

# 骨再生医療に用いる生体材料の表面性状の 最適化に関する研究

The surface property optimizations of biomaterials  
used in bone tissue engineering

2013 年 7 月

早稲田大学大学院 創造理工学研究科  
地球・環境資源理工学専攻 応用鉱物学研究

程 侃

Kan CHENG

# The Surface Property Optimizations of Biomaterials used in Bone Tissue Engineering

Kan Cheng

## Abstract

The surface property of artificial bone, percutaneous device and other biomaterials (scaffold) has received much attention in recent years owing to the effect on cellular functions, including adhesion, proliferation and differentiation. However, the correlation remains unclear between scaffold and cell morphologies of biomaterials, particularly cell attachment area of MSCs in the initial stage of culturing. In this study, ceramic and metal biomaterials are selected which are often used in bone tissue engineering and the surface properties of these biomaterials are discussed thus to further develop prediction technology of cell functions on various type of biomaterials. The detail topics include (1) an non-absorbent  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite disk (HAp/TCP); (2) various surface properties of hydroxyapatite disk (HAp); (3) a hydroxyapatite layer on titanium (Ti) or oxidized titanium ( $\text{TiO}_2$ ). Chapter two also emphasized that apatite layers were fixed immovably on oxidized titanium thus proteins were successfully immobilized.

This article is composed of six chapters.

First chapter is focused on research background and summaries especially experimental methods in the research. In order to reveal the correlation between cell functionality and biomaterials, or cell adhesion morphology and cell differentiation in initial stage, understanding the form of cell initial contacts on biomaterials becomes critical. For cell adhesion morphological of biomaterials in its initial stage, visualization techniques and evaluation techniques were specially developed. Applying techniques described above is for exploring correlation of cell functionalities of biomaterials and expecting to develop predictive technology of cell differentiation according to contact areas of cell initial formation. For the types of biomaterials such as metal, ceramic, etc.,

their surface properties will be adjusted via physical or chemical treatment such as heat process or acid treatment, etc., so that to systemically study modification of cell morphology and cell differentiation.

Second chapter describes a two-step method to fabricate a fibroblast growth factor (FGF)-2/ apatite composite layer and to immobilize FGF-2 on anodically oxidized titanium pins at room temperature. Anodically oxidized titanium pins pre-coated with a homogeneous apatite layer were immersed in a supersaturated calcium phosphate solution containing FGF-2 at 25°C for 24 hours. The contents of FGF-2 on the FGF-2-apatite composite layer were found to be  $0.41 \pm 0.12 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . The FGF-2 was immobilized not by adsorption but by co-precipitation with apatite on the titanium pins.

Third chapter describes the correlation between cell attachment areas after 2 hours of culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells (rMSCs) on non-absorbent  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxyapatite disk (HAp/TCP). The results illustrate that the  $\beta$ -TCP particles on disk surface and the characteristics of collection from hydroxyapatite particles may affect the cell attachment areas in initial stage cultured on a surface of materials and also osteogenic differentiation activity. In summary, optimization of the surface condition on non-absorbent TCP/HAp material was established.

Forth chapter focused on the correlation between cell attachment areas after 2 hours of culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells (rMSCs) on various surfaces of hydroxyapatite disks (HAp). Involving ceramic raw material and hydroxyapatite powder, present study demonstrates that a wide range of crystal grain size distribution and surface of fine structure on apatite disks can be manufactured systematically depending on various types of sintered temperatures. Further, on these type surfaces of hydroxyapatite disks sowing rMSCs, a correlation was established between cell attachment area in the initial stage and osteogenic differentiation activity in the culture after 3 weeks. In particular, a correlation is determined between the hydroxyapatite particle sizes of the disk surface and the cell attachment area. The results showed that the smaller cell attachment area usually the higher the osteogenic differentiation activity.

Fifth chapter is for correlation between cell attachment areas after 2 hours of

culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells (rMSCs) on a hydroxyapatite layer of titanium(Ti) or oxidized titanium ( $\text{TiO}_2$ ). After immersion in the supersaturated calcium phosphate solution, apatite layers synthesized Ti,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti, and  $300^\circ\text{C}$ -Ti plates. By identifying these different types of morphological, and chemical, and/or structural characteristics, the correlation between cell attachment areas and osteogenic differentiation activity is determined. Finally, this chapter describes the technical feasibility of cell differentiation and forecast on biomaterials.

Last Chapter summarized conclusion of the study and the future direction of development.

• Abstract

第 1 章 緒論.....	1
1.1 背景・目的 .....	1
1.2 主な材料分析方法 .....	7
1.2.1 走査電子顕微鏡 .....	7
1.2.2 薄膜 X 線回折.....	7
1.3 細胞.....	8
1.3.1 間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell).....	8
1.3.2 主な細胞観察方法 .....	9
1.3.3 細胞初期接着形態の画像化技術.....	9
1.3.4 解析手順.....	10
1.3.5 細胞初期接着面積 .....	11
第 2 章 陽極酸化チタンピン上への繊維芽細胞成長因子(FGF)-2/アパ イト複合層の形成.....	12
2.1 緒言.....	12
2.1.1 研究目的.....	12
2.1.2 研究背景.....	13
2.1.3 創外骨折固定 .....	14
2.1.3.1 創外骨折固定とは .....	14
2.1.3.2 創外骨折固定器具 .....	15
チタンスクリュー、創外骨折固定器の種類、 創外固定法の長所と短所、創外固定法の適応、合併症	
2.1.4 骨の修復.....	18
2.1.4.1 骨折の治癒.....	18
2.1.4.2 一次性骨癒合 .....	19
2.1.4.3 骨折治癒に影響を及ぼす因子 .....	19
2.1.5 タンパクーリン酸カルシウム共沈担持法 .....	20
2.1.5.1 リン酸カルシウム過飽和溶液 .....	20
2.1.5.2 繊維芽細胞成長因子(FGF-2) .....	21
2.2 溶液及び評価方法 .....	22
2.2.1 溶液 .....	22
2.2.1.1 含カルシウム溶液 .....	22
リンゲル液(Ringer's Solution)、	

コンクライトーCa液(Conclyte-Ca Solution)	
2.2.1.2 含リン溶液.....	23
クリニザルツ B(Klinisalz B)、ソリターT2(SOLITA-TNo.2)	
コンクライト液ーPK(Conclyte-PK Solution)	
2.2.1.3 pH 調整剤 .....	26
バイフィル(Bifil)専用炭酸水素ナトリウム補充液、 メイロン液(Meylon Solution)	
2.2.1.4 その他 .....	27
フィブラストスプレー500	
生理的食塩水(physiological salt solution)	
2.2.2 評価方法.....	28
2.2.2.1 走査電子顕微鏡 .....	28
原理、観察条件	
2.2.2.2 誘導結合プラズマ発光分析装置 .....	29
原理、測定条件、検量線	
2.2.2.3 紫外可視分光光度計 .....	30
原理、測定条件、検量線	
2.2.2.4 粉末 X 線回折 .....	31
原理、測定条件	
2.3 医療用輸液混合溶液のリン酸カルシウム形成能評価 .....	32
2.3.1 実験目的.....	32
2.3.2 実験操作.....	32
2.3.2.1 パラメータについて .....	32
基本型の混合法、発展型の混合法	
2.3.2.2 混合条件 .....	35
基本型、発展型	
2.3.2.3 実験手順 .....	38
2.3.3 実験結果.....	39
2.3.3.1 pH 測定データ及び pH 図 .....	39
2.3.3.2 ICP データ及び ICP 図 .....	45
ICP データ及び図(37℃)、ICP データ及び図(50℃)	
2.3.4 考察 .....	49
2.3.4.1 pH 図について .....	49
2.3.4.2 ICP データについて .....	50
2.3.4.3 パラメータについて .....	50
2.4 陽極酸化 Ti 棒のリン酸カルシウムコーティング層 .....	52

2.4.1	実験目的.....	52
2.4.2	実験操作.....	52
2.4.2.1	基材について .....	52
2.4.2.2	リン酸カルシウム過飽和溶液処理.....	53
2.4.3	実験結果.....	53
2.4.3.1	Ti 棒上のリン酸カルシウムの析出量 .....	54
2.4.3.2	SEM 写真及び EDX 結果.....	56
	SEM 写真及び EDX 結果グラフ、 EDX スペクトルのピーク面積強度比	
2.4.4	考察 .....	85
2.5	陽極酸化 Ti 棒への FGF-2-リン酸カルシウム層形成.....	86
2.5.1	実験目的.....	86
2.5.2	実験操作.....	86
2.5.3	実験結果.....	87
2.5.4	考察 .....	95
2.6	FGF-2 担持による細胞活性化評価.....	98
2.6.1	実験目的.....	98
2.6.2	実験操作.....	98
2.6.1.1	Ti スクリューについて .....	98
2.6.2.2	実験手順.....	98
	RKB 液を使用したコントロールの作製、 FGF-2 担持 Ti スクリューの作製、FGF-2 の抽出、 細胞実験による FGF-2 の活性評価方法	
2.6.3	実験結果.....	107
2.6.3.1	FGF-2 担持量 .....	107
2.6.3.2	ICP データ及び ICP 図 .....	108
2.6.3.3	細胞による FGF-2 活性評価 .....	110
2.6.3.4	細胞写真.....	112
2.6.4	考察 .....	116
第 3 章	非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上におけるラット由来 間葉系幹細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関.....	118
3.1	実験目的 .....	118
3.2	実験材料 .....	118
3.3	実験結果 .....	118
3.3.1	非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上でのラット由来間葉系	

幹細胞(rMSCs)生存率及び初期接着面積 .....	118
3.3.2 非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での DNA 濃度 ....	121
3.3.3 非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での骨形成分化能	122
3.3.4 間葉系幹細胞の初期接着面積及び骨分化能との相関 .....	123
3.4 考察 .....	124
 第 4 章 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上におけるラット 由来間葉系幹細胞(rMSCs)初期接着挙動及び細胞分化能の相関 .....	126
4.1 実験目的 .....	126
4.2 実験材料 .....	126
4.3 実験結果 .....	126
4.3.1 アパタイトディスクの物性評価 .....	127
SEM 観察及び薄膜 X 線回折パターンを用いた種々アパタイトデ ィスクの表面性状分析	
アパタイトディスクの PBS(-)浸漬液の pH 値	
アパタイトディスクからのカルシウム溶解量	
4.3.2 アパタイトディスク上でのラット間葉系幹細胞初期接着形態 .	132
無血清培地で 2 時間培養後の細胞接着面積	
4.3.3 アパタイトディスク上での細胞分化能 .....	136
異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での DNA 濃度	
アパタイトディスク上でのオステオカルシン含有量	
異なる微細構造を有するアパタイトディスク上の間葉系幹細胞 初期接着面積及び骨形成分化能の相関性	
4.4 考察 .....	138
 第 5 章 アパタイト層で表面修飾したチタン上における間葉系幹細胞初 期接着挙動及び細胞分化能の相関 .....	141
5.1 実験目的 .....	141
5.2 実験方法 .....	141
5.3 実験結果 .....	141
5.3.1 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン板の物性評価 .....	142
種々のアパタイト層で表面修飾したチタン板の SEM 観察	
種々のアパタイト層で表面修飾したチタンの薄膜 X 線回析分析	
5.3.2 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での間葉系幹細胞の 初期接着面積 .....	145

5.3.3 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での骨形成分化能 .....	147
5.3.4 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での間葉系幹細胞初期接面積及び骨形成分化能の相関 .....	148
5.4 考察 .....	149
第 6 章 結論 .....	151

・ 謝辞

・ 参考文献

・ 参考資料

・ 研究業績

## 第 1 章 緒論

### 1.1 背景・目的

幹細胞等、生きた細胞を用いる再生医療は、従来型の対処療法的治療技術とは異なり、組織再生により構造・機能を回復させる先端的根治技術である。組織を再生するためには、細胞を操作・加工した後、患者様へ戻すプロセスが必要になるが、全く新しい治療技術であるため、各段階での細胞・組織の評価方法の確立が求められている。また、再生医療は、非常に新規性の高い分野であるがゆえに、既存の評価方法が役に立たない場合が多く、その場合、新たに評価方法を構築しなければならない。特に、事業の経済的見通しを明確化し、再生医療の実用化を推進するためには、細胞/再生組織が移植時に期待される機能を有していることを、培養の初期段階で予測評価・判定する技術が求められる。

我が国の独立行政法人産業技術総合研究所(以下、産総研)のヒューマンライフテクノロジー高機能生体材料研究部門では、現状の再生医療の経済的技術的問題を発展的に解決する方法として「生体内に埋入すると材料自身が細胞分化や組織再生を促がす」第 3 世代生体材料の開発を主テーマの 1 つとして研究を行っている。本研究は、産総研との共同研究により、生体材料における研究を補い、細胞生物学の視点を入れつつ、融合して一層の進展を計るため、「骨再生医療に用いる生体材料の表面性状の最適化に関する研究」をテーマとして研究を行ってきた成果である。

生体材料分野において、その表面性状とは濡れ性や、形態や、幾何形状や、弾性や、溶解性などを挙げられる。人工骨や経皮デバイスなどの生体材料(細胞の足場, scaffold)の表面性状は細胞、特に間葉系幹細胞(MSCs)の分化に大きくに影響を与えることがわかってきた。

具体的な内容を挙げると、まず、生体材料表面の濡れ性は間葉系幹細胞の分化に影響を与えることがわかってきた。

Olivares Navarrete<sup>[1]</sup>らは、サンドブラスト酸エッチング処理によりチタン板の前進接触角が 95.8°から 0°まで減少させ、超親水性を持つチタン上に培養した MSCs が骨芽細胞へ分化し、骨形成分化能を促進されることを示した。Aita<sup>[2]</sup>らは、紫外線処理によりチタン板の接触角が 90°から 10°以下に減少させ、超親水性になったチタン板状上における MSCs の接着性及び骨形成分化能を促進されることを示した。Curran<sup>[3]</sup>らは、脂肪族ポリエステルポリ ε カプロラクトン(PCL)とポリ(ラクチド-co-グリコリド)(PLGA)を異なる混合割合で膜状生体材料を作成し、(80wt% PCL+20wt%)親水的な表面性状を持つ PLGA 上における MSCs の骨形成分化能を促進されることを示した。Iviroco<sup>[4]</sup>らは、CLMA-co-HEA の 3D

多孔体が HEA 含有量より調整でき、30% HEA を含有する 3D 多孔体上に培養した MSCs の骨形成分化能を促進されることを示した。

また、生体材料表面上に修飾した官能基及びタンパク質は濡れ性を変化でき、MSCs の分化に影響を与えることがわかってきた。

—CH<sub>3</sub>、—OH、—COOH、及び—NH<sub>2</sub>で修飾した材料表面は細胞接着インテグリンを調整でき、細胞の分化などの挙動を変化させる<sup>[5,6]</sup>。

Curran<sup>[7,8]</sup>らは—NH<sub>2</sub>、—SH で修飾したガラス(TAAB)上に MSCs を培養し、骨形成分化能を促進することを報告した。また、Beroit<sup>[9]</sup>らは、リン酸官能基を導入したエチレングリコールハイドロゲル(PEG)は MSCs の骨形成分化能を促進する効果があった。官能基以外、タンパク質の例として、タンパク質であるフィブロネクチン(Fn)で修飾したデジタル・マイクロミラー・デバイス(DMD)上に培養した MSCs が骨形成分化能を促進することを認められた<sup>[10]</sup>。また、生体材料上に異なる構造をもつ同じタンパク質でも MSCs の骨形成分化能に影響を与えることが明らかにされた。

Mauney<sup>[11]</sup>らはラット尾より抽出した酸可溶性非変性 I 型コラーゲンが MSCs の骨形成分化能を促進した一方、変性 I 型コラーゲンが MSCs の骨形成分化能を促進しない結果となった。更に、細胞培養皿(TCPs)より、変性 I 型コラーゲン培養基材は MSCs の骨形成分化能を促進したことを報告した<sup>[12]</sup>。更に、タンパク質はアミノ酸で構成されているが、アミノ酸重合体のポリペプチドは MSCs の骨形成分化能を促進する効果もある。

Guo らは、RGD<sup>[13]</sup>や骨形成タンパク質(BMP-2)<sup>[14]</sup>で修飾した PLGA が MSCs の骨芽細胞分化能を促進することを示した。Chun<sup>[15]</sup>らは、注射型の感熱性ポリ(オルガノホスファゼン)ヒドロゲルをラットの背中に注射し、RGD を添加したヒドロゲルが MSCs の骨形成分化能を促進したことを報告した。Martino<sup>[16]</sup>らは、フィブロネクチン(Fn)断片はフィブロネクチンより MSCs の骨形成分化能を促進できることを報告した。

さらに、生体材料の表面形態は MSCs の分化に影響を与えることがわかってきた。

Olivares-Navarrete<sup>[1]</sup>らは、チタン板の粗さを 0.8μm から 3.22μm まで上昇し、MSCs の骨形成分化能を促進した。Balloni<sup>[17]</sup>らは、二重酸エッチング処理したチタン板上に培養した MSCs は骨形成タンパク質 2(BMP-2)、RNA から骨芽細胞特異的転写因子 cbfa1、Osx を発見し、I 型コラーゲン、ALP 発見を促進し、相対的な粗さがある表面が MSCs の骨形成分化能を促進する結果を認めた。Ruckh<sup>[18]</sup>らは、表面が粗いポリ ε-カプロラクトン(PCL) のナノファイバーがスムーズな PCL より、MSCs の ALP 発見、オステオポンチン、オステオカルシンの高濃度を示し、骨

形成分化能を促進されていることを報告した。また、脱細胞化された ECM 構造(PCL/ECM)は PCL より MSCs の骨形成分化能を促進されていることを示した<sup>[19]</sup>。ファイバー表面の粗さ以外、ファイバーの直径も MSCs の骨形成分化能に影響する。Takahashi<sup>[20]</sup>らは、ファイバーの直径、空隙率が異なる PET 織物上に MSCs を培養し、直径 9 $\mu$ m ファイバーかつ低い空隙率 PET 培養基材上における MSCs の ALP 発見、オステオカルシンの濃度が高く、骨形成分化能を促進する効果があったことを報告した。Ding<sup>[21]</sup>グループは異なるサイズの細胞接着を阻害する PEG 及び細胞接着を促進する RGD のポリペプチドを使用し、マイクロパターンニングした生体材料表面上に MSCs を培養し、細胞間の相互作用により脂肪細胞及び骨芽細胞の分化を促進されていることを示した。Dalby<sup>[22]</sup>らは深さ 120nm、間隔 200nm のポリメタクリル酸メチル(PMMA)上に培養したところ、MSCs は滑らかな PMMA 材料より骨形成分化能を促進した。また、チタンナノチューブ層を持つ生体材料上に MSCs を培養すると、直径 100nm のチタンナノチューブ層上における MSCs が骨芽細胞への分化を促進し、直径 30nm のチタンナノチューブ層上は MSCs の増殖しかできない結果が認められた<sup>[23,24]</sup>。Marletta<sup>[25]</sup>らは 10keV He で処理したマイクロ相分離の PCL は MSCs の高い骨形成分化能を示した。

また、幾何学的形状に対する生体材料は MSCs の分化に影響を与えることがわかってきた。

Ruiz<sup>[26]</sup>らは、マイクロ印刷技術で円形縞状フィブロネクチンをガラス表面上にコーティングし、MSCs を培養し、骨及び脂肪誘導培養液で、円形中心にいる MSCs が脂肪細胞へ分化し、中心の周りにいる MSCs が骨芽細胞へ分化したが、円形の直径に関係ない結果となった。更に、正方形、長方形、楕円、半楕円形の縞状の内側における MSCs が脂肪細胞へ分化し、外側における MSCs が骨芽細胞へ分化することを示した。同じように、凸面における MSCs は骨芽細胞へ分化しやすく、凹面における MSCs は脂肪細胞へ分化しやすい結果となった。すなわち、凸面に受ける応力は凹面に受ける応力の 3 倍、異なる応力で細胞骨格に影響した原因となり、MSCs が異なる分化方向になったと考えられる。

また、生体材料の弾性は MSCs の分化に影響を与えることもわかってきた。

MSCs は力学的な影響を受け、それに従って、生物反応を生じ、幹細胞の分化への影響を生じる。Engler<sup>[27]</sup>らは異なる弾性を持つ膜 PAAm 上の MSCs の骨形成分化能の影響を調べた結果、低い強度(0.1–1 Kpa)の場合、MSCs が神経細胞へ分化し、強度(8–17Kpa)の場合、MSCs が筋原細

胞へ分化し、強い強度(25–40Kpa)の場合、MSCs が骨芽細胞へ分化することを示した。更に、コラーゲン材料は PET を混入することで、コラーゲンの強度を上昇し、MSCs の骨形成分化能を促進する<sup>[28]</sup>。Fu<sup>[29]</sup>らは、マクロ配列エラストマー柱状培養基材を使用し、微柱の高さを変化することで、弾性をコントロールでき、MSCs を培養した結果、高い弾性率(牽引力 30 nN 以上)を持つ基材上で MSCs の骨形成分化能が促進されていることを示した。生体外培養では、力学的な刺激を受ける MSCs は迅速に反応し、細胞表面の受容体や、接着サイトを影響すると、細胞内のシグナル信号の一連的な反応を起こり、特異的な DNA や、細胞外タンパク質を分泌する<sup>[30]</sup>。以上のことによって、硬い培養基材上に MSCs が骨芽細胞へ分化し、骨形成分化能を促進する効果がある。

以上により、生体材料分野において、その表面の微細な変化が MSCs の分化に影響を与えることは明らかである。

一方、細胞生物学分野において、生体材料表面の性状は細胞の接着、増殖、分化などの基本的な細胞挙動に大きく連動的に影響を与えることもわかってきた。その影響を明らかにしたのは軟骨細胞の培養研究である。細胞の足場環境により、軟骨細胞は繊維芽細胞との相互転換ができる。つまり、細胞が丸い形態になる場合、特有な II 型コラーゲンを合成することができる。一方、軟骨細胞が丸い形態を失う場合、繊維芽細胞に特徴的な I 型コラーゲンを合成し始まる。勿論、その逆転換も可能である。繊維芽細胞様に変換した軟骨細胞を培養皿から静かにはがしてアガロースの培養皿に移すと、アガロースのゲルが細胞の周囲を囲むので細胞は基質に接着せずに宇に浮き、丸い形を取らざるおえなくなる<sup>[31]</sup>。このような状況では細胞は軟骨細胞の性質に戻り、再び II 型コラーゲンを作り始まる。

すなわち、生体材料分野における表面性状の最適化を解明するため、その材料上における細胞の初期接着形態が重要な役割を担うことを考えられる。

以前、我々研究グループは、アパタイトコーティングしたシルク繊維上における間葉系幹細胞(MSCs)の丸い形態及びシルク繊維上における MSCs の紡錘形態を観察し、培養 3 週間後の骨形成分化能が異なる結果を認めた<sup>[33]</sup>。

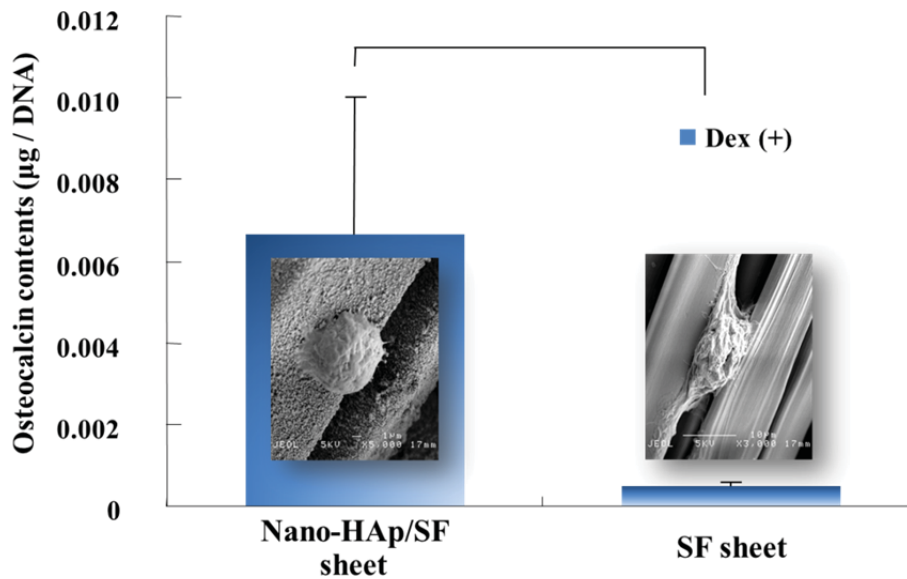


図 1.1. 間葉系幹細胞(MSCs)の丸い接着形態及び骨形成分化能<sup>[33]</sup>

しかしながら、①SEM 画像では特徴がある細胞しか取れず、一般化されていない欠点がある。また、②細胞初期接着形態は丸い形態及び紡錘形態が観察できたものの、数字化にされておらず、研究のインパクトが弱い欠点もある。

細胞形態の観察方法及び数字化の研究について、我々は細胞の画像化技術を開発した。(節 1.3.3)

また、生体材料の表面性状、細胞の初期接着形態及び細胞分化のメカニズムとして、「細胞から材料へ能動的シグナルが送られている」のは間違いないと考えられている。例えば、細胞が材料を溶解し、その結果、遊離した化学物質がシグナルとなっているとも考えられる。もしそうでなければ、細胞は、これまで考えられていたよりはるかに高度な認識システムをもっていることになる<sup>[34]</sup>。例えば、図 1.2 で示した通り、細胞はインテグリンやタンパク質を介して生体材料と接着するが、細胞が材料を溶解することで、細胞外の微小空間にも溶解された物質(生体材料の微量子や、イオンなど)を存在する。従って、異なる生体材料上における細胞の初期接着形態が大変重要になってくる。

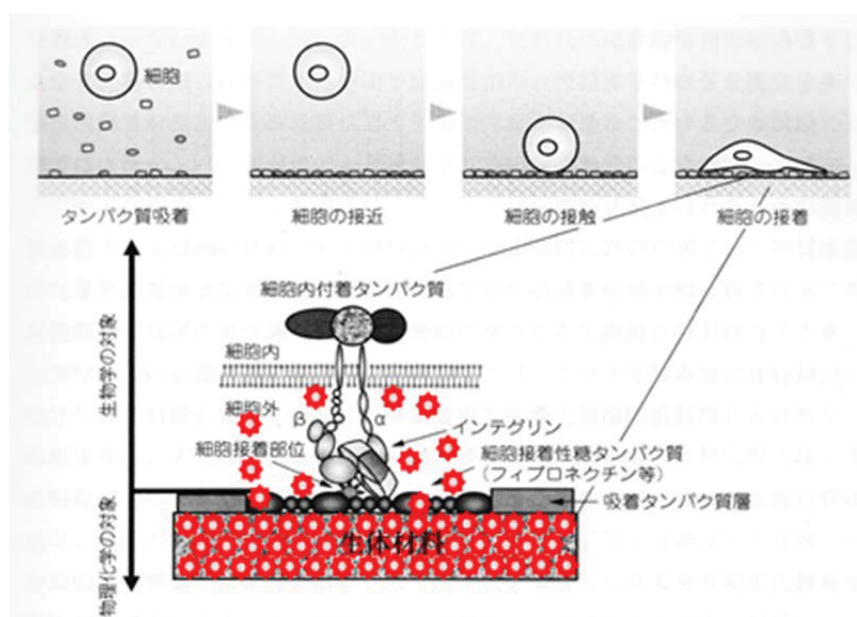


図 1.2. 生体材料への細胞接着過程と接着部位の模式図<sup>[35]</sup>

生体材料の表面性状における細胞の初期接着形態及び分化能の相関に関する研究は生体材料分野だけではなく、再生医療分野にも波紋をもたらすと期待される。

実施例として、人の骨髄から採取した間葉系幹細胞の培養技術を応用し、産総研では約 80 例の患者由来の間葉系幹細胞の培養を人工関節などの生体材料上で行ってきたことで再生培養骨の作製が実現し、骨再生医療の序幕を開いた。しかしながら、患者由来の細胞は同一組織由来であっても、人工関節などの生体材料上での細胞分化が大きく異なることが確認されて再生培養骨が形成できず、患者への移植治療が出来ないケースも報告されている。従って、骨再生医療の実用化の促進には、移植時に期待される骨形成能を有していることを、培養早期の細胞形態によって評価・判定する技術の確立が求められているのが現状である。

そこで本研究では、上記課題の解決を目指して、骨再生医療に用いる生体材料上における幹細胞の分化能力を早期に予測するための評価技術開発に資する基礎的研究をおこなった。具体的には、本研究は、溶解性が異なる骨再生医療で汎用に用いられるセラミックス系・金属系生体材料として主に用いられている、(1) 非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク(第 3 章), (2) 異なる微細構造を有するアパタイトディスク(第 4 章), (3) 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上(第 5 章), の 3 種類を選択し、これら生体材料の最適な表面性状を検討し、異なる生体材料上における間葉

系幹細胞の培養の極めて早期における細胞接着面積と骨分化との相関、つまり、細胞挙動の予測技術の構築を目的としてものである。また、チタン合金上に修飾するアパタイト層の形成方法の開発も目的である(第2章)。

検討した成果として、次の2点が挙げられる。

- ① 初期接着面積と骨分化能との間に強い相関性があることを見出した。  
(*BBRC* 430, 156-160 (2013))
- ② 微細構造の異なるアパタイト層を表面に有する培養基材上で、間葉系幹細胞の接着面積が極めて早期(培養開始2時間後)に異なることを見出した。  
(*STAM* 13, 209-214 (2012))

以上より、生体材料上における細胞の培養初期の接着面積から、分化を早期に予測できる可能性が強く示唆された。

## 1.2 主な材料分析方法

### 1.2.1 走査電子顕微鏡

- ① 非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク, ②異なる微細構造を有するアパタイトディスク, ③種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金上 Ti 棒の析出物の観察には、走査電子顕微鏡(XL30、FEI Company Japan Ltd., Japan)を使用した。また、印可電圧は 5.00kV と設定した。真空度が  $3.5 \times 10^{-5}$  Pa 以下の環境で観察を行った。ただし、観察を行う前、すべての試料を金蒸着した。

### 1.2.2 薄膜 X 線回折

材料の表面を構成する相の同定を行う

ため、(株)リガク製薄膜 X 線回折装置 RINT-2250 を用いた。

表 1.1. セラミックス系材料の薄膜 X 線回折測定条件

Mode	Continuous scan
Target	Monochromatized Cu K $\alpha$
Voltage	40 kV
Current	300 mA
$\theta$ Fixed-Angle	1.0000
Sampling step	0.02°(2 $\theta$ )
Scanning speed	2.000 °/min
Slit system	DS 0.20mm-RS 開放—SS 開放
Scanning angle	2-60° (2 $\theta$ )

表 1.2. チタン金属材料の薄膜 X 線回折測定条件

Mode	Continuous scan
Target	Monochromatized Cu K $\alpha$
Voltage	40 kV
Current	300 mA
$\theta$ Fixed-Angle	2.0000
Sampling step	0.02°(2 $\theta$ )
Scanning speed	2.000 °/min
Slit system	DS 0.20mm-RS 開放—SS 開放
Scanning angle	2-60° (2 $\theta$ )

### 1.3 細胞

生物の基本的な単位であり、細胞の基本機能の仕組みはすべての生物で共通である。また、生物の個体は 1 個の細胞から始まり、その分裂によって構築される。つまり、その 1 個の細胞は種を決める遺伝情報を運ぶ乗り物といえる。すなわち細胞は周囲から集めた材料を用いて、同じ姿をし、遺伝情報を点する新しい細胞を作るしくみをもつ。この能力を備えるものは細胞以外にない<sup>[31]</sup>。

#### 1.3.1 間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell)

間葉系幹細胞の別名は間充織幹細胞である。MSCs はストローマ細胞であり、自己再生する多能性を持つ。また、骨髄のストローマ細胞は結合組織の融通性を示す好例である。その細胞は繊維芽細胞の一種と考える場合もあり、骨髄から取り出して培養できるので、一個のストローマ細胞を祖先とする子孫細胞の大量クローンを入手できる。培地にシグナルタンパクを加えると、増殖を続けさせて同型の細胞を作り出したり、脂肪細胞や軟骨細胞や骨細胞に分化させたりできる<sup>[31]</sup>。また、MSCs は抗炎症能力があり、体内に移植した後、炎症反応を起こす環境でも生存できる。

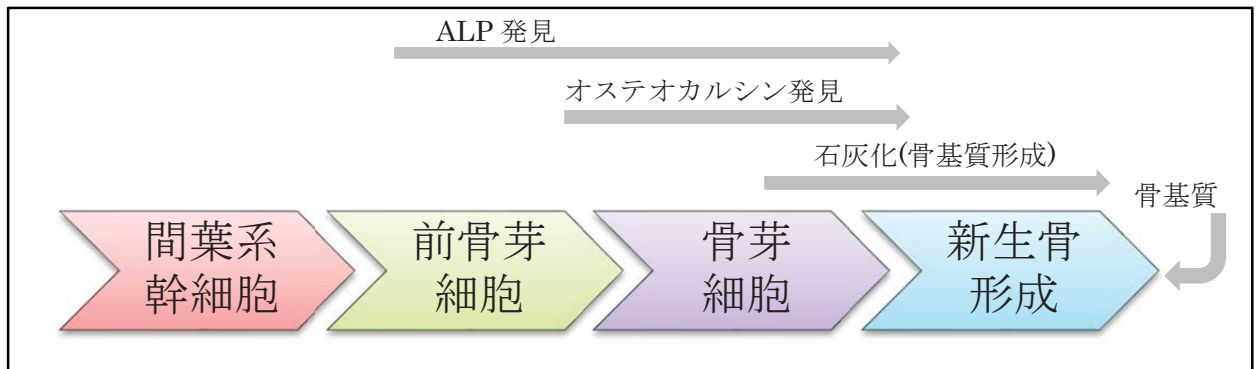


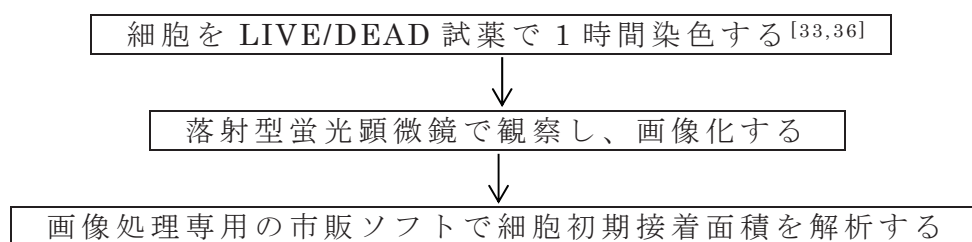
図 1.3. 間葉系幹細胞(MSC)の骨芽細胞への分化と骨形成<sup>[32]</sup>

細胞に関する研究では、タンパク質、DNA、RNA などの分析手法を主に用いたものと、顕微鏡を用いる細胞挙動の観察方法を主にもちいたものの二通りが主流である。

### 1.3.2 主な細胞観察方法

細胞の挙動を知る上で、その接着形態を知ることは不可欠である。19 世紀の初頭、優れた光学顕微鏡が現れてから、1838 年に **Schleiden** と **Schwann** が細胞説(cell doctrine)を提起し、細胞生物学が誕生した。また、光学顕微鏡に使う可視光には、対象を破壊しにくいという利点がある。特定の細胞成分に蛍光タンパクなどの蛍光標識をつけ、生細胞内での運動や相互作用をそのまま観察できる。しかし、光学顕微鏡には可視光の波長による分解能の限界がある<sup>[31]</sup>。

### 1.3.3 細胞初期接着形態の画像化技術



本研究では、細胞初期接着面積を確認するために、細胞染色液として LIVE/DEAD 試薬を使用した。LIVE/DEAD 試薬はカルセイン AM(生細胞染色剤、緑色素)及びエチジウムホモダイマー1(死細胞染色剤、赤色染色)が含まれている。生細胞の場合、細胞膜透過性を持つカルセイン AM は、細胞内のエステラーゼによる加水分解で蛍光を示すカルセインとなる。ま

た、カルセインはほとんど細胞毒性を持たず、膜不透過性(細胞膜からの漏出がない)の化合物で、波長 530nm 付近の、強い黄緑色の蛍光を示す。一方、死細胞の場合、エチジウムホモダイマー1は細胞膜構造の変化に伴い細胞膜を透過し、細胞核の DNA と結合し、波長 585nm 付近で赤色の蛍光を発する。

これまで、我々の研究グループでは、チタン金属材料上での LIVE/DEAD 試薬で染色した間葉系幹細胞の接着形態を観察した結果、得られた知見を報告した<sup>[34]</sup>。また、同じ細胞観察手法を利用して、アパタイトコーティングしたシルク材料及びアパタイトコーティングしないシルク材料上での間葉系幹細胞の接着数を比較し、その違いから得られたアパタイトコーティングの効果を報告した<sup>[36]</sup>。本研究では、同じ細胞観察手法、すなわち、落射型蛍光顕微鏡で蛍光色素を取り込んだ間葉系幹細胞の接着様子を観察し、撮影した。

さらに “image-pro”等の細胞形態画像処理専用の市販ソフトを用いることで、生体材料に接着した初期細胞について形態(面積)などのパラメータを自動的に数値化することができる。

本研究で開発した評価技術の利点として

- ① 操作が簡単
- ② 100 個以上の細胞が連続的に観察できることで、評価結果の一般化ができる

ことが挙げられる。一方、評価技術の弱点として、

- ① 細胞の投影面積を観察するため、生体材料の表面状態に測定値が左右される
- ② 面積画像の綺麗さは細胞厚みに左右される

ことが挙げられる。

#### 1.3.4 解析手順

- ① カラー画像からモノクロ画像へ変換する(はじめからモノクロ画像であれば必要ない)

実際には、編集メニューの変換で 24 ビットカラーであれば 8 ビットグレースケールに変換した。

- ② 抽出

測定メニューのカウントサイズで手動抽出を選択して抽出レンジを設定する

URL ページ、

[http://www.mediacy.jp/webhelp/count\\_size\\_general\\_operation.htm](http://www.mediacy.jp/webhelp/count_size_general_operation.htm)

の 3B を参照。

- ③ カウントで②で設定した抽出レンジの物が全て抽出される

参照したい細胞（抽出された）をダブルクリックすることで測定値が表示される

削除したい画像はダブルクリックで削除項目がでる。チェックすることで削除できる。また、データの一覧表示はカウントサイズの表示で測定データを選択することで可能。

### 1.3.5 細胞初期接着面積

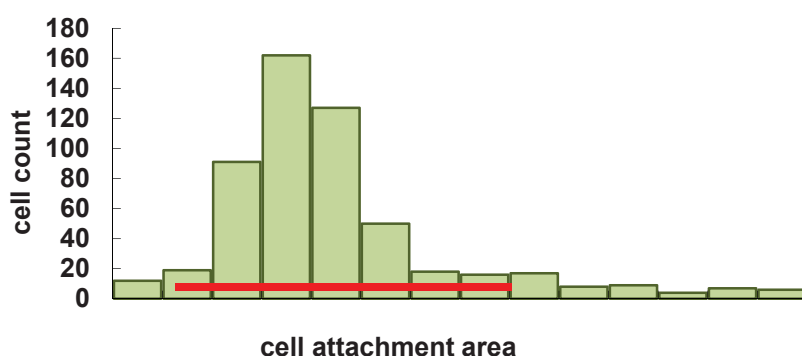


図 1.4. 典型的な細胞初期接着面積分布の例

図 1.4 に示したように、生体材料上における全ての細胞はある限られた範囲の初期接着面積値に集中し、その後減少する傾向が見られる。そこで本研究では、細胞初期接着面積を  $350\mu\text{m}^2$  から  $3500\mu\text{m}^2$  までと設定し、平均値及び誤差を求める。求めた平均値から誤差を引いた値は細胞初期接着面積の最小値として採用し、求めた平均値から誤差を足した値は細胞初期接着面積の最大値として採用する。さらに、測定した細胞初期接着面積のデータにより、平均値及び誤差を求める。

## 第 2 章 陽極酸化チタンピン上への繊維芽細胞成長因子(FGF)-2/アパタイト複合層の形成

### 2.1 緒言

#### 2.1.1 研究目的

繊維芽細胞成長因子(以下、**FGF-2** と記す)は、皮膚組織、血管、骨組織など多岐にわたる組織の再生を促進する効果があるため、近年、医療応用への研究が盛んに行われている生体活性物質のひとつである。**FGF-2** の皮膚組織再生能は、科研製薬株式会社より市販されている褥創治療薬(フィブラストスプレー)で既に利用されており、さらに同社によって現在、骨組織や軟骨組織の再生を促進する薬品としても臨床研究が進められている。この **FGF-2** は体内で急速に拡散、失活するため、効果の持続のために断続的な大量投与が必要となる。そこで、**FGF-2** を何らかの基材に固定化し、除放させることによって失活を防ぎつつ効果を持続させるというアイディアは以前から研究されてきた<sup>[37-40, 56]</sup>。そうした研究の内、**FGF-2** を過飽和リン酸カルシウム溶液に添加し、共沈によって基材に担持させるという方法が、独立行政法人産業技術総合研究所、伊藤らによって開発されている。伊藤らは、水酸アパタイトセラミック<sup>[40]</sup>や表面を陽極酸化処理したチタン<sup>[56]</sup>を基材とした研究を行い、いずれの基材にも臨床応用が認められている医療用輸液を混合した得られるリン酸カルシウム過飽和溶液を用いて **FGF-2** がリン酸カルシウムとの共沈で担持可能であること、さらに担持後の **FGF-2** が完全失活していないことを明らかにした。特に、後者の研究で用いられた陽極酸化処理チタンは、骨折治療の一手法である創外骨折固定に用いる治具の素材としても利用されており、**FGF-2** の担持によって経皮埋入された治具周辺の骨組織あるいは皮膚組織の再生を促進し、創外骨折固定で問題となっている挿入路感染防止に有効であることが動物実験によって明らかとなった<sup>[55]</sup>。しかし、現在報告されている陽極酸化処理チタン表面への **FGF-2** の共沈担持量最適条件は 37 °C で 48 時間保持するという生体物質には過酷な条件で、**FGF-2** の失活率を考慮に入れると非常に非効率な担持方法であり、改善の余地があると考えられる。溶解化した **FGF-2** が失活しない限界条件が 25 °C で 24 時間とされており、少なくともこの条件内で **FGF-2** を担持することにより、失活率を低減させることが可能であると考えられる。一方で、低温ではリン酸カルシウムの析出速度が低下し、十分量の **FGF-2** の担持が望めないことも留意する必要がある。

そこで本研究では、**FGF-2** 活性を維持しつつ室温、24 時間で **FGF-2** を陽極酸化処理チタン上に担持する技術の確立を行った。具体的には、

第一にリン酸カルシウムの結晶成長の核として表面にリン酸カルシウム層を形成する前処理の最適条件を決定し、第二に前処理が FGF-2・リン酸カルシウム複合層の作製にもたらす効果(複合層のできやすさ)について検討することを目的とした。さらに第三として、担持された FGF-2 の活性評価を細胞培養実験によって行った。以上の研究結果を総合することによって、FGF-2 を失活させずに効率よく共沈担持できる新規の手法を確立できるものと期待できる。

### 2.1.2 研究背景

医療現場は進化し、最近では開放骨折や粉碎骨折にも対応できる創外骨折固定と呼ばれる骨折治療法を用いるケースが年率 3 %で増加している。創外骨折固定とは長骨の骨折部位を挟む位置に金属位のピンを経皮的に(皮膚を貫通して)挿入し、そのピンを体外で固定することによって行う低侵襲の骨折治療方法であり、リハビリへの移行時間が短くて済むなどの特長がある反面、手術後のピンと皮膚界面の挿入路を通じて起こる高率(10.0~53.3 %)な細菌感染、いわゆるトンネル感染が問題となっている。この細菌感染の主要因は経皮的に埋入するピンと骨との結合強度及び皮膚との接着強度の低さである。骨固着強度を上げるためにはピンの表面に骨と結合するアパタイトをコーティングすること(第二世代骨折固定具)が効果的であり<sup>[41-43]</sup>、感染防止効果としては抗菌薬投与と院内外での日常的ピンケアが最も効果的とされてきた<sup>[44-46]</sup>。しかし、アパタイトコーティングの直接的感染防止効果は限定的であり、抗菌薬や日常的ピンケアは組織のピンへの密着を促すものではない。さらに院内外での創外固定器具ケアは患者の QOL(Quality of life)を低下させ、看護師の介護負担を強いる結果となっている。

こうした中、産総研では、「材料と生体内に埋入すると材料自身が細胞分化や組織再生を促がす」生体材料<sup>[47]</sup>である「第三世代生体材料」の開発を念頭に置き、これを再生医療の経済的技術的問題を補う方法として提唱した。それによれば、多くの生体材料は、生物学的活性化因子を変性させず表面に担持することで第三世代化が可能である。その考えに基づき、皮膚組織と骨組織の再生を促がす生物学的活性化因子を担持させた第三世代創外骨折固定具を開発すれば、創外骨折固定術で問題となる皮膚界面でのトンネル感染を劇的に抑制できるものと期待される。

生物学的活性化因子の多くはタンパクからなるため、伊藤ら(産総研)は、骨や歯の成分であるリン酸カルシウムのタンパク吸着能に着目し、リン酸カルシウムナノクラスター会合体の $\zeta$ 電位を制御してタンパクと

の共沈反応を起こし、種々の人工材料に担持させる方法を研究開発してきた<sup>[48-55]</sup>。この手法を用いると、成長因子、細胞接着因子、コラーゲンなどのタンパク質以外にも DNA やビタミン等を担持させることが可能である。特に、皮膚や骨の組織再生を促進する成長因子の一種である繊維芽細胞成長因子-2(以下 FGF-2 と記す)を医療用輸液の混合によって得られるリン酸カルシウム過飽和溶液に混合させた溶液にチタン製経皮骨折固定具(以下チタンピン)を浸漬することによって、FGF-2-アパタイト複合皮膜(AP-FGF)を作製することに成功した。このように担持された FGF-2 は、*in vitro* 実験によって十分な活性を残していることが示された。さらに、AP-FGF コーティングチタンピンを 1 ヶ月ウサギ脛骨に経皮的に埋入したところ、FGF-2 は骨固着と皮膚再生を同時に促進し、通常では皮膚の密着不良で 94 % が皮膚-ピン界面でトンネル感染を生じる厳しい環境でも、抗菌剤の投入なしに、感染率を 44 % に抑えることが分かった<sup>[56]</sup>。

したがって、AP-FGF コーティングしたチタンピンと抗菌薬投入を組み合わせれば、創外骨折固定術で問題になる皮膚界面での細菌感染を効果的に防止できることが期待される。

しかしながら、これまでにチャンピオンデータが得られている AP-FGF コーティングしたチタンピンは、37 °C、48 時間という FGF-2 にとっては過酷な条件で処理されているため、処理中に失活してしまう分子の量が際立って多く、90 % 以上の失活率という推算がなされている。担持されている FGF-2 の内、正味 10 % 程度しか有効に利用されないというのは非効率であり、この FGF-2 担持技術にはまだ改善の余地があると考えられる。その中には利用する医療用輸液の組み合わせも含まれる。

### 2.1.3 創外骨折固定

#### 2.1.3.1 創外骨折固定とは

上述のように、創外固定とは、粉碎骨折（粉々な骨折）のように手術による骨の再配置が困難な場合、開放骨折（骨がいったん皮膚の外へとびだした骨折）のように骨折部が感染（化膿すること）しやすく直接手術できない場合、関節部の骨折のように骨折の固定がしにくい場合などによく用いられる。創外固定は骨折部を直接に切開しないので、骨にダメージを与えず骨折部を切開する手術に比べ骨折の治りを損なわない。創外固定の骨折部をはさんだ両側の骨にネジを数本挿入し、骨折部を引っ張って骨折のずれをできるだけ矯正し、時に支えとなる金属製の支柱

(創外固定器という)で骨折を固定する場合もある。メリットとしては、体内に金属を入れて留めるのではなく体外で固定するため、不恰好になるが、ギプスで固定する場合とは異なり早期からリハビリはできるし、金属を除去する手術も簡単である。

創外固定による骨折の治療は歴史的には 1853 年の MALGAIGNE の爪型創外固定器の使用に始まり、古くより使用が試みられてきた。1907 年には LAMBOTTE がハーフピンを使用する創外固定器を考案した。日本でも 1925 年に同様の前田式創外固定器が考案された。現在でも使用されている HOFFMANN 創外固定器は 1935 年スイスで考案され、ヨーロッパで多くの臨床応用が行われた。

このように創外固定法は内固定法と並列に発展していたが、ピンを皮質骨に経皮的に埋入するため、その挿入路からの感染に伴う骨髓炎発症という抗生物質発見以前の医学では十分対応できない合併症があるため、次第にその使用頻度が少なくなった。

第二次大戦後、抗生物質の開発、創外固定器の改良、そしてピンの改良により、ピンの挿入路からの感染による危険が少なくなった。また労働災害や交通事故による高エネルギー外傷が増えるに従い、従来の内固定法では対応できない外傷が発生し、再度創外固定法が見直され、限定的適応のもとに再度利用されるようになった。

一方、旧ソ連クルガンの ILIZAROV は、骨折の整復、固定と早期運動を可能にする ILIZAROV 創外固定器を独自に開発した。この創外固定器は骨折の固定のみでなく、仮骨延長による四肢延長、骨軟部変形の矯正、骨軟部欠損の治療のいずれにも使用でき、他の創外固定器の限界を越える画期的なものであった。仮骨延長や骨移動の方法はこの延長器に始まり、現在使用されている Orthofix 創外固定器などに影響を与えている。

### 2.1.3.2 創外骨折固定器具

#### 2.1.3.2.1 チタンスクリュー

創外骨折固定において、金属は構造材料として大切な素材である。生体材料としての金属材料の欠点は、疲労による破壊、腐食によって放出された金属イオンの毒性が挙げられ、さらに人工関節などの場合は可動部からの摩耗粉の毒性などが考えられる。創外骨折固定にはステンレスやチタンが利用されているが、本研究で対象とするチタンに関して言及すれば、比較的軽く機械強度も優れているうえ生体内で安定である。具体的には、本研究で使用する創外固定チタンスクリュー(以下は Ti ピンと記す)は陽極酸化皮膜に覆われるため、不働態化する特徴がある。Ti

ピンは生体内に短期間しか存在せず、その期間のみ体重や活動による荷重を耐えればよい、腐食疲労、フレッティング腐食疲労などによる生体破壊を起こす可能性が極めて小さい。そして、他の金属の比重、弾性係数の約半分しかない点から、チタン金属は比強度が大きく、骨により近い弾性係数をもつ優れた創外骨折固定材料とも言える。

#### 2.1.3.2.2 創外骨折固定器の種類

##### ① 片側固定型 **unilateral type**

ハーフピンを片側より刺入し、これを創外固定器で片側固定する。**Orthofix** 創外固定器・**AO** 創外固定器・**CLYBURN** 創外固定器など各種ある。いずれも長軸方向での延長、短縮が可能である。装着後屈曲および側方転位を整復可能な固定器が多い。回旋転位は整復できない。装着時にできるだけ転位を整復しておくことが大切である。

##### ② 両側固定型 **bilateral type**

貫通ピンを 2 個の創外固定器で支持固定する。**HOFFMANN** 創外固定器が代表的である。手指骨に用いる生田式創外固定器もこの分類に属する。

##### ③ 半円型 **semicircular type**

創外固定器のフレームが半円状で、貫通ピンを用いる。**ACE-FISHER** 創外固定器、**VOLKOV OGANESIAN** 創外固定器がこの型である。

##### ④ 円型 **circular type**

**ILIZAROV** の創外固定器がよく知られる。前述のように旧ソ連の **ILIZAROV** が 1951 年開発したが、西側諸国には 1981 年以後知られるようになった。**KIRSCHNER** 銅線を貫通ピンに用い緊張を円板フレーム上で加え、固定力を向上させる。軸転位を含むあらゆる転位、変形を計画的に整復できる。使用には予め一連の講習を受ける必要がある。

#### 2.1.3.2.3 創外固定法の長所と短所

##### 1) 長所

- ① 少ない侵襲で損傷部より離れて固定できる。したがって内固定が困難な組織欠損や感染がある開放骨折、偽関節により適応がある。また全身状態に問題があり、内固定術の侵襲をさせたい多発外傷例にも適応できる。
- ② 骨折部に侵襲を加えないため骨折部の皮膚、筋肉、骨膜を最大限温存できる。また骨折部に内固定材などの異物を留置しない。
- ③ 開放創、感染創の状態の観察、処置、皮弁などの植皮、骨手術が創

外固定器をつけたまま行える。

- ④ 創外固定器により、骨折部への圧迫、牽引がかけられる。短縮に対して仮骨延長術も適応できる。
- ⑤ 創外固定器装着後に骨折の転位の整復が可能である。
- ⑥ 早期の隣接関節の運動を可能にする固定力が得られる。
- ⑦ 抜釘が内固定にくらべ容易である。

## 2) 短所

- ① ピン刺入部の清潔に留意しないと感染を起こしやすい。
- ② ピンの刺入方向・固定器の装着に技術が必要である。
- ③ 協力的でない患者では固定が維持できないことがある。
- ④ 装着部の入浴が長期できない。
- ⑤ 創外固定器が高価である。

### 2.1.3.2.4 創外固定法の適応

従来の治療法(内固定・外固定)で十分な成績が上げられる骨折には適応がない。特定の例に選択的適応があると考えるべきである。

- ① 開放性粉碎骨折
- ② 熱傷を伴う骨折
- ③ 感染性骨折・偽関節
- ④ 骨軟部欠損があり、皮弁などの再建手術を要する骨折
- ⑤ 粉碎部のあるとう骨遠位端骨折のごとく骨長維持が成績に影響の大きい骨折
- ⑥ 骨折の治療と仮骨延長術を当時に行うとき

これらのほか、条件によって創外固定法を選ぶ余地のあるものには、

- ① 腸骨の骨折、脱臼
- ② 血管、神経修復を当時に行う必要がある骨折
- ③ 多発性骨折
- ④ 内固定が不十分な骨折に対する追加固定

### 2.1.3.2.5 合併症

無制限に適応すれば合併症は増加しやすい。選択的に用い、骨折治療原則と各創外固定器の使用基準、方法を遵守すれば減らすことができる。創外固定法を行うときは以下の合併症が発生しやすいことに留意しなければならない。

- ① ピンの感染はもっとも多い合併症である。

- ② 神経、血管傷害——ピン刺入部の解剖学的構造を横断面でよく理解しておく必要がある。安全な刺入部位方向を選ぶ。上腕より前腕にかけてとう骨神経、前腕遠位でのとう骨神経浅枝、下腿での前肢骨動脈、深腓骨神経がもっとも傷害例が多い。
- ③ 筋腱傷害——ピンが筋腱に刺入され、可動性を制限する。多くはピンを後に抜去することにより改善するが、永続的癒着や断裂を残すことがあり、追加手術を要する。
- ④ 遷延治療——創外固定器で固定し、骨折部の免荷状態が続くと発生する。

#### 2.1.4 骨の修復

骨は種々の病態で損傷されるが、その代表として骨折が上げられる。骨折が生じると、初期には他の組織の創傷治療と同様な修復反応が見られる。しかし、経過とともに骨折部には新たな骨が形成され、最終的に瘢痕組織ではなく、本来の骨組織で修復されることが特徴である。

##### 2.1.4.1 骨折の治癒原理

骨折が起こると、損傷された皮膚骨、骨髓、骨膜、周囲の軟部組織から出血が生じ、破壊されて壊死した組織片とともに、骨折部に血腫を形成する。血腫にはマクロファージなどの炎症性細胞が浸潤し、骨折部に腫脹、熱感、発赤などの炎症反応を引き起こす。一方、血腫の周囲では未分化な細胞の増殖や毛細血管の新生が認められ、血腫は徐々に肉芽組織に置換されていく。

その後、骨修復に特有な新たな骨の形成が始まる。骨形成はまず骨折部から離れた骨膜下でみられ、骨膜に沿って進行していく。その骨形成は、未分化な間葉系細胞が骨芽細胞に直接分化して骨基質を産生するもので、「膜性骨化」と呼ばれる。一方、骨折部の肉芽組織の中では、未分化な細胞から分化した軟骨細胞が軟骨組織を形成していく。軟骨組織の中で軟骨細胞は徐々に肥大化していき、成長軟骨板でみられる軟骨内骨化と同じ様式で軟骨組織が骨に置換されていく。

このような2種類の骨化過程の進展により、骨折端は新たに形成された骨(仮骨)で結合され、骨の連続性が回復する。しかし、この時点で生じた仮骨は増板構造を持たない線維性骨であり、力学的には脆弱な組織である。その後、長期間にわたって骨吸収と骨形成を繰り返しながら、仮骨は層板骨へと置換され、皮質骨と海綿骨からなる骨本来の組織構造を回復していく。この過程をリモデリングという。

また骨折部に生じた変形は、機械的負荷に対する Wolff の法則に則って、凸側では骨吸収、凹側では骨形成が起こり、正常に近い骨形態となるように矯正されていく。この自家矯正力は年齢が低いほど旺盛であり、成長に伴って次第に低下する。

以上のような一連の経過を経て骨癒合は完了するが、この骨折治癒過程では、TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ )、BMP(bone morphogenetic protein)、IGF(insulin-like growth factor)、FGF(fibroblast growth factor)などさまざまな成長因子により、細胞の増殖や分化が調節・制御されていることが明らかとなっている。

#### 2.1.4.2 一次性骨癒合

骨折は、前述のように仮骨の形成を経て骨癒合に至るのが一般的であり、これを二次性骨癒合という。一方、仮骨形成を伴うことなく骨癒合が完了する場合を一次性骨癒合と呼ぶ。一時性骨癒合はハバース管での生理的なリモデリングにより骨折が治癒するもので、骨折部を隙間なく正確に整復し、強固にプレート固定を行った場合に見られる。一時性骨癒合ではプレート抜去後に再骨折をきたすことがあり、臨床的には必ずしも優れた骨癒合形成というわけではない。

#### 2.1.4.3 骨折治癒に影響を及ぼす因子

骨折の治癒過程は、様々な全身的因子や局所的因子により影響を受ける。

##### 1) 全身的因子

- ① 年齢：年齢が低いほど骨形成は活発で、変形も矯正されやすい。
- ② 栄養状態：貧血、低蛋白血症、電解質異常などがあると、骨癒合過程は遅延する。
- ③ 骨代謝に影響する基礎疾患、薬剤など：糖尿病や腎不全では骨折治癒は遅延し、エストロゲンや成長ホルモンの低下、副腎皮質ステロイドも骨癒合に不利に働く。副甲状腺ホルモン、カルシトニン、活性型ビタミン D など骨骨折治癒過程に影響すると考えられる。

##### 2) 局所的因子

- ① 骨折的状态：開放骨折や粉碎骨折などのように、骨膜や周囲軟部組織の広範な損傷を伴う骨折では骨形成が阻害され、骨折治癒は遅延する。
- ② 骨折端の接触：骨片相互の転位、骨欠損、骨折間隙への軟部組織の分在などにより骨折端同士の接触が不良な場合には、骨癒合は遷延す

る。

- ③ 骨折部の固定性：骨癒合を得るためには骨折部の良好な固定性が必要であり、骨折端同士が不安定な場合には骨癒合は障害される。骨折部に加える機械的負荷も重要で、適度な圧迫力は骨癒合を促進するが、せん断力や回旋力は骨癒合を妨げる。
- ④ 骨折部の血行：血流は骨折治癒に不可欠な因子であり、骨折を起こすと解剖学的に血行不良に陥りやすい部位は骨癒合に不利である。体表的な例として、大腿骨頸部骨折、手舟状骨骨折などがある。
- ⑤ 感染：感染は骨折治癒を阻害する。開放骨折あるいは手術によりひとたび感染が起これば、骨癒合はきわめて困難となる。

## 2.1.5 タンパクーリン酸カルシウム共沈担持法

### 2.1.5.1 リン酸カルシウム過飽和溶液

産総研・伊藤らが取り組んでいるリン酸カルシウム過飽和溶液を用いた生体活性物質の担持法では、臨床応用へのハードルを低くするため、すでに厚生労働省により医療現場での使用が認可されている医療用輸液のみの混合によって作成している。医療用輸液は「経口摂取ができない場合、または、経口のみでは不十分な場合の、(1)水分、電解質、酸塩基平衡の是正と維持、(2)循環血液量の維持、(3)栄養保持」を目的とした医薬品であるため、仮に人工骨材料に残留しても生体への影響はほとんどないと考えられる。従来のリン酸カルシウム溶液(RKB液)の作製法は三種類の医療用輸液リンゲル液、バイフィル、クリニザルツ Bを混合する手法である。ちなみに、リンゲル液は電解質・キシリトール輸液、クリニザルツ Bは体液増量・電解質補給溶剤、そしてバイフィルは透析ろ過型人工腎臓用透析液の一商品名である。また、バイフィルに関しては輸液の pH の調整を行うためのアルカリ化剤のみを用いている。

この従来型の RKB 液に使用しているクリニザルツ B 液は、入手しにくい薬剤であり、またバイフィルは透析ろ過型人工腎臓用透析液のため、直接人体に注射できない欠点がある。

本研究では、同じくリンゲル液を用いて、クリニザルツ B 液と同じくリン酸イオンを含有するソリター T2 を使用し、バイフィルと同じ pH 調整効果のメイロン液を変更した。これらの混合液を輸液の頭文字をとって RSM 液と呼ぶことにする。また、RSM 液の過飽和度を上昇させるため、カルシウムイオン濃度補正用の注射液であるコンクライトー Ca 及びリン酸イオン濃度補正用の注射液であるコンクライト液ー PK も添加した。

#### 2.1.5.2 繊維芽細胞成長因子(FGF-2)

現在までに、繊維芽細胞成長因子は20種類以上の存在が知られている。本研究で使用するものは、塩基性であることから、一般に**bFGF**(塩基性繊維芽細胞成長因子-**basic fibroblast growth factor**-)と呼ばれることもあるが、前述の通り種類が多岐にわたるため、2番目に発見されたことによる名称、**FGF-2**が用いられる。1989年より科研製薬株式会社は、遺伝子組み換えヒト**FGF-2**(**recombinant human FGF-2**; **rhFGF2**)を用いた基礎研究を開始し、その生物学的特性を詳細に検討した。その結果**rhFGF-2**が創傷治癒を担う細胞の増殖促進作用に基づく皮膚潰瘍治療薬とともに、骨原性細胞増殖及びリモデリング促進作用による硬組織再生促進薬となりうる可能性を見出した。

**FGF-2**は *in vitro* で繊維芽細胞や血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、上皮細胞などの増殖及び遊走を強力に促進することが確認され、2001年6月に、世界初の成長因子製剤(フィブラストスプレー)が、皮膚潰瘍治療薬として販売開始されている。

また、**FGF-2**は *in vitro* で骨芽細胞、軟骨細胞及び骨外膜細胞といった、硬組織を形成する細胞群の増殖も強く促進することが報告されていたが<sup>[57]</sup>、この作用の *in vivo* での意義は明確ではなかった。中村らは**rhFGF-2**がラット全身投与で骨内膜下に著しい骨形成作用を発揮することを見出し、その作用機序の詳細な解析の結果、これが未分化な前骨芽細胞に対する強い増殖促進作用に由来することを明らかにした。

この発見により**rhFGF-2**は *in vitro* においても著しい骨形成作用を発揮することが示され、これと前後して川口らは、ラット、イヌ及びサルの実験的骨折モデルに対する**rhFGF-2**の効果を検討した。その結果、**rhFGF-2**はいずれの動物においても骨折部に1回投与することで投与量に依存して骨折部の仮骨量を増加させるだけでなく、仮骨中の破骨細胞数を増加させて仮骨の吸収を促進することで骨折治癒を早め、骨折部の力学的強度の回復を促進した。**rhFGF-2**は破骨細胞形成も促進することが報告されており、**rhFGF-2**の骨折治療促進効果は局所での骨形成と同時に骨吸収の促進、すなわち骨代謝回転亢進作用に基づくことが強く示唆されている。

硬組織再生促進作用を臨床的に検証するには、投与局所への貯留性を付与した新規製剤が必要であり、その担体として不溶化ゼラチンなどが検討されている<sup>[58]</sup>。

## 2.2 溶液及び評価方法

### 2.2.1 溶液

過去の研究では、**FGF-2** の担持に用いるリン酸カルシウム過飽和溶液は、一般の研究試薬を溶解して作製した医療用薬品と同組成の溶液を使用して調製を行っている。

しかし、市販の医療用医薬品には、品質保証のために少量の pH 調整剤などが添加されていることがあり、市販の医療用医薬品を用いても過去の研究で得られた結果と全く同様の結果が得られる保証がないという点は、今後の臨床応用に対する問題と考えられる。そこで本研究では、**FGF-2** 担持を行う際に用いるすべての溶液は市販の医療用医薬品のみを使用することにした。本節ではそれぞれの溶液の組成や性状について述べる。

#### 2.2.1.1 含カルシウム溶液

本実験でカルシウム源として使用する 2 種類の医療用医薬品(リンゲル液及びコンクライト-Ca)について述べる。

##### 2.2.1.1.1 リンゲル液(Ringer's Solution)

###### 1) 販売元

リンゲル液は、大塚製薬など多くの製薬会社から販売されている。

###### 2) 主要成分及び電解質濃度

表. 2.1.①. リンゲル液の主要成分

成分名	組成式	含有量 / g・500 mL <sup>-1</sup>
塩化ナトリウム	NaCl	4.3
塩化カリウム	KCl	0.15
塩化カルシウム	CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.165

表. 2.1.②. リンゲル液の電解質濃度

イオン種	化学式	濃度 / mM
ナトリウムイオン	Na <sup>+</sup>	147
カリウムイオン	K <sup>+</sup>	4
カルシウムイオン	Ca <sup>2+</sup>	2.25
塩化物イオン	Cl <sup>-</sup>	155.5

### 3) 性状

- ① 無色かつ澄明な液体である。
- ② pH 値は約 6.4(製造直後の平均実測値)である。(規格値 5.0～7.5)
- ③ 生理食塩水に対して、浸透圧比は約 1 である。

#### 2.2.1.1.2 コンクライト-Ca 液(Conclyte-Ca Solution)

##### 1) 販売元

大塚製薬

##### 2) 主要成分及び電解質濃度

表. 2.2.①. コンクライト-Ca 液の主要成分(g/20ml)

成分名	組成式	含有量 / g・20 mL <sup>-1</sup>
塩化カルシウム	CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	1.47

表. 2.2.②. コンクライト-Ca 液の電解質濃度

イオン種	化学式	濃度 / mM
カルシウムイオン	Ca <sup>2+</sup>	500
塩化物イオン	Cl <sup>-</sup>	1000

### 3) 性状

- ① 無色かつ澄明な液体である。
- ② pH 値は 4.5 から 7.5 までの間である
- ③ 生理食塩液に対して、浸透圧比は約 5 である。

\* 但し、コンクライト-Ca 液は 0.5 mol/L 塩化カルシウム液である。  
添加物として塩酸 (pH 調整剤) を含有する。

#### 2.2.1.2 含リン溶液

本実験でリン源として使用する 3 種類の医療用医薬品(クリニザルツ B、ソリタ-T2 及びコンクライト液-PK)について述べる。

##### 2.2.1.2.1 クリニザルツ B(Klinisalz B)

##### 1) 販売元

アイロム製薬

##### 2) 主要成分及び電解質濃度

表. 2.3.①. クリニザルツ B の主要成分

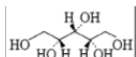
成分名	組成式	含有量 / g・500 mL <sup>-1</sup>
塩化ナトリウム	NaCl	0.7306
塩化カリウム	KCl	0.5592
酢酸ナトリウム	CH <sub>3</sub> COONa・3H <sub>2</sub> O	1.3608 *
リン酸二水素カリウム	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6805
塩化マグネシウム	MgCl <sub>2</sub> ・6H <sub>2</sub> O	0.2542
キシリトール		25

表. 2.3.②. クリニザルツ B の電解質濃度

イオン種	化学式	濃度 / mM
ナトリウムイオン	Na <sup>+</sup>	45
カリウムイオン	K <sup>+</sup>	25
マグネシウムイオン	Mg <sup>2+</sup>	2.5
塩化物イオン	Cl <sup>-</sup>	45
リン酸イオン	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	10
酢酸イオン	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	20

## 2.2.1.2.2 ソリター T2(SOLITA-TN0.2)

## 1) 販売元

味の素ファルマ

## 2) 主要成分及び電解質濃度

表. 2.4.①. ソリター T2 の主要成分

成分名	組成式	含有量 / g・500 mL <sup>-1</sup>
塩化ナトリウム	NaCl	1.35
塩化カリウム	KCl	0.745
結晶リン酸二水素ナトリウム	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.155
リン酸水素ナトリウム	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O	1.435
ブドウ糖		16.0
L-乳酸ナトリウム	CH <sub>3</sub> CH(OH)COONa	1.12
(添加物) pH 調整剤	適量	適量

表 2.4.②. ソリタ-T2 の電解質濃度

イオン種	化学式	濃度 / mM
ナトリウムイオン	$\text{Na}^+$	84
カリウムイオン	$\text{K}^+$	20
塩化物イオン	$\text{Cl}^-$	66
L-乳酸イオン	L-Lactate $^-$	20
リン酸イオン	$\text{PO}_4^{3-}(\text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{HPO}_4^{2-})$	10

### 3) 性状

- ① 無色から微黄色まで、澄明な液体である。
- ② わずかに特異なにおいがする。
- ③ 塩味がある液体である。
- ④ pH 値は 3.5 から 6.5 まで変動する。
- ⑤ 生理食塩水に対して、浸透圧比は約 1 である。

#### 2.2.1.2.3 コンクライト液-PK(Conclyte-PK Solution)

##### 1) 販売元

大塚製薬

##### 2) 主要成分及び電解質濃度

表 2.5.①. コンクライト液-PK の主要成分(20 g/ml)

成分名	組成式	含有量 / g・20 mL <sup>-1</sup>
リン酸水素二カリウム	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.74 g

表 2.5.②. コンクライト液-PK の電解質組成

イオン種	化学式	濃度 / mM
カリウムイオン	$\text{K}^+$	1000
リン酸水素イオン	$\text{HPO}_4^{2-}$	500

### 3) 性状

- ① 無色かつ澄明な液体である。
- ② pH 値は 8.8 から 9.4 の間である。
- ③ 生理食塩液に対して、浸透圧比は約 4 である。

但し、コンクライト液－PK は 0.5 mol/L リン酸二カリウム液である。

#### 2.2.1.3 pH 調整剤

2.2.1.1 節及び 2.2.1.2 節に列記した含カルシウム溶液及び含リン溶液を混合すると、pH5 後半～6 の酸性溶液となる。リン酸カルシウム(アパタイト)の沈殿を促進するには pH7 以上に設定する必要がある、本研究では 2 種類のアルカリ化剤(バイフィル専用炭酸水素ナトリウム補充液及びメイロン)を使用した。

##### 2.2.1.3.1 バイフィル(Bifil)専用炭酸水素ナトリウム補充液

#### 1) 販売元

味の素。正式名称は前述の通り『バイフィル専用炭酸水素ナトリウム補充液』だが、冗長であるため本論文では、以後単に『バイフィル』と記す。

#### 2) 主要成分及び電解質濃度

表 2.6.①. バイフィルの主要成分

成分名	組成式	含有量 / g・500 mL <sup>-1</sup>
炭酸水素ナトリウム	NaHCO <sub>3</sub>	6.95

表 2.6.②. バイフィルの電解質組成

イオン種	化学式	濃度 / mM
ナトリウムイオン	Na <sup>+</sup>	166
炭酸イオン	HCO <sub>3</sub>	166

##### 2.2.1.3.2 メイロン液(Meylon Solution)

#### 1) 販売元

大塚製薬

## 2) 主要成分及び電解質濃度

表 2.7.①. メイロンの主要成分

成分名	組成式	含有量 / $\text{g} \cdot 20 \text{ mL}^{-1}$
炭酸水素ナトリウム	$\text{NaHCO}_3$	1.4

表 2.7.②. メイロンの電解質組成

イオン種	化学式	濃度 / mM
ナトリウムイオン	$\text{Na}^+$	833
炭酸水素イオン	$\text{HCO}_3^-$	833

## 3) 性状

- ① 無色かつ澄明な液体である。
- ② pH 値は製造直後の平均実測値により、約 7.9 である。  
(規格値：7.0～8.5)
- ③ 生理食塩水に対して、浸透圧比は約 5 である。

### 2.2.1.4 その他

FGF-2 源としては市販の褥創治療薬であるフィブラストスプレーを、フィブラストスプレーの溶媒には生理的食塩水を使用した。

#### 2.2.1.4.1 フィブラストスプレー500

##### 1) 販売元

科研製薬株式会社

##### 2) 組成

###### ① 有効成分

〈凍結乾燥品〉 1 バイアル中にトラフェルミン(遺伝子組換え)  
500  $\mu\text{g}$ (60 万国際標準単位)を含有する。

###### ② 添加物

〈凍結乾燥品〉 エデト酸ナトリウム水和物、白糖、pH 調整  
剤

〈添付溶解液〉 ベンザルコニウム塩化物

##### 3) 性状

- ① 〈凍結乾燥品〉 白色の塊又は粉末である。
- ② 浸透圧比 0.9～1.3(500  $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$  添付溶解液)
- ③ pH 4.8～5.4(500  $\mu\text{g}/5 \text{ mL}$  添付溶解液)

4) 主成分トラフェルミンについて

- ① 一般名：Trafermin(genetical recombination)(トラフェルミン(遺伝子組換え))
- ② 本質：ヒト由来の塩基性線維芽細胞成長因子ゲノム遺伝子の発現により組換え体で生産される 154 個 ( $C_{764}H_{1201}N_{217}O_{219}S_6$ ；分子量：17, 122. 67)及び 153 個 ( $C_{761}H_{1196}N_{216}O_{218}S_6$ ；分子量：17, 051. 59)のアミノ酸残基からなるタンパク質(N 末端；Ala-Ala：65%以上、Ala：35%以下)

2.2.1.4.2 生理的食塩水(physiological salt solution)

1) 販売元

大塚製薬をはじめ各製薬会社で製造販売を行っている。

2) 主要成分及び電解質濃度

表. 2.8.①. 生理食塩水の主要成分

成分名	組成式	含有量 / $g \cdot 500 mL^{-1}$
塩化ナトリウム	NaCl	4.5

表 2.8.②. 生理的食塩水の電解質組成

イオン種	化学式	濃度 / mM
ナトリウムイオン	$Na^+$	154
塩化物イオン	$Cl^-$	154

2.2.2 評価方法

2.2.2.1 走査電子顕微鏡

2.2.2.1.1 原理

走査電子顕微鏡の原理は、電子銃から出た電子を 1 個または 2 個の集束レンズで細く絞り、その電子プローブを試料表面に照射する。透過型電子顕微鏡と違って、走査顕微鏡では電子線を偏光コイルで試料面を 2 次元的に走査し、これと同期して陰極線管のビームを走査させておき、電子プローブの照射によって試料面からの反射電子を電子検出器に受

け増幅して、その強度に応じて陰極線管のビーム強度を変調し、テレビ像として観察する。試料の表面構造を立体的に細かいところまで観察できる特徴がある。それだけではなく、後方散乱電子像(反射電子像)、カソードルミネッセンス像、特性 X 線像などの情報も利用できる。

#### 2.2.2.1.2 観察条件

Ti 棒の析出物の観察には、走査電子顕微鏡(XL30、FEI Company Japan Ltd., Japan)と(Genesis2000,EDAX Japan K.K., Japan)を使用した。

#### 2.2.2.2 誘導結合プラズマ発光分析装置

##### 2.2.2.2.1 原理

ICP 発光分光分析法とは、高周波による誘導放電によるプラズマを励起源とする発光分析である。プラズマ中では Ar ガスが一部電離しており、中心部ほど温度が低いためプラズマの断面はドーナツ状である。試料溶液をプラズマ中に導入することにより、溶液中の元素は熱的に原子状態に解離し、さらに励起されて発光する。

##### 2.2.2.2.2 測定条件

医療用輸液を用いて、作製したリン酸カルシウム過飽和溶液中に基材を浸漬することによってリン酸カルシウムが基材表面に析出する。リン酸カルシウムの析出量は過飽和溶液中のカルシウム及びリンの濃度変化を調べることによって推定可能である。そこで、これらのイオン濃度変化を、誘導結合プラズマ発光分析(ICP)装置(ICP-OES、VISTA-MPX CCD Simultaneous 及び SPS-7800、セイコーインスツルメンツ(株))を使用し測定した。測定に際し、Ca の測定波長を 422.673 nm、P の測定波長を 213.68 nm と設定した。

##### 2.2.2.2.3 検量線

検量線用標準液として、和光純薬工業(株)製の原子吸光分析用カルシウム標準液、関東化学(株)製のリン標準原液を使用した。

- ① NaCl 約 8.77 g、KCl 約 0.52 g を精秤し、純水に溶解し、100 mL にメスフラスコで定容する。マトリックス液として使用する。

表. 2.2.2.2.3. 標準試料

試料 番号	マトリックス 液(mL)	Ca 標準試料 (mL)	P 標準試料 (mL)
A	3.3	0	0
B	3.3	3	3
C	3.3	5	5
D	3.3	8	8

上記 A～D の割合で 4 本のメスフラスコに分取りし、全量が 100ml となるように超純水を添加する。

### 2.2.2.3 紫外可視分光光度計

#### 2.2.2.3.1 原理

本研究で使用する FGF-2 はタンパクの一種であり、一般に応用される下記のタンパク定量方法が応用できる。

- ① Lowry 法(定量範囲 5-100  $\mu\text{g/mL}$ )・・・タンパクによって銅イオン( $\text{Cu}^{2+}$ )が還元( $\text{Cu}^+$ )されることを利用した比色法。銅と結合したフェノール試薬とタンパク(チロシン、トリプトファン、システイン)とが相互作用する際の吸光の変化を測定。
- ② Bradford 法(定量範囲 1-25  $\mu\text{g/mL}$ )・・・タンパクと結合して変色する Coomassie Brilliant Blue(CBB)を用いた比色法。操作が簡単で妨害物質が少ないが、タンパク質によって発色率に差があり、界面活性剤の混入により不正確な場合がある。
- ③ BCA 法(定量範囲 0.5-20  $\mu\text{g/mL}$ )・・・Lowry 法の変法で、銅イオンとキレートを形成する Bichinonic Acid が、銅イオンの還元により変色することを利用した比色法。Bichinonic Acid と混合した試料溶液を加熱する必要がある。
- ④ 紫外吸収法(定量範囲 100-1000  $\mu\text{g/mL}$ )・・・タンパク質が紫外領域(280 nm 付近)に持つ強い吸収を利用して定量する比色法。タンパク質の吸収はタンパク質中のトリプトファン(吸収極大値: 278 nm)、チロシン(275 nm)、フェニルアラニン(257 nm)によるものである。タンパク質の種類によって上記のアミノ酸の含量が異なるので吸光度が異なる欠点があるが、最も簡単で敏速かつ微量で定量でき、しかも試料が回収できる利点がある。

本研究の FGF-2 定量方法として、測定限界(1  $\mu\text{g/mL}$ )と操作の簡便さから Bradford 法を採用した。

#### 2.2.2.3.2 測定条件

FGF-2 の比色法での吸光度測定には(株)島津製作所製 紫外可視分光装置 UV-2450 を使用した。また、Bradford 法でのタンパク定量試薬として、Bio-Rad 社から販売されている Protein Assay Reagent Kit を用いた。キットの使用方法に従い、吸光度測定は測定波長を 595 nm に固定し、染色液と測定試料は 1 : 4 の体積比で混合した。また、染色液を添加した後、室温で 5 分以上インキュベートし、一時間以内に測定した。

#### 2.2.2.3.3 検量線

フィブラスト 100  $\mu\text{g/mL}$  の溶液を 500  $\mu\text{L}$  取り出し、4500  $\mu\text{L}$  クエン酸バッファを添加し、10  $\mu\text{g/mL}$  の標準試料とする。同じ方法で、5、2.5、1、0.5 及び 0  $\mu\text{g/mL}$  の標準試料を調製する。

#### 2.2.2.4 粉末 X 線回折

##### 2.2.2.4.1 原理

結晶は、非晶質とは異なって周期的な原子配列をもっており、この規則性は単位格子とよばれる最小単位の繰り返しとなっている。結晶に単一波長の平行 X 線を照射すると、各原子と X 線が相互作用して、X 線が散乱されて干渉を起こす。結晶のもつ規則性により、Bragg の条件を満足する場合には、散乱された X 線が強め合う回折とよばれる現象が起こる。したがって、回折現象を解析することにより結晶の原子配列を知ることができる。

##### 2.2.2.4.2 測定条件

Ti 棒の表面に担持したアパタイトを測定するため、薬匙で Ti 棒表面に析出したリン酸カルシウム層を削り落とし、無反射シリコン板にアルコールで塗布した。測定は、(株)リガク製粉末 X 線回折装置 RINT-2250 を用いて行った。

表.2.2.2.4. 粉末 X 線回折測定条件

Mode	Fixed-time scan
Traget	Monochromatized Cu K $\alpha$
Voltage	40 kV
Current	300 mA
Sampling step	0.01° (2 $\theta$ )
Counting time	5 s
Slit system	DS1°-RS0.3mm-SS1°
Scanning angle	2-40° (2 $\theta$ )

## 2.3 医療用輸液混合溶液のリン酸カルシウム形成能評価

### 2.3.1 実験目的

従来の研究で使用した医療用溶液について、クリニザルツ B 液 (Klinisalz B) は入手しにくい薬剤であり、バイフィル(Bifil)は透析ろ過型人工腎臓用透析液のため、直接人体に注射できない欠点がある。その代わりに、本研究では、クリニザルツ B 液と同じくリン酸イオンを含有するソリターT2 (SOLITA-T2) を使用し、バイフィルと同じ pH 調整効果のメイロン(Meylon)に変更した。従来の研究に従い、医療用輸液であるソリタ T2 液、リンゲル液に静脈注射用薬剤のメイロンを添加し、リン酸カルシウム過飽和溶液を作成することができる。過飽和度を上昇させることにより低結晶性アパタイトの形成量が増大でき、その方法としてはエタノール添加法及び別種の医療用輸液(コンクライト-Ca 液及びコンクライト液-PK)添加法が考えられる。本研究では残留エタノールによる患者への影響を考慮しなくても良い、後者の方法で過飽和度を上昇させ、リン酸カルシウム過飽和溶液を混合する最適条件を目的としている。

### 2.3.2 実験操作

#### 2.3.2.1 パラメータについて

リン酸カルシウム過飽和溶液の組成の違いによって沈澱するリン酸カルシウム量が異なることが予想されるため、以下の 3 つのパラメータを変化させて様々な組成のリン酸カルシウム過飽和溶液を作製し、実験に用いた。

#### ① Ca/P のモル比

0.5、1.0、及び 1.5 の 3 段階とした。但し、溶液組成の Ca/P モル比と沈澱の Ca/P モル比は必ずしも一致せず、過去の研究ではいずれの Ca/P モル比でも低結晶質アパタイト様物質が形成したことを確認している。

#### ② Ca と P 濃度

以下、Ca と P 濃度は Ratio と記す。Ratio は Ca と P の濃度の倍率を表し、本研究では 1.0、1.5 及び 2.0 に設定した。つまり、市販のリンゲル液の Ca 濃度を 1 倍、市販のソリタ T2 液の P 濃度を 1 倍と設定し、コンクライト-Ca 液とコンクライト液-P を添加することによって、Ca、P の濃度を上昇させて、Ratio を変化させた。本実験で、リ

ン酸カルシウム過飽和溶液を作成する際に混合する Ca 溶液と P 溶液の濃度の比率は常に同じ値とした。

### ③ $\text{NaHCO}_3$ 濃度

添加する  $\text{NaHCO}_3$  の濃度は近藤(2004)に基づき、7.90、10.86、15.09 mM と設定した。 $\text{NaHCO}_3$  を添加することによって、リン酸カルシウム過飽和溶液の pH が上昇するため、リン酸カルシウムの沈澱反応が促進される。また、脱炭酸反応によってさらに pH は上昇するため、脱炭酸速度を変化させることによって析出するリン酸カルシウムの相も変化する可能性がある。

#### 2.3.2.1.1 基本型の混合法

Ratio=1.0、すなわちコンクライト-Ca 及びコンクライト液-PK を使用しないリン酸カルシウム過飽和溶液の混合比は以下のようにして算出した。

$$V_{Ca} + V_P + V_{CO_3} = V_{total} \quad \cdots \cdots \textcircled{1}$$

$$\frac{R_{Ca} \times V_{Ca}}{S_{PO_4} \times V_P} = A_{Ca/P} \quad \cdots \cdots \textcircled{2}$$

$$\frac{V_{CO_3} \times 100}{V_{Ca} + V_P + V_{CO_3}} = V_M \quad \cdots \cdots \textcircled{3}$$

$$\frac{833}{166} \times V_M = V_B \quad \cdots \cdots \textcircled{4}$$

ここで、上記の式に使用している各変数は次の通りである。

- $V_{Ca}$ : 含Ca液（リンゲル液）の体積
- $V_P$ : 含P液（ソリタ T2液）の体積
- $V_{CO_3}$ : 含  $CO_3$  液（メイロン）の体積
- $V_{total}$ : 全体体積
- $V_M$ : メイロンの体積
- $V_B$ : Bifil液の体積
- $R_{Ca}$ : リンゲル液の Ca の濃度

$S_{PO_4}$ : ソリタ T2液の P の濃度

$A_{Ca/P}$ : Ca / P のモル比

$V_{total}$ 、 $R_{Ca}$ 、 $S_{PO_4}$ 、 $V_B$  を変化することによって、混合割合が変わる。  
つまり、リンゲル液、ソリタ T2、メイロンの液量が決定できる。算出された混合比は 2.3.2.2 節にまとめた。

#### 2.3.2.1.2 発展型の混合法

リン酸カルシウム過飽和溶液の過飽和度上昇のため、混合するカルシウム溶液(リンゲル液)およびリン溶液(ソリタ-T2)の初期濃度を上昇させた。表 2.11 に示した通り、市販のリンゲル液の Ca 濃度(2.25 mM)およびソリタ-T2 の P 濃度(10 mM)を基準に、1.0 倍、1.5 倍および 2.0 倍の濃度となるように設定した。

表 2.11. Ratio と Ca、P 濃度の関係

Ratio	Ca 濃度 (mM)	P 濃度 (mM)
1.00	2.250 (リンゲルの Ca 濃度)	10 (ソリタ T2 の P 濃度)
1.50	3.375	15
2.00	4.500	20

濃度を上昇させるために添加したのは、リンゲル液に対してはコンクライト Ca、ソリタ-T2 に対してはコンクライト液 PK であり、混合比は以下の通り算出した。

ここで、Ratio は  $x$  とすると、

$$R_{Ca} \times V_R + C_{CaCa} \times V_{CCa} = R_{Ca} \times x \quad \cdots \cdots \textcircled{5}$$

$$S_{PO_4} \times V_S + C_{PKP} \times V_{CPK} = S_{PO_4} \times x \quad \cdots \cdots \textcircled{6}$$

$$V_R + V_{CCa} = V_{Ca} \quad \cdots \cdots \textcircled{7}$$

$$V_S + V_{CPK} = V_P \quad \cdots \cdots \textcircled{8}$$

ここで、上記の式に使用している変数は下記の通りである。

$V_R$ : リンゲル液の体積

$V_S$ : ソリタ T2 液の体積

$C_{CaCa}$ : コンクライト-Ca の Ca 濃度

$C_{CPK}$ : コンクライト-PKのP濃度

$V_{CCa}$ : コンクライト-Ca液の体積

$V_{CPK}$ : コンクライト-P液の体積

算出された混合比は表 3.2 にまとめた。

先に示した Ca/P モル比、Ratio および  $\text{NaHCO}_3$  濃度に加え、3 段階の溶液温度を加えた表 3.2 にある全てのパラメータを満たすリン酸カルシウム過飽和溶液、全 54 種類を使用して実験を行った。

表 2.12. パラメータのまとめ

パラメータ	単位	設定値
Ca/P モル比		0.5、1.0、1.5
Ratio		1.0、1.5、2.0
$\text{NaHCO}_3$ 濃度	mM	7.90、10.86、15.09
温度	℃	37、50

#### 2.3.2.2 混合条件

リン酸カルシウム過飽和溶液は、2.3.2.1 節で述べたとおり Ratio を揃えた Ca 溶液と P 溶液の混合により作成できるが、操作の簡便性から、必要となる医療用輸液(リンゲル液、ソリタ-T2、メイロン、コンクライト Ca およびコンクライト溶液 PK)を直接混合しても調製は可能である。本節では、個々の医療用輸液の混合体積比をまとめた。

2.3.2.2.1 節および 2.3.2.2.2 節にまとめた混合体積比を元に調製された 15 mL の各リン酸カルシウム過飽和溶液をポリスチレン製の容器に注ぎ、室温で 1 日静置した後に、溶液の pH 測定、溶液中の残留 Ca および P 濃度測定した。

##### 2.3.2.2.1 基本型

基本型のリン酸カルシウム過飽和溶液は Ratio を固定しているので、Ca/P モル比と  $\text{NaHCO}_3$  濃度を変化させた全 9 組成となる。表 3.3 に、15 mL のリン酸カルシウム過飽和溶液を作成する際の混合比を示す。

表. 2.13.①. リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=0.5、Ratio=1.0)

NaHCO <sub>3</sub> concentration	Ringer's solution	Solita T2	Meylon
m M	m L	m L	m L
7.90	13.67	6.14	0.19
10.86	13.62	6.12	0.26
15.09	13.55	6.08	0.36

表. 2.13.②. リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=1.0、Ratio=1.0)

NaHCO <sub>3</sub> concentration	Ringer's solution	Solita T2	Meylon
m M	m L	m L	m L
7.90	16.18	3.63	0.19
10.86	16.12	3.62	0.26
15.09	16.04	3.60	0.36

表. 2.13.③. リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=1.5、Ratio=1.0)

NaHCO <sub>3</sub> concentration	Ringer's solution	Solita T2	Meylon
m M	m L	m L	m L
7.90	17.23	2.58	0.19
10.86	17.17	2.57	0.26
15.09	17.08	2.56	0.36

#### 2.3.2.2.2 発展型

発展型のリン酸カルシウム過飽和溶液は Ratio の設定が 1.5 および 2.0 のため、組成は全 18 種となる。表 3.4 に全ての混合比を示す。

表. 2.14.①. 高濃度リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=0.5、Ratio=1.5)

NaHCO <sub>3</sub> conc.	Ringer's solution	Conclyte Ca	Solita T2	Conclyte soln. PK	Meylon
m M	m L	μL	m L	μL	m L
7.90	13.64	30.82	6.08	62.63	0.19
10.86	13.59	30.71	6.05	63.41	0.26
15.09	13.52	30.56	6.02	62.09	0.36

表. 2.14.②. 高濃度リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=1.0、Ratio=1.5)

NaHCO <sub>3</sub> conc.	Ringer's solution	Conclyte Ca	Solita T2	Conclyte soln. PK	Meylon
m M	m L	μL	m L	μL	m L
7.90	16.14	36.47	3.59	37.06	0.19
10.86	16.08	36.34	3.58	36.92	0.26
15.09	16.00	36.16	3.56	36.73	0.36

表. 2.14.③. 高濃度リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=1.5、Ratio=1.5)

NaHCO <sub>3</sub> conc.	Ringer's solution	Conclyte Ca	Solita T2	Conclyte soln. PK	Meylon
m M	m L	μL	m L	μL	m L
7.90	17.19	38.85	2.55	26.31	0.19
10.86	17.13	38.71	2.54	26.22	0.26
15.09	17.04	38.51	2.53	26.08	0.36

表. 2.14.④. 高濃度リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=0.5、Ratio=2.0)

NaHCO <sub>3</sub> conc.	Ringer's solution	Conclyte Ca	Solita T2	Conclyte soln. PK	Meylon
m M	m L	μL	m L	μL	m L
7.90	13.61	61.65	6.01	125.27	0.19
10.86	13.56	61.43	5.99	124.82	0.26
15.09	13.49	61.11	5.96	124.18	0.36

表. 2.14.⑤. 高濃度リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=1.0、Ratio=2.0)

NaHCO <sub>3</sub> conc.	Ringer's solution	Conclyte Ca	Solita T2	Conclyte soln. PK	Meylon
m M	m L	μL	m L	μL	m L
7.90	16.11	72.95	3.56	74.12	0.19
10.86	16.05	72.69	3.54	73.85	0.26
15.09	15.97	72.31	3.53	73.47	0.36

表. 2.14.⑥. 高濃度リン酸カルシウム過飽和溶液組成(Ca/P=1.5、Ratio=2.0)

NaHCO <sub>3</sub> conc.	Ringer's solution	Conclyte Ca	Solita T2	Conclyte soln. PK	Meylon
m M	m L	μL	m L	μL	m L
7.90	17.15	77.70	2.53	52.63	0.19
10.86	17.09	77.42	2.52	52.44	0.26
15.09	17.00	77.02	2.50	52.17	0.36

## 2.3.2.3 実験手順

- ① 表 2.13 および 2.14 に示した体積のソリター T2、コンクライト液ー PK、リンゲル液、コンクライトー Ca 及びメイロン液をこの順番で混合し、血球分析用バイアルに入れる。
- ② 作製した溶液を pH 測定する。
- ③ 混合溶液を 3 mL 分取し、ファルコンチューブにいれ、1 M 塩酸を 30 μl 加え、さらに 6 mL 超純水を添加する。この液は初期溶液濃度測定用として ICP 測定に用いる。
- ④ 血球分析用バイアルの蓋を被せる程度で、37 °C もしくは 50 °C のインキュベータ内に一日静置する。
- ⑤ 一日後、それぞれの溶液を pH 測定する。
- ⑥ ポアサイズ 0.22 μm のフィルタでろ過した混合溶液を 3 mL 分取し、ファルコンチューブにいれ、1 M 塩酸を 30 μL 加え、更に 6mL 超純水を添加する。この液は最終溶液濃度測定用として ICP 測定に用いる。

### 2.3.3 実験結果

#### 2.3.3.1 pH 測定データ及び pH 図

各種 RSM 液を調製し、各温度 1 日静置した前後の RSM 液の pH を測定した(表 2.15)。すべての RSM 液は、調製直後の pH と比較して静置後の pH が高くなる傾向が見られた。また、RSM 液の Ca/P モル比、NaHCO<sub>3</sub> 濃度及び静置温度が高くなるほど高い pH が測定された。

表. 2.15.①. リン酸カルシウム溶液の pH 値(Ratio=1.0)

Ca/P	Ratio	NaHCO <sub>3</sub> concentration mM	Initial		Final (37°C)		Final (50 °C)	
			pH	Temp °C	pH	Temp °C	pH	Temp °C
0.5	1.0	7.90	6.58	24.9	7.79	31.5	8.88	42.2
	1.0	10.86	6.78	24.9	8.22	32.5	8.98	44.3
	1.0	15.09	6.85	24.8	8.67	31.6	9.09	43.9
1.0	1.0	7.90	6.79	22.5	8.11	30.7	8.85	42.5
	1.0	10.86	6.96	22.2	8.41	32.3	9.01	44.6
	1.0	15.09	7.08	22.5	8.68	32.2	9.13	44.2
1.5	1.0	7.90	6.79	23.9	8.32	33.1	8.81	43.1
	1.0	10.86	7.09	23.9	8.58	33.5	8.97	44.6
	1.0	15.09	7.23	24.1	8.74	32.8	9.13	44.7

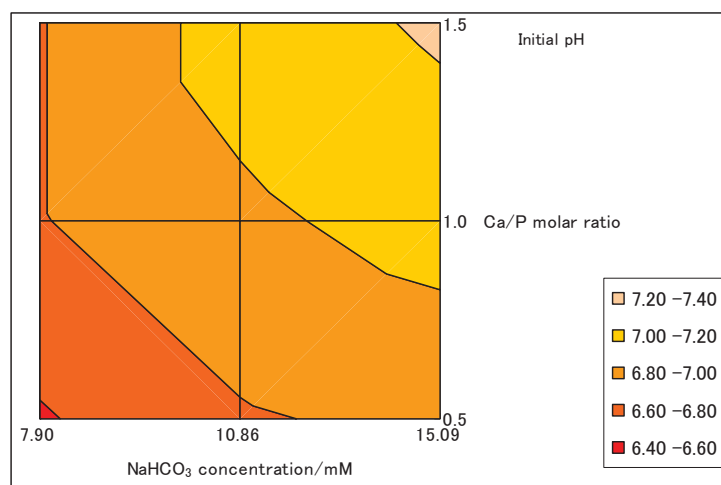


図. 2.1.1.①. リン酸カルシウム過飽和溶液の初期 pH. (25 °C、Ratio=1.0)

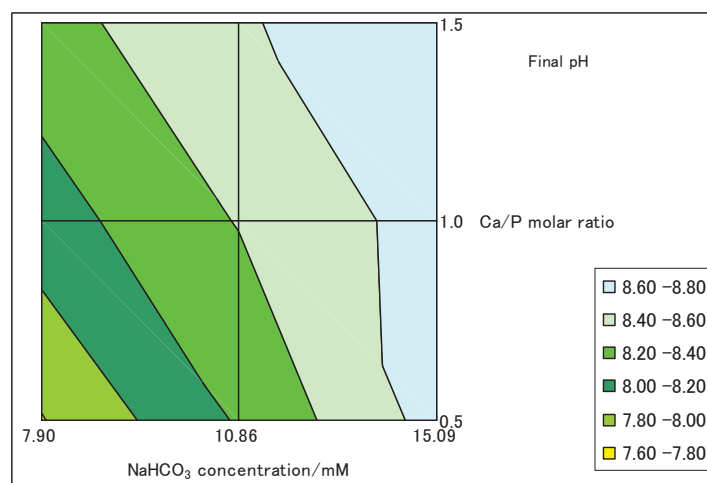


図. 2.1.1.②. リン酸カルシウム過飽和溶液の終了 pH. (37 °C、Ratio=1.0)

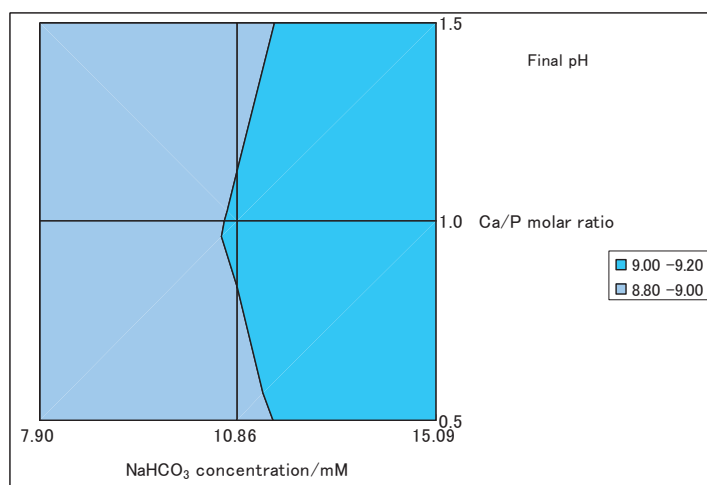


図. 2.1.1.③. リン酸カルシウム過飽和溶液の終了 pH. (50 °C、Ratio=1.0)

表. 2.15.②. リン酸カルシウム溶液の pH 値(Ratio=1.5 )

Ca/P	Ratio	NaHCO <sub>3</sub> concentration mM	Initial		Final (37°C)		Final (50 °C)	
			pH	Temp ℃	pH	Temp ℃	pH	Temp ℃
0.5	1.5	7.90	6.78	24.8	7.90	32.7	8.65	43.9
	1.5	10.86	6.86	24.7	8.29	31.8	8.94	43.8
	1.5	15.09	6.99	24.7	8.56	31.5	9.14	43.4
1.0	1.5	7.90	6.93	22.4	8.02	32.0	8.78	44.1
	1.5	10.86	7.02	22.3	8.28	32.2	9.08	44.3
	1.5	15.09	7.17	21.9	8.58	32.4	9.11	43.6
1.5	1.5	7.90	7.00	24.1	8.38	33.4	8.72	43.7
	1.5	10.86	7.18	24.1	8.58	33.2	8.96	44.7
	1.5	15.09	7.29	24.2	8.68	32.6	9.11	44.2

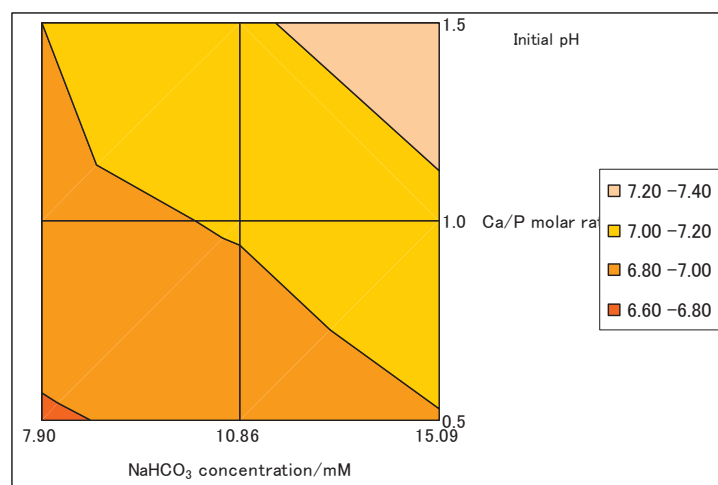


図. 2.1.1.④. リン酸カルシウム過飽和溶液の初期 pH. (25 °C、Ratio=1.5)

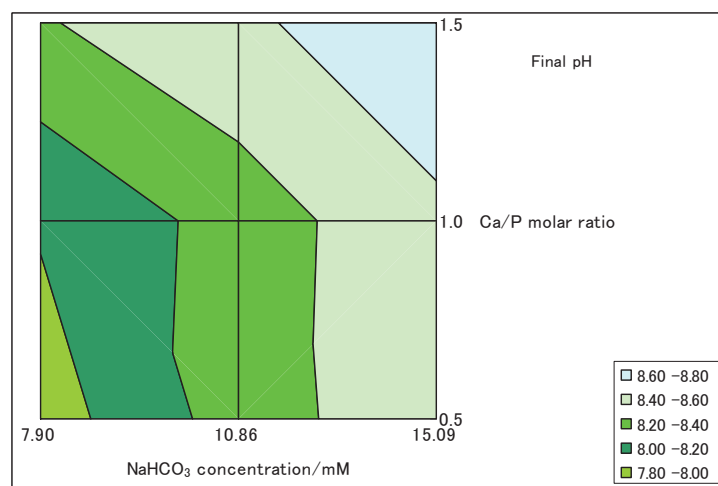


図. 2.1.1.⑤. リン酸カルシウム過飽和溶液の終了 pH. (37 °C、Ratio=1.5)

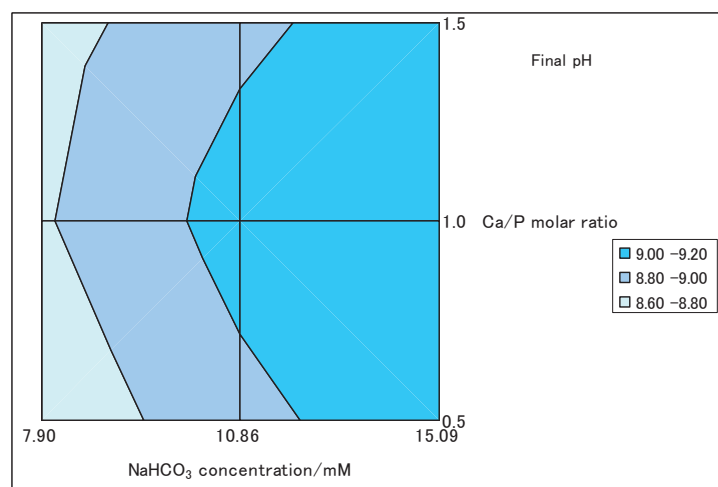


図. 2.1.1.⑥. リン酸カルシウム過飽和溶液の終了 pH. (50 °C、Ratio=1.5)

表. 2.15.③. リン酸カルシウム溶液の pH 値(Ratio=2.0)

Ca/P	Ratio	NaHCO <sub>3</sub> concentration mM	Initial		Final (37°C)		Final (50 °C)	
			pH	Temp °C	pH	Temp °C	pH	Temp °C
0.5	2.0	7.90	6.88	24.8	7.92	31.9	8.56	44.7
	2.0	10.86	6.98	24.6	8.26	32.3	8.96	42.5
	2.0	15.09	7.03	24.7	8.58	32.0	9.16	42.6
1.0	2.0	7.90	7.02	22.3	8.12	32.3	8.78	43.6
	2.0	10.86	7.10	22.0	8.28	32.3	8.95	43.6
	2.0	15.09	7.17	21.9	8.46	32.4	9.16	43.1
1.5	2.0	7.90	7.12	24.2	8.05	33.5	8.72	44.1
	2.0	10.86	7.20	24.2	8.17	33.5	8.96	43.5
	2.0	15.09	7.30	24.4	8.58	32.0	9.10	43.7

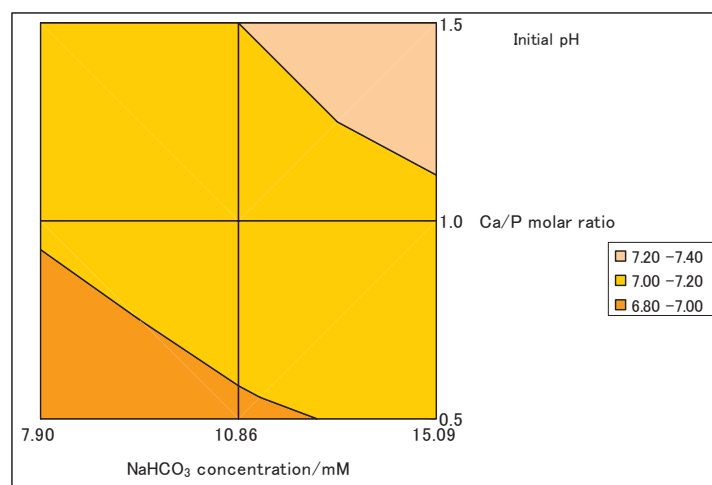


図. 2.1.⑦. リン酸カルシウム過飽和溶液の初期 pH. (50 °C、Ratio=2.0)

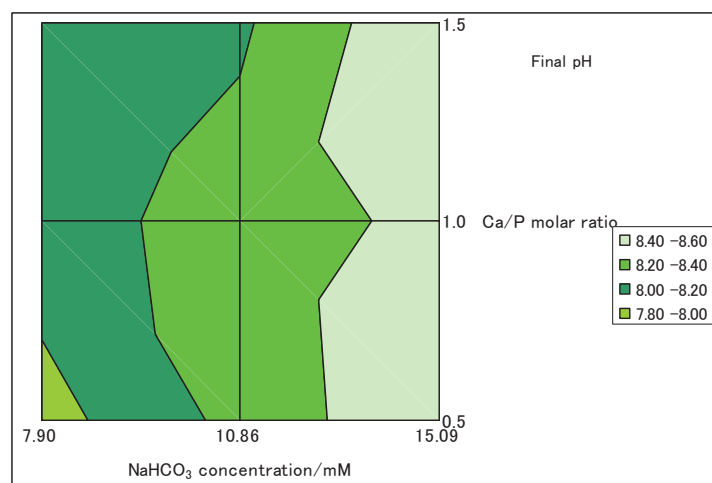


図. 2.1.⑧. リン酸カルシウム過飽和溶液の終了 pH. (37 °C、Ratio=2.0)

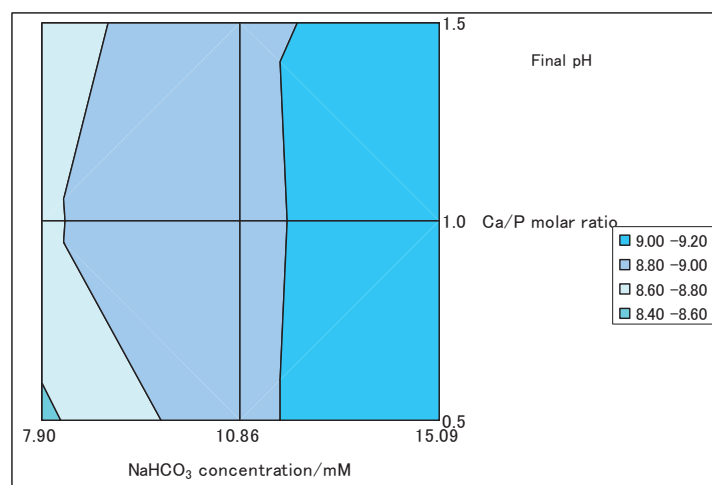


図. 2.1.⑨. リン酸カルシウム過飽和溶液の終了 pH. (50 °C、Ratio=2.0)

### 2.3.3.2 ICP データ及び ICP 図

リン酸カルシウム過飽和溶液を 37 °C で 1 日静置すると沈澱が生じた。その量を定量化する目的で、上澄み液中の Ca 及び P のモル数変化を、ICP を用いた化学組成分析により測定した。結果を表 2.16.①(37°C)、表 2.16.①(50°C)、及び図 2.2、図 2.3 に示す。

表. 2.16.①. 37°Cにおけるリン酸カルシウム過飽和溶液中からの Ca 及び P の減少量

Ca/P (計算)	Ratio	NaHCO <sub>3</sub> Concentration mM	溶液中	減少 Ca モル数 mM(20mL) <sup>-1</sup>	減少 P モル数 mM(20mL) <sup>-1</sup>	沈殿物
			Ca/P 比			Ca/P 比
0.5	1.0	7.90	0.46	2.49	2.07	1.20
		10.86	0.46	2.64	2.30	1.15
		15.09	0.45	2.62	2.15	1.22
	1.5	7.90	0.47	4.09	3.52	1.16
		10.86	0.47	4.11	3.28	1.26
		15.09	0.47	4.16	3.25	1.28
	2.0	7.90	0.48	5.56	4.99	1.12
		10.86	0.47	5.43	4.43	1.23
		15.09	0.47	5.60	3.41	1.64
1.0	1.0	7.90	0.96	2.90	2.33	1.25
		10.86	0.99	3.19	2.40	1.33
		15.09	0.93	3.04	2.39	1.27
	1.5	7.90	0.98	4.77	3.81	1.25
		10.86	0.98	3.36	2.87	1.17
		15.09	1.00	5.29	6.80	0.78
	2.0	7.90	1.03	6.95	5.52	1.26
		10.86	1.03	7.16	5.54	1.29
		15.09	1.00	6.95	5.38	1.29
1.5	1.0	7.90	1.55	1.31	1.08	1.21
		10.86	1.55	1.84	1.37	1.35
		15.09	1.49	1.60	1.21	1.33
	1.5	7.90	1.52	3.01	2.59	1.16
		10.86	1.52	3.38	2.82	1.20
		15.09	1.52	3.55	2.79	1.27
	2.0	7.90	1.54	7.09	5.44	1.30
		10.86	1.56	7.20	5.29	1.36
		15.09	1.61	8.06	6.49	1.24

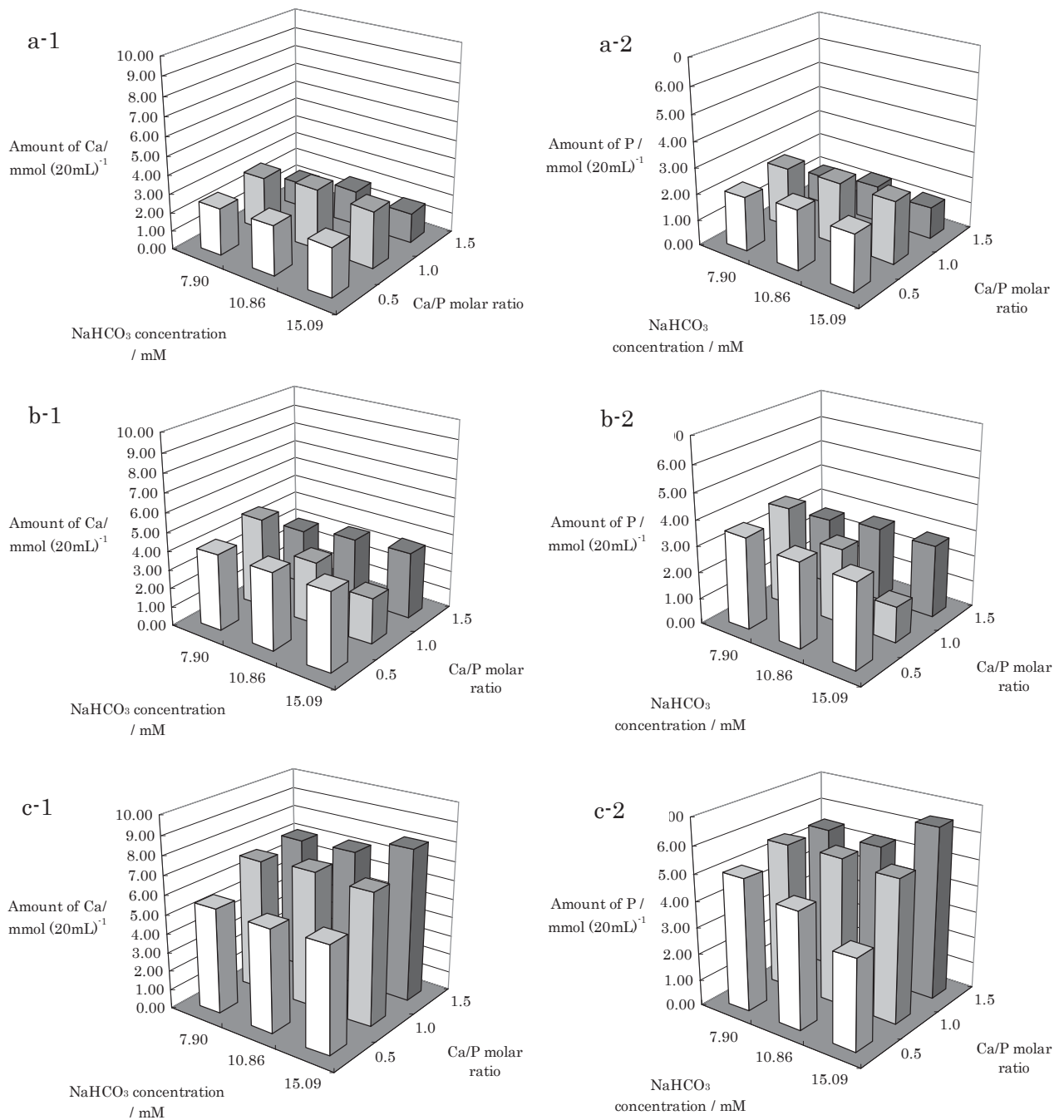


図. 2.2. 37°Cにおけるリン酸カルシウム過飽和溶液中からの Ca 及び P の減少量.  
Ratio=1.0 の Ca 減少量(a-1)及び P 減少量(a-2)、Ratio=1.5 の Ca 減少量(b-1)及び P 減少量(b-2)、及び Ratio=2.0 の Ca 減少量(c-1) 及び P 減少量(c-2)

表. 2.16.②. 50℃におけるリン酸カルシウム過飽和溶液中からの Ca 及び P の減少量

Ca/P (計算)	Ratio	NaHCO <sub>3</sub> Concentration mM	溶液中	減少 Ca モル数 mM(20mL) <sup>-1</sup>	減少 P モル数 mM(20mL) <sup>-1</sup>	沈殿物
			Ca/P 比			Ca/P 比
0.5	1.0	7.90	0.49	2.82	1.58	1.79
		10.86	0.46	2.72	1.58	1.73
		15.09	0.44	2.63	2.23	1.18
	1.5	7.90	0.46	4.20	3.26	1.29
		10.86	0.48	4.74	3.80	1.25
		15.09	0.50	4.52	2.51	1.80
	2.0	7.90	0.50	6.21	4.33	1.43
		10.86	0.51	6.71	5.62	1.19
		15.09	0.50	6.18	3.76	1.65
1.0	1.0	7.90	1.01	3.76	2.88	1.31
		10.86	1.08	3.91	2.62	1.49
		15.09	1.00	3.60	2.64	1.36
	1.5	7.90	1.09	6.02	4.35	1.38
		10.86	1.11	5.99	4.22	1.42
		15.09	1.10	6.06	4.17	1.45
	2.0	7.90	1.13	9.14	6.60	1.38
		10.86	1.14	8.45	5.65	1.50
		15.09	1.13	8.43	5.63	1.50
1.5	1.0	7.90	1.71	4.51	3.01	1.50
		10.86	1.69	4.44	2.94	1.51
		15.09	1.68	4.49	2.88	1.56
	1.5	7.90	1.67	6.71	4.65	1.44
		10.86	1.74	6.97	4.48	1.56
		15.09	1.65	6.51	4.32	1.51
	2.0	7.90	1.48	9.38	6.32	1.48
		10.86	1.50	9.55	6.23	1.54
		15.09	1.46	9.35	6.07	1.54

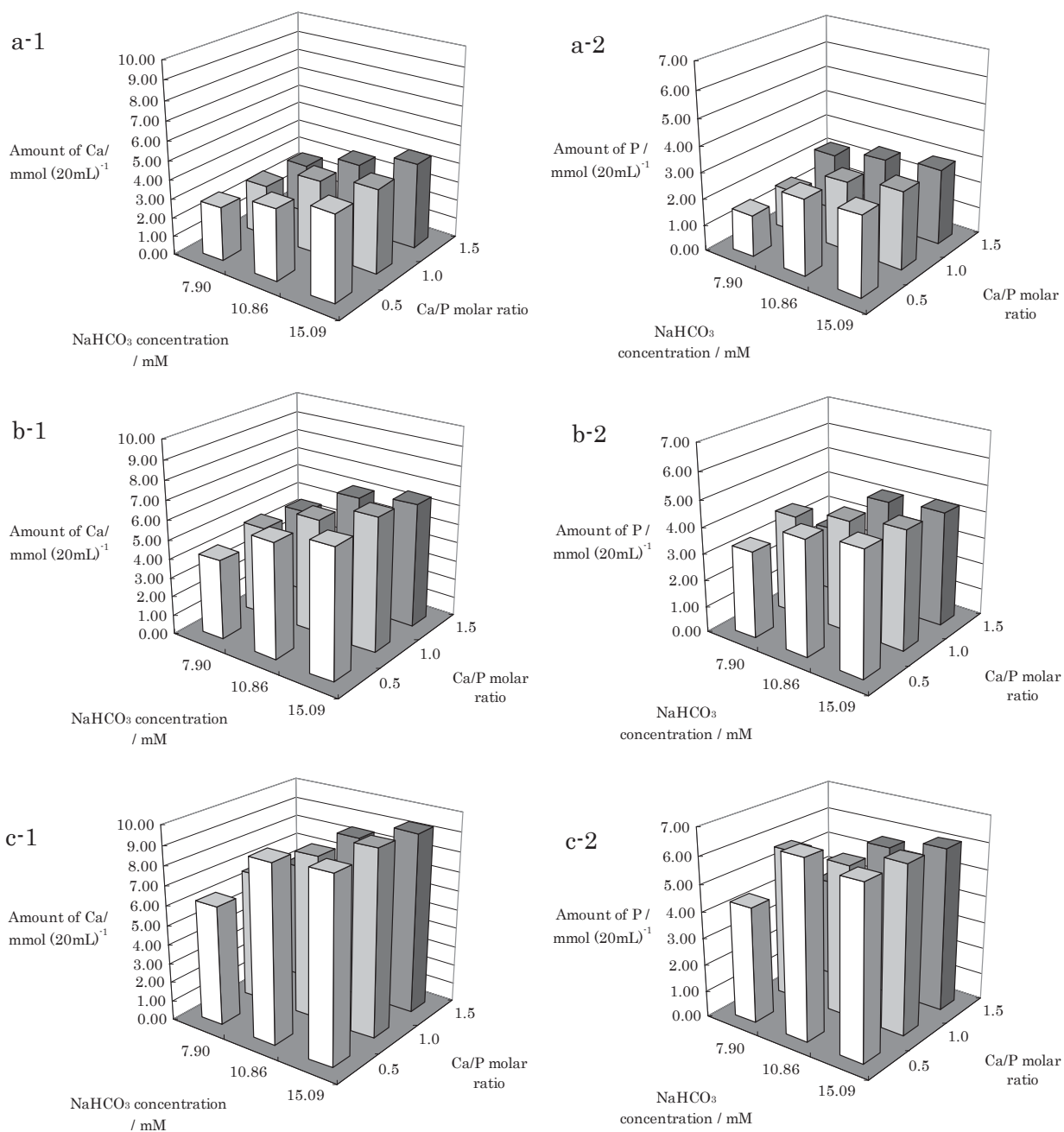


図. 2.3. 50℃におけるリン酸カルシウム過飽和溶液中からのCa及びPの減少量.  
Ratio=1.0のCa減少量(a-1)及びP減少量(a-2)、Ratio=1.5のCa減少量(b-1)及びP減少量(b-2)、及びRatio=2.0のCa減少量(c-1)及びP減少量(c-2)

## 2.3.4 考察

### 2.3.4.1 pH 図について

リン酸カルシウム過飽和溶液の pH 値は、リン酸カルシウム(アパタイト)の析出し易い方向に変化していることが確かめられた。調製したすべてのリン酸カルシウム過飽和溶液の初期 pH は 6.58~7.30 の範囲に収まった(表 2.14、2.15)。アパタイトが形成されうる最低 pH は 7.4 程度と言われており、その pH 値と比較すると若干低めの溶液が作製されたことが分かる。しかし 1 日静置後の pH は、37℃ 処理の場合で 7.79~8.74、50℃ 処理では 8.56~9.16 と全て 7.4 より大きい値を示しており(表 2.14、2.15)、アパタイトが十分析出していることが分かった。実際、1 日静置した後のリン酸カルシウム過飽和溶液はどれも白沈を生じており、それらは溶液組成からアパタイト、あるいはその前駆体であるアモルファスリン酸カルシウム(Amorphous Calcium Phosphate、ACP)や octacalcium phosphate (OCP)であると予想される。このことから、本実験で調製したリン酸カルシウム過飽和溶液はどれも、リン酸カルシウム過飽和溶液を用いた過去の報告(たとえば、海老原 2005)と同様に、リン酸カルシウムコーティングに利用可能であることが示唆された。

処理温度の差異について言及すると、37℃ に比べて 50℃ で処理した方が pH 値は上昇することが明らかとなった。主な原因は、高温での処理に伴いリン酸カルシウム過飽和溶液中の  $\text{HCO}_3^-$  から、 $\text{CO}_2$  としての放出が促進された事が考えられる。また、測定した pH をまとめた等値線図(図 2.1①~⑨)では、37℃ 処理後の pH 等高線が  $\text{NaHCO}_3$  濃度軸に対して斜めに交わるのに対して、50℃ になるとほぼ垂直へと傾きが変化している。この事実は、比較的溫度が低い領域では Ca 濃度も pH 変化に影響する傾向を示し、溫度を 50℃ まで上げると添加した  $\text{NaHCO}_3$  の量が pH に対して支配的になると言うことを意味している。別の言い方をすると、50℃ で 1 日間処理すると  $\text{CO}_2$  の放出がほぼ平衡状態に達して、同等の pH を示すようになったということが示唆される。 $\text{CO}_2$  放出に伴うリン酸カルシウム過飽和溶液の pH 変化がリン酸カルシウム析出を促進させると考えられるため、50℃ 処理の場合、1 日より短い時間でリン酸カルシウムの析出が終了することになる。つまり、基材上での不均質核形成が起これる時間が 37℃ よりも短く、均一なリン酸カルシウム表面層を形成するという目的にはどちらかといえば 37℃ 処理が適していると考えられる。

#### 2.3.4.2 ICP データについて

各種リン酸カルシウム過飽和溶液の **Ratio** を高く設定することによって、**Ca** 及び **P** の減少量が多くなる傾向が明らかとなった(表 2.16、2.17 及び図 2.2、2.3)。**Ratio** を高く設定するとリン酸カルシウムの過飽和度も上昇するため、この傾向は妥当であると考えられる。

37 °C 処理の場合、終了 pH は **Ca/P** モル比及び  $\text{NaHCO}_3$  濃度の変化によって異なったが、**Ca** 及び **P** の減少量が終了 pH から影響を受けていることを示すデータは得られなかった(図 2.2)。一方 50 °C 処理の場合、終了 pH が高くなるほど、すなわち  $\text{NaHCO}_3$  濃度が高くなるほど **Ca** 及び **P** の減少量が多くなる傾向がわかった(図 2.3)。これは 2.3.4.1 節でも考察したように、 $\text{CO}_2$  の放出がほぼ平衡状態に達して  $\text{NaHCO}_3$  濃度に対応する pH 値に収束したことが起因すると示唆される。なぜなら、 $\text{NaHCO}_3$  濃度を変化させてもリン酸カルシウム過飽和溶液中の **Ca** 及び **P** 濃度はほとんど変化しないことから、それぞれの終了 pH 値で析出しうる量のリン酸カルシウムが形成されたと考えられるためである。

**Ca** 及び **P** の減少量から析出物の **Ca/P** モル比が推定できるが(表 2.15、2.16)、その結果は一部水酸アパタイトの **Ca/P** モル比である 1.67 を超える析出物も存在するものの、大方は 1.12~1.6 程度となっている。この傾向は、析出物の相が大きく関わっているものと想像される。リン酸カルシウム過飽和溶液から最も早く沈殿を起こすのは ACP と言われている。析出相はやがて脱水を繰り返し、ACP(**Ca/P** モル比=0.50~2.00)から DCPD ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、**Ca/P** モル比=1.00)あるいは OCP ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、**Ca/P** モル比=1.33)を経て低結晶質の HAP が形成される。析出したばかりの沈殿は水酸アパタイトへの熟成時間が十分ではないために 1.67 よりも低い **Ca/P** モル比である可能性が高い。この傾向は、リン酸カルシウム過飽和溶液から沈殿させたリン酸カルシウムに良く見られるもので、基材上に析出させたリン酸カルシウムが OCP と水酸アパタイトの中間的な XRD パターンを示すことは広く知られている。つまり、本実験で得られた析出物も、低結晶質アパタイトではなくその前駆状態であると推定される。析出物の XRD 測定を試みたものの明瞭な回折パターンが認められなかったが、そのこと自体が析出物が結晶性の高い物質ではないことを示唆している。

#### 2.3.4.3 パラメータについて

節 2.3 の研究の結果、リン酸カルシウムの析出に最も影響を与えるパラメータは処理温度と  $\text{NaHCO}_3$  濃度であった。節 2.4 以降で取り組む陽極

酸化チタン表面へのリン酸カルシウム層の形成とその後の FGF-2 の共沈担持でも、これらのパラメータは鍵となることが予想される。前者の場合、処理温度と  $\text{NaHCO}_3$  濃度について、特に制限なく変化させることが可能である。一方で、FGF-2 を扱う場合には、FGF-2 の失活を抑制する目的から、本章で設定した処理温度である 37 °C や 50 °C では高すぎると考えられる。FGF-2 の失活を考慮すると 25 °C 以下の処理が求められるが、脱炭酸反応が緩慢なので、pH があまり上昇せず、その結果十分量の沈澱が生じないことも予想される。これについて近藤 (2003) はメイロンと同様の炭酸水素ナトリウム溶液であるバイフィルの添加量が多くなるほど、pH 上昇が早くなることを報告した。以上のことから、添加した  $\text{NaHCO}_3$  の量を増加させると、溶液中の沈殿が生成する速度が上昇できると予想され、比較的低温での処理となる FGF-2 の共沈担持に有利になると考えられる。

## 2.4 陽極酸化 Ti 棒のリン酸カルシウムコーティング層

### 2.4.1 実験目的

前節では、医療用輸液の混合により得られた RSM 液を 37℃ 以上に加熱することによって低結晶質アパタイトがよく形成されることが明らかとなった。つまり、37℃ 以上に加熱した RSM 液に陽極酸化皮膜を有する Ti キャンセラス・スクリューを浸漬することによって、その表面にリン酸カルシウムコーティングを形成可能と考えられ、リン酸カルシウム過飽和溶液からの低結晶質アパタイトの不均質核形成促進に有効な前処理操作になりうると期待できる。

本節では、Ti キャンセラス・スクリュー上へのリン酸カルシウムコーティングの最適条件決定を目的としている。

### 2.4.2 実験操作

#### 2.4.2.1 基材について

本来であれば動物実験、あるいは臨床研究を見据えて、基材には実際に使用する陽極酸化皮膜を有する Ti キャンセラス・スクリューを使用して研究すべきであるが、スクリーニングの段階であることも考慮し、安価であるシンセス株式会社製キルシュナーワイヤー(AO スモールフラグメントシステムインプラント Ti)を使用した。本研究で用いたキルシュナーワイヤーは直径 2.50 mm で、低速ダイヤモンドカッターを用いて長さ 16 mm に切断して、これを基材として 2 本一組で使用した。以下、この基材を Ti 棒と記す。走査電子顕微鏡(SEM)を用いた表面観察では、Ti 棒(図 2.4(a))及び Ti キャンセラス・スクリュー(図 2.4(b))で多少様子は異なるものの滑らかかつ起伏に富んだ表面構造はほぼ同様であり、表面構造の違いによる析出挙動の変化はないと考えられる。

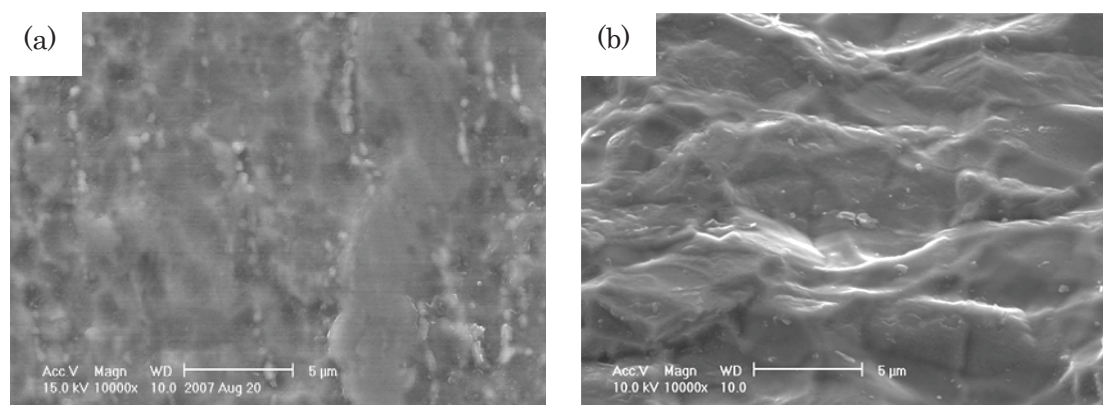


図 2.4. Ti 棒(a)及び Ti キャンセラススクリュー(b)の表面

#### 2.4.2.2 リン酸カルシウム過飽和溶液処理

Ti 棒は以下の方法でリン酸カルシウム過飽和溶液に浸漬した。

- ① Ti 棒を 24 ウェルのマルチウェルプレートの各ウェルに 2 本ずつ入れる。
- ②  $\text{Ca/P} = 1.5$  のリン酸カルシウム溶液  $\text{Ratio} \times 0.5$ 、1.5、2.0 をそれぞれ 10 mL 調製する。
- ③ Ti 棒を入れた 24 ウェルのマルチウェルプレートの各ウェルにリン酸カルシウム溶液を 2 mL ずつ添加し、チタン棒を 37°C、24 時間静置する。
- ④ Ti 棒をピンセットで取り出し、新たな 24 ウェルのマルチウェルプレートの各ウェルに移す。
- ⑤ Ti 棒を移した各ウェル内に 2 mL ずつ超純水を注ぎパスツールピペットで超純水を吸いだすことにより洗浄する。
- ⑥ ⑤の操作をもう一度繰り返す。
- ⑦ チタン棒を凍結乾燥して、SEM 観察及び EDX 分析に使用した。
- ⑧ Ti 棒浸漬に用いた 24 ウェルのマルチウェルプレートの各ウェル中の残留リン酸カルシウム溶液に 40  $\mu\text{L}$  塩酸を添加し、沈殿物を溶解する。
- ⑨ ⑧の液は超純水を用いて 3 倍に希釈した後に ICP 測定に使用する。

#### 2.4.3 実験結果

すべてのリン酸カルシウム過飽和溶液は 1 日静置後に白沈を生じており、Ti 棒を浸漬しても節 2.3 と同様に、低結晶質のリン酸カルシウムが析出し易い系であることが確認できた。その一方で、Ti 棒の肉眼観察を行っても表面の色彩にはほとんど変化がなかった。Ti 棒上のリン酸カルシウムの析出量を表 2.17 及び図 2.5 に示す。

表 2.17. 37℃ Ca/P=1.5 の ICP データ

試料 No.	Ratio	NaHCO <sub>3</sub> Concentration mM	溶液中 Ca/P 比	減少 Ca モル数 mM(20mL) <sup>-1</sup>	減少 P モル数 mM(20mL) <sup>-1</sup>	沈殿物 Ca/P 比
1-A	1.0	7.90	1.5	0.49	0.43	1.1
1-B				0.30	0.35	0.9
1-C				0.25	0.32	0.8
2-A		10.86	1.4	0.21	0.28	0.7
2-B				0.05	0.25	0.2
2-C				0.13	0.29	0.5
3-A		15.09	1.4	0.16	0.25	0.6
3-B				0.04	0.23	0.2
3-C				0.11	0.22	0.5
4-A	1.5	7.90	1.5	0.35	0.42	0.8
4-B				0.73	0.61	1.2
4-C				0.25	0.40	0.6
5-A		10.86	1.4	0.83	0.60	1.2
5-B				0.81	0.69	1.6
5-C				0.46	0.52	0.8
6-A		15.09	1.4	0.76	0.64	1.2
6-B				0.96	0.67	1.4
6-C				0.91	0.67	1.4
7-A	2.0	7.90	1.5	0.89	0.67	1.3
7-B				0.63	0.57	1.1
7-C				0.86	0.56	1.5
8-A		10.86	1.5	0.90	0.71	1.3
8-B				0.94	0.79	1.2
8-C				0.94	0.78	1.2
9-A		15.09	1.5	0.95	0.71	1.3
9-B				1.15	0.81	1.4
9-C				0.80	0.68	1.2

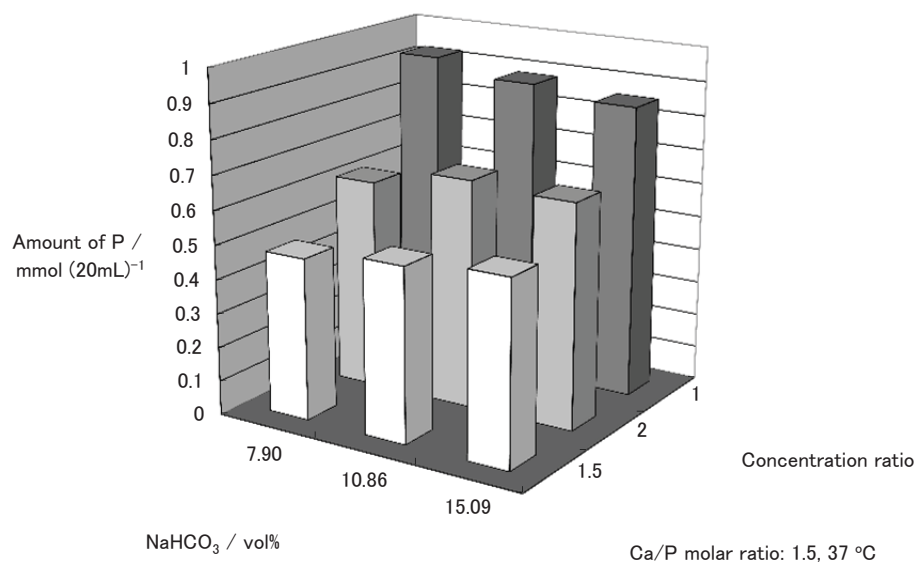
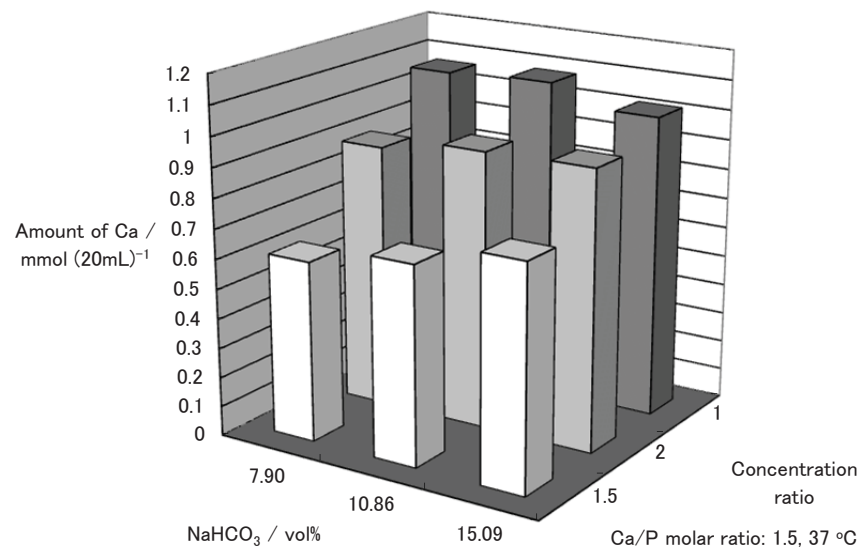


図 . 2.5. Ca、P モル数変化図

#### 2.4.3.2 SEM 写真及び EDX 結果

##### 2.4.3.2.1 SEM 写真及び EDX 結果グラフ

Ratio=1.0 に設定した場合、500 倍で SEM 観察すると析出物が膜状に表面を覆っている箇所が確認できた。これらの膜状の析出物は高倍率で観察すると骨類似アパタイトに形状の似た物質であり、EDX 測定により確かにリン酸カルシウムからなる物質であることが確認できた。一方で、 $\text{NaHCO}_3$  添加量の多少にかかわらず、全く析出物が認められない領域も観察された(図 2.6~2.14)。析出物が SEM で認められない領域で測定した EDX では Ca の存在も認められなかった。さらに EDX スペクトルに観察される Ca に帰属するピーク強度は強くとも基材中の Al および V によるピーク強度程度にしか測定されず、Ratio=1.0 のリン酸カルシウム過飽和溶液中で浸漬しても、リン酸カルシウム過飽和溶液の化学組成分析の結果と一致し、他の Ratio のリン酸カルシウム過飽和溶液中と比較しても析出物の量は少ないものと考えられる。

Ratio=1.5 の場合、多少の例外はあるものの、Ratio=1.0 のように全く析出物が形成されない領域というのはほとんど観察されなかった(図 2.15~2.23)。析出物が認められない領域の多くは浸漬の段階で気泡が付着していたと考えられる領域のみ(図 2.17 など)である。析出物が認められる領域の EDX スペクトル中の Ti ピーク強度に対する Ca ピークの相対強度は明らかに Ratio=1.0 の場合と異なり高くなっていることが分かる。また、Ratio=1.0 とは異なり、直径  $0.7\sim 1.5\ \mu\text{m}$  程度の球状の粒子が多数析出していることが確認できた。これらの粒子は均質核形成したリン酸カルシウムが表面に付着・結合した物と考えられる。球状粒子の数は、 $\text{NaHCO}_3$  濃度が高いほど多いように観察された。

Ratio=2.0 の場合も、気泡の発生による析出物層形成が不十分な領域が存在するものの、Ratio=1.5 の場合と比べて明らかに少なく、最も均質なコーティングが行われている様子が確認された(図 2.24~2.32)。特にその中でも最も  $\text{NaHCO}_3$  濃度を高くした条件(図 2.30~図 2.32)の SEM 写真では、リン酸カルシウムが花びら状、あるいは骨類似アパタイト様に成長していることが観察できた。また、Ratio=1.5 の条件と同様にリン酸カルシウム過飽和溶液中で均質核形成後に Ti 棒表面に付着・結合したと思われる粒子も多数確認されたが、そのサイズは Ratio=1.5 の場合と比べやや大きく  $1.8\sim 2.8\ \mu\text{m}$  程度であった。これらの粒子は洗浄しても剥がれ落ちない程度の固着強度は有しているものの、Ti 棒上に直接析出したものと異なり機械的な作業で容易に剥離する可能性が考えられる。

なお、EDX スペクトル中に認められる Al および V はキルシュナーワイヤーの材料がもともと含むものであり、リン酸カルシウムの析出がなくても観察される P は、陽極酸化を行う際に用いる酸性溶液にリン酸が使用されていることによる。

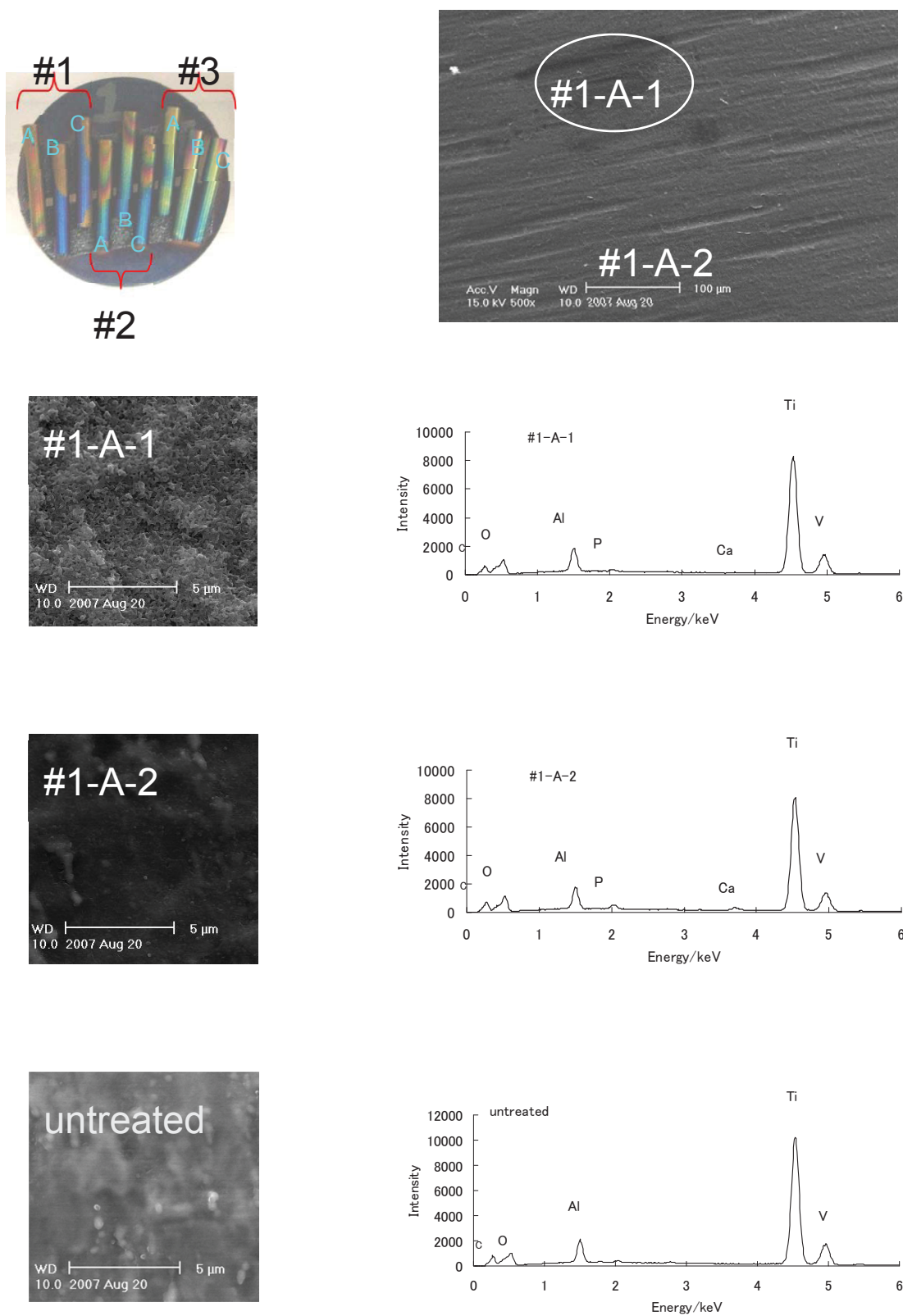


図. 2.6. SEM 写真及び EDX 結果 1-A

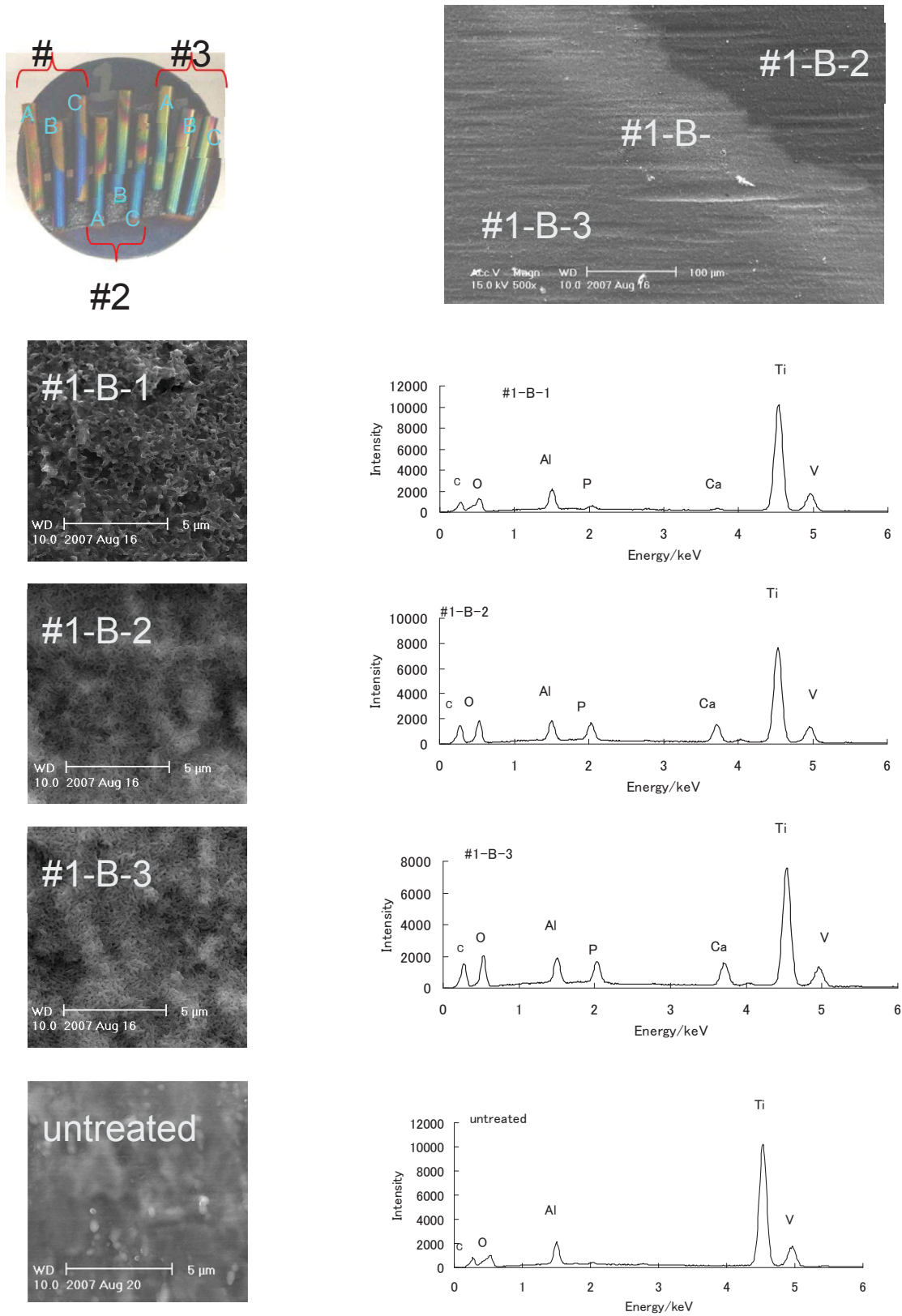


図. 2.7. SEM 写真及び EDX 結果 1-B

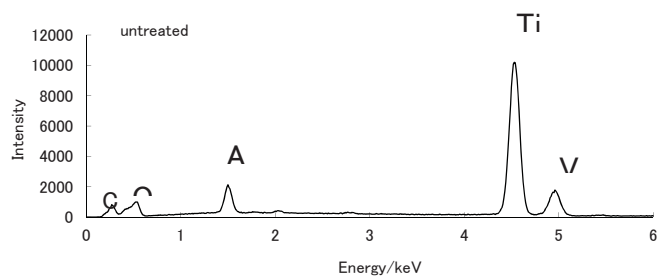
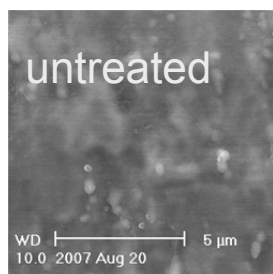
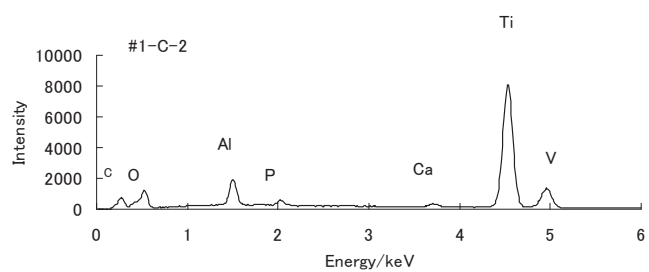
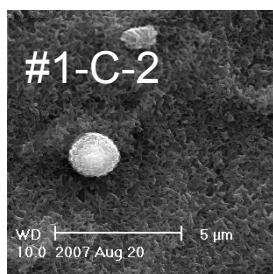
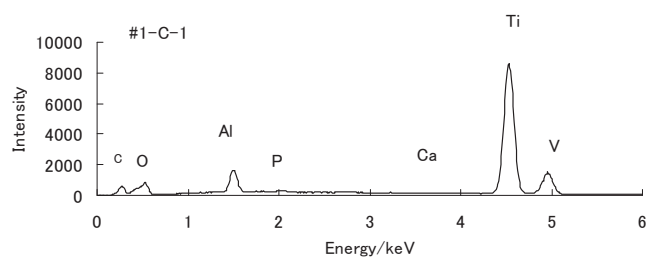
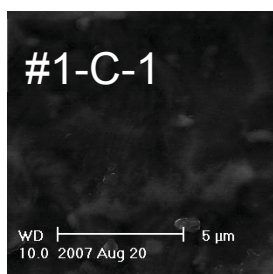
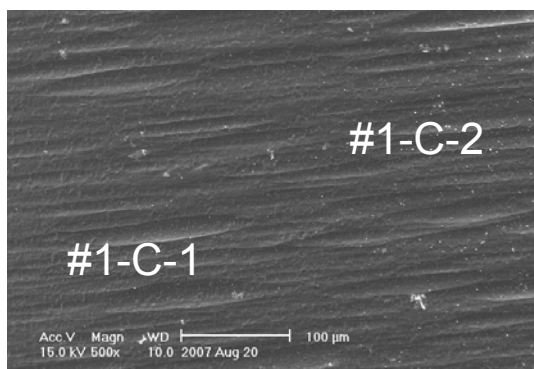
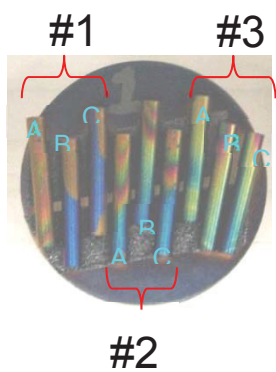


図. 2.8. SEM 写真及び EDX 結果 1-C

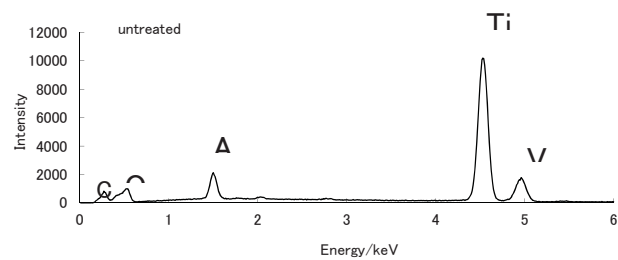
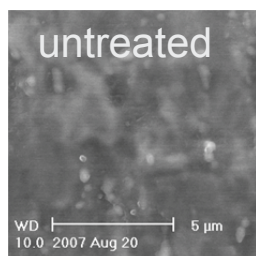
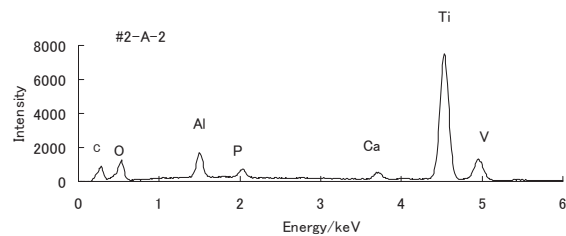
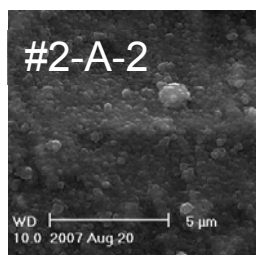
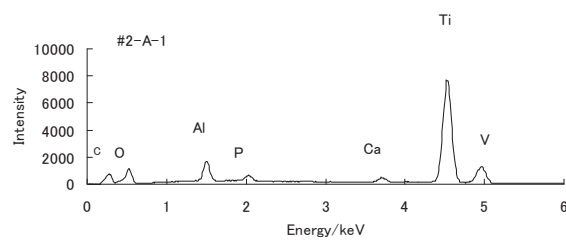
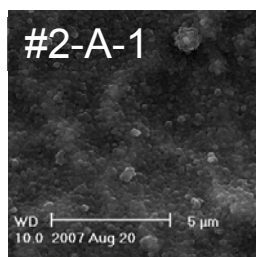
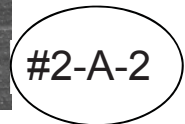
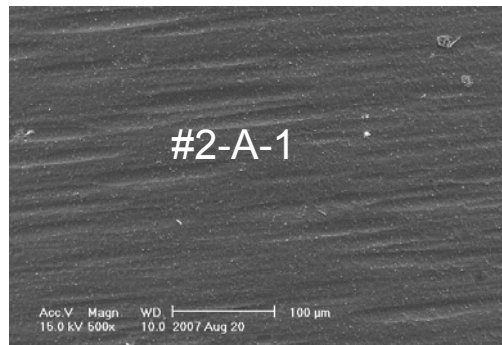
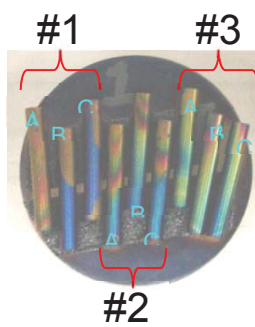
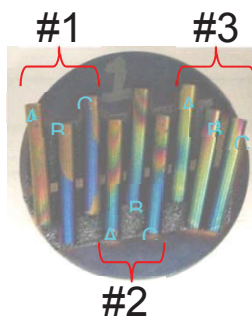


図. 2.9. SEM 写真及び EDX 結果 2-A



#2-B-2

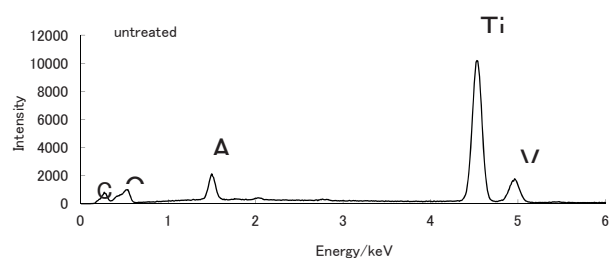
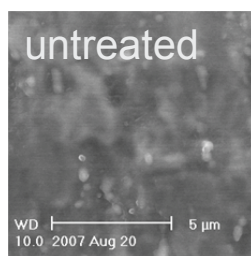
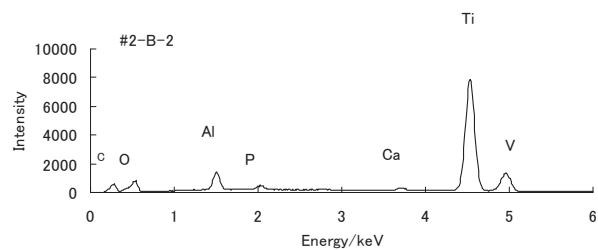
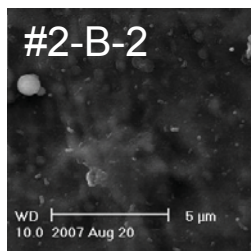
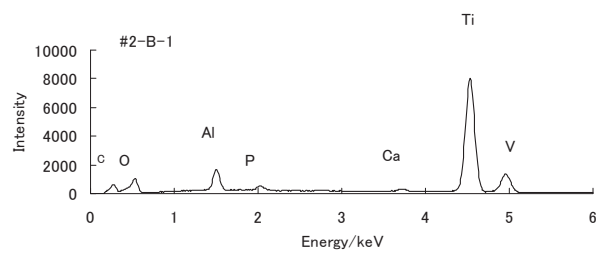
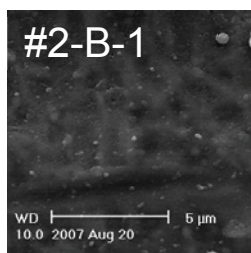


図. 2.10. SEM 写真及び EDX 結果 2-B

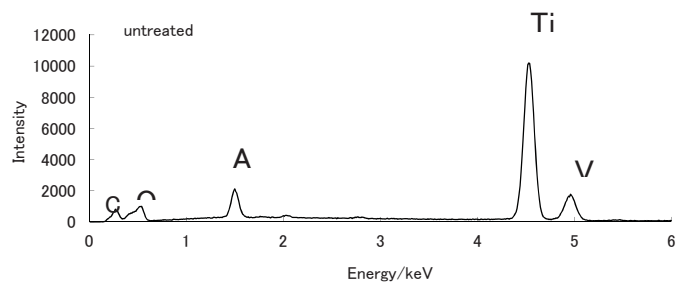
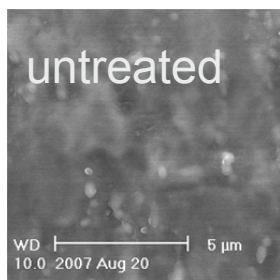
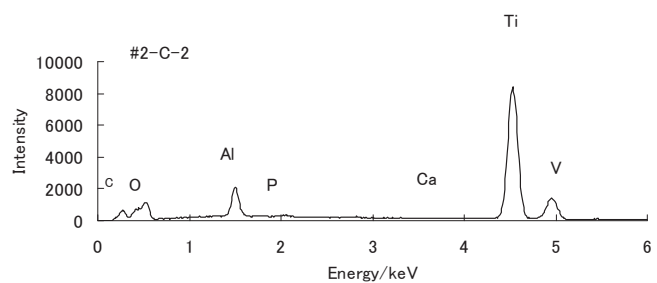
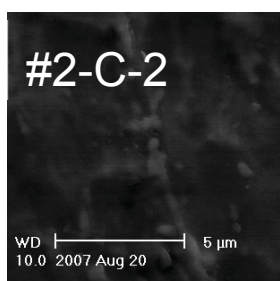
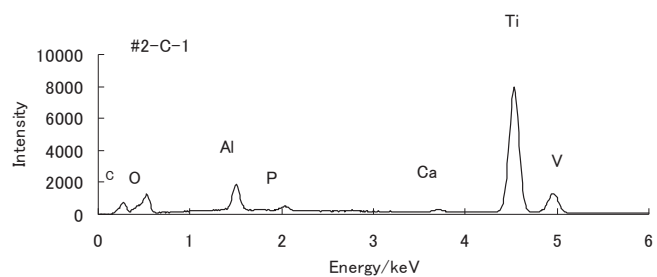
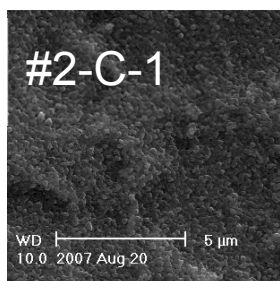
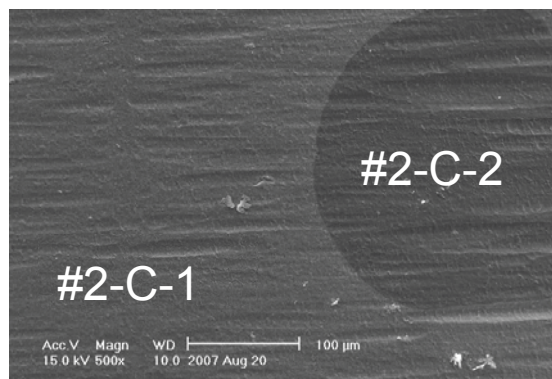
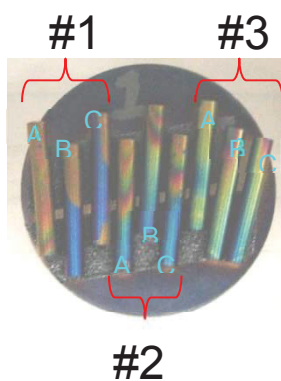


図. 2.11. SEM 写真及び EDX 結果 2-C

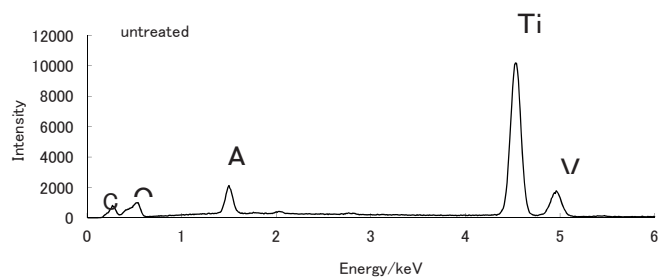
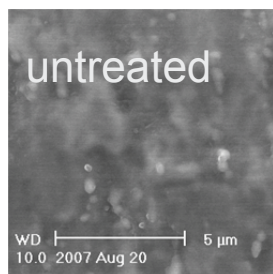
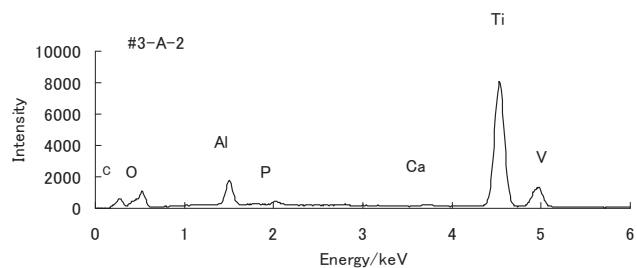
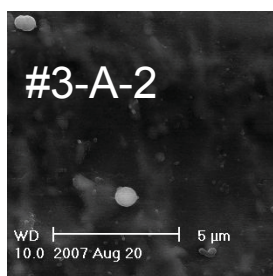
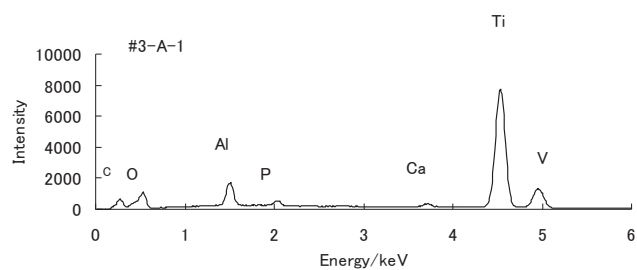
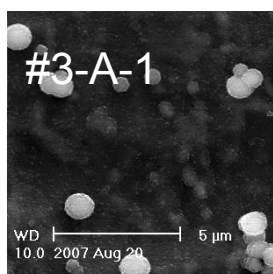
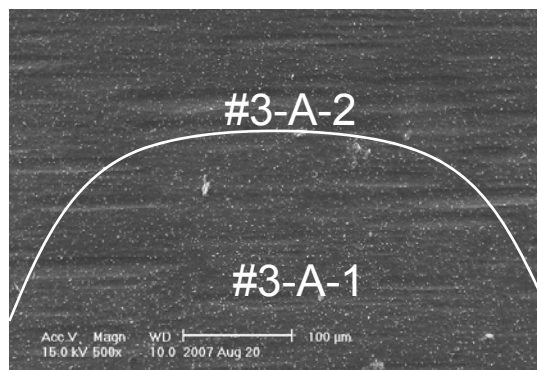
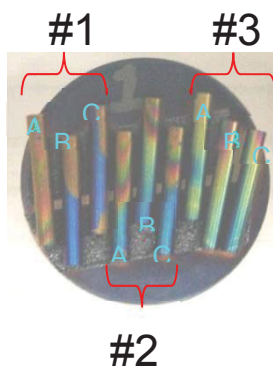


図 . 2.12. SEM 写真及び EDX 結果 3-A

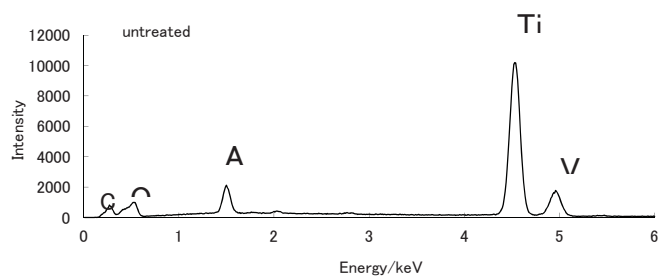
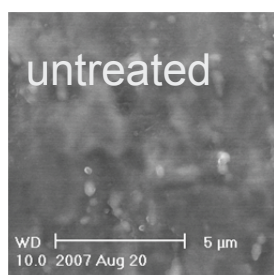
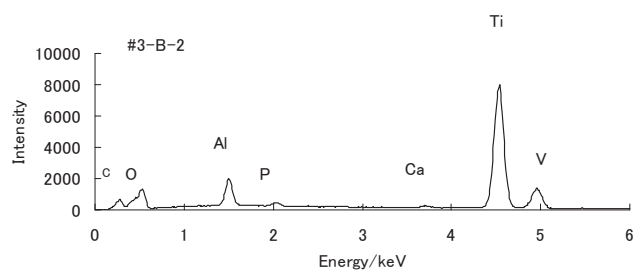
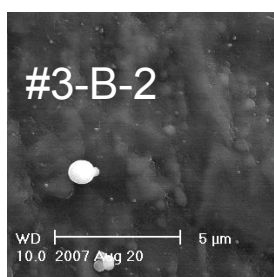
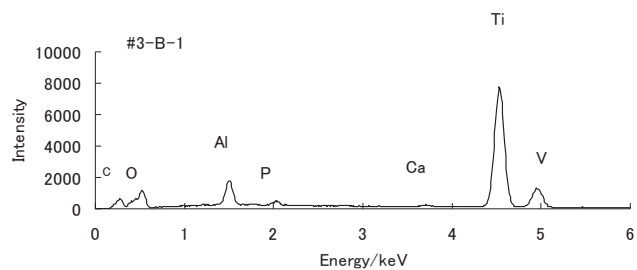
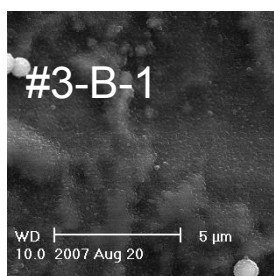
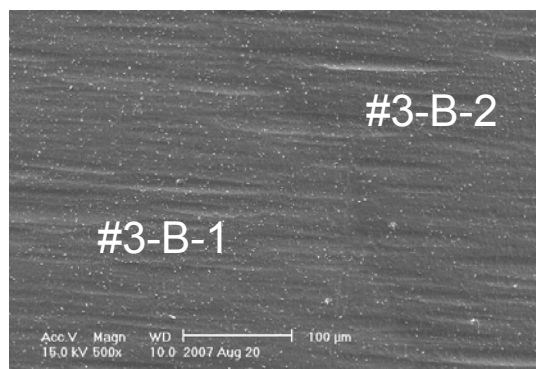
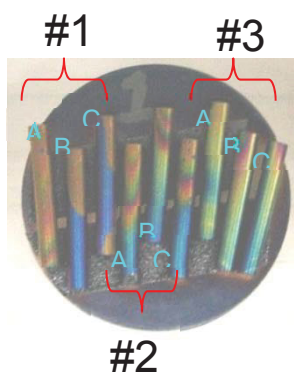
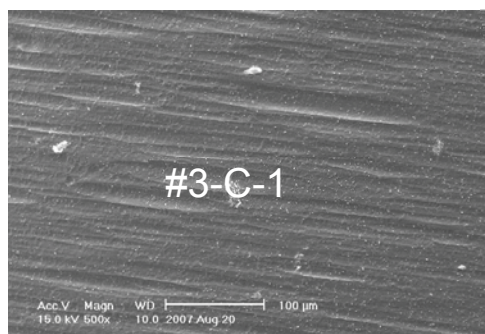
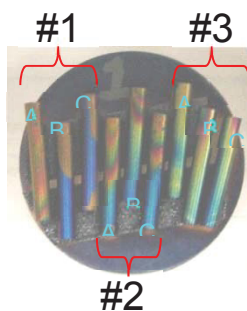


図. 2.13. SEM 写真及び EDX 結果 3-B



#3-C-2

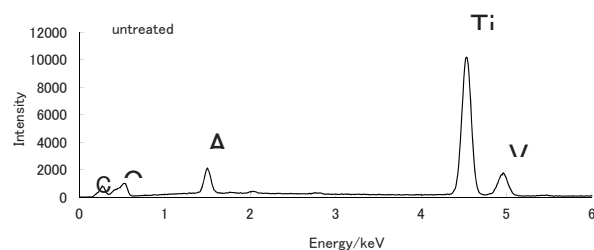
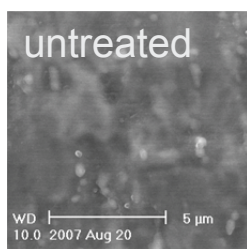
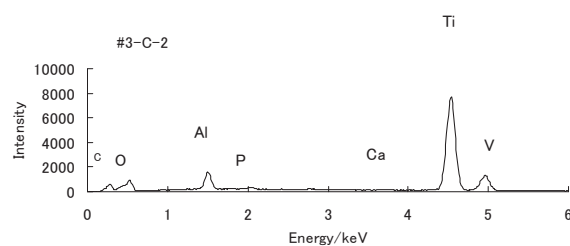
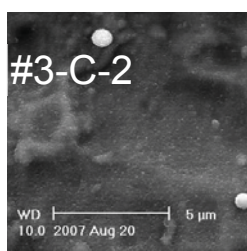
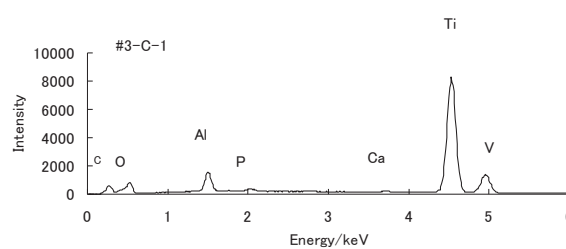
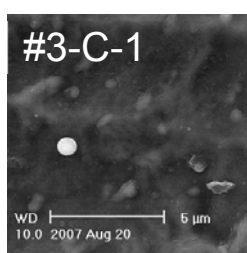


図 . 2.14. SEM 写真及び EDX 結果 3-C

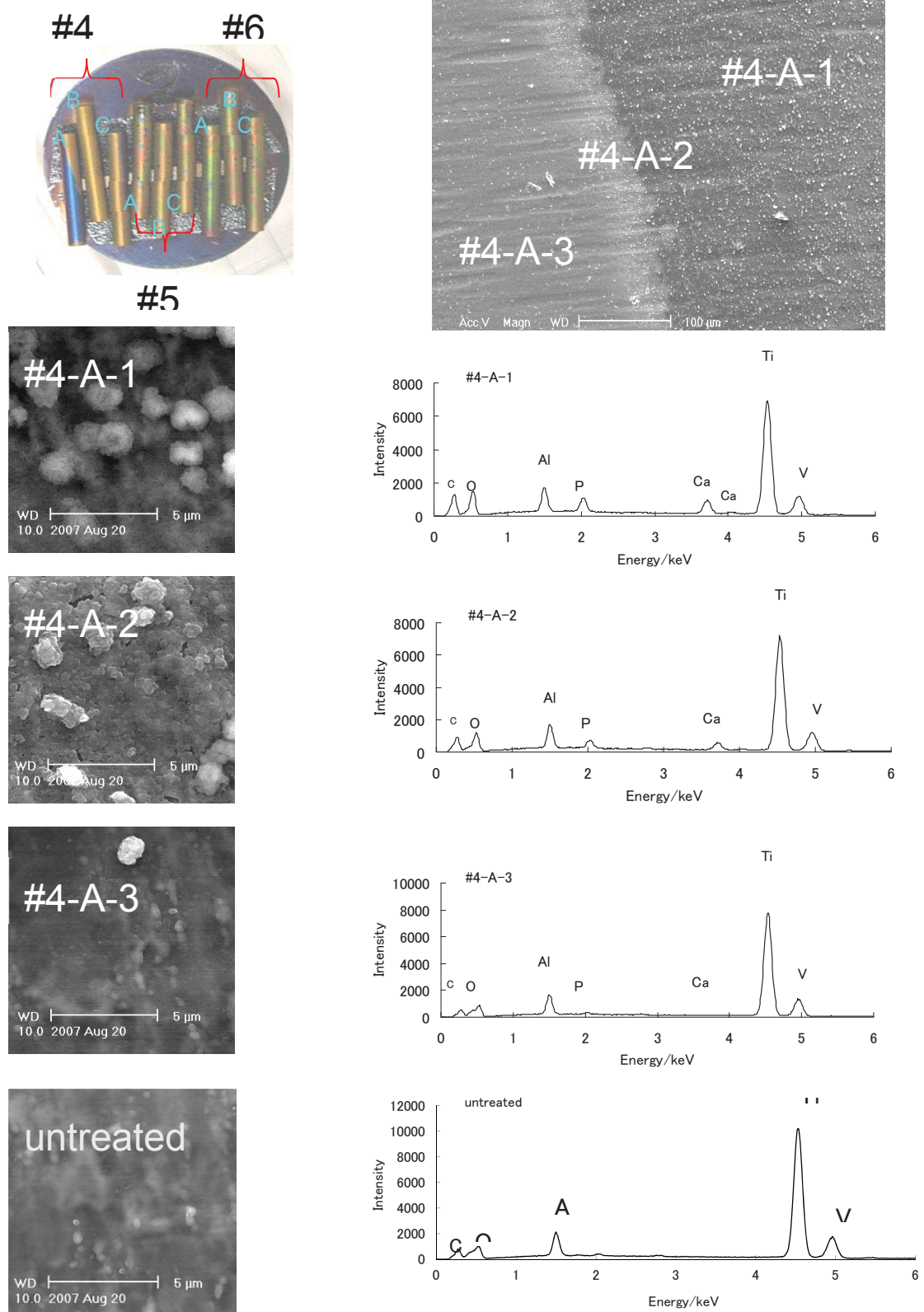


図. 2.15. SEM 写真及び EDX 結果 4-A

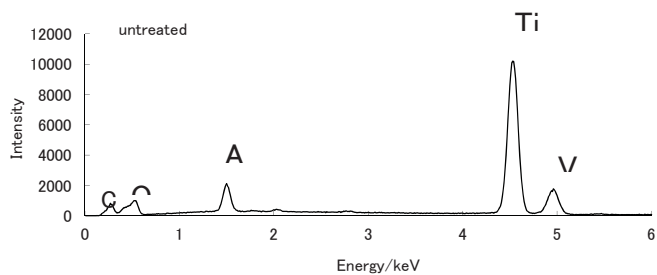
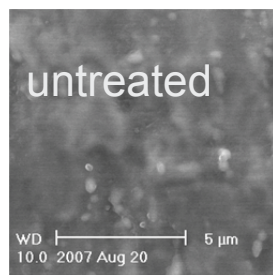
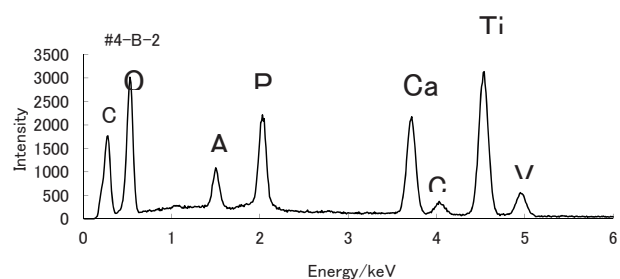
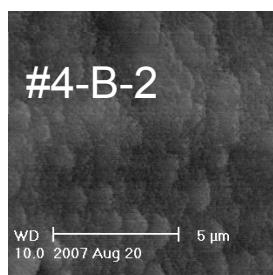
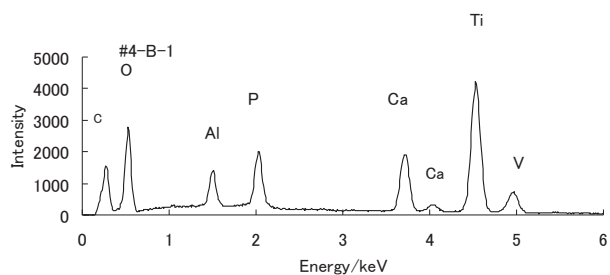
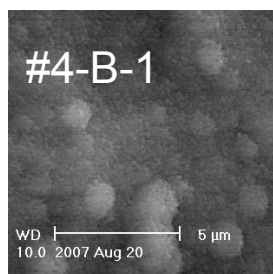
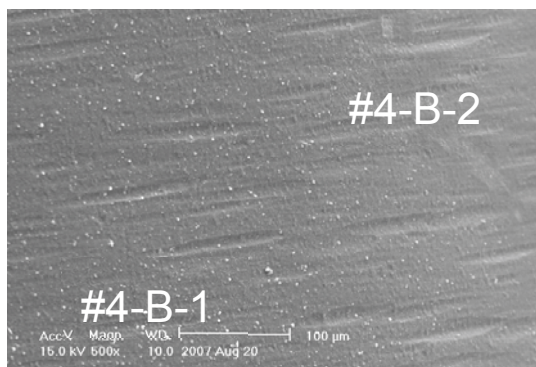
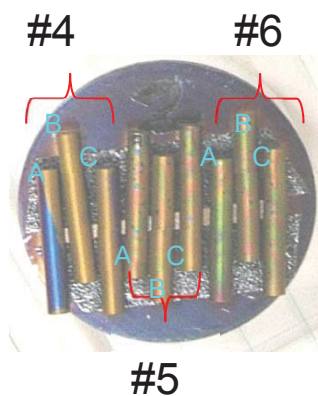
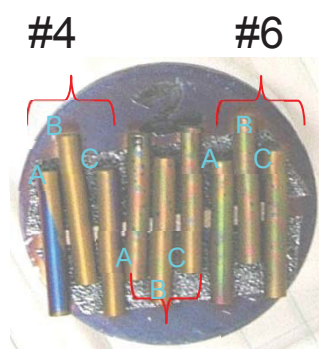


図. 2.16. SEM 写真及び EDX 結果 4-B



#5

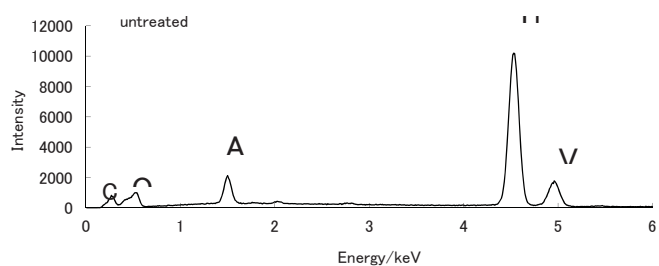
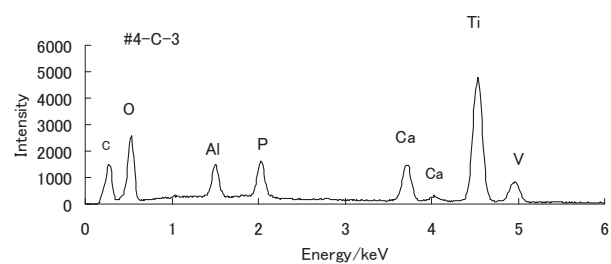
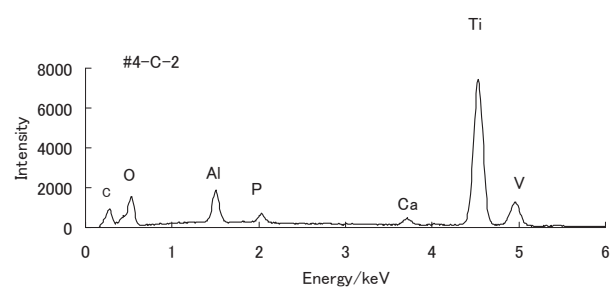
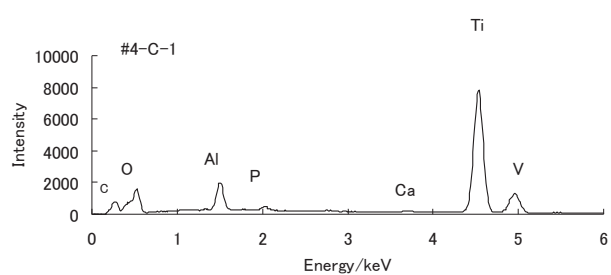
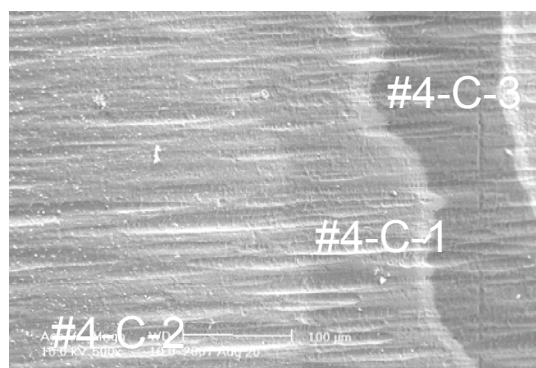
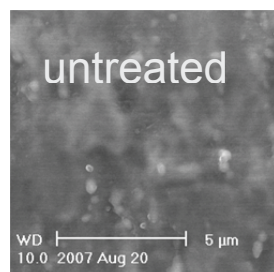
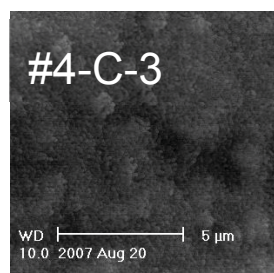
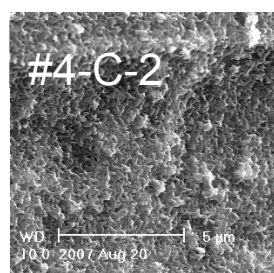
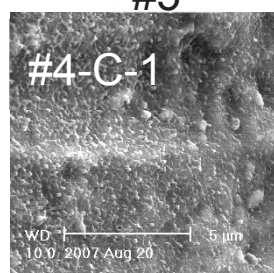


図. 2.17. SEM 写真及び EDX 結果 4-C

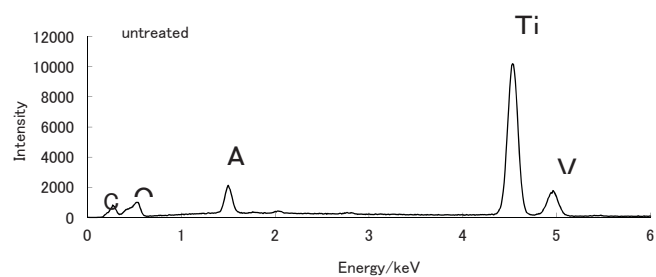
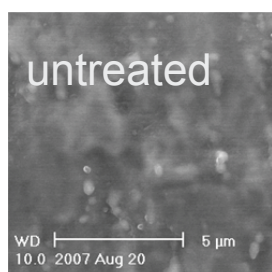
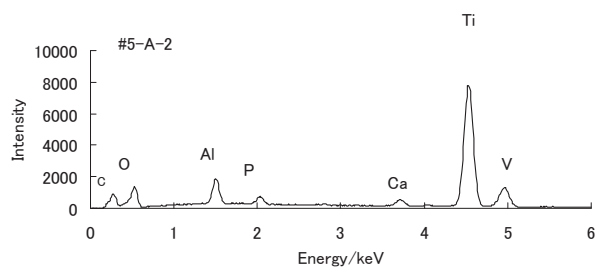
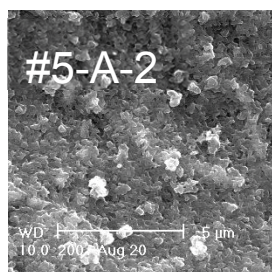
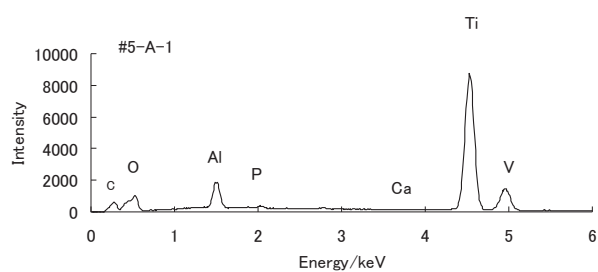
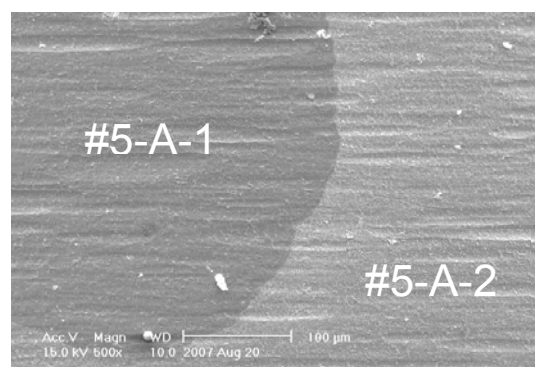
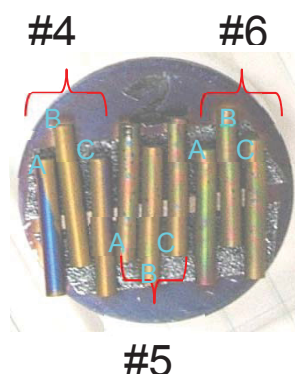
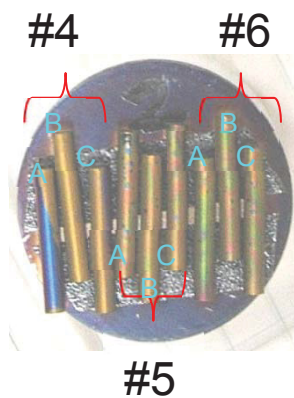


図. 2.18. SEM 写真及び EDX 結果 5-A



#5-B-2

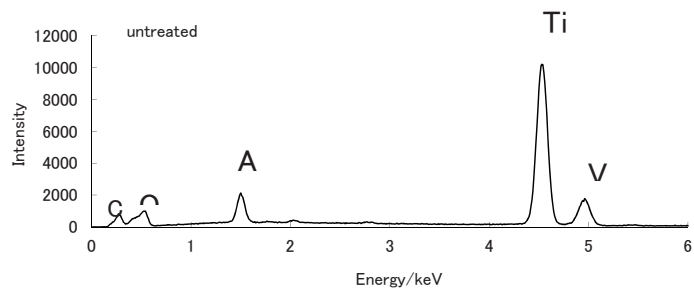
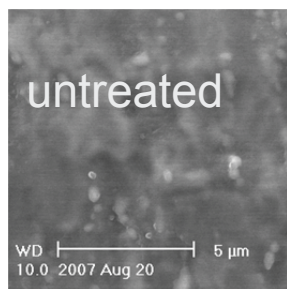
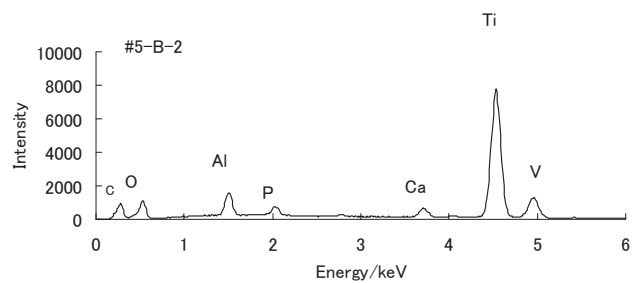
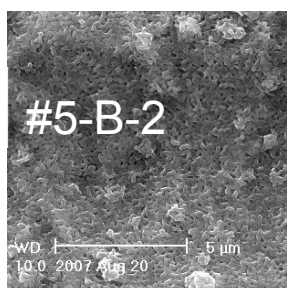
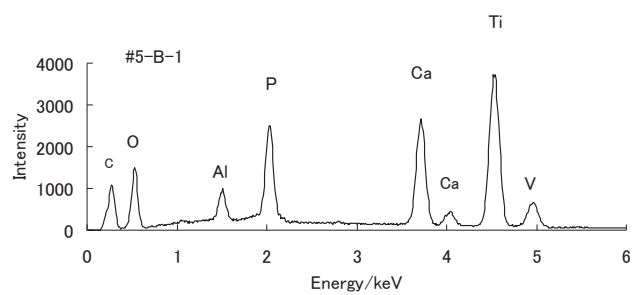
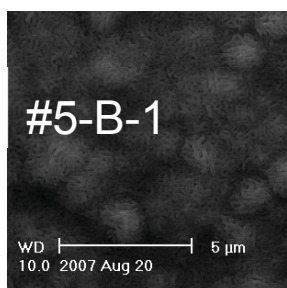
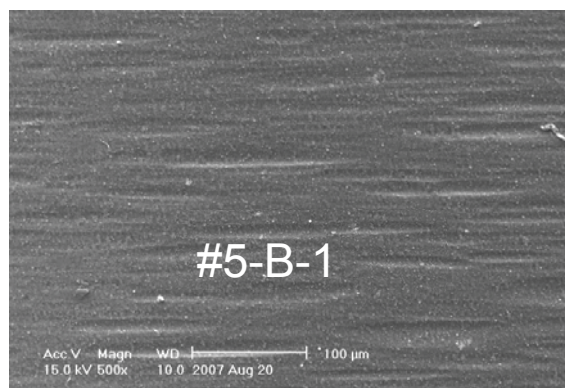


図. 2.19. SEM 写真及び EDX 結果 5-B

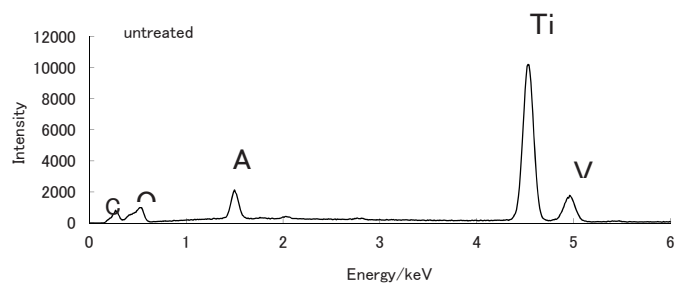
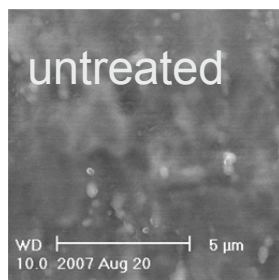
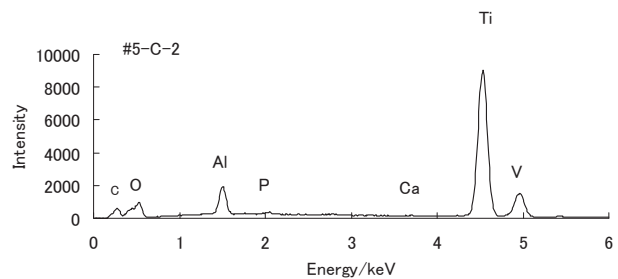
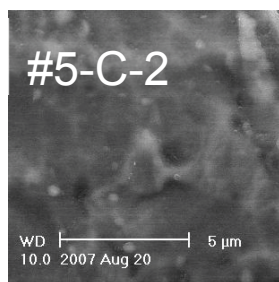
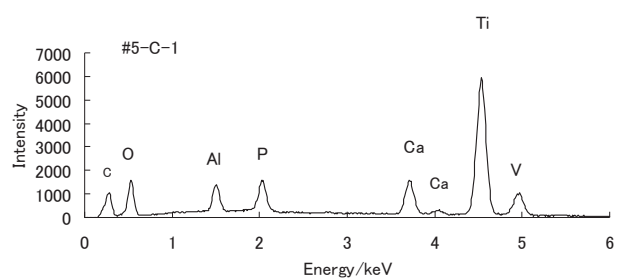
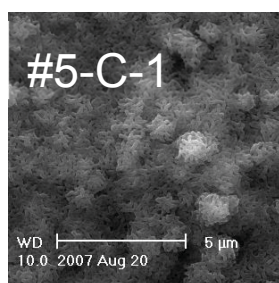
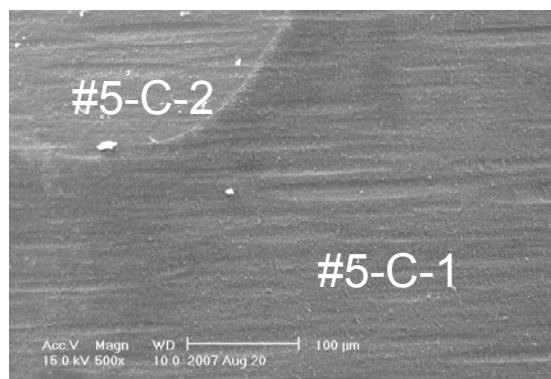
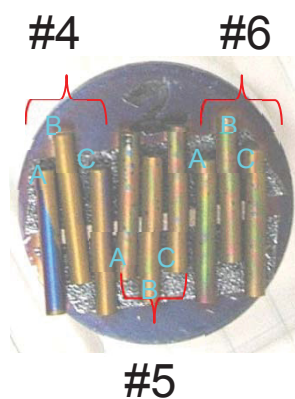


図 . 2.20. SEM 写真及び EDX 結果 5-C

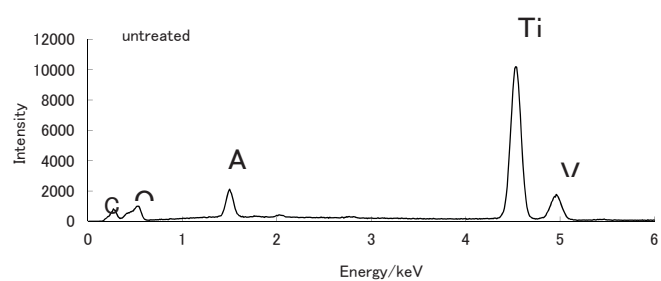
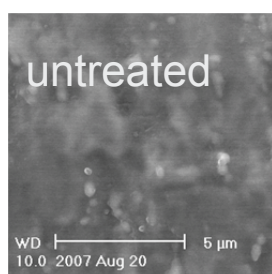
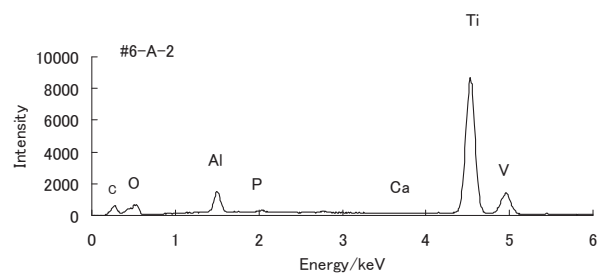
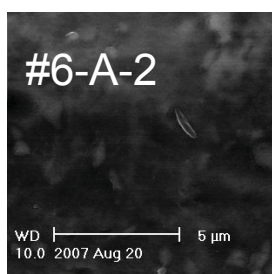
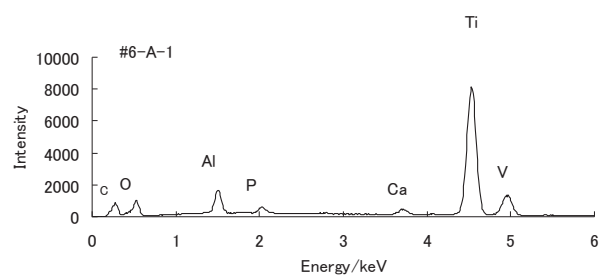
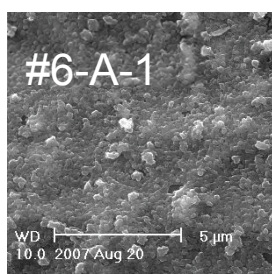
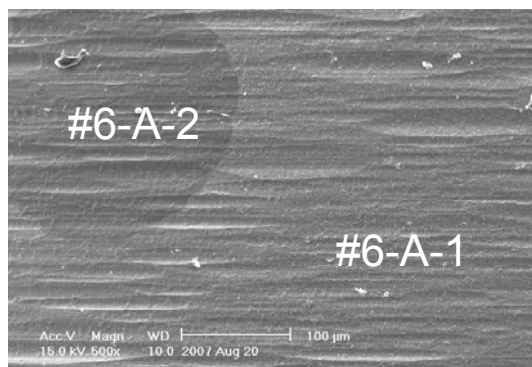
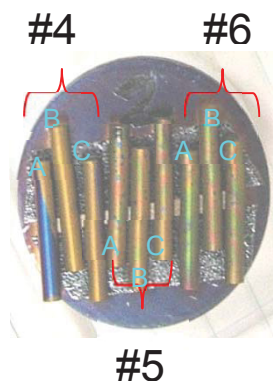


図. 2.21. SEM 写真及び EDX 結果 6-A

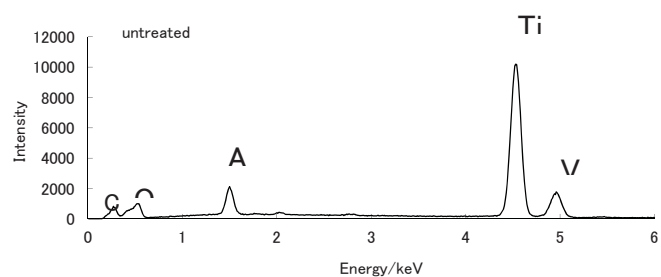
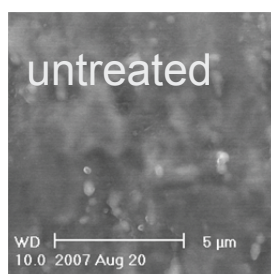
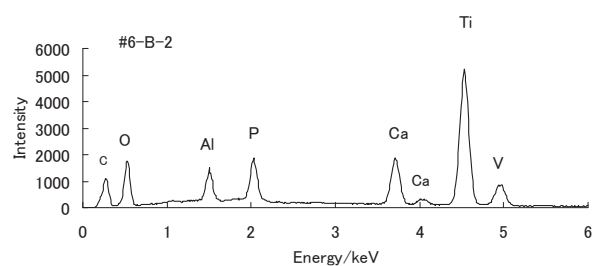
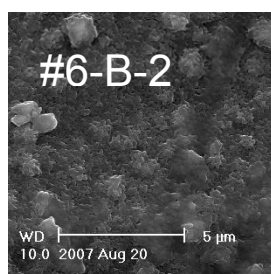
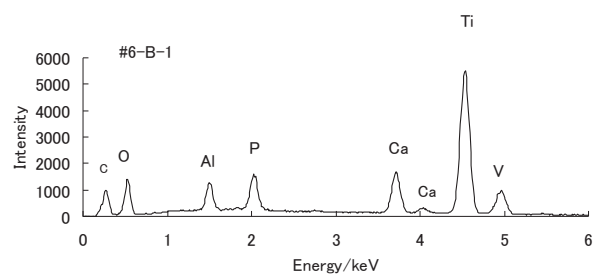
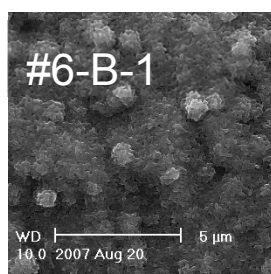
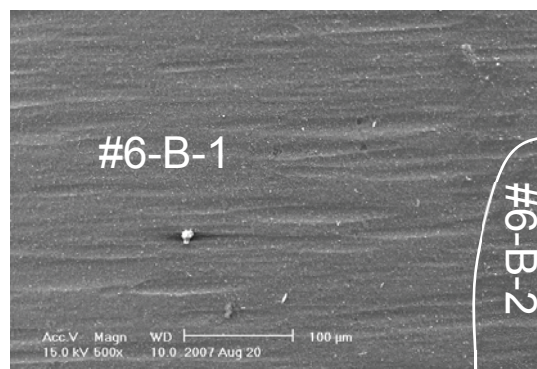
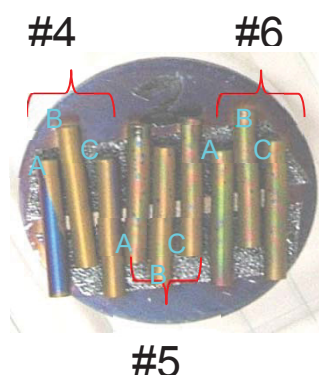


図 . 2.22. SEM 写真及び EDX 結果 6-B

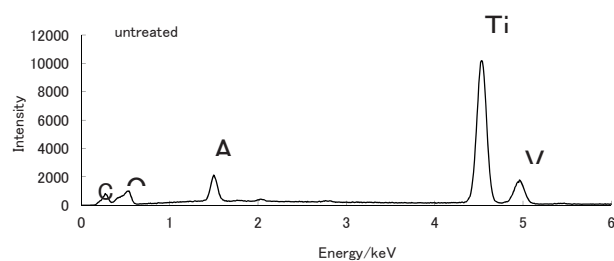
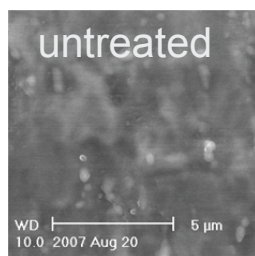
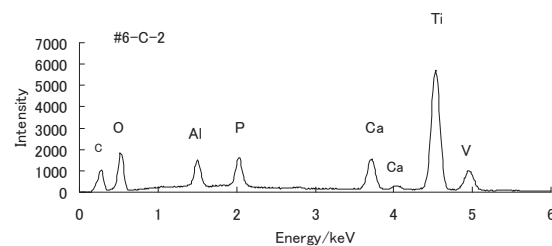
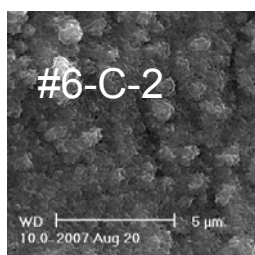
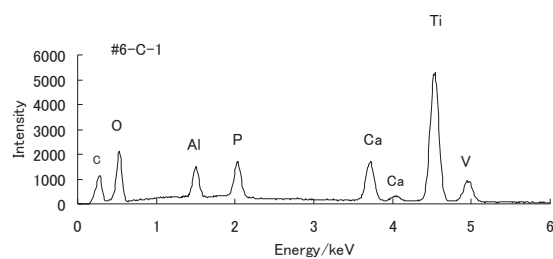
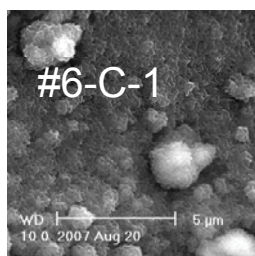
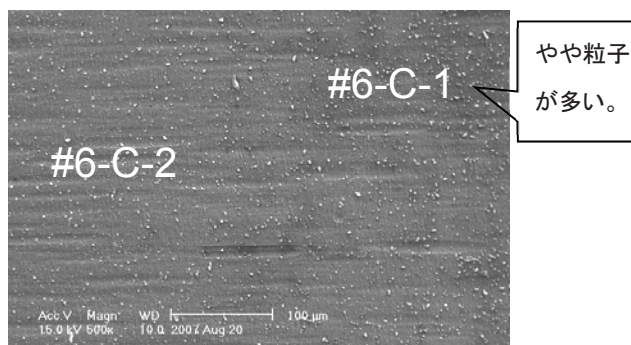
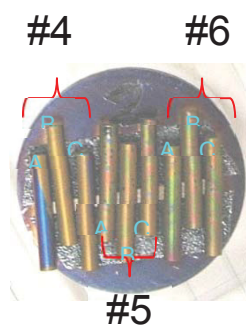


図 . 2.23. SEM 写真及び EDX 結果 6-C

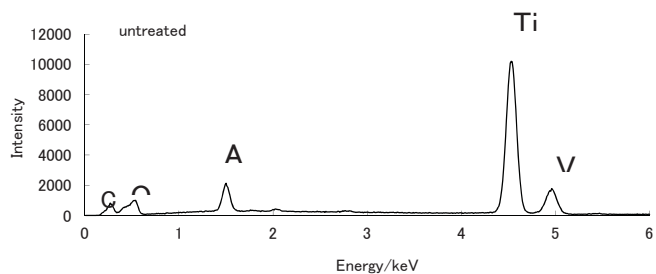
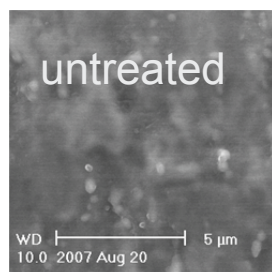
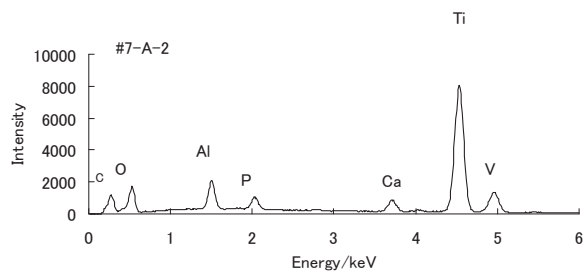
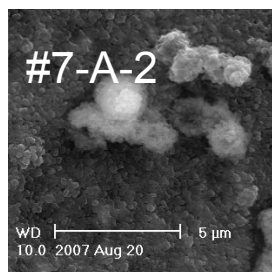
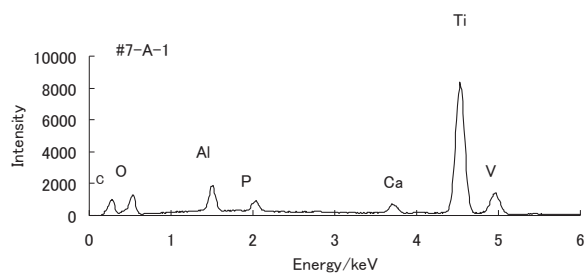
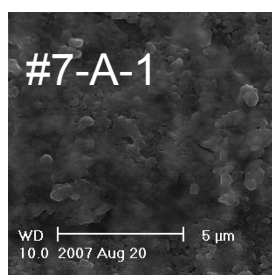
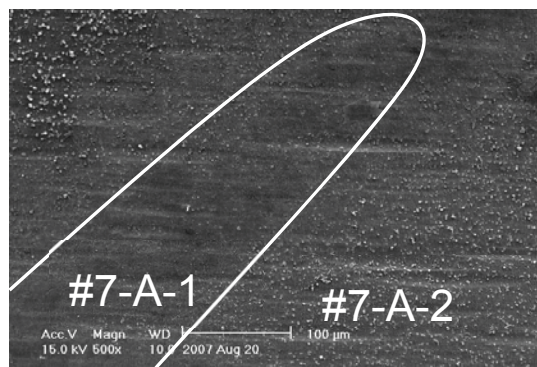
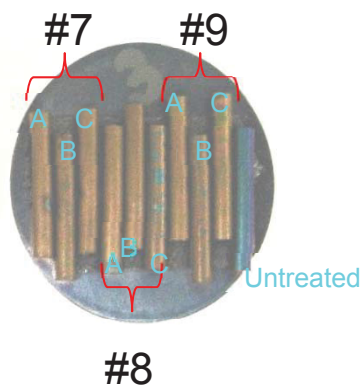


図 . 2.24. SEM 写真及び EDX 結果 7-A

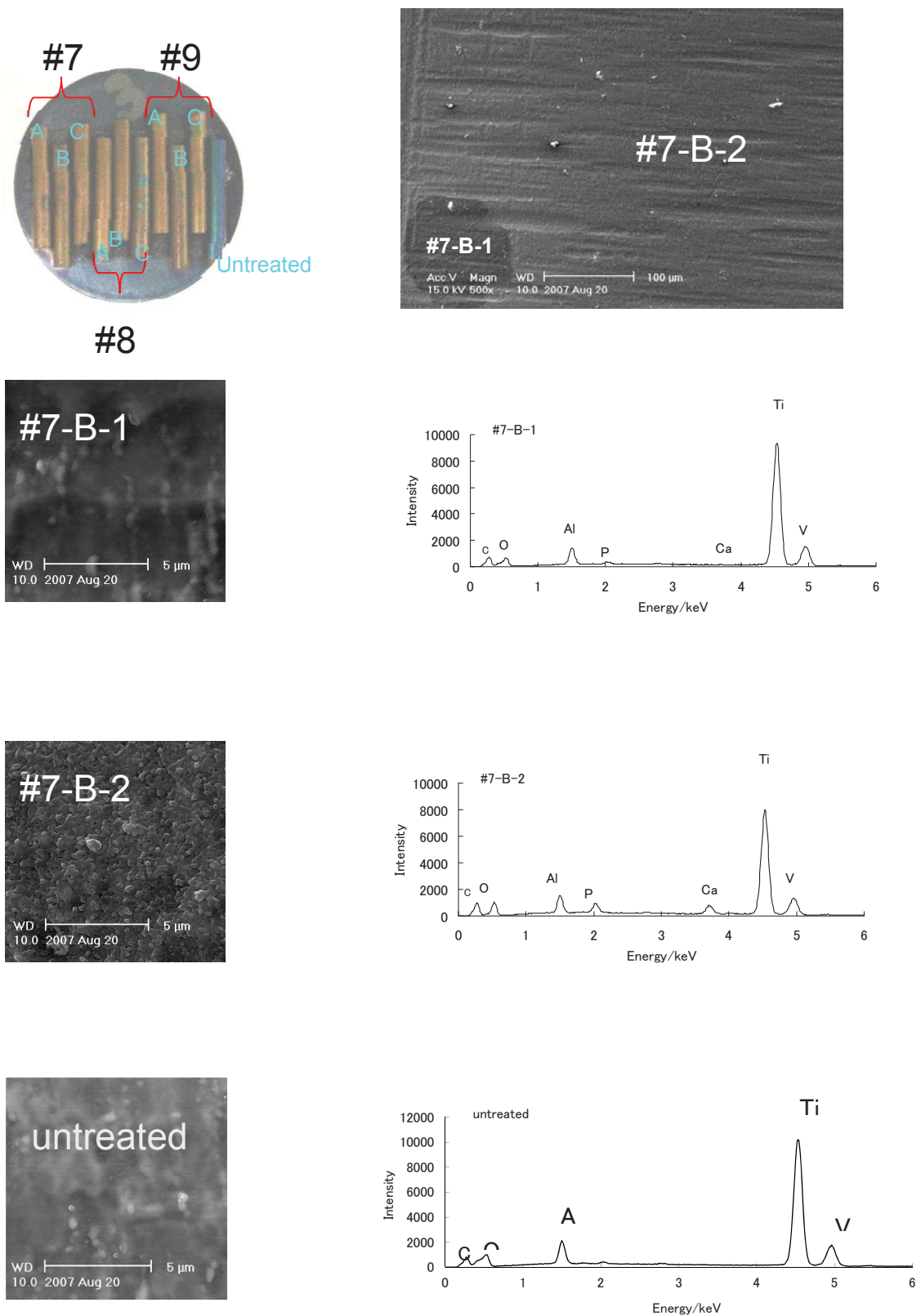


図. 2.25. SEM 写真及び EDX 結果 7-B

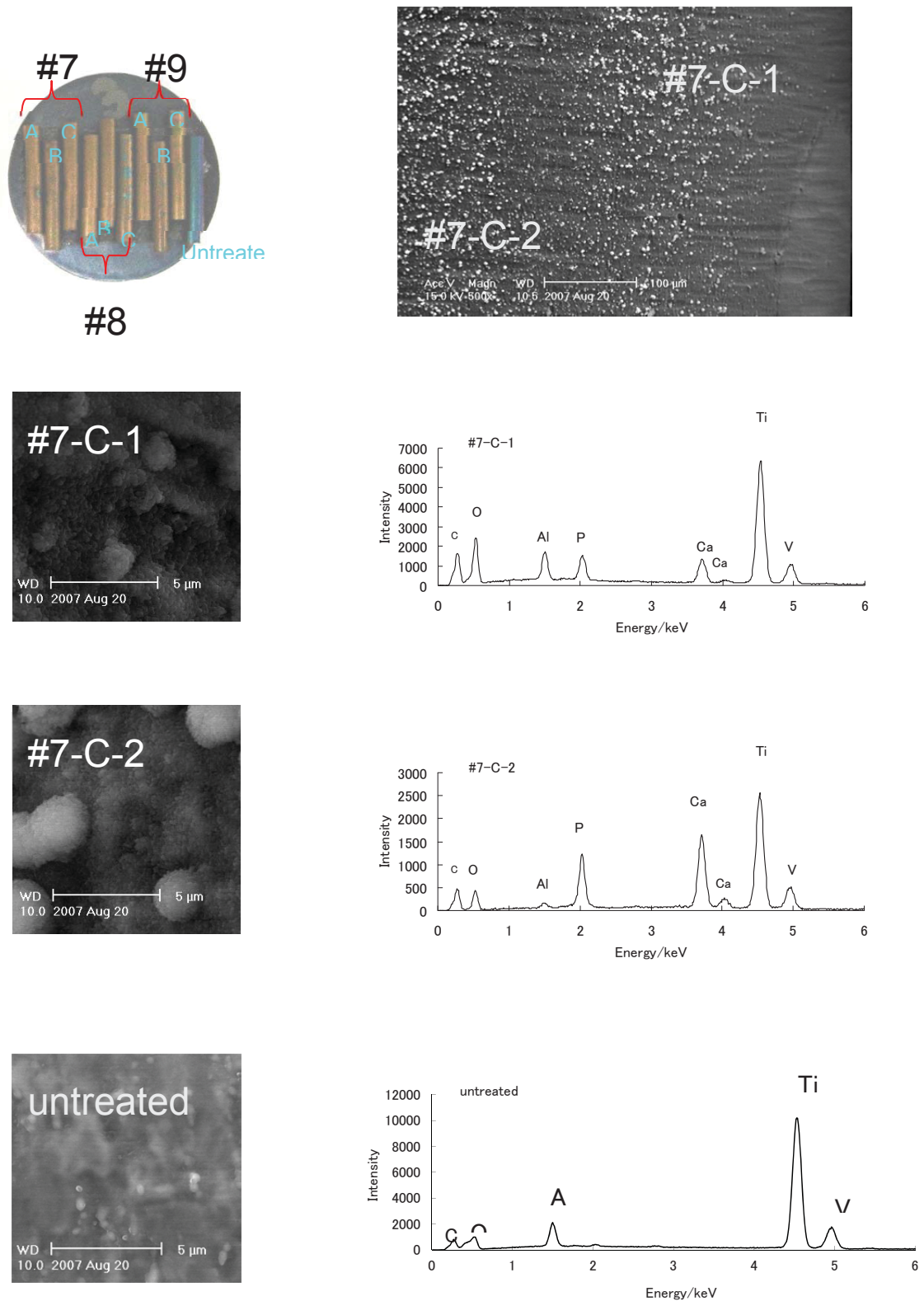


図 . 2.26. SEM 写真及び EDX 結果 7-C

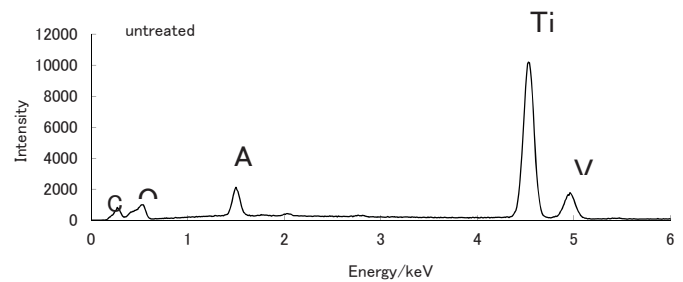
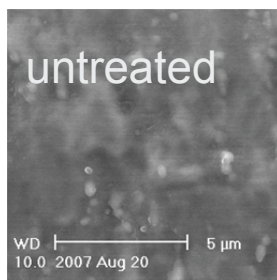
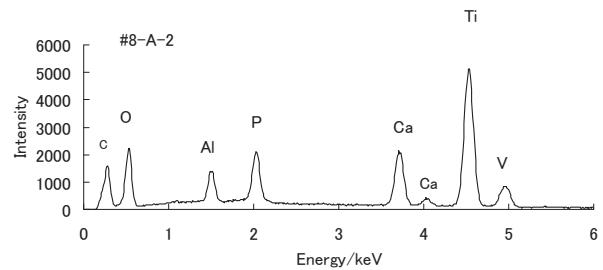
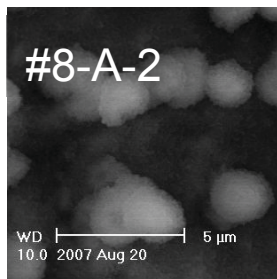
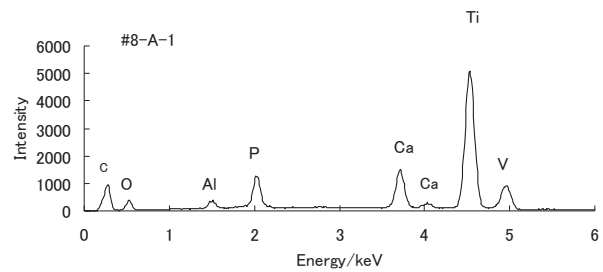
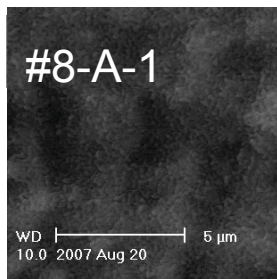
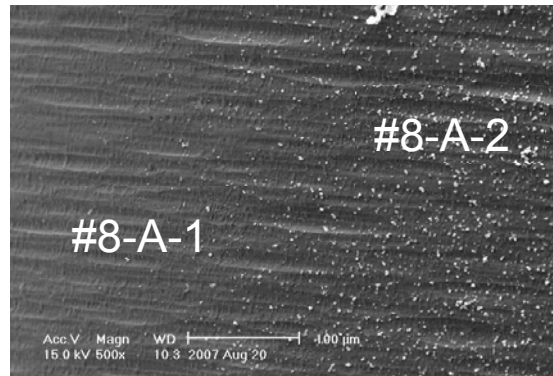
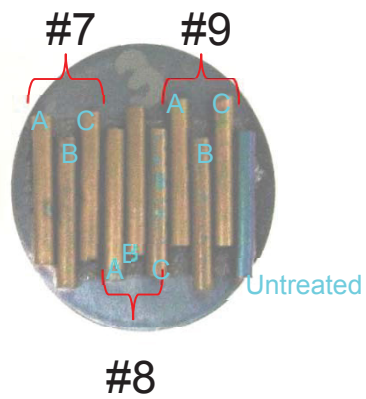


図 . 2.27. SEM 写真及び EDX 結果 8-A

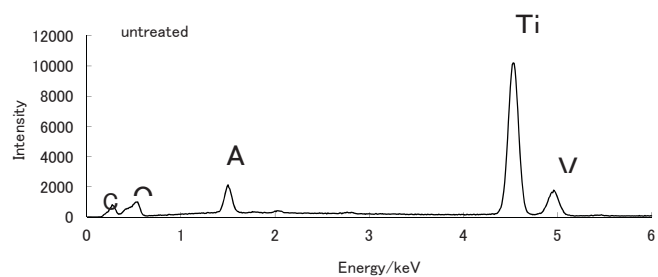
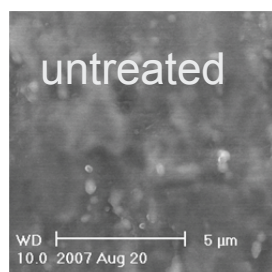
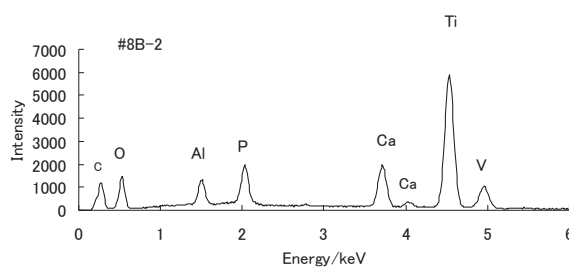
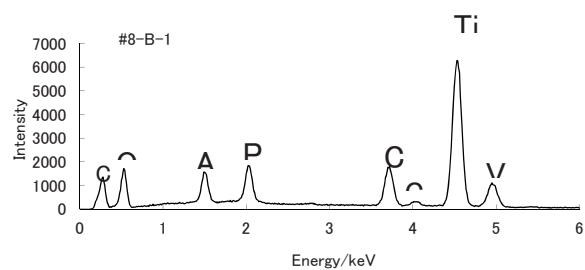
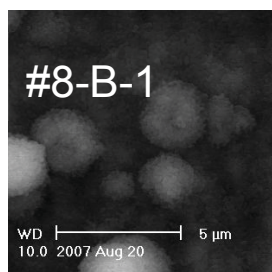
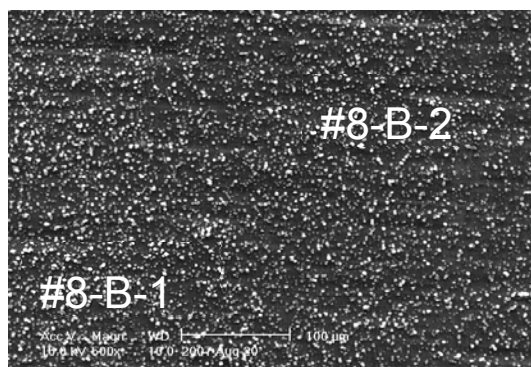
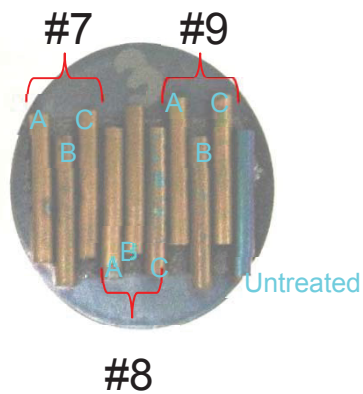


図 . 2.28. SEM 写真及び EDX 結果 8-B

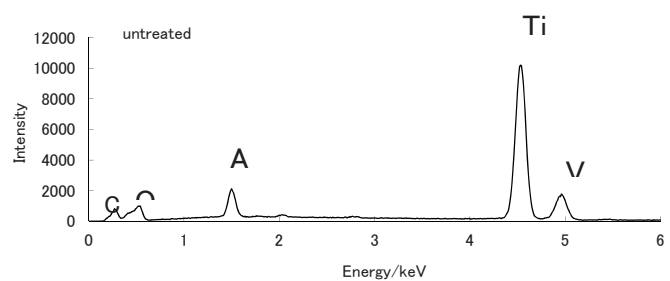
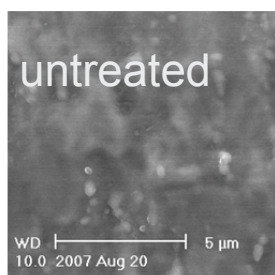
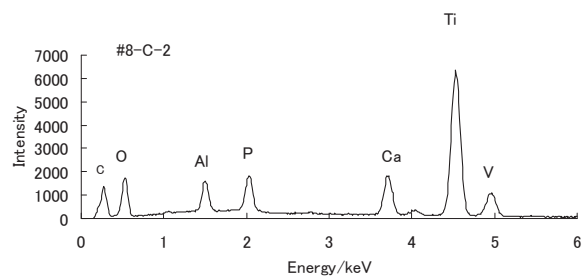
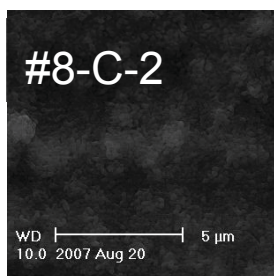
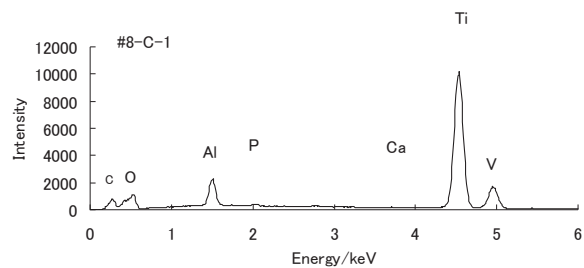
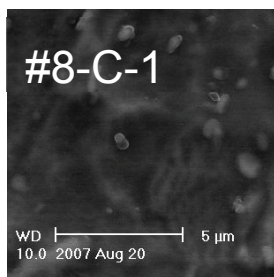
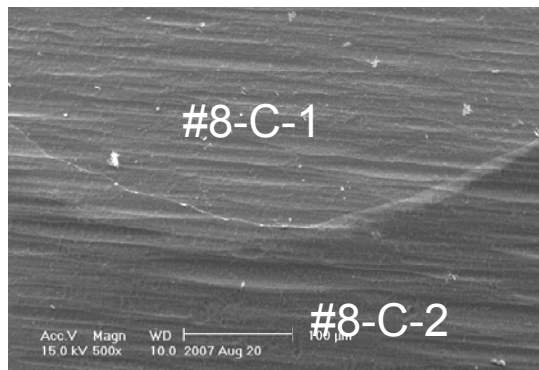
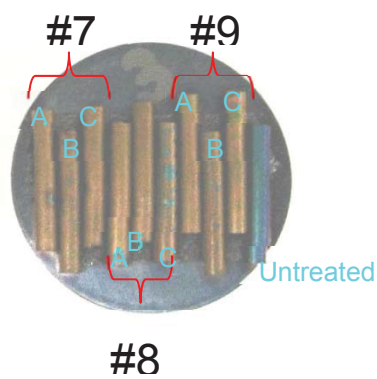


図 . 2.29. SEM 写真及び EDX 結果 8-C

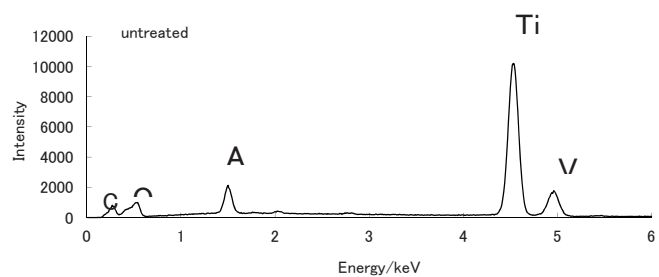
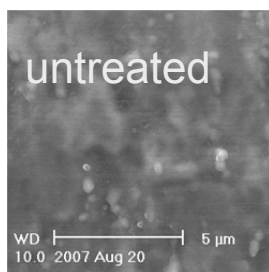
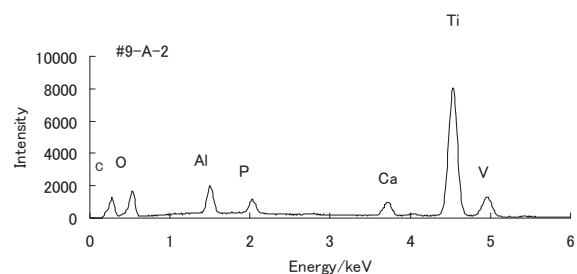
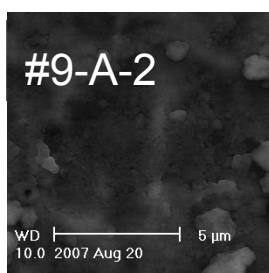
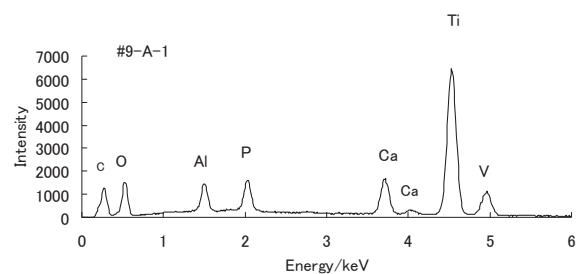
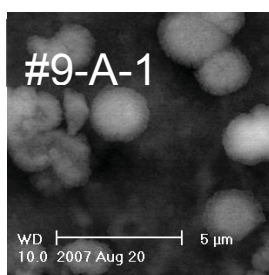
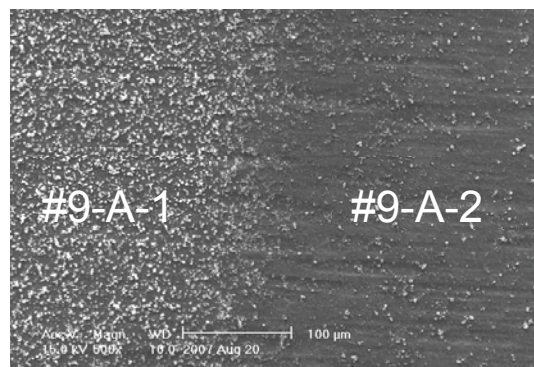
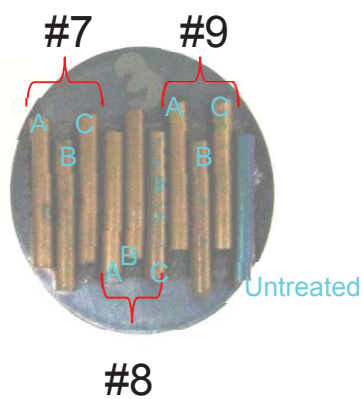


図 . 2.30. SEM 写真及び EDX 結果 9-A

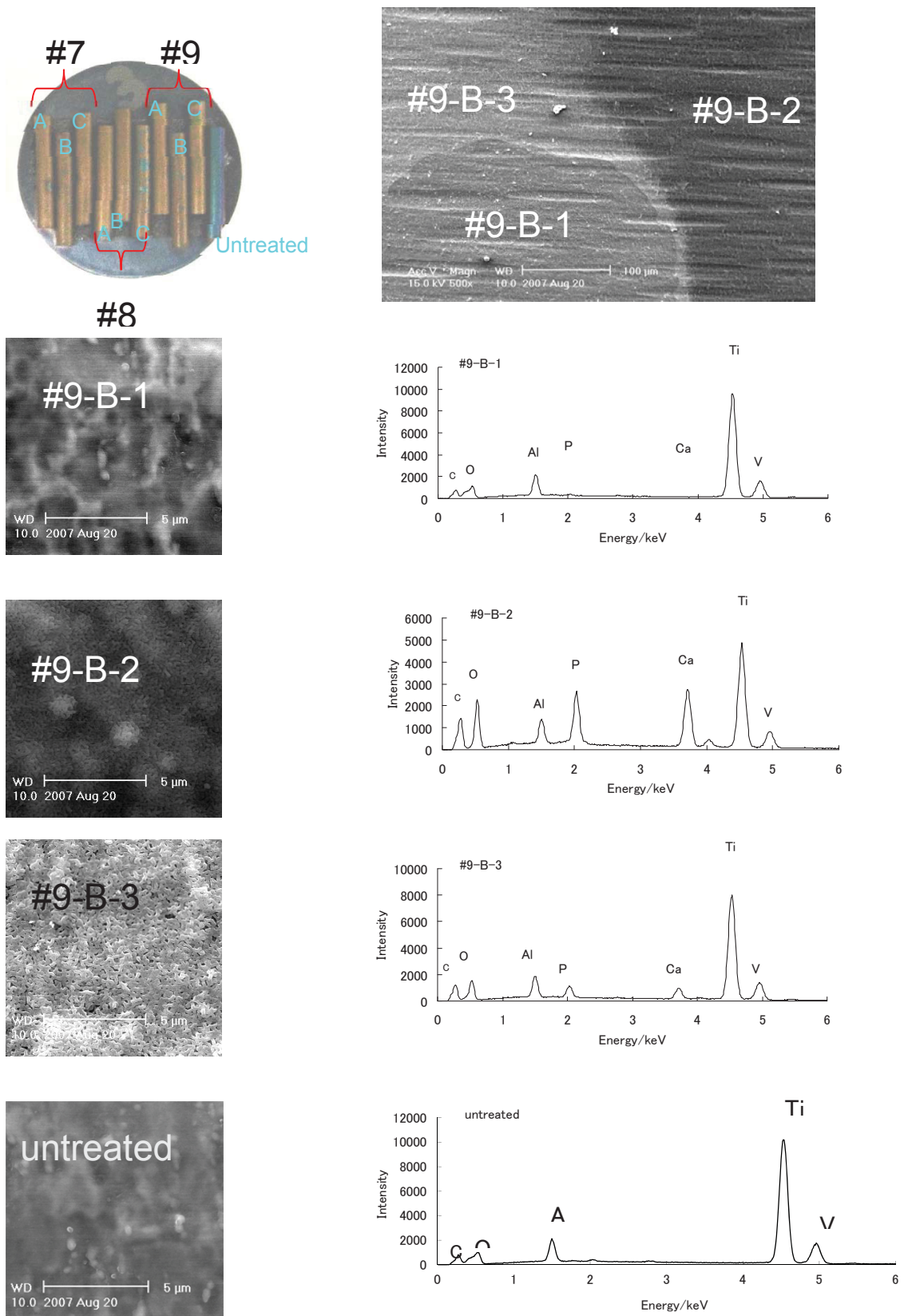


図. 2.31. SEM 写真及び EDX 結果 9-B

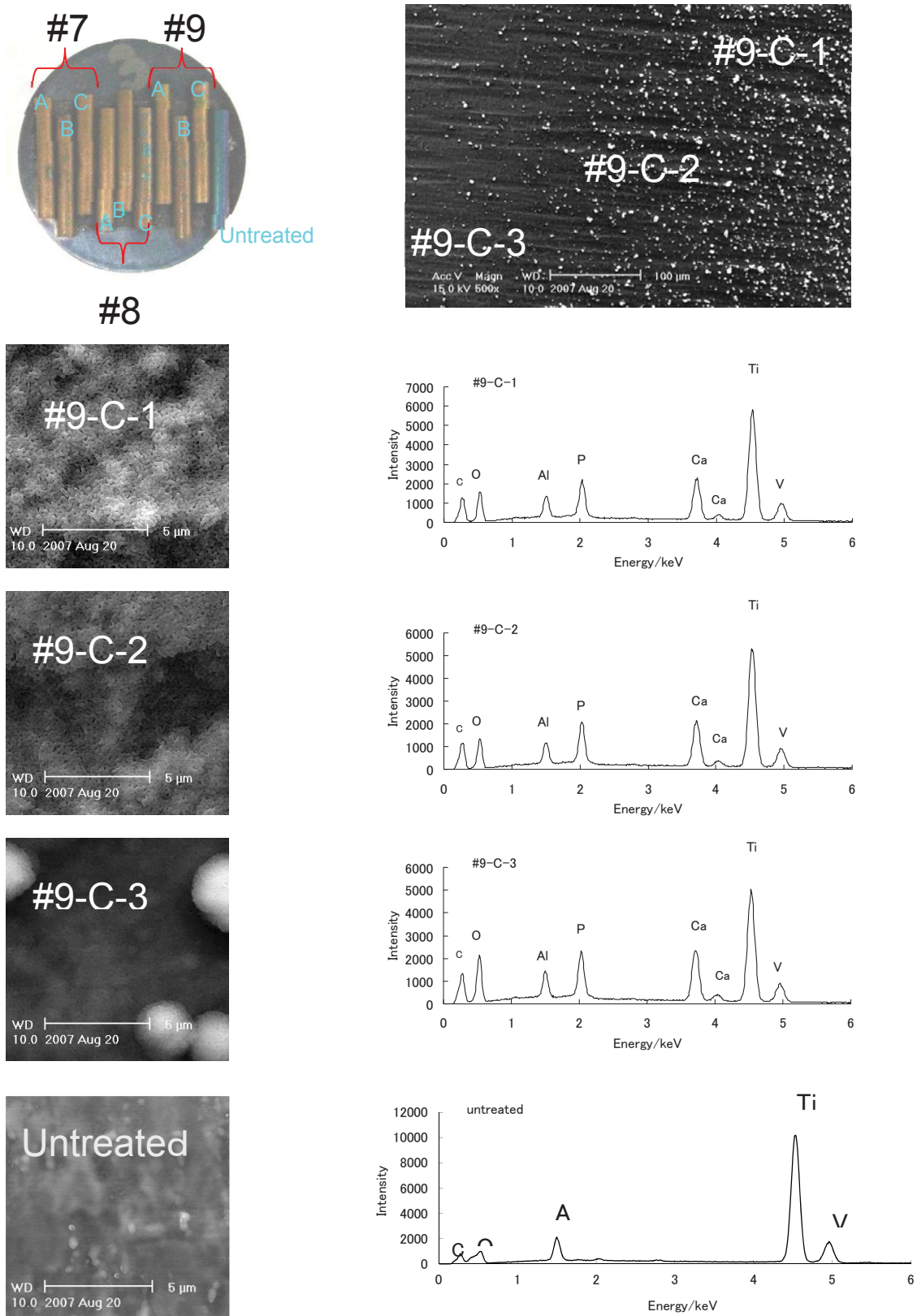


図 . 2.32. SEM 写真及び EDX 結果 9-C

各試料の EDX スペクトルのピーク面積強度比を表 2.18 に示す。

表 2.18. EDX スペクトルのピーク面積強度比

Sample No.	Ca/P molar ratio	NaHCO <sub>3</sub> /mM	Ca conc. /mM	P/Ti	Ca/Ti
1	1.0	7.90	2.25	0.019±0.009	0.011±0.011
2	1.0	10.86	2.25	0.023±0.013	0.016±0.018
3	1.0	15.09	2.25	0.028±0.016	0.022±0.022
4	1.5	7.90	3.38	0.032±0.015	0.028±0.020
5	1.5	10.86	3.38	0.031±0.013	0.027±0.018
6	1.5	15.09	3.38	0.035±0.011	0.032±0.015
7	2.0	7.90	4.50	0.031±0.014	0.027±0.018
8	2.0	10.86	4.50	0.024±0.008	0.018±0.010
9	2.0	15.09	4.50	0.024±0.007	0.017±0.009

#### 2.4.4 考察

本章では、ICP によるリン酸カルシウム過飽和溶液からの Ca および P の減少量という間接的なアパタイト層形成量の推算だけでなく、ZAF 法によって、直接表面に形成された層中の各元素の含有量を求めた。全データから見ると、Ca/P モル比が同じ 1.5 の時に、NaHCO<sub>3</sub> の添加量の増加に従い、P/Ti 比及び Ca/Ti 比が大きくなる傾向が見られ、この傾向は ICP による化学組成分析結果と一致していると考えられる。その中、Ratio=1.5、2.0 と比較して Ratio=1 の場合では、P/Ti 比及び Ca/Ti 比が小さいことがわかり、図 2.6～図 2.14 の SEM 写真からリン酸カルシウム沈殿が少ないことと良い一致を示した。この結果は、リン酸カルシウム過飽和溶液の濃度が高いほど Ti 棒上のアパタイト層形成に有利であることを示すと考えられる。このため、まず Ratio=1 の条件は前処理条件として適切ではないと考えられる。また、P/Ti 比と Ca/Ti 比が比較的大きい Ratio=1.5 の場合でも、標準偏差値から P/Ti 比と Ca/Ti 比のバラつきが大きい事が分かった。均質なアパタイト層形成が望ましいと考えられるため、Ratio=1.5 の条件も前処理条件として適切ではないと考えられる。一方で Ratio=2.0 に設定すると、EDX データも安定し、SEM 観察でもほぼ全面が骨類似アパタイトで覆われている様子が確認できることから、Ratio=2.0 が前処理の最適条件にふさわしいと考えられる。

## 2.5 陽極酸化 Ti 棒への FGF-2-リン酸カルシウム層形成

### 2.5.1 実験目的

節 2.4 までの研究で、陽極酸化 Ti 表面に均質なアパタイト層を形成させることに成功した。前処理としてこのような均質なアパタイト層の形成を行うと、アパタイトの結晶成長が促進されることが想像され、従来から研究されているリン酸カルシウム過飽和溶液を用いたタンパクの共沈担持には有利に働くと考えられる。特に失活を嫌う FGF-2 のような薬剤を担持させる場合にはアパタイトの析出が起こりにくい低温での処理を求められるため、上記の前処理は薬剤担持量を増やす有効手段と考えられる。本章では、リン酸カルシウム過飽和溶液を用いて前処理を行った Ti 棒上への FGF-2 の共沈担持処理実験を行い、この仮説が正しいかどうかについて検討を行った。

### 2.5.2 実験操作

まず、Ti 棒上へのアパタイト層の形成が FGF-2 の担持に与える影響を調べるため、前処理を行う Ti 棒と未処理のまま使用する Ti 棒の 2 種類を準備した。さらに、FGF-2 が単なる吸着による担持ではなく、リン酸カルシウムとの共沈で担持されていることを示すため、浸漬液には RSM 液と、Ca および P を含まない生理的食塩水の 2 種類を使用した。以下に前処理を含む FGF-2 担持処理を説明する。

- ① Ti 棒を 24 ウェルプレートの各ウェルに 2 本ずつ入れる。
- ② Ca/P モル比: 1.5、Ratio: 2.0 及び  $\text{NaHCO}_3$ : 15.09 mM のリン酸カルシウム溶液を 40mL 調製する。
- ③ このリン酸カルシウム溶液を 2 mL ずつ、24 ウェルプレートの各ウェルに注ぎ、Ti 棒を浸漬する。
- ④ 24 ウェルプレートをビニール袋で包み、37 °C のインキュベータ内に 24 時間静置する。
- ⑤ Ti 棒は 24 ウェルプレートの各ウェルから取り出し、新しい 24 ウェルプレートに移し、滅菌水で 2 回洗浄する。
- ⑥ Ti 棒浸漬後の残留リン酸カルシウム溶液は 40  $\mu\text{L}$  ずつ 1 M 塩酸を添加し、それぞれコニカルチューブに移しかえ、ICP を用いた化学組成分析に使用する。
- ⑦ リン酸カルシウムコーティングした（以下、前処理と略記する）Ti 棒は 24 ウェルプレートの各ウェルに 2 本ずつ全 16 本置く。
- ⑧ 未処理の Ti 棒を⑦と同じ 24 ウェルプレートの各ウェルに 2 本ず

つ全 16 本置く。これを 2 セット作製する。

- ⑨ Ca/P モル比: 1.5、Ratio: 1.0 及び  $\text{NaHCO}_3$ : 13.58 mM のリン酸カルシウム溶液を 50 mL 調製する。
- ⑩ このリン酸カルシウム溶液を 1.8 mL ずつ、⑧の一方の 24 ウェルのマルチウェルプレートの各ウェルに注ぎ、前処理及び未処理の Ti 棒を浸漬する。
- ⑪ 生理食塩水を 1.8 mL ずつ、⑧のもう一方の 24 ウェルプレートの各ウェルに注ぎ、前処理及び未処理の Ti 棒を浸漬する。
- ⑫ 更に、⑩及び⑪の各ウェルに 100  $\mu\text{g/mL}$  FGF-2 溶液を 0.2 mL ずつ添加する。
- ⑬ 25 °C で 24 時間静置する。
- ⑭ 4 パターンの Ti 棒を全部取り出し、新しい 24 ウェルプレートにいれ、超純水で 2 回洗浄する。
- ⑮ 洗浄後の Ti 棒を冷凍保存する。
- ⑯ 24 ウェルプレートの各ウェルの残留リン酸カルシウム溶液に 40  $\mu\text{L}$  の 1 M 塩酸を添加し、それぞれコニカルチューブに移しかえ、ICP を用いた化学組成分析に使用する。

\* 分散分析によるデータの統計処理を行うため、各溶液組成について同様の操作を 8 回行った (N=8)。

### 2.5.3 実験結果

前処理を行った Ti 棒を、FGF-2 を含有する RSM 液に浸漬することで、25 °C でも FGF-2 の担持ができた。FGF-2 の担持量は、未処理の Ti 棒を用いると、RSM 液を用いても生理的食塩水を用いても 1 本当たり 0.11 ~ 0.17  $\mu\text{g}$  程度の担持量だった(表 2.19①)。一方、前処理を行うと、生理食塩水を用いた担持では未処理の Ti の場合と比較して有意差は認められないものの多少高い担持量(0.23  $\mu\text{g}$ )を示し、さらに RSM 液を用いると他のどの条件よりも有意に担持量が多くなることがわかった(表 2.19②及び③、図 2.33)。化学組成分析の結果、前処理を行った Ti 棒に FGF-2 を担持した後の RSM 液は Ca および P 濃度が初期濃度から低下しており、FGF-2 とリン酸カルシウムとの共沈によって担持されたことが示唆された(表 2.20)。未処理の Ti 棒を浸漬した場合の RSM 液中の Ca 及び P 濃度変化は前処理を施した Ti 棒を浸漬した場合と比べて小さく、リン酸カルシウムの析出量は少ないことが分った。SEM および EDX 測定の結果では、前処理した Ti 棒を RSM 液に浸漬して FGF-2 担持を行った場合のみ、骨類似アパタイト様の表面析出層が確認できた(図

2.34)。未処理の Ti 棒の表面上にはリン酸カルシウムの析出が確認できず、この点は ICP の測定結果と異なった。しかしいずれにしても前処理を施した Ti 棒と比較して有効な手法ではないことは明らかである。また、Ti 棒は前処理を行っても、生理食塩水で作製した FGF-2 溶液に浸漬すると、ほぼ完全に溶解してしまうことも確認された。前処理後に RSM 液を用いて FGF-2 担持させた Ti 棒上に形成された表面層を掻き取って Si 無反射板を用いて相同定を行ったところ、確かに低結晶質アパタイトであることが確認できた(図 2.35)。

表. 2.19①. 各処理条件における FGF-2 担持量

測定状況		試料 No.	測定値	担持量 $\mu\text{g}/\text{mL}$	平均 $\mu\text{g}/\text{mL}$	一本当り $\mu\text{g}$
RSM+FGF	前処理	1	0.085	2.874	2.08 $\pm$ 0.62	0.52
		2	0.058	1.957		
		3	0.040	1.357		
		4	0.063	2.120		
	未処理	1	0.018	0.615	0.69 $\pm$ 0.19	0.17
		2	0.016	0.533		
		3	0.029	0.971		
		4	0.019	0.650		
生食+FGF	前処理	1	0.026	0.889	0.91 $\pm$ 0.03	0.23
		2	0.026	0.887		
		3	0.028	0.956		
		4	0.026	0.900		
	未処理	1	0.014	0.484	0.43 $\pm$ 0.07	0.11
		2	0.014	0.486		
		3	0.011	0.392		
		4	0.010	0.355		

表. 2.19② 分散分析

ソース	自由度	平方和	平均平方	F 値	p 値
合計	15	7.640	0.509	19.5561	< .0001
A	3	6.343	2.114		
残差	12	1.297	0.108		

表. 2.20. ICP による Ca 及び P 濃度変化

			温度 ℃	減少 Ca モル数 mM	減少 P モル数 mM
一日	RSM		37	0.32±0.03	0.19±0.02
二日	RSM+FGF-2	前処理	25	0.15±0.01	0.08±0.01
		未処理		0.12±0.02	0.06±0.00

表. 2.19③. Tukey 法によるすべてのデータの対比較

比較	平均差	<i>q</i>	<i>p</i> 値	95%信頼限界	有意水準 5%
前処理→RSM 対 未処理→生食	1.648	10.021	< 0.0001	0.95731 から 2.3379	有意差あり
前処理→RSM 対 未処理→RSM	1.385	8.422	0.0003	0.6944 から 2.075	有意差あり
前処理→RSM 対 前処理→生食	1.169	7.110	0.0015	0.47856 から 1.8591	有意差あり
前処理→生食 対 未処理→生食	0.479	2.912	0.221	-0.21153 から 1.169	有意差なし
未処理→生食 対 未処理→RSM	0.216	1.313	0.7905	-0.47443 から 0.90613	有意差なし
未処理→RSM 対 未処理→生食	0.263	1.599	0.6786	-0.42738 から 0.95319	有意差なし

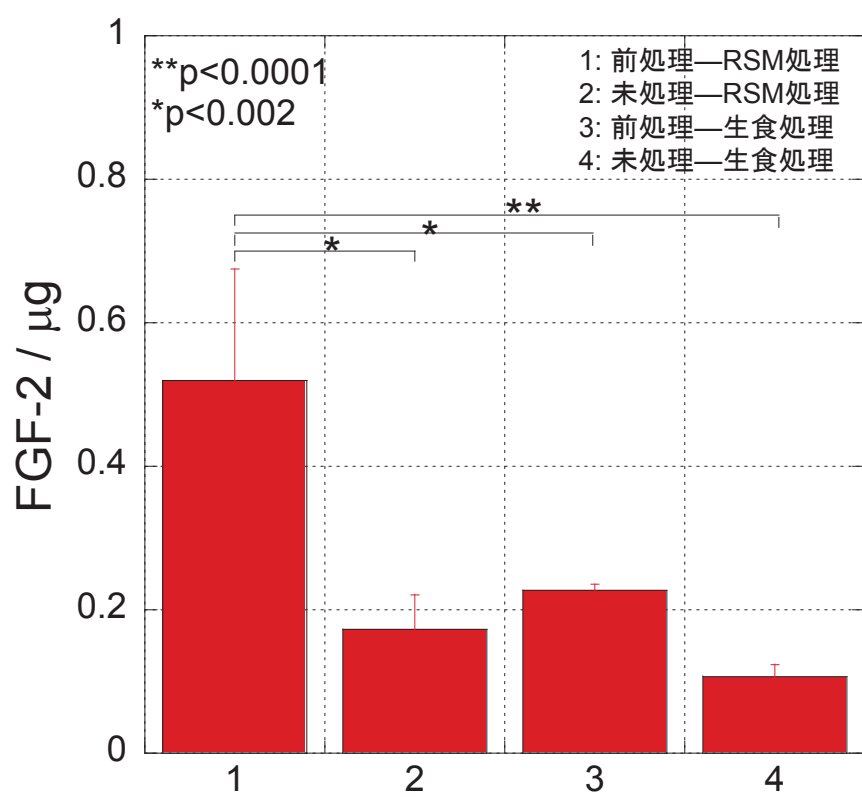


图. 2.33. FGF-2 担持量

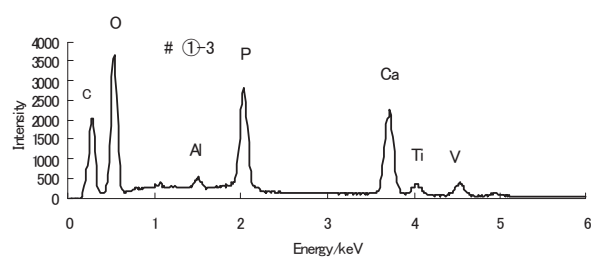
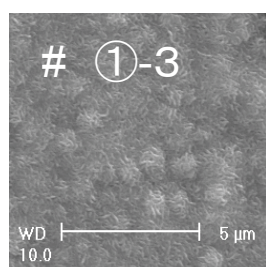
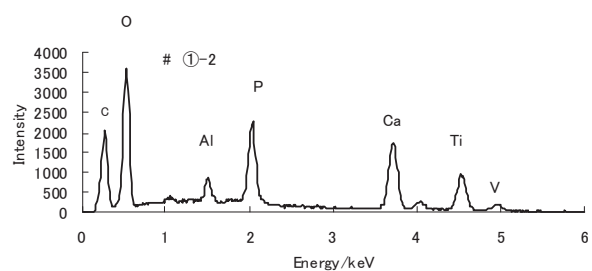
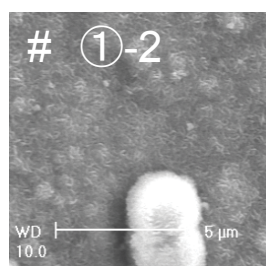
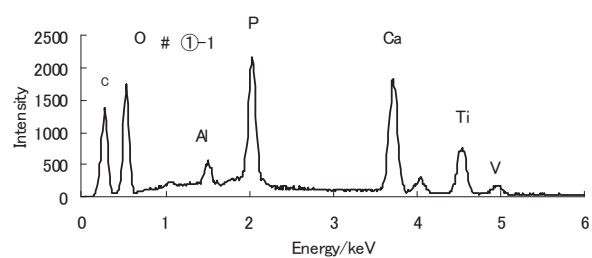
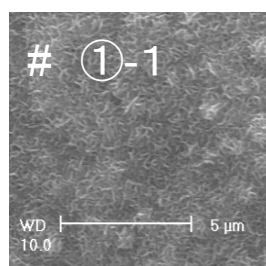
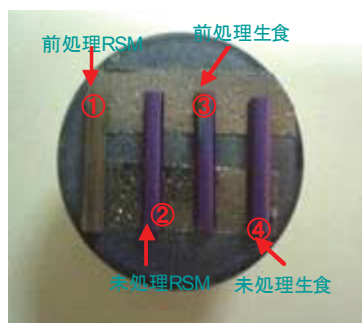


図.2.34. SEM 写真及び EDX 結果①

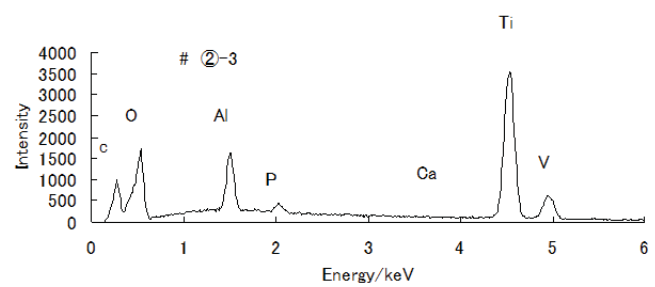
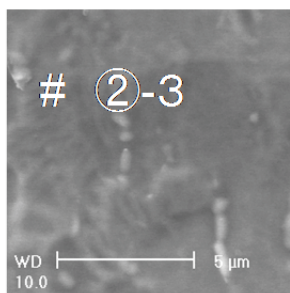
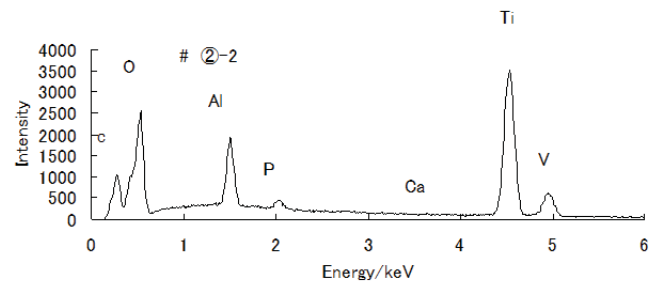
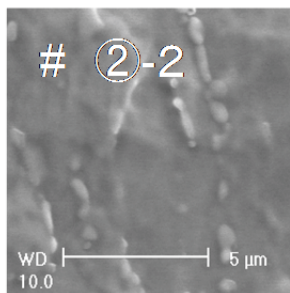
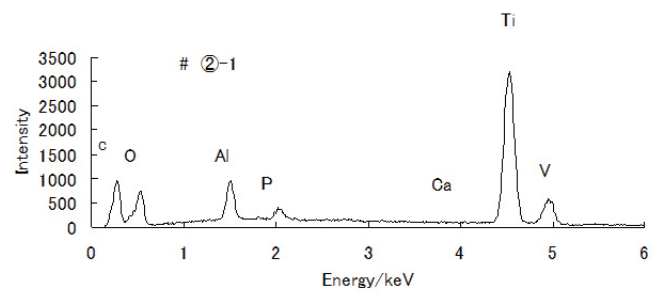
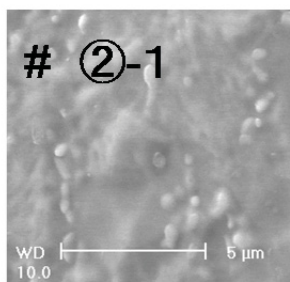
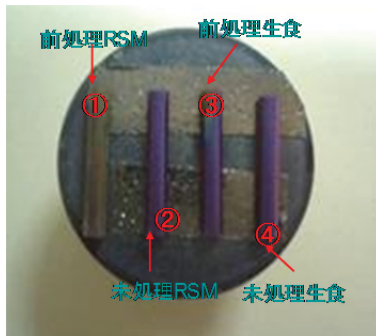


図.2.34. SEM 写真及び EDX 結果②

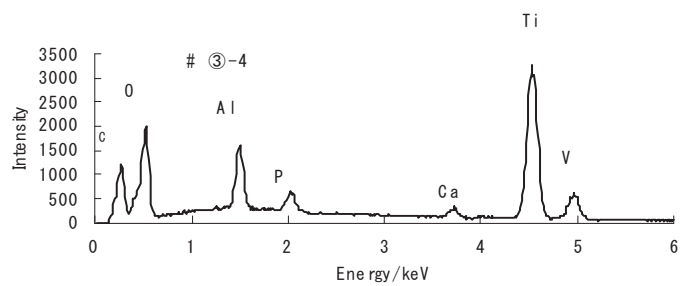
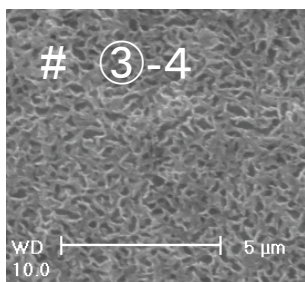
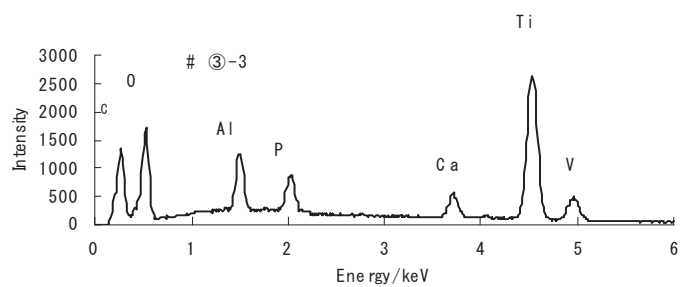
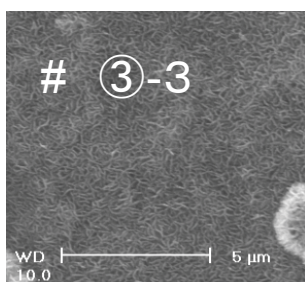
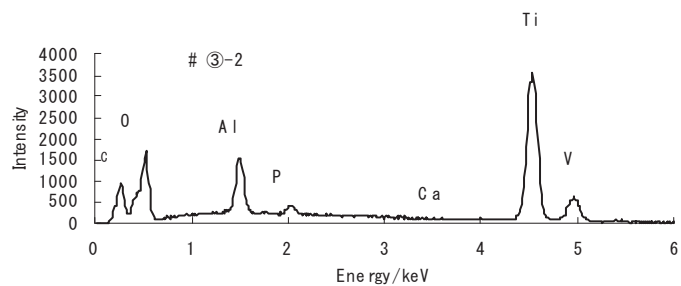
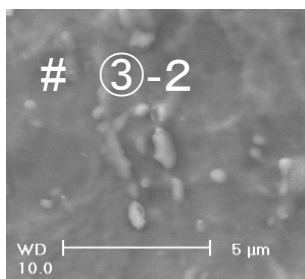
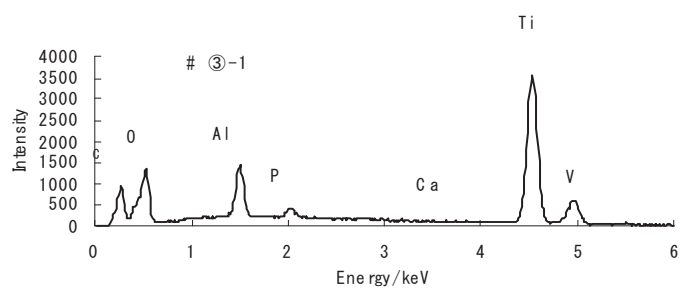
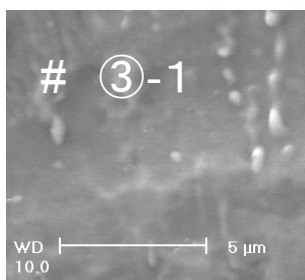


図.2.34. SEM 写真及び EDX 結果③

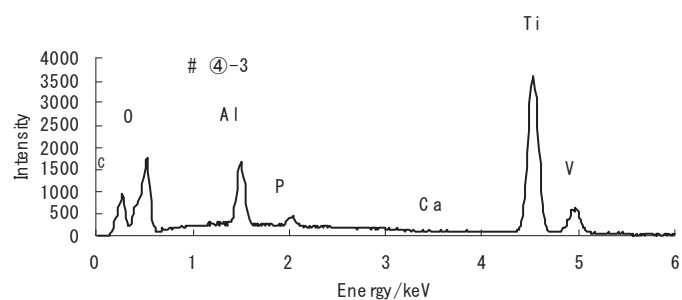
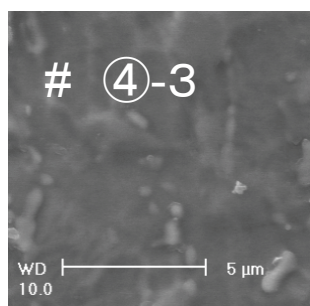
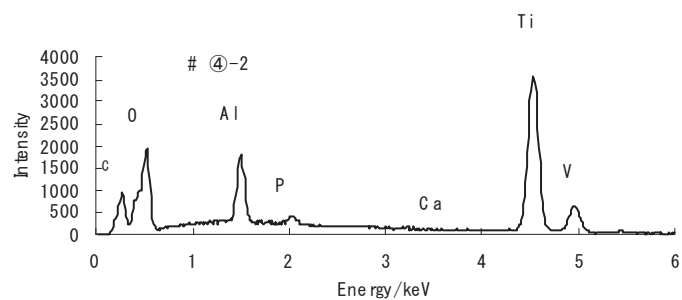
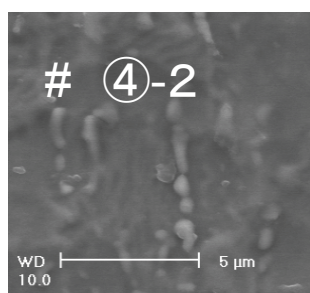
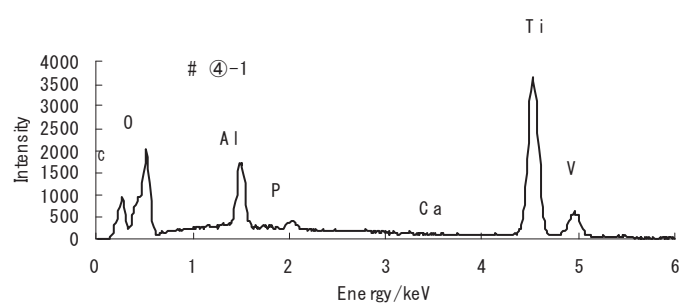
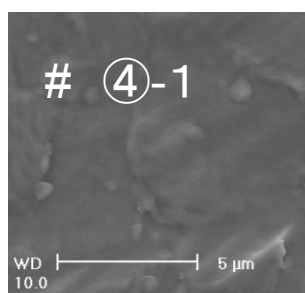


図.2.34. SEM 写真及び EDX 結果④

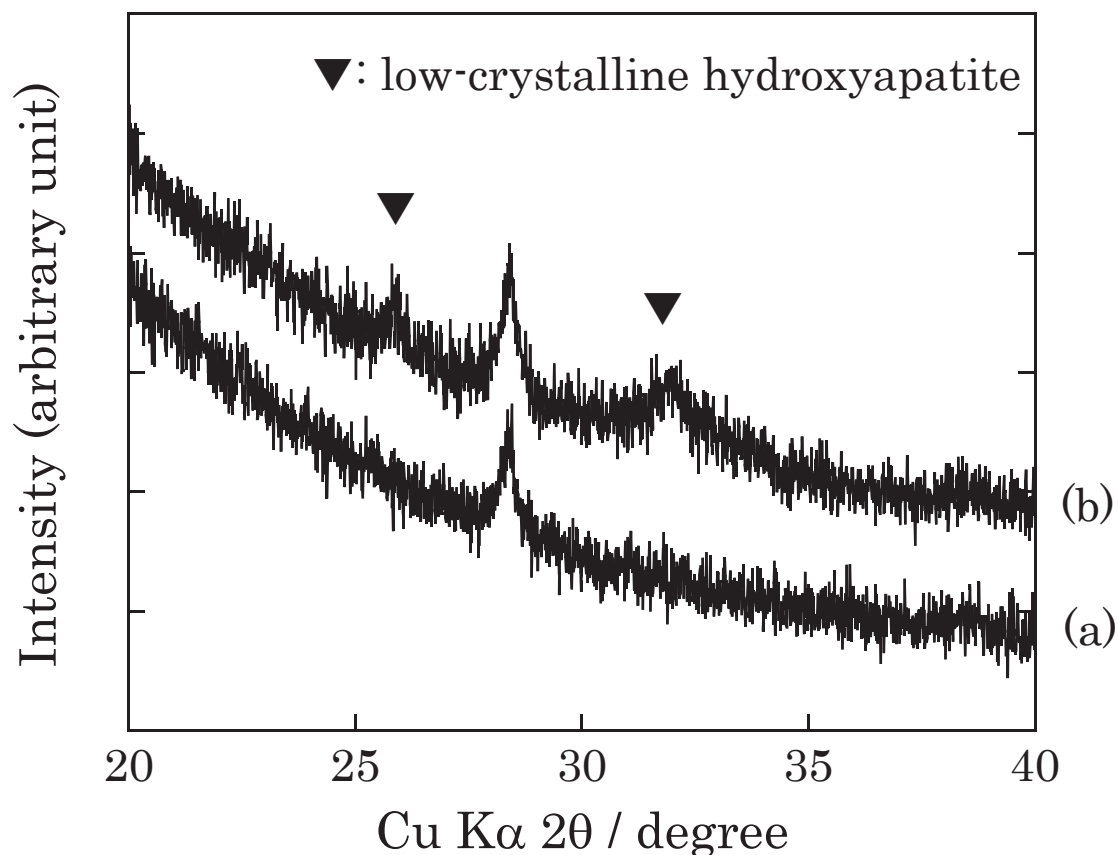


図.2.35. 前処理後に RSM 液を用いて FGF-2 担持した後の表面層の薄膜 X 線回折パターン.

(a)バックグラウンド及び(b)Ti 棒表面の低結晶質アパタイト

#### 2.5.4 考察

前処理を行った Ti 棒を FGF-2 を含有する RSM 液に浸漬した場合にのみ、FGF-2 が相当量担持されることが明らかとなった。節 2.4 で明らかな通り、RSM 液で前処理を行った Ti 棒の表面には骨類似アパタイト層が観察された(図 2.6～2.32)。同じ RSM 液を用いた FGF-2 担持でも、析出するリン酸カルシウムは骨類似アパタイト様であることは過去のリン酸カルシウム過飽和溶液によるタンパク担持実験で容易に予想される<sup>[56]</sup>。本研究で使用した XRD や EDX といった分析手法でアパタイト層の成長を検出するのは困難であるが、幸い SEM 観察結果で興味深いことが分かった。それは、前処理層のアパタイトと FGF-2 担持後のアパタイトのパーティクルの大きさが異なることである。前処理層中のパーティクル一つ一つの大きさは調べたところ長さが約 590

nm、幅が 174 nm 程度なのに対して RSM 液で FGF-2 を担持させた時に形成されたパーティクルの大きさは長さが 310 nm、幅が 86 nm、すなわち、パーティクルサイズが小さくなっていることが分かった。FGF-2 担持処理は前処理に比べて低温処理なので、アパタイトの結晶成長(あるいは粒成長)が比較的遅いと考えられ、FGF-2 担持後のパーティクルサイズが小さくなっているという事実は妥当といえる。つまり、違うサイズの結晶が観察されたことによって前処理層中のアパタイトパーティクルが肥大化したのではなく、第 2 層目が形成されたことによると考えられる。FGF-2 の担持量も他の条件と比較して有意に高く(Fig.2.33)、FGF-2 とアパタイトの複合化層が形成されたことが示唆される。

一方、未処理の Ti 棒を RSM 液中に浸漬しても、SEM 写真では未処理の Ti 棒の表面状態とほぼ同じように観察され、アパタイト層の形成は認められなかった。EDX の結果からも Ca が検出されず、アパタイト層が形成されないと考えられる。つまり、FGF-2 は 2 段階法にして初めて 25 °C で担持可能であることが示された。

また、前処理後の Ti 棒に生理的食塩水で FGF-2 担持処理を行っても、FGF-2 の担持量がほとんど増加しない(Fig.2.33)どころか、ほとんどすべての処理試料でアパタイト層が SEM 観察や EDX で検出できないことから、生理的食塩水あるいはそれに含まれる EDTA(エデト酸ナトリウム)がアパタイト層の溶解を助けているらしいことが想像できる。Ti 棒の端(3 枚目と 4 枚目)は前処理層が残っているように観察されている。この Ti 棒の端というのが底側か液面に近い側かは判断できないが、図.2.36 によって、③-3→③-4→③-1 枚目のようにアパタイト層の様子が変化し、アパタイト層の厚さがだんだん小さくなっていると推測できる。FGF-2 の担持量が未処理の Ti 棒に比べてやや高めに測定されるのは、この残留している前処理層に FGF-2 が吸着したことが原因ではないかと推察される。しかしいずれにしても Ti 棒に前処理を施した効果はほとんど発揮されず、FGF-2 担持方法としては適切ではないと結論できる。

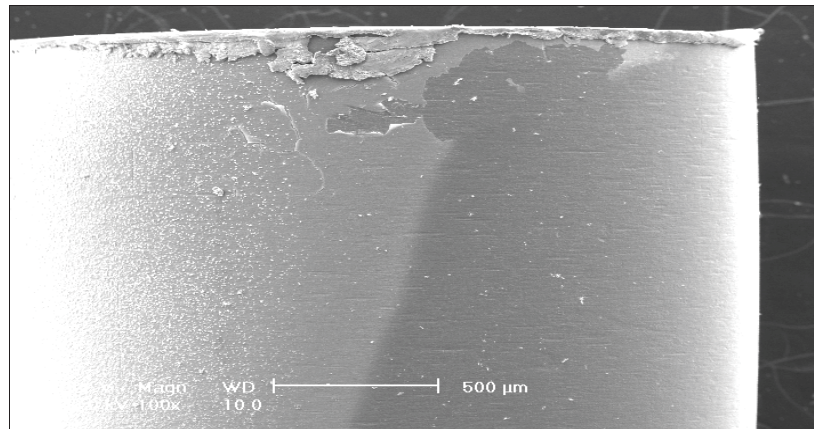


図.2.36. Ti 棒表面図

以上をまとめると、アパタイトが成長するための結晶核を Ti 棒表面に析出させる前処理を行うと、FGF-2 の失活リスクを考慮しなくても良い 25 °C で 1 日間の浸漬時間でも FGF-2 を担持可能であり、なおかつ薬剤担持量を増やす有効手段と考えられる。但し、FGF-2 が失活しているか否かは実際に細胞や生体組織の反応を持ってのみ証明可能と考えられるため、次章において *in vitro* での活性試験を行う。

## 2.6 FGF-2 担持による細胞活性化評価

### 2.6.1 実験目的

前節で行った FGF-2 の担持実験により、前処理によってアパタイトコーティングを施した Ti 棒に共沈担持された FGF-2 量が有意に多くなることが分かった。それを踏まえて本節では、Ti 棒と同様に表面が陽極酸化膜で覆われた創外骨折固定用 Ti スクリューを使用して FGF-2 担持を行い、その過程において FGF-2 がどの程度失活するのかを検討した。具体的には繊維芽細胞様細胞である NIH3T3 細胞の培養系に担持された FGF-2 の抽出液を添加して培養を継続し、細胞増殖率から FGF-2 が担持後も活性を維持しているかどうかを評価した。さらに、ウサギに対する挿入路感染防止効果が認められた Mutsuzaki et al.の研究<sup>[58]</sup>の結果と比較するため、Mutsuzaki et al.が用いた医療用医薬品の混合により得られる RKB 液で FGF-2 を担持させたチタンスクリューをコントロールとした比較も行った。

### 2.6.2 実験操作

#### 2.6.1.1 Ti スクリューについて

基材としては陽極酸化 Ti 製キャンセラス・スクリュー(Synthes、φ4.0 mm、長さ 300 mm、以下 Ti スクリュー)を使用した。γ 線滅菌済みの Ti スクリューも入手可能であるが、Ti 棒は洗浄の後 EOG 滅菌を施して実験に使用したという経緯から、Ti スクリューも未滅菌のものを使用した。

#### 2.6.2.2 実験手順

##### 2.6.2.2.1 RKB 液を使用したコントロールの作製

##### 1) コントロールの作製条件

コントロールの FGF-2 担持の諸条件は Mutsuzaki et al.の研究<sup>9)</sup>を参考にした。本研究と異なる条件を簡単に述べると、以下の 5 点が挙げられる。

- ① リン酸カルシウム過飽和溶液は、高濃度 RKB 液、すなわち基本となる輸液の組み合わせはリンゲル液、クリニザルツ B(Klinisalz B)及びバイフィル(Bifil)とした。
- ② リン酸カルシウム過飽和溶液のパラメータは Ca/P モル比=2.0、Ratio=2.0 倍(Ca 濃度=3.67 mM)及び NaHCO<sub>3</sub> 濃度=15.09 mM である。
- ③ FGF-2 溶液は、科研製薬が販売しているフィブラスト 500 の本剤を少量の Ringer×2.0 液で溶解する。この溶液を 5 mL メスフラスコ中で

Ringer×2.0 液で定容して 100 µg/mL の FGF-2 溶液として使用した。

④ 1 本の Ti スクリューに対して使用するリン酸カルシウム過飽和溶液の体積は 10 mL である。

⑤ FGF-2 担持処理は 37℃、48 時間の条件で行った。

高濃度 RKB 液は、表 6.1 に示す医療用輸液と混合体積比を基に作成した。

表 2.21. 高濃度 RKB 液に使用する医療用輸液と混合体積比

	Ringer's solution  mL	Conclyte Ca  µL	Klinisalz B  mL	Conclyte solution PK  µL	Bifil  mL	Total  mL
RKB solution	8.14	36.85	0.90	18.72	0.91	10.00

## 2) コントロールの作製

コントロールは以下の方法で作製した。

① 15 mL コニカルチューブに 9.6 ml RKB 液と 0.4 mL FGF-2 溶液を添加する。

② よくピペッティングした後、Ti スクリュー 1 本を投入する。気泡が Ti スクリューに付着することがあるので、コニカルチューブを軽く叩いて除去する。

③ 二酸化炭素を放出するため、15 mL コニカルチューブの蓋を軽く被せる。

④ 湿度維持及びコンタミネーション防止のため、15 mL コニカルチューブをビニール袋に包み、インキュベータで 37℃、48 時間に静置する。

⑤ Ti スクリューを RKB 液から取り出し、滅菌水で 2 回洗浄する。

FGF-2 の定量や活性評価に際しては、洗浄後の Ti スクリューをそのまま使用した。形成された FGF-2-アパタイト複合化層のキャラクタリゼーションを行う際には凍結乾燥後に使用した。

### 2.6.2.2.2 FGF-2 担持 Ti スクリューの作製

試料としては、節 2.5 で FGF-2 担持が確認された条件、すなわち前処理を施した後に Ratio=1.0 の RSM 液を用いて FGF-2 担持を行う条件に加え、FGF-2 担持量が多くなると考えられる Ratio=2.0 の RSM 液を用いても FGF-2 担持を行った。また、FGF-2 溶液はその濃度が高いほど

FGF-2 担持量が少なくなることが報告されていることから<sup>[55]</sup>、FGF-2 濃度を低下(4 及び 2  $\mu\text{g/mL}$ )させる条件についても同時に検討した。計 4 種類の FGF-2 担持 Ti スクリューを作成するに当たり、以下の 2 点に注意した。

1) Ti スクリュー上へのアパタイト層形成(前処理)

FGF-2 担持の前処理として、Ti スクリュー上にアパタイト層の形成を行った。基本的に、前処理条件は第四章で得られた条件をそのまま適用した。但し、コントロールの作成方法に倣い、使用する RSM 液の量は 10 mL とし、15 mL コニカルチューブ内で処理を行う、という軽微な変更は行っている。

2) Ti スクリュー上への FGF-2 担持

FGF-2 の担持処理は節 2.5 で使用した条件をそのまま適用した。但し、前処理と同様にコントロール作成方法に倣って使用する RSM 液の量は 10 mL とし、15 mL コニカルチューブ内で処理を行う、という軽微な変更は行っている。

具体的な試料作成方法を以下に簡潔に示す。

- ① 1.25 mL ソリター T2、26.08  $\mu\text{L}$  コンクライト PK、8.50 mL リンゲル液、38.51  $\mu\text{L}$  コンクライト Ca 及び 0.18 mL メイロン液をこの順番で混合し、コニカルチューブに入れて、Ti スクリューを投入する。
- ② RSM 液処理した Ti スクリューを取り出し、チューブに入れる。
- ③ 滅菌水で Ti スクリューを 2 回洗浄する。
- ④ パスツールピペットで滅菌水を吸出し、Ti スクリューは新 15 mL コニカルチューブに移し入れる。
- ⑤ 表.6.1 に示すように、RSM 液と FGF-2 タンパク溶液を混合する。
- ⑥ 二酸化炭素を放出するため、15 mL コニカルチューブの蓋を軽く被せる。
- ⑦ 15 mL コニカルチューブをビニール袋に包み、室温 (25  $^{\circ}\text{C}$ ) で 24 時間静置する。

表. 2.22. 各混合液の調製割合

n = 4		パターン I *	パターン II *	パターン III*	パターン IV*
Solita-T2	mL	1.15	1.13	1.13	1.13
Conclyta-PK	μL	0	23.48	23.48	23.48
Ringer's	mL	7.69	7.65	7.65	7.65
Conclyta-Ca	μL	0	34.66	34.66	34.66
Meylon	mL	0.16	0.16	0.16	0.16
FGF-2 溶液	mL	1	1	0.4	0.2
生理食塩水	mL	0	0	0.6	0.8

\*: パターン I: 節 2.5 と同じ条件

パターン II: パターン I の Ratio を 1.0 から 2.0 に変えた条件

パターン III: パターン II の FGF-2 濃度を 10 μg/mL から 4 μg/mL に変えた条件

パターン IV: パターン II の FGF-2 濃度を 10 μg/mL から 2 μg/mL に変えた条件

#### 2.6.2.2.3 FGF-2 の抽出

Ti スクリューは長さが 30 mm のため通常の細胞培養容器を使用しての細胞試験に向かないと判断し、過去の研究<sup>[55]</sup>と同様に FGF-2-リン酸カルシウム複合層を溶解して得られる抽出液を使用した。複合層の溶解には、pH の安定性とアパタイト溶解性の高さの両面から、同論文と同様に pH5.43(25 °C)の 10 mM クエン酸-クエン酸ナトリウムバッファを使用した。抽出方法は以下の通りである。

- ① コントロール及び 4 種類の試料は、作成後それぞれに別のチューブに移し変える。
- ② それぞれ滅菌水で 2 回洗浄した後に、3.5 mL クライオバイアルチューブに入れる。
- ③ クライオバイアルチューブに 2 mL クエン酸バッファを添加し、各 Ti スクリューを十分浸漬させる。
- ④ 室温(25 °C)で 3 時間静置する。

極力 FGF-2 の培養系外での失活を抑えるため、この液は FGF-2 抽出操作の後すぐに細胞培養実験に使用した。

#### 2.6.2.2.4 培養細胞実験による FGF-2 の活性評価方法

FGF-2 の活性評価は繊維芽細胞の増殖率を利用する方法を選択した。繊維芽細胞としては、理研セルバンクから購入したマウス由来の繊維芽細胞様細胞 NIH3T3(理研セルバンクでの登録名: NIH3T3-3-4)を使用した。当実験方法は、使用する細胞が異なるものの、基本的には FGF-2 製剤フィブラストスプレー500 を販売している科研製薬株式会社のアッセイ方法に準じている。

##### 1) 試料準備

細胞培養に必要な各溶液は以下の通り調製した。

##### ○PBS(-)溶液

- ① PBS(-)粉末(ダルベッコ PBS(-)日水製薬、05913)4.8 g を超純水 500 mL に溶解する。
- ② 溶液をオートクレーブ滅菌(120℃で 20 分間)あるいはろ過滅菌(ステリカップを使用)する。
- ③ 冷蔵庫に保存する。

##### ○3g/dL L-グルタミン溶液

- ① 3g の L-グルタミン(MP Bio,194678)を 100 mL の PBS(-)に溶解する。ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルタを用いてろ過滅菌する。冷凍庫に保存する。

##### ○ペニシリン/ストレプトマイシン溶液

- ① コニカルチューブに 1 mL のペニシリン/ストレプトマイシン溶液(100X、和光純薬工業、548-01971)を注ぐ。
- ② 10mL の生理食塩水(2X : 1.8 wt%)と 9 mL の超純水を注ぐ。
- ③ ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルタを用いてろ過滅菌する。
- ④ 冷凍庫に保存する。

##### ○BSA 溶液(20 g/dL)

- ① 0.2 g の BSA(牛血清アルブミン、Thermo electron、194678)を 1.0 mL の PBS(-)に溶解する。
- ② ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルタを用いてろ過滅菌する。
- ③ 冷凍庫に保存する。

○インスリン溶液(0.4g/dL)

- ① 10 mg のインスリン(和光純薬工業、090-03446)を 2.5 mL の PBS(-) で溶解する。
- ② ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルタを用いてろ過滅菌する。
- ③ 冷凍庫に保存する。

○トランスフェリン溶液(0.4 g/dL)

- ① 10 mg のトランスフェリン(Calbiochem,178481)を 2.5 mL の PBS(-) で溶解する。
- ② ポアサイズ 0.22  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルタを用いてろ過滅菌する。
- ③ 冷凍庫に保存する。

○細胞培養液

- ① DMEM、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液、L-グルタミン溶液、牛血清を 37  $^{\circ}\text{C}$  の湯浴で 30 分間温める。
- ② 500 mL の DMEM に 2.5 mL のペニシリン/ストレプトマイシン溶液を添加する。
- ③ 44.5 mL の上記 DMEM に 0.5 mL の L-グルタミン溶液と 5 mL の牛血清を添加する。
- ④ 冷蔵庫で保存する。

○無血清培養液

- ① DMEM、ペニシリン/ストレプトマイシン溶液、インスリン溶液、トランスフェリン溶液、BSA 溶液、L-グルタミン溶液、牛血清を 37  $^{\circ}\text{C}$  の湯浴で 30 分間温める。
- ② 500 mL の DMEM に 2.5 mL のペニシリン/ストレプトマイシン溶液を添加する。
- ③ 49.25 mL の上記 DMEM に 0.5 mL の L-グルタミン、0.25 mL の牛血清アルブミン、125  $\mu\text{L}$  のインスリン、25  $\mu\text{L}$  のトランスフェリンの各溶液を添加する。
- ④ 冷蔵庫で保存する。

2) 細胞の解凍

- ① コニカルチューブ 2 本に培養液をそれぞれ 5 ml ずつ入れる。
- ② 培養液が入ったコニカルチューブを氷浴で冷却しておく。
- ③ 遠心分離機の温度を 4  $^{\circ}\text{C}$  にセットする。

- ④ 湯浴を 37 °C に暖めておく。
- ⑤ 液体窒素に保存しているクライオチューブを取り出す。
- ⑥ クライオチューブ中の内容物を湯浴で半解凍状態にする。
- ⑦ クライオチューブ中の内容物をピペッティングし、冷却しておいた培養液に加えてさらにピペッティングする。
- ⑧ 1000 rpm で 3 分間遠心分離にかける。
- ⑨ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑩ コニカルチューブに細胞培養液を注ぐピペッティングする。
- ⑪ 1000 rpm で 3 分間遠心分離にかける。
- ⑫ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑬ コニカルチューブに細胞培養液を注ぎピペッティングして細胞懸濁液にする。
- ⑭ 細胞懸濁液を細胞培養用フラスコに注ぐ。
- ⑮ 細胞培養用フラスコを CO<sub>2</sub> インキュベータに入れる。
- ⑯ 翌日、細胞培養液を交換する。

### 3) 細胞(NIH3T3)の継代

- ① 細胞培養液、PBS(-)と 0.25%トリプシン/EDTA 溶液を湯浴で 37 °C に温める。
- ② フラスコ中の培養液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ③ 細胞を 5 mL の PBS(-)で緩やかに洗浄する。
- ④ PBS(-)を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑤ 2~3 ml の 0.25%トリプシン/EDTA 溶液をフラスコに加え、すぐに吸い取り再び 2~3 滴加える。
- ⑥ 細胞が剥がれるまでフラスコをインキュベータに戻し、2,3 分間静置する。
- ⑦ トリプシンを失活させるため細胞培養液を加える。
- ⑧ 細胞培養液でフラスコの底面を優しく洗い流し、細胞懸濁液とする。
- ⑨ 細胞懸濁液をコニカルチューブに注ぐ。
- ⑩ 1000 rpm で 3 分間遠心分離を行う。
- ⑪ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑫ 5 mL の細胞培養液をコニカルチューブに注ぐ、ピペッティングする。
- ⑬ 1000 rpm で 3 分間遠心分離を行う。
- ⑭ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑮ 5 mL の細胞培養液をコニカルチューブに注ぎ、ピペッティングする。

- ⑩ 1000 rpm で 3 分間遠心分離を行う。
- ⑪ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑫ 5 mL の細胞培養液をコニカルチューブに注ぎ、ピペッティングして細胞懸濁液とする。
- ⑬ 100  $\mu$ L の細胞懸濁液をテストチューブに分取する。
- ⑭ 100  $\mu$ L の 0.03% トリパンプルー溶液をテストチューブに加えピペッティングする。
- ⑮ マイクロアッセイ法⑭の細胞懸濁液を血球計算盤に注ぐ。
- ⑯ 顕微鏡下で細胞数をカウントし、細胞密度を算出する。
- ⑰ 5 mL の新しい細胞培養液を細胞培養フラスコに注ぐ。
- ⑱ 必要となる細胞数となるように、適当量の細胞懸濁液をフラスコに加える。
- ⑲ 細胞培養用フラスコを CO<sub>2</sub> インキュベータに入れる。

#### 4) FGF-2 の活性評価

FGF-2 はその名の通り繊維芽細胞の増殖に関与するため、FGF-2 が活性を有していれば、無血清培養液中であっても繊維芽細胞様細胞である NIH3T3 の培養系に添加することによって細胞数が増殖する。その細胞数変化を定量することによって FGF-2 の保持する活性を評価した。細胞数カウントには、同仁化学(株)から販売されている細胞増殖アッセイキット(CCK-8)を使用した。本キットは細胞内脱水素酵素により還元され、高感度水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩(WST-8)を発色基質として採用した物で、細胞数と生成するホルマザンの量は直線的な比例関係にあることから、ホルマザンの 450 nm の吸光度を直接測定することにより、容易に生細胞数を計測することが可能である。

実験方法の詳細に関しては以下の通りである。

- ① 細胞培養液、無血清培養液、PBS(-)と 0.25% トリプシン/EDTA 溶液を湯浴で 37 °C に温める。
- ② 24 well プレート各ウェルに 450  $\mu$ L の無血清培養液を注ぐ。
- ③ 24 well プレートを CO<sub>2</sub> インキュベータに入れる。
- ④ フラスコ中の培養液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑤ 細胞を 5 mL の PBS(-)で緩やかに洗浄する。
- ⑥ PBS(-)を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑦ 2~3ml の 0.25% トリプシン/EDTA 溶液をフラスコに加え、すぐに吸

い取り再び 2～3 滴加える。

- ⑧ 細胞が剥がれるまでフラスコをインキュベータに戻し、2,3 分間静置する。
- ⑨ トリプシンを失活させるため細胞培養液を加える。
- ⑩ 細胞培養液でフラスコの底面を優しく洗い流し、細胞懸濁液とする。
- ⑪ 細胞懸濁液をコニカルチューブに注ぐ。
- ⑫ 1000 rpm で 3 分間遠心分離を行う。
- ⑬ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑭ 5 mL の無血清培養液をコニカルチューブに注ぐ、ピペッティングする。
- ⑮ 1000 rpm で 3 分間遠心分離を行う。
- ⑯ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑰ 5 mL の無血清培養液をコニカルチューブに注ぐ、ピペッティングする。
- ⑱ 1000 rpm で 3 分間遠心分離を行う。
- ⑲ 上澄み液を真空ポンプに繋いだパスツールピペットで吸い出す。
- ⑳ 5 mL の無血清培養液をコニカルチューブに注ぐ、ピペッティングし細胞懸濁液とする。
- ㉑ 100  $\mu$ L の細胞懸濁液をテストチューブに分取する。
- ㉒ 100  $\mu$ L の 0.03% トリパンブルー溶液をテストチューブに加えピペッティングする。
- ㉓ ㉒の細胞懸濁液を血球計算盤に注ぐ。
- ㉔ 顕微鏡下で細胞数をカウントし、細胞密度を算出する。
- ㉕ 10000 cells/mL の細胞懸濁液を必要量調製する。
- ㉖ ③の 24 well プレーートの各ウェルに 500  $\mu$ L の 10000 cells/mL 細胞懸濁液を注ぐ。
- ㉗ 24 well プレーートを CO<sub>2</sub> インキュベータに入れ、細胞接着のため 1 時間静置する。
- ㉘ ㉗の 24 well プレーートの各ウェルに、50  $\mu$ L FGF-2 抽出液を注ぐ。
- ㉙ 72 時間培養する。
- ㉚ ㉙の各ウェルに 100  $\mu$ L の CCK-8 を注ぐ。
- ㉛ 1 時間培養する。
- ㉜ 100  $\mu$ L の上澄みの培養液を 96 well プレーートに移す。
- ㉝ マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。

### 2.6.3 実験結果

### 2.6.3.1 FGF-2 担持量

FGF-2 の担持量は、総じて前処理を施す本研究の方法の方がコントロールよりも多くなったが、有意差が認められたのはパターン I およびパターン III で、特にパターン I に関しては他のすべての条件に対して有意差があるという結果が得られた。なお、FGF-2 の定量方法が異なるので単純な比較はできないものの、RKB 液を用いるコントロールの FGF-2 担持量は過去の報告<sup>[55]</sup>でなされた  $2.2 \mu\text{g}$  の約半分程度という結果であり、パターン I の担持量とほぼ同等であった。

表 6.3. 処理試料の UV 測定データ

	測定状況	試料 No.	測定値	FGF-2 濃度	担持量
				$\mu\text{g}/\text{mL}$	$\mu\text{g}$
パターン I	RSM	1	0.052	1.288	$2.45 \pm 0.21$
	Ratio $\times$ 1.0	2	0.055	1.338	
	FGF-2	3	0.047	1.150	
	$10\mu\text{g}/\text{mL}$	4	0.045	1.121	
パターン II	RSM	1	0.033	0.819	$1.52 \pm 0.13$
	Ratio $\times$ 2.0	2	0.030	0.745	
	FGF-2	3	0.027	0.671	
	$10\mu\text{g}/\text{mL}$	4	0.032	0.795	
パターン III	RSM	1	0.040	0.997	$1.78 \pm 0.25$
	Ratio $\times$ 2.0	2	0.040	0.995	
	FGF-2	3	0.031	0.773	
	$4\mu\text{g}/\text{mL}$	4	0.032	0.792	
パターン VI	RSM	1	0.036	0.904	$1.52 \pm 0.23$
	Ratio $\times$ 2.0	2	0.030	0.747	
	FGF-2	3	0.030	0.757	
	$2\mu\text{g}/\text{mL}$	4	0.025	0.623	
コントロール	RKB	1	0.027	0.688	$1.12 \pm 0.18$
	Ratio $\times$ 2.0	2	0.019	0.485	
	FGF-2	3	0.021	0.545	
	$4\mu\text{g}/\text{mL}$	4	0.020	0.521	

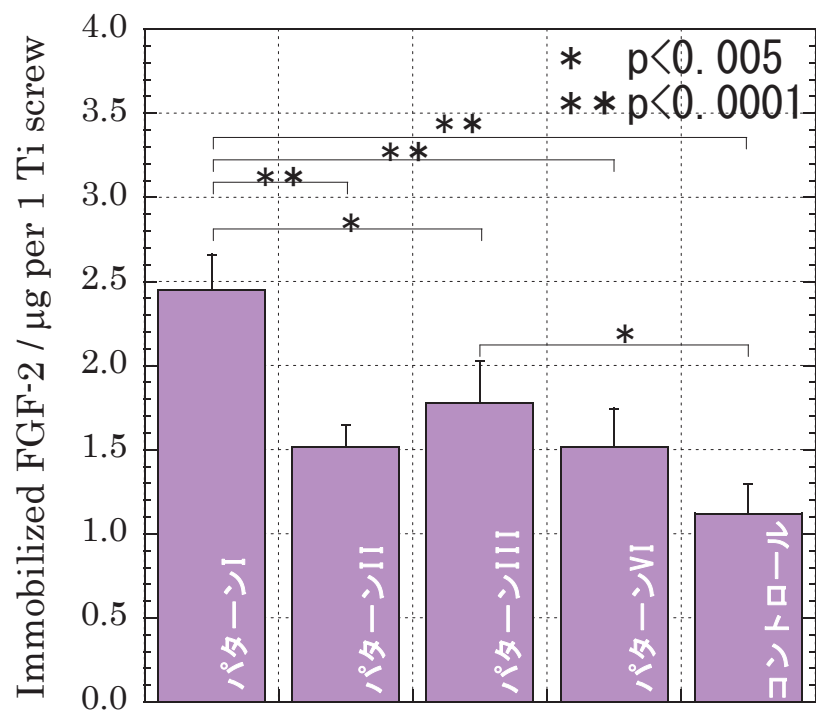


図. 2.37. FGF-2 担持量

#### 2.6.3.2 ICP データ及び ICP 図

FGF-2 担持量から判断して、パターン I の Ca と P の減少量は多くなると予想されたものの、実際には Ca および P の減少はほとんど認められず、他の条件、殊更 Ratio が高く FGF-2 濃度が低いパターン III およびパターン VI で顕著であった(表 6.4 及び図 6.3)。

表 2.24. 各パターン試料の ICP データ

パターン	FGF-2 μg /mL	No.	Ca 減少 量 mM	P 減少 量 mM	Ca/P 前	Ca/P 後	Ca 減少量 平均 μmol	P 減少量 平均 μmol
RSM I	10	前	1.74	1.22	1.43			
Ca/P=1.5		①	1.74	1.25		1.39	-0.39±0.47	-0.06±0.25
Ratio×1.0		②	1.83	1.24		1.48		
NaHCO <sub>3</sub>		③	1.82	1.20		1.51		
13.58		④	1.74	1.20		1.45		
RSM II	10	前	3.39	2.36	1.44			
Ca/P=1.5		①	3.23	2.10		1.54	2.07±1.89	2.79±0.28
Ratio×2.0		②	3.12	2.11		1.48		
NaHCO <sub>3</sub>		③	3.42	2.06		1.66		
13.58		④	2.97	2.05		1.45		
RSM III	4	前	3.47	2.30	1.51			
Ca/P=1.5		①	2.76	1.85		1.49	7.21±1.86	4.56±0.65
Ratio×2.0		②	2.98	1.93		1.54		
NaHCO <sub>3</sub>		③	2.74	1.83		1.50		
13.58		④	2.52	1.77		1.42		
RSM IV	2	前	3.13	2.14	1.47			
Ca/P=1.5		①	2.37	1.63		1.46	7.59±0.39	5.38±0.20
Ratio×2.0		②	2.36	1.60		1.47		
NaHCO <sub>3</sub>		③	2.33	1.59		1.47		
13.58		④	2.42	1.58		1.53		
RKB	4	前	3.36	1.65	2.04			
Ca/P=2.0		①	2.97	1.52		1.95	2.98±1.12	1.33±0.22
Ratio×2.0		②	3.08	1.50		2.05		
NaHCO <sub>3</sub>		③	3.22	1.54		2.08		
13.58		④	3.00	1.49		2.01		

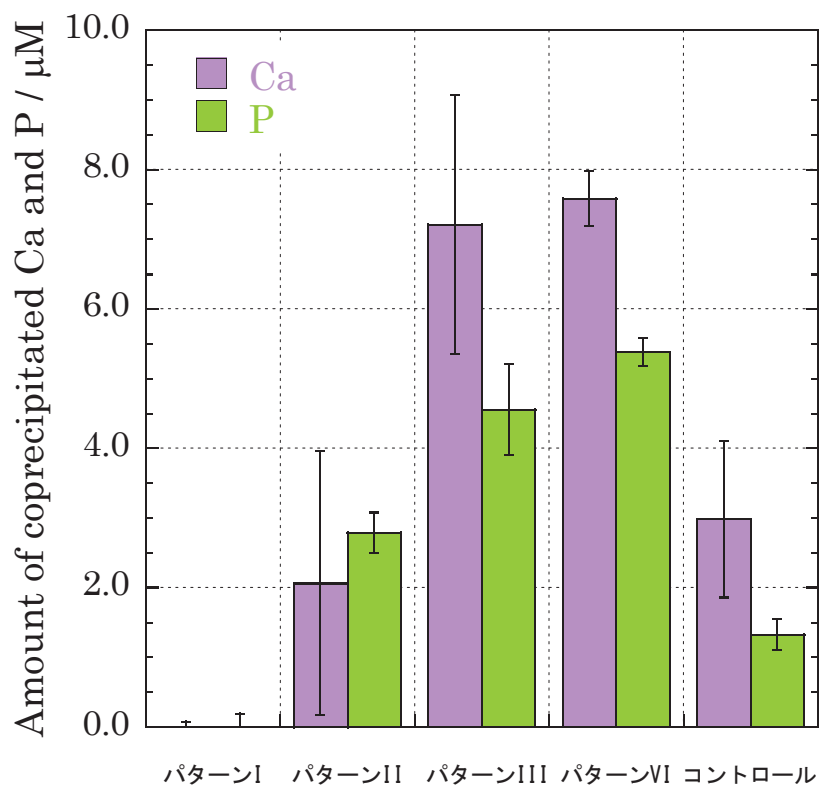


図. 2.38. Ca 及び P の減少量

#### 2.6.3.3 細胞による FGF-2 活性評価

本研究で提案した方法で FGF-2 を担持すると、いずれの場合も FGF-2 が完全失活しないことが確認された(図 6.4)。FGF-2 の担持量から FGF-2 の活性はパターン I が最も高いと予想されたが、実際にはパターン II、すなわち Ratio=2.0 で最も希薄な FGF-2 濃度(2  $\mu\text{g/mL}$ )に設定した場合に最も活性が高いことがわかった。一方で本実験では、過去の報告<sup>[55]</sup>とは異なりコントロールの細胞活性が認められなかった。全く細胞活性が認められない、すなわち完全失活しているとは考え難く、この点については再度検討の余地がある。

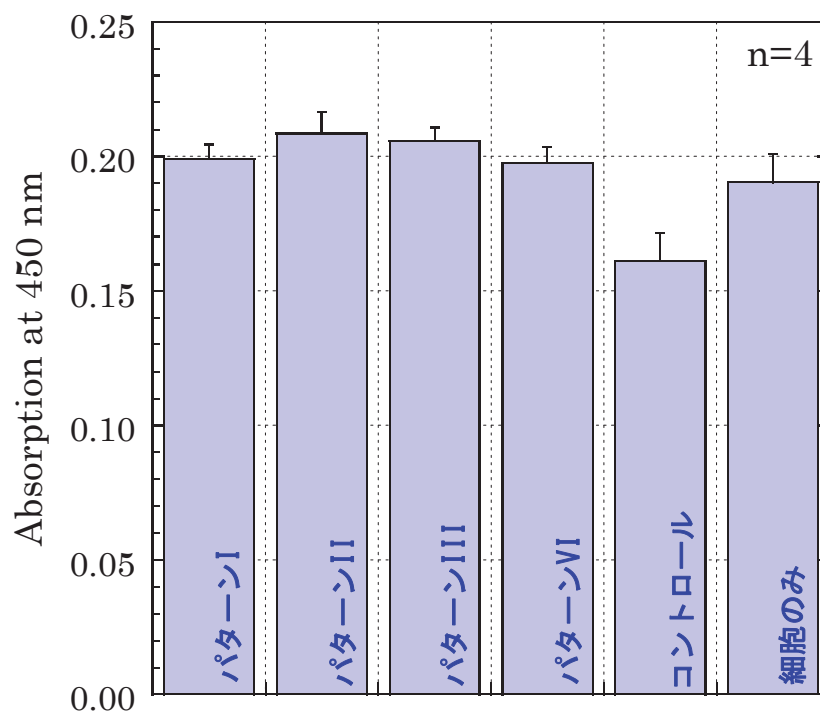


図. 2.39. 各条件で調製した試料の FGF-2 抽出液を添加した無血清培養系で培養した NIH3T3 細胞数

FGF-2 を添加せずに無血清培地で細胞を培養した場合(細胞のみ)は、当然ながらほとんど細胞数の増殖が認められないが、細胞数定量キット CCK-8 の性質上、細胞のみでも吸光度が測定される(図 2.39)。この値をバックグラウンドとすると、パターン I ～ IV までの条件で担持された FGF-2 は細胞数が増加しており FGF-2 が完全失活を起こしていないことが示された(図 2.39)。他方、コントロールに関しては、バックグラウンドを下回る吸光度しか測定できず、FGF-2 の活性を議論する以前のトラブルがあったものと考えられる(図 2.39)。

図 2.39 のデータと同時に測定した、無血清培養系への FGF-2 の添加量と細胞数との関係(すなわち検量線)はデータの特徴上、図 2.40 に示すような非線形の曲線になった。この図 2.39 及び 2.40 の結果を元に、Ti スクリューに担持後も活性を保持している FGF-2 の量を算出したところ、表 2.24 のようになった。細胞数のデータがパターンに因らずほぼ同等であったように、活性保持 FGF-2 の担持量もパターンに因らず約 0.30～0.45  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲内に収まった。図 2.37 にまとめたパターン I ～ IV までのそれぞれ Ti 棒表面のタンパクとしての FGF-2 の担持量と、細胞試験による活性 FGF-2 の担持量から、担持した FGF-2 の失活率が算出でき(表 2.24)、

最も低い失活率でパターン II のおよそ 71%、最高でパターン I の 87% という結果となった。

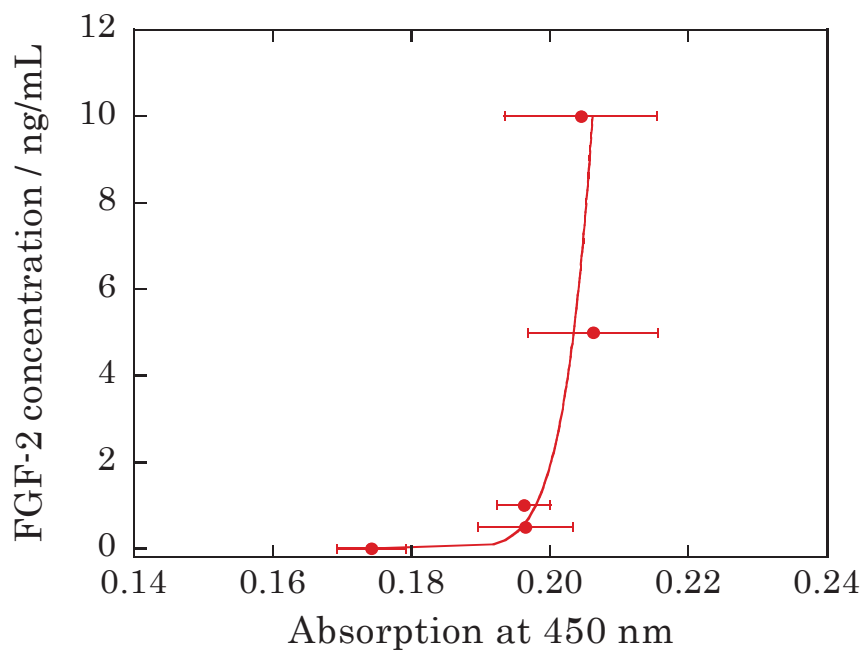


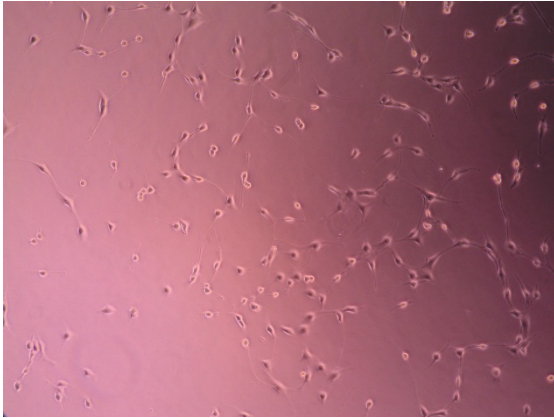
図 2.40. 活性 FGF-2 定量用検量線

表 2.25. NIH3T3 細胞による FGF-2 の失活率

パターン	Ti 棒表面の FGF-2 担持量 $\mu\text{g} / \text{mL}$	細胞による FGF-2 吸着量 $\mu\text{g} / \text{mL}$	失活率 %
I	$2.45 \pm 0.21$	$0.31 \pm 0.07$	87.21
II	$1.52 \pm 0.13$	$0.44 \pm 0.11$	70.83
III	$1.78 \pm 0.25$	$0.41 \pm 0.07$	77.15
IV	$1.52 \pm 0.23$	$0.30 \pm 0.08$	80.62

#### 2.6.3.4 細胞写真

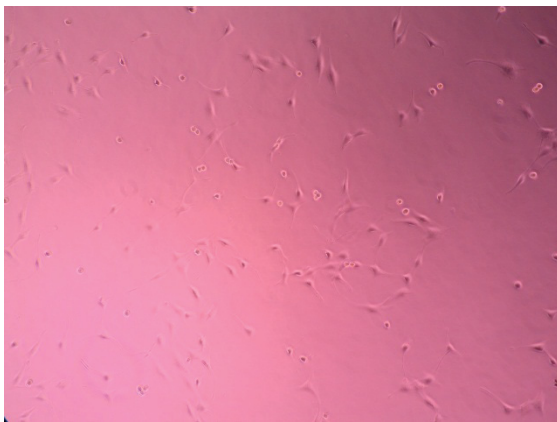
20、10、5、2、1、0.5、0 ng/mL FGF-2 及び各パターンの FGF-2 を投入し、72 時間培養後 NIH3T3 細胞成長した写真である。無血清培地で 72 時間培養した NIH3T3 細胞成長した写真を比較とした。



0 ng/mL FGF-2



10 ng/mL FGF-2



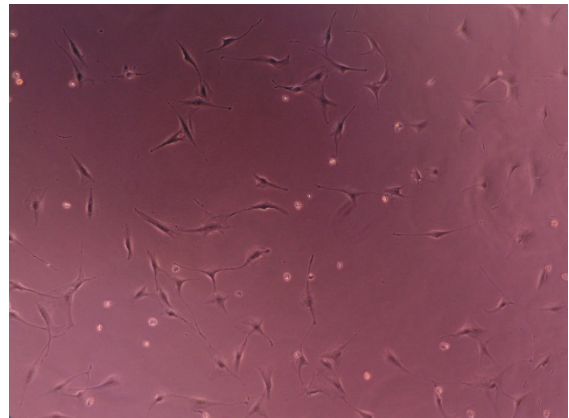
5 ng/mL FGF-2



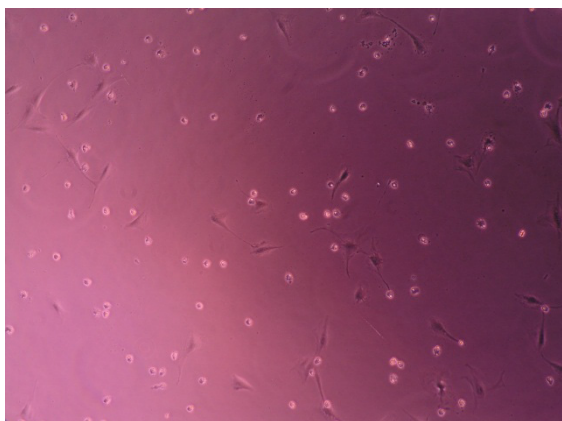
2 ng/mL FGF-2



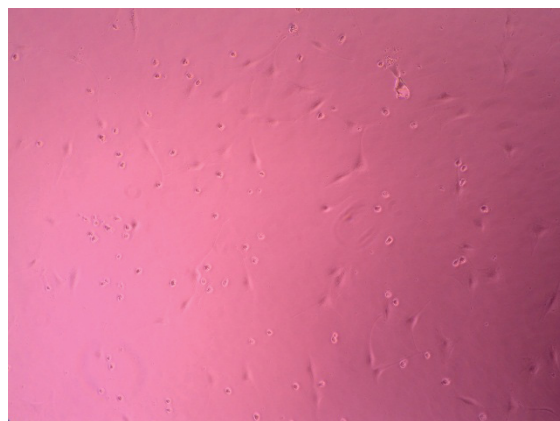
1 ng/mL FGF-2



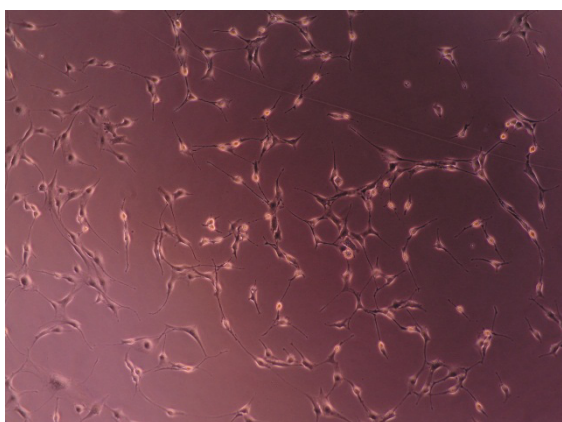
0.5 ng/mL FGF-2



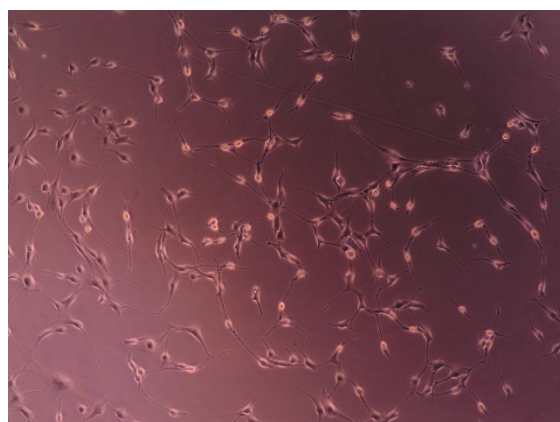
0 ng/mL FGF-2



細胞のみ



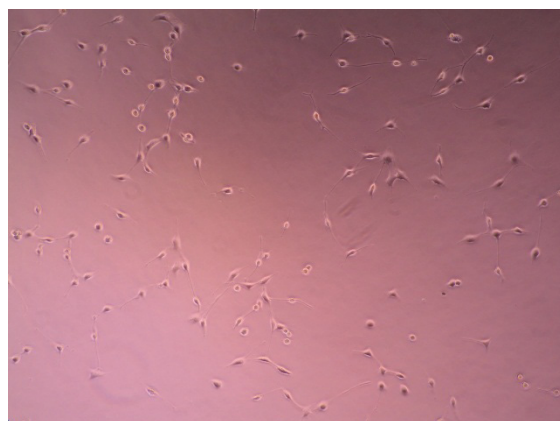
パターン I



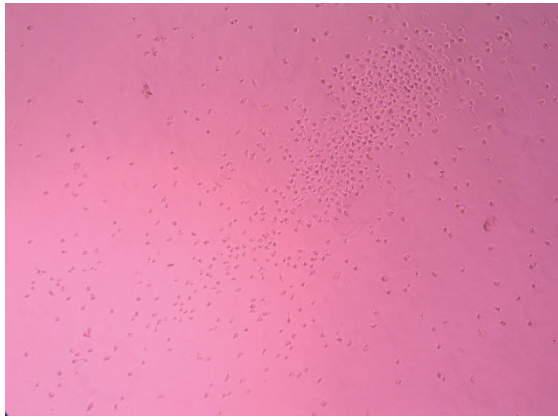
パターン II



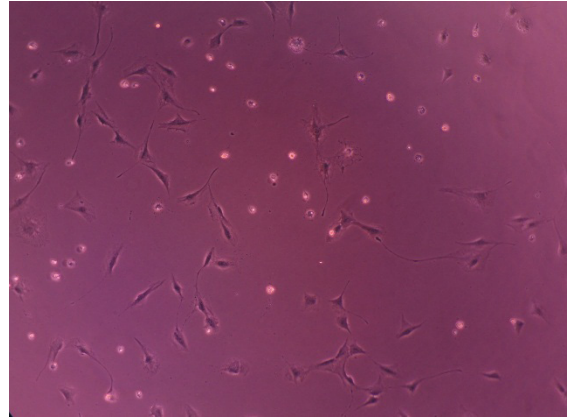
パターン III



パターン IV



RKB 死細胞群



RKB 細胞

図 2.41. NIH3T3 細胞写真

#### 2.6.4 考察

本章の研究により、陽極酸化皮膜を有する創外骨折固定用 Ti スクリューに FGF-2 を完全失活させることなくアパタイトとの複合化層として担持可能であることが示された。これまで、同様の報告としては唯一六崎らによってもたらされていたが、その担持条件は 37 °C で 48 時間の処理を行うという苛烈なもので、25 °C 以下ならば水溶液中で安定<sup>[53]</sup>とされる FGF-2 の過剰な失活が避けられないと考えられる条件であった。本研究の FGF-2 担持条件は上記の安定条件を満たすものであり、FGF-2 とアパタイトの複合化層を形成させる方法として有用な手法になると期待される。

確かに本方法で担持させると、FGF-2 の失活率は低減可能であることが示された。総 FGF-2 担持量に関して六崎らのデータ(Ti スクリュー 1 本あたり 2.2 µg)と比較すると、本研究では多少低めではあるもののほぼ同レベルの担持量を実現できた。一方で過去の研究(Mutsuzaki et al.)の RKB 液の場合では 90%近くが失活してしまうのに対して、本研究では失活率が 70%強にまで低減された試料(パターン II)も作成できた。

この試料の場合、失活率だけでなく、活性 FGF-2 の担持量もおおよそ 2 倍に増加させることができている、本研究によって FGF-2 担持方法が改善できたと考えられる。

表 6.4 についてさらに結果を見比べると (1)RSM 液中の初期 FGF-2 量が多いほど失活率が低くなる、(2)Ratio の値を高く設定することで失活率が低くなるということを示唆するものと考えられる。以上のことから、FGF-2 担持の最適条件は、『前処理によって均質なアパタイト層を形成させた Ti スクリューを Ca/P モル比=1.5、Ratio=2.0、NaHCO<sub>3</sub>=13.58 mM、FGF-2 濃度=10 µg/mL のリン酸カルシウム過飽和溶液に 25 °C で 1 日浸漬する』と言うように決定された。

ところで、Mutsuzaki らのトレース実験を兼ねた RKB 液を用いた FGF-2 の担持であったが、細胞培養試験を行っても増殖した様子が確認できなかった。しかし、図 2.40 の写真にあるように、RKB 液で FGF-2 を担持した Ti スクリューから抽出した FGF-2 液を添加して培養した NIH3T3 細胞も、何も添加しない細胞と比較して紡錘状に偽足を伸展させる様子などが明らかに異なり、FGF-2 が間違いなく細胞に作用していることを示唆している。しかし同一ウェル内で、図 2.41 のように偽足を伸展している細胞がほとんど見られない領域も存在した。これらの細胞が死んでいるために見かけ上、無血清培養液中で細胞培養した場合(すな

わちバックグラウンド)と比較して細胞数が低くなってしまったのではないかと考えられるが、コンタミネーションが起こった様子は伺えなかった。また、ウェルの底面積は直径 16 mm の円形なので初期の細胞密度は、

$$\text{初期細胞密度} = 10000 \text{ 個} / (8\text{mm} \times 8\text{mm} \times \pi) = 49.7 \text{ 個/mm}^2$$

と算出される。一方図 2.41 の写真の縦は 1.3 mm、横は 1.732 mm に相当するので、すべての FGF-2 が失活して細胞増殖に影響を与えなかったとすれば、各視野に観察される細胞数は、

$$\text{細胞数} = 49.7 \text{ 個/mm}^2 \times (1.3 \text{ mm} \times 1.732 \text{ mm}) = 111.9 \text{ 個}$$

と算出される。図 2.41 は特徴のある部分を抜き出して撮影した写真であるため、もっと細胞がない箇所も存在したものの、図 2.41 の領域にはこれを遥かに上回る細胞が確認できるため、細胞は播種した直後に死んだわけではなく、培養の最中に何らかの事故により死んだものと推察される。原因はどうあれ、コントロールの FGF-2 担持 Ti スクリューは現状で唯一ウサギによる動物実験で抗感染効果を示した材料であることから、コントロールとの比較実験を再度行う必要があると考えている。

## 第3章 非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上におけるラット由来間葉系幹細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関

### 3.1 実験目的

骨再生医療に用いられるセラミックスは人体の欠損組織の代替として組織機能の回復を目的として利用されている。その中、水酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、略語 HAp とする。)及び  $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、略語  $\beta$ -TCP とする。)を代表として作られるセラミックスは、自然骨に近似する無機組成及び結晶構造を持ち、材料及び骨組織間化学結合ができる。本章では水酸アパタイト粉体に  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクに着目した。まず、0、10、20、30wt%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクを 1100°C で焼成して、様々な微細構造を有する非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクを作製する手法を確立することを目的とした。そして、とくに一般に骨再生医療用材料として用いられている非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上において、ラット由来間葉系幹細胞(以下、rMSCs と記す)の初期接着面積の可視化技術・評価技術を確立し、細胞の初期接着面積及び骨形成分化能の相関性について調べることを第2の目的とした。

### 3.2 実験材料

本章では4種類のアパタイトディスク、すなわち 0%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク(100 HAp)、10%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク(90 HAp/10  $\beta$ -TCP)、20%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク(80 HAp/20  $\beta$ -TCP)、30%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク(70 HAp/30  $\beta$ -TCP)を作製した。詳細な作製方法は参考資料に載せる。

### 3.3 実験結果

本章の実験結果は非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における rMSCs の生存率、初期接着面積(3.3.1 節)、及び骨分化能(3.3.2、3.3.3 及び 3.3.4 節)に基づいて検討した。

#### 3.3.1 非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上でのラット由来間葉系幹細胞(rMSCs)生存率及び初期接着面積

LIVE/DEAD 試薬を添加した無血清培地での培養 2 時間後、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での rMSCs を落射型蛍光顕微鏡で撮影し、MSCs(生細胞)に含まれる蛍光色素のカルセインが波長 530nm 付近で

緑色の蛍光を発する(図 3.1 A-1,B-1,C-1,D-1)。同じ視野で rMSCs(死細胞)を撮影した。rMSCs(死細胞)の細胞核 DNA にエチジウムホモダイマー1をくっ付き、波長 585nm 付近で赤色の蛍光を発する(図 3.1 A-2,B-2,C-2,D-2)。ここで試料 A~D の  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクはそれぞれ A : 100 HAp、B : 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、C : 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、D : 70 HAp/30  $\beta$ -TCP である。

まず、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での rMSCs 生存率について、すべてのディスク上での rMSCs 生存率「生細胞/(生細胞+死細胞)×100%」は 80%以上であった。非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクは MSCs が培養可能な足場材料であることを確認できた(表 3.1、図 3.3.1.1)。

次に、rMSCs 初期接着面積について、培養 2 時間後での面積を設定した。細胞の接着行動とは、細胞と材料の接近から、タンパク質に介して接着、細胞の伸展(細胞を伸びる限界)までの時間、すなわち、細胞の伸展が終わるまでは約 2 時間が必要である。

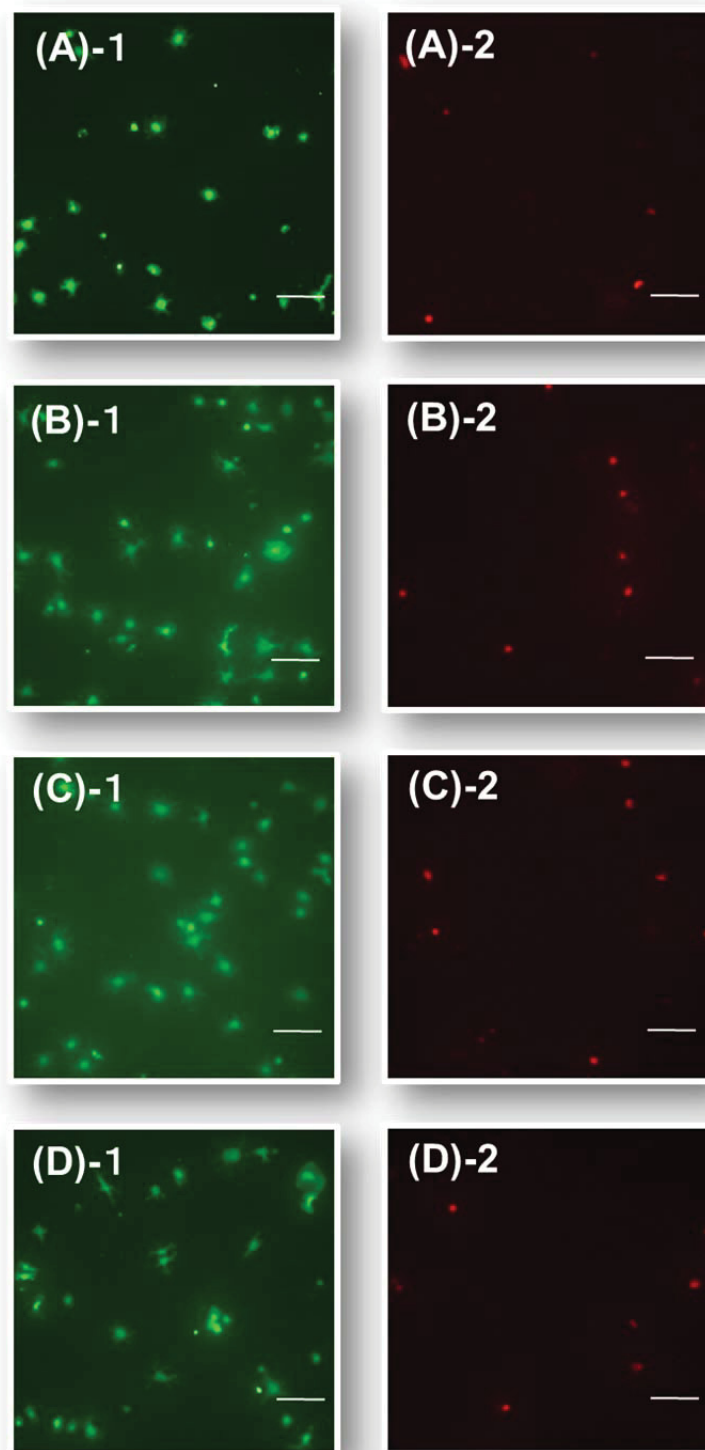


図 3.1. 無血清培地に 2 時間培養後、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での rMSCs の接着の様子. (A) 100 HAp、(B) 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、(C) 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、(D) 70 HAp/30  $\beta$ -TCP  
(A-1、B-1、C-1、D-1)生細胞、(A-2、B-2、C-2、D-2)死細胞 bar : 100 $\mu$ m

表 3.1. rMSCs 生存率及び初期接着面積

パターン	生存数	死亡数	生存率 「%」	初期接着面積 「 $\mu\text{m}^2$ 」
100 HAp	93	22	81	$467 \pm 168$
90 HAp/10 $\beta$ -TCP	124	27	82	$466 \pm 167$
80 HAp/20 $\beta$ -TCP	119	28	81	$476 \pm 153$
70 HAp/30 $\beta$ -TCP	98	23	81	$494 \pm 176$

### 3.3.2 非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での DNA 濃度

骨分化因子を添加した血清培地でそれぞれ 3 週間培養した後、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での rMSCs の骨形成分化能の評価基準として、細胞数を表す DNA 濃度を測定した(図 3.4)。ここで試料 A~D はそれぞれ A : 100 HAp、B : 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、C : 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、D : 70 HAp/30  $\beta$ -TCP である。培養 3 週間後各試料上の DNA 濃度は、student-t 検定の結果により、有意差が認められた。その結果、試料 A 上の DNA 濃度は試料 C、試料 D より有意に少なかった。試料 B 上の DNA 濃度は試料 C、試料 D より有意に少なかった。試料 C は有意に多い結果となった。また、試料 A 及び試料 B の間に有意的な違いを認められなかった。

表 3.2.  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での rMSCs の DNA 濃度

試料	培養 3 週間後の DNA 濃度「ng/mL」
A : 100 HAp	$638 \pm 151$
B : 90 HAp/10 $\beta$ -TCP	$611 \pm 191$
C : 80 HAp/20 $\beta$ -TCP	$960 \pm 69$
D : 70 HAp/30 $\beta$ -TCP	$891 \pm 110$

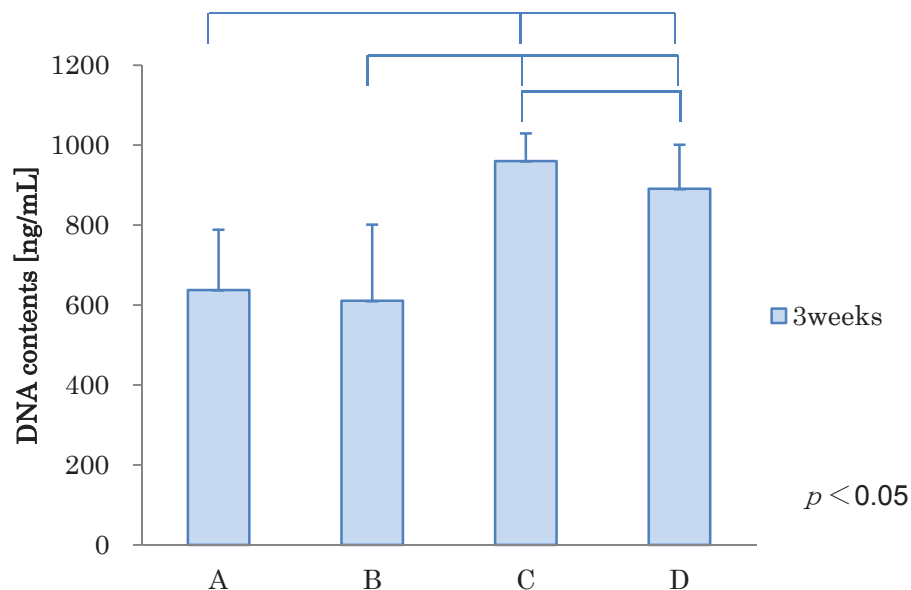


図 3.2. 骨分化因子を添加した血清培地に 3 週間、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での MSCs の DNA 濃度. (A) 100 HAp、(B) 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、(C) 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、(D) 70 HAp/30  $\beta$ -TCP

### 3.3.3 非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での骨形成分化能

骨基質タンパク質であるオステオカルシン量も骨基質量と同様の増加パターンを示すことを確認されている<sup>[60]</sup>。骨芽細胞の後期分化マーカーであるオステオカルシン生成量を ELISA 法で測定した。また、培養 3 週間後、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上でのオステオカルシン含有量/DNA 含有量を図 2.5 で示した。ここで試料 A～D はそれぞれ A : 100 HAp、B : 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、C : 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、D : 70 HAp/30  $\beta$ -TCP である。試料 A のオステオカルシン含有量が最も多く、試料 D のオステオカルシン量が最も少ない結果となった。また、試料 B と試料 C のオステオカルシンの含有量がほぼ同じ傾向の生成が見られた。

表 3.3. 非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上でのオステオカルシン/DNA 濃度

試料	オステオカルシン濃度「ng/mL」	オステオカルシン/DNA 濃度「/DNA」
A : 100 HAp	321 ± 216	0.50 ± 0.36
B : 90 HAp/10 $\beta$ -TCP	153 ± 72	0.25 ± 0.14
C : 80 HAp/20 $\beta$ -TCP	238 ± 109	0.25 ± 0.11
D : 70 HAp/30 $\beta$ -TCP	176 ± 88	0.20 ± 0.10

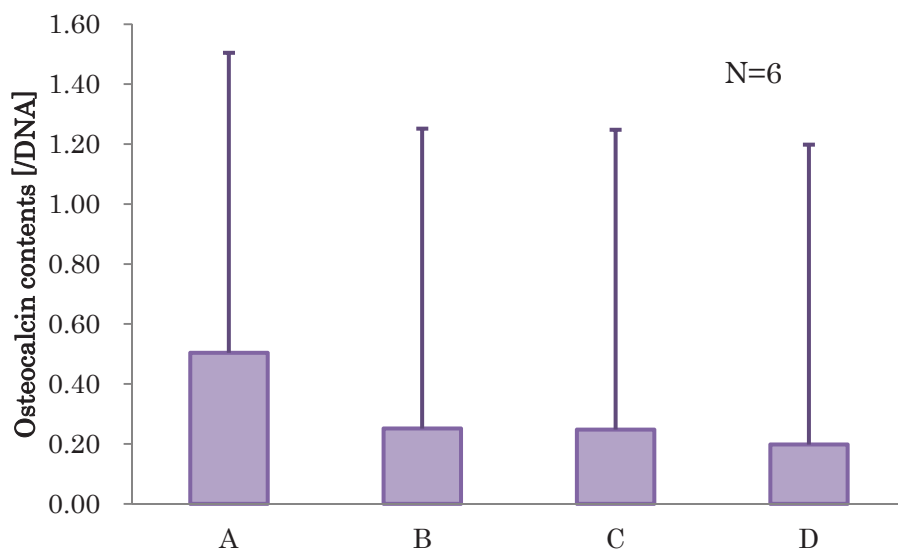


図 3.3. 骨分化因子を添加した血清培地に 3 週間、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での MSCs のオステオカルシン/DNA 濃度. (A) 100 HAp、(B) 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、(C) 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、(D) 70 HAp/30  $\beta$ -TCP

### 3.3.4 間葉系幹細胞の初期接着面積及び骨分化能との相関

最初二乗法により、MSCs の初期接着面積及び骨分化能の相関係数  $R^2$  は 0.3516 となり、弱い相関が確認できた。

表 3.4. MSCs の初期接着面積及びオステオカルシン/DNA 濃度

試料	細胞初期接着面積 「 $\mu\text{m}^2$ 」	オステオカルシン /DNA 濃度 「/DNA」
A : 100 HAp	467 ± 168	0.50 ± 0.36
B : 90 HAp/10 $\beta$ -TCP	466 ± 167	0.25 ± 0.14
C : 80 HAp/20 $\beta$ -TCP	476 ± 153	0.25 ± 0.11
D : 70 HAp/30 $\beta$ -TCP	494 ± 176	0.20 ± 0.10

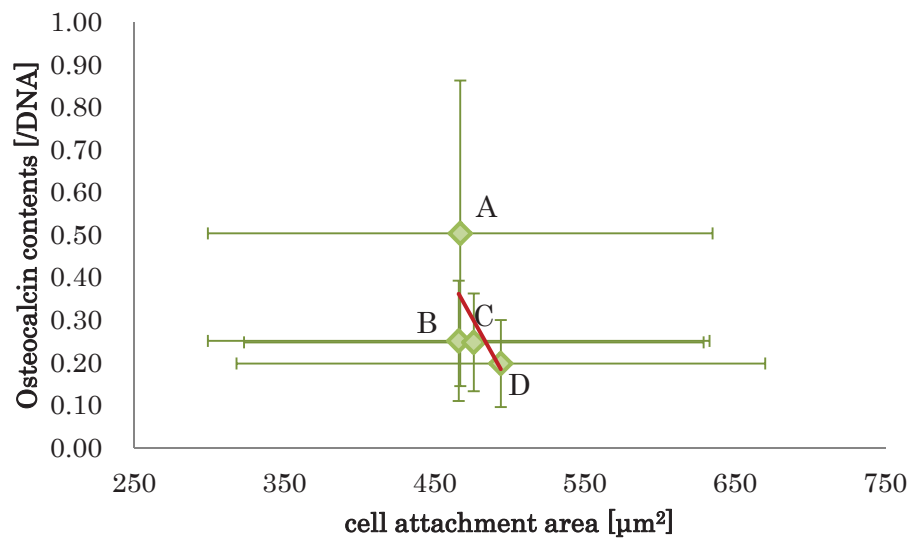


図 3.4. 骨分化因子を添加した血清培地に 3 週間、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での MSCs の初期接着面積及び骨分化能の相関.

(A) 100 HAp、(B) 90 HAp/10  $\beta$ -TCP、(C) 80 HAp/20  $\beta$ -TCP、  
(D) 70 HAp/30  $\beta$ -TCP

### 3.4 考察

本章では、rMSCs 培養 3 週間後の骨形成分化能の結果により、種々の非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上での rMSCs の初期接着面積及び骨分化能の負の相関の傾向が認められた(図 3.4)。つまり、培養 2 時間後の rMSCs の初期接着面積を測定すれば、骨分化能を予測でき、更に、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイト質材料の最適な表面条件を求めることができると考えられる。

まず、無血清培地(牛血清を添加しない培養液)で 2 時間培養した後、種々の非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における細胞初期接着面積が異なったが、有意的な違いが認められなかった。更に、アパタイトディスクに含有する  $\beta$ -TCP 混合量が上昇すると共に、rMSCs の初期接着面積が増大する傾向を見られた。よって、アパタイトディスクに  $\beta$ -TCP 含有量によるカルシウムイオンや、リン酸イオンなどの溶解性も変化し、その異なる溶解性を持つ表面性状は rMSCs の初期接着面積に影響を与えると考えられる。

次に、培養 3 週間後、種々  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における DNA 濃度が有意的に異なった。更に、20wt% 及び 30wt%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における DNA 濃度が有意的に高い結果となった。す

なわち、 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクの溶解性を増加させ、MSCs 細胞数を示す DNA 濃度が高い結果になると考えられる。

また、培養 3 週間後、種々  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における骨形成分化能が異なったが、有意的な違いが認められなかった。 $\beta$ -TCP の添加量を上昇すると共に、骨形成分化能を減少する傾向を認められ、骨形成分化能が促進できなかった。

種々  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における MSCs 細胞初期接着面積及び骨形成分化能の相関性を新規に見出した。非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイト質材料の最適な表面条件は MSCs の初期接着形態及び骨分化能との相関による判断できることが分かった。すなわち、MSCs を予測する技術は可能であり、その技術による骨再生医療用生体材料を評価できることが示唆された。

## 第 4 章 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上におけるラット由来間葉系幹細胞(rMSCs)初期接着挙動及び細胞分化能の相関

### 4.1 実験目的

人工骨や経皮デバイスなどの生体材料（細胞の足場，scaffold）の表面性状は間葉系幹細胞(MSCs)の分化などの基本的な細胞挙動に大きくに影響を与えることがわかってきた。本研究では骨再生医療によく用いられるセラミックス系生体材料に着目し、その表面性状の溶解性は間葉系幹細胞の細胞挙動に影響を与えることについて研究した。

前章では、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の負の相関の傾向を見出した。

本章では、rMSCs の足場となるセラミックス系生体材料としてハイドロキシアパタイト粉体を原料として用い、異なる焼結温度により、様々な結晶粒径分布と表面微細構造を有するアパタイトディスクを作製することを第 1 の目的とした。そして、それら表面性状の異なるハイドロキシアパタイトディスク上にラット由来の rMSCs を播種し、3 週間培養後の早期における細胞接着面積と細胞分化能の相関を確認することを第 2 の目的とした。

### 4.2 実験材料

本章では、ハイドロキシアパタイト粉体を原料として用い、7 種類の焼結アパタイトディスクを系統的に作製した。作製方法について、添付資料として示した。以下、①900℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(900℃-HAp)、②950℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(950℃-HAp)、③1000℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(1000℃-HAp)、④1050℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(1050℃-HAp)、⑤1100℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(1100℃-HAp)、⑥1150℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(1150℃-HAp)、⑦1200℃焼結ハイドロキシアパタイトディスク(1200℃-HAp)7 種類、また、⑧酢酸処理した 1150℃-HAp(AC-1150℃-HAp)、⑨重曹処理した 1150℃-HAp(SC-1150℃-HAp)の 2 種類がある。以上の計 9 種類の材料を作製して実験に提供した。

### 4.3 実験結果

本章では、まず、分析機器によるアパタイトディスクの表面性状評価(4.3.1 節)、rMSCs によるアパタイトディスクの表面性状評価(4.3.2 節、4.3.3 節)の順で検討した。

#### 4.3.1 アパタイトディスクの物性評価

##### 4.3.1.1 SEM 観察及び薄膜 X 線回折パターンを用いた種々アパタイトディスクの表面性状分析

rMSCs を接着するアパタイトディスクの表面構造を立体的に観察するために SEM 観察を行い、また、異なる焼結温度(900℃～1200℃)によるアパタイトディスクの表面性状を構成する同定を薄膜 X 線回折測定で行った。ここで、試料 A～I はそれぞれ、A : 900℃-HAp、B : 950℃-HAp、C : 1000℃-HAp、D : 1050℃-HAp、E : 1100℃-HAp、F : 1150℃-HAp、G : 1200℃-HAp、H : AC-1150℃-HAp、I : SC-1150℃-HAp である。焼結温度が上昇すると共に、アパタイトの結晶サイズが大きくなった。また、試料 A から試料 E までの焼結温度では、アパタイトの結晶サイズがほぼ均一であった。また、試料 F から試料 G までの焼結温度では、アパタイト結晶が板状を呈している。焼結温度が上昇すると共に、結晶が粗粒化し、結晶粒子の粒径のバラツキが顕著になった。薄膜 X 線回折パターンの結果、すべてのアパタイトディスクの表面アパタイトの相を同定できた。また、アパタイトの特徴的なピークである 25°(赤い線)、30°(緑の線)付近に見られた。試料 H、試料 I はそれぞれ塩酸及び重曹で処理したことで、材料表面の粗さ変化を見られた。

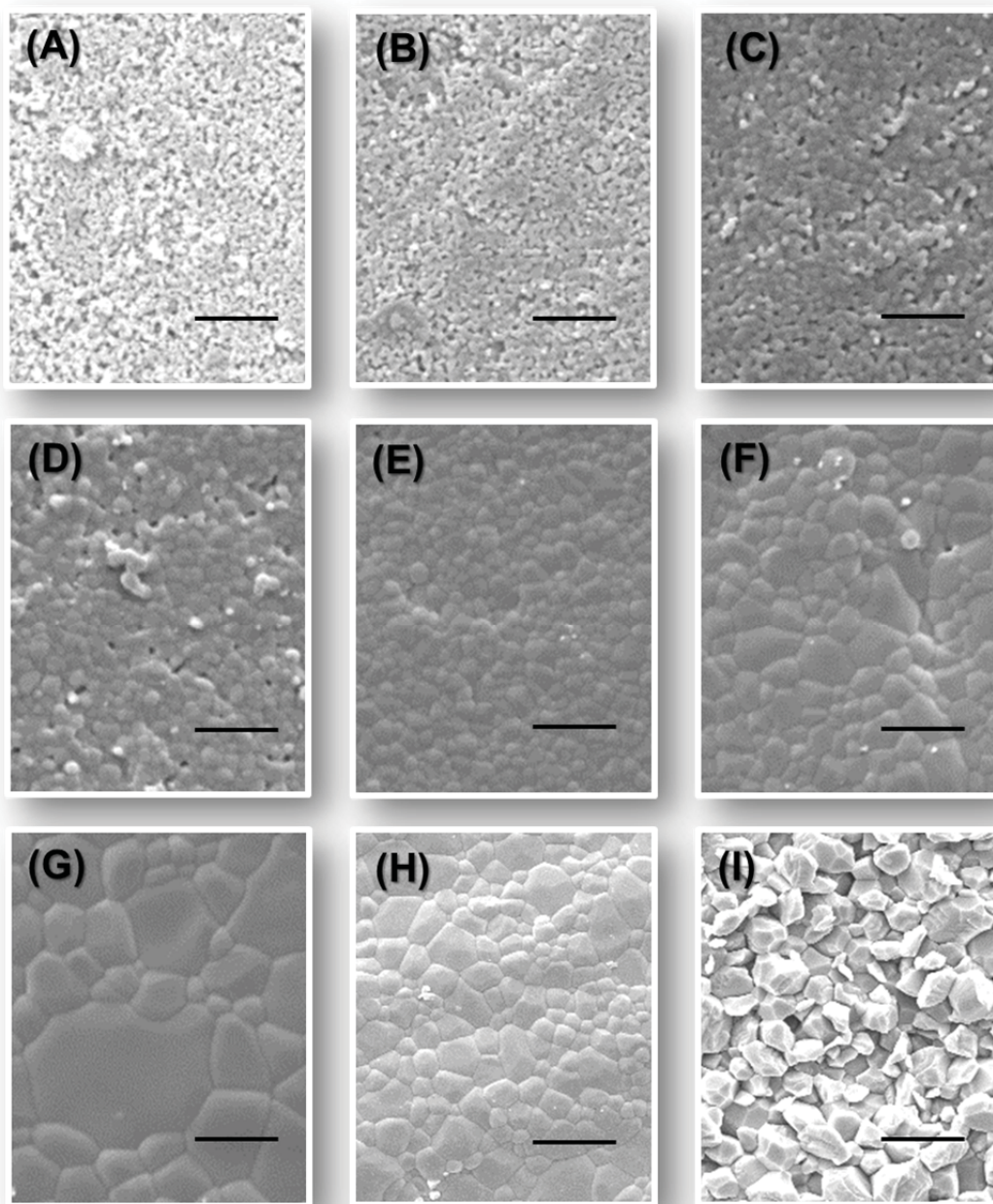


図 4.1.SEM 観察を用いる種々アパタイトディスクの表面性状分析.  
 (A)900℃-HAp、(B)950℃-HAp、(C)1000℃-HAp、(D)1050℃-HAp、  
 (E)1100℃-HAp、(F)1150℃-HAp、(G)1200℃-HAp、  
 (H)AC-1150℃-HAp、(I)SC-1150℃-HAp bar:2μm

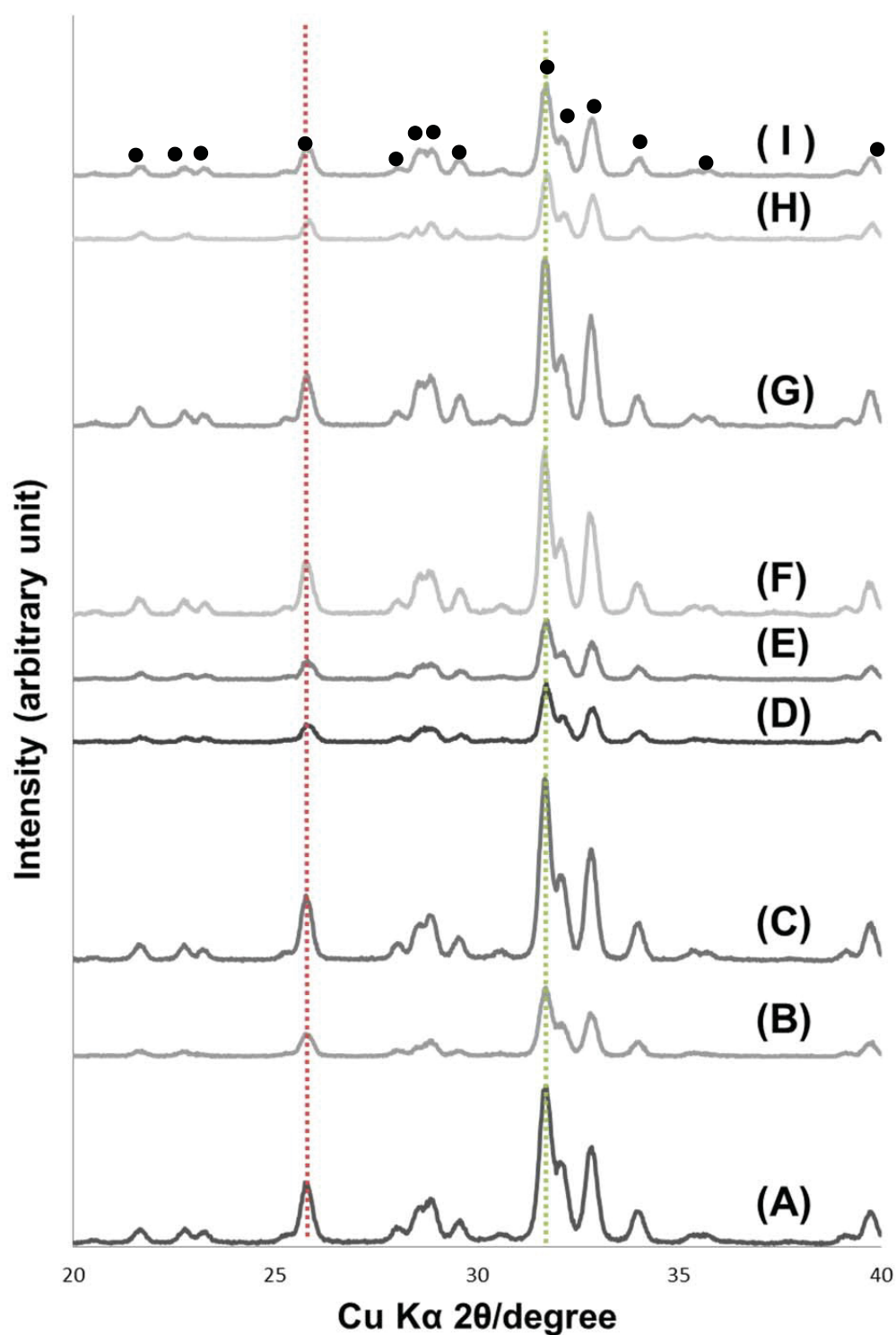


図 4.2. 薄膜 X 線回折パターンを用いる種々アパタイトディスクの表面性状分析. (A)900℃ -HAp、(B)950℃ -HAp、(C)1000℃ -HAp、(D)1050℃ -HAp、(E)1100℃ -HAp、(F)1150℃ -HAp、(G)1200℃ -HAp、(H)AC-1150℃ -HAp、(I)SC-1150℃ -HAp(●: Hydroxyapatite)

#### 4.3.1.2 アパタイトディスクの PBS(-)浸漬液の pH 値

rMSCs を接着するアパタイトディスク上の pH 変化を調べるため、本研究では、37℃、5mL の PBS(-)に種々のアパタイトディスクを浸漬し、その浸漬液の pH 値を測定した。ここで、試料 A～I はそれぞれ、A : 900℃-HAp、B : 950℃-HAp、C : 1000℃-HAp、D : 1050℃-HAp、E : 1100℃-HAp、F : 1150℃-HAp、G : 1200℃-HAp、H : AC-1150℃-HAp、I : SC-1150℃-HAp である。pH 値変化は二つグループに分かれた。グループ A は試料 A から試料 D まで、PBS(-)の pH 値より高い結果が認められた。グループ B は試料 E から試料 I まで、PBS(-)の pH 値とほとんど同じ結果が認められた。

表 4.1. 25℃ PBS(-)浸漬液中の pH 値

パターン	pH 測定値
A : 900℃-HAp	7.85±0.07
B : 950℃-HAp	7.75±0.03
C : 1000℃-HAp	7.72±0.03
D : 1050℃-HAp	7.41±0.01
E : 1100℃-HAp	7.38±0.04
F : 1150℃-HAp	7.37±0.02
G : 1200℃-HAp	7.36±0.01
H : AC-1150℃-HAp	7.37±0.01
I : SC-1150℃-HAp	7.38±0.01

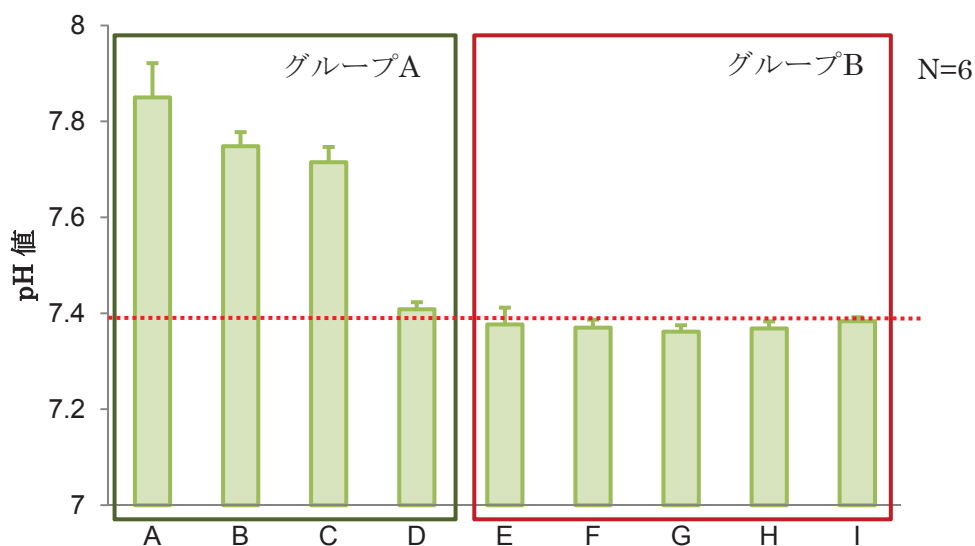


図 4.3. 25℃ PBS(-)浸漬液中の pH 値.(A)900℃-HAp、(B)950℃-HAp、(C)1000℃-HAp、(D)1050℃-HAp、(E)1100℃-HAp、(F)1150℃-HAp、(G)1200℃-HAp、(H)AC-1150℃-HAp、(I)SC-1150℃-HAp

#### 4.3.1.3 アパタイトディスクからのカルシウム溶解量

rMSCs を接着するアパタイトディスクからのカルシウム溶解性を調べるため、上述した種々のアパタイトディスクを 5mL の PBS(-)溶液に浸漬し、37℃に保持した。2 時間、5 時間後、1 日後の PBS(-)浸漬液中のカルシウム濃度を ICP で測定した。ここで、試料 A~I はそれぞれ、A : 900℃-HAp、B : 950℃-HAp、C : 1000℃-HAp、D : 1050℃-HAp、E : 1100℃-HAp、F : 1150℃-HAp、G : 1200℃-HAp、H : AC-1150℃-HAp、I : SC-1150℃-HAp である。pH 値変化の結果に従って、グループ A は、試料 A から試料 D まで、時間と共に PBS(-)浸漬液中のカルシウム溶解性を増加した傾向が見られた。一方、グループ B は、試料 E から試料 I まで、時間と共に PBS(-)浸漬液中のカルシウム溶解性をほとんど変化しない、または減少した傾向が見られた。その中、2 時間、5 時間及び 1 日後の測定では、試料 I から溶解したカルシウムが最も多く、試料 E から溶解したカルシウムが最も少ない結果となった。本論文では、37℃、5mL の PBS(-)で 1 日浸漬した種々のアパタイトディスクを使用し、MSCs 培養を行った。

表 4.1. PBS(-)浸漬液中の Ca 濃度 (N=1)

パターン	2 時間後 Ca 濃度「ng/mL」	5 時間後 Ca 濃度「ng/mL」	1 日後 Ca 濃度「ng/mL」
A : 900℃-HAp	0.00±0.00	64.28±1.89	77.28±1.88
B : 950℃-HAp	41.78±2.57	51.39±1.06	82.59±4.65
C : 1000℃-HAp	47.64±2.74	92.30±1.33	123.31±1.54
D : 1050℃-HAp	97.78±1.73	90.88±1.78	115.20±3.24
E : 1100℃-HAp	28.99±0.00	29.32±2.09	35.51±1.57
F : 1150℃-HAp	38.63±2.45	38.36±4.04	35.19±1.98
G : 1200℃-HAp	84.17±2.24	61.56±0.97	47.07±0.80
H : AC-1150℃-HAp	211.86±3.39	152.45±2.88	130.94±3.22
I : SC-1150℃-HAp	430.76±4.83	271.09±3.29	164.96±2.35

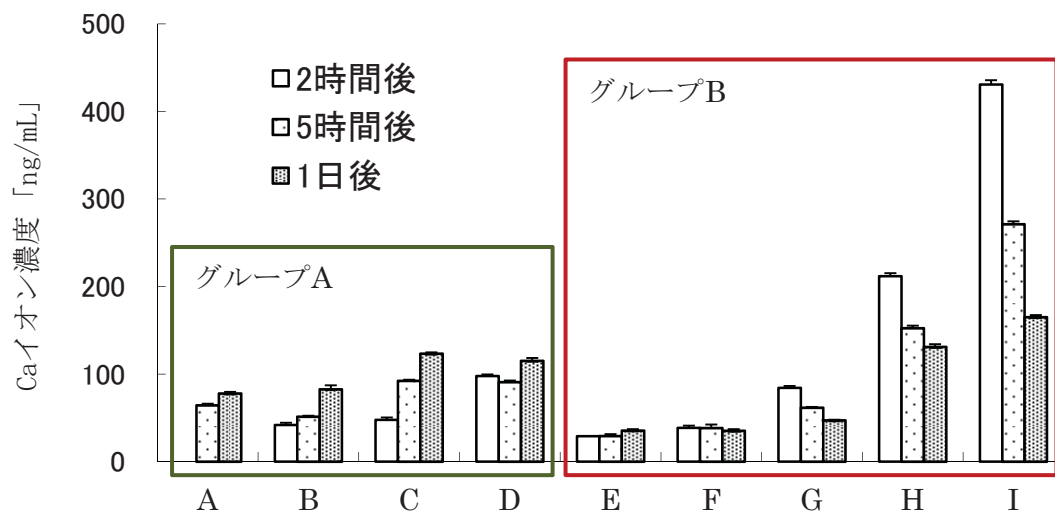


図 4.4. PBS(-)浸漬液中の Ca 濃度測定結果. (A)900℃-HAp、(B)950℃-HAp、(C)1000℃-HAp、(D)1050℃-HAp、(E)1100℃-HAp、(F)1150℃-HAp、(G)1200℃-HAp、(H)AC-1150℃-HAp、(I)SC-1150℃-HAp

#### 4.3.2 アパタイトディスク上でのラット間葉系幹細胞初期接着形態

無血清培地で 2 時間培養し、それぞれの異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での rMSCs 初期接着面積と細胞骨格を観察した。ここで、試料 A～I はそれぞれ、A: 900℃-HAp、B: 950℃-HAp、C: 1000℃-HAp、D: 1050℃-HAp、E: 1100℃-HAp、F: 1150℃-HAp、G: 1200℃-HAp、H: AC-1150℃-HAp、I: SC-1150℃-HAp である。

まず、rMSCs 初期接着形態について、丸い形態及び周りに発散状の形態をもつ rMSCs が殆ど観察された(図 4.5(A)–(F)、(H)–(I))。従来の細胞培養基材(TCPs)上における丸い細胞形態も観察された(図 4.5(G))。

また、rMSCs 初期接着面積について、pH 値の結果に従って、グループ A は試料 A から試料 D まで、rMSCs 初期接着面積の変化が無規則だった。一方、グループ B は試料 E から試料 I まで、焼結温度が上昇すると共に rMSCs 初期接着面積が有意的に増大したことを認められた(表 3.3、図 3.6)。試料 E 上における rMSCs 初期接着面積が最も大きい結果となった。

さらに、rMSCs の細胞骨格について、すべての試料上での rMSCs は rMSCs の皮層にアクチンフィラメントが存在し、ストレスファイバーが比較的少ない結果となった。また、rMSCs は紅葉のような偽足が多く見られた(図 4.9(A)–(F)、(H)–(I))。一方、丸い形態の rMSCs も観察さ

れた(図 4.8(G))。

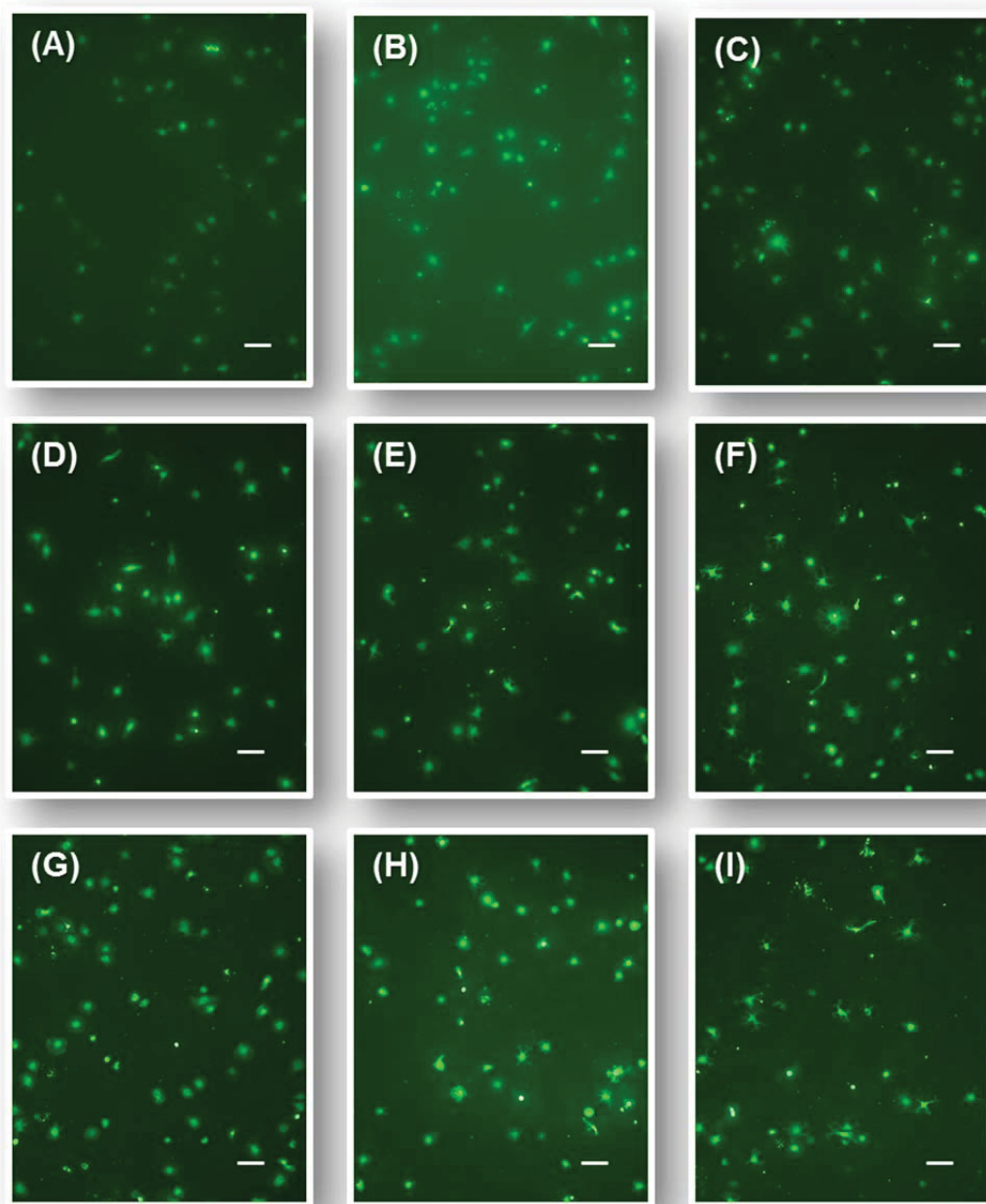


図 4.5. 無血清培地で 2 時間培養後の細胞接着形態.(A)900℃-HAp、(B)950℃-HAp、(C)1000℃-HAp、(D)1050℃-HAp、(E)1100℃-HAp、(F)1150℃-HAp、(G)1200℃-HAp、(H)AC-1150℃-HAp、(I)SC-1150℃-HAp bar:100μm

表 4.3. 無血清培地で 2 時間培養後の細胞接着面積

パターン	初期細胞接着面積「 $\mu\text{m}^2$ 」
A : 900℃ -HAp	1139 $\pm$ 286
B : 950℃ -HAp	1508 $\pm$ 388
C : 1000℃ -HAp	1371 $\pm$ 363
D : 1050℃ -HAp	1558 $\pm$ 329
E : 1100℃ -HAp	1100 $\pm$ 181
F : 1150℃ -HAp	1332 $\pm$ 310
G : 1200℃ -HAp	1488 $\pm$ 301
H : AC-1150℃ -HAp	1267 $\pm$ 286
I : SC-1150℃ -HAp	1370 $\pm$ 317

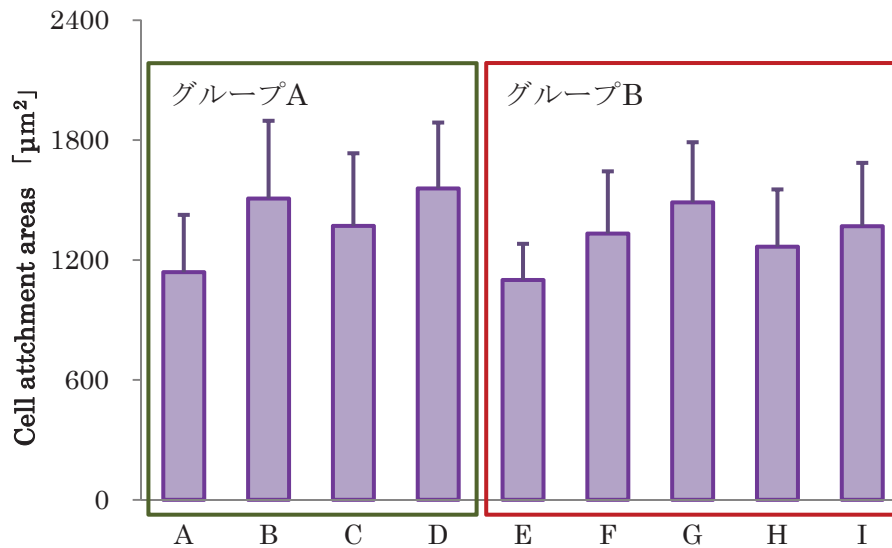


図 4.6. 無血清培地で 2 時間培養後の細胞接着面積.(A)900℃ -HAp、(B)950℃ -HAp、(C)1000℃ -HAp、(D)1050℃ -HAp、(E)1100℃ -HAp、(F)1150℃ -HAp、(G)1200℃ -HAp、(H)AC-1150℃ -HAp、(I)SC-1150℃ -HAp

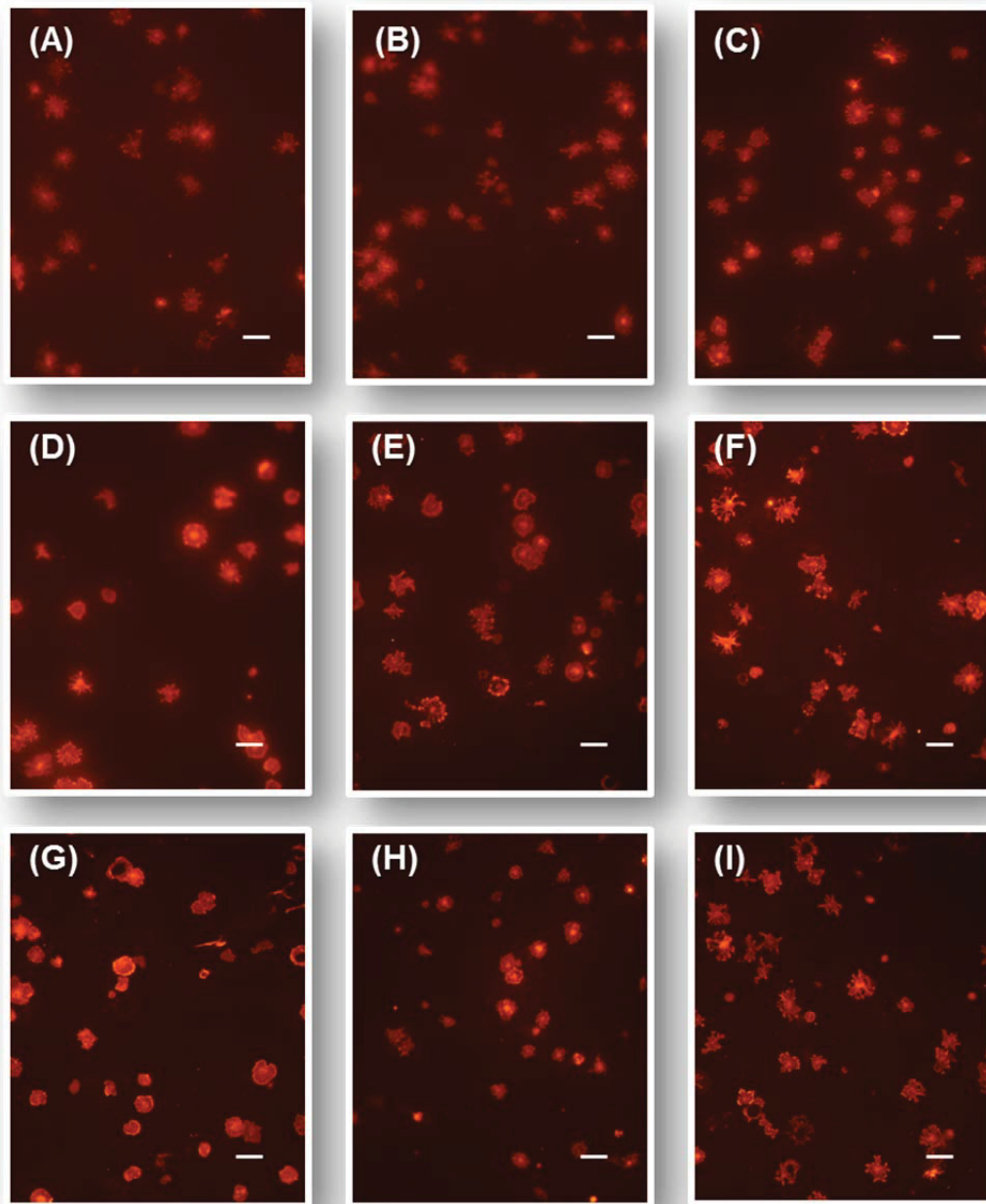


図 4.7. 無血清培地で 2 時間培養後の細胞骨格.(A)900°C-HAp、(B)950°C-HAp、(C)1000°C-HAp、(D)1050°C-HAp、(E)1100°C-HAp、(F)1150°C-HAp、(G)1200°C-HAp、(H)AC-1150°C-HAp、(I)SC-1150°C-HAp bar:50 $\mu$ m

### 4.3.3 アパタイトディスク上での細胞分化能

#### 4.3.3.1 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での DNA 濃度

種々のアパタイトディスク上での rMSCs 細胞数を評価するため、DNA 濃度を測定した(表 3.8、図 3.12)。ここで、試料 A～I はそれぞれ、A: 900℃-HAp、B: 950℃-HAp、C: 1000℃-HAp、D: 1050℃-HAp、E: 1100℃-HAp、F: 1150℃-HAp、G: 1200℃-HAp、H: AC-1150℃-HAp、I: SC-1150℃-HAp である。グループ A は試料 A から試料 D まで、DNA 濃度が有意的に異なったが、グループ B は試料 E から試料 F まで、DNA 濃度が有意的に同じであった。

表 4.4.異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での DNA 濃度

パターン	DNA 濃度「ng/mL」
A : 900℃-HAp	9±3
B : 950℃-HAp	378±78
C : 1000℃-HAp	1244±117
D : 1050℃-HAp	1067±37
E : 1100℃-HAp	1068±45
F : 1150℃-HAp	1110±64
G : 1200℃-HAp	1096±40
H : AC-1150℃-HAp	1032±12
I : SC-1150℃-HAp	1024±28

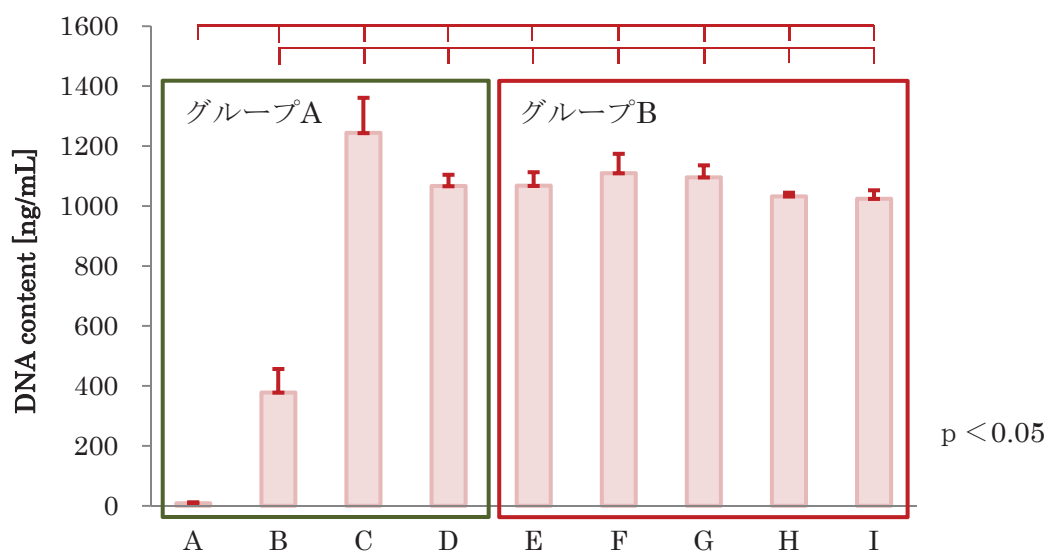


図 4.8. 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での DNA 濃度.(A)900℃-HAp、(B)950℃-HAp、(C)1000℃-HAp、(D)1050℃-HAp、(E)1100℃-HAp、(F)1150℃-HAp、(G)1200℃-HAp、(H)AC-1150℃-HAp、(I)SC-1150℃-HAp

#### 4.3.3.2 アパタイトディスク上でのオステオカルシン含有量

種々のアパタイトディスク上での MSCs の骨形成分化能を評価するために、ELISA 法(サンドイッチ法)でオステオカルシン含有量を測定した。更に、オステオカルシン/DNA 濃度で、種々アパタイトディスク評価を行った。グループ A は試料 A から試料 D まで、オステオカルシン/DNA 濃度が無規則であった。一方、グループ B は試料 E から試料 I まで、焼結温度を上昇すると共に、オステオカルシン/DNA 濃度変化を減少する傾向を見られた(表 3.9、図 3.9)。

表 4.5. 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での  
オステオカルシン/DNA 濃度

パターン	オステオカルシン/DNA 濃度「/DNA」
A : 900℃ -HAp	1.60±3.25
B : 950℃ -HAp	0.07±0.09
C : 1000℃ -HAp	0.13±0.09
D : 1050℃ -HAp	1.31±0.79
E : 1100℃ -HAp	2.68±1.02
F : 1150℃ -HAp	0.97±0.76
G : 1200℃ -HAp	0.99±0.35
H : AC-1150℃ -HAp	1.62±1.20
I : SC-1150℃ -HAp	0.89±0.06

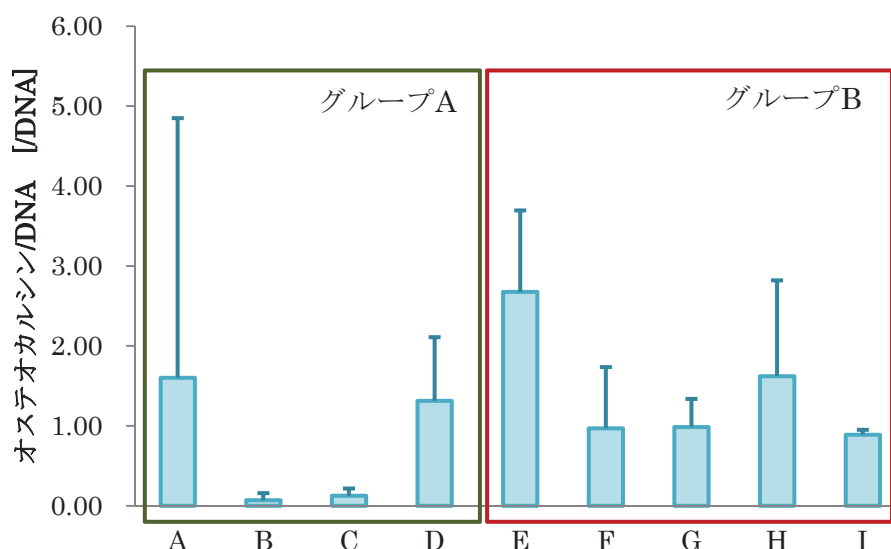


図 4.9. 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上でのオステオカルシン/DNA 濃度.(A)900℃ -HAp、(B)950℃ -HAp、(C)1000℃ -HAp、(D)1050℃ -HAp、(E)1100℃ -HAp、(F)1150℃ -HAp、(G)1200℃ -HAp、(H)AC-1150℃ -HAp、(I)SC-1150℃ -HAp

#### 4.3.3.3 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上の間葉系幹細胞初期 接着面積及び骨形成分化能の相関性

種々のアパタイトディスク上での rMSCs 初期接着面積及び骨形成分化能の負の相関を認められた。最小二乗法の結果では、相関係数が 0.8191 となり、強い相関となった。

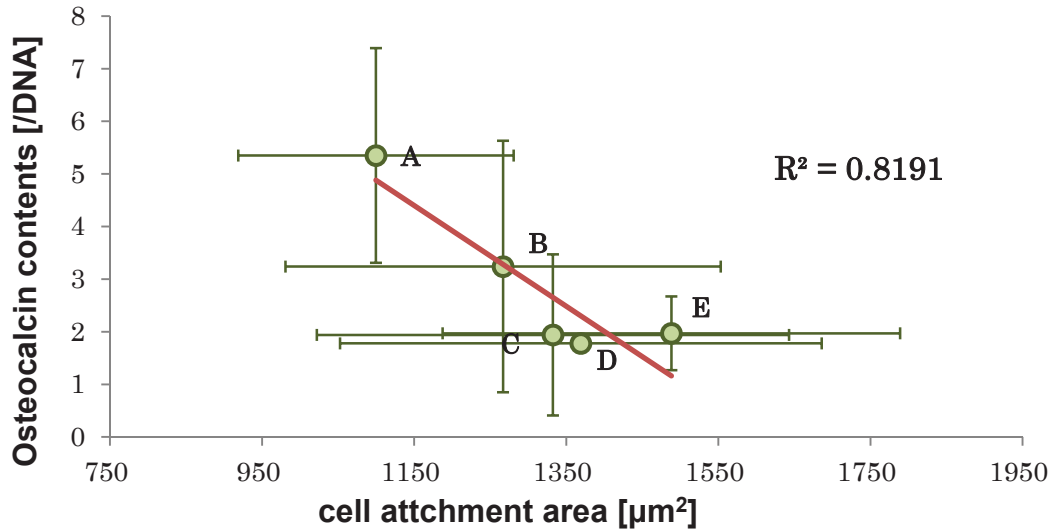


図 4.10. rMSCs の初期接着面積及び骨基質形成量の相関. (A)1100°C-HAp、(B)AC-1150°C-HAp、(C)1150°C-HAp、(D)SC-1150°C-HAp、(E)1200°C-HAp

#### 4.4 考察

骨再生医療によく用いられるセラミックス系生体材料の表面性状の溶解性は、rMSCs 初期接着面積及び骨形成分化能の負の相関性に影響を与えることを認められた。焼結温度 900°C から 1200°C まで、異なる微細構造を有するアパタイトディスク上における rMSCs 初期接着挙動及び細胞分化能の負の相関を認められなかった。一方、焼結温度 1100°C から 1200°C まで、異なる微細構造を有するアパタイトディスク上における rMSCs 初期接着挙動及び細胞分化能の負の強い相関を認められた(図 4.10)。

まず、rMSCs を無血清培養で 2 時間培養した後、異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での rMSCs の初期接着面積が有意的に異なった。900°C から 1200°C まで焼結したアパタイト結晶はサイズが大きくなるほど(図 4.1)、rMSCs の初期接着面積の変化が無規則であった(図 4.6 グループ A)。その中、900°C から 1050°C まで焼結した焼結アパタイトディスク表面の pH がアルカリ性に偏り(図 4.1 グループ A)、表面から溶解した

カルシウムイオンやカルシウム物質も時間と共に増加することで(図 4.4 グループ A)、rMSCs の接着が出来ない原因と考えられる(図 4.6 グループ A、図 4.8 グループ A)。一方、1100℃以上で焼結したアパタイト結晶はサイズが大きくなるほど(図 4.1)、rMSCs の初期接着面積が有意的に大きい結果を認められた(図 4.6 グループ B)。また、1100℃以上で焼結アパタイトディスク表面の pH が 7.38 付近であり、殆ど変化しない結果が認められた(図 4.1 グループ B)。表面から溶解したカルシウムイオンやアパタイト結晶が時間とともに変化しても、rMSCs の接着、増殖に影響を与えたと考えられる。(図 4.6 グループ B、図 4.8 グループ B)。すなわち、1100℃から 1200℃まで焼結温度を上昇し、作製したアパタイトディスクの表面から、溶解したカルシウム濃度に影響を与え、アパタイト結晶サイズが大きいくほど、rMSCs の初期接着面積が大きいと推測される。

次に、rMSCs を血清培養で 3 週間培養した後、異なる微細構造を有するアパタイトディスク上での rMSCs の骨形成分化能が異なった結果を認められた(図 4.9)。900℃から 1200℃まで焼結したアパタイト結晶はサイズが大きくなるほど(図 4.1)、rMSCs の骨形成分化能の変化が無規則であった(図 4.9)。その中、900℃から 1050℃まで焼結したアパタイトディスクはカルシウムイオンやカルシウム物質を溶解することで(図 4.4 グループ B)、rMSCs の骨形成分化能に影響を与え、骨形成分化能の変化を見られなかった(図 4.9 グループ A)。一方、1100℃から 1200℃まで焼結したアパタイト結晶はサイズが大きくなるほど(図 4.1)、骨形成分化能が大きい傾向を認められた(図 4.9 グループ B)。また、1100℃から 1200℃まで焼結したアパタイトディスクはカルシウムイオンやカルシウム物質を溶解することで(図 4.4 グループ B)、rMSCs の骨形成分化能の変化を見られ、減少する傾向を認められた(図 4.9 グループ B)。すなわち、1100℃から 1200℃まで焼結温度を上昇し、作製したアパタイトディスクの表面の溶解性に影響せず、アパタイト結晶サイズが大きいくほど、rMSCs の骨形成分化能が減少すると考えられる。

また、1100℃から 1200℃まで焼結温度を上昇し、作製した異なる微細構造を有するアパタイトディスク上における rMSCs の初期接着面積及び骨形成分化能の負の強い相関を認められた(図 4.10)。すなわち、rMSCs の初期接着面積が大きく、細胞形態が丸く(図 4.7(G))、3 週間後の骨形成分化能が低い結果を示した。また、rMSCs の初期接着面積が小さいほど、細胞形態が紅葉のようになり(図 4.7(E))、3 週間後の骨形成分化能が高い結果を示した。

以上のことによって、900℃から 1050℃まで焼結したアパタイトディス

クの溶解性に影響を受けた rMSCs は初期接着ができず、1100℃から1200℃まで焼結したアパタイトディスクの溶解性があっても、rMSCs の初期接着面積及び骨形成分化能の負の相関に影響を与えないと考えられる。その rMSCs の初期接着面積は  $350\mu\text{m}^2$  から  $3500\mu\text{m}^2$  の間であった。また、その相関性を用いて、焼結アパタイト材料の評価技術に応用でき、更に、間葉系幹細胞の予測技術にも応用できると考えられる。今後、異なる焼結温度で焼結したアパタイトの違いについて、研究する余地があると考えられる。

## 第 5 章 アパタイト層で表面修飾したチタン上における間葉系幹細胞初期 接着挙動及び細胞分化能の相関

### 5.1 実験目的

本論文の最終的な目的は、間葉系幹細胞の予測技術である。すなわち、間葉系幹細胞の初期接着面積を測定すれば、細胞分化能が評価できる。更に、その間葉系幹細胞を培養する足場となる生体材料も評価できると考えられる。

ここで、第 3 章、第 4 章では、骨再生医療で良く用いられるセラミックス系生体材料を使用し、その間葉系幹細胞の初期接着面積及び細胞分化能の相関を認められた。間葉系幹細胞の予測技術の可能性を示唆された。

しかしながら、生体材料の表面性状では、セラミックス系だけではなく、一般に人工骨や人工歯根として用いられる金属も挙げられる。

本章では、一般に人工骨や人工歯根として用いられる金属／セラミックスの複合生体材料として、対象的なチタンの表面に対して、様々な条件で加熱処理や酸処理を行い、種々の結晶相組成や微細構造を有したアパタイト層を修飾形成した。また、種々のアパタイト層で表面修飾したチタンを用いてラット由来間葉系幹細胞の初期接着時における細胞形態と細胞分化の相関性を確認し、生体材料上での細胞分化の予測技術を開発することを目的とする。

### 5.2 実験方法

本章では、人工骨や人工歯根として一般に用いられる金属／セラミックスの複合生体材料として、まず、チタン板(10mm×10mm×1.2mm)を 300℃で熱処理し、酸化膜を作製した後、過飽和リン酸カルシウム溶液に浸漬し、アパタイト層で修飾して使用した(300℃-Ti-Ap)。次に、過酸化水素処理によって、チタン板上に酸化膜を作製した後、過飽和リン酸カルシウム溶液に浸漬し、アパタイト層で修飾して使用した(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ti-Ap)。最後に、チタン板(Ti)及びアパタイト層で修飾したチタン(Ti-Ap)も含めた。4 種類の複合生体材料のプロトコールを添付資料に詳細に示した。

### 5.3 実験結果

本章では、まず、分析機器によるアパタイト層で表面修飾したチタンの表面性状評価(5.3.1 節)、rMSCs によるアパタイト層で表面修飾したチタンの表面性状評価 (5.3.2 節、5.3.3 節、5.3.4 節)の順で検討した。

### 5.3.1 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン板の物性評価

#### 5.3.1.1 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン板の SEM 観察

rMSCs の足場となる種々のアパタイト層で表面修飾したチタン板上の表面性状は倍率 2 万倍の SEM 観察を行った。ここで、試料 A~D はそれぞれ、A : Ti、B : Ti-Ap、C :  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti-Ap、D :  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap である。試料 A の表面は小粒の金属結晶が多数付着している状態を観察できた(図 5.1-(A))。また、試料 B、試料 C 及び試料 D の表面では、異なる形態のナノレベルのアパタイト結晶が形成したことを確認できた。試料 B 上では均一なプレート状のようなアパタイト結晶が形成された。試料 C 上では配向性がある針状なアパタイト結晶が形成した。試料 D 上では不均一な微小なプレート状のようなアパタイト結晶が形成された(図 5.1-(B)、(C)、(D))。

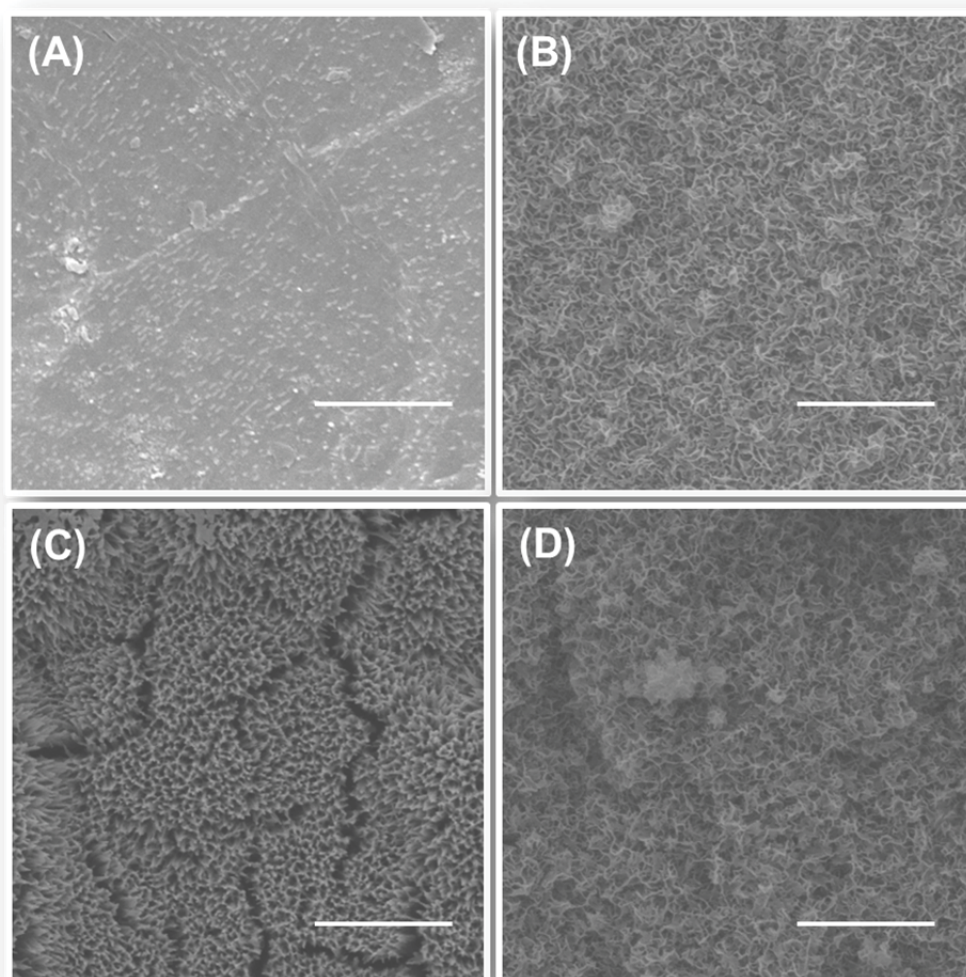


図 5.1. 種々のアパタイト層で表面修飾したチタンの SEM 観察  
(A) Ti、(B) Ti-Ap、(C)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti-Ap、(D)  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap

### 5.3.1.2 種々のアパタイト層で表面修飾したチタンの薄膜 X 線回折分析

リン酸カルシウム過飽和溶液を用いて、チタン板及び酸化チタン板上にアパタイト層を作製したことを薄膜 X 線回折分析で確認できた(図 5.2-(B)、図 5.3-(B)、図 5.4-(B))。また、バックグラウンドとして、化学組成や微細構造が異なる Ti、 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Ti}$ 、 $300^\circ\text{C-Ti}$  を薄膜 X 線回折分析で確認できた(図 5.2-(A)、図 5.3-(A)、図 5.4-(A))。また、結晶がナノサイズのため(図 5.1)、Ti 及び  $300^\circ\text{C-Ti}$  上に形成されたアパタイトのピークと比較し、 $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Ti}$  上に形成されたアパタイトのピークが弱い結果となった。ここで、同じアパタイトの作製手法を使い、六崎ら(2007 年)は形成されたアパタイト層が低結晶性の類骨似アパタイト層であり、ACP、OCP 及び炭酸カルシウムを存在することを報告した<sup>[56]</sup>。

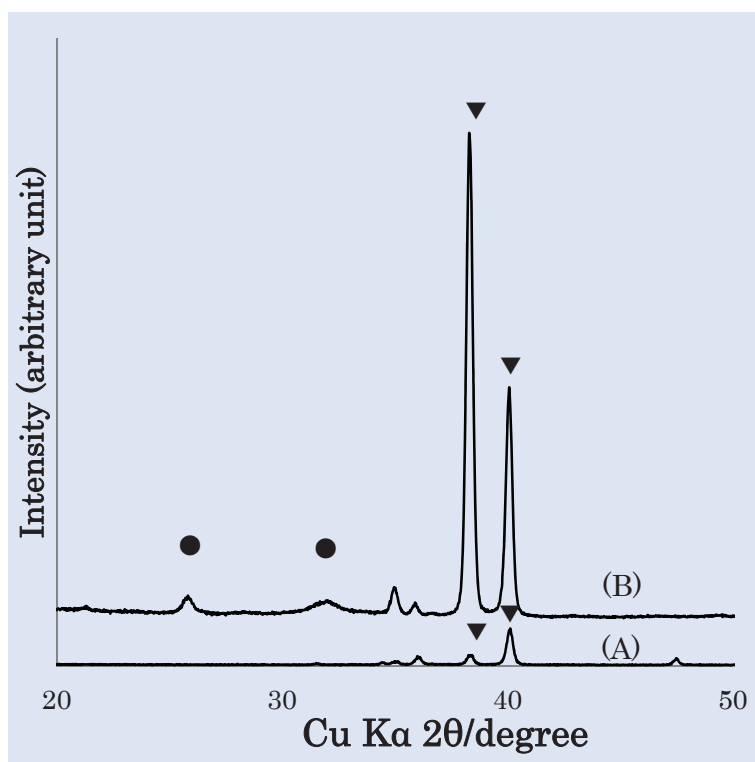


図 5.2. アパタイト層で表面修飾したチタンの薄膜 X 線回折

(A) Ti、(B) Ti-Ap、▼ : Titanium、● : Hydroxyapatite

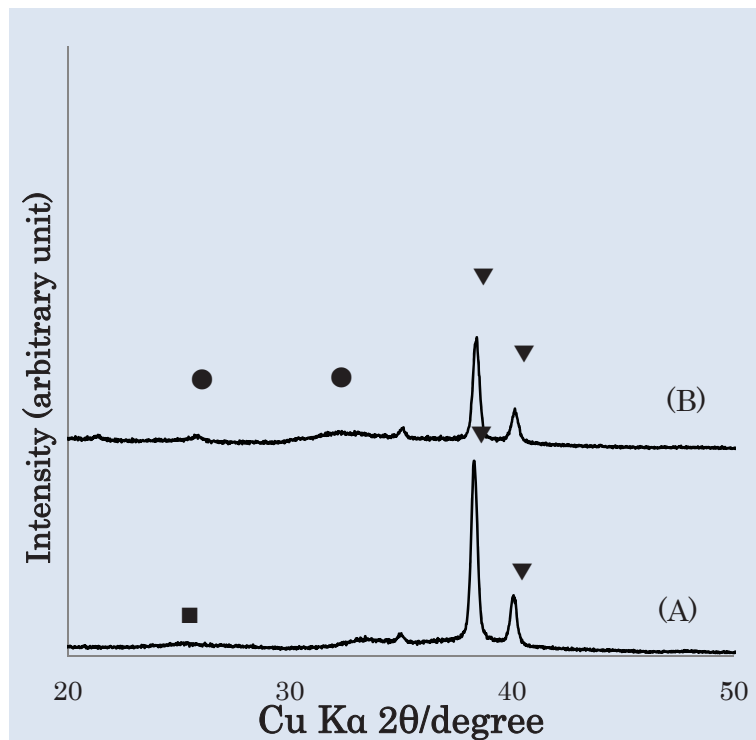


図 5.3. アパタイト層で表面修飾した過酸化水素処理チタンの薄膜 X 線回折  
 (A)  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Ti}$ 、(B)  $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Ti-Ap}$ 、▼ : Titanium、● : Hydroxyapatite、■ : Anatase

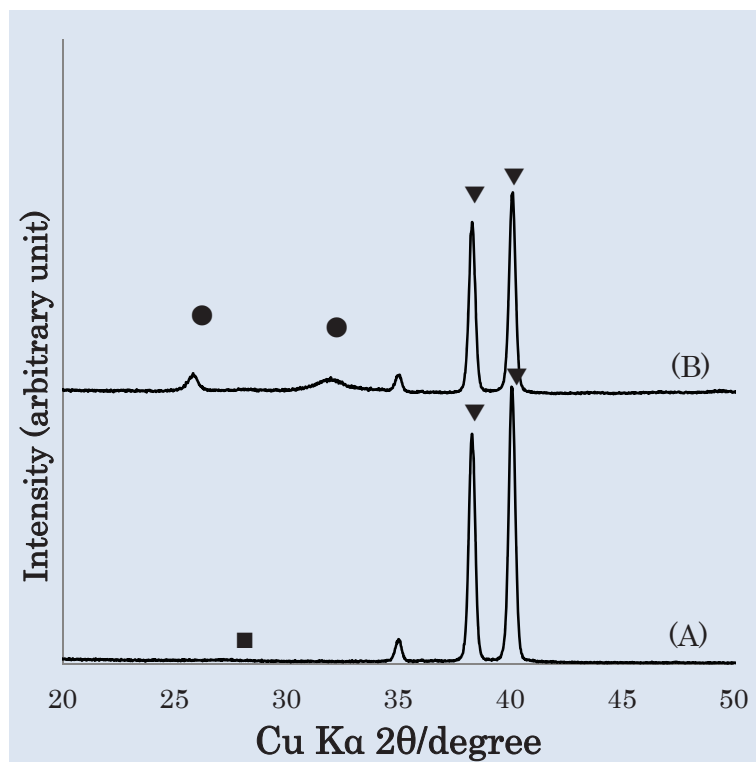


図 5.4. 種々のアパタイト層で表面修飾した  $300^\circ\text{C}$ 熱処理チタンの薄膜 X 線回折  
 (A)  $300^\circ\text{C-Ti}$ 、(B)  $300^\circ\text{C-Ti-Ap}$ 、▼ : Titanium、● : hydroxyapatite、■ : Rutile

### 5.3.2 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での間葉系幹細胞の初期接着面積

血清培地で種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での rMSCs の初期接着面積を測定した。ここで、試料 A～D はそれぞれ、A : Ti、B : Ti-Ap、C :  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti-Ap、D :  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap である。Student-t 検定により、試料 A での rMSCs の初期接着面積が最も大きく、試料 D 上での rMSCs の初期接着面積が最も小さい結果となった(図 5.5)。更に、試料 A での rMSCs の初期接着形態の蛍光写真では、rMSCs が伸展する様子が確認され、試料 B、試料 C、試料 D 上では rMSCs の偽足らしいものが確認された。各写真の左下に rMSCs の拡大図も載せた。(図 5.6) 無血清培地で rMSCs を 2 時間培養した結果、試料 B 及び試料 D では rMSCs が殆ど死滅した。

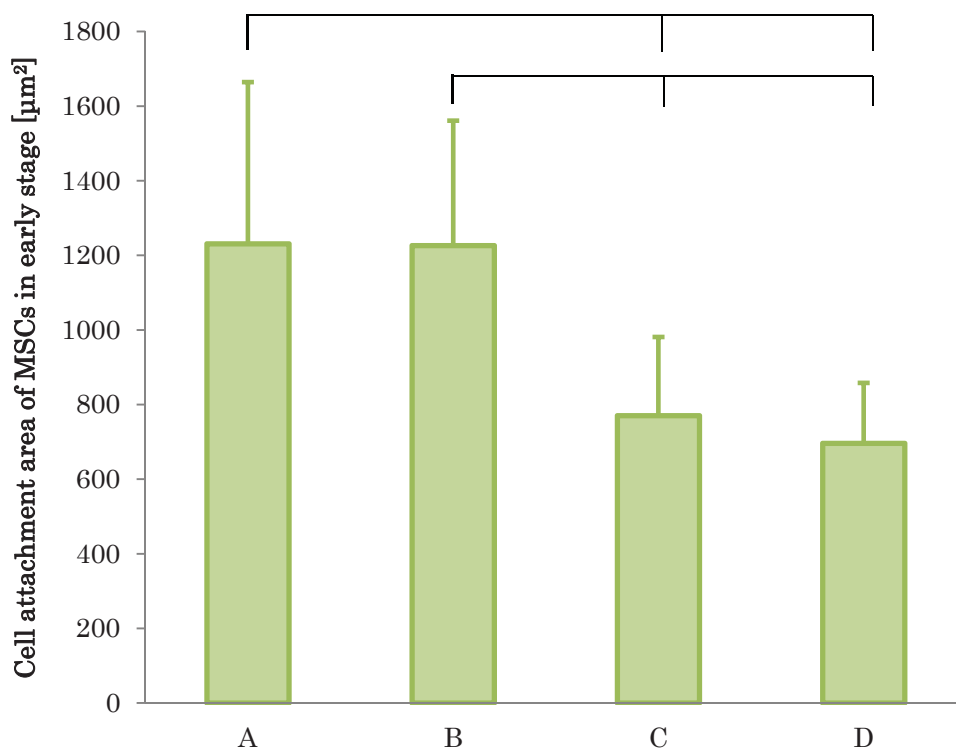


図 5.5. 種々のアパタイト層で表面修飾したチタンの rMSCs 初期接着面積 (A) Ti、(B) Ti-Ap、(C)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti-Ap、(D)  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap  $p < 0.05$

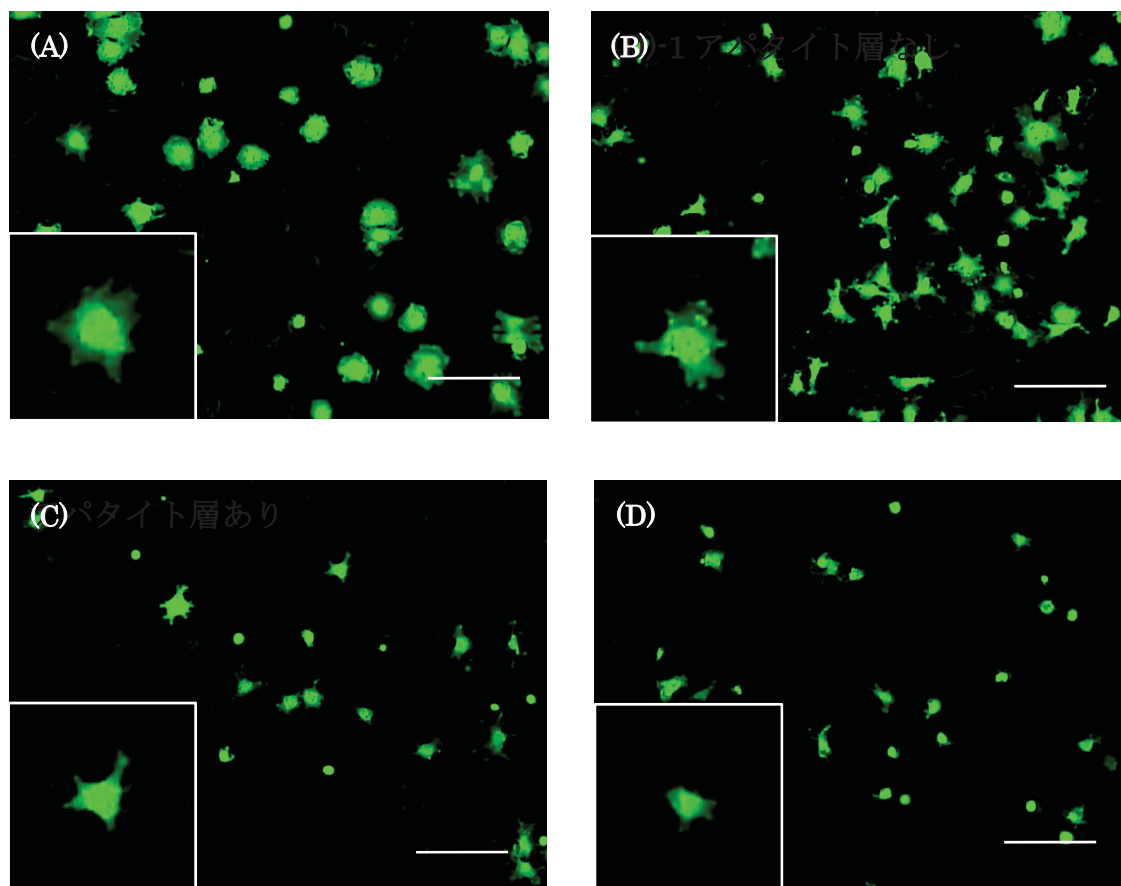


図 5.6. 種々のアパタイト層で表面修飾したチタンの rMSCs 初期接着形態写真 (A) Ti、(B) Ti-Ap、(C) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Ti-Ap、(D) 300°C-Ti-Ap  
bar:100 μm

### 5.3.3 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での骨形成分化能

オステオカルシンキットを用いて、種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での骨形成分化能を測定した。また、細胞数を評価するため、タンパク生成量の定量を行った。ここで、試料 A～D はそれぞれ、A : Ti、B : Ti-Ap、C :  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti-Ap、D :  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap である。試料 D 上の細胞分化能が最も高く、試料 A 及び試料 B 上の細胞分化能がほぼ同じ低さであった。

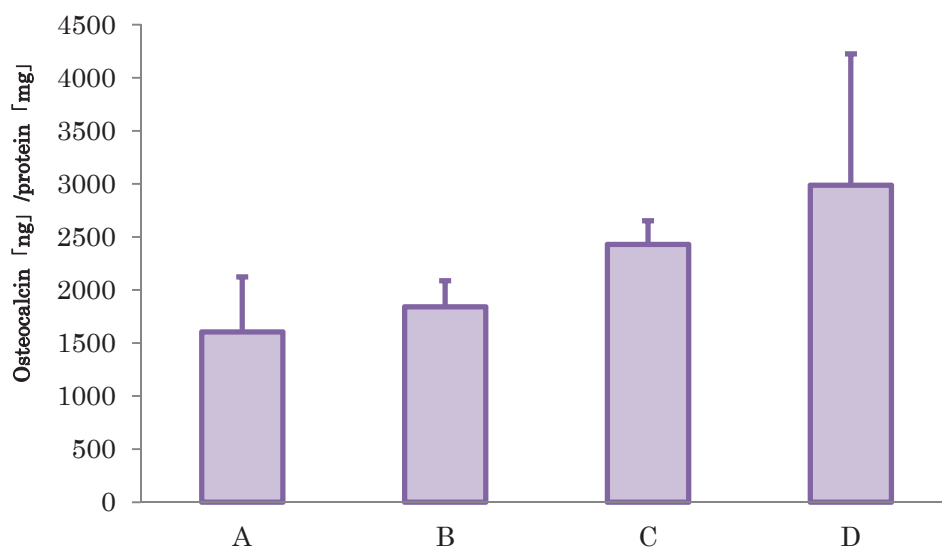


図 5.7. 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での rMSCs 骨分化形成能  
(A) Ti、(B) Ti-Ap、(C)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti-Ap、(D)  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap

#### 5.3.4 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での間葉系幹細胞初期接着面積及び骨形成分化能の相関

種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上での初期接着面積及び骨形成分化能の相関係数  $R^2$  は 0.9059 である。試料 A～D はそれぞれ、A : Ti、B : Ti-Ap、C :  $H_2O_2$ -Ti-Ap、D :  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap である。

表 5.1. rMSCs 初期接着面積及び骨形成分化能の相関

パターン	初期接着面積「 $\mu\text{m}^2$ 」	オステオカルシン/プロテイン「mg」
A : Ti	1231 $\pm$ 433	1604 $\pm$ 519
B : Ti-Ap	1226 $\pm$ 335	1841 $\pm$ 245
C : $H_2O_2$ -Ti-Ap	770 $\pm$ 211	2430 $\pm$ 222
D : $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap	696 $\pm$ 162	2987 $\pm$ 1237

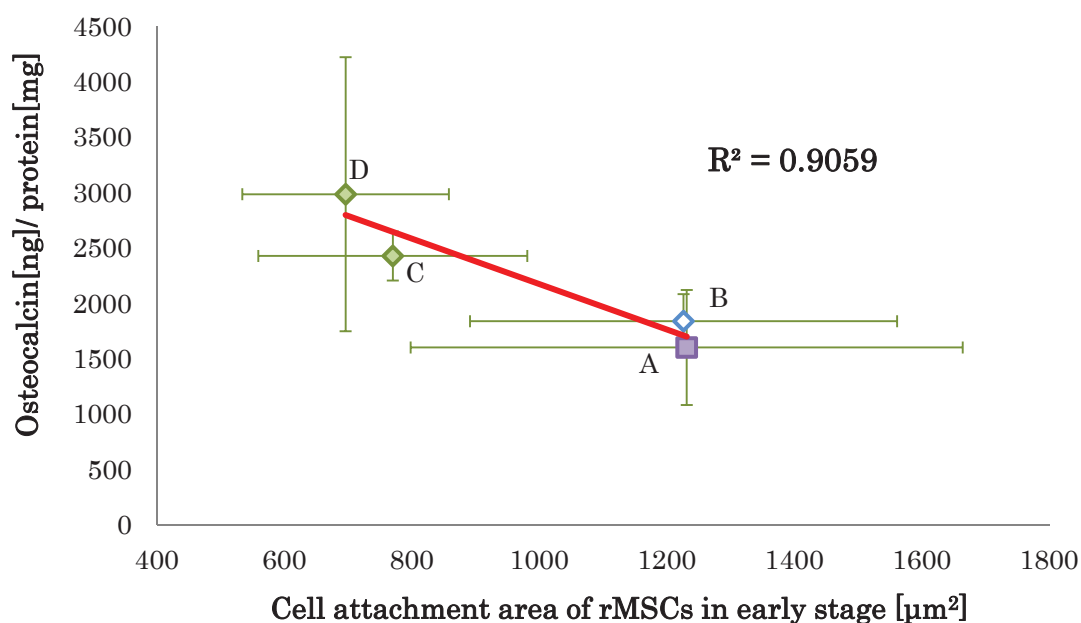


図 5.8. rMSCs 初期接着面積及び骨形成分化能の相関図  
(A) Ti、(B) Ti-Ap、(C)  $H_2O_2$ -Ti-Ap、(D)  $300^\circ\text{C}$ -Ti-Ap

#### 5.4 考察

第 3、4 章では、セラミックス系生体材料上での rMSCs 初期接着面積及び骨分化形成能の負の相関が認められた。本章では、更に、金属及びセラミックス系材料上での rMSCs 初期接着面積及び骨分化形成能の負の相関が認められた。

まず、血清培地で 2 時間培養後の rMSCs の初期接着面積が有意的に異なった(図 5.5)。アパタイト層の形成状態により、rMSCs の初期接着面積が異なり、チタン(アパタイト層なし)である金属上における rMSCs の初期接着面積はアパタイト層修飾したチタン及び酸化チタンより大きい傾向が見られた。また、チタンの酸化膜により、rMSCs の初期接着面積が異なり、アパタイト層修飾したチタンはアパタイト修飾した酸化チタンより有意的に大きい結果を認められた。更に、チタンの酸化膜の状態により、rMSCs の初期接着面積が異なり、アパタイト修飾したアナターゼ型の酸化チタンはアパタイト修飾したルチル型の酸化チタンより、rMSCs の初期接着面積が大きい結果を認められた。

次に、rMSCs を血清培地で 3 週間培養した後では、rMSCs 骨形成分化能が異なった (図 5.7)。アパタイト層の形成状態により、rMSCs の骨形成分化能が異なり、チタン(アパタイト層なし)である金属上における rMSCs の骨形成分化能はアパタイト層修飾したチタン及び酸化チタンより小さい傾向が見られた。また、チタンの酸化膜により、rMSCs の骨形成分化能が異なり、アパタイト層修飾したチタンはアパタイト修飾した酸化チタンより小さい結果を認められた。更に、チタンの酸化膜の状態により、rMSCs の骨形成分化能が異なり、アパタイト修飾したアナターゼ型の酸化チタンはアパタイト修飾したルチル型の酸化チタンより、rMSCs の骨形成分化能が小さい結果を認められた。

ところで、表 5.1 で示したように、培養 2 時間後、チタン及びアパタイト層で修飾したチタン上における rMSCs の初期接着面積が有意的な違いを認められず、また、培養 3 週間後では、チタン及びアパタイト層で修飾したチタン上での骨分化形成もほぼ同じ結果となった。すなわち、チタンのような金属の表面性状はアパタイト層で修飾したチタンといったセラミックス系材料でコーティングした金属材料の表面性状がまったく異なるものにも係らず、rMSCs が同じ挙動を示した。また、リン酸カルシウム過飽和溶液でチタン上に作成したアパタイト層は培地にほとんど溶解せず、または rMSCs の接着に影響を与えないと推測できる。

それによって、材料表面の種類によらず、rMSCs 初期接着面積及び骨分化形成能の負の相関があることを示唆された。以上の結果は、間葉系幹

細胞(MSCs)の予測技術の開発が十分可能であることを示していると考えられる。

## 第6章 結論

骨再生医療に用いる生体材料の最適な表面性状を解明するため、本論では生体材料上に接着する細胞の挙動、特に初期接着面積に着目し、3週間後の骨形成分化能との相関性を検討した。

- ① 非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における培養 2 時間後の細胞初期接着面積及び骨形成分化能の相関の傾向を認められた。

ここで、0、10、20、30wt%  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクを 1100°C で焼成して、様々な微細構造を有する非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクを作製する手法を確立した。その四種類の  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における rMSCs の 80% 生存率が確認できた。また、 $\beta$ -TCP の含有量が上昇すると共に、培養 2 時間後の rMSCs の初期接着面積が増大する傾向を見られたが、培養 3 週間後の rMSCs の骨形成分化能が減少する傾向を見られた。つまり、ディスク表面の  $\beta$ -TCP 粒子およびハイドロキシアパタイト粒子の集合組織性状が、表面で培養したラット細胞の初期接着面積及び分化能に影響を与えることを見出した。これにより、非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイト質材料の最適な表面条件として、rMSCs の初期接着面積が  $350\mu\text{m}^2$  から  $3500\mu\text{m}^2$  までに押さえれば、そしてその初期接着面積が小さければ小さいほどがよいと考えられる。

- ② 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の強い負の相関を認められた。

rMSCs の足場となるセラミックス系生体材料としてハイドロキシアパタイト粉体を原料として用い、異なる焼結温度により、様々な結晶粒径分布と表面微細構造を有するアパタイトディスクを作製する手法を確立した。特に、焼結温度が 1100°C から 1200°C までのディスク表面のハイドロキシアパタイト粒子サイズは、細胞接着面積と相関性が認められ、概して細胞接着面積が小さいほど骨分化活性が高いことがわかった。これにより、ハイドロキシアパタイト質材料の最適な表面条件として、rMSCs の初期接着面積が  $350\mu\text{m}^2$  から  $3500\mu\text{m}^2$  までに押さえれば、そしてその初期接着面積が小さければ小さいほどがよいと考えられる。

- ② 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の負の相関を認められた。

形成されたアパタイト修飾層は基本的にはチタン合金表面の酸化状態によって構成組成や微細構造が制御されることがわかった。材料表面の種

類によらず、rMSCs 初期接着面積及び骨分化形成能の負の相関があることを示唆された。

以上のことにより、細胞の足場となる生体材料表面上での rMSCs の初期接着形態が決まれば、培養 3 週間後の骨分化形成能まで一連の細胞挙動を推測できる。すなわち、骨再生医療用生体材料上の細胞初期接着形態が最も重要なポイントとなり、その材料を評価するカギとなると考えられる。しかしながら、図 6.1 で示したように、細胞の初期接着の最小面積の限界があり、本論では  $350\mu\text{m}^2$  と考え、それ以上小さくなればネクローシスという細胞死を起こる恐れがある。

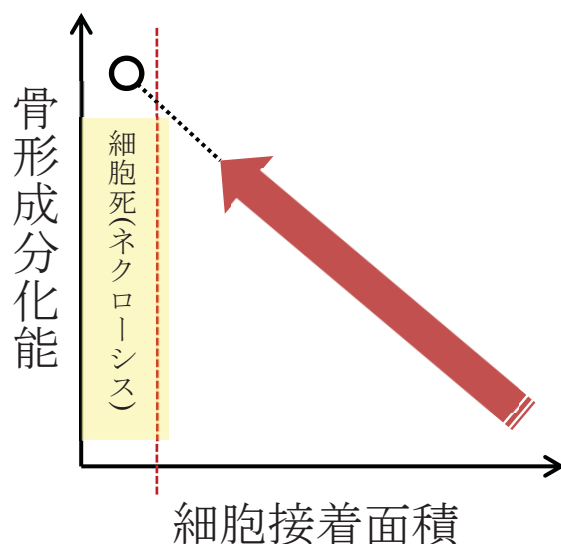


図 6.1. 骨再生医療用生体材料上での MSCs の初期接着面積及び骨形成分化能の相関

以上より、骨再生医療用生体材料上での骨形成分化能が高いほど、MSCs の初期接着面積が小さい結果が認められた。

この結果を用いることにより、間葉系幹細胞(MSCs)の予測技術の開発が十分可能だと考えられる。

最後に、本研究によって明らかになった事柄を以下にまとめる。

- ① 医療用医薬品のみを混合して得られるリン酸カルシウム過飽和溶液(RSM 液)を用いて、アパタイト層形成の第一段階と FGF-2 とリン酸カルシウムの共沈の第二段階からなる 2 段階法を取り入れることによって、陽極酸化被膜を有する Ti 棒上に

FGF-2 を完全失活させることなく担持させることに成功した。

- ② RSM 液は(1)Ca および P の濃度倍率を高く設定する、(2)NaHCO<sub>3</sub>濃度を高く設定する、(3)温度を高く設定することによってリン酸カルシウムが析出しやすくなることが分った。
- ③ 陽極酸化被膜を有する Ti 棒を、RSM 液を用いて均質なアパタイト層で被覆する最適条件は Ca/P モル比=1.5、Ratio=2.0、NaHCO<sub>3</sub>濃度=15.09 mM、37℃、1 日浸漬と決定された。
- ④ 均質なアパタイト層を形成した Ti 棒(φ2.5、16 mm 長)を 10 μg/mLFGF-2 含有 RSM 液(Ca/P モル比=1.5、Ratio=1.0、NaHCO<sub>3</sub>濃度=15.09 mM)に 25℃で 1 日浸漬すると Ti 棒 1 本当たり 0.52 μg の FGF-2 がリン酸カルシウムとの共沈によって担持できることが分った。
- ⑤ 陽極酸化被膜を有する創外骨折固定用 Ti スクリュー(φ4.0、30 mm 長)に対しても、均質なアパタイト層を形成した後に FGF-2 含有 RSM 液に浸漬することによって 1 本当たり 1.52 ~2.45 μg の FGF-2 を担持可能であることが明らかとなった。また、活性を有している FGF-2 の割合は 13~30%と見積もられた。

## 謝辞

本研究は早稲田大学 理工学部 山崎 淳司教授のご指導のもとに行われました。山崎先生には、大変お世話になり、懇切丁寧な御指導、御助言を賜りましたことをここに深く御礼申し上げます。

独立行政法人 産業技術総合研究所 廣瀬 志弘 研究員には、本研究のテーマを与えていただき、本研究全般において大いなるお力添えをいただきました。大変感謝しております。

また、同研究センターの研究員である伊藤 敦夫主任研究員、十河 友氏は、多忙の中細かな点にまで丁寧に見てくださいました。実験への取り組み方に始まり多岐にわたる御指導をいただき、十河 友氏の優しさと熱心さに感動しており、心から感謝の意を捧げます。

様々な事務的な面でお手をかけて頂き、不自由のない研究環境を活かすためにご便宜を図って頂いたうえ、精神面、生活面でお世話になった産業技術総合研究所の杉浦 由実様にこの場を借りて感謝申し上げます。

励ましながら共に頑張った王 秀鵬氏、李 霞氏独立行政法人 産業技術総合研究所で知り合った仲間達には本当に感謝しています。ありがとうございました。

本研究を進めていく上で貴重なご助言と討論を頂き、また精神的な支えとなっていた早稲田大学山崎研究室の安井 万奈客員研究員に御礼申し上げます。

山崎研究室の先輩と同級生の皆様にもお礼を申し上げます。皆様のご協力とおかげで、楽しく充実した大学生活を送ることができました。どうもありがとうございました。どうか今後とも、よろしくお願いいたします。

最後に本来なら冒頭で述べたいところではありますが、大学まで進学させていただいた両親には感謝の極みです。どうもありがとうございました。（毎年3月21日は留学記念日です。「あ、い、う、え、お」から日本語を学び、有名な学府である早稲田大学で勉強し、博士号を取得するまで、大変貴重な留学経験をしました。11年間に及んだ留学生活ですが、31歳になった私の集大成とも言えます。今後の目標として、①良い人と縁を結ぶこと、②キャリアを積める仕事をする事、③いつか、自分なりの「学問の独立」にすること、以上の目標を実現するため、一生懸命頑張りたいと思います。）

簡単ですが、御礼の言葉といたします。皆様のご恩に対して報いることのできるよう、これからももっと頑張っていきますので、ご指導の方よろしく願いいたします。

## 【参考文献】

- [1] Olivares-Navarrete R, Hyzy S L, Hutton D L, Erdman C P, Wieland M, Boyan B D, Schwartz Z. *Biomaterials*, 2010, 31: 2728-2735
- [2] Aita H, Att W, Ueno T, Yamada M, Hori N, Iwasa F, Tsukimura N, Ogawa T. *Acta Biomater.*, 2009, 5: 3247-3257
- [3] Curran J M, Tang Z, Hunt J A. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2009, 89A: 1-12
- [4] Ivirico J L, Salmeron-Sanchez M, Ribelles J L, Pradas M M, Soria J M, Gomes M E, Reis R L, Mano J F. *J. Biomed. Mater. Res. B*, 2009, 91: 277-286
- [5] Keselowsky B G, Collard D M, Garcia A J. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2003, 66: 247-259
- [6] Keselowsky B G, Collard D M, Garcia A J. *Biomaterials*, 2004, 25: 5947-5954
- [7] Curran J M, Chen R, Hunt J A. *Biomaterials*, 2006, 27: 4783-4793
- [8] Curran J M, Chen R, Hunt J A. *Biomaterials*, 2005, 26: 7057-7067
- [9] Benoit D S, Schwartz M P, Durney A R, Anseth K S. *Nat. Mater.*, 2008, 7: 816-823
- [10] Lu Y, Mapili G, Suhali G, Chen S, Roy K. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 77: 396-405
- [11] Mauney J, Volloch V. *Matrix. Biol.*, 2009, 28: 239-250
- [12] Mauney J R, Kirker-Head C, Abrahamson L, Gronowicz G, Volloch V, Kaplan D L. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2006, 79A: 464-475
- [13] 李长文(Li C W), 郑启新(Zhen Q X), 郭晓东(Guo X D), 全大萍(Quan D P), 赵洁(Zhao J). *中国生物医学工程学报(Chinese Journal of Biomedical Engineering)*, 2006, 25: 142-146
- [14] 段智霞(Duan Z X), 郑启新(Zhen Q X), 郭晓东(Guo X D), 白玉(Bai Y), 袁泉

- (Yuan Q),陈顺广(Chen G S). 中国矫形外科杂志(Orthopedic Journal of China), 2007, 15: 1647-1650
- [15] Chun C, Lim H J, Hong K Y, Park K H, Song S C. *Biomaterials*, 2009, 30: 6295-6308
- [16] Martino M M, Mochizuki M, Rothenfluh D A, Rempel S A, Hubbell J A, Barker T H. *Biomaterials*, 2009, 30: 1089-1097
- [17] Balloni S, Calvi E M, Damiani F, Bistoni G, Calvitti M, Locci P, Becchetti E, Marinucci L. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants*, 2009, 24: 627-635
- [18] Ruckh T T, Kumar K, Kipper M J, Popat K C. *Acta Biomater.*, 2010, 6: 2949-2959
- [19] Thibault R A, Baggett L S, Mikos A G, Kasper F K. *Tissue. Eng. Part A*, 2010, 16: 431-440
- [20] Takahashi Y, Tabata Y. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2004, 15: 41-57
- [21] Tang J, Peng R, Ding J. *Biomaterials*, 2010, 31: 2470-2476
- [22] Dalby M J, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle M O, Herzyk P, Wilkinson C D, Oreffo R O. *Nat. Mater.*, 2007, 6: 997-1003
- [23] Oh S, Brammer K S, Li Y S, Teng D, Engler A J, Chien S, Jin S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106: 2130-2135
- [24] Von der Mark K, Bauer S, Park J, Schmuki P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106: E60; author reply E61
- [25] Marletta G, Ciapetti G, Satriano C, Perut F, Salerno M, Baldini N. *Biomaterials*, 2007, 28: 1132-1140
- [26] Ruiz S A, Chen C S. *Stem Cells*, 2008, 26: 2921-2927
- [27] Reilly G C, Engler A J. *J. Biomech.*, 2010, 43:55-62
- [28] Engler A J, Sen S, Sweeney H L, Discher D E. *Cell*, 2006, 126: 677-689

- [29] Jianping Fu, Yang-Kao Wang, Michael T Yang. Nat.Methods, 2010: 733-736
- [30] Dawson E, Mapili G, Erickson K, Taqvi S, Roy K. Adv. Drug. Deliv. Rev.,2008,60:215-228
- [31] 細胞の分子生物学 第5版
- [32] 大串始. バイオマテリアル - 生体材料
- [33] Toshimitsu Tanaka, Motohiro Hirose, Noriko Kotobuki. Mater Sci Eng C, 2007: 817-823
- [34] 石川邦夫. バイオマテリアル生体材料. 2005: 348-352
- [35] 環境調和型新材料シリーズ 生体材料 日刊工業新聞社 2008:10-12
- [36] Masahiko Maeda, Motohiro Hirose, Hajime Ohgushi. J.Biochem, 2007: 729-736
- [37] J.-S. Wang , P. Aspenberg. Clin. Orthop. Res. 333, 252-60 (1996).
- [38] M.L. Radomsky, T.B. Aufdemorte, L.D. Swain. J. Orthop. Res. 17, 1999: 607-14
- [39] G. Lisignoli, N. Zini, G. Remiddi. Biomaterials 22, 2001:2095-5
- [40] Y. Sogo, A. Ito, M. Onoguchi, A. Oyane, H. Tsurushima, N. Ichinose. Biomed. Mater. 2, 2007:S175-S180
- [41] A. Moroni, L. Orienti, S. Stea, M. Visentin. J Orthop Traum, 10, 1996: 236-242
- [42] A. Moroni, V.L. Caja, M.C. Maltarello, L. Savarino, F. Marinelli, S. Stea, M. Visentin, S. Giannini. J Orthop Traum, 11, 1997:154-161
- [43] A. Moroni, J. Heikkila, G. Magyar, S. Toksvig-Larsen, S. Giannini. Clin Orthop Relat Res, 388, 2001: 209-217
- [44] L.M. Bernardo. Orthop Nurs, 20,2001: 29-34
- [45] C. Pullen, A. Manzotti, M.A. Catagni, F. Guerreschi.J Shoulder Elbow Surg, 12, 2003:436-441
- [46] J.J. Hutson Jr, G.A. Zych. J Orthop Traum, 12, 1998:214-218
- [47] L.L.Hench and J.M. Polak Science, 295, 2002:1014-1017
- [48] A. Oyane, M. Uchida and A. Ito. J. Biomed. Mater. Res., Vol. 72A, 2005:168-174,
- [49] M. Uchida, A. Oyane, H.-M. Kim, T. Kokubo and A. Ito.Advanced Materials, 16, 2004:1071-1074

- [50] Y. Sogo, A. Ito, K. Fukasawa, N. Kondo, Y. Ishikawa, N. Ichinose and A. Yamazaki. *Current Appl. Phys.*, 5, 2005:526-530
- [51] M. Uchida, A. Ito, K.S. Furukawa, K. Nakamura, Y. Onimura, A. Oyane, T. Ushida, T. Yamane, T. Tamaki and T. Tateishi. *Biomaterials*, 26, 2005:6924-6931
- [52] A. Oyane, M. Uchida, K. Onuma and A. Ito. *Biomaterials*, 27, 2006:167-175
- [53] A. Oyane, Y. Yokoyama, M. Uchida and A. Ito. *Biomaterials*, 27, 2006:3295-3303
- [54] H. Mutsuzaki, A. Ito, M. Sakane, Y. Sogo, A. Oyane, Y. Ebihara, N. Ichinose and N. Ochiai. *J. Mater Med; Mater in Med*, 2007:1799-1808
- [55] Y. Sogo, A. Ito, T. Matsuno, A. Oyane, G. Tamazawa, T. Satoh, A. Yamazaki, E. Uchimura and T. Ohno. *Biomed. Mater.*, 2, 2007:116-123
- [56] H. Mutsuzaki, A.Ito, M. Sakane, Y. Sogo, A.Oyane and N. Ochiai. *J.Biomed.Mater.Res.B*, 2008: 365-374
- [57] Kawaguchi H, et al: *J Clin Invest*(1995)96: 923-930
- [58] 中村俊之 細胞工学 Vol.24 No.10 2005
- [59] Wang YJ, Shahrokh Z, Vemuri S, Eberlein G, Beylin I, and Busch M. 1996, Characterization, stability, and formulations of basic fibroblast growth factor: *Formulation, characterization and stability of protein drugs* eds. Pearlman R and Wang YJ (Plenum Press, New York) pp. 141-80.

## 【参考資料】

### 1. 細胞培養について

#### 1.1 ラット骨髄細胞の採取

##### 1.1.1 試薬の準備

#### 1) 細胞培養液の作り方

表 1.1. 細胞培養液の混合割合

試薬	添加量「mL」
$\alpha$ - MEM	44.5
FBS	5
Antibiotics (Penicillin-Streptomycin-AmphotericinB)	0.5

#### 2) 分化因子の準備

##### 2-1) $\beta$ -GP (Glycerol 2-phosphate Disodium Salt n-Hydrate)

販売元 Becton Dickinson and Company

表 1.2. 混合割合

試薬	添加量
$\beta$ -GP	1.53g
超純水	5mL

- ① 0.22 $\mu$ m のフィルターを通す。
- ② 3mL ごとに分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存する。

##### 2-2) Vit.C (L-AscorbicAcid phosphate Magnesium Salt n-Hydrate)

販売元 Becton Dickinson and Company

表 1.3. 混合割合

試薬	添加量
Vit.C	328mg
超純水	40mL

- ① 0.22 $\mu$ m のフィルターを通す。
- ② 3mL ごとに分注し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存する。

## 2-3) Dex (Dexamethasone)

販売元 Sigma-Aldrich Company

表 1.4. 混合割合

試薬	添加量
Dex	9.8mg
PBS(－)	5mL
エタノール	5mL

- ① 0.5mL①を 12mL の PBS(－)で希釈し、0.22 $\mu$ m のフィルターを通す。
- ② 30 $\mu$ L③を 3mL の  $\alpha$  - MEM と混合し、－20℃で保存する。

### 1.1.2 材料の準備

- ① Fischer344 雄 7 週令 2 匹
- ② 麻酔剤
- ③ バリカン
- ④ 解体セット (ピンセット、メス、はさみ)
- ⑤ 70%エタノール
- ⑥ キムワイプ
- ⑦ 培地入りコニカルチューブ
- ⑧ 培地 (MEM+10%FBS+Antibiotics)
- ⑨ 10mL 用ピペット
- ⑩ 21G 注射針 2 本
- ⑪ 30mL シリンジ 2 本
- ⑫ 50mL コニカルチューブ 2 本
- ⑬ T-75 フラスコ 2 個

### 1.1.3 操作手順

・クリーンベンチ内操作

- ① 15mL コニカルチューブに 7mL 培地を入れる。(大腿骨 1 本つき、チューブ 1 本が必要のため、本実験ではあらかじめ 4 本準備した。)

・動物実験室内操作

- ② ラットを麻酔剤で安楽死する。  
(目の色は赤から透明になる、②心臓の動きが止まる。)
- ③ 両下肢体毛をバリカンで刈り取る。
- ④ ラットを水(水道水可)で洗い、70%エタノールで拭く。
- ⑤ 両大腿骨を取り出し、15mL コニカルチューブに 1 本ずつ入れる。

・クリーンベンチ内操作

- ⑥ 50mL コニカルチューブに 30mL の培地を入れる。
- ⑦ 30mL 注射器に 21G の針を付け、15mL 培地を吸って、50mL コニカルチューブに立てておく。
- ⑧ 大腿骨を吸い上げて 35mm ディッシュに 1 本取り出し、メスで付着する軟部組織を取り除く。(軟骨部組織にきちんと取り除くこと)
- ⑨ 両骨幹端部をはさみで切離する。
- ⑩ 骨髓を洗い流す。
- ⑪ 同様にしてもう 1 本の大腿骨より骨髓細胞を採取する。
- ⑫ 50mL コニカルチューブ内で 10mL 電子ピペットにて 9 往復サスペンドする。  
(骨髓の塊をできるだけ粉砕すること)
- ⑬ 約 15mL ずつ、T-75 フラスコに分注する。  
(フラスコに日期、細胞種、作成者を記入する。)
- ⑭ 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れる。

#### 1.2.4 MSCs 継代法

- ① 細胞培養液、0.25%トリプシン/EDTA 溶液を浴場で 37°Cに温める。
- ② Dex、Vit.C、 $\beta$ -GP 自然解凍する。
- ③ T-75 フラスコ中の培養液を真空ポンプに繋いだバスツールピペットで吸い出す。
- ④ 細胞を電子ピペットで 10 mL の PBS(-)で緩やかに洗浄する。
- ⑤ PBS(-)を真空ポンプに繋いだバスツールピペットで吸い出す。
- ⑥ 6mL の 0.25%トリプシン/EDTA 溶液をフラスコに加える。  
(フラスコを左右に傾きながら、フラスコの底に 0.25%トリプシン/EDTA を馴染ませる。)
- ⑦ 0.25%トリプシン/EDTA を吸い取り再び 5、6 滴を戻す。
- ⑧ 細胞が剥がれるまでフラスコをクリーンベンチ内で静置し、3 分間待つ。  
(フラスコの横を手で叩いた後、顕微鏡で MSCs 浮遊様子を確認する。)
- ⑨ トリプシンを失活させるため 10mL の細胞培養液を添加し、細胞培養液でフラスコの底面を優しく洗い流し、MSCs を 50mL コニカルチューブに回収する。
- ⑩ 100  $\mu$ L の細胞懸濁液をテストチューブに分取する。
- ⑪ 100  $\mu$ L の 0.03%トリパンブルー溶液をテストチューブに加えピペッティングする。
- ⑫ マイクロアッセイ法⑨の細胞懸濁液を血球計算盤に注ぐ。
- ⑬ 顕微鏡下で細胞数をカウントし、細胞密度を算出する。

表 1.5. rMSCs の濃度

	細胞数/ well・mL	培養プレート	試薬 「mL」	添加因子
接着実験	$4 \times 10^5$ cells	12wellplate	$\alpha$ -MEM : 49.5 抗生剤 : 0.5	なし
分化実験	$5 \times 10^5$ cells	24wellplate	$\alpha$ MEM、ウシア ルブミン、抗生 剤	デキサメタゾ ン、 $\beta$ -グリセ ロリン酸、ビタ ミン C

#### 1.4.2.3 細胞初期接着面積蛍光染色法 (Live/Dead 染色法)

販売元 Invitrogen

- ① 15mL コニカルチューブに 20 $\mu$ L の Calcein AM と 80 $\mu$ L の PBS(−)を混合する。
- ② 新 15mL コニカルチューブに 20 $\mu$ L の①を取り出し、1560 $\mu$ L の PBS(−)と混合する。
- ③ 20 $\mu$ L の EthD-1 を取り出し、②と混合する。

\*1000 $\mu$ L の細胞懸濁液に 100 $\mu$ L の染色液を添加する。

##### 1.4.2.3.1 image-pro による細胞面積の測定法

販売元 株式会社日本ローパー

- ①スケールの設定
- ②画像の鮮明化
- ③細胞初期接着面積の数字化

#### 1.4.2.4 細胞骨格染色法 (Rhodamine phalloidin)

販売元 Invitrogen Co.

##### 1.4.2.4.1 試薬の準備

- 1) 2% アルデヒトの作製(グルタルアルデヒド溶液)

販売元 和光製薬

表 1.6. 混合割合

試薬	添加量
グルタルアルデヒド	1mL
PBS(−)	49mL

2) 0.1% Triton X-100

販売元 SIGMA-ALDRICH Co.

表 1.7. 混合割合

試薬	添加量
Triton X-100	50 $\mu$ L
PBS(－)	50mL

\* 図 6 のように、100 $\mu$ L チップの先端を切って、使用する。

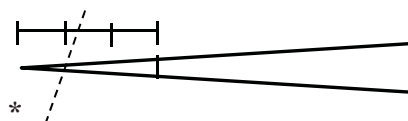


図 6. チップの切断位置図

3) 1%BSA 溶液

販売元 GIBCO Invitrogen Co.

表 1.8. 混合割合

試薬	添加量
BSA	0.5g
PBS(－)	50mL

4) 染色液

表 1.9. 混合割合

試薬	添加量
ロウダミン	375 $\mu$ L
1%BSA	15mL

1.4.2.4.2 操作手順

- ① 細胞培地を吸い出す。
- ② 37℃ 1mL/well の PBS(－)で細胞を洗浄し、吸い出す。(2 回)
- ③ 1mL/well の 2%アルデヒドで 10min 静置し、吸い出す。
- ④ 1mL/well の PBS(－)で細胞を洗浄し、吸い出す。(2 回)
- ⑤ 1mL/well の 0.1% Triton X-100 で 5min 程度浸漬し、吸い出す。
- ⑥ 1mL/well の PBS(－)で細胞を洗浄し、吸い出す。(2 回)
- ⑦ 1mL/well の 1%BSA 液で 30min 程度浸漬する。
- ⑧ 1mL/well の細胞骨格染色液を添加し、30min 程度浸漬し、吸い出す。
- ⑨ 1mL/well の PBS(－)で 2 回以上細胞を洗浄し、吸い出す。
- ⑩ 蛍光顕微鏡による細胞骨格を観察する。

#### 1.4.2.5 オステオカルシンの測定

##### 1.4.2.5.1 試薬の準備

###### 1) 洗浄液の調整

表 1.10. 混合割合

試薬	添加量
洗浄液	50mL
精製水	450mL

###### 2) 検体の準備 (段階希釈)

- ① 15 $\mu$ L 検体(上澄み培地)に 135 $\mu$ L 希釈用液と混合する。(10 倍希釈)
- ② ①の検体を 15 $\mu$ L 取り出し、135 $\mu$ L 希釈用液と混合する。(100 倍希釈)

###### 3) 標準溶液の調製

- ① 標準試薬に 500 $\mu$ L 精製水を添加し、15min 静置する。(標準溶液とする。)

表 1.11. 検量線

パターン	濃度「ng/mL」	添加試薬	添加量「 $\mu$ L」	希釈用液量「 $\mu$ L」
A	67.5	標準溶液	100	100
B	33.8	A	100	100
C	13.5	B	80	120
D	6.8	C	100	100
E	3.4	D	100	100
F	1.7	E	100	100
G	0	なし	0	100

###### 4) 希釈用マイクロプレート

- ① 希釈用マイクロプレートの各ウェルに 135 $\mu$ L の希釈用液を添加する。
- ② 標準溶液(A~G)及び検体を 15 $\mu$ L ずつ希釈用マイクロプレートに添加する。
- ③ 30s 攪拌する。

##### 1.4.2.5.2 操作手順

- ① 保存液を吸い取る。
- ② 抗体結合ウェルをペーパータオルで包み、逆さにして、叩きながら、余分な水分を吸い取る。(ペーパータオルに水が見えなくなるまで、抗体結合ウェルを叩く。)
- ③ 抗体結合ウェルの各ウェルに 100 $\mu$ L の希釈用液を添加する。
- ④ 希釈用マイクロプレートの溶液を 25 $\mu$ L ずつ添加する。

- ⑤ 30s 攪拌する。
- ⑥ アルミホイルでプレートを包み、60min 静置する。
- ⑦ 反応液を除去する。
- ⑧ 300 $\mu$ L の洗浄液を加えて、除去する。同じ洗浄操作を 3 回行う。
- ⑨ 抗体結合ウェルをペーパータオルで包み、逆さにして、叩きながら、余分な水分を吸い取る。(ペーパータオルに水が見えなくなるまで、抗体結合ウェルを叩く。)
- ⑩ 100 $\mu$ L の標識抗体を加える。
- ⑪ 30s 攪拌する。
- ⑫ アルミホイルでプレートを包み、60min 静置する。
- ⑬ 反応液を除去する。
- ⑭ 300 $\mu$ L の洗浄液を加えて、除去する。同じ洗浄操作を 3 回行う。
- ⑮ 抗体結合ウェルをペーパータオルで包み、逆さにして、叩きながら、余分な水分を吸い取る。
- ⑯ 100 $\mu$ L の基質液を加える。
- ⑰ アルミホイルでプレートを包み、30min 静置する。
- ⑱ 100 $\mu$ L の反応停止液を加える。
- ⑲ 30s 攪拌して、450nm の吸光度を測定する。

#### 1.4.2.6 DNA 測定方法(Quant-iT™ Pico Green® ds DNA Reagent)

##### 1.4.2.6.1 試薬の準備

各試薬は室温に戻す。

##### 1) 0.1%Triton

表 1.12. 混合割合

試薬	添加量
TritonX-100	50μL
PBS(－)	50mL

##### 2) 1 X TE バッファー

表 1.13. 混合割合

試薬	添加量
20X TE	1mL
滅菌水	19mL

##### 3) 検量線用試薬の準備

##### 3-1) High-range

表 1.14. 混合割合

試薬	添加量
Lambda DNA standard	30μL
1 XTE	1.47mL

##### 3-2) Low-range

表 1.15. 混合割合

試薬	添加量
High-range 液	30μL
1 XTE	1.17mL

##### 4) 測定キットの準備

表 1.16. 混合割合

試薬	添加量
Quant-iT™ Pico Green® ds DNA Reagent	100μL
1 XTE	19.9mL

## 5) 検量線の作製

- ① 標準試薬に 500 $\mu$ L 精製水を添加し、15min 静置する。(標準溶液とする。)

表②. 検量線

TE バッファー 添加量「 $\mu$ L」	2 $\mu$ g/mL DNA stock 添加量「 $\mu$ L」	希釈 Quant-iT™ Pico Green®ds DNA Reagent 添加量「 $\mu$ L」	Final DNA Concentration in Quant-iT™ Pico Green Assay
0	500	500	1 $\mu$ g/mL
250	250	500	500ng/mL
450	50	500	100ng/mL
495	5	500	10ng/mL
500	0	500	blank

### 1.4.2.6.2 操作手順

- ① 細胞培地をパスツールピペットで除去する。
- ② 1 mL/well の PBS(−)で各培養サンプルを洗浄し、5min 程度静置する。(同じ操作 2 回行う。)
- ③ 0.1%Triton 溶液を 1mL ずつ添加し、細胞破壊することを顕微鏡で確認する。
- ④ 500 $\mu$ L の③の試料を取り出し、MPC チューブに入れる。
- ⑤ 500 $\mu$ L の④の DNA 抽出液に希釈 Quant-iT™ Pico Green®ds DNA Reagent を添加する。
- ⑥ アルミホイルで試料を遮光し、室温で 5min 程度静置する
- ⑦ 各サンプルから 200 $\mu$ L を取り出し、96 ウェルプレートに入れる。
- ⑧ 520nm の吸光度を測定する。

## 2.非吸収性 $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスク上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関

### 2.1 材料の作製

#### 2.1.1 バインダーの調整

##### 2.1.1.1 使用する試薬

- ①ポリエチレングリコール(PEG)

販売元 関東科学(株)、#4000

- ②ポリビニルアルコール(PVA)

販売元 酢ビ・ポバール(株)、JP-05

#### 2.1.1.2 使用する器具、装置

- ① 薬さじ
- ② ガラスビーカー
- ③ ホットスターラー
- ④ 攪拌子
- ⑤ 棒温度計(100℃以上が測れるもの)
- ⑥ 自動天秤
- ⑦ プラスチック容器(保存用)

#### 2.1.1.3 実験手順

- ① ガラスビーカーに 400mL の超純水を注ぎ、ホットスターラーで 80℃に加熱する。蒸発を防ぐため、上部はラップフィルムで覆う。
- ② 12g の PVA を秤量し、温めた超純水に添加する。一気に加えると PVA が塊になって溶けにくくなる。
- ③ PVA が完全に溶解するまで攪拌し続ける。
- ④ 4g の PEG を秤量し、③の PVA 溶液に添加する。
- ⑤ PEG が完全に溶解するまで攪拌し続ける。これをバインダー溶液とする。
- ⑥ 適当な容器に移し替えて保存する。

### 2.1.2 β-TCP 含有アパタイトディスクの作製方法

造粒とは HAP 粉末をバインダーでコーティングする作業である。これによって、圧粉による粉分の成型がしやすくなる。

#### 2.1.2.1 使用する試薬

##### ①HAP 粉末

販売元 ADVANCE 製

850℃、1 時間仮焼、75μm

##### ②β-TCP 粉末

販売元 ADVANCE 製

##### ③バインダー

#### 2.1.2.2 使用する器具、装置

- ① 薬さじ
- ② 大容量プラスチック容器
- ③ 乾燥機
- ④ 篩(網の目 : 150μm = 100 mesh 、 75μm = 200 mesh)
- ⑤ アルミナ乳鉢
- ⑥ 自動天秤(210g まで計量可能なもの)

#### 2.1.2.3 実験手順

- ① 200g の HAP 粉末(ADVANCE 製)を大容量プラスチック容器に量り取る。
- ② 200g のバインダー溶液を注ぎ入れる。
- ③ HAP 粉末とバインダー溶液を薬匙で均一になるまで混ぜる。
- ④ 混合物を 50℃の乾燥機で 1 d 以上乾燥させる。
- ⑤ 乾燥した混合物をアルミナ乳鉢で粉砕する。
- ⑥ 粉砕物を篩う。
- ⑦ 50g の  $\beta$ -TCP 粉末(ADVANCE 製)を大容量プラスチック容器に量り取る。
- ⑧ 50g のバインダー溶液を注ぎ入れる。
- ⑨ ③、④、⑤、⑥と同じ作業を繰り返す。
- ⑩ ビニール袋に 45g の HAP 混合物及び 5g の  $\beta$ -TCP 混合物を入れ、5 分程度かき混ぜる。(10%  $\beta$ -TCP 含有アパタイト造粒粉とする。)
- ⑪ ビニール袋に 40g の HAP 混合物及び 10g の  $\beta$ -TCP 混合物を入れ、5 分程度かき混ぜる。(20%  $\beta$ -TCP 含有アパタイト造粒粉とする。)
- ⑫ ビニール袋に 35g の HAP 混合物及び 15g の  $\beta$ -TCP 混合物を入れ、5 分程度かき混ぜる。(30%  $\beta$ -TCP 含有アパタイト造粒粉とする。)
- ⑬ それぞれ作製した混合物はサンプル袋に保存する。サンプル袋には組成と Lot.No.、調整年月日を記入しておく。
- ⑭ アルミナ乳鉢、乳棒、篩は適当な濃度のクエン酸水溶液中に数十分~1d 浸漬し、超純水ですすいで、乾燥機で乾燥させる。
- ⑮ 飛散した試料は掃除機で吸い取る。

#### 2.1.2.4 秤量

造粒粉を、 $\beta$ -TCP 含有 HAP ディスク作製に都合がよい分量だけ小分けにする操作である。

#### 2.1.2.5 使用する試薬

- ①アパタイト造粒粉
- ②10%  $\beta$ -TCP 含有アパタイト造粒粉
- ③20%  $\beta$ -TCP 含有アパタイト造粒粉
- ④30%  $\beta$ -TCP 含有アパタイト造粒粉

##### 2.1.2.5.1 使用する器具、装置

- ① 薬さじ
- ② 薬包紙
- ③ 自動天秤
- ④ スパチュラ
- ⑤  $\phi$  16 用金型
- ⑥ 油圧式 ハンドプレス
- ⑦ ストップウォッチ

- ⑧ 蓋付きシャーレ
- ⑨ キムワイプ
- ⑩ ケイドライ
- ⑪ ワセリン

#### 2.1.2.5.2 実験手順

- ① 折り目をつけた薬包紙を自動天秤に載せ、表示加重をリセットする。
- ② 造粒粉を 390mg 量り取る。
- ③ 薬包紙を畳む。
- ④ 造粒粉を包んだ薬包紙を適当な容器に保存する。
- ⑤ 図 1 のように、金型の底の部品と側面の部品を組み合わせる。

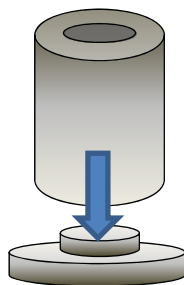


図 1. 金型のセッティングその①

- ⑥ 穴に造粒粉を入れ、スパチュラで造粒粉を平らにならし、円盤状の金属片をいれ、金属棒などで軽く押す。
- ⑦ ⑥の操作を繰り返す。

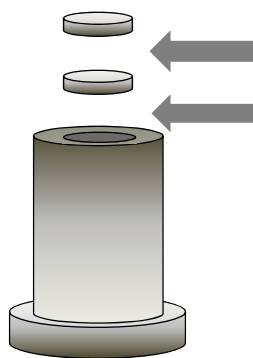


図 2. 金型のセッティングその②

- ⑧ 0.6 t で 1.5min の予備加圧を行う。
- ⑨ 1.2 t で 3min の本加圧を行う。

- ⑩ 加圧が終わったら徐々にプレス圧を抜く。
- ⑪ 成型器を裏返して、底になっていた金具を取り除く。
- ⑫ 裏返した状態のまま、圧粉体取り出し用金具を載せる。
- ⑬ 圧粉体取り出し用金型を、プレス器を用いて押し込み、圧粉体を取り出す。
- ⑭ 圧粉体は壊れやすいので、焼成するまでケイドライやキムワイプで包んで蓋付きシャーレなどに入れておく。

### 3. 異なる微細構造を有するアパタイトディスク上における MSCs 初期接着挙動及び細胞分化能の相関

非吸収性  $\beta$ -TCP 含有アパタイトディスクの作製方法を参照する。

### 4. 種々のアパタイト層で表面修飾したチタン合金上における細胞初期接着挙動及び細胞分化能の相関

#### 4.1 実験材料

##### 4.1.1 材料の準備

##### 4.1.1.1 Ti 板処理

##### <Ti 板切り出し>

- ① 切削溶液を準備しておく。スーパーノヴァ下の引き出しに 8 分目の水をいれ、切削剤を 50 倍希釈する。
- ② Ti 板(Nilaco、100 mm×200 mm×1 mm、TI453512)をアクリル板(100 mm×200 mm×5 mm)に両面テープで固定する。両面テープにはカーペット接着用のものでクッション材を含まないものが適している。
- ③ Ti 板表面に、ブレードの厚さ(1.2 mm)を考慮しながら切り出しの目印となる線を描いておく。ブレードと試料との相対位置はスーパーノヴァ本体にもデジタル表示されるため必然性はないが、描いておくとう便利。
- ④ ③をセラミック板に両面テープで貼り付ける。アクリル板自体はスーパーノヴァの試料取り付け台に直接セットできないため行う。
- ⑤ 板をセットする。取り付け台全面のネジを六角レンチで緩め、セラミック板を Ti 板ごと置いて六角レンチで留める。
- ⑥ ブレードの位置を決めるためステージを x、y、z それぞれの方向に対して調節する。Y 方向のみデジタル表示がなされる。
- ⑦ 本体電源を投入する。
- ⑧ ブレードの回転を始め、その後に切削溶液の吐出を開始する。
- ⑨ 自動送りレバーを Auto 側に動かしたら自動送りを開始する。切削溶液がブレードに当たっていないと火花が散るので注意。

#### <洗浄>

- ① Ti 板についた切削溶液やきりこを良く拭しておく。アクリル板に取り付けてあった方が扱いは楽と思われる。
- ② アクリル板から Ti 板を取り外す。
- ③ 十分量のアセトンに浸漬し、15 分間超音波洗浄を行う。
- ④ アセトンから Ti 板を取り出し、エタノールに浸漬して再度 15 分間超音波洗浄を行う。
- ⑤ エタノールから Ti 板を取り出し、超純水に浸漬して再度 15 分間超音波洗浄を行う。
- ⑥ 超純水から Ti 板を取り出し、40℃の乾燥機で 12～24 時間かけて乾燥させる。

#### <研磨>

- ① 平らな場所に #400 の SiC 耐水研磨紙を敷く。
- ② 指で押さえながら鉛直下方に力が均等に加わるようにして Ti 板を耐水研磨紙上で動かし、一方の底面を約 1 分間研磨する。
- ③ 研磨が終了したら超純水槽に浸して汚れがこびりつかないようにする。
- ④ 超純水槽から Ti 板を取り出し、アセトンに浸漬して 15 分間超音波洗浄を行う。
- ⑤ アセトンから Ti 板を取り出し、エタノールに浸漬して再度 15 分間超音波洗浄を行う。
- ⑥ エタノールから Ti 板を取り出し、超純水に浸漬して再度 15 分間超音波洗浄を行う。
- ⑦ 超純水から Ti 板を取り出し、40℃の乾燥機で 12～24 時間かけて乾燥させる。

#### 4.1.1.2 Ti 板酸化膜コーティング

##### <300℃・Ti の作製>

- ① Ti 板を 300℃で加熱処理し、酸化膜を作製する。

##### <H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>・Ti の作製>

オキシドール（3%過酸化水素）

販売元 日本薬局方

- ① 17.5mL のオキシドールをメジューム瓶に入れる。
- ② Ti 板にバツ印を付け、裏面とする。
- ③ Ti 板の表面を上向きに、①のメジューム瓶に入れる。
- ④ 被せる程度で③メジュームを締め、120℃、20min でオートクレーブ処理する。
- ⑤ 室温に戻してから、作製した Ti をメジューム瓶から取り出す。

#### 4.1.1.3 アパタイト層の作製

##### 4.1.1.3.1 過飽和リン酸カルシウム過飽和医療用輸液の調製

ボトルタイプの輸液、注射液の滅菌蓋付きボトルへの移し変え方法すべての操作はゴム手袋を着け、滅菌済みの器具を使用して行うこと。エンドトキシンフリーが望ましく、滅菌パックされたものが入手できる場合は、パックに封入されている新品を使用すること。吸引ろ過を行う過程があるので、吸引ポンプを準備すること。その際、コンタミネーションを防ぐため、ホースにはエアフィルタ (Millex-FG、SLFG05010 など、孔径: 0.22  $\mu\text{m}$ ) を噛ませること。

① 以下の液及び器具に 70%アルコールを吹きかけ、十分に滅菌した後にクリーンベンチ内に持ち込む。滅菌パックされている製品は、パック自体をアルコール滅菌して持ち込み、クリーンベンチ内で開封する。吸引ポンプの吸引ホースも、外表面をアルコール滅菌した後にクリーンベンチ内に挿入する。

#### <医療用輸液>

- ① Ringer's Solution (大塚製薬など) 500 mL
- ② Klinisalz B (アイロム製薬) 500 mL
- ③ 注射用蒸留水 ワッサー「フソー」-PL (扶桑薬品) 500 mL

#### 準備器具

- ① ステリカップ-GV (Millipore、SCGVU05RE、500 mL 用、孔径: 0.22  $\mu\text{m}$ )  
移し変える液の種類×1 個
- ② メスハンドル 1 本(注射用蒸留水には必要なし)
- ③ メス替え刃 2 枚(注射用蒸留水には必要なし)

#### 実験手順

- ① ステリカップ-GV の本体(ファンネル+レシーバ容器)を袋から取り出す。
- ② ステリカップ-GV の吸引口を吸引ポンプの吸引ホースに接続する。
- ③ Ringer's Solution あるいは Klinisalz B はボトルの開封予定部分を炎滅菌する。注射用蒸留水は袋から取り出し、開封可能箇所を炎滅菌する。



Klinisalz B



Ringer's solution



- ④ Ringer's Solution あるいは Klinisalz B は、刃先を炎滅菌したメスを用いて 開封する。注射用蒸留水は手で開封する。
- ⑤ ④のボトル内の液を 2)のステリカップのカップ部分に移す。

- ⑥ ポンプを作動させ、吸引ろ過を行う。
- ⑦ すべての液がレシーバ容器に溜まったら、ポンプを停止して吸引ホースを外す。
- ⑧ ファンネルとレシーバ容器のねじ部を炎滅菌して、ファンネルを緩める。
- ⑨ 蓋を袋から取り出し、炎滅菌する。
- ⑩ ファンネルと蓋を取り替える。
- ⑪ ボトルの口と蓋を炎滅菌した後、閉める。
- ⑫ ボトルの蓋と本体に内容物と移し変えた年月日を記す。
- ⑬ 室温(20～25 °C)で保存する。保存期限は 1 ヶ月とする。

#### <アンプルタイプの注射液の滅菌蓋付きボトルへの移し換え方法>

以下の液及び器具に 70%アルコールを吹きかけ、十分に滅菌した後にクリーンベンチ内に持ち込む。滅菌パックされている製品は、パック自体をアルコール滅菌して持ち込み、クリーンベンチ内で開封する。

#### <医療用輸液>

- ① Conclyte Ca (大塚製薬) 20 mL
- ② Conclyte 液 PK (大塚製薬) 20 mL

#### <実験器具>

- ① 50 mL コニカルチューブ 移し変える液の種類×1 本
- ② ステリフリップ-GP (Millipore、SCGP00525、孔径: 0.22 μm)  
移し変える液の種類×1 個
- ③ デジタルピペット (100～1000 μL が分取可能なもの) 1 台
- ④ 滅菌チップ (100～1000 μL 用、ラック入り) 1 箱

#### <実験手順>

- ① アンプルの開封部分を炎滅菌する。
- ② アンプルを開封する。
- ③ 50 mL コニカルチューブの蓋を炎滅菌して開ける。
- ④ ③のアンプルの内容液を、デジタルピペットを用いて 50 mL コニカルチューブに移し変える。
- ⑤ ステリフリップ-GP の本体(フィルタ+レシーバ容器)を袋から取り出す。
- ⑥ ⑤のコニカルチューブをステリフリップ-GP 本体に取り付ける。
- ⑦ ステリフリップ-GP の吸引口を吸引ポンプの吸引ホースに接続する。
- ⑧ ポンプを作動させ、吸引ろ過を行う。
- ⑨ すべての液がレシーバ容器に溜まったら、ポンプを停止して吸引ホースを外す。
- ⑩ フィルターとレシーバ容器のねじ部を炎滅菌して、フィルターを緩める。

- ⑪ 蓋を袋から取り出し、炎滅菌する。
- ⑫ フィルターと蓋を取り替える。
- ⑬ ステリフリップ本体の口と蓋を炎滅菌した後、閉める。
- ⑭ ボトルの蓋と本体に内容物と移し変えた年月日を記す。
- ⑮ 室温(20～25 °C)で保存する。保存期限は 1 ヶ月とする。

#### <×2.0 Ringer's の調製>

以下の液及び器具に 70%アルコールを吹きかけ、十分に滅菌した後にクリーンベンチ内に持ち込む。滅菌パックされている製品は、パック自体をアルコール滅菌して持ち込み、クリーンベンチ内で開封する。

#### <医療用輸液>

- ① Ringer's Solution 約 500 mL
- ② Concllyte Ca 約 20 mL

#### <実験器具>

- ① ストーレージボトル (Corning, 500 mL) 1 個
- ② 15 mL コニカルチューブ (Falcon) 1 本
- ③ マルチペットプラス (eppendorf) 1 台
- ④ コンビチッププラスバイオピュア (eppendorf, 10 mL あるいは 50 mL) 2 個
- ⑤ マルチペットプラス 50mL 用コネクタ 1 個
- ⑥ デジタルピペット (100～1000  $\mu$ L が分取可能なもの) 1 台
- ⑦ 滅菌チップ (100～1000  $\mu$ L 用、ラック入り) 1 箱

#### <実験手順>

- ① ストーレージボトルの蓋を炎滅菌して緩める。
- ② Ringer's Solution のボトルの蓋を炎滅菌して緩める。
- ③ 495 mL の Ringer's Solution を、マルチペットプラスを用いてストーレー ジボトルに注ぐ。
- ④ デジタルピペットを用いて 2.746 mL の Ringere's Solution を③のストーレージボトルに加える。
- ⑤ Ringer's Solution のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑥ Concllyte Ca のボトルの蓋を炎滅菌して緩める。
- ⑦ デジタルピペットを用いて 2.254 mL の concllyte Ca を⑥のストーレージボトルに加える。

- ⑧ **Conclyte Ca** のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑨ デジタルピペットのチップを新しいものに交換し、⑧のストレージボトル内の溶液を 30 秒間ピペッティングして均質化を行う。
- ⑩ ストレージボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑪ ストレージボトルの蓋と本体に内容物(**×2.0R**)と作成年月日を記す。
- ⑫ 室温(**20～25 °C**)で保存する。保存期限は 1 週間とし、それまでに使い切ることとする。

#### <×2.0 Klinisalz B の調製>

以下の液及び器具に **70%**アルコールを吹きかけ、十分に滅菌した後にクリーンベンチ内に持ち込む。滅菌パックされている製品は、パック自体をアルコール滅菌して持ち込み、クリーンベンチ内で開封する。

#### <医療用輸液>

- ① **Klinisalz B** 約 500 mL
- ② **Conclyte 液 PK** 約 20 mL

#### <実験器具>

- ① ストレージボトル (**Corning, 150 mL**) 1 個
- ② マルチペットプラス (**eppendorf**) 1 台
- ③ コンビチッププラスバイオピュア (**eppendorf, 10 mL**) 1 個
- ④ デジタルピペット (**100～1000 μL** が分取可能なもの) 1 台
- ⑤ 滅菌チップ (**100～1000 μL** 用、ラック入り) 1 箱

#### <実験手順>

- ① ストレージボトルの蓋を炎滅菌して緩める。
- ② **Klinisalz B** のボトルの蓋を炎滅菌して緩める。
- ③ **95 mL** の **Klinisalz B** を、マルチペットプラスを用いてストレージボトルに注ぐ。
- ④ デジタルピペットを用いて **2.959 mL** の **Klinisalz B** を③のストレージボトルに加える。
- ⑤ **Klinisalz B** のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑥ **Conclyte 液 PK** のボトルの蓋を炎滅菌して緩める。
- ⑦ デジタルピペットを用いて **2.041 mL** の **conclyte 液 PK** を⑥のストレージボトルに加える。
- ⑧ **Conclyte 液 PK** のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑨ ストレージボトルの蓋を炎滅菌して閉める。

- ⑩ ストローレジボトルの蓋と本体に内容物(×2.0K)と作成年月日を記す。
- ⑪ 室温(20～30 °C)で保存する。保存期限は 1 週間とし、それまでに使い切ることとする。

#### <医療用輸液>

①Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液(味の素ファルマ) 1 L 1 本

②テルモシリンジ (任意の容量) 1 本

③シリンジ針 1 本

#### <実験手順>

- ① Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液を、注射器を用いて必要量分取する。
- ② 50 mL コニカルチューブの蓋を緩めておく。
- ③ Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液を、コニカルチューブに移す。
- ④ コニカルチューブの蓋を閉める。
- ⑤ pH 値が 8.80 になるまで攪拌する。
- ⑥ ⑤の本体に内容物(Bifil、未滅菌)と分取年月日を記す。  
以降のすべての操作は Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液の滅菌操作なので、滅菌済みの器具を使用すること。エンドトキシンフリーが望ましく、滅菌パックされたものが入手できる場合は、パックに封入されている新品を使用すること。  
以下の液及び器具に 70%アルコールを吹きかけ、十分に滅菌した後にクリーンベンチ内に持ち込む。滅菌パックされている製品は、パック自体をアルコール滅菌して持ち込み、クリーンベンチ内で開封する。

- ・ 5)のコニカルチューブ
  - ・ 替えのコニカルチューブ 1 本
  - ・ テルモシリンジ (任意の容量) 1 本
  - ・ マイレクス GV (Millipore、孔径: 0.22 µm、ハウジングのサイズは任意)
- ⑦ ⑥のコニカルチューブの蓋を炎滅菌して緩める。
  - ⑧ 替えのコニカルチューブの蓋を炎滅菌して緩める。
  - ⑨ マイレクス GV を取り出し、テルモシリンジの先に装着する。
  - ⑩ テルモシリンジのピストン部を抜き取る。
  - ⑪ テルモシリンジの本体に 7)のコニカルチューブの内容物を移す
  - ⑫ ⑪の本体にピストンを装着する。ピストン装着と同時にろ過が始まるので注意
  - ⑬ ろ過滅菌した Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液を替えのコニカルチューブに受ける。

- ⑭ シリンジ内の液がすべてろ過されたら、替えのコニカルチューブの蓋と口を炎滅菌して閉じる。
- ⑮ ⑭のチューブ本体に内容物(Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液)と作成年月日を記す

<混合医療用輸液>

- ① 2.0R 約 200 mL
- ② ×2.0K 約 20 mL
- ③ Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液 約 20 mL

<実験器具>

- ① チューブラック 1 台
- ② マルチペットプラス (eppendorf) 1 台
- ③ コンビチッププラスバイオピュア (eppendorf、10 mL) 1 個
- ④ 各種の Ti 板
- ⑤ 15 mL コニカルチューブ
- ⑥ プラスチック製ピンセット 1 個
- ⑦ チャック付きポリ袋
- ⑧ サインペン(出来れば顔料系で、アルコールで簡単ににじまないもの)
- ⑨ デジタルピペット (100~1000  $\mu$ L が分取可能なもの) 1 台
- ⑩ 滅菌チップ (100~1000  $\mu$ L 用、ラック入り) 1 箱

<実験手順>

- ① すべての Ti、 $\text{H}_2\text{O}_2$ -Ti、 $300^\circ\text{C}$ -Ti の外側の滅菌パックを取り除く。
- ② チューブラックに 15 mL コニカルチューブを必要本数立てる。
- ③ ②のコニカルチューブ本体に試料名、試料番号等 Ti 板を特定できる情報を書き込む。
- ④ ③のすべてのコニカルチューブの蓋を炎滅菌して緩めておく。
- ⑤ ×2.0R のボトルの蓋を炎滅菌して緩めておく。
- ⑥ マルチペットプラスを用いて 30 秒間ピペッティングした後、×2.0R を 8.174 mL ずつ③の 15 mL コニカルチューブに注ぐ。
- ⑦ デジタルピペットを用い、×2.0R を 0.274 mL ずつ⑥のコニカルチューブに加える。
- ⑧ ×2.0R のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑨ ×2.0K のボトルの蓋を炎滅菌して緩めておく。
- ⑩ デジタルピペットを用い、×2.0K を 0.917 mL ずつ⑨のコニカルチューブに加える。
- ⑪ ×2.0K のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。

- ⑫ Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液のボトルの蓋を炎滅菌して緩めておく。
- ⑬ デジタルピペットを用い、Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液を 0.909 mL ずつ⑫のコニカルチューブに加える。
- ⑭ Bifil 専用炭酸水素ナトリウム補充液のボトルの蓋を炎滅菌して閉める。
- ⑮ 各種の Ti 板を 1 枚ずつ⑩の混合液中に浸漬する。
- ⑯ ⑮のすべてのコニカルチューブは炎滅菌して蓋を閉める。
- ⑰ ⑯のコニカルチューブの底をクリーンベンチの作業面に軽く 2~3 回叩きつけ、Ti スクリューに気泡が付着していないようにする。気泡が付着した部分にはアパタイト層が形成されないため。
- ⑱ 炎滅菌して蓋を開け、⑰のコニカルチューブの上に載せてチューブラックに立てる。
- ⑲ ⑯~⑱の作業がすべて終了したら、チューブラックごとチャック付きのポリ袋に入れる。
- ⑳ 37°C のインキュベータに入れて 48±0.5 時間静置する。

# 研究業績書

(2013 年 7 月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
筆頭論文 (査読有)	○ Correlation between cell attachment areas after 2 hours of culture and osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells on hydroxyapatite substrates with various surface <u>Kan Cheng</u> , Motohiro Hirose, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsushi Yamazaki, Atsuo Ito <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> 2012.
筆頭論文 (査読有)	○ Development of an early estimation method for predicting later osteogenic differentiation activity of rat mesenchymal stem cells cultured on biomaterials <u>Kan Cheng</u> , Motohiro Hirose, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsushi Yamazaki, Atsuo Ito <i>Science and Technology of Advanced Materials</i> 2012.
共 著 論 文 (査読有)	Effect of coprecipitation temperature on the properties and activity of fibroblast growth factor-2 apatite composite layer Xia Li, Xiupeng Wang, Ito Atsuo, Sogo Yu, <u>Kan Cheng</u> , Oyane Ayako <i>Materials Science and Engineering C</i> 2009, vol.29, 216-221
学会発表	室温 2 回法による陽極酸化チタンピン上への繊維芽細胞成長因子(FGF)-2/アパタイト複合層の形成 <u>程侃</u> 、山崎淳司、大矢根綾子、十河友、王秀鵬、伊藤敦夫 2008 年 3 月 日本セラミックス協会 2008 年年会
学会発表	FGF-2-アパタイト複合層の Ti ピン上への形成 <u>程侃</u> 、山崎淳司、大矢根綾子、十河友、王秀鵬、伊藤敦夫 2008 年 11 月 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008
学会発表	種々のアパタイト層で表面修飾したチタン上における細胞挙動の評価 <u>程侃</u> 、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2010 年 11 月 第 32 回 日本バイオマテリアル学会大会
学会発表	種々表面性状を有するアパタイトディスクを用いた間葉系幹細胞の骨分化評価 <u>程侃</u> 、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫 2011 年 3 月 第 10 回 日本再生医療学会総会

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
学会発表	<p>Correlation between osteoblastic differentiation activity and cell morphology of rat mesenchymal stem cells  <u>Kan Cheng</u>, Motohiro Hirose, Hirotaka Mutsuzaki, Xiupeng Wang, Yu Sogo, Atsushi Yamazaki, Atsuo Ito  2011 年 3 月 国際幹細胞学会</p>
学会発表	<p>微細表面性状を有するチタン/アパタイト層複合体を用いた間葉系幹細胞の骨分化評価  <u>程侃</u>、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫  2011 年 11 月 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会</p>
学会発表	<p>骨の再生医療に用いる生体材料の最適な表面性状の解明その①  <u>程侃</u>、廣瀬志弘、六崎裕高、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫  2012 年 1 月 つくば医工連携フォーラム 2012 「医工連携研究から社会還元・産業化へ」</p>
学会発表	<p>骨髄由来間葉系幹細胞における初期細胞接着形態と骨分化能の相関性及び作用機序の検討  小林悠太、廣瀬志弘、<u>程侃</u>、十河友、伊藤敦夫、山崎淳司  2012 年 10 月 第 64 回 日本生物工学会</p>
学会発表	<p>骨の再生医療に用いる生体材料の最適な表面性状の解明その②  <u>程侃</u>、廣瀬志弘、王秀鵬、十河友、山崎淳司、伊藤敦夫  2012 年 11 月 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム</p>