

相澤「次世代バイオセラミックス」プロジェクト

## 研究概要集

平成 25 年 9 月 30 日

プロジェクトリーダー 相澤 守

公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー

# 目 次

## <総括>

1. 基本構想.....	i
2. 全体計画と遂行方針.....	i
3. 研究体制および組織.....	ii
4. 研究成果の概要.....	iii
4.1 生体内安定性アパタイトセメントの実用化研究.....	iii
4.2 生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの実用化研究.....	iii
4.3 骨誘導能を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発.....	iii
4.4 インテリジェント DDS の構築(抗菌性).....	iv
4.5 イノシトールリン酸の抗腫瘍効果の検証.....	iv
4.6 非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメントの開発と評価.....	v
4.7 多機能型アパタイトセメントの開発と評価.....	v
5. 課題および今後の展望.....	vi
6. 業績.....	vii
7. プロジェクト参加者一覧.....	xix

## <研究報告>

1. 生体内安定性アパタイトセメントの創製とその評価.....	1
2. 生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの創製とその評価.....	8
3. 種々のリン酸カルシウム相をもつセメント試験片の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> における 吸収性の比較とその関連性の解明.....	21
4. 非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメントの開発とその評価.....	25
5. 高い骨伝導性を備えた HAp 系セメントの創製とその評価(1) -骨ミネラル含有アパタイトによるアプローチ-	29
6. 高い骨伝導性を備えた HAp 系セメントの創製とその評価(2) -ケイ素含有アパタイトによるアプローチ-	35
7. 骨形成レベルを視覚化する評価・解析手法の確立(1) -クサビラオレンジブタによるアプローチ-	40
8. 骨形成レベルを視覚化する評価・解析手法の確立(2) -遺伝子導入による double-colored osteoblasts の創出-	44
9. 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(1) -銀含有アパタイトによるアプローチ-	48
10. 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(2) -抗生物質を担持させたリン酸カルシウム微小球によるアプローチ-	54

11. 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(3) -プロタミンによるアプローチ-	58
12. 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(4) -ラクトフェリンによるアプローチ-	62
13. イノシトールリン酸単独の抗腫瘍効果の検証	67
14. 抗腫瘍効果を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの創製とその評価	71
15. キレート硬化型アパタイトセメントの抗腫瘍効果の発現機構の解析 -セルサイクルからのアプローチ-	75

# 総 括

## 1. 基本構想

平成 22 年総務省統計局の調べによると、我が国は 65 歳人口が 23.1%に達し、既に「超高齢社会」に突入している。他の先進国に先駆けて、超高齢社会を迎えた我が国においては、骨粗鬆症などの疾患に対する高度先進医療を実現することが急務な課題である。本プロジェクトでは、例えば、高齢者特有の骨粗鬆症などの骨疾患に対して、注射器などで注入可能な低侵襲治療を具現化する「次世代ペースト状人工骨」を開発することを目的として研究を推進した。

骨移植を伴う疾患に対する現在の治療法は自家骨を補填する方法がゴールドスタンダードであるが、採取量の限界や二次的な侵襲などの問題がある。その代替手段としては、水酸アパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)などのバイオセラミックスを利用する方法がある。実際、HAp は骨組織と直接結合する「生体活性」を有するため、整形外科や口腔外科などの領域で骨充填材として臨床応用されている。水酸アパタイトの材料形態には緻密体・多孔体・顆粒・セメント（ペースト状人工骨）などがあるが、これらの材料形態のなかで任意形状に成形可能なペースト状人工骨、すなわち「アパタイトセメント」は今後の発展が期待される材料である。しかしながら、現行のアパタイトセメントは酸性物質のリン酸水素カルシウム( $\text{CaHPO}_4$ )と塩基性物質のリン酸四カルシウム( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ )との酸-塩基反応を利用することが多く、セメントの硬化にはリン酸水素カルシウムの溶解が律速となるためにかかなりの時間を要する。また、硬化時に pH の変動を伴うため、組織周辺の炎症反応を惹起する恐れもある。さらに、硬化時に血液が介在すると硬化時間が遅れる、あるいは硬化しなくなるという報告もあり、現行製品はユーザの要求を十分に満たしているとはいえない。

本プロジェクトを通して、我々は強力な「医工連携」により、従来の骨修復セメントの問題点をすべて解決した新しいメカニズムで硬化する「ペースト状人工骨」の創製に成功した。その硬化メカニズムが「イノシトールリン酸(IP6)」のキレート結合によることから、我々はこのセメントを「キレート硬化型骨修復セメント」と呼んでいる。また、企業との連携により、このペースト状人工骨の実用化を指向した研究も推進している。さらに、骨粗しょう症の患者に臨床的に適用しても確実な骨癒合を得、さらに医者が安心して使用し、患者の方々の生活の質(Quality of life; QOL)を向上させるには、このセメントに新たな機能を付与させる必要がある。そこで、本プロジェクトでは、「次世代型ペースト状人工骨」の開発を指向し、「骨誘導（より高い骨形成能）」・「抗菌性（感染防止）」・「抗腫瘍効果（適用症例の拡大）」の 3 つの機能を付与させた新規な「多機能性キレート硬化型骨修復セメント」の創製を試み、実際に高い骨形成能や抗菌性を備えたセメント、腫瘍細胞に細胞のプログラム死であるアポトーシスを誘導するセメントの試作に成功している。

本研究プロジェクトで得られた成果は、例えば、ペースト状の人工骨を注射器などで患部に経皮的に注入するだけで骨折を治癒させる「低侵襲治療」を実現するものであり、超高齢社会を迎えた我が国だけでなく全世界の人々の QOL 向上に大いに貢献するものと期待できる。

## 2. 全体計画と遂行方針

本研究の目的は、例えば、高齢者の「圧迫骨折」を適用症例とする注射器などで患部に注入可能な低侵襲治療を実現するセメント（ペースト状人工骨）を開発することである（図 1）。これまでに我々は「医工連携」により従来の骨修復セメントの問題点をすべて解決した新しいメカニズムで硬化する「ペースト状人工骨」を開発した。その硬化メカニズムが IP6 のキレート結合によることから、我々はこのセメントを「キレート硬化型骨修復セメント」と呼んでいる。

このペースト状人工骨の実用化を目指し、本プロジェクトの枠組みの中で実用化に向けた研究開発に取り組んだ。また、骨粗しょう症の患者に臨床的に適用しても確実な骨癒合を得、さらに医者が安心して使用し、患者の QOL を向上させるには、このセメントに新たな機能を付与させる必要がある。そこで、本研究プロジェクトでは、「次世代型ペースト状人工骨」の開発を指向し、「骨誘導」・「抗菌性（感染防止）」・「抗腫瘍効果」の 3 つの機能を単独あるいは複数同時に付与させた新規な「多機能性キレート硬化型骨修復セメント」の開発にも取り組んだ。

本プロジェクトでは、前半の「フェーズ I（平成 21 年 10 月から 23 年 9 月までの 2 年間）」において以下のサブテーマを実施したことから、それらの研究内容を概説する。

- ① 生体内安定性アパタイト(HAp)セメントの実用化研究
- ② 生体内吸収性リン酸三カルシウム(TCP)セメントの実用化研究
- ③ 骨誘導能を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発
- ④ インテリジェント薬剤送達システム(DDS)の構築(抗菌性の付与)
- ⑤ イノシトールリン酸の抗腫瘍効果の検証

まず、①および②では、セメントの材料特性を実用化可能なレベルまで引き上げ、さらにそれらの試料片の *in vitro* および *in vivo* における生体適合性と生体吸収性を確認している。③では、骨誘導性（より高い骨形成能）の付与を目的とし、生体必須微量元素などを含有した生体活性のより高いセメント原料の合成方法を確立し、セメント試料片を試製し、



*in vitro* および *in vivo* の両面から骨形成能を評価している。④では、抗菌性付与を目的とし、薬剤の二段階徐放を可能にする「ナノサイズの孔をその表面に備えた中空微小球」を調製し、この微小球に抗生物質などを担持させ、その抗菌活性を評価している。また、抗菌性をもつ金属イオンである銀(Ag)を担持させた HAp 微小球を合成し、その粉体を出発原料として抗菌性セメントの試作も行なっている。⑤では、抗腫瘍効果の検証を

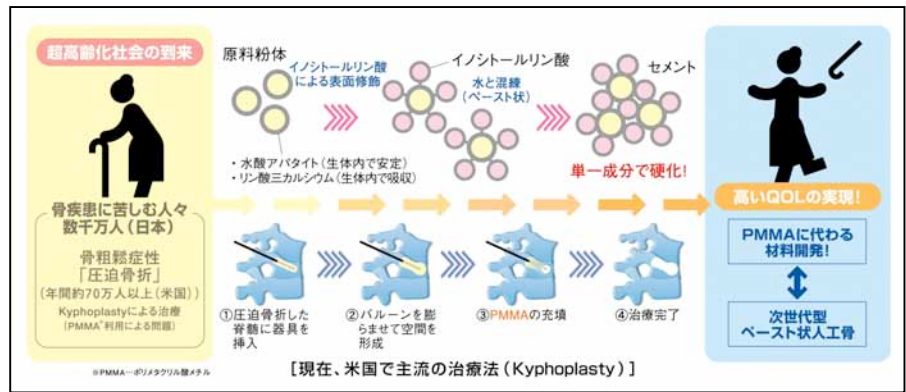


図1 本プロジェクトの概要と主な適用症例

目的とし、試製したセメントと腫瘍モデル細胞との共存培養を行ない、その増殖性や形態とともに、アポトーシスの誘導が抗腫瘍効果の成因であることを明らかにしている。

なお、平成23年10月以降は、「フェーズII(平成23年10月から25年9月までの2年間)」にはいったため、より実用化を意識して、①および②のテーマを昇華させて「⑥ 非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメントの開発と評価」を、また③④⑤のテーマを融合させて「⑦ 多機能性アパタイトセメントの開発と評価」を推進している。まず、⑥の課題は、現在、リン酸カルシウムセメント(CPC)の臨床応用において最も問題とされている Fragmentation を解決した新しいセメントの創製を推進するとともに、いまだ確立していない Fragmentation の評価方法を提案することを目的としている。実際、セメントペーストの Fragmentation を評価するプロトコルを提案し、関連学会で報告している。また、我々が開発したβ-TCP をベースとした「非崩壊性セメント」をモデル材料として、擬似的な臨床環境(血液中およびブタ脛骨内)で Fragmentation を生じないセメントの試作にも成功している。次に、⑦の課題では、骨形成を促進する元素や生体骨を模倣したアパタイトをセメント原料とすることで、骨代謝レベルの低下した高齢者に対して、特に有効な高い骨形成能を備えたセメントの試作に成功している。また、サケ由来のタンパク質を利用した、新しいタイプの抗菌性セメントの試作にも成功しており、このセメントがバイオフィーム形成を阻害する機能を備えていることも明らかにしている。さらに、抗腫瘍効果を備えたセメントの開発では、IP6 が細胞周期の G1 期に作用することでアポトーシスを誘導することを明らかにしている。

上記のようなペースト状で使用する人工骨は、高齢者特有の骨粗鬆症性圧迫骨折などに対して低侵襲治療を可能にする(図1)。本研究による成果は、今後の超高齢社会において非常に重要な研究であり、県民だけでなく日本およびグローバルな視点で、多くの人々の QOL 向上にも大きく貢献するとともに、産業的な波及効果も大きいと考えられる。

### 3. 研究体制および組織

本プロジェクトは、かながわサイエンスパーク (KSP) 東棟の研究室 (404, 405) を主な研究拠点として実験を行なった。本研究プロジェクトは、「医療の現場で本当に求められている医療材料を創製する」という観点から、専門を異とする3つ研究チームを構成し、それらのチームの有機的連携により遂行した(図2)。まず、1) 材料創製とその機能評価を行なう研究者(工学系チーム)は、バイオマテリアルなどを専門とするメンバー(相澤、小西、水本ほか)で構成し、主に「骨修復セメントの開発」を推進した。2) 創製した材料を生物学的な視点で評価・解析できる研究者(理・農系チーム)では、分子生物学や生化学、発生工学などを専門とするメンバー(本田、神澤、長嶋ほか)で構成し、主に「生化学的解析・動物実験(ブタ)」を遂行した。さらに、3) 実際の病態に即して創製した材料の臨床的研究を行なえる研究者(医学系チーム)では、整形外科を専門とするメンバー(松本、石井ほか)で構成し、主に「動物実験(ウサギ)・臨床モデルによる検証」を遂行した。これらの3つのチームの連携により、新しい「次世代型ペースト状人工骨の開発」を推進した。

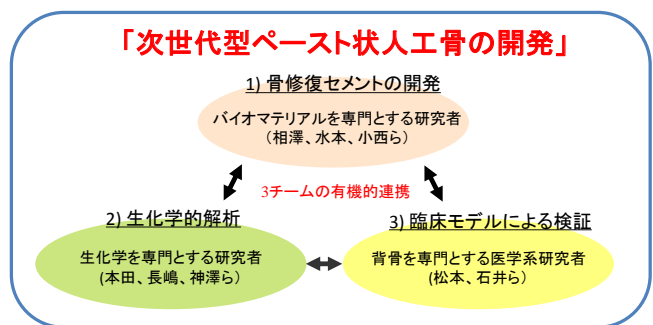


図2 本プロジェクトの研究体制

プロジェクト期間中、総計3名の常勤研究員・常勤準研究員とコアメンバーとし、上述した専門を異とする総計6名の非常勤研究員に研究を分担していただくことで幅広い分野の研究を効率的に実施して研究推進を加速させた。また、コアメンバーが創造的な研究に取り組む時間をより多く確保するため、総計5名の研究補助員を採用し、ルーチンワーク的な仕事を担当していただいた。プロジェクトリーダーの本務先である明治大学理工学部および明治大学大学院理工学研究科

の卒研生・博士前期課程に在籍する学生諸君にも研究協力員として当該プロジェクトに参画してもらい（総計 18 名）、当該プロジェクトの推進に協力していただいた。明治大学理工学部・明治大学大学院理工学研究科は、神奈川県川崎市に拠点があり、研究協力員の学生はすべて神奈川県内の大学生および大学院生である。研究員や準研究員は当然として、彼らもまた国内学会や国際会議などで研究成果を発表し、なかには「優秀賞」に採択される学生も複数おり、非常に優れた研究成果を挙げた。また、研究協力員の中には論文投稿・掲載や特許出願を行なう者も複数おり、さらに 4 年間という短い研究期間でありながら博士取得者も 1 名いる。したがって、我々のプロジェクトは単なる研究成果のみならず、神奈川県内の学生への教育上の貢献についても極めて多大であったと自負している。

#### 4. 研究成果の概要

##### 4.1 生体内安定性アパタイトセメントの実用化研究

このサブプロジェクトでは、最終的な製品の形として、低侵襲治療を可能とする「インジェクション型デバイス」を想定していることから、ペースト状人工骨の材料特性を臨床的に使用可能な特性に最適化する実験を推進した。評価項目として、ハンドリング性、圧縮強度、生体適合性および非崩壊性を掲げ、フェーズ I 終了時に達成する目標値を表 1 のように設定した。これまでに粉体の調製方法やイノシトールリン酸の表面修飾条件、適切な混練液の選択などを行ない、注射器でインジェクション可能であり、非崩壊性で、硬化時間 ~17 min、圧縮強度 ~22 MPa のセメントの開発に成功している。一例として、湿式法で合成したアパタイト粉体を 8000 ppm のイノシトールリン酸水溶液を媒体とし、ボールミル粉砕することで、粉砕とイノシトールリン酸による表面修飾を同時に行なって「セメント原料粉体」を調製した。これを 10 mass% キトサンおよび 2.5 mass% リン酸二水素ナトリウムを含む混練液と混ぜることで、上記のようなバランスの良い材料特性を備えたセメント試験の創製に成功している。以下、表 1 にフェーズ I 終了時における「評価項目、それらの目標値、成果(到達度)および自己評価」をまとめて示す。概ね目標値を越える成果を上げている。この研究成果を昇華させて「非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメント」の創製につなげていく。

表 1 インジェクション型 HAp セメントの研究成果

評価項目	ハンドリング性	圧縮強度	生体適合性	非崩壊性
目標値 (フェーズ I 終了時)	初期硬化 20 min 以内	ヒト脊椎の約 2 倍の 30 MPa 以上	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での 検証	水中にいれても崩壊せずに 形状を維持
到達度	17 min	22 MPa	<i>In vitro</i> → ○ <i>In vivo</i> → ○	○
自己評価	◎	○	○	○

##### 4.2 生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの実用化研究

このサブプロジェクトにおいても、低侵襲治療を可能とする「インジェクション型デバイス」を想定し、実用化を指向した研究を展開した。これまでに徒手混練や注射器で注入可能なセメントペーストを試作し、臨床不可欠な特性である「非崩壊性」を担保したセメントの作製に成功している。なお、この研究成果は、2012 年 3 月 22 日発行の日経産業新聞に「人工骨 ペースト状材料」としてプレスリリースされ、メディアからも注目されている。評価項目として、HAp 系で前述した四項目：ハンドリング性、圧縮強度、生体適合性および非崩壊性に「生体吸収性」を加え、フェーズ I 終了時に達成する目標値を表 2 のように設定した。概ね目標値を超える成果を上げている。より具体的には、これまでに粉体の調製方法やイノシトールリン酸の表面修飾条件、適切な混練液の選択などを行ない、注射器でインジェクション可能であり、非崩壊性で、硬化時間 ~25 min、圧縮強度 ~25 MPa のセメントの開発に成功している。

今後は、「非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメント」の創製を目指し、より実用化を意識してより高いスペックを備えたセメントに作りこんでいくとともに、生体吸収性に関わるセメント試験片の *in vitro* と *in vivo* での相関関係を明らかにする。

表 2 インジェクション型 TCP セメントの研究成果

評価項目	ハンドリング性	圧縮強度	生体適合性	生体吸収性	非崩壊性
目標値 (フェーズ I 終了時)	初期硬化 20 min 以内	ヒト脊椎よりも高い 20 MPa 程度	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での 検証	<i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での 確認	水中にいれても崩壊せずに 形状を維持
到達度	25 min	25 MPa	<i>In vitro</i> → ○ <i>In vivo</i> → ○	<i>In vitro</i> → ○ <i>In vivo</i> → ○	○
自己評価	○	◎	○	○	○

##### 4.3 骨誘導能を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの開発

このサブプロジェクトでは、フェーズ I において、フェーズ II で実施する「多機能性キレート硬化型アパタイトセメン

ト」を開発するための要素技術のひとつである「骨誘導能（より高い骨形成能）の付与」を目指した研究を展開した。ここでは、骨形成を促進する元素であるケイ素を添加した「ケイ素含有アパタイト」と生体骨と類似した化学組成をもつ「骨ミネラル含有アパタイト」を、それぞれ、セメントの出発原料に使用する2つのアプローチで研究を推進した。

まず、「骨ミネラル含有アパタイト」を出発物質とし、これにイノシトールリン酸を表面修飾して、セメントを試作したところ、圧縮強度 15 MPa 以上を備えたセメント試料片の試作に成功した。ついで、得られた試験片をモデルとして、実際にアパタイトよりも優れた生体活性を備えているかどうかを骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 やラット骨髄由来間葉系幹細胞などにより *in vitro* での生体適合性評価を行なった。ここでは、試験片表面の粗さによる影響を取り除くため、緻密な骨ミネラル含有アパタイトセラミックスを別に作製し評価したが、純粋なアパタイトよりも骨ミネラル含有アパタイトの方がより高い骨芽細胞の分化誘導能（特に、初期・中期の分化を促進）を示すことが明らかとなった。さらに、ウサギ脛骨にモデル試験片をインプラントし、その生体硬組織反応を比較検討したところ、インプラント 4 週の予備的研究では、骨ミネラル含有アパタイトの方が純粋なアパタイトよりも材料周囲での高い骨形成量が約 30% も多いことが分かった。また、「ケイ素含有アパタイト」をセメントの出発原料とすることで、高い細胞増殖性や骨形成能を備えたセメント試験の試作にも成功している。

これらのセメント試験片は、従来のアパタイト系セメントよりも極めて優れた骨形成能を担保しており、特に骨代謝レベルの低下した高齢者向けのペースト状人工骨の素材として臨床応用が期待される。

#### 4.4 インテリジェント DDS の構築(抗菌性)

このサブプロジェクトでは、フェーズ I において、フェーズ II で実施する「多機能性キレート硬化型アパタイトセメント」を開発するための要素技術のひとつである「抗菌性の付与」を目指した研究を展開した。ここでは、2つのアプローチで研究を推進した。一つは、i) 表面にナノサイズの細孔を備えた中空微小球を合成し、これをバンコマイシンなどの抗生物質のキャリアとして利用し、バンコマイシン担持中空微小球をセメント原料に添加して「抗菌性セメント」を創製する研究である。もう一つは、ii) 抗菌性のある銀(Ag)に着目し、Ag 担持リン酸カルシウム粉体を合成し、これをセメント原料に添加することで、「抗菌性セメント」を創製するアプローチである。

まず、i)のアプローチでは、「塩添加法超音波噴霧熱分解法」により表面にナノサイズの気孔を備えたアパタイト系中空微小球の合成に成功し、特に抗菌剤の担持と徐放の観点から、微小球の表面構造の最適化を進め、抗生物質（バンコマイシン）の二段階徐放が可能な微小球の調製に成功している。このバンコマイシン担持リン酸カルシウム微小球を用いて、セメント試作も進めている。また、ii)のアプローチにより、上記の方法により、銀を担持させたアパタイト(Ag-HAp)微小球を調製し、その抗菌性を *in vitro* および *in vivo* で調査し、その抗菌性を確認している。*In vivo* においても抗菌性の発現が認められたため、その結果をもとに、②で確立したセメント作製のプロトコルに Ag-HAp 粉体を添加し、「抗菌性セメント」の試作を行ない、非崩壊性でかつ抗菌性を備え、細胞毒性のほとんどないセメント試験片の試作にも成功している。なお、この研究はバイオセラミックスの分野で唯一の国際会議である 23rd International Symposium Ceramics in Medicine において、Best Poster Award を受賞している(Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa and M. Aizawa, "Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property", Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.)。これは我々の研究がグローバルな視点で front line にいることを示すエビデンスであり、特筆に値する。

これらのセメント試験片は、従来、感染に弱いと指摘されていたリン酸カルシウム系バイオセラミックスに耐感染性を付与させるものであり、術後感染の問題をクリアした「医者も患者も安心して使用できる新しいペースト状人工骨」の素材として臨床応用が期待される。

#### 4.5 イノシトールリン酸の抗腫瘍効果の検証

このサブプロジェクトでは、フェーズ I において、フェーズ II で実施する「多機能性キレート硬化型アパタイトセメント」を開発するための要素技術のひとつである「抗腫瘍効果の付与」を目指した研究を展開した。

まず、ヒト骨腫瘍由来の「細胞種 HOS (human osteosarcoma)細胞」をモデルとしてイノシトールリン酸(IP6)単独および IP6 で表面修飾したキレート硬化型アパタイトセメント(IP6-HAp セメント)上での細胞応答性について検証した。その結果、HOS 細胞に対し IP6 を処理することにより、アポトーシスが誘導され、濃度依存的に細胞増殖性が抑制されることが明らかになった。なお、この結果は別に独立して行なった「HeLa 細胞」における検証結果とも一致している。

また、IP6 の表面修飾濃度をかえ、異なる IP6 濃度をもつ IP6-HAp セメントを作製した。それらをモデル材料として上記と同様な評価を行なったところ、IP6 の表面修飾濃度が高濃度(5000 ppm 以上)になるとセメント上の細胞に形態異常が認められ、細胞増殖性にも影響を与えることが分かった。また、DNA マイクロアレイ法により、アポトーシス関連遺伝子の発現を調べたところ、IP6-HAp セメントにおいて、アポトーシス関連遺伝子の発現が亢進していることが明らかとなった。したがって、IP6 による表面修飾濃度をコントロールすることにより、がん細胞の増殖性を制御できることが分かった。

このセメント試験片は、リン酸カルシウム系ペースト状人工骨に抗腫瘍効果を付与させるものであり、骨腫瘍掻爬後の骨充填材として応用すると、腫瘍の再発防止につながるような新機能を付加させた新しいタイプの「ペースト状人工骨」の素材として臨床応用が期待される。

前述した「骨誘導能 (4.3 節)」「抗菌性 (4.4 節)」「抗腫瘍効果 (4.5 節)」に関する研究成果を融合させて、骨誘導・抗菌性・抗腫瘍効果の 3 つの機能を単独あるいは複数同時に付与させた「多機能性骨修復セメント」の創製につなげていく。

#### 4.6 非崩壊性および Non-fragmentation を担保した革新的骨修復セメントの開発と評価

ここでは、Phase I での研究実績を基盤として、臨床医が求めるニーズをすべて満たしたスペックを備えたペースト状人工骨、特に、血液介在時での確実な硬化および硬化後に fragmentation を生じない革新的なセメントを試作し、実際にそのモデル材料の創製に成功している。

まず、研究を始めるに際し、上記の Non-fragmentation を実験的に検証するための方法について、文献調査などを実施した。我々の文献調査の結果から、現状のリン酸カルシウムセメントは、血液介在時に確実な硬化が得られないことが第一の問題点であることがわかったが、その検証方法が現在ないことも判明し、そのプロトコル作成から研究を開始することにした。簡単に述べると、我々の提案しているプロトコルは、血液中に浸漬した型枠にセメントペーストを注入し、その硬化状態および fragmentation を X 線  $\mu$ -CT などにより検証するというものである。

本サブプロジェクトにおいても、最終的な製品の形として、低侵襲治療を可能とする「インジェクション型デバイス」を想定しているため、インジェクション法によりセメントを作製する条件において、達成項目とその目標値を以下のように定めた。

- 1) 非崩壊性: セメントペーストを所定の型枠に注入し、硬化後に純水中に投入しても崩壊しないセメントを作製する。
- 2) ハンドリング性: 上記の「非崩壊性」を担保した上で、硬化時間 20 分以内を達成する。
- 3) 最大強度に達する時間: 上記の「非崩壊性」を担保した上で、HAp セメント試料片の圧縮強度が 24 時間程度でヒト脊椎の圧縮強度(15 MPa)よりも高い 20 MPa 以上を達成させる。また、 $\beta$ -TCP セメントは生体吸収性であるため、10 MPa 程度を達成させる。
- 4) Non-fragmentation の検証: 実験動物から腰椎を取出し、その髄腔内にセメントペーストを注入し、fragmentation の有無を X 線  $\mu$ -CT を使って検証する。

まず、生体内安定性セメントに関しては、これまでに粉体の調製方法やイノシトールリン酸の表面修飾方法検討、混練液の検討を行なうことにより、非崩壊性で初期硬化時間 17 分、圧縮強度 22 MPa のセメントの開発に成功している。また、*in vivo* での生体適合性を確認するため、このセメントのブタ脛骨へ 4 週間埋入し、組織学的評価を行なったところ、埋入セメント材料周囲で炎症等は見られず、旺盛な骨形成が認められるとともに、材料付近に類骨、低石灰化骨、骨単位も観察されている。さらに、このセメントのブタ脛骨内での non-fragmentation も X 線  $\mu$ -CT により確認している。

生体内吸収性セメントに関しては、これまでに、IP6 中で  $\beta$ -TCP を粉砕および表面修飾同時処理することで得られた粉体を用いると、「非崩壊性」を備えたペースト状人工骨を作製できることを明らかにしてきた。ここでは、この粉体とクエン酸-リン酸水素ナトリウム-アルギン酸からなる混練液を用いることで、インジェクション可能なペーストが 17 分で初期硬化開始し、圧縮強度が約 25 MPa であるセメント作製条件を見いだしている。この条件から作製したセメントは、上記 1)-3) の目標はクリアしている。一方、項目 4) では、ブタの脛骨および筋肉内にセメントペースト注入し、その硬化状態および fragmentation を検討した。注入したペーストは脛骨および筋肉内で一塊となって硬化しており、 $\mu$ -CT 像から fragmentation を起こしていないことを確認している。

今後は、上記同様、骨粗鬆症モデル骨を用い、繰り返し荷重を负荷させた場合の fragmentation について検討する予定である。なお、これらの研究課題は企業との共同研究を開始しており、プロジェクト終了後、臨床応用を目指した実用化研究を展開する。

#### 4.7 多機能型アパタイトセメントの開発と評価

ここでは、Phase I での研究実績を基盤として、次世代を見据え、骨誘導・抗菌性・抗腫瘍効果の 3 つの機能を単独あるいは複数同時に付与させた「多機能性骨修復セメントの開発」を推進した。骨誘導能に関して、一例をあげると、ケイ素は骨形成を促進する元素として知られている。ここでは、ケイ素含有量の異なるアパタイト粉体を湿式法により合成し、これらを出発物質として、イノシトールリン酸を表面修飾し、セメント試験片を試作した。これまでに圧縮強度 15 MPa 以上を備えたセメント試験片の試作に成功している。ついで、得られた試験片をモデルとして、実際にアパタイトよりも優れた生体活性を備えているかどうかを骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて、細胞増殖性を評価した。その結果、純粋なアパタイトに比べて、ケイ素を仕込み組成で 2.4 mass% 含有したケイ素含有アパタイトは約 2 倍も細胞増殖性が向上することが明らかとなった。さらに、ブタ脛骨にモデル試験片をインプラントし、その生体硬組織反応を比較検討したところ、いずれの試験片を用いた場合も、骨と直接結合し、優れた骨伝導性を示すことが明らかになった。特に、低石灰化骨の形成に関しては、0.8 mass% 含有したケイ素含有アパタイトにおいて形成量の増大が確認された。また、2.4 mass% の場

合もコントロール(アパタイトのみ)に比べ、低石灰化骨量の増加が認められた。以上のことから、ケイ素含有アパタイトセメントは優れた生体適合性を有し、さらに骨形成能を促進し得るセメントとして大いに期待できる。また、骨ミネラル含有アパタイトを用いた研究が2012年9月11日の日経産業新聞に「ペースト状でミネラルを配合：骨の形成を促す効果が高い人工骨材料を開発」としてプレスリリースされている。

また、抗菌性セメントでは、サケ由来のタンパク質である「プロタミン」を利用し、バイオフィーム形成を阻害する、新しいセメントの試作にも成功している。この課題は企業との共同研究も進行しており、ここでは詳細の記載は避ける。なお、この研究に関連して、2012年9月14日に化学工業日報に「サケ由来のたんぱく質利用 新規抗菌性材料を創製」として研究成果が掲載されている。

さらに、抗腫瘍効果を備えたセメントでは、抗腫瘍効果の発現誘導メカニズムを明らかにするために、細胞周期関連遺伝子の発現解析を行ない、その結果、HOS細胞において細胞周期G1期に関する遺伝子であるCyclin D1の発現量の低下が確認されている。このことから、IP6-HApセメントから溶出したIP6がHOS細胞に選択的に作用し、細胞周期G1期の進行を阻害することで細胞増殖抑制効果を発揮している可能性が考えられる。IP6により引き起こされた細胞周期の異常がこれまでに確認されたアポトーシスを誘導したと考えられる。

また、これらの機能を複数同時に付加させるアプローチについても検討を開始している。今後は、より付加価値の高い「次世代型ペースト状人工骨」としての展開をはかるべく、骨誘導・抗菌性・抗腫瘍効果の発現メカニズムの解明とともに、実際の臨床応用に使用可能なレベルに材料特性を作りこむ計画である。

## 5. 課題および今後の展望

これまで「創造展開プロジェクト」として推進した4年間の研究成果の概略を述べてきた。我が国は他の先進国に先駆けて既に「超高齢社会」に突入している。そのため、骨粗鬆症などの疾患に対する高度先進医療を実現することが急務な課題である。本プロジェクトでは、例えば、高齢者特有の骨粗鬆症などの骨疾患に対して、注射器などで注入可能な低侵襲治療を具現化する「次世代ペースト状人工骨」を開発することを目的として研究を推進した。また、現在、骨移植を伴う疾患に対する現在の治療法は自家骨を補填する方法がゴールドスタンダードであるが、採取量の限界や二次的な侵襲などの問題がある。これを解決する方法は、人工骨により骨誘導能（より高い骨形成能）を付与させる技術を確認する必要がある。また、最近、人工骨や金属インプラントなどのバイオマテリアルの利用が増加しているが、術後感染がひとつの大きな問題となっている。これを解決する手段は材料自身に抗菌性を付与させることである。さらに、悪性新生物（がん）はここ20年来我が国における死亡率の第1位であり、抗腫瘍効果を備えた材料開発も重要な課題と言える。

当該プロジェクトでは、そのような社会的背景を鑑み、低侵襲治療を可能にし、「非崩壊性および non-fragmentation を備えた新規なペースト状人工骨」の開発を推進してきた。これまでに、非崩壊性および non-fragmentation を担保したセメント試験片モデルの試作に成功しており、現在、さらに材料特性・生体適合性・医療現場での操作性に関してバランスのとれたセメントに作りこむべく「作製条件の最適化」を推進しているところである。この革新的なペースト状人工骨は、企業と既に連携しており、プロジェクト終了後は、本務先の明治大学で、その企業と実用化研究を進めていく。また、骨誘導・抗菌性・抗腫瘍効果を備えた「多機能性ペースト状人工骨」は「次世代」のペースト状人工骨として位置づけられ、メディアにも取り上げられているように、これまでに優れた研究成果（骨形成能の大幅な向上など）を上げている。今後は、機能発現メカニズムの解明とともに、より臨床応用を意識して材料特性などを向上させる研究を本務先で継続して進めていく。近い将来、この研究プロジェクトにもとづく成果が、我が国だけでなく全世界の「患者さんのもとに届く」ことを願い、さらに研究を遂行していきたい。

## 6. 業績(丸印の論文を巻末に掲載)

### 【原著論文】

- ① Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, T. Uchino, and M. Aizawa, "Preparation of apatite microspheres with nano-size pores on the surface via salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and its drug release behavior", *J. Aust. Ceram. Soc.*, **46**, 6-10 (2010).
2. S. Sato, Y. Horiguchi, M. Mizumoto, T. Konishi, M. Honda, K. Oribe, and M. Aizawa, "Effects of mixing solutions on the initial setting time and compressive strength of chelate-setting apatite cements", *Arch. BioCeram. Res.*, **10**, 133-136 (2010).
3. S. Takahashi, T. Konishi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, S. Sato, K. Oribe, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting  $\beta$ -tricalcium phosphate cements for minimally-invasive treatment and their evaluations", *Arch. BioCeram. Res.*, **10**, 145-148 (2010).
4. M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, "Cell proliferation, morphology and differentiation of transgenic-cloned pig calvarial osteoblasts on the silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray-pyrolysis technique", *J. Aust. Ceram. Soc.*, **47**, 37-41 (2011).
- ⑤ S. Takahashi, T. Konishi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, and M. Aizawa, "Fabrication of novel bioresorbable  $\beta$ -tricalcium phosphate cement on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate and its evaluation", *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **119**, 35-42 (2011).
6. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang, and M. Aizawa, "Fabrication of calcium-phosphate cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various concentrations of sodium inositol hexaphosphate and their material properties", *World J. Engineer.*, **7 (Suppl 3)**, 595-596 (2011).
7. H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Biochemical Studies of the Potential Anti-Tumor Activity of Novel Chelate-Setting Apatite Cements", *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 315-319 (2012).
8. M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda, and H. Yoshimura, "Hydroxyapatite Ceramics Including Bone Minerals Promote Differentiation of Osteoblasts Derived from Rat Bone Marrow Cells", *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 320-324 (2012).
9. Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted hydroxyapatite and its property", *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 370-374 (2012).
10. Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, and M. Aizawa, "Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property", *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 678-683 (2012).
11. H. Funao, K. Ishii, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, M. Aizawa, Y. Okada, K. Chiba, S. Koyasu, Y. Toyama, and M. Matsumoto, "Establishment of a Real-Time, Quantitative, and Reproducible Mouse Model of Staphylococcus Osteomyelitis Using Bioluminescence Imaging", *Infect. Immun.*, **80**, 733-741 (2012).
12. T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various sodium inositol hexaphosphate concentrations and their mechanical properties", *Procedia Eng.*, **36**, 137-143 (2012).
13. Z. Zhuang, T. Miki, M. Yumoto, T. Konishi, and M. Aizawa, "Ultrastructural observation of hydroxyapatite ceramics with preferred orientation to a-plane using high-resolution transmission electron microscopy", *Procedia Eng.*, **36**, 121-127 (2012).

14. T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting cement from hydroxyapatite powder prepared by simultaneously grinding and surface-modifying with sodium inositol hexaphosphate and their material properties", *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **120**, 159-165 (2012).
15. H. Manabe, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "In vitro bioresorbability of chelate-setting cements with various calcium-phosphate phases", *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 105-108 (2012).
16. T. Ganmoto, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, H. Matsunari, Y. Takeuchi, H. Nagashima, and M. Aizawa, "In vivo biocompatibility of apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property using pig model by implanting into tibia", *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 1-3 (2012).
17. T. Konishi, S. Takahashi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Oribe, and M. Aizawa, "Effect of the addition of various polysaccharides on the material properties and cytotoxicity of chelate-setting  $\beta$ -tricalcium phosphate cement", *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 59-64 (2012).
18. Z. Zhuang, T. Konishi, H. Yoshimura, and M. Aizawa, "Ultrastructural analysis of hydroxyapatite nano particles synthesized under different initial pH conditions using high-resolution transmission electron microscopy", *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 81-86 (2012).
19. M. Honda, K. Kikushima, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray pyrolysis technique", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **23**, 2923-2932 (2012).
20. T. Konishi, S. Takahashi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Kida, Y. Horiguchi, K. Oribe, K. Ishii, H. Morisue, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, "Comparative study on bioresorbability of chelate-setting cements with various calcium-phosphate phase using rabbit", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 167-172 (2013).
21. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Adsorption behavior of sodium inositol hexaphosphate on the surface of hydroxyapatite", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 161-166 (2013).
22. M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "In vitro evaluation of anti-tumor effect of the chelate-setting hydroxyapatite cement using inositol hexaphosphate", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 173-177 (2013).
23. Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "In vitro evaluation of chelate-setting cements fabricated from silicon-containing apatite powder using osteoblastic cells", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 183-186 (2013).
24. T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Studies on the anti-tumor action of chelate-setting apatite cements", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 178-182 (2013).
25. H. Ishii, Y. Mukai, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Analysis of gene expression and morphology of P19 cells cultured in an apatite-fiber scaffold", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 370-373 (2013).
26. H. Ohsugi, Y. Habuto, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Evaluation of the anti-bacterial activity of a novel chelate-setting apatite cement containing lactoferrin", *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 187-191 (2013).
27. E.S. Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe, P.N. Lim, B. Ho, C. Choong, and M. Aizawa, "Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 437-445 (2013).
28. T. Konishi, Y. Horiguchi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa,

- “Novel chelate-setting calcium-phosphate cements fabricated with wet-synthesized hydroxyapatite powder”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 611-621 (2013).
29. Z. Zhuang, T.J. Fujimi, M. Nakamura, T. Konishi, H. Yoshimura and M. Aizawa, “Development of *a,b*-plane-oriented hydroxyapatite ceramics as models for living bones and their cell adhesion behavior”, *Acta Biomater.*, **9**, 6732-6740 (2013).
30. T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Biodegradable  $\beta$ -tricalcium phosphate cement with anti-washout property based on chelate-setting mechanism of inositol phosphate”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 1383-1394 (2013).
31. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “Fabrication of novel biodegradable  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement set by chelating capability of inositol phosphate and its biocompatibility”, *J. Nanomater.*, **2013**, 1-11 (2013).
32. M. Honda, Y. Watanabe, T. Tsuchiya, N. Kanzawa, and M. Aizawa, “Selective differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteocytes via endochondral ossification in an apatite-fiber scaffold”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, (Accepted).

#### 【総説・解説・書籍】

1. 本田みちよ, 「バイオマテリアル開発における異分野融合」, バイオマテリアル-生体材料-, **28**, 130 (2010).
2. 相澤 守, 「無機リン化学とアパタイト」, *Phosphorus Letter*, **67**, 2-4 (2010).
3. 相澤 守, 「明治大学工学部応用化学科 生体関連材料研究室 神奈川科学技術アカデミー 相澤「次世代バイオセラミックス」プロジェクト」, *Phosphorus Letter*, **68**, 34-41 (2010).
4. 相澤 守・小西敏功・松本守雄, 「キレート硬化型骨修復セメントの開発」, セラミックデータブック 2010, **38**, 201-205 (2010).
5. 小西敏功, 「学会印象記 第3回国際セラミックス会議」, バイオマテリアル-生体材料-, **29**, 58-59 (2011).
6. 相澤 守・松本守雄, 「生体硬組織への応用を目指したアパタイト系材料の創製とその生物学的評価」, 材料の科学と工学, **49**, 242-245 (2012).
7. 相澤 守・小西敏功・松本守雄, 「第11回「次世代バイオセラミックス」-低侵襲治療を指向したペースト状人工骨の開発-」, 工業材料, **60**, 46-54 (2012).
8. 本田みちよ・相澤 守, 「抗菌性を有するキレート硬化型骨修復セメントの開発」, 無機マテリアル, **19**, 423-429 (2012).
9. 相澤 守, 「バイオセラミックスの現状と新展開」, 無機マテリアル, **19**, 363-370 (2012).
10. 相澤 守, 「高い骨形成能を備えたキレート硬化型骨修復セメントの開発」, *Ceramics Japan (セラミックス)*, **48**, 57 (2013).
11. 本田みちよ, 「学会印象記 日本セラミックス協会 第25回秋季シンポジウム」, バイオマテリアル-生体材料-, **31**, 51-52 (2013).
12. 本田みちよ, 「抗菌性 生体材料を活用した研究開発テーマの発掘」, 技術シーズ, (In press).

#### 【口頭発表(ポスター発表を含む)】

[国内学会]



1. ○相澤 守, 「生体材料の現状と将来、水酸アパタイトの形態制御とその応用」, 日本無機リン化学会, 2010/3/4 (招待講演)
2. ○本田みちよ・水本みのり・神澤信行・相澤 守, 「キレート硬化型骨アパタイトセメントの抗腫瘍効果-ヒト骨肉腫細胞による基礎研究-」, 日本セラミックス協会 2010 年年会, 2010/3/22-24
3. ○水本みのり・吉川哲史・堀口悠紀子・織部一弥・相澤 守, 「機械粉碎アパタイト粉体から作製した高強度化キレート硬化型セメントの生体適合性」, 日本セラミックス協会 2010 年年会, 2010/3/22-24
4. ○佐藤静磨・堀口悠紀子・水本みのり・織部一弥・相澤守, 「キレート硬化型アパタイトセメントの圧縮強度および細胞毒性に及ぼすコンドロイチン硫酸添加の影響」, 日本セラミックス協会 2010 年年会, 2010/3/22-24
5. ○相澤 守, 「バイオセラミックスを利用した新しい癌化学塞栓療法の開発」, 第 60 回福岡がん化学療法研究会, 2010/3/31 (招待講演)
6. ○川延勇介・本田みちよ・神澤信行・相澤 守, 「塩添加超音波噴霧熱分解法によるリン酸カルシウム微小球の合成と薬剤除放特性」, 無機マテリアル学会第 120 回学術講演会, 2010/6/4
7. ○猪股義彦・本田みちよ・水本みのり・小西敏功・平岡和佳子・相澤 守, 「イノシトールリン酸濃度の異なるキレート硬化型アパタイトセメントの作製とその評価」, 第 20 回無機リン化学討論会, 2010/10/7
8. ○大山 遼・藤見峰彦・本田みちよ・前橋はるか・松浦知和・相澤 守, 「アパタイトファイバースキャフォールドを用いて三次元培養した血管内皮細胞の増殖性およびその形態観察」, 第 20 回無機リン化学討論会, 2010/10/7
9. ○鴈本拓也・島田愛生・安富由美子・本田みちよ・水本みのり・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守, 「クサビラオレンジ蛍光遺伝子を導入したブタを用いた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの *in vivo* 評価」, 第 20 回無機リン化学討論会, 2010/10/7
10. ○相澤 守・小西敏功・木田弘毅・高橋周平・織部一弥・森末 光・戸山芳昭・松本守雄, 「生体吸収性の異なるキレート硬化型骨修復セメントの生体内反応」, 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010/10/15
11. ○本田みちよ・小西敏功・水本みのり・相澤 守, 「キレート硬化型骨アパタイトセメントの抗腫瘍性評価」, 無機マテリアル学会第 121 回学術講演会, 2010/11/4 (講演奨励賞)
12. ○相澤 守・小西敏功・松本守雄, 「キレート硬化型ペースト状人工骨の創製とその機能」, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 2010/11/30 (招待講演)
13. ○本田みちよ・菊島光一・水本みのり・小西敏功・相澤 守, 「ケイ素含有アパタイトセラミックス上で培養した骨芽細胞の増殖・形態および分化」, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 2010/11/30
14. ○水本みのり・吉川哲史・堀口悠紀子・織部一弥・小西敏功・本田みちよ・相澤 守, 「機械粉碎アパタイトおよびコンドロイチン硫酸を利用したキレート硬化型セメントの高強度化およびその細胞毒性」, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 2010/11/30
15. ○川延勇介・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・羽太優理・神澤信行・相澤 守, 「表面にナノサイズの細孔を備えたりん酸カルシウム中空微小球の調整とその薬剤徐放特性」, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 2010/11/30
16. ○猪股義彦・本田みちよ・水本みのり・小西敏功・平岡和佳子・相澤 守, 「イノシトールリン酸を用いて創製したキレート硬化型アパタイトセメントの抗腫瘍効果 -HeLa 細胞による検討-」, 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 2010/11/30

17. ○湯沢 琴・初川淳一・相澤 守・神澤信行,「大腸菌発現 BMP-2 の骨形成促進能の評価」,第 32 回日本バイオマテリアル学会大会,2010/11/29
18. ○小西秀典・湯沢 琴・相澤 守・神澤信行,「多機能性キレート硬化型骨修復セメントの抗腫瘍性に関する評価と解析」,第 32 回日本バイオマテリアル学会大会,2010/11/29
19. ○大山 遼・前橋はるか・松浦知和・本田みちよ・藤見峰彦・相澤 守,「アパタイトファイバースキャフォールドを用いて三次元培養した血管内皮細胞の増殖性およびその形態」,第 32 回日本バイオマテリアル学会大会,2010/11/30
20. ○初川淳一・湯沢 琴・相澤 守・神澤信行,「蛍光タンパク質を用いた生体材料の骨誘導能評価システムの構築」,第 32 回日本バイオマテリアル学会,2010/11/30
21. ○本田みちよ・水本みのり・小西敏功・松成ひとみ・長嶋比呂志・相澤 守,「クサビラオレンジブタ頭蓋骨より単離した骨芽細胞の骨分化過程の解析」,第 14 回生体関連セラミックス討論会,2010/12/3
22. ○高橋周平・小西敏功・西山晃司・水本みのり・本田みちよ・織部一弥・相澤 守,「低侵襲治療を指向した生体吸収性キレート硬化型  $\beta$ -リン酸三カルシウムセメントの作製とその評価」,第 14 回生体関連セラミックス討論会,2010/12/3
23. ○相澤 守,「バイオセラミックスの研究動向-次世代ペースト状人工骨の開発-」,第 310 回応用化学コロキウム,2010/12/18
24. ○水本みのり・吉川哲史・小西敏功・本田みちよ・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤守,「機械粉碎アパタイトとキトサン溶液を利用したキレート硬化型セメントの作製とその生体適合性」,日本セラミックス協会 2011 年年会,2011/3/16
25. ○猪股義彦・平岡和佳子・本田みちよ・小西敏功・水本みのり・相澤 守,「HeLa 細胞をモデルとしたキレート硬化型アパタイトセメントの抗腫瘍効果の検証」,日本セラミックス協会 2011 年年会,2011/3/17
26. ○鷹本拓也・島田愛生・安富由美子・本田みちよ・水本みのり・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守,「クサビラオレンジブタ脛骨埋入による高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの生体適合性評価」,日本セラミックス協会 2011 年年会,2011/3/16
27. ○本田みちよ・小西敏功・水本みのり・松成ひとみ・長嶋比呂志・相澤 守,「ケイ素含有アパタイトセラミックス上でのクサビラオレンジブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の骨分化過程の解析」,無機マテリアル学会 第 122 回講演会,2011/6/2
28. ○本田みちよ・小西敏功・水本みのり・松成ひとみ・長嶋比呂志・相澤守,「クサビラオレンジブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の単離とその生物学的評価」,第 20 回硬組織再生生物学会学術大会,2011/8/27
29. ○鷹本拓也・本田みちよ・水本みのり・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守,「ブタの脛骨埋入による高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの生体適合性評価」,第 20 回硬組織再生生物学会学術大会,2011/8/27
30. ○真部弘毅・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守,「種々のリン酸カルシウム相からなるキレート硬化型セメントの *in vitro* における生体吸収性の評価」,第 24 回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム,2011/9/7
31. ○小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守,「種々のイノシトールリン酸濃度で表面修飾したアパタイト粉体からの骨修復セメントの作製とその評価」,第 24 回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム,2011/9/7
32. ○中島佑亮・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守,「湿式法により調製したケイ素含有アパタイトによるキレート硬化型セメントの作製とその評価」,第 24 回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム,2011/9/7
33. ○千布悠貴・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・松本守雄・石井 賢・相澤 守,「骨ミネラル含有アパタイトから作製し

たキレート硬化型セメントのウサギ脛骨埋入による組織学的評価」, 第 24 回日本セラミックス協会 秋季シンポジウム, 2011/9/8

34. ○三木拓也・安富由美子・本田みちよ・吉村英恭・相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトセラミックスによるラット骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化誘導」, 第 21 回無機リン化学討論会, 2011/9/30
35. ○本田みちよ・小西敏功・水本みのり・相澤 守, 「キレート硬化型骨アパタイトセメントにおける骨肉腫細胞の生化学的評価」, 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 2011/11/21
36. ○水本みのり・小西敏功・本田みちよ・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守, 「キトサン添加によるインジェクション型アパタイトセメントの試作と大型動物による生体適合性の検証」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/22
37. ○鷹本拓也・安富由美子・本田みちよ・水本みのり・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守, 「大型動物であるブタの脛骨に埋入した高強度化アパタイトファイバースキャホルドの硬組織適合性」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/22
38. ○川延勇介・本田みちよ・水本みのり・小西敏功・羽太優里・神澤信行・石井 賢・松本守雄・相澤 守, 「超音波噴霧熱分解法により合成した銀担持ハイドロキシアパタイト微小球の抗菌性評価」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/22
39. ○千布悠貴・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・松本守雄・石井 賢・相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの生体適合性評価」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/22
40. ○三木拓也・藤野匡敏・安富由美子・深澤倫子・吉村英恭・相澤守, 「骨ミネラル含有アパタイトセラミックスの材料特性」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/22
41. ○羽太優理・相澤 守・神澤信行, 「キレート硬化型骨修復セメントへの生理活性ペプチド添加による抗菌性付与」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/21
42. ○稲山哲哉・小西秀典・相澤 守・神澤信行, 「腫瘍治療に有効なキレート硬化型骨修復セメントの評価」, 第 33 回バイオマテリアル学会大会, 2011/11/22
43. ○水本みのり・小西敏功・本田みちよ・船尾陽生・石井 賢・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守, 「キトサンを添加したインジェクション型アパタイトセメントのウサギ脛骨への埋入による硬組織適合性評価」, セラミックス協会 2012 年年会, 2012/3/19
44. ○中島佑亮・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守, 「ケイ素含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの骨芽細胞を用いた *in vitro* 評価」, 日本セラミックス協会 2012 年年会, 2012/3/20
45. ○相澤 守・本田みちよ・小西敏功・水本みのり・神澤信行・長嶋比呂志・石井賢・戸山芳昭・松本守雄, 「多機能性キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの開発」, 第 85 回日本整形外科学会学術総会, 2012/5/17 (招待講演)
46. ○相澤 守, 「バイオセラミックスの現状と新展開」, オリンパステルモバイオマテリアル株式会社セラミックス塾, 2012/8/24
47. ○相澤 守, 「先端機能性セラミックスの作製と応用 -バイオセラミックスを例にして-」, 日本セラミックス協会東北北海道支部郡山地区セミナー, 2012/9/8 (招待講演)
48. ○本田みちよ・川延勇介・小西敏功・水本みのり・相澤 守, 「バイオフィルム形成阻害可能な抗菌性材料の開発」, 日本

セラミックス協会 第 25 回秋季シンポジウム, 2012/9/19

49. ○水本みのり・小西敏功・本田みちよ・相澤 守, 「イノシトールリン酸溶液中での粉碎および表面修飾の同時処理を施した湿式合成アパタイト粉体によるキレート硬化型セメントの作製」, 日本セラミックス協会 第 25 回秋季シンポジウム, 2012/9/19
50. ○持田直輝・川延勇介・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・羽太優理・神澤信行・相澤 守, 「バンコマイシン担持リン酸カルシウム微小球を用いた抗菌性セメントの作製とその評価」, 日本セラミックス協会 第 25 回秋季シンポジウム, 2012/9/20
51. ○目黒佑太・猪股義彦・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守, 「抗腫瘍効果を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの作製とその評価」, 日本セラミックス協会 第 25 回秋季シンポジウム, 2012/9/20
52. ○永田幸平・小西敏功・高橋周平・水本みのり・本田みちよ・相澤 守, 「非崩壊性を備えたキレート硬化型  $\beta$ -リン酸三カルシウムセメントの作製とその材料特性」, 第 22 回無機リン化学討論会, 2012/9/25
53. ○相澤 守, 「低侵襲治療に貢献する次世代バイオセラミックスの開発」, グンゼ株式会社, 2012/9/27 (招待講演)
54. ○庄 志・中村まり子・小西敏功・吉村英恭・相澤 守, 「 $a$  面配向アパタイトセラミックスによる生体骨モデルの構築とその評価」, 第 125 回無機マテリアル学会学術講演会, 2012/11/1
55. ○本田みちよ・川延勇介・小西敏功・水本みのり・清水友亮・神澤信行・石井賢・松本守雄・戸山芳・相澤守, 「銀含有リン酸カルシウム微小球による抗菌性セメントの創製とその評価」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012/11/26
56. ○眞部弘毅・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・石井 賢・船尾陽生・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守, 「種々のリン酸カルシウム相からなるキレート硬化型リン酸カルシウムセメントの *in vitro/in vivo* における生体吸収性の評価」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012/11/27
57. ○千布悠貴・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・石井賢・船尾陽生・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの硬組織適合性」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012/11/27
58. ○鷹本拓也・本田みちよ・水本みのり・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守, 「高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの骨誘導能の検証」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012, 2012/11/27
59. ○持田直輝・川延勇介・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・羽太優理・神澤信行・相澤 守, 「バンコマイシン担持リン酸カルシウム微小球を用いた抗菌性セメントの作製とその評価」, 第 16 回生体関連セラミックス討論会, 2012/11/30
60. ○眞部弘毅・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・石井賢・船尾陽生・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守, 「種々のリン酸カルシウム相からなるキレート硬化型カルシウムセメントの *in vitro/in vivo* における生体吸収性評価」, 第 16 回生体関連セラミックス討論会, 2012/11/30
61. ○千布悠貴・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・石井 賢・船尾陽生・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの生物学的評価」, 第 16 回生体関連セラミックス討論会, 2012/11/30
62. ○小西敏功・高橋周平・庄 志・永田幸平・水本みのり・本田みちよ・竹内靖浩・松成ひとみ・長嶋比呂志・相澤 守, 「 $\beta$ -リン酸三カルシウムを用いたキレート硬化型ペースト状人骨の開発」, 第 51 回セラミックス基礎科学討論会, 2013/1/10

63. ○目黒佑太・猪股義彦・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守, 「種々のイノシトールリン酸濃度で作製したキレート硬化型アパタイトセメントに対する腫瘍モデル細胞の細胞応答性」, 第 51 回セラミックス基礎科学討論会, 2013/1/10
64. ○相澤 守, 「多機能性キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの開発」, ライフサイエンス分野シンポジウム: バイオマテリアルの新展開, 2013/1/29
65. ○相澤 守, 「生体硬組織への応用を目指したアパタイト系材料の創製とその生物学的評価」, 第 4 回医用・生体材料分科会講演会, 2013/3/4
66. ○藤岡 恵・永田幸平・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守, 「Non-fragmentation を担保したリン酸カルシウムセメントの試作とその評価方法」, 日本セラミックス協会 2013 年年会, 2013/3/18
67. ○横田倫啓・三木拓也・千布悠貴・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・船尾陽生・戸山芳昭・石井 賢・松本守雄・相澤 守, 「骨ミネラル含有アパタイトセラミックスの *in vivo* 評価」, 日本セラミックス協会 2013 年年会, 2013/3/17
68. ○清水友亮・川延勇介・小西敏功・本田みちよ・相澤 守, 「抗菌性を備えた非崩壊型骨修復セメントの作製とその細胞毒性評価」, 明治大学・北見工業大学 大学院研究交流プログラム 2013, 2013/3/21
69. ○本田みちよ, 「抗菌性生体材料のニーズと研究開発動向」, 技術情報協会セミナー, 2013/3/29 (依頼講演)
70. ○相澤 守, 「バイオセラミックスの現状と新展開 - 低侵襲治療を目指したペースト状人工骨の開発- 」, 株式会社豊田中央研究所, 2013/5/31 (招待講演)
71. 中島佑亮・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・新井良和・中野和明・長屋昌樹・長嶋比呂志・○相澤 守, 「ケイ素含有アパタイトを用いたキレート硬化型セメントの創製とその硬組織適合性」, 無機マテリアル学会 第 126 回学術講演会, 2013/6/6
72. ○本田みちよ・水本みのり・川延勇介・清水友亮・持田直樹・小西敏功・石井 賢・松本守雄・相澤 守, 「銀含有リン酸カルシウムセメントの創製とその生物学的評価」, 無機マテリアル学会 第 126 回学術講演会, 2013/6/6
73. ○小西敏功, 「キレート硬化メカニズムによる新規なリン酸カルシウムセメントの創製とその材料特性」, 第 13 回次世代医工学研究会, 2013/6/21

#### 〔国際会議〕

1. S. Sato, Y. Horiguchi, M. Mizumoto, K. Oribe, and M. Aizawa, “Effects of mixing solutions on mechanical property of chelate-setting apatite cements for minimally invasive treatment”, 2010 Annual Meeting of the Orthopaedics Research Society, 7th Mar, 2010.
2. M. Aizawa, T. Konishi, K. Kida, K. Oribe, H. Morisue, Y. Toyama, and M. Matsumoto, “Development of novel calcium-phosphate cements on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate”, Fourth International Conference on Science and Technology of Advanced Ceramics (STAC-4), 23th Jun, 2010 (*Invited talk*).
3. M. Aizawa, “Development of hollow calcium- phosphate ceramics microsphere loaded with anti-angiogenic agent for novel chemical and embolic therapy”, Research Seminar: Angiogenesis Inhibition in Cancer and Biomaterial Science, National Cancer Center of Mongolia, 11th Jun, 2010, (*Invited talk*).
4. S. Sato, Y. Horiguchi, M. Mizumoto, T. Konishi, M. Honda, K. Oribe, and M. Aizawa, “Effects of mixing solutions on the

- initial setting time and compressive strength of chelate-setting apatite cements”, Asian BioCeramics Symposium 2010 (ABC2010), 3rd Nov, 2010.
5. S. Takahashi, T. Konishi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, S. Sato, K. Oribe, and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting  $\beta$ -tricalcium phosphate cements for minimally-invasive treatment and their evaluations”, Asian BioCeramics Symposium 2010 (ABC2010), 3rd Nov, 2010.
  6. T. Konishi, S. Takahashi, K. Nishiyama, K. Kida, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, H. Morisue, Y. Toyama, and M. Matsumoto, and M. Aizawa, “*In vivo* evaluation of chelate-setting calcium phosphate cements with bioresorbability using rabbit model”, 3rd International Congress on Ceramics (ICC3), 16th Nov, 2010
  7. M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Cell proliferation, morphology and differentiation of Transgenic- cloned pig calvarial osteoblasts on the silicon- substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray-pyrolysis technique”, 5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials (ISACB5), 12th Dec, 2010.
  8. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, S. Sato, K. Oribe, and M. Aizawa, “Effect of the addition of citric acid to mixing solution on handling ability and mechanical property of chelate-setting calcium- phosphate cement”, 5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials (ISACB5), 11th Dec, 2010.
  9. Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, and M. Aizawa, “Preparation of apatite microsphere with nano-size pores on the surface via salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and its drug release behavior”, 5th International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials (ISACB5), 11th Dec, 2010.
  10. T. Konishi, S. Takahashi, M. Mizumoto, S. Sato, M. Honda, K. Kida, Y. Horiguchi, K. Oribe, K. Ishii, K. Morisue, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “*In vivo* comparative study of chelate-setting calcium-phosphate cements with various bioresorbability using rabbit model”, 2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 13 Jan, 2011.
  11. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang, and M. Aizawa, “Fabrication of calcium-phosphate cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various concentrations of sodium inositol hexaphosphate and their material properties”, 19th International Conference on Composites/Nano Engineering (ICCE-19), 27th Jul, 2011 (*Invited talk*).
  12. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various sodium inositol hexaphosphate concentrations and their mechanical properties”, IUMRS International Conference in Asia 2011 (IUMRS-ICA 2011), 19th Sep, 2011.
  13. M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda, and H. Yoshimura, “Hydroxyapatite ceramics including bone minerals promote differentiation of osteoblasts derived from rat bone marrow cells”, 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 7th Nov, 2011.
  14. H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, “Biochemical studies on novel chelate-setting apatite cements in antitumor action”, 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 7th Nov, 2011.
  15. Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, Z. Zhuang, and M. Aizawa, “Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property”, 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 7th Nov, 2011 (*Best Poster Presentation Award*).

16. Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted hydroxyapatite and its property", 23rd International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 8th Nov, 2011.
17. H. Manabe, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Evaluation of *in vitro* bioresorbability of chelate-setting calcium phosphates cements", 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 30th Nov, 2011.
18. T. Ganmoto, M. Honda, M. Mizumoto, H. Matsunari, Y. Takeuchi, H. Nagashima, and M. Aizawa, "Hard tissue compatibility of apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property using pig model by implanting into tibia", 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 30th Nov, 2011.
19. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang, and M. Aizawa, "Effect of concentration of inositol hexaphosphate on material properties of chelate-setting apatite cement", 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 30th Nov, 2011 (**ABC Award 2011**).
20. Z. Zhuang, M. Yumoto, T. Miki, T. Konishi, and M. Aizawa, "Development of hydroxyapatite ceramics with preferred orientation to *a*-plane", 11th Asian BioCeramics Symposium (ABC2011), 30th Nov, 2011.
21. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Material properties of chelate-setting  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement using Inositol Hexaphosphate", 9th World Biomaterials Congress (WBC), 4th Jun, 2012.
22. T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Development of calcium-phosphate cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various concentrations of sodium inositol hexaphosphate and their evaluation", International Conference of Young Researchers on Advanced Materials 2012 (ICYRAM 2012), 2nd Jul, 2012 (**Invited talk**).
23. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Nagashima, and M. Aizawa, "Enhancement of handling and mechanical property of chelate-setting  $\alpha$ -calcium phosphate cement by addition of citric acid and chitosan to mixing solution and its *in vitro/vivo* evaluations", 4th International Congress on Ceramics (ICC4), 16th Jul, 2012.
24. M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "*In vitro* biological evaluation of anti-tumor effect of the chelate-setting hydroxyapatite cement", 24th International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24), 22nd Oct, 2012.
25. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, "Adsorption behavior of sodium inositol hexaphosphate on the surface of hydroxyapatite", 24th International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24), 22nd Oct, 2012.
26. T. Konishi, S. Takahashi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Kida, Y. Horiguchi, K. Oribe, K. Ishii, H. Morisue, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, "Comparative study of bioresorbability of chelate-setting cements with various calcium-phosphate phase using rabbit model", 24th International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24), 22nd Oct, 2012.
27. Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, "*In vitro* evaluation of chelate-setting cements fabricated from silicon-containing apatite powder using osteoblastic cells", 24th International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24), 22nd Oct, 2012.
28. T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Studies on the anti-tumor action of chelate-setting apatite cements", 24th International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24), 22nd Oct, 2012.
29. H. Ohsugi, Y. Habuto, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, "Evaluation of the anti-bacterial activity of a novel chelate-setting apatite cement containing lactoferrin", 24th International Symposium for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24),

22nd Oct, 2012.

30. M. Aizawa, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, H. Morisue, K. Ishi, Y. Toyama, and M. Matsumoto, “Development of novel calcium-phosphate cements on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate”, 12th Asian BioCeramics Symposium (ABC2012), 18th Nov, 2012 (*Invited talk*).
31. K. Nagata, S. Takahashi, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting  $\beta$ -tricalcium phosphate cements with anti-washout ability and their material properties”, 12th Asian BioCeramics Symposium (ABC2012), 18th Nov, 2012.
32. K. Fujioka, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of novel calcium-phosphate cements with non-fragmentation property and their evaluations”, 12th Asian BioCeramics Symposium (ABC2012), 18th Nov, 2012.
33. T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa, and N. Kanzawa, “Studies on the anti-tumor action of a novel apatite cement”, 12th Asian BioCeramics Symposium (ABC2012), 18-21 Nov.2012.
34. K. Nagata, S. Takahashi, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting  $\beta$ -tricalcium phosphate cements with anti-washout ability and their material properties”, 4th PCGMR-NCKU Symposium, 21st Nov, 2012.
35. K. Fujioka, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of novel calcium-phosphate cements with non-fragmentation property and their evaluations”, 4th PCGMR-NCKU Symposium, 21st Nov, 2012.
36. H. Ohsugi, J. Hatsukawa, Y. Otsuka, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Establishment of a real-time evaluation system of the osteoconduction using fluorescent proteins”, 2012 ASCB Annual Meeting, 15th Dec, 2012.
37. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Fabrication of  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement using chelating mechanism of inositol phosphate and its histological evaluation”, International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials (ISACB6), 6th Jun, 2013.
38. T. Konishi, S. Takahashi, K. Nagata, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Fabrication of biodegradable  $\beta$ -tricalcium phosphate cement with anti-washout property based on chelate-setting mechanism of inositol phosphate and its biocompatibility”, 4th Asian Biomaterials Congress (ABMC4), 27 Jun, 2013 (*Racquel LeGeros Young Scientist Award*).

#### 【特許】

1. 相澤 守・水本みのり・小西敏功・高橋周平・佐藤静磨、特許公開 2012-130672、「注入可能なペースト状組成物及びそれから成る骨又は歯充填材」、出願人：財団法人神奈川科学技術アカデミー・学校法人明治大学・昭和医科工業株式会社
2. 相澤 守・小西敏功・高橋周平、特許公開 2012-210346、「組成物及びそれを用いた骨又は歯充填材の製造方法」、出願人：財団法人神奈川科学技術アカデミー・学校法人明治大学
3. 相澤 守・高橋周平・小西敏功・水本みのり、特開 2012-228383、「セメント用材料の製造方法、セメント原料粉体、セメントの製造方法、およびセメント」、出願人：財団法人神奈川科学技術アカデミー/学校法人明治大学(出願日 2011年 11月 29日)

他未公開 3 件



## 【共同研究】

6 件

## 【記者発表・取材】

1. 2010年8月26日；日経産業新聞に研究成果掲載（抗菌性セメント 抗菌剤担持に成功）
2. 2011年4月13日；日本経済新聞社より取材（蛍光タンパク質を用いた生体材料の骨誘導能評価システムの構築；共同研究員：神澤信行）
3. 2012年2月8日；日経産業新聞に研究成果掲載（抗菌性セメント）
4. 2012年2月28日；日本経済産業新聞に研究成果掲載（人工骨 ペースト状材料）
5. 2012年9月11日；日経産業新聞に研究成果掲載（骨ミネラル含有セメント）

## 【展示】

1. 2011年2月2-4日；テクニカルショウヨコハマ 2011
2. 2012年4月25-27日；第11回国際バイオテクノロジー展／技術会議（BIO Tech 2012）
3. 2013年1月30日-2月1日；Nano tech 2013

## 【受賞】

1. ABC Award 2009 (9th Asian BioCeramics Symposium, 佐藤, 2009)
2. 講演奨励賞（無機マテリアル学会 第121回学術講演会, 本田, 2010)
3. ABC Award 2011 (11th Asian BioCeramics Symposium, 小西, 2011)
4. Best Poster Presentation Award (23rd Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23), 川延, 2011)
5. Racquel LeGeros Young Scientist Award (6th International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials 2013 (ISACB6), 小西, 2013)

## 【学位取得者】

小西敏功（博士（工学）2013年9月）

## 7. プロジェクト参加者一覧

〔氏名〕	〔役職〕	〔在籍期間〕
相澤 守	プロジェクトリーダー(明治大学理工学部・教授)	2009年10月～2013年9月
本田みちよ	常勤研究員(サブプロジェクトリーダー)	2009年10月～2013年9月
水本みのり	常勤準研究員	2009年10月～2013年9月
小西敏功	研究協力員 常勤準研究員	2009年10月～2010年3月 2010年4月～2013年9月
長嶋比呂志	非常勤研究員(明治大学農学部・教授)	2009年10月～2013年9月
松本守雄	非常勤研究員(慶應義塾大学医学部・准教授)	2009年10月～2013年9月
石井 賢	非常勤研究員(慶應義塾大学医学部・講師)	2009年10月～2013年9月
Eng San Thian	非常勤研究員(National University of Singapore, Assistant professor)	2012年1月～2012年2月
庄 志	非常勤研究員(明治大学理工学部・助教)	2013年4月～2013年9月
神澤信行	非常勤研究員(上智大学理工学部・准教授) 共同研究員(上智大学理工学部・准教授)	2009年10月～2010年3月 2010年4月～2013年9月
三木拓也	研究補助員	2011年1月～2011年3月
呉 哲宇	研究補助員	2011年5月～2012年3月
岡野恵子	研究補助員	2011年12月～2012年3月
中城京子	研究補助員	2012年4月～2012年6月
高田明李	研究補助員	2012年4月～2013年3月
菊島光一	研究協力員	2009年10月～2010年3月
猪俣義彦	研究協力員	2009年10月～2011年3月
高橋周平	研究協力員	2009年10月～2011年3月
藤井拓也	研究協力員	2009年10月～2012年3月
川延勇介	研究協力員	2009年10月～2012年3月
中島佑亮	研究協力員	2010年4月～2013年3月
千布悠貴	研究協力員 研究補助員	2010年4月～2013年3月 2013年4月～2013年9月
真部弘毅	研究協力員	2010年4月～2013年3月
藤岡 恵	研究協力員	2010年4月～2013年3月
兼子千里	研究協力員	2011年4月～2012年3月
永田幸平	研究協力員	2011年4月～2013年9月
目黒佑太	研究協力員	2011年4月～2013年9月
持田直輝	研究協力員	2011年4月～2013年9月

清水友亮	研究協力員	2012年4月～2013年9月
小林慧太	研究協力員	2013年4月～2013年9月
沢田知也	研究協力員	2013年4月～2013年9月
松岡健人	研究協力員	2013年4月～2013年9月
佐々木裕美	事務補助員	2009年10月～2011年3月
坂井知子	事務補助員	2011年3月～2013年9月
佐藤静磨	派遣研究員(昭和医科工業株式会社)	2009年10月～2010年12月

# 研究報告

# 生体内安定性アパタイトセメントの創製とその評価

水本みのり、佐藤静磨、本田みちよ、長嶋比呂志、石井 賢、松本守雄、相澤 守

## 1. はじめに

現在、「超高齢社会」に突入した我が国において、高齢者の生活の質(QOL)の向上を目指す上で、骨粗鬆症などの疾患に対する低侵襲な医療を実現させることは、早急に解決すべき重要な課題である。当プロジェクトでは、骨組織と直接結合する「生体活性」を有する水酸アパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)の表面をイノシトールリン酸(IP6)で表面修飾し、IP6のキレート能により硬化する新しい硬化メカニズムをもった「生体内安定性骨修復セメント」、すなわち「キレート硬化型 HAp セメント」の開発を推進してきた。本研究では、高齢者特有の脊椎圧迫骨折などを適用症例とし、低侵襲治療を実現する骨修復セメントを開発する。これまでに本プロジェクトで開発した基盤技術[1,2]を応用し、インジェクション型ペースト状人工骨の実用化に向けて、1) ハンドリング性、2) 圧縮強度、3) 生体適合性について目標値を設定し、研究を推進している。

本研究は、より臨床に近い形でのインジェクションセメントの創製を目的として、作製時に用いる混練液を比較検討し、その材料特性および動物埋入試験での生体適合性評価をおこなった。つぎに、セメントペーストの硬化時間の短縮・非崩壊性のセメント創製を目的として、HAp 原料粉体の粉砕・調製方法を再検討した。さらに、改良セメントの動物埋入試験での生体適合性試験もおこなったのでこれを報告する。

## 2 実験と結果

### 2.1 湿式合成 HAp 表面修飾粉体の作製

$0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  水酸化カルシウム懸濁液に、Ca/P 比が 1.67 になるように  $0.3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  リン酸水溶液を攪拌しながら滴下し、25 mass%  $\text{NH}_4\text{OH}$  溶液で pH 調整後、1 h 攪拌した。インキュベータ内で 24 h 熟成させた後、吸引ろ過・凍結乾燥し「湿式合成 HAp 粉体」を得た。

得られた粉体を  $\phi 10 \text{ mm}$  の  $\text{ZrO}_2$  ボールを用い、遊星型ボールミル(Fritsch 社製)で 5 min 粉砕処理した。その後、あらかじめ 1000 ppm に調製した IP6 溶液で 5 h 表面修飾し、吸引ろ過・凍結乾燥し、湿式合成 HAp 表面修飾粉体「IP6-HAp 粉体」を得た。

### 2.2 キレート硬化型アパタイトセメントの試製とその材料特性

#### 2.2.1 混練液の検討とその特性評価

ハンドリング性および圧縮強度の向上を目的に、セメント作製時の混練液を改良・検討した。純水を混練液として

作製したセメントは、注射器等のデバイスを用いてインジェクションする際のハンドリング性に乏しく、また、圧縮強度も 3-5 MPa と低い。そこで本項では、セメント混練液に、生物学的に安全性が高く、かつ高粘度の多糖類を添加剤として用いることを検討した。まず、10 種類以上の多糖類を混練液に用いてセメントを作製後、圧縮強度を測定した。そのうち強度が高かった多糖類について、表 1 に示す条件の混練液で、最適な条件を検討した。粉と混練液の割合(固液比)を  $1/0.90$ - $1/1.10 \text{ [g/cm}^3]$  となるように加えセメント試料片( $\phi 5 \text{ mm}$ ,  $h 8 \text{ mm}$ )を作製した。インキュベータ( $37^\circ\text{C}$ , 相対湿度 100%)中で 24 h 養生後圧縮強度を測定した(図 1)。その結果、混練液に多糖類を添加したことにより、ハンドリング性は格段に向上し、より広い固液比でセメントの作製が可能となった。特に chito W10 を用いて作製したセメントは、固液比  $1/1.05$  において 35 MPa であり、他の混練液と比較して高い強度であった。つぎに、セメントペーストの初期硬化試験を測定した。初期硬化時間測定は JIS 規格(JIS T 6602)[3]に準じて行なった。室温で粉体と混練液を所定の固液比(粉体/液体)  $[\text{g/cm}^3]$  で混練後、セメントを作製し、容器( $\phi 8 \text{ mm}$ ,  $h 4 \text{ mm}$ )に充填後、表面を均した。一定

表 1 混練液に用いた添加剤の組成

	添加剤		濃度	溶媒
	A	B		
Con	コンドロイチン硫酸 Na	-	25	1000 ppm IP6
Con-koh	コンドロイチン硫酸 Na	コハク酸	5-25	1000 ppm IP6
Chit GL	キトサン	-	10	乳酸
Chit W10	キトサン	-	10	乳酸

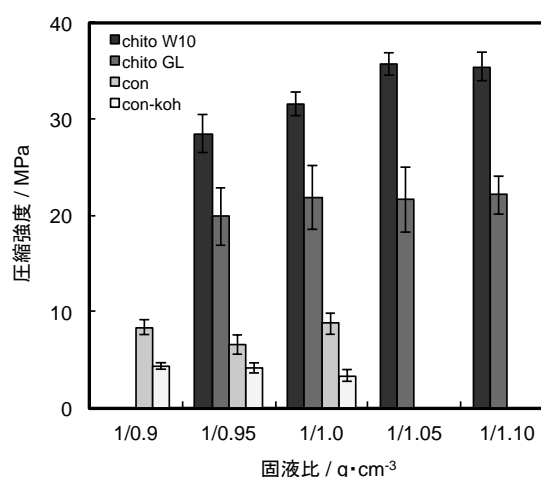


図 1 セメントの圧縮強度 (n=5)

時間インキュベータで養生後、ギルモア針を静かに下ろし、表面に圧痕がつかなくなるまでの時間を「初期硬化時間」とした。なお、圧痕が見られる場合は速やかにインキュベータ内に戻して養生させた。

混練液に chito W10 を用いたセメントの初期硬化時間は固液比 1/1.05 において 45 min、chito GL を用いたセメントは固液比 1/1.10 において 92 min であり、硬化に時間がかかることがわかった。セメントペースト作製の際の、混練液量が多いことが原因として考えられる。また、混練液の粘性が高いためキレート結合に時間がかかってしまったと考えられる。

つぎに、作製したセメント試料片の生体適合性の一次スクリーニングとして、トランズウェル(Corning 社)を用いて、間接細胞培養試験を行った(図 2)。この試験では、セメントから細胞増殖に好ましくない物質が溶出しているか否かを調べることを目的としている。トランズウェルはプレート上部より吊り下げる構造をしている。メンブラン膜とプレート底部の間は 1 mm の間隔がありプレート底部で細胞培養を行うことができる。細胞は新生児 C57BL/6 マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 を用い

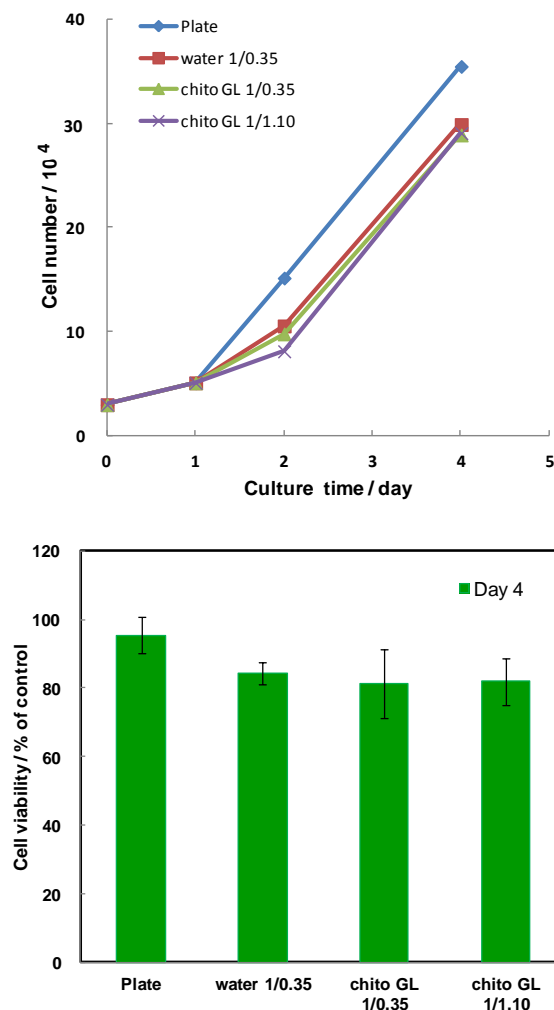


図 2 セメントの細胞培養試験結果  
(上: 細胞増殖曲線, 下: 細胞相対増殖率)

て、培養 1, 2 および 4 日後に細胞数を測定し細胞増殖性を調べた。その結果、chito GL 混練液に pH 調整を行うことで、細胞が完全に死滅することなく増殖することが確認された(図 2 上)。また、コントロール(ポリスチレンプレート)と比較しても作製したセメントからは細胞の増殖性を阻害する物質が溶出しないことが明らかとなった(図 2 下)。

## 2. 2. 2 実験動物を用いたセメントの *in vivo* 評価

*In vitro* 試験における生体適合性評価において結果が良好であった「chito GL」を混練液に用いたセメント試料片について、動物埋入試験を行なった。具体的には、作製したセメントを実験動物(ウサギ・ブタ)の脛骨に所定の期間埋入後、セメント周辺組織での炎症反応の有無、骨組織とセメントとの結合性を確認することを目的とした。

まず、湿式合成 HAp セメントペーストの *in vivo* 評価として、ウサギを用いて生体硬組織に対する反応を調査した。

ウサギは日本白色種体重 3 kg、16 週齢を用いた。麻酔後、ウサギ後肢の両膝内側部を剃毛・切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させドリルで穿孔( $\phi$  4.2 mm)し、作製したセメントペースト硬化体( $\phi$  4.0 mm、h 7-8 mm)を埋入した。埋入期間は 4 週とした。所定期間埋入後、インプラント部分の脛骨を取り出し、凍結組織切片を作製し、組織学的観察を行なった。

図 3 に湿式合成 HAp セメントの埋入 4 週におけるトルイジン青(TB)染色および HE 染色による組織学的観察写真を示す。埋入したセメント周辺に炎症は見られなかった。トルイジン青染色(a)では埋入セメント(C)周辺に新生骨(矢印)が結合している様子が観察された。また、HE 染色(b)においても埋入セメント周辺に新生骨が結合している様子が観察された。

以上の結果より、ウサギ脛骨への埋入試験において、混練液にキトサンを用いた湿式合成 HAp セメントはその生体適合性が良好であることがわかった。

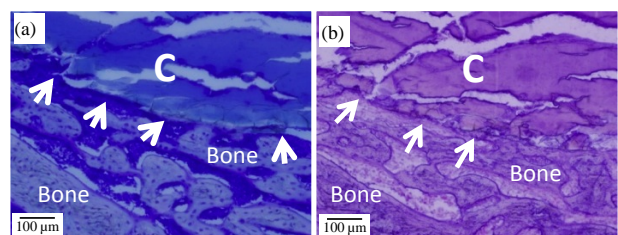


図 3 TB 染色および HE 染色の組織学的観察(埋入 4 週)  
(a) 湿式合成 HAp (TB 染色, 拡大図)  
(b) 湿式合成 HAp (HE 染色, 拡大図)

つぎに、よりヒトに近い大型動物であるブタを用いて、セメント試料片の生体硬組織に対する組織反応を調べた。当プロジェクトの非常勤研究員である長嶋らは、これまでにクサビラオレンジ蛍光蛋白を遺伝子導入したクローン豚(huKO)の作出に成功している[4]。huKO ブタは、蛍光蛋白を遺伝子導入したクローンブタであり、細胞が蛍光下で赤く光ることが報告されている。

本試験ではこの huKO ブタを用い、作製したセメントペ

ースト試料片について、生体硬組織に対する組織反応を調査した。huKO ブタは体重 200 kg、1 歳齢の雌を用いた。麻酔後、ブタ後肢の左膝内側部を剃毛・切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させドリルで穿孔( $\phi 4.4$  mm)した。2.2 節で調整した混練液を用いて、セメントペーストを固液比 1/1.10 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] の条件で作製し、室温で 24 h 養生させた硬化体( $\phi 4.0$  mm、h 7-8 mm)を埋入した。コントロールとして現在臨床的に使用されている Biopex<sup>®</sup>-R を使用した。埋入期間は 4 週とした。所定期間埋入後、インプラント部分の脛骨を取り出し、凍結組織切片を作製し、組織学的観察を行なった。

図 4 に Biopex<sup>®</sup>-R セメント、湿式合成 HAp セメントの埋入 4 週におけるトルイジン青(TB)染色による組織学的観察写真を示す。トルイジン青は主に、軟骨基質の新しい骨(新生骨)を濃青に染める。

埋入した湿式合成 HAp セメント(図 4 b, b')はセメント (C) 周辺に炎症はみられなかった。コントロール(図 4 a, a')と比較しても、同様に埋入セメント(C)の周辺に新生骨(矢印部分)が結合している様子が観察された。また、作製した標本を蛍光下で観察したところ(図 5)、いずれのセメ

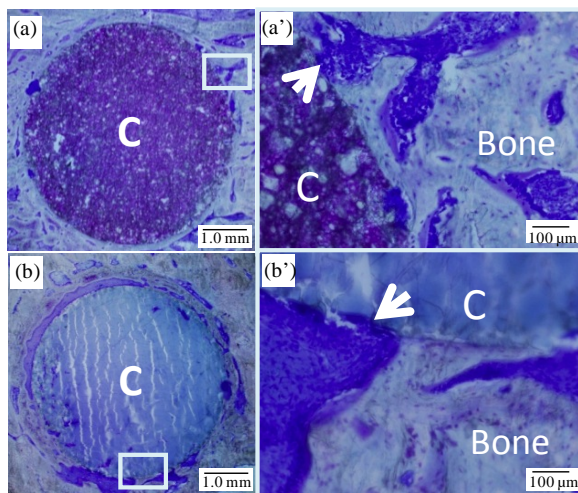


図 4 TB 染色による組織学的観察(埋入 4 週)  
(a) Biopex<sup>®</sup>-R(全体像), (a') Biopex<sup>®</sup>-R(拡大像)  
(b) 湿式合成 HAp(全体像), (b') 湿式合成 HAp(拡大像)

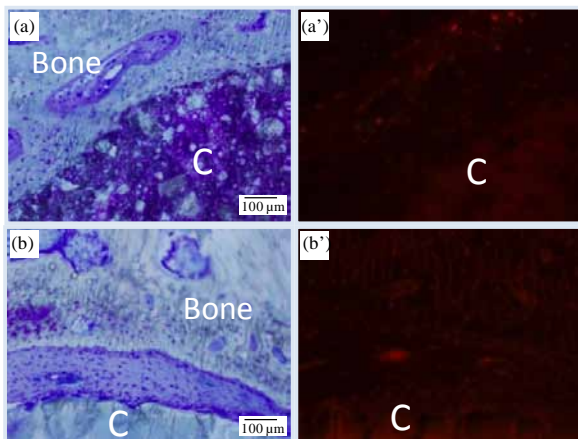


図 5 TB 染色および蛍光下での組織学的観察(埋入 4 週)  
(a) Biopex<sup>®</sup>-R(拡大像), (a') Biopex<sup>®</sup>-R(蛍光下)  
(b) 湿式合成 HAp(拡大像), (b') 湿式合成 HAp(蛍光下)

ント(図 5 a, b)も蛍光下において、埋入セメント周辺で赤く光る細胞が観察された(図 5 a', b')。

以上の結果から、混練液にキトサンを用いた湿式合成 HAp セメントは、その生体適合性が良好であることがわかった。

つぎに、より臨床利用に近い形での確認試験として、ブタを用いてセメントペーストのインジェクション法による埋入試験を行なった。ブタは体重 200 kg、1 歳齢の雌を用いた。麻酔後、ブタ後肢の左膝内側部を剃毛・切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させドリルで穿孔( $\phi 4.2$  mm)した。2.2 節で作製した混練液を使用し、湿式合成 HAp ; 固液比 1/1.10 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] の条件で作製したセメントペーストを、インジェクションデバイスを用いて直接埋入した。埋入期間は 4 週とし、所定期間経過後、インプラント部分の脛骨を取り出し、凍結組織切片を作製し、組織学的観察を行なった。

図 6 に湿式合成 HAp セメントの埋入 4 週におけるトルイジン青染色による組織学的観察写真を示す。埋入したセメント周辺に炎症は見られず埋入セメント周辺に骨組織が結合している様子が確認された。

以上の結果から、混練液にキトサンを用いた湿式合成 HAp セメントは、より臨床利用に近い形でのインジェクション法による埋入試験の生体適合性試験でも問題ないことがわかった。

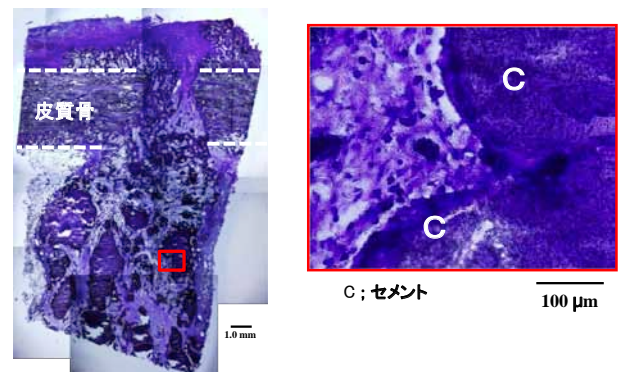


図 6 TB 染色によるインジェクションセメントの組織学的観察

### 2.3 湿式合成 HAp 粉体の表面修飾条件の検討

2.2 項では、セメント作製時に用いる混練液に多糖類を添加することでインジェクション可能な高強度セメントの作製に成功し、その安全性も確認した。本項ではセメントの硬化時間の短縮を目的として、HAp 原料粉体の粉碎・表面修飾条件を再検討した。

まず、原料粉体の粉碎に使用するボール径および粉碎時間の検討をした。2.1 項で調製した「湿式合成 HAp 粉体」を $\phi 10$  mm(50 個)または $\phi 2$  mm(180 g)の ZrO<sub>2</sub> ボールを用いて遊星型ボールミル(Fritsch 製)で純水を溶媒として粉碎し、経時的にボールミル中のスラリーの粒径(メジアン径)をレーザー回折/散乱式粒子径分布装置 LA-300 (堀場製作所製)を用いて測定した。図 7 に粉体のメジアン径と粉碎時間の関係を示す。 $\phi 10$  mm のボールを用いて粉碎したスラリー



は時間とともにその粒径は小さくなっていき、粉碎 180 min 程度で粒径が変化しなくなったのに対し、 $\phi$  2 mm のボールを用いて粉碎したスラリーは粉碎 60 min 程度で粒径が変化しなくなった。 $\phi$  2 mm に変更することで、粉碎時の  $ZrO_2$  ボールが小さく、数も増加する。HAp 粉体との衝突回数が増えたことにより短時間で粒径が小さくなったと考えられる。また一定の粒径まで粉碎されると粉碎時間を長くしても粒径はそれ以上変わらないことがわかった。以上の結果より、湿式合成 HAp 粉体は  $\phi$  2 mm の  $ZrO_2$  ボールを用いて 60 min 粉碎することで、より効率的に微粒化できることがわかった。

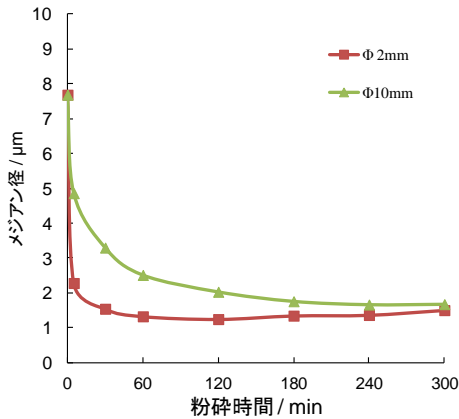


図 7 粉体のメジアン径と粉碎時間の関係

つぎに、湿式合成 HAp 粉体と IP6 溶液 40  $cm^3$ ,  $\phi$  2 mm  $ZrO_2$  を遊星型ボールミルで 60 min 粉碎するとともに、IP6 の表面修飾処理を同時に行った。IP6 は 0, 1000, 4000, 8000, 12000 ppm の濃度を用いた。粉碎後に得られたスラリーを吸引ろ過・凍結乾燥することで「bmIP6-HAp 粉体」を得た。bmIP6-HAp 粉体に対する IP6 吸着量を図 8 に示す。IP6 吸着量は粉碎後のスラリーを遠心分離し、上清に含まれるリン(P)量を測定することで算出した。IP6 濃度の増加に伴い IP6 吸着量は増加し、8000 ppm 以上の濃度で飽和吸着に達することがわかった。

つぎに、レーザードップラー法を用いて bmIP6-HAp 粉体の表面電位を測定した(図 9)。IP6 濃度の増加に伴い、表面電位は負電荷側にシフトしていき、8000 ppm 程度で平衡に達していることがわかった。IP6 が HAp 粒子に吸着することにより、HAp 粒子表面の  $OH^-$  基が増加していくためだと考えられる。つぎに、bmIP6-HAp 粉体の Ca/P 比を測定した結果を図 10 に示す。湿式合成 HAp 粉体の Ca/P 比は仕込み組成である 1.67 であった。IP6 濃度の増加にともない、Ca/P 比が低下していき、IP6 濃度が 8000 ppm 以上で平衡に達することがわかった。これは、IP6 が HAp 粒子に吸着したことにより粉体中のリン(P)量が増加したためと考えられる。IP6 吸着量および表面電位、Ca/P 比の結果はほぼ一致しており、これらの結果より HAp 粉体の IP6 吸着量は IP6 濃度が 8000 ppm 以上になると飽和に達すると考えられる。

つぎに、0, 1000, 4000, 8000 および 12000 ppm IP6 溶液で表面修飾した bmIP6-HAp 粉体を用いてセメントを作製し、

それらの材料特性を評価した。セメントは純水を混練液として使い、インジェクション可能な固液比で作製した。インキュベータ中で 24 h 養生した後、圧縮強度を測定した。圧縮強度試験後のセメント破断面について SEM を用いて観察した。さらに、セメントペーストの初期硬化試験、ちよう度試験も測定した。図 11 にセメントの圧縮強度と相対密度の結果を示す。IP6 濃度 0-4000 ppm では圧縮強度が 5 MPa 程度であったのに対し、8000 ppm 以上になると強

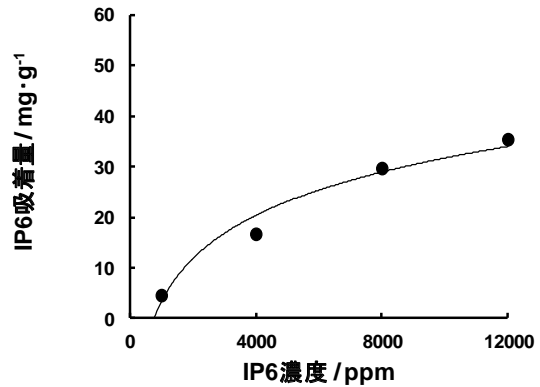


図 8 調製した HAp 粉体の IP6 吸着量

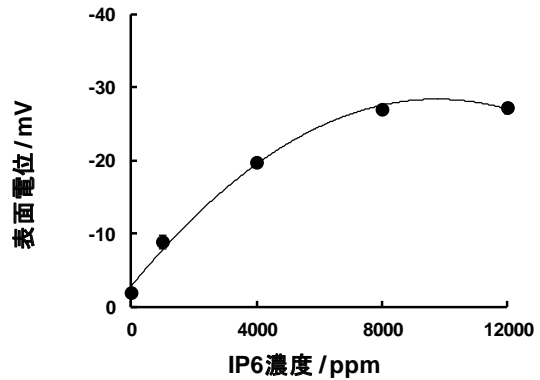


図 9 調製した HAp 粉体の表面電位

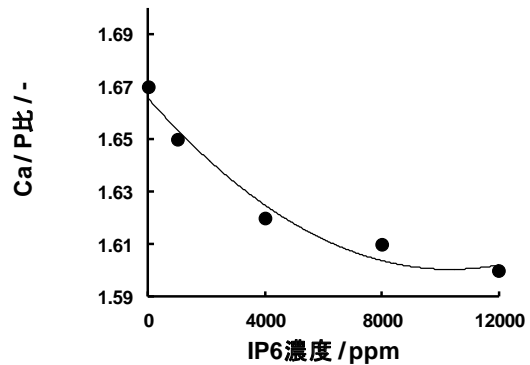


図 10 調製した HAp 粉体の Ca/P 比



度が高くなり、最大強度は IP6 濃度が 12000 ppm セメントの 10 MPa であった(図 11 上)。また、相対密度が向上するにつれて圧縮強度も向上することがわかった(図 11 下)。

さらに、SEM を用いてセメントの内部を観察した結果、IP6 濃度が 0 および 1000 ppm のセメントは多くの空隙(図 12 a, b)が確認されたのに対して、4000 ppm のセメント(図 12 c)では減少し、8000 および 12000 ppm セメント(図 12 d, e)ではさらに減少し、セメント粒子同士が密に充填されていることを確認した。

また、セメントペーストのハンドリング性を確認するために、JIS T 6602 [3]に準じて稠度を測定した。調製したセメントペーストの上にガラス板を乗せ、セメントペーストの広がり面積から稠度を算出した。図 13 に湿式合成 HAp セメントの固液比と稠度の関係を示す。IP6 濃度が高くな

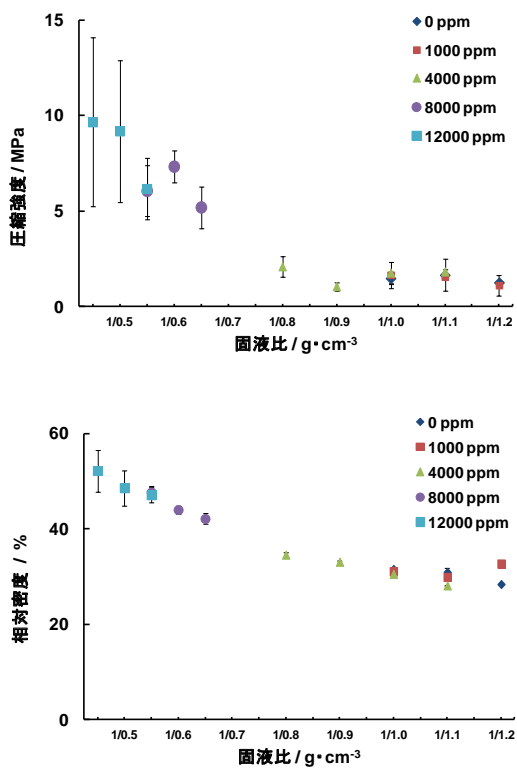


図 11 IP6 濃度の異なるセメントの圧縮強度(上) および相対密度(下)

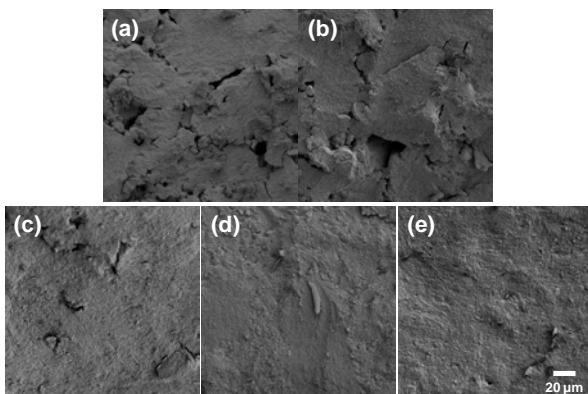


図 12 IP6 濃度の異なるセメントの微細構造

(a) 0 ppm, (b) 1000 ppm, (c) 4000 ppm, (d) 8000 ppm, (e) 12000 ppm

るにつれてインジェクションが可能な固液比は高くなり、IP6 の濃度が 8000 ppm 以上になると調製したセメントペーストがより少ない混練液量でペースト状になることがわかった。IP6 中で粉砕と表面修飾を同時に行うことにより、HAp 粉体への IP6 吸着量が増えるため、セメントペースト中では HAp 粒子間の摩擦が減り、より少ない固液比でのインジェクションが可能になったと考えられる。また、セメントの初期硬化(図 14)は、IP6 濃度 4000 ppm 以上になると、0-1000 ppm のセメントと比較して硬化時間が大幅に短縮した。12000-IP6-HAp セメントの硬化時間は最短で 25.3 min (固液比 1/0.45 [g/cm³])であった。12000-IP6-HAp セメントは高い IP6 濃度と高い固液比(混練液量が少ない)のため、イノシトールリン酸による HAp 粒子間がキレート結合する時間が短縮されていると考えられる。

以上のことから、IP6 濃度が 8000 ppm 以上で粉砕および表面修飾の同時処理をした粉体を用いることで、より少ない混練液量でインジェクション可能なセメントペーストを調製でき、そのセメントは高い圧縮強度を有することがわかった。

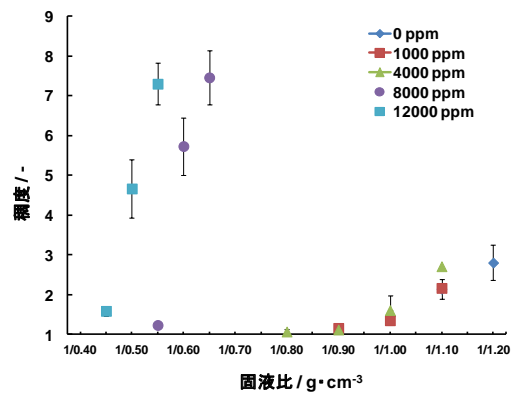


図 13 IP6 濃度の異なるセメントの稠度

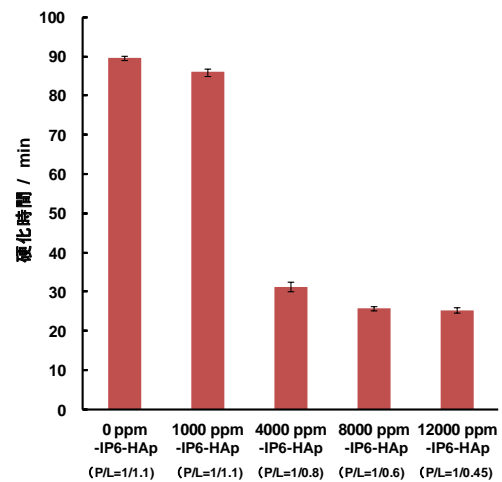


図 14 IP6 濃度の異なるセメントの初期硬化

## 2.4 非崩壊型湿式合成 HAp セメントの作製とその評価

### 2.4.1 混練液の検討とその材料特性評価

本項では、セメントの非崩壊性を担保するために IP6 溶液中で粉碎・表面修飾した bmIP6-HAp 粉体および  $\alpha$ -TCP 粉体の混合粉体を用いてセメントを作製し、それらの材料特性を評価した。つぎに、非崩壊性を担保したセメントのハンドリング性および圧縮強度の向上を目的として、セメント作製時に使用する混練液に多糖類を加え検討した。粉体は 2.3 項と同様に 8000 ppm IP6 溶液中で 60 min 粉碎した bmIP6-HAp 粉体(8000 ppm bmIP6-HAp)を用いた。市販  $\alpha$ -TCP 粉体( $\alpha$ -TCP-A)は純水中で 120 min( $\phi$  10 mm, 50 個) 粉碎し調製した。8000 ppm bmIP6-HAp 粉体と  $\alpha$ -TCP 粉体を重量比(8:2)となるように V 形混合機(筒井理学器械)に入れ、混合した調製粉体を使用した。セメントは 2.5 mass% リン酸二水素ナトリウム( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )を混練液として用い、固液比 1/0.70 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]で作製した。図 15 に湿式合成 HAp セメント崩壊性試験の結果を示す。これまでの従来法[4]で作製した IP6-HAp セメント(a), (a')は純水中では硬化していないのに対し、粉碎および表面修飾の同時処理を行った 8000 ppm bmIP6-HAp セメント(b), (b')は硬化していることが確認された。

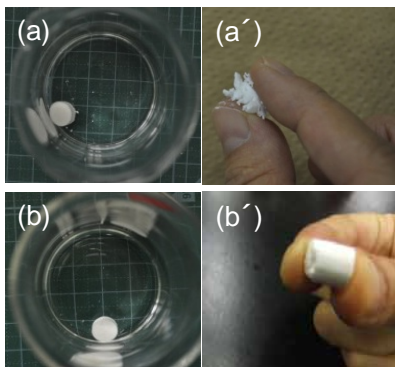


図 15 湿式合成 HAp セメントの崩壊性試験  
(a), (a'): 従来法 HAp セメント  
(b), (b'): bmIP6-HAp セメント

つぎに、非崩壊性を担保したセメントのハンドリング性および圧縮強度の向上を目的として、セメント作製時に使用する混練液に多糖類を加え検討した。混練液は 2.5 mass% リン酸二水素ナトリウム(2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )および、2.5 mass%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  溶液に 10 mass% キトサン GL (10%chit + 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 25 mass% コンドロイチン硫酸(25%cond + 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 25 mass% デキストラン硫酸イオウ 5 (25%dex + 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )をそれぞれ添加した溶液を用いた。粉体は 2.2.1 項で混合調製した粉体を用いて、各混練液を固液比 1/0.60-1/0.80 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]となるように加え、混練・成形後、24 h 室温で養生した。

図 16 に bmIP6-HAp セメントの圧縮強度の結果を示す。混練液に多糖類を加えることにより、ハンドリング性および圧縮強度が向上した。混練液に 10%chit + 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を用いて作製したセメントは固液比 1/0.70 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]において 22 MPa であった。これは他の混練液と比較して高い圧縮強度であった。

これまでの報告[5]より、原料粉体を従来法で調製した IP6-HAp セメントの初期硬化は固液比 1/0.95 の時に 87 min であったが、本研究の bmIP6-HAp セメントペーストの初期硬化はどの混練液でも 20 min 以下(図 17)と大幅に短縮され、最短で 25%cond + 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  の 12 min であった。これは、調製粉体の IP6 吸着量が増加したこと、またセメント作製時の混練液量が減少したことにより、HAp 粒子がより密になりキレート硬化時間が早くなったためと考えられる。これにより、強度、非崩壊性、硬化時間を考慮するとバランスの良いセメントとして、混練液に 10%chit+2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  を固液比 1/0.70 で使用した場合、非崩壊性であり、22 MPa の強度を得られることがわかった。またその初期硬化時間は 17 min であった。

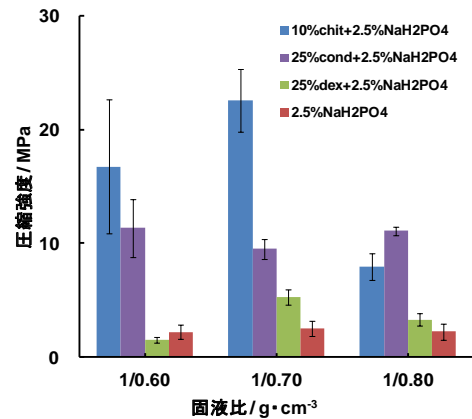


図 16 混練液に多糖類を用いたセメントの圧縮強度

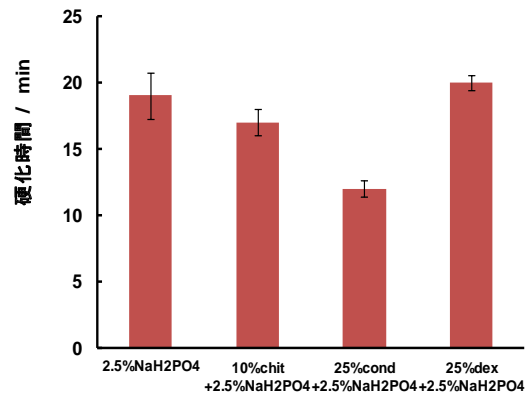


図 17 混練液に多糖類を用いたセメントの初期硬化

### 2.4.2 実験動物を用いたセメントの *in vivo* 評価

非崩壊性を担保した改善法セメント試料片について、生体適合性を評価するために動物埋入試験を行なった。ブタは体重 130 kg、8 カ月齢の雌を用いた。麻酔後、ブタ後肢の左膝内側部を剃毛・切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させドリルで穿孔( $\phi$  4.4 mm)した。2.3.1 項で調製した粉体に 10%chit + 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  と、コントロールと 2.5% $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  混練液を用いて、セメントペーストを固液比 1/0.7 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]の条件で作製し、室温で 24 h 養生させた硬化体( $\phi$  4.0 mm, h 7-8 mm)を埋入した。埋入期間は 4 週とし

た。所定期間埋入後、インプラント部分の脛骨を取り出し、非脱灰研磨標本を作製し、組織学的観察を行なった。

図 18 に埋入 4 週におけるピラヌエバ骨染色による組織学的観察写真を示す。埋入した改善法 HAp セメントは混練液 10%chit + 2.5%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>および 2.5%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>を使用したどちらのセメントも材料セメント(C)周辺で炎症等は見られず(図 18 a, b)、旺盛な骨形成が認められた。また、その拡大像(図 18 a', b')から、茶色に染色された低石灰化骨、矢印部分に示した類骨の形成、三角で示したハーバース管の形成も確認でき、セメントが良好な硬組織適合性を示すことが明らかとなった。

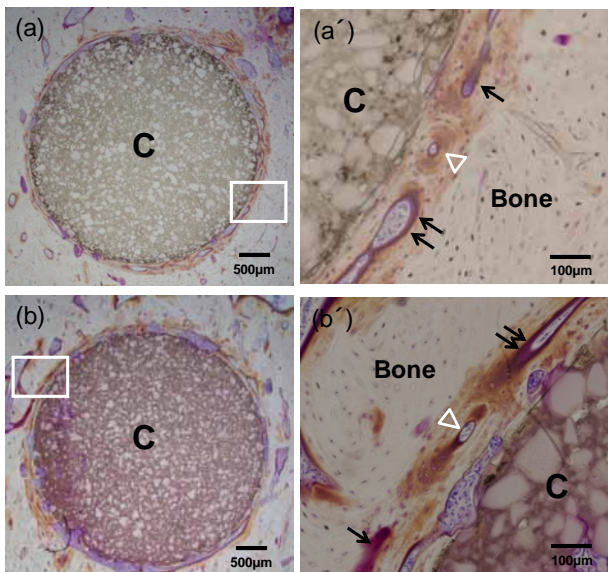


図 18 ピラヌエバ骨染色による組織学的観察(埋入 4 週)  
 (a) 10%chit+2.5%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> セメント, (a') (a)の拡大図  
 (b) 2.5%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> セメント, (b') (b)の拡大図

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、湿式合成により得られた HAp 粉体を出発原料として研究を推進している。これまでに本プロジェクトで開発した基盤技術[1, 2]を応用し、インジェクション型ペースト状人工骨の実用化に向けて、1) ハンドリング性、2) 圧縮強度、3) 生体適合性について目標値を設定し、研究を推進している。2.2 節ではセメント作製時の混練液検討をおこなった。混練液に多糖類を用いることにより、ハンドリング性は格段に向上され、インジェクションによるセメント作製が可能となった。圧縮強度においては、「キトサン W10」および「キトサン GL」を混練液として作製したセメントが高強度であった。また「キトサン GL」を pH 調製することで細胞毒性試験(*in vitro*)でも良好な結果が得られた。

つぎに、ハンドリング性、圧縮強度、生体適合性(*in vitro* 試験)の全てに優れているキトサン GL を混練液に使用したセメントペーストについて、生体適合性(*in vivo*)試験をおこなった。その結果、ウサギおよびブタという異種動物間において、周辺組織での炎症はみられずセメント周辺に新生骨が結合している様子が確認できた。さらに、より臨床応用に近い形でのインジェクション法による埋入試験

でも、セメント周辺に細胞が結合している様子が確認でき、その生体適合性が良好であることがわかった。しかしながら、このペーストは初期硬化時間が 92 min と今後臨床利用するにはやや問題があった。また、純水に浸漬させると崩壊する場合があった。そこで、2.3 節では、硬化時間の短縮と非崩壊性のセメントの作製を目的として、粉碎条件と IP6 表面修飾条件の検討をおこなった。湿式合成 HAp 粉体をφ 2 mm の ZrO<sub>2</sub> を用いて 8000 ppm IP6 溶液中で 60 min 粉碎・表面修飾を同時に処理することにより、より短時間で HAp が微粒子化され、また IP6 吸着量が増加することがわかった。作製したセメントペーストは、より少ない混練液量でインジェクション可能となり、その初期硬化時間も短縮された。さらに、2.4 節では α-TCP を添加することにより、非崩壊性で硬化していることが確認された。またセメントペーストに用いる混練液を検討した結果、圧縮強度において 10%chit + 2.5%NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> を混練液として作製したセメントの強度は 22 MPa という高強度が得られた。セメントペーストの初期硬化時間は 17 min で硬化することがわかった。このセメント硬化体をブタに埋入したところ、材料周辺に炎症を起こすことなくその生体適合性に問題ないことも確認した。

今後はより臨床利用に向けて Non-fragmentation を担保したリン酸カルシウムセメントの作製に応用展開していく予定である。

#### 【参考文献】

1. M. Aizawa, Y. Haruta, and I. Okada, *Arch. BioCeram. Res.*, **3**, 134-138 (2003).
2. Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50 (2008).
3. JIS T 6602 (1993), 「歯科用りん酸亜鉛セメント」
4. H. Matsunari, M. Onodera, N. Tada, H. Mochizuki, S. Karasawa, E. Haruyama, N. Nakayama, H. Saito, S. Ueno, M. Kurome, A. Miyawaki, and H. Nagashima, *Cloning and stem cells*, **10**, 313 (2008).
5. 水本みのり, 佐藤静磨, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤守, “平成 22 年度研究概要”, 36-39 (2011).

# 生体内吸収性リン酸三カルシウムセメントの創製とその評価

小西敏功、永田幸平、高橋周平、庄 志、長嶋比呂志、石井 賢、松本守雄、相澤 守

## 1. はじめに

ハイドロキシアパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)およびリン酸三カルシウム( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; TCP)は、生体適合性・骨親和性を有することから、バイオセラミックスとして整形外科領域において広く臨床応用されている。しかしながら、それらは顆粒状やブロック状の自形を有することから、骨欠損の補填に際して、欠損形状に合わせて製品形状を選択するか、しばしば製品自身を加工する必要が生じる。また、顆粒の散乱や欠損部に形状通りに充填できない問題[1]、ある程度大きな手術侵襲は避けられず、患者への負担が大きいという問題などもある。そうしたことから、補填時には小さな孔から注入可能で、体内で欠損形状に合わせて硬化する「ペースト状人工骨(以下、セメント)」が待望され、開発されてきた。

現行のセメントは、酸性のリン酸水素カルシウム( $\text{CaHPO}_4$ )と塩基性のリン酸四カルシウム( $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ )からHApを形成する酸-塩基反応を利用することが多く、硬化に時間がかかるほか、硬化時にpH変動を伴うため、組織周辺に炎症反応を起こす恐れもある[2]。また、硬化時に血液が介在すると硬化時間がさらに遅れ、硬化しないという報告もある[3]。さらに、酸-塩基反応により形成される上述のリン酸カルシウムセメントは生体内でほとんど吸収されない欠点もある[4]。そのため、最終的に生体内で吸収されて自家骨と置換するような素材による「生体吸収性ペースト状人工骨」の開発が医療の現場から強く望まれている。

そこで、本研究では、全く新しい硬化メカニズムを導入し、従来の骨修復セメントの問題点を全て解決した新規のペースト状人工骨を開発する。具体的には、イノシトールリン酸( $\text{C}_6\text{H}_{18}\text{O}_{24}\text{P}_6$ ; IP6)でTCPの表面を修飾し、IP6とカルシウムのキレート結合により硬化する生体吸収性ペースト状人工骨を創製する。このペースト状人工骨は、IP6のキレート結合で硬化するため、硬化時間も短く、炎症反応の心配もないほか、化学反応を伴わずにTCPのまま直接硬化するという特長を持っている。

本研究では、溶解性の異なる二種類のTCP( $\beta$ -および $\alpha$ -TCP)を用いて、異なる溶解性を有するキレート硬化型ペースト状人工骨の開発をそれぞれ行った。2.1節では、 $\beta$ -TCPを用いて、プロトタイプセメントの作製から臨床応用を指向した材料特性を有する非崩壊性セメントへの改良を行った。2.2節では、 $\alpha$ -TCPを用いて、プロトタイプセメントの作製からクエン酸塩を混練液とした非崩壊性セメントへの改良を行った。

## 2. 実験と結果

### 2.1 キレート硬化型 $\beta$ -リン酸三カルシウムセメントの創製

#### 2.1.1 キレート硬化型 $\beta$ -リン酸三カルシウムプロトタイプセメントの試作とその材料特性評価

セメント原料粉体は、市販  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -TCP-100)粉体を遊星ボールミルにより湿式粉碎して調製した。まず、 $\phi 10$  mm  $\text{ZrO}_2$  ボールで4 h 粉碎( $\beta$ -TCP-4h)した。得られたスラリーをそれぞれ吸引ろ過、凍結乾燥し、粉碎粉体を得た。ついで、その粉体を3000 ppmに調製したIP6溶液中で24 h 表面修飾後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\beta$ -TCP 粉体(IP6- $\beta$ -TCP-4h)を得た。

図1に調製した  $\beta$ -TCP 粉体のX線回折(XRD)パターンを示す。4 h 粉碎後、結晶性はわずかに低下したが、粉碎後および表面修飾前後で結晶相に変化はなかった。表1に調製粉体のメジアン粒子径、比表面積およびゼータ電位の結果を示す。粉碎によってメジアン粒子径は減少し、比表面積は向上したが、表面修飾前後で差異は見られなかった。一方で、ゼータ電位は、 $\beta$ -TCP 粒子へのIP6の吸着によって表面修飾前後で大きく低下した。また、走査型電子顕微鏡(SEM)観察からも  $\beta$ -TCP 粒子が微粒化していることも確

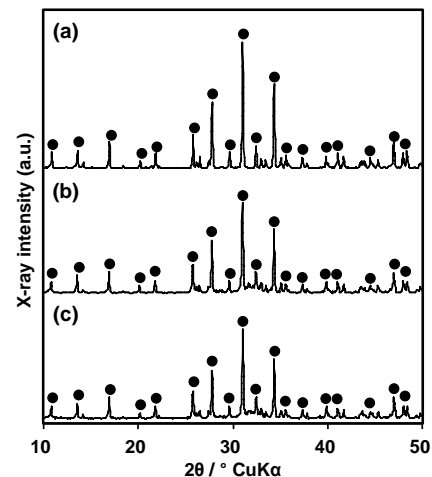


図1 調製粉体のXRDパターン  
(a)  $\beta$ -TCP-100, (b)  $\beta$ -TCP-4h, IP6- $\beta$ -TCP-4h

表1 調製粉体のメジアン粒子径、比表面積およびゼータ電位

	メジアン粒子径 ( $\mu\text{m}$ )	比表面積 ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	ゼータ電位 (mV)
$\beta$ -TCP-0h	5.1	2.5	-19.7
$\beta$ -TCP-4h	1.5	20.3	-7.73
IP6- $\beta$ -TCP-4h	1.4	21.4	-29.7



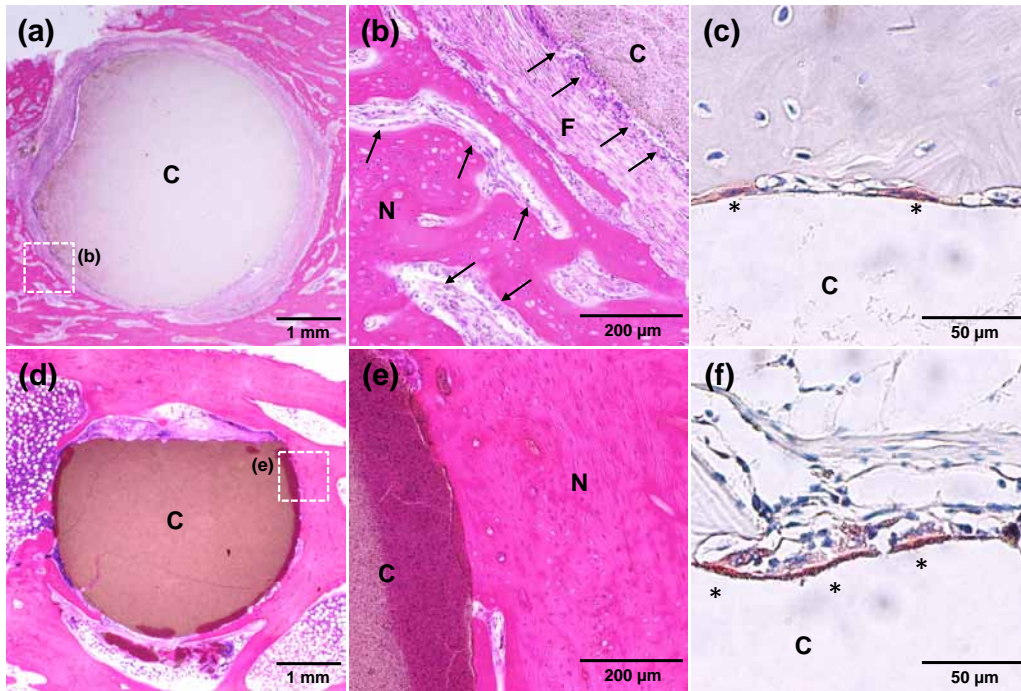


図2 ウサギ脛骨に4および24週間埋入後のセメントの組織学像

(a)-(c)は4週、(d)-(f)は24週埋入後の組織像を示し、(a, b), (d, e)はHE染色像、(c), (f)はTRAP染色像である。セメント(C)周囲でピンク色の新生骨(N)の形成が認められた。(b)では、セメントと新生骨の間に線維性組織(F)が見られたが、矢印(→)で示すように骨芽細胞による旺盛な骨形成が確認できる。一方で、(c)および(f)では、TRAP陽性の破骨細胞(\*)による材料の吸収も確認された。

認した。

ついで、調製したIP6-β-TCP-4h粉体に固液比(粉体/混練液(P/L)=1/0.20 [g/cm<sup>3</sup>])になるように混練液(純水)を加え、混練・成形してIP6-β-TCP-4hセメント(φ4.2 mm, h7~8 mm)を作製し、室温で24 h養生した。得られたセメントの生体適合性・生体吸収性を評価するため、ウサギ脛骨にφ4.4 mmの骨欠損を作製し、作製したセメントを4および24週間埋入した。その後、脱灰標本作製し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を、非脱灰研磨標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色をそれぞれ行い、その組織学的観察・評価を行った[5]。HE染色は細胞核・骨組織などが赤く染色される。TRAP染色は、材料や骨の吸収を行うTRAP陽性の破骨細胞が赤く染色される。

図2にIP6-β-TCP-4hセメントの埋入4週(a-c)および24週(d-f)後の組織学像を示す。(a, b), (d, e)はHE染色像、(c), (f)はTRAP染色像である。埋入4週では、セメント(C)とピンク色で示した新生骨(N)の間に線維性組織の介在が見られたが、セメント上および新生骨周囲で骨形成を行う骨芽細胞(→)の存在も確認された。また、TRAP染色像(c)からは、TRAP陽性の破骨細胞の存在が観察され、材料が吸収されていることが確認された。埋入4週では、セメント(C)が成熟した新生骨(N)で覆われている様子がわかる。TRAP染色像(f)から、試料片周囲にTRAP陽性の破骨細胞の存在が観察され、24週においても材料が吸収され続けていることが明らかとなった。これらの結果から、IP6-β-TCP-4hセメントは、生体適合性、生体吸収性に優れたセメントであるといえる。

## 2. 1. 2 高強度化キレート硬化型β-リン酸三カルシウムセメントの試作とその材料特性評価

我々は最終的に、低侵襲治療を実現するシリンジなどのインジェクションデバイスで注入可能なペースト状人工骨の開発を目標としている。純水を混練液として用いたセメントは、混練時のハンドリング性(操作性)に乏しく、力学強度が低いという欠点がある。そこで、これらの問題を解決するために、表2に示す粘性多糖類を混練液として用いてセメントを作製した[6]。

2.1.1項で調製したIP6-β-TCP-4h粉体および混練液(粘性多糖類)を、固液比1/0.45-1/0.55 [g/cm<sup>3</sup>]になるように加え、混練することでセメントペーストを調製し、稠度および硬化時間を測定した。また、ペーストを徒手またはシリンジを用いてインジェクションで成形し、セメント試料片(φ6 mm, h12 mm)を作製し、インキュベータ(37°C, 相対湿度: 100%)で24 h養生した後、圧縮強度およびXRDを測定し、セメント破断面を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

まず、セメントペーストのハンドリング性を評価するために稠度(ペーストの広がり)を測定した(図3)。純水を混練

表2 混練液として使用した多糖類

略語	濃度 (mass%)	添加剤	溶媒
Water	0	-	-
Alg	2	アルギン酸ナトリウム	3000 ppm IP6
Dex	20	デキストラン硫酸ナトリウム	3000 ppm IP6
Chond	20	コンドロイチン硫酸ナトリウム	3000 ppm IP6
Chito GL	10	キトサン	乳酸
Chito W10	10	キトサン	乳酸

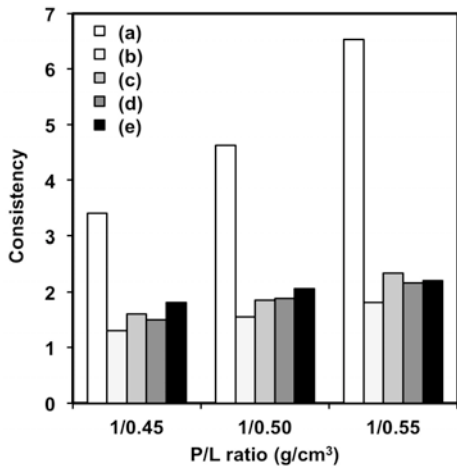


図3 セメントペーストの稠度  
(a) water, (b) Alg, (c) Dex, (d) Chond, (e) Chito W10

液とした場合、高い稠度(低い粘性)のセメントペーストであったのに対して、多糖類を添加した混練液を用いた場合、低い稠度(高い粘性)のセメントペーストが得られた。しかしながら、各多糖類の間で稠度に差は見られなかった。この結果から、混練液に多糖類を添加して使用することで、ペーストに適度な粘性を付与させることが可能となり、純水のみで混練した時よりも、ハンドリング性(操作性)が向上することが明らかとなった。また、Chito W10を混練液として調製したセメントペーストの硬化時間は、P/L=1/0.50 [g/cm³]で8.0±1.0 min、P/L=1/0.55で20±1.0 minであった。

次に、徒手成形で作製したセメント試料片の圧縮強度を図4に示す。純水を混練液として用いた場合、セメントの圧縮強度はいずれの固液比でも約0.5 MPaであったのに対して、多糖類を添加した混練液を用いた場合、いずれのセメントの圧縮強度も向上した。特に、Chito W10を混練液として用いた場合、高い圧縮強度(17.4±1.8 MPa)のセメントが得られることがわかった。また、シリンジを用いてインジェクションで成形したセメントにおいても、Chito GLおよびChito W10を混練液として用いた場合、他の混練液を用いた場合よりも高い圧縮強度が得られることがわかった(Chito GL: 10.5±1.8 MPa (P/L=1/0.55 [g/cm³]), Chito W10: 15.9±2.0 MPa (P/L=1/0.55 [g/cm³]))。

セメントの圧縮強度と相対密度との関係を図5に示す。セメントの相対密度が増加するにつれて、指数関数的に圧縮強度が増加することが明らかとなった。高い圧縮強度(17.4±1.8 MPa)を有していたChito W10を混練液として用いたセメントは、高い相対密度(51.7±0.9%)も有していた。このことから、Chito W10を混練液として用いたセメントが高い圧縮強度となった要因は相対密度の増加であるといえる。しかしながら、SEMを用いてセメント破断面の微細構造を観察した結果、各セメント間でセメント粒子の充填性に違いは確認できなかった。これは、各セメント間の相対密度の差が約5%しかないためだと考えられる。

さらに、セメントのXRDパターンを測定した結果、純水および多糖類を添加した場合、いずれのセメントもβ-TCP単一相からなることがわかった。これは、セメント

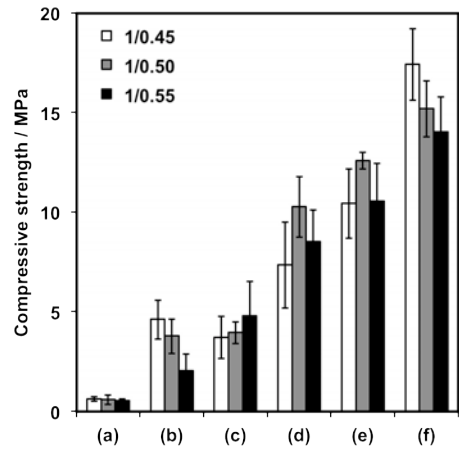


図4 セメントの圧縮強度  
(a) water, (b) Alg, (c) Dex, (d) Chond, (e) Chito GL, (f) Chito W10

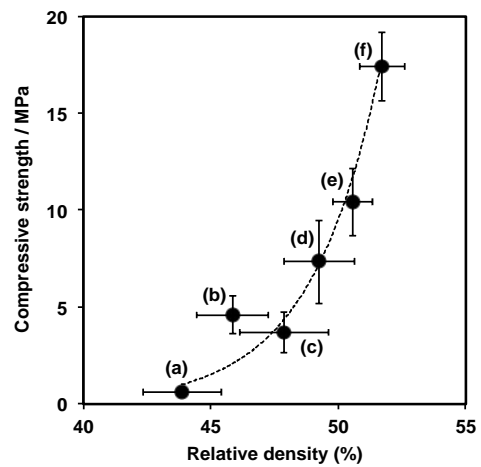


図5 セメントの圧縮強度と相対密度との関係  
(a) water, (b) Alg, (c) Dex, (d) Chond, (e) Chito GL, (f) Chito W10, P/L=1/0.45 [g/cm³]

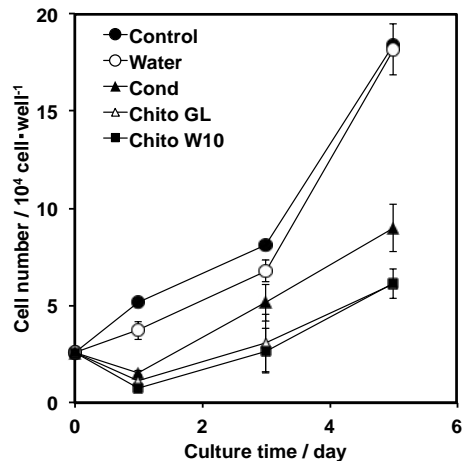


図6 セメントと共培養した細胞の増殖性

が原料粉体の結晶相を維持したまま硬化したことを示している。

ついで、セメント試料片の生体適合性を調べるため、Transwell® (Corning, USA)を用いて間接培養を行った。純水を混練液として作製したセメントは、コントロールと同等な細胞増殖を示した(図6)。一方、Chond, Chito GL およ

びChito W10を混練液として作製したセメントの細胞増殖は、1日目に大きく低下した。しかしながら、3日目には播種した細胞数にまで回復し、5日目まで増殖し続けた。細胞増殖の低下は、混練液の成分がセメントから溶出し培地中のpHを変化させたことが原因と考えられる。

### 2. 1. 3 非崩壊性キレート硬化型 $\beta$ -リン酸三カルシウムセメントの試作とその材料特性評価

2.1.2 項では、多糖類を混練液として用いることで、インジェクション可能かつ高い圧縮強度を有するセメントの作製に成功した。しかしながら、セメントの作製条件によっては、作製したセメントが水中に浸漬した場合に崩壊してしまうという問題が見られた。

一方で、我々はこれまでに、非崩壊性 HAp セメント作製のための新規な粉体調製プロセス（以降、改善法）を考案してきた[7]。これまでは、市販 HAp 粉体を湿式粉碎後、IP6 で表面修飾することでセメント原料粉体を調製した（以降、従来法）[8]。一方で、改善法では、IP6 中で市販 HAp 粉体を湿式粉碎すると同時に IP6 による表面修飾を行うことで、セメント原料粉体を調製した。

本項では、新規な粉体調製プロセス（改善法）を IP6- $\beta$ -TCP セメントの作製のために適用し、セメントの材料特性、とりわけ非崩壊性に及ぼす粉碎時間および IP6 濃度の影響を検討した[9]

市販  $\beta$ -TCP-100 粉体 10 g および 3000 ppm IP6 水溶液(pH 7.3) 40 cm<sup>3</sup>、 $\phi$ 2 mm ZrO<sub>2</sub> ボール(180 g)を ZrO<sub>2</sub> ポットに入れ、遊星型ボールミルを用いて 1-6 h 湿式粉碎するとともに、IP6 による表面修飾処理を同時に行った。粉碎後に得られたスラリーを吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\beta$ -TCP 粉体を得た。ここで、例えば 3000 ppm IP6 を用いて、 $\phi$ 2 mm ZrO<sub>2</sub> ボールで 3 h 粉碎した粉体を「 $\beta$ -TCP-3h(3000)」とする。「 $\beta$ -TCP-0h(0)」は市販  $\beta$ -TCP-100 粉体である。

図 7 に調製した  $\beta$ -TCP 粉体の XRD パターンを示す。粉碎時間 3 h までは、ほぼ  $\beta$ -TCP 単一相であったが、4-6 h の粉碎時間では  $\beta$ -TCP/HAp 混合相であることがわかった。4 h 以上の粉碎時間では、 $\beta$ -TCP が IP6 中で加水分解され、HAp が形成したと考えられる。

次に、トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸(Tris-HCl)バッファー(pH7.3)中での調製粉体の溶解性をカルシウムイオン電極を用いて調べた(図 8)。1-3 h の粉碎時間では、粉碎時間の増加とともに溶解性が高まり、3 h 粉碎粉体( $\beta$ -TCP-3h(3000))では、最も溶解性が高いことが明らかとなった。一方、4 h 以上粉碎した粉体は粉碎前の粉体よりも溶解性が低下した。4 h 粉碎粉体は  $\beta$ -TCP/HAp 混合相であり、低結晶性 HAp は中性溶液中で溶解しにくいいため溶解性が低下したと考えられる。

調製粉体の粒子形態を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察した(図 9)。 $\beta$ -TCP-0h(0)は数  $\mu$ m からなるスムーズな表面の焼結粒子(図 9a)であり、拡大像(図 9b)から一次粒子は 10 nm 以下であることがわかった。粉碎時間の増加に伴って粒子径が減少し、ナノサイズの粒子が増加していることが確認した(図 9c, e および g)。また、 $\beta$ -TCP-2h(3000)

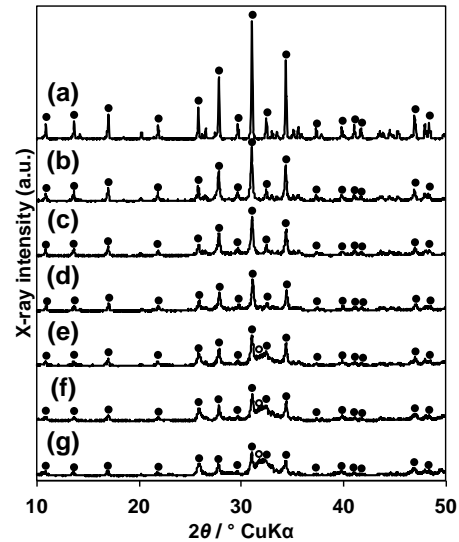


図 7  $\beta$ -TCP 粉体の XRD パターン  
(a)  $\beta$ -TCP-0h(0), (b)  $\beta$ -TCP-1h(3000), (c)  $\beta$ -TCP-2h(3000), (d)  $\beta$ -TCP-3h(3000), (e)  $\beta$ -TCP-4h(3000), (f)  $\beta$ -TCP-5h(3000), (g)  $\beta$ -TCP-6h(3000). ●:  $\beta$ -TCP, ○: HAp

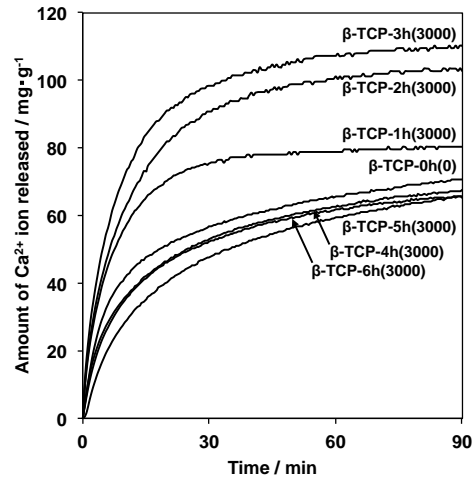


図 8 Tris-HCl バッファーにおける  $\beta$ -TCP 粉体の溶解性

および  $\beta$ -TCP-3h(3000)では、それらの粒子表面は  $\beta$ -TCP-0h(0)と比較して凹凸が増加し、粒子表面は極めて非晶質に近い状態になっていることがわかる(図 9d および f)。一方、 $\beta$ -TCP-4h(3000)では、粒子径は減少したものの(図 9g)、その粒子表面は微細な針状粒子の凝集体であることがわかった(図 9h)。これは、IP6 中で  $\beta$ -TCP が加水分解され、低結晶性 HAp 粒子が析出したためであると考えられる。実際に、 $\beta$ -TCP-3h(3000)と  $\beta$ -TCP-4h(3000)を比較すると、比表面積(SSA)は  $18.6 \pm 1.1$  m<sup>2</sup>/g から  $76.5 \pm 0.5$  m<sup>2</sup>/g に、粉体中の HAp 含有率は  $4.9 \pm 2.4\%$  から  $25.1 \pm 2.6\%$  に増加したことを確認しており、これらの結果は TEM 観察結果とよく一致している。

これらの粉体および 2.5 mass%リン酸水素二ナトリウム(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)を混練液として調製したセメントペーストの非崩壊性を調べた結果(図 10)、最も高い溶解性を示した  $\beta$ -TCP-3h(3000)粉体から調製したペーストのみ 5 min 以内に純水中で非崩壊性を示した。

ついで、粉体性状に及ぼす IP6 濃度の影響を検討するた



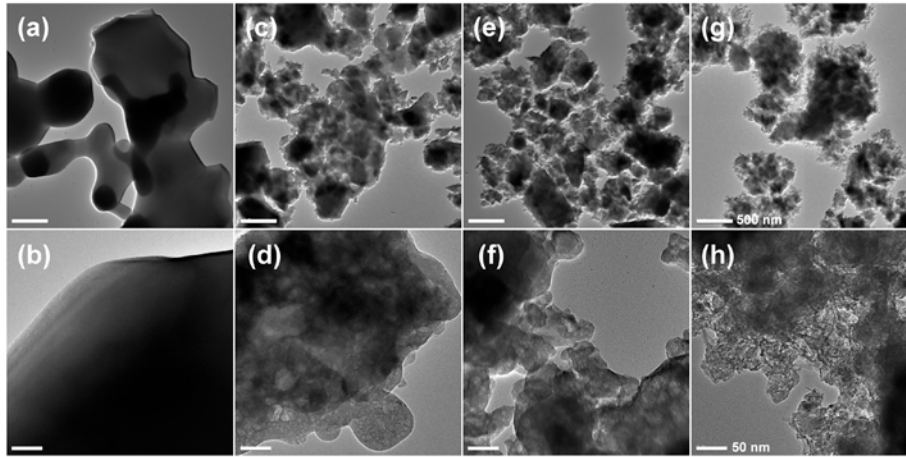


図 9  $\beta$ -TCP 粒子の TEM 像

(a, b)  $\beta$ -TCP-0h(3000), (c, d)  $\beta$ -TCP-2h(3000), (e, f)  $\beta$ -TCP-3h(3000), (g, h)  $\beta$ -TCP-4h(3000)

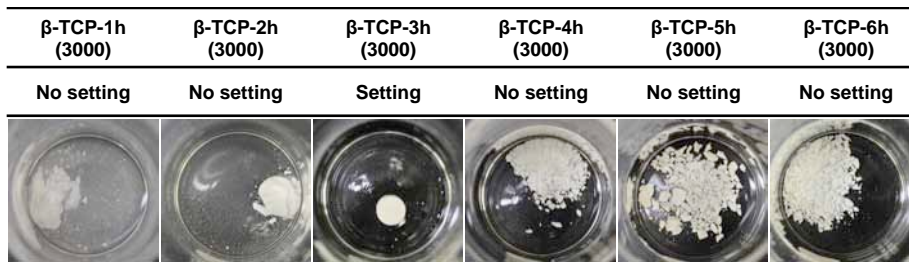


図 10 非崩壊性試験後のセメントの外観

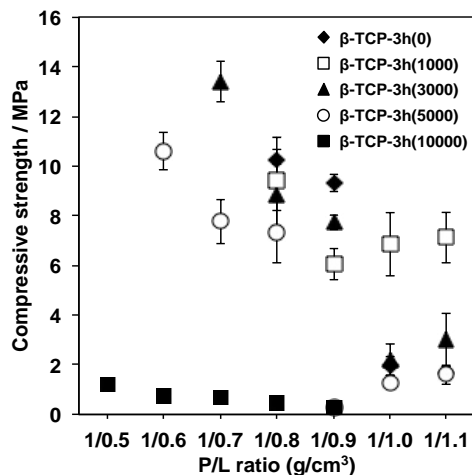


図 11  $\beta$ -TCP セメントの圧縮強度

め、粉碎時間を 3 h に固定し、0-10,000 ppm IP6 水溶液(pH 7.3)中で市販  $\beta$ -TCP-100 粉体を上記と同様な方法で粉碎した。粉碎後、得られたスラリーを吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\beta$ -TCP 粉体を得た。

調製粉体の XRD パターンを測定した結果、IP6 中で粉碎したすべての調製粉体は、 $\beta$ -TCP 単一相であったが、純水中で粉碎した粉体は一部 HAp 相が含まれていることが確認できた。また、1,000-10,000 ppm IP6 中で粉碎した粉体では、SSA はほとんど変化しなかったが、純水中で粉碎した粉体の SSA は、IP6 中で粉碎した粉体のそれよりも増加した。純水中で粉碎した粉体表面は微細な HAp 結晶が析出したため、SSA が増加したと考えられる。

次に、0 および 1000, 3000, 5000, 10000 ppm で表面修飾

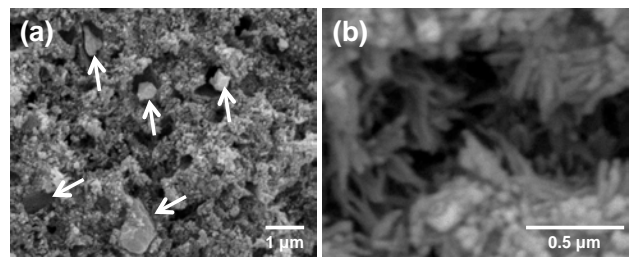


図 12  $\beta$ -TCP-3h(3000)セメント破断面の微細構造

(a) 低倍像, (b) 高倍像, 矢印は未反応の  $\beta$ -TCP

した  $\beta$ -TCP-3h 粉体および 2.5 mass% リン酸水素二ナトリウム( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )を混練液としてセメントを作製し、それらの材料特性を評価した。セメントは、各  $\beta$ -TCP 粉体に固液比(P/L)が 1/0.5-1/1.1 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]となるように混練液を加え、混練することで作製した。インキュベータ中で 24 時間養生した後、圧縮強度および相対密度、XRD パターンを測定した。また、XRD パターンのピーク強度から HAp 転化率を算出した。さらに、圧縮強度試験後のセメント破断面を走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。

図 11 に  $\beta$ -TCP セメントの圧縮強度を示す。圧縮強度は固液比の減少とともに低下した。また、相対密度についても同様な傾向が確認された。最も高い圧縮強度のセメント ( $13.4 \pm 0.8$  MPa)は、 $\beta$ -TCP-3h(3000) (P/L=1/0.7 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ])粉体から得られ、その相対密度についても最も高い値 ( $53.3 \pm 1.5\%$ )であった。XRD パターン測定の結果から、このセメントの HAp 含有率は 24.9%であった。つまり、粒子同士が密にパッキングされ、高い相対密度となったこと、 $\beta$ -TCP から HAp への相転移によって粒子同士のアンカリ



ング(絡まり)が起こったことで高い圧縮強度が得られたと考えられる。

さらに、 $\beta$ -TCP-3h(3000)セメントの破断面の微細構造をSEMを用いて観察したところ、密に充填された粒子間に矢印で示したように未反応の大きな $\beta$ -TCP塊(図12a)および析出した針状HAp粒子(図12b)の存在が確認できた。この結果は、粉碎によって $\beta$ -TCP粒子表面に形成した非晶質に近い微細粒子のみが加水分解され、図12bに示したような針状HApに転化することでセメント硬化に寄与し、十分に粉碎されずに残った大きな $\beta$ -TCP塊はセメント硬化に寄与しなかったことを意味している。

続いて、酢酸-酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.5)中での $\beta$ -TCP-3h(0)および $\beta$ -TCP-3h(3000)セメント(P/L=1/0.7 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ])の溶解性をカルシウムイオン電極を用いて調べた(図13)。溶解性の比較として、純水を混練液として作製したHApセメント(P/L=1/0.3)も同様に測定した。 $\beta$ -TCP-3h(3000)セメントは $\beta$ -TCP-3h(0)セメントよりも高い溶解性を示し、HApセメントと比較した場合、3倍以上の溶解性を示した。

*In vivo*での改善法 $\beta$ -TCPセメントの生体適合性を評価するために、 $\beta$ -TCP-3h(0) (P/L=1/1.0 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ])および $\beta$ -TCP-3h(3000) (P/L=1/1.1 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ])セメントをブタ脛骨骨端部に4週間埋入し、組織学的観察を行った。

図14にトルイジンブルー染色した凍結薄切片像を示す。図14aおよびcから、 $\beta$ -TCP-3h(0)、 $\beta$ -TCP-3h(3000)両セメント(C)とともに周囲の骨および新生骨と直接結合している様子が確認できる。また、その拡大像(図14bおよびd)から、セメントの表面上では破骨細胞(白矢印)による材

料の吸収が、セメントとは反対側で骨芽細胞(黒矢印)による類骨の形成(白破線矢印)が行われている様子が確認できる。この結果から、埋入した $\beta$ -TCP-3h(0)、 $\beta$ -TCP-3h(3000)両セメントは、生体内で骨リモデリングサイクルの状態にあるといえる。さらに、図14dでは、血管や神経が通るハーバース管(\*)が形成されつつあることが確認できる。このことから4週間という短い埋入期間でありながらも形成された新生骨は良好に成熟していることがわかる。以上の結果から、 $\beta$ -TCP-3h(0)および $\beta$ -TCP-3h(3000)セメントは良好な生体適合性を有するといえる。

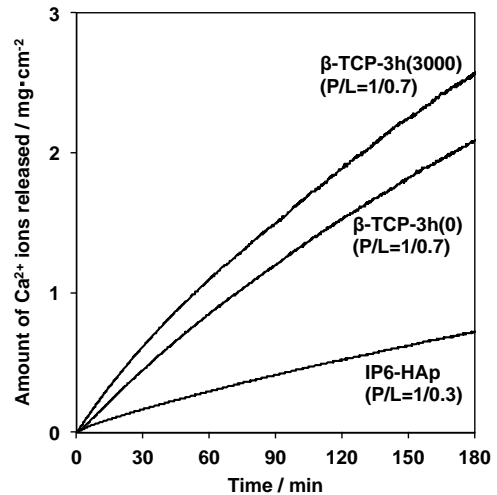


図13 酢酸バッファーにおける $\beta$ -TCPセメントの溶解性

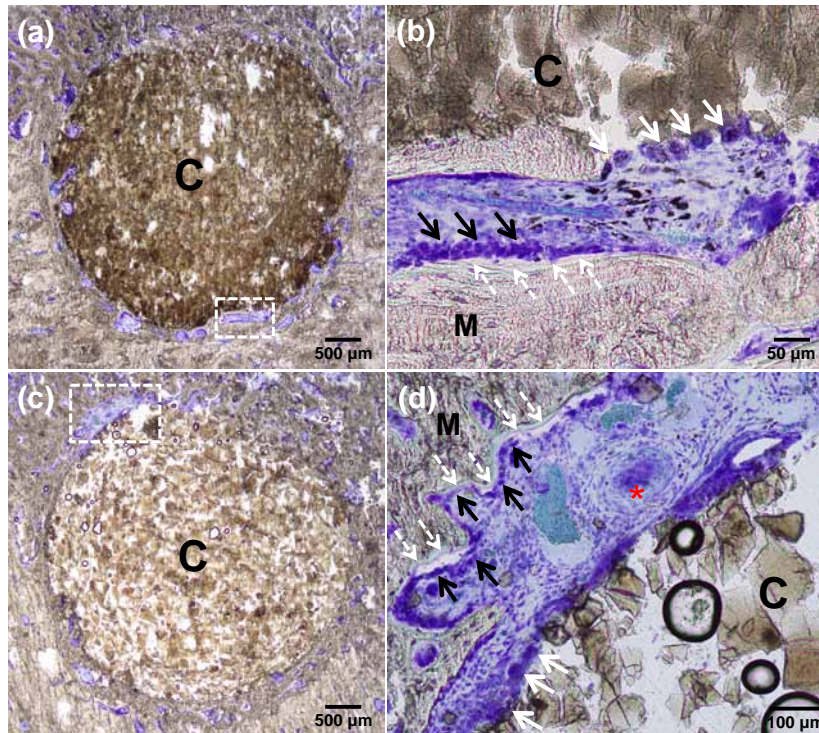


図14  $\beta$ -TCPセメントの組織学的観察(TB染色)

(a, b)  $\beta$ -TCP-3h(0), (c, d)  $\beta$ -TCP-3h(3000)セメント。(b)および(d)はそれぞれ(a)および(c)中の拡大像。セメント(C)は周囲の骨および新生骨と直接結合している(a, c)。また、骨芽細胞(黒矢印)による類骨(白破線矢印)の形成および破骨細胞(白矢印)による材料吸収が確認できる。(d)では、血管の通り道であるハーバース管(\*)が形成されつつある。

## 2. 1. 4 非崩壊性キレート硬化型 $\beta$ -リン酸三カルシウムセメントの高強度化とその材料特性評価

2.1.3 項では、改善法を  $\beta$ -TCP セメント原料粉体の調製に適用することで、非崩壊型  $\beta$ -TCP セメントの作製に成功した。また、そのセメントが *in vitro* において高い溶解性を示すこと、*in vivo* において優れた生体適合性と破骨細胞による吸収を受けることを示した。

本項では、このセメントを臨床応用可能な材料特性へと向上させるために、セメント作製に用いる混練液の改良を行った。混練液には、クエン酸(和光純薬工業株式会社)、リン酸水素二ナトリウム(和光純薬工業株式会社)、アルギン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)の三種類の溶質を純水中に溶解し用いた。クエン酸は  $\beta$ -TCP の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合し、粒子を負に帯電させ、粒子間の反発によっての分散性を向上させること[10]が期待できる。リン酸水素二ナトリウムは既報[9]で報告したように、 $\beta$ -TCP の HAp への転移を促進させることで、圧縮強度の向上、硬化時間の短縮に寄与する。アルギン酸ナトリウムは  $\beta$ -TCP 中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合しゲル化することで、崩壊性の抑制に期待できる[11]。混練液は三種類の溶質を溶解した後、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7.0 に調整した。混練液の略称は「クエン酸濃度-リン酸水素二ナトリウム濃度-アルギン酸ナトリウム濃度」とする。例えば、1.5 mass% クエン酸、2.5 mass% リン酸水素二ナトリウム、1.0 mass% アルギン酸ナトリウムの場合には「1.5-2.5-1.0」となる。表 3 に使用した混練液の組成を示す。

セメントペーストは、 $\beta$ -TCP-3h(3000)粉体に固液比(P/L)が 1/0.9 [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ]となるように上記の混練液を加え、混練することで調製し、徒手でテフロン割型に充填し、セメント試料片( $\phi 6 \text{ mm}$ ,  $h 12 \text{ mm}$ )を作製した。その後、インキュベータ( $37^\circ\text{C}$ , 相対湿度 100%)中で 24 時間養生した。また、生体環境下でのセメントの硬化を模倣するため、テフロン割型の上下をクランプを用いて挟みこみ、水中に浸漬し、インキュベータ( $37^\circ\text{C}$ , 相対湿度 100%)で 72 時間養生した。所定時間養生後、セメント試料片の圧縮強度および XRD パターンを測定した。

図 15 にインキュベータで 24 時間養生後および水中で 72 時間養生後のセメント試料片の圧縮強度(A)および相対密度(B)を示す。また、図 16 にインキュベータで 24 時間養生後のセメント試料片(A)および水中で 72 時間養生後の

表 3 使用した混練液の組成

	クエン酸 ナトリウム (mass%)	リン酸水素二 ナトリウム (mass%)	アルギン酸 ナトリウム (mass%)
0-0-0	0	0	0
0-2.5-0	0	2.5	0
0-0-1.0	0	0	1.0
0-2.5-1.0	0	2.5	1.0
1.0-2.5-1.0	1.0	2.5	1.0
1.5-2.5-1.0	1.5	2.5	1.0
2.5-2.5-1.0	2.5	2.5	1.0
3.0-2.5-1.0	3.0	2.5	1.0

セメント試料片(B)の HAp 転化率を示す。図 15A では、混練液に純水(0-0-0)を用いて作製したセメント試料片の圧縮強度は  $9.1 \pm 1.4 \text{ MPa}$  であった。また、混練液にリン酸水素二ナトリウム(0-2.5-0)を用いた場合、セメント試料片の圧縮強度は  $9.4 \pm 1.5 \text{ MPa}$  であった。混練液にリン酸水素二ナトリウムを添加することにより、 $\text{PO}_4^{3-}$  イオンが供給され、 $\beta$ -TCP の HAp への転化を促進し、圧縮強度が高くなったと考えられる。また、混練液にアルギン酸ナトリウム(0-0-1.0)を添加して作製したセメント試料片の圧縮強度は  $11.0 \pm 3.4 \text{ MPa}$  であり、純水(0-0-0)を用いて作製したセメント試料片と比較してわずかに向上した。このことから、混練液にアルギン酸ナトリウムを用いるだけでも圧縮強度に影響を及ぼすことが示唆された。また、混練液にリン酸水素二ナトリウムおよびアルギン酸ナトリウム(0-2.5-1.0)を用いた場合のセメント試料片の圧縮強度は、純水(0-0-0)、リン酸水素二ナトリウム(0-2.5-0)、またはアルギン酸ナトリウム(0-0-1.0)を用いた場合と比較して向上した。このことは、リン酸水素二ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、いずれの混練液もセメントの強度向上に影響していることを示している。また、混練液にクエン酸、リン酸水素二ナトリウム、アルギン酸ナトリウムの三種類(1.0-2.5-1.0, 1.5-2.5-1.0, 2.5-2.5-1.0, 3.0-2.5-1.0)を用いた場合、セメント試料片の圧縮強度は、それぞれ  $21.7 \pm 1.8$ ,  $20.5 \pm 3.1$ ,  $21.8 \pm 2.0$ ,  $30.7 \pm 8.1 \text{ MPa}$  であり、純水(0-0-0)を用いた場合と比較して、

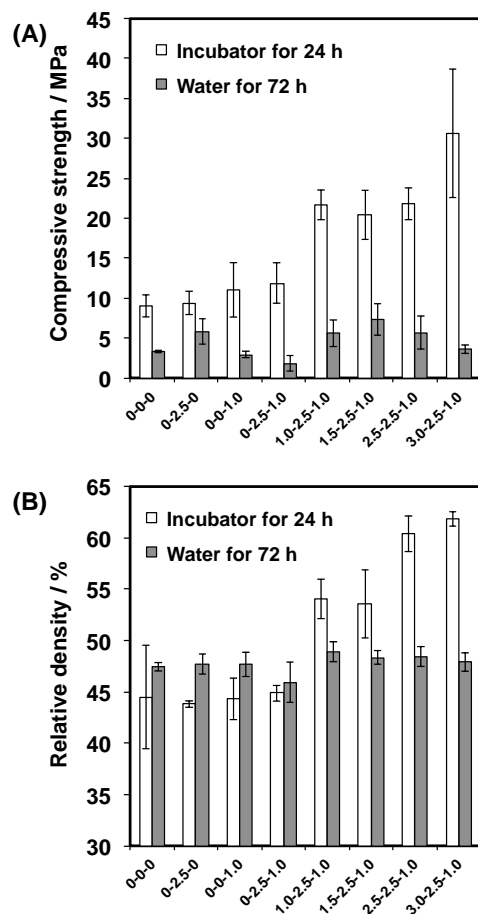


図 15 セメントの圧縮強度(A)および相対密度(B)

圧縮強度は約 2~3 倍に向上した。クエン酸を添加することにより、 $\beta$ -TCP 中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとクエン酸の  $\text{COO}^-$  イオンが結合することでセメント粒子の分散性が向上し、その結果、セメント粒子が密に充填され、圧縮強度が向上したと考えられる。

一方で、水中で 3 日間養生後のセメント試料片の圧縮強度(図 15B)は、全てのサンプルにおいて、インキュベータ中で 24 時間養生後のセメント試料片と比較して低下した。最も高い圧縮強度は、混練液に 1.5-2.5-1.0 を用いた場合に得られ、その圧縮強度は  $7.4 \pm 2.0$  MPa であった。2.5 および 3.0 mass% のクエン酸濃度で圧縮強度が低くなった原因は、過剰のクエン酸を添加したため、分散性は向上したものの  $\beta$ -TCP の HAp への転移を阻害したためであると考えられる。

ついで、インキュベータ中で 24 時間養生後のセメント試料片および水中で 72 時間養生後のセメント試料片の圧縮強度試験後の XRD パターンを測定し、HAp 含有量をそれぞれ求めた(図 16)。作製したセメント試料片は、混練液および養生条件に関わらず全て  $\beta$ -TCP と HAp の混合相であることが分かった。水中で 72 時間養生後のセメント試料片の HAp 含有量は、24 時間養生後のセメント試料片のそれよりも増加したが、養生時間の違いもこの要因として考えられる。また、混練液として 0-2.5-0 を用いた場合、インキュベータ中および水中で養生後のセメントは、いずれも最も高い HAp 含有量であった。リン酸水素二ナトリウムを単独で用いた場合、供給された  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンが  $\beta$ -TCP から HAp への転移を最も促進したと考えられる。

一方で、インキュベータ中および水中で養生したセメン

トいずれの場合も、クエン酸濃度が増加するにつれて、HAp 含有率が低下する傾向にあった。クエン酸濃度が増加するにつれて、 $\beta$ -TCP 中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合する  $\text{COO}^-$  イオンが増加し、 $\beta$ -TCP から HAp への転移が抑制されたと考えられる。

セメントペーストの非崩壊性を検討した(図 17)。2.5-2.5-1.0 および 3.0-2.5-1.0 を混練液として用いたセメントのみ水中で崩壊した。高いクエン酸濃度を用いた場合、 $\beta$ -TCP 中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合する  $\text{COO}^-$  イオンが増加し、 $\beta$ -TCP から HAp への転移が抑制されたため、水中で崩壊したと考えられる。

セメントペーストのハンドリング性を評価するために、稠度を測定した(図 18)。混練液に 0-0-0 を用いて調製したペーストの稠度は  $1.2 \pm 0.3$  であった。混練液に 0-2.5-0、0-2.5-1.0 を用いて調製したセメントペーストの稠度は約 1.0 であり、0-0-0 を用いて調製した場合と比較して、ほとんど変化はなかった。一方で、混練液に 0-0-1.0 を用いて調製されたペーストの稠度は約 1.5 であった。これは、混練液にアルギン酸ナトリウムを用いることでペーストがゲル化し稠度が増加したと考えられる。また、混練液のクエン酸濃度が 1.5, 2.5, 3.0 mass% のとき、稠度は約 2.5, 4.0, 3.7 に増加した。クエン酸の  $\text{COO}^-$  イオンが  $\beta$ -TCP 中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合することで、負に帯電した  $\beta$ -TCP 粒子同士が反発し、液状化のような減少を起こしたため、ペーストの稠度が増加したと考えられる。

セメントペーストの硬化時間を図 19 に示す。最も硬化時間が長かったのは混練液に 0-0-0 を用いた場合であり、硬化時間は  $31.8 \pm 1.3$  min であった。一方で、混練液に 0-2.5-0

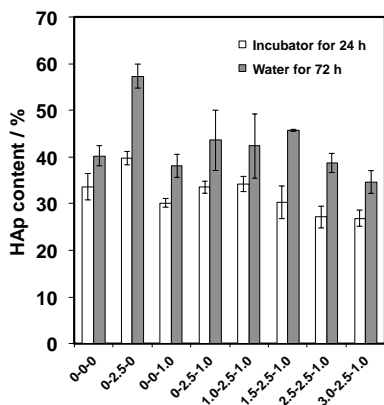


図 16 セメントの HAp 含有量

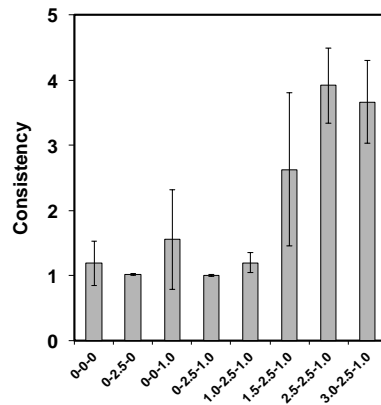


図 18 セメントペーストの稠度

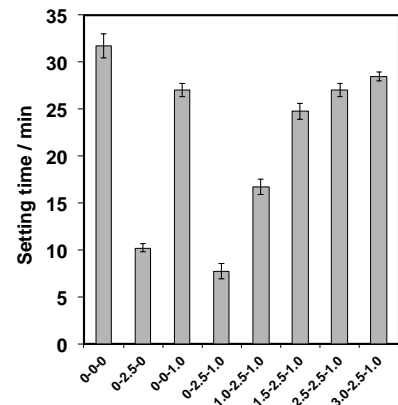


図 19 セメントペーストの硬化時間

混練液	0-0-0	0-2.5-0	0-0-1.0	0-2.5-1.0	1.0-2.5-1.0	1.5-2.5-1.0	2.5-2.5-1.0	3.0-2.5-1.0
外観								
崩壊性	非崩壊	非崩壊	非崩壊	非崩壊	非崩壊	非崩壊	少し崩壊	崩壊
崩壊率	0.1%	0.3%	0.1%	0.3%	2.0%	2.6%	4.8%	73.9%

図 17 非崩壊性試験後のセメントの外観



を用いた場合、硬化時間は  $10.3 \pm 0.4$  min に短縮した。これは、 $\text{PO}_4^{3-}$  イオンの供給が  $\beta$ -TCP の HAp への転移を促進したためだと考えられる。混練液に 0-0-1.0 を用いて作製したセメントの硬化時間は  $27.0 \pm 0.7$  min であり、0-0-0 と比較してほぼ同等の硬化時間であった。このことは、アルギン酸ナトリウムが硬化に影響を及ぼさないことを示している。また、クエン酸濃度が増加するにつれて硬化時間も増加した。これは、クエン酸の  $\text{COO}^-$  イオンが  $\text{Ca}^{2+}$  イオンと結合し、 $\beta$ -TCP の HAp への転移を抑制したためであると考えられる。

## 2.2 キレート硬化型 $\alpha$ -リン酸三カルシウムセメントの創製

### 2.2.1 キレート硬化型 $\alpha$ -リン酸三カルシウムプロトタイプセメントの試作とその材料特性評価

セメント原料粉体は、市販  $\alpha$ -TCP ( $\alpha$ -TCP-A) 粉体を遊星ボールミルにより湿式粉碎して調製した。まず、 $\text{ZrO}_2$  製ポッドと  $\phi 10$  mm  $\text{ZrO}_2$  ボール 50 個を使用し、30, 60, 120, 180, 270 min 粉碎した。粉碎した粉体を吸引ろ過後、1000 ppm に調製した IP6 溶液中で 24 h 表面修飾後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\alpha$ -TCP 粉体を得た[12]。粉体の略称は、例えば 120 min 粉碎した粉体を「 $\alpha$ -TCP120」、さらに IP6 による表面修飾を行った粉体を「IP6- $\alpha$ -TCP120」とする。

図 20 に調製した  $\alpha$ -TCP 粉体の XRD パターンを示す。 $\alpha$ -TCP については、粉碎時間 120 min までは  $\alpha$ -TCP 単一相を維持していたが、粉碎時間が 180 min 以上の場合、 $\alpha$ -TCP

と HAp の混合相であることが明らかとなった。この HAp 相の生成は、水和反応と機械粉碎によるメカノケミカル反応によるものと考えられる。また、SEM 観察と粒度分布測定の結果から、 $\alpha$ -TCP 粒子が微粒化していることも確認している。

調製した  $\alpha$ -TCP 単一相からなる IP6- $\alpha$ -TCP120 粉体に固液比が  $1/0.40$  [ $\text{g}/\text{cm}^3$ ] となるように混練液(純水)を加え、混練・成形してセメント( $\phi 4.2$  mm,  $h 7 \sim 8$  mm)を作製し、室温

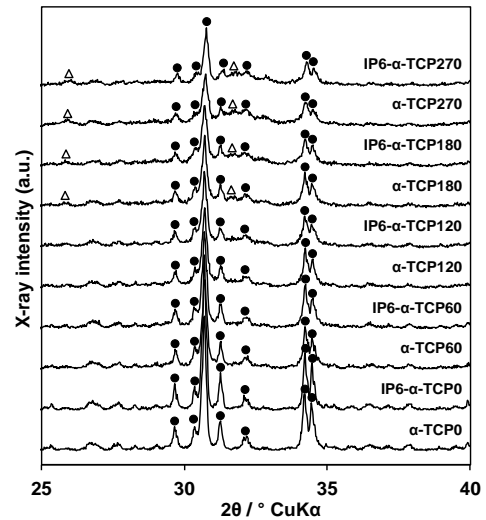


図 20  $\alpha$ -TCP 調製粉体の XRD パターン

●:  $\alpha$ -TCP, △: HAp

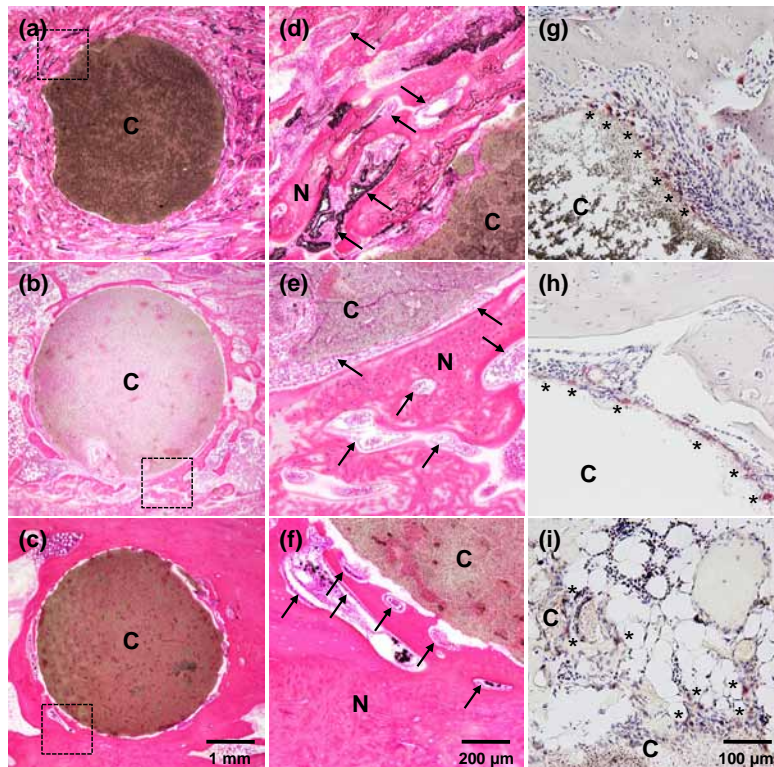


図 21 ウサギ脛骨に 4, 8 および 24 週間埋入後のセメントの組織学像

(a), (d), (g)は 4 週、(b), (e), (h)は 8 週、(c), (f), (i)は 24 週間埋入後の組織像を示し、(a)-(f)は HE 染色像、(g)-(i)は TRAP 染色像である。セメント(C)周囲でピンク色の新生骨(N)の形成が認められた。セメントと新生骨の間には、一部で線維性組織の形成が見られたが、矢印(→)で示すように骨芽細胞による旺盛な骨形成が確認できる。一方で、(g)-(i)では、いずれの埋入期間においても TRAP 陽性の破骨細胞(\*)による材料の吸収も確認された。

で 24 h 養生した。得られたセメントの生体適合性・生体吸収性を評価するため、ウサギ脛骨にφ4.4 mm の骨欠損を作製し、作製したセメントを 4, 8 および 24 週間埋入した。その後、脱灰標本作製し、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を、非脱灰研磨標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色をそれぞれ行い、その組織学的観察・評価を行った。HE 染色は細胞核・骨組織などが赤く染色される。TRAP 染色は、材料や骨の吸収を行う TRAP 陽性の破骨細胞が赤く染色される。

図 21 に IP6-α-TCP120 セメントの埋入 4 週(a, d, g)、埋入 8 週(b, e, h)および 24 週(c, f, i)後の組織学像を示す。(a)-(f) は HE 染色像、(g)-(i) は TRAP 染色像である。セメント(C) 周囲でピンク色の新生骨(N)の形成が認められ、埋入期間の増加とともにその新生骨が成熟している様子が見られた(d-f)。また、セメントと新生骨の間には一部で線維性組織の形成が見られたが、矢印(→)で示すように骨芽細胞による旺盛な骨形成が確認できる。一方で、(g)-(i)では、いずれの埋入期間においても TRAP 陽性の破骨細胞(\*)によるセメントの吸収も確認されたことから、24 週においてもセメントが吸収され続けていることが明らかとなった。これらの結果から、IP6-α-TCP120 セメントは、生体適合性、生体吸収性に優れたセメントであるといえる。

## 2. 2. 2 非崩壊性キレート硬化型 α-リン酸三カルシウムセメントの試作とその材料特性評価

本項では、非崩壊性セメントを作製することを目的として、2.2.1 項で調製した IP6-α-TCP120 粉体からセメントを作製し、その材料特性を評価した。まず、混練液として用いるセメント硬化に有効なカルボン酸の種類を検討し、その後、クエン酸塩を混練液として用いてセメントを作製し、評価した。

### (i) セメント硬化に及ぼすカルボン酸種の影響

セメント硬化に有効なカルボン酸の種類を調べるため、代表的なカルボン酸であるグリコール酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸を用いて、1 mol·dm<sup>-3</sup> 溶液を調製した。グリコール酸のみ 2 mol·dm<sup>-3</sup> 溶液も調製した。IP6-α-TCP120 粉体に、適切な固液比になるように混練液を加え混練後、

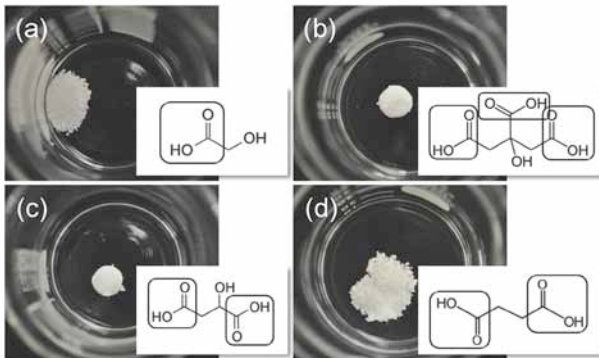


図 22 セメントの非崩壊性試験後のセメントの外観および混練液の構造式

(a) グリコール酸, (b) クエン酸, (c) リンゴ酸, (d) コハク酸

球状に成形し、純水に浸漬させ、非崩壊性試験を行った。各種カルボン酸を用いたセメントの非崩壊性試験結果および各種カルボン酸の構造式を図 22 に示す。グリコール酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸溶液の pH はそれぞれ pH1.9, 1.6, 1.7, 7.6 であった。クエン酸およびリンゴ酸を用いた場合には崩壊は見られず、セメントも硬化していた。グリコール酸を用いた場合には低い pH であるのにも関わらず硬化しなかった(2 mol·dm<sup>-3</sup> 溶液でも同様)。グリコール酸とクエン酸またはリンゴ酸を比較すると、カルボキシル基の数に違いがあるため、これが硬化に関わっていると考えられる[13]。コハク酸を用いた場合には pH がほぼ中性であるため硬化しなかったと考えられる。

### (ii) カルボン酸塩を用いたセメントの作製とその評価

水酸化ナトリウム溶液を用いて pH7.0 に調整した 0, 0.3, 0.5 および 0.7 mol·dm<sup>-3</sup> クエン酸塩(Citrate)溶液を調製した。また、この溶液を溶媒として、1 mass% アルギン酸ナトリウムを添加した溶液(Alg-Citrate)を調製した。IP6-α-TCP120 粉体に調製した各混練液を固液比 1/0.60 になるように加え、混練することでセメントペーストを調製した。その後、非崩壊性試験および稠度測定を行った。また、テフロン割型にセメントペーストを成形後、24 h 室温で養生し、圧縮強度および XRD パターンを測定した。

図 23 に、クエン酸塩を用いて作製したセメントの圧縮強度(A)および相対密度(B)をそれぞれ示す。いずれのセメントにおいてもクエン酸塩または、アルギン酸を添加したクエン酸塩を用いることで、圧縮強度は向上したが、アル

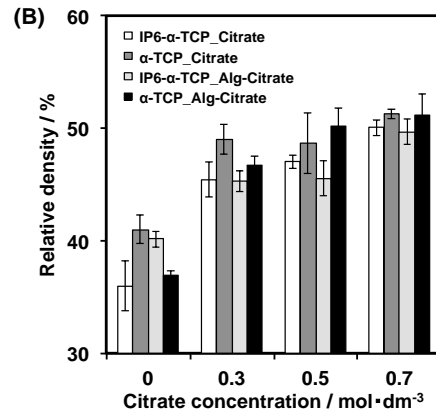
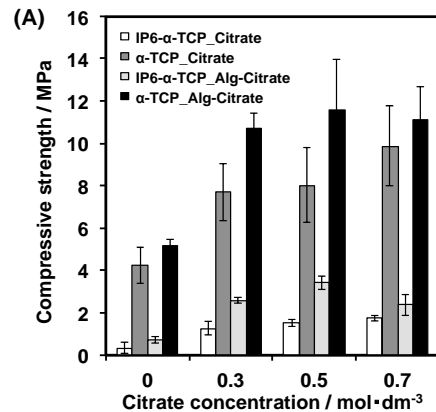


図 23 セメントの圧縮強度(A)および相対密度(B)



ギン酸を添加したクエン酸塩を用いた方が、クエン酸塩よりも圧縮強度向上に効果的であった。圧縮強度は、 $\alpha$ -TCP セメント > IP6- $\alpha$ -TCP セメントであった。また、いずれの混練液を用いた場合でも、カルボン酸が含まれる溶液では、純水と比較して、10%程度の相対密度の増加がみられた。これは、 $\alpha$ -TCP 粉体表面の  $\text{Ca}^{2+}$  とカルボキシル基の相互作用によるものだと考えられる。

セメントの XRD パターン測定の結果から、 $\alpha$ -TCP セメントは水和反応によって高い HAp 含有量となった(図 24)。そのため、 $\alpha$ -TCP セメントは、IP6- $\alpha$ -TCP セメントよりも高い圧縮強度を示したと考えられる。一方で、IP6- $\alpha$ -TCP セメントの場合、いずれの混練液を用いても HAp 転化率は 10%以下であることがわかった。このことから、セメントは IP6 のキレート結合およびカルボキシル基の相互作用のみで硬化したと考えられる。

次に、非崩壊性試験後のセメントの外観を図 25 に示す。いずれのクエン酸濃度のセメントペーストにおいてもセメントの崩壊は認められなかった。カルボン酸塩を混練液として用いると、水中でも硬化することが明らかとなった。このことから、血液介在時でも硬化することが期待されるセメントの稠度を測定した結果、クエン酸を添加すること

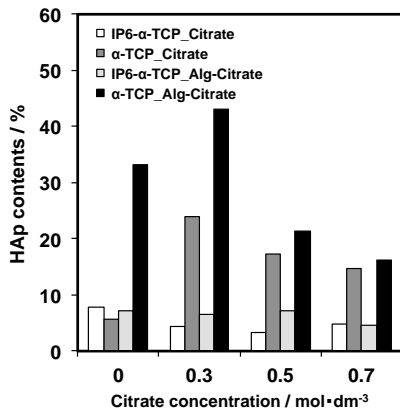


図 24 セメントの HAp 含有量

で、稠度が増加することが明らかとなった(図 26)。これは、 $\alpha$ -TCP 粉体表面の  $\text{Ca}^{2+}$  とカルボキシル基が結合し、負に帯電した  $\alpha$ -TCP 粒子の反発で粒子の分散性が向上したためだと考えられる。クエン酸塩にアルギン酸を添加した場合には、変化は見られなかった。

最後に、*in vivo* での非崩壊性 IP6- $\alpha$ -TCP120 セメントの生体適合性を評価するために、IP6- $\alpha$ -TCP120 粉体と Alg-0.5M Citrate (P/L=1/0.6 [g/cm<sup>3</sup>])から作製したセメントをブタ脛骨骨端部に 4 週間埋入し、組織学的観察を行った。

図 27 にトルイジンブルー染色した凍結薄切片像を示す。図 27a および b から、セメント(C)は自家骨および新生骨と直接結合している様子が確認できた。また、拡大像(図 27c)から、セメントの周囲では一列に並んだ骨芽細胞(矢印)による新生骨の形成(ピンク色部分)が行われ、石灰化前線の存在が認められた。この結果から、IP6- $\alpha$ -TCP120 セメントは良好な生体適合性を有するといえる。

### 3. 考察及び今後の展望

生体内で安定な現行のアパタイトセメントや PMMA セメントは、患者の骨代謝や骨格変化に対応できず、アパタイトセメントや PMMA に代わる「生体内吸収性ペースト

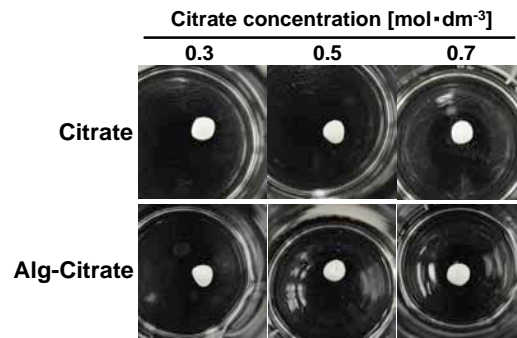


図 25 非崩壊性試験後のセメントの外観

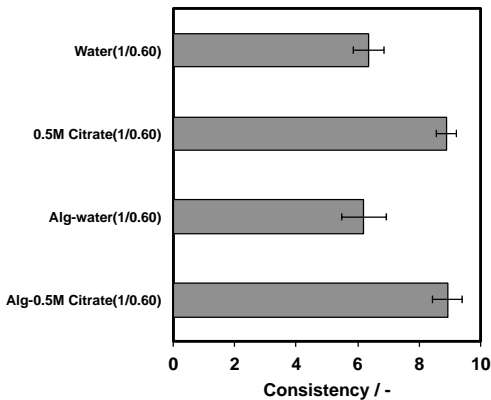


図 26 セメントペーストの稠度

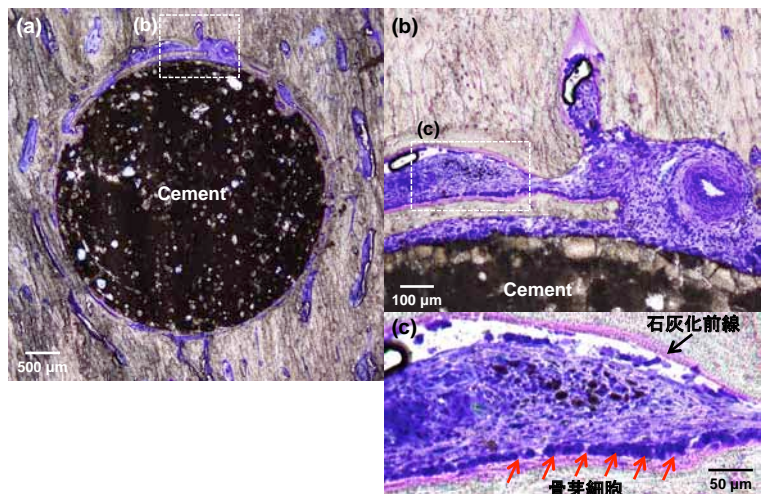


図 27  $\alpha$ -TCP セメントの組織学的観察(TB 染色)

(b)および(c)はそれぞれ(a)および(b)中の拡大像。セメント(C)は自家骨および新生骨と直接結合している(a, b)。また、骨芽細胞(矢印)により新生骨が形成され、石灰化前線の存在も確認できる。

状人工骨」を開発することは重要な課題であり、医療の現場からも切望されている。そのため、本研究では、異なる溶解性を有する  $\beta$ -TCP および  $\alpha$ -TCP を原料粉体として用い、セメントを作製した。

$\beta$ -TCP 系セメントについては、まず、2.1.1 項において、キレート硬化型  $\beta$ -TCP プロトタイプセメントを試作した。ウサギを用いた *in vivo* 評価では、そのセメント周囲で旺盛な新生骨の形成が認められ、セメント表面では、TRAP 陽性の破骨細胞の存在が観察された。これらの結果から、IP6- $\beta$ -TCP セメントは、生体適合性、生体吸収性に優れたセメントであることが明らかとなった。

2.1.2 項では、IP6- $\beta$ -TCP セメントの力学強度およびハンドリング性に及ぼすセメント混練液への種々の多糖類添加の影響を検討した。添加剤を含まない純水と比較して、添加剤を含む混練液を使用することによって、すべてのセメントの力学強度およびハンドリング性が改善された[5]。特に、Chito GL または Chito W10 を混練液として用いることで、高い力学強度と優れたハンドリング性を有するセメントを作製できることがわかった。

2.1.2 項で作製したセメントは、高い力学強度と優れたハンドリング性を有していたが、セメントの作製条件によっては、作製したセメントが水中に浸漬した場合に崩壊してしまうという問題が見られた。

そこで、2.1.3 項では、非崩壊性 HAp セメント作製のための新規な粉体調製プロセス（改善法）を IP6- $\beta$ -TCP セメントの作製のために適用し、セメントの材料特性、とりわけ非崩壊性に及ぼす粉砕時間および IP6 濃度の影響を検討した。その結果、非崩壊性  $\beta$ -TCP セメントは、3000 ppm IP6 中で 3 h 粉砕した  $\beta$ -TCP 粉体と 2.5 mass% リン酸水素ナトリウムとを混練することで得られ、その圧縮強度は  $13.4 \pm 0.8$  MPa であった。また、このセメントは、*in vitro* および *in vivo* において生体吸収性および生体適合性に優れたセメントであることが明らかとなった。

この改善法セメントの硬化メカニズム(図 28)について考察すると、粉砕によって形成された溶解性の高い「低結晶性ナノ  $\beta$ -TCP 粒子」が、リン酸水素二ナトリウムと反応し、HAp へ転化することでセメントの硬化を促進したと考えられる。実際に、セメントの破断面の SEM 観察から、十分に粉砕されずセメントの硬化に寄与しなかった「未反応の  $\beta$ -TCP」および析出した「針状 HAp 粒子」の存在も確認している(図 12)。

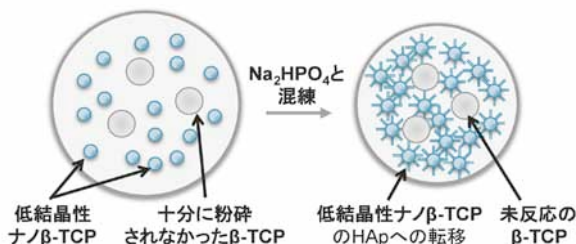


図 28 改善法  $\beta$ -TCP セメントの硬化メカニズム

さらに、2.1.4 項では、このセメントを臨床応用可能な材料特性へと向上させるために、セメント作製に用いる混

練液の改良を行った。その結果、 $\beta$ -TCP-3h(3000)粉体および 1.5 mass% クエン酸-2.5 mass% リン酸水素二ナトリウム-1.0 mass% アルギン酸を混練液としてセメントを作製した場合に、インキュベータで養生後の強度が  $20.5 \pm 3.1$  MPa、水中で養生後の強度が  $7.4 \pm 2.0$  MPa であることがわかった。海綿骨の強度は約 5 MPa であり、このセメントは水中で養生後も海綿骨と同等の強度を有していることが明らかとなった。

$\alpha$ -TCP 系セメントについても、まず、2.2.1 項において、キレート硬化型  $\alpha$ -TCP プロトタイプセメントを試作した。その結果、120 分間純水中で粉砕し、表面修飾したセメント原料粉体から作製したセメントは、 $\alpha$ -TCP 単一相からなり、*in vivo* において良好な骨形成と TRAP 陽性の破骨細胞によるセメントの吸収が行われることが明らかとなった。

2.2.2 項では、非崩壊性セメントを作製することを目的として、2.2.1 項で調製した IP6- $\alpha$ -TCP120 粉体およびクエン酸塩を混練液としてセメントを作製し、その材料特性を評価した。その結果、クエン酸塩または、クエン酸塩にアルギン酸ナトリウムを添加した溶液を混練液として用いることで、IP6 のキレート能およびカルボキシル基の相互作用のみを利用して、非崩壊性セメントを作製できることが明らかとなった。また、ブタ脛骨にセメントを埋入し、生体内での生体適合性を組織学的に評価したところ、セメント周囲で、骨芽細胞による新生骨の形成が確認された。このことから、このセメントは良好な生体適合性を有することが明らかとなった。

#### 【参考文献】

1. A.R.M. Wittkamp, *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, **46**, 1019-1021 (1988).
2. Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, T. Toh, T. Yuasa, M. Nagayama, and K. Suzuki, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.*, **48**, 36-42 (1999).
3. T. Umeda, K. Itatani, H. Endo, H. Takeuchi, K. Mizutani, and Y. Musha, *J. Euro. Ceram. Soc.*, **26**, 525 (2006).
4. D. Apelt, F. Theiss, A.O. El-Warrak, K. Zlinszky, R. Bettschart-Wolfisberger, M. Bohner, S. Matter, J.A. Auer, and B. Von Rechenberg, *Biomaterials*, **25**, 1439 (2004).
5. K. Nishiyama, S. Takahashi, M. Mizumoto, K. Oribe, M. Matsumoto, H. Morisue, Y. Toyama, and M. Aizawa, *Bioceramics*, **22**, 871-874 (2009).
6. T. Konishi, S. Takahashi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Oribe, and M. Aizawa, *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 59-64 (2012).
7. T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **120**, 159-165 (2012).
8. T. Konishi, Y. Horiguchi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 611-621 (2013).
9. T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H.

- Nagashima, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **24**, 1383-1394 (2013).
10. S. Sarda, E. Fernández, M. Nilsson, M. Balcells, and J.A. Planell, *J. Biomed. Mater. Res.*, **61**, 653-659 (2002).
  11. Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Yuasa, M. Takechi, M. Nagayama, M. Kon, and K. Asaoka, *Biomaterials*, **17**, 1429-1435 (1996).
  12. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, M. Aizawa, *J. Nanomater.*, **2013**, 1-11 (2013).
  13. J.E. Barralet, M. Tremayne, K.J. Lilley, and U. Gbureck, *Chem. Mater.*, **17**, 1313-1319 (2005).



# 種々のリン酸カルシウムセメントの *in vitro* および *in vivo* に おける吸収性の比較とその連関性の解明

小西敏功、眞鍋弘毅、石井 賢、松本守雄、相澤 守

## 1. はじめに

我々は、これまでに生体内安定性のキレート硬化型ハイドロキシアパタイト(HAp)セメント[1]、生体内吸収性のキレート硬化型  $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)[2]、 $\alpha$ -TCP セメント[3]をそれぞれ開発してきた。これらのリン酸カルシウムセメントの生体吸収性・生体適合性を評価することは、医療器具を開発する上で必須である。しかしながら、生体材料の吸収性・生体適合性の評価は、動物実験による検証に限られているため動物愛護や動物福祉といった問題が常につきまとう。動物実験に反対する運動の思想的背景をみると、動物は可愛がる存在である「動物愛護」、動物の立場に立って動物に接する「動物福祉」という思想から、動物には他の生物に侵されずに「生きる権利」があるという「動物権」、動物種による差別「Speciesism」という考え方にまで広がっている。さらに、「動物の開放」という思想のもと、すべての動物を人の手から開放せよという手段を選ばず動物を開放する過激な活動にまで発展しており、動物実験に反対する動きが拡大しているのが現状である。

また、動物実験ではその結果を得るのに数週間から数か月といった時間を要してしまうという問題もあり、動物実験を行わずに短期間で生体内での材料の吸収性を評価ができるような手法を確立することは急務な課題である。

バイオセラミックス分野において *in vivo* 実験を *in vitro* で代替し、減らそうとする動きとして、バイオセラミックスの溶解性に関する規格、JIS T 0330-3:2012「生体活性バイオセラミックス—第3部：溶解速度試験方法」が制定された。これは、緻密質、多孔質または顆粒状のリン酸カルシウム系セラミックスを対象にした溶解速度試験に関する規格であり、リン酸カルシウム系セラミックスの30分後の初期溶解速度の相対値が、動物実験での4週埋入後の相対吸収量と一致しているという実験結果を基に作成されている[4]。

そこで本研究では、種々のリン酸カルシウム相からなるキレート硬化型セメントのような異種材料間でも、動物実験を行わずに短期間で生体内での材料の吸収性を評価ができるような手法を確立するため、JIS T0330-3:2012に準じてカルシウムイオン電極を用いた *in vitro* での生体吸収性評価を行った。また、実際にウサギを用いて *in vivo* での生体吸収性を評価した。さらに、*in vitro* および *in vivo* における吸収性の連関性の解明を試みた。

## 2. 実験と結果

### 2.1 種々のキレート硬化型リン酸カルシウムセメントの作製とそのキャラクターゼーション

#### (i) 湿式合成 HAp 粉体の調製とセメントの作製

湿式合成 HAp 粉体(wHAp)は、既報に従って合成した[1]。wHAp 粉体を  $ZrO_2$  ポットと  $\phi 10$  mm  $ZrO_2$  ボール 50 個を使用し、5 min 粉碎した(IP6(-)-wHAp)。ついで、1000 ppm IP6 溶液中で 5 h 表面修飾後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾 wHAp 粉体(IP6(+)-wHAp)を得た。セメントは固液比 1/0.35 [g/cm<sup>3</sup>]で純水と混練し、 $\phi 5$  mm 成形器を用いて 100 MPa で成形し、作製した。

#### (ii) 市販 HAp 粉体からのセメントの作製

HAp-100 粉体(太平化学製)を遊星ボールミルにより湿式粉碎して調製した。まず、 $ZrO_2$  ポットと  $\phi 10$  mm  $ZrO_2$  ボール 50 個を使用し、5 min 粉碎した(IP6(-)-cHAp)。得られたスラリーをそれぞれ吸引ろ過、凍結乾燥し、粉碎粉体を得た。ついで、1000 ppm IP6 溶液中で 24 h 表面修飾後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾 cHAp 粉体(IP6(+)-cHAp)を得た。セメントは固液比 1/0.30 [g/cm<sup>3</sup>]で純水と混練し、 $\phi 5$  mm 成形器を用いて 100 MPa で成形し、作製した。

#### (iii) $\beta$ -TCP 粉体からのセメントの作製

$\beta$ -TCP-100 粉体(太平化学製)を遊星ボールミルにより湿式粉碎して調製した。まず、 $ZrO_2$  ポットと  $\phi 10$  mm  $ZrO_2$  ボール 50 個を使用し、4 h 粉碎した(IP6(-)- $\beta$ -TCP)。得られたスラリーをそれぞれ吸引ろ過、凍結乾燥し、粉碎粉体を得た。ついで、3000 ppm IP6 溶液中で 24 h 表面修飾後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\beta$ -TCP 粉体(IP6(+)- $\beta$ -TCP)を得た。セメントは固液比 1/0.20 [g/cm<sup>3</sup>]で純水と混練し、 $\phi 5$  mm 成形器を用いて 100 MPa で成形し、作製した。

#### (iv) $\alpha$ -TCP 粉体からのセメントの作製

$\alpha$ -TCP-A 粉体(太平化学製)を遊星ボールミルにより湿式粉碎して調製した。まず、 $ZrO_2$  ポットと  $\phi 10$  mm  $ZrO_2$  ボール 50 個を使用し、2 h 粉碎した(IP6(-)- $\alpha$ -TCP)。ついで、1000 ppm IP6 溶液中で 24 h 表面修飾後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\alpha$ -TCP 粉体(IP6(+)- $\alpha$ -TCP)を得た。セメントは固液比 1/0.40 [g/cm<sup>3</sup>]で純水と混練し、 $\phi 5$  mm 成形器を用いて 100 MPa で成形し、作製した。

作製したセメントの XRD パターンを図 1 に示す。IP6(-)- $\alpha$ -TCP を除くすべてのセメントは、セメント原料粉体の結晶相を維持したまま硬化していることが確認され

た。一方、IP6で表面修飾していないIP6(-)- $\alpha$ -TCPセメントは水和反応によって一部HApに転移していた。

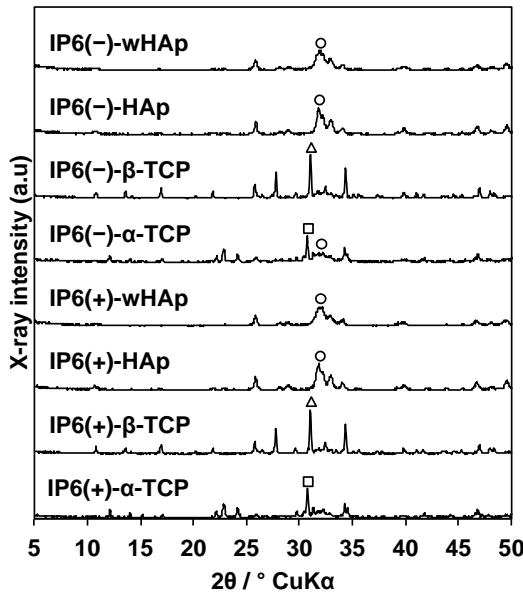


図1 作製したセメントのXRDパターン  
O: HAp, Δ: β-TCP, □: α-TCP

## 2.2 セメントの *in vitro* 溶解性

2.1節で作製したセメントの *in vitro* の溶解性をカルシウムイオン電極 (8203-10C, 堀場製作所) を用いて測定した。測定は  $0.08 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.50±0.02) 200 cm<sup>3</sup> 中にネットを用いてセメントを浸漬し、攪拌速度  $430 \pm 15 \text{ rpm}$  で攪拌しながら、180分間経時的にカルシウム溶出量を測定した。

図2にセメント試料片からのCa<sup>2+</sup>イオン溶出量を示す。IP6の表面修飾の有無に関わらず、Ca<sup>2+</sup>イオン溶出量は $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP > wHAp > HApの順であった。図2(a)ではIP6(-)-wHApおよびIP6(-)-HApセメントの溶解性が高くなった。IP6(-)- $\alpha$ -TCP, IP6(-)- $\beta$ -TCP, IP6(-)-wHApおよびIP6(-)-HApセメントの相対密度は、それぞれ  $58.5 \pm 0.7\%$ ,  $57.4 \pm 3.7\%$ ,  $44.5 \pm 2.7\%$ ,  $50.2 \pm 2.7\%$ であった。HAp系セメントの相対密度はTCP系セメントのそれよりも低いことから、相対気孔率はHAp系セメントの方が高いといえる。そのため、HAp系セメントの溶解性が高い結果となったと考えられる。また、IP6- $\beta$ -TCPセメントは、3000 ppm IP6で表面修飾したため1000 ppm IP6で表面修飾した他のセメントと比べて溶解性が低下したと考えられる。さらに、急激に溶解して飽和に向かう粉体の溶解性とは異なり、セメント試験片ではその表面から少しずつ溶解が進んだため180分間継続して一次関数的な溶解曲線になったと考えられる。

図3には溶解性試験後のセメントのXRDパターンを示す。IP6(-)- $\alpha$ -TCPはわずかにXRD含有量が増加したが、その他のセメントの結晶相は溶解試験前と比較して変化していなかった。

ついで、セメントの溶解性を比較するため、平均溶解速度を以下の式を用いて算出した。

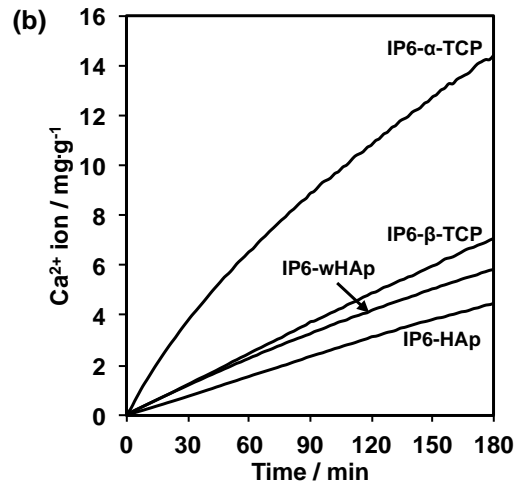
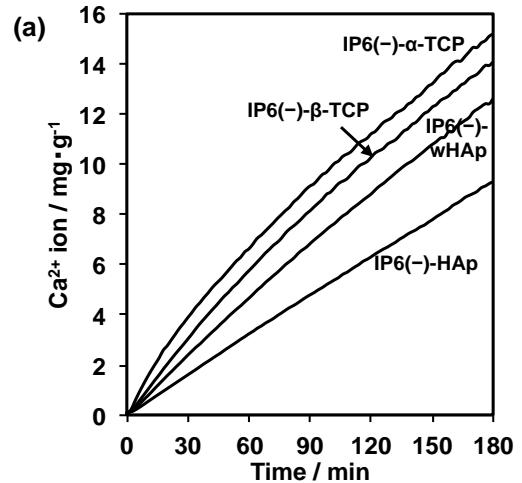


図2 セメントからのCa<sup>2+</sup>イオン溶出量  
(a) IP6(-)セメント, (b) IP6(+)セメント

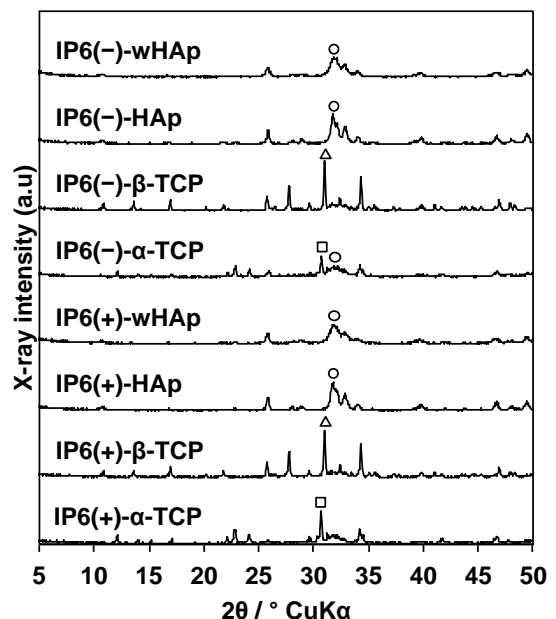


図3 溶解性試験後のセメントのXRDパターン  
O: HAp, Δ: β-TCP, □: α-TCP

$$\text{測定時間 } t [\text{min}] \text{ の平均溶解速度 } R_{at} [\text{mmol} \cdot \text{s}^{-1}] = \\ (t \text{ 分後の Ca 濃度} [\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}] \times \text{液量} [\text{dm}^3] \times 10^6) \\ \div (3 \text{ or } 10 \times 40.08 [\text{mg} \cdot \text{mmol}^{-1}] \times t [\text{min}] \times 60 [\text{s} \cdot \text{min}^{-1}])$$

ここで、TCP の場合は 3、HAp の場合は 10 を定数として用いた。40.08 [mg・mmol<sup>-1</sup>] は Ca のモル質量である。

上記の式を用いて計算した測定時間 30 min での単位質量あたりの平均溶解速度  $R_{a30/W}$  を図 4 に示す。平均溶解速度  $R_{a30/W}$  は、 $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP > wHAp > HAp の順であった。IP6(-) と IP6(+ )との間には、 $\beta$ -TCP 系セメントを除いて平均溶解速度に有意な差は認められなかった。前述したように、IP6- $\beta$ -TCP セメントは、3000 ppm IP6 で表面修飾したため 1000 ppm IP6 で表面修飾した他のセメントと比べて平均溶解速度も低下したと考えられる。そのため、IP6- $\beta$ -TCP と IP6-wHAp セメントとの間には有意差は認められなかった。

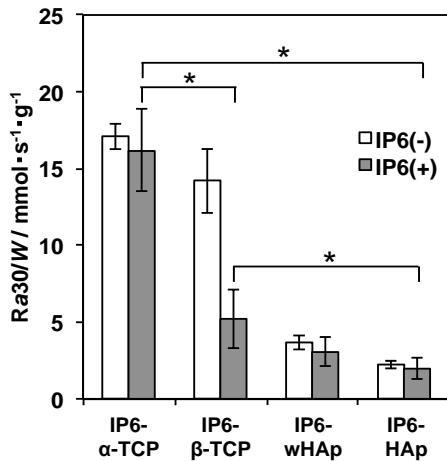


図 4 単位質量あたりのセメントの平均溶解速度  $R_{a30/W}$  (\*  $P < 0.01$ )

### 2.3 セメントの *in vivo* 吸収性

*In vivo* でのセメント試料片の生体吸収性を調べるために、セメント試料片をウサギ (平均体重 3 kg, 16 週齢) 両足脛骨に 4 および 24 週間埋入した。また、対照試料として市販の Bioplex<sup>®</sup>-R (HOYA) も同様に試験した。まず、静脈注射によりソムノペンチル (共立製薬) を投与し、全身麻酔を行った。ついで、ウサギ後肢の膝内側部を剃毛して縦に 3 cm 程度皮膚を切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出

させ、 $\phi 4.1$  mm のドリルで穿孔することで骨欠損を作製した。そこに、セメント試料片 (直径 4 mm, 高さ 7 mm) を埋入、再縫合した。所定期間埋入後、ソムノペンチルの過剰投与によりウサギを犠牲にし、埋入した試料片を含む脛骨を摘出した。組織学的評価のために、摘出した脛骨をビラヌエバ骨染色し、非脱灰研磨標本を作製した。

作製した標本を生物顕微鏡 (BX-41, オリンパス) を用いて観察し、WinRoof (三谷商事) を用いて画像解析によりセメントの吸収率を算出した。吸収率は以下の式を用いて算出した。

$$\text{セメントの吸収率 [\%]} = 100 - (\text{残存セメント面積} / \text{埋入自のセメント面積}) \times 100$$

ウサギ脛骨に 4 および 24 週間埋入後のセメントの組織像を図 5 に示す。IP6- $\alpha$ -TCP および IP6- $\beta$ -TCP セメントでは、いずれの埋入期間においても新生骨がセメントと直接結合している部分は少なく、セメントから少し離れたところで新生骨の形成が確認された。一方で、IP6-wHAp セメントおよび Bioplex<sup>®</sup>-R では、セメント周囲で新生骨の形成が認められ、それらはセメントと直接結合していることが確認された。

ついで、図 6 に *in vivo* でのセメントの吸収率を示す。セメントの吸収率は  $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP > Bioplex<sup>®</sup>-R > wHAp の順であり、いずれのセメントも 24 週での吸収率は 4 週のそれよりも高かった。Bioplex<sup>®</sup>-R は  $\alpha$ -TCP から HAp への水和反応によって硬化するためカルシウム欠損 HAp が生成する。カルシウム欠損 HAp は HAp よりも熱力学的に不安定なため IP6-wHAp セメントよりも吸収されたと考えられる。

### 2.4 *In vitro* および *in vivo* におけるセメントの吸収性の連関性

*In vitro* および *in vivo* におけるセメントの吸収性の連関性について検討した。リン酸カルシウム系セラミックスの 30 分後の初期溶解速度の相対値が、動物実験での 4 週埋

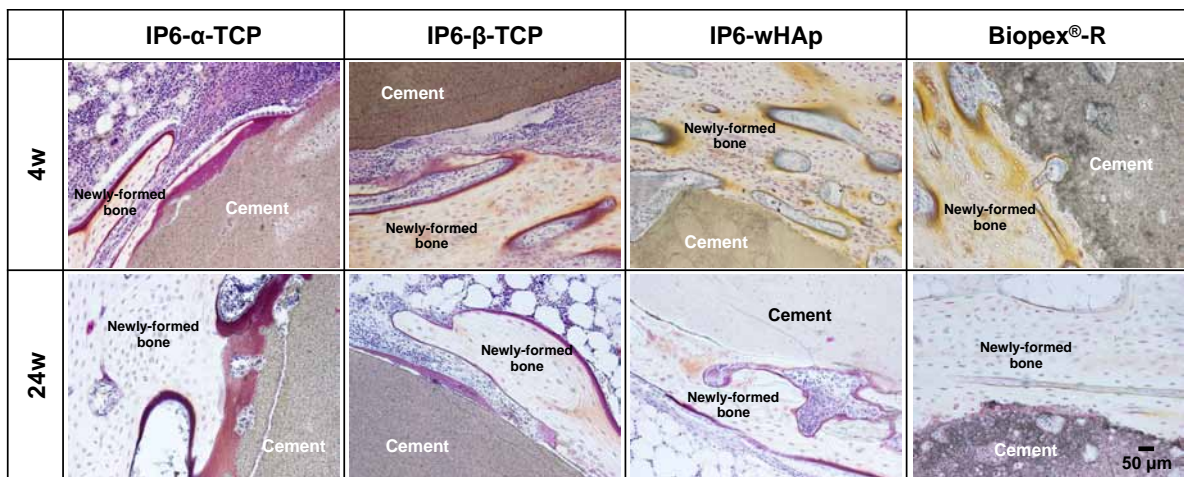


図 5 ウサギ脛骨に 4 および 24 週間埋入後のセメントの組織像

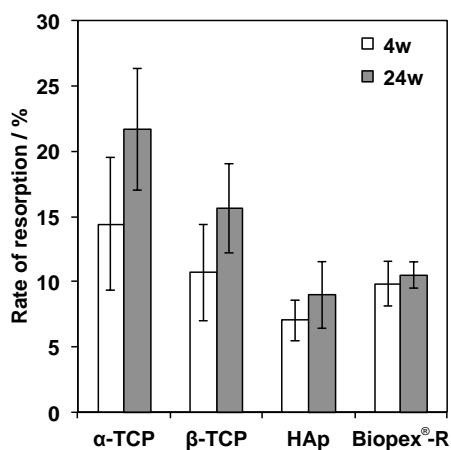


図 6 *in vivo* でのセメントの吸収率

入後の相対吸収量と一致しているという報告[4]を基に、まず、 $R_{a30/W}$  と埋入 4 週での吸収率との関係を検討した (図 7)。しかしながら、両パラメータの間に高い相関関係は認められなかった。

ついで、種々のタイムポイントでの初期溶解速度と 4 週または 24 週の埋入期間での吸収率を比較したところ、 $R_{a15/W}$  と埋入 24 週での吸収率との間に高い相関関係 ( $r=0.95$ ) があることが明らかとなった (図 8)。この結果は、カルシウムイオン電極を用いて測定した 15 分後の異種材料間の初期溶解速度が、ウサギ脛骨に 24 週埋入後の吸収率と高い相関があることを示している。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、種々のリン酸カルシウム相からなるキレート硬化型セメントのような異種材料間でも、動物実験を行わずに短期間で生体内での材料の吸収性を評価ができる手法を確立することを目的とした。そのために、JIS T0330-3:2012 に準じてカルシウムイオン電極を用いた *in vitro* での生体吸収性およびウサギを用いて *in vivo* での生体吸収性を評価し、それらの連関性を検討した。

*In vitro* では、測定時間 30 min での単位質量あたりの平均溶解速度  $R_{a30/W}$  は、 $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP > wHAp > HAp の順であった。*In vivo* でのセメントの吸収率は  $\alpha$ -TCP >  $\beta$ -TCP >

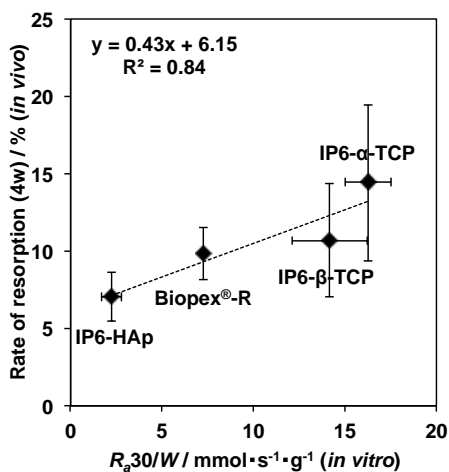


図 7  $R_{a30/W}$  と *in vivo* での埋入 4 週における吸収率の関係

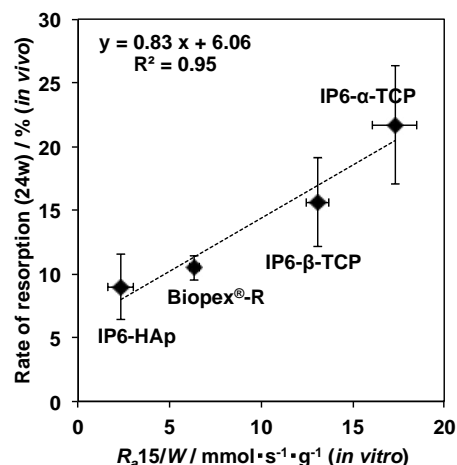


図 8  $R_{a15/W}$  と *in vivo* での埋入 24 週における吸収率の関係

BiopeX®-R > wHAp の順であり、いずれのセメントも 24 週での吸収率は 4 週のそれよりも高かった。

*In vitro* および *in vivo* におけるセメントの吸収性の連関性について検討した結果、カルシウムイオン電極を用いて測定した 15 分後の異種材料間の初期溶解速度  $R_{a15/W}$  とウサギ脛骨に 24 週埋入後の吸収率との間に高い相関があることが明らかとなった。このことから、カルシウムイオン電極を用いてセメントの初期溶解速度  $R_{a15/W}$  を求めることで、動物実験を行わずに短期間で異種材料の生体内吸収性を予想できることが示唆された。

今後は、 $\beta$ -TCP/HAp および  $\alpha$ -TCP/HAp 混合セメントなどの *in vitro* および *in vivo* での吸収性を調べ、図 8 で示した「 $R_{a15/W}$  と *in vivo* での埋入 24 週における吸収率の関係」の信憑性について検討する必要がある。

#### 【参考文献】

1. T. Konishi, Y. Horiguchi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 611-621 (2013).
2. S. Takahashi, T. Konishi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **119**, 35-42 (2011).
3. T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, *J. Nanomater.*, **2013**, 1-11 (2013).
4. A. Ito, Y. Sogo, A. Yamazaki, M. Aizawa, A. Osaka, S. Hayakawa, M. Kikuchi, I. Akahane, K. Yamashita, Y. Tanaka, M. Tadokoro, and H. Ohgushi, *Extended abstracts of the 26th International Japan-Korea Seminar on Ceramics*, 425-428 (2009).

# 非崩壊性および Non-fragmentation を担保した

## 革新的骨修復セメントの開発と評価

水本みのり、藤岡 恵、小西敏功、本田みちよ、長嶋比呂志、相澤 守

### 1. はじめに

近年、骨粗鬆症による椎体骨折への低侵襲ペースト状人工骨による治療に注目が集まっている。この治療法には椎体形成術が確立しており、椎体に針で穴をあけ、骨セメントを充填することで低侵襲治療、短い手術時間、任意の形状での硬化を実現する。現在、最も臨床応用されている骨セメントは Polymethylmethacrylate (PMMA)セメントでありハンドリング性の高さや、優れた初期安定性、高い強度と剛性による壊れにくさなどの利点をもつ。しかしながら、その高すぎる強度に伴う術後の隣接椎体の骨折[1]や、硬化反応にともなう発熱および pH 変動による患部周辺の神経の炎症[2]、モノマーの毒性による術中の患者の血圧低下[3]、などの問題も抱える。そのため、これらの問題を解決した新規な骨セメントが求められている。一方、リン酸カルシウム系ペースト状人工骨は、骨と類似した組織、優れた組織反応、および骨伝導性から注目を集めており、緻密体、多孔体、顆粒、セメントと様々な形態をとることができる。

これらのセメントは PMMA セメントと比較して、炎症反応が少なく、また自家骨より高い強度をもつために骨セメントとして期待されている[4]。現在、様々なリン酸カルシウムセメントが存在しているが、ペースト硬化時、あるいはセメントへの患者の生活に伴う繰り返しの荷重により部分破壊やクラックなどの Fragmentation を生むことが臨床上の課題として報告されている[5]。Fragmentation はセメントの強度を低下させ、壊れたセメントの破片は新たな問題を引き起こす可能性があるため、患者に再手術をもたらす。そのため、Non-fragmentation の性質はペースト状人工骨の評価には非常に重要な要素であると言える。しかしながら、Fragmentation を材料の視点で調査した報告は少なく、その評価法も確立されていない。

本研究はこの Non-fragmentation を実験的に検証するための方法について、文献調査などを実施した。その調査結果をもとに、当プロジェクトのキレート硬化型セメントをモデル材料として、擬似的な臨床環境での Fragmentation の評価法を確立するとともに、そのプロトコルの作成や Non-fragmentation の性質を検証した。具体的には、イノシトールリン酸( $C_6H_{18}O_{24}P_6$ ; IP6)で  $\beta$ -TCP の表面を修飾し、IP6 とカルシウムのキレート結合により硬化する IP6- $\beta$ -TCP セメントをモデル材料とし、このペーストをシリンジで型に流し込み、水、および血液中で一体化してい

るかどうかが、硬化時における Fragmentation の有無を確認した。さらに、生活運動による Fragmentation の予備的検証として、セメントペーストをブタの脛骨および筋肉内に注入し、一定期間埋入後、セメントを X 線マイクロ CT により調査しその硬化状態と Fragmentation の有無を確認したので、これを報告する。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 セメントペーストの調製および特性評価

市販  $\beta$ -TCP-100 粉体 10 g と 3000 ppm IP6 水溶液(pH 7.3) 40  $cm^3$  を  $\phi 2$  mm  $ZrO_2$  ボール(180 g)と共に遊星型ボールミル内に入れ 3 h 湿式粉碎するとともに、IP6 による表面修飾処理を同時に行った。粉碎後に得られたスラリーを吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾  $\beta$ -TCP 粉体「IP6/ $\beta$ -TCP」を得た。この粉体に対して、2.5 mass% リン酸水素二ナトリウム( $Na_2HPO_4$ )水溶液が固液比(P/L)=1/1.3 [ $g/cm^3$ ]になるよう調製し、2 min 混合することでセメントペーストを得た。セメントペースト 0.5 mL を、シリンジの先端部をカットしたシリンジに充填し、水中に静かに押し出した。その後 24 h 静置し、円柱状に押し出されたセメントの崩壊の有無により、セメントが非崩壊能を有しているかを判断した。つぎに、セメントペーストをテフロン型(6 mm  $\phi$ , 12 mm h)にパテ法およびインジェクション成形により充填した。インキュベータ(37  $^{\circ}C$ , 相対湿度 100%)中で 24 時間養生した後、圧縮強度および相対密度を測定した。さらに、セメントペーストを 1 mL シリンジに充填し、内径の異なる種々の注射針を取り付け、セメントが注射針から押し出せるかを試験した。図 1 に崩壊性試験の結果を示す。水中で 24 h 経過しても崩壊しないことが明らかとなり、手で確認したところセメントは硬化していたため「非崩壊性」が担保

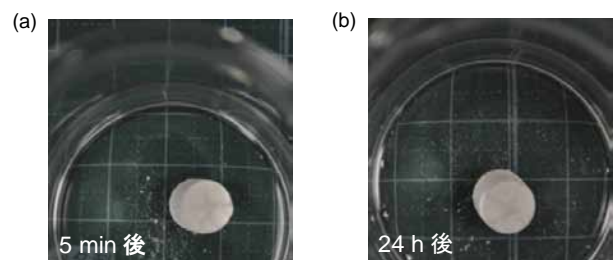


図 1 崩壊性試験後のセメントの外観  
(a) 5 min 後, (b) 24 h 後



された。図2に作製したセメントの圧縮強度および相対密度の結果を示す。作製したセメントはパテ法では圧縮強度14.3 MPa、相対密度36%、インジェクション法では圧縮強度11.8 MPa、相対密度30.5%であった(図2)。骨粗鬆症のヒト海綿骨は2-3 MPaの強度であるため、このセメントが十分な強度をもつことが明らかとなった。また、インジェクション法よりパテ法の方が高い圧縮強度と相対密度を示した。これは成形時の圧力の違いであり、パテ法の方がペーストをテフロン型に押し込むため、充填率が高くなり、強度と相対密度を上昇させたと考えられる。表1に注射針種類と針直径に伴う、押し出しの評価を示す。注射針は、18Gの1.2 mm径では十分に押し出せ、0.8 mm径では3回に1回詰まり、0.65 mm径では押し出せないことが明らかになった。したがって、Fragmentation 評価には18Gのシリンジ針を使用することとした。

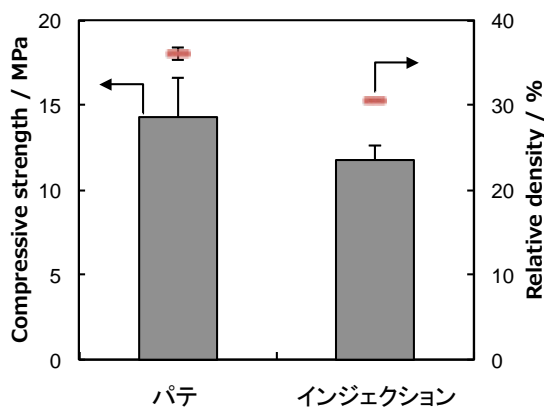


図2 セメントの圧縮強度および相対密度

表1 インジェクション試験

ゲージ	注射針内径 (mm)	注射針外径 (mm)	インジェクション成功率 (成功回数 / n)
18	0.94	1.2	6/6
21	0.57	0.8	2/6
23	0.40	0.65	0/2

## 2.2 擬似生体環境下で硬化したセメントの評価

セメント硬化時に介在させる溶液として、水、血液(綿羊無菌保存液：抗血液凝固剤50%混合)を使用した。テフロン型(6 mm φ, 12 mm h)をビーカーに入れ、テフロン型の孔が完全に浸る高さまで各溶液を加えた(図3a)。テフロン型をビーカーごとインキュベータに入れ、溶液が37℃と同温になるまで静置した。その後、シリンジおよび18G注射針(1.2 mm φ)を用いて孔にセメントペーストを充填し(図3b, c)、インキュベータ中で24 h養生した。比較対象として、IP6の代わりに水で粉砕した0 ppm IP6/β-TCP粉体も同様に調製し試験をおこなった(図4)。得られたセメントをテフロン型から外し、表面を観察した。つぎに、X線マイクロCT(卓上型マイクロフォーカスX線CTシステムinspeXio SMX-90CT, Shimadzu)により内部を観察した。マイクロCT観察は、セメントに対して上下方向および横方

向において Fragmentation の有無を観察した。図5に溶液中で充填、成形させた各セメントを示す。大部分のペーストはテフロン型に充填され、いずれの条件で作製されたセメントでも一塊であることが確認された(図5)。しかしながら、セメントペーストの一部は溶液内に拡散し、その後沈殿していた。また、テフロン型枠から外したセメントからは、いずれの溶液を用いた場合でも、セメント表面に部分的にくぼみが見られ、テフロン型に完全に充填できていないことが明らかとなった。これは、型の上部が開放系であることにより、セメント同士を密着させるほど圧力がかからず、溶液のたまりができたと考えられる。臨床では、腰椎体内部に針を刺して充填するため、ある程度充填時に圧力がかかると考えられる。そのため、このような表面の欠陥は減ると予想できる。また、血液中で硬化したセメントからは、取り出したセメントが血液の色で染まっていることが確認できた(図5b, d)。これは、ペースト充填時に、ペーストと溶液が混ざっていることを反映しており、臨床の環境に近い厳しい環境下でもこのセメントペーストが成形できることを明らかにした。



図3 Non-fragmentation 試験法

- (a) テフロン型の溶液内への浸漬
- (b) 溶液内でのセメントペーストの充填
- (c) 充填後のセメント

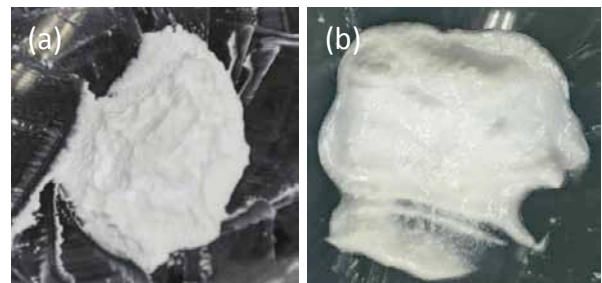


図4 セメントペーストの状態

- (a) IP6/β-TCP セメント
- (b) 0 ppm IP6/β-TCP セメント

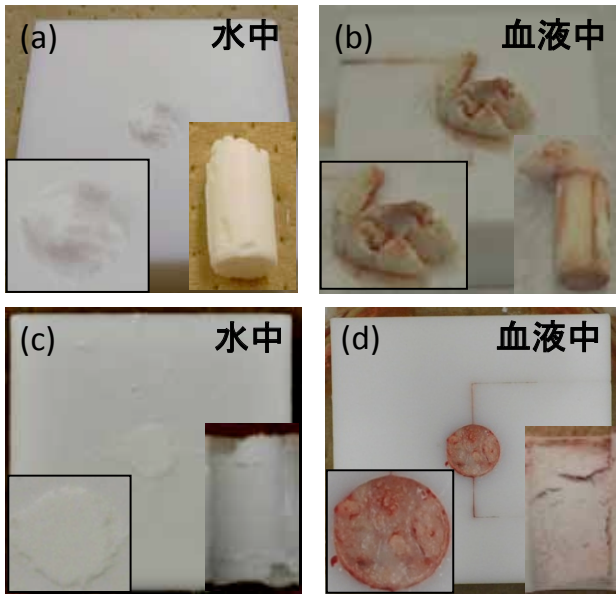


図5 各溶液内で成形したセメントの外観  
(a, b) IP6/β-TCP セメント, (c, d) 0 ppm IP6/β-TCP セメント

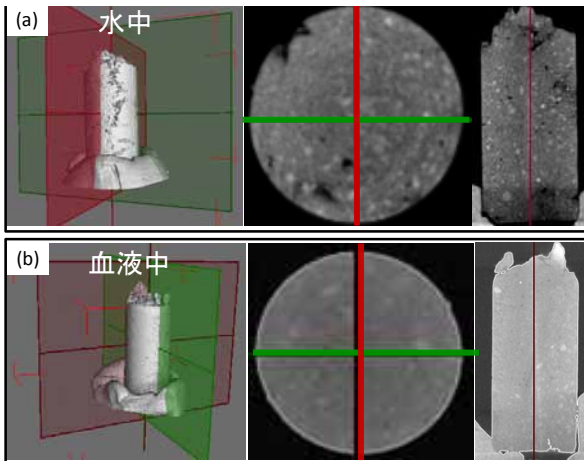


図6 IP6/β-TCP セメントのCT像  
(a) 水中, (b) 血液中

つぎに、得られた IP6/β-TCP セメントの CT 画像を図 6 に、比較対象として IP6 の代わりに水で粉砕した 0 ppm IP6/β-TCP セメントの CT 画像を図 7 に示す。目視で観察したように表面にはセメントが十分に充填されていない箇所が部分的に見られた。特に、型の上部は開放系であるためにセメントが十分充填せず、一塊に硬化していない部分が見られた。しかしながら、大きな欠陥は認められず、目視で見られた血液とペーストが混合した部分でも十分硬化していることが明らかとなった。また、内部の CT 像からは、どちらの溶液中でもセメントの部分的な崩壊は認められず、一塊であることが分かった(図 6)。しかしながら、どちらの溶液でも非常に小さな空隙がセメント内に見られた。これはセメントペースト作製過程での混練で混入した空気および、充填時の溶液のたまりであると推測される。いずれにせよ、材料の性質ではなく、セメント充填時の脱気等の方法の改善により十分回避できることが推測できる。一方、比較対象として IP6 の代わりに水で粉砕した 0 ppm IP6/β-TCP セメントは水中、血液中いずれにおい

ても多数の亀裂が観察され、Non-fragmentation を担保していないことが明らかとなった(図 7)。さらに、Fragmentation は矢印で示した溶液の介在によるクラックと、ひし形矢印で示した充填時に内包した溶液のたまりと思われる大きな空隙の 2 種が存在することが明らかとなり、また、この 2 種がつながっている部分が多いことも明らかとなった。どちらも、セメントペーストが溶液内で一塊になりにくいことが原因であると考えられる。Non-fragmentation の担保には、セメントペーストの高いインジェクション能および、粘性が求められ、それらを同時に満たすことで、溶液内で Fragmentation を起こさずに一塊に硬化することが示唆された。

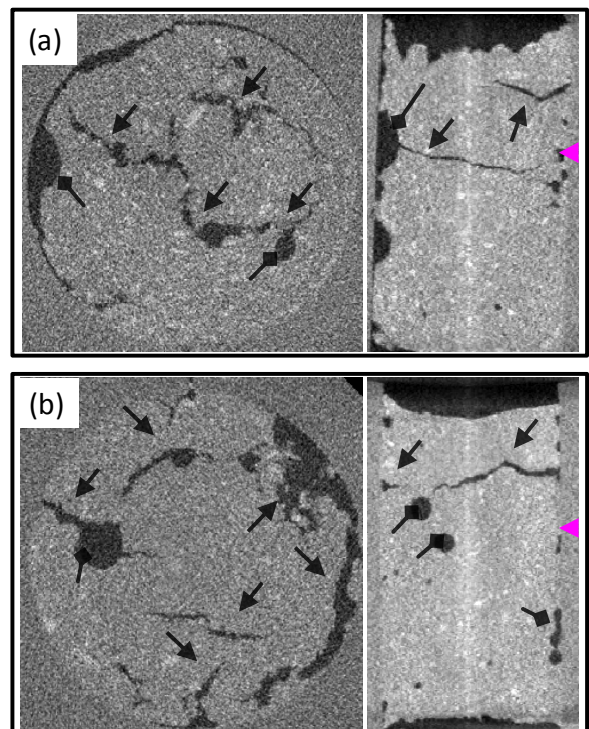


図7 0 ppm IP6/β-TCP セメントのCT像  
(a) 水中, (b) 血液中

### 2.3 ブタ生体内で硬化したセメントの評価

*In vivo* 試験として、2.2 項で検証した IP6/β-TCP セメント(P/L=1/1.0 [g/cm<sup>3</sup>])をシリンジに充填した後、インジェクション法により、ブタ(体重 120 kg)脛骨および筋肉内に注入し 4 週間埋入後取り出した。埋入セメントをマイクロ CT により観察しその硬化状態を観察した。また、対照試料として市販の Biopex<sup>®</sup>-R (HOYA)も同様に試験した。図 8 に取り出し後のセメントの CT 画像を示す。脛骨埋入(図 8-a, c)では、ドリルで穿孔後に注入したセメントペーストが髄腔内に落ちることなく、一塊の状態に硬化している事が観察された。また、筋肉内に注入したペースト(図 8-b, d)も同様に大きな亀裂は見られず生体内においても Non-fragmentation を担保していることが示唆された。

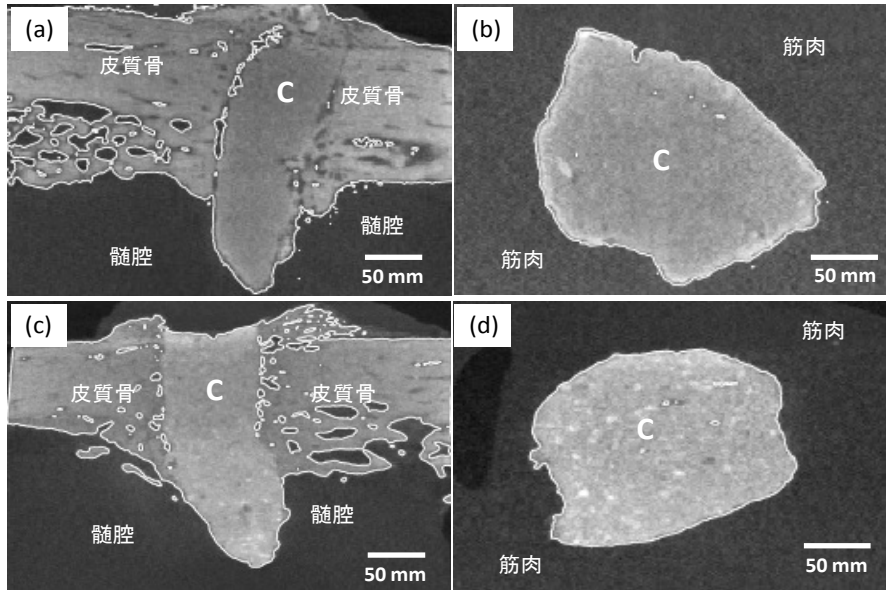


図 8 ブタ埋入 4 週後のセメントの CT 像  
(a, b) IP6/β-TCP セメント, (c, d) Biopex®-R セメント

### 3. 考察及び今後の展望

β-TCP セメントは最も臨床応用されている PMMA と比較して、高い生体適合性や、早期より周辺に新生骨が形成されること、自家骨に対して高すぎない強度をもつことが知られている。また、市販の HAp, α-TCP ベースのセメントと比較して、生体吸収性をもち、HAp へ転化しにくいという明確な利点をもつ。さらに、本研究で開発された IP6 を用いた β-TCP 微粒子の表面修飾は、β-TCP と IP6 のキレート結合により硬化させることで、HAp への転化を抑え、硬化時の pH の変化を生じさせないため、患者への負担がより低くなる[6]。様々な利点をもつリン酸カルシウムセメントが存在するが、一方でペースト硬化時、あるいはセメントへの患者の生活に伴う繰り返しの荷重により部分破壊やクラックなどの Fragmentation を生むことが臨床上の課題として報告されている。しかしながら、Fragmentation を材料の視点で調査した報告は少なく、その評価法も確立されていない。そのため、本研究では新しいキレート硬化型セメントをモデル材料として、擬似的な臨床環境での Fragmentation の評価法を確立するとともに、そのプロトコルに基づく Non-fragmentation の性質を探索することを目的として、以下の知見を得た。

擬似的な生体環境を得るため、37 °C の水、血液中で注射針を用いたインジェクションによりセメントを成形した。用いた IP6/β-TCP セメントは、予備的な試験で注射針から押し出せていることが分かっており、この環境下でも充填することができた。得られたセメントはいずれの溶液でも一塊に成型され、部分破壊は見られなかった。また、μCT による内部観察からも部分破壊やクラックは見られず、Non-fragmentation を担保していることが明らかとなった。しかしながら、小さな空隙が観察された。これはペースト混練時の空気の混入だと考えられ、充填時の脱気等の充填法の改善により十分回避できることが推測できる。ま

た、ブタを用いた *in vivo* 試験でも脛骨および筋肉内に注入したセメントペーストは大きな亀裂などの Fragmentation を起こすことなく一塊の状態では硬化していた。擬似的な臨床環境下でのセメントの Fragmentation の評価法を確立したことで、多くの利点をもつリン酸カルシウムセメントが臨床応用に耐えうるかを判断可能になった。また、IP6/β-TCP セメントの Non-fragmentation の担保が確認され、臨床応用可能であることが明示された。今後は、セメントへの患者の生活に伴う繰り返しの荷重による部分破壊やクラックなどの Fragmentation の検証として、骨粗鬆症モデル材料を用いて、繰り返し荷重を负荷させた場合の Fragmentation について検討の必要がある。

#### 【参考文献】

1. H.J. Wilke, U. Mehnert, L.E. Claes, M.M. Bierschneider, H. Jaksche, and B.M. Boszczyk, *Spine*, **31**, 2934-2941 (2006).
2. H. Deramond, N.T. Wright, and S.M. Belkoff, *Bone*, **25**, S17-21 (1999).
3. P. Kim and R. Kurokawa, *Jpn. J. Neurosurg.*, **18**, 121-130 (2009).
4. 松家茂樹, 石川邦夫, セラミックス, **43**, 298-302 (2008).
5. S. Nouda, S. Tomita, A. Kin, K. Kawahara, and M. Kinoshita, *Spine*, **34**, 2613-2618 (2009).
6. T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 1383-1394 (2013).



# 高い骨伝導性を備えた HAp 系セメントの創製とその評価(1)

## 一骨ミネラル含有アパタイトによるアプローチ

相澤 守、千布悠貴、横田倫啓、三木拓也、長嶋比呂志、  
石井 賢、松本守雄、水本みのり、小西敏功、本田みちよ

### 1. はじめに

骨肉腫や外傷を含む種々の骨の疾患やその治療において病変部を外科的に切除することにより骨に欠損が生じる。この骨欠損部の再建や補填には、現在、①自家骨移植(患者自らの骨を正常部より摘出移植する)、②他家骨移植(骨バンクで保存されている他人から提供された骨を移植する)、③人工骨移植などが行われている。

このうち自家骨移植は移植片に骨芽細胞など骨形成に関わる細胞が多く含まれていることから、皮下や筋肉内など骨のないところで骨形成を促進させる能力、すなわち“骨誘導能”が備わっているだけでなく、力学特性も周囲の骨に適していることから、現在のところ最も効果の望める治療法である。しかしながら、自分の健全な骨の一部を削り取って移植するため、採取部の疼痛や摘出量の制限などの問題が残る。一方、他家骨移植は骨の入手が困難なことと安全性が疑問視されている点から、我が国においてはあまり実施されていない。

そこで、上記の問題を克服させるために開発されたのが、骨の無機成分であり、骨と直接結合する水酸アパタイト(HAp)などの人工骨である。この人工骨は一般に材料を骨の上や中に移植した際に新生骨を材料表面に沿って形成させる能力、すなわち“骨伝導能”を有するものの骨誘導能は保持しておらず、自家骨移植の代替方法となるまでには至っていないのが現状である。

したがって、自家骨に匹敵する骨誘導能を持ち、十分な骨再建を実施できる骨再生医療技術の開発が急務とされている。そこで、本研究では、生体骨の成分に酷似した組成からなる「骨ミネラル含有アパタイト(Bone HAp)」を用いて、骨誘導能(より高い骨伝導能)を備えたペースト状人工骨を開発することを目的とした。

以下、Bone HAp について述べる。我々の生体骨の無機成分は HAp に類似しているが、生体骨中のアパタイト構造中には、ナトリウムやマグネシウム、炭酸イオンなど多くのイオン種が固溶している。これらのイオン種の固溶はアパタイト構造を歪ませるため、生体骨は多くの欠陥を包含している。我々はその欠陥構造が HAp の生体活性を誘起していると考えており、そのようなナレレベルの欠陥構造を積極的に HAp に導入することができれば、HAp の生体活性を大幅に向上させることが可能であると推測している[1]。

そこで、本研究では、「骨誘導能を備えた次世代型ペースト

状人工骨の開発」に先立ち、骨ミネラルを含有した緻密な HAp セラミックス(Bone HAp セラミックス)を試製し、そのセラミックス上でラット骨髄由来間葉系幹細胞(RBMC)を培養し、そのナノ欠陥構造を備えたモデル材料と骨芽細胞との分化誘導について調査した。さらに、この Bone HAp セラミックスをウサギ脛骨に埋入し、その硬組織適合性を純粋な HAp と比較した。ここで得られた基礎的知見をもとに、Bone HAp 粉体からセメント試験片を試作し、その材料特性を明らかにするとともに、ウサギ脛骨および大型動物であるブタ脛骨にインプラントし、組織学的評価を行なった。以下、得られた知見を報告する。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 Bone HAp セラミックスの作製とその評価

Bone HAp 粉体は、既報[2]に従って、出発物質として  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{KCl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  および  $\text{NH}_4\text{F}$  を用いて湿式法により合成した。 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaCl}$  および  $\text{KCl}$  を含む  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  懸濁液を攪拌し、そこにマイクロチューブポンプで  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  および  $\text{NH}_4\text{F}$  を含む  $\text{H}_3\text{PO}_4$  水溶液を滴下した。得られた白色沈殿を  $37^\circ\text{C}$  にて 3 日間熟成し、ろ過および凍結乾燥して「Bone HAp 粉体」を得た。なお、対照試料として、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  および  $\text{H}_3\text{PO}_4$  を出発原料として、骨ミネラルを含まない Pure HAp 粉体も同様な方法で合成した。

濾過・乾燥後、得られた粉体を水蒸気を含む二酸化炭素雰囲気下にて  $800^\circ\text{C}$ 、1 h 仮焼した。それをボールミル粉碎したのち、一軸加圧成形(質量 0.30 g、直径 10 mm、厚さ 2-3 mm、成形圧 100 MPa)を行い、得られた粉体を水蒸気を含む二酸化炭素雰囲気下にて  $1000^\circ\text{C}$ 、 $1200^\circ\text{C}$  および  $1300^\circ\text{C}$  で 5 h 焼成して、「Bone HAp セラミックス」を作製した。また、同様なプロセスで、Control である純粋水酸アパタイト(Pure HAp)セラミックスも作製した。

得られたセラミックスは、粉末 X 線回折測定(XRD)、フーリエ変換型赤外分光光度法(FT-IR)、走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)、エネルギー分散型 X 線回折分析(EDX)およびラマン散乱測定(Raman)を用いて特性評価を行なった。

得られた Bone HAp セラミックスの相対密度は、 $1000^\circ\text{C}$  焼成では 94.5%、 $1200^\circ\text{C}$  焼成では 77.3%、 $1300^\circ\text{C}$  焼成では 77.2% であり、 $1000^\circ\text{C}$  で焼成した場合に緻密体が得られるこ

とがわかった。XRD により結晶相を調べたところ、1000 °C で焼成したセラミックスでは HAp 単一相が、1200 °C および 1300 °C で焼成したセラミックスでは HAp に加えて酸化カルシウム(CaO)が認められた。また、FT-IR スペクトルからはいずれの焼成条件でも OH、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>および CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>確認され、これらのアパタイトは炭酸含有であることがわかった。

SEM による微細構造観察から、焼成温度が高くなるにつれて粒成長をしていること、また EDX スペクトルより添加したミネラルの存在が確認された。その結晶粒の大きさは Pure HAp セラミックスよりも Bone HAp セラミックスの方が小さいことがわかった。これは EDX でミネラルの存在が確認されていることから、添加したミネラルの一部が粒界に偏析し、粒界の移動を抑制したためと考えられる。

次に、マクロレベルでの欠陥構造を調べるため、代表的な Pure HAp および Bone HAp セラミックスのラマンスペクトルを測定した。いずれも OH および PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>の吸収が確認されたが、Pure HAp と Bone HAp の散乱ピークとを比較すると、各々のピークの強度、本数が異なっていることが明らかになった。これは OH が CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>と置換して消失していること、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>がミネラルの置換により伸縮を起こしているためと考えられる。このことから、作製した Bone HAp セラミックスにはミネラルが含有され、Pure HAp と比較するとより多くの欠陥および歪みが含まれていることが確認された。

ついで、ナノレベルでの情報収集を目的として HR-TEM による観察を行なった。図 1 はイオンスライサー (JEOL EM-09100IS) でおよそ 30-40 μm の薄片を作製し、カーボン蒸着したものを観察した結果である。TEM により 1000 °C 焼成したセラミックスの内部観察を行ったところ、結晶内に欠陥と歪みが確認された。EDX による定性分析を行なったところ、内部にも微量のミネラルが確認された。

以上の結果から、本研究で作製された骨ミネラル含有アパタイトセラミックスは水蒸気を含む二酸化炭素雰囲気下で 1000 °C で焼成を行うと、アパタイト単一相の緻密体が得られ、欠陥および歪みはそのアパタイト構造に導入されていることが確認された。

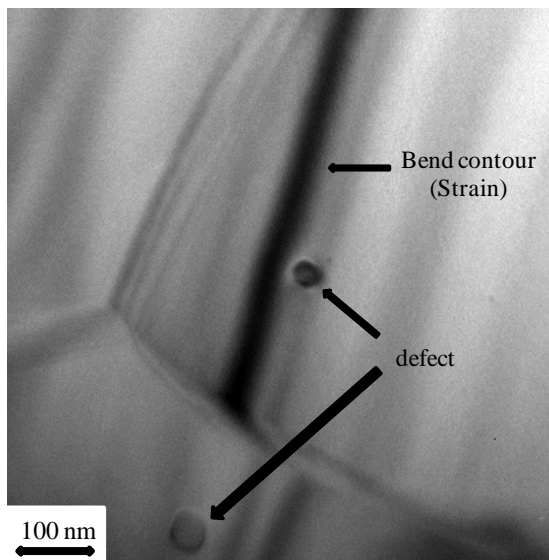


図 1 Bone HAp セラミックスの TEM 像 (1000 °C, 5 h 焼成)

## 2. 2 Bone HAp セラミックスの生体活性

本節では、2.1 節で記載した Bone HAp セラミックスの生体活性を *in vitro* および *in vivo* の両面から評価した結果について述べる。まず、*in vitro* 評価として、Bone HAp セラミックス上でラット骨髄由来間葉系幹細胞(RBMC)を培養し、そのナノ欠陥構造を備えたモデル材料と骨芽細胞との分化誘導について調査した結果について記載する。

RBMC は以下の方法により採取し、細胞培養試験に使

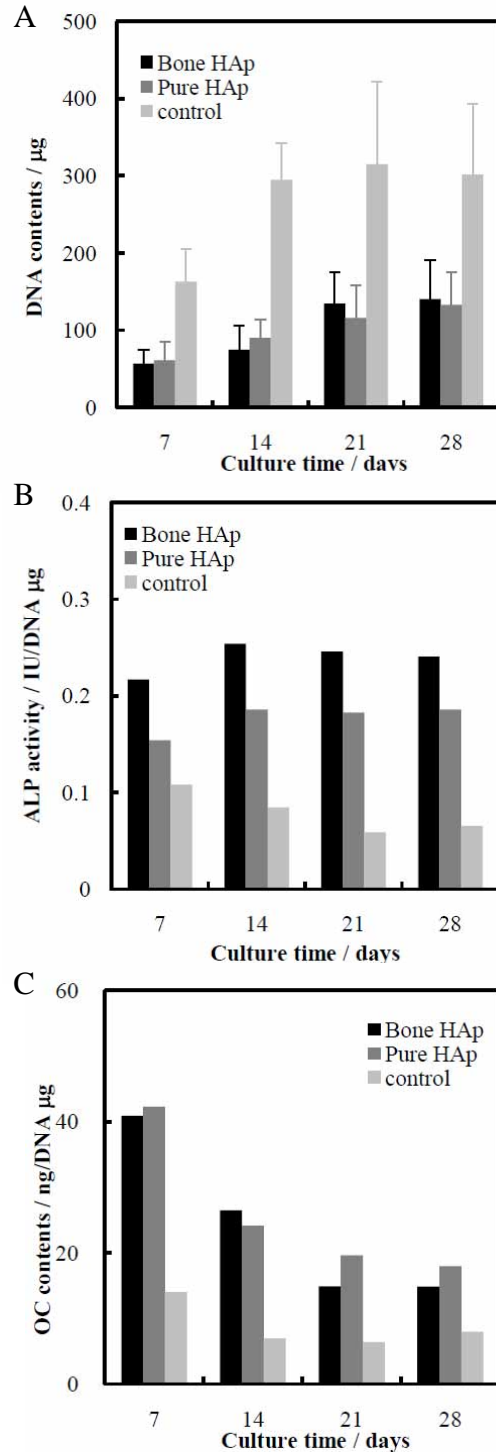


図 2 各培養期間における骨髄間質細胞の DNA 濃度、ALP 活性、OC 産生量 (A) DNA 量, (B) ALP 活性を DNA 1 μg あたりに換算したもの, (C) OC 産生量を DNA 1 μg あたりに換算したもの

用した[3]。4週齢のWistar ratから骨髄間質細胞を採取し、培養液として標準培地 ( $\alpha$ -MEM + 10% FBS) を培養液として用いて、必要細胞数が得られるまで培養した。密度  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の骨髄間質細胞を各材料 (Pure HAp, Bone HAp) およびコントロール (12孔プレート) に2 mL ずつ播種した ( $n=9$ )。骨芽細胞に分化誘導するため、培養4日目に分化誘導培地 ( $\alpha$ -MEM + 10% FBS + 10 nM Dexamethasone + 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate + 200  $\mu$ M ascorbic acid) に切り替えて一定期間培養した。ついで、骨芽細胞への分化誘導後、培養7, 14, 21, 28日目に細胞を回収し、DNA濃度、Alkaline phosphatase (ALP)活性、osteocalcin (OC)産生量を測定した。

まず、各培養条件での細胞数を確認するためDNA濃度を測定した。細胞培養21日目までは、12孔プレートに骨髄間質細胞を播種した場合でも材料に播種した場合でも培養期間が長くなるにつれてDNA量が多くなり、培養21日目以降はDNA量にほとんど変化がみられなかった(図2A)。このことから、骨髄間質細胞が骨芽細胞へと分化誘導するため細胞分裂が抑えられるものの、未分化な細胞は増殖し続け、培養21日目あたりで全ての細胞が骨芽細胞へと分化するのではないかと考えた。

そこで、骨芽細胞の分化レベルと、Pure HApとBone HApの分化誘導能の違いをタンパク質レベルで調べるため、ALP活性値とOC産生量を測定した。各培養条件での単位DNAあたりのALP活性は、全ての培養期間においてBone HApに播種した細胞がもっとも高く、ついでPure HApに播種した細胞、12孔プレートに播種した細胞の順に活性値が高かった(図2B)。このことから、Bone HApとPure HApは初期・中期の分化において12孔プレートより骨芽細胞への分化誘導能が高く、またBone HApは骨芽細胞への分化誘導能が最も高い材料であることが分かった。

各培養条件でのOC産生量は、培養期間が長くなるにつれて減少することが分かった(図2C)。OC産生量が経時的に減少したのは、OC産生量が各培養期間での差が生じないほどごく少量であったのに対し、DNA量は経時的に増加したためではないかと考えられる。OC産生量がごく少量であったのは、細胞の分化レベルが低く、そのため後期分化マーカーであるOCの産生量が少なかったのではないかと考えた。

これらの結果は、ナノ欠陥構造を持つBone HApはPure HApに比べて骨芽細胞の分化を促進させることが可能であることを示している[4]。この結果を受けて、次にウサギ脛骨に、このBone HApセラミックスを埋入した結果について述べる。

埋入実験に使用したBone HApセラミックスは直径: 4 mm、高さ: 8 mm、相対密度: ~95%の円柱状試験片である。これを日本白色種ウサギ(♂, ~3 kg)の脛骨骨端部に埋入した。埋入4週および24週間後に取り出し、Villanueva Bone染色を行ない、非脱灰研磨標本作製し、組織学的観察を行なった。また、材料と新生骨の接触率および材料周囲の骨形成率を画像解析ソフトWinROOF(三谷商事)

を用いて計測した。

いずれのセラミックス試験片も炎症などの反応は認められず、材料と新生骨とが直接結合している様子が見られた。特に、4週間埋入したBone HApセラミックスで材料周囲での旺盛な骨形成が認められた(図3)。画像解析による骨接触率及び骨形成率の測定結果は、24週埋入試験片ではPure HApとBone HAp間で有意な差が見られなかったが、4週間埋入Bone HApセラミックスでは骨接触率および骨形成率いずれもPure HApより約1.5倍も高い値を示した。

この結果は、Bone HApセラミックスがPure HApセラミックスよりも早期に骨形成を促進させる優れた骨形成能を備えていることを示すものであり、Bone HApは次世代のペースト状人工骨の素材として極めて有望である。

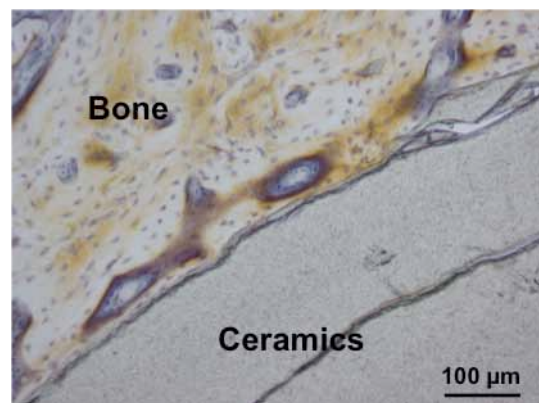


図3 Villanueva Bone染色によるBone HApセラミックスの組織学的評価

### 2.3 Bone HApセメントの作製とその評価

本節では、2.2節で優れた骨伝導性を有することを明らかにしたBone HAp粉体からキレート硬化型セメントを作製するプロセスと得られたセメント試験片の材料特性について記載する。

まず、Bone HAp粉体は2.1節の方法で合成した。ついで、得られたBone HAp粉体をボールミルを用いて5 min 湿式粉碎し、1000 ppmに調整したIP6溶液で5 h表面修飾した。その後、吸引ろ過、24 h凍結乾燥させ、表面修飾した粉体(IP6-Bone HAp)を得た。また、対照試験片のPure HAp粉体にも同様な操作を施した。

IP6による表面修飾前後のBone HApおよびPure HAp粉体のキャラクタリゼーションは、粉末X線回折測定(XRD)、フーリエ変換型赤外分光光度法(FT-IR)、走査型電子顕微鏡(SEM)、高周波誘導結合プラズマ発光分析(ICP-ES)などを用いて行なった。

図4はBone HAp粉体とこれをIP6で表面修飾したIP6-Bone HAp粉体のXRD図を示している。Bone HAp粉体およびIP6-Bone HAp粉体はいずれも低結晶性のHAp単一相であり、IP6の表面修飾による結晶相の変化は認められなかった。また、データは省略するが、Pure HApでも同様な結果が得られた。

また、Bone HAp粉体のFT-IRスペクトルの結果からは

(図 5), 1100~960, 600, 560  $\text{cm}^{-1}$  付近にリン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ )に基づく吸収が、3600  $\text{cm}^{-1}$  付近に HAp の O-H 伸縮に基づく吸収が観察され、いずれも HAp に特徴的な吸収が認められた。また、1455, 1430 および 880  $\text{cm}^{-1}$  付近に炭酸イオン ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) に帰属される吸収も認められた。このことから、Bone HAp 粉体は炭酸含有アパタイトであることがわかった。また、データは省略するが、炭酸イオンに帰属される吸収は低いレベルであったが、Pure HAp でも同様な結果が得られた。

表 1 に IP6 による表面修飾前後の Pure および Bone HAp の化学組成を示す。Pure HAp の Ca/P 比は 1.67 で、合成時に仕込んだ Ca/P 比と近い値になった。一方で、Bone HAp の Ca/P 比は 1.75 であり、目的とするイオンが含有されていることが確認された。Bone HAp の Ca/P 比が Pure HAp と違って高いのは、Bone HAp が炭酸含有アパタイトであり、HAp のリン酸サイトに炭酸が置換し、P の含有量が減り、Ca/P 比が向上したためだと考えられる。また、表面

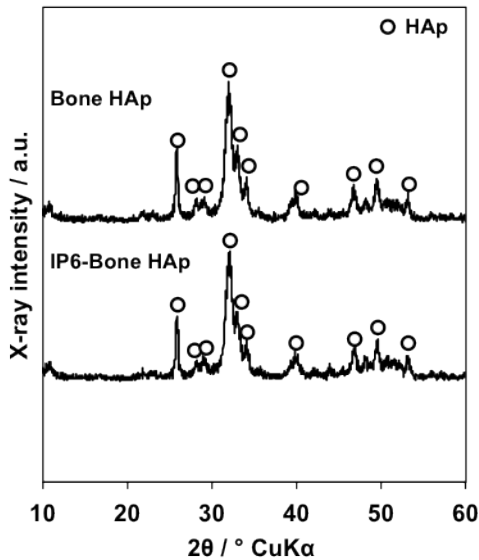


図 4 IP6 表面修飾前後の Bone HAp 粉体の XRD パターン

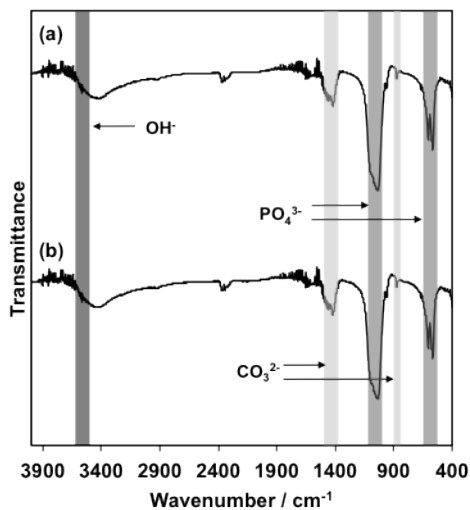


図 5 IP6 表面修飾前後の Bone HAp 粉体の FT-IR スペクトル

表 1 IP6 表面修飾前後の Pure および Bone HAp 粉体の化学組成

	Ca	P	Na	K	Mg	Ca/P
	[mass%]	[mass%]	[mass%]	[mass%]	[mass%]	
Pure HAp	36.1	16.7	-	-	-	1.67
IP6-Pure HAp	36.6	17.0	-	-	-	1.61
Bone HAp	34.0	15.2	0.5	0.4	0.1	1.75
IP6-Bone HAp	34.9	15.5	0.7	0.4	0.1	1.73

修飾を施した IP6-Pure HAp および IP6-Bone HAp は Pure HAp および Bone HAp よりも Ca/P 比が低下していた。これは表面修飾により固定化された IP6 の分だけが P が増加したためであると考えられる。

## 2. 4 Bone HAp セメントの骨形成能

本節では、2.3 節で試作した IP6-Bone HAp セメント試験片をウサギおよびブタ脛骨にインプラントし、その周囲での骨形成能について評価した結果を述べる。

まず、上記の IP6-Pure HAp 粉体および IP6-Bone HAp 粉体を用いて、ウサギおよびブタ脛骨インプラント用の試験片(直径 4 mm, 高さ 7-8 mm)を作製した。IP6-Pure HAp 粉体に固液比(粉体[w]/水[w])が 1/0.35 となるように混練液(水)を加え、混練・成形し、24 h 養生して「IP6-Pure HAp セメント」を作製した。同様に、IP6-Bone HAp 粉体を用いて固液比が 1/0.40 となるように水を加えて「IP6-Bone HAp セメント」を作製した。作製した IP6-Pure HAp セメントの相対密度および圧縮強度は  $43.0 \pm 1.0\%$  および  $13.2 \pm 0.6 \text{ MPa}$  であり、IP6-Bone HAp セメントのそれらは  $43.1 \pm 0.7\%$  および  $13.4 \pm 0.7 \text{ MPa}$  であった。これら 2 つの試験片の相対密度および圧縮強度はほぼ同レベルであり、*in vivo* 実験に際し、材料間の影響はほとんど無視できると考えられる。

まず、セメント試験片のウサギ脛骨に対する生体硬組織反応を調べるために、所定の期間(4, 24 w; 各  $n=3$ )、ウサギの両足脛骨骨端部に埋入した。実験動物には、体重約 3 kg, 16 週齢の日本白色種(JW)のウサギを用いた。まず、ソムノベンチルを  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  になるように静脈注射により投与し、麻酔を行なった。その後、ウサギ後肢の膝内側部を切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させ、ドリルで穿孔(4.2 mmφ)し、セメント試験片を埋入した。左足に IP6-Bone HAp セメント(4 mmφ×7-8 mm)、右足に IP6-Pure HAp セメント(4 mmφ×7-8 mm)の円柱状試験片をそれぞれ一本ずつ埋入した。所定の期間経過後(4 w)、周囲の骨組織とともに試験片を取り出し、凍結薄切標本および非脱灰研磨標本を作製し、組織学的評価を行なった。凍結薄切標本では、トルイジンブルー(TB)染色、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行なった。また、非脱灰研磨標本では、ビラヌエバ骨染色を使用した。

図 6 は TB 染色した組織像である。IP6-Pure HAp および IP6-Bone HAp セメントいずれもセメント周囲での旺盛な骨形成が認められた。また、セメントと新生骨とが直接結合している



様子も観察された。データは省力するが、HE 染色でも同様な結果を得ている。24 w 群についても良好な硬組織適合性を示していた。

図 7 は ALP および TRAP 染色した結果である。ALP 染色で陽性の部分(←でマーク)は骨芽細胞が、TRAP 染色で陽性の部分(←でマーク)は破骨細胞が存在していることを示している。IP6-Pure HAp および IP6-Bone HAp セメントいずれも ALP 陽性および TRAP 陽性の部分が散見され、これらのセメントが骨のリモデリングサイクルに適応していることが分かった。

ついで、セメント周囲での骨形成量を定量するため、ピラエバ骨染色の組織像を用いて、セメント周囲の骨形成率を画像解析により算出した。なお、ここで「骨形成率(%)」は「骨の面積」を「セメント周辺の面積(円全体の面積-セメントの面積)」で除して 100 をかけたものである。実際、Pure HAp セメントの骨形成率は 57%、Bone HAp セメントのそれは 74%であった。Bone HAp セメントの方が Pure HAp セメントよりも約 30%もその周囲で多くの骨が形成されており、Bone HAp が Pure HAp よりも高い骨伝導能を備えていることが明らかとなった。この結果は、2.2 節で示した Bone HAp セラミックスと Pure HAp セラミックスとの比較実験とほぼ同等な結果である。セラミックスとセメントと材料形態が異なるにもかかわらず、Bone HAp の

方がより高い骨形成能を示したことは、この Bone HAp の人工骨の素材としての極めて高いポテンシャルを想像させる。今後、追試を行ない、この知見を精査していく。

実験動物として、ウサギで優れた結果を得たため、よりヒトに近い大型動物であるブタを用いて、セメント試験片の生体硬組織に対する組織反応を調べた。所定の期間(4, 24 w; 各 n=4)、ブタの左足脛骨骨端部に埋入した。実験動物には、体重約~110 kg, 188 週齢のブタ(Wild type)を用いた。まず、ソムノペンチルを静脈注射により投与して麻酔を行なった後、ブタ後肢の膝内側部を切開し、骨膜を剥がして脛骨を露出させ、ドリルで穿孔(4.2 mmφ)し、8 つのセメント試料片を埋入した。所定の期間経過後(4 w)、周囲の骨組織とともに試験片を取り出し、凍結薄切標本および非脱灰研磨標本を作製し、組織学的評価を行なった。凍結薄切標本では、トルイジンブルー(TB)染色、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色を行なった。

図 8 はブタ脛骨に 4 および 24 週間インプラントしたセメント試験片の組織像を示す。図 8A は、4 週(a, b)および 24 週(c, d)埋入後のセメント試料片の TB 染色像である。図 8B および C はそれぞれ 4 および 24 週間インプラントしたセメント試験片の連続組織像である。

図 8A より、Pure HAp および Bone HAp セメントいずれもセメント周囲での旺盛な骨形成が認められた。また、セメントと新生骨とが直接結合している様子も観察された。今回の組織学的所見では、Pure HAp よりも Bone HAp の方がその周囲において、旺盛な石灰化骨の接触が見受けられた。

図 8B および C は、4 および 24 週間インプラントしたセメント試験片から連続切片を作成し、それらを TB、ALP および TRAP 染色した結果である。4 および 24 週いずれの埋入期間においても、TB 染色では新生骨がセメント試料片と結合している様子が確認できる。また、ALP 染色で陽性の部分(←でマーク)は骨芽細胞が、TRAP 染色で陽性の部分(←でマーク)

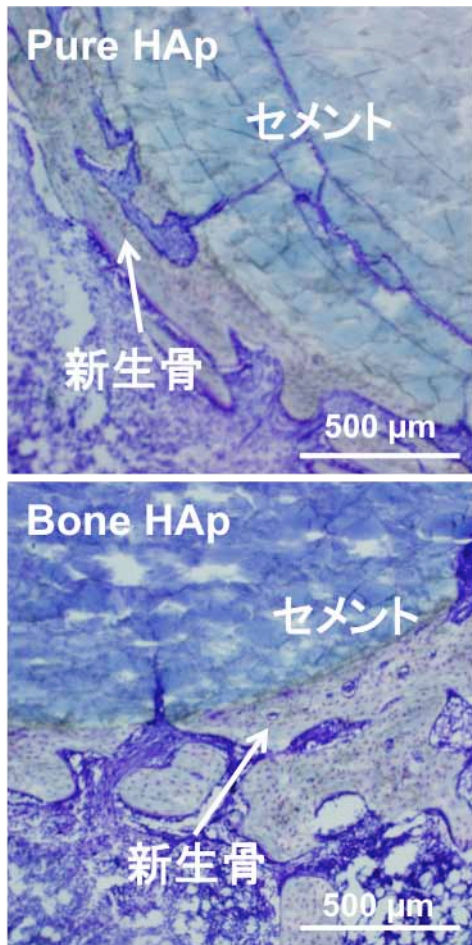


図 6 TB 染色による Pure HAp および Bone HAp セメント試験片の組織学的評価 (ウサギ: 4 w)

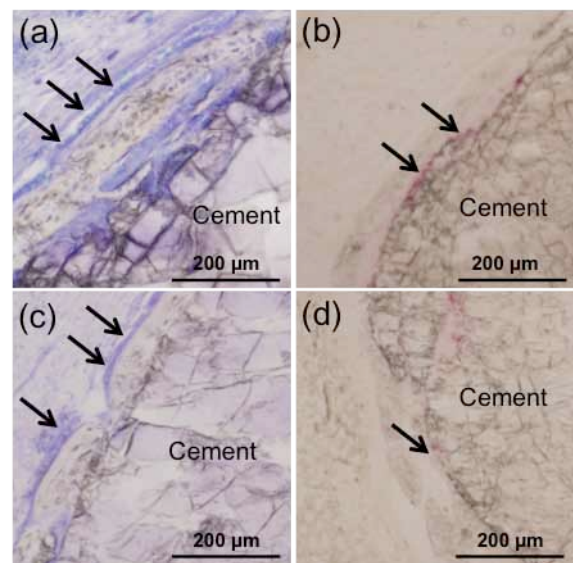


図 7 セメント試験片の組織学的評価 (ウサギ: 4 w): (a, b) Pure HAp セメント、(c, d) Bone HAp セメント、(a, c) ALP 染色、(b, d) TRAP 染色

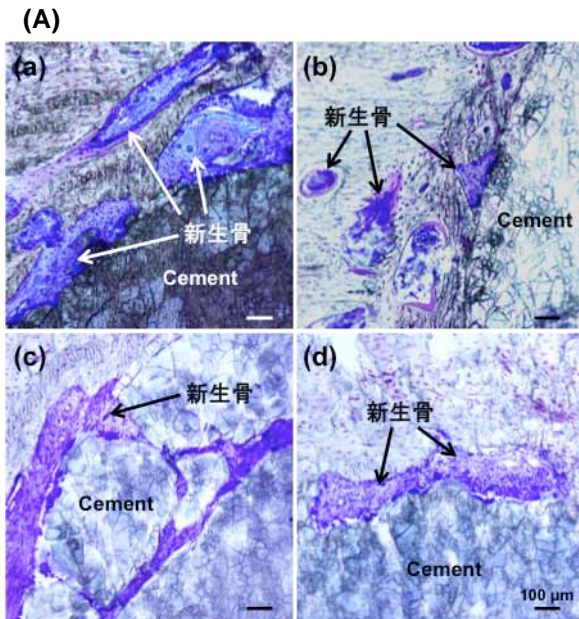
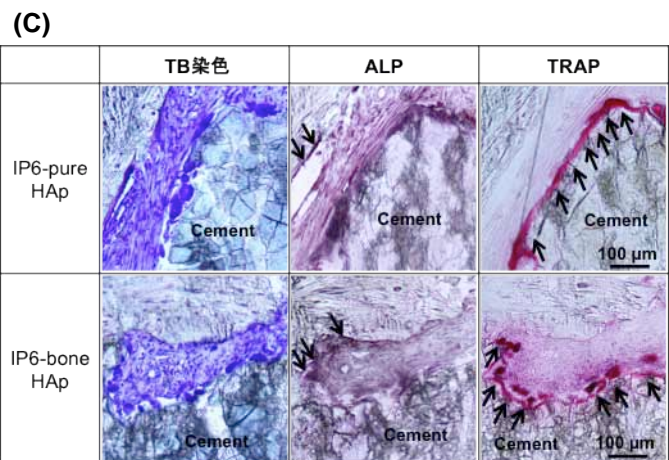
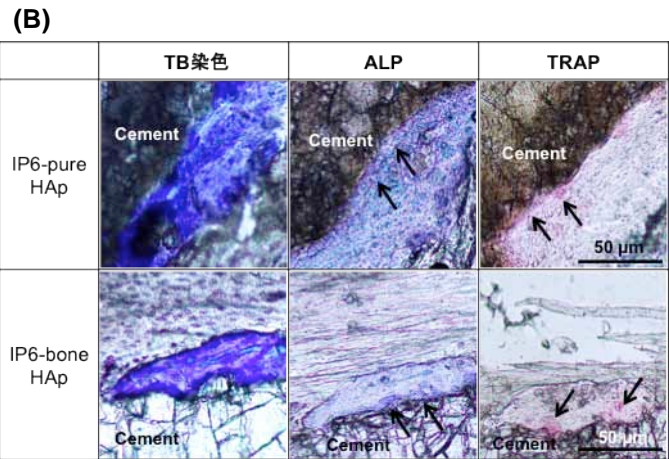


図8 ブタ脛骨に4および24週間インプラントしたセメント試験片の組織学的評価

(A) 4週(a, b)および24週(c, d)埋入後のセメント試験片のTB染色像。(a, c) Pure HAp, (b, d) Bone HAp

(B) 4週間インプラントしたセメント試験片の連続組織像

(C) 24週間インプラントしたセメント試験片の連続組織像



は破骨細胞が存在していることを示している。Pure HAp および Bone HAp セメントいずれも ALP 陽性および TRAP 陽性の部分が散見され、これらのセメントが骨のリモデリングサイクルに取り込まれていることが分かった。

### 3. 考察及び今後の展望

自家骨移植の問題点を解決する目的で生体親和性に優れたリン酸カルシウム系セラミックスを用いた人工骨が開発され、広く臨床応用されている。骨移植に際し、人工骨の利用は年々増加傾向にあるが、人工骨は現在のところ、自家骨の持つ“骨誘導”がまだ備わっていないため、人工骨だけの骨再建は難しい。

そこで、本研究では、生体骨の成分に酷似した組成からなる骨ミネラル含有アパタイト(Bone HAp)を合成した。Bone HApでは、これまでにウサギ脛骨にセメント試験片をインプラントし、その生体硬組織反応を比較検討したところ、インプラント4週では、Bone HApの方がPure HApよりも材料周囲での高い骨形成量が約30%も高いことが分かった。これは極めて優れた骨形成能である。また、今回、行なったブタへのインプラント実験においても良好な硬組織適合性を示している。

今後は、セメントの材料特性の向上とともに、より詳細な *in vitro* および *in vivo* 評価を進め、これまでにない“骨誘導能(より高い骨伝導能)”を担保した次世代型ペースト状人工骨の創製につなげたい。

### 【参考文献】

1. 相澤 守, 神澤信行, 松本守雄, バイオマテリアル, **23**, 336-342 (2005).
2. T. Fujino and M. Aizawa, *Arch. BioCeram. Res.*, **7**, 175-178 (2007).
3. C. Maniopoulos, J. Sodek, and A.H. Melcher, *Cell Tissue Res.*, **254**, 317-330 (1988).
4. M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda, and H. Yoshimura, *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 320-324 (2012).



# 高い骨伝導性を備えた HAp 系セメントの創製とその評価(2)

## ーケイ素含有アパタイトによるアプローチー

本田みちよ、長嶋比呂志、中島佑亮、相澤 守

### 1. はじめに

水酸アパタイト(hydroxyapatite; HAp)は骨と歯の無機成分と化学的、生物学的に類似しており、優れた生体適合性、骨伝導能、骨結合性を有することからバイオセラミックス材料として用いられている[1-5]。しかしながら、他の生体活性ガラスやガラスセラミックスに対して、純粋な HAp インプラントの表面に有意な骨接合が起こるのにはかなりの時間が必要とされる[6-8]。

HAp の生体活性を高める一つの方法は骨のミネラル相の化学組成と構造的に類似した置換型アパタイトを得ることである[9, 10]。硬組織の無機成分を構成するアパタイト相は多置換のリン酸カルシウムである。Si, Mg, Zn, Sr, Na などを含む小さな微量元素が生物学的アパタイトの特徴と関連していることや、これらの微量元素が骨や象牙質の生化学での主な役割を果たしていることはよく知られている。Carlisle によって行われた研究では、骨形成と石灰化におけるケイ素(Si)の重要性を示した[11]。

Si 置換アパタイトは様々な方法での合成が試みられている。

Ruy らはゾルゲル法を用いて Si 置換アパタイト合成したが、これらの物質では HAp 相のほか、Si の置換の程度に応じて他の結晶相を含んでいた[12]。Boyer らは固相反応を用いて Si 置換アパタイトの研究を行ったが、これらの場合、ランタンや硫酸塩に似た二次イオンの取り込みが必要となった[13]。また、Gibson らと Kim らは湿式法を用いて Si 置換アパタイトを合成したが、高温で焼結すると通常よりも結晶径が大きくなることを示した[14,15]。また、我々はこれまでに超音波噴霧熱分解法(USSP 法)を用いて、Si-HAp 微小球を合成し、これを焼結させることで、Si-HAp セラミックスを創製することに成功している[16]。

本研究では、キレート硬化型 Si-HAp セメントと細胞応答性の調査に先立ち、湿式法で Si 含有 HAp 粉体 (Si-HAp) を合成した。この粉体を用いてキレート硬化型セメントを作製し、得られた原料粉体のキャラクタリゼーションを行なうとともに、キレート硬化型 Si-HAp セメントと従来のキレート硬化型 HAp セメントとの材料特性の比較を行なった。

さらに、キレート硬化型 Si-HAp セメントを用いた生体適合性の評価として、骨芽細胞様細胞を用いた *in vitro* 評価と大型動物を用いた *in vivo* 評価を行なった。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 Si-HAp 粉体の合成とキャラクタリゼーション

Si-HAp は湿式法により、水酸化カルシウム ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) 懸濁液に、オルトリン酸水溶液( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )ならびテトラオルトケイ酸( $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ; TEOS)混合水溶液を滴下して合成した。仕込みの Si 含有量は 0, 0.4, 0.8, 1.6 および 2.4 mass% とした。得られた粉体の性状を粉末 X 線回折法(XRD), 赤外分光光度法(IR), 走査型電子顕微鏡法(SEM)および誘導結合プラズマ発光分光法 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry; ICP-AES)などを用いて調査した。

合成した Si-HAp 粉体の XRD パターンを図 1 に示す。

XRD パターンから合成した粉体は Si の含有量に関わらず、HAp 単一相であることがわかった。また、ピークが全体的にブロードであったことから、これら粉体は低結晶性であるといえる。その原因は合成した粉体を焼結していないため、低結晶性であったと考えられる。

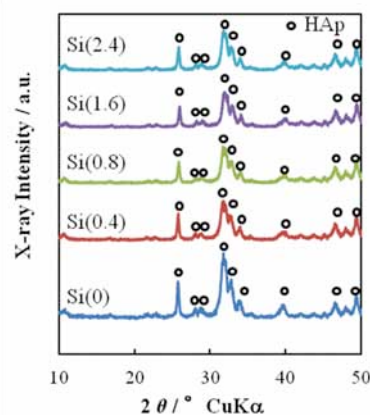


図 1. Si-HAp 粉体の XRD パターン

また、FT-IR スペクトルから、Si(0)-HAp, Si(0.4)-HAp および Si(0.8)-HAp では、リン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ )の吸収、水酸化物イオン( $\text{OH}^-$ )の微弱な吸収、炭酸イオン( $\text{CO}_3^{2-}$ )に帰属される吸収が確認された (data not shown)。これに対し、Si(1.6)-HAp と Si(2.4)-HAp の FT-IR スペクトルでは、リン酸イオン ( $\text{PO}_4^{3-}$ )の吸収、炭酸イオン( $\text{CO}_3^{2-}$ )に帰属される吸収が見られたが、水酸化物イオン( $\text{OH}^-$ )の吸収が観察されなかった。明確な理由は分からないが、Si の含有が  $\text{OH}^-$  の微弱な吸収に影響を与える可能性が考えられる。

次に、SEM により合成後の Si-HAp 粉体の観察を行なった。その結果、合成粉体はいずれも 100  $\mu\text{m}$  程度の大きさの粒子と 10  $\mu\text{m}$  程度の粒子、さらに小さい粒子などが混在していた(data not shown)。さらに高倍率で観察してみると、



Si-HAp 粉体は小さな粒子の凝集体であることが分かった。ただし、Siの含有量の違いがその形態に大きな影響を与えるものではないということがわかった。

続いて、ICPを用いてSi-HAp粉体中のCa, Si, P含有量を測定した。まず、各Si-HAp粉体中のSi含有量を図2に示す。

0.4 mass%のSiが含まれている粉体ではほぼ全量を取り込まれていることが分かる。さらに0.8 mass%, 1.6 mass%, 2.4 mass%と仕込み量を変化させていったところ、これらの粉体では全量ではないもの

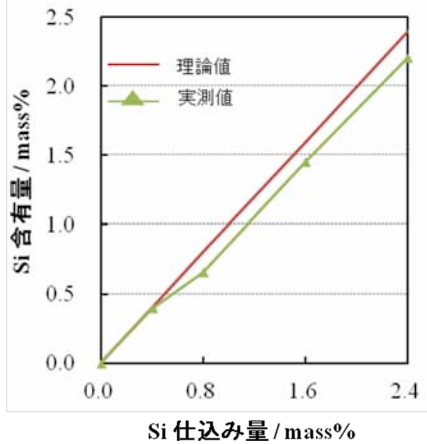


図2. Si-HAp粉体中のSi含有量

の仕込み量に比例してSiが含有されていることが分かった。したがって、湿式法による合成でもSiを十分に含有させることができるという結果が得られた。

そこで、実際に、ケイ酸イオンがリン酸サイトに置換されているかを調べるために、格子定数を求めた。その結果を表1に示す。Si(0)-HApではSiを含有していないので、HApの理論値とほぼ同じ値であった。Siを含有している粉体Si(0.4)-HAp, Si(0.8)-HAp, Si(1.6)-HApおよびSi(2.4)-HApではa軸が減少する結果が得られた。また、Siの含有量が増えるに従い、a軸の値は小さくなっていった。リン酸サイトにSi(ケイ酸)が置換した場合、a軸が減少すると報告されている[13]。この結果は格子内にSiが取り込まれたことを示唆している。

表1. Si-HAp粉体の格子定数

Sample	a 軸 (nm)	c 軸 (nm)
Si(0)-HAp	0.942(3)	0.688(2)
Si(0.4)-HAp	0.946(3)	0.689(3)
Si(0.8)-HAp	0.941(6)	0.688(4)
Si(1.6)-HAp	0.934(5)	0.688(4)
Si(2.4)-HAp	0.933(5)	0.691(4)
HAp 理論値	0.942(3)	0.688(2)

次に、Si含有量の異なるSi-HAp粉体からのSi溶出量を調べた。単位質量当たりのSi溶出量を図3に示す。Si(0)-HAp粉体については、Siを含有していないので当然溶出は起こらない。Si(0.4)-HAp~Si(2.4)-HApの粉体の単位質量当たりの溶出量は、浸漬7日目で、Si(0.4)-HAp: 0.79 mg·g<sup>-1</sup>、Si(0.8)-HAp: 1.41 mg·g<sup>-1</sup>、Si(1.6)-HAp: 2.62 mg·g<sup>-1</sup>、Si(2.4)-HAp: 3.42 mg·g<sup>-1</sup>であることが分かった。すなわち、Siを含有している粉体では、Siの含有量に準じて、溶出量が大きくなっていることが分かった。また、これらの結果からSiは1日目で大きく溶出し、その後緩やかに溶出していることが分かった。さらに、この時の溶出率を算出した

結果、いずれの粉体でも約13-17%のSiが1日目に溶出しており、7日目においては約15-17%のSiが溶出した。これらの結果から、溶出率はSiの含有量が増えても上昇しないことが分かった。したがって、粉体中のSi含有量を調節することでSiの溶出量はコントロールできると考えられる。

## 2.2 Si-HApによるキレート硬化型セメントの作製と力学的評価

湿式法によって合成された粉体10.0 gと純水40.0 cm<sup>3</sup>を遊星ボールミル中で湿式粉碎した。粉碎には10 mm径のジルコニアボールを用い、5分間粉碎した。1000 ppmに調製したイノシトールリン酸(IP6)溶液200 cm<sup>3</sup>と湿式粉碎した

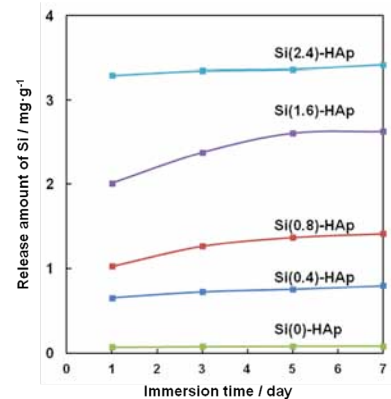


図3. Si-HAp粉体からのSi溶出量

Si-HAp粉体を500 cm<sup>3</sup>ビーカーに入れ、攪拌機で毎分400回、4時間室温で攪拌した。これを吸引ろ過し、-80℃で1日凍結させた。凍結後、粉体を凍結乾燥機を用いて24時間乾燥させて表面修飾したケイ素含有アパタイト(IP6-Si-HAp)を得た。得られた粉体を固液比が1/0.3 [g/cm<sup>3</sup>]となるよう純水と混練し、一軸加圧成形し、IP6-Si-HApセメントを作製した。その後、それらのセメントの力学的評価を行なった。

始めに各セメントの相対密度を測定した結果、Siの含有量およびIP6の表面修飾に関わらず、相対密度は50%程度であった。これらの結果から、セメント中のSi含有量およびIP6表面修飾の有無は試料片の相対密度に大きな影響を与えるものではないと確認された(data not shown)。

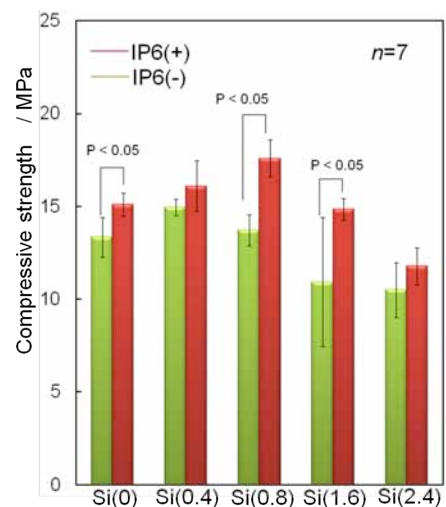


図4. Si含有量とIP6表面修飾の圧縮強度への影響

次に、Si 含有量の圧縮強度への影響について調べた(図4)。その結果、IP6 表面修飾にかかわらず、Si(1.6)-HAp と Si(2.4)-HAp のセメント試料片の圧縮強度が低くなる傾向がわかった。現時点で Si 含有量が圧縮強度に影響を与えるメカニズムは分からないが、Si が含有され結晶構造が変化したことなどが圧縮強度の向上に影響している可能性が考えられる。一方、Si(0)-HAp, Si(0.4)-HAp, Si(0.8)-HAp から作製されたセメント試料片間では大きな圧縮強度の変化は認められなかった。したがって、Si を含有していても従来の IP6-HAp セメントと同様の作製条件で圧縮強度の向上ができることがわかった。

また、セメントの圧縮強度は HAp 粉体を IP6 により表面修飾することで向上することが分かった。実際、すべての Si 含有量で表面修飾を施したセメント試料片の圧縮強度が大きくなり、Si(0)-HAp, Si(0.8)-HAp, Si(1.6)-HAp において、5%の有意差が確認された。これは Si-HAp 粒子が IP6 を介してキレート結合したために強度が向上したためだと考えられる。

### 2.3 骨芽細胞様細胞を用いた IP6-HAp セメントの *in vitro* 生体適合性評価

IP6-Si-HAp セメント試料片の生体適合性を調べるために、新生児 C57BL/6 マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 を用いて *in vitro* における細胞培養試験を行った。In vitro 評価用セメントには、1000 ppm IP6 表面修飾した IP6-Si-HAp 粉体を用い、粉体と純水を 1/0.35 [g/cm<sup>3</sup>] となるよう混練し、その後加圧成形したものを IP6-Si-HAp セメントとした。また、本研究では、溶出した Si の細胞増殖性への影響を調べるために、Transwell® (CORNING) キットを用いて、細胞とセメントを共存培養させた時の細

胞毒性を評価した(間接培養試験)。さらに、セメントへ細胞を直接播種し、その増殖性や形態についても評価した(直接培養試験)。セメント上における細胞の形態については、細胞を固定後、Alexa Fluor 488-phalloidin で actin を染色し、DAPI で核を染色した後に、倒立型リサーチ顕微鏡 IX71(Olympus)を用いて観察した。

始めに、セメント試料片の細胞毒性を調べるために Transwell®を用いた間接培養試験を行なった(図5)。

Si を含有していない Si(0)と低濃度の Si を含有した Si(0.4)について比較すると、control (ポリスチレンプレート) よりもやや低い値を示した。これはセメント試料片に培地中のタンパク質やイオンが吸着したことにより増殖性が低下したものと考えられる。IP6 表面修飾前後で増殖性を比較すると IP6 吸着後の方がその影響は小さいと思われる。次に、Si を中程度含有した Si(0.8)および高濃度含有させた Si(1.6), Si(2.4)において検証してみると、これらのサンプルでは control よりも優れた細胞増殖性を示した。この時、培地中に溶出した Si 濃度を測定した結果、Si(0.8), Si(1.6), Si(2.4)では Si(0.4)に比べて溶出量が大きかった。これは、セメントから溶出した Si が細胞増殖へ影響を与えたということの意味する。しかしながら、Si(0.8), Si(1.6), Si(2.4)の三点を比較すると仕込み量の差ほど溶出量に差は生じなかった。この結果から、Si の溶出はある一定の濃度で平衡に達していると考えられる。

次に、IP6-Si-HAp セメントへ細胞を直接播種した時の細

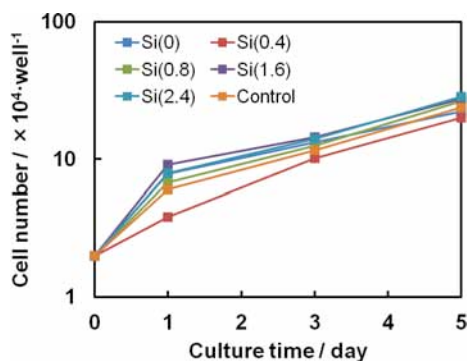


図5. Transwell を用いた間接培養による細胞増殖性

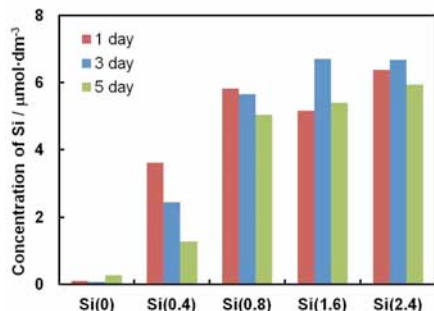


図6. 間接培養時におけるセメントからの Si 溶出

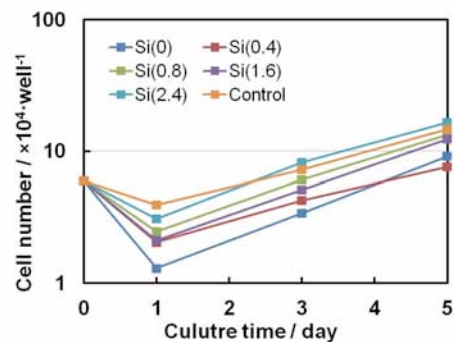


図7. 直接培養による細胞増殖性

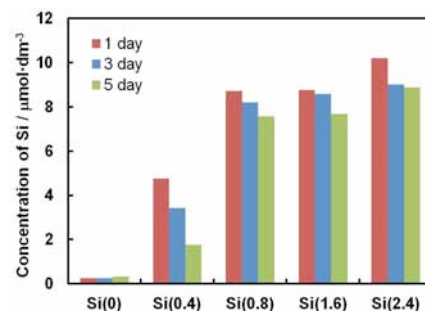


図8. 直接培養時におけるセメントからの Si 溶出

胞増殖性について示す(図7)。Control では1日目に細胞数は減少し、その後、対数的に増加した。一方、各セメント試料片における細胞は、材料の表面粗さ等の影響により1日目に control と比べて著しく減少したが、その後、良好に細胞が増殖していることがわかった。5日目の細胞数を比較すると Si(0), Si(0.4), Si(1.6) では control に比べ、細胞

数が少なかった。この理由は初期に付着した細胞数を反映し、対数増殖期に入るのが遅延したことや表面が粗く細胞が増殖しにくい環境であること、セメント試料片は多孔質であるために試料片内部に培地中の栄養分を吸着してしまっただけなどが挙げられる。

しかし、Si(0.8)、Si(2.4)において、表面粗さなどの諸条件は同じであるのにも関わらず、細胞増殖性が Si(0)、Si(0.4)、Si(1.6)に比べ亢進されていることがわかる。Si(1.6)の細胞増殖が優れなかったことから一概には言えないが、Siの含有が生体適合性の向上に寄与していると推察される。

また、細胞増殖に及ぼす Si 含有量の影響を検討するために培地中に溶出した Si 量を測定した結果を図 8 に示す。この結果、ある閾値を超えた場合においてセメント生体適合性が向上するのではないかと考えられる。すなわち、Si 含有セメントを作製する場合、Si の含有量の検討が重要であるとされる。

IP6-Si-HAp セメント上で培養された細胞の形態を観察するために、細胞形態を蛍光染色した結果を図 9 に示す。細胞核 (DNA) を DAPI により青色に、細胞骨格タンパク質であるアクチンを Alexa Fluor 488-phalloidin で緑色に染色した。観察の結果、control であるポリスチレンプレート上の細胞では、アクチンのストレスファイバーが発達し、細胞内を走っている様子が認められた。またそれぞれの細胞形態を比較すると、control は細胞が大きく広がり、面で付着しているようであり、1 day から 5 day にかけて見ると順調に増殖していきコンフルエントに近づいていく様子が観察された。

一方、セメント上の細胞は、細胞が細長く、糸状仮足を発達させている様子が見られた。これは、圧粉体上は表面

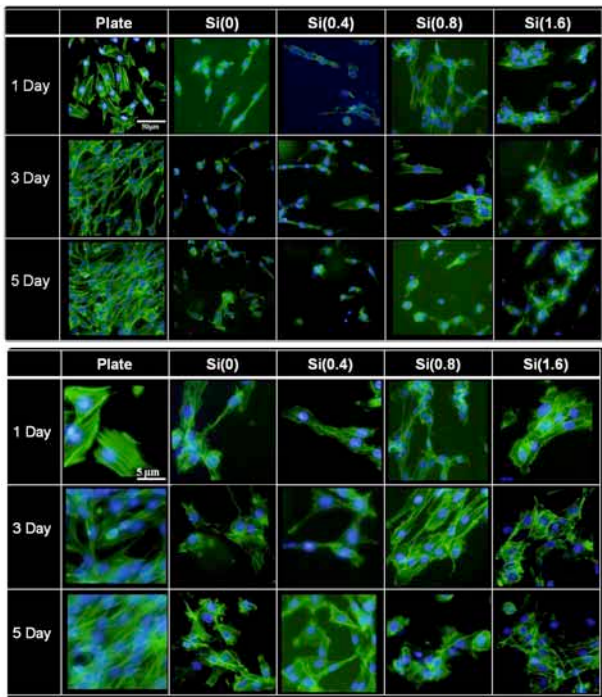


図 9. IP6-Si-HAp セメント上における細胞形態観察  
下段は上段の拡大図であり、スケールバーは各々 50 μm, 5 μm である。

の凹凸などの影響により control に比べて細胞の増殖に不利な条件であるためだと考えられる。Si(0)、Si(0.4)では丸まった細胞が多く見られたが Si(0.8)、Si(1.6)においては細胞数が増えているように見受けられた。この結果は、細胞増殖性試験の結果と一致していた。

## 2. 4 大型動物(ブタ)を用いた IP6-HAp セメントの *in vivo* 生体適合性評価

IP6-Si-HAp セメントの生体適合性を調査するため大型動物ブタを用いて *in vivo* 評価を行った。IP6-Si-HAp セメントの *in vivo* 評価には、生後 200 週齢のオスで、体重が 109 kg のクサビラオレンジ蛍光遺伝子を導入したクローン豚 (huKO ブタ)を用いた。huKO ブタの脛骨に、それぞれの試験片の大きさに合わせてドリル (直径 4.1 mm または 4.2 mm)を用いて穿孔し、各 2-3 個ずつ計 8 個の IP6-Si-HAp セメントを埋入した。埋入期間は 4 週間とした。

試験片を埋入してから 4 週間後に、埋入部位を取り出した。まず、取り出した脛骨を、バンドソーを用いて試験片周辺で 8 つに切り分け X 線μCT を撮影した。その後、70% エタノール水溶液で脱脂を行った。これらの試料片について非脱灰研磨標本を作製した。非脱灰研磨標本の作製にあたり、あらかじめ villanueva bone stain を行ない組織学的に評価した(図 10)。なお、骨形成量計測は普通光下で観察された切片において WinRoof を用いた画像処理によって行なった。この方法を用いて試料片近傍の低石灰化骨の量を定量、比較した。

Si(0)において、明視野では材料の周囲にドリル径の後ろと思われる部位が存在し、そこに茶色に染色された低石灰化骨の形成が認められた。また材料周囲と分け隔てなく結合されており良好な生体適合であると言える。Si(0.8)においても Si(0)と同様に周囲の骨組織との分け隔てない結合が確認された。拡大した図においてはフォルクマン管と思わ

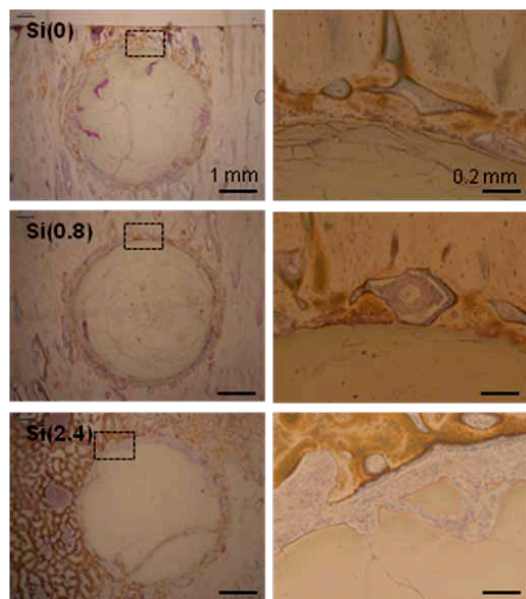


図 10. IP6-Si-HAp セメントの組織染色像  
Villanueva bone stain 後の明視野観察像  
左図中の破線枠を拡大したものが右図



れる細胞組織が散見された。これらの結果は材料の周辺部において優れた骨再生が行われていることを示唆している。Si(2.4)においては材料周辺が細胞組織に覆われていたものの直接材料と結合している部位も確認された。このサンプルは材料周囲の骨がスポンジ上になっていることから、皮質骨ではなく仮骨近傍で作製されたサンプルと推察される。再試験も含めた検討を行う必要がある。

続いて、これらのサンプルの明視野における新生骨の形成量を計測した。明視野において低石灰化骨は茶色に染められている。WinRoofを用いて茶色に染められた部位を検出し、その面積を測定した(図 11)。この結果から Si を含有したサンプルにおいて Si(0)と比較して優れた低石灰化骨の形成が確認された。また Si(0.8)と Si(2.4)を比較すると Si(0.8)がより優れた骨形成であったことが確認された。しかし Si(2.4)については前述のように再検討が必要と考えられる。

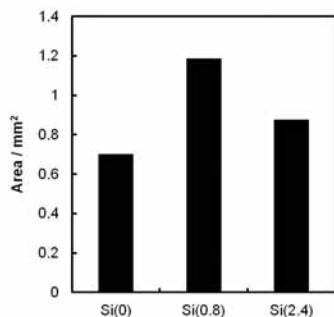


図 11. IP6-Si-HAp セメント周囲の低石灰化骨量

以上の結果から、IP6-Si-HAp セメントの *in vivo* における生体適合性は、4 週間の埋入後に試験動物に炎症の惹起などは確認されなかったことから、良好であったと評価できる。Villanueva bone stain による非脱灰研磨標本で各材料と骨との界面を観察した結果、材料周辺部に新生骨の形成が確認され、ホストの骨と結合していた。また、Si を含有させたサンプルは Si を含有していないサンプルに比べて優れた骨形成を示した。これらの結果から本材料は骨形成を促進する材料として期待される。

### 3. 考察及び今後の展望

ケイ素(Si)は生体必須微量元素のひとつで、人の健康を保つためには欠くことができない重要な元素である。高等動物の骨格はリン酸カルシウムからなるが、その形成にはケイ素が必須であることがニワトリやラットを用いた研究から明らかにされている[17,18]。ケイ素が不足するとニワトリでは骨格の発達が悪く、頭蓋骨の奇形が生じる[4]。また、Gibson らは Si を HAp に置換固溶させると、HAp の骨伝導性が向上することを報告している[13]。

そこで、本研究では、この骨形成能を促進させると考えられている Si を HAp に含有させることにより、骨誘導能を保持した新規のペースト状人工骨の開発を進めてきた。これまで超音波熱噴霧分解(USSP)法によりケイ素を置換したアパタイト(ケイ素含有アパタイト; Si-HAp)粉体を合成し、得られた粉体のキャラクタリゼーションを行なう

とともに、緻密なセラミックスを作製し、その上で骨芽細胞を培養すると骨芽細胞の分化を促進することを明らかにした[16]。なお、USSP 法は合成粉体の組成制御を行うことが容易であり、水蒸気雰囲気下で直接粉体を合成できるため HAp などの水酸基を含む化合物の合成に有利な方法である。この USSP 法により合成した Si-HAp 粉体を利用して、キレート硬化型セメントを試作し、その材料特性について調べたが、この方法で合成される微粒子は「球状」であり、所望の材料特性を得るに至らなかった。そこで、本研究では、Si-HAp の合成方法を見直し、湿式法により微細な粉体を合成して、これをセメント原料に適用し、その材料特性と骨芽細胞による *in vitro* 評価を行なった。

その結果、湿式法により微細な Si-HAp 粉体を合成し、ほぼ目的とする強度を備えたセメント試験片の試作に成功した。また、このセメントは骨芽細胞の増殖性を向上させるだけではなく、*in vivo* においても低石灰化骨の骨量を増加させることも明らかにしている。

今後は生体活性を高めるこれまでにない“骨誘導能”を保持した次世代型生体材料の創製に応用したい。

#### 【参考文献】

1. C. Lavernia, and J.M. Schoenung, *Am. Ceram. Soc. Bull.*, **70**, 95-100 (1991).
2. W. Cao, and L.L. Hench, *Ceram. Int.*, **22**, 493-507 (1996).
3. T.S.B. Narasaruju, and D.E. Phebe, *J. Mater. Sci.*, **31**, 1-21 (1996).
4. G. Willmann, *Br. Ceram. Trans.*, **95**, 212-216 (1996).
5. E. Schepers, M. Declercq, P. Ducheyne, and R. Kempeneers, *J. Oral Rehabil.*, **18**, 439-452 (1991).
6. G. Dalculsi, R.Z. Legeros, E. Nery, K. Lynch, and B. Kerebel, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 883-894 (1989).
7. W. Holand, W. Vogel, K. Naumann, and J. Gummel, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 303-312 (1985).
8. R.Z. LeGeros, M.A. Miravite, G.B. Quiroigico, and M.E.J. Curzon, *Calcif. Tissue Int.*, **22**, 362-367 (1976).
9. L.J. Jha, J.C. Best, S.M.J Knowles, I. Rehman, J.D. Santos, and W. Bonfield, *J. Mater. Sci., Mater.*, **8**, 185-191 (1997).
10. E.M. Carlisle, *Science*, **167**, 179-180 (1970).
11. A.J. Ruys, *J. Aust. Ceram. Soc.*, **4**, 83-88 (1993).
12. L. Boyer, J. Carpena, and J.L. Lacout, *Solid State Ion.*, **95**, 121-130 (1997).
13. I.R. Gibson, S.M. Best, and W. Bonfield, *J. Biomed. Mater. Res.*, **4**, 422-428 (1994).
14. S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J. Lee, S.C. Chung, and Y.H. Kim, *Biomaterials*, **24**, 1389-1398 (2003).
15. R. J. Anderson, *J. Biol. Chem.*, **17**, 141-150 (1914).
16. M. Honda, K. Kikushima, Y. Kawanobe, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **23**, 2923-2932 (2012).
17. K. Schwarz, and D.B. Milne, *Nature*, **239**, 333-334 (1972).
18. E.M. Carlisle, *J. Nutr.*, **106**, 478-484 (1976).

# 骨形成レベルを視覚化する評価・解析手法の確立(1)

## クサビラオレンジブタによるアプローチ

本田みちよ、長嶋比呂志

### 1. はじめに

骨は破骨細胞により吸収され、骨芽細胞により形成されることで微妙なバランスを保ちながら、新しく生まれ変わるが、骨粗鬆症の場合、このバランスが崩れ、骨吸収に傾く。現在我が国では約一千万人も骨粗鬆症患者がいてと推定されており、治療法・治療薬の開発が切望されている。開発に当たっては、骨代謝に関する研究を行うことが必須となるが、その際、器官培養系による総合的な評価に加え、個々の骨細胞の活性について理解することが重要である。しかし、現在多用されている株化細胞は生体内での骨芽細胞の機能が全て発現しているわけではなく、個々の細胞の特性を十分に理解できるとは言えない。そのため、より生体に類似した機能を有する骨芽細胞を単離することが重要である。そこで、本研究では、生体に類似した機能を有する骨芽細胞を単離し、その生化学的評価を実施することを目的とした。なお、本研究では、ヒトと類似した生物学的要素を有する大型動物であるブタに注目し、一度に多量の細胞を単離することが可能な実験方法を確立することを目標とした。

クサビラオレンジ(humanized Kusabira-Orange; huKO)ブタ(図 1)はサンゴ由来の赤色蛍光タンパク遺伝子を導入したブタで全ての組織が赤色蛍光を示す[1]。



図 1. クサビラオレンジ新生仔ブタ

通常、生体材料の生物学的な評価を実施する際には材料と細胞との相互作用を理解することが非常に重要となるが、現在、その相互作用を調べるためには細胞の固定や溶解などといった操作を行った後に観察、解析しなければならない。しかし、huKOブタ由来の細胞を用いることにより、細胞を生きた状態のまま観察することが可能となる。これは細胞をより生体に近い状態で観察できるだけでなく、一つの細胞群での経時的な変化も解析することを可能とする。そこで、本研究では、huKO頭蓋骨より骨芽細胞

を、また新生児大腿骨より間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)を単離し、さらに異なる材料基材における細胞の増殖・分化・形態を調べ、細胞の応答性を比較し、解析した。MSCは骨、軟骨、心臓、脂肪、神経などの多種類の細胞に分化する能力を有しており、再生医療にも適応されている[2]。胚を利用する胚性幹細胞(ES細胞)に比べ、生命倫理上のハードルは低く、また、人工多能性幹細胞(iPS細胞)と比較すると癌化のリスクが低いと考えられている[3-5]。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 クサビラブタ頭蓋骨由来骨芽細胞株樹立

実験は以下のような手順ですすめられた[6]。分娩直後のhuKOブタの頭蓋骨片(3×3 cm程度)を3×3 mm程度に細かく切断し、濾過滅菌済2 ml 0.1%コラゲナーゼおよび0.2%ディスパーゼ含有0.01 M phosphate buffered saline (PBS)にて処理した。頭蓋骨片10個あたりに上記の酵素処理液2 mlを50 ml遠沈チューブに入れて、37°C、10分間、振とうさせた。上清のみを100 μmセルストレーナーで濾過した。新しい酵素処理液を添加して、同様の操作を繰り返した。5回目の濾過液に10% FBS/α-MEMを6 ml添加し、毎分2,000回転で5分間遠心した。細胞ペレットを確認し、上清を吸引し、新しい10% FBS/α-MEMを10 ml添加した。細胞塊を静かにピペッティング後、細胞懸濁液を100 mmカルチャーディッシュ上へ播種した。1日おきに培地交換を行い、70~80%のコンフルエント状態まで増殖させた。

他方、骨移植片培養法については、以下の通りである。骨片を2~3 mm大に細切し、これらをディッシュに数個の骨片を入れ、10%のFBSを含むα-MEM培地中、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で培養した。数日後、骨片から細胞が多数遊出してきた細胞をTrypsin-EDTAにより剥離した後、適切な細胞数に希釈した細胞をディッシュへ再度播種し、培養を行った。

huKO新生仔ブタの頭蓋骨片を連続的に酵素処理することにより、骨芽細胞様細胞を分離した(図 2)。得られた細胞を蛍光顕微鏡により観察するとクサビラオレンジ遺伝子由来のオレンジ色の発色が認められた。

次に、得られたhuKO細胞を7日間培養した後、cDNA poolを合成した。それを鋳型にRT-PCRを行い、単離した細胞が骨芽細胞であるかどうかを骨分化関連マーカー遺

伝子の発現から評価した(図 3)。その結果、様々な分化段階における骨関連遺伝子の発現が認められ、単離した細胞が骨芽細胞であることを同定した。また、各種マーカー遺伝子の発現が確認されたことから、単離した huKO 細胞群は株化細胞とは異なり、様々な分化段階にある細胞集団であることが明らかになった。

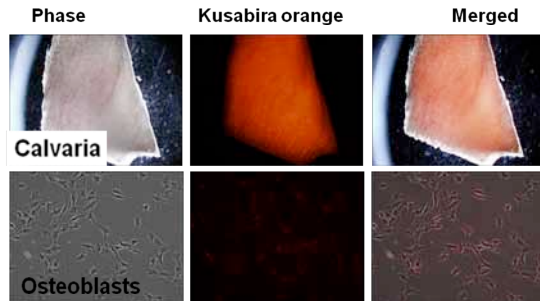


図 2. 頭蓋骨から単離した骨芽細胞様細胞

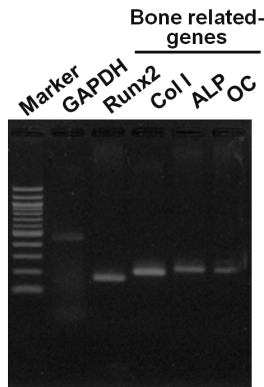


図 3. 頭蓋骨から単離した骨芽細胞様細胞における骨分化マーカー遺伝子の発現

さらに、得られた huKO 細胞を一定期間培養し、骨芽細胞の代表的な分化マーカーである ALP の活性染色を行ったところ、全ての細胞は紫色に染色され、また培養日数の経過と共にそれらの細胞は紫色に濃染されたことから高い分化能を有する骨芽細胞であることが分かった。続いて、この単離した huKO 骨芽細胞と骨芽細胞の株化細胞である MC3T3-E1 細胞についてその分化能を比較するために ALP 活性染色を実施した。その結果、huKO 細胞は培養した全ての期間において、MC3T3-E1 細胞よりも著しく高い活性を有することが明らかになった(図 4)。

しかし、単離した huKO 細胞を継代培養し、長期的な培養を継続したところ、ALP 活性の低下が認められ、初期の分化能が損なわれることが分かった。このことから、高い分化能を維持したまま細胞を培養するためには、継代は 2 回程度までとするのがよいと考えられた。

さらに、単離した細胞を緻密な水酸アパタイト(HAp)セラミックス上へ播種し、その形態観察を行った(図 5)。通常、光を透過しないセラミックス上で細胞の形態を観察するには細胞の固定、膜処理、蛍光染色といった操作を経る必要があるが、単離した huKO 細胞ではその工程を省くことができ、ポリスチレンプレート上の細胞を観察する時と同じように生きたままの細胞の形態を蛍光下で直接観察することができた。このように非透過性の生体材料上で

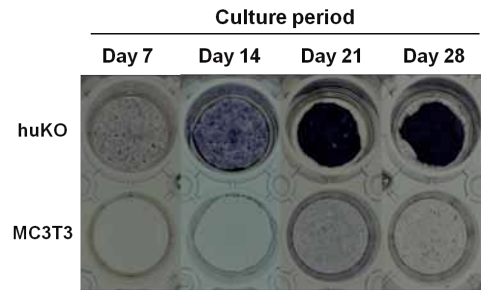


図 4. huKO 由来骨芽細胞と MC3T3-E1 細胞における ALP 活性の比較

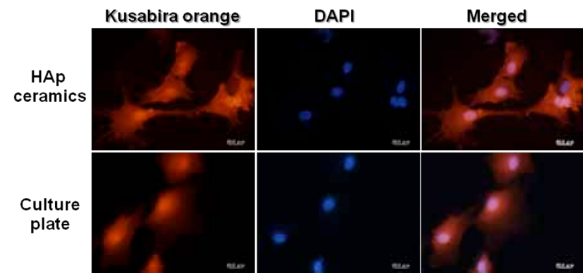


図 5. HAp セラミックスおよび培養プレート上での huKO 由来骨芽細胞の形態観察

非侵襲的に細胞の形態を経時的に観察することができることは、材料と細胞との相互作用を理解する上で非常に有益であり、単離した細胞は様々な生体材料の評価に使用可能であると考えられる。さらに、本研究では、頭蓋骨の一部を利用し、細胞の単離・同定・評価を行ったが、新生仔ブタ頭蓋骨を用いれば、一度に多量の細胞も単離可能であると思われる。したがって、連続酵素消化法により新生仔 huKO ブタ頭蓋骨からより生体に近い状態の骨芽細胞を単離する本法は有用な方法であると判断できる。

## 2.2 クサビラオレンジ新生児ブタ由来 mesenchymal stem cell (MSC)の単離と培養技術の確立

クサビラオレンジ新生児ブタ由来間葉系幹細胞の単離には、生後 1 週齢のクサビラオレンジ(humanized kusabira orange; huKO) 新生児ブタ(約 3 kg)を犠牲にし、両足大腿骨を用いた(明治大学農学部、長嶋教授ご提供)。以下に示す方法で間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)を単離した。

大腿骨の骨端をノミで割り落とし、骨端を落とした骨は 100 mm dish に入れて、乾燥しないように PBS に浸漬した。シリンジを使い、抗生物質含有 PBS(-)で骨髄を灌流し、出てきた液を 70  $\mu$ m セルストレイナーで濾過した。濾液を遠心分離(310 g x 5 min, 室温)し、上清除去後、PBS(-) 50 ml で懸濁した。懸濁液をさらに 40  $\mu$ m セルストレイナーで濾過し、濾液を遠心分離(310 g x 5 min, 室温)した。上清を除去した後に、培養培地 10 ml で懸濁し、細胞数をカウントした。この際、チュルク液とトリプブルーを加えてカウントを行った。翌日、PBS(-)で洗浄した後に培地交換を行った。その後、3-4 日間ごとに半培地交換を行った。なお、培養液には、20%FBS/D-MEM を使用した。

続いて、得られた MSC の分化誘導は以下の手順で行な



った。MSC は骨、脂肪、軟骨、筋肉など様々な組織の細胞に分化することが可能である。そこで、今回単離した細胞が多分化能を有する MSC であるかを評価するために、はじめに骨(芽)細胞と脂肪細胞への分化誘導を行った。

上記で培養した細胞を 24 well plate へ播種し直し、コンフルエントになるまで培養した。その後、各細胞へ分化誘導することができる培地(Osteogenesis Differentiation medium, Adipogenesis Differentiation medium (Gibco))を用いて、分化誘導を行った。なお、分化の評価には、骨(芽)細胞は ALP 活性染色および Osteoimage Mineralization assay (Lonza)を用い、脂肪細胞は Oil Red O 染色および Lipidtox (Invitrogen)を用いた。

はじめに、得られた MSC の分化能について調べるために、脂肪細胞と骨細胞への分化について検証した。細胞をコンフルエントになるまで培養した後、各細胞専用の分化誘導培地を用いて、培養を行い、誘導 7 日目と 14 日目の細胞の形態および分化マーカーの発現などを観察した。誘導 7 日目における MSC の脂肪細胞への分化能を調べた結果、脂肪が存在すると緑色の蛍光が確認される Lipidtox は分化誘導していないもの(Non), 脂肪細胞へ分化誘導したもの(Adipocyte), 骨細胞へ分化誘導したもの(Osteoblast)いずれにおいても同程度に認められ、その蛍光は非特異的なものであることが考えられた(図 6)。また、Oil red O 染色も行ったが陽性反応は認められなかった(data not shown)。このことから、誘導 7 日目では脂肪細胞へは分化していないことが明らかになった。

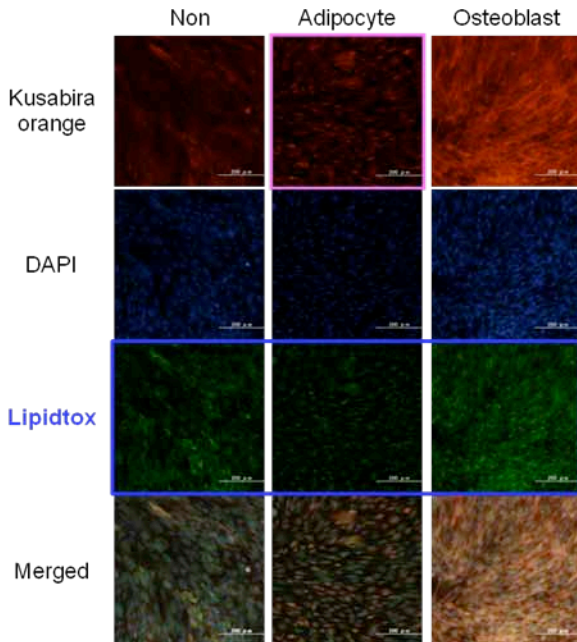


図 6. huKO MSC の脂肪細胞への分化 (誘導 7 日目)

続いて、骨細胞への分化能を ALP 活性染色(図 7a)と Mineralization assay (図 7b)を用いて検証した。ALP 活性染色の結果、Osteoblast > Non > Adipocyte の順に活性が高いことが分かった。特に、骨細胞へ分化誘導した細胞(Osteoblast)では、強い ALP 活性を示した。しかし、シート状になった細胞は dish に接着し続けることが困難で一部剥離した細胞が存在した。他方、Non においても、ALP

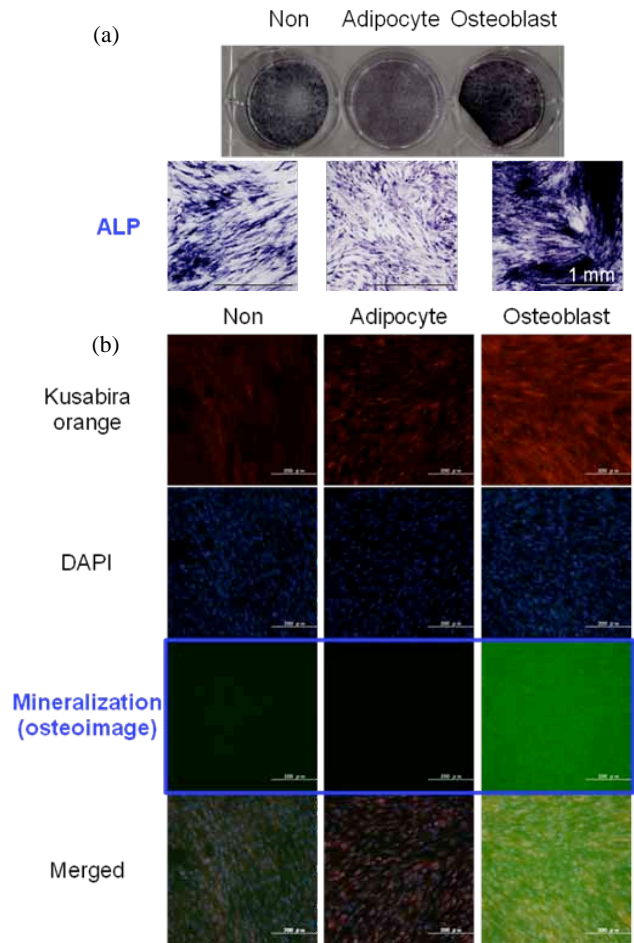


図 7. huKO MSC の骨細胞への分化 (誘導 7 日目)

(a) ALP stain, (b) Osteoimage Mineralization assay

positive な細胞が多く認められたことから、増殖培地を用いて培養しても、骨細胞への分化が進行してしまうことが分かった。Mineralization assay では、Osteoblast のバックグラウンドが高くなっていましたが、特異的な蛍光は確認できなかったことから、石灰化はまだ起こっていなかったと推測される。

さらに、誘導 14 日目の分化能について調べたところ、Adipocyte にのみ Lipidtox に反応した脂肪滴が確認された(図 8)。増殖培地(Non)でも骨細胞への分化が進行してしまったことから、脂肪細胞へ分化する割合が低減してしまったため、脂肪滴が確認できるまでに時間を要したと考えられる。なお、脂肪滴は他の培地を用いた場合には確認されなかった。骨分化に関しては、7 日目と同様に、Non においても ALP positive 細胞が多数観察され、骨細胞特有な配行性を示した(図 9a)。Adipocyte は僅かに紫色を呈したが、他の 2 条件と比較すると明らかに淡染色であったことから、骨への分化は抑制されていることが分かる。一方、骨細胞へ分化した Osteoblast に関しては、細胞が完全に剥離してしまい、残った一部の細胞でしか評価できなかったが、細胞塊は強い ALP 活性を示し、さらに Mineralization assay においても Osteoblast でのみ石灰化が観察されたことから、骨化が優先的に進行していることが明らかになった(図 9b)。以上のことから、今回単離した MSC は脂肪細胞や骨細胞へ分化可能な多分化能を有する細胞であることが分

かった。

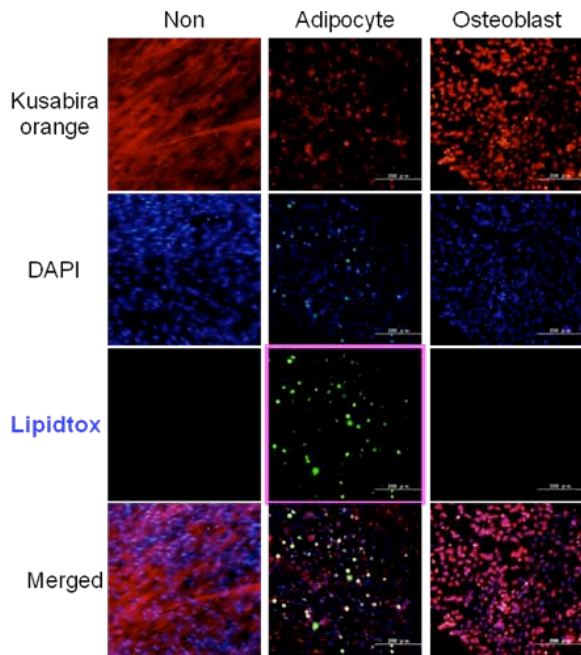


図 8. huKO MSC の脂肪細胞への分化 (誘導 14 日目)  
Non Adipocyte Osteoblast

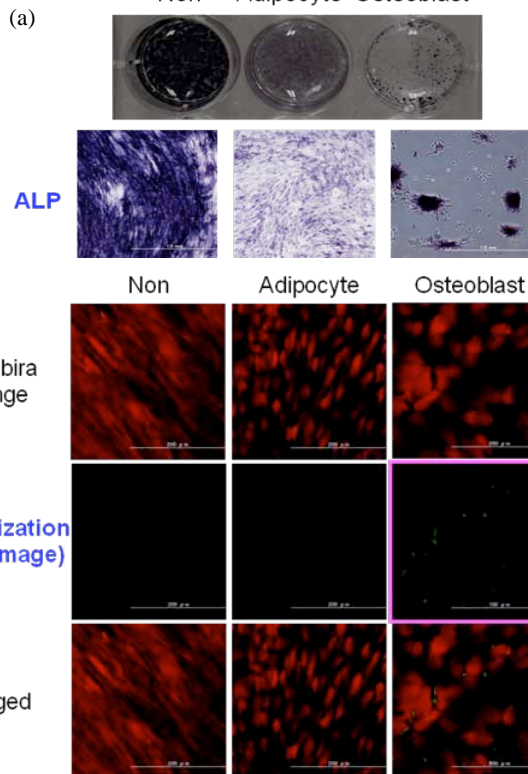


図 9. huKO MSC の骨細胞への分化 (誘導 14 日目)  
(a) ALP stain, (b) Osteoimage Mineralization assay

しかしながら、一般的に骨髄より採取した細胞に含まれる MSC の割合は極めて低いことから、本実験においてもその割合は低かったことが推測できる。高純度の MSC を単離するためには、FACS でソートをかける必要があるが、そこまでしなくとも、ficoll などを用いて細胞の精製を行うことで純度を向上させることが可能であると考えられる。高い分化能と様々な組織への分化能を有する MSC を

単離することができれば、材料評価にも広く応用できると期待できる。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究より、ブタ新生仔頭蓋骨から分離した細胞は優れた分化能を有する骨芽細胞であったということが明らかになった。複数のクローン間で細胞増殖や分化について検討した。各クローン間での有意な差は認められなかったが、増殖・分化の優れたクローンを検索するには最低 14 日程度の培養を実施し、評価すべきであるということがわかった。しかし、形態から判断予想ができればもう少し短期間での評価が可能となると考えられる。いずれにしても本法で細胞の分離を実施することにより、骨分化能を有した骨芽細胞を単離できることが示された。

一方、huKO 新生仔ブタ大腿骨からも多分化能を有する MSC を単離することができた。しかしながら、使用した培地(20%FBS/D-MEM)では骨細胞への分化が進行したと考えられ、脂肪細胞への分化はわずかであった。また、一般的に骨髄より採取した細胞に含まれる MSC の割合は極めて低いことから、本実験においてもその割合は低かったことが推測できる。高純度の MSC を単離するためには、FACS でソートをかける必要があるが、そこまでしなくとも、ficoll などを用いて細胞の精製を行うことで純度を向上させることが可能であると考えられる。高い分化能と様々な組織への分化能を有する MSC を単離することができれば、材料評価にも広く応用できると期待できる。

また、今回の実験で培養開始時に用いる培地を十分に吟味する必要があることも分かった。骨細胞への分化が優先的に起こってしまうと他の組織の細胞への分化は抑制されてしまうことが考えられる。多分化能を維持した MSC の単離が最重要であると思われる。

#### 【参考文献】

1. H. Matsunari, M. Onodera, N. Tada, H. Mochizuki, S. Karasawa, E. Haruyama, N. Nakayama, H. Saito, S. Ueno, M. Kurome, A. Miyawaki, and H. Nagashima, *Cloning Stem Cells*, **10**, 313-323 (2008).
2. M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, M.A. Moorman, D.W. Simonetti, S. Craig, and D.R. Marshak, *Science*, **284**, 143-147 (1999).
3. J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones, *Science*, **282**, 1145-1147 (1998).
4. K. Takahashi and S. Yamanaka, *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
5. M. Nakagawa, M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochizuki, N. Takizawa, and S. Yamanaka, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 101-106 (2008).
6. A.D. Bakker and J. Klein-Nulend, *Meth. Mol. Biol.*, **816**, 19-29 (2012).

# 骨形成レベルを視覚化する評価・解析手法の確立(2)

## — 遺伝子導入による double color 遺伝子導入 osteoblasts の創出 —

神澤信行、大杉仁美、初川淳一

### 1. はじめに

我が国では超高齢社会の到来に伴い、骨粗鬆症等の骨疾患に苦しむ患者の方々が増加している。そのため、我々は、骨疾患患者の Quality of Life の維持あるいは向上の実現を目指して、水酸アパタイト (HAp) 表面をイノシトールリン酸 (IP6) で修飾し、IP6 のキレート作用により硬化する「キレート硬化型骨修復 (IP6-HAp) セメント」を創製した。また、我々は IP6-HAp セメントの多機能化をはかり、キレート硬化型骨修復セメントに「骨誘導能」・「抗菌性」・「抗腫瘍効果」の3つの機能を付与した多機能性キレート硬化型骨修復セメントの開発を進めている。我々はこの3つの機能の中でも「骨誘導能」に着目し、骨修復セメントの骨誘導能評価方法の検討を試みている。

#### 1.1 骨誘導と骨分化解析

骨誘導とは骨外部に骨を形成するプロセスとして定義され、非骨芽細胞を骨芽細胞に分化させ骨を形成するプロセスを含んでいる。そのため生体材料の骨誘導能は、主にその材料上で未分化細胞を培養し、その細胞の骨分化過程を解析することで評価することが出来る。細胞の骨化過程の解析には alkaline phosphatase (ALP) や type I collagen (Colla1)、bone sialoprotein (BSP) や osteocalcin (OC) などの骨分化マーカー遺伝子の発現解析などの分子生物学的手法[1]、骨分化マーカータンパク質や STRO-1 [2] や SB-10 [3]、HOP-26 [4] といった細胞表面抗原に対する免疫染色などの免疫組織化学的手法、そして ALP 染色やアリザリンレッド染色などの各種染色法などが主に用いられている。これらの手法はいずれも細胞を回収もしくは固定化する必要があり、継続的な観察に不向きである。またこれらの実験操作は複雑な作業を伴うため実験技術の習得が必要で、かつ時間とコストもかかるといったデメリットがある。そのため、より簡便で迅速な評価方法が必要とされている。我々は新たな評価システムを構築することで、骨修復セメント開発の迅速化に貢献出来ると考えている。

#### 1.2 蛍光タンパク質の利用

骨誘導能評価システムの新しい手法として有用だと考えられるのが蛍光タンパク質の利用である。蛍光タンパク質とは 1960 年代にオワンクラゲから単離された Green Fluorescent Protein (GFP) に代表されるように[5]、ある特定の波長の光をあてると蛍光を発するタンパク質のことで

あり、現在までに研究・改良が進められ様々な色の蛍光を発するタンパク質が同定・製品化されている。GFP は遺伝子発現とタンパク質間相互作用を生きた細胞内でリアルタイムに可視化でき、fluorescence-activated cell sorting (FACS) 技術により細胞亜種を単離出来るといった応用例から注目を集めている。本研究でもそれらの特徴を利用し、蛍光タンパク質を骨分化マーカー遺伝子の promoter によって細胞内で発現させることで、細胞を生かしたままリアルタイムで骨分化マーカー遺伝子の発現を可視化することにした。これにより、RNA 抽出や染色などの複雑な操作を行うことなく顕微鏡観察のみで骨分化過程の解析行えるようになるため、上述の障害を克服できると言える。また GFP の蛍光は真核細胞において定量的であるという報告があるため[6]、簡便だけでなく骨誘導の定量解析が行えると考えられる。骨形成に関する分野では現在までに GFP を type I collagen promoter のレポーターとして promoter 活性の解析に用いる他に、骨髄間質細胞などにおける骨分化集団の単離や[7,8]、骨形成能を持った薬剤や生物活性物質のスクリーニングなどに用いた例[9,10]が報告されている。しかし、二種のプロモーターに異なる蛍光タンパク質を繋ぎ、骨化過程を経時的に観察出来る系はこれまでに存在しない。この方法を用いれば、セメントの骨誘導能を顕微鏡で観察するだけで評価でき、迅速、簡便な評価が可能となる。

## 2. 実験と結果

### 2.1 蛍光タンパク質発現コンストラクトの作製

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様樹立細胞株 MC3T3-E1 を 10-cm dish で培養し、genome DNA を抽出した。この genome DNA を template として PCR により、各 promoter 配列を増幅した。Type I collagen の promoter である colla1 (約 2.3 kbp) は 5'-AAGCTTGGAACCCATTGCC-3' と 5'-TCTAGACCCTAGACATGTAGA-3' の primer により増幅し、osteocalcin の promoter である OG2 (約 1.0 kbp) は 5'-AAGCTTGAATTGCTCATCGCAGC-3' と 5'-TGCACCCTCCAGCATCCA-3' の primer で増幅した。それぞれ増幅された promoter 配列は pGEM T-easy Vector にクローニングし、配列の確認を行った。図 1 に示す様にクローニング済みの colla1 については promoterless 蛍光タンパク質発現 vector の pmCherry-1 と、OG2 については同様



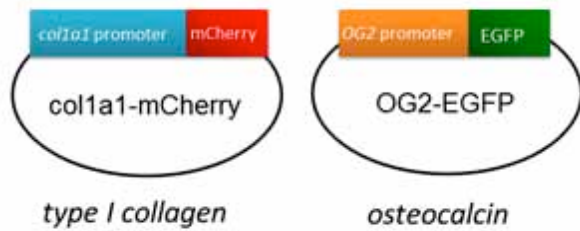


図 1. 発現コンストラクトの模式図

Type I collagen の promoter は mCherry の上流に、osteocalcin の promoter は GFP の上流に繋ぎ、発現解析用プラスミドを構築した。

に pEGFP-1 と *Eco* RI および *Hin* dIII のサイトを使い ligation し、形質転換用のプラスミドを構築した。

## 2. 2 遺伝子導入

形質転換の前日に細胞数を計測し、翌日に 90% コンフルエントになるように 6-well plate に MC3T3-E1 細胞を播種した。定法に従い、Lipofectamine™2000 (Invitrogen) を用いて、細胞に各プラスミド遺伝子を導入した。その後、G418 を 400 µg/ml 含んだ α-MEM 培地で 1 週間に 2 回培地交換しながら培養し、2 週間後に G418 耐性コロニーが形成されるのを確認した。シングルコロニーを単離し、希釈培養する事で、コロニー精製を行った。

## 2. 3 蛍光顕微鏡による経過観察

Colla1 promoter を導入したものはその 1 週間後、OG2 promoter を導入したものはその 10 日後に蛍光顕微鏡で細胞を観察した。そこで蛍光が観察された細胞を精製・継代し、さらに同様の期間培養した後に顕微鏡で観察し(図 2)、3 次スクリーニングでも蛍光が確認された細胞を、安定導入遺伝子細胞株としてその後の実験に用いた。

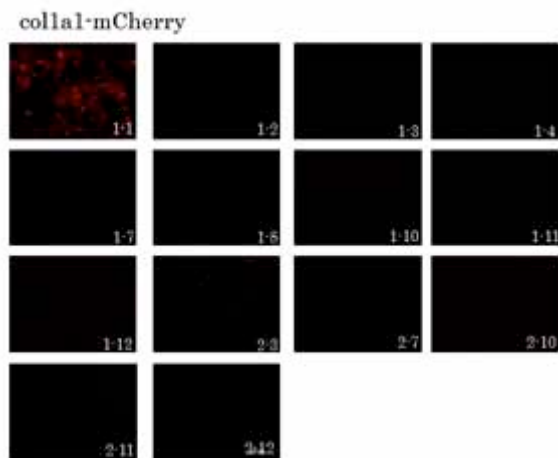


図 2. 遺伝導入後の 2 次スクリーニングの一例

Type I collagen の promoter を mCherry の上流導入したプラスミドで細胞を形質転換した。1 次スクリーニングでポジティブでも、2 次スクリーニングでは蛍光が失われてしまうものが多く、安定に導入できた細胞だけを 3 次スクリーニングに回した。

## 2. 4 Double color 遺伝子導入細胞の作製と観察

Colla1-mcherry を安定に発現する細胞を選び出し、同細胞に対して、上記と同様に OG2-EGFP を遺伝子導入し、安定株の単離を行った。この際、OG2-EGFP には hygromycin 耐性遺伝子を融合し、hygromycin (100 µg/ml) と G418 による二重選択を行った。その結果、図 3 に示す様に、培養期間によって同一細胞内で異なる蛍光発色を示す細胞が単離・精製出来た。分化誘導培地で培養開始後 4 日目(day4)においては、赤色蛍光を発する細胞が多く、緑色蛍光を発する細胞が少ないのに対し、経目的に赤色蛍光を発する細胞は減少し、緑色蛍光を発する細胞が増加している様子が観察された。Day7 では両蛍光が重なり、黄色の細胞として観察する事も出来た。このことから、2 色の蛍光の発現様式が骨分化マーカー遺伝子の既知の発現様式と一致していると考えられた。また、21 日間経っても GFP の蛍光を確認できたことから、プラスミドが 2 種類の選択抗生物質 (G418 と hygromycin) を用いてスクリーニングした事で安定的に導入されたと考えられた。

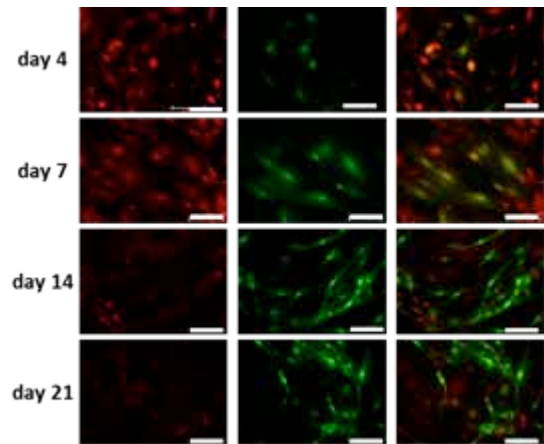


図 3. 蛍光顕微鏡を用いた double color 遺伝子導入細胞の観察  
2 種のプラスミドを導入した MC3T3-E1 細胞を分化誘導後 4, 7, 14, 21 日目に観察した。左のパネルは col1a1 の発現を中央のパネルは OG2 の発現をそれぞれ観察し、右のパネルはそれらを重ね合わせたものである。

## 2. 5 Double color 遺伝子導入細胞の増殖性評価

Double color 遺伝子導入細胞の増殖能と形態について、野生型の MC3T3-E1 細胞と比較した。遺伝子導入はゲノム上にランダムに起こる事から、細胞の生存や増殖、分化等に影響をあたえることが考えられる。そこで分化誘導培地で細胞を経目的に培養し、増殖曲線の作成と位相差顕微鏡による細胞の形態観察を行った(図 4)。

その結果、増殖曲線には野生型の細胞との差はみられず、遺伝子導入したことによる増殖能への変化はないものと考えられた。しかしながら形態観察を行うと、野生型の細胞ではあらゆる方向に足をのばして、広々と張り付いている様子が確認されたのに対し、double color 遺伝子導入細胞は細長い形態をしている細胞が多く、二つの方向に足をのばしていることが観察された。2 種類のコンストラクトを挿入していることから、挿入した時もしくは細胞のスク

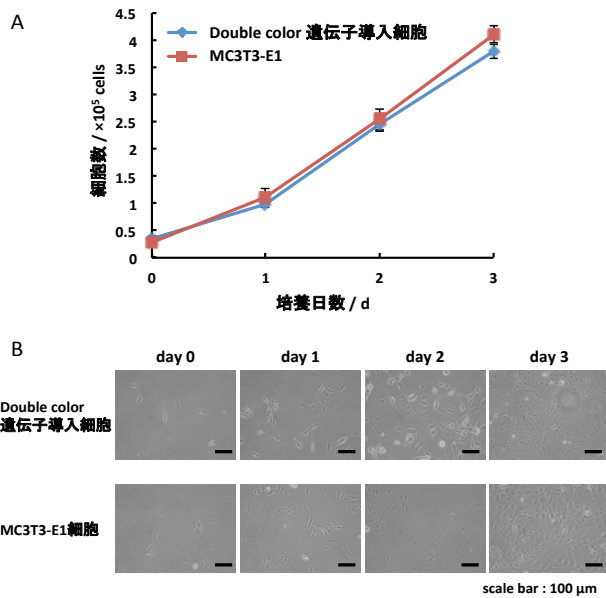


図 4. Double color 遺伝子導入細胞の増殖性評価と形態観察  
Double color 遺伝子を導入した細胞について、その細胞増殖性(A)と形態(B)について経時変化を追って野生型 MC3T3-E1 細胞と比較した。

リーニングを行う際に使用する選択抗生物質が細胞の形態に影響を及ぼしたことが考えられた。詳細には付いては今後の解析が必要である。

## 2. 6 Double color 遺伝子導入細胞の遺伝子発現解析

蛍光タンパク質の遺伝子発現が、内在する骨分化マーカー遺伝子の発現と対応しているかどうかを確認するため、double color 遺伝子導入細胞を分化誘導培地で経日的に培養し、RNA 抽出および RT-PCR を行って遺伝子発現を解析した。増幅した各遺伝子は内部標準である *gapdh* のバンド強度で標準化し、各遺伝子の平均バンド強度を 1 として相対バンド強度をグラフにした(図 5)。その結果、骨化の初期マーカーである Type I Collagen の発現は培養初期に高く、後期に低下していく傾向を示した。これと同じ様に、*mCherry* 遺伝子の発現は培養初期に高く後期に低下した。また、骨化の後期マーカーである *osteocalcin* と *EGFP* の発現はどちらも培養初期には低く抑えられ、後期に向けて高くなっていることが確認出来た。このように蛍光タンパク質の遺伝子としての発現量は、内在するマーカー遺伝子の発現量とよく対応する事が分かった[11]。また、蛍光観察の結果ともよく一致し、遺伝子の発現を蛍光の発光量として捕らえる事が期待出来る。上記の様な結果から形質転換細胞の作製に成功したと考えられる。

## 2. 7 Double-color 遺伝子導入細胞の ALP 活性評価

骨分化後期マーカーである *osteocalcin* は分化した骨芽細胞によって合成されるのに対して、ALP は未分化な骨芽細胞活性を反映する。従って ALP の活性を測定する必要もあると考えた。通常細胞と double color 遺伝子導入細胞とで経目的にどの様に ALP 活性が変化するかを調べた。

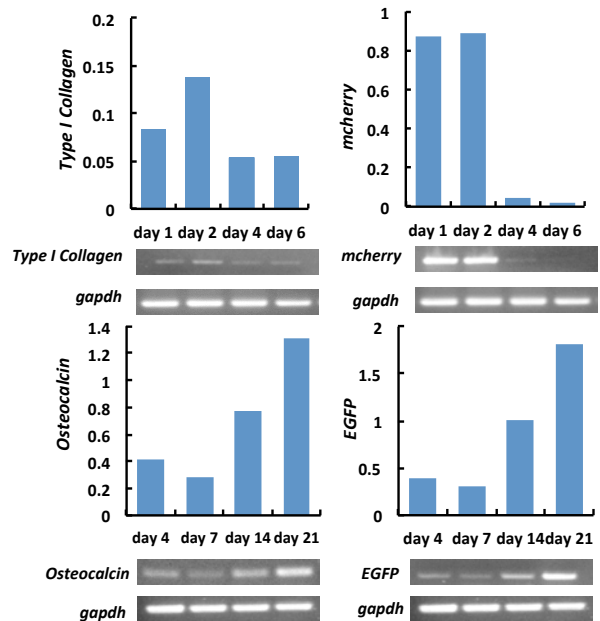


図 5. Double color 遺伝子導入細胞の遺伝子発現解析  
Double-color 遺伝子を導入した細胞について、実際にそのマーカー遺伝子の発現と、内在性のマーカー遺伝子の発現が同期しているかを確認するため、RT-PCR によって遺伝子発現解析を行った。

(図 6)。その結果 day 14 までは両細胞とも同じような活性を示した。しかしながら day 21 において double color 遺伝子導入細胞において著しい活性の減少が見られた。過去の ALP 活性染色の結果と合わせると、継代を重ねた細胞では培養後期に活性の速やかな低下が見られることが示唆され、今後精査する必要があると考えられる。

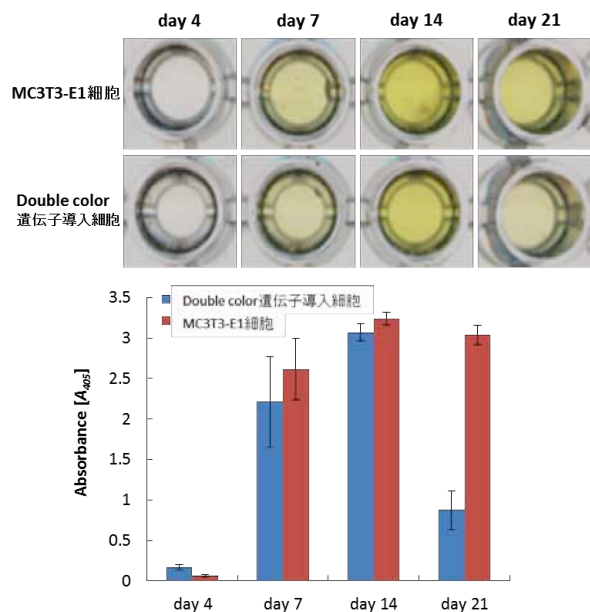


図 6. Double color 遺伝子導入細胞の ALP 活性評価  
分化誘導培地で培養開始後 21 日目までの細胞について、ALP 活性を測定し比較した。上段は活性測定時の発色の様子。下段は吸光度測定の結果をグラフ化した。



## 2. 8 Double color 遺伝子導入細胞の石灰化の解析

増殖曲線における増殖挙動の解析で得られた結果から、増殖能に問題ないことが確認できた一方で、野生型の MC3T3-E1 細胞との比較実験で day 21 において ALP 活性に差がみられたため、分化誘導培地で MC3T3-E1 細胞と double color 遺伝子導入細胞を 21 日間培養し、Alizarin red 染色により石灰化状態を解析した(図 7)。その結果、分化誘導促進剤を添加していない DEX 0 nM と DEX 10 nM を添加した場合、細胞の染色は両細胞ともに確認されなかった。しかし、ハイドロコルチゾンを含む骨芽細胞分化試薬を添加した場合は両細胞共に赤く染色されていることが確認できた。よって、増殖曲線の結果と合わせて double color 遺伝子導入細胞の正常な成長・分化を確認することが出来た。しかし、DEX は分化誘導促進剤といわれているのにも関わらず、今回の実験では石灰化が起こらないことが確認でき、過去に報告された通り、最適化された濃度以外では石灰化を抑制していることが示唆された[12]。学術論文にも石灰化を抑制するという報告が多くされている事から、今後はハイドロコルチゾンを含む骨芽細胞分化試薬を添加して double color 導入遺伝子体を培養していくこととする。

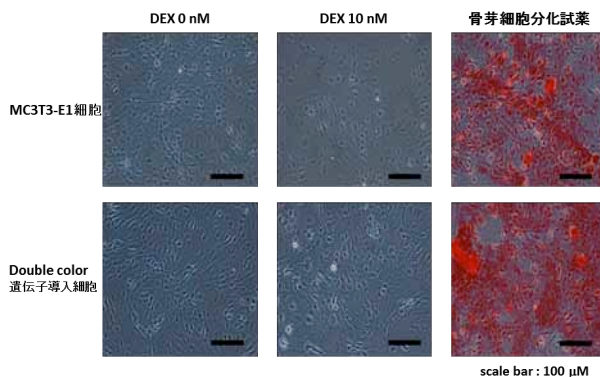


図 7. Alizarin red 染色による石灰化の解析

Double color 遺伝子を導入した細胞について、実際にそのマーカー遺伝子の発現と、内在性のマーカー遺伝子の発現が同期しているかを確認するため、RT-PCR によって遺伝子発現解析を行った。

## 3. 考察及び今後の展望

二種類のコンストラクトを挿入した MC3T3-E1 細胞は、蛍光顕微鏡での観察結果と遺伝子発現解析結果をふまえると、骨分化マーカー遺伝子の発現に対応して蛍光タンパク質が経目的に発現していることが確認された。また増殖曲線の作成、ALP 活性測定、石灰化の解析結果から、二種類のコンストラクトを MC3T3-E1 細胞に挿入しても、増殖能や骨分化能は通常細胞と差がみられないことが確認できた。

しかし、目的の遺伝子が genome 上のどの部位に挿入されたかを特定する必要がある。今回 genomic PCR で導入遺伝子体の genome への組み込みを確認するために PCR により目的配列の増幅を試みたが、非特異のバンドが多く検出されてしまい、目的サイズのバンドを確認することができ

なかった。今後、再度 genome を抽出し、genomic PCR を行っていく必要がある(data not shown)。

今後は導入遺伝子細胞を用いた応用実験を行なっていく。具体的には生体材料の早期実現化に向けて、この細胞を用いた評価を行っていくとともに、まだ分化誘導培地として条件が定まっていない培地の検討もこの細胞を用いれば遺伝子発現解析などの方法よりも正確なデータが出せると考えている。

### 【参考文献】

1. I. Kalajzic, Z. Kalajzic, M. Kaliterna, G. Gronowicz, S.H. Clark, A.C. Lichtler, and D. Rowe, *J. Bone Miner. Res.*, **17**, 15-25 (2002).
2. P.J. Simmons and B. Torok-Storb, *Blood*, **78**, 44-62 (1991).
3. S.P. Bruder, N.S. Ricalton, R.E. Boynton, T.J. Connolly, N. Jaiswal, J. Zaia, and F.P. Barry, *J. Bone Miner. Res.*, **13**, 655-663 (1998).
4. C.J. Joyner, A. Bennett and J.T. Triffitt, *Bone*, **21**, 1-6 (1997).
5. O. Shimomura, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 5590-5602 (2009).
6. M.R. Soboleski J. Oaks, and W.P. Halford *FASEB J.*, **19**, 449-442 (2005).
7. M.L. Stover, C.K. Wang, M.B. McKinstry, I. Kalajzic, G. Gronowicz, S.H. Clark, D.W. Rowe, and A.C. Lichtler, *Mol. Ther.*, **3**, 543-550 (2001).
8. A. Balic and M. Mina, *Orthod. Craniofac. Res.*, **8**, 252-258 (2005).
9. K. Jang, K. Sato, K. Igawa, U.I. Chung, T. Kitamori *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 825-832 (2008).
10. Y. Takahashi, S. Tsuji, Y. Kazuki, M. Noguchi, I. Arifuku, Y. Umebayashi, T. Nakanishi, M. Oshimura, and K. Sato, *J. Biochem.*, **148**, 29-34 (2010).
11. A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, and A. Miyawaki, *Cell*, **132**, 487-498 (2008).
12. Y.F. Chou, W.B. Huang, J.C.Y. Dunn, T.A. Miller, and B.M. Wo, *Biomaterials*, **26**, 285-295 (2005).

# 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(1)

## —銀含有アパタイトによるアプローチ—

本田みちよ、石井 賢、川延勇介、清水友亮、相澤 守

### 1. はじめに

骨疾患患者の生活の質(quality of life; QOL)の向上をめざすためにはより高度な先進医療を実現する必要がある。現在、骨疾患の治療法には自家骨移植が多く行われているが、健常部位への二次的な侵襲や採取量の限界といった問題があり、自家骨に代わる人工材料の開発に注目が集まっている。

これまでに水酸アパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)などのバイオセラミックスを利用した骨補填剤が整形外科などの領域で臨床応用されており、その材料形状には緻密体・多孔体・顆粒・セメント(ペースト状人工骨)などがある。そのなかでも任意の形状に成形可能なセメントは、よりニーズの高い材料であり、その開発にも期待が高まっている。また、このペースト状人工骨を用いた骨セメント注入療法は低侵襲性という点で患者への負担を軽減できることから、医療現場からのニーズは高まる一方で、国内外の熾烈な競争を生んでいる要因の一つと考えられる。しかしながら、現在臨床現場で利用されているセメントは硬化時における力学特性や生体適合性を含め、多くの問題を抱えているのが現状である。

そこで、我々は現状の問題(硬化時間、pH変動、体内への残存など)を解決するために、「イノシトールリン酸(inositol hexaphosphate; IP6)」のキレート作用を利用して従来の反応とは異なったメカニズムで硬化する新規の骨修復セメントの開発を行っている[1]。さらに、医者も患者も安心して使用することができるセメントを創製するために、このセメントに新たな機能を付与し、単なる骨セメントとしてではなく、その用途を拡充させた高機能セメントの作製も試みている。ここでは、キレート硬化型骨修復セメントとそれに新たな機能として「抗菌性(感染防止)」を付与したセメントについて報告する。

抗菌性を付与させる理由には、外部から埋入部への細菌感染という問題があげられる[2]。生体材料を体内に留置する手術では、術後感染の危険性が高く、いったん発病すればその予後は不良であり、感染は治療を困難なものとする。感染症の遷延化の原因の一つに細菌の形成するバイオフィームがあるが、バイオフィームは一度インプラント表面に形成されるとバイオフィーム内部の細菌が抗生物質や免疫に対し、強い抵抗性を示し、インプラントの抜去や多数回の手術を含めた加療が必要となる[3]。そのため、患部への効率的な薬剤送達を目的とし、薬剤と人工骨などを複合化した材料の開発の推進が強く望まれている。

そこで、本研究では、キレート硬化型セメント原料中へ抗菌性を保持するよう作製した微小球[4]を添加し、抗菌性を有する骨修復セメントを創製した。

より具体的には、セメント原料中に抗菌性を有する銀を含有させた微小球を添加して、セメントを作製することで、銀イオンの溶出により抗菌性を発現するようなマテリアルデザインである。本研究では、抗菌性セメントの開発を行うための要素技術の一つとして、銀含有リン酸カルシウム微小球を作製し、これによる抗菌性セメントを開発することを目的とした。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 *In vivo* での抗菌性発現の可視化

抗菌性生体材料の創製に際し、*in vitro* での評価は当然であるが、*in vivo* においても抗菌性が発現しているかどうかを調査することは非常に重要なことである。そこで、本研究では、まず *in vivo* イメージングが実施できる装置(IVIS)を利用して、*in vivo* での抗菌性試験に使用できるモデルマウスの作出を行なった(図1)。

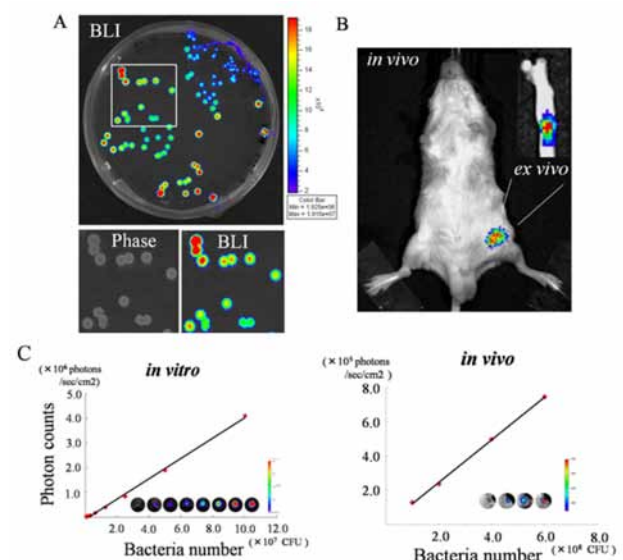


図1. 抗菌 *in vivo* 実験用マウスの作出 (IVIS: *in vivo* imaging system)

図1Aは、ルシフェラーゼ活性をもつ黄色ブドウ球菌をシャーレ状に播種し、コロニー形成を行なったものである。化学発光もしくは蛍光のフォトンカウントから細菌数を定量化でき、光強度と菌数は比例関係にあることが分かる

(図 1C, 左)。さらに、図 1B は実際に作出したモデルマウスの写真である。マウス大腿骨に遺伝子改変した黄色ブドウ球菌を植え付け、同一個体における生菌数をリアルタイムで追跡することができる。その結果が図 1C, 右に示されており、*in vivo* においても生菌数が可視化および定量化できることが理解できる。このシステムを利用することで、同一個体において、非侵襲的に *in vivo* における抗菌性を評価することを可能とした[4]。

## 2.2 銀含有リン酸カルシウム中空微小球の合成

試料溶液は Ca/P 比が 1.67 となるように、 $0.50 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.30 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $0.40 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{HNO}_3$  および  $\text{AgNO}_3$  を混合して調製した。なお、Ag 添加量は HAp に対して 0, 1, 5 および 20 mol% とした。上記の 4 種類の試料溶液について、熱分解条件を上部電気炉温度  $850 \text{ }^\circ\text{C}$ 、下部電気炉温度  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  とし、超音波振動数は  $2.4 \text{ MHz}$  に設定して超音波噴霧熱分解[5]を行い、銀含有 HAp (Ag-HAp) 微小球を得た。過剰な硝酸塩は、微小球を合成後、純水中で超音波洗浄することで除去した。これを「洗浄粉体」とした。

得られた合成粉体および洗浄粉体の粉体性状を粉末 X 線回折法(XRD), 赤外分光光度法(IR), 走査型電子顕微鏡法(SEM)および誘導結合プラズマ発光分光法 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry ; ICP-AES)などを用いて調査した。

始めに、それぞれ Ag 添加量が異なる 4 種類の試料溶液(0, 1, 5, 20 mol%)から得られた粉体の結晶相を XRD により同定した。これより、Ag を添加した洗浄粉体および Ag 無添加の洗浄粉体ともに、HAp に

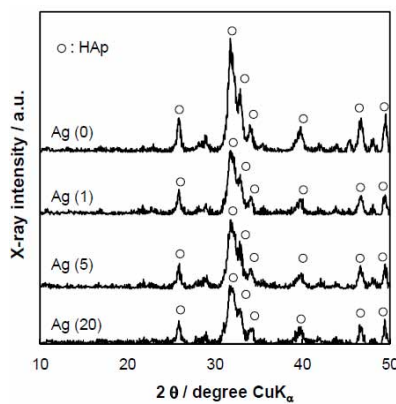


図 2. 銀含有微小球の XRD パターン

帰属される回折ピークのみ認められた(図 2)。また、Ag の含有に伴い、ピークがブロードとなったことから、合成粉体は低結晶性の粉体であることが分かる。一方、FT-IR スペクトルより、合成粉体に残存している硝酸イオン( $\text{NO}_3^-$ )は純水で洗浄処理することにより除去されることが確認された (data not shown)。

次に、得られた洗浄粉体の SEM による形態観察結果を図 3 に示す。Ag 添加、無添加いずれの場合も、球状粒子で構成されており、球状粒子の中には窪んだ粒子も観察された。Ag 添加量は微小球の形態に大きな影響を与えないことが分かった。なお、いずれの微小球も平均メジアン径は約  $2 \mu\text{m}$  であった。

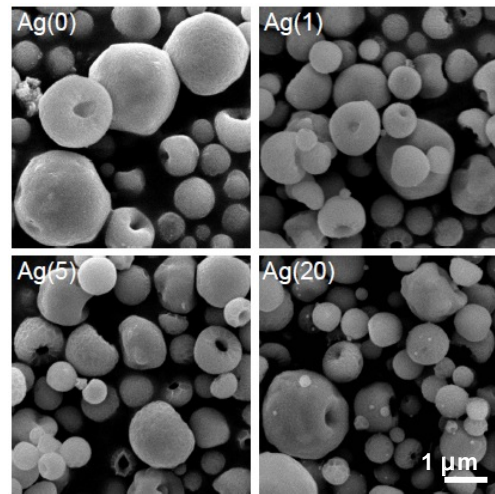


図 3. 銀含有微小球の表面形態

## 2.3 銀含有リン酸カルシウム中空微小球の特性評価

### 2.3.1 銀含有リン酸カルシウム中空微小球のキャラクタリゼーション

Ag-HAp 中の  $\text{Ag}^+$  の担持量を測定するために、ICP-AES を用いて Ag イオンの定量を行った。その結果、全ての系列で Ag の仕込み量に対し、約 80% の Ag を担持できていることが確認された。

また、Ag が HAp の格子内に取り込まれているか否かを検討するために、Ag-HAp 加熱粉体を調製した後、そのキャラクタリゼーションを行った。まず、合成した 4 種類の Ag-HAp 粉体 (0-20 mol%) 0.5 g を箱型電気炉を用いて、保持温度  $900 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1 h, 昇温速度  $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  の条件で焼成を行った。これを「加熱粉体」とした。焼成の際、着色防止のためアルミナボートを使用した。「加熱粉体」のキャラクタリゼーションを SEM, XRD を用いて行った。調製した「加熱粉体」の表面形態観察を行った結果より、加熱後も表面形態に大きな変化はなく、球状粒子を保っていた。さらに、「加熱粉体」の格子定数測定結果より、Ag 添加により  $a$  軸,  $c$  軸ともに多少の変化は認められた(表 1)。しかし、Ag のイオン半径は  $1.30 \text{ \AA}$  であり、Ca のイオン半径 ( $1.14 \text{ \AA}$ ) と比較して大きいため、Ag が HAp 格子内に取り込まれていると仮定すると  $a$  軸,  $c$  軸ともにさらに大幅な上昇が確認されるはずである。

表 1. 銀含有微小球の格子定数

Sample	格子定数 / nm	
	$a$ 軸	$c$ 軸
Ag-HAp(0)	0.9415(2)	0.68789(3)
Ag-HAp(1)	0.94222(7)	0.68796(8)
Ag-HAp(5)	0.94217(12)	0.68809(14)
Ag-HAp(20)	0.94211(9)	0.68781(11)

したがって、本法で合成した Ag-HAp 粉体中の Ag は、固溶しているのではなく、微小球中に分散していると考えられる。特に、Ag-HAp(20)粉体について、TEM により観察を行った結果、粉体の表面にドット状の Ag ナノ粒子が確認されている。さらに、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) による元素分析の結果からは、Ag-HAp(20)粉体表面



上の Ag ナノ粒子には Ca, P, O および Ag のピークが検出されている。これらの結果も、Ag<sup>+</sup>イオンが HAp 構造中に置換固溶しておらずに、微小球中に均一に分散していることを裏付けている。結果として、本研究で合成した Ag-HAp 粉体は従来の Ag-HAp 粉体よりも Ag による着色が抑制されているものと推測できる。

### 2.3.2 銀含有リン酸カルシウム中空微小球からの Ag イオン放出挙動の調査

4 種類の Ag-HAp 粉体 0.1 g を 15 cm<sup>3</sup> チューブに秤取り、それに HEPES バッファー (pH 7.3) を 10 cm<sup>3</sup> 加えて、Ag-HAp 微小球からの Ag<sup>+</sup>イオン放出挙動調査を行った。放出試験後に遠心分離を行い、上清に含まれる Ag<sup>+</sup>イオンの量を ICP-AES により定量した。図 4a に Ag<sup>+</sup>イオンの放出量測定結果、図 4b に Ag<sup>+</sup>イオンの放出率を示す。

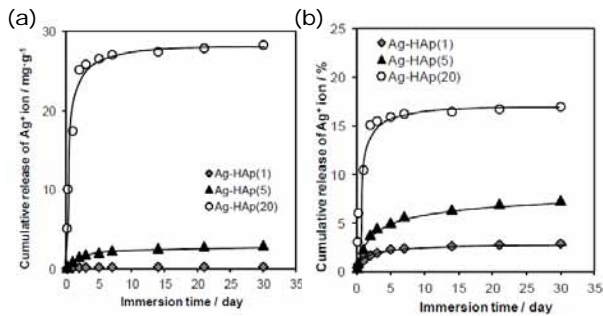


図 4. 銀含有微小球からの Ag<sup>+</sup>イオンの放出量 (a) と放出率 (b)

Ag<sup>+</sup>イオンの放出量は Ag の添加量に比例して増加した。また、浸漬時間の経過とともに、総計 Ag<sup>+</sup>イオンの放出量が増加したことも確認できた。さらに、Ca<sup>2+</sup>イオンと PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>イオンの放出についても調べたところ、いずれのイオンも浸漬時間の経過とともにその放出量が増加していた。つまり、Ag<sup>+</sup>イオンは微小球表面からだけではなく、微小球の溶解に伴い、内部からも放出されたものであると推測できる。なお、Ag<sup>+</sup>イオン放出試験後の粉体を回収し、特性評価を行ったところ、表面形態には大きな変化はなかったが、Ag 添加量が 5 mol% 以上の粉体では微小球表面に Ag ナノ粒子の存在が確認できた。これは微小球の溶解により内部に担持されていた Ag ナノ粒子が表面に現れたものであると考えられる。また、XRD の結果から、結晶相の変化は確認されなかったが、いずれの粉体も結晶性が低下していた。これらの結果は、合成した Ag-HAp 微小球がその溶解性を利用し、表面および内部に局在する Ag<sup>+</sup>イオンを長期にわたり、放出させることが可能な材料であることを示している。

## 2.4 銀含有リン酸カルシウム中空微小球の抗菌性評価

### 2.4.1 銀含有リン酸カルシウム中空微小球粉体およびディスクの *in vitro* 抗菌性評価

Ag-HAp 微小球粉体単独での抗菌性を *in vitro* で調査するために、標準寒天培地中に黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* IAM 1011; *S. aureus*, 1×10<sup>2</sup> cells) と 0.1

g 微小球粉体 (Ag-HAp(0), Ag-HAp(1), Ag-HAp(5), Ag-HAp(20)) を混合し、37°C, 48 時間培養を行った。培養後、コロニー数をカウントすることにより、抗菌性を評価した (表 2)。

表 2. Ag-HAp 粉体の *S. aureus* に対する抗菌性評価

Sample	Bacterial strain	Bacterial number /cells	Number of colony / 48 h
Control	<i>S. aureus</i>	4.00×10 <sup>2</sup>	8.06×10 <sup>3</sup>
Ag-HAp(0)			6.05×10 <sup>3</sup>
Ag-HAp(1)			2.87×10 <sup>2</sup>
Ag-HAp(5)			4.00
Ag-HAp(20)			0

Ag<sup>+</sup>イオンの仕込み量が 1 mol% 以上の場合、菌の増殖を抑制することがわかった。さらに、Ag<sup>+</sup>イオンの仕込み量が 5 mol% 以上ではほぼコロニー形成が確認されず 20 mol% になると、菌は全く生存できなかった [6]。

次に、この粉体を水と混練、一軸加圧成形することにより、Ag-HAp ディスクを作製した。これを粉体での抗菌性評価と同様に標準寒天培地中に設置し、*S. aureus* と共に 37°C, 48 時間培養を行った。培養後、形成された阻止円を画像解析ソフト (ImageJ) を用いて、相対抗菌面積を算出した (図 5)。その結果、Ag<sup>+</sup>イオンの添加量に依存して、阻止円が大きくなることが明らかになった。また、相対抗菌面積を比較したところ、5 mol% 以上の Ag<sup>+</sup>イオン添加で抗菌性の大幅な上昇が確認された。これらの結果は、粉体で行った抗菌性試験の結果 (表 1) と一致している。また、通常、Ag 含有セラ

ミックスでは、Ag の酸化により着色現象が起こるが、超音波噴霧熱分解法により合成した Ag-HAp 微小球は、黒色に呈色しない。これは、本法は溶液を介して粉体が調製されるため、Ag が微小球中に均一に分散することで、黒色に着色しなかったと考えられる。

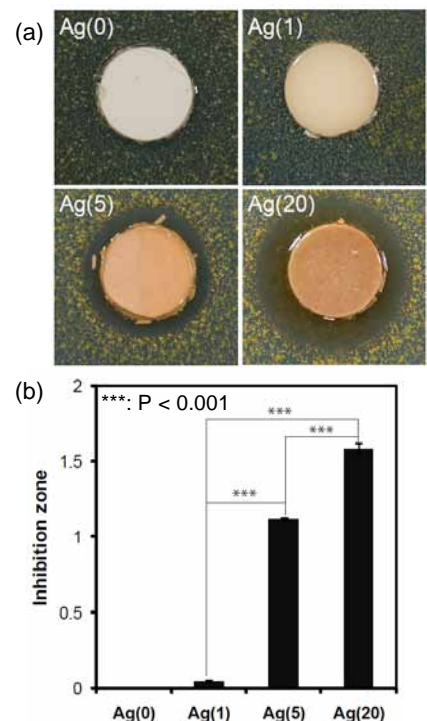


図 5. Ag-HAp ディスクの抗菌性の比較

(a) ディスクにより形成される阻止円

(b) 阻止円の相対面積比による抗菌性の比較

## 2. 4. 2 銀含有リン酸カルシウム中空微小球の *in vivo* 抗菌性評価

Ag-HAp(0)および(5)洗浄粉体 0.35 g に対し、純水を固液比 1/0.3 [g/cm<sup>3</sup>]の割合で加え、直径 10 mm の成形器を用いて、成形圧 100 MPa で一軸加圧成形を行った。24 時間室温で養生後、180°C、3 h の条件で乾熱滅菌を行ったディスクを「IVIS 評価用ディスク」とした。Balb/c 12 w (♂)のマウスを用いて皮下ポケット内で「IVIS 評価用ディスク」および 9.6×10<sup>5</sup> CFU・cm<sup>-3</sup> に調製したメチシリン感受性黄色ブドウ球菌[4]とともに共培養し、所定の時間で IVIS を用いて生物発光イメージング(BLI)を経時的に観察した。さらに、BLI のフォトンカウントから細菌数を定量した。Ag-HAp 微小球を圧縮成形したディスクでの抗菌性を *in vivo* で調査した結果を図 6 に示す。

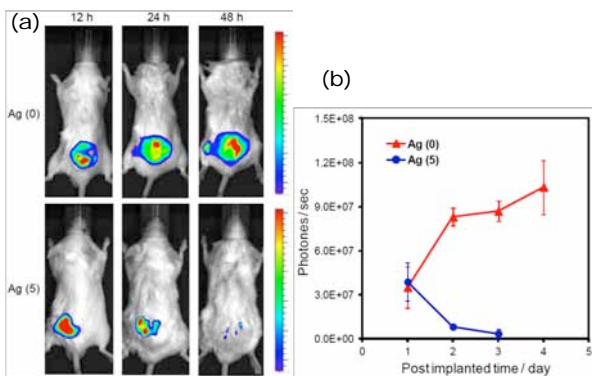


図 6. Ag-HAp 微小球の *in vivo* 抗菌性評価

- (a) IVIS による *in vivo* イメージング  
(b) 黄色ブドウ球菌の増殖曲線

その結果、Ag<sup>+</sup>イオンを添加していないサンプル Ag-HAp(0)では、術後直後から菌数が増加し続けており、抗菌性が発現していないことがわかる。一方、Ag<sup>+</sup>イオンを添加したサンプル Ag-HAp(5)は術後 2 日目までに菌数が激減しており、顕著な抗菌性を発現していることが分かる。つまり、Ag-HAp ディスクは *in vitro* [6]だけではなく、*in vivo* においても強い抗菌性を発現する優れた材料であることが明らかになった。しかし、現行のディスクでは強度に問題があり、長期的な観察および評価は難しい。また、背部皮下への埋入は感染巣を覆う組織がないため、細菌増殖と炎症が局在化せず広く分布してしまう可能性がある。そこで、サンプルの高強度化を図ると共に、*in vivo* における評価方法を検討する必要がある。

## 2. 5 Ag-HAp/β-TCP セメントの試作と評価

Ag-HAp は、粉体およびディスク単独で、抗菌性を有する優れた材料であることを証明した。さらに、実用化を指向するためには、生体内で非崩壊性を有するセメントを作製する必要がある。しかしながら、Ag-HAp 粉体だけでは非崩壊性のセメントを作製することはできなかった。

そこで、本節では、実用化を指向し、Ag-HAp 粉体を我々がこれまでに開発した「非崩壊性 β-TCP セメント」への添加材として利用することで、「非崩壊性 Ag-HAp/β-TCP セメント」を作製し、その評価を行った。

IP6/β-TCP 粉体は既報[7]に従い、調製した。これを Ag-HAp 粉体と任意の割合 (Ag-HAp[w]: β-TCP[w] = 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 および 0:100) で瑪瑙乳鉢内で混合し、「Ag-HAp/β-TCP 粉体」を得た。

以後、β-TCP 粉体に Ag-HAp(5)粉体を 25 mass% 混合した粉体を「Ag(5)-(25)」のように略記する。

### 2. 5. 1 Ag-HAp/β-TCP セメントのキャラクタリゼーション

Ag-HAp/β-TCP セメントの結晶相を同定するために、XRD による評価を行った。Ag-HAp(5)/β-TCP セメントの代表的な XRD パターンを図 7 に示す。Ag(5)-(25)粉体およびそれより作製したセメントともに、HAp およびβ-TCP の混合相であることが確認された。

また、混合粉体をセメントにすることで、β-TCP の割合が減少し、HAp の割合が増加していることがわかる。この時 β-TCP から HAp への転化率を XRD パターンの回折線

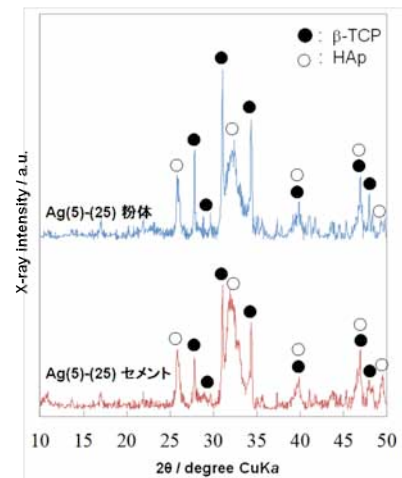


図 7. Ag-HAp/β-TCP セメントの XRD パターンの回折線

の相対強度から算出した結果、β-TCP は 74% から 50.4% へ減少し、HAp は 26% から 49.6% に増加した。これは、セメント作製の際に純水ではなく、2.5 mass% の Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液を使用しているため、水和反応が加速され、最終生成物の HAp 含有量が増加したことが原因であると考えられる。

抗菌性試験でポジティブなデータが得られた Ag-HAp(5)粉体を添加剤として使用し、「Ag(5)/β-TCP セメント」を作製して、その圧縮強度試験を行った。その結果、セメントの圧縮強度は約 10 MPa 程度であったが、Ag-HAp の添加量に伴い、圧縮強度の低下が確認された (data not shown)。これは、β-TCP セメントに混合した微小球がクラックの発生源となるため、微小球の添加量に比例して破断しやすくなったためであると考えられる。したがって、圧縮強度をさらに求めるためには微小球表面の加工を行い、摩擦を多くすることでパッキング性能を向上させるなどの改善が必要であるといえる。

Ag-HAp 粉体より作製したディスクは水中では崩壊してしまうため、寒天培地以外で培養することが困難であった。そこで、

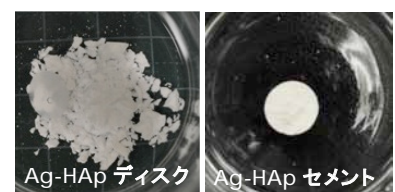


図 8. 水中での崩壊性試験



作製した Ag-HAp/ $\beta$ -TCP セメントが水中で崩壊しないかどうかを調べた。 $\beta$ -TCP 粉体に Ag-HAp(5)粉体を 50 mass% 添加したサンプルまでは、非崩壊性のセメントが作製できていることが確認された(図 8)。しかしながら、75 mass% 以上添加してしまうと崩壊していることが確認された。

### 2.5.2 Ag-HAp/ $\beta$ -TCP セメントからの Ag イオン放出挙動の調査

次に、Ag-HAp/ $\beta$ -TCP セメントからの Ag<sup>+</sup>イオン溶出量を調査するために、37 °C、pH 7.3 の HEPES バッファー中で Ag (図 9)および Ca, P (図 10)の放出挙動を調べた。Ag<sup>+</sup>イオン放出量は経過時間に比例し、増加していることが確認できた。5 日目から 7 日目に粉体の時と同様に微小球表面に存在している Ag ナノ粒子が多量に放出されるため、初期の放出量が多くなっていることが確認された。しかし、粉体と比較してセメントは、 $\beta$ -TCP 粉体と混合していることで、Ag<sup>+</sup>イオンの溶出が遅くなり、さらに長期間の Ag<sup>+</sup>イオンの徐放が期待できる。特に Ag(5)-(25)サンプルは、5 日目から 21 日目まで細菌感染を阻止できる Ag<sup>+</sup>イオンの徐放が確認された。したがって、これらのセメントは粉体よりもゆっくりかつ長期間にわたって抗菌性が持続すると考えられる。

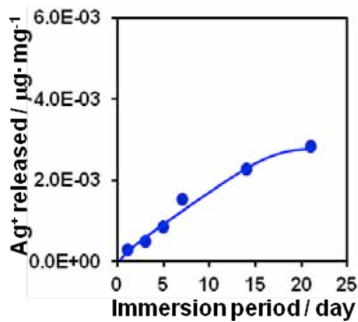


図 9. Ag-HAp セメントからの Ag<sup>+</sup>イオン溶出

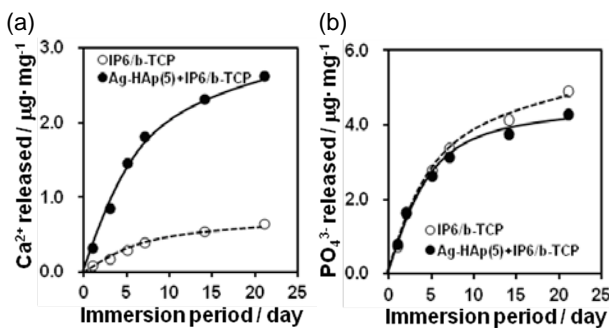


図 10. Ag-HAp セメントからの Ca<sup>2+</sup> (a)および PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (b) イオンの溶出

### 2.6 Ag-HAp/ $\beta$ -TCP セメントの *in vitro* 抗菌性評価

はじめに Ag-HAp/ $\beta$ -TCP セメントの抗菌性評価をするために、阻止円法による試験を行なった。Ag(2)/ $\beta$ -TCP 粉体から作製したセメントは、 $\beta$ -TCP の添加量にかかわらず、 $\beta$ -TCP を混合した全てのセメントで明確な阻止円を形成しなかった。Ag(5)/ $\beta$ -TCP 粉体に関しては、Ag-HAp 粉体の添加量が 25, 50 および 75 mass% の粉体で抗菌性を発現し、添加量の増加に比例して抗菌面積が増加していること

がわかった。一方、Ag-HAp(20)/ $\beta$ -TCP 粉体も同様に、Ag-HAp 粉体の添加量が 25, 50 および 75 mass% の粉体で抗菌性が発現した。Ag-HAp(5)/ $\beta$ -TCP セメントと比較するとその相対抗菌面積の値が大きかった(data not shown)。

次に、バイオフィーム形成試験を実施した。ここでは、Ag(0)/ $\beta$ -TCP と Ag(5)/ $\beta$ -TCP セメントについて示す(図 11a)。LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight 染色後に蛍光顕微鏡で観察した結果、Ag<sup>+</sup>イオン添加に伴い、セメント表面上の菌が減少していることが確認された。さらに、材料表面上の菌形態および材料と菌との接着を確認するために SEM による菌の形態観察を行った(図 11b)。その結果、Ag(0)-(25)セメント上には、大量の菌が確認されたのに対し、Ag(5)-(25)セメント上では、明確に菌の付着を阻害していることが確認された。さらに、Ag 含有セメント上の細菌で溶菌と思われる現象が確認された。この理由として、Ag<sup>+</sup>イオンが菌へ直接的に作用をしていることが考えられる。

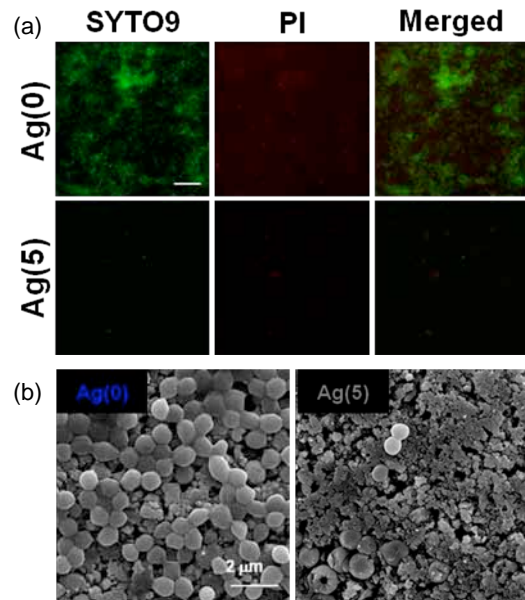


図 11. Ag-HAp セメントによるバイオフィーム形成阻害

- (a) LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight 染色による評価
- (b) SEM による菌の形態観察

### 2.7 Ag-HAp/ $\beta$ -TCP セメントの生体適合性評価

セメントの生体適合性を調査するために、骨芽細胞様樹立株(MC3T3-E1)を用いた直接播種試験を行った(図 12)。細胞増殖性および細胞の形態観察の結果から、Ag(0)-(25)セメント試料片における細胞は、初期付着率を反映して 1 日目に減少したが、その後、良好に細胞が増殖していることがわかった。しかしながら、Ag(2)-(25)セメントおよび Ag(5)-(25)セメントに接着している細胞数は各日数で control (ポリスチレンプレート) および Ag(0)-(25)セメントよりも下回っていた。特に、Ag(2)-(25)セメントよりも Ag(5)-(25)セメントの細胞数が少ないことが確認された。このような結果が得られた理由としては、サンプルの表面粗さや Ag の放出が関係していると考えられる。

一方、Ag(2)-(25) および Ag(5)-(25)セメントでは、培養

1日目から3日目にかけて細胞増殖が抑制されたが、培養3日目以降では細胞数が増加する傾向にあったことから、Ag-HApセメント上において細胞は、培養初期にはリリースされたAg<sup>+</sup>イオンの影響を受けるが、長期間培養するとその影響は軽減されることが推測された。

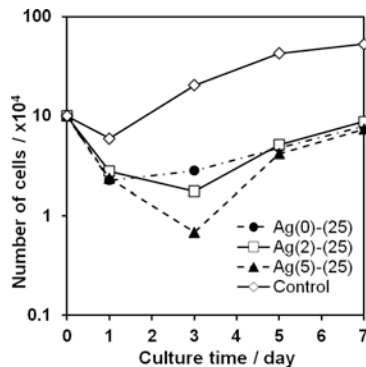


図 12. Ag-HAp セメント上での細胞増殖性試験

### 3. 考察及び今後の展望

我々は、良好な生体親和性を有する HAp に Ag<sup>+</sup>イオンを担持させることで、細菌感染が生じた場合でも再手術の必要性がなく、患者の QOL を向上させることができると考えた。

本研究の最終的な目的は、「抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの開発」である。その目的を達成するため、超音波噴霧熱分解法により Ag 担持 HAp (Ag-HAp) 中空微小球を合成し、その粉体性状、抗菌性および生体適合性について明らかにするとともに抗菌性セメントの試作を行った。

その結果、合成されたすべての Ag-HAp 粉体は、HAp に帰属される回折ピークのみ認められ、Ag 添加量の増加による結晶相の変化はなかった。さらに、HAp 格子内に Ag を取り込んでいなく、微小球中にナノ分散していることがわかった。また、Ag-HAp 粉体は Ag<sup>+</sup>イオンの徐放性を有する材料であることが確認された。さらに、粉体を圧縮成形したディスクを用いて、黄色ブドウ球菌を用いた抗菌性評価を行った結果、Ag<sup>+</sup>イオンの仕込み量が 2 mol% 以上で、抗菌性を示すことがわかった。Ag<sup>+</sup>イオン濃度が 5 mol% の粉体より作製したディスクを用いて生体適合性を評価したところ、Ag<sup>+</sup>イオンの溶出による細胞毒性は発現しなかった。また、*in vitro* で確認された抗菌作用を *in vivo* においても発揮できるかどうかを評価した結果、Ag を添加したサンプルは術後 2 日目までにバックグラウンドまで ROI が低下しており、顕著な抗菌性を発現していることが確認された。このように、Ag-HAp 粉体は粉体でもディスク状に成形しても寒天培地中で抗菌性を示すことが確認された。

しかしながら、このディスクは粉体を圧縮成形したもので、水中では崩壊してしまう。そこで、実用化を指向し、非崩壊性β-TCP セメントの原料である「IP6/β-TCP 粉体」と Ag-HAp 粉体を混合し、それらを出発原料として非崩壊性の抗菌性セメントを試作し、その評価を行った。

その結果、β-TCP 粉体に Ag-HAp(5) 粉体を 50 mass% 添加したサンプルまでは、非崩壊性のセメントが作製できていることがわかった。そこで、次に Ag-HAp/β-TCP セメント用いた抗菌性評価を行った。その結果、Ag<sup>+</sup>イオンの仕込み量が 5 mol% 以上の粉体かつ Ag-HAp 粉体の添加量が 25 mass% 以上のとき、明確な阻止円が確認された。さらに、これらのセメント表面には黄色ブドウ球菌がバイオフィルムを形成しないことが確認された。また、明確な阻止円を形成したサンプルでは、溶菌と見られる現象が確認された。続いて、このセメントの生体適合性を調査するために、骨芽細胞様樹立株(MC3T3-E1)を用いた細胞増殖性試験を行ったところ、Ag<sup>+</sup>イオンを含有したセメントでは、培養1日目から3日目にかけて細胞増殖性能が含有していないものに比べて低下した。しかしながら、培養3日目以降では細胞数が増加する傾向にあったことから、Ag-HAp セメント上において細胞は、培養初期にはリリースされた Ag<sup>+</sup>イオンの影響を受けるが、長期間培養するとその影響は軽減されることが推測された。

以上の結果より、Ag-HAp/β-TCP セメントは抗菌性・非崩壊性・生体適合性を備えた次世代型キレート硬化型セメントとして期待できる。

今後は、圧縮強度や生体吸収性などの機能を向上させるために、Ag-HAp から Ag-TCP などに粉体性状を変化させることで、よりハイパフォーマンスな抗菌性セメントの開発が期待できる。

#### 【参考文献】

1. H. Funao, K. Ishii, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, M. Aizawa, Y. Okada, K. Chiba, S. Koyasu, Y. Toyama, and M. Matsumoto, *Infect. Immun.*, **80**, 733-741 (2012).
2. Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50-55 (2008).
3. Y.H. An and R.J. Friedman, *J. Hosp. Infect.*, **33**, 93-108 (1996).
4. P.S. Stewart and J.W. Costerton, *Lancet*, **358**, 135-138 (2001).
5. M. Aizawa, K. Itatani, and I. Okada, *Phosphorous Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).
6. Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, and M. Aizawa, *Key. Eng. Mater.*, **493-494**, 678-683 (2012).
7. T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 1383-1394 (2013).

# 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(2)

## —抗生物質を担持させたリン酸カルシウム微小球によるアプローチ—

本田みちよ、持田直輝、川延勇介、神澤信行、相澤 守

### 1. はじめに

リン酸カルシウムは整形外科領域で緻密体、顆粒、多孔体、セメントなどの形状で広く利用され、その中でリン酸カルシウムセメントは、骨欠損部位の形状に合わせて任意に加工できるという特長をもつ。しかし、一般的に、リン酸カルシウムは感染に弱く、一度細菌感染を引き起こすと、再手術や長期間にわたる抗菌薬治療を行う必要がある。そこで、細菌感染の問題を解決した、抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントが必要となっている。

現在、リン酸カルシウムセメントに抗菌薬を含有させ抗菌性を付与したセメントが臨床応用されている。しかし、この問題点として抗菌薬の放出を制御できないことがあげられる。

そこで、本研究では、我々がこれまでに水酸アパタイト(HAp)など種々のアパタイト関連化合物の合成に成功している超音波噴霧熱分解法[1]を用いて、表面に細孔を備えた中空状リン酸カルシウム微小球を合成し、これを抗菌薬のキャリアとして応用させることを考案した。この中空状微小球に抗菌薬を担持させることにより、抗菌薬の微小球表面からの迅速な放出と微小球内部からの緩慢な放出の二段階の薬剤放出を可能とした[2]。

この抗菌薬を担持させたリン酸カルシウム微小球を我々がこれまでに開発したイノシトールリン酸(IP6)のキレート作用で硬化する新規なペースト状人工骨(セメント)[3]に添加することにより、抗菌薬の放出を制御した抗菌性セメントの試作を行った。

以下ではモデル薬剤としてバンコマイシン塩酸塩(VCM)を担持させたリン酸カルシウム微小球の抗菌性、これをセメントに添加して得られた抗菌性を備えたセメントの圧縮強度、抗菌薬の放出挙動、抗菌性について検討を行った。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 VCM 担持微小球の調製

##### 2.1.1 表面にナノサイズの気孔を備えたリン酸カルシウム中空微小球の合成

試料溶液は Ca/P 比が 1.50 となるように、 $0.60 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.40 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $0.40 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{HNO}_3$  および NaCl を混合して調製した。なお、NaCl 濃度は 0, 0.60 および  $1.00 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  とした。上記の 3 種類の試料溶液について、熱分解条件を上部電気炉温度  $850^\circ\text{C}$ 、下

部電気炉温度  $300^\circ\text{C}$  とし、超音波振動数は  $2.4 \text{ MHz}$  に設定して超音波噴霧熱分解を行い、リン酸カルシウム微小球を得た。添加した塩は、微小球を合成後、純水中で超音波洗浄することで除去した。これを「洗浄粉体」とした。得られた合成粉体および洗浄粉体の粉体性状を粉末 X 線回折法(XRD)、赤外分光光度法(FT-IR)および走査型電子顕微鏡(SEM)などを用いて調査した。

まず、それぞれ NaCl 添加量が異なる 3 種類の試料溶液から得られた粉体の結晶相を XRD により同定した。これより、NaCl 添加をした洗浄粉体では、アパタイト単一相であり、NaCl 無添加の洗浄粉体では、アパタイトおよびリン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) に帰属される回折ピークが認められた。また、FT-IR スペクトルより、合成粉体に残存している塩化ナトリウムおよび硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) は洗浄処理することで除去されることが確認された。

次に、合成粉体および洗浄粉体の SEM による形態観察結果を図 1 に示す。NaCl 無添加の粉体は、球状粒子で構成されており、洗浄処理による微小球の形態への影響は観察されなかった。NaCl 濃度  $0.60$  および  $1.00 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  で合成して得られた洗浄粉体では、一次粒子がロッド状の凝集二次粒子を形成し、中にはロッド状一次粒子が複雑に絡み合い、表面にナノサイズの微細な気孔を有する粒子も観察された。

	NaCl(0)	NaCl(0.6)	NaCl(1.0)
合成			
SSA [ $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ]	10.6	5.6	7.30
洗浄			
SSA [ $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ]	14.4	12.8	24.6

図 1 リン酸カルシウム中空微小球の粒径制御

##### 2.1.2 リン酸カルシウム微小球への VCM の担持

洗浄粉体  $0.6 \text{ g}$  に対して VCM 水溶液を  $12 \text{ cm}^3$  加え超音波洗浄機を用いて  $20 \text{ min}$  超音波処理を行った。その後  $3000 \text{ rpm}$  にて遠心分離を行い、上澄み液を除去した。得ら



れた粉体を凍結乾燥し、「薬剤担持微小球」とした。なお加える VCM 水溶液の濃度は 1~1000 ppm の範囲で調製し、1000 ppm の濃度で得られた薬剤担持微小球を用いて薬剤放出実験を、それぞれの濃度で得られた薬剤担持微小球を用いて抗菌性試験を行った。また、得られた微小球を  $1.0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  の塩酸水溶液に溶解させ、280 nm の吸光度を測定することにより微小球 1 mg 中に担持された薬剤の量を測定した。1000 ppm の粉体では NaCl(0)で  $2.4 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、NaCl(0.6)で  $4.4 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 、NaCl(1.0)で  $4.8 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ であった。

## 2. 2 VCM 担持微小球の *in vitro* 抗菌性試験

### 2. 2. 1 薬剤担持微小球からのディスクの作製

抗菌性試験を行うため、薬剤担持微小球からのディスクを作製した。以下、その方法を記載する。

ディスクは一軸加圧成形法により作製した。薬剤担持微小球 0.3 g をメノウ乳鉢にわけとり、そこへ純水  $75 \text{ mm}^3$  を加えよく混練し、 $15 \text{ mm}\phi$ の成形器へ移し、100 MPa の圧力を加えた。このようにして作製したディスクを「薬剤担持微小球ディスク」とした。

### 2. 2. 2 薬剤担持微小球ディスクにおける *in vitro* 抗菌性試験

阻止円法による抗菌性試験を行なった。培地は LB 寒天培地を使用し、菌種は黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)を用いた。

LB 寒天培地上に  $15\text{mm}\phi$ ディスク試料を置き、そこへ菌液  $0.1 \text{ cm}^3$  を加えたトップアガー  $10 \text{ cm}^3$  を流し込んだ。なお、溶液中の菌数は  $1\times 10^5$  個程度となるように LB 培地で調製した。流し込んだトップアガーが固まるまで静置し、 $35\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ 、40~48 時間培養を行い、阻止円の有無を観察した(図 2)。この結果から VCM の担持濃度が 10 ppm 以上からわずかに阻止円が観察され、50 ppm 以上では顕著な阻止円が確認できた。したがって、微小球をキャリアとした場合、VCM の担持濃度が 50 ppm 以上で顕著な抗菌性を発現するといえる。一方、NaCl を添加し、表面に細孔を備えた微小球を用いた場合、添加しなかった場合と比較して阻止円が大きいことが確認できる。これは表面に細孔を備えたことにより、微小球内部にも薬剤が担持できるため薬剤の担持量が増加し、最終的な放出量が多かったためではないかと考えられる。

マウス大腿骨に黄色ブドウ球菌を植え付け、同一個体における生菌数をリアルタイムで追跡することができる。その結果を示した図が図 3C 右であり、*in vivo* においても生菌数が可視化および定量化できることが理解できる。

## 2. 3 抗菌性セメントの試作とその圧縮強度

薬剤担持微小球を我々が開発した IP6- $\beta$ -TCP セメントへ添加することにより、抗菌性セメントの試作を行った。また、薬剤担持微小球を添加することにより、セメントの機械的特性に影響が出ないかを確かめるために圧縮強度試験を行った。

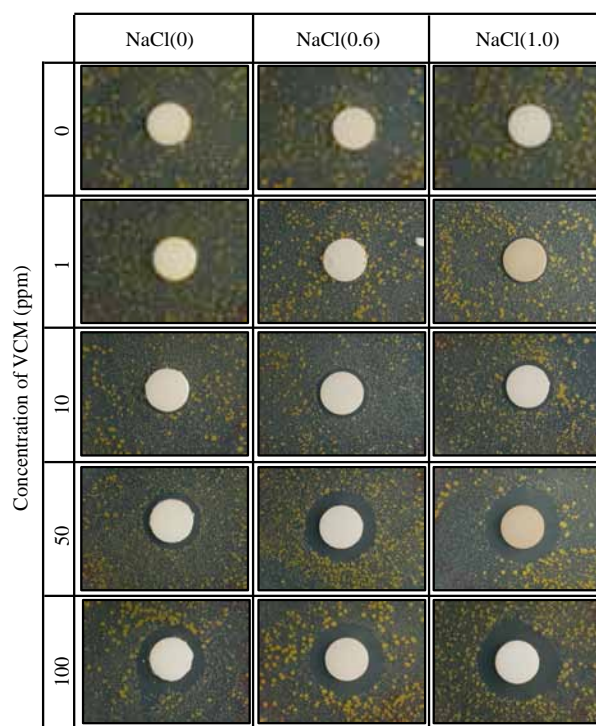


図 2. 阻止円法による抗菌性試験結果

### 2. 3. 1 $\beta$ -TCP 粉体の調製

IP6 溶液を 3000 ppm となるように純水にて希釈した。この時、NaOHaq を加えて pH を 7.3 となるようにした。市販  $\beta$ -TCP 粉体 10 g を調製した IP6 溶液  $40 \text{ cm}^3$  に加え、ジルコニアボールは  $2 \text{ mm}\phi$  を用いて、遊星型ボールミルで 3 h 粉碎した。得られたスラリーをろ過後、凍結乾燥し、IP6- $\beta$ -TCP 粉体を調製した。この IP6- $\beta$ -TCP 粉体に薬剤担持微小球を添加することにより、抗菌性を備えたキレート硬化型セメントの試作を行った。

### 2. 3. 2 圧縮強度試験

IP6- $\beta$ -TCP 粉体と薬剤担持微小球を質量比が 100 : 0, 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 となるようにわけとり(全量 0.2 g)、メノウ乳鉢と乳棒を用いて混合した。ここに混練液として 2.5 mass%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液を固液比 1/0.3 ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )となるように加え、 $5 \text{ mm}\phi$ の成形器を用いて 100 MPa で一軸加圧成形した。作製した成形体を  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度 100% のインキュベーターに 1 日静置し、得られた成形体の圧縮強度を測定した。図 3 に圧縮強度の結果を示す。図 3 から微小球の添加量が増えるにつれて、圧縮強度が低くなっていく傾向が観察された。これは球状の粒子がセメント内に入り込むことにより、球状粒子同士が触れ合う面でクラックが生じやすくなるためではないかと考えられる。

また、NaCl 濃度を  $1.0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  にて合成した微小球を添加したセメントでは強度の低下が小さいことが観察された。これは、ロッド状の一次粒子により、微小球表面に凹凸が多くなるため、微小球同士が触れ合った場合でも摩擦が大きくなり、クラックが生じにくいのではないかと考えられる。一方で、NaCl 無添加の微小球を添加したセメントは添加量 50 mass% まで高い圧縮強度を示した。これは

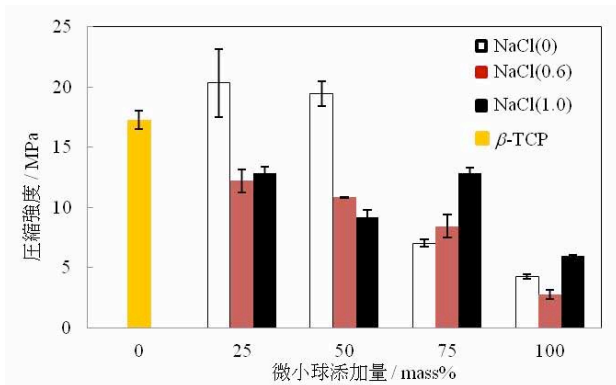


図3. 微小球添加セメントの圧縮強度

微小球が、 $\beta$ -TCP 粉体どうしの隙間に入り込み、より緻密なセメントを作ることができたためではないかと考えられる。一方で、NaCl を添加した微小球をセメントに添加した場合、微小球を添加していないセメントと比較して常に低い圧縮強度となっていた。これは、NaCl を添加した微小球は添加していないものと比較して表面に細孔が存在するため、微小球自体の強度がやや低くなってしまっているためかもしれない。

この結果から圧縮強度が最も高い、微小球添加量 25 mass% が最適な微小球の添加量であると判断した。

## 2.4 抗菌性セメントからの薬剤放出挙動

VCM の放出実験は 1000 ppm の濃度で担持を行った微小球を IP6- $\beta$ -TCP 粉体に 25 mass% 添加した混合粉体を一軸加圧して得られた試料片を用いて行った。試料片は 0.3 g の混合粉体に 75 mm<sup>3</sup> の純水を加えてよく混練し、これを全量 15 mm $\phi$  の成形器に入れ 100 MPa の圧力をかけて作製した。作製した試料片を 24 well plate に入れ、ここに生理食塩水を 2 cm<sup>3</sup> 加え、37 °C のインキュベーター内に静置した。サンプリング時間ごとに生理食塩水を全量取り除き新たに生理食塩水を加える操作を行った。取り除いた生理食塩水を 0.22  $\mu$ m のメンブレンフィルターに通した後、分光光度計にて 280 nm の吸光度を測定することにより、VCM の放出量を測定した。

徐放実験の結果を図 4 に示す。図 4 (A) から、NaCl を添加した溶液から作製した微小球を添加したセメントは、NaCl を添加していない溶液から作製した微小球を添加したセメントと比較して、VCM の放出量が多いことが確認できる。これは VCM の担持量の違いによるものである。一方で図 4 (B) から VCM の放出率は NaCl 無添加の溶液から作製した微小球をセメントに添加した場合に最も高くなることが観察された。これは、NaCl を添加し、表面に細孔を備えた微小球は、セメントに混ぜ込んだ場合、表面の細孔がセメント片によってふさがり、微小球内部の薬剤が放出されにくくなるためであると考えられる。このようにセメントに取り込まれたままの薬剤は、セメントの溶解と共に放出されると考えられる。そのため、溶解性の異なるセメントを作製することで薬剤徐放を制御可能となると期待できる。

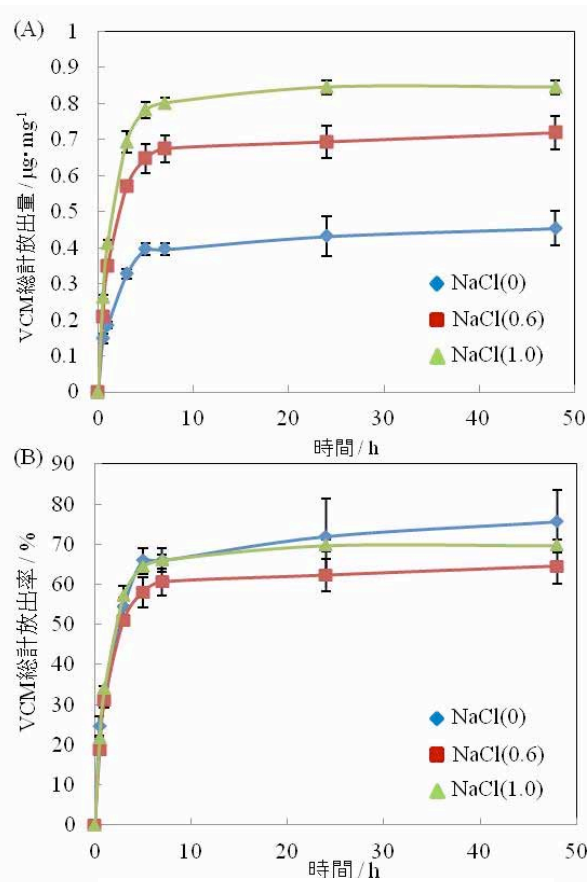


図4 VCM の総計放出量(A)と放出率(B)

## 2.5 抗菌性セメントの in vitro 抗菌性

異なる濃度の VCM 溶液により担持を行った微小球を IP6- $\beta$ -TCP 粉体に 25 mass% 添加し、作製したセメント試料片において阻止円法による抗菌性試験を行った。

なお、セメント試料片は 2.4 節(薬剤徐放実験)と同様な方法で作製した。形成された阻止円の面積から相対抗菌面積を算出し抗菌性の比較を行った(図 5)。VCM 担持濃度 500 ppm 以上から顕著な阻止円が形成されることがわかった。また、NaCl を添加した溶液から作製した微小球を添加したセメントでは、抗菌性が強くなる傾向が確認された。この結果は徐放実験の結果と一致しており、薬剤が多く放出されるため、抗菌性が強くなったと考えられる。

## 3. 考察および今後の展開

ここでは「多機能性キレート硬化型アパタイトセメント」を開発するための要素技術のひとつである「抗菌性の付与」を目指した研究を展開している。より具体的には、塩添加法超音波噴霧熱分解法によりアパタイト系中空微小球を合成しここに抗菌薬を担持させ、これをセメントに添加することにより、抗菌薬の放出を制御した抗菌性セメントの作製を目指している。

本研究の特筆すべき成果として、表面に細孔を備えた微小球をセメントへ添加することにより、より多くの薬剤を担持させ放出させることに成功した。実際に抗菌性試験を行い、抗菌性の強さを比較したところ、NaCl を添加した溶液で作製した微小球を添加したセメントではより強い



抗菌性を得られることが確認された。以上のことからセメントに抗菌性を付与することに成功したといえる。

今後は細胞への毒性等を調査し、抗菌薬の担持濃度の最適化を行う必要がある。

M. Matsumoto, *Infect. Immun.*, **80**, 733-741 (2012).

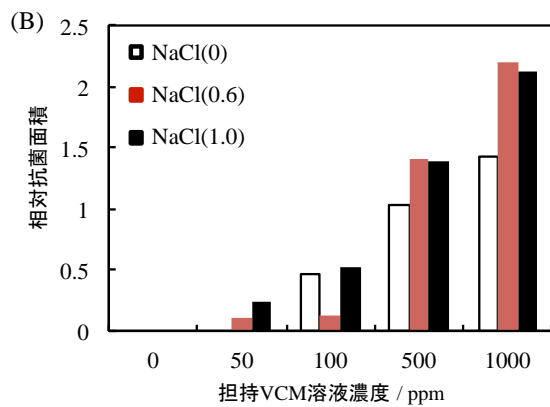
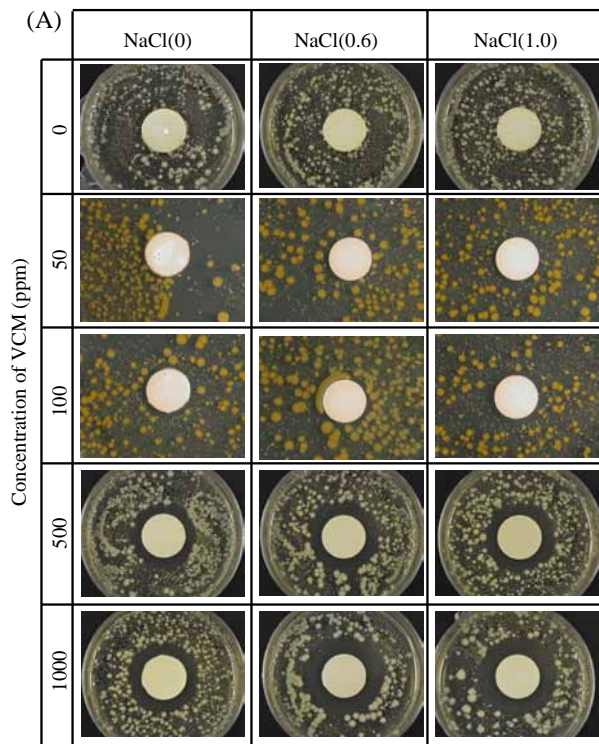


図5 VCM 担持微小球添加セメントの抗菌性試験

(A) 抗菌性セメントによる阻止円の形成

(B) 阻止円の相対的な面積の比較

【参考文献】

1. Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, T. Uchino, and M. Aizawa, *J. Aus. Ceram. Soc.*, **46**, 6-10 (2011).
2. M. Aizawa, K. Itatani, and I. Okada, *Phosphorous Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).
3. Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50-55 (2008).
4. H. Funao, K. Ishii, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, M. Aizawa, Y. Okada, K. Chiba, S. Koyasu, Y. Toyama, and

# 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(3)

## —プロタミンによるアプローチ—

本田みちよ

### 1. はじめに

世界的に進む高齢化や新興国での人口増加を背景に医療機器に対する需要は現在増加傾向にある。我が国は世界でも突出した高齢化先進国であり、国内医療市場は世界市場の伸び率を上回るペースで拡大しており、世界第2位の規模を有する。今後、医療技術の充実は以前にも増して重要な課題となり、患者のニーズを満たす新たな生体材料の開発が急務となる。同時に新規材料の導入に伴って予想される有害な細菌や感染症を制御するためには、有効な抗菌薬の開発と生体材料自体に抗感染性や抗菌性を付与する技術の開発も不可欠となる。抗菌薬の開発に関しては、次々に出現する薬剤耐性菌をいかに征圧するかという課題を国際的な協力のもと解決しようとする取り組みが進められている。一方、生体材料に関連する感染症については、その需要の増加に対し、感染率の十分な低減は認められておらず、新規な抗感染性材料の創出が期待されている。感染制御は、患者の生活の質(Quality of life; QOL)の向上に貢献するだけでなく、膨大な医療コストの削減にもつながるため、医療経済の観点からも非常に重要な開発テーマの一つである。

なかでも、生体材料を体内に留置する手術では、術後感染の危険性が高く、いったん発病すればその予後は不良であり、感染は治療を困難なものとする。感染症の遷延化の原因の一つに細菌の形成するバイオフィーム[1]がある。一度、バイオフィームがインプラント表面に形成されると抗菌薬の全身投与などの治療に抵抗し、インプラントの抜去を余儀なくされる場合や多数回の手術を含めた長期間の加療が必要となる場合もある。

そこで、本研究ではバイオフィーム感染症の効果的な予防を目指し、バイオフィーム形成を阻害可能な生体材料の開発を目的とし、抗菌性タンパク質であるプロタミン[2]を利用し、新規の抗菌性材料を創製した。

### 2. 実験と結果

#### 2.1 リン酸カルシウム中空微小球の合成と評価

試料溶液はCa/P比が1.50となるように、 $0.60 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $0.40 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $0.40 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{HNO}_3$ を混合して調製した。それを熱分解条件を上部電気炉温度  $850^\circ\text{C}$ 、下部電気炉温度  $300^\circ\text{C}$  とし、超音波振動数は  $2.4 \text{ MHz}$  に設定して超音波噴霧熱分解を行い、リン酸カルシウム微小球を得た。得られた粉体を純水で洗浄し、

硝酸イオンを除去したものを洗浄粉体として、以降の実験に用いた。得られた合成粉体および洗浄粉体の粉体性状を粉末 X 線回折法(XRD)、赤外分光光度法(IR)、および走査型電子顕微鏡 (SEM) などを用いて調査した。

はじめに、合成粉体の結晶相を XRD により同定した(図1)。その結果、洗浄粉体ではアパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; HAp)およびリン酸三カルシウム( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\beta\text{-TCP}$ )に帰属される回折ピークが認められた。また、FT-IR スペクトルより、合成粉体に残存している硝酸イオン( $\text{NO}_3^-$ )は洗浄処理することで除去されることが確認された(図2)。

次に、合成粉体および洗浄粉体の SEM による形態観察結果を図3に示す。粉体はいずれも球状粒子で構成されており、洗浄処理による微小球の形態への影響は観察されなかった。さらに、合成粉体および洗浄粉体の比表面積を

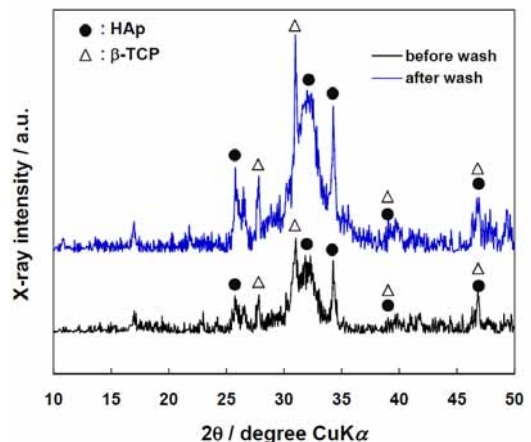


図1. 洗浄前後の微小球のXRDパターン

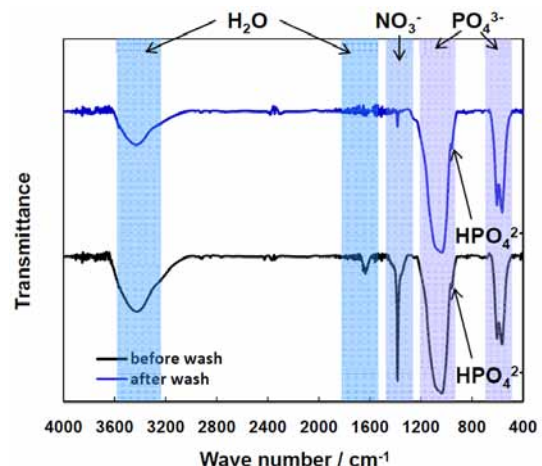


図2. 洗浄前後微小球のFT-IRスペクトル

BET 法により測定した。合成粉体の場合、その比表面積 (Specific surface area; SSA)は  $10.6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ であったのに対し、粉体を洗浄することにより SSA は  $14.4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ に増大した (data not shown)。

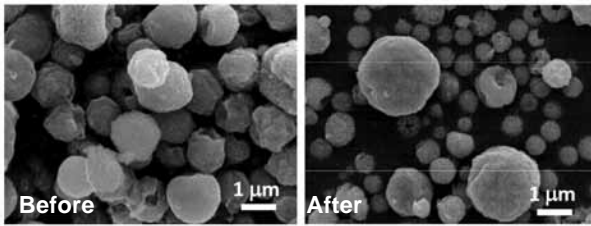


図 3. 洗浄前後微小球の SEM による形態観察

## 2.2 プロタミン担持微小球の作製とその評価

2.1 節で合成した微小球粉体をプロタミン溶液 (0-1.0 mg/mL)に加えた後、室温にて一定時間振とうした (120 rpm)。これを 9000 rpm で遠心分離し、上清と沈澱に区別した。上清のプロタミン濃度を測定することにより、担持前後の溶液の濃度差を求めることで微小球へのプロタミンの吸着量を算出した。一方、沈澱は 24 時間凍結乾燥し、これをプロタミン担持微小球とした。また、得られたプロタミン担持微小球を酢酸バッファー (0.08 M, pH 5.5)に懸濁し、室温にて任意の時間振とうし、放出されたプロタミン濃度を測定し、徐放量を算出した。サンプリング時間毎に懸濁液を遠心分離し、上清のみを回収した後、再び酢酸バッファーを加え懸濁、振とうを繰り返す。経時的な徐放量を調べた。上清中のプロタミン量は Bradford 法により測定した。得られた粉体性状については XRD, SEM, 表面電位計などを用いて調べた。

リン酸カルシウム微小球粉体とプロタミン溶液を共に tube へ入れ、振とうさせるバッチ法を利用して、微小球へのプロタミン担持を試みた結果、微小球へのプロタミンの吸着量はプロタミン濃度と振とう時間に依存して増加し、反応 72 時間程度でほぼ一定となることが分かった (図 4)。また、プロタミンは Langmuir 型に吸着することが明らかになった。

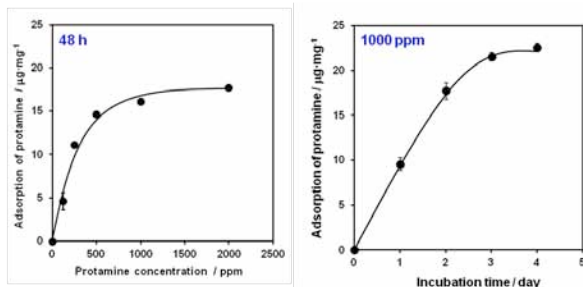


図 4. プロタミンの微小球への吸着

次に、調製したプロタミン担持微小球粉体を酢酸バッファー (0.08 M, pH 5.5)に浸漬、振とうすることで粉体からのプロタミンの放出挙動を調べた (図 5)。この条件は、破骨細胞による骨吸収時における条件を模倣している。その結果、振とう 5 分後で全吸着タンパク質量の約 70%が溶出し、120 分後に 100%に達することが分かった。このとき、粉

体からの  $\text{Ca}^{2+}$ の溶出挙動はプロタミンのリリース挙動と一致していたことから、固定化されたプロタミンは破骨細胞により粉体が吸収されると同時に体内でリリースされることが予想できる。すなわち、破骨細胞の吸収を受け、材料が溶解することにより、抗菌性を発現することが考えられる。

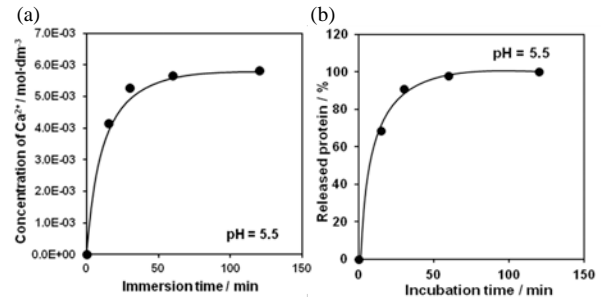


図 5. 破骨細胞模倣条件下におけるプロタミン担持微小球からの  $\text{Ca}^{2+}$  (a)とプロタミン (b)のリリース

一方、得られたプロタミン担持微小球粉体の結晶相は XRD により同定した (図 6)。担持前の微小球と同様に、HAP および  $\beta$ -TCP に帰属される回折ピークが認められた。しかし、プロタミン溶液と微小球粉体とを 24 時間反応させたため、 $\beta$ -TCP は水和反応により一部が HAP へ相転移した。

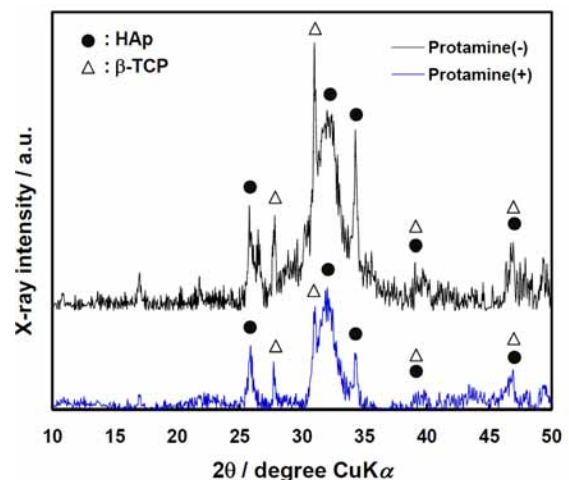


図 6. プロタミン担持前後微小球の XRD パターン

また、プロタミン担持後の粉体は担持前に比べ、結晶性が低下することが分かった。続いて、粉体形態を SEM により観察した (図 7)。粉体はプロタミンの有無に関わらず、球状粒子であった。しかし、プロタミン担持微小球は微小球表面にプロタミンのコーティング膜状の層が形成された上に、 $\beta$ -TCP が HAP へ転移したことにより、針状の析出物が観察された。さらに、この粉体の表面電位 ( $\zeta$ -potential)を測定した結果、プロタミンを担持させたことにより、 $\zeta$ -potential は吸着したプロタミンに相応して、正電荷側へシフトした (図 8)。吸着 (図 4)および表面電位 (図 8)の結果から、プロタミンは微小球粉体に吸着していると考えられる。

そこで、プロタミンと微小球との関係を詳細に調べるために X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)によりプロタミン微小球の表面状態を解析した (図 9)。その結果、N 1s スペクトルにおいてプロタミン担持微小球は、微小球に比べ



強いピークが認められた。さらに、この N 1s スペクトルを詳細に解析した結果、プロタミンに由来するアミド態窒素、アミノ態窒素、アンモニア態窒素のピークが確認され、プロタミンと微小球との吸着が裏付けられる結果となった。この吸着は微小球の HAp もしくは  $\beta$ -TCP のリン酸基 ( $\text{PO}_4$ ) とプロタミンのアミノ基 ( $\text{NH}_2^+$ ) がイオン結合したものと推測される。

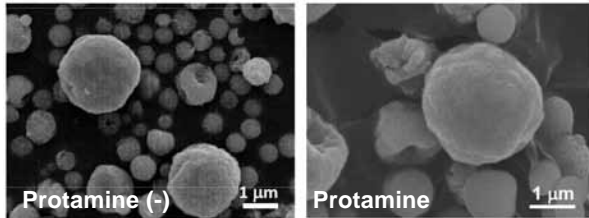


図 7. プロタミン担持前後微小球の SEM による形態観察

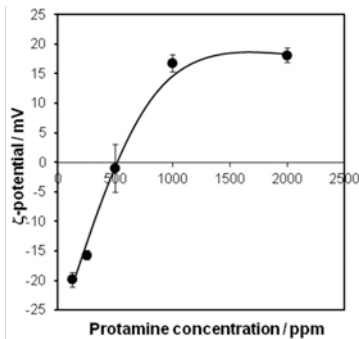


図 8. プロタミン担持微小球の表面電位

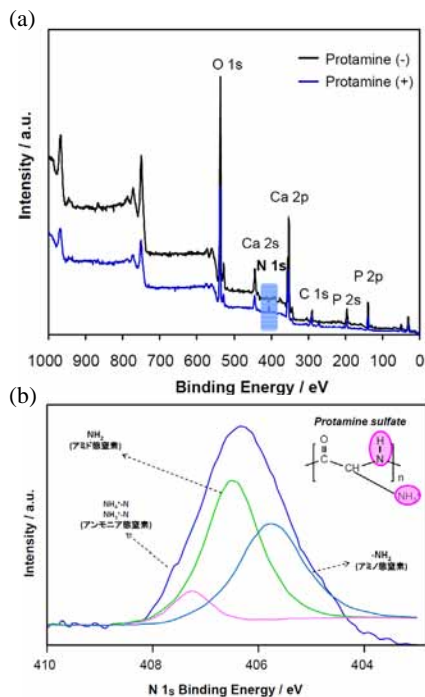


図 9. XSP によるプロタミン担持微小球の解析  
(a) プロタミン(±)微小球のワイドスペクトル  
(b) プロタミン(±)微小球のナローズスペクトル

### 2.3 プロタミン担持微小球セメントの抗菌性評価

プロタミン担持微小球粉体からなるディスクは、微小球またはプロタミン微小球粉体を固液比 1/0.3 (w/w) となるよう純水と混練し、100 MPa で一軸加圧成形をすることにより作製し、これらを *in vitro* 抗菌性試験(阻止円法)に用いた。一方、非崩壊性のセメントを作製するためには、我々がこれまでに開発した IP6/ $\beta$ -TCP 粉体[3]を用いた。具体的には、調製したプロタミン担持微小球粉体と IP6/ $\beta$ -TCP 粉体を重量比 1:1 となるよう混合した粉体をセメントの原料粉体とした。この粉体を固液比 1/0.3 (w/w) となるよう 2.5 mass%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  と混練し、100 MPa で一軸加圧成形し、 $\phi 15\text{mm}$  のセメントを作製した。作製したセメントを用いて *in vitro* 抗菌性試験(バイオフィーム形成試験)に用いた。

プロタミン担持微小球セメントの抗菌性評価には、阻止円法による抗菌性評価とバイオフィーム形成法による抗菌性評価を実施した。阻止円法では、作製したセメントを寒天培地上に静置した後、黄色ブドウ球菌( $1 \times 10^5$  cfu)を加えた top agar を流し込み、 $37^\circ\text{C}$  インキュベータ中で 48 時間静置培養した。培養後、形成された阻止円の面積から抗菌性を評価した。一方、バイオフィーム形成法では、黄色ブドウ球菌を LB 培地中で 18 時間前培養し、これを  $\text{OD}_{600}=0.05$  となるよう希釈した。希釈した菌液 1.2 mL を 24 well plate へ設置したセメント上へ播種し、 $25^\circ\text{C}$  インキュベータ中で 24 時間静置培養した。培養後、バイオフィームの形成を評価するために LIVE/DEAD BacLight dye で黄色ブドウ球菌を染色し、蛍光顕微鏡により菌の生死の状態を観察した。

プロタミンは微生物に対する抗菌性を保持していることから、リン酸カルシウム微小球へ担持させた場合にも同様に抗菌性を示すことが期待できる。そこで、はじめにプロタミン担持微小球粉体からセメントを作製し、その抗菌性を阻止円法を用いて評価した。その結果、予想に反して阻止円の形成は認められず、抗菌活性を示さなかった(図 10)。これは、プロタミンが微小球へ吸着しているため、寒天培地中へ放出されるプロタミン量が僅かとなり、阻止円を形成することができなかったと考えられる。

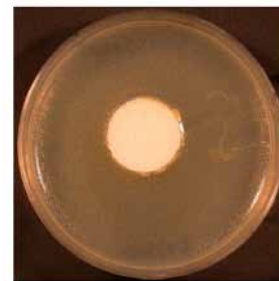


図 10. 阻止円法によるプロタミン担持微小球の抗菌性評価

そこで、抗菌性の評価方法を変更し、バイオフィーム形成の有無でプロタミン担持微小球の抗菌性評価を行った。その際、セメントを培地中へ浸漬させ、バイオフィーム形成の可否を調べるため、水中において崩れない「非崩壊性のセメント」の作製が必要となる。しかし、微小球粉体のみで作製したセメントは水中では崩壊してしまった。そこで、我々が既に開発済みである  $\beta$ -TCP 粉体と各微小

球とを混合することで、非崩壊性のセメントを作製した。その結果、コントロールの $\beta$ -TCPセメント上では、菌が大量に付着しバイオフィームが形成されたのに対し、微小球との混合セメントではいずれも菌が僅かにしか存在せず、バイオフィームの形成を阻害できた(図 11)。これはセメントからの僅かな未洗浄プロタミンの放出と微小球に吸着したプロタミンと菌とが接触することで細胞内の電子分布の不均衡が起こることにより細胞壁が破壊され、バイオフィームが形成されなかったものと考えられる(図 12)。

以上の結果から、プロタミン担持リン酸カルシウム微小球は、菌と接触することによりその抗菌性を発現することが可能な上に、微小球からのプロタミンの放出は僅かであることから、安全性も非常に高いと考えられる。したがって、本研究で作製したプロタミン担持リン酸カルシウム微小球はバイオフィーム形成を阻害可能な優れた生体材料として活用されることが期待できる。

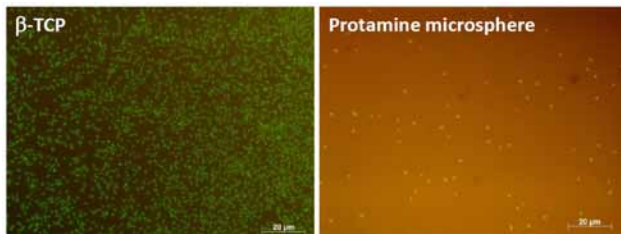


図 11. バイオフィーム法によるプロタミン担持微小球含有セメントの抗菌性評価

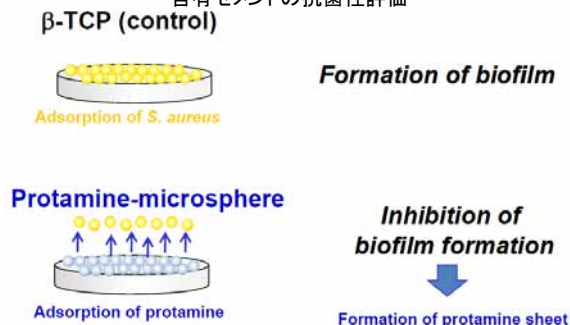


図 12. 抗菌性発現メカニズムの模式図

### 3. 考察及び今後の展望

プロタミンを含む抗菌性ペプチド(タンパク質)はヒトを含むあらゆる生物に共通の先天性免疫機構に関与し、病原菌の侵入の際に働く生体防御機構として近年注目を集めている[4]。微生物の細胞膜に直接作用して膜構造を破壊する膜作動型ペプチドは耐性が生じにくいと考えられ、新薬の開発にも期待が寄せられている。多くの抗菌性ペプチドは、静電相互作用で膜に結合し、細胞膜を亢進させ、これが主要な殺菌機構であると考えられている[5]。この抗菌性ペプチドは皮膚・気道・消化管などの外界と接触する上皮組織あるいは貪食性の血球に存在しており、様々な細菌に活性を示し、さらに宿主に対して毒性が低いといった優れた特性も備えている。従来の薬剤とは異なる作用機序を有する抗菌性ペプチドは抗菌薬への応用が待望されるとともに、近年、ペプチドの構造や作用機序からヒントを得て、ポリマー抗菌剤の開発にも応用されるなど幅広い展開に貢献している。

本研究では、抗菌性タンパク質と骨補填剤として利用されるリン酸カルシウムとを組み合わせることで、抗菌性を発現するリン酸カルシウムの創製を試みた。抗菌性タンパク質を静電相互作用に基づきリン酸カルシウムへ吸着させ、材料表面上に抗菌性タンパク質をコーティングする技術である。リン酸カルシウム表面に吸着した抗菌性タンパク質は、破骨細胞によるリン酸カルシウムの溶解(吸収)に伴い、材料表面よりリリースされ、これが細菌に作用することで、細菌の膜構造を破壊し、生体材料上でのバイオフィーム形成を阻害する。本技術は、耐性菌の出現を抑制することが可能で、かつ細菌感染の主要原因とされるバイオフィームの形成を阻害することができ、感染症のリスクを低減させる新規の抗菌性生体材料として利用されることを期待する。

世界的に高齢化が進み、2040年には先進国のみならず中国、ロシアといった新興国でも高齢化率が超高齢化社会とされる21%を超える。なかでも日本は世界最速のペースで高齢化が進行し、2040年には高齢化率が40%を超える見通しである。高齢化に伴い疾病の予防や診断・治療に使用される医療機器への需要は増加の一途をたどっており、今後も高い成長を維持することが予想される。医療機器、生体材料の導入には有害な細菌や感染症を伴う事例が多いことから、有効な抗菌薬の開発と共に生体材料自体に抗感染性や抗菌性を付与する技術の開発がより一層求められる。ワクチンや抗体、抗菌ポリマーの開発というように抗菌薬に依存しない薬剤耐性菌感染症に対する治療戦略の検討とその技術を生体材料にも応用、発展させることが重要である。

最後に、抗菌性と生体適合性はトレードオフの関係にあり、高い抗菌力を要求すると細胞を寄せ付けないほどの生体不適合性を招くことが多い。しかし、十分な抗菌作用がなければ、感染症を征圧することは不可能である。抗菌性と生体適合性、両者の微妙なバランスを保ちつつ、それぞれの機能を存分に発揮できるような材料設計および材料創製が必要である。

#### 【参考文献】

1. P.S. Stewart and J.W. Costerton, *Lancet*, **358**, 135-138 (2001).
2. R. Balhorn, *Genome. Biol.*, **8**, 227.1-227.8 (2007).
3. T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 1383-1394 (2013).
4. M. Zasloff, *Nature*, **415**, 389-395 (2002).
5. K.A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 238-250 (2005).



# 抗菌性を備えたリン酸カルシウムセメントの創製とその評価(4)

## —ラクトフェリンによるアプローチ—

神澤信行、羽太優理、松本 純、川延勇介、相澤 守

### 1. はじめに

Hydroxyapatite (HAp)は骨や歯など硬組織を形成する無機成分に類似した化学組成をもち、骨組織と直接接合できる、「生体活性」を持つことから、整形外科や口腔外科などの領域で骨充填剤として臨床応用されている。また HAp の材料形態には、緻密体、多孔体、顆粒、セメントなどがあるが、特に骨欠損部の補填に際して小さな孔から注入可能で、体内で欠損形状に合わせて硬化するセメントは臨床現場からのニーズも高いとされている。しかしながら、現在のアパタイトセメントは、酸塩基反応を利用し硬化させることが多く、問題点として硬化時の pH 変動によって患部での炎症が惹起されたり、硬化に時間がかかってしまうことなどが問題として挙げられてきた。そこで、従来とは全く異なった硬化メカニズムをもつ、アパタイトセメントが明治大学相澤らにより開発された[1]。

#### 1.1 抗菌性の付与

相澤らは、イノシトール 6 リン酸(IP6)のキレート作用により HAp を表面修飾し、水と混練することで硬化させる新しい硬化メカニズムを持つ HAp セメントを作製した。その結果、pH 変動を伴うことなく、短時間で HAp セメントは硬化し、生体適合性などが検証されてきた。また、臨床応用を前にして、更に付加価値として抗菌性を付与したセメントの創製が検討されてきた。キレート硬化型の HAp セメントに限らず、体内にインプラントした際に起きる術後感染 Surgical Site Infection (SSI)は大きな問題である。現在、人工骨を体内にインプラントするには、クリーンルームを用いて無菌状態で行うが、抗菌剤を同時に投与すると、SSI 発生率は低くなることが報告されている[2]。しかし、SSI の予防目的での抗生物質投与は、多剤耐性菌の発生を促しかねないとの懸念もあり問題視されている。さらに骨組織は、全身投与では抗菌剤が移行しにくい部位であり、いったん感染が発症すると、人工骨を除去しなくてはならず、抗菌剤投与が有効であるかは疑問視されている。そこで国内では、人工骨置換術後の MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)感染に対し、バンコマイシン含有骨セメントを補填する試みが行われており、その有効性が報告されている。欧州でもバンコマイシン含有骨セメントを用いた *in vivo* 実験が 20 年以上前から行われている。これ以外にも、Alt らは家兎を用いた動物実験で、骨セメントにゲンタマイシンを含有させ、術後感染発症率を減少させることを骨組織の抗菌剤濃度、組織学的検討によって明らかに

した[3]。このように生体材料に抗生物質を添加し、抗菌性を付与させた材料開発は国内外で行われているが、耐性菌の出現などにより新たな抗菌物質を用いた生体材料の開発が定期的に必要であることや、耐性菌は他の抗生物質に対しても最小発育阻止濃度 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)値が高くなることが問題となっている。

#### 1.2 ラクトフェリンについて

先述の様な耐性菌に対するアプローチとしては 2 つあげられる。1 つめは新たな抗菌物質または現行の抗生物質の構造変化による改良である。そして 2 つめは 2 種以上の抗菌物質を組み合わせることで、相乗効果により MRSA などの耐性菌にも一種類の抗菌剤の濃度をあげることなく抗菌効果を持たせる方法である。注目されている抗菌物質のひとつとして、ヒトやウシなどの母乳、鼻水、涙の構成成分であり、抗菌性、抗腫瘍性、骨分化促進なども報告されている、lactoferrin (LF, 図 1) があげられる[4, 5]。LF は単体で抗菌活性をもつだけでなく、抗生物質と同時に使用することにより、耐性菌の MIC 値を下げることも報告されている。また、*in vitro* だけでなく、*in vivo* で免疫系に作用し炎症を緩和することも報告されている。*In vitro* 実験では同じ涙などの構成成分で抗菌物質としても知られる lysozyme (LZ) と同時に菌懸濁液に添加することにより、相乗効果によって抗菌活性があがることが報告されている[6]。この相乗効果は LF および LZ が細菌の細胞壁に結合し、細胞壁の構造変化により細胞内に運ばれ、細胞内の物質にも作用するためとされているが、詳細は分かってい

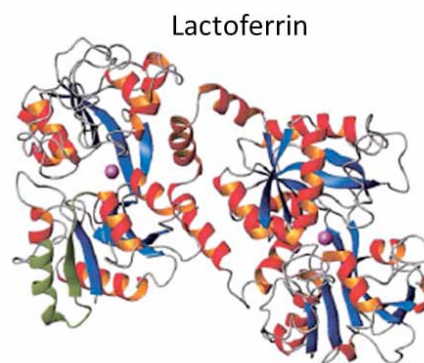


図 1. Lactoferrin

Lactoferrin は分子量 78 kDa のタンパク質で、母乳や涙に含まれる。分子内には 2 つの鉄がキレート結合しており、抗菌性の他に抗腫瘍性や骨分化促進能があるとされている。

ない。

LF を HAp に添加した生体材料の抗菌効果は、*in vivo*、*in vitro* ともに報告されており、抗菌剤としての有用性が示されてきた[7, 8]。また、LF は抗菌効果だけでなく、破骨細胞分化抑制や、抗腫瘍効果も報告されており、骨の生体材料として用いることで多機能性を付与できることも期待できる。しかしながら *in vitro* 評価系において、LF の抗菌活性は十分に評価されておらず、生体材料への機能付与に関しても基礎的な解析を行う必要がある。

そこで本研究ではキレート硬化型骨修復セメントに LF をモデル抗菌物質として添加し、抗菌性を付与させるにあたり、LF および LF セメントが大腸菌や黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成にどのような影響をおよぼすのか、さらにバイオフィーム内の生死菌の局在や形態について詳細に解析し、最終的には生体材料に多機能性を付与できる因子としての可能性について検討した。

## 2. 実験と結果

### 2.1 菌の培養

大腸菌 *Escherichia coli* K12 W3110 [Wild Type] および、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* IAM1011 [Wild Type] を、それぞれ LB 寒天培地上で培養(37°C、一晚)し、この寒天培地よりシングルコロニーを取り、LB 液体培地で培養(37°C、一晚)したものを *overnight culture* として使用した。

### 2.2 LF によるバイオフィーム形成抑制

主に生体材料に対する医療の現場では、材料表面に付着する菌によって形成されるバイオフィームの形成が問題視されている。バイオフィームの形成は抗菌剤が菌にアクセスすることを阻害し、長期にわたって菌の感染を維持させる働きがある。そこで、付着菌に対して LF が抗菌活性を示すか調べるため、LB 培地中で 18 時間前培養した *S. aureus* と *E. coli* の菌液中に、LF 2 mg·ml<sup>-1</sup> と LZ 6 mg·ml<sup>-1</sup> を単独あるいは共に添加し、12-well plate dish に播種し 24 h 培養後、バイオフィームの形成量をクリスタルバイオレット染色により比較した(図 2 上段)。LF を単独で添加したものは、*S. aureus* によって作られるバイオフィーム形成量が何も加えてない場合と比べて有意に減少した。しかしながら、LF と LZ と共に加えた場合や、LZ を単独で加えた場合はバイオフィームの形成に変化が見られなかった。この結果は過去の報告とは異なるが、本研究では LF 単独で HAp セメントに添加する抗菌物質として用いることとした。また、LF によるバイオフィーム形成抑制がどの添加濃度からそれぞれ起こるかを調べるため、培地中に 0~3 mg·ml<sup>-1</sup> の添加濃度で同様の実験を行った(図 2 下段)。その結果、どちらの菌も LF 濃度依存的にバイオフィーム形成が抑制されたが、*S. aureus* では 0.1 mg·ml<sup>-1</sup>、*E. coli* では 2 mg·ml<sup>-1</sup> からバイオフィームの形成が抑制された。

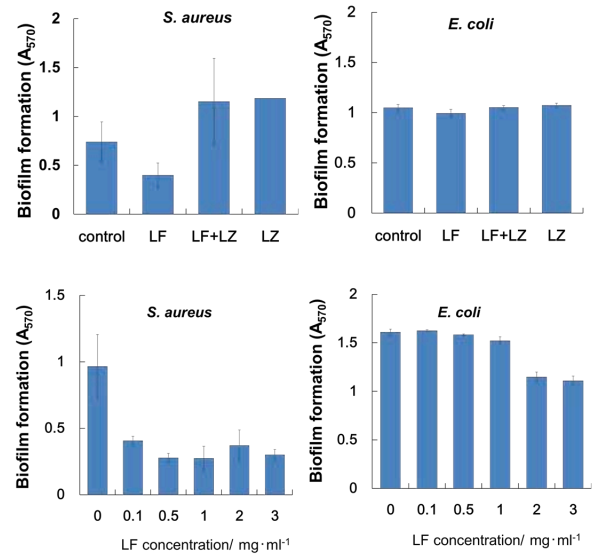


図 2. LF 存在下でのバイオフィーム形成

異なる条件の LF または LZ を加え、培養 dish 上で培養した。一定期間後、クリスタルバイオレット染色によりバイオフィームを染色後、比色し形成量としてグラフにまとめた。

### 2.3 LIVE/DEAD 染色による評価

LF 添加時に形成されたバイオフィーム内の菌の生死細胞の局在を調べるため、形成されたバイオフィームを LIVE/DEAD viability kit を用い蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察した(図 3)。LF を添加していない菌と比べ、どちらの菌も死細胞の個数の増加は観察されず、菌数自体の減少が見られた。また、この時接着しなかった菌がどの程度死滅しているかをコロニーカウント法により測定した(data not shown)。その結果、生菌数が control と比べ差が見られなかったことから、LF によるバイオフィーム形成阻害は、殺菌作用によるものではなく、接着阻害であることが示唆された。LF の現在までに報告されているグラム陰性菌に対する抗菌メカニズムは、細胞壁の構成物質である Lipopolysaccharide (LPS) の、特に Lipid A を遊離させる作用であり、グラム陽性菌に対しては、リポ多

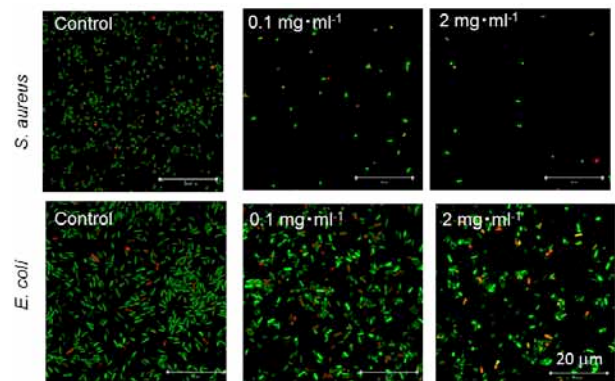


図 3. Dish 上に培養した菌の LIVE/DEAD 染色

黄色ブドウ球菌(上段)と大腸菌(下段)を異なる濃度の LF 存在下で dish 培養し、接着した菌の様子を LIVE/DEAD 染色した。

糖に結合し、細胞の細胞壁の構造変化を起こさせる作用があるとされているが、詳細に関しては今後検討の必要がある。

## 2. 4 LF の細胞増殖への影響評価

*E. coli* と *S. aureus* の両菌で接着阻害が起きた LF の濃度条件 ( $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) が正常細胞の増殖に影響を与えるかを調べるため、dish 上に MC3T3-E1 細胞を  $1\times 10^5$  個播種し、終濃度  $0.1$  および  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  の LF を培地に添加後 24 h 培養した MC3T3-E1 細胞を観察した(図 4)。また、DAPI により核染色、Alexa Fluor® 594 phalloidin により actin の染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した (data not shown)。LF を添加した MC3T3-E1 細胞は何も添加していない control の細胞と比べて形態に差異は見いだせなかった。蛍光観察でも核の形態異常や、細胞骨格への影響を精査したが、顕著な違いは見られなかった。このことから、添加濃度  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  の LF は MC3T3-E1 細胞に対し外見上有意な影響を及ぼさないものと考えられた。

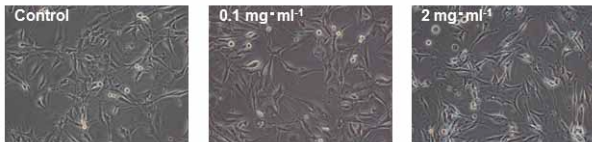


図 4. LF 添加による細胞形態へ影響の解析

抗菌性が明らかな濃度で LF を添加した培地で dish 培養した MC3T3-E1 細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。

さらに、LF が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖にどのような影響があるかを調べる為に、MC3T3-E1 細胞を用いて、培地に LF を  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  および  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  の濃度になるように添加し、3 日目までの細胞増殖を、血球計算盤を用いて測定した (図 5)。その結果、LF の濃度が  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  では control と比べ有意差がみられなかったが  $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  添加では培養 3 日目において control より増殖が抑えられるという結果になった。菌の接着自体は 24 時間以内に押さえ込むことが出来るため、細胞への影響を考慮した場合、2 日間程度までの添加が妥当であることがわかった。

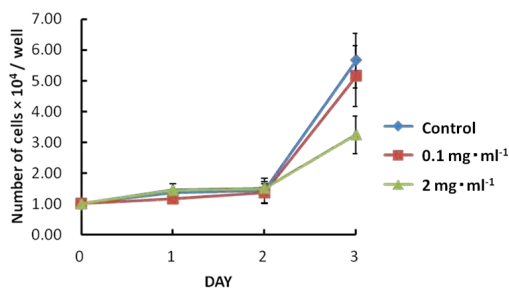


図 5. LF 添加による細胞増殖への影響の解析

LF 添加後 3 日間までの増殖性を細胞数をカウントすることで調べた。 $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  の LF 濃度では、僅かに増殖抑制が見られた。

## 2. 5 IP6-HAp セメントの作製

HAp セメントは既報に従い、湿式合成した。Ca(OH)<sub>2</sub> 37 g を  $1 \text{ dm}^3$  の超純水に溶解してから懸濁溶液を  $3 \text{ dm}^3$  ビーカーに入れ、液温が  $37^\circ\text{C}$  になるまで恒温槽で温めた。 $0.3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を  $1 \text{ dm}^3/\text{h}$  の速さで滴下し、pH が 10 を切らないように 25%アンモニアを加えた。滴下終了後、さらに 1 時間攪拌し、 $37^\circ\text{C}$ 、24 時間インキュベートした。次に、42 Ashless  $\phi 90 \text{ mm}$  のろ紙 (GE healthcare) で濾過後、アンモニア臭がしなくなるまで水洗浄した。液体窒素で凍結させ、水分がなくなるまで減圧乾燥し保存した。また、IP6 での表面修飾効率を向上させるため、合成 HAp 10 g に超純水 40 ml を加え、容器に ZrO<sub>2</sub> ボール 50 個入れ、5 分間 300 rpm でボールミル (FRITTSCH, WATERLOO, German) 粉砕した。

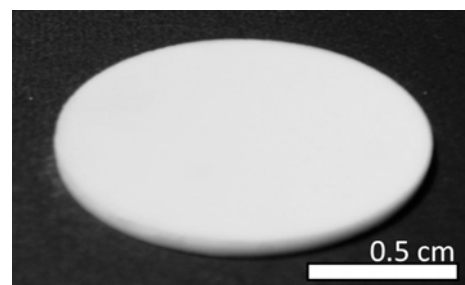


図 6. 成形後の IP6-HAp セメント

粉砕後の粉末は 400 ml の 1000 ppm IP6 溶液に懸濁し、5 h 攪拌することで粉末表面を IP6 コーティングした (IP6-HAp)。IP6-HAp は減圧乾燥し、メノー乳鉢で塊を粉砕し、ビニール袋に入れてデシケーター内で保存した。セメントに成形する際には、この粉体 1 g を量りとりメノー乳鉢に入れ、精製水 0.25 ml を加えて 2 分間ゴムベラとスパチュラを使って混ぜ合わせた。混ぜ終わったら成形器に移し、15 MPa の圧力をかけて成形体を得た (IP6-HAp セメント、図 6)。1 日乾燥させた後、E.O.G.滅菌 (elk, Osaka, Japan) をして保存した。

## 2. 6 LF セメントの作製

遠心チューブ内 (50 ml) で IP6-HAp 粉末 1 g に対しフィルター滅菌した LF  $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  溶液を 3 ml 加え (total LF  $15 \text{ mg/g}$  HAp)、24 h rotator でゆっくりと攪拌した。その後凍結乾燥し、得られた LF を含む粉末を IP6-HAp と同様に成形、滅菌した。これにより作製されたセメントを LF セメントと以後表記する。

## 2. 7 LF セメントからの LF 溶出量

LF セメントを精製水に浸漬し、3 日間の LF 溶出量の変化を Bradford 法により調べた (図 7)。その結果、バイオフィーム形成 (24 h 後) までに 1 g の LF セメントから 1 ml 中に  $41.64 \mu\text{g}$  の LF が溶出されたことがわかった。また、溶出挙動を調べたところ、30 min までに大量の溶出が見られ、その後一定に溶出されることが分かった。この結果を踏まえた上で、LF セメントの生化学的な評価、解析を行った。



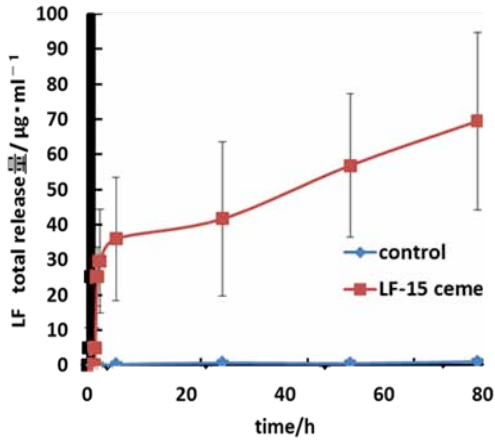


図 7. LF セメントからの LF 溶出挙動

LF セメント及び control セメントから溶出する LF のタンパク質濃度を Bradford 法により測定した。積算した値を縦軸としてプロットした。

## 2. 8 LF セメント上で培養した菌の観察

LF セメント上に接着した菌の様子を観察するために、*S. aureus* 及び *E. coli* を LF セメント上に一定量播種し、LF を添加していない control セメント上での増殖と比較した。菌の生死は、LIVE/DEAD viability kit により染め分け、2 種間で違いが見られるかどうかを共焦点レーザー顕微鏡により観察した (図 8)。*E. coli* に対しては、control セメント自体に菌の接着を抑制する傾向が見られ、初期状態から接着した菌の数が少なかった。しかし、LF セメントと control セメントで差が見られず、LF 添加による増殖抑制効果は見られなかった。しかし *S. aureus* に対しては control セメントに対して LF セメントで顕著な増殖抑制が観察された。LF セメント上では control セメント上と比較し接着細胞の数が減少し、バイオフィルムの形成が抑制されたと考えられる。実際に共焦点レーザー顕微鏡で菌の存在する Z 軸方向の暑さを測定しバイオフィルム量として評価した。その結果 control セメント上で存在する菌の層 (5.25 µm) に対して、LF セメント上での菌の層 (3.85 µm) には有意な減少が見られ、バイオフィルム形成を抑制していることが確認出来た。同様の実験を *E. coli* に付いても行ったが、菌の存在する層の厚みには変化が見られず、LF 添加による効果は見られなかった。

LF セメントからの LF の溶出 ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) は、より感受性が強い *S. aureus* においても十分な量 ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) とは言えなかったが、LF セメント上でのバイオフィルム形成が control セメントと比較し顕著に抑制されたことから、材料表面のチャージ変化が菌の接着や増殖に影響を与えているのではないかと考えた。そこで正のチャージをもつタンパク質代表として LZ、またチャージの傾きがなく、HAP に添加するタンパク質の control として BSA を用い、LF と同じ濃度で HAP 紛体に添加し作製した各セメント上でも LIVE/DEAD assay を行った (data not shown)。Control タンパク質として添加した BSA セメント上では無添加の

セメント上に比べてバイオフィルムの厚さが増え、正のチャージを持つ LZ セメント上では LF セメント上ほど顕著ではないが、*E. coli* では初期接着菌数の低下がみられた。*S. aureus* では、LZ セメント上でも LF セメントと同様な接着菌数の減少が見られた。これらの結果から、LF が示す抗菌性は、単に溶液状態で菌数を抑えるだけでなく、セメントに埋め込まれた際には、セメントの表面電位を変え、菌の接着を防いでいる事が考えられた。各セメントの表面電位の測定は今後の課題となる。

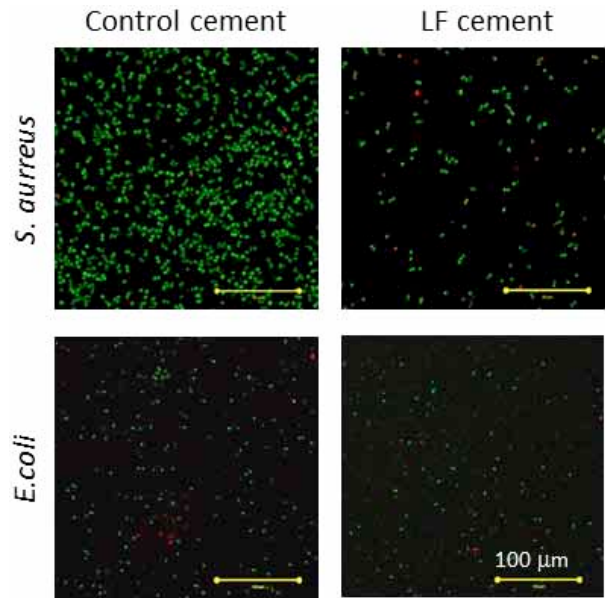


図 8. LF セメント上で培養した菌の LIVE/DEAD 染色

LF セメントおよび control セメント上で各菌を培養し、LIVE/DEAD 染色により生死の判定を行うと共に、共焦点レーザー顕微鏡による観察で、菌の存在する層の厚さを求めバイオフィルム形成の指標とした。

## 2. 1 SEM による LF セメント上の菌の観察

LF セメントの材料表面が菌の形態に及ぼす影響を詳細に解析する為に、LF セメント上に形成したバイオフィルム内の菌を SEM によって観察した (図 9)。*E. coli* は LF セメント上では菌が偏在化し、細胞のまわりにファイバー状のネットが観察され、バイオフィルム特有の細胞外リ多糖類のネットワークと思われるものが観察できた。また、LIVE/DEAD 染色の結果では *S. aureus* は LF セメント上で接着菌数が減少していたが、SEM による観察では control セメント上と比較し顕著な違いは見られず、菌形態に異常

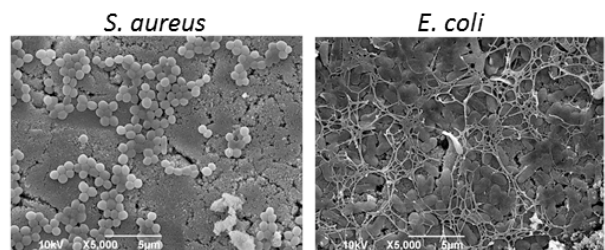


図 9. LF セメント上で培養した菌の SEM 観察



も見られなかった。

### 3. 考察及び今後の展望

我々は本研究に先立ち、キレート硬化型骨修復セメント自体の抗菌性評価を行い、IP6 および IP6-HAp セメント自体には抗菌性がないことを明らかにしている。そこで本研究では、*in vitro*、*in vivo* 共に抗菌性を有することが報告されている LF をモデル抗菌物質として IP6-HAp セメントに添加した。

本研究ではまず LF 2 mg·ml<sup>-1</sup> を単独あるいは LZ 6 mg·ml<sup>-1</sup> とともに添加した培地での菌の増殖について調べた (data not shown)。既報と同様に LF 単独で加えるよりも、LZ と共に添加した場合の方が菌の増殖は抑制された。LZ と LF のどちらも、菌の細胞壁に結合し、構造変化を起こす作用がある事では一致するものの、結合部位が異なるため、相乗的な抗菌作用が見られたものと考えられた。しかし、同じ添加濃度にも関わらず、付着菌に対する抗菌評価であるバイオフィーム形成能について調べたところ、バイオフィーム形成量は LF 単独添加の場合のみで有意に減少した。今回は LF 単独添加による抗菌性付与の可能性について以後検討を行った。

LF によるバイオフィーム形成抑制は、LF 濃度依存性であった。また、LF セメント上のバイオフィーム形成の様子は、LIVE/DEAD 染色と共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。*E. coli* では、初期播種時の IP6-HAp セメントへの接着の悪さから抑制効果の評価が難しく、*S. aureus* でのみ接着後の顕著な増殖抑制が見られた。また、Z 軸方向への観察から、バイオフィームの形成自体も LF の添加により抑制された。Bradford 法により測定した LF セメントからの LF 溶出量は、dish 上のバイオフィーム形成抑制を示す LF 濃度よりも少量であったにも関わらず、LF セメント上でのバイオフィーム形成は control セメントと比較し有意に抑制された。このことは LF が正のチャージを持ち、細菌の細胞壁に結合し、負電荷を減らすことが報告されているため、材料表面のチャージが変化したこと起因するのではないかと考えられた。しかし、LF の抗菌効果としては細胞壁の他にも強い鉄イオンのキレート作用による細胞増殖の静菌的な抑制が報告されている[9]。

このように、LF セメントの抗菌評価は、*S. aureus* に代表されるグラム陽性菌、*E. coli* に代表されるグラム陰性菌どちらに対しても菌を死滅させるような殺菌的作用はなく、静菌的な抗菌作用が示された。近年、LF の抗菌活性部位である N 末端側の 1-11 番までのアミノ酸配列である LF(1-11)を、水酸アパタイトに添加したセメントの抗菌評価が行われ始めている[8]。また、LF の pepsin 分解物であり、LF 抗菌活性部位を含み、LF に対して 10~100 倍の抗菌活性をもつ LFc<sub>in</sub> についても、抗菌評価だけでなく抗腫瘍効果に関する研究が報告されてきている[5, 10]。しかし、骨分化促進や破骨細胞分化抑制などは限定的にしか報告されておらず[4, 11]、生体材料への応用を考えるためには、更なる検討が必要である。

今回作製された LF セメントは骨芽細胞の細胞増殖に影

響を与えることなく *S. aureus* の接着を抑制した。*E. coli* への影響は、その詳細を解明するに至らなかった。今後更なる抗菌効果を望むためには LF の IP6-HAp セメントへの添加量をあげることにより、セメントからの溶出量を増やし溶出された LF により菌を死滅させるか、抗菌活性部位が表面に出るようにセメントの作製方法を改善する必要があると考える。

#### 【参考文献】

1. Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50-55 (2008).
2. S.M. Mchugh, M.A. Corrigan, B.D. Dimitrov, S. Cowman, S. Tierney, A.D.K. Hikll, and H. Humphreys, *J. Hosp. Infec.*, **78**, 312-316 (2011).
3. V. Alt, A. Bitschnau, J. Osterling, A. Sewing, C. Meyer, R. Kraus, S.A. Meissner, S. Wenisch, E. Domann and R. Schnettler, *Biomaterials* **27**, 4627-4634 (2006).
4. J. Cornish and D. Naot, *Biometals*, **23**, 425-430 (2010).
5. L.T. Eliassen, G. Berge, A. Leknessund, M. Wikman, I. Lindin, C. Lokke, F. Ponthan, J.I. Johnsen, B. Sveinbjornsson, P. Kogner, T. Flaegstad, and O. Rekdal, *Int. J. Cancer*, **119**, 493-500 (2006).
6. E.C. Leitch and M.D.P. Willcox *J. Med. Microbiol.*, **47**, 837-842 (1998).
7. J.Z. Qiu, D.R. Hendrixson, E.N. Baker, T.F. Murphy, J. W. Geme, and A.G. Plaut, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 12641-12646 (1998).
8. H.P. Stallmann, R. deRoo, C. Faber, A.V.N. Amerongen and P.I.J.M. Wuisman *J. Orthop. Res.*, **26**, 531-538 (2008).
9. C.C. Yen, C.J. She, W.H. Hsu, Y.H. Lin, H.L. Chen, C.M. Chen. *Biometals*, **24**, 585-594 (2011).
10. J.L. Gifford, H.N. Hunter, and H.J. Vogel, *Cell Mol. Life Sci.*, **62**, 2588-2598 (2005).
11. F. Lorget, J. Clough, M. Oliveira, M.C. Daury, A. Sabokbar, and E. Offord, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 261-266 (2002).

# イノシトールリン酸単独の抗腫瘍効果の検証

本田みちよ、猪股義彦、相澤 守

## 1. はじめに

世界保健機関の国際ガン研究機関は、ガンによる年間死亡者数は2030年までに、2008年からほぼ倍増の1330万人に達するとの予測を発表した。27種類のガンに焦点をあてたこの予測は、2030年までに、ガンの年間罹患患者数は2130万人(08年は1270万人)、年間死亡者数は1330万人(08年は760万人)に跳ね上がるとしている。組織別に見ると、罹患数が多いのは肺ガンで、次いで多かったのは乳ガン、大腸ガンの順であった。骨転移しやすいガンには肺ガン、乳ガン、前立腺ガンなどがあるが、乳ガンや前立腺ガン、甲状腺ガンは骨転移してから2年以上の生命予後が期待できる。乳ガンは肺ガンに次いで世界で2番目に多いガンで、女性では最も多い。2006年のアメリカにおける新規乳ガン患者は年間約100万人を超え、死亡数は年間約40万人と推定される。2004年の日本における乳ガン患者の罹患数は年間3.2万人、死亡数は年間8,882人と推定される。世界的に増加傾向にある乳ガンは骨転移の発生頻度は高く、再発の約50%は骨転移で発見されると言われる。さらに骨転移しても50%生存期間が約30-40ヶ月と長い乳ガンは、脊椎転移に対して有効な治療法の開発が必要である。

イノシトールリン酸(inositol hexaphosphate; IP6)は、米や小麦、豆類などの穀物繊維に多く含まれ、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)に匹敵するほどの強いキレート能を有しており、様々な金属イオンを強く結合する。IP6は多くの動植物の細胞内に普遍的に発現し、細胞の増殖や分化など極めて重要な細胞機能を制御していると考えられている。また抗酸化作用や高度の抗腫瘍効果を示すだけでなく、化学療法、薬物療法を含む現在のガン治療法の多くで問題となっている重篤な副作用を引き起こしにくい物質と考えられており、ガン治療への応用が期待されている[1]。

そこで、はじめにIP6セメントにおける効果を検証する前に、IP6単独での抗腫瘍効果を調べるために代表的な株化ガン細胞であるヒト子宮頸ガン由来HeLa細胞を用いてIP6の効果について検証した。さらに、本研究のターゲットとなる“骨”に生じるガン、ヒト骨肉腫細胞(HOS)を用いてIP6の抗腫瘍効果について調べた。本報告では、2種のガン細胞におけるIP6の効果について検証した結果を示す。

## 2. 実験と結果

### 2.1 HeLa細胞におけるIP6の抗腫瘍効果の検証

HeLa細胞はヒト子宮頸癌由来の細胞株であり、一般的

なヒト細胞のモデルとして多くの研究に利用されている。そこで本研究ではまずIP6の抗腫瘍効果を検証するため、HeLa細胞に種々の濃度(0-100 mM)のIP6を一定期間(1, 3, 5 days)処理し、ガン細胞の増殖性について調べた。その結果、IP6処理3日目以降において、1 mMのIP6を処理した細胞ではその増殖が有意に抑制され、5 mMを超えると細胞がほとんど生存できなくなることが明らかになった(data not shown)。そこで、処理期間3日、IP6濃度5 mM以下の条件において、ガン細胞の増殖抑制についてより詳細な解析を行った。

まずIP6濃度と細胞増殖性および細胞障害性の関係について調べるために、生細胞数の測定と乳酸脱水素酵素(Lactate Dehydrogenase; LDH)活性に基づく細胞障害性試験を行った(図1)。

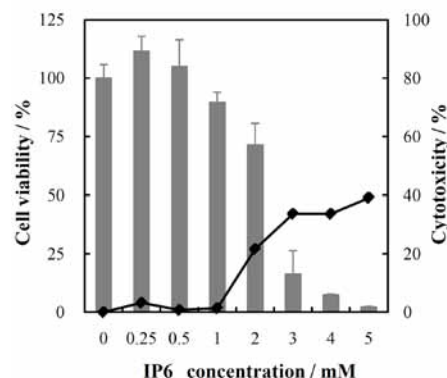


図1. HeLa細胞におけるIP6の細胞増殖に与える影響

その結果、2 mM IP6を処理した場合、生存率は未処理の細胞に対し約70%であった。これに対し、3 mMでは16.3%、5 mMでは2.2%であり、高濃度のIP6をガン細胞であるHeLa細胞に処理することにより著しい細胞増殖抑制を発揮することが示された。次に、同条件において、細胞障害性について調べた。LDHは全ての細胞に存在する原形質酵素であり、原形質膜が損傷を受けることにより、LDHが細胞培養液に放出される。このLDH放出量から損傷を受けた細胞の割合を算出した。その結果、細胞生存率の結果を支持するように、細胞死が誘導され始めたIP6処理濃度が2 mM以上の場合から、急激に細胞障害性が増加した。以上2つの結果から、IP6がHeLa細胞において細胞死を誘導し、ガン細胞の増殖を抑制することが分かった。

次に、IP6がどのようなメカニズムで細胞死を誘導したのかを調べた。一般に、細胞死は、細胞内外の環境の悪化によって起こる細胞死(ネクローシス)と個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる細胞死(アポトーシス)に分類することができる。そこで、今回IP6を処

理することにより引き起こされた細胞死がネクローシスによるものかアポトーシスによるものかを調べるために、フローサイトメトリー(fluorescence activated cell sorting: FACS)を用いて、Annexin V とヨウ化プロピジウム(PI)によるアポトーシスの解析を行った(図 2)。Annexin V は  $Ca^{2+}$  存在下で通常脂質二重層の内側に存在している phosphatidylserin に対し強い親和性を持つためアポトーシスによって引き起こされる細胞膜の変化を検出することができる[2]。また PI はアポトーシスの進行に伴い、細胞膜の構造が壊れると細胞内に入り込み、DNA と結合する。この特徴を利用し、5 mM IP6 を 3 日間処理した際の細胞の状態について調べた。その結果、IP6 を処理した細胞(図 2b, d, f)においては未処理の細胞(図 2a, c, e)に対し、Annexin V 陽性の細胞が増加し、さらに PI と DNA の結合が優位に増加したことも確認された。この結果から、HeLa 細胞に IP6 を処理することにより、アポトーシスが誘導され、本条件においては、細胞が後期のアポトーシスの状態にあることが示された。

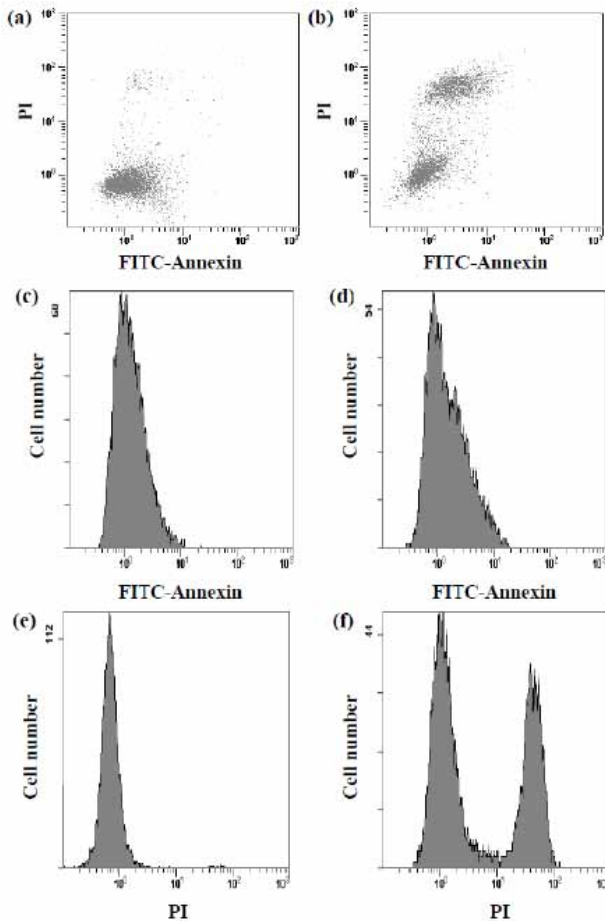


図 2. HeLa 細胞における IP6 によるアポトーシスの誘導 (a, c, e) non treatment, (b, d, f) treatment of 5 mM IP6 for 3 days

さらに、IP6 処理に伴う p53 の発現量の変化に着目した[3]。p53 は多くのヒトガン患者において機能が喪失しているがん抑制遺伝子の一つで、アポトーシスを活性化し、ガンに対する主要な防御機能として作用する。そこで、IP6 を 3 日間様々な濃度で処理した細胞において p53 タンパク

質量がどのように変化するかを調べた(図 3)。その結果、IP6 濃度依存的に p53 タンパク質量は有意に増加した。つまり、IP6 を処理することにより、p53 によるアポトーシスが誘導され、ガン細胞の増殖抑制をもたらしたものと考えられる。

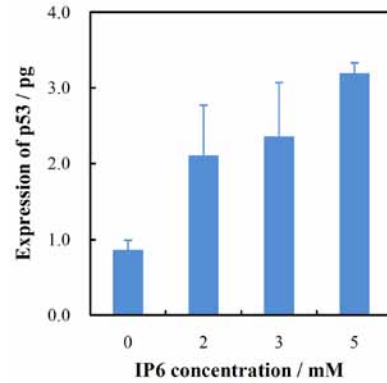


図 3. IP6 処理による p53 タンパク質量の変化

## 2. 2 HOS 細胞における IP6 の抗腫瘍効果の検証

広くガン研究に用いられている HeLa 細胞において、IP6 が抗腫瘍効果を示したことから、次に、今回我々の研究のターゲットとなる“骨のガン”、骨肉腫細胞においても IP6 が抗腫瘍効果を発揮するかを検証した。HeLa 細胞の場合と同様に、種々の濃度の IP6 (0-1.0 mM)を一定期間(1, 2, 3 days)処理し、HOS 細胞の生存率を調べた(図 4)。

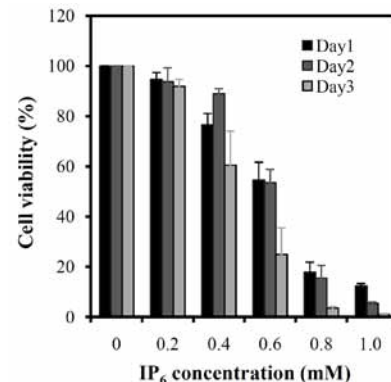


図 4. HOS 細胞における IP6 の細胞増殖に与える影響

その結果、HeLa 細胞の場合と同様に IP6 の濃度依存的に細胞死が誘導され、細胞増殖抑制が起こることが分かった。しかしながら、HeLa 細胞に比べ、IP6 の処理時間、処理濃度が短期間かつ低濃度で細胞死が誘導されることが分かった。HOS 細胞では 0.2 mM 以上の IP6 処理を処理することにより細胞死が誘導され始め、0.8 mM では細胞生存率が約 20%となった。これは HeLa 細胞における 3 mM と同程度である。また HeLa 細胞では処理 3 日後から強い細胞抑制が確認されたが、HOS 細胞では処理 1 日後からその効果が現れた。つまり、細胞腫によって IP6 に対する感受性がかなり異なることが示された。IP6 の抗腫瘍効果を求める場合には、組織や細胞種などによってその有効濃度を明らかにし、最適な条件を設定することが重要である。次に、IP6 を 24 時間処理し、増殖抑制が確認された濃度

における細胞の形態について観察した(図 5)。その結果、0.6 mM IP6 を処理した細胞は、細胞数の減少は確認されたが、コントロールの細胞群と比較し、形態的には大きな変化が見られなかった。0.8 mM の IP6 を処理した場合には、細胞数が著しく減少し、図中\*で示したように細胞が丸く委縮した形態に変化していた。さらに、1 mM の場合は、細胞膜の崩壊や明らかな形態異常が確認された(図中矢印)。またこの時の細胞核を DAPI により染色し、蛍光顕微鏡により観察したところ、一部に核の断片化が認められた(図 6)。今回確認された細胞の委縮、核の断片化、細胞の断片化という現象はアポトーシス時に見られる現象と一致している。さらに、IP6 処理に伴い、caspase も検出されたことから、細胞がアポトーシスを起こしていることが分かった。つまり、HOS 細胞においても HeLa 細胞と同様に IP6 を処理することにより、アポトーシスが誘導され、細胞死を引き起こされるというメカニズムで抗腫瘍効果が発揮されることが明らかになった。

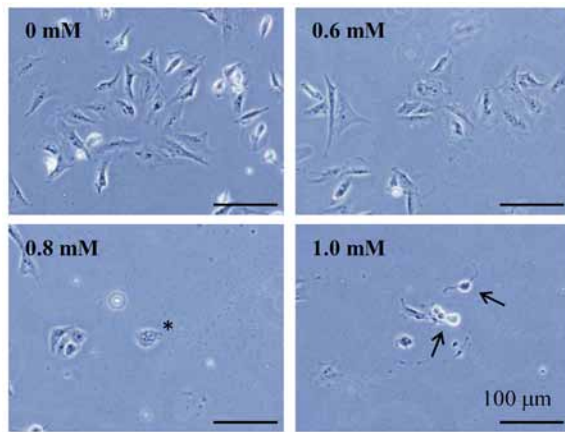


図 5. IP6 処理に伴う HOS 細胞の形態変化

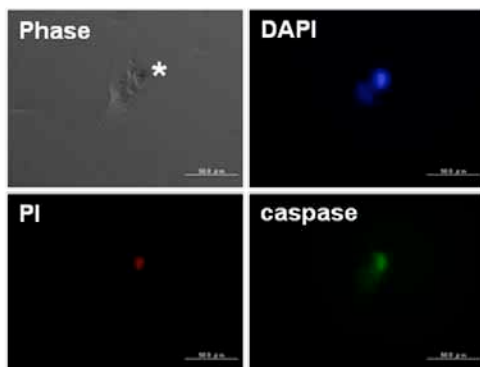


図 6. IP6 処理によるアポトーシスの誘導

そこで、次に、HOS 細胞に対し、1 mM IP6 溶液を 24 時間処理し、DNA マイクロアレイにより IP6 処理に伴う遺伝子発現変動について解析した。

その結果、5,837 遺伝子において発現に変動が確認された(表 1)。その遺伝子の中には遺伝子産物のネットワークを担う機能・遺伝子産物が担う機能・遺伝子の発現場所など機能や発現部位などが大きく異なっているものが存在した。必ずしも大きく変動した遺伝子が重要とも限らないので、一つ一つ遺伝子の機能を確認しつつ、IP6 による影

表 1. HOS 細胞での IP6 処理による発現変動遺伝子

Non treatment vs 1 mM IP6 treatment	
Reliable genes	5837
2X up-regulated genes	204
2X down-regulated genes	324
4X up-regulated genes	19
4X down-regulated genes	20

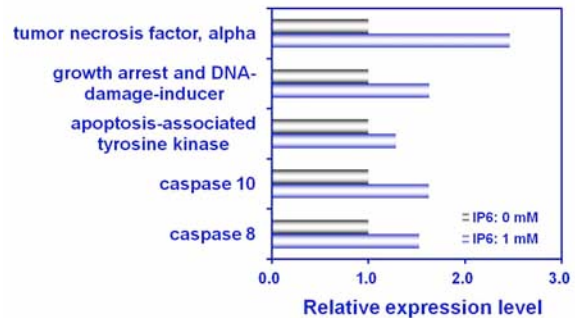


図 7. IP6 処理に伴うアポトーシス関連遺伝子の発現変動

影響について解析する必要がある。

しかし、ここまでの研究において、IP6 を腫瘍細胞へ処理するとアポトーシスを介した細胞死が誘導されることが明らかになっている。そこで、変動遺伝子群の中でもアポトーシスに注目して、その変化について調べた(図 7)。その結果、TNF (tumor necrosis factor) と呼ばれるアポトーシス誘導因子 (=デス因子) の発現が IP6 処理に伴い 2 倍以上に増加し、また caspase の発現も約 1.5 倍に増加した。このように形態学的な変化と同時に遺伝子レベルでの変動も確認され、IP6 による細胞死はアポトーシスが主な経路として引き起こされていることが明らかになった。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、キレート硬化型セメントの開発において、IP6 の有するキレート能を利用し、新規のメカニズムでセメントの硬化を促進させるだけでなく、IP6 の抗腫瘍効果を応用し、ガン細胞の増殖抑制などこれまでにない付加価値を有する高機能セメントの創製を最終的な目標としている。

そこで、抗腫瘍効果を有するセメントの創製に先立ち、まず IP6 単独での抗腫瘍効果について検証した。IP6 は過去の研究において、大腸ガン、乳ガン、前立腺ガン、肝ガンなどの臓器、組織においてガンを抑制するという報告がある[4]。そこで本研究では、ヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞とヒト骨肉種由来 HOS 細胞において、IP6 が過去の報告と同様に抗腫瘍効果を発揮するかを検証した。その結果、いずれの細胞においても有効濃度は異なったが、IP6 はガン細胞の増殖を抑制することが明らかになった。またその増殖抑制は、IP6 を処理することによりアポトーシスが誘導され、細胞死が引き起こされるというメカニズムに基づくことも示された。さらにガン抑制遺伝子である p53 の発現も IP6 処理により増加した。p53 の発現量増加に伴い、細胞増殖の抑制と細胞成熟の促進つまりガン細胞の浸潤



増殖する機能が著しく低下することが考えられる。一方、今回は検証しなかったが、IP6 のもつ抗酸化作用や免疫力増強作用により、ナチュラルキラー細胞が活性化されていることも予想できる。また、過去の研究から IP6 が細胞分裂の抑制にも関与するという報告[5]もあり、IP6 が DNA 合成の速度を低下させたことにより、ガン細胞の増殖を抑制し、抗腫瘍効果を発揮した可能性も考えられる。

以上の結果から、IP6 の抗腫瘍効果は様々な細胞においてその効果が発揮されるが、その有効濃度が異なるため、細胞種により処理濃度を検討する必要があることが示された。

本研究で使用する骨肉腫の細胞においても抗腫瘍効果が示されたことから、今後 IP6 キレート硬化型セメント上で HOS 細胞を培養した際にも同様な効果が発揮されることが推察できる。IP6 キレート硬化型セメントにおいては HOS 細胞の抗腫瘍効果を検証するとともにセメントに対する細胞の生体適合性についても評価する必要がある。最終的な臨床での使用を考慮すると腫瘍部もしくは腫瘍搔爬部へのインプラントが想定されるため、腫瘍細胞だけではなく、正常細胞を用いても良好な生体適合性を示さなければならない。したがって、作製したセメント上で未分化間葉系幹細胞などを培養し、その細胞応答性の観点から生物学的な評価を実施し、IP6 キレート硬化型セメントの安全性と有用性の検証を行う必要がある。

それらの検証結果については、次頁以降で報告する。

#### 【参考文献】

1. Vucenik and A.M. Shamsuddin, *J. Nutr.*, **133**, 3778-3784 (2003).
2. S. Huerta, E.J. Goulet, S. Huerta-Yeppez and E.H. Livingston, *J. Surg. Res.*, **139**, 143-156 (2007).
3. F. Rodier, J. Campisi, and D. Bhaumik, *Nucleic Acids Res.*, **35**, 7475-7484 (2007).
4. A.M. Shamsuddin, I. Vucenik, and K.E. Cole, *Life Sci.*, **61**, 343-354 (1997).
5. J. Singh and K.P. Gupta, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **27**, 209-217 (2008).

# 抗腫瘍効果を備えたキレート硬化型アパタイトセメントの 創製とその評価

本田みちよ

## 1. はじめに

日本人の死亡原因の第一位はガンで、現在では死亡数の30%を超えて、3人に1人はガンで死亡する状況であり、社会問題ともいえる。そのガンは様々な組織から血管を通過して、骨に転移する可能性を持っている。骨転移を起こすと疼痛や脆弱化による病的骨折を引き起こし、quality of life (QOL)が著しく低下する。疼痛、麻痺の進行や病的骨折を起こしてしまった場合には、早期の離床を目指し、骨修復セメントで補強する治療を基本とし、症状に合わせた様々な人工材料で再建する治療方法が行われている。

そこで、近年、病変部の骨欠損に移植するために様々な材質、形状の人工骨が開発されている。水酸アパタイトに代表される骨充填剤には、緻密体、多孔体、顆粒、セメントなどがあるが、中でも任意の形状に成形可能なセメントは臨床現場からのニーズも高い[1-4]。しかしながら、現在臨床現場で利用されているセメントは硬化時における力学特性や生体適合性を含め、多くの問題を抱えているのが現状である。そこで、本プロジェクトでは現状の硬化時の問題を克服するために、「イノシトールリン酸(inositol hexaphosphate; IP6)」のキレート作用を利用して従来の反応とは異なったメカニズムで硬化する新規の骨修復セメントの開発を試みている[5]。

前頁にて報告した通り、このIP6は抗腫瘍効果を示すだけでなく、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)に匹敵するほどの強いキレート能を有しており、様々な金属イオンを強く結合する。

本研究では、IP6の持つ利点を応用し、従来の骨修復セメントを用いた「骨の強度を高め、疼痛緩和させる治療」に使用するだけでなく、「転移したガン細胞の増殖抑制やガンの予防など」を付加し、単なる骨セメントとしてではなく、その用途を拡充させた高機能セメントを作製し、その有用性を生物学的に証明することを目的としている。なお、本研究ではセメントの作製およびセメント上での細胞応答性の調査を実施した。具体的には、様々な濃度のIP6溶液でHAp粉体を表面修飾したIP6-HAp粉体を調製し、粉体のキャラクタリゼーションを行った。さらに、得られた粉体を用いて、IP6-HApセメントを作製した。作製したセメント上で正常細胞および腫瘍細胞を培養することにより、IP6-HApセメントに対する細胞の応答性を生物学的に検証した。

## 2. 実験と結果

### 2.1 セメント原料粉体の調製とセメントの作製

セメント原料粉体には、湿式法により合成した水酸アパタイト(wHAp)を用い、その粉体を1000, 2000, 3000, 5000, 10000 ppmに調製したIP6溶液中で5時間表面修飾した。その後、吸引ろ過、凍結乾燥し、表面修飾wHAp粉体(IP6-wHAp)を得た。XRDパターンより、表面修飾に用いたIP6溶液の濃度に関わらず、得られた粉体はいずれもHAp単一相であり、IP6による表面修飾は粉体の結晶性に影響を与えないことを確認した(図1)。

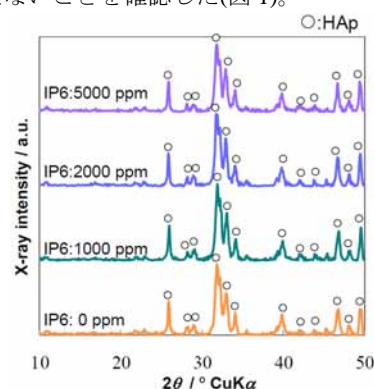


図1. セメント原料粉体のXRDパターン

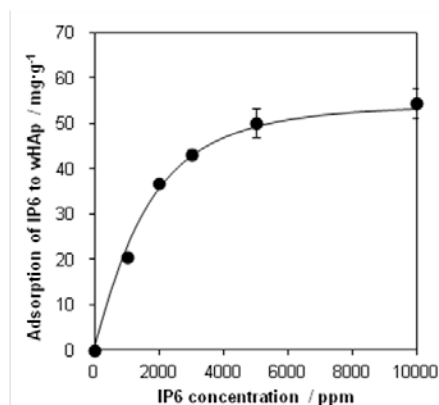


図2. wHAp粉体に対するIP6の吸着量

さらに、wHAp粉体に対するIP6の吸着量について調べたところ、IP6はwHAp粉体に対して典型的なLangmuir型の単分子層吸着し、5000 ppm以上で飽和に達することが示された(図2)。この結果は、HAp-100粉体を用いた場合と同様な結果であったが、湿式合成したwHApの方が粒

子が微小化されたことから、粉体に対する IP6 吸着量は増加した。しかしながら、IP6 の粉体への吸着様式は粉体の種類を問わず Langmuir 型の単分子層吸着であり、一様であることが分かった。さらに、調製した IP6-HAp 粉体の表面電位をレーザードップラー法を用いて測定した。その結果、IP6 による表面修飾濃度が 2000 ppm までは濃度依存的にゼータ電位が負電荷側にシフトしたが、それ以上の濃度域ではほぼ一定の値を示した(data not shown)。IP6 の吸着量の増加に伴い、表面の OH 基が増加したことによりゼータ電位が負電荷側へシフトしたと考えられる。HAp 粉体への IP6 の吸着が飽和に達したことによりゼータ電位も一定値を示したと考えられる。

また各種評価を行うために、固液比が 1/0.3 [g/cm<sup>3</sup>]となるように、IP6-wHAp 粉体と水を混練し、一軸加圧成形することにより、セメントを作製した。なお、各セメントの表面粗さはほぼ一定となるよう作製した。材料基板の表面粗さは細胞接着、強いては細胞増殖、分化に大きな影響を与える因子である。各セメント試料片の表面粗さは IP6 濃度に依存せず、1.52±0.21 μm であり、これはポリスチレンプレートに比べ非常に大きい。表面粗さを小さくすることにより細胞の接着性が向上することが予想できることから、粒子同士のパッキング力、充填性を高める必要があると考えられる。

## 2.2 セメントにおける細胞応答性

各セメント試料片における細胞の増殖性を調べるために、ヒト骨肉腫細胞(HOS)をセメント(φ22 mm)上へ 6×10<sup>4</sup> cells となるように播種し、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で一定期間培養した後、細胞数をカウントすることにより増殖曲線を作成した(図 3)。

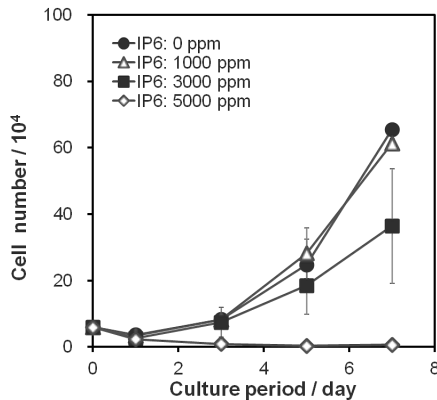


図 3. IP6-HAp セメント上での HOS 細胞の増殖曲線

その結果、1000 ppm IP6 溶液で表面修飾した粉体(1000IP6-wHAp)を用いて作製したセメント上で培養した HOS 細胞は表面修飾をしていない wHAp セメント上で培養した細胞と同程度の増殖性を示した。これに対し、3000IP6-wHAp セメントにおいては、5 日目以降増殖性が低減し、培養 7 日目における生細胞数は wHAp に対し、57.06%にまで低下した。一方、5000IP6-wHAp セメントでは、培養 3 日目より著しくその増殖性が低下し、wHAp に対し 3 日目では 11.06%、5 日目は 1.42%、7 日目は 1.12%にまで細胞増殖が抑制されていた。次に、この時の細胞形態について細胞骨格タンパク質であるア

クチンをファロイジンにより染色し、落斜型蛍光顕微鏡で観察した(図 4)。なお、形態観察の際には細胞を固定後、Alexa 488-phalloidin で actin を染色し、DAPI で核を染色した。

その結果、培養 3 日目以降 3000 ppm 以上の IP6 で表面修飾したセメント上では細胞数が著しく減少していたのが分かる。さらにそれらの形態を詳細に観察したところ、細胞膜が崩壊し

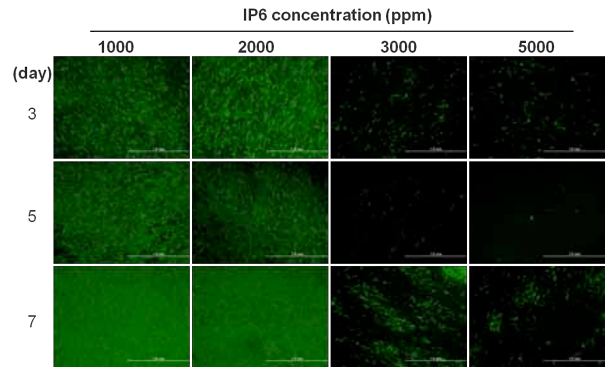


図 4. IP6-HAp セメント上での HOS 細胞の形態観察

たもの(図 5\*)や楕円形や紡錘形に変形した細胞が多く認められ、形態に異常が見られる細胞が多数存在することが明らかになった。また、播種 1 日後に関しても 3000, 5000IP6-wHAp セメント上で培養した場合は細胞増殖が抑制された。しかし、その増殖抑制率は 3 日目以降に比べると小さかった。これらの結果より、セメント上での細胞増殖性に関しては、初期の培養環境に加え、培養過程における環境の変化が大きく影響することが考えられた。

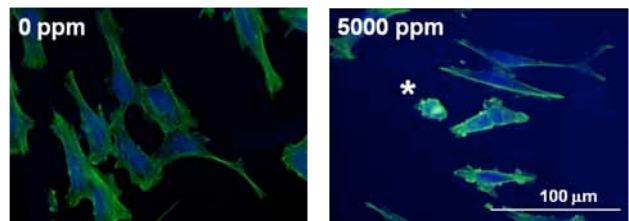


図 5. IP6-HAp セメント上での HOS 細胞の形態異常

次に、細胞増殖性に最も違いが認められた 5000IP6-wHAp セメントと wHAp および 1000IP6-wHAp セメントにおける HOS 細胞の遺伝子発現変動について、DNA マイクロアレイを用いて解析した。各セメントに HOS 細胞を播種し、24 時間培養した細胞から得た cDNA を解析用のサンプルとした。DNA マイクロアレイによる解析の結果、HAp セメントに対し、1000, 5000IP6-HAp セメント上で培養した細胞では表 1 に示すように遺伝子発現が変動した。

表 1. HAp および IP6-HAp セメントにおける発現変動遺伝子数

	HAp vs 1000-IP6-HAp	HAp vs 5000-IP6-HAp
Reliable genes	23,124	22,118
2x up-regulated genes	2,280	2,259
2x down-regulated genes	2,584	4,201
4x up-regulated genes	550	440
4x down-regulated genes	416	378

変動が認められた遺伝子群は、1) 細胞間シグナル伝達・細胞増殖や分化・形態形成など生物学的に重要な工程に関わる遺伝子や 2) 細胞内や細胞外・細胞外マトリックスを含む細胞構成成分に関わる遺伝子、また 3) アポトーシス調節・様々な分子との結合・細胞接着分子・転写因子など分子機能に関わる遺伝子と多岐にわたった。中でも、高濃度の IP6-wHAp セメント上で細胞死が誘導されたことから、今回はアポトーシスに関連する遺伝子に注目し、HAp セメントと 5000 ppm IP6-HAp セメント上での遺伝子発現変動について解析した(図 6)。

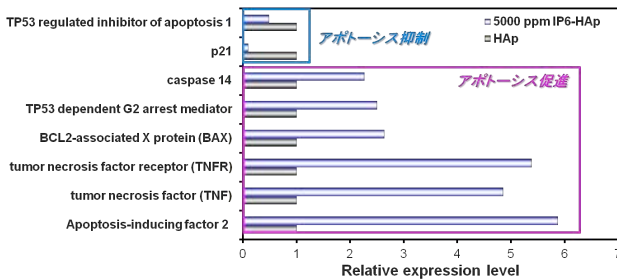


図 6. IP6-HAp セメント上での遺伝子発現変動(アポトーシス)

アポトーシスが誘導されるには多くの経路が存在する[3]。TNF (tumor necrosis factor)と呼ばれるサイトカインは炎症性サイトカインであると同時にアポトーシス誘導因子(=デス因子)としても知られる[6]。今回、この TNF は 5000IP6-wHAp セメント上で培養した細胞において、コントロール(wHAp)と比較し、発現レベルが約 5 倍に増加した。また、それに伴い TNF 受容体の発現レベルも増加した。これらの現象は 1000IP6-wHAp セメントにおいては確認されていないことから、高濃度の IP6 で表面修飾した際にアポトーシス誘導因子である TNF の発現が亢進するということが示された。次に、アポトーシスを促進する遺伝子(Bax, [7])及び抑制する遺伝子(BCL-2, [8])に注目した。マイクロアレイの解析による結果、5000 IP6-wHAp セメント上で培養した HOS 細胞において、Bax はコントロールに対し 2.63 倍、BCL-2 は 0.226 倍の発現レベルであった。つまり、5000 ppm IP6 溶液で表面修飾したセメントで HOS 細胞を培養することにより、アポトーシスが促進されたことが分かる。また他のアポトーシス誘導因子も複数発現レベルの向上が認められた。しかしながら、アポトーシスの検出によく使用される caspase 群 [5]の遺伝子発現に関しては、caspase14 のみ増加が認められたが、他は増加せず、むしろ減少していた。高濃度の IP6 で wHAp 粉体を表面修飾した場合、アポトーシスが誘導されることは確かであるが、24 時間の培養時間ではカスケードの最終ポイントまで達していない可能性もある。調べる遺伝子を絞り込み、時系列を追って遺伝子発現を定量することにより詳細を解明することが重要であると考えられる。

### 2.3 セメントと細胞の相互作用

2.2 節の結果より、3000 ppm 以上の IP6 溶液で表面修飾した粉体を用いて作製した IP6-wHAp セメント上で HOS 細胞を培養すると、細胞形態の異常、細胞増殖の抑制が生じ、アポトーシスに関連する種々の遺伝子発現に変動が認められることが分かった。そこで、セメント上で確認されたアポトーシスを介

した抗腫瘍性という機能がどのように発現されているのかということについて検証するために、2.1 節で作製した IP6-wHAp セメント(1000, 3000, 5000 ppm)を水中に一定時間浸漬させ、溶出する IP6 量について調べた(図 7)。

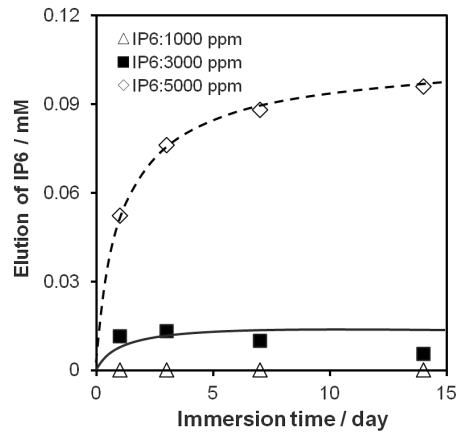


図 7. IP6-HAp セメントからの IP6 の溶出

その結果、1000IP6-wHAp セメントからは IP6 の溶出が認められなかったが、3000IP6-wHAp セメントからは 0.01mM 程度の IP6 が溶出することが分かった。また、5000IP6-wHAp セメントからは約 0.1 mM の IP6 が溶出することが確認された。検出された IP6 は一度 wHAp へ吸着した IP6 が脱着後に溶出したというより、粉体を表面修飾する際に用いた IP6 のうち wHAp 粉体へ未吸着であったものが徐々に溶出したと推測できる。ここで、IP6 溶液単独で HOS 細胞の増殖性に影響を及ぼす濃度が 1 mM 以上であるのに対し、増殖抑制が認められた 5000IP6-wHAp セメントから溶出した IP6 の濃度は最大でも 0.1 mM 程度であり、両者に大きな違いが生じた。この違いは、セメント表面上では溶出された IP6 が局所的に高濃度となり、その IP6 を細胞が取り込んだことで、細胞死が引き起こされたと推測することができる。

すなわち、IP6-wHAp セメントにおけるアポトーシスを介した細胞増殖抑制は 1) IP6 の表面修飾によるセメント材料表面の構造変化に対する応答、2) 溶出された局所的に高濃度となった IP6 を細胞が取り込んだことに対する応答により引き起こされたと考えられる。つまりこの時、セメントは薬剤を担持した DDS (drug delivery system)キャリアの様に機能していると思われる(図 8)。

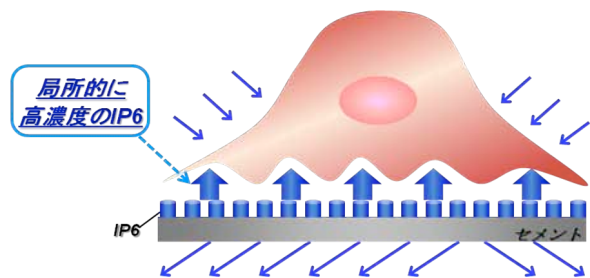


図 8. IP6-HAp セメントからの IP6 の溶出と細胞への作用

続いて、IP6-wHAp セメントに対する応答性が細胞種により異なると仮説を立て、腫瘍細胞と正常細胞をセメント上で培養することにより応答性を比較した。3000IP6-wHAp セメント



へHOS細胞とMC3T3-E1細胞を播種し、その形態と増殖性について解析した(図9)。その結果、3000IP6-wHApセメントにおいてHOS細胞では増殖抑制、形態異常が誘発されたのに対し、MC3T3-E1細胞ではそのような異常は観察されず、良好な細胞形態を維持したまま、旺盛な増殖を続けた。つまり、細胞種によってIP6やIP6-wHApセメントに対する感受性が異なることが明らかになった。この細胞種によるIP6への感受性の違いを利用し、粉体への表面修飾時のIP6濃度を変化させ、セメントを作製することで、正常細胞へは影響を与えず、腫瘍細胞のみの増殖を抑制することが可能なセメントの作製が実現できると示唆された。

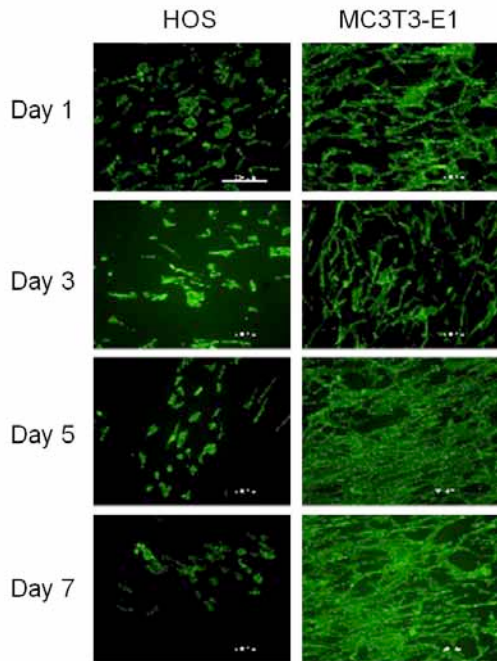


図9. 細胞種によるIP6-wHApセメントに対する応答性の違い

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では、キレート硬化型骨修復セメントの開発において、IP6の有するキレート能を利用し、新規のメカニズムでセメントの硬化を促進させるだけでなく、IP6の抗腫瘍効果を応用し、ガン細胞の増殖を特異的に抑制するこれまでにない付加価値を有する高機能性セメントの創製を試みた。

HApは湿式法により合成し微粒化することで粉体に対するIP6の吸着量を増加させた。HApとIP6がキレート作用で結合したことにより、粉体の表面電位は低下した。さらに、HApへIP6が吸着したことで、培地中のタンパク質の吸着やイオンの吸着も抑制されたと考えられ、これにより低濃度(3000 ppm以下)のIP6-HApセメントでは、細胞接着性がHApセメントに比べ改善される傾向にあった。

さらに、IP6-wHAp粉体を調製後、セメントを作製し、そのセメント上での細胞の応答性を正常細胞および腫瘍細胞を用いて解析した。その結果、3000 ppm以上のIP6溶液を用いて粉体を表面修飾し、作製したセメント上で細胞を培養すると腫瘍細胞に対してのみ細胞増殖性を低下させた。正常細胞においては、良好な細胞増殖を示し、IP6

による影響は確認されなかった。この腫瘍細胞特異的な細胞死がどのようなメカニズムで引き起こされたかを調べた結果、この細胞増殖抑制はアポトーシスを介した細胞死により誘引されたものであることがわかった。

さらに、この時セメントから溶出したIP6の濃度を測定したところ、1000IP6-wHApセメントからはIP6の溶出が認められなかったが、3000IP6-wHApセメントからは0.01 mM程度のIP6が溶出することが分かった。また、5000IP6-wHApセメントからは約0.1 mMのIP6が溶出することが確認された。これまでの研究から、IP6はHOS細胞に対し、1 mM以上の濃度で処理すると細胞が生存できない。しかし、今回検出されたIP6の濃度は溶液単独でHOS細胞の増殖性に影響を及ぼす濃度よりもはるかに低濃度であることがわかった。この結果は、溶出されたIP6がセメント表面上で局所的に高濃度となり、細胞増殖に影響を及ぼしたと推測できる。つまり、セメント内部のIP6が徐々に溶出し、セメント自体がDDSキャリア様に機能したことで抗腫瘍性の発現に関与したと考えられる[9]。

また、これまでの研究結果より、IP6の表面修飾に伴った材料表面の構造変化も細胞へ影響を及ぼすことが示唆されており、IP6-wHApセメントにおいては、2つの作用が抗腫瘍性に寄与すると思われる。

さらに、正常細胞と腫瘍細胞においてIP6-wHApセメントに対する感受性が異なることが明らかになり、IP6による表面修飾濃度をコントロールすることにより、細胞の応答性を制御でき、腫瘍細胞特異的に機能性を発現させる材料創製が可能であるということが示された。

今後は、本法を応用し、生体内で吸収されるリン酸三カルシウム系の出発材料を選択し、セメントの溶解と共にIP6が放出されるような新たな材料設計を行い、より機能性の高いセメントの作製の実現を目指す。

### 【参考文献】

1. C. Lavernia, and J.M. Schoenung, *Am. Ceram. Soc. Bull.*, **70**, 95-100 (1991).
2. W. Cao, and L.L. Hench, *Ceram. Int.*, **22**, 493-507 (1996).
3. T.S.B. Narasraju, and D.E. Phebe, *J. Mater. Sci.*, **31**, 1-21 (1996).
4. G. Willmann, *Br. Ceram. Trans.*, **95**, 212-216 (1996).
5. T. Konishi, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **120**, 159-165 (2012).
6. A. Ashkenazi, and V.M. Dixit, *Science*, **281**, 1305-1308 (1998).
7. J.M. Adams and S. Cory, *Science*, **281**, 1322-1326 (1998).
8. Z.N. Oltvai, C.L. Milliman, and S.J. Korsmeyer, *Cell*, **74**, 609-619 (1993).
9. M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, *Key. Eng. Mater.*, **529-530**, 173-177 (2013).

# キレート硬化型アパタイトセメントの抗腫瘍効果の発現機構の解析 —セルサイクルからのアプローチ—

神澤信行、稲山哲哉、小西秀典、本田みちよ

## 1. はじめに

我が国において、悪性腫瘍は1981年以後死亡原因の第1位であり、根本的な治療法の確立が大きな課題となっている。特に骨は、肺や肝臓とともに癌の転移や再発を起こしやすい臓器であり、様々な組織の悪性腫瘍から血管を通過して、骨転移することで疼痛や病的骨折、さらに脊椎では脊髄圧迫による麻痺を惹起し、Quality Of Life (QOL)の著しい低下を引き起こす。骨腫瘍の治療に伴う骨欠損には、自家骨や他家骨の移植が一般には行われるが[1, 2]、健常部位への二次的な侵襲や採取量の限界、また他家骨による患者の拒絶反応といった問題があり、患者のニーズを満たした治療とは言い難い段階に来ている。そこで、自家骨に代わる人工材料を用いた治療が俄かに脚光を浴びている。その中でも、骨や歯など硬組織を形成する無機成分に類似した材料である hydroxyapatite (HAp)は特に注目を集めている。

### 1.1 IP6-HAp セメント

HAp は、緻密体、多孔体、顆粒、セメントといった多様な形態を持つが、その中でも骨欠損部の形状に合わせて任意に成形が可能であるセメントに本研究では注目している。現在利用されているセメントは、酸性物質のリン酸水素カルシウム( $\text{CaHPO}_4$ )と塩基性物質のリン酸四カルシウム( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ )との酸塩基反応を介して硬化するため、硬化時間が長く、硬化時に pH の変動を伴うため、患部周辺組織の炎症反応を惹起するといった問題点もある[3]。そこで、明治大学神澤らによりこれらの問題点を克服するような「キレート硬化型骨修復セメント(IP6-HAp cement)」が開発された[4]。このセメントは HAp の表面をイノシトール6リン酸(IP6)で修飾することにより、IP6のキレート作用を介して硬化する全く新しい硬化メカニズムを有したセメントである。IP6-HAp cement は、硬化時間も短く、炎症反応の恐れもないほか、化学反応を伴わずに HAp のまま直接硬化するという特長をもつ。

### 1.2 IP6の抗腫瘍性

IP6はイノシトール環に6つのリン酸基が結合した単純な構造をもつ低分子化合物であり、穀類のような高繊維食物に数多く含有されている。1980年代半ばに、メリーランド大学のシャムスディン博士らにより、IP6の抗腫瘍効果が最初に報告された[5]。その後の研究から、IP6は特定組織の癌細胞だけではなく、大腸癌、肺小細胞癌、神経膠芽腫、乳癌、前立腺癌、肝臓癌、皮膚癌、悪性リンパ腫や白血病など数多くの癌細胞に対して抗腫瘍効果を示すこ

とが明らかとなった[6]。IP6は癌細胞へのアポトーシス誘導、細胞周期G1期の停止、ナチュラルキラー細胞等の免疫細胞の活性化を通じて抗腫瘍効果を発揮することが示唆されているが[7, 8]、その分子メカニズムは完全には明らかとなっていない。

IP6は腫瘍細胞だけではなく、骨芽細胞や血管内皮細胞など、正常な組織の細胞にも少なからず影響を及ぼすことが報告されている[9, 10]。有用な抗癌剤である、シクロホスファミドやイホスファミドといった薬剤においてもこの問題は同様であり、正常組織への悪影響は、脱毛、貧血、倦怠感、吐き気や嘔吐といった深刻な副作用として患者に多大なる苦痛を与え続けている[11]。このことから、癌治療において副作用の少ない抗癌剤の開発や、特異性のある抗腫瘍効果を持つ生体材料の開発が重要である。

### 1.3 IP6-HAp cementの抗腫瘍性

本研究に先立ち、ヒト骨肉腫細胞株(HOS)をもちいてIP6及びIP6-HAp cementの抗腫瘍効果の評価と解析を行った。その結果、HOS細胞の増殖抑制効果、及びアポトーシス誘導を確認することができ、IP6及びIP6-HAp cementの抗腫瘍効果が明らかになった[12]。しかしながら、ラット骨髄間質細胞(BMSC)を用いて同様の実験をおこなったところ、正常細胞であるBMSCに関しても、HOS細胞に比べて程度は低いが増殖抑制効果が確認され、正常細胞に対する細胞毒性の存在が問題視された。そこで本研究では、IP6-HAp cementから徐放される高濃度IP6の挙動と、長期培養した際のIP6の細胞への影響を複数種の細胞について評価した。具体的には、HOS細胞及びヒト由来子宮頸癌細胞株(HeLa)、正常細胞としてマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)及びチャイニーズハムスター卵巣K1細胞株(CHO-K1)を用いて、IP6-HAp cementの抗腫瘍効果や腫瘍特異性、及び骨分化能について生化学的な評価と解析を行った。

## 2. 実験と結果

### 2.1 IP6-HAp 粉末の調製

IP6-HAp cement は定法に従い調製した。詳細は別項「抗菌性を備えたリン酸化カルシウムセメントの創製とその評価(4)」に記した。異なる部分は以下の通りである。

合成HApと0.1, 0.5, 1% IP6溶液400 mlを500 ml ビーカーに入れ400 rpmで5時間攪拌した。その後沈殿物を凍結乾燥した。乾燥後、メノウ乳鉢で粉碎し、3種のIP6-HAp粉体を得た。これらのうち0.1% IP6溶液で表面修飾した

粉体を IP6-HAp-1 粉体、0.5% IP6 溶液で表面修飾した粉体を IP6-HAp-5 粉体、1% IP6 溶液で表面修飾した粉体を IP6-HAp-10 粉体とした。対照試料として湿式ボールミル粉砕した未修飾の HAp 粉体を調製した。3 種の IP6-HAp 粉体と HAp 粉体はビニール袋に入れてデシケーター内で保存した。

IP6-HAp-1 粉体、IP6-HAp-5 粉体、IP6-HAp-10 粉体 1 g 当たりの IP6 吸着量の測定を行った(Table 1)。その結果、IP6-HAp 粉体 1 g 当たりの IP6 吸着量は、IP6-HAp-1 粉体が 36.3 mg、IP6-HAp-5 粉体が 48.4 mg、IP6-HAp-10 粉体が 76.1 mg となり、IP6-HAp-1 粉体 < IP6-HAp-5 粉体 < IP6-HAp-10 粉体の順に多くなっている事が分かった。また今回 0.1~1% IP6 溶液で HAp に IP6 を表面修飾したが、HAp に対する IP6 の吸着は 1% で飽和するという報告もあり、詳細は今後の検討課題である。

Table 1. IP6-HAp cement の IP6 吸着量

	1-cement	5-cement	10- cement
IP6 吸着量 (mg)	36.3±4.32	48.4±5.99	76.1±10.3

また、HAp 粉体および IP6-HAp 粉体の粉末 X 線回折 (X-ray diffraction: XRD) 解析を行った。その結果、XRD のピーク位置から、これらすべての粉体が典型的な HAp 単一相から成ることが確認された(図 1)。

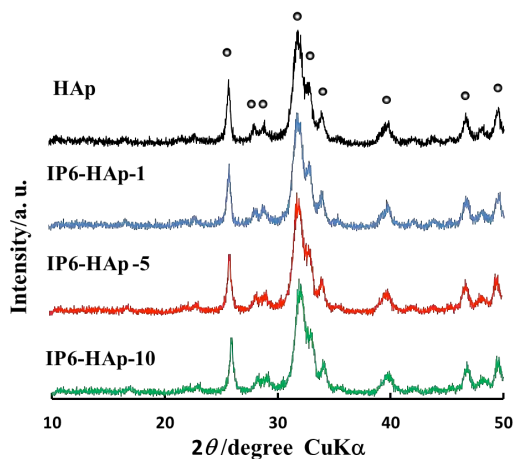


図 1. XRD による結晶構造解析

## 2. 2 IP6-HAp cement の作製

3 種の IP6-HAp 粉体 1 g を量りとりメノウ乳鉢に入れ、精製水 0.30 ml を加えて 2 分間ゴムベラとスパチュラを使って混ぜ合わせた。混ぜ終わったら成形器に移し、15 MPa の圧力をかけて成形し、3 種の IP6-HAp cement を得た。これらのうち IP6-HAp-1 粉体を用いて成形した cement を IP6-HAp-1 cement (1-cement)、IP6-HAp-5 粉体を用いて成形した cement を IP6-HAp-5 cement (5-cement)、IP6-HAp-10 粉体を用いて成形した cement を IP6-HAp-10 cement (10-cement) とした。対照試料として未修飾の HAp 粉体を

用い、HAp cement を同様に作製した。3 種の IP6-HAp cement と HAp cement は 1 日乾燥させた後、E.O.G.滅菌 (elk, Osaka, Japan) をして使用した。

## 2. 3 IP6-HAp cement からの IP6 溶出挙動

作製した 1-cement、5-cement、10-cement からの培地中への IP6 放出濃度の測定を 21 日目まで行った(図 2)。その結果、1-cement < 5-cement < 10-cement の順に増加した。また、IP6-HAp cement の IP6 の放出量は 1 日目最大で、時間経過とともに減少していくことが分かった。なお、1-cement、5-cement、10-cement における IP6 放出濃度の最大値は、それぞれ約 0.1 mM、0.35 mM、0.45 mM であった。本研究ではさらに、IP6 の放出量の異なる 3 つの IP6-HAp cement について生化学的な評価、解析を以下のように行った。

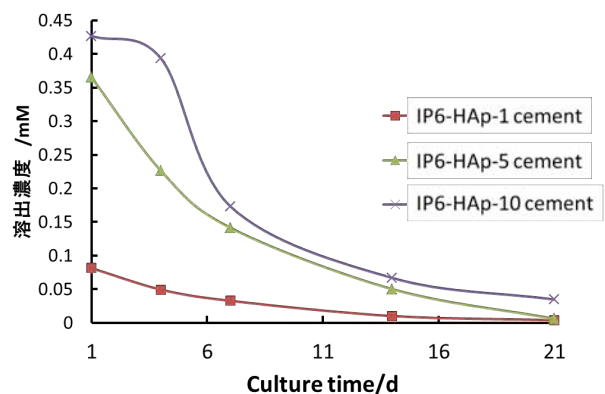


図 2. IP6-HAp cement から溶出する IP6 の濃度変化

## 2. 4 IP6 を添加して長期期間培養した MC3T3-E1 細胞の増殖曲線

IP6 cement の増殖抑制効果の解析を行う前段階として、IP6 溶液を用いて増殖抑制試験を行った。6-well culture plate に MC3T3-E1 細胞を  $4.0 \times 10^4$  cells/well 播種し、0~0.5 mM となるように IP6 溶液を添加した培地で 21 日間培養後、細胞増殖曲線を作成した(図 3 左)。この際、培養 7 日目までは  $\alpha$ -MEM、それ以降は分化誘導培地 (Osteoblast-Inducer Reagent, TaKaRa) を用いて培養を行った。その結果、0~0.3 mM IP6 存在下では細胞は正常に confluent に達したが、0.5 mM IP6 存在下では confluent に達するまでに遅れが生じていた。

IP6-HAp cement を用いて同様に増殖試験を行った。12-well culture plate 及び 12-well culture plate 上に設置した 1-cement、5-cement、10-cement の 3 種類の cement に、それぞれ MC3T3-E1 細胞を  $4.0 \times 10^4$  cells/well、 $8.0 \times 10^4$  cells/well 播種し、21 日間培養した後、細胞数を測定した(図 3 右)。その結果、1-cement、5-cement に関しては dish 培養の値と比較して有意差は見られず ( $p > 0.05$ )、十分な増殖が確認された。しかしながら、10-cement に関しては、dish 培養と比較するとわずかではあるが有意差があった ( $p < 0.05$ )。以上から、用いた 1-cement、5-cement では MC3T3-E1 細胞の増殖には大きな影響を与えないことが

明らかとなった。また、図 2 から、IP6-HAp cement から溶出する IP6 は一過的であり、6 日目を経過した頃には IP6 濃度は、1-cement、5-cement、10-cement に関してそれぞれ 0.05 mM、0.2 mM、0.25 mM となる。これらの結果から、溶液状態では 0.3~0.5 M の範囲で顕著な差がみられたものの、セメント上での培養では、その溶出挙動から、高濃度の IP6 にさらされる期間は限られ、結果として IP6 の正常細胞に対する影響は限定的であると考えられた。

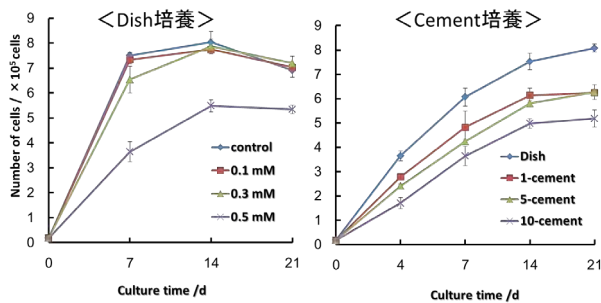


図 3. IP6 が細胞増殖性に与える影響の解析

MC3T3-E1 細胞を一定濃度の IP6 を常に添加し Dish で培養した場合と、IP6-HAp cement 上で培養した場合とでその増殖性を評価した。

## 2. 5 IP6 が MC3T3-E1 細胞の石灰化状態に与える影響

IP6 存在下で長期培養した MC3T3-E1 細胞の石灰化状態を、いくつかの方法で評価した。6-well culture plate に MC3T3-E1 細胞を  $4.0 \times 10^4$  cells/well 播種し、0~5.0 mM となるように IP6 溶液を添加した培地で 21 日間培養したものをサンプルとし、ALP 活性染色と Alizarin red 染色を行った(図 4)。この際、培養 7 日目までは  $\alpha$ -MEM、それ以降は分化誘導培地を用いて培養を行った。その結果、0.1~1.0 mM の IP6 濃度範囲で MC3T3-E1 細胞が赤色に染色されていることがわかった。ゆえに、図 3 で示す様に、増殖性に問題が有るような高濃度条件下でも、MC3T3-E1 細胞が良好な石灰化状態が示すことが明らかとなった。また、図 2

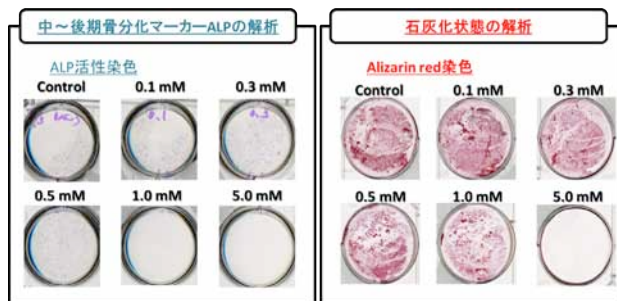


図 4. IP6 が骨分化に与える影響の評価

Dish 培養した MC3T3-E1 細胞について、IP6 を含む通常培地で 7 日間培養後、分化誘導培地で 14 日目(ALP 染色)または 21 日目まで(Alizarin red 染色)培養した。分化の中後期マーカーである ALP の活性染色、および後期の石灰化を評価するために Alizarin red 染色を行った。

から IP6-HAp cement から溶出する IP6 濃度は最大でも 0.5 mM 程度であり、IP6-HAp cement に抗腫瘍性を付与するために IP6 表面修飾濃度を高く設定しても MC3T3-E1 細胞の石灰化には大きな影響が無いことが示された。

## 2. 6 IP6 に対する HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞の増殖挙動の比較

任意の濃度に設定した IP6 を用いて腫瘍細胞 HOS と、正常細胞 MC3T3-E1 とを 6-well culture plate 上で培養した。IP6-HAp cement から溶出する IP6 濃度は、初期段階で比較的高い値であり、その後は徐々に低い値をとることが上述の結果から明らかとなっている。そのため、本実験では IP6 の溶出挙動を模倣して、IP6 添加条件を以下の①~③の様に設定した。①Day 1 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養 ②Day 2 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養 ③Day 3 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養した。このような条件で 7 日間培養した細胞をサンプルとして増殖曲線を作成した(図 5)。

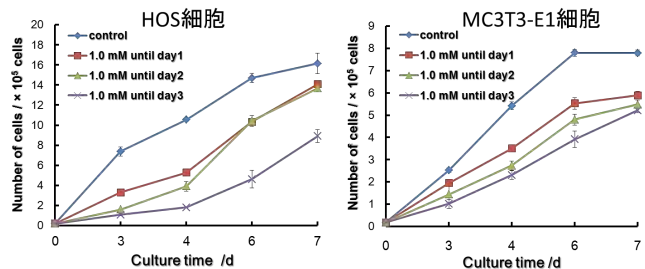


図 5. IP6 添加期間の違いによる細胞増殖挙動の変化

HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞について、Dish 培養開始後 1 日目まで 1 mM IP6 で培養し、その後通常培養に移した(1.0 mM until day1)場合、同様に 2 日目、3 日目まで IP6 存在下で培養し、その後通常培地で培養した場合について、その増殖性を評価した。

図 3 で示した結果の様に、1 mM の IP6 が常時添加された場合では、増殖は顕著に抑えられる事が予想された。しかし、添加期間を cement からの溶出挙動を参考に限定することで、どちらの細胞でも培養 2 日目まで IP6 が存在しても増殖性にほとんど影響は見られなかった。しかし、腫瘍細胞である HOS 細胞では、3 日目まで IP6 を添加することで全体の増殖性に影響が見られた。このことから、細胞によって IP6 に対する感受性の違いがある事が明らかになった。実際に Day 4 の HOS 細胞を位相差顕微鏡で観察し撮影したところ、増殖曲線と対応するように HOS 細胞が control に比べて丸みを帯び、形態に異常をきたしているような細胞が散見された(data not shown)。

## 2. 7 LIVE/DEAD 染色による IP6 に対する HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞の細胞生存率の比較

IP6 による細胞増殖抑制効果をより詳細に解析するため、LIVE/DEAD 染色により細胞生存率の評価を行った。この染色方法は、蛍光試薬 SYTO9 と PI の膜透過性の違いを利用し、生細胞と死細胞をそれぞれ緑と赤色に染め分けるこ



とで細胞生存率(cell viability)の評価を可能にする方法である。35-mm dish に HOS 細胞、MC3T3-E1 細胞を  $4.0 \times 10^4$  個播種し、終濃度 0~1.0 mM となるように IP6 溶液を添加した培地で 3 日間培養したものをサンプルとし、LIVE/DEAD 染色を行った(図 6)。その結果、どちらの細胞でも IP6 濃度依存的に総細胞数が減少していることが確認された。しかし、赤色蛍光に着目すると、MC3T3-E1 細胞に比べ HOS 細胞の方が僅かに死細胞数が多い事が確認された。

IP6-HAp cement に関しても同様の実験を行った。1-cement、5-cement、10-cement の 3 種類のセメント及び HAp cement を用いて初期播種数  $8.0 \times 10^4$  個の HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞を 3 日間培養したものをサンプルとし、LIVE/DEAD 染色を行った(図 7)。その結果、IP6-HAp cement から溶出する IP6 濃度依存的な増殖抑制効果が確認された。また両細胞共、死細胞数の増加が確認されたが、ここでも MC3T3-E1 細胞と比較して HOS 細胞の方が、死細胞数が多い傾向が見られた。

## 2. 8 MTT assay による IP6 に対する HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞の細胞生存率の比較

上記で確認された IP6 による細胞生存率への影響を定量的に解析するため、MTT assay を用いて細胞生存率の評価を試みた。6-well culture plate に HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞を  $4.0 \times 10^4$  個播種し、終濃度 0~1.0 mM となるように IP6 溶液を添加した培地で 3 日間培養したものをサンプルとし、MTT assay を行った(図 8)。その結果、HOS 細胞では cell viability が IP6 濃度依存的に低下していることが明らかとなった。特に 1.0 mM では HOS 細胞の cell viability が約 30%程度まで低下していた。一方で、IP6 が MC3T3-E1 細胞の cell viability に及ぼす影響は小さく、最も大きな影響を受けていた 1.0 mM でも cell viability は約 65%程度であった。先述の LIVE/DEAD 染色では腫瘍特異性を確認することは出来なかったが、MTT assay により定量的に解析することで、IP6 が増殖に及ぼす影響が顕在化する以前に、HOS 細胞の細胞内機能に著しく影響を及ぼしていることが確認できた。

IP6-HAp cement に関しても MTT assay を行った。3 種類のセメントを用いて上記と同様の培養条件下で 3 日間培養した HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞をサンプルとし、MTT assay を行った(図 9)。その結果、Dish 培養に比べて cement 上では cell viability の値がさらに減少することが分かった。

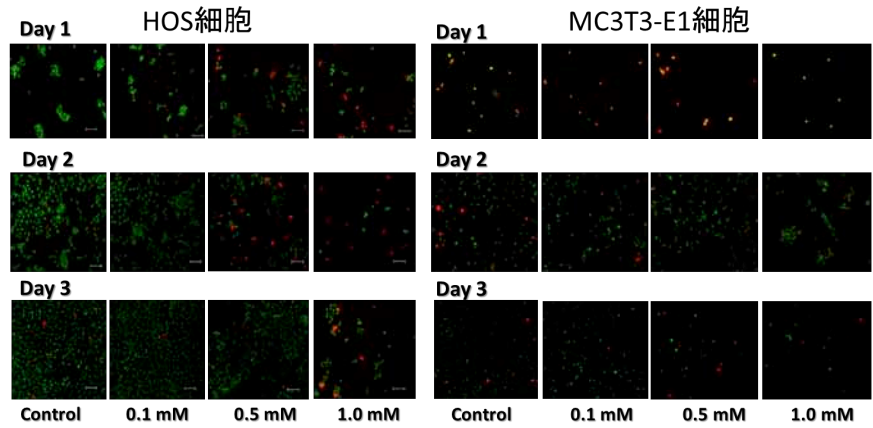


図 6. IP6 存在下で Dish 培養した細胞の生存評価(LIVE/DEAD 染色)

Dish で培養した両細胞に各濃度の IP6 を添加し、3 日目まで培養後 LIVE/DEAD 染色で生細胞(緑)と、死細胞(赤)を蛍光染色により染め分けた。

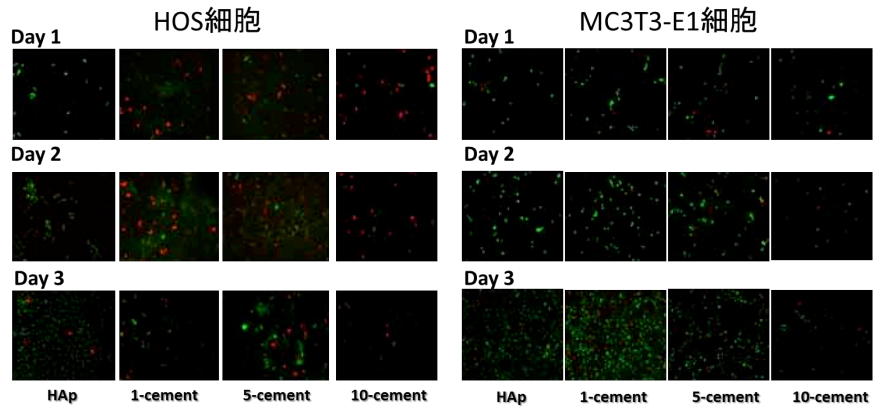


図 7. IP6-HAp cement 上で培養した細胞の生存評価(LIVE/DEAD 染色)

IP6-HAp cement 上で培養した HOS 細胞の cell viability の低下は、dish 上で IP6 を添加した培地で培養した HOS 細胞よりも著しく、最も IP6 表面修飾濃度の低い 1-cement でも day 3 には HOS 細胞の cell viability は約 10%程度まで低下していた。一方で、IP6 が MC3T3-E1 細胞の cell viability に及ぼす影響は、dish 上で IP6 を添加した培地で培養した MC3T3-E1 細胞の cell viability よりも大きいことが確認されたが、HOS 細胞に比べて cell viability は全体的に高く、最も大きな影響を受けていた 10-cement 上で培養した MC3T3-E1 細胞でも cell viability は約 45%程度であった。

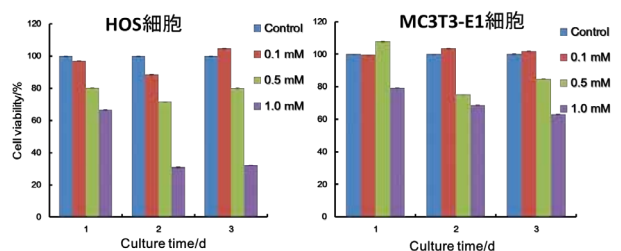


図 8. Dish 培養した細胞の生存評価(MTT assay)

Dish に対して IP6 を添加していない HAp では、初期定着が 60-70%になることが知られており (data not shown)、これを加味しても、十分な効果の違いが見いだされた。これらのことから、上述の LIVE/DEAD 染色で見られる最終的な現象とは異なり、細胞内の生理機能は初期段階で、腫瘍細胞特異的に、その後の増殖性にまで影響するような致命的な影響を与えていることが明らかになった。現段階では IP6 の腫瘍特異性が何に起因するものなのか不明である。これに関しては後述する。

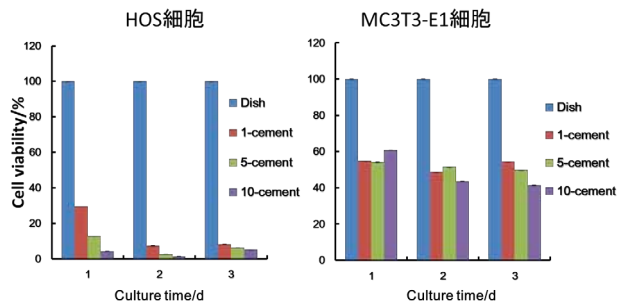


図 9. IP6-HAp cement 上で培養した細胞の生存評価(MTT assay)

## 2. 9 その他の腫瘍細胞、正常細胞を用いた腫瘍特異性の比較

ここまで、腫瘍細胞 HOS、正常細胞 MC3T3-E1 のみを用いて比較実験を行ってきたが、2 種類の細胞間で比較しただけでは「腫瘍特異性がある」ことの検証には不十分である。ここでは腫瘍細胞としてヒト由来子宮頸癌細胞株 (HeLa) を、正常細胞としてチャイニーズハムスター卵巣 K1 細胞株 (CHO-K1) を用いて細胞増殖試験を行い、同等の腫瘍特異性が見られるか検証を行った。6-well culture plate に両細胞を  $4.0 \times 10^4$  cells/well 播種し、①Day 1 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養 ②Day 2 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養 ③Day 3 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養した。このような条件で 7 日間培養した細胞の増殖曲線を作成し解析した (図 10)。その結果、CHO-K1 細胞においていずれの条件においても control との有意差が見られず ( $p > 0.05$ )、IP6

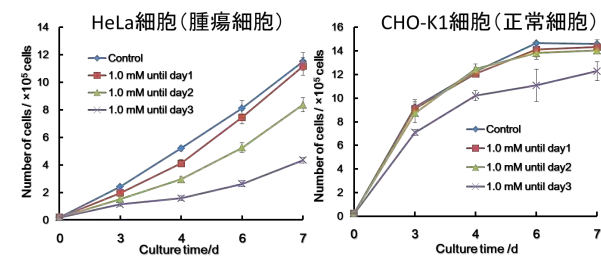


図 10. IP6 添加期間の違いによる細胞増殖挙動の変化

HeLa 細胞と CHO-K1 細胞について、Dish 培養開始後 1 日目まで 1 mM IP6 で培養し、その後通常培養に移した (1.0 mM until day1) 場合、同様に 2 日目、3 日目まで IP6 存在下で培養し、その後通常培地で培養した場合について、その増殖性を評価した。

による増殖抑制効果を殆ど受けなかった。一方で、HeLa 細胞は HOS 細胞と同様に Day 3 まで 1.0 mM IP6 を添加した条件下において control との有意差が見られ ( $p < 0.01$ )、強い増殖抑制効果を受けたことがわかった。このことから、IP6 が様々な腫瘍細胞に対して特異的に増殖抑制効果を発揮すると考えられた。

## 2. 10 IP6 及び IP6-HAp cement の細胞増殖抑制機構の解析

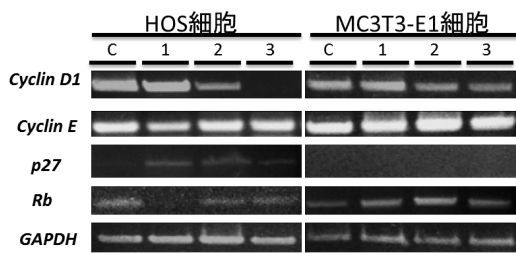
これまでの実験から、IP6 が細胞増殖抑制効果と細胞生存抑制効果を有すること、さらにそれらが腫瘍細胞に対して特異的に作用することが明らかとなっている。ここでは、これらについてより詳細な解析を行うため、遺伝子発現解析を行った。過去の研究から IP6 及び IP6-HAp cement が、腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導することが明らかになっている。このことから、本研究では細胞周期関連遺伝子に着目し、実験を行った。

6-well culture plate に HOS, MC3T3-E1 両細胞を  $4.0 \times 10^4$  播種し、①Day 1 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養 ②Day 2 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養 ③Day 3 まで 1.0 mM IP6 を添加し、その後は通常培地で培養した。このような条件で 3 日間培養した細胞から抽出した total RNA を元に RT-PCR による発現解析を行った (図 11)。なお、この際解析した遺伝子は細胞周期 G1-S 期の入り口で促進的に関する *Cyclin D1* と S 期への進行を最終的に決定する *Cyclin E*、細胞周期進行を抑制する働きを持つサイクリン依存性キナーゼインヒビター (CKI) の 1 種である *p27*、癌抑制タンパク質であり、細胞周期 G1-S 期を制御している *Rb*、内部標準として *GAPDH* を用いた。その結果、HOS 細胞においては、IP6 を作用させた時間に依存して *Cyclin D1* の発現量が減少したのに対して、MC3T3-E1 細胞においてはほぼ一定であった。同様に、*p27* に関しても HOS 細胞においてのみ IP6 を作用させた時間に依存して発現量が増加した。このことから、IP6 は腫瘍細胞特異的に作用し、細胞周期 G1-S 期の進行を阻害していることが考えられた。一方で、*Cyclin E* の発現量は HOS 細胞、MC3T3-E1 細胞のどちらにおいても変化はなかった。また、*Rb* は HOS 細胞において発現量に目立った変化はなく、MC3T3-E1 細胞においても一定であった。以上から、IP6 は HOS 細胞に特異的に作用し、細胞周期 G1-S 期の進行を阻害し、増殖抑制効果を発揮していることが示唆された。

さらに、IP6-HAp cement 上で培養した HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞に関しても同様に遺伝子発現解析を行った。1-cement、5-cement、10-cement の 3 種類の IP6-HAp cement 及び control として HAp を用いて初期播種数  $8.0 \times 10^4$  個の HOS 細胞、MC3T3-E1 細胞を 3 日間培養した。その結果、HOS 細胞では 5-cement、10-cement において *Cyclin D1* の発現量の減少が確認されたのに対し、MC3T3-E1 細胞では 10-cement のみ発現量が減少した。また、dish 培養とは異なり、HOS 細胞、MC3T3-E1 細胞の両細胞において *Cyclin E* の発現量の減少が確認された。さらに、HOS 細胞

において *Rb* の発現量が IP6-HAp cement の IP6 表面修飾濃度依存的に減少することもわかった。このことから、IP6-HAp cement においても溶出した IP6 が HOS 細胞に対して特異的に作用し、細胞周期 G1-S 期の進行を阻害することで細胞増殖を抑制していると考えられた。しかし、*p27* に関しては control のセメントでも発現していることから、dish 培養に比べ初期播種後に一過的に *viability* が減少している事に起因していることが考えられたが、詳細は不明である。

### <Dish培養>



### <Cement培養>

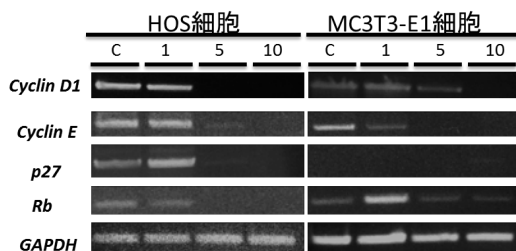


図 11. IP6 存在で培養した細胞の周期関連遺伝子の発現解析

Dish 培養では二種の細胞を、1 日目まで(1)、2 日目まで(2)、3 日目まで(3)、1 mM の IP6 存在下で培養した。Cement では、1-cement (1)、5-cement (5)、10-cement(10)上で培養した細胞について発現解析を行った。

### 3. 考察及び今後の展望

本研究では IP6-HAp cement の開発において、IP6 が持つキレート能を利用し、新規のメカニズムでセメントの硬化を促進させるだけでなく、骨腫瘍治療に有用な抗腫瘍性を有する IP6-HAp cement を作製するため、IP6-HAp cement の生化学的な評価と解析を行うことを目的とした。これまでの結果から、HOS 細胞の増殖抑制効果、及びアポトーシス誘導能が IP6-HAp cement にはあることが分かっていた。しかし、ラット骨髄間質細胞(BMSC)を用いて同様の実験をおこなったところ、正常細胞である BMSC に関しても、HOS 細胞に比べて程度は低いが増殖抑制効果が確認され、正常細胞に対する細胞毒性の存在が問題視された。

そこで本研究では、骨腫瘍細胞としてヒト骨肉腫様細胞株(HOS)と正常細胞としてマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)を用いて、IP6 及び IP6-HAp cement の抗腫瘍効果について評価し、さらに IP6-HAp cement の骨分

化能について生化学的な評価と解析を行った。

今回の結果からは、IP6-HAp cement において、HAp の表面に修飾する IP6 の濃度範囲が 0.1~1% であれば MC3T3-E1 細胞の正常な成長に影響を与えず、正常な骨分化が促されるため、骨粗鬆症等の骨疾患療法に対する有効な骨補填剤と成り得ることが明らかになった。また、IP6 による細胞増殖抑制効果を、HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞を用いて比較したところ、IP6 が、特異的に腫瘍細胞である HOS 細胞の増殖を抑制することがわかった。またその効果は IP6 単体で作用させた時よりも IP6-HAp cement で細胞を培養した方がより腫瘍細胞特異的に作用し、HOS 細胞の生存率を著しく低下させたことが挙げられた。さらに、HeLa 細胞や CHO-K1 細胞といった他の腫瘍細胞と正常細胞を用いて IP6 の腫瘍特異性を検証した。その結果、HOS 細胞だけではなく IP6 は HeLa 細胞に対しても腫瘍特異性を示した。以上から、IP6 及び IP6-HAp cement は様々な腫瘍細胞に対して特異的に作用し、細胞増殖性や細胞生存を抑制することがわかった。

本研究ではさらに、IP6 の腫瘍特異性メカニズムを解明するため、IP6 を添加した培地で培養した HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞に対して遺伝子発現解析を行った。IP6 は過去の報告から、腫瘍細胞に対して細胞周期の停止を誘導することがわかっており、本研究においても細胞周期関連遺伝子に着目して解析をおこなった。その結果、IP6 は主に Cyclin D1 の発現を抑制することで細胞周期 G1-S 期の進行を阻害していることが明らかとなった。

一般に、腫瘍細胞は正常細胞に比べて cell cycle が早いことが知られている。このことから、腫瘍細胞は正常細胞よりも IP6 による細胞周期停止の影響を早く(強く)受けてしまうため、正常細胞に比べて増殖性や細胞生存が著しく低下するのだと考えられた。IP6 は単体であれば濃度 2.0 mM ~4.0 mM 程度で抗腫瘍効果を発揮することが明らかであるが、本研究で作製した IP6-HAp cement は溶出してくる IP6 濃度が最大でも 0.5 mM 程度であるにも関わらず、増殖抑制効果を発揮している。その理由として、セメント表面にダイレクトに細胞が接着することによって IP6 濃度が局所的に高い環境を創り出すことができ、溶液中に溶出した IP6 よりも効果的に作用しているとも考えることができる。また、HOS 細胞や MC3T3-E1 細胞以外の腫瘍細胞 HeLa や正常細胞 CHO-K1 を用いて増殖試験を行ったところ、他の腫瘍細胞においても IP6 が細胞増殖を特異的に抑制していることが明らかとなった。

上記のとおり、IP6-HAp cement により強力な抗腫瘍効果を担持させることができ、腫瘍治療への応用にも十分期待出来る。今後、より有効な骨補填剤として IP6-HAp cement を発展させるために、特定の物質を添加させて多機能化を図る手段も有益であると考えられる。IP6-HAp cement は、HAp 表面に抗腫瘍性を有する IP6 を修飾することで骨分化能、及び抗腫瘍効果を獲得した重要な生体材料と成り得る。さらに IP6-HAp cement は、高齢社会の未充足な医療ニーズに貢献し得る有効な生体材料として活躍していくことが期待される。

【参考文献】

1. J.C. Banwart, M.A. Asher, and R.S. Hassanein, *Spine*, **20**, 1055-1060 (1995).
2. E.D. Arrington, W.J. Smith, H.G. Chambers, A.L. Bucknell, and N.A. Davino, *Clin. Ortho. Rel. Res.*, **329**, 300-309 (1996).
3. Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takeuchi, T. Toh, T. Yuasa, M. Nagayama, and K. Suzuki, *J. Biomed. Mater. Res.*, **48**, 36-42 (1999).
4. Y. Horiguchi, A. Yoshikawa, K. Oribe, and M. Aizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 50-55 (2008).
5. A.M. Shamsuddin, A.M. Elsayed, and A. Ullah, *Carcinogenesis*, **9**, 577-580 (1988).
6. K. Sakamoto, G. Venkatraman, and A.M. Shamsuddin, *Carcinogenesis*, **14**, 1815-1819 (1993).
7. A. Baten, A. Ullah, V.J. Tomazic, and A.M. Shamsuddin, *Carcinogenesis*, **10**, 1595-1598 (1989).
8. H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, *Key Engineer. Mater.*, **493-494**, 315-319 (2012).
9. L.U. Thompson and L. Zhang, *Carcinogenesis*, **12**, 2041-2045 (1991).
10. I. Vucenik, A. Passaniti, M.I. Vitolo, K. Tantivejkul, P. Eggleton, and A.M. Shamsuddin, *Carcinogenesis*, **25**, 2115-2123 (2004).
11. W.N. Addison and M.D. McKee, *Bone*, **46**, 1100-1107 (2010).
12. Y. Saito, *Yakugaku Zashi J. Pharmaceut. Soc. Japan*, **131**, 239-246 (2011).



---

相澤「次世代バイオセラミックス」プロジェクト研究概要集  
平成 25 年 9 月 30 日発行

発行 公益財団法人神奈川科学技術アカデミー  
川崎市高津区坂戸3-2-1 / 〒213-0012  
TEL. (044)819-2030  
印刷 高山プレスシステムセンター株式会社

---

●無断転載・複製を禁じます。