

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 μm) 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 μm 直径のものが最も高い値をしめした。

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。

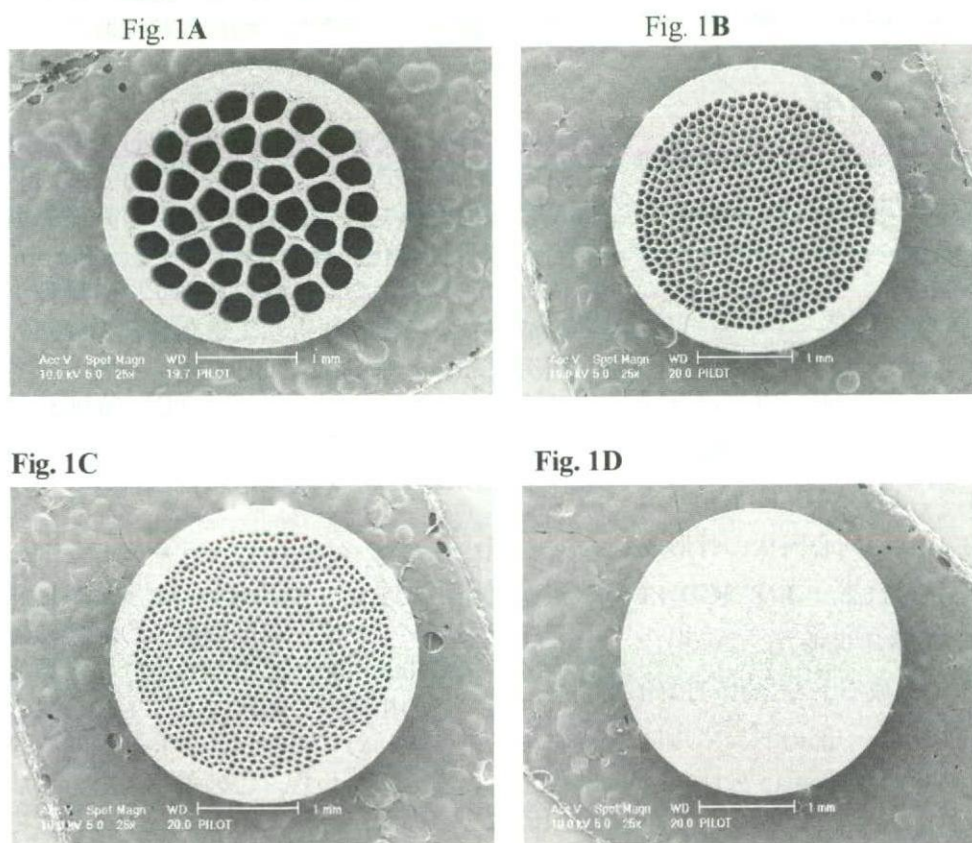


Fig. 2 トンネルの直径および数の異なるハニカム状 β -TCP の骨形成能の比較

Effect of pore sizes and numbers of tunnel
in honeycomb beta-TCP on ALP activity at 2 weeks

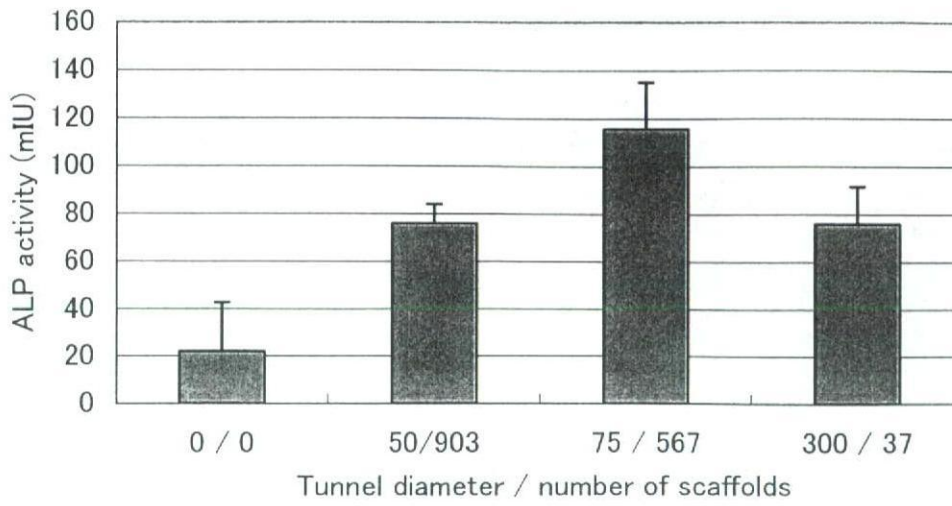


Fig. 3 埋植 2 週および 3 週後におけるハニカム β -TCP トンネル内および周囲の骨形成を示す組織像：AB はハニカム状 β -TCP300/37、CD はハニカム状 β -TCP75/568、EF はハニカム状 β -TCP 50/903、A-F はいずれも埋植後 4 週後の組織像、GH は 2 週後のハニカム状 β -TCP50/903 を示す。ACEG は弱拡大像、BDFH は強拡大像である。

Fig. 3A

Fig. 3B

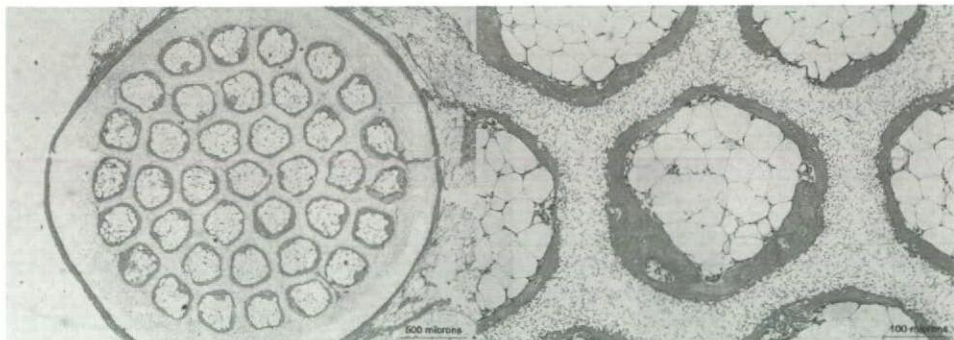


Fig. 3C

Fig. 3D

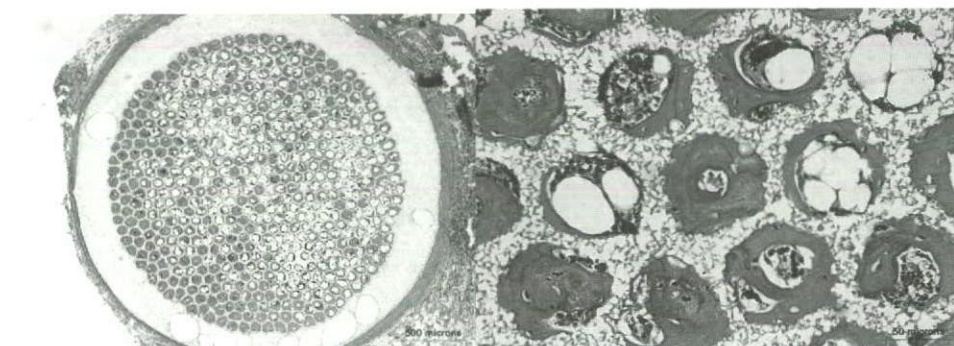


Fig. 3E

Fig. 3F

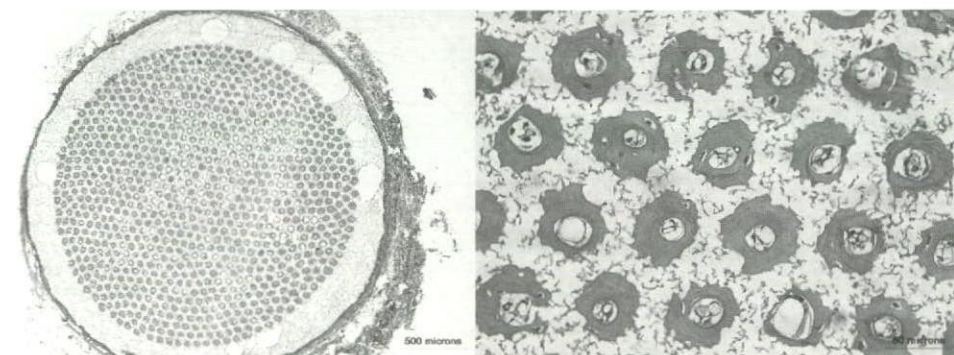
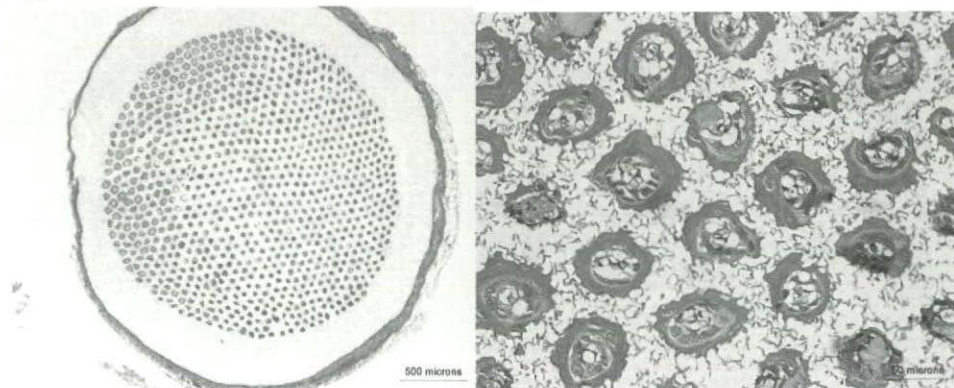


Fig. 3G

Fig. 3H



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3報 ハニカム型 β -TCPのトンネルの長さ、血管・骨の誘導効果について

第3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スカフォールド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した。【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

先に報告した、本研究の第2報までに、我々は生体内吸収性で、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、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。1)

今回は、ハニカム型 β TCPの、骨以外の組織、すなわち血管や神経の再建への応用を視野に入れ、トンネルの長さを延長し、長さ4 mm、ならびに10 mmのハニカム型 β -TCPを製作し、骨と血管の誘導を検討した。さらに、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も追求した。

B. 研究方法

BMP 担体として使用した人工 ECM :

直径 3mm、高さ 4 mm ならびに 10 mm 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 37 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 :

健康な 4 週齢および 12 週齢の Wistar King AH 系雄ラットを用いた。麻酔方法は第 1 報に従った。埋植すべき試料は 4 週齢ラットの背部皮下、または 12 週齢ラットの大腿 4 頭筋肉内に埋植した。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。

倫理面への配慮

第 1 報で詳述したたとおり、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

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 4 mm ならびに 10 mm 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 4 mm、ならびに 10 mm 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 4 mm 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 10 mm のハニカムをラットの大腿部の筋肉内に埋植後 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 4 mm 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 10 mm 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、Fukushima ら 28) が示したように、神経の再生にも有用であることが期待される。

第 1 報から第 3 報を通しての総合考察

本研究では主として、人工 ECM 幾何学の 1 分野、すなわちミクロン・オーダーの考察に限定し、その一例としてのハニカム型 β -TCP の組織誘導能について論じた。しかし、これらミクロン・オーダーの幾何学の考察は、ナノ・オーダーでの展開をするための必須の土台であると考えられる。現在、ナノ・オーダーでの人工 ECM 幾何学は、その重要性にも関わらず殆ど未開拓の状態にあるが、今後、ナノ・オーダーでの人

工 ECM 幾何学は、ナノ・オーダーの生命の科学である生化学そのものと密接な関連をもつようになる新しい興味深い分野である。本研究でなされた考察と結論が、ミクロン・オーダーから、ナノ・オーダーへの展開に重要な架橋の役割を果たすと期待される。

第 1 部の発表

F. 研究発表

1. 論文発表

【人工 ECM 幾何学の基礎の基礎となる論文】

- 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
- 14) Y. Kuboki, R. Yoshimoto, H. Kato, D. Li, T Kaku, and H. Takita (ほか7名): A New Paradigm of Titanium-Bone Bonding: Creation of the Collaboration Zone between the both Substances by Use of 3-D Titanium Web, which is attached to the Titanium Bulk by Vacuum Sintering. *Archives of Bioceramics Research*, Vol. 5: 146-149, 2005
- 15) Jansen JA, Vehof JW, Ruhe PQ, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, Hedberg EL, Mikos AG Growth factor-loaded Makoto Takahashi, Yoshiaki Wakabayashi, Soichiro Itoh,

scaffolds for bone engineering. *J Control Release*. 2005 Jan 3; 101(1-3):127-36

- 16) R. Yoshimoto, H. Takita, K. Nemoto, and Y. Kuboki: Attempts to Arrest the Cartilage Stage in Endochondral Ossification by Geometrical Devices of an Artificial ECM. *Archives of Bioceramics Research*, Vol. 5: 404-407, 2005
- 17) T. Nakade, N. Egashira, R. Yoshimoto, H. Kato, H. Shiota, Y. Seki and Y. Kuboki: Dental Implant System based on Titanium Web-Equipped Titanium Rod (TWT) Induced Collaboration Zone between Bone and Rod of Implant in Beagle Mandibles. *Archives of Bioceramics Research*, Vol. 5: 277-280, 2005
- 18) D. Li, S. Iku, K. Nemoto, Y. Kokai, T. Odajima, R. Yoshimoto, T. Kaku, H. Katoh, H. Shiota, Y. Seki, N. Ogura, Y. Abiko, Y. Kuboki: Geometry of artificial ECM: Three-Dimensional Structure of Titanium-Web (TW) Promotes Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells into Osteoblasts. *J. Hard Tissue Biol.* 14: (2) 333-334, 2005.
- 19) 久保木芳徳、滝田裕子：FGFとBMPは歯科に何をもちたらずか、歯科臨床研究、2: 18-27, 2005
- 20) 久保木芳徳、藤沢隆一、滝田裕子：硬組織再建の原理、川上敏行、久保木芳徳編集、歯と骨の再生医療、学際企画、東京、2007、pp5-14.
- 21) 藤沢隆一、久保木芳徳、滝田裕子：硬組織形成に必要な5大要素とその統合、歯と骨の再生医療、学際企画、東京、2007、pp15-50.
- 22) 久保木芳徳、藤沢隆一、滝田裕子：人工ECMの幾何学、川上敏行、久保木芳徳編集、歯と骨の再生医療、学際企画、東京、2007、pp51-66.
- 23) 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.

【再生医療およびナノ粒子の最近の論文】

- 24) 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
- 25) Ichinohe N, Kuboki Y, Tabata Y: Bone regeneration using titanium nonwoven fabrics combined with FGF-2 release from gelatin hydrogel microspheres in rabbit defects, *Tissue Eng Part A* 2008, Oct; 14 (10): 1663-171
- 26) Fukui N, T, Kuboki Y, Aoki H: Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite /collagen composite at the early stage of implantation, *Biomed Mater Eng*, 2008;18 (1): 25-33
- 27) 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.
- 28) Kazuyuki Fukushima, Mitsuhiro Enomoto, Shoji Tomizawa,

Across a Honeycomb Collagen Sponge Applied to the
Transected Spinal Cord, J Med and Den Sci, 55: (1) 71-77,
2008

29) Hiroshi Masago, Yasuyuki Shibuya, Sachiko Munemoto,
Junichiro Takeuchi, Masahiroumeda, Takahide Komori,
Yoshinori Kuboki, Y: Alveolar ridge augmentation using various
bone substitutes- a web form of titanium fibers promotes rapid
bone development, Kobe J Med Sci, (2007) 53 : 257-263

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、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

4) 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）

5) 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 図書館

6) 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3
9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、東京

Fig. 1A

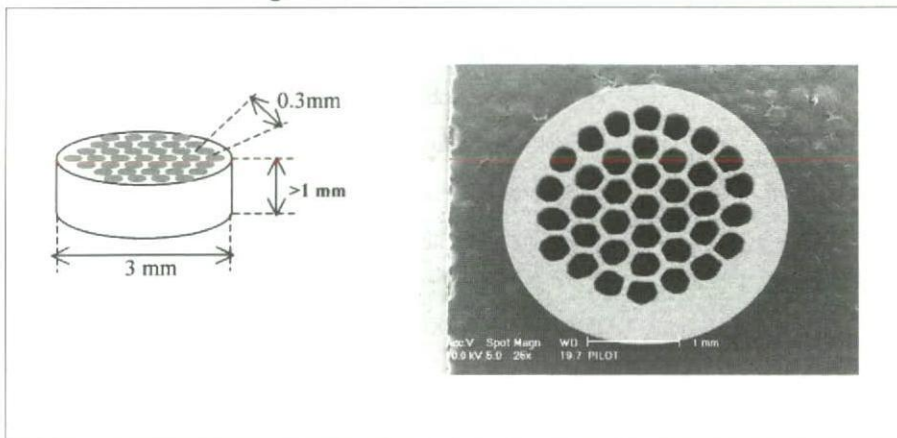


Fig. 1B

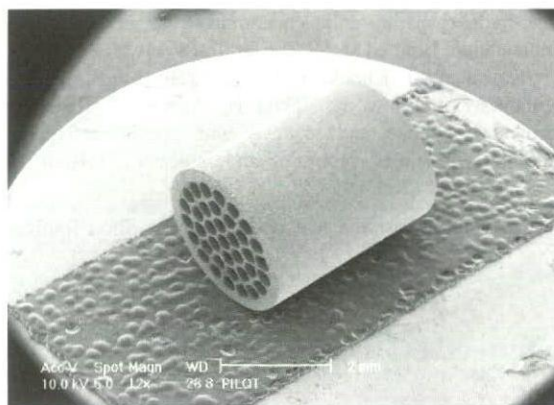


Fig. 1C

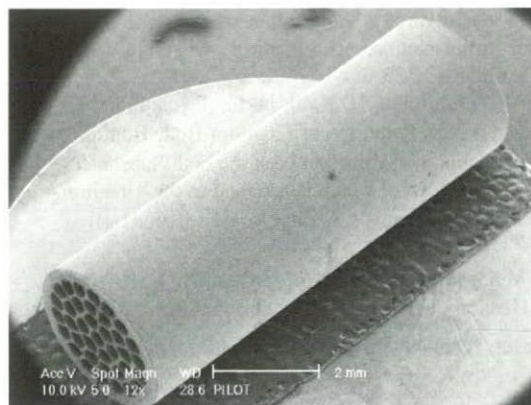


Fig. 1 Images in SEM and light microscopy of honeycomb shaped beta-TCP ceramics of disc type (A), cylinder-type of 4 mm length (B) and of 10 mm length (C), all uniformly having outer diameters of 3 mm, and thirty-seven straight tunnels with diameter of 300 μm . The scale bar in right side of A is 1 mm;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

Fig. 2A

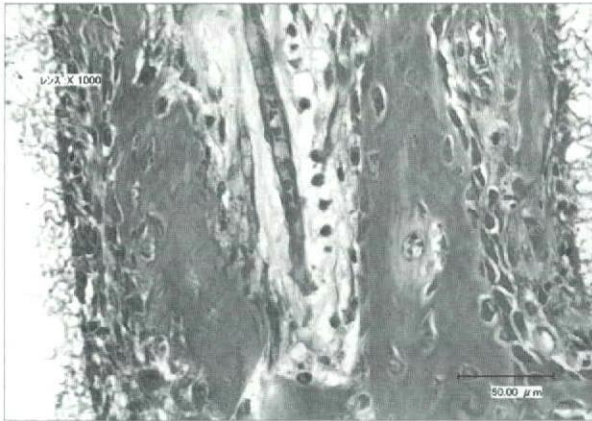


Fig. 2B



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

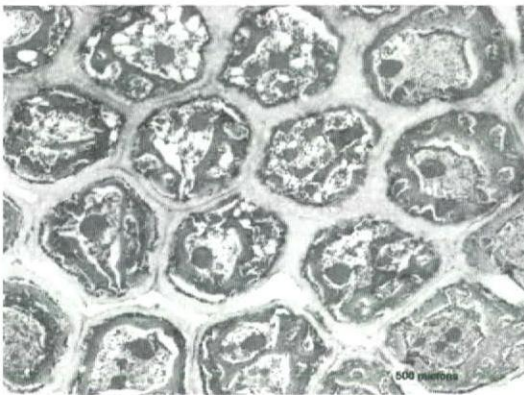


Fig. 3B

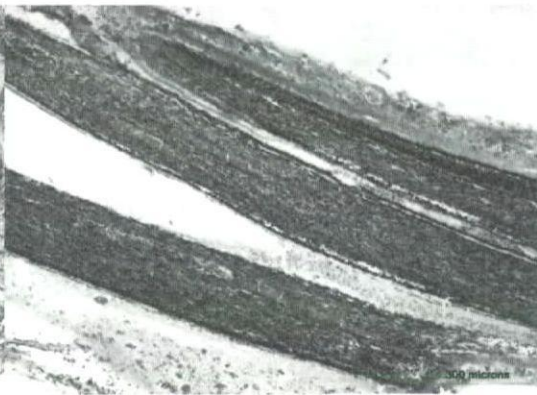


Fig. 3C

Fig. 3D

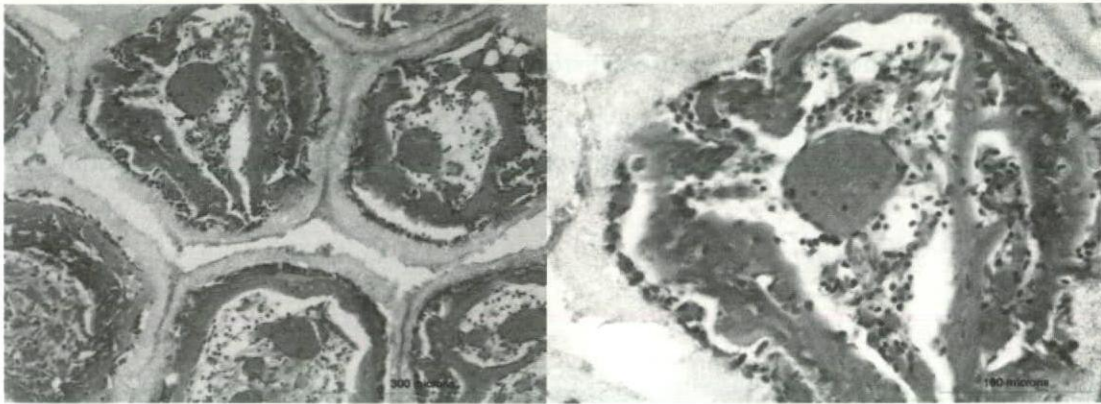


Fig. 3 Histology of parallel development of bone and capillary within the honeycomb beta TCP of 10 mm length implanted with rhBMP-7 for 2 weeks. A, C and D show the step-wise enlargement of the cross-sectional image of honeycomb β - TCP: B, longitudinal section. Capillaries were clearly observed in the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

Fig. 4A

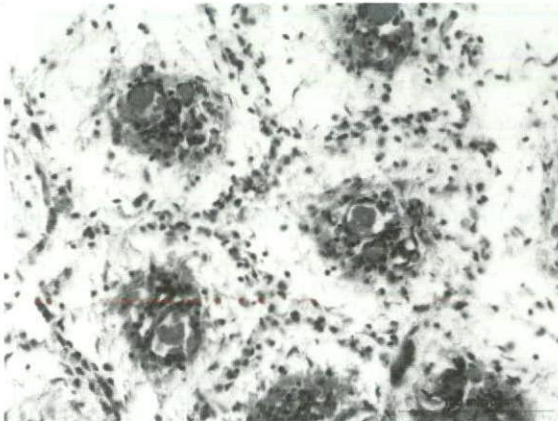


Fig. 4B

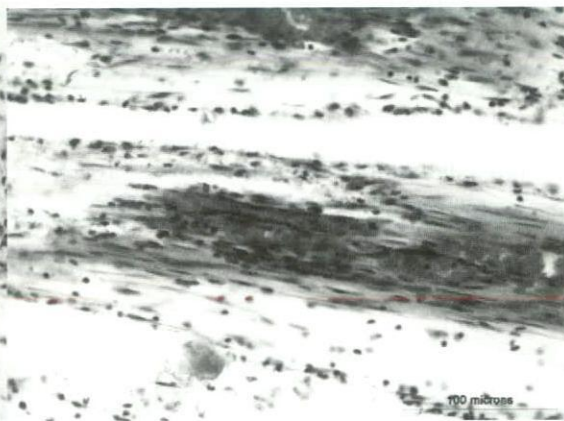


Fig. 4

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

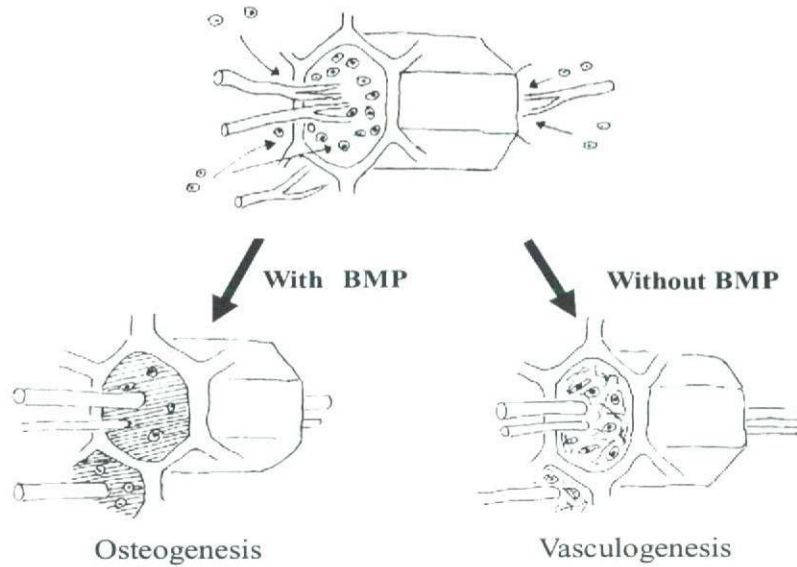


Fig. 5

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.

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
—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 初年度は、生体材料への応用を目指したナノ炭酸アパタイト結晶の合成を行い、その物理化学的性状を X 線回折、FT-IR, SEM, HR-TEM, ICP 等を用いて分析した。その結果、炭酸含有量の変化に応じて異なる結晶学的物性を示すことが明らかとなり、生体材料への応用に当たっては創製したナノアパタイトコンポジットが三次元培養や代謝性のコントロールに利用できる可能性が示唆された。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。そこで次年度では、合成により得られたナノ炭酸アパタイト結晶とコラーゲンとの複合体を試作し、高機能性を付与することを目的にこの炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドに骨増殖因子としての rhBMP2 の修飾を試みた。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。最終年度では、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。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。本研究で創製した骨様炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドは高機能性硬組織バイオマテリアルとしての応用が期待される。

A. 研究目的

ヒトの硬組織である歯や骨の無機成分は、ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ と呼ばれる狭義のバイオセラミックスから成り立っている。この無機成分に加え歯質エナメル質では、非コラーゲン性タンパク質がわずかに含まれ、象牙質や骨では有機成分としてコラーゲンが 30~40wt% 含まれる。この歯質エナメル質と象牙質、骨を X 線回折してみると、非常に興味深いことに構成するアパタイトの結晶性が

まったく異なる (図 1)。エナメル質はきわめて結晶性が高いが、象牙質や骨の結晶性は低い。

アパタイトは、リン酸カルシウム的一种で、自然界には数多くの異なるアパタイトが存在し、歯や骨をつくるアパタイトがハイドロキシアパタイトである。このハイドロキシアパタイトは、六方晶系のイオン結晶で、1/3 が結晶ユニットになっている。実際の生体アパタイトは、この Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^- の位置に微量の元素が種々置換し、さらに複雑な構造にな

っている。CO₃²⁻も PO₄³⁻の位置に数%置換し、生体アパタイトは、炭酸アパタイトとも呼ばれている。

この炭酸アパタイトは、炭酸含有量によって物理化学的性状が大きく異なる。従って、炭酸アパタイトを利用した生体材料を生体内へ埋入する場合には、生体親和性も大きく左右されることが予想され、時として生体内リスクを伴うことも完全には否定できない。

一方、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。

組織工学による再生医療には、細胞やサイトカインに加えて、スカフォールドの存在は欠かせない。特に、細胞の3次元培養可能な多孔性のスカフォールド生体材料が期待されている。我々は、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の合成を行い、得られた粉末結晶試料をコラーゲン溶液と混合し、凍結乾燥することによりスポンジ状スカフォールドの創製を確立している。また、ポーラスなアパタイト円筒状フレームを作成し、スポンジとハイブリッド化することにより、生体骨の緻密骨と海綿骨に類似した構造をもつ人工骨の創製も可能となっている(図2)。もしここへ骨増殖因子や血管新生因子のようなサイトカインを導入できれば、高機能性を有する生体模倣の人工骨の創製が可能となる。

そこで本研究では、その際の炭酸アパタイトの生体親和性と生体内安全性をナノレベルで評価できる解析手法を検討するとともに、さらには炭酸アパタイト複合体の最適化を検討することにした。

B. 研究方法

(i) アパタイトの合成

ハイドロキシアパタイト HAp および炭酸アパタイト CO₃Ap の合成は、0.2 M 酢酸カルシウム Ca(CH₃COO)₂・H₂O 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 (NH₄)₂CO₃ を含む 0.12 M リン酸アンモニウム NH₄H₂PO₄、0.5 L を、攪拌中の 1.3 M 酢酸アンモニウム溶液 CH₃COONH₄ 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。

(ii) X線回折による結晶性の評価

X線回折装置(島津 DX1)を用いて HAp と CO₃Ap を測定した。測定フォルダーに試料を圧接して装置にセット後、4°~40°および 32.0°~34.0°の角度範囲で測定した。

(iii) FT-IR による測定

FT-IR(島津 FT-IR 8400S)を用いて、HAp と CO₃Ap の IR 吸光度スペクトルを 500~4000 カイザーの範囲で測定した。1.0 mg の試料と 100 mg の KBr を混合し、乳鉢ですりつぶした粉末を拡散反射法で測定した。

(iv) 粉末の形態観察

走査型電子顕微鏡(SEM: 日立 S-4300)を用いて、HAp と CO₃Ap の形態を観察した。試料は、導電性テープを貼った試料台に固定後、イオンスプッター装置を用いてプラチナ蒸着を施し、5000 倍と 20000 倍の倍率で観察した。また、高解像度透過型電子顕微鏡(HR-TEM: Topcon EM002B)を用いて、約 60μm の薄片試料の結晶断面形状を観察した。

(v) 炭酸アパタイト・コラーゲンスポンジの作製

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, .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 CO₃Ap 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3)。

(vi) 動物実験

得られた各種スポンジ試料を家兎大腿骨へ埋入し(図4)、さらには最適炭酸含有量組成の試料を hBMP2 とともにラット頭蓋骨骨膜下に埋入、また血管新生因子 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

(i) 化学分析およびX線回折

各合成試料の化学分析の結果を表1に示す。炭酸供給量の増加に伴い炭酸含有量は増加し、P含有量が低下しているのがわかる。各試料のX線回折パターンはアパタイトックパターンを示し、炭酸濃度が高くなるほど結晶性は低下した(図5)。また、拡大した $32.0^\circ \sim 32.3^\circ$ および $32.6^\circ \sim 33.0^\circ$ 付近に認められた(300)回折線ピークは、炭酸濃度の増加に伴い高角度側にシフトした。

(ii) FT-IRによる測定

1400 ~ 1500 cm^{-1} での吸収ピークは炭酸の存在を示しており、炭酸の濃度が増加するにつれて吸光度も増加した。

(iii) SEMおよびHR-TEMでの形態観察

HApの形態は明瞭な針状結晶示していた(図6)。0.005Mの形態は板状結晶になっており、板状が重なり合っていた。0.06Mの形態は板状が小さくなった。0.3Mの形態はブロッコリー状になっており、細かく小さな針状の固まりのようであった。HR-TEM観察では、HApの場合明瞭な六角形の結晶断面構造が観察されたが、炭酸含有量の増加に伴い結晶の六角形形態は維持されなくなった。

(vi) 細胞培養実験

試作炭酸アパタイト・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。

(vii) 動物実験

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7)。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8)。一方、骨増殖因子としての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(図9)。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10)。

D. 考察

本研究で水溶液系にて合成した炭酸アパタイトは、炭酸イオンがアパタイト結晶内に取り込まれるにつれX線回折パターンの(300)回折線は高角度側にシフトし、a軸の格子定数が減少した。このことは CO_3^{2-} が一部 PO_4^{3-} の位置に置換したことを意味する。一般に、 80°C で合成された結晶性の良いハイドロキシアパタイトは大きな六方晶の板状結晶を示すが、炭酸イオンが増加してくるにつれ次第に丸みを帯び、合成温度が 60°C と低くなると結晶もフレーク状から小さな結晶が凝集したような像を呈するようになる。HR-TEMによるナノレベルでの観察においても、炭酸イオン含有量が増大すると最早六方晶の断面構造は示さなくなり多くの格子欠陥が認められるようになる。本研究のSEM, HR-TEM観察においても、これらの報告を支持する所見が得られた。

X線回折にてピークが高角度側にシフトし、結晶格子が小さくなったことが示唆されが、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7, 8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。

概して、頭蓋骨膜下での骨形成は起こりにくい。以前の研究でも、サイトカインを添加していない炭酸アパタイト・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rhBMP2をこのスカフォールドに添加することを試みた。rhBMP2添加フレーム強化型炭酸アパ

タイト・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(図9)。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力が弱く、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、rhBMP2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。

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(図10)。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、骨増殖因子rhBMP2の添加や血管新生因子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。このように、本研究では化学分析と動物実験との併用によりナノバイオマテリアルの安全性を評価できる体内動態検索手法を確立することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yokota R., Hayashi H., Hirata I., Miake Y., Yanagisawa T. and Okazaki M.: Detailed consideration of physicochemical properties of CO₃apatites as biomaterials in relation to carbonate content using ICP, X-ray diffraction, FT-IR, SEM and HR-TEM. *Dent Mater J* 25: 597-603, 2006.
2. 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.
3. Hirata I., Okazaki M.: Higher Concentrations of Fluoride Ions

Dramatically Inhibit the Survival of Osteoblasts. *J Oral Tissue Engin* 6: 3-8, 2008.

4. Matsuura A., Kubo T., Doi K., Hayashi K., Morita K., Yokota R., Hayashi H., Hirata I., Okazaki M., Akagawa Y. "Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents" *Dent Mater J*, in press.

2. 学会発表

1. 岡崎正之, "硬組織バイオマテリアルの現状と将来展望" 平成18年9月16日, 化学工学会第38回秋季大会シンポジウム<バイオメディカルマテリアルの最前線>「展望講演」, 福岡.
2. 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
3. Tieliewuhan Y, Hirata I, and Okazaki M., "Bone formation with reinforced CO₃Ap-collagen scaffolds" Nov. 24, 2007, International Dental Materials Congress 2007, Bangkok, Thailand
4. 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
5. Okazaki M., Hirata I. "Promoted Bone Formation in Frame-Reinforced CO₃Ap-Collagen Composites with BMP2" WBC, Amsterdam, Netherland, May 31, 2008.
6. Hirata I. Okazaki M. "Evaluation of Waveform-like Pattern of Cell Proliferations on Self-Assembled Monolayers with a Series of Surface Composition Changes" ISNT2008, Sapporo, June 16, 2008.
7. Okazaki M., Hirata I. "Application of Nano-crystal CO₃Ap as Hard Tissue Scaffold Biomaterials" ISNT2008, Sapporo, June 17, 2008.

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

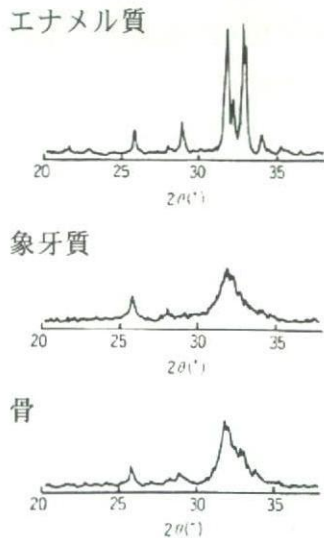


図1 歯と骨の X 線回折パターン

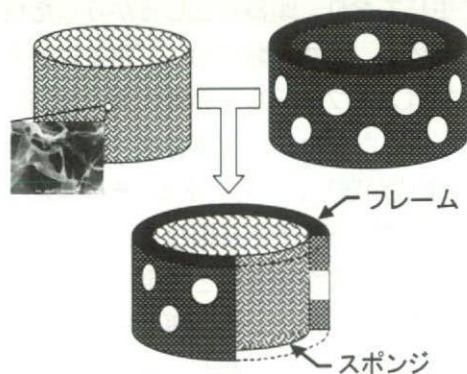


図2 フレーム強化炭酸アパタイト・
コラーゲンスカフォールド

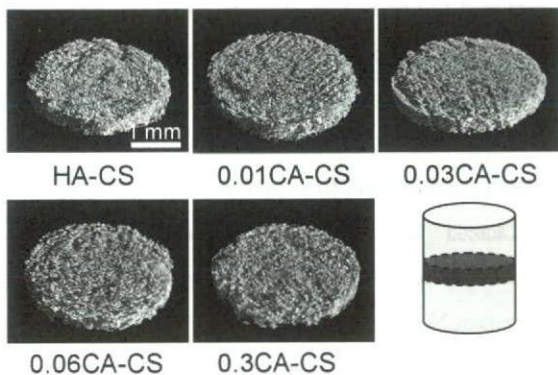


図3 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・
コラーゲンスカフォールドの μ CT 横断面像

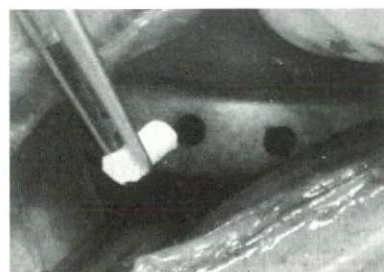


図4 家兎大腿骨への炭酸アパタイト・
コラーゲンスカフォールド埋入時写真

表1 合成炭酸アパタイトの化学組成

Samples	Ca (mmol/g)	P (mmol/g)	CO ₃ (mmol/g)
HAp	9.01±0.09	5.74±0.09	-
CO ₃ Ap _{0.005}	8.45±0.09	5.48±0.07	0.12±0.05
CO ₃ Ap _{0.01}	8.49±0.19	5.62±0.12	0.21±0.09
CO ₃ Ap _{0.03}	8.72±0.09	5.50±0.11	0.58±0.06
CO ₃ Ap _{0.06}	8.78±0.16	5.46±0.15	0.80±0.07
CO ₃ Ap _{0.3}	8.56±0.12	4.69±0.11	1.57±0.03

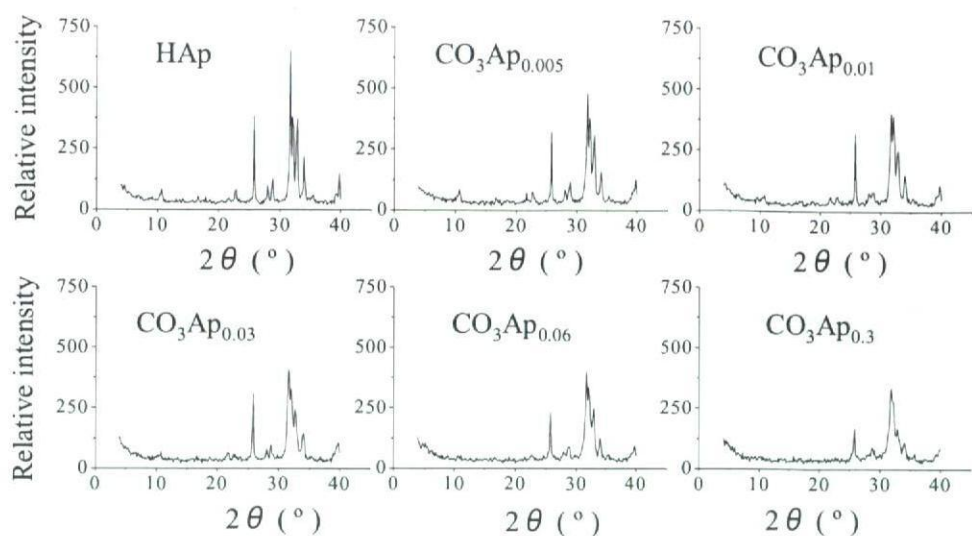


図5 炭酸アパタイトのX線回折パターン

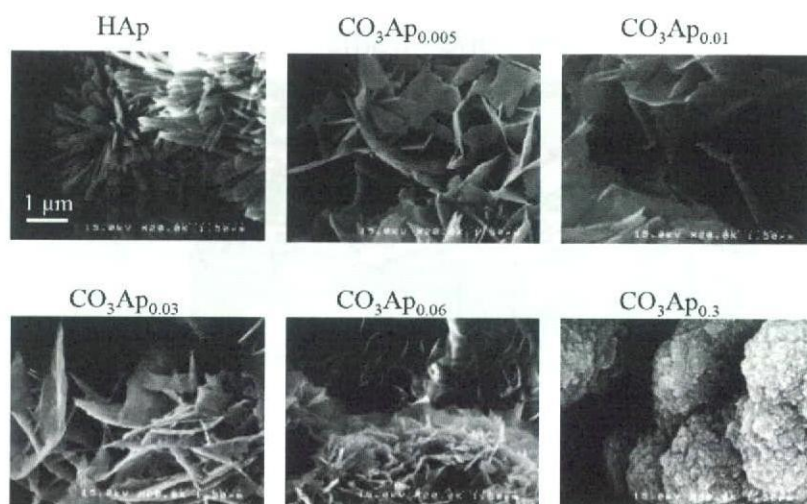


図6 炭酸アパタイトのSEM写真

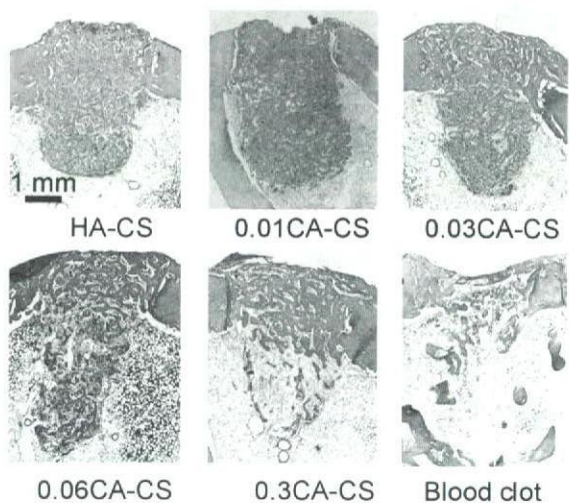


図7 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドを家兎大腿骨埋入2週後のH-E染色像

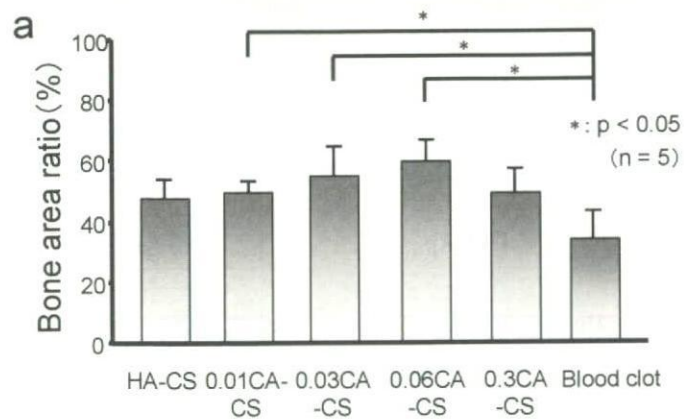


図8 炭酸含有量の異なる各種炭酸アパタイト・コラーゲンスカフォールドの骨面積率の比較 (家兎大腿骨埋入3週間後の値)

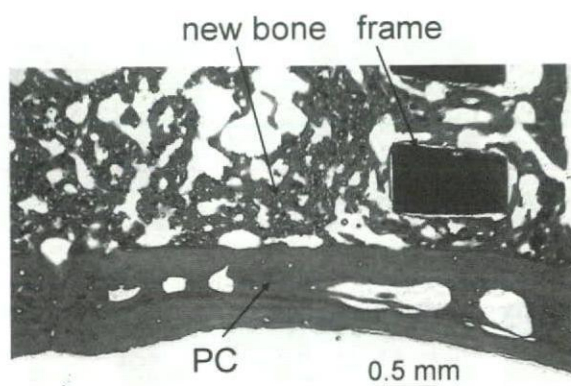
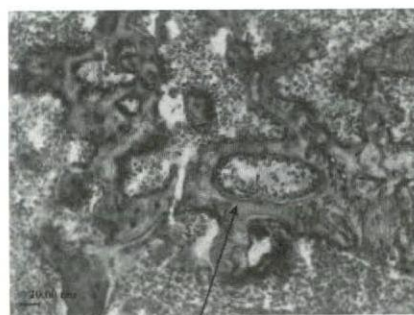


図9 ラット頭蓋骨膜下に4週間埋入したフレーム強化型スポンジでの新生骨のH-E染色像



VIII factor-staining

図10 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)

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結晶子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。

ナノアパタイトは熱力学的安定性の差違を利用した溶解析出反応によって調製するため、炭酸カルシウムを前駆体として選択した。炭酸カルシウム圧粉体は水溶液に浸漬すると崩壊し、また、反応性が限定的であったため、水酸化カルシウム圧粉体を二酸化炭素に暴露することによってナノ結晶子炭酸カルシウムブロックを調製した。炭酸カルシウムの変態は最も熱力学的安定相であるカルサイトであり、結晶子は 262-306 nm であり極めて結晶子が小さいカルサイトブロックが調製できることがわかった。

次に得られたナノ結晶子炭酸カルシウムブロックをナノ炭酸アパタイトブロックに組成変換する条件を検討した。その結果、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は破骨細胞によって吸収されなかったが、ナノ結晶子炭酸アパタイトは破骨細胞による吸収と見られる吸収窩が認められた。実験動物の骨欠損再建実験においてはいずれも優れた組織親和性と骨伝導性を示した。しかし、骨への置換では著明な差異が認められた。水酸アパタイト焼結体は全く吸収されていなかったが、ナノ結晶子炭酸アパタイトの平均サイズは埋入 4 週目で約 50% となっていた。これらの実験結果から、ナノ結晶子炭酸アパタイトは焼結体水酸アパタイトとは全く異なる挙動を示すこと、破骨細胞によって吸収されるため、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（骨が繊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繊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。例えば通常のコ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破骨細胞を用いて挙動を検討する。

B. 研究方法

生体骨と同じ、ナノ結晶子炭酸アパタイトブロックは焼結法によって調製することが不可能である。そこで前駆体を調製し、前駆体とナノ結晶子炭酸アパタイトの熱力学的安定性の差異を利用した溶解-

析出反応によって形態を保ったまま組成変化させる調製法を考案した。前駆体にはナノ結晶子炭酸アパタイトと比較して熱力学的に不安定であること、適度な溶解度を有することなどから炭酸カルシウムを選択した。炭酸カルシウム圧粉体は水溶液に浸漬すると崩れるため、まず、反応性に富むナノ結晶子炭酸カルシウムブロックを調製し、当該ナノ結晶子炭酸カルシウムブロックをリン酸塩水溶液に浸漬することによってナノ結晶子炭酸アパタイトを調製、細胞および実験動物を用いて水酸アパタイト焼結体との差異を検討した。

I ナノ結晶子炭酸カルシウムブロックの調製

水酸化カルシウム { $\text{Ca}(\text{OH})_2$; ナカライテスク、京都} 粉末をステンレス製金型に入れ、油圧プレスを用いて1-5 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1-72時間反応させた。

II ナノ結晶子炭酸カルシウムブロックの分析

ナノ結晶子炭酸カルシウムブロックの機械的強さは間接引張強さ(DTS: diametral tensile strength)および圧縮強さ(CS: compressive strength)を指標として万能試験機 (IS5000、島津、京都) によって測定した。

試料組成は粉末 X 線回折装置 (RINT 2500V、理学、東京) によって分析し、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) によって観察した。

また、試料の見かけ密度を試料の体積および重量測定から計算し、気孔率は炭酸カルシウムの変態の一種であるカルサイトの密度(2.711 g/cm³)と見かけ密度から計算した。

III ナノ結晶子炭酸カルシウムのリン酸化によるナノ結晶子炭酸アパタイトブロックの調製

ナノ結晶子炭酸カルシウムブロックを 60°C の 1 mol/L Na_2HPO_4 水溶液に最大 14 日間浸漬することによって溶解析出による組成変換反応を行い、ナノ結晶子炭酸アパタイトブロックの調製を行った。

IV ナノ結晶子炭酸アパタイトブロックの分析

ナノ結晶子炭酸アパタイトブロックの組成分析、機械的強さおよび微細構造の探索に関しては、IIに記載した粉末X線回折、万能試験機、走査型電子顕微鏡観察によって行った。

組成に関しては、さらに詳細に分析を行うため、KB r 錠剤法によるフーリエ変換赤外分光分析 (Spectrum 2000LX、パーキンエルマー、神奈川) および、CHN コーダー (ヤナコCHN コーダーMT6)) にて炭酸基量を測定した。

V 破骨細胞によるナノ結晶子炭酸アパタイトブロックの吸収性評価

5日令家兔 (白色家兔、井上実験動物、熊本) の頸骨および腓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体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。

VI 実験動物によるナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒の骨置換性評価

ラット頭蓋骨に直径 8mm の骨欠損を調製した。当該骨欠損を水酸アパタイト焼結体顆粒およびナノ結晶子炭酸アパタイト顆粒によって再建した。顆粒の粒径はいずれも直径 200~400 μm とした。経時的に試料を周囲組織と一塊に摘出し、病理組織学的に検索した。

C. 研究結果

I ナノ結晶子炭酸カルシウムの調製に関して

水酸化カルシウム圧粉体を72時間二酸化炭素に暴露しても巨視的な変化は認められなかった。図1は成形圧 1MPa で調整した水酸化カルシウム圧粉体の二酸化炭素暴露前(a, b)、二酸化炭素に4時間暴露した試料(c, d) および二酸化炭素に72時間暴露した試料の表面(a, c, e)および断面(b, d, f)のSEM写真である。このように SEM レベルにおいても二酸化炭素暴露による結晶形態の著名な変化は認められなかった。

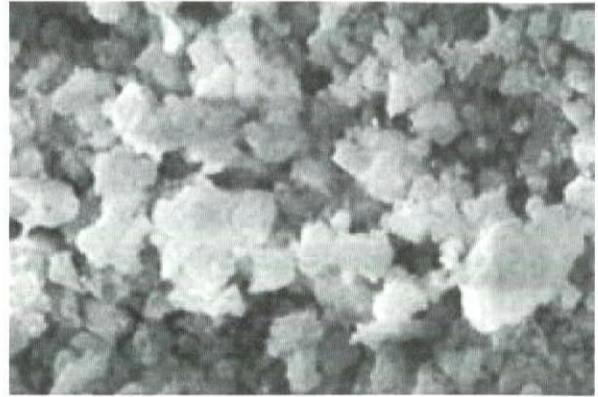


図1 a 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体の表面のSEM像

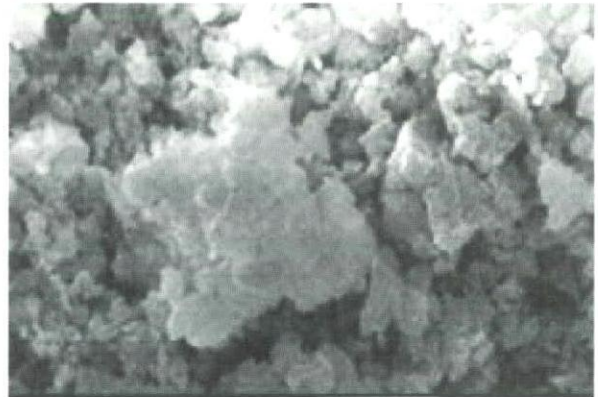


図1 b 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体の断面のSEM像

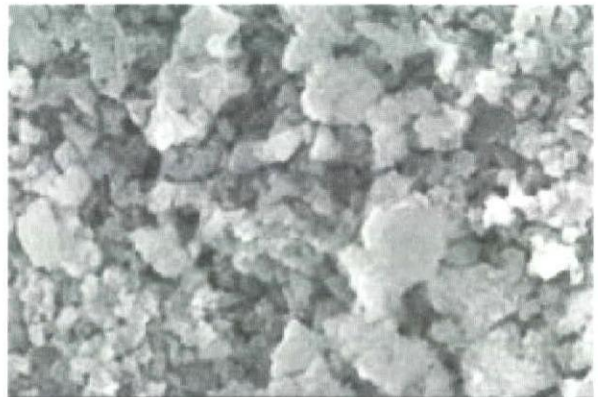


図1 c 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体を4時間二酸化炭素暴露した試料表面のSEM像

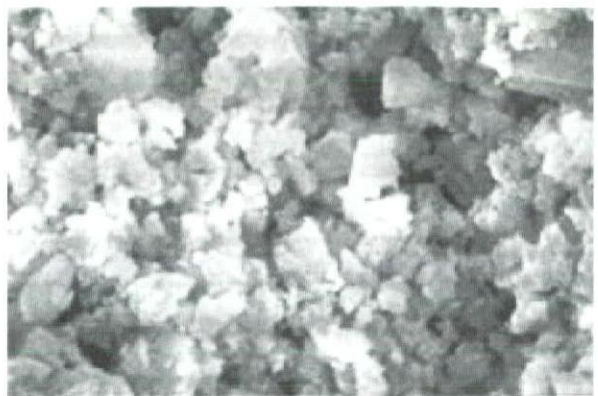


図1 d 1MPa で成形した水酸化カルシウム圧粉体