig. 2a). Genotyping was performed by PCR using the primers 5′-TCC CCGACTACTTGAAGCTG-3′ and 5′-CTTGGCCATGTAG GTGGTCT-3′, which amplify 317 bp of *mRFP1* (Fig. 2b). The animal care and experimental procedures used were approved by the Animal Research Committee, Kyoto University, and were performed according to the Regulation on Animal Experimentation at Kyoto University.

Cell culture

Primary mouse calvarial osteoblasts were harvested from the calvaria of 1- to 5-day-old neonatal transgenic mice using a modification of a previously described protocol [10]. Calvarial bone fragments were subjected to five sequential 15-min digestions in medium containing 0.1 % collagenase P (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) and 0.00125 % trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and cell fractions 3–5 were collected. Cells were seeded at a density of 3×10^5 and 1×10^5 cells/well in 6- and 12-well tissue culture polystyrene plates, respectively, containing the titanium plates on the bottom. Cells were grown in osteogenic medium comprising DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Tissue Culture Biologicals, Long Beach, CA, USA), 10 mM β -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 80 μ g/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich), and 10^{-8} M dexamethasone (Sigma-Aldrich) at

37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ and 95 % air. The culture medium was replaced every other day.

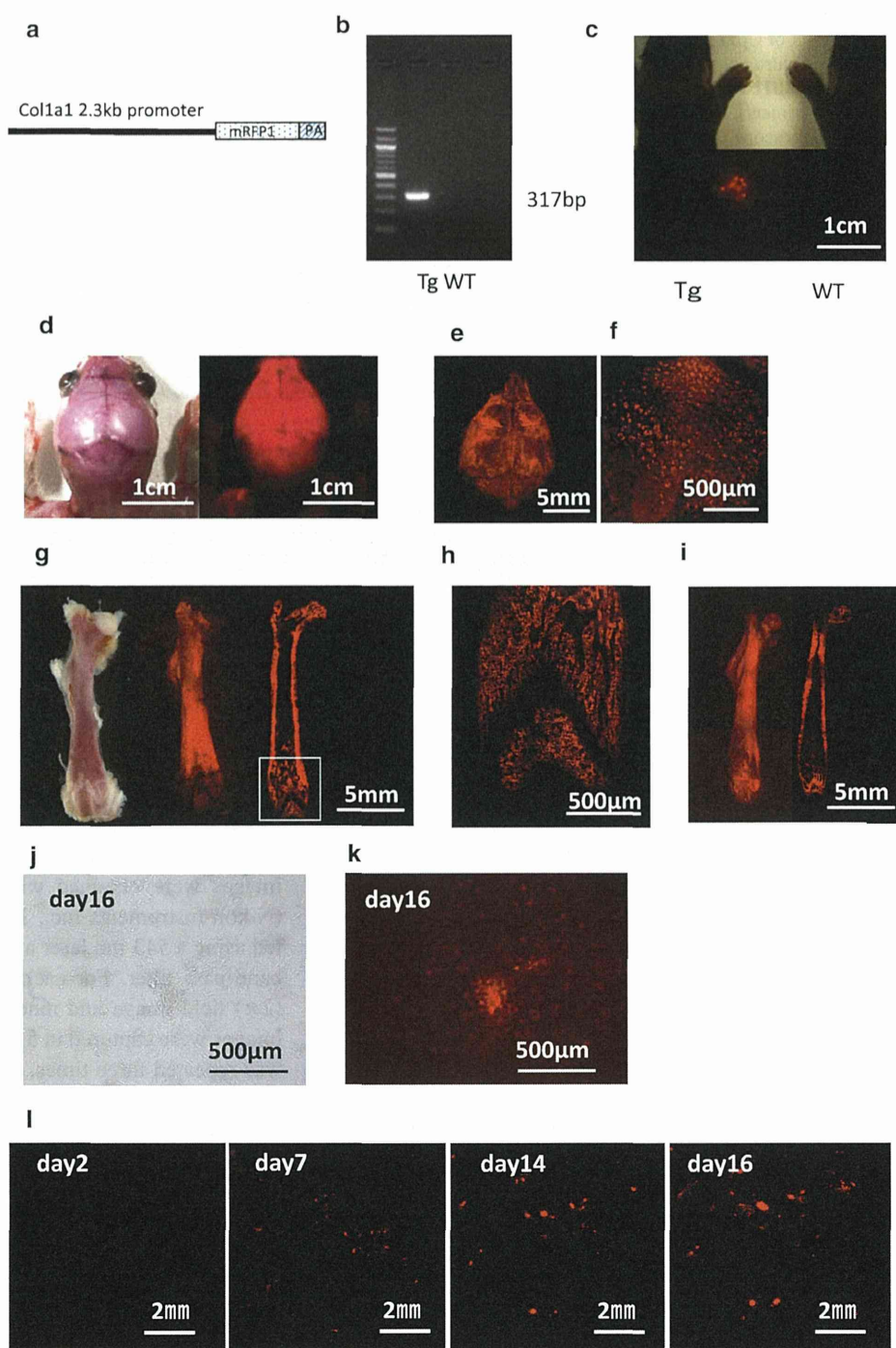
Confocal laser scanning imaging of cell cultures

Fluorescence imaging of cultured cells was performed every 4 days after seeding until day 28. Fluorescence images were obtained with a confocal laser microscope (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). mRFP1 was excited using a 543 nm laser and detected through a 590/50 nm band-pass filter. For each sample, one low-magnification (2 \times) field image and nine high-magnification (10 \times) field images were captured in 512 \times 531 pixels. The experiment was repeated three times, and the pinhole setting and contrast gain were maintained for all scans at the same magnifications. The images were analyzed using NIH ImageJ free software available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>. The number of red pixels was counted in each sample. The threshold was maintained for all images. The intensity of mRFP1 expression (total fluorescent area) was defined as the total number of red pixels from nine high-magnification (10 \times) fields. Red fluorescent spots of >10 pixels in low-magnification images (2 \times) were considered to be calcification nodules, and the number and the size of nodules were analyzed using the “Analyze Particle” function of ImageJ.

2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide reduction assay

To measure cell numbers 2, 7, and 16 days after seeding, an XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-

Fig. 2 Establishment of *Col1a1*(2.3 kb)-*mRFP1* transgenic mice. **a** The structure of the *Col1a1*-*mRFP1* transgene is shown. The *mRFP1* transgene is under the control of the 2.3-kb fragment of promoter of *Col1a1*. **b** Genomic PCR analysis of the *mRFP1* transgene. **c** *mRFP1* expression was observed in the limb skeleton of a 7-day-old transgenic mouse. **d** High expression of *mRFP1* was observed in a calvarium of a 7-day-old transgenic mouse. **e** Confocal fluorescence images of a calvarium. **f** Individual osteoblasts are visualized in a high-magnification image. **g** Fluorescence images of an extracted femur of a 3-week-old mouse. **h** Zoomed image of the white boxed area in the frozen section image shown in (g). **i** Macro and frozen-section fluorescence images of a 10-month-old transgenic mouse. **j** Microscopic image of cell culture on day 16. **k** *mRFP1* was observed in the dense cellular area. **l** Serial observations of cultured osteoblasts grown on a titanium plate. Development of nodules can be seen



sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] reduction assay was performed as described previously [11]. Briefly, 500 μ l of XTT working solution was added to each well, the cells were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 6 h, and the absorbance was measured on a microplate reader (Thermo LabSystems, Cheshire, UK). Specific absorbance was calculated as follows: specific

absorbance = A450 nm (test) - A450 nm (blank) - A630 nm (test).

RT-PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the

manufacturer's instructions. The quality of RNA was confirmed by electrophoresis using an agarose ethidium bromide gel. From each sample, 200 ng of RNA was reverse-transcribed with random primers using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science). Real-time PCR was performed to assess the expression levels of the genes type I collagen (*Coll1*), osteocalcin (*Ocn*), and alkaline phosphatase (*Alp*) using the carousel-based LightCycler system (Roche) with FastStart DNA Master SYBR Green (Roche). The primers were as follows: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*), 5'-TGTCCGTCGTGGATCTGAC-3' and 5'-CC TGCTTACCACCTTCTTG-3'; *Alp*, 5'-ACTCAGGG CAATGAGGTCAC-3' and 5'-CACCCGAGTGGTAGTCAAA-3'; *Coll1*, 5'-CTCCTGGCAAGAATGGAGAT-3' and 5'-AATCCACGAGCACCCTGA-3'; and *Ocn*, 5'-AG ACTCCGGCGCTACCTT-3' and 5'-CTCGTCACAAGCAGGTTAAG-3'.

Surgical procedure

Ten-week-old male *Coll1*(2.3 kb)-*mRFP1* mice were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (40 mg/kg). The lateral thigh and knee joint were incised, and the knee joint was opened by medially dislocating the patella. A hole was drilled into the intercondylar fossa with a 23-G needle, and a treated or untreated titanium wire was tapped from the hole into the medullary cavity until it broke through the cortex of the greater trochanter. Both ends of the wire were bent and trimmed, and the knee joint and skin were sutured after reducing the patella.

Imaging of mRFP1 fluorescence of the intramedullary wires

Mice were killed 28 days after the implantation. The distally protruding wire was cut and the rest of the wire was pulled out proximally. From the distally cut end, 2 mm was excluded, and the remaining 8 mm was set as the region of interest. Fluorescence images were obtained just after wire removal using a stereomicroscope (SZX12; Olympus, Tokyo, Japan) equipped with a fluorescent lamp system with the same conditions and exposure time. For each wire, the entire circumference was captured in two images taken from the top and the bottom. The number of red pixels on the wire was counted.

Histological examination

Twenty-eight days after implantation, the mice were killed and the right femur was removed, fixed in 10 % phosphate-buffered formalin (pH 7.25) for 7 days, and

dehydrated in an ethanol series. The specimens were then embedded in EpoFix Resin (Struers, Ballerup, Denmark) and cut with a band saw (BS-3000CP; EXACT cutting system, Norderstedt, Germany) perpendicular to the longitudinal axis of the femur. For each sample, three sections were chosen (subtrochanteric, middle shaft, and supracondylar regions). The sliced samples were ground to a thickness of 40–60 μ m using a grinding–sliding machine (microgrinding MG-4000; EXACT). The sections were stained with Van Gieson's picrofuchsin [12]. The ratio of bone contact relative to the total perimeter of the implant was defined as the affinity index and was quantified using ImageJ.

Statistical analysis

The data are presented as the mean \pm SD and were assessed using Student's *t* test to compare two groups. Differences with *p* < 0.05 were considered significant.

Results

Specific expression of red fluorescence was observed in vivo in bone tissues and in vitro in differentiated osteoblasts

To verify the tissue specificity of mRFP1 expression, fluorescent images were obtained in neonatal mice. Images of forelimbs of a 7-day-old transgenic mouse using light and fluorescence microscopy are shown in Fig. 2c. Red fluorescence in the limb skeleton was observed through the skin of the transgenic mouse. The calvarial bone showed a high level of expression of mRFP1 (Fig. 2d). Each osteoblast was visualized in the calvaria using a confocal laser microscope (Fig. 2e, f). Macrofluorescence photography and observations of frozen sections of an exposed femur of a 3-week-old transgenic mouse showed no fluorescence in the growth plate and articular cartilage (Fig. 2g, h). The sustained expression of mRFP1 was confirmed in a 10-month-old transgenic mouse (Fig. 2i).

To confirm this transgene expression in culture, cultured osteoblasts were observed with fluorescence imaging. Figure 2j, k shows images obtained using light and fluorescence microscopy to observe cultured osteoblasts in a polystyrene culture dish on day 16. Red fluorescence was observed mainly in areas dense with osteoblasts. Serial observation of osteoblasts on titanium plates using confocal microscopy showed that fluorescence became detectable around culture day 7 and the fluorescent area increased progressively over time (Fig. 2l).