

学位論文題名

Basic research for biomedical application of
aluminosilicate nanotubes, imogolite

(アルミノシリケートナノチューブ (イモゴライト) の
バイオ応用に関する基礎研究)

学位論文内容の要旨

1. 緒言

21世紀の中心的な技術の1つにナノテクノロジーがあげられる。近年、カーボンナノチューブをはじめとする様々なナノマテリアルのバイオ応用開発が盛んになりつつある。イモゴライトは、1962年熊本県人吉盆地火山灰俗称「芋後」と呼ばれる土壤中より発見された天然のアルミノシリケートで、化学組成は $[Al_2O_3-SiO_2-2H_2O]_n$ であり、チューブ内外表面を水酸基にて覆われている。形態は、外径約2nm、内径約1nm、長さ数十nm～数 μm のナノチューブである。その形状ゆえに比表面積が900～1100 m^2/g と非常に大きく、表面の水酸基により水との親和性も非常に優れ、バイオ応用できる可能性が高いと考えられる。しかし、天然ガス等の燃料貯蔵媒体、高温条件下で水蒸気を多量に吸放出する結露防止剤、さらには触媒における担持材としての性能や、有機ポリマーとの複合化による難燃性材料等、様々な工業応用されているものの、バイオ分野での研究はほとんどなされていないのが現状である。本研究では、イモゴライトの基礎的バイオ特性を調べることを目的として、イモゴライトを用いてスキャホールドを作製し骨芽細胞様細胞の培養を行い細胞増殖および機能性に及ぼす影響を検討した。

2. 材料と方法

産業技術総合研究所より提供された合成イモゴライトスラリーを遠心分離、乾燥を行い、通法に従い包埋し、切片(約80nm)を作製し、透過型電子顕微鏡(TEM)にてイモゴライトの形態観察を行った。イモゴライトスラリーを3種類の濃度(10・100・1000ppm)に調整後、培養ディッシュ上にそれぞれ20・200・2000 μg コートしスキャホールドとした(以下Im20・Im200・Im2000)。比較サンプルとして形態の類似したSingle Walled Carbon Nanotubesをコートしたスキャホールドも作製した

(以下 CNT)。コントロールとして培養ディッシュを使用した (以下 Cntl)。表面形態の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、表面粗さ、および接触角測定によるぬれ性評価を行った。蛍光アルブミンを使用し蛋白質吸着能評価さらに ICP (Inductively Coupled Plasma) を用いてケイ素リリース能の評価を行った。通法に従いヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞 (SaOS2) およびマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の細胞培養を行い、SEM による細胞形態観察、増殖数測定、蛋白質定量、トリプシンを用いた細胞剥離による接着性評価、ローダミン蛍光染色による細胞骨格観察、免疫染色による接着斑観察および ALP 活性測定、カルシウム定量による骨芽細胞機能性の評価を行った。

3. 結果と考察

3.1 イモゴライトの形態観察およびスキヤホールドの機能性評価

TEM 観察より、イモゴライトのナノチューブ状構造 (直径: 約 2nm) が確認された。スキヤホールド表面形態は、コートしたイモゴライト量依存的に、島状凝集体 (Im20) →一方向に自己組織化した構造体 (Im200) →ランダムに配向した積層構造体 (Im2000) へと変化した。バンドルの直径もイモゴライト量依存的に変化した。これは、イモゴライトの密度により凝集力の働き方に差が出たためと考えられる。表面粗さは、イモゴライト量の増加とともに増加した。特に高濃度イモゴライトをコートしたランダム配向積層体 (Im2000) では、粗さは比較的大きく R_{max} は $4\mu\text{m}$ を超えた。ぬれ性は、イモゴライト量の増加とともに改善した。Cntl では約 47° であったが Im2000 では約 22° と急激なぬれの改善が認められた。これは、イモゴライトが親水性ということに加え、メソポーラスな粗い表面構造によると考えられる。CNT では約 67° とカーボンナノチューブが疎水性のためぬれは低下した。蛋白質吸着量は時間経過とともに増加し、やがて飽和状態へと達した。ナノチューブ量の増加とともに付着蛋白質量も増加した。ケイ素リリース能は、Im2000 で最高特性を示した。これらは、イモゴライト表面の親水性やぬれ性等の化学的特性に加え大きな表面積によると考えられる。至適ケイ素濃度については、 $0.3\sim 17\text{ppm}$ と様々な報告がなされているがおおよそ本研究の値は、これらと一致するものであった。

3.2 SaOS2 培養

培養細胞形態は、イモゴライト上では通常の紡錘形 (Cntl) と比較し、全方位に等方的に大きく伸展し、葉状および糸状仮足が発達していた。細胞増殖数は、コートしたイモゴライト量の増加とともに減少した。蛋白質定量 (培養細胞および細胞外マトリクス以下 ECM) により個々の細胞体積は、コントロールと比較し、約 2 倍であることが明らかとなった。ゆえに、イモゴライト上の細胞は大きく伸展した

ため増殖に必要な面積が増大したことが、細胞増殖数が少ない一つの要因である可能性が示唆された。10 分間トリプシン処理を行うと、Cntl 上の細胞は、ほぼ全てが剥離されてしまうのに対し、Im2000 上の細胞は半数以上が残留していた。SEM 観察より細胞は浮力により浮き上がるも仮足によりスキヤホールドへ強固に機械的に接着し剥離が困難であった。細胞骨格は Cntl での単一方向から様々な方向へ重畳した発達が観察され、接着斑も同様に発達している様子が観察された。骨芽細胞機能性評価の一つであるカルシウム定量においても、Im2000 では、Cntl の 2 倍以上の高値を示した。

3.3 MC3T3-E1 培養

培養細胞形態は、SaOS2 と同様イモゴライト上では全方位に等方的に大きく伸展していた。細胞増殖数は、イモゴライト量が増加するに従って増加した。Im2000 では、Cntl と比較し約 1.5 倍程度有意に増加していた。これは、スキヤホールドのナノスケール大の幾何学的メッシュワーク構造による非常に大きな表面積、さらに大きな表面積により向上したと考えられる吸着蛋白質およびリリースケイ素の働きによると考えられる。細胞骨格もまた様々な方向へ発達している様子が観察された。骨芽細胞機能において Im2000 では Cntl と比較し ALP 活性は約 2 倍以上高い値を示した。また、Im2000 では Cntl と比較しカルシウム定量値は約 2 倍以上の高値を示した。これらは、スキヤホールドの表面形態、表面積、表面粗さ、ぬれ性、スキヤホールド表面へ吸着した蛋白質、リリースケイ素等、機械・化学的様々な要因が作用した結果、スキヤホールドからのナノレベルの刺激がナノレベルでの細胞応答を昂進したものと考えられる。

4. 結論

イモゴライトは優れた細胞親和性を有し、骨芽細胞の接着、伸展、増殖を昂進し、石灰化機能の促進が示唆された。以上よりイモゴライトスキヤホールドによる細胞増殖・組織再生をはじめとした、様々なバイオ応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 佐 野 英 彦

学 位 論 文 題 名

Basic research for biomedical application of aluminosilicate nanotubes, imogolite

(アルミノシリケートナノチューブ (イモゴライト) の
バイオ応用に関する基礎研究)

近年、カーボンナノチューブをはじめとするナノマテリアルのバイオ応用開発が盛んになりつつある。イモゴライトは、火山灰土壤中に存在する天然のアルミノシリケートで、外径約 2nm、内径約 1nm、長さ数 10nm～数 μm のナノチューブである。その形状ゆえに比表面積が 900～1100 m^2/g と非常に大きく、水との親和性も非常に優れ、バイオ応用できる可能性が高い。本研究では、イモゴライトの基礎的バイオ特性を調べることを目的として、骨芽細胞を用いて、スキャホールドを作製し、細胞増殖と機能性に及ぼす影響を検討した。合成イモゴライトスラリーを培養ディッシュ上にコートしスキャホールド作製後、表面形態の SEM 観察、表面粗さおよび接触角測定によるぬれ性、蛋白質吸着能等の評価を行った。通法に従って骨芽細胞様細胞 (Saos-2 および MC3T3-E1) の細胞培養を行い、細胞形態観察、増殖数測定、トリプシンを用いた細胞剥離による接着性評価、ローダミン蛍光染色による細胞骨格観察および ALP 活性、アリザリンレッドによる石灰化部染色、カルシウム定量の骨芽細胞機能の評価を行った。

スキャホールド表面形態は、コートしたイモゴライト量に依存し、島状凝集体→一方向に自己組織化した単層構造→ランダムに配向した積層構造へと変化した。ランダム配向積層体では粗さは比較的大きく、ぬれ性および蛋白質吸着能は最高特性を示した。イモゴライト上では通常の紡錘形と比較し、全方向に等方的に大きく伸展し、葉状および糸状仮足が発達し、細胞増殖数も優位に高かった。剥離試験から細胞は仮足により強固にスキャホールドに接着し、細胞骨格は通常の単一方向から様々な方向へ重畳した発達を観察された。骨芽細胞機能において、コントロールに比べ ALP 活性は 2 倍以上高く、細胞コロニーの中心部に石灰化結節が観察され、カルシウム定量値も早期から検知され、2 倍以上の高値を示した。イモゴライトは優れた細胞親和性を有し、骨芽細胞の接着、伸展、増殖を昂進し、骨形成機能の促進が示唆された。以上よりイモゴライトにおけるスキャホールドによる細

胞増殖・組織再生への応用をはじめとした、様々なバイオ応用の可能性が示唆された。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

- ① イモゴライトスキャホールドの表面構造の変化について
- ② イモゴライトの配列方向および培養細胞骨格の伸長方向の関連について
- ③ 硬組織誘導能を有するイモゴライト含有歯科充填剤開発について
- ④ ナノチューブの毒性および生分解性について
- ⑤ イモゴライトのケイ素放出能および放出後のナノチューブ構造の変化について
- ⑥ イモゴライトの現時点での応用例について
- ⑦ この4年間の研究における失敗について
- ⑧ 今後の展望について

などであり、これらの質問に対し申請者から適切かつ明快な回答が得られた。実験手技についても詳細を熟知しており、申請者が関連分野について幅広い知識を有していることが明らかになった。さらに本研究の発展を見据えた展望について、ならびに発展に必要な研究についての具体的な提示が申請者から示された。以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与するのに十分な学識・資質を有しているものと認めた。