

Quarterly e-mail newsletter for

*Ceramics Research Forum in Medicine, Biomimetics, and Biology*

## ***THE DIVISION***

**No. 55**

**June 2010**

(夏号)

*Editor-in-Chief*      K. Teraoka, National Institute of Advanced Industrial Science and  
Technology (AIST)

*Associate Editor*    T. Miyazaki, Kyushu Institute of Technology  
T. Kawai, Yamagata University

*Editorial Staffs*

J. Hamagami, Kurume National College of M. Neo, Kyoto University  
Technology

M. Hattori, NGK Spark Plug Co., Ltd.

S. Hayakawa, Okayama University

K. Ioku, Tohoku University

K. Ishikawa, Kyushu University

M. Kikuchi, NIMS

S. Nakamura, The University of Tokyo

M. Ohgaki, SII Nano Technology Inc.

C. Ohtsuki, Nagoya University

H. Takeuchi, HOYA Co.

N. Tomita, Kyoto University

H. Unuma, Yamagata University

# Contents

<b>1. MESSAGE &amp; OPINION</b> .....	<b>3</b>
< 巻頭言 >	
擬似体液について思うこと	(川下 将一)
<b>2. INFORMATION ON RESEARCH &amp; DEVELOPMENT</b> .....	<b>6</b>
< 編集部からの手紙 >	
擬似体液年表	
擬似体液に対する外国からの挑戦状？と思しき論文発見	
擬似体液に係るヒヤリハット集	
<b>3. INTRODUCTION OF RECENT PAPERS</b> .....	<b>13</b>
< 論文紹介 >	
<b>4. ANNOUNCEMENT</b> .....	<b>19</b>
< 行事案内 >	
< 編集部からのお知らせ >	
編集後記 .....	<b>22</b>

## 1. MESSAGE & OPINION

< 巻頭言 >

### 擬似体液について思うこと

東北大学大学院 医工学研究科

川下将一

私は1992年に京都大学の小久保正先生(現中部大学)の研究室に4年生として配属され、2003年の小久保先生の定年退職までの間、小久保研究室の学生および教員として過ごしました。後述のように擬似体液(Simulated Body Fluid: SBF)の論文発表が1990年ですので、私はSBFの開発そのものには関わっていません。しかし、SBFの開発者である小久保先生の間近で10年以上に亘ってSBFを取り扱ったということで私に巻頭言執筆の機会が与えられたようです。折角の機会ですので、特に生体セラミックス分野に飛び込んで間もない方々に向けてSBFに対する私見を述べてみたいと思います。

今日、国内外の生体セラミックスに関する学会に参加すれば、一度はSBFあるいは小久保溶液(Kokubo solution)という言葉を目にするかと思えます。

実際、SBFに関する以下の2つの代表的な論文

T. Kokubo *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24** (1990) 721-734.

T. Kokubo *et al.*, *Biomaterials*, **27** (2006) 2907-2915.

の被引用件数は、2010年3月17日現在、それぞれ1340および391件に上っており、SBFが世界中で広く認知されていることが窺えます。

1972年にHench先生が報告したBioglass<sup>®1)</sup>や、1982年に小久保先生が報告した結晶化ガラスA-W<sup>2)</sup>などは、生体内でその表面にアパタイト層を形成し、それを介して骨と結合します。骨修復あるいは骨置換材料の分野では、このように骨と結合する性質は「生体活性(bioactive)」と呼ばれています<sup>3)</sup>。私の認識では、元々SBFは、「生体内(*in vivo*)においてBioglass<sup>®</sup>や結晶化ガラスA-W等といった生体活性な材料の表面にどのような機構でアパタイト層が形成されるか？」を生体外(*in vitro*)で明らかにするための水溶液だったように思います。実際、上記の1990年の論文のタイトルは、“Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramics A-W(生体活性結晶化ガラスA-Wの*in vivo*での表面構造変化を再現し得る溶液)”というタイトルになっています。従って、SBFは「結晶化ガラスA-W等の生体活性材料の*in vivo*での結果を*in vitro*で再現(解釈)するための水溶液」として設計されたといえます。

一方、私が学生として小久保研究室に配属された1992年当時、SBFは当初の設計思想とは若干異なり、「生体材料の*in vivo*でのアパタイト形成の能力(アパタイト形成能)を*in vitro*で予測するための水溶液」として、研究室内で広く使用されていました。これは、その後の幾多の研究により、種々の人工材料のSBF中でのアパタイト形成能と同材料の動物実験の結果との間に比較的良好な相関関係が見られたためと思われる。このSBFは、その作製に高価な試薬・装置や特別な技術を必要とせず、特許化もされなかったため、これまでに世界中の(特に工学系の)研究者に広く使用され、アルカリー加熱処理チ

タン金属および合金<sup>4)</sup>などの新たな表面改質技術も生まれてきました。

このように SBF は生体材料(特に生体活性材料)分野の発展に多大な貢献をしてきた訳ですが、ここで注意すべきことは、「人工材料の SBF 中での表面反応が完全にそのまま生体内で再現されるとは限らず、人工材料の SBF でのアパタイト形成能と *in vivo* での骨結合性とは必ずしもイコールの関係ではない(例外も十分に考えられる)」ということです。実際、 $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)は SBF 中でアパタイトを形成しませんが<sup>5)</sup>、骨と結合します<sup>6)</sup>。また、アワビ貝殻は SBF 中でアパタイトを形成しますが<sup>7)</sup>、生体内では骨と結合しません<sup>8)</sup>。さらに、主に  $\delta$  型アルミナからなる粒子を含む骨セメントは、SBF 中ではアパタイトを形成しませんが、生体内で骨と結合します<sup>9)</sup>。従って、SBF を使用する研究者は、「SBF は人工材料の骨結合性を調べるための万能の水溶液ではなく、SBF 浸漬実験の結果『だけ』に囚われてしまうと、そこに隠された重要な知見や新たな骨結合性材料の前を素通りしてしまう可能性がある」ことを認識しておくべきでしょう。

また、SBF の 1.5 倍の濃度を有する水溶液(1.5SBF)を用いて人工材料の生体活性を評価する場合も注意を要します。人工材料の 1.5SBF 中でのアパタイト形成能と生体内でのアパタイト形成能との相関が明らかでないからです。最初に 1.5SBF が用いられたのは、有機高分子へのバイオメテックコーティング法<sup>10)</sup>においてであろうと思われます。同法では、先ず SBF 中でアパタイトの核を有機高分子上に形成させ、そのアパタイトの成長を促進するためにイオン濃度を高めた 1.5SBF が用いられています。以上のことから、今のところ、人工材料の生体活性評価法としての 1.5SBF の有用性には疑問符が付くといわざるを得ません。

一方、これまでに SBF の組成をヒトの体液のそれに出来るだけ近づけようとする試みもなされました<sup>11,12)</sup>。しかし、SBF のイオン濃度をヒトの体液のそれに近づけようすると、SBF の安定性、長期保存性あるいは再現性が低下しました。そこで 2007 年には、それまで広く用いられてきた組成(表 1 参照)の SBF が生体内における人工材料表面のアパタイト形成能を評価する標準溶液として国際標準化機構(ISO)に登録されました。

表 1 ヒト血漿および SBF のイオン濃度

	イオン濃度 / mM							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
ヒト血漿 <sup>13)</sup>	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0.5

人工材料表面でのアパタイト形成能評価系の一つとして SBF は確かに優れた水溶液です。しかし、上述したように、SBF の試験結果だけに頼ると、そこに埋もれた新たな知見や興味深い材料を見落とす可能性も皆無ではありません。ここらで人工材料の骨結合性の新たな *in vitro* 評価法を考えてみても良いかも知れません。人工材料の骨結合性に対する(SBF 以外の) *in vitro* 評価法としては、種々の細胞を用いた実験が思い浮かびますが、同実験においても、今のところ、人工材料の生体内反応の一部が再現されるに過ぎません。新しい評価系を一から構築することは、私たち生体関連セラミックス研究者の知

識や技術だけでは難しいでしょうが、生物学あるいは医歯薬学の研究者の協力や助言を仰ぐことができれば実現できるかも知れません。

動物実験に対する世間の風当たりが強くなり、欧州連合(EU)圏内では化粧品開発における動物実験がほとんど禁止されつつある昨今、人工材料の生体内反応をより正確に再現できる *in vitro* 評価法への期待と需要が世界的に益々高まると予測されます。その意味において、産業技術総合研究所の伊藤敦夫先生が中心になって進められている「*in vitro* 生体吸収性試験法<sup>14)</sup>」の今後の展開などは大いに注目されることでしょう。

以上、SBF に関して思いつくままに綴ってみました。私の勉強不足や認識の間違いが多々あるかと思しますので、「SBF に対してこういう見方や考え方をする人も居るんだなあ」程度に受け取って頂ければと思います。今回の THE DIVISION が、これまでの SBF の歴史を振り返り、そこから次世代の人工材料の *in vitro* 評価法を考える一助となれば幸いです。

#### 参考文献

- 1) L. L. Hench *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **2** (1972) 117-141.
- 2) T. Kokubo *et al.*, *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.*, **60** (1982) 260-268.
- 3) J. F. Osborn *et al.*, In: *Dental Implants*, G. Heimke (ed.), Carl Hansen Verlag, Munich, Germany (1980), pp. 111-123.
- 4) T. Kokubo *et al.*, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **15**, (2004) 99-107.
- 5) 例えば、C. Ohtsuki *et al.*, *Phos. Res. Bull.*, **1** (1991) 191-196.
- 6) 例えば、S. Kotani *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25** (1991) 1303-1315.
- 7) C. Ohtsuki *et al.*, Transactions of the 11th annual meeting of Japanese Society for Biomaterials, 1989. p. 12.
- 8) Y. Fujita *et al.*, Transactions of the 11th annual meeting of Japanese Society for Biomaterials, 1989. p. 3.
- 9) M. Kobayashi *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **37** (1997) 554-565.
- 10) M. Tanahashi *et al.*, *J. Am. Ceram. Soc.*, **77** (1994) 2805-2808.
- 11) A. Oyane *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A** (2003) 188-195.
- 12) H. Takadama *et al.*, *Phos. Res. Bull.*, **17** (2004) 119-125.
- 13) J. E. Gamble, *Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 1967, p. 1-17.
- 14) 伊藤敦夫, *THE DIVISION*, **51** (2008) 3-4.

## 2. INFORMATION ON RESEARCH & DEVELOPMENT

<編集部からの手紙>

### 擬似体液年表

擬似体液 (SBF) や生体環境模倣水溶液を取り巻く出来事を年表形式でまとめてみた。事象の発生をどの時点と定義するのは難しいところではあるが、原則として学術論文誌における発表を基礎としている。したがって、実際の事象発生とはややズレがあるかも知れないが、大きな流れを振り返る企画ということでご容赦頂ければ幸いである。

年代	出来事	対応する論文
1882	Ringer が、細胞外液と等張な輸液用液としてリンゲル液を開発する。同溶液は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、塩素イオンなどを含むが、リン酸イオンは含んでいない。	S. Ringer, "Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle", <i>J. Physiol.</i> , <b>3</b> , 380-393 (1882).
1932	Gamble が、正常血しょう内の酸塩基組成を明らかにした。この組成図はギャンブルグラムと呼ばれ、現在でも体液組成の基礎的なデータとして活用されている。	J.L. Gamble, G.S. Ross, and F.F. Tisdall, "The metabolism of fixed base in fasting," <i>J. Biol. Chem.</i> , <b>57</b> , 633-695 (1932).
1949	Hanks が生体組織や細胞の保存に用いるための溶液として、ハンクス溶液を開発する。	J.H. Hanks and R.E. Wallace, "Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration", <i>Proc. Soc. Exp. Biol. Med.</i> , <b>71</b> , 196-200 (1949).
1972	Na <sub>2</sub> O-CaO-SiO <sub>2</sub> -P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> 系のいわゆる Bioglass が骨と結合することが示される。	L.L. Hench, R.J. Splinger, W.C. Allen and T.K. Greenlee, "Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramic Prosthetic Materials," <i>J. Biomed. Mater. Res. Symp.</i> , <b>2</b> , 117-141 (1972).
1977	焼結水酸アパタイトが骨結合性を示すことが、Aoki と Jarcho らにより、ほぼ同時期に独立して見出される。	M. Jarcho, J.F. Kay, H.P. Drobeck and R.H. Doremus, "Tissue Cellular and Subcellular Events at Bone-ceramic Hydroxyapatite Interface," <i>J. Bioeng.</i> , <b>1</b> , 79-92 (1977).  H. Aoki, K. Kato and T. Tabata, "Osteocompatibility of apatite ceramics in dog's mandibles", <i>Rep. Inst. Med. Dent. Eng. Japan</i> , <b>11</b> , 33-35 (1977).
1982	結晶化ガラス A-W が生体内で骨と結合することが報告される。	T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro and S. Higashi, "Apatite- and Wollastonite-Containing Glass-Ceramics for Prosthetic Application," <i>Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.</i> , <b>60</b> , 260-268 (1982).
1987	SBF が、生体内における結晶化ガラス A-W 同士の結合機序を知るための試験溶液として運用された。このとき SBF には SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> が含まれていない。	T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sanka and T. Yamamuro, "Fatigue and life-time of bioactive glass-ceramic A-W containing apatite and wollastonite", <i>J. Mater. Sci.</i> , <b>22</b> , 1573-4803 (1987).  T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, Bonding between Bioactive Glasses, Glass-Ceramics or Ceramics in a Simulated Body Fluid, <i>窯業協会誌</i> , <b>95</b> , 785-791 (1987).

1990	生体内での結晶化ガラス A-W 上のアパタイト形成挙動を再現できる溶液として、SBF が最適であることが報告される。論文中 No.9 の組成が現在の SBF の原型であり、Hench は、その著作において K-9 と称している。	T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W", <i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , <b>24</b> , 721-734 (1990).
1990	SBF 中で形成されたカルシウムとリンに富む層の構造が解析される。	T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, "Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W", <i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , <b>24</b> , 331-343 (1990).
1990	種々の材料表面にアパタイトをコーティングするための水溶液として 1.5SBF が提案される。	Y. Abe, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process", <i>J. Mater. Sci.: Mater. Med.</i> , <b>1</b> , 233-238 (1990).
1991	硫酸イオン濃度についても体液と等しくした現在に近い形の SBF が提案される。	C. Ohtsuki, T. Kokubo, M. Neo, S. Kotani, T. Yamamuro, T. Nakamura and Y. Bando, "Bone-Bonding Mechanism of Sintered $\beta$ -3CaO·P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ", <i>Phosphorus Res. Bull.</i> , <b>1</b> , 191-196 (1991).  C. Ohtsuki, H. Kushitani, T. Kokubo, S. Kotani and T. Yamamuro, "Apatite formation on the surface of Ceravital-type glass-ceramic in the body", <i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , <b>25</b> , 1363-1370 (1991).
1999	SBF の国際標準化を目指して、NEDO 基準創成事業プロジェクト「生体用ファインセラミックスの試験評価方法の標準化」が、ファインセラミックスセンター (JFCC) を中心としてスタートする。	<a href="http://www.jfcc.or.jp/23_develop_2/08res_bi1b.html">http://www.jfcc.or.jp/23_develop_2/08res_bi1b.html</a>
2003	SBF の組成を改良し、炭酸や塩素イオンの濃度も体液にほぼ等しく合わせた新規溶液の調製法が提案される。	A. Oyane, H.-M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki and T. Nakamura, "Preparation and assessment of revised simulated body fluid", <i>J. Biomed. Mater. Res.</i> , <b>65A</b> , 188-195 (2003).
2006	SBF が材料の骨結合性予測に有用であることを述べた論文が <i>Biomaterials</i> に掲載される。	T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", <i>Biomaterials</i> , <b>27</b> , 2907-2915 (2006).
2007	SBF を用いた材料の骨結合性評価方法が ISO に登録される。	ISO/CD 23317, "Implants for surgery - In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials"
2010	2006 年の上記 <i>Biomaterials</i> 論文が、材料科学分野で被引用件数の最も多い論文の一つとして、トムソン・ロイター社のウェブサイト "Science Watch" で紹介される。	<a href="http://science.thomsonreuters.jp/science_watch/">http://science.thomsonreuters.jp/science_watch/</a>

編集責任: 宮崎敏樹

コンテンツの無断転載を禁じます。

## 擬似体液に対する外国からの挑戦状？と思しき論文発見

外国では、下に紹介する文献のように、「改 SBF」の使用を積極的に奨める動きも見られる。

Marc Bohner, Jacques Lemaitre, Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? (SBF で in vitro 生体活性を試験できるの?), *Biomaterials* 30 (2009) 2175-2179.

材料の生体活性を調べるために SBF が利用できるという理論は、多くの科学者から認められているが、この理論を裏付ける科学的なデータが今のところ充分とは言えず、たとえその理論が正しいとしても、一般的に実施されている試験法を改良する余地があることが本論文では述べられており、具体的にその説明を立証する理論的根拠と事実に加え、試験法の改良案が示されている。

SBF の歴史・生体活性 【論文レビュー】T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials* 27 (2006) 2907. (本誌 16-17 頁, 文献 3)を参照ください。文献 3 に対して、ヒト血清の  $\text{CO}_2$  分圧  $p(\text{CO}_2)$  は 0.05atm であり、生体活性試験はそのような生理学的条件下で行うべきであると述べられている。

結晶化の理論 血清も SBF もアパタイト結晶に対して過飽和すなわち準安定状態であるが、問題は核形成を誘起する「時間」であると述べられている。ここで、核形成に係る臨界粒子半径( $r_c$ )が種々の因子を用いた式で表されており、核-溶液界面の自由エネルギーとの関係が述べられているが、このことは文献 K の「表面に傷のない平滑なプラスチック容器中で試験を行う」ことを肯定している。また、次に重要な観点となる結晶核発生「速度」( $J(t)$ )が種々の因子を用いた式で表されている。

SBF 中でのアパタイト形成と結晶化理論 アパタイトの不均一核形成を促進させる戦略、i)新しいアパタイト核形成の必要性を取り除くためのアパタイト核の提供、ii)界面エネルギーの低い表面の提供、iii)局所的な過飽和状態の変化)が示されており、そのうち iii)についてさらに深く議論されている。例えば Bioglass は SBF に漬けると周囲の pH を上昇させることでアパタイト核形成を促進させていると考えられる。大量のカルシウムおよび(または)リン酸イオンを溶出するような CSH、CSD、DCPD も溶液組成を局所的に変化させることができるが、in vivo では吸収が速過ぎて骨と直接結合しない。また、動的条件下では静的よりもアパタイト形成を抑制し、比表面積が大きいと局所的組成変化が大きく早期にアパタイトが形成する。加えて、材料/溶液比もアパタイト形成速度を変化させると考えられる。など。

SBF を用いた生体活性試験  $\beta$ -TCP は大々的に骨結合するにも関わらず、SBF 中でアパタイトを形成するとは限らない事実から、「SBF による材料の in vitro 生体活性試験は in vivo 骨結合能を予測することには利用できない。」とした方が正しいように思われる。SBF と血清の主な違いは、i)アパタイト核形成の制御に重要な役割を担う「タンパク」を欠いていること、ii)緩衝剤として TRIS を添加していること、iii)血清の pH 緩衝剤として働く炭酸イオン含有率が制御できていないことである。それ故、材料の「生体活性」を



試験する SBF を用いて唯一わかることは、37°C で水酸アパタイトを析出させることができるか否かである。新しい組成の SBF が提案されてきたが、いずれもヒト血清の組成と一致しない。そこで、著者らは SBF に代わる溶液を提案している。i)簡素化された組成:血清中に存在する主な無機イオン( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ )のみを含有させる。ii)生体を模倣した組成:血清の主たる特徴(イオン強度 約 140mM、カルシウム濃度 約 2.5mM、pH=7.4)に倣う。iii)熱化学的な状態:生理学的条件下で DCPD と平衡状態の溶液(T=37°C、 $\text{CO}_2$ 分圧=0.05atm、pH=7.4)を用いる。それらを満たす SBF 組成が付録 I に記載されている。

SBF の作製法 文献 3 の方法では、i)調製を 37°C で行うことにより、早期のリン酸カルシウム析出のリスクが増える、ii)析出に大きな影響を及ぼす不溶性汚染物質をろ過していない、iii)溶液の pH やリン酸カルシウムおよび炭酸カルシウムの飽和度レベルの変化に影響を及ぼす炭酸イオン量が制御されていない。これらのことから、再現性の低い結果が得られるリスクが増えると述べられている。これに対して著者らは、再現性を良くするなら、熱力学的に安定な二種類の原液を 5% $\text{CO}_2$  雰囲気下で作製、限外ろ過して暗所で保存し、使用直前に試験温度で平衡させ混合することを提案している。一方、単純化した系が付録 II で提案されている。

付録 I 厳選された SBF 組成の比較 表 I:c-SBF をベースとした改 SBF の変更点、表 II:改 SBF の各イオン濃度、表 III:改 SBF における数種の含 Ca 化合物に対する熱力学的状態が記載されている。

付録 II SBF の調製法 表 IV:改 SBF において使用する出発原料の単位体積あたりの必要重量、表 V:二種類の原液で改 SBF を作製するとき使用する出発原料の必要重量が記載されている。溶液 A には  $\text{CaCl}_2$  を除く全ての固体試薬と全 HCl の半分量を含む。溶液 B には  $\text{CaCl}_2$  と残りの HCl を含む。試験前に体積比 1:1 の割合で溶液 A と B を混合。溶液 A:試薬を加える順序は重要ではないが、蒸留水の最終体積の約 80%中で半分量の HCl を希釈した後、固体試薬を加えるのが望ましい( $\text{NaHCO}_3$  を最後に)。溶液 A には微量の防腐剤を加えるのもよいそうである。

生体活性試験の開始:(1)別々に保存しておいた同体積の溶液 A, B を恒温器中で 37°C にする。(2)Y 字型チューブを用いた混合デバイスを準備する。(3)細胞培養用フラスコなどの容器に試験片を入れる。(4)二本のシリンジを(例えば 0.25 ミクロンの)フィルターを付した混合デバイスに接続する。(5)二本のシリンジ中の液を、混合デバイスを通して決まった速さで同時に押し出し試験容器に入れ、恒温器中に置く。(6)本手順により、溶液 A, B を用いて数々の試験容器を連続して準備できることから、試験の再現性が顕著に改善されるはずだと述べられている。

参考文献数 34 報

本論文も Biomaterials 誌の Leading Opinion として位置づけられているが、約 1 年間での被引用件数が 9 しかないのが意外である。(参照データベース:SCOPUS, 参照日時:2010 年 5 月 31 日 22 時)

確かに様々な因子について取りあげ変更を提案しているが、それでも「これ！」といった画期的な変更はなかったので、むしろ取っ付きにくくなってしまっているのかも知れない。ただしデータ数が増えて行けば、この論文の引用件数が「文献 3」を超える日が来るのかもしれない。

文責:川井貴裕

## 擬似体液に係るヒヤリハット集

SBF調製の主役は学生諸君のようです。そこで学生諸君からSBF調製に関して思うことを聴取してみました。彼らの思い、指導教員に届け！！

### (1) 調製について

#### ◆M2『SBF調製過程で混入する埃の類が心配です』

私の作るSBFには常に埃入っています(入っているはずですが)。このとき、それらを核とした結晶成長があるのではないかと心配です。

SBFの出来映えを評価する方法にあたりましたが、いささか消極的な方法であると思いました。また、規定時間後に析出がなく正常との判断を下したSBFが、本質的に析出を作らない出来損ないであったら・・・と考えると使うのが怖いです。

ゴミが少しでも入ると、必ず失敗作になってしまうのか？経験的にずばらに作ったSBFの析出は良好(?)であるため悩みます(わざとダメなSBFの方が報われる?! )。

皆さんのSBFには埃が入っていないのでしょうか？理想的には、一カ所で熟練した作業者が調整したSBFをお安く購入できたら最高であると思います。

#### ◆M2『CaCl<sub>2</sub>とトリスはゆっくり入れる必要があるのに、その他は一気に入れても本当に問題ないのか？』

研究室で連綿と受け継がれている具体的なSBF調製法には疑問な点が多い。何が必用で不要か？教育的な配慮からくる too much な行程があるとしたらいやだ。

#### ◆M2『リン酸水素カリウム3水和物や塩化マグネシウム6水和物が扱いにくいです』

扱いにくい試薬は個人差を広げる原因となるように思います。

これらを水溶液として保存し添加するのではいけないのでしょうか？

#### ◆M2『pH調整について1』

pHメーターの小数点第2位は不正確であると思う。pHメーターの読みが不正確であるのは仕方がないと思うが、そのようなバラツキ有りでもokと言える理由を教えてください(修論対策のようです)。

#### ◆M2『pH調整について2』

pHの調整に関してかなりシビアなことを言われました。しかし、攪拌の有無で先生の気に障る程度のpHの違いが出ます。つまり、攪拌しながら指示通りのpHに調整しても、攪拌を止めるとpHがかわり、しかし析出がないわけで、なんだか釈然としません。

#### ◆M2『pH調整について3』

pH調整に関してですが、途中で入れる1M-HClの量を減らし、トリスを規定量添加後、HClでpH調整できると、作業時間・pH調整ミスが減らせるのでうれしい。

#### ◆M1『辛い作業』

トリスを入れる際に途中でウトウトしていたら、恒温槽の湯に加えていたので、一から作り直すことになって悲しかった。トリスを加える速さ(量)には個人差があると思うが、正直この作業が一番つらいと思う。

#### ◆M2『重要な作業ポイントを示して欲しい』

1.5SBFは何度作製しても液が濁った。後になって、はじめに準備する超純水の量が論文に記載の量よりも少なめであったからだとわかった。はじめに準備する超純水の量がさほど重要に思えていなかったのが意外だった。

#### ◆B4『どれくらいのミスまで許されるのか?』

論文に、試薬を加えるときは、前に加えた試薬が完全に溶けてから投入するとあるが、最初のNaClが溶け残っている状況で誤って次のNaHCO<sub>3</sub>を入れてしまった。この場合作り直す必要があるのだろうか?

#### ◆M2『ご提案1』

最後に加える1M塩酸の液温が低いと、最終のpH調整時にSBFの液温が36.5℃に戻るまで時間がかかり相当待つ羽目になった。だからと言って恒温槽サーモスタットの温度を上げ過ぎると結局今度は温度が下がるのを待つことになる。→1M塩酸も36.5付近に加温してから使用した方が便利なのかと思った。

#### ◆M1『ご提案2』

吸湿性の試薬を掬う薬サジは、試薬毎に替えた方がいいのではないかと思う。キムワイプで完璧に拭いたつもりでもサジの裏側に小粒が残っていたり、水分が拭ききれていなかったことがあった。

### (2) 活用に関して

#### ◆M2『SBF浸漬実験に統一が欲しい』

何か生体材料を作ったとき、SBF浸漬試験をやればイメージに結果が増えてハッピーです。ですから、SBF浸漬試験の経験がある研究者は多く、つまり、そこではSBF浸漬試験の作法もばらつきます。しかし、SBF浸漬試験のお作法は統一的であるべきです。

正しくは多くの論文にあたって、SBF浸漬試験のエッセンスを抜き出すのがよろしいと思うのですが、そのような努力を各自に任せていたのではSBF浸漬試験の価値が育っていかないとおもいます。何か統一ルールがあれば従います。

### ◆M2『結果の解釈に困る』

SBF 浸漬試験の結果解釈に対する文句のないルールを知りたいです。

### ◆M1『賞味(消費)期限?』

- 1) 冷蔵庫から取り出した SBF を 36.5°C まで加温するのに要した時間はアパタイト形成能に影響を及ぼさないのか心配だ。
- 2) SBF の使用期限が約 1 ヶ月という根拠が論文にも記載されていないしわからない。作りたてホヤホヤの SBF と 1 ヶ月保存した SBF を同じ土俵で使用してもいいのか疑問である。

### (3) 安全に関して

### ◆M2『使用機器洗浄がキビシイ』

超音波洗浄で秤量瓶が割れてしまうことがあります。秤量瓶の置き方の問題だと思いますが、十分に広い超音波洗浄機がありません。秤量瓶をプラスチック容器に変えても問題ないでしょうか？

### (4) SBF なら

### ◆M2『ウワサ』

ナカライテスク社製の以外の試薬を使うと、アパタイト形成能が低い結果が得られるという噂は本当なのか？ちなみに加える試薬を全てシグマ-アルドリッチ社製にすると、ナカライよりも高い傾向になるというウワサも果たして本当なのか？

### \* 編集委員総評と注 \*

「(1) 調製方法について」に関する意見が目立ちます。辛い作業は訓練と学生時代の思い出になりますが、一方、SBF の普及を考えたときには何か打つ手はないかと考えてしまいます。

原文のニュアンスを大切に編集しました(例え意味が通らなくとも)。

編集責任: 寺岡啓

### 3. INTRODUCTION OF RECENT PAPERS

<論文紹介>

本号はSBF特集ということで、先のSBF年表に示した論文を取り上げてみました。

(1)

#### **Bonding between Bioactive Glasses, Glass-Ceramics or Ceramics in a Simulated Body Fluid**

(擬似体液中に於けるバイオアクティブガラス同士、ガラスセラミックス同士、セラミックス同士の結合) T. Kokubo, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, 窯業協会誌, 95[8], 785-791(1987).

擬似体液(SBF)国内初出の論文です(生体材料研究者必読の1報と言える)。A-W結晶化ガラスが生体環境下で強度を保ちながら骨と結合することが判り、そしてA-W結晶化ガラス同士でも結合することが判り、その特性に自家骨のごとく自己修復機能を持つ人工骨の可能性を期待していた状況が研究背景。

この論文の目的は、A-W結晶化ガラスの自己修復機能に關与する生体由来因子を知ること。具体的には、生体環境を「体液+細胞」と単純化し、懸案の結合は「細胞+体液」の關与によるものなのか？或いは「体液」のみによるものなのか？という二律背反を解こうとしている(細胞が關与しない自己修復であった場合、A-W結晶化ガラスの価値はいっそう高いと考えていたのではないか？細胞不要であれば骨から遠い部位においても自己修復が期待できる！？)。

上記目的のためにSBFは細胞の入っていない体液として創出された(SBFはA-W結晶化ガラス同士の結合機序を知るための手段だったのだ!)。つまり、SBF内においてもA-W結晶化ガラス同士が結合するなら、該結合は「体液」が主にもたらす結合となる。実験は、試験片同士をナイロン糸で貼り合わせてSBFに浸漬し、所定の期間毎に取り出し、引っ張り、摺り、ひねりにより結合を評価している。

結果として、A-W結晶化ガラス同士はSBF内で結合していると報告されている。然して、懸案の自己修復機能は体液に負うところが多いと結論されている。同様の実験を、A-Wガラ(G)、バイオガラス(Bg: Bioglass 45S5 相当品)、HAセラミックス(HAp)でも行っており、結合強度を相対的に「HAp<G=A-W<Bg」としている(A-W: A-W結晶かガラス)。しかし、この時点でSBFを一般化して生体活性評価に使うとの考えは示されていない。その他の結果・考察に関しては省略。

今日一般化した多様なSBFの用途を鑑みると、シンプルなSBF誕生理由がおもしろい。また、この時代のSBFに $SO_4^{2-}$ が含まれないことにも興味を惹かれる。その他諸々興味は尽きないが、間違えを恐れて私のレビューはここまで。この先は興味を持たれた読者諸氏に任せる。

文責:寺岡啓

(2)

#### **Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic**

A-W (生体活性結晶化ガラス A-W の *in vivo* での表面構造変化を再現し得る溶液) T. Kokubo, H.

Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **24**, 721-734 (1990).

結晶化ガラスは生体内で表面に骨類似アパタイト層を形成し、それを介して骨と結合する。そのアパタイト形成挙動は擬似体液を用いた生体外試験でも再現できる。本研究では、そのために擬似体液に必要な成分を解明するため、細胞を含まない種々の組成の水溶液を調製し、結晶化ガラス A-W 表面での構造変化が調べられている。

<本研究で用いた水溶液> (No.1-No.9 の pH は 7.25)

No.1: トリスバッファのみ

No.2: トリスバッファ+生理食塩水

No.3: No.2 に、ヒト血しょうと等濃度の  $\text{HCO}_3^-$  添加

No.4: No.3 に、ヒト血しょうと等濃度の  $\text{K}^+$  添加

No.5: No.4 に、ヒト血しょう中での解離濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  添加

No.6: No.4 に、ヒト血しょうと等濃度の  $\text{HPO}_4^{2-}$  添加

No.7: No.4 に、No.5 と No.6 の両方のイオンを添加

No.8: No.7 に、ヒト血しょうでの解離濃度の  $\text{Mg}^{2+}$  添加

No.9: No.8 での  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  濃度をヒト血しょうと等濃度にした

No.9': No.9 の緩衝剤をフタル酸水素カリウムに替え、pH6.00 に調整

No.9'': No.9 の緩衝剤をフタル酸水素カリウムに替え、pH4.00 に調整

結果の概要は以下の通りである。

<No.1 から No.9 での比較>

赤外分光分析(IR)で表面変化を測定すると、7日後にはNo.9のみで変化があり、30日後にはNo.7, 8, 9で変化が認められた。

<No.9, No.9', No.9''を比較>

7日後、30日後いずれも、IRで表面変化を測定するとNo.9のみで変化が認められた。

薄膜 X 線では、IR で変化の見られた試料について低結晶性アパタイトの形成が認められた。Bioglass 組成のガラスでは No.1 でもアパタイト形成が認められるが、結晶化ガラス A-W では No.1 で変化は見られず、pH やカルシウム、リン酸イオン濃度により敏感であることを示唆している。焼結水酸アパタイトも結晶化ガラス A-W と同様の傾向を示した。No.9 が比較的幅広い材料で生体内挙動を再現できるものの、そのために適した水溶液の組成は材料によって異なることに注意を払うべきであることを示唆している。実際、 $\beta$ -TCP など擬似体液で生体内挙動が再現できないセラミックスも存在する。

現在、擬似体液の調製は国内外で広く行われ、その方法はプロトコルとして完成した状態で目にすることも多いが、それが生まれるに至った経緯を表面反応性の観点から一段ずつ丹念に示したマイルスト

ー的な論文と言えよう。

文責:宮崎敏樹

(3)

**How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?**(in vivo 骨生体活性を予測する上で SBF はどれほど有用か?), T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials* **27**, 2907-2915 (2006).

本論文では、SBF の歴史、種々の材料上における SBF 中でのアパタイト形成能と in vivo 骨結合性との相関性、SBF 中でのアパタイト形成に基づく新規な生体活性材料の開発にまつわる内容が総括的に論じられており、SBF 中でのアパタイト形成能の調査は材料の in vivo 骨結合性を予測するのに有用で、動物実験の件数やそれに充てる動物の数を劇的に減らすことができる、と結論づけられている。

#### SBF の歴史

Bioglass<sup>®</sup>や結晶化ガラス A-W を対象とした研究により、「材料の in vivo 骨結合能は、その材料表面の SBF 中での骨類似アパタイト形成能を調べることにより予測可能である」ことを著者らは提案した(1991年)。同年、ヒトの血漿に含まれる  $\text{SO}_4^{2-}$  が、SBF に含まれる一イオン種として追加された。1995年、Choらにより、SBF を濁らせずに調製する方法が報告された。2003年 Oyaneら、2004年 Takadamaらにより、SBF の Cl<sup>-</sup> および(または)  $\text{HCO}_3^-$  の濃度が血漿中のそれらと同程度になるような、「改良型 SBF」が調製された。これらの SBF はラウンドロビンテストに供され、この際、本報付録 A に記載の「従来型 SBF」の詳細な調製方法が示された。2003年、ISO/TC150 において「インプラント材料の in vitro アパタイト形成能計測用溶液」をテーマに議論がなされている。→ 2007年 ISO に登録 (ISO/CD23317)。

#### 材料の SBF 中でのアパタイト形成能と in vivo 骨結合性との定性的な相関

★SBF 中で骨類似アパタイト層を形成する/in vivo 骨結合能を示す材料:

$\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  系ガラス (Bioglass<sup>®</sup> 45S5)、 $\text{Na}_2\text{O-CaO-B}_2\text{O}_5\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  系ガラス、Ceravital<sup>®</sup>型 Apatite 含有結晶化ガラス、結晶化ガラス A-W、焼結水酸アパタイト、Apatite/ $\beta$ -TCP 二相セラミックス、硫酸カルシウム、ポリエチレンマトリックス中に結晶化ガラス A-W 粒子を分散させた複合体。(※Bioverit<sup>®</sup>型 Apatite, phlogopite 含有結晶化ガラスは、in vivo 骨結合能を有するが SBF 中での骨類似アパタイト形成能は未調査。)

★SBF 中で骨類似アパタイト層を形成しない/in vivo 骨結合能を示さない材料:結晶化ガラス A-W (Al)

★SBF 中で骨類似アパタイト層を形成しない/in vivo 骨結合能を示す材料: $\beta$ -TCP、天然 Calcite

★SBF 中で骨類似アパタイト層を形成する/in vivo 骨結合能を示さない材料:天然アワビ貝殻

→毒性や抗体反応を誘起する物質を含まない材料のうち、SBF 中でその表面に骨類似アパタイトを形成する材料は in vivo 骨結合能を示す材料と言えることが記されている。また、材料の 1.5SBF 中に



おけるアパタイト形成能と in vivo 骨結合能には相関性がないことが記述されている。

#### 材料の SBF 中でのアパタイト形成能と in vivo 骨結合性との定量的な相関

★Na<sub>2</sub>O/CaO モル濃度比を等しくした Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> 系ガラスにおいて、SiO<sub>2</sub> 含有率が 70% のとき SBF 中 12 時間でアパタイトが形成し、50% ではそれに 28 日以上を要することが示された。

★SBF 中でアパタイトの形成に要する時間が短いほど骨成長の深度が増大する傾向が示された。

★SBF 中でのアパタイト形成能および in vivo 骨結合能の程度: HA < A-W < Bioglass®

#### SBF 中でのアパタイト形成に基づく新規な生体活性材料の開発

★CaO-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 系ガラスのアパタイト形成能、in vivo 骨結合能: 基本組成が CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> では示さず、CaO-SiO<sub>2</sub> の場合に示す。CaO-SiO<sub>2</sub> 系ガラスへの Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の添加で減少、Na<sub>2</sub>O または P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> の添加で増大。→生体活性と強磁性を併せ示すマグネタイト含有 CaO-SiO<sub>2</sub> ガラスマトリックス系結晶化ガラスへ展開。

★ゾルゲル法で得られる金属酸化物ゲル表面の Si-OH、Ti-OH、Zr-OH、Nb-OH、Ta-OH は、アパタイト形成を誘起するのに効果的である。→チタン金属、チタン合金またはタンタル金属を NaOH 溶液処理後に加熱処理することでその表面にチタン酸またはタンタル酸ナトリウムを形成させ、生体活性を与えた。

#### SBF 作製法とアパタイト形成能試験法(付録とされているが、この内容が最重要であると思う。)

※かなり細部に亘って記述されているので、特に注意すべきと思われる事項(コツ)を以下に抜粋。

<作製上の注意点>

★1000mL の SBF を作製する場合、はじめにイオン交換-蒸留水を 700mL 準備する。

★吸湿性の高い試薬はなるべく短時間で秤量する。

★pH 調整プロセスに移る前に、溶液の体積を計 900mL にしておく。

★36.5±0.5°C で pH が 7.45 を上回らないようにする。(36.5±1.5°C の範囲で pH はおよそ 0.05 /°C 変化する。)

★最終的に 36.5°C で pH が 7.40 になるよう調整する。このとき、溶液温度の上昇および下降速度が 0.1°C/min 未満となるようにする。

★調製した SBF は 5-10°C で保存し、調製後 30 日以内に使用する。

<試験上の注意点>

★緻密な材料に対して用いる SBF の体積(mL)は、材料の見かけ表面積(mm<sup>2</sup>)の値の 1/10 とする。

★稀に生じる均一沈殿したアパタイトと区別するために、図 A1 のように材料を置くことを勧める。図 A1(b) のように置いた場合、図の下方にあたる面をアパタイト形成の試験対象とする。

★SEM と薄膜 XRD を用いてアパタイト形成の有無を確認する。

#### 参考文献数 55 報

本論文は Biomaterials 誌の Leading Opinion として位置づけられており、約 4 年間で 442 もの被

引用件数を獲得している。(参照データベース：SCOPUS, 参照日時：2010年5月5日13時)

The DV 読者にはお馴染みの「SBF」に関する一文献ではあるが、The DV 編集委員の知る限り、SBF の作り方についてこれほど詳細に論じられている文献は本報以外にはないものと思われる。

文責：川井貴裕

#### 4. ANNOUNCEMENT

<行事案内>

**(1) 23rd European Conference on Biomaterials (ESB2010)**

【日時】 2009年9月11～15日  
【場所】 フィンランド, タンペレ  
【ホームページ】 <http://www.esb2010.org/>

**(2) 第20回無機リン化学討論会(仙台大会)**

【日時】 2010年10月7日～8日  
【場所】 東北大学青葉記念会館(青葉山キャンパス、仙台市青葉区)  
【ホームページ】 <http://www.jaipc.jp/>

**(3) 第56回日本歯科理工学会学術講演会**

【日時】 2010年10月9～10日  
【場所】 長良川国際会議場  
【ホームページ】 <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsdmd/2010/riko56.html>

**(4) 10th Asian BioCeramics Symposium 2010 (ABC 2010)**

【日時】 2010年11月2～5日  
【場所】 インドネシア・ジョグジャカルタ  
【ホームページ】 <http://abc2010.ugm.ac.id/>

**(5) The 3rd International Congress on Ceramics (ICC3)** (第23回日本セラミックス協会秋季シンポジウムを含む)

【日時】 2010年11月14～18日  
【場所】 大阪国際会議場(グランキューブ大阪)  
【ホームページ】 <http://www.ceramic.or.jp/icc3/top.html>

**(6) 第32回日本バイオマテリアル学会大会**

【日時】 2010年11月29日～30日  
【場所】 グランドプリンスホテル広島  
【ホームページ】 <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsbm/>

**(7) 第14回生体関連セラミックス討論会**

【日時】 2010年12月3日  
【場所】 京都テルサ

【ホームページ】 準備中(開設次第, 生体関連材料部会サイトにリンク)

**(8) 整形外科・バイオマテリアル学会(旧整形外科・セラミックインプラント研究会)**

【日時】 2010年12月4日

【場所】 京都テルサ

【ホームページ】 準備中(開設次第, 生体関連材料部会サイトにリンク)

**(9) 5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials (ISACB2010)**

【日時】 2010年12月10～13日

【場所】 オーストラリア・ケアンズ

【ホームページ】 <http://www.isacb.com>

**(10) 第49回セラミックス基礎科学討論会**

【日時】 2011年1月11～12日

【場所】 岡山コンベンションセンター

【ホームページ】 [http://www.ceramic.or.jp/bkiso/index\\_j.html](http://www.ceramic.or.jp/bkiso/index_j.html)

(基礎科学部会サイト, 独自サイトは7月開設予定)

**(11) 35th International Conference and Exposition on Advanced Ceramics and Composites**

【日時】 2010年1月23～28日

【場所】 アメリカ, デイトナビーチ

【ホームページ】 <http://ceramics.org/icacc-11/>

<編集部からのお知らせ>

メーリングリスト新規登録及び登録内容更新のお願い

ML 新規登録および更新される場合には、下記フォームに必要事項を記入の上、東北大学 上高原先生宛 (kamitaka@mail.kankyo.tohoku.ac.jp) に送って下さい。

.....

生体関連セラミックス・メーリングリスト新規登録・更新願

No.1 氏名／所属／メールアドレス／新規 or 更新

No.2 ...

...

以上、よろしくお願い致します。

.....

## 編集後記

学会等の議論の場で、我々はスキーマのようなものをぼんやり持っているように思います。同業集団の中において、スキーマの成立は成り行きであり便利です。一方、初学者等まだスキーマが成立していない者にとっては厄介です。例えば、SBFはその中の1つではないでしょうか。既にSBFに係る情報は膨大です。また、手に入れづらいものもあります。常に読者諸氏同士が出会ったときの話題や一助に成りたい The Division です。従って、今号ではSBFを取り上げたのです。今号の盲信は禁物ですが、どうか皆様の役に立つ内容でありますように。

追伸: 今回のテーマはあまりに重く手間取りました(春号をしれっと抜いてしまつてすいません)。

(The Division 編集長: 寺岡 啓)

今回の企画については、予測される反響を考えるとパンドラの箱を開ける思いも若干致しましたが、擬似液体の開発経緯を振り返ることができるとともに、なかなか活字には出て来難い学生の現場の声もつかむことができ、企画して良かったと思っています。

(The Division 副編集長: 宮崎敏樹)

前号に引き続き、今号でも一キーワードを取りあげ、内容の展開を試みました。みんなが知っているSBF、便利な液体SBF。親しみを感じる方が多いと思われるこの液体の話題だからこそ、自然と内容が増えてゆく訳ですね。色んな視点からSBFを再考する良い機会になったと自負しています。この「特集」シリーズは今後も続けて行きたいと考えていますので、率直なご意見ご感想をお待ちしております。

(The Division 副編集長: 川井貴裕)