

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22936

研究課題名（和文）骨とサンゴのアナロジーに着目したサンゴ礁の早期再生手法の開発

研究課題名（英文）Development of new restoration method for coral reefs focusing on analogy between bone and coral skeleton

研究代表者

上田 正人（UEDA, Masato）

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：40362660

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：サンゴの軟組織であるポリプは、チタンや酸化チタン表面では旺盛に伸展した。これは一般的な細胞における密着挙動と類似している。また、ポリプの無性生殖は酸化チタン表面に比べ、チタン表面の方が活性が高い傾向が認められた。酸化チタン表面における軟組織の密着はチタンのそれに比べ、強力であることに起因していると推察している。また、水晶振動子マイクロバランスシステム（QCM）によって測定した共振周波数と共振抵抗の変化と光学顕微鏡によって観察したポリプの基盤密着挙動を関連付けた。本手法はミリメートルオーダーのサイズを有するサンゴ軟組織の基盤密着挙動の解析にも利用できることを実験的に示すこともできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物とサンゴにおける軟組織密着性や骨格形成には類似点が多く、これまでに蓄積してきた再生医療、バイオマテリアル研究の知見や技術は、サンゴ礁の早期再生に役立つことを実験的に示すことができた。サンゴの成長は非常に遅く、再生に関する基礎的なデータを取得するには、長時間を要する。基礎的なデータ・知見を地道に収集する正攻法では歯が立たない可能性が高く、本研究はこれまでの延長線上にない革新的な切り口を提案できたと考えている。また、サンゴの骨格は炭酸カルシウムであり、その成長は二酸化炭素の固定化にも繋がる。最近注目を集めているカーボンニュートラルを実現する有力な候補にもなると考えている。

研究成果の概要（英文）：Polyps which are soft tissue of corals expanded vigorously on the surface of titanium and titanium oxide. This behaviour is quite similar to that in soft tissues of vertebrates. In addition, asexual reproduction of polyps tended to be more active on the titanium than on the titanium oxide. It might be due to adhesion strength of polyps to the substrates; polyps adhere more firmly to titanium oxide than to titanium. The changes in resonance frequency and resonance resistance were measured by using the quartz crystal microbalance system (QCM) in order to investigate the interfacial reaction. The adhesion behaviour was also observed with an optical microscope. Protein adsorption and polyp adhesion could be detected from these two perspectives. It was also experimentally shown that this method can be used to analyse the several reactions at the interface between the substrates and soft tissues of corals with millimetre order.

研究分野：材料物性

キーワード：生体材料 酸化チタン チタン 骨形成

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁は地球表面の0.1%の面積を占めるに過ぎないが、9万種類もの多様な生物が生息し、人類を含めた多くの生物に多大な恩恵を与えている。近年、急激な気候変動などにより、サンゴ礁は破滅的な状況に曝されており、世界のサンゴ礁の3分の1が絶滅の危機にある。従来、サンゴ礁の保全は、天敵であるオニヒトデの駆除、陸域からの赤土流入の削減など、対症的な方法で行われてきたが、近年は、サンゴの破片を海底に固定し、増殖させる方法(断片移植)、サンゴを固定した基盤に陸地から直流電流を通電することでサンゴの成長を促進する方法など、積極的な増殖方法も試行されている。しかし、いずれも画期的な成果は得られていない。したがって、新規な観点から、新規な原理に基づく、サンゴ礁の新規な再生手法を探索・確立することは、喫緊の課題である。

我々は、最近、骨とサンゴの骨格形成過程において非常に興味深いアナロジーが存在することに気がついた(図1)。骨では、骨芽細胞が産生したコラーゲンにリン酸カルシウムが沈着し、結晶化することでハイドロキシアパタイトの骨格を形成する。一方、サンゴは、刺胞動物(イソギンチャクやクラゲなど)に分類され、ポリプと呼ばれる個体に存在する造骨細胞から分泌された有機基質に炭酸カルシウムが沈着することで骨格を形成する。骨格の物質こそ異なるが、形成メカニズムはまったく同じである。

骨形成・再生に関しては、基礎から応用まで詳細かつ多彩な研究が多数報告されている。例えば、インプラント表面の骨形成においては、化学組成の影響のみならず表面粗さの影響、官能基の影響、また、生体骨においては、密度や構造、結晶の配向化における細胞の役割、外場の影響など、非常に詳細な知見が得られている(図2)。これらを利用して、非常に効果的な治療が実現されている。

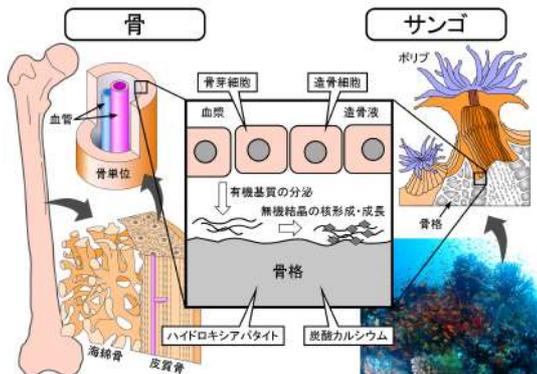


図1 骨格形成における骨とサンゴのアナロジー

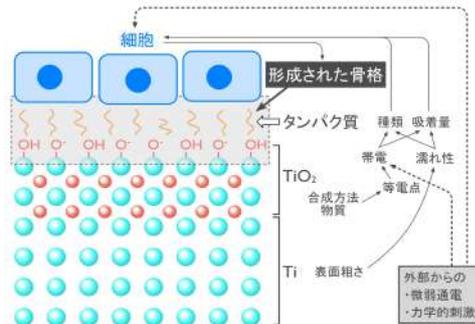


図2 骨形成に影響を及ぼす因子の例

2. 研究の目的

本研究では、既に確立されている骨形成・再生手法をサンゴに転用し、新規なサンゴ骨格形成促進手法を確立することを目的とした。具体的には、①骨形成が促進される酸化膜上でのサンゴの骨格形成、②再生足場への微弱通電によるサンゴ骨格形成の促進、③ポリプの人工培養技術について検討した。さらに、骨とサンゴの骨格形成において、酷似している点、似て非なる点を系統的に整理することで、骨関連分野にサンゴの知見をフィードバックし、アナロジーに着目した協奏的な研究・開発の実施例ならびに優位性を示した。

3. 研究の方法

(1) 海底におけるサンゴ増殖と小型発電デバイスの改良

フライアッシュ(石炭火力発電所排出の石炭灰)、シリカフェーム、酸化チタン粉末を添加したモルタル基盤を作製し、一部の基盤は表面を炭酸化した。それらモルタル基盤にチタン板を接着し、その上にサンゴ片を固定した供試体を和歌山県串本町沿岸(2019.6~)、鹿児島県与論島沿岸(2019.12~)に設置した。

小型発電デバイスでは、シリコンチューブ(外径5mm、内径3mm)に圧電フィルムを $N=1\sim 3$ 回巻きつけることで円柱状の圧電素子部を作製した。なお、電極には汎用のアルミホイールを使用した。3点曲げ試験による荷重-たわみ曲線からヤング率を求め、約1Hzの周期で湾曲させた際の電流を測定した。

(2) 純チタン基盤におけるサンゴの接着・増殖に及ぼす表面修飾の影響

純チタン板(JIS2種相当)に陽極酸化処理(0.1Mリン酸水溶液、印加電圧:80V)を施した。アザミサンゴからCoralliteを切断し、ポリプを露出させた状態で基盤に結束バンドを用いて固定した。水槽内で飼育し、軟組織と骨格形成の経時変化を光学顕微鏡、ならびにマイクロフォーカスCTシステムで観察した。

(3) ポリプの人工培養

ハナヤサイサングの破片を人工海水に浸漬した状態で様々な環境ストレスを与えた。そのストレスによるペールアウト反応により剥離したポリプをピペットで取り出した。その単離されたポリプを各種基盤に播種し、基盤密着挙動を観察した。

水晶振動子マイクロバランスシステム (QCM: QCA922, セイコーEG&G) を用いて共振周波数 (F) と共振抵抗 (R) の変化を測定し、同時に底部から光学顕微鏡 (OM, ViTiny, UM12) で撮影可能な装置を構築した (図3)。PEEK 製ウェル型セル (QA-CL4PK) と、ITO (酸化インジウムスズ) 電極 (QA-A9M ITO (M) (SEP), 7.9 × 7.9 mm) とした水晶振動子 (基本共振周波数: 9 MHz) を使用した。水晶振動子上には純Tiを使用したRFマグネトロンスパッタリング (Kenix) により、TiO₂膜をコーティングし、純チタン表面を模擬した。この基盤上にもポリプを播種し、QCMとOMで基盤密着挙動を同時に測定・観察した。

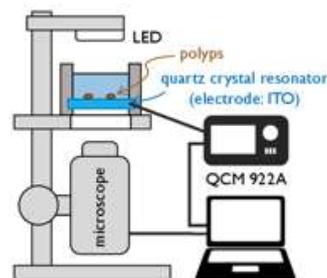


図3 QCMとOMによる軟組織の基盤密着挙動の同時観察装置

4. 研究成果

(1) 海底におけるサンゴ増殖と小型発電デバイスの改良

フライアッシュ、シリカフェーム、酸化チタン粉末を添加したモルタル基盤、表面を炭酸化した基盤にチタン板を接着し、サンゴ片を固定した状態で和歌山県串本町沿岸、鹿児島県と論島沿岸の海底に設置した。前者は悪天候により供試体は流されたが、後者は現在経過観察中である。その一例を図4に示す。シリカフェームを添加し、表面を炭酸化した試料、ならびに酸化チタンを添加した試料でサンゴ片の成長量が大きくなる傾向が認められた。基盤表面近傍のpHが高くなるとサンゴ片固定化初期にポリプの接着が忌避されたためと思われる。pHの高い基盤においても、時間が経てば炭酸カルシウムが析出し、ポリプが接着しやすい表面になるはずである。そのタイムラグが成長量に反映されたと考えている。また、一般的な細胞が接着しやすい酸化チタンを含むモルタル基盤でサンゴの旺盛な成長が観察されたことは興味深い。サンゴの成長は現在も観察継続中である。



図4 海底に設置しているサンプル例 (鹿児島県と論島沿岸)

従来、作製していた小型発電デバイスは圧電素子部分が板状であったため一方向の流れにしか応答できず、実際の海底において生じているランダム方向の潮流やサージに対して十分に振動させることができなかった。そこで図5に示すように圧電素子部分を丸棒状に変更し、潮流・サージ方向に依存しない構造となるよう改良した。また、圧電フィルムの巻数 N を1~3と変化させたところ、ヤング率は1.6~2.9 MPaと単調に増加した。 N を増加させると発電量は増加するはずであるが、電流は N^2 で最大値を示した。現在、圧電素子部のヤング率を低く抑えるため、圧電フィルム間は積層しているだけであり、湾曲した際の接触状態が影響していると考えている。圧電素子部の長さや N 、圧電フィルムの積層状態(接着を含め)を最適化することにより、発電効率をさらに向上できると考えている。

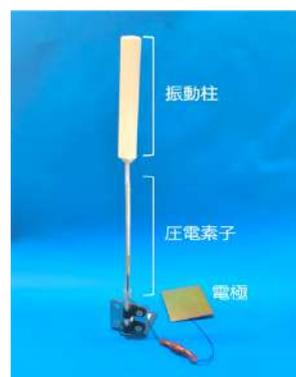


図5 海流・サージ方向に依存しない小型発電デバイス

また、現在、潮流方向とその速度を連続測定し、より速い潮流が期待できる試験フィールドを探索している。

(2) 純チタン基盤におけるサンゴの接着・増殖に及ぼす表面修飾の影響

純チタン板 (JIS2種相当) に陽極酸化処理を施すと結晶性の低いアナターゼ型TiO₂膜が得られた。一部の基盤はエメリー紙を用いた機械研磨により粗面化した。アザミサンゴからCoralliteを切断し、骨格の一部を破碎しポリプを露出させた状態で各種基盤に結束バンドを用いて固定した。水槽内で飼育し、ポリプの接着と進展を光学顕微鏡で観察した (図6)。純チタンでは、表面粗さ、陽極酸化の有無に強く依存せず、基本的にポリプは接着・進展した。ただ、一般的な細胞と同様、ポリプの基盤接着が非常に早く、強い場合、その進展は若干遅くなる傾向が認められた。軟組織と基盤が適度な密着力を有する場合、旺盛に進展するものと思われる。ここでは、Sample Aに比べ、Sample Bの方がポリプ/基盤界面の密着力が強いと思われる。進展したポリプ中には、無性生殖により増殖した新たなポリプも観察された (図6, 赤丸)。その個数はポリプの拡張面積にほぼ比例した。表面修飾の条件によらず、進展したポリプの下には骨格の形成も確認された (図7)。

サンゴ片に環境ストレスを与えることで単離したポリプを純チタンと酸化チタン (陽極酸化により合成) 上に播種し、初期接着を光学顕微鏡で観察した (図8)。純チタン、酸化チタン基盤に

密着して固定化されたポリプの割合は、播種後 5h において、それぞれ 33%, 75%と酸化チタンへの接着性がチタンのそれに比べ高いことがわかった。最終的に、その割合は共に同程度になったが、強くタッピングすると純チタンの方ではほとんどのポリプが剥離した。一方、酸化チタンの方では、ほとんどが残留し、接着も強固であった。

このように一般的な細胞における基盤への接着挙動や増殖挙動と等価な現象をポリプにおいても捉えることができた。

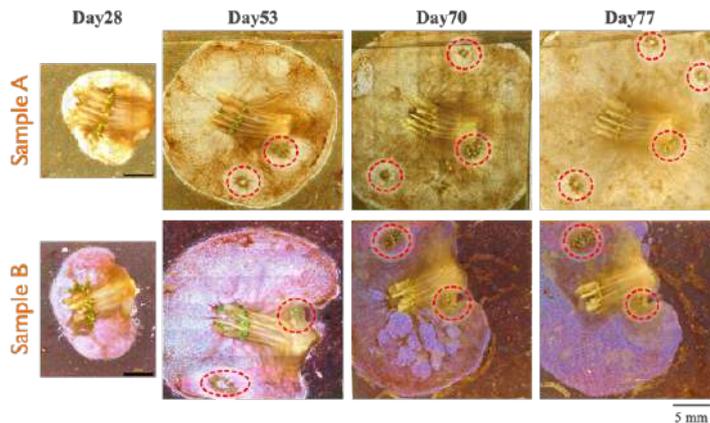


図 6 基盤に接着したポリプとその無性生殖

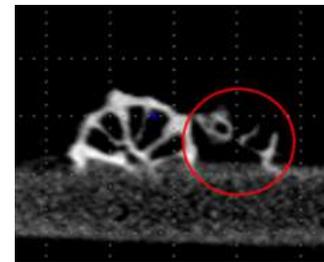


図 7 ポリプ下で形成された骨格の CT 像

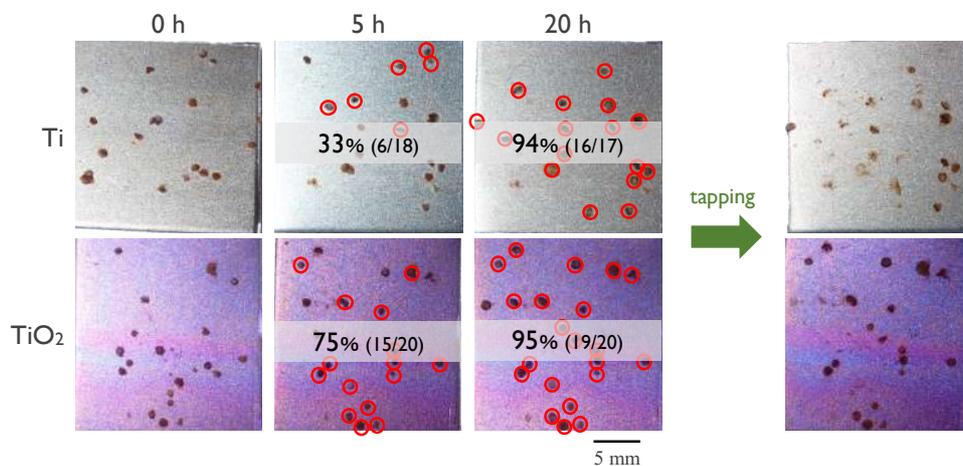


図 8 単離したポリプの基盤接着

(3) ポリプの人工培養

図 9 に環境ストレスの付与によってポリプがベールアウトする様子を示す。時間経過に伴い、ポリプ同士を繋ぐ共肉部分が徐々に薄くなり、最終的に切断され、骨格からポリプが単離した。その単離されたポリプは回転しながら遊泳していた。同じ種類のサンゴにおいても、その単離に要した時間は 12-24h と個体によって大きな差が認められた。Corallite の形態（開口直径、深さなど）が影響していると考えている。

次にそのポリプの基盤密着過程を OM と QCM で調査した。水晶振動子表面にスパッタリング法で酸化チタンを成膜した基盤に、ポリプを播種し、底部からその密着過程を観察した。ここでもポリプが回転しながら遊泳したり、底面にタッチ&ゴーしたりする様子が観察された。細胞が仮足をスプレッドするように、ポリプも自らの組織を拡張させ接着する様子が観察される。撮影した動画から ImageJ を用いて底面積に対するポリプの接着面積率を 4 h 毎に算出した（図 10）。この面積率の絶対値は、播種したポリプの個体数に依存するので重要ではないが、その変化の傾向は興味深い。ポリプを播種後、比較的早いタイミングで基盤表面に接着していることがわかる。その後、約 8 時間で自らの組織を拡張し、定常状態に入っている。播種後 16 h 頃からの接着面積率の減少は、一部のポリプが死滅していることに起因している。

上述したポリプの基盤接着挙動を QCM で捉えることができるか検討した。QCM は水晶振動子上の電極表面に吸着した質量増加に応じて共振周波数 (F) が変化する。材料表面における吸着物の質量変化をナノグラムオーダーでリアルタイムかつ定量的にモニタリングすることが可能である。また、同時に共振抵抗 (R) も測定し、基板表面が接する溶液の粘性を捉えることも可能である。その測定において、試料表面に吸着した物質の質量が増加・減少すると、共振周波数 (F) は減少・増加する。一方、試料表面に接している液体の粘性(粘度)が増加・減少すると共振抵抗 (R) は増加・減少する。このような特徴を利用し、一般的に、タンパク質や血液成分など分子レベルの吸着物の定量評価やセンサーなどに利用されている。さらに、最近では、細胞が材料表面に接着する現象の解析にも利用されている。骨芽細胞や繊維芽細胞などの基盤接着挙動

の解析では、 F と R の経時変化を独立して議論するだけでなく、 F - R ダイアグラムを作成し、複合的に考察した研究が報告されている。

図 11 に QCM 測定結果の全体像を示す。なお、(a) は初期段階を拡大したものであり、測定開始からポリプの播種直後までに相当し、(b) は測定した全体図である。具体的な操作としては、まず、ウェル型セルが空の状態では F 、 R を安定させた。その後、人工海水を 600 μL 入れた (A 位置)。再び F と R を安定させた後、人工海水を 300 μL 抜き、7 個のポリプを含む人工海水 300 μL を入れた (B 位置)。ポリプを播種すると、基本的に F は減少し、 R は増加した。これは海水中のタンパク質などの吸着、ならびにポリプの接触、接着、拡張を反映したものである。ポリプの基盤接触面積率がほぼ飽和した 8 h 付近で、 F 、 R の経時変化に屈曲が観察された。さらに 16 h 付近において、 F は増加、 R は減少に転じた。図 11 に示した F 、 R 曲線から作成した F - R ダイアグラムを図 12 に示す。水槽から採取した海水のみで 20 h 測定したプロットも併せて示す。これは海水中のタンパク質などが吸着したものに相当し、プロットは左上へ向かってシフトした。ポリプを播種するとそのプロットも左上へ向かい、その変化量は海水のみのそれに比べて著しく大きくなった。この F - R ダイアグラムにおいても、8 h 近傍に屈曲が観察された。さらに 16 h 以降は右下へのシフトに急変した。細胞の基盤密着を QCM で観察した研究では、細胞の接着形態の変化に起因して F - R プロットは右上へのシフトに移行することが報告されている。今回の右下へのシフトはポリプ死を示していると考えている。このように F - R ダイアグラムにより、基盤へのポリプの接着挙動をリアルタイムに観察できることを示すことができた。

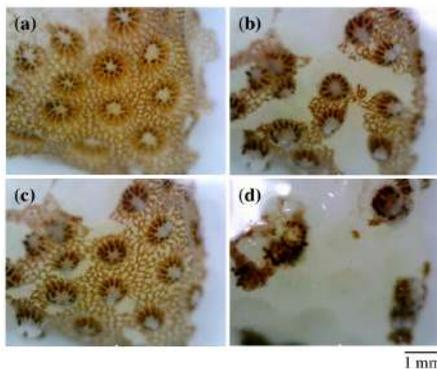


図 9 ポリプのベールアウト

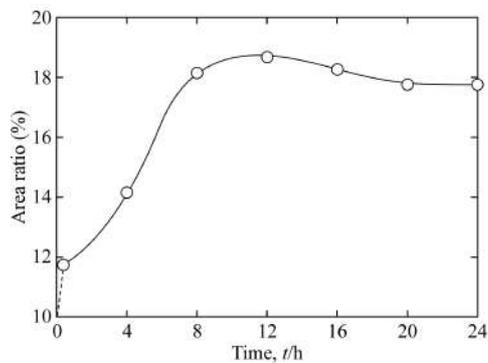


図 10 ポリプの基盤密着面積率

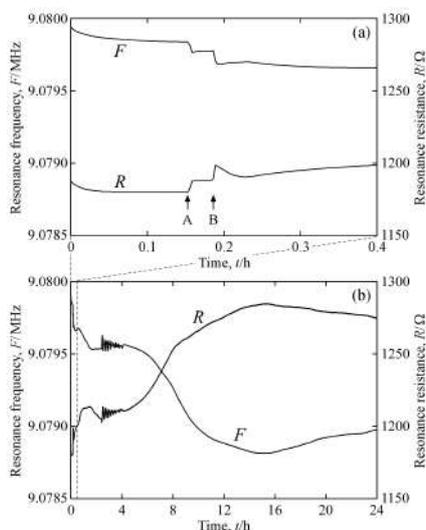


図 11 QCM における共振周波数 (F) と共振抵抗 (R) の経時変化

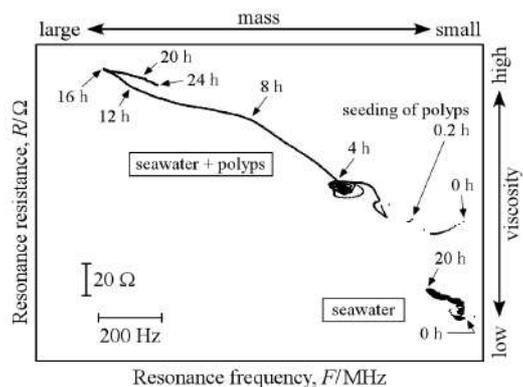


図 12 F - R ダイアグラム

(4) 総括

ポリプはステンレス鋼表面に伸展しなかったが、チタンや酸化チタン表面では旺盛に伸展した。これは一般的な細胞における密着挙動と類似している。また、ポリプの無性生殖は酸化チタン表面に比べ、チタン表面の方が活性が高い傾向が認められた。酸化チタン表面における軟組織の密着はチタンのそれに比べ、強力であることに起因していると考えられている。また、QCM は、ミリメートルオーダーのサイズを有するサンゴ軟組織の基盤密着挙動の解析にも利用できることを実験的に示すこともできた。このように脊椎動物とサンゴにおける軟組織密着性や骨格形成には類似点が多く、これまでに蓄積してきた再生医療の知見や技術は、サンゴ礁の早期再生に役立つことを実験的に示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 M.Ueda, C. Sawatari, T. Takahashi, H. Tsuruta, H. Tokushige, H. Hikosaka, D. Yonetsu, M. Ikeda	4. 巻 1016
2. 論文標題 Utilisation of Titanium and Titanium Dioxide as Scaffolds for Proliferating Coral Reef	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mater. Sci. Forum	6. 最初と最後の頁 1497-1502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Ueda, C. Saruwatari, M. Ikeda, T. Takahashi, H. Tsuruta, H. Tokushige, H. Hikosaka, D. Yonetsu	4. 巻 5
2. 論文標題 Cell printers and coral reef regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IMPACT	6. 最初と最後の頁 54-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 猿渡ちひろ, 上田正人, 池田勝彦
2. 発表標題 QCMとmicro;CTを利用したサンゴと再生足場の界面解析
3. 学会等名 日本サンゴ礁学会第22回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猿渡ちひろ, 上田正人, 池田勝彦
2. 発表標題 micro;CTとQCMによるサンゴと再生基盤の界面解析
3. 学会等名 第2回 日本金属学会 第7分野講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猿渡ちひろ, 上田正人, 池田勝彦
2. 発表標題 サンゴとチタン基再生足場の界面解析の試み
3. 学会等名 日本金属学会2020年春期(第166回)講演大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上坂 菜々子, 上田 正人, 池田 勝彦, 石橋 菜々, 内山 七海, 猿渡 ちひろ
2. 発表標題 チタン基足場におけるポリプの接着特性
3. 学会等名 日本金属学会2021年春期(第168回)講演大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ueda
2. 発表標題 Utilisation of Ceramic films in Biomedical and Environmental Applications
3. 学会等名 The 15th International Workshop on Biomaterials in Interface Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masato Ueda, Chihiro Sawatari, Tomoyuki Takahashi, Hiroaki Tsuruta, Hidenobu Tokushige, Hirohisa Hikosaka, Daigo Yonetsu, Masahiko Ikeda
2. 発表標題 Utilisation of Titanium and Titanium Dioxide as Scaffolds for Proliferating Coral Reef
3. 学会等名 Thermec2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西大学 化学生命工学部 化学・物質工学科 環境材料研究室
<https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/matt/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 智幸 (TAKAHASHI Tomoyuki) (40261599)	関西大学・社会安全学部・教授 (34416)	
研究分担者	鶴田 浩章 (TSURUTA Hiroaki) (90253484)	関西大学・環境都市工学部・教授 (34416)	
研究分担者	徳重 英信 (TOKUSHIGE Hidenobu) (80291269)	秋田大学・理工学研究科・教授 (11401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------