

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.14)。

### 3. 動物実験における骨再生の検討結果

a) Fig.15 に示した組織像では、粗研磨 Ti の周囲に Ti の弧に沿って薄い紫色に染色された細胞が確認された。コラーゲンコート Ti MWCNT コート Ti の周囲には Ti の弧に沿って薄い青色に染色された細胞が確認された。しかし、Ti 周囲には骨や類骨を示す薄茶色の組織像や、薄赤色の組織像は確認されなかった。

## D. 考察

1. 水溶液中への分散が困難である MWCNTs にカルボキシル基を付与し、コール酸ナトリウム水溶液にて分散を行うことにより、MWCNTs を均一に分散することができた。
2. コラーゲンコートディッシュ表面に均一かつ緻密に MWCNTs が吸着し、凝集体がほとんど存在しない MWCNT コートディッシュの作製には、100ppmMWCNTs 分散液を用い、分散液を 3 時間作用させたものが最適であることが判明した。
3. 最適条件で作製された MWCNT コートディッシュは、透過性を持ち、光学顕微鏡観察が可能であった。
4. MWCNT コートディッシュ上の MWCNTs は、洗浄や培養で剥離することなく安定していた。
5. MWCNT コートディッシュでの細胞活性、細胞増殖率ともコラーゲンコートディッシュにやや劣るものの、コラーゲンコートディッシュの高い組織親和性を考慮するとほぼ同等の組織親和性があると考えられた。
6. MWCNT コートディッシュ上の細胞はトリプシン EDTA 処理を行っても剥離しにくく、高い細胞付着性を持っていることが明らかとなった。
7. MWCNT コートディッシュは、細胞親和性、高い細胞付着性を持つことから、選択性細胞採取などの特徴を持った新たな細胞培養担体とし

ての可能性が示唆された。

8. 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なかった。

9. MWCNT-coated Ti 板は、研磨 Ti 板、collagen-coated 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。

10. 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。

11. 動物実験において、十分な埋入期間をおいにも関わらず MWCNT コート Ti 線の周囲に骨が確認されなかったことから、動物実験の実験系自体を再検討する必要があると考えられた。

## E. 結論

MWCNT-coated dish は、通常の培養担体では付着、培養しにくい細胞も付着させることができる可能性を秘めた、新たな細胞培養担体になりうる可能性が示唆された。

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kyan M, Onodera Y, Iizuka T, Notan K, Kohgo T, Kitagawa Y, Shindoh M: N-acetylglucosaminyltransferase V expression is implicated in malignant phenotype of human tongue squamous cell carcinoma. *Oral Medicine & Pathology* 10: in press, 2006.
2. Minowa K, Sakakibara N, Yoshikawa H, Omori K, Kitagawa Y, Inoue N, Totsuka Y, Nakamamura M: CT and MRI findings of the intracranial Schwannoma of the mandible: a case report. *Dentomaxillofacial Radiology*: in press, 2006.



3. Ogasawara T, Miyoshi N, Sano K, Kitagawa Y, Yamada T, Ogawa T, Miyauchi K, Kinoshita H: Influence of administration methods on the accumulation of ALA-induced Pp-IX in mouse tongue tumors. *Oral Dis* 12(4): 415-419, 2006.
4. Yamazaki Y, Satoh C, Ishikawa M, Notani K, Nomura K, Kitagawa Y: Remarkable response of juvenile diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible to pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*: in press, 2006.
5. Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Kitagawa Y.: Specific expression of substance P in synovial tissues of patients with symptomatic, non-reducing internal derangement of the temporomandibular joint: Comparison with clinical findings. *Br J Oral Maxillofac Surg*. In press, 2006.
6. Yamazaki Y, Satoh C, Ishikawa M, Notani KI, Nomura K, Kitagawa Y: Remarkable response of juvenile diffuse sclerosing osteomyelitis of mandible to pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.104: 67-71, 2007.
7. Minowa K, Sakakibara N, Yoshikawa H, Omori K, Kitagawa Y, Inoue N, Totsuka Y, Nakamura M: CT and MRI findings of the intraosseous Schwannoma of the mandible: a case report. *Dentomaxillofacial Radiology* 36: 113-116, 2007.
8. Sato J, Segami N, Yoshitake Y, Kaneyama K, Yoshimura H, Fujimura K, Kitagawa Y: Specific expression of substance P in synovial tissues of patients with symptomatic, non-reducing internal derangement of the temporomandibular joint: Comparison with clinical findings. *Br J Oral Maxillofac Surg* 45(5): 372-377, 2007.
9. Sato J, Segami N, Nishimura M, Yoshitake Y, Kaneyama K, Kitagawa Y: Expression of interleukin 8 in synovial tissues in patients with internal derangement of the temporomandibular joint and its relationship with clinical variables. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103(4): 467-474, 2007.
10. Kondoh N, Ohkura S, Arai M, Hada A, Ishikawa T, Yamazaki Y, Shindoh M, Takahashi M, Kitagawa Y, Matsubara O, Yamamoto M: Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 43: 455-462, 2007.
11. Minowa K, Inoue N, Ohmori K, Sakakibara N, Kuroshima Y, Totsuka Y, Kitagawa Y, Nakamura M: Vacuum phenomenon in non-open fracture of the mandibular condyle: report of 3 cases. *Dentomaxillofacial radiology* 36(2): 113-116, 2007.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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. 山崎 裕, 佐藤 明, 野谷健一, 鄭 漢忠, 戸塚靖則, 滝波修一, 中村太保, 北川善政: 口腔扁平上皮癌頭部リンパ節転移におけるFDG-PETとCTの診断能に関する比較研究. 第24回日本口腔腫瘍学会総会(シンポジウム3) 口腔癌とPET. 2006年1月26日, 小倉.
2. 齊藤正晃, 北川善政: 口腔癌におけるPET診断. 平成18年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業. 2006.5.16, 支笏湖
3. Yamazaki Y, Kitagawa Y, Saito M, Notani K, Tei K, Totsuka Y, Takinami S, Tamaki N: Comparative study of FDG-PET with CT in assessment of cervical lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma” Society of nuclear medicine 53rd annual meeting, June 4, 2006, San Diego.
4. Y. Kitagawa, K. Sano, M. Nakamura, T. Ogasawara, H. Okazawa, Y. Fujibayashi, N. Sadato, Y. Yonekura: FDG-PET to Evaluate Response to Intraarterial Chemoradiotherapy for Organ Preservation in Oral Squamous Cell Carcinoma. Society of nuclear medicine 53rd annual

meeting. June 5, 2006., San Diego.

5. 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖則、佐藤隆文、滝波修一、中村太保、北川善政：頭頸部癌頸部リンパ節転移における FDG-PET と CT、US の診断能に関する比較研究 第 30 回日本頭頸部癌学会. 2006.6.15. 大阪

6. Yamazaki Y, Kitagawa Y, Saito M, Notani K, Totsuka Y, Takinami S, Tamaki N: Preoperative lymph node staging of oral cancer using FDG-PET. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 88th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition. Oct 5, 2006, San Diego.

7. 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖則、北川善政：頭頸部癌における MET-PET の有用性の検討 第 51 回日本口腔外科学会総会. 2006.10.12. 北九州

8. 齊藤正晃、山崎 裕、佐藤 明、野谷健一、鄭 漢忠、戸塚靖則、滝波修一、北川善政：頭頸部癌における MET-PET の有用性の検討. 33 回北海道頭頸部腫瘍研究会. 2007.2.17. 札幌

9. 寺田典子、宇尾基弘、久保木芳徳、北川善政、亘理文夫：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、第 49 回日本歯科理工学会学術講演会、2007.5.12-13、北海道札幌市

10. Michiko Terada, Motohiro Uo, Yoshinori Kuboki, Yoshinobu Kitagawa, Fumio Watri: Development of multi walled carbon nanotubes coated collagen for cell culturing and application to metals. The 56th AAID Annual Meeting. 2007.11.7-11, Las Vegas, USA

11. Michiko Terada, Motohiro Uo, Yoshimasa Kitagawa, Fumio Watri: Development of multi walled carbon nanotubes coated collagen for cell culturing. The International Dental Materials Congress 2007. 2007.11.21-24

12. 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

13. 寺田典子、宇尾基弘、北川善政、亘理文夫：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

14. 寺田典子、宇尾基弘、北川善政、亘理文夫：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

1. 特許取得

無し

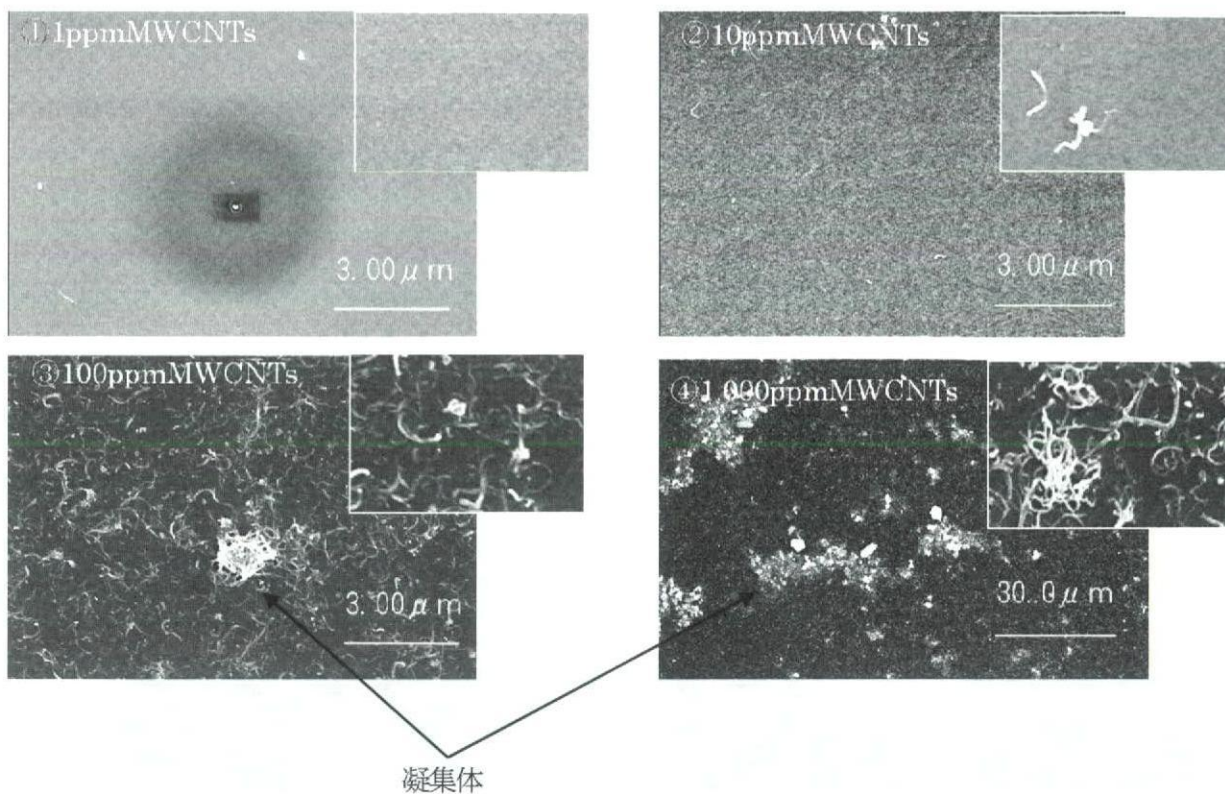
2. 実用新案取得

無し

## G. 知的所有権の取得状況

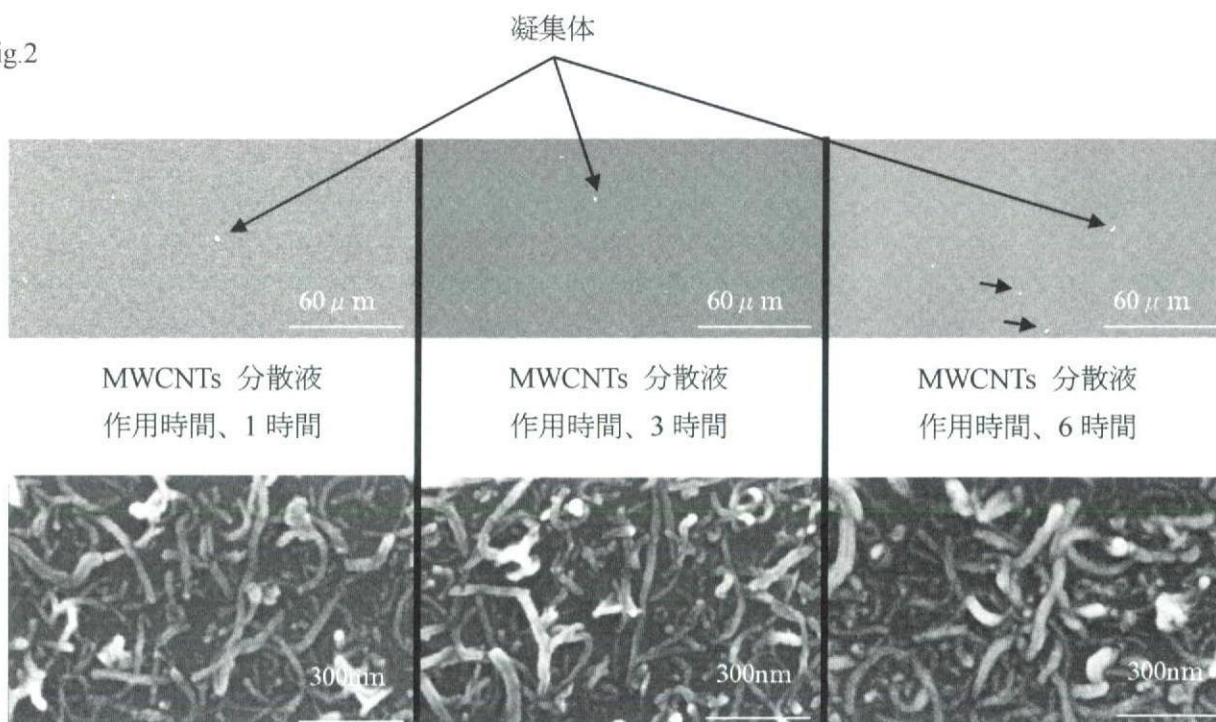


Fig.1



MWCNTs の濃度が高ければ、MWCNTs の付着量は増加するが、凝集体の量も増加する。

Fig.2



MWCNTs 分散液の作用時間が長ければ、MWCNTs の付着量は増加するが、凝集体の量も増加する。

Fig.3 コラーゲンおよびMWCNT コートディッシュの光学像



Fig.4

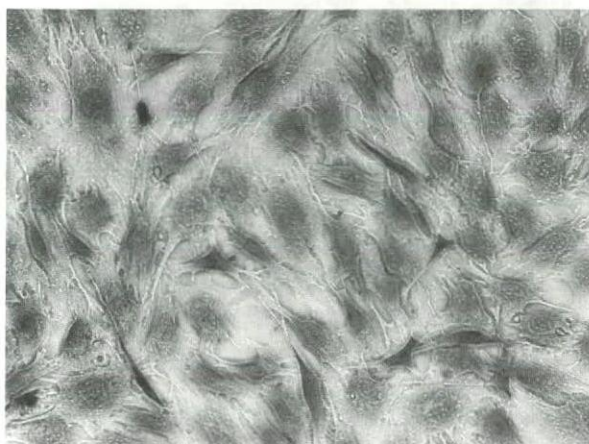


Fig.4-1 コラーゲンコートディッシュ  
光学顕微鏡像：×200



Fig.4-2 MWCNT コートディッシュ  
光学顕微鏡像：×200

Fig.5

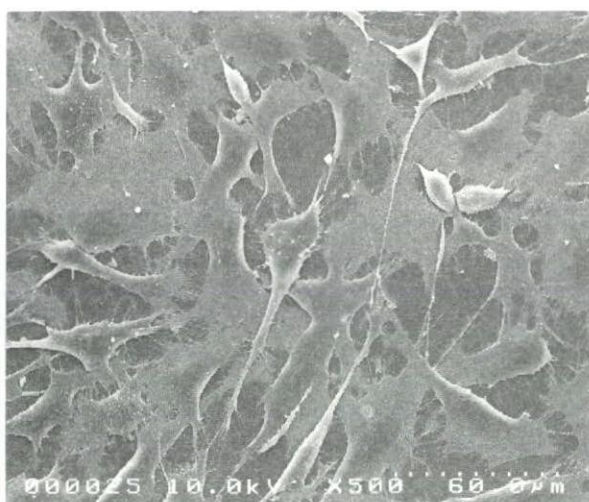


Fig.5-1 MWCNT コートディッシュ  
SEM 像

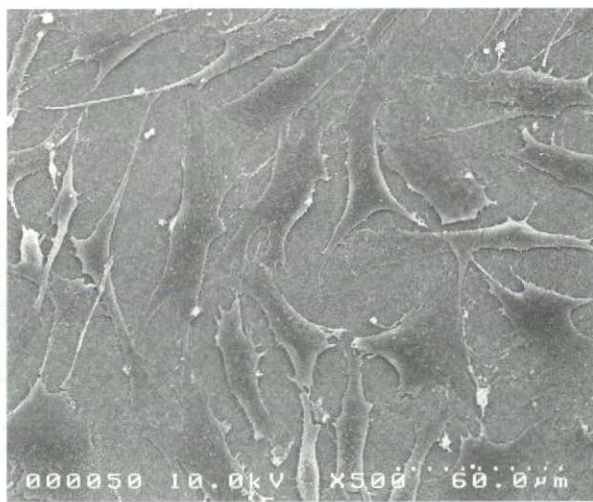


Fig.5-2 コラーゲンコートディッシュ  
SEM



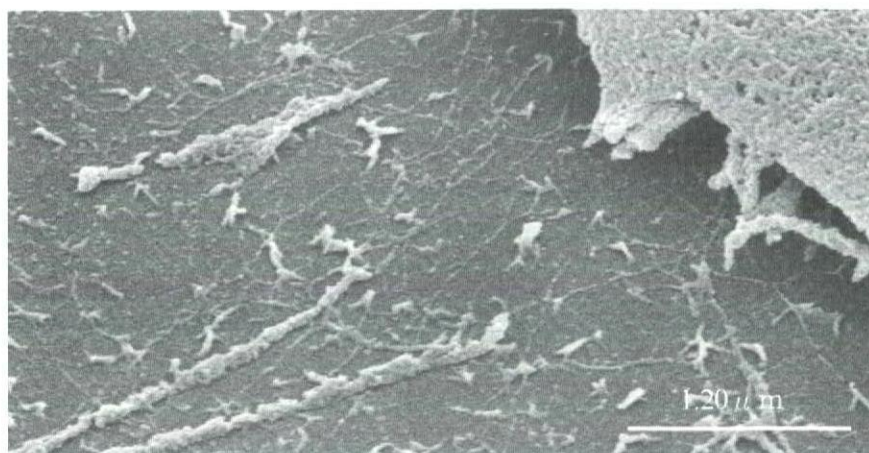


Fig.5-3 コラーゲンコートディッシュ上の細胞の偽足  
SEM 像



Fig.5-4 MWCNT コートディッシュ上の細胞の偽足  
SEM 像

Fig.6

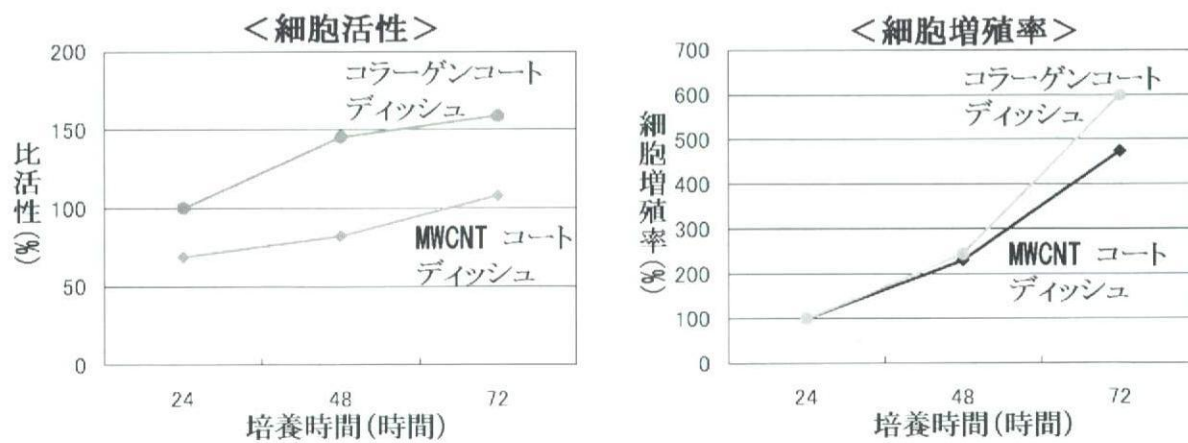


Fig.7

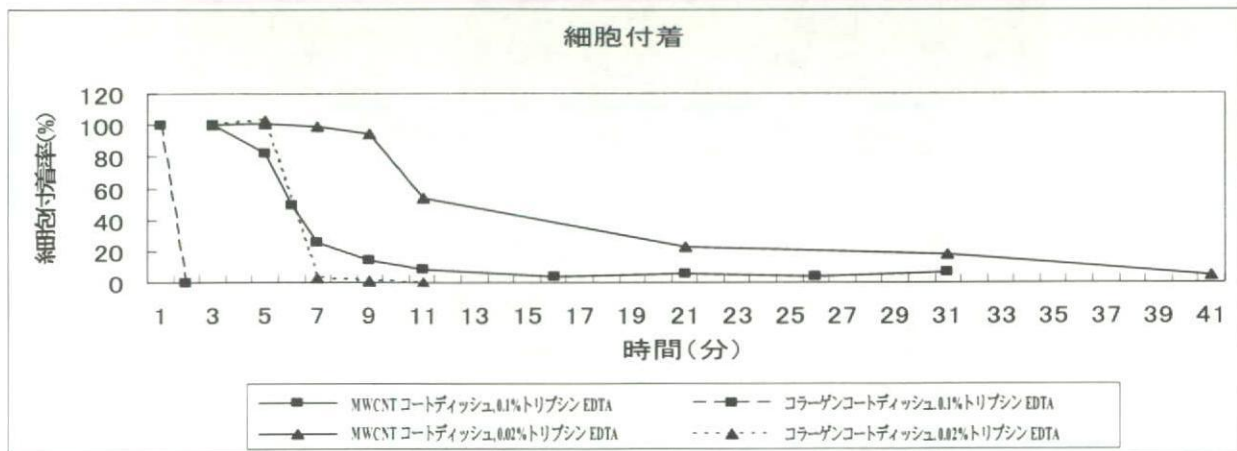


Fig.8

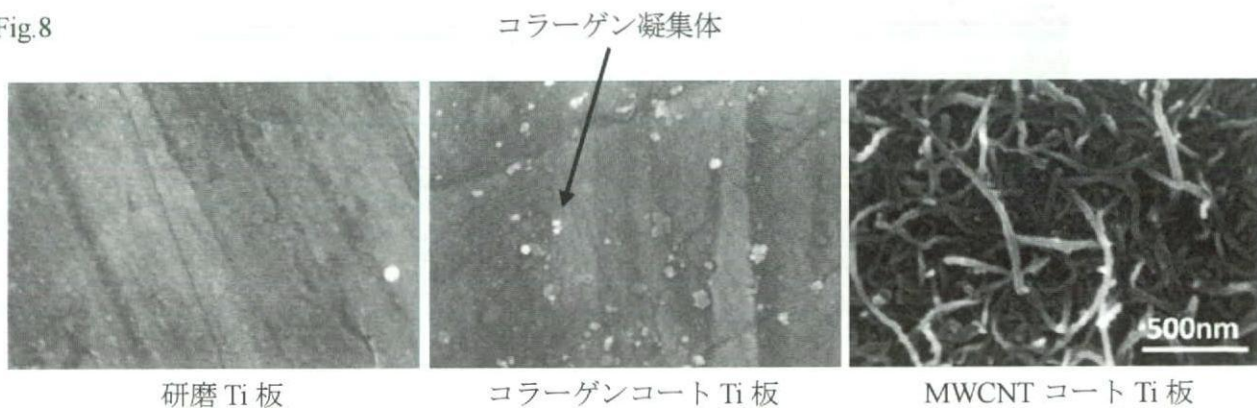


Fig.9

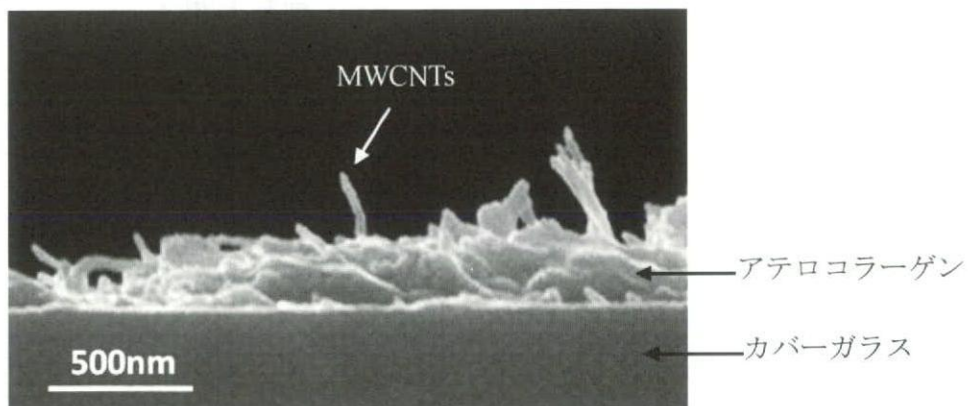


Fig.10-1

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.10-2

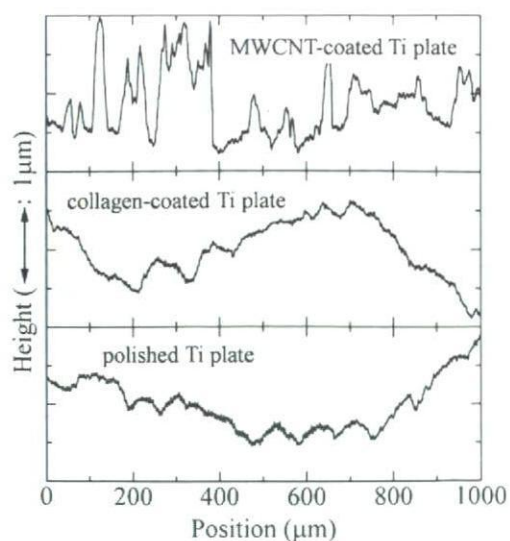


Fig.11

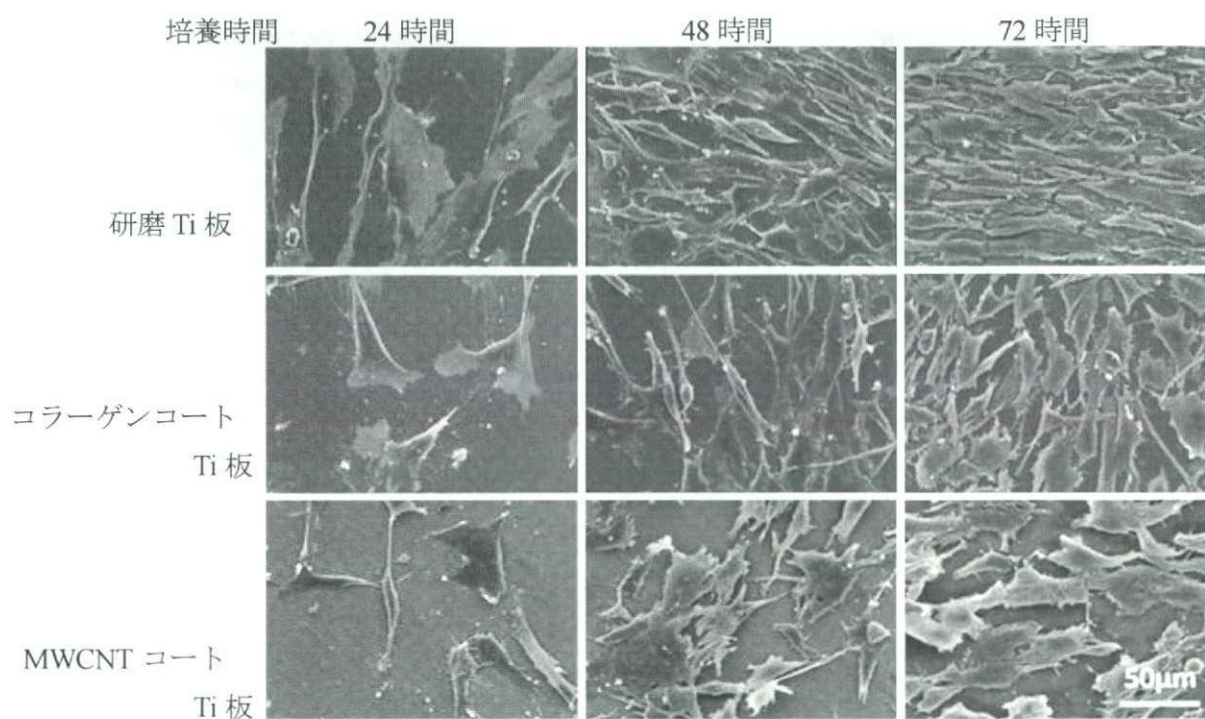
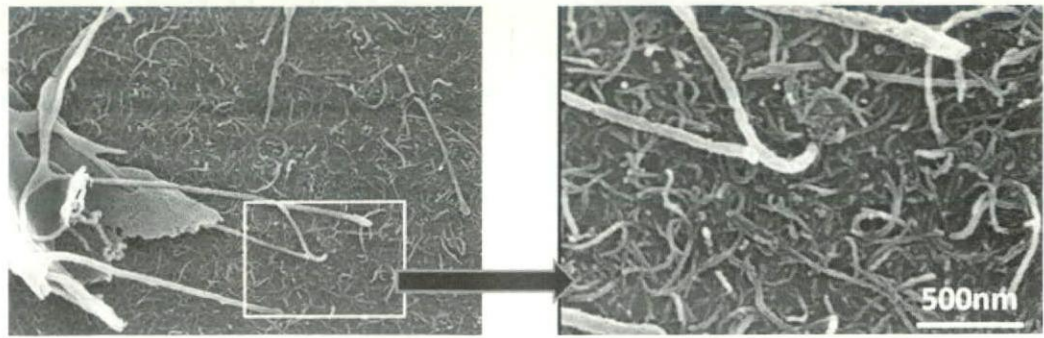
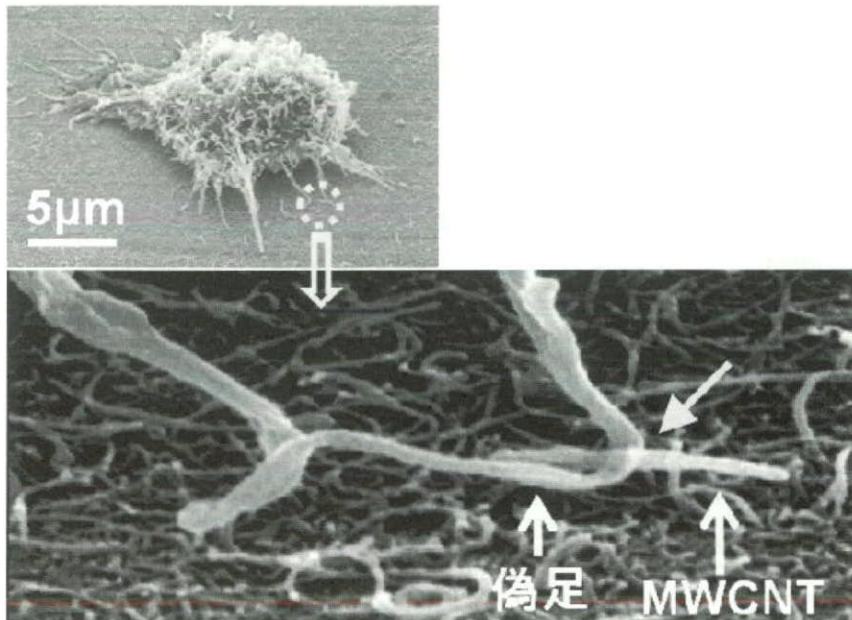




Fig.12



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.13

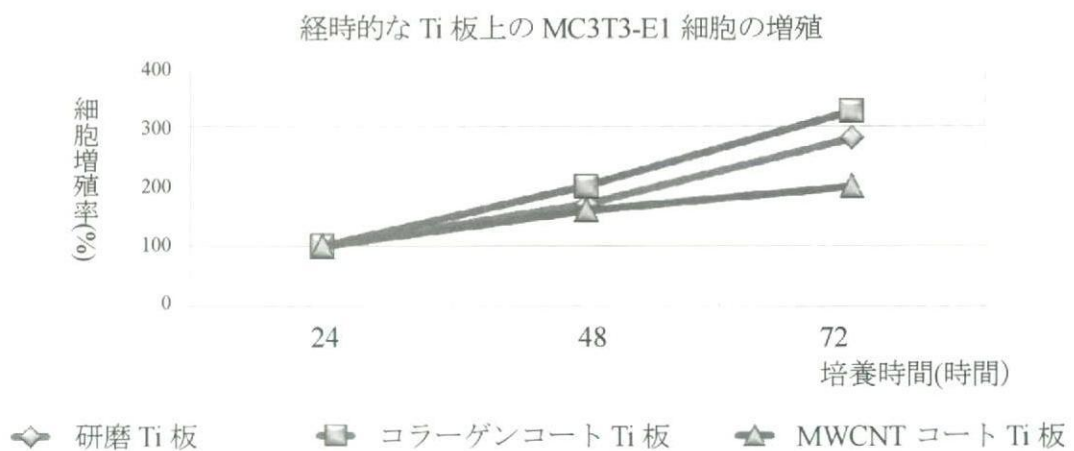


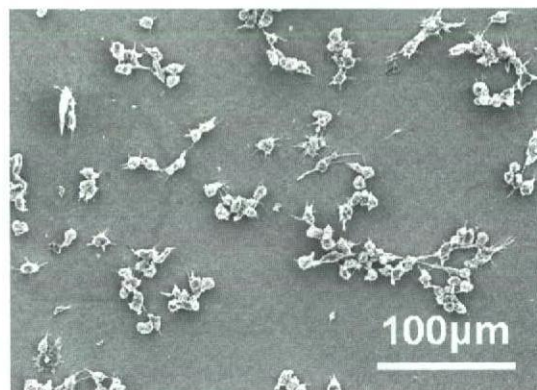
Fig.14

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



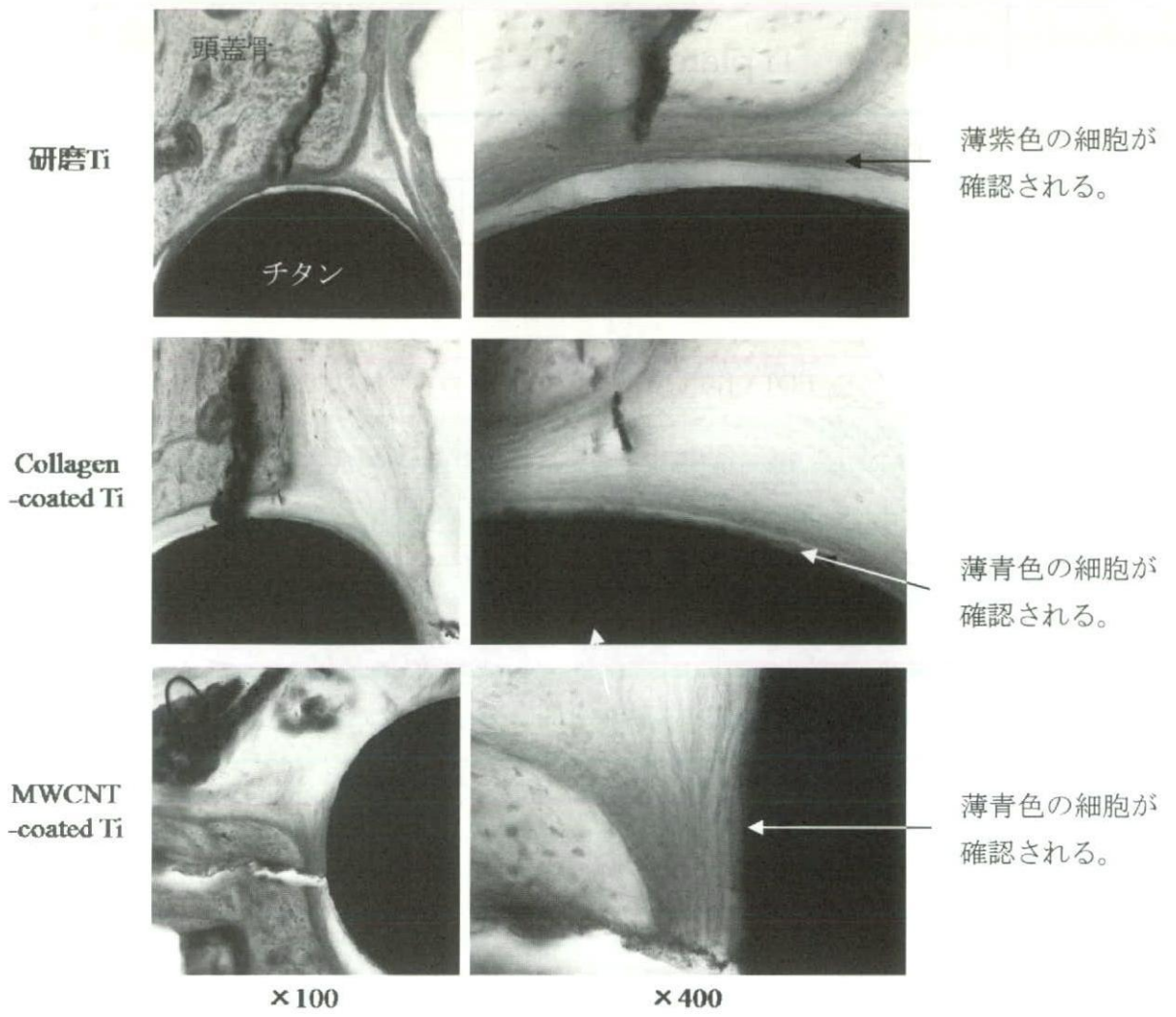
コラーゲンコート Ti 板



MWCNT コート Ti 板



Fig.15



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」の研究

第1報 新素材ハニカム型  $\beta$ -TCP の機能「血管・骨の新生誘導」について

第2報 ハニカム型  $\beta$ -TCP のトンネル直径と、血管・骨の誘導能について

第3報 ハニカム型  $\beta$ -TCP のトンネルの長さ、血管・骨の誘導効果について

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	郁小兵	新郷医科大学客員教授
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	高山満利子	(株)パイロットプレジジョン
研究協力者	寺田典子	北海道大学歯学研究科大学院院生

第1報 新素材ハニカム型  $\beta$ -TCP の機能「血管・骨の新生誘導」について

**第1報 研究要旨** 私たちは、「人工細胞外マトリックスの幾何学」を提唱し、再生医療へのその重要性を強調してきた。組織の再生には、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ECMについては、物理、化学、生化学的性質が詳しく追究されてきた一方、「人工ECMの幾何学的性質」の分析が等閑にされてきた。私たちはこの点に着目し、同一材料でも幾何構造によって組織の分化、成長に多大な影響を与えることを実証し人工ECM幾何学の重要性を強調してきた (Kuboki Y, et al. : Journal of Bone & Joint Surgery,83: 105-115, 2001)。このサイエンスに基づいて、迅速、適切な骨の欠損修復を目指し、新しい高性能の骨補填材の開発が求められている。そこで、われわれは、多数の直線状トンネルを有するハニカム構造が、骨・軟骨・血管の再生医療に極めて有効であると考え、ハニカム構造を持った  $\beta$ -TCP を用いて研究を開始した。その結果、「ハニカム型  $\beta$ -TCP」は第1に吸収性の骨補填剤として実用性があり、さらに、血管新生と骨新生の相互関係研究に有用であることを見出した。3編から成る本研究シリーズでは、「ハニカム型  $\beta$ -TCP」の形態、並びに制御因子の有無が、組織誘導に如何なる影響をもたらすかを比較検討した。本第1報ではトンネルの有無の影響を比較した。

**A. 研究目的**

組織工学あるいは再生医療の分野において、いかにして効率よく組織形成を促進できるか

は最大の課題である。その理論的、実践的追及の過程で、私たちは「人工細胞外マトリックス幾何学」を提唱し、再生医療への重要性を



強調してきた。1-23) その根幹は次の通りである。組織の再生には、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、そのうち天然ならびに人工の ECM に関しては、(1) 物理、(2) 化学、(3) 生

化学的性質が詳しく追究されてきた一方、(4) 幾何学的性質の研究が等閑にされている。そこで、我々は、現在までに開発されてきた人工マトリックス幾何構造を、表 1 の様に、10 種類に分類し、それぞれの特徴を解析してきた。

表 1. ミクロン・オーダー (1-1000  $\mu\text{m}$ ) における人工 ECM の幾何構造の 10 種分類  
文献 1, 2, 6, 7, 22, 23)より改変引用、特徴と実例についても、同文献を参照

カテゴリ	基本幾何形態		特徴と実例
凸型	繊維 (Fibers)		<b>1-1. Fibrous collagen membrane</b> C. Fibrous glass membrane Titanium web (50 micron fiber) CPSA glass fibers
	粒子 (Particles)		<b>Insoluble bone matrix</b> Porous particles of hydroxyapatite (PPHAP, particles with continuous pores)
平面型	平面 (Plane)		Conventional dishes
	シート (Sheet)		Laser-perforated membrane (LPM, sheets with pore)
	ブロック (Blocks)		Porous blocks of hydroxyapatite (PBHAP, blocks with pores)
凹型	不規則連続孔 (Irregular por)		PPHAP PBHAP
	トンネル (Tunnels)		Honeycomb-shaped hydroxyapatite Apatite-coated honeycomb collagen Rat incisor tube
	円形窪み A. (Round concavities)		Concavities on HAP monolith
	水田型窪み (Rectangular concavities)		Micro-pits on silicon tip
	溝 (Grooves)		Microgrooves

今回は、その 10 種類分類の中で、直線的

トンネル構造に着目し、この構造を骨補填材

として多く用いられ、生体内吸収性を持つ素材である  $\beta$ -TCP によって作製することに成功した。このハニカム状  $\beta$ -TCP について以下 3 編の研究を報告する。

第 1 報では直線的トンネルを有するハニカム型  $\beta$ -TCP に、骨形成蛋白質 BMP を配合し、ラットの皮下に埋植したところ、トンネルを持たない  $\beta$ -TCP の場合と比較し、トンネルに沿って血管と骨が直線的に迅速に成長できることを明らかにした。さらに第 2 報ではトンネルの直径を変えた実験結果を報告し、第 3 報では、トンネルに長さを延長し、これまでの長さ 1 mm から、4 mm ならびに 10 mm のハニカム型  $\beta$ -TCP を製作して、骨と血管の誘導能力を調べた結果を報告する。今後、この実験系におけるミクロン・オーダーのトンネルを利用することで、さらにナノ・オーダーの幾何構造の違いが、組織の成長にどう影響するかを解析できる可能性を追求する予定である。

## B. 研究方法

使用担体：

直径 3mm、厚さ(高さ) 1mm または 4mm、長軸方向に直径 300  $\mu$ m のトンネルを 37 個保有しているハニカム状  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -TCP、パイロットプレジジョン製、(Fig.1) に、BMP-7 (0.5  $\mu$ g / 2.5  $\mu$ l) と等量のコラーゲン(高研セルゲン)を (7.5  $\mu$ g / 2.5  $\mu$ l) を混合した溶液を含浸させ、凍結乾燥した。この試料を“BMP 含浸ハニカム状  $\beta$ -TCP37”とした。

対照として、ハニカム状  $\beta$ -TCP と同じ容積で、トンネルを持たない立方体 (2.65 x 2.65 x 1 mm) の  $\beta$ -TCP (無トンネル性  $\beta$ -TCP、パイロットプレジジョン製) に、BMP 含浸ハニカム状  $\beta$ -TCP と同様にゲルを含浸、凍結乾燥させた。これを“BMP 含浸無トンネル性  $\beta$ -TCP”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、ペント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 1 kg 当たり 7.1 ml (ペントバルビタールナトリウムに換算すると体重 1 kg 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 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フォスファターゼ (ALP) の活性は、摘出した担体を、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、500  $\mu$ l の 0.2% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich USA) / 10mM / Tris-HCl / 1 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.4. を用いて抽出し 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

摘出時：担体は被膜で覆われ、周囲から血管が誘導されてきているのが認められた。ま



た、細トンネルの中にも血管が貫通しているのが認められた (Fig.2)。

ALP 活性の結果：埋植後2週目の埋植体のALP 活性はFig.3 に示すようにBMP 含浸ハニカム状  $\beta$ -TCP は BMP 含浸無トンネル性  $\beta$ -TCP よりも ALP 活性が高かったことが分かった。

組織学的所見：Fig.4 は埋入2週後のハニカム状  $\beta$ -TCP37 の弱拡大と強拡大の組織学的所見です。弱拡大で見られる白い部分が  $\beta$ -TCP の壁で、壁と壁の間を強拡大で示しました。壁と壁の間の中央に内皮細胞で形作られた1本の血管が通っており、その両側に骨組織が競うようにして直線的に成長しています。Fig.5 は埋入2週間後におけるBMP 含有無トンネル性  $\beta$ -TCP の弱拡大の組織所見である。ハニカム状と比較してトンネルが直線的ではなく、不規則であるのが分かる。また、担体の外側から骨が不規則に形成され、トンネル内腔には未分化幹細胞、脂肪細胞が認められ、二次骨形成の存在、血管の所在が分かりにくくなっている。適切な直径の円柱状のトンネルであれば、同心円状に1~2本の血管に伴って骨が形成されていくが、不適切な大きさの不規則なトンネルであると血管形成が難しく骨形成をハニカム状のものよりも遅滞する可能性が推測できる。

#### D. 考察

BMP 含有ハニカム状  $\beta$ -TCP は、BMP 含有無トンネル性  $\beta$ -TCP よりも骨形成が著明であったと考えられる。これは、BMP 含有ハニカム状  $\beta$ -TCP が無トンネル性のもよりも

骨形成に必要な血管形成に適した幾何学的構造を伴っていたためだと考えられる。

また、Fig.4 のような像は、従来の人工ECMでは報告がなく、血管と骨との関係を明らかにするための新しい実験系になるとも考えている。

現在はまだ実験が始まったばかりだが、今後は、担体の長さを変化させた場合の形態 (Fig.6) や、制御因子の種類の変更、埋入期間の延長による経時的変化の確認、実際の市販骨補填剤との比較を行うなど比較検討をしていく予定である。

#### E. 結論

従来のトンネルを持たない  $\beta$ -TCP の場合と比較し、トンネルに沿って血管と骨が直線的に迅速に成長できることがわかった。ハニカム状  $\beta$ -TCP は吸収性骨補填材として、臨床応用の可能性があり、また、血管と骨との関係を明らかにするための新しい実験系の可能性もある。今後、この実験系におけるミクロン・オーダーのトンネルの壁にカーボンナノチューブなどにより、各種のナノ構造を利用することで、さらにナノ・オーダーの幾何構造が、組織成長に如何なる影響を与えるかを解析可能になった。

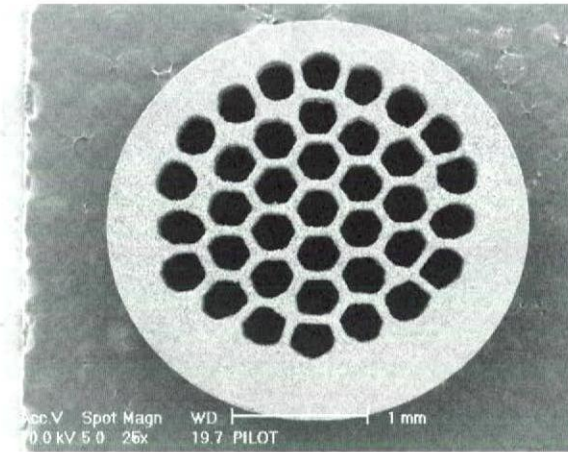


Fig. 1 直径3mm、高さ1mm、トンネル口径0.3mmの $\beta$ -TCP 37のSEM写真。トンネルの数と大きさ、高さは自在に設計できる。

## 2週後の異所性骨形成能

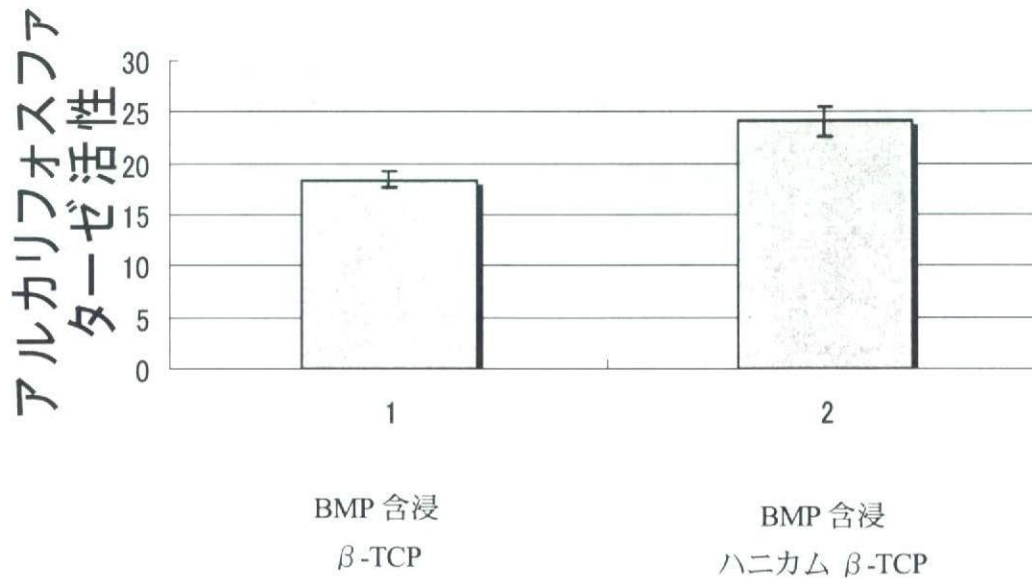


Fig. 2 ハニカム構造を持たない $\beta$ -TCPと、ハニカム $\beta$ -TCP 37と、の骨形成能の差を埋植後2週のアリカリフォスファターゼ活性で比較した。



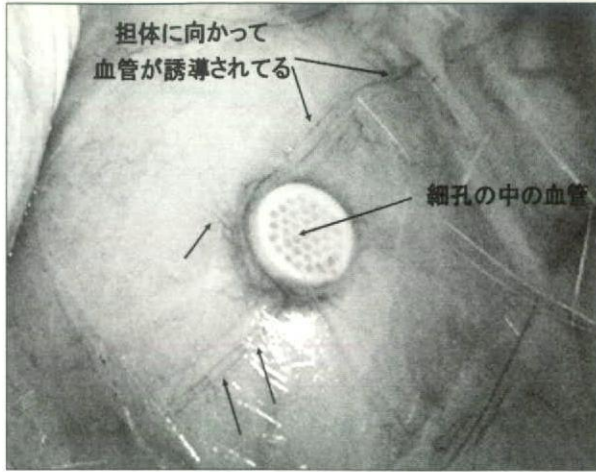


Fig. 3 ハニカム  $\beta$ -TCP37 (直径 3 mm、厚さ 1 mm、トンネル口径 0.3mm) をラットの皮下に埋植して2週後に、埋植物の周囲に血管が集まっていることを示す写真。細い矢印は血管を示す。



Fig. 4 直径 3 mm、長さ 4 mm の BMP 含浸ハニカム  $\beta$ -TCP37 を埋植して2週後の骨の旺盛な成長。 $\beta$ -TCP37 の壁面に挟まれて血管を含む間葉組織が進入し、次第に骨が生成されていくことが分かる。

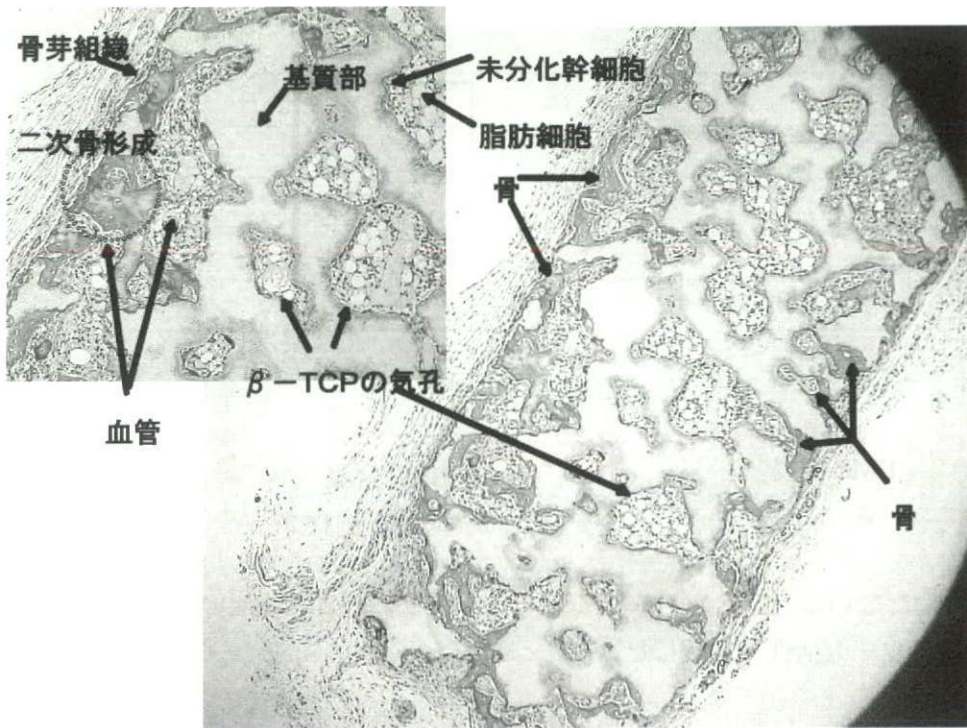


Fig. 5 トンネル構造を持たない  $\beta$ -TCP のブロック (2.69 x 2.69 x 1mm) をラットの皮下に埋植して、2週間後の組織像。不規則な  $\beta$ -TCP ポアの壁面に、骨は形成されているが、方向性はなく、成長方向はランダムである。Aは、Bの強拡大像。血管は横断面が多いので、その走行方向は明瞭ではない。



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」の提唱：  
第2報 ハニカム型 $\beta$ -TCPのトンネル直径と、血管・骨の誘導能について

**第2報 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  $\mu\text{m}$  のハニカム型 $\beta$  TCP 円柱体、並びにトンネルを持たない $\beta$  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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ であるとされてきた。しかし今回、直線的トンネルを持つ $\beta$  TCPの場合には、75 $\mu\text{m}$ 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

本研究第1報に引き続き、ハニカム構造体の幾何学のうち、ここではトンネルの直径の影響を比較検討した。

第2報の目的において詳述したように、人体組織の部分欠損を再建するための5大要素のうち、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。

その中でわれわれは、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, 2, 6, 7, 22, 23) 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 $\beta$ -TCP37は、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 $\mu$ 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。

われわれは、今回、生体内吸収性で、骨に置換することが知られている $\beta$ -トリカルシウムリン酸( $\beta$ -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EC

#### 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7.1ml(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

Mとして用いることにした。このハニカム型 $\beta$ -TCPのトンネル直径を、50、75、300 $\mu$ m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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\mu$ m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 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\mu$ g/2.5 $\mu$ l)と等量のコラーゲン(高研 Atelocollagen I-PC)を(7.5 $\mu$ g/2.5 $\mu$ 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 $\beta$ -TCP-300、75、50ならびに充実円筒体”とした。

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：

第1報で詳述した方法に従い、摘出試料中のアルカリホスファターゼ(ALP)の活性測定を行った。

### 組織学的観察

摘出した担体を第1報で詳述した方法に従い、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、組織切片を製作し、HE染色を行った。

#### 倫理面への配慮

第一報で詳述したように、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 $\beta$ -TCP の創製：

3種のトンネル直径の異なるハニカム状  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$

-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  $\beta$ -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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ m 以下の直径の場合、軟骨性骨化を伴うのに対して、350  $\mu$ 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  $\beta$ -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  $\beta$ -TCP ハニカムでの最適直径が75  $\mu$ 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、300-400  $\mu$ 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  $\beta$ -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、 $\beta$ -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。