

# 学位論文

紫外線オゾン処理によるハイドロキシアパタイトの  
高機能ナノバイオ界面制御

学位申請者 保田 啓介

広島大学大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

応用生命科学部門 先端歯科補綴学

(主指導教員：津賀 一弘)

2016年

## 第1章 緒論

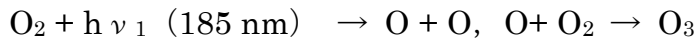
ハイドロキシアパタイト（以下、HAP）は骨補填用リン酸カルシウム系セラミック系バイオマテリアルとして知られ、優れた骨伝導性を示し、生体骨と化学的な結合を生じ、また、優れた材料強度および空間保持能を有することから、広く臨床応用されている。

しかしながら、生体界面における溶解度が低く、骨との結合に時間を要することが問題点として指摘されている。その理由として、界面における HAP の溶解度の低さ、および液相との平衡状態獲得の遅延が理由として挙げられている (Bertazzo *et al.*, 2010)。つまり、溶解度の高いセラミック系バイオマテリアルにおいては、骨形成が増強することが示されている (Ducheyne *et al.*, 1992, de Bruijn *et al.*, 1994)。

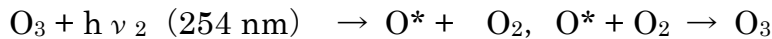
これまでに、リン酸溶液による HAP の生体活性化表面改質が、表面の溶解性を高め、骨芽細胞の接着、増殖を促進させることが報告されている (Abe *et al.*, 2013)。すなわち、リン酸カルシウムの溶解度を高めることで、生体活性を増強させることができる。生体内の pH 7.4 以下の環境において、HAP (Ca/P 比 : 1.67) , リン酸 3 カルシウム (Ca/P 比 : 1.50) , 第 2 リン酸カルシウム (Ca/P 比 : 1.00) の順に表面の溶解度は向上することから (Elliot, 2002) , リン酸溶液により処理することで、表面の Ca/P 比を低下させ、溶解度の高い生体活性化界面を HAP に付与できる。

一方、紫外線/オゾン処理（以下、UV/O<sub>3</sub> 処理）は、フォトレジストポリマーの解重合に応用 (Bolon *et al.*, 1972) されて以降、広く工業分野で用いられてきた。セラミック系マテリアルにおいては、界面において汚染除去効果を発揮するといわれている。短波長の UV (UV-C : 波長 185/254 nm) を照射する

ことにより、大気中の酸素よりオゾン (O<sub>3</sub>) や励起酸素原子 (O\*) を生成し、金属、高分子およびセラミックス材料に対して表面改質や汚染除去の作用を有する。波長 185 nm の UV は大気中の酸素に吸収され、以下の反応式によりオゾンが生成する。



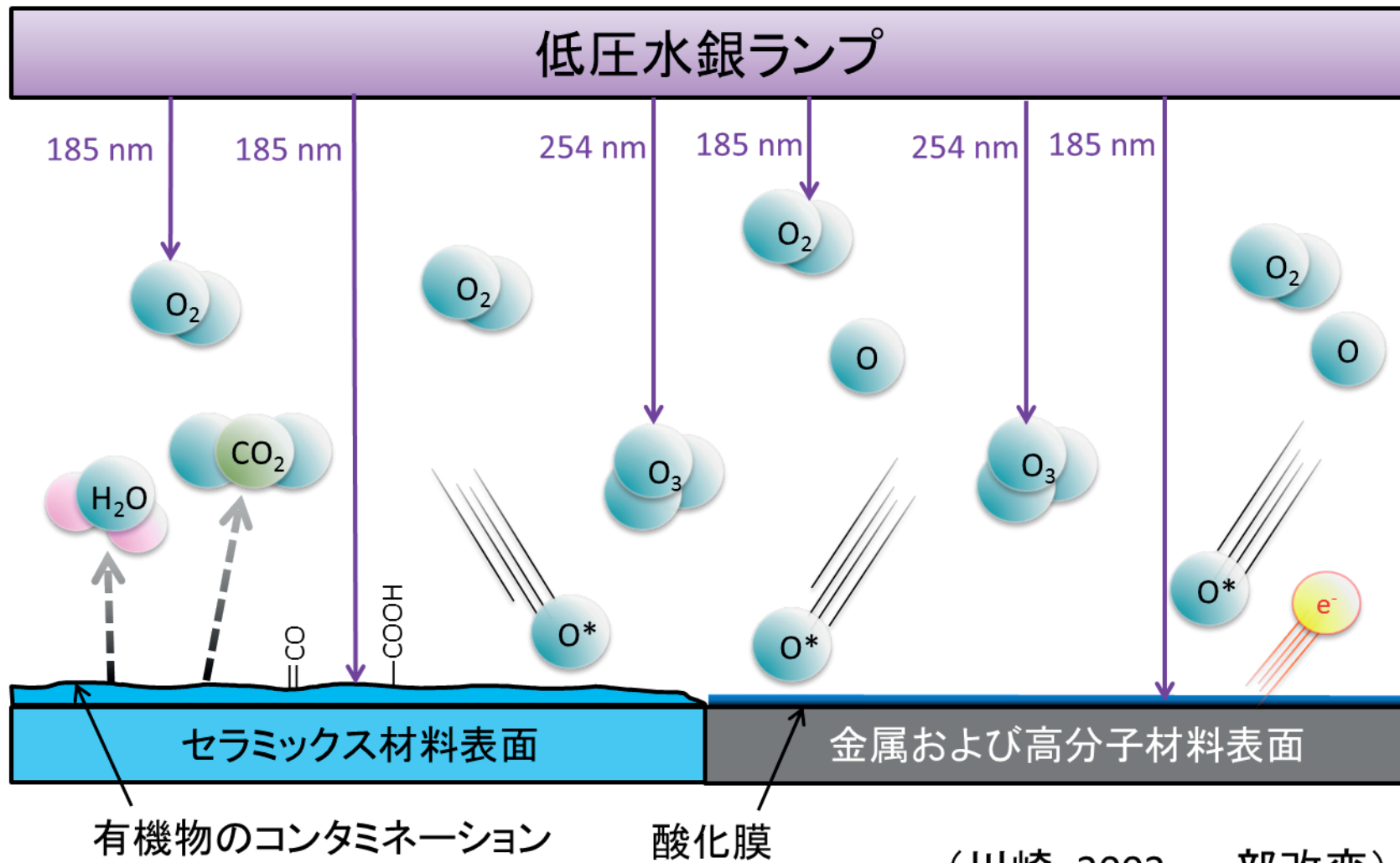
このオゾンは、波長 254 nm の UV を吸収することにより、以下の反応式で励起状態の原子状の酸素とオゾンを生成する (角田, 2004)。



セラミックス材料表面においては、表面の有機物コンタミネーションに  $h\nu_1$  の作用により分子切断が起こり、活性化され、励起酸素原子と反応することにより揮発し分解する。金属および高分子材料表面においては、 $h\nu_1$  の作用により原子から電子が励起放出されて空孔化が起こり、励起酸素原子と反応することにより酸化膜を形成する (図 1) (川崎, 2002)。分子レベルでの反応機序より、超音波洗浄では洗浄することのできない 50 -70 nm の量子ドット内のコンタミネーションを UV/O<sub>3</sub> 処理によりすべて除去できる (Helfrich *et al.*, 2011)。

UV/O<sub>3</sub> 処理の医工学分野への応用としては、酸化チタン表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことにより、表面の酸素原子の欠損部を作り出し、表面を両親触媒性とするという報告 (Wang *et al.*, 1997) をはじめ、チタンインプラント表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことにより、機械研磨表面および酸エッチング表面において、骨伝導能を増強するという報告 (Aita *et al.*, 2009) や、ジルコニアディスク表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで骨芽細胞の接着、増殖、石灰化を増強するという報告 (Att *et al.*, 2009) がなされている。しかしながら、HAP 表面を UV/O<sub>3</sub> 処理することについては、高温状態の HAP に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことでフリーラジカルを形成するという報告 (Nishikawa, 2003) があるのみで、HAP の生体活性

に係る界面でのメカニズムは未だ明らかではない。生体材料の界面をナノレベルで制御することにより骨関連細胞の生体活性が増強するとの報告 (Walmsley *et al.*, 2015) があることから、本研究の目的は、生体活性化表面改質 HAP における UV/O<sub>3</sub> 処理による高機能ナノバイオ界面制御の効果を明らかにすることとした。



(川崎, 2002; 一部改変)

図1 UV/O<sub>3</sub>処理の作用機序

## 第2章 未処理 HAP に対する UV/O<sub>3</sub> 処理の効果の検討

### 1) 緒言

バイオマテリアルとしての HAP に対して UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことは、チタン表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行った場合のように表面改質効果を発揮するのか、それとも他のセラミック表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行った場合のように表面汚染除去効果を発揮するのか未だ明らかではない。そこで本章では、医療用骨補填材料と同等の HAP を用い、未処理 HAP に対する UV/O<sub>3</sub> 処理の効果を検討することとした。

### 2) 材料ならびに方法

#### (1) 材料

HAP プレート (10 mm × 10 mm × 2 mm) (APP-100: Pentax, Tokyo, Japan) および UV/O<sub>3</sub> 処理装置 (ASM401N, Asumi, Tokyo, Japan) を用いた。

#### (2) 方法

各 HAP プレートを、処理時間 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 120 分として UV/O<sub>3</sub> 処理し、iHAP 試料を作製した。作製した試料に対し、以下の表面科学的分析を行った。

#### ①表面観察

走査型電子顕微鏡 (VE-8800, Keyence, Tokyo, Japan) を用い、高真空条件下、加速電圧 1.5 kV にて 1000 倍の画像を作成した。

## ②表面粗さ (Ra) 計測

共焦点レーザー走査型顕微鏡 (VK-8500, Keyence, Tokyo, Japan) を用い、画像上に関心領域  $100 \times 100 \mu\text{m}$  を設定し、1 部位につき 5 領域の表面粗さ (Ra) を計測した。

## ③表面元素分析

X 線光電子分光装置 (AXIS-HS, Kratos, Manchester, UK) を用い、Al-K  $\alpha$  単色化 X 線源で  $10^{-7}$  Pa 前後の超高真空化にて分析した。ワイドスキャンスペクトル 80 eV、ナロースキャンスペクトル 40 eV にて、各エネルギー分解能で測定し、測定元素は、Ca 2p, P 2p, O 1s, C 1s とし、C 1s ピークを 284.6 eV とし、各元素のピークを補正した。

## ④表面ぬれ性評価

接触角計 (Simage mini, Excimer, Kanagawa, Japan) を用い、超純水 3.6  $\mu\text{L}$  を滴下し、接触角測定モデルであるアーク・タンジェント  $1/2\theta$  法により水滴画像の座標解析から接触角度を算出した。

## ⑤統計学的分析

one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法を用い、有意水準 5%で行った。

## 3) 結果

### ①UV/O<sub>3</sub> 処理前後の SEM 像と表面粗さ (Ra)

最大時間である 120 分処理した試料および処理 0 分の SEM 像と表面粗さ (Ra) 計測結果を図 2 に示す。表面形状に変化はなく、表面粗さ (Ra) についても有意な変化は認められなかった。

#### ②UV/O<sub>3</sub> 処理による表面元素割合の変化

UV/O<sub>3</sub> 処理による表面元素割合と Ca/P 比の変化を表 1 に示す。Ca/P 比は 1.6 前後で変化は認められなかった。一方、処理 0 分では、コンタミネーション由来炭素 (C) 量は、 $30.6 \pm 2.3\%$  となったが、処理時間の増加とともに漸減し、処理 120 分においては、 $5.2 \pm 0.8\%$  まで低下を認めた (図 3)。測定元素における結合エネルギーに変化は見られず、C 1s のナローズキャンスペクトルにおいてグループシフト等も認められなかった。

#### ③UV/O<sub>3</sub> 処理による接触角の変化

処理 0 分および処理 5 分の水滴画像、UV/O<sub>3</sub> 処理による接触角の変化を図 4 に示す。処理 0 分においては、接触角は  $113.7 \pm 4.8$  度という疎水性を示していたが、処理 5 分において接触角は  $13.9 \pm 1.7$  度という親水性を示した。処理時間の増加とともに接触角は漸減し、処理 5 分で有意差がなくなった。

#### 4) 考察

SEM 像と表面粗さ (Ra) 計測結果より、UV/O<sub>3</sub> 処理は表面形状には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

また、表面元素分析結果より、各元素の結合エネルギーおよび Ca/P 比に変化は見られなかった。本研究で用いた XPS は、試料表面から数 nm 程度の表面分

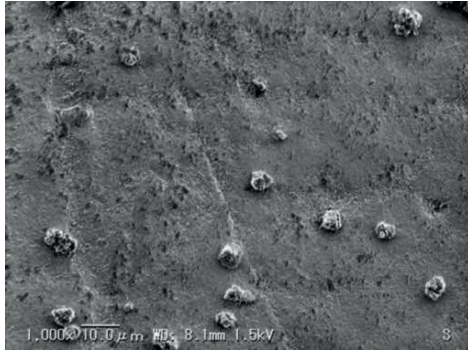


析が可能であり，検出限界は約 0.1 atom%程度と極めて高い精度を有する。それゆえ，UV/O<sub>3</sub>処理は，HAP の表面元素構成に影響を及ぼさず，表面改質効果は認めなかった。しかしながら，コンタミネーション由来 C 量の減少がみられ，処理 60 分では，5%前後まで低下が認められた。ここで示すコンタミネーションとは，切削油，皮脂，空气中暴露中に吸着した汚染，および真空蒸着した炭素の薄膜等の有機物を指す (Vig *et al.*, 1975)。iHAP 表面に沈着していたこれらの有機物のコンタミネーションが，オゾンおよび励起酸素原子により酸化，揮発除去され，表面における炭素量が減少したと考えられる。

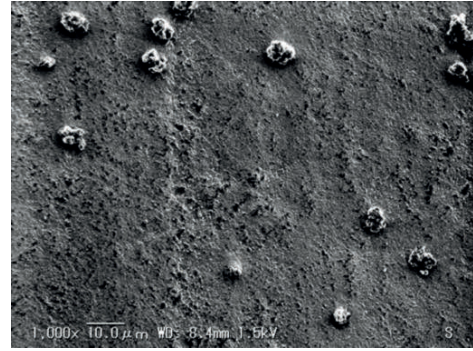
接触角においても UV/O<sub>3</sub>処理により，疎水性から親水性への転換がみられた。多くの有機物のコンタミネーションが親油性であり，疎水性を示すことから，これらが除去された結果，表面ぬれ性が向上し接触角が減少したと考えられる。

以上より，iHAP 表面に UV/O<sub>3</sub>処理を行うことで，表面のコンタミネーションを除去し，ぬれ性を向上させることが明らかとなった。

a



処理 0 分



処理 120 分

b

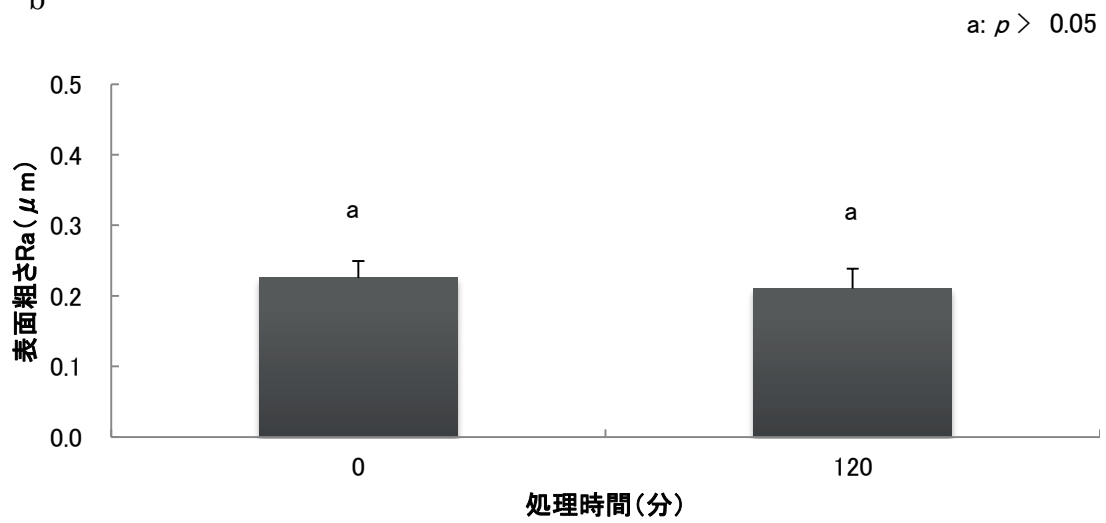


図 2 UV/O<sub>3</sub> 処理前後の SEM 像と表面粗さ (Ra)

- a) 処理前後の表面形状に大きな変化は認められなかった。
- b) 最大時間 120 分処理した iHAP においても、未処理のものと比較し有意な変化は認めなかった。

表 1 UV/O<sub>3</sub> 処理による表面元素割合と Ca/P 比

処理時間(分)	表面元素割合				Ca/P 比
	O	Ca	C	P	
0	39.57	17.37	30.63	11.20	1.55 <sup>a</sup>
1	48.38	18.57	21.21	11.71	1.59 <sup>a</sup>
2	48.94	17.49	22.30	11.27	1.55 <sup>a</sup>
3	52.05	17.37	19.46	11.16	1.56 <sup>a</sup>
4	54.45	18.39	15.68	11.48	1.60 <sup>a</sup>
5	53.17	19.73	14.45	13.54	1.58 <sup>a</sup>
10	56.88	21.46	8.12	13.54	1.63 <sup>a</sup>
30	55.26	22.03	9.19	13.52	1.63 <sup>a</sup>
60	58.28	21.78	6.31	13.65	1.60 <sup>a</sup>
120	59.17	21.86	5.24	13.73	1.59 <sup>a</sup>

a :  $p > 0.05$

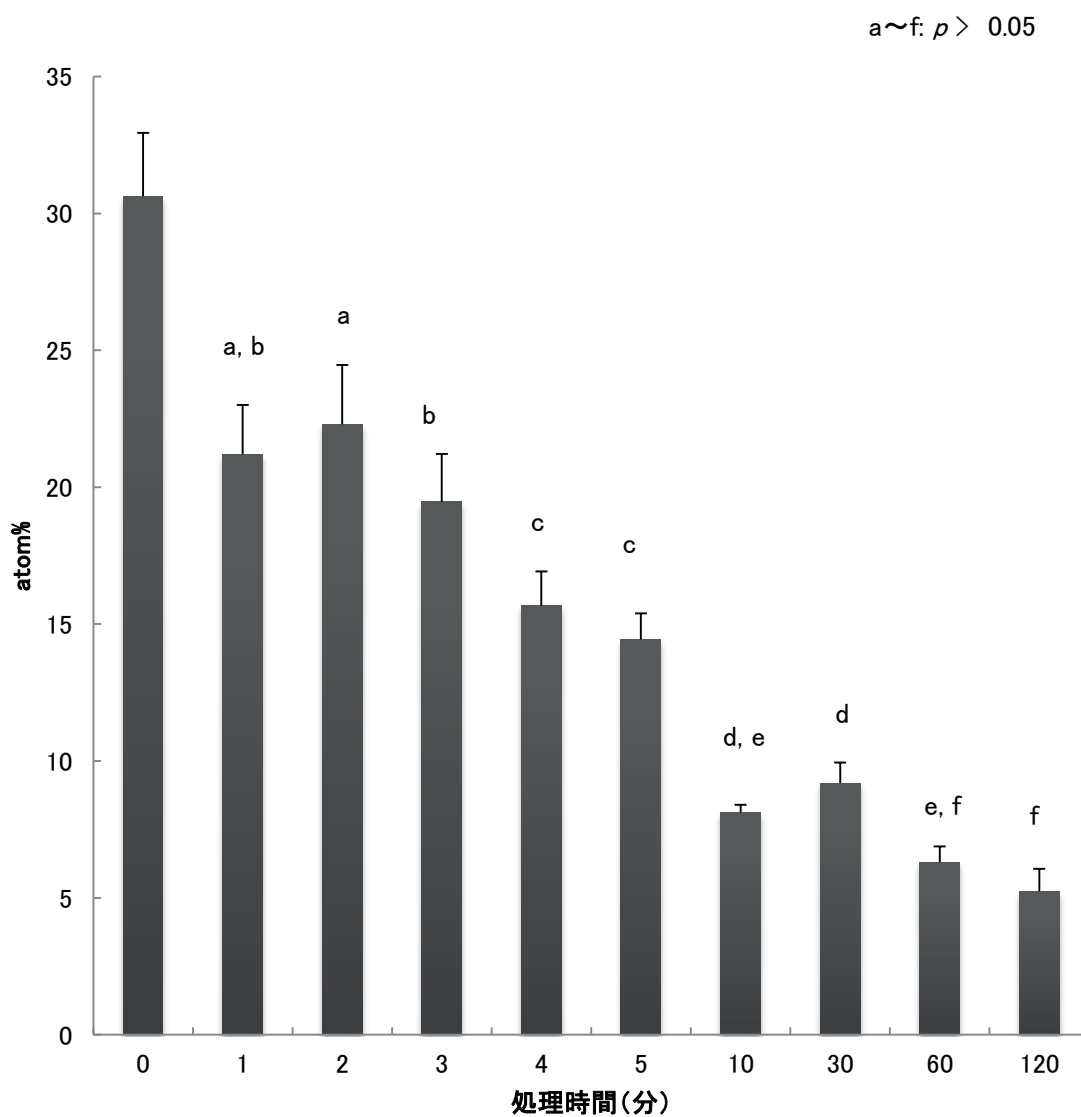
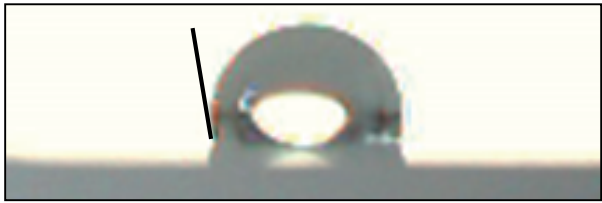


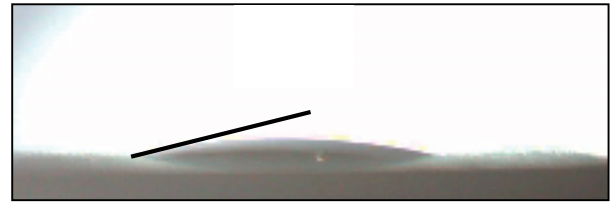
図3 UV/O<sub>3</sub>処理によるコンタミネーション由来炭素 (C) 量の変化

処理0分では、コンタミネーション由来C量は $30.6 \pm 2.3\%$ となったが、処理時間の増加とともに漸減し、処理120分においては、 $5.2 \pm 0.8\%$ まで低下を認めた。

a



処理 0 分



処理 120 分

b

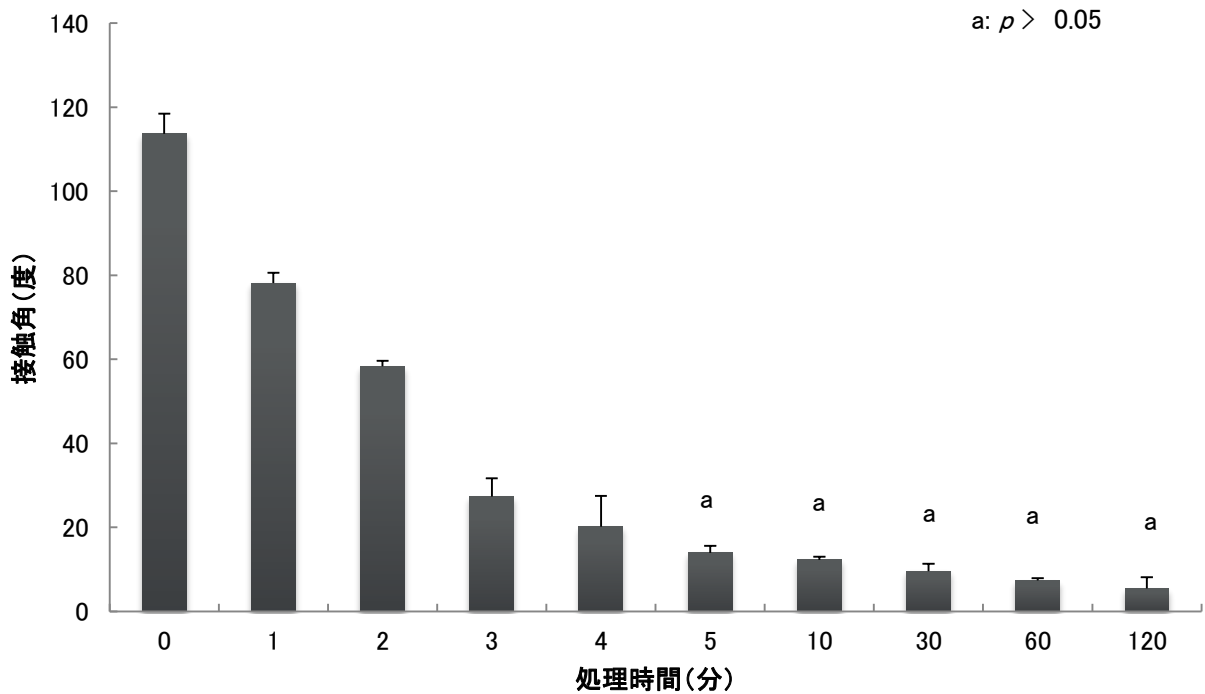


図 4 UV/O<sub>3</sub> 処理による接触角の変化

- a) 処理 0 分においては、接触角は  $113.7 \pm 4.8$  度という疎水性を示していたが、処理 5 分においては接触角は  $13.9 \pm 1.7$  度という親水性を示した。
- b) 処理時間の増加とともに接触角は漸減し、処理 5 分で有意差がなくなった。

### 第3章 生体活性化 HAP に対する UV/O<sub>3</sub> 処理の効果の検討

#### 1) 緒言

第2章より、バイオマテリアルとしての HAP に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、表面汚染除去効果を発揮し、ぬれ性を向上させることが明らかとなった。そこで本章では、リン酸溶液で処理することで Ca/P 比を変化させ、表面性状を変化させた生体活性化 HAP に対して UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで同様の効果が得られるのか、それとも異なった効果をもたらすのかを、表面科学的分析を行うことで明らかにすることとした。

#### 2) 材料ならびに方法

##### (1) 材料

第2章と同じ HAP プレートと UV/O<sub>3</sub> 処理装置を用いた。また、表面処理のための 30%リン酸溶液[H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>] (Lot No. T1949; Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan) を用意した。

##### (2) 方法

###### ①生体活性化 HAP 試料の作製

HAP 試料を 30%リン酸溶液に 10 分間浸漬したのち、超純水 (MilliQ water : >18 MΩcm) にて 3 回洗浄し、生体活性化 HAP (以下, HAP-30%PA) を作製した。この試料に UV/O<sub>3</sub> 処理装置にて処理時間を 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 30, 60, 120 分として処理を行い実験に使用した (以下, UV-処理時間 (分) -HAP)。

## ②表面科学的分析

第2章と同様に、表面観察、表面粗さ (Ra) 計測、表面元素分析、表面ぬれ性評価を行った。

## ③効果持続性分析

UV-5-HAP 表面における表面ぬれ性の経日的変化を評価した。24 well プレートに試料を設置し、蓋をした上で室温、暗所にて静置した。1, 3, 5, 7 日の静置期間ののち、接触角を評価した。

## ③統計学的分析

one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法を用い、有意水準 5%で行った。

## 3) 結果

### ①UV/O<sub>3</sub> 処理前後の SEM 像と表面粗さ (Ra)

UV-0-HAP および UV-120-HAP の SEM 像および表面粗さ (Ra) 計測結果を図 5 に示す。双方の表面 SEM 画像にリン酸処理によるピットが観察されたが、大きな変化は認められなかった。表面粗さ (Ra) は、iHAP (第2章) と比較すると増大していたが、有意な変化は認められなかった。

### ②UV/O<sub>3</sub> 処理による表面元素割合の変化

UV/O<sub>3</sub> 処理による表面元素割合の変化を表 2 に示す。Ca/P 比は 1.4 前後で変化を認めなかった。コンタミネーション由来 C 量は処理時間が短いちはやや

不安定な増減を示したが、処理時間の増加とともに漸減し、処理 5 分で 10 atom%以下となり安定した（図 6）。

### ③UV/O<sub>3</sub> 処理による接触角の変化

UV-0-HAP および UV-5-HAP における水滴画像、UV/O<sub>3</sub> 処理による接触角の変化を図 7 に示す。UV-0-HAP においても iHAP と比較し接触角の低下が認められ、 $57.7 \pm 1.6$  度と親水性を示した。しかしながら、UV-5-HAP においては、 $4.1 \pm 0.7$  度と水滴が材料表面に拡散している様子が確認され、超親水性を示した。接触角は、処理時間の増加とともに漸減し、処理 3 分以降で有意差がなくなったが、処理 5 分以降では、接触角が 5 度以下で安定した。

### ④UV-5-HAP の接触角の経時的変化

UV-5-HAP を UV/O<sub>3</sub> 処理後 7 日間静置したのちにおいても接触角は 1 ケタを維持し、有意な変化は認められなかった。静置 0 日においては、 $5.2 \pm 1.2$  度を示し、静置 7 日においても  $5.1 \pm 1.1$  度と変化は見られなかった（図 8）。

## 4) 考察

iHAP 表面にリン酸処理を行ったことで、表面粗さ (Ra) は iHAP と比較すると増加していたが、UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで変化は見られず、HAP-30%PA に対しても表面形状には変化を及ぼさなかった。

また、表面元素分析結果においても Ca/P 比は 1.4 前後で変化は見られず、結合エネルギーにおいても変化は見られなかった。コンタミネーション由来 C 量は、リン酸処理により表面がエッチングされたことで、iHAP との比較において



も、わずかに減少がみられたが、UV-0-HAP では依然 25 atom%程度であった。UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、UV-5-HAP 以後においては 10 atom%以下まで低下を示し、汚染除去効果が認められた。

表面ぬれ性評価において、UV-0-HAP の接触角は 60 度以下となりすでに親水性を示していた。これは、HAP-30%PA は、表面が Calcium deficient hydroxyapatite の様相を呈し、Ca/P が低下していると考えられ (Abe *et al.*, 2013) , 表面の極性が変化したことにより親水性と変化したと考えられる。さらに、HAP-30%PA は iHAP と比較し、表面粗さ (Ra) が増加していた。粗さを有する表面におけるぬれ性は、固体の表面エネルギーの寄与が大きくなり、親水性のものはより親水性に、疎水性のものはより疎水性になる (中島, 2009) ことから、親水性へと変化し表面粗さ (Ra) も増加したことから、ぬれ性が向上したと考えられる。

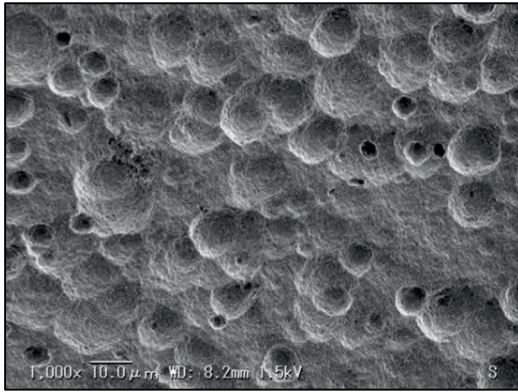
UV-5-HAP 以降においては、接触角が 5 度以下の超親水性を示し安定した。これは、親水性へと変化した HAP-30%PA 表面のコンタミネーションを除去したことでさらにぬれ性が向上し、超親水性表面へと転換したと考えられる。

また、UV-5-HAP は 7 日間超親水性表面を維持していた。UV 照射したジルコニアディスクの接触角は大気中に保管した場合は増加を示すが、液体中に保管した場合は維持されるという報告があるが (Noro *et al.*, 2012) , 本研究においては大気中の保存にもかかわらず維持されていた。これは、保管方法が蓋をされた 24well プレートであったことから、大気中からの汚染を最小限に抑えることができたためと考えられる。すなわち、UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことにより汚染除去した表面は、ある程度密封された環境であれば大気中に静置したとしても再汚染されにくいということが明らかとなった。

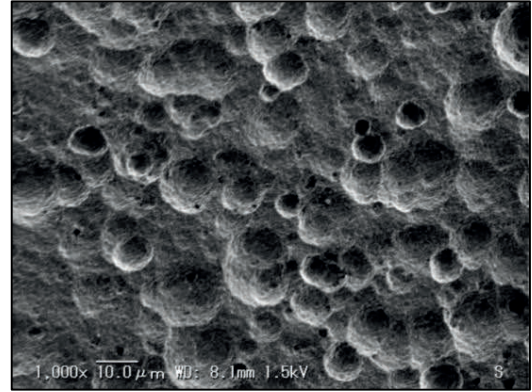
以上より、HAP-30%PA 表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、iHAP と同様に表

面性状を変化させることなくぬれ性が向上し、処理 5 分で超親水性表面を付与することができ、その効果は 7 日間持続することが明らかとなった。つまり、必要十分な至適処理時間は 5 分であることが示唆された。

a



UV-0-HAP



UV-120-HAP

b

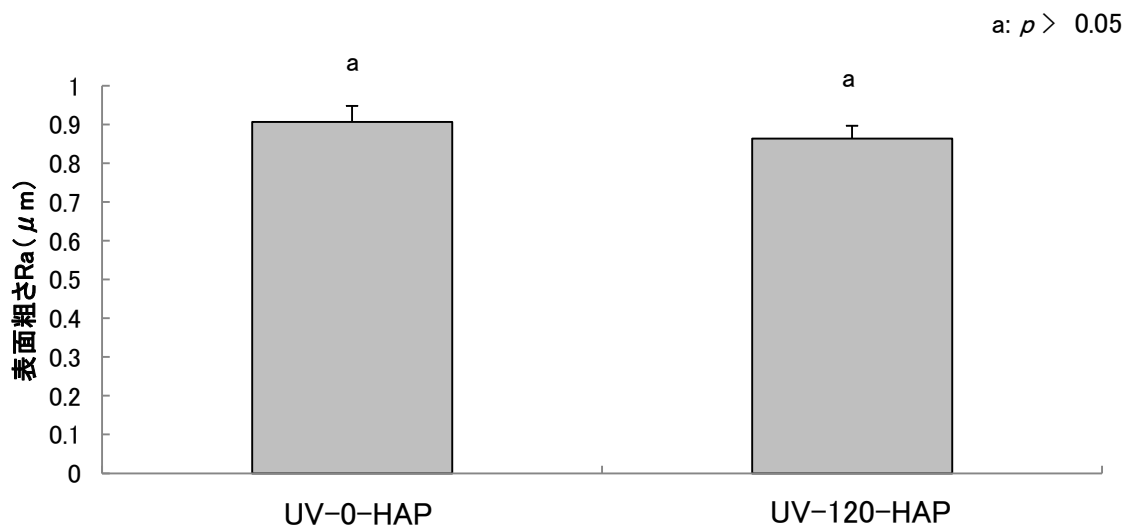


図5 UV/O<sub>3</sub>処理前後のSEM像と表面粗さ (Ra)

a) 双方の表面SEM画像にリン酸処理によるピットが観察されたが、大きな変化は認められなかった。

b) 表面粗さ (Ra) は、iHAPと比較すると増大していたが、有意な変化は認められなかった。

表2 UV/O<sub>3</sub>処理による表面元素割合と Ca/P 比

処理時間(分)	表面元素割合				Ca/P 比
	O	C	Ca	P	
0	46.62	24.83	16.62	11.94	1.39 <sup>a</sup>
1	50.71	18.59	18.05	12.65	1.43 <sup>a</sup>
2	48.93	24.65	15.26	11.16	1.37 <sup>a</sup>
3	54.79	12.46	18.96	13.79	1.37 <sup>a</sup>
4	53.27	13.51	19.41	13.81	1.41 <sup>a</sup>
5	55.83	6.95	21.78	15.46	1.41 <sup>a</sup>
10	56.51	6.74	21.80	15.07	1.45 <sup>a</sup>
30	56.83	6.93	21.53	14.72	1.46 <sup>a</sup>
60	56.81	6.21	21.78	15.20	1.43 <sup>a</sup>
120	56.94	6.82	21.67	14.57	1.49 <sup>a</sup>

a :  $p > 0.05$

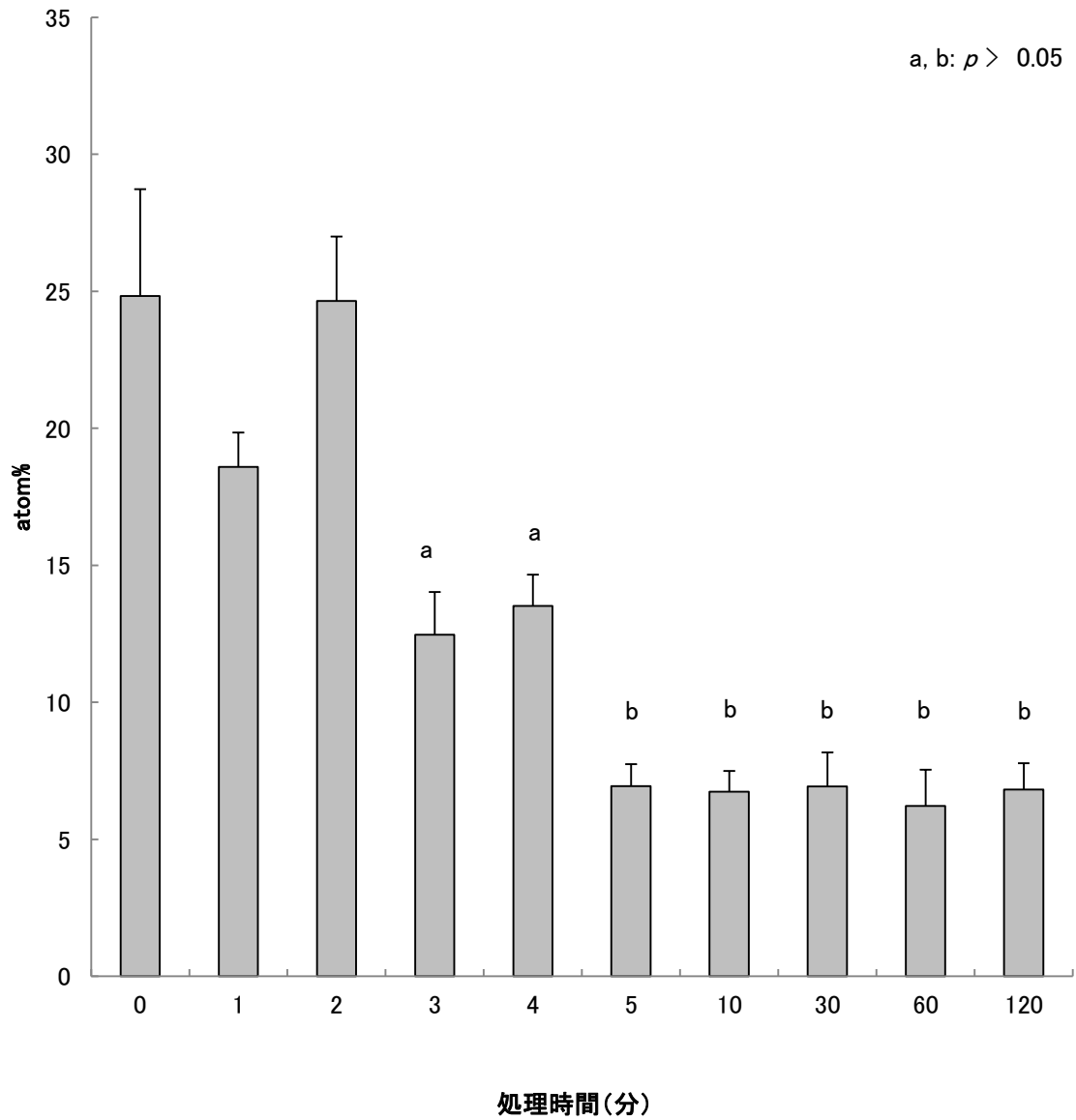


図 6 UV/O<sub>3</sub> 処理によるコンタミネーション由来 C 量の変化

処理時間の短いうちはやや不安定な増減を示したが、処理時間の増加とともに漸減し、処理 5 分で 10 atom% 以下となり安定した。

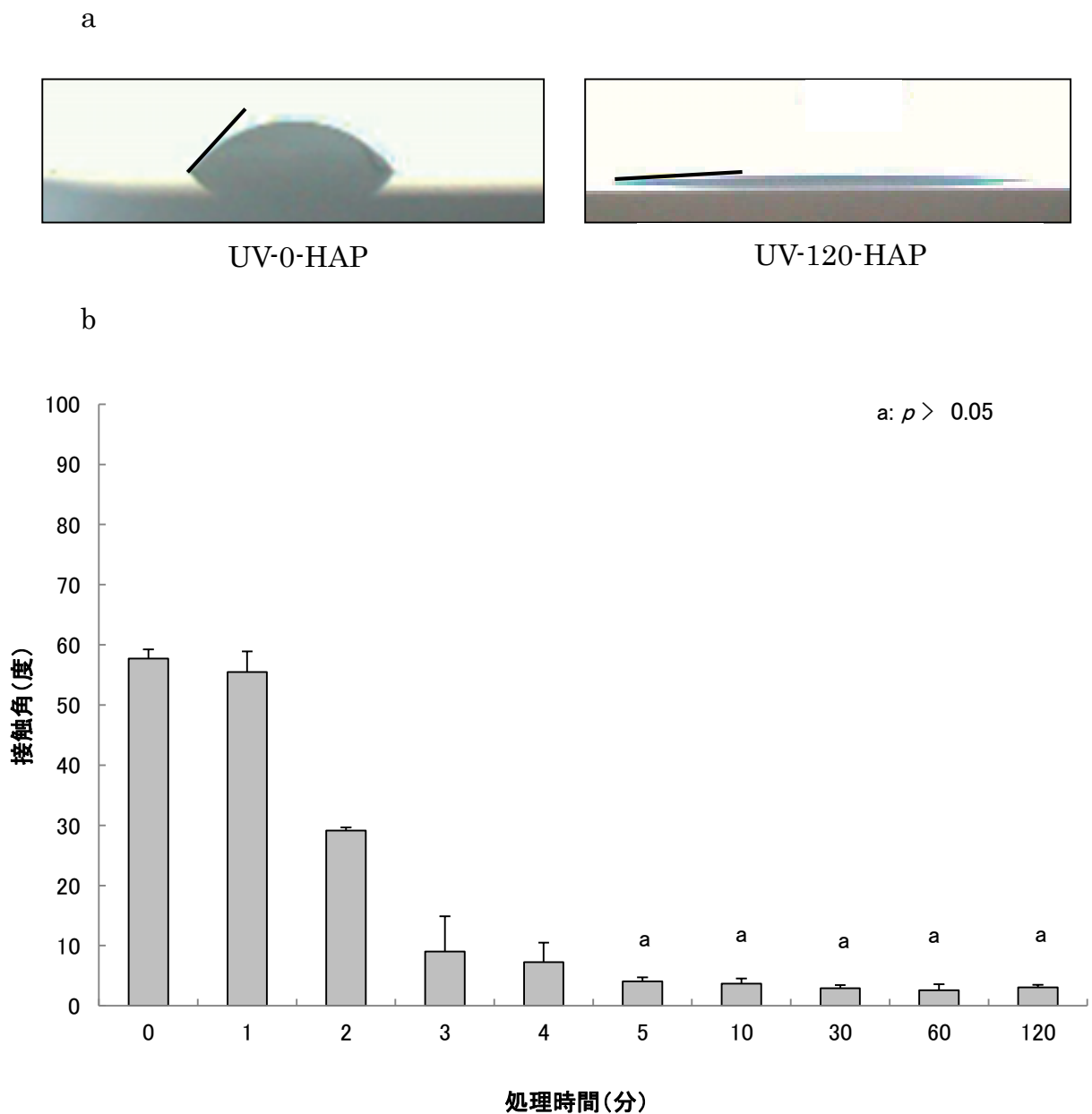


図 7 UV/O<sub>3</sub> 処理による接触角の変化

a) UV-0-HAP においても iHAP と比較し接触角の低下が認められ、 $57.7 \pm 1.6$  度と親水性を示した。しかしながら、UV-5-HAP においては、 $4.1 \pm 0.7$  度と水滴が材料表面に拡散している様子が確認され、超親水性を示した。

b) 処理時間の増加とともに漸減し、処理 3 分以降で有意差がなくなったが、処理 5 分以降では、接触角が 5 度以下で安定した。

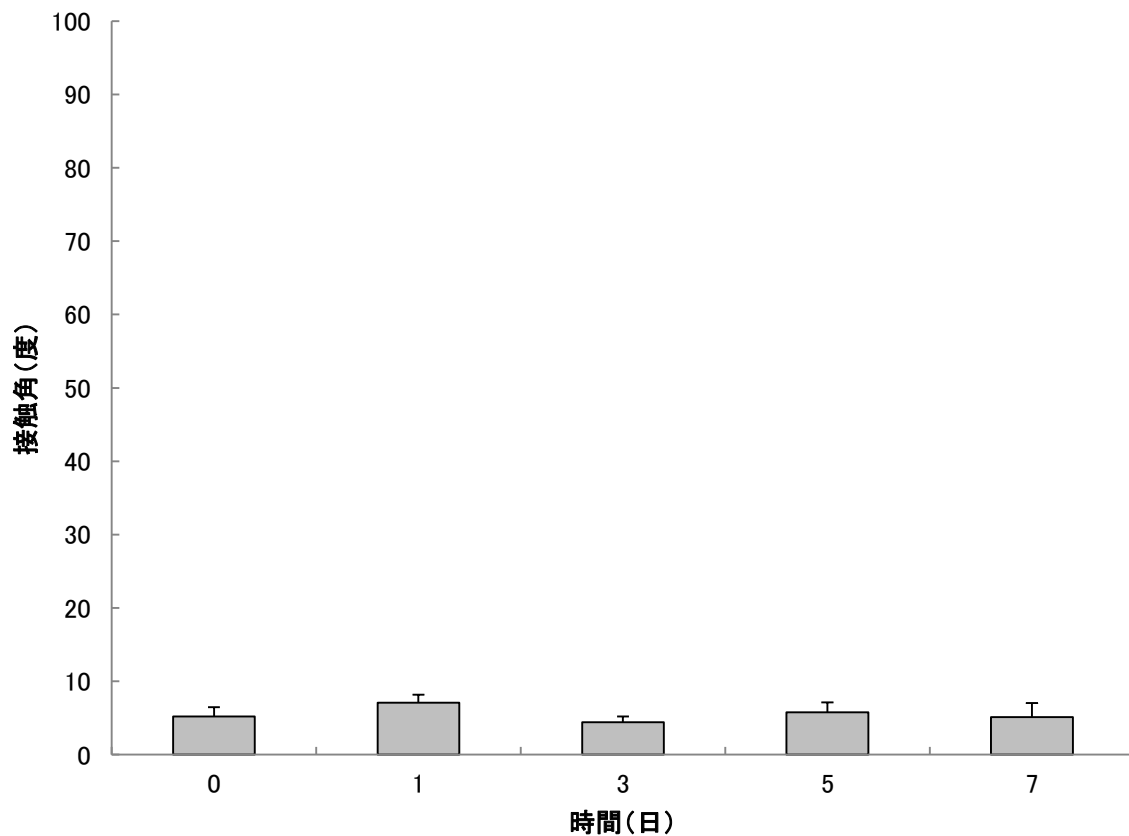


図8 UV-5-HAPの接触角の経時的変化

UV-5-HAPをUV/O<sub>3</sub>処理後7日間静置したのちにおいても接触角は1ケタを維持し、有意な変化は認められなかった。

静置0日においては、 $5.2 \pm 1.2$ 度を示し、静置7日においても $5.1 \pm 1.1$ 度と変化は見られなかった。

## 第4章 UV/O<sub>3</sub>処理した生体活性化表面改質 HAP に対する骨芽細胞応答解析

### 1) 緒言

第3章より UV/O<sub>3</sub>処理は、HAP-30%PA に超親水性表面を付与し、制御することが明らかとなったが、生体に及ぼす影響は明らかではない。骨補填材として臨床応用するためには、毒性がなく、生体親和性があり、機械的支持と骨伝導能を有することが求められる (Buser, 2009)。オゾンは、波長 254 nm の UV を吸収しただちに分解することが報告されているが (Clavert & Pitts, 1966)、本処理法に対する細胞レベルでの影響は明らかではないことから、骨組織を形成する骨芽細胞との応答解析について検討することとした。

### 2) 材料ならびに方法

#### (1) 材料

処理群として、5 分間 UV/O<sub>3</sub>処理した HAP-30%PA である UV-5-HAP を、コントロール群として未処理の HAP-30%PA である UV-0-HAP を用いた。

#### (2) 方法

UV/O<sub>3</sub>処理した生体活性化 HAP 上での骨芽細胞応答解析のため、骨芽細胞を各試料上で培養した後、細胞増殖能評価として細胞増殖試験を、分化能評価として定量 reverse transcription PCR (RT-PCR) を、石灰化能評価としてアリザリンレッド S 染色を行った。



### (3) 骨芽細胞の培養

細胞には、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いた。同細胞の培養は、10% Fetal Bovine Serum (FBS) および 1% penicillin-streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) 中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて行った。培地交換は 3 日ごとに行った。定量 RT-PCR およびアリザリンレッド S 染色においては、コンフルエント確認後、骨芽細胞分化試薬 (1% Ascorbic acid, 0.2% Hydrocortisone, 2%  $\beta$ -Glycerophosphate. , Takara, Shiga, Japan) , 10% FBS および 1% penicillin-streptomycin 添加した Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification ( $\alpha$  MEM) に培地変更し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下にて行った。

### (4) 細胞増殖試験

各試料上に MC3T3-E1 細胞を  $5.0 \times 10^3$  cells/well で播種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて培養した。播種後 1, 3, 5 日に、Phosphate Buffered Saline (PBS) にて非接着細胞を除去後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用い、WST-8 法により発光強度として 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (Varioskan Flash 2.4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US) にて測定した。

### (5) 定量 RT-PCR

各試料上に MC3T3-E1 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 下にて培養した。コンフルエントを確認した日を 0 日とし、培養期間を 7, 14, 21 日とした。各培養期間にて細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いて total RNA を抽出した。その後、Nano Drop (ND-1000 ; LMS

Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて total RNA を定量し, 30 ng/ $\mu$ L に調整した。定量した RNA を用い, One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>®</sup> RT-PCR Kit (Takara, Shiga, Japan) および 4 種類の特異的プライマー (Type I collagen, Alkaline phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin) を用いて Roche LightCycler<sup>™</sup> 1.5 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) にて 1 ステップ PCR を行った。逆転写反応 (42°C · 5 分, 95°C · 10 秒) を 1 サイクル, PCR 反応 (95°C · 5 秒, 60°C · 20 秒) を 40 サイクル繰り返した。溶解曲線で確認後,  $\Delta \Delta$ Ct 法にて定量した。内部標準として, ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を選択した。各プライマーシーケンスは表 3 に示す。

#### (6) アリザリンレッド S 染色

各試料上に MC3T3-E1 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/well で播種し, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下にて培養した。コンフルエントを確認した日を 0 日とし, 培養 28 日に培養液を除去し PBS にて洗浄後, メタノールにて 4°C, 20 分固定した。石灰化染色キット (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) にて試料表面を染色後, image J (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA) にて輝度解析を行った。

#### (7) 統計学的分析

one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法, 群間の比較に Student's *t*-test を用い, 有意水準 5%で行った。

### 3) 結果

#### (1) 細胞増殖試験

細胞増殖試験の結果を図 9 に示す。細胞増殖は、両群とも培養期間の増加とともに増殖を示し、培養 1 日でも処理群が高い傾向にあったが、培養 3 日で処理群がコントロール群と比較し有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。また、培養 5 日においてさらにその差は広がった ( $p < 0.01$ )。

#### (2) 各マーカーの遺伝子発現レベル

各マーカーの遺伝子発現レベルを図 10 に示す。培養 7 日ではすべてのマーカーに有意な差は認めなかった。培養 14 日における Type I collagen, Osteopontin において、処理群が有意に高値を示した ( $p < 0.05$ )。

また、培養 21 日における Alkaline phosphatase ( $p < 0.01$ ) , Osteocalcin ( $p < 0.05$ ) において処理群が有意に高値を示し、Osteopontin に関してはコントロール群が高値を示した ( $p < 0.01$ )。

#### (3) アリザリンレッド S 染色

染色したプレート画像および輝度解析結果を図 11 に示す。プレート表面が肉眼的にも濃染していた。輝度解析結果においても、処理群 ( $212.1 \pm 12.7$ ) がコントロール群 ( $240.0 \pm 2.1$ ) と比較し、有意に低い輝度を示した ( $p < 0.01$ )。

#### 4) 考察

骨芽細胞は増殖期から分化期、形成期に移行し、骨細胞となり静止期に移行する。

本研究結果より、増殖期に細胞増殖の促進を示した。増殖 1 日においても有意

差がないものの処理群において高値を示し、培養 3, 5 日で有意に差が広がった。つまり、UV/O<sub>3</sub> 処理により材料表面への骨芽細胞接着、それに伴う増殖が促進されたことより、より早期の分化期、石灰化期への移行が行われると示唆された。

分化期においては、Type I collagen は分化初期から後期に発現し、遅れて Alkaline phosphatase, 更に遅れて Osteopontin が発現する。Osteocalcin は、分化後期でのみ発現すると言われている（野田, 1998 ; 松本, 2001 ; 松口, 2009）。14 日での Type I collagen, Osteopontin, 21 日での Alkaline phosphatase, Osteocalcin の遺伝子発現が増強したことから、分化後期にかけて骨芽細胞分化を促進することが示唆された。本研究においては、10×10 mm の限られた面積の中で増殖させた細胞における結果であるため、通常の骨関連遺伝子発現のタイムコースとはややずれた結果となった。しかしながら、同条件、同期間での両群の比較において有意差が生まれたことは有意なことであると考える。Osteopontin に関して、培養 21 日でコントロール群が高値を示したことについては、処理群の発現ピークがコントロール群と比較し早められたためと考えられる。

また、形成期において石灰化を促進した。PCR と同条件での培養であるため、培養 28 日にかけて骨芽細胞分化が促進された結果、石灰化も促進されたと示唆される。

したがって、HAP-30%PA 表面に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、骨芽細胞増殖、分化、石灰化を促進させることが明らかとなった。

セラミック材料周囲では、骨芽細胞の接着・増殖に先立ち、液相・固相界面において、①固相からの溶解、②液相からの沈殿、③イオン交換、④沈殿物からの相互拡散、⑤セラミック表面へのミネラル相、有機相の沈着・結合がおこ

ったのちに，⑥骨芽細胞の材料表面への走化が起こるといわれている (Ducheyne & Qiu, 1999)。また，ハイドロキシアパタイトと培養液界面において， $\text{Ca}^{2+}$ と  $\text{HPO}_4^{2-}$ の平衡状態が達成されたあと，骨芽細胞接着・増殖が起こるといわれている (Bertazzo *et al.*, 2010)。本研究に用いた生体活性化 HAP は，Ca/P 比を低下させることにより溶解度が高まっており，さらに  $\text{UV/O}_3$  処理により表面のコンタミネーションを減少したことにより，界面における培養液との接触がより直接的となり，界面からの溶解・イオン交換を盛んにさせたと考えられる。

また，界面からの  $\text{Ca}^{2+}$ イオンの培養液への溶解が盛んになることで，局所の  $\text{Ca}^{2+}$ イオン濃度が高まっていると考えられる。骨芽細胞の骨関連遺伝子発現は，リン酸カルシウム系セラミックスの生体適合性と生体活性に基づくという報告 (Wang *et al.*, 2004) や，適切なカルシウムおよびリン酸供給が，*in vitro* においてラット頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞の石灰化を促進するという報告 (Chang *et al.*, 2000) もあることから，界面における  $\text{Ca}^{2+}$ イオンが増加したことで，骨芽細胞分化・石灰化を促進させたと考えられる。

表 3 評価に用いた骨分化マーカー

ターゲット	略号	プライマー シークエンス
Type I collagen	Col 1	Forward primer 5'-3' : AAGCCTGGTGAACAGGGTGT
		Reverse primer 5'-3' : GAAACCTCTCTCGCCTCTTGC
Alkaline phosphatase	ALP	Forward primer 5'-3' : AGGGTGGACTACCTCTTAGGTCT
		Reverse primer 5'-3' : TGGTCAATCCTGCCTCCTTCC
Osteopontin	OPN	Forward primer 5'-3' : TCTCCTTGCGCCACAGAATG
		Reverse primer 5'-3' : GAATTGCTTGGAAGAGTTTCTTG
Osteocalcin	OCN	Forward primer 5'-3' : CACAGCAGCTTGGCCCAG
		Reverse primer 5'-3' : CCTGCTTGGACATGAAGGCTTT
GAPDH	—	Forward primer 5'-3' : GCCAGCCTCGTCCCGTAG
		Reverse primer 5'-3' : CAAATGGCAGCCCTGGTGAC

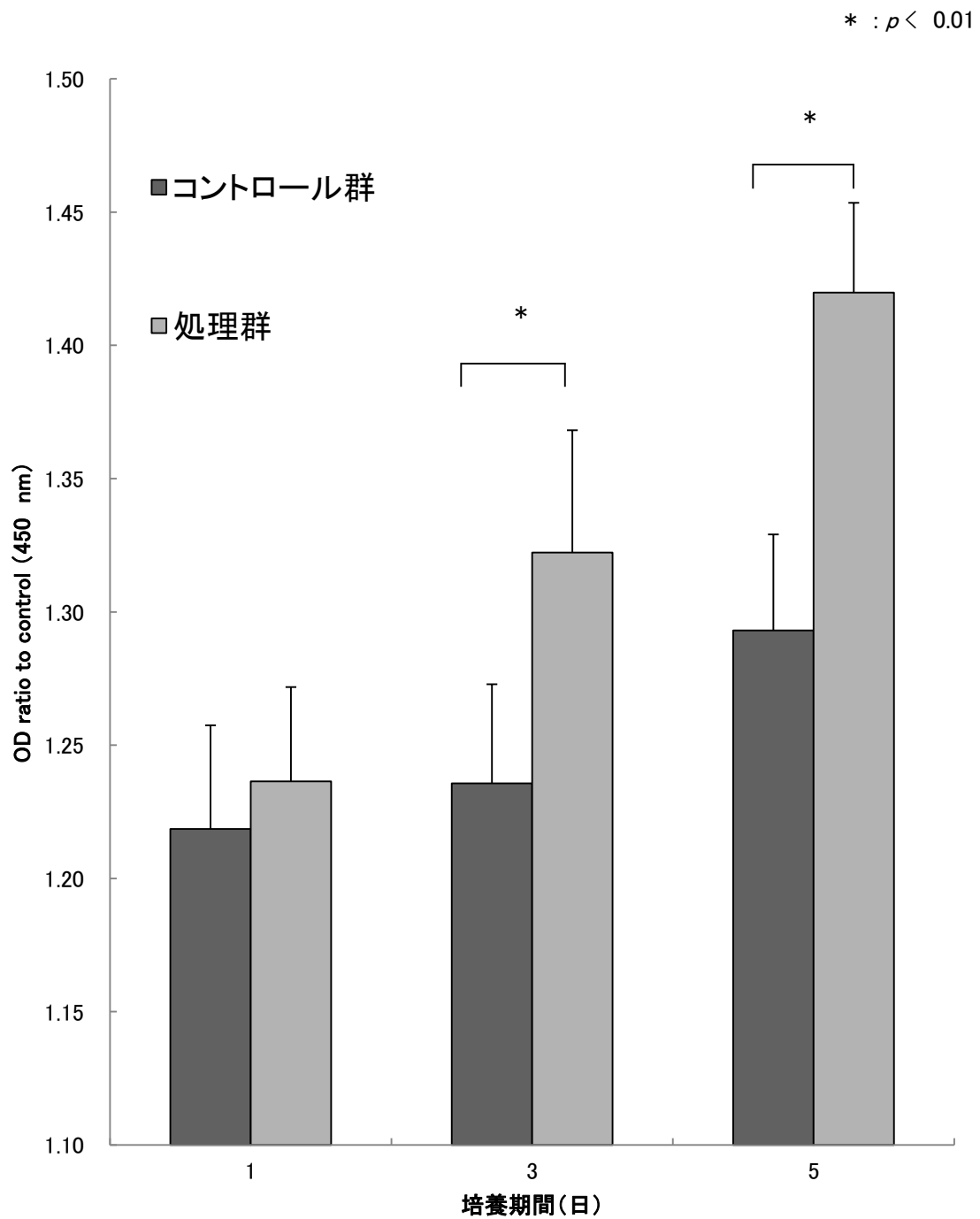


図9 WST-8法による細胞増殖試験

両群とも培養時間の増加とともに増殖を示し、培養3日で処理群がコントロール群と比較し有意に高値を示し、培養5日でさらにその差は広がった。

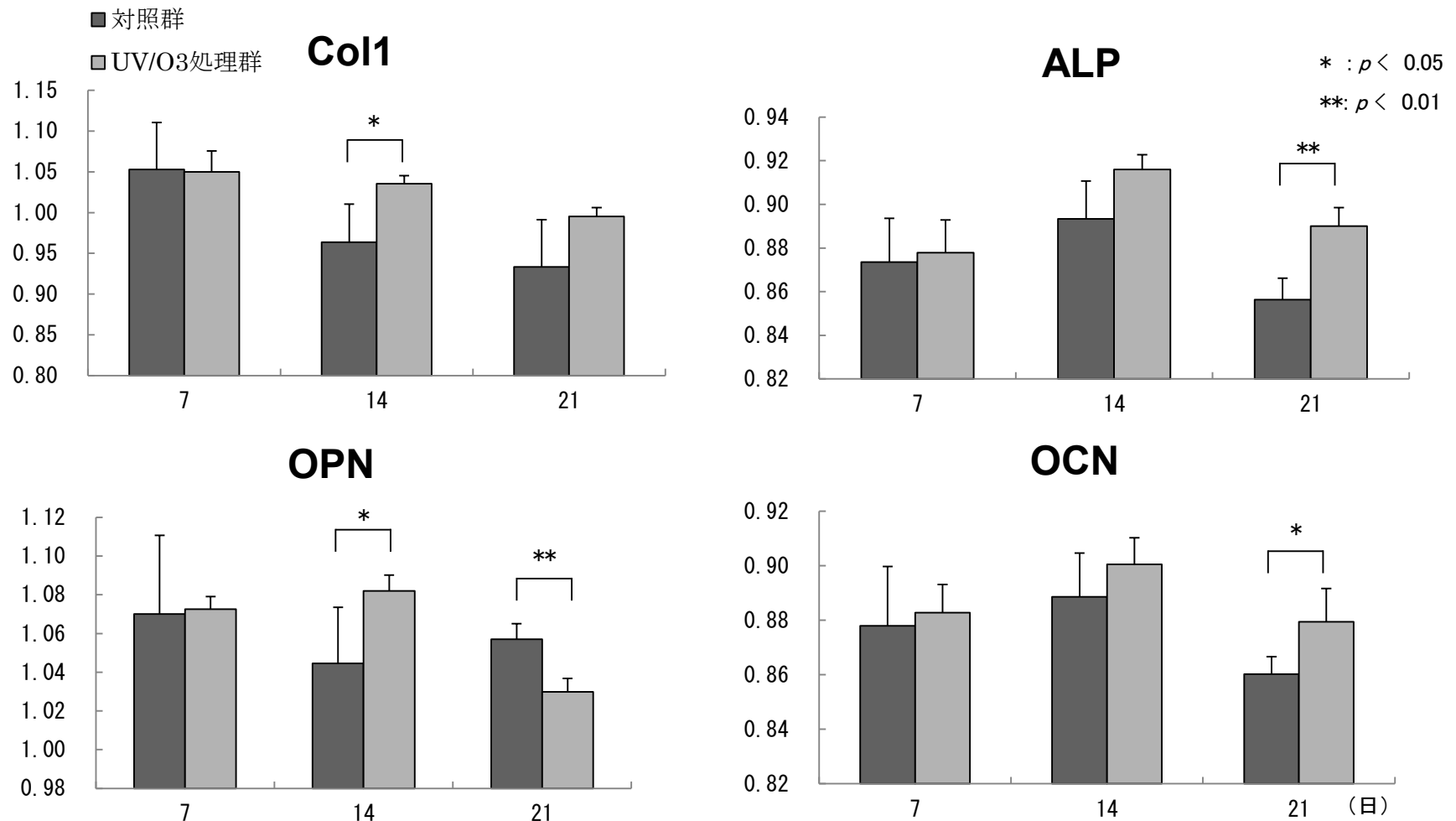
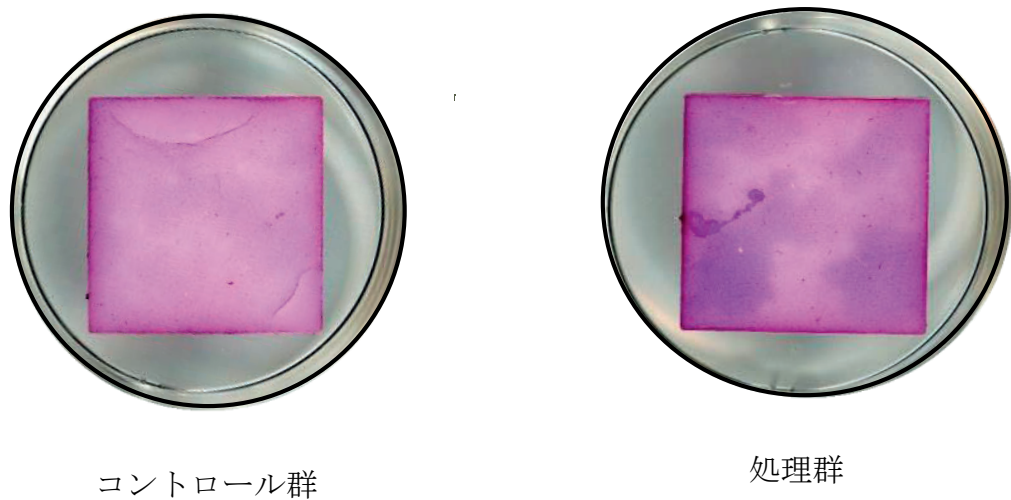


図 10 各マーカーの遺伝子発現レベル

培養 7 日ではすべてのマーカーに有意な差は認めなかった。培養 14 日における Type I collagen, Osteopontin において、処理群が有意に高値を示し、培養 21 日における Alkaline phosphatase, Osteocalcin において処理群が有意に高値を示し、Osteopontin に関してはコントロール群が高値を示した。



a



b

\* :  $p < 0.01$

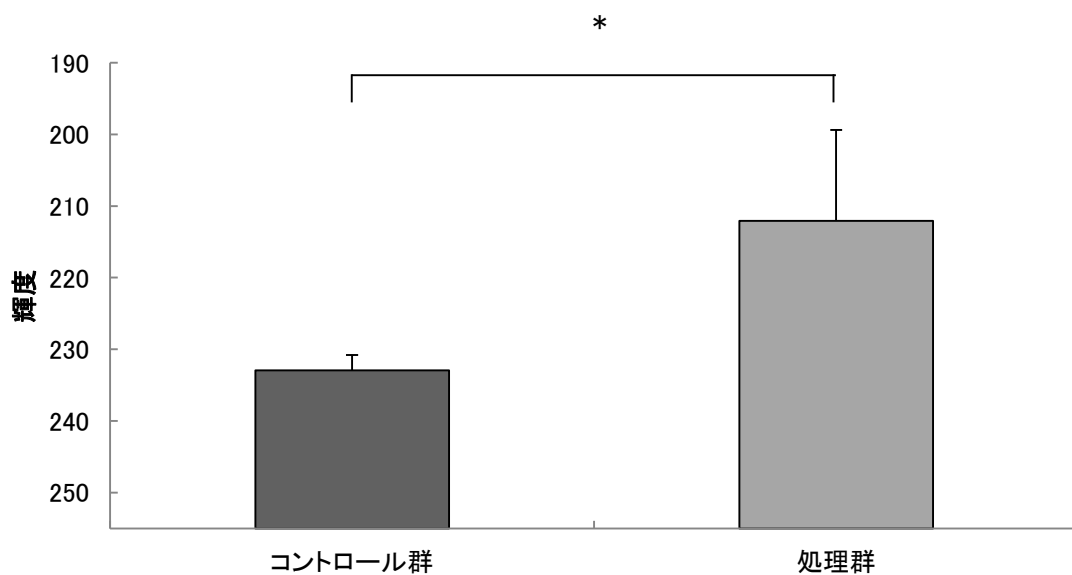


図 11 アリザリンレッド S 染色したプレート画像および輝度解析結果

a) 肉眼的にも、処理群が濃染していた。また、骨芽細胞と思われる濃染した斑点が確認可能である。

b) 処理群 (212.1 ± 12.7) がコントロール群 (240.0 ± 2.1) と比較し、低い輝度を示した。

## 第5章 総括

生体活性化 HAP における UV/O<sub>3</sub> 処理による高機能ナノバイオ界面制御の効果を明らかにすることを目的として、未処理および生体活性化 HAP に対する UV/O<sub>3</sub> 処理の効果の検討としての表面科学的分析、および生体活性化 HAP に対する骨芽細胞応答解析を行い、以下の結果を得た。

1. 未処理 HAP に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、表面のコンタミネーションを除去し、ぬれ性を向上させた。
2. 生体活性化 HAP に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、iHAP と同様に表面性状を変化させることなくぬれ性が向上させた。処理 5 分で超親水性表面を付与することができ、その効果は 7 日間持続した。
3. UV/O<sub>3</sub> 処理を行った生体活性化 HAP 表面において、骨芽細胞増殖、分化、石灰化を促進させた。

以上のことより、生体活性化 HAP に UV/O<sub>3</sub> 処理を行うことで、ナノレベルでの汚染除去効果を発揮するとともにそのぬれ性を制御し、骨芽細胞の増殖、分化、石灰化を促進したことから、高機能ナノバイオ界面制御としての効果を示唆できた。

現在臨床現場において、気孔率を高め、骨形成性細胞や増殖因子導入、欠陥侵入、内部までの骨形成が可能である連通多孔性 HAP が多く用いられているが、連通多孔性 HAP に対してもリン酸溶液処理は液体のため、表面全体に処理することは容易であると考えられる。UV/O<sub>3</sub> 処理については、UV は直進する性質をもつため、内部まで照射野には含まれない。しかしながら、汚染除去の主体であるオゾン及び励起酸素原子は、気体であるため、対流により気孔内部まで侵

入し、効果を発揮することができると考えられる。それゆえ、本処理法を臨床現場に応用することは、より早期の骨結合の獲得に有用であると示唆される。