

Venezuela

Y. Wu, M. Kouno, N. Saito, Y. Inoue, O. Takai,
Impact of Water Droplets on Ultra
Water-Repellent Surface: Their Shape and
Energy Dissipation, MRS 2004 FALL
MEETING, Nov., 2004, Boston, America.

中西一生、河野正雄、呉雲影、齋藤永宏、
井上泰志、井藤彰、本多裕之、高井治、マ
イクロ構造化超はっ水・親水表面上でのキ
ャピラリー血管一括形成、表面技術協会
第111回講演大会、平成17年3月14日～16日、
千葉工業大学（講演奨励賞）

呉雲影、河野正雄、中西一生、齋藤永宏、
井上泰志、井藤彰、本多裕之、高井治、超
はっ水性表面を利用した新規細胞培養法の
開発、表面技術協会 第111回講演大会、平
成17年3月14日～16日、千葉工業大学

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）

特許の名称：所定のパターンの細胞物生産
方法及び該生産用基板

出願日：平成16年9月8日

出願番号：特願2004-261216

発明者名（寄与率）：高井治（20%）、齋
藤永宏（20%）、呉雲影（20%）、本多
裕之（20%）、井藤彰（20%）

出願人（持ち分）：名古屋大学（100%）

特許の名称：生体有機体の生産方法と該方
法に用いる容器

出願日：平成16年3月31日

出願番号：

発明者名（寄与率）：高井治（20%）、齋
藤永宏（20%）、呉雲影（20%）、本多
裕之（20%）、井藤彰（20%）

出願人（持ち分）：名古屋大学（100%）

1. 特許取得

European Patent Application EP 1252904A3

Date of Filing 24.04.2002

Precursors for active materials, active materials
using such precursors, and method for
producing said active materials

Inventors: Sugimura Hiroyuki, Takai Osamu,
Gomez-Vega, Jose Manuel

Applicant: Nagoya University

Priority 25.04.2001 JP201128093

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

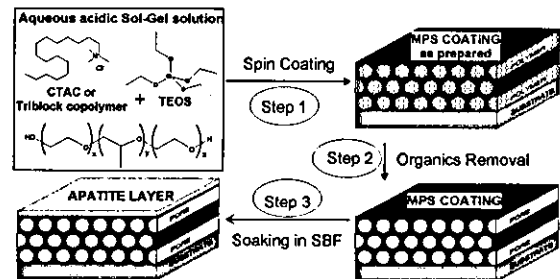


図1 MPS膜作製に使用した手順



図2 MPS上に形成したアパタイト

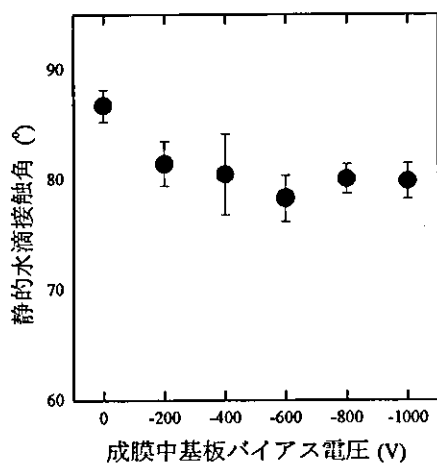


図3 各成膜中基板バイアス電圧で作製した a-CN 薄膜の静的水滴接触角

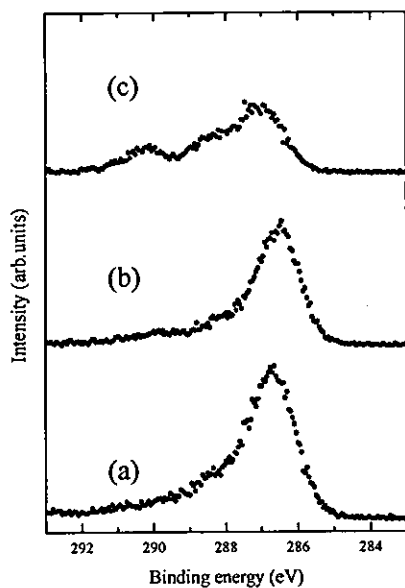


図4 XPS C 1s スペクトル ((a) 各溶液浸漬前の a-CN 薄膜, (b) PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜, (c) フィブリンノーゲンを溶解した PBS 溶液に浸漬した a-CN 薄膜)

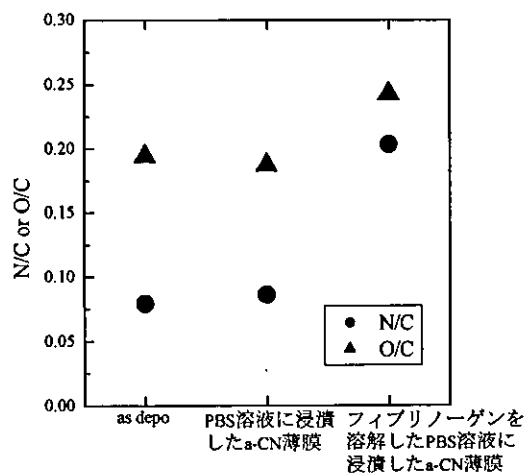


図5 基板バイアス電圧-400 V で作製した a-CN 薄膜の XPS により得られた N/C および O/C 組成比

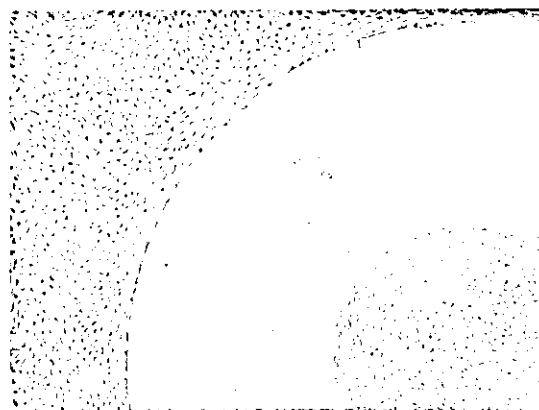


図6 超はっ水・超親水上でのマウス線維芽細胞培養. 超親水性領域に細胞が選択的に接着している.

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

培養器の表面性状の改良

分担者 小林一清 名古屋大学工学研究科 教授

研究要旨

組織工学技術の一環として、生体認識機能を発現する糖鎖を高分子材料に結合させることにより、生体適合性・生分解性に優れた細胞培養足場材料の開発を目指している。細胞工学を考える上で、細胞を生体外で培養する際に必要となる細胞の足場材料や、細胞適合性材料の開発が欠かせない。これまでにポリ乳酸などの生分解性高分子材料や表面処理により生体認識性を付与したポリスチレンディッシュなどが再生医工学材料あるいは細胞培養材料として知られている。しかし、生体適合性ならびに生体吸収性に優れた材料は限られており、新しい素材への要求は大きい。我々は、糖鎖をベースとした新規な材料の開発により、材料科学と生物科学の融合を図るとともに、生体適合性の高い新しい細胞工学材料を提供することを目指して、次の項目の研究を行ってきた。

- (1) マイクロパターン化細胞培養表面の創製
- (2) 再生医学を目指した生分解性糖鎖高分子の合成と機能開発
- (3) 生体外細胞工学を目指した糖鎖修飾表面の開発と微細加工
- (4) 抗生物質アミノグリコシドを組み込んだ高分子材料
- (5) ウイルスや毒素を中和する糖鎖高分子材料

以下に項目(1)に焦点を絞って報告する。

A. 研究目的 材料のナノ構造を制御する技術は格段の進歩をみせている。ナノテクノロジーを生体材料に応用することによって、優れたバイオ材料を開発することができる。例えば、微細構造化したバイオマテリアルは優れた生体適合性を示すようになることが報告されている。ナノまたはセミマイクロ領域の構造を制御する上で、自己組織化を活かすと、精緻な構造を造るのに有用である。特に光リソグラフィなどのトップダウンの手法と分子の自己組織化を同時に用いることで、望みのマイクロ構造を容易に得ることができる。我々はシリコン基板上に、自己組織化単分子膜を形成させ、

両親媒性を有する糖鎖高分子を選択的に自己組織化させた。これを生体高分子のマイクロ構造制御に利用して、糖鎖と蛋白質を容易にマイクロ構造化した表面を得られること、その表面が優れた生体認識性を有していることを示してきた。本研究では、2種類の糖鎖分子、糖鎖高分子とプロテオグリカンを用いて、自己組織性を用いることで、2種類の糖、2種類の蛋白質を選択的に提示することを目標とした。

B. 研究方法 シリコン基板上 Octadecyltrimetoxysilane (ODS) の自己組織化単分子膜のマイクロパターンを光リソグ

ラフィーによって作製した。3-aminopropyl triethoxysilane (APS) をレジスト領域に自己組織化させ、2種類のマルチパターンを形成した。糖鎖高分子 (PVLA) の疎水性相互作用、および Heparin の静電相互作用によって生理学的にマイルドな条件で、選択的に自己組織化した。

さらに集積化された糖鎖高分子を蛍光ラベル化レクチンによって結合させ、階層化させた。FITC および TRITC で蛍光プローブされたパターンの観察は、蛍光顕微鏡で観察を行った。

C. 研究結果 シリコン 基板上に施した ODS と APS の複合パターンに対して、自己組織性を活かして選択的に生体高分子を並べるために、ODS あるいは APS の各パターンに対する糖鎖高分子、およびレクチンの吸着の挙動をエリブソメーターと接触角、X 線光電子分光法 (XPS) によって解析した。ODS-SAM 上に疎水性相互作用による糖鎖高分子 (PVLA) の吸着、または APS-SAM 上の静電的相互作用による Heparin の吸着は、ナノレベルの薄膜を形成し、糖鎖を自己組織的に固体表面上に修飾させる有効性が示唆された。

これらの知見を応用し、ODS-SAM と APS-SAM の複合パターンを作製し、糖鎖・タンパク質といった複数の生体高分子の自己組織化を試みた。ODS と APS 上に構築された PVLA、および Heparin の薄膜に、FITC や TRITC によって蛍光ラベル化されたレクチンを作用させ、蛍光顕微鏡写真で観察した。ODS-SAM 上には、FITC 由来の RCA₁₂₀ の蛍光が観察された。一方で、ODS のレジスト領域、つまり APS-SAM 上

には、TRITC のパターンが観察できたことから、bFGF の存在が確認された。その蛍光画像の S/N 比は、それぞれ 3.1 および 2.2 であることを解析した。以上より、RCA₁₂₀ や bFGF の特異的な吸着によって、糖鎖高分子や Heparin の自己組織化と、糖鎖による認識を利用したタンパク質の規則的な階層化が確認された。

D. 考察 疎水性相互作用と静電相互作用さらにタンパク質と糖鎖の相互作用という、幾つかの分子認識を組み合わせ、複雑かつ精緻な構造を有する材料の構築の可能性を示した。自己組織化単分子膜を介してシリコンあるいはガラス表面を改質する手法は、生体高分子の平滑で安定な機能表面の提示とその複合化において有効であることがわかった。

E. 結論 複数の生体高分子の微細構造を制御する手法は、細胞膜を模倣する機能表面の開発が可能になり、バイオチップや細胞培養材料の開発に大いに役立つだろう。この選択的自己組織化の手法は、自己組織性を用いた材料工学として極めて新しく、有用な手法であることを記しておく。

F. 健康被害情報 特になし

関連研究

上記記載の項目(1)に加えていくつかの関連研究も含めて記載する。

1) 達成度について

糖鎖を用いた細胞工学材料として、高分子系統の提案と表面技術を用いた提案し目

的を達成できた。特に表面科学を用いたアプローチでは細胞工学材料に止まらず糖鎖マイクロアレイの調製を進めることができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究成果は糖鎖をバイオシグナルとして捉えて材料化することによって、再生医学やバイオテクノロジーに有用な材料化を進めることができることを示した。

3) 今後の展望について

糖鎖を網羅的固定化した糖鎖のマイクロアレイプレートを調製する。糖鎖と細胞との親和性、細胞成長因子との親和性について解析する基材の開発を進める。また、それを用いた細胞工学の展開を行う。

G. 結論

糖鎖を天然高分子や基板表面に導入することで、生体機能材料の開発に成功した。糖鎖を導入することで、タンパク質、細胞親和性を容易に上昇させることができた。天然高分子アルギン酸については、天然材料がもつ高分子性およびゲル性を保ちつつ、生体適合性を上昇させることができた。特に、タンパク質結合性の上昇が観察され、マウスによる試験では炎症性が後退した。

糖鎖修飾基板では糖鎖の修飾表面を緻密に設計することに先ず主眼をおいた。その結果、均一な薄膜を形成させることができた。タンパク質認識性は糖鎖特異性が強く現れたことから、細胞工学材料としての応用が期待される。

H. 研究発表

学会口頭発表 10件

英文レビュー 2件

Yoshihiro Nishida, Hirofumi Dohi, Kazukiyo Kobayashi, "Facile access to cell surface oligosaccharide mimics: Carbohydrate Module Approach", TIGG 2004 (in press).

Kazunori Matsuura and Kazukiyo Kobayashi, "Analysis of GM3-Gg3 Interaction Using Clustered Glycoconjugate Models Constructed from Glycolipid Monolayers and Artificial Glycoconjugate Polymers" *Glycoconjugate J.*, 21, 139-148 (2004).

国際学会招待講演 (2件)

Yoshihiro Nishida, Yuko Shingu, Kazukiyo Kobayashi, Practical assembly of alpha-glycoside epitopes, from monomers to polyvalent models, Glycostructure and Glycobiology Symposium in Dec. 4,5, 2003, Hamburg.

Kazukiyo Kobayashi, Yoshihiro Nishida, Hirofumi Dohi, and Kenji Sasaki, Facile Assembly of Cell Surface Oligosaccharide Mimics by Artificial Glycoconjugate Polymers, the Europolymer Congress, June 23-27, 2003, in Stockholm.

主な国際学会発表 (6件)

1. M. Kambara, K. Sasaki, Y. Nishida, H. Uzawa, K. Kobayashi, "Biological potential of 6-sulfo-Galctosamines and their polyvalent models as homologues of N-acetyl-neuraminic acids", US /JAPAN Glyco 2004 (Nov. 17-20, Honolulu, USA).

2. K. Watanabe, H. Dohi, Y. Nishida, K. Kobayashi, "Design and application of a non-malodoriferous thioglycosylation method" (US

/JAPAN Glyco 2004 in Nov. 17-20, Honolulu).

3. M. Koike, Y. Miura, K. Yasuda, Y. Nishida, K. Kobayashi, "Inhibition of beta-sheet aggregation of by 6-sulfo-beta-glucosaminides", (US /JAPAN Glyco 2004 in Nov. 17-20, Honolulu).

4. T. Nakamura, Y. Shingu, K. Matsuda, Y. Nishida, K. Kobayashi, "Phosphorylcholine-carrying alpha-glycoglycerolipids from Mycoplasma fermentans" (US /JAPAN Glyco 2004 in Nov. 17-20, Honolulu).

5. M. Suzuki, Y. Ohguro, Y. Nishida, K. Kobayashi, "Fluorescent photo-affinity reagents carrying carbohydrate probes", (US /JAPAN Glyco 2004 in Nov. 17-20, Honolulu).

6. H. Sato.; Y. Miura; N. Saito.; K. Kobayashi.; O. Takai. *Assembly of Glycoconjugate Polymers on Hydrophobic Templates on Silicon*. MRS (Materials Research Society) fall meeting. 608. Boston, U.S. December 2004.

7. H. Sato.; Y. Miura; N. Saito.; K. Kobayashi.; O. Takai. *Saccharide display on the silicon surface*. 5-th international symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP). 71. Nagoya, Japan. January, 2005.

主な原著論文

1. H. Uzawa, Y. Nishida, K. Sasaki, N. Minoura, and K. Kobayashi, "Synthetic Potential of Molluscan Sulfatases for the Library Synthesis of Regioselectively O-Sulfonated D-Galacto-Sugars", *Chem. Bio. Chem.*, 4, 101-108 (2003).

2. Y. Shingu, Y. Nishida, H. Dohi, K. Kobayashi, "An easy access to halide ion-catalytic alpha-glycosylation using carbon tetrabromide and triphenylphosphine as multifunctional agents", *Orga. Biomol. Chem.*, 2518-2521 (2003).

3. Y. Nishida, Y. Shingu, H. Dohi, K. Kobayashi, "One-pot alpha-glycosylation method using Apple agents in N,N-dimethylformamide", *Org. Lett.*, 5, 2377-2380 (2003).

4. Y. Nishida, T. Tsurumi, K. Sasaki, K. Watanabe, H. Dohi and K. Kobayashi "The Design and Synthesis of C3-Symmetric LewisX Antigen", *Org. Lett.*, 5, 3775-3778 (2003).

5. K. Sasaki, Y. Nishida, H. Uzawa, and K. Kobayashi, "N-Acetyl-6-sulfo-D-glucosamine as a promising mimic of N-acetyl neuraminic acid", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 2821-2823 (2003).

6. Y. Miura, T. Ikeda, N. Wada, K. Kobayashi, Chemoenzymatic Synthesis of a Multivalent Aminoglycoside. *Macromol. Biosci.*, 3 662-667 (2003).

7. M. Suzuki, Y. Nishida, Y. Ohguro, Y. Miura, A. Tsuchida and Kazukiyo Kobayashi, "Syntheses and characterization of asymmetric o- and m-nitro-benzoic acid with a 1,3-benzodioxole skeleton, *Tetrahedron Asymmetry*, 15, 159-165 (2004).

8. K. Sasaki, Y. Nishida, M. Kanbara, H. Uzawa, T. Takahashi, T. Suzuki, Y. Suzuki and K. Kobayashi, "Design of N-Acetyl-6-sulfo-beta-D-glucosaminide-based Inhibitors of Influenza Virus Sialidase *Bioorg.*

Med. Chem., 12, 1367-1375 (2004).

9. Y. Nishida, A. Mizuno, H. Kato, A. Yashiro, T. Ohtake, K. Kobayashi, "Stereo- and Biochemical profiles of the 5-6 and 6-6-Junction Isomers of alpha-D-mannopyranosyl [60]Fullerenes", Chem. Biodiv. 1, 1452-1464 (2004).

10. H. Uzawa, Y. Nishida, K. Sasaki, T. nagatsuka, H. Hiramatsu, K. Kobayashi, "Sulfatase-catalyzed assembly of regioselectively O-sulfated p-nitrophenyl alphah-D-gluco- and alpha-D-mannopyranosides", Carbohydr. Res., 339, 1597-1602 (2004).

11. Y. Miura, N. Wada, Y. Nishida, H. Mori, K. Kobayashi, "Chemoenzymatic Synthesis of Glycoconjugate Polymers Starting from Non-reducing Disaccharides", J. Polymer Sci., Part A. 42, 4598-4606 (2004).

12. Y. Miura, H. Sato, T. Ikeda, H. Sugimura, O. Takai, and K. Kobayashi, Micro-Patterned Carbohydrate Displays by Self-Assembly of Glyco-conjugate Polymers on Hydrophobic Templates on S/ *Biomacromolecules*, 5, 1708-1703 (2004).

知的所有権の出願・取得状況

1) 蛍光標識を行うラベル化試薬、リガンドを表面にもつ基材の製造方法及びラベル化試薬を用いた測定方法

発明者：西田芳弘、鈴木雅也、小林一清

出願人：国立大学法人 名古屋大学
(代表者 平野眞一)

2004年11月出願

2) トレハロース型二糖及びその誘導体の製造方法、並びに新規トレハロース二糖

類誘導体

発明者：宮地彬、新宮祐子、西田芳弘、小林一清

出願人：国立大学法人 名古屋大学
(代表者 平野眞一)

2004年9月出願

3) プリオン増殖抑制剤

発明者：鶴沢浩隆、堀内基広、西田芳弘、佐々木健二、小林一清

出願人：独立法人産業科学総合研究所、名古屋産業科学研究所

2004年2月出願

4) 硫酸化グルコース化合物

発明者：小林一清、鈴木康夫、佐々木 健二、西田芳弘、鈴木 隆、鶴沢浩隆

出願人：科学技術振興事業団

5) ガラクト型トレハロース若しくはその誘導体の製造方法及びそれによって得られるトレハロース由来のペロ毒素用リガンド

発明者：西田芳弘、土肥博史、古田有希、小林一清

出願人：名古屋産業科学研究所

特許公開：2003-073391

6) 生体用材料

発明者：上坊史子、三浦佳子、小林一清

出願人：小林一清

特許公開：2003-260125

特許

(1) 生体用材料

出願番号 特願 2002-111346

出願日 平成 14 年 3 月 10 日

発明者 三浦佳子、上坊史子、小林一

清

出願人 小林一清

公開番号 特開 2003-260125

公開日 平成 15 年 9 月 16 日

(2)酵素触媒による生分解性糖鎖高分子の
製造法

出願番号 特願 2002-62899

出願日 平成 14 年 3 月 8 日

発明者 三浦佳子、池田高康、小林一

清

出願人 小林一清

公開番号 特開 2003-261621

公開日 平成 15 年 9 月 19 日

研究要旨

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目的として、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を、さらに軟骨の細胞源としての間葉系幹細胞の利用の可能性を、実際の臨床応用を視野に入れて検討を行った。

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目的として、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を、さらに軟骨の細胞源としての間葉系幹細胞の利用の可能性を、実際の臨床応用を視野に入れて検討を行った。

B. 研究方法

注入型および3次元培養における軟骨組織再生の面から至適材料の検討を行い、PLC（ポリ乳酸-ε-カプロラクトン共重合体）などの生体内で分解可能なポリマーを選択した。グンゼ株式会社で開発されたPLCはポリ乳酸とε-カプロラクトンの量比を75:50(75PLC)と50:50(50PLC)のものを用意し、さらにこれらをコラーゲンでコートしたhybrid-PLCやコラーゲングルも用意した。ラットの肋軟骨から得た軟骨細胞、牛の関節軟骨から得た軟骨細胞をあらかじめ整形されたスキヤフォールドマトリックスに播種し、2時間後にマトリ

ックスに不接着の細胞を洗い流した後、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地で培養した。一部の軟骨細胞を以下に示すポリマーマトリックスに播種し、1日培養後にヌードマウスの背部皮下に移植を行い、2週、4週後に組織をアルシアンブルー染色、基質アグリカン量、リアルタイムPCR（GDH（グリセロール脱水化酵素）をコントロール）により基質アグリカンmRNA発現レベルを中心とした軟骨マーカーの発現を指標にそれぞれのマトリックスを評価した。PLCに天然の場に近い、グリコミノグリカン糖鎖の効果を加えるため、PLCマトリックスへグリコサミノグリカン鎖を以下のようにして結合させた。グリコサミノグリカンのホスファチジルエタノールアミンジパルミトイル誘導體（GAG-PE）水溶液をPLCに加えて4℃で結合させ、その後リン酸緩衝液で良く洗浄して未結合のものを洗い流して行った。

軟骨分化能を有するヒト間葉幹細胞、MSCは、Cambrex Bio Science Walkersville（米国、MD）より購入して使用した。この細胞の軟骨細胞の分化能を助けるための超音波処理は、ポリプロピレンチューブ中のペレット培養法を用いてTGF-β刺激で軟骨細胞に分化させたMSCについて毎日20分間行った。

C. 研究結果

15年度には、MSCからTGF- β 刺激による軟骨細胞への分化の確認を2週、4週後に組織を軟骨基質を特異に染色するアルシャンブルー染色、また軟骨特異なマトリックス基質であり軟骨マーカーと考えてよいアグリカン分子の組織蓄積量、さらにその発現活性をリアルタイムPCR（グリセロール脱水化酵素（GDH）をコントロール発現として比較）によるmRNA発現レベルにより、さらにMSCの分化の基質としてPLC系のポリマーの評価を行った。PLCは超音波処理にも耐える優れたスキャフォールドマトリックス基質として有効であるとともに、MSCは超音波処理でTGF- β 刺激のみに比べて約3倍の軟骨分化の促進が確認された。

ラット軟骨細胞について増殖、継代培養し、PLCを主体とするスキャフォールドに注入し、培養した結果では、hybrid-75PLCとコラーゲンと同じように良く接着し、その後の細胞増殖率はむしろ75PLCで最高になった。またヌードマウス皮下での*in vivo*で4週後の軟骨再生の能力を検討したところコラーゲンスキャフォールドではその容積の半分の減少があったが、PLCのものは元の形を保ったままであり、軟骨組織の形成が見られた。

ウシの膝関節軟骨について、グリコサミノグリカン鎖をPLC担体マトリックスに付加することで、BMP-6やFGF-2などの細胞増殖因子の活性発現部位を任意に調節可能で、しかも効率よく軟骨分化を維持できる生体親和性の高い担体の開発ができると予測した。実際、ウシから得た軟骨細胞は、PLCのコポリマー培養基質とBMP-6の添加により高い軟骨分化能をかなりの細胞分裂後も維持できることを明らかにした。この時、グリコサミノグリカン鎖としては、ヘパリンがもっとも効

果的、ついでコンドロイチン硫酸Cが効果的であった。*in vitro*でのこれらの因子とグリコサミノグリカン鎖との結合実験の結合効率と良い一致を示した。

D. 考察

超音波刺激による間葉系幹細胞からの効率の培養法の確立に成功した。さらに軟骨細胞を用いて、任意の形に整形できる生体分解性の人工コポリマーが有効な軟骨形成の場所として使用できる可能性が出てきた。またこれに細胞増殖因子結合性の糖鎖を結合させることにより、効率よい軟骨細胞の増殖と組織形成が可能であることが分かった。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、実際細胞死もほとんどなく生存していたことから、希望する特定の形を持った軟骨組織の作製に応用できることが予想された。さらに生化学的、細胞生物学的な研究から多くの増殖因子はグリコサミノグリカンの特異構造を認識して結合すること、しかもその構造は増殖因子により異なること、従って結合グリコサミノグリカン構造の調節により軟骨の形態、分化の程度、細胞の性質、従ってそれぞれ軟骨により異なる軟骨の特異機能をも調整できる可能性があることも分かってきた。細胞増殖因子とグリコサミノグリカンとの相互作用と細胞へのシグナリングの詳細な研究により再現性の問題も克服できると思われる。今後はこのような成果を考慮したグリコサミノグリカンスキャフォールドマトリックスの開発を目指す。

E. 結論

1. 達成度について

幹細胞のより効果的な軟骨細胞への分化能を調節する一つの条件として超音波が有効なことを示し、一方で生体分解性の合成コポリ

マー、PLCにグリコサミノグリカン鎖を付加したものが高い軟骨組織の再生を行うことをみつけ、組織工学的材料として至適である結果を示し、細胞とその微小環境の両面で目標に近い達成度が得られた。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

グリコサミノグリカンとFGFやBMPなどの細胞増殖因子との相互作用を実際に組織の再生の現場に持ち込み、実際に軟骨組織の形成とさらに組織の整形に応用可能であることを初めて示した。

3. 今後の展望について

今回の成果により軟骨細胞をある形を持つように局所的に増殖させることが可能と思われる。実際の軟骨組織中の細胞は様ではなく、部位により増殖や合成する細胞外基質分子も異なる(組織分化)。今後は今回開発に成功した系における組織でこのような組織分化現象を解析し、*in vivo*を反映するものに近づける

4. 研究内容の効率性について

グリコサミノグリカンとBMPなどの細胞増殖因子との相互作用については、世界で初めてグリコサミノグリカン鎖上の細胞増殖因子の結合に必要な構造を示し、しかもそれらが細胞増殖因子の異なりにより相違するなどの成果を上げたが、この実績が直ぐに今回の軟骨再生の問題に活かされた。

5. 結論

生体分解性の合成コポリマー、PLCに同じく生体成分であるグリコサミノグリカン糖鎖を付加したものが軟骨組織の再生を行う上で有効な組織工学的材料となることを初めて示した。しかし、PLCスキュフォールドへの細胞の埋え込む方法などが、まだ一様ではなく、その後の軟骨再生の大きさや成熟度に問題を引き起こす。また上記した再現性の問題もあ

る。これらの点を考慮し系をさらに改善して、より良好な組織をつくるよう検討する必要がある、このような研究が行える機会を再度頂けることを希望する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- M. Honda, N. Morikawa, K. Hata, T. Yada, S. Morita, M. Ueda, K. Kimata. Rat costochondral cell characteristics on poly (L-lactid-co-ε-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 2003;24:3511-3519.
- P. Jemth, E. Smeds, A-T. Do, H. Habuchi, K. Kimata, U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg. Oligosaccharide library-based assessment of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase substrate specificity. *J Biol Chem* 2003;278:24371-24376.
- A. Irie, H. Habuchi, K. Kimata, Y. Sanai. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:858-65.
- T. Kozaki, Y. Matsui, J. Gu, R. Nishiuchi, N. Sugiura, K. Kimata, K. Ozono, H. Yoshikawa, K. Sekiguchi. Recombinant expression and characterization of a novel fibronectin isoform expressed in cartilaginous tissues. *J Biol Chem* 2003;278:50546-50553.
- H. Watanabe, K. Matsumoto, K. Kimata. The proteoglycan aggregate: Structure and function. *Connective Tissue* 2003;35:201-205.
- K. Nogami, H. Suzuki, H. Habuchi, N. Ishiguro, H. Iwata, K. Kimata. Distinctive expression patterns of heparan sulfate O-sulfotransferases and regional differences in heparan sulfate structure in chick limb buds. *J Biol Chem* 2004;279:8219-8229.
- S. Ashikari-Hada, H. Habuchi, Y. Kariya, N. Itoh, A. H. Reddi, K. Kimata. Characterization of

- Growth Factor-binding Structures in Heparin/Heparan Sulfate Using an Octasaccharide Library. *J Biol Chem* 2004;279:12346-54.
- S. Takeo, M. Fujise, T. Akiyama, H. Habuchi, N. Itano, T. Matsuo, T. Aigaki, K. Kimata, H. Nakato. *In vivo* hyaluronan synthesis upon expression of the mammalian hyaluronan synthase gene in *drosophila*. *J Biol Chem* 2004;279:18920-18925.
 - Y. Yamada, N. Itano, K. Hata, M. Ueda, K. Kimata. 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* 2004;122:631-639.
 - S. Cattaruzza, MSChiappacassi, K. Kimata, A. Colombatti, R. Perris. The globular domains of PG-M/versican modulate the proliferation-apoptosis equilibrium and invasive capabilities of tumor cells. *FASEB J* 2004;18:779-81.
 - K. Ebisawa, K. Hata, K. Okada, K. Kimata, M. Ueda, S. Torii, H. Watanabe. Ultrasound enhances transforming growth factor beta-mediated chondrocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2004;10:921-9.
 - I. Kakizaki, K. Kojima, K. Takagaki, M. Endo, R. Kannagi, M. Ito, Y. Maruo, H. Sato, T. Yasuda, S. Mita, K. Kimata, N. Itano. A novel mechanism for the inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. *J Biol Chem* 2004;279:33281-33289.
 - L. Zhuo, V. C. Hascall, K. Kimata. Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 2004;279:38079-38082.
 - K. Kamimura, J. M. Rhodes, R. Ueda, M. McNeely, D. Shukla, K. Kimata, P. G. Spear, N. W. Shworak, H. Nakato. Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J Cell Biol* 2004;166:1069-79.
 - H. Habuchi, O. Habuchi, K. Kimata. Sulfation pattern in glycosaminoglycan: Does it have a code? *Glycoconj J* 2004;21:47-52.
 - M. J. Honda, T. Yada, M. Ueda, K. Kimata. Cartilage formation by serial passaged cultured chondrocytes in a new scaffold: hybrid 75:25 poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) sponge. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1510-6.
 - T. Yada, N. Koide, K. Kimata. Chapter 4 Functions of proteoglycan/glycosaminoglycan in liver. *Extracellular Matrix and the Liver*. Elsevier Science, 2003:55-74.
 - L. Zhuo, N. Itano, L. Shen, J. Wu, H. Watanabe, K. Kimata, T. Nonogaki. Chapter 9 Biological function of SHAP-hyaluronan covalent complex. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Elsevier Ltd., 2004:205-222.
2. 学会発表
- Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using octasaccharide libraries. H. Habuchi, S. Ashikari-Hada, K. Kimata. International Symposium on Biological Science of Heparan Sulfate Proteoglycans. 2003.4.28 京都
 - Proteoglycan aggregate of versican/PG-M: structure and function. K. Matsumoto, M. Shionyu, M. Go, N. Kamiya, F. Atsumi, K. Shimizu, T. Shinomura, K. Kimata, H. Watanabe. 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. 2003.6.3-7 山口
 - Human chondroitin sulfate glycosyltransferases: molecular clonings and characterizations of the gene family. T. Yada, M. Gotoh, T. Sato, H.

Kaseyama, H. Iwasaki, H. Mochizuki, N. Kikuchi, Y-D Kwon, A. Togayachi, T. Kudo, H. Watanabe, O. Habuchi, H. Narimatsu, K. Kimata. 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. 2003.6.3-7 山口

- Roles of versican/PG-M in cartilage development and function. H. Watanabe, N. Kamiya, K. Matsumoto, K. Kimata. 5th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. 2003.6.4 山口
- 4-メチルウンベリフェロンによるヒアルロン酸合成阻害機構に関する研究. 柿崎育子、板野直樹、三田知花、伊藤誠紀、丸尾良浩、佐藤浩、遠藤正彦、高垣啓一、木全弘治. 第24回日本糖質学会年会 2003.7.29-30 横浜
- Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 deficient mice result in runting and perinatal lethality, and defective heparan sulfate biosynthesis. H. Habuchi, N. Nagai, M. Fujise, F. Atsumi, K. Kimata. 3rd International Conference on Proteoglycans Pathobiology of Proteoglycans. 2003.9.22 Parma, Italy
- A unique nonreducing terminal modification of chondroitin sulfate by N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O-sulfotransferase. S. Ohtake, K. Kimata, O. Habuchi. 3rd International Conference on Proteoglycans Pathobiology of Proteoglycans. 2003.9.22-24 Parma, Italy
- Proteoglycan aggregate of versican: structure and function. H. Watanabe, K. Matsumoto, M. Shinyu, M. Go, F. Atsumi, N. Kamiya, K. Shimizu, K. Kimata. 3rd International Conference on Proteoglycans Pathobiology of Proteoglycans. 2003.9.23 Parma, Italy
- 慢性肝疾患患者における血清 SHAP-HA 濃度-肝細胞癌のマーカーとしての有用性の検討-. 申力、卓麗聖、奥村明彦、石川哲也、各務伸一、木全弘治. 第23回日本分子腫瘍マ-

カー研究会. 2003.9.24 名古屋

- A novel mechanism for inhibition of hyaluronan biosynthesis by 4-methylumbelliferone. N. Itano, I. Kakizaki, S. Mita, M. Endo, K. Takagaki, K. Kimata. Hyaluronan 2003. 2003.10.12 Ohio, USA
- Proteoglycan aggregate of versican/PG-M: structure and function. K. Matsumoto, M. Shionyu, M. Go, N. Kamiya, F. Atsumi, K. Shimizu, T. Shinomura, K. Kimata, H. Watanabe. 8th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International. 2003.10.13 Berlin, Germany
- Role of SHAP in the construction of cumulus matrix and oocyte maturation. L. Zhuo, A. Salustri, M. Kawano, J. Wu, L. Shen, A. Ogura, H. Yasue, V.C. Hascall, K. Kimata. Hyaluronan 2003. 2003.10.15 Ohio, USA
- Systematic screening of novel ECM proteins from a RIKEN mouse full-length enriched cDNA collection. R. Manabe, T. Yamada, J. Kawai, K. Tsutsui, Y. Furutani, C. Shimono, M. Kimura, I. Nakano, S. Fukuda, N. Sugiura, K. Kimata, Y. Hayashizaki, K. Sekiguchi. 第76回日本生化学会大会. 2003.10.16 横浜
- Characterization of chondroitin polymerase from Escherichia coli strain K4. N. Sugiura, T. Ninomiya, H. Mochizuki, T. Yada, K. Kimata. 第76回日本生化学会大会. 2003.10.16 横浜
- PG-M/バーシカンのプロテオグリカン会合体; その機能とメカニズム. 松本和、神谷宣広、清水克時、木全弘治、渡辺秀人. 第18回日本整形外科学会基礎学術集会. 2003.10.17 北九州
- Aggregation of the pathological synovial SHAP-hyaluronan complex. L. Zhuo, W. Yingsung, M. Morgelin, M. Yoneda, H. Watanabe, N. Itano, N. Ishiguro. H. Iwata, K. Kimata. 第76

回日本生化学会大会. 2003.10.18 横浜

・糖鎖による分子複合体の機能調節. 木全弘治. 第1回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム. 2003.11.4 東京

・ヒアルロン酸結合部位を知るためのドメイン間相互作用様式の予測. 塩生真史, 松本和, 清水克時, 木全弘治, 渡辺秀人, 郷通子. 第26回日本分子生物学会年会. 2003.12.10 神戸

・Tissue engineering を用いた軟骨再生法の開発. 蛭沢克己, 渡辺秀人, 畠賢一郎, 岡田邦彦, 各務秀明, 木全弘治, 鳥居修平, 上田実. 第5回東海再生医学研究会. 2004.1.31 名古屋

・Mesenchymal proteoglycan, PG-M/versican, regulates chondrogenesis. N. Kamiya, H. Watanabe, H. Takagi, T. Shinomura, K. Shimizu, K. Kimata. 50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2004.3.7-10 San Francisco, U. S. A.

・経口投与したヒアルロン酸の SHAP-HA 複合体への変換. 高橋真弓, 酒井信夫, 豊田英尚, Lisheng Zhuo, 木全弘治, 戸井田敏彦. 日本薬学会第124年会. 2004.3.29 大阪

・Structure and function of cumulus HA-rich matrix. Jiwen Wu, Lisheng Zhuo, Fukiko Atsumi, Mayumi Kawano, Koji Kimata. 第51回マトリックス研究会大会. 2004.4.9 京都

・Proteoglycan aggregate of versican / PG-M in cartilage. Hideto Watanabe, Kazu Matsumoto, Nobuhiro Kamiya, Fukiko Atsumi, Yoshihiko Yamada, Koji Kimata. 11th Gordon Research Conference Proteoglycans. 2004.7.11-16 New Hampshire, U.S.A.

・グリコサミノグリカンは第3の生命鎖としての情報を持つか? 木全弘治. 産学連携を指向したタンパク質最前線セミナー5 疾患グライコプロテオミクス 複合糖質の全体像の中での網羅的糖鎖機能解析. 2004.8.6 東京

・第3の生命鎖、グリコサミノグリカン. 木

全弘治. 糖鎖科学の魅力と広がり. 2004.9.6 名古屋

・4-メチルウンベリフェロンによるヒアルロン酸合成阻害の新しい機構. 柿崎育子, 児島薫, 高垣啓一, 遠藤正彦, 神奈木玲児, 安田忠司, 三田知花, 木全弘治, 板野直樹. 第77回日本生化学会大会 2004.10.16 横浜

・ヘパラン硫酸6-O-硫酸転移酵素-1 (HS6ST-1) 欠損マウス: ヘパラン硫酸合成の欠陥が発育不良と出生前後の致死になる. 羽瀧弘子, 永井尚子, 藤瀬桃子, 渥美ふき子, 木全弘治. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ヘパラン硫酸は骨形成因子シグナルに重要である. 入江敦, 羽瀧弘子, 木全弘治, 佐内豊. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・炎症性サイトカインと成長因子によるヒト歯肉線維芽細胞のヒアルロン酸合成および分解制御. 安田忠司, 木全弘治, 渋谷俊昭, 板野直樹. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・SHAP は CD44-ヒアルロン酸相互作用による細胞接着を増強する. Lisheng Zhuo, 金森審子, 神奈木玲児, 板野直樹, Jiwen Wu, Li Shen, 浜口道成, 石黒直樹, 木全弘治. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ヘパリンおよび修飾ヘパリンが VEGF 活性に与える影響. 芦刈-羽田智子, 羽瀧弘子, 荻谷豊, 木全弘治. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・ヘパラン硫酸6硫酸化転移酵素 (HS6ST-2) ノックアウトマウスの解析. 永井尚子, 羽瀧弘子, 渥美ふき子, 木全弘治. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

・軟骨分化におけるコンドロイチン硫酸合成酵素の発現. 坂井顕一郎, 木全弘治, 成松久, 四宮謙一, 渡辺秀人. 第77回日本生化学会大会. 2004.10.16 横浜

- ・基底膜蛋白質局在性データベースの作成。眞鍋理一郎、中野伊津子、筒井仰、下野知性、福田友彦、木村美奈、山田登美子、古谷裕、三千典子、浄住大慈、長田亜紀、福田史朗、河合純、木全弘治、林崎良英、関口清俊。第77回日本生化学会大会。2004.10.16 横浜
- ・ Enzymatic synthesis of chondroitin by chondroitin polymerase from *Escherichia coli* strain K4. Nobuo Sugiura, Hideo Mochizuki, Hiroshi Maeda, Koji Kimata. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.18 Hawaii, U.S.A.
- ・ Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. Keisuke Kamimura, John M. Rhodes, Melissa McNeely, Deepak Shukla, Koji Kimata, Patricia G. Spear, Nicholas W. Shworak, Hiroshi Nakato. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.19 Hawaii, U.S.A.
- ・ Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 (HS6ST-1) deficient mice: defective heparan sulfate biosynthesis caused runting and perinatal lethality. Hiroko Habuchi, Naoko Nagai, Noriko Sugaya, Fukiko Atsumi, Koji Kimata. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.19 Hawaii, U.S.A.
- ・ Role of chondroitin sulfate chains of versican/Pg-M in regulation of chondrogenesis as an essential factor for mesenchymal condensation. Nobuhiro Kamiya, Hideto Watanabe, Hidekazu Takagi, Tamayuki Shinomura, Katsuji Shimizu, Koji Kimata. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.19 Hawaii, U.S.A.
- ・ A novel inhibition mechanism of hyaluronan synthesis by 4-methylumbelliferone. Ikuko Kakizaki, Kaoru Kojima, Keiichi Takagaki, Masahiko Endo, Reiji Kannagi, Tadashi Yasuda, Satoka Mita, Koji Kimata, Naoki Itano. Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research. 2004.11.20 Hawaii, U.S.A.
- ・ Functional regulation of molecular complexes with glycosylation. Koichi Furukawa, Koji Kimata. Joint Meeting of the Japanese and American Consortia for Glycomics. 2004.11.21 Hawaii, U.S.A.
- ・ Proteoglycan aggregate of versican/Pg-M in cartilage. K. Matsumoto, K. Kamiya, F. Atsumi, K. Shimizu, Y. Yamada, K. Kimata, H. Watanabe. 9th World Congress of the OsteoArthritis Research Society International. 2004.12.2-5 Chicago, U.S.A
- ・ PG-M/パーシカンとヒアルロン酸、リンク蛋白との結合様式の解析(第10回日本軟骨代謝学会賞受賞)。松本和、塩生真史、郷通子、清水克時、篠村多摩之、木全弘治、渡辺秀人。第18回日本軟骨代謝学会。2005.3.18 大阪
- ・ 軟骨分化における糖鎖合成酵素の発現。坂井顕一郎、木全弘治、渥美ふき子、成松久、四宮謙一、渡辺秀人。第18回日本軟骨代謝学会。2005.3.18 大阪
- ・ マトリーム解析：I 新規細胞外マトリックス蛋白質の網羅的探索と基底膜蛋白質ボデーマップデータベースの作成。眞鍋理一郎、筒井仰、福田友彦、中野伊津子、木村美奈、下野知性、小栗康子、嶋本桂子、三千典子、浄住大慈、佐渡義一、佐藤祐哉、河合純、林崎良英、木全弘治、妹尾春樹、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分
- ・ マトリーム解析：II 細胞外マトリックス

蛋白質の腎臓基底膜での空間・時間特異的発現パターン。福田友彦、眞鍋理一郎、筒井仰、中野伊津子、嶋本桂子、木村美奈、下野知性、小栗康子、三千典子、浄住大慈、佐渡義一、佐藤祐哉、河合純、林崎良英、木全弘治、妹尾春樹、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分

・マトリオーム解析：IV 骨格系形成過程における新規細胞外マトリックス因子群の発現パターンの多様性。筒井仰、眞鍋理一郎、中野伊津子、福田友彦、木村美奈、小栗康子、河合純、林崎良英、木全弘治、関口清俊。第52回マトリックス研究会大会。2005.3.19 大分

・マトリオーム解析：III 細胞外マトリックス蛋白質の腸基底膜での空間・時間特異的発現パターン。嶋本桂子、眞鍋理一郎、福田友彦、筒井仰、中野伊津子、木村美奈、下野知性、小栗康子、三千典子、浄住大慈、佐渡義一、佐藤祐哉、河合純、林崎良英、木全弘治、妹尾春樹、関口清俊。第52回マトリックス研究

会大会。2005.3.19 大分

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

・ノックアウト動物 発明者：木全弘治、羽瀧弘子、佐藤尚子 権利者：生化学工業株式会社 工業所有権の種類、番号：特願

2003-295726 出願年月日：2003.8.19 取得年月日：-

・ヒアルロナン結合性蛋白質とヒアルロナンとの複合体の形成促進剤 発明者：戸井田敏彦、木全弘治 権利者：生化学工業株式会社 工業所有権の種類、番号：特願 2004-22727 出願年月日：2004.1.30 取得年月日：-

分担研究者 春日敏宏 名古屋工業大学大学院工学研究科物質工学専攻 教授

研究要旨

粒子溶出法とバイオメテック法を組み合わせ、炭酸含有アパタイトがセラミックス/ポリマー複合体 CCPC の骨格表面を覆った新規多孔体を作製した。得られた多孔体は、大きな気孔径を持ち、気孔率は 75 %であった。CCPC 上に骨類似アパタイトが存在すると、骨芽細胞の接着性を向上させるだけでなく、破骨細胞による吸収も増加する。炭酸含有アパタイトが CCPC 骨格表面を覆った多孔体は、骨再生用組織工学マトリックスとして有用であると思われた。

さらに、CCPC を中空球状粒子に成形する方法を新たに開発することに成功した。この中空球に、細胞の進入に適したチャンネルを設けることも可能であった。骨芽細胞の接着性を調べたところ、細胞は中空球内部に良好に接着した。シリンジを用いて経皮的に人工骨を患部に注入するタイプの細胞組込型人工骨への応用が期待される。

A. 研究目的

炭酸含有アパタイト(HCA)は、骨を構成するアパタイトの組成に近く、焼結アパタイトと同程度の骨芽細胞との親和性を示し、高い生体吸収性も持つことが期待されているため、新規生体材料としての応用が提案されている。そこで、HCA のスキャホールドへの応用を我々は検討しているが、セラミックス単体では脆く、培養操作の際に、マトリックスが崩壊する恐れがある。このような欠点を補うために、脆性破壊を示さないポリ乳酸(PLA)のような生体吸収性高分子で多孔体を作製し、その骨格表面に HCA をコーティングすることを考えた。

本研究では、12~14 年度で検討してきた、PLA と炭酸カルシウムの多形であるバテライトからなる複合体 (CCPC) を用いて、HCA で骨格表面を覆った多孔体の開発を試みた。また、スキャホールドへの応用を検討する上で、細胞と材料の親和性を調べた。

さらに、この CCPC を用いて、上田が提案する注入型人工骨に適用可能なスキャホールドの開発を進めた。このタイプのスキャホールドの形態は、①流動性を高める球形であること、②細胞を球内部に接着させ保護する中空状であること、③細胞が導入でき、栄養分等の補給ができる球表面に外部との連絡通路があること、である。

B. 研究方法

CCPC 多孔体の作製と評価：

バテライトの作製には、炭酸ガス化合法を用いた。作製したバテライトは、2 次粒子が 500 nm、比表面積が $40 \text{ m}^2/\text{g}$ と微細な球形の結晶が得られた。

塩化メチレンに溶解した分子量 16 万の PLA 溶液に、バテライト粉末を混合し、PLA スラリーを得た。このとき、バテライトと PLA の重量比は 1:2 とした。多孔化の方法として、粒子溶出法を用いた。PLA スラリー中に、造孔剤

として、0.5~1 mm でふるいわけしたショ糖を CCPC に対して 6 倍(重量比)加え、攪拌混合した。混合溶液を、金型に流し出し、乾燥後、180℃、1 時間で熱処理を行い、40 MPa でプレス成型した。作製した試料から、ショ糖を取り除くと同時に、HCA を析出させるために、擬似体液 (SBF) に 3 日間浸漬し、多孔体を作製した。

SBF に 3 日間浸漬し、作製した多孔体に骨芽様細胞 (MC3T3-E1) を播種し、1 週間培養した。また、破骨細胞による材料の吸収を調べるために、ディスク状に成形した CCPC(バテライト:PLA=1:2 wt ratio)を SBF に 2 日間浸漬し、表面を骨類似アパタイトに置換した状態のものに、破骨細胞を播種し、2 日間培養した。

小球体の作製:

上述の PLA スラリーを 1% ポリエチレングリコール (PEG) 水溶液に流し出した。スラリーを流し出した後、所定時間攪拌を行うことで小球体を得られた。その後、小球体を取り出し、乾燥した。

作製した球体に骨芽様細胞 (MC3T3-E1) を播種し、1 週間培養して、接着性を調べた。

C. 研究結果および考察

図 1 に SBF に浸漬して、作製した多孔体の SEM 写真を示す。気孔径は 450~580 μm 、連通気孔径は 70~120 μm 、気孔率は 75% であった。また、骨格表面は、HCA で覆われていた。水銀ポロシメータにより、平均気孔径は 125 μm であり、骨芽細胞が侵入しにくいかもしれない数十 μm という小さな気孔はほとんどないことがわかった。これは、ホットプレス時に、ショ糖表面が溶解し、隣同士のショ糖粒子の接着面積が増加したためと思われる。これらの結果から、ショ糖を用いて作製した多孔体は、細胞が侵入できるような気孔構造を持つと思わ

れる。

図 2 に、作製した CCPC 多孔体、および同程度の気孔率を持つ β -TCP 多孔体の圧縮試験の応力-歪み曲線の例を示す。CCPC 多孔体は、1.5 MPa 程度の圧縮応力に耐えるが、セラミックスのような脆性破壊は示さず、大きな変形ができることがわかった。一方、 β -TCP 多孔体は CCPC 多孔体と同程度の圧縮強度を示したが、脆性破壊を示した。CCPC 多孔体では、細胞播種時、埋入時のハンドリングに十分耐えることができると期待される。

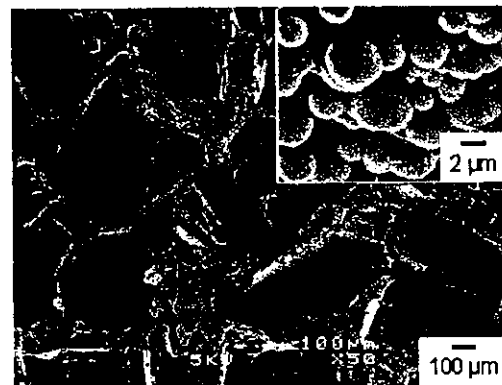


図 1. HCA を骨格表面に析出させた CCPC 多孔体の断面 SEM 写真(挿入図: 骨格表面の拡大写真)

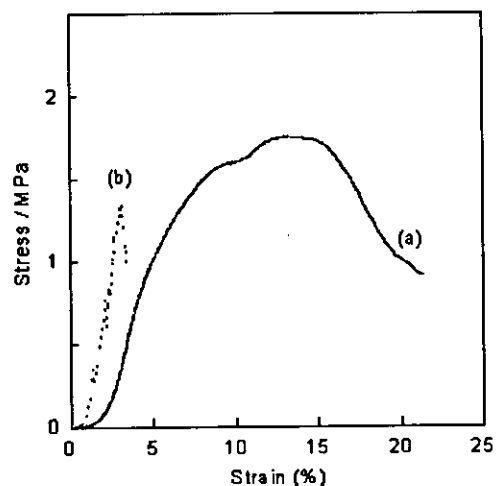


図 2. (a)作製した CCPC 多孔体と(b) β -TCP 多孔体の圧縮試験の応力-歪み曲線

骨芽様細胞を播種後、1 週間培養したところ、

HCA で覆われた骨格表面に接着し、細胞が試料内部にまで、侵入できることが確認された。同様の方法で作製した PLA 多孔体では、試料内部ではほとんど細胞が見られなかった。骨格表面を HCA で覆った多孔体は、細胞の接着性を向上させると結論できる。

破骨細胞播種後、2日間培養した後のディスク状試料表面を観察した。SBF に浸漬し、HCA を析出させた CCPC 表面では、破骨細胞が接着し、25 μm 程度の吸収窩が観察された。一方、SBF に浸漬しなかった CCPC では、15 μm 程度の吸収窩が観察された。また、HCA を析出させた CCPC の方が、多く破骨細胞の接着と吸収窩が見られた。このことから、CCPC 上に生成した HCA は破骨細胞が接着しやすい環境になり、効果的に吸収されることがわかった。

球状粒子の作製とその生成機構：

PLA スラリーを 1% ポリエチレングリコール (PEG) 水溶液に流し出した。スラリーを流し出した後、所定時間攪拌を行うことで小球体を得られた。小球体の直径は、攪拌 2 h まで小さくなった後、2 h から 3 h で急激に大きくなり、攪拌 8 h 以降は時間を経るごとに徐々に小さくなった。

流しだされた PLA スラリーは球形となって溶媒中に存在する。溶媒を攪拌している間に、スラリー中の塩化メチレンは溶媒中に抜け出ていくため、ポリ乳酸は小球体の外側から固化する。塩化メチレンには安定化剤として塩酸が若干含まれており、PLA スラリー中の炭酸カルシウムを分解する。これにより発生した炭酸ガスは、球の骨格であるポリ乳酸の隙間を通過して小球体の外側へと少しずつ抜け出ていく。攪拌時間が 2 h の場合、一部固化し始めた表面付近のポリ乳酸も、水中に存在する塩化メチレンによって徐々に溶解され、球が小さくなる。このとき、ポリ乳酸の膜は非常にやわらかい。攪拌

3 h までは、発生した炭酸ガスがやわらかいポリ乳酸の膜を押し広げることで、球が急激に大きくなり、中空化しはじめる。攪拌 3 h 以降は、溶媒からの塩化メチレンの揮発が進み、濃度が下がる。これによりポリ乳酸は固化しはじめ、攪拌 3 h 以降の球の成長が止まる。炭酸カルシウムの溶解によって発生した炭酸ガスが球内部で増加し、それらが会合して球内部に大きな空洞を作ることになる。溶媒に添加された PEG は、球の骨格を構成している固化したポリ乳酸の間隙を埋めていると考えられ、球内部で増加する炭酸ガス圧を高める。

中空体が生成すると、球内部のスラリーはなくなり、炭酸ガスの圧力増加が止まるため、球の成長も止まる。

開口部の作製：

細胞を中空体の内部に入れるために、外部との連絡通路が必要である。アセトンで 50% に希釈した塩化メチレン溶液に中空球状粒子を入れ、3 min 攪拌したところ、粒子の壁厚が薄い部分のポリ乳酸が溶解し、図 3 に示すような、数百 μm の開口部が得られた。これは、中空粒子が攪拌して作られる間に遠心力で内部の気孔が偏心することを利用したものである。

球状粒子のアパタイトコーティング：

中空球状粒子にはアパタイト核形成誘起化学種の一種であるカルボキシ基をもつポリ乳酸が存在する。しかし、炭酸カルシウムは中空体を得られる段階で分解して、その量は減少しており、 Ca^{2+} イオンを供給して周囲のアパタイトに対する過飽和度を急上昇させるのは容易ではない。そこで、 Ca^{2+} イオンの供給源を増やすことを目的として、塩化カルシウム溶液に中空球状粒子を 1 日浸漬し、その後、37°C の SBF に 3 日間浸漬した。外壁表面、内壁表面、膜内において、炭酸含有タイプのアパタイト結晶が

生成した。

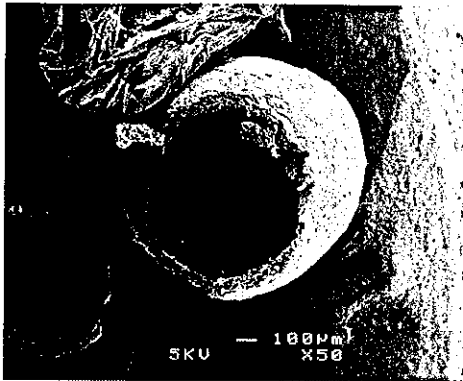


図3. 開口した CCPC 球状粒子

図4は、骨芽様細胞を7日間培養した中空球状粒子(表面をアパタイト化したもの)の内壁面のSEM写真である。良好な細胞接着性が見られる。外壁表面への接着はほとんどみられなかった。注入型人工骨としてのスキャホールドを考えた場合、外壁には注入・流動時に外力がかかり、細胞が付着していたとしてもダメージを受ける可能性が高い。この球体の場合、細胞は球内壁部に付着して保護されており、理想的な状態と想像される。

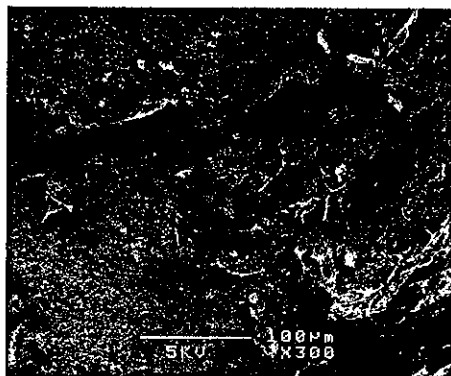


図2. 骨芽様細胞を7日培養後の中空球状粒子の内壁表面

D. 結論

粒子溶出法とバイオミメティック法を組み合わせた新規多孔体作製法を用いることで、CCPC多孔体の骨格表面を、HCAに短期間に、かつ、容易に置換できた。この多孔体の気孔径

は、450~580 μmで、連通孔は、70~120 μm、気孔率は、75%であった。多孔体の気孔構造は、細胞の導入に適していると思われる。また、多孔体は、延性を示すために、ハンドリング時の材料の破壊の恐れが低下すると思われる。HCAでCCPCを覆うことで、細胞親和性を向上できたと思われる。HCAを骨格表面に持つ多孔体は、スキャホールドとしての応用が期待できる。

CCPC中空小球体は、専用シリンジの針を通り、複雑な形態に対応できると考えており、体内で再生骨用のスペースを確保するスペーサーとしての役割を担うものと期待される。このCCPC中空体には、一部に細胞が侵入できる程度の穴が確保されており、細胞が中空体の内側に接着し、注入の際、他の球との摩擦に直接さらされずに保護できると考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami, H. Kagami, K. Hata, and M. Ueda: Preparation of Bonelike Apatite Composite Sponge, **Key Engng. Mater.**, **254-256**, 497-500 (2004).
- H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Vaterite / Poly(lactic acid) Composite Biomaterials, **Arch. Biocer. Res.**, **3**, 110-113 (2003).
- H. Maeda, T. Kasuga, M. Nogami: Preparation of Calcium Carbonate / Poly(lactic acid) Composite (CCPC) Hollow Spheres, **Key Engng. Mater.**, **254-256**, 533-536 (2004).
- H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Apatite formation on titania-vaterite powders in simulated body fluid, **J. Eur. Ceram. Soc.**, **24**, 2125-2130 (2004).
- H. Maeda, T. Kasuga, and M. Nogami: Bonelike Apatite Coating on Skeleton of Poly (Lactic Acid) Composite Sponge, **Mater. Trans.**, **45**, 989-993