

Title	培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムを用 いた新しい人工関節軟骨モデルの研究	
Author(s)	青木, 慎介	
Citation 大阪大学, 2004, 博士論文		
Version Type	VoR	
URL	https://doi.org/10.18910/44917	
rights		
Note		

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システム を用いた新しい人工関節軟骨モデルの研究

平成 15 年 12 月

7

大阪大学大学院工学研究科 知能·機能創成工学専攻

青木慎介

目次

第1	章	序調	A.	$\cdots 1$
1		関節	の構造及び特徴とその治療方法	····1
		1-1	関節の構造	1
		1-2	関節軟骨と関節液	2
		1-3	人工関節置換術を用いた関節軟骨の外科的治療	5
		1-4	PVA-H(ポリビニルアルコールハイドロゲル)/TFM(チタン	
			ファイバーメッシュ)系人工関節軟骨システムを用いた関節	
			軟骨の修復	10
		1-5	生体組織工学的手法を用いた関節軟骨の修復	10
			1-5-1 生体組織工学の意義と関節軟骨修復への応用	10
			1−5−2 細胞の直接移植による関節軟骨の修復	12
			1-5-3 人工培養軟骨移植による関節軟骨の修復	13
	2	本研	F究の目的	$\cdots 14$
	引)	刊文 南	 武	14
第2	2章	泡せ 多3	zラミックス法及び水熱処理法を組み合わせた方法を用いた し質リン酸カルシウムの作製とその細胞応答性	17
	1	緒言		17
	2	実験	方法	30
		2-1	試薬	30
		2-2	多孔質リン酸カルシウムの合成	30
		2-3	多孔質リン酸カルシウムの物性測定	33
		2-4	MC3T3-E1 細胞の単層培養	34
		2-5	多孔質リン酸カルシウム上での MC3T3-E1 細胞の三次元培養	35
		2-6	MTT アッセイ	35
		2-7	アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	35
		2-8	デジタルマイクロスコープ観察	36
	3	結果	1	36
		3-1	粉末 X 線回折(PXD)	36
		3-2	FT-IR 測定	38
		3-3	サンプルの破断面観察	38

3-4 物性測定(Ca/P比、比表面積、気孔率)…463-5 MC3T3-E1 細胞の単層培養…46

	3-6 多孔質リン酸カルシウム上での MC3T3-E1 細胞の三次元培養	$\cdots 46$
	3-7 MTT アッセイ	46
	3-8 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	56
	3-9 デジタルマイクロスコープ観察	56
4	考察	59
5	結言	61
引	用文献	62

第3章	培養軟骨ー多孔質リン酸三カルシウム接合システムに基づいた新しい	
	人工関節軟骨モデルの研究	68
1	緒言	68
2	実験方法	$\cdots 71$
	2-1 試薬	$\cdots 71$
	2-2 測定装置	$\cdots 71$
	2-3 多孔質リン酸カルシウム(β-TCP)の作製	···72
	2-4 培養軟骨-多孔質β-TCPの作製	73
	2-4-1 ATDC5 細胞の培養	73
	2-4-2 コラーゲン溶液の調製	73
	2-4-3 培養軟骨-多孔質β-TCPの作製	73
	2-4-4 培養軟骨-多孔質β-TCPの測定準備	$\cdots 74$
	2-4-5 トルイジンブルー染色	74
	2-4-6 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	$\cdots 74$
3	結果	$\cdots 74$
	3-1 多孔質β-TCP の物性測定	75
	3-2 培養軟骨-多孔質β-TCPの物性測定	75
	3-2-1 位相差顕微鏡観察	…75
	3-2-2 SEM 観察	75
	3-2-3 FT-IR 測定	82
	3-2-4 トルイジンブルー染色	82
	3-2-5 培養軟骨-多孔質β-TCP のアルカリ	
	ホスフォターゼ(ALPase)活性	88
4	考察	91
5	結言	···92
引	用文献	95

第4章 細胞増殖因子を利用した培養軟骨-多孔質リン酸三カルシウム接合

	シス	テムに基づいた新しい人工関節軟骨モデルの改良	97
1	1 緒言 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1		97
2	実験	方法	99
	2-1	試薬	99
	2-2	測定装置	99
	2-3	ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養における	
		細胞増殖因子の影響	100
		2-3-1 ATDC5 細胞の培養	…100
		2-3-2 コラーゲン溶液の調製	…100
		2-3-3 細胞増殖因子(BMP-6 及び PTHrP)の調製	100
		2-3-4 ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養	
		における細胞増殖因子の影響	100
		2-3-5 培養サンプルの固定化及び凍結乾燥	100
		2-3-6 アルシアンブルー染色	101
		2-3-7 トルイジンブルー染色	101
		2-3-8 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	101
	2-4	ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を	
		吸着したβ-TCP 粉末の細胞成長に及ぼす影響	…102
		2-4-1 細胞増殖因子(BMP-6)の調製とβ-TCP 粉末への吸着	…102
		2-4-2 BMP-6 を吸着したβ-TCP 粉末を加えた ATDC5 細胞	
		のコラーゲンゲル包埋培養	102
		2-4-3 pH 測定	102
		2-4-4 FT-IR 測定	102
		2-4-5 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	103
		2-4-6 ビラネバ・ゴルドナー染色	103
	2-5	ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6を吸着	
		した多孔質β-TCPの細胞成長に及ぼす影響	…103
		2-5-1 細胞増殖因子(BMP-6)の調製と多孔質β-TCP	
		への吸着	103
		2-5-2 BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP を加えた ATDC5	
		細胞のコラーゲンゲル包埋培養	…104
		2-5-3 粉末 X 線回折(PXD)	104
		2-5-4 FT-IR 測定	…104
		2-5-5 pH 測定	…104
		2-5-6 SEM 観察	…104
		2-5-7 ビラネバ・ゴルドナー染色	105

3	結果	<u>a</u>	105
	3-1	ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養における	
		細胞増殖因子の影響	…105
		3-1-1 位相差顕微鏡観察	…105
		3-1-2 アルシアンブルー染色	108
		3-1-3 トルイジンブルー染色	108
		3-1-4 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	111
	3-2	ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を	
		吸着したβ-TCP 粉末の細胞成長に及ぼす影響	…116
		3-2-1 位相差顕微鏡観察	…116
		3-2-2 pH 測定	…116
		3-2-3 FT-IR 測定	…116
		3-2-4 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性	120
		3-2-5 ビラネバ・ゴルドナー染色	120
	3-3	ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を	
		吸着した多孔質β-TCPの細胞成長に及ぼす影響	123
		3-3-1 粉末 X 線回折(PXD)	123
		3-3-2 FT-IR 測定	123
		3-3-3 pH 測定	123
		3-3-4 SEM 観察	123
		3-3-5 ビラネバ・ゴルドナー染色	124
4	考察		130
5	結言		131
引)	用文	武	132

第5章 生理活性を有する低分子有機化合物を複合化したリン酸カルシウム の合成とその細胞応答性

1	緒言	…135
2	実験方法	…136
	2-1 試薬	…136
	2-2 測定装置	…136
	2-3 ATDC5 細胞の単層培養におけるアスパラギン酸ナトリウム及び	
	アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウムの影響	…136
	2-3-1 ATDC5 細胞の培養	…136
	2-3-2 アスパラギン酸ナトリウム溶液及びアスコルビン酸リン酸	

エステルマグネシウム溶液の調製 …136

...135

	2−3−3 ATDC5 細胞の単層培養におけるアスパラギン酸	
	ナトリウム及びアスコルビン酸リン酸エステルマグネ	
	シウムの影響	…137
	2-3-4 培養サンプルの固定化(単層培養)	…137
	2-3-5 トルイジンブルー染色(単層培養)	…137
	2-4 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での ATDC5	
	細胞のコラーゲンゲル包埋培養	137
	2-4-1 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末の合成	…137
	2-4-2 コラーゲン溶液の調製	…138
	2-4-3 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での	
	ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養	…138
	2-4-4 pH 測定	…138
	2-4-5 トルイジンブルー染色	139
3	結果と考察	139
	3-1 ATDC5 細胞の単層培養におけるアスパラギン酸ナトリウム及び	
	アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウムの影響	…139
	3-2 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での ATDC5 細胞	泡
	のコラーゲンゲル包埋培養	…144
	3-2-1 アスパラギン酸含有リン酸八カルシウムの物性測定	…144
	3-2-2 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での	
	ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養	…151
4	結言	…158
引	用文献	…158

第6章 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡による培養軟骨

	-多孔質リン酸三カルシウム接合システムの表面観察	160
1	緒言	…160
2	実験方法	162
	2-1 試薬	162
	2-2 多孔質β-TCP の合成と BMP-6 の吸着	162
	2-3 ATDC5 細胞の培養	162
	2-4 コラーゲン溶液の調製	163
	2-5 培養軟骨-多孔質β-TCP システムの作製	163
	2-6 pH 測定	163
	2-7 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡による	
	培養軟骨-多孔質β-TCP システムの表面観察	163

3 結果と考察	165
3−1 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡による	
培養軟骨-多孔質β-TCP システムの表面観察	165
4 結言	169
引用文献	…169
第7章 総括	$\cdots 171$
発表論文リスト	…175
謝辞	…178

., J

第1章 序論

人間は一日に約 10 万回も関節を動かしていると言われている。股関節や膝関節では立 ったときに上半身をしっかりと支える必要があり、また飛んだり走ったりしたときに関節にかか る衝撃を受け止めなければならない。このようなさまざまな日常的な使用に耐えられるように、 関節はたいへん緻密な構造をしている。

関節の上下の骨がずれないように靭帯という組織が関節を囲んで、しっかりと支えられて いる。また関節の上下の骨の先端は軟骨でおおわれており、骨と骨がぶつかった際の衝撃 をやわらげている。関節の中は関節液で満たされ、上下の骨と骨が擦れあう時に生じる摩擦 を非常に少なくし、また骨にかかる衝撃を和らげるクッションのような働きもしている。

しかし、関節軟骨はそれ自身に修復能が無く、1 度損傷を受けてしまうと関節機能に大き な障害が生じる。その障害は小さな範囲であっても痛みや不快感が生じ、日常生活に支障 をきたす。今日、関節に障害を抱える患者は大変多く、慢性関節リウマチだけでも人口の約 1%に発症するとされている。またもう一つの大きな関節疾患として変形性膝関節症の 65 歳 以上の発生率は 30.2%(全体の 3 割、女性 36.6%、男性 17.6%)であり、これらの患者に対 しては人工関節置換術を適応している例が多い[1]。また外傷性の関節軟骨損傷(小欠損) の患者は若年層が多く、容易に人工関節置換術を選択できないのが現状である。本章では 特に関節軟骨の小欠損部の修復に現在使用されている修復方法の特徴と問題点について 関節の構造とその特徴を説明した後で述べる。

1 関節の構造及び特徴とその治療方法

1-1 関節の構造

ヒトの体には大小合わせて 206 個の骨(bone)があり、それらの骨が互いに連結されて骨格を形成している。その骨と骨との結合様式として、ほとんど動くことができないように強固に連結された不動結合(synarthrosis)と、大きな可動性を有する可動結合(diarthrosis)とがある。 関節(joint)とはこの可動結合の部分を指しており、生体が動く、すなわち体の姿勢を変えるための要となる器官である。

骨の大きさには大小があり、またその形や運動形式も同一ではない。しかも、関節は必ず しも2つの骨を連結するとは限らず、3個以上を1つの関節として連結していることもある。し たがって、関節の構造を一言でまとめることは非常に難しい。例えば、ヒトの体の中で最大の 大きさを持つ関節は膝関節であるが、この関節の運動はほぼ1平面内の運動に限られる。こ

れに対して、体のほぼ中央にある股関節(hip joint)はボールジョイントのように自由度があり、 幾何学的な構造もまたボールジョイントに近い。

このように幾何学的な形は関節により違いはあるが、幾何学的な構造はほぼ一致している。 図 1.1 に股関節の模式図を示す。骨端は関節軟骨(articular cartilage)に覆われている。こ の関節軟骨と向かいあう関節軟骨が摩擦するが、その間に関節液(synovial fluid、あるいは synovia)が満たされており、ほとんどの関節運動はこの関節液を介した関節軟骨の摩擦運 動ということである。

関節軟骨に覆われた両骨端部分は関節包(joint capsule)で連結されており、同時に関節 包は関節液を閉じ込めておく働きも持つ。関節包の内面には滑膜(synovial membrane)と呼 ばれる組織があり、この滑膜細胞のうちのB型細胞から関節液の特徴的な成分であるヒアル ロン酸(hyaluronic acid)が分泌される。

1-2 関節軟骨と関節液

図 1.1 に示すように、関節の摩擦にとって最も重要な役割を果たすのは関節軟骨と関節 液である。

関節軟骨は股関節、膝関節などの大きな関節で、若い成人で厚さ約4mmであり、この厚 さは加齢とともに薄くなる。その表面は肉眼的には滑らかで、光沢がある。その弾性率は低く、 弾性範囲が広い。そして多量の水分を含有しており、軟骨湿重量の75~78%は水である[2]。 この水は軟骨内外にかなりの移動度を有しており、例えば軟骨につめを立てるとその部分 は窪んでその周囲に水分が滲み出る。爪を離せば窪みはただちに回復し、滲み出た水は 再び吸い込まれる。このように軟骨が弾性変形しやすいことは関節の潤滑機構に重要な意 味をもっている。

関節軟骨は細胞成分と軟骨基質(cartilage matrix)からなっている。細胞成分は軟骨細胞 1 種類で、他の組織に比べて細胞密度は低く、豊富な軟骨基質に取り囲まれている。細胞 外基質の大部分はコラーゲン繊維であり。他にエラスチンを少量含んでいる。関節軟骨の 最表層にあるコラーゲン繊維が、軟骨表面に高さ数µm、ピッチ 25µm の凹凸を与える。一方、 無形成分は水とプロテオグリカン(グリコサミノグリカン(ムコ多糖)が特定のタンパク質と結合 したもの)で、関節軟骨中に含まれるグリコサミノグリカンとしては、コンドロイチン-4-硫酸、コ ンドロイチン-6-硫酸、ケラタン硫酸が主たるものである。このプロテオグリカンは軟骨細胞内 で合成され、細胞外に出て軟骨基質を構成する[3]。

出来上がったプロテオグリカンは、関節組織を特徴づけるグリコサミノグリカンであるヒアル ロン酸(分子量:約100万)を中心として巨大な凝集形になり、図1.2に示すようなブラシのよ

 $\mathbf{2}$



Fig.1.1 Schematic view of a hip joint



Fig.1.2 Schematic view of aggregates of a proteoglycans

うな形態をとる[4]。 長い鎖状のコアタンパク質(分子量:約 25 万)を中心に多数のコンドロイ チン硫酸(分子量:約3万)とケラタン硫酸(分子量:約8千)が側鎖として結合しており、この 結合体(プロテオグリカン)がさらに長い鎖状のヒアルロン酸に共有結合で多数の集合体を つくり、分子量150万以上の巨大分子を形成している。このプロテオグリカン巨大分子が水と 結合し、コラーゲンネットワークの中に閉じ込められているのが軟骨基質の基本構造である [4]。 図 1.3 にそれを模式的に示す[5]。

1-3 人工関節置換術を用いた関節軟骨の外科的治療

上記に示したように、ほとんどの関節運動はこの関節液を介した関節軟骨の摩擦運動ということである。正常な関節軟骨はその寿命が 70~80 年と非常に長期間の使用にも耐える ことができる組織である。しかし、関節軟骨はそれ自身に修復能が無く、1 度損傷を受けてし まうと関節機能に大きな障害が生じ、現在、これらの関節疾患患者に対する、最終的な外科 的治療として、人工関節術が広く行われているのが一般的である。

人工関節置換術は、機能を失った関節に対して人工材料を用いて作製した人工関節に 置換する治療法である。人工関節は、適用する関節の種類により人工股関節、人工膝関節、 人工足関節、人工肩関節、人工肘関節、人工指関節に分類できる。この中で、日常生活に 欠かせない「歩行」という動作に欠かせない股関節と膝関節の2種類の人工関節の使用数 が、適用の大半を占めている。

人工関節用材料の変遷を表 1.1 に示す。19世紀の終わりの Gluck らの考案した象牙製膝 関節(1890年)を始まりに、20世紀前半はステンレス鋼(1930年)、Co-Cr-Mo 合金(1938年) や各種高分子材料が登場し、メタル-メタル製人工股関節や、各種人工骨頭、蝶番式(金属 製)人工膝関節などが臨床応用された。当時の製品の真球度・半径すきま・表面粗さから判 断すると流体潤滑モードの維持は困難であったと推定され、金属間の高摩擦は緩みの原因 となり、全般的に良好な成績は得られなかった。

このような背景の中で、イギリスの Chamley らは 1958 年に PTFE (ポリテトラフルオロエチレン; テフロン) とステンレス鋼を用いた人工関節を提案した。しかし、実使用すると、過度の磨耗(1-3mm/年) が生じるという問題があったため実用的には問題があった[6]。 1962 年に Chamley らは更にその問題を解決するために、図 1.4 に示すような UHMWPE (超高分子ポリエチレン) 製の臼蓋コンポーネントとステンレス製の大腿骨ステム(骨頭径 22mm)を骨セメント(ポリメチルメタクリレート)を使用して骨に固定するという人工股関節を提案した[6]。これ は磨耗しにくく(0.1-0.2mm/年) であり、初めて人工関節の実用化にめどが立ったのである。 そしてその後この Chamley らのモデルを基として、1970 年にフランスの Boutin らやドイツ



Excepted volume Subunit of proteoglycan Hyaluronic acid

Fig.1.3 Schematic view of the distribution of proteoglycan, collagen, and water in articular cartilage [31]

Date	Artificer	Materials	
1890	Gluck	Ivoried knee joint	
1938	Smith- Petersen	Co-Cr-Mo alloy cup	
1938	Wiles	Metal/Metal(stainless steels) artificial hip joint	
1943	Moore	Co-Cr-Mo alloy artificial cup	
1946	Judet	Acrylic artificial cup	
1951	Mckee	Metal/Metal(Co-Cr-Mo alloy) artificial hip joint	
1952	Haboush	PMMA bone cement (for artificial hip joint)	
1957	Leventhal	Ti artificial cup	
1958	Charnley	PTFE/stainless steels artificial hip joint	
1962	Charnley	UHMWPE/stainless steels artificial hip joint	
1970	Weber- Huggler	Polyester cup artificial hip joint	
1970	Boutin	Alumina/alumina artificial hip joint	

Table 1.1 Transition of materials for artificial joint



Fig.1.4 Schematic view of Charnley-type total hip replacement

の Griss、Mittelmeier らによって骨頭及びソケットが多結晶アルミナ金属ステム結合型の 人工股関節を発表している。初期型は可動範囲が狭かったが、現在では痛みがとれること が前提として、「どうしたらよく曲がるか」、「どうしたら長持ちするか」という内容の研究が数多 く行われており、臨床応用も国内だけでも 10 万件/年 が実施されている。

このように人工関節による関節置換術は、大きな成果を挙げているが、術後に起こる生体 骨に埋め込まれた人工関節ステムの緩みが問題とされている。股関節全置換手術の後、主 な技術的な失敗がない場合でも、関節の周りの著しい骨破壊のため、骨基部に近い方向へ の関節部分の移動が起こりうる。現在使用されている人工股関節は、骨、骨セメント、ポリマ ー(人工骨頭)、金属(ステムもしくは人工骨頭)という 4 つの異種材料から構成される。これ らの機械的特性はそれぞれ異なり、それに伴いそれぞれの界面部分で起こる重大な応力集 中が緩みを引き起こす原因となっている。人工関節の 231 症例のうち、26 症例(11.6%)の 寛骨臼側、69 症例(29.9%)の大腿骨側で、術後 10 年で緩みが生じたという研究報告があ る[7]。大部分の緩みが、骨と骨セメントの界面で起きているので、これは骨セメントが原因で あると考えられている。これを解決するためにセメントレスタイプの人工関節の研究も行われ ているが、解決には至っていない。

また、寛骨臼側に用いられている UHMWPE 磨耗粉による炎症反応が問題となっている。 Howie らは、実験的にアクリルセメントと骨との間での骨吸収と肉芽腫性の薄膜の形成が、 主に UHMWPE の粒子によって誘発されることを明らかにした[8]。またこの UHMWPE の磨 耗は量が少なければリンパ系に吸収されるが、対応しきれない量が生じた場合、マクロファ ージ(約 10µm)が磨耗粉を消化しようと集まってくる。食べようとする磨耗粉は数µm 以下の 粒子であり、大きいものは食べない。取り込まれた微磨耗粉も UHMWPE 自体が安定した物 質であるので消化できず、食べたマクロファージが異常な指令 (タンパク)を出し始める。そ の異常命令は骨吸収を誘発し、人工関節周りの骨が吸収され、人工関節取り付け部のゆる み(loosening)が生じるという結果になる。

更に人工関節による置換の問題点として、本来関節部で行われている衝撃吸収が効率よ く行われないことが挙げられる。人間が 3m の高さからジャンプをすると、股関節には体重の 7 倍の負荷がかかる。通常、健康な関節であるならば、関節軟骨や軟骨下骨が、その負荷を 減じる重要な役目をする。しかし、現行の人工関節術においては、これらの健康な部分を含 む重要な構造が切除されているので、衝撃吸収能力を失うことになる。そのため、ステムの 緩みだけでなく、寛骨臼側の生体骨が損傷する場合がある。

以上のように改良すべき点はあるものの、患部を全て除去することによる疼痛除去の効果 がある点で高い評価を得ているが、耐久性が15年程度である点を考慮して、その適用は高 齢者に限られているのが現状である。

1-4 PVA-H(ポリビニルアルコールハイドロゲル)/TFM(チタンファイバーメッシュ)系人工 関節軟骨システムを用いた関節軟骨の修復

従来の人工関節置換術では大量の健康な海綿骨の切除が必要であり、更に適用年齢の 制限や再手術の必要性などが問題であったので、近年、人工関節軟骨による関節軟骨の 修復が注目されている。なかでも、Oka らは、人工関節軟骨部として、人工関節軟骨に要求 される条件;潤滑特性、衝撃吸収特性、生体適合性、及び耐磨耗性を満たした PVA-H(ポリ ビニルアルコールハイドロゲル)に着目した。この PVA-Hを高圧下で TFM(多孔性人工骨チ タンファイバーメッシュ)に含浸し、ゲル硬化を行い、PVA-H を TFM に結合させた人工関節 軟骨 (PVA-H/TFM)システムを開発した(図 1.5)[9-12]。このシステムでは TFM 孔内に新生 骨が進入し、チタンと新生骨の固定がおこる。ビーグル犬での埋入実験では、埋入 12 ヶ月 後、人工軟骨 PVA-H は周囲の生体関節軟骨と円滑な関節面を形成し、相対する寛骨臼の 異常は認められなかった。

しかし、PVA-H/TFM 人工関節軟骨において、TFM から PVA-H が剥離することが報告されており[10]、接合強度の改善が望まれる。一般に PVA のような親水性材料が生体内に埋入されると、リン酸カルシウムの沈着による石灰化を起こすことが知られている[13]。このような PVA-H の材料特性から、人工関節軟骨の PVA-H/TFM 界面付近において同様な石灰化が起こり、それにより PVA-H/TFM 間の結合が弱められ、剥離が起こる可能性がある。

そこで、Tominaga らはこの PVA-H/Ti 間の結合を改善するために、チタネートカップリング 剤でチタンの表面処理を行い、PVA-H/Ti 間の接着強さの改善を検討した。チタネートカッ プリング剤処理により、単分子状の薄膜が形成される。この Ti 片を、擬似体液(SBF)中に浸 漬したが、アパタイトの形成は見られなかった。PVA-H/Ti 間の引張りせん断接着強さ試験を 行った結果、PVA-H/Ti の界面での破断は起こらず、PVA-H 内で破断した。また、表面処理 を行った Ti 片の細胞毒性試験の結果は陰性であった。PVA-H/TFM 人工関節軟骨システム において、PVA-H と TFM の接着部分に予め表面処理をすることにより、接着性の改善がで きると報告している[14]。

しかしながら、PVA-H や TFM は本来生体内に存在しない材料であるので、関節軟骨と PVA-H の接着や TFM の生体骨への置換は起こらない。そのため、完全な形での修復は達 成されないという問題点が残る。

1-5 生体組織工学的手法を用いた関節軟骨の修復

1-5-1 生体組織工学の意義と関節軟骨修復への応用



Fig.1.5 Schematic view of PVA-H/TFM system for the repair of articular cartilage

1993年にLangerとVacantiはティッシュエンジニアリング(組織工学)という概念を"組織の 機能を再生、維持、修復を目的とする生物学的代用品の開発に工学的原理と生命科学を 応用する学際的な研究開発"と定義した[15]。すなわち、組織工学とは従来の生体材料に 細胞を組み込み、組織の形態及び機能修復を最終的な目的としている。この方法を用いれ ば、人工組織を作製する細胞を培養により増殖させることができるため、ドナーの採取による 正常組織の侵襲が最小限となり、これまでの患者に負担の大きい人工関節置換術を行わな くてもすむという点、更に最終的には完全な形に修復できるという点で、その早期の臨床応 用が期待されている。生体組織工学を用いた関節軟骨の修復には、1) 関節軟骨欠損部 に自家軟骨を直接もしくは3次元培養担体に包埋後移植し、軟骨の再生を促進させる方法 と、2) 3 次元培養担体中で軟骨細胞を培養し、人工関節軟骨を作成した後、移植を行う方 法がある。

1-5-2 細胞の直接移植による関節軟骨の修復

Brittberg らは、非荷重部より採取した軟骨細胞を培養後、その細胞懸濁液を欠損部に直接注入し、骨膜により覆った。しかし、培養した軟骨細胞は、軟骨欠損の治癒を促進するものの、硝子軟骨再生には1年程度の長い時間がかかる[16]。

Wakitaniらは、移植細胞を骨軟骨欠損部に固定させるため、軟骨細胞をコラーゲンゲル内 に包埋させ、それを軟骨欠損部に充填した[17]。移植後1週から硝子軟骨で修復され、さら に24週には全体の80%が硝子軟骨により修復された。

このように自己軟骨細胞を用いた場合は、細胞採取部位が限られるので、採取できる軟骨細胞の数に限りがある。そこで細胞の採取が容易な骨髄由来の未分化間葉系細胞を培養し、コラーゲンゲルに包埋後、変形性膝関節症患者の大腿骨顆荷重部に移植すると、その後6~8週で関節軟骨欠損部は軟組織に覆われ、33週で全体は軟骨様となり、硝子軟骨も一部確認されたことを報告している[18,19]。

また近年、胚性幹細胞(ES 細胞)を用いた治療方法についても注目されている。ES 細胞 はほぼ無制限に細胞を増殖させることが可能であり、しかも増殖させた後でもあらゆる細胞 に分化する能力を持つ。したがって ES 細胞は再生医療において理想的な性質を持つ細胞 である。しかしながら、ES 細胞を様々な細胞へ分化コントロールする方法が報告されている が、軟骨への特異的分化誘導法はない。それゆえに、この ES 細胞を実際用いるためには、 確実に軟骨細胞に誘導する技術が必要である[20]。

このような軟骨欠損部に直接細胞を移植する方法では、正常な硝子軟骨が再構築されるまで長期の時間を要するという問題点がある。

1-5-3 人工培養軟骨移植による関節軟骨の修復

上記の細胞の直接移植による関節軟骨の修復の問題点を解決するために、細胞を生体 外(3次元培養担体中)で培養後、移植する方法が試みられた。

その3次元培養担体としては、Dacron(ポリエチレンテレフタラート)、pHEMA(ポリ(2-ヒドロ キシエチルメタクリレート))、PGA(ポリグリコール酸)、PLGA(ポリ乳酸-グリコール酸)、 PLLA(ポリ L-乳酸)、PMMA(ポリメチルメタクリレート)、PU(ポリウレタン)、そして PVA(ポリ ビニルアルコール)の高分子や、アルギン酸ナトリウムやアガロースやゼラチン、そしてコラー ゲンが用いられてきた。

Vacanti らは、軟骨細胞を生体分解性高分子の PLGA テンプレートとともに 10 日間培養し た後、ヌードマウスの皮下に移植し 3~9ヶ月後に軟骨組織が再生していることを報告してい る[21]。また、Freed らはウサギの関節から採取した軟骨細胞を同じく生体内分解性高分子 である PGA とともに 3~4週間培養した後、別のウサギの関節軟骨欠損部に移植したところ、 PGA のみの移植に比べ軟骨再生が良好であると報告している[22]。更に、Sittinger らは、3 次元培養担体に細胞を接着させる試みとして、PLLA や PGA にポリ-L-リジンや typeII コラ ーゲンをコートすると、細胞接着性が高まったと報告している[23]。

Kawamura らは、コラーゲンゲルに軟骨細胞を包埋し。細胞が放出する軟骨基質でゲル硬化後に、移植を行った。家兎に移植後3日から24週までの経過で、欠損部は硝子軟骨で修復された[24,25]。

Chen らは、機械的強度があり優れた成形性をもつ PLGA スポンジと細胞が接着する足場 となるコラーゲンを複合化し、PLGA-コラーゲン複合スポンジを作製した。複合化により PLGA スポンジ内にコラーゲンマイクロスポンジが形成され、細胞とのぬれ性が向上し、スポ ンジ内での軟骨細胞の増殖や硝子軟骨形成が確認されている[26]。

また、Taguchiらはヒアルロン酸とtypeIIコラーゲンマトリックス材料を作製し、三次元培養を行った結果、1週間後でコラーゲンを用いた場合の約4倍の細胞数になったと報告している[27]。

Ibusuki らは、コラーゲンを用いた関節軟骨修復法の問題点の一つである、「軟骨欠損部 に隙間なく補填することが困難である」という点を克服するために軟骨細胞を体温によりゲル 化する人工細胞外マトリックス(PNIPAAm-geratin)に加え、軟骨欠損部へ注入移植する方 法を考案した。その結果、軟骨細胞は順調に成長し、硝子軟骨の主成分である typeII コラ ーゲンや軟骨基質の排出が確認している[28]。

しかしながら、これら生体由来分子は組織親和性の点で優れているが、抗原体や病原体

混入、初期強度の脆弱性、迅速な生体内吸収などの問題がある。また、培養した軟骨細胞の分化状態の維持や、移植後の周囲の関節軟骨組織や生体骨である軟骨下骨と接着しないという問題点がある。

2 本研究の目的

これまで関節軟骨の小欠損部に対する生体組織工学手法を用いた治療方法として、細 胞の直接移植による方法や人工培養軟骨移植による方法が用いられてきた。しかしながら、 これらの方法では、(1) 移植した細胞や培養軟骨と移植周辺部の関節軟骨または生体骨 と接着しない、(2) 移植した細胞や培養軟骨中の細胞分化を制御しなければならない、と いう2つの大きな問題点があった。そこで、本研究では、まず前者(1)の問題である培養軟 骨と生体骨との接着を改善するために、多孔質リン酸カルシウムに培養軟骨を接合する形 の新しい人工関節軟骨モデルを考案し、作製した。使用する多孔質リン酸カルシウムは、生 体吸収性に優れ、最終的には生体骨と置換するリン酸三カルシウム(β-TCP)を選択した。 細胞成長に適した気孔性状(大きな気孔径(直径:100µm 以上[29])、高い気孔率(60%以 上[30])、そして粗い表面)を持つ多孔質リン酸カルシウムの作製方法として、泡セラミックス 法と水熱処理法を組み合わせた新規な合成方法を開発し、それを用いて合成した。更に上 記の(2)の問題を解決するために、培養軟骨-多孔質リン酸カルシウムシステムに細胞増殖 因子の利用を考えた。詳しくは、多孔質リン酸カルシウムに細胞増殖因子の一つである骨形 成タンパク質-6(BMP-6)を吸着し、培養軟骨-多孔質リン酸カルシウムシステムを作製し、培 養軟骨と多孔質リン酸カルシウムの界面付近の軟骨細胞の石灰化を促進させることを試み た。

以下、第2章では培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムに使用する、多孔質リン酸カルシウムの合成について述べる。第3章では第2章で作製した多孔質リン酸カルシウムを用いて、実際に培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムを用いた新しい人工関節軟骨モデルの作製を行った。第4章では細胞増殖因子の軟骨細胞に対する影響とその結果を基にして細胞増殖因子を強固に吸着した培養軟骨/多孔質リン酸カルシウム接合システムの改良について述べる。第5章では生理活性を持つ低分子有機物を複合化したリン酸カルシウム粉末を用いた軟骨細胞の細胞成長に及ぼす影響について述べる。第6章では光走査型化学顕微鏡を用いた培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムの表面観察について述べる。最後に第7章で本論文を総括する。

引用文献

[1] 持田睦, "住民検診により高齢者膝関節の X 線学的解析", 東京女子医科大学雑誌, 44;1995: 12-15.

[2] Linn FC, Sokoloff A. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. Arthritis Reum 1965;8:481-94.

[3] Sasada T, Tsukamoto Y, Mabuchi K. Biotribology, Sangyo-tosho, Tokyo, 1988 p. 39.

[4] Frenkel VH, Nordin M. Seikeigeka biomechanics nyumon, Nankodo, Tokyo, 1983 p.59

[5] Frenkel VH, Nordin M. Seikeigeka biomechanics nyumon, Nankodo, Tokyo, 1983 p.56

[6] Charnley J. Low friction artroplasty of the hip, Springer-Verlag, New York, 1979

[7] Stauffer RN. Ten year follow-up study of one hundred consecutive muller curved stem total hip replacement arthroplasties. J Bone Joint Surg 1982;64-A:983-90.

[8] Howie DW, Vernon-Roberts B, Oakeshott R. A rat model of resorption of bone at the cement bone interface in the presence of polyethylene wear articles. J Bone Joint Surg 1988;70-A:257-64.

[9] 岡正典,"人工関節軟骨の開発",第18回医用高分子研究会講座,2001:14-7.

[10] 岡正典,由良茂人,玄丞烋,中村孝志,"人工椎間板の開発"脊椎脊髄, 12;1999: 429-34.

[11] Chang Y, Oka M, Kobayashi M, Gu H, Li Z, Kitsugi T, Nakamura T. Bone formation and remodeling around implanted materials under load-bearing conditions. Clin Mater 1994;17:181-7.

[12] 孕石佳久, 岡正典, 由良茂人, "犬用人工椎間板の力学的特性評価", 日本臨床バイオメカにクス学会誌, 20;1999: 7-11.

[13] 岸田晶夫,田口哲志,柳正和,愛甲孝,明石満, "医療材料としての高分子とアパタ イトの複合化の検討",高分子論文集,57(4);2000:159-66.

[14] Tominaga Y, Yamaguchi S, Inoue M, Takahashi M, Suganuma K. Improvement of adhesion strength between polyvinyl alcohol hydrogel (PVA-H) and titanium The 23rd annual meeting of the Japanese society for biomaterials 2001:191.

[15] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 260;1993:920-6.

[16] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. The new England J Med 331;1994:889-95.

[17] Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of large full-thickness articular cartilagedefects with allograft articular chondrocytes embedded in a

collagen gel", Tissue Eng 4(4);1998:429-44.

[18] 脇谷滋之,"軟骨細胞移植",骨·関節·靭帯,10(1);1997:71-7.

[19] 脇谷滋之,"関節軟骨の再生",第18回医用高分子研究会講座,2001:18-21.

[20] Wakitani S, Horibe S. Problems unsolved in articular cartilage regeneration. Bioindustry 19;2002:38-43.

[21] Vacanti C, Langer R, Schloo B. Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo. Plast reconstr Surg 1991;88:753.

[22] Freed LR, Grande DA, Lingbin Z, Emmanual J, Marquis JC, Langer R. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res 1994;28:891-9.

[23] Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, Hierlemann H, Hammer C, Kastenbauer E, Planck H, Burmester GR, Bujia J. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. J Biomed Mater Res 33;1996:57-63.

[24] Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI, Shino K, Ochi T. Articular cartilage repair, rabbit experiments with acollagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. Acta Orthop Scand 1998;69:56-62.

[25] 脇谷滋之, "細胞移植による関節軟骨欠損修復", 人工臓器, 2000;29:277-80.

[26] 陳国平, 牛田多加志, 立石哲也,"生体分解性複合スポンジ材料の開発と軟骨細胞の3次元培養への応用", 人工臓器, 2000;29:463-7.

[27] Taguchi T, Ikoma T, Tanaka J. An improved method to prepare hyaluronic acid and type II collagen composite matrices. J Biomed Mater Res 2002;61:330-6.

[28] Ibusuki S, Fujii Y, IwamotoY, Matsuda T. Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin: Fabrication and in vitro performance. Tissue Eng 2003;9: 371-84.

[29] Yamazaki Y. Experimental study on porous apatite as artificial bone – Experimental implantation in the mandible -. Kokubyo Gakkai Zasshi 1984;51:372-446.

[30] Irie H. Bone substitute to be remodeled to natural bone. Bull The Ceram Soc Jpn 2003;38:55-57.

[31] Lai WM, Mow VC. Drug-induced compression of articular cartilage during a permeation experiment. Biology 1980;17:111-23.

第2章 泡セラミックス法と水熱処理法を組み合わせた方法を用いた 多孔質リン酸カルシウムの合成とその細胞応答性

1 緒言

従来の生体材料である金属や高分子に加えて、骨治療用の生体材料としてセラミックス (バイオセラミックス)が研究されるようになってきたのは、1960年頃からである。それまでセラ ミックスは脆いという欠点があるため従来は利用されていなかった。1980年代には骨と直接 結合して、しかも強度の高い緻密なセラミックスが実用されるに至り、椎骨や頸骨あるいは歯 根のように力のかかる部位へのインプラント材料としてリンやカルシウムを含む A-W 結晶化 ガラスあるいはセラミックスが臨床応用に使用され始めた。生体材料として最も重要な生体 安全性に関しては、セラミックスは埋入条件に注意すれば、一般に、毒性・組織為害性がな く、安全な材料であり、生体親和性も良好である。

このようなバイオセラミックスの種類は生体内の歯や骨の無機成分に含まれる Ca 及び P の含有の有無を基にして、表 2.1 に示すように、Ca 及び P を含む「生体活性バイオセラミックス」と Ca 及び P を含まない「生体不活性バイオセラミックス」に分けることができる。

(a) 生体活性バイオセラミックス

(a-1) ハイドロキシアパタイト(HAp)

生体の骨や歯の70-89%を占める無機質はHAp(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)に類似のミネラル である。生体組織に対して為害性はなく、硬組織代替材料に中では最も優れた生体活 性を示す材料の代表である。HAp は骨組織内に埋入すると、直ちにアルブミンや血液 細胞等の吸着や皮膜の形成が起こる。極性表面を持つアルミナのような不活性材料で も同様のことが起こるが、HAp の場合短期間で新生骨に被われ、新生骨と直接結合す る。また HAp は軟組織との親和性も良好であり[1]、Mg²⁺や Na⁺、Fや CO₃²⁻といった 様々なイオンが固溶することが知られている。その微量成分の固溶によって HAp の生 体活性や安定性、骨修復能を向上し、制御することができると期待されている。

(a-2) リン酸カルシウム(TCP)

1120-1180°C 以下で安定相をもつβ-TCP が人工骨としてよく用いられている。これは β-TCP が生体吸収性材料であるからである。β-TCP の焼結温度は転移温度以上である ので、転移抑制のために MgO、SiO₂、Al₂O₃、AlF₃ などの焼結助剤を加えて、ポリアクリ ル酸アンモニウムのような熱分解し、揮発性であるバインダーを混合して成形し、 1200-1400°C で焼結して、焼結体を得る。しかし、加える焼結助剤の陽イオンがβ-TCP 構造内に固溶すると、その構造を安定化し、生体吸収性が変わるので、使用する際に 希望する吸収時間にあった材料を選択する必要がある。

α-TCP も生体活性材料であり、特に水和反応によって容易にカルシウム欠損型ハイ ドロキシアパタイト(Ca-dHAp)に転化することが知られている。この特徴から、人工骨の 利用よりも骨セメントの主成分としての利用が多い。

(a-3) 結晶化ガラス

生体活性ガラスとして最初に登場したのは Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅系ガラス(Hench、「バ イオガラス」、1971年)である。これをきっかけとして高強度と生体活性を併せ持つ数多く の結晶化ガラスが開発されている。CaO-MgO-P₂O₅-SiO₂-CaF₂系結晶化ガラス(Kokubo、 「A-W 結晶化ガラス」、1982年)は、アパタイト(A)と針状のワラストナイト(W)が結晶化し て分散複合した構造である。骨との結合性はアルミナの 6-7 倍、HAp の 1.2 倍ほどを示 し、長骨などの強度的な負荷に耐えることのできる人工骨として期待されている。その他 にはアルノケイ酸塩系(MgO-TiO₂-Al₂O₃-SiO₂-CaF₂)結晶化ガラスが人工骨頭用に開 発されている。

(b) 生体不活性バイオセラミックス

(b-1) アルミナ(Al₂O₃)

溶融法による単結晶体(サファイヤ)と多結晶焼結体がある。化学的安定性の高い親 水性表面を持つ生体不活性材料の代表である。工業材料として広く利用され、材料技 術的に確立している。機械的強度及び耐磨耗性に優れ、生体内で溶解や反応をしな い。生体組織と直接結合はしないが、生体組織親和性に優れ、硬組織代替材料として 実用化されているものの中では、最も長期の実績をあげているセラミックスで、信頼性は 高い。しかし、生体骨と比べて硬すぎるために、生体力学的調和性が無いという問題点 がある。また歯科材料の分野においては、インプラント材料として用いられてきている例 があるが、失敗例も数多くあるという問題点もある[2]。

(b-2) ジルコニア (ZrO_2)

純粋なジルコニアは3種類の結晶構造を持ち、高温側から、立方晶、正方晶、単斜晶 と変態する。特に正方晶→単斜晶はマルテンサイト変態と呼ばれる体積膨張(4-5%)を 伴う変態であり、焼結体内にミクロ割れを発生し、焼結体が壊れてしまうので、MgO、 CaO、Y₂O₃などを固溶させて転移を抑えた焼結体が用いられている。このように部分的 に固溶したジルコニア(部分安定化ジルコニア)は高強度、高靱性、生体不活性な性質をもち、人工歯根や人工関節骨頭としての研究が進んでいる。しかし、この部分安定化ジルコニアは水分により劣化することが知られている[3]。

(b-3) カーボン(C)

カーボンは疎水性表面を持つ生体不活性材料であり、生体内で反応も溶解もせず、 生体親和性は良好である。抗血栓性、耐磨耗性、潤滑性に優れ、人工心臓弁、人工歯 根、人工骨、人工腱、人工靭帯などが開発されている。機械的性質の制御技術はセラミ ックスの中は最も進んでいる。カーボンには幾つかの種類があるが、生体材料として利 用されているのはガラス状炭素(GC)、炭素繊維(CF)、熱分解炭素(PC)及び C/C 複合 炭素である。熱分解炭素には、700-1500°C で析出させる低温熱分解炭素(LTPC)、 1500-2000°C で析出させる熱分解炭素(PC)、2000°C 以上で析出させる熱分解黒鉛 (PG)の3種がある。とくに組織が等方的な低温等方性熱分解炭素(LTIカーボン)は人 工心臓弁として実績をあげている。また、近年注目を浴びている「カーボンナノチュー ブ」の利用も今後考えられる。

これらのバイオセラミックスは、多孔質化することで、生体活性セラミックスでは「骨伝導性 により骨生成がおこる」や「骨の生成能力が促進される」また生体不活性セラミックスでは「生 体組織(骨)が孔内に入って機械的交錯により接着する」、「金属、不活性セラミックスに生体 との親和性を与える」という利点がある。

特に生体活性セラミックスである多孔質リン酸カルシウムは生体適合性や生体骨に対する 骨伝導性を持つために、フィラー、スペーサー、骨充填剤やドラッグデリバリーシステムの担 体の幅広い用途に利用されている[4-8]。特に人工骨として使用する場合には、多孔質リン 酸カルシウムに対して、(1) 気孔内に骨芽細胞が侵入しやすいように気孔径が直径 50-100µm 以上[9]、もしくは 250-300µm 以上であること[10-12]、(2) 気孔内に侵入した骨芽 細胞が多孔体全体に行き渡るように、内部連通孔であること[13-15]、(3) 粗い表面を持つこ と[16,17]、が求められている。

このような特徴を持つ多孔質リン酸カルシウムの歴史は今から約 60 年前から始まった。当 初は、生体中の歯の再石灰化の研究の際に見られた、多孔質炭酸アパタイト(1953 年[18]) や、脱水素化触媒として用いられる材料の一つとして用いられた例(1967 年[19])という生体 材料としての多孔質リン酸カルシウムの研究が主ではなかった。1971 年に Weber らは炭酸 カルシウム(CaCO₃)を用いた多孔質炭酸カルシウムを新しい多孔質生体材料として紹介し ている[20]。それに続いて、1974年にRoyらは炭酸カルシウムが主成分であるサンゴの水熱

	Class	Application
	Hydroxyapatite (HAp)	Dental implant, artificial bone, Bone filler
	Tricalcium phosphate (TCP)	Biocement, artificial cup
Bioactive	Tetracalcium phosphate (TTCP)	Biocement
ceramics	Calcium phosphate glass	Auditory ossicle, biocement
	Calcium phosphate crystallized glass	Artificial bone, artificial crown
	Multicomponent (containing Ca,P) glass	Artificial bone, joint cup
	Alumina (Al ₂ O ₃)	Dental implant, artificial bone, artificial cup, bone filler
	Zirconia (ZrO ₂)	Dental implant, artificial cup
Bioinert	Zinc oxide (ZnO)	Dental cement base material
ceramics	Silica (SiO ₂)	Filler (for dental repair resin)
	Carbon (C)	Artificial heart valve, dental implant, artificial tendon
	Silicon nitride (Si ₃ N ₄)	Filler (for dental repair resin)

Table 2.1 Classification of bioceramics

処理を利用した生体材料用の多孔質水酸化アパタイトの合成について報告している[21]。 その多孔質リン酸カルシウムの作製方法は、表 2.2 に示すように(1) ナチュラルソースタイプ、 (2) フォーミングタイプ、(3) ポアメーカータイプ、(4) パーティクルシェイプタイプ、(5) レプ リカタイプ、(6) ソリッドフリーフォームタイプ、(7) その他、に分類できる。以下ではそれらの 作製方法と特徴について詳細に述べる。

(1) ナチュラルソースタイプ[21-25]

多孔質リン酸カルシウムの作製方法として最も初期から用いられている方法である。材料と してはサンゴ(アラゴナイト)やオニヒトデ(カルサイト)を水熱処理し、焼成する方法や、ウシ の海面骨を焼成する方法が一般的である。水熱処理に使用するリン酸塩水溶液の濃度や 焼成温度を変えることで、組成を変えることができる。しかし、これらの天然材料は高価であ り、またサンゴの場合には焼成後に炭酸カルシウムが残留する、ウシの海面骨の場合には 不純物(炭酸イオンやマグネシウムイオン、ナトリウムイオン等)を含むという問題があり、生 体材料として使用する場合にはこれらのことを考慮に入れる必要がある。

(2) フォーミングタイプ[26-30]

リン酸カルシウムスラリーを発泡、または2種類のリン酸カルシウムの固相反応で生じる 「泡」を「気孔」として利用する多孔質リン酸カルシウムの作製方法である。特に過酸化水素 (H2O2)を用いた多孔質リン酸カルシウムの作製方法が最も一般的である。熱分解と焼結過 程を同時に出来れば最も単純な作製方法であるが、その発泡のコントロールは困難で、希 望する気孔径や気孔率の多孔質リン酸カルシウムを得ることは難しい。また多孔体を構成す る梁(もしくは気孔壁)が薄く、強度が弱いという問題点がある。

(3) ポアメーカータイプ[31-35]

気孔形成のための可燃性有機物の燃焼(ワックス、高分子ビーズ、可燃性有機物)をリン酸カルシウム粉末やリン酸カルシウムスラリーに加える。これらを成型した後、加熱することで 有機物が成型体から燃焼するという方法である。この方法で合成した多孔質リン酸カルシウムの気孔径は加えた有機物の大きさに依存する。また、この方法では有機物の燃焼後、焼 結体にひびが入る、破壊するという問題がある。

(4) パーティクルシェイプタイプ[36-40]

形状の異なるリン酸カルシウム粉末を用いて成形し、それを焼結し、粒子同士の絡み合いによって生じる隙間を気孔として利用する方法である。特に針状粒子を用いると、比表面積

が大きく、気孔径分布が狭い、開気孔性であるという利点がある。しかし、この方法で得られ る気孔径は 0.01-1µm と細胞が進入するには小さく、他のマクロポアを形成する作製方法の 補助的な気孔導入方法として用いることが望ましい。

(5) レプリカタイプ [41-45]

ポリマー担体(ポリウレタンスポンジ、ポリエステル繊維、ポリプロピレンネット、セルロースス ポンジ等)にリン酸カルシウムスラリーをコーティング、もしくは浸漬し、それらを焼成して、多 孔質リン酸カルシウムを得る方法である。基のポリマーと同じ形状となるのが「ポジティブタイ プ」、基のポリマーと逆になるのが「ネガティブタイプ」である。気孔率や気孔径が使用するポ リマー担体に依存するので自由度は低い。

(6) ソリッドフリーフォームタイプ[46,47]

CADやCTデータを基にして、希望する気孔径や気孔形状を設計して、作製した鋳型にリン酸カルシウムスラリーを流し込み、焼結する方法である。人工骨として使用する場合には、 患部の大きさに合わせて設計ができるので、治療中の加工の手間が少なくて済むという利 点はあるが、直径 50µm 以下のポアを作製することは現在の機械の精度では困難である。

(7) その他[48-50]

以上に挙げた多孔質リン酸カルシウムの作製方法以外には、特殊な金型を用いて完全連 通孔で高強度な多孔体を作る方法、凍結乾燥を利用して高配向性の多孔体を作る方法、 泳動電着法を用いて多孔質コーティングをする方法があるが、それぞれ大量生産できない、 一定方向の力に弱い、バルク体の作製が困難である、という解決すべき問題点がある。

このように、それぞれの多孔質リン酸カルシウムの合成方法には一長一短がある。特に「細胞成長に適した多孔質リン酸カルシウム」という点でみると、大きな均一の気孔構造、内部連通孔、高い気孔率を導入することが可能で、かつ作製方法が容易である「フォーミングタイプ」が最も適していると考える。「フォーミングタイプ」の問題点である、「発泡の制御の困難 さ」と「多孔体の弱い強度」は、その合成方法を工夫することで改善できると考える。

近年、Imura らは起泡剤を含むポリアミン-エポキシ系のその場重合を利用した新しい多孔 質ハイドロキシアパタイト(HAp)の合成を報告している。この方法で合成した多孔質 HAp は 内部連通の大きな気孔を持ち、その比表面積は 0.1m²/g であった[29]。

そこで、我々は Imura らの方法を基にして、高温安定型のα型のリン酸三カルシウム (α-TCP)-ポリマー発泡体を合成した。この発泡体を緩衝液中で水熱処理をすると、その

比表面積は 11.13-15.37m²/g の範囲であった。この水熱処理した成形体を焼結することによって、0.34-0.52m²/g の範囲の高い比表面積を持つ多孔質リン酸カルシウムを得た。

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、得られた多孔体中で三次元培養を行った。培養後 MTT アッセイと ALP 活性測定試験をそれぞれ行い、骨芽細胞の細胞増殖能及び細胞分化能を調べ、得られた多孔質リン酸カルシウムの MC3T3-E1 細胞の細胞成長に及ぼす影響を調べた。

Table 2.2 Preparation methods of porous calcium phosphates

作製方法	組 成	気孔径 (気孔 率)	特徴	文 献
1a .ナチュラルソースタイプ:サ ンゴ(アラゴナイト)及びオニヒ トデ(カルサイト)を (NH ₄) ₂ HPO ₄ 中で180~350℃、 12~48hの条件で水熱処理を する。(圧力有)	ΗΑp, β- TCP	約 100µm (使用 するサ ンゴに 依存)	サンゴ(アラゴナイト)及びオニヒトデ (カルサイト)を水熱処理すると、サン ゴはHApになりオニヒトデはβ-TCPに 変換した。	Roy et al. (197 4) [21]
1b.ナチュラルソースタイプ:イ ンド洋産サンゴを(NH ₄) ₂ HPO ₄ で水熱処理してから、900℃、 2hの条件で焼成する。	НАр	気 径 孔 も す る ゴ 存 (ん	出発材料に豊富なインド洋産のサン ゴを使用。 $(NH_4)_2$ HPO ₄ 中で水熱処 理をしてHApに変換してから焼成。 (そのまま焼成してもCaCO ₃ のままで あった。)	Siva kum ar et al. (199 6) [22]
1c.ナチュラルソースタイプ: Poritesサンゴをリン酸二水素 カリウム中で2~17日間水熱 処理をする。	HAp, HAp/ β- TCP, β- TCP	50- 100µm (使用 するサ ンゴに 依存)	リン酸二水素カリウムを加えた水と加 えていない水を用いてPoritesサンゴ の水熱処理を行った。リン酸二水素 カリウムを加えた系では10日で完全 にHApに変換した。(水だけでは17 日間かかった。)その間にはβ-TCPが 存在した。	Xu et al. (200 1) [23]
ld.ナチュラルソースタイプ:ウ シの海面骨をNa ₄ P ₂ O ₇ ・ 10H ₂ Oの濃度を変えて加えて、 加熱する。	多相	約 200µm (使用 するウ シの骨 に依 存)	加えるNa ₄ P ₂ O ₇ ・10H ₂ Oの濃度と焼結 温度を変えることで、HAp、HAp/TCP、 HAp/TCP/NaCaPO ₄ そして TCP/NaCaPO ₄ の組成を持つリン酸カ ルシウムを作製できる。	Lin et al. (199 9) [24]
1e.ナチュラルソースタイプ:ウ シの海面骨を焼成して、有機 物を飛ばす。商品名: Endobon®(Merch GmbH)	HAp (+1wt % CaO)	マクロ ポア: 約 500µm ミクロポ ア:約 3µm	得られたHApはCO ₃ ²⁻ 、Mg ²⁺ 、そして Na ⁺ を含んでいた。また、気孔の形状 が球状ではないためにその圧縮強度 は力を加える方向で異なっていた。	Hin g et al. (199 9) [25]

作製方法	組 成	気孔径 (気孔 率)	特徴	文献
2a.フォーミングタイプ:HAp粉 末にポリビニルアルコールを 加えて、そこへH ₂ O ₂ を加えて 撹拌し、発泡させ、その発泡 体を焼結する。	НАр	撹拌す る条件 に依存 (5- 60%)	Ryshkewitchらの多孔体(Al ₂ O ₃ や ZrO ₂)の作製方法を多孔質HApの作 製に応用した。気孔となる発泡の制 御が難しい。気孔の周りの壁が薄い ために脆い。	Klei n et al. (199 4) [26]
2b.フォーミングタイプ:HAp粉 末にメチルセルロース水溶液 を加えて、撹拌する。 その後、超音波照射をして発 泡させ、その発泡体を焼結す る。	НАр	100- 250µm (60- 90%)	使用するメチルセルロース水溶液の 添加量と濃度、そして照射する超音 波の強度が気孔率を制御するのに重 要。内部連通孔も確認された。	Engi n et al. (199 9) [27]
2c.フォーミングタイプ:易焼結 性のβ-TCP粉末に純水を加 えてスラリーを調製する。その スラリーに界面活性剤を加え て、撹拌し、発泡させて、乾 燥後に1050°C、1hの条件で 焼結をする。	β- ΤСР	200- 400µm (75%)	オリンパス株式会社から販売されて いる「オスフェリオン」として知られて いる。スラリーの濃度と界面活性剤の 量を制御することで、気孔径を制御 できる。また、内部連通孔(100- 200µm)を有する。	Don g et al. (200 2) [28]
2d.フォーミングタイプ:HAp粉 末にポリエチレンイミン水溶 液を加え、スラリーを調製す る。そこへ、界面活性剤、グリ セロールジグリシジルエーテ ルを加え、その場重合する。 その後、焼結する。	НАр	150- 300μm (75%)	泡セラミックス法にイミンとエーテルの 架橋重合反応(その場重合)を取り入 れた、多孔質HApの作製方法。多孔 体内の気孔構造を均一すること可能 である。	Imur a et al. (199 9) [29]
2e.フォーミングタイプ: CaHPO ₄ とCaCO ₃ との固相反 応を利用して、気孔率を制御 した多孔体をテープキャス ティング法を用いて作製する。	НАр	<2μm (8- 62%)	CaHPO₄とCaCO3を850 ℃以上で反 応させる事によって、発生するCO2ガ スの泡を気孔として利用する。得られ たHApは化学量論性である。また、 反応温度が1200 ℃以上では緻密化 する。	Arit a et al. (199 5) [30]

作製方法	組 成	気孔径 (気孔 率)	特徴	文 献
3a.ポアメーカータイプ:ゾル- ゲル法で合成したHAp粉末 にポリビニルブチラール(188- 420µm)を加えて、スリップ キャスティング法で成形する。 仮焼後、1200°C、3hの条件 で焼結をする。	НАр	160- 200 μm (32- 78%)	加えるポリビニルブチラールの量と粒 径分布を制御することで、HApスラ リーのレオロジー特性が変わる。各種 条件で作製した成形体を焼結するこ とで目的に応じた強度と弾性率を持 つ多孔質HApの作製ができる。	Liu et al. (199 7) [31]
3b.ポアメーカータイプ:HAp 粉末にPS粒子、PMMA粒子、 もしくは活性炭粒子を加え、 湿式濾過成形法で成形後、 カプセルフリーHIP焼結 (1000-1200°C、120MPa)を する。	НАр	μm (40- 70%)	湿式濾過成形法という成形法を用い て、気孔率を厚さ方向で傾斜組成の 成形体を作製し、その後、焼結を行う ことで、気孔率分布が異なる多孔質 HApの作製ができる。	Iwat a et al. (199 8) [32]
3c.ポアメーカータイプ:HAp 粉末にナフタレンとPMMAを 加えて、重合し、成形する。 加熱し、有機物を燃焼してか ら焼結する。	НАр	300- 800 μm (< 60%)	HAp粉末とナフタレンそして、PMMA を加えるという「二相混合撹拌」という 方法で多孔質HApを作製した。(1) 気孔の80%以上が300-800µmの範 囲であった。(2)均一で等方性の完 全な内部連通孔を持っている。(3)気 孔率は60%以上である。(4)細胞培 養の担体としての機械的強度を持つ。	Li et al. (200 3) [33]
3d.ポアメーカータイプ:易焼 結性のβ-TCP粉末にゼラチン 溶液と平均粒径700μmのレジ ンビーズを加えて、凍結成形 し、1100°C、1hの条件で焼 結する。	β- ΤСР	マクロ ポア: 250- 350µm ミクロポ ア:2- 3µm	骨形成タンパク質(BMP)を吸着させる担体として作製された。気孔は250- 350μmのマクロポアと2-3μmのミクロ ポアの二峰性のポアを持つ。	Mie ki et al. (199 0) [34]
3e.ポアメーカータイプ:HAp 粉末を低融点ワックスに加え て調製したスラリーに黒鉛を 加えて、1200-1400℃の条件 で焼結する。	НАр	300- 750µт (5- 80%)	黒鉛の含有量、粒径そして焼結温度 を変えることで気孔率、気孔径を制 御することができる。低融点ワックスを 用いる成形法はボールミルを用いた 混合方法と比べて、壊れやすい粉体 でも粒形を壊すことなく混合すること ができる。	Sato et al. (200 2) [35]

作製方法	組 成	気孔径 (気孔 率)	特徴	文 献
4a.パーティクルシェイプタイ プ:尿素を用いた均一沈殿法 で合成した繊維状炭酸含有 HAp(CO ₃ Ap)を1100-1300℃ の条件で焼結する。	НАр	0.1- 1µm (10- 43%)	長さ約50µmのCO ₃ Ap粉末を1150°C、 5hの条件で焼結すると、気孔率39% で気孔径が0.1-1µmのほぼ正規分布 に従う多孔質HApを合成できる。	Kin oshit a et al. (199 4) [36]
4b .パーティクルシェイプタイ プ:尿素を用いた均一沈殿法 で合成した繊維状炭酸含有 HAp(CO ₃ Ap)を成形時の圧 力と焼結温度変えて作製す る。	НАр	0.1- 1μm (17- 55%)	成形時の圧力(20-40MPa)と焼結温 度(1000-1300°C)を変えることで、気 孔率、相対密度そして比表面積を制 御することができた。また、気孔の殆 どが開気孔である。	Aiza waet al. (200 0) [37]
4c.パーティクルシェイプタイ プ:球状、ロッド状、そしてウィ スカー状のHAp粉末を焼結 温度(900及び1000°C)を変 えて焼結する。	НАр	0.01- 1µm (40- 60%)	用いるHAp粉末粒子のアスペクト比、 長軸の長さによって多孔質HApの気 孔の性状(大きさ、形、そして開気孔 の割合)の制御ができる。特にウィス カー状の粒子を用いて作製した多孔 質HApの気孔径分布は狭い。	Nak ahir a et al. (200 0) [8
4d.パーティクルシェイプタイ プ:球状、ロッド状、そしてウィ スカー状のHAp粉末を焼結 方法(常圧焼結及びカプセル フリーHIP焼結)を変えて焼結 する。	HAp、 HAp/ β- TCP	0.01- 1µm (30- 64%)	カプセルフリーHIP焼結を用いると、 異方性の強い粒子では、常圧焼結 体とほぼ同じ気孔率を有する多孔質 焼結体になるが、開気孔性が向上し、 気孔径が増大した。また、それらの微 細構造は高圧ガスによる成長した ネックが確認された。	Tam ai et al. (200 0) [39]
4e.パーティクルシェイプタイ プ:1%アルギン酸ナトリウム HApスラリーを用いて、貫通 孔を空けた多孔質球状HAp 粒子を作製し、1250℃、1.5h の条件で焼成をする。	НАр	300µm (%)	この多孔質球状HApの気孔はそれぞ れ貫通孔が開いているので、この粒 子で構成させるユニットは理論的に は完全内部連通孔を持つことになる。	Tera oka et al. (200 2) [40]

作製方法	組 成	気孔径 (気孔 率)	特徴	文 献
5a.レプリカタイプ(ポジティ ブ):ポリウレタンフォームに HApスラリーを含浸し、 1200℃で焼結する。	НАр	< 2000µ m (58- 80%)	HApスラリーの濃度を変えることで、 気孔率を制御できる。使用できる多 孔質ポリウレタンの気孔径は2000µm 以内までである。(それ以上になると 強度が弱くなり、実用的ではない。)	Tran et al. (200 1) [41]
5b.レプリカタイプ(ポジティ ブ):ポリウレタンフォームとモ ノマーを含むHApスラリーを 含浸し、重合後、1350℃、2h の条件で焼結する。	НАр	200- 400µm (70- 77%)	ポリウレタンフォームとゲルキャスティ ング法を組み合わせた方法。ポリウレ タンフォームに含浸したHApスラリー を均一にしてその場重合することによ り、圧縮弾性率:8GPa、降伏強さ: 5MPa(50wt%HApスラリー使用時)と 強度が改善された。	Ram ay et al. (200 3) [42]
5c.レプリカタイプ(ポジティ ブ):気孔形状の異なる3種類 (シリンダー型、スポンジ型、 そして十字架型)のポリマー にHApスラリーを含浸して、 1300°C、2hの条件で焼結す る。	НАр	49- 250μm (42- 84%)	気孔形状の異なる3種類のポリマー 担体(シリンダー型[ポリエステル繊 維]、スポンジ型[ポリウレタン]、そして 十字架型[ポリプロピレンネット])を使 用した。\$300µmのシリンダー型の多 孔質HApが強度的及び骨伝導性の 結果、担体として最適であった。	Cha ng et al. (200 0) [43]
5d.レプリカタイプ(ネガタイ プ):セルローススポンジを $CO_3Apスラリーを浸漬し、560°C、1hの条件で有機物を飛ばして、CO_2ガスを流しながら、900°C、1hの条件で焼結する。$	CO ₃ A p	100- 200μm (45%)	セルローススポンジをCO ₃ Apスラリー に浸漬し、スポンジの気孔部分にスラ リーを充填する方法。約3wt.%の炭 酸イオンが含有していた。圧縮強度 は約6MPaである。	Lan di et al. (200 3) [44]
5e.レプリカタイプ(ネガタイ プ):ポリスチレンビーズの人 エオパール結晶テンプレート を3次元的に配列し、そこへ 非晶質リン酸カルシウム (ACP)ゾルを含浸し、900℃ で 焼結する。	НАр	1-30μm (%)	気孔径は使用するポリスチレンビーズの粒径に依存する。得られた多孔 質HApを擬似体液(SBF)に浸漬する と、骨類似アパタイトの結晶成長を観 察した。しかし、ACPゾルの組成が一 定せず、焼結後のHApの組成にばら つきがある。	Kan amu ra et al. (200 2) [45]
	<u>л</u> н	気孔径		_ <u>_</u>
--	------------	---	---	--
作製方法	組 成	(気孔 率)	特徴	又献
6a.ソリッドフリーフォームタイ プ:エポキシレジンを希望の 形状に加工し、そこへHApス ラリーを流し込み、成形体を 作製する。800-1350°Cの条 件で焼結する。	НАр	366– 986µт (26- 52%)	エポキシレジンをCADとCTデータを 用いて、希望の形状加工する。標準 偏差50µm以内の精度の気孔を導入 することができる。	Chu et al. (200 1) [46]
6b.ソリッドフリーフォームタイ プ:イメージベースデザイン法 (IBD法)を用いて希望の気 孔形状のデザインをする。そ こへHApスラリーを流し込み、 成形体を作製し、1300℃の 条件で焼結する。	НАр	マクロ ポア: 500- 800μm ミクロポ ア:50- 100μm	IBD法を用いて希望の気孔形状をデ ザインする。レプリカントタイプのポジ ティブ及びネガティブタイプのどちら の作製ができる。HAp/ポリ乳酸複合 体のようなセラミックス/高分子複合体 の作製も可能である。	Tab oas et al. (200 3) [47]
7a.その他:金型にHApスラ リーを入れ、金型の下を一気 に冷却し、一方向凝固をさせ る。その後、凍結乾燥して、 水を除去しから、焼結する。	НАр	80µm (%)	一方向凝固を利用するので、非常に 高配向性の多孔質HApの作製が可 能である。しかし、凍結速度が遅いと 気孔の配向性に乱れが生じる。また、 気孔に水平方向の強度は強いが、垂 直方向の強度が弱いという問題点も ある。	Kato et al. (200 2) [48]
7b.その他:特殊な金型に HAp粉末を金型プレス成形し、 1170℃、1hの条件で焼結す る。	НАр	50- 380µm (58- 64%)	x方向、y方向、そしてz方向に内部連 通孔がある。しかし、全ては開気孔で ない。圧縮強度はサンゴ由来の多孔 質HApと同程度の10MPa以上の値を 示した。金型を使用するので大量生 産や気孔径の制御は困難である。	Lan di et al. (200 3) [49]
7c. その他:泳動電着法(EPD 法)を用いて、電極の上に多 孔質HApを析出させ、乾燥後、 1200℃、1hの条件で焼結す る。	НАр	マクロ ポア: 100- 200μm ミクロポ ア:0.5- 1μm	添加物やバインダーの必要がなく、 内部連通孔を得ることができる。pH や印加電圧を変えることで気孔径を 制御できる。しかし、コストが高く、 コーティングには適するが、バルク体 を得ることは困難である。	Ma et al. (200 3) [50]

1-1 試薬

α-TCP は太平化学産業株式会社製を用いた。図 2.1 にその SEM 写真を図 2.2 に X 線回 折パターンを示す。その平均粒径は 5 μ m であった。50wt%ポリエチレンイミンはアルドリッチ 製を用いた。界面活性剤は花王株式会社製の「MORE」を用いた。グリセロールジグリシジ ルエーテルはシグマ社製のものを使用した。マウス由来の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞 は理化学研究所の細胞開発銀行から入手した。この MC3T3-E1 細胞は、Kodama らによっ て樹立されたもので骨芽細胞の機能や調節機構に関わる研究に数多く利用されている細 胞である。 α -MEM 液体培地、ウシ胎児血清(FBS)、0.25%トリプシンは GIBCO 社製のもの を使用した。Ca/P 比を求めるための「カルシウム E-テストワコー」キット及び「ホスファ C-テス ト ワ コ ー 」 キ ッ ト 、 MTT ア ッ セ イ を 行 う た め の MTT (3-{4,5-dimethyl-2-thyazolyl}-2,5-diphenyl-2H tetrazolium-bromide)(25mg/バイアル)、 ALPase 活性を測定するための「アルカリフォスファ K-テスト ワコー」キットは和光純薬株式 会社製のものを使用した。

2-2 多孔質リン酸カルシウムの合成

多孔体の合成は泡セラミックス法と水熱処理法を組み合わせた方法で作製した。

100mlのナス型フラスコに8gのα-TCP 粉末を入れた。そこへ12gの15wt%ポリエチレンイ ミン水溶液を加えた。そのナス型フラスコにバーベル型の撹拌子を入れて、マグネチックスタ ーラーで30分間撹拌した。その後、超音波ホモジナイザーで30分間混合物を超音波分散 した。この混合物に1gの界面活性剤と0.968gのグリセロールジグリシジルエーテルを加えて、 3分間マグネチックスターラーで撹拌した。発泡したスラリーを先を切ったプラスチック製 5ml シリンジに重合が終了する前に流し込んだ。このシリンジを60°Cの乾燥機に30分間入れた。 30分後、ポリエチレンイミンとグリセロールジグリシジルエーテルが架橋重合により硬化して いることを指で確認してから、成型体をシリンジから取り出した。成型体をカッターの刃で ¢12×1mmに切断し、60°Cの乾燥機で24時間乾燥した。乾燥したサンプルはステンレス製 のオートクレーブ容器に入れ、次の4種類の溶液をそれぞれ50ml加えた。(1) Na₂CO₃/NaHCO₃緩衝液(pH=8.5、サンプル名:CaP1-HT)、(2)Na₂HPO₄/NaOH緩衝液 (pH=11.7、サンプル名:CaP2-HT)、(3)蒸留水(pH=7.4、サンプル名:CaP3-HT or CaP4-HT)である。ここでは便宜上その後の処理過程のことを考えて、名前を2種類に分け



Fig.2.1 SEM photograph of α-TCP powder





て記した。また、リン酸緩衝液の組成及び pH の違いが水熱処理後及びそれに続く焼結後の組成にどのような影響があるかを調べるために(4) リン酸緩衝液 Na₂PO₄/NaH₂PO₄ 緩衝液 (pH=5.7、サンプル名: CaP5-HT)も用いた。それぞれの溶液を加えた後、蓋をしてから、121°C、24 時間の条件で水熱処理を行った。水熱処理したサンプルを 60°C の乾燥機で 24時間乾燥し、その後、大気圧下、1150°C(もしくは 1250°C)、3 時間保持の条件で焼結を行った。焼結後のサンプル名は CaP1-SI(CaP1-HT を 1150°C、3 時間保持で焼結)、CaP2-SI (CaP2-HT を 1150°C、3 時間保持で焼結)、CaP2-SI (CaP4-HT を 1250°C、3 時間保持で焼結)、CaP5-SI(CaP5-HT を 1150°C、3 時間保持で焼結)である。

2-3 多孔質リン酸カルシウムの物性測定

培養後のサンプルの凍結乾燥は東京理科器機社製のFD-1000型の装置を用いた。凍結乾燥するサンプルは、-20°Cのフリーザーで3時間予備冷凍をしてから、凍結乾燥機のサンプル入れに入れ、-45°C、2時間の条件でサンプル保存のために凍結乾燥を行った。

作製した多孔体の構成相の同定は、粉末 X 線回折装置 (PXD;リガク製 Rint-1200)を用 いて行った。X 線源は CuKα₁であり、出力は管電圧 50kV、管電流 150mA である。測定条 件は、走査速度 2.000°/min、サンプリング幅 0.010°、発散スリット 1/2°、散乱スリット 1/2°、受 光スリット 0.15mm である。

生成物の微細構造の観察には走査型電子顕微鏡(SEM;日立製作所製 S-2150)を用いた。サンプルをカーボンテープを貼ったサンプルホルダーに貼り付け、2 分 40 秒間 Au/Pt 蒸着を行った。測定は加速電圧 20kV で観察した。

作製した多孔体の比表面積は、Micrometripics 社製 フローソーブ II2300 型の装置を用いて、BET 法に基づいて測定した。測定は、0.1~0.2gのサンプルを200°C、30分間の条件でサンプルを予備加熱し、サンプル中の水分を完全に除去してから、吸着温度は液体窒素の温度(77K)で窒素へリウム混合気体を吸着する方法で行った。

試料の赤外線吸収特性は、フーリエ変換赤外分光装置(FT-IR; JEOL 社製 WINSPEC-100)を用いて測定した。凍結乾燥したサンプル(約 1.0mg)を電子天秤で精秤し た。そこへ、KBr 粉末をサンプル:KBr の比が 1:100 になるように加えた。サンプルとKBr 粉 末を薬包紙上でスパチュラを用いて混合した。約 2.0mg の混合粉末を用いて測定用の KBr ペレットを作製した。測定範囲は 4000-400cm⁻¹ であり、その分解能は 2 cm⁻¹ である。

電子スペクトルは島津製作所製 BioSpec-miniを用いて 190-1100nm の間で測定した。 ALP 活性測定を行うためのサンプル粉砕には超音波ホモジナイザー(Heidolph 社製 DIAX100)を用いた。また三次元培養後、多孔質リン酸カルシウムに MC3T3-E1 細胞が接着している様子を観察するために、デジタルマイクロスコープ(Keyence 社製 VH-6300)を使用した。

約 1.0mg のサンプルを 15ml 遠沈管に入れ、そこへ 1N-HCl を 10ml 加え、溶解した。カ ルシウムの量はメチルキシレノールブルー法を用いて定量した[51]。 無機リンの量は *p*-メチ ルアミノフェノール還元法で定量した[52]。 それぞれ 10 回測定したものの平均値をカルシウ ムとリンの値として、その値から Ca/P 比を計算した。

得られた多孔質リン酸カルシウムの気孔率は以下の方法で求めた。

サンプルの乾燥重量(W_s)を測定した。そのサンプル(ϕ 12×1mm)をステンレス製の容器に入れ、そこへ溶融したパラフィン(m.p.=48-50°C、比重=0.89g/cm³)を加え、焼結体を覆った。 それを 70°C で 24 時間真空脱気処理を行った。その後室温まで冷却した。サンプルを容器 から取り外し、余分なパラフィンをカッターの刃と研磨紙で取り除いた後、その乾燥重量 (W_{sp})と蒸留水中で湿重量($_wW_{sp}$)を測定した。全気孔率は以下の式を用いて計算した。

パラフィンを含むサンプルの体積(V_{sp})=(W_{sp} -w W_{sp})/ ρ_w (2.1)

サンプルの体積 $(V_s) = V_{sp} - (W_{sp} - W_s)/0.89$ (2.2)

全気孔率={(V_{sp}-V_s)/V_{sp}}×100 (2.3)

ここで、pw は蒸留水の比重(0.998g/cm³、25°C)である。

2-4 MC3T3-E1 細胞の単層培養

凍結保存しておいた MC3T3-E1 細胞入りのアンプルを 37℃ の恒温槽で解凍し、クリーン ベンチ内に準備しておいた 50ml 遠沈管に入れた。ここにα-MEM 液体培地に 10vol.%(全 体積の 10%)FBS を含むように調製した培養液(α-MEM with 10%FBS 培養液)を加え、細 胞濃度を 3.0×10⁵cells/ml にした。この細胞を含む培養液を直径 60mm のディッシュ(以下、 60mm ディッシュと示す。)に 5ml 入れ、蓋をしてから 37℃、5%CO₂に設定した CO₂インキュ ベーターに入れた。培養液は 2 日毎に交換し、計 4 日間培養を行った。位相差顕微鏡で 90%コンフルエントに達したことを確認してから、培養液を吸引し、2ml のリン酸緩衝生理食 塩水 (PBS)で 2 回洗浄した。ちなみに、ディッシュ全体がコンフルエント(90%)に達してから も MC3T3-E1 細胞の単層培養時の細胞形状の変化を位相差顕微鏡で 336 時間まで観察し た。1ml の 0.25%トリプシン溶液を 60mm ディッシュに加え、全体に行き渡らせてから、吸引 した。その後 5ml の培養液を加え、細胞を 60mm ディッシュから剥がした。その細胞懸濁液 を 50ml 遠沈管に移し、1000rpm、3 分間の条件で遠心分離を行った。その上澄み液を吸引 し、MC3T3-E1 細胞を集めた。

2-5 多孔質リン酸カルシウム上での MC3T3-E1 細胞の三次元培養

CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI、CaP4-SIのサンプルを121°C、30分間の条件でオートクレー ブ滅菌を行った。この滅菌したサンプルをそれぞれ別の24孔マルチウェルプレートに入れ た。2-4で得たMC3T3-E1細胞にα-MEM with 10%FBS培養液を加え、最終細胞濃度が 1.0×10⁵cells/mlとした細胞懸濁液をそれぞれのウェルに1mlずつ加えた。多孔質リン酸カル シウム上のMC3T3-E1細胞を37°C、5%CO2に設定したCO2インキュベーター中で14日間 培養し、その様子を位相差顕微鏡で観察した。

2-6 MTT アッセイ

MC3T3-E1 細胞の生細胞数を調べるために、Wanらの報告を参照し、MTTアッセイを行った[53]。MTT アッセイの測定原理は、細胞ミトコンドアリ内膜の脱水素酵素の開裂によって赤紫色の MTT ホルマザンが生成し、この呈色反応が生存する細胞数に比例するということの基づいたものである。MTT 溶液は 7.5mg の凍結乾燥した MTT 粉末を 50ml 遠沈管に入れ、そこへ 30mlのα-MEM with 10%FBS 培養液を加え、溶解し、ろ過滅菌をして調製した。 14 日間培養後、それぞれのウェルから培養液を吸引し、1ml の MTT 溶液を加えた。それを 37°C、5%CO₂に設定した CO₂インキュベーター中で4時間放置した。MTT 溶液を吸引し、 0.5ml の DMSO(Dimethyl sulfoxide)をそれぞれのウェルに加えた。その DMSO 溶液の 570nmの吸光度をスペクトルフォトメーターを用いて測定した。コントロールとして MC3T3-E1 細胞をリン酸カルシウムを加えないで 24 孔マルチウェルプレートで単層培養したものを用いた。

2-7 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性

アルカリホスフォターゼ(ALP)は体内諸器官に広く分布し、その起源は造骨組織に由来 するものが多いといわれており、クル病、線維性骨炎、上皮小体機能亢進症、Paget病、転 移性骨癌、骨軟化症などの造骨組織の疾患に際し、症状の程度に並行して血清中のアル カリホスフォターゼ活性の上昇が見られることが知られている。また MC3T3-E1 細胞における アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性の増加は、その石灰化の程度を表すものの一つであ る。今回 ALPase 活性の測定に用いた方法は「フェニルリン酸基質法」である。この測定方法 の原理は、フェニルリン酸を含む炭酸塩緩衝液中で試料を作用させると、試料中のアルカリ ホスフォターゼによってフェニルリン酸がフェノールとリン酸に分解される。この反応液に発 色試薬としてフェリシアン化カリウムを加えると、酵素反応が停止すると同時に遊離したフェノ ールが 4-アミノアンチピリンと定量的に酸化縮合し、赤色キノン色素を生じる。この赤色キノ ン色素の吸光度を測定することにより試料中の ALPase 活性値を求めるというものである。こ の測定方法は、フェニルホスフェートを基質として用いる改良型 Kind-King 法に基づいたも のである[54]。

多孔質リン酸カルシウム上で MC3T3-E1 細胞を培養し、その後、凍結乾燥したサンプル 電子天秤で精秤した(15.0mg)を15ml遠沈管に入れ、そこへ0.5mlのトリス塩酸緩衝食塩水 (TBS)を加え、超音波ホモジナイザーで1分間粉砕した。その懸濁液を3000G、15分間の 条件で遠心分離を行い、上澄み液(0.2ml)をフィンピペットで得た。ALPase 活性はこの得ら れた上澄み液の一部を用いて測定を行った[53]。pH=10.2の50mM 炭酸塩緩衝液(2ml)を 15ml遠沈管に入れ、蓋をして、37°Cの恒温槽で3分間予備加熱をした。そこへ0.05mlの 上澄み液をフィンピペットで加えた。蓋をして、37°Cの恒温槽で15分間加熱した。この溶液 に発色試薬として36mmol/1のフェリシアン化カリウム(2ml)を加えた。発色した溶液を電子ス ペクトル測定用の石英セルにフィンピペットを用いて共洗いを5回してから、100µl入れた。 波長500nmの吸光度をスペクトルフォトメーターを用いて測定した。基準濃度の検量線は、 アルカリホスフォターゼ活性値(K-A単位)10、20、30、40、50、98.8の溶液から作成した。ま たこのK-A単位に7.1をかけた値が国際単位(IU/1、37°C)であり、この単位を使用した。

2-8 デジタルマイクロコープ観察

凍結乾燥したサンプルに 0.05%トルイジンブルー溶液を 5ml 加え、室温で 30 分間染色した。染色後、余剰のトルイジンブルー溶液を吸引し、5mlの 95%エタノールで各 5 秒間ずつ 3 回洗浄を行い、5mlの無水エタノールで 10 秒間洗浄を行った。染色したサンプルをデジタ ルマイクロスコープで観察した。

3 結果

3-1 粉末 X 線回折(PXD)

図2.3に水熱処理後のサンプルのX線回折パターンを示す。水熱処理後の成型体の全て のピークはブロードであった。CaP1-HT ではハイドロキシアパタイト(HAp)の(300)面に帰属 するピークが32.8°から33.0°の高角度側にシフトしており、これは格子定数が減少したことを 意味する。水熱処理に用いた溶液に含まれている炭酸イオンの一部がHAp構造中に取り



Fig.2.3 XRD patterns of the porous calcium phosphates after hydrothermal treatment

込まれた炭酸イオン含有 HAp であることを示している[56]。Ca2-HT と Ca3-HT は、ピークが ブロードであり、カルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト(Ca-dHAp)であった[57]。

図 2.4 に 1150°C もしくは 1250°C で焼結したサンプルの X 線回折パターンを示す。CaP1-SI、 CaP3-SI、CaP4-SI は、それぞれ HAp、 β -TCP、 α -TCP であった。CaP2-SI は HAp と β -TCP が混合していた。

図 2.5 に pH 及びイオン濃度の異なる2種類のリン酸緩衝液と蒸留水中で水熱処理した後、 焼結した多孔質リン酸カルシウム(CaP2-SI、CaP3-SI、CaP5-SI)の X 線回折パターンを示す。 CaP5-SI では、β-TCP の他に、28.7°、29.6°、30.1°にβ型のピロリン酸カルシウム(β-CPP)に 帰属するピークを観測した。

3-2 FT-IR 測定

図 2.6 に水熱処理後の多孔質リン酸カルシウムの FT-IR スペクトルを示す。CaP1-HT では 1420cm⁻¹ と 875cm⁻¹ に CO₃²⁻に対応する吸収バンドが存在した[58,59]。CaP2-HT では 961cm⁻¹ と 875cm⁻¹ に Ca-dHAp の HPO₄²⁻に対応する吸収バンドが存在した[60]。CaP2-HT では Ca-dHAp の HPO₄²⁻に対応する 961cm⁻¹ と 875cm⁻¹ の吸収バンドと 1225cm⁻¹ のショルダ ーが存在した。875cm⁻¹ の吸収バンドは CO₃²⁻と HPO₄²⁻のどちらの吸収バンドとも重なるので、 それぞれのイオンの含有量を定量的に求めることは困難であった。

図 2.7 に pH 及びイオン濃度の異なる2種類のリン酸緩衝液と蒸留水中で水熱処理した後の多孔質リン酸カルシウム(CaP2-HT、CaP3-HT、CaP5-HT)の FT-IR スペクトルを示す。 pH5.7 の Na₂PO₄/NaH₂PO₄ 緩衝液を用いて水熱処理した CaP5-HT のスペクトルは蒸留水を 用いて水熱処理をした CaP3-HT と類似したスペクトルであった。

図 2.8 に 1150°C、1250°C で焼結した多孔質リン酸カルシウムの FT-IR スペクトルを示す。 CaP1-SI、CaP3-SI、CaP4-SI の吸収バンドはそれぞれ HAp、β-TCP 及びα-TCP に相当する。 CaP2-SI の吸収バンドは HAp とβ-TCP に相当した。

図 2.9 に 1150°C で焼結した多孔質リン酸カルシウム(CaP2-SI、CaP3-SI、CaP5-SI)の FT-IR スペクトルを示す。CaP5-SI では 1213 cm⁻¹と727cm⁻¹に β -CPPの $P_2O_7^4$ に対応する吸 収バンドが観察された。

3-3 サンプルの破断面観察

図 2.10 に得られた蒸留水中で水熱処理した後の多孔質リン酸カルシウム(CaP3-SI)の破面のデジタルマイクロスコープ観察及び SEM 観察の結果を示す。デジタルマイクロスコープ 写真で灰色に写った部分がマクロポア(>100µm)であり黒色に写った部分は内部連通孔である。8 枚の SEM 写真からマクロポアの平均気孔径の大きさを Scion 社製のフリー画像解



Fig.2.4 XRD patterns of the porous calcium phosphates after sintering





[a] CaP2-SI (Na₂HPO₄/NaOH buffer [pH 11.7→11.0])

- [b] CaP5-SI (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer [pH 5.7→5.7])
- [c] CaP3-SI (Distilled water [pH 7.4→5.5])



Fig.2.6 FT-IR spectra of the porous calcium phosphates after hydrothermal treatment



Fig.2.7 FT-IR spectra of the porous calcium phosphates after hydrothermal treatment

- [a] CaP2-SI (Na₂HPO₄/NaOH buffer [pH 11.7→11.0])
- [b] CaP5-SI (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer [pH 5.7→5.7])
- [c] CaP3-SI (Distilled water [pH 7.4→5.5])



Fig.2.8 FT-IR spectra of the porous calcium phosphates after sintering



Fig.2.9 FT-IR spectra of the porous calcium phosphates after sintering

- [a] CaP2-SI (Na₂HPO₄/NaOH buffer [pH 11.7→11.0])
- [b] CaP5-SI (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer [pH 5.7→5.7])
- [c] CaP3-SI (Distilled water [pH 7.4→5.5])





Fig.2.10 SEM photographs and a digital microscope image of the green body after hydrothermal treatment in distilled water

- [a-1] Surface structure (SEM,×100)
- [a-2] Surface structure (Digital microscope image,×100)
- [b] Microstructure (SEM,×5000)

析ソフト Scion Image を用いて求めた結果、その大きさは 121 ± 42μm であった。水熱処理後の成型体の表面は、α-TCP の加水分解による、板状や針状粒子が析出した[61]。

図 2.11 に 1150°C、1250°C で焼結した後の多孔質リン酸カルシウムの破面の SEM 観察の 結果を示す。全ての多孔質リン酸カルシウムで、板状や針状粒子は焼結により、粒子同士 がネック成長し、板状や針状の粒子は観察しなかったが、それらの粒子に由来する凹凸の ある表面であった。

3-4 物性測定(Ca/P比、比表面積、気孔率)

表 2.3 に定量したカルシウム及びリンの値を示し、表 2.4 に水熱処理条件と水熱処理後の 多孔質リン酸カルシウムの Ca/P 比、比表面積の値を示す。表 2.5 に焼結条件と焼結後の多 孔質リン酸カルシウムの比表面積の値と気孔率を示す。それぞれのサンプルの Ca/P 比は 1.77(CaP1-HT)、1.57(CaP2-HT)、1.45(CaP3-HT)、1.45(CaP4-HT)であった。

4 つの多孔質リン酸カルシウムの水熱処理後の比表面積は 11.13-15.37m²/g の範囲であった。焼結後、それらの比表面積の値は 0.34-0.52m²/g の範囲へ減少した。気孔率はそれぞれ 90.2% (CaP1-SI)、80.0% (CaP2-SI)、82.2% (CaP3-SI)、81.7% (CaP4-SI)であった。

3-5 MC3T3-E1 細胞の単層培養

図2.12にMC3T3-E1細胞の単層培養時の位相差顕微鏡観察の結果を示す。MC3T3-E1 細胞は6時間後にはディッシュ底面に接着し、その後増殖した。96時間後には、90%コンフ ルエント状態に達した。更に培養時間が長くなると、細胞がより凝集し、細胞の形状が紡錘 形から菱形や三角形に変化した。

3-6 多孔質リン酸カルシウム上での MC3T3-E1 細胞の三次元培養

図 2.13 から図 2.15 にかけて、MC3T3-E1 細胞を4種類の多孔質リン酸カルシウム上で 14 日間培養する間の位相差顕微鏡観察の結果を示す。全てのサンプルにおいて、培養 3 日 後には、それぞれの多孔質リン酸カルシウム表面に細胞が存在し、接着している様子を観 察した。その時に接着している細胞数は、見かけ上、CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI では有意 な差はなかった。しかしながら、CaP4-SI のサンプルではその細胞数は少なかった。

3-7 MTT アッセイ

図 2.16 に、MC3T3-E1 細胞を4種類の多孔質リン酸カルシウム上で 14 日間培養したもの と、コントロールとして単層培養を行った後に行った MTT アッセイの結果を示す。その結果、 CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI の吸光度は単層培養したものと有意な差はなかった。このこと



Fig.2.11 SEM photographs of the porous calcium phosphates after sintering [a] CaP1-SI [b] CaP2-SI

- [c] CaP3-SI
- [d] CaP4-SI

Table 2.3 Amounts of calcium and phosphorous, and Ca/P ratio of the resulting samples after hydrothermal treatment

Sample	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca/P ratio
CaP1-HT	4.773	2.086	1.77
CaP2-HT	4.103	2.019	1.57
CaP3-HT	3.073	1.638	1.45

Table 2.4 Hydrothermal treatment conditions and characteristicsof the resulting samples after hydrothermal treatment

Sample	Hydrothermal trea Solution	ermal treatment conditions ution Temp.(°C) Time(h)			S.S.A* (m ² g ⁻¹)	Component
CaP1- HT	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ buffer (pH=8.5)	121	24	1.77	11.13	CO ₃ Ap
CaP2- HT	Na ₂ HPO ₄ /NaOH buffer (pH=11.7)	121	24	1.57	15.37	Ca-dHAp
CaP3- HT	Distilled water (pH=7.4)	121	24	1.45	15.19	Ca-dHAp
CaP4- HT	Distilled water (pH=7.4)	121	24	1.45	15.19	Ca-dHAp

* S.S.A. = Specific surface area

Table 2.5 Sintering conditions and characteristics of the resulting samples after hydrothermal treatment

Sample	Sintering Starting sample	Time(h)	S.S.A* (m ² g ⁻¹)	Total porosity (%)	Components	
CaP1- SI	CaP1-HT	1150	3	0.52	90.2	HAp (+ CaO)
CaP2- SI	CaP2-HT	1150	3	0.44	80.0	НАр/β- ТСР
CaP3- SI	CaP3-HT	1150	3	0.46	82.2	β-TCP (+ β-CPP)
CaP4- SI	CaP4-HT	1250	3	0.34	81.7	α-ΤСР

* S.S.A. = Specific surface area



Fig.2.12 Phase-contrast photographs of monolayer-cultured MC3T3-E1 cells















Fig.2.16 MTT assay of the samples after culture of MC3T3-E1 cells for living cells

から CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI 上で培養した MC3T3-E1 細胞の生細胞数は、単層培養 のものに匹敵することを示している。しかしながら、CaP4-SI の吸光度は他のサンプルと比べ て低く、生細胞数が少ないことを示している。

3-8 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性

MC3T3-E1 細胞におけるアルカリホスフォターゼ (ALPase) 活性の増加は、その MC3T3-E1 細胞の成長 (特に細胞分化能)の程度を表すものの一つである。図 2.17 に、 MC3T3-E1 細胞を4種類の多孔質リン酸カルシウム上で 14 日間培養したものの ALPase 活 性の結果を示す。その結果、CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI の活性に違いはなかったが、 CaP4-SI の値はこれら 3 つのサンプルと比較して低かった。これは、CaP1-SI、CaP2-SI、 CaP3-SI 上で培養した MC3T3-E1 細胞の細胞分化能が CaP4-SI で培養したものより高いこ とを示している。

3-9 デジタルマイクロスコープ観察

図2.18に、凍結乾燥したサンプルをトルイジンブルー染色した後にデジタルマイクロスコー プで観察した結果を示す。全てのサンプルで青色に染色した MC3T3-E1 細胞が気孔内を 含めた多孔体全体に行き渡っている様子が観察された。CaP1-HT、CaP2-HT、CaP3-HT で は見かけ上の細胞密度に違いはなかった。しかし、CaP4-SI ではその細胞密度は他の 3 つ のサンプルと比較して低かった。



Fig.2.17 ALPase activities of the samples after culture of MC3T3-E1 cells



Fig.2.18 Light micrographs of the samples stained with toluidine blue after culture of MC3T3-E1 cells

- [a] CaP1-SI
- [b] CaP2-SI
- [c] CaP3-SI
- [d] CaP4-SI

4 考察

粉末 X 線回折パターン、FT-IR スペクトルから、CaP1-HT は一般式、 Ca_{10-x}(PO₄)_{6-x}(CO₃)_x(OH)_{2-x}で示される炭酸含有アパタイト(CO₃Ap)であり、Ca/P 比(=1.77) を用いて計算した結果、その組成式は Ca_{9.19}(PO₄)_{5.19}(CO₃)_{0.81}(OH)_{1.19}(x=0.81)となった[62]。 CO₃Ap における炭酸の含有量は、半定量的であるが、(300)面のピークシフトから求めること ができる。33.0°に(300)面のピークを観察したことから、この CaP1-HT は約 5%の高い含有 率で炭酸を含んでいると考える。上記の組成式から求めた炭酸の理論含有量は約 5.2%で あり、この結果とよい一致を示した。

粉末 X 線回折パターン、FT-IR スペクトルから、CaP2-HT、CaP3-HT、CaP4-HT はそれぞれ Ca-dHAp であった。Ca/P 比によって、Ca-dHAp を次に示すような 2 つの異なる組成式を 持つモデルに分けることができる[63,64]。

モデル 1 Ca_{10-x}(HPO₄)_x(PO₄)_{6-x}(OH)_{2-x}·(H₂O)_x; 0 < x < 1; 1.5 < Ca/P < 1.67 (2.4)

モデル 2 Ca_{9-x}(HPO₄)_{1+2x}(PO₄)_{5-2x}(OH) ·(H₂O); 0 < x < 1; 1.33 < Ca/P < 1.5 (2.5)

モデル 2 の FT-IR スペクトルでは、1225 cm⁻¹ に HPO₄²⁻に帰属する特徴的な吸収バンドが観察されるが、モデル 1 ではその吸収バンドは観察されない。これはモデル 2 中の HPO₄²⁻の存在量がモデル 1 のものより多く、モデル 1 とは異なる位置に存在しているためである[64]。 CaP3-HT において 1225 cm⁻¹ にショルダーを観察したので、これはモデル 2 に対応するものと考えられる。また、CaP2-HT ではこのショルダーが観察されず、Ca/P 比が 1.57 であることからモデル 1 に属すると考えられる。

CaP2-HTとCaP3-HTの組成式をそれぞれのモデルに適用して、Ca/P比から計算すると次のようになる。

CaP2-HT Ca_{9.42}(HPO₄)_{0.58}(PO₄)_{5.42}(OH)_{1.42}·(H₂O)_{0.58}; x = 0.58

CaP3-HT Ca_{8.70}(HPO₄)_{1.60}(PO₄)_{4.40}(OH) \cdot (H₂O); x = 0.30

得られた多孔質リン酸カルシウムの組成は水熱処理時の溶液によってコントールが可能 である。特に、用いた溶液のイオン濃度(CO_3^{2-} 、 HPO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 、 H^+ 、 OH^-)は、リン酸カ ルシウムの組成のコントロールに効果的な因子である。CaP1-HT では、 CO_3^{2-} のイオ ン濃度が HPO_4^{2-} と比べて高いので、Ca-dHAp 中にある 2 つの OH⁻のサイトに HPO_4^{2-} の代わりに入り、CO₃Ap が生成する。CaP3-HT では、pH=11.7 の溶液中で PO₄³⁻が優 先的に存在しており[65]、HPO₄²⁻が高い含有率である Ca-dHAp が得られた。

CaP1、CaP2、CaP3の熱的反応は、次のように示される。

CaP1:

 $Ca_{9.19}(PO_4)_{5.19}(CO_3)_{0.81}(OH)_{1.19} \rightarrow m Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + n CaO + [x CO_2] + [y H_2O]$

CaP2:

CaP3:

 $Ca_{8.70}(HPO_4)_{1.60}(PO_4)_{4.40}(OH) \cdot (H_2O) \rightarrow m"\beta - Ca_3(PO_4)_2 + n"\beta - Ca_2P_2O_7 + [x H_2O]$

CO₃Ap を熱処理すると、化学量論性 HAp と酸化カルシウムが生じる。CaP1-SI の XRD パタ ーンから酸化カルシウムの生成は確認できなかった。これは、20= 32.3°のピークが酸化カル シウムの特徴的なピークと HAp のピークの一つと重なってしまうためである[66]。FT-IR スペ クトルでは 1420cm⁻¹と 875cm⁻¹にそれぞれ CO₃²⁻のv₃及びv₂振動に帰属する吸収バンドが 消失していた。このことは CaP1-HT が上記に示したように化学量論性 HApと酸化カルシウム に分解したことを示している。

CaP2-SI では、上記に示したように HAp とβ-TCP の生成を観察した。これは XRD パターン と FT-IR スペクトルからも支持される結果である。

モデル 2 に属する Ca-dHAp は、熱的に分解し β -TCP と β 型のピロリン酸カルシウム (β -CPP)を与える。モデル 2 に属する CaP3-HT を焼結した CaP3-SI の XRD パターンから、 β -CPP の生成は確認できなかった。これは 2 θ = 29.6°のピークが β -CPP の特徴的なピークと β -TCP のピークの一つと重なってしまうためである[66]。FT-IR スペクトルでは、875 cm⁻¹ の HPO₄²⁻に対応する吸収バンドが消失した。このことは、CaP3-HT が上記に示したように β -TCP と β -CPP に分解したことが示される。

また、CaP5-SI では、XRD パターン及び FT-IR スペクトルから β -CPP と β -CPP の生成が観察された。CaP3-SI と比べて、 β -CPP の存在割合が大きいことを示している。これは水熱処理時の pH はほぼ同じ (pH=5.5~5.7) であるが、CaP5-HT の方が溶液に存在するリン酸のイオン濃度は高いので CaP3-HT と比べて、HPO₄²⁻が高い含有率な Ca-dHAp を生成したと考えられる。この CaP5-HT の焼結時の HPO₄²⁻の熱分解によって生じた P₂O₇⁴を含むリン

酸カルシウムのβ-CPP は、CaP3-HT の熱分解によって生じる量よりも多いと考えることができる。

焼結後の多孔質リン酸カルシウムは 80%以上の高い気孔率を持ち、大きな気孔径(直径 100µm 以上)を有していた。それに加え、表面粗さも保持していた。比表面積の値は 0.3m²/g 以上であり、これは骨生成促進に働くドラッグの吸着に必要な 0.2m²/g の値[67]を十分に満たしている。

焼結したサンプル(CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI、CaP4-SI)中で MC3T3-E1 細胞を三次元 培養した結果、全てのサンプルにおいて、培養直後はMC3T3-E1細胞は球状で多孔質リン 酸カルシウムの表面付近に存在していた。しかし、培養 3 日後には細胞の形状は球状から 紡錘状に変わり、それぞれの多孔質リン酸カルシウム表面に接着した。しかし、その細胞数 は、CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI では見かけ上同じであったが、CaP4-SI 表面付近の細胞数 は他の3つのものと比較して少なかった。14日間培養後にトルイジンブルー染色した後のデ ジタルマイクロスコープで観察した結果も培養中の位相差顕微鏡の観察の結果と対応して いた。これは、CaP4-SIの構成主成分がリン酸カルシウムの中でも溶解度の非常に高い α-TCP であるために、培養中にこのα-TCP から溶け出したカルシウムイオンやリン酸イオン が MC3T3-E1 細胞の細胞成長を阻害したためであると考える。この結果は、ALP 活性測定 とMTT アッセイの測定結果から、CaP4-SI のサンプルの値が他のサンプルに比べて低い値 であったことからも支持される。一般的には、α-TCP はその高い溶解度のために、例えば β-TCPと比べた場合、非常に低い細胞成長であることがYuanらによって報告されている[68]。 しかしながら、今回の結果では顕著な細胞成長の阻害は観察されなかった。これは、α-TCP の生成方法の違いにより、その溶液中での反応性が異なるためであると考える。Duracan ら は、α-TCP の合成方法によって水溶液中での加水分解反応性が異なると報告しており[69]、 今回作製した CaP4-SIのα-TCPの反応性は低かったので、細胞成長の著しい阻害がなかっ たと考えることができる。

CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI では、単層培養したものに匹敵する細胞活性であった。それ ぞれにサンプルを構成している HAp、酸化カルシウム、β-TCP、β-CPP は生体親和性をもつ 材料であることが知られている[70-73]。実際にそれぞれのサンプルを用いて実験を行った 結果において、MC3T3-E1 細胞の細胞成長は阻害されなかった。

以上の結果から、CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI は MC3T3-E1 細胞の細胞成長に対して有 用な多孔質材料であることがわかった。

5 結言

61

大きな気孔径、高い気孔率と同時に高い比表面積を持つ多孔質リン酸カルシウムの新し い合成方法として、泡セラミックス法と水熱処理法を組み合わせた合成方法を開発した。水 熱処理に用いる溶液を変えることで、得られる多孔質リン酸カルシウムの組成をコントロール することが出来た。焼結した多孔質リン酸カルシウムは、人工骨として要求される気孔率 (60%以上)、気孔径(直径 100µm以上)及び表面粗さを有していた。特に、その比表面積 は 0.34-0.52m²/g であり、これは Imura らが合成した多孔質 HAp の 3 倍以上の値を示した。 また、焼結した多孔質リン酸カルシウム(CaP1-SI、CaP2-SI、CaP3-SI)で培養した骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞の細胞活性は、MTT アッセイ、ALPase 活性、細胞密度の結果において、 単層培養のものに匹敵する結果を示した。

引用文献

[1] Niwa S. Hydroxyapatite in orthopedic surgery. Gypsum & Lime 1987;211:377-83.

[2] Tachikawa N, Taira K, Okada T, Munakata M, Masaka K, Shiota M, Kasugai S. A clinical study on unfavorable cases of dental implant. Kokubyo Gakkai Zasshi 2003;70:182-9.

[3] Sato T, Shimada M. Control of the tetragonal-to-monoclinic phase transformation of yttria partially stabilized zirconia in hot water. J Mater Sci 1985;20:3988-92.

[4] de Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. Biomaterials 1980;1:47-50.

[5] Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop Rel Res 1981;157:259.

[6] Damien CJ, Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. J Appl Biomaterials 1990;2:187-208.

[7] Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, Wada E, Katagiri Y. Development of a porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. J Biomeá Mater Res 1998;39:536-8.

[8] Netz DJA, Sepulveda P, Pandolfelli VC, Spadaro ACC, Alencastre JB, Bentley MVLB, Marchetti JM. Potential use of gelcasting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system. Int J Pharm 2001;213:117-25.

[9] Le Huec JC, Shaeverbeke T, Clement D, Faber J,Le Rebeller A. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. Biomaterials 1996;16:113-8.

[10] Klawiter JJ, Bagwell JG, Weinstein AM, Sauer BW, Pruitt JR. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. 1976;10:311-21.

[11] Eggli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with bone of rabbits. Clin Orthoped. 1987;232:127-38.

[12] Dauculsi G, Passuti N. Effect of the macropotosity for osseous substitution of calcium phosphate Biomaterials 1990;11:86-87.

[13] Holmes R. Bone regeneration within a coralline hydroxyapatite implant. Plast Reconstr Surg 1979;63:626-33.

[14] Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. J Orthop Res 1985;3:301-10.

[15] del Real RP, Wolke JGC, Vallet-Regí M, Jansen JA. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. Biomaterials 2002;23:3673-80.

[16] Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL, Dean DD, Schwartz Z, Boskey AL. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent of surface microtopography. Calcif Tissue Int 2002;71:519-29

[17] Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. Biomaterials 2001;22:87-96.

[18] Gore JT. Role of calcium carbonate in dental caries. J Am Dent Ass 1953;47:180-9.

[19] Polymer Corp. Ltd. Dehydrogenation of catalysts of improved activity. Brit 1967;12

[20] Weber JN, White RA, Lebiedzik J. New porous biomaterials by replication of echinoderm skeletal microstructure. Nature 1971;233:337.

[21] Roy DM, Linneham SK. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. Nature 1974;247:220-2.

[22] Sivakumar M, Sampath Kumar TS, Shantha KL, Panduranga Rao K. Development of hydroxyapatite derived from Indian coral. Biomaterials 1996;17:1709-14.

[23] Xu Y, Wang D, Yang L, Tang H. Hydrothermal conversion of coral into hydroxyapatite. Mater Character 2001;47:83-7.

[24] Lin FH, Liao CJ, Chen KS, Sun JS. Preparation of a biphasic porous bioceramics by heating bovine cacellous bone with $Na_4P_2O_7 \bullet 10H_2O$ addition. Bioceramics 1999;20:475-84.

[25] Hing KA, Best SM, BONFIELD W. Characterization of porous hydroxyapatite. J Mater Sci: Mater Med 1999;10:135-45.

[26] Klein CPAT, de Groot K, Weiqun C, Yuabo L, Xingdong Z. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues. Biomaterials 1994;15:31-4.

[27] Engin NO, Tas AC. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics. J

Eur Ceram Soc 1999;19:2569-72.

[28] Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. Biomaterials 2002;23:4493-502.

[29] Imura K, Uemoto H, Tanaka J, Kikuchi M, Yamazaki, H. New process of sintered porous hydroxyapatite. the 21th Nihon Biomaterial Gakkai Taikai Yokosyu 1999: 70.

[30] Arita H, Castano VM, Wilkinson DS. Synthesis and processing of hydroxyapatite ceramic tapes with controlled porosity. J Mater Sci: Mater Med 1995;6:19-23.

[31] Liu DM, Preparation and characterization of porous hydroxyapatite bioceramic via a slip-casting route. Ceramics Internatonal 1998;24:441-6.

[32] Iwata M, Shimono A, Kishiro K, Kunieda Y. Preparation of porous hydroxyapatite materials with a continuous porosity profile by use of a filtration method. J Japan Inst Metals 1998;62:1088-94.

[33] Li SH, de Win R, Layrolle P, de Groot K. Novel method to manufacture porous hydroxyapatite by dual-phase mixing. J Am Ceram Soc 2003;86:65-72.

[34] Mieki A. Bone-inductive activity of β -tricalcium phosphate-bone morphogenetic protein complex. Aichi Gakuin Daigaku Shigakkaishi 1990;28:43-58.

[35] Sato T, Besshi T, Kori T, Hatano A, Tamatani J. Preparation and structure control of porous hydroxyapatite. J Soc Mat Sci Japan 2002;51:637-41.

[36] Kinoshita M, Kimura M, Aizawa M, Itatani K, Kishioka A. Fabrication of porous-apatite ceramics from fibrous carbonate-containing hydroxyapatite. Muki Materiaru 1994;1:521-5.

[37] Aizawa M, Howell FS, Itatani K, Yokogawa Y, Nishizawa K, Toriyama M, Kameyama, T. Fabrication of porous ceramics with well-controlled open pores by sintering of fibrous hydroxyapatite particles. J Ceram Soc Japan 2000;108:249-53.

[38] Nakahira A, Tamai M, Sakamoto K, Yamaguchi S. Sintering and microstructure of porous hydroxyapatite. J Ceram Soc Japan 2000;108:99-104.

[39] Tamai M, Miki S, Pezzotti G, Nakahira A. Fabrication and evaluation of porous hydroxyapatite by pressureless sintering and capsule-free HIP sintering. J Ceram Soc Japan 2000;108:915-920.

[40] Teraoka H, Yokokawa Y, Kameyama T. A new idea of constructing porous hydroxyapatite ceramics. The 6th Symposium on Ceramics in Medicine, Biology and Biomimetics 2002:14.

[41] Tran J, Tian J. Preparation of porous hydroxyapatite. J Mater Sci 2001;36:3061-6.
[42] Ramay HR, Zhang RM. Preparation of porous hydroxyapatite scaffold by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. Biomaterials 2003;24:3293-302.

[43] Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW. Biomaterials 2000;21:1291-1298.

[44] Landi E, Celotti G, Logroscino G, Tampieri A. Carbonated hydroxyapatite as bone substite. J Eur Ceram Soc 2003;23:2931-7.

[45] Kanamura K, Hagiwara T, Hamagami J, Umegaki T. Fabrication and in vitro characterization of porous bioactive ceramics with highly controlled microstructure. Phosphorus Res Bull 2002;13:147-52.

[46] Chu TMG, Halloran JW, Hollister SJ, Feinberg SE. Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. J Mater Sci: Mater Med 2001;14:471-8.

[47] Taboas JM, Maddox RD. Krebsbach PH, Hollister SJ. Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. Biomaterials 2003;24:181-94.

[48] Kato T, Suetsugu Y, Tanaka J, Yokota T. Preparation of hydroxyapatite ceramics with one-dimensinal pore using freeze-dry process. The 6th Symposium on Ceramics in Medicine, Biology and Biomimetics 2002:22.

[49] Ito A, Sakurai T, Sogo Y. Development of high strength porous hydroxyapatite with linear pore arrangement. The 23rd annual meeting of the Japanese society for biomaterials 2001:119.

[50] Ma J, Wang C, Peng KW. Electrophoretic deposition of porous hydroxyapatite scaffold. Biomaterials 2003;24:3505-10.

[51] Kitano M, Ueda J. Spectrophotometric determination of calcium with methylxylenol blue. Nippon Kagaku Zasshi 1971;92:168-70.

[52] Drewes PA. Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. Clinica Chimica Acta; Int J Clin Chem 1972; 39:81-8.

[53] Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. The cytotoxicity evaluation of Kevlar and silicon carbide by MTT assay. J Mater Sci: Mater Med 1994;5:154-9.

[54] Kind PRN, King EJ. Estimation of plasma phosphatase by determination of hydrolyzed phenol with aminoantipyrine. J Clin Path 1954;7:332-6.

[55] Imranul AM, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate rations as carriers for rhBMP-2. Biomaterials 2001;22:1643-51.

[56] Kumar TSS, Manjubala I, Gunasekaran J. Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation. Biomaterials 2000;21:1623-9.

[57] Liu SzC, Chen SY, Liu DM, Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratio. Biomaterials 2003;24:3981-8.

[58] Barralet J, Knowles JC, Best S, Bonfield W. Themal decomposition of synthesized carbonate hydroxyapatite. J Mater Sci: Mater Med 1994;5:154-9.

[59] Rehman I, Bonfield W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FT-IR spectroxcopy. J Mater Sci: Mater Med 1997;8:1-4.

[60] Vallet-Regí M, Rodríguez-Lorenzo LM, Salinas AJ. Synthesis and characterization of calcium deficient apatite. Solid State Ion 1997;101-3:1279-85.

[61] Yashimura M, Suda H, Okamoto K, Ioku K. Hydrothermal synthesis of biocompatible whiskers. J Mater Sci 1994;29:3399-402.

[62] Joris SJ, Amberg CH. Nature of deficiency in nonstoichiometric hydroxyapatites. I. Catalytic activity of calcium and strontium hydroxyapatites. J Phys Chem 1971;75:3167-71.

[63] Joris SJ, Amberg CH. Nature of deficiency in nonstoichiometric hydroxyapatites. II. Spectroscopic studies of calcium and strontium hydroxyapatites. J Phys Chem 1971;75:3172-8.

[64] Anderís-Vergés M, Fernández-González C, Martínez-Gallego M, Solier JD, Cachadiña I, Matijević E. A new route for the synthesis of calcium-deficient hydroxyapatites with low Ca/P ratio: both spectroscopic and electric characterization. J Mater Res 2000;15:2526-33.

[65] Pecsok RL, Shelds LD. Modern methods of chemical analysis. Tokyo: Tokyo Kagaku Dojin, 1971. p. 348.

[66] Raynaoud S, Champion E, Bernache-Assollant D. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ration II. Calcinations and sintering. Biomaterials 2002;23:1073-80.

[67] Imura K. Porous sintered calcium phosphates and its preparation method. Jpn Patent No.P2000-302567A, 2000.

[68] Yuan H, de Brujin JD, Li Y, Feng J, Yang Z, de Groot K, Zhang X. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous α -TCP and β -TCP. J Mater Sci: Mater Med 2001;12:7-13.

[69] Duracan C, Brown PW. Reactivity of α -tricalcium phosphate. J Mater Sci 2002;37:963-9.

[70] Doi Y, Iwanaga H, Shibutani T, Moriwaki , Iwayama Y. Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. J Biome Mater Res 1999;47:424-33.

[71] Sun JS, Tsuang YH, Liao CJ, Liu HC, Hang YS, Lin FH. The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts. J Biomed Mater Res 1997;37:324-34.

[72] Guigand M, Pellen-Mussi P, Goff AL, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. J endod 1999;25:419-23.

[73] Sawai J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. J Microbiol Medhods 2003;54:177-82.

第3章 培養軟骨-多孔質リン酸三カルシウム接合システムに基づいた 新しい人工関節軟骨モデルの研究

1 緒言

現在、軟骨再生のために用いられている細胞として「同種軟骨細胞」、「自己軟骨細胞」、 「幹細胞」、「自己骨髄間葉系細胞」、そして「胚性幹細胞(ES 細胞)」が知られている。それ ぞれの特徴について以下に示す。

(1) 同種軟骨細胞

同種軟骨細胞を用いた移植は、現在のところ実験的に最もきれいに軟骨欠損を修復する ことのできる方法の1つである。しかし、臨床に使うには問題点がいくつかあり、実用化には 至っていない。それは同種移植であるので disease transmission、あるいは免疫反応の問題 があるということである。感染症は酵素連鎖反応を用いて、既知のものは否定できるが、それ 以外のものに対しては無効である。免疫反応も軟骨では低く問題とならない可能性があるが、 そのことをヒトを用いて実験することはできないので、明らかにはなっていない。

Advance Tissue Science 社の Neocyte はヒト同種軟骨細胞移植の商品であり、現在、米国 食品薬品局に申請中である。日本における大きな問題は同種軟骨細胞をどこから採取する かという問題である。Tissue banking system が構築されておらず、死体からの採取は困難で ある。

(2) 自己軟骨細胞

自己軟骨細胞では同種軟骨細胞で問題であった、disease transmission や免疫反応の問題は無く、臨床応用しやすい。しかし、自己組織を採取するために組織欠損が生じ、多量の自己細胞を採取することができない。そのため少量を採取し、増殖する必要がある。

軟骨細胞に限らず多くの細胞では、分化した機能を維持したまま細胞を増殖させることは 困難である。軟骨細胞を単層培養で増殖させると、その分化した形質を失う。しかしコラーゲ ンゲル包埋培養では、分化した形質は維持され、長期間の培養が可能となる。

(3) 幹細胞

幹細胞とは、それ自身は分裂能力を維持し、その後細胞が様々な組織に分化する細胞の ことをいう。幹細胞を増殖させた後に目的とする組織に分化させれば、最初の細胞数が少量 であっても、大きな組織を修復させることが可能である。



Fig.3.1 Schematic view of the cultured cartilage / porous $\beta\text{-TCP}$ system

(4) 自己骨髄間葉系細胞

軟骨、骨、筋肉、脂肪、腱などの元になる間葉系幹細胞に近い細胞と考えられているのが、 骨髄間葉系細胞である。ヒトの骨髄間葉系細胞でも、*in vitro*で培養条件を変えると、骨、軟 骨、脂肪、筋肉になることが知られている。しかし、ヒトから採取した骨髄間葉系細胞は無限 に増殖したという報告や、間葉系のあらゆる組織の細胞に分化したという報告はない。

近年、脂肪、筋肉、末梢血中にも骨格系の前駆細胞の存在が報告されている。このような 細胞が体中いたるところに存在するにも関わらず、十分な組織再生ができないのは、それら の細胞数が不十分であるためと考えられており、その細胞を増殖して移植する方法が考えら れている。

骨髄中の間葉系細胞を in vitro で増殖させ免疫不全マウスの皮下に移植すると骨軟骨が 形成することから、骨髄の間葉系細胞の中には少なくとも骨と軟骨の前駆細胞があることが 明らかとなっている。

(5) 胚性幹細胞(ES 細胞)

胚性幹細胞(ES 細胞)はほぼ無制限に細胞を増殖させることが可能であり、しかも増殖さ せた後でもあらゆる細胞に分化する能力を持つ。したがって ES 細胞は再生医療において 理想的な性質を持つ細胞である。

ES 細胞は同種移植になるために免疫反応の問題が生じる。その改善策として ES 細胞内 にドナーの核を入れるマイ ES 細胞を用いる方法などが考案されている。

ES 細胞を様々な細胞へ分化コントロールする方法が報告されているが、軟骨への特異的分化誘導法はまだ確立されておらず、確実に目的とする組織だけに誘導する技術が必要である。

このように、それぞれの用いる細胞には一長一短がある。そのことを踏まえて、in vitro に おいて、新しい人工関節軟骨モデルを作製し、確立する場合、用いる細胞は出来るだけ、 由来が明確で、分化過程を段階毎に追うことができることが重要である。そこで、今回その条 件を満たす軟骨株細胞としてマウス胚性腫瘍由来株細胞 ATDC5 細胞を選択した。

ATDC5 細胞は 1990 年に Atsumi らによって多分化能を持つという ES 細胞類似の胚性腫 瘍細胞 (EC 細胞)株 AT805 から樹立された細胞である。 ATDC5 細胞は腫瘍を造りだす性質 を持たないので、純粋に軟骨分化を追う事ができる細胞としては非常に有用である。 ATDC5 細胞を用いた in vitro における軟骨多分化モデルの最大の特徴は、軟骨初期分化から後期 分化に至るプロセスを 1 つの系で再現できる点である。 しかも、 ATDC5 細胞の軟骨分化能 は非常に高く、最終的には培養シャーレ内で分化した軟骨細胞でその 85%が占められる。 未分化 ATDC5 細胞は、均一な集団として倍加時間 15-16 時間で分裂を繰り返した後、コン フルエントに達すると接触阻害により増殖を停止する。その後、凝集領域が形成されて、その中に軟骨細胞が出現する(初期分化)。凝集領域では II 型、IX 型、XI 型コラーゲンやア グリカンなどの細胞外基質を排出する軟骨細胞が倍加時間 36-48 時間で増殖を続け、軟骨 結節が形成される。その一方で、凝集間隙を占有する細胞群は線維芽細胞の性格を保持 し続ける。やがて結節内の軟骨細胞は増殖を停止し、分化成熟をした細胞が肥大化して X 型コラーゲンを排出するようになる。そして最終的に肥大化軟骨細胞の周囲の基質小胞か ら細胞外基質の石灰化が進行する(後期分化)[1,2]。

そこで本章では、培養軟骨と生体骨との間の接着を改善するために、第2章で作製した 多孔質リン酸カルシウムの内、生体吸収性に優れ、生体骨との接着が期待できる「多孔質リ ン酸三カルシウム(β-TCP)」とATDC5 細胞をコラーゲンゲル中で培養した「培養軟骨」[3]か らなる培養軟骨-多孔質リン酸三カルシウム接合システムを作製した(図 3.1)。

2 実験方法

2-1 試薬

α-TCP は、太平化学産業株式会社製を用いた。図 2.1 にその SEM 写真を図 2.2 に X 線 回折パターンを示す。その平均粒径は 5µm であった。50wt%ポリエチレンイミンは、アルドリ ッチ製を用いた。界面活性剤は、花王株式会社製の「MORE」を用いた。グリセロールジグリ シジルエーテルは、シグマ社製のものを使用した。軟骨株細胞 ATDC5 細胞は、理化学研 究所の細胞開発銀行から入手した。D-MEM/F-12 液体培地、ウシ胎児血清(FBS)、0.25% トリプシンは、GIBCO 社製のものを使用した。Cellmatrix type I-A(A 液、B 液、そして C 液) と 1%コラゲナーゼは、新田ゼラチン株式会社製のものを用いた。10%中性緩衝ホルマリン 液、0.05%トルイジンブルー液、トリス塩酸緩衝液(TBS)そして「アルカリフォスファ K-テスト ワコー」キットは、和光純薬株式会社製のものを使用した。

2-2 測定装置

サンプルの凍結乾燥は、東京理科器機社製の FD-1000 型の装置を用いて行った。凍結 乾燥するサンプルは、-20°C のフリーザーで3時間予備冷凍をしてから、凍結乾燥機のサン プル入れに入れた。そして、-45°C、2時間の条件で凍結乾燥を行った。

作製した多孔体の構成相の同定は、粉末 X 線回折装置(PXD;リガク製 Rint-1200)を用いて行った。X 線源は CuKα1 であり、出力は管電圧 50kV、管電流 150mA である。測定条

件は、走査速度 2.000°/min、サンプリング幅 0.010°、発散スリット 1/2°、散乱スリット 1/2°、受 光スリット 0.15mm である。

生成物の微細構造の観察は、走査型電子顕微鏡(SEM;日立製作所製 S-2150)を用いた。サンプルをカーボンテープを貼ったサンプルホルダーに貼り付け、2 分 40 秒間 Au/Pt 蒸着を行った。測定は、加速電圧 20kV で観察した。

作製した多孔体の比表面積は、Micrometripics 社製 フローソーブ II2300 型の装置を用いて、BET 法に基づいて測定した。測定は、0.1~0.2gのサンプルを200°C、30分間の条件でサンプルを予備加熱し、サンプル中の水分を完全に除去してから、吸着温度は液体窒素の温度(77K)で窒素へリウム混合気体を吸着する方法で行った。

試料の赤外線吸収特性は、フーリエ変換赤外分光装置(FT-IR; JEOL 社製 WINSPEC-100)を用いて測定した。凍結乾燥したサンプル(約 1.0mg)を電子天秤で精秤し た。そこへ、KBr粉末をサンプル:KBr比が1:100になるように加えた。サンプルとKBr粉末 を薬包紙上でスパチュラを用いて混合した。約2.0mgの混合粉末を用いて測定用のKBrペ レットを作製した。測定範囲は4000-400cm⁻¹であり、その分解能は2 cm⁻¹である。

電子スペクトルは、島津製作所製 BioSpec-miniを用いて 190-1100nm の間で測定した。 ALP 活性測定を行うためのサンプル粉砕を行うために超音波ホモジナーザー(Heidolph 社 製 DIAX100)を用いた。また培養後、多孔質リン酸カルシウムに MC3T3-E1 細胞が接着し ている様子を観察するために、デジタルマイクロスコープ(Keyence 社製 VH-6300)を使用し た。ATDC5 細胞の成長の観察をするために、位相差顕微鏡(Olympus 社製 BX40)を使用 した。

2-3 多孔質リン酸三カルシウム(β-TCP)の作製

多孔体の作製は、前節で用いた泡セラミックス法と水熱処理法を組み合わせた方法で作 製した[4]。

100mlのナス型フラスコに8gのα-TCP粉末を入れ、12gの15wt%ポリエチレンイミン水溶液を加えた。そのナス型フラスコにバーベル型の撹拌子を入れて、マグネチックスターラーで30分間撹拌した。その後、超音波ホモジナイザーで30分間混合物を超音波分散した。 この混合物に1gの界面活性剤と0.968gのグリセロールジグリシジルエーテルを加えて、3分間マグネチックスターラーで撹拌した。発泡したスラリーは、先を切ったプラスチック製5mlシリンジに重合が終了する前に流し込んだ。このシリンジを60°Cの乾燥機に30分間入れた。 30分後、ポリエチレンイミンとグリセロールジグリシジルエーテルが架橋重合により硬化していることを指で確認してから、成型体をシリンジから取り出した。成型体をカッターの刃で ¢12×1mmに切断し、60℃の乾燥機で24時間乾燥した。乾燥したサンプルは、ステンレス製のオートクレーブ容器に50mlの蒸留水と共に入れた。蓋をしてから、121℃、24時間の条件で水熱処理を行った。水熱処理したサンプルを60℃の乾燥機で24時間乾燥し、その後、 大気圧下、1150℃そして3時間保持の条件で焼結を行った。

2-4 培養軟骨-多孔質β-TCP の作製

2-4-1 ATDC5 細胞の培養

凍結保存しておいた ATDC5 細胞入りのアンプルを 37℃ の恒温槽で解凍し、クリーンベン チ内に準備しておいた 50ml 遠沈管に一旦入れた。ここに D-MEM/F-12 液体培地に 5vol.% (全体積の 5%)FBS を含むように調製した培養液 (D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液)を加 え、細胞濃度を 3.0×10⁵ cells/ml にした。この細胞を含む培養液を直径 60mm ディッシュ(以 下、60mm ディッシュと示す)に 5ml 入れ、蓋をしてから 37℃、5%CO₂ に設定した CO₂イン キュベーターに入れた。培養液は 2 日毎に交換し、計 7 日間培養を行った。位相差顕微鏡 で 90%コンフルエントに達したことを確認してから、培養液を吸引し、2ml のリン酸緩衝生理 食塩水 (PBS)で 2 回洗浄した。ちなみに 90%コンフルエントに達してからも ATDC5 細胞の 単層培養時の細胞形状の変化を位相差顕微鏡で 168 時間まで観察した。そして 1ml の 0.25%トリプシン溶液を 60mm ディッシュに加え、全体に行き渡らせてから、吸引した。その 後 5ml の培養液を加え、細胞を 60mm ディッシュから剥がした。その細胞懸濁液を 50ml 遠 沈管に移し、1000rpm、3 分間の条件で遠心分離を行った。その上澄み液を吸引し、ATDC5 細胞を集めた。

2-4-2 コラーゲン溶液の調製

コラーゲン溶液は、報告されている方法を参照して[5]、Cellmatrix type I-AのA液、B液、 そしてC液を体積比A:B:C=8:1:1で混合して調製した。ここで、A液は0.15%タイプIコ ラーゲン、B液は10×D-MEM/F-12液体培地、そしてC液はコラーゲンゲル再構成用緩衝 液である。

2-4-3 培養軟骨-多孔質β-TCP の作製

2-4-1 で集めた ATDC5 細胞に 2-4-2 で調製したコラーゲン溶液を加え、ピペットで ATDC5 細胞をコラーゲン溶液に均一に分散した。121°C、30 分間の条件でオートクレーブ滅菌した 多孔質β-TCP を 35mm ディッシュに入れ、その多孔質β-TCP を完全に覆うように ATDC5 細 胞含有コラーゲン溶液を 5ml 加えた。(このときの細胞濃度は 7.0×10⁶cells/ml である。)この 35mm ディッシュを 37℃、5%CO2 に設定した CO2 インキュベーターに 30 分間入れて、ゲル 化した。その後、D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液を 2ml 加え、再び CO2 インキュベーター に戻した。培養液は 2 日毎に交換し、計 21 日間培養を行った。

2-4-4 培養軟骨-多孔質β-TCP の測定準備

ー定期間(3、7 そして 21 日間)培養したサンプルはそれぞれ、2ml の PBS 溶液で 2 回洗 浄した。そして 5ml の 10%中性緩衝ホルマリン液を加え 1 日間固定した。固定したサンプル はトルイジンブルー染色とコラゲナーゼ処理のために用いた。

また別のサンプルとして、PBS 溶液で洗浄後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥は-50°C、 10MPa 以下の条件で行った。凍結乾燥をしたサンプルは FT-IR 測定、SEM 観察、そして ALP 活性測定のために使用した。SEM 観察用のサンプルとしてカッターの刃で 2×1×1mm に切断し、Au/Pt 蒸着を行った。

2-4-5 トルイジンブルー染色

10%中性緩衝ホルマリン液で固定したサンプルを 5ml の蒸留水で 10 秒間の洗浄を 3 回 行った。そして 0.05%トルイジンブルー溶液を 5ml 加え、室温で 30 分間染色した。染色後、 余剰のトルイジンブルー溶液を吸引し、5mlの 95%エタノールで各 5 秒間ずつ 3 回洗浄を 行い、5mlの無水エタノールで 10 秒間洗浄を行った。染色した培養軟骨部分を位相差顕微 鏡で観察した。

染色した培養軟骨を2枚の石英板で挟みこみ、スペクトルメーターを用いて、電子スペクト ルを測定した。測定範囲は400-800nmである。

2-4-6 アルカリホスフォターゼ (ALPase) 活性

電子天秤を用いて精秤した凍結乾燥したサンプル(約14.5mg)を15ml遠沈管に入れ、そ こへ 0.5ml の 1×TBS を加えた。そして超音波ホモジナイザーで1分間粉砕した。その懸濁 液を 3000g、15分間の条件で遠心分離を行い、上澄み液(0.2ml)をフィンピペットで得た。 ALPase 活性はこの得られた上澄み液の一部を用いて測定を行った[6]。pH=10.2の50mM 炭酸塩緩衝液(2ml)を15ml遠沈管に入れ、蓋をして、37℃の恒温槽で3分間予備加熱を した。そして、そこへ 0.05ml の上澄み液をフィンピペットで加えた。そして蓋をして、37℃の 恒温槽で15分間加熱した。この溶液に発色試薬として36mmol/lのフェリシアン化カリウム (2ml)を加えた。発色した溶液を電子スペクトル測定用の石英セルにフィンピペットを用いて 共洗いを5回してから、100µl入れた。波長500nmの吸光度をスペクトルフォトメーターを用 いて測定した[7]。基準濃度の検量線は、アルカリホスフォターゼ活性値(K-A単位)10、20、 30、40、50、そして 98.8 の溶液から作成した。またこの K-A 単位に 7.1 をかけた値が国際単位 (IU/I、37°C) であり、この単位を使用した。

3 結果

3-1 多孔質β-TCP の物性測定

図 3.2 に焼結前後のサンプルの X 線回折パターンを示す。水熱処理後の成型体のピーク はカルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト(Ca-dHAp)であった。800°C 及び 1150°C で焼結 した多孔体はどちらもβ-TCP であり、そのピーク強度は成型体のものと比べて強くなった。得 られた多孔質β-TCP の破面のデジタルマイクロスコープ観察(図 3.3)及び SEM 観察(図 3.4)の結果を示す。デジタルマイクロスコープ写真で灰色に写った部分がマクロポア(> 100µm)であり黒色に写った部分は内部連通孔である。そのマクロポアの平均気孔径の大き さを Scion 社製のフリー画像解析ソフト Scion Image を用いて求めた結果、その大きさは 116 ±46µm であった。1150°C で焼結した多孔質β-TCP の微細構造は珊瑚礁状であった。

水熱処理後の比表面積は 24.46m²/g であったが、800°C 及び 1150°C で焼結すると、その 値はそれぞれ 1.61m²/g、0.46m²/g であった。

3-2 培養軟骨-多孔質β-TCP の物性測定

3-2-1 位相差顕微鏡観察

図 3.5 に ATDC5 細胞の単層培養時の位相差顕微鏡観察の結果を示す。最長 168 時間 まで培養を行った。その結果、6 時間後には ATDC5 細胞はディッシュ底面に接着し、その 後増殖していることがわかった。そして、96 時間後には、90%コンフルエント状態に達した。 更に培養時間が長くにつれて、細胞が増殖し凝集する様子を観察した。そしてその細胞の 形状は紡錘形から六角形に変化した。

図 3.6 に培養軟骨中(多孔質β-TCP の気孔の内側と外側)の ATDC5 細胞の位相差顕微 鏡観察の結果を示す。ATDC5 細胞はコラーゲンゲル中に均一に分散していた。ATDC5 細 胞の形状は培養直後では気孔の内側、外側のどちらとも球状であった。培養 3 日以上では、 気孔の内側、外側に存在する ATDC5 細胞の形状は球状ではなく紡錘状であった。

3-2-2 SEM 観察

図 3.7 に 21 日間培養した培養軟骨-多孔質β-TCP の破面の SEM 写真を示す。多孔質

75



Fig.3.2 XRD patterns of porous products before and after sintering



Fig.3.3 Digital micrograph of porous β -TCP with hydrothermal treatment after sintering

*Sintering temperature: 1150 °C Sintering time: 3 h



Fig.3.4 SEM photographs of porous β -TCP with hydrothermal treatment before and after sintering

*Sintering temperature: 1150 °C

Sintering time: 3 h

- [a-1] Before sintering (×100)
- [a-2] Before sintering (×2000)
- [b-1] After sintering (×100)
- [b-2] After sintering (×2000)



Fig.3.5 Phase-contrast photographs of the monolayer-cultured ATDC5 cells

(a) At the beginning of cultivation



(b) After cultivation for 21 days



Outside of porous β -TCP





Inside of pore porous β -TCP



Fig.3.6 Phase-contrast photographs of ATDC5 cells in collagen gel inside and outside of porous β -TCP



Fig.3.7 SEM photograph of the fractured surface of the cultured cartilage / porous β -TCP system after culture for 21 days

β-TCP の表面は繊維状の物質に覆われていた。このサンプルを 1%コラゲナーゼで処理を 行った結果、繊維状の物質は分解した(図 3.8)。また、多孔質β-TCP にコラーゲンゲルだけ を加え、21 日間インキュベートしたサンプルの SEM 観察の結果、その表面に図 3.8 で観察 したような繊維状の物質を観察されなかった。

3-2-3 FT-IR 測定

図 3.9 に 21 日間培養した培養軟骨-多孔質β-TCP の破面の FT-IR スペクトルを示す。その 結果、1200~800cm⁻¹のβ-TCP に帰属する吸収バンドに変化はなかった。図 3.10 にコラーゲ ンゲル(0.15%)と 21 日間培養したサンプルの培養軟骨部分の FT-IR スペクトル(1800~ 800cm⁻¹)を示す。サンプルの培養軟骨部分のスペクトルから、1550cm⁻¹ と 1250cm⁻¹ の吸収 バンドが 0.15%コラーゲンゲルのスペクトルと比べて増加していた。1550cm⁻¹ の吸収バンド はプロテオグリカンの C-N 伸縮振動、N-H 変角振動 (アミドII)に帰属する吸収である[8-11]。 また 1250cm⁻¹のショルダーの増加はプロテオグリカンの硫酸基の v_{as}(SO₃⁻)に帰属するもので ある[12]。更に 855cm⁻¹ にプロテオグリカンの中のコンドロイチン硫酸の C-O-S に対応する吸 収バンドを観察した。

3-2-4 トルイジンブルー染色

図 3.11 にトルイジンブルー染色をした培養軟骨-多孔質β-TCP(21 日間培養)の光学顕微 鏡観察の結果を示す。その結果、ATDC5細胞は多孔質β-TCP全体に均一に存在していた。 また、ATDC5 細胞は気孔内に侵入し、気孔内部に接着している様子も観察した。トルイジン ブルー色素自体の色は濃紺色であるが、染色後のサンプルでは紫色に変化した。この色の 変化は「メタクロマジー(異調性)」と呼ばれるものである。メタクロマジーの原理は、ウロン酸 (一部ガラクトース)とヘキソサミンが交互に長鎖状に配列した重合化合物であるムコ多糖が そのウロン酸部分に持つ-COOH、ヘキソサミン部分もしくはウロン酸とヘキソサミン部分に持 つ-SO2OH の各電離基と正に荷電したトルイジンブルー色素が結合ことで、トルイジンブル ーの最大吸収波長がこれより短波長側に移動することにより起こる。この波長域の移動は結 合に伴い、(1)色素が重合することにより起こるもの、(2)色素分子の互換異性体が生じること により起こるもの、(3)量子学的共鳴の関与することで起こるもの等の説があるが、未だに完 全には解明されていない。図 3.12 にそれぞれトルイジンブルー染色をした、コラーゲンゲル、 培養軟骨、そして1.0mg/mlのコンドロイチン硫酸Cナトリウムを含むコラーゲンゲルの電子ス ペクトルを示す。その結果、ATDC5 細胞を含むコラーゲンゲルを3 日間培養した培養軟骨 は593nm及び530nmの吸収がコラーゲンゲルだけのものと比べて増加した。培養時間の増 加と共に 530nm のピーク強度は増加した。21 日間培養した培養軟骨の吸収ピークの形は



Fig.3.8 SEM photograph of the fractured surface of the cultured cartilage / porous β -TCP system after collagenase treatment with 1% collagenase



Fig.3.9 FT-IR spectra of porous β -TCP [a] and the cultured cartilage / porous β -TCP system (21 days) [b]



Fig.3.10 FT-IR spectra of the lyophilized gel part with the cultured cartilage / porous β -TCP system

(a) Collagen gel (0.15%) as reference

(b) The gel part of the cultured cartilage / porous β -TCP system after cultivation for 21 days



Fig.3.11 Digital micrographs of the cultured cartilage / porous β -TCP system after toluidine blue staining



Fig.3.12 Electronic spectra of the cultured cartilage part outside of porous β -TCP with toluidine blue staining

- (a) 0.15% collagen gel
- (b) The cultured cartilage (3 days)
- (c) The cultured cartilage (7 days)
- (d) The cultured cartilage (21 days)
- (e) Collagen gel with 1.0mg/ml sodium chondroitin sulfate C

1.0mg/mlのコンドロイチン硫酸 C ナトリウムを加えたコラーゲンゲルと類似していた。図 3.13 に示す位相差顕微鏡観察の結果、21 日培養後のサンプルにおいてメタクロマジーを示した。

3-2-5 培養軟骨-多孔質β-TCP のアルカリホスフォターゼ (ALPase) 活性

ATDC5 細胞におけるアルカリホスフォターゼ(ALPase)活性の増加は、その ATDC5 細胞 の成長(分化能や増殖能)の程度を表すものの一つである[13]。図 3.14 にある一定期間培 養した培養軟骨-多孔質β-TCP とコントロールとして多孔質β-TCP の ALPase 活性測定の結 果を示す。ALPase 活性は培養時間が長くなるにつれて増加した。21 日間培養したサンプ ルの ALPase 活性は 3 日間培養したものの約 15 倍の値を示した。



Fig.3.13 Phase-contrast photographs of the cultured cartilage part outside of porous β -TCP with toluidine blue staining



Fig.3.14 ALPase activity of the cultured cartilage / porous $\beta\text{-TCP}$ system

*n.d. = not detected

4 考察

位相差顕微鏡観察の結果(図 3.6)から、培養軟骨-多孔質β-TCP システム中の ATDC5 細胞は培養時間が増加するにつれて気孔の内側、外側のどちらにおいても成長していた。 本システムにおいて、ATDC5 細胞は、気孔の外側では通常の三次元培養であるが、気孔 の内側ではコラーゲンゲルの周りをβ-TCP が存在するという特殊な三次元培養の環境下に ある。通常、コラーゲンゲル中での三次元培養は、単層培養と比べて、横方向だけでなく、 縦方向にも細胞分裂することが出来るので、その細胞増殖は早い。そのため、培養 21 日目 において、気孔の外側では細胞一つ一つの形状を区別できない程、細胞は増加した。しか し、気孔の内側では外側と比較して細胞数が少なかった。これは気孔内部に侵入した細胞 が少ないためである。細胞が気孔内部にまで侵入するために、多孔質β-TCP の表面にある 気孔(100µm 以上)及び内部連通孔(20~30µm)の一種の"ふるい"を通過する必要があり、 そのために気孔内部に到達できる細胞は気孔の外側に比べて少なくなる。しかし、一度、細 胞が気孔内部に侵入すれば、気孔の外側と内側で細胞成長に伴う細胞の形状の変化に差 はなかった。

Sugaya らは、コラーゲンゲルに HAp 粉末を混ぜたものをイヌの歯周骨欠損に埋入した場合、HAp 粉末を埋入した場合と比べて、早く骨形成が見られたと報告している[14]。 Lossdörfer らは、P₂O₅を含むバイオガラス上で骨芽細胞である MG63 細胞を培養した場合、 そのある一定の濃度(6%)の時にもっとも細胞数が増加したと報告している[15]。また、Fujita らは、ATDC5 細胞培養時に無機リン酸を存在させることで、typeX コラーゲンの発現と石灰 化結節の生成を誘発されたと報告している[16]。このことは、コラーゲンゲルと無機リン酸を 含むリン酸カルシウムが共存することにより、細胞成長がさらに促進することを示している。

培養軟骨-多孔質β-TCPシステムにおいて、気孔の内部のATDC5細胞は無機リン酸を含むβ-TCP に囲まれて存在している。細胞が成長し、培養液の pH が減少すると、β-TCP は局所的に溶解し、リン酸イオンを放出する。このリン酸イオンがATDC5細胞に作用することにより、気孔内部のATDC5細胞の成長は促進されると考えることができる。

ATDC5 細胞は気孔の内側に接着しており、SEM 写真(図 3.7)から培養後に破面に繊維 状の物質を観察した。1%コラゲナーゼで処理すると、この繊維状の物質は分解し(図 3.8)、 多孔質β-TCP にコラーゲンゲルだけを加え、21 日間インキュベートしたサンプルの表面には、 この繊維状の物質を観察されなかった。このことから、この繊維状の物質は最初に加えたコ ラーゲン溶液由来のものではなく、ATDC5 細胞が培養中に排出した繊維状コラーゲンであ ると考えることができる。この多孔質β-TCP 表面をコラーゲン線維が覆っている様子は、Chen らが報告している[17]、PLGA-コラーゲン複合スポンジを用いて、子ウシの膝関節から採取

91

した軟骨細胞を 6 週間、三次元培養したサンプルの組織観察の結果と類似していた。この 場合も使用した軟骨細胞の種類が異なるために、単純比較はできないが、本システムにお いて、コラーゲン線維の生成は、PLGA-コラーゲン複合スポンジで三次元培養した場合より、 約 3 週間も早いことがわかった。この結果からも、コラーゲンゲル及びβ-TCP の組み合わせ が細胞成長の促進に有用であることを示している。

FT-IR 測定の結果、培養軟骨-多孔質β-TCP システムを 21 日間培養したサンプルにおい て、C-N 伸縮振動、N-H 変角振動(アミドII)、硫酸基の vas(SO3)、C-O-S の吸収バンドを観 察した。排出されたプロテオグリカンの中でも、特にコンドロイチン硫酸が多く含有していた。 このコンドロイチン硫酸の種類はコンドロイチン4硫酸であり、ATDC5 細胞を 52 日間単層培 養したサンプルで見られた結果とよい一致を示した[13]。つまり、ATDC5 細胞は、コラーゲン ゲルとβ-TCPを含む本システムであっても、それぞれが ATDC5 細胞の細胞成長を阻害せず、 単層培養時と同じプロテオグリカンを排出することがわかった。

トルイジンブルー染色後の位相差顕微鏡観察の結果(図 3.13)では、メタクロマジーは7 日間培養したサンプルでは観察しなかったが、電子スペクトルでは、3 日間培養したサンプ ルでもメタクロマジーを観察した。すなわち、プロテオグリカンの排出は培養3日目では既に 始まっていることがわかった。

Shukunami らは、ATDC5 細胞の単層培養において、ALPase 活性の著しい増加を、培養 30日後以降に観察した[13]。それに対して、本システムでは、培養7日後から、ALPase 活性 の大幅な増加を観察した。更に ALPase 活性の増加率もほぼ同様の傾向を示したことから、 本システムにおける ATDC5 細胞の細胞成長は、単層培養と比較して、細胞成長のスピード は増加し、成長に伴って排出されるプロテオグリカンの種類や細胞増加率は単層培養のも のと同様であることがわかった。

本システムは、言い換えると、多孔質β-TCP を含むコラーゲンゲル中での ATDC5 細胞の コラーゲン包埋培養である。コラーゲンゲルは、ATDC5 細胞の細胞成長に適した環境であ り、更に多孔質β-TCP は、細胞成長を促進に有効な無機リン酸を多く含む。つまり、本シス テムは、単層培養やコラーゲン包埋培養と比べて、ATDC5 細胞の細胞成長に適した環境が 揃っており、新しい人工関節軟骨モデルとして、非常に有用であると考えている。

5 結言

新しい人工関節モデルとして生体外で培養軟骨-多孔質β-TCPの作製を行った。このシス テムにおいて ATDC5 細胞は培養することによってコラーゲン線維及びプロテオグリカンを排 出することがわかった。その排出されたコラーゲン線維及びプロテオグリカンによって、培養 前と比べて培養軟骨は多孔質β-TCP に強く接着していた(図 3.15)。これまで培養軟骨に は"生体骨と接着しない"という問題点があった。本章で作製した培養軟骨/多孔質β-TCP シ ステムでは、生体吸収性に優れ、生体骨との接着も可能な多孔質β-TCP と培養軟骨が強く 接着したことによる上記の問題点の一つの解決方法を示した。



Fig.3.15 Photograph of the cultured cartilage / porous $\beta\text{-TCP}$ system

引用文献

[1] Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y. Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. Exp Cell Res 1998;241: 1-11.

[2] Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, Hiraki Y. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. Cell Struc Funct 2000;25: 195-204.

[3] Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. Cell Differ Dev 1990;30:109-16.

[4] Imura K, Uemoto H, Tanaka J, Kikuchi M, Yamazaki, H. New process of sintered porous hydroxyapatite. the 21th Nihon Biomaterial Gakkai Taikai Yokosyu 1999: 70.

[5] Enami J, Koezuka M, Hata M, Kawamura K, Tachibana Y, Kusama Y, Koga M. Collagen gel culture method. The tissue culture engineering 1987;13:26-30.

[6] Imranul AM, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate rations as carriers for rhBMP-2. Biomaterials 2001;22:1643-51.

[7] Kanai I. In Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine, ed. M Kanai. Kanahara Pub Japan 1998;pp. 613-22.

[8] Payne KJ, Veis A. Fourier transform IR spectroscopy of collagen and gelatin solutions: deconvolution of the amide I band for conformational studies. Biopolymers 1988;27: 1749-60.

[9] Camacho NP, West P, Torzilli PA, Mendelsohn R. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. Biopolymers 2001;62:1-8.

[10] Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelshon R, Yamauchi M. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. J Bone Miner Res 2001;16: 1821-28.

[11] Pouliot R, Germain L, Auger FA, Tremblay N, Juhasz J. Physical characterization of the stratum corneum of an in vitro human skin equivalent produced by tissue engineering and its comparison with normal human skin by ATR-FTIR spectroscopy and thermal analysis (DSC). Biochim Biophys Acta 1999;1439:341-52.

[12] Servaty R, Schiller J, Binder H, Arnold K. Hydration of polymeric components of cartilage - an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. Int J

Biol Macromol 2001;28:121-7.

[13] Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertrophy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenetic cell line ATDC5 in vitro. J Bone Miner Res 1997;12:1174-88.

[14] Sugaya A, Minabe M, Hori T, Watanabe Y. Effects on wound healing of hydroxyapatite-collagen complex implants in periodontal osseous defects in the dog. J Periodontal Res 1989;24:284-8.

[15] Lossdörfer S, Schwartx Z, Lohmann CH, Greenspan DC, Ranly DM, Boyan BD. Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. Biomterials (2003) in press.

[16] Fujita T, Meguro T, Izumo N, Yasutomi C, Fukuyama R, Nakamura H, Koida M. Phosphate stimulates differentiation and mineralization of the chondroprogenitor clone ATDC5. Jpn J Pharmacol 2001;86:86-96.

[17] Chen G, Ushida T, Tateishi T. Preparation of biodegradable hybrod sponge and its application to three-dimensional chondrocyte culture. Jpn J Artif Organs 2000;29:463-7.

第4章 細胞増殖因子を利用した培養軟骨-多孔質リン酸三カルシウム 接合システムに基づいた新しい人工関節軟骨モデルの改良

1 緒言

第3章では、図 3.1 に示すような新しい人工関節モデルとして生体外で培養軟骨-多孔質 β-TCP システムの作製を行った[1]。このシステムにおいて ATDC5 細胞は培養することによ って軟骨基質を排出することがわかった。培養後、培養軟骨は多孔質β-TCP に強く接着し ていることを観察した。軟骨基質の排出とその結果としての接着を達成したことにより、我々 が提案し、作製したモデルは培養軟骨-多孔質β-TCP システムにおける培養軟骨に対する 基本的な要求を満たしていると考える。しかしながら、軟骨と生体骨との接着強度に比べ、 培養軟骨と多孔質β-TCP の間の接着強度は弱いため、改善する必要がある。

ATDC5細胞は、その細胞株の由来が明確な細胞であり、その分化過程を初期段階から最 終段階(石灰化過程)までを追うことが出来る細胞である[2]。それに加えて、分化過程に及 ぼす細胞増殖因子の添加の効果についても数多くの報告がある[3-8]。特に ATDC5 細胞の 石灰化過程には、BMP-6の添加が効果的である[9-11]。培養軟骨-多孔質β-TCPに対して、 石灰化を適用することによって、培養軟骨と多孔質β-TCPの間の強い結合だけでなく、関節 組織の一つである成長板のような傾斜化した構造[12]の接合界面(図 4.1)を持つ、より生体 関節軟骨に近い新しい人工関節軟骨モデルになることが期待できる。

そこで、まず2種類の細胞増殖因子(BMP-6とPTHrP)をそれぞれ含む系でATDC5 細胞 の単層培養及びコラーゲン包埋培養を行い、その細胞成長の違いを調べた。用いた細胞 増殖因子の内、BMP-6 はβ-TCP 粉末に吸着させて、それを ATDC5 細胞のコラーゲンゲル 包埋培養時に加えて、その細胞成長の様子を観察した。更にこの結果を基に、我々が第3 章で作製したモデルの多孔質β-TCP に対して適用し、培養を行った。本章では、培養軟骨-多孔質β-TCP システム中の ATDC5 細胞の細胞成長に対する細胞増殖因子の影響を3段 階の実験から考察する。

97



Fig.4.1 Schematic view of a growth plate with gradient structure

2-1 試薬

α-TCP は太平化学産業株式会社製を用いた。図 2.1 にその SEM 写真を図 2.2 に X 線回 折パターンを示す。その平均粒径は 5µm であった。50wt%ポリエチレンイミンはアルドリッチ 製を用いた。界面活性剤は花王株式会社製の「MORE」を用いた。グリセロールジグリシジ ルエーテルはシグマ社製のものを使用した。軟骨株細胞 ATDC5 細胞は理化学研究所の細 胞開発銀行から入手した。D-MEM/F-12 液体培地、ウシ胎児血清(FBS)、0.25%トリプシン とサフランは、ギブコ社製のものを使用した。骨形成タンパク質(BMP-6)は、バイオジェネシ ス社製のものを使用した。副甲状腺ホルモン関連蛋白(Parathyroid hormone-related Protein; PTH-rP)は、インビトロジェン社製のものを用いた。Cellmatrix type I-A (A 液、B 液、そして C 液)と 1%コラゲナーゼは、新田ゼラチン株式会社製のものを用いた。ビラネバ・ゴルドナー 染色のためのワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液1及び2、ポンソーフクシン液は、武藤化学株 式会社製のものを使用した。10%中性緩衝ホルマリン液、0.05%トルイジンブルー液 (pH=7.0)、アルシアンブルー液(pH=2.5)、トリス塩酸緩衝液(TBS)、ナフトールグリーンB、 MTT アッセイを行うための MTT (3-{4,5-dimethyl-2-thyazolyl}-2,5-diphenyl-2H tetrazolium-bromide)(25mg/バイアル)、ALPase 活性を測定するための「アルカリフォスファ K-テスト ワコー」キット及びその他の試薬は、和光純薬株式会社製のものを使用した。

2-2 測定装置

作製した多孔体の構成相の同定は粉末 X 線回折装置(PXD;リガク製 Rint-1200)を用い て行った。X線源はCuK α_1 であり、出力は50kV、150mAである。生成物の微細構造の観察 は、Au/Pt 蒸着を行った後、走査型電子顕微鏡(SEM;日立製作所製 S-2150)を用いて、加 速電圧 20kV で観察した。試料の赤外線吸収特性は、フーリエ変換赤外分光装置(FT-IR; JEOL 社製 WINSPEC-100)を用いて、KBr 錠法に従ってペレットを作製して測定した。測定 範囲は4000-400cm⁻¹であり、その分解能は2 cm⁻¹である。電子スペクトルは、島津製作所製 BioSpec-miniを用いて 190-1100nm の間で測定した。ALP 活性測定を行うためのサンプル 調製として超音波ホモジナーザー(Heidolph 社製 DIAX100)を用いた。そして ATDC5 細胞 の成長の観察をするために、位相差顕微鏡(Olympus 社製 BX40)を使用した。そしてビラ ネバ・ゴルドナー染色後のサンプルを観察するために、デジタルマイクロスコープ(Keyence 社製 VH-6300)を使用した。pH 測定は、簡易型 pH メーター(堀場製作所製 B-211)を用 いた。

2-3 ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養における細胞増殖因子の影響

2-3-1 ATDC5 細胞の培養

第3章の2-4-1と同様の手順でATDC5細胞を単層培養した。遠心分離を行い、細胞を集めた。

2-3-2 コラーゲン溶液の調製

コラーゲン溶液は、報告されている方法を参照して[13]、Cellmatrix type I-A の A 液、B 液、 C 液を体積比 A:B:C=8:1:1 で混合して調製した。ちなみに A 液は 0.15%タイプ I コラー ゲン、B 液は 10×D-MEM/F-12 液体培地、そして C 液はコラーゲンゲル再構成用緩衝液で ある。

2-3-3 細胞増殖因子(BMP-6 及び PTHrP)の調製

BMP-6 溶液と PTHrP 溶液はそれぞれ 50mg 入り及び 0.5mg 入りのアンプルに 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌し、室温に冷やした超純水を 1ml 加えた。このアンプルを 37°C の CO₂ インキュベーターに 120 分間入れ、保持した。その後、0. 20mm のフィルターを用いて ろ過滅菌を行い、15ml 遠沈管に入れた。BMP-6 溶液及び PTHrP 溶液の濃度は、それぞれ、 50mg/ml 及び 0.5mg/ml である。

2-3-4 ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲン包埋培養における細胞増殖因子の影響

2-3-1 で集めた ATDC5 細胞に 2-3-2 で調製したコラーゲン溶液を加え、ピペットで ATDC5 細胞がコラーゲン溶液に均一に分散させた。121°C、30 分間の条件でオートクレーブ滅菌し た多孔質β-TCP を 35mm ディッシュに入れ、その多孔質β-TCP を完全に覆うように ATDC5 細胞含有コラーゲン溶液を 5ml 加えた。(このときの細胞濃度は 7.0×10⁶cells/ml である。)こ の 35mm ディッシュを 37°C、5%CO₂に設定した CO₂インキュベーターに 30 分間入れて、 ゲル化した。その後、D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液を 2ml 加え、再び CO₂インキュベー ターに戻した。また、細胞濃度を 3.0×10^5 cells/ml の培養液を 35mm ディッシュに 2ml 入れ、 ATDC5 細胞単層培養のサンプルとした。培養液は 2 日毎に交換し、それと同時に細胞増殖 因子をフィンピペッターを用いて、100µl ずつ加えた。そして計 21 日間培養を行った。細胞 の様子を一定期間(3 日間及び 21 日間)で観察した。

2-3-5 培養サンプルの固定化及び凍結乾燥
21 日間培養したサンプルは、それぞれ、2mlの PBS 溶液で2回洗浄した。2mlの10%中 性緩衝ホルマリン液及びメタノールを加え1日間固定した。固定したサンプルはそれぞれト ルイジンブルー染色とアルシアンブルー染色を施した。

また別のサンプルとして、PBS 溶液で洗浄後、凍結乾燥を行った。凍結乾燥は-50°C、 10MPa 以下の条件で行った。この凍結乾燥をしたサンプルは、FT-IR 測定、SEM 観察、 ALP 活性測定に使用した。

2-3-6 アルシアンブルー染色

メタノールで固定した培養軟骨のサンプル(約 50mg)を 5ml の蒸留水で3 回洗浄した。ア ルシアンブルー溶液(pH=2.5)を2ml 加え、室温で30分間染色した。染色後、余剰のアルシ アンブルー溶液を吸引し、2mlの 95%エタノールで各5秒間ずつ3回洗浄を行い、2mlの 無水エタノールで10秒間洗浄を行った。染色した培養軟骨部分を位相差顕微鏡で観察し た。

染色した培養軟骨を2枚の石英板で挟みこみ、スペクトルメーターを用いて、電子スペクト ルを測定した。測定範囲は400-800nmである。

2-3-7 トルイジンブルー染色

10%中性緩衝ホルマリン液で固定した培養軟骨のサンプル(約 50mg)を 2ml の蒸留水で 3 回洗浄した。0.05%トルイジンブルー溶液を 2ml 加え、室温で 30 分間染色した。染色後、 余剰のトルイジンブルー溶液を吸引し、2mlの 95%エタノールで各 5 秒間ずつ 3 回洗浄を 行い、2mlの無水エタノールで10秒間洗浄を行った。染色した培養軟骨部分を位相差顕微 鏡で観察した。

染色した培養軟骨を2枚の石英板で挟みこみ、スペクトルメーターを用いて、電子スペクト ルを測定した。測定範囲は400-800nmである。

2-3-8 アルカリホスフォターゼ (ALPase) 活性

凍結乾燥したサンプル(単層培養:約1.0mg、コラーゲン包埋培養:約5.0mg)を15ml遠沈 管に入れ、そこへ0.5mlのTBSを加えた。超音波ホモジナイザーで1分間均一に粉砕した。 その懸濁液を3000G、15分間の条件で遠心分離を行い、上澄み液を得た[14]。ALPase 活 性はこの得られた上澄み液の一部を用いて測定を行った。測定方法はフェニルホスフェート を基質として用いる改良型 Kind-King 法[15]に基づいたものである。スペクトルメーターを用 いて、波長 500nm の吸収を測定した。

2-4 ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を吸着したβ-TCP 粉末の細胞成長に及ぼす影響

2-4-1 細胞増殖因子(BMP-6)の調製とβ-TCP 粉末への吸着

β-TCP 粉末は、第3章の3-2-3 で作製した多孔体を乳鉢で粉砕したものを用いた。BMP-6 溶液は、50mg 入りのアンプルに 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌し、室温に冷やした超 純水を 1ml 加えた。このアンプルを 37°C の CO₂インキュベーターに 120 分間入れ、保持し た。その後、0.20mm のフィルターを用いてろ過滅菌を行い、15ml 遠沈管に入れた。この遠 沈管に 160°C、4 時間乾熱滅菌したβ-TCP を 5mg 入れた。この遠沈管を 37°C の CO₂イン キュベーターに 120 分間入れ、保持した。その後、乾熱滅菌したデシケーターに蓋を開けた 15ml 遠沈管を入れ、3 時間凍結乾燥した。

2-4-2 BMP-6を吸着したβ-TCP 粉末を加えた ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養

2-3-1 で集めた ATDC5 細胞に 2-3-2 で調製したコラーゲン溶液を加え、ピペットで ATDC5 細胞がコラーゲン溶液に均一に分散した。この ATDC5 細胞含有コラーゲン溶液を 24 孔マ ルチウェルプレートにそれぞれ 1ml 加えた。(このときの細胞濃度は 7.0×10⁶cells/ml であ る。)そこへ β -TCP 及び 2-4-3 で調製した BMP-6 を吸着した β -TCP をそれぞれのウェルに 1mg ずつ加えた。そのプレートを 37°C、5%CO₂に設定した CO₂インキュベーターに 30 分間 入れて、ゲル化した。その後、D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液を 1ml 加え、再び CO₂イン キュベーターに戻し、21 日間培養を行った。細胞の様子を一定期間(7、14、21 日間)定点 観測した。

2-4-3 pH 測定

培養液の交換時に培養後の培地をパスツールピペットを用いて、15ml 遠沈管に入れた。 そしてクリーンベンチの外で、簡易型 pHメーターを用いてその培地(約 1ml)の pHを測定した。

2-4-4 FT-IR 測定

凍結乾燥したサンプル(約1.0mg)を電子天秤で精秤し、KBr粉末をサンプル:KBrの比が 1:100になるように加えた。サンプルとKBr粉末を薬包紙上でスパチュラを用いて混合した。 約2.0mgの混合粉末を用いて測定用のKBrペレットを作製した。その赤外線吸収特性をフ ーリエ変換赤外分光装置(FT-IR;JEOL 社製 WINSPEC-100)を用いて、測定した。測定範 囲は4000-400cm⁻¹であり、その分解能は2 cm⁻¹である。

2-4-5 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性

凍結乾燥したサンプル(約1.0mg)を15ml遠沈管に入れ、そこへ0.5mlの1×TBSを加え、 超音波ホモジナイザーで1分間均一に粉砕した。その懸濁液を3000G、15分間の条件で遠 心分離を行い上澄み液を得た。ALPase 活性は、この得られた上澄み液の一部を用いて測 定を行った。測定方法はフェニルホスフェートを基質として用いる改良型 Kind-King 法に基 づいたものである。スペクトルメーターを用いて、波長 500nm の吸収を測定した。

2-4-6 ビラネバ・ゴルドナー染色

ビラネバ・ゴルドナー染色で使用する溶液の調製は、以下の手順で行った[16]。

- 鉄ヘマトキシリン溶液:2.5mlのワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液1に2.5mlのワイゲルトテ ツヘマトキシリン溶液2を加えて、計5.0mlとした。
- リンタングステン酸 / リンモリブデン酸溶液:1.25gのリンタングステン酸 n 水和物と1.25gのリンモリブデン酸 n 水和物に対して 50mlの蒸留水を加えて調製した。
- ナフトールグリーン B 溶液:0.5g のナフトールグリーンB粉末に対して、50mlの 1%酢酸を加えて、調製した。
- サフラン溶液:0.2g のサフランに 20ml の無水エタノールを加えた。この溶液を 65°C、24 時間の条件でオーブンに入れ、その抽出液をサフラン溶液とした。

無水エタノールで固定したサンプルを 1ml の蒸留水で 3 回洗浄した。鉄ヘマトキシリン溶液 を 1ml 加え、10 分間染色した。余剰の鉄ヘマトキシリン溶液を吸引し、1ml の蒸留水で 10 分間洗浄を行った。続いて 1ml のポンソーフクシン液を加えて、90 分間染色した。余剰のポ ンソーフクシン液を吸引し、1mlの1%酢酸で5回洗浄した。更に 1mlのリンタングステン酸 / リンモリブデン酸溶液を加え、5分間染色した。1mlの1%酢酸で1分間洗浄した。また、1ml のナフトールグリーン B 溶液で 15分間染色した後、1ml の蒸留水で 3 回と 1ml の無水エタ ノールで 1 回洗浄した。最後にサフラン溶液を加え、15 分間染色した。余剰のサフラン溶液 を吸引した後、デジタルマイクロスコープを用いて、観察を行った。

2-5 ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP の細胞成長に及ぼす影響

2-5-1 細胞増殖因子 (BMP-6) の調製と多孔質β-TCP への吸着

多孔質β-TCP は、第3章の 3-2-3 で作製したものを用いた。BMP-6 溶液は 50mg 入りのア ンプルに 121°C、20 分間オートクレーブ滅菌し、室温に冷やした超純水を 1ml 加えた。この アンプルを 37°C の CO₂ インキュベーターに 120 分間入れ、保持した。その後、0.20mm のフ イルターを用いてろ過滅菌を行い、15ml 遠沈管に入れた。この遠沈管に 160°C、4 時間乾 熱滅菌した多孔質β-TCP を 5 個 (約 100mg)入れた。この遠沈管を 37°C の CO₂インキュベ ーターに 120 分間入れ、保持した。その後、乾熱滅菌したデシケーターに蓋を開けた 15ml 遠沈管を入れ、3 時間凍結乾燥した。

2-5-2 BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP を加えた ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養

2-3-1 で集めた ATDC5 細胞ペレットに 2-3-2 で調製したコラーゲン溶液を加え、ピペットで ATDC5 細胞がコラーゲン溶液に均一に分散した。この ATDC5 細胞含有コラーゲン溶液を 24 孔マルチウェルプレートにそれぞれ 1ml 加えた。(このときの細胞濃度は 7.0×10⁶cells/ml である。)そこへ β -TCP 及び 2-4-2 で調製した BMP-6 を吸着した多孔質 β -TCP(約 20mg)を それぞれのウェルに加えた。そのプレートを37°C、5%CO₂に設定した CO₂インキュベーター に 30 分間入れて、ゲル化した。その後、D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液を 1ml 加え、再 び CO₂インキュベーターに戻した。そして計 21 日間培養を行った。

2-5-3 粉末 X 線回折(PXD)

凍結乾燥したサンプルを乳鉢で粉砕した。用いたサンプルホルダーはシリコン無反射板 (φ5mm)である。そして構成相の同定を粉末 X 線回折装置(PXD;リガク製 Rint-1200)を用 いて行った。X 線源は CuKα₁ であり、出力は 50kV、150mA である。

2-5-4 FT-IR 測定

凍結乾燥したサンプル(約 1.0mg)を電子天秤で精秤した。そこへ、KBr 粉末をサンプル: KBr の比が 1:100 になるように加えた。サンプルとKBr 粉末を薬包紙上でスパチュラを用い て混合した。約 2.0mg の混合粉末を用いて測定用の KBr ペレットを作製した。そしてその赤 外線吸収特性をフーリエ変換赤外分光装置(FT-IR; JEOL 社製 WINSPEC-100)を用いて、 測定した。測定範囲は 4000-400cm⁻¹ であり、その分解能は 1 cm⁻¹ である。

2-5-5 pH 測定

培養液の交換時に培養後の培地をパスツールピペットを用いて、15ml 遠沈管に入れた。 そしてクリーンベンチの外で、簡易型 pHメーターを用いてその培地(約 1ml)の pHを測定した。

2-5-6 SEM 観察

凍結乾燥したサンプル(約20mg)の微細構造の観察は、Au/Pt蒸着を行った後、走査型電

子顕微鏡(SEM;日立製作所製 S-2150)を用いて、加速電圧 20kV で観察した。

2-5-7 ビラネバ・ゴルドナー染色

ビラネバ・ゴルドナー染色で使用する溶液の調製は 2-4-7 と同様の手順で行った。 無水エタノールで固定したサンプルを 1ml の蒸留水で 3 回洗浄した。鉄ヘマトキシリン溶液 を 1ml 加え、10 分間染色した。余剰の鉄ヘマトキシリン溶液を吸引し、1ml の蒸留水で 10 分間洗浄を行った。続いて 1ml のポンソーフクシン液を加えて、90 分間染色した。余剰のポ ンソーフクシン液を吸引し、1ml の1%酢酸で 5 回洗浄した。更に 1ml のリンタングステン酸 / リンモリブデン酸溶液を加え、5 分間染色した。1ml の 1%酢酸で 1 分間洗浄した。また、1ml のナフトールグリーン B 溶液で 15 分間染色した後、1ml の蒸留水で 3 回と 1ml の無水エタ ノールで 1 回洗浄した。最後にサフラン溶液を加え、15 分間染色した。余剰のサフラン溶液 を吸引した後、デジタルマイクロスコープを用いて、観察を行った。

3 結果

3-1 ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養における細胞増殖因子の影響 3-1-1 位相差顕微鏡観察

一定期間、単層培養及びコラーゲン包埋培養した ATDC5 細胞の位相差顕微鏡観察の結果を図 4.2 (3 日間) に示す。それぞれの写真において、左側は単層培養、右側はココラーゲン包埋培養のものである。上段に細胞増殖因子を何も加えない(コントロール)もの、中段には培地交換時に 50µg/ml の BMP-6 を 100µl ずつ加えて培養したもの、下段には培地交換時に 0.1mg/ml の PTHrP を 100µl ずつ加えて培養したものを示す。ATDC5 細胞の単層培養において、BMP-6 は 200ng/ml 及び PTHrP は 10⁸ M の濃度でそれぞれ石灰化の促進及び抑制について、アリザリンレッド染色の結果から有意な差が認められている[3]。本実験では、その石灰化の違いを明確に観察するために上記の量を加えることにした。

単層培養を3日間行ったもののについて、8枚の写真から平均細胞数をScion社製のフリー画像解析ソフトScion Imageを用いて求めた結果、コントロールで1728±38(個/mm²)、 BMP-6を加えたもので3602±54(個/mm²)、PTHrPを加えたものでは1049±23(個/mm²) であり、有意な差が認められた。それらの細胞の形状は、コントロール及びPTHrPを加えた ものでは紡錘形のものが大半であったが、BMP-6を加えたものでは、六角形や球状に近い 細胞が多く存在した。しかし、コラーゲンゲル包埋培養したものでは、見かけ上の細胞数や 細胞形状に違いはなかった。

培養21日後(図4.3)では、BMP-6を加えたサンプルでは、大きな球状の細胞の存在を観



Fig.4.2 Phase-contrast micrographs of monolayer-culture and embedded culture in collagen gel of ATDC5 cells with cytokines after culture for 3 days



Fig.4.3 Phase-contrast micrographs of monolayer-culture and embedded culture in collagen gel of ATDC5 cells with cytokines after culture for 21 days

察した。コントロールのサンプルでも部分的には大きな球状の細胞を観察したが、その割合は BMP-6 を加えたものより低かった。PTHrP を加えたサンプルでは大きな球状の細胞を観察しなかった。コラーゲン包埋培養においても同様の傾向を示していた。

3-1-2 アルシアンブルー染色

アルシアンブルー染色法は、主として上皮性粘液細胞の分泌するムチン(シアロムチンや スルホムチン)や間質組織の構成成分であるプロテオグリカン(コンドロイチン硫酸、ヘパラン 硫酸あるいはケラタン硫酸)等の酸性ムコ物質の検出を目的とする方法である[17-19]。生体 内の酸性ムコ物質は、粘液細胞の分泌するムチン刷子縁、2型肺胞上皮、線毛上皮等の管 腔面の形質膜に特に多く存在し、さらに結合組織、軟骨、滑膜、椎間板、心弁膜、大動脈等 に存在する。また、当然ながらこれらの組織から発生する腫瘍組織等も、それぞれの組織に 特有な形質を受け継ぐ可能性が高く、これらのムコ物質を検出することが特に病理診断を行 う上で大いに役に立つ場合がある。原理は、アルシアンブルー色素が、構造分子の中心に 銅イオンをもつ塩基性の色素(フタロシアニン系色素)で、組織中の陰性荷電を有する硫酸 基やカルボキシル基とイオン結合する。pH=1.0のアルシアンブルー溶液では硫酸基のみ と結合するが、今回用いた pH=2.5のものではカルボキシル基と硫酸基の両者と結合する。 つまり、この染色から ATDC5 細胞がその成長に伴って排出されるプロテオグリカンの存在を 確かめることが出来る。

アルシアンブルー染色後のサンプルの位相差顕微鏡観察の結果を図 4.4 に示す。 単層培養後、染色したサンプルは細胞の形状の違いは、培養中に位相差顕微鏡で観察し たものより明確にわかったが、その色の濃さに有意な差は観察されなかった。しかしながら、 コラーゲンゲル包埋培養した後、染色したサンプルを観察すると、BMP-6 を加えたサンプル において、濃青色に染色した部分がコントロール及び PTHrP を加えたサンプルよりも見かけ 上、多く存在した。しかしながら、位相差顕微鏡観察の結果からコントロールと PTHrP のサン プルの染色の色の違いに有意な差は観察されなかった。

コラーゲンゲル包埋培養し、アルシアンブルー染色したサンプルをスペクトルフォトメータ ーで測定した結果を図 4.5 に示す。この電子スペクトルから 600nm の吸光度の大きさが BMP-6>コントロール>PTHrP の順になった。

3-1-3 トルイジンブルー染色

トルイジンブルー染色は第3章の3-2-4で説明したようにATDC5細胞がその成長に伴っ て排出されるプロテオグリカンの存在を確かめる方法の一つである。今回用いた pH=7.0のト ルイジンブルー溶液はコンドロイチン硫酸やムコイチン硫酸だけでなく、ヒアルロン酸も同時



Fig.4.4 Phase-contrast micrographs of monolayer-culture and embedded culture in collagen gel of ATDC5 cells with cytokines after alcian blue staining (21 days)



Fig.4.5 Electronic spectra of collagen gel containing ATDC5 cells with cytokines after alcian blue staining (21 days)

に染色できる染色方法であり、アルシアンブルー染色と併用することでプロテオグリカンの存 在がより明確にするために使用した。

トルイジンブルー染色後のサンプルの位相差顕微鏡観察の結果を図4.6に示す。単層培養後、染色したサンプルにおいて BMP-6 を加えたサンプルでディッシュ全体が紫色に染色された様子が観察された。細胞増殖因子を加えていないコントロール試料では、紫色に染色された部分もあるが、トルイジンブルー色素の青色も同時に観察した。PTHrP を加えたサンプルでは紫色の部分は観察せず、ディッシュ全体が青色であった。BMP-6 を加えたサンプルがコントロール及び PTHrP を加えたサンプルと比較して最も強いメタクロマジーを示していた。

コラーゲンゲル包埋培養した後、染色したサンプルにおいても、位相差顕微鏡で観察した結果、単層培養と同様の傾向を示した。このコラーゲンゲル包埋培養後、トルイジンブルー染色したサンプルをスペクトルフォトメーターで測定した結果を図 4.7 に示す。この電子スペクトルから 570nm に最大吸光度を観測したコントロールのサンプルを基準に考えると、 BMP-6 を加えたサンプルではピーク位置は短波長側(570nm→560nm)にシフトし、そのピーク強度は増加した。また PTHrP を加えたサンプルではピーク位置は長波長側(570nm→580nm)にシフトし、そのピーク強度は減少した。

3-1-4 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性

図 4.8 に細胞増殖因子を加えて ATDC5 細胞を 21 日間、単層培養行った後の ALPase 活性測定の結果を示す。コントロールのサンプルの ALPase 活性値を 1 とすると、BMP-6 を 加えたサンプルでは 1.225 そして PTHrP を加えたサンプルでは、0.971 であった。

図 4.9 に細胞増殖因子を加えて ATDC5 細胞を 21 日間、コラーゲン包埋培養行った後の ALPase 活性測定の結果を示す。コントロールのサンプルの ALPase 活性値を 1 とすると、 BMP-6 を加えたサンプルでは 1.393 そして PTHrP を加えたサンプルでは、0.595 であった。 この結果は単層培養のものと同じ傾向を示した。



Fig.4.6 Phase-contrast micrographs of monolayer-culture and embedded culture in collagen gel of ATDC5 cells with cytokines after toluidine blue staining (21 days)



Fig.4.7 Electronic spectra of collagen gel containing ATDC5 cells with cytokines after toluidine blue staining (21 days)



Fig.4.8 ALPase activities of monolayer-cultured ATDC5 cells with cytokines after cultivation for 21 days



Fig.4.9 ALPase activities of embedded culture in collagen gel of ATDC5 cells with cytokines after cultivation for 21 days

3-2 ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を吸着したβ-TCP 粉末 の細胞成長に及ぼす影響

3-2-1 位相差顕微鏡観察

図 4.10 に、ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 を吸着したβ-TCP を加え たサンプルと、BMP-6 を吸着していないβ-TCP を加えたサンプルを加えたものの細胞の様 子を位相差顕微鏡で観察した結果を示す。培養 7 日後の観察では、どちらのサンプルにお いても ATDC5 細胞がβ-TCP 粒子の表面近くに存在、接着して伸展している様子が観察され た。しかし、その細胞形状は BMP-6 を吸着していないβ-TCP を加えたサンプルでは細長い 細胞であるのに対して、BMP-6 を吸着したβ-TCP を加えたサンプルでは大きな球状の細胞 が密集していた。培養 14 日後の観察では、どちらのサンプルにおいても培養7日のものと比 べて細胞数は見かけ上増加していた。しかし、その細胞の形状は BMP-6 を吸着していない β-TCP を加えたサンプルでは細長い細胞であるのに対して、BMP-6 を吸着したβ-TCP を加 えたサンプルでは大きな球状の細胞であった。また、BMP-6 を吸着したβ-TCP を加 えたサンプルでは大きな球状の細胞であった。また、BMP-6 を吸着したβ-TCP を加 えたサンプルではたきな球状の細胞であった。また、BMP-6 を吸着したβ-TCP を加えたサン プルでは培養7日後のサンプルと比べて、β-TCP 粒子の一部に ATDC5 細胞が侵食してい るような様子を観察した。培養 21 日後の観察の結果、BMP-6 を吸着したβ-TCP を加えたサ ンプルにおいて、培養 14 日後で観察した ATDC5 細胞のβ-TCP 粒子への重なりの範囲が 拡大した。

3-2-2 pH 測定

図 4.11 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 を吸着したものとしていな いβ-TCP 粉末を加え培養した際の培養後の培地の pH 変化を示す。用いた培地の培養前 の pH は pH=7.4 である。培養7日目までは BMP-6 吸着 β -TCP を加えたサンプル、及び BMP-6 吸着がない β -TCP を加えたサンプルで pH は減少したが、その差は有意なものでは なかった。しかしながら、培養7日目以降では BMP-6 吸着 β -TCP を加えたサンプルの pH の 減少は BMP-6 吸着がない β -TCP を加えたサンプルと比べて大きくなり、最終的には pH= 6.4 と酸性を示した。

3-2-3 FT-IR 測定

図 4.12 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 を吸着したものとしていな いβ-TCP 粉末を加え、21日間培養した後のサンプルの FT-IR 測定の結果を示す。その結果、 BMP-6 を吸着したサンプルでは、1120cm⁻¹ 及び 1080cm⁻¹ に吸収バンドが増加した。この2 本の吸収バンドは、 β -TCP 及びコラーゲンゲルによるものではない。また、BMP-6 を吸着し ていない β -TCP を加えたサンプルでは、この 2 本の吸収バンドは観測したが、その強度は



β-ΤCΡ

β-TCP adsorbing BMP-6

Fig.4.10 Phase-contrast micrographs of ATDC5 cells in collagen gel containing β -TCP and β -TCP adsorbing BMP-6



Fig.4.11 pH change of culture media after cultivation



Fig.4.12 FT-IR spectra of ATDC5 cells in collagen gel containing β -TCP and β -TCP adsorbing BMP-6

BMP-6を吸着したβ-TCPを加えたサンプルよりは小さかった。この2本の吸収バンドは、ハイドロキシアパタイト(HAp)の13PO4³⁻に帰属できる。

3-2-4 アルカリホスフォターゼ(ALPase)活性

図 4.13 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 を吸着したものとしていな いβ-TCP 粉末を加え、21 日間培養した後のサンプルの ALPase 活性測定の結果を示す。そ の結果、培養7日目までは BMP-6を吸着したβ-TCP 粉末及び吸着していないβ-TCPを用い たものでも、ALPase 活性値に有意な差は見られなかった。これは、pH の減少に対応してい る。しかしながら、その BMP-6 を吸着したサンプルと吸着してないサンプルの ALPase 活性 値は培養14日後では、約 1.5 倍、そして培養 21 日後では、約 2.5 倍の差があった。

3-2-5 ビラネバ・ゴルドナー染色

ビラネバ・ゴルドナー染色法[16]は、Villanueva らがマッソン・トリクローム染色ゴルドナー法 [20]を改良したものである。原理は、ポンソーフクシンで類骨を赤染し、ナフトール B で石灰 骨を緑染し、サフラン液で軟骨を黄緑染するというものである。

ビラネバ・ゴルドナー染色後のサンプルのデジタルマイクロスコープ観察の結果を図 4.14 に 示す。BMP-6 を吸着したβ-TCP を加えたサンプルにおいて、β-TCP の周りに赤色に染色し た ATDC5 細胞が凝集している様子が観察された。また、一部には緑色の部分も観察した。 BMP-6 を吸着していないβ-TCP を加えたサンプルでもβ-TCP の周りに赤色の染色した ATDC5 細胞が観察されたが、その数は非常に少なかった。



Fig.4.13 ALPase activities of ATDC5 cells in collagen gel containing β -TCP and β -TCP adsorbing BMP-6



Fig.4.14 Observation of β -TCP in collagen gel with ATDC5 cells stained with Villanueva's Goldner method after cultivation for 21 days

(a) β-TCP

- (b) β-TCP adsorbing BMP-6
- (T: β-tricalcium phosphate, *: osteoid tissue)

3-3 ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養における BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP の細胞成長に及ぼす影響

3-3-1 粉末 X 線回折(PXD)

図 4.15 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 を吸着したものとしていな い多孔質β-TCP を加え、21 日間培養した後のサンプルの XRD 回折パターンを示す。 BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP のサンプルでは、28.8°、31.7°、32.2°、32.8°にピークが観 測された。BMP-6 を吸着していない多孔質β-TCP を加えたサンプルでは、31.7°にピークが 観測された。その強度は、BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP を加えたサンプルよりは小さかっ た。これら4本のピークは、ハイドロキシアパタイト(HAp)のものであった[21,22]。

3-3-2 FT-IR 測定

図 4.16 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 を吸着したものとしていな い多孔質β-TCPを加え、21日間培養した後のサンプルの FT-IR 測定の結果を示す。その結 果、BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP を加えたサンプルでは、1090cm⁻¹ 及び 1030cm⁻¹ に吸 収バンドが増加したが、BMP-6を吸着していないβ-TCPを加えたサンプルではこの2本の吸 収バンドは観測されなかった。この2本の吸収バンドはハイドロキシアパタイト(HAp)の ν₃PO₄³⁻に帰属できる。

3-3-3 pH 測定

図 4.17 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6 吸着したものとしていない 多孔質 β -TCP を加え培養した際の培養後の培地の pH 変化を示す。用いた培地の培養前 の pH は 7.4 である。培養7日目までは BMP-6 を吸着した β -TCP を加えたサンプル及び BMP-6 を吸着していない β -TCP を加えたサンプルで pH は減少したが、その差は有意なも のではなかった。しかしながら、培養7日目以降では BMP-6 を吸着した β -TCP を加えたサン プルの pH の減少は BMP-6 を吸着していない β -TCP を加えたサンプルと比べて大きくなり、 最終的には pH=6.4 となり、酸性を示した。

3-3-4 SEM 観察

図 4.18 に、ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に BMP-6を吸着したものとしていな い多孔質β-TCP を加え、21 日間培養した後のサンプルの凍結乾燥後の SEM 写真を示す。 多孔質β-TCP は、サンゴ礁状の粗い表面であった。これは、第2章で示したように泡セラミッ クス法及び水熱処理法を組み合わせた合成方法で達成されたものである。BMP-6 を吸着し ていない多孔質β-TCP のサンプルでは、多孔質β-TCP の表面にコラーゲン線維が接着して いる様子が観察された。しかし、そのサンゴ礁状の粗い表面はそのままであった。しかし、 BMP-6を吸着した多孔質β-TCPのサンプルでは、多孔質β-TCPに約 5µm 程の塊がサンゴ 礁状の表面に接着していた。その大きさから考えて、ATDC5 細胞が接着していると考えるこ とができる。

3-3-5 ビラネバ・ゴルドナー染色

ビラネバ・ゴルドナー染色後のサンプルのデジタルマイクロスコープ観察の結果を図 4.19 に示す。BMP-6を吸着した多孔質 β -TCPを加えたサンプルにおいて、多孔質 β -TCPの気孔 内部を含めた全体に赤色に染色した ATDC5 細胞が存在する。また、一部には緑色の部分 も観察された。BMP-6 を吸着していない多孔質 β -TCP を加えたサンプルでも多孔質 β -TCP の中に赤色の染色した ATDC5 細胞が観察されたが、その数は非常に少なかった。



Fig.4.15 XRD patterns of the samples

- (a) Porous β-TCP
- (b) The cultured cartilage / porous $\beta\text{-TCP}$ (21 days)
- (c) The cultured cartilage / porous β -TCP with BMP-6 (21 days)





Fig.4.17 pH change of culture media after cultivation



Fig.4.18 Scanning electron micrographs of the samples

- (a) Porous β-TCP
- (b) The cultured cartilage / porous $\beta\text{-TCP}\left(21\ days\right)$
- (c) The cultured cartilage / porous $\beta\text{-TCP}$ with BMP-6 (21 days)





Fig.4.19 Digital micrographs images of the samples after Villanueva's Goldner staining

(a) The cultured cartilage / porous β -TCP (21 days)

(b) The cultured cartilage / porous β -TCP with BMP-6 (21 days)

4 考察

2種類の細胞増殖因子(BMP-6とPTHrP)をそれぞれ含む系でATDC5細胞の単層培養 及びコラーゲン包埋培養を行った。

ATDC5 細胞に BMP-6 溶液を加えて単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養を行った場合、ALPase 活性測定の結果から、単層培養及びコラーゲンゲル包埋培養とも、その活性値は BMP-6>コントロール>PTHrP の順であり、これは BMP-6 を加えて培養したサンプルが 最も ATDC5 細胞の細胞分化能が高いことを示している。この結果から、ATDC5 細胞の細胞 成長において、BMP-6 は"促進"、PTHrP は"抑制"という働きを持つという点で、Shukunami らの結果とよい一致を示しており、更にその働きはコラーゲンゲル包埋培養においてより顕著な差をもたらすことがわかった。

上記の結果から、ATDC5 細胞の細胞成長を促進する BMP-6を選択し、BMP-6を凍結乾燥によって吸着したβ-TCP存在下でATDC5 細胞をコラーゲンゲル包埋培養した。位相差顕微鏡観察の結果、ATDC5 細胞の細胞成長は BMP-6を吸着したβ-TCP 表面でもっとも促進していた。

BMP-6を溶液として、ATDC5細胞の単層培養時やコラーゲンゲル包埋培養時に加えると、 ディッシュ全体及びコラーゲンゲル全体の細胞が一様に成長した。生体内の関節軟骨の組 織では、大きく分けて4種類の分化状態の異なった軟骨細胞が階層的に存在しており。そ のような組織を本システムで実現するためには、このBMP-6を溶液として加える方法は、適 切ではないと考える。BMP-6を凍結乾燥によってβ-TCPに吸着した場合、BMP-6に吸着し ている結合水、その周りにある不凍水、更にその周りにある自由水が除去される。このため BMP-6はβ-TCPと強固に接着し、培養した際にでも容易には脱離しない。加温真空乾燥の 場合、BMP-6が熱変性する可能性があり、自然乾燥の場合は水分除去率が低いため BMP-6の吸着は凍結乾燥した場合より弱くなる。BMP-6とβ-TCPとの接着強度が低い場合、 BMP-6が早く脱離し、コラーゲンゲル中及び培養液中に拡散してATDC5細胞に作用する。 ATDC5細胞は細胞成長の中期段階(肥大化過程)以降に作用することが知られており、そ の成長段階まではBMP-6をβ-TCPに強固に吸着する必要がある。そのため、この凍結乾燥 を用いた吸着方法は有用であると考える。

Shukunami らの報告[3]によると、単層培養で石灰化した ATDC5 細胞は 1130cm⁻¹ から 1030cm⁻¹ の間に2本の吸収バンドが観測され、これらはアパタイト類似のミネラルの PO₄³⁻に 対応するとしている。BMP-6を吸着した β -TCPを用いた本システムにおいて、1120cm⁻¹及び 1080cm⁻¹に吸収バンドが増加したことから、 β -TCP 表面付近に石灰化した ATDC5 細胞が存 在すること示している。

粉末X線回折測定の結果、HApのピークを観察した。Scherrerの式を用いて、(002)及び (130)の半値幅から、その結晶サイズを計算した[25]。計算式は以下に示す。

$D = K \lambda / B_{1/2} \cos \theta(4.1)$

ここで、λは使用した X線の波長(1.54056Å)、B_{1/2}は(002)、(130)の半値幅、θはその回折 角である。K は定数で半値幅を用いて計算する場合は 0.9 である。計算した結果、その結晶 サイズは約 75nm であった。Kim らはチキンの石灰化した成長板軟骨の石灰化組織の大き さが 40nm から 160nm であると報告しており[26]、得られた HAp は ATDC5 細胞の石灰化に 伴うミネラルと考えられる。

SEM 観察の結果、石灰化した ATDC5 細胞の様子は石灰化した骨端軟骨の組織と類似 していた[28]。また、ビラネバ・ゴルドナー染色の結果から、BMP-6 はβ-TCP 周辺の ATDC5 細胞の成長を促進し、石灰化及び類骨化していることがわかった。類骨化は石灰化の前段 階であり、細胞が凝集している付近での色の識別、つまり、石灰化と類骨化の区別は困難で あった。黄緑色の部分は、軟骨を示すものであり、BMP-6を吸着していないβ-TCP を加えた サンプルでは、ATDC5 細胞の分化段階が石灰化段階にまだ移行していなかった。

凍結乾燥法により、BMP-6 をβ-TCP に強固に吸着することにより、β-TCP 付近の ATDC5 細胞の石灰化を促進した。その石灰化した組織により培養軟骨と多孔質β-TCP の接着も期 待できる。

4 結言

第3章で我々が提案した培養軟骨-多孔質β-TCP 人工軟骨システムにおいて、培養軟骨 と多孔質β-TCP の接着性は向上した。更なる要求として、軟骨と生体骨にような接着強度を 培養軟骨と多孔質β-TCP の間に持たせる必要がある。そこで、細胞増殖因子を用いて培養 軟骨-多孔質β-TCPの軟骨細胞自身の石灰化を利用して培養軟骨-多孔質β-TCP 間の接着 の向上について検討した。この軟骨細胞自身の石灰化の利用は、培養軟骨と多孔質β-TCP の間の強い結合だけでなく、関節組織の一つである成長板のような傾斜化した構造を持つ 接合界面を持たせることができる可能性がある。しかし、これに際して使用する細胞増殖因 子の影響を調べる必要がある。

そこで、(1) 2 種類の細胞増殖因子 (BMP-6とPTHrP)をそれぞれ含む系で ATDC5 細胞 の単層培養及びコラーゲン包埋培養を行い、その影響を調べる。(2) BMP-6 をβ-TCP 粉 末に吸着させて、その粉末を ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に加えることによっ て、細胞成長の様子を観察する。(3) 我々が開発したモデルの多孔質β-TCP に BMP-6 を 吸着し、培養するという三段階で実験を行った。

その結果、ATDC5 細胞の単層培養及びコラーゲン包埋培養のどちらの場合においても、

少量の細胞増殖因子(BMP-6:50µg/ml(100µl)、PTHrP:0.1mg/ml(100µl))を加えたことに より、細胞の形状、細胞成長(特に細胞分化能)、そして細胞成長に伴うプロテオグリカンの 排出に有意な差が生じることがわかった。特に、BMP-6 を加えたものでは、ATDC5 細胞の 細胞成長は促進し、多量のプロテオグリカンを排出した。

この結果を基に、ATDC5 細胞のコラーゲン包埋培養時にβ-TCP 粉末に BMP-6 を吸着し たものを加えて培養を行った。その結果、BMP-6 を吸着したβ-TCP 粉末を用いたサンプル では、β-TCP 粒子付近の ATDC5 細胞の成長が BMP-6 によって促進し、石灰化及び類骨 化していることを認めた。

更にその結果をもとに、培養軟骨-多孔質β-TCP 人工軟骨システムモデルに適用した結果、 β-TCP 粉末を用いた場合と同様に、BMP-6 によって ATDC5 細胞の成長が促進し、石灰化 及び類骨化に伴う HAp の生成が観察され、実際の生体関節軟骨類似の組織を持つことが わかった。

引用文献

[1] Aoki S, Yamaguchi S, Nakahira A, Suganuma K. A new approach to an artificial joint based on bio-cartilage/porous β -tricalcium phosphate system. J Eur Ceram Soc 2003;23:2939-46.

[2] Atsumi T, Miwa Y, Kimata K, Ikawa Y. A chondrogenic cell line derived from a differentiating culture of AT805 teratocarcinoma cells. Cell Differ Dev 1990;30:109-16.

[3] Shukunami C, Sigeno C, Atsumi T, Ishizeki K, Suzuki F, Hiraki Y. Chondorogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro: differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor.. J Cell Biol 1996;133:457-68.

[4] Shukunami C, Ishizeki K, Atsumi T, Ohta Y, Suzuki F, Hiraki Y. Cellular hypertropy and calcification of embryonal carcinoma-derived chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. J Bone Miner Res 1997;12:1174-88.

[5] Shimizu A, Tada K, Shukunami C, Hiraki Y, Kurokawa T, Magane N, Kurokawa-Seo M. A novel alternatively spliced fibroblast growth receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. J Biol Chem 2001;276:11031-40.

[6] Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad

proteins in osteoblast and chondroblast differentiation, Mol Biol Cell 1999;10:3801-13

[7] Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Uchida S. Saeki-Miura K, Makishita F. p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. Exp Cell Res 1999;250:351-63.

[8] Negishi Y, Ui N, Nakajima M, Kawashima K, Maruyama k, Takizawa T, Endo H. p21Cip-1/SDI-1/WAF-1 gene is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells in vitro. J Biol Chem 2001;276:33249-56.

[9] Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y. Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. Exp Cell Res 1998;241:1-11.

[10] Shukunami C, Akiyama H, nakamura T, Hiraki Y. Requirement of autocrine signaling by bone morphogenetic protein-4 for chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. FEBS Lett 2000;469:83-7.

[11] Akiyama H, Shukunami C, Nakamura T, Hiraki Y. Differential expressions of BMP family genes during chondrogenic differentiation of mouse ATDC5 cells. Cell Struct Funct 2000;25:195-204.

[12] Poole AR. in Arthritis & Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology, 12th ed. (ed. McCarty, D.J. and Koopman, W.J.), Lea & Febiger, Philadelphia, 1993, pp. 279-333.

[13] Enami J, Koezuka M, Hata M, Kawamura K, Tachibana Y, Kusama Y, Koga M. Collagen gel culture method. The tissue culture engineering 1987;13:26-30.

[14] Imranul AM, Asahina I, Ohmamiuda K, Takahashi K, Yokota S, Enomoto S. Evaluation of ceramics composed of different hydroxyapatite to tricalcium phosphate rations as carriers for rhBMP-2. Biomaterials 2001;22:1643-51.

[15] Kanai I. In Kanai's Manual of Clinical Laboratory Medicine, ed. M Kanai. Kanahara Pub Japan 1998;pp. 613-22.

[16] Fujita K. Shin senshoku hou no subete, ed. Fujita K. Ishiyaku Pub Japan 1999;pp. 134-5.

[17] Fujita K. Shin senshoku hou no subete, ed. Fujita K. Ishiyaku Pub Japan 1999;pp. 144-50.

[18] Spicer SS, Horn PG, Leppi TJ. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. In: Theconnective tissue, Williams & Wilkins, Baltimore, 1967, pp. 251-303.

[19] Katsuyama T, Ono K. Recent advances in mucosubstance histochemistry. In: Gastric mucous and mucous secreting cell, Excerpta Medica, Amsterdam, 1985, pp. 3-18.

[20] Villanueva AR, Mehr LA. Modifications of the Goldner and Gomori one-step trichrome

stains for plastic-embedded thin sections of bone. Am J Med Technol 1977;43:536-8.

[21] Raynaoud S, Champion E, Bernache-Assollant D, Thomas P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ration I. Synthesis, characterization and thermal stability of powder. Biomaterials 2002;23:1065-72.

[22] Peňa J, Vallet-Regi M, Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique. J Eur Ceram Soc 2003;23:1687-96.

[23] Luo HQ, Liu SP, Liu ZF, Liu Q, Li NB. Resonance Rayleigh scattering spectra for studying the interaction of heparin with some basic phenothiazine dyes and their analytical applicationd. Anal Chim Acta 2001;449:261-70.

[24] Enami J, Koezuka M, Hata M, Enami S, Koga M. Gel strength-dependent branching morphogenesis of mouse mammary tumor cells in collagen matrix culture. Dokkyo J Med Sci 1985;12:25-30.

[25] Klug HP, Alexander LE. X-ray diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, 1974:618-708.

[26] Kim HM, Rey C, Glimcher MJ. X-ray diffraction, electron microscopy, and fourier transform infrared spectroscopy of apatite crystals isolated from chicken and bovine calcified cartilage. Calcif Tissue Int 1996;59:58-63.

[27] Kunze C, Freier T, Helwig E, Sander B, Reif D, Wutzler A, Radusch HJ. Surface modification of tricalcium phosphate for improvement of the interfacial compatibility with biodegradable polymers. Biomaterials 2003;24:967-74.

[28] Arsenault AL, Grynpas MD. Crystals in calcified epiphyseal cartilage and cortical bone of the rat. Calcif Tissue Int 1988;43:219-25.

第5章 生理活性を有する低分子有機化合物を複合化したリン酸 カルシウムの合成とその細胞応答性

1 緒言

第4章では、培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムにおいて細胞増殖因子として BMP-6を多孔質リン酸カルシウムに強固に吸着させることによって軟骨株細胞 ATDC5 細胞 の石灰化が促進することを明らかにした。しかしながら、実際の臨床応用を考えた場合、使 用できる細胞増殖因子には制限があり、実際に BMP-6 は現在のところ、連邦食品医薬局の 承認を得ていない。また BMP-6 のような細胞増殖因子は一般に高価で、多量に使用するこ とは難しく、その複雑な構造から、構造中のどの部位が細胞成長に関与するかを特定するこ とは難しい。そこで、これまでの細胞増殖因子に代わる代替物質の使用が必要となる。

そこで、生理活性を有し、構造が単純な低分子有機化合物を複合化したリン酸カルシウムの使用を考えた。本章では上記の条件を満たす有機物としては、アスパラギン酸ナトリウム及びアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウムを選択した。アスパラギン酸ナトリウムは、 生体内に存在するアミノ酸の一種であり、またアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウムは、 生体内でのコラーゲンの合成に重要な役割を果たすことが知られている、アスコルビン酸 (ビタミン C)のマグネシウム塩として知られている[1]。

実験は、(1) それぞれの2種類の有機物を含む溶液を培養液に加えて ATDC5 細胞の単 層培養を行う。(2) そのスクリーニングの結果、細胞増殖を促進した有機物について、その 有機物を含有したリン酸カルシウム粉末を合成し、その粉末存在下で ATDC5 細胞をコラー ゲン包埋培養し、細胞成長の様子を観察する。という2段階の手順で行った。(2)の実験に おいて、有機物をリン酸カルシウム粉末に含有させる方法として、表面吸着型と層間取り込 み型の2種類の方法を用いた。使用したリン酸カルシウム粉末は表面吸着型に使用するも のとして、第3章の 3-2-3 で作製し、乳鉢で粉砕したβ-TCP を、層間取り込み型に使用する ものとして、層状構造であるリン酸八カルシウム(Octacalcium phosphate;OCP)を使用した。

OCP は「アパタイト層」と「水和層」と呼ばれる2つの異なる層が積み重なった層状構造を持つ[2]。水和層中に存在する2種類ある HPO4²⁻の内、一つの HPO4²⁻はコハク酸やアジピン酸、フマル酸のようなジカルボン酸と容易に置換し、無機-有機層状化合物を形成することが Monma らによって報告されている[3-5]。そこで、ジカルボン酸骨格を持つアスパラギン酸 (及びそのナトリウム塩)も同様に層間に取り込むことが可能であることが予想される。このよう に層間に有機物を取り込むことによって、表面吸着とは異なる徐放過程が期待できる。

本章では、これらの2段階の実験から、ATDC5 細胞の成長を促進する有機物の選択、及

びそれらを含有させたリン酸カルシウム存在下でのATDC5細胞の成長の様子を観察し、その有機物の細胞成長に及ぼす影響について考察する。

2 実験方法

2-1 試薬

α-TCP は太平化学産業株式会社製を用いた。図 2.1 にその SEM 写真を図 2.2 に X 線回 折パターンを示す。その平均粒径は 5µm であった。軟骨株細胞 ATDC5 細胞は理化学研究 所の細胞開発銀行から入手した。D-MEM/F-12 液体培地、ウシ胎児血清 (FBS)、0.25%トリ プシンは GIBCO 社製のものを使用した。Cellmatrix type I-A (A 液、B 液、C 液)と1%コラゲ ナーゼは新田ゼラチン株式会社製のものを用いた。L-アスパラギン酸ナトリウムー水和物、 L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物、コハク酸、10% 中性緩衝ホルマリ ン液、0.05%トルイジンブルー液、1×トリスバッファー溶液 (1×TBS) は和光純薬株式会社製 のものを使用した。

2-2 測定装置

測定装置は第3章の2-2で使用したものを用いた。更に、熱重量の測定に島津製作所製 DTG-50を用い、炭素及び窒素の含有量は Perkin Elmer 社製の CHN マイクロアナライザー を用いた。高分解能³¹P 固体 NMR 測定は JEOL 社製の NMR 装置 GX-270を用いて、行 った。TEM 観察は JEOL 社製の透過型電子顕微鏡 JEM-3000F を用いて行った。

2-3 ATDC5 細胞の単層培養におけるアスパラギン酸ナトリウム及びアスコルビン酸リン酸 エステルマグネシウムの影響

2-3-1 ATDC5 細胞の培養

第3章の2-4-1と同様の手順でATDC5細胞を単層培養した。遠心分離を行い、細胞を集めた。

2-3-2 アスパラギン酸ナトリウム溶液及びアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液の 調製

L-アスパラギン酸ナトリウム溶液と L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液はそれぞれの粉末を 250mg ずつ、別々の 15ml 遠沈管に入れ、超純水を 5ml 加えた。その後、
0. 20mmのフィルターを用いてろ過滅菌を行い、15ml 遠沈管に入れた。アスパラギン酸ナト リウム溶液及びアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液の濃度は、それぞれ、 50mg/ml である。

2-3-3 ATDC5 細胞の単層培養におけるアスパラギン酸ナトリウム及びアスコルビン酸リン酸 エステルマグネシウムの影響

2-3-1 で集めた ATDC5 細胞に D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液を加えて、細胞濃度を 3.0×10⁵cells/ml の細胞懸濁液を調製し、それを 35mm ディッシュに 2ml 入れ、ATDC5 細胞 単層培養のサンプルとした。培養液は2日毎に交換し、それと同時に 2-2-2 で調製した、ア スパラギン酸ナトリウム溶液とアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液をフィンピペッ ターを用いて、100µl ずつ加えた。そして計 12日間培養を行った。細胞の様子は位相差顕 微鏡で観察した。

2-3-4 培養サンプルの固定化(単層培養)

12 日間培養したサンプルは、それぞれ、2mlの PBS 溶液で2回洗浄した。2mlの10%中 性緩衝ホルマリン液及びメタノールを加え1日間固定した。固定したサンプルはそれぞれト ルイジンブルー染色を施した。

2-3-5 トルイジンブルー染色(単層培養)

10%中性緩衝ホルマリン液で固定したディッシュを2mlの蒸留水で3回洗浄した。0.05%ト ルイジンブルー溶液を2ml加え、室温で30分間染色した。染色後、余剰のトルイジンブル ー溶液を吸引し、2mlの95%エタノールで各5秒間ずつ3回洗浄を行い、2mlの無水エタノ ールで10秒間洗浄を行った。染色したサンプルを位相差顕微鏡で観察した。

2-4 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での ATDC5 細胞のコラーゲンゲル 包埋培養

2-4-1 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末の合成

アスパラギン酸含有リン酸カルシウムとして、2 種類のサンプルを合成した。一つは「層間 取り込み型」のリアスパラギン酸含有リン酸八カルシウム(Asp-OCP)、もう一つは「表面吸着 型」のアスパラギン酸含有B型リン酸三カルシウム(Asp-β-TCP)である。

Asp-OCP は、100ml のナス型フラスコに 2.0mmol のα-TCP 粉末を入れ、4.5mmol の L-ア スパラギン酸ナトリウム一水和物を含む酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH=5.1)を 18ml 加えた。 そのナス型フラスコに撹拌子を入れて、マグネチックスターラーで、37°C のオイルバス中で 144 時間撹拌した。用いた酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液の調製は既報の方法で調製した[6]。 その後、生成物を吸引ろ過し、蒸留水で5回洗浄した。その後、50°Cの乾燥機で24時間乾 燥し、乳鉢で粉砕した。

Asp-β-TCP は、100ml のナス型フラスコに第3章の3-2-3 で作製した多孔質β-TCP を乳鉢 で粉砕したβ-TCP 粉末(2.0mmol)を入れ、4.5mmol の L-アスパラギン酸ナトリウム一水和物 を含む蒸留水を18ml 加えた。そのナス型フラスコに撹拌子を入れて、マグネチックスターラ ーで、37°C のオイルバス中で30分間撹拌した。その後、生成物を吸引ろ過し、蒸留水で5 回洗浄した。その後、50°C の乾燥機で24時間乾燥し、乳鉢で粉砕した。

比較サンプルとして、OCP、コハク酸含有 OCP(Suc-OCP)、β-TCP を合成した。OCP はこ れまでに開発された方法を改良した方法で合成した[7]。100mlのナス型フラスコに2.0mmol のα-TCP 粉末を入れ、酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液 (pH=3.3)を18ml 加えた。そのナス型フラ スコに撹拌子を入れて、マグネチックスターラーで、70°C のオイルバス中で3 時間撹拌した。 Suc-OCP は 100mlのナス型フラスコに2.0mmolのα-TCP 粉末を入れ、18mlの酢酸/酢酸ナ トリウム緩衝液 (pH=5.1)に 6ml の 1N-NaOH を加えた溶液を加えた。そのナス型フラスコに 撹拌子を入れて、マグネチックスターラーで、50°C のオイルバス中で3 時間撹拌した OCP 及び Suc-OCP の撹拌後の処理は Asp-OCP の場合と同様である。β-TCP は、第3章の3-2-3 で作製した多孔質β-TCP を乳鉢で粉砕したものを使用した。

2-4-2 コラーゲン溶液の調製

コラーゲン溶液は第3章の2-4-2と同様の手順で調製した。

2-4-3 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での ATDC5 細胞のコラーゲンゲル 包埋培養

2-3-1 で集めた ATDC5 細胞に 2-4-2 で調製したコラーゲン溶液を加え、ピペットで ATDC5 細胞がコラーゲン溶液に均一に分散した。この ATDC5 細胞含有コラーゲン溶液を 24 孔マ ルチウェルプレートにそれぞれ 0.5ml 加えた。(このときの細胞濃度は 7.0×10⁶ cells/ml であ る。)そこへ 2-4-1 で合成した、Asp-OCP、Asp- β -TCP、OCP、 β -TCP をそれぞれのウェルに 1mg ずつ加えた。そのプレートを 37°C、5% CO₂ に設定した CO₂ インキュベーターに 30 分間 入れて、ゲル化した。その後、D-MEM/F-12 with 5% FBS 培養液を 1ml 加え、再び CO₂ イン キュベーターに戻し、7 日間培養を行った。細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した。

2-4-4 pH 測定

培養液の交換時に培養後の培地をパスツールピペットを用いて、15ml 遠沈管に入れた。

138

クリーンベンチの外で、簡易型 pHメーターを用いてその培地(約 1ml)の pHを測定した。

2-4-5 トルイジンブルー染色

10%中性緩衝ホルマリン液で固定したサンプル(約 50mg)を 2ml の蒸留水で 3 回洗浄した。0.05%トルイジンブルー溶液を 2ml 加え、室温で 30 分間染色した。染色後、余剰のトルイジンブルー溶液を吸引し、2mlの 95%エタノールで各 5 秒間ずつ 3 回洗浄を行い、2mlの無水エタノールで 10 秒間洗浄を行った。染色したサンプルをデジタルマイクロスコープで 観察した。Adobe 社製の画像編集ソフト Photoshop4.0 を用いて、撮影した画像の青色のヒストグラム分布を測定した。

3 結果と考察

3-1 ATDC5 細胞の単層培養におけるアスパラギン酸ナトリウム及びアスコルビン酸リン酸 エステルマグネシウムの影響

一定期間(1日間、5日間、12日間)、単層培養した ATDC5 細胞の位相差顕微鏡観察の 結果を図 5.1 から図 5.3 に示す。それぞれの写真において、上段は何も加えないコントロー ル、中段はアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液を 100µm 加えて培養したサンプ ル、下段はアスパラギン酸ナトリウム溶液を 100µm 加えて培養したサンプルを示す。

単層培養1日目では、コントロール、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液、ア スパラギン酸ナトリウム溶液を加えたサンプルはディッシュ底面に細胞が接着していた、

単層培養5日目及び12日目では、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液及び アスパラギン酸ナトリウム溶液加えたサンプルとも細胞が増殖しコンフルエントに達し、細胞 増殖はコントロールのサンプルと見かけ上の差はなかった。

12 日間培養後、トルイジンブルー染色を行った結果を図 5.4 に示す。コントロールのサン プルでは青色に染色されたが、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液及びアスパ ラギン酸ナトリウム溶液を加えたサンプルでは、紫色に染色され、メタクロマジーを示した。染 色前では、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液及びアスパラギン酸ナトリウム溶 液を加えたサンプルでは見かけ上の細胞数はほぼ同程度であったが、染色後、その細胞の 分化状態は異なることがわかった。つまり、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム及び アスパラギン酸ナトリウム溶液を加えたサンプルでは、どちらもコントロールのサンプルと比べ てプロテオグリカンを多量に排出したことを示している。

Nagataらは、精巣の間質細胞である Leydig 細胞を 200µM のアスパラギン酸存在下で培



Fig.5.1 Phase-contrast micrographs of monolayer-culured ATDC5 cells with organic solution after culture for 1 day

- (a) Control
- (b) Ascorbic acid phospholic ester magnesium salt
- (c) Sodium aspartate



Fig.5.2 Phase-contrast micrographs of monolayer-cultured ATDC5 cells with organic solution after cultivation for 5 days

- (a) Control
- (b) Ascorbic acid phospholic ester magnesium salt
- (c) Sodium aspartate



Fig.5.3 Phase-contrast micrographs of monolayer-cultured ATDC5 cells with organic solution after cultivation for 12 days

- (a) Control
- (b) Ascorbic acid phospholic ester magnesium salt
- (c) Sodium aspartate



Fig.5.4 Phase-contrast micrographs of monolayer-cultured ATDC5 cells with organic solution after toluidine blue staining (12 days)

(a) Control

(b) Ascorbic acid phospholic ester magnesium salt

(c) Sodium aspartate

養した場合、細胞の成長に伴い合成されるテストステロンの量が培養 21 時間で約3 倍多く なることを報告している[8]。この結果をそのまま本実験系に当てはめることはできないが、ア スパラギン酸がある種の細胞成長し、それに伴い排出物は増加するという事実から、本実験 系においてアスパラギン酸ナトリウムが ATDC5 細胞の成長を促進したと考えることができる。

Fujita らは、ATDC5 細胞にアスコルビン酸存在下で培養した場合、アスコルビン酸を加え ないサンプルと比較して、その細胞成長を示すカルシウム含有量が有意な差で増加したと 報告している[9]。本実験で用いた安定な水溶性誘導体であるアルスコルビン酸リン酸エス テルマグネシウムは、培養中に酵素によって加水分解し、アスコルビン酸となる。そのアスコ ルビン酸が ATDC5 細胞の細胞成長及びそれに伴うプロテオグリカンの排出を促進している と考えられる。

トルイジンブルー染色の結果、アスパラギン酸ナトリウム溶液を加えて培養したサンプルと アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液を加えて培養したサンプルのプロテオグリカ ンの生成量は見かけ上、同程度であった。つまり、アスパラギン酸ナトリウムはアスコルビン 酸リン酸エステルマグネシウムと同程度に細胞成長を促進する働きがあることを示している。

3-2 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下での ATDC5 細胞のコラーゲンゲル 包埋培養

3-2-1 アスパラギン酸含有リン酸八カルシウムの物性測定

図 5.5 に Asp-OCP 及び OCP の XRD パターンを示す。Asp-OCP のピークは OCP のピー クと比べてそのピーク強度は低かった。OCP 特有の(100)面を示すピークは OCP の 20=4.7° と比べて、低角度側にシフトし、20=4.2°にピークを観察した。これは a 軸が 1.87nm から 2.14nm に増加したことを示している。OCP の水和層中に存在する HPO₄²⁻の代わりにアスパ ラギン酸イオン('OOC-CH(NH₂)-CH₂-COO⁻)が取り込まれたと考えた場合の a 軸の増加とよ い一致を示す。

表 5.1 に CHN 化学分析、TG-DTA 測定、蛍光 X 線分析で求めた Ca/P 比から計算した Asp-OCP、OCP、Suc-OCP の構造式を示す。その計算方法は Monma らの報告した方法を 用 い た [10] 。 そ の 結 果 、 Asp-OCP 、 OCP 、 Suc-OCP の 構 造 式 は 、 $Ca_8(HPO_4)_{1.28}(C_4H_5NO_4)_{0.72}(PO_4)_{4}.6.3H_2O$ 、 $Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_{4}.4.4H_2O$ 、 $Ca_8(HPO_4)_{1.06}(C_4H_4O_4)_{0.94}(PO_4)_{4}.5.3H_2O$ であった。アスパラギン酸イオンによる HPO_4^{2-2} の 置換率は 72%であった。

図 5.6 に Asp-OCP、OCP、Suc-OCP の FT-IR スペクトルを示す。OCP のスペクトルでは、 特徴的な吸収バンドを 863cm⁻¹(HPO₄²⁻の P-O(H)の対称伸縮バンド)と 910cm⁻¹(HPO₄²⁻の O-H の面内変角振動に由来するバンド)を観察した[11]。Suc-OCP のスペクトルでは、



Fig.5.5 XRD patterns of Asp-OCP obtained at 144 hours and OCP

Table 5.1 Elemental analyses of OCP, Suc-OCP, and Asp-OCP

Sample name	Chemical analyses			Formula ^{*2}	
	C^{*1}	N^{*1}	Ca/P ratio	Z	m*3
OCP	-	-	1.34	0	4.4
Suc-OCP inclusion compound	4.29	-	1.58	0.94	5.3
Asp-OCP inclusion compound	3.93	1.94	1.51	0.72	6.3

*1 All values of mass %

*2 General formula: Ca₈(HPO₄)_{2-z}(RC₂O₄)z(PO₄)₄·mH₂O (z=0-1)

*3 "m" is calculated from the result of the weight loss





- (a) OCP
- (b) Suc-OCP
- (c) Asp-OCP

863cm⁻¹ の吸収バンドが消失した。これは水和層中にある HPO4²⁻がコハク酸イオン (OOC-(CH₂)₂-COO)と置換したためであると考えられる。Asp-OCP のスペクトルにおいて、 OCP と比べて、863cm⁻¹ の吸収バンドの強度が減少した。すなわち、OCP の水和層中の置 換可能な HPO4²⁻がアスパラギン酸イオンによって置換したものと考えることができる。この結 果は、元素分析の結果から求めた構造式ともよい一致を示す。

図 5.7 に高分解能 ³¹P 固体 NMR 測定の結果を示す。OCP には 3 本のシグナルを観察した。この内、2 本のシグナル (3.4ppm、-0.1ppm、強度比 2:1)と低温でもう一本のシグナルがあり[12,13]、強度比、CP (Cross Polarization)の予備実験から、3.8ppm のシグナルがアパタイト層中の PO4³⁻のリン、-0.06ppm のシグナルが水和層中の HPO4⁻² のリン、2.1ppm のシグナルは 3.8ppm と同じくアパタイト層中の PO4³⁻のリンである。一方、Suc-OCP の-0.06ppm のシグナル強度は OCP と比較して低下した。これは HPO4²⁻とコハク酸イオンが置換したため、水和層中のリンが減少したためと考えることができる。Asp-OCP では、OCP や Suc-OCP と比べて、³¹P のシグナルがブロードであった。これは Asp-OCP の低結晶性であるためと考えることができる。-0.06ppm のピークは Suc-OCP の場合と同様に減少していることから、Asp-OCP においてもSuc-OCP と同じように OCP の水和層中の HPO4⁻² とアスパラギン酸イオンが置換したと考えることができる。しかし、-0.06ppm のシグナルは完全に消失していないことから、部分的な置換が起こっていると考えることができる。

図 5.8 に Asp-OCP の TEM 写真とその電子回折パターンを示す。電子線回折パターンを 観察したことから、この Asp-OCP はアモルファスではなく、低結晶性であることがわかった。 また、結晶サイズはおおよそ 100nm であった。



Fig.5.7 The solid-state ³¹P magic angle spinning NMR spectra of OCP, Suc-OCP, and Asp-OCP

- (a) OCP
- (b) Suc-OCP
- (c) Asp-OCP



Fig.5.8 TEM photograph (a) and its electron diffraction pattern (b) of Asp-OCP

3-2-2 アスパラギン酸含有リン酸カルシウム粉末存在下でのATDC5細胞のコラーゲンゲル

包埋培養

4種類のリン酸カルシウム粉末存在下で一定期間(培養直後、4日間、7日間)コラーゲン ゲル包埋培養した ATDC5 細胞の位相差顕微鏡観察の結果を図 5.9 から図 5.11 に示す。

培養直後では、ATDC5 細胞は、どのリン酸カルシウム表面にも接着しておらず、その形状は球状であった。

培養 4 日目では、全てのサンプルで ATDC5 細胞が球状から紡錘状に変化したが、 Asp-OCP 存在下で培養したサンプルにおいて、特に細胞が伸張した Asp-OCP 粒子表面に 接着している様子を観察した。

培養7日目では、全てのサンプルで伸張したATDC5細胞を観察した。特にAsp-OCP存 在下で培養したサンプルでは、ATDC5細胞がAsp-OCP粒子表面を覆うように存在している 様子を多くの視野で観察した。

図 5.12 に ATDC5 細胞のコラーゲンゲル包埋培養時に 4 種類のリン酸カルシウム存在下 及び何も加えずに ATDC5 細胞をコラーゲン包埋培養した際の培養後の培地の pH 変化を 示す。用いた培地の培養前の pH は pH=7.4 である。培養 4 日目及び 7 日目において、ア スパラギン酸含有サンプル(Asp-OCP 及び Asp-β-TCP)存在下で培養したサンプルの培養 後の培地の pH は、アスパラギン酸を含んでいない OCP とβ-TCP と比べて減少した。特に Asp-OCP 存在下培養したサンプルがもっとも pH の減少が大きかった。この pH の減少は、 細胞増殖により細胞自身の呼吸による CO₂の排出の増加と成長した ATDC5 細胞によって 排出されるプロテオグリカンの増加が原因であると考えることができ、Asp-OCP 存在下でコラ ーゲンゲル包埋培養した ATDC5 細胞の細胞成長がもっとも早いと考えられる。

7 日間培養後、トルイジンブルー染色を行った結果を図 5.13 に示す。コントロール及び4 種類のリン酸カルシウム粉末を加えて培養したサンプルはそれぞれ青色に染色されたが、 Asp-OCP 存在下で培養したサンプルでは、その色は濃い青紫色であった。この濃い青紫色 は、ATDC5 細胞がその成長に伴って排出したプロテオグリカンとトルイジンブルーが結合し て、メタクロマジーが現れたことを意味する。

染色後、撮影した画像の青色のヒストグラムを定量的に示した結果を図5.14に示す。図中のヒストグラムは左側に行くほど濃い青色、右側に行くほど薄い青色であることを示している。 この結果、青色が濃い順番は、Asp-OCP>Asp-β-TCP>β-TCP>OCP≅control であった。 これは、アスパラギン酸を含む Asp-OCP 及び Asp-β-TCP がアスパラギン酸を含まないサン プルより、強いメタクロマジーを示している。これは、単層培養の結果において、アスパラギン 酸が ATDC5 細胞の細胞成長を促進しているという結果とよい一致を示した。一般的に、細 胞は細胞膜上のムコ多糖タンパク質複合体や糖鎖末端のシアル酸により、負荷電を有す

151



Fig.5.9 Phase-contrast micrographs of ATDC5 cells in collagen gel with calcium phosphates at the beginning of the culture

- (a) Control
- **(b)** β**-TCP**
- (c) Asp-β-TCP
- (d) OCP
- (e) Asp-OCP





- (a) Control
- (b) β-TCP
- (c) Asp-β-TCP
- (d) OCP
- (e) Asp-OCP



Fig.5.11 Phase-contrast micrographs of ATDC5 cells in collagen gel with calcium phosphates after culture for 7 days

- (a) Control
- (b) β-TCP
- (c) Asp-β-TCP
- (d) OCP
- (e) Asp-OCP



Fig.5.12 pH change of culture media after culture



Fig.5.13 Phase-contrast micrographs of the embedded culture in collagen gel of ATDC5 cells with calcium phosphate after toluidine blue staining (7 days)

- (a) Control
- (b) β-TCP
- (c) Asp-β-TCP
- (d) OCP
- (e) Asp-OCP



Fig.5.14 Histogram for blue color of the embedded cultivation in collagen gel of ATDC5 cells with calcium phosphate after toluidine blue staining (7 days)

- (a) Control
- (b) β-TCP
- (c) Asp-β-TCP
- (d) OCP
- (e) Asp-OCP

る。そのため、正荷電を有する塩基性タンパク質(例えば、ポリリジン、ポリオルニチン、ヒスト ン等)を導入すると、細胞接着は著しく増加することが知られている。しかし、アスパラギン酸 は酸性アミノ酸であり、それが導入された場合、負荷電を有することになり、その細胞接着及 び成長は抑制されるはずである。これは上記のアスパラギン酸を吸着したサンプルの方が、 アスパラギン酸を含まないサンプルより、その細胞成長が促進したことと矛盾する。しかし、 負苛電を持つ表面であっても、培養液 Caイオンが存在する場合、その Caイオンが介在する ことにより、細胞接着が促進するという報告がある[14]。 つまり、本実験系においては、アスパ ラギン酸イオンがリン酸カルシウムのCaイオンと結合しているために、ATDC5細胞の細胞成 長が促進したと考えることができる。アスパラギン酸を含むリン酸カルシウムである Asp-OCP とAsp-β-TCPを比較した場合、Asp-OCP存在下で培養したATDC5細胞の方が、早い細胞 成長を示した。これは、Asp-β-TCP では、アスパラギン酸はβ-TCP 表面の Ca イオンと結合し ているだけであるが、Asp-OCP では表面吸着に加えて、OCP の水和層中に存在し、上下の アパタイト層中のCaイオンと結合している。アスパラギン酸イオンが層間に取り込まれた場合、 そのアスパラギン酸イオンの脱離は Asp-OCP が分解する際に起こることになり、表面吸着の ものと比べて、その速度は遅くなる。つまり、層間に取り込むことによって、表面吸着型の担 持方法には見られない、徐放効果が期待できる。また、β-TCPの結晶サイズが Asp-OCP と 同程度であったと仮定しても、その層間を利用できるという点で、Asp-OCP が多くの量のアス パラギン酸を担持できるものと考える。以上のことから、Asp-OCP は長期間の培養において も、生理活性物質を提供し続けることが可能であることを示している。

4 結言

本章では、細胞増殖因子に変わる ATDC5 細胞の細胞成長を促進する生理活性を有す る低分子有機物としてアスパラギン酸ナトリウムとアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム に着目し、ATDC5 細胞の単層培養時にそれぞれの溶液を加えて培養した。その結果、アス パラギン酸ナトリウム溶液を加えたサンプルは、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム 溶液を加えたサンプルと比べ、細胞成長に伴うプロテオグリカンの生成量の点で、見かけ上 同程度の細胞成長の促進を観察した。このことから、アスパラギン酸ナトリウムが ATDC5 細 胞の細胞成長を促進することがわかった。

次に、アスパラギン酸を層間に取り込んだ、Asp-OCP 及び表面吸着した Asp-β-TCPを合成し、アスパラギン酸を含まない OCP 及びβ-TCP と共に、4種類のリン酸カルシウム存在下で ATDC5 細胞のコラーゲン包埋培養を行った。その結果、アスパラギン酸を含むリン酸カ ルシウム粉末存在下(Asp-OCP 及び Asp-β-TCP)で培養したサンプルにおいて、アスパラギ

158

ン酸を含まない OCP やβ-TCP と比べて、その細胞成長に伴うプロテオグリカンの生成量が 多いことがわかった。Asp-OCP 存在下で培養した ATDC5 細胞がもっともプロテオグリカンを 排出したことから、その成長を促進するアスパラギン酸の担持方法として、OCP の層間に取 り込むことが有用であることがわかった。

引用文献

[1] Kitagawa Y, Ono M, Jeon F. Role of vitamin C in basement membrane synthesis and cell differentiation. Vitamin 1992;66:431-6.

[2] Brown WE. Crystal structure of octacalcium phosphate. Nature 1962;196:1048-50.

[3] Monma H, Goto M. Thermal alternation of succinate-complexed octacalcium phosphate. J Mater Sci Lett 1985;4:147-50.

[4] Monma H, Moriyoshi Y. Zeolitic-dehydration-rehydration of adipate-intercalated octacalcium phosphate. J Mater Sci: Mater Med 1990;1:21-5.

[5] Monma H, Nishikawa H. Thermal behavior of octacalcium phosphate intercalated with β -dihydromuconate. Nippon Seramikkusu Kyokai Gakujutsu Ronbunshi 1992;100:373-6.

[6] Perrin DD. Buffers for pH and metal ion control. Kodansha, Tokyo 1981:138.

[7] Monma H. Octacalcium phosphate. Gypsum & Lime 1980;166:112-21.

[8] Nagata Y, Honma H, Lee JA, Imai K. D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells. FEBS Letters 1999;444:160-4.

[9] Fujita T, Meguro T, Izumo N, Yasutomi C, Fukuyama R, Nakamura H, Koida M. Phosphate stimulates differentiation and mineralization of the chondroprogenitor clone ATDC5. Jpn J Pharmacol 2001;85:278-81.

[10] Monma H, Thermal properties of layer-structured calcium phosphate intercalated with succinate and methylsuccinate ions. Gypsum & Lime 1990;229:396-401.

[11] Fowler BO, Markovic M, Brown WE. Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra. Chem Mater 1993;5:1414-23.

[12] Rothwell WP, Waugh JS, Yesinowski JP. High-resolution variable-temperature 31P NMR of solid calcium phosphates. J Am Chem Soc 1980;102:2637-43.

[13] Tropp J, Blumenthal NC, Waugh JS. Phosphorus NMR study of solid amorphous calcium phosphate. J Am Chem Soc 1983;105:22-6.

[14] Tamada Y, Ikada Y. Cell attachment to various polymer surfaces. Polymer Science and Technology 1986;34:101-15.

第6章 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡による 培養軟骨-多孔質リン酸三カルシウム接合システムの表面観察

1 緒言

これまで軟骨細胞の細胞成長の定量的に測定する方法として、細胞分化能については ALP活性測定、細胞増殖能についてはMTTアッセイがある[1,2]。また、遺伝子解析の手法 を用いて細胞成長に伴う変化を追跡する方法がある[3]。しかし、これらの方法では作業手 順が多く、解析するためには高価な測定装置や解析に高度な専門知識が必要となる。その 他の方法として、細胞成長を可視化する方法として「染色」という方法が一般的に用いられ ているが、染色の際に細胞を固定するために、生きている軟骨細胞の直接の細胞成長の評 価方法とは言い難い。

我々が作製した培養軟骨-多孔質β-TCP システムにおいて、細胞成長の違いがあるかどう かを知ることは重要である。

光走査型化学顕微鏡は、半導体からできた平面型のセンサー(pH イメージングセンサー)を用いて、複数の微小な測定点で pH 値を独立して測定することで、微小な領域の pH 分布を画像として表示できるものである(図 6.1)。その測定原理は、絶縁体(SiO₂/Si₃N₄)/半 導体(Si)からなる構造の Si₃N₄ 面上に電解質を載せ、Si₃N₄ 面で pH 測定を行う。シリコンと 電解質間にバイアス電圧を印加した状態で、シリコン面に光を照射した時に生じる光電流の 特性が、Si₃N₄ 面に接する電解質中のプロトン量に依存して変動することを利用する。光照 射のスポットを小さく絞り、照射スポットを走査すれば、単独のセンサーを複数の pH 測定点 を有するように機能させることが可能である[4,5]。

この顕微鏡を用いると、ゲルや液体を含む多孔体中のプロトン移動の観察など、従来の ガラス電極とは異なる方法で pH 測定が行える[6-8]。軟骨細胞はその成長に伴って、コンド ロイチン硫酸やヒアルロン酸等の酸性物質を排出する。このことは本システム培養後の培養 液の pH 減少という結果が支持している。しかしながら、これはシステム全体の情報しか得る ことができず、システム内の細胞成長の様子を知るために培養液の pH 測定以外の新しい測 定方法を用いる必要がある。

そこで、本章では、光走査型化学顕微鏡がゲル中に形成した pH 分布を可視化できること を利用して、培養軟骨-多孔質β-TCP システムにおける細胞成長の様子を観察した。



Fig.6.1 Schematic view of the pH imaging sensor

2-1 試薬

α-TCP は太平化学産業株式会社製を用いた。図 2.1 にその SEM 写真を図 2.2 に X 線回 折パターンを示す。その平均粒径は 5µm であった。50wt%ポリエチレンイミンはアルドリッチ 製を用いた。界面活性剤は花王株式会社製の「MORE」を用いた。グリセロールジグリシジ ルエーテルはシグマ社製のものを使用した。軟骨株細胞 ATDC5 細胞は理化学研究所の細 胞開発銀行から入手した。D-MEM/F-12 液体培地、ウシ胎児血清(FBS)、0.25%トリプシン は GIBCO 社製のものを使用した。Cellmatrix type I-A(A 液、B 液、C 液)は新田ゼラチン株 式会社製のものを用いた。

2-2 多孔質β-TCP の合成と BMP-6 の吸着

多孔質β-TCP は第3章の 3-2-3 と同様の手順で作製した。多孔質β-TCP に BMP-6 を吸 着させる手順は、次の通りである。BMP-6 溶液は 50mg 入りのアンプルに 121°C、20 分間オ ートクレーブ滅菌をし、室温に冷やした超純水を 1ml 加えた。このアンプルを 37°C の CO₂ インキュベーターに 120 分間入れ、保持した。その後、0.20mm のフィルターを用いてろ過滅 菌を行い、15ml 遠沈管に入れた。この遠沈管に 160°C、4 時間乾熱滅菌した多孔質β-TCP を5 個(約 100mg)入れた。この遠沈管を 37°C の CO₂ インキュベーターに 120 分間入れ、 保持した。その後、乾熱滅菌したデシケーターに蓋を開けた 15ml 遠沈管を入れ、3 時間凍 結乾燥した。

2-3 ATDC5 細胞の培養

凍結保存しておいた ATDC5 細胞入りのアンプルを 37℃ の恒温槽で解凍し、クリーンベン チ内に準備しておいた 50ml 遠沈管に一旦入れた。ここに D-MEM/F-12 液体培地に 5vol.% (全体積の 5%)FBS を含むように調製した培養液 (D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液)を加 え、細胞濃度を 3.0×10⁵ cells/ml にした。この細胞を含む培養液を直径 60mm ディッシュに 5ml 入れ、蓋をしてから 37℃、5%CO2 に設定した CO2 インキュベーターに入れた。培養液 は 2 日毎に交換し、計 7 日間培養を行った。位相差顕微鏡で 90%コンフルエントに達したこ とを確認してから、培養液を吸引し、2ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)で 2 回洗浄した。 1ml の 0.25%トリプシン溶液を 60mm ディッシュに加え、全体に行き渡らせてから、吸引した。 その後 5ml の培養液を加え、フラッシングをして細胞を 60mm ディッシュから剥がした。その 細胞懸濁液を 50ml 遠沈管に移し、1000rpm、3 分間の条件で遠心分離を行った。その上澄 み液を吸引し、ATDC5 細胞を集めた。

2-4 コラーゲン溶液の調製

コラーゲン溶液は報告されている方法を参照して[9]、Cellmatrix type I-AのA液、B液、C 液を体積比がA:B:C=8:1:1 になるように混合して調製した。ちなみにA液は0.15%タイ プIコラーゲン、B液は10×D-MEM/F-12液体培地、C液はコラーゲンゲル再構成用緩衝液 である。

2-5 培養軟骨-多孔質β-TCP システムの作製

2-3 で集めた ATDC5 細胞に 2-4 で調製したコラーゲン溶液を加え、ピペットで ATDC5 細胞がコラーゲン溶液に均一に分散した。この ATDC5 細胞含有コラーゲン溶液を 96 孔マル チウェルプレートに 150µl 加えた。(このときの細胞濃度は 7.0×10⁶cells/ml である。)そこへ 2-2 で調製した BMP-6 を吸着した多孔質 β -TCP(約 20mg)をウェルに加えた。そのプレート を 37°C、5%CO₂に設定した CO₂インキュベーターに 30 分間入れて、ゲル化した。その後、 D-MEM/F-12 with 5%FBS 培養液を 150µl 加え、再び CO₂インキュベーターに戻した。培養 液は 2 日毎に交換し、21 及び 63 日間培養を行った。

2-6 pH 測定

培養液の交換時に培養後の培地をパスツールピペットを用いて、15ml 遠沈管に入れた。 クリーンベンチの外で、簡易型 pHメーターを用いてその培地(約 1ml)の pH を測定した。

2-7 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡による培養軟骨-多孔質β-TCP システムの表面観察

光走査型化学顕微鏡の測定装置図を図 6.2 に示す。10⁻²M KCl 溶液と寒天粉末を混ぜ、 それを 121C、20 分間の条件でオートクレーブ処理をして 1.5%寒天溶液を得た。その寒天 溶液を室温で 30 分間放置し、ゲル化した後、カッターで 10×10×3 mm に切断した。これを切 断した寒天ゲルをサンプルホルダーに置いた。寒天ゲルの中央上部に白金線を挿し、リファ



Fig.6.2 Photograph of light scanning chemical microscope

レンスの I-V 値を測定した。その測定から決定した I-V 値をパソコンに入力し、リファレンスの 画像測定を行った。画像測定の条件は、周波数:10 KHz、測定範囲:10.24×10.24 mm、画 素数:512×512、測定感覚:10ms、サンプルパルス数:64 である。リファレンスの画像測定後、 図 6.3 に示すように向かって左側に21 日間培養したサンプル、右側に63 日間培養したサン プルを置いた。リファレンスの画像測定と同じ条件でサンプルの画像測定を行った。

3 結果と考察

3-1 半導体シリコンセンサーを用いた光走査型化学顕微鏡による培養軟骨-多孔質β-TCP システムの表面観察

リファレンスの I-V 値の結果を図 6.4 に示す。この結果から、I-V 値の設定値を-0.80V と決 定した。図 6.5 にリファレンスと BMP-6 を吸着した2つのサンプルを置いた後の画像測定結 果を示す。21日間培養したサンプルを置いた左側(x)はリファレンスと殆ど変化はなかったが、 63 日間培養したサンプルを置いた右側(y)はサンプルを置いた場所に対応する部分が黄色 から黄緑色に色が変化した。培養後の培地のpHは21日間培養した場合で6.6、63日間培 養した場合で 6.3 であった。この 63 日間培養したサンプルの画像測定の結果で観察した黄 色から黄緑色の変化は、培地の pH の低下に対応し、それは成長した ATDC5 細胞の呼吸 量の増加及び排出した軟骨基質の増加によって生じたプロトン量の増加が原因である。 Kitasako らの報告によると、健全歯と虫歯を光走査型化学顕微鏡で観察した場合、それぞ れの pH はそれぞれ 7.3 と 6.9 であり、その pH の差を明確に見分けることができたと報告し た[10,11]。 つまり、 0.3~0.4 程度の pH 差であれば、 それを観測し、 可視化できることを示し ている。また、63日間培養したサンプルにおいて、サンプルの上部分(培養軟骨側)のpHが 下部分(多孔質β-TCP 側)より相対的に低かった。ATDC5 細胞の成長が、成熟過程から石 灰化過程に進行すると、ATDC5 細胞が排出する軟骨基質の量は減少し、それによって生じ るプロトン量が減少する。その結果として pH の減少は抑制される。 つまり、BMP-6 を加えた 多孔質β-TCPと培養軟骨を考えた場合、BMP-6濃度が高い多孔質β-TCPの近くに存在す る ATDC5 細胞の石灰化を含む細胞成長は、培養軟骨部分と比べて早いと考えることができ る。



Fig.6.3 Photograph of the sample folder and samples

- (x) The cultured cartilage / porous β -TCP with BMP-6 (21 days)
- (y) The cultured cartilage / porous β -TCP with BMP-6 (63 days)



Fig.6.4 The I-V characteristics curve



Fig.6.5 pH images reference (a) and sample (b)

- (x) The cultured cartilage / porous β -TCP with BMP-6 (21 days)
- (y) The cultured cartilage / porous β -TCP with BMP-6 (63 days)

本章では、光走査型化学顕微鏡を用いた BMP-6 を含む培養軟骨-多孔質β-TCP システムにおける細胞成長の可視化を試みた。その結果、21 日間培養したサンプルと 63 日間培養したサンプル間において、pH の差を画像化することができ、その培養後の培養液の pH の差から0.3~0.4 であることがわかった。また、63 日間培養したサンプルでは培養軟骨部分と多孔質β-TCP 部分で pH の差があることがわかり、それを画像化することにより、同じシステム内であっても細胞成長の程度が場所によって異なることがわかった。今後、装置の精度を上げることにより、システム内のそれぞれの部分(培養軟骨部分と多孔質β-TCP 部分)の中での細胞成長の違いを可視化することが可能であると考えられる。

引用文献

[1] Ishizeki K, Takigawa M, Nawa T, Suzuki F. Mouse Meckel's cartilage chondroxytes evoke bone-like matrix and further transform into osteocyte-like cells in culture. The Anatomical Record 1996;245:25-35.

[2] Liang HJ, Tsai CL, Chen PQ, Lu FJ. Oxidative injury induced by synthetic humic acid polymer and monomer in cultured rabbit articular chondrocytes. Life Sciences 1999;65:1163-73.

[3] Kubota S, Moritani N, Kawaki H, Mimura H, Minato M, Takigawa M. Transcriptinal induction of connective tissue growth factor/hypertropic chondrocyte-specific 24 gene by dexamethasone in human chondrocytic cells. Bone 2003;33:694-702.

[4] Nakao M, Inoue S, Oishi R, Yoshinobu T, Iwasaki H. Observation of microorganism colonies using a scanning-laser-beam pH-sensing microscope. J Ferment Bioeng 1995;79:163-6.

[5] Nakao M, Nomura S, Takamatsu S, Tomita K, Yoshinobu T, Iwasaki H, High resolution chemical imaging sensor using semiconductor Si. T IEE Jpn 1998;118:584-9.

[6] Nomura S, Nakao M, Nakanishi T, Takamatsu S, Tomita K. Anal Chem 1997;69:977-81.

[7] Yoshinobu T, Iwasaki H, Nakao M, Nomura S, Nakanishi T, Takamatsu S, Tomita K. Application of chemical imaging sensor to electro generated pH distribution. J Appl Phys Lett 1998;37:L353-5.

[8] Nomura S, Takamatsu S, Nakao M, Yang YG, Inoue C, Chida T. Observation of proton diffusion in porous media using pH-imaging technology. Bunseki Kagaku 1999;48:763-9.

[9] Enami J, Koezuka M, Hata M, Kawamura K, Tachibana Y, Kusama Y, Koga M. Collagen gel culture method. The tissue culture engineering 1987;13:26-30.

[10] Kitasako Y, Nikahido T, Tagami J, Ikeda K, Mitsunan K, Nomura S. Surface analysis of human teeth using pH imaging microscope based on semiconductor silicon sensor. Bunseki Kagaku 2000;49:325-7.

[11] Hiraishi N, Kitasako Y, Nikaido T. Evaluation of active and arrested carious dentin using a pH-imaging microscope and an X-ray analytical microscope. Operative Dentistry 2003;28:598-604.

第7章 総括

関節軟骨はそれ自身に修復能が無く、1 度損傷を受けてしまうと関節機能に大きな障害 が生じるために、最終的な外科的治療として、人工関節術が広く行われているのが一般的 である。このような人工関節置換術は疼痛除去効果が著しく、耐久性は15年程あるが、未だ に満足な治療方法がない。生体骨に埋め込まれた人工関節ステムの緩みや UHMWPE(超 高密度ポリエチレン)磨耗粉による炎症反応が生じ、再手術が必要になる。そのため、損傷 した関節軟骨の部分的な修復が期待できる生体組織工学手法を用いた治療方法として、細 胞の直接移植による方法や人工培養軟骨移植による方法が近年注目を浴びている。しかし ながら、これらの方法では、(1) 移植した細胞や培養軟骨と移植周辺部の関節軟骨または 生体骨と接着しない、(2) 移植した細胞や培養軟骨中の細胞分化を制御しなければなら ない、という2つの大きな問題点があった。

そこで、本研究では、まず前者(1)の問題である培養軟骨と生体骨との接着を改善するた めに、多孔質リン酸カルシウムに培養軟骨を接合した新しい人工関節軟骨モデルを考案し、 作製した。ここで用いた多孔質リン酸カルシウムは、泡セラミックス法と水熱処理法を組み合 わせた新規な合成方法で作製した。この作製した多孔質リン酸カルシウムは生体親和性に 優れ、細胞成長に適した気孔性状(大きな気孔径(直径:100µm 以上)、高い気孔率(60% 以上)、そして粗い表面)を持つ。更に(2)の問題を解決するために、培養軟骨/多孔質リン 酸カルシウム接合システムに中の多孔質リン酸カルシウムの代わりに、細胞増殖因子の一 つである骨形成タンパク質-6(BMP-6)を強固に吸着した多孔質リン酸三カルシウムを用い、 培養軟骨と多孔質リン酸三カルシウムの界面付近の軟骨細胞の石灰化を試みた。

第1章では、関節の構造とその特徴、そして損傷した関節軟骨の治療方法の特徴と問題 点について概説した。

第2章では、培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムを用いた新しい人工関節軟 骨モデルに用いる、多孔質リン酸カルシウムの新しい合成方法について述べた。この合成 方法は泡セラミックス法と水熱処理法を組み合わせたものである。まず泡セラミックス法で高 温安定型のα型のリン酸三カルシウム(α-TCP)- ポリマー発泡体を合成した。この発泡体を 緩衝液中で水熱処理をすると、α-TCP が加水分解され、針状や板状の粒子が発泡体表面 に析出した。その比表面積は11.13-15.37m²/g の範囲の高い値であった。この水熱処理した 成形体を焼結することによって、0.34-0.52m²/g の範囲の値であった。この時水熱処理に使 用する溶液の種類を変えることで、得られる多孔質リン酸カルシウム発泡体の組成をコントロ

171

ールすることができた。特に、用いた溶液のイオン濃度($CO_3^{2^\circ}$ 、 $HPO_4^{2^\circ}$ 、 $PO_4^{3^\circ}$ 、 H^+ 、そして OH)はリン酸カルシウムの組成のコントロールに効果的な因子であることがわかった。 $CO_3^{2^\circ}$ のイオン濃度が高い Na₂CO₃/NaHCO₃ 緩衝液 (pH=8.5)を用いた場合、カルシウム欠損型ハイドロキシアパタイト (Ca-dHAp)中にある 2 つの OH のサイト に HPO₄²⁻の代わりに入り、炭酸含有アパタイト (CO₃Ap)が生成した。PO₄³⁻のイオン 濃度が高い Na₂HPO₄/NaOH 緩衝液 (pH=11.7)を用いた場合、pH=11.7の溶液中で PO₄³⁻ が優先的に存在しており、蒸留水 (pH=7.4)を用いて水熱処理をしたものより PO₄³⁻ が高い含有率な Ca-dHAp を得た。

水熱処理後のサンプルの Ca/P 比は、それぞれ、1.77 (Na₂CO₃/NaHCO₃ 緩衝液)、1.57 (Na₂HPO₄/NaOH 緩衝液)、1.45 (蒸留水)であり、それぞれのサンプルを 1150°C で焼結す ると、それぞれ HAp(+CaO)、HAp/β-TCP、β-TCP(+β-CPP)[α-TCP(1250°C)]の異なる組 成を持つ多孔質リン酸カルシウムを得た。焼結した多孔質リン酸カルシウムで培養した骨芽 細胞 MC3T3-E1 細胞の細胞活性は MTT アッセイ、ALPase 活性そして細胞密度の結果、 単層培養のものに匹敵する細胞活性を示した。水熱処理時のイオン濃度と焼結温度をコン トロールすることで、人工骨として要求される気孔率(60%以上)、気孔径(直径 100µm以 上)、更に細胞接着に有利な表面粗さを持ち、スキャホールドとして十分に使用可能な異な る組成を持つ多孔質リン酸カルシウムを作製することができた。

第3章では、培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムを用いた新しい人工関節軟 骨モデルの作製について述べた。多孔質リン酸カルシウムとして、第2章で合成したもの中 で生体吸収性に優れ、最終的に生体骨と置換する多孔質リン酸三カルシウム(β-TCP)を用 いた。培養軟骨は、コラーゲンゲル中で軟骨株細胞 ATDC5 細胞を培養したものである。 ATDC5 細胞はその由来が明確な細胞であり、その分化過程を初期段階から最終段階(石 灰化過程)までを追うことが出来る細胞株である。

このシステムを培養した結果、ALPase 活性、トルイジンブルー染色したサンプルの電子ス ペクトルそして FT-IR スペクトルから、3 日間培養したサンプルにおいて、多孔質β-TCP の気 孔の外側及び内側のコラーゲンゲルの両方で ATDC5 細胞が成長していることがわかった。 更に21 日間培養したサンプルにおいて、ATDC5 細胞の形状及び ATDC5 細胞が多量のプ ロテオグリカンを排出していることから、その分化状態は成熟段階に達していると考えられ る。

更に ATDC5 細胞の成長に伴う、繊維状コラーゲンを観察した。この繊維状コラーゲンはサンゴ礁様の粗い表面を持つ多孔質β-TCP の気孔内部壁に絡み合っていた。線維状コラーゲンと多孔質β-TCP 間の絡み合いは培養軟骨と多孔質β-TCP 間の接着力の改善が期待で
きる。多孔質β-TCP の内部において、ATDC5 細胞がその気孔内部で接着していることを観察したことから、この多孔質β-TCP は ATDC5 細胞の成長を阻害せず、3 次元培養担体とし て有用であることを示した。これまで培養軟骨には"生体骨と接着しない"という問題点があった。本章で作製した培養軟骨/多孔質β-TCP システムでは、生体吸収性に優れ、生体骨との 接着も可能な多孔質β-TCP と培養軟骨が見かけ上接着したことによる、上記の問題点の一 つの解決方法を示した。

第4章では、細胞増殖因子を強固に吸着した多孔質β-TCPを用いて改良した培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムの性質について述べた。

細胞増殖因子は、骨形成タンパク質-6(BMP-6)と副甲状腺ホルモン関連蛋白(Parathyroid hormone-related Protein; PTH-rP)の2種類を用いた。BMP-6を加えた系では単層培養及び コラーゲン包埋培養のどちらの場合でもATDC5細胞の細胞成長は促進され、多量の軟骨 基質を排出した。それに対して PTHrP を加えた系では、単層培養及びコラーゲン包埋培養 のどちらの培養条件でも、ATDC5細胞の細胞分化の抑制が観察された。この結果は、 Shukunami らの結果とよい一致を示した。

更に BMP-6 を吸着したβ-TCP 粉末存下で ATDC5 細胞のコラーゲン包埋培養を行った。 その結果、BMP-6 を吸着したβ-TCP 粉末を用いたサンプルでは、β-TCP 粒子付近の ATDC5 細胞の成長が BMP-6 によって促進し、ビラネバ・ゴルドナー染色から石灰化及び類 骨化していることを観察した。

そこで、実際に培養軟骨/多孔質リン酸カルシウム接合システムの多孔質β-TCP の代わり に BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP を用いて培養した結果、β-TCP 粉末を用いた場合と同 様に、BMP-6 によって ATDC5 細胞が多孔質β-TCP 全体に行き渡り、接着し、細胞成長をし ている様子が観察された。また BMP-6 を用いた場合、用いていない場合よりも石灰化及び 類骨化が促進された。XRD パターン及び FT-IR スペクトルからこの生成したミネラル成分は HAp であった。この結果から、多孔質β-TCP に BMP-6 を強固に吸着することで、多孔質 β-TCP 表面付近の ATDC5 細胞の石灰化及び類骨化を促進し、生体内の成長板のような構 造を持つシステムを作製することができた。

第5章では、細胞増殖因子に変わる生理活性を有する低分子有機物としてアスパラギン酸ナトリウムとアスコルビン酸リン酸エステルマグネシウムに着目し、ATDC5細胞の単層培養時にそれぞれの溶液を加えて培養した。その結果、アスパラギン酸ナトリウム溶液を加えたサンプルは、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム溶液を加えたサンプルと同等の細胞成長を促進した様子を観察した。この結果を基に、アスパラギン酸を層間に取り込んだ、

173

Asp-OCP 及び表面吸着した Asp-β-TCPを合成し、アスパラギン酸を含まない OCP 及び β-TCP と合わせて4種類のリン酸カルシウム存在下で ATDC5 細胞のコラーゲン包埋培養を 行った。その結果、アスパラギン酸を含むリン酸カルシウム粉末存在下(Asp-OCP 及び Asp-β-TCP)で培養したサンプルにおいて、アスパラギン酸を含まないリン酸カルシウム粉末 と比べて、その細胞成長に伴うプロテオグリカンの生成量が多いことがわかった。Asp-OCP 存在下で培養した ATDC5 細胞がもっともプロテオグリカンを排出したことから、細胞成長を 促進するアスパラギン酸の担持方法として、OCP の層間に取り込むことが有効であることが わかった。

第6章では、培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムにおける細胞成長を観察するために光走査型化学顕微鏡を用いた新しい測定方法を検討した。

細胞増殖因子として BMP-6 を吸着した多孔質β-TCP を用い、21 日間及び 63 日間培養 したサンプルを測定した結果、0.3~0.4 の pH の差を画像化することができた。また、培養軟 骨部分と多孔質β-TCP 部分で pH の差があることを観察した。このことから、同じ培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システム内においても、細胞成長の程度が場所によって異なる ことがわかった。

上述のように、本論文において、細胞成長に適した多孔質リン酸カルシウムを泡セラミック ス法と水熱処理法を組み合わせた方法で作製し、それを用いて培養軟骨-多孔質β-TCP 接 合システムを用いた新しい人工関節軟骨モデルを作製した。更にこのモデルに BMP-6を強 固に吸着した多孔質β-TCP を用いることによって、軟骨細胞の石灰化が促進することがわか った。

本論文で作製した培養軟骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムは、新しい人工関節軟 骨モデルの一つとして有用であることを示した。今後、培養軟骨に使用するコラーゲンゲル の強度を上げることが課題である。更に臨床で使用する場合には、更に使用する細胞として 間葉系細胞やES細胞を用いる、使用が認められている細胞増殖因子を選択する、といった 改良を行うことで、動物実験を含む臨床応用に発展するであろう。最終的には、この培養軟 骨-多孔質リン酸カルシウム接合システムに基づいた治療法が、人工関節置換術とは異なる 新しい治療法の選択肢となり、その選択によって患者の QOL(生活の質)の向上につながる ことを望むものである。

174

- 1. <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira and Katsuaki.Suganuma: "A new approach to an artificial joint based on bio-cartilage/porous β-tricalcium phosphate system", Journal of European Ceramic Society, 23(2003), 2939-2946.
- 2. <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira and Katsuaki Suganuma: "Preparation of porous calcium phosphates sing a ceramic foaming technique combined with a hydrothermal treatment and the cell response with osteoblast-like cells", Journal of the Ceramic Society of Japan, (2003) accepted
- Shinsuke Aoki, Shunro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "The system of the cultured cartilage combined with porous β-tricalcium phosphate (β-TCP) adsorbing bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) as a new artificial joint cartilage model", Biomaterials, (2003) submitted
- 4. <u>Shinsuke Aoki</u>, Atsushi Nakahira, Hirokazu Nakayama, Kiyoko Sakamoto, Shunro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "Synthesis and Aldehyde Absorption Properties of Aspartate-Octacalcium Phosphate Inclusion Compound", Journal of Physics and Chemistry of Solids, (2003) in preparation
- <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira and Katsuaki Suganuma: "Aldehyde absorption with Asp-OCP inclusion compound", Phosphorous and Sulfur and Silicon, 177(2002), 2259.
- Shinsuke Aoki, Kiyoko Sakamoto, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira: "Syntheses of Octacalcium Phosphate Containing Dicarboxylic Acids and Effects of the Side Groups on the Crystal Growth of Octacalcium Phosphate", Journal of the Ceramic Society of Japan, 108(2000), 909-914.
- Atsushi Nakahira, <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi, Kiyoko Sakamoto and Katsuaki Suganuma: "Synthesis and evaluation of various layered octacalcium phosphates by wet-chemical processing", Journal of Materials Science in Medicine, 12(2001), 793-800.

国際会議発表

- <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "The cultured cartilage / porous β-tricalcium phosphate (TCP) system as an artificial joint model", 3rd Asian BioCeramics Symposium (ABC2003), Fukuoka, November 18-20, (2003).
- Shinsuke Aoki, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira, Hirokazu Nakayama, Kiyoko Sakamoto and Katsuaki Suganuma: "Synthesis and aldehyde absorption properties of Asp-OCP inclusion compound", 12th International Symposium on Intercalation Compounds, Poznan, June 1-5, (2003).

- Shinsuke Aoki: "Development of a new artificial joint model based on the cultured cartilage / porous calcium phosphate using the bonding boundary controlled at nano level", International Symposium on 21st Century COE Program, Osaka, March 11-12, (2003).
- <u>Shinsuke Aoki</u>, Shuro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "A new approach to an artificial joint based on bio-cartilage / porous β-tricalcium phosphate system", International Symposium on Scientific and Industrial Nanotechnology 2002 (ISSIN2002), Osaka, December 12-13, (2002), 89.
- <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi, Katsuaki Suganuma: "Preparation of porous calcium phosphates using hydrothermal treatment and ceramic foaming technique and the cultivation of osteoblast-like cells on them", The 8th Seminar on Core University Program (CUP) between Japan and Korea, Osaka, Novenber 3-6, (2002), 24.
- <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "A new approach to an artificial joint with bio-cartilage / porous β-tricalcium phosphate system", International Materials Conference CERAMIC & METAL INTERFACES, Oviedo, June 23-27, (2002)
- <u>Shinsuke Aoki</u>, Shunro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "A new approach to an artificial joint with bio-cartilage / porous β-tricalcium phosphate system", The Fifth SANKEN International Symposium, Osaka, March 14-15, (2002), 194.
- Shinsuke Aoki, Atsushi Nakahira, Shunro Yamaguchi and Katsuaki Suganuma: "Aldehyde absorption with Asp-OCP inclusion compound", XVth International Conference on Phosphorous Chemistry (ICPC15), Miyagi, June 29 – August 3, (2001), 262.
- 9. <u>Shinsuke Aoki</u>, Kiyoko Sakamoto, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira and Katsuaki Suganuma: "Asp-OCP /aldehydes hybrid material as a new drug delivery system", EUROMAT2001, Rimini, June 10-14, (2001), 313.
- Shinsuke Aoki, Kiyoko Sakamoto, Shunro Yamaguchi, Atsushi Nakahira and Katsuaki Suganuma: "Syntheses and evaluation of various layered octacalcium phosphate / dicarboxylic acids composites", 4th Internatinal Symposium on Intermaterial, Osaka, February 6-7, (2001)
- 11. <u>Shinsuke Aoki</u>, Atsushi Nakahira, Kiyoko Sakamoto and Shunro Yamaguchi: "Syntheses and evaluation of various layered octacalcium phosphate through TCP by wet-chemical processing", Austceram 2000, Sydney, June 25-28, (2000)

国内会議発表

1. <u>青木慎介</u>,山口俊郎, 菅沼克昭: 水熱処理法と泡セラミックス法を組み合わせた多孔 質リン酸カルシウムの合成とその細胞応答性, 第18回アパタイト研究会,日本アパタイト 研究会, (2002), 19-20.

- 2. <u>青木慎介</u>,坂本清子,山口俊郎,中平 敦: アミノ酸添加した層状リン酸カルシウムの 合成,2000 年年会,日本セラミックス協会,(2000),152.
- 3. <u>青木慎介</u>,坂本清子,山口俊郎,中平 敦: 層状リン酸カルシウムの合成と評価,無機 マテリアル学会・日本無機リン化学合同研究会,(1999),148.

謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所産業科学ナノテクノロジーセンターナノテクノロジー 産業応用研究部門環境調和ナノマテリアル分野 菅沼克昭教授の御指導の下に行ったも のであります。研究を遂行するにあたり、終始御指導して頂き、有意義な議論及び御助言を 賜りました菅沼克昭教授に心から感謝の意を表わし、深く御礼申し上げます。

論文作成にあたり、貴重な御教示をして頂きました大阪大学歯学部 高橋純造教授、大阪大学工学部 新原晧一教授、大阪大学工学部 安田秀幸助教授に深く感謝致します。

また、大阪大学産業科学研究所山口俊郎助手には、研究の立ち上げ段階から多くの時間を割いて垂範して頂き、墾篤な指導、鞭撻を賜りました。ここに深謝致します。

多孔質リン酸カルシウムの合成に関しては、京都工芸繊維大学工芸学部 中平 敦助教 授には有益な御指導あるいは御助言を賜りました。

光走査型化学顕微鏡の測定に関しては、大阪大学産業科学研究所 吉信達夫助教授 に貴重な御教示ならびに御助言を賜りました。

細胞培養及び染色方法に関しては、大阪大学歯学部 松本卓也助手に有益な御助言を 賜りました。

固体 NMR 測定に関しては、神戸薬科大学薬学部 中山尋量助教授に貴重な御助言を 賜りました。

大阪産業大学教養部 坂本清子助教授、大阪大学産業科学研究所 市原潤子助手には有益な御討論ならびに適切な御助言を賜りました。

大阪大学産業科学研究所産業科学ナノテクノロジーセンターナノテクノロジー産業応用 研究部門環境調和ナノマテリアル分野菅沼研究室の奥健夫助教授、井上雅博助手、谷畑 公昭技官、また研究員の金 槿銖博士をはじめとする菅沼研究室の皆様には、研究遂行に 際して大変お世話になりました。ここに記して、厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行するに当たり、筆者を支えてくれた、家族、友人に心より感謝致します。

178