

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

組織工学技術を用いた骨・軟骨再生に関する研究

分担研究者 木全 弘治 愛知医科大学分子医科学研究所 教授

研究要旨

組織工学的手法を用いた再生軟骨作製に関わる、マトリックスの検討や実際の臨床応用を視野に入れた検討を行った。注入型軟骨作製および3次元培養における至適材料の検討において、組織アリュースャンブルー染色、基質アグリカン量を中心とした軟骨マーカーを指標に観察した。その結果、コラーゲン、アルギン酸などが再生軟骨を行う上で組織工学的材料として至適である結果が得られた。

A. 研究目的

再生医療におけるティッシュエンジニアリング組織の中で軟骨は比較的臨床応用されやすく、また移植軟骨組織を必要とする患者の数も多い。本研究では軟骨移植の臨床応用に向けてより効率的な軟骨移植組織作製を念頭に実験を行った。

B. 研究方法

注入型軟骨組織再生の面から至適材料の検討を行った。試した材料は、アルギン酸、I型コラーゲングル、II型コラーゲングル、マトリゲル、フィブリン糊などである。これらのマトリックスに軟骨細胞に分化させたMSCを混ぜヌードマウスの背部皮下に移植を行い、2週、4週後の組織をアリュースャンブルー染色、基質アグリカン量を中心とした軟骨マーカーを指標にそれぞれのマトリックスを評価した。

（倫理面への配慮）

採取した組織は患者プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行った。また動物実験においては使用動物および使用法に関して慣例を逸脱しないように

配慮した。

C. 研究結果

MSCから軟骨細胞への分化をおこした細胞から、コラーゲングルおよびアルギン酸をマトリックスにした移植組織から4週後に軟骨基質が生成している結果を得た。また材料内で細胞の生存が確認でき、軟骨細胞への変化が見られた。

D. 考察

これらの良好な材料では、細胞毒性や異物反応が起こりにくく、細胞も中で生存していたことから、軟骨組織を作製する能力を持つことが予想された。

E. 結論

注入型軟骨作成では、未だ、スポンジ型に比べまだ軟骨再生の大きさや成熟度に問題があり、3次元のマトリックスを埋め込む方が成績がよい傾向にある。操作が簡便であり、患者の負担も少なくなる注入型軟骨作成術は、より良好な組織をつくるよう改善を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

本研究において国民の生命、健康に重

大な影響を及ぼす事項は発生しておりません。

G. 研究発表

1. 論文発表

Honda M., Morikawa N., Hata K., Yada T., Morita S., Ueda M, and Kimata K. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactide-co-e-caprolactone) scaffolds

Biomaterials, 2003, in press

Itano N, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact-inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 3609-3614.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

総括研究報告書に記す

分担研究者 春日敏宏 名古屋工業大学工学部材料工学科 助教授

### 研究要旨

これまでに検討してきた、骨類似アパタイトが急速に生成する新しいポリマー／セラミックス複合材料 CCPC とスクロースとを混合し成形したのち、擬似体液中に浸漬することで、平均 100 $\mu\text{m}$  の大きさの連通孔を有し、その骨格が生体吸収性骨類似アパタイト／ポリ乳酸からなる、気孔率約 90% の多孔体を得られた。比較的高い強度をもち、培養骨用マトリックスとして好適と考えられる。

#### A. 研究目的

炭酸含有アパタイト HCA は細胞接着性に優れており、また、生体吸収性も期待できることから、新しい生体材料として応用が期待されている。一方、生分解性ポリ乳酸 PLA は、加水分解してカルボキシ基を生成する。このカルボキシ基は、HCA 結晶の核形成を誘起すると考えられている。そこで、PLA の機械的延性を保持しながら、かつ、表面に HCA が生成した材料が得られれば、組織工学マトリックスとして、これまでになく使い勝手のよい、リン酸カルシウム質製剤となると考えられる。

本年度の研究では、昨年度まで検討してきた、炭酸カルシウム（バテライト）CC と PLA からなる複合材料 CCPC を多孔質化すると同時に、この表面にアパタイトを迅速に生成させることで培養骨マトリックス用新型リン酸カルシウム製剤を作製することを目的とした。

#### B. 研究方法

メタノールを用いた炭酸ガス化合法を用いて、バテライトのナノ粒子を作製した。1 次粒子は 0.1  $\mu\text{m}$ 、2 次粒子は 0.5~1  $\mu\text{m}$  であ

り、比表面積は 40  $\text{m}^2/\text{g}$  と非常に高い。分子量 16 万の PLA を塩化メチレンで溶かした溶液に、作製したナノバテライトを加えて攪拌混合し、スラリーを作製した。PLA:CC の比は種々変化させた。このスラリーを金型に入れ、乾燥させた後、180 $^{\circ}\text{C}$ 、40 MPa でホットプレスした。

多孔体の作製には、400~600  $\mu\text{m}$  に整粒したスクロースを、上記スラリー 1 に対し、6 の重量比で混合したものを金型に入れ、180 $^{\circ}\text{C}$  でホットプレスした。室温まで冷却した後、擬似体液中に浸漬することでスクロースを溶出除去し、多孔体を作製した。

#### C. 研究結果および考察

図 1 は、CCPC の曲げ強度およびヤング率と CC 含有量の関係である。CC (vaterite) が 30% では約 40~60 MPa の曲げ強度を示す。ヤング率は、50% で約 7 GPa に達した。本研究の複合材料は 30% の CC を混合することで、3~4 GPa のヤング率が得られることがわかった。先に報告しているように、本研究の複合体では、PLA 中のカルボキシ基に  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが配位した化学結合を作っており、少量の CC 導入量でさえ、ヤング率が効果的に

向上すると思われる。CCPC(CC30%)は、セラミックスのような完全な脆性破壊は示さず、臨床上、取扱やすいので有用である。CC40%以上では、脆性破壊しやすくなってしまふことがわかった。

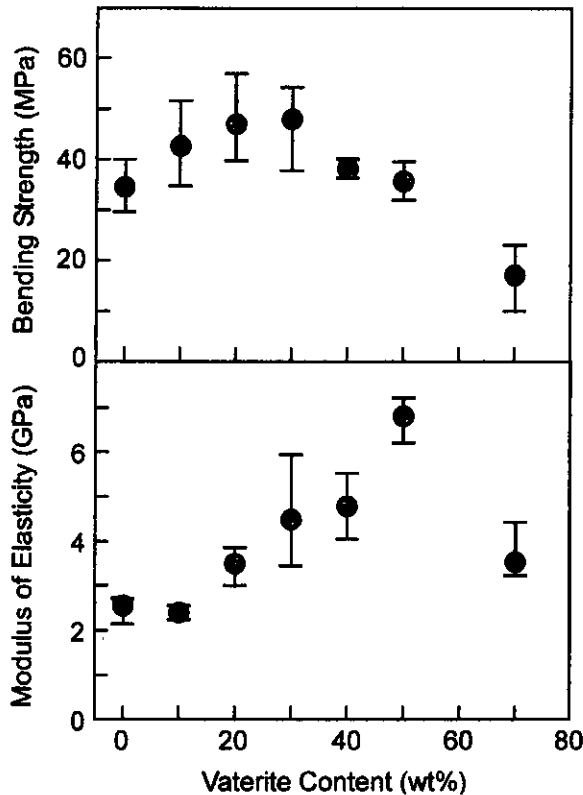


図1. CCPCの曲げ強度およびヤング率とCC含有量の関係(上図:曲げ強度、下図:ヤング率)

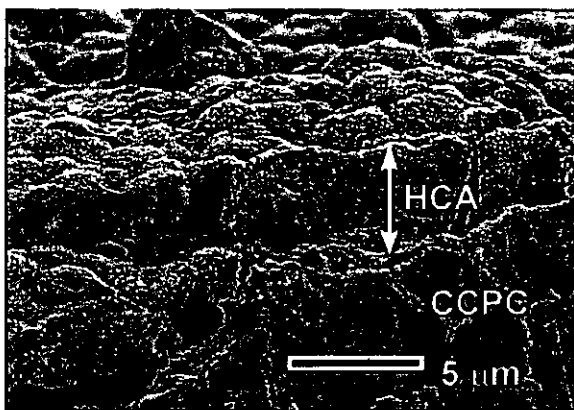


図2. 擬似体液に浸漬した後CCPC(CC30%)上に生成したHCA(断面写真)

図2はSBF浸漬後の30%試料の表面付近の断面のSEM観察である。生成したアパタイト層の厚さは、1日浸漬で約4~5 $\mu\text{m}$ であった。生成したアパタイトとCCPC複合体基板とは直接結合しているようにみえる。

多孔体の作製には、スクロースをCCPC(CC30%)スラリーに混合したものを金型に入れ、十分乾燥した後、180 $^{\circ}\text{C}$ でホットプレスした。室温まで冷却した後、擬似体液に浸漬することで、混合したスクロースは溶解し、大きな気孔を有する多孔体が作製された。得られた多孔体は、スクロースの大きさや量に依存するが、約100 $\mu\text{m}$ の連通孔をもつ多孔体を作製するためには、400~600 $\mu\text{m}$ に整粒したスクロースを用いる必要があり、CCPC:スクロースの比率は1:6(重量比)が適当であることがわかった。

図3は得られた多孔体のSEM写真である。気孔径は350~590 $\mu\text{m}$ (平均460 $\mu\text{m}$ )、連通気孔径は90~120 $\mu\text{m}$ (平均100 $\mu\text{m}$ )であった。また、気孔率は89%であり、極めて高い。骨格表面には約2 $\mu\text{m}$ の厚さのHCAが生成している。つまり、この多孔化処理(擬似体液を用いる)によれば、気孔を形成するだけでなく、得られる多孔体の骨格表面にHCAを同時に析出させることができる。

気孔分布を水銀ポロシメータを用いて測定したところ、数十 $\mu\text{m}$ 以下の気孔は20%以下であった。つまり、細胞が進入するに好ましい気孔のみを有している。

多孔体の圧縮強度測定における応力-歪み曲線を測定したところ、本多孔体は89%もの高気孔率でありながら、高い強度(圧縮強度~2 MPa)をもち、さらに、セラミックスのような脆性破壊を示さない。培養時のハンドリングなど、臨床において非常に好ましい性質をもっている。

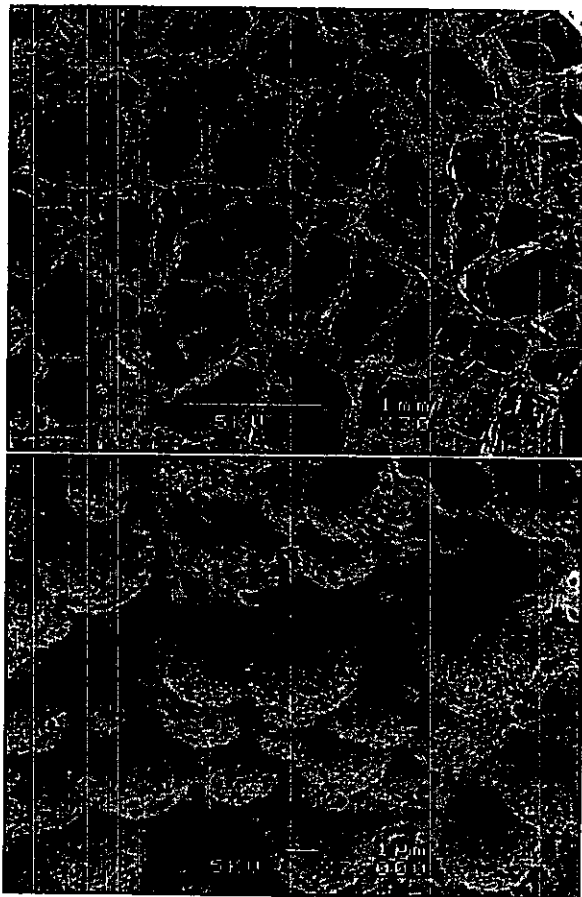


図3. HCA を骨格表面に生成させたハイブリッド多孔体の SEM 写真（上写真：断面写真。下写真：骨格表面の拡大写真）

#### D. 結論

CCPC (CC30%) は、ダクティリティをもち、擬似体液中で1日以内に生体吸収性骨類似アパタイトで被覆される。CCPC とスクロースを混合し、ホットプレスして作製した試料を擬似体液中に浸漬することで、多孔化と同時に骨格表面に骨類似アパタイトを生成させることができた。この多孔体は培養骨用マトリックスに好ましい形状をもち、有用と期待された。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

・ T. Kasuga, H. Maeda, K. Kato, M. Nogami, K. Hata, M. Ueda: Preparation of poly(lactic acid) composites

containing calcium carbonate (vaterite), *Biomaterials*, *in press*.

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, Y. Hibino, K. Hata, M. Ueda, and Y. Ota : Preparation of Bioactive Poly(lactic Acid) Composites Containing Calcium Carbonates, *Key Engng. Mater.*, **240-242**, 163-166 (2003).

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, Y. Hibino, K. Hata, M. Ueda, and Y. Ota: Biomimetic Apatite Formation on Poly(lactic Acid) Composites Containing Calcium Carbonates, *J. Mater. Res.*, **17**, 727-730 (2002).

##### 2. 口頭発表

・ 前田、加藤、春日、野上、畠、上田、太田：多孔質骨類似アパタイト複合体の作製、日本セラミックス協会秋季シンポジウム（秋田、2002年9月22～24日）

・ H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, Y. Hibino, K. Hata, M. Ueda, and Y. Ota : Preparation of Bioactive Poly(lactic Acid) Composites Containing Calcium Carbonates, 15<sup>th</sup> International Symposium on Ceramics in Medicine, Sydney, 4-8 Dec. 2002.

・ 加藤、前田、春日、野上：バテライト含有ポリ乳酸複合生体材料の作製、日本セラミックス協会東海支部学術発表会（名古屋、2002年12月6日）

・ 春日、前田、加藤、佐々木、野上、畠、上田：バテライト含有複合体の生体材料としての可能性、日本セラミックス協会年会（東京、2003年3月23～24日）

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

出願・登録ともなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

Ueda M.: Maxillofacial Bone regeneration using tissue engineering concepts. *Dentistry in Japan*, 39, 2003  
in press

Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, Kojima K, Ueda M, Bonassar LJ: Tissue engineered composite of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine*, 2003 in press

Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M.: Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Cranio Maxill Surg*, 31, 27-33, 2003

Boo J S, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M: Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Cranio-fac. Surg.* 13 231-239, 2002

Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Hibino Y, Hata K, Ueda M, Ota Y.: Biomimetic Apatite Formation on Polylactic Acid Composites Containing Calcium Carbonates, *J. Mater. Res.*, 17, 727-730 (2002).

Maeda H, Kasuga T, Nogami M, Hibino Y, Hata K, Ueda M, Ota Y.: Preparation of Bioactive Polylactic Acid Composites Containing Calcium Carbonates, *Key Engng Mater*, 240-242, 163-166 (2003).

Toriyama, K. Torii T. et al. Endogenous adipocyte precursor cells for regenerative soft-tissue engineering. *Tissue Engineering* 8:157-168 2002

Ito A, Kobayashi T. et al.: Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 95(4), in press (2003).

Ito A, Kobayashi T. et al.: Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering. *J. Biosci. Bioeng.* 95(2), 196-199 (2003)

Okido M, Nishikawa K, Kuroda K, Ichino R, Zhao ZW, Takai O. Evaluation of the Hydroxyapatite Film Coating on Titanium Cathode by QCM, *Mater. Trans.* Vol. 43, No. 12 (2002) 3010-3014

Kuroda K, Miyashita Y, Ichino R, Okido M, Takai O. Preparation of Calcium Phosphate Coatings on Titanium Using the Thermal Substrate Method and Their in vitro Evaluation, *Mater. Trans.* Vol. 43, No. 12 (2002) 3015-3019

Okido M, Kuroda K, Ishikawa M, Ichino R, Takai O. Hydroxyapatite Coating on Titanium by Means of Thermal Substrate Method in Aqueous Solutions, *Solid State Ionics*, Vol. 151 (2002) 47-52

Gomez-Vega JM, Teshima K, Hozumi A, Sugimura H, Takai O. Mesoporous Silica Thin Films Produced by Calcination in Oxygen Plasma, *Surface and Coatings Technology*, in press (2003)

Miura Y, Ikeda T, Kobayashi K. Chemoenzymatically synthesized glycoconjugate polymers, *Biomacromolecules*, 4, 410-415 (2003)

Tanaka H, Nishida Y, Furuta Y, Kobayashi K. A Convenient Synthetic Pathway for Multivalent Assembly of Aminoglycoside Antibiotics Starting from Amikacin. *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.*, 12, 1723-1726 (2002)

Honda M., Morikawa N., Hata K., Yada T., Morita S., Ueda M, and Kimata K. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactide-co-ε-caprolactone) scaffolds

Biomaterials, 2003, in press

Itano N, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, Hamaguchi M, Kimata K. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact-inhibition of cell growth and promotes cell migration. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 3609-3614.

Zako M, Iwaki M, Yoneda M, Miyaishi O, Zhao J, Suzuki Y, Takeuchi M, Miyake G, Ikagawa H, Kimata K. Molecular cloning and characterization of chick sialoprotein associated with cones and rods, a developmentally regulated glycoprotein of interphotoreceptor matrix. J. Bioll. Chem, 277, 25592-25600.

Kasuga T, Maeda H, Kato K, Nogami M, Hata K, Ueda M.: Preparation of poly(lactic acid) composites containing calcium carbonate (vaterite), Biomaterials, *in press*.

20020465

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
P.24-P.25の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。