=====

特集シリーズ

=====

医療と福祉における複合材料の利用技術—IV.

自己組織化機構による骨・軟骨系複合材料の開発

—バイオミメティックス法—

生駒 俊之*, 田中 順三**

1. はじめに

日本は世界に類を見ない高齢化社会に突入し、特に医療福祉の改善・発展が期待されている。高齢化にともない、骨がもろくなる・軟骨が磨り減るなど我々の日常生活に重篤な疾患が報告されている。これらの疾患には、自家組織移植・モザイクプラスチックなど自分の正常組織を切り取って疾患部位に移植するなどの手術が行われている。しかし、移植するには、その大きさの限界、正常組織からの採取・移植にかかる時間、正常組織を採取したことによる痛みなど患者のQOL (quality of life; 生活の質) の低下が大きな課題となっている。

自家組織の移植で対応できないような大きな欠損や疾患の治療には、現在、人工材料が用いられている。たとえば、加重のかかる部位である股関節の大腿骨治療には、金属(ステンレス・チタン合金)やセラミックス(アルミナ; Al_2O_3)などの材料が用いられる¹⁾。また過重のあまりかからない部位では、骨と直接接合するハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)・リン酸三カルシウム ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)などの焼結体²⁾が用いられている。しかし、強度の違いによる生体骨の破壊、材料から溶け出す有害イオンによる痛み、周辺組織と人工材料の親和性の問題による緩みなどが問題となっている。

近年、医工学の急速な進歩は、再生医療といった新しい技術を生み出した。1993年にLangerとVacantiが最初にティッシュ・エンジニアリングの概念を提唱した³⁾。これは人工材料に細胞や生理活性物質を複合化させ、生体組織を *in vitro* (生体外) で再生させる試みである。彼らは合成吸収系(ポリグリコール酸とポリ乳酸の共重合

体)に牛胎仔軟骨細胞を付着させ、培養・増殖した後、その複合体を軟骨欠損部位に移植し、硝子軟骨組織の再生に成功した⁴⁾。これまでの研究から再生医療には、細胞の足場材・生化学的因子・力学的因子などが重要であることが提唱され、広範囲にわたる分野で研究開発が行われている。特に細胞の足場材の開発では、細胞との接着性・親和性、生体内吸収性、生化学的因子と材料の結合性などの改善が必要とされている。

再生医療における細胞の足場材には、コラーゲン・多糖類などの生体高分子やポリ乳酸・ポリグリコール酸などの合成高分子が用いられている⁵⁾。上述した問題点を克服するためには、これまでに使われている素材を上手に複合化し、その特性を生かした材料設計が必要である。本稿ではバイオミメティックス法と自己組織化機構により、生体組織に近い組成・構造を持った複合材料の開発に関して我々の最新の知見を交えながら考えてみたい。

2. バイオミメティックス法⁶⁾

バイオミメティックス法とは“自然から得たアイデアをより進んだテクノロジーに応用する”概念である。この研究の基盤となるのは、バイオミネラリゼーションといった“生体が溶液中で無機イオンを固体に変換するプロセス”であり、そこには必ず、“有機相と無機相が緊密な関係を持つプロセス”がある。我々は生体材料を開発する際に自然界からどのようなアイデアを材料設計に応用すればよいのだろうか。

骨は皮質骨(緻密骨)と海綿骨とに分類される。皮質骨は骨の外側に、海綿骨はつねに内側に存在する。皮質骨は、水分(15%)、ハイドロキシアパタイト(50%)、I型コラーゲン(30%)と多糖類(5%)により構成される⁷⁾。その構造は、67 nmの縞模様の周期を持ったコラーゲン原繊維が一方向に整列し、さらにその周りにハイド

* Toshiyuki IKOMA: 物質・材料研究機構生体材料研究センター (305-0044 つくば市並木1-1)

** Junzo TANAKA: 物質・材料研究機構生体材料研究センター (305-0044 つくば市並木1-1)

ロキシアパタイトの微結晶が c 軸に配向した階層構造を持っている。この秩序だった構造のため、骨は“しなやか”で“硬い”機械的特性を持っている。

一方、軟骨は繊維の種類・量によって硝子軟骨・弾性軟骨・繊維軟骨に大別される。軟骨組織は、多くの水分(73%)を保持し、タンパク質であるII型コラーゲン(10%)とグリコサミノグリカン(GAG)と呼ばれる多糖類(コンドロイチン硫酸・ケラタン硫酸・ヒアルロン酸など;14%)により形成されている⁷⁾。また、無機質(3%)はほとんど含まれていない。軟骨細胞はこの細胞外マトリックス(ECM)と呼ばれる複雑な構造をもった基質により囲まれている。この複雑な構造のため高い含水率と軟骨細胞への栄養素の供給を行い、軟骨特有の“粘弾性特性”と“低摩耗性”を保っている。

我々の身体は無機物と有機物から成る複雑な構造から積み上げられ、実に巧みに高機能性を実現している。この複雑な構造を形成している過程を工学的な視点から考えてみる。これら細胞外マトリックスの素材(コラーゲン・多糖類など)は細胞内で作られ、細胞外に産出される。そこで、各素材が自己組織化的に整列し、複雑な構造を作り出している。この生体内でのメカニズムは、実際には微量な有機成分や無機イオンなどが関与し複雑であるが、実際の合成にフィードバックするために簡略化した合成系を考える必要がある。つまり、素材を提供する順序・pH・温度・イオン強度などを制御すれば生体組織と類似した構造・組成を持った無機・有機複合材料の設計が可能であると考えられる。

3. 自己組織化機構を用いた材料合成・その微細構造⁸⁾

細胞が日常行っている自己組織化による骨・軟骨系組織の複雑な構造を完全に人工的に作ることは、現時点では難しい。そのため、2つのアプローチが考えられる。(1) 複合材料を生体内に移植して我々の身体の中で生体組織をつくらせる、(2) 複合材料にあらかじめ細胞を播

種して生体組織をつくらせ、生体内に移植する(再生医療)。後者の方法が現在注目され、研究が進められている。いずれの場合でも材料の役割が大きく、新しい材料の開発が急務である。一例として、骨・軟骨を修復する材料の開発に関して述べる。

生体組織での石灰化では、リン酸カルシウム的一种であるアパタイト(HAp)が形成される。この結晶は極めて小さな結晶(30~50 nm)であり、炭酸イオンを8%含んでいる。コラーゲン(Col)は生体内に最も多く存在するタンパク質で、約1,000個のアミノ酸がペプチド結合でつながっている。ポリペプチド鎖は左巻きのらせん構造であり、その3本が組み合わさって右巻きのらせん構造を作っている。つまりコラーゲン分子は複合三重らせん構造である。コラーゲン分子の大きさは300×1.5 nmであり、コラーゲン繊維は67 nm周期の縞模様が観察される。これは、コラーゲン分子が1/4周期ずれて整列しているためである。一方、軟骨組織に豊富に存在する酸性多糖類には、ヒアルロン酸(HyA)・コンドロイチン硫酸(ChS)が存在する。これらの2次構造の模式図を図1に示す。HyAはD-グルクロン酸とN-アセチルD-グルコサミンの2糖鎖の繰り返しにより構成され、側鎖にカルボキシル基をもっている。またChSは、D-グルクロン酸とN-アセチルD-ガラクトサミンの2糖鎖の繰り返しにより構成され、側鎖に硫酸基とカルボキシル基をもっている。これらはグリコサミノグリカン(GAG)と呼ばれ、生理条件下では負に帯電している。このため、生体組織の石灰化に重要な役割をしていると考えられている。

図2に様々な素材を複合化する方法の模式図を示す。この方法は2段階の反応により構成されている。最初にHAp/多糖類複合体を作成し、さらに2段階目の反応でコラーゲンを複合化させる。コラーゲンの複合化は恒温槽にて37°Cで行った。これはコラーゲン繊維が形成され、複合体の強度を向上させることが期待される。アパタイトと多糖類とコラーゲンの割合は、60, 25と15wt%

図1 グリコサミノグリカンの例
左: ヒアルロン酸, 右: コンドロイチン硫酸

図 2 合成模式図

左：アパタイトと多糖類の複合材料の合成法，右：アパタイト/多糖類自己組織化体とコラーゲンの複合化方法

図 3 合成したアパタイト/多糖類自己組織化体の透過型電子顕微鏡

左：アパタイト/コンドロイチン硫酸自己組織化体，右：アパタイト/ヒアルロン酸自己組織化体，電子線回折測定の結果から，一つの小さな凝集体中でアパタイト微結晶が長軸方向に整列している

にて合成を行った。この方法により，HAp/ChS/I型コラーゲン (I-Col)・HAp/HyA/I-Col・HAp/HyA/II型コラーゲン (II-Col)・HAp/HyA/II-Colの4種類の複合体を合成した。

図3にHAp/多糖類複合体の透過型電子顕微鏡像（以下，TEM）を示す。HAp/コンドロイチン硫酸複合体では，アパタイト微結晶の凝集体（大きさ 150×50 nm）が観測される。またアパタイト/ヒアルロン酸複合体でも，同様な凝集体（大きさ 300×30 nm）が観測される。一つの凝集体から電子線回折測定を行った結果，アパタイトの(002)と(004)の回折線がスポット状に観測される。これは，アパタイト微結晶の c 軸が凝集体の長軸方向に整列していること示している。このようなアパタイト微結晶の整列は，多糖類を水酸化カルシウム懸濁液に添加して合成したときに自己組織化的に生じている。

図4に各複合体の格子像を示す。矢印で示した方向に対して垂直に0.34 nmの間隔の縞模様が観測される。アパタイト微結晶のカルシウム密度が高い部分が縞状に観測されている。自己組織化機構の詳細に関しては5節で述べる。得られたアパタイト微結晶の大きさは， 20×5 nmの板状結晶であった。

図5に一軸圧縮法により圧力を40 MPaかけて成形したHAp/ChS/II-Col複合体を示す。合成直後の複合体は大量に水を含んでいる。このため成形する時に脱水・圧縮を同時に行う。図に一例を示したように得られた複合体は，いずれも透明なものであった。

図6にHAp/ChS/II-Col複合体を圧縮方向に垂直に切断した断面のTEM像を示す。図に示すように0.34 nmの間隔の縞が観測される。これは，アパタイト微結晶が圧縮方向に対して垂直に配向していることを示してい

図4 自己組織化体の格子像

左：アパタイト/コンドロイチン硫酸自己組織化体，右：アパタイト/ヒアルロン酸自己組織化体

図5 成形したアパタイト/コンドロイチン硫酸/I型コラーゲン複合体

図6 成形した複合体の断面透過型電子顕微鏡像
写真内に 0.34 nm 間隔の縞が観測される

る。また、成形体を粉砕した試料とそのままの成形体を粉末 X 線回折 (XRD) 測定した結果、粉砕した試料の場合には 002 の回折線が観測されるが、成形体を測定した場合は、002 の回折線が観測されなかった。このことは、成形体中でアパタイト微結晶の c 軸が圧縮方向に対して垂直に配向していることを示しており、TEM 観察の結果と一致していた。

ここに示したように HAp/多糖類自己組織化を合成してコラーゲン繊維を組み合わせ、一軸圧縮(脱水)を行うことで階層構造を持った複合体の設計が可能であることが示唆された。

これまでに皮質骨および軟骨の 3 点曲げ試験による機械強度は 50~150 MPa および 10~40 MPa である。また、これまでに臨床応用されている HAp 焼結体の機械

強度は約 100 MPa である。今回合成した各複合体の機械強度を 3 点曲げ試験を用いて行った。図 7 にそれぞれの複合体の機械強度を示す。I 型コラーゲンを含む 3 成分系の複合体は、II 型コラーゲンを含む複合体と比較して明らかに強度が高いことが分かる。また、HAp/ChS/I-Col 複合体は、83 MPa と骨に近い強度を持っていることが明らかとなった。I 型コラーゲンと II 型コラーゲンを含む複合体での強度の違いは、コラーゲン分子の繊維形成能に依存していると考えられる。

4. 自己組織化のメカニズム

多段階的な反応機構における各段階での無機/有機複合界面で生じている反応、特にアパタイト微結晶の自己

図 7 各複合体の三点曲げ試験結果

I 型コラーゲンを含む複合体は II 型コラーゲンを含む複合体と比較して強度が高い

図 8 ラット・膝関節に移植した材料の光学顕微鏡写真 (TB 染色)

組織化に関して考えてみる。水酸化カルシウム懸濁液中に添加した多糖類のカルボキシル基は、アルカリ性溶液中で解離してカルシウムイオンと結合していると考えられる。このカルボキシル基と弱い配位結合により結合したカルシウムイオンを核形成場として、リン酸基との反応が生じアパタイトの沈着が生じる。このようなカルボキシル基とのアパタイト結晶の相互作用に関してはこれまでに LB (Langmuir-Blodgett) 膜法により盛んに研究されている。ここでは、多糖類の 2 次構造 (カルボキシル基の配列) とアパタイト結晶のエピタキシャル的な成長に関して述べる。

アパタイト結晶は $a=0.942$, $c=0.688$ nm の格子定数を持ち、空間群・六方晶系に属する結晶である。アパ

図 9 多孔質材料と *in vitro* 中で軟骨再生した軟骨組織 (細胞培養 2 週後)

イト格子中の水酸基は水酸コラムといわれる c 軸上に整列している。この周りにカルシウム三角形が $z=1/4, 3/4$ のミラー面上に存在している。この隣り合うカルシウム三角形の c 軸方向の距離は、格子定数の半分の長さである (0.34 nm)。一般に、 a 面はカルシウムにより終端しているため、正に帯電していると考えられている。一方、多糖類は 2 糖鎖の繰り返し構造により形成されている。D-グルクロン酸の側鎖であるカルボキシル基の繰り返しにより、アパタイトの核形成場となるカルボキシル基間の距離は約 1.02 nm の間隔で整列している。この距離は、アパタイト結晶の c 軸長の 1.5 倍の距離 (1.05 nm) とほぼ一致している。このためアパタイト/多糖類の自己組織化が生じたと考えられる。

5. 複合体の生体内反応性

HAp/ChS/II-Col 複合体を軟骨組織に移植して生体の応答を調べる実験を行った。図 8 に材料を家兔の膝関節に移植して 4 週後の結果を示す。材料内部に未分化の軟骨様細胞が入っている様子が観測される。このように軟骨様細胞が材料内部に入り込む現象は、他の材料では観測されていない。さらに HAp/HyA/II-Col 複合体を多孔質化させた材料にマウスの肋軟骨の軟骨細胞を播種して *in-vitro* の実験系により軟骨組織の再建を試みた。図 9 にその結果を示す。細胞を播種しない場合、トルイジンブルー染色により何も染色されない。3 日後には青色に軟骨細胞が染色されていることが分かる。さらに 1 週後には軟骨細胞が生着でき、2 週後には細胞外基質の産生を行っていることが分かった。このように材料の微構造を制御することで軟骨組織の再建の可能性が示唆さ

れ、軟骨細胞の分化・増殖に与える材料効果の解明が進められている。

6. ま と め

軟骨・骨再生の研究は、現在、米国・日本において熾烈な国際競争が繰り広げられている。ここ数年の組織工学の進展は目覚ましいものがあり、多数の企業・機関において軟骨組織の再生に対して成長因子・生体力学効果を解明している。細胞の足場材に関しては、コラーゲン・乳酸系ポリマーなどが取り上げられ、多孔体を用いた研究が進められている。軟骨組織に近い材料の研究はまだ着手されたばかりであるが、今後、合成技術の開発・細胞や組織に与える材料効果を解明することで新しい複合機能材料が開発されると期待される。

この研究は、東京医科歯科大学(宗田教授・関矢助手)との共同研究として進められている。その研究結果の一部を紹介した。

参 考 文 献

- 1) 宮入裕夫：生体材料の構造と機能，養賢堂 (2001)。
- 2) 牧島亮男，青木秀希：セラミックスサイエンスシリーズ 7，バイオセラミックス (山口 喬，柳田博明編)，技報堂出版(株) (1984)。
- 3) R. Langer & J.P. Vacanti : *Science*, **260** (1993), 920-932.
- 4) C.A. Vacanti, R. Langer, B. Schloo & J.P. Vacanti : *Plast. Reconstr. Surg.*, **88** (1991), 753-759.
- 5) 再生医療と生命科学，蛋白質 核酸 酵素，共立出版，2000年9月増刊号 (2000)。
- 6) 長田義仁編：バイオミメティックスハンドブック，エヌ・ティーエス(株) (2000)。
- 7) 須田立雄，小澤英浩，高橋栄明：骨の科学，医歯薬出版 (1995)。
- 8) T. Ikoma, T. Muneta & J. Tanaka : *Key Eng. Mat.*, **192**, 5 (2000), 487-490.