

Fig.4-1 コラーゲンコートディッシュ
光学顕微鏡像：×200

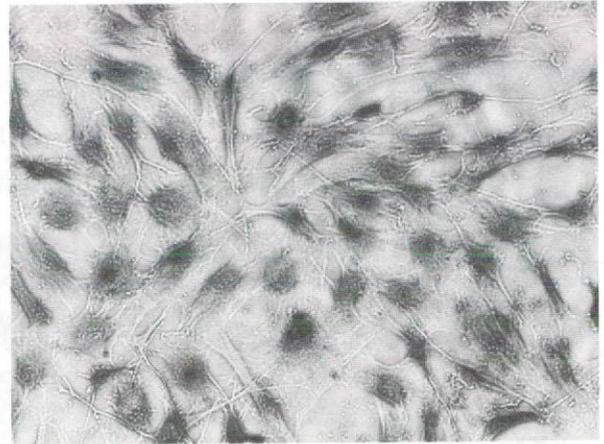


Fig.4-2 MWCNT コートディッシュ
光学顕微鏡像：×200

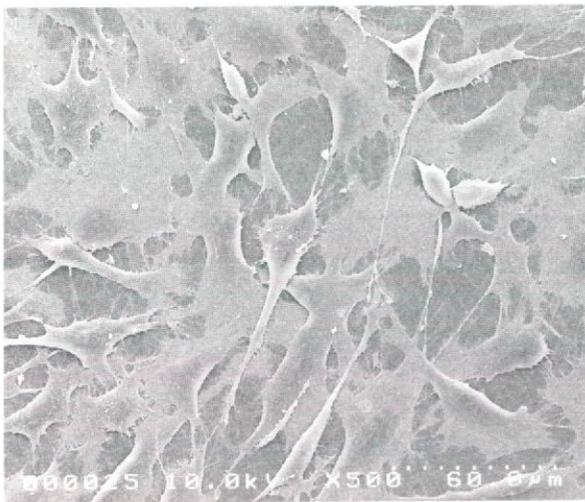


Fig.5-1 MWCNT コートディッシュ
SEM 像

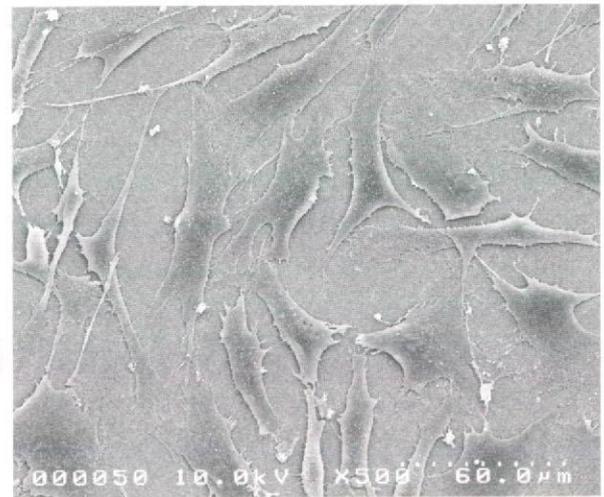


Fig.5-2 コラーゲンコートディッシュ
SEM

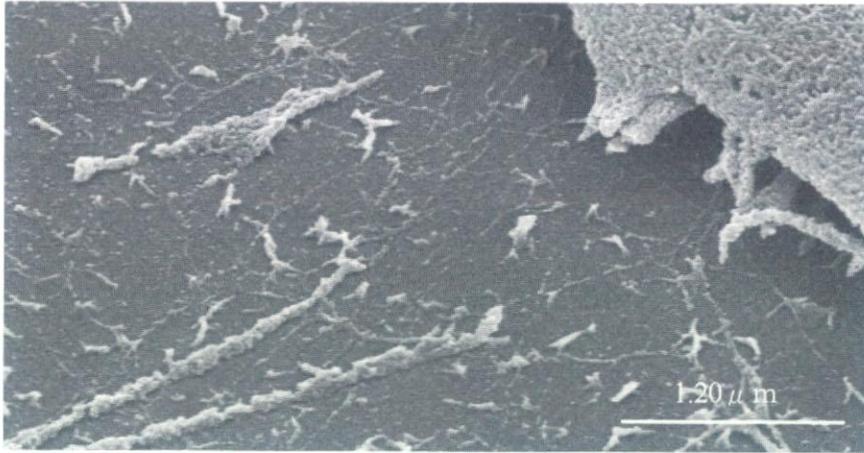


Fig.5-3 コラーゲンコートディッシュ上の細胞の偽足
SEM 像

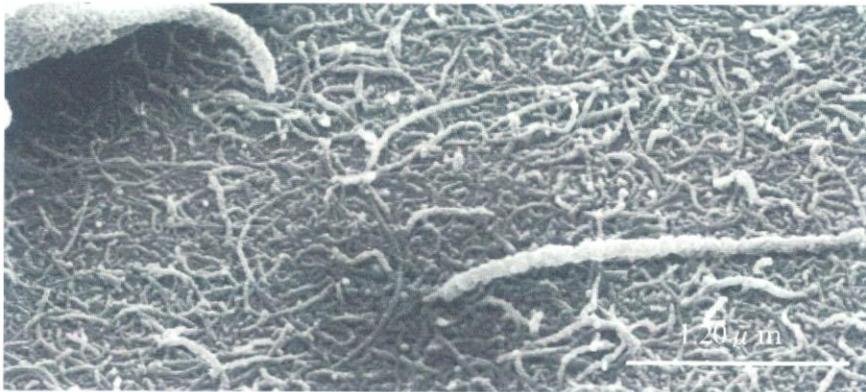


Fig.5-4 MWCNT コートディッシュ上の細胞の偽足
SEM 像

Fig.6

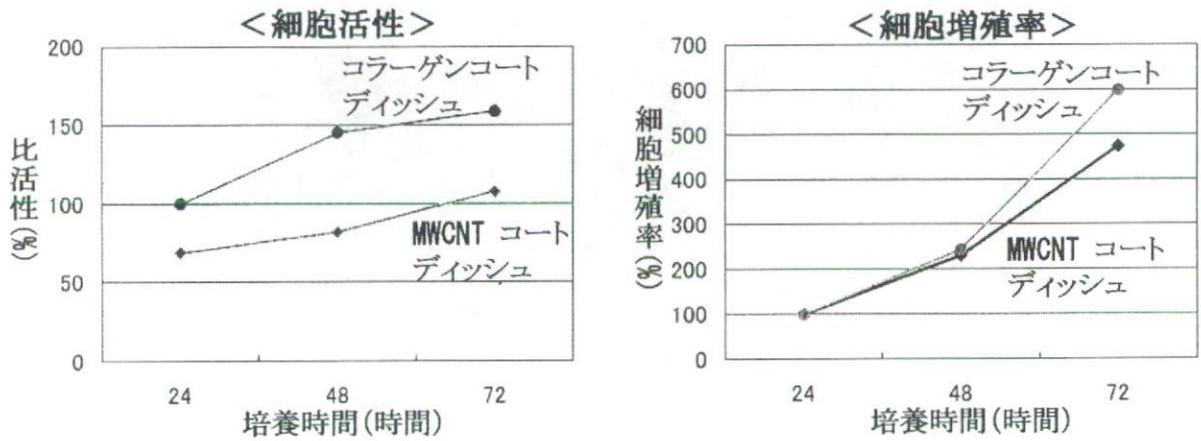


Fig.7

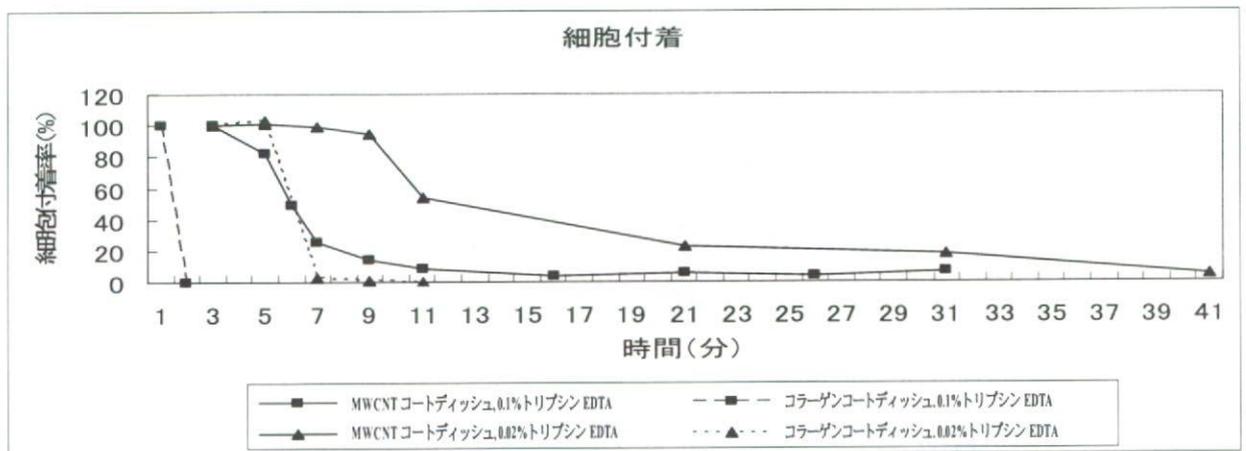


Fig.8

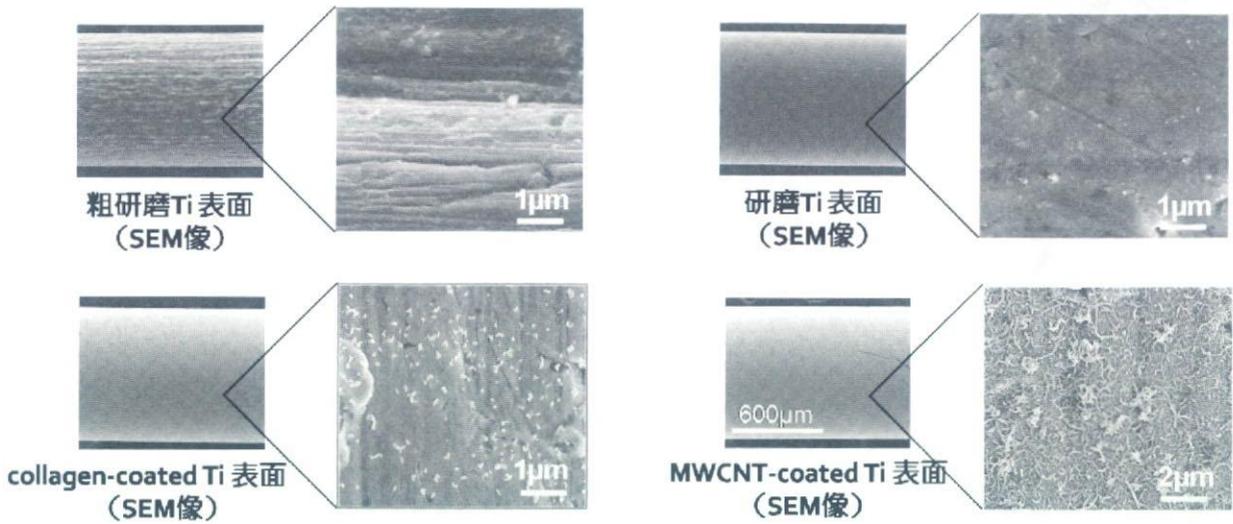
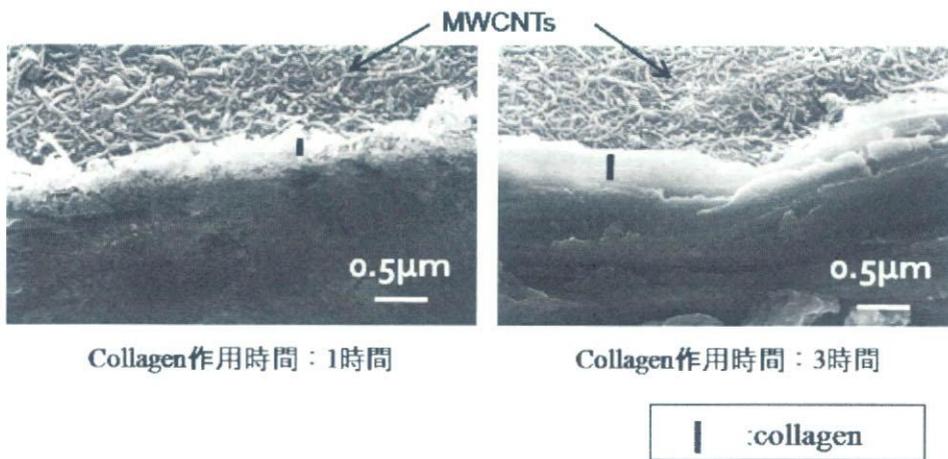
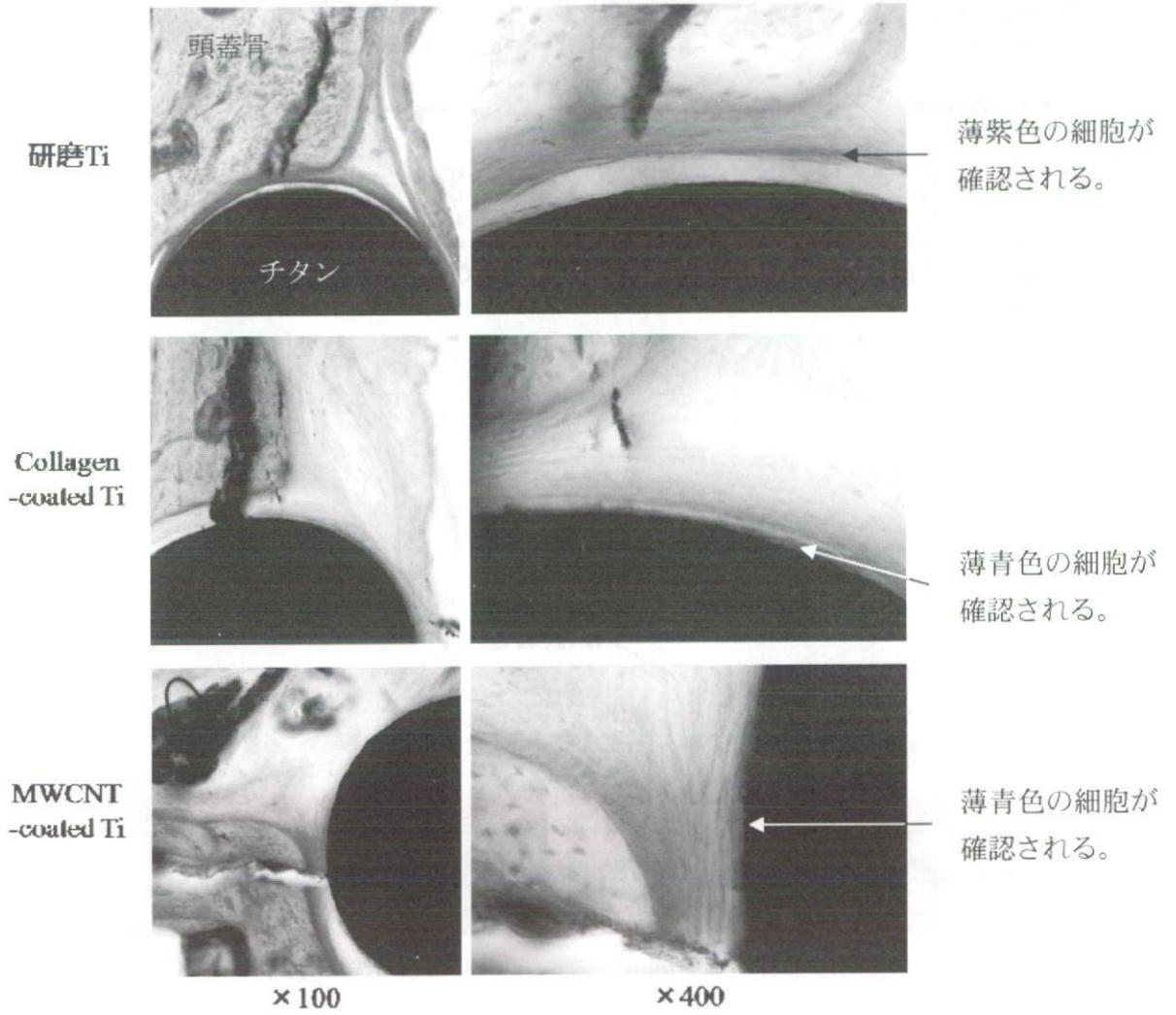


Fig.9



コラーゲン作用時間が長いほど、コラーゲンの厚みは増した。

Fig.10



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ミクロンからナノ・オーダーへの「人工細胞外マトリックス幾何学」（2）：
トンネル直径の異なるハニカム型 β -TCP セラミックスの骨形成に関する研究

分担研究者	北川善政	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	久保木芳徳	北海道大学名誉教授
研究協力者	高山満利子	(株)パイロットプレジジョン
研究協力者	賀来 亨	北海道医療大学歯学部教授
研究協力者	寺田典子	北海道大学歯学研究科大学院院生

研究要旨 【目的】医療目的で、局所的に骨を効率よく再建するための必要条件が追求されてきたが、最近、「人工細胞外マトリックスの幾何学」が提唱されている。この理論によれば、組織の再建には、①細胞、②細胞外マトリックス（ECM）、③制御因子、④栄養供給、⑤力学刺激という5大要素の統合が必要であるが、そのうち外部から与えられる人工の細胞外マトリックス（ECM）については、その組織再建に最適な3次元幾何構造を与えることが、決定的に重要とされている。そこで、今回、そのような最適空間をハニカム構造のトンネルに求め、その最適直径を追求した。【方法】トンネル直径が、300, 75, 50 μm のハニカム型 β TCP 円柱体、並びにトンネルを持たない β TCP 円柱体、あわせて4種類の人工ECMを用い、それらのBMP誘導による異所骨形成能を比較した。【結果】4種の人工ECMをラットの皮下に埋植後、2週目に埋植物内のアルカリフォスファターゼ活性を比較して結果、75 μm のトンネル直径を持つ埋植体が、最も強い骨形成能を示すことがわかった。【考察と結論】骨を最も効率よく再建する人工ECMの幾何構造の一つは、久保木らの人工ECM幾何学の10種類分類法によれば、一般にポアを有する構造であり、その最適のポアサイズは、従来ヒドロキシアパタイトのブロックにおける不規則な貫通孔の場合、300-400 μm であるとされてきた。しかし今回、直線的トンネルを持つ β TCP の場合には、75 μm であったことは、最適の骨形成空間が、材質に依存すると同時に、トンネルの形状（直線トンネルか、不規則なポアか）にも依存することを示している。今後、骨形成を目的とした人工ECMの最適空間を設計するに当たっては、その材質の選択と同時に、その材質に適した最適空間の確立が必要であると考えられる。

A. 研究目的

人類が、長寿を全うするようになると、骨、歯などの硬組織もこれまで以上に長期間にわたって使用されるようになり、その結果、歯・骨の障害と欠損の機会が増加し、再建の必要が高

まっているのが現状である。骨組織の部分欠損、典型的な例としては歯周疾患による歯槽骨の部分欠損が一つであるが、その欠損部分を生物学的に再建するためには、いくつかの要素を整える必要がある。このような要素は、その時代の技術の進歩段階によっても異なるが、現時点に

においては、次の5要素とされている。すなわち、①細胞、②細胞外マトリックス。③栄養供給、④サイトカインを含む制御因子、⑤動力学的要素である。

このうち、比較的人的操作の加えやすい要素は、②細胞外マトリックス (extracellular matrix, 以下ECMと略す)、であり、この場合のECMは、天然のそれではなく、人工のECMが主として用いられる。これらの材料は、一般にバイオマテリアルと呼ばれている材料の1種であるが、とくに細胞に直接反応を求める点で、人工ECM (artificial extracellular matrix) と呼ばれるので、本論文では後者を採用する。

骨組織再建用の人工ECMは、これまで無数のものが開発されてきた。その要件は、①物理的、②化学的、③生化学的性質は詳細に研究されてきたが、第4の要件と考えられる幾何学的要件については殆ど系統的な研究がなかった。そこで、われわれは、2001年以来「人工ECM幾何学」を開拓し、人工ECMの幾何構造の10種類分類を提唱し、全ての人工ECMを何れかの範疇に分類した。1-10) この分類によると、骨再建に効率のよい幾何構造は一般に凹型であり、なかでも何らかの形のポアを有するタイプが優れていることが分かった。さらに敦賀らは、5) 異なるポアサイズを有する5種類の多孔性ヒドロキシアパタイト・ブロックを人工ECMとして、骨形成タンパク質 (BMP) によって誘導される異所骨形成能を比較した結果、300-400 μm のポアサイズが、最も効率よく骨を形成することを明らかにした。この仕事は、唯一の系統的最適ポアサイズの研究として、これまでも広く引用されてきた。しかしながら、敦賀らが用いた多孔性ヒドロキシアパタイトは内部貫通性ではあるが、ポアの形は不規則で数珠状をなしていた。さらに素材が、ヒドロキシアパタイトであるため、生体内では吸収されず、骨に置換されないという人工ECMとして弱点があった。

そこで、今回、生体内吸収性で、骨に置換することが知られている β -トリカルシウムリン酸 (β -TCP) を素材として用い、規則的に配列した直線的トンネルを多数有するハニカム構造体を開発し、これを人工ECMとして用いることにした。このハニカム型 β TCPのトンネル直径を、50、75、300 μm の3段階に変えた人工ECMを作製し、さらにトンネルのない β TCPの円柱を対照として、BMP誘導異所骨形成を行い、4者の骨形成能を比較検討することにした。

B. 研究方法

BMP担体として使用した人工ECM：

直径3mm、厚さ(高さ)1mmの円筒形の比較的緻密な β -TCPよりなるセラミックスで、長軸方向に直径300、75、ならびに50 μm のトンネルを、それぞれ37、568ならびに907個備えている、いわゆる「ハニカム状 β -TCP」を開発し製作した。さらに、同じ円筒形であるかトンネルを持たない充実円筒体を対照として製作した。製造方法については、既に報告したハニカム状ヒドロキシアパタイトの場合と同様な方向に従った。1) Fig. 1にそれらのSEM像を示す。

これらのハニカム状 β -TCPと充実円筒体に、rhBMP-2 (アステラス製薬株式会社より恵与、0.5 $\mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) と等量のコラーゲン (高研 Atelocollagen I-PC) を (7.5 $\mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) を混合した溶液を、含浸させ、凍結乾燥した。これらの試料を“BMP含浸ハニカム状 β -TCP-300、75、50 ならびに充実円筒体”とした。

使用動物：

体重が70g~85gの健康な4週齢のWistar King AH系雄ラットを用いた。動物に対する全身麻酔には、ペンタバルビタールナトリウム (商品名：ネプタール、大日本住友製薬) を生理的食塩水にて10倍希釈し、体重1kg 当たり7.1 ml (ペンタバルビタールナトリウムに換算すると体重1kg 当たり35g) にて腹腔内注射を行っ

た。各試料は、ラットの背部を剃毛した後、ディスポーザルメス#11 を用い皮膚切開を加え、皮下に埋入した。埋植 2、及び 4 週間後に試料を摘出し分析に供した。

生化学分析：

摘出試料中のアルカリホスファターゼ (ALP) の活性は、摘出した担体に 300 μ l の PBS を加え、ステンレス製の杵を用いてエッペンドルフ・チューブ内で磨砕した後、その一部をと等量の 0.4% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich USA) / 20mM / Tris-HCl / 2 mM MgCl₂ pH 7.4. を加えて抽出し p-ニトロフェニールリン酸法 (Bessey-Lowry 法) にて分析した。

組織学的観察

摘出した担体を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH 7.4) にて固定後、パラフィン包埋後、組織切片を作製し、HE 染色を行った。

倫理面への配慮

北海道大学では動物実験倫理を高い水準で維持するため、ここで実施される全ての実験の倫理面を厳しく規制している。関連法規に従い、全ての研究計画の妥当性について、動物実験倫理問題検討委員会で審議している。本研究の動物実験は、北海道大学大学院歯学研究科・歯学部動物実験に関する指針に基づいて行った。

C. 研究結果

ハニカム状 β -TCP の創製：

3 種のトンネル直径の異なるハニカム状 β -TCP は、いずれも Fig. 1 の写真のごとくポアが均一に分布していることが分かった。トンネルの直径および数も設計した値が得られている。

アルカリフォスファターゼ活性

Fig. 2 に明らかなように、ハニカム状 β -TCP 75/567 が最も高く、0/0 が最も低い。50/90 と 300/37 はほぼ同程度である。

組織学的所見：

埋植後、2 週ならびに 4 週目の観察では、ハニカム状 β -TCP のトンネル内に、骨はほぼ同心円

状に形成されている。4 週後の組織像を、写真 Fig. 3A-F に示す。Fig. 3AB に示すハニカム状 β -TCP 300/37 では、同心円状の骨形成と顕著な脂肪組織が見られる。Fig. 3CD はハニカム状 β -TCP 75/568 であるが、この場合とくに骨形成は顕著で、或るトンネルでは殆ど骨組織が充満している。一部のトンネルには脂肪細胞が占めているが、300/37 に比べるとその存在比率は少ない。

Fig. 3EF はハニカム状 β -TCP 50/903 の 4 週目、Fig. 3GH は 2 週目の組織像を示した。この人工 ECM において注目される点は、2 週目で軟骨の存在が観察される点である。以上 A-F において、3 種のハニカム状 β -TCP とそれぞれ特徴あるトンネル内の骨形成のパターンを持っている。トンネル以外に円筒体の外周にも若干の骨形成が見られる。

Fig. 3GH に 4 週後に摘出したハニカム状 β -TCP 50/903 の組織像を示す。2 週後に観察された軟骨はもはや消失し、骨組織がそれに置き換わって増大している。

D. 考察

本論文は、生体内吸収性素材である β -TCP 製のハニカム・セラミックス人工 ECM を用いた最初の効率的骨形成の報告である。その結果、検討した直線的トンネルにおける最適の直径は、75 μ m であることが示された。

一般に骨再建用の人工 ECM、あるいはスカフォールドフォールドには、連続貫通性のポアの存在が重要であり、その最適のポアサイズが議論されてきた。われわれは既に、ヒドロキシアパタイト製のスカフォールドにおいて、不規則ポアの場合の最適サイズは、300–400 μ m であるとの結論を出していた。5) ヒドロキシアパタイト製のハニカム型のトンネルにおいては、100 μ m 以下の直径の場合、軟骨性骨化を伴うのに対して、350 μ m 直径のトンネルでは、軟骨を経ずに直接骨が形成されることを報告してきた。1-3) 今回の研究においても、Fig. 3GH において、トンネル直径の小さいハニカム状 β -TCP 50/903 が軟骨形成を示したことは、ヒドロ

キシアパタイト・ハニカムでの過去の報告と合致している。

しかしながら、今回の β -TCPハニカムでの最適直径が $75\mu\text{m}$ であるという結果は、ヒドロキシアパタイト性不規則型ポアの場合の最適サイズ、 $300\text{--}400\mu\text{m}$ よりも小さいと見なされる。この相違点の解釈は、人工ECMの幾何学上、きわめて興味深い重要な課題を提供している。すなわち、この差をもたらした原因は2つの面があり、第1に、素材としての非吸収性のヒドロキシアパタイトと、吸収性 β -TCPの違いであり、第2に不規則貫通性ポアと直線的トンネルの幾何学的相違の結果を示すものと考えられる。

本論文では、全く同一の幾何学的構造を持つ、 β -TCPハニカムと、ヒドロキシアパタイト・ハニカムでの同時比較が行われなかったが、現在50/903、75/568、および300/37と同じ幾何構造を持つヒドロキシアパタイト製ハニカムを製作中である。これを待って、今後、詳細な比較を行う予定である。

E. 結論

トンネル直径の異なる3種のハニカム β -TCP製(各々の直径、 300 、 75 、 $50\mu\text{m}$)の人工ECMをBMP担体として用い、ラット皮下埋植後、2週目のアルカリフォスファターゼ活性を調べた結果、いずれもいずれも、ポアのない β -TCP円筒体よりも高い値を示し、これらのハニカム状 β -TCPが、再生医療用の人工ECMとして有効であることが示された。検討した3種の中では $75\mu\text{m}$ 直径のものが最も高い値をしめした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kuboki Y, Jin Q, Takita H: Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *J Bone Joint Surg* 2001, 83-A: S1-105-114.
- 2) Kuboki Y, Takita H, Mizuno M, and Fujisawa R: Geometry of artificial extracellular matrices: a new paradigm from dental tissue engineering. *Dentistry in Japan* 2001, 37: 42-50
- 3) Jin Q-M, Takita H, Kohgo T, Atsumi K, Itoh H, and Kuboki Y: Effects of geometry of hydroxyapatite as a cell substratum in BMP-induced ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 2000, 51: 491-499.
- 4) Kuboki Y, Jin Q, Kikuchi M, Mahmood J, Takita H.: Geometry of artificial ECM: sizes of pores controlling phenotype expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. *Connect Tissue Res.* 2002; 43(2-3):529-34.

- 5) Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, and Kuboki: Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997, 121: 317-324.
- 6) 久保木芳徳, 滝田裕子, 吉本良太, 賀来亨: 人工細胞外マトリックスの幾何学, ティッシュエンジニアリング 2006, 田畑泰彦, 岡野光夫, 編集, 日本医学館, 東京, 24-33.
- 7) 久保木芳徳, 郁小兵, 滝田裕子, 吉本良太, 賀来亨: 人工細胞外マトリックスの幾何学の統一原理, 再生医療 3: 20-30, 2006
- 8) 阿蘇雄, 久保木芳徳, 宮田輝夫: コラーゲンを素材にした幾何学的スカフォールドの製造とその組織誘導, 再生医療, 5: 31-37, 2006.
- 9) 菊池佑二, 菊池裕子, 高橋正行, 矢澤道生, 西泰治, 久保木芳徳: 微細加工空間構造内での, 培養細胞の増殖・分化, 再生医療, 5: 46-72, 2006
- 10) George, J., Kuboki, Y., and Miyata, T.: Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds, 2006, *Biotech. Bioeng.* 95, 404.
- 11) N. Fukui, Y. Kuboki, T. Sato, Y. Kuboki, and H. Aoki: Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen composite at the early stage of implantation, *Bio-medical Materials and Engineering*, 18: (2008), 25-33
- 12) Y. Ichinohe, Y. Kuboki and Yasuhiko Tabata: Bone regeneration using titanium nonwoven fabrics combined with FGF-2 release from gelatin hydrogel microspheres in rabbit skull defects, *Tissue Engineering*, 2008 in Press.

2. 学会発表

- 1) 久保木芳徳, 寺田典子, 北川善政, 宇尾基弘, 亙理文夫: コラーゲン分子のトリプルヘリクス構造がカーボンナノチューブとの反応に必須である, 代用臓器・再生研究会, 2008年2月2日, 北海道大学, 学術交流会館
- 2) 久保木芳徳: 石灰化ハニカム・コラーゲンの特性とサイナスリフトなどへの応用の展望, 第20回アパタイト研究会シンポジウム 2007年12月17日 東京都立産業技術研究センター(西が丘本部)
- 3) 久保木芳徳: 基調講演; 硬組織再建の原理, 第16回硬組織再生生物学会 学術大会・総会 2007年9月22日 松本歯科大学 図書会館
- 4) 久保木芳徳, 寺田典子, 北川善政, 高山満利子, 河野牧子, 郁小兵, 阿蘇雄, 賀来亨, 宇尾基弘, 亙理文夫: 人工ECMの幾何学: ハニカム長軸構造を持つ人工細胞外マトリックスにおける血管・骨の新生誘導能について, 第39回結合組織学会・第54回マトリックス研究会合同学術集会, 2007年5月9~11日 北区・北トピア

Fig. 1 トンネルの直径および数の異なるハニカム状 β -TCP の SEM 像

A はハニカム状 β -TCP 300/37、 B はハニカム状 β -TCP 75/568、 C はハニカム状 β -TCP 50/903、 D はトンネルを持たない β -TCP 円柱である。

Fig. 1A

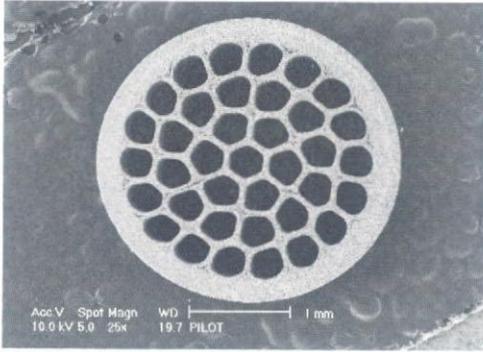


Fig. 1B

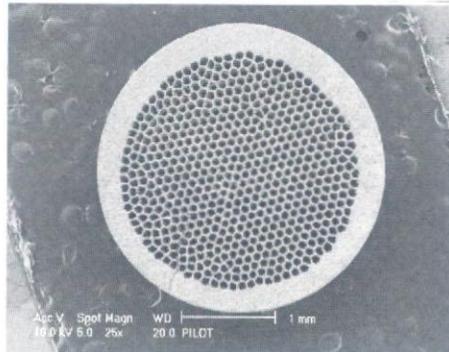


Fig. 1C

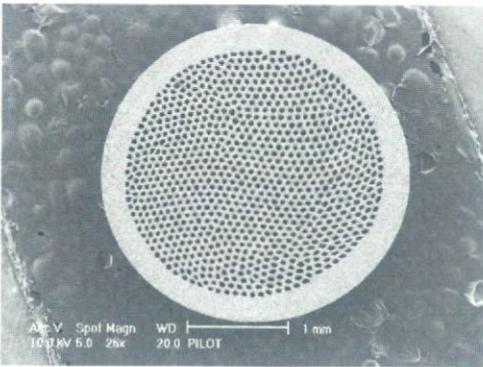


Fig. 1D

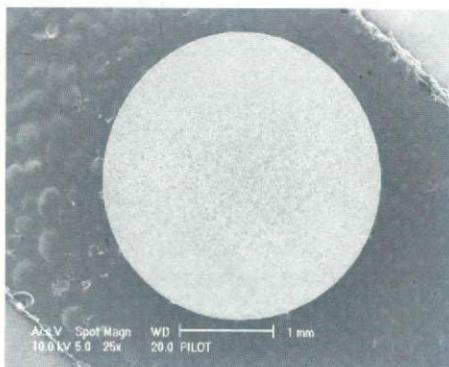


Fig. 2 トンネルの直径および数の異なるハニカム状 β -TCP の骨形成能の比較

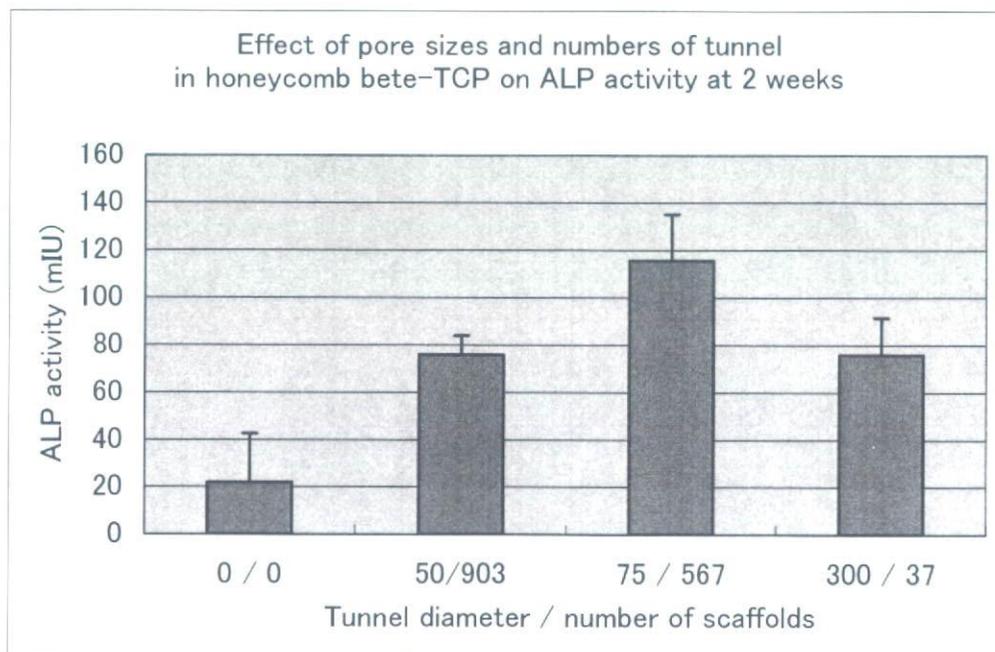


Fig. 3 埋植 2 週および 3 週後におけるハニカム β -TCP トンネル内および周囲の骨形成を示す組織像：AB はハニカム状 β -TCP300/37、CD はハニカム状 β -TCP75/568、EF はハニカム状 β -TCP 50/903、A-F はいずれも埋植後 4 週後の組織像、GH は 2 週後のハニカム状 β -TCP50/903 を示す。ACEG は弱拡大像、BDFH は強拡大像である。

Fig. 3A

Fig. 3B

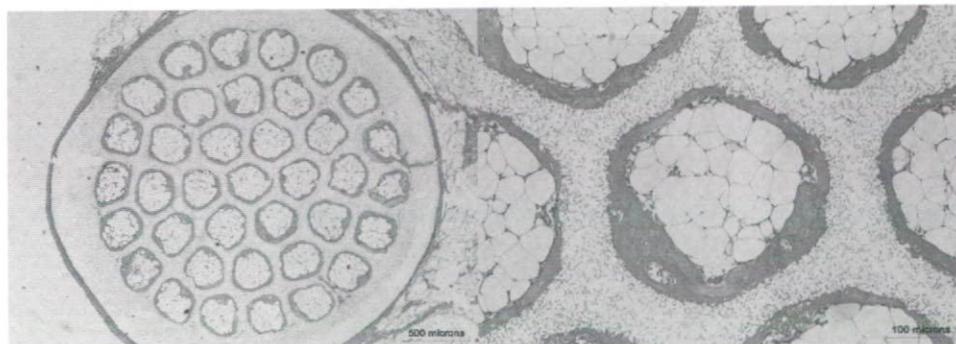


Fig. 3C

Fig. 3D

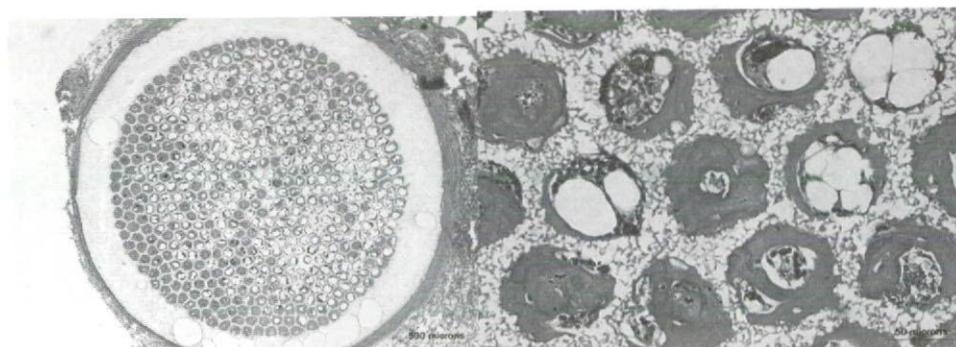


Fig. 3E

Fig. 3F

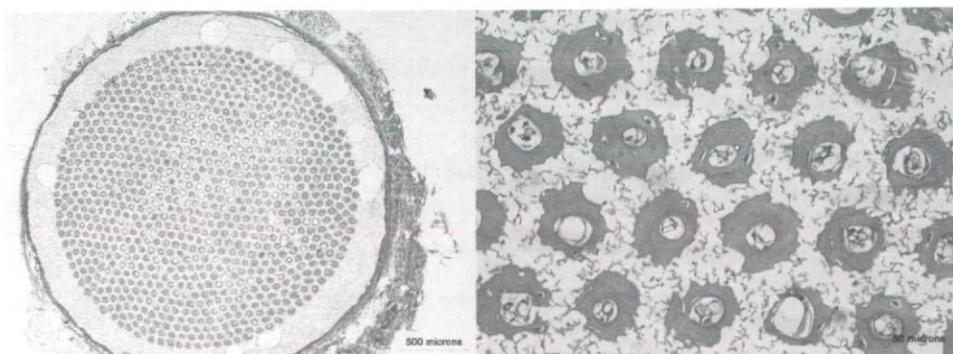
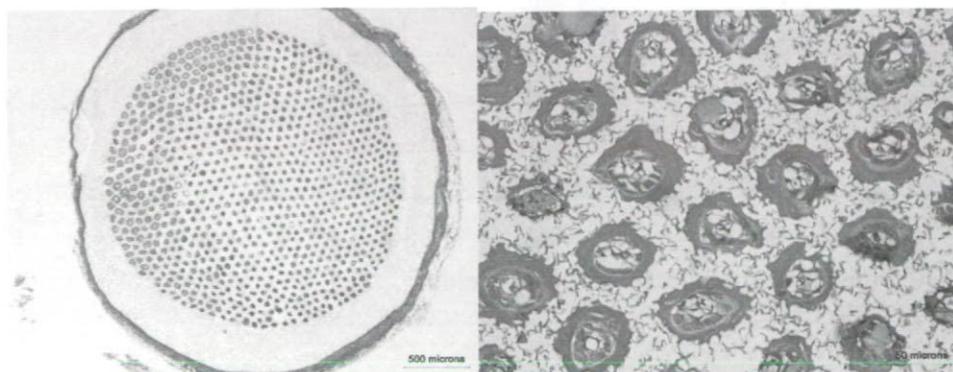


Fig. 3G

Fig. 3H



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究
—BMP 修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨形成能—

分担研究者 岡崎 正之 広島大学医歯薬学総合研究科教授
研究協力者 平田 伊佐雄 広島大学医歯薬学総合研究科助教

研究要旨 高齢者のような骨再生能力の衰えた患者に対する再生医療にとって、細胞やスカフォールドに加え、サイトカインの存在は欠かせない。我々は、これまで細胞の3次元培養可能な多孔性の炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジスカフォールドを創製し、形態保持を容易にするため周囲に多孔性のアパタイト・フレームをハイブリッド化することを試みてきた。今回、さらに骨増殖因子としてのrhBMP2を添加したところ、興味ある知見を得たので報告する。

無機フィラーとしては、骨アパタイトに類似した結晶性と組成を有する炭酸アパタイトを合成したものをを用いた。得られた粉末結晶試料を、0.5wt%コラーゲン溶液と混合し、スポンジスカフォールドとフレームのハイブリッド試料を作成した。試作した炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、0.1-0.3mm程度の貫通孔を有し、細胞の遊走には適当なサイズと思われた。マウスMC3T3-E1骨芽細胞様細胞を用い細胞培養実験を行なったところ、フレーム強化したハイブリッド試料では、スポンジの収縮は抑制され、細胞の内部への侵入も良好であった。また、rhBMP2とともにラット頭蓋骨骨膜下に埋入した際には、生体親和性は良好で、旺盛な新生骨の形成が認められ、必要十分量の骨が形成される期間が8週間から4週間に短縮された。

A. 研究目的

世界の主要国の中で初の超高齢社会を迎える日本において、介護費や医療費の増大はもはや必然の状況である。加えて、近年における『寝たきり老人』の急激な増加は、これらの社会福祉費をさらに押し上げる深刻な問題であり、早急に対処すべき課題となっている。特に、骨・関節の疾患や歯牙喪失は『寝たきり』と強い相関があることが報告されており、今後、これらの硬組織疾患治療の需要拡大は益々増加するものと予想される。そのため、多くの硬組織代替材料が研究されている。

我々は炭酸アパタイト (CO₃Ap)-コラーゲン複合体を作ることに成功しており、これらはラットの腹部や頭蓋骨膜下に埋め込んだとき優れた生体適合性や骨形成能を有することが示されている¹⁾。しかしながら、この材料は培養もしくは動物実験の間に縮むことがあきらかであった。骨再生誘導法 (GBR) の概念から、新しい骨が簡単に形成できる安定した十分な空間について考えることにより、フレーム強化型スポンジスカフォールドを作製した²⁾。本研究では、フレーム強化型CO₃Ap-コラーゲンスポンジスカフォールドにBMP2を添加することによって骨形成をさらに促進することについて検討した。

B. 研究方法

合成した CO_3Ap の Ca, P, CO_3 の含有量をそれぞれ原子吸光、紫外線分光、Conway の滴定法により求めた。X 線回折装置 (XRD) により得られた CO_3Ap の結晶度を測定した。 CO_3Ap を 0.5wt% コラーゲン溶液と混合し、凍結乾燥することにより 70-wt% CO_3Ap -コラーゲンスポンジを作成した。また、あらかじめポーラスなハイドロキシアパタイト (HAp) 円筒状フレームを作成し、スポンジとハイブリッド化したフレーム強化型 CO_3Ap -コラーゲンスポンジスカフォールドも作成した (図 1)。各試料につき空隙の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察するとともに、マウス骨芽細胞様細胞を含む血清添加懸濁液を滴下して培養実験を行ない、スポンジ上の細胞の形態も SEM 観察により検討した。フレーム強化型 CO_3Ap -コラーゲンスポンジスカフォールドに 0.1mg/ml の rh-BMP2 を 60 μ l 滴下し、ラット頭蓋骨膜下に 4 週間埋入した。犠牲死により摘出した試料は、ホルマリン固定・脱水・パラフィン包埋を行い、試料切片を HE 染色後、光学顕微鏡にて骨形成組織像を観察した。なお、動物実験は、広島大学倫理規定に基づき行った。

C. 研究結果

合成した CO_3Ap 中の Ca, P, CO_3 の含有量はそれぞれ 8.78 ± 0.16 , 5.46 ± 0.15 , 0.80 ± 0.07 mmol/g となった。XRD (図 2) および FT-IR (図 3) の結果から、合成した CO_3Ap は 60 $^\circ\text{C}$ で合成した結晶度の高い HAp と比較して低結晶アパタイトパターンを有した。図 4a は、凍結乾燥で作製した 70-wt% CO_3Ap -コラーゲンスポンジの SEM 像を示す。約 50-300 μm の大きさの孔がスポンジ内部まで深く続いていることが明らかとなった。また、図 4b より培養期間中にスポンジ表面が劇的に変化することが観察された。スポンジ表面での細胞外マトリックスの量は培養期間とともに増加し、骨芽細胞は細胞外マトリックスでほとんど覆われていた。ラットの頭蓋骨膜下に 4 週間埋入した rh-BMP2 添加フレーム強化型 CO_3Ap -コラーゲンスポンジの組織切片像を図 5 に示す。図 5a より、この

スカフォールドで骨形成が活発に行われたことが示された。さらに、フレームの孔の部分を通して骨形成がスカフォールドの外まで生じた。観察倍率を上げると、新しくできた骨が頭蓋骨表面からできていることが観察された (図 5b)。

D. 考察

合成した CO_3Ap は人骨 (Ca; 8.94 ± 0.04 mmol/g, P; 5.13 ± 0.10 mmol/g, CO_3 ; 0.69 ± 0.05 mmol/g) と似た組成と低結晶度を有していた³⁾。このことより、結晶度の高い HAp と比較して、骨アパタイトと同様に我々の合成した CO_3Ap は体内において溶けやすさか骨芽細胞や破骨細胞により容易に代謝される。この骨と似ている CO_3Ap を用いて、更にアパタイトとコラーゲンの比率を骨と同等にした CO_3Ap -コラーゲンスポンジを、空間保持能を有する HAp フレーム内に作製した。

このスポンジは、孔径が約 50-300 μm と細胞のサイズより十分大きいいため、細胞が侵入するために十分な空隙を有していた。また、このフレーム強化型 CO_3Ap -コラーゲンスポンジはスポンジの収縮問題も解決した。スポンジはハイドロキシアパタイトとコラーゲンとの化学的結合に加えて投錨効果によりフレームの孔を介して機械的に結合しており、穴あきフレーム内でスポンジは収縮が抑制されていた。

概して、頭蓋骨膜下での骨形成は起こりにくい。前回の研究でも、サイトカインを添加していない CO_3Ap -コラーゲン複合体・スポンジはラット頭蓋骨膜下において十分な骨形成に 8 週間を要した。そこで、骨形成を劇的に促進するサイトカインである BMP2 をこのスカフォールドに添加することを試みた。rh-BMP2 添加フレーム強化型 CO_3Ap -コラーゲンスポンジをラット頭蓋骨膜下に 4 週間埋入したところ、骨形成がスカフォールドの外まで活発に生じており、頭蓋骨としっかりした結合もしていた。動物実験において頭蓋骨膜下での骨形成観察はスカフォールドの骨代謝の評価に非常に優れている。なぜなら、頭蓋骨は一般に骨再生能が弱く、骨形成が難しいからである。それゆえ、もし骨形成が頭蓋骨膜下でできるのなら、他の骨領域では更に十分な骨形成ができると推定できる。本研究では、rh-BMP2 の添加により必要十分量の骨が形成される期間が 8 週間から 4 週間に短縮された。

E. 結論

本研究で試作したフレーム強化炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、BMP を修飾することにより骨再生を促進する効果が大きく、硬組織再生用生体材料として有望であり、特に歯槽骨の再建・再生への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirata I, Nomura Y, Ito M, Shimazu A. and Okazaki M.: Acceleration of bone formation with BMP2 in frame-reinforced carbonate apatite-collagen sponge scaffolds. J Artif Organs 10: 212-217, 2007.

2. 学会発表

1. 赤松麻衣、長尾雅美、増西稔、横田理絵、林英貴、平田伊佐雄、岡崎正之、“骨芽細胞様細胞の炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジ上での細胞活性”平成19年5月12日、第49回日本歯科理工学会、札幌
2. Tieliewuhan Y, Hirata I, and Okazaki M., “Bone formation with reinforced CO₃Ap-collagen scaffolds” Nov. 24, 2007, International Dental Materials Congress 2007, Bangkok, Thailand
3. 岡崎正之、“シンポジウム13「アパタイトを基盤とした歯科領域の再生医療」アパタイト無くして歯や骨は語れない”平成19年11月26日、第29回日本バイオマテリアル学会、大阪

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し

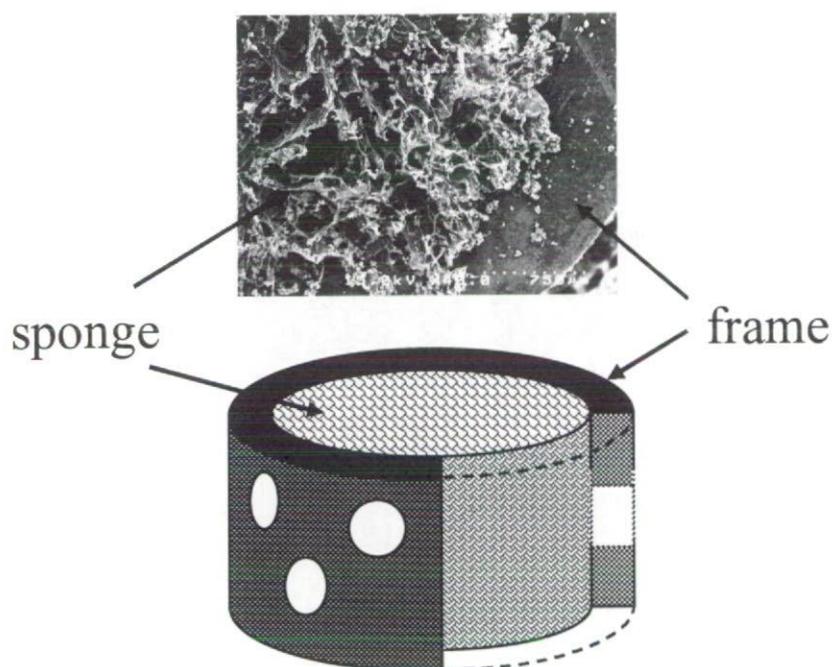


図1 ハイドロキシアパタイトフレームで強化した炭酸アパタイト-コラーゲンスポンジ

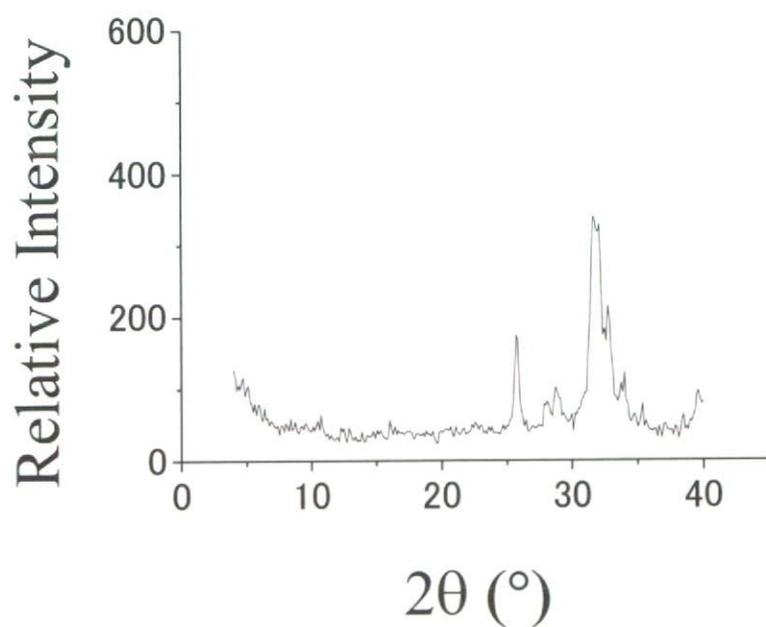


図2 炭酸アパタイトのX線回折パターン

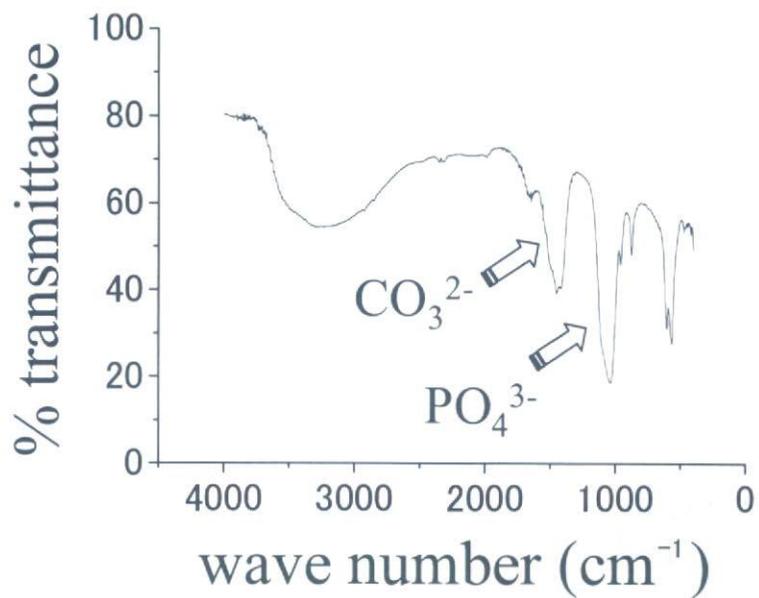


図3 炭酸アパタイトのFT-IR スペクトル

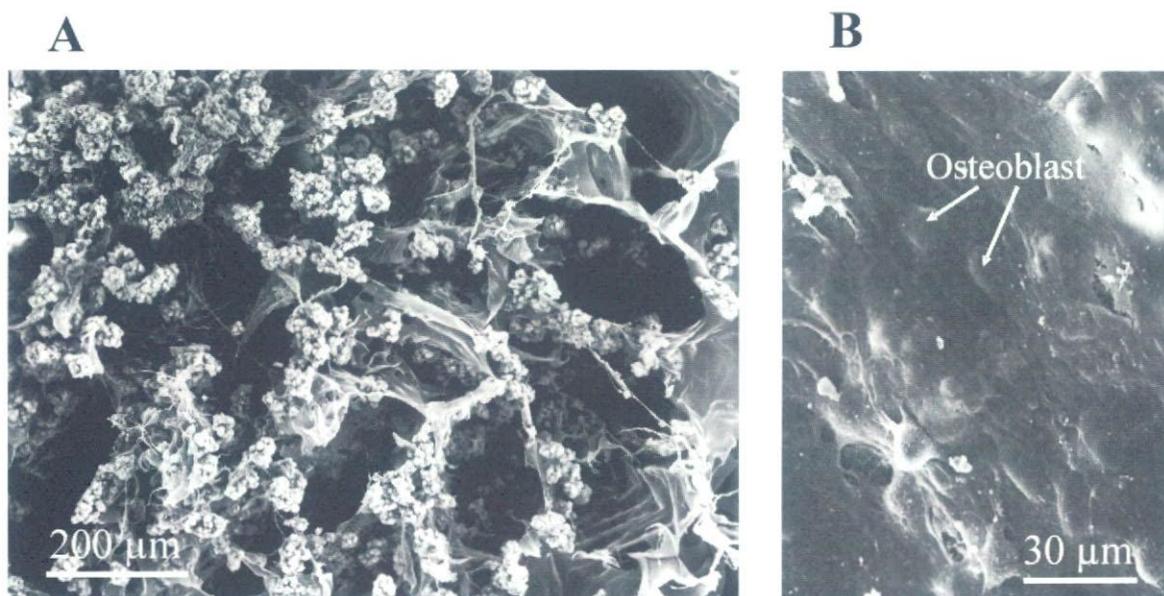


図4 (A) 70-wt% 炭酸アパタイト-コラーゲンスポンジと(B)このスポンジに 10日間培養したマウス骨芽細胞様細胞の走査型電子顕微鏡

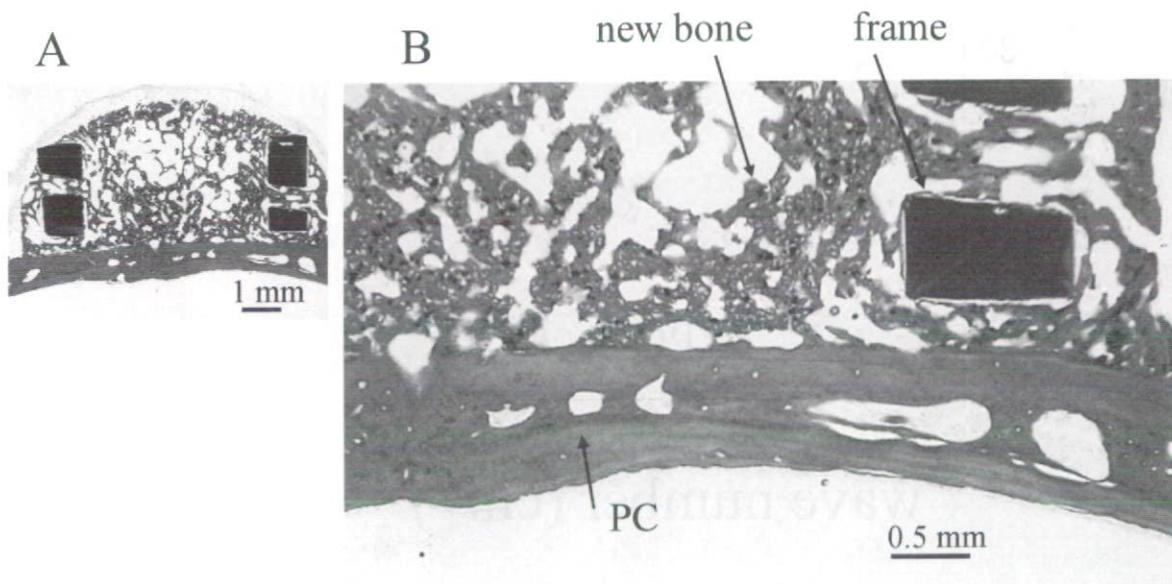


図 5 ラット頭蓋骨膜下に埋入したハイドロキシアパタイトフレーム強化型スポンジでの新生骨のヘマトキシリン・エオジン染色像

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ナノアパタイトの全身動態検索に関する研究

分担研究者 石川邦夫

九州大学大学院歯学研究院教授

研究要旨 本研究においては生体骨の無機主成分がナノアパタイトであることに着目し、現在骨補填材として用いられている焼結体アパタイトとナノアパタイトの生体内挙動に関する差異を検討することを目的とした。

生体骨の無機主成分であるナノサイズ炭酸アパタイトは生体内の中性環境においては熱力学的最安定相であるが、焼結等で用いられる高温領域においては熱力学的に不安定であるため通常セラミックスの調製として用いられる焼結法では調製できない。

生体内の環境では炭酸アパタイトが熱力学的最安定相であることから考えると熱力学的不安定相を中間体として溶解-析出反応を利用すれば、炭酸アパタイトブロックが調製できる。中間体としては無脊椎動物の硬組織である炭酸カルシウムを選択した。昨年度に調製したナノ結晶子炭酸カルシウムブロックを 1 モル濃度リン酸アンモニウム水溶液に 60℃で 14 日間浸漬することによってナノ結晶子炭酸カルシウムブロックが形態を保持したままで、その組成が炭酸カルシウム（カルサイト）から炭酸アパタイトに変換されることがわかった。得られた炭酸アパタイトの間接引張強さは約 10MPa であり、炭酸基含有量は 7.8%であった。

対照である水酸アパタイト焼結体上で破骨細胞を培養しても吸収窩は認められなかったが、炭酸アパタイトブロック上で破骨細胞を培養すると破骨細胞による吸収と見られる吸収窩が認められた。破骨細胞性吸収窩の形成からナノ結晶子炭酸アパタイトはリモデリングを受けると考えられる。したがって、ナノ結晶子炭酸アパタイトは骨欠損部で骨に置換される人工骨置換材料となる可能性が高いと結論した。

A. 研究目的

超高齢社会の到来に伴い、骨疾患が急増している。骨欠損治療における第一選択は自家骨移植であるが、1) 自家骨採取に必要な健全部位への二次的手術のコストおよび倫理的問題、2) 健全部位への侵襲に伴う疾患発生リスク、3) 採取可能骨の量的制限、4) 採取可能骨の形態的制限が指摘されている。これらの自家骨採取に付随する問題は自家骨と同等の機能を有する人工骨補填材が開発されれば全て解決されるが、現時点において生体骨と同様の機能を示す人工骨補填材は開発されていない。

現時点において人工骨補填材の主流は生体骨の無機主成分を模倣した焼結体アパタイトである。生体骨と同成分、同じ結晶子サイズのアパタイトが好ましいと予測されるが、アパタイト粉末は生体内で結晶性炎症を惹起するため、粉末では骨補填材として使用できず、ブロックのアパタイトに加工する必要がある。そのため、化学合成したアパタイト粉末を焼結し、ブロック状や顆粒状とした人工骨補填材が臨床応用されている。

現在、骨補填材として臨床応用されているアパタイト焼結体は優れた組織親和性と骨伝導性（骨が織

維性結合組織の介在なしに材料と結合する性質)を示すが、自家骨とは異なり生体骨とは置換されない。また、骨形成能に関しても生体骨と比較すると限定的であるため骨再建術においては自家骨移植が第一選択とされている。

骨疾患が寝たきりの第二要因(女性に限定した場合は第一要因、また骨疾患は認知症の第一要因)である現状から判断しても自家骨移植に変わりうる人工骨補填材の開発は極めて大きな問題であるが、なぜアパタイトが骨伝導性(骨組織が存在する部位にインプラントした場合に透過型電子顕微鏡レベルでも維性結合組織の介在なしに材料と母床骨が直接結合する性質)を示すかという基本的な事象を含めても研究は行われていない。

生体骨とアパタイト焼結体の間には骨成長因子(BMP: Bone Morphogenic protein)の存在の有無、コラーゲンの存在の有無、微量元素の存在の有無などさまざまな相違があるが、大きな相違点の一つはアパタイトの結晶性(結晶子サイズ)である。例えば通常のみクロンサイズのアパタイトの等電点はマイナスであるが、ナノサイズのアパタイトの等電点はプラスになることが報告されている。アパタイトの骨伝導性には蛋白の吸着等が関与していることが予測されており生体骨に近いナノアパタイトの生体内挙動の解明は自家骨に変わりうる骨置換材創製のみならず、骨格系を形成している骨の形成機序の観点からも極めて重要である。

本研究においては生体骨と同じナノサイズ炭酸アパタイトを調製し、その生体内挙動を実験動物を用いて検討することにある。また、生体内挙動をより詳細に解明するために骨リモデリングに重要な役割を果たしている骨芽細胞、破骨細胞を用いて挙動を検討する。

本年度は3年計画の2年目としてナノサイズ結晶子炭酸アパタイトの調製を行った。また、骨芽細胞、破骨細胞を用いて細胞レベルでナノサイズ結晶子炭酸アパタイトの解析を行った。

B. 研究方法

B-1 炭酸カルシウムの調製

試薬グレードの水酸化カルシウム{Ca(OH)₂; ナカライテスク、京都}をステンレス製金型に入れ、

油圧プレスを用いて2 MPaで一軸加圧した。得られた水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素を充填した反応容器に静置し、室温で72時間反応させた。粉末X線回折装置を用いて試料が炭酸カルシウム(カルサイト)となっていることを確認した。(詳細は平成18年度報告書)また、得られた炭酸カルシウムブロックを蒸留水中に浸漬しても崩れることなく形態を保てることを確認した。

B-2 ナノ結晶子炭酸カルシウムのリン酸化による炭酸アパタイトの調製

炭酸カルシウムブロックとしてはB-1に記載した炭酸カルシウムブロックを用いた。リン酸ナトリウム水溶液としては1 mol/L Na₂HPO₄水溶液を用い、予備実験の結果から反応条件を60℃、14日間とし、反応を行った。

B-3 粉末X線回折分析

試料は粉末とし、粉末X線回折装置(RINT 2500V、理学、東京)を用いて管電圧40 kV、管電流100 mAの条件で、CuK α モノクロ条件で10 to 60° 2 θ をスキャン速度 毎分2°にて測定した。

B-4 フーリエ変換赤外分光分析

試料は粉末とし、KB r 錠剤法にてフーリエ変換赤外分光分析装置(Spectrum 2000LX、パーキンエルマー、神奈川) 370-7800cm⁻¹について測定した。

B-5 炭酸基定量分析

試料中の炭酸基量はCHN コーダー(ヤナコCHN コーダーMT6))にて炭素量を分析し、炭酸基量として換算することによって測定した。

B-6 機械的強さの測定

試料の機械的強さは万能試験機(IS5000、島津、京都)を用い、クロスヘッドスピードを毎分1 mm

として間接引張強さ(DTS: diametral tensile strength)および圧縮強さ(CS: compressive strength)測定により評価した。試料数は1条件につき、最低5個とした。

B-7 微細構造検索

試料表面および内部の微細構造は金コーティングの後、走査型電子顕微鏡 (JSM 5400LV、JEOL、東京) にて加速電圧 15 kV の条件で観察した。

B-8 破骨細胞の分離と破骨細胞による吸収性評価

5日令家兔 (白色家兔、井上実験動物、熊本) の頸骨および肋骨から採取した破骨細胞を含む細胞を水酸アパタイト焼結およびナノ結晶子炭酸アパタイトブロック上で四日間培養した。その後、TRAP 染色を用いて、破骨細胞分化能力を検討した。また四日間培養後の試料表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、破骨細胞による骨吸収性の有無について検討した。

C. 研究結果

炭酸カルシウムブロックを 1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 水および 1 mol/L $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 水溶液に 60°C、14 日間浸漬しても巨視的な形態変化は認められなかった。

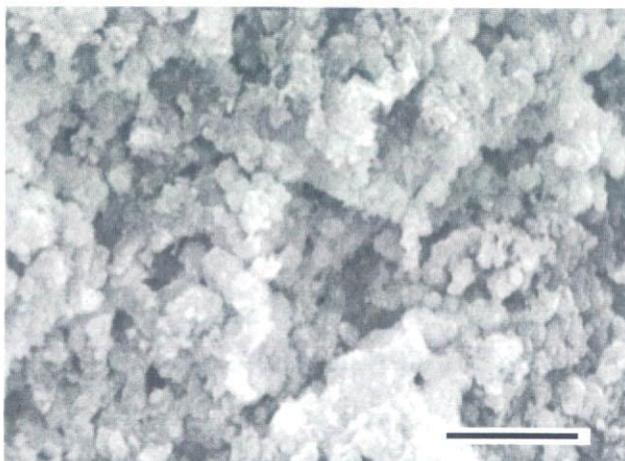


図 1 a 成型圧 2MPa で調製した水酸化カルシウム圧粉体に 72 時間二酸化炭素を暴露して調製した炭酸カルシウムブロックの SEM 像。バーは 5 μm

巨視的な形態変化が見られないことは所望の形態のナノ炭酸アパタイトブロックを調製するために好ましい。一方、詳細な反応機構を解明するために、SEM によって試料の超微細構造を探索した。

図 1 a は成型圧 2MPa で調製した水酸化カルシウム圧粉体に 72 時間二酸化炭素を暴露して調製した炭酸カルシウムブロックの SEM 像であり、図 1 b~図 1 d は 60°C で 1 mol/L $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 水溶液に 1, 7, 14 日間炭酸カルシウムブロックを浸漬した後の SEM 像である。図 1 a と図 1 c-d では顕著な差が認められる。すなわち、図 1 c-d では析出物と見られる結晶構造が確認される。巨視的には形態変化が認められな

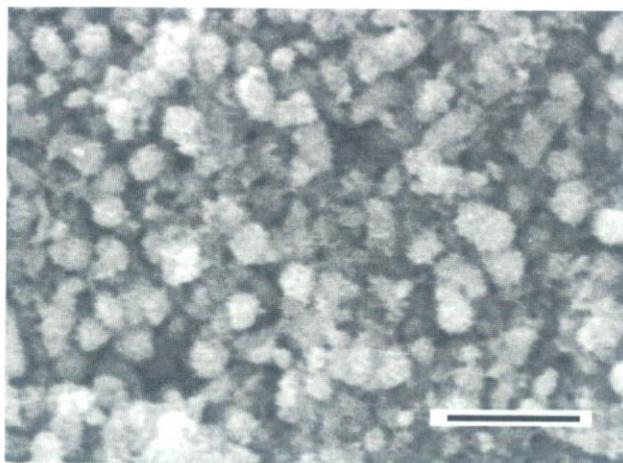


図 1 b 炭酸カルシウムブロックを 1 mol/L $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 水溶液に 60°C で 1 日間浸漬した後の試料の SEM 像。バーは 5 μm

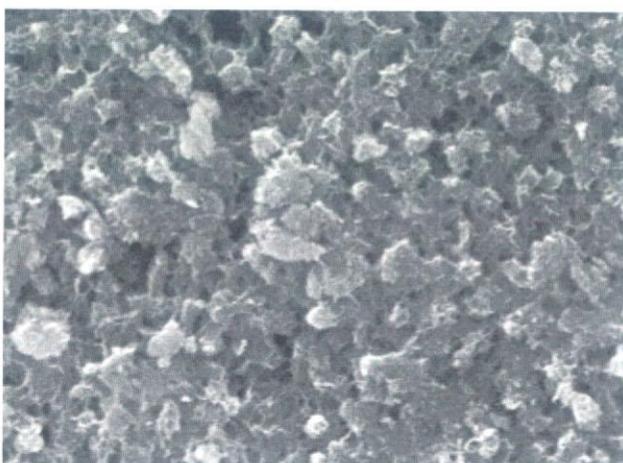


図 1 c 炭酸カルシウムブロックを 1 mol/L $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 水溶液に 60°C で 7 日間浸漬した後の試料の SEM 像。バーは 5 μm