

バイオメディカルエンジニアリング・ライフサポート工学

バイオマテリアル

2004年5月、第7回 World Biomaterials Congress がシドニーにおいて開催され、約250人の日本人を含む2000人近くの研究者が参加した。4年に一度開催されるこの学会には世界中の研究者が集い、バイオマテリアル研究の動向がよく現れる。近年、国内でも盛んに研究されている組織工学 (tissue engineering) に関するシンポジウムや演題が目立った。

1980年代、生体吸収性スキャホールドに細胞を播種することで組織を再建する試みが tissue engineering としてアメリカのグループから提唱され、その後、我が国では、再生医療として研究が活発化した。「再生医療」は、regenerative medicine と、逆に翻訳されて国外でも用いられている。この数年で、再生医療研究は大きく変遷し、幹細胞の分化誘導、分子生物学的に細胞を制御する試み、増殖因子の利用など、若い研究者による生物学的アプローチが目立つ。一方で、スキャホールドの成形加工法、チップテクノロジーを利用したハイスループットスクリーニング法、従来の三次元培養法を改良した *in vitro* 組織構築システムなどの、システム開発研究が盛んなことも特徴であり、実用化と臨床への期待が進んでいることがうかがえる。このように、バイオマテリアル研究は、従来の人工血管や人工透析器、あるいは人工股関節などのいわゆる「材料」の開発研究から、新たなシステム構築の時代へと移りつつあるといえよう。

また、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の領域では、制ガン剤などの送達システムに関する研究例が減少し、遺伝子送達システムが多く検討されている。対象分子が低分子薬物から DNA 分子に置き換わることで、全く異なる戦略を建てる必要性があり、ここでも生物学的な手法を駆使して遺伝子送達のメカニズムを解明する研究が精力的に進められている。我が国では6年前に遺伝子・デリバリー研究会が発足し、アメリカ遺伝子治療学会はすでに8年目を迎え、その規模は年々拡大している。数年前に報告された遺伝子治療事故例の逆風に負けることなく、安全なシステムが完成されるよう期待される。

(山岡 哲二 国立病院機構センター研究所)

医用生体計測

医用生体計測は一般の計測工学と同様、プローブとして力、光、電波、電流、音波、化学物質などが使われるが、低侵襲性、安全性の確保が必要となる。具体的な計測手法としては、①応力一ひずみ特性、衝撃、AFMなどの力学的手法、②LDV、レーザ顕微鏡、干渉、赤外分光などの光学的手法、③電気インピーダンス、電波、核磁気共鳴などの電磁気学的手法、④X線、電子線、⑤音響インピーダンスや超音波、⑥熱計測、⑦分析化学的手法などがあり、さらにこれらによって可視化された画像処理が含まれる。本部門の動向を眺めると、第17回バイオエンジニアリング講演会では「非侵襲計測技術」として、また The First Asian Pacific Conference on Biomechanics では「Imaging&Measurement」としてセッションが組まれていた。生体計測、医用計測はバイオエンジニアリングにとって必要不可欠なものであることは間違いない。

エム・イー学会 (日本生体医工学会に改称) や応用物理学会および関連国際会議でも医用生体計測のセッションが生まれ、医用の分野にメカニクスの考え方や機械計測の手法を、また生

体メカニクスの分野にエレクトロニクスやオプティクスの手法などを取り入れた複合的な研究が見られる。いずれも①~⑦を効果的に利用していることがわかる。しかし機械学会が関係する研究会などでは①が主流のようである。各種ナノ技術や非線形光学、極短パルスレーザーなどの発達で計測工学分野が日進月歩であり、今後これらの新しい手法を積極的に取り入れ、従来法のデータと比較することでバイオエンジニアリング全般の研究・開発が加速されると信じる。

(荒木 勉 大阪大学)

バイオテクノロジー・バイオインフォマティクス

バイオナノテクノロジー

個々の原子を回路素子としてLSIをつくるのは微細加工技術研究のめざす夢であるが、自然が数十億年にわたって進化させてきた生物の体は、すでに原子を機能部品としてできたナノマシンから組みあがっている。1本鎖の鎖状高分子であるタンパク質や核酸がアミノ酸配列や塩基配列に応じて折りたたまり、個々の構成原子が特定の立体配置をとってナノマシンとしての立体構造を自己形成する点が、固い材料や合成高分子でナノ構造を作るのと本質的に異なる。しかも、その原子立体配置精度は0.01nmよりも高く、信号やエネルギーを伝達処理するために相互作用すべき相手を高精度で認識し、自発的に会合して情報・物質・エネルギーを媒介するダイナミックなネットワークを構築する。それが生命機能そのものであり、この自発的会合を「自己集合」、形成する複合体を「超分子ナノマシン」と呼ぶ。

例えば、細菌べん毛は20数種類の蛋白質からできた典型的な超分子で、細胞膜内の基部体 (回転モータ)、細胞外に伸びるべん毛繊維 (プロペラ)、両者を連結するフック (自在継手) で構成されるナノマシンである。その自己構築過程は基部体の形成から始まり、各部の構成蛋白質が細胞内からべん毛中心を貫通する細長いチャネルを通してべん毛先端へ輸送され、順序よく先端へ自己集合することによって効率よく構造を形成する。最近はいった生体内で働く数多くの超分子ナノマシンの原子立体構造が、X線、NMR、電子顕微鏡による構造解析法を相補的に用いて解明できるようになり、自己構築や動作の仕組みが構造をもとに少しずつ明らかになりつつある。

ナノテクノロジーで最も困難なナノ構造の量産技術が自己組織化と自己集合の原理を最大限に活用する生体体系では確立しているため、生体超分子の構造と動作機構から得られる知識はナノテクノロジーの良いお手本になると期待される。しかも硬い人工機械とは動作原理が異なり、エネルギーロスのほとんどない高効率エネルギー変換やダイナミックな超並列信号伝達処理が実現されている。その究極の姿が現在のコンピュータで実現不可能な高次脳機能であり、数百kWの電力を消費して高熱を発生しながら毎秒35兆回の計算をする地球シミュレータでさえ、体長数mmのショウジョウバエの脳がわずか数μWのエネルギーで実現する複雑な視覚情報処理や飛行行動制御機能をシミュレートできない。生体超分子ナノマシンを研究する意義がここにある。

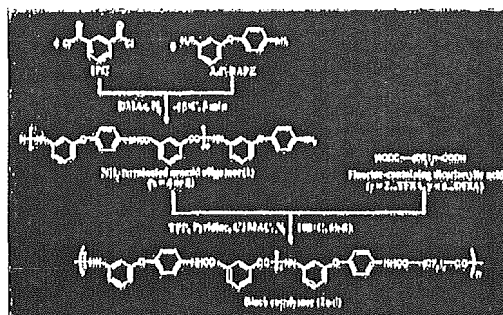
(難波 啓一 大阪大学)

文 献

(1) 日本機械学会論文集, 70-697, A (2004).

Summary: Novel block copolymers containing aromatic polyamide (aramid) and fluoroethylene segments were synthesized by a two-step solution polycondensation. This synthetic method could control the chain-length of aramid segments and these copolymers could have high structural regularity. The number-average molecular weight (M_n) of one of these polymers is over 2.0×10^4 . Incorporating fluoroethylene segments improves the solubility of the resulting polymer compared with conventional aramids.

The synthesis of the fluoroethylene-aramid block copolymers.



Synthesis of Block Copolymers containing Chain-Controlled Aramid and Fluoroethylene Segments

Arata Korematsu, Tsutomu Furuzono,* Akio Kishida

Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
Fax: +81-6-6872-8090; E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

Received: July 22, 2004; Revised: September 28, 2004; Accepted: October 13, 2004; DOI: 10.1002/mame.200400188

Keywords: aramid; block copolymers; chain-control; fluoroethylene; polycondensation

Introduction

Aromatic polyamides (aramids) have received considerable attention with regard to the production of high-performance materials, due to their outstanding thermal stability, chemical resistance, low flammability, and mechanical properties.^{11,21} However, the poor solubility and high softening or melting temperature caused by the high crystallinity and high stiffness of these polymer backbones leads to difficult processability. Many approaches to increasing solubility and processability, therefore, have been made. The introduction of the fluorine atom into the aramid is one of these approaches. It is well known that the fluorine atom has peculiar properties such as high electron negativity, large C–F bond energy, and low intermolecular cohesive energy. The incorporation of the fluorine-containing component into the aramid, consequently, has already been designed.^{13–21} While these polymers contained fluorine substituents in benzene or hexafluoroisopropylidene groups in the main chain, or perfluoroalkyl groups in the side chains, there are very few examples of aramids containing fluoroethylene segments in the main chains. It is expected that

block copolymers containing aramid and fluoroethylene segments would be novel polymers by which the processability is improved compared with aramid, without impairing the thermal and mechanical properties of aramid, and that they would be suitable for functional material.

Steinhauser and Mülhaupt reported the synthesis of aramids derived from diamine-terminated oligo(tetrafluoroethylene).¹⁸¹ Although these polymers were soluble in polar solvents, such as *N,N*-dimethylformamide, *N,N*-dimethylacetamide, and dimethyl sulfoxide, solubility in regard to other solvents was not clarified. In an earlier publication, we demonstrated the synthesis of fluoroethylene-aramid block copolymer soluble in tetrahydrofuran and acetone, and not just in polar solvents.¹⁹¹ The number-average molecular weight of this copolymer, however, is 1.7×10^3 . We decided as our next target, therefore, to synthesize a copolymer having a larger molecular weight and in order to realize it, we judged that the chain of the aramid segment needs to be extended, expecting that this would bring about the production of a copolymer with a larger molecular weight than our previous one and lead to the development of material with high functionality.

In this paper, we report the synthesis and properties of novel block copolymers with fluoroethylene segment and extended and chain-length-controlled aramid segments. The characterization tests of the block copolymers were conducted by IR spectroscopy, ^1H NMR, and GPC.

Experimental Part

The synthesis of the aramid oligomers and the fluoroethylene-aramid block copolymers is outlined in Scheme 1.

Synthesis of the NH_2 -Terminated Aramid Oligomer (1)

9.00 g (45 mmol) of 3,4'-diaminodiphenyl ether (3,4'-DAPE, Wakayama Seika Kogyo Co., Ltd., Wakayama, Japan) and 60 ml of anhydrous *N,N'*-dimethylacetamide (DMAc) were placed into a thoroughly dried 100 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a mechanical stirrer under a nitrogen atmosphere. After cooling with an ice-salt bath (-15°C), 7.30 g (36 mmol) of isophthaloyl chloride (IPC) in 60 ml of anhydrous DMAc was added slowly to the stirred solution. The reaction mixture was stirred for 5 min at -15°C under the nitrogen atmosphere, after which it was poured into an excess of methanol (1 500 ml) and the solution was filtrated and evaporated. 900 ml of ethyl acetate was added into the concentrate. The organic layer was washed with a 1 *N* potassium hydroxide solution (450 ml \times 3) and was dried over anhydrous sodium sulfate. After filtration, the filtrate was concentrated in vacuo. The crude product was purified by gel permeation chromatography [Sephadex LH-20 (Amersham Pharmacia, NJ, USA)], eluting with *N,N*-dimethylformamide to give the NH_2 -terminated aramid oligomer as a white solid. Two kinds of oligomers, of which the number of repetition

units (x) was 4 and 8, were obtained. Yield: 1.804 g ($x=4$), 0.925 g ($x=8$). Purity: 89.6% ($x=4$), 68.7% ($x=8$) (calculated from ^1H NMR results).

IR (KBr): 3 288 (NH_2 , NH, ν_s), 3 062 (aromatic C–H, ν_s), 1 655 (C=O, ν_s), 1 602, 1 504 (aromatic C–C, ν_s), and 1 536 cm^{-1} (NH, δ_s).

^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 4.96 (s, 2H, NH_2), 5.18 (s, 2H, NH_2), 6.10–8.53 (m, 104H, arom.), and 10.46 (s, 16H, –CONH–).

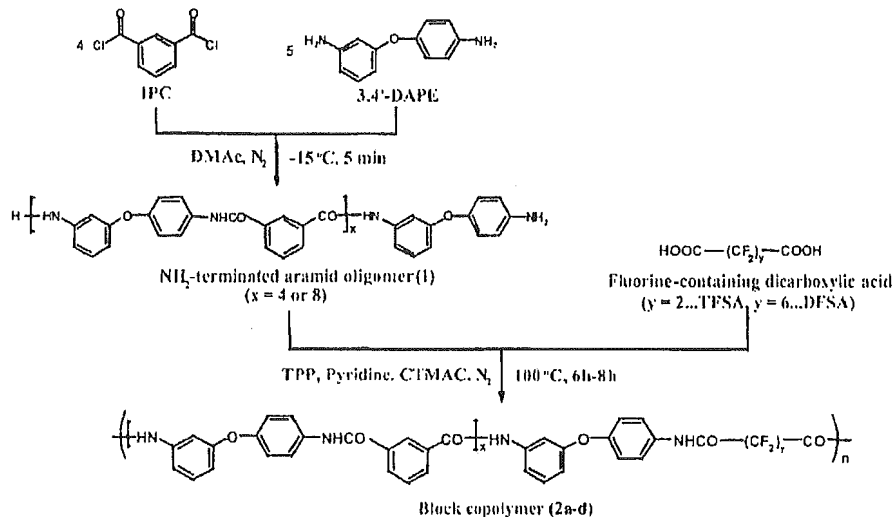
Synthesis of Fluoroethylene-Aramid Block Copolymers

The marks (x and y) of the block copolymers show the repetition number of aramid unit and difluoroethylene unit, respectively (cf. Scheme 1).

1) $x=4$, $y=2$ (2a)

0.10 g (6.57×10^{-5} mol) of the aramid oligomer ($x=4$), 0.051 g (1.64×10^{-4} mol) of triphenyl phosphate (TPP) as the condensing agent, 0.002 g (6.25×10^{-6} mol) of cetyltrimethylammonium chloride (CTMAC) as the additive, and 0.25 ml of anhydrous pyridine were placed into a thoroughly dried 100 ml three-necked round-bottomed flask equipped with a mechanical stirrer under a nitrogen atmosphere. 0.012 g (6.57×10^{-5} mol) of tetrafluorosuccinic acid (TFSA, $y=2$) in anhydrous pyridine (0.20 ml) was added slowly to the stirred solution. The reaction mixture was maintained at 100°C and stirred for 6 h under the nitrogen atmosphere. The copolymer was precipitated by pouring the reaction mixture into an excess of isopropyl alcohol while stirring, and purified by reprecipitation with hot DMAc-isopropyl alcohol. Yield: 0.027 g (24.5%).

IR (KBr): 3 435 (NH, ν_s), 3072 (aromatic C–H, ν_s), 1 708, 1 659 (C=O, ν_s), 1 601, 1 505, 1 487 (aromatic C–C, ν_s), 1 536 (NH, δ_s), 1 213, and 1 147 cm^{-1} (C–F, ν_s).



Scheme 1. The synthesis of the fluoroethylene-aramid block copolymers.

^1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 6.16\text{--}8.48$ (m, 56H, arom.), 10.43 (s, 8H, -arom.-CONH-arom.), and 11.08 (s, 2H, -CF₂-CONH-arom.).

2) $x = 8$, $y = 2$ (2b)

This was prepared from the aramid oligomer ($x = 8$) [0.20 g (7.03×10^{-5} mol)] and TFSA [0.013 g (7.03×10^{-5} mol)] in pyridine (0.9 ml) using TPP [0.055 g (1.76×10^{-4} mol)] and CTMAC [0.002 g (6.25×10^{-6} mol)]. Yield: 0.118 g (56.1%).

IR (KBr): 3300 (NH, ν_s), 3062 (aromatic C-H, ν_s), 1703, 1656 (C=O, ν_s), 1602, 1505, 1487 (aromatic C-C, ν_s), 1535 (NH, δ_s), 1213, and 1172 cm^{-1} (C-F, ν_s).

^1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 6.10\text{--}8.52$ (m, 104H, arom.), 10.45 (s, 16H, -arom.-CONH-arom.), and 11.09 (s, 2H, -CF₂-CONH-arom.).

3) $x = 4$, $y = 6$ (2c)

This was prepared from the aramid oligomer ($x = 4$) [0.20 g (1.31×10^{-4} mol)] and dodecafluorosuberic acid (DFSA, $y = 6$) [0.051 g (1.31×10^{-4} mol)] in pyridine (2.0 ml) using TPP [0.102 g (3.29×10^{-4} mol)] and CTMAC [0.005 g (1.56×10^{-5} mol)]. Yield: 0.028 g (11.3%).

IR (KBr): 3300 (NH, ν_s), 3064 (aromatic C-H, ν_s), 1659 (C=O, ν_s), 1602, 1505, 1487 (aromatic C-C, ν_s), 1537 (NH, δ_s), 1213, and 1172 cm^{-1} (C-F, ν_s).

^1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 6.15\text{--}8.52$ (m, 56H, arom.), and 10.44 (s, 12H, -CONH-).

4) $x = 8$, $y = 6$ (2d)

This was prepared from the aramid oligomer ($x = 8$) [0.20 g (7.03×10^{-5} mol)] and DFSA [0.027 g (7.03×10^{-5} mol)] in pyridine (4.0 ml) using TPP [0.065 g (2.11×10^{-4} mol)] and CTMAC [0.02 g (6.25×10^{-5} mol)]. Yield: 0.086 g (38.4%).

IR (KBr): 3300 (NH, ν_s), 3062 (aromatic C-H, ν_s), 1656 (C=O, ν_s), 1602, 1505, 1487 (aromatic C-C, ν_s), 1536 (NH, δ_s), 1213, and 1172 cm^{-1} (C-F, ν_s).

^1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 6.10\text{--}8.52$ (m, 104H, arom.), 10.44 (s, 16H, -arom.-CONH-arom.), and 11.07 (s, 2H, -CF₂-CONH-arom.).

Measurements

IR spectra were recorded on a Spectrum One FT-IR Spectrometer (Perkin-Elmer, MA, USA) and ^1H NMR spectra were recorded on a GEMINI 300 spectrometer (Varian, Inc., CA, USA) using tetramethylsilane as an internal standard. The molecular weight was determined by an HLC8220-GPC instrument (Tosoh Co., Ltd, Tokyo, Japan) with TSKgel superAW4000 and superAW3000 columns in DMF (polystyrene standards, a column temperature of 40 °C, DMF eluent with 10 mmol/L LiBr).

Results and Discussion

The synthesis of the NH₂-terminated aramid oligomers and block copolymers is outlined in Scheme 1. In the first step,

NH₂-terminated aramid oligomers were prepared by the reaction of 3,4'-DAPE with IPC in anhydrous DMAc. High molecular aromatic polyamide was removed by precipitation using methanol. The concentrate from the methanol solution contained the NH₂- and COCH₃-terminated aramid oligomers and unreacted monomers. The organic layer was washed, therefore, with a potassium hydroxide solution for extracting the NH₂-terminated oligomer. The crude oligomer product consisted of three kinds of oligomers, such as $x = 2$, 4, and 8 (calculated from the number-average molecular weight of the oligomers investigated by GPC), and unreacted 3,4'-DAPE monomers. In order to take out the reasonable chain-length oligomer ($x = 4$ and 8) from the crude product, gel permeation chromatography was used, by which this synthetic method could control the chain-length of the aramid segment. Imai et al. synthesized multiblock copolymers based on poly(dimethylsiloxane) and aromatic polyamides using a one-pot reaction system.¹¹⁰¹ In this one-pot system, however, there is the possibility that an aramid segment whose length is not constant might be formed. Synthesizing the oligomer can make these copolymers have high structural regularity.

In the second step of Scheme 1, block copolymers were synthesized by direct polycondensation of the NH₂-terminated aramid oligomer with fluorine-containing dicarboxylic acid, such as TFSA and DFSA, using TPP and pyridine as the condensing agent. Imai et al. also reported on polycondensation using TPP and pyridine in *N*-methyl-2-pyrrolidone in a homogeneous solution for the synthesis of poly(oxyethylene-aramid)^{111,121} and poly(butadiene-aramid) multiblock copolymers.¹¹³¹ The preparation of aramid-fluoroethylene block copolymers was, however, unsuccessful under the same reaction condition, because of the low probability of a reaction between the amino groups of the aramid oligomer and the carboxylic groups of TFSA and DFSA. Some additives, such as inorganic salts, were examined to improve the reaction system. For example, lithium chloride and calcium chloride have been reported as effective additives to obtain poly(oxyethylene-aramid) and poly(butadiene-aramid) multiblock copolymers of higher molecular weight.^{111,12,141} Although lithium chloride and calcium chloride were used as additives in this reaction system, only block copolymers of low molecular weight were obtained. It was reported that the inherent viscosity of the polydimethylsiloxane-aramid block copolymer which was synthesized using CTMAC as the additive was relatively higher than those of copolymers using other inorganic salts.¹¹⁵¹ According to this report, we adopted CTMAC as the additive, and as a result, we obtained block copolymers with a molecular weight of over 20 000 (Table 1). It is assumed that CTMAC behaves as the phase-transfer catalyst in this direct polycondensation system, in agreement with a previous report.¹¹⁵¹

The characterization of the NH₂-terminated aramid oligomer was based on its IR and ^1H NMR spectral data.

Table 1. The number-average molecular weight (\bar{M}_n) of the fluoroethylene-aramid block copolymers.

Block copolymer	2a	2b	2c	2d
\bar{M}_n (from GPC)	20 300	10 200	4 000	4 400

Figure 1 shows the IR spectrum of the NH_2 -terminated aramid oligomer. This spectrum shows the absorption bands due to NH and NH_2 stretch at 3 288, amide bonds at 1 655 (C=O stretch, amide I) and 1 536 (NH bending, amide II), and aromatic C—C stretch at 1 602, 1 504, and 1 487 cm^{-1} . Figure 2 shows the ^1H NMR spectrum of the NH_2 -terminated aramid oligomer. The singlet at 4.96 and 5.18 ppm is attributed to the terminal NH_2 groups, while the singlet at 10.46 ppm is attributed to the amide bond NH. The peaks at 6.10–8.53 ppm are characteristic of the protons of the phenyl groups.

The fluoroethylene-aramid block copolymers were obtained by direct polycondensation of the NH_2 -terminated aramid oligomers with TFSA or DFSA in anhydrous pyridine. The characterization of the block copolymer was based on its IR and ^1H NMR spectral data. Figure 3 shows the IR spectrum of the block copolymer 2a. This spectrum shows the absorption bands due to NH stretch at 3 435 and 1 536 (NH bending, amide II), aromatic C—C stretch at 1 601, 1 505, and 1 487, and C—F stretch at 1 213 and 1 147 cm^{-1} . Especially, two peaks of amide I, 1 708 and 1 659 cm^{-1} , appeared. The peak of 1 708 cm^{-1} showed the amide groups adjacent to the fluorocarbon group, while the peak of 1 659 cm^{-1} showed the amide groups in the aramid segment. This is due to the electronic and mass effect of the adjacent substituent.¹¹⁶¹ Figure 4 shows the ^1H NMR spectrum of the block copolymer 2a. The multiplet at 6.16–8.48 ppm belongs to aromatic C—H. The singlet at

10.43 ppm is attributed to the amide bonds of the aramid segments and the singlet at 11.08 ppm is attributed to the amide bonds between the fluorocarbon and benzene rings. The peak of the amide bond adjacent to the fluorocarbon group shifts to the low magnetic field side compared to that in the aramid segment.¹¹⁷¹ This is due to the presence of CF_2 , described in our former report.¹⁹¹ The proton of the amide bond neighbor to CF_2 is deshielded.¹¹⁶¹ The disappearance of the singlet at 4.96 and 5.18 ppm observed in the ^1H NMR spectrum of the aramid oligomer proves that the terminal NH_2 groups of the oligomer react completely with the carboxylate groups of TFSA. The spectra of the other three polymers were similar to that of 2a.

Table 1 shows the molecular weight of the fluoroethylene-aramid block copolymers investigated by GPC. The chromatogram of every block copolymer was monomodal. The number-average molecular weight (\bar{M}_n) of 2a is 20 300. This molecular weight is larger than that of the polymer reported in our previous paper,¹⁹¹ because of the effect of the size of the monomers. On the other hand, there is a tendency to the effect that the larger the molecular weight of the monomers (which are the constituents of the polymers), the smaller the molecular weight of the polymers obtained from this reaction system. Especially, the molecular weights of the polymers containing DFSA (2c and 2d) are 4 400 and 4 000. This is due to the low probability of a reaction between the amino groups of the aramid oligomer and the carboxylic groups of DFSA. It seems that the motility of the monomers is lowered when their molecular weight becomes large.

The solubility of block copolymers is shown in Table 2. Although the aramid which consists of 3,4'-DAPE and IPC is dissolved in polar solvents, such as DMAc and DMF, but not in acetone and tetrahydrofuran (THF),^{13,181} our block copolymers were actually dissolved or swelled in acetone

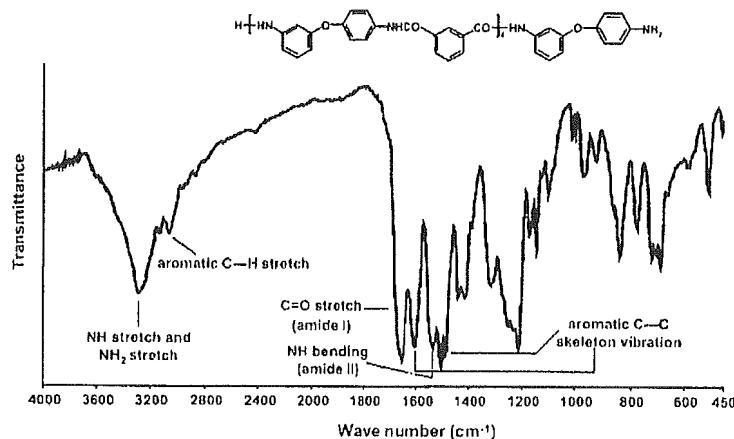


Figure 1. IR spectrum of the aramid oligomer 1 ($\lambda = 4$).

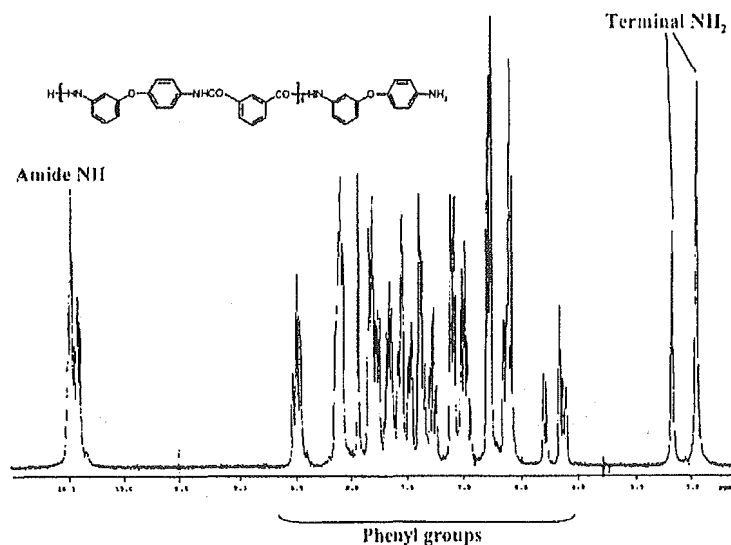


Figure 2. ^1H NMR spectrum of the aramid oligomer I ($x = 4$).

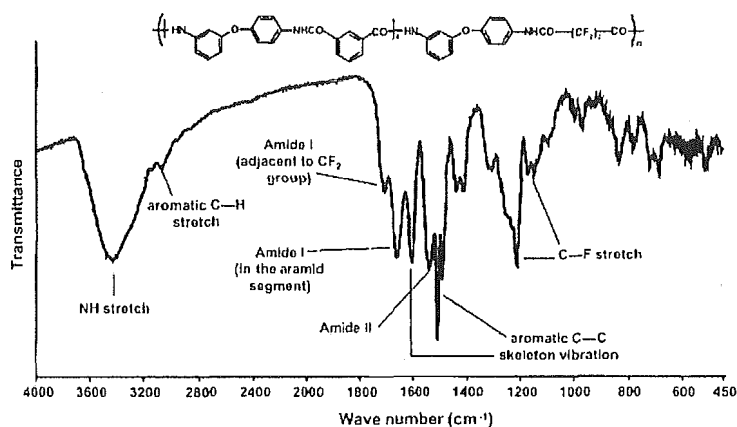


Figure 3. IR spectrum of the block copolymer 2a.

and THF. This solubility of our block copolymers in the solvents is similar to that of the fluorine-containing aromatic polyamides reported in previous studies, because the fluorine atom has weak intermolecular cohesive energy.^{15,19)} This result proves that incorporating fluoroethylene segments improves the solubility of the resulting polymer, as described in our former paper.¹⁹⁾

Conclusion

The aramid oligomers were synthesized by low-temperature condensation with 3,4'-DAPE and IPC in dry DMAc

and the fluoroethylene-aramid block copolymers were synthesized by direct polycondensation in anhydrous DMAc with aramid oligomers and fluorine-containing dicarboxylic acids in the presence of TPP and pyridine as condensing agents and CTMAC as the additive. This synthetic method could control the chain-length of aramid segments and these copolymers could have high structural regularity. The number-average molecular weight of one of these polymers (\bar{M}_n) investigated by GPC is over 2.0×10^4 . Incorporating fluoroethylene segments improves the solubility of the resulting polymers. Currently, the mass production, tensile test, and thermal analysis of these polymers are in progress.

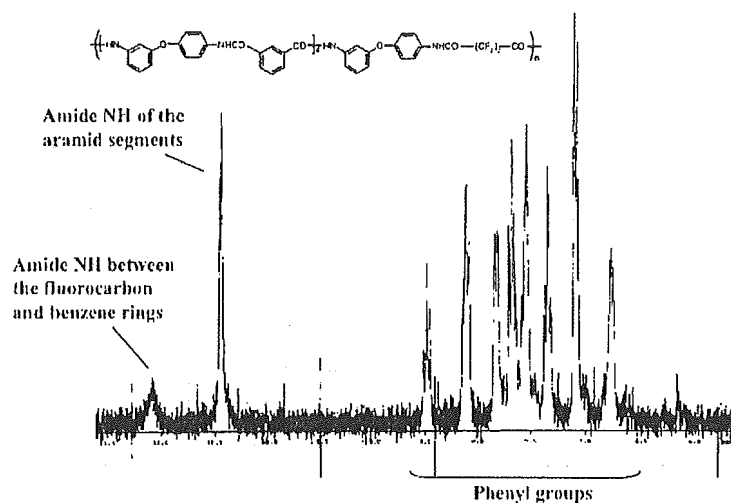
Figure 4. ^1H NMR spectrum of the block copolymer 2a.

Table 2. The solubility of block copolymers.

	DMF	DMAc	DMSO	THF	Acetone
Aramid from 3,4'-DAPI and IPC ^[3,18]	+	+	+	-	-
2a	+	+	+	+	+
2b	+	+	+	+	±
2c	+	+	+	±	±
2d	+	+	+	±	±

⁺: soluble; -: insoluble; ±: swelling.

Acknowledgements: This study was financially supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 13480300) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and the Foundation for Promotion of Material Science and Technology of Japan (MST Foundation).

- [1] J. Lin, D. C. Sherrington, *Adv. Polym. Sci.* **1994**, *111*, 179.
- [2] P. W. Morgan, *Chemtech* **1979**, *9*, 316.
- [3] M. Kajiyama, J. Kudo, H. Mizumachi, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1999**, *37*, 1135.
- [4] G. Caporiccio, E. Stropparola, G. Bargigia, G. Novaira, G. Peveri, *Makromol. Chem.* **1983**, *184*, 935.
- [5] T. Kiyotsukuri, N. Tsutsumi, K. Okada, K. Asai, M. Nagata, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1988**, *26*, 2225.
- [6] Y. Oishi, S. Harada, M. Kakimoto, Y. Imai, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1989**, *27*, 3393.
- [7] C. S. Wang, R. W. Yang, *Polymer* **1997**, *38*, 6109.
- [8] N. Steinhauser, R. Müllhaupt, *High Perform. Polym.* **1994**, *6*, 133.
- [9] A. Korematsu, T. Furuzono, A. Kishida, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41*, 2840.
- [10] M. Kajiyama, M. Kakimoto, Y. Imai, *Macromolecules* **1989**, *22*, 4143.
- [11] Y. Imai, M. Kajiyama, S. Ogata, M. Kakimoto, *Polym. J. (Tokyo)* **1984**, *16*, 267.
- [12] Y. Imai, M. Kajiyama, S. Ogata, M. Kakimoto, *Polym. J. (Tokyo)* **1985**, *17*, 1173.
- [13] S. Ogata, M. Kakimoto, Y. Imai, *Macromolecules* **1985**, *18*, 851.
- [14] S. Ogata, H. Maeda, M. Kakimoto, Y. Imai, *Polym. J. (Tokyo)* **1985**, *17*, 935.
- [15] M. Kajiyama, Y. Nishikata, M. Kakimoto, Y. Imai, *Polym. J. (Tokyo)* **1986**, *18*, 735.
- [16] R. M. Silverstein, F. X. Webster, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", 6th edition, Wiley, New York 1998.
- [17] L. H. Gan, P. Blais, D. J. Carlsson, T. Suprunchuk, D. M. Wiles, *J. Appl. Polym. Sci.* **1975**, *19*, 69.
- [18] Y. Imai, M. Kajiyama, S. Ogata, M. Kakimoto, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **1984**, *22*, 3183.
- [19] T. Kiyotsukuri, M. Nagata, K. Nakashita, T. Ishii, *Sen-i Gakkaishi* **1984**, *40*, T-381.

Preparation of plated β -tricalcium phosphate containing hydroxyapatite for use in bonded inorganic-organic composites

T. FURUZONO*

Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan
E-mail: furuzono@ri.ncvc.go.jp

D. WALSH

ICYS Center, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

S. YASUDA

Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

K. SATO

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Anagahara 2266-98, Shimoshidami, Moriyama-ku, Nagoya 463-8560, Japan

J. TANAKA

Biomaterials Center, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044, Japan

A. KISHIDA[†]

Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Calcium phosphate ceramics such as β -tricalcium phosphate (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP) and hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) show excellent bioactivity for bone generation because their chemical composition is similar to that of bone [1–3]. The ceramics have been also used as a scaffold for fibroblast growth factor (β -FGF) [4], transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) [5], or bone morphogenic protein-2 (BMP-2) [6] showing a high affinity for those molecules. Such bio-ceramics have found widespread application in the medical field.

Recently, we demonstrated a sintered HAp particle coating on polymer substrates with covalent linkage for use in development of a percutaneous device. This technology is a unique approach to surface coating, and bioactivity of HAp such as cell-adhesiveness can be provided at the surface of underlying polymer substrates without the mechanical properties of the polymers being effected adversely [7–12]. To increase the interaction between ceramics particles and polymer substrate surface, a particle with a larger surface area for adhesion to the substrate surface is necessary. Nanometer-sized sintered HAp rods were therefore developed by an emulsion system and by this way increased surface interaction with the polymer [13, 14]. Although the interface stability of a composite consisting of nanometer-sized HAp particles and a polymer substrate was increased, aggregated inorganic particles

were observed on the composite surface [9–11]. This is because the nanometer-sized ceramics aggregated easily with each other in the process of calcination or composite preparation.

To increase interface interaction between a ceramic and substrate as well as to prevent aggregation, a novel micrometer-sized and plated ceramic consisting of β -TCP and a calcium-deficient apatite was developed. The prepared ceramic was characterized by scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and transmission electron microscopy (TEM).

Dicalcium phosphate dihydrate ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD, brushite) and calcium carbonate (CaCO_3) (Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan), and monocalcium phosphate monohydrate [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, MCPM] (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) were used as supplied. Calcium-deficient hydroxyapatite ($\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$, CDHA) showing plated morphology was prepared by modification of previous reports [15, 16]. Briefly, tetracalcium phosphate monoxide [$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$, TCPM] as a source material was prepared initially from heating an equimolar mixture of DCPD and CaCO_3 at 1500°C for 5 hr. Past-like DCPD was prepared from 25.2 g of MCPM and 10.0 g of CaCO_3 with 250 ml of distilled water stirring for 15 min. An amount of 3.44 g of precipitated DCPD was subsequently mixed with 3.66 g of milled TCPM with 2.4 ml of 0.25 mol/l Na_2HPO_4 as an accelerator solution

*Author to whom all correspondence should be addressed.

[†]Present address: Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda-Surugadai 2-3-10, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan.

adjusted at pH 7.4. The molar ratio of TCPM/DCPD is 1/2. The mixture was poured into hollow cylindrical containers (12 mm of height and 6 mm of diameter) and then mixed for 1 min to form a paste. The container containing the calcium phosphate paste formed was covered with a paper sheet and aged for 3 days in air to gradually remove moisture content. The product was removed from the container and then crushed in a mortar. The crushed calcium phosphate was finally calcined at 800 °C with a heating rate of 10 °C/min for different time periods.

XRD measurements of all reagents were taken to determine the phase purity, indexing of peaks was carried out by means of measuring known samples together with reference to JCPDS card no. 9-347 for MCPM, 25-1137 for TCPM, 9-77 for DCPD, 46-905 for calcium deficient apatite and 9-432 for HAp (Joint Committee on Powder Diffraction Standard). SEM (JSM-6301F, JEOL, Tokyo, Japan) was used in order to observe the sample surface. XRD were recorded using a Philips PW1729 X-ray diffractometer (Netherlands) with Cu K α radiation. β -TCP content in the calcined product was calculated from ratio of the peak intensity of the XRD patterns as follows;

$$\beta\text{-TCP content}(\%) = [I_{\beta\text{-TCP}} / (I_{\beta\text{-TCP}} + I_{\text{Ap}})] \times 100$$

$I_{\beta\text{-TCP}}$: peak intensity of (0210) ($2\theta = 31.16^\circ$) in XRD of β -TCP

I_{Ap} : peak intensity of (211) ($2\theta = 31.92^\circ$) in XRD of CDHA

The working curve was determined using β -TCP (SIGMA-ALDRICH, JAPAN, Tokyo Japan) and HAp (APACERAM[®], Pentax Co., Japan). Microstructure observation and electron diffraction was performed using transmittance electron microscopy (TEM, JEM-2000EXII, operating at 200 kV JEOL, Tokyo, Japan).

Fig. 1 shows an SEM image of the pre-calcined crushed calcium phosphate after storage for 3 days in air. Calcium phosphate of irregular plate-like morphol-

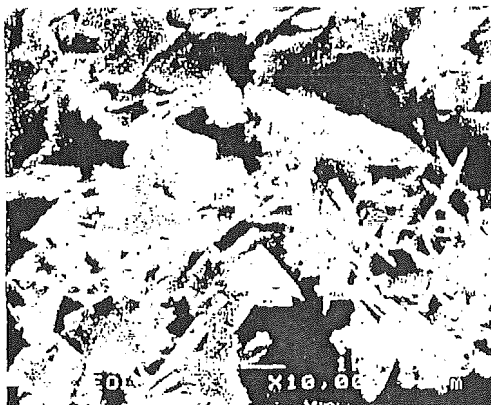


Figure 1 SEM micrograph of plates of crushed calcium phosphate before calcination.

2596

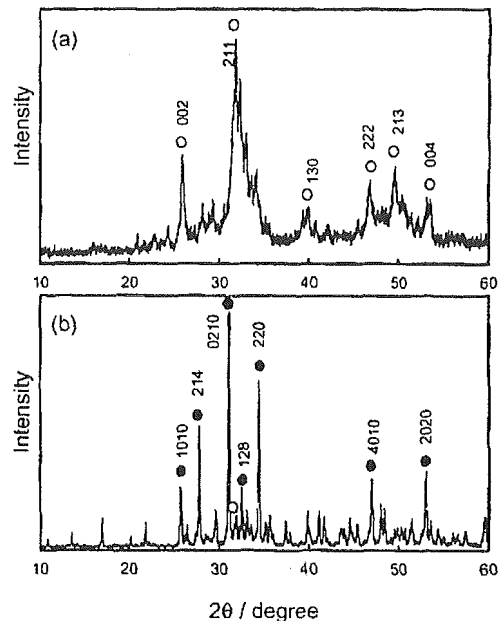


Figure 2 XRD profiles of calcium phosphate products (a) before and (b) after calcination for 60 min at 800 °C. Open and closed circles show peaks of HAp and β -TCP, respectively. Miller indices of HAp and β -TCP present in figure.

ogy of 1–2 μm in length and 50–100 nm thickness was observed. Fig. 2 shows the XRD profiles of the pre- and post-calcined products. The XRD profile of the preheated calcium phosphate give reflections consistent with poorly crystalline calcium deficient apatite ($d(\text{\AA})$ spacings of 3.44 (002), 2.81 (211), 2.78 (112), 2.72 (300), 2.26 (130), 1.94 (222), 1.84 (213) and 1.72 (004) corresponding to the hexagonal unit cell of calcium deficient apatite) (Fig. 2a). After calcination for 60 min at 800 °C, the XRD profile shows reflections consistent with crystalline β -TCP ($d(\text{\AA})$ spacings of 3.45 (1010), 3.21 (214), 2.88 (0210), 2.76 (128), 2.61 (220), 1.93 (4010) and 1.73 (2020) corresponding to the rhombohedral unit cell of β -TCP) together with a small amount of HAp crystal as shown by a small reflection present at $d = 2.81 \text{ \AA}$ (211) (Fig. 2b). Fig. 3 shows the β -TCP content in the calcium phosphate powder as plotted against calcination time at 800 °C. Zero of the calcined time means temperature in furnace increases by 10 °C/min up to 800 °C and simultaneously decreases to room temperature.

CDHA with a Ca/P ratio of 1.5:1 will convert to pure β -TCP on heating at temperatures over 800 °C (Equation 1), but at a ratio of 1.5:1 to 1.67:1 a mixture of β -TCP and HAp is obtained [17]. Thus under the reaction conditions used, the CDHA formed has a Ca/P ration between 1.5:1 and 1.67:1 which resulted in a mixed phase product.

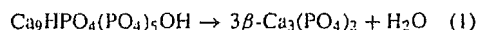


Fig. 4 shows SEM image of the product calcined for 60 min at 800 °C. The product largely consisted

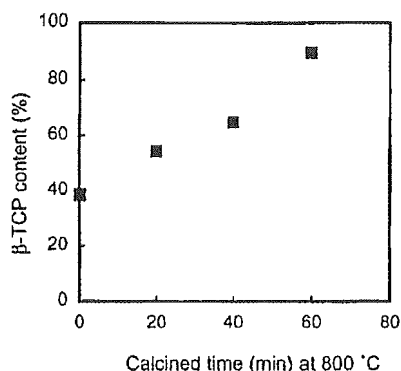


Figure 3 β -TCP content in the calcium phosphate powder plotted against calcination time at 800 °C

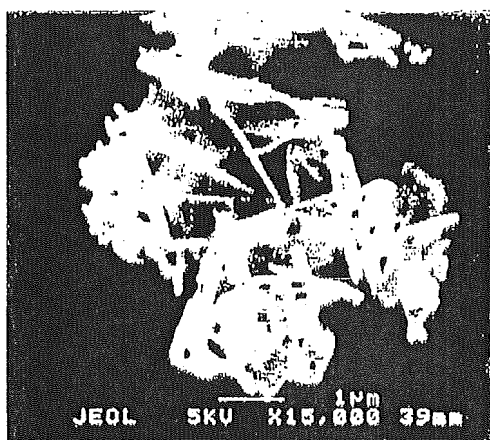


Figure 4 SEM micrograph of calcium phosphate plates calcined for 60 min at 800 °C.

of porous plated crystals of 0.5–2 μm in length and 50–100 nm in thickness, holes when present were 100–300 nm in diameter. The calcined crystals were generally more smoother in appearance than the pre-calcined plates. The holes in a plate of β -TCP crystal were generated due to a decrease in crystal mass and volume with increasing calcination at 800 °C.

The plates produced are expected to be more suitable for coating of a polymer surface since they provide a larger surface area for adhesion to a substrate surface. The plated calcium phosphate also contains hydroxyl groups due to the minor presence of HAp, this functional group can react with alkoxy-silyl or isocyanate groups by covalent bonding. Thus it is possible to prepare an inorganic/organic composite with the plated ceramics prepared herein, employing a novel hybrid system by using graft-polymers having alkoxy-silyl or isocyanate groups in the branches [9, 10]. Also surface calcium ions of the plated β -TCP can be utilized to develop a composite, for example poly(4-methacryloyloxyethyl trimellitate anhydride) possessing dicarboxyl groups in

the branches shows and ionic interaction with cationic ions [11].

In conclusion, a porous plated β -TCP containing a low proportion of HAp was prepared by calcinations of a prepared CDHA at 800 °C, the plated morphology of a source DCPD being broadly retained in the CDHA intermediate and subsequent β -TCP product. The content of the HAp phase in the plated calcium phosphate could be controlled by calcinations time at 800 °C. The plates of β -TCP containing of HAp are expected to be more suitable for coating of a polymer surface due to the larger surface area of adhesion to the substrate. We are now developing a novel inorganic/organic composite using the inorganic plates.

Acknowledgments

Authors thank CREST of JST (Japan Science and Technology) and Dr. A. Matsuda for assistance with measurement of XRD.

References

1. T. UEMURA, J. DONG, Y. WANG, H. KOJIMA, T. SAITO, D. LEJIMA, M. KIKUCHI, J. TANAKA and T. TATEISHI, *Biomaterials* 24 (2003) 2277.
2. I. MANJUBALA, M. SIVAKUMAR, R. V. SURESHKUMAR and T. P. SASTRY, *J. Biomed. Mater. Res.* 63 (2002) 200.
3. H. AOKI, in "Medical Application of Hydroxyapatite" (Ishiyaku WuroAmerica, Inc., 1994) p. 90.
4. C. NIEDHART, U. MAUS, O. MILTNER, H. G. GRABER, F. U. NIETHARD and C. H. SIEBERT, *J. Biomed. Mater. Res.* 69A (2004) 680.
5. J. S. SUN, F. H. LIN, Y. J. WANG, Y. C. HUNG, S. C. CHUEH and F. Y. HSU, *Artif. Organs* 27 (2003) 605.
6. D. R. SUMNER, T. M. TURNER, R. M. URBAN, T. TUREK, H. SEEHERMAN and J. M. WOZNEY, *J. Orthop. Res.* 22 (2004) 58.
7. T. FURUZONO, K. SONODA and J. TANAKA, *J. Biomed. Mater. Res.* 56 (2001) 9.
8. T. FURUZONO, P. WANG, A. KOREMATSU, K. MIYAZAKI, M. OIDO-MORI, Y. KOWASHI, K. OHURA, J. TANAKA and A. KISHIDA, *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 65B (2003) 217.
9. T. FURUZONO, J. TANAKA and A. KISHIDA, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15 (2004) 19-23.
10. A. KOREMATSU, T. FURUZONO, S. YASUDA, J. TANAKA and A. KISHIDA, *J. Mater. Sci.* 39 (2004) 3221.
11. *Idem.*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, in press.
12. T. FURUZONO, S. YASUDA, T. KIMURA, S. KYOTANI, J. TANAKA and A. KISHIDA, *J. Artif. Organs*, in press.
13. T. FURUZONO, D. WALSH, K. SATO, K. SONODA and J. TANAKA, *J. Mater. Sci. Lett.* 20 (2001) 111.
14. K. SONODA, T. FURUZONO, D. WALSH, K. SATO and J. TANAKA, *Solid State Ionics*, 151 (2002) 321.
15. D. WALSH and J. TANAKA, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12 (2001) 339.
16. D. WALSH, T. FURUZONO and J. TANAKA, *Biomaterials* 22 (2001) 1205.
17. S. V. DOROZHKIN and M. EPPLE, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002).

Received 9 August
and accepted 17 November 2004

特集 THE SPECIAL EDITION

ナノメディシン/part2

再生医療：ナノアパタイト

Nano-apatite

古蘭 勉^{*1} 岸田晶夫^{**}

有機材料と無機材料のお互いの特性を生かした材料を開発するため、アパタイトのナノ結晶を作製し、有機材料の表面に固定する技術を開発した。これにより、骨だけでなく生体の軟組織にも親和性を有する生体材料を生み出すことができる。具体的な応用例として、生体の内と外を連結する経皮デバイスへの応用をとりあげ、アパタイトナノ粒子の合成から細胞接着実験、および動物実験についての結果を紹介する。

1. はじめに

脊椎動物の硬組織（骨・歯）は無機成分としてハイドロキシアパタイト（HAp： $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ）、有機成分としてコラーゲンほかのタンパク質から構成されている。材料としてのHApはこれまで、骨結合性材料など主として歯科および整形外科領域において幅広く研究されている^{1,2)}。このうちHApの生理活性のうち主として骨結合性あるいは骨誘導性に注目して多くのアパタイト材料、アパタイト複合化材料が開発されている。アパタイトは一般に粉末あるいはバルクの焼結体として供与されるため、成形加工は一般に専門の研究室以外では困難である。また、純粋に合成されたアパタイトなどのセラミックの物性は一般的に軟組織や血管などとは全く異質であり、また薄膜化が困難で重量が重いこともあって、整形外科領域以外ではなじみが薄い材料であった。しかしアパタイトの軟組織や血液との関係については以

前から研究されており、様々な知見が得られている³⁻⁶⁾。例えば、軟組織との高い接着性が知られており、これを利用した経皮デバイスの開発が以前から報告されている⁷⁻⁹⁾。また最近では血流と接触する環境では骨髄に類似した構造を誘導することが報告されている⁹⁾。

このように優れたタンパク質吸着能、軟組織接着能を利用して、アパタイトをより積極的に利用した新しい人工材料あるいは人工臓器およびその周辺技術の開発については大いに興味が持たれる。その際には、上述したこれまでのアパタイト材料で問題とされていた、成形性、易加工性、重量、薄膜化などの点を克服する必要がある。その一つの手法が、異なる材料との複合化である。現在までに硬組織用材料としては、HApのような無機材料にフレキシビリティや弾性といった物性を付与するために高分子材料に骨結合性を付与した材料の開発が試みられている。例えばRadderらは、生体活性なポリエチレンオキシド（PEO）/ポ

^{*1}Tsutomu Furuzono 国立循環器病センター研究所 生体工学部 室長

^{**}Akio Kishida 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授

リブチレンテレフタレート (PBT) 共重合体 (Polyactive™)-HAp 複合体を調製している¹⁹⁾。Verheyen¹¹⁾、Bonfield¹²⁾、Stupp¹³⁾、加藤¹⁴⁾らは、ポリマーのマトリックス中に HAp 結晶が分散しているポリ乳酸-HAp、ポリエチレン-HAp、高分子電解質-HAp、リン酸基含有ポリマー-HAp 複合体をそれぞれ調製している。棚橋、小久保らは、生体模倣反応により高分子表面に HAp 層を形成させ、その HAp 層により骨組織への親和性が向上することを報告している¹⁵⁾。また、コラーゲン-HAp 複合体についての報告もある^{16)~17)}。

これまでに検討されたアパタイト複合化合物はアパタイト粉末を混合する等の、いわばマクロレベルでの複合化が多く、より精密な材料設計として高分子の分子鎖と HAp のナノレベルでの複合化することが望まれ、これを実現するための技術として種々の方法が提案されている。小久保らの生体模倣反応法は先駆的な研究であり、模擬体液に材料を浸漬することで材料表面に HAp 層を形成させる方法である¹⁸⁾。また筆者らは、HAp の新しい *in situ* 合成法として交互浸漬法を考案し^{19)~21)}、さらに安定なアパタイト界面を有しながら柔軟な新しい医療用材料の開発に取り組んでいる。ここでは新しい医療用材料の開発および新しい周辺技術に貢献する有機・無機ハイブリッド機能性材料の開発の観点から、ナノアパタイト粒子を作製し、これを高分子材料の表面に複合化する技術について紹介する。

2. HAp ナノ粒子を用いたハイブリッド化

医療材料としての高分子-アパタイト複合体のニーズとして、硬組織および軟組織への高い接着性・融合性および生体適合性があげられる。このようなニーズに対して、筆者らは *in situ* による複合体形成だけでなく、HAp 粒子を用いた開発研究を行っている。これは *in situ* による複合体形成^{18)~21)} がバイオミネラリゼーションをはじめとする分子複合体の創出が主目的であったのに比較し、再生医療をはじめとする医療に貢献する材料の創出を目的とした場合の筆者らの最適解として

の研究である。

ハイドロキシアパタイトは、骨や歯のような硬組織に対する親和性だけではなく、軟組織に対しても親和性があることが知られてきた。この軟組織親和性の余容は明らかになっていないが、生体内へのインプラント初期に接着性タンパク質や成長因子などが HAp 表面に強く吸着するであろうことは容易に推察される^{22)~24)}。1990 年代当初、青木らが初めて軟組織適合性、特に経皮デバイスに HAp からなるセラミックスディスクを応用し、HAp 焼結体が良好な軟組織親和性を有していることを明らかにしている²⁵⁾。しかしながら皮膚を貫通したデバイスがディスク状で堅いものであったため、患者にとって違和感があり小型化（すなわち高い接着性）と柔軟性の付与が課題として残った。これはセラミックスが元来有する“堅い”“脆い”といった性質が、デバイス開発の障壁となった例である。

柔軟性を有する高分子材料とアパタイトを複合化することによって、上記の問題点を克服する方法論については、上で述べたように *in situ* での複合化が考えられるが、医療材料としての高分子-アパタイトには種々の越えるべきハードルが存在する。例えば、保存安定性や生体内での安定性、可滅菌性などである。また製品化に当たっては他の競合技術に負けない特性も要求される。HAp の生体材料としてのすぐれた特性を生体内で維持するためには容易に溶解しない高い結晶化度が必要であるし、安定した性能を発揮するためには材料表面に表出する結晶面の制御も重要である。このような課題を克服する方法として、HAp 結晶の微粒子を高分子材料表面に結合することが考えられる。この際、全体の物理特性を変化させず、さらに HAp による表面被覆率をできるだけ高く保つためには、HAp 微粒子のサイズを小さくすればよい。筆者らはこのような目的に適合する、生体内で溶解しにくい HAp ナノ焼結体を開発し、さらにこれを高分子と複合化させる技術を開発している^{25)~26)}。一般的な HAp 焼結体を高分子溶液に練り込み成型加工する方法と異な

り、高分子材料の表面に化学結合で強固にHApナノ微粒子和結合させることを特徴としている、これは具体的には、次の2つのキーテクノロジーからなる。

① ナノスケールHAp単結晶体の調製と形態制御

② 共有結合による無機・有機複合化の反応条件の設定

ここでは、これらの基盤技術の説明と、これらの技術から調製された無機・有機複合体の特性について解説する。

2.1 HApナノ粒子の粒径および形態制御^{24,25)}

高分子基材上に高分子の機械的物性を損なうことなく無機結晶を表面修飾するには、その粒径と形態を制御し良好に基材への結合を促す必要がある。これを実現するために要求されるHAp微粒子の条件は、①高分子基材とより広い接着面積にて結合する面を有する板状もしくはロッド状構造体であること、②分散溶液に分散しやすいことである。筆者らは独自にマイクロエマルジョン法を改良して、ロッド状構造体を成した、ナノスケールにて粒径制御可能なHAp単結晶体の合成法を提案している。

写真1に、HApナノ粒子1個のTEM像とその電子線回折パターンを示す。この回折像から、得られたHApナノ粒子は単結晶体であり、その長軸はHAp格子のc軸に沿って伸張していることが分かる。また、この電子線回折パターンは[010]ゾーンに相当し、TEM像におけるHAp

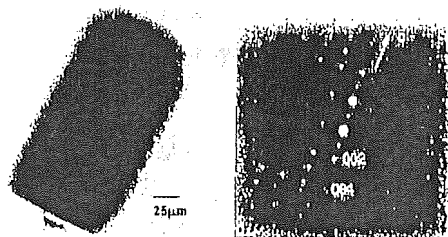


写真1 エマルジョン法にて作成したHApナノ粒子のTEM像と電子線回折パターン

の広い面がユニットセルのa面、そして狭い面がc面に帰属される。ここでHApのa面がカルシウムイオンリッチであり、またc面がリン酸イオンリッチな面とされている²⁶⁾。このことは、ロッド状HApの結晶成長制御によって、面による粒子1個における電荷の制御が可能であることを示している。

2.2 HApナノ粒子による高分子表面修飾

HAp単結晶表面に存在する水酸基と共有結合で結合する反応性基として、アルコキシシリル基およびイソシアネート基が知られている。筆者らは、高分子基材にアルコキシシリル基およびイソシアネート基を末端に有するモノマーをグラフト重合し、そのグラフト鎖を足場にHApナノ粒子を固定化している。ここでは高分子基材にシルク繊維を用いている。シルクは高い機械的強度と柔軟性、繊維・シート・多孔体への優れた加工性、縫合糸としての長年に渡る臨床実績、そして表面に多くの官能基を有するために表面修飾がやりやすいといった優れた特徴を有する。写真2に、HApナノ粒子により表面被覆されたシルク繊維の走査型電子顕微鏡像を示す。HApナノ粒子の表面被覆状態は、単一粒子から数個の粒子が凝集した状態で結合している。これはHApナノ粒子が単結晶体であり、1粒子内に陰性および陽性の面を有して凝集しやすい性質のためである。

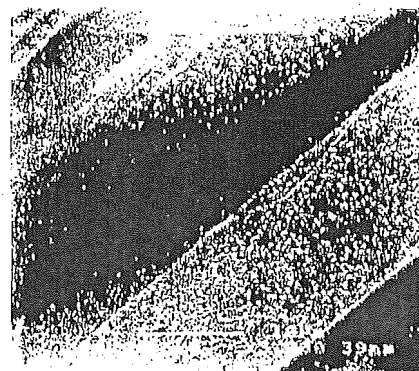


写真2 HAp複合シルク繊維表面のSEM像

2.3 HAp 複合体の生物学的特性

複合体の生物学的特性は、線維芽細胞を用いた培養試験およびラット皮下への埋植試験により調べている。1×10⁵個のマウス線維芽細胞（L929細胞）を24ウェルマルチプレートに静置したHAp複合シルク繊維上に播種し、24時間培養した。培養後の未処理シルク繊維との違いをSEM観察した（写真3）。シルク繊維上では接着性細胞の接着・増殖が生じにくいことが知られている。この現象は、繊維表面の濡れ性もしくは結晶性および非結晶性成分の相分離による影響と推察しているが、現在のところ十分な検討がなされていない。

HAp複合化シルク繊維上では、十分な細胞接着性が認められている。さらに、高倍率で観察するとHApナノ粒子上に細胞から微小突起が延び

接着している様子も確認できる。筆者らの系ではHAp単結晶のカルシウムイオンがリッチであるa面が表面に露出している可能性が高いことから、細胞膜表面が陰性荷電している細胞が接着しやすいことが推察される。さらに接着性タンパク質との相互作用の観点からみると、一般的にHApの特性として、塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF）がカーボネート含有HApに強く吸着しやすいこと²⁴⁾、および線維芽細胞から放出される細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン、ヒトロネクチン、ラミニンおよびコラーゲンが吸着しやすいこと²⁵⁾が知られている。ただしこれらの場合、二次粒子からなるHAp凝結体との相互作用から検討されているため、HAp結晶表面が接着性タンパク質の吸着にどのように相互作用しているのか明確ではない。筆者らの独自技術でc軸方向への粒径および面を制御したHAp単結晶体を基材上に並べた界面を構築することにより、接着性タンパク質の吸着行動やコンフォメーションをさらに詳細に明らかにできると考えている。

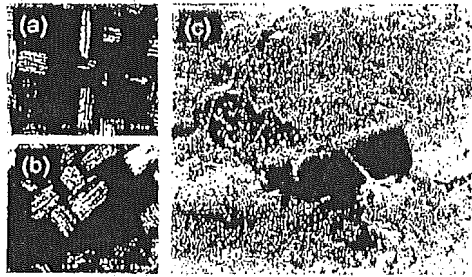


写真3 HAp複合シルク繊維上の線維芽細胞接着性のSEM像

a) 未処理シルク繊維、b) HAp複合シルク繊維、c) HAp複合シルク繊維上の細胞接着部位拡大像

2.4 経皮デバイスの加工と動物インプラントによる評価

具体的な医療材料の応用として、生体の内外を連絡する経皮デバイスを想定して実験を行っている。HAp複合化シルク繊維を、あらかじめ中心静脈カテーテル用に設計したシリコンラバー製ボタンの表面に植毛することにより、セラミック経皮ボタンを作製した。製造された経皮ボタンは、

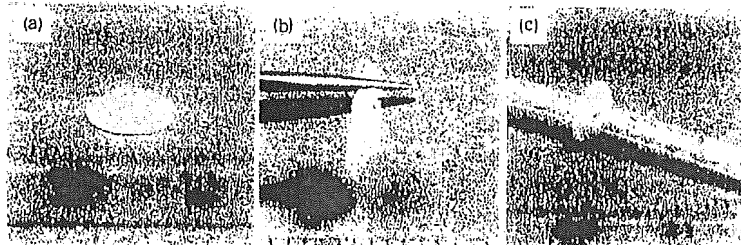


写真4 経皮デバイスの外観

a) 全容、b) 柔軟性を有している、c) カテーテル装着像

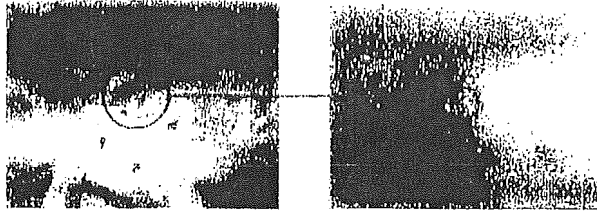


写真5 ウサギ背部へインプラント後3か月目の外観

白色状で表面特性はセラミックスそのものでありながら、しなやかさを有している(写真4)。また、この経皮ボタンを3か月、ウサギ背部に経皮的にインプラントしたが、皮膚組織は隙間なくボタンに密着し(写真5)、外観からは大きな炎症は認められず、優れた成績をあげている⁹⁾。

3. おわりに

高分子とアパタイトの複合化は、混合法、*in situ*法およびナノ粒子結合法いずれの場合でも、ナノレベルでの考察が必要である。特に無機結晶と高分子の分子レベルでの相互作用や結合法がマクロレベルでの特性に大きな影響を与える。再生医療用スキャフォールドとしては、骨、歯などの硬組織の代替物のもとより、細菌感染を防止できる軟組織結合性材料のモデルとして高分子-アパタイト複合体の研究は今後ますます重要性を増してゆくと思われる。

[謝辞] 本稿をまとめるにあたり、生物材料研究機構生体材料研究センターの田中順三先生に感謝いたします。また、科学技術振興機構戦略的創造研究事業CRESTタイプならびにさきがけタイプからの助成も受けました。当該関係者に心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) 金弦敏, 宮路史明, 小久保正, 人工骨創製の新手法: バイオミメティック法, *人工臓器*, 26, 934 (1997)
- 2) 小久保正, 医用セラミックスの最近の展開-人工

骨・軟組織修復・新治療への応用, *人工臓器*, 1994-95, 阿岸哲三編, 中山書店, pp.271-276 (1994)

- 3) Li D. J., Ohsaki K., Li K., Ye Q., Nobuo Y., Tenshin S., Yamamoto T., Long-term observation of subcutaneous tissue reaction to synthetic auditory ossicle (Apaceram) in rats, *J. Laryngol. Otol.*, 111, 702 (1997)
- 4) Flint P. W., Corio R. L., Cummings C. W., Comparison of soft tissue response in rabbits following laryngeal implantation with hydroxyapatite, silicone rubber, and teflon, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 106, 399 (1997)
- 5) Pettig R. H., Kay J. F., A seven year clinical evaluation of soft-tissue effects of hydroxyapatite-coated vs. uncoated subperiosteal implants, *J. Oral Implantol.*, 20, 42 (1994)
- 6) Jansen J. A., van der Waerden J. P., de Groot K., Development of a new percutaneous access device for implantation in soft tissues, *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, 1535 (1991)
- 7) Tsuji T., Aoki H., Shin Y. *et al.*, Hydroxyapatite percutaneous devices implanted in forearms of three volunteers for four years, *Artif. Organs.*, 14, 185 (1990)
- 8) Aoki H., Akao M., Shin Y., Tsuji T., Togawa T., Sintered hydroxyapatite for a percutaneous device and its clinical application, *Med. Prog. Technol.*, 12, 213 (1987)
- 9) 西原克成, ハイブリッド型人工骨髄造血渠誘導へのアプローチ, *人工臓器*, 24, 6 (1995)
- 10) Lin Q., de Wijn J. R., van Blitterswijk C. A., Composite biomaterials with chemical bonding between hydroxyapatite filler particles and PEG/PBT copolymer matrix, *J. Biomed. Mater.*

- Res., 40, 490 (1998)
- 11) Vehcayen C. C., de Wijn J. R., van Blitterswijk, de Groot K., Rozing P. M., Hydroxyapatite/poly (L-lactide) composites : an animal study on push-out strengths and interface histology. *J. Biomed. Mater. Res.*, 27, 433 (1993)
 - 12) Wang M., Joseph R., Bonfield W., Hydroxyapatite-polyethylene composite for bone substitution : effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials*, 19, 2357 (1998)
 - 13) Stupp S. I., Ciegler G. W., Organonapatites : materials for artificial bone. I. Synthesis and microstructure. *J. Biomed. Mater. Res.*, 26, 169, (1992)
 - 14) Kato K., Eika Y., Ikada Y., Deposition of a hydroxyapatite thin layer onto a polymer surface carrying grafted phosphate polymer chains. *J. Biomed. Mater. Res.*, 32, 687 (1996)
 - 15) Tanahashi M., Yao T., Kokubo T., Minoda M., Miyamoto T., Nakamura T., Yamamuro T., Apatite coating on organic polymer by biomimetic process. *J. Am. Ceram. Soc.*, 77, 2805 (1994)
 - 16) Okazaki M., Ohmae H., Takahashi J., Kimura H., Sakuda M., Insolubilized properties of UV-irradiated CO₂ apatite-collagen composites. *Biomaterials*, 11, 568 (1990)
 - 17) 岡崎正之, 大前博昭, アパタイト・コラーゲン複合ラミネート膜の不溶化と生体接着特性, 人工臓器, 26, 508 (1997)
 - 18) 棚橋雅美, 小久保正, バイオミメティック法による各種基板上における特徴的アパタイト層の形成, 化学工業, 44, 703 (1993)
 - 19) Taguchi T., Kishida A., Akashi M., Hydroxyapatite formation on/in poly (vinyl alcohol) hydrogel matrices using a novel alternate soaking process. *Chem. Lett.*, 711 (1998)
 - 20) Taguchi T., Shiraogawa M., Kishida A., Akashi M., A study on hydroxyapatite formation on/in the hydroxyl groups-bearing nonionic hydrogels. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 10, 19 (1999)
 - 21) Taguchi T., Kishida A., Akashi M., Apatite formation on/in hydrogel matrices using an alternate soaking process : II. Effect of swelling ratios of poly (vinyl alcohol) hydrogel matrices on apatite formation. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, 10, 331 (1999)
 - 22) 網野省三, 川瀬俊美, 神奈川歯学, 27, 179-192 (1992)
 - 23) Midy V., Rey C., Bres E., Dard M., Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate. *J. Biomed. Mater. Res.*, 41, 405-411 (1998)
 - 24) Aoki H., Medical applications of hydroxyapatite, Ishiyaku Euro America Inc, Tokyo (1994)
 - 25) Furuzono T., Sonoda K., Tanaka J., Hydroxyapatite coating on a silicone implant material by covalent linkage. *J. Biomed. Mater. Res.*, 56, 9-16 (2001)
 - 26) Furuzono T., Wang P. L., Korenatsu A., Miyazaki K., Oido-Mori M., Kowashi Y., Ohura K., Tanaka J., Kishida A., Physical and biological Evaluations of Sintered Hydroxyapatite/Silicone Composite with Covalent Bonding for a Percutaneous Implant Material. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.*, 65B, 217-226 (2003)
 - 27) Furuzono T., Walsh D., Sato K., Sonoda K., Tanaka J., Effect of reaction temperature on the morphology and size of hydroxyapatite nanoparticles in an emulsion system. *J. Mater. Sci. Lett.*, 20, 1205-1212 (2001)
 - 28) Sonoda K., Furuzono T., Walsh D., Sato K., Tanaka J., Influence of emulsion on crystal growth of hydroxyapatite. *Solid State Ionics*, 151, 321-327 (2002)
 - 29) Kawasaki K., Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *J. Chromatogr.*, 544, 147-184 (1991)
 - 30) Furuzono T., Yasuda S., Kimura T., Tanaka J., Kishida A., Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite IV. Fabrication and cell adhesion of a 3D scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device. *J. Artif. Organs.*, 7, 137-141 (2001)

総説

生体材料の遺伝子発現による評価

岸田晶夫*

1. はじめに

医用材料の基本条件¹⁾は、最小限の生体機能代行性と生体安全性（非毒性）と生体適合性の3つである。前2者は不可欠条件であり、今日のほとんどすべての材料はそれらの最低レベルを満足している。それに対して、生体適合性は必ずしも必須ではない。優れた特性を持っている材料でも、生体適合性が不十分のために医療に適用できない場合もあると言われ、これまでに多くの研究が行われてきた。しかしながら、今日では医用材料の生体適合性についての議論は拡散している感がある。これは開発される医療材料が、これまでの汎用的なものからより合目的なものに特化されているためである。このような現状をふまえて、生体適合性についての考え方から新しい評価法について紹介する。

2. 生体と材料の相互作用について

医療用材料（バイオマテリアル）は、損傷あるいは失われた組織の機能を代行・改善するために、生体内に設置されたり、チューブと連結されて体外で器官の機能代行をしたりする。バイオマテリアルを用いるためには、それが生体内であれ体外であれ、最初に生体組織を傷つけなければならない。生体組織が傷つけられるかまたは破壊されると、周辺の細胞は創傷治癒反応を開始する。創傷への急性反応は炎症反応である。白血球は、創傷部位に於いて、侵襲と感染に対して防御反応を起こす。損傷組織によって放出される化学メディエータが白血球を集めさせ、炎症反応の引き金となる。炎症のこの第1段階は急性炎症と呼ばれる。この段階にかかわる白血球の大部分は好中球である。次の段階は慢性炎症である。単球と呼ばれる白血球は、炎症部位に移動し、成熟してマクロファージ（異物や老廃細胞を捕食・消化する細胞）となる。治癒に不利な異物反応がなく、さらに感染が全くない場合には、炎症反応は軽微なものとなる。その後、創傷治癒が開始され肉芽組織が形成される。移植されたバイオマテリアルがマクロファージと異物巨細胞で

覆われるようになるとき、一般的には、肉芽組織形成から線維組織による被包化が進行し、最終的にカプセル化によって周辺組織と隔離される。肉芽組織やカプセル化などの創傷治癒部が形成される程度は周囲の組織の注入される材料、その表面特性、および細胞の再生能に依存する。この正常な治癒過程が進行する場合に、生体内に移植されたバイオマテリアルを「生体適合性である」と呼ぶことができる。一方、材料の化学的、物理的特性あるいは移植部位での材料の動きによって慢性炎症が引き起こされるかもしれない。それらの反応は細胞の損傷をもたらすので、炎症反応のための引き金が引き続けられ、その結果、炎症が持続する。このように、「生体適合性」は材料と生体組織の間の反応を決定するための用語であり、かつ生体システムとバイオマテリアルの相互作用の結果であると説明される。

3. 生体適合性について

生体適合性は定義するのが難しいが、通常、「材料が特定の用途について、適切な宿主反応の範囲内で効果を発揮する能力のこと」と定義されている²⁾。また、他の表現では、「生体に対して全く影響を与えない（少なくとも観察している時間範囲内で）物質は生体適合性である」と表される³⁾。また、我々がどのようにバイオマテリアルを使用したいかによって、バイオマテリアルの生体適合性の定義は異なる。「細胞接着性」について例を挙げれば、バイオマテリアルが組織に植えつけられるのであるなら、そのバイオマテリアルに対して細胞が接着し増殖できることが生体適合性の要件であると考えられる。一方、血液に接触するのであれば、血液細胞が接着しないことが生体適合性の要件である場合と、早期に内皮細胞の接着と増殖が必要である場合の相反する特性のいずれもが、生体適合性の要件となる場合もある。他の見方をすると、バイオマテリアルと組織界面が、使用されている期間内で安定しているとき、そのバイオマテリアルは生体適合性であると言える。界面（インターフェイス）が不安定であると、刺激、炎症、損傷、免疫源性、発熱源性、毒性、変異原性または発癌性などの反応の惹起が懸念され、そのバイオマテリアルは「生体非適合性である」と定義される。このように種々の生体適合性についての考え方があり、その評価法・試験法については、それぞれの状況に応じたものを選択する必

平成17年5月20日受付

* 東京医科歯科大学生体材料工学研究所：東京都千代田区神田駿河台2-3-10

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University: 2-3-10 Kanda-Sunugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

要がある。

4. 生体適合性評価法

一般に、細胞や器官などで構成される生体システムと関連して用いられるいずれの分子、材料、またデバイス(機器)も臨床応用する前に、生体システムへの効果を試験しなければならない。実際に市販される(されている)バイオマテリアルに関しては、生物学的適合性の試験は高度に規制されている。しかしながら、この試験では「生体適合性」という単語は「無毒性」と同じ意味で使用される。一般に、生体適合性試験を実行するための方法のためのガイドラインが、ASTM 特別部会 F04 や国際標準化機構(ISO)の第 194 技術部会(TC194)による規格の中で議論されている。ISO 10993 規格に基づいて、米国の食品医薬品局(FDA)は米国とヨーロッパでの主な試験法を統一した。また、日本の当局は医療機器の毒物学的な試験試行のための国際向けガイドラインを発行している。このドキュメントは Medical Materials の Basic Biological Tests と Devices3 のための Guidelines として非公式の翻訳で利用可能である⁶⁾。それは ISO 10993 と構成と内容について共通部分をもっている⁷⁾。

試験法としては、生体外 (in vitro) と生体内 (in vivo) で評価する二法がある。通常は in vitro 試験から実施する。いくつかの試験法で、材料と細胞が直接に接触した状態で試験される。直接接触法の利点は、簡便であり、生体内移植において細胞が材料に接触している状況のための最高のモデルであるということである。他の試験法では、材料は最初に液体で抽出され、その抽出液について試験される。用いられる状況(臨床の)または材料の特質によって、使用される抽出法は異なっている。一般に、2種の溶媒(1つは極性溶媒、もうひとつは非極性溶媒)が使用される。これらの試験は、細胞毒性、免疫系への刺激(特にアレルギー)、慢性炎症の惹起、血液と血液成分への影響、および変異原性と腫瘍形成を含む遺伝因子への効果について検討するようにデザインされている。

in vitro 試験で問題なかった場合に続いて、in vivo 試験が必要である。これは動物を用いて安全性評価と機能評価を行うものである。硬組織バイオマテリアル(人工関節や人工骨)を試験するには、試験に必要な十分量の緻密骨を得るためには、犬や羊が必要になる。他のバイオマテリアルに関しては、初期の通常の移植部位は皮下である。マウス、ネズミおよびモルモットを使用し、線維性カプセルの厚さ、バイオマテリアル周辺の炎症などが調査される。また、安全性評価に特化した生物学的安全性評価はすべての新しいバイオマテリアル、およびこれまでに用いられているバイオマテリアルでも新しい目的で使用される場合には必要となる。

5. 生体適合性評価の新しい考え方

バイオマテリアル-生体組織間の相互作用はさまざまな疾病の状態と治療に関連している。最近、バイオマテリアル-生体組織間の相互作用は、再生医学や生体工学と呼ばれる領域で注目されている。この領域では、バイオマテリアルは、恒久的足場材料、生体内分解性足場材料、ドラッグデリバリー用デバイス、およびバリアー材料として利用される。生体適合性の研究の先端領域では、研究者は生体適合性の新局面に直面する。バイオマテリアルが生体内でどのように働くかを知ることができたなら、我々は生体適合性の分子論的背景が明らかになり、これを基盤に新しいバイオマテリアルを設計することができる。生体とバイオマテリアルの相互作用を分子レベルで理解するために、分子生物学の成果を利用した新しい評価法が提案されている。以下に、これらの新しい技術の一端を紹介する。

材料と生体との相互作用は大別すると次のように分類できる。分子レベル(界面物性)、タンパク質レベル(吸着および変性)、細胞レベル(接着、増殖、機能発現)および生体レベル(動物実験)の4つである。多くの研究のうち、材料に生理活性物質(タンパク質やペプチド)を複合化した材料についての生体との相互作用、いわゆる特異的な相互作用の研究は一応の成果を挙げているが、大多数の材料で問題となる非特異的相互作用を主とする細胞の認識については、細胞の接着や形態変化などの初歩的な評価にとどまっている。

生体との相互作用を検討する手法として、材料表面上への細胞の接着・増殖について観察する方法がある。これは表面処理技術を用いて種々の表面性状の材料を調製し、その上に細胞を播種して接着細胞数の計測や形態を観察することで、表面の物理化学的性質が細胞接着や増殖に及ぼす影響を明らかにしようとするものである。これまでに、細胞の接着・増殖について大まかに材料表面の物理化学的特性で整理できることが明らかになっているが、一方で例外的な結果が得られる場合もあり、結果の解釈が困難なことも多い。生理学的な立場からは、細胞接着はフィブロネクチンなどの接着タンパク質を仲介して説明される。一方、それらの接着タンパク質に依存しない細胞接着も存在している。いわゆる無血清培養における細胞培養はすべてそうであるが、接着性タンパク質の存在しない環境でも細胞は多種多様な接着を行う。それらはいわゆる「非特異的相互作用」として説明されていた。「非特異的相互作用」とは、物理化学的相互作用が代表的なもので、たとえば同じ表面自由エネルギーの材料であれば、同じタンパク質の吸着量、細胞接着を示すというものである。これはコロイド科学的な解釈であり、接着の初期(30分~2時間)では比較的適合する。しかし、必ずしも表面自由エネルギーで整理できるとは限らず、その場合に

は他の非特異的相互作用の影響(たとえば電荷など)を組み合わせて、現象の説明を行っている。

このような「非特異的相互作用」を理解するためには単純な表面を作成して細胞の反応を調べる必要がある。しかし、表面自由エネルギーを一定にして電荷量を変化させるなどの改質は非常に難しい。一方、材料ではなく細胞に着目すると、細胞が材料をどのように認識しているかを直接調べた例はほとんどない。細胞の反応を接着や増殖などのマクロな解析だけでなく、最新の細胞生物学の手法を用いてミクロな反応を検討できれば、生体側の材料認識のメカニズムを明らかにできる可能性がある。それを用いて、材料設計の指針を得られれば、新規材料設計も容易に行える。細胞が材料と接触すると、情報収集(レセプターの活性化)→状況認識(細胞内カスケードの活性化)→対応策策定(転写因子活性化)→対応準備(転写・タンパク質合成)→対応策実施(タンパク質機能発現・接着)の一連の反応が細胞内で起こる。細胞の接着や増殖というのは最終の対応策実施段階を観察しているわけであるが、その前段階についての情報についての研究はほとんどない。ここでは材料と生体との相互作用のうち、特に非特異的相互作用について、細胞内の遺伝子レベルで理解することを目的とした評価法について検討した。

6. 遺伝子発現評価について

材料に対する細胞の反応を遺伝子発現で評価するためにはいろいろな手法が考えられる。直接に発現遺伝子を知るにはノーザンブロット法が適している。しかし、ノーザンブロット法は大量の細胞を必要とするため、大表面積の細胞接着用材料が必要である。材料開発のための基礎検討のためには簡便に大量のサンプルを処理できることを第一に考える必要がある。このような条件に適合する逆転写酵素を用いたポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)による遺伝子発現評価法を用いた。

PCR法はPolymerase Chain Reactionの略で、Mullisらによって1985年に発表された技法である⁹⁾。PCRの原理はDNAポリメラーゼ反応を利用したDNAの増幅反応の繰り返しであり、DNAの熱変性、プライマーとのアニーリング及び伸長反応を1サイクルとして、このDNAポリメラーゼ反応をn回繰り返すことで2ⁿ倍にDNAを増幅する。このため非常に高感度であり、極微量のサンプルからでも検出が可能である。mRNA発現をPCR法によって解析するには、mRNAを逆転写酵素で変換したcDNAを鋳型にすることによりPCRに用いることができ、reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法と呼ばれる⁹⁾⁽¹¹⁾。

また、解析対象としては、熱ショックタンパク質(Heat-Shock-Protein(HSP))に注目した。HSPは、生物がそれぞれの育成温度より高温の環境にさらされると(熱ショック)特異的に発現量が多くなる一瞬のタンパク質として発見された。

しかしその後、熱ショックばかりでなく、遷移金属・酸化的ストレス・生体内での虚血・炎症・分化誘導試薬などの様々なストレス因子によっても誘導されることがわかり、より一般的にストレスタンパク質と呼ばれている。HSPには多くの種類があり、その分子量に由来した命名がされている。HSP70はもっとも一般的なHSPであり、熱ショックをはじめとする様々なストレスに対応して発現する。HSP47は近年、細胞接着や組織修復に重要な役割を果たしているコラーゲンの特異的分子シャペロンであることが明らかにされた。これらのHSPはそれぞれの刺激に対して迅速に発現されることから、材料と接触した細胞の応答を見積もるために有用と考えた。

7. HSP mRNA 発現評価¹²⁾⁻¹⁷⁾

HSP発現評価では、HeLaS3細胞を用い、種々の材料上の播種した細胞のHSP遺伝子の発現を解析した。図1に各高分子材料上で24時間培養後のHSP70Bの相対的な発現量を示す。HSP70Bは熱のようなストレスに対する細胞の応答の指標を表す最も一般的な熱ショックタンパク質である。HSP70Bの発現量は組織培養用ポリスチレン(TCPS, No.7)を境として発現量に大きな差異が生じており、TCPSより親水性の材料では発現が大きく誘導され、ポリエチレン(PE)、シリコーン膜(SilasticTM)、フッ素系高分子(6F)などの疎水性の高い材料ではTCPSとほぼ同程度の発現量を示した。

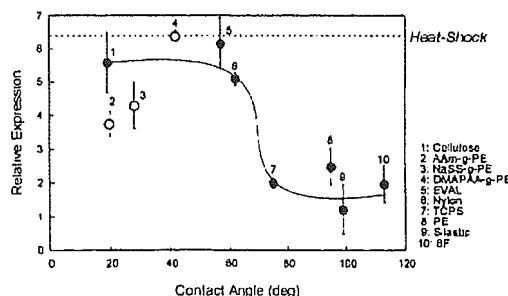


図1 RT-PCR法によるHeLaS3細胞におけるHSP70BのmRNA発現評価(●:固相表面, ○:水と表面) Heat-Shock: 熱処理(45°C, 20分)時の発現

これよりHSP70Bは親水・疎水の異なる材料に対して、それぞれ異なる発現挙動を示すことが分かる。TCPS上に接着した細胞に熱処理(45°C, 20min)した場合の発現量と比較すると、親水性の材料に接着した細胞は、熱処理時と同程度の刺激を受けていることがわかる。また、親水性の材料ではTCPSや疎水性の材料と比較して細胞の接着数は少ないにもかかわらず、細胞当たりに対してHSP70B発現の刺激を与えていると考えられる。さ

らに細胞接着数(性)と HSP70B の発現結果を比較すると、NaSS-g-PE (p-styrenesulfonic acid sodium salt (NaSS)を表面グラフト重合した PE) と TCPS, ナイロンと疎水性材料 (PE, Silastic™, 6F)は同じような細胞接着数を示しているにも関わらず、HSP70B 発現挙動には明らかな差異がみられ、両者の間に相関関係はみられなかった。

このように高分子材料に接着・接触した細胞の HSP 発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性の材料で発現が高い結果が得られた。しかし、これら一連の HSP 発現のシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態にあると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパク質の吸脱着などが動的な環境におかれ、材料表面と直接接したり離れたりを繰り返し、周りの環境が刻々と変化していることが刺激となっているとも考えられる。同様の考察が由井らによって報告されている¹⁸⁾。これより、材料上の吸着タンパク質同様に、材料表面の物理化学的性質も HSP 発現に直接的な役割を果たしていると考えられる。

また、同じ時間だけ材料と接触していても接着しない細胞が存在する。特に非電荷親水性材料では大多数の細胞が接着していない。これらの非接着細胞の HSP70B の mRNA 発現を調べた結果が図 2 である。一見して、接着細胞と同様の傾向を示していることが分かる。すなわち HSP70B 遺伝子の発現と細胞接着とは直接には関係がなく、細胞は材料に触れただけでも認識を行っていることになる。

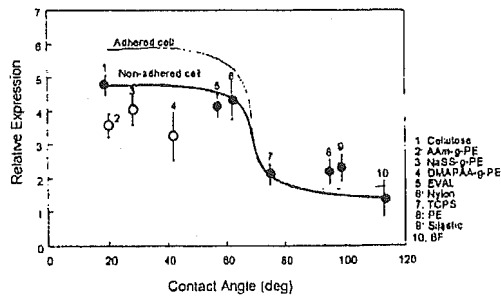


図 2 RT-PCR 法による HeLaS3 細胞における HSP70B の mRNA 発現評価: 接着細胞と非接着細胞の比較 (●: 固相表面, ○: 水和表面)

図 1, 2 では材料の水濡れ性 (対水接触角) で材料を整理しているので、物理化学的性質が HSP70B 遺伝子発現のパラメータのように思われる。表面自由エネルギーで HSP70B 遺伝子の発現が制御されているならば、これはある種の特異的相互作用と考えることもできる。事実は単純ではないだろうが、このよう

な材料の性質が複数の非特異的相互作用を同時に発揮するのであれば、ここで観察された細胞の反応もそれぞれの材料に対して特異的なものとは考えることを著者らは提案している。

8. 転写因子発現評価¹⁹⁾

上記のような仮説を確かめるために、mRNA 発現より早期の細胞反応を解析するため、転写因子に注目した。代表的な転写因子である NF- κ B は、外界刺激を受けた際の一次反応のスイッチとして機能していると考えられており、細胞と材料の相互作用解析に有用であると考えられた。図 3 に NF- κ B 発現の時間変化を示す。脂質 (DPPC) 膜上では初期に発現が見られるが、その後減少し、正常レベルに戻る。一方、脂質膜と同じ親水性表面であるセルロースやアクリルアミドグラフト表面では経時的に発現量が増加していることが分かる。この結果から、同じ親水性表面をもつ材料でもそれを構成する分子種の違いにより、生体反応が異なることが示された。

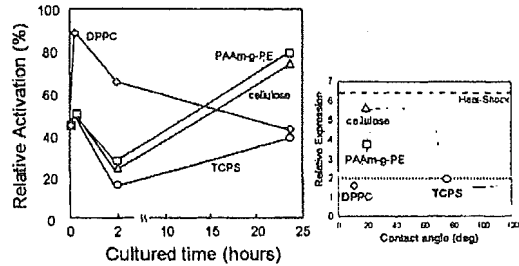


図 3 材料表面での細胞内転写因子発現の時間変化 (右図は HSP70B の mRNA 発現の比較)

高分子材料に接着・接触した細胞の HSP 発現評価では、疎水性の材料で発現が低く、親水性の材料で発現が高い結果が得られた。一方、同じ親水性材料でも脂質膜と他の高分子では細胞の認識が異なることが NF- κ B 発現評価から示された。これらのシグナルがどのような経路で細胞内に伝達されているかは明らかでない。考えられる要因の一例として、親水性材料表面は動的な状態にあると想定した場合、血清タンパク質の吸脱着と細胞の膜タンパク質の吸脱着などが動的な環境におかれ、材料表面と直接に接することや、周囲の環境が刻々と変化していることが刺激となっているとも考えられる。今後、より詳細な検討が必要である。

9. おわりに

遺伝子発現評価および転写因子発現評価のほかにも、細胞機能発現によって生体適合性の指標とする試みが報告されている²⁰⁻²¹⁾。これは材料に接触した細胞が細胞-細胞間連絡のためのキ