

**「無機ナノ結晶・高分子系の自己組織化と
生体組織誘導材料の創出」**

**独立行政法人物質・材料研究機構
生体材料研究センター**

センター長 田中 順三

研究期間：平成11年11月1日～平成17年3月31日

1. 研究実施の概要

本プロジェクトでは、界面モデル、自己組織化材料、新規結合系、組織工学・医学応用研究グループの4つに分かれて相互に緊密な関係を維持しながら研究を行ってきた。界面モデル・自己組織化材料・新規結合系研究グループでは、骨組織系材料、軟骨組織系材料、靭帯再建材料、新規結合導入複合体の合成条件の確定と自己組織化の検討を行い、組織工学・医学応用研究グループにより創出した材料・方法を用いてこれまでの研究と比較した材料の優位性・新規足場材料の開発・医学応用に関して検討を行った。平成14年度にグループの再編を行い、界面モデル、新規結合系研究グループを自己組織化材料研究グループに加えて、医工連携による組織工学・医学応用研究グループと緊密な連携をとり、研究を進めた。

界面モデル研究グループ（生体材料研究センター・東京大学大学院理学系研究科）では、溶液から高分子基板へのアパタイトの析出による形態観察・メカニズムに関して検討を行った。特にアパタイト {100} 界面との原子配列に関して高分解能電子顕微鏡を用いて検討した。さらにカルボキシル基が2次元的に配列した有機単分子膜を作製し、炭酸カルシウム結晶の育成を行った。その結果 a 軸のみが制御されることが明らかとなった。

自己組織化材料研究グループ（生体材料研究センター・生化学工業・新田ゼラチン・ブリストル大学）では、骨・軟骨・靭帯・腱を再建する材料とその表面改質方法を開発した。 Ca^{2+} , PO_4^{3-} イオン濃度・pH・滴下速度を制御し、アパタイト微結晶がコラーゲン繊維に整列する自己組織化現象により生体骨と同様な構造を持ったアパタイト/コラーゲン複合体を開発した。このような自己組織化はコラーゲン分子のカルボキシル基をアパタイト核形成場とし、アパタイト結晶が成長するために生じる。合成条件により、自己組織化体の繊維形成が促進され、長さ1cm程度の骨類似材料の創出に成功した。また、アパタイト/コラーゲン自己組織化体を用いたスポンジ材料の作製を行った。アパタイト/キトサン複合体はキトサンのアミノ基とアパタイト表面のCaイオンの配位結合により、アパタイト/コラーゲンと同様な自己組織化した材料の創出を行った。この材料の特徴は、水熱処理により柔軟性が増加し、機械強度に優れた材料であった。アパタイト/多糖類/コラーゲン複合体を作成した。これはアパタイト/多糖類複合体中でアパタイト微結晶が一方向に整列した自己組織化体にさらにコラーゲンを複合化した材料である。機械強度は83MPaと生体骨に匹敵する強度を持っていた。魚類ウロコの微細構造の観察・コラーゲンの抽出を行った。魚類ウロコは、I型コラーゲンと水酸アパタイトにより構成され、コラーゲンシート（1~2 μm ）が交互に90度回転した階層構造を持

っていることを明らかにした。この階層構造のため、引張り強度は93MPaと高い強度を示した。また、ウロコから抽出体コラーゲンの変性温度は、30度（鯛）・35度（テラピア）と動物由来のコラーゲンの変性温度に比較して低い値を示した。また靭帯再建におけるリン酸カルシウムのコーティング方法に関して、カルシウム・リン酸溶液の最適化を行った。生理条件に近い条件（pH7.4、浸透圧290mmol/kg）にて移植腱のダメージを最小とし、腱表面だけでなく内部までアパタイトが分布していることを確認した。これら創出した材料の医学応用等に関しては組織工学・医学応用研究グループにて行った。**新規結合系研究グループ**（生体材料研究センター・国立循環器病センター研究所・多木化学では、経皮デバイスを目的としたシリコンシートへのアパタイトコーティング・軟骨再生用マトリックスとしてコラーゲンと多糖類に架橋剤により結合させたハイドロゲル・神経再建用キトサンチューブ材料の開発を行った。

新規経皮デバイスとしてはアパタイト焼結微粒子にシランカップリング剤を用いて官能基を導入し、医療シリコンにコロナ放電処理法を用いてラジカルを導入後、アクリル酸をグラフト重合させた。この両者をカップリングさせ共有結合を導入したシリコン/アパタイト複合体を作製した。繊維芽細胞を播種し接着・増殖能を評価したところ、シリコンシートに対して高い細胞接着・増殖能を示した。また、動物埋入試験により短期間で材料挿入部位の創傷治癒効果が確認され、引張り試験からもコラーゲンコーティング材料以上の接着力を示した。

軟骨再生用マトリックスは、ポリエチレングリコール(PEG)骨格の側鎖に活性エステル基を有する四官能性架橋剤により、リン酸緩衝溶液中に様々な量比のコラーゲンとグリコサミノグリカン溶解後、架橋結合を導入した。軟骨細胞を組み込んだ状態でハイドロゲルを作製させ、材料と軟骨細胞の相互作用に関して検討した。1週後の細胞培養試験の結果、細胞が生体軟骨と同じようにマトリックス内部に均一に分散しており、1週間後も軟骨特有の丸い形状を保持し、コンドロイチン硫酸等のプロテオグリカンを合成していることが分かった。RT-PCR法により、軟骨の細胞外マトリックスに近い組成を示した。

神経再建用キトサンチューブは、カニ腱由来の配向性キトサンを用いた。カニの腱はキチン・タンパク質・リン酸カルシウムの複合体であるが、キチン分子は腱の長軸方向に配向している。この配向性を維持したままキトサンを合成し、平板状チューブ構造を作製した。さらに水熱処理・アパタイト修飾を行い、生体内で中空構造を維持できるように三角形のチューブを作成した。この結果、細胞浸潤・貪食細胞数が減少し、神経組織の再生が良好に行えた。

組織工学・医学応用グループ（生体材料研究センター・東京医科歯科大学・産業技術総合研究所・東京大学大学院工学系研究科・東京医科歯科大学・茨城県立医療大学では、

他のグループで創出・または独自に開発した材料の細胞反応性・医学応用を中心に検討した。

多孔性アパタイトの細胞の足場材への応用に関して検討を行った。小動物レベルでの試験により良好な骨再生の所見を得た。また引圧下における細胞播種方法により、細胞が多孔質体中の中心部まで進入し骨形成能が上昇すること・生体外での培養方法を従来の静止培地ではなく循環型システム (Perfusion system) を導入することで常に新鮮な培地を供給し骨形成能が更に亢進することを確かめた。これより従来と比較してより効率の高い培養骨移植方法を実現することが可能となった。

アパタイト/コラーゲン多孔質体を用いて移植材料としての適用性を検討した。アパタイト/コラーゲン複合体は、アパタイト微結晶から構成され、有効な微結晶表面積は膨大であるため薬剤 (増殖因子・分化誘導因子) の徐放材料として期待できる。アパタイト/コラーゲン複合体単独で細胞培養を行った場合、培養液中のイオンが吸着されるため細胞剥離・細胞死が生じた。そのため FGF 2 溶液を含浸させ細胞培養を行った結果、細胞増殖が促進されることを確認した。さらに骨誘導能を有する増殖因子である BMP2 を含浸させ、ラット背筋内に移植すると低濃度の BMP2 でも異所性骨化が誘導された。このように薬剤徐放担体としても有効であることが確認できた。この材料の前臨床試験として組織再生治療の有効性を調べるため、イヌ下顎骨・頭骸骨・頸骨に実験的に欠損を設けて治療を行い、その効果を調べた。複合体は破骨細胞により貪食され、骨形成が促進されること・吸収されたリン酸カルシウムが骨形成に再利用される可能性が高いことなどを生体内における基礎的特性を明らかにした。材料のみを用いて 20mm 程度と極めて大きな骨欠損における再生が細胞増殖因子なしで可能であることを明らかとした。また沈痛消炎剤の投与による組織修復の影響を調べた。さらに BMP を含浸させた複合体を 20mm の頸骨欠損部位 (骨膜完全切除) に埋入した。術後 24 週で創外固定を除去し、新生骨の熟成が観測された。ビーグル犬の頸椎に rh-BMP を印圧下で吸着させ間移入した結果、架橋密度に依存するが埋入した材料と椎体との接する部位で骨と直接結合することが明らかとなった。

軟骨組織を生体外再構築するために適切な 3 次元培養担体の開発・培養方法の確立を行った。PLGA スポンジの表面にコラーゲンをグルタルアルデヒドにて結合させた PLGA-コラーゲン複合スポンジを開発した。軟骨細胞を培養した結果、細胞が均一に成育していることが確認できた。またコラーゲンを表面に被覆した結果、コラーゲンが培養条件下でゲル化し、軟骨細胞をトラップして良好に細胞外マトリックスを産出している結果が得られた。さらに継体培養により脱分化した膝軟骨細胞を旋回流れの存在かで浮遊培養した結果、3 次元凝集塊 (スフェロイド) が一度に大量に形成されることを見出した。関節軟骨組織を再構築させるための軟骨細胞の再分化法として有効であった。

アパタイト/多糖類/コラーゲン複合体中でヒト関節症軟骨細胞を培養した結果軟骨細胞の生着が観測された。またマウス軟骨細胞を加えた場合、軟骨細胞の盛んな増勢が見られ、軟骨基質の産生も認められた。継時的にも細胞の増殖・軟骨基質の産生の増加が明らかであった。

膝靭帯再建では生体腱をカルシウム溶液とリン酸溶液に交互に浸漬することでアパタイトを傾斜化させた複合化方法を開発した。この方法により生体腱と生体骨が直接結合し、界面の力学強度も通常の方法より強固であることを見出した。臨床応用のために自動浸漬技術を開発し、現在臨床研究を申請している。

蟹腱由来キトサンチューブによる末梢神経再建では、材料の生体適合性（熱架橋・アパタイトコーティング）など神経再生へ及ぼす効果を検討した。未処理のキトサンチューブでは、移植後1週で貪食細胞が観測され細胞浸潤が観測され神経再建は出来なかった。熱架橋により、チューブ内腔に神経組織の再生が確認できた。アパタイトコーティングにより神経再生能は高くなり、新生血管に富む再生軸策の集合体が観測され、同系神経移植に匹敵する神経再生が行われた。

2. 研究構想

我が国の生体関連材料の供給は大部分が海外に依存している（国内で製造される医療デバイスは2割弱）。自家骨移植にかわる材料、現存しない生体組織再建材料のような新規医療デバイスの開発は国内における医療産業の活性化をもたらす。さらに、日本は2020年に4人に1人が65歳以上という超高齢社会になり、福祉医療の高度化が一層必要とされる。新規医療デバイスの開発により、臓器代替治療および生命維持管理の在宅化が実現可能になり医療費の低減をもたらす。また、患者の「生活の質」(Quality of Life)の向上につながると考えられる。

自然界の中では、分子領域から特異に組織化された有機・無機複合系細胞外マトリックスが存在する。それらの特異構造は細胞の作用によって構築されるが、多くの場合、細胞は特定の時系列にしたがって素材を供給し、複合系の構造は細胞外で素材自身の化学的相互作用によってナノ領域から自己組織化的に形成されていく。

本研究では、「自己組織化(self-organization)による複合系構造の構築」を、「有機無機の界面形成→表面修飾と配位結合によるイオン/共有結合の競合・協調」および「結晶核形成時における結晶方位の規定→共有結合の方向性とイオン配列の制御」のように材料科学的に制御可能なプロセスとして捉え、さらに人為的な化学結合を導入して高分子(共有結合)/無機ナノ結晶(イオン結合)系からなる新規ナノコンポジットの創出を目指してきた。特に、有機官能基-無機イオン相互作用についてカルシウムイオンを中心に理解し、生

体組織誘導型人工骨・歯・靱帯再建用材料の開発を目標とした。

高分子(生体高分子・合成高分子)と無機ナノ結晶をナノ領域から複合化し、しかも生体組織と類似した構造を構築することにより、新規な生体組織再建材料の創出を行った。リン酸カルシウム系無機化合物は、生体親和性が高く、しかも細胞接着の足場となることからカルシウム系材料を中心に研究を進めてきた。本研究グループでは、理学・工学・医学・産業など異分野の研究者との交流を進めながら、学際的な生体組織再建に関する検討を行った。

界面モデル研究グループでは、主に無機と有機界面における結晶成長方位に関する研究を行い、自己組織化材料及び新規結合系材料の開発の基礎的知見を得た。さらに自己組織化材料研究グループでは、生体高分子(コラーゲンや多糖類など)とリン酸カルシウムの複合体を開発し、その生体内における生体親和性・材料の有効性・安全性に関して医学応用研究グループと連携して行った。新規結合系研究グループでは、無機/有機複合界面において共有結合を導入する新しい技術開発を行ってきた。医学応用研究グループでは、他グループが創出した材料の生体特性に関する詳細な検討及び、再生医工学に向けた細胞培養技術などに関する検討を行った。

このような異分野の連携により、「有機無機の界面形成→表面修飾と配位結合によるイオン/共有結合の競合・協調」および「結晶核形成時における結晶方位の規定→共有結合の方向性とイオン配列の制御」といった当初目標に対して連携を取り、新規生体材料の開発を進め、現在、臨床応用に向けた試験並びに前臨床試験に結びつけた。

3. 研究成果

3. 1 “界面モデル研究グループ”

(1) 研究内容

本テーマは“生体鉱物形成における有機－無機相互作用の解明”という課題でスタートして、この5年間で生体鉱物形成一般にかかわる研究を行なってきた。具体的には有機薄膜をテンプレートとした生体鉱物の形成実験、液中原子間力顕微鏡 (AFM) による生体鉱物成長のその場観察、実際の生体における硬組織の観察そして生体鉱物の構造 (多形, 結晶方位, 形態等) を正確に解析できる手法の確立などが含まれる。また生体鉱物として最も重要なものは骨などの主要成分であるハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite: HAp) と貝殻や外骨格などを形成する炭酸カルシウム (CaCO_3) に関して研究を進めた。中でもHApは医学的な応用に直接つながる重要な物質であり、本テーマでもいくつかの研究を進め、その基礎的な理解を得ることができた。しかしながら生体鉱物が形成される常温常圧の形成条件ではHApはナノ結晶と呼ぶべき大きさの凝集体となり、その結晶学的な解析は難しく有機－無機相互作用の解明という目的には限界がある。これに対して炭酸カルシウムは常温常圧で比較的大きな結晶となり、例えば有機薄膜をテンプレートとした結晶成長等を解析することにより、有機－無機相互作用の原子レベルでの解明が期待された。本グループではこの2つの物質をそれぞれ違う目的で研究を進めることになった。以下の各研究を具体的に報告する。

- ① 疑似体液中において形成された HAp の配向性及び溶液中のカルシウムイオン濃度が結晶形態に与える影響
- ② 交互浸漬法及び生物起源の水酸アパタイト微結晶の構造とその形成条件依存性
- ③ 炭酸カルシウムの結晶成長及び結晶形態に及ぼす微量希土類元素の影響

(2) 研究成果及び今後期待される効果

①に関しては骨などの HAp がなぜ板状結晶になるのか、その形態に影響する溶液成分についての考察を加え、疑似体液から形成される HAp 凝集体の構造について結晶学的視点から明らかに

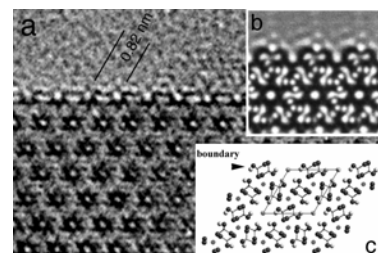


図1. HAp {100} 界面の原子配列. (a) HRTEM 像, (b) シミュレーション像, (c) 界面構造モデル

した. また HA p 微結晶の主要な表面である {100} 界面の原子配列に関して焼結体を用いて高分解能電子顕微鏡 (HRTEM) 観察により考察を行った (図 1).

②に関しては最近 HAp のコーティング法として提案された交互浸漬法で形成される微細な HAp シートの構造について、HRTEM 観察や計算機シミュレーションによる回折パターンとの比較により解析を行った. そして HAp 微結晶の厚さ回折パターンから推定する方法を提案した (図 2).

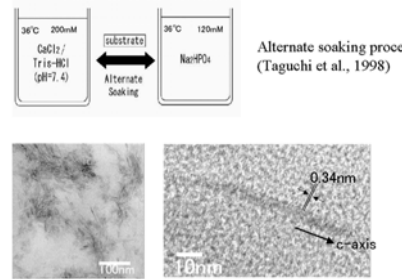


図 2. 交互浸漬法による HAp の作製手順と形成された HAp の HRTEM 像

③のテーマは過飽和溶液からの炭酸カルシウムの析出において、溶液中の Yb³⁺等の希土類イオンが析出する炭酸カルシウムの多形及びその安定性、結晶形態にどのような影響するかを調べ、炭酸カルシウムの今までに見られない特異な結晶形態を見出し、その解析を行なった.

このような研究と平行して、様々な有機薄膜上に結晶成長させたリン酸カルシウムや炭酸カルシウムが、どのような構造的特徴を持つかを透過電子顕微鏡等により解析した. 特にカルボキシル末端基と中央に 3 重アセチル結合を持った両親媒性分子の単分子膜を重合させた有機膜は、その表面に 2 次元的に配列したなカルボキシル基を持つことが電子回折等によって示され、その上で成長した炭酸カルシウムの結晶相 (calcite) はその a 軸方向が非常によく制御されることを見出した. またこの炭酸カルシウムを析出させる飽和溶液に Ca の 10 倍の Mg を添加したところその結晶形態は大きく変わったが、やはり Mg が大量に固溶した calcite の結晶が同様な方位制御により重合膜上に形成されることがわかった (図 3).



図 3. 表面にカルボキシル基が規則的に配列した重合化膜上に形成された Mg 含有炭酸カルシウムの結晶. 膜の重合化方向に従って結晶の方向が制御されている.

また、多糖などの生体高分子が生体鉱物の結晶成長にどのような影響を及ぼすか、走査プローブ顕微鏡を用いたその場観察実験を始めた. 過去の研究で抽出し構造を解明した炭酸カルシウムの結晶成長の阻害能を有する酸性多糖 (Coccolith Matrix

Acidic Polysaccharide: CMAP) を溶液に導入し、calcite の結晶成長のその場観察を行った。その結果、ごく微量の CMAP の導入により成長を続けていた炭酸カルシウム(calcite)表面上のステップはその成長が止まることを確認できた(図4)。しかしながらこのような阻害機能の結晶方位や結晶構造(多形)の依存性についてなど詳しい結果は得られていない。

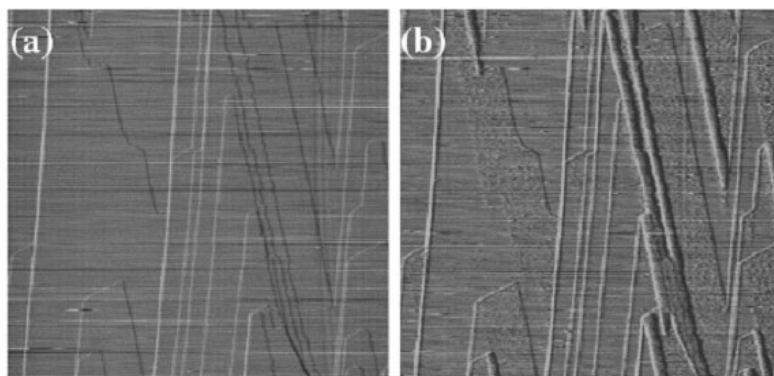


図4. Calcite {104}面上のステップ成長を示す液中 AFM 像. (a) 溶液中の酸性多糖を添加前. (b) 添加後. (b)ではステップ端に何らかの物質が形成され, 成長が止まることが確認された. 図のサイズは $25\mu\text{m}$ 角.

最後に無機-有機相互作用によってどのように結晶の方位が制御されるかということ効率的, 正確に解析するため, CREST の予算を利用して電子線後方散乱(Electron Back-Scattering Diffraction: EBSD)測定装置を大学に SEM に取り付け、このための解析システムの開発を行なった。これにより上で述べたような有機薄膜上の炭酸カルシウムの結晶方位(膜の重合方向との関係)や SEM 内での多形の決定, 形態と結晶構造の対応などを正確に決定できるようになった。またこの手法を用いて実際の生物の硬組織についての解析も行なった。具体的には植物プランクトンである円石藻がつくる Cocolith と呼ばれる炭酸カルシウム結晶集合体中の結晶方位を明らかにすることに成功した(図5)。

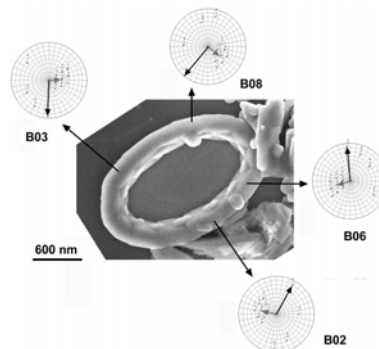


図5 (右). Cocolithを構成する calcite 微結晶の結晶方位分布. ステレオ図上で黒い矢印が a 軸, 灰色の矢印が c 軸の方向を示す.

この5年間の研究により生体鉱物の形成機構について多くの知見を得ることができたが、まだまだ未解明な問題も多い。例えば図5に示した天然における Cocolith の炭酸カルシウムの結晶方位制御は、図3の有機重合膜上の結果と非常に類似しており、同様な有機基質によるテンプレート機能が働いていると考えられる。おそらく生体における炭酸カルシウムの多形制御機構(よく言われる calcite-aragonite 間

題)にも今回の結果は非常に示唆的と思われる。しかしながらこれがすべての生体鉱物の形成に共通なものと判断することはできない。例えば多くのタンパク質の(特に結晶形成場での)立体構造は未知であり、 Ca^{2+} との結合位置及びその配列がどのようになっているかはまだまだ解明できない難しい問題である。また骨のような HAp の微結晶の構造は小胞内での単なる溶液の過飽和でも十分に説明することができると思われる。今後の研究の展開としては今回の研究手法等を用いてさらに実証的なデータを出していく一方で、タンパク質の立体構造などの情報を含めたより新しい実験により、より詳細な生体鉱物における有機-無機相互作用の解明が望まれる。

3. 2 “自己組織化材料研究グループ”

3. 2. 1 魚類ウロコの物理的・化学的特性

(1) 研究内容

硬骨魚類のウロコはカルシウム欠損型水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) と細胞外マトリックス、特にI型コラーゲンにより形成されている。これらは高次に秩序化した3次元構造を持っている。ウロコは二つの異なった構造からつくられている。外側の層 (Osseous layer) と内側の繊維層 (fibrillary plate) から出来ている。上側の外側の層では、コラーゲン繊維が無秩序に配列しており、プロテオグリカン中に埋め込まれている。対照的に、下側の繊維層ではコラーゲン繊維が整列しており、平板状構造をつくっている。つまり直行したまたは2重に織り込まれたベニヤ構造をしている。繊維層中に存在するコラーゲン繊維はウロコの底面にいるスクレロブラストにより作られている。この繊維はマイクロチューブル (microtubule) やアクチン (actin) マイクロフィラメントの協調により形成されているが、底面層形成過程はまだ議論が残るところである。コラーゲン繊維の特異な組織化は異なる結合組織の機械的特性にはなほ重要な問題である。

魚類ウロコの石灰化は生命体の一生に渡りたゆまなく生じている。外側層は最初にマトリックスベシクルにより石灰化がされ、それから内側層に展開されていく。無秩序に配列した針状や薄片状のアパタイト結晶が最外層に観測されている。逆に内側層の石灰化はマトリックスベシクルが存在しないが、硬骨魚類のコラーゲン繊維と平行にアパタイト結晶の *c* 軸が整列していることが最近の小角 X 線回折から決定された。

本研究では、鯛から剥ぎ取ったウロコの微構造を透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分析 (EDS)、X 線回折測定 (XRD) とフーリエ変換型赤外線スペクトルにより分析を行った。我々の知る限り、魚類ウロコの機械的強度試験の結果はこれまでに報告されておらず、そのため、我々はこれらの生体石灰化組織の機械的強度とその破断機構に関して検討を行った。さらに熱処理により有機物を完全に除去させることで、元のベニヤ構造を保持したままのバイオミメティック構造のレプリカを作製した。通常の合成方法ではそのような材料を得ることは不可能であり、生体材料研究において生体が創り出した構造物は大変興味深い。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

鯛ウロコの SEM 像観察の結果、最外層に特有な年輪が観測された。(図 1) また、染色

した薄片の TEM 像中に明らかに繊維層が観測された。(図 2)最外層では 3-4 μm の幅で無秩序には移行したコラーゲン繊維により形成されていた。(図 3)さらに、繊維層は直線的な 1-2 μm の平板構造により形成され、細密充填された 70-80nm の直径のコラーゲン繊維を含んでいた。(図 4)繊維の整列は隣り合う平板構造間で約 90° 回転したベニヤ構造をしていた。高倍率の染色した試料では、I 型コラーゲンに特有な 65nm の周期構造を持つ縞が観測された。しかしながら、マトリックス中のアパタイト結晶の廃校は TEM では観測されなかった。これは試料調整中に結晶が溶解したためと考えられる。鯛のウロコの微細構造はこれまでに報告されているものとそっくりであった。

XRD パターンは、アパタイト構造に対応する 0.343, 0.280, 0.225, 0.194, 0.172nm の d 値を持ったブロードな回折線を示した。(図 5)他のリン酸カルシウムや炭酸カルシウムは観測されなかった。ブロードは回折ピークは、結晶が小さいか、構造が無秩序であるか、その両方であることを意味している。定量的な EDX 分析の結果、無機物の組成は P₂O₅, Na₂O, MgO, CaO でそれぞれ 41 \pm 2, 3 \pm 2, 2 \pm 1, 54 \pm 2wt%であった。Ca/P 比は 1.67 であった。TG-DTA 測定の結果、水分・有機物・無機物の組成は、13, 4, 46%であった。吸着水は吸熱をともない 473K までに観測され、コラーゲン繊維や他の生体高分子(多糖類)は発熱を伴い 648K から生じ 873K まで観測された。FTIR スペクトルは約 600 と 1000cm⁻¹に強い吸収が観測され、アパタイト格子中のリン酸基に対応していた。またアパタイト格子中のリン酸基に置換した炭酸基の吸収がそれぞれ 873, 1420, 1447cm⁻¹に観測された。(図 6)同様なデータがこれまでに人間の骨や歯の生



図 1 タイのウロコの SEM 像。年輪が観測される。

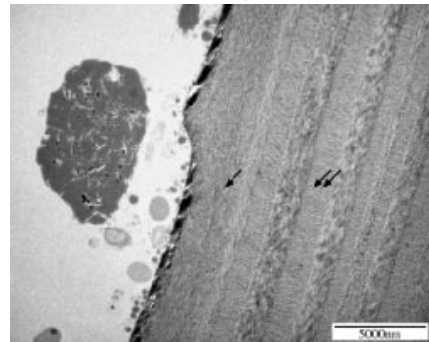


図 2 オスミニウムにより染色したタイのウロコの TEM 像。矢印は最外層(osseous layer)を二重矢印は繊維層(fibrillary plate)を示している。

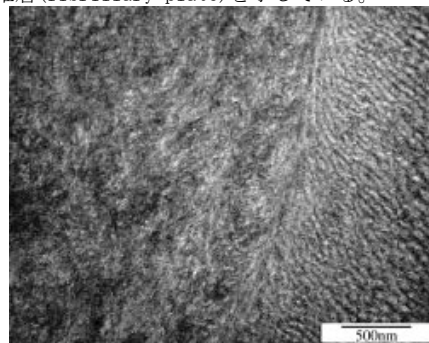


図 3 最外層の染色したコラーゲンの TEM 像。左側はウロコの表面部位を示し、無秩序に廃校したコラーゲン繊維が観測される。内部の繊維層のコラーゲン秩序構造が右側に観測される。

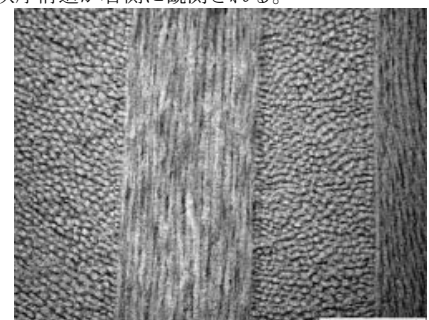


図 4 内部構造の TEM 増。平板状構造中に直径 70-80nm のコラーゲン繊維が配向している。コラーゲン繊維はそれぞれのシートで互いに 90° 回転した構造をしている。

体鉱物で観測されている。加えて、アミノ I, II, III に帰属される FTIR バンドがそれぞれ 1657, 1520, 1227 cm^{-1} に観測される。その結果は魚類ウロコが I 型コラーゲンと炭酸含有カルシウム欠損アパタイトにより形成されている事を示している。

鯛ウロコの引張り強度試験の結果、平均値が $93 \pm 1.8 \text{MPa}$ ($n=10$) であった。引張り試験によるストレス-ストレインカーブ(図 7) は最初に直線性を示し、ヤング率 $2.2 \pm 0.3 \text{GPa}$ の値を示した。この値は比較的低い硬さを示していた。これはアカシカ(～50%, 6.1GPa) やアクシスジカ(～80%, 31.6GPa) の無機物含有量と比較してウロコの低い無機物の含有量(46%)によるものである。無機物含有量と硬さ(ヤング率)の相関は既に報告されている。高いストレス値において、引張りストレス-ストレインカーブは破断前に明らかなプラスチック特性を示した。破断面の SEM 観察の結果、 $2\text{-}3 \mu\text{m}$ のコラーゲン層状構造のスライドと個々のコラーゲン繊維の引き裂きが破断前の塑性変形に影響している。(図 8) ウロコを脱灰することで、明らかに平均の引張り強度 ($36 \pm 8.4 \text{MPa}$; $n=10$) とヤング率 ($0.53 \pm 0.06 \text{GPa}$; $n=10$) の低下が観測された。そのため破断挙動は本質的に脱灰前の組織と同じであった。

3. 2 熱処理プロセスとバイオミメティックレプリカ

XRD と FTIR 測定の結果、873 と 1473K で焼成したウロコの無機物は水酸アパタイトまたは水酸アパタイトとリン酸三カルシウム(TCP; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) の混合物であった。高温

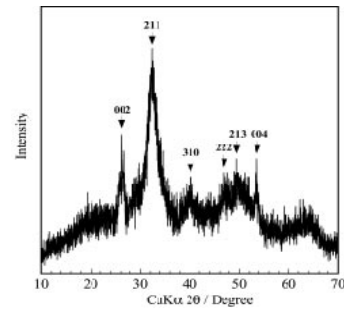


図 5 ウロコの X 線回折測定結果。水酸アパタイトの(002)、(211)、(310)、(222)、(213)と(004)のブロードな回折線が観測される。

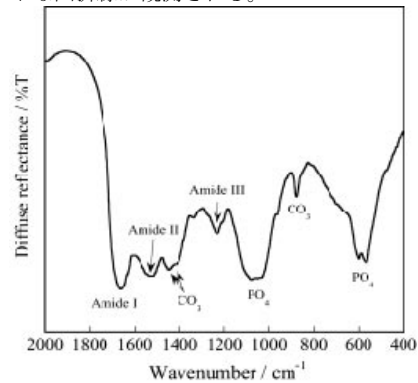


図 6 ウロコの IR スペクトル。コラーゲンに帰属されるアミド I, II, III が観測され、アパタイト格子中のリン酸基と炭酸基がそれぞれ観察された。

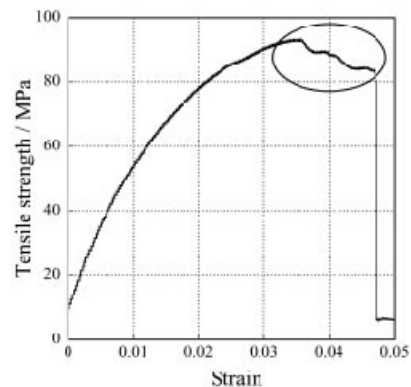


図 7 ウロコの引張りストレス-ストレイン曲線。 $(n=10)$ 円で示した最大歪値はコラーゲン繊維の層状構造中の滑りと引き裂きにより生じた塑性変形に対応する。

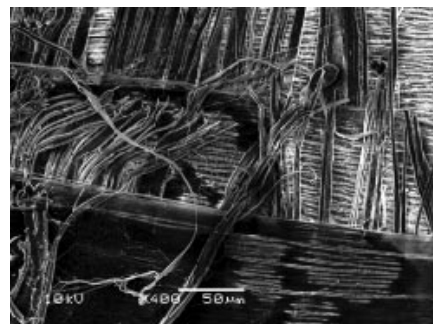


図 8 ウロコの破断面の SEM 像。コラーゲン繊維の層状構造の滑りとコラーゲン繊維の引き裂きで破断されている。

μm の TCP の小さな結晶が 1473K で焼成した試料表面に観測された。対応する繊維層の SEM 像は明らかに元のベニヤ構造を保存した無機物のレプリカが観測された。(図 10) 両方の場合において、リン酸カルシウムの 2-4 μm の平行な元と同様なシートが出来上がっていた。これは交互に層間において $\sim 90^\circ$ 回転した構造をしていた。リン酸カルシウムの層状構造は 1-2 μm の間隔の多孔構造を持っており、滑らかで平坦な表面を呈していた。それぞれのシートは多層構造が安定に存在し、隣り合うリン酸カルシウム間に

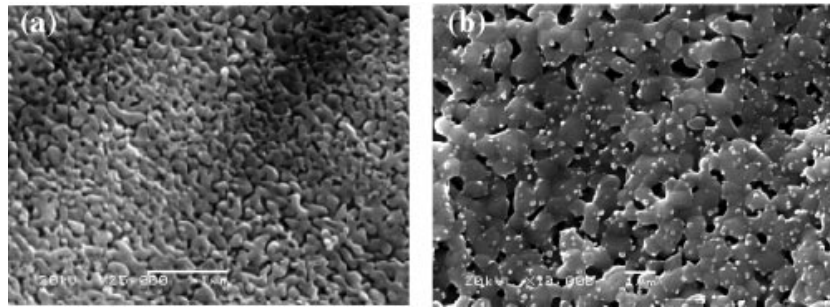


図9 873(a)と 1473K(b)で焼成したウロコの最外層表面の SEM 像。リン酸カルシウムの結晶が観測される。

枝が存在していた。873K で焼成した試料の高倍率の SEM 像では、0.5-0.6 \times 0.1-0.2 μm の細い板状のアパタイト結晶が縞に沿っては移項していた。焼成温度を 1473K と高くすることでアパタイト結晶の粒子サイズが大きくなるが、基本的なリン酸カルシウム構造は保持されていた。この結果はコラーゲン繊維に沿ったアパタイト粒子の配向が焼成物中でも保持されているということを意味している。

鯛のウロコの微構造と組成とこれまでの研究の異なる組織との微構造の類似性を述

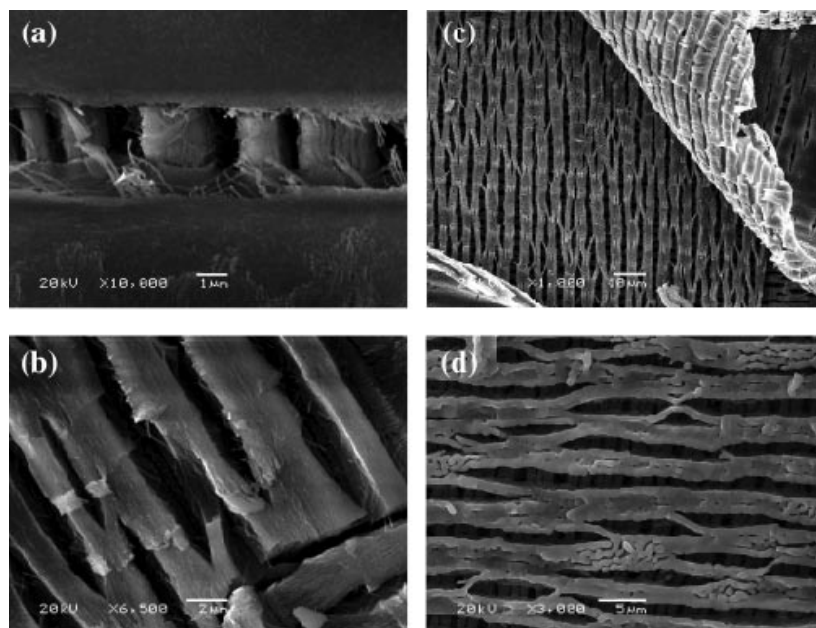


図9 873(a, b)と 1473K(c, d)で焼成したウロコ内部の SEM 像。長く幅の狭い板状アパタイト結晶がコラーゲン層状構造のコラーゲン分子に平行に配向して入ることが分かる。(c)多孔質リン酸カルシウムシートがベニヤ構造をそのまま保持したレプリカ構造をしている。(d)連結したリン酸カルシウムの橋かけ構造の高倍率像。

べた。無機相はカルシウム欠損型炭酸水酸アパタイトであり、金魚ウロコのこれまでの研究にあるように炭酸塩鉱物は検出されなかった。薄片化したウロコの TEM 観察はコラーゲンマトリックス中の無機物の位置を決定することが出来なかったが、焼成した試料はアパタイト結晶が長く細長い板状結晶であることを示し、さらにそれぞれの層においてコラーゲン繊維と平行に整列していることを示していた。これは最外層と内部層に観測されるアパタイト結晶の配向性の他のウロコのこれまでの研究と良い一致をしていた。硬骨魚類の薄い最外層の無機化が内部層の無機化より先に生じるということは一般に受け入れられている。これは有機マトリックスのコラーゲン繊維の組織化を含んでいる。最外層はコラーゲン繊維が無秩序に整列しており、内部層は高次に組織化したコラーゲン繊維の平板構造により構築されている。TEM 観察は魚類ウロコの構造も出ると一致していることを示し、鯛ウロコの直行ベニヤ構造層がこれまでのウロコの観察結果とほぼ同じであることを示した。しかし金魚の 2 重捻り構造とは異なっていた。

ウロコの機械強度特性はこれまでに報告されていない。Meuier はウロコ中のコラーゲン繊維が無機化により硬くなることを提案しているが、これは我々が観測した脱灰前と後に測定した引張り試験と一致していた。そのため、ウロコの高い引張り強度はアパタイト結晶とコラーゲン繊維の高い秩序構造に起因することが明らかである。つまり板状のアパタイト結晶の c 軸がコラーゲン繊維に沿って配向しているためである。コラーゲンといった生体マトリックスとあばたちおの整列はこれまでに報告されており、組織の強度を強くするための無機物バインダーや機械強度の異方性による機能的な利点が知られている。さらに、我々は鯛ウロコのプラスチック変形を観察し、これは繊維間に無機物が沈着していることを示し、繊維間に侵入していないことを示している。特にこれらの領域では薄いコラーゲン繊維が含まれている。

終わりに、我々はウロコを焼成することで簡単に層状のリン酸カルシウムレプリカを合成することが出来た。この構造は直接的な生体過程でつくられたものではないが、バイオメテック材料研究分野において興味深いものだった。さらなる研究により、分離技術・触媒・医療応用に使われる複雑な構造を持った多孔質無機材料の新しい方法として魚類ウロコの応用に関して研究が必要である。

3. 2. 2 魚類由来コラーゲンの物理的・化学的特性

(1) 研究内容

I型コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、組織や器官の機械強度の保持の役割をしている。また細胞環境に生理学的な調節を行っている。I型コラーゲンの利用は健康食品・美容外科・生体材料の産業などに広がっている。生体材料への利用のためのI型コラーゲンの利点として、その低い抗原性や細胞との直接的な接着が知られている。これまでに、多くの分野におけるI型コラーゲンの主原料は牛やブタの真皮などに限られてきた。I型コラーゲンは海洋生物の皮膚などから抽出されてきた。例えば、クラゲ、ヒトデ、タコ、オウムガイ、イカ、ウニや他の生物から抽出されてきた。一方、高次に組織化したI型コラーゲンと水酸アパタイト構造を持つ魚類ウロコからのI型コラーゲンの抽出は、野村らにより報告されている。これは、鯛のウロコからI型コラーゲンを抽出し、酸可溶性コラーゲン(SC)は変性温度 300K であると報告されている。海洋性の皮膚由来コラーゲンはブタ真皮から抽出したコラーゲン(314K)に比較して低い変性温度をしている。

一般に、ペプシン可溶化コラーゲン(PSC)の変性はSCと比較して低いことが知られている。またPSCのN及びC末端がペプシン処理により失われるためSCと比較して抗原性は低い。ペプシン処理の処理時間と温度は、 α I(1)鎖より小さな分子量の断片化を促進させるための重要な要因である。ラマン分光は特にコラーゲンの分析に有用であり、Frushourらにより関連する変性物の報告がある。彼らは、コラーゲンの骨格アミノ酸に関連した特定の官能基を分別させることが出来ると報告している。そのため他の蛋白質と純粋なコラーゲンを同定することが可能である。

本論文で、我々は簡単な方法により鯛(海水魚)とテラピア(淡水魚)の魚類ウロコからI型コラーゲンを抽出した。さらにCDスペクトルにより変性温度を算出した。加えて我々はFT-Raman分光により温度とアミノ酸組成の関係に関して検討を行った。

表1 アミノ酸組成(1000残基)・変性温度・熱力学データ

Resource	Porcine dermis	Fish Scale of <i>Pagrus major</i>	Fish Scale of <i>Oreochromis niloticus</i>
Hydroxyproline	97	73	83
Aspartic acid	44	43	47
Threonine	16	24	24
Serine	33	41	36
Glutamic acid	72	71	72
Proline	123	107	110
Glycine	341	346	336
Alanine	115	133	126
Half-cystine	0	0	0
Valine	22	19	20
Methionine	6	15	12
Isoleucine	10	7	11
Leucine	22	18	21
Tyrosine	1	3	3
Phenylalanine	12	13	13
Hydroxylysine	7	7	7
Lysine	27	26	25
Histidine	5	7	5
Arginine	48	49	49
Total	1000	1000	1000
Denaturation Temperature (K)	313.84(2)	302.97(3)	308.68(3)
ΔH (KJ/mol)	-669(8)	-522(9)	-452(7)
ΔS (KJ/molK)	-2.13(3)	-1.72(3)	-1.46(2)

(2) 研究成果及び今後期待される効果

熱分析の結果、ウロコは24時間処理することで完全に脱灰していた。酸溶解性とペプシン可溶化コラーゲンの収率は約2%であった。表1に1000個の残基に対するコラーゲンのアミノ酸組成を示す。コラーゲンに特有な(Gly-Pro-Hyp)_nの3重らせんの

繰り返しにより、グリシン(Gly)が最も多く存在し、34.6% (タイ) と 33.6% (セラピア) 含まれていることが分かった。この値は、ブタ真皮から抽出したコラーゲンのグリシン (34.1%) とほぼ一致していた。1000 個に対するイミノ酸、プロリンやヒドロキシプロリンの数は、ブタ真皮 (220)、セラピア (193)、タイ (180) の順に減少していた。これはコラーゲン繊維の安定性や変性温度に影響している。各 I 型コラーゲンのプロリンのヒドロキシル化は、44.1% (ブタ真皮)、43.0% (セラピア)、40.6% (タイ) であり、リシンのヒドロキシル化は約 21%であった。また、硫黄を含むメチオニン残基の数は明らかにウコロから抽出したコラーゲンのほうが多く、ブタ真皮 (6/1000)、セラピア (12/1000)、タイ (15/1000) であった。

図 1 に温度範囲 278-353K における 3 種類の I 型コラーゲンの CD スペクトルを示す。コラーゲンは 221nm に正の極大が観測され、191nm に負の極大が観測された。また各スペクトルの交点 (ゼロ回転) は 212nm に観測された。これは蛋白質の 3 重らせん構造の特徴である。図 2 に平均分子楕円率 $(\theta)_{221}$ の温度変化を示す。 $(\theta)_{221}$ の値は温度とともに減少し、コラーゲン特有な 3 重らせん構造の分解に依存していた。また各コラーゲンの変性温度は、ブタ真皮 (313.8K)、セラピア (308.7K)、タイ (302.9K) であった。変性の開始と終了温度は、ブタ真皮 (309-319K)、セラピア (301-316K)、タイ (297-309K) であった。HyP 残基の数に対して変性温度をプロットすると直線性を示すが、プロリン含有量ではそれほど一致は見られなかった。(図 3)

コラーゲン変性に関連してのエンタルピー (ΔH) とエントロピー (ΔS) の変化を図 2 に示した熱変化曲線を用いて van't Hoff の近似式から算出した。 ΔH と ΔS の値は、それぞれ -452 (7) kJ/mol と -1.46 (2) kJ/molK (セラピア)、-522 (9) kJ/mol と -1.72 (2) kJ/molK (タイ)、-669 (8) kJ/mol と -2.13 (3) kJ/molK (ブタ真皮) であった。この値は、Gly-X-Y の繰り返しによる位置に依存しているため、変性温度と直接的に対応しているわけではない。

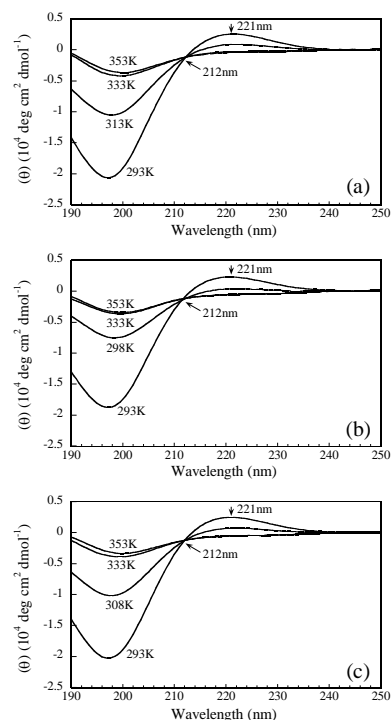


図 1 I 型コラーゲンの CD スペクトル; (a) ブタ真皮由来、(b) タイウコロ由来、(c) セラピアウコロ由来

Ac(Gly-Pro-Hyp)₃-Gly-X-Y-(Gly-Pro-Hyp)₄-Gly-Gly-NH₂のXとY位置がArg、Lys、GluとAsp に関しての熱安定性とエンタルピーとエントロピーが報告されている。X位置に電荷を帯びた鎖をおき、Gly-Pro-Hyp や Gly-Ala-Hyp 配列と比較するとエンタルピーは大きくなり、エントロピーは小さくなる。そのため、ウロコから抽出した I 型コラーゲンのエンタルピーとエントロピーの違いがアミノ酸の特異的な配列に起因していること、その 3 重らせんの安定性に影響していることが考えられる。これは、α 鎖内部の水素結合形成に依存し、Gly-Pro-Hyp の 3 つのペプチド配列が最もコラーゲン分子内で安定であるためである。ウロコの低い変性温度は小さな負のΔHの値が影響していることが推察されるが、これは、テラピアのΔH値とタイのΔH値の比較から、より高いMet含有量に関係した硫黄の相互結合が影響していることが考えられる。

図4にI型コラーゲンに対する1800-800cm⁻¹のラマンスペクトルを示す。1670と1640cm⁻¹の二本のピークはそれぞれコラーゲンのアミドIに帰属される。一方、1270と1246cm⁻¹のピークはアミドIIIに帰属される。カルボキシル基に帰属されるバンド(アスパラギン酸とグルタミン酸; 1421、1062cm⁻¹)と水素化したアミノ残基(1162cm⁻¹)が観測された。ラマンスペクトルの顕著な違いは、1000-800cm⁻¹に観測され、芳香環や残基リングを持つフェニルアラニン、プロリン、ヒドロキシプロリンは強いラマン散乱をしている。フェニルアラニンに帰属される二本のバンドは1033と1004cm⁻¹に観測され、プロリンの2つのバンドとヒドロキシプロリンのバンドがそれぞれ921と855cm⁻¹や880cm⁻¹に観測される。後者はタイに多く含まれ、コラーゲンのヒドロキシプロリンの量が顕著に異なることと一致していた。タイとテラピアのウロコから抽出したI型コラーゲンに関して検討を行い、アミノ酸組成と変性温度の相関を明らかにした。CDスペクトル測定により、変性温度がイミノ酸残基の減少とともに低くなり、

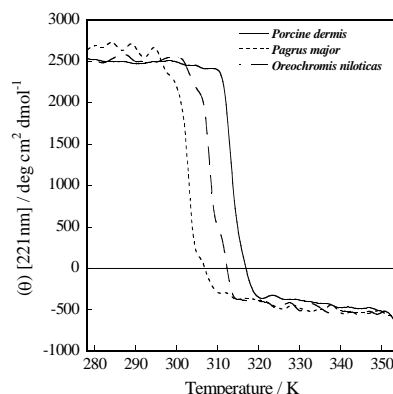


図2 221nmにおけるCDスペクトルの温度変化

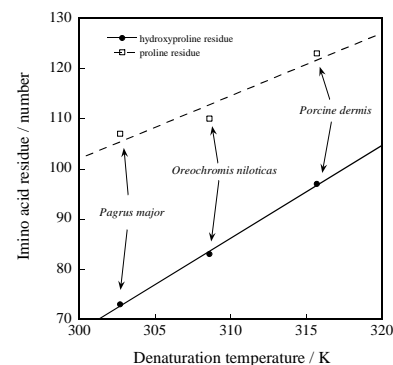


図3 ヒドロキシプロリンとプロリン残基に対する変性温度の関係

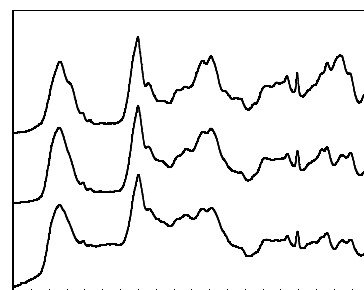


図4 1800 から 800cm⁻¹でのI型コラーゲンのラマンスペクトル。(a)ブタ真皮由来、(b)タイ由来、(c)テラピア由来。明らかな違いがヒドロキシプロリンとプロリンピークに観測される。

そしてヒドロキシプロリン含有量と強い相関があることを明らかとした。ウロコとブタ真皮から抽出した I 型コラーゲンのエンタルピーとエントロピーの変化は組成によるラマンスペクトルの違いに依存すると説明できた。

3.2.3 無機/有機複合体の創出

(1) 研究内容

I 型コラーゲン/水酸アパタイトの複合体については、300 μm の自己組織化構造の構築に成功した。合成条件はほ乳動物の体温と同じ温度 40、pH は体内より高い pH9~10 であることを見出した。さらに動物実験より、複合体の周囲に骨芽細胞と破骨細胞が誘導され、自家骨と同じ代謝を受けて新生骨に代わることを実証した。さらに、I 型コラーゲン/水酸アパタイト複合体の懸濁液に架橋剤を添加して架橋密度を制御し、多孔体構造を作製した。

水酸アパタイト/多糖類の自己組織化体については、水酸アパタイトを無機体として、コンドロイチン硫酸・ヒアルロン酸・キトサンの 3 種類について制御を試みた。コンドロイチン硫酸は、4 位または 6 位にスルホニル基($-\text{SO}_3^-$)をもち 2 位にカルボキシル基($-\text{COO}^-$)をもつ 2 糖鎖の繰り返しである。一方、ヒアルロン酸は 2 位にカルボキシル基をもつだけである。それぞれの自己組織化体の電子顕微鏡写真を示す(図 1)。多糖類分子鎖に対してアパタイトの a 面が接して、c 軸が分子鎖に平行に整列している。分子鎖上のカルボキシル基がアパタイトの核形成の場となっており、有機単分子膜を用いた結果と一致している。



図 3 アパタイト/多糖類複合体の透過型電子顕微鏡像

また、水酸アパタイト/キトサン複合体についても同様の自己組織化体の合成に成功している。この場合には、キトサン中のアミノ基と水酸アパタイトの Ca イオンの相互作用が構造構築を支配している。複合体の機械的強度は、水熱処理により改善された。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

骨組織の形成過程を材料科学的に解釈すると、コラーゲン分子、カルシウムイオンとリン酸イオンをどのように供給するかが重要である。骨類似組織を人工的に合成するには、コラーゲンの繊維化と同時に水酸アパタイトを形成させる必要がある。コラーゲン分子は強アルカリ下では分解されるが、酸性溶液中では安定に存在する。また、適度なイオンが存在する環境下では温度が 40℃付近で繊維化する。一方、水酸アパタイトはこれまでの研究から弱アルカリ領域で安定に結晶成長することが知られている。

そこで、我々はコラーゲン分子を分散させたリン酸水溶液（酸性溶液）と水酸化カルシウム懸濁液の二液を準備し、精製水を入れた反応容器中に同時に滴下させることで生体内環境を模倣した。そのために用いた装置を図 1 に示す。ここで、リン酸水溶液や水酸化カルシウムを出発原料として用いたのは、水酸アパタイト形成後に他の不純物を析出させないためである。水酸アパタイト/コラーゲン複合体は、形成する水酸アパタイトとコラーゲンの重量比を 80 : 20 に固定し、合成環境のパラメータとして温度、pH、イオン濃度を変化させて合成した。温度は室温から 40℃の範囲で、また pH は 7, 8, 9 の 3 点で合成した。40℃で合成した場合は、水酸アパタイトのナノ結晶とコラーゲン分子が自己組織化して繊維が形成されていたが、温度を低くした場合は、繊維形成が促進されなかった。pH を変化させた結果、8~9 では自己組織化が促進されていた。このことは、コラーゲン分子が繊維を形成して、コラーゲン分子の構造水が脱離してカルシウムイオンとの相互作用が容易に生じるといった協調的な反応の結果と考えられる。イオン濃度を変化させることで自己組織化繊維が長くなり、最長 75mm 程度まで成長することが分かった。図 2 に自己組織化により得られた繊維の写真を示す。

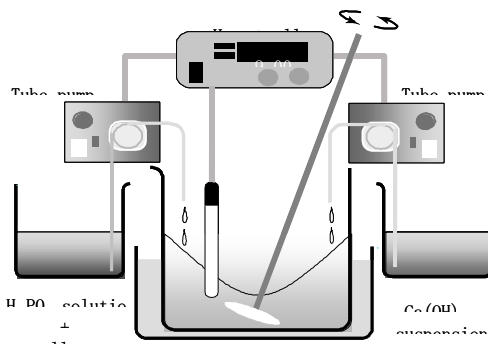


図 1 合成の模式図

得られた自己組織化繊維の構造を透過型電子顕微鏡により観察した（図 3）。電子線回折測定の結果、水酸アパタイトの 002 面の回折がコラーゲン線維の方向に三日月状の幅を持って観測された。つまり、この繊維の中で水酸アパタイトの *c* 軸が三日月の範囲内でコラーゲン線維に沿って整列していることが明らかとなった。また、得られた水酸アパタイトナノ結晶は、大きさ 40nm×10nm 程度であった。この構造は骨組織中のコラーゲン繊維とアパタイトナノ結晶の高次構造と類似していた。さらにこの自己組織化繊維

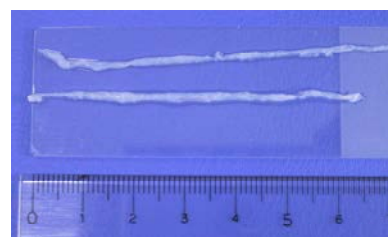


図 2 自己組織化した HAp/Col1

得られた自己組織化繊維の構造を透過型電子顕微鏡により観察した（図 3）。電子線回折測定の結果、水酸アパタイトの 002 面の回折がコラーゲン線維の方向に三日月状の幅を持って観測された。つまり、この繊維の中で水酸アパタイトの *c* 軸が三日月の範囲内でコラーゲン線維に沿って整列していることが明らかとなった。また、得られた水酸アパタイトナノ結晶は、大きさ 40nm×10nm 程度であった。この構造は骨組織中のコラーゲン繊維とアパタイトナノ結晶の高次構造と類似していた。さらにこの自己組織化繊維

維の赤外分光測定の結果、コラーゲン分子に観測される 1341cm^{-1} の吸収ピークが、自己組織化による複合化で 1337cm^{-1} に赤方偏移していることが明らかであった。つまり、カルシウムイオンとカルボキシル基中の酸素が相互作用して、その結果、炭素 - 酸素（カルボキシル基）の結合エネルギーが低下したことを意味している。

我々は呼吸することで炭酸イオンを血液中に溶解させて、骨組織の水酸アパタイト構造中に置換している。上述の方法で合成した水酸アパタイト構造中には炭酸基が微量（3～5wt%）リン酸基に置換していた。この炭酸基は合成時に大気中から溶解・混合しているが、骨組織に存在する水酸アパタイトの組成と良く一致していた。

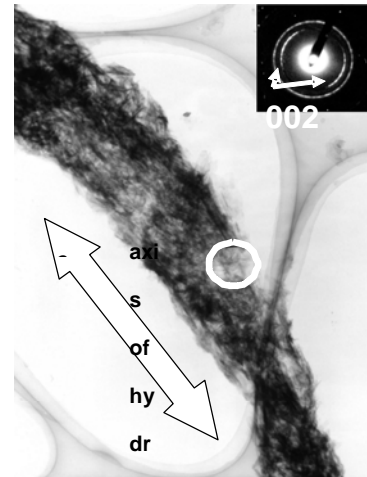


図3 HAp/CoI複合体の透過型電子顕微鏡像

3. 3 “新規結合系研究グループ”

(1) 研究内容

ハイドロキシアパタイト(HAp)は骨や歯のような硬組織に対する親和性だけでなく軟組織に対しても親和性があることが知られてきた。この軟組織親和性の全容は明らかになっていないが、生体内へのインプラント初期に接着性タンパク質や成長因子等がHAp表面に強く吸着するであろうことは容易に推察される。我々はセラミックス固有の性質を重要視し、生体内で溶解しにくいHAp焼結体を高分子と複合化させる技術を開発している。一般的に行われているHAp焼結体を高分子溶液に練り込み成型加工する方法と異なり、高分子界面にて化学結合で強固にセラミックス微粒子と結合させることを特徴としている。この独自技術をこれまで人工的に十分に成し得なかった軟組織と硬物との接着に応用し、新規な軟組織適合性材料の開発を進めている。当該研究分担では共有結合による無機・有機複合体の創出、及び高分子複合化に適したリン酸カルシウムの形態・粒径制御技術を中心に開発した。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

はじめに

我々が目的とする材料は生体内でより安定に存在する生体非吸収性 HAp 層である。高分子基材の機械的物性を損なうことなく複合化させるために、セラミック層を個々の粒子に細分化させ、その粒子と高分子基材とを有機的に結合させるという新規な方法論を考案し、無機物・有機物の複合化を試みた。平均粒径 $2\mu\text{m}$ の焼結体 HAp 粒子（旭ペンタックス社製、炭酸含有緻密体）に末端アミノ基含有シランカップリング剤を反応させアミノ基を導入した。得られたアミノ化 HAp 粒子のアミノ基導入率は蛍光分析法と BET 法により測定した比表面積値から、最大で 1.0nm^2 当たり 1 分子と算出された。反応時間を変えることによりアミノ基導入率は制御可能である。換言すれば未処理の HAp 表面とアミノ基表面との割合を自由に変えることができる。

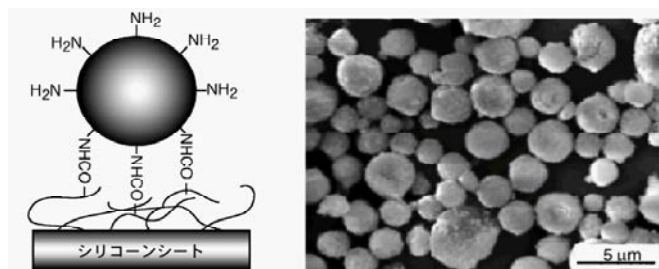


図 1. 複合体の科学結合状態と表面観察像

次にシリコン表面修飾と複合法について説明する。コロナ放電処理により基材表面にラジカルを導入した後、アクリル酸をグラフト重合させ、カルボキシル基導入基材を得た（導入率 16.7mg/cm²）。アミノ化 HA 粒子をアクリル酸グラフトシリコン表面へ水中で静電的に吸着させた後に、180℃、6 時間減圧下で固相縮合反応させ界面に共有結合を導入し、HAp 複合材料を合成した（図 1）。

機械的特性

得られた複合体と未処理シリコンの引っ張り強度と伸び率はそれぞれ 7.7MPa と 570%であり不変であった。このことは反応前後で基材の機械的物性が損なわれることなくエラストマーとしての物性を保持していることを示している。一方、ヤング率は複合体が未処理シリコンに比較して 1.3 倍高い値を示している。これは基材表面に結合した HAp 粒子同士の化学的相互作用による影響であると推察している。基材表面に結合した HAp 粒子の結合強度を粘着テープによる剥離試験で定性的に調べている。市販の粘着テープ (Scotch[®],cat.no.810-1-12) を複合体に貼付し 10 秒間 1mmHg にて密着させた後剥離し、剥離前後の走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。剥離前後において HAp 粒子に三次元的に重層している粒子の剥離以外に大きな変化が認められていないことから、テープ剥離に耐えられる HAp 粒子結合強度を有していることが認められる。また摩擦力顕微鏡による結合強度測定において、共有結合とイオンの相互作用との剥離強度に 1.5~2.0 倍の差が存在することが確認されている。

生物学的特性

線維芽細胞播種後 24 時間後において、複合体での細胞接着数は未処理シリコンに比較して 14 倍と高く、一方、ポジティブコントロールである培養用シャーレもしくはゼラチンコートガラスに比較して約 80%と、やや低いことがわかる。シリコンの生体不活性はその表面が有する低表面自由エネルギーの効果に起因することで説明される。72 時間培養後、複合体ではポジティブコントロールと同等の細胞数に達する。HAp 上の細胞接着・増殖は基材の表面性状による影響に加えて、細胞外マトリックスタンパク質の構造が影響していると予想される。さらに、接着細胞の核蛍光染色像観察および SEM 観察においても HAp による細胞接着数の増加を裏付ける結果を得ている。

さらに我々は、ラットを用いて複合体の in vivo 試験を行っている。まず蒸気圧

滅菌した複合体シート(1.0 x 5.0 cm)をラット背部に経皮的に 6 日間埋植し、その経過を観察した。未処理シリコンシートにおいては皮膚組織が材料に接着せず炎症が持続していることがわかる。しかしながら、複合体においてはわずか6日後で、皮膚組織が材料表面と十分に接着しており早期創傷治癒の効果が確認されている。さらに複合体を 4 週間埋植し、シート端をラット背部から剥離して引き抜き試験を行った。複合体シートの最大引き抜き強度は 49.8gf であり未処理シリコンシートの約 15 倍の高値を示している。コラーゲンを化学的に固定したシリコンシートにおける同様な引き抜き試験では、埋植後 3 週間において、未処理シリコンに比較して約 12 倍高い値を示していることが報告されている¹⁾。この引き抜き強度の差は、HAp 複合体においてコラーゲンのような細胞接着性タンパク質の吸着に加えて、表面形状に起因するアンカリング効果によるものと予想している。これらの結果は、シリコン基材へ HAp 粒子を化学的に結合させることにより、生体活性能をシリコンの不活性表面へ付与できることを示している。

HAp ナノ単結晶体の形態及び粒径制御

高分子基材上に高分子の機械的物性を損なうことなく無機結晶を表面修飾するには、その粒径と形態を制御し良好に基材への結合を促す必要がある。これを実現するために要求される HAp 微粒子の条件は、1) 高分子基材とより広い接着面積にて結合する面を有する板状もしくはロッド状構造体であること、2) 分散溶液に単分散しやすいことである。我々は独自にマイクロエマルジョン法を改良して、ロッド状構造体を成した、ナノスケールにて粒径制御可能な HAp 単結晶体の合成法を提案している。

ドデカンオイル相、純水を水相とし、界面活性剤として Pentaethylene glycol dodecyl ether(C₁₂E₅)を添加して W/O エマルジョン溶液を調製した。2.5M 水酸化カルシウム[Ca(OH)₂]を添加した後十分に撹拌し、1.5M リン酸二水素カリウム[KH₂PO₄]水溶液を添加した。反応温度 25, 35, 50 および 70°Cにて 2 4 時間撹拌後、多量のエタノールおよび水を用いて遠心法にて精製した。得られた無機物は 60°Cにて乾燥し、さらに 800°C、1 時間、昇温速度 10°C/分にて焼結した。

典型的な HAp ナノ粒子の FT-IR スペクトルにおいて、602/572cm⁻¹および 474cm⁻¹の吸収はそれぞれν₄PO₄³⁻およびν₂PO₄³⁻に帰属され、また 1092/1045cm⁻¹および 963cm⁻¹の吸収はそれぞれν₃PO₄³⁻およびν₁PO₄³⁻に帰属される。3573 および 632cm⁻¹の吸収は水酸基の伸縮および変角振動に帰属される。これらの鋭い吸収からこの HAp が高い結晶性を有していることが分かる。877cm⁻¹および 1413/1456cm⁻¹は HAp 結晶骨格のリン

酸位に置換した CO_3^{2-} に相当する。このカーボネートイオンは高い pH (~12) での反応中に雰囲気の炭酸ガスが混入することによって付加される。また ICP 発光元素分析法によりこの HAp の Ca/P は 1.61 であった。カーボネートイオンを含むカルシウム欠損 HAp は化学量論的な HAp (Ca/P=1.67) に比較して、天然骨に含まれる生体由来 HAp の組成と近似していることから生体活性が高いことが知られている。

得られた HAp ナノ粒子の典型的な X 線回折パターンにおいて、HAp 以外の三リン酸カルシウムのようなリン酸カルシウムの混入は認められず、この試料は単一なカーボネート含有 HAp であることが分かる。異なる反応温度にて調製された HAp 微粒子の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像で、25°C で得られた HAp 微粒子の形態は球状で不定形を呈している。温度が高くなるに従い、角が丸くなったロッド状の形態を呈し始める。TEM 像より無作為に抽出した 100 個の HAp ナノ粒子より算出したナノ単結晶体の平均粒径を表 1 に示す。反応温度 25°C における HAp ナノ粒子の短径 (a 軸方向の長さ) / 長径 (c 軸方向の長さ) はそれぞれ $43 \pm 10 \text{ nm}$ および $64 \pm 20 \text{ nm}$ であり、アスペクト比は 1.5 である。この粒径は反応温度が高くなるに従い大きくなっている。

表 1. HAp ナノ粒子の平均粒径とアスペクト比

Temp. (°C)	Crystallite size (nm)		Aspect ratio (c/a)
	a axis	c axis	
25	43 ± 10	64 ± 20	1.51
50	78 ± 16	154 ± 48	1.98
95	87 ± 23	236 ± 81	2.72

反応温度 50°C における HAp ナノ粒子の短径 / 長径はそれぞれ $78 \pm 16 \text{ nm}$ および $154 \pm 48 \text{ nm}$ でありアスペクト比は 1.98 で、反応温度が増加するに従い増えている。最近では密封反応系にて 95°C まで反応温度を上昇させることにより、短径 $87 \pm 23 \text{ nm}$ および長径 $236 \pm 81 \text{ nm}$ であるナノ粒子 (アスペクト比=2.72) が得られている。これらの異なる粒径の中で後者が最もトルエン / メタノール混合溶媒系に分散しやすいため、複合化にはこの HAp ナノ粒子を用いている。電子線回折パターンから、得られた HAp ナノ粒子は単結晶体であり、その長軸は HAp 格子の c 軸に沿って伸張していることが分かる。またこの電子線回折パターンは [0 1 0] ゾーンに相当し、TEM 像における HAp の広い面がユニットセルの a 面、そして狭い面が c 面に帰属される。ここで HAp の a 面がカルシウムイオンリッチであり、また c 面がリン酸イオンリッチな面とされている。このことはロッド状 HAp の結晶成長制御により面による粒子 1 個における電荷の制御が可能であることを示している。

エマルジョン法における反応温度上昇による HAp 粒径増加の現象は次のように説明される。反応温度が 25°C の時、制限されたベシクルの空間の中で、リン酸カルシウムの結晶成長が生じる。得られた HAp ナノ粒子は粒径数十 nm の球状～不定形微粒子となる。反応温度が増加すると界面活性剤の親水性鎖に相互作用した水分子の運動性が高まり疎水性化する。そのことによって熱力学的に界面活性剤からなるベシクルが不安定となり制限された空間にひずみが生じる。水酸化カルシウム水溶液を添加すると、カルシウムイオンは界面活性剤の水酸基末端と弱い相互作用で結合する。その後、リン酸水溶液を添加することによって界面活性剤分子に結合したカルシウムがリン酸カルシウムの核生成の中心として働く。そして HAp 結晶は核を基にしてより高温でより顕著に *c* 軸方向に結晶成長することになる。この成長は例えば添加物を加えて特定の面制御を行うときにみられる現象に類似している。

3. 4 “組織工学・医学応用グループ”

3. 4. 1 低侵襲性治療による骨／軟骨組織の再建

(1) 研究内容

Tissue engineering の技法を用いた軟骨組織再生に対して、scaffold を使用した多くの研究がなされている。Scaffold の形状には、PGA、PLLAなどのスポンジ状のものとコラーゲンゲルに代表されるゲル状のものがある。スポンジ状の scaffold は、細胞進入を高めるため気孔率が高く、強度的に脆弱であり、細胞が流失する可能性も高い。ゲル状の scaffold は、ゲル化以前は液体であるため、細胞を suspension することができ、ゲル化後、細胞はポリマーの中に均一に包まれ、自由自在な大きさにも作製できる。近年報告されている I 型コラーゲンゲルを使用した軟骨修復において、II 型コラーゲン、proteoglycan を誘導し、In vivo においても、良好な成績が報告されている。しかし、軟骨組織本来のマトリックスの主成分は II 型コラーゲンであり、I 型コラーゲンではない。また、これまで作製されたコラーゲンゲルは、紫外線により架橋をおこない、架橋反応に時間を要した。また、軟骨欠損部への移植方法として、in vivo で scaffold に培養細胞を包埋し移植する方法と、in vitro で、欠損部に直接注入移植する方法がある。In vivo で移植組織を作製する方法では、欠損部と同サイズの移植組織を作製することは困難であり、境界部の gap が生じやすい。また、移植組織を欠損部に固定させることは困難であり、その保持のため骨膜の被覆を必要とする。ゲル溶液に包埋した移植細胞を軟骨欠損部に直接注入し、ゲル化させ、プレスフィットさせることができれば、様々な形態の欠損部に対応でき、骨膜の被覆も不要である。ゲルを scaffold に使用し軟骨細胞を含有した移植実験が報告されているが、直接欠損部に注入移植をおこなったものはなく、マウスの背部皮下に注入移植したものや in vitro でゲルを固定し、欠損部に二期的に移植する報告があるのみである。

そこで本研究では、欠損部に直接注入可能なゲル状の形態で、軟骨に親和性の高い II 型コラーゲンを成分とする scaffold を新たに開発し、軟骨移植に利用可能であることを検討した。一方その後、母床との強固の固着を目的にするため、このゲルの半層を骨芽細胞に適した環境にし、骨軟骨複合体を作成する試みを行った。

軟骨再生の分野では、動物移植実験の前に、in vitro でのゲルの培養（図 1）、架橋剤濃度の研究（細胞を包埋させ、ゲルを培養する）（図 2）をおこなった。また、

マウスの背部皮下に移植し、ゲルが2週間経っても残存することを確認した(図3)。

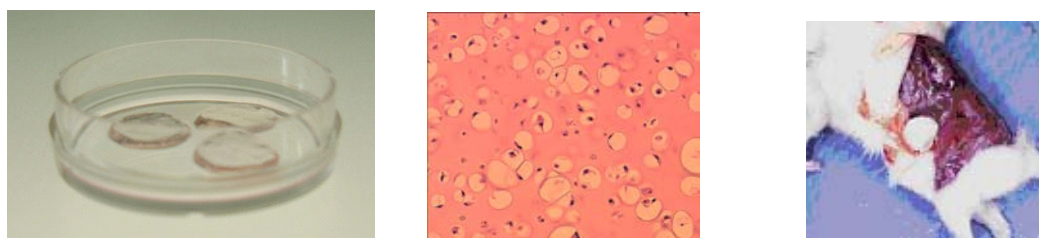


図1 II型コラーゲンゲル 図2 軟骨細胞を包埋したゲル 図3 背部皮下への移植

動物移植実験方法としては、幼若ニュージーランド白色家兎から、軟骨細胞を採取し、体重約3kgの家兎16羽の膝蓋大腿関節面に円柱状の軟骨全層欠損を作製し、軟骨細胞(1×10^7 /ml)及び架橋剤(1.0mM)を混合したII型コラーゲン溶液を注入移植し、ゲル化させた(移植群)。同様に全層欠損のみを作製した家兎16羽を対照群とした。両群で、移植後4週、8週、12週、24週に各4羽ずつ屠殺し、肉眼的及び組織学的評価(Safranin-O染色、免疫染色)を行った。肉眼的評価としてICRSのMacroscopic scalesを、組織学的評価としてO'DriscollのHistological grading scalesを使用した。

一方骨の分野では、まず骨芽細胞のsourceとして、間葉系幹細胞を考えたため、mouse及びヒトでの幹細胞から骨芽細胞への分化を確立し、その形質をRT-PCR法にて確認した。この実験に関して、慶應義塾大学の倫理委員会の承認を得ており、インフォームドコンセントの上了承を得た患者様から得た、手術中の骨髄液を利用させていただき、骨髄間葉系幹細胞を比重遠心法により抽出・培養する。これに骨分化誘導因子を加えることにより、骨芽細胞への分化誘導を確認した。

次に、上記軟骨再生実験と同じII型コラーゲンゲルにアパタイト沈着させるべく、田口らの提唱した交互浸漬の手技を応用し、ゲルをカルシウム溶液(Ca溶液)およびリン溶液(P_i)に交互に浸漬し、細胞包埋アパタイト含有ゲルを確立した。更に P_i を架橋剤溶解液に含有させることで、Ca溶液含有培養液での培養のみで、アパタイトを沈着させる技術へ応用した。この際沈着したアパタイトは、X線解析を用いてその成分を確認した。

最後に、交互浸漬の際に用いるCa及び P_i であるが、 P_i は文献的に至適濃度が分かっているものの、Caに関して不明であり、骨芽細胞に対する影響を検討した。まず胎生1日齢のStd-ddyマウスの頭蓋骨を摘出し、酵素処理を行い、骨芽細胞を抽出・増殖させ、RT-PCRで形質を確認した。さらにこの細胞をII型コラーゲンゲル内に包埋し、ヌードマウスの移植実験(皮下)で、鋳型の交互浸漬の有用性を検討した。同時に、in vitroではアパタイト沈着のためのCa含有培養液の適正Ca濃度を決定した。すなわち、2次元の単層培養と3次元のゲル培養において、

骨芽細胞の viability について、Ca の毒性の影響、一方で Ca の増殖促進効果の検討を行った。分化を ALP 染色や quantitative RT-PCR 法を用いてオステオカルシンの発現量を検討することにより、また石灰化能に関し、Ca 定量を行うことにより測定した。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

本研究の軟骨再生部門での移植実験では、骨軟骨欠損部に注入されると同時に容易充填され、隅々まで浸透し、数分でゲル化し、隣接軟骨と母床の海綿骨に固定された。開発した II 型コラーゲンは、アテロコラーゲンを使用しており、抗原性を抑制し、実際に移植による拒絶反応もなく、滑膜炎などの生体内での炎症もなかった。肉眼的 (図 4) には、両群ともに術後 8 週以降、欠損部は白色の再生軟骨で覆われたが、Macroscopic scales (図 5) では有意差は認めなかった。

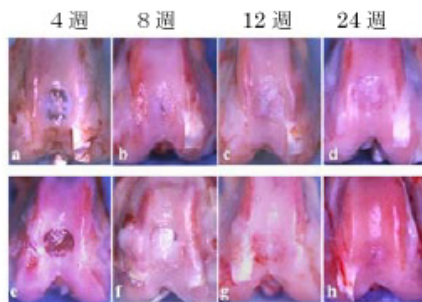


図 4 : 肉眼的所見
a-d: コントロール群、 e-h: 移植群

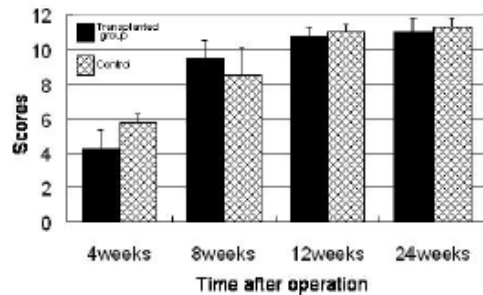


図 5 : ICRS の Macroscopic scales

組織的には、軟骨細胞/ I I 型コラーゲンゲル移植群 (図 6) では、4 週では中央部分に移植したゲルが残存し、周囲より骨が進入し、骨組織に置換された。8 週では、欠損部表層は軟骨様組織に再生され、再生軟骨層の厚みも周囲と同レベルであった。境界部の強拡大 (図 7) では、隣接軟骨部との境界も不明瞭であり、軟骨細胞の morphology も良好で、良好な硝子軟骨による再生が確認できた。さらに、12 週、24 週でも良好な軟骨再生がみられ、再生軟

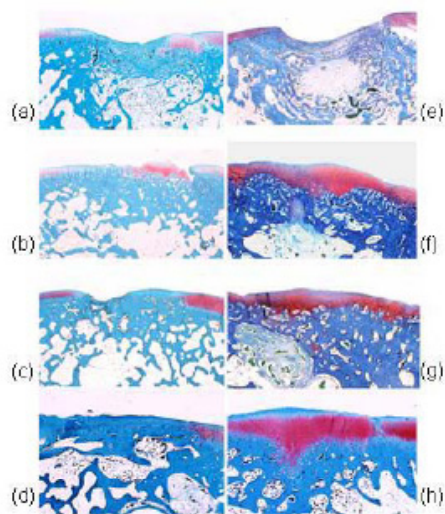


図 6 : 組織学的所見
a-d: コントロール群 e-h: 移植群
a, e: 4 週 b, f: 8 週 c, g: 12 週 d, h: 24 週

骨表面は平坦化し、再生軟骨の厚み、隣接軟骨組織との癒合も良好であり、24週では再生軟骨層に tidemark も見られた。免疫染色 (図8) では、8週において正常組織と同程度の I 型コラーゲン合成が見られた。I 型コラーゲンの合成は認められなかった。24週においても、I 型コラーゲンの合成は優れ、隣接軟骨との癒合も良好であり、染色性に差はなかった。中央部分の強拡大 (図9) では、細胞は円形で軟骨細胞の形態が保持され、細胞周囲が、より濃染されている様子が確認できた。再生組織の Histological grading score (図10) では、4週では、有意差はなかったが、8週にて、移植群で、良好な軟骨再生が得られ、12週、24週ではコントロール群と比較し、明らかな有意差が得られた。

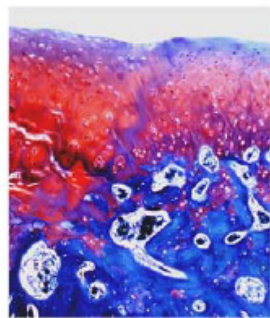


図7：移植後8週での境界部

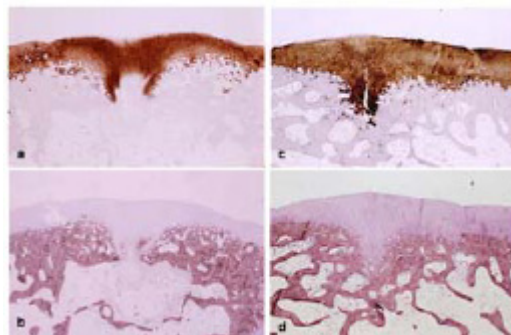


図8：免疫染色の写真
a, b: 移植後8週、 c, d: 移植後24週
a, c: II型コラーゲン、b, d: I型コラーゲン

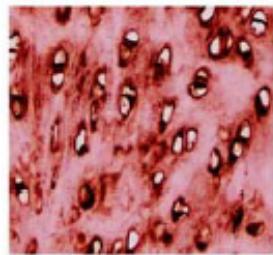


図9：移植後24週

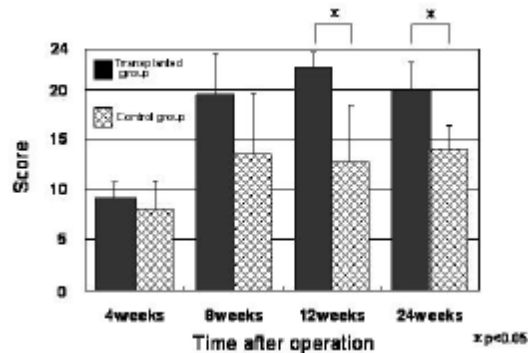
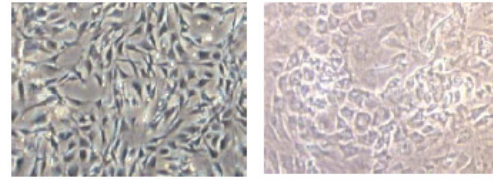


図10：Histological grading score

今回使用した、II型コラーゲンゲルは移植細胞を均一に包埋することができ、直接欠損部へ注射器で注入移植することが可能であり、臨床応用を考えた場合、最小侵襲手技での応用も期待できる。また、移植後8週で、良好な軟骨形成がみられ、24週でも維持されていたから、組織学的にも良好な修復がなされ、軟骨修復にたいして、新たな scaffold として期待できることが分かった。

一方、ヒト骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化誘導を、およびマウス骨芽細

胞の抽出及び分化促進を、アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、デキサメサゾンを用いて行い、幹細胞を細胞の source として使えることをまず確認した (図 11)。



(A) Dex (-) (B) Dex (+)

図 11: マウスの骨芽細胞分化

次に、ゲルの作成手技として、2%II型コラーゲンゲルを用いたゲルの作成につき、条件設定を行い、確立した。交互浸漬法によりアパタイトの沈着が可能であることを確認した (図 12)

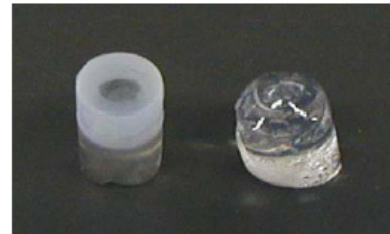


図 12: ゲルの作製とアパタイト沈着

マウスの皮下への移植実験においては、交互浸漬を行ったゲルのみ高度な石灰化が見られ、またその速さは交互浸漬の際のCa濃度が高いほど早かった (図 13)。しかし高すぎてもその石灰化の速さは平衡に達し、10mM以上であれば、その速さはほぼ平衡に達することが判明した。一方 2.5mM以下では、石灰化を最後まで、促進できないゲルが存在することも確認した。また、その病理所見から、Ca10mM以上の濃度であると、石灰化は起こっていても、細胞の viability が有意に低下していることを証明した。



図 13: マウス皮下への移植

次に、in vitro で Ca 溶液のマウス骨芽細胞 (mOB) に対する影響を、検討した。骨芽細胞を抽出・培養し、単層培養では 96 well tissue culture plate に播種し、ゲル培養ではディスク状のゲルを作成し、各種 Ca 溶液に 4 時間浸漬し、生存細胞数を WST 法、MTT 法を用いて測定した (図 14)。単層培養では、Ca2-6mM で細胞の活性がよく、ゲル培養ではやはり同様の傾向で、2mM をピークに、高い Ca 濃度では活性は落ちていった。

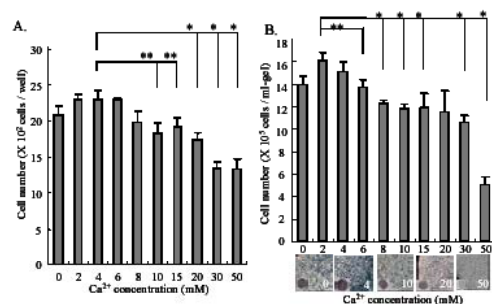


図 14: Ca 溶液に 4 時間浸漬後の mOB の生存細胞数 (A: 単層培養, B: ゲル培養)

一方、Ca に対する細胞の増殖能を見るため、様々な濃度の Ca の培養液を用意し、

単層培養では 24 well tissue culture plate で、ゲル培養ではディスク状ゲル内での培養で、それぞれ細胞数を定期的に測定した。すると、Ca5mM での培養が、いずれもよい細胞増殖を示したが、単層培養では Ca20mM よりも 0mM の方が、ゲル培養では Ca0mM よりも 20mM の方が増殖能がよかった (図 15)。

また、Ca 含有培養液でのゲル培養では、ゲルにアパタイトが沈着する。沈着したアパタイトはゲルに強度を与え、培養 2 ヶ月の時点では、アパタイトを沈着させたゲルではその形状を維持するが、沈着させないゲルでは崩壊する (図 16)。

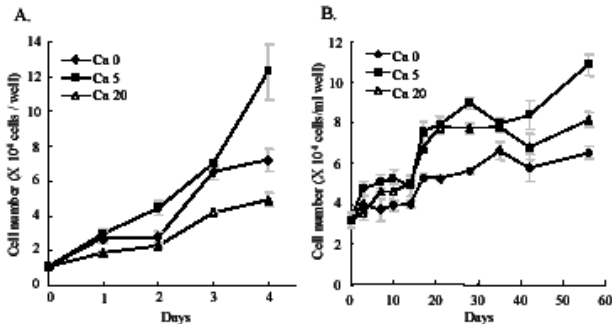


図 15 : Ca 含有培養液中での mOB の生存細胞数 (A:単層培養、B:ゲル培養)

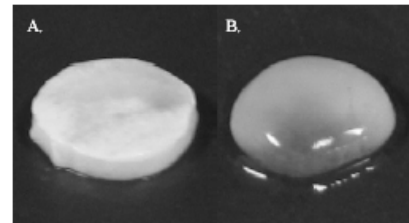


図 16 : 培養 60 日後のゲル形態 (A:Ca20mM 含有、B:Ca0mM 含有)

次に、Ca 含有培養液による培養 1 週間の時点での、骨芽細胞の分化を最終分化マーカーであるオステオカルシンの mRNA 発現量で測定した。単層培養では Ca6-15mM の培養で骨芽細胞の分化が亢進し、ゲルの培養においては Ca2mM 以上全てにおいて骨芽細胞の分化が亢進していた。ALP 染色では、初期分化マーカーであるため分化が亢進していないと思われた Ca0mM で活性が高かった (図 17)。

石灰化能を見るための、培養 1 週目における Ca の定量実験では、単層培養では Ca10 mM で石灰化能がよく、ゲルの培養においては Ca6mM で石灰化が亢進していた (図 18)。単層培養では、細胞活性もよく、また溶解度積の問題で Ca が析出しやすい濃度が 10mM であることが理解できる。ただ、ゲル培養においては、物理的・非生物学的石灰化を起こすため、骨芽細胞の基質産生によるものだけであるということは

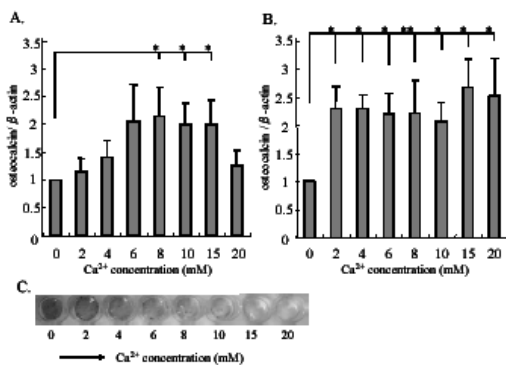


図 17 : Ca 含有培養液中での培養 1 週間における mOB の分化 (A:単層培養、B:ゲル培養でのオステオカルシン発現量、C:ALP)

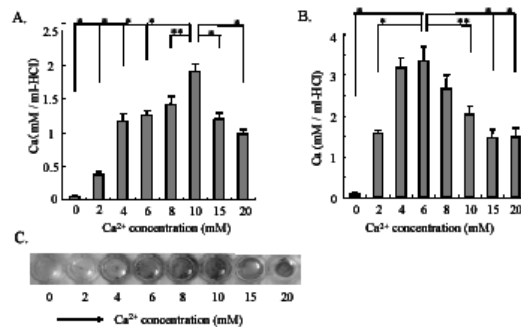


図 18 : Ca 含有培養液中での、培養 1 週間における Ca 沈着量 (A:単層培養、B:ゲル培養 C: von kossa 染色)

難しい。

Ca 沈着量の経時的变化であるが、単層培養では 10mM、15mM、5mM の順で Ca の沈着が起こった。ゲル培養においては、細胞の基質産生を待つ必要がないため、すなわちゲル自体にも Ca の沈着が起こるため、Ca は直線的に増加していくが、細胞を包埋しないゲルに関してもかなりのレベルの石灰化が起こった (図 19)。

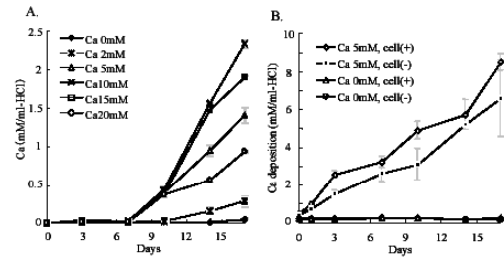


図 19 : Ca 含有培養液中での Ca 沈着量の経時变化 (A: 単層培養、B: ゲル培養)

近年、離断性骨軟骨炎やスポーツ外傷による軟骨損傷に対する軟骨移植に、tissue engineering の技術が取り入れられ、欧米ではすでに臨床応用に至っている。しかしその成績は決して満足すべきものではなく、変形性関節症などの広範囲の軟骨欠損には対応できない。今回、軟骨細胞が細胞外マトリックスを保持しながらその機能を維持するには、生体内分解性の II 型コラーゲンを使用した鋳型が有用であることを証明した。また、軟骨欠損部は軟骨下骨が露出しており、培養軟骨組織の生着は困難である。移植した軟骨組織の生着を考えた場合、骨親和性物質であるハイドロキシアパタイトの包含さらに MSCs の骨芽細胞への分化が有用である。われわれはこの点を踏まえて骨親和性が必要な面に対してはアパタイトの含有量を傾斜的に増量していくことが有用であることを証明した。

今後はこの鋳型に未分化間葉系細胞を軟骨細胞及び骨芽細胞に分化させた状態で、あるいは直接包埋し、浅層は軟骨、深層は骨という骨軟骨複合体を作製する。骨軟骨複合体を軟骨欠損部に移植すると深層の骨の部分と host 側の母床との間で骨 vs 骨の癒合が得られ、従来問題とされていた移植軟骨組織の安定性が格段に向上することが予想される。

3. 4. 2 骨／軟骨組織の再建に関して

(2) 研究内容

骨の組織工学を臨床応用するためには、細胞足場材料の改良、評価、培養技術の改良による骨組織再生の促進化技術などが重要な要素となる。骨の組織工学で最も代表的な手法は培養骨移植法である。骨の欠損部位の形状にあわせて多孔性の材料を作製し、そこに幹細胞から分化させた骨芽細胞を播種し、移植し新しい骨を再生する。この技術を実用化するために乗り越えないといけない問題がいくつかある。ひとつはスキャホールド（細胞足場材料）の開発である。スキャホールドの性能としてまず、まず細胞の取り込み能力の高さから多孔性であること、そして加重がかかることから強度が要求される。この観点から以下の実験を行った。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

泡法ハイドロキシアパタイト多孔体の骨移植スキャホールドとしての評価

高強度(7Mpa)のハイドロキシアパタイト多孔体を細胞足場材料(スキャホールド; 図1)としてラット骨髄細胞を用いた培養骨移植モデル(図2)を用い、本材料が骨の組織工学のスキャホールドとしての有効性試験を行った。

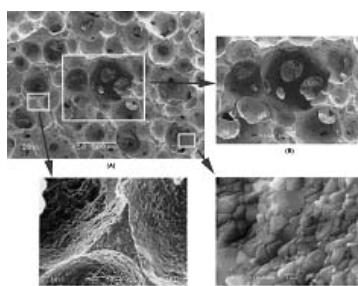


図1 泡法 HAp 多孔体の SEM 像

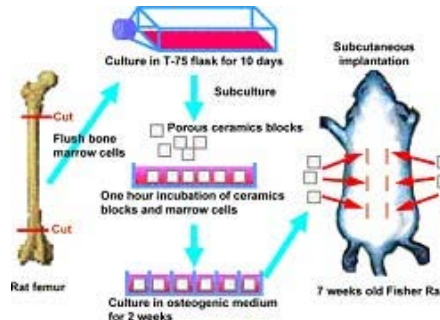


図2 ラット骨髄細胞を用いた移植モデル概念図

高強度人工多孔性ハイドロキシアパタイトブロックを足場として、ラット骨髄由来骨芽細胞様初代培養細胞を植え、培養した後、ラットの皮下に移植し、一定時間の飼育後、屠殺、ブロックを取りだし、組織染色による骨形成の観察、アルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン発現などのデータ(図3)から、人工多孔性ハイドロキシアパタイトブロックにおいても骨形成が起こっている

ことが確認され、臨床応用に有望な材料であることが確認された。さらに孔内への多量の細胞の強力な接着、及び分化誘導が促進され、また血管が多孔性ブロックの内部まで侵入し、中央部まで均一に骨形成が促進され、良好な骨組織が形成された（図4）。

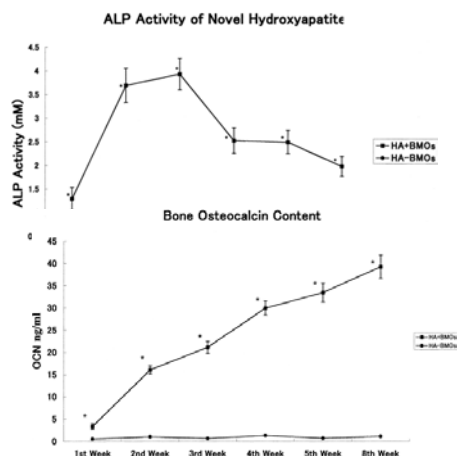


図3 生化学的評価（アルカリフォスファターゼ；上図、オステオカルシン；下図）

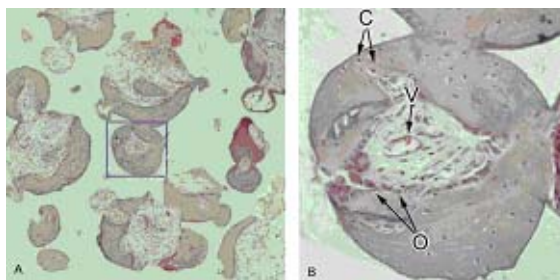


図4 組織化学的評価

環流培養法を用いた培養骨移植における骨形成の促進化技術

環流培養装置と概念図を図5と図6に示す。



図5 環流培養装置



図6 概念図

環流培養により培養した骨髄細胞のアルカリフォスファターゼ活性やオステオカルシン量は静置培養にくらべ2倍以上の活性や発現量の亢進が観察された。

また、ラット皮下に多孔性セラミックス材料と骨髄細胞とのコンポジットを移植した結果（図7）から、明らかに還流培養した細胞を用いた場合に骨化が促進していることが明らかになった。還流培養の培養骨移植における有効性が示された。

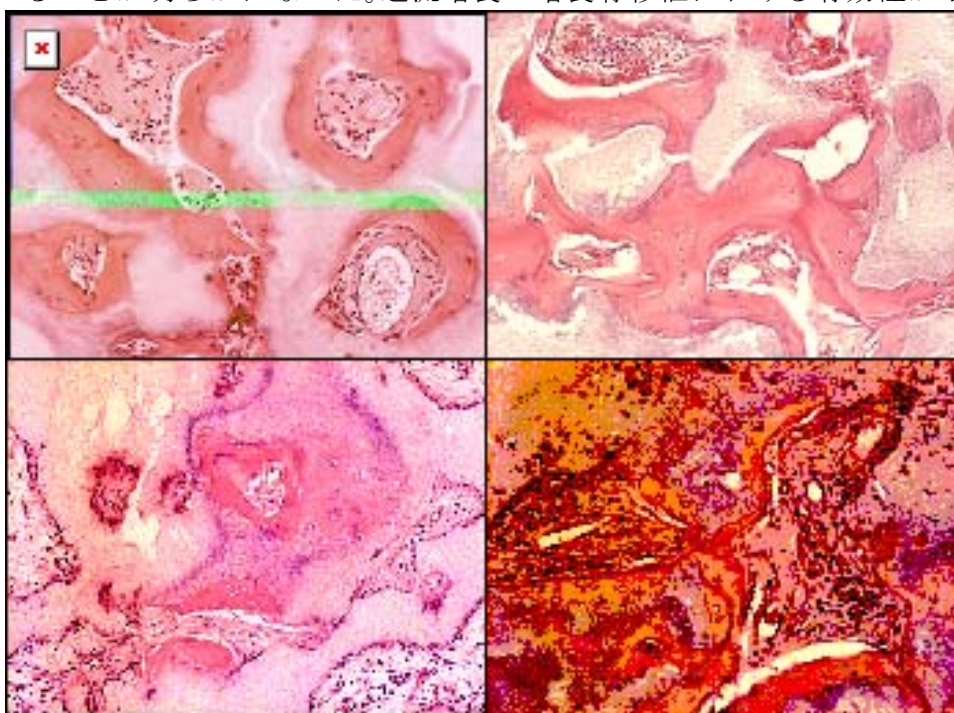


図7 還流培養により培養した骨髄細胞の移植結果（H&E染色像）
 上図(a,b): 還流培養による 下図(c,d): 通常培養（還流せず）
 左図(a,c): 移植4週後 右図(b,d): 移植8週後

RWVバイオリアクタシステムを用いた軟骨組織再生

変形性関節症などの関節疾患の治療法として、軟骨再生技術の確立が急がれている。しかし、生体外での細胞培養時に生じる障害によって培養組織が壊死を起こすため、広範囲の軟骨欠損に応用可能な大型の軟骨組織を再生する技術は確立されていない。そこでわれわれは従来の軟骨再生技術における問題点を解決し、大型の三次元軟骨組織を再生することを目的として、細胞障害の少ない微小重力環境を模倣するバイオリアクターを利用した新規軟骨再生技術の確立を行なった。

軟骨疾患の治療法として期待されているひとつが、骨髄由来の間葉系幹細胞を用いて欠損した軟骨組織を再生する技術である。間葉系幹細胞は高い増殖能力を持ち、適切な分化誘導因子の存在下で三次元培養を行なうこと

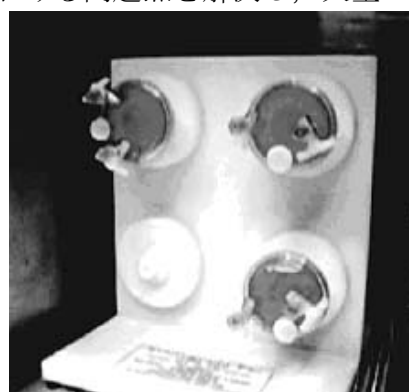


図8 RWV バイオリアクター

で軟骨組織へ分化する能力を持っている。しかし、生体外で培養を行なう際、地上重力の影響を受け細胞はシャーレの底に沈んでしまうため、培養組織はシート状にしか形成されない。また、軟骨細胞は2次的に培養すると繊維芽細胞様の細胞に脱分化することが知られている。

そのため、生体材料を使った三次元培養法や、攪拌培養などが行なわれているが、細胞が高密度に凝縮することで培養液の組織内部への浸透が阻害されたり、攪拌によるストレスで細胞傷害を受けたりして培養組織が壊死するという問題が生じる。このような問題を解決する方法のひとつとして、無重力に近い環境、すなわち微小重力環境を利用した三次元培養法が考えられ

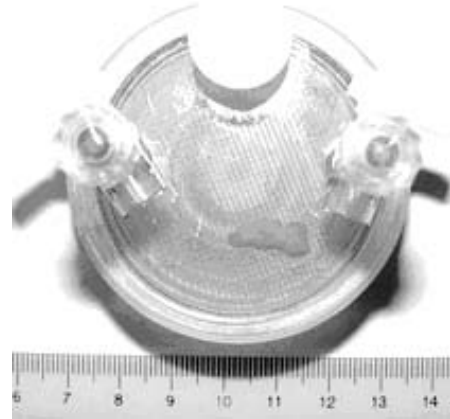


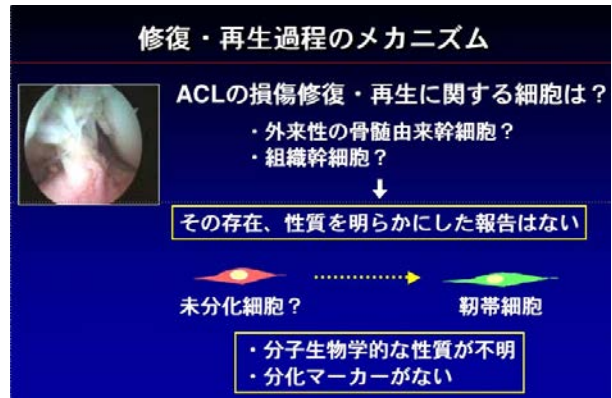
図9 バイオリアクター内で形成された3次元軟骨様組織

る。この微小重力での細胞培養を実現するため開発されたのが、RWV (rotating wall vessel) バイオリアクターである(図8)。RWVは、ガス交換膜を裏側に備えた円形のベッセルが、回転することで細胞に与える重力方向を絶えず変化させ、その結果、時間平均すると、地上重力の100分の1という微小重力環境を模倣することができる。ベッセルの回転によって、細胞はベッセルの底に沈むことなく、培養液中にふわふわと浮いた状態で徐々に三次元集合体を形成すると考えられている。RWVバイオリアクターを用いて、ラビットより採取した骨髄細胞よりインビトロでの軟骨再生を試みた。われわれが行った研究では、ラビット10日齢のロングボーンより骨髄細胞を採取し、3週間培養により増殖させた後、TGF- β などを添加した培養液中でRWVバイオリアクターによる回転培養を行った結果、長径1.5 cm、短径0.8 cmの大型で均質な3次元軟骨組織を形成させることに成功した(図9)。切片を作製しサフラニンO染色やアグリカンやコラーゲンIIの発現量から軟骨類似の組織であることを確認した。本研究は現在筑波大学との共同で臨床に向けた試験を行っている。

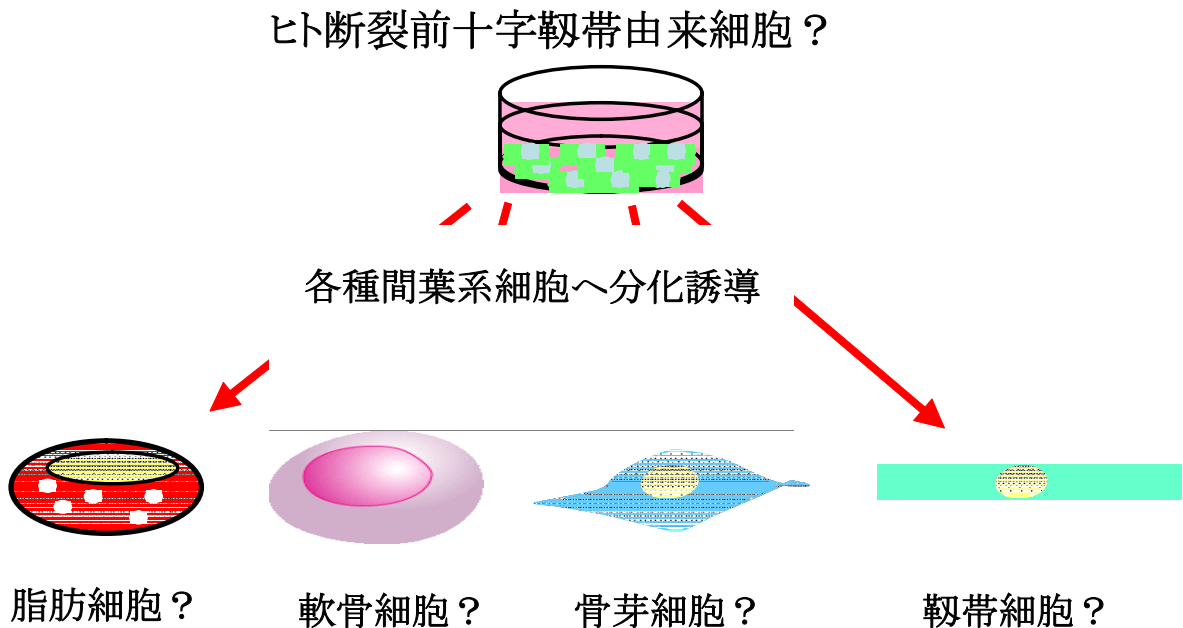
3. 4. 3 靱帯組織の再構築に関する研究

(1) 研究内容

膝前十字靱帯（ACL）は、膝の安定にとっても重要である。しかし、特にスポーツなどにおいて頻繁に損傷する組織であるにもかかわらず、治癒する場合も稀にあるがその修復能は非常に乏しい。前十字靱帯損傷における修復において骨髄由来の未分化細胞や滑膜細胞などの関与が推定されているが、癒痕を形成した損傷靱帯組織にどのような性質を持った細胞が存在しているのかは不明である。また、靱帯細胞の分化マーカーとなるような特異的遺伝子は知られていない。損傷・再建術後の靱帯組織の修復・再生過程を解明するためには、損傷及び正常靱帯細胞の特性を明らかにしなければならない。



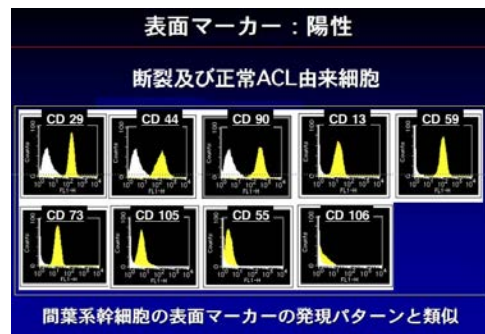
- 1) ヒト断裂前十字靱帯にどのような性質を持った細胞集団が存在するのかを明らかにするために、フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカー解析と骨、軟骨、脂肪細胞への分化能について解析した。



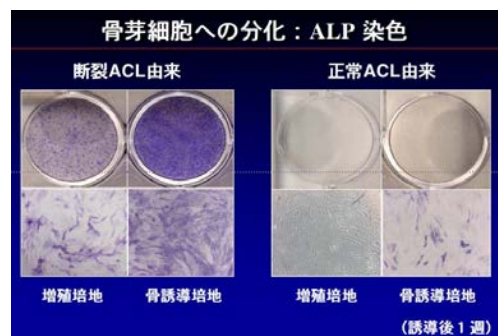
- 2) 靱帯細胞のマーカーとなるような特異的な遺伝子を探索するために、シグナルシーケンストラップ法を用いて、分泌・膜タンパクをコードしている遺伝子に注目し解析を行った。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

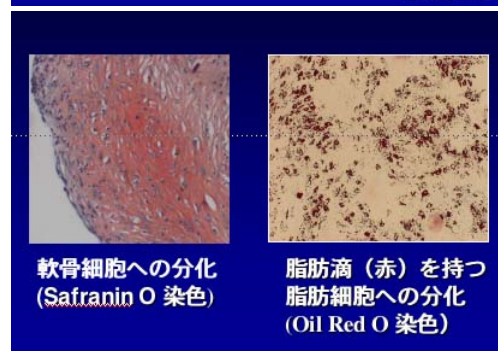
フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカーの解析：前十字靱帯由来細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞などの多分化能を有する細胞で陽性である CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 を発現し、CD31, CD34, CD45, CD140a などの造血系細胞、血球系、血管内皮細胞の表面マーカーは陰性であった。



各種細胞への分化誘導及びその評価：骨誘導培地で培養した細胞は結節を形成し、alkaline phosphatase (ALP) と Arizarin red S 染色共に強陽性であった。軟骨へ誘導した組織染色では、軟骨細胞特有の形態形成を観察し、Safranin O 染色も陽性であった。脂肪誘導培地では、脂肪滴をもつ細胞が多数観察でき Oil Red O 染色でも陽性であった。また各々の分化マーカーの遺伝子発現も確認することができた。

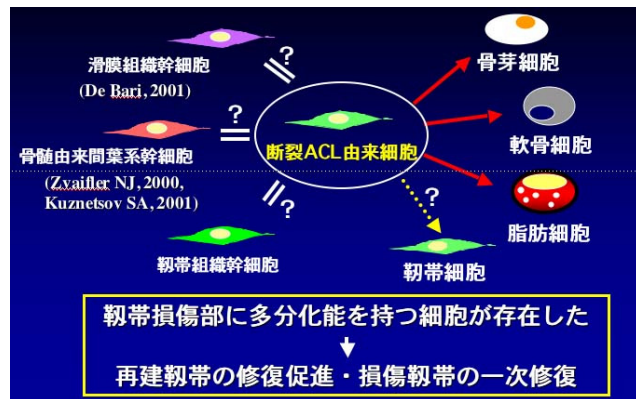


前十字靱帯で発現が報告されていないものも含め、138 の分泌・膜タンパク遺伝子を同定した。靱帯組織特異的な遺伝子を同定することはできなかったが、すでに靱帯において発現が報告されている遺伝子や報告されていない遺伝子を含む膜及び分泌タンパクをコードしている遺伝子の発現をプロファイリングした。



本研究は、断裂靱帯由来の細胞群が、今までに報告されているような多分化能を持つ細胞で陽性であった細胞表面マーカーを発現し、骨、軟骨、脂肪に分化することができることを初めて報告した。この細胞群は、損傷による刺激によって誘導

された骨髄由来間葉系細胞であるのか、滑膜由来であるのか、正常靭帯組織中に存在している細胞であるのかの起源を特定することはできない。しかし、靭帯損傷部に多分化能を持つ細胞が存在することで、適切な足場、成長因子、物理的刺激等の適切な環境



を与え靭帯細胞への分化を誘導させることができれば、再建靭帯の修復促進や損傷靭帯の一次修復も期待できると考えられる。また、正常靭帯由来細胞において膜及び分泌タンパクをコードしている遺伝子の発現をプロファイリングし、靭帯での機能未知な遺伝子の概要を得たことで、前十字靭帯機能を分子レベルでより明らかにする為の貴重な情報を与えることになるであろう。今後、靭帯修復のための新たな治療法は、靭帯細胞や幹細胞が標的になると予想され、生体材料開発と合わせて、より一層の分子レベルでの理解が新たな治療法の開発や改善につながるであろう。

本研究は、靭帯損傷部由来の細胞群が、今までに報告されているような多分化能を持つ細胞で陽性であった細胞表面マーカーを発現し、骨、軟骨、脂肪に分化することができる多分化能を持つこと。また、靭帯細胞より発現している膜及び分泌タンパクの発現をプロファイリングすることで、靭帯細胞の性質を一部明らかにした。

3. 4. 4 靱帯組織の再構築に関する研究

(1) 研究内容

われわれは、1999年より、交互浸漬法を用いて手術の途中で軟部組織の任意の場所にリン酸カルシウムアパタイトを析出させ、「軟部-硬組織界面」の初期固定強度を上げ、長期的に解剖学的構造の再生を目指してきた。また、その基礎実験・動物実験・生物学的安全性試験をもとに、倫理委員会【筑波大学医の倫理特別委員会】の承認を受け、2003年1月より膝前十字靱帯再建術に応用している。

1) 生体腱へのリン酸カルシウム (CaP) 複合化 : in vitro

日本白色家兎の長趾屈筋腱 (FDL) をカルシウム水溶液 (200mM $\text{CaCl}_2/\text{Tris-HCl}$, pH 7.4, 37°C) とリン酸水溶液 (120mM Na_2HPO_4 , pH=9, 37°C) にそれぞれ 30 分浸漬し、その間を 30 秒間蒸留水にて洗浄する過程を 1 サイクルとして、2 および 7 サイクルの交互浸漬を行った。

2) リン酸カルシウム (CaP) 複合化生体腱の微細構造、CaP 複合化腱の骨孔内移植 : in vivo、in vitro

日本白色家兎の長趾屈筋腱 (FDL) をカルシウム水溶液 (200mM $\text{CaCl}_2/\text{Tris-HCl}$, pH 7.4, 37°C) とリン酸水溶液 (120mM Na_2HPO_4 , pH=9, 37°C) にそれぞれ 30 分浸漬し、その間を 30 秒間蒸留水にて洗浄する過程を 1 サイクルとして、2 および 7 サイクルの交互浸漬を行った。交互浸漬後の FDL 腱は透過電子顕微鏡 (TEM)、電子線回折にて評価した。

ビーグル犬の長趾伸筋腱の大腿骨側を分離し交互浸漬した腱を脛骨近位骨幹端部に貫通固定した関節外モデルで、4 週での組織像を評価した。

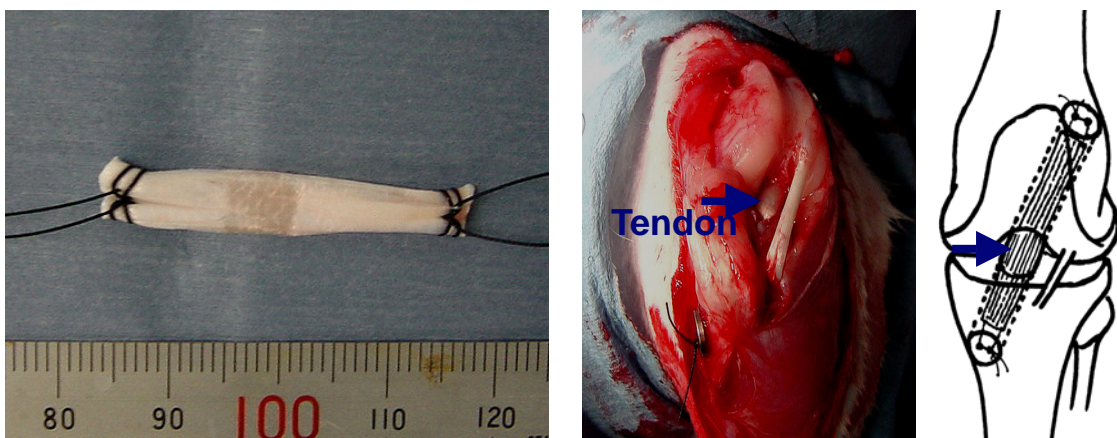
3) CaP 複合化腱の骨孔内移植力学試験 -関節外モデル- : in vivo

日本白色家兎 12 羽を使用した。長趾屈筋腱 (FDL) を足関節側から翻転し、脛骨近位骨幹端部骨ソケットに挿入したモデルを作成した。カルシウム水溶液 (100mM $\text{CaCl}_2+30\text{mM L-hisichisin}$) およびリン酸水溶液 (116.4mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 : 128.7\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}=15\% : 85\%$) にそれぞれ 30 秒交互に 10 回浸漬した (溶液は生体に安全を期するため pH を 7.4 に揃え、また、臨床応用可能な短時間での CaP 複合化を考え浸漬時間、浸漬回数を上記のごとく改良した)。術後 4 週で屠殺し、脛骨を固定し、FDL を 0.1mm/sec の速度で引っ張り、移植腱の骨付着部の破断強度を測定し、破断様式を調査した。

4) CaP 複合化腱の骨孔内固着過程 -関節内モデル- : in vivo

成熟日本白色家兎 50 羽を用いた。長趾屈筋腱を取り出し、カルシウム溶液(100mM CaCl₂+30mM L-hischisin) とリン酸溶液(116.4mM NaH₂PO₄ : 128.7mM Na₂HPO₄・12H₂O=15% : 85%)に 30 秒、10 回交互浸漬させ、CaP 複合化し移植腱とした。ACL を切除し、付着部(脛骨・大腿骨)に骨孔を開けて移植腱を移植した(CaP 群)。

術後 3 日、5 日、2 週、3 週、4 週でそれぞれ 10 羽ずつ屠殺し脛骨側の組織学的評価(HE 染色、類骨染色、Azan・Safranin-O・ALP・TRAP 染色)を行った。CaP 複合化しなかった対側を control 群とした。



5) CaP 複合化腱の骨孔内固着メカニズム -関節内モデル- : in vivo

腱のCaP複合化は、成熟日本白色家兎の長趾屈筋腱を取り出し、カルシウム溶液(pH 7.4: 100 mM of CaCl₂ + 30 mM of L-hischisin)とリン酸溶液(pH 7.4: 116.4 mM NaH₂PO₄ : 128.7mM Na₂HPO₄・12H₂O = 15% : 85%)にそれぞれ 30 秒、10 回交互浸漬し行った。CaP の性状評価は X 線回析、von Kossa 染色、透過電子顕微鏡(TEM)で行った。また、膝前十字靭帯を切除し、複合化遊離腱を、その骨付着部(脛骨・大腿骨)に骨孔を開けて移植した。術後 1、2 週でそれぞれ 3 羽ずつ屠殺し腱-骨移行部を TEM にて評価した。

6) ヒト腱へのリン酸カルシウム複合化と自動浸漬器械の開発 : in vitro

ヒト屍体新鮮凍結半腱様筋腱、薄筋腱それぞれ 25 本を用いた。腱を 4 重束にし脛骨側は 2 号 Ethibond で連続縫合、大腿骨側は Endobutton CL を通し、中央 1/3(関節内)は手術用手袋を被せタイガンでとめた。全長 6cm、各部は 2cm とした。CaP の複合化は腱を Ca 溶液(100mM CaCl₂+30mM L-hischisin)と P 溶液(116.4mM NaH₂PO₄:128.7mM Na₂HPO₄・12H₂O=15% : 85%)に交互に浸漬させ、その間を生理食塩水で洗浄し、1 回とした。A 群、B 群、C 群は、30 秒、1、3 分の交互浸漬をそれぞれ 20、15、5 回行った。検体各部

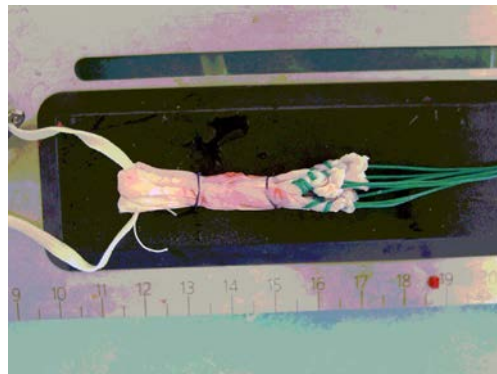
を熱重量測定・示差熱分析法で乾燥無機物含有量を測定した。

7) リン酸カルシウム複合化手術シミュレーション

上記で開発した自動化装置と実際に使う手術機械を用いて手術シミュレーションを行った。



ブタを使った手術シミュレーション



自動浸漬器械を使ってコーティングしたブタ腱

8) 臨床応用

生物学的安全性試験：安全性の確保・証明

財団法人、食品薬品安全センターに委託して、生物学的安全性試験を行った。筑波大学倫理委員会に臨床試験を申請し、承認を得たのち平成 14 年 1 月 24 日、筑波大学附属病院にて第一例の臨床応用を行った。現在までに 6 例が終了している。

*安全性試験は、坂根正孝、エスコム株式会社：科学技術振興事業団、平成 13 年度独創的研究成果共同育成事業「膝関節靭帯再建用・術中燐酸カルシウムコーティングシステム」、の研究助成を受けた。

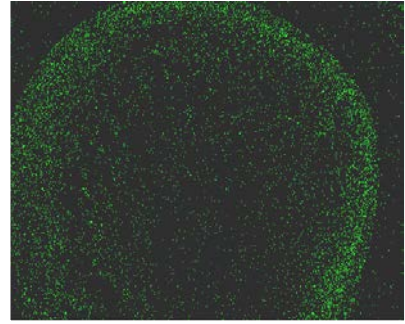


自動コーティング器械は用いず、交互浸漬は手動で行った。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

1) 生体腱へのリン酸カルシウム (CaP) 複合化：in vitro

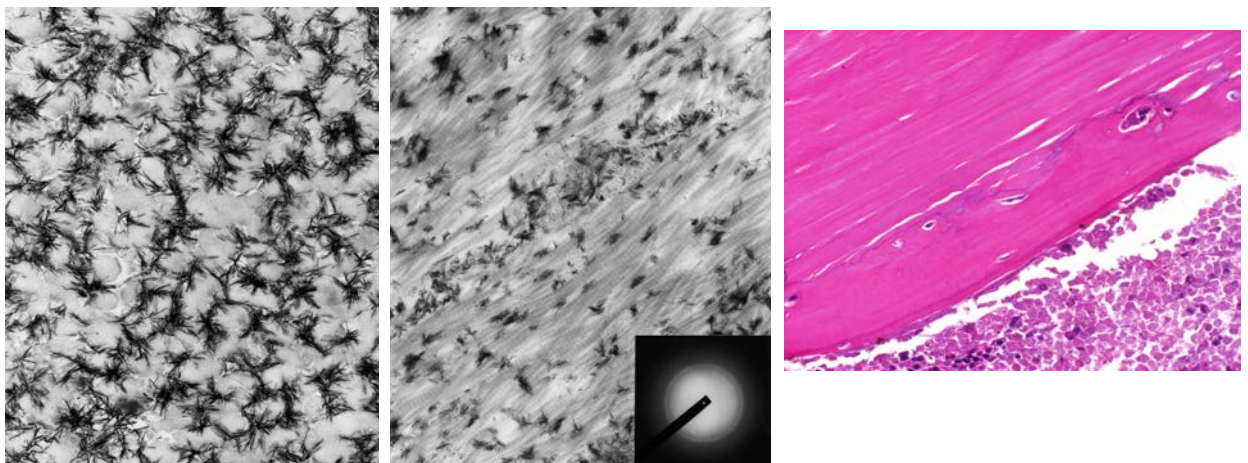
コントロールの腱に含まれる無機物は 0.8wt%であるのに対し、交互浸漬法を行ったFDLに含まれる無機物は、2サイクルで $8.0 \pm 1.6\text{wt}\%$ 、7サイクルでは $23.8 \pm 6.3\text{wt}\%$ であった。断面のSEM写真像から、カルシウムおよびリンは表層に近い部分で観察されたが7サイクルのものでは表層のみでなく少し内部にも取り込まれていた。X線回折法によると生成した無機物は明らかなピークを示さなかったがカルシウム欠損型のアパタイトであった。



2) リン酸カルシウム (CaP) 複合化生体腱の微細構造、CaP 複合化腱の骨孔内移植 : in vivo, in vitro

TEM において腱表面から $500 \mu\text{m}$ まで傾斜的にアパタイトの結晶を認め、コラーゲン線維束上、間に存在していた。また、アパタイトが存在していた深部では、オクタリンサンカルシウム (OCP) が存在していた。さらに、電子線回折では、アパタイト結晶はコラーゲン線維束と配向性を認めた(002) (004)。

4週での組織像でCaP複合化側において移植腱表面と骨孔間は線維組織の介在なく新生骨を介し直接固着が認められた。

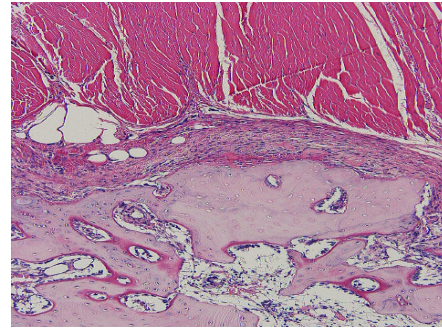
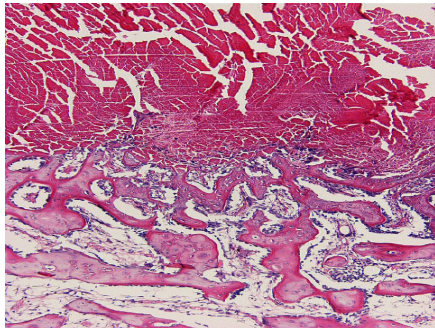


3) CaP 複合化腱の骨孔内移植力学試験 -関節外モデル- : in vivo

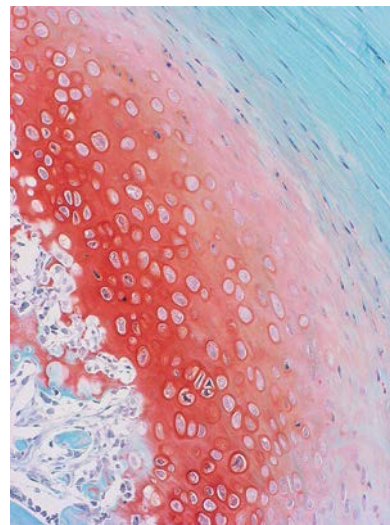
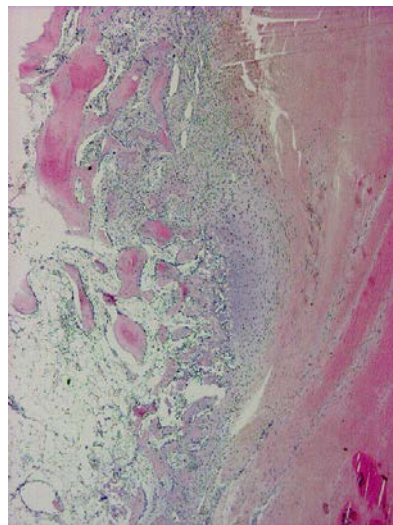
CaP 群の最大破断強度は $9.0 \pm 5\text{N}$ であり、コントロールの $6.8 \pm 3.4\text{N}$ に比べ有意に大きかった ($p=0.0116$, Paired T test)。破断様式はCaP群が12羽のうち7羽が腱部分の断裂で、5羽が腱-骨間の引き抜きであったが、コントロールでは、12羽全てが腱-骨間の引き抜きであった。

4) CaP 複合化腱の骨孔内固着過程 -関節内モデル- : in vivo

術後3日 CaP 群、control 群ともに TRAP、ALP 陽性細胞を認めなかった。術後5日 CaP 群 : TRAP 陽性の多核巨細胞が移植腱表面付近に出現し、骨側では骨芽細胞の増生を認めた。control 群 : TRAP、ALP 陽性細胞は骨側にのみ存在した。術後2週 CaP 群 : 移植腱表面の多核巨細胞数は術後1週に比べ増勢し、旺盛な類骨形成を認めた。



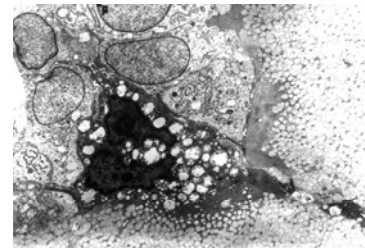
一部では、骨と移植腱は軟部組織を介さず直接固着を認めた（上図右）。control 群 : 腱-骨間には軟部組織が介在した（上図左）。



術後 3 週 CaP 群：腱骨はほぼ直接固着し、腱圧迫部分の一部に移植腱-軟骨層-骨移行帯が形成された。

5) CaP 複合化腱の骨孔内固着メカニズム -関節内モデル- : in vivo

複合化した CaP は、低結晶性のハイドロキシアパタイトで、腱表面から深さ 200 μm まで傾斜的に沈着した。アパタイトは、30-50nm の針状構造をしており、それは集合体として腱内部のコラーゲン線維束間に存在した。



動物実験で、移植腱表面には、術後 1 週で破骨細胞、骨芽細胞を認めた。術後 2 週では、破骨細胞はさらに活性化し、腱表面のアパタイトを分解した。骨芽細胞は腱表面で骨細胞となり、骨と腱は直接固着した。

生体腱にナノレベルの CaP が存在し、アパタイト・コラーゲンとして骨細胞外基質と類似する。複合化移植腱を骨孔内に移植することで、CaP の分解のため破骨細胞が早期に遊走され、骨芽細胞が活性化し、骨との直接固着が起きたと考えた。

6) ヒト腱へのリン酸カルシウム複合化と自動浸漬器械の開発 : in vitro

総作業時間は A 群、B 群、C 群で 90 分、70 分、50 分であった。無機物含有量平均は大腿骨側、関節内、脛骨側で A 群が $4.7 \pm 0.9\text{wt}$ 、 $1.1 \pm 0.2\text{wt}$ 、 $6.2 \pm 0.6\text{wt}\%$ 、B 群が $4.4 \pm 0.4\text{wt}$ 、 $1.1 \pm 0.3\text{wt}$ 、 $6.1 \pm 0.5\text{wt}\%$ 、C 群が $3.0 \pm 0.2\text{wt}$ 、 $1.1 \pm 0.1\text{wt}$ 、 $4.0 \pm 0.5\text{wt}\%$ であった。関節内と大腿骨側・脛骨側、脛骨側と大腿骨側に有意差をみとめた。Kossa 染色にて Ca は表面下から傾斜的に染色された。脛骨側では糸穴部分に CaP が浸透している。マスキング部分は染色されていない。また、改良した新自動浸漬器械 (ESCOM 社製) 総作業時間は A 群、B 群、C 群で 45、47、35 分と短縮された。

* 本実験の一部 (自動浸漬器械) は、坂根正孝、エスコム株式会社 : 科学技術振興事業

団、平成 13 年度独創的研究成果共同育成事業「膝関節靭帯再建用・術中燐酸カルシウムコーティングシステム」、の研究助成を受けた。

7) リン酸カルシウム複合化手術シミュレーション

動物は 120kg 前後の食用ブタで、臨床で使う手術機械がそのまま利用可能であった。リン酸カルシウムコーティング処置は約 18 分で完了した。

*本実験の一部（自動浸漬器械）は、坂根正孝、エスコム株式会社：科学技術振興事業団、平成 13 年度独創的研究成果共同育成事業「膝関節靭帯再建用・術中燐酸カルシウムコーティングシステム」、の研究助成を受けた。

8) 臨床応用

臨床応用は現在までに 6 例終了している。



実際に Ca 溶液に浸漬しているところ。



リン酸カルシウム複合化後

今後の展望

臨床応用の継続：手術を受けた患者の社会・スポーツ復帰が早期に行なわれたか、長期にわたって再建靭帯と骨の親和性が安定しているかどうかを検討する。また、従来法に比して臨床成績が優れていることが証明できれば、高度先進医療に申請する（厚生労働省）予定である。

長期動物モデルを用いた検討：臨床試験では、力学試験等は困難であり、ヤギ・羊等の大型動物を使った検討が必要と考える。

ナノレベルで自己組織化された、コラーゲン束とリン酸カルシウム複合体を骨髄腔に置くと破骨細胞が、「あたかも骨のリモデリングを行なう」様に誘導され、骨芽細胞による類骨形成が起こった。この細胞動態に関するシグナル伝達、遺伝子発現、さらにメカニカルストレスとの関連等の解明は、靭帯付着部の再生の鍵であると考えられる。

3. 4. 5 水酸アパタイト/コラーゲン複合体の臨床に向けたデザインとその有効性

(1) 研究内容

開発した水酸アパタイト/コラーゲン (HAp/Col) 複合体の骨補填材としての臨床応用に向けたデザインとその有効性について確認を行った。その作業過程については、①「材料特性の確認：生体内での材料の特徴（挙動）を確認」、②「臨床に向けた材料の最適化（デザイン）：生体において臨床で求められる機械的強度や生体吸収性などの確認」、③「材料の有効性：比較的大きな骨欠損に材料を移植した際の再建の様相について確認」を実施し、これらについて、検討を行った。本報告では、前述の各事項に沿って、研究成果を述べる。

材料特性の確認：生体内における HAp/Col 複合体の生体吸収機序の解明

《実験方法》

ラット脛骨横孔モデル 未架橋 HAp/Col ブロック埋め込み実験

使用動物：SD ラット ♂8 週齢

欠損：脛骨 φ2mm

使用材料：未架橋 HAp/Col ブロック

評価方法：HE 染色，酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAcP, 破骨細胞マーカー)

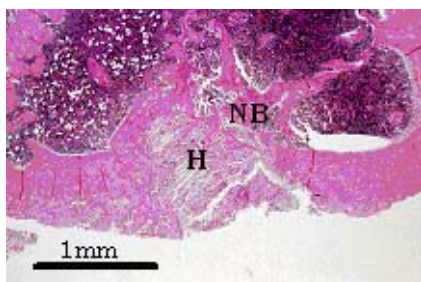


図 1：埋め込み 2 週間後の脛骨内 HAp/Col
H: HAp/Col NB: 新生骨

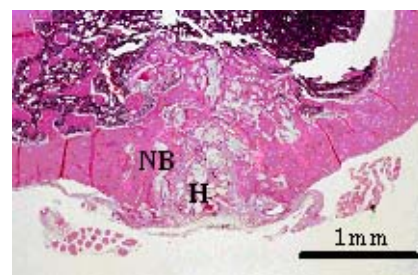


図 2：埋め込み 4 週間後の脛骨内 HAp/Col
H: HAp/Col NB: 新生骨

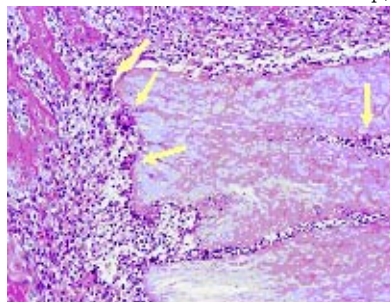


図 3：材料周辺の強拡大、矢印：多核細胞

《結果》

未架橋 HAp/Col は骨欠損部に埋め込むと時間と共に吸収・崩壊し、新生骨に置換さ

れていくことがわかった (図 1, 2)。材料周辺部には多核の巨細胞が接着し、あたかも骨基質を吸収する破骨細胞のような観察像が見られた。破骨細胞マーカーを染色する TRAcP 染色を行なったところ、埋め込まれた材料周辺には埋め込み後 5 日目以降 多数の TRAcP 陽性多核細胞 (破骨細胞) が出現することが明らかとなった (図 4 矢印)。蛍光色素ローダミンを含浸させた HAp/Col を埋め込んだ後、周辺組織を蛍光顕微鏡を用いて観察すると破骨細胞と思われる多核細胞の中に HAp/Col 由来のローダミンが認められた (図 5)。すなわち HAp/Col 複合体は生体骨近傍において破骨細胞による骨吸収と同様の機序で吸収され、その後新たな骨に置換されていくことが明らかとなった。

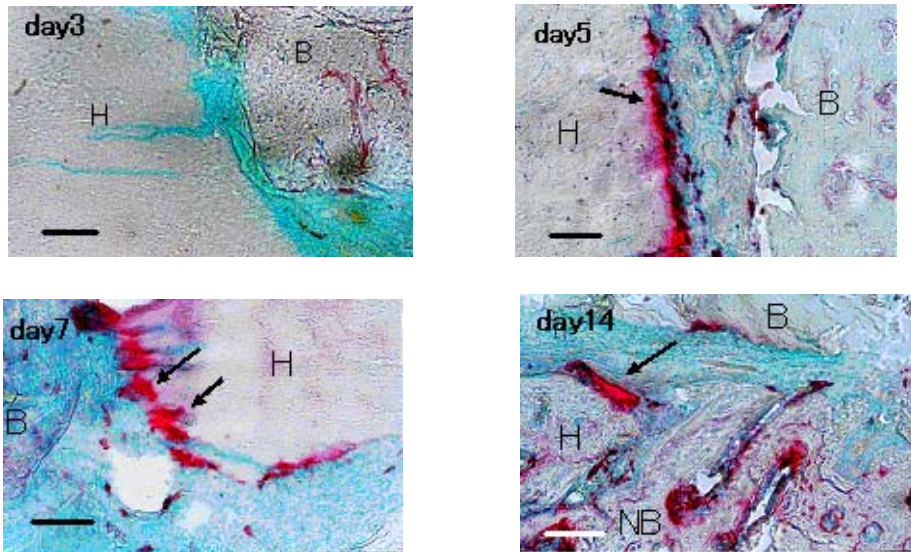


図 4 : TRAcP 染色像 H: HAp/Col B: 骨 NB: 新生骨, 矢印: TRAcP 陽性多核細胞 (破骨細胞) (Bar=10 μ m)

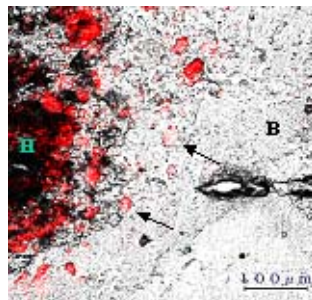


図 5 : ローダミン含浸 HAp/Col 埋め込み後 5 日目の蛍光観察像
H: ローダミン含浸 HAp/Col B: 骨 矢印: ローダミン陽性多核細胞

骨粗鬆症モデルラットを用いた HAp/Col 複合体による骨欠損治癒

《実験方法》

使用動物 : SD ラット ♀6 週齢 骨粗鬆症モデル (卵巣摘出後低 Ca 食飼育, 図 10)

欠損 : 脛骨 ϕ 2mm

使用材料 : HAp/Col ブロック ϕ 2mm

評価方法 : HE 染色, pQCT による骨密度測定

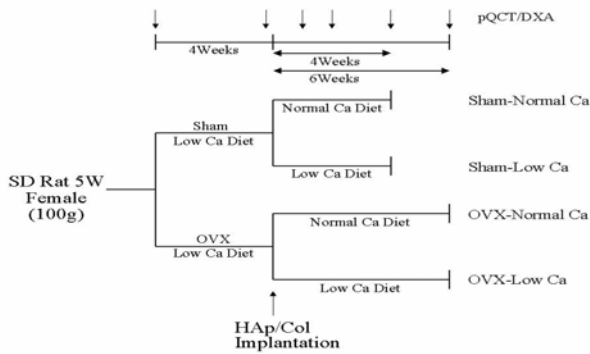


図 10：骨粗鬆症モデルラット実験プロトコール

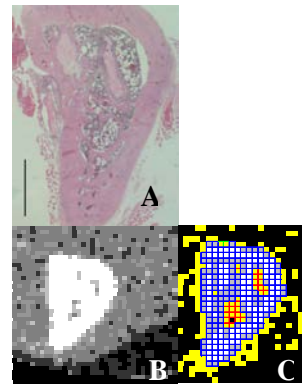


図 11 p QCT による脛骨断面骨密度測定
B:A 脛骨断面の p QCT 像
C:B 像の骨密度レベル別変換画像

《結果》

いずれの実験群においても HAp/Col を埋め込んだ部分の海綿骨骨密度がコントロール側に比べて有意に増加した(図 12)。すなわち HAp/Col 埋め込みによる骨形成亢進が正常状態 (Sham-Normal Ca 群)のみならず、極度のカルシウム欠乏状態 (OVX-Low Ca 群)においても確認できた。OVX-Normal Ca 群においては、4 週間の低 Ca 食飼育後に Normal Ca 食に戻して Ca の供給を経口で行ったにもかかわらずコントロール側の骨密度の改善はみられないが、埋め込み側では埋め込み部分の海綿骨骨密度が Sham 群と同等レベルまで上昇した。HAp/Col 複合体は骨粗鬆症のような骨量減少に対して埋め込み部分の海綿骨の形成を促進させることがわかった。骨粗鬆症モデルにおいて骨形成の効果を発揮していると結論できる。

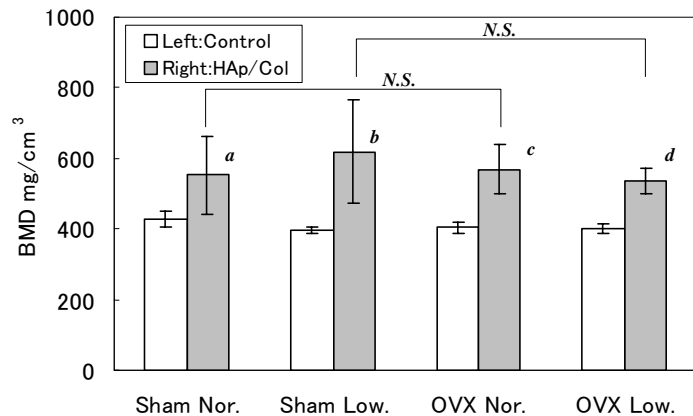


図 12：HAp/Col 埋め込み 4 週後の脛骨海綿骨密度
a, b, c, d : p < 0.01 by student's t-test.

臨床に向けた材料の最適：HAp/Col 複合体架橋方法の検討

《実験方法》

ウサギ脛骨横孔モデル 各種架橋 HAp/Col ブロック埋め込み実験

使用動物：日本白色家兎 ♂3 ヶ月齢 (2.5-3kg)

欠損 : 脛骨 φ 5mm

使用材料 : 各種架橋 HAp/Col ブロック 2x2x5mm

評価方法 : HE 染色, 画像処理による残存材料および新生骨の面積定量

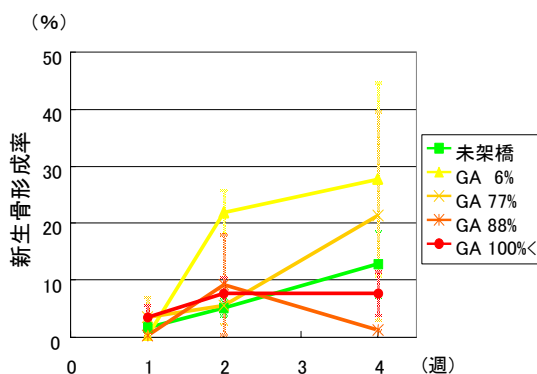


図6 架橋条件の違いによる骨置換性の違い

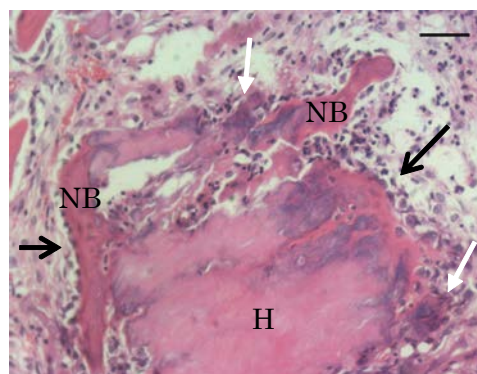


図7 GA6%HAp/Col の骨置換

白矢印 : 破骨細胞

黒矢印 : 骨芽細胞 (Bar=100μm)

《結果》

HAp/Col 複合体は施す架橋方法によってその生体吸収性, 骨置換性が異なることが明らかとなった(図6)。脛骨などの長幹骨皮質骨部分に埋め込んだ場合にはグルタルアルデヒド (GA) がコラーゲン上アミノ酸残基 (主にリジン) の6~10%を架橋する濃度条件が最も望ましい材料強度, 材料吸収・骨置換を示した(図7)。熱架橋, カルボジイミド架橋については今後最適な架橋条件を探ることによって実用化の可能性が示された(実験5 膜状 HAp/Col 参照)。HAp/Col 複合体は架橋条件を考慮することにより材料吸収速度をコントロールできる可能性が明らかとなった。

HAp/Col 複合体の滅菌方法の検討

《実験方法》

ウサギ脛骨横孔モデル 各種架橋 HAp/Col ブロック埋め込み実験

使用動物 : 日本白色家兎 ♂3ヶ月齢 (2.5-3kg)

欠損 : 脛骨 φ 5mm

使用材料 : 各種滅菌 HAp/Col ブロック 2x2x5mm (表1参照)

評価方法 : HE 染色, 画像処理による残存材料および新生骨の面積定量

《結果》

HAp/Col 複合体は滅菌方法によって強度, 生体吸収性などの特徴に影響を与えることが明らかとなった(図8)。特にプラズマ照射滅菌した HAp/Col 複合体はコラーゲン線維の乱れが見られ, 滅菌による変成の可能性が示された。電子線照射滅菌は複合体が崩壊しやすくなる傾向が見られた。HAp/Col の特徴を維持したまま最も効果的に

滅菌処理できる方法は γ 線照射であった(図9)。 γ 線 10kGy 照射した HAp/Col 複合体は適度な強度と吸収性を併せ持ち、未滅菌材料と同等の優れた骨置換性を維持していた。

滅菌方法	未架橋	GA架橋
Vaccum Heat Dry 150°C 3時間	ST-1	ST-GA-1
Plasma O-ragical	ST-2	ST-GA-2
ガンマ線	10kGy	ST-3
	25kGy	ST-4
電子線	15kGy	ST-5
	25kGy	ST-6
	50kGy	ST-7
		ST-GA-3
		ST-GA-4
		ST-GA-5
		ST-GA-6
		ST-GA-7

表 1 : 実験に用いた各種滅菌 HAp/Col

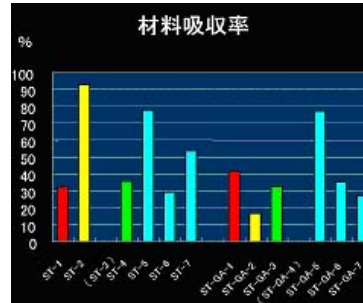


図 8 : 各種滅菌処理 HAp/Col の生体吸収率

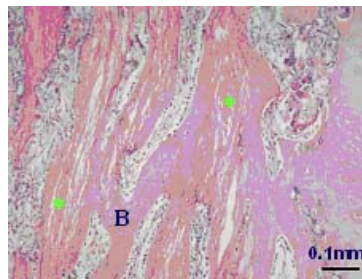


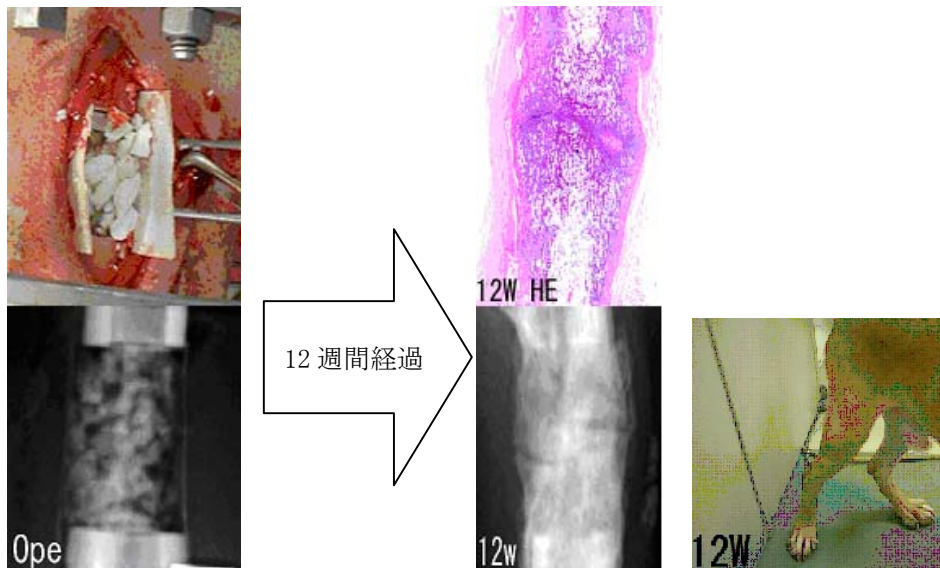
図 9 γ 線照射(10kGy)滅菌 HAp/Col

* : γ 線照射 HAp/Col B:新生骨

材料の有効性：顆粒状 Hydroxyapatite/Collagen による骨再建

a. 偽関節モデル (脛骨離断)

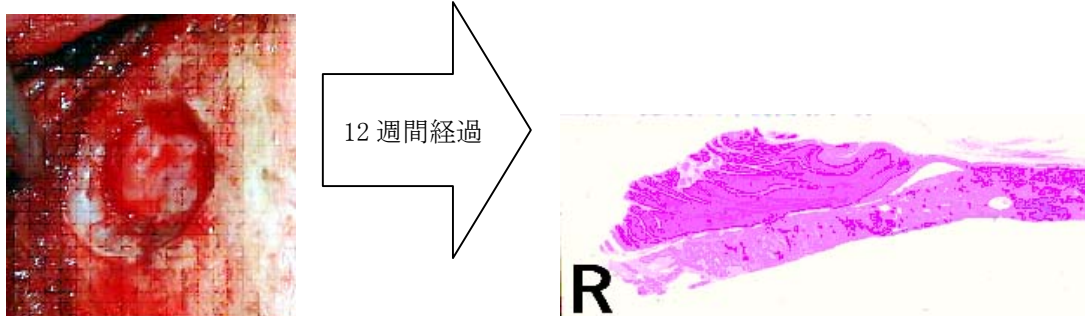
犬の脛骨骨幹部に 2cm の骨欠損を形成し、粒径約 3mm の顆粒状 Hydroxyapatite/Collagen を骨欠損内に填塞した後、12 週間経過観察を行った。



骨欠損内中央部に若干の軟骨様組織が存在しているが、骨端を架橋する骨組織が再生している。再生した骨組織は、運動に耐えられる機械的強度を有している。

b. 頭蓋骨骨孔モデル

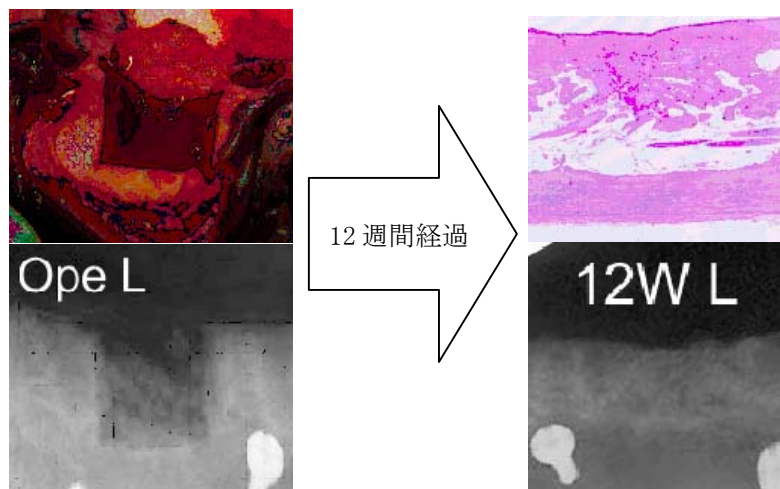
犬の頭蓋骨に直径 10mm の骨孔を形成し、粒径約 3mm の顆粒状 HAp/Col を骨孔内に填塞した後、12 週間経過観察を行った。



吸収途中の材料が若干残存しているものの、骨孔内を満たす骨組織の再生が確認できる。

c. 辺縁骨欠損モデル

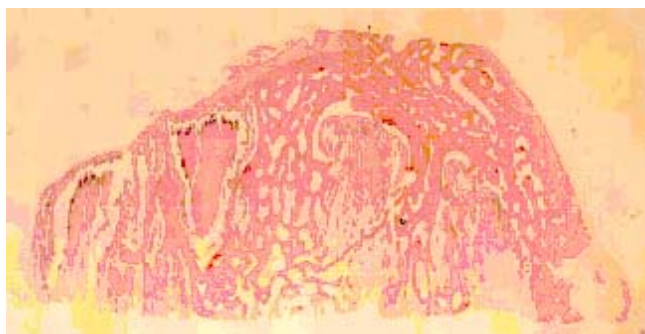
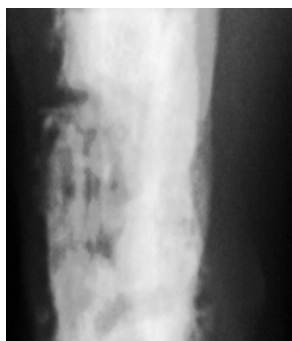
犬の下顎骨に長さ 10mm，深さ 10mm，頬側から舌側へ貫通する骨欠損を形成し、粒径約 3mm の顆粒状 Hydroxyapatite/Collagen を骨欠損内に填塞した後、12 週間経過観察を行った。



顆粒が若干残存しているが良好な骨再生が認められた。

Hydroxyapatite/Collagen による骨再建

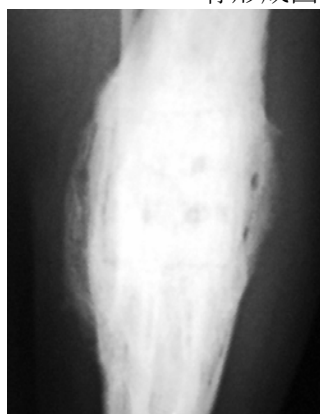




あらかじめ付与したトンネル構造内に骨組織が再生している。

犬の脛骨骨幹部に 2cm の骨欠損を形成し、直径 10mm の HAp/Col を骨欠損内に移植した後、12 週間経過観察を行った。

骨形成因子を吸着させた HAp/Col



骨形成因子を吸着させたことによって、トンネル構造内および材料周囲に骨組織が形成されている。

膜状 Hydroxyapatite/Collagen による骨再建

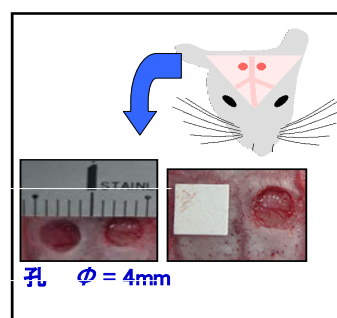
《実験方法》

使用動物：SD ラット ♂8 週齢

欠損：頭蓋骨 ϕ 4mm

使用材料：膜状 HAp/Col 5x5x0.2mm

評価方法：HE 染色，画像処理による残存材料および新生骨の面積定量



《結果》

頭蓋骨骨欠損モデルにおいて熱により架橋を施した膜状 HAp/Col は、GA 架橋とほぼ同等に欠損を治癒させることがあきらかとなった (図 13)。また、熱架橋の条件を変えることによって骨置換速度をコントロールできる可能性が示唆された (図 14)。

当材料の実用化に向け、適用する部位の骨の性質や目的にふさわしい生体活性を持つ HAp/Col 複合体を選択することがのぞましいが、熱架橋法によっても HAp/Col 複合体の修飾を段階的に調整し、適切な生体活性を持つ材料を作り出せる可能性が明らかとなった。

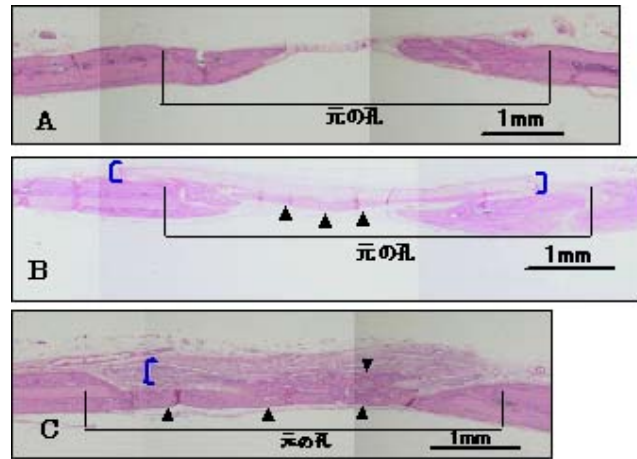


図 13 術後 4 週の頭蓋骨横断切片
 A:材料なし (孔のみ) B:GA6%架橋 HAp/Col 膜
 C:熱架橋 HAp/Col 膜
 矢頭 : HAp/Col に沿った新生骨形成

(2) 研究成果及び今後期待される効果

生体内において、骨組織と類似した挙動を示す人工材料は、世界的にも類をみない開発と考えられる。現在、臨床においては、自家骨移植、海綿骨の移植が行われている。これは、自己組織に新たな欠損を形成する欠点はあるものの、安定かつ安全に骨形成が促される材料として広く応用されている。このことから、開発された Hydroxyapatite/Collagen は、海綿骨の代替材料として、価値を有するものと考えられる。もし、人工海綿骨的な特性を有する Hydroxyapatite/Collagen が臨床へ展開できるならば、骨再生が求められる整形外科、脳外科、形成外科、口腔外科など多くの領域に対して、多大な影響を及ぼす可能性が高いと思われる。このことから、Hydroxyapatite/Collagen の臨床に向けた最適化と有効性実験を行ったところ、臨床応用に求められる安全性や治療効果が確認された。一方、Hydroxyapatite/Collagen は、タンパク質の吸着性や細胞接着性に優れていることから、今後、組織工学的手法や遺伝子治療において、基礎的 (担体) 材料として有用であることは、疑いない。現在、組織工学や遺伝子工学に必要な材料の開発は、後手に廻っている感が否めないことから、この点について、Hydroxyapatite/Collagen は、さらなる展開が期待できると考えられる。もちろん、今回、適用した骨組織に対する再生工学においても、さらにナノコンポジットの技術 (合成法) を改良することによって、次世代型の骨再生材料となる可能性が極めて高いと考えられる。

3. 4. 6 カニの腱を用いた人工神経の開発

(1) 研究内容

天然素材から合成したキトサンは、抗菌剤や健康食品として広く用いられているが、セルロースに似た骨格をもつ多糖類で、分解産物であるグルコサミンは人体に無害である。カニの腱を構成するキチンは甲羅と異なり、キチン分子が規則正しく配列しているため、機械的強度が甲羅よりも大きいという特徴がある。これは特に方向性を持つ組織の再建には有利な特長と考えられる。我々はカニの腱を化学処理することによりチューブ状にし、これを神経再生用チューブとして成型することに成功した。

神経組織の有髄軸索は周囲を基底膜に囲まれている。この基底膜の内面に多く分布するラミニンと呼ばれる接着因子は、再生軸索の足場になり、神経断端からのシュワン細胞の移動と接着を促進することが知られている。しかし研究で使用されているラミニンは Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 腫瘍から抽出されるため、人間には使用できない。また、ヒト胎盤由来のラミニンも、感染症の危険や、倫理的な問題がある。さらに、分子量が巨大であるため(900kD)合成も不可能である。近年、ラミニンの研究が急速に進み、その構造が解明されて、特定の amino acid 配列(ドメイン)の持つ機能もわかってきた。このような合成ラミニンペプチドの一つである YIGSR 配列は細胞の接着と移動、67kD レセプターとの結合を促進することが知られている。この神経細胞に対する生理活性物質をハイドロキシアパタイトでコーティングしたキトサンチューブに結合すれば、神経再生促進効果を発揮することが期待される。この効果を実証するため以下のような実験を行い、合成ラミニンペプチド固定化法と作製したキトサンチューブの移植成績を検討した。

(2) 研究成果及び今後期待される効果

チオール化反応は求電子性であるため、主にカニ腱キトサンのアミノ基と反応すると考えられる^{6,7)}(図1)。反応の進行を確認するために、反応前後における ATR FT-IR 測定をおこなった。未処理のカニ腱キトサンの場合、アミノ基に帰属される一つの 1595cm^{-1} のピークが観察された。一方、25 および 96 時間反応後のカニ腱キトサンでは、アミド基に帰属される二つの 1665 および 1543cm^{-1} のピークが観察された。これは、

カニ腱キトサンのアミノ基が 4-thiobutylolactone と反応し、アミド結合を形成していることを意味している。しかし、導入したチオール基が反応性を持っている状態で存在し

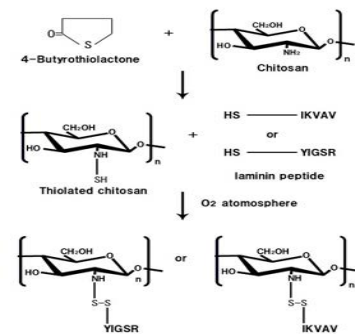


図1 固定化方法

ていることを確認するためには、FT-IR では感度が低く検出できない。そこで、¹H-NMR 測定を行った。未反応のカニ腱キトサンではチオール基のプロトンに帰属される 2.1ppm のピークが観察されなかった。一方、25 および 96 時間反応後のカニ腱キトサンでは、チオール基のプロトンに帰属される 2.1ppm にピークが確認された。以上の結果から、4-thiobutylolactone はキトサンにチオール基の反応性を消失させることなく反応していることが明らかとなった。SEM-EDS 分析により、カニ腱キトサンに導入されたチオール基の分布を観察すると、導入されたチオール基はカニ腱全体に存在していた。表面付近における反応の経時的変化を見ると、80 時間までは時間経過とともにチオール基の導入量が増加し、それ以後飽和状態になった。この時、カニ腱キトサン表面に対するチオール基の導入量は 1.24 μmol/g であった。また、カニ腱キトサン全体のチオール基導入量は経時的に増加し、130 時間で飽和状態になり、その導入量は表面の 4 倍以上であった。

UV による定量分析の結果、チオール化したカニ腱キトサンに対するラミニンペプチドの固定化は表面に導入したチオール基に対し YIGSR がほぼ 100% 導入できたのに対し、IKVAV では 65% 程度しか導入できなかった。これは、YIGSR の分子量が IKVAV よりも小さく、チオール基に対する反応性が良いためと考えられる。このサンプルを偏光顕微鏡で観察すると、未処理のカニ腱キトサンと同様に 45° 回転するご

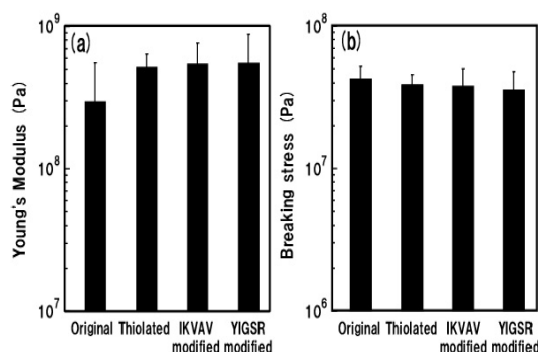


図 2 引張り強度、ヤング率試験の結果

とに明視野と暗視野が交互に現れた。これはカニ腱キトサンの分子レベルでの配向構造が化学処理後も壊れていないことを示す。また、引っ張り試験を行うと、ヤング率、破断強度は未処理のカニ腱と比べてほぼ同じ値を示していた (図 2)。従って、カニ腱キトサンの力学特性も上記反応後変わらないことが証明された。

さらにアパタイトコーティングしたチオール化カニ腱キトサンチューブに対する YIGSR、IKVAV、laminin の固定化量はそれぞれ、 $2.9 \pm 1.9 \mu\text{g}/\text{tube}$ 、 $14.4 \pm 4.6 \mu\text{g}/\text{tube}$ 、 $20.6 \pm 7.5 \mu\text{g}/\text{tube}$ であった。一方、チオール基を導入していないチューブに対する固定化量はそれぞれ $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{tube}$ 、 $10.9 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{tube}$ 、and $10.3 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{tube}$ であった。チオール基を導入する事で、単純な物理吸着に比べより多くのラミニンやラミニンペプチドを固定化することに成功した。

HAp, HAp-SH チューブ移植群ではチューブと再生神経組織の間に疎性結合織が介在し、神経はチューブの中央よりに再生していた。チューブへの炎症細胞浸潤はなく、壁を貫通する新生血管は観察されなかった。シュワン細胞を伴う有髄・無髄神経軸索よりなる

minifascicle の集合体だけでなく、疎性結合織も血管に富んでいた。これに対し、Y/HAp, Y/HAp-SH 群では、神経組織が神経近位断端よりチューブ壁に沿って伸び、チューブ中央部では管腔全体に広がって再生されていた。神経組織はチューブ内壁に形成された数層の神経上膜様組織に沿って再生していた (図 3)。チューブへの炎症細胞浸潤はなかった。神経上膜様組織を構成する紡錘形の細胞はミトコンドリア、疎面小胞体が発達し、大きな顆粒を含有するが基底膜は持っておらず、活性化された線維芽細胞 (神経周膜・上膜に分化することが知られている) であることが示唆された。この神経上膜様組織の内側に minifascicle が観察された。一方、Col 群ではチューブ壁を新生血管が貫通し器質化していた。炎症細胞浸潤は観察されなかった。このチューブ壁に接して神経組織が再生していた。以上の結果より、キトサンチューブ自体はコラーゲンチューブより神経組織との親和性が劣ること、しかし YIGSR ペプチドの固定化によりキトサンチューブの生体適合性が改善することが示唆された。

再生した有髄軸索の軸索占有率は、HAp-SH チューブ移植群 が HAp, Y/HAp-SH チューブ移植群より有意に小さかった (図 4)。また Y/HAp チューブ移植群が Col チューブ移植群より大きかった。この結果は、SH 基を導入することにより神経再生が遅延すること、しかし YIGSR ペプチドの固定化により神経組織の再生が促進されることを示唆する。しかし、YIGSR ペプチドを固定化した群でも軸索占有率は同系移植群と比較すると小さかった。

M 波は全ての群において 6 匹中 6 匹で記録された。終末潜時の比は、YIGSR ペプチドを固定化した群がしていない群に比較し小さかった (図 5)。また、Col, Y/HAp チューブ移植群と同系移植群 間には有意差がなかった。この結果は、YIGSR ペプチドの固定化が電気生理学的にも神経再生を促進することを示唆している。

YIGSR ペプチドを固定化していない群では再生神経組織がチューブと直接接触していなかった。この場合、フィブリンマトリックスを足場として再生神経が伸張すると考えられる。これに対し、YIGSR ペプチドを固定化した群ではチューブ内壁に神経上膜様組織が形成され、これに接して内部に minifascicle が集合体を形成していた。これに加え、組織学的、あるいは電気生理学的解析の結果を考慮すると、吸着、共有結合いずれの場合にも固定化された YIGSR ペプチドは移植後短時間でチューブから解離することなく、少なくとも神経架橋が完成するまではチューブ壁にとどまり再生神経の伸張を促進することが示唆される。

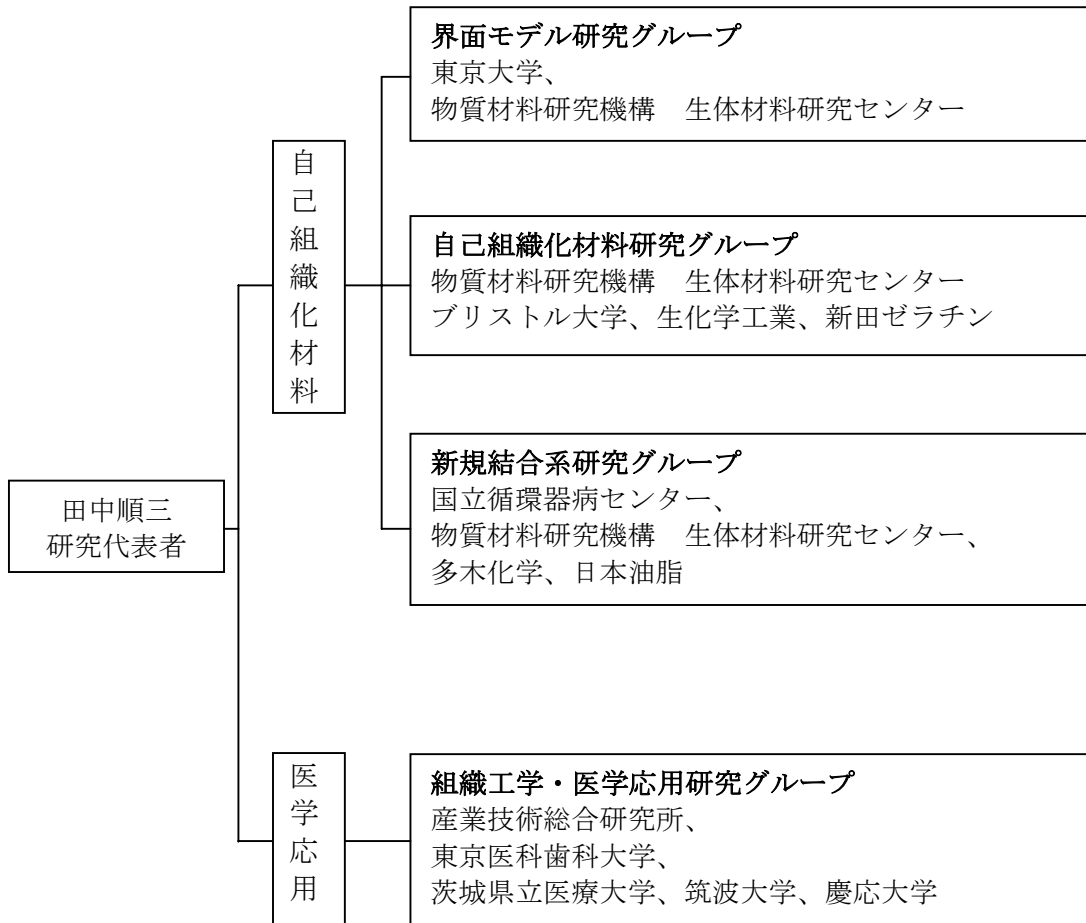
一方、コラーゲンチューブの場合はチューブ自体が器質化して神経上膜様組織に置換されていた。このような生体適合性の良さにより、単純な管空構造でもコラーゲンチューブでは神経再生が順調に起こるものと思われる。これに対し、キトサンチューブのみ場合はチューブ壁を新生血管が貫通することなく、チューブと再生神経組織の間に疎

性結合織が介在していた。これは、キトサンチューブがコラーゲンチューブよりも生分解性が劣り、自己組織化が遅れるためと考えられる。また、キトサンチューブにSH基を導入することにより神経再生が遅延した。これは、化学処理により導入されたSH基がラミニンペプチドの持つSH基と反応して共有結合を形成するだけでなく、キトサン分子自身が持つSH基とも反応して架橋が形成されるためと考えられる。すなわち、キトサンチューブに新たな架橋が形成された結果チューブの生分解性が低下し、再生神経組織とチューブの適合性も低下することが示唆される。しかし、前述のごとく YIGSR ペプチドを固定化することによりチューブと神経組織の適合性が改善することから、YIGSR ペプチドの固定化は神経架橋用チューブの作製に極めて有効な方法である。

以上の実験結果は、日常臨床で遭遇する程度の神経欠損であれば、われわれが開発したキトサンチューブで十分架橋可能であることを示唆している。さらに移植成績を向上し、関節上に移植しても折れ曲がらないチューブを作製するため、キトサンからナノファイバーを作製してメッシュ状のチューブに採型し、移植後にチューブ周囲と栄養因子や老廃物、あるいはガスの交換ができるような技術を現在開発中である。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

①界面モデル研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○田中 順三	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	センター長	研究統括	平成11年11月 平成17年3月
佐藤 公泰	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	重点支援研究員 CREST 研究員	LB膜を用いた無機結晶 析出制御	平成12年1月 平成14年3月
熊谷 友里	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	CREST 技術員	LB膜を用いた無機結晶 析出制御	平成12年1月 平成16年10月
瀬尾 恵美	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	CREST 事務員	事務	平成11年12月 平成14年3月
小松崎礼子	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	CREST 事務員	事務	平成14年1月 平成15年5月
酒井晶子	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	CREST 事務員	事務	平成15年6月 平成17年3月
小暮 敏博	東京大学大学院 理学系研究科	助教授	電子顕微鏡を用いた無 機結晶方位決定	平成11年11月 平成17年3月
白尾 雅之	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	電子顕微鏡を用いた無 機結晶方位決定	平成13年4月 平成14年3月
引田 友幸	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	電子顕微鏡を用いた無 機結晶方位決定	平成13年4月 平成14年3月
尾崎 紀昭	東京大学大学院 理学系研究科	CREST研究員	電子顕微鏡を用いた無 機結晶方位決定	平成14年4月 平成16年3月
廣井 登	東京大学大学院 理学系研究科	大学院生	電子顕微鏡を用いた無 機結晶方位決定	平成15年9月 平成16年3月

② 自己組織化材料研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○田中 順三	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	センター長	研究統括	平成11年11月 平成17年3月
菊池 正紀	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	研究員	自己組織化材料の構築	平成11年11月 平成17年3月
生駒 俊之	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	科学技術特別研究員 CREST 研究員 研究員	自己組織化材料の構築	平成11年11月 平成17年3月
梶山 哲人	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	重点研究支援	高分子自己組織化材料の構築	平成14年9月 平成15年3月
水野 郁子	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	研究補助員	自己組織化材料の合成	平成12年11月 平成17年3月
太田 一史	茨城大学サテライトベンチャービジネスラボラトリー	研究員	自己組織化材料の構築	平成13年9月 平成17年3月
東 紀史	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	大学院生	自己組織化材料の構築	平成14年3月 平成17年3月
Stephen Mann	ブリストル大学	教授	バイオミネラリゼーション	平成13年4月 平成17年3月
Dominic Walsh	ブリストル大学	研究官	バイオミネラリゼーション	平成13年4月 平成17年3月
Ingrid Leveque	ブリストル大学	大学院生	バイオミネラリゼーション	平成14年4月 平成15年7月
Andrew Collins	ブリストル大学	大学院生	バイオミネラリゼーション	平成14年4月 平成17年3月
Charlotte Peet	ブリストル大学	大学院生	バイオミネラリゼーション	平成14年4月 平成17年3月
Sajani Sadasivan	ブリストル大学	大学院生	バイオミネラリゼーション	平成14年4月 平成17年3月
山口 勇	多木化学	研究員	自己組織化材料の構築	平成11年11月 平成17年3月
宮崎 匡輔	生化学工業	部長	多糖類の高純度化	平成11年11月 平成17年3月
佐倉 義幸	生化学工業	次長	多糖類の高純度化	平成11年11月 平成17年3月
伊藤 典一	新田ゼラチン	所長	コラーゲンの精製	平成13年4月 平成17年3月
萬代 佳宣	新田ゼラチン	グループ長	コラーゲンの精製	平成11年11月 平成17年3月

③ 新規結合系研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○田中 順三	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	センター長	研究統括	平成11年11月 平成17年3月
末次 寧	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	主任研究員	ゲル中における無機析出	平成11年11月 平成17年3月
田口 哲志	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	研究員	共有結合を導入した新規ゲル材料	平成12年4月 平成17年3月
松田 篤	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	科学技術特別研究員	共有結合を導入した新規複合材料	平成13年1月 平成16年3月
古川 早苗	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	CREST 技術員	細胞培養	平成14年7月 平成15年3月
沢辺 祐	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	大学院生	共有結合を導入した新規複合材料	平成13年12月 平成15年3月
舘野加代子	物質・材料研究機構 生体材料研究センター	実験補助員	細胞培養	平成13年4月 平成17年3月
岸田 晶夫	国立循環器病センター 生体工学部	部長	無機／有機界面への共有結合導入	平成12年4月 平成17年3月
古菌 勉	国立循環器病センター 生体工学部	室長	無機／有機界面への共有結合導入	平成11年11月 平成17年3月
安田 昌司	国立循環器病センター 生体工学部	CREST 研究補助員	無機／有機界面への共有結合導入	平成14年4月 平成17年3月
是松 新	国立循環器病センター 生体工学部	研究員	無機／有機界面への共有結合導入	平成13年4月 平成14年3月
中島三保子	国立循環器病センター 生体工学部	CREST 研究補助員	無機／有機界面への共有結合導入	平成13年7月 平成14年3月
宮崎 幸造	国立循環器病センター 生体工学部	派遣研究員	無機／有機界面への共有結合導入	平成15年4月 平成16年3月
木村 剛	国立循環器病センター 生体工学部	派遣研究員	無機／有機界面への共有結合導入	平成15年4月 平成17年3月
西村 亜矢	国立循環器病センター 生体工学部	CREST 研究補助員	無機／有機界面への共有結合導入	平成15年11月 平成16年3月
梶原 操	国立循環器病センター 生体工学部	CREST 研究補助員	無機／有機界面への共有結合導入	平成16年7月 平成17年3月
山元 和哉	鹿児島大学	助手	共有結合を導入した新規ゲル材料	平成14年1月 平成14年3月
福崎 裕延	多木化学	室長	無機／有機界面への共有結合導入	平成11年11月 平成15年3月

新規結合系研究グループの続き

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
岡 洋一	多木化学	研究員	無機／有機界面への共有結合導入	平成12年4月 平成17年3月
田中 忍	筑波大学	CREST 研究補助員	靱帯再建に関する研究	平成11年12月 平成14年8月

④ 組織工学・医学応用研究グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○立石 哲也	東京大学大学院 工学系 研究科	教授	軟骨・靭帯再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
牛田多加志	東京大学大学院 工学系 研究科	助教授	軟骨・靭帯再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
沼田 章子	東京大学大学院 工学系 研究科	CREST 技術員	細胞培養	平成 13 年 4 月 平成 16 年 3 月
植村 壽公	産業技術総合研究所	主任研究官	骨・軟骨再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
ドン・ジアン	産業技術総合研究所	研究員	骨・軟骨再建	平成 13 年 4 月 平成 14 年 3 月
根本 淳子	産業技術総合研究所	CREST 研究補助員	骨・軟骨再建	平成 12 年 4 月 平成 14 年 10 月
味八木 茂	産業技術総合研究所	CREST 研究補助員	骨・軟骨再建	平成 12 年 4 月 平成 16 年 3 月
川添菜津子	産業技術総合研究所	CREST 研究補助員	骨・軟骨再建	平成 13 年 11 月 平成 14 年 6 月
高久田和夫	東京医科歯科大学	助教授	骨組織再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
四宮 謙一	東京医科歯科大学	教授	骨組織再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
伊藤聰一郎	東京医科歯科大学	助教授	神経再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
宗田 大	東京医科歯科大学	教授	軟骨再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
小山 富久	東京医科歯科大学	講師	骨組織再建	平成 11 年 11 月 平成 17 年 3 月
若林 良明	東京医科歯科大学	医員	骨組織再建	平成 13 年 8 月 平成 16 年 3 月
松本 裕子	東京医科歯科大学	CREST 研究員	骨組織再建	平成 12 年 4 月 平成 17 年 3 月
早乙女進一	東京医科歯科大学	CREST 研究補助員	骨組織再建	平成 14 年 5 月 平成 17 年 3 月
中川いづみ	東京医科歯科大学	CREST 研究補助員	細胞培養	平成 12 年 12 月 平成 17 年 3 月
稲葉 梨恵	東京医科歯科大学	CREST 研究補助員	細胞培養	平成 13 年 6 月 平成 17 年 3 月

組織工学・医学応用研究グループの続き

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
麻生 善則	東京医科歯科大学	助手	骨・神経再建	平成14年5月 平成17年3月
鈴木 真澄	東京医科歯科大学	大学院生	骨組織再建	平成13年8月 平成16年3月
山田 武喜	東京医科歯科大学	大学院生	骨組織再建	平成13年9月 平成16年3月
砂村 聡子	東京医科歯科大学	CREST 技術員	細胞培養	平成14年4月 平成17年3月
落合 直之	筑波大学	教授	靭帯組織再建	平成15年4月 平成17年3月
坂根 正孝	筑波大学	講師	靭帯組織再建	平成11年11月 平成17年3月
六崎 裕高	筑波大学	CREST 研究補助員	靭帯組織再建	平成14年9月 平成17年3月
和田野安良	茨城県立医療大学医科学センター	助教授	靭帯組織再建	平成11年11月 平成15年3月
宮永 豊	筑波大学・体育科学系スポーツ医学	教授	靭帯組織再建	平成12年1月 平成16年10月
下條 仁士	筑波大学・体育科学系スポーツ医学	助教授	靭帯組織再建	平成12年1月 平成15年3月
石井 朝夫	筑波大学 臨床医学系	助教授	靭帯組織再建	平成12年1月 平成17年3月
戸山 芳明	慶応義塾大学医学部	専任講師	軟骨組織再建	平成14年4月 平成17年3月
松本 秀男	慶応義塾大学医学部	専任講師	軟骨組織再建	平成14年4月 平成17年3月
千葉 一裕	慶応義塾大学医学部	助手	軟骨組織再建	平成14年4月 平成17年3月
二木 康夫	慶応義塾大学医学部	助手	軟骨組織再建	平成14年4月 平成17年3月
船山 敦	慶応義塾大学医学部	助手	軟骨組織再建	平成14年4月 平成17年3月
谷田部 拓	慶応義塾大学医学部	大学院生	軟骨組織再建	平成14年4月 平成17年3月
前野 晋一	慶応義塾大学医学部	助手	軟骨組織再建	平成15年9月 平成17年3月
鈴木 亨	慶応義塾大学医学部	大学院生	軟骨組織再建	平成15年9月 平成17年3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成14年3月14日 日から16日	International Symposium on Bio-integrated Materials and Tissue Engineering	日本科学 未来館	230人	世界各国の一流の研究者 との研究意見交換を行った。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
張 明喆 (韓国群山大学校、教授)	共同研究	無機材質研究所	12/4/20-12/4/26
Peter Kratzer (Fritz-Haber-Institut der MPG, Research Associate)	共同研究	無機材質研究所	12/11/10-12/11/16
Williams, R. Stanley (Hewlett-Packard Labs, Senior Principal laboratory Scientist)	共同研究	無機材質研究所	12/11/11-12/11/15
Dominic Walsh (イギリス、ブリストル 大学、主任研究員)	共同研究	無機材質研究所	12/11/11-12/11/18
神谷 利夫 (イギリス、ケンブリ ッジ大学、在外研究員)	共同研究	ブリストル大学	13/2/7-13/2/9
明石 満 (鹿児島大学工学部応用 工学科、教授)	共同研究	無機材質研究所	12/7/3-12/7/4
尾込 大介 (鹿児島大学工学部応 用工学科、大学院生)	共同研究	無機材質研究所	12/7/26-12/7/27
松崎 典弥 (鹿児島大学工学部応 用科学工学科大学院生)	共同研究	無機材質研究所	12/7/26-12/7/27
松田 篤 (北海道大学大学院理 学系研究科、博士研究員)	共同研究	無機材質研究所	12/11/17-12/11/18
筏義人 (鈴鹿医療大学医用工学部、 教授)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/6-14/3/8
Min Wang (Nyang Tech. Univ., Singapore, Professor)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/6-14/3/9
Allan S. Hoffman (Univ. of Washington, Professor)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/5-14/3/9
Mehmet. Sarikaya (Univ. of Washington, Assistant Professor)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/6-14/3/9
Dominic Walsh (Univ. of Bristol)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/6-14/3/9
A. Hari Reddi (Univ. of California Davis)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/6-14/3/10
Ronald D. G. McKay (NIH)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/5-14/3/10
Jakie Duke (Univ. of Texas)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/5-14/3/10
張 明喆 (韓国、群山大学校、教 授)	国際シンポジウム (BMTE) にて講演	物質・材料研究機構	14/3/5-14/3/10
張 明喆 (韓国、群山大学校、教 授)	日本機械学会国際シ ンポジウム参加	物質・材料研究機構	14/9/27-14/9/29
Dominic Walsh (Univ. of Bristol)	共同研究	物質・材料研究機構	14/9/25-14/11/5

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内6件、海外70件)

1. Mutsuzaki H, Sakane M, Ito A, Nakajima H, Hattori S, Miyanaga Y, Tanaka J, Ochiai N, "The interaction between osteoclast-like cells and osteoblasts mediated by nanophase calcium phosphate-hybridized tendons", *BIOMATERIALS* 26 (9): 1027-1034 2005
2. Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Matumoto HN, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, "Development of a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite for medical use" *BIO-MEDICAL MATERIALS AND ENGINEERING* 15 (1-2): 29-41 2005
3. Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, "Development of a hydroxyapatite/collagen nanocomposite as a medical device", *CELL TRANSPLANTATION* 13 (4): 451-461 2004
4. Mutsuzaki H, Sakane M, Nakajima H, Ito A, Hattori S, Miyanaga Y, Ochiai N, Tanaka J, "Calcium-phosphate-hybridized tendon directly promotes regeneration of tendon-bone insertion" *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A* 70A (2): 319-327 2004
5. Itoh S, Uyeda A, Hukuoka Y, Fujimori KE, Matsuda A, Ichinose S, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J, Taguchi T, "Muscle-specific protein MDP77 specifically promotes motor nerve regeneration in rats", *NEUROSCIENCE LETTERS* 360 (3): 175-177 APR 29 2004
6. Azuma N, Ikoma T, Osaka A, Tanaka J, "Effects of hyaluronic acid on the rheological properties of zinc carboxylate gels", *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-BIOMIMETIC AND SUPRAMOLECULAR SYSTEMS* 24 (6-8): 703-707 2004
7. Azuma N, Ikoma T, Osaka A, Tanaka J, "Novel hydrogels composed of malic acid and zinc: their synthesis and characterization", *JOURNAL OF NON-CRYSTALLINE SOLIDS* 342 (1-3): 125-131 2004
8. Kikuchi M, Ikoma T, Itoh S, Matsumoto HN, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, "Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen", *COMPOSITES SCIENCE AND TECHNOLOGY* 64 (6): 819-825 2004
9. Ikoma T, Azuma N, Tanaka J, "Preparation of hydroxyapatite/chondroitin sulfate nanocomposite and its spherical porous microparticle", *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 29 (6):2911-2914 2004
10. Itoh S, Tomioka H, Tanaka J, et al. "Relationship between bone mineral density of the distal radius and ulna and fracture characteristics" *JOURNAL OF HAND SURGERY-AMERICAN VOLUME* 29A (1): 123-130 2004
11. Azuma N, Ikoma T, Osaka A, Tanaka J, "Novel hydrogels of malic acid and zinc; syntehsis and characterization", *Transactions of the Materials Research Soeciety of Japan*, 29 (6): 2901-2904 2004
12. Miyaki S, Tezuka K, Ushida T, Akimoto T, Akaogi H, Kitamura T, Miyanaga Y, Tanaka J, Ochiai N, Tateishi T, "Identification of membrane and secreted proteins in anterior cruciate ligament derived cells using "signal-sequence-trap", a retrovirus-mediated expression screening method" *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-BIOMIMETIC AND SUPRAMOLECULAR SYSTEMS* 24 (3): 397-401 2004
13. Kikuchi M, Ikoma T, Syoji D, Matsumoto HN, Koyama Y, Itoh S, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, "Porous body preparation of hydroxyapatite/colliagen nanocomposites for bone tissue regeneration", *KEY ENGINEERING MATERIALS* 254-2: 561-564 2004
14. Sotome S, Uemura T, Kikuchi M, Chen J, Itoh S, Tanaka J, Tateishi T, Shinomiya K, "Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen-alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein" *MATERIALS SCIENCE & ENGINEERING C-BIOMIMETIC AND SUPRAMOLECULAR SYSTEMS* 24 (3): 341-347 2004
15. Kikuchi M, Matsumoto HN, Yamada T, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J, "Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites", *BIOMATERIALS* 25 (1): 63-69 2004

16. Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S, "Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*", *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES* 32 (3-5): 199-204 2003
17. Walsh D, Arcelli L, Ikoma T, Tanaka J, Mann S, "Dextran templating for the synthesis of metallic and metal oxide sponges", *NATURE MATERIALS* 2 (6): 386-U5 2003
18. Wang YC, Uemura T, Dong R, Kojima H, Tanaka J, Tateishi T, "Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials", *TISSUE ENGINEERING* 9 (6): 1205-1214 2003
19. Yamaguchi I, Kogure T, Sakane M, Tanaka S, Osaka A, Tanaka J, "Microstructure analysis of calcium phosphate formed in tendon" *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE* 14 (10): 883-889 2003
20. Matsuda A, Furuzono T, Walsh D, Kishida A, Tanaka J, "Surface modification of a porous hydroxyapatite to promote bonded polymer coatings" *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE* 14 (11): 973-978 NOV 2003
21. Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J, "Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube", *ARTIFICIAL ORGANS* 27 (12): 1079-1088 2003
22. Furukawa KS, Suenaga H, Toita K, Numata A, Tanaka J, Ushida T, Sakai Y, Tateishi T, "Rapid and large-scale formation of chondrocyte aggregates by rotational culture", *CELL TRANSPLANTATION* 12 (5): 475-479 2003
23. Suzuki M, Itoh S, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J, "Tendon chitosan tubes covalently coupled with synthesized laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo" *JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH* 72 (5): 646-659 2003
24. Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S, "Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*", *JOURNAL OF STRUCTURAL BIOLOGY* 142 (3): 327-333 JUN 2003
25. Yamaguchi I, Itoh S, Suzuki M, Osaka A, Tanaka J, "The chitosan prepared from crab tendons: II. The chitosan/apatite composites and their application to nerve regeneration", *BIOMATERIALS* 24 (19): 3285-3292 2003
26. Furuzono T, Wang PL, Korematsu A, Miyazaki K, Oido-Mori M, Kowashi Y, Ohura K, Tanaka J, Kishida A, "Physical and biological evaluations of sintered hydroxyapatite/silicone composite with covalent bonding for a percutaneous implant material" *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS* 65B (2): 217-226 2003
27. Kikuchi M, Itoh S, Matsumoto HN, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, "Fibrillogenesis of hydroxyapatite/collagen self-organized composites", *KEY ENGINEERING MATERIALS* 240-2: 567-570 2003
28. Uemura T, Dong J, Wang YC, Kojima H, Saito T, Iejima D, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T, "Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques", *BIOMATERIALS* 24 (13): 2277-2286 2003
29. Yamaguchi I, Itoh S, Suzuki M, Sakane M, Osaka A, Tanaka J, "The chitosan prepared from crab tendon I: the characterization and the mechanical properties", *BIOMATERIALS* 24 (12): 2031-2036 2003
30. Itoh S, Yamaguchi I, Suzuki M, Ichinose S, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J, "Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo", *BRAIN RESEARCH* 993 (1-2): 111-123 2003
31. Yamaguchi I, Iizuka S, Osaka A, Monma H, Tanaka J, "The effect of citric acid addition on chitosan/hydroxyapatite composites", *COLLOIDS AND SURFACES A-PHYSICO-CHEMICAL AND ENGINEERING ASPECTS* 214 (1-3): 111-118 2003
32. Sato K, Kogure T, Iwai H, Tanaka J, "Atomic-scale {1010} interfacial structure in hydroxyapatite determined by high-resolution transmission electron microscopy", *JOURNAL OF THE AMERICAN CERAMIC SOCIETY* 85 (12): 3054-3058 2002
33. Uemura T, Dong J, Yoshikawa T, Hakamatsuka Y, Irie H, Inoue H, Tateishi T, "Allogenic transplantation of cultured bone/porous beta-TCP materials construct", *KEY ENGINEERING MATERIALS* 218-2: 253-256 2002

34. Sonoda K, Furuzono T, Walsh D, Sato K, Tanaka J, "Influence of emulsion on crystal growth of hydroxyapatite", *SOLID STATE IONICS* 151 (1-4): 321-327 2002
35. Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Miyairi H, Shirahama N, Tanaka J, "In vitro change in mechanical-strength of beta-tricalcium phosphate/copolymerized poly-L-lactide composites and their application for guided bone regeneration", *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH* 62 (2): 265-272 2002
36. Chang MC, Ikoma T, Kikuchi M, Tanaka J, "The cross-linkage effect of hydroxyapatite/collagen nanocomposites on a self-organization phenomenon", *JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE-MATERIALS IN MEDICINE* 13 (10): 993-997 2002
37. Uemura T, Lee M, Dong J, Kojima H, Iejima D, Yoshikawa T, Ryoo H, Wang P, Tateishi T, "Effect of immunosuppressant FK506 on osteoblast differentiation and its application to bone tissue engineering", *BONE* 30 (3): C52 Suppl. S 2002
38. Dong J, Uemura T, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T, "Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells", *BIO-MEDICAL MATERIALS AND ENGINEERING* 12 (2): 203-209 2002
39. Kojima H, Nemoto A, Uemura T, Honma R, Ogura M, Liu YK, "Study of expression of rDRAK1 - A novel kinase related to apoptosis - In active osteoclasts and its role in osteoclast apoptosis", *BONE* 30 (3): C70 Suppl. S 2002
40. Yamaguchi I, Sakane M, Osaka A, Tanaka J, "Hydroxyapatite formed on the aligned chitosan prepared from crab tendon", *KEY ENGINEERING MATERIALS* 218-2: 13-16 2002
41. Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, "Development of an artificial vertebral body using a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen composite", *BIOMATERIALS* 23 (19): 3919-3926 2002
42. Sotome S, Uemura T, Kikuchi M, Itoh S, Tanaka J, Takahashi M, Tateishi T, Shinomiya K, "In vitro evaluation of highly absorptive ceramics materials needs consideration of calcium and magnesium ions adsorbed to the materials", *KEY ENGINEERING MATERIALS* 218-2: 153-156 2002
43. Itoh S, Kikuchi M, Takakuda K, Nagaoka K, Koyama Y, Tanaka J, Shinomiya K, "Implantation study of a novel hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite into weight-bearing sites of dogs", *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH* 63 (5): 507-515 2002
44. Kojima H, Nemoto A, Uemura T, Honma R, Ogura M, Liu YK, "rDRAK1, a novel kinase related to apoptosis, is strongly expressed in active osteoclasts and induces apoptosis", *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 276 (22): 19238-19243 2001
45. Furukawa KS, Ushida T, Sakai Y, Suzuki M, Tanaka J, Tateishi T, "Formation of human fibroblast aggregates (spheroids) by rotational culture", *CELL TRANSPLANTATION* 10 (4-5): 441-445 2001
46. Uemura T, Lee M, Dong J, Kojima H, Iejima D, Yoshikawa T, Ryoo H, Wang P, Tateishi T, "The role of immunosuppressant FK506 on osteoblast differentiation and its application to tissue engineering in bone" *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* 16: S495-S495 Suppl. 2001
47. Sato K, Kogure T, Kumagai Y, Tanaka J, "Crystal orientation of hydroxyapatite induced by ordered carboxyl groups", *JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE* 240 (1): 133-138 2001
48. Kojima H, Uemura T, Nemoto A, Honma R, Ogura M, Liu Y, "rDRAK1, a novel kinase related to apoptosis, is expressed in osteoclasts and induces apoptosis." *JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH* 16: S384-S384 Suppl. 2001
49. Ikoma T, Muneta T, Tanaka J, "Fabrication and animal experiment of nanocomposites of hydroxyapatite collagen and polysaccharides", *KEY ENGINEERING MATERIALS* 192-1: 487-490 2000

その他27件

(2) 口頭発表

①招待、口頭講演 (国内 97 件、海外 38 件)

1. Sakane M, Mutsuzaki H, Miyanaga Y, Tanaka J, Ochiai N, “Nano-Composites of Calcium Phosphate-Collagen Promote Osteoclast: Biological Graft Fixation Technique in the ACL Reconstruction”, 11th ESSKA Congress & 4th World Congress on Sports TRAUMA (H16.5.6) Greece
2. Sakane M, Mutsuzaki H, Miyanaga Y, Tanaka J, Ochiai N, “Nano-Composites of Calcium Phosphate-Collagen Promote Osteoclast: Growth at the interface between implanted tendons and bone tunnels in knee ligament reconstruction”, 7th World Biomaterials Congress (H16.5.19) Australia
3. Kogure T, Sakano Y, Miyawaki R, “New interlayer structure of mica found in Aspidolite, the Na analogue of phlogopite”, 32nd International Geological Congress (H16.8.22) Italy
4. Kogure T, “New interlayer structure of mica found in Aspidolite, the Na analogue of phlogopite”, 22nd European Crystallographic Meeting (H16.8.28) Hungary
5. Itoh S, Shinomiya K, Yamaguchi I, Kobayashi H, Tanaka J, “The Triangular Chitosan Tubes Coated with HAp and Coupled with Laminin Peptides Enhance Nerve Regeneration in vivo”, The II.Congress of the World Society for Reconstructive Microsurgery, Heidelberg/Germany (H15.6.12) German
6. Kikuchi M, Itoh S, Shinomiya K, Tanaka J, “Long Fiber Formation of Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposites through a Self-Organization Mechanism”, The 5th International Conference on Intelligent Materials (H15.6.15), USA
7. Kikuchi M, Ikoma T, Shoji D, Matsumoto HN, Koyama Y, Itoh S, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J, “Porous body preparation of Hydroxyapatite/collagen nano-composites for bone tissue regeneration”, 16th International Symposium on Ceramics in Medicine(H15.11.7) Portugal
8. Ozaki N, Kogure T, Tanaka J, “Crystal orientation of coccoliths of coccolithophore”, Mineralogical Society of America Biomineralization Short Course (H15.12.6) USA
9. Sakane M, Mutsuzaki H, Tanaka J, Miyanaga Y, Ochiai N., “Microstructure of Calcium Phosphate Hybridized tendon-bone interface: Biological tendon fixation in the ACL Reconstruction”, Fourth International Symposium on Ligaments And Tendons (H16.3.6) USA
10. Uemura T., Nemoto A., R.Honma, Y-K,Liu, “DD-PCR Study of Rabbit Osteoclasts Cultured on Ivory”, The 8th Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease(2001.4.1~4.4) Switzerland
11. Uemura T., Nemoto A., “Hypergravity Effects on Activity of Osteoclasts Cultured on Ivory”, The 8th Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease (2001.4.1~4.4) Switzerland
12. Furuzono T., Kishida A., Sonoda K., Tanaka J., “A novel hydroxyapatite coating method on a polymer substrate by covalent linkage”, Society for Biomaterials, 27th Annual Meeting & Exposition 2001.4.29 USA
13. T. Uemura, J.Don, H.Kojima, J. Tanaka, M. Kikuchi, T. Yoshikawa, H.Yamazaki, “In VIVO Osteogenic Potential of Bone Marrow Derived Osteoblasts in Artificial Porous Hydroxyapatite”, 28th European Symposium on Calcified Tissues 2001.6.6 ~6.10 Spain
14. T. Uemura, A. Nemoto, R.Honma, Y-K,Liu, “Cloning of Specific Genes Expressed in Osteoclasts on Ivory”, 28th European Symposium on Calcified Tissues 2001.6.6 Spain
15. S. Takashi, H. Simojo, Y. Miyanaga, M. Sakane, J. Tanaka, “Novel Approach to Enhance Graft-Healing in Bone Tunnel: Intra-operative Calcium Phosphate Coating”, The American Orthopaedic Society for Sports Medicine 27th Annual Meeting 2001.7.1 USA

16. T. Tateishi, T. Ushida, C. Guoping, "Cartilage Engineering Using Biodegradable Hybrid Scaffolds", 5th ASIAN SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL MATERIALS 2001.12.11
17. T. Tateishi, T. Ushida, C. Guoping, T. Tamaki, "Porous Hydroxyapatite Beads Hybridized With Biodegradable Synthetic Polymers for Bone Tissue Engineering", 5th ASIAN SYMPOSIUM ON BIOMEDICAL MATERIALS 2001.12.11
18. S. Miyaki "Identification of membrane and secreted proteins in anterior cruciate ligament-derived cells using signal-sequence-trap, a retrovirus-mediated expression screening method", 48th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2002.2.10-11 USA
19. S. Itoh, K. Sinomiya, Y. Koyama, H. Matsumoto, K. Tanakuda, M. Kikuchi, J. Tanaka, "Development of artificial vertebra body using Hydroxyapatite/collagen", Orthopaedic Research Society 48th Annual Meeting 2002.2.10-13 USA
20. S. Itoh, K. Shinomiya, M. Suzuki, S. Hata, Y. Yamaguchi, J. Tanaka, "An Experimental Study on Nerve Regeneration Using A Novel Biomaterial, Chitosan Tube", ASIAN-PACIFIC FEDERATION OF SOCIETIES FOR SURGERY OF THE HAND The 4th International Congress 2002.3.3-6 Korea
21. M. Suzuki, "An Experimental Study on Nerve Regeneration Using A Novel Biomaterial, Chitosan Tube", ASIAN-PACIFIC FEDERATION OF SOCIETIES FOR SURGERY OF THE HAND The 4th International Congress 2002.3.3-6 Korea
22. Sakane M, Miyanaga Y, Shimojo H, Tanaka S, Yamaguchi I, Tateishi T, Tanaka J., "Hydroxyapatite Coating on/in the Tendon", International Symposium on Ligament and Tendon 2000.3.11 USA
23. T. Uemura, A. Nemoto, "Hypergravity Effect on Activity of Osteoclasts Cultured on Ivory", 8th Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease 2000.4.3 Swiss
24. T. Uemura, R. Honma, A. Nemoto, Yin-kun Liu, "DD-PCR study of rabbit osteoclasts cultured on ivory", 8th Workshop on Cell Biology of Bone and Cartilage in Health and Disease, 2000.4.3 Swiss
25. M. Kikuchi, J. Tanaka, S. Itho, "Biomimetic synthesis and bone tissue reaction of self-organized hydroxyapatite/collagen composites", 6th World Biomaterials Conference 2000.5.20 Hawaii
26. Furukawa K, Ushida T, Tateishi T, H. Sugano, N. Ohshima, T. Tamaki, "Effect of shear stress on platelet adhesions to materials with various wettability", American Society for Artificial International Organs, 46th Annual Conference (2000.6.30) USA
27. Furukawa K, Ushida T, Tateishi T, T. Nagase, H. Nakamigawa, T. Noguchi, T. Tamaki, "Quantitative analysis of cell detachment by cone and plate-type rheometer", American Society for Artificial International Organs, 46th Annual Conference (2000.7.1) USA
28. Itoh S, Kawachi T, Shinomiya K, Takakuda K, Koyama Y, Kikuchi M, Tanaka J, "A Study on a Novel Biomaterial Hydroxyapatite/Composite Implantation into Bone Defect of Tibia", The 7th Meeting of the International Society for Fracture Repair (2000.9.20-23) Hong Kong
29. Ikoma T, Tanaka J, Muneta T, "Fabrication and Animal Experiment of Nanocomposites of Hydroxyapatite, Collagen and Polysaccharides", 13th International Symposium on Ceramics in Medicine (2000.11.22) Italy
30. Ikoma T, Tanaka J, Kubo Y, Yamazaki A, Akao M, "Effect of Carbonate Contents on Crystal Structure of A-Type Carbonate Apatites", 13th International Symposium on Ceramics in Medicine (2000.11.22) Italy
31. Sato K, Kumagai Y, Ikoma T, Tanaka J, Kogure T, "Atomic Scale Interfacial Structure of Hydroxyapatite Observed with High Resolution Transmission Electron Microscopy", 13th International Symposium on Ceramics in Medicine (2000.11.24) Italy
32. Yamaguchi I, Fukuzaki H, Watakuchi K, Monma H, Koyama Y, Takakuda K, Tanaka J, "The Preparation and Microstructure Analysis of Chitosan

- /Hydroxyapatite Nanocomposites”, *BIOCERAMICS* 13 (2000.11.22-26) Italy
33. Tanaka S, Miyanaga Y, Sakane M, Tanaka J, Yamaguchi I, Kato K, Tateishi T, “Apatite Coating in / on Rabbit Tendons Using an Alternate Soaking Process”, *BIOCERAMICS* 13 (2000.11.22-26) Italy
 34. Sato K, Ikoma T, Kumagai Y, Tanaka J, Kogure T, “Atomic Scale Interfacial Structure of Hydroxyapatite: High-resolution Transmission Electron Microscopy”, The 2000 Fall Materials Research Society Meeting(2000,11,27)USA
 35. Ikoma T, Tanaka J, “The synthesis of Hydroxyapatite / Polysaccharides Nanocomposites Self-Organization Mechanism”, The 2000 Fall Materials Research Society Meeting(2000,11,30)USA
 36. Sakai K, Ushida T, Tateishi T, Yasuyuki Sakai, Motoyuki Suzuki, Tanaka J, “Novel dermal grafts composed of human fibroblasts-Aggregates form by rotational culture”, Tissue Engineering Society International Meeting(2000.12.3)USA
 37. Itoh S, Takakuda K, Kawachi T, Shinomiya K, Koyama Y, Tanaka J, Kikuchi M, Nagaoka K, “A Study on Implantation of a Novel Biomaterial, Hydroxyapatite/Collagen Composite into The Weight-Bearing Site”, Orthopaedic Research Society 47th Annual Meeting(2001.2.25)USA
 38. Sakane M, Yamaguchi I, Tanaka S, Shimojo H, Sato Takashi, Ochiai Naoyuki, Wadano Y, Tateishi T, Tanaka J, “Intraoperative Hydroxyapatite Coating on / in the Tendons”, Orthopaedic Research Society 47th Annual Meeting(2001,2,25)USA
 39. 岡田正弘、古菌勉、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、「経皮デバイスを目指したナノサイズアパタイト粒子の高分子基板上への吸着・結合挙動」、第53回高分子討論会 (H16. 9. 16) 北海道
 40. 六崎裕高、「リン酸カルシウム複合化腱は破骨細胞と骨芽細胞を刺激し骨と直接固着する」、第19回日本整形外科学会基礎学術集会 (H16. 10. 21) 東京
 41. 古菌勉、岡田正弘、安田昌司、田中順三、岸田晶夫、「長期留置可能なボタン型経皮デバイスの作製」、第42回日本人工臓器学会大会 (H16. 10. 6) 東京
 42. 岡田正弘、古菌勉「一次粒子で分散可能なハイドロキシアパタイト焼結体粒子の作製」、第8回生体関連セラミックス討論会 (H16. 12. 3) 東京
 43. 東紀史、生駒俊之、尾坂明義、田中順三、「低分子有機酸と亜鉛を用いたハイドロゲルの合成と特性」、第52回高分子討論会 (H15. 9. 25) 徳島
 44. Dominic Walsh, Laura Arcelli, 生駒俊之、田中順三、Stephen Mann, “Soft templating of metallic and metal oxide porous sponges using sacrificial dextran-based composites”, IUMRS-ICAM 2003(H15. 10. 12) 神奈川
 45. 菊池正紀、生駒俊之、早乙女進一、庄司大助、小山富久、伊藤聰一郎、高久田和夫、四宮謙一、田中順三、“Fabrication of porous body using HAp/Col nanocomposite and its biological reaction”, 第20回日韓国際セラミックスセミナー (H15. 11. 21) 島根
 46. 植村寿公、小島弘子、Wang Yichao, Jian Dong, 田中順三、「骨髓細胞を用いた骨再生の促進化技術」、第8回つくば医療産業懇談会、第10回つくばバイオマテリアル研究会 (H15. 11. 19) 茨城
 47. 六崎裕高、坂根正孝、宮永豊、中島弘美、田中順三、「リン酸カルシウム複合化腱の骨孔内移植後の微細構造」、回7回生体関連セラミックス討論会 (H15. 12. 4) 東京
 48. 菊池正紀、生駒俊之、庄司大助、早乙女進一、松本裕子、小山富久、高久田和夫、伊藤聰一郎、四宮謙一、田中順三、「人工細胞外マトリックス：アパタイト/コラーゲンナノ複合体の作製」、第25回日本バイオマテリアル学会 (H15. 12. 16) 大阪
 49. 伊藤聰一郎、四宮謙一、湯川佳宣、鈴木博之、代田雅彦、田中順三、「骨

電気刺激癒合促進装置1CCEFで治療した骨癒合遷延2症例」、第31回日本生体電気刺激研究会(H15.3.6) 鹿児島

50. 山口勇、鈴木真澄、伊藤聡一郎、田中順三、「カニの腱由来キトサンチューブ-神経再建材料-」、H14繊維学会年次大会(H14.5.23) 東京

他85件

②ポスター発表 (国内 50 件、海外 5 件)

1. 熊谷友里、佐藤公泰、小暮敏博、渡利広司、田中順三、“Interactions at the hetero-interfaces Of hydroxyapatite and organic matrices”、第16回 DV-X α 研究会(H15.8.6) 茨城
2. 尾崎紀昭、小暮敏博、田中順三、“Crystal orientation of calcite Components in coccoliths:EBSD Analyses of submicron crystals”、Goldschmidt Conference 2003 (H15.9.9) 岡山
3. Dominic Walsh、Laura Arcelli、生駒俊之、田中順三、Stephen Mann、“金属・金属酸化物系多孔質材料の新合成法”、NIMS フォーラム 2003 (H15.11.21) 東京
4. Azuma N, Ikoma T, Osaka A, Tanaka J, “Novel malic acid-zinc hydrogels”、MRS Fall Meeting (H15,12,3) USA
5. Sakane M, Mutsuzaki H, Nakajima H, Hattori S, Watanabe Y, Miyanaga Y, Ochiai N, Tanaka J, “The Calcium Phosphate Hybridization Method Results in the Regeneration of a Direct Insertion at the Tendon-Bone Tunnel Interface”、50th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (H15.3.7) USA
6. Mutsuzaki H, “Development of an Intra-operative Automatic Apparatus for Calcium Phosphate Coating in the Human Anterior Cruciate Ligament Graft”、2003 ISAKOS Congress (H15.3.11) NewZealand
7. Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Shinomiya K, Takakuda K, Tanaka J, “Development of a Nerve Scaffold Using a Tendon Chitosan Tube”、Orthopaedic Research Society 49th Annual Meeting (H15,2,2) USA
8. Ozaki N, Nagasawa H, Kogure T, Tanaka J, “A Novel Acidic Polysaccharide from Coccolith”、Gordon Research Conference, Biomineralization Colby-Sawyer (H14.8.11) USA

他47件

(3)特許出願 (国内 17 件、海外 11 件)

①国内

発明者：田中順三、古菌勉

発明の名称：ハイドロキシアパタイトナノ粒子の製造方法

出願番号：00-333638

出願日：2000/10/31

発明者：田中順三、田口哲志、宮崎匡輔、佐倉義幸、大塚龍郎、萬代佳宣

発明の名称：組織再生マトリックス用グリコサミノグリカン-ポリカチオン複合体とその製造方法

出願番号：00-273187

出願日：2000/9/8

発明者：田中順三、坂根正孝、福崎裕延、横山能周、太田邦博、菊池正紀、
生駒俊之、山口勇
発明の名称：生体組織材料を処理する交互侵漬装置および交互侵漬方法
出願番号：01-17694
出願日：2001/1/25

発明者：四宮謙一、伊藤聰一郎、田中順三、菊池正紀
発明の名称：人工錐体
出願番号：01-49493
出願日：2001/2/23

発明者：山口勇、田口哲志、田中順三、福崎裕延、四宮謙一、伊藤聰一郎、
岡洋一
発明の名称：神経再建生体材料およびその製造方法
出願番号：01-180789
出願日：2001/6/14

発明者：田中順三、田口哲志、宮崎匡輔、佐倉義幸、大塚龍郎、萬代佳宣
発明の名称：多官能性架橋剤によって架橋したグリコサミノグリカン-ポリカチ
オン複合体とその製造方法
出願番号：01-250856
出願日：2001/8/21

発明者：早乙女進一、植村寿公、田中順三
発明の名称：生体内薬物徐放材料
出願番号：01-262476
出願日：2001/8/30

発明者：早乙女進一、植村寿公、田中順三、菊池正紀
発明の名称：複合生体材料
出願番号：01-328167
出願日：2001/10/25

発明者：菊池正紀、田中順三、萬代佳宣、伊藤典一
発明の名称：複合生体材料の生分解性制御
出願番号：02-65831
出願日：2002/3/11

発明者：田中順三、菊池正紀、伊藤典一、萬代佳宣
発明の名称：有機無機複合生体材料およびその製造方法
出願番号：02-65778
出願日：2002/3/13

発明者：田中順三、田口哲志
発明の名称：硬組織-軟組織界面再生用足場材料
出願番号：02-168588
出願日：2002/6/10

発明者：菊池正紀、田中順三、萬代佳宣、伊藤典一、松本裕子、小山富久

高久田和夫

発明の名称：骨増生剤および骨粗しょう症治療剤

出願番号：02-138989

出願日：2002/5/14

発明者：田中順三、生駒俊之、東紀史

発明の名称：リンゴ酸ハイドロゲル

出願番号：03-050589

出願日：2003/2/27

発明者：田中順三、生駒俊之、田口哲志

発明の名称：金属イオンで一部置換または表面担持されたリン酸カルシウム
多孔質球形粒子とリン酸カルシウム多孔質多層球形粒子

出願番号：03-299362

出願日：2003/8/22

発明者：古菌勉、田中順三、岸田晶夫、安田昌司

発明の名称：板状リン酸カルシウムおよび製造方法ならびにそれを用いた
医療用材料およびリン酸カルシウム複合体

出願番号：03-307549

出願日：2003/8/29

発明者：古菌勉、岸田晶夫、田中順三、安田昌司、吉山昌宏、糸田俊之、
土居潤一

発明の名称：象牙質知覚過敏治療剤

出願番号：04-11842

出願日：2004/4/13

発明者：木田尚子、植村寿公、田中順三、大藪淑美

発明の名称：擬似小重力環境下での骨髄細胞を用いた3次元軟骨組織構築方法

出願番号：04-096686

出願日：2004/3/29

②海外

発明者：四宮謙一、伊藤聰一郎、田中順三、菊池正紀

発明の名称：人工錐体

出願日：2002/2/20

発明者：Dominic Walsh, Laura Arcelli, 生駒俊之、田中順三、
Stephen Mann

発明の名称：触媒材料としての多孔質銀スポンジの簡便な合成法

出願日：2002/12/17

発明者：田中順三、田口哲志、宮崎匡輔、佐倉義幸、大塚龍郎、萬代佳宣

発明の名称：多官能性架橋剤によって架橋したグリコサミノグリカン-ポリカチ
オン複合体とその製造方法

出願日：2002/7/31

発明者：田中順三、菊池正紀、伊藤典一、萬代佳宣

発明の名称：有機無機複合生体材料およびその製造方法
出願日：2002/9/19

発明者：早乙女進一、植村寿公、田中順三
発明の名称：生体内薬物徐放材料
出願日：2002/8/14

発明者：早乙女進一、植村寿公、田中順三、菊池正紀
発明の名称：複合生体材料
出願日：2002/9/27

発明者：早乙女進一、植村寿公、田中順三、菊池正紀、四宮謙一、伊藤聰一郎、
立石哲也
発明の名称：多孔質複合材料の製造方法
出願日：2002/5/1

発明者：山口勇、田口哲志、田中順三、福崎裕延、四宮謙一、伊藤聰一郎、
岡洋一
発明の名称：神経再建生体材料およびその製造方法
出願日：2002/6/12

発明者：菊池正紀、田中順三、萬代佳宣、伊藤典一、松本裕子、小山富久、高久
田和夫
発明の名称：複合生体材料の生分解性制御
出願日：2002/8/19

発明者：田中順三、坂根正孝、福崎裕延、横山能周、太田邦博、菊池正紀、
生駒俊之、山口勇
発明の名称：生体組織材料を処理する交互侵漬装置および交互侵漬方法
出願日：2002/7/25

発明者：田中順三、田口哲志
発明の名称：硬組織-軟組織界面再生用足場材料
出願日：2003/5/2

(4) 新聞報道等

① 新聞報道

骨再建等 9件（毎日・日刊工業（2001.10.3）、日本経済（2002.5.17））
靱帯再建等 7件（日本経済・読売・毎日（2001.8.29）、科学（2001.9.14））
神経再建 2件（日本産業（2001.9.14）、日本経済（2002.2.4））
経皮デバイス 3件（日経産業新聞（2001.11.20））等

② 受賞

- 第44回日本手の外科学会賞，若林良明、伊藤聰一郎、四宮謙一、植田淳子、
田口隆久除 神経筋由来神経突起伸長因子の末梢神経再生に及ぼす影響に
ついて，2001.
- 第11回インテリジェント材料シンポジウム(2002) 高木賞 生駒俊之、東

(5) その他特記事項

本研究からは、ペンタックス株式会社と共同で人工骨の科学技術進行機構の委託開発研究事業につなげた。これに伴い、実施許諾実施を行った。また、靱帯再建に関しては筑波大学で全臨床試験を開始している。

7. 結び

本プロジェクトは12の研究機関および企業と相互に緊密な関係を保ちつつ、骨・軟骨・靭帯腱・神経組織の再建のための研究を行ってきた。医学・工学・企業の各機関の特徴を最大限に生かして研究を分担し、医学応用に向けて研究の達成度はかなり高いと自負している。骨・靭帯腱の再建材料に関しては、前臨床まで研究が進み、現在、企業と実用化について検討を進めている。近い将来臨床応用に展開すると期待され、成果の意義は極めて大きい。一方、軟骨・神経の再生では、医学応用に関する基礎知見の蓄積し、今後、臨床応用に向けて材料の最適化と医学術式の検討を行っていきたいと考えている。

