

平成 22 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500411

研究課題名（和文） ハイドロキシアパタイト単結晶複合体ナノ界面の細胞機能

研究課題名（英文） Cell function on nano-surface of hydroxyapatite nanocrystal composite

研究代表者 古菌 勉 (FURUZONO TSUTOMU)

研究者番号：30332406

研究成果の概要（和文）：

ハイドロキシアパタイト(HAp)ナノ単結晶（粒子）を被覆した複合材料表面の細胞機能を詳細に検討した。HAp 被覆シートでは未処理ポリエチレンテレフタレート(PET)シートより高い細胞接着性および増殖性を示した。細胞の強固な接着は、HAp のナノ構造に起因する細胞のアンカリングと細胞外マトリックスのリモデリングが積極的に行われていることによると推察された。

研究成果の概要（英文）：

Cell functions of cells on hydroxyapatite (HAp) nanoparticles coated on polyethyleneterephthalate (PET) sheet were examined in detail. Cell adhesiveness and proliferation on HAp sheet was higher than original PET sheet. It was thought that the higher adhesion strength of cells on HAp substrate compare to the on original PET depend on cell anchoring on nano-structure and higher remodeling of extracellular matrix.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体機能材料

1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイト(HAp)は骨や歯の成分であり、高い生体親和性を持つことが知られている。なぜHApが高い生体親和性を有するのか多くの研究がなされ、例えば細胞接着性タンパク質や成長因子が吸着しやすい

表面特性を有することなどが報告されている。しかしながら、これらの報告に用いられているHApは二次粒子もしくは二次粒子から成形加工された平板であることから、HAp粒子の方位や面の制御がランダムであり、HApの材料特性を正確に表わしている訳ではな

い。我々は HAp 単結晶体で単分散性を示すナノ微粒子を合成し、高分子及び金属基材上に共有結合でかつ単層で強固に結合した新規なナノ複合材料を創出し、抗感染性カテーテル、人工血管、ステント、再生医療用基材へと応用している。当該材料の生物特性として、既に線維芽細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞および間葉系幹細胞が強固に接着することが明らかとなっている。

2. 研究の目的

一連の研究の中で、接着した細胞は増殖するにも係わらず、トリプシン EDTA さらにコラゲナーゼを用いても細胞を剥離できない程に材料上に強固に結合していることを認めた。当該研究では材料の表面特性（ナノ粒子の表面被覆率及びナノ粒子の粒径を制御）と接着細胞の接着分子及び機能性発現との関係から、当該新材料と細胞機能との相互作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 複合材料制御①ナノ HAp の形状サイズの制御

HAp 焼成体を製造する際、リン酸カルシウム・アクリル酸からなる融着防止剤を用いて分散性の優れた HAp を調製した。湿式調製時に反応温度を変化させることにより、粒径コントロールを行った。HAp をコーティングする基材としてポリエチレンテレフタレート (PET) シートを用いた。コロナ放電処理により PET シート表面にラジカルを導入後、ポリアクリル酸水溶液を用いてグラフト重合を行い、PET 表面に HAp と高い相互作用を有するカルボキシル基を導入した。

(2) 複合材料制御②ナノ HAp の被覆率の制御

無水エタノール中に HAp 添加量を変化させた濃度の異なる HAp 分散溶液を調製した後、カルボキシル基を導入した PET シート（直径 14mm 円盤状）を浸漬し、吸着量の制御を行った（図 1）。

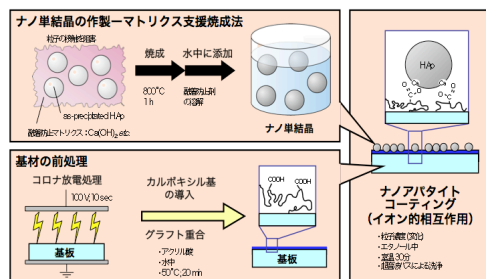


図 1. HAp 粒子製造法と複合材料製造法

(3) 細胞接着・増殖挙動

L929 線維芽細胞をロッド状 HAp 被覆シート上に播種し、初期細胞接着性（細胞数 570

cells/mm²(n=17)、8 時間)および増殖性(播種細胞数 20 cells/mm²(n=4)、5 日間)を評価した。

(4) 表面特性の評価

HAp 粒子の表面特性はゼータ電位および X 線光電子分光法 (XPS) を用いて測定された。

(5) 細胞移動状態の評価

各試料表面における細胞移動状態は、リアルタイム培養細胞観察法により評価した。

(6) 細胞/基材断面の評価

L929 細胞を 3 日間培養後、細胞が接着した基材ごと脱水固定して樹脂包埋し、ミクロトームにて薄膜切片を作成し透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。

(7) 細胞/基材間における細胞接着性タンパク質産生の評価

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、未処理 PET と HAp 被覆シート上に置けるファイブロンネクチンの蛍光観察（ファイブロンネクチン抗体を用いた可視化）を行った。

4. 研究成果

(1) 複合材料制御①ナノ HAp の形状サイズの制御

湿式法による反応溶液温度を変えることにより、粒子の結晶成長を制御した。得られた粒子は球状粒子（平均粒径 52nm）およびロッド状粒子（平均粒径 316nm）であった。

(2) 複合材料制御②ナノ HAp の被覆率の制御

図 1 に HAp 製造法と PET シートへの表面被覆法を示す。HAp 表面にある Ca イオンと PET 表面のカルボキシル基との静電的相互作用により HAp はほぼ単層で基材表面に吸着した。

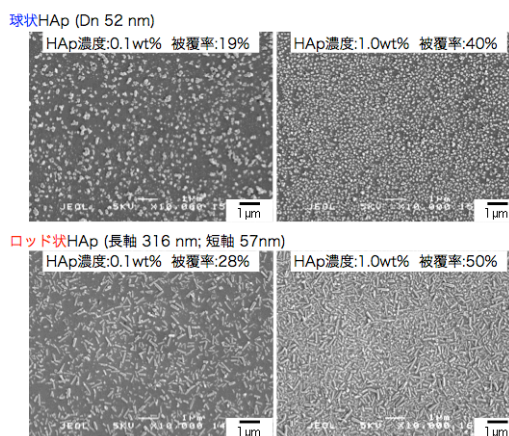


図 2. HAp 粒子の表面被覆率制御

図 2 に表面被覆率を制御した複合材料の電子顕微鏡像を示す。球状粒子の場合、HAp 濃度 0.1wt% で平均被覆率 19%、1.0wt% で 40%を

示した。またロッド状粒子の場合、HAp 濃度 0.1%で被覆率 28%、1.0wt%で被覆率 50%を示した。いずれに置いても再現性良く表面被覆制御が可能であった。また、コーティングの安定性を評価するため、リン酸バッファーに 37°C で 3 日間静置し剥離実験を行った結果、被覆率に変化が認められなかったことから、調製した複合材料は細胞培養に好適であることが確認された。

(3)細胞接着・増殖挙動

初期細胞接着時間(8 時間)において、HAp 被覆シートは未処理の PET シートに比較して接着数は有意に増加したが、培養シャーレ (TCPS) よりも低い細胞接着数を示した。その後、HAp 被覆シートにおける細胞増殖性は培養 1~2 日目において TCPS と並び、さらに 3 日目において TCPS より有意に増加した (図 3)。

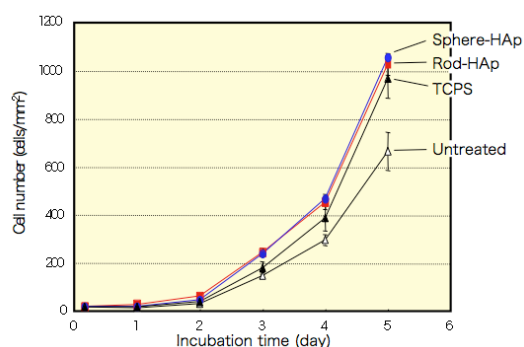


図 3. 細胞増殖性試験

(4)表面特性の評価

ロッド状 HAp および球状 HAp におけるポテンシャル (mV) は、それぞれ 9.2 ± 4.7 および 2.6 ± 38 であった。これはロッド状 HAp の場合、Ca リッチな a 面が相対的に広いためトータルとして陽電荷に傾いたものと推察された。XPS 測定において両者とも Ca/P が HAp の化学量論比 (1.67) より高い値をとることから、材料表面が Ca リッチな陽電荷を有することを裏付ける結果となった。

(5)細胞移動状態の評価

リアルタイム細胞培養観察法 (48 時間観察) による、球状 HAp 複合シート上よりロッド状 HAp 複合シートの方が細胞の移動時間が短い (早期に安定接着する) ことが観察された。この結果はポテンシャルの陽電荷の傾向とは一致しないことから、表面ナノ構造 (ナノトポロジー) の違いを細胞表面が認識している可能性が示唆された。

(6)細胞/基材断面の評価

細胞培養 3 日後の細胞/基材間を透過型電子顕微鏡にて観察した。未処理 PET 表面では

細胞は剥離し非常に弱い相互作用で接着 (もしくは吸着) している様子が観察された。一方、HAp 被覆表面では未処理 (コントロール) 表面に比較して、細胞が HAp に対して安定接着している様子が確認された。

(7)細胞/基材間における細胞接着性タンパク質産生の評価

未処理 PET に比較して HAp 被覆シート表面ではフィブロネクチンが細胞から豊富に産生されており、細胞外マトリックス (ECM) のリモデリングが積極的に行われていることが明らかとなった。

(8)まとめ

HAp 複合材料表面における強固な安定接着は、ナノ界面における凹凸を細胞表面が認識し強固にアンカリングしていること、および細胞外マトリックス (ECM) によるリモデリングが積極的に行われていることにより生じていることが推察された。このことは、当該材料が細胞足場材料として有効であることを示唆している。しかしながら球状構造体とロッド状構造体が細胞接着性に与える影響は未だ十分に解明できなかった。両者の間に微妙な細胞接着に与える影響の差が認められていることから、さらなる詳細な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) M. Okada, H. Yanagida, M. Masuda, I. Narama, S. Nakano, S. Kitao, Y. Koyama, K. Takakuda, T. Furuzono, Osteoblast Cell Adhesion on Hydroxyapatite-Nanocrystal-Coated Poly(L-lactic acid) Nonwoven Fabrics, *Arch. BioCeram. Res.*, **9**, 287-290 (2009)
- 2) H. Yanagida, M. Okada, M. Masuda, M. Ueki, I. Narama, S. Kitao, Y. Koyama, K. Takakuda, T. Furuzono, Cell adhesion and tissue response to hydroxyapatite-nanocrystal-coated poly(L-lactic acid) fabric, *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 235-243 (2009)
- 3) M. Okada, K. Furukawa, T. Serizawa, Y. Yanagisawa, H. Tanaka, T. Kawai, T. Furuzono, Interfacial interactions between

calcined hydroxyapatite nanocrystals and substrates, *Langmuir*, **25**, 6300-6306 (2009)

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) 岡田正弘, 古藺勉, バイオセラミックス・ナノ結晶コーティングによる先端医療機器開発, ニューセラミックス懇話会 第 190 回特別研究会, たかつガーデン, 大阪, 2009.12.11
- 2) M. Okada, H. Yanagida, M. Masuda, I. Narama, S. Kitao, Y. Koyama, K. Takakuda, T. Furuzono, Osteoblast Cell Adhesion on Hydroxyapatite-Nanocrystal-Coated Poly(L-lactic acid) Nonwoven Fabrics, 9th Asian BioCeramics Symposium 2009 (ABC2009), Nagoya, Japan, 2009.12.8-11
- 3) 柳田洋, 岡田正弘, 奈良間功, 中野恵之, 北尾哲, 小山富久, 高久田和夫, 古藺勉, 再生医療に向けた細胞の足場材料として有用なナノアパタイト複合化ポリ乳酸を用いた生体吸収性材料の創出, 第 31 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 2009.11.16-17
- 4) 古藺勉, 益田美和, 岡田正弘, 新田尚隆, 賀谷彰夫, 山根隆志, 抗感染性カテーテル創出に向けたナノマテリアルの開発, 日本セラミックス協会第 22 回秋季シンポジウム, 愛媛大学, 愛媛, 2009.9.16-18 (招待講演)
- 5) 古藺勉, 感染制御とナノマテリアル, 関西大学先端科学技術推進機構 研究部門別発表会 (第 14 回)「ナノで機能するマテリアルとデバイス」、関西大学、2009、9、1(招待講演)
- 6) 虫邊 慶悟, 岡田正弘, 楠正暢, 本津茂樹, 古藺勉, アパタイトナノ粒子コーティング基材上での細胞挙動に関する基礎研究, 第 4 回日本接着学会関西支部若手研究者の会, 大阪工業大学, 大阪, 2008.12.3
- 7) 柳田 洋, 岡田正弘, 益田美和, 奈良間功, 小山富久, 高久田和夫, 古藺勉, エレクトロスピンニングを用いて作製したアパタイトナノ焼成体/ポリ乳酸複合体の創出とその in vivo 試験, 第 46 回日本人工臓器学会, 六本木アカデミーヒルズ, 東京, 2008.11.27-29
- 8) 柳田 洋, 岡田正弘, 奈良間功, 小山富久, 高久田和夫, 古藺勉, ナノアパタイト複合化ポリ乳酸繊維の生物学的特性, 第 57 回高分子討論会, 大阪府立大学杉本キャンパス, 大阪, 2008.9.24-26
- 9) H. Yanagida, M. Okada, I. Narama, Y. Koyama, K. Takakuda, T. Furuzono, Improvement of cell adhesion and tissue reaction of poly(L-lactic acid) with coating highly crystalline hydroxyapatite by soft-nanoceramic processing for tissue engineering, 2007 Joint Congress: The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs (JSAO) and The 2nd International Federation for Artificial Organs (IFAO), Osaka, Japan, 2007.10.28-31
- 10) H. Yanagida, M. Okada, M. Masuda, M. Ueki, I. Narama, S. Kitao, Y. Koyama, K. Takakuda, T. Furuzono, Fabrication of poly(L-lactic acid) fabric coated with calcined hydroxyapatite nanocrystals by soft-nanoceramic processing, The Seventh Asian BioCeramics Symposium 2007 (ABC2007), Osaka, Japan, 2007.9.25-27
- 11) 古藺勉, 岡田正弘, 小粥康充, 医療機器開発を目的とするナノセラミックス高分子複合材料, 第 56 回高分子討論会, 名古屋工業大学, 名古屋, 2007.9.19-21
- 12) 柳田洋, 岡田正弘, 奈良間功, 植木光樹, 小山富久, 高久田和夫, 古藺勉, ソフトナノセラミック・プロセッショ

グによるアパタイト/ポリ乳酸複合体
の創出, 第 56 回高分子学会年次大会,
京都, 2007.5.29-31

〔図書〕 (計 2 件)

- 1) 古菌勉, 岡田正弘, 小粥康充, ナノアパタイト単結晶コーティング, 機能材料, シーエムシー出版, **27**, 40-48 (2007)
- 2) 岡田正弘, 古菌勉, ナノアパタイト複合技術 (ソフトナノセラミック・プロセス) とその応用, マテリアルインテグレーション, ティー・アイ・シー, **20**, 113-119 (2007)

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古菌 勉 (FURUZONO Tsutomu)

国立循環器病センター研究所・生体工学部・
室長

研究者番号 : 30332406