

それが、岡野先生がご指摘になったような高分子ミセル系の話でしょうし、私も今日CRESTのヒアリングを受けてきたところですが、実際に樹状細胞のなかに組み立てた純合成ではないですが、工夫して組み立てたような免疫賦活剤を開発して送り込むようなところは、けっして製薬メーカーからは出ないような、マテリアルをやっている人でないと絶対出てこないような発想がどうもあるようです。いま、岡野先生の話を知っていて、同じようなことを感じながら研究をされていると思いました。

米山 材料単独ではなくさらにそれにつけ加える機能、特にドラッグデリバリーという方面で最近大きく展開している点と、岡野先生がはじめのほうでご指摘になった材料と界面のところがよくわかってきたという点、マテリアルの複合化に関して二つの話が出てまいりました。



土屋 複合化という点で、DES (ドラッグエリユーティングステント) が医療機器として、厚生労働省で

医療材料部会で審議され、承認されています。ですからこれからは医療材料の分野のなかでかなり複合化されたものが評価される時代になる。というのは、医療機器・医療材料をよく知っている人でないと、薬が組み込まれたものの評価もなかなか難しいということが、先行きみえてくるのです。

実際、骨や血管といった物理的な補強、そういうものを埋め込む従来型の人工物や人工血管といわれているものを使用される患者さんの骨や血管は、通常病的な状態となっており、薬を飲みながら治療をしているのです。薬というものは、それを治療すべき部位に持っていくまでに多く

のテクノロジーが要ります。薬の場合、一般的に効き目が速い代わりに副作用も強い。そういった場合に、直接治療すべき部位にその薬を局在させる、まさしくデバイスが必要な部位に薬を同時に存在させることは、経口あるいは静注による全身への副作用を低減化させることが可能となる。巧みなドラッグリリースのシステム設計が材料屋の技術レベルとして求められるところです。このようなタイプの医療機器は、治療器としての効率的な治療効果からも、これからはまさしく医療側の医師、それから患者も望む医療機器であると思います。大量の薬を飲まなくても治療すべき部位に薬が存在し、不具合を低減化でき、かつ有効性が高い治療法となる。再生医療の分野でも効果が早く、よく効き目のあるものがこれからはどんどんつくられていくと思います。

再生医療の場合、ただスキャフォールドがあって、細胞を組み込んで *in vitro* で培養物ができればそれでよいというものではありません。材料そのものがよくなければ、いくらよい細胞をそこにせっかく分離して、きれいにして、培養しても、結局その細胞の機能を低下させることがあるわけです。ですから、すぐれたスキャフォールドの開発は、再生医療品の効果の開発をも促進することになります。

米山 次世代の先進医療機器のなかで、材料の果たす重要性が明確になるようなお話がつぎつぎに出てきますね。

堤 バイオマテリアルのそういう生物医学的・科学的・薬学的性能が非常に向上して、それが患者さんに非常に貢献をして



いるのです。全体としての長期的な寿命を支える一つの大事な要因として、やはり物理的なことも忘れてはならないと思います。生体そのものが生体材料から受ける影響と生体から材料に与える影響を、物理的な側面にも若い人たちに大いに参加してもらって、総合的な性能を向上させる研究がより必要になってくると思います。

その一つとして、私たちが体の中に入った生体材料の長期の状況を予測したり、不具合症例を再現する生体力学的シミュレーションを研究しています。動物実験も一つのシミュレーションですから、計算シミュレーションだけではなく体の中での現象を追跡できるシミュレーターを実現したいと思います。もっともっと開発しなければならないのですが、技術がかなり発展してきてきたので、これから応用が大いに期待されています。予測技術、また失敗例からの改善技術をどんどん開発していくことによって、よりよい医療器具に発展することを期待します。

米山 薬剤などと組み合わせる局所で特に効果を発揮するお話と、また違って、生体全体を構成している硬組織を再建するといった応用に関する、最近の注目技術エリアについてお話いただきました。

堤 硬組織だけではなくて、やわらかい組織、それから血管や血液の流れなどもシミュレーションの対象です。

岡野 こういう人工材料が空気・雰囲気下1気圧で外に置かれているのと、体のなかに入れられるのではまったく違う環境です。生体内の環境でどのようなことが起きるかという、いままでわれわれが予測できなかったようなことが起きるわけですから、それは体のなかにイオンがあったり、脂質があったり、蛋白があったり、

さまざまな細胞との関わりのなかで材料が機能を果たしていくわけですから、それをいま堤先生がおっしゃったように、かなり正確にシミュレートできるようなテクノロジーができれば、われわれはそういう材料やデバイスが体のなかでどんな寿命を持っているかとか、あるいは体がどんな影響を受けるかということがしっかり描けるわけです。そうすると、やはり長期治療や、埋め込みでなが治療していくような局面では非常に大事なテクノロジーになります。

バイオマテリアルは材料が高分子とか金属とかセラミックスとかそういうものだけではなくて、堤先生のように機械工学的な立場からみたり、もう少し生物細胞との病理学的な側面からみたり、解剖学的な面からみたり、さまざまな総合学問として捉えなくてはいけないのではないのでしょうか。

米山 実際の製品をつくっていらっしゃる立場からはいかがでしょうか。



松下 たとえば一つの関節をシステムとして使うときは、総合工学的あるいは科学的でなければいけないというのはそのと

おりだと思います。

一方で、先ほど岡野先生がおっしゃった、界面がどこまで設計できるかとか、あるいはどこまでコントロールができるかという点については、たとえばインプラントと硬組織を考えたときに、従来はアパタイトなどの生体活性材料は骨と引つつくということで捉えられました。しかし私は金属屋ですから、たとえばチタン材料を骨と引つつけるためにはどうしたらよいか、あるいはバイオイナートセラミックスを引つつけるた

めにはどうしたらよいかと考えて取り組みました。

チタン材料については中部大の小久保 正先生のアルカリ処理技術があります。チタン表面に最終的にOH基が来ると、それをベースにしてアパタイトが生体内で出来て骨と引つつくというものです。それが公表されて以降、その発想をさまざまな材料に適用していくと、結構チタン以外の金属とも引つつくようになりました。一つの現象がわかると基本的な情報として、それが波及的にさまざまなところへ広がっていきます。

また、骨は微細な空隙に対して侵入する特性を持っているという情報もあります。結果的には数年かかっていますが、バイオイナートなジルコニアセラミックスと骨は引つつかないと思われませんが、表面をマイクロ凸凹構造にすると結果的にはちゃんと引つつくんです。従来は骨セメントを使って引つけていたものを、今度はそういうものを使わずに、表面を微細構造にするだけで骨がそのなかに入り、結合します。そうするとセメントレスのインプラントとして実際に使えるようになる。そういう意味で、界面の現象を追求すること自体が、バイオマテリアルの本質を引き出してくる重要な課題になっていると考えます。

明石 材料工学かなにかの学会で、もともと冶金、金属工学の阪大の馬越先生・中野先生のお話を聞きました。ストレスのかからないところには骨が出来ない。これはわれわれが材料を一方的な方向からみていると出てこないような発想です。実験結果をとると、ストレスがかかるようなところにテープを巻く、応力緩和みたいな感じです。そのようなことで骨は出来ていくのだという結果を出されていました。マテリアルの分野にも、物それ自体でもない、界面で

もないこのような考え方があるのだと思いました。

岡野 古くから知られた現象で、われわれの骨というのは、やはり圧力をかけていかないと、カルシウムが抜けていってしまうのです。

明石 私が疑問だったのは、たんにサイトカインを出してアパタイト系のものをつくっても、陥没したところに骨ができるのは当然ですが、上に骨を接ぐことができるかどうかという点です。その結論からすると出来ないのです。ですから歯科インプラントをしたいときには、土台の骨をしっかりとつくりたい。本来はその人の必要としないところにはやはり骨は出来ません。そうするとどうなるのですか。

堤 歯が抜けてしまった跡に人工歯根を植えなければ歯槽骨はどんどん減っていきます。骨を維持するためには咬合力の刺激が必要です。

明石 骨を高く積むということですね。

堤 力学的刺激をなんらかの形で与えれば骨は維持できます。

明石 たとえば、もっといいますと、背が高くなるのでしょうか。

堤 その治療法をイリザロフ骨骨延長術といいます。骨に切れ目を入れて、そこにピンを打ち込んで、毎日少しずつ引き離していくと、1日0.1 mm程度で、延べ15 cmぐらいは伸ばせます。

明石 ここで先ほどの話です。力のかかっていないところに自然に骨は出来るのですか。

堤 カルシウムや生化学的な要因で再生することはできるけれども、力学的な刺激がなければやがて消えてしまいます。

土屋 それはいま再生医療で、力学的刺激を導入した培養法などさまざまなところで研究されています。軟骨も力学的刺激がないと分化や強度、

微細構造などがどうかなるとかといった研究も進められています。

明石 騙してつくることはできるけれども、結局、出来ないということですか。

岡野 吸収されて安定性がわるいということですか。

米山 離れたままですと骨は出来ませんが、ちょうどよい具合に離しつつつづけると、その間がなくなったら困ると認識されて骨が添加されていきます。

明石 なくなったら困るという場所では出来るので、本来盛り上げることというのはきわめて難しい。

米山 はい、盛り上げることは難しいです。

医療技術とサイエンス

米山 いま、エリアの違う松下先生のお話でも、以前の研究、たとえばミクロのレベルの材料研究から一歩進んで、徐放性のもや、表面に何基が出ているかというような微細構造の話になりますと、いまはやりのナノエリアの研究に入ってきていると思います。やはり界面と、徐放性のような機能性の分子という2方面がメインでしょうが、先生方のご意見はいかがでしょうか。

岡野 物理的な接着の強さ・弱さというのが、表面の上で反応基があって反応するかしないといったことはもちろん起きます。一方、やはり生体の側のレスポンスというのは代謝を使って変化します。ですから細胞が表面をみて形態変化していきますから、異物として認識するのとか、表面上でどういう接着をしていくかというような現象に関し、代謝が関与する世界だとかなり通常の物理化学的現象と違います。それがバイオマテリアルの非常に面白いところです。これがコントロールできる

ようになれば、表面で生体を刺激したり、細胞を刺激したりできるので、これまでは受身的に材料の安定がどうかといった面ばかりが強調されてきましたが、今度は逆に、表面を使って生体を刺激して病気を治すことに使うような話までがいま出てきているのです。そういう意味では、この表面がどのくらい強い相互作用があるのかとか、スペシフィックなシグナルが入るかとか、そういった問題が非常にホットになってきています。これに関連し、さまざまなことがわかってきて、応用が広がっていくのではないかと思います。

土屋 そういう意味で界面の反応として、細胞側の生体適合性評価指標としてギャップジャンクションが一つの指標になるのではないかとということで数年以上研究をつづけています。アメリカの規格協会ASTMからギャップ結合細胞間連絡に関する標準化文書をつくってくださると依頼されており、会議に出席している外資系企業の質問などを受け関心の高さがわかりました。

細胞間情報伝達はギャップジャンクション構成蛋白分子のみがキーとなり行われるわけではないのです。エキストラセルラマトリクスなどが絡んでギャップジャンクション機能が上がるわけです。いくつもの候補因子があるなかで、やはりなにかが生体適合性や安全性においてキーポイントになるかということ効率よく適切に絞らないと非常に時間と費用がかかると思います。そういう意味ではギャップジャンクションは一つのマーカーになるのではないかと

岡野先生の再生医療で、心筋再生ではこのギャップジャンクション蛋白質の発現や局在性機能を心筋再生の指標としての評価においても発表されています。これからは細胞と材

料の相互作用として、細胞・組織の形態のみでなく細胞間・細胞内の情報伝達・シグナル伝達を考慮した設計に基づく医療機器開発の重要性が明らかになり、国際的な開発戦略としてさまざまところに広がっていくと思います。

堤 わかるという意味では、特に再生医療などで、計測技術や計測パラメーターを抽出して、体のなかに入れてしまった細胞や組織がどのように反応していくのかを追跡する技術というのが、これからは非常に望まれてくるだろうと思います。私は先ほどからシミュレーションが必要と言っていますが、シミュレーションも嘘であってはいけないので、バリデーションが非常に大切です。信頼性を上げるために、体内でなにが起こっているかを追跡できる計測技術が、もっと必要になってくるだろうし、望まれる技術だと思います。

土屋 堤先生のおっしゃられるシミュレーション技術ですが、すでに米国では、審査のなかでの自主基準ですけれども、ごく一部分は承認申請書に使用されはじめています。

米国の不具合の40%強は設計上の原因があるといわれています。新技術が科学的な根拠に基づいて適切に導入される必要があります。わが国もそういう意味でも、堤先生がリードしてこられたものを、より育て、耐腐蝕性、精密化、寿命、デザインとしての適切性などが的確に数字として出せるような技術レベルになるよう大いに期待します。それをやらないと安全性を担保し、コスト面で合理性を追究するメーカーも困ると思います。

堤 そのときに必要な臨床のデータベースがまだ不十分ですので、皆の力で構築していかなければなりません。よい例は当然データベースとして客観的に洗い直し、わるい例は

もっと大事ですから、さらに慎重に調べて蓄積していくのです。そこからも重要な因子を絞り出していきます。シミュレーションのよいところは因子を抽出して、純化できる点です。特定の因子だけを追及すればどうなるかとか、分類できるというのは大事な特色の一つであろうと思います。審査基準や標準化にもっていくためには、計測技術と臨床データベースの構築が必須ですから、これから学会をあげての取り組みを望みたいと思います。

明石 エリアのどういうサイエンス、どういうテクノロジーと組み合わせるかということ整理する必要が出てきているのではないのでしょうか。そうしないとマテリアル研究に焦点が当たらずに、たんなる組み合わせだけになってしまって、マテリアル研究に反映されないようなことになる可能性があるように思います。

松下 先ほどのシミュレーションのお話ですが、われわれメーカーの立場ですと、構造解析や変形解析に数値シミュレーション技術を活用し、データを蓄積していますので、申請書類にシミュレーションの結果を、これは工学的にできることです。それなりの経験に基づいた数値を付けているのですけれども、なかなか信用してもらえないのです。それはおそらく、先ほど堤先生がおっしゃった臨床成績とその数値シミュレーションの結果が合っているかというところが充分理解されていないのではないかと思います。結果的には、実験したデータをも付けています。それを何回もやることではじめて、このシミュレーションも信用できるということになるようです。

土屋 そこはまさしく、バイオマテリアル学会や医療機器フォーラムで主題に取り上げています。審査官

側の方に活用していただけるような整理、蓄積、そういったものを目にみえる形で行ったほうがよいと思います。

松下 現状ではそれでかなりの回数、書類のやり取りを行っています。

岡野 結局それはサイエンスだと思えます。たとえばシリコンみたいなものですと、脂質がじわじわ入って行って、屈折のところが弱くなります。しかし、親水性のものだとそんなに入っていきません。ところが今度はカルシウムが入ってきて、石灰化が起きて固くなってしまふ。それは材料にもよります。そうするとシミュレーションといいながらも、そのような影響を勝手にないようにしてしまったり、勝手にあるようにしたりということが行われなとも限りません。どこまでリアリティーがあるのか。そういう意味では堤先生がおっしゃるように、ある仮定のもとでおいたシミュレーションは生体のなかの現象をこれだけ反映している、というデータが必要です。

しかし、そこがないから必ずしも信用できないので、そこをみんなで集めていく必要があります。界面でどういうことが起きていて、この現象はこの材料に限っては無視できるけれど、この材料に関してはこういう成分の影響は考えなくてはいけないというのを、もっときれいに整理していくことが重要だと思います。結局は界面のサイエンスをわれわれがどこまできちんと把握できるかで、やはり企業の人たちも含めた会員のなかで、そういうデータベースを全員で構築していくという雰囲気重要ではないでしょうか。

松下 重要だと思います。シミュレーションの前提がなにであるかを明確にしてデータを蓄積する必要があります。そこが曖昧であれば結果の信用度がぐらついてしまいますか

ら。

岡野 結局日本のバイオマテリアルのレベルを上げるためにも、バイオマテリアル学会できちんとそういうことをやっていくというのは重要です。

土屋 昨年5月のASTMで、有限要素法のWGがありました。40～50人の米国系や海外の企業の人が参加していました。非常に注目されていると思いました。しかし日本からは私以外誰も参加していなかったのです。1メーカーが大変優秀で全部できるのならよいですけれども、そうでなければ、やはりトップと常に一緒になって情報を収集するというのが非常に重要だと思います。彼らは、すでに数社以上で validation study を行っており、結果について活発に議論していました。われわれ厚生労働省の国立医薬品食品衛生研究所としましては、再生医療をどうやって早くするかとなると、結局はそのなかで一番トップの人をよんでやらないと、とてもではありませんが早く進みません。その分野の人がいればよい、数が集まればよい、そういったことではなくて、先端医療となるとやはりポイントとなる人を集めてつくっていくことが非常に重要だと思います。

新技術とこれからの医療

米山 実際に応用される医療用具の開発のところまでサイエンスは必要であるというお話で進んできましたが、ではそういう新しい技術が、実際に社会の未来にどのような貢献をするかという観点からお話いただけますか。

土屋 従来の医療機器に関するイメージが非常に変わります。薬以上に劇的に効く、例外はありますが、従来型の医療機器ですと、使用

しても思ったほど治療効果が出ないなど、大手の有名な外国製品も少なからず不具合が出ています。

米山 用具、薬というのが分かれている状況とはまったく違う応用や、治療が可能になるということでしょうか。

土屋 新たな夢のある治療法として、薬以上に効くデバイスができるというように変わると思います。

米山 そうなると、これまでは材料を入れて治していたのではないところに、材料を入れて治すということもありえますか。

土屋 どちらかというときは工業製品を入れて、埋めていたという感じですが、いまは、しだいにさまざまな技術なり、材料側も通常化学物質としての作用や、薬など多くの tool となりうる化学合成品や天然由来成分の特性や活性などの作用がわかってきました。それから材料と細胞とのインターアクション、メカニズムがわかってきました。なにが異物反応を起こしてくるのか、どういうものが病気を起こしているのかということが昔にくらべ、格段とわかってきています。それにどのような化学物質なり材料を持ってくればよいのかということが、先生方、企業などのなかにもアイデアとしてあるはずですが、ですからやはり次世代には、いまの医療機器以上のものをつくっていただきたいと思います。

米山 それは改良されるものというだけでなく、まったく新しいところに医療用具を使うということも含めてですか。

土屋 少なくともいまの医療機器でもよいものはありますが、従来型のものより進んだものを出していただきたいと思います。認められているものはすべてよい、というわけではありません。ほかにないから使用している場合もあるのです。

米山 高齢化ということで、そのようなテクノロジーがどんどん活かされてくると考えられますか。

松下 はい。いままでだったら、疾患があるので、それを治すために入れざるをえないという話であったのが、今度はむしろそれを自分で取り入れていって治していこうという、自発的な治療という発想になるのではないのでしょうか。

岡野 これまでは薬の研究が非常に進みました。ペプチドのようなバイオテクノロジーが出てきて、生理活性物質というのが非常に大量に合成できる時代に突入したのです。しかしあまりにも活性の切れ味がよいため、ターゲットの場所に持っていけないことには副作用ばかりが大きくなってしまいます。そうすると、薬を標的部位に送達する DDS ではバイオマテリアル抜きではつぎの新しい世代が出ないのではないのでしょうか。DDS はまさにバイオマテリアル抜きには考えられない時代に来ていますし、組織工学、ティッシュエンジニアリングのように、細胞で組織をつくるというのも、やはりどのように一体化していくかで、バイオマテリアル抜きの応用は考えられません。

いま、ES細胞、ステムセルなどの新しいテクノロジーがどんどん出てきています。ではES細胞をちょっと体のなかに入れると、一瞬にして心臓ができて、体に瞬時につながってしまうかということ、そんなことはできません。それを治療に使うためには、バイオマテリアルとどうやって複合させていくかというシステムで考えていかなければいけません。

バイオマテリアルというのは、これまで医療のなかにつくられてきたベーシックなテクノロジーをブレイクスルーしていく一つの大切な手法になりつつあるのではないかと思う

のです。“材料”というと物の塊のようにみえますが、そうではなくて、そこに表面、あるいは内部から薬を出して、機能を伴っていて、そういう全体の設計論がバイオマテリアルの本質であり、これからさまざまな治療や診断をブレイクスルーして、われわれが予想しなかったような新しいものをつくり出す可能性のある新材料であると考えればよいと思います。

米山 治療方法自体が変わってしまうということですか。

岡野 はい。

土屋 バイオマテリアル単独では炎症を起こすような材料でも、そのバイオマテリアルにあるものを、たとえば薬まではいなくても炎症を抑えるような普通の化学物質を添加することによって、その材料の力学的な特性を活かせる材料の創生ということがかなりあります。ですから多少わるいといわれたからといってあきらめないでいただきたい。デグラデーションというのは大変重要な組織置換型のよい性質があるわけですから、工夫すればできる可能性もあるのです。非常に領域が広がるので、ぜひチャレンジするべきだと思います。

堤 再生医療でのバイオマテリアルというと足場材料だけが強調されますが、いま、お二人の先生がおっしゃったように、場や環境として、生体との間で対話する大事な場だということです。そこにはさまざまな環境因子が必要だし、物理的な力学的場、電磁の場なども入ってくるでしょうし、そういう場を提供するのは、体のなかで夢の舞台となる場をつくるのがバイオマテリアルです。夢の大きい分野だと思います。

米山 マテリアルなしには有効なターゲティングのできる場の提供が困難ですから。

明石 三つのポイントがあると思います。

ます。名古屋学芸大学学長(元・鹿児島大学学長)の井形昭弘先生が言われたのですが、歴史的に考えると、ダイアライザーが登場して、これだけ多くの人の生命を救うことができるとは想像もできなかった、マテリアルというのはすごいと、はじめてお目にかかったときにそのように褒めていただいたのです。そういう一つの世代があったのだという気がします。そのつぎは骨の問題です。チタンを中心にしたようなものを体のなかに埋め込んで、どれだけ多くの人歩け、どれだけ多くの人正常なことになってきたかということがあります。この二つだけでマテリアルというのはもう社会に十分に認識されて、大きな期待をもって、非常にファミリアなものになったと思います。

では三つ目のポイントとしてこれからはあるかと考えると、土屋先生がご指摘されたように、医薬品を有効に、その切れ味を出そうと思うと、マテリアルサポートというのが一つの分野になってきます。それは非常に幅広く、DDSの問題です、再生医療の問題です。そういう世界がこれから出てきて、われわれが想像もしないような、みながよかったと思うようなものが出てくる可能性が非常に高いと思います。それがこの10年以内に起こるといふ気がします。

米山 そうするとまったく違う治療用具であり、まったく違う薬の投与方法であるということになってきます。

土屋 Drug delivery device(DDD)というのがあります。Drug delivery system(DDS)というのはいままでかなり長く使われているので、新しいネーミングを、ということでこちらを使用してもよいかと思ひます。

若い人は、これまでのようにサン

ブルをABCDと並べて、ただそれらの違いを見つけて、論文を書いて、デバイスにすればよいという時代ではなくなっています。やはり自分の論理や理想を大きく掲げて粘り強く一貫してやっていただければ、ステップアップして、日本発の医療材料として世界に発信できるものが出来てくると思ひます。その例としては、岡野先生、明石先生、それから本日おられますが東大の石原先生などがおられますので、そういう方が何十人とつづいて出てくるようになれば、自然と日本から世界に発信するバイオマテリアルサイエンスが生まれてくるはずで

社会が用意すべきこと

米山 いまの土屋先生のお話のように、新しいデバイスが応用できるような研究をこれからプロモートしていくために必要なことで、われわれが用意しなければいけないこと、社会が用意しなければいけないこと、そういう点でご意見をいただけますか。臨床も含めて、これまでは分かれていた多くの領域の科学が融合しなければならぬということはあるのですが、具体的にはどういったことでしょうか。

岡野 バイオマテリアルサイエンスというのはかなり以前からありました。バイオマテリアルが体と接触して使われるときに、どこまで構造と機能相関がしっかりと整理できるかという、複雑系でなかなかできませんでした。そうすると誰もが、わけがわからないから行き当たりばつたりで材料を体に入れて利用してました。そのような時代から、いまはある程度設計しながら、予測しながらできるような時代になってきたわけ

それがもう一歩進んで、かなり機

能が設計できるとか、さらに材料設計からただたんに物理的な問題のみならず、表面や、体にどのように働きかけるかという意味での機能なども含めて、そういう設計論が立つようなことが必要だと思うのです。そのためには、いままではクラシカルな物理科学を勉強したり、材料を勉強したりしていればよいという時代でしたが、ダブルメジャーの時代になってきていて、体がどうなっているかとか、生体側を理解するバイオロジーを勉強しなければいけないのです。工学がわかればよいというのではなくて、われわれの体や細胞、バイオなどがわからないといけませんし、逆に医学部の立場から見ると、いままでの医学だけではなくて、工学的なセンスも持たなければいけません。医学と工学の両面のことが必要な時代になってきたと思ひます。

そういう研究者が活躍できる場というのをこれからきちんと整備しなければいけなくて、この日本バイオマテリアル学会はそういうことにずっと取り組んできたのです。私は工学の出身の立場で医学部教授をやっているのですから、このようなダブルメジャーでやれるような場所をもっと整備していく必要があると思ひます。工学部にいてあまりにも多くの動物を使うと、工学部でそこまでやるのかといわれてしまうような雰囲気は研究の阻害因子になってしまうし、医学部のなかで工学的なことをどこまでやるのかというのも、そういう理解なしにはできないと思ひます。ですから工学と医学というこれまでの縦型の枠組みを決めた学問体系をもう一歩切り崩して、工学と医学の間に新しいものをつくり上げるという環境づくりにこの学会は力を入れて、若い人たちがそういう境界にチャレンジできるような

研究環境を、きちんと整備していくというのが急務だと思います。

米山 先生方の研究所のように、医学部と工学部の融合したような場所をもっと増やすというようなことでしょうか。

岡野 東京女子医大はそうやって頑張っていますし、東京医科歯科大も生体材料工学研究所をつくっています。堤先生のところの京都大学再生医学研究所はいかがですか。

堤 私はそういう意味ではラッキーで、いま私は医学研究科の教授であり、工学研究科の教授でもあるので、大学院生は両方から来ています。一つの研究室、実験室のなかで、2分野の学生が一生懸命討論して、面白いものをつくろうと頑張っています。交流と協力のありかたを問いかけていかなければいけないのではないのでしょうか。

米山 医学・工学両方の講義を受けるからといって学生が育てられるというわけではなくて、やはり普段から一緒に研究することが重要です。

松下 企業でもそうです。従来は、自分が機械工学を知っていて、お医者さんとおつき合いをしていけば物が生まれるという感じでしたが、しだいに創造的になってくると、ケミカルもわからないといけないうし、医師がなにをニーズに持っているかもわからないといけないう。それらが全部要るのです。そうすると、これまでの企業体系のなかではおそらく対応できませんので、新人を採用するときは、医学知識を持っていて、なおかつ工学に興味があるという学生を採用したくなるわけです。企業にいる人材で、機械系で入ってきた人を大学に留学させて医学を勉強させたり、体験させたりしていると、時間的にも費用的にもとても間に合いません。ですからそういう医学的な知識を持った、先ほど岡野先生がおつ

しゃったようなダブルメジャーな学生さんだったら、喜んで採用したいというニーズを企業も持っているという気がします。

明石 大阪大学も、インターフェカルティー教育という言い方で、積極的に、医学部の方は工学部のこのカリキュラムをとってくださいとカリキュラムを提示して、いくつか取るとライセンスを発行するようなシステムにしました。さらに、工学部の先生方には、医学部の学生さんが必ず何名か来ますからそれを考えて講義を組み立ててくださいと、医学部の先生方には、工学部の学生さんたちが聞きにくることを前提にして講義をしてくださいとして、一つずつそのような講義をつくりました。ある程度の単位をそこで修得すると、それにライセンスを出すということにしました。

米山 どういったライセンスを出すのですか。

明石 臨床医工学融合研究教育センターの修了証書です。そして、そのようなものを取っている学生は見てほしいと企業の方にお問い合わせしました。きちんと教育を受けて、このような単位を取っているのだということになれば、そこにどんどん人が入っていきますし、できればそこを独立させて大学院をつくりたいのです。ここでドクターコース、あるいは修士を出す。教員の配置もする。そうしますと、岡野先生が実践されているようなことを、各大学でできてくると思います。古い体質の大学に新しいものをつくるのはきわめて難しいですが、一つずつでもやっていこうと思っています。

岡野 やはり日本というのは、産業があつて、産業のために大学があつたわけです。さまざまな産業があつて、どのくらいの人数がそこに必要かで各学部の大きさが決まっ

ていました。そうすると、現在ない産業を誰がつくるのかという問題があります。改良はやっていけるのですが、新産業というのはなかなかできないのです。

ところがアメリカは、1970年代の後半から80年代にかけて、すでに50もの大学でバイオエンジニアリングやバイオメディカルエンジニアリングの学部や学科が出来ているのです。リソグラフィーをやっている人たちに必修で遺伝子を教えてしまいます。つまりバイオとエンジニアリングを合体させる教育をやっていたわけですが、彼らはそのときに産業があるわけでもなんでもなかったのです。このような教育を受けた人たちが未来の産業をつくるのだということを信じて、そういう人たちをつくってきたのです。それで21世紀に突入すると、遺伝子チップや新しいバイオテクノロジーの新産業をそのような人たちが作りはじめています。

そのことをそろそろ日本も本気でやらなければいけない時代に来ていて、産業があるから人をつくるのではなくて、未来のために産業をつくり出すような人をつくっていかねばいけません。そのプロセスのなかで、工夫の仕方によって企業はいくらでもメリットを出していけると思います。そういう課題をきちんと持って教育されてきた人たちは、おまけを出しながら目標に向かっていきますから、場の設定ということをそろそろみんなの本気に考える時代が来たのではないかと思います。

明石 間違いなくそのようになっています。松下先生が言われましたが、若い人はそのような分野をやりたいため、大きな会社ではなくて新しい会社にどんどん来るようになってきている。間違いなく、若い人は自然にそのようなところに集まってくるのです。先ほどお話しした臨

療機器メーカーはあまりにも出席していません。ISO/TC150の人工血管のWGは誰も出席していない。ステントなどはDESの標準化がスタートし、どんどん進んでいます。そのWGに日本のメーカーの方はどなたも参加されていません。中国からは5名も出席されていました。

米山 土屋先生はISO/TC194で生物安全に関して検討していらっしゃると思いますが、そちらはいかがでしょうか。

土屋 生物学的安全性についてはISO/TC194国内委員会がしっかりとやっています。30~40名の委員で構成され、中村前薬品部長のときに築かれた伝統を引き継いでいまして、医療機器の高度化に伴い、しだいにメンバーが増えてきている状況です。

米山 その国内委員会における最新の標準の状況などはどのようにして知らせているのでしょうか。

土屋 TC194国内委員会ホームページ(<http://dmd.nih.go.jp/iso-tc194/>)に標準化に関する最新の情報を掲載しております。ホームページをみていただければ、これまで開催された国内委員会の議事録がすべて掲載されています。

米山 産・官・学連携のフォーラムなどでも公開されていますか。

土屋 前回の医療機器フォーラムまではISO/TC194の状況を紹介していましたが、2005年10月の医療機器フォーラムでは動物組織材料のBSE問題をとりあげました。医療用具の場合、コラーゲンや生体弁などがありますので、それらのBSE問題について、大阪大の黒澤 努先生に現在の状況を説明していただきます。国立医薬品食品衛生研究所でもISO/TC194 SCIで作成作業が進められている“動物組織安全性”に関する三つの文書案について専門の方々をお招きして拡大委員会をやることになっ

ています。また、実際そういったものを扱っている国内と外資系企業にも入っていただいた拡大委員会でも議論し、厚生労働省の担当官にもご意見をお聞きして進めていく予定です。

米山 堤先生のISO/TC150では医療用具のメインである外科用インプラントを対象に審議されているところですが、どういう状況でしょうか。

堤 ISO/TC150の国内検討委員会では、参加企業がしだいに増えてきたのですが、全体としてやはり、外科系インプラントそのものを製造する会社が、日本としてはまだまだ多くない。インプラント産業の底上げをしていかないといけません。その原因として、先ほどからさまざまなことが出ていますが、日本の企業体質が医療器具に対してまだまだ積極的でない。若い人がどんどん企業に入っていくって、日本独自の外科用インプラントを開発していただくというのが本当に望まれます。

米山 環境という面では、前よりもよくなっている部分もありますが、依然として十分に整っていないので、これからのバイオマテリアルを活かした次世代の医療用具開発につながるような研究開発をますます推進していくためには、さらに環境も整えていかなければいけませんし、残っている問題もかなりあります。

土屋 このところ約2年間は、認証基準のためのJISや規格づくりを中心に進めていただいていたのですが、いまは承認審査ガイドラインづくりが中心になっています。現在は月1回程度、規格・基準づくりなどのための会議を開いています。医療機器・医療材料の合同部会は3カ月に1回ありますが、合同部会での審議にターゲットを絞って可及的に早くガイドラインなどの文書が公開されるように進めています。

米山 そのガイドラインに従って行えば承認にもつながるような、労力を省けるようなものでしょうか。

土屋 はい。承認審査ガイドライン(案)も厚生労働省のホームページで公開し、コメントを募集後、修正し、最終版となります。これらは月に2回発行される薬事行政の本に掲載されています。

今年度から次世代医療機器評価指標策定事業を経済産業省と一緒にやることになり、再生医療、ナビゲーション医療、生体親和性インプラント、体内埋め込み型能動型機器、リボソームなどのデリバリーシステムの五つのWGで次世代的医療機器の評価指標作成のための事業が行われることになりました。それぞれ五つのWGにおいて、関連学会からの委員も入っていただくことになっています。そのような状況のなかで評価指標が整備されていきますと、今後は企業側の体質が問われる時代になると思います。

未来の研究者へのメッセージ

米山 企業側の体質も問われるという話が出たところで、将来を背負って立つ若手の研究者、あるいはこれからそう思うと思っている学生さんたち、企業に入ってくる準備軍、あるいは入ったばかりの人たち、技術者、そういった人たちに対して、こういうところが魅力だ、こういうところは気をつけたほうがよいとか、こういうことをやりなさいというご助言などをいただきたいと思います。

明石 教育面から考えると、医学部の先生の理解がかなり進んだような気がします。医学部の先生が嫌がらずに工学部の学生にも講義をしています。松田 暉先生が、工学部の1年生の学生さんに熱心に講義されるという時代が来ているのです。感動

です。大阪大をもうリタイアされていて、でも講義をする。講義していた後、松田先生にお礼を申し上げましたら、来年はもっと準備しますからとおっしゃられて、びっくりしました。松田先生がこういう気持ちを持っていらっしゃるということは、もうみなさん方がそういう意識にしたいに変わってこられているのでしょうか。

これも岡野先生のお力が大きいと思うのですが、大阪大医学部の澤 芳樹先生、松田先生に対して、われわれ工学の研究者が、工学だけではなく、誠意を持ってこういう分野を一生懸命働きかけてきたと思うのです。いまの時代になってきて、医学部の先生方が、やはり自分たちも同じ土俵で学ばねば先の治療、医療をする者がいないという意識に変わってきたのです。それを今度は若い人が敏感に感じて、教育面ではかなりうまくいくようになってきているのではないのでしょうか。工学部の方々も、医学部の先生方に対して、いい意味での畏れはあるけれど、怖いという意味の恐れはなくなってきている。そのような雰囲気はありませんか。

米山 そういう環境としてはよい面も出ているかもしれません。逆に言うと、ただ興味を引かれてそういう融合領域のところへ行ったらけれども、結局どっちもわからないというような学生も出てくるのではないのでしょうか。

明石 どっちもわからなくなってきているというよりは、新しい分野に対する興味を持っている人が増えてきていると思います。われわれ団塊の世代とくらべて、いまは外国語を非常に自然に受け入れています。それと同じように、このようなバイオサイエンスやバイオテクノロジー、バイオエンジニアリングというのを非常に普通のものとして受け入れる

時代が来ているのではないかと思います。

岡野 お手本があれば真似はしやすいのです。ある世代、つい最近までは、先生がいて、先輩がいて、先生や先輩の真似をしていけば間違いがなかった。なにかできたわけです。日本はみんな、自分の専門ですとって小さなフィールドで、そこから出ない方がむしろよい人生が描けたし、それが成功者になりました。ところがそういう限られたところというのは、中国・韓国の人たちがどんどん出てきて、追いつかれています。アメリカはどうしているかという、縦割りではない学際領域に出ていって、新しいフィールドをどんどん立ち上げていっているわけです。むしろ先生や先輩がやらないことをどうやってやろうかということ、アメリカの若い人たちは本気で考えています。日本は先生と先輩のやったことしかやらない、それがよいことだと思ひ込んでしまっているのです。

そこにいま大変なギャップがあります。バイオマテリアルというのは医学と工学のちょうど境界領域のようなところにあって、そういう場所こそが、つぎの新しい時代をつくるということが最近ようやくいろいろな実績から注目されるようになってきました。ところが教育は変わっていないから、本気で取り組むにはなかなか勇気が要るわけです。

東京女子医大の清水達也先生は循環器のお医者さんで、しばらく臨床はやめて、細胞で心筋をつくりたいとって私の研究所に来ました。現在講師で活躍しています。泌尿器のお医者さんだった白柳慶之先生は、助手を辞めて、細胞で膀胱をつくるから大学院の学生にしてくれとって、新しい再生医療の研究をはじめたりしています。そういう人も出てくるのです。

医師にとっては、これまでのやり方とは変わったやり方というのをやるにはかなり勇気が要るわけです。それでも夢があるからやるという人が出てきたわけです。工学サイドでも、夢があるからこういうバイオマテリアルをやるという人たちが出てきたわけです。時代がやはりそういう人たちを必要としているし、そういう人たちが出てきて成功していく時代になってくればますます人材が集まってくる。やはり、お手本どおりの生き方でよいのかどうかです。本当に賢い人は新しいフィールドへ出てきてチャレンジしたら面白いのではないかと行ってあげたいです。

米山 おそらく、お手本どおりのことをやっても、自分がお手本となるべき年齢になったときにその場所はないという状況が、いまの展開では充分ありえると思います。さまざまな授業や講演などもあるので、そういうところに積極的に出席して、どういうところがあるのかを自分で探せということでしょう。

松下 ありふれたことですが、やはり最後までやり遂げる粘り強さが大切です。先ほど岡野先生がおっしゃった、自分はこれをしたいという、やりたいことに対する情熱をどれだけ燃やせるかという精神構造になったときに、最後まで粘り強くやれるかどうかでしょう。

よく言われるように、途中でやめたらそれは失敗で、粘り強く最後まで行き着いたらそれは成功だと。その成功というところへ行き着くための粘り強さというのは、なかなか普通はできないと思いますが、本人がまず情熱を持ってその努力をする。組織の場合は、それを今度は上司がサポートする。先がみえない場合でも、激励することで限りなく力が出てくると思います。そういう組み合わせが必要です。本人の情熱と努力

は最も重要だと思いますが、それだけではなく、その二つの組み合わせがないと最後まで行き着かないのではないかと思います。

明石 社会としての受け皿を用意するように組んでいきたいです。そういう人たちの生きる道を与えようということです。

松下 道をみせるような感じです。

堤 大学で新しい教授を迎えるときに、実績で評価します。論文が多いとか、引用数が多いとかありますが、陥りやすいのは、その人の先生が偉くて、その先生の仕事を一所懸命やってきたという候補者ばかりが目立ちやすいのです。そういう人よりも、まさに岡野先生がおっしゃったような、変わった人、自分の発想でやってきた人を発掘しようとしているのに、逆にそうした人材がまだまだ少ないというのも困ったものです。

若い人には大いに自分らしさを発揮する研究を粘り強くやっていただきたいと思います。熱意を持っている人はかなり増えてきましたが、他人と違うことを言うと叩かれるのはやむをえません。そこで打たれ強くなるためには、情熱もそうですが、理論を持たなければいけません。こうあるべきだという、従来と違う自分の哲学をつくるような、粘り強くことん頑固でありながら、間違いとわかれば正しい方向へと豹変できる勇氣もある、そういう人を待望しています。

米山 現実として、Ph.Dを取った後に助手のポストが充分にない場合には、どんな気持ちで頑張れと先生方は助言なさいますか。

岡野 私は工学部を卒業しましたので、医学部に行くときに、周り中からどうかしているのではないかと言われました。医学部で万年助手をやるつもりかと言われて出てきました。現在、京工大の赤池先生と東大の

片岡先生と、3人で助手をやっていた時代があるわけです。そのように言われながらも、いま3人とも教授になっています。

時代とともにそういうものは変わるし、自分が大丈夫だと思っても窓際になってしまうこともあります。それなら、ポストのために研究をするのはやめて、自分が信じられる場所でやったほうがよいと思うのです。ポストがあるからとか、教授になれるからというのは研究が好きなのではありません。本当に好きな研究をやって、そこで頑張りつづけていけば、ポストはどこかでついて回ってくるのではないのでしょうか。結局私はアメリカまで行って、働く場所をアメリカに求めて、そこまで追い詰められても好きなことをやりつづけたのです。そうするとなにかが変わります。ですからやはり研究が好きだったら、あるいはやる必要があるだと思ったら、先ほど堤先生がおっしゃった理論的なバックグラウンドをきちんと持つことが大事だと思います。こういうことをやりたいという夢に向かって努力する若者は、社会が必ず必要とするから、いつかポストは回ってくる。ポストのために自分を曲げる必要はまったくないと思います。

明石 バイオマテリアル分野の若手研究者は自分で道を拓けと言ってしまってもいいかもしれません。先駆者たちはそうしてきたのです。先ほど申し上げた、ポストを社会で用意できたらというのは願望で、若い人に言うべきこととしては、哲学を持ってとか、自分で道を拓けというのが、この分野としてはふさわしいのかもしれない。

米山 若い人が、これがよいと思うのが一番正しい方向かもしれません。

明石 そういう人でないと生き残

れないし、拓いていけない分野であることは間違いないと思います。いまの教育システムはそれなりに意味があると思います。ただ、国民の利益を考えるとしたら、もう少し受け皿を用意して、教育システムを充実させて、そういうところに人材がうまく流れるように持っているほうが国益に適うと思いませんか。

米山 産業のほうまで影響するような知的なバックグラウンドを整えて、国際競争力のある新産業創出にという方向につなげるためには、重要なお指摘だと思います。

岡野 電機というフィールドは非常に日本は頑張っている。ところが少し自分で工夫が必要だったり、創造や新しい挑戦が必要だったりするフィールドが、日本では懸案事項になっていて、ゲリラ的な戦いになっている。バイオマテリアル研究では平均値でアメリカにやられていますが、トップレベルの研究も負けているかという必ずしもそうではなくて、世界で通用するような、というか世界をリードするような研究がたくさんあるのです。このフィールドのかさ上げという意味では、社会整備をきちんとしていれば優秀な若者が入ってくるはずで、ほかのフィールドにとられてしまうのは、先駆者たちがわるいのではないのでしょうか。企業でもそうです。優秀な人材をたくさん採れば自分の事業部も一気に大きくなって、会社も発展するわけですから。それを電機会社や自動車会社にとられてしまうのは工夫がないからです。大学も同じではありませんか。

米山 生体材料を標榜する大学の研究室、学科はますます増えてきておりますので、会社のニーズを満たしたような卒業生がどんどん出てきて、よりどりみどりとあればよいですね。

岡野 行政サイドでも、そういう人が必要なのです。おそらく土屋先生のような、バイオマテリアルを本当に専門でやってこられた人が行政サイドに立ってやったらもっどよくなるはずですが。しかしそういう人を出す仕組みがないのです。

土屋 はい。審査官も300人定員のところ190人しかいないのです。

明石 埋まっていないのですか。

米山 無理に埋めても仕方ないからです。

土屋 そうです。募集で受けられるのですが、落とされるようです。医療機器の生物系もそうです。現在、2人ぐらいの審査官ですから、そのあたりが今後も課題だと思います。

若い人というのは上の人の一言で変わるのです。エンカレッジして、この人は駄目だと決めつけしないで、その人の能力を最大限に引き上げてあげて、それを常に考えてあげるとかなり違います。

米山 若手に対するというよりはわれわれに対する助言ですね。

土屋 私のところには大学院生が1人いますが、学生さんはいません。さまざまなところを経由したPh.Dがいますが、前の教授が非常に明るく育てた人と、いじめられたとされているような人とはかなり違うので

す。そこで自信を持たせて、あなたならできると言っただけなのです。一見元気がなさそうでも、本日ここにいらっしゃる先生方は成功例だからご自分の経験としてはおわかりにならないかもしれませんが、一言、元気づけてあげれば人は変わります。若手は特に変わります。そうすると日本のパワーになります。そこがまず非常に重要です。人材育成をもっともっと重要視していただきたい。優秀になれる可能性がある人がたくさんいます。全員にその資格があり、よいところはあるわけですから、よい面をみて育ててください。

明石 土屋先生は激励型ですか。先生はもしかしたら怒るタイプかと思っていました。

土屋 若いころはそうでした。室長のころは必死ですから、そうすると若い人を厳しくみてしまいます。それで反省したのです。

米山 若手をエンカレッジするので、若手自身は自分を信じて粘り強く頑張れと。

土屋 定員は少ないわけですから、最大限活躍してもらうように、いままで一つで済んだことを三つも四つもやれるような人材を育てないとやっていけません。

米山 このエリアはチャンスが多

いということですか。

岡野 バイオマテリアル学会に来ると普段会えないような人と会えるという学会にして、そういう人が集まっている学会だから、常に未来のテクノロジーの創出に向けて、エンカレッジメントをしながら学会で若い人を育てていくというのも大切ですね。

米山 学会の懇親会にも出ましょう。

土屋 そうすると、周りの方々に理解していただけてよいかもしれません。

堤 アメリカの学会では本当に学生を大事にする部会がたくさんあります。論文の書き方の講習とか、もちろん就職相談のコーナーもあります。

明石 バイオマテリアル学会も落ちてきたようなので、若手の育成というのを次期は入れていただいたらどうですか。

米山 本誌24巻3号(2006年5月号)に若手の特集が組まれておりますので、是非そちらも参考にさせていただいて、バイオマテリアルの未来を背負う人材がますます育っていくように、学会をあげて取り組みましょう。

本日は貴重なお話をいただき、ありがとうございました。

ORIGINAL ARTICLE

Nasreen Banu, MD · Yasmin Banu, MD, PhD
Masamune Sakai, BSc · Tadahiko Mashino, PhD
Toshie Tsuchiya, PhD

Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes

Abstract The aim of this study was to evaluate the potential role of polyglycolic acid (PGA), poly(glycolic acid- ϵ -caprolactone) (PGCL), poly(L-lactic acid-glycolic acid) (PLGA), poly(L-lactic acid- ϵ -caprolactone, 75:25 (w/w)) [P(LA-CL)25], poly- ϵ -caprolactone (tetrabutoxy titanium) [PCL(Ti)], and fullerene C-60 dimalononic acid (DMA) in cartilage transplants. After 4 weeks of culture of human articular cartilage, the levels of cell proliferation and differentiation and the expression of cartilage-specific matrix genes were estimated. The relationship between cell differentiation and gap junction protein connexin 43 (Cx43) was also evaluated. All materials except PCL(Ti) retained cell proliferation activities similar to the controls. Cell differentiation levels from the highest to the lowest were in the following order: PGA >> PLGA > PGCL > Control = DMSO > P(LA-CL)25 = PCL(Ti) >> fullerene C-60 DMA. Expression of the collagen type II gene was selectively upregulated for PGA, PGCL, and PLGA and slightly increased for P(LA-CL)25 polymers but was downregulated for fullerene C-60 DMA. Aggrecan gene expression was strongest with PGA and was consistently expressed with other matrices, especially with PGCL and PLGA. However, the expression patterns of the connexin 43 gene were different from the former two genes. Multiple regression analysis revealed a high correlation between cartilage proteoglycans production and expression levels of these three genes.

Key words Human articular chondrocytes · Biodegradable polymers · Matrix gene · Connexin 43

Introduction

A shortage of donor tissue restricts the successful application of tissue reconstruction for various cartilage injuries. Tissue engineering is a relatively new and promising field directed at the evolution of new tissues that will offer hope to orthopedic patients with a variety of injuries. To permit repair of cartilage defects, many researchers are turning toward a tissue engineering approach involving cultured cells and biomaterials. Although these biomaterials, especially polyglycolic acid (PGA) and poly(L-lactic acid) (PLLA), play an increasingly important role in orthopedics, adverse reactions to these biomaterials have been reported in animal experiments. PLLA produces toxic substances due to acidic degradation,¹ and long-term implants of PLLA produced tumorigenicity in rats.² Despite these setbacks, numerous studies have documented the biocompatibility of these bioabsorbable polymers.^{3–7} PLLA, PGA, and their copolymers also have been used in clinical practice.^{5,8} More recent studies have indicated that copolymers of glycolic acid promoted peripheral nerve regeneration in a rat model.^{9,10} These polymers are degraded by hydrolysis and enzymatic activity and have a range of mechanical and physical properties that can be engineered appropriately to suit a particular application.

Knowledge of the biological interactions between chondrocytes and biodegradable polymers is needed to design novel biomaterials and to develop new strategies for cartilage repair. Therefore, further experimental elucidation of these polymers, their combination with other biomaterials, and new materials to find good substrates is essential to attain satisfactory conditions for their clinical application. In this study, along with PGA and poly(L-lactic acid-glycolic acid) (PLGA), we investigated the copolymer poly(glycolic acid- ϵ -caprolactone) (PGCL), the copolymer poly(L-lactic acid- ϵ -caprolactone) 75:25 (w/w) P(LA-

Received: February 2, 2005 / Accepted: June 8, 2005

N. Banu · Y. Banu · T. Tsuchiya (✉)
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,
1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
Tel. +81-3-3700-9196; Fax +81-3-3700-9196
E-mail: tsuchiya@nihs.go.jp

M. Sakai
Polymer Laboratory, UBE Industries, Ltd., Chiba, Japan

T. Mashino
Kyoritsu University of Pharmacy, Tokyo, Japan

The first two authors contributed equally to this work

CL)25, and poly- ϵ -caprolactone (tetrabutoxy titanium [PCL(Ti)]) to determine their effects on human articular chondrocyte (HAC) proliferation, differentiation, and phenotypic expression with the aim of clarifying their suitability as carriers for future clinical cartilage transplants. Fullerene C-60 dimalonic acid (DMA) has been reported to stimulate¹¹ and inhibit¹² proliferation and differentiation of rat embryonic limb bud cells and mouse embryo midbrain cells, respectively, and in the present study we also investigated the effect of fullerene C-60 DMA on HACs.

Gap junctions are intercellular channels supporting direct cell-to-cell communication and tissue integration.¹³ Connexins, the family of proteins that form vertebrate gap junctions, play key roles during development and in the adult. Among the 19 connexins that have been identified in mammals, the gap junction protein connexin 43 (Cx43) is the most abundant member of the channel-forming proteins in chondrocytes.^{14,15} The distribution of Cx43 in hyaline cartilage and in the perichondrium of mouse and rat knee joints suggested a possible involvement of connexins in cartilage development.¹⁶ It has been indicated that the early stage of in vitro chondrocyte differentiation is the formation of cell condensations and the ability to establish cell-to-cell communication. Cx43, together with other molecular mechanisms, mediates the condensation phase of chondrogenesis.¹⁷ In the present study, we investigated the role of gap junctional protein Cx43 in the process of chondrocyte differentiation.

Materials and methods

Materials

HACs from knee joints and chondrocyte growth medium were commercially obtained from BioWhittaker (Walkersville, MD, USA). Chondrocyte growth medium contains bovine insulin, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1, transferrin, gentamicin sulfate, and fetal bovine serum (5% v/v). PGA (mw 3000) and PLGA (mw 5000) were purchased from Nakalai Tesque (Kyoto, Japan) and PGCL (mw 3000) was from Taki Chemical (Hyogo, Japan). P(LA-CL)25 (mw 10000) and PCL(Ti) (mw 130000) were synthesized in our laboratory and fullerene C-60 DMA was obtained from Dr. T. Mashino.¹⁸

Synthesis of P(LA-CL)25

L-Lactide (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japan) 7.5g and caprolactone (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 2.5g were put into a reactor as monomers. As a catalyst, tetrabutoxy titanium (Wako) 0.03g was added. Furthermore, *n*-octyl alcohol (Wako) 0.001g was added. These were completely dissolved in methylene chloride (Wako) 50mL at room temperature. Methylene chloride was removed by decompression and a uniform mixture was left. The reactor was filled with nitrogen and was sealed. The contents were mixed and heated to 140°C. Polymeriza-

tion was carried out for 4h. After the reaction, the reactant was cooled to room temperature, and was dissolved in tetrahydrofuran 100mL. The solution was dropped into cold methanol and a colorless precipitate was obtained. This was dried under reduced pressure and precipitation was done once again. This was again dried under reduced pressure and the polymer was obtained. The yield was 58.2% (5.82g).

Synthesis of PCL(Ti)

Synthesis was done using the same method as described for the synthesis of P(LA-CL)25 except that the monomer was only caprolactone (Wako). The yield was 87.1% (8.71g).

Preparation of materials

PGA, PGCL, PLGA, and P(LA-CL)25 were dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) at a concentration of 50 μ g/0.8 μ l of DMSO (Sigma-Aldrich, Irvine, CA, USA) and then dissolved in chondrocyte growth medium to give a final concentration of 50 μ g/ml. PCL(Ti) was dissolved in tetrahydrofuran (THF) at a concentration of 5mg of PCL/ml of THF. Glass wells were coated with this solution to give a final concentration of 2mg PCL(Ti)/well. A homogenous solution of fullerene C-60 DMA was made with the chondrocyte growth medium.

Cell culture

In vitro high-density micromass cultures of HACs were initiated by spotting 4×10^5 cells in 20 μ l of medium onto each well of 12-well microplates for tissue culture (Costar Type 3513, Corning, Corning, NY, USA) and PCL(Ti)-coated glass wells (diameter 22mm). After 2h in a 5% CO₂ incubator at 37°C, the wells were flooded with chondrocyte growth medium (2ml/well). The medium was supplemented with DMSO (0.8 μ l/ml), PGA (50 μ g/ml), PGCL (50 μ g/ml), PLGA (50 μ g/ml), P(LA-CL)25 (50 μ g/ml), or fullerene C60 DMA (50 μ g/ml). HACs cultured on tissue culture polystyrene but not exposed to any biomaterials served as a control. The media were changed in every 3 days and culture was continued for 4 weeks.

Cell morphology assay

Cell morphology was determined by inverted light microscopy. Twice weekly observations were done and photographs were taken with Fuji film.

Proliferation assay

Cell proliferation was quantitatively measured by alamar blue (Biosource International, Camarillo, CA, USA) assay after 4 weeks of culture, as previously described.¹⁸ The assay

demonstrates the metabolic activity of the cells by detection of mitochondrial activity. The indicator dye alamar blue is incorporated into the cells and reduced and excreted as a fluorescent product. At the end of the 4-week culture period, the medium from all wells was discarded and the culture wells and three blank wells were filled with 1 ml/well of 5% alamar blue solution in fresh medium. The culture plates were incubated at 37°C for 4h. After the incubation period, two aliquots of 100 µl of solution from each well were transferred to new wells of a Costar 96-well tissue culture microplate (Costar Type 3595, Corning). The extent of cell proliferation was quantitated by a Cytofluor II fluorescence multiwell cell reader (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) at 535 nm for excitation and 590 nm for emission. The intensity of the blue color obtained was directly proportional to the metabolic activity of the cell populations. Blank values were subtracted from experimental values to eliminate background readings.

Proteoglycan production assay

Proteoglycans are typical components of the cartilage matrix. The extent of chondrogenesis was determined by staining the cartilage-specific proteoglycans with alcian blue (Wako) as described previously.^{11,19} Briefly, the cultures and three blank wells were stained overnight at 4°C (0.5 ml/well) with 1% (v/v) alcian blue, pH 1.0. The alcian blue solution was then removed and the micromass cultures and blank wells were rinsed with 3% (v/v) acetic acid and distilled water to completely remove the free dye. The cartilage proteoglycans were extracted using 4-M guanidine hydrochloride, and the absorbance was measured at a wavelength of 600 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). Blank values were subtracted from experimental values to eliminate background readings.

RNA harvest

After the 4-week culture period, RNA was extracted from all matrices except the PCL(Ti) matrix. For the PCL(Ti) matrix, we did not have enough samples to harvest RNA because cells from 50% of the cultured wells became detached overnight following cell spotting. Total cellular RNA was extracted from cultured cells of four wells (for each material) in 0.5 ml Trizol reagent (Life Technologies, Frederick, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. The concentration of total RNA was determined using a UV spectrophotometer (Gene Quanta, Pharmacy Biotech, Piscataway NJ, USA) at 260 nm.

Reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR)

The matrix molecules probed as part of this study were collagen type II and aggrecan. The gap junction protein

gene Cx43 was also studied. Single-strand cDNA was prepared from 1 µg of total RNA by reverse transcription (RT) using a commercially available First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After optimization of PCR conditions, subsequent PCR was performed with 4 µg of cDNA in a 20-µl reaction mixture (10 × PCR buffer 2 µl, dNTP 1.6 µl, forward and reverse primer 0.4 µl, Taq DNA polymerase 0.1 µl, and distilled water to make up 20 µl). The codon sequence used for the primer sets was as follows:

Collagen type II:

forward 5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3'
reverse 5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'

Aggrecan:

forward 5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3'
reverse 5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'

Connexin 43 (*Homo sapiens*):

forward 5'-ATGGGTGACTGGAGCGCCTTAGGCAA
ACTC-3'
reverse 5'-GACCTCGGCCTGATGACCTGGAGATC
TAG-3'

For collagen type II and Cx43, an initial denaturation step at 94°C was carried out for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 10 min. For aggrecan, an initial denaturation at 95°C was carried out for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension at 72°C for 5 min. The polymerization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was accomplished by 25 cycles with a corresponding PCR program. Electrophoresis of PCR products was done on 3% agarose gel for visualization of collagen type II and aggrecan and on 1% agarose gel for Cx43 after staining with SYBR Green I (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA). The relative intensity of signals from each lane was analyzed with a computerized scanner. For relative quantitation, the signal intensity of each lane was standardized to that of a housekeeping gene, GAPDH:

forward 5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA-
3'
reverse 5'-TGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTTG
G-3'.

Statistical analysis

Comparing the control with samples exposed to various materials assessed the statistical significance of the cell proliferation and cartilage proteoglycans production. Student's *t* test was used to assess the statistical significance. Statistical significance was taken as $P < 0.05$. Data were indicated as the mean ± SD (standard deviation). Four or five cultures were run for each biomaterial. All experiments were repeated at least twice, and similar results were obtained.

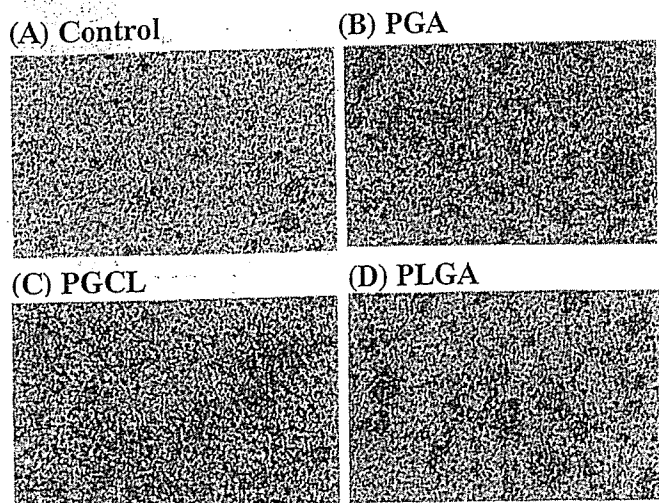


Fig. 1A-D. Light microscopic appearance of cultured human articular chondrocytes spotted as a high-density micromass culture with different biodegradable polymers for 4 weeks. A Control, B polyglycolic acid (PGA), C poly(glycolic acid-ε-caprolactone) (PGCL), D poly(L-lactic acid-glycolic acid) (PLGA). Original magnification $\times 200$

Results

Cell morphology

Cells were aggregated as high-density micromass cultures 2h after cell spotting. After 4 weeks of culture, the chondrocytes mainly formed a uniform sheet of chondrogenic cells with nodules. The cartilage nodules were first observed in the first week of the culture. These nodules were better visualized by staining the proteoglycans with alcian blue after 4 weeks of culture. The control cells showed less nodule formation and they were poorly defined (Fig. 1A). The cultures exposed to the PGA and PLGA had more distinct nodules and greater numbers of nodule formations than the controls (Figs. 1B and 1D). The nodules formed in the culture exposed to PGCL were less distinct and fewer in number than the nodules in the cultures exposed to PGA and PLGA, but were more distinct and numerous than the nodules of the control cultures (Fig. 1C). After alcian blue staining, light microscopic examination also revealed that PGA-, PGCL-, and PLGA-treated cultures contained denser extracellular matrix (ECM) than the controls. Cells extended from the edge of all micromass cultures, and the extending cells were spindle-shaped.

Cell proliferation assay

The proliferation rates of all the matrices are shown in Fig. 2, with error bars representing the standard deviation of the mean. All values for the samples exposed to the biomaterials were expressed as a percentage of the control average value, which was taken as 100%. The effect of DMSO on cell proliferation was not significant ($99.3\% \pm 1.6\%$). The cell proliferations for PGA, PGCL, and PLGA

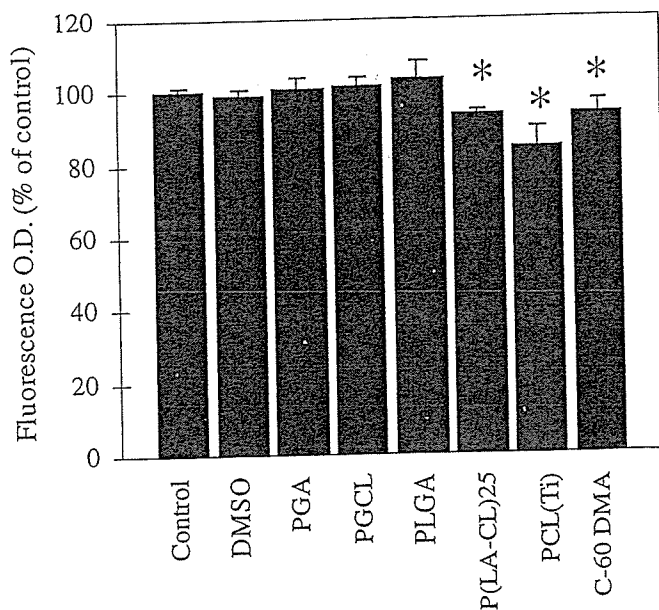


Fig. 2. Cell proliferation of human articular chondrocytes as determined by alamar blue assay after culturing with synthetic biodegradable polymers for 4 weeks. The proliferation in all samples exposed to dimethyl sulfoxide (DMSO) and biomaterials were calculated as a percentage of control values. P(LA-CL)25, poly(L-lactic acid-ε-caprolactone) 75:25 (w/w); PCL(Ti), poly-ε-caprolactone (tetrabutoxy titanium); C-60 DMA, fullerene C-60 dimalonic acid. * $P < 0.05$ and error bars represent standard deviations of the mean

were fairly parallel to that of control cell proliferation. The cell proliferation for P(LA-CL)25, PCL(Ti), and fullerene C-60 DMA were significantly inhibited compared to the control. The inhibitions for P(LA-CL)25 and fullerene C-60 DMA were mainly due to the small variation of the standard deviation. Despite being significantly different from the control, both proliferation values were fairly close to the control proliferation value.

Therefore, from the standpoint of cell proliferation, all materials except for PCL(Ti) remained viable candidates for tissue engineering. The values of cell proliferation for the samples exposed to PGA, PGCL, PLGA, P(LA-CL)25, PCL(Ti), and fullerene C-60 DMA were $101.6\% \pm 2.2\%$, $101.6\% \pm 2.2\%$, $103.5\% \pm 4.8\%$, $93.2\% \pm 1.4\%$, $84.3\% \pm 5.1\%$, and $93.6\% \pm 3.7\%$, respectively.

Proteoglycan synthesis

The proteoglycans bound with alcian blue were extracted with 4-M guanidine hydrochloride. Their levels were expressed as a percentage of the average control value, which was taken as 100% (Fig. 3). The intensity of alcian blue staining was found to be higher in PGA-, PGCL-, and PLGA-containing cultures than in the control culture. Among the biomaterials, PGA caused a significant 3.1-fold increase in cartilage proteoglycans compared to the control ($P < 0.05$). The samples exposed to PGCL ($116.2\% \pm 10.1\%$) and PLGA ($128.4\% \pm 11.1\%$) also produced

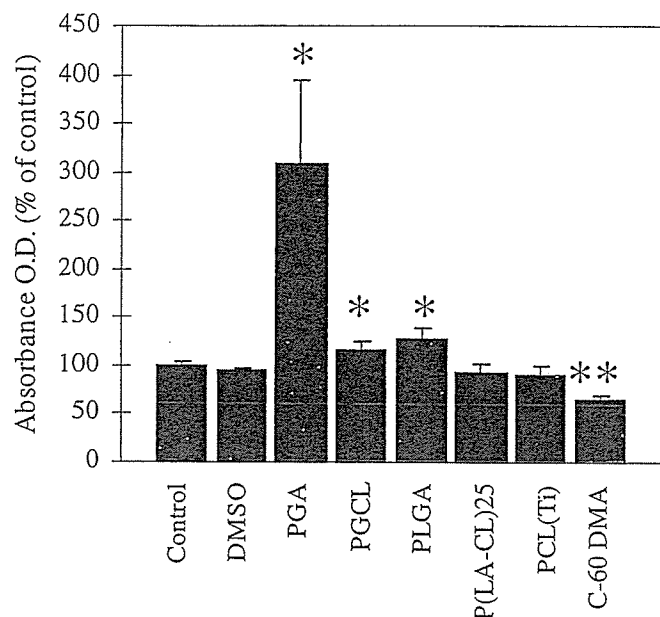


Fig. 3. Cartilage proteoglycan content of human articular chondrocytes as determined by the alcian blue staining method after culturing with synthetic biodegradable polymers for 4 weeks. The values are expressed as a percentage of control values. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

significantly higher cartilage proteoglycans than the control. Copolymers P(LA-CL)25 ($92.7\% \pm 10.5\%$) and PCL(Ti) ($90.8\% \pm 9.1\%$) did not induce significant changes in cartilage proteoglycans compared to the control. Fullerene C60 DMA acted as a potent inhibitor ($66.1\% \pm 4.7\%$) and caused a significant inhibition of cartilage proteoglycans ($P < 0.01$) compared to the control. The effect of DMSO ($96\% \pm 1.1\%$) on cell differentiation was negligible.

Extracellular matrix gene expression

RT-PCR and corresponding National Institutes of Health (NIH) image analysis showed that all matrices consistently supported the expression of the collagen type II gene and that the PGA matrix had the strongest induction (Fig. 4). Slight increases in expression of the collagen type II gene were noted with PGCL, PLGA, and P(LA-CL)25 matrices. Expression of the collagen type II gene for fullerene C60 DMA was similar to the control. The PGA matrix also showed the strongest induction of the aggrecan gene (Fig. 5). Aggrecan gene expression was slightly increased in PGCL and PLGA matrices. The P(LA-CL)25 matrix caused an expression of this gene similar to that of the control, but the fullerene C60 DMA matrix caused decreased expression of this gene.

Expression of gap junction protein connexin 43 gene

To determine the expression of gap junctions during in vitro chondrocyte differentiation, RT-PCR and corresponding

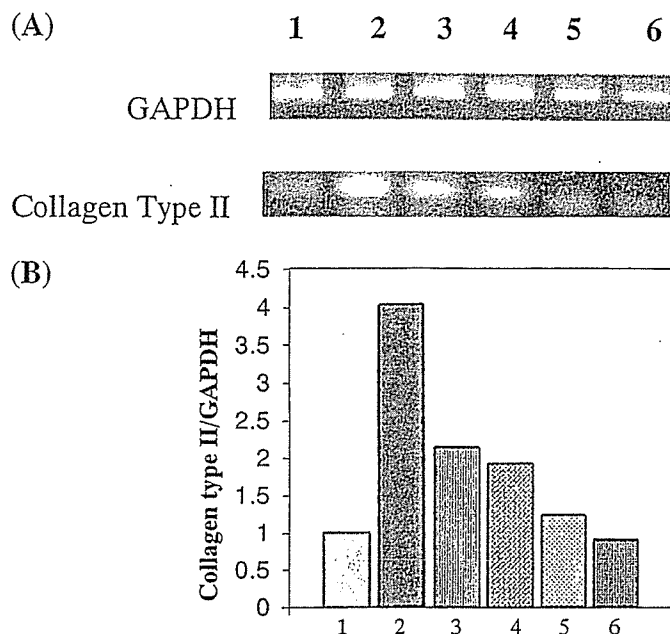


Fig. 4. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis (A) and National Institutes of Health (NIH) image analysis quantitation of RT-PCR bands (B). In both figures, the level of collagen type-II gene expression was represented by the mRNA level of 4-week cultured human articular chondrocytes treated with different types of biodegradable polymers. The mRNA expression of house-keeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was used for comparing the level of expression. **A** Lane 1, Control; lane 2, PGA; lane 3, PGCL; lane 4, PLGA; lane 5, P(LA-CL)25; lane 6, Fullerene C-60 DMA. **B** Bar 1, Control; bar 2, PGA; bar 3, PGCL; bar 4, PLGA; bar 5, P(LA-CL)25; bar 6, Fullerene C-60 DMA

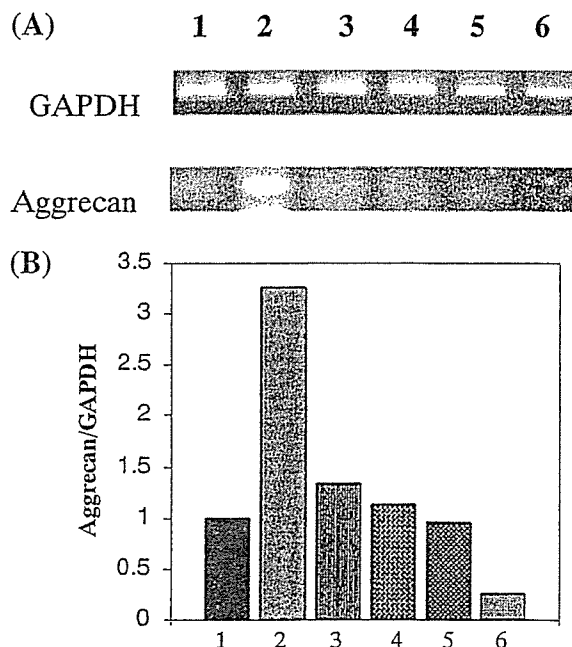


Fig. 5. RT-PCR analysis (A) and National Institutes of Health (NIH) image analysis quantitation of RT-PCR bands (B). In both figures, the level of aggrecan gene expression was represented by the mRNA level of 4-week cultured human articular chondrocytes treated with different types of biodegradable polymers. The mRNA expression of house-keeping gene *GAPDH* was used for comparing the levels of expression. Lanes and bars as defined in Fig. 4

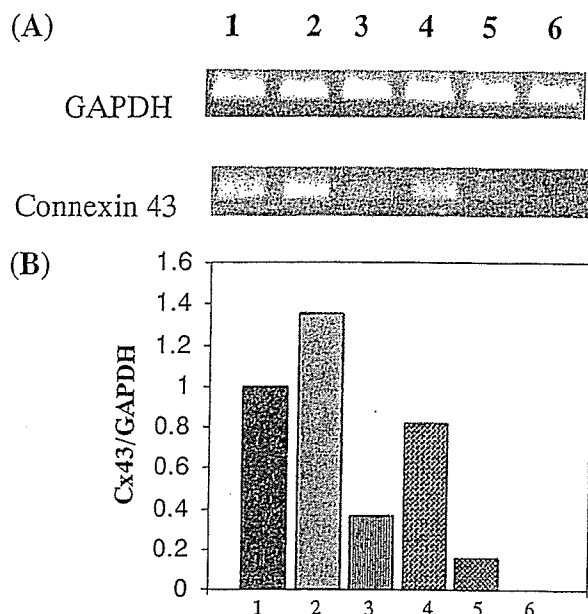


Fig. 6. RT-PCR analysis (A) and National Institutes of Health (NIH) image analysis quantitation of RT-PCR bands (B). In both figures, the level of connexin 43 gene expression was represented by the mRNA level of 4-week cultured human articular chondrocytes treated with different types of biodegradable polymers. The expression of GAPDH mRNA was used as an internal control. *Lanes and bars* as defined in Fig. 4

NIH image analysis was performed with connexin 43 in 4-week cultured human articular chondrocytes treated with various biodegradable biomaterials. Cx43 expression was normalized by comparison to the expression of GAPDH. Figure 6 shows that PGA induced the highest level of Cx43 mRNA expression, and a decreased level of expression was noted in the PLGA- and PGCL-treated cultures. A faint expression for P(LA-CL)25- and almost zero expression for fullerene C-60 DMA-treated cultures were observed.

Multiple regression analysis

Using multiple regression analysis, the correlation was investigated between cartilage proteoglycan production by the alcian blue method and the three gene expression levels. There was a high correlation between cartilage proteoglycan production and the three gene expression levels (data not shown).

Discussion

The evolution of new biodegradable polymers has drawn much attention in recent years, mainly because of growing application in clinical use. PCL is being utilized for biomedical applications such as controlled drug delivery systems²⁰ and also as surgical implants in rabbits.²¹ Just as for PGA and PLLA, PCL degrades to a naturally occurring metabo-

lite, 6-hydroxyhexanoic acid. To date, research to improve materials and the bioactivity of materials for tissue engineering has centered on PGA and PLLA; however, a short resorption time and low strength characteristics are two major drawbacks of these biodegradable materials. To widen the spectrum of biomaterial choices in tissue engineering, we investigated a copolymer of PGA and PCL, namely, PGCL, and copolymers of PLLA and PCL namely, P(LA-CL)25, PCL(Ti), and fullerene C60 DMA. To compare the bioactivity of these materials with commonly used materials, PGA and PLGA were included in this study. We also included PCL(Sn), synthesized using stannous 2-ethyl hexanoate as the catalyst, in our initial study, but following overnight culture after cell spotting, the cells were detached as a white condensed mass from 15 of 16 PCL(Sn)-coated glass wells in repeated studies. Therefore, PCL(Sn) was excluded from this study. Cells were also detached from 8 (50%) of a total of 16 glass wells coated with PCL(Ti). Thus, both PCL(Ti) and PCL(Sn) matrices were harmful to the cell attachment process. Decreased attachment of human articular chondrocytes with PCL matrix was previously reported.²² After culture periods of 4 weeks, cell proliferation was significantly inhibited by the PCL(Ti) matrix, and together with its poor cell attachment ability, this ruled out PCL(Ti) as a matrix for future chondrocyte culture. The significant inhibition of cell proliferation by P(LA-CL)25 and fullerene C60 DMA matrices was a result of their narrow range of standard deviation, but, with proliferation levels of 93% of that for the control, they remain feasible candidates for tissue engineering biomaterials. Other matrices had comparable cell proliferation to the control.

During differentiation, chondrocytes secrete extracellular matrix (ECM) molecules characteristic of cartilage, such as type II collagen, aggrecan, and link protein, offering an environment that preserves the chondrocyte phenotype. Therefore, chondrocytes are defined both by their morphology and their ability to produce these characteristic ECM molecules. Collagen type II is regarded as the most important component among the ECM molecules. Previous study detected type II collagen as early as 7 days after beginning 3-D culture, and at 21 days, the matrix of the entire aggregate contained type II collagen.²³ Among the ECM molecules, aggrecan is a major proteoglycan.²⁴ It has been reported that in chick cartilage, aggrecan expression starts at embryonic day 5 in limb rudiments, continues through the entire period of chondrocyte development, and remains a biochemical marker of the cartilage phenotype thereafter.²⁵

In this study, we demonstrated good cell differentiation with the formation of cartilaginous nodules on culture plates by alcian blue staining, which is commonly used for identification of cartilage, and by expression of ECM molecules collagen type II and aggrecan. The morphology after the designated culture period revealed that cells aggregated on the culture plate and formed cartilaginous nodules (Fig. 1). These nodules were first observed after 1 week of culture and progressively became denser as culture continued. These nodules contained copious amounts of ECM, which became stained intensely with alcian blue. The greatest cell

differentiation, a 3.1-fold increase of that of the controls, was found in the sample treated with PGA. The potencies of cell differentiation after 4 weeks of culture from the highest to the lowest were in the following order: PGA >> PLGA > PGCL > Control = DMSO > P(LA-CL)25 = PCL(Ti) >> fullerene C60 DMA. The increased cell differentiation with PGA and PLGA matrices are in agreement with our previous findings in a micromass culture system;¹⁹ however, in our present study we included the matrix gene expression of these materials. The cell differentiation findings of PCL(Ti) and copolymers PGCL and P(LA-CL)25 could not be compared with other studies because we found no reports describing the effects of PCL and its associated polymers on chondrocyte differentiation. The recent discovery that fullerene C60 DMA can be produced in macroscopic quantities has sparked much interest in the chemistry of this unusual molecule, which did not cause acute toxic effects on mouse skin epidermis.²⁶ Increased cell proliferation and differentiation of rat embryonic limb bud cells by fullerene C60 were reported,¹¹ but the data of the present study showed that fullerene C60 DMA acted as a potent inhibitor of HAC differentiation.

As tissue engineering becomes increasingly complex, there is a need to understand how a specific biomaterial influences gene expression. Therefore, the matrices used in this study were evaluated with respect to their influence on the expression of collagen type II and aggrecan genes (Figs. 4 and 5). The increased expression of collagen type II and aggrecan genes in the PGA-, PGCL-, and PLGA-treated matrices was well correlated with their elevated level of cell differentiation values, as shown by alcian blue staining. The low expression of collagen type II and aggrecan genes in the fullerene C60 DMA-treated matrix paralleled the decreased level of cell differentiation, as shown by alcian blue. Therefore, low cell proliferation and differentiation values along with almost no expression of collagen type II and aggrecan genes in the fullerene C60 DMA-treated matrix completely exclude this matrix from use in ECM tissue engineering. The expression of collagen type II and aggrecan genes in the P(LA-CL)25-treated culture was consistent with its cell differentiation value. The data from this study showed that cultured chondrocytes also retained their phenotype throughout the experimental period, as indicated by expression of the type II collagen gene (Fig. 4A, 4B). To the best of our knowledge, this study is the first to show the bioactivity of PCL(Ti) and copolymers PGCL and P(LA-CL)25 in chondrogenic differentiation of HAC in a micromass culture system. Further, we know of no studies that have evaluated the matrix gene expression for PGA and PLGA matrices using HAC in a micromass culture system. Results of the present study confirmed PGA, PLGA, and PGCL as useful scaffolding matrices for cartilage tissue engineering, and information about the other matrices will further contribute to the development of improved cartilaginous constructs for future clinical implants.

The progression of chondrogenic differentiation can be followed by the expression of markers of cytodifferentiation. For example, precartilaginous condensations express type I collagen,²⁷ whereas the next phase of cartilage dif-

ferentiation involves the expression of type II collagen, aggrecan, and link proteins, which form the cartilage matrix.²⁸ The mechanism of precartilaginous condensation is poorly understood, but cell-cell interactions are putative effectors for chondrocyte aggregation.²⁹ Chondrocytes in the primary culture can proceed through the same differentiation program as they do in the cartilaginous angle of the long bone, and the earliest morphological event on the way to overt differentiation is the formation of cell condensation.¹⁷ The observed expression of Cx43 suggested that the process of condensation is in part caused by the interconnection of cells by means of gap junctions.¹³ In this study, RT-PCR analysis showed that the mRNA level of Cx43 gene expression was consistent with chondrogenic differentiation in the presence of different biomaterials. Our findings on Cx43 expression by chondrocytes are in agreement with a previous study that reported expression of functional gap junctions by chondrocytes isolated from adult articular cartilage.³⁰ Gap junction-mediated intercellular communication is critically involved in the development of cartilage during differentiation.³¹

Conclusions

The analysis of three set of genes, namely collagen type II, aggrecan, and Cx43 was important to evaluate the effect of biodegradable polymers and other types of cartilaginous scaffolds on the chondrogenesis of HAC for tissue engineering.

Acknowledgments We are grateful for the support of Health and Labour Sciences Research Grants, and support from Research on Advanced Medical Technology, Ministry of Health, Labour and Welfare, and the Japan Health Sciences Foundation.

References

1. Taylor MS, Daniels AU, Andriano KP, Heller J. Six bioabsorbable polymers: in vitro acute toxicity of accumulated degradation products. *J Appl Biomater* 1994;5:151-157
2. Nakamura T, Shimizu Y, Okumura N, Matsui T, Hyon SH, Shimamoto T. Tumorigenicity of poly-L-lactide (PLLA) plates compared with medical-grade polyethylene. *J Biomed Mater Res* 1994;28:17-25
3. Matsusue Y, Yamamuro T, Oka M, Shikunami Y, Hyon SH, Ikada Y. In vitro and in vivo studies on bioabsorbable ultra-high-strength poly (L-lactide) rods. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1553-1567
4. Furukawa T, Matsusue Y, Yasunaga T, Shikunami Y, Okuno M, Nakamura T. Biodegradation behavior of ultra-high-strength hydroxyapatite/poly (L-lactide) composite rods for internal fixation of bone fractures. *Biomaterials* 2000;21:889-898
5. Hope PG, Williamson DM, Coates CJ, Cole WG. Biodegradable pin fixation of elbow fractures in children. *J Bone Joint Surg* 1991;73:965-968
6. Kleinschmidt J, Marden L, Kent D, Quigley N, Hollinger J. A multiphase system bone implant for regenerating the calvaria. *J Plast Reconstr Surg* 1993;91:581-588
7. Hollinger JO. Preliminary report on the osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mater Res* 1983;17:71-82

8. Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. Bioabsorbable osteosynthetic implants of ultra-high-strength poly-L-lactide. A clinical study. *Int Orthop* 1996;20:392-394
9. Evans GR, Brandt K, Widmer MS, Lu L, Meszlenyi RK, Gupta PK, Mikos AG, Hodges J, Williams J, Gurlek A, Nabawi A, Lohman R, Patrick CW Jr. In vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* 1999;20:1109-1115
10. Hadlock T, Sundback C, Hunter D, Cheney M, Vacanti JP. A polymer foam conduit seeded with Schwann cells promotes guided peripheral nerve regeneration. *Tissue Eng* 2000;6:119-127
11. Tsuchiya T, Yamakoshi YN, Miyata N. A novel promoting action of fullerene C60 on the chondrogenesis in rat embryonic limb bud cell culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;206:885-894
12. Tsuchiya T, Oguri I, Yamakoshi YN, Miyata N. Novel harmful effects of [60] fullerene on mouse embryos in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 1996;393:139-145
13. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. *Cell* 1996;84:381-388
14. Solursh M, Linsenmeyer TF, Jensen KL. Chondrogenesis from single limb mesenchyme cells. *Dev Biol* 1982;94:259-262
15. Willecke K, Hennemann H, Dahl E, Jungbluth S, Heynkes R. The diversity of connexin genes encoding gap junctional proteins. *Eur J Cell Biol* 1991;56:1-7
16. Schwab W, Hofer A, Kasper M. Immunohistochemical distribution of connexin 43 in the cartilage of rats and mice. *Histochem J* 1998;30:413-419
17. Loty S, Foll C, Forest N, Sautier JM. Association of enhanced expression of gap junctions with in vitro chondrogenic differentiation of rat nasal septal cartilage-released cells following their dedifferentiation and redifferentiation. *Arch Oral Biol* 2000;45:843-856
18. Okuda K, Hirota M, Hirobe T, Nagano M, Mochizuki M, Mashino T. Synthesis of various water-soluble C60 derivatives and their superoxide-quenching activity. *Fullerene Sci Tech* 2000;8:89-104
19. Rahman MS, Tsuchiya T. Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers. *Tissue Eng* 2001;7:781-790
20. Hombreiro PM, Zinutti C, Lamprecht A, Ubrich N, Astier A, Hoffman M, Bodmeier R, Maincent P. The preparation and evaluation of poly (epsilon-caprolactone) microparticles containing both a lipophilic and a hydrophilic drug. *J Control Release* 2000;65:429-438
21. Lowry KJ, Hamson KR, Bear L, Peng YB, Calaluce R, Evans ML, Allen WC. Polycaprolactone/glass bioabsorbable implant in a rabbit humerus fracture model *J Biomed Mater Res* 1997;36:536-541
22. Ishaug-Riley SL, Okun LE, Prado G, Applegate MA, Ratcliffe A. Human articular chondrocyte adhesion and proliferation on synthetic biodegradable polymer films. *Biomaterials* 1999;20:2245-2256
23. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;23:265-272
24. Watanabe H, Yamada Y, Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem (Tokyo)* 1998;124:687-693
25. Schwartz NB, Domowicz M, Krueger RC Jr, Li H, Mangoura D. Brain aggrecan. *Perspect Dev Neurobiol* 1996;3:291-306
26. Nelson MA, Domann FE, Bowden GT, Hooser SB, Fernando Q, Carter DE. Effects of acute and subchronic exposure of topically applied fullerene extracts on the mouse skin. *Toxicol Ind Health* 1993;9:623-630
27. Langille RM, Solursh M. Formation of chondrous and osseous tissues in micromass cultures of rat frontonasal and mandibular ectomesenchyme. *Differentiation* 1990;44:197-206
28. Kosher RA, Gay SW, Kamanitz JR, Kulyk WM, Rodgers BJ, Sai S, Tanaka T, Tanzer ML. Cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb cartilage differentiation. *Dev Biol* 1986;118:112-117
29. Frenz DA, Jaikaria NS, Newman SA. The mechanism of precartilage mesenchymal condensation: a major role for interaction of the cell surface with the amino-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Dev Biol* 1989;136:97-103
30. Donahue HJ, Guilak F, Vander Molen MA, McLeod KJ, Rubin CT, Grande DA, Brink PR. Chondrocytes isolated from mature articular cartilage retain the capacity to form functional gap junctions. *J Bone Miner Res* 1995;10:1359-1364
31. Coelho CN, Kosher RA. Gap junctional communication during limb cartilage differentiation. *Dev Biol* 1991;144:47-53



Osteoblast Differentiation and Apatite Formation on Gamma-Irradiated PLLA Sheets

Kazuo Isama^a and Toshie Tsuchiya^b

Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
^aisama@nihs.go.jp, ^btsuchiya@nihs.go.jp

Keywords: Poly(L-lactide), gamma-ray irradiation, osteoblast differentiation, apatite formation.

Abstract. The effects of the γ -irradiated PLLA on the osteoblasts and apatite formation were investigated *in vitro*. The PLLA sheet was γ -ray irradiated at the dose of 10, 25 or 50 kGy. The mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells and normal human osteoblast NHOst cells were micromass cultured on the PLLA sheet for 2 weeks, and then the proliferation and differentiation of the cells were determined. The proliferations of MC3T3-E1 and NHOst cells hardly changed with increasing irradiation dose. However, the differentiations of MC3T3-E1 and NHOst cells increased with irradiation dose. On the other hand, the surface of the PLLA sheet after soaking in the medium without the cells was characterized by SEM, EDX, FT-IR and XPS. The hydroxyapatite was formed on the surface of the PLLA sheet after soaking, and the amount of hydroxyapatite increased with irradiation dose. In summary, the γ -irradiated PLLA increased the differentiation of osteoblasts and also increased apatite-forming ability even without the osteoblasts. The osteoblast differentiation was enhanced well in the apatite formation on the surface of PLLA after the γ -irradiation.

Introduction

Poly(L-lactide) (PLLA) has been well reported on a good osteocompatibility *in vivo* and *in vitro*. The γ -ray sterilized PLLA sample was implanted *in vivo*, and newly bone was formed around the PLLA implant [1]. It was not clear whether there was the effect of γ -irradiation on the formation of newly bone in this result. However, it was the fact that γ -irradiation decreased the molecular weight and mechanical strength of PLLA [2]. On the other hand, PLLA fibers formed bone-like apatite in a simulated body fluid [3]. It was reported that the apatite layer formed on the bioactive glass increased the attachment and initial proliferation of osteoblasts [4]. If the apatite-forming ability of PLLA is increased by γ -irradiation, there may be a good influence on osteoblasts cultured on the irradiated PLLA. Therefore, we clarified the effects of the γ -irradiated PLLA sheet on the osteoblasts and apatite formation *in vitro*.

Materials and Methods

Materials. PLLA sheet with 0.3 mm thickness (Shimadzu Co., Japan) was γ -ray irradiated at the dose of 10, 25 or 50 kGy using ⁶⁰Co as the radiation source. The weight average molecular weight (Mw) of the unirradiated PLLA was 271,000 and the Mw's of the irradiated PLLA's at the dose