

生体材料の生物学的評価法 現状と将来展望

永井 亜希子*

1. はじめに

生体材料は、多様な材料が多様な目的で用いられていて、その評価法も材料によって多種多様である。例えば、生体適合性評価と一口にいても、生体に認識されない(血液適合性)、生体と結合する(骨結合性)といった逆の性質を評価することになる。本稿では、硬組織に用いられるインプラント材料(人工歯根や人工股関節のステム部など)の骨結合性に注目した生物学的評価法を紹介し、今後の展望への題材とした。

骨結合性は生体活性とも表現され、骨組織と材料が直接結合することができるという非常に興味深い物性である。この物性については多くの論文で報告されているが、そのメカニズムは未だ不明な点も多く、今後、材料評価を通じてメカニズムに迫る研究へ発展することを期待したい。

生物学的評価の対象となる生体適合性と並んで生体材料に求められる重要な性能に、生体内における耐久性がある。材料の耐久性は、力学的特性や耐食性として評価されるので詳しくは文献(1)などを参照していただきたい。また、生体の免疫システム(非自己を見極め排除する機構である)の初期段階に、マクロファージの異物認識・貪食作用がある。免疫反応への耐久性も含めて考えると、そのメカニズム解明には生物学的なアプローチも必要となるだろう。

2. 骨結合性の生物学的評価

インプラント材料の動物実験実施前の、もしくは動物実験を省略することを目指した評価法を、*in vitro* 評価と *in vivo* 評価に分け、代表的な2つの評価法を述べる。生体から取り出した物質を用いる *in vitro* 評価としては擬似体液テストが、生命の最小単位を用いた *in vivo* 評価としては培養細胞による評価が行われることが多い。

3. 擬似体液テスト(simulated body fluid test, SBF テスト, 1987年)

ヒト血清の無機成分を擬似して作製された SBF 溶液中に、目的の材料を一定期間浸漬し、材料上に形成される骨類似アパタイトを、走査型電子顕微鏡(SEM)などで観察する試験法である。開発者の名をとって Kokubo's method とも呼ばれる。文献(2)にその歴史や文献、作製法などが詳しくまとめられている。Tyload 液(1910年)や Hanks 液(1949年)などそれまで開発された擬似体液がリン酸バッファーであるのに対して、SBF はトリスバッファーである点が特徴の一つである。トリスバッファーはトリスヒドロキシメチルアミノメタンというアミノ基と水酸基を持った有機化合物の塩酸塩である。安価なバッファーで生化学や分子生物学でよく用いられるが、第1級アミンであり、タンパク質と相互作用をするため、生物実験ではあまり用いられない。SBF はその無機成分にばかり注目されがちだが、トリスもアパタイト核形成に役割を果たしている可能性がある。無機成分では、SBF 溶液、つまり体液中のカルシウムイオン濃度がアパタイト核形成に対して過飽和濃度であるという点は非常に興味深い。このため、作製時のちょっとした不手際で溶液中に微細なアパタイト核形成を起こしてしまう可能性があり、注意が必要である。とはいえ、このような現象は、生体内でおこる異所性の石灰化現象の一側面を表現している可能性があると考えられる。

SBF テストは骨結合能の *in vitro* 評価法として、特別な装置を必要としないこと、手技・理論が簡明であったこと、ビボの骨結合能との相関性を有するという報告が多数あったことから、現在まで多く用いられてきている。図1に、SBF 溶液に炭酸アパタイト緻密体を浸漬後、その表面に形成された骨類似アパタイトの SEM 像を示した。針状のアパタイト結晶がドーム状に凝集しているのが認められる。2009年に、SBF テストと動物実験での骨結合能の相関性について疑問を呈する論文が発表されたが⁽³⁾、これまで多くの研究者によ

* 東京医科歯科大学准教授；生体材料工学研究所(〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10)

Biological Evaluation of Biomaterials for Hard Tissue Implant; Akiko Nagai(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo)

Keywords: biomaterial, biological evaluations, SBF (simulated body fluid) test, cell culture, animal study

2012年2月23日受理

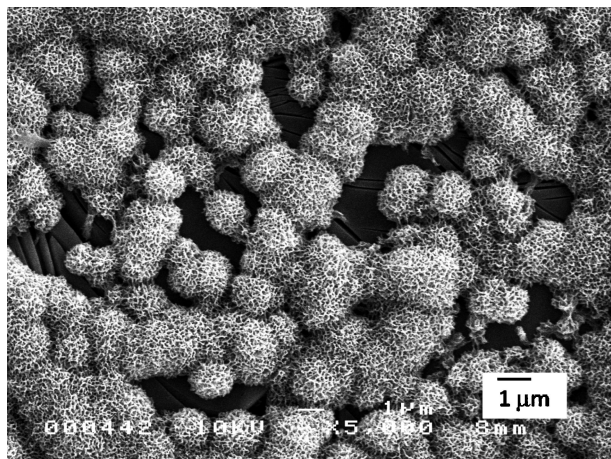


図1 炭酸アパタイトのSBF浸漬後のSEM像.

り検証されていること, そもそも一試験で全ての材料が表現できる評価法があるはずがないことから, その有意性は揺るがないだろう.

4. 細胞培養テスト

in vivo 評価として, 培養細胞を用いた, 材料上での細胞挙動の観察が挙げられる. 生体内の骨リモデリングは, 骨を形成する骨芽細胞とその分化型の骨細胞, そして骨を吸収する破骨細胞という一見相対する細胞群の協調作業で行われる. また, 異所性石灰化の一つである血管の石灰化は, 従来考えられていた壊死した細胞にカルシウムが沈着するといった受動的な過程ではなく, 血管平滑筋細胞が骨芽細胞様に形質転換して起こる, 骨形成類似のメカニズムであるという説が示された⁽⁴⁾. このような生体内の骨化現象は, 材料と骨との結合という現象も生化学的な石灰化だけでは説明できず, 生命の最小単位であるこれら細胞群が深く関わっていると考えられる. したがって, 材料の骨結合を評価するときには, 材料表面と骨の間に存在する, もしくはリクルートされる, 骨結合に関わるであろう細胞の挙動を調査対象とすべきである. 培養可能な細胞の種類は幾つもあるので, 材料の使用目的に応じた培養細胞を選択することになる.

(1) 細胞の種類

(a) 骨系細胞

(i) 骨芽細胞: 骨形成を行う, つまり骨基質を産生する細胞である. インプラント材料を評価するとき最も多く用いられて, これからも用いられていくと予想される. 代表例にマウス頭蓋骨由来(MC3T3-E1細胞), ヒト骨肉腫由来(MG63細胞, SaOS-2細胞(癌抑制遺伝子の一つであるRB遺伝子が欠損していることが分かっているため分子生物学分野でもよく用いられる))がある. 初代培養を行うときは, 骨髄間葉系幹細胞を分化させて用いる.

(ii) 破骨細胞: 骨吸収担当細胞である. 骨リモデリングに欠かせない細胞であるが, 現在の骨粗鬆症の治療は, 主にこの

細胞の活性抑制がターゲットとされている. 培養細胞は細胞活性が高くないものが多く, 初代培養(末血単球より分化させる)を使うことが多い.

(iii) 骨細胞: 骨芽細胞が最終分化した細胞であり, 自らが作った骨基質に埋もれて存在している. 静止細胞のため, 近年まであまり研究が進んでいなかったが, メカノセンサー機能を持つ細胞である可能性が示されたため, 注目されている. 培養は初代培養を用いるが, 継代は培養細胞の中で難しいものの一つである. 培養系の樹立には, 遺伝子改変などの技術が必要とされる.

(b) 幹細胞

(i) 骨髄間質細胞: 骨髄から採取される細胞である. ここから得られる間葉系幹細胞は, 既に臨床現場で細胞治療として用いられている. すなわち材料とこの細胞の組み合わせは臨床応用に近く, より実践的な実験計画のもとで行われるべきである. この細胞は誘導因子を用いて, 骨芽細胞などに分化させることができる. 採取には動物が必要となること(ヒトでは骨髄穿刺), 採取量が限られること, 要事調整であるなどの点が, 障壁となる. ヒト由来のものを使用する場合は倫理審査が必要である.

(ii) 多能性未分化細胞: 胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)⁽⁵⁾などがある. ES細胞は, 卵子胚盤胞の内部細胞塊から取った細胞を培養したもので, 無限に増殖でき(自己複製能), ほとんどすべての組織に分化できる. iPS細胞は, 体細胞に遺伝子を導入したり低分子化合物を作用させたりすることで, ES細胞のような性質を持たせた細胞である. 図2に未分化マーカーであるアルカリホスファターゼ染色したES細胞を示した. コロニー状に密に増殖するのが特徴で, 濃染している部分(実際には青色)が陽性部位である. 大きなポテンシャルを秘めた細胞群であるが, 実際に生体中存在する細胞ではなく, 特にiPS細胞は癌原性を含めてまだ研究途上といえる. ヒト由来のものを使用する場合は倫理的審査が必要である.

(2) 細胞と材料の相互作用(詳しい手技は文献(1), (6)などを参照)

材料上での細胞挙動を観察することで, 細胞と材料の相互作用の一部を調べることができる. 接着細胞は, トリプシン処理などで足場や周囲細胞から剥離されると, 理想的には一つ一つばらばらになり, 球状になる. この状態で, 色素や抗体でマーキングすることで, セルソーターを用いて望みの細胞を分類したり数えたりすることができる. 次に, ばらばらにした細胞を材料に播種すると, 材料が毒性や非接着特性などを持たなければ, 細胞は細胞接着分子を介して材料に接着していく. このときの接着細胞数は, 核染色後のセルカウントやMTTアッセイなどで酵素活性を比色定量法にて測定することで評価することができる. これらの手法は, 細胞の生存率や増殖率を調べる時も使うことができる. 接着した細胞はその後伸展し, 増殖する. 伸展の様子は, 細胞骨格であるアクチン染色を行うなどして観察することができる. ES細胞

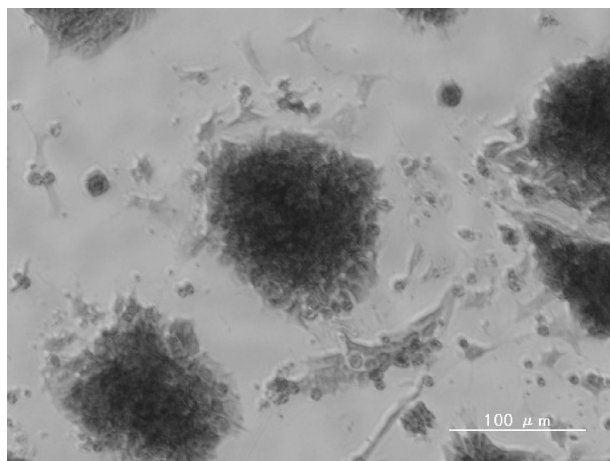


図2 ガラス上に培養したES細胞のアルカリホスファターゼ染色(濃い部分)の光学顕微鏡像。

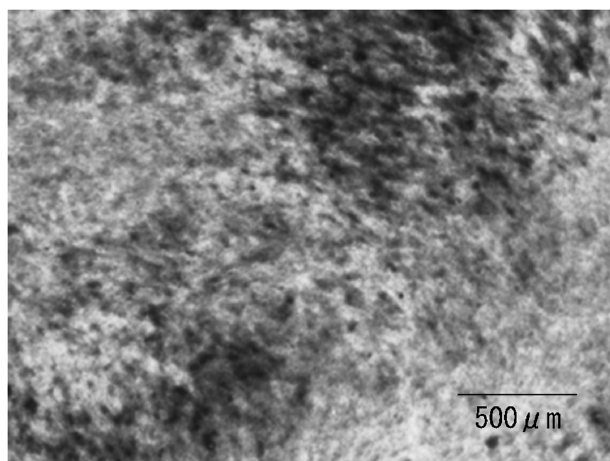


図3 チタン上に培養し分化させたMG63細胞のアルカリホスファターゼ染色(濃い部分)の光学顕微鏡像。

胞の足場として用いるフィーダー細胞であるマイトマイシンC処理されたマウス胎仔線維芽細胞(MEF)など例外はあるが、普通、培養細胞は増殖を繰り返すことができなければ、死を意味する。そのため培養容器内の細胞は、一定期間ごとに培地交換や継代操作が必要となる。上記のように細胞の通常の初期挙動を観察すると、細胞によっては分化誘導因子などを用いて、その細胞特有の分化能を発現させることができる。骨芽細胞の分化には、アスコルビン酸や β -グリセロフォスフェート、ヒドロコルチゾン、ビタミンD、副甲状腺ホルモン(PTH)などを実験目的により組み合わせる。それぞれの分化に即したマーカー遺伝子・タンパク質の発現を、分子生物学的手法で評価する。骨芽細胞のマーカーとしては、初期に発現するアルカリホスファターゼ、オステオポンチン、後期に発現するオステオカルシンなどがよく用いられる。図3に、骨芽細胞様細胞であるMG63細胞をチタン上に播種し、分化させた後、アルカリホスファターゼ染色し

たものを示す。濃染している部分(実際には茶色)がアルカリホスファターゼ陽性であり、細胞が分化を始めていることが分かる。

これら細胞による評価も、材料の物性の一側面を見ているにすぎない。一つ例を挙げると、生体不活性材料であるジルコニアやアルミナ上で、骨芽細胞を培養すると、接着・増殖し、分化誘導することもできる⁽⁷⁾。つまり、これらの生体不活性材料は、骨芽細胞親和性材料であっても骨結合能を持たない材料と結論付けられる。この例をみても、全てを一貫して評価できる方法は現在のところないと言っている。

5. 動物実験

骨結合の2方面からの生物学的評価を述べてきたが、これら材料と生体間で生じるであろう様々な反応は同時進行的に起こっている訳ではなく、反応により時間差があったり、またそれらの要素が互いに干渉しあったりする。また、未知の機構が関わっている可能性も否定できない。そのような複合的な影響を調べるためには、最終的には、動物実験を行うことになる。

実験前には倫理審査が必要である。また、3R(数の削減、苦痛の軽減、置き換え)の工夫も求められる。これまでに紹介した評価法は、動物実験を減らすことができる点でも価値がある。

インプラント材料の形状、大きさ、使用目的、行う実験がどの段階にあるかなどにより動物種を選択する。埋入部位は、実験目的により、頭蓋骨、大腿骨、脛骨、顎骨など比較的骨量が多く皮膚に近いものが選ばれる。また多くの骨は海綿骨(多孔質)と皮質骨(緻密骨)から成り、骨髓や軟骨が存在する。これらも加味して部位を選択する。

6. 将来展望

将来、生体材料はどんな評価法を用いて評価されるのだろうか。統一した評価法は理想ではあるが、新しい材料を開発した時点で未知な物性を持つ材料の評価を行うわけだから、どの材料にも使える評価という議論自体が無意味なのかもしれない。

結局、文献を正確に把握し、なるべく同じ条件で謙虚に比較し、事実を積み重ねていくことが重要なのだと考える。文献⁽⁸⁾のレビューは、MG63細胞とチタンインプラント表面の相互作用の論文が多数紹介されていて参考になるが、実験条件が多面で異なっているので比較しづらい。このような現状が、なかなか真実が見えにくい一因ではないだろうか。さらに、ポジティブな結果はもちろん、ネガティブデータも正当な評価を受けるべきである。ネガティブデータが世に出にくいようでは、その評価法を両面から熟考したことになるからである。

文 献

- (1) 埴 隆夫編：医療用金属材料概論，日本金属学会(2010)．
- (2) T. Kokubo and H. Takadama: *Biomaterials*, **27** (2006), 2907–2913.
- (3) M. Bohner and J. Lemaître: *Biomaterials*, **30** (2009), 2175–2180.
- (4) L. L. Demer and Y. Tintut: *Circulation*, **117** (2008), 2938–2948.
- (5) K. Takahashi and S. Yamanaka: *Cell*, **126** (2006), 663–666.
- (6) 石渡一彦，埴 隆夫，前田瑞夫編：バイオマテリアルの基礎，日本医学館(2010)．
- (7) K. C. Popat, K.-I. Chatvanichkul, G. L. Barnes, T. J. Latempa

Jr., C. A. Grimes and T. A. Desai: *J. Biomed. Mater. Res.*, **80A** (2007), 955–964.

- (8) M. Bachle and R.J. Kohal: Clin. Oral Implants Res., **15** (2004), 683-703.



永井亜希子

★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★ ★

2002年 東京医科歯科大学大学院医学系研究科博士課程修了

2008年 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所無機材料分野

現在に至る

専門分野：再生医療工学

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★