

「分子複合系の構築と機能」  
平成11年度採択研究代表者

田中 順三

(物質・材料研究機構 主幹研究員)

## 「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」

### 1. 研究実施の概要

細胞の時系列にしたがった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を化学的相互作用によるナノ領域からの自己組織化過程として捉えて研究を行っている。特に、「自己組織化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捉え、さらに人為的な化学結合を導入して高分子/無機ナノ結晶系からなる新規ナノコンポジットの創出を目指している。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・靭帯再建用材料の開発・生体における特性評価を行なう。これまでにコラーゲン繊維に対してアパタイトのc軸が整列した300 $\mu$ mの自己組織化体を作製し、骨単位に類似した構造体を得ている。また、コラーゲン間に架橋を導入する事でより骨に近い強度をもった複合体の創出をしている。今後、架橋・有機官能基と無機イオンの相互作用を制御することが必要とされている。生体中での材料の組織学的特性は骨芽細胞・破骨細胞といった骨を溶かし、再生させる細胞の増殖が確認されている。

### 2. 研究実施内容

無機ナノ結晶・高分子系による自己組織化現象を捉えるには、「無機ナノ結晶の表面構造」・「有機単分子膜を用いた水酸アパタイト (HAp,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) の核形成モデル実験」により、基礎的知見を明らかにし、HApナノ結晶と高分子中の有機官能基 (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -SO<sub>3</sub>, -OH) との表面修飾による配位結合 (イオン/共有結合の競合・協調) を導入した高次に自己組織化した複合体の創出を目的とする。また、創出した材料の生物学的特性・反応性を明らかにする。

HAP微結晶がタンパク質・多糖類分子鎖に沿って自己組織化的に整列する現象は、有機官能基であるカルボキシル基がHAp核形成の場となることにより生じている。このため表面構造 (最安定終端構造) に関して高分解能電子顕微鏡 (HRTEM) を用いた直接観察を行った。図1に観察結果を示す。これより水酸アパタイトの最も安定な終端構造は、{100}面であることが分かった。さらに疑似体液 (SBF) 組成

を変化させ、有機薄膜(Langmuir-Blodgett膜)上にHApの結晶成長を行った。Ca濃度の増大と共にHApの大きな板状結晶が形成される。SBF溶液中のCa濃度を2倍以上にすると自己沈殿により、HAp結晶は小さくなった。得られた板状結晶はやはり一組の{100}面が成長し、c軸が基板に垂直に配向している事が明らかとなった。

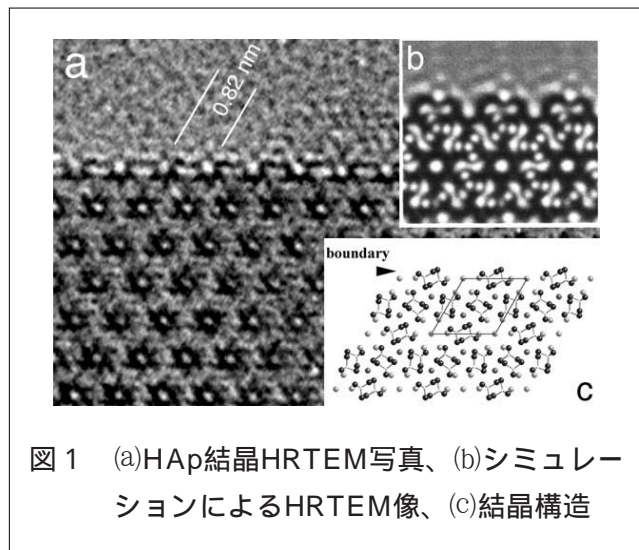


図1 (a)HAp結晶HRTEM写真、(b)シミュレーションによるHRTEM像、(c)結晶構造

自己組織化させたHAp/Col複合体(未架橋体)及び架橋導入した複合体(架橋体)の早期生体内挙動(3日~4週後)に関する組織学的観察を行った。8週齢オスSD系ラットの脛骨骨幹部外側に埋め込んだ。図2に組織染色結果を示す。未架橋体は5日後に材料周囲に破骨細胞が出現し、骨代謝と同様な骨吸収が生じた。1週後には多数の破骨細胞による吸収が旺盛となるが、新生骨の形成は見られなかった。2週後には破骨細胞による材料の吸収・崩壊が進み、周囲には皮質骨様の新生骨が形成された。4週後には破骨細胞数は減少し、残存するHAp/Colの周囲に新生骨が形成されることが明らかとなった。一方、架橋体は破骨細胞による吸収・分解は受けず、

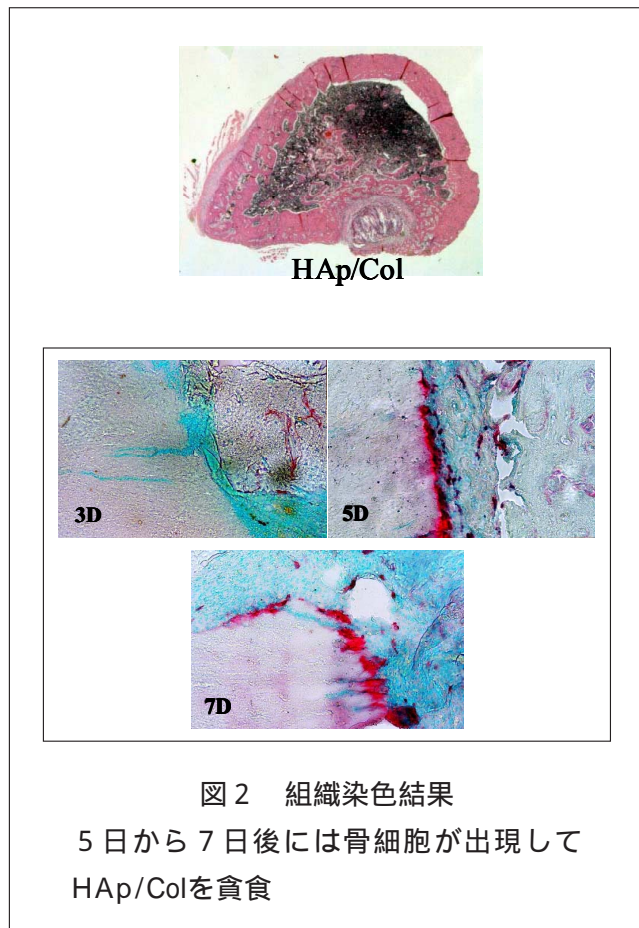


図2 組織染色結果

5日から7日後には骨細胞が出現してHAp/Colを貪食

4週後もほぼ原形のまま残存していた。これより、HAp/Col複合体が破骨細胞によって骨吸収と同様の機序で吸収されることが明らかである。この現象を利用して高度に分化した破骨細胞に遺伝子などを導入するキャリアーとして利用できると考えられる。

HAp/Col複合体は微結晶体により形成されているため、吸着有効表面積が膨大である。そのためさまざまな薬剤(増殖因子・分化誘導因子)の徐放材としての可能性を模索した。通常の培養方法では、タンパク質・イオンの吸着が多く細胞の生育を妨げた。これは主に培養液中のカルシウム・マグネシウムイオンの吸着が原因であった。成長因子である $\beta$ -FGFを吸着させて細胞の接着性・増殖能を評価したところ良好な成績を得ることができた。

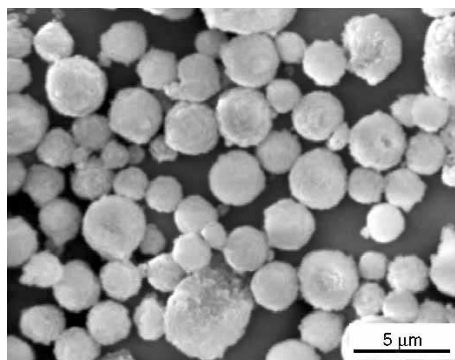


図3 HAp粒子とシリコン間に共有結合を導入した複合体のSEM像

HAp結晶と有機分子間に共有結合を導入した新規医療デバイス(機能性無機粒子)の創製を行った。直径 $2\ \mu\text{m}$ のHAp焼結体粒子表面に末端アミノ基含有シランカップリング剤を用いてアミノ基を導入した。Si-O伸縮振動が $1043\text{cm}^{-1}$ に観測(FT-IR測定)され、アミノ基がHAp表面に共有結合で導入されたことが分かる。蛍光物質を用いた官能基導入率の定量より、1分子/ $1\ \text{nm}^2$ であることが明らかとなった。シリコンの表面をコロナ放電処理にてラジカル修飾を行い、アクリル酸モノマーをグラフト重合(導入率: $16.7\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )した。アミノ基を導入したHAp粒子とカルボキシル基を導入したシリコンシート間の反応は固相反応法にて行った。両者を水溶液中に浸漬後、 $180\ ^\circ\text{C}$ ・6時間・真空下で加熱反応させ共有結合を導入した。得られた複合体の走査型電子顕微鏡像を図3に示す。複合体の外観はアパタイト粒子の表面が変化することなくシリコンに固定されており、その表面被覆率は65%と算出された。

再生医療において組織を効率よく再構築するためには、適切な培養単体に細胞を3次元的に播種する技術を確立する必要がある。そこで培養単体としてポリL乳酸(PLLA)不織布を用いた軟骨細胞懸濁液の播種方法に関するモデルの検討を行った。表面を親水処理したPLLA、未処理物及びコラーゲンコーティングしたPLLA複合体に関しては、軟骨細胞が材料内にトラップされなかった。一方、軟骨細胞を内包したコラーゲンゲルの場合には、コラーゲンゲル量に依存するもののほぼ100%の軟骨細胞がトラップされていることが明らかとなった。軟骨細胞は、材料内均一に分布していた。培養開始9日目に組織再建の指標となる細胞外マトリックスの分布を解析した結果、組織内に細胞外マトリックスが蓄積されていることが明らかとなった。これより細胞を培養単体に3次元的に播種する方法の提案ができたと考えられる。

### 3 . 主な研究成果の発表 ( 論文発表 )

Myung Chul Chang ( 大韓民国群山大 ) 田中 順三、生駒 俊之、菊池 正紀 ( 無機材研 / CREST )

“ preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a crosslinkage agent ”

• Journal of Materials Science Letters ( May 8, 2000 )

植村 寿公 ( 融合研 ) Yin-kun Liu ( 上海医科大 ) 久保木 芳徳 ( 北大歯学部 )

“ mRNA Expression of MT 1 -MMP, MMP-9, Cathepsin K and TRAP in Highly Enriched Osteoclasts Cultured on Several Matrix Proteins and Ivory Surfaces ”

• Biosci. Biotechnol.. Biochem. Vol64, No.8 ( 2000 ) ( May 1, 2000 )

山口 勇、福崎 裕延 ( 多木化学 (株) ) 渡久地 恵子、門間 英毅 ( 工学院大学 )

小山 富久、高久田 和夫 ( 東京医科歯科大 ) 田中 順三 ( 無機材研 )

“ The Preparation and Microstructure Analysis of Chitosan/ Hydroxyapatite Nanocomposites ”

• BIOCERAMICS ( July 4, 2000 )

山口 勇、福崎 裕延 ( 多木化学 (株) ) 渡久地 恵子、門間 英毅 ( 工学院大学 )

小山 富久、高久田 和夫 ( 東京医科歯科大 ) 田中 順三 ( 無機材研 )

“ Preparation and Microstructure Analysis of Chitosan/Hydroxyapatite Nanocomposites ”

• JBMR ( July 4, 2000 )

植村 寿公 ( 産業技術融合研 ) 田中 順三 ( 無機材研 )

「無機材料」

• 蛋白質 核酸 酵素 Vol.45 No.12 ( 2000 ) ( 7 / 25 )

伊藤 聡一郎、高久田 和夫、小山 富久、松本 裕子、市野瀬 志津子、河内 敏行

四宮 謙一 ( 東京医科歯科大 ) 菊池 正紀、田中 順三 ( 無機材研 )

“ Osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial ”

• Journal of Biomedical Materials Research ( August 25, 2000 )

K. Kurata, T. Murakami, H. Miura, Y. Iwamoto ( Kyushu Univ ) T. Uemura, A. Nemoto, T. Tateishi ( NAIR ) H. Higaki ( Kyushu Sangyo Univ )

“ Mechanical Strain Effect on Bone-resorbing Activity and mRNA Expressions of Marker Enzymes in Isolated Osteoclast Culture ”

• A contributed article to JBMR ( Journal of Bone and Mineral Research

( Oct 10, 2000 )

萬代 佳宣、平岡 陽介 ( 新田ゼラチン ) 菊池 正紀、田中 順三 ( 無機材研 )



- 「生体骨に近い生物特性をもつアパタイト/コラーゲン複合体製人工骨」  
 ・工業材料 (10 / 18)  
 田中 忍、下条 仁士、宮永 豊 (筑波大学) 坂根 正孝 (茨城県立医療大)  
 山口 勇、福崎 裕延 (多木化学) 田中 順三 (無機材研)
- 「腱/靭帯へのリン酸カルシウム化合物コーティング 交互浸漬法による最適複合化」  
 ・日本臨床バイオメカニクス学会誌 (12 / 18)  
 田口 哲志 (CREST) 田中 順三 (無機材研)
- “ A Novel in Situ Preparation Method of Hyaluronic Acid and Type Collagen Composite Matrices for Cartilage Regeneration ”  
 ・ Journal of Biomedical Materials Research ( December 26, 2000 )  
 古菌 勉 (国立循環器病センター) 園田 賢作 (日本油脂) 田中 順三 (無機材研)
- “ Nucleation of Hydroxyapatite on an Inert Polymer Surface by Covalent Linkage ”  
 ・ Transactions of the Materials Research Society of Japan ( December )  
 田口 哲志、佐藤 公康 (CREST) M. Akashi (九州大) T. Kurata, K. Imachi (東京大) 田中 順三 (無機材研)
- “ In vitro calcification model (2) : apatite formation on segmented polyurethane thin films by using an alternate soaking process : the effect of adsorbed serumproteins on calcification ”  
 ・ J. of Bioactive and Compatible Polymers ( February 1, 2001 )  
 田口 哲志、田中 順三 (無機材研)
- “ Covalent and Non-covalent Crosslinking of Hyaluronic Acid and Type Collagen ”  
 ・ Biomacromolecules ( February 14, 2001 )  
 佐藤 公康、熊谷 友里 (CREST) 小暮 敏博 (東大院理) 田中 順三 (無機材研)
- “ Crystal Orientation of Hydroxyapatite Induced by Ordered Carboxyl Groups ”  
 ・ Journal of Colloid and Interface Science