



図7 各ディッシュ上で継代・培養した細胞を Culture dish に播種し直した後の SEM 観察象



図8 各ディッシュ上で継代・培養した細胞を Culture dish に播種し直した後の ALP 染色象

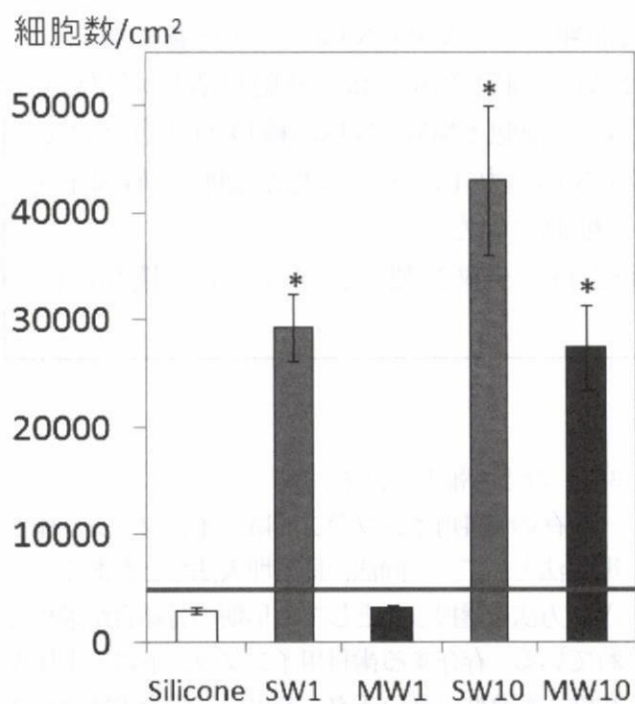


図9-1 各シート上での増殖細胞数

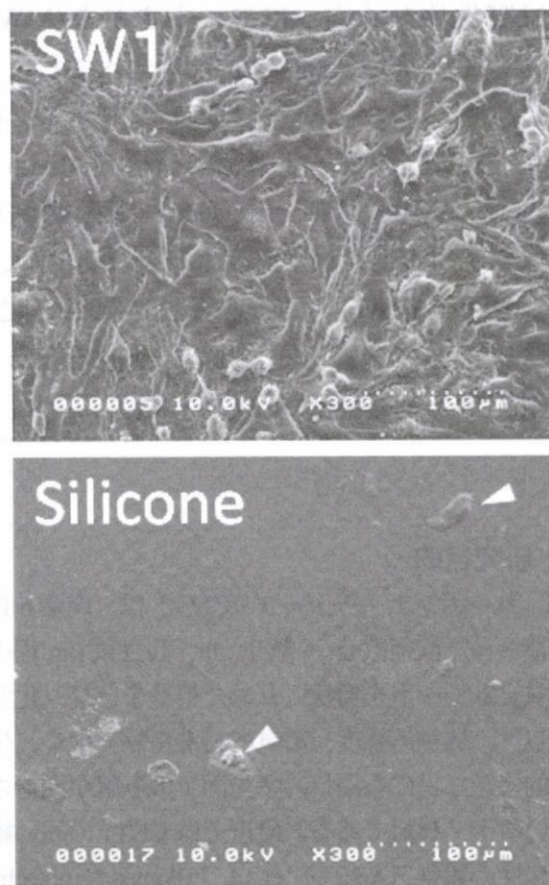


図9-2 CNT をコートしたシリコン上での細胞 (上)
コートしていないシリコンでの細胞 (下)

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

コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした
細胞培養担体の開発に関する研究と金属への応用

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	宇尾基弘	北海道大学歯学研究科准教授
研究協力者	寺田典子	北海道大学歯学研究科大学院生

研究要旨 カーボンナノチューブ(CNTs)は、化学的安定性、機械的強度、電気的特性に優れ、生体適合性も高いことが推測されており、多方面での応用が期待されている。そこで我々は、CNTsをコラーゲンコートディッシュ表面にコートした新たな細胞培養担体を開発した。その作製技術を歯科用インプラントで主に用いられるチタンに応用し、チタンへの細胞付着性を向上させることを目的とし研究を行った。鏡面研磨されたチタン板をアミノ化し、アテロコラーゲンを付着させ、MWCNTコートディッシュの作製法と同条件（精製多層CNTs(MWCNTs)に水酸基を付与し、100ppmとなるようコール酸ナトリウム水溶液に均一に分散）のMWCNTs分散液を作用させたところ、MWCNTsは凝集体なく均一にコートされた(MWCNTコートチタン板)。MWCNTsはコラーゲンを介してチタン表面に強くコートされており、このコーティング層に厚みは150-300nmと見積もられた。MWCNTコートチタン板の表面粗さは、MWCNTsにより有意に増加した。MWCNTコートチタン板にもdish同様、良好な細胞増殖と高い細胞付着性が認められた。MWCNTコートチタン板の細胞付着性は、細胞とMWCNTsの機械的結合だけでなく、MWCNTsによる比表面積の増大やMWCNTsのカルボキシル化が細胞接着因子をより多くMWCNTsに吸着させたことに因ると推測された。

以上のことから、細胞接着能を有した表面を持つチタン製インプラントの開発に応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

カーボンナノチューブ (CNTs) は、炭素6員環が連なった直径数 nm～数十 nm、長さ数 μm 程のグラフェンシートを筒状に丸めた構造をとり、化学的安定性、機械的強度、電気的特性だけでなく、生物学的特徴などにも優れ、多方面での応用が期待されているナノ材料である。最近ではCNTsの高い細胞親和性の報告 (Aoki N, et al. J.Biomed.Nanotechnol. 2005; 1(4)) や、コラーゲンとの親和性 (Rebecca A. MacDonald, et al. J Biomed Mater Res A. 2005; 74(A),

3(1)) なども報告されている。

現在の歯科用インプラントは、インプラント体を埋入法として、二回法、即時埋入法などがあるが、どの方法を選択したとしても早期の骨結合が求められている。存在する歯科用インプラントは、生体親和性、耐食性の高いチタンを用い、骨との結合を強固にさせるべく、インプラント体の構造を工夫することや、表面構造を変化させ早期の骨結合を図っている。表面加工では、プラズマ溶射法や放電加工法などでその表面を粗造にし、骨とオステオインテグ

レーションさせているもの、インプラント体表面にハイドロキシアパタイトをコーティングし、オバイオインテグレーションさせているものなどがある。しかし、インプラント体と骨との間に一層の糖蛋白が介し、製造過程が煩雑となっている。

また、歯科用インプラントの研究で歯根膜附着型インプラントも非常に興味深い。従来の歯科用インプラントは咬合圧緩衝や咀嚼センサーなどの役割を果たす歯根膜が無い。チタン表面を改質したものやハイドロキシアパタイトなどを付着させたものなど歯科用インプラントの表面の改質の研究がなされているが、すべての研究において、歯根膜細胞の強固な附着や安定した増殖がインプラント表面には必要である。

我々の開発した細胞培養担体、MWCNT コートディッシュには組織親和性があり、高い細胞附着能を持つことから、現存する歯科用インプラントよりもより強固に骨と結合できる可能性、歯根膜細胞の強固な附着により歯根膜新生の可能性が考えられる。そこで、これまで開発してきたMWCNT コートディッシュの作製技法を応用して、MWCNTs を使用した新たな歯科用インプラントの表面改質の開発を目的とし、研究を行った。

B. 研究方法

B-1 インプラント表面改質の研究

1. チタン表面へのコラーゲンコーティングの検討
 - a) チタン板 (99.5%, 1mm 厚, ニラコ) を emery paper にて鏡面研磨し、16×5mm に切断する (以降、研磨 Ti 板と呼ぶ)。
 - b) 研磨 Ti 板を 3-Aminopropyltriethoxysilane (東京化成) にてアミノ化し、0.1%アテロコラーゲンを 1 時間作用させた (以降、コラーゲンコート Ti 板と呼ぶ)。
 - c) 得られたコラーゲンコート Ti 板に 100ppm MWCNTs 分散液を 3 時間作用させた (以降、MWCNT コート Ti 板と呼ぶ)。
 - d) 各チタン板の表面を、SEM にて観察した。
 - e) MWCNT コート Ti 板の作製方法を用い、カバーガラスに MWCNTs を付着させ (MWCNT コートカバーガラス)、機械的破断面を SEM にて確認し、コラーゲンの厚みを観察した。

- f) 表面粗さ測定器 (Surfcom 130A; 東京精密, 東京) にて表面粗さ (Ra)、断面粗さを測定した。

2. MWCNT コートチタン板上での細胞培養

- a) MWCNT コート Ti 板を $\phi 35\text{mm}$ のアズノールシャーレの中央にコート面が上になるように置き、マウス線維芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) を 1×10^5 cells/dish とするよう播種した。培地は α -MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO™) + 10% FBS (biowest) を用い、37°C、5%CO₂ にて 1~3 日間培養およびコンフルエント培養した。対照は研磨 Ti 板、コラーゲンコート Ti 板とした。

- b) 経時的 (培養 24, 48, 72 時間) に、①細胞形態観察 ②細胞活性評価 ③細胞附着性の確認をした。

- ①細胞形態観察: 各チタン板を通例に従い、固定・臨界点乾燥後 SEM 観察を行った。

- ②細胞活性評価: 細胞質増殖率にて評価した。SEM 観察にて無作為に 5 カ所選出し細胞数をカウントし平均を求め、チタン板上の細胞数を算出した。培養 24 時間の細胞数を 100 とし、経時的に細胞増殖を求めた。

- ③細胞附着性: コンフルエントになるまで細胞培養し、0.02%トリプシン EDTA を 2cc ずつ MWCNT コートディッシュとコラーゲンディッシュに作用させ、トリプシン EDTA 作用 10 分後にディッシュ基質上に残存している細胞数を観察、カウントした。

C. 研究結果

C-1. チタン表面へのコラーゲンコーティングの検討結果

- a) 研磨 Ti 板はほぼ平滑であり、collagen コート Ti 板は collagen の凝集体がやや認められたが、研磨 Ti 板と同様にほぼ平滑であった。MWCNT-coated Ti 板表面は、MWCNTs が均一に凝集体なくコートされていた (Fig.1)。
- b) MWCNT コートカバーガラス破断面像から、collagen の厚みは約 150-300nm で、その表面には MWCNTs が一層でコートされていることが確認された (Fig.2)。
- c) MWCNT コート Ti 板の表面平均粗さは、0.13

±0.01 μm と有意に他のチタン板より粗造であり (Fig.3-1)、断面粗さも他のチタン板よりも粗造であることが確認された (Fig.3-2)。

2. MWCNT コート Ti 板上での細胞培養結果

- a) MWCNT-coated Ti 板上の細胞は、初期の段階で他のチタン板上の細胞よりやや小さく、細長いのが、時間の経過とともに、伸展が増した (Fig.4)。
- b) 一部の E1 細胞の偽足先端は、MWCNTs との機械的結合が認められたが、ほとんどの細胞の偽足先端は、MWCNTs に付着していた (Fig.5)。
- c) MWCNT コート Ti 上の E1 細胞は、他の 2 種の Ti 板と比較してやや低い細胞増殖率を示した (Fig.6)。
- d) 細胞接着試験では、トリプシン作用 10 分後、コラーゲンコート Ti 板上の細胞はすべて剥離したのに対し、MWCNT コート Ti 板の基質には約 9% の細胞が残存していた (Fig.7)。

D. 考察

1. チタン表面をアミノ化することで、チタン上にコラーゲン付着することができ、さらにコラーゲンを介して均一に緻密に MWCNTs を付着させることができた。また、洗浄によっても剥離することはなかった。
2. MWCNT コート Ti 板は、研磨 Ti 板、collagen コート Ti 板とほぼ同等の細胞増殖を示したことから、MWCNTs による為害性は少ないと考えられた。
3. MWCNT コートディッシュおよび Ti 板の非常に高い細胞付着性は、MWCNTs と細胞との機械的結合、MWCNTs のカルボキシル化、比表面積の増大、細胞接着因子の増大により、細胞が長時間付着したと考えられた。

E. 結論

MWCNT-coated Ti plate は、インプラント表面に応用することにより、表面に高い細胞付着性を付与でき、インプラント周囲組織と強固に接着することができる可能性が示唆された。

今後は、MWCNT コート Ti の技術を用いて、生体組織親和性と骨との結合を確認していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y: Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 21: 291-296, 2008.
 2. J.Sato, J.Goto, T.Kato, M.Terada, A.Sato, Y.Kitagawa: Thrombocytopenia associated with loxoprofen sodium: a case report. Asian J Oral Maxillofac surg 19(4): 226-229, 2008.
 3. Yamazaki Y, Saitoh M, Notani K, Tei K, Totsuka Y, Takinami S, Kanegae K, Inubushi M, Tamaki N, Kitagawa Y: Assessment of cervical lymph node metastases using FDG-PET in patients with oral squamous cell carcinoma. Annals of Nuclear Medicine: 22(3): 177-184, 2008.
 4. Hata H, Kitamura T, Higashino F, Hida K, Yoshida K, Ohiro Y, Totsuka Y, Kitagawa Y, Shindo M: Expression of E1AF, an ets-oncogene transcription factor, highly correlates with malignant phenotype of malignant melanoma through up-regulation of the membrane-type-1 matrix metalloproteinase gene. Oncol Rep: 19(5): 1093-1098, 2008.
 5. 寺田典子: コラーゲン上に多層カーボンナノチューブをコートした細胞培養担体の開発. DE 165: 35-36, 2008.
 6. Michiko TERADA, Shigeaki ABE, Tsukasa AKASAKA, Motohiro UO, Yoshimasa KITAGAWA and Fumio WATARI: Development of a Multiwalled Carbon Nanotube Coated Collagen Dish. Dent. Mater. J. 28(1): 82-88, 2008.
 7. Michiko Terada, Shigeaki Abe, Tsukasa Akasaka, Motohiro Uo, Yoshimasa Kitagawa and Fumio Watari: Multiwalled carbon nanotube coating on titanium. Bio-Medical Materials and Engineering: in press, 2009
- ### 2. 学会発表
1. Michiko Terada, Motohiro Uo, Yoshimasa Kitagawa, Fumio Watri: Development of multi walled carbon nanotubes coated collagen for cell culturing. International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes (ISNT2008). 2008.6.16-17
 2. 寺田典子, 宇尾基弘, 北川善政, 巨理文夫: 多層カーボンナノチューブをコラーゲンコートディッシュにコートした細胞培養担体の開発と金属への応用. 第 52 回日本歯科理工学会学術講演

会. 2008.9.20-21

3. 寺田典子, 宇尾基弘, 北川善政, 巨理文夫: カーボンナノチューブの細胞培養担体およびインプラント材料表面改質への応用. 北海道歯学会平成20年度秋季大会. 2008.11.21-22

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



Figure 1. Relationship between the diameter of carbon nanotubes and their surface area. The diameter of carbon nanotubes was measured by TEM. The surface area was calculated from the diameter of carbon nanotubes. The surface area of carbon nanotubes decreased as the diameter of carbon nanotubes increased.

Fig.1

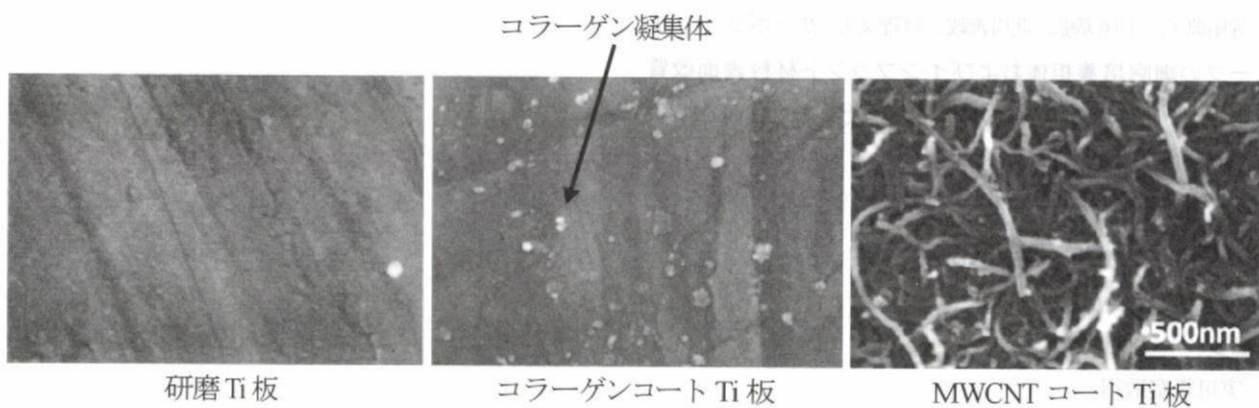


Fig.2

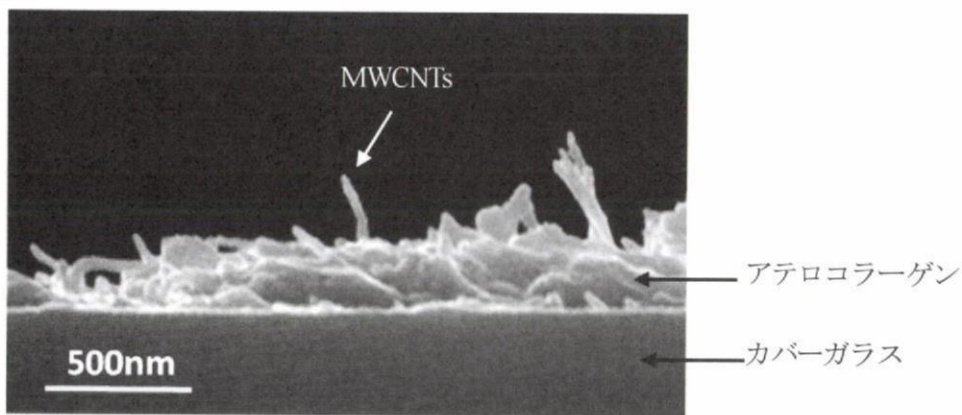


Fig.3-1

MWCNT-coated Ti plate $0.13 \pm 0.01 \mu\text{m}$
collagen-coated Ti plate $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}$
polished Ti plate $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}$

Fig.3-2

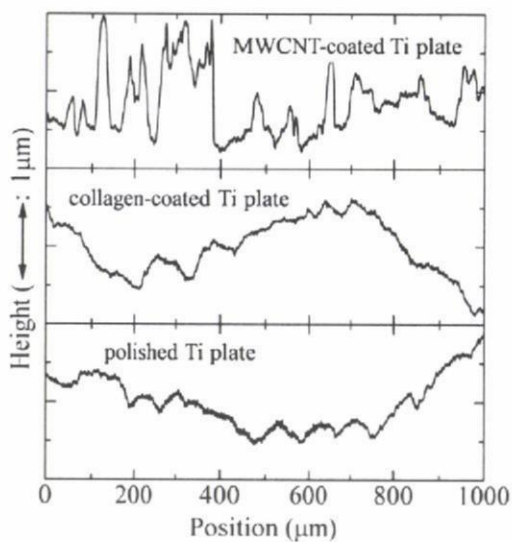


Fig.4

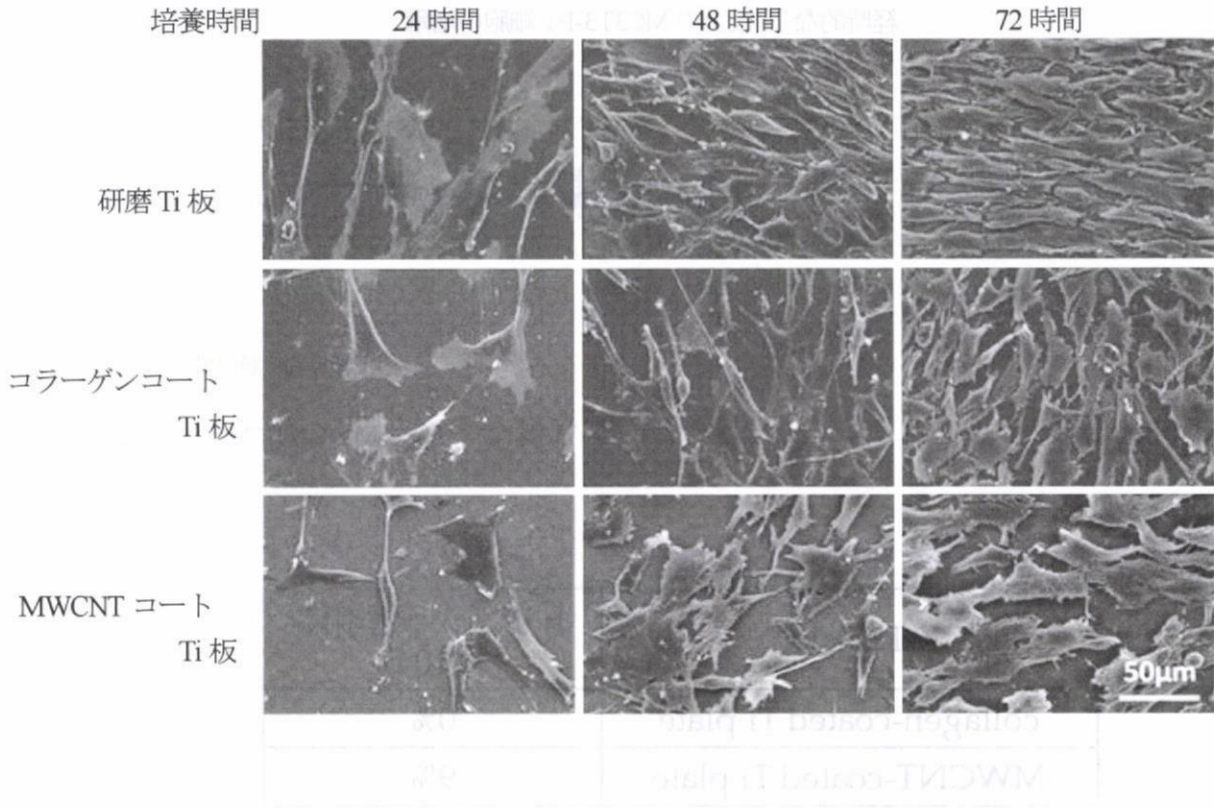
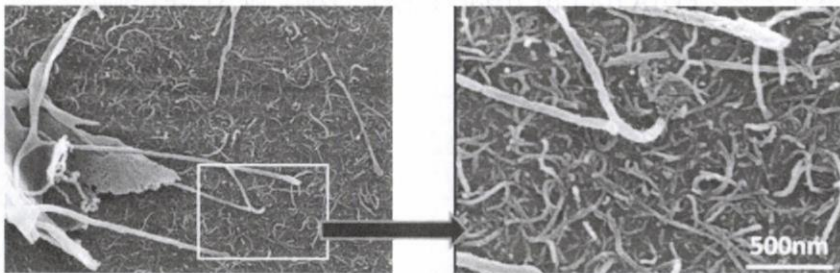
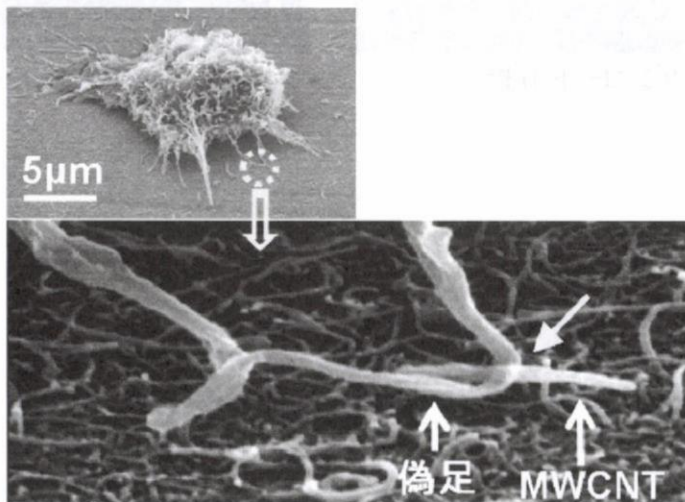


Fig.5



多くの MC3T3E1 細胞の偽足先端は MWCNTs に付着している。



一部の細胞の偽足先端は MWCNTs と機械的結合が認められた。

Fig.6

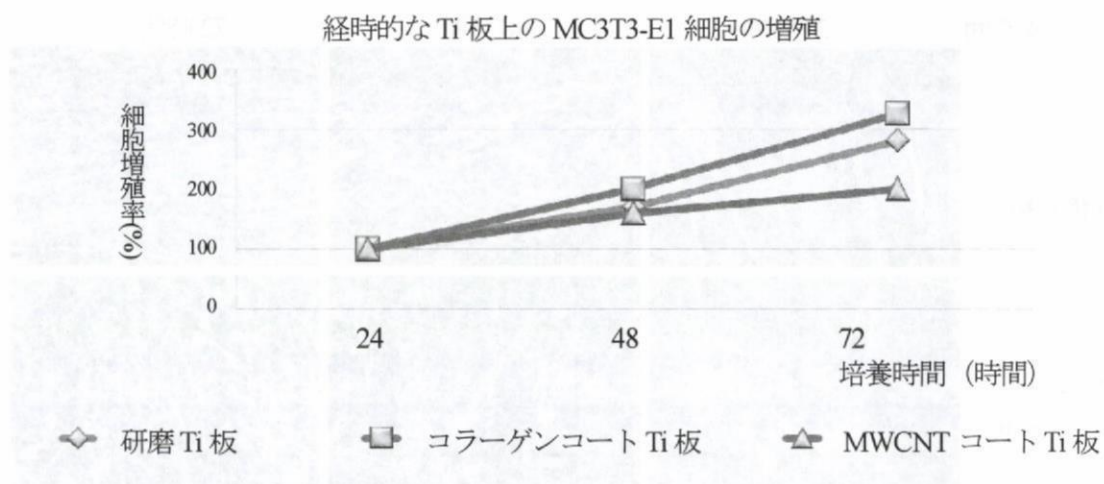


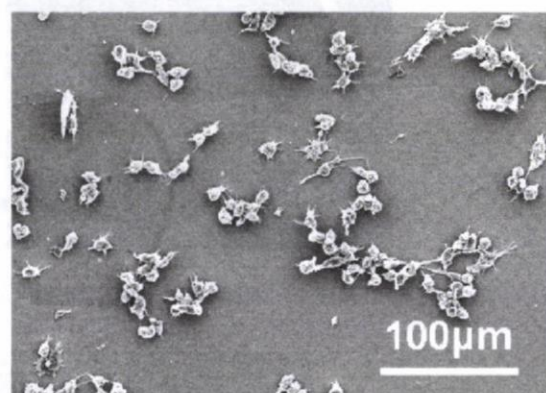
Fig.7

Ti plate	トリプシン作用時間10分
collagen-coated Ti plate	0%
MWCNT-coated Ti plate	9%

トリプシン EDTA 作用 10 分後の Ti 板上の残存 MC3T3-E1 細胞



コラーゲンコート Ti 板



MWCNT コート Ti 板



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」(3)：
「トンネル構造」の血管と骨の誘導効果と最適空間論について

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)パイロットコーポレーション
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	郁小兵	新郷医科大学客員教授
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スcaffoldsの構造を追求してきた結果、私たちは「人工細胞外マトリックスの幾何学」に到達した。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。そのうち人工の細胞外マトリックス (人工 ECM) については、最適な 3 次元幾何構造がとくに重要である。骨と血管の形成に最適空間の一つをハニカム構造のトンネルであるが、我々は既にその最適直径を決定した (厚さ 1 mm のハニカム型ディスク β TCP の場合、最適直径は、75 μ m)。今回は、長軸方向に伸びた円柱状ハニカムを用いて骨誘導タンパク質 (rhBMP-7) 存在と非存在下での、骨と血管の誘導現象を比較する。【方法】縦方向に直径 300 μ m の円形トンネルを 37 本備えた円柱で、外側の直径は 3 mm、長さは 4 mm および 10 mm 2 種類のハニカム型 β TCP を作製した。これらの人工 ECM を、BMP 添加及び非添加で、ラットの皮下に埋植し、2 週後に摘出して組織学的に観察した。【結果】BMP 添加群では、4 mm 長のハニカムのトンネル内に、骨と血管が、トンネルの長軸に並行して成長している。このような、骨と血管の成長は血管を中心にして、それを取り囲むようにして骨が成長している。従って、毛細血管の 10-40 μ m の間隔において骨芽細胞が、新生骨の上に規則的に配列し、骨を形成しているのが明瞭に観察できる。血管・骨の間の空隙には、骨芽細胞の前駆細胞と、血管の前駆細胞 (未確認) が存在した。一方、BMP 非添加群では、埋植後 2 週間に血管のみが顕著に長軸方向に新生することを見出した。【考察と結論】、長軸ハニカムのトンネル構造は、BMP があれば骨を、なくても血管のみを誘導するという今回の発見は、人工 ECM 幾何学の新しい顕著な実証であり、このような「トンネル効果」は骨、血管のみならずおそらくは神経の再生にも有用であることが期待される。

A. 研究目的

21 世紀における長寿社会では、骨、歯など

の硬組織の長期にわたる健全維持と再建の必要が高まっていることは明らかである。骨組織の部分欠損、典型的な例としては歯周疾患による

歯槽骨の部分欠損であるが、その再建には、いくつかの要素が必要である。現時点においては、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。

骨組織再建に最適な人工ECMは何かというテーマを求めて、これまで無数の研究がなされてきた。これまでの研究では、最適人工ECMの、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。1-17) 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。すでに敦賀らは、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 μ m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。

その後、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

(ハニカム型 β TCP)を開発した。最近我々は、このハニカム型 β TCPのトンネル直径を、50、75、300 μ mの3段階に変えた人工ECMを比較した結果、2週間後のアルカリフォスファターゼ活性で比較した限りでは、75 μ mのトンネルが最も高い結果を得た。この結果が、材質の差であるのか、不規則なポアと直線トンネルとの差であるのかは、今後の課題である。

今回は、ハニカム型 β TCPの、骨以外の組織再建への応用を目指して、トンネルの長さを延長し、BMP非存在下において骨以外の関連組織、すなわち血管が誘導されるか否かを追求した。

B. 研究方法

BMP担体として使用した人工ECM:

直径3mm、高さ4mmならびに10mmの円筒形で、比較的気孔率の高い β -TCPよりなるセラミックスであり、長軸方向に直径300 μ mのトンネルを、それぞれ個備えた、いわゆる「長軸ハニカム β -TCP」を開発し製作した。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法に従った。

長軸ハニカム状型-TCPに、rhBMP-7 (R & D System, USA, 1.0 μ g/5 μ l) と等量のコラーゲン (高研 Atelocollagen I-PC) を (15 μ g/50 μ 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含浸ハニカム型 β -TCP”とした。

使用動物:

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。

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：ネンブタール、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、ラットの背部皮下、または大腿部の大腿筋肉内に埋植した。埋植2、3あるいは4週間後に試料を摘出し分析に供した。

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。

C. 研究結果

長軸ハニカム状 β -TCPの創製：

今回製作した長軸方向に直径300 μ mのトンネルを37個備えた、直径3mm、高さ4mmならびに10mmの円柱状の β -TCP、すなわち「長軸ハニカム β -TCP」は、いずれもFig. 1ABおよびC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。

組織学的所見：

埋植後、2週目の観察では、長さ4mm、ならびに10mmのBMP添加長軸ハニカム β -TCPのトンネル内に、骨は、血管を中心にほぼ同心円状に形成されている。長さ4mmの長軸ハニカムをラットの皮下に埋植2週後の組織像を、Fig. 2AおよびBに、長さ10mmのハニカムをラットの大腿部の筋肉内に埋植2週間後の組織像をFig. 3ABCおよびDに示す。筋肉内での中心血管の形成は顕著である。

一方、BMPを添加せずに、長さ4mmの長軸ハニカムをラットの筋肉内に埋植3週後の組織像をFig. 4ABに示す。注目すべきは、ハニカムの中心に、赤血球を含む数本の毛細血管が走

っているである。

D. 考察と結論

本論文は、生体内吸収性素材である β -TCP製のハニカム型人工ECMのトンネル内に、4あるいは10mmに及ぶ距離で、BMP存在下では骨が、非存在下では血管が形成されることを示した最初の報告である。今回の発見は、人工ECM幾何学の新しい顕著な実証であり、ハニカム型構造体におけるこのような「トンネル効果」は骨、血管のみならずおそらくは神経の再生にも有用であることが期待される。

E. 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 Eng Part A* 2008, Oct; 14 (10): 1663-171.

- 13) Kawakami T, Kuboki Y, Tanaka J, Hijikata S, akazawa T, Murata M, Fujisawa R, Takita H, Arisue M: Regenerative medicine of bone and teeth – with special references to biological principles, problems and indicators, *J Hard Tissue Biology* 16 (3): (2007) 95-113.
- 14) Y: Alveolar ridge augmentation using various bone substitutes- a web form of titanium fibers promotes rapid bone development, *Kobe J Med Sci*, 2007 53 (5): 257-263
- 15) 久保木芳徳, 藤澤隆一, 滝田裕子: 人工細胞外マトリックス, ティッシュエンジニアリング 2007, 田畑泰彦, 岡野光夫, 編集, 日本医学館, 東京, 101-108.
- 16) Kazuyuki Fukushima, Mitsuhiro Enomoto, Shoji Tomizawa, Makoto Takahashi, Yoshiaki Wakabayashi, Soichiro Itoh, Yoshinori Kuboki, Kenichi Shinomiya: The Axonal Regeneration Across a Honeycomb Collagen Sponge Applied to the Transected Spinal Cord, *J Med and Den*, 2008
- 17) Kuboki, Y., Iku, S., Yoshimoto, R., Kaku, T. and Takita, H.: Modification of titanium surfaces based on the principles of geometry of the artificial extracellular matrix (ECM). In Tanaka, J. and Itoh, S. (Eds), *Modification of the Biomaterials for Clinical Application*, Research Signpost, Kerala, India, 2009 in Press.
- 18) Yoshinori Kuboki, Michiko Terada, Yoshimasa Kitagawa, Shigeaki Abe, Motohiro Uo and Fumio Watari: Interaction of collagen triple-helix with carbon nanotubes: Geometric property of rod-like molecules, *Biomed Mater Eng*, 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, 亘理文夫: 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, 亘理文夫: 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. 1A

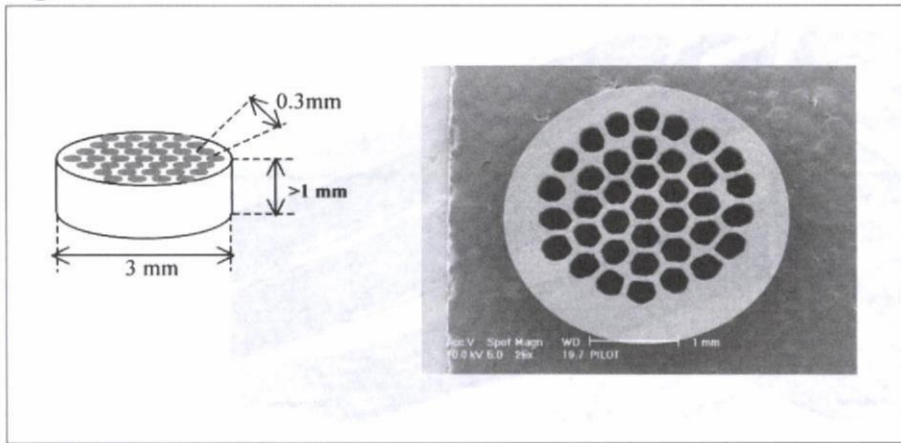


Fig. 1B

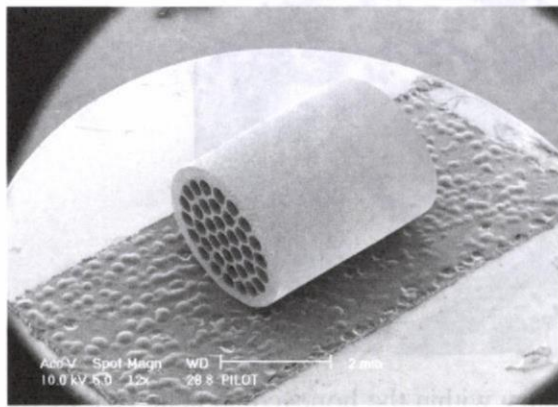


Fig. 1C

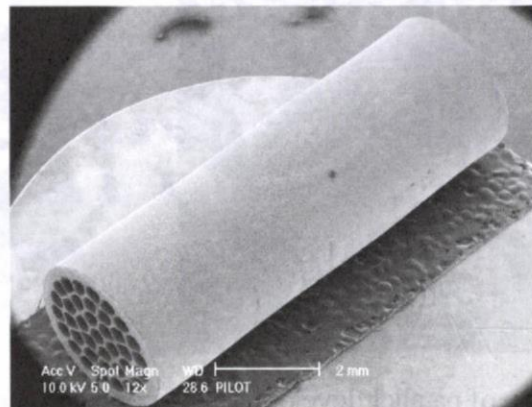


Fig. 1 Images in SEM and light microscopy of honeycomb shaped beta-TCP ceramics of disc type (A), cylinder-type of 4 mm length (B) and of 10 mm length (C), all uniformly having outer diameters of 3 mm, and thirty-seven straight tunnels with diameter of 300 μm . The scale bar in right side of A is 1 mm; those in B and C are 2mm. Methodology of manufacturing process on these honeycomb ceramics is outlined in the text.

Fig. 2A

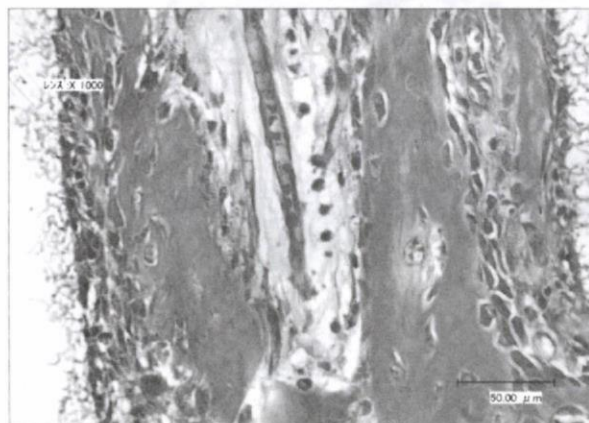


Fig. 2B

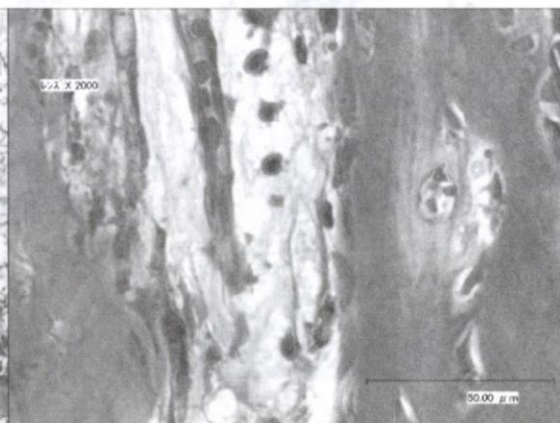


Fig. 2A and B: Histology of parallel development of bone and capillary within the honeycomb beta TCP of 4mm length implanted with rhBMP-7 for 2 weeks

Spaces between capillary and new bone were close as 20-50 μm , thereby a group osteoprogenitor cells and unidentified cells of stellar shape were observed. B is the enlarged image of A.

Fig. 3A

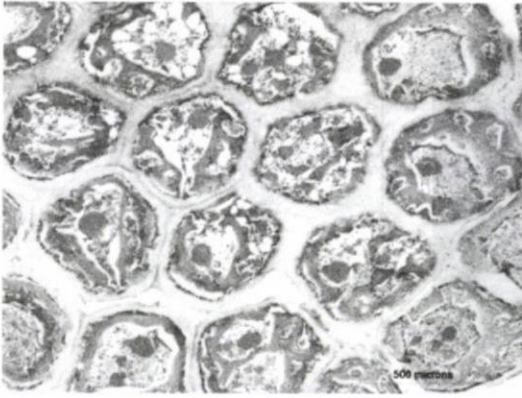


Fig. 3B

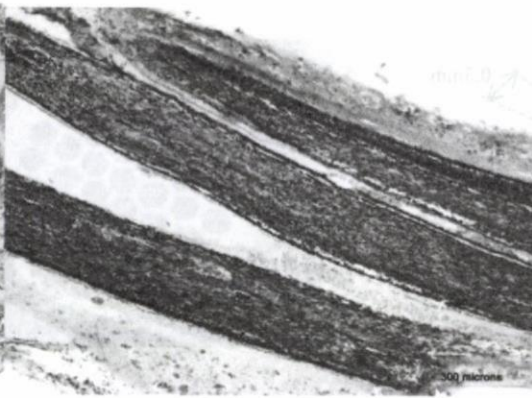


Fig. 3C

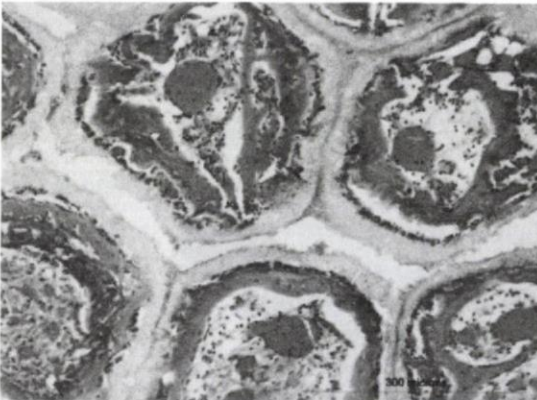


Fig. 3D

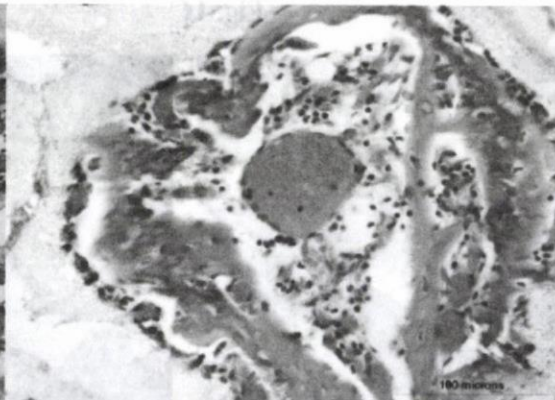


Fig. 3 Histology of parallel development of bone and capillary within the honeycomb beta TCP of 10 mm length implanted with rhBMP-7 for 2 weeks. A, C and D show the step-wise enlargement of the cross-sectional image of honeycomb β -TCP; B, longitudinal section. Capillaries were clearly observed in the center of the tunnels in all sections.

Fig. 4A

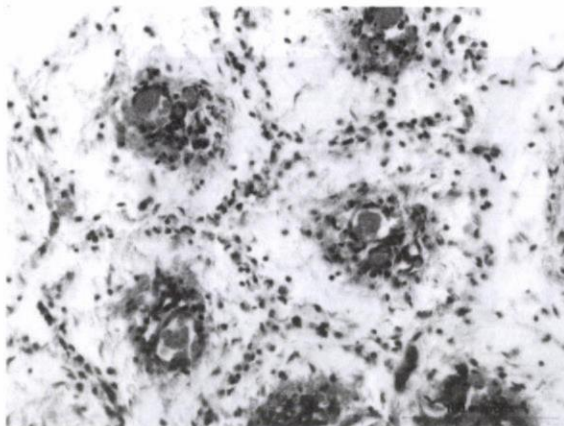


Fig. 4B



Fig. 4

Vasculature formation within the tunnel of honeycomb β -TCP of 4 mm length without addition of BMP. It was found that even without BMP; vasculature was clearly induced in the center of the tunnels, indicating the remarkable example of geometric effect of artificial ECM. A is the cross section and B is the longitudinal section of the honeycomb β -TCP, retrieved 3 weeks after implantation.

Fig. 5

Diagram of osteo- and vasculo-genesis in honeycomb β -TCP

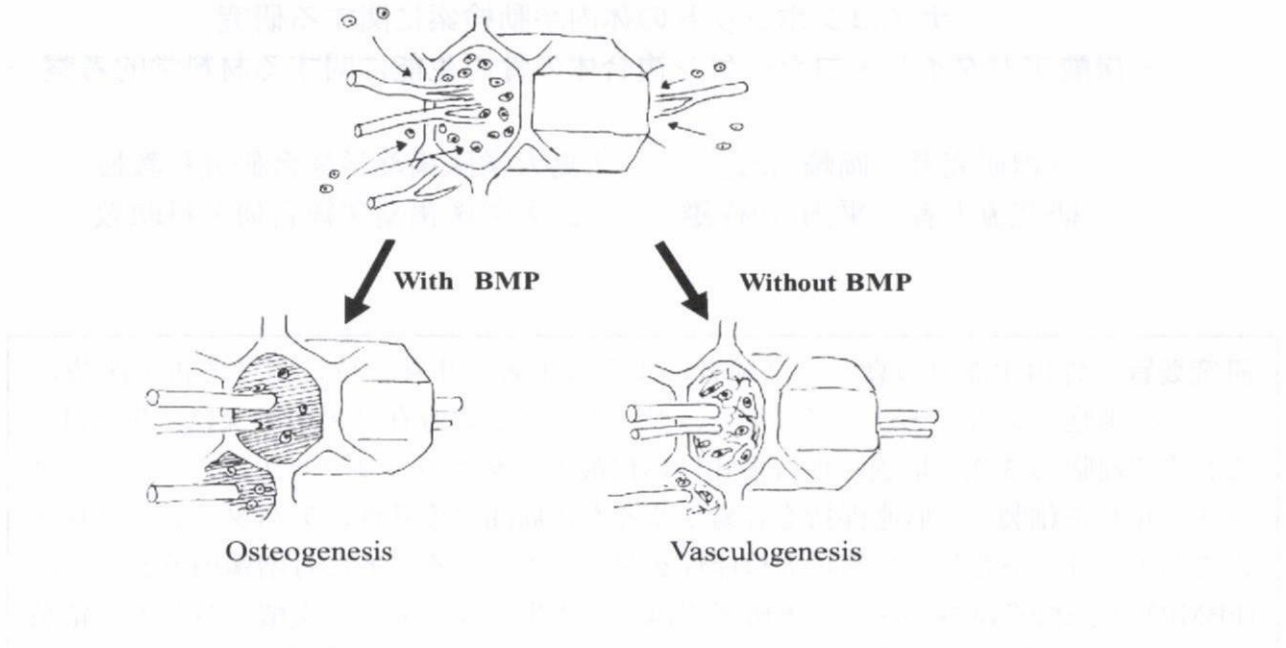


Fig. 5

Schematic representation on the function of artificial ECM of honeycomb shaped β -TCP

With BMP the honeycomb shaped β -TCP induces haversian-type bone formation accompanied by vasculature in the center of the tunnel. However it was found in this paper that even without BMP; vasculature was also induced in the center of the tunnels, indicating the remarkable example of geometric effect of artificial ECM.

ナノコンポジットの体内挙動検索に関する研究
—炭酸アパタイト・コラーゲン複合体の骨再生能に関する材料学的考察—

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 骨再生能力の衰えた高齢者のような患者や生体部位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し、さらに高機能性を付与することを目的に骨増殖因子としてのrhBMP2の修飾を試みてきた。本研究では、骨再生に及ぼすナノ炭酸アパタイト結晶中の炭酸含有量の影響や、その最適濃度の検討、並びに血管新生因子としてのSVVYGLRサイトカインの影響を材料学的観点から検討したところ、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、炭酸含有量の異なる各種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、1.0wt%コラーゲン溶液と混合し、スポンジスカフォールド試料を作成した。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。炭酸含有量の異なる各種スカフォールドを家兎大腿骨に埋入し、骨面積率を比較したところ、生体骨と類似した結晶性と炭酸含有量を有するスカフォールドが最も高い骨再生能を示した。一方、SVVYGLRを修飾した骨様炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドでは、埋入1週目で血管新生が認められた。

A. 研究目的

超高齢社会を迎えつつある日本においては、介護費や医療費の増大はもはや必然の状況であり、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おり、骨再生能の衰えた患者や部位に対しても

有効な高機能性の硬組織バイオマテリアルの創製が期待されている。

我々は炭酸アパタイト・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。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。本研究では、まず各種

炭酸含有量の異なる炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジスカフォールドを作成し、骨形成能に及ぼす炭酸含有量の影響について検討することにした。さらに高機能性を付与するために血管新生因子であるSVVYGLRをコンビナトリアルケミストリーの手法を用いて合成し、骨様炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジスカフォールドに添加することにより骨形成能の促進について検討した。

B. 研究方法

ハイドロキシアパタイト HAp および炭酸アパタイト CO_3Ap の合成は、0.2 M 酢酸カルシウム $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶液、0.5 L、並びに 0 M, 0.005 M, 0.01 M, 0.03 M, 0.06 M, 0.3 M の炭酸アンモニウム $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ を含む 0.12 M リン酸アンモニウム $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5 L を、攪拌中の 1.3 M 酢酸アンモニウム溶液 $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 溶液、1 L 中へ供給することにより 60°C, pH 7.4 一定で行った。

また、各種炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジ (HA-CS, 0.01CA-CS, 0.03 CA-CS, 0.06 CA-CS, 0.03 CA-CS) は、0.8 mL の 0.1M 水酸化ナトリウム NaOH と 10 mL の 0.1 wt% アテロコラーゲンを混合ゲル化させ、その中に 243 mg の HAp および CO_3Ap を混合し、テフロン型に入れ、-80°C で 2 時間凍結後、-50°C で 24 時間凍結乾燥することにより作製した (図 1)。得られた各種スポンジ試料を家兎大腿骨へ埋入し (図 2)、さらには最適炭酸含有量組成の試料に対し血管新生因子 SVVYGLR を合成後修飾したスカフォールドを作製しラット頸骨に埋入することにより、骨形成能を検討した。

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

合成した炭酸アパタイトの結晶性は炭酸含有量とともに低下し、骨と類似した炭酸含有量 (4-6wt%) を有する炭酸アパタイトを用いて作成した炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールド (0.06 CA-CS) は、骨と同程度の結晶性を示した (図 3)。この炭酸

アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、細胞の遊走には適当なサイズの貫通孔を有した。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。炭酸含有量の異なる各種スカフォールドを家兎大腿骨に埋入したところ、2 週目において炭酸含有量の高い試料では材料の吸収と骨形成が始まった (図 4)。また、骨面積率を比較したところ、生体骨と類似した結晶性と炭酸含有量を有するスカフォールドが最も高い骨再生能を示した (図 5)。一方、SVVYGLR を修飾したスカフォールドでは、埋入 1 週目で早くも血管新生が認められた (図 6)。

D. 考察

一般に炭酸アパタイトは、炭酸含有量の増加に伴い結晶性は低下し、溶解性が高くなることが知られている。本研究で合成した炭酸アパタイトも、骨アパタイトと同様に体内において溶けやすかつ骨芽細胞や破骨細胞により容易に代謝される。ただ、炭酸含有量が多くなりすぎると早く代謝され過ぎ、Ca, P の供給源とはなりえない。また、骨欠損部の形態保持にも役立たない。その結果、図 4 に認められるように、高炭酸含有量の炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジでは、かえって骨再生能が低下したのではないかと考えられる。

一方、SVVYGLR を修飾した実験では、1 週目で血管新生が観察された。このように、スカフォールド埋入早期から血管新生が認められたことは、骨再生にとっては、きわめて重要である。なぜなら、血管は骨形成のために必要なミネラルや養分の運搬供給に欠かせないライフラインだからである。

E. 結論

本研究で試作した炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは、骨の結晶性や炭酸含有量に類似した試料で最も高い骨形成能を示し、血管新生因子 SVVYGLR を化学修飾することによりさらに骨再生を促進する可能性が示唆された。この新規創製のスカフォールド材料は、硬組織再生用生体材料として有望である。

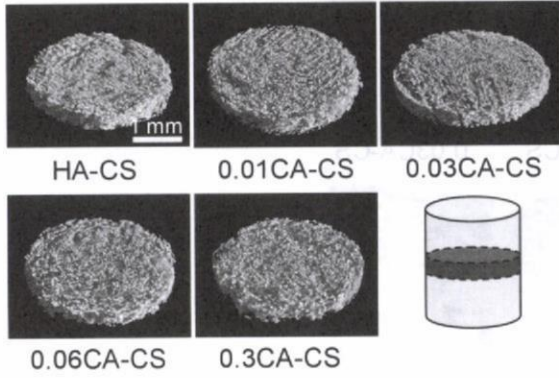


図1 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・
コラーゲンスカフォールドの μ CT横断面像

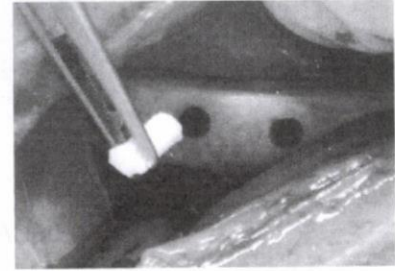


図2 家兎大腿骨への炭酸アパタイト・
コラーゲンスカフォールド埋入時写真

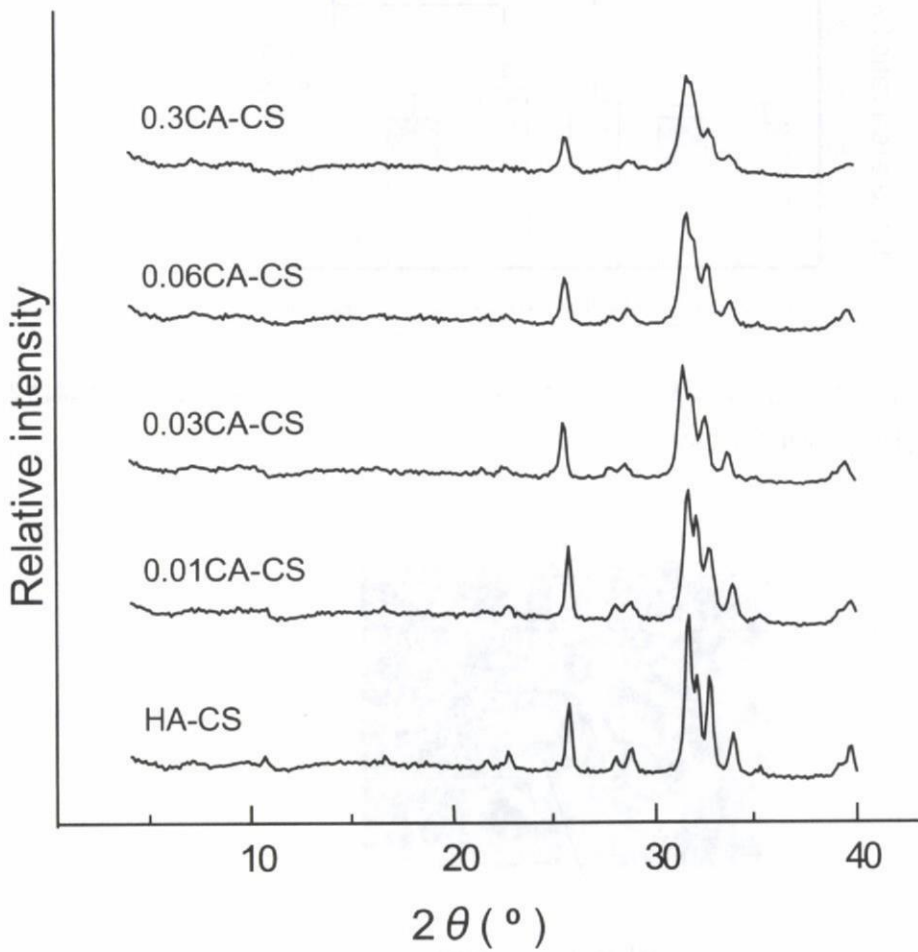


図3 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの
X線回折パターン

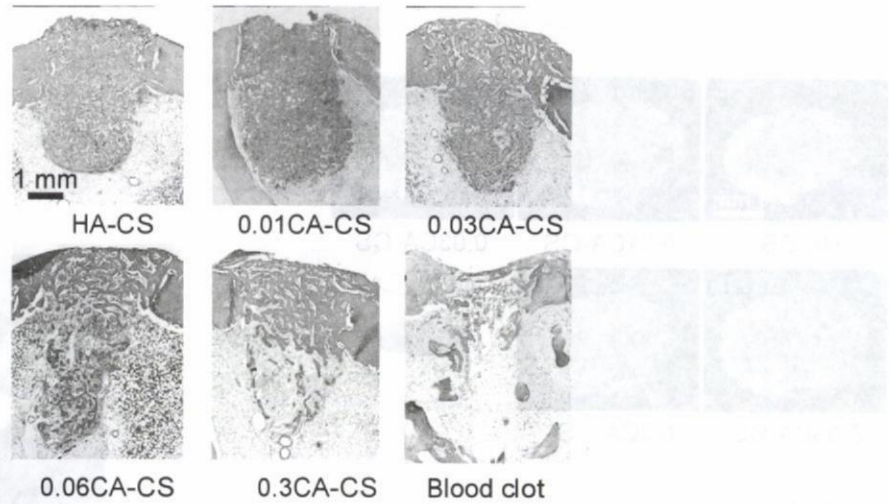


図4 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドを家兎大腿骨埋入2週後のH-E染色像

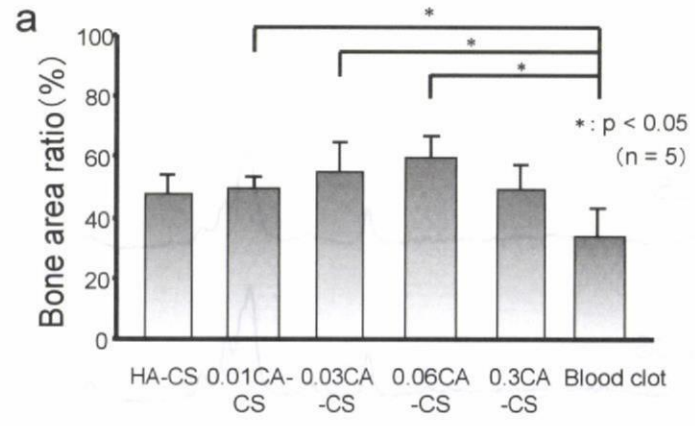
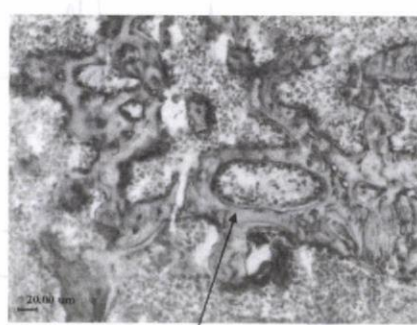


図5 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨面積率の比較(家兎大腿骨埋入3週間後の値)



VIII factor-staining

図6 SVVYGLR修飾炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの血管新生能(ラット頸骨埋入1週間後の組織学的所見)