

整理番号	H26-J-102	報告者氏名	城崎 由紀
------	-----------	-------	-------

研究課題名 HAp ナノシートを集積させた組織修復用パッチの創製

<代表研究者> 機関名：九州工業大学 職名：准教授 氏名：城崎由紀

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

HAp は、歯や骨の生体硬組織の主成分で、整形外科や歯科などの医療分野のみならず、化粧品や吸着剤等にも使用されている。しかし、現在使用されている HAp 粒子は一次粒子からなる顆粒状のものがほとんどで、HAp が持つ結晶面の特性を完全に発揮できているとは言えない。そこで、本申請にて提案するように、HAp ナノシートを集積させ、巨大なナノ HAp パッチを作製できれば、ある特定面のみが表面に露出した試料となり、それを利用して生体組織との親和性等に関する新たな知見を得ることができる。また、厚みがナノレベルであるため、無機物質の HAp であっても柔軟な膜となり、低侵襲治療への使用範囲が広がる。このナノ HAp パッチを積層し、層間に薬物等を固定できれば、薬物担持剤としても応用が可能となり得る。

一方、この HAp ナノシートを柔軟性高分子表面に単層でコーティングできれば、既存の医療高分子表面の生体適合性を改善することができ、片面は生体適合性を有し、他面は組織が癒着しない薄膜の作製も可能となる。

本研究では、骨芽細胞および破骨細胞を用いて HAp ナノシートの細胞適合性を調べるとともに、HAp ナノシートを金薄膜表面へ積層させ、その表面での細胞接着・増殖性を観察した。HAp ナノシートは単独で骨芽細胞の活性を低下させず、破骨細胞の分化活性の発現に効果を及ぼした。また、HAp ナノシートを積層させた金薄膜表面で、細胞は良好に接着・増殖することが分かった。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>
特記ありません。

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

研究目的

胃潰瘍等の潰瘍を発症した場合、現在では、薬物療法により治療することが主な対処方法であるが、症状や年齢等により使用できない。また、胃酸産生を抑制する薬物を投与した場合、食事等が制限される。薬物投与後、潰瘍等の炎症は1~2週間続くため、食事等に制限があり、患者の社会活動に支障をきたす。一方、消化管に穴が開いた（上部消化管穿孔）場合、手術により穿孔部を縫合あるいは血管閉塞等を行い治療する。これまでにアロンアルファとほぼ同成分の接着剤を用いる試み等が医療現場でなされてきたが、組織との結合性等解決されていない。

本研究では、生体適合性を有するヒドロキシアパタイト（以下HAp）ナノシートを集積し、生体修復用パッチを作製することを試みた。HApはその構成イオンを別種イオンと置換することができ、その置換により生分解性、選択的タンパク吸着特性、抗菌性等様々な特性を発現することが分かっている。このHApをナノサイズの厚みを有する巨大シート（パッチ）化、あるいは柔軟な薄膜に修飾することにより、パッチ自身に柔軟性を持たせることができ、内視鏡操作下での局所的な手術に使用可能となり得る。さらに、その生分解性を制御することによって、胃酸存在下（pH2~3）において1週間程度保持でき、さらに抗菌性薬剤等を担持させることにより、炎症を抑制し得る。上記提案が可能となるナノパッチを作製できれば、治療中でも、社会活動を継続可能となることが期待できる。

経過

出発原料として硝酸カルシウム四水和物とリン酸水素二アンモニウム（nacalai tesque 製、特級）を用いた。それぞれの試薬をHApの化学量論比であるCa/P=1.67になるように調製し、さらに混合溶液の最終pHを調製するため、リン酸水素二アンモニウム水溶液にあらかじめアンモニア水を添加した。アンモニア水により調整しない場合は、pH6.4である。調製した2種類の水溶液を流速 $2\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で送液ポンプによりチューブリアクター（ $\phi 2000\mu\text{m}$ ）内に送液し、 40°C の恒温槽内で流通熟成させた。その際、2相混合部にT字型の混合リアクターを用いた。反応溶液をメンブランフィルターによりろ過し、ろ過物を凍結乾燥し、HApナノシートを得た。得られたHApナノシートは、エチレンオキサイドガスによって滅菌した。継代培養したMG63細胞を96wellに300 cells/wellとなるよう播種し、1日培養した。ヒト血漿からヒPBMCを単離し、96wellに 5×10^5 cells/wellとなるよう播種した。MG63/PBMC共培養系は、先にMG63細胞を培養した上にPBMCを播種した。培養1日後、培地を交換し7日間培養を行った。HApナノシートをそれぞれ100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培地に懸濁させた。上記細胞の培養7日あるいは14日後に各wellの上澄みを取り除いた後、各HApナノシート懸濁培地を100 μl ずつ加えさらに7および14日間それぞれ培養を行った。比較として粒子を添加していない条件でも同様に培養を行った所定期間培養後、各well中の細胞の（1）総タンパク量、（2）ALP活性、および（3）TRAP活性を測定した。

（1）総タンパク量：各wellから上澄み液を取り除いた後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH7.4）で洗浄し、0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液100 μl を加え、室温にて1時間静置させた。得られた溶液にBRADFORD溶液を反応させ、595 nmの吸光度をプレートリーダーにて測定し、総タンパク量に換算した。

（2）ALP活性：各wellから上澄み溶液を取り除いた後、PBSにて洗浄し、0.1%トリトン水溶液100 μl を加え、室温にて1時間静置させた。フォスファターゼ基質溶液を添加した後、 37°C で1時間静置し、5水酸化ナトリウム水溶液20 μl を添加して反応を止めた。得られた溶液の400 nmの吸光度を測定し、ALP活性値を得た。

（3）TRAP活性：各wellから上澄み溶液を取り除いた後、PBSにて洗浄し、0.1%トリトン水溶液100 μl を加え、室温にて1時間静置させた。フォスファターゼ基質溶液を添加した後、 37°C

で1時間静置し、5 水酸化ナトリウム水溶液 20 μl を添加して反応を止めた。得られた溶液の 400 nm の吸光度を測定し、TRAP 活性値を得た。(2) および (3) で得られた値を (1) の総タンパク量で割り、タンパク量あたりの ALP 活性および TRAP 活性を結果として示した。

細胞毒性確認後、HAp ナノシートを金ポーラス薄膜上に、濾過法によって積層させた。当初、HAp ナノシートおよび高分子基板表面をシランカップリング剤や各官能基で修飾して化学結合させることも試していたが、金薄膜表面への濾過法が最も簡便かつ均一に HAp ナノシートが積層されたので、本研究で採用した。HAp ナノシートを1層積層させた金薄膜をエチレンオキサイドガス滅菌し、試料とした。FBS を含む培地に試料を1日浸漬させ、その後 MG63 細胞培養懸濁液を加えて、36.5°C で5日間培養した。培養後、細胞を試料表面に固定し、走査電子顕微鏡で表面を観察した。

結果

HAp ナノシート提供者から粒子作製法を学び、HAp ナノシートを作製した。得られたシートは、長片が 100~200 nm のシート状であった。

積層した HAp シートが剥がれ落ちることも想定し、まず HAp ナノシートの担体の細胞適合性を調べた。HAp に関する培養が多い、骨芽細胞および破骨細胞を用いて培養試験を行った。また、破骨細胞は骨芽細胞との共培養によってその活性が発揮されるため、共培養下で試験した。MG63 担体培養の場合、培養7日目で1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の HAp ナノシートを添加した際に高い ALP 活性値を示した。一方、100 $\mu\text{g/ml}$ 添加すると ALP 活性は低下し、MG63 細胞の分化活性を抑制した。培養14日目の HAp ナノシートの添加は MG63 細胞の ALP 活性に影響しなかった。共培養の場合、MG63 細胞のみを培養した場合より、全体的に ALP 活性値は高くなった。しかし、HAp ナノシートの添加濃度に対する細胞の応答性も高まり、培養7日目で1 $\mu\text{g/ml}$ および 10 $\mu\text{g/ml}$ の HAp ナノシートを添加した場合だけでなく、培養14日目に粒子を添加した場合にも ALP 活性は著しく低下した。共培養によって、粒子が MG63 細胞の分化活性におよぼす影響は高まり、少量の粒子を添加すると活性を促進する効果があることが分かった。

また、破骨細胞による TRAP 活性は、培養7日目に HAp ナノシートを添加すると、添加7日後では、PBMC 中の破骨細胞による TRAP 活性はすべて抑制されていたが、14日後には1 $\mu\text{g/ml}$ 添加時において活性は促進された。また、培養14日目に HAp ナノシートを添加した場合、その傾向がより顕著に現れていた。

MG63 細胞の分化活性よりも、破骨細胞の分化活性の方が遅いため、培養後期での HAp ナノシート添加が破骨細胞に影響すると考えられる。また共培養の場合、単一培養時とは異なり、培養7日目に HAp ナノシートを添加すると、その後培養7日目で 100 $\mu\text{g/ml}$ の場合を除いて TRAP 活性は上昇した。100 $\mu\text{g/ml}$ の場合にも培養14日目では促進されている様子が観察された。一方、培養14日目に HAp ナノシートを添加した場合には、濃度に関わらず TRAP 活性は低下した。ALP 活性および TRAP 活性の両結果から、HAp ナノシートは骨芽細胞の活性を低下させず、破骨細胞の分化活性を促進させる効果があると考えられる。

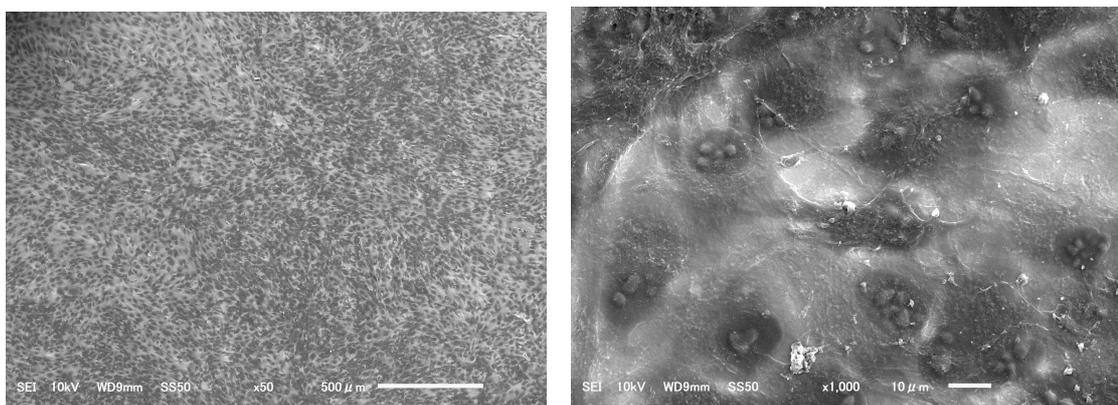


図1 HAp ナノシート積層金薄膜上で5日間培養した骨芽細胞様細胞

濾過法を用いて、金薄膜表面に積層した HAp ナノシートは、乾燥後に剥がれ落ちる様子は観察されなかった。また、シート同士が重なり合う面もあったが、一様に金薄膜表面を覆っていた。HAp ナノシート積層金薄膜表面で培養した骨芽細胞は、培養 5 日後ではまだ集密化していなかったがよく増殖し、表面全体を覆っていた (図 1 左)。各細胞は偽足を伸ばして、よく伸展していた。また細胞核内の核小体がはっきりと観察され、細胞が試料表面で活性化していることが分かった (図 1 右)。

以上のことから、HAp ナノシート担体は骨芽細胞に対して細胞毒性を示さず、またそのシートを積層させた金薄膜表面で良好に接着・増殖することが分かった。

考察

当初、柔軟性を有する高分子を基板材料として検討していたが、より生体内で不活性な金薄膜を基板材料として用いる事にした。薄膜化した金は、柔軟性に富むため、手術時に小さくまとめた状態で体内に埋入し、その後患部で広げることが可能である。またチオール基等の反応に富む為、今後 HAp ナノシートと基板間の結合力を向上させることを目的として、各種官能基をその表面に導入しやすい。ナノサイズの孔を有する金薄膜を用いることで、それに濾紙の役割を持たせ、HAp ナノシート懸濁液を基板上面から濾過し、簡便に金薄膜表面に HAp ナノシートを積層することができた。

HAp ナノシート担体は、一般的に用いられている HAp 粒子とは形状がかなり異なる為、シート担体の細胞適合性も評価した。ナノシートの形状は骨芽細胞の活性には影響しなかったが、破骨細胞の活性は促進させた。これは、HAp がナノシート状で大変薄く、破骨細胞存在下にて、通常の HAp 粒子やバルク体と比較してより溶解しやすいからであると考えられる。

HAp ナノシート単層を積層させた金薄膜表面でも骨芽細胞は良好に接着し、金薄膜担体表面よりも増殖・活性した。これは、金表面の HAp 層が骨芽細胞の活性を促進することによる。現在本単層積層試料表面での線維細胞の培養を行っており、目的としている胃潰瘍組織へ応用可能かどうかを検討している。また、破骨細胞との共培養下および骨髄間葉系幹細胞を用いた培養試験も行っており、当初の応用目的だけではなく、骨あるいは歯の修復関係への利用も目指している。また同時に HAp 層の分解性試験も継続して検討中である。

本助成採択後、HAp ナノシートの提供を受けられなくなったため、提供者から作成方法を学び再現することに時間を有したため、HAp ナノシートを複層化するには至らなかった。今後は、HAp 層表面をコラーゲンで修飾し、複層化した後、コラーゲン層へ各種薬剤を固定することを試みる。