

「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

(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)

「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なっている。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。これまでに有機単分子膜を用いたリン酸カルシウム・炭酸カルシウムの形成過程、水酸アパタイト/コラーゲン複合体の合成と生物学的特性、配向性キトサンを用いたチューブによる神経再生の研究により生体組織誘導材料の開発を行っている。さらに硬組織周辺を自己治癒能力により再生させる材料及び技術の実用化を目指す。

2. 研究実施内容

本プロジェクトでは、(1) 無機ナノ結晶と高分子官能基との相互作用、(2) 骨組織系材料、(3) 軟骨組織系材料、(4) 神経再建材料、(5) 靭帯再建材料の合成条件の確定と自己組織化の検討を行い、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・新規細胞の足場材料の医学応用に関して検討を行った。

(1) **無機ナノ結晶と高分子官能基との相互作用**；カルボキシル基を表面に配列させた重合化有機単分子膜が炭酸カルシウムの結晶方位を制御するメカニズムを明らかにするため、霏石構造をもつ炭酸ストロンチウムでどのように結晶方位を制御するかを調べた。また天然において炭酸カルシウムの結晶方位を最も完全に制御している例として円石藻の殻(coccolith)の結晶配向を電子後方散乱回折により明らかにした。重合化有機単分子膜上に炭酸ストロンチウムを成長させたが、一定の結晶方位を持っているとは考えられないような結晶形態が観察された。またcoccolith中の炭酸カルシウム(方解石構造)は、調べた3つの種においてすべてそのa軸がcoccolithの円周方向に向いており、重合化有機単

分子膜上での炭酸カルシウムと似た構造であるという示唆的な結果が得られた。溶液からの炭酸カルシウムの結晶成長において、溶液中に添加された微量のランタン(La)イオンは、炭酸カルシウムの多形のうちバテライトの成長にはまったく影響しないがカルサイトの成長を著しく阻害し、その結晶形態は今まで見られない独特の形態となること、さらにこの形態を電子後方散乱回折で解析した結果、結晶構造中の3つのグライド面に沿って伸長したものであることを明らかにした。

炭酸カルシウム、ビス(リン酸オキサイト)(TCPM)を細砕・混合した後、反応促進剤であるリン酸二水素ナトリウム水溶液を添加した。混合物の水分蒸散速度を制御することにより、ブルッシュアイト(DCPD)とTCPMとからなる板状構造体を調製した。得られた板状構造体を一定昇温速度にて800°Cまで昇温後、同温度にて所定時間一定に保持した。得られたCaPは孔を有する板状形態を示した。孔は焼結過程により結晶化が進行し体積減少が生じたことによると推察された。また、本CaPはハイドロキシアパタイト(Hap)と β -リン酸三カルシウム(β -TCP)から構成されていた。さらにX線回折法により、焼結時間の増加に伴い β -TCP含有率が増加することが認められた。これらのことより、本板状CaPは高分子基材と共有結合できる活性基(水酸基)を有する機能性無機材料であることが明らかとなった。

(2) 骨組織系材料；これまでに開発してきた多孔質HAp/Colは崩れにくく弾力性を持っており、非常に手術時に扱いが簡便である。細胞が侵入しやすく、実質部(気孔以外の部分)の密度が高くないため、薬剤の浸透・徐放制御が簡便である。ラットの大腿骨遠位部に ϕ 3 mmの骨孔を穿ち、多孔体を移植して骨伝導能を検討した。移植した多孔体は3日後より変性、吸収され始めた。1週間には未石灰化骨(osteoid)が骨髓内に形成された。2週間後、新生骨(woven bone)が形成され、TRAP陽性の破骨細胞様細胞が変性した多孔体と新生骨表面に付着していた。4週経過すると、多孔体はほぼ骨に置換されていた。HAp/Col多孔体は移植後多数の破骨細胞が動員されて吸収され、骨芽細胞による骨形成を促進することが示唆された。

(3) 軟骨組織系材料；正常な自家軟骨細胞を生体外培養し三次元的に組織を再構築した後、損傷部位に移植する試みが臨床で始まりつつある。このような培養軟骨の臨床応用には組織形成度の評価、特に力学的側面からの評価が必要不可欠である。しかしながら培養軟骨のバイオメカニクスは発展途上の分野であり、培養軟骨組織の機械的特性は未だ明らかにされていない。そこで、細胞外マトリックスの力学特性評価モデルとしてアガロースゲル包埋培養法を用いてウシ軟骨細胞を三次元培養し、動的・静的環境下において圧縮方向の機械的特性を明らかにした。アガロース-軟骨細胞培養体の培養期間に伴う平衡凝集体弾性率の変化、動的弾性率の変化を計測したところ、平衡弾性率、動的弾性率は培養期間とともに向上したのに対し、損失正接は培養期間の増加に伴い減少する傾向にあった。次に各試料について硫酸化グリコサミノグリカンの含有量に対する平衡凝集体弾性率、動的弾性率(周波数0.01, 5.0Hz)との関係を探ったところ、各弾性率と硫酸化グリコサミノグリカンの含有量には相関関係が存在した。本モデルは圧縮特性以外の力学特性と細胞

外基質の相関関係の検討においても有効であると考えられる。さらに微小重力環境を模倣するRWV(rotating wall vessel)バイオリアクターは種々の細胞から3次元組織を構築するのに適していると考えられている。擬似微小重力環境下において間葉系幹細胞より軟骨細胞を誘導し、3次元軟骨組織の再生を試みた。ウサギ骨髄由来間葉系幹細胞より軟骨細胞の誘導に成功し、長径1.4cm程度の均一な軟骨組織塊を得ることができた。その組織塊は細胞生物学及び分子生物学的側面から、関節軟骨組織に類似する組織であることも証明された。

(4) **神経再建材料**；新規神経架橋材料としてカニの腱より配向キトサンチューブを開発してきた。熱処理による表面架橋と無機成分の表面修飾により、安定な三角形の断面を持つ中空構造を作製し、力学強度を向上するためハイドロキシアパタイト(HAp)を結合させた。ラミニンペプチド(YIGSR)の活性基を温存したままチューブに結合させるため、キトサンチューブにSH基を導入して共有結合させて、SDラットの坐骨神経に架橋移植した。キトサンチューブにYIGSRを共有結合させることにより生体適合性が向上し、HApにラミニンを吸着させたチューブとともに、組織学的にはやや劣るものの、電気生理学的には同系移植群に匹敵する神経再生効果が得られた。さらに、rhMDP77を含むI型コラーゲンをシリコンチューブに充填後ゲル化し、ラットの坐骨神経に架橋移植した。Toe Spread Indexを用いた運動機能評価では濃度依存性に機能回復が促進された。しかし、Heat Plate Testを用いた知覚機能評価では有意さがなかった。架橋形成率は濃度依存性に増加したが、再生神経の組織像や軸索の直径分布に相違はなく、再生軸索の成熟化にrhMDP77は影響しないと考えられた。一方、軸索密度と軸索占有率は濃度依存性に増加し、rhMDP77の発芽促進効果が考えられた。以上より、rhMDP77の運動神経特異的再生促進効果が示唆された。

(5) **靭帯再建材料**；CaP複合化したウサギ遊離移植腱を関節内骨孔に移植し、前十字靭帯(ACL)再建術の際の骨-腱移行部の再生過程を組織学的に評価した。成熟日本白色家兎67羽を用いた。麻酔はバルビツール酸誘導体である市販ソムノペンチル(64.8mg/ml)を0.5ml/体重kgを耳翼周縁静脈に緩やかに注射し麻酔した。左右の膝ACL再建術を行った。左膝の移植腱には、カルシウム溶液(pH 7.4: 100 mM of CaCl_2 + 30 mM of L-hisichisin)とリン酸溶液(pH 7.4: 116.4 mM NaH_2PO_4 : 128.7mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ = 15% : 85%)を交互浸漬し、CaPを複合化した。術後1日(n=3)、3日(n=10)、5日(n=10)、1週(n=10)、2週(n=10)、3週(n=10)、4週(n=10)、8週(n=2)、3ヶ月(n=2)でそれぞれ屠殺し膝腱移植部分の組織学的評価を行った。組織学的評価はHE染色、類骨染色(Goland-Yoshiki method、Villanueva bone stain)、Azan染色、Safranin-O染色、ALP染色、TRAP染色で評価した。CaP群では、術後5日-1週でTRAP陽性の多核巨細胞が移植腱表面付近に出現し、界面では骨芽細胞の増生を認めた。術後2週になると、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。術後3週では、腱圧迫部分の一部に、移植腱-軟骨層-骨移行帯が形成され、その他の部分では骨との直接固着を認めた。その後は経時的に付着部分の

成熟が進行し、術後3ヶ月では、より正常ACL付着部構造に類似した。

3. 研究実施体制

自己組織化材料研究グループ

① 研究分担グループ長：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）

② 研究項目：複合材料の合成条件の検討・医療技術応用の開発

- (1) 無機ナノ結晶と高分子官能基との相互作用
- (2) 骨組織系材料
- (3) 軟骨組織系材料
- (4) 神経再建材料
- (5) 靭帯再建材料

組織工学・医学応用研究グループ

① 研究分担グループ長：四宮謙一（東京医科歯科大学 整形外科 教授）

② 研究項目：創出した複合材料の医学応用及び臨床現場への医療技術の適用

- (1) 骨組織系材料
- (2) 軟骨組織系材料
- (3) 神経再建材料
- (4) 靭帯再建材料

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

山口勇 鈴木真澄、伊藤聡一郎 A. Osaka 田中順三	Biomaterials 24(19)3285-3292 (2003)	The chitosan prepared from crab tendon II ; Chitosan/apatite composite applied to nerve regeneration
鈴木真澄、伊藤聡一郎 山口勇、高久田和夫 Ichinose S.	J.Neurosci. Res. 72 646-659, 2003	Tendon chitosan tubes covalently coupled with synthesized laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo
生駒俊之、小林尚俊 田中順三 Dominic Walsh Stephen Mann	J. of Structural Biology 142(2003)327-333	Microstructure, mechanical and biomimetic properties of fish scales from Pagrus major

Dominic Walsh Laura Arcelli 生駒俊之、田中順三 Stephen Mann	Nature Materials Vol.2, June 2003 386-390	Dextran tempalating for the synthesis of metallic and Metal oxide sponges
生駒俊之、小林尚俊 田中順三 Dominic Walsh Stephen Mann	International Journal of Biological Macromolecules 32(2003)199-204	Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromis niloticas
Yichao Wang 植村寿公、Jian Dong, 小島弘子 田中順三 立石哲也	Tissue Engineering 9(6), 1205-1214 (2003)	Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of rat bone marrow- derived osteoblastic cells in porous ceramic materials
菊池正紀 伊藤聰一郎、松本裕子 小山富久、高久田和夫 四宮謙一 田中順三	Key Engineering Materials 240-242(2003) pp. 567-570	Fivrillogenesis of Hydroxyapatite/Collagen self- Organized composites
伊藤聰一郎 山口勇 小林尚俊 四宮謙一 田中順三	Science and Technology of Advanced Materials 4(2003)261-268	Development of the chitosan tube prepared from crab Tendon for nerve regeneration
尾崎紀昭 小暮敏博	GEOCHIM. COSMOCHIM. AC. 67, A368-A368 (2003)	Crystal orientation of calcite components in coccoliths : EBSD analyses of submicron crystals
伊藤聰一郎、鈴木真澄 山口勇 高久田和夫 小林尚俊 四宮謙一 田中順三	Artif. Organs 27(2003)1079- 1088	Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube.

伊藤聰一郎 山口勇 鈴木真澄 Ichinose S. 高久田和夫 小林尚俊 四宮謙一 田中順三	Brain Research 993(1-2):111- 123DEC2003	Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with Adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo
伊藤聰一郎 Tomioka H. 田中順三 四宮謙一	J. of Hand Surgery 29 Issue 1 (2004) 123-130	Relationship between bone mineral density of the distal Radius and ulna and fracture characteristics.
是松新、古菌勉 安田昌司 田中順三 岸田晶夫	J.Mater.Sci., In contribution 39, 3221- 3225(2004)	Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite II. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly(2-(0-[1- methylpropylideneamino]carboxy-amino)ethy l methacrylate)-grafted silk fibroin fibers through covalent linkage
菊池正紀 松本裕子 Takeki Yamada 小山富久, 高久田和夫 田中順三	Biomaterials 25(2004)63-69	Glutaraldehyde cross-linked hydroxyapatite/collagen Self-organized nanocomposites
植村寿公 Jian Dong Yichao Wang 小島弘子 Takashi Saito Daisuke Iejima 菊池正紀、田中順三	Biomaterials 24(2003)2277- 2286	Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques

古川克子 Hideyuki Suenaga Kenshi Toita 沼田章子 田中順三 牛田多加志 Yasuyuki Sakai 立石哲也	Cell Transplantation Vol. 12, pp. 475- 479 2003	Rapid and Large-Scale Formation of Chondrocyte Aggregates by Rotational Culture
菊池正紀 生駒俊之 庄司大助 松本裕子 小山富久 伊藤聰一郎 高久田和夫 四宮謙一 田中順三	Bioceramics 16, Key Engineering Materials 254- 256 (2004) pp. 561- 564 プロシーディング	Porous Body Preparation of Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposites for Bone Tissue Regeneration
菊池正紀 小山富久 Kazumi Akita Noriaki Shirahama 高久田和夫 田中順三	Proc. 8 th Japan International SAMPE Symposium Nov. 18-21, 2003 プロシーディング	Preparation of β - Tricalciumphosphate/poly-(L-Lactide- -co-Glycolide-co- ϵ - caprolactone) composite for guided bone regeneration
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	Proc. of the 20 th International Japan -Korea Seminar on Ceramics P101-104 (2003) プロシーディング	Fabrication of porous body using HAp/Col nanocomposite and its biological reaction

伊藤聰一郎 四宮謙一 Atsuko Ueda Kazuhiro E. Fujimori 田口隆久 松田篤 小林尚俊 田中順三	Neuroscience Letters 360(2004)175-177	Muscle-specific protein MDP77 Specifically Promotes Motor Nerve Regeneration in vivo
早乙女進一 植村寿公 菊池正紀 Chen Jiani 伊藤聰一郎 田中順三 立石哲也 四宮謙一	Materials Science Engineering C24, 341- 347(2004)	Synthesis and in vivo evaluation of a novel Hydroxy- Apatite/Collagen-alginate as bone filler and a drug Delivery carrier of bone morphogenetic protein
Shogo Miyata 古川克子 牛田多加志 Yasuo Nitta 立石哲也	Materials Science Engineering C24(2004)425-429	Static and dynamic mechanical properties of extracellular matrix synthesized by cultured chondrocytes

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：4件（CREST研究期間累積件数：28件）