



# 組織の再生を促す生体活性ガラスの開発

小幡亜希子（名古屋工業大学 生命・応用化学科 環境セラミックス分野）

# コンテンツ

1. 背景
2. 細胞に対するイオンの組合せ効果
3. わた状ガラス繊維構造体の作製
4. まとめ

# 背景

## 生体活性ガラスの発明 (1970年頃)

Prof. Larry Hench

University of Florida

### 45S5 bioactive glass

(46.1SiO<sub>2</sub>-26.9CaO-24.4Na<sub>2</sub>O-2.5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in mol%)

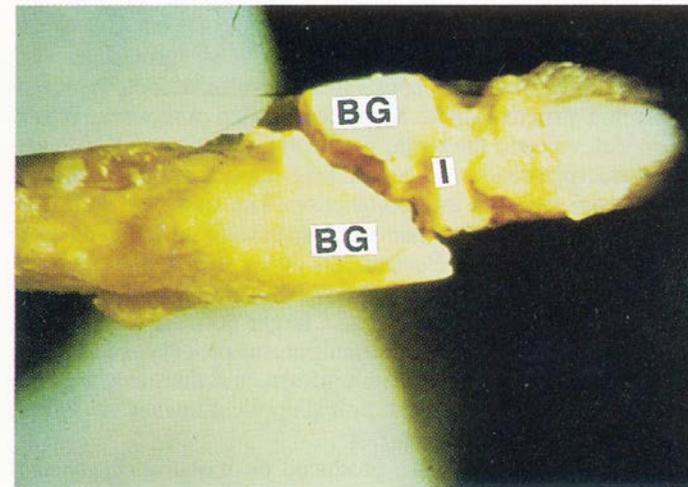
#### 生体活性ガラス・セラミックス

- ✓ 生体内で化学的に反応
- ✓ 骨と自然に直接化学結合する

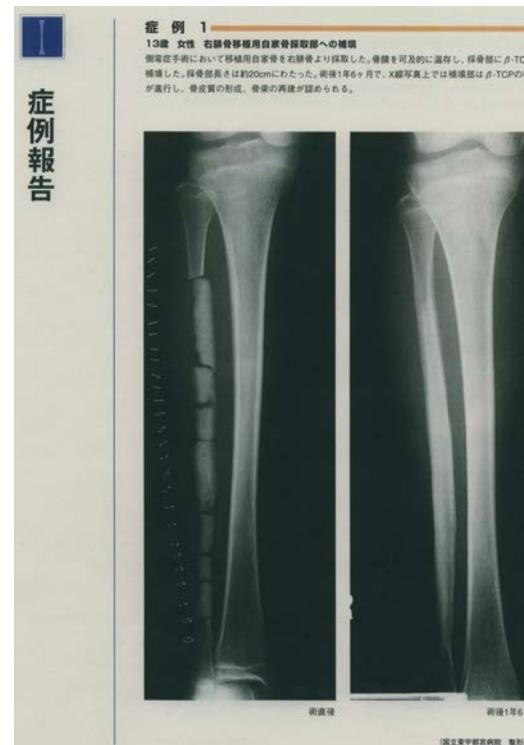
Bioglass® (45S5 bioactive glass)

水酸アパタイト  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

β-リン酸三カルシウム  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  など



(Hench LL, 1998)



(Bio-glasses edited by Jones and Clare, 2012)

β-リン酸三カルシウム  
(HOYAカタログより)

# 背景

## 骨の成長に対するSiの影響（1970年頃） Carlisleらの報告

- ✓ Siが骨の成長部位に特に多く存在
- ✓ 正常な骨格成長にSiの摂取が重要

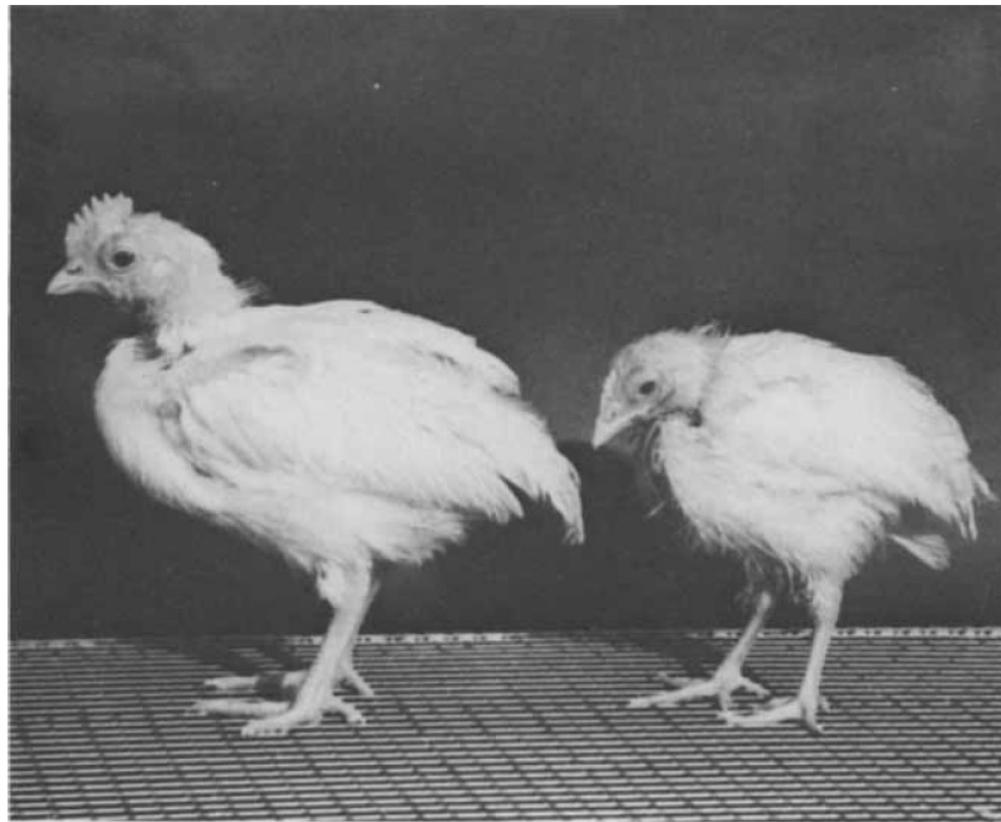


FIG. 1. Four-week-old chicks on silicon-supplemented diet (left) and low-silicon basal diet (right) (Carlisle 1972).

# 背景

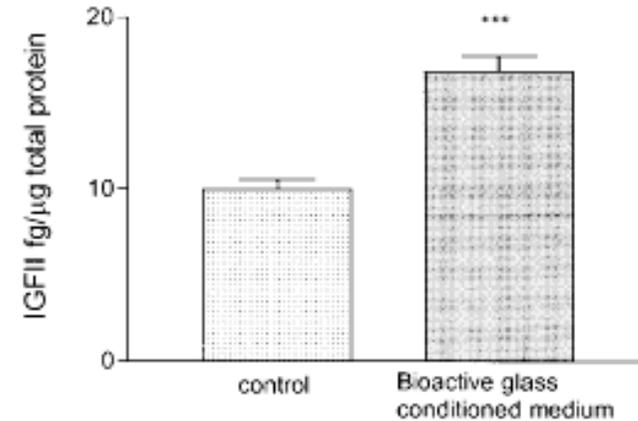
45S5 bioactive glassの優れた骨形成機能の要因の一つとして溶出イオンに着目

## 45S5 bioactive glass

(46.1SiO<sub>2</sub>-26.9CaO-24.4Na<sub>2</sub>O-2.5P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in mol%)

45S5ガラスから溶出する微量のSiとCaが  
ヒト骨芽細胞の増殖を促進

- ・骨芽細胞の生細胞数が増大;コントロールの155%
- ・成長因子(IGF II)の産生を促進;コントロールの290% →



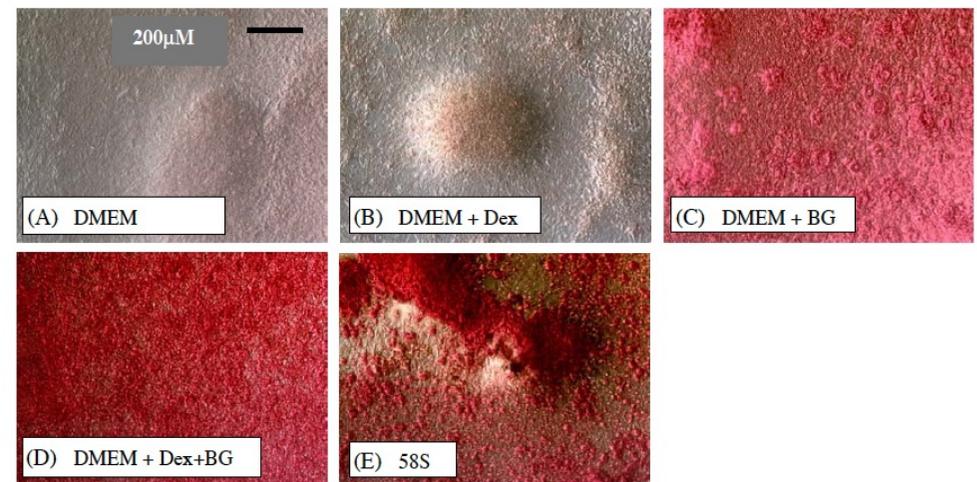
(Xynos ID. *et al.*, 2001)

## 58S bioactive glass

(60SiO<sub>2</sub>-36CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in mol%)

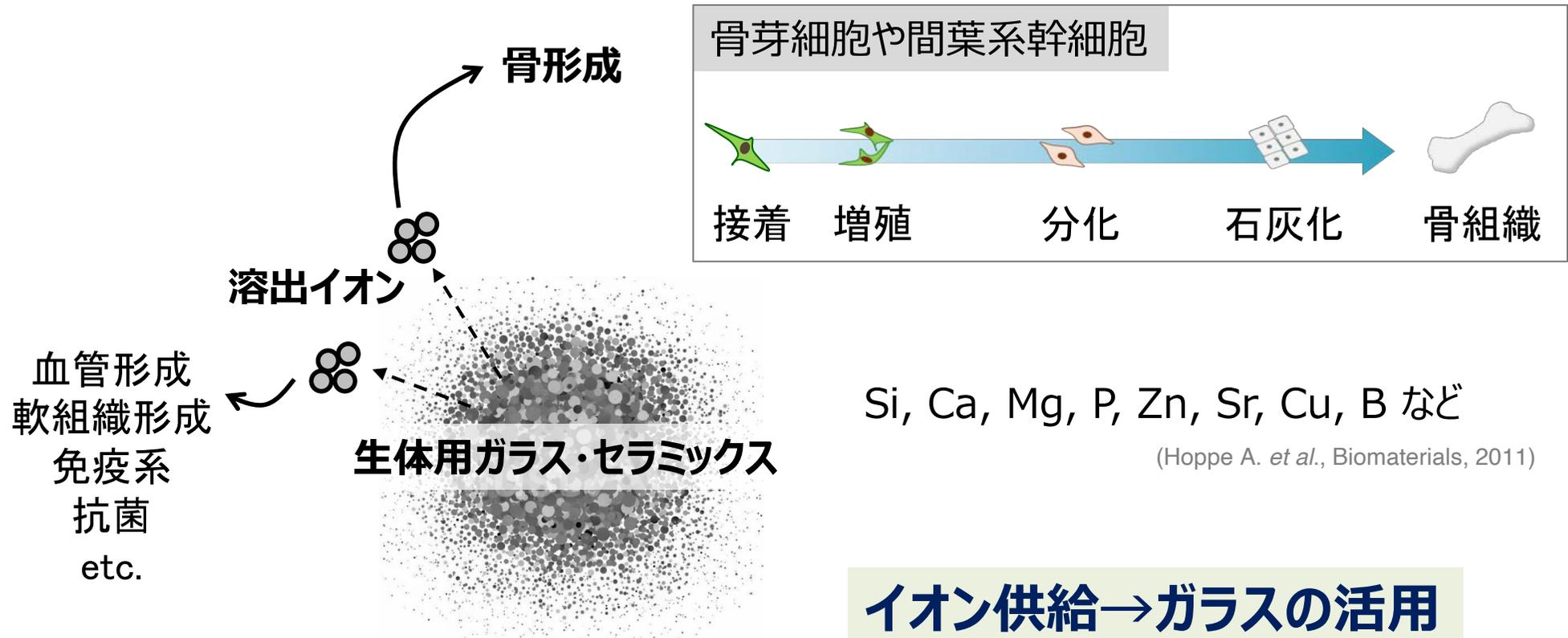
58Sガラスから溶出する微量のSiとCaが  
ヒト骨芽細胞の石灰化を誘導

- ・ガラスからのイオン供給のみで細胞の石灰化を引き起こす(赤色部位が石灰化基質) →



(Gough JE. *et al.*, 2004)

# 背景



## イオン供給→ガラスの活用

### 組成設計

細胞に対するイオンの組合せ効果



### 形状設計

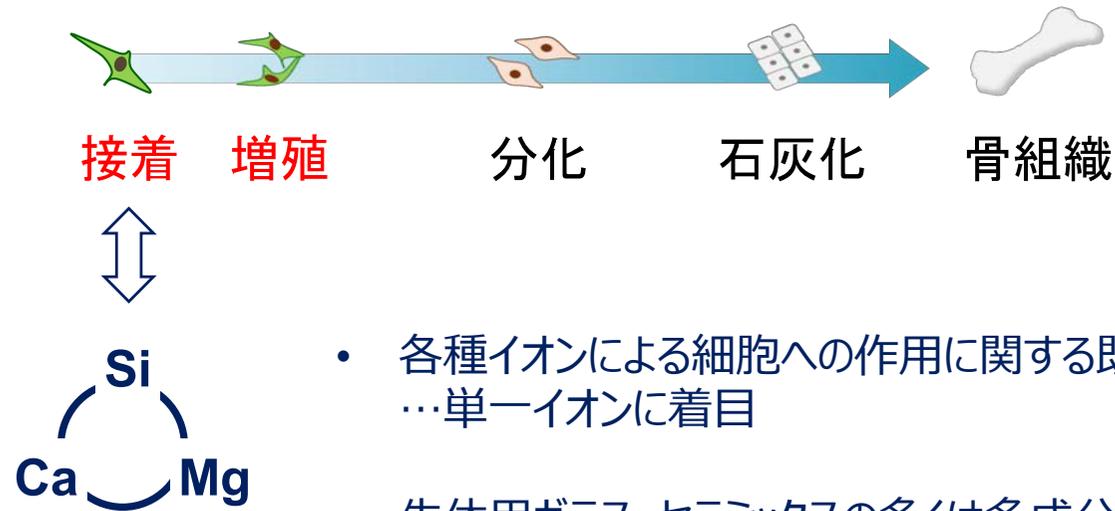
わたの様なガラス繊維構造体



生体活性ゾルゲルガラス  
70SiO<sub>2</sub>-30CaO mol%  
+  
抗菌  
Ag

# ストラテジー

骨芽細胞や間葉系幹細胞



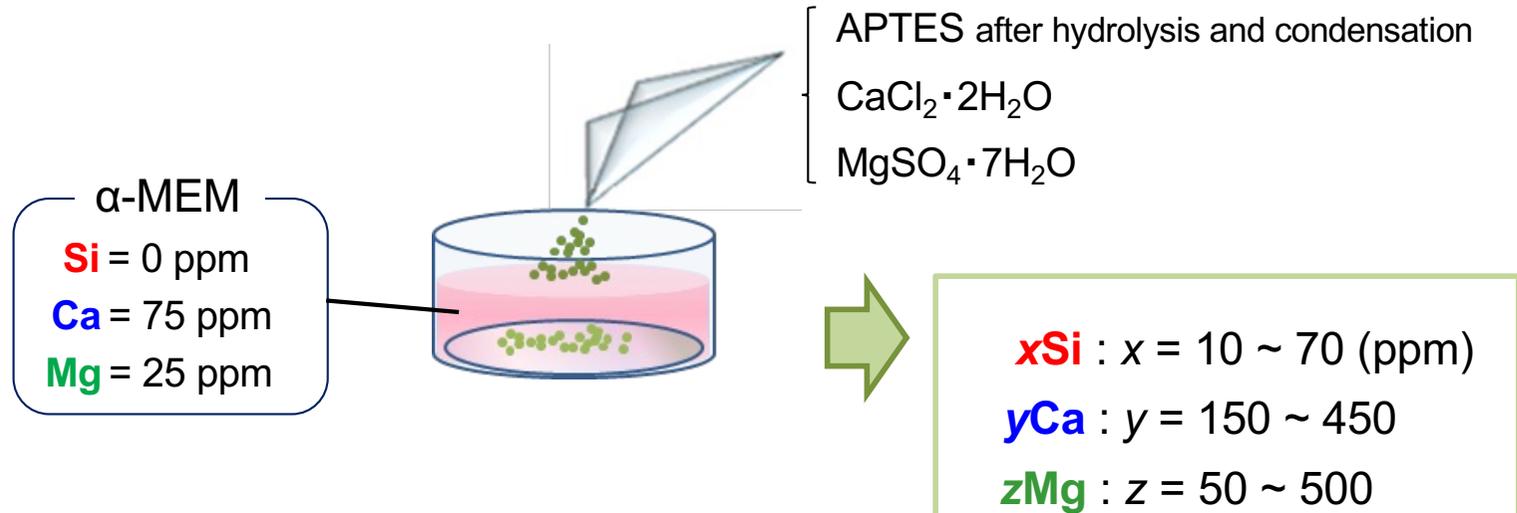
- 各種イオンによる細胞への作用に関する既報  
…単一イオンに着目
- 生体用ガラス・セラミックスの多くは多成分系

活性化効果が報告されているSi, Ca, Mgについて  
組合せによる作用（相乗・拮抗作用）の調査

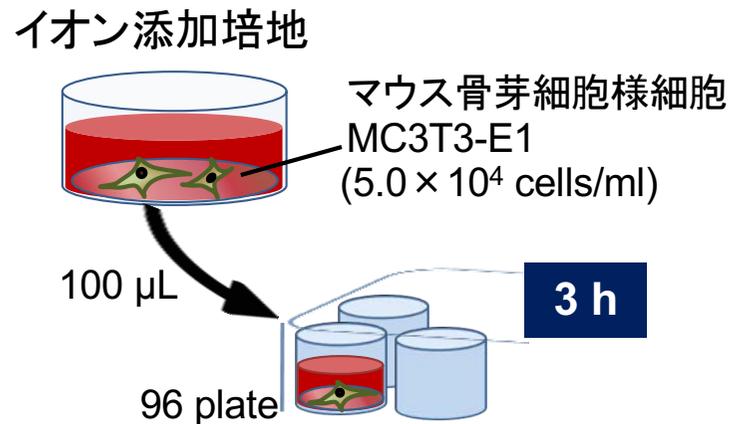
組織再生の促進に有効な組合せ

# 実験方法

## イオン添加培地の作製



## 接着試験



**xSi-yCa**

**xSi-zMg**

**yCa-zMg**

**xSi-yCa-zMg**

# 1成分系

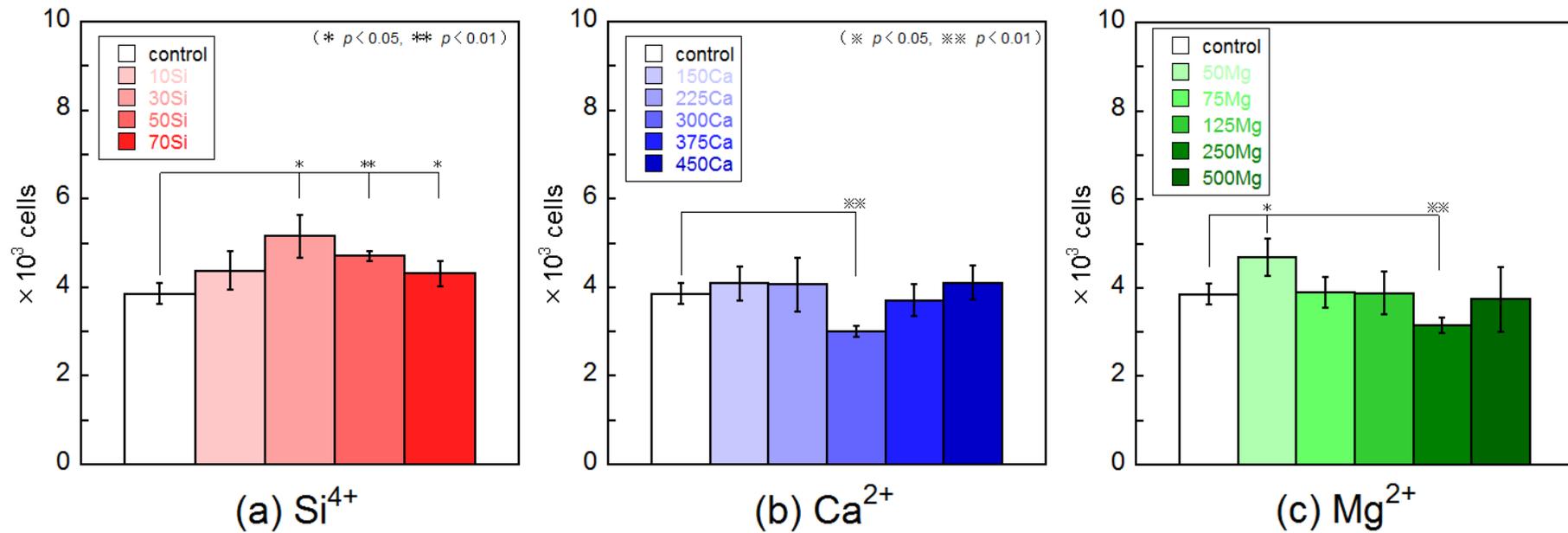
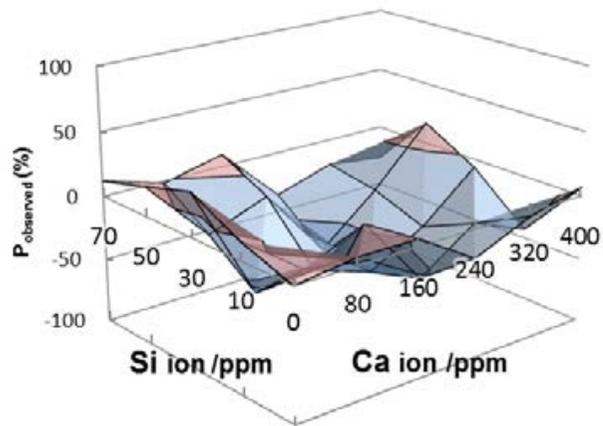
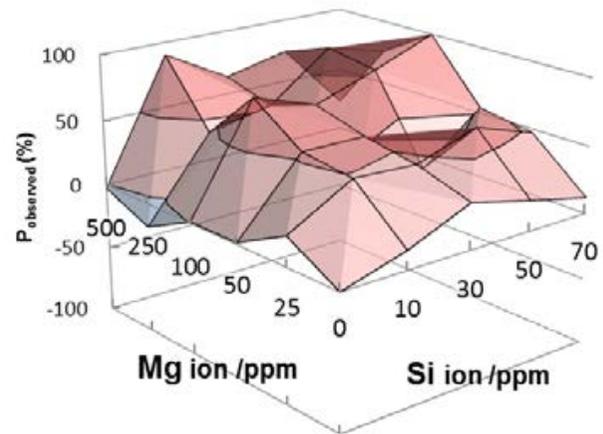


Fig. MC3T3-E1 cell numbers after 3 hours of culture in ion containing media.

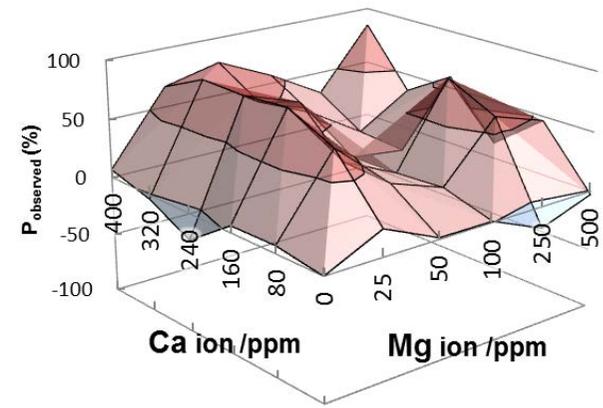
# 2成分系



Si-Ca



Mg-Si



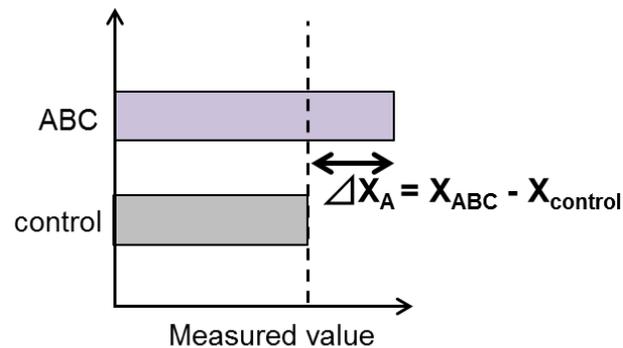
Ca-Mg

Fig. Adhered cell numbers cultured for 3 hours in ions containing media.

# 組合せ効果の判定方法

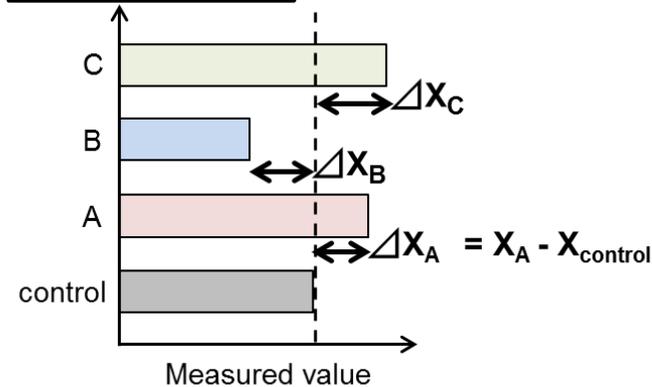
(J.C. Wataha, *et al*, 1992)

**observed**



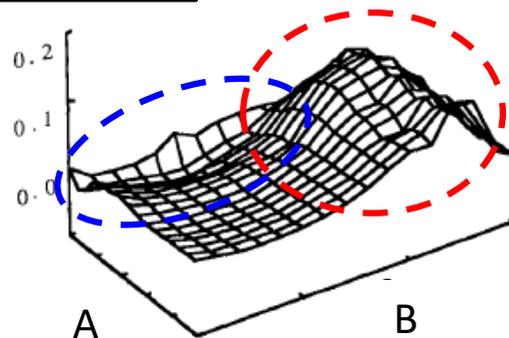
$$P_{\text{observed}} = \frac{\Delta X_{\text{ABC}}}{X_{\text{control}}} \times 100 (\%)$$

**expected**



$$P_{\text{expected}} = \frac{\Delta X_A + \Delta X_B + \Delta X_C}{X_{\text{control}}} \times 100 (\%)$$

**differential**



observed – expected > 0

→ 相乗作用

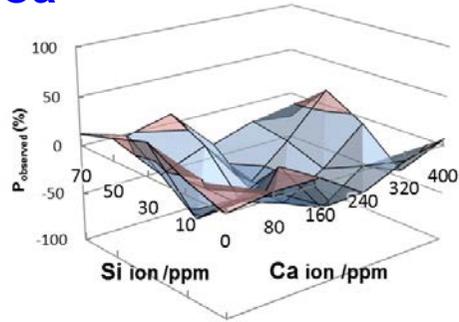
observed – expected < 0

→ 拮抗作用

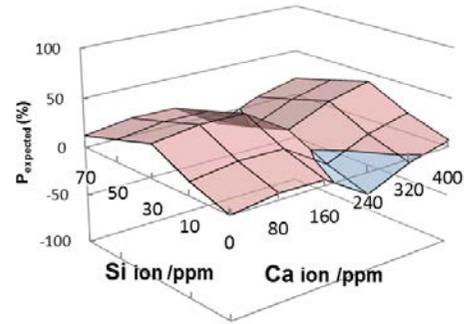
# 2成分系

Si-Ca

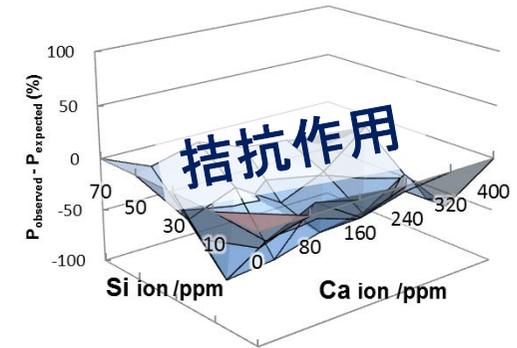
observed



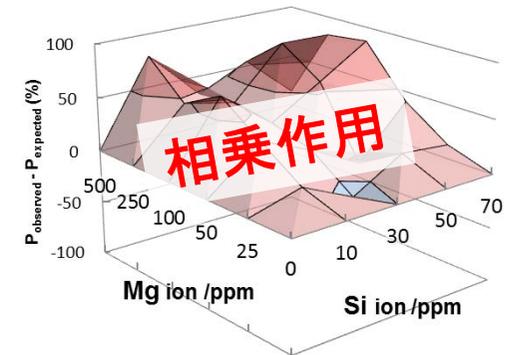
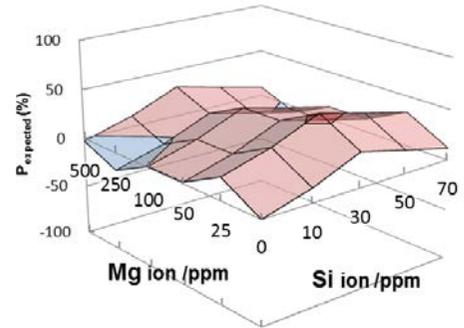
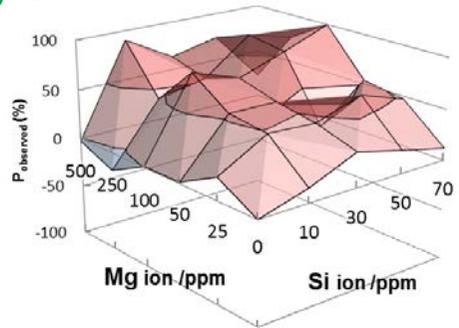
expected



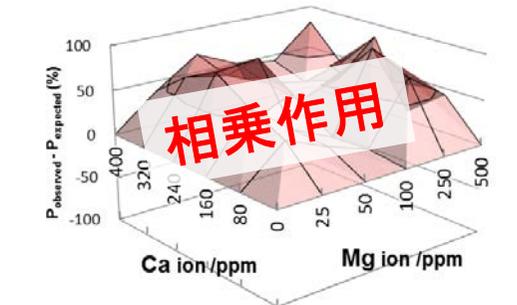
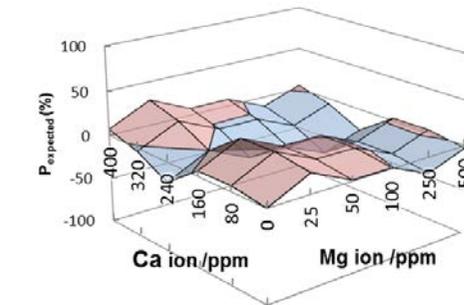
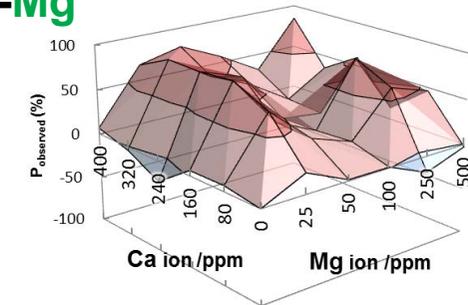
differential



Mg-Si

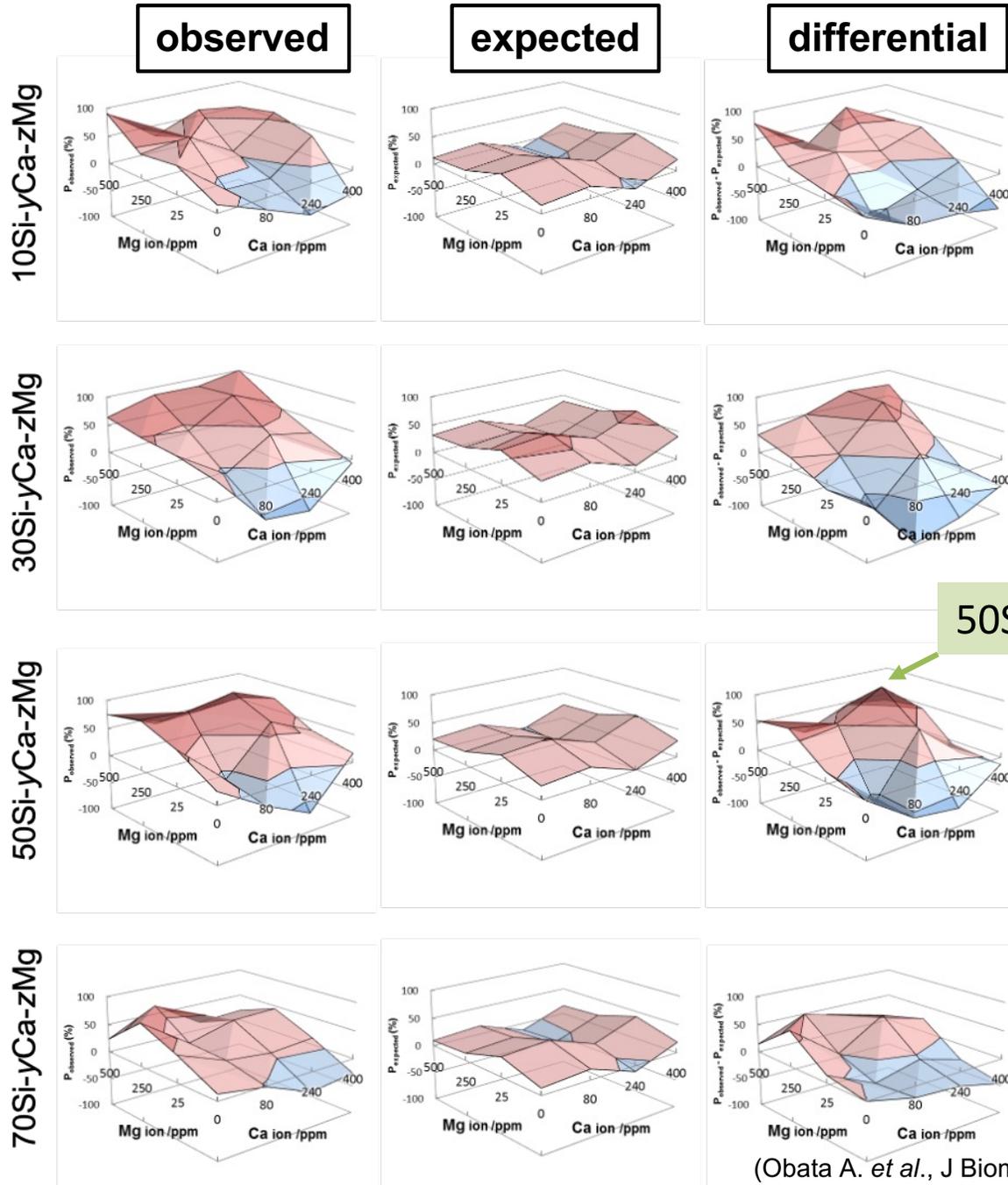


Ca-Mg

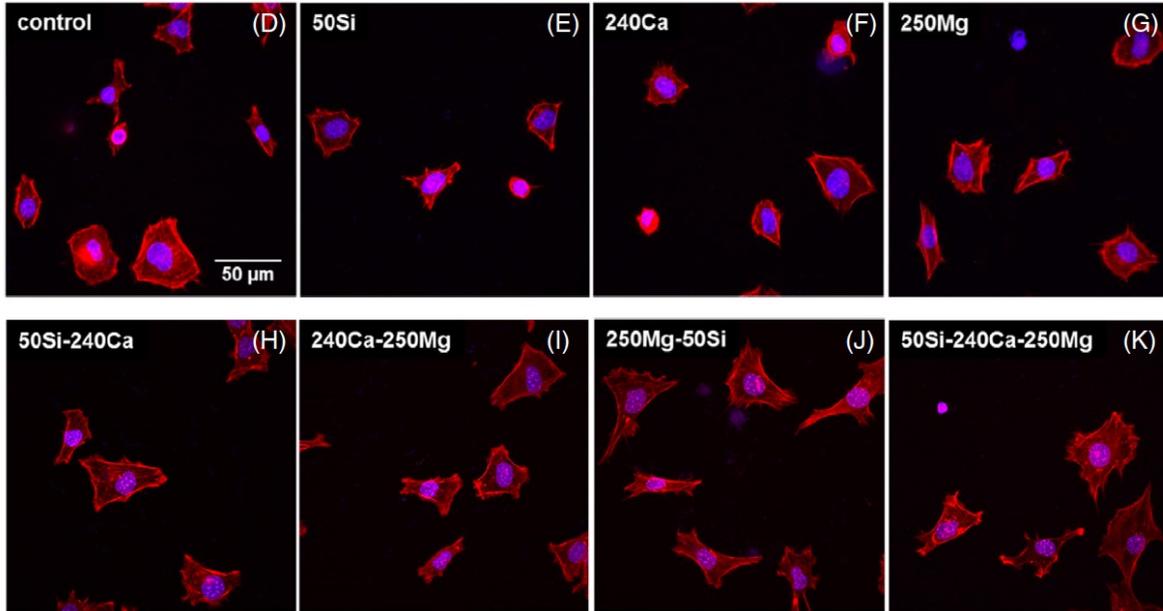


# 3成分系

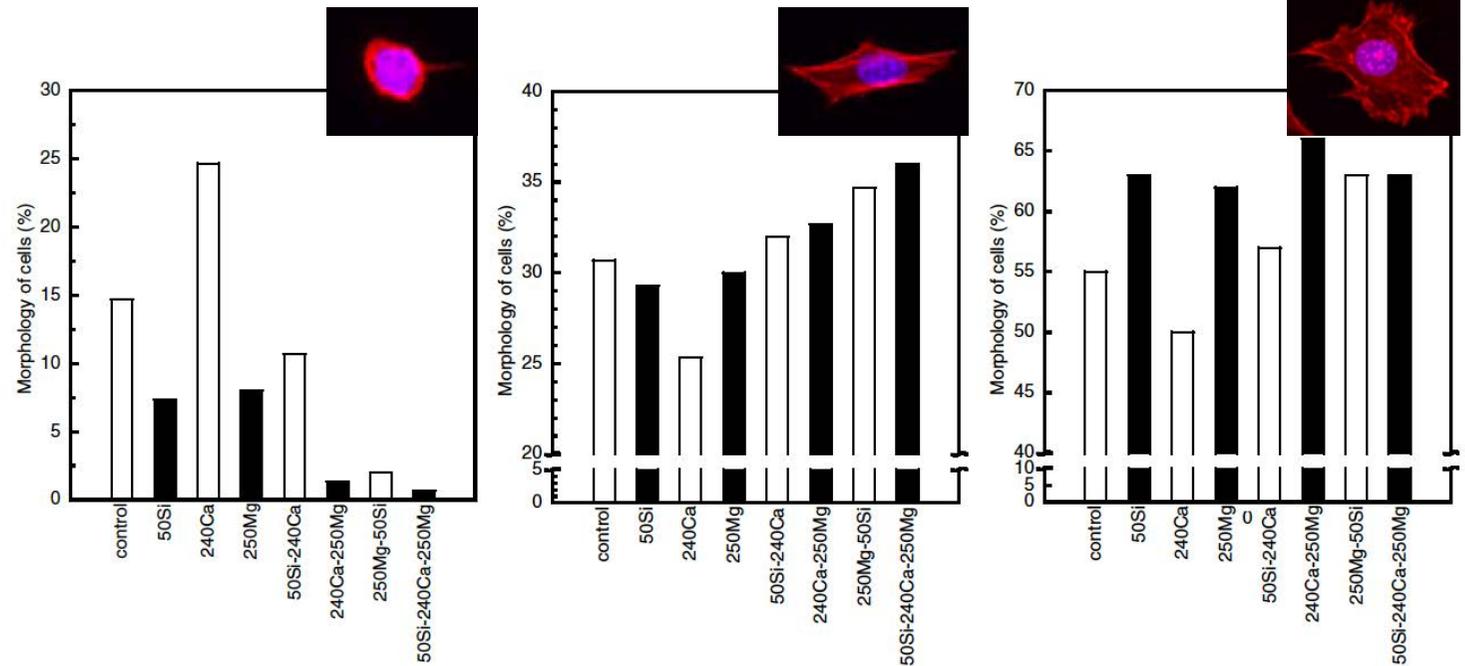
Si量増大



# 50Si-240Ca-250Mg



細胞の蛍光染色画像  
 青色；核  
 赤色；F-アクチン



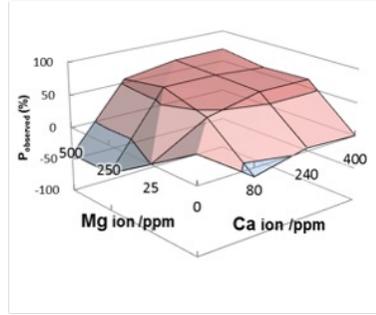
各形状の細胞の存在割合  
 (150個の細胞を対象に、  
 アスペクト比と枝分かれ数から分類)

# 3成分系

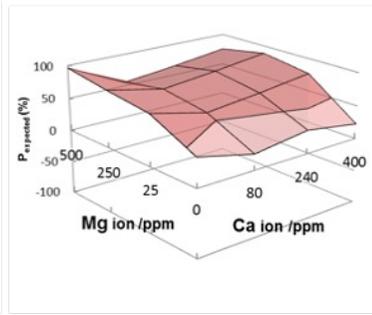
増殖  
(5日間培養)

Si量増大

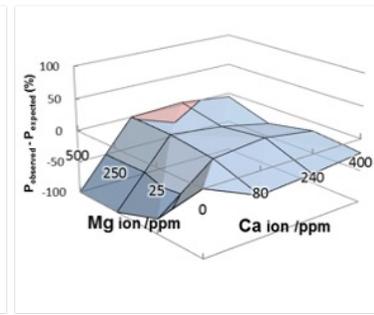
10Si-yCa-zMg



observed

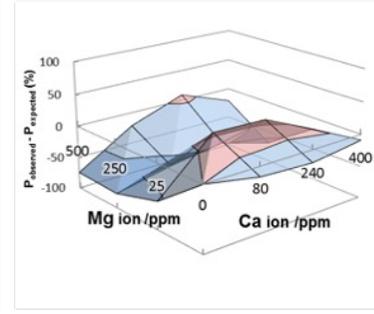
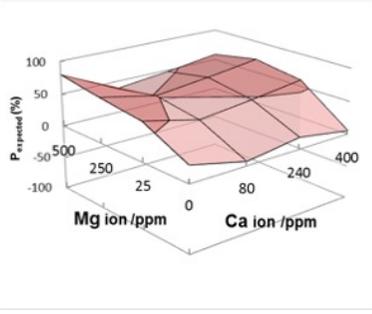
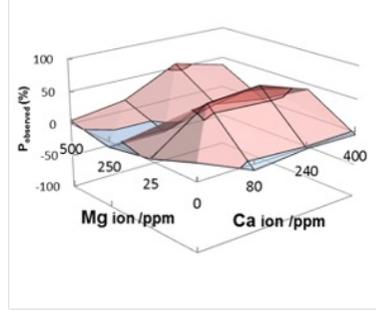


expected

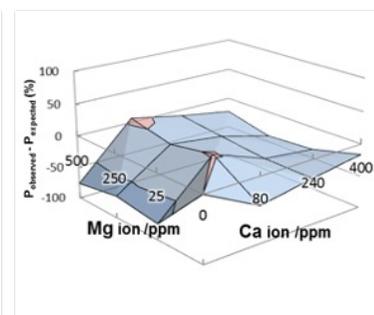
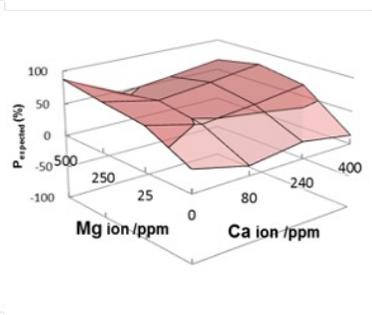
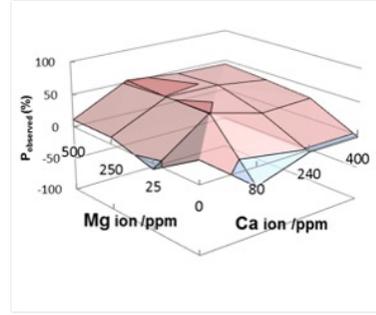


differential

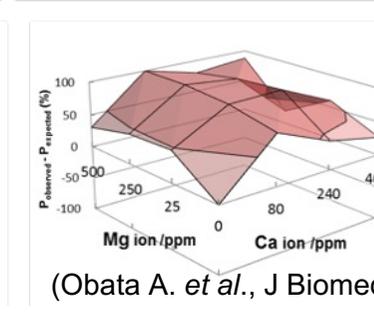
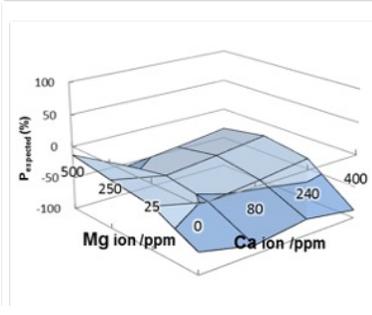
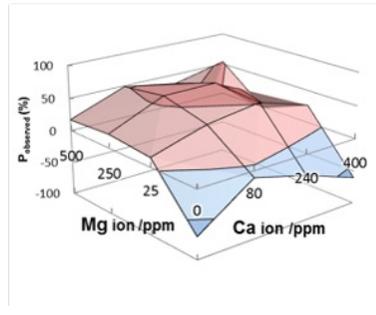
30Si-yCa-zMg



50Si-yCa-zMg



70Si-yCa-zMg



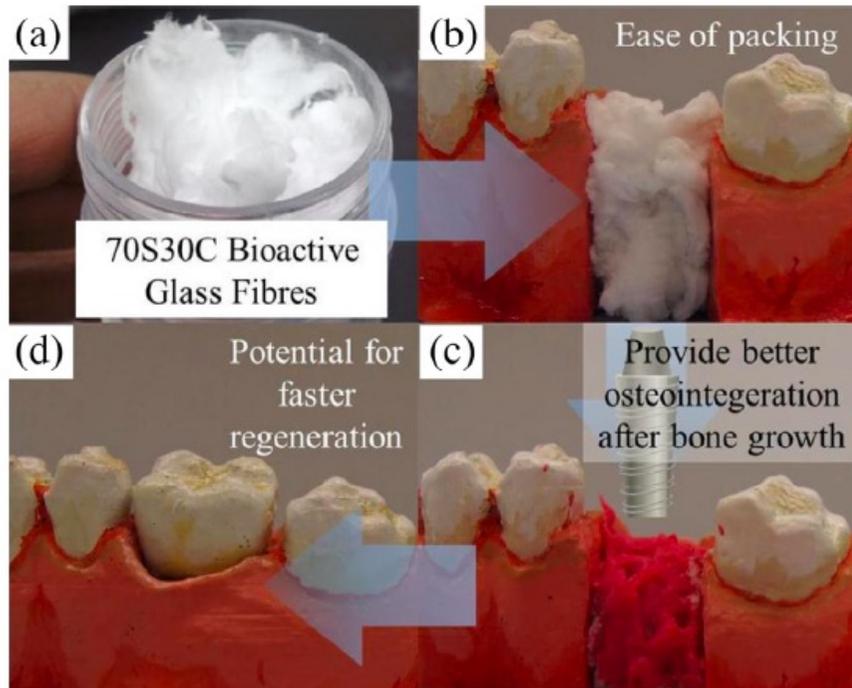
# まとめ（イオンの組合せ効果）

骨芽細胞様細胞に対するSi, Ca, Mgの3種のイオンの供給において、組み合わせによる影響を調査した。

- 3種のイオンを全て供給することで、接着した生細胞数が増大した。
- Mgイオンの供給によって、接着過程に対する相乗効果を確認した。
- 接着および増殖過程に対し、相乗効果をもたらす因子となるイオン種は異なることがわかった。（接着ではMg、増殖ではSi）

**イオン供給源となる生体活性ガラス・セラミックスの組成の設計に活用**

# ストラテジー

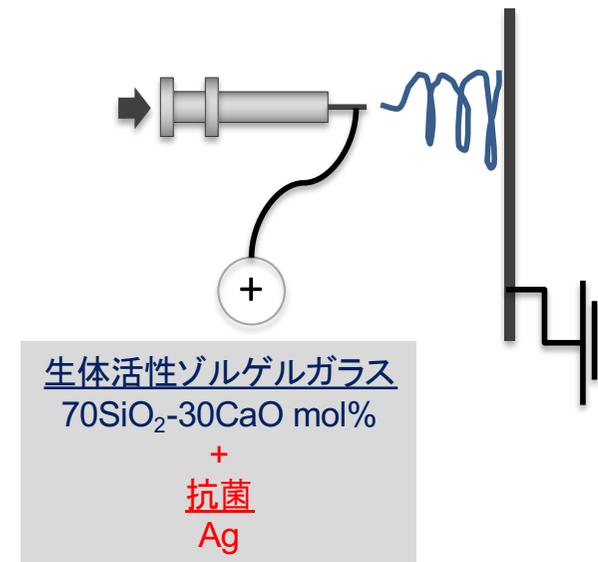


- イオンによる骨形成の促進
- 複雑形状部位にも対応可能な柔軟性と操作性
- 軟組織再生への展開

わたの様な立体的な繊維構造体

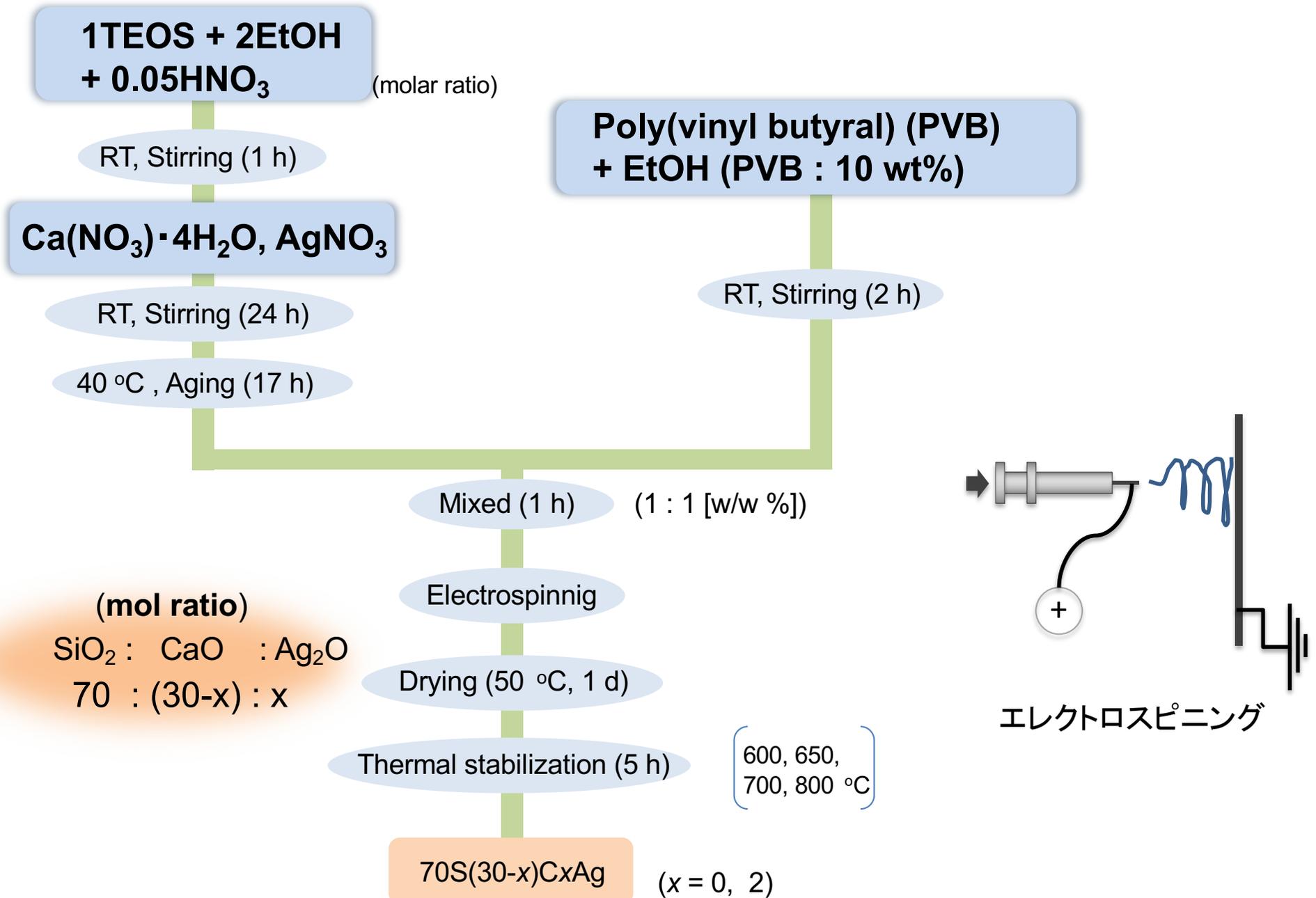
## エレクトロスピニング法（電界紡糸法）

シート状の繊維構造体（不織布）の作製方法の一つ



- 積層する繊維の立体化
- Agイオンの溶出による抗菌機能付与（感染予防→正常な組織再生）

# 実験方法



# 外観

スピニング時の湿度

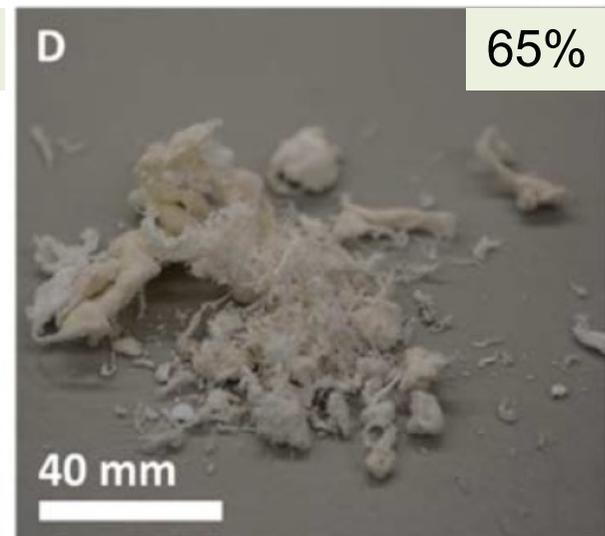
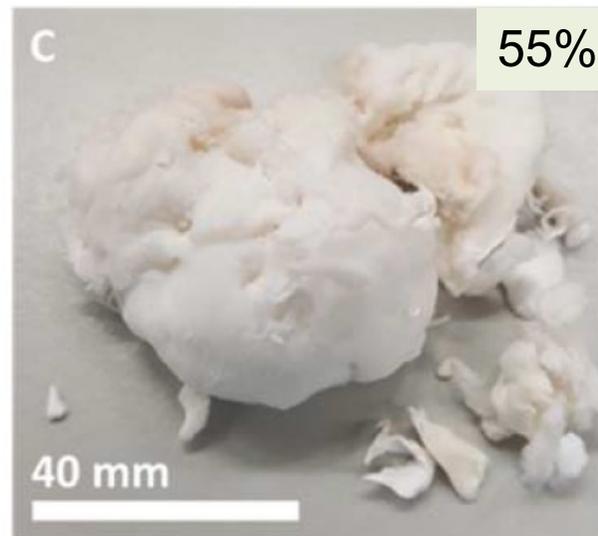
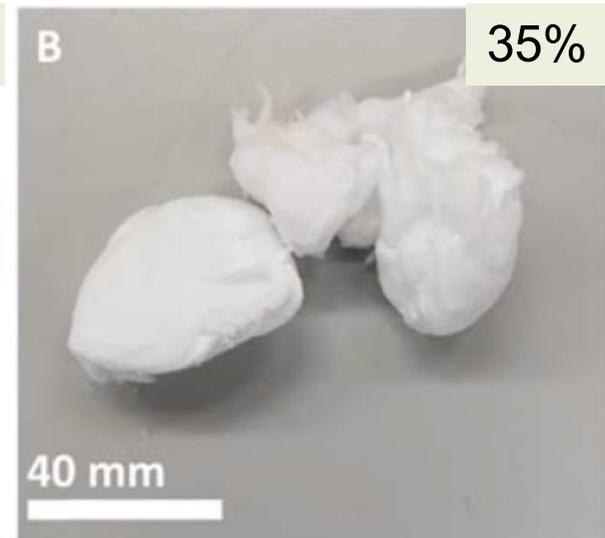
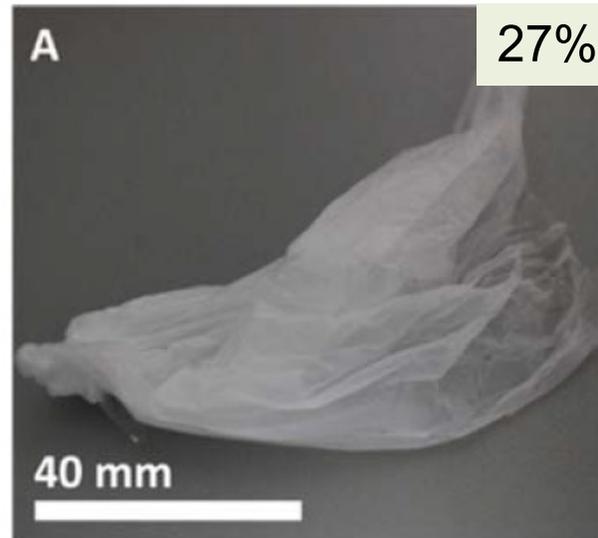
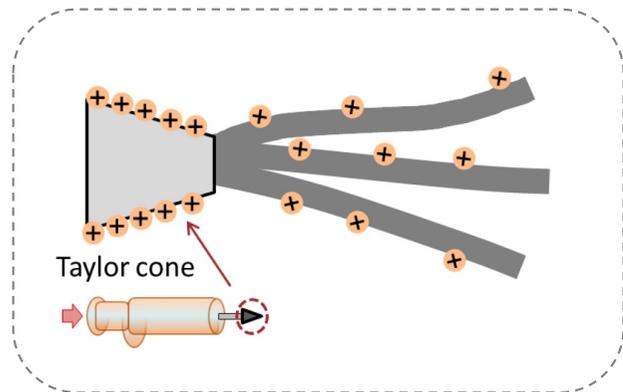
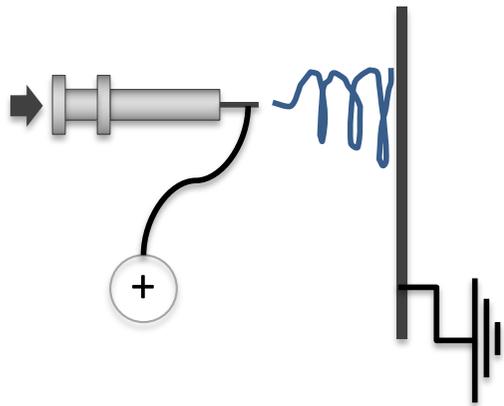


Fig. Photographs showing the morphology of 70S30C sol electrospun at different relative humidity values (A) 27%, (B) 35%, (C) 55% and (D) 65%.

# SEM·XRD

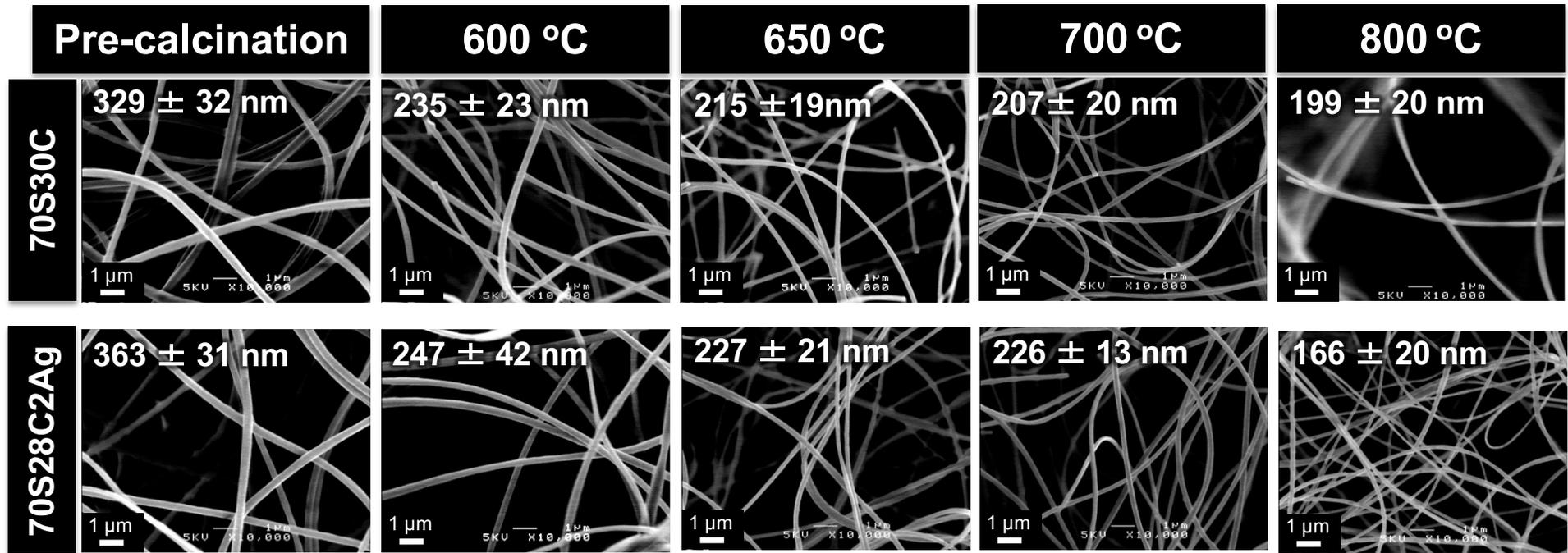


Fig. SEM images of the 70S30C and 70S28C2Ag samples with different stabilization temperatures.

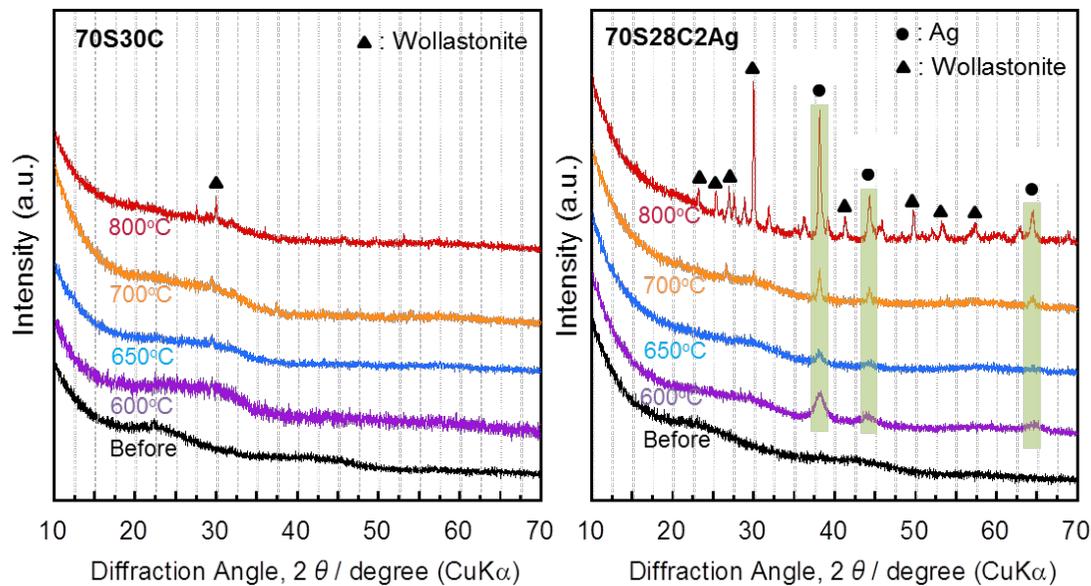


Fig. XRD spectra of the 70S30C and 70S28C2Ag samples with different thermal stabilization temperatures.

# TEM

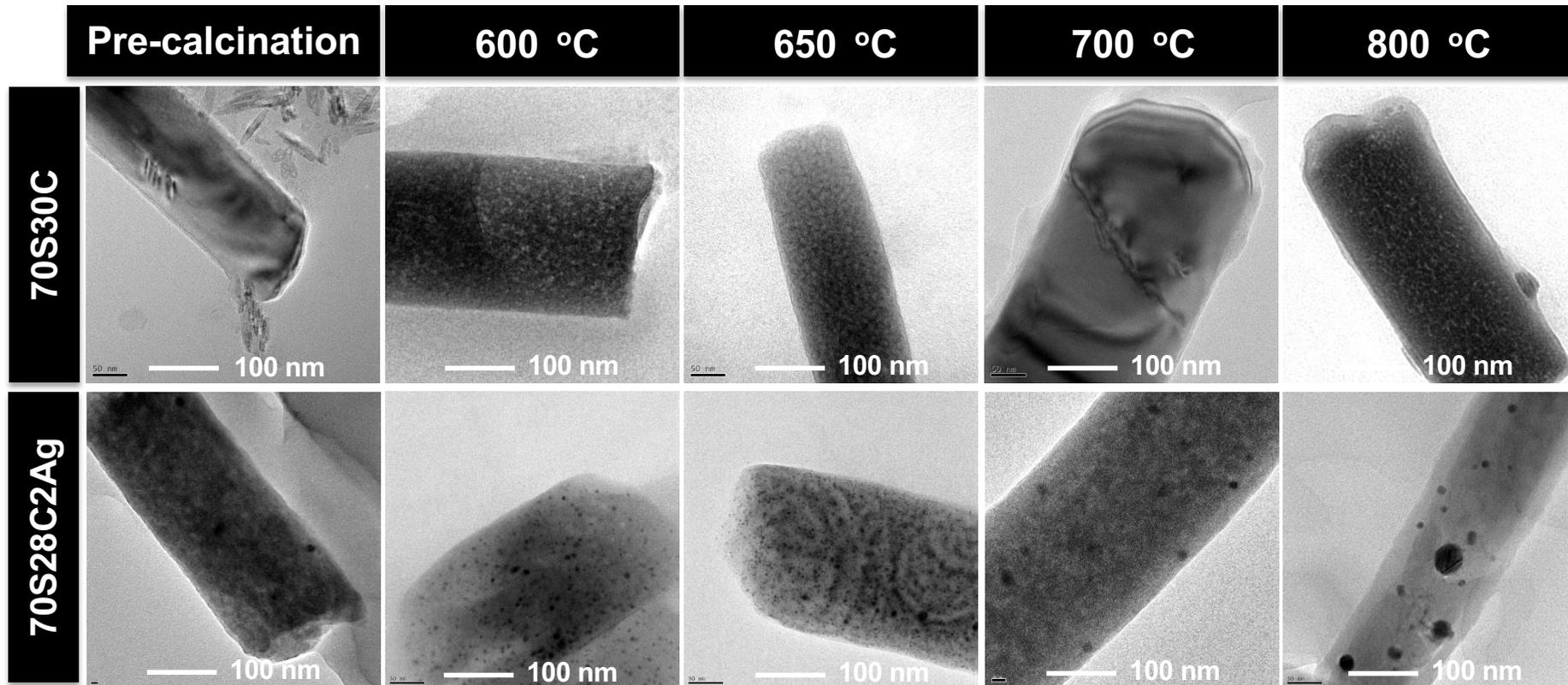


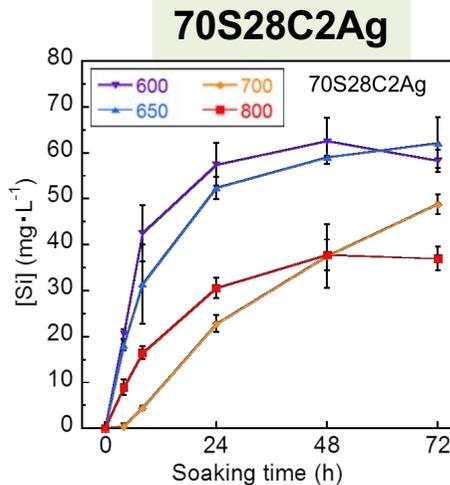
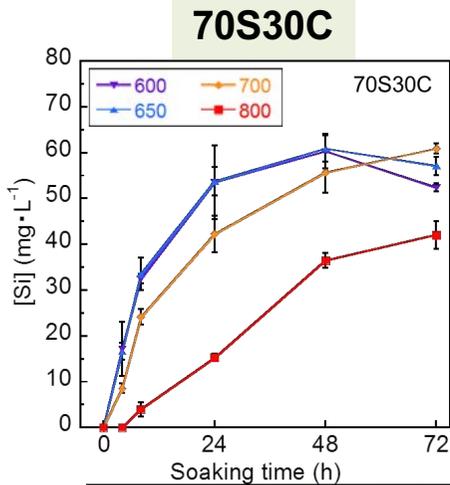
Fig. TEM images of the 70S30C and 70S28C2Ag samples with different stabilization temperatures.

Table  
Silver mean diameter in  
70S28C2Ag samples from TEM  
images at different stabilizing  
temperatures.

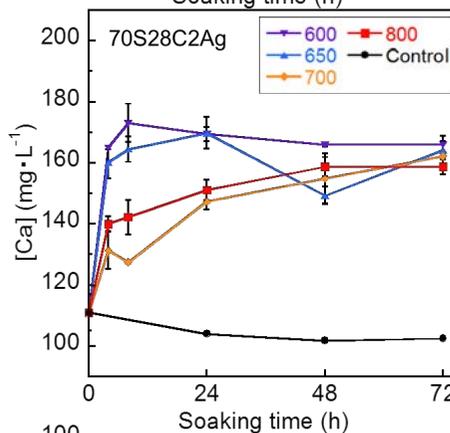
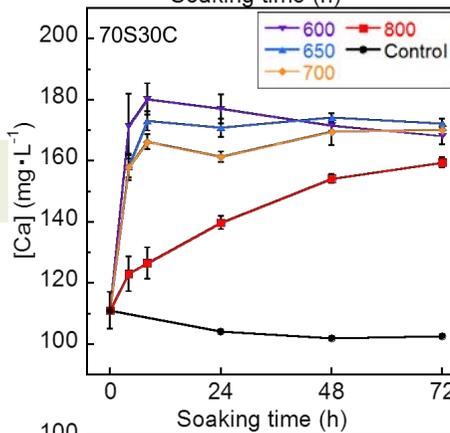
Temperature (°C)	Mean diameter (nm)
600 °C	3.68 ± 1.17
650 °C	3.96 ± 1.35
700 °C	12.5 ± 1.29
800 °C	25.98 ± 12.29

# 培地中でのイオン溶出

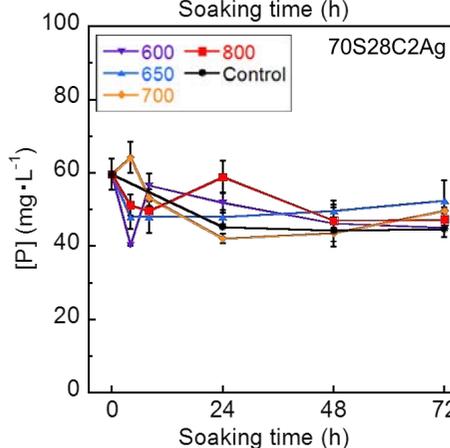
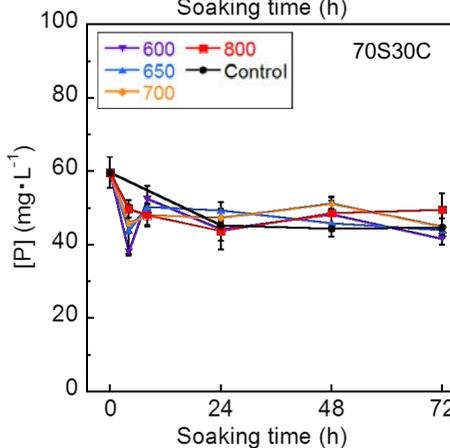
Si



Ca



P



Ag

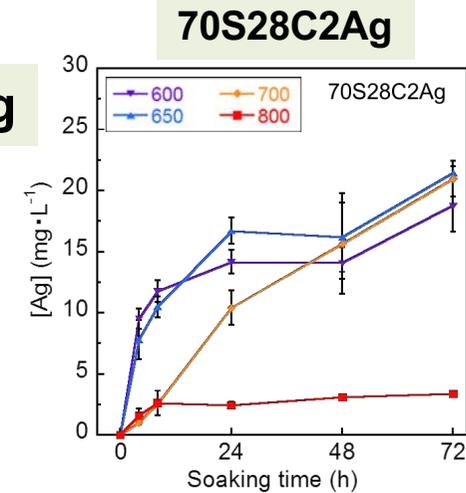


Table Specific surface area (m<sup>2</sup>/g) at different stabilizing temperatures.

Temperature (°C)	70S30C	70S28C2Ag
Pre-calcination	5.35	12.6
600	11.0	25.6
650	20.6	18.6
700	35.6	17.7
800	12.9	10.3

# 抗菌試験

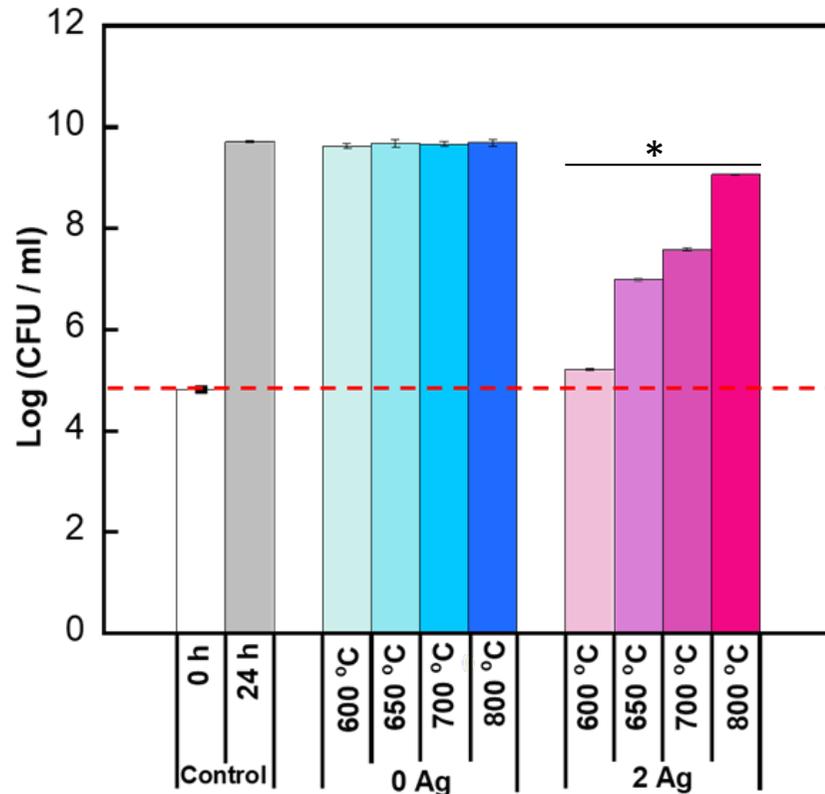
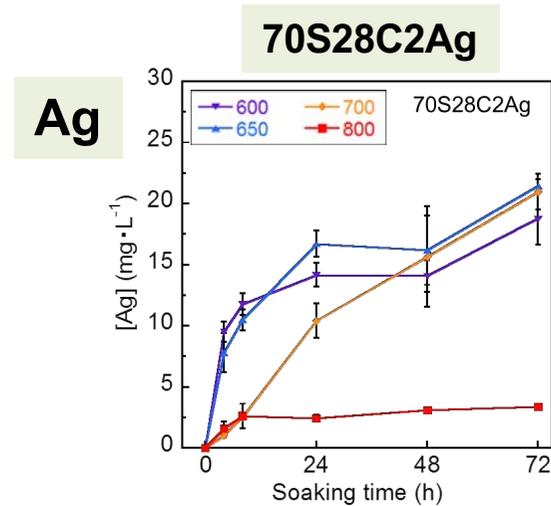


Fig. Number (log CFU/mL) of *E. coli* after 24 h cultivation with the 70S30C (0Ag) and 70S28C2Ag (2Ag) samples with different calcination temperatures. (dotted line; the level of Control sample before cultivation) (\*  $p < 0.05$  vs Control@24 h).



# まとめ（わた状ガラス繊維構造体）

生体活性ゾルゲルガラス（70SiO<sub>2</sub>-30CaO mol%）について、わたの様な繊維構造体を作製した。また、抗菌機能を付与すべくAgの導入を試みた。

- スピニング時の湿度によって、シート状やわた状の繊維構造体を得られた。
- 焼成温度を上昇させるに従って、Ag粒子の成長が促進された。
- 焼成温度によって溶出イオン量が変化し、これに伴い抗菌機能の発現にも作用することがわかった。

**柔軟性や操作性の優れた生体活性ガラスであり、抗菌機能の付与も可能**

**硬組織だけでなく皮膚などの軟組織の再生にも活用が期待**