

「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、細菌感染のない経皮デバイス等の研究により生体組織誘導材料の開発を行っている。今後、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開発・実用化を目指す。

## 2. 研究実施内容

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 Scaffold の開発・医学応用に関して検討を行った。

界面モデル研究グループでは、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。

自己組織化材料研究グループでは、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<sup>2+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>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・m）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を溶解後、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生合成している

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。

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。

### 3. 研究実施体制

#### 界面モデル研究グループ

① 研究分担グループ長：田中順三（（独）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：自己組織化現象の解明を担当

有機単分子膜を用いたリン酸カルシウム・炭酸カルシウム結晶の方位制御技術開発  
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（（独）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：無機・有機複合体の創出を担当

リン酸カルシウムとコラーゲン・キトサン・多糖類などの生体高分子を複合化させ、その形態制御技術の開発。

#### 新規結合系研究グループ

① 研究分担グループ長：田中順三（（独）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：新規結合を導入した複合体の創出を担当

アパタイトとシリコーン間への新規結合の導入による複合化技術開発

#### 組織工学・医学応用研究グループ

① 研究分担グループ長：立石哲也（東京大学大学院工学系研究会 教授）

② 研究項目：複合体の組織工学・医学応用を担当

上記グループにより創出した複合材料の生体適合性評価・組織工学手法の導入・医学応用検討を行う。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

古菌勉・Pao-Li Wang 是松新・宮崎幸造・ Mari Oido-mori・ Yusuke Kowashi Kiyoshi Ohura 田中順三・岸田晶夫	J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)	Physical and biological evaluations of sintered hydro- xyapatite/silicone Composite with covalent bond- ing for a percutaneous implant
山口勇・S, 飯塚・ A, Osaka・H, Monma 田中順三	Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	The effect of citric acid addition on Chitosan/hydro- xyapatite Composites.
山口勇・小暮敏博・ 坂根正孝・田中忍・ A. Osaka・田中順三	Journal of Materials Science	Microstructure analysis of calcium Phosphate formed in tendon

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：14件（研究期間累積件数：32件）