

Ito A, Hayashida M, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T. Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force. Tissue Engineering 10(5-6): 873-80, 2004

Ito A, Hibino E, Honda H, Hata K, Kagami H, Ueda M and Kobayashi T. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles. Biochem Eng J. 20: 119-125, 2004

Maeda H., Kasuga T, Nogami M, Kagami H, Hata K, Ueda M. Preparation of bonelike apatite composite sponge. Key Engineering Materials 254, 497-500, 2004

各務秀明、上田実 再生医療の臨床応用と産業化 「小児外科」 Vol.36 No.11, 1383-1387, 2004

各務秀明、水野裕和、山田陽一、上田実 細胞移植による歯周病の治療 「治療学」 Vol.38 No.10, 103-105, 2004

各務秀明、上田実 / 再生医療の現状と展望 「月刊新医療」 Vol.31 No.1, 18-21, 2004

大屋盛道, 山田陽一, 和田圭祐, 渡邊和代, 小澤亮太郎, 岡崎恭宏, 日比英晴, 各務秀明, 畠賢一郎, 上田実 間葉系幹細胞とPRP複合体を用いた上顎洞底挙上術における骨造成法の実験的研究 口外誌 50(10):559-566, 2004

2. 学会発表

16th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery. May 14-20, 2003, Athens, Greece.

Regeneration of alveolar bone by cultured periosteum.

Mizuno H., Hata K-I., Wada K., Kogami, H., Sojo K., Ueda M.

82nd General session and exhibition of the IADR March 10-13, 2004, Hawaii, USA.

A novel approach to regenerating periodontal tissue by cultured periosteum. Mizuno H., Hata K-I., Wada K., Kogami, H., Ueda M..

Symposium III 「Tissue Engineering」 6th Asian Congress on Oral and maxillofacial Surgery 10/20-23/2004 Chiba, Japan. Hideaki Kagami

Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society 10/10-13,2004 Lausanne, Switzerland

Tissue engineering as a tool to regenerate oral and maxillofacial tissues. Kagami H

各務秀明, 本田雅規, 安藤由典, 上田実 歯および歯胚由来細胞を用いた再生医療とその可能性

シンポジウムー7ー1

歯, 歯周組織, 顎骨の再生に向けて 第3回日本再生医療学会総会 2004.3.23-25 千葉 幕張メッセ

各務秀明
培養骨膜シートを用いた歯周組織の再生治療
シンポジウム3「皮膚・眼・歯周」第7回
日本組織工学会 2004.7.1-2 東京 砂防会館

各務秀明
組織工学的手法を用いた歯の再生
ミニシンポジウム
第57回日本口腔科学会総会 2003.5.7-8
福岡
各務秀明、上田実
各科外科手術の最前線1

臨床応用の進む歯科の再生医療
要望演題
第28回日本外科系連合会学術集会
2003.6.20-21 東京 都市センターホテル

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

特願 2003-98989 人工軟骨

特願 2003-291078 硬組織の再生

特願 2003-346976 培養骨膜パッケージ、及びその調製方法

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

未分化間葉系細胞を用いた骨再生の臨床研究

分担研究者 山田 陽一 名古屋大学医学部附属病院遺伝子再生医療センター 助手

研究要旨

再生医療は生きた細胞、生理活性物質、マトリックスを用いて組織を再生する、移植医療に変わりうる新しい概念の組織再生療法のひとつである。本研究では、中でも骨組織再生に着目し、再生医療的手法を用いた骨系統疾患患者の治療方法を確立しようとするものである。今回生きた細胞として、多分化能を持ち合わせた未分化間葉系幹細胞（MSCs）を、生理活性物質、マトリックスとして多血小板血漿（PRP）を用いて、低侵襲で形態付与性を持ち合わせた注入型培養骨による骨再生を試みる。まず、基礎研究において、犬下顎骨に作製した骨欠損に移植した上記マトリックスおよび現在、臨床的に行われている自家骨と比較検討することにより、骨再生能力を検討した。さらなる培養骨の特徴を検討することに加えて、この結果を受けて倫理委員会にて承認されている培養骨の臨床応用を押し進め、患者への貢献をいち早く行っていき、さらに基礎研究、臨床研究を関係付けることによるトランスレーショナルリサーチを進めていくものとする。

A. 研究目的

現在、骨再生は人工材料、自家骨などを用いて行われているが、前者は吸収期間、異物反応などの問題を抱えており、後者も、正常組織に侵襲を新たに加えなければならないことに加えて、採取量にも制限がある。そこで、今回低侵襲による、形態付与性を持ち合わせた注入型培養骨による骨再生を試みる。また、いち早く臨床応用を行うことで患者への貢献をし、quality of life (QOL) の向上に寄与することを目的とする。

さらに、今回その臨床経験とすでに未分化間葉系幹細胞を用いた骨再生に成功している技術を応用する中で、基礎研究に根ざした、さらなる治療方法の開発および臨床症例を重ねていく中で、最適化を検討していきたい。このことが達成されれば歯科界に関する貢献は画期的で計り知れないものが

ある。

B. 研究方法

注入型培養骨の特徴を組織学的検討に加えて、組織形態学および物理的強度、人工歯根（インプラント）との結合率、骨占有率などにおいても検討を行った。また、移植細胞の特性、安全性についても検討を行い、より安全性に担保された臨床応用を進めることを計画した。本研究期間では、骨のみでなく歯周組織の再生についても検討を行うこととした。臨床症例を重ねることで、患者負担の少ない再生医療を進めるものとする。各症例においては、臨床的評価に加えて、レントゲンの（CTなどを用いて）臨床評価を行う。

（倫理面への配慮）

組織採取、臨床応用を行う場合、名古屋大学倫理委員会にて承認された申請内容に従い、該当患者に書面および口頭で十分に説明し同意を得た。また、採取したすべての組織については、プライバシーの保護のためドナー情報は秘密にて行うこととした。

C. 研究結果

注入型培養骨の骨再生能力を欠損のみ、自家骨、PRPのみと比較検討した。その結果、再生された骨占有率は、移植後 8 週目においては、 $18.3\pm 4.84\%$ (欠損のみ), $29.2\pm 5.47\%$ (PRP), $61.4\pm 3.38\%$ (自家骨), そして $67.3\pm 2.06\%$ (注入型培養骨)であった。また、インプラントとの骨結合率については $26.4\pm 9.5\%$ (欠損のみ), $44.2\pm 10.8\%$ (PRP), $49.9\pm 8.2\%$ (自家骨), and $58.6\pm 9.7\%$ (注入型培養骨)であった。さらに、組織学的にも注入型培養骨は十分な層板構造を持った成熟した骨再生が確認された。また、非脱灰切片を作製し、人工材料である BioOss とも比較検討を行い、物理的強度を計測した結果、移植後 2 週という初期において $8.40\pm 1.50\%$ (欠損のみ), $9.30\pm 1.64\%$ (PRP), $11.24\pm 1.97\%$ (自家骨), $17.66\pm 2.60\%$ (注入型培養骨)の値を示したのに対し、BioOss では十分な強度を有しておらず、計測不可能であった。また、採取している MSCs は CD105、CD44 などの表面抗体を発現しており、造血幹細胞に特異的とされる CD34、CD45 などの発現は見られなかった。さらに、細胞の安全性についても検討し、マイコプラズマ感染、エンドトキシンなども検出されなかった。また、染色体においても転座、欠失などの異常は見られなかった。以上の結果をもとに、臨床応用を行った。インプラントとの

応用例 (13 例)、骨延長部への応用例 (6 例)、歯周病への応用例 (3 例) に適応され、現在経過は良好である。



図1: 培養骨による骨再生

(V) イヌ下顎骨モデルによる実験 (Vi) 非脱灰切片による培養骨の組織学的所見 (Vii) 臨床応用例; 74歳男性、広範囲な骨欠損を認める。(Viii) 注入型培養骨の応用 (ix) 6ヶ月後に良好な骨再生が確認された。矢印が骨再生部

D. 考察

幹細胞を応用したトランスレーショナルリサーチは良好な結果を得ており、今後も臨床例を積み重ね、よりよい臨床研究、貢献を続けていくと同時に、慎重に経過観察を行っていくものとするのが重要であると思われる。

E. 結論

基礎研究に根ざした、MSCs と PRP を用いた骨再生療法は、臨床応用においても、現在 22 例すべて経過良好であった。今後臨床症例の拡充と同時に、臨床経過を検討していくこととする。

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。

研究発表

1. 論文発表

小澤亮太郎, 山田陽一, 日比野祥敬, 長坂徹郎, 夫才成, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田実.

間葉系幹細胞, フィブリンのりおよび生体吸収性足場を用いた注入法による骨再生に関する実験的研究, 日本口腔外科学会誌, 2003, VOL49, NO5, 317-322.

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

Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Iwai, T., Ueda, M., and Kimata, K. CD44 variant exon6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Oncology Reports*, 10 (6), 1919-1924, 2003.

Yamada, Y., Itano, N., Narimatsu, H., Kudo, T., Hirohashi, S., Ochiai, A., Ueda, M., and Kimata, K. Elevated Expression of Hyaluronan Synthase1 Correlates with Poor Prognosis of Human Colon Cancer, *Clin Exp Metastas*, 21(1), 57-63, 2004.

Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., and Ueda M., A comparison of osteogenesis-related gene expression of mesenchymal stem cells during the osteoblastic differentiation induced Type-I collagen and/or fibronectin, *Int J Oral-Med Sci*, 1, 148-155, 2003.

Yamada, Y., Ueda M, Naiki T and Nagasaka, T. Tissue-engineered injectable bone regeneration

for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Impl Res*, 15, 589-597, 2004.

Yamada, Y., Itano, N, Hata, K., Ueda, M., and Kimata, K. Differential Regulation by IL-1 β and EGF of Expression of Three Different Hyaluronan Synthases in Oral Mucosal Epithelial Cells and Fibroblasts and Dermal Fibroblasts: Quantitative Analysis using Real Time RT-PCR, *J Invest Dermatol*, 122 (3), 631-639, 2004.

Yamada, Y., Ueda M, Hibi H and Nagasaka, T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma-from basic research to clinical case study. *Cell transplantation*, 13, 343-355, 2004.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., and Nagasaka, T. Autogenous injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Platelet-Rich Plasma (PRP) - Tissue-engineered bone regeneration- *Tissue engineering*. 10 (5/6), 955-964, 2004.

Takahashi, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ohya, M., Ito, K., and Ueda, M. Expression of Odontoblastic-related Genes in Human Dental Follicle Cells, Dental Pulp Stem Cells, and Oral Mucosal Cells. *Int J Oral-Med Sci*, 3, 41-48, 2004.

Ito, K., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, H., and Ueda, M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-Oss®), platelet-rich plasma (PRP), and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings.

J. Biomed. Mater. Res. A, 73, 63-72, 2005.

Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., and Ueda M. Sinus floor elevation applied for tissue-engineered bone – comparative study between mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits -. Clin Oral Impl Res, in press.

Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., and Okazaki, Y. A clinical report of injectable tissue-engineered bone applied for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry in press.

Yamada, Y., Ueda, M., Hibi, H., and Baba, S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) using tissue engineering technology – a clinical case report -. The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry in press.

2. 学会発表

Ueda, M., Yamada, Y., Ito, K., and Okazaki, Y. Tissue engineered bone using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. Academy of osseointegration 18th annual meeting, Boston, 2003. 2.27-3.1

山田陽一, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 注入型培養骨を用いた骨再生医療. 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第2回日本再生医療学会大会. 神戸, 2003.3.10-12

古市保志, 山田陽一, 山本松男, 松山孝司, 尾畑俊和, 金城守明, 中村利明, 吉元剛彦, 上田 実, 和泉雄一. 間葉系幹細胞および高血小板血漿を用いた歯周組織再生療法の組織学的評価. 第46回日本歯周病学会春季学術大会. 東京, 2003.4.24-26

山田陽一, 古市保志, 畠賢一郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 伊藤憲治, 和泉雄一, 上田 実. 未分化間葉系幹細胞、多血小板血漿を応用した注入型による歯周組織再生療法-GTR法との比較-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

高橋 誠, 山田陽一, 小沢亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 岡崎恭宏, 上田 実. 培養歯髄幹細胞による象牙質形成能の比較検討 (in vitro). 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9

日比英晴, 大隅 省, 惣城一美, 伊藤優子, 坂井謙介, 巖山 大, 水野裕和, 大久保肇, 服部 宇, 伊藤憲治, 山田陽一, 畠賢一郎, 重富俊雄, 藤内 祝, 上田 実, 澤木佳弘, 水谷英樹. 外科矯正手術と仮骨延長術-仮骨延長術にみられる問題とその対策-. 第57回日本口腔科学会総会. 福岡, 2003.5.8-9.

大屋盛道, 山田陽一, 和田圭祐, 畑中隆志, 夫才成, 渡辺和代, 伊藤憲治, 小澤亮太郎, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 上田 実. 間葉系幹細胞とPRP複合体を用いた上顎洞底挙上術への骨造成法. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

日比英晴, 山田陽一, 小澤亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 高橋 誠, 岩槻慎二, 上田 実. 血管柄付き遊離移植された肩甲骨中のインプラント周囲組織. 第33回日本口腔インプラント会総会. 名古屋, 2003.7.18-20

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Ozawa,

- R., Hibi, H., Kagami H, and Baba, S. Injectable tissue-engineered bone regeneration for osseointegrated dental implants: clinical and basic approach. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11
- Ozawa, R., Yamada, Y., Nagasaka, T., Baba, S., Hata, K-I, and Ueda, M. Injectable bone regeneration with mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. European association for osseointegration 12th annual scientific congress, Vienna, Austria, 2003. 10.9-11
- 山田陽一, 日比英晴, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 木下一彦, 長坂徹郎, 各務秀明, 岡崎恭宏, 畠賢一郎, 馬場俊輔, 上田 実. 注入型培養骨による骨再生医療—基礎研究から臨床応用に関するトランスレーショナルリサーチ—, 第48回日本口腔外科学会総会. 富山, 2003.10.23-24.
- Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Ito, K., Hibi, H., and Baba, S. Translational research as for injectable tissue-engineered bone regeneration: from basic research to clinical approach. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network (A-IMBN) 2003, Tokyo, Japan, 2003. 11.12-13
- Hibi, H., Kinoshita, K., Hishida, S., Nishiguchi, H., Yamada, Y., and Ueda. New internal and multidirectional distractor for the treatment of mandibular segmental defect. 7th European craniofacial congress, Italy, 2003.11.19-22
- Yamada, Y., Fujimoto, A., Ozawa, R., Ito, K., and Ueda, M. Cluster analysis and gene expression profile between mesenchymal stem cells (MSCs) and Dentin pulp stem cells (DPSCs). International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13
- Ito, K., Yamada, Y., Baba, H., Hibi, H., Ozawa, R., Takahashi, M., Ohya, M., Sojo, K., Kinoshita, K., and Ueda, M. Mechanical properties of tissue-engineered bone using MSCs and PRP. International Association for Dental Research (82nd General session & Exhibition of IADR), Honolulu, America, 2004. 3.10-13
- 日比英晴, 木下一彦, 菱田純代, 西口浩明, 山田陽一, 上田 実. 創内型多方向性骨延長装置の下顎骨区域欠損への適応. 第58回日本口腔科学会総会. 横浜, 2004.5.7-8.
- 山田陽一, 古市保志, 伊藤憲治, 山本松男, 馬場俊輔, 日比英晴, 和泉雄一, 上田実. 未分化間葉系幹細胞、多血小板血漿を応用した注入型による歯周組織再生療法:—基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチ—, 第47回日本歯周病学会春季学術大会. 鹿児島, 2004.5.21-22.
- 山田陽一, 上田 実. 間葉系幹細胞を応用した骨、歯周組織再生医療—基礎研究から臨床応用へのトランスレーショナルリサーチ—, 第7回日本組織工学会, シンポジウム; 皮膚・眼・歯周, 東京, 2004.7.2
- Ohya, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Ito, K., Takahashi, M., Kagami, H., Hibi, H., Hata, K-I and Ueda M. Maxillary sinus augmentation in rabbits: A comparative histologic-histomorphometric study between mesenchymal stem cells and autogenous bone. 13th annual scientific meeting of European association for osseointegration, Paris, France, 2004, 9.16-18.

山田陽一, 上田 実, 小澤亮太郎, 伊藤憲治, 大屋盛道, 高橋 誠, 日比英晴, 馬場俊輔. トランスレーショナルリサーチの概念による基礎研究に基づいた注入型培養骨の臨床応用とその特徴, 第34回日本口腔インプラント学会総会. 大阪, 2004.9.24-26.

日比英晴, 山田陽一, 木下一彦, 小澤亮太郎, 大屋盛道, 伊藤憲治, 高橋 誠, 各務秀明, 上田 実.

骨延長法への間葉系幹細胞移植の応用. 第34回日本口腔インプラント学会総会. 大阪, 2004.9.24-26

Yamada, Y., Hibi, H., Ozawa, R., Ito, K., Ohya, M., Takahashi, M., Kagami, H., and Ueda, M. The various possibilities of injectable tissue-engineered bone (the application for dental implants, periodontitis, distraction osteogenesis, and residual alveolar cleft. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, Tokyo, Japan, 2004. 10.20-23.

Hibi, H., Yamamoto, N., Oda, T., Yamada, Y., Kagami, H., Tohrai, I., and Ueda, M. Mandibular reconstruction using multidirectional internal distraction device. 6th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery. 49th Annual Meeting of Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, Tokyo, Japan, 2004. 10.20-23.

山田陽一, 上田 実, 日比英晴, 各務 秀

明. 注入型培養骨を用いた顎顔面領域再生への挑戦: インプラント、歯周病、骨延長、顎裂部骨移植への応用, 第4回日本再生医療学会総会. 大阪, 2005.3.10-12.

山田陽一, 上田 実. ティッシュエンジニアリングコンセプトに基づいた歯槽骨と歯周組織の再生, 第52回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 総会・学術大会, シンポジウム; 歯科領域における再生医療の最近の進歩, 東京, 2004.11.27-28.

Yamada, Y., Hibi, H., Yajima, A., Ito, K., Ohya, M., Ozawa, R., Takahashi, M., Nagasaka, T., and Ueda, M. The clinical application of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells (MSCs) and platelet-rich plasma (PRP) on basis of basic experimental research. Academy of osseointegration, Orland, FL, USA, 2005. 3.10-12.

Hibi, H., Yamada, Y., Kinishita, K., Ozawa, R., Ohya, M., Ito, K., Takahashi, M., Kagami, H., and Ueda, M. Distraction osteogenesis assisted with injection of tissue-engineered osteogenic material. Academy of osseointegration, Orland, FL, USA, 2005. 3.10-12.

知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

特許申請中

特願 2004-097644 「組織または器官再生用材料」

特願 2004-317241 「骨又は歯周組織形成用組成物」

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

軟骨効果的効率的再生に関する研究

分担研究者 鳥居 修平 名古屋大学医学部形成外科 教授

研究要旨

われわれは、関節軟骨疾患に対する治療法の開発を中心に、新たな軟骨再生のための研究を行っている。これまでの結果では、軟骨再生における至適マトリックスの検討および、MSCより軟骨細胞への至適分化条件等を検索してきた。これらの細胞や生体吸収性材料を用いて、ウサギ膝軟骨欠損モデルでの臨床的有用性を検討した。これらの結果、未分化間葉系幹細胞（MSC）を関節軟骨部の欠損にPGAの不織布を担体として埋入することで、骨膜等で関節面を被覆する方法と同等の関節面保護、癒着防止効果が得られる可能性を見いだした。

一方、関節面の治療には、軟骨のみでなく骨・軟骨複合組織が有用である。間葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞双方へ分化可能だが、この分岐には増殖因子、サイトカイン等の関与が知られている。今回MSCを分化させずに移植に用いても、骨部位では移植した細胞が骨様組織に分化しており、また、軟骨部においては、軟骨様組織を呈していた。未分化なMSCを骨軟骨欠損部に移植することで、低侵襲で骨軟骨様組織が作成可能であり、将来臨床的に応用可能と考えられた。

研究目的

現在までに、関節軟骨の欠損に対して培養軟骨細胞を注入する治療が行なわれてきたが、骨膜を採取して損傷部位をカバーする必要があることから、新たな組織欠損をつくるなど解決すべき課題がある。本研究では、生体吸収性材料を用いた特殊な不織布を用いて、骨膜によるカバーを用いない関節軟骨再生法を新たに開発する。これにより治療侵襲を軽減できるのみでなく、長期予後の改善にもつながる可能性がある。これにより治療侵襲を軽減できるのみでなく、長期予後の改善にもつながる可能性がある。さらに骨・軟骨複合組織の再生は、より重篤な関節の傷害にも応用可能と考えられ、運動機能の傷害を持つ高齢者に新たな治療法を提供することが期待される。

研究方法

MSCから軟骨細胞への分化誘導法は確立しており、臨床の場で使用しやすい再生法の開発を本研究期間

の課題とする。予備実験から、関節軟骨部の欠損に繊維状コラーゲンとPLAの特殊な不織布を担体として埋入することで、骨膜等で関節面を被覆する方法と同等の関節面保護、癒着防止効果が得られる可能性を見いだした。このことから、誘導軟骨細胞を用いてウサギ膝関節での軟骨再生法を確立し、臨床応用をめざす。具体的には日本白色家兎（1.5-2.5kg）の骨髄を採取し、MSCを単離、培養を行った。PHK26(Sigma社製)を用いて標識されたMSCをpolyglycolic acid(以下PGA)のscaffoldに播種して一週間さらに培養した。ウサギ膝関節大腿骨顆部荷重面に5×10mm、深さ2mmの軟骨下骨が十分に露出する軟骨欠損を作成し、培養組織を移植し、関節裂隙にSeptrafilm（GENZYME社製）をスペーサーとして使用し移植モデルとした。術後2・4・8・12週での肉眼的所見、組織学的評価、蛍光免疫染色（I型およびII型コラーゲン）を行い作成した移植片を評価した。

（倫理面への配慮）

動物実験については名古屋大学動物実験指針に基づき、学内動物実験委員会にて承認された内容を遵守して行った。

研究結果

生体吸収性材料である、PGA は軟骨作製時に至適な材料として、推定することができ、軟骨欠損部に MSC とともに埋入する事で、2 週の時点で軟骨様の組織へと変化していた。2 週から 8 週までに作成された軟骨様組織の厚みは正常軟骨の 2/3 に減少していき、8 週からは変化しなかった。軟骨下骨にも PKH 陽性細胞は認められた事より、埋入された MSC は骨細胞にも分化している事が示唆された。II 型コラーゲンはほぼ軟骨様組織全体で発現が認められた。I 型は軟骨下骨に近い部分でのみ発現が認められた。それぞれ移植した細胞の PKH とコラーゲン免疫染色により、それぞれに分化している事を証明した。

考察

未分化な MSC を骨軟骨欠損部に移植することで、低侵襲で骨軟骨様組織が作成可能であり、将来臨床的に応用可能と考えられた。生体吸収性材料である PGA は、強い炎症反応などもおこらず、軟骨作製時に推奨される材料であると考えられる。骨・軟骨複合組織の再生を目指す上で、MSC から骨、軟骨細胞に分化させた細胞をそれぞれ別に移植するよりも、今回の実験で用いたように移植する事で、より早期に、コスト削減の面からも有用である事が示唆された。

結論

間葉系幹細胞（以下 MSC）は採取が容易で増殖能に優れ、低侵襲での軟骨欠損の治療が実現できる可能性を持っている。

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。

研究発表

論文発表

K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances TGFβ-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 10, 921-929, 2004

M. Tatebe, R. Nakamura, H. Kagami, K. Okada, M. Ueda. The formation of joint cartilage and bone by fluorescent labeled mesenchymal stem cells without differentiation. (*Clinical Orthopaedics and Related Research*) in preparation

Ikuo Hyodo, Bin Nakayama, Mitsuru Takahashi, Kzuihiro Toriyama, Yuzuru

Kamei and Shuhei Torii: The gastrocnemius with soleus bi-muscle flap.

British Journal of Plastic Surgery, 57: 77-82, 2004.

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 本多裕之 名古屋大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

我々は、磁力を利用して細胞を自在に配置・配列する技術を組織工学に応用して、Mag-TE(Magnetic force-based tissue engineering)を開発した。本研究課題において、Mag-TEの技術を用いて、二通りのアプローチで研究成果をあげた。一つは、磁力で高密度に間葉系幹細胞（MSC）を播種することによって、MSCの増殖を促進させることができることを示した。もう一つは新たな三次元生体組織の構築法として、磁石で細胞を集積・重層化させ、重層化細胞シートを構築することができた。これらの方法は、骨や軟骨を含む Tissue Engineering における有用な手法になると考えられる。

1. 研究目的

Tissue Engineering 分野における工程では、患者の細胞を増幅する工程と、増幅した細胞を三次元的に再構築する工程に分類することができる。我々は機能性磁性微粒子であるマグネタイトで細胞を標識し、磁力で引きつけることによって、細胞を任意の場所に配置・接着させて三次元組織を構築する手法（マグ ティッシュ エンジニアリング, Mag-TE）を開発した。この技術を用いることで、MSCの増幅培養法および細胞の重層化による三次元組織構築法を開発した。

2. 研究方法

2-1 機能性磁性微粒子を用いた MSC の増幅培養

磁性微粒子であるマグネタイトを脂質二重膜であるリポソームで包埋して、その表面に MSC 特異的な抗体である抗 CD105 抗体を結合した AML(Antibody-conjugated magnetoliposome : 図1)を、顎骨あるいは腸骨から採取した骨髓液を1ml含む培地(total 10 ml)に添加した。AML 添加後、骨髓液を培養面積 55cm²の培養皿に播種した。播種の際に、上面の面積が 3cm²の円柱状ネオジ磁石 (0.45T) を培養皿底面に設置した。対照群として、AML を添加せ

ず、磁石を設置しない細胞を用いた。磁石を設置して、7日後の細胞数を測定した。

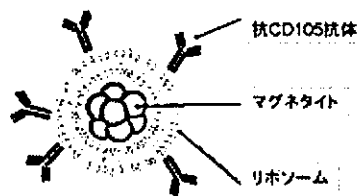


図1 AMLの模式図。粒子径は 140

さらに、本方法で得られた細胞が MSC であることを同定するために、骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨細胞への分化誘導培地で培養を行うことで、多分化能を評価した。

2-2 機能性磁性微粒子を用いた三次元組織構築

培養表皮シートの作製法を図2に示す。表皮角化細胞は新生児包皮由来の keratinocyte (クラボウ) を用いた。MCL を 50 pg/cell、25 pg/cell の濃度で添加し細胞を磁気ラベルした。磁気ラベルした細胞を超低接着性 24 well plate (コーニング) に 2×10^5 cell/well (コンフルエントの細胞数の 5 倍) で播種し、上面の面積が 6.8cm²の円柱状ネオジ磁石 (0.45T) を培養皿底面に設置して1日培養した。その後、高カルシウム濃度 (1 mM) 培地で1日培養し、表皮シートを作製した。

次に、培養皿底面の磁石を撤去した後、表面にPVDF膜を吸着した10mm□の円柱磁石をwellの上から接近させて、表皮シートを回収した。

作製した培養表皮は、電子顕微鏡による観察と横断面の観察により評価した。また作製した培養表皮のMCL残存量を測定した。

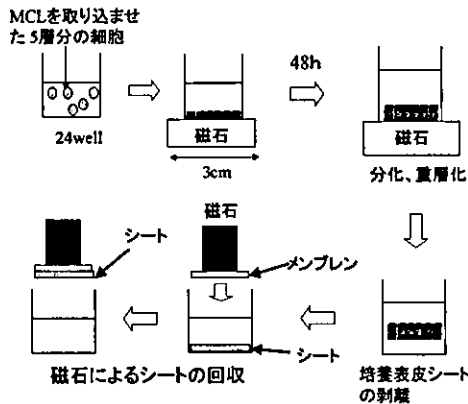


図2. 培養表皮シートの作製法

3. 研究結果

3-1 機能性磁性微粒子を用いたMSCの増幅培養

AMLを添加して、磁石を設置した場合、磁石を設置した部分に細胞が集積している様子が観察された。播種して7日後の細胞数を測定したところ、磁石を用いなかった場合では、顎骨髓液からは細胞は得られず、腸骨髓液からもわずかな細胞しか得られなかった。一方、磁石を用いた培養では、対照群と比べて、明らかに多数の細胞を得ることができた(図3)。さらに、腸骨あるいは顎骨の骨髓液から得られた細胞は、アルカリホスファターゼの発現誘導およびカルシウムの沈着が見られたことから骨芽細胞への分化能が、脂肪滴の形成から脂肪細胞への分化能が、さらにトルイジンブルーおよびII型コラーゲン陽性であったことから軟骨細胞への分化能が確認された。

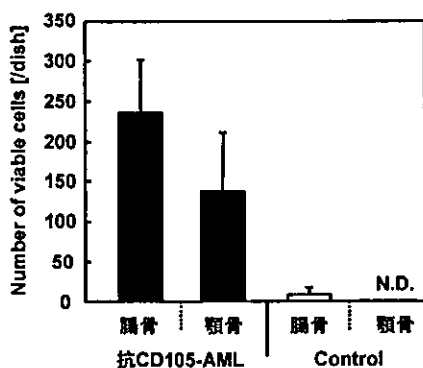


図3. 磁石を用いた高密度播種による細胞増殖の促進

3-2 機能性磁性微粒子を用いた三次元組織構築 keratinocyteにMCLを50pg/cell、25pg/cellの濃度で添加したところ、4時間後に取り込みが最大となり、それぞれ32.6pg/cell、18.3pg/cellのマグネタイトが細胞に取り込まれた。一方、このMCLs取り込みによる細胞の増殖阻害は見られなかった。

25pg/cellの濃度でMCLを添加した場合、磁石で細胞は十分に集積せず、均一なシートを形成しなかった。一方、50pg/cellの濃度でMCLを添加した場合、均一なシートを作製した。

電子顕微鏡で細胞間結合を観察したところ、デスモソームを観察できた。これにより、細胞同士は細胞外マトリクスを通して結合していることが確認できた。

次にHE染色してシートの横断面を観察したところ、10層の細胞層を確認できた。(図4)

また、表皮シートのシート内マグネタイト量を測定したところ、シート作製前とほぼ同じだった。そのため、作製したシートは円柱磁石を近づけることで容易に回収することができた。このように磁力で回収することにより、回収を自動化できる可能性がある。



図4. 培養表皮シートの横断面

4. 考察

4-1 機能性磁性微粒子を用いたMSCの増幅培養

本実験では対照群として、1mlの骨髓液を55cm²の

培養皿に播種した群を用いた。この従来法と比較して、AML を用いて高密度播種することで、多数の細胞数を獲得することができた。これは、低密度に播種された細胞は細胞増殖に遅れがでるためだと考えられる。その理由として、細胞が分泌するサイトカイン等の成長因子によるオートクライン作用が考えられる。MSC は Dickkopf-1 (Dkk-1) の自己分泌によって細胞増殖が開始するといった報告がある。MSC を、AML を用いて高密度に播種することによって、Dkk-1 等のオートクライン因子の濃度が高まり、lag time なく増殖が開始したと考えられる。

この技術は MSC に限らず、幹細胞をはじめとする他の正常細胞にも応用できることから、この技術は再生医工学にとって、非常に重要な技術になりうる。

4-2 機能性磁性微粒子を用いた三次元組織構築

本研究では、三次元組織を構築するために、MCL を用いている。本研究ではモデル細胞として表皮角化細胞を用いたが、今後 MSC(間葉系幹細胞)を用いてシート形成や分化の実験を行っていく。MCL の細胞に対する毒性については、上述した通り、見られなかったことから、MCL は MSC の分化にも影響しないと考えられる。

この技術は骨や軟骨あるいは MSC に限らず、様々な組織にも応用できることから、この技術は Tissue Engineering にとって、非常に重要な技術になりうる。

5. 評価

1) 達成度について

組織工学における二つの重要な工程である細胞増幅法と組織再構築法について、磁性微粒子と磁力を用いるといった全く新しい方法論で取り組み、それぞれ成功するといった成果をあげた点で、基礎研究としては80%以上の達成度が得られたと考えられる。しかし、この新手法“Mag-TE”は、未だ基礎研究の段階であるので、今後臨床応用するために、さらに具体的(モデルではなく、疾患に合わせた方法等)で詳細な(MCLの局所残留や毒性等)検討が必要となる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は、Tissue Engineering 誌等の国際的な専門誌で発表されており、学術的に評価されている。また、再生医療分野の新しい方法論を開発したことから、医療福祉の点で社会的意義を持つと考えられる。

3) 今後の展望について

本研究で開発した Mag-TE 法を幅広い細胞・組織・臓器に応用していき、その中で Mag-TE の威力が最も発揮されるケースを見つけて、臨床応用を目指す。

4) 研究内容の効率性について

本研究の成果は、この2年間で16件の学会発表および10報の論文発表が行われており、高い効率で成果をあげているといえる。

6. 結論

磁力を利用して細胞を自在に配置・配列する技術を組織工学に応用して、Mag-TE を開発した。本研究課題において、Mag-TE の技術を用いて、二通りのアプローチで研究成果をあげた。一つは、磁力で高密度に MSC を播種することによって、MSC の増殖を促進させることができることを示した。もう一つは新たな三次元生体組織の構築法として、磁石で細胞を集積・重層化させ、重層化細胞シートを構築することができた。これらの結果から、Mag-TE 法は、骨や軟骨を含む Tissue Engineering における有用な手法になると考えられる。

7. 研究発表

1) 国内

口頭発表 12件

原著論文による発表 0件

それ以外(レビュー等)の発表 2件

そのうち主なもの

論文発表

論文

井藤 彰、本多裕之「磁性微粒子を用いた Tissue Engineering の開発」*ケイカエンジニアリング* 49 巻 6-12 頁 2004 年

井藤 彰、本多裕之「ナノ磁性微粒子を用いた生体組織構築」*ケイカエンジニアリング* 印刷中 2005 年

学会発表

井藤 彰、滝沢洋平、本多裕之、畠賢一郎、各務秀明、上田 実、小林 猛「機能性磁性微粒子を用いた三次元生体組織の構築」 化学工学会、東北大、2003 年 9 月 12 日

林田真生、井藤 彰、本多裕之、畠賢一郎、各務秀明、上田 実、小林 猛「機能性磁性微粒子を用いた新規培養表皮シート作製法の開発」 化学工学会、東北大、2003 年 9 月 12 日

日比野恵理、井藤 彰、本多裕之、畠賢一郎、各務秀明、上田 実、小林 猛「機能性磁性微粒子を用いた間葉系幹細胞の新規培養法」 化学工学会、東北大、2003 年 9 月 12 日

井藤 彰、本多裕之「機能性磁性ナノ粒子を用いた Tissue engineering 手法の開発」 中化連秋季大会、名古屋大学、2004 年 9 月 17 日

井藤 彰、各務秀明、上田実、本多裕之「機能性磁性微粒子を用いた三次元生体組織の構築-Mag-TE の開発」 日本組織工学会、砂防会館、2004 年 7 月 1 日

伊野浩介、井藤 彰、小林 猛、本多裕之「機能性磁性微粒子を用いた細胞シートの作製」 日本生物工学会、名城大学、2004 年 9 月 21 日

日比野恵里、井藤 彰、小林 猛、寺崎浩子、各務秀明、上田 実、本多裕之「Mag-TE による網膜色素上皮シートの作製と移植」 日本生物工学会、名城大学、2004 年 9 月 21 日

本多裕之、井藤 彰「ナノ磁性微粒子を用いた生体組織構築」 日本バイオイメージング学会、京都府立医科大学、2004 年 11 月 5 日

井藤 彰、各務秀明、上田 実、本多裕之「磁性ナノ粒子を用いた組織工学手法の開発」 日本再生医

療学会、大阪国際会議場、2005 年 3 月 1 日

伊野浩介、林田真生、小林 猛、井藤 彰、本多裕之「磁性ナノ粒子を用いた管状組織の構築」 化学工学会、名古屋大学、2005 年 3 月 22 日

清水一憲、吉田達郎、井藤 彰、小林 猛、山田陽一、上田 実、本多裕之「磁力を用いた間葉系幹細胞シートの作製」 化学工学会、名古屋大学、2005 年 3 月 22 日

井藤 彰、日比野恵里、小林 猛、山田陽一、日比英晴、上田 実、本多裕之「抗体結合型マグネトロポソームを用いた間葉系幹細胞の濃縮培養法」 化学工学会、名古屋大学、2005 年 3 月 22 日

2) 海外

口頭発表 2 件

原著論文による発表 10 件

それ以外 (レビュー等) の発表 0 件

そのうち主なもの

論文発表

Akira Ito, Masao Hayashida, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Construction and harvest of multilayered keratinocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" *Tissue Engineering*, 10, 873-880, 2004.

Naoki Kato, Takeshi Kobayashi, and Hiroyuki Honda H "Screening of stress enhancer based on analysis of gene expression profiles: hyperthermia-induced tumor necrosis by an MMP-3 inhibitor" *Cancer Science*, 94 (7), 644-649, 2003.

Akira Ito, Yohei Takizawa, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Minoru Ueda, Naohiko Kuno, Atsuo Itakura and Takeshi Kobayashi "Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering" *J Biosci Bioeng*, 95(6), 589-593, 2003.

Akira Ito, Atshunori Mase, Yohei Takizawa, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Transglutaminase-mediated gelatin matrices incorporating cell adhesion factors as a biomaterial for tissue engineering" *J Biosci Bioeng*, 95(2),

196-199, 2003.

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticles" *Biochemical Engineering Journal*, 20, 119-125, 2004.

Akira Ito, Yohei Takizawa, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Tissue engineering using magnetite nanoparticles and magnetic force: heterotypic layers of co-cultured hepatocytes and endothelial cells" *Tissue Engineering*, 10(5/6), 833-840, 2004.

Akira Ito, Eri Hibino, Hiroyuki Honda, Chiaki Kobayashi, Hiroko Terasaki, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Takeshi Kobayashi "Construction and delivery of tissue-engineering human retinal pigment epithelial cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" *Tissue Engineering*, in press, 2005.

Akira Ito, Kousuke Ino, Takeshi Kobayashi and Hiroyuki Honda "The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting" *Biomaterials*, in press, 2005.

Akira Ito, Kousuke Ino, Masao Hayashida, Takeshi Kobayashi, Hiroshi Matsunuma, Hideaki Kagami, Minoru Ueda and Hiroyuki Honda "A Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic force" *Tissue Engineering*, in press, 2005.

Akira Ito, Eri Hibino, Kazunori Shimizu, Takeshi Kobayashi, Yoichi Yamada, Hideharu Hibi, Minoru Ueda

and Hiroyuki Honda "Magnetic force-based mesenchymal stem cell expansion using antibody-conjugated magnetoliposomes" *Journal of Biomedical Materials Research*, in press, 2005.

学会発表

Akira Ito, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Takeshi Kobayashi, "Construction of multilayered cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" APCChE 10th Congress, October 17, 2004, Kitakyushu, Japan.

Akira Ito, Hiroyuki Honda, Ken-ichiro Hata, Hideaki Kagami, Minoru Ueda, Takeshi Kobayashi, "Construction of multilayered cell sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force" YABEC 2004, September 24, 2004, Osaka, Japan.

8. 知的財産権の出願・取得状況

1. 特許取得

特願 2003-046060 号

「細胞培養方法」

特願 2003-78964 号

「医用材料」

特願 2003-73808 号

「細胞培養方法及び細胞シート」

特願 2003-136336 号

「細胞培養方法及び培養組織」

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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

骨組織マトリックスの作成に関する研究

分担研究者 高井 治 名古屋大学エコトピア科学研究機構 教授

研究要旨

新しい骨形成マトリックス作製のために、特に無機材料を中心として研究開発を行った。バイオミメティック・プロセスにより、シリカ系のナノ細孔薄膜を合成し、バイオガラスと組み合わせることにより人工的骨組織マトリックスとして応用することを研究した。新合成のナノ細孔材料の一種であるシリカ系のメソポーラスシリカ（MPS）膜は、人工体液中でのアパタイト形成能力が優れていることがわかり、その作製法の改良を行った。また、硬質炭素系材料の開発を行い、骨組織マトリックスとしての可能性を検討した。今後、MPSおよび炭素系材料を骨組織マトリックスとしての応用をはかり、その再生医療用材料としての評価を進める。

A. 研究目的

本研究では、バイオミメティック・プロセスにより、シリカ系のナノ細孔薄膜を合成し、バイオガラスと組み合わせることにより人工的骨組織マトリックスとして応用することを目的とする。トリブロックコポリマーまたは界面活性剤をテンプレートとする方法により、有機—無機複合薄膜を合成し、その後、有機物を除去することにより、メソポーラスシリカ（MPS）薄膜を作製した。有機物除去法として、フォトカルシネーション法を開発した。本方法が、ナノ細孔構造制御に、またアパタイト形成に、従来の熱カルシネーション法や溶媒抽出法より優れていることを実証する。

また、新たに非晶質炭素系材料およびシリカ系材料のプラズマ合成を行い、骨組織マトリックス用材料および生体適合材料としての本材料の可能性を検討した。

B. 研究方法

(1) メソポーラスシリカ（MPS）膜は、トリブロックコポリマーまたは界面活性剤（CTAC）ミセルをテンプレートとして合成した。Xeエキシマランプにより発生した真空紫外光($\lambda=172\text{nm}$)を照射するフォトカルシネーション法により、シリカ-界面活性剤メソ構造体内部のポリマーまたは界面活性剤を除去した。従来の方法における剥離、クラック、周期構造の乱れが生じやすいという問題点の解決を目指した。フォトカルシネーションと熱カルシネーションの2種類の処理方法の違いが、MPS薄膜の周期構造、組成、膜体積に与える影響について調べた。さらに、プラズマカルシネーションの効果についても検討した。MPS膜のアパタイト形成能力を、人工体液中に浸せきすることにより評価した。

使用した手順を、図1に示す。

(2) 非晶質炭素系材料としては、誘導結

合プラズマ化学蒸着法 (ICP-CVD) により作製した非晶質窒化炭素 (a-CN) 薄膜を検討材料にした。基板には、ポリエチレンテレフタレート (PET), ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) などのポリマーおよび Si (100) を用いた。原料ガスには、ベンゼンと窒素を用いて作製した。成膜中高周波出力は 1 kW とした。生体適合性を調査するため、今年度は、各成膜中基板バイアス電圧 (0, -200, -400, -600, -800, -1000V) で作製した a-CN 膜の血漿蛋白質適合性を調査した。

材料表面の蛋白質適合性は、表面の濡れ性により大きく左右される。各試料表面の濡れ性は、静的水滴接触角測定により評価した。血漿蛋白質 (フィブリノーゲン, アルブミン) に対する適合性を評価するため、血漿蛋白質を溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に各試料を浸漬した。比較のため、フィブリノーゲンを溶解していない PBS 溶液にも浸漬した。各試料表面の血漿蛋白質吸着状態は、X 線光電子分光法 (XPS), 電界放射型走査電子顕微鏡 (FESEM), 原子間力顕微鏡 (AFM) により評価した。

(3) 超はっ水・超親水パターン上での細胞接着性

自然界には、ハス、サトイモなどの植物の葉のように、水滴を球に近い形ではじく超はっ水性を示すものがある。こうした植物の超はっ水性表面は、疎水性の微細な突起や毛などで覆われているという特徴を持っている。一方、このような構造をもつ有表面に親水基を導入することにより、超親水性を示すことが知られている。本研究では、マイクロ波プラズマ CVD および真空紫外光 (VUV) リソグラフィを用いて超はっ水/超親

水パターンの作製およびその細胞親和性に関する検討を行った。

超はっ水膜は、マイクロ波プラズマ CVD 法を利用し作製した。成膜条件は、トリメチルメトキシシラン (TMMOS)、Ar の分圧をそれぞれ 26.7 Pa、46.7 Pa、マイクロ波出力を 300 W であった。成膜後、TEM メッシュをフォトマスクとして利用し、真空紫外光リソグラフィにより、超はっ水/超親水パターンを作成した。最後に、超はっ水/超親水パターンを基板とし、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) を培養し、微細構造化表面の細胞親和性あるいはその特異性について詳細に調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では、生体に関する実験は一切行っていない。

C. 研究結果

(1) コポリマーまたは界面活性剤除去の有無を赤外吸収分光で調べた結果、フォトカルシネーションにより効果的に、コポリマーと界面活性剤が除去されたことが判明した。また、X 線回折の結果、フォトカルシネーションでは、熱カルシネーションに比べ、周期構造の乱れ、細孔径・膜体積の収縮が小さいことがわかった。また、ガラス基板上においても優れた配向性を示すことが判明した。人工体液中でのアパタイト形成を行った結果を、図 2 に示す。37°C で 7 日後の表面観察結果である。アパタイト形成が観察される。

また、プラズマカルシネーションについても検討を行い、その有用性が確認できた。フォトカルシネーションにくらべ、プラズ

マカルシネーションは高速処理であるが、周期構造には乱れが大きいことが判明した。プラズマカルシネーションしたMPS膜の人工体液中でのアパタイト形成能については、今後の検討が必要である。

(2) 図3に、成膜中各基板バイアス電圧により作製したSi(100)基板上のa-CN薄膜の静的水滴接触角を示す。基板バイアス電圧を印加せずに作製したa-CN薄膜(0V)よりも、各バイアス電圧で作製したa-CN薄膜の方がより親水性の表面を有していた。基板バイアス電圧-200Vで作製したa-CN薄膜は、静的水滴接触角測定の際に、水を吸収し、Si(100)基板から剥離した。

各基板バイアス電圧で作製したa-CN薄膜を、PBS溶液に浸漬した結果、基板バイアス電圧0および-200Vで作製したa-CN薄膜は、吸着試験中に剥離した。図4に、フィブリノーゲン吸着試験前後の基板バイアス電圧-400Vで作製したa-CN薄膜のXPS C 1sスペクトルを示す((a)各溶液浸漬前のa-CN薄膜、(b)PBS溶液に浸漬したa-CN薄膜および(c)フィブリノーゲンを溶解したPBS溶液中に浸漬したa-CN薄膜)。帯電補正を行っていないため、全ての結合エネルギーが高エネルギー側にずれている。PBS溶液への浸漬のみでは、a-CN薄膜のC 1sスペクトルに大きな変化はなかった。フィブリノーゲンを溶解したPBS溶液に浸漬後のa-CN薄膜のC 1sスペクトルには、高結合エネルギー側にいくつかのピークが現れた。これらは、フィブリノーゲン中のCに帰属すると考えられる。図5に、XPSにより得られた組成から算出し

た各試料のN/CおよびO/C組成比を示す。PBS溶液への浸漬のみでは、a-CN薄膜のN/CおよびO/C組成比にほとんど変化はなかった。フィブリノーゲンを溶解したPBS溶液中にa-CN薄膜を浸漬した結果、a-CN薄膜表面のN/CおよびO/C組成比が増加した。a-CN薄膜表面のNおよびOの増加は、フィブリノーゲンの吸着に起因すると考えられる。

(3) 図6に培養後3日目の細胞の光学顕微鏡像を示す。この図から、細胞は超親水領域に位置選択的に成長していることがわかる。

D. 考察

(1) MPS上での形成物をFT-IRによる赤外吸収分光にて調べた。この解析結果より、MPS上へのアパタイトの形成が認められた。MPSを被覆していないガラス上には、アパタイトが形成しなかった。このことから、MPSはバイオアクティブな性質を有している。また、MRS上では、高速で、アパタイト形成が行えることがわかった。

(2) 非晶質炭素系a-CN膜の血漿蛋白質適合能について検討した。静的水滴接触角測定の結果、成膜中基板バイアス電圧の印加により、a-CN薄膜表面がより親水性となった。XPSによる化学結合状態解析の結果、基板バイアス電圧-400Vで作製したa-CN薄膜にフィブリノーゲンの吸着が確認された。今後、骨組織マトリックスとしての特性を検討することが必要である。

(3) 超はっ水・超親水パターン上では、超親水領域に選択的に線維芽細胞が接着し

た。これと比較するため、疎水性の自己組織化単分子膜(SAM)を利用し、はっ水・親水パターンを作製し、細胞を培養させた。しかし、超はっ水/超親水パターン基板のような高度な選択性は得ることが出来なかった。つまり、超はっ水領域および超親水領域の双方を細胞が認識することにより、上記の選択性が実現しているものと考えられる。

E. 結論

フォトカルシネーションは、従来の方法に比べ、MP S 薄膜のコポリマーおよび界面活性剤の除去において周期構造の維持が行える新しい方法であり、ナノ細孔薄膜合成に有用である。新たに合成した、ナノ細孔材料の一種であるシリカ系のMP S 膜は、人工体液中でのアパタイト形成能力が優れていることが判明した。また、新たに開発したプラズマカルシネーション法も高速処理法として有用であることが判明した。

また、新たな骨組織マトリックス用材料として、非晶質炭素系材料の検討を行った。この結果、生体材料としての基礎的な知見が得られた。炭素系材料は、生体親和性および機械的特性を併有する材料として可能性を秘めている。

今後、MP S および非晶質炭素系材料の骨組織マトリックスとして応用をはかり、その再生医療用材料としての評価を進めることが重要である。

F. 健康危険情報

本研究を通じて、健康に危険をもたらす事項を認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nae FA, Saito N, Hozumi A, Takai O. High-resolution submicron patterning of self-assembled monolayers using a molecular Fluorine laser at 157nm, *Langmuir*, 21, 1398-1402 (2005)

Saito N, Maeda N, Sugimura H, takai O. Generation of amino-terminated surfaces by chemical lithography using atomic force microscopy, *Langmuir*, 20, 5182-5184 (2004)

Surface potential microscopy for chemistry of organic self-assembled monolayers in small domains, *Nonotechnol.*, 15, S69-S75 (2004)

Mechanical durability of ultra-water-repellent thin film by microwave plasma-enhanced CVD, *Thin Solid Films*, 457, 122-127 (2004)

UV Raman spectroscopic probing into nitrogen-doped hydrogenated amorphous carbon, *Thin Solid Films*, 457, 128-132 (2004)

Dependence of hybridizations analyzed by XPS and visible Raman spectroscopy on nanohardness and wear resistance of amorphous carbon carbon nitride films, *Diamond Related Mater.*, 13, 507-512 (2004)

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, Hydroxyapatite Coating on Titanium by Thermal Substrate Method in Aqueous Solution, *J. Biomed. Mater. Res. Vol. 59, No.2* (2002) 390-397

K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai,

Effects of Ion Concentration and pH on Hydroxyapatite Deposition from Aqueous Solution onto Titanium by the Thermal Substrate Method, *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 61, No. 3 (2002) 354-359

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

K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido and O. Takai, 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

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

J.M. Gomez-Vega, K. Teshima, A. Hozumi, H. Sugimura and O. Takai, Mesoporous Silica Thin Films Produced by Calcination in Oxygen Plasma, *Surface and Coatings Technology*, Vol. 169 (2003) 583-586

2. 学会発表

Riichiro Ohta, Kyung-Hwang Lee, Nagahiro Saito, Yasushi Inoue, Hiroyuki Sugimura, Osamu Takai, Microscopic Behavior of Blood Coagulation Protein Adsorbed on NO-Releasing Amorphous Carbon Nitride Surface, The 8th IUMRS International Conference on Advanced Materials, October 8-13, 2003, Yokohama, Japan.

太田理一郎, 齋藤永宏, 井上泰志, 杉村博

之, 高井治, ポリマー基板上NO貯蔵アモルファス窒化炭素薄膜の作製と化学結合状態評価, 2003年8月30-9月2日, 秋季第64回応用物理学関係連合講演会, 福岡大学.

太田理一郎, 齋藤永宏, 井上泰志, 高井治, 非晶質炭素系薄膜表面の血漿蛋白質適合能評価, 2004年3月15-17日, 表面技術協会第109回講演大会, 東京都立大学.

J.M. Gomez-Vega, H. Sugimura, O. Takai and A. Hozumi, Bioactive Mesoporous Silica Coatings, 2nd International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-2), 2002. 1. 15-17, Nagoya, Japan, Organizing Committee of BMMP-2

J. M. Gomez-Vega, H. Sugimura, O. Takai and A. Hozumi, Bioactive Pure Silica Coatings with Ordered Nanostructures, International Workshop on Ceramic and Metal Interfaces, 2002.6.23-27, Oviedo, Spain, Spanish Ceramics Society

O. Takai, Wettability Control at Water/Solid Interface, International Workshop on Ceramic and Metal Interfaces, 2002.6.23-27, Oviedo, Spain, Spanish Ceramics Society

O. Takai, Plasma Processing for Biomimetic Materials, The Gordon Research Conference on Plasma Processing Science, 2002.7.21-26, Tilton, U.S.A, Gordon Research Conference

O. Takai, Advanced Plasma Coating Technologies, 5th Latin American Course on Plasma Processing of Materials, 2002.8.12-16, Buenos Aires, Argentina, JICA & CNEA

O. Takai, Biomimetic Materials Processing, The II-National Symposium on Surface Engineering and JIFI 2002, 2002.11.24-29, Caracas, Venezuela, Central University of