

生体活性セラミックスの創製に関する研究

2001

無機材質研究所研究報告書第117号

目 次

1. 研究概要および構成	1
1. 1 はじめに	1
1. 2 研究概要	1
1. 3 研究構成員	1
1. 4 執筆分担	2
2. 骨組織誘導再生膜の開発	3
2. 1 はじめに	3
2. 2 リン酸カルシウム／ポリ乳酸共重合体複合体の合成	3
2. 2. 1 はじめに	3
2. 2. 2 材料と方法	3
2. 2. 3 結果と考察	4
2. 2. 4 結論	6
2. 3 TCP／CPLA複合体の生体外試験	6
2. 3. 1 はじめに	6
2. 3. 2 材料と方法	6
2. 3. 3 結果と考察	7
2. 3. 4 まとめ	11
2. 4 TCP／CPLA複合体膜のGTRおよびGBRへの応用	11
2. 4. 1 はじめに	11
2. 4. 2 材料と方法	11
2. 4. 3 結果と考察	11
2. 4. 4 まとめ	12
2. 5 TCP／ポリ(乳酸-グリコール酸-カプロラクトン)複合体の合成とGBRへの応用	12
2. 5. 1 はじめに	12
2. 5. 2 材料と方法	13
2. 5. 3 結果と考察	13
2. 5. 4 まとめ	14
2. 6 結論	16
3. 多糖類系・軟骨材料の開発	18
3. 1 軟骨代替材料の創製に関する研究－無機化学の視点から－	18
3. 1. 1 はじめに	18
3. 1. 2 自己組織化を用いたアパタイト/酸性多糖類複合体	18
3. 1. 2. 1 はじめに	18
3. 1. 2. 2 実験方法	18
3. 1. 2. 3 結果と考察	19
3. 1. 3 計算科学による無機/有機界面の電子状態	21

3. 1. 3. 1	はじめに	21
3. 1. 3. 2	計算方法	21
3. 1. 3. 3	結果と考察	23
3. 1. 4	自己組織化体の表面制御	24
3. 1. 4. 1	はじめに	24
3. 1. 4. 2	実験方法	24
3. 1. 4. 3	実験結果	25
3. 1. 5	軟骨代替材料の合成と医学応用	25
3. 1. 5. 1	はじめに	26
3. 1. 5. 2	実験方法	26
3. 1. 5. 3	結果と考察	27
3. 1. 6	おわりに	27
3. 2	軟骨再生マトリックスの構築と物性評価に関する研究	28
3. 2. 1	はじめに	28
3. 2. 2	実験方法	28
3. 2. 2. 1	ポリイオンコンプレックス(P I C)を形成しない条件の設定	28
3. 2. 2. 2	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの調製と膨潤度測定	29
3. 2. 2. 3	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスのキャラクタリゼーション	29
3. 2. 2. 4	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックス上での軟骨細胞の培養	29
3. 2. 3	結果と考察	29
3. 2. 3. 1	ポリイオンコンプレックス(P I C)を形成しない条件の設定	29
3. 2. 3. 2	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの調製	30
3. 2. 3. 3	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスのキャラクタリゼーション	30
3. 2. 3. 4	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの膨潤度評価	31
3. 2. 3. 5	ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの生物学的機能評価	32
3. 2. 4	おわりに	32
3. 3	Effect of Chondroitin Sulfate on the Crystal Growth of Hydroxyapatite	32
3. 3. 1	Introduction	32
3. 3. 2	Experimental Procedure	33
3. 3. 3	Results and Discussion	33
3. 3. 4	Conclusions	35
4.	骨周囲組織系材料の開発	38
4. 1	キトサン-ハイドロキシアパタイト複合体に関する研究	38
4. 1. 1	キトサン-ハイドロキシアパタイト複合体の合成	38
4. 1. 2	キトサン-ハイドロキシアパタイト複合体の評価	38
4. 1. 2. 1	有機酸の効果	38
4. 1. 2. 2	キトサン/H A P組成比の効果	38
4. 1. 2. 3	透過型電子顕微鏡(T E M)による観察	39
4. 1. 2. 4	強度試験による評価	40
4. 1. 2. 5	動物試験による評価	40

4. 2	交互浸漬法を用いた靱帯・腱のH A P 処理に関する研究	40
4. 2. 1	靱帯・腱-H A P 複合体の合成	41
4. 2. 2	靱帯・腱-H A P 複合体の評価	41
4. 2. 2. 1	複合化領域の評価	41
4. 2. 2. 2	動物試験による評価	41
4. 2. 2. 3	医学応用へのアプローチ	42
5.	その他の生体材料の開発	43
5. 1	経皮デバイスを目的としたアパタイト・シリコーン複合体の開発	43
5. 1. 1	緒言	43
5. 1. 2	アパタイトの表面修飾	43
5. 1. 3	シリコーン表面修飾	43
5. 1. 4	アパタイトコーティングシリコーン複合体の調製	44
5. 1. 5	複合体の外観	44
5. 2	ハイドロキシアパタイトとポリエチレングリコール界面で起こる有機無機相互作用	44
5. 2. 1	緒言	44
5. 2. 2	実験方法	45
5. 2. 3	結果	45
5. 2. 4	考察	46
5. 3	アパタイト単結晶の表面吸着に関する研究	47
5. 3. 1	緒言	47
5. 3. 2	実験方法	47
5. 3. 2. 1	試料のエッチング条件の検討	47
5. 3. 2. 2	F T- I R 測定用試料の作成	48
5. 3. 2. 3	L B 膜の累積	48
5. 3. 2. 4	A F M の測定 (液中)	48
5. 3. 2. 5	F T- I R の測定	48
5. 3. 2. 6	走査型電子顕微鏡 (S E M) の測定	48
5. 3. 3	結果および考察	49
5. 3. 3. 1	エッチング条件の検討	49
5. 3. 3. 2	アラキジン酸累積後の A F M による観察	49
5. 3. 3. 3	F T- I R の測定	49
5. 3. 4	結言	49
6.	残された問題と将来展望	51
7.	研究発表	52
7. 1	発表論文	52
7. 2	特許出願	57
7. 3	受賞・表彰	58

第1章 研究概要および構成

1.1 はじめに

医療材料の分野では、新しい研究が芽生えつつある。それは、「生物がもっている生命力を最大限に活かす」、あるいは「細胞を材料の一部として利用する」という考え方に基づいている。生体の反応は複雑であるため、従来のように人工材料の「機能・特性」に頼った材料至上主義ではなく、生体・細胞と共存し組織の治癒力を高める新しい材料研究が大きく急速に進展しようとしている。本プロジェクトでは、人の運動機能にとって不可欠な骨・軟骨などを再生するいくつかの材料について研究を行った。

1.2 研究概要

本報告書は、4つの章から構成されている。

第2章では、骨の再建技術として注目されている骨再生誘導法(GBR)について述べた。GBR法は、生体がかもともっている組織再生能を利用して骨組織を再建する手術方法である。そのため、骨疾患部に骨芽細胞のような有用な細胞だけを誘導し、その他の細胞の浸入を遮断する膜材料が求められている。これまでGBR法では5mm程度の骨欠損が再生できると考えられていたが、本研究では、20mm以上の大型骨欠損を再生する膜材料を開発できた。得られたTCP/CPLA複合体は、無機/有機材料のそれぞれの特長をうまく組み合わせた材料で、化学結合を制御することが大切と考えられる。この材料については、整形外科・脳外科で応用が可能であり、すでに技術を企業に移管し、前臨床(生物学的安全性試験)の後、3～4年後に治験に入る予定で開発が進んでいる。

第3章では、軟骨関連材料の開発について記載されている。軟骨疾患は高齢化や過度なスポーツによって引き起こされる。代表的な疾患としては、変形性関節症・慢性リウマチ・スポーツ外傷などがあげられる。軟骨疾患は年々増加の一途をたどり、現在、我が国では全人口の1%(120万人)に達している。NIH(米国保健機関)の統計によると、米国では500万人が軟骨治療を待っているとされ、世界全体の患者数は1000万人を越えると推定されている。軟骨は、他の生体組織に比べて代謝能力が弱く、一度損傷すると自然に治癒することが難しい。そのため、現在、有効な治療法がなく、

組織工学(ティッシュエンジニアリング)あるいは再生医学と呼ばれる治療法が世界各国で研究されている。本研究で、再生医学の効果を最大限に引き出すためのマトリックス材料を開発する探索研究を行った。

第4章では、キトサン分子とアパタイトからなるナノコンポジットを開発した。その結果、アパタイトに有機高分子の柔軟性を付与した新しい材料を得ることができた。この材料は、水熱処理により滅菌処理・形状制御が容易に行え、同時にその処理によって柔軟性が向上した。さらに、動物実験によって、生体内で炎症反応がなく骨誘導能を示すことが明らかになった。骨周囲に存在する組織(靱帯・腱)を再建する材料としての利用が期待される。

第5章では、経皮デバイス・カテーテルなどに利用できる材料の開発を目指した。現在、シリコーンは、耐熱性や耐薬品性に優れた生体不活性材料として医用材料(カテーテル・人工肺用素材)に広く用いられている。シリコーンの優れた物性とアパタイトの優れた生体親和性を複合化するため、アパタイト粒子にアミノ基を導入し、シリコーンの表面にカルボキシル基を導入して、アパタイト修飾シリコーンを作製した。この材料は、細胞・組織との親和性が高く、柔軟性が高いことから今後さまざまな応用につながると期待している。

本プロジェクトを進めるにあたって、多くの方の積極的なご協力をいただいた。とりわけ、東京医科歯科大学の宮入裕夫教授・四宮謙一教授・宗田大教授・高久田和夫助教授・伊藤聰一郎講師、岡山大学の尾坂明義教授、工学院大学の門間英毅教授、さらに多木化学・川澄化学・新田ゼラチン・生化学工業・日本油脂など多くの企業の方に暖かいご指導・ご支援をいただいた。ここに改めて、謝辞を表し、心からのお礼を申し上げたい。

1.3 研究構成員

総合研究官

田中 順三

主任研究官

岡村富士夫、村松 国孝

研究員

末次寧, 菊池 正紀, J.R.Hester,
科学技術特別研究員
生駒 俊之, 趙最佰
重点研究支援協力員
松田 篤
CREST 研究員
田口 哲志, 佐藤 公泰
CREST 技術員
熊谷 友里
CREST チーム事務員
瀬尾 恵美
客員研究官
西原 克成 (東京大学医学部講師)
広田 和士 (イー・エッチ・アイ研究所長)
門間 英毅 (工学院教授)
STA フェロー
Dominic Walsh
日韓フェロー
李相勲
NEDO 研究員
古菌勉
外来研究員

重谷 寿士, 関口 象一 (太陽誘電株式会社)
山口 勇 (多木化学株式会社)
園田 賢作 (日本油脂株式会社)
朝長 成之 (三菱重工業株式会社)
伊藤 貴俊, 安永 雅志 (川澄化学工業株式会社)
高橋 靖彦 (筑波大学)
河野 哲夫, 藤原 康裕, 中村 智 (慶応義塾大
学)
野村 雅信, 牧 英之 (早稲田大学)
村田 直文, 東 紀史 (岡山大学)
伊奈 幸雄, 久保健志郎, 渡久地恵子, 飯塚 俊輔
(工学院大学)
根本励 (東京理科大学)

1. 4 執筆分担

第1章 田中順三
第2章 菊池正紀
第3章 田中順三
第4章 田中順三
第5章 田中順三
第6章 田中順三

第2章 骨組織誘導再生膜の開発

2.1 はじめに

高齢化社会に伴って、病気やけがなどで骨を失う機会が増えてきている。例えば、骨肉腫では、腫瘍および周囲の骨組織を取り除く治療をするし、歯槽膿漏などの歯周病では炎症性の吸収を起こした顎の骨と歯周組織（象牙質・セメント質・歯根膜）を取り除く治療をする。このような骨および周囲組織が大きく失われた場合、現在は自家骨移植や生体活性なセラミックス（水酸アパタイトやAW結晶化ガラスなど）を欠損部に充填することで、骨を伝導する治療がおこなわれている。しかし、自家骨移植では採取できる骨の大きさに限界があるし、生体活性セラミックスはいつまでも身体の中に残るため、再生部分の骨の量が少なくなること、材料と骨の強度・弾性率の違いによって、セラミックスが脱転したり、脆性破壊を起こす。その結果骨量の少ない部分で、骨折が起こってしまう場合もある。グループ研究報告書第3章で研究開発したアパタイト/コラーゲン複合体はこれらの問題を解決する一つの手段である。

一方で、骨は骨を食べる破骨細胞による骨吸収と骨を作る骨芽細胞による骨形成というリモデリングを繰り返しているため、生体内で再生可能な組織であるといえる。しかし、骨組織は軟組織に比べて成長が遅いため、大きな骨欠損部はほとんどが軟組織で充填されてしまう。そこで、近年組織再生誘導法（Guided Tissue Regeneration: GTR）の一手法である「歯周組織再生誘導法」や「骨再生誘導法」（Guided Bone Regeneration: GBR）が特に歯科口腔外科領域で応用され始めている¹⁾。GBRは骨欠損部に膜状の材料を巻くことで、軟組織の侵入を防ぎ、膜内部に骨再生環境を作る手法である。現在、GTR膜として広く応用されているのは、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）である²⁾。PTFEは組織適合性が高いバイオイナートな材料であり、ヤング率の低い柔らかい膜であるため成形性にもすぐれているが、このヤング率の低さのため大きな骨欠損部に使用すると、膜が形状を保つことが出来ずに骨再生に支障をきたすことや、バイオイナートであることから摘出手術をおこなう必要があることなどの問題点が指摘されている。強度を改善するために、チタンにPTFEをコーティングした膜をGBRに使用する例が報告されて

いる³⁾が、これらの材料でも、摘出手術は避けられない。そこで、近年、ポリ（乳酸-グリコール酸）などの生体吸収性ポリマーで出来たGTR材料⁴⁾が市販され始めたが、これら生体吸収性高分子でも、ヤング率は骨の十分の一程度であることから巨大な骨欠損への応用は難しい。また、これらの吸収がポリ乳酸とポリグリコール酸の加水分解によるため、局所的にpHの低下が起こり、周囲組織の炎症や、それに伴う骨吸収の危険性が指摘されている。

そこで、本研究では生体親和性が高く、生体吸収性で、骨に近いヤング率を持ち、骨を再生する能力にすぐれたGTRおよびGBRに応用できる複合材料を合成することを目的とした。

2.2 リン酸カルシウム/ポリ乳酸共重合体複合体の合成⁵⁻⁷⁾

2.2.1 はじめに

生体活性で骨伝導能があり生体吸収可能な材料を考えると、リン酸カルシウム系のセラミックスである水酸アパタイト（HAp）やリン酸三カルシウム（TCP）にほぼ限定される。また、生体吸収性で、賦形性があり、無害である合成高分子材料を考えると、乳酸系のポリマーに限定される。しかも、セラミックスの持つ骨伝導性能を損なわないためには重量比で50%以上のリン酸カルシウムが必要となる。そこで、本節では、これらのセラミックスとポリマーを均質に複合化する手法の開発と複合材料の物性の評価を目的とする。

2.2.2 材料と方法

リン酸カルシウムを合成するための出発材料は、炭酸カルシウム（アルカリ分析用、和光純薬工業）、オルトリン酸（試薬特級、和光純薬工業）とした。炭酸カルシウムはあらかじめ1050°Cで3時間焼成後、加水消化をおこない、水酸化カルシウムのスラリーとした。

0.6Mのリン酸水溶液を、激しく攪拌した1Mの水酸化カルシウム懸濁液5dm³中に徐々に滴下した。HAp合成の場合は終点のpHを9に、TCP合成の場合は終点のpHを7に調整した。終点のpH近傍で沈殿物をサンプリングし、それぞれの単一相が粉末X線回折法で確認された時点で合成を終了した。その後、沈殿を1・3

日熟成し、吸引ろ過した。これを120°Cで乾燥した後、800°Cで焼成して HAp および β -TCP 単相の粉末を得た。各種粉末はらいかい機で125 μ m以下に粉碎して以後の試験に使用した。また、乳酸系共重合体として、共重合物であるエチレンセバケートとヘキサメチレンセバケートの共重合比を変えることで、材料の物性を变化しうる大日本インキ化学工業社製のポリ乳酸共重合体 (CPLA) のハードタイプ (CPLA-H) とソフトタイプ (CPLA-S) を用いた。

複合化の条件を設定するにあたって、以下の3通りをおこなった。全ての条件で、HAp は180°Cで30分間乾燥させたものを使用した。

1) クロロフォルム溶媒法

各 CPLA をクロロフォルムに溶解した後にリン酸カルシウムセラミックス粉末を混合し、クロロフォルムを蒸発させる方法。HAp/CPLA-H 重量比は75/25とした。混練時間は10分、室温にて複合化した。

2) 加熱乳鉢による混練法

各 CPLA を乳鉢中で加熱溶解後にリン酸カルシウムセラミックス粉末を混合する方法。HAp/CPLA-S 重量比は72/28および60/40とした。混練時間は、15・60分、混練温度は180°Cとした。

3) ラボプラストミル (東洋精機) による熱混練法

各 CPLA をラボプラストミル中で加熱溶解後にリン酸カルシウムセラミックス粉末を混合する方法。HAp/CPLA-H 重量比は75/25とし、混練時間は10分、混練温度は180°Cとした。

さらに、3の方法に従って、TCP/CPLA-H 重量比50/50, 60/40, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10の複合体、および TCP/CPLA-S 重量比70/30, 75/25の複合体を作

成した。複合化前後のリン酸カルシウム相を粉末 X 線回折法にて同定した。得られた複合体中の CPLA の分子量はポリスチレンを標準試料としたゲルパーミーエションクロマトグラフ (GPC) により測定した。

得られた複合体はヒートプレス (東洋精機) により金型モールドを用いて 3 mm の板に加熱圧縮成型した。さらに、複合体を 5 × 3 × 20mm に成型し、三点曲げ試験をおこない、その荷重ひずみ曲線より、ヤング率を求めた。曲げ試験の条件はスパン15mm, クロスヘッド速度500 μ m/min である。また、TCP/CPLA 複合体の微構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて複合体の破断面にて観察した。さらに、TCP/CPLA-H 複合体中の TCP と CPLA-H 間の相互作用をフーリエ変換反射赤外スペクトル測定により検討した。また動的熱機械測定法により、複合体の変形可能温度を測定した。

2. 2. 3 結果と考察

図2.1に示すように、リン酸カルシウム相は、全ての混練条件で複合化前後に変化は認められなかった。2) と3)の方法で得られた複合体の写真を図2.2に示す。1)の方法では、肉眼的に均一で成形可能な複合体は得られなかったため、写真には示していない。右上の HAp/CPLA-S のみが2)の方法で合成された試料である。写真の上でも、右の列にある HAp/CPLA 複合体は、全て色が付いていることが分かる。特に、HAp/CPLA-S=60/40 (wt/wt) の試料は、混練時間を60分取ったため、ポリマーが焦げたような状態になっている。各試料の分子量測定の結果を表2.1に示す。同一の方法で複合化したにもかかわらず、TCP/CPLA-H と HAp/CPLA-H では重量平均分子量 (Mw) が約半分となっ

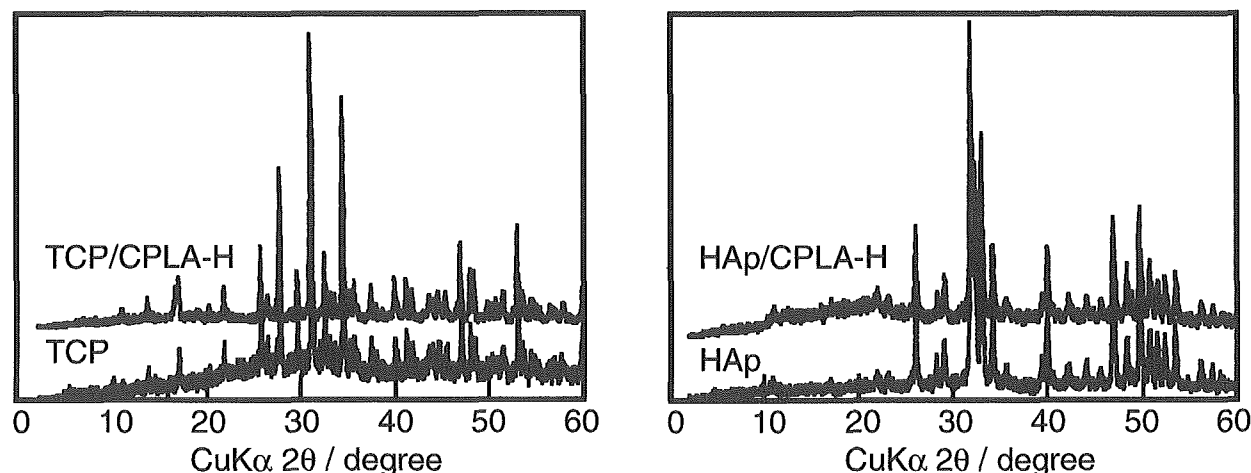


Fig. 2.1 Powder X-ray diffraction patterns of calcium phosphate before and after mixing. No phase changes were detected in β -tricalcium phosphate (a) and hydroxyapatite (b).

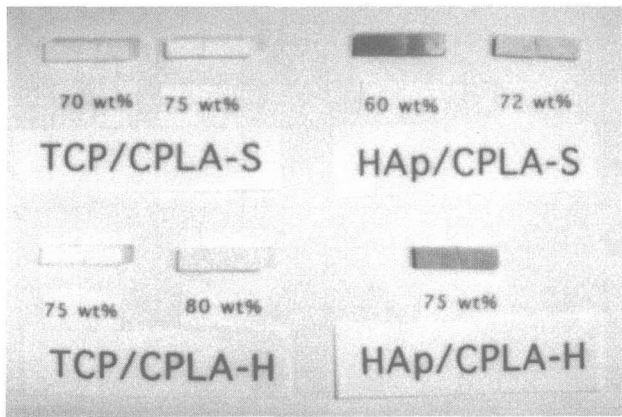


Fig. 2.2 Photograph of calcium phosphate/copolymerized poly-L-lactide (CPLA) composites. Coloration of HAp/CPLA composites was observed and indicated degeneration of CPLA.

Table 2.1. Molecular weight of CPLA after mixing.

Sample	mixing ratio (wt/wt)	Mw(kDa)	Mw/Mn
TCP/CPLA-H	75/25	111	1.83
TCP/CPLA-S	75/25	100	1.73
HAp/CPLA-H	75/25	60.3	2.16
HAp/CPLA-S*	72/28	44.3	2.41

*heating mortar method

Mw: weight average molecular weight

Mn: number average molecular weight

インテリジェント材料研究（生体活性セラミックスの創製）

菊池正紀 第2章 2. 2. 3節

ている。また、分子量の分散を示す指標である Mw と数平均分子量 (Mn) の比も HAp/CPLA の方が大きくなっており、HAp が CPLA の加水分解を促進していることが明らかとなった。これはおそらく HAp の持つ OH 基が関連しているものと考えられた。そのため、安定に複合体を作成するためには、リン酸カルシウムとして TCP を選択した方がいいことが分かった。これは、生体内で溶解性の高い材料を選択することにもつながり、本材料のコンセプトに合致している。

リン酸カルシウムの混合比と三点曲げ強度・ヤング率の関係をそれぞれ図2.3, 2.4に示す。リン酸カルシウムの混合比と三点曲げ強度の間に相関はなかった。ヤング率は混合比と正の相関を示した、ヤング率の低いポリマーに、ヤング率の高いセラミックスを複合化しているためであると考えられる。三点曲げ強度・ヤング率と重量平均分子量との関係を図2.5, 2.6に示す。今度は、曲げ強度と分子量の間に正の相関が確認できる。すなわち、分子量が60000以上になると、曲げ強度が約50MPa と、もとのポリマーの強度と等しい値を示

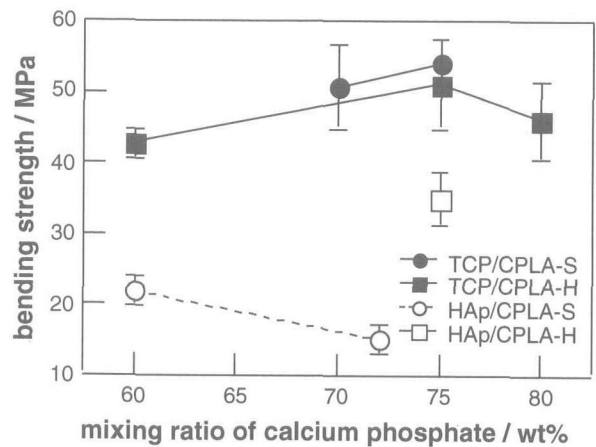


Fig. 2.3 Three point bending strength of the calcium phosphate/CPLA composites as a function of mixing ratio of the calcium phosphates. No relations between mixing ratio and strength were indicated, and TCP/CPLA composites kept the strength of CPLA.

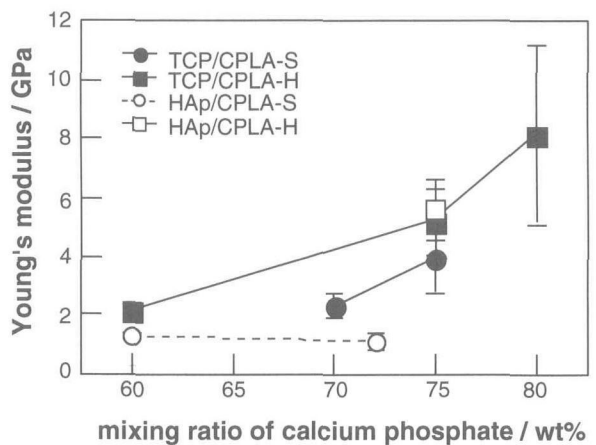


Fig. 2.4 Young's modulus of the calcium phosphate/CPLA composites as a function of mixing ratio of the calcium phosphates. Young's modulus increased with increasing in mixing ratio.

している。このような分子量と強度の相関は一般的にポリ乳酸系の共重合体で認められるものとよく一致している。一方、分子量とヤング率との間に相関は認められなかった。

図2.7に破断面の SEM 像を示す。CPLA がちぎれているように見えるところ、TCP 粒子が、CPLA から引き剥がされた後のようなところが見える。また、TCP 粒子表面に CPLA が覆うようにして貼り付いていることがよく分かる。このように、TCP と CPLA は非常に濡れ性が良い。また、図2.8に示す赤外吸収スペクトル（測定した反射赤外スペクトルをクラマース-クローニ

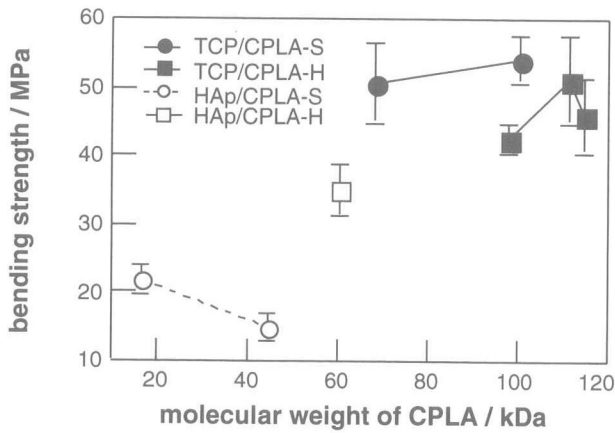


Fig. 2.5 Three point bending strength of the calcium phosphate/CPLA composites as a function of weight average molecular weight of CPLA in the composites. Bending strength rapidly decreased when molecular weight of CPLA decreased to 60,000 or lower.

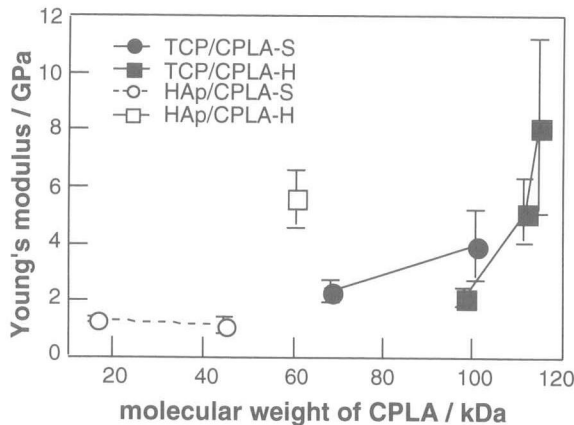


Fig. 2.6 Young's modulus of the calcium phosphate/CPLA composites as a function of weight average molecular weight of CPLA in the composites. No relations between molecular weight and Young's modulus were indicated.

ッグ変換することにより求めた)で、 1770cm^{-1} 付近で観測される乳酸のエステル結合由来のC=O二重結合の伸縮振動が、複合化によって低波数側にシフトしていることがわかる。このことから、分極したC=OのO⁻とTCP表面のCa²⁺が電気的な相互作用を持っていると考えられ、この相互作用によってTCPとCPLAの濡れ性が説明できる。また、この濡れ性の高さから、複合体は重量比で80%のTCPを含んでいても、曲げ強度を保つことができると考えられる。さらに、この複合体は熱可塑性を保ち50°C付近で軟化することがわかった。機械的強度や熱可塑性の点から、この複合体は、GTRおよびGBR膜として十分な物性を示すことが明らかとなった。

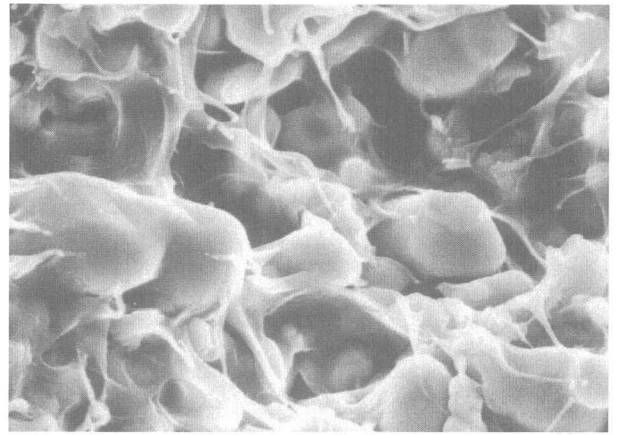


Fig. 2.7 Scanning electron micrograph of TCP/CPLA-H composite. TCP particles and CPLA well attached each other with high wettability.

2. 2. 4 結論

リン酸カルシウムとポリ乳酸共重合体の複合体を合成したところ、ラボプラストミルによる熱混練によって、均一かつ物性値の良い複合体が得られた。この複合体の強度は、ポリマーの強度（分子量）に依存し、ヤング率はセラミックスの混合量に依存した。HApとCPLAを熱混練すると、HApの触媒効果によってCPLAの分解が促進されるので、複合体の安定合成のためにTCPを使用することがよいことが分かった。SEM観察の結果、TCPとCPLAは濡れ性が高く、赤外吸収スペクトルからTCP表面のCaとCPLAのC=OのOとが電気的な相互作用を持つことが分かった。そのため、複合体は80重量%のTCPを含んでいても強度と熱可塑性を保つことが分かった。

2. 3 TCP/CPLA 複合体の生体外試験^{8,9)}

2. 3. 1 はじめに

前節の結果から、TCP/CPLA複合体はGTRおよびGBR膜として必要な物理的性質を示すことが明らかとなった。しかし、これらを生体内に埋入したときに何らかの有害性があっては問題となる。そこで本節では前動物実験試験として、生理食塩水浸漬試験、疑似体液浸漬試験、細胞培養試験の生体外試験をおこなった。

2. 3. 2 材料と方法

焼成を800°Cと1100°Cの2点でおこなったTCP粉末（それぞれTCP₁₀₇₃、TCP₁₃₇₃）を用いて、前節で示したラボプラストミルによる熱混練法（以下熱混練法）により重量比75/25のTCP/CPLA-H複合体を作成した。得られた試料を加熱圧縮により3mm圧の板状に

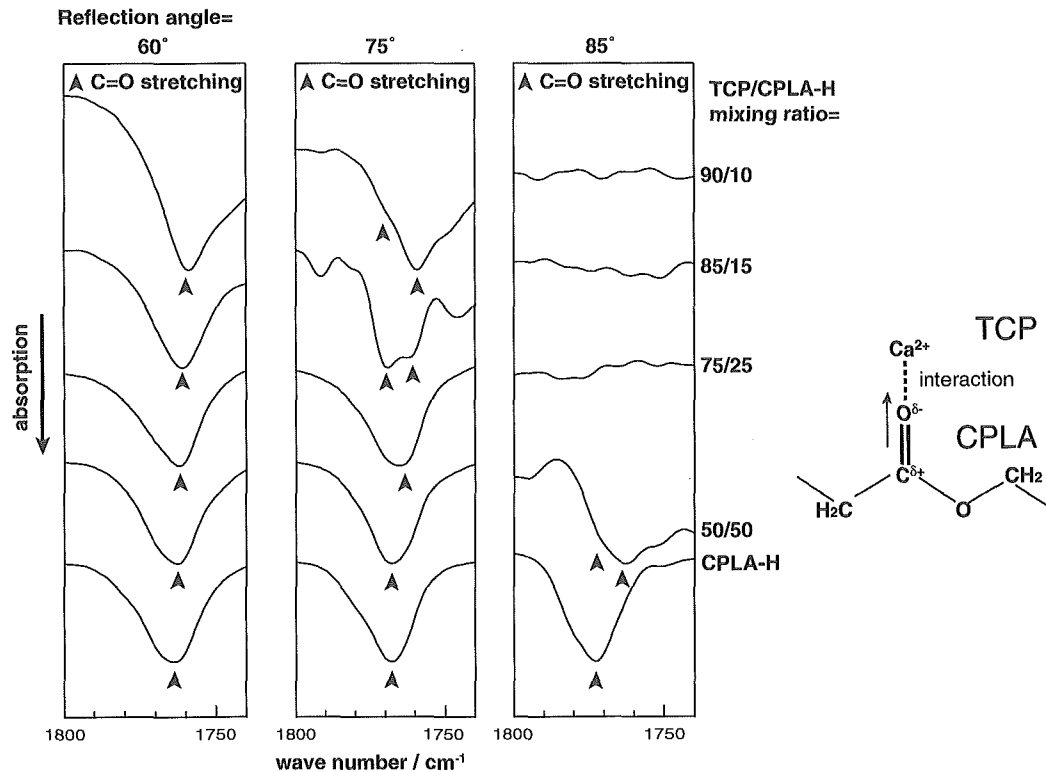


Fig. 2.8 Fourier-transformed infrared spectra of TCP/CPLA-H composites. Red shift of C=O stretching band around 1770cm^{-1} indicated chemical interaction between TCP and CPLA surfaces.

整形した後、 $5 \times 3 \times 20\text{mm}$ の板に切り出し、表面を3000番の研磨紙で研磨した後、以下の実験に使用した。

まず、 37°C の生理食塩水中に TCP₁₀₇₃/CPLA-H, TCP₁₃₇₃/CPLA-H, CPLA-H の試料を浸漬した。試験期間は1, 2, 4, 8, 12, 24週間とした。生理食塩水の量は、各試料ごとに1～8週までは 100cm^3 , 12, 24週は 300cm^3 とした。各試験期間終了後、以下の各試験をおこなった。三点曲げ試験はスパン 15mm , クロスヘッド速度 $500\mu\text{m}/\text{min}$ でおこなった。CPLA の分子量はポリスチレンを標準試料とした GPC により測定した。試料の表面を SEM で観察し、複合体の分解の様子を調べた。また、生理食塩水中の Ca, P の濃度は誘導結合高周波プラズマ分光分析(ICP)により測定し、pH は pH メータで測定した。さらに、浸漬後の試料の反射赤外スペクトルを測定した。

次に、TCP₁₀₇₃/CPLA-H, CPLA-H の試料を人間の血漿の無機イオン濃度に類似したイオン濃度を持つ 37°C の疑似体液(SBF)に浸漬し、その表面への骨類似 HAp の成長を、薄膜 X 線回折法と SEM 観察により調べた。

最後に、細胞培養試験をおこなった。培養にはマウス骨芽細胞由来の細胞株 MC3T3-E1細胞を用い、培養液には10%の子牛胎児血清を加えた α -modified

Eagle's minimum essential medium を用いた。 10^4 cells/ cm^3 の細胞懸濁液 2cm^3 を 35mm の培養シャーレに加え、5%の炭酸ガス中 37°C で培養をおこなった。細胞が培養シャーレに接着した細胞播種一日経過後に TCP₁₀₇₃/CPLA-H 複合体を加えた。比較として、複合体を加えずに培養した系を用いた。細胞は、培養経過1～4日まで、毎日位相差顕微鏡下で観察した後、0.25%のトリプシンを含んだリン酸緩衝液で細胞を回収し、血球計数版にて細胞数を数えた。

2. 3. 3 結果と考察

三点曲げ強度とヤング率の変化をそれぞれ図2.9, 2.10に示す。複合体はいずれも4週間までは急激に強度、ヤング率が落ちているが CPLA 単体では4週までに強度の変化はほとんどない。一方、4週以降の曲げ強度については TCP₁₃₇₃/CPLA-H の場合はほとんど強度の変化が無く、TCP₁₀₇₃/CPLA-H においても、強度の変化がゆるやかであったが、CPLA 単体の場合は強度が急激に減少した。

図2.11に生理食塩水中の Ca の濃度を示す。図. から TCP の溶解にともなって、TCP₁₀₇₃/CPLA-H, TCP₁₃₇₃/CPLA-H とともに Ca の溶出量は増えているが、

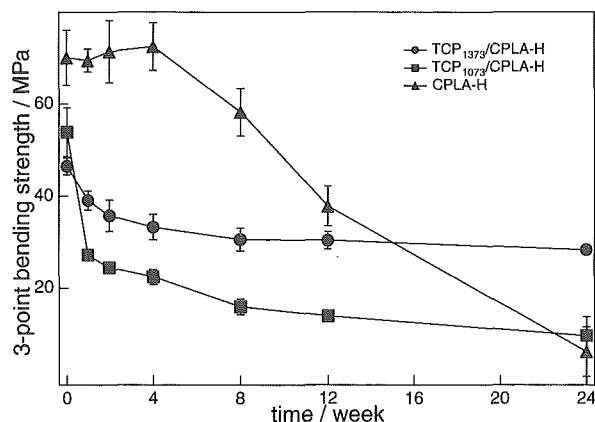


Fig. 2.9 Changes in 3-point bending strength of TCP/CPLA-H composites and CPLA-H as a function of soaking time in physiological saline. Bending strength of the composites decreased in first 2 weeks and then it was maintained for 24 weeks, while that of CPLA-H decreased rapidly from 4 weeks' soaking.

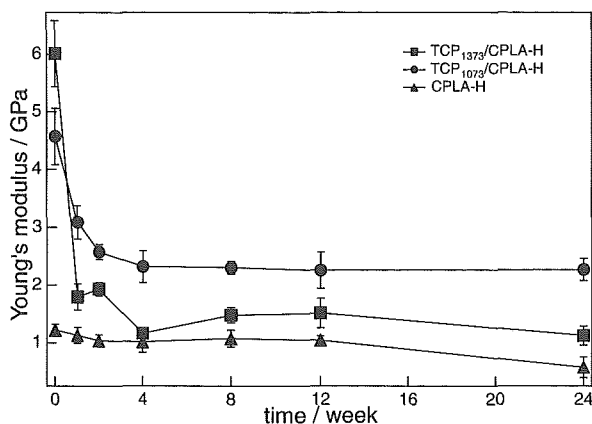


Fig. 2.10 Changes in Young's modulus of TCP/CPLA-H composites and CPLA-H as a function of soaking time in physiological saline.

焼成温度の低い TCP₁₀₇₃/CPLA-H のほうが 2・5 倍多く溶けだしていることがわかる。複合体を浸漬した場合の pH は図 2.12 に示すように、中性付近にたもたれているが、CPLA-H の場合は、CPLA-H の加水分解による乳酸の生成によって pH が酸性になった。CPLA-H の加水分解が進んでいる 12 週以降ではさらに pH の低下が進んでいた。

図 2.13 に TCP₁₃₇₃/CPLA-H, TCP₁₀₇₃/CPLA-H, CPLA-H の浸漬前後の SEM 像を示す。TCP₁₃₇₃/CPLA-H (A) および CPLA-H (E) の浸漬前の表面は比較的平滑であるが、TCP₁₀₇₃/CPLA-H (C) の表面は多

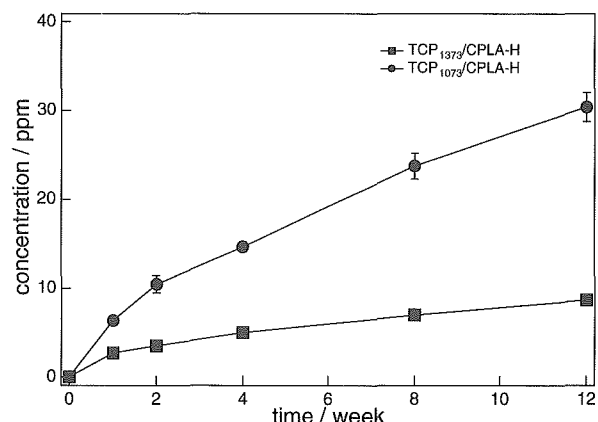


Fig. 2.11 Changes in Ca concentration in physiological saline as a function of TCP/CPLA-H soaking time. The Ca concentration increased immediately after soaking of the composite.

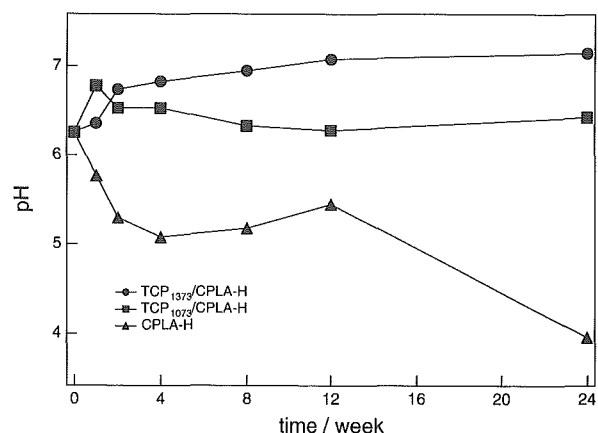


Fig. 2.12 Changes in pH of physiological saline as a function of soaking time of the TCP/CPLA-H composites and CPLA-H. Soaking of CPLA-H lead decreasing of pH to 4, while soaking of the composites maintained pH neutral.

孔質であった。浸漬 12 週で複合体 (B,D) では表面の TCP の溶出がみとめられた。一方、CPLA-H 表面において浸漬 12 週で CPLA-H の加水分解による亀裂の発生がみとめられた (F) が、複合体表面 (B,D) では CPLA-H 部分に亀裂の発生はみとめられなかった。

CPLA-H では図 2.14 に示すように、浸漬直後からほぼ同じペースで分子量が低下し、加水分解が進んでいた。一方、複合体では加水分解速度が遅く、表面が比較的多孔質であった TCP₁₀₇₃/CPLA-H においても加水分解はほとんど進行していなかった。

これらの結果を総合すると、複合体を生理食塩水中に 4 週まで浸漬したときの強度の低下はおもに表面の

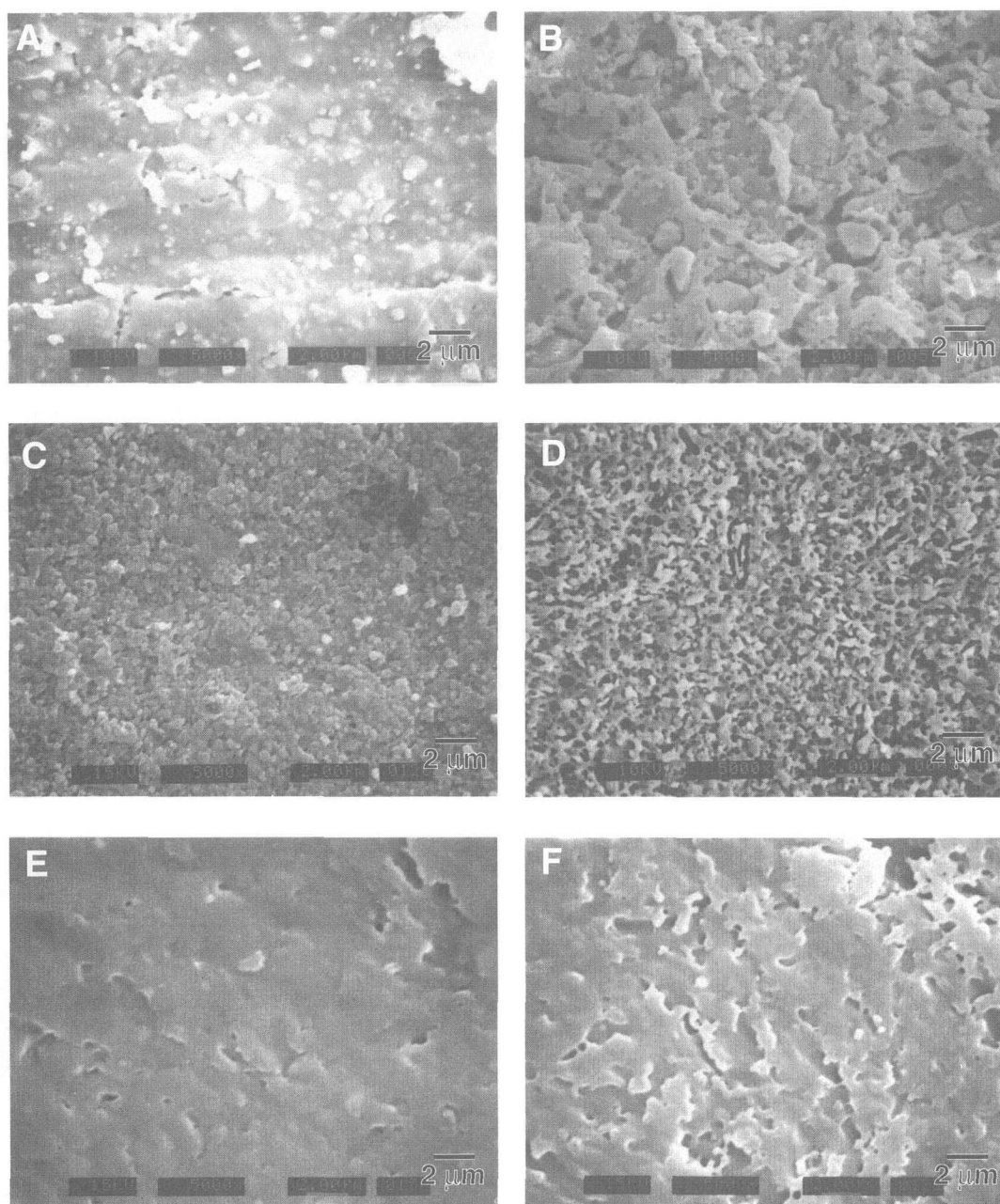


Fig. 2.13 Scanning electron micrographs of the surface of the TCP/CPLA-H composites and CPLA-H before and after soaking in physiological saline. TCP 1373/CPLA-H surfaces A: before and B: after soaking. TCP 1073/CPLA-H surfaces C: before and D: after soaking. CPLA-H surfaces E: before and F: after soaking. Dissolution of TCP on the composite surfaces and crack on CPLA-H surface were observed.

TCP の溶出によって複合体表面が多孔質になることで、見かけ上全体の強度が低下したものと考えられる。また、4 週以降に CPLA-H の曲げ強度が急激に低下したのは、CPLA-H の加水分解による分子量低下に起因すると考えられる。この加水分解による曲げ強度のいちじるしい低下までの時間は骨プレートとして一般に使用されているポリ乳酸 (PLLA) のそれに比べて短い。(PLLA では42週経過後でもほぼ強度をたもっている¹⁰⁾。)CPLA-H が単体では必ずしも GBR 用の膜として十分であるとはいえないが、本報の複合体では骨が

できるのに十分な期間である24週まで強度をたもっていた。さらに、TCP₁₀₇₃/CPLA-H 成形体の場合には表面の TCP が溶出したあとに、生理食塩水が進入することで TCP の溶出が進むため、曲げ強度の低下が徐々に進んだと考えられる。しかし、図2.15の赤外吸収スペクトルからわかるように、エステル結合の C=O の伸縮振動の波数が浸漬後のどの時期でも、CPLA-H 単体に対して同じ化学シフトを起こしていることから、TCP と CPLA-H 間の相互作用は、生理食塩水浸漬によっても保たれることが分かった。

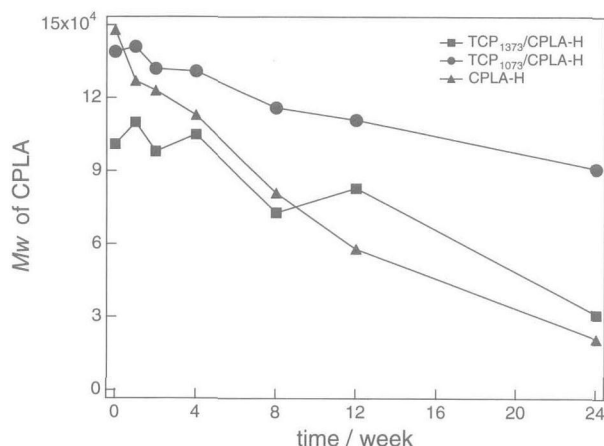


Fig. 2.14 Changes in weight average molecular weight of TCP/CPLA-H composites and CPLA-H as a function of soaking time in physiological saline. CPLA-H in the composites slowly decomposed, while pure CPLA-H rapidly decomposed to 60,000.

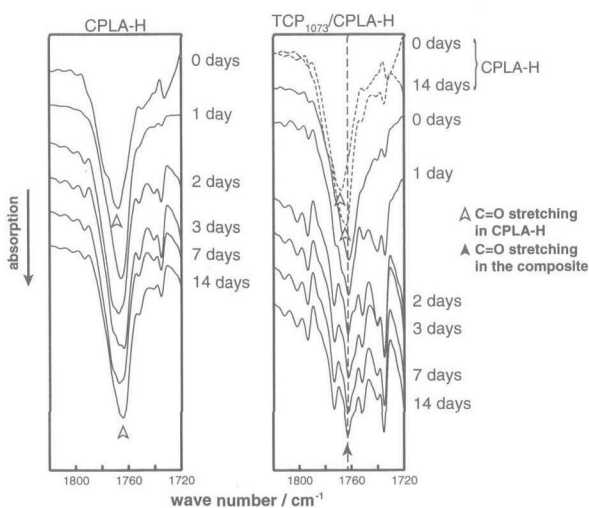


Fig. 2.15 Fourier-transformed infrared spectra of TCP/CPLA-H composites and CPLA-H before and after soaking. No change on red shift of C=O stretching band around 1770cm^{-1} indicated maintenance of chemical interaction between TCP and CPLA surfaces.

一方、CPLA-Hの分解にともなうpHの変化が複合体では観察されないのは、TCPの溶出による酸の中和作用およびCPLA-Hの分解生成物のTCP表面への吸着によるものと考えた。一般にポリエステル加水分解は酸およびアルカリ触媒によって促進される。また、ポリ乳酸系のエステルの場合、加水分解によって生成した乳酸が自己触媒としてはたらくことで加水分解が促進されることが知られている。しかし、TCPと複合化することにより加水分解速度がゆるやかになることが明らかになった(図2.14)。したがって、TCPとの複

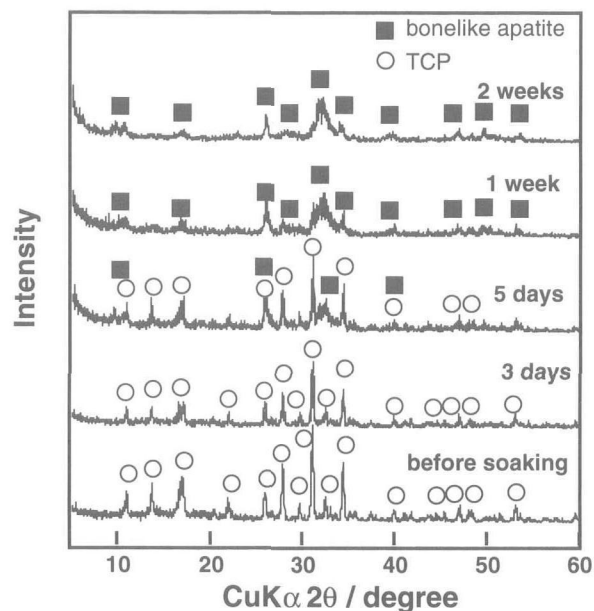


Fig. 2.16 Thin-film X-ray diffraction patterns of TCP/CPLA-H composite surfaces after soaking in simulated body fluid. Bone-like apatite layer formed on the surface at 5 days after soaking and it indicated highly bioactivity.

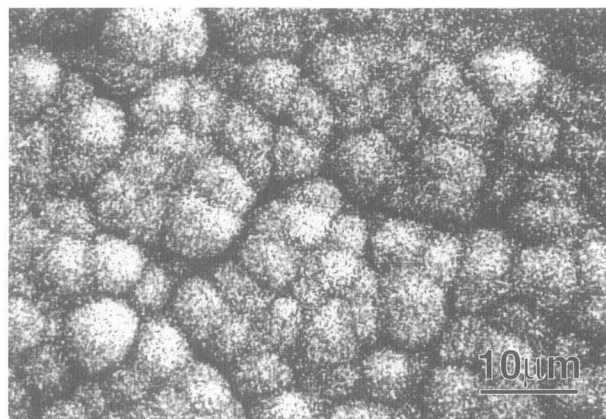


Fig. 2.17 Scanning electron micrographs of the TCP/CPLA-H composite surfaces before and after soaking in simulated body fluid. The surface was covered with apatite microcrystals.

合化は生体内での乳酸による周囲組織の炎症を緩和するだけでなく、生体組織を意図する空間に誘導するための場を必要な期間だけ保持する強度をたもつことができる。よって、本複合体は生体への低刺激性材料としてもすぐれていると考えられる。

次に、SBF浸漬試験の結果を図2.16, 2.17に示す。浸漬後5日目で、複合体表面に低結晶性のHApができれば、一週間で表面を覆い尽くしていることが、Figure 2.16の薄膜X線回折パターンから分かる。また、図2.17のSEM像もX線の結果とよく一致している。このこ

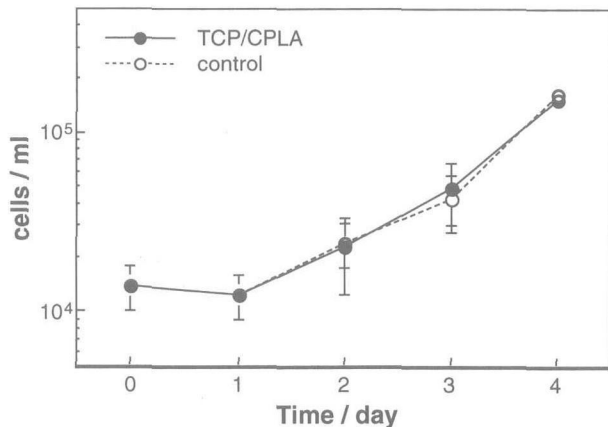


Fig. 2.18 Growth curve for MC3T3-E1 cells cultured with TCP/CPLA-H composite. The curve was the same as that of blank control group and showed high biocompatibility of the composite.

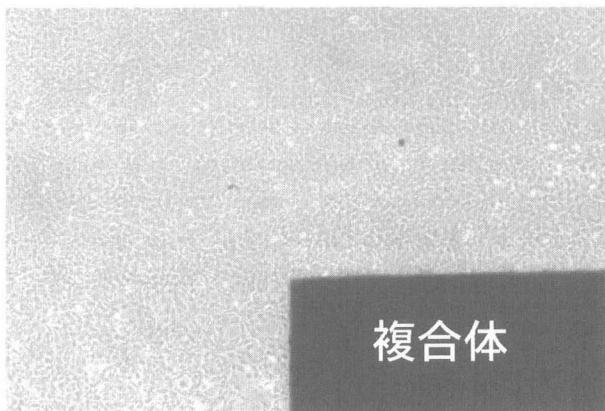


Fig. 2.19 Phase contrast micrograph of the cells 4 days after cultivation. Normal spindle shaped cells grew closely in contact with composite surface.

とから、本複合体が表面に骨類似の HAp 微結晶を析出する能力を持っている「生体活性」な材料であり、生体活性セラミックスである HAp や TCP における HAp 微結晶析出期間の 4 週間に比べて 4 倍早いことから、HAp や TCP セラミックスと比べても、生体活性が高いことが分かった。

細胞培養試験からは、図2.18の細胞増殖曲線が示すとおり、TCP/CPLA-H 複合体が細胞の増殖になんの影響も与えないことが分かった。図2.19の培養四日目の位相差顕微鏡写真からは細胞が複合体表面に貼り付くようにして増殖していることがよく分かる。したがって、本複合体は、細胞に対する急性毒性を全く示さないことが明らかとなった。

2. 3. 4 まとめ

TCP/CPLA-H 複合体は生理食塩水中において、CPLA-H よりも長期にわたり高い強度をたもてることが分かった。また、TCP との複合化により、CPLA-H の加水分解にともなう周囲の pH 変化を抑制することがわかった。これらのことから、TCP/CPLA-H 複合体は生分解性の骨誘導再生用の膜としてすぐれた性質をもっていることがわかった。また、SBF 浸漬試験からは、高い生体活性を示すことが明らかとなり、細胞培養試験から動物実験へ進んでも安全であることが示唆された。

2. 4 TCP/CPLA 複合体膜の GTR および GBR への応用^{11,12)}

2. 4. 1 はじめに

前節で、本複合体が、物理的にも生物学的にも安全に GTR および GBR に応用できることが明らかとなった。本節では、複合体膜をビーグル犬の歯周組織、顎骨および脛骨の欠損部に覆い、歯周組織並びに骨組織が再生するかどうかを調べた。

2. 4. 2 材料と方法

動物実験に用いた複合体は、その操作性から、TCP/CPLA-S の重量比50/50のものを用いた。複合体を加熱圧縮成型して、250 μ m の膜とした。膜はエタノールに30分浸漬することで滅菌した。滅菌した膜を約50 $^{\circ}$ Cの温生理食塩水中で欠損部に合わせて賦形した。

歯周組織の欠損は、健康なイヌ臼歯の側面の歯肉を剝離し、歯科用ラウンドバーで臼歯側の象牙質から、顎骨の一部までの幅 3 mm を深さ 5 mm にわたって削り取って作成した。顎骨の欠損は、健康なイヌを抜歯後 4 週間経過した後、最大幅20mm、深さ10mm、舌側から頬側に貫通する大きな骨欠損を作成した。脛骨の欠損は、創外固定器で脛骨を固定後、骨幹部を20mm にわたって完全に離断して作成した。各欠損には、賦形した複合体膜を覆い、12週間レントゲンにて経過を観察し、その後屠殺して組織標本を作製した。顎骨においては放置群を、脛骨においては CPLA-H 膜で覆った群とそのまま放置した群を比較のために作成した。

2. 4. 3 結果と考察

まず、GTR の結果を図2.20に示す。手術直後(a)にあった骨欠損が、8週間後(b)には綺麗に治っていることが分かる。また、図2.21の組織切片を見ると、象牙質、セメント質、歯根膜、顎骨の全ての歯周組織が正常に治っていることが明らかとなった。

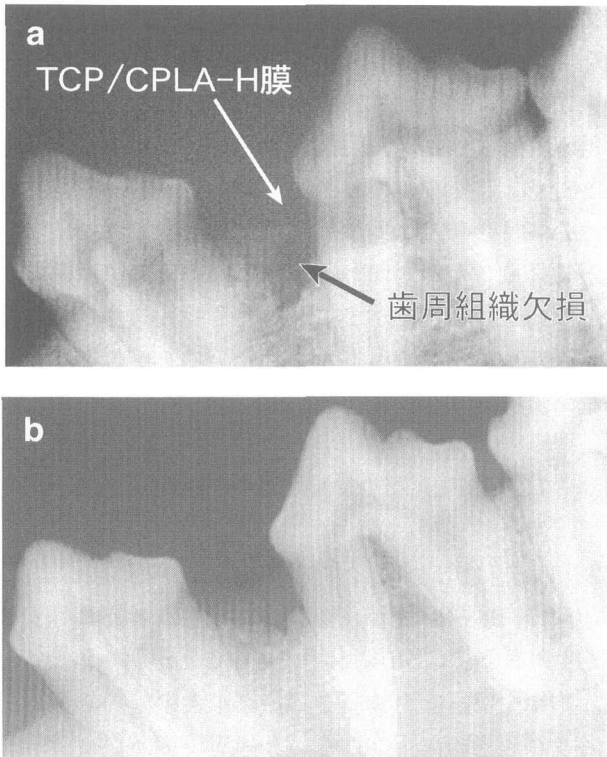


Fig. 2.20 X-ray photographs of beagle's mandible after periodontal tissue regeneration operation using TCP/CPLA composite membrane. a: beagle's mandible just after operation. The composite membrane and bone defect was observed. b: 8 weeks after operation. Calcification of the defect was observed.

次に、顎骨欠損の GBR の結果を図2,22に示す。手術直後のレントゲン像(a)では膜が確認され、レントゲンによる膜の位置を確認ができることが分かった。また、4週目(b)には膜がほぼ吸収され、周囲の骨から、徐々に骨組織ができあがっていき、8週(c)、12週(d)とすすむにつれて、骨量が増してくることが分かる。一方、図2.23の比較群は、12週の時点でも軟組織の侵入によって骨が数 mm 程度しか再生しなかったことが分かる。12週の時点でのヴィラヌーバ染色写真でも、骨組織が再生していることが確認できた。

最後に、脛骨離断部における GBR の結果を示す。図2.24に示すように手術後4週、8週と離断部の両末端から骨が再生していき、12週で完全に骨が繋がった。一方、CPLA 膜のみを用いた場合は、8週まではよく似た治癒過程を示すが、12週ではまだ5 mm 程度の間隙が残っていた(図2.25-a)。放置群の場合は、両端から3 mm 弱の骨が形成されただけであった(図2.25-b)。これらの脱灰 HE 染色像を図2.26に示す。複合体膜で覆った群は a に示すように中央まで新生骨の組織が形成されているが、b の CPLA 膜で覆った群と c の放置群は大きさは違うものの、中央に軟組織が侵入してし



Fig. 2.21 Histological section of beagle's mandible after periodontal tissue regeneration operation using TCP/CPLA composite membrane. The upper side of an arrow had been the defect. All of the defect tissues, dentin, cementum, periodontal membrane and mandible, were regenerated.

まい、これ以上の骨再生は不可能であると考えられる。

以上の結果から、本複合体膜は、TCP との複合効果によって、歯周組織の再生はもちろん、巨大な骨欠損部でも誘導再生が可能なすぐれた膜材料であることが明らかとなった。

2.4.4 まとめ

本複合体膜は、TCP による骨再生促進効果が認められた。特に、吸収性膜では世界で初めて、20mm にわたる骨欠損を再生することが可能であることが分かった。さらに、TCP の X 線不透過性によって、膜が吸収されるまでの間、膜の位置がレントゲンで十分確認可能であり、医師の経過観察に適した材料であることも分かった。

2.5 TCP/ポリ(乳酸-グリコール酸-カプロラクトン)複合体の合成と GBR への応用^{13,14)}

2.5.1 はじめに

前節までに明らかにしたように、TCP/CPLA は GBR 用の膜材料としてすぐれた性質をもっている。しかし、

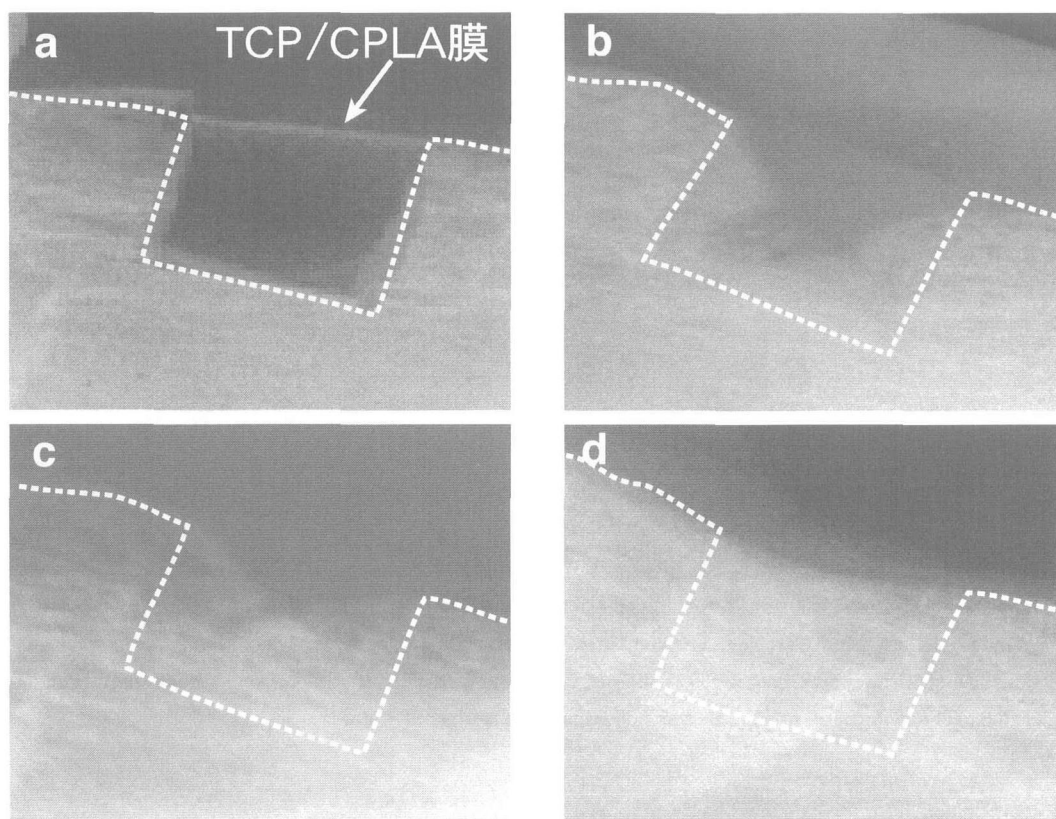


Fig. 2.22 X-ray photographs of beagle's mandible after guided bone regeneration operation using TCP/CPLA composite membrane. a: beagle's mandible just after operation. The composite membrane and bone defect was observed. b: 4 weeks, c: 8 weeks after operation. The membrane was absorbed, and bone tissue gradually regenerated from limbus of the defect. d: 12 weeks after operation. Mandible perfectly regenerated.

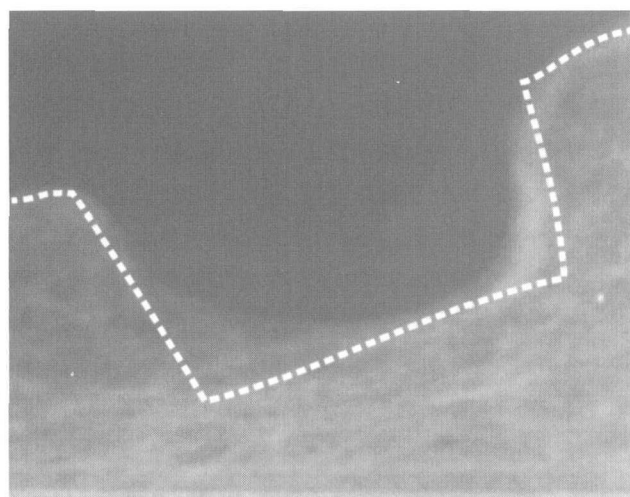


Fig. 2.23 X-ray photographs of beagle's mandible defect at 12 weeks after operation without composite membrane. No bone regenerated.

CPLA には、セバケートが共重合物と入っており、各国の医用材料認可を受けることが困難である。また、CPLA は、ソフトタイプでも TCP と複合化することで低温時の柔軟性が低く、医師の作業性にわずかに欠けている。そこで、本節では、医療用認可の受けやすく、柔軟性の高い共重合体であるポリ(乳酸-グリコール酸

-カプロラクトン) (PLGC) を用いて、TCP との複合体を合成し、その物性を2.3節にしたがって検討した。また、2.4節にしたがって、ビーグル犬を用いて顎骨、脛骨の欠損部の再生誘導への応用を検討した。

2. 5. 2 材料と方法

前節までと同様に TCP と PLGC を熱混練し、複合体を合成した。使用した PLGC はハード(1001)・ミディアム(2004)・ソフトタイプ(3005)であり、TCP と PLGC の重量比は60/40ないしは50/50とした。得られた複合体を加熱圧縮成型し、200 μ m の膜とした。複合体と PLGC のエステル結合の吸収帯は反射赤外法で測定し、PLGC と TCP の相互作用を検討した。また、膜を3 $\times$ 5 mm に切り出し、n=5、クロスヘッドスピード500 μ m/min で引っ張り試験を行った。さらに、複合体膜を生理食塩水中に浸漬し、24週間まで強度変化を測定した。

動物実験は、2.4節にしたがい、顎骨と脛骨の欠損についておこなった。

2. 5. 3 結果と考察

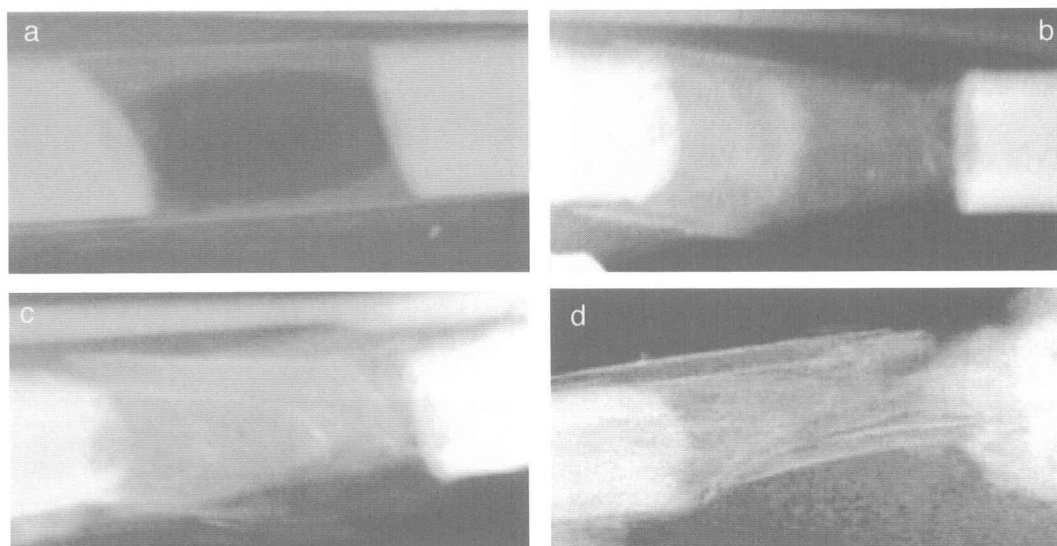


Fig. 2.24 X-ray photographs of beagle's tibia after guided bone regeneration operation using TCP/CPLA composite membrane. a: beagle's mandible just after operation. The composite membrane and bone defect was observed. b: 4 weeks, c: 8 weeks after operation. Bone tissue gradually regenerated from both edge of the defect. d: 12 weeks after operation. Tibia perfectly regenerated. The composite membrane was not perfectly absorbed at tibia.

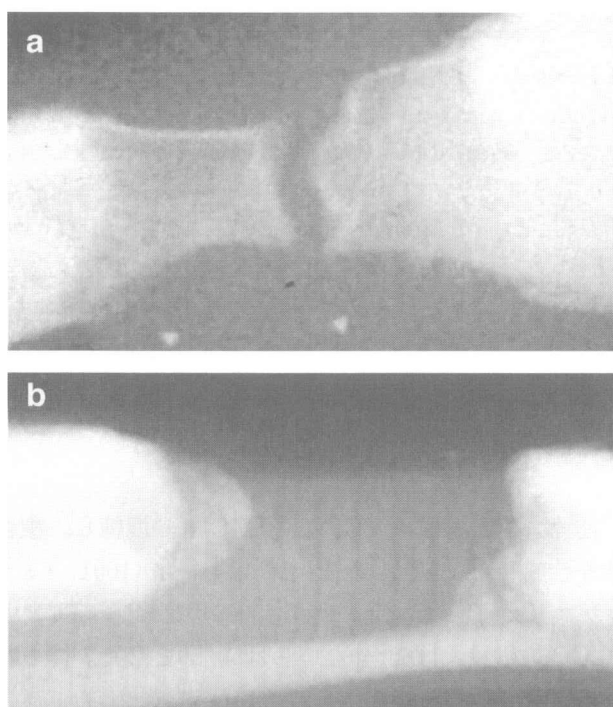


Fig. 2.25 X-ray photographs of beagle's tibia defect at 12 weeks after operation with CPLA membrane (a) and without membrane (b). Bone regeneration ended with invasion of soft tissue in a. No bone regenerated in b.

引っ張り強度およびヤング率は複合化によってそれぞれ $9.378 \pm 1.22 \text{ MPa}$, $0.677 \pm 0.0578 \text{ GPa}$ から $15.6 \pm 4.6 \text{ MPa}$, $2.58 \pm 0.132 \text{ GPa}$ に上昇した。また、反射赤外法から、複合化によって、エステル結合の伸縮振動の吸収帯がわずかに赤方偏移していることが分かった

(図2.27)。これはエステル結合の結合エネルギーが小さくなっていることを意味し、このことから、TCP/PLGC 複合体においてもポリ乳酸由来のエステル結合の O^δ と、TCP 表面の Ca とが化学的相互作用を起こしていることが示唆された。さらに、図2.28に示すとおり、複合体は生理食塩水中でも12週間までは引っ張り強度 ($9.37 \pm 1.65 \text{ MPa}$) を保っていた。また、図2.29に示す ICP 分析の結果から生理食塩水中への複合体膜からの TCP の溶出が認められた。これにより PLGC 分解生成物 (乳酸・グリコール酸) による生理食塩水の pH 低下を抑制することができた(図2.30)。また、図2.31に示す分子量分析の結果、TCP/CPLA 複合体と同様に、複合化によって PLGC の加水分解が抑制された。これらの機序は、TCP/CPLA 複合体の場合と同じであることが推察された。これらの結果から、TCP/PLGC 複合体は、しなやかさなどの物性がさらに GBR に適した材料であることが分かった。

動物実験では、図2.32, 2.33に示すように、TCP/PLGC 複合体によって顎骨並びに脛骨の欠損部が再生したことが分かった。これらの結果から、TCP/PLGC 複合体は、GBR による骨欠損部の再建に応用可能な材料であることが分かった。

2. 5. 4 まとめ

TCP/PLGC 複合体は、TCP/CPLA 複合体と比べて、医師による操作性がよく、さらなる広範囲に応用可能な材料であると考えられる。また、動物実験にお

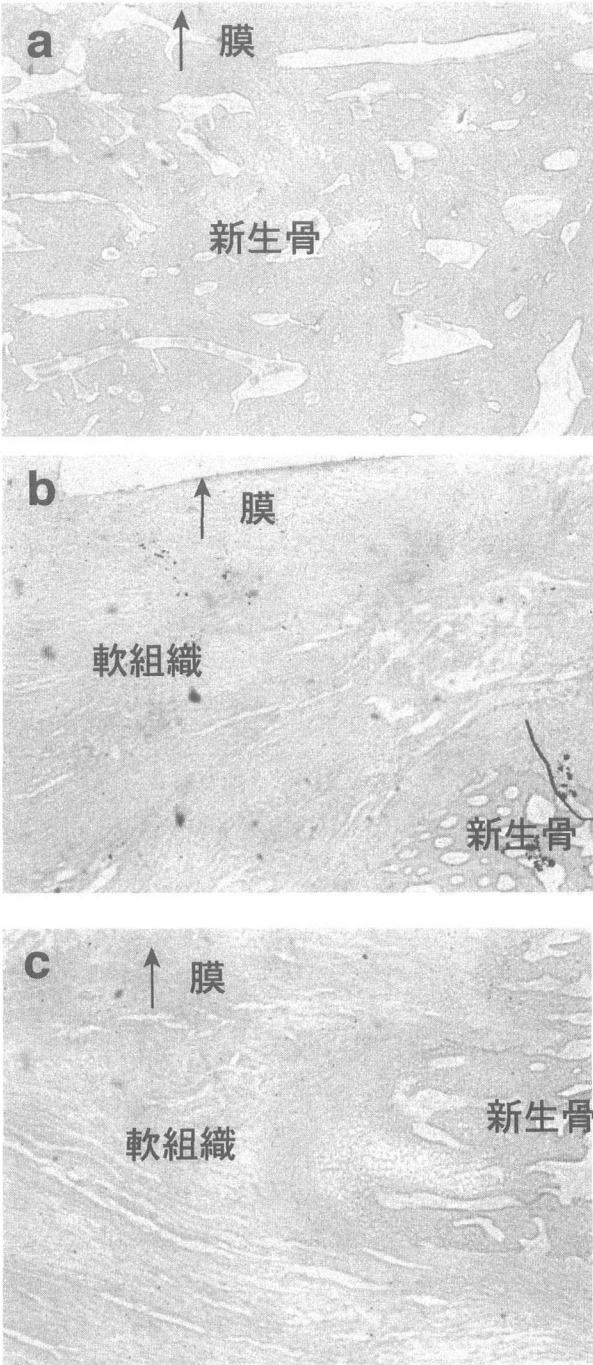


Fig. 2.26 Hematoxylin and eosin stained histological section of tibia after guided bone regeneration test. a: with TCP/CPLA composite membrane. Young newly formed bone regenerated in center of the defect. b: with CPLA membrane. Invasion of soft tissue was observed at center of defect and impossible to regenerate any more. c: without membrane. Only a few amount of bone regenerated from both edge, and other part of defect was filled with soft tissue.

いても TCP/PLGC 複合体は, TCP/CPLA と同等以上の効果がある材料であることが分かった。本材料は, 歯科口腔外科領域を中心として十分に実用可能な GBR 膜材料であると考えられる。

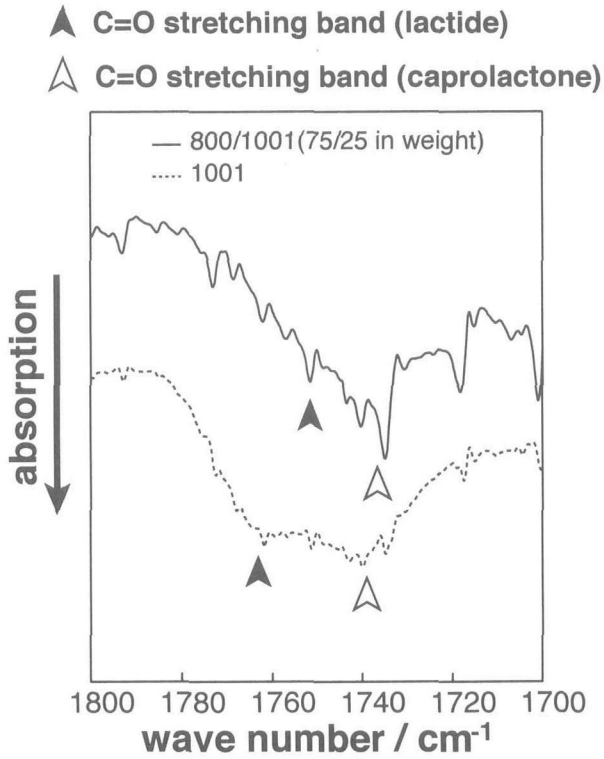


Fig. 2.27 Fourier-transformed infrared spectra of TCP/PLGC composites. Red shift of C=O stretching band around 1770cm⁻¹ indicated chemical interaction between TCP and PLGC surfaces.

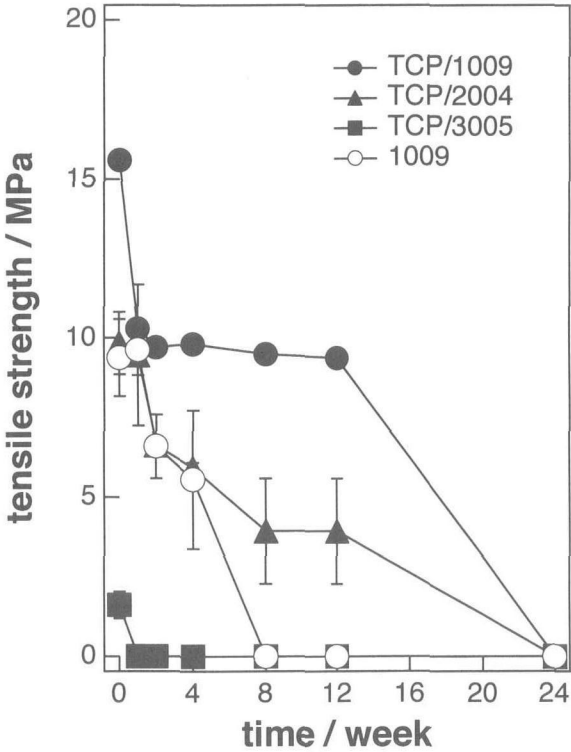


Fig. 2.28 Changes in tensile strength of TCP/PLGC composites and PLGC as a function of soaking time in physiological saline. The composites maintained their strength to 12 weeks; however, the strength of PLGC decreased just after soaking.

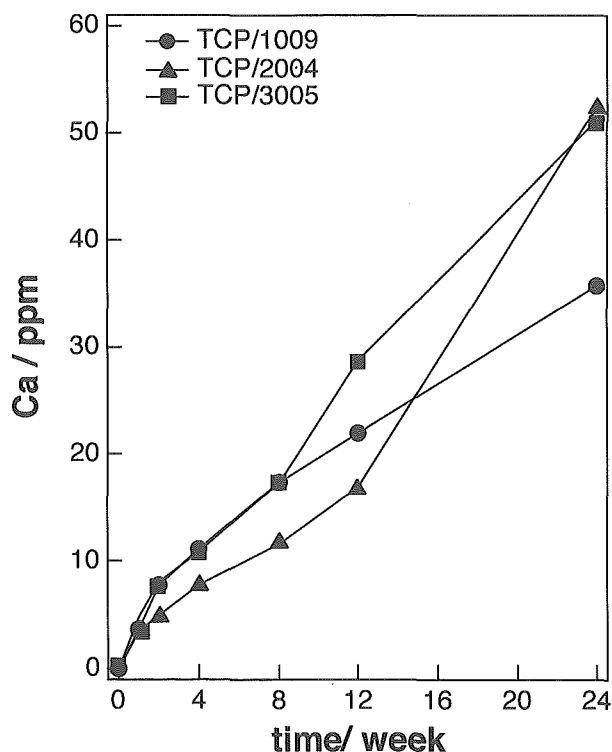


Fig. 2.29 Changes in Ca concentration in physiological saline as a function of soaking time of TCP/PLGC composites. Concentration of Ca immediately increased by soaking.

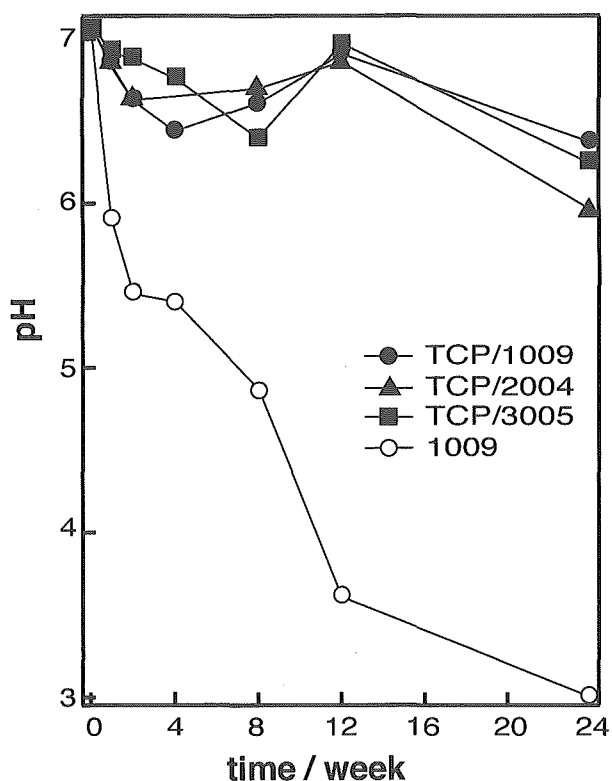


Fig. 2.30 Changes in pH of physiological saline as a function of soaking time of the TCP/PLGC composites and PLGC. Soaking of PLGC lead decreasing of pH to 3, while soaking of the composites maintained pH neutral.

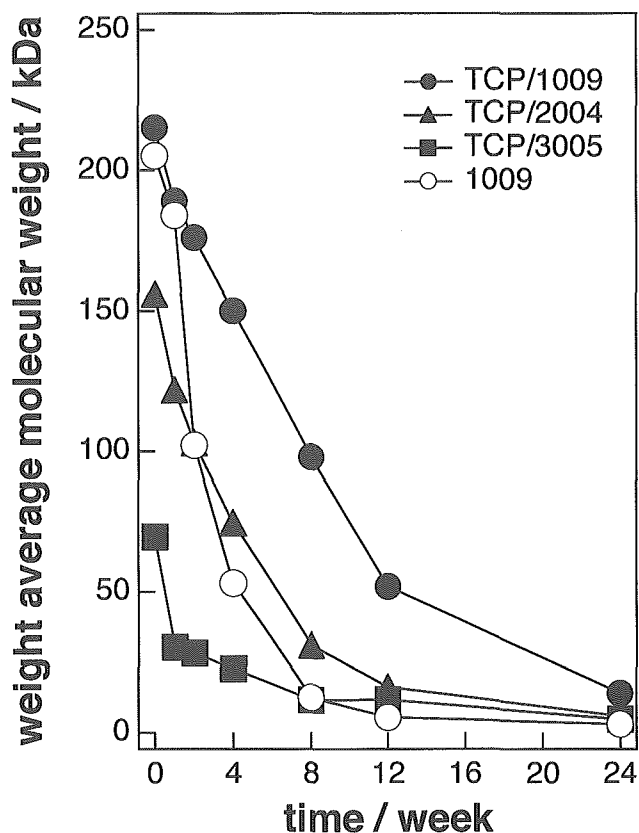


Fig. 2.31 Changes in weight average molecular weight of TCP/PLGC composites and PLGC as a function of soaking time in physiological saline. PLGC in the composites slowly decomposed, while pure PLGC rapidly decomposed.

2. 6 結論

本章では、リン酸カルシウム/乳酸系共重合体の複合体を、TCP とポリマー界面の相互作用を利用することによって合成した。TCP/CPLA および TCP/PLGC 複合体は GBR 膜としてすぐれた物性と生体親和性を示し、生体吸収性膜材料として初めて20mm以上の骨欠損を再建できることが明らかとなった。TCP/CPLA 複合体では、ポリマーの構成成分や物性に関して、実用化に対する障害があったが、TCP/PLGC 複合体を新たに合成することでこれらの問題を解決し、実用化に一步近づけることが出来た。

謝辞

動物実験は、東京医科歯科大学生体材料工学研究所の宮入裕夫教授・高久田和夫助教授・小山富久博士、日本大学生物資源科学部の田中茂男教授・永岡勝好講師・小坂俊文講師の協力によりおこなった。ここに深く感謝いたします。

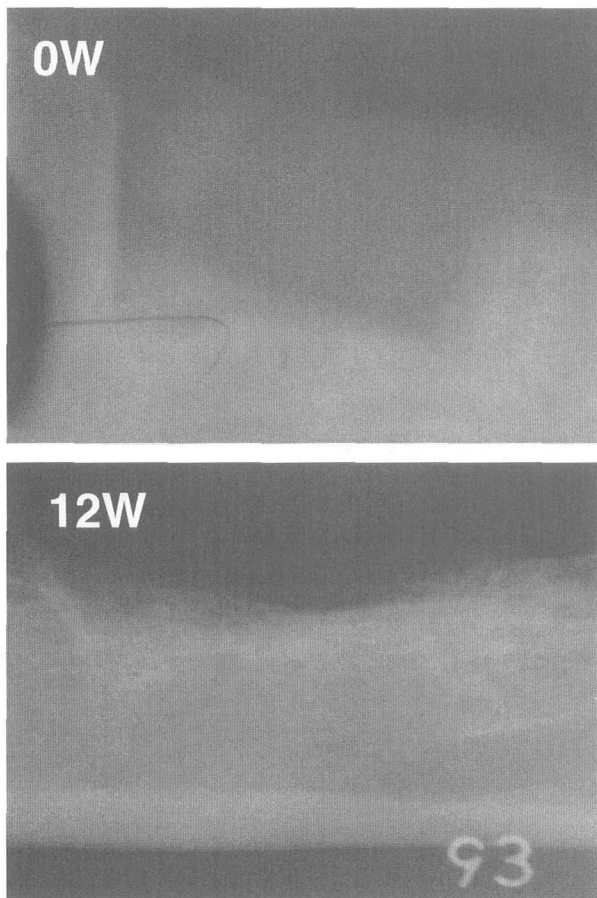


Fig. 2.32 X-ray photographs of beagle's mandible after guided bone regeneration operation using TCP/PLGC composite membrane. a: beagle's mandible just after operation. The composite membrane and bone defect was observed. b: 4 weeks, c: 8 weeks after operation. The membrane was absorbed, and bone tissue gradually regenerated from limbus of the defect. d: 12 weeks after operation. Mandible perfectly regenerated.

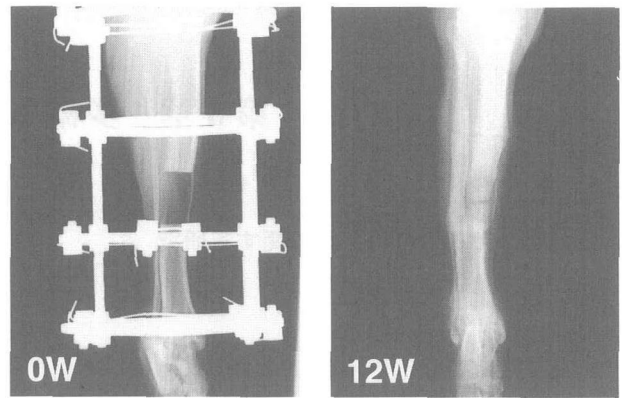


Fig. 2.23 X-ray photographs of beagle's tibia after guided bone regeneration operation using TCP/PLGC composite membrane. a: beagle's mandible just after operation. The composite membrane and bone defect was observed. b: 4 weeks, c: 8 weeks after operation. Bone tissue gradually regenerated from both edge of the defect. d: 12 weeks after operation. Tibia perfectly regenerated. The composite membrane was not perfectly absorbed at tibia.

参考文献

- 1) 細川隆司, The Quintessence, 14, No.2, 183-193 (1995).
- 2) J. Gottlow, S. Nyman, J. Lindhe, T. Karring and J. Wennstrom, J Clin Periodontol, 13(6):604-616(1986).
- 3) S.A. Jovanovic and M. Nevins, Int J Periodontics Restorative Dent, 15(1), 56-69(1995).
- 4) V. Lekovic, P.M. Camargo, P.R. Klokkevold, M. Weinlaender, E.B. Kenney, B. Dimitrijevic and M. Nedic, J Periodontol., 69(9), 1044-1049(1998).

- 5) M. Kikuchi, Y.i Suetsugu, J. Tanaka and M. Akao, J. Mater. Sci., Mater. in Med., 8, 361-364.(1997)
- 6) 菊池正紀, 趙晟佰, 田中順三, 小山富久, 小林孝之, 高久田和夫, 赤尾勝, 粉体及び粉末冶金, 45, 36-40(1998)
- 7) M. Kikuchi and J. Tanaka, J.Ceram. Soc. Japan, 108, 642-645(2000)
- 8) 菊池正紀, 田中順三, 有賀利郎, 田代豊, 無機マテリアル, 5, 493-497(1998)
- 9) M. Kikuchi, J. Tanaka, Y. Koyama and K. Takakuda, J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.), 48, 108-110 (1999)
- 10) 草野雅章, 杉村正仁, 野村賀寿雄, 西村敬一, 坂井勝也, 篠田法正, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 1, 61 (1995)
- 11) M. Kikuchi, S-B. Cho, Y. Suetsugu and J. Tanaka, Bioceramics, 10, 407-410(1997)
- 12) 投稿準備中, M. kikuchi, Y. koyama, K. Takakuda. H. Miyairi, N. Shirayama, and J. Tanaka, J. Biomed. Matera Res, inprint.
- 13) M. Kikuchi, Y. Koyama, K. Takakuda, H Myairi and J. Tanaka, Key-Engineering Materials (Bioceramics 13), 192-195, 677-680(2001)
- 14) 投稿準備中

第3章 多糖類系・軟骨材料の開発

3.1 軟骨代替材料の創製に関する研究

—無機化学の視点から—

3.1.1 はじめに

軟骨疾患は高齢化や過度なスポーツによって引き起こされる。また、我が国では高齢化が急速に進んでいるため、日常生活に支障を持つ軟骨疾患患者数は年々増加し、現在全人口の1% (120万人) に達しようとしている¹⁾。医学的に見ると、軟骨は他の生体組織に比べて代謝能力が著しく弱く、一度損傷すると自然に治癒することが非常に難しい。²⁾ いまだに有効な治療法はなく、現在、組織工学 (ティッシュエンジニアリング) あるいは再生医学と呼ばれる治療法が世界各国で研究されている。その方法は軟骨組織の細胞を一度生体外に取り出し、試験管の中 (in vitro) で3次元培養して再び損傷部位に移植する方法である。この治療法における3大要素は、「生化学的刺激」・「生体力学刺激」・「細胞の足場材 (Scaffold)」であることが提唱されている。³⁾ このため再生医学の治療効果を高めるのに有効な「細胞の足場材」の開発が望まれている。

軟骨の成分には、無機質として水酸アパタイト (リン酸カルシウム)、たんぱく質としてII型コラーゲン (II-Col) および酸性多糖類 (グリコサミノグリカン, GAG) がある。軟骨は GAG とたんぱく質が共有結合したプロテオグリカン (PG) と呼ばれる複雑なシグ状構造をした複合糖たんぱく質が主成分である⁴⁾。この構造のため、軟骨細胞への栄養輸送・軟骨特有の機械強度・高い水分保持能を有している。重要な酸性多糖類には、コンドロイチン硫酸 (ChS) やヒアルロン酸 (HyA) が知られており、大きく負に帯電することで軟骨細胞に最適な環境を提供している。本章は細胞の足場材 (細胞・組織を活性化する材料) として有用と考えられる無機/有

機複合材料の開発を目的とした。特に無機化学の視点から軟骨代替材料の創製にアプローチした。

3.1.2 自己組織化を用いたアパタイト/酸性多糖類複合体

3.1.2.1 はじめに

軟組織中に広く分布するコンドロイチン硫酸 (ChS) やヒアルロン酸 (HyA) は、有機官能基としてスルホン基 ($-\text{SO}_3^-$) やカルボキシル基 ($-\text{COO}^-$) を持った硬い生体高分子である^{5,6)}。そのため生体環境下 (pH 7.4) では大きく負に帯電し、軟組織の石灰化 (骨化) の際にリン酸カルシウムの沈着に大きな影響を与えている。ChS や HyA は D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンまたは N-アセチル-D-ガラクトサミン 2 糖鎖の繰り返しにより構成されている。図3.1に二次構造の模式図を載せる。点線は糖鎖内での水素結合を示している。この水素結合のため水溶液中では直鎖型高分子である。

本節では湿式法により水酸アパタイト (HAp) と ChS または HyA をナノオーダーで複合化させ、その微細構造の解明を目的とした。

3.1.2.2 実験方法

HAp と多糖類の複合化は湿式法により行なった。合成模式図を図3.2に載せる。出発物質には炭酸カルシウム (CaCO_3)、リン酸 (H_3PO_4) 水溶液及び ChS ナトリウム塩 (15K Da.)、HyA ナトリウム塩 (640K Da.) を用いた。炭酸カルシウムは1050°Cにて3時間焼成し、酸化カルシウム (CaO) とした。得られた酸化カルシウムは3倍量の精製水にて加水消化処理を行ない、水酸化カルシウム懸濁液 (0.25mol/l, 1l) に調整した。得られた水酸化カルシウム懸濁液に2.5gのChS及びHyAを分散

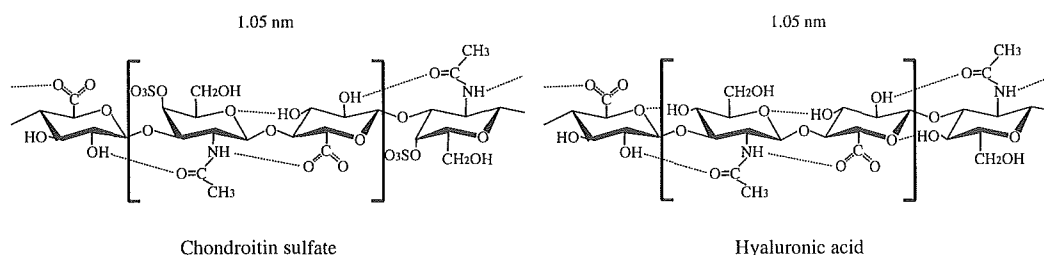


Fig. 3.1 Secondary structures of ChS (Left) and HyA (right).

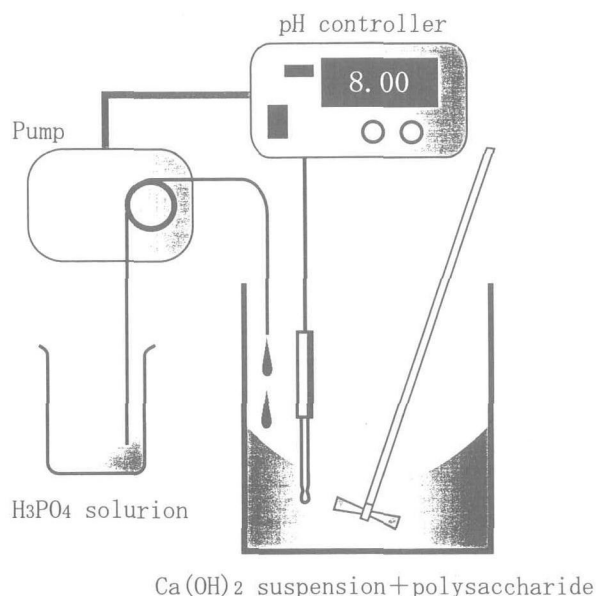


Fig. 3.2 Schematic diagram of preparation method for HAp/ChS and HAp/HyA composites.

させ、激しく攪拌を行ないながら、薄めたリン酸水溶液(0.15mol/l, 1l)を滴下した。これによりナノオーダーで複合化した無機/有機複合体を合成した。

得られた各複合体は粉末 X 線回折測定、赤外線スペクトル分析を行なった。また微細構造の観察は、エタノール中に分散させた後、加速電圧200kV の透過型電子顕微鏡(TEM)により観察を行なった。

また、HAp/ChS 自己組織化体の合成条件を変化させる事により、最適な自己組織化条件の検討した。合成方法は上述と同じにし、水酸化カルシウム懸濁液に加える ChS 添加量のみを変化させて合成した。ChS 添加量は、25g, 12.5g, 5g, 2.5g, 1.25g, 0.5g とした。微細構造に関しては TEM により観察を行なった。

3. 1. 2. 3 結果と考察

図3.3に X 線回折測定の結果を示す。得られた無機成分はいずれも低結晶性の HAp である事がわかる。また、合成の際に大気中から HAp 格子中に置換した炭酸基による吸収ピークが赤外線スペクトルにより観察できた。

TEM 観察による微細構造を図3.4に示す。HAp/ChS 複合体は長さ約150nm, 幅約50nm の島状の凝集体が観測される。(図3.4(a)) また HAp/HyA 複合体では長さ約300nm, 幅約50nm の凝集体を形成していた。(図3.4(b)) いずれの複合体でも HAp 微粒子は板状の形態を呈し、大きさ約20×5 nm²であった。図中に丸で囲った凝集体からの電子線回折像を示す。HAp の002と004の回折線がスポット状に観測される。複合体中では HAp 微結晶が自己組織化的に c 軸に強く配向していた。さ

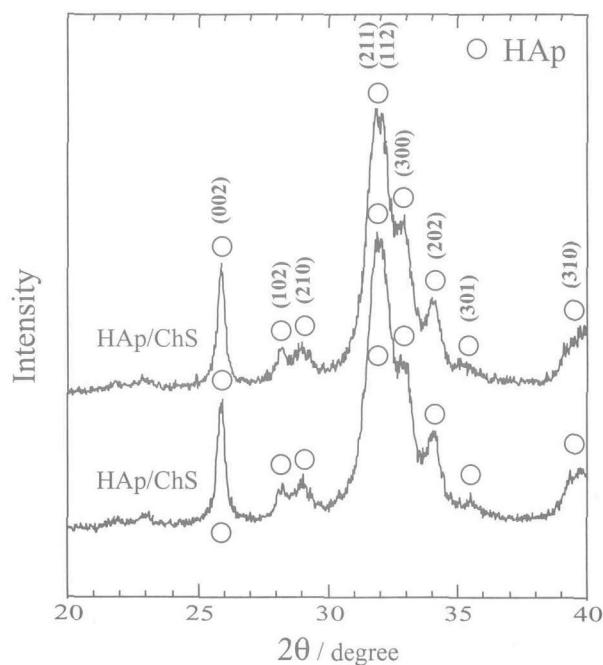
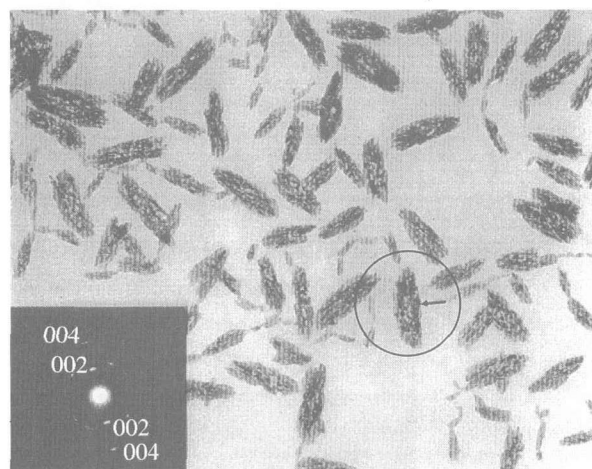
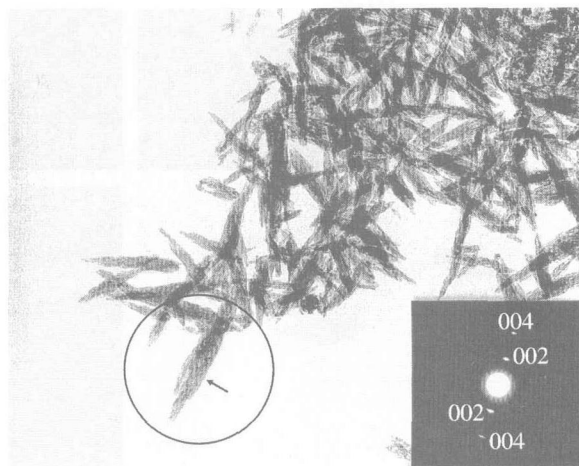


Fig. 3.3 XRD patterns of HAp/ChS and HAp/HyA nanocomposites after freeze-dried.



(a) HAp/ChS —100nm



(b) HAp/HyA —100nm

Fig. 3.4 TEM and electron diffraction patterns of (a) HAp/ChS and (b) HAp/HyA nanocomposites.

らに HAp/ChS 複合体中における HAp 微結晶の自己組織化を確認するため、島状凝集体の短軸方向に対して回転させ、電子線回折測定を行なった。この結果を図3.5に示す。回転角度を0, 5, 10, 15, 20度と変化した図である。0, 5, 10度では HAp の002と004の回折線がスポット状に観測される。15, 20度ではこのスポット状の回折点が消滅する。これより、HAp 微結晶がc軸方向にのみ配向している事が明らかである。さらに HAp/HyA 自己組織化体の長軸方向で回転させた場合の電子

線回折像を図3.6に示す。長軸方向で回転させた場合は、300の回折線が常に観測される。これは、HAp 微結晶がc軸方向にのみ配向している事を示す。自己組織化体構造の細部を観察するため、島状凝集体の格子像の観察を行なった。結果を図3.7に示す。HAp のc軸長(0.68nm)の半分である0.33nmの縞が観測される。この縞は、HAp のc軸に対して垂直に存在するCa(2)の三角形による回折線である。このCa(2)サイトが多糖類のカルボキシル基と相互作用する事により自己組織化的な HAp 微結晶の整列を生じさせていると考えられる。

HAp/ChS 複合体のリン酸滴下による自己組織化体の形成状態に関して TEM 観察を行なった。結果を図3.8に示す。図3.8(a)は水酸化カルシウム懸濁液中に ChS を分散させた状態である。水酸化カルシウムが ChS 分子の周りに球状の凝集体が観測される。図3.8(b)はリン酸水溶液を滴下し、pH12付近の TEM 像である。これより高アルカリ条件下で既に自己組織化体が観測される。リン酸水溶液を更に滴下することで自己組織化体の大きさがそろっていく事が分かる。自己組織化現象は高アルカリ側で生じていることが明らかとなった。また、電子線回折測定の結果を比較すると、pH12では002及び004の回折線はpH10と比較して三日月状に広がっていることが分かる。リン酸水溶液を滴下する事により、HAp 微結晶の整列がさらに進むと考えられる。

ChS 分子の水溶液中での空間占有率が自己組織化現

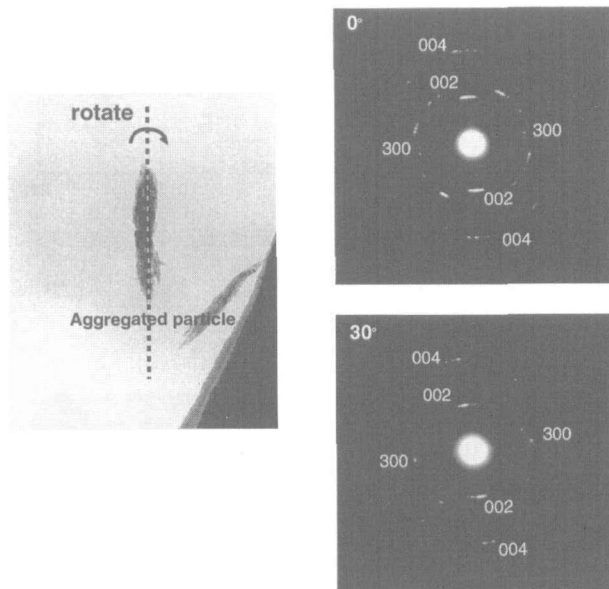


Fig. 3.6 Electron diffraction patterns of HAp/HyA nanocomposite after rotated at 0 and 30° for the minor axis of island-like aggregation.

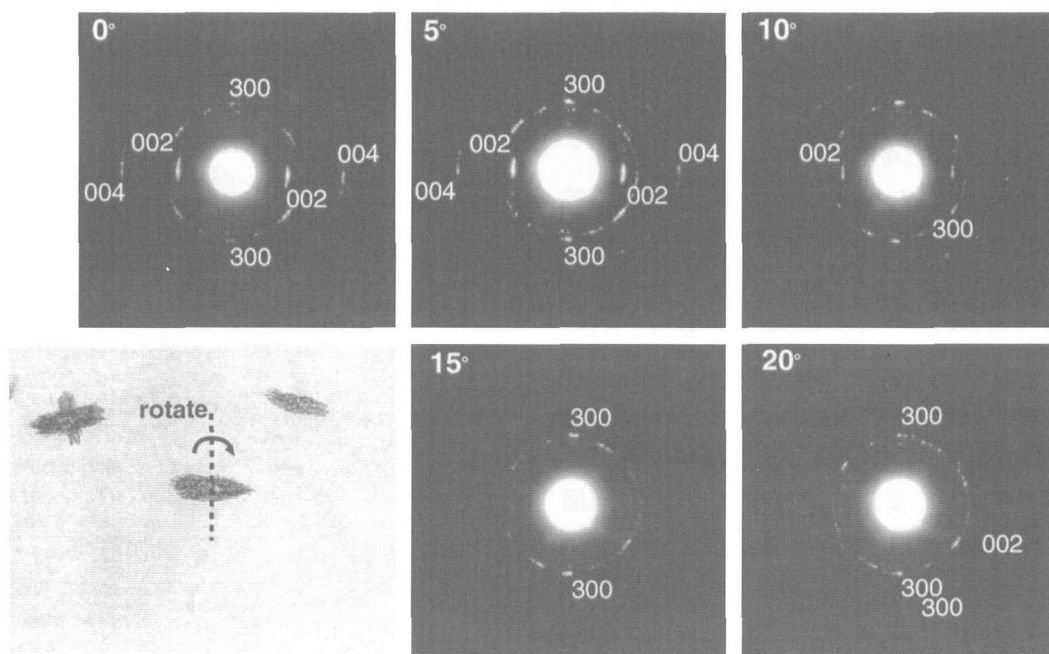
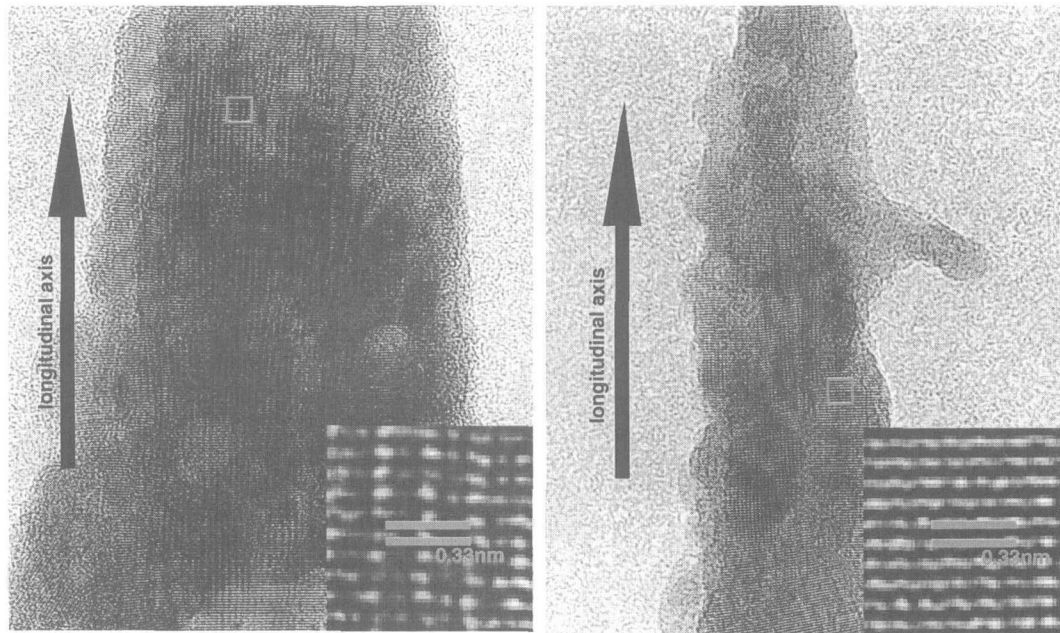


Fig. 3.5 Electron diffraction patterns of HAp/ChS nanocomposite after rotated at 0, 5, 10, 15 and 20° for the major axis of island-like aggregation.



HAp/ChS

HAp/HyA

Fig. 3.7 Lattice images of (a) HAp/ChS and (b) HAp/HyA nanocomposites.

象に及ぼす影響に関して検討した。水酸化カルシウム懸濁液に25g, 12.5g, 5g, 2.5g, 1.25g, 0.5g と ChS 添加量を変化させて合成を行なった。スルホン基とカルボキシル基の2つの有機官能基をもつ ChS は、溶液中では大きく負に帯電している。このため、空間占有率が高くなると静電的反発力が働く。図3.4(a)に示したように自己組織化体中には幾つもの ChS 分子鎖が集まって凝集体を形成している。TEM 観察の結果、0.5g, 1.25g と2.5g 加えた場合は自己組織化体が観測された。一方、5g, 2.5g, 25g 加えて合成した場合は自己組織化体が観測されなかった。このことは、ChS 分子の水溶液中での空間占有率(静電的相互作用)が自己組織化現象を生じさせる一つの重要な要因である事を示唆していた。

酸性多糖類分子鎖に沿って HAp 微結晶が整列する現象は、1. 高アルカリ溶液中でのカルボキシル基のイオン化、2. カルボキシル基への Ca イオンの結合、3. Ca イオンの結合したカルボキシル基での HAp 核形成、であると考えられる。ChS 及び HyA のカルボキシル基間の距離は約1.05nm である⁵⁾。この距離は HAp の c 軸長の3/2倍である。このことは、HAp 微結晶が c 軸方向に対して多糖類分子鎖にそったエピタキシャル成長をしている事を示唆している。これまで LB 膜を用いた擬似液体中の研究でも、カルボキシル基を有する基板上に HAp が成長する事が報告されている。⁷⁾本研究でも、HAp 微結晶の整列は HAp の表面にある特定の PO_4^{3-} - Ca^{2+} 構造とその Ca^{2+} とカルボキシル基間の結

合に依存すると考えられる。

3. 1. 3 計算科学による無機/有機界面の電子状態

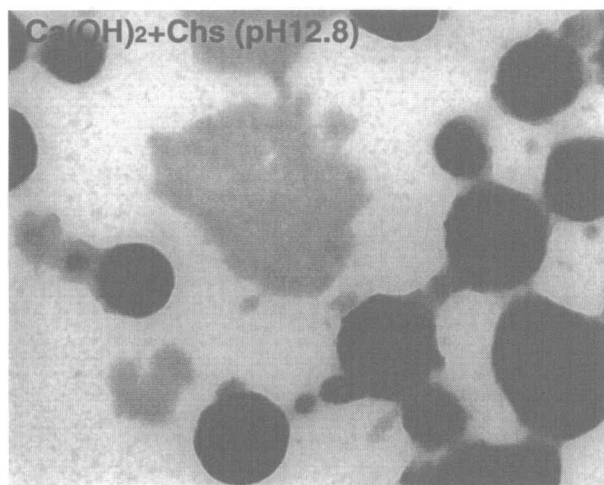
3. 1. 3. 1 はじめに

これまでに HAp と酸性多糖類との自己組織化に関して述べた。この自己組織化は有機官能基としてカルボキシル基が重要な役割を果たしていると考えられる。さらに生体骨は HAp, I 型コラーゲン(Col), 微量の多糖類及び水により構成されている。I 型コラーゲンは官能基にカルボキシル基を持ち、1分子中の全アミノ酸の1/10程度存在している。コラーゲンは細胞の代謝により分泌され、コラーゲン特有の横縞様を持った繊維構造を作る。これにリン酸カルシウムが沈着し、HAp がある特定の方位に整列(自己組織化現象)する。

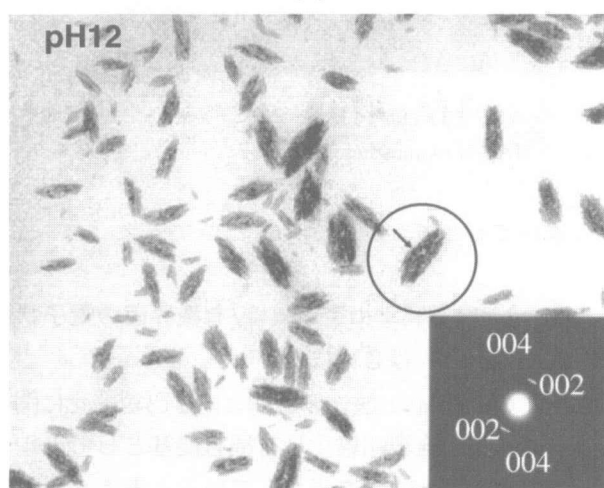
本節の目的は、カルボキシル基と HAp 界面の結合状態及び電子状態をクラスター法による分子軌道法(DVX α 分子軌道計算)を用いて明らかにする事とした。1. 各種金属イオンとカルボキシル基の結合、2. HAp の電子状態、3. HAp とカルボキシル基界面の電子状態に関して検討を行なった。

3. 1. 3. 2 計算方法

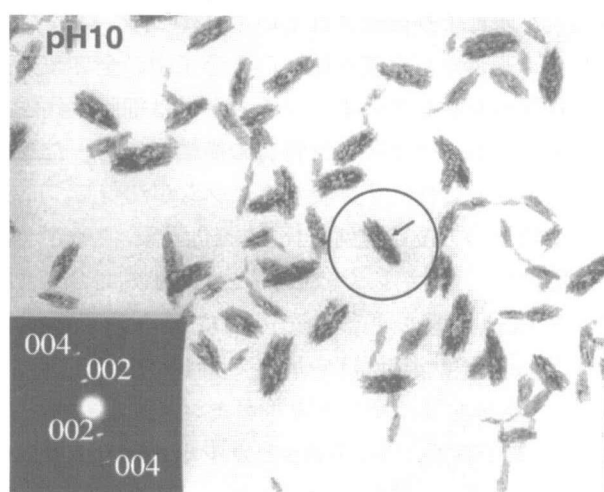
カルボキシル基と2価金属イオンの結合回数に関して計算を行なった。カルボキシル基は酢酸イオンを用いたクラスターモデルとし、2価金属イオンとカルボキシル基の酸素イオンとの結合距離を変化させて計算を行なった。(図3.9) HAp パルクのクラスターモデル



(a)



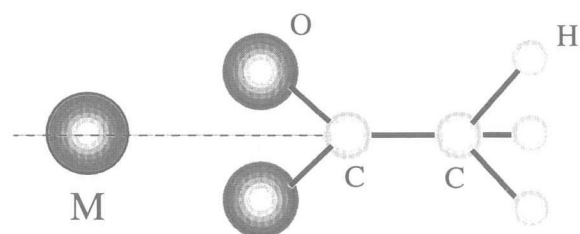
(b)



(c) —100nm

Fig. 3.8 TEM images of HAp/ChS nanocomposites for precipitation process at various pH.

$(\text{Ca}_{18}\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ を図3.10に示す。このクラスターモデルは水酸基コラムを中心としたモデルであり、Ciの対称性をもつ。点電荷をクラスターの周りに配置



$\text{M} = \text{Mg}, \text{Ca}, \text{Ni}, \text{Fe}, \text{Mn}, \text{Cu}, \text{Cd}, \text{Zn}$

Fig. 3.9 Cluster model of M-OOCCH_3 .

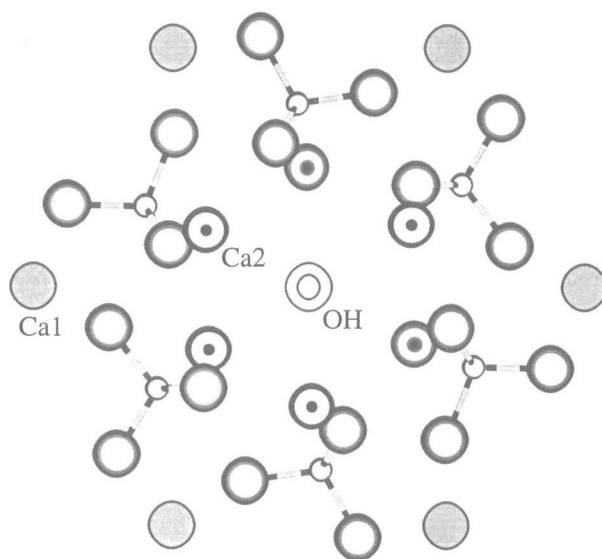


Fig. 3.10 Cluster model of HAp bulk $(\text{Ca}_{18}\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$.

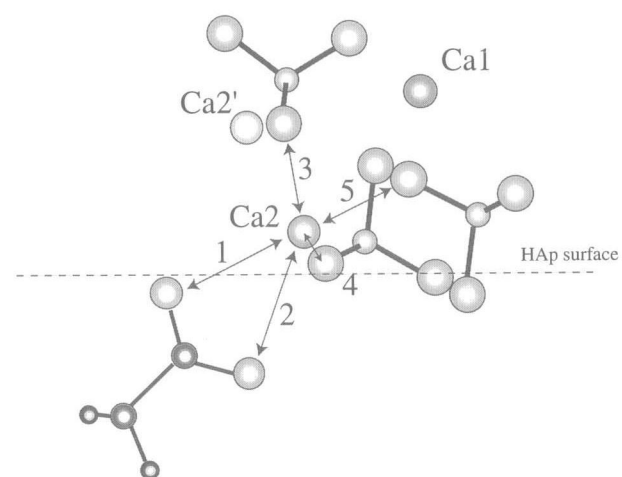


Fig. 3.11 Cluster model of HAp surface $(\text{Ca}_2\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3-\text{OOCCH}_3)$.

して計算を行なった。さらに HAp 焼結体の X 線光電子分光を測定した。HAp とカルボキシル基の結合状態に関して検討を行なった。計算に用いた酢酸イオンと HAp 表面のクラスターモデルを図3.11に示す。HAp 表面にはマードリングポテンシャルを配置させて計算を

行なった。

3. 1. 3. 3 結果と考察

図3.12は各金属イオンとカルボキシル基の酸素原子との結合次数の変化を結合距離に対してプロットした。カルボキシル基に対する結合の強さは、 $Mg > Ni = Zn > Fe > Mn > Cu > Cd > Ca$ の順となり、これまでに報告されている Irving-William 系列⁹⁾とほぼ一致する。また Ca イオンはカルボキシル基の酸素原子から $2.33 \text{ \AA}$ で最大となった。これより、HAp とカルボキシル基界面に Mg や Zn の金属イオンを置換させる事により結合が制御可能である事を示唆している。

HAp は、六方晶系・空間群 $P6_3/m$ で $a=0.9422\text{nm}$, $c=0.6882\text{nm}$ の格子定数である。⁹⁾HAp 格子中には結晶学的に異なる 2 つの Ca サイトが存在しており、Ca (1) サイトと Ca (2) サイトが存在する。各サイトの酸素配位状態を図3.13に載せる。Ca (1) サイトは近接する 9 つの PO_4 イオンの酸素イオンにより配位されている。9 つの酸素イオンは三角柱状に配位しており、6 つの短い結合（三角柱の表面の酸素イオン）と 3 つの長い結合を形成している。一方、Ca (2) サイトは 7 つの酸素イオンにより配位され、OH 基の 1 つの O イオンと 6 つの PO_4 イオンの酸素イオンにより形成されている。図3.14は状態密度図と HAp 焼結体の XPS 測定結果である。両者はほぼ一致している事から、 $\text{DVX}\alpha$ 法により HAp 価電子状態を考察できる事が分かる。また、図3.15にエネルギーレベル図を載せる。Ca (2) サイトと PO_4 イオンの酸素原子の結合は、 $-15 \sim -25\text{eV}$ では Ca-3p 軌道と O-2s 軌道により結合性軌道と反結合性軌道が形成されている。 $-0 \sim -10\text{eV}$ では、Ca-3d,4s,4p 軌道と O-2p 軌道により結合性軌道が形成されている事が分

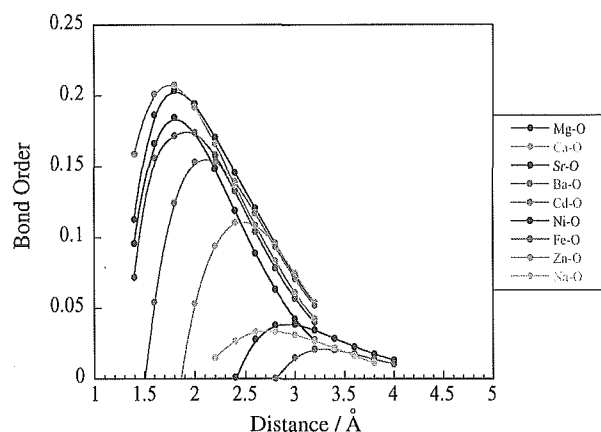


Fig. 3.12 Bond order changes against bond distance between M and carboxyl oxygen.

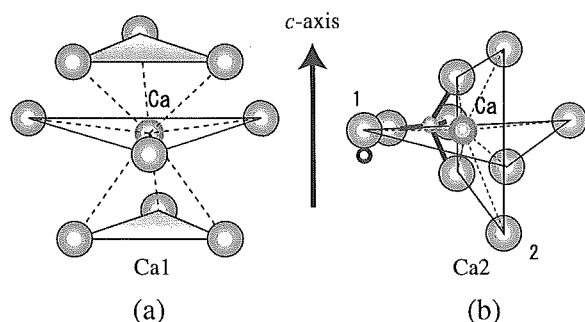


Fig. 3.13 Coordination states of Ca(1) and Ca(2) sites in HAp lattice.

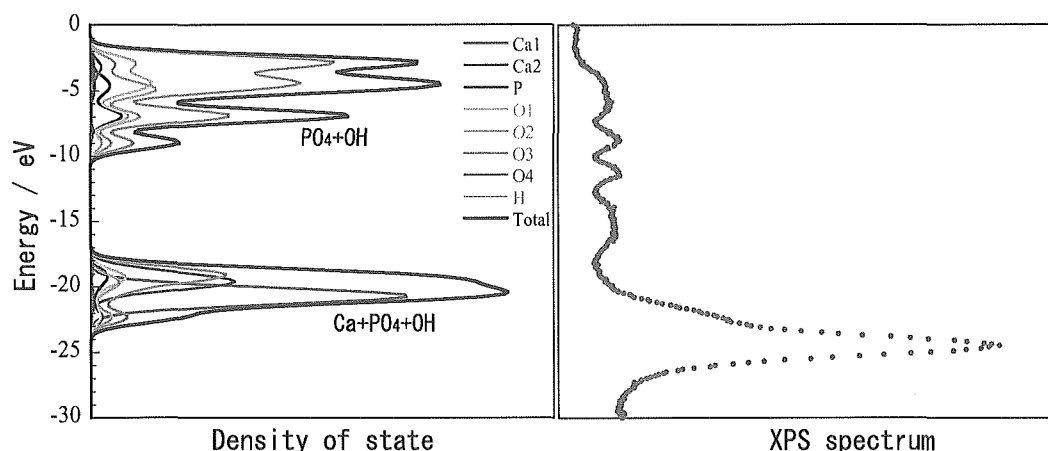


Fig. 3.14 Density of state of HAp bulk and XPS spectrum of sintered HAp.

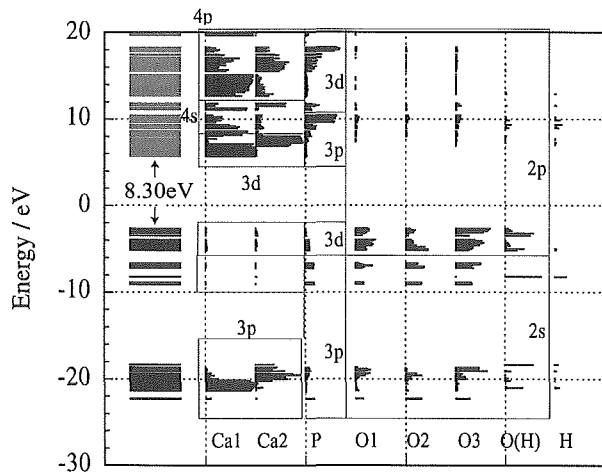


Fig. 3.15 Energy level of HAp bulk.

かる。

HApと多糖類の複合化界面の様子を実験的に観察することは困難である。そのため、計算化学による電子状態を解明する事は、無機/有機複合体の材料設計に大きな指標となると考えられる。高分解能 TEM による焼結体粒界面の観察により、HApの終端構造はCa(2)サイトであると報告されている。また、HAp/酸性多糖類自己組織化体の格子像からCa(2)に対応する縞が観測されていることから、Ca(2)サイトの電子状態が自己組織化的配列に大きく影響していると予想される。そこでCa(2)サイトの電子状態を中心に解析を行った。

図3.13(b)に示したCaイオンに配位している1と2

の酸素原子位置にカルボキシル基の酸素原子を配位させた結合状態に関して検討を行なった。オーバーラップポピュレーションの解析より、各Caイオンと酸素原子の結合状態はHApバルク中における結合状態とほぼ同様の結合様式を示した。これよりCa(2)サイトの酸素配位状態(7配位)を変化させることなしにカルボキシル基がHAp表面に結合するのが、自己組織化的にHAp微結晶が整列するのに有利であると考えられる。

3. 1. 4 自己組織化体の表面制御

3. 1. 4. 1 はじめに

これまで酸性多糖類を用いたイオン結合架橋に関する研究は、食品に应用されているアルギン酸(多糖類；直鎖型高分子(D-マンヌロン酸と α -L-グルクロン酸))に対して報告されている。¹⁰⁾ 1価金属塩では水に溶けやすく、2価金属イオン(カルシウムイオン)によりゲル化する。本節では合成した自己組織化体(HAp/ChS150 nm×50nm；HAp/HyA300nm×50nm)の表面特性を解明し、自己組織化体界面に人為的的化学結合をする事でより大きな自己組織化体を創出する事を目的とした。具体的には金属イオン(Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+})を自己組織化体界面に修飾することで酸性多糖類の有機官能基同士にイオン結合架橋を施すことを試みた。

3. 1. 4. 2 実験方法

自己組織化体の合成方法に関しては既に述べた。金

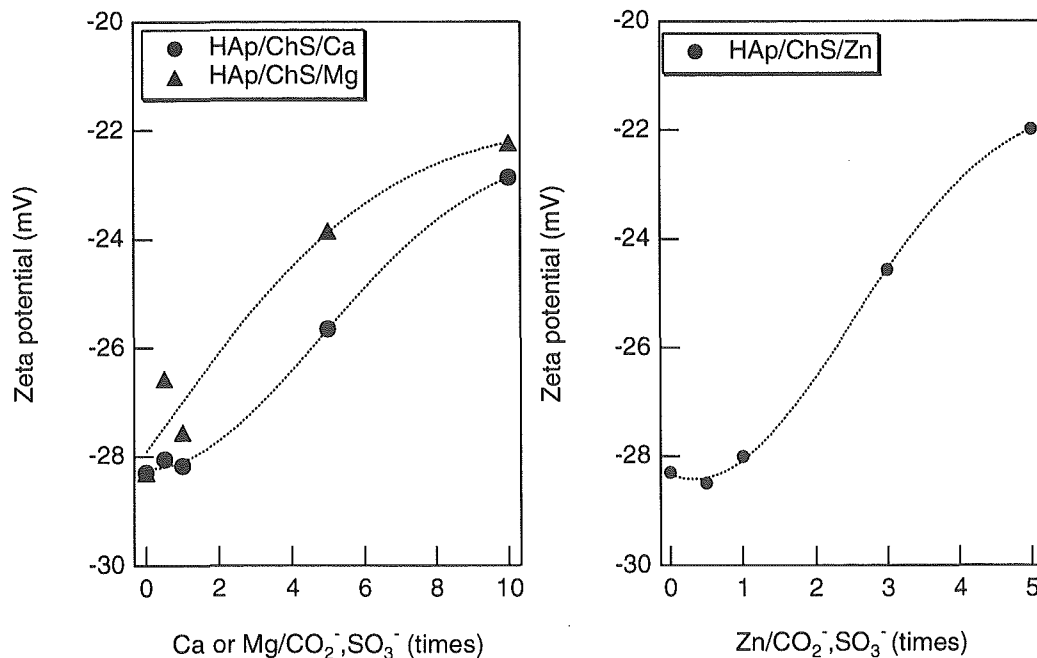


Fig. 3.16 Zeta potential of HAp/ChS nanocomposites added Ca, Mg and Zn ions.

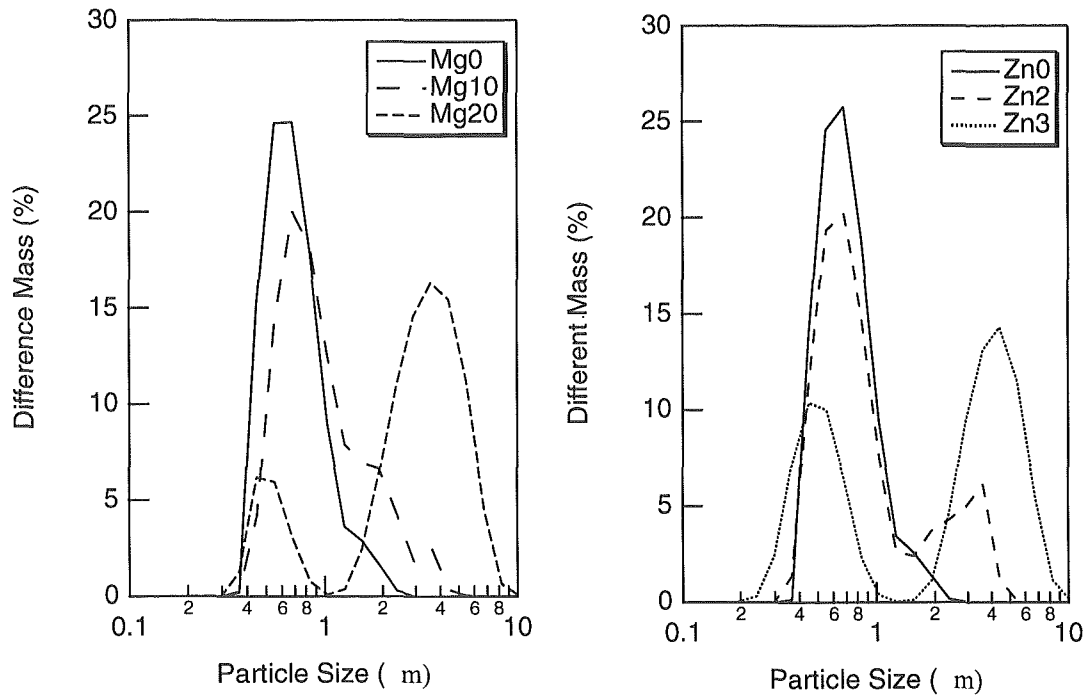


Fig. 3.17 Particle distribution of HAP/ChS nanocomposites added Ca, Mg and Zn ions.

属イオンによるイオン結合架橋は、硝酸亜鉛・硝酸マグネシウム・硝酸カルシウムを用いて行なった。得られた自己組織化体の表面構造に関しては、0.01mol/lの KNO_3 電解質に自己組織化体を添加し十分に平衡状態に達した後に超音波照射により分散させ金属イオンを添加し、ゼータ電位測定により評価した。また金属イオン処理によるイオン結合架橋に関しては、自己組織化体の粒度分布測定により評価した。

3. 1. 4. 3 実験結果

ゼータ電位測定の結果、溶液のpHが8の場合HAP/ChS複合体では約-27mV, HAP/HyAでは約-35mVであった。またHAP粒子の表面電位は約-3mVであった。これよりHAP/酸性多糖類自己組織化体の表面構造は、多糖類分子鎖により終端していると考えられる。そのため、自己組織化体同士にイオン結合架橋を導入する事が可能である。本節ではまずHAP/ChS自己組織化体同士への金属イオン結合架橋を試みた。図3.16にゼータ電位測定結果を示す。これによると金属イオンを添加することで自己組織化体の表面電荷は約-23mVになり表面負電荷は小さくなった。これは自己組織化体表面に金属イオンが修飾されたためであると考えられる。図3.17に自己組織化体の粒度分布測定結果を示す。これによると金属イオンを添加すると自己組織化体の粒子径が $0.5\mu\text{m}$ から $5\mu\text{m}$ になった。これ

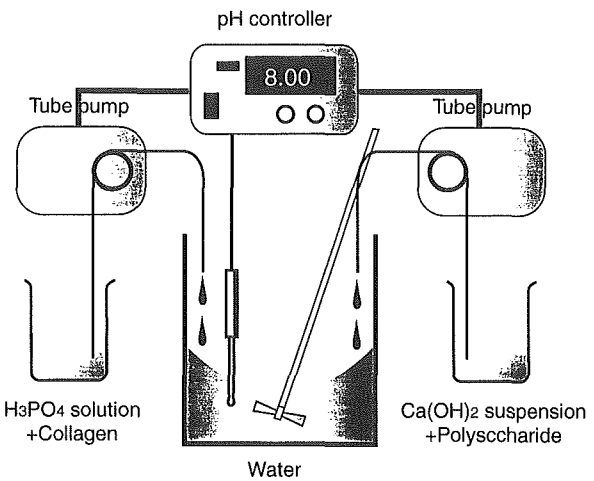


Fig. 3.18 Schematic diagram of coprecipitation method of HAP/Col/polysaccharides.

は修飾された金属イオンを介して自己組織化体同士がイオン結合により架橋されたために凝集体が得られたと考えられる。いずれの効果も Ca^{2+} と Mg^{2+} を添加した場合は同じような傾向がみられた。また3種類の金属イオンの添加量を比較すると、 Zn^{2+} が最も少ないが最も少ない添加量で効果が見られた。これは2価金属イオンの錯体形成の安定性を示すIrving-Williams系列に従っていると考えられる

3. 1. 5 軟骨代替材料の合成と医学応用

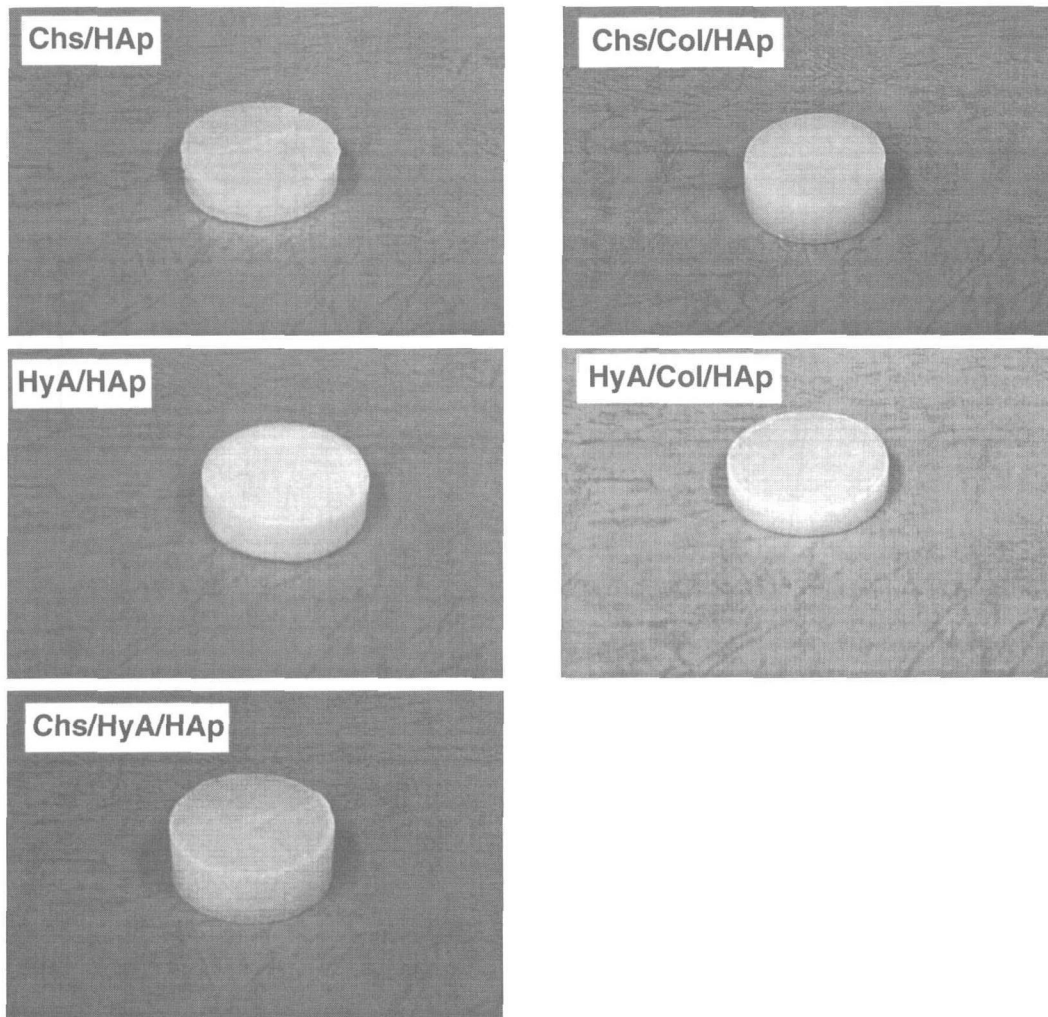


Fig. 3.19 Compacted bodies of (a) HAp/ChS, (b) HAp/HyA, (c) HAp/ChS/HyA, (d) HAp/Col/ChS and (e) HAp/Col/HyA composites.

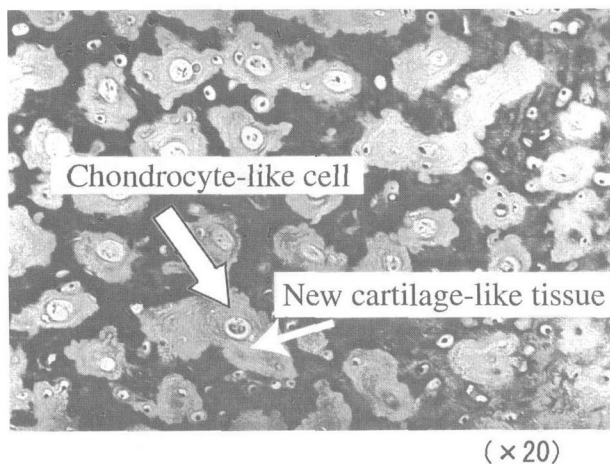


Fig. 3.20 Histological section of HAp/Col/ChS composite implanted for 4 weeks.

3. 1. 5. 1 はじめに

これまでに軟骨再生に関する研究は、再生医学を用いた研究が報告されている¹¹⁻¹³⁾。細胞の足場材としては、1) 生体吸収性、2) 分解産物に毒性が無い、3) 細胞接着性、4) 細胞活性の維持、5) 組織再生が可能な構

造、6) 組織再生までの形態安定性、7) 一定の機械的強度が考えられる。これまで軟骨細胞の足場材としてはポリグリコール酸(PGA)¹⁴⁾、メッシュポリ乳酸(PLLA)スポンジ¹⁵⁾、コラーゲンスポンジ¹⁶⁾が報告されている。本節では、無機/有機複合体の細胞の足場材への応用に関して動物実験により検討を行った。HAp/ChS・HAp/HyA・HAp/II-Col/ChS・HAp/II-Col/HyA 複合体を作製し軟骨代替材料への応用を検討した。

3. 1. 5. 2 実験方法

HAp/ChS・HAp/HyA 複合体は、水酸化カルシウム懸濁液(0.25mol/l, 1l)にChS及びHyAを分散させ、激しく攪拌を行ないながら、薄めたリン酸水溶液(0.15 mol/l, 1l)を滴下して合成した。またHAp/II-Col/ChS・HAp/II-Col/HyA 複合体の合成は、以下の手順で行なった。最初にHAp/ChS及びHAp/HyA自己組織化体を合成し、その後リン酸水溶液に分散させたII-Colと水酸化カルシウム懸濁液を同時に自己組織化体

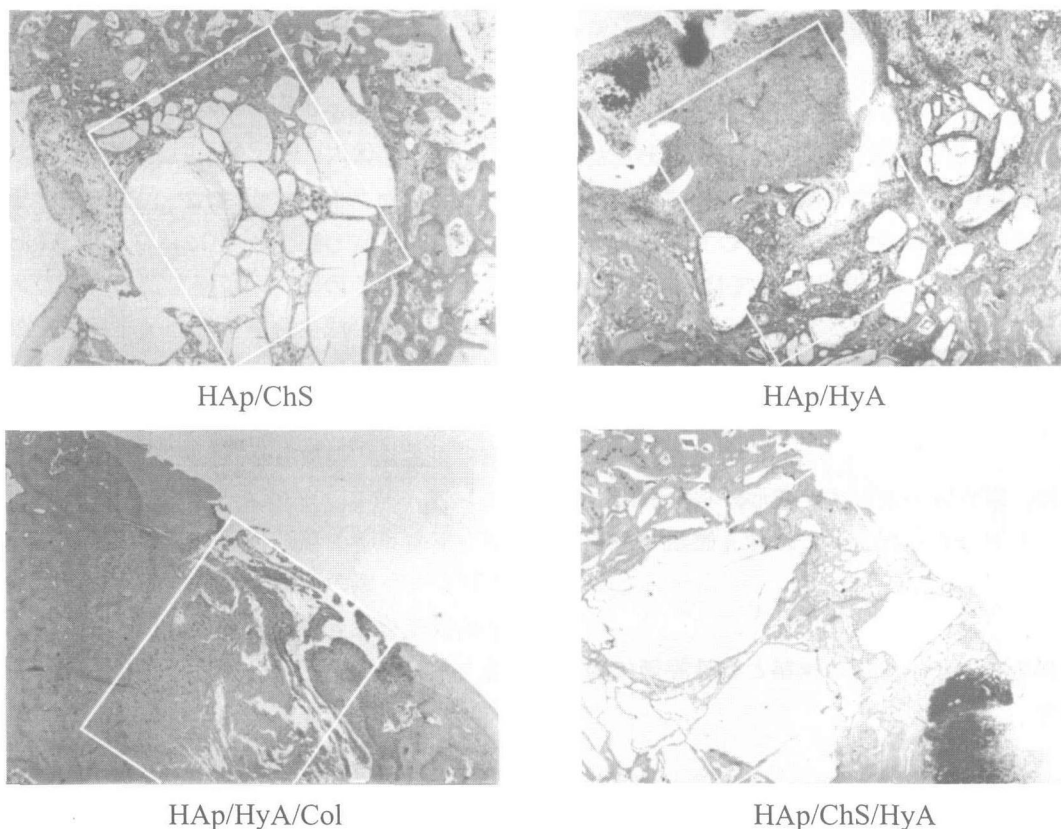


Fig. 3.21 Histological section of composites implanted for 4 weeks.

懸濁液に滴下して合成した。(図3.18)合成した各複合体は、遠心分離機により固相分離を行ない、30MPaの圧力により一軸プレスにて成形を行なった。得られた各複合体は、熱分析により水分含有量の分析した。昇温速度は20K/minとし、1473Kまで昇温した。試料量は10mgとした。

成形した試料を3×3×5mmの大きさに切断し、家兎の膝関節軟骨中に移植した。移植4週後に組織切片をHE染色・TB染色法により評価した。

3. 1. 5. 3 結果と考察

図3.19に成形した各複合体の写真を載せる。各試料の水分含有量は、30%(HAp/ChS)、42%(HAp/HyA)、42%(HAp/ChS/HyA)、60%(HAp/II-Col/ChS)、40%(HAp/II-Col/HyA)であった。全ての複合体は、高い割合で水分を保持する能力を示した。軟骨は大量の水(75%)を含んでいて保水性が軟骨マトリクス材料に求められる。

家兎の膝関節軟骨(大腿骨部)に移植した結果、HAp/II-Col/ChSの内部には丸い形態を持つ軟骨様細胞が侵入し、その周りに軟骨組織の再生が確認された。(図3.20)各試料の移植4週後における組織切片像を図3.21に示す。HAp/ChS・HAp/HyA・HAp/ChS/HyA複合体は、生体中で小片に分離し、繊維芽細胞によりその周

りが覆われていることが分かる。炎症反応は観測されないが、軟骨組織再生には至らなかった。一方HAp/II-Col/HyAは軟骨様細胞の侵入は見とめられないが、周りとの組織反応は良好である。これより、軟骨再生にはコラーゲン繊維が必須である事がわかる。また、軟骨様細胞の侵入はChSを複合化させた場合でのみ観測された事から、多糖類も軟骨再生に必須である事が考えられる。ChSはHyAと比較してより負に大きく帯電させる事から、電氣的陰性も軟骨再生には重要な要素であると考えられる。

3. 1. 6 おわりに

軟骨組織の構造は複雑でそれをそのまま人工的に合成する事は困難である。本章では、軟骨組織に必須と考えられるコラーゲン・ヒアルロン酸・コンドロイチン硫酸といった生体高分子を用いて無機物との複合化の研究をおこなった。水酸アパタイトと多糖類の自己組織化体の合成・詳細な構造に関して明らかにした。HAp・ChS及びHAp/HyA複合体では、それぞれ150nm×50nm、300nm×50nmの凝集体が観測された。自己組織化体中では、HApのc軸が一方方向に整列している事が明らかとなった。自己組織化体の無機/有機界面の結合は、主にCa(2)サイトのリン酸基の酸素原子配位状態を変化させる事無しにカルボキシル基が結合す

るのが最も安定であると考えられる。金属イオンによるイオン結合架橋により、自己組織化体は有為に大きくなることが明らかとなった。軟骨再生材料としては、無機/有機複合体の材料のスクリーニングが終わった段階である。この段階で材料中に軟骨様細胞が侵入するこれまでに例の無い材料の開発に成功している。しかし、軟骨再生材料としての問題点としては、生分解性・リン酸カルシウムの軟骨再生への影響・軟骨細胞に最適な環境の模索が大きな問題となる。

謝辞

動物実験は、東京医科歯科大学整形外科の宗田大教授の協力によりおこなった。ここに深く感謝いたします。

3. 2 軟骨再生マトリックスの構築と物性評価に関する研究

3. 2. 1 はじめに

関節軟骨は、血管のない組織であるために一度損傷を受けると再生が非常に困難な組織であることが知られている。もし傷害を受けた軟骨組織が新しい軟骨に置き換わったとしても、形成される軟骨は繊維軟骨と呼ばれる軟骨組織であり、この繊維軟骨は実際の軟骨とは生化学的にも機械的にも十分ではない¹⁷⁾。再生が必要とされている軟骨は硝子軟骨であり、この軟骨の細胞外マトリックス (ECM) の主成分は II 型コラーゲン、ヒアルロン酸 (HyA) のようなグリコサミノグリカン (GAG) およびプロテオグリカンである。現在、老化やスポーツ傷害によって引き起こされる変形性関節症、関節リウマチ等関節軟骨疾患の患者数は、世界全体で約1000万人 (国内で約120万人) と言われており、今後高齢化人口の割合の増加に伴い、関節軟骨疾患が増大

してくることが予想され、軟骨を再生させる技術の開発が切望されている。

近年、細胞を用いて生体組織を生体外で調整し、その組織を生体内に移植するという生体組織工学¹⁸⁾と呼ばれるコンセプトが提唱された。このとき重要になるのが細胞の接着・増殖・分化に必要な足場 (scaffold) の構築である。この細胞の足場を調整するために天然高分子あるいは合成生分解性高分子を用いた軟骨再生マトリックスの研究が盛んに行われている。用いられている合成高分子はポリグリコール酸¹⁹⁾、ポリ乳酸²⁰⁾およびその重合体²¹⁾等であり、天然高分子材料は、I 型コラーゲン²²⁾、I 型コラーゲン-コンドロイチン硫酸複合体²³⁾、コンドロイチン硫酸²⁴⁾、HyA²⁵⁾等である。天然高分子を用いた足場の構築は、化学的架橋あるいは GAG の化学的固定化など多段階で行われているが、これらの手法を用いると分子レベルでの複合化が難しいだけでなく、目的とする生体組織の形状をもつ足場を形成することが非常に困難である。

そこで本研究では、硝子軟骨の主成分である HyA と II 型コラーゲンを用い、一段階で HyA-II 型コラーゲン複合マトリックスを得る手法を確立した。また、得られた複合マトリックスの生物学的機能についても検討を行った²⁶⁾。

3. 2. 2 実験方法

3. 2. 2. 1 ポリイオンコンプレックス (PIC) を形成しない条件の設定

HyA と II 型コラーゲン溶液 (1.25w/v%) は、蒸留水あるいは 0.01N-HCl にそれぞれ溶解することによって調製した。得られた溶液を HyA/コラーゲン (重量比) が 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 になるように調製した。HyA とコラーゲンとのポリイオンコンプレックス (PIC) 形成に

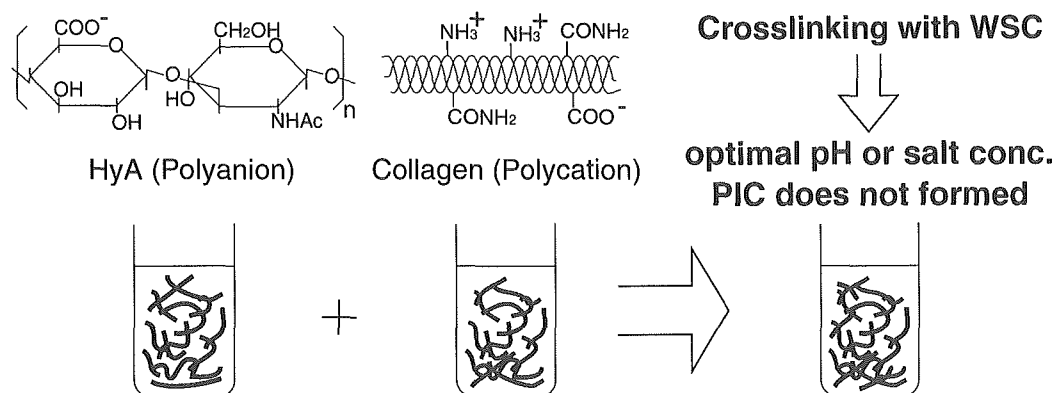


Fig. 3.22 Preparation procedure of HyA and collagen composite matrices.

及ぼす塩濃度の影響を調べるために種々の NaCl 濃度で HyA とコラーゲンを混合した。PIC 形成に及ぼす pH の影響は、pH の異なる HyA 水溶液とコラーゲン溶液を混合し評価した。PIC 形成は、UV/Vis spectrometer による透過率測定により行った。

3. 2. 2. 2 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの調製と膨潤度測定

HyA-コラーゲン複合マトリックスの調製法を図3.22に示す。HyA とコラーゲンを混合した際に PIC を形成しない条件で最終濃度が0-200mM の縮合剤(WSC;1-ethyl-3-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide)水溶液を滴下し、十分攪拌、脱泡した後、室温で24時間放置した。その後、得られたマトリックスを大過剰の水で洗浄し、得られたマトリックスから縮合剤および Na イオン、Cl イオンを除去した。膨潤度 (SR:swelling ratio) は以下の式により算出した。

$$SR = (W_d W_0) / W_0$$

ここで、 W_d と W_0 はそれぞれ乾燥あるいは湿潤時のマトリックスの重量である。

3. 2. 2. 3 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスのキャラクタリゼーション

縮合反応によってエステル結合が形成されていることを確認するために凍結乾燥したマトリックスの FT-IR 測定を行った。また、凍結乾燥したマトリックスの構造を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。

3. 2. 2. 4 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックス上での軟骨細胞の培養

WSC を用いた縮合反応によって得られた HyA-コラーゲン複合マトリックスの軟骨細胞の増殖に対する影響を検討するためにディスク状の複合マトリックスを調製した。その後、子牛軟骨から酵素処理により単離した軟骨細胞を播種し、10%ウシ血清存在下で37°C、1週間培養を行った。その後、細胞数を WST-1 (同人化学薬品株式会社) による比色法により計数した。コントロールとして組織培養用ポリスチレン (TCPS) およびコラーゲンをを用いた。

3. 2. 3 結果と考察

3. 2. 3. 1 ポリイオンコンプレックス (PIC) を形成しない条件の設定

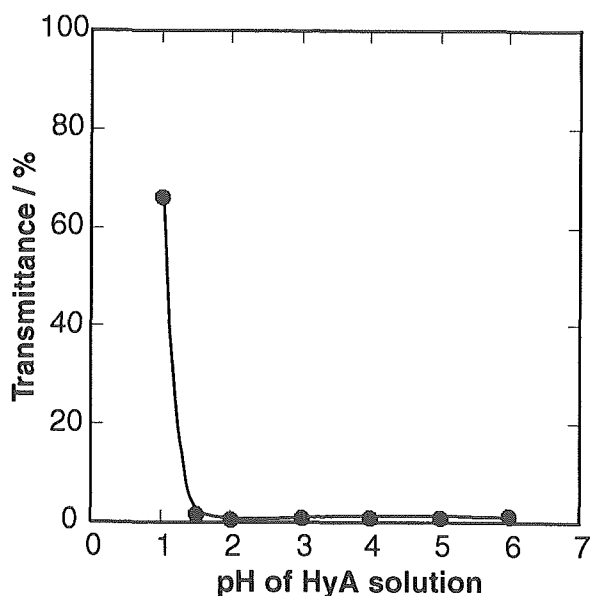


Fig. 3.23 The effect of pH of HyA solution on polyion complex formation.

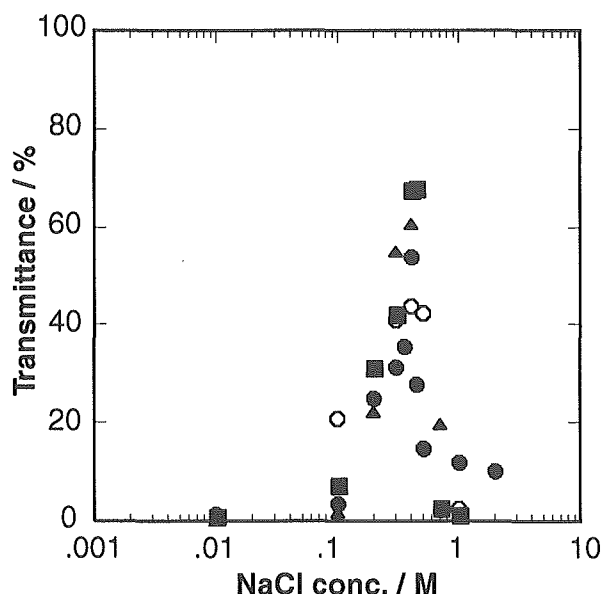


Fig. 3.24 The effect of ionic strength on polyion complex formation. HyA/collagen ratios were (●)1/1, (▲)1/2, (■)1/4 and (○)1/8.

HyA は、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルコサミンから構成されるアニオン性の多糖であり、一方、コラーゲンは分子内に存在するアルギニン、リジン等により分子全体としてカチオン性を示す。そのため、これらの反対電荷をもつ HyA とコラーゲンとを水中で混合するとポリイオンコンプレックス (PIC) を形成する。一般に PIC 形成は、溶液中の pH や塩濃度^{27,28)}など様々な環境因子によって影響を受けることが知られている。一段階で HyA とコラーゲンとの複合マトリックスを得るためには、PIC を形成しない条件下で縮合剤である

WSC を用いて化学的に架橋を行う必要がある。以上の理由により、まず、HyA とコラーゲンの PIC 形成に及ぼす pH および塩濃度の影響について検討した。図3.23 に PIC 形成に及ぼす HyA 水溶液の pH の影響について検討した結果を示す。PIC 形成は、HyA とコラーゲンを混合した溶液の500nm における透過率を測定することによって評価した。HyA とコラーゲンの混合比を1対1と固定し、溶液濃度は1.25w/v%とした。HyA とコラーゲンを混合した溶液の PIC 形成は、HyA 水溶液の pH が減少することによって増加した。このことは、HyA とコラーゲンとの PIC 形成が pH を低くすることにより抑制されるということを意味している。低い pH において PIC 形成が抑制されるのは、HyA とコラーゲン中に存在するカルボキシル基が低 pH になると解離しなくなるためにコラーゲンに含まれるアミノ基との静電相互作用がなくなるためであると考えられる。次に PIC 形成に及ぼす典型的な無機塩である NaCl を用い、イオン強度の影響について検討した。図3.24に示すように HyA とコラーゲンを混合した溶液の透過率は NaCl の濃度の増加とともに0.4M まで増加し、その後減少した。透過率が NaCl 濃度0.4M まで増加したことは PIC 形成が抑制されていることを意味しており、0.4 M 以上の NaCl 濃度以上になると塩析効果によってコラーゲン分子が析出してくるために透過率が減少するものと考えられる。HyA とコラーゲンの混合比を変えたサンプルについても同様の実験を行ったが、どの混合比の場合でも NaCl 濃度が0.4M 付近で極大値をとり PIC 形成が抑制されることが明らかとなった。図3.23 と図3.24の結果から PIC 形成が抑制される条件としては(1)HyA 水溶液の pH が1以下の時、(2)NaCl 濃度が0.4M の時(pH 約5)であることが明らかとなった。

縮合剤として用いる WSC は、水あるいは有機溶媒中でカルボキシル基を活性化し、その活性化されたカルボキシル基は、一級アミンや水酸基と反応することが知られている²⁹⁾。水中で反応する際、WSC の最適な pH は、4-8であることが知られている。HyA とコラーゲンからなる複合マトリックスを得るためには、HyA とコラーゲンが PIC 形成しない条件と WSC が縮合剤として作用する pH で行う必要がある。以上のことを考慮すると PIC 形成を pH1で抑制するのは WSC が安定に作用しないために不適當であることが言える。一方、0.4M の NaCl 存在下で PIC 形成を抑制したときの pH はおよそ5であり、これは WSC が十分安定に作用する条件である。

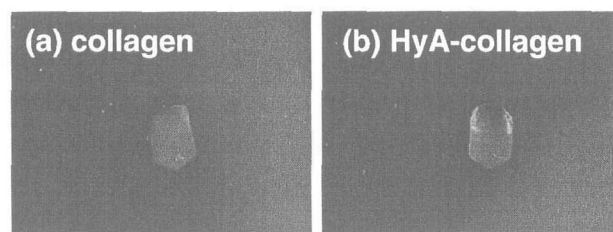


Fig. 3.25 HyA-collagen composite matrices (wet state) prepared in this study. ((a) collagen matrix; (b) HyA-collagen composite matrix (HyA/collagen ratio=1/1 (w/w))

3. 2. 3. 2 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの調製

図3.23, 24の結果と WSC の安定性の考察から、HyA とコラーゲンからなる複合マトリックスを調製する条件として0.4M の NaCl 存在下で WSC による縮合反応を行った。得られた複合マトリックスは、水中に浸漬しナトリウムイオンや塩化物イオン等の低分子物質を取り除き洗浄した。同じ実験をコラーゲン単独についても行った。図3.25は、水中に浸漬した後の(a)コラーゲンマトリックスおよび(b)HyA-コラーゲン複合マトリックスを示している。この手法を用いて得られたマトリックスは、水に不要であり1ヶ月後でも安定に存在した。他の研究者らは、GAG とコラーゲンからなる PIC を皮膚再生のための足場として使用している³⁰⁾。しかしながら、GAG とコラーゲンとの PIC 形成は瞬時に起こるため、この手法を用いると複雑な形状をした足場を調整することは不可能である。一方、我々の手法を用いると HyA とコラーゲンからなるマトリックスは、鋳型を用いることでどのような形にでも成型が可能である。このことは、組織の欠損部分と同じ形状をした細胞の足場を簡単に調整できることを示している。

3. 2. 3. 3 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスのキャラクタリゼーション

図3.26は、得られた HyA-コラーゲン複合マトリックスの FT-IR スペクトルである。架橋形成後では1700 cm^{-1} 付近にエステル結合に起因するピークが認められた。このピークは、WSC の濃度が200mM になるとより顕著に認められた。コラーゲン中には、アスパラギン酸とグルタミン酸の酸性アミノ酸と水酸基を持つヒドロキシリジン、ヒドロキシプロリンおよびチロシンが存在する。また、HyA 中に存在する官能基で反応が可能な官能基は、カルボキシル基と水酸基である。そ

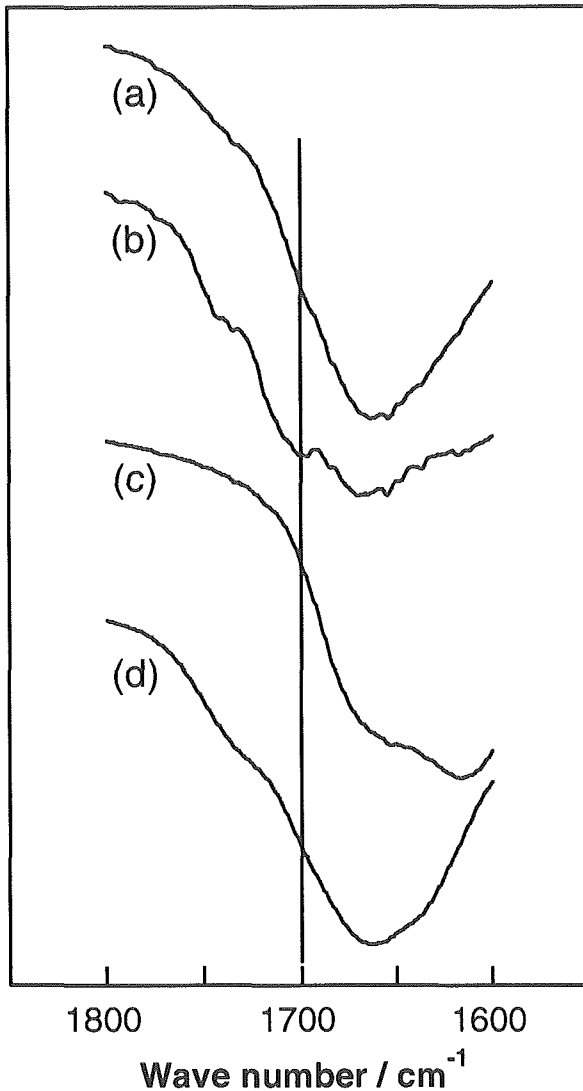


Fig. 3.26 FT-IR spectra of HyA-collagen composite matrices.

(a) WSC conc. 20 mM; (b) WSD conc. 200mM; (c) original HyA; (d) original collagen.

のためエステル結合の形成は、HyA-HyA, HyA-コラーゲンおよびコラーゲン-コラーゲン間における反応により形成される。一方、WSCによって活性化されたカルボキシル基は、一級アミンとも反応可能でありアミド結合も形成されていることが予想されるが、コラーゲン中に含まれるアミド結合との識別が困難であるためにエステル結合のみの同定を行った。

3. 2. 3. 4 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの膨潤度評価

HyA-コラーゲン複合マトリックスの収率は、混合溶液に添加するWSCの溶液濃度の増加に伴い増加した。混合溶液中でのWSC濃度が20mM以上になると収率はほぼ100%であり、溶液の組成どおりの複合マトリックスが得られた。WSCによって活性化されたカルボキ

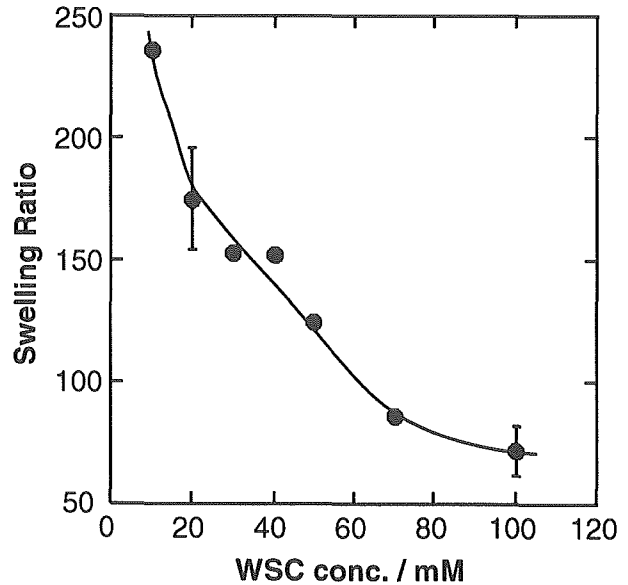


Fig. 3.27 Swelling ratio of HyA-collagen composite matrices at different WSC concentrations. HyA/collagen ratio was fixed at 1/1 (w/w).

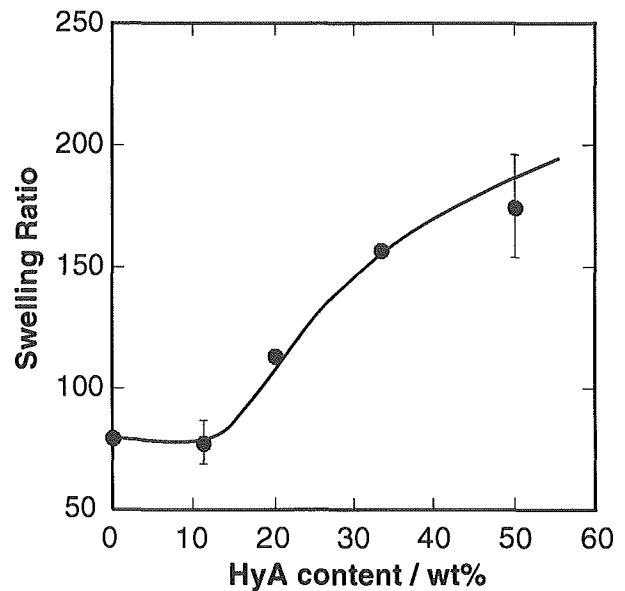


Fig. 3.28 The effect of HyA content on swelling ratio of the matrices. The WSC concentration was fixed at 20 mM and HyA content were varied from 0 to 50 wt%.

シル基は、一級アミンおよび水酸基と反応するが、今回行っている縮合反応は水中で行っているため、活性化したカルボキシル基は、一級アミン、水酸基および水と競争的に反応する。WSCが低濃度の場合に収率が低いのは、活性化したカルボキシル基が少なく、水との競争反応によりより架橋形成が阻害されることによるものであると考えられる。HyA-コラーゲン複合マトリックスの膨潤度とWSC濃度との関係を図3.27に示す。HyA-コラーゲン複合マトリックスの膨潤度は、WSC

濃度の増加に伴い減少した。このことは、高濃度の WSC により架橋形成が進んだことを示している。また、図 3.27 には WSC 濃度を一定値の 20mM とし、HyA/コラーゲン比を変化させたときの膨潤度を示している。複合マトリックスの膨潤度は、複合マトリックス中に含まれる HyA の含量の増加に伴い増加した。これは、HyA の含量が増加すると複合マトリックスの親水性度が増加するためであると考えられる。図 3.27, 28 の結果から HyA-コラーゲン複合マトリックスの膨潤度は、WSC 濃度と HyA/コラーゲン比を変化させることにより制御可能であることが明らかとなった。図 3.28 には、凍結乾燥した HyA-コラーゲン複合マトリックスの SEM 観察を行った結果を示す。凍結乾燥した複合マトリックスは多孔体であり、このスペースに軟骨細胞を移植し培養可能なことが示唆された。

3. 2. 3. 5 ヒアルロン酸-コラーゲン複合マトリックスの生物学的機能評価

図 3.29 には、子牛関節より単離した軟骨細胞を HyA-コラーゲン複合マトリックス上で 1 週間培養した後の細胞数の相対比を示す。コントロールとして組織培養用ポリスチレン(TCPS)およびコラーゲン単独のマトリックスを用いた。HyA-コラーゲン複合マトリックスには、HyA/コラーゲン比が 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 のものおよび WSC 濃度が 20, 100mM のものを使用した。HyA-コラーゲン複合マトリックス上における 1 週間後の細胞数は、どの混合比および WSC 濃度のものでもコントロールの 4 倍から 8 倍の細胞数を示し、今回調製した複合マトリックスが良好に軟骨細胞の増殖を刺激していることが示唆された。HyA 含量が少ない 1/8 の複合マトリックスとコラーゲン単独マトリックス上の細胞数を比較しても細胞数が 4 倍以上も差があることから調製した複合マトリックスの HyA とコラーゲンの 2 つの成分が効果的に軟骨細胞の増殖を刺激しているものと考えられる。一般に知られている HyA とコラーゲンに対する軟骨細胞のレセプターは、CD44 とインテグリンであるがこの双方のレセプターへ刺激が軟骨細胞の増殖を促進する要因となっていることが示唆された。

3.2.4 おわりに

軟骨再生を促すための細胞の足場としてヒアルロン酸(HyA)とコラーゲンからなる複合マトリックスの新しい調整法を確立した。HyA とコラーゲンを水中で混合するとポリイオンコンプレックス(PIC)が形成するが、この PIC を形成しない条件を設定し、縮合剤である

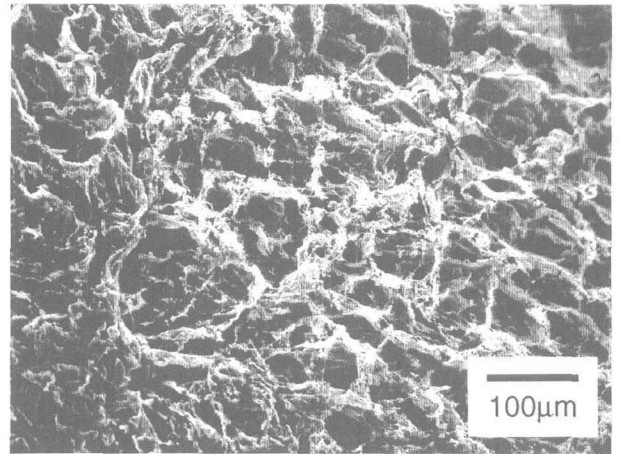


Fig. 3.29 SEM image of freeze-dried HyA-collagen composite matrix with HyA/collagen ratio of 1/1 (w/w).

WSC により HyA あるいはコラーゲン中のカルボキシル基と水酸基あるいはアミノ基とを反応させることにより HyA-コラーゲン複合マトリックスが得られた。この手法を用いるとどのような形状の複合マトリックスを得ることも可能であり、このことは軟骨欠損部と同じ形状をした軟骨再生の足場を調整できることを示している。この HyA-コラーゲン複合マトリックス上で軟骨細胞を 2 次元培養するとコラーゲン単独マトリックスや組織培養用ポリスチレンより 4 倍以上もの細胞増殖数を示し、HyA-コラーゲン複合マトリックスが増殖を刺激していることが明らかとなった。また、得られたマトリックスの凍結乾燥体は多孔体であり、細胞移植して培養するという生体組織工学のための細胞の足場(3次元培養)として機能しうることが示唆された。

3.3 Effect of Chondroitin Sulfate on the Crystal Growth of Hydroxyapatite

3.3.1 Introduction

Proteoglycans have long been implicated in the regulation of hydroxyapatite (HAp) nucleation and growth in the process of cartilage calcification.³¹⁻³³⁾ Cartilage proteoglycans exist mainly in the form of large aggregates containing proteoglycan monomers, link proteins, and hyaluronic acid associated through noncovalent linkages. The predominant glycosaminoglycan in cartilage proteoglycan is known as chondroitin 4-sulfate.^{34,35)} It is composed of repeating disaccharide units; one of the two monosaccharides is N-acetylgalactosamine sulfate (GalNAc-OSO₃), which contains a sulfate group, and the other is glucuronic acid (GlcUA),

which contains a carboxylate group.³⁶⁾ The combination of these two functional groups gives the chondroitin sulfate (ChS) a very high density of negative charge, which is known to have an inhibitory effect on crystal growth by covering the active growth sites of HAp seed crystals³⁷⁾ or even formation of HAp crystals by binding a Ca ion³⁸⁻⁴⁰⁾ or interfering with the diffusion rate of calcium and phosphate ions.⁴¹⁾ All of the experimental results, however, were assessed by indirect observation, e. g., the time-dependent concentration change of hydroxyl ions after addition of HAp seed crystals.^{37,41)} Thus, the possibility of ChS acting as a nucleation center by binding calcium ions to its functional groups and consequently regulating the crystal growth of HAp was neglected.

In this study, the inhibitory effect of ChS on the crystal growth of HAp was reexamined with the main focus on organic matrix regulated nucleation and growth. HAp particles and HAp/ChS hybrid were synthesized by using a precipitation method with a calcium hydroxide suspension and phosphoric acid solutions without and with the presence of ChS, respectively. Limited crystal growth of HAp regulated by ChS templates was observed in the HAp/ChS hybrid compared to crystal growth of HAp without ChS.

3. 3. 2 Experimental Procedure

HAp particles and 60HAp/40ChS hybrid (in wt%) were synthesized by using a precipitation method with a $\text{Ca}(\text{OH})_2$ suspension and H_3PO_4 solutions without and with ChS, respectively. The $\text{Ca}(\text{OH})_2$ powder was made by slaking of CaO , which was made through the calcination of CaCO_3 (Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan) at 1050°C for 3 h. The H_3PO_4 solution containing ChS was prepared by adding 4 g of ChS powder to 39 mL of 0.7M H_3PO_4 (Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan) solution with vigorous stirring until all of the ChS power was dissolved completely. The ChS (Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) used in this study was made from bovine trachea cartilage and the molecular weight was 13000. Its composition is shown in Table 3.1. The HAp particles and HAp/

Table 3.1 Composition of chondroitin sulfate

Composition (%)					
$\Delta\text{Di-0S}$	$\Delta\text{Di-6S}$	$\Delta\text{Di-4S}$	$\Delta\text{Di-disD}$	$\Delta\text{Di-disE}$	$\Delta\text{Di-triS}$
6.3	43.0	48.0	1.8	0.7	0.3

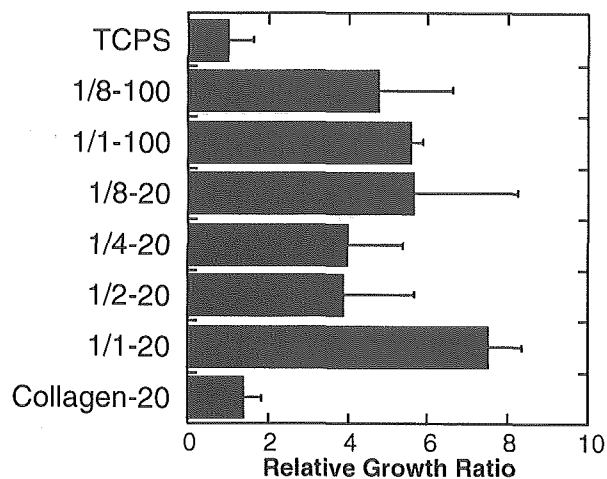


Fig. 3.30 Relative growth ratio of chondrocyte growth on HyA-collagen composite matrices with various HyA/collagen ratios.

ChS hybrid were prepared by slowly adding the H_3PO_4 solutions without and with ChS, respectively, to 100 mL of 0.45M $\text{Ca}(\text{OH})_2$ suspension with vigorous stirring until the pH reached around 9 at 36.5°C. The total reaction time was around 3 d.

For checking the crystal phase of the precipitates, X-ray diffractometer (XRD) measurements were conducted on the as-prepared specimens. The microstructures were observed by transmission electron microscopy (JEM-2000EX II, JEOL, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 200 kV. The chemical interactions between HAp crystals and two functional groups (carboxylate and sulfate groups) of the ChS templates were assessed from the chemical shifts using diffuse reflectance Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy (Spectrum 2000, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) with a resolution of 0.5 cm^{-1} before and after precipitation. For IR spectroscopy measurements, pulverized specimens were diluted with KBr powder by one tenth and background noise was corrected with pure KBr data.

3. 3. 3 Results and Discussion

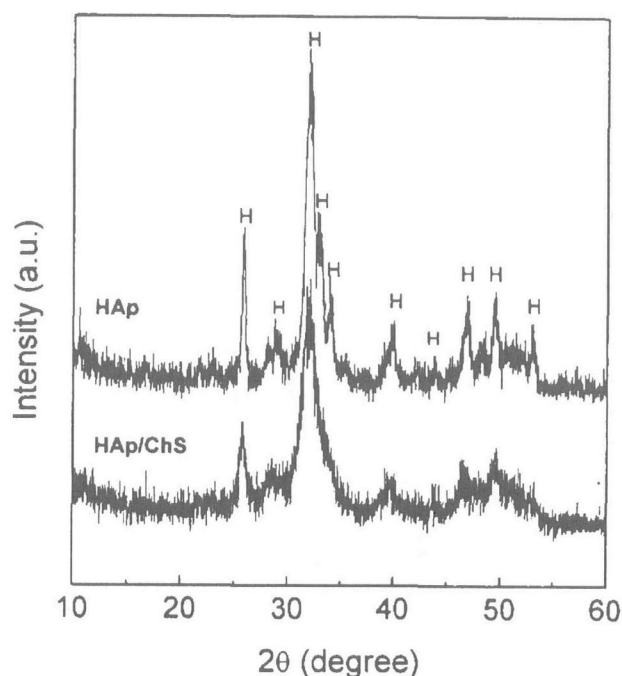


Fig. 3.31 XRD profiles of the HAp and 60HAp/40ChS (in wt%) specimens.

Figure 3.30 shows the results of XRD measurements on the as-prepared HAp and HAp/ChS specimens. Several HAp peaks denoted by “H” were observed in both of the specimens. As the HAp peaks were comparatively broader than those of a normal HAp specimen, it was concluded that the HAp crystals grown had low crystallinity or small crystallite size.

Figure 3.31 shows the microstructures of the HAp and HAp/ChS specimens. For the HAp specimen, the shape of HAp crystals was a characteristic needle type and their size and aspect ratio were around $75\text{ nm} \times 10\text{ nm}$ and 8, respectively, as shown in Fig. 3.31(a). However, for the HAp/ChS specimen, large numbers of HAp crystals were formed on ChS (around $150\text{ nm} \times 50\text{ nm}$ in size) templates and their shape was changed to small plate type; their size and aspect ratio decreased to around $12\text{ nm} \times 6\text{ nm}$ and 2, respectively, as shown in Fig. 3.31(b).

Figure 3.32 shows the FT-IR spectra for the ChS, HAp/ChS, and HAp specimens. For the HAp and HAp/ChS specimens, the stretching mode of PO_4^{3-} ion was detected at around 1038, 963, 602, and 565 cm^{-1} in both of the specimens. Further, two stretching modes and an out-of-plane mode for CO_3^{2-} ion

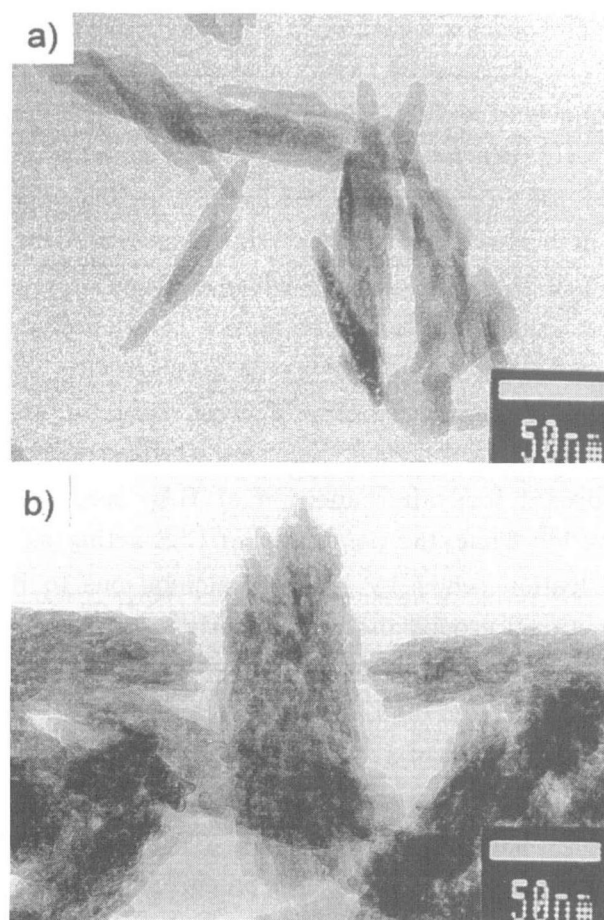


Fig. 3.32 Microstructures of the (a) HAp and (b) 60HAp/40ChS (in wt%) specimens.

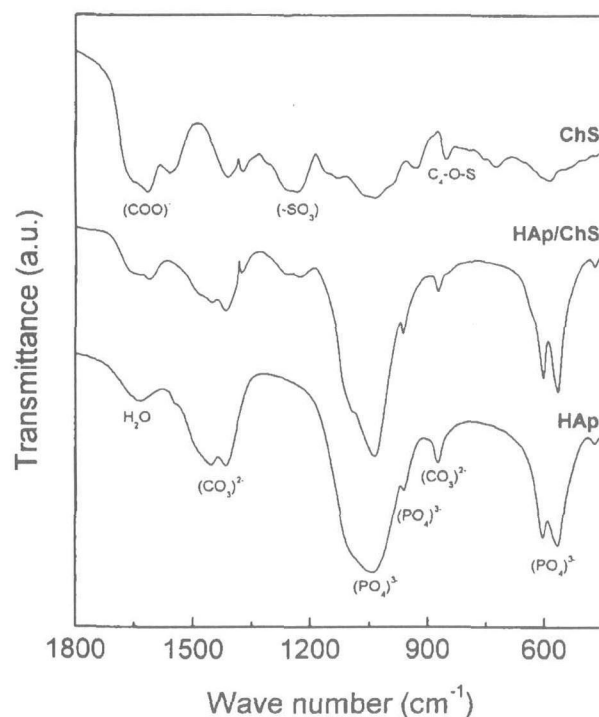


Fig. 3.33 Diffuse reflectance FT-IR spectra for the HAp, 60HAp/40ChS (in wt %) and ChS specimens.

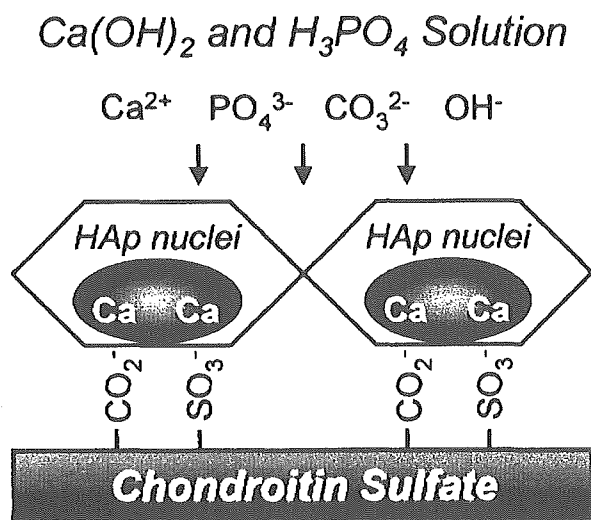


Fig. 3.34 Schematic illustration of the nucleation and growth of HAp crystals regulated by ChS templates.

were also observed at around 1454, 1419, and 875 cm^{-1} , respectively. This means that the PO_4 sites of the HAp structure, i.e., B-sites, were partly substituted by carbonate ions.⁴²⁾ Therefore, the HAp crystals synthesized without and with ChS, respectively, were identified as carbonate-containing hydroxyapatites.

For the ChS specimen, the asymmetrical stretching modes of COO^- and $-\text{SO}_3^-$ ions were detected at around 1632 and 1234 cm^{-1} , respectively. After formation of HAp crystals on ChS templates, however, they were detected at around 1613 and 1228, respectively; i.e., they showed red chemical shifts. Therefore, chemical interactions occurred between the HAp crystals and the functional groups of the ChS templates during the precipitation. From the results, it can be presumed that the limited crystal growth of HAp on ChS templates was critically dependent on the chemical interactions between the HAp crystals and the functional groups of the ChS templates. For an explanation of the limited crystal growth of the HAp observed in this work, the nucleation model based on the binding of calcium ions to the functional groups of ChS templates is believed to be appropriate, as Ca ion binding is believed to be an initial step in the formation of calcium phosphates.⁴³⁻⁴⁸⁾

Negatively charged carboxylate and sulfate groups on a ChS template will chelate calcium ions

in a calcium and phosphate solution and form a Ca-ChS complex. Then a cluster with a critical size can be formed by adsorbing calcium, phosphate, carbonate, and hydroxyl ions on the Ca-ChS complex three-dimensionally and it may act as a nucleus for HAp crystal growth, as schematically shown in Fig. 3.33. After nucleation, the HAp crystals can grow spontaneously, but limited in size because of the regulation of the functional groups of the ChS templates (Fig. 3.32) and because of steric hindrance by adjacent HAp crystals (Fig. 3.31(b)). However, the HAp crystals precipitated without ChS templates can grow normally because there is no limitation on growth (Fig. 3.31(a)). The results suggest that the nucleation and growth of HAp crystals might be regulated by the functional groups of ChS templates. It is noted that previous assertions of the inhibitory effect of ChS on the nucleation and growth of HAp crystals in vitro by simply binding Ca ions,³⁸⁻⁴⁰⁾ interfering with the diffusion rate of calcium and phosphate ions,⁴¹⁾ or covering the active growth sites of HAp seed crystals³⁷⁾ are not sufficient for describing the nucleation and limited growth of HAp crystals on ChS templates. From direct microstructural observation and the chemical shifts in this work, it can be concluded that ChS does not have an inhibitory effect on the nucleation of HAp itself but regulates nucleation and growth of HAp crystals, which results in limited crystal growth of HAp.

3. 3. 4 Conclusions

The inhibitory effect of chondroitin sulfate on the crystal growth of hydroxyapatite was investigated. The precipitation of HAp crystals was regulated by the functional groups of ChS templates and brought about a decrease in the HAp crystal size compared with that of HAp precipitated without ChS. The limited crystal growth of HAp is believed to occur through nucleation and growth regulated by ChS templates following steric hindrance by adjacent crystals.

Acknowledgment

We thank Seikagaku Kogyo Co. for donating the

chondroitin sulfate.

参考文献

- 1) Tetsuya Tateishi and Takashi Ushida : Tissue Engineering and Mechanical Stimulation, Material Integration, 13 (2000) 27-32
- 2) J. Buckealter et al., The American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1987 p465-482
- 3) 浅島誠, 岩田博夫, 上田実, 中辻憲夫編: 再生医学と生命科学, 共立出版, 2000
- 4) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明編: 骨の科学, 医歯薬出版, 東京, 1985
- 5) J.E. Scott, J. Anat., 187, 259-269 (1995)
- 6) C.A.W. Andrew, E. Khor and G.W. Hastings, J. Biomed. Mater. Res. 41 (4) 541-548 (1998)
- 7) 4章参照
- 8) Irving and William, J.Chem.Soc. 3192 (1953)
- 9) J.C. Elliott, "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates" ed. by J.C. Elliott, Elsevier Press, Amsterdam, chapter. 3 (1994).
- 10) K. Mosbach, Ed., Methods in Enzymology, 135, Academic Press, New York, 1987
- 11) S. Kawamura et al., Acta Orthop. Scand., 69, 74-80 (1998)
- 12) M. Honda, T. Yada M. Ueda, K. Kimata, Biomaterials, 17, 767-775 (2000)
- 13) T. Ushida and T. Tateishi : Incorporation of Physical factors into tissue engineering, Tissue Engineering for Therapeutic Use 1, (ed. Y. Ikada) Elsevier p 139-148 (1998)
- 14) C.A. Vacanti, R. Langer, B. Schloo, J.P. Vacanti, Plast. Reconstr. Surg., 88, 753-759 (1991)
- 15) K. Ito, T. Fujisato, Y. Ikada, Mater. Res. Soc. Symp. Proc., 252, 359 (1992)
- 16) T. Fujisato, T. Sajiki, Q. Liu, Y. Ikada, Biomaterials, 17, 155-162 (1996)
- 17) Temenoff JS, Mikos AG., Biomaterials, 21, 431-40 (2000).
- 18) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 260, 920-6 (1993).
- 19) For example, Burg KJ, Holder WD, Culbertson CR, Beiler RJ, Greene KG, Loeb sack AB, Roland WD, Eiselt P, Mooney DJ, Halberstadt CR, J Biomed Mater Res 51, 642-9 (2000).
- 20) Gugala Z, Gogolewski S. *In vitro* growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. J Biomed Mater Res 49, 183-91 (2000).
- 21) Chen G, Ushida T, Tateishi T. Hybrid biomaterials for tissue engineering: A preparative method for PLA or PLGA-collagen hybrid sponges. Adv Mater 12, 455-7 (2000).
- 22) Olde Damink LHH, Dijkstra PJ, van Luyn JA, van Wachem PB, Nieuwenhuis P, Feijen J. Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials. J Mater Sci Mater Med 6, 460-72 (1995).
- 23) Denuziere A, Ferrie D, Damour O, Domard A. Chitosan - chondroitin sulfate and chitosan - hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. Biomaterials 19, 1275-85 (1998).
- 24) Sintov A, Di-Capua N, Rubinstein A. Cross-linked chondroitin sulphate: characterization for drug delivery purposes. Biomaterials 16, 473-8 (1995).
- 25) Tomihara K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. J Biomed Mater Res 37, 243-51 (1997).
- 26) Taguchi T, Tanaka J, A novel in situ preparation method of hyaluronic acid-collagen composite matrices for cartilage regeneration, J Biomed Mater Res, submitted.
- 27) Tsuchida E, Formation of polyelectrolyte complexes and their structures. J Macromol Sci Pure Appl Chem A31, 1-15 (1994).
- 28) Dumitriu S, Chornet E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complexes. Adv Drug Deliv Reviews 31, 223-46 (1998).
- 29) Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. Bioconjugate Chem 6, 123-30 (1995).
- 30) Yannas IV, Orgill DP, Skrabut EM, Murphy GF. Synthesis and characterization of model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. Proc Natl Acad Sci USA 86, 933-7 (1989).
- 31) G. K. Hunter, K. S. Wong, and J. J. Kim, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 260 [1] 161-67 (1988).
- 32) D. S. Howell, J. C. Pita, J. F. Marquez, and R. A. Gatter, *J. Clin. Invest.*, 48, 630-41 (1969).
- 33) L. A. Cuervo, J. C. Pitta, and D. S. Howell, "Inhibition of Calcium Phosphate Mineral Growth by Proteoglycan

- Aggregate Fractions in a Synthetic Lymph," *Calcif. Tissue Res.*, 13, 1-10 (1973).
- 34) H. Muir and T. E. Hardingham, "Structure of Proteoglycans"; pp. 153-221 in *Biochemistry of Carbohydrates*, Vol. 5. Edited by W. J. Whelan. Butterworth/ University Park Press, Baltimore, MD, 1975.
- 35) L. Rosenberg, "Structure of Cartilage Proteoglycans"; pp. 105-27 in *Dynamics of Connective Tissue Macromolecules*. Edited by P. M. C. Burleigh and A. R. Poole. North-Holland, New York, 1975. U. Lindahl and M. Höök, "Glycosaminoglycans and Their Binding to Biological Macromolecules," *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 385-417 (1978).
- 36) C.-C. Chen, A. L. Boskey, and L. C. Rosenberg, "The Inhibitory Effect of Cartilage Proteoglycans on Hydroxyapatite Growth," *Calcif. Tissue Int.*, 36, 285-90 (1984).
- 37) D. D. Dziewiatkowski, "Binding of Calcium by Proteoglycans In Vitro," *Calcif. Tissue Int.*, 40, 265-69 (1987).
- 38) A. Hesse, H. Wurzel, G. Krampitz, and W. Vahlensieck, "Experimental Determination of the Kinetics of Calcium-Binding with Chondroitin Sulphate and the Effects of Uric Acid on This Process," *Urol. Res.*, 15, 93-97 (1987).
- 39) G. Embery, S. Rees, R. Hall, K. Rose, R. Waddington, and P. Shellis, "Calcium-and Hydroxyapatite Binding Properties of Glucuronic Acid Rich and Iduronic Acid Rich Glycosaminoglycans and Proteoglycans," *Eur. J. Oral Sci.*, 106, 267-73 (1998).
- 40) C.-C. Chen and A. L. Boskey, "Mechanism of Proteoglycan Inhibition of Hydroxyapatite Growth," *Calcif. Tissue Int.*, 37, 395-400 (1985).
- 41) Y. Suetsugu, I. Shimoya, and J. Tanaka, "Configuration of Carbonate Ions in Apatite Structure Determined by Polarized Infrared Spectroscopy," *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 [3] 746-48 (1998).
- 42) S.-H. Rhee and J. Tanaka, "Hydroxyapatite Coating on a Collagen Membrane with a Biomimetic Method," *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 [11] 3029-31 (1998).
- 43) M. Tanahashi and T. Matsuda, "Surface Functional Group Dependence on Apatite Formation on Self-Assembled Monolayers in a Simulated Body Fluid," *J. Biomed. Mater. Res.*, 34, 305-15 (1997).
- 44) A. L. Boskey and A. S. Posner, "The Role of Synthetic and Bone Extracted Ca-Phospholipid-PO₄ Complexes in Hydroxyapatite Formation," *Calcif. Tissue Res.*, 23, 251-58 (1977).
- 45) S. Weiner, "Organization of Extracellularly Mineralized Tissues: A Comparative Study of Biological Crystal Growth," *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 20, 365-408 (1986).
- 46) A. Linde, A. Lussi, and M. A. Crenshaw, "Mineral Induction by Immobilized Polyanionic Proteins," *Calcif. Tissue Int.*, 44, 286-95 (1989).
- 47) S. Shimabayashi, N. Hashimoto, and T. Uno, "Effect of Phosphorylated Cellulose and Bovine Serum Albumin on Crystallization of Hydroxyapatite," *Phosphorous Res. Bull.*, 3, 7-12 (1993). M

第4章 骨周囲組織系材料の開発

4.1 キトサン-ハイドロキシアパタイト複合体に関する研究

一般に人工素材を生体内に埋入すると、生体防御反応によってその物質を生体組織から隔離しようとする。この異物反応を示さない生体親和性が良好な材料としてハイドロキシアパタイト (HAp) が知られており、骨代替材料として利用されている。一方、キトサンは生体親和性が良い生体内分解性の材料であり、様々な生理活性 (治癒促進効果など) や抗菌性を示すことが知られている。このキトサンは、セルロース類似の分子構造をもち、耐熱性に優れていてオートクレーブ滅菌が可能であることから、実用的な医用材料として期待されている。

本研究では、リン酸カルシウム化合物とキトサンを複合化することにより、骨伝導能と生分解性をあわせ持つ新規医用材料の設計・開発を試みた。とりわけ微細構造の設計・構築においては、有機物と無機物を分子レベルで配列する必要があるため、有機-無機相互作用について解析評価を行った。また、医用材料としての応用の可能性を調査するために力学強度試験、動物試験による評価を行った。

4.1.1 キトサン-ハイドロキシアパタイト複合体の合成

まず、キトサンを希薄有機酸水溶液に溶解しキトサン水溶液を得た。これにリン酸水溶液を加え、キトサン-リン酸混合水溶液 (酸性溶液) を得た。こうして得られたキトサン-リン酸混合水溶液を水酸化カルシウム懸濁液 (塩基性溶液) 中に強攪拌下で滴下した。この時、反応場の pH が9になるまで滴下した。キトサンはアルカリ条件下で不溶性になるためキトサンの析出がおこる。それと同時にリン酸と水酸化カルシウムが反応し、HAp を生成するため、キトサン-HAp 複合体の沈殿物を生じる。こうして得られた沈殿物を吸引ろ過し、蒸留水で洗浄することにより酢酸塩などの不要物を除去した。さらに、30MPa、48時間の圧縮脱水成形により、Fig.4.1に示すようなキトサン-HAp 複合体の固形物を得た。

4.1.2 キトサン-ハイドロキシアパタイト複合体の評価

4.1.2.1 有機酸の効果

キトサンは分子間及び分子内水素結合により安定化しているため水溶性を示さないが、希薄な有機酸水溶液には容易に溶解することが知られている。したがって、上記合成法に示す通り、一度キトサンを有機酸水溶液に溶解する必要がある。ところが、有機酸の種類によっては HAp の生成を促進したり、阻害したりする効果があることが指摘されている¹⁾。そこで、まず有機種の選定を行った。

キトサンを溶解するために乳酸、酢酸、リンゴ酸、クエン酸を用いて作成したキトサン-HAp 複合体の粉末 X 線回折 (XRD) パターンを Fig.4.2に示す。その結果、乳酸、酢酸を用いたものについては低結晶性 HAp の構造による回折パターンを示したが、リンゴ酸、クエン酸を用いたものについては、HAp の構造による回折パターンを確認することができなかった。副生成物として得られる酢酸カルシウムの水溶性が高く水洗による除去が容易なことから、今回の研究ではキトサン溶解有機酸として酢酸を用いることにした。

4.1.2.2 キトサン/HAp 組成比の効果

上記合成法においては、キトサン/HAp 組成比を制御することは容易である。実際に、キトサン/HAp=75/25, 50/50, 25/75の組成比の複合体を作成し、示差熱・熱重量分析 (DTA-TG) から組成を確認したところ、バッチ組成と良い一致を示した。また、組成比の異なる

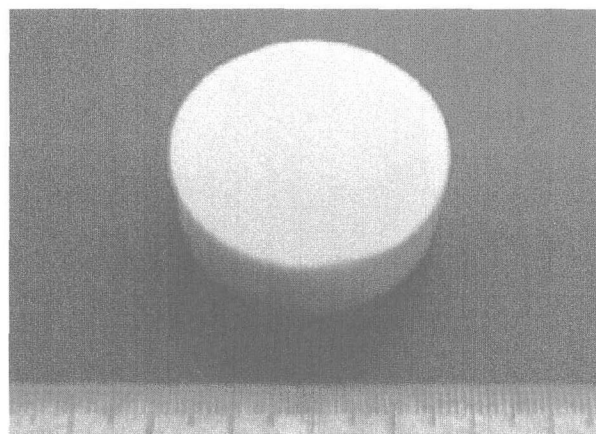


Fig. 4.1 Photographs of 50/50 chitosan/HAp compressed composite.

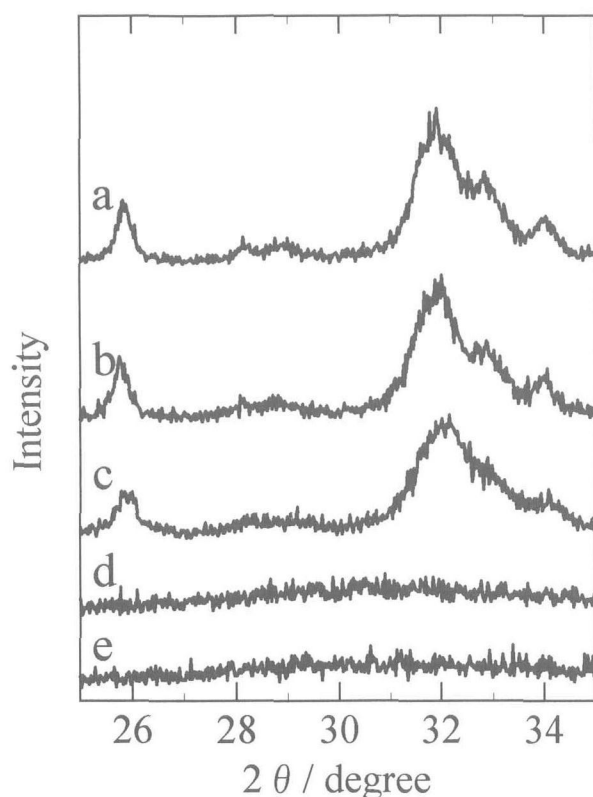


Fig. 4.2 XRD patterns of a pure HAp (a), and chitosan/HAp composites prepared using chitosan dissolved in aqueous solutions containing respectively acetic acid (b), lactic acid (c), malic acid (d) and citric acid (e).

る複合体の XRD パターンは、すべての組成領域において HAp の構造による回折パターンを示した。ただ、キトサン含有量が 50wt % 以上では、キトサンの構造による回折パターンも確認された。このことから、キトサン含有量が 50wt % 以下においては、キトサン分子が非常に良く分散しておりキトサン分子同士の相互作用が小さいと推測される。さらに、詳細な検討を行うために、ゼータ電位の測定を行った。ゼータ電位と組成の関係を Fig.4.3 に示す。キトサン含有量が増えるに従い、ゼータ電位が 0 に近づくことがわかる。これは、キトサンが HAp の負電荷を打ち消すために起こると考えられる。そして、キトサン含有量が 25wt % を超えた辺りでその傾向がなくなることから、HAp 粒子の周囲をキトサンが覆い尽くしたと推測することができる。それ以降に加えられるキトサンについては、複合体よりもむしろキトサンの物性を示すと考えられる。

4. 1. 2. 3 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察
キトサン-HAp 複合体の TEM 像及び電子線回折像を Fig.4.4 に示す。長径 30nm、短径 5 nm 程度の HAp 微粒子が確認できる。これらは集まって長径 200~300

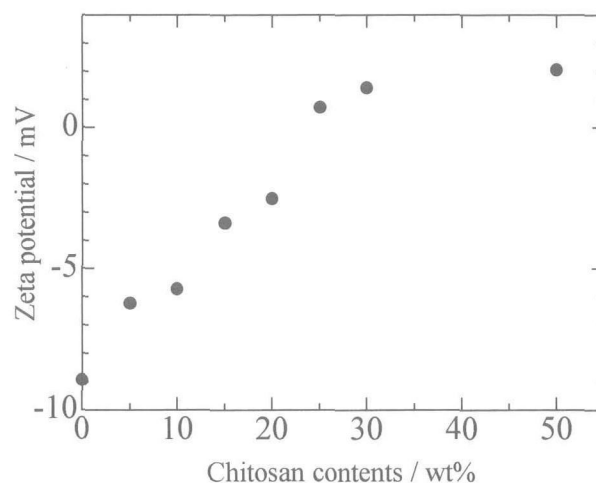


Fig. 4.3 The zeta potential of various chitosan contents.

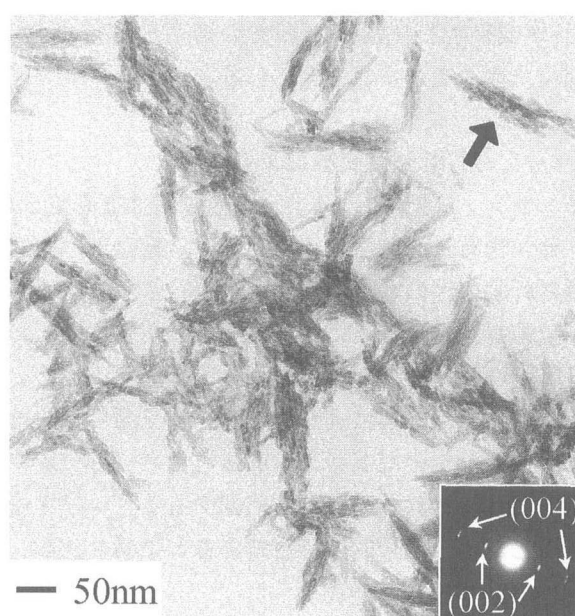


Fig. 4.4 TEM images and diffraction pattern of chitosan/HAp composite of 50/50

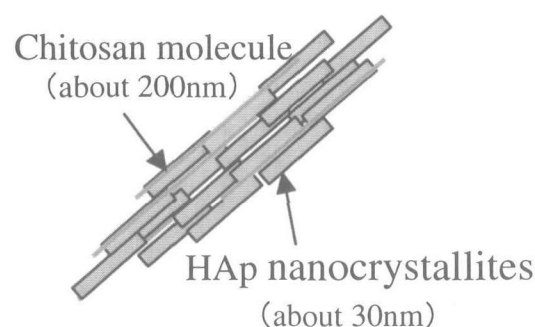


Fig. 4.5 Images of chitosan/HAp composite.

nm、短径 30~50nm の楕円凝集体を形成している。この凝集体のひとつについて電子線回折像をとると、三日月型の回折パターンを示した。これは、HAp 微粒子が一方向に配列していることを示すものであり²⁾、この

パターンは生体骨の回折パターンと類似したものであることが知られている。このことから、微細領域においては骨類似構造を有していると考えられる。この楕円凝集体の微細構造を解明するために、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) を用いてキトサンの分子量分布を測定したところ、平均分子量 9.4×10^4 Da を得た。この平均分子量から計算されるキトサンの分子長は 280 nm であり³⁾、楕円凝集体の長径と良い一致を示した。このことから、キトサン-HAp 複合体の楕円凝集体の構造は、キトサン分子の周りに HAp が規則正しく一軸方向に配列した構造を有していると考えられる (Fig. 4-5)。このような構造を形成するには、キトサン-HAp 間の相互作用が必要であり、おそらくは、キトサンにカルシウムイオンが方向性をもって配位した状態から HAp が成長するために、HAp の結晶方位が一方向に配列した構造をとると考えられる。

4. 1. 2. 4 強度試験による評価

キトサン-HAp 複合体の三点曲げ強度を測定した。キトサン含有量が増加するに従って、高分子の物性が強調され柔軟性の増加が確認された。さらに、 120°C 、20 分の水熱処理 (オートクレーブ滅菌条件) において、飛躍的な柔軟性の向上が確認された (Fig. 4.6)。おそらくは、水熱処理によりキトサン分子間の水素結合が増加したためだと考えられる⁴⁾。ただ、FT-IR による測定では、それらの変化を確認することができなかったことから、部分的な結合であると推測される。

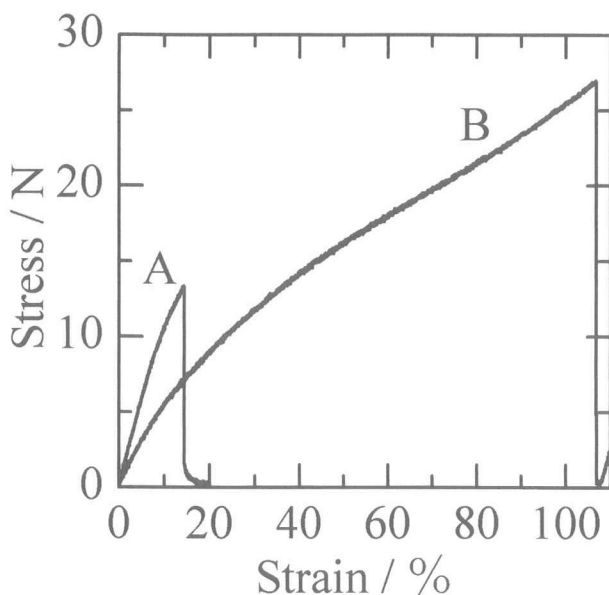


Fig. 4.6 The stress-strain curve for chitosan/HAp=50/50 with (A) no heat treatment and (B) steam treatment.

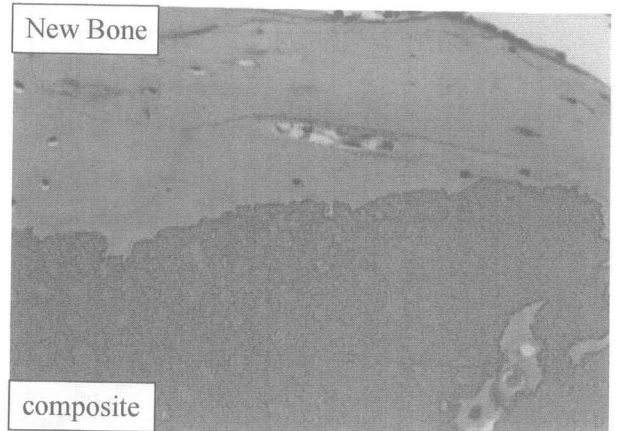


Fig. 4.7 The chitosan/HAp composites with 50/50 (in bone marrow, 4 weeks, hematoxylin and eosin stain).

4. 1. 2. 5 動物試験による評価

キトサン-HAp 複合体をラットの大腿骨内に埋入した。4 週後、摘出し組織を観察した結果を Fig. 4.7 に示す。キトサン-HAp 複合体の周囲には、特に炎症を示すことなく新生骨の形成が確認された。また、最表面には凹凸ができており、分解速度までは明確でないが、少なくとも生体内分解性を示していることがわかる。このことから、この複合体は骨伝導能と生体内分解性をあわせ持つ材料であることが確認できる。キチン・キトサン系材料は、活性が強すぎるにより炎症を引き起こす例があることが報告されているが、HAp と複合化することにより、そのような効果を抑制できている可能性がある。

これらの特性から、本材料は非荷重部における骨充填材としての用途が考えられる。特に、成形性のよさから頭蓋骨のバーホール充填材としての用途があげられる。

4. 2 交互浸漬法を用いた靱帯・腱の HAp 処理に関する研究

現在主流の靱帯・腱の再建術は、自家靱帯・腱を損傷部位に移植する方法である。ポリエステルメッシュを使った Leeds-Keio 靱帯による再建術も行われているが、再手術の場合など限定的である⁵⁾。靱帯・腱 (軟組織) は骨 (硬組織) と接合している材料であるため、靱帯・腱の再建には、軟組織と硬組織を接合する技術が必要である。現在は、骨トンネル内を通してボタンやスクリューで固定する方法がとられているが、トンネル付近での靱帯・腱の再断裂、骨トンネルの拡大が報告されている⁶⁾。原因として接着強度、接着速度の不十分さがあげられ、改善策が求められている。逆に骨

と接合しない部位については、柔軟性を失ってはならない。そこで、本研究では骨と接合する部位にだけ HAp を導入することにより、接着強度および接着速度の改善を試みた。接着強度が重要であるため、剥がれ落ちやすい単なるコーティングでなく、靱帯・腱の表面及び内部に相互作用を持って結合していることが望ましい。そこで、微細構造を評価することにより複合化の状態を検討した。また、医用材料としての応用の可能性を調査するために、現在の術式に添った形での動物試験による評価を行った。

4. 2. 1 靱帯・腱-HAp 複合体の合成

①塩化カルシウム水溶液、②蒸留水、③リン酸 2 水素ナトリウム水溶液、④蒸留水 に靱帯・腱を順に浸漬することによりその表面及び内部に HAp を生成した⁷⁾。文献にならって、浸漬温度を 37°C、浸漬時間を各溶液につき 30 分とした。①～④の溶液に浸漬する操作を 1 サイクルとし、いくつかのサイクル数について合成を行った。

4. 2. 2 靱帯・腱-HAp 複合体の評価

4. 2. 2. 1 複合化領域の評価

交互浸漬法により靱帯・腱をアパタイト処理したサンプルについて、線分析を行った。浸漬回数 7 回のを Fig.4.8 に示す。カルシウム、リンともに表面部分に最も多く分布しているが、表面だけでなく内部まで分布していることがわかる。浸漬回数が増えるに従って、HAp 生成量が増え、内部まで複合化されることが確認された。7 回浸漬したものについては、表面から約 500 μ m 内部までカルシウムおよびリンが分布している。この複合化領域を TEM で観察したところ、HAp 粒子が観察された (Fig.4.9)。靱帯・腱の構造は、長軸

に沿ってコラーゲンが一軸配向した構造体であることが知られている⁸⁾。複合化した靱帯・腱をコラーゲン繊維と平行な面で観察すると、電子線回折像から HAp 微粒子の結晶方位 (C 軸) が一方向に配向していることが確認された。対して、コラーゲン繊維と垂直な面で見ると、HAp 微粒子の配向性は確認できなかった。このことから、HAp 粒子は、靱帯・腱の成分であるコラーゲンと相互作用を持って結合し、コラーゲン繊維と平行に配列していると考えられる。

4. 2. 2. 2 動物試験による評価

靱帯・腱の一端のみを交互浸漬することにより、骨との接合部位のみ HAp を析出させ、ビーグル犬骨トンネル内に埋入した。4 週後、摘出し組織を観察した結

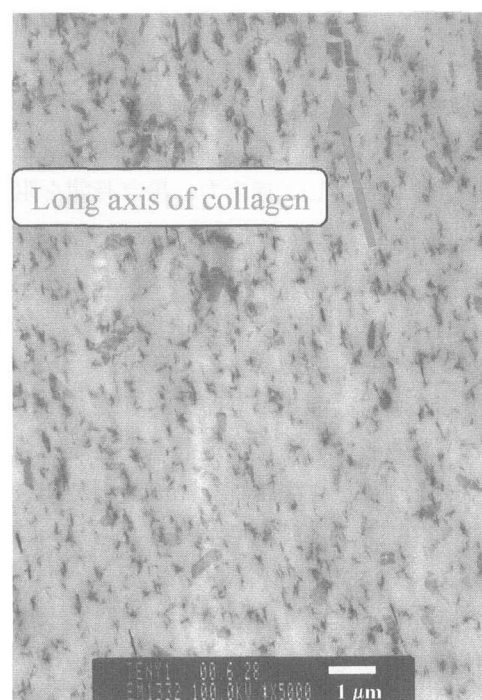


Fig. 4.9 TEM images of tendon/HAp composite.

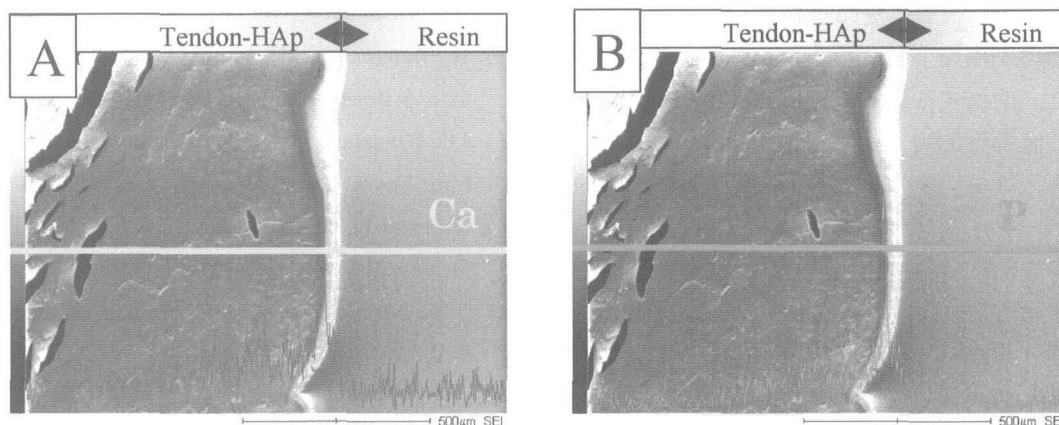


Fig. 4.8 The line scan of Tendon-HAp composite (A) calcium (B) phosphorous.

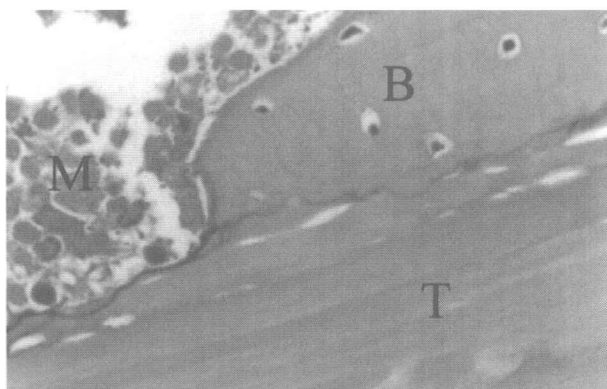


Fig. 4.10 The tendon/HAp composites with 7 times alternate soaking (in bone marrow, 4 weeks, hematoxylin and eosin stain). (T): Tendon, (B): New bone, (M): Bone marrow cell

果を Fig.4.10に示す。処理された靱帯・腱の周囲は、特に炎症を示すことなく靱帯・腱に直接接合した新生骨の形成が確認できた。HAp 処理を行わず骨トンネル内に埋入したものについては、靱帯・腱と新生骨の間に繊維性組織が介在し、接合力、接合時間を阻害すると言われている。このことを考えると、今回の結果は、靱帯再建術において良い効果を示したといえる。

4. 2. 2. 3 医学応用へのアプローチ

交互浸漬法を自家組織の処理に応用するにあたって、溶液の pH を体液に近い7.4, 洗浄液を生理食塩水, 各溶液の浸透圧を生理食塩水 (290mmHg) に改善した。ただ、この方法を手術現場で利用する場合、腱・靱帯をカルシウムイオン含有水溶液に浸漬し、次いで生理食塩水で洗浄し、更にリン酸イオンを含む水溶液に浸漬する操作を手動で行うことになる。しかし、この方法では、手術時間が長くなり、複合化を行う人員が必要になるなどの不都合がある。そこで、Fig.4.11のような、自動的に複合化を行える装置を設計・開発した。その結果、自動的に複合化を行うため非常に容易に改質でき、手術の効率を下げることなく処理することが可能になった。使用する改質用材料はきわめて安全であり、すべて医薬添加物として認可されている材料を用いた。また、コーティングシステムに使われる接続チューブ・コーティングパックは、医療用に認可された塩化ビニルを使用し、溶液用パックは医療用点滴パックを使用することにより、接続操作は、従来の点滴接続操作と同一となり、一度の使用で廃棄することができるため医療事故を起こす危険性を回避できる。

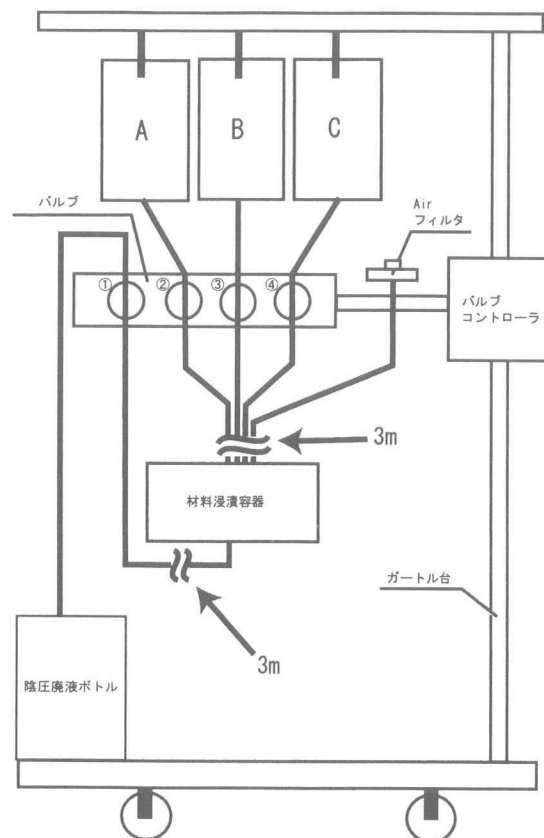


Fig. 4.11 The automatic alternate soaking system for medical treatment.

参考文献

- 1) S.H. Rhee and J. Tanaka, Biomaterials 20, 2155 (1999)
- 2) S.H. Rhee and J. Tanaka, J. Am. Ceram. Soc 83(8), 2100 (2000)
- 3) K. Ogawa, S. Hirano, T. Miyanishi, T. Yui and T. Watanabe, Macromolecules 17, 973 (1984)
- 4) Y.L. Lee, E. Khor and C.E. Ling, J Biomed Mater Res (Appl Biomater) 48, 111 (1999)
- 5) H. Matsumoto, M. Kawakubo, T. Otani and K. Fujikawa, J Bone Joint Surg Br 81(1), 34 (1999)
- 6) J.C. L'Insalata, B. Klatt, F.H. Fu and C.D. Harner, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 5(4), 234 (1997)
- 7) T. Taguchi, A. Kishida and M. Akashi, J Biomater Sci Polym Ed 10(3), 331 (1999)
- 8) J. Kasteric, A. Galesk and E. Baer, Connect Tissue Res 6, 11 (1978)

第5章 その他の生体材料の開発

5.1 経皮デバイスを目的としたアパタイト・シリコン複合体の開発

5.1.1 緒言

一時的もしくは長期に及ぶ臓器不全に陥った患者は生命維持管理装置にて一命を取り留め、さらに社会復帰への足がかりとしている。人工心臓・人工腎臓・人工呼吸器等にみられるように、生体内外は人工材料を介してアクセスされ不要成分と必要成分との交換を行っている。このように経皮デバイスは臓器代替システムを機能させる上で重要な接点である。これまでに皮膚の貫入と連鎖的に惹起する感染が問題視され、その改善方法が検討されてきている。

我々はこの問題を克服するために、生体活性に優れたハイドロキシアパタイト (HAp) 焼結体を用い、シリコンなどのカテーテル用高分子基材と共有結合でコートする新しい方法を開発した¹⁾²⁾。

5.1.2 アパタイトの表面修飾

まず平均粒径 $2\ \mu\text{m}$ のアパタイト球状粒子 (旭光学社製) にシランカップリング剤 (γ -aminopropyltriethoxysilane, γ -APS) を無水トルエン中、120度で24時間還流して反応させた。このシランカップリング剤は末端にアミノ基をもつためアパタイト粒子にアミノ基を導入できる。アミノ基が導入されたことは図5.1の FT-IR スペクトルから確認される。600及び575 cm^{-1} に認められる吸収は HAp の $\nu_4\ \text{PO}_4^{3-}$ に帰属され、また963 cm^{-1} の吸収は $\nu_2\ \text{PO}_4^{3-}$ 、1100/1035 cm^{-1} の吸収は $\nu_3\ \text{PO}_4^{3-}$ に帰属される図5.1c に示した2928 cm^{-1} の吸収は C-H 伸縮振動に帰属され、1043 cm^{-1} の吸収はアパタイト表面に共有結合した Si-O 伸縮振動である。以上のことからアミノ基がアパタイト微粒子表面に共有結合で導入されたことがわかる。

アパタイト粒子へのアミノ基導入率は sulfo-succinimidyl-4-O-(4,4'-dimethoxytrityl)-butyrate (s-SDTB, PIERCE, IL, USA) を用いた分光学的方法から決定され、また比表面積は BET 法から測定された。アミノ基導入率は10.3 $\mu\text{mol/g}$ (SD=2.4, n=3) であり、未処理のアパタイト微粒子の比表面積は6.15 $\pm$ 0.08 m^2/g であった。この両者の値からアパタイト表面へのアミノ基導入率は1.0 nm^2 当たり約1分子と算出される。こ

れは、西澤らが報告したリン酸カルシウムセラミックスへのシランカップリング剤反応率³⁾と比較して、1/3から1/4の低い値である。この違いはアパタイト微粒子の表面構造の違いおよび導入率同定法の違いによるものであると考えられ、今後、さらに本手法を改良していく必要性を示している。

5.1.3 シリコン表面修飾

シリコンの表面修飾はコロナ放電処理によるアクリル酸グラフト法によって行われた⁴⁾。まずコロナ放電処理を施したシリコンシートを10wt%アクリル酸水溶液に浸漬し、脱気封管後、60度1時間反応させた。アクリル酸をグラフトしたシートを温水で十分に洗浄した後、乾燥させた。グラフト基材の同定は ATR FT-IR 法で行うことができ、材料表面へのカルボキシル基の導入が確認できる。

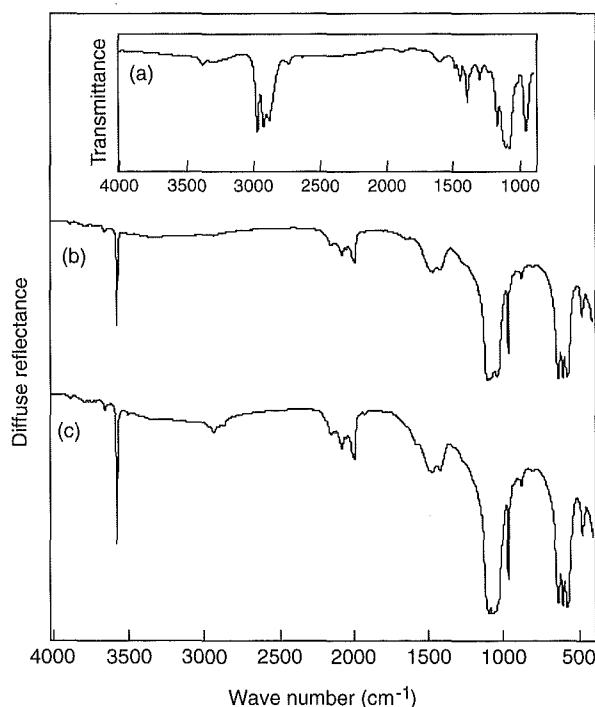


Fig. 5.1 FT-IR spectra of (a) γ -APS, (b) non-treated-HAp particles and (c) amino group-modified HAp particles.

5. 1. 4 アパタイトコーティングシリコン複合体の調製

アミノ基を導入したアパタイト粒子とカルボキシル基を導入したシリコンシート間の反応は固相反応法で行うことができる。アパタイト粒子を分散させた水溶液中にシリコンシートを浸漬し、1時間攪拌する。粒子が吸着したシリコンシートを十分に水洗し、180度、6時間、1 mmHg の条件下で加熱反応させ、両者を共有結合させたアパタイト・シリコン複合体を調製できる。

共有結合の存在は間接的に推定される。アクリル酸ホモポリマーと γ -APS をカルボジイミドを用いてカップリングさせた試料とアクリル酸ホモポリマーとアミノ基導入アパタイトを固相反応法を用いて結合させた試料を調製し、両者を FT-IR 法にて分析すると、図5.2の結果が得られる。1805/1755 cm^{-1} に酸無水物中のカルボキシル基に由来する吸収、また1700 cm^{-1} にフリーなカルボキシル基に由来する吸収が認められる。酸無水物は減圧・加熱条件下でアクリル酸側鎖間で脱水縮合して生成したと考えられる。アミド結合に由来するアミド I (1640 cm^{-1}) 及びアミド II (1560 cm^{-1}) の吸収が認められることから、アパタイト粒子とシリコンシートは共有結合で結合していると推察される。

5. 1. 5 複合体の外観

図5.3に走査型電子顕微鏡で観察したアパタイト・シリコン複合体の外観を示す。アパタイト微粒子は表面が変化することなくシート表面に固定され、その表面被覆率はおよそ65% (SD=6.3, n=3) である。また、

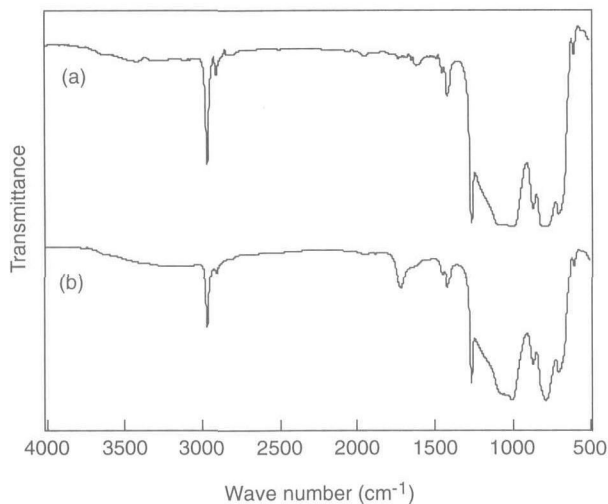


Fig. 5.2 FT-IR spectra of polyAAc-co- γ -APS prepared by (a) carbodiimide and (b) a heating product of a mixture of AAc homopolymer and amino group-modified HAp particles.

部分的に三次元的な凝集塊も観察される。これはアパタイト微粒子上のアミノ基が、アパタイト未処理表面と相互作用して吸着したものである。

以上のようにアミノ基を導入したアパタイト粒子とカルボキシル基を導入したシリコンシートを用いることにより、両者が共有結合で結合した界面を形成でき、安定なアパタイトコーティングが実現できる。本材料を成型加工することにより、皮膚との密着性に優れた生体親和性・経皮デバイスの創成が可能であると考えられる。

5. 2 ハイドロキシアパタイトとポリエチレングリコール界面で起こる有機無機相互作用

5. 2. 1 緒言

病気や怪我で損傷した骨を置換しその機能を代替する材料には、生体骨に類似した機械的性質を持つとともに、高い生体親和性を示すことが要求される。HApは、脊椎動物の歯や骨の主成分であり骨と直接強固な結合をつくる生体親和性の極めて高い物質である。しかし、HApは脆くて成形性に欠けるなどの問題点があるため、主に骨充填材や金属のコーティング材として使用されているにすぎない。

一方、有機高分子の中には柔軟性、成形性を有するものが存在する。しかしながら、有機高分子の殆どが

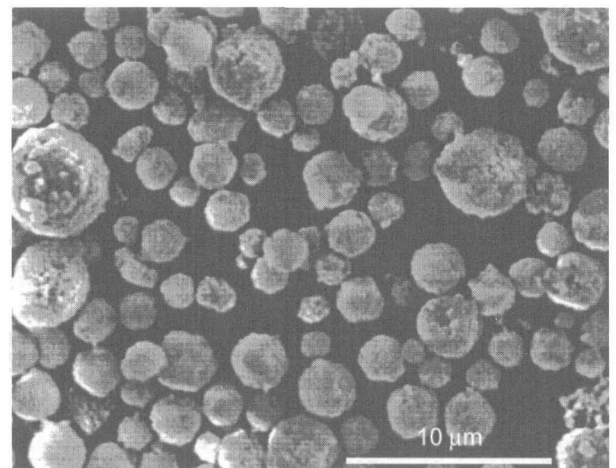


Fig. 5.3 SEM observation of a silicone material coated with HAp particles.

Table 5.1 Mixture ratio of HAp and PEG.

Sample name	Functional group	PEG (wt%)	HAp (wt%)
30PEGOH	OH	30	70
30PEGCOOH	COOH	30	70
40PEGCOOH	COOH	40	60
50PEGCOOH	COOH	50	50
70PEGCOOH	COOH	70	30

生体親和性を有していない。高い生体親和性を有し、さらに柔軟で成形性の良い骨置換材料を開発するためには、有機材料、無機材料のそれぞれの利点を生かしながら複合化する必要がある。

生体骨は有機材料と無機材料の利点を生かしながら複合化されている。HAp 表面のカルシウムとコラーゲンの官能基であるカルボキシル基の化学的相互作用により、約70wt%の HAp 微結晶が約30wt%の繊維状コラーゲン高分子の周りに規則正しく配向している。そのため優れた機械的強度を有している。この生体骨で起こる相互作用を解明すれば、有機材料と無機材料を複合化した新規骨置換材料を開発する指針になると予想される。本報では、無機材料として HAp, 有機材料として末端基が COOH, OH のポリエチレングリコール (PEG) を用い、有機-無機相互作用についてフーリエ変換赤外反射分光法 (FT-IR) および示差走査熱測定 (DSC), 走査型電子顕微鏡 (SEM) により検討した。

5. 2. 2 実験方法

表5.1に合成した試料の組成を示す。実験には、PEG (日本油脂社製, 末端基-COOH (M.W. 3000), -OH (M.W. 4000)) を用いた。70度に保持したラボプラストミル中に PEG を加え溶解させた。溶解した PEG に蒸留水を加え 3 分間, 50min^{-1} にて混練した。さらに, HAp 粉末を加え 10 分間, 50min^{-1} にて混練した。蒸留水は PEG と HAp の全重量に対して 10wt% とした。得られた試料を凍結乾燥し, その 2.5g に 15ml の蒸留水を添加し, 30 分間放置後, 濾過した。その試料を凍結乾燥し, フーリエ変換赤外反射分光法で解析した。フーリエ変換赤外反射分光法には, Perkin Elmer (株) 製 SPEC-TRUM 2000, フーリエ変換赤外反射分光光度計を用いて積算回数 100 回, 分解能 2cm^{-1} , 拡散反射法で測定した。示差走査熱測定には, SHIMADZU (株) 製 DSC 60, 示差走査熱測定装置を用いて昇温速度 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ で測定した。走査電子顕微鏡観察には, 試験片を金コーティングした後, TOPCOM (株) 製 ABT-32, 走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて加速電圧 15kV で観察した。

5. 2. 3 結果

図5.4に HAp, PEGCOOH, PEGOH 及び PEG/HAp 複合体の FT-IR スペクトルを示す。PEGCOOH では, 1752cm^{-1} にピークが検出された。これは二量体 (PEG-COOH/HOOC-PEG) の C=O 伸縮振動に帰属できる。PEGCOOH/HAp 複合体では, 1752cm^{-1} と 1590cm^{-1} にピークが検出された。前者は二量体の C=O 伸

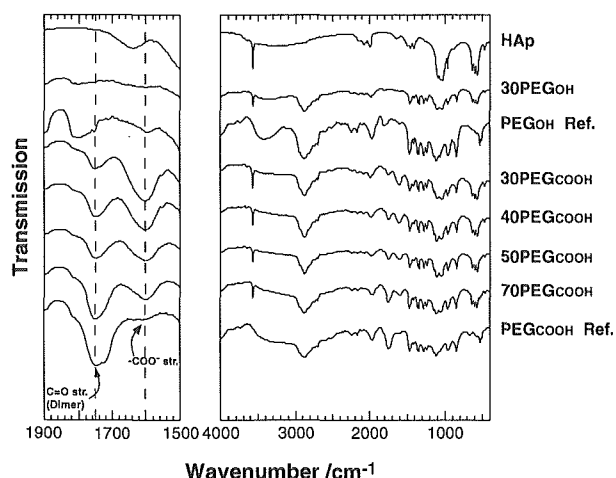


Fig. 5.4 FT-IR spectra of HAp, PEGCOOH, PEGOH and their composites.

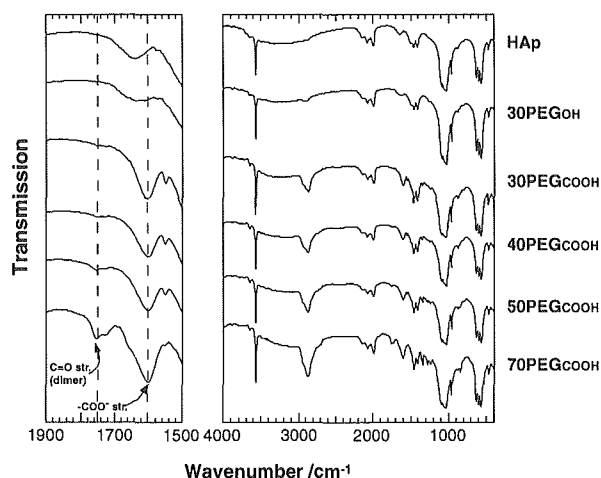


Fig. 5.5 FT-IR spectra of the composites after soaking in water for 30 minutes and filtering.

縮振動, 後者は COO-伸縮振動に帰属できる。二量体の C=O 伸縮振動のピーク強度を A, COO-伸縮振動のピーク強度を B とすると, A/B の値は HAp の添加量を増加させるに従い減少した。PEGOH では, 1799cm^{-1} にピークが検出された。これは C=O 伸縮振動 (単量体) に帰属できる。図5.5に蒸留水を加え濾過した PEG/HAp 複合体の FT-IR スペクトルを示す。50PEGCOOH 及び 70PEGCOOH では, 1750cm^{-1} に C=O 伸縮振動のピークが検出されたが, 40PEGCOOH 及び 30PEGCOOH では, 検出されなかった。すべての複合体で 1590cm^{-1} にピークが検出された。30PEGOH では, 洗浄後に PEGOH に期属できるピークは検出されなかった。図5.6に PEGCOOH 及び複合体の DSC 曲線を示す。PEGCOOH では, 51.2° にピークが検出された。70PEGCOOH では, 55.5° にピークが検出された。40

PEGCOOH 及び50PEGCOOH 及では、55.5度、59.0度にピークが検出された。30PEGCOOH では、55.5度にピークが検出された。HAp 添加量が増加するに従い融点は55.5度、59.0度と上昇した。PEGOH では、57.0度にピークが検出され、30PEGOH では、58.2度にピークが検出された。融点の上昇量は1.2度であった。

図5.7に複合体のSEM像を示す。30PEGCOOH では、HAp 表面全体に高分子が付着していた。30PEGOH では、表面に付着しているPEGOH と微細な粒子となってHAp 表面に付着しているPEGOH が存在した。

5. 2. 4 考察

PEGCOOH では HAp を添加すると末端にあるカルボキシル基の H^+ が解離し COO^- 基が形成され则认为

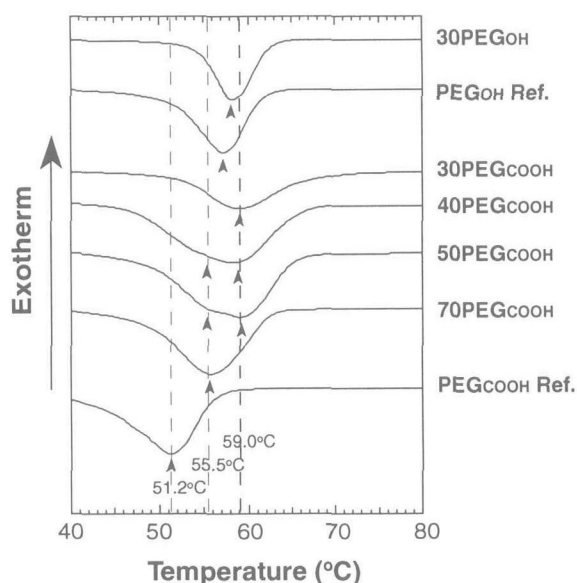


Fig. 5.6 DSC curves of the pure PEGCOOH, PEGOH and their composites.

られる。また、HAp の添加量が増えるに従い、 COO^- 基の割合は増加すると考えられる。さらに、FT-IR の結果からこの COO^- 基は HAp と相互作用していると考えられる。 COO^- 基が負電荷を有することを考えると正電荷を持つ HAp 表面に存在するカルシウムイオンに相互作用していることが予想される。この相互作用は水酸基よりも強いいため、蒸留水で洗浄後も COO^- 基末端をもつ PEG のみが HAp 表面に残存すると考えられる。

図5.8に PEGCOOH の3つの分子状態モデルを示す。図の(A)では、2つのカルボキシル基末端が両方とも近くの PEG 分子と2量体を形成している。(B)では、2つの末端のうち一方が2量体を形成し、もう一方は HAp 表面のカルシウムイオンと化学結合を形成している。さらに、(C)では、カルボキシル基末端は両方とも HAp 表面のカルシウムイオンと化学結合をつくっている。30PEGCOOH がもっとも融点が高いことから、カルボキシル基は2量体を形成するより COO^- 基を形成して HAp 表面のカルシウムイオンと結合した方が安定であると考えられる。つまり、複合体中のカルシウムイオ

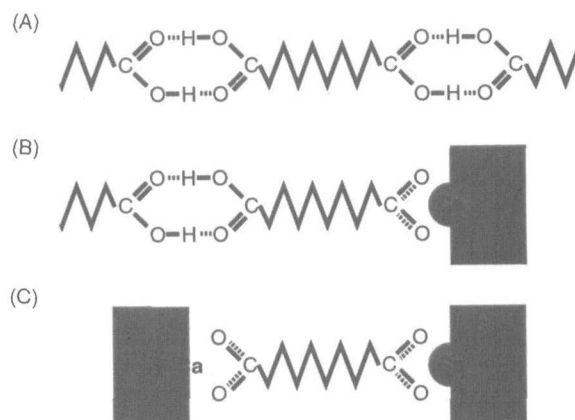


Fig. 5.8 Possible molecular states of PEGCOOH.

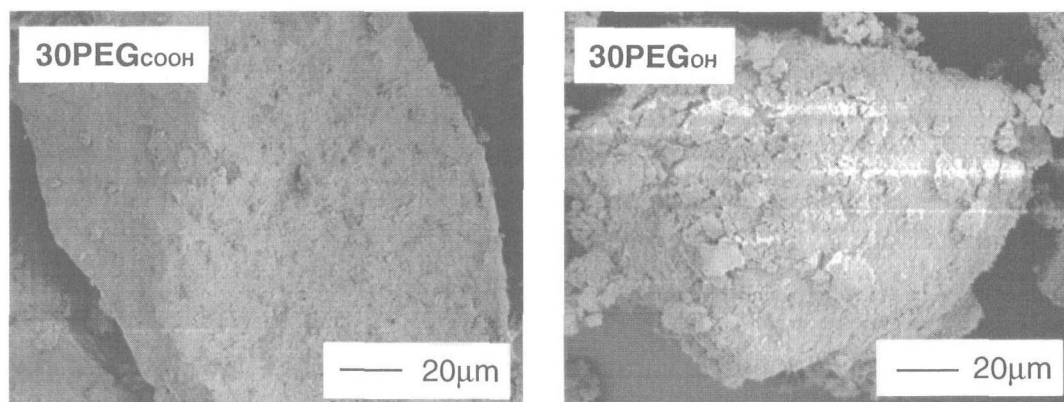


Fig. 5.7 SEM micrographs for the surfaces of 30PEGCOOH and 30PEGOH.

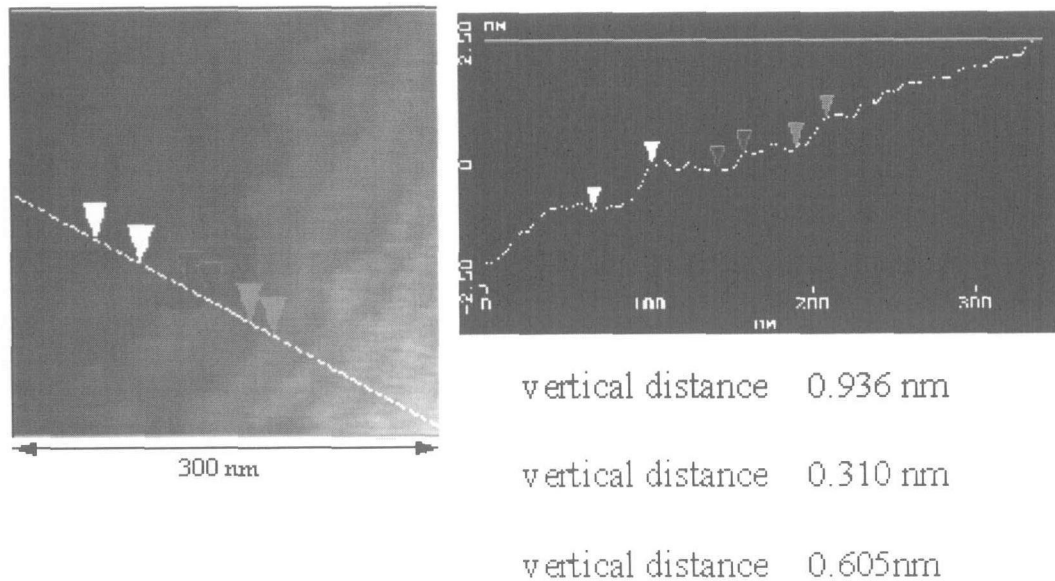


Fig. 5.9 AFM image and section analysis of HAp surface. The surface were etched for 1min by 8M-CH₃COOH aqueous solution.

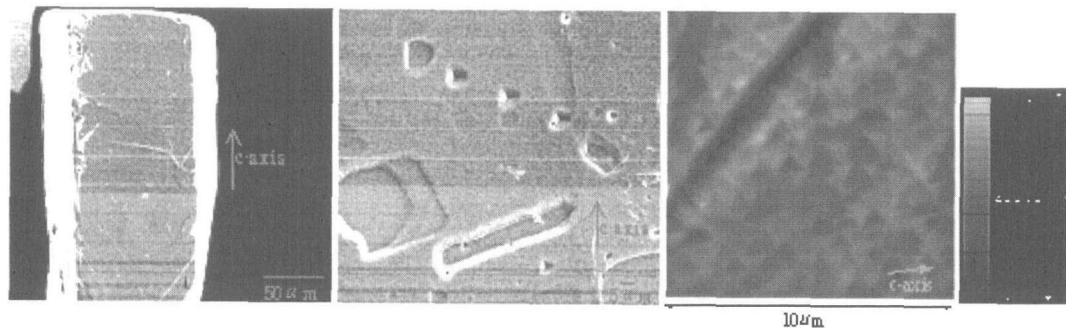


Fig. 5.10 SEM and AFM image of HAp surface. The surface were etched for 1min by 8M-CH₃COOH aqueous solution

ンの濃度(HAp 量)が高いと(C)の状態が多くなり融点が高くなるが、カルシウムイオンの濃度が低くなるにしたがい(B)から(A)の状態となり、HAp と PEG 間の相互作用が弱くなるために融点が低くなると考えられる。

5. 3 アパタイト単結晶の表面吸着に関する研究

5. 3. 1 緒言

病気や怪我で損傷した骨欠損部位を置換しその機能を代替する材料には、生体骨に類似した機械的性質と高い生体親和性を持つことが要求される。その生体骨代替材料は、埋入後、繊維性皮膜のカプセル化を起こすことなく骨組織と直接強固な結合を作ることが必要である。そのような材料として、リン酸カルシウムやバイオガラスのような生体活性セラミックスが知られている。HAp はリン酸カルシウムのひとつであり、脊椎動物の歯や骨の約70w%を占める無機成分である。歯や骨の残り約30w%は有機高分子であるコラーゲンであ

り、骨の中ではコラーゲンと HAp が相互作用し、硬組織特有の機械的強度を示すものと考えられている。この HAp とコラーゲン分子の相互作用を解明することができれば、無機材料と有機材料を複合化した新規生体材料を開発するための指針になると考えられる。

本研究では、モデル実験としてコラーゲンの代わりに同じ官能基を持つアラキジン酸(CH₃(CH₂)₁₈COOH)を用い、HAp とコラーゲンとの間で起きている相互作用について検討した。

5. 3. 2 実験方法

5. 3. 2. 1 試料のエッチング条件の検討

HAp の表面を制御するために、酢酸(CH₃COOH)による溶液エッチングを行った。エッチングは、溶液の中に試料をそのまま浸した状態で行った。濃度と時間を任意に振って、エッチング後、純水ですぐ洗浄し乾燥させた。その後、AFM(大気中コンタクトモード)により測定し条件を決定した。また、表面制御をした

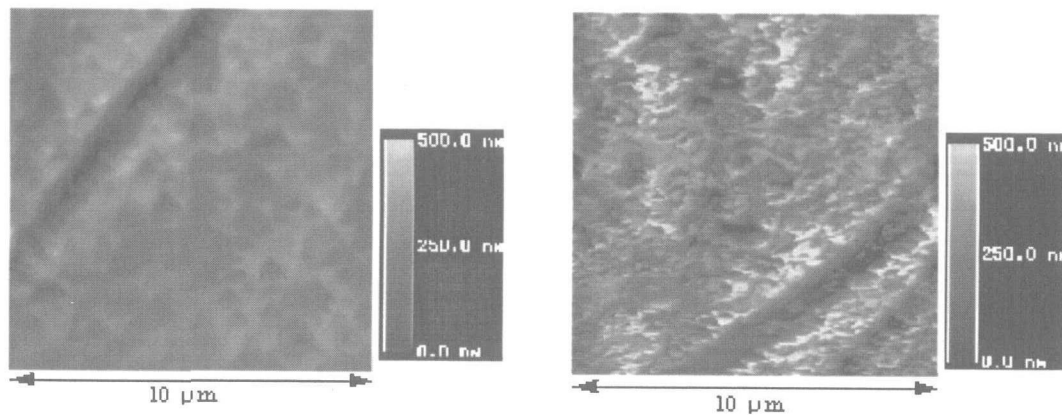


Fig. 5.11 The AFM image of arachidic acid accumulated on a HAp

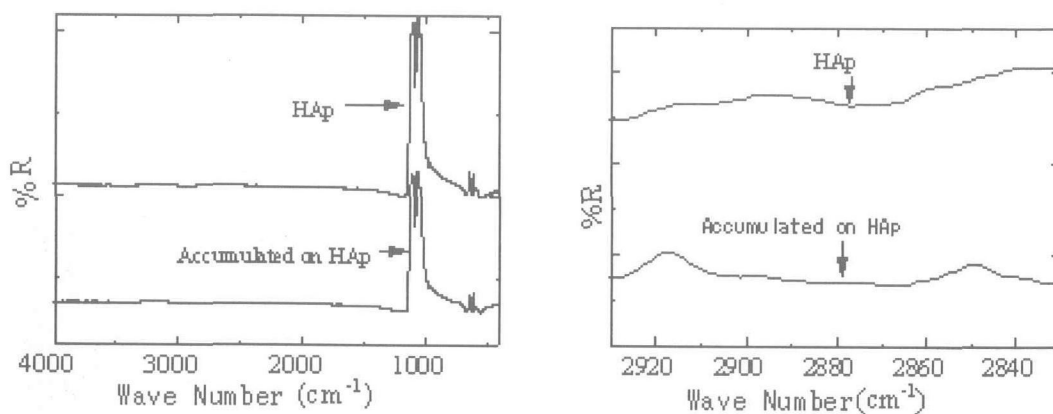


Fig. 5.12 FT-IR patterns of HAp and arachidic acid accumulated on a HAp

HAp 表面の原子イメージの測定を試みた。

5. 3. 2. 2 FT-IR 測定用試料の作成

AFM 測定用の試料ホルダーに HAp をのせ、エポキシ樹脂で全体をコーティングした。その後、HAp の表面が出てくるまで研磨した。さらに、周りのエポキシ樹脂部分に金を50nm 蒸着した。その後、HAp の表面を制御するために酢酸でエッチングを行った。

5. 3. 2. 3 LB 膜の累積

LB 膜の作成には、1 mM の濃度のアラキジン酸-クロロホルム展開液を用い、HAp を引き上げながら表面圧力25mN、速度 4 mm/min で LB 膜を累積させた。1 回の積層にアラキジン酸をマイクロシリンジで300μl 使用した。また、ガラス基板上にも同様にアラキジン酸を累積させた。

5. 3. 2. 4 AFM の測定 (液中)

LB 膜を累積させた試料を AFM 液中タッピングモー

ドで測定した。液中測定の際には、超純水を使用した。

5. 2. 3. 5 FT-IR の測定

LB 膜を累積させた試料とガラス基板を一回反射により測定した。始めに、ガラス基板にアラキジン酸を累積した試料を測定した。アルミ蒸着 mirror をバックグラウンドとして使用し、入射角80°, 反射角80° resolution 4, 積算回数100回を測定条件とした。HAp のときのバックグラウンドは条件を同じにするために、AFM 測定用ホルダーにエポキシ樹脂をコーティングし、研磨後、金でスパッタリングしたものを使用した。また、顕微 IR を用いて単結晶 HAp にターゲットを絞って測定した。

5. 2. 3. 6 走査型電子顕微鏡 (SEM) の測定

表面をエッチングにより制御した HAp を SEM により測定した。試料ホルダーにカーボンテープで接着させた HAp を金で300nm スパッタリングした。その後、加速電圧15kv と20kv で測定した。

5. 3. 3 結果および考察

5. 3. 3. 1 エッチング条件の検討

以下の図は、単結晶 HAp の a 面のエッチング処理後の AFM 像である。単結晶 HAp はカルシウムが内部から表面に移動しカルシウム過剰層を形成し、大気中の水分、酸素、二酸化炭素と結合するため、カルシウム化合物層を形成すると考えられる⁵⁾。このため、エッチング処理を行うことによりこの化合物層を除去し、表面の制御を行う必要がある。条件を検討した結果、8M-CH₃COOH で1分間エッチングを行うと表面制御が可能であり、ステップテラス構造が現れることが明らかとなった。その解析結果を図5.9に示す。この時と同じ条件で数回測定を行ったところ、ステップハイトが0.94 nm, 0.31nm, 0.61nm, 付近の値になった。ステップハイトが a 軸格子定数 (0.94176nm) の1/3, 2/3, 1の値が出ることから、ステップハイトは a 軸格子定数の1/3単位であることが分かった。HAp の a 軸方向は格子定数のおよそ1/3を単位にしてイオン密度が周期的に変化している⁶⁾。このことから、a 面は全体として正か負に荷電しているため、これらの表面では荷電量を減らす方向に Ca²⁺イオンが変位するなどの格子緩和が起きると考えられる。また、SEM の測定結果より、単結晶 HAp の a 面のエッチングを行うと a 面の鉛直方向にエッチングが進むことが明らかになった。また、図5.10に現れている三角形のエッチピットが現れることも分かった。

ここで、SEM の測定結果と AFM の測定結果を比べた。この結果から、三角形の一边が c 軸に平行になることが確認できた。そして、AFM 測定時の試料の置き方から、図5.10に示した向きが c 軸方向であることが分かった。また、ステップテラス構造が、その一边から頂点にに向かって出ること確認できた。このことより、ステップテラス構造が c 軸に平行になることが分かった。

5. 3. 3. 2 アラキジン酸累積後の AFM による観察

図5.11に 8M-CH₃COOH でエッチングした後の AFM による解析結果を示す。100nm 以上の凹凸が出ていることが明らかになったが、アラキジン酸を累積した後に液中の AFM 測定により観察すると、この凹凸が少なくなり、なだらかな凹凸が現れることが分かった。この結果より、アラキジン酸が累積されていることが確認できた。しかし、この測定では単分子層の累

積が出来ているのかは確認できなかった。これは、アラキジン酸の分子鎖長が2.7nm であるが、この高さの確認ができなかったためである⁷⁾。また、累積膜が単分子層であるため液中では分子が揺れ観察することが出来なかった。

5. 3. 3. 3 FT-IR の測定

ガラス基盤に累積したアラキジン酸は、2850cm⁻¹と2919cm⁻¹付近にアルキル基のピークを検出できた⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。ここで、アラキジン酸を HAp に累積前、累積後で測定し比較すると、2850cm⁻¹と2919 cm⁻¹付近にアルキル基のピークが検出された。図5.12で検出されたピークは、アラキジン酸のアルキル基のピークと同じところに出ているが、このピークは上向きのため、これは何か別の不純物を検出したものと考えられる。または、大気中にさらされているため条件が変わった可能性があり、そのためノイズがキャンセルされず、検出されたものと考えられる。

5. 3. 4 結言

単結晶 HAp をエッチングすることにより、a 面には三角形のエッチピットが現れた。この三角形の一边は c 軸に平行であり、c 軸に垂線上方方向にステップテラス構造が現れた。ステップは c 軸に平行に現れた。ステップハイトを測定した結果、a 軸格子定数 (0.94176 nm) の1/3単位であることが分かり、原子レベルでの表面制御ができたことが分かった。FT-IR 測定の結果、単結晶 HAp 表面上のアラキジン酸の累積が充分でなく、カルボキシル基を IR で検出することが困難であることが分かった。

参考文献

- 1) T. Furuzono, K. Sonoda, J. Tanaka, *J. Biomed. Mater. Res.*, in press.
- 2) T. Furuzono, K. Sonoda, J. Tanaka, *Trans. of MRS-J*, in press.
- 3) 西澤かおり, 鳥山素弘, 鈴木高広, 河本ゆかり, 横川善之, 永田夫久江, 日本化学会誌, 1, 63-67 (1995).
- 4) T. Okada and Y. Ikada, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1509-1518 (1993).
- 5) Y. Suetsugu, K. Hirota, K. Fujii and J. Tanaka, *J. Mater. Sci.*, **31**, 4541 (1996).
- 6) M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner, *Nature*, **204**, 1050, (1964).

- 7) ナノ表面研究会, “走査型トンネル顕微鏡/原子間力顕微鏡
利用技術集成”, p62 (ティー・アイ・シー, 1994).
- 8) 浜島 健二郎, “実用農薬ガイドブック”, p68 (化学工業
社).
- 9) T. Onishi, A. Ishitani, H. Ishida, N. Yamamoto, & H.
Tsubomura, *J. Phys. Chem.* **82**, 1989, (1978).
- 10) 田隅三生, “FT-IR の基礎と実際”, 第2版, p111 (東京
化学同人, 1994).

第6章 残された問題と将来展望

再生医学は21世紀の治療技術として、遺伝子治療とともに大きな流れになると予想されている。本報告書では、この5年間で開発した細胞の足場となり得る複合材料について紹介した。合成した材料はそれぞれに特色があり、自ら分解しながら生体細胞を誘導する可能性を秘めている。

近年、ES細胞（多能性幹細胞）がヒト初期胚細胞や胎児由来始原生殖細胞から得られている。それらを培養することによって神経細胞や造血系細胞といった多種に渡る機能細胞に分化させることができると期待さ

れ、細胞移植や再生医療に利用する方向が模索されている。しかし、それを現実するためには、それぞれの機能細胞に適した足場となる材料の開発が急務であり、材料の物性・強度及び分解速度を活かしつつ生体部位に最適な環境を作り出す材料が強く求められている。

再生医学の発展は優れた足場材料を開発できるかにかかっていると言えよう。今後の5年間は、新たに軟骨再生、靱帯再建、神経再建を目指して、セラミックスと生体高分子の特長を活かす研究を進める計画でいる。

第7章 研究発表

7.1 発表論文

- 菊池正紀, 趙晟佰, 田中順三, “新しい人工骨材の開発—有機・無機複合化技術”, BIO INDUSTRY, 13, 8, 28-34 (1996)
- 田中順三, “ナノスペースラボ —材料のインテリジェント化—”, Boundary, 12, 7, 13-19 (1996)
- 西原克成, 丹下剛, 松田良一, 瀬野久和, 梁井皎, 藤井和子, 田中順三, 広田和士, “実験進化学手法によるハイブリット型人工器官の開発と新しい免疫学の概念”, 人工臓器, 25, 3, 753-758 (1996)
- 西原克成, 丹下剛, 松田良一, 田中順三, 広田和士, 樺沢洋, “人工骨髄造血巣の誘導実験と新しい免疫系の概念”, 日本口腔診断学会雑誌, 9, 2, 217-231 (1996)
- 西原克成, 田中順三, 広田和士, “実験進化学手法による力学対応進化学の検証”, 日本口腔診断学会雑誌, 9, 2, 232-249 (1996)
- 田中順三, “アパタイトの不思議”, 材料科学, 33, 4 (1996) 180-182
- 田中順三, 末次寧, 大橋直樹, “Electronic States of F⁻ and OH-Apatite Studied by a DV-X α Method”, Transaction of Materials Research Society of Japan, 20, 910-913 (1996)
- P.Zhou, M.Hosonuma, M.Kikuchi, J.Tanaka, S.Nakamura, M.Ohgaki, M.Akao, “Thermal Decomposition Methods For HA And CaTiO₃ Coating On Titanium”, Bioceramics 9, 349-352 (1996)
- S.B.Cho, Y.Suetsugu, J.Tanaka, R.Azumi, M.Matsumoto, “Bio-Solid-Chemical Process of Apatite Formation on LB Monolayer in Simulated Body Fluid”, Bioceramics 9, 403-406 (1996)
- K.Nishihara, J.Tanaka, “Successful Inducement of Hybrid Type Artificial Bone Marrow Using Bioceramics in Vertebrates”, Bioceramics 9, 69-72 (1996)
- M.Kikuchi, Y.Suetsugu, J.Tanaka, M.Akao, “Preparation of Calcium Phosphate-CPLA Composite”, Bioceramics 9, 395-398 (1996)
- 西原克成, 田中順三, “骨格系組織の力学対応システムとリモデリングの遺伝子工学”, 日本機械学会第74期全国大会講演論文集 (I), 96-15, 155-156 (1996)
- 田中順三, 趙晟佰, “自己組織化に基づいた有機・無機複合体人工骨の開発”, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 2, 2, 14-19 (1996)
- 西原克成, 立川 統, 田中順三, 広田和士, “実験進化学手法によるセメント質誘導型のアパタイト人工歯根の開発”, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 2, 2, 59-70 (1996)
- Y.Suetsugu, I.Shimoya, M.Kikuchi, J.Tanaka, “CRYSTAL GROWTH OF CARBONATE APATITE USING CaCO₃-Ca(OH)₂ FLUX”, Phosphorus Research Bulletin, 6, 225-228 (1996)
- S.B.Cho, Y.Suetsugu, J.Tanaka, “PRECIPITATION OF CALCIUM PHOSPHATES FROM AN ACCELLULAR SIMULATED BODY FLUID”, Phosphorus Research Bulletin, 6, 309-312 (1996).
- 趙晟佰, 末次寧, 田中順三, 阿澄玲子, 松本陸良, “Effects of divalent cations on calcium phosphates precipitation on a Langmuir-Blodgett monolayer”, Bioceramics 10, 545-548 (1996)
- Y.Suetsugu, Y.Takahashi, S.B.Cho, F.Okamura, J.Tanaka, “Space Group Determination of Hydroxyapatite and Carbonate Apatite”, Key Eng Materials, 132-136 (1997)
- 田中順三, “セラミックス”, 平成8年度「マイクロマシンの基礎技術の調査研究」成果報告書 (1997)
- M.Kikuchi, Y.Suetsugu, J.Tanaka, M.Akao, “Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composites”, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 8, 361-364 (1997)
- S.B.Cho, M.Kikuchi, Y.Suetsugu, J.Tanaka, “Novel Calcium Phosphate/Poly lactide Composites: Its in vitro Evaluation”, Key Engineering Materials, 132-136, 802-805 (1997)
- 西原克成, 田中順三, “海から陸へ脊椎動物の上陸劇の重力対応”, バイオメカニクス学会誌 21.4, 1-8 (1997)
- 菊池正紀, 趙晟佰, 田中順三, 小山富久, 小林孝之, 高久田和夫, 赤尾勝, “ β -リン酸三カルシウム/ポリ乳酸共重合体複合体の作成と生体親和性”, 粉体および粉末冶金 45.1, 36-40 (1998)

- 田中順三, “有機・無機複合材料の開発”, 金属, 68, 3, 33-42(1998)
- 田中順三, “酸化物粒界の構造と機能”, 表面, 36-1, 29-38(1998)
- M.Kikuchi,S.B.Cho,Y.Suetsugu,J.Tanaka, “In vitro and in vivo tests of newly developed TCP/CPLA composites”, Bioceramics10, 407-410(1997)
- Y.Suetsugu,I.Shimoya,J.Tanaka, “The Detailed Configuration of Carbonate Ions in Apatite Structure Determined by Polarized IR Spectroscopy”, Bioceramics 10, 249-252(1997)
- Y.Suetsugu,I.Shimoya,J.Tanaka, “Configuration of Carbonate Ions in Apatite Structure Determined by Polarized Infrared Spectroscopy”, J. Am. Ceram. Soc., 81,3, 746-748(1997)
- Y.Suetsugu,Y.Takahashi,S.B.Cho,F.P.Okamura,J.Tanaka, “Hydroxyapatite and Carbonate Apatite”, Key Eng Materials,132-136, 2037-2039 (1997)
- 菊池正紀, 趙晟佰, 末次寧, 田中順三, 小山富久, 小林孝之, 高久田和夫, 赤尾勝, 志方紀樹, 田代豊, “Mechanical and Osteoconductive Properties of TCP/CPLA Composites” 日韓セラミックスシンポジウム, 11月, 268-271(1997)
- 趙晟佰, 佐藤公泰, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, “Zeta Potential of Various Bioactive Ceramics and Organic/inorganic Composites” 日韓セラミックスシンポジウム, 11月, 123-126(1997)
- 蔣麗萍, 丹下剛, 樺沢洋, 田中順三, 西原克成, “組織免疫・HLA と重力作用”, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 4.1, 54-57(1998)
- 小山富久, 松本裕子, 高久田和夫, 宮入裕夫, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, 川瀬清, 小林孝之, “ β -TCP ポリ乳酸系ポリマー膜による骨再建”, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 4.1, 44-45(1998)
- 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, 萬代佳宣, 中谷伸一, “水酸アパタイト/コラーゲン複合体の合成と自己組織化”, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 4.1, 42-43(1998)
- 菊池正紀, 田中順三, 有賀利郎, 田代豊, “ β リン酸三カルシウム/ポリ乳酸共重合体複合体の生理食塩水中における機械的強度変化”, 無機マテリアル, 5-11, 493-497(1998)
- 李相勲, 田中順三, “Hydroxyapatite Coating on a Collagen Membrane by a Biomimetic Method”, J. Am.Ceram.Soc. 81-11, 3029-3031(1998)
- 田中順三, “生体材料と無機・有機複合化”, 無機マテリアル, 5-11, 512-516(1998)
- 村田直文, 尾坂明義, 伊藤憲治, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, “Organic/Inorganic Interaction between Hydroxyapatite and Derivatives of Poly (Etylene Glycol)” Transactions of the Materials Research Society of Japan, 24-4, 549-552(1999)
- 佐藤公泰, 末次寧, 菊池正紀, 熊谷友里, 田中順三, “Electrostatic and Structural Analysis of Phosphate/Organic Materials Interfaces”, Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine, 485-488(1998)
- 末次寧, 菊池正紀, 佐藤公泰, 田中順三, “Crystal Growth and Analyses of Carbonate Hydroxyapatite”, Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine, 93-95 (1998)
- 菊池正紀, 佐藤公泰, 末次寧, 田中順三, 小山富久, 高久田和夫, “Changes in Mechanical Properties and GBR Application of TCP/CPLA Composite”, Proceedings of the 11th International Symposium on Ceramics in Medicine, 153-156(1998)
- 田中順三, 菊池正紀, 平岡陽介, 萬代佳宣, 中谷伸一郎, “The Influence of pH and Temperature on the Self-Organization Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen”, International Symposium on Advanced Biomaterial & Tissue Engineering, O1 (1999)
- 李相勲, 田中順三, “Self-Assembly Phenomenon in a Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Composite”, International Symposium on Advanced Biomaterial & Tissue Engineering, O6(1999)
- 田中順三, “人工骨と自己組織化 —試験管の中で骨をつくる—”, HAP・TCP '99 (横浜) プログラム・抄録集 (ページ表示なし) (1999)
- 末次寧, 下矢一良, 田中順三, “Configuration of Carbonate Ions in Apatite Structure Determined by Polarized Infrared Spectroscopy”, J.of the American Ceramic Society, 81-3, 746-748(1998)
- Sang-Hoon Rhee,Junzo Tanaka, “Chemical Interaction between Hydroxyapatites and collagen Fibrils” J.Am.Ceram.Soc. in print
- 菊池正紀, 田中順三, 小山富久, 高久田和夫, “Cell culture test of TCP/CPLA composites”, J

- Biomed Mater Res (Appl Biomater),48, 108-100 (1999)
- 宗田大, 高久田和夫, 小山富久, 田中順三, 菊池正紀, 四宮謙一, “ β リン酸三カルシウム/ポリ乳酸共重合体複合体膜による家兎尺骨骨幹部欠損の治療”, 日整会誌, 73(8) (ページ表示なし) (1999)
- 田中順三, “超高齢化社会を助ける生体材料”, 科学技術ジャーナル, 99-6, 18-19 (1999)
- Masanori Kikuchi, Yasushi Suetsugu, Junzo Tanaka, Soichiro Iatoh, Shizuko Ichinose, Ken'ichi Shinomiya, Yousuke Hiraoka, Yoshinobu Mandai, Shin'ichi Nakatani, “The Biomimetic Synthesis and Biocompatibility of Self-Organized Hydroxyapatite/Collagen Composites”, Biocera 12, 361-365 (1999)
- D.Walsh, J. Tanaka, “Preparation of a bone-like apatite foam cement”, Journal of Materials Science-Materials in Medicine, in print
- 西原克成, 田中順三, “Successful development of artificial bone marrow bio-chamber using bioceramics by means of experimental evolutionary study -reading trilateral riddles of the vertebrates”, 9th Cimtec-World Forum on New Materials Symposium XI-Materials in Clinical Applications, 353-364 (1999)
- 田中順三, 菊池正紀, “バイオミメティックス生体材料の開発”, セラミックス, 34-7, 543-546 (1999)
- 菊池正紀, 田中順三, “有機/無機複合人工骨材料の開発”, 有機・無機ハイブリッド材料・技術資料集, 260-264 (1999)
- 田中順三, 菊池正紀, “コラーゲンと無機化合物の複合化”, 表面科学, 20-9, 18-24 (1999)
- 生駒俊之, 山崎淳司, 赤尾勝, 田中順三, “高温粉末X線回折による水酸アパタイトの Rietveld 解析”, 理学電気ジャーナル, 30-2, 24-29 (1999)
- 村田直文, 尾坂明義, 李相勲, 宮崎匡輔, 佐倉義幸, 生駒俊之, 田中順三, “The preparation of hydroxyapatite and chondroitin sulfate composites”, Bioceramics 12, 429-432 (1999)
- 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, 伊藤聰一郎, 市ノ瀬志津子, 四宮謙一, 平岡陽介, 萬代佳宣, 中谷伸一, “The biomimetic synthesis and biocompatibility of self-organized hydroxyapatite/collagen composites”, Bioceramics 12, 393-396 (1999)
- 小山富久, 松本裕子, 高久田和夫, 宮入裕夫, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, 末倉碧, 長岡勝好, 小坂俊文, 田中茂男, 伊藤聰一郎, 四宮謙一, 川瀬清, “Development of new organic /inorganic composite materials for bone reconstruction in veterinary dentistry”, Proceeding of the 13th annual veterinary dental forum and veterinary dentistry '99, 66-68 (1999)
- 末次寧, 田中順三, “Crystal growth of carbonate apatite using CaCO_3 flux”, J. Material Sci.: J. Materials in Medicine, 10, 561-566 (1999)
- 菊池正紀, 藤沢章, 服部昌晃, “バイオセラミックスの新しい応用”, セラミックス, 34, 42-46 (1999)
- 李相勲, 田中順三, “Effect of citric acid on the nucleation of hydroxyapatite in a simulated body fluid”, Biomaterials, 20, 2155-2160 (1999)
- H.-Kim, K.Kishimoto, F.Miyaji, T.Kokubo, T.Yao, Y.Suetsugu, J.Tanaka, T.Nakamura, “Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products”, J.of Biomedical Materials Research, 46, 228-235 (1999)
- 田中順三, 菊池正紀, 小山富久, 高久田和夫, “TCP/CPLA 複合体の強度変化と GBR への応用”, 粉体粉末冶金協会講演概要集 (平成11年度春季大会) 181-181 (1999)
- 田中順三, 菊池正紀, 伊藤聰一郎, 市ノ瀬志津子, “自己組織化現象による新規骨材料の生体適合化”, 日本 ME 学会雑誌論文号, 37, 4 (1999)
- 高久田和夫, 小山富久, 松本裕子, 宮入裕夫, 伊藤聰一郎, 四宮謙一, 菊池正紀, 田中順三, 永岡勝好, 小坂俊文, 田中茂男, “アパタイト/コラーゲン複合体による骨再建” Journal of Oromaxillofacial Biomechanics 5-1, 37-38 (1999)
- 菊池正紀, 田中順三, “ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の自己組織化的合成と骨反応” Journal of Oromaxillofacial Biomechanics 5-1, 33-34 (1999)
- 生駒俊之, 村田直文, 田中順三, 宗田大, 萬代佳宣, 中谷伸一, 佐倉義幸, 宮崎匡輔, “水酸アパタイト/ヒアルロン酸系複合体の合成と自己組織化” Journal of Oromaxillofacial Biomechanics 5-1, 35-36 (1999)
- 小山富久, 松本裕子, 高久田和夫, 宮入裕夫, 菊池正紀, 田中順三, “Guided Bone Regeneration with Bioabsorbable Organic/Inorganic Membrane”

- Journal of Oromaxillofacial Biomechanics 5-1, 39-40 (1999)
- 川瀬清, 田中順三, 広田和士, 樺沢洋, 西原克成, “Studies on Development of Biocompatible Biomaterials by Means of Experimental Evolutionary Studies” Journal of Oromaxillofacial Biomechanics 5-1, 41-42 (1999)
- 伊奈幸雄, 門間英毅, 佐藤公泰, 末次寧, 田中順三 “AFM Observation of the Surface of Hydroxyapatite Single Crystal with and without L-B Monolayers” Transaction of Materials Research Society of Japan 24-4, 639-642 (1999)
- 伊藤聰一郎, 河内敏行, 高久田和夫, 小山富久, 松本祐子, 宮入裕夫, 市ノ瀬志津子, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, “ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の生体親和性と骨伝導能”, The Third Symposium on Tissue Engineering for Hard Tissues”, 35-38 (1999)
- 高久田和夫, 小山富久, 松本裕子, 宮入裕夫, 伊藤聰一郎, 四宮謙一, 菊池正紀, 田中順三, 永岡勝好, 小坂俊文, 田中茂男, “Bone Reconstruction with Hydroxyapatite/Collagen” International Workshop on Bio-integrated Materials & Tissue Engineering, 72-73 (2000)
- 小山富久, 松本裕子, 高久田和夫, 宮入裕夫, 菊池正紀, 田中順三 “Guided Bone Regeneration with Bioabsorbable Organic/Inorganic Composite” International Workshop on Bio-integrated Materials & Tissue Engineering 70-71 (2000)
- 佐藤公泰, 熊谷友里, 田中順三, “Apatite formation on organic monolayers in simulated body environment”, Journal of Biomedical Materials Research, 50-1, 16-20 (2000)
- 田中順三, 菊池正紀, 生駒俊之, “自家骨に替わる複合材料”, マテリアルインテグレーション, 13-2, 7-12 (2000)
- 田中順三, 田畑泰彦, “生体材料”, インテリジェント, 古藺勉, 菊池正紀, 田中順三 “バイオセラミックスの開発動向” ファインセラミックス, 18-2, 38-42 (2000)
- 菊池正紀, 田中順三, “ β リン酸三カルシウム/ポリ乳酸共重合対複合体中の化学的相互作用”, 日本セラミックス協会学術論文誌, 108, 642-645 (2000)
- 菊池正紀, 田中順三, 伊藤聰一郎, 四宮謙一, 小山富久, 高久田和夫, 宮入裕夫, “骨系細胞誘導機能をもつ HA P/Collagen ナノコンポジットの Biomimetic 合成” インテリジェント材料, 10-1 (2000)
- 李相勲, 田中順三, “Effect of Chondroitin Sulfate on the Crystal Growth of Hydroxyapatite”, J. of American Ceramic Society, 83-8, 2100-2102 (2000)
- 田中順三, 菊池正紀, “セラミックス材料”, 金属系バイオマテリアルの基礎と応用, アイピーシー出版, 554-569 (2000)
- 李相勲, 田中順三, “Hydroxyapatite formation on cellulose cloth induced by citric acid”, J of Materials Science: MATERIALS IN MEDICINE 11, 449-452 (2000)
- 佐藤公泰, 末次寧, 田中順三, 伊奈幸雄, 門間英毅, “The surface structure of hydroxyapatite single crystal and the accumulation of arachidic acid”, J. of Colloid and Interface Science, 224, 23-27 (2000)
- 伊藤聰一郎, 松原正明, 河内敏行, 中村浩, 雪竹修司, 四宮謙一, 市ノ瀬志津子, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, “ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の合成と生体親和性”, The 2nd symposium on tissue engineering for hard tissues 46-51 (1999)
- 田中順三, 植村寿公, “無機材料”, 蛋白質 核酸 酵素, 45-13, 156-161 (2000)
- 田中忍, 坂根正孝, 田中順三, 山口勇, 下條仁士, 加藤賢治, 立石哲也, 宮永豊, “Apatite coating in/on rabbit tendons using an alternate sorking process”, Proceedings of 13th Bioceramics, 479-482 (2000)
- 伊藤聰一郎, 四宮謙一, 高久田和夫, 小山富久, 松本裕子, 菊池正紀, 末次寧, 田中順三, “荷重部位へのハイドロキシアパタイト/コラーゲン implant 移植実験”, 日整会誌 74-8 (2000) 頁表示なし
- 小山富久, 高久田和夫, 菊池正紀, 田中順三, 松本裕子, 宮入裕夫, 青木美香, 永岡勝好, 小坂俊文, 田中茂男, “ β -TCP/ポリ乳酸系コポリマー膜による骨再建=第3報 骨膜移植による骨再建=”, 顎顔面バイオメカニクス学会誌, 6-1, 31-32 (2000)
- 佐藤公泰, 小暮敏博, 生駒俊之, 熊谷友里, 田中順三, “Atomic scale interfacial structure of hydroxyapatite observed with high-resolution transmission electron microscopy”, Proceedings of the 13th International Symposium on Ceramics in Medicine, 283-286 (2000)
- Sang-Hoon Rhee, Jae Do Lee, 田中順三, “Nucleation of Hydroxyapatite Crystal through Chemi-

- cal Interaction with Collagen" J. of American Ceramic Society, (2000.8.21accepted)
- 伊藤聰一郎, 高久田和夫, 小山富久, 松本裕子, 一ノ瀬志津子, 河内敏行, 四宮謙一, 田中順三, 菊池正紀, "Osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial", J. of Biomedical Materials Research (2000.8/25accepted)
- 菊池正紀, 田中順三, 伊藤聰一郎, 市ノ瀬志津子, 小山富久, 高久田和夫, 長岡勝好, 田中茂男, "Preparation of Hydroxyapatite/Collagen Composites Using Biomimetic Process and Their Biocompatibility", Mat. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 599, 51-53 (2000)
- 西原克成, 田中順三, "骨髓造血の発生と重力作用", バイオメティックスハンドブック, 430-435, エヌ・ティー・エス(2000)
- 田中順三, 生駒俊之, "骨・軟骨材料の自己組織化", バイオメティックスハンドブック, 436-440, エヌ・ティー・エス(2000)
- 菊池正紀, 田中順三, "コラーゲンと無機化合物", バイオメティックスハンドブック, 479-482, エヌ・ティー・エス(2000)
- 西原克成, 田中順三, "ハイブリッド型人工歯根の開発ーセメント質・歯根質・固有歯槽骨の再生", バイオメティックスハンドブック, 502-507, エヌ・ティー・エス(2000)
- 萬代佳宣, 平岡陽介, 田中順三, 菊池正紀, "生体骨に近い生物特性をもつアパタイト/コラーゲン複合体製人工骨", 工業材料, 48-11, 77-80(2000)
- 菊池正紀, 伊藤聰一郎, 市野瀬志津子, 四宮謙一, 田中順三, "Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesize vitro and its biological reaction", Biomaterials.
- 末次寧, 高橋靖彦, 岡村富士夫, 田中順三, "Structure Analysis of A-Type Carbonate Apatite by a Single Crystal X-Ray Diffraction Method", J. Solid State Chem.
- Toshiyuki Ikoma, Yoshinori Kubo, Atushi Yamazaki, Masaru Akao, Junzo Tanaka, "Effect of Carbonate Contents on Crystal Structure of A-Type Carbonate Apatites" Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine, Italy, 22-26Nov. 191-194(2000)
- Yasushi Suetsugu, Toshiyuki Ikoma, Junzo Tanaka, "Single Crystal Growth and Structure Analysis of Monoclinic Hydroxyapatite" Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine, Italy, 22-26Nov. 287-290(2000)
- Toshiyuki Ikoma, Takeshi Muneta, Junzo Tanaka, "Fabrication and Animal Experiment of Nanocomposites of Hydroxyapatite Collagen and Polysaccharides" Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine, Italy, 22-26Nov. 487-490(2000)
- M. Kikuchi, Y. Koyama, K. Takakuda, H. Miyairi, J. Tanaka, "In Vitro Test and Application for Guided Bone Regeneration of β Tricalcium Phosphate/Poly-(Lactide-Glycolic Acid- ϵ -Caprolactone) Composites" Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine, Italy, 22-26Nov. 677-680(2000)
- K. Nishihara, T. Ueda, J. Tanaka, K. Hirota, "Development of Revolutionizing Methods for Hybrid-Type Artificial Organs by Means of Bioceramics and Biomechanics" Proceedings of the 13th Int. Symp. on Ceramics in Medicine, Italy, 22-26Nov. 893-896(2000)
- Tsuyoshi Kijima, Keisuke Yamaguchi, Akira Miyata, Mitsunori Yada, Masato Machida, Junzo Tanaka, "Crystallization of Calcium Phosphate Templated by α -Amino Acids Depending on Their Composition, Chain Length, and Enantiomerism" Chem. Lett, 1324-1325(2000)
- Walsh D, Chapter 1: Morphology and Structure; Section 5: From Biomineralization to Biomimetics. In: "バイオメティックスハンドブック", NTS, 58-69, (2000)
- 早乙女進一, 植村寿公, 小島弘子, 伊藤聰一郎, 高久田和夫, 四宮謙一, 菊池正紀, 田中順三, 立石哲也, "タンパクの担体としてのハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の性質" Bionic Design Workshop 2000 Poster Session, 26 (2000)
- 田中忍, 坂根正孝, 田中順三, 山口勇, 福崎裕延, 下條仁士, 宮永豊, "腱・靱帯に対する術中アパタイトコーティングに向けて: 交互浸漬法を用いた最適複合化手法", 第27回日本臨床バイオメカニクス学会, 98(2000)
- 古蘭勉, 園田賢作, 田中順三, "Nucleation of Hydrox-

yapatite on an Inert Polymer Surface by Covalente Linkage”, Transaction of the Materials Research Society of Japan, 25-4, 915-918 (2000)

佐藤公泰, 田中順三, “バイオミネラリゼーション”, ナノテクノロジーの最新技術, C・M・C 出版, (2001) in printing

Tatsuro Karita, Kou Imachi, Tetsushi Taguchi, Mitsuru Akashi, Kimiyasu Sato, Junzo Tanaka, “In vitro Calcification Model (2): Apatite Formation on Segmented Polyurethane Thin Films by Using an Alternate Soaking Process: The Effect of Adsorbed Serum Proteins on Calcification”, J. of Bioactive and Compatible Polymers, 15 -May, 231-244 (2000)

伊藤聰一郎, 菊池正紀, 高久田和夫, 小山富久, 松本裕子, 市ノ瀬志津子, 田中順三, 河内敏行, 四宮謙一, “The biocompatibility and osteoconductive activity of a novel hydroxyapatite/collagen composite biomaterial, and its function as a carrier of rhBMP-2”, J. of Biomedical Material Research, 54, 445-453 (2001)

Walsh D, Furuzono T, Tanaka J, “Preparation of porous composite implant materials by in situ polymerisation of porous apatite containing (-caprolactone or methyl methacrylate”, Biomaterials in press (2001)

Walsh D, Tanaka J, “Preparation of a bone-like apatite foam cement”, J Mat Sci: Mat in Med (12) 1-5, (2001) in press

Furuzono T, Walsh D, Sato K, Sonoda K, Tanaka J, Effect of reaction temperature on the morphology and size of hydroxyapatite nanoparticles in an emulsion system, J. Mater. Sci. Lett. in press

李相勲, 田中順三, “Synthesis of a Hydroxyapatite/Collagen/Chondroitin Sulfate Nanocomposite by a Novel Precipitation Method”, J. Am. Ceram. Soc., 84, 2, 459-461 (2001)

7. 2 特許出願

“骨誘導能ないしは伝導能を有する薬剤徐放可能な生体活性生体吸収型有機無機複合体”

田中順三, 末次寧, 菊池正紀, 柿沢保利*, 志方紀樹*
*大日本インキ化学工業株式会社
特願平08-193771 (1996.07.23)

公開平10-000229 (1998.01.06)

“乳酸系複合体及びその製造方法”

菊池正紀, 田中順三, 末次寧, 柿沢保利*, 志方紀樹*
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平08-288822 (1996.10.30)

公開平10-127751 (1998.05.19)

“生体適合性複合体”

菊池正紀, 田中順三, 末次寧, 柿沢保利*, 志方紀樹*
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平08-288823 (1996.10.30)

“乳酸系繊維”

田中順三, 末次寧, 柿沢保利*, 志方紀樹*
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平08-288824 (1996.10.30)

特開平10-130952 (1998.05.19)

“吸収性遮断膜”

田中順三, 末次寧, 菊池正紀, 柿沢保利*, 志方紀樹*
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平09-72475 (1997.03.25)

“生体吸収性複合成形物, 生体吸収性材料およびそれらの製造方法”

柿沢保利*, 志方紀樹*, 田中順三, 末次寧, 菊池正紀,
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平09-107663 (1997.04.24)

特開平10-298108 (1998.11.10)

“生体適合性複合体”

柿沢保利*, 志方紀樹*, 田中順三, 末次寧, 菊池正紀,
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平09-211012 (1997.08.05)

特開平10-179715 (1998.07.07)

“吸収性遮断膜”

柿沢保利*, 志方紀樹*, 田中順三, 末次寧, 菊池正紀,
*大日本インキ化学工業株式会社

特願平10-6120 (1998.01.14)

公開平10-324641 (1998.12.08)

“新規グリコサミノ無機結合体, その製造方法及びそれを含む医療材料”

田中順三, 菊池正紀, 末次寧, 李相勲*, 宮崎匡輔**
*韓国化学研究所

**生化学工業株式会社

特願平11-112708 (1999.3.15)

特開2000-264610 (2000.09.26)

“生体材料”

田中順三, 菊池正紀, 宮本公博*, 諏訪修司**, 市川俊二**

*川澄バイオサイエンス株式会社

**川澄化学工業株式会社

特願平11-230348 (1999.08.17)

“癒着防止材料”

田中順三, 菊池正紀, 宮本公博¹, 諏訪修司¹, 市川俊二¹, 横山悦郎¹, 昭野聡一², 岡田隆雄², 今村有賀里²

¹川澄化学株式会社, ²多木化学株式会社

特願2000-002240 (2000.1.11)

“骨再生誘導材料”

高久田和夫¹, 小山富久¹, 田中茂男², 田中順三, 菊池正紀, 宮本公博³, 白濱憲昭³, 伊藤貴俊³, 市川俊二³, 横山悦郎³, 昭野聡一⁴, 岡田隆雄⁴, 今村有賀里⁴

¹東京医科歯科大学, ²日本大学, ³川澄化学株式会社, ⁴多木化学株式会社

特願2000-185878 (2000.6.21)

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

田中順三, 田口哲志*, 宮崎匡輔**, 佐倉義幸**, 大塚龍郎***, 萬代佳宣***

*科学技術振興事業団

**生化学工業株式会社

***新田ゼラチン株式会社

特願2000-273187 (2000.9.8)

“ハイドロキシアパタイトナノ粒子およびその製造方法”

田中順三, 古菌勉¹

¹国立循環器病センター

特願2000-333638 (2000.10.31)

“生体組織材料を処理する交互浸漬装置および交互浸漬方法”

坂根正孝, 横山能周, 田中順三, 福崎裕延, 太田邦博, 山口勇, 菊池正紀, 生駒俊之

特願2001-17694

7. 3 受賞・表彰

1997年4月16日

科学技術庁 長官賞 研究功績者表彰 “生体骨と置換可能な有機無機複合体人工骨に関する研究” 田中順三

2000年3月16日

インテリジェント材料シンポジウム 高木賞 “The Biomimetic Synthesis of Hydroxyapatite/Collagen Nanocomposites With Bone-Related Cell Inductive Property” 菊池正紀, 田中順三, 伊藤聡一郎, 四宮謙一, 小山富久, 高久田和夫, 宮入裕夫

2000年4月29日

市村学術賞 貢献賞 “自己組織化機構による有機・無機複合構造対の創出” 田中順三, 菊池正紀

発 行 日 平成14年 2 月28日

無機材質研究所研究報告書第117号
生体活性セラミックスの創製に関する研究

編集・発行 独立行政法人 物質・材料研究機構
〒305-0044 茨城県つくば市並木1丁目1番
電 話 0298-58-5616
F A X 0298-55-2142
