

細胞を活性化させる生体材料研究

小幡 亜希子*

1. はじめに

骨や歯に代表される硬組織代替材料の一つに、リン酸カルシウム系材料が挙げられる。骨や歯の主要成分の一つはヒドロキシアパタイト (HAp)、つまりリン酸カルシウムであり、コラーゲン等の有機物と緻密に複合化することで絶妙な構造を作り出している。硬組織代替材料として求められる機能としては、体内にて周辺組織と親和性を示すことはもちろんのこと、自家骨等と直接結合する機能(生体活性とよばれる)をも兼ね揃えることが重要である。リン酸カルシウム系材料は優れた生体活性を示すことがすでに多くの研究結果から示されており、実際の臨床にて様々なリン酸カルシウム系材料から成る硬組織代替材料が応用されている。顆粒や多孔体などを用いた硬組織代替材料や、チタン材料等の金属系インプラントのコーティング材とした応用など、その形態は多種といえる。このように、リン酸カルシウム系材料をはじめとするある種のセラミックスは生体活性材料開発において重要な役割を果たすとともに、生体反応性および機械特性上より高機能化すべく様々な研究開発が進められている。

2. 細胞を活性化させる機能を付与した材料設計

生体活性材料にある種のタンパク質や DNA 等を組み込むことで、体内において周辺組織を積極的に活性化させ骨などの組織欠損部の再建を促すという試みが近年盛んに行われている。例えば骨再建を目的とした場合、骨誘導タンパク (BMP) やトランスフォーミング増殖因子 (TGF) などのタンパク質系の細胞増殖因子があげられる。この場合、タンパク質等の活性を損失することなく担持・徐放する機能を付与することが有効と考えられる。

一方で、無機イオンによる細胞の活性化効果についても多くの報告例があげられており、それら無機イオンの徐放機能を付与させるような生体材料設計が試みられている。活性化

効果を示す無機イオンの一つにシリコン種イオンがある。シリコン種イオンは極微量ながらも自然骨に含まれており、骨の成長において重要な役割を担うことが知られている。シリコン種イオンによる細胞への活性化効果を証明する研究の一つとして、Xynos らによる報告⁽¹⁾があげられる。彼らは、骨代替材料として臨床応用された Bioglass[®] について、その優れた性質をもたらす要因の一つとして、材料から溶出するシリコン種イオンに着目した。Bioglass[®] を細胞培養用培地に浸漬することで、材料からシリコン種イオン等が培地中に溶出し、このシリコン種イオン含有培地を用いてヒト由来の骨芽細胞の培養を行った。その結果、通常の培地 (Bioglass[®] を浸漬していない培地) 中で培養された細胞と比較して有意に増殖が促進されることを見出した。またこのとき、細胞増殖促進因子であるインスリン様成長因子-II (IGF-II)、IGF-II の輸送タンパク質である IGF 結合タンパク質-3 (IGFBP-3)、IGF-II と IGFBP-3 を分離する酵素であるマトロプロテイナーゼ-2 (MMP-2) とカテプシン-D (Cathepsin-D) の発現が促進されることにより骨芽細胞の増殖が促進されることも同時に見出した。同研究グループによる他の報告では、さらに、シリコン種イオン含有培地中では骨芽細胞の石灰化も促進されることがわかっている⁽²⁾。

以上のように、骨形成におけるシリコン種イオンの応用は有効であり、また無機イオンであるために幅広い方法で各種材料へ組み込むことが可能と期待される。

3. シリコン徐放能を付与した材料開発

筆者が現在所属する名古屋工業大学大学院工学研究科共生機能材料研究室 (春日研究室) では、これまでに様々な種類のシリコン徐放型生体活性材料を開発してきた。その中でも、筆者が携わった研究の一部をここに紹介する。

(1) シロキサン含有ポリ乳酸・バテライト複合体

生分解性ポリマーの一つであるポリ乳酸に、シランカップ

* 名古屋工業大学助教；大学院工学研究科 (〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町)
Development of Biomaterials Enhancing Cell Functions; Akiko Obata (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology, Nagoya)
Keywords: ceramics, bone, calcium phosphate, polymer, silicon
2009年12月5日受理

リング剤の一種であるアミノプロピルトリエトキシシラン (APTES)を用いてシロキサンをハイブリッド化し、さらに炭酸カルシウムの多形の一つであるバテライト粒子(直径が約 500 nm)を分散させて複合体を作製した。複合体の構造および HAp 形成能については前田先生(現・東北大学)がすでに報告されており⁽³⁾、筆者は主にこの複合体を用いた細胞培養実験を行った。骨形成に関与する細胞種として、マウス由来骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)、ヒト由来間葉系幹細胞(hMSC)、ヒト由来骨芽細胞(HOB)を用いて同実験を進めた。

用いた材料の表面形態を図 1 に示す。この複合体は擬似体液(SBF)に浸漬することで、表面を HAp でコーティングすることが可能であり、また前田先生の研究より、HAp コーティングしたサンプル上の方がコーティングしていないそれよりも細胞の増殖が優れることがわかっていたため、筆者も、図 1(b)に示すような HAp コーティングしたサンプルを用いた。比較として、シロキサンをハイブリッド化していないポリ乳酸・バテライト複合体を用い、これについても SBF 浸漬によって HAp コーティングし、サンプルとして用いた。

細胞実験の結果、MC3T3-E1 はシロキサンをハイブリッド化したサンプル上に有意に増殖が優れることがわかった。また hMSC においては、分化誘導因子を培養培地に加えることなく各サンプル上で培養したところ、シロキサンをハイブリッド化したサンプル上においてのみ分化が進行する現象がみられた。また、全体の細胞数についてもシロキサンをハイブリッド化したサンプル上では有意に多かった。HOB においては、石灰化誘導因子を加えることなく培養したところ、石灰化の過程で観察される骨小結節(bone nodule)とみられる塊状物質の生成がシロキサンをハイブリッド化したサンプル上では旺盛に観察された。同時に測定したラマンスペクトル結果からも、その物質が骨小結節(bone nodule)と推測され、シロキサンをハイブリッド化したサンプル上ではそれに帰属されるピークがより強く現れた⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

以上の結果より、シロキサンをハイブリッド化したサンプルにおいては、骨形成に関与する細胞の活性を促進・誘起させる効果があることがわかった。

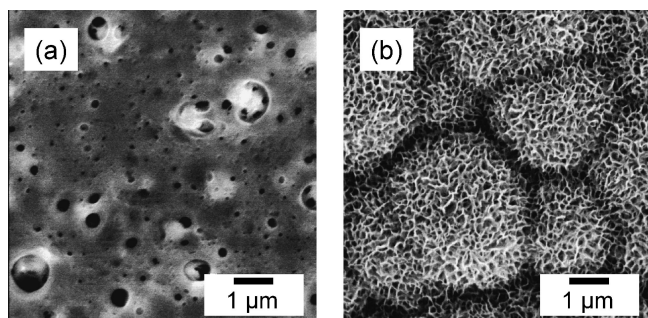


図 1 シロキサン含有ポリ乳酸・バテライト複合体の表面 SEM 像。(a)アパタイトコーティング前と(b)後。

(2) シロキサン含有バテライト (SiV)

新たなシリコン種イオン徐放型材料を開発するにあたり、APTES を用いてシロキサン含有バテライト粒子(SiV)が開発された。これは矢橋工業の太田氏のご尽力のもと進められた。カルシウムと同時に微量のシリコン種イオンを徐放する材料を作製することで、種々のポリマーと複合化することが容易となる。

メタノール中に水酸化カルシウムと APTES を加え、二酸化炭素ガスをバブリングし、得られたスラリーを乾燥させることで SiV が得られる。SiV の SEM 像を図 2 に示す。SiV は直径が約 1 μm の球状粒子であり、数百 nm の一次粒子が凝集した二次粒子であった。²⁹Si-MAS-NMR 結果より、導入された APTES はシロキサンの形態で存在することがわかった。含有されるシリコン種イオン量は、導入する APTES 量の調整で制御可能であるが、以降に示す研究成果については、約 2 wt% のシリコン種イオンを含有した材料を用いた結果である。

SiV とポリ乳酸の複合体を用いて、エレクトロスピンニング法(高分子溶液または熔融状態の高分子に高電圧を加えることで、ファイバーを紡糸する技術)により不織布タイプの材料を作製した。不織布の構造は繊維がランダムに絡み合った状態であり、そのため連通した孔が確実に存在する。また本材料ではポリマーをベースとして用いるため、柔軟性のある不織布を得ることができる。このような特徴は、骨充填材等への応用において大変有効と考える。連通孔は体内において栄養素の供給パスとして、さらには細胞の侵入パスとして機能し、また柔軟性を持ち合わせることで埋植時の操作性が格段に向上する。まず、SiV とポリ乳酸を混練機にて 473 K 下で加熱混練し複合化した。この複合体をクロロホルムに溶かし、得られた溶液を用いてエレクトロスピンニング法にて不織布化した。ポリマー溶液中のポリマー濃度や印可電圧条件等を変化させることで繊維径は制御可能であり、当複合体の場合、0.5~20 μm 径の繊維からなる不織布を作製することが可能であった。構造解析を試みたところ、¹³C CP/MAS-NMR と FT-IR 結果より、ポリ乳酸の構造内に存在するカルボキシ基とバテライト粒子表面に存在するカルシウムイオン間に配位結合が、カルボキシ基とシロキサン中に存在するアミノ基間でアミド結合が形成されていることがわかった。

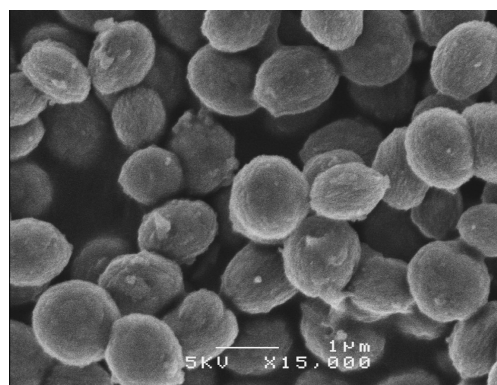


図 2 シロキサン含有バテライト (SiV) の SEM 像。

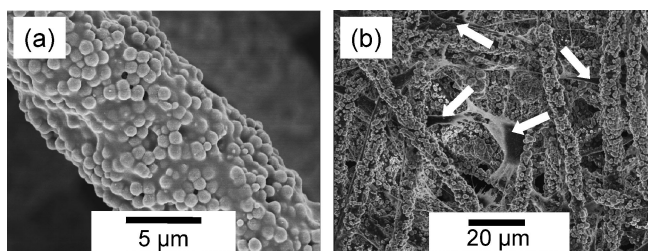


図3 シロキサン含有ハイドラキッド・ポリ乳酸複合体からなる不織布タイプ材料のSEM像。(a)アパタイトコーティング前の繊維拡大像。(b)アパタイトコーティングしMC3T3-E1細胞播種後3日目のサンプル表面像。図中の矢印は細胞を示す。

図3(a)は作製した不織布のSEM像である。SiV:ポリ乳酸の重量比が3:2, 繊維径が約10μm径の場合を一例として示す。ポリ乳酸をマトリックスとして, 繊維表面にはSiVが密に存在するのがわかる。またこの繊維一本の断面を観察したところ, 繊維の内部もSiVが密に詰まった状態であることがわかった。当複合体の不織布についても, SBF浸漬することで繊維表面をHApコーティングすることが可能であった。また, 培地中において数ppmのシリコン種イオンを徐放し続けることも確認された。よってその後の細胞・動物実験には, HApをコーティングしたサンプルを用いることとした。図3(b)は不織布上にMC3T3-E1細胞を播種し3日間培養後の材料表面のSEM像である。繊維を足場として細胞が伸展しているのがわかる。また, サンプル最表面だけでなく内部にもすでに進入している。繊維間に形成される空隙はランダムではあるが数百μmサイズを示す場合も認められたため, 細胞が進入するためのパスとなったと考える。また, ウサギを用いた動物実験結果では, 膜内部での旺盛な新生骨形成が観察され, 比較として用いた市販の生分解性ポリマー膜材よりも良好な結果を得ることができた(6)。

(3) 水ガラスを用いたシリコン種イオン徐放型HApコーティング

高濃度ケイ酸ナトリウム水溶液である水ガラスは土木用接着剤としても使用され, 比較的安価な材料である。様々な材料表面に573K程度の比較的低温でコーティングが可能であり, イオン交換によってアパタイト核形成を誘起するSi-OH基を多量に含むシリカガラスとなり, このシリカガラス層は加水分解によって容易にシリコン種イオンを溶出する。我々はこの水ガラスを用いることで, 機械的性質は優れるが生体不活性であるチタン材料やアルミノケイ酸塩鉱物であるムライト表面に, シリコン種イオン徐放能を有したHApコーティングを作製した。比較的低温下にて基板材料表面に水ガラスをコーティングできることから, 基板材料の機械的性質を低下させることなく作製できる利点がある。ここではチタン材料の研究成果を紹介する。

サンドブラスト処理した工業用純チタン板にディップコーティングすることで水ガラスを被覆させ, 573Kにて熱処理を行った。続いて0.1MのHCl水溶液に浸漬することで,

ガラス内のナトリウムイオンと溶液中の水素イオン間でイオン交換させた。EDSより算出されたガラス層のNa/Si値は, もっとも小さいもので0.03を示すサンプルを作製することができ, ほぼシリカガラスからなるコーティング膜を得ることができた。ハイドラキッドスラリーを用いてシリカガラス上にハイドラキッド粒子を被覆させ, これをSBFに浸漬することでHApコーティング膜を作製した。ハイドラキッドを被覆しておくことで, カルシウムイオンが積極的に供給されSBF中でのHAp生成が促進される。他の炭酸カルシウム(カルサイト, アラゴナイト)や塩化カルシウムと比較したところ, ハイドラキッドがもっとも優れたHAp生成促進効果を示すことも見出した。

HApコーティングしたサンプルは, 培地中にて微量のシリコン種イオンを徐放し続け, MC3T3-E1細胞を用いた培養実験結果では, シリコン種イオンを徐放しないサンプル(1073Kで熱処理し酸化膜を作製してからハイドラキッドを被覆し, SBF浸漬にてHApコーティングを作製したサンプル)と比較して, シリコン種イオンを徐放するサンプルの方が有意に増殖が優れることがわかった。

4. おわりに

今回, 日本金属学会奨励賞を受賞することができたのは, これまでお世話になった多くのみなさまのおかげと考える。現在所属する名古屋工業大学の春日敏宏教授には, シリコン種イオンに着目した材料をはじめ, 生体材料研究についてその基礎から応用まで幅広くご教授いただいた。矢橋工業の太田氏, 山八歯材の脇田氏, 春日研究室に所属する学生のみなさんには, 研究の遂行にあたり多くのサポートをいただいた。筆者が大学院時代から今日に至るまで生体材料研究に従事してきたのは, 東京医科歯科大学生体材料工学研究所の山下仁大教授にご指導いただいたことに始まっている。心から感謝申し上げる。

文 献

- (1) I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. K. Buttery, L. L. Hench and J. M. Polak: *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**(2001), 151-157.
- (2) J. E. Gough, J. R. Jones and L. L. Hench: *Biomaterials*, **25**(2004), 2039-2046.
- (3) H. Maeda, T. Kasuga and L. L. Hench: *Biomaterials*, **26**(2006), 1216-1222.
- (4) A. Obata and T. Kasuga: *J. Biomed. Mater. Res.*, **85A**(2008), 140-144.
- (5) A. Obata and T. Kasuga: *J. Biomed. Mater. Res.*, **91A**(2009), 11-17.
- (6) A. Obata, T. Hotta, T. Wakita, Y. Ota and T. Kasuga: *Acta Biomater.* in press.



小幡亜希子

★★
 2004年3月 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体支持組織学専攻博士課程修了
 2005年4月~2008年4月 名古屋工業大学・プロジェクト助教(この間2007年4月~2008年4月 日本学術振興会特別研究員(SPD))
 2008年5月~ 現職に至る
 専門分野: バイオマテリアル, 骨代替材料
 ◎セラミックスをベースとした骨代替材料研究に従事。最近ではシリコン種イオンの効果に着目し, その材料開発や細胞培養実験を中心に活動。
 ★★★