
生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築および
垂直統合型研究拠点形成

平成 23 年度～平成 27 年度

文部科学省
私立大学戦略的研究基盤形成事業

研究成果報告書

平成 28 年 3 月 31 日

学校法人名：学校法人明治大学

大学名：明治大学

研究組織：生命機能マテリアル研究クラスター

研究代表者：相澤 守

(明治大学理工学部 教授)

<はしがき>

本プロジェクト「生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築および垂直統合型研究拠点形成」は、平成 23 年度に文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業として採択され、明治大学特定課題研究所「先端医療材料創製ユニット」(2014 年 4 月より明治大学生命機能マテリアル研究クラスター (http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/cluster/) に移行) を中心として 5 年計画で研究を推進した。

このプロジェクトは、平成 18 年度から平成 22 年度に推進した私立大学学術高度化推進事業「学術フロンティア」(課題名: 高度先進医療を支援するハイパフォーマンスバイオマテリアルの創製とその医療用デバイスとしての応用) で得られた研究成果に立脚し、生命現象に積極的に働きかける「生命機能マテリアル」の創製と、それを活用して医工連携により次世代の「再生医療」に貢献する医工学技術の構築を目指している。これまでの類似研究は、医学あるいは工学サイドで独自で展開されている場合が多く、組織再生に必要な細胞の足場材料(スキャフォールド)の創製から三次元組織の再生、生体内試験までを川上から川下まで一貫して研究する組織はほとんどなかったと思われる。本プロジェクトでは、密接な医工連携により次世代再生医療のための「垂直統合型研究拠点」を形成することも目的としている。

今年度(2015 年度)で、プロジェクト開始から 5 年目(最終年度)を迎え、これまでの研究成果をまとめたので、これを有識者の方々に配布し、我々の研究成果を報告するとともに、今後の発展のために忌避のないご意見を頂ければと考えている。

このプロジェクトは、私立大学を中心とした「密接な医工連携による次世代再生医療技術の構築と垂直統合型研究拠点の形成」を目指しており、理工農系だけでなく医学系のメンバーにも参画していただいている。また、このプロジェクトは、a) 生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出、b) 三次元組織の構築と機能、c) 血管形成の制御、d) *in vitro* → *in vivo* 評価系の構築の 4 つのサブプロジェクトから構成されており、それぞれのサブプロジェクトに、1) 材料創製とその機能評価を行なう研究者、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、3) 創製した材料の実際の病態に即した臨床的研究を行なえる研究者を配置し、「材料創成から機能評価まで」を一貫して遂行できる研究体制で臨んでいる。

この「研究成果報告書」は 7 つの章から構成されている。まず、第 1 章は「プロジェクト総括」であり、研究代表者が報じている。第 2 章～第 6 章では、研究代表者および研究分担者が推進してきた課題についてサブプロジェクトごとに詳細に報告している。第 2 章は「生命機能マテリアルの創出」、第 3 章は「三次元組織の構築」、第 4 章は「血管形成の制御」、第 5 章は「血管を含む組織再生」、第 6 章は「*in vitro* → *in vivo* 評価系の構築」について報じている。

このプロジェクトによる研究推進により、専門を異とするメンバー間の相互理解は深まり、本学がバイオマテリアル創製の中核的研究拠点のひとつに発展しつつあると確信している。今後は、これらの研究体制を基盤として、さらなる飛躍をはかり、我が国だけでなくグローバルな視点で Quality of Life (QOL) の向上に貢献するような材料の創製と研究拠点の構築を目指したい。

研究代表者 相澤 守 (明治大学理工学部・教授)

2016 年 3 月 31 日

【目次】

1. プロジェクト総括 (研究代表者: 相澤 守 他)	1
2. 生命機能マテリアルの創出	
配向性アパタイトセラミックスの開発とその生命機能 (庄 志・中村まり子・藤見峰彦・相澤 守)	97
<i>a</i> 面を多く露出した水酸アパタイトセラミックスの作製とその評価 (玉澤成記・本田みちよ・相澤 守)	104
<i>c</i> 面を多く露出した板状アパタイトの Ca/P 比の制御 (森 祐貴・本田みちよ・相澤 守)	109
異方性粒子をテンプレートとした異方性制御リン酸塩セラミックスの作製プロセスの構築 (石田明祐・庄 志・本田みちよ・鈴木彰敏・堀 茂雄・岸田佳大・中野秀之・谷 俊彦・ 相澤 守)	114
気孔構造を精密制御したリン酸カルシウム多孔体の創製およびその気孔内での骨形成能の評価 (長田直生・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守)	120
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.....	
(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)	123
気孔構造を精密制御した多孔質水酸アパタイトセラミックスの生体内反応 (伊藤賢人・鷹本拓也・長田直生・中野和明・浅野吉則・長屋昌樹・本田みちよ・織部一弥・ 長嶋比呂志・相澤 守)	127
ケイ素含有アパタイトファイバーを用いた硬組織再生用スキャフォールドの開発 (木下友花里・長嶋比呂志・相澤 守)	132
高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの材料特性とその生物学的評価 (乾 鷹羽・木下友花里・中野和明・浅野吉則・松成ひとみ・長屋昌樹・本田みちよ・ 長嶋比呂志・相澤 守)	136
イノシトールリン酸のキレート能を利用した銀担持抗菌性ポリエーテルエーテルケトン インプラントの創製とその生体適合性 (柿沼祐亮・石井 賢・石濱寛子・本田 みちよ・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守)	141

二極化した細孔構造をもつ水酸アパタイト多孔質セラミックスへのイノシトールリン酸の表面修飾および銀イオンの固定化による抗菌性付与 (鶴見秀平・間 暁啓・本田 みちよ・石井 賢・松本守雄・相澤 守)	145
アパタイト/コラーゲン多孔体への銀イオンの固定化とその抗菌性 (鶴見秀平・本田 みちよ・高山知士・中島武彦・石井 賢・松本守雄・相澤 守)	150
窒素ドーピング法により改質した水酸アパタイトセラミックスの表面特性およびその細胞 (梅田 遼・奥山 慧・渡邊友亮・相澤 守)	154
窒素ドーピング法により改質した水酸アパタイトセラミックスの表面特性およびその細胞応答性 (梅田 遼・伊澤千尋・中村まり子・渡邊友亮・相澤 守)	158
窒素をドーピングした水酸アパタイトセラミックスに対する骨芽細胞の細胞応答性 (並木亮太・陶山拓也・伊澤千尋・本田みちよ・渡邊友亮・相澤 守)	161
水酸アパタイトに導入された窒素の化学状態の検討 (並木亮太・陶山拓也・伊澤千尋・本田みちよ・深澤倫子・渡邊友亮・相澤 守)	166
超音波噴霧熱分解法によるカリウム置換アパタイトセラミックスの作製とその材料特性 (横田倫啓・本田みちよ・相澤 守)	170
超音波噴霧熱分解法により作製した金属イオン置換アパタイトセラミックスの材料特性と 骨髄間葉系幹細胞を用いた <i>in vitro</i> 評価 (清水友亮・中村まり子・本田みちよ・相澤 守)	174
ホウ素含有アパタイトセラミックスと共存培養したマウス脾臓由来 T, B, NK 細胞の細胞比率と その免疫評価 (中村まり子・永井重徳・相澤 守)	177
イノシトールリン酸を利用した水酸アパタイトセラミックス上で培養したマウス脾臓由来 免疫細胞の応答性とその形態観察 (山田清貴・中村まり子・永井重徳・本田みちよ・相澤守)	180
CaO-P ₂ O ₅ -SiO ₂ -B ₂ O ₃ 系ガラスセラミックスの免疫細胞応答性 (木造理萌子・山田清貴・永井重徳・本田みちよ・相澤守)	185
骨形成を促進させるセラミックスの創製とその生物学的評価 (針谷 諒・本田みちよ・相澤守)	189

フォルステライトのガラス構造における温度履歴の効果 (深澤 倫子)	193
--	-----

3. 三次元組織の構築

アパタイトファイバースキャフォールドを装填したラジアルフロー型バイオリアクターによる ラット骨髄細胞からの再生培養骨の構築 —培地循環速度の最適化— (三浦舞子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守)	197
---	-----

ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた再生培養骨の構築に向けた アパタイトファイバースキャフォールドの最適気孔構造の検討 (中村まり子・三浦舞子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守)	202
--	-----

間葉系幹細胞を培養したアパタイトファイバースキャフォールドのラット背部皮下埋入 による生体内反応 (鈴木 来・本田みちよ・相澤 守)	204
--	-----

アパタイトファイバースキャフォールドを用いた株化軟骨細胞の三次元培養とその機能評価 (宮澤雄太・内村祐太・中村まり子・相澤 守)	209
---	-----

高強度化アパタイトファイバースキャフォールドを用いた株化軟骨細胞株 ATDC5 の三次元培養 (内村祐太・宮澤雄太・中村まり子・本田みちよ・相澤 守)	212
--	-----

アパタイトファイバースキャフォールド用いた再生肝オルガノイドの構築と機能評価 (安生絵利奈・藤見峰彦・安富由美子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守)	215
--	-----

アパタイトファイバースキャフォールド用いた再生肝オルガノイドの構築と機能評価 (安生絵利奈・藤見峰彦・前橋はるか・松浦知和・相澤 守)	219
--	-----

遺伝子改変ブタ頭蓋骨由来骨芽細胞および間葉系幹細胞の単離と培養技術の確立 (本田みちよ・相澤 守)	222
--	-----

力学的圧縮ストレス負荷が培養軟骨細胞に与えるシグナルの変化 —バイオスキャフォールドの影響について— (武田勇樹・二木康夫・宇田川和彦)	230
--	-----

ラジアルフロー型バイオリアクターを利用したヒト蛋白質性バイオ医薬品生産系 確立の為の基礎的研究 (松浦知和・藤見峰彦・吉川 輝・松本喜弘・前橋はるか)	233
---	-----

アパタイトファイバースキャフォールドにおける分化維持培養に向けた肝細胞の栄養応答の解析 (竹中麻子)	240
---	-----

4. 血管形成の制御

血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの作製と その <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 評価 (茅嶋健太郎・大山 遼・江本 精・松浦知和・新井良和・長屋昌樹・長嶋比呂志・ 相澤 守)	246
---	-----

血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの 特性評価と生物学的評価 (安田沙織・本田みちよ・長屋昌樹・浅野吉則・中野和明・長嶋比呂志・相澤 守)	250
--	-----

表面にナノポアを備えたリン酸カルシウム中空微小球の合成とそのがん化学塞栓療法への応用 (藪 翔太郎・中村まり子・本田みちよ・江本 精・相澤 守)	255
---	-----

悪性子宮腫瘍株移植腫瘍に対する血管新生阻害剤を担持した KNO ₃ 添加中空微小球の 抗腫瘍効果と血管新生阻害能の検討 (江本 精・矢野杏子・チョイジャムツ バトスレン・相澤 守)	258
---	-----

5. 血管を含む組織再生

アパタイトファイバースキャフォールドを用いた再生培養骨の構築 (本田みちよ・中村まり子・相澤 守)	264
--	-----

血管を含む肝組織の構築 (中村まり子・本田みちよ・前橋はるか・松浦知和・相澤 守)	275
--	-----

6. 評価系の構築

バイオ人工肝臓の構築に向けた要素技術の開発 (吉川 輝・中村まり子・前橋はるか・相澤 守・松浦知和)	279
---	-----

血漿製剤・ワクチン製造に展開可能な物質生産系の構築を目的とした アパタイトファイバースキャフォールドの構造最適化 (森田恵里香・松浦知和・相澤 守)	282
--	-----

骨再生研究に有用な赤色蛍光タンパク発現ブタ系統の樹立 (松成ひとみ・中野和明・渡邊将人・梅山一大・長屋昌樹・長嶋比呂志)	286
---	-----

プリオンペプチドの選択的金属結合とその生理的機能 (平岡和佳子)	314
分子標識をめざしたタンパク質内包ナノ粒子の開発 (吉村 英恭)	321
硬組織および軟組織再生のためのスキャフォールド機能性評価と蛍光タンパク質の評価系への応用 (安田圭・富田祐樹・大杉仁美・石井英・向井優哉・相澤守・神澤信行)	328

第1章

プロジェクト総括

生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築および垂直統合型研究拠点形成

相澤 守・長嶋比呂志・吉村英恭・渡邊友亮・平岡和佳子・竹中麻子・深澤倫子・神澤信行・
本田みちよ・松本守雄・石井 賢・松本秀男・二木康夫・江本 精・松浦知和

Development of Next-generation Regenerative Medicine Process Using Biomaterials with Life Function on the Basis of Vertical Integration System

M. Aizawa, H. Nagashima, H. Yoshimura, T. Watanabe, W. Hiraoka, A. Takenaka, T. Fukazawa,
N. Kanzawa, M. Honda, M. Matsumoto, K. Ishii, H. Matsumoto, Y. Niki, M. Emoto and T. Matsuura

1. はじめに

再生医療は組織を形成する細胞、その細胞の足場となる材料(スキャフォールド)および細胞の成長因子を巧みに組み合わせて組織を再生する技術である。他の先進諸国に先駆けて、超高齢社会に突入した我が国においては、「再生医療」は多くの方々の生活の質(Quality of Life; QOL)の向上を約束する医工学融合技術といえる。

本研究では、「生命機能マテリアル」を用いて血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を確立する。当該プロジェクトの研究計画の概略を以下に示す。最初の3年間で「phase I」と位置付け、三次元的な骨・軟骨・肝組織の再生と血管新生に係わる基礎研究を推進する。ついで、後半の2年間で「phase II」と位置付け、複数組織の同時再生を目指す応用的な研究を実施する。

また、2013年9月に文部科学省に提出した中間審査報告の結果が2014年5月13日付で届き、審査員4名中、A評価3名・B評価1名の比較的高い評価を受けている(A: 着実な進捗が見られる, B: 進捗は見られるが、改善すべき点がある, C: 進捗があまり見られない)。本年度(2015年度)はプロジェクト開始から5年目にあたり、最終年度となる。審査員からいただいたコメントを参考にし、これまでに整備した設備などを有効に活用しながら研究を推進した。本稿は、5年分の研究成果をまとめたものである。

2. サブプロジェクトおよびその担当者

本研究では、血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を確立することを目的としているが、これを達成するためには、4つの要素技術:i) 三次元的な組織構築のためのスキャフォールド, ii) 三次元組織を構築する培養方法の確立, iii) 血管の導入, iv) 評価系の構築を確立する必要がある。そこで、これらの4つの要素技術を確立するとともに、最終的にこれらを統合して次世代を見据えた「再生医療技術」を構築する。これまでの類似研究は、医療あるいは工学サイドで独自で展開されている場合が多く、組織再生に必要なスキャフォールドの創製から三次元組織の再生、生体内試験までを川上から川下まで一貫して研究する組織はほとんどなかった。本プロジェクトでは、密接な医工連携により次世代再生医療のための「垂直統合型研究拠点」を形成することも目的としている。

そこで、本研究プロジェクトのメンバーを、

- 1) 材料創製とその機能評価を行なう研究者 (研究者カテゴリー#1)
- 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 (研究者カテゴリー#2)
- 3) 創製した材料の実際の病態に即した臨床的研究を行なえる研究者 (研究者カテゴリー#3)

から構成し、それらが互いに有機的に連携した研究組織を構築した。現在、「医工連携」がひとつの潮流であるが、本研究ではそれに生物学的な要素も加えた「医理農工」による連携体制で研究に臨んでいる。

また、本プロジェクトでは、より効率的に研究成果をあげるため、チームを次の4つの部門に分類し、そのチームで以下のサブプロジェクトを推進している。なお、担当者の **Bold** は本学メンバーで、*斜体* は外部機関のメンバーである。

a) 革新的な生命機能マテリアルの創製およびその機能

Phase Iにおいて創出した「生命機能マテリアル」による次世代型スキャフォールドのさらなる高機能化ならびに多機能化を指向し、組織再生制御、分化誘導制御、免疫賦活効果とその制御、耐感染性制御プロセスを確立する。

[担当者：**相澤**・吉村・渡邊・深澤・本田]

b) 三次元組織の構築と機能

a)で開発した生命機能マテリアルを培養基材として、例えば、骨芽細胞と血管内皮細胞を培養することで、「骨+血管」を同時に再生させることが可能な材料と培養方法を確立する。最終的には、高密度三次元培養を可能にするラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を使用し、臨床応用可能なサイズを持つ三次元組織を構築する。

[担当者：**相澤**・竹中・神澤・松本(守)・石井・松本(秀)・二木・松浦]

c) 血管形成の制御

再生組織をより長期間にわたって機能させるには、血管を備えた骨組織や肝組織を構築する必要がある。ここでは、再生組織への血管導入を踏まえた基礎研究を行い、その知見をb)にフィードバックすることで、当該プロジェクトの後半時期に「血管を備えた組織再生」を目指した基礎研究を展開する。

[担当者：**相澤**・長嶋・神澤・江本・松浦]

d) *In vitro*→*in vivo* 評価系の構築

「再生組織」の生命機能の発現とそのメカニズムを検証するには、適切な評価系を構築する必要がある。まず、細胞を利用した *in vitro* 系で生命機能の評価系を確立し、ついで実際の病態に即した評価ができるように *in vivo* 系で生命機能の評価系を確立する。

[担当者：**長嶋**・相澤・平岡・本田]

上記の内容を表にまとめると以下のようになる。

サブプロジェクト	材料創製とその機能評価を行なう研究者 (研究者カテゴリー#1)	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 (研究者カテゴリー#2)	創製した材料の実際の病態に即した臨床的研究を行なえる研究者 (研究者カテゴリー#3)
生命機能マテリアルによる次世代 Scaffold の創出	○相澤・吉村・深澤・渡邊	相澤 ・本田	---
三次元組織の構築と機能	○相澤	竹中・相澤・神澤	骨： 松本(守) 、石井 軟骨： 松本(秀) 、二木 肝臓： 松浦
血管形成の制御	相澤	長嶋・相澤・神澤	江本 ・松浦
<i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築	相澤	○長嶋・平岡・本田	---

上記の4つのサブプロジェクトは、これまで行なってきた共同研究の実績をふまえ、ある一定の期間内で優れた成果を挙げ、さらに本学を世界レベルの研究拠点として発展させるため、以下の研究機関との共同研究体制で推進している。

- ① 慶應義塾大学医学部（整形外科教室）（研究者カテゴリー#3, 研究部門b）
- ② 東京慈恵会医科大学（臨床医学講座）（研究者カテゴリー#3, 研究部門b, c）
- ③ 国際医療福祉大学（研究者カテゴリー#3, 研究部門c）
- ④ 上智大学理工学部（物質生命理工学科）（研究者カテゴリー#2, 研究部門b, c）

なお、これらのサブプロジェクトは代表者の相澤が統括するが、各サブプロジェクトにリーダーを設け（上記、担当者の下線）、十分にコミュニケーションをとりながら研究を遂行している。

3. 研究組織

研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
相澤 守	理工・教授	生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出 三次元組織の構築と機能（骨・軟骨・肝） 血管形成の制御	組織再生の足場となる生命機能マテリアルを創出する。また、そのスキャフォールドを利用して、骨、軟骨、肝を対象とした三次元組織の構築をするとともに、血管の形成についても検討する。
長嶋比呂志	農・教授	<i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築 血管形成の制御	長嶋教授らの作出した体の組織が蛍光下で赤く光るクサビラオレンジ豚を用いて、生命機能マテリアル単独あるいはそれを基材として再生した組織の生体内反応を血管新生も含めて調査する。
吉村英恭	理工・教授	生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出	高分解能透過型電子顕微鏡を駆使し、生命機能マテリアルの超微細構造を調査する。この知見を別に行なう生体活性の評価と関連付ける。
平岡和佳子	理工・教授	<i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築	フローサイトメトリーおよび電子スピン共鳴法などを利用し、生命機能マテリアルと共培養した細胞の機能性について調査する。
竹中麻子 ^{*1)}	農・教授	三次元組織の構築と機能（肝）	ラットなどから肝細胞を採取し、生命機能マテリアルとの共培養を行ない、その細胞の機能について検討する。
渡辺友亮 ^{*2)}	理工・教授	生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出	生命機能マテリアルの材料化学的評価を推進し、別に行なう生体活性の評価とを関連付ける。
深澤倫子	理工・准教授	生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出	ラマン分光法を駆使し、生命機能マテリアルの欠陥構造の解析を行なう。この知見を別に行なう生体活性の評価と関連付ける。
本田みちよ ^{*3)}	明治大学 研究・知財戦略機構・研究推進員	血管形成の制御 <i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築	クサビラオレンジ豚の頭蓋骨などから初代骨芽細胞を樹立する方法を確立するとともに、生命機能マテリアルとの共培養を行なう。
(共同研究機関等)			
松本守雄 ^{*4)}	慶應義塾大学・医学部・	三次元組織の構築と機能（骨組織）	ラットなどから間葉系幹細胞を採取し、生命機能マテリアルとの共培養により三次元

	教授		な骨組織を構築し、その機能を調査する。
石井 賢	慶應義塾大学・ 医学部・ 講師	三次元組織の構築と機能（骨組織）	ラットなどから間葉系幹細胞を採取し、生命機能マテリアルとの共培養により三次元な骨組織を構築し、その機能を調査する。
松本秀男	慶應義塾大学・ 医学部・スポーツ医学総合センター・教授	三次元組織の構築と機能（軟骨）	ラットなどから間葉系幹細胞を採取し、生命機能マテリアルとの共培養により三次元な軟骨組織を構築し、その機能を調査する。
二木康夫	慶應義塾大学・ 医学部・ 講師	三次元組織の構築と機能（軟骨）	ラットなどから間葉系幹細胞を採取し、生命機能マテリアルとの共培養により三次元な軟骨組織を構築し、その機能を調査する。
松浦知和 ^{*5)}	東京慈恵会 医科大学・ 教授	三次元組織の構築と機能（肝）	ラットなどから間葉系幹細胞を採取し、生命機能マテリアルとの共培養により三次元な肝組織を構築し、その機能を調査する。
江本 精 ^{*6)}	国際医療福祉大 学・ 教授	血管形成の制御	血管導入量を定量化する実験系を確立し、それをスキャフォールド内部への血管新生に応用する。
神澤信行 ^{*7)}	上智大学・ 理工学部・ 教授	血管形成の制御 <i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築	生命機能マテリアルと共培養した血管内皮細胞の機能を調査するための免疫染色法などを確立する。

*1) 竹中麻子；平成 25 年 4 月 1 日：准教授より教授に昇格

*2) 渡辺友亮；平成 24 年 4 月 1 日：准教授より教授に昇格

*3) 本田みちよ；平成 25 年 10 月 1 日： KAST 常勤研究員を経て明治大学 研究・知財戦略機構・研究推進員に異動

*4) 松本守雄；平成 27 年 4 月 1 日：准教授より教授に昇格

*5) 松浦知和；平成 26 年 1 月 1 日：准教授より教授に昇格

*6) 江本 精；平成 23 年 4 月 1 日：福岡大学・医学部・准教授より国際医療福祉大学・教授に昇格

*7) 神澤信行；平成 26 年 4 月 1 日：准教授より教授に昇格

4. 研究成果の概要

プロジェクト開始以来、学内外のメンバー間での学際的交流を推進する意味も含めて、一年間に 3-4 回の割合で、本学において「次世代バイオマテリアルを考える会 (勉強会)」を開催している。この勉強会では、各回 1-2 名のメンバーや外部有識者が最新の研究紹介などを行ない、情報の共有化をはかり、研究推進のためのソフトな基盤構築を進めている。この勉強会を開催するタイミングで研究者間の進捗報告を行なっている。さらに、上記の勉強会とは別に国内外の有識者を招聘して行なう「公開シンポジウム」も概ね年間 1-2 件開催している。本事業は、既に専門を異にする研究者が互いに協力して多くの研究発表および論文を報告しており、密接な「医工連携」を基盤とする「次世代再生医療のための垂直統合型研究拠点」として順調に発展していると自己分析している。

図 1 に本プロジェクトの概略と計画 (マイルストーン) を示す。最初の 3 年間で「**phase I**」と位置付け、三次元的な骨・軟骨・肝組織の再生と血管新生に係わる基礎研究を推進した。ついで、後半の 2 年間で「**phase II**」と位置付け、複数組織の同時再生を目指す応用的な研究を実施している。

本研究の概略とマイルストーン

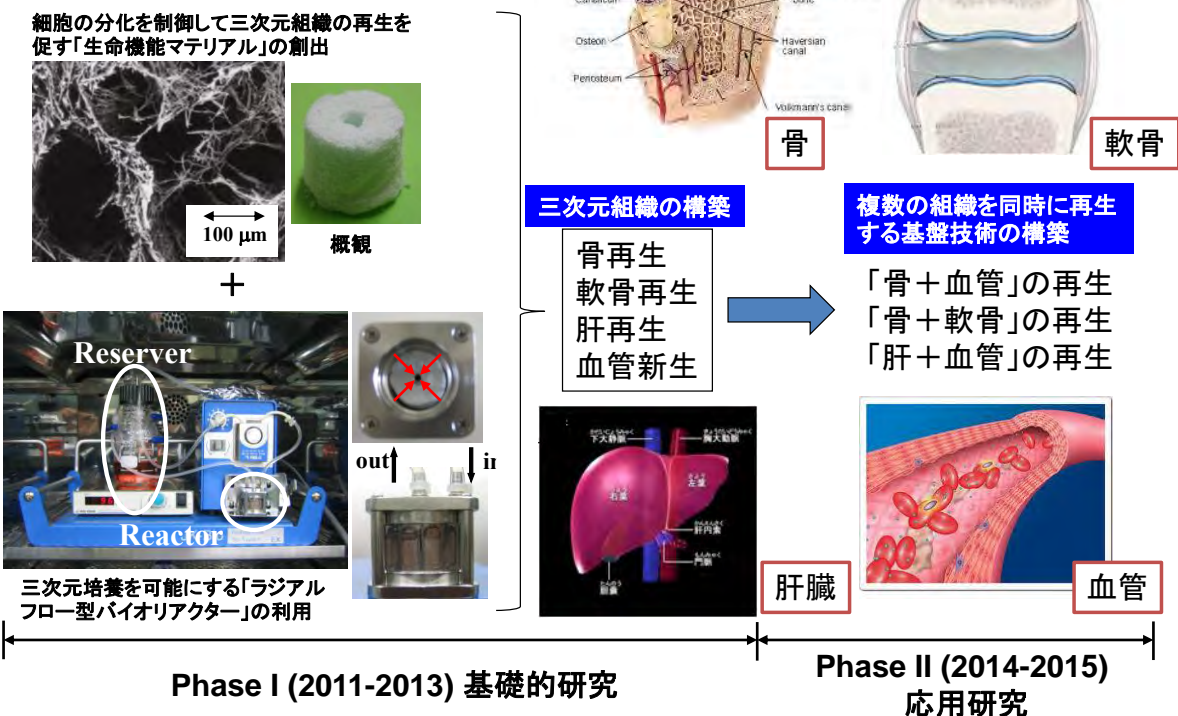


図1 本研究プロジェクトの概略とマイルストーン

まず、本事業の申請時に掲げた目標（phase I；3年目まで）およびそれらに対する達成度をサブプロジェクト毎に「表1」にまとめて示す。右欄の総合的な達成度は自己評価であり、◎は目標よりも達成度が高い、○が目標通り進捗している、△がやや予想よりも遅れていることを示している。

表1 Phase Iにおける研究目標と具体的な研究成果および達成度

サブプロジェクト	Phase I の目標 (2011-2013 年度)	具体的な研究成果	総合的な達成度
1) 生命機能マテリアルによる次世代 Scaffold の創出	<p>1) 我々が独自に開発したアパタイトファイバースキャフォールドなどを生命機能マテリアルのモデル物質として、次世代再生医療に貢献する新規なスキャフォールドを開発する。</p> <p>2) 特に、スキャフォールドの化学組成や微細構造、力学的な強度、表面特性、配向性、ナノレベルの欠陥構造などについて精査する。</p> <p>3) さらに、スキャフォールドが発現する「生命機能」として、骨芽細胞のいないところでも骨形成を生じる「骨誘導」に着目し、スキャフォールドの材料特性と骨誘導の発現との関連性を明らかにする。</p>	<p>従来のアパタイトファイバースキャフォールドの作製方法を見直し、気孔率を制御した高強度化 AFS の創製に成功している。また、アパタイトファイバーではなく、リン酸カルシウムファイバーを出発原料にすることで、化学組成(リン酸カルシウム相)を制御した高強度化スキャフォールドの創製にも成功している。これらの高強度化スキャフォールドを長嶋らが作出したクサビラオレンジ遺伝子導入ブタの脛骨・筋・脂肪組織にインプラントして、<u>気孔内での骨形成を評価したところ、脛骨および筋にインプラントしたスキャフォールドの気孔内部での骨形成が認められ、スキャフォールド自体の生体内での吸収も確認されている (*1)</u>。筋内での骨形成は当該スキャフォールドが「骨誘導能」を備えていることを示しており、これは骨再生のためのスキャフォールドとして極めて有効な特性である。</p> <p>また、<u>骨形成を促進させる元素であるケイ素(Si)を含有したアパタイトファイバーを用いて新しいスキャフォールド(Si-AFS)を創製し、Si を添加した AFS が優れた細胞増殖性や骨形成能を有していることを明らかにしている (*2)</u>。なお、この研究は「第 16 回生体関連セラミックス討論会」において「The Division 賞」を受賞して</p>	◎

		いる。	
2) 三次元組織の構築と機能	<p>1) 従来型スキャフォールドを高密度三次元循環培養を可能にするラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、骨・軟骨・肝の3つの組織を対象として、培養条件の最適化を行なう。</p> <p>2) 得られた再生組織を組織学的に評価し、細胞の分化レベルについて考察する。</p> <p>3) 研究の進捗が予定よりも早い場合には、1)で開発した新しいスキャフォールドで三次元組織(骨、軟骨、肝)の構築を行ない、各組織に対して最適な培養条件を見極める。</p>	<p>「骨再生」において、前記した従来型 AFS を直径 15 mm、高さ 18 mm の円筒状に加工して、これを三次元循環培養が可能なラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、ラット骨髄間質系幹細胞を播種して、骨芽細胞への分化誘導をかけながら所定の期間培養した。このとき、<u>培地の循環速度を 0.4, 1.3, 6.3, 11.5 および 16.5 cm³·min⁻¹ に設定して 5 種類の再生培養骨を構築し、その AFS 内の骨芽細胞の分化レベルを調べたところ、6.3 cm³·min⁻¹ の流速のときに最も骨芽細胞の分化が誘導されることが分かった。これは細胞に対する適切なシェアストレスが分化を促進することを示している(*3)</u>。なお、この研究は 2011 年度に「日本セラミックス協会第 24 回秋季シンポジウム特定セッション学生優秀発表賞(2012)」および 2012 年度に「日本セラミックス協会第 25 回秋季シンポジウム特定セッション学生優秀発表賞(2012)」に二年連続で採択されている。</p> <p>また、「肝再生」においても上記の技術を利用し、アルブミン産生能やアンモニア解毒作用を備えたバイオ人工肝の構築に成功し、3 か月もの長期培養にも成功している(*4)。なお、この研究も「第 22 回無機リン化学討論会」で「若手優秀研究発表賞」を受賞している。さらに、「軟骨再生」についても、軟骨株化細胞を AFS に播種して三次元培養を行ない、AFS が軟骨細胞の培養にも好適であることを明らかにしている。</p>	○
3) 血管形成の制御	<p>1) 再生組織への血管導入を踏まえた基礎的研究を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の両面から進める。</p> <p>2) スキャフォールド内部で血管内皮細胞の三次元培養を行ない、その細胞増殖と形態、細胞侵入性などについて評価する。</p> <p>3) また、スキャフォールドをブタの筋内などに埋入して、スキャフォールド内部での血管形成について調査する。</p> <p>4) 最終的に、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> において、スキャフォールド内部に形成する血管を定量化するプロセスを構築する。</p>	<p>1)の AFS への血管新生の制御を指向し、前記した高強度化 AFS への血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の担持方法を確立し、その薬剤徐放性について明らかにしている。実際、血管内皮細胞モデルである M1 細胞(分担研究者: 松浦らにより樹立)を播種し、VEGF 担持の有無で VEGF を担持させた AFS の方がより高い細胞増殖性を示すことを明らかにしている(*5)。</p> <p>また、ブタ脛骨および筋・脂肪へのインプラント実験も行なっている。現在、組織学的評価を進めているところであるが、骨に関しては、VEGF を担持させると血管形成のみならず、骨形成量が増加するという非常に興味深い知見も得ている。さらに、AFS 内への血管新生を定量化するため、ヒト血管内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells; HUVEC)モデルを利用して、AFS 内への内皮細胞の侵入性を評価している。</p>	○
4) <i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築	<p>1) 細胞を利用した <i>in vitro</i> 系で生命機能を評価する系を確立する。一例をあげると、長嶋教授が作出したクラビラオレンジブタの頭蓋骨から赤く光る初代骨芽細胞株を樹立する。</p> <p>2) <i>In vitro</i> 系での骨芽細胞の樹立に続き、クラビラオレンジブタを用いた <i>in vivo</i> 系の評価方法を検討する。例えば、創製したスキャフォールドをインプラントし、組織学的に評価する方法などを確立する。</p> <p>3) また、2)で構築した再生培養骨などを臨床モデルにより評価する実験系も確立する。</p>	<p>長嶋らにより作出された huKO ブタは、臓器、筋肉、血管、皮膚をはじめ、脳神経細胞、血球、組織幹細胞に至るまで全身性に赤色蛍光を発現することから、臓器移植・再生や細胞移植治療の研究に有用な大型動物となり得ると期待されている。本研究では、<u>huKO の胎児の頭蓋骨を細胞ソースとして利用し、コラゲナーゼ消化法により骨芽細胞を単離することに成功し、この細胞が蛍光化で赤く光ることも確認している。この蛍光下で赤く光る骨芽細胞をケイ素を含有したアパタイトセラミックス上に播種し、その増殖と分化について検証し、バイオイメージングのツールとして有効であることを明らかにしている(*6)</u>。今後は、この細胞の三次元培養などを進めていく。</p> <p>また、ブタを実験モデルとする <i>in vivo</i> 試験の方法も確立できており、実際に前記した「骨誘導」など優れた研究成果をあげつつある。さらに、慶應医学部との共同研</p>	○

		究により、2)の再生培養骨を脊椎固定術に利用する実験モデルを構築しつつあり、今後、インプラント実験を行なう計画である。	
--	--	---	--

次に、本事業の申請時に掲げた目標（phase II；4-5年目）およびそれらに対する達成度をサブプロジェクト毎に「表2」にまとめて示す。右欄の総合的な達成度は「表1」と同様である。

表2 Phase IIにおける研究目標と具体的な研究成果および達成度

サブプロジェクト	Phase II の目標 (2014-2015 年度)	具体的な研究成果	総合的な達成度
1) 生命機能材料による次世代 Scaffold の創出	<p>1) Phase I までに得られたスキャフォールド開発に関わる知見をもとに、複数の組織を同時に再生しうるスキャフォールドを創製するとともに、その材料特性や生体適合性を明らかにする。</p> <p>2) 免疫系に積極的に働きかけるバイオ材料を創製し、その材料と脾臓由来の免疫細胞(B細胞、キラーT細胞、ヘルパーT細胞、NK細胞)との応答性を明らかにする。</p> <p>3) 感染を防止する抗菌性バイオ材料を創製し、その抗菌性を <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の両面から評価する。</p>	<p>生命機能材料とは、材料が細胞や生体に積極的に働きかけて、細胞分化や骨誘導能(骨芽細胞非存在下での骨形成)・免疫機能の亢進、耐感染性の発現などの生命機能を引き出す性質を備えた材料である。今年度から Phase II に突入したため、i) 組織再生制御、ii) 分化誘導制御、iii) 免疫賦活効果とその制御、iv) 耐感染性制御の切り口で生命機能材料の高機能化ならびに多機能化を推進している。</p> <p>一例を挙げると、気孔率を70%に一定に設定した生体活性をもつ水酸アパタイト(HAp)多孔体と生体吸収性をもつβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)多孔体をブタの脛骨・筋・脂肪組織に埋入し、気孔内での骨形成能を明らかにする実験を行なった。HAp およびβ-TCP いずれも優れた骨伝導性(骨芽細胞存在下での骨形成)を発現する一方、今回の実験では、HAp に骨誘導が発現することが分かった(*7)。特に、脂肪組織よりも筋組織の方が高い骨形成が認められ、骨誘導を検証する部位として有効であることも明らかとなった。この知見は、4)の「<i>In vitro</i>→<i>in vivo</i> 評価系の構築」にも関連する。また、生体骨の化学組成を模倣した骨ミネラル含有アパタイト(Bone HAp)多孔体は、純粋な HAp 多孔体と比べて、より高い生体内吸収性と骨形成能を備えていることも明らかにしている(*8) (日本無機リン化学会にて「第11回若手優秀発表賞」受賞)。</p> <p>これらの生命機能材料に加えて、免疫賦活効果とその制御では、HAp セラミックスにイノシトールリン酸(IP6)を固定化したものを培養基材として利用し、マウス脾臓由来免疫細胞を培養したところ、免疫細胞(B細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞)中のヘルパーおよびキラーT細胞の比率が向上することが分かった(*9)。この研究成果は新しい癌本学より特許出願している(特願2014-192763)。</p> <p>耐感染性制御では、HAp 膜を形成させた医療用ポリマー上にイノシトールリン酸(IP6)のキレート能を利用して抗菌性のある銀イオンを固定化することにより、抗菌性を備えかつ生体適合性にも優れた整形外科用インプラントの創製に成功している(*10) (日本セラミックス協会「2014年年会優秀ポスター発表賞」受賞)。</p>	◎
2) 三次元組織の構築と機能 + 3) 血管形成の制御	<p>1) Phase I までに得られている最高レベルのスキャフォールドと RFB を利用して、「骨+血管」、「骨+軟骨」、「肝+血管」という複数の組織を同時に再生させうる基盤技術を構築す</p>	<p>「再生培養骨」の構築においては、Phase II では「骨+血管」を目標としているため、AFS によるヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)とヒト骨芽細胞様細胞(MG-63)との共培養実験も開始している。これまでの検討から、共培養系では管腔様構造が形成し、単一培養系よりも骨芽細胞の石灰化が促進することを明らかにしている。(*11)</p>	○

	<p>る。</p> <p>2) 得られた再生組織を組織学的に評価し、血管の形成とともに細胞の分化レベルについて考察する。</p> <p>3) 上記は血管形成を誘導する研究であるが、血管形成を阻害することも生命機能のひとつであり、特にがん治療に有用である。ここでは、1)および2)の課題とは逆の方向からアプローチし、血管形成を阻害するセラミックス微小球による新規な癌化学塞栓療法を構築する。</p>	<p>なお、この成果は日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウムにおいて「特定セッション若手優秀発表賞」を受賞している。「肝再生」では、<u>より肝臓に近い血管を備えた再生肝オルガノイドを構築するため、AFS(気孔率98%、気孔径250 μm)を装填したRFBを用いて、肝細胞・星細胞・血管内皮細胞の共培養を行なった。現在、アルブミン産生とアンモニア代謝の肝機能の観点から、培養条件の最適化を進めている(*12)。</u>これまでに得られている成果をJST新技術説明会(2014.12.3付)で発表したところ、その内容が日経産業新聞に「立体的な肝臓作製」としてプレスリリースされている(2014.12.5付)。さらに、「軟骨再生」においても高強度化AFSを用いて株化軟骨細胞であるATDC5を三次元培養したところ、軟骨特有のタンパク質であるII型コラーゲンの産生を確認しており、AFSは軟骨再生の足場としても有効であることを明らかにしている。</p> <p>AFSへの血管形成の制御を指向し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を担持させた高強度化AFSの開発を進めている。これまでにVEGFを担持させた高強度化AFSは、<u>その気孔内での骨形成量が増加するという結果を得ている。これはVEGFの徐放が血管を呼び込む結果、骨形成に関与する間葉系幹細胞も気孔内に導入し、VEGFを担持していないAFSよりも高い骨形成能を示したものと考えられる(*13)。</u>そこで、VEGF担持高強度化AFSを用いてHUVECを培養したところ、細胞がAFSの骨格に沿って良好に接着・増殖することが分かった。今後、この知見を発展させて、血管を導くための材料設計を推進する。</p> <p>一方、がん細胞はVEGFを自ら放出し、血管を呼び込むことによりがん組織に栄養を与えて肥大化する。そこで、新生血管の形成を阻害することは癌治療に有用である。<u>我々は「表面にナノサイズの気孔を備えた生体吸収性セラミックス微小球」の合成に成功し、それに血管新生抑制剤を担持させ、薬剤の徐放挙動を明らかにしている。その薬剤担持セラミックス微小球を担癌ヌードマウスに注入すると、腫瘍サイズを減少させ、さらに寿命を延長できることも動物実験により明らかにしている(*14)。</u></p>	
<p>4) <i>In vitro</i> → <i>in vivo</i> 評価系の構築</p>	<p>複数の組織を同時に再生させるプロセスを構築するに当たり、<i>in vitro</i>系では共培養の手法が、<i>in vivo</i>系では適切な実験動物モデルが不可欠となる。そこで、ここでは、サブプロジェクト#2および#3をサポートすべく好適な実験系の確立を推進する。</p>	<p>長嶋らはより臓器、筋肉、血管、皮膚をはじめ、脳神経細胞、血球、組織幹細胞に至るまで全身性に赤色蛍光を発現する、humanized Kusabira-Orange (huKO) 遺伝子導入ブタ (huKO; H. Matsunari, H. Nagashima et al., <i>Cloning Stem Cells</i>, 10, 313-323 (2008).)の作出に成功している。このhuKOは生命機能マテリアウの開発研究に極めて有用であり、大量に増殖させて実験に給するシステムの構築が望まれている。本年度は、第1世代から第3世代における遺伝子伝達ならびに発現動態を解析することによって全身性にhuKO遺伝子を発現するブタが有用な大型実験動物として系統化されたかどうかを検証している。</p> <p>また、前年度までに最適化した「三次元培養骨」の<i>in vivo</i>実験の準備をするため、本学に小規模な動物実験設備の立ち上げを行ない、既にラット背部皮下埋入モデルの予備実験を行なっている。</p> <p>さらに、上智大学の神澤らは骨芽細胞の分化レベルに応じて、蛍光下で細胞の色が変化する細胞の作出にも成功している。これらの細胞群は、上述のhuKOブタとともに、生命機能マテリアルの評価系の確立に有用であ</p>	○

		る。今後は、これらの細胞の三次元培養などを進めていく。	
--	--	-----------------------------	--

上記の4つ (phase II では3つ) のサブプロジェクトは、いずれも概ねマイルストーン通りに進行している。なお、上記の表1および表2では、説明不足の点もあるので、以下、各サブプロジェクトの代表的な研究成果を述べる。

< 1) 生命機能マテリアルによる次世代スキャフォールドの創出 >

従来のアパタイトファイバースキャフォールド (Apatite-fiber scaffold; AFS) の作製方法を見直し、気孔形成剤であるカーボンビーズを粒径が 20 μm および 150 μm のものを 1:1 の割合 (質量比) で原料であるアパタイトファイバーに対して 100, 300, 500, 700 mass% 添加し、さらに一軸加圧成形を施すことにより、気孔率を制御した高強度化 AFS の創製に成功している (図 2)。なお、ここで得られた AFS は AF の質量に対して 1, 3, 5, 7 倍量のカーボンビーズを添加していることから、例えば「AFS100」と表記している。また、添加したカーボン

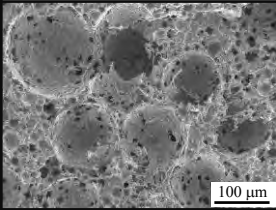
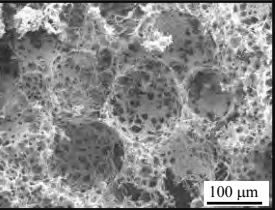
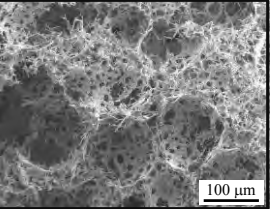
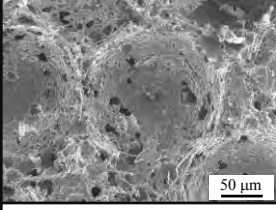
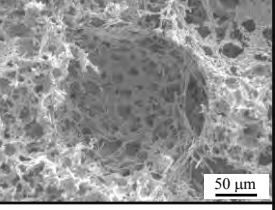
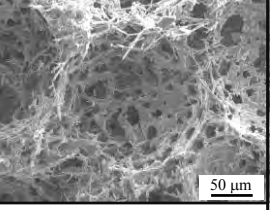
ビーズの比率は、150 μm および 20 μm のビーズいずれも 50% であるので、例えば「AFS100(50-50)」と略記する。いずれのスキャフォールドも AF の絡み合いによるマイクロ気孔に加え、CB (粒径 150 μm および 20 μm) 焼失に由来するマクロ気孔や連通気孔が観察できる。

これらの高強度化 AFS を長嶋らが作出したクサビラオレンジ遺伝子導入ブタ

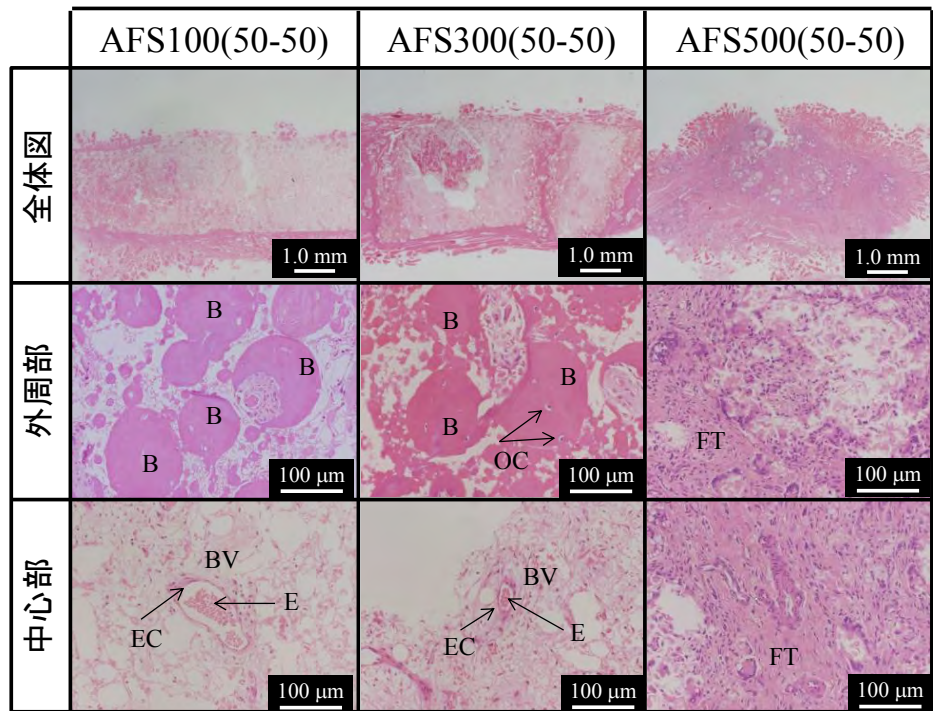
(huKO ブタ; H. Matsunari, H. Nagashima et al., *Cloning Stem Cells*, **10**, 313-323 (2008).) の脛骨・筋・脂肪組織にインプラントして、気孔内での骨形成を評価した。脛骨へのインプラント実験では、気孔内部への旺盛な骨侵入が認められ、さらに AFS 自体の生体内での吸収性も確認されている。

また、骨芽細胞の存在しない筋組織へのインプラン実験においても気孔内で骨形成が確認された (図 3)。AFS100(50-50) では、スキャフォールド外周部の気孔領域において骨組織の形成が確認できた。スキャフォールド中心部の気孔領域では、血管の侵入が確認でき、血管内皮細胞が観察された。同様に、AFS300(50-50) でも、スキャフォールド外周部での骨細胞を有する骨組織の形成、中心部での血管の侵入が確認できた。しかしながら、AFS500(50-50) では、材料が生体に吸収もしくは溶解しており、試験片形状の完全性は失われていた。また、スキャフォールドの気孔領域は線維性結合組織で満たされ、異所骨形成は確認できなかった。

以上の結果より、高強度化 AFS による骨誘導において、「気孔率」は非常に重要な因子であると考えられる。一般的に、骨誘導は、体液中を循環する骨形成タンパク質 (BMP) のスキャフォールド上への吸着、それに続く間葉系幹細胞の骨形成細胞への分化によって開始される。しかしながら、気孔率が高す

	AFS100(50-50)	AFS300(50-50)	AFS500(50-50)
低圧率			
高圧率			
気孔率 / %	67.6 ± 0.3	83.4 ± 0.1	89.3 ± 0.1

ぎると、体液の高循環環境において、BMP をスキャフォールド内部に留めることができないため、骨誘導は生じない。つまり、BMP の吸着および細胞分化において、速い体液の循環から保護された静的な空間が異所骨形成には重要であることが示唆された。埋入 12 および 24 週間による経時的な組織学的評価より、骨誘導のプロセスは、血管の侵入、細胞凝集体の接着、骨芽細胞への分化、骨形成の過程を経ることがわかった。したがって、より早期にスキャフォールド内部への血管侵入を可能にする気孔構造が重要であり、相互に連通したマクロ気孔は骨誘導発現において必要不可欠であることがわかった。



B : Bone tissue, BV : Blood vessel, EC : Endothelial cell, E : Erythrocyte, OC : Osteocyte, FT : Fibrous connective tissue

図3 ブタ筋肉内に24週間インプラントした高強度化AFSの気孔内での骨形成 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

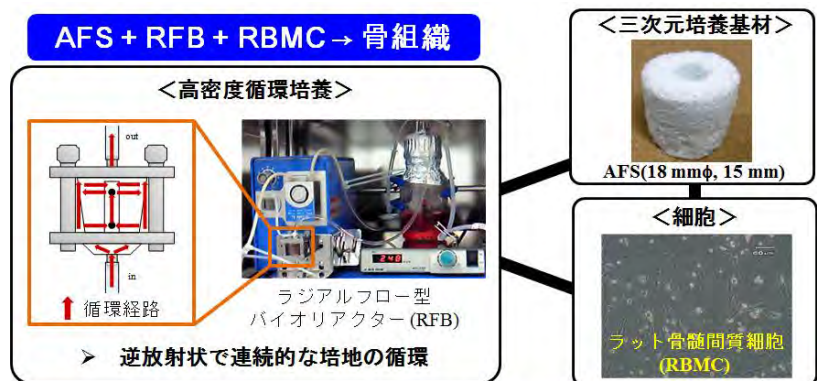
これまでの研究結果より、材料依存による骨誘導において、1) タンパク質の吸着や細胞の接着に有利な安定した足場、2) 速い体液の循環から保護された静的な空間、3) 血管や細胞の侵入を促進する相互連通したマクロ気孔、4) タンパク質の吸着領域を増大させるマイクロ気孔が重要であることが示された。

したがって、本研究で作製した「高強度化 AFS300(50-50)」は、高气孔率・高連通性を有し、優れた骨伝導能と骨誘導能を併せ持っていることから、再生医療に大きく貢献できるスキャフォールドとして期待できる。なお、この研究は、第37回日本バイオマテリアル学会大会で「ハイライト講演」に選定され、また「第131回学術講演会無機マテリアル学会講演奨励賞(2015)」にも採択されている。

したがって、本研究で作製した「高強度化 AFS300(50-50)」は、高气孔率・高連通性を有し、優れた骨伝導能と骨誘導能を併せ持っていることから、再生医療に大きく貢献できるスキャフォールドとして期待できる。なお、この研究は、第37回日本バイオマテリアル学会大会で「ハイライト講演」に選定され、また「第131回学術講演会無機マテリアル学会講演奨励賞(2015)」にも採択されている。

< 2) 三次元組織の構築と機能 >

「骨再生」において、前記した従来型 AFS (前述したマイルストーンの図参照) を直径 15 mm、高さ 18 mm の円筒状に加工して、これを三次元循環培養が可能なラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、ラット骨髄間質系幹細胞を播種して、骨芽細胞への分化誘導をかけながら所定の期間培養した (図4)。このと



三次元再生培養骨の培養技術の確立

図4 AFS, RFB, RBMC を用いた三次元構造を備えた再生培養骨の構築

き、培地の循環速度を 0.4, 1.3, 6.3, 11.5 および 16.5 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ に設定して 5 種類の再生培養骨を構築した。なお、この構築した再生培養骨を、それぞれ Bone#1, #2, #3, #4, #5 と定義する。

その AFS 内の骨芽細胞の分化レベルを調べたところ、Bone#3 を構築した流速 (6.3 $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) のときに最も骨芽細胞の分化が誘導されることが分かった (図 5)。これは細胞に対する適切なシェアストレスが分化を促進することを示している。この理由として、循環される培地による細胞への力学的負荷によるものであると考えられる。細胞に液体流動による刺激が断続的に加わることにより骨芽細胞の活性を

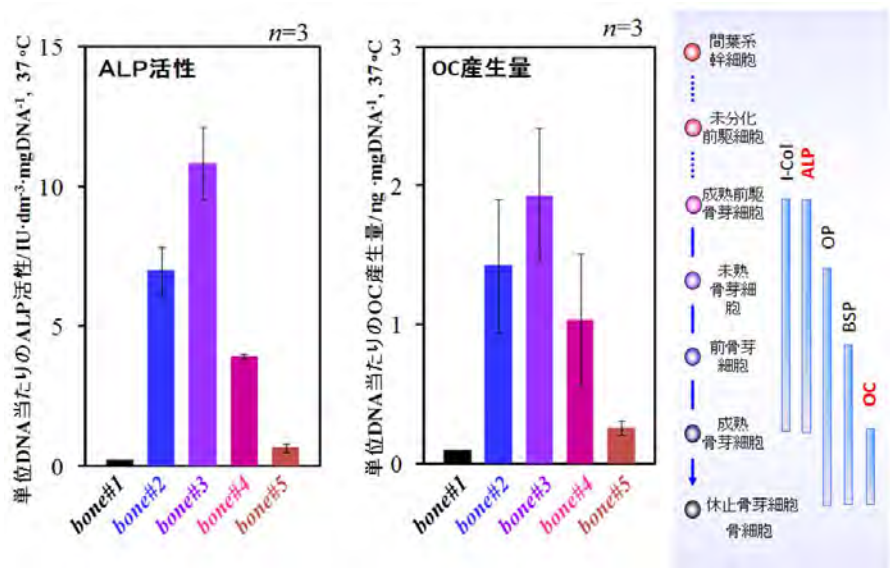


図 5 三次元構造を備えた再生培養骨内の骨芽細胞の分化レベル

高める可能性が考えられる。また、循環速度が速くなることで新鮮な栄養分や酸素を得やすい環境になり、細胞の生育状態が向上したことも一因として考えられる。しかしながら、循環速度の増加に伴い分化レベルが高くなるわけではなく、Bone#3 の培養条件を境に分化レベルが下がることがわかった。これは過度な力学的負荷が細胞にかかり、その生育に悪影響を与えてしまったことが考えられる。

以上より、RFB による骨再生において、Bone#3 の培養条件が最も骨芽細胞の分化を促進すると考えられる。なお、この研究は、「日本セラミックス協会第 24 回秋季シンポジウム特定セッション学生優秀発表賞 (2011)」および「日本セラミックス協会第 25 回秋季シンポジウム特定セッション学生優秀発表賞 (2012)」に二年連続で採択されている。さらに、この再生培養骨をラット背部皮下に埋入し、骨形成を調査した展開研究も「第 25 回 無機リン化学討論会第 12 回 若手優秀発表賞(2015)」に採択されている。

また、「肝再生」においても上記の技術を利用し、アルブミン産生能やアンモニア解毒作用を備えたバイオ人工肝の構築に成功し、3 か月もの長期培養にも成功している。なお、この研究は「第 22 回無機リン化学討論会」で「若手優秀研究発表賞」を受賞している。

< 3) 血管形成の制御 >

組織工学において、組織再生を促進させ、さらに再生した組織の長寿命化を達成させるには、再生組織への血管形成が重要である。そこで、前述した気孔率の異なる AFS を試作し、血管内皮細胞の強力な増殖因子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を担持させた。これまでに、VEGF を担持させた AFS からの VEGF の徐放挙動を明らかにするとともに、血管内皮細胞のモデル細胞である M1 細胞を用いて、

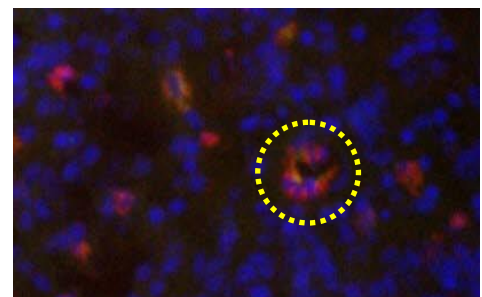


図 6 VEGF 担持 AFS500(50-50)へのブタ筋内での管腔形成(埋入期間: 4 w)

その増殖性を評価し、VEGF を担持させると、有意に細胞増殖が亢進することを明らかにしている。また、AFS 内への血管新生を調べるため、ヒト血管内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells ; HUVEC) モデルを利用した研究も推進している。さらに、ブタ筋肉に VEGF 担持 AFS を埋入すると、その気孔内に *in vivo* 環境下で管腔構造が形成されることが分かった。図 6 はその研究結果の一例を示している。これはブタ筋肉から取り出した試料の切片を免疫染色したものであり、青い部分が細胞の「核」を、赤い部分が血管を形成する血管内皮細胞に特異的に存在する物質「CD3」を示している。赤い部分が円形を示していることから、細胞が円形の構造 (血管の管腔構造) を形作っていることが分かる。

上記の実験結果をもとに、VEGF を担持させた円柱状 AFS (直径 4 mm, 高さ 7 mm) をブタ脛骨に 4 週間埋入し、その「生体吸収性」と「骨形成量」を VEGF を担持させていない AFS と比較検討した。まず、生体吸収性に関して、代表として「AFS100(50-50)」の結果を図 7 に示す。この図は、トルイジンブルーで染色した組織像を用いて、AFS の残留部分を色分けし、AFS の面積を求めたものである。VEGF を担持させた AFS の方がより吸収を受けているのが分かる。

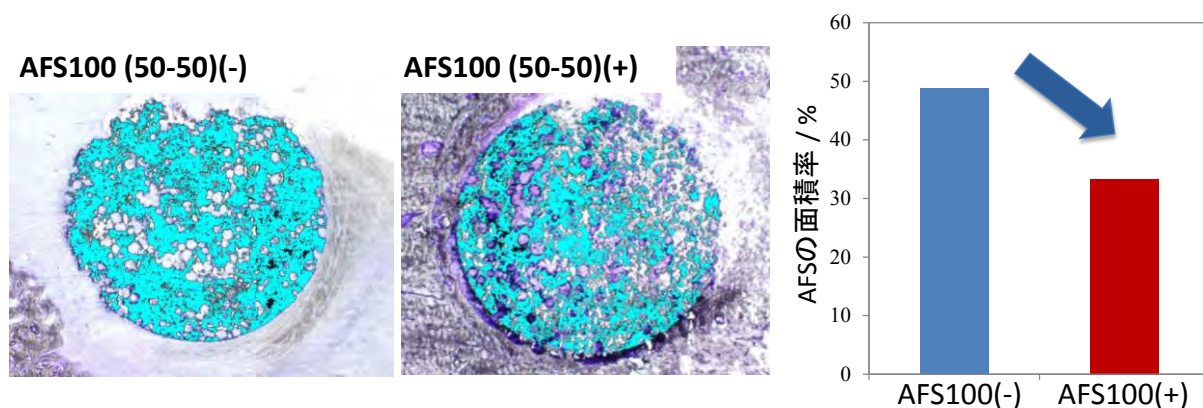


図 7 VEGF の担持の有無による生体吸収性の比較

一方、図 8 は AFS 気孔内部への骨形成量を定量化した図である。これは図中に示したように、特定のエリア (ROI) を決めて、その ROI 中の骨組織の面積を求め、VEGF の有無で比較したものである。気孔率の高い AFS500 シリーズの方が AFS100 シリーズよりも高い骨形成量を示し、さらに VEGF の添加は骨形成を亢進していることが分かる。これは AFS の微細構造とそこからリリースされる VEGF が血管内皮細胞の遊走を促進させ、その結果として骨形成を促す未分化間葉系幹細胞を呼び込み、正常に近い骨形成が行われた結果ではないかと考えている。

このような VEGF による骨形成の促進は、(我々の知る限り)ほとんど報告が見受けられず、人工骨の特性を自家骨レベルに引き上げる優れた手法であると考えている。

なお、これらの研究は、「第 23 回無機リン化学討論会 若手優秀研究発表賞(2013)」および「第 131 回学術講演会無機マテリアル学会講演奨励賞

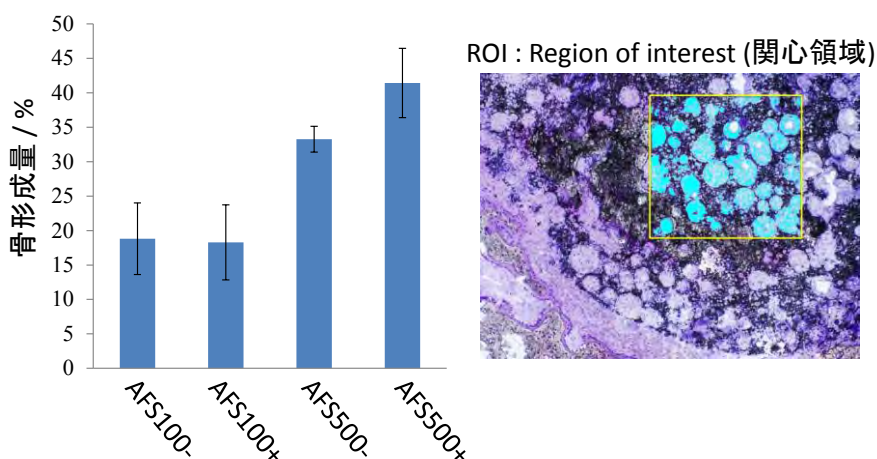


図 8 VEGF の担持の有無による骨形成量の比較

(2015)」に採択されている。

< 2+3) 血管を含む組織再生 >

ここでは Phase II における取り組みとして、「骨+血管」および「肝+血管」に関する事例を報告する。

まず、「血管を含む骨再生」について紹介する。生体骨は血管を豊富に含んでおり、機能的な三次元培養骨を構築するには、適切な細胞の足場(スキャフォールド)に骨を形成する間葉系幹細胞を供給するとともに、その骨再生組織への「血管新生の誘導・制御」が非常に重要となる。そこで、ここでは、優れた生体活性を有するアパタイトファイバースキャフォールド(Apatite-fiber Scaffold; AFS)を活用して、血管内皮細胞と骨芽細胞とを共培養することにより、血管侵入をサポートできる骨再生環境を作出し、骨再生と血管新生との関係を明らかにすることを目的として研究を推進している。

骨芽細胞のモデルとしてヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(MG-63, Riken cell bank)を、血管内皮細胞のモデルとしてヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC, Lonza)を使用し、これらを任意の割合で一定期間単独もしくは

共培養を行なった。AFS 三次元培養環境下における共培養時の骨芽細胞への影響については HUVEC: MG-63 = 1:1 の条件で 28 日間培養した結果を以下に示す。培養 28 日後の AFS から作製した薄切切片の HE 染色の結果から、MG-63 単独での培養および MG-63 と HUVEC の共培養はいずれの培養条件においても、細胞は AF へ接着した後に、マイクロ気孔を利用して増殖した。より詳細に AFS における細胞の分布を観察すると、MG-63 は、

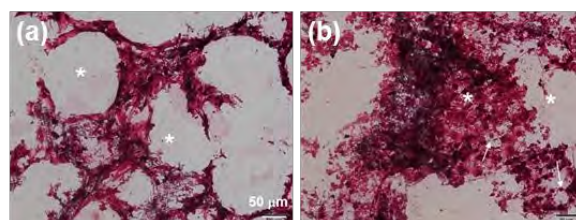


図9 HE染色によるAFSにおけるMG-63およびMG-63+HUVECの細胞局在観察

(a) MG-63 (mono-culture), (b) MG-63+HUVEC (co-culture), *:マクロ気孔, →:管腔様構造, Scale bar: 50 μm

マクロ気孔の外周部から内部へと増殖し、さらにマクロ気孔を架橋するように三次元的に局在していた(図 9a)。一方、共培養した場合は、マクロ気孔を充填するようにそれぞれの細胞が増殖し、一部では管腔様の構造を形成していた(図 9b)。この血管様構造について、さらに詳細に解析するために血管内皮細胞のマーカーである vWF および CD31 の発現について免疫染色を行なった。その結果、形成されていた管腔はいずれも vWF, CD31 陽性の細胞であり、HUVEC 由来の細胞から形成されていることが分かった(data not shown)。すなわち、AFS はその内部へ血管内皮細胞を誘導し、血管を形成させることが可能な三次元的な骨形成の足場を提供できるということが示された。

次に、共培養による骨芽細胞の分化への影響を調べるために、ALP 活性染色を行なった(図 10)。培養条件に関わらず、マイクロ気孔内で細胞が多数存在する箇所 ALP 活性を有する細胞が確認された。特に、共培養時に ALP 活性を強く持つ細胞が多く観察された。この結果は、三次元培養環境においても骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養すると、骨分化を促進させる傾向にあることを意味している。さらに、血管内皮細胞との共培養が、骨芽細胞の石灰化に対し、どのような影響を及ぼすかを検証するために、OsteoImage を用いて、石灰化レベルを評価したところ、MG-63 を単独で培養した場合、OsteoImage 試薬

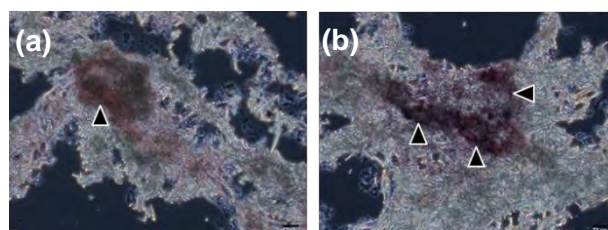


図10 AFSでのMG-63細胞単独培養およびMG-63+HUVECとの共培養時におけるALP活性の比較 (a) MG-63 (mono-culture), (b) MG-63+HUVEC (co-culture), ▲: ALP活性陽性

の多くは、AF へ結合しており、石灰化が進行している様子はあまり観察されなかったが、共培養系では単一培養系に比べ、細胞が局所的に集中している部分で石灰化による蛍光が強く観察された。このことから、MG-63 を単独で培養するよりも HUVEC と共培養した方が、石灰化を促進するということが明らかになった。また、血管新生に重要な VEGF 産生量について調べたところ、MG-63 においては、常に高いレベルでかつ一定のレベルで VEGF が産生されていた。これに対し、共培養した場合には、培養日数の経過とともに VEGF 産生量が増加することが分かった。

これらの結果は、2つの細胞を共培養すると、産生された VEGF により MG-63, HUVEC 両細胞が刺激を受け、活性化されることで、骨分化や血管網の形成が促進されると考えられる。したがって、AFS で2つの細胞を共培養すると、血管新生を伴った三次元的な骨形成というものが実現できると考えられる。

なお、この研究は、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウムで「特定セッション若手優秀発表賞」に採択され、また日本セラミックス協会 2016年年会では「トピックス講演」に選定されている。

ついで、もう一つの例として、「血管を含む肝再生」について紹介する。肝臓の微細構造は、①肝細胞の索状配列、②肝細胞索を突起で取り囲む星細胞（血管平滑筋としての役割をもつ pericyte）、③肝臓の毛細血管（類洞）を形成する内皮細胞で構築されている。松浦らは、相澤らが開発したカラム状 AFS (直径 15 mm, 高さ 18 mm) を RFB に充填し、そこに不活化肝細胞、星細胞、内皮細胞を還流・三次元共培養することで「類洞構造を再現する」ことに成功している

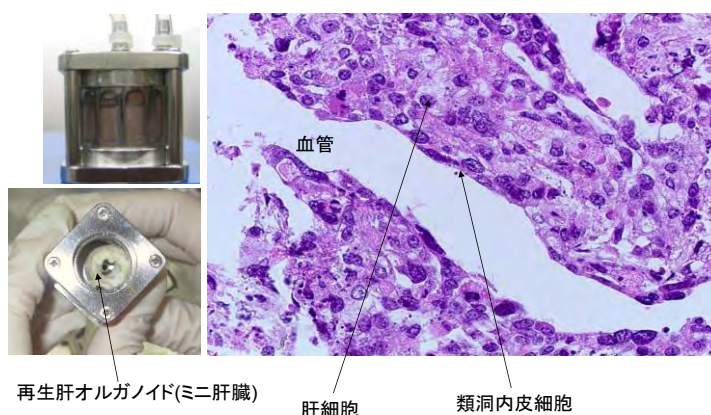


図 11 AFS および RFB を用いた肝細胞・星細胞・類洞内皮細胞により構築した再生肝オルガノイドの概観と組織像

る (図 11)。さらに、このミニ肝臓をヌードマウスの体網および腎臓に移植すると生着し、肝特異的な遺伝子の発現を確認している。AFS カラムは、類洞構造の再現のためのマクロ空間 (直径 200 μm ほどの空間) と培養液が細胞に万遍なく細胞に供給されるのに適したマイクロポアを兼ね備えている。この知見を足掛かりにして、今後、創製した生命機能マテリアルを用いて、臨床的に移植可能な「肝再生オルガノイド」を構築していく。なお、この研究成果は日経産業新聞に「立体的な肝臓作製」としてプレスリリースされている。

< 4) *In vitro*→*in vivo* 評価系の構築 >

人工骨などの *in vivo* 評価には、ウサギやイヌ (ビーグル) などが実験動物として広く用いられているが、これらの動物の骨形成速度は人間よりも早く、人間に適用した時との相関が取れないことがある。そこで、骨形成速度が人間と比較的近いブタやヒツジなどの大型動物を用いて行なう *in vivo* 評価は、人間に適用した時との相関を考える上で非常に貴重なデータとなる。

長嶋らにより作出された huKO ブタは、臓器、筋肉、血管、皮膚をはじめ、脳神経細胞、血球、組織幹細胞に至るまで全身性に赤色蛍光を発現することから、臓器移植・再生や細胞移植治療の研究に有用な大型動物となり得ると期待されている。

本研究では、huKO の胎児の頭蓋骨を細胞ソースとして利用し、コラゲナーゼ消化法により骨芽細胞を単離することに成功し、この細胞が蛍光化で赤く光ることも確認している (図 12)。

この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 13)。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際には細胞の固定、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。

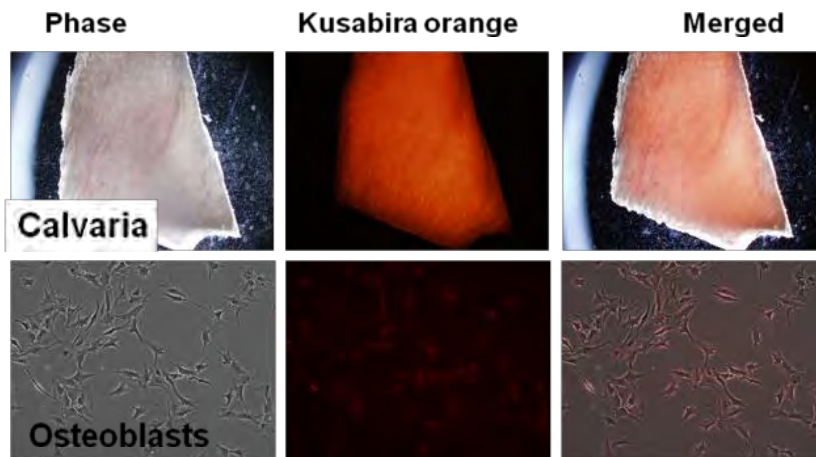


図 12 huKO 頭蓋冠から単離した骨芽細胞

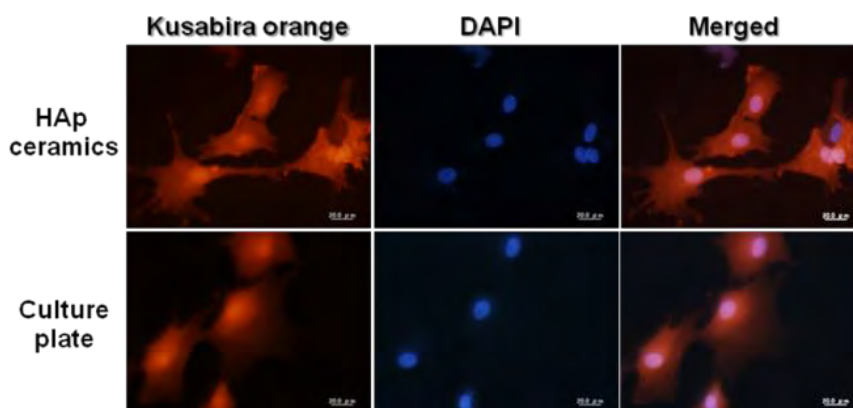


図 13 緻密な HAp セラミックス上で培養した huKO 由来骨芽細胞の細胞形態

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。また、最近、この蛍光下で赤く光る骨芽細胞をケイ素を含有したアパタイトセラミックス上に播種し、その増殖と分化について検証し、バイオイメージングのツールとして有効であることを明らかにしている。

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。

<優れた成果があがった点>

生命機能マテリアルのモデルのひとつである AFS を円筒状に加工して、これを三次元循環培養が可能なラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に装填し、ラット骨髄間質系幹細胞を三次元循環培養すると、世界的に見ても大きな「三次元再生培養骨」が構築可能であることを明らかにした(*3)。さらに、その培地循環速度が骨芽細胞の分化に影響を与えることも明らかにしている。これらの知見は特に優れた研究成果といえる。この研究成果は、東京慈恵会医科大学の松浦知和教授との共同研究であり、プロジェクト採択時に付された「実質的な医工連携を期待する」に沿う研究成果である。この研究成果を JST が主催する「新技術説明会」で発表したところ、数社と NDA を締結し、プレスリリースされている (14 その他の研究成果等参照)。

<問題点>

現在のところ、ほぼマイルストーン通りに研究を進めており、一部では予定よりも早く研究を推進できている。しかしながら、例えば、「肝臓+血管」・「骨+血管」など複数の組織を同時に構築することを目指している「phase II」は、研究上のハードルが高く、より密接に異分野交流を図りながら、現在、研究を推進しているところである。

また、当該プロジェクトでは、申請時には「生命機能マテリアル」を「組織再生の場」として位置づけたが、プロジェクトを進めていくうちに、「生命機能」という観点では、「**免疫系に働きかけるバイオマテリアル(*9)**」や「**感染を防止する抗菌性バイオマテリアル(*10)**」などを創製する課題も重要であることが分かり、「生命機能」の守備範囲を拡大して phase II において積極的に展開している。特に、免疫系に働きかけるバイオセラミックスを「イムノセラミックス(特許出願中)」と定義し、この研究が 2015 年度の科研費：基盤研究 B (研究代表者：相澤守) に採択されている。

<評価体制>

学内における研究達成レベルの評価(自己点検)に関しては、本学研究企画推進本部による進捗状況の点検が定期的に行なわれている。

明治大学研究企画推進本部会議(研究支援事業に係る専門部会)において、研究代表者から提出された

①研究達成度・自己点検表

②私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(研究年度)全体研究計画・ロードマップ

③提出前の私立大学戦略的研究基盤形成支援事業に係る中間評価(研究進捗状況報告書)または事後評価(研究成果報告書概要)

について、年度ごとに確認・点検作業を行ない、研究代表者にその結果をフィードバックしている。

なお、上記①～③については、私立大学戦略的研究基盤形成支援事業学内選考および採択後の進捗管理体制に関する内規を制定し、具体的な取り組みについては、本学 HP に掲載している。

(<http://www.meiji.ac.jp/research/promote/> ; 本学における大型研究進捗状況等の検証体制/本学における研究グループ内の自己点検・評価と学内外評価との関係)

この点検とは別にプロジェクト独自の自己点検をプロジェクトの折り返し地点(3 年目：中間審査)と最終年度(5 年目：最終審査)を行なっている。

まず、3 年目の「中間審査」では、2013 年度末に「公開シンポジウム」を行ない、その際にバイオマテリアル分野の有識者を外部評価者として依頼し、本プロジェクトの外部評価も行なった。審査員には、当該分野を牽引している東京工業大学 教授 田中順三先生(現名誉教授)、九州大学 教授 石川邦夫先生、名古屋大学教授 大槻主税先生の 3 名の先生に審査をお願いした。審査項目は、1) 研究課題の学術的重要性・妥当性、2) 研究計画・方法の妥当性、3) 研究課題の独創性および革新性、4) 研究課題の波及効果および普遍性、5) 研究遂行能力および研究環境の適切性の 5 つであり、それらを踏まえて、5 段階で評価していただいた。5 点は「極めて優れた研究成果をあげている」、4 点は「優れた研究成果をあげている」、3 点は「概ね妥当な研究成果をあげている」、2 点は「あまり研究成果が上がっていない」、1 点は「研究成果が上がっていない」である。評価結果は 5 点が 2 名、4 点が 1 名であった。概ね「生体機能マテリアルを用いて血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を開発するというプロジェクトの目標に対して四つのサブプロジェクトが有機的に連合し、当初設定したマイルストーン通

りあるいは予定を若干上回って研究が遂行され、かつ、研究成果が原著論文や特許として出されている」などのポジティブな評価を頂いたが、「phase2 ではより困難な課題に対処する必要があり、研究代表者の強いリーダーシップと強固な連携が期待される」という励ましの言葉も頂いている。文部科学省の中間審査で頂いたご意見とともに、アドバイスを踏まえて研究を推進している。以下、中間審査時に諸先生方からの総評を記載する。

審査員#1: アパタイトファイバースキャフォールドを開発し、骨芽細胞の分化レベルを制御した「再生培養骨」の構築、あるいは肝再生技術の確立など研究課題の学術的重要性・独創性・革新性は高く、今後、波及効果が期待される。医工連携による研究遂行は適切である。今後、実用化に向けて生物学的安全性データの収集整理が求められる。

審査員#2: 生体機能マテリアルを用いて血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を開発するというプロジェクトの目標に対して四つのサブプロジェクトが有機的に連合し、当初設定したマイルストーン通りあるいは予定を若干上回って研究が遂行され、かつ、研究成果が原著論文や特許として出されている。超高齢社会への対応から社会的要請が極めて大きい分野の研究であり、アパタイトファイバースキャフォールドを用いることによって極めて高い気孔率を達成していることは独創性が高いと評価できる。また研究業績から研究遂行能力等も優れていると判断できる。以上から総合的には極めて優れた研究成果をあげていると判断する。Phase2 ではより困難な課題に対処する必要があり、研究代表者の強いリーダーシップと強固な連携が期待される。

審査員#3: 本研究課題は、後期高齢者の人口割合が増大する我が国において、将来の医療材料の方向性を探索するうえで、きわめて重要な内容を含んでいる。また生体内における材料の挙動を材料学と生物学の両面から解析する視点で研究が展開されており、学術的に重要性も高く評価できる。研究計画は、組織再生に必要なスキャフォールド (Scaffold) の開発から、三次元組織の構築、生体内試験までを一貫して遂行する点を特徴としている。具体的には、4つのサブプロジェクトとして、1) 組織再生のための Scaffold の創製、2) 三次元組織の構築、3) 培養組織内への血管の形成、4) *in vitro* および *in vivo* での評価系の確立、を設定し、それらを統合して、再生医療技術の構築を進めている。この目的を達成するために、材料を専門とする研究者、生物学的な評価・解析を専門とする研究者、臨床的な研究を行える研究者を擁している。その体制は、医工連携を実践するうえで妥当なものであり、技術開発の実現性も高いと評価できる。本研究課題は、アパタイトファイバースキャフォールド (AFS) を用いた材料の開発、AFS を基材にしての骨・軟骨・肝の三次元培養、AFS への血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の担持による血管の導入により長期に機能する組織を構築する取り組みを進めている。さらにそれらの生体機能の評価する新しいシステムの確立を目指している。それぞれの独自技術を一連の開発として連携することにより、総合的にも独創的な課題となっており、再生医療に革新的な技術を与えると考えられる。個々の技術には、成果が上がっているので、基盤技術の融合がいっそう進むことも期待したい。本研究課題の成果は、再生医療分野で大きな波及効果を持つと予測できる。すでに AFS を用いた三次元培養で骨芽細胞分化への誘導が起こる際に、適切なシェアストレスが必要であることを見出している。肝再生においても3ヶ月の長期培養に成功している。また、VEGF の担持により高い細胞増殖性を示すことも確かめている。一方、全身性に赤色蛍光を発現する huKO ブタを利用した評価法は、すでに一部が確立されており、*in vivo* 実験に有益な手法になると考えられる。研究遂行の能力は十分であり、すでに AFS とラジアルフロー型バイオリクターを用いて、大きな三次元再生培養骨の構築に成功している。これまでは順調に研究成果を蓄積していると評価できる。ただし、臨床への展開を見据える課題であるため、基

盤技術の複合化に課題が生じることも予見される。これから肝臓と血管、骨と血管などの複雑な組織構築を進めるにあたり、より機能の高い材料の開発が重要になると考えられる。上記の内容を総合的に捉え、本研究課題は所期の目的を十分に達成し、優れた成果を上げていると評価した。また、若手研究者も順調に育成され、次世代の医工連携を担う人材を輩出している点も高く評価される。

ついで、「最終審査」について述べる。最終審査は中間審査と同様な方法で実施し、各審査員から以下の総評を頂いている。

審査員#1：本研究は、生体親和性の高いアパタイトファイバーに着目し、高強度多孔質スキャフオールドの開発を精力的に進めている。特に、医工連携分野の研究者を中心にして農学系研究者を有機的に組織化した研究体制はユニークであり、その結果、査読付原著論文 68 件以上、学会受賞 23 件、さらに特許出願を含めた数多くの優れた成果を上げている。現在、iPS 細胞・幹細胞を用いた再生医療技術が世界的に進展している研究状況の中で、本研究で得られた新しいスキャフオールド開発および 3 次元組織構築と血管形成に関する基礎技術は、近い将来、立体的な血管・管腔構造をもつ骨および肝臓組織の再生に不可欠な技術として応用貢献することが強く期待される。第一期・第二期を通して得られた成果から、研究代表者は新規のセラミックス研究領域である「生命機能マテリアル研究クラスター」を立ち上げており基礎科学の視点からも極めて高く評価される。

審査員#2：本研究課題は、「生命機能マテリアル」による血管形成を含む機能的な三次元組織を再生させる技術を確立するものであり、その学術的重要性は高い。また、政府の成長戦略重点 5 分野の一つに人工組織が挙げられていることから本研究課題に対する社会的な要請が大であることもわかる。

再生医工学の研究およびその実用化においてはスッキャフオールド、細胞、成長因子の融合とともに工学系と基礎医学系、臨床医学系の研究者の融合が必須要件であるが、本研究課題においては、研究代表者のリーダーシップのもとで各分野の研究者の融合が図れていると判断される。研究計画についても、個々の研究者の強みをいかし、シナジー効果が現れる計画となっており、実際にシナジー効果が認められたと判断できる。研究計画の独創性・革新性については、特にアパタイトファイバースキャフオールド (AFS) が特筆される。極めて気孔率の高いスッキャフオールドであり、AFS の特徴を活かすことによってラジアルフロー型バイオリクターにおいて骨、軟骨、肝の培養条件を最適化し、3 ヶ月も機能するバイオ人工肝を創製している。また、VEGF 担持 AFS によって血管形成能だけでなく骨形成が促進されることも見出している。本研究課題で得られた成果は臨床医学や臨床歯学への貢献が期待されるだけでなく、組織再生工学の分野においても先駆的な研究として期待される。スキャフオールドの構造と組成が細胞の分化に影響を及ぼすことが明らかになったので、今後はその詳細の解明も期待される。

研究代表者および研究分担者の研究遂行能力が優れていたことは、極めて多くの研究成果や多くの研究者が短期間に昇進していることから明らかである。また、研究環境の整備も含めて適切な環境で研究を遂行できていたと判断される。これらの個別分析から、本研究課題は最終的に「極めて優れた研究成果をあげている」と判断する。なお、本研究課題は本年度で終了するものの、今後、適切な研究プロジェクトに応募して、本研究課題で得られた成果をさらに発展させることを期待したい。本研究課題の遂行によって免疫系への対応や感染防止などへの発展が明示されている。研究成果に基づく研究領域の拡大自体は好ましいことであるが、研究代表者には研究課題の選択と集中を行い、強いリーダーシップで実用化を進めて欲しい。

審査員#3：審査用書類の内容を精査した結果、本研究課題は所期の目的を十分に達成し、関連分野に広く波及する成果を上げていた。さらに、「免疫系に働きかけるバイオマテリアル」や「感染を防止す

る抗菌性バイオマテリアル」をセラミックスにより達成する「イムノセラミックス」の概念を提唱し、医学と材料科学を横断する新しい領域も開拓している。これらを総合的に評価し、「極めて優れた研究成果をあげている」とした。

研究課題の学術的重要性：本研究課題は、再生医療によって、生活の質（QOL）の向上や健康寿命の延伸を達成するために必須となる立体臓器（三次元組織）作製のための基盤技術の構築するものである。三次元組織の構築のためには、スキャフォールドの材料科学、三次元培養の技術、血管の導入を促す技術、ならびに生体外（*in vitro*）から生体内（*in vivo*）にわたる評価系の確立といった多様な専門分野を横断する学術領域が必要となる。本研究課題では、これらの分野を統合することで、材料学と生物学、医学の視点から解析する内容であり、学術的な重要性も高く評価できる。

研究計画・方法：研究計画は、組織再生に必要なスキャフォールド（Scaffold）の創出から、三次元組織の構築、血管形成の制御、生体外から生体内試験に至る評価系の構築までを一貫して遂行する点を特徴としている。具体的には、4つのサブプロジェクトを設定し、それらを統合して、再生医療技術の構築を進めている。この目的を達成するために、材料を専門とする研究者、生物学的な評価・解析を専門とする研究者、臨床的な研究を行える研究者を擁している。その体制は、医工連携を実践するうえで妥当なものであり、多くの研究成果を輩出する計画であると評価できる。また多くの大学院生の参画を得ており、若手研究者の育成にも十分な計画となっている。

研究課題の独創性および革新性：本研究課題は、アパタイトファイバースキャフォールド（AFS）を用いた材料の開発、AFSを基材にしての骨・軟骨・肝の三次元培養、AFSへの血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の担持による血管の導入により長期に機能する組織の構築、さらにそれらの生体機能の評価する新しいシステムの確立に取り組んだ。これらを一連の開発として連携して進められた。スキャフォールドの開発では吸収性や骨誘導を示す材料開発にも成功している。さらに免疫賦活効果や耐感染性を示すスキャフォールドを開発した。三次元組織の構築では、骨再生の分化を誘導する培養条件を明らかにするとともにバイオ人工肝の構築にも成功した。血管形成の制御に関してもVEGFの担持により、細胞増殖性を増大させ、骨形成量の増加を見出した。さらに、血管新生抑制剤を用いた癌治療用セラミックス微小球の可能性を示した。開発した材料について、全身性に赤色蛍光を発現するhuKOブタを利用した*in vitro*での評価法については、新生仔ブタ頭蓋骨を用いての、細胞の単離・同定・評価を行い、バイオイメージングのツールとしての有用性を確かめた。これらが独立した知見や技術ではなく、連携研究として実施されたとおり、高い独創性と革新性に繋がっているといえる。

研究課題の波及効果および普遍性：本研究課題の成果は、再生医療分野で大きな波及効果を持つと予測できる。AFSを基盤技術にしたスキャフォールド開発は、骨芽細胞分化や、肝再生における長期培養を可能にしており、材料の精密設計が再生医療の多くの分野で利用可能なことを示したといえる。VEGFの担持により高い細胞増殖性を示す材料を提示したことも、薬剤担持した材料の可能性を大きく広げた。一方、全身性に赤色蛍光を発現するhuKOブタを利用した評価法について、*in vitro*実験によるものが進み、大型動物を用いた*in vivo*実験への広がりが期待される成果が得られた。

研究遂行能力および研究環境の適切性：研究遂行の能力は十分発揮されている。AFSとラジアルフロー型バイオリクターを用いて、大きな三次元再生培養骨の構築に成功した。AFSを用いたスキャフォールドでの研究成果から、肝臓と血管、骨と血管などの複雑な組織構築についても、研究が実施され、成果を得ている。成果の発信にも積極的で、「iPS細胞と医農工連携」の真のジウムを開催し、多くの方々に開発の理念と重要性を啓蒙したことも高く評価される。

また、若手研究者も順調に育成され、次世代の医工連携を担う人材を輩出している点も高く評価される。

以上のように、「最終審査」においても各審査員より貴重なコメントを頂き、今後の方向性を考える上で大変有意義であった。当該プロジェクトは今年度で終了するため、この研究組織は解体され、この組織で継続して研究を実施することは難しいものの、このプロジェクトで得た知見や確立した技術を発展させ、学術領域の形成と新規医療材料の実用化につなげていきたい。

上記の内部評価および外部評価とは別に、「2011/2012 年度」および「2013/2014 年度」の研究成果をまとめた「冊子体の成果報告書」を作成し、我々の研究成果を外部の方々に紹介するとともにご意見をいただくため、この冊子に関連する約 60 ヶ所の研究機関に送付している。5 か年分の研究成果をまとめた成果報告書も作成し、2015 年度末に関係機関に発送する。

<研究期間終了後の展望>

ここまで得られた研究成果をさらに発展させて、「医工連携」を実践しながら「産学連携」による材料開発を推進して「患者さんのもとに届く材料」を上市したい。また、当該プロジェクトの研究基盤をコアとして、これまでの三回の科研費「新学術領域（2013・2014・2015 年度）」への申請を行なっている。2015 年度の申請の領域名は「生命機能マテリアル：異方性とニッチ空間が奏でる組織構」である。その申請内容は「異方性とニッチ空間が奏でる組織構築」を命題として、材料系研究者と生物・医学系研究者の密接な連携により、細胞の運命を決定づける「ニッチ」を再現する新規材料「異方性生命機能マテリアル」の創製プロセスを開発するとともに、そのための新しい学問基盤「異方性生命医工学」を創成することであったが、結果は不採択であった。今後は、班員の構成から再検討し、他の外部研究費も視野に入れて再挑戦したい。

明治大学内の制度で、「特定課題研究所」というものがある。これは同じ研究の方向性を向いている教員が数名集い、特定の課題に向けて研究を実施するもので、大学が申請する研究費の母体となっており、本プロジェクトも**特定課題研究所「先端医療材料創製ユニット」**が母体となっている。現在、80 に及ぶ特定課題研究所があり、それらのなかで現在、6 つの研究所が大学の厳密な審査のもと「研究クラスター」に選ばれている。2013 年度、研究代表者（相澤）の特定課題研究所もそのクラスター「**生命機能マテリアル研究クラスター**」に選定されており、現在はこの研究クラスターが母体となり、研究を展開している。採択初年度の 2013 年度のみ、大学より研究費（年額 300 万円）の支援を受けたが、基本的にこのクラスターは外資を取得して運用することが求められている。このクラスター制度のメリットは「特任教員」を雇うことができることであり、その原資は外資に依存する。そこで、今後、外部資金を獲得し、このクラスターを枠組みとして、継続して研究を展開していく。

また、「特に優れた研究成果」で記載した「**アパタイトファイバースキャフォールド(AFS)**」と「**ラジアルフロー型バイオリクター(RFB)**」との組み合わせは、大きな組織の再生を可能にする技術であり、再生医療の分野に新しいエポックを築くものと期待している。現在、我々は「未分化間葉系幹細胞」を利用しているため、間葉系組織（骨や軟骨など）の構築には目途が立っているものの、他の正常組織を再生するのは未分化間葉系幹細胞では難しい。2012 年に京都大学の山中教授が「iPS 細胞」に係わる研究成果でノーベル賞を受賞したが、「未分化間葉系幹細胞」の代わりに「iPS 細胞」を利用することで、あらゆる組織の再生が可能になると期待している。また、知的財産に関しても、二つの特許が本学で権利化されており（特許 4631049 号：バイオリクター、特許 4790944 号：細胞の培養方法）、今後の実

用面での展開も大いに期待している。

<研究成果の副次的効果>

プロジェクト期間中に、「生命機能マテリアル」に関する特許出願が7件ある。

- 1) 相澤 守・中村まり子・山田清貴・永井重徳、特願 2014-192763、細胞培養基材、細胞培養基材の製造方法、細胞培養方法、及び細胞培養装置、学校法人 明治大学(出願日 2014年9月22日)
- 2) 谷 俊彦・相澤 守・石田明祐、特願 2014-115232、板状リン酸化合物粒子、それを含む板状リン酸化合物粉体、及び、板状リン酸化合物粉体の製造方法、株式会社 豊田中央研究所・学校法人 明治大学(出願日 2014年6月3日)
- 3) 木南啓司・有村英俊・相澤 守・水本みのり・小西敏功、特願 2013-167002、生体吸収性セメントおよびその製造方法、グンゼ株式会社・学校法人 明治大学・公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー(出願日 2013年8月9日)
- 4) 相澤 守・小西敏功・水本みのり、特願 2012-230511、ハイドロキシアパタイト組成物及びそれから成る骨又は歯充填材、財団法人神奈川科学技術アカデミー(出願日 2012年10月18日)
- 5) 相澤守・清水秀樹・庄志・猪股義彦、特願 2012-231346、球状水酸アパタイト及びその製造方法、学校法人明治大学・太平化学産業株式会社 (2012年10月19日)
- 6) 相澤 守・小西敏功・水本みのり・高橋周平、特願 2011-260177、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、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 (出願日 2011年11月29日)
- 7) 相澤守・高橋周平・小西敏功、特願 2011-98674 (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、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4月26日)

これらは本学と連携企業との共願となっている。今後は、他のサブプロジェクトでも積極的に知的財産の形成を進めていく。

また、現在、数社の企業と「骨誘導能を備えた次世代人工骨」や「抗菌性バイオマテリアル」、「低侵襲治療を可能にする完全吸収置換型ペースト状人工骨」などの課題に産学連携体制で推進している。2015年7月に、グンゼ株式会社と共同で、AMEDの「産学連携医療イノベーション創出プログラム【急激な少子高齢化社会を支える革新的医療技術・医療機器の研究開発】」に「健康寿命の増進を実現する完全吸収置換型有機-無機ハイブリッド人工骨の臨床応用可能性の検証」という課題で申請した。今回は不採択であったが、グラントの採択は当該研究の成果が実社会で活用される確度を大きく向上させることができるため、連携企業とともに実用化に向けて努力していく。

<シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等>

1) ホームページでの研究状況の公開

明治大学生体関連材料研究室：http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/

生命機能マテリアル研究クラスター：http://www.isc.meiji.ac.jp/~a_lab/cluster/

2) 公開シンポジウム (海外有識者を招いての講演会含む) の開催

・2012年2月2日開催 (会場：A310教室、参加人数：35名)

THIAN Eng San, PhD FRMS; National University of Singapore

“Calcium Phosphate as an Alternative Healthy Bone Materials for Tissue Remodeling and Regeneration”

・2012年11月28日開催（会場：A310 教室、参加人数：28名）

Dr. Saksit Chanthai; Khon Kaen University, Thailand

“QuEChERS : A Primer Mean for Sample Preparation Optimization and Analytical Techniques in Food Safety and Quality, and Various Featured Applications”

・2013年3月1日開催（会場：A208 教室、参加人数：53名）

吉村 昌弘, 東京工業大学名誉教授、国立成功大学特聘講座教授

「なぜ溶液からのナノ無機材料の直接作製プロセスを研究するのか？ -物質・材料と社会と自然環境をグローバルに考える-」

・2014年3月6日開催 「公開シンポジウム」（会場：A416/A417 教室、参加人数：50名）

1) 基調講演（14：00-15：00）：

科学技術のリスクとベネフィットから考えるバイオマテリアル研究の重要性（慶應義塾大学・教授 井奥洪二）

2) 進捗報告(15:00-15:40)：

生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築および垂直統合型研究拠点形成（研究代表者：明治大学・教授 相澤 守）

3) 話題提供 1(15:50-16:10)：

バイオ人工肝臓開発のための肝臓移植マウスモデルの検討（東京慈恵会医科大学・教授 松浦知和）

4) 話題提供 2（16：10-16：30）：

クサビラオレンジ遺伝子導入ブタ由来細胞を用いた生命機能マテリアルにおける組織再生技術の構築（明治大学 研究知財戦略機構・研究推進員 本田みちよ）

5) 話題提供 3（16：30-16：50）：

遺伝子導入による double color 遺伝子導入骨芽細胞の創出（上智大学・准教授 神澤信行）

・2015年7月21日開催（会場：A304 教室、参加人数：30名）

THIAN Eng San, PhD FIMMM FRMS; Assistant Professor,

National University of Singapore

“Solving Musculoskeletal Issues using Engineering Approaches”

・2016年3月4日開催「公開シンポジウム」（会場：第1校舎 6-206 教室、参加人数：60名）

1) 成果概要報告（13:30-14:20）：

私立大学戦略的研究基盤形成事業『生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築および垂直統合型研究拠点形成』の総括および今後の展望(研究代表者：明治大学・教授 相澤 守)

2) 基調講演(14:20-15:20)：

骨・軟骨組織の再生誘導と再建外科への展開（近畿大学医学部形成外科・教授・磯貝典孝）

3) 話題提供（15:30-16:50）：

・三次元培養スキャフォールドを用いた骨組織再生における血管内皮細胞と骨芽細胞の関係（明治大学 研究・知財戦略機構・研究推進員・本田みちよ）

・ラジアルフロー型バイオリアクターを利用したヒト蛋白質性バイオ医薬品生産系確立の基礎研究から明らかになった肝細胞機能発現におけるアミノ酸代謝の重要性（東京慈恵会医科大学・訪問研究

員/文教大学健康栄養学部・准教授・藤見峰彦)

- ・ブタのゲノム編集の現状と展望 (明治大学研究・知財戦略機構・特任講師・渡邊将人)
- ・3D スキャフォールド機能性評価への蛍光タンパク質の応用 (上智大学理工学部・教授・神澤信行)

3) 明治大学リバティアカデミーの開催：2012.10月より5回

「これからの医療とバイオマテリアル」：当該研究プロジェクトの社会的背景および研究成果を一般の方々に分かりやすく紹介した

生田
教養・文化
講座コード
13220065

これからの医療とバイオマテリアル

医学と工学の連携

川崎市教育委員会連携事業

講座趣旨

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生命機能マテリアルによる次世代再生医療技術の構築と垂直統合型研究拠点形成」で進めている研究の社会的背景や研究内容を一般の方々に分かりやすく解説し、研究成果の社会への還元をはかる。また、研究のアウトプットが「医学」であることから、臨床の現場でも第一線で活躍している医学系研究者の方々に「代表的な疾患とこれからの医療」についてご紹介いただく。

講義概要

曜 日	土曜日
時 間	10:30~12:00
定 員	30名
会 場	生田キャンパス 地域産学連携 研究センター
回 数	5回
受 講 料	10,000円
教 材 料	レジュメ資料
ポ イ ン ト	★

講師紹介

相澤 守
コーディネータ
明治大学理工学部教授

江本 精
国際医療福祉大学教授

松本 守雄
慶應義塾大学
医学部整形外科准教授

松本 秀男
慶應義塾大学スポーツ医学
総合センター教授

松浦 知和
東京慈恵会医科大学
臨床検査医学講座准教授

日程	日	内 容	講 師
1	10/5(土)	これからの医療を支えるバイオマテリアル	相澤
2	10/12(土)	ガンとこれからの医療	江本
3	10/26(土)	骨の病気とこれからの医療	松本守
4	11/2(土)	関節の病気とこれからの医療	松本秀
5	11/9(土)	肝臓とこれからの医療	松浦

4) 「明治大学・京都大学 iPS 細胞研究所 共催イベント」での講演

明治大学・京都大学iPS細胞研究所 共催イベント

「iPS細胞と医農工連携： あたらしい医療を考える」

シンポジウム登壇者

長嶋 比呂志
明治大学
薬学博士
薬学博士
薬学博士
薬学博士

相澤 守
明治大学
理工学部
理工学部
理工学部

長屋 昌樹
明治大学
理学部
理学部
理学部

山中 伸弥
京都大学
IPS細胞研究所
IPS細胞研究所

山下 潤
明治大学
理工学部
理工学部
理工学部

司会進行

梶 太一
明治大学
理工学部
理工学部
理工学部

7/26日

13:30~17:00
(13時間)

【会場】
明治大学 駿河台キャンパス
アカデミーホール

お申込み

■予約受付開始日6月15日(月)昼12時~
■申込URL:
<http://www.meiji.ac.jp/koho/ips/>
※上記URLよりお申し込みください。

■入場無料
■先着順 ※席空人数に限り、先着順で申し込みを締め切ります。
■お問い合わせ先:
明治大学 経営企画部 広報課
koho@mcoss.meiji.ac.jp

〒101-8301 東京都千代田区神田駿河台1-1
TEL.03-3296-4545(代表)
<http://www.meiji.ac.jp/>

24

ノーベル賞を受賞された京都大学教授山中伸弥先生とともに、京都大学 iPS 細胞研究所との共催イベントを本学駿河台キャンパスで開催し、当該プロジェクトメンバー（長嶋教授・相澤教授）がそれぞれ「難治性疾患の研究に役立つ動物モデルの開発」および「これからの医療に講演する生命機能マテリアルの開発」という演題で一般向けに研究を紹介した。総勢 1200 名の参加があった。なお、この講演の様子が朝日新聞(2015 年 8 月 29 日)および読売新聞(2015 年 8 月 25 日)に掲載されている。

5) 「次世代バイオマテリアルを考える会」(当該プロジェクト主催研究会)

年度	講演日	講演者(所属)	講演タイトル	参加者数
2011	2011 年 7 月 15 日	二木康夫 (慶應義塾大学 医学部)	軟骨再生治療の現況	30 名
	2011 年 10 月 28 日	永井重徳 (慶應義塾大学 医学部)	細菌感染と宿主免疫応答	30 名
2012	2012 年 7 月 6 日	菊池正紀 (物質・材料研究機構 生体機能材料ユニット)	バイオセラミックスの標準化への取り組み	32 名
2013	2013 年 6 月 27 日	本田みちよ (神奈川科学技術アカデミー)	分子細胞生物学とバイオマテリアル	34 名
	2014 年 2 月 22 日	小西敏功 (岡山大学自然科学研究科)	ペースト状人工骨(リン酸カルシウムセメント)の現状と新展開	60 名
2014	2014 年 5 月 29 日	谷 俊彦 (株式会社 豊田中央研究所)	異方性を創る・測る・設計する	28 名
	2014 年 6 月 25 日	岩崎泰彦(関西大学)	細胞糖鎖改変技術を利用したソフトバイオマテリアルの設計	26 名
		木村 剛 (東京医科歯科大学 生体材料工学研究所)	細胞外マトリックス構造体を用いた組織再構築	
		野村直之 (東北大学大学院 工学研究科)	三次元積層造形法による医療用金属材料の開発	
	2014 年 10 月 17 日	江本 精 (国際医療福祉大学保健医療学部)	産婦人科超音波診断の進歩ー胎児から腫瘍までー	28 名
	2014 年 10 月 28 日	早川 聡 (岡山大学大学院 自然科学研究科)	固体 NMR 分光法によるリン酸カルシウム粒子の構造解析	25 名
	2014 年 12 月 17 日	伊藤敦夫 (産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門)	臨床応用と薬事承認を目指すバイオマテリアル研究開発手法	24 名
	2015 年 2 月 21 日	菊池正紀(物質・材料研究機構 生体機能材料ユニット バイオセラミックスグループ)	無機/有機複合体による骨再生材料の開発	58 名
2015	2015 年 7 月 9 日	江本 精 (国際医療福祉大学)	ナノ気孔セラミックス微小球を用いた癌化学塞栓療法の確立に向けて	25 名
	2015 年 7 月 15 日	熊田伸弘(山梨大学大学院総合研究部附属クリスタル科学研究センター)	水熱反応による新しい無機化合物の探索と特性評価	41 名

	2015年 9月9日	永井重徳(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科)	免疫学の歴史と基礎	26名
--	---------------	-------------------------------	-----------	-----

<受賞(関連学生などによる学会賞)>

- 1) (*11) 本田みちよ, 相澤 守
トピックス講演に選定
タイトル: アパタイトファイバースキャフォールドにおける骨芽細胞と血管内皮細胞の局在
日本セラミックス協会 2016 年年会、早稲田大学・西早稲田キャンパス、日本セラミックス協会
- 2) (*1) 鈴木 来, 本田みちよ, 相澤 守
第 12 回 若手優秀発表賞
タイトル: 間葉系幹細胞を培養したアパタイトファイバースキャフォールドのラット背部皮下埋入による生体内反応
第 25 回 無機リン化学討論会、山形県米沢市 山形大学、日本無機リン化学会
- 3) 井ヶ田一貴, 永井 亜希子, 相澤 守, 山下仁大
第 12 回 若手優秀発表賞
タイトル: マクロファージ接着が引き起こす生体反応の相違
第 25 回 無機リン化学討論会、山形県米沢市 山形大学、日本無機リン化学会
- 4) (*5) 安田沙織, 本田みちよ, 長屋昌樹, 浅野吉則, 中野和明, 長嶋比呂志, 相澤 守
無機マテリアル学会講演奨励賞
タイトル: 筋および脂肪組織埋入による血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの組織学的評価
第 131 回学術講演会、愛知県名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会
- 5) (*1,*7) 伊藤賢人, 鴈本拓也, 長田直生, 中野和明, 浅野吉則, 長屋昌樹, 松成ひとみ, 本田みちよ, 織部一弥, 長嶋比呂志, 相澤 守
無機マテリアル学会講演奨励賞
タイトル: 気孔構造を精密制御した多孔質水酸アパタイトセラミックスの生体内反応
第 131 回学術講演会、愛知県名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会
- 6) (*1,*7) 伊藤賢人, 鴈本拓也, 長田直生, 中野和明, 浅野吉則, 長屋昌樹, 織部一弥, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤 守
ハイライト講演に選定
タイトル: 気孔構造を精密制御した多孔質・リン酸三カルシウムセラミックスの骨形成能
第 37 回 日本バイオマテリアル学会大会、日本バイオマテリアル学会
- 7) (*10) Shuhei Tsurumi, Michiyo Honda, Tomoji Takayama, Takehiko Nakajima, Ken Ishii, Morio Matsumoto and Mamoru Aizawa (鶴見秀平, 本田みちよ, 高山知士, 中島武彦, 石井賢, 松本守雄, 相澤 守)
Best Student SCMBB Award, The 15th Asian BioCeramics Symposium (2015)
タイトル: Immobilization of silver ions to porous hydroxyapatite/collagen composites and its anti-bacterial activity (多孔質アパタイト/コラーゲン複合体への銀イオンの固定化およびその抗菌活性)

- 8) (*10) 柿沼祐亮, 石井 賢, 石濱寛子, 本田 みちよ, 戸山芳昭, 松本守雄, 相澤 守
2014 年年会優秀ポスター発表賞
タイトル: イノシトールリン酸のキレート能を利用した銀担持アパタイトによる抗菌性インプラントの創製とその生体適合性
日本セラミックス協会 2014 年年会、慶應義塾大学 (日吉キャンパス)
- 9) (*11) 本田みちよ, 中村まり子, 相澤 守
特定セッション若手優秀発表賞
タイトル: アパタイトファイバースキャフォールドにおける血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養
日本セラミックス協会 第 27 回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)
- 10) (*8) 横田倫啓, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤 守
第 11 回 若手優秀発表賞
タイトル: 骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とその *in vivo* 評価
第 24 回 無機リン化学討論会、高知県高知市 高知会館、日本無機リン化学会
- 11) 沢田知也, 永田幸平, 本田みちよ, 長屋昌樹, 林田豪太, 中野和明, 木南啓司, 有村英俊, 長嶋比呂志, 相澤 守
ハイライト講演に選定
タイトル: 気孔形成剤を添加した生体吸収性 β -リン酸三カルシウムセメントの *in vivo* 評価
第 36 回 日本バイオマテリアル学会大会、日本バイオマテリアル学会
- 12) 永田幸平, 小西敏功, 本田みちよ, 相澤 守
最優秀発表賞
タイトル: キレート硬化型 β -リン酸三カルシウムセメントの血液中での Non-fragmentation の検証
第 18 回 生体関連セラミックス討論会、日本セラミックス協会 生体関連材料部会
- 13) 永田幸平, 小西敏功, 本田みちよ, 相澤 守
トピックス講演に選定
タイトル: キレート硬化型 β -リン酸三カルシウムセメントの Non-fragmentation の検証とその材料評価
日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学 津島キャンパス、日本セラミックス協会
- 14) (*13) 茅嶋健太郎, 大山 遼, 江本 精, 松浦 知和, 新井 良和, 長屋 昌樹, 長嶋比呂志, 相澤 守
第 23 回無機リン化学討論会 若手優秀研究発表賞 (2013)
タイトル: 血管内皮細胞増殖因子を担持し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 vitro* および *in vivo* 評価、第 23 回無機リン化学討論会、島根県松江市 松江テルサ、日本無機リン化学会、2013.9.19-20
- 15) (*9) 中村まり子, 庄 志, 梅田 遼, 永井重徳, 相澤 守
Best Poster Award; The 2nd International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2013 (ISIEM 2013)
タイトル: Cellular response of immunocyte to boron-containing apatite ceramics
(2013 年 10 月 27 日~10 月 31 日にフランス・レンヌにて開催)
- 16) (*3) 中村まり子, 三浦舞子, 前橋はるか, 松浦知和, 相澤 守
ハイライト講演に選定

- タイトル：ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた再生培養骨の構築に向けたアパタイトファイバースキャフォールドの最適気孔構造の検討
第 35 回 日本バイオマテリアル学会大会、日本バイオマテリアル学会
- 17) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa
Racquel LeGeros Award (2012)
タイトル：Fabrication of α -Tricalcium Phosphate Cement Using Chelating Mechanism of Inositol Phosphate and Its Histological Evaluation
(和訳：イノシトールリン酸のキレートメカニズムを利用した α -リン酸三カルシウムセメントの作製およびその組織学的評価)
- 18) Zhi Zhuang, Midori Yumoto, Takuya Miki and Mamoru Aizawa
Best Poster Award, 9th World Biomaterials Congress (2012)
タイトル：Development of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to *a*-plane and Their Characterizations
(和訳：*a* 面配向水酸アパタイトセラミックスの開発とそのキャラクタリゼーション)
- 19) **(*3)** 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守
日本セラミックス協会 第 25 回秋季シンポジウム 特定セッション学生優秀発表賞 (2012)
タイトル：アパタイトファイバースキャフォールドを装填したラジアルフロー型バイオリアクターによるラット骨髄細胞からの再生培養骨の構築 —培地循環速度の最適化—
- 20) **(*4)** 安生絵利奈・藤見峰彦・前橋はるか・松浦知和・相澤 守
第 22 回無機リン化学討論会 若手優秀研究発表賞 (2012)
タイトル：アパタイトファイバースキャフォールドを用いた長期三次元循環培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能
- 21) 服部竜也・永井亜希子・五十嵐香理・相澤 守・山下仁大
第 22 回無機リン化学討論会 若手優秀研究発表賞 (2012)
タイトル：分極水酸アパタイトセラミックスを用いた肉腫細胞の増殖抑制”、第 22 回無機リン化学討論会「神戸大会」、神戸大学六甲台キャンパス 瀧川記念学術交流会館、日本無機リン化学会、2012.9.25-26
- 22) 清水秀樹・庄 志・猪股義彦・松田信之・相澤 守
公益社団法人日本セラミックス協会生体関連材料部会
第 16 回生体関連セラミックス討論会 最優秀発表賞受賞 (2012)
タイトル：クエン酸を添加した均一沈殿法による球状水酸アパタイトの合成とそのキャラクタリゼーション
- 23) **(*2)** 木下友花里・S. M. Best・相澤 守
公益社団法人日本セラミックス協会生体関連材料部会
第 16 回生体関連セラミックス討論会 The Division 賞受賞 (2012)
タイトル：ケイ素含有アパタイトファイバーによる骨再生用スキャフォールドの *in vitro* 評価
- 24) **(*3)** 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守
日本セラミックス協会第 24 回秋季シンポジウム 特定セッション学生優秀発表賞 (2011)
タイトル：アパタイトファイバースキャフォールドとラット骨髄細胞を用いて再構築した再生培養

- 骨の骨芽細胞の分化に及ぼすラジアルフロー型バイオリクター内の培地循環速度の影響
- 25) 藤岡 恵・高 正宏・澤田敏樹・Zhi Chunyi・坂東義雄・Golberg Dmitri・相澤 守・芹澤 武
第 63 回コロイドおよび界面化学討論会 ポスター賞 (2011)
タイトル：水溶性合成ポリマーによる窒化ホウ素ナノチューブの単一分散
- 26) (*1) 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
第 20 回硬組織再生生物学会学術大会・優秀一般演題 (口演) (2011)
タイトル：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
- 27) Z. Zhuang, T. Miki, M. Yumoto, M. Aizawa
Outstanding Poster Award, 12th International Union of Materials Research Societies International Conference in Asia (2011)
タイトル：Ultrastructural Observation of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to *a*-plane using High-resolution Transmission Electron Microscopy
(和訳：高分解能透過型電子顕微鏡法による *a* 面配向性アパタイトセラミックスの超微細構造観察)
- 28) (*10) Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa, Z. Zhuang and M. Aizawa
The Best Poster Presentation Award, 23rd Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (ISCM)-(Bioceramics23) by ISCM (2011)
タイトル：Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property
(和訳：超音波噴霧熱分解法による銀含有水酸アパタイト粉体の調製およびその抗菌特性)
- 29) (*2) Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa
ABC Award 2011, The 11th Asian BioCeramics Symposium (2011)
タイトル：Fabrication and evaluation of silicon-containing apatite fiber scaffolds for bone tissue engineering
(和訳：ケイ素含有アパタイトファイバーを用いた骨再生用スキャフォールドの作製と評価)
- 30) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Zhi Zhuang and M. Aizawa
ABC award 2011, The 11th Asian BioCeramics Symposium (2011)
タイトル：Effect of concentration of inositol hexaphosphate on material properties of chelate-setting apatite cement
(和訳：キレート硬化型アパタイトセメントの材料特性に及ぼすイノシトールリン酸濃度の影響)

<プレスリリース>

- 1) 2015年3月13日；化学工業日報に研究成果掲載（ペースト状人工骨 血液介在時に硬化）
- 2) (*12) 2014年12月5日；日経産業新聞に研究成果掲載（立体的な肝臓作製；右図）
- 3) 2013年9月20日；化学工業日報に研究成果掲載（ペースト状の人工骨 短時間で硬化 骨粗しょう症などに）
- 4) (*8) 2012年9月11日；日経産業新聞に研究成果掲載（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）
- 5) (*10) 2012年9月12日；化学工業日報に研究成果掲載（サケ由来のたんぱく質利用 新規抗菌性材料を創製）



<企業との連携（共同研究および指定寄付金）>

- 1) 自家骨に代わりうる次世代人工骨の開発（昭和医科工業株式会社）
- 2) アパタイトの形態制御プロセスの構築（太平化学産業株式会社）
- 3) 有機/無機ハイブリッドペースト状人工骨の開発（グンゼ株式会社）
- 4) 異方性アパタイトセラミックスの開発（株式会社豊田中央研究所）
- 5) 抗菌性バイオマテリアルの開発（マルハニチロ株式会社）

ほか3件

5. 業績リスト

(審査付原著論文, 解説記事, 特許, 新聞発表, 学会発表に分けて記載)

研究代表者：相澤 守 (明治大学)

1. 審査付原著論文 (査読つき Proceedings 含む)

- 1-1) H. Nishikawa, M. Honda, T. Yokota, Y. Shimizu, and M. Aizawa, “Preparation of spherical Zn-substituted tricalcium phosphate powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its characterization”, *J. Nanomater.* (2015) *in press*. Article ID 6753203
- 1-2) K. Hagiwara, Y. Koike, M. Aizawa, and T. Nakamura, “On-site quantitation of arsenic in drinking water by disk solid-phase extraction/mobile X-ray fluorescence spectrometry”, *Talanta*, **144**, 788-792(2015).
- 1-3) A. Ito, Y. Sogo, A. Yamazaki, M. Aizawa, A. Osaka, S. Hayakawa, M. Kikuchi, K. Yamashita, Y. Tanaka, M. Tadokoro, L. Á. de Sena, F. Buchanan, H. Ohgushi, and M. Bohner, “Interlaboratory studies on in vitro test methods for estimating *in vivo* resorption of calcium phosphate ceramics”, *Acta Biomaterialia*, **25**, 347-355(2015).
- 1-4) (*14) M. Emoto, H. Yoshihisa, K. Yano, B. Chojamts, H. Tsugu, K. Tachibana, and M. Aizawa, “Advanced Chemoembolization by Anti-angiogenic Calcium-Phosphate Ceramic Microspheres Targeting the Vascular Heterogeneity of Cancer Xenografts”, *Anticancer Research*, **35**, 4757-4764(2015).
- 1-5) M. Emoto, K. Yano, B. Chojamts, S. Sakai, S. Hirasawa, S. Wakamori, M. Aizawa, K. Nabeshima, K. Tachibana, and N. Kanomata, “Azaspirene analogs inhibit the growth of human uterine carcinosarcoma *in vitro*”, *Anticancer Research*, **35**, 2739-2746(2015).
- 1-6) Y. Takeoka, M. Hayashi, N. Sugiyama, M. Y. Fujita, M. Aizawa and M. Rikukawa, “*In situ* preparation of poly(L-lactic acid-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composites as artificial bone materials”, *Polymer Journal*, **47**, 164-170(2015).
- 1-7) K. Hagiwara, T. Inui, Y. Koike, M. Aizawa and T. Nakamura, “Speciation of inorganic arsenic in drinking water by wavelength-dispersive X-ray fluorescence spectrometry after in situ preconcentration with miniature solid-phase extraction disks”, *Talanta*, **134**, 739-744(2015).
- 1-8) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 107-112(2015).
- 1-9) T. Konishi, M. Honda, T. Yoshioka, S. Hayakawa and M. Aizawa, “Preparation of α -tricalcium phosphate powders surface-modified with inositol phosphate for cement fabrication”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 113-118(2015).
- 1-10) K. Yasuda, H. Ishii, M. Takahara, M. Aizawa and N. Kanzawa, “P19.CL6 cells cultured in apatite-fiber scaffold differentiate into cardiomyocyte”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 295-299(2015).
- 1-11) H. Ohsugi, J. Hatsukawa, M. Takahara, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Real-time evaluation of effects of dexamethasone on osteoblastic cells using dual fluorescence proteins”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 379-383(2015).
- 1-12) K. Kiminami, K. Matsuoka, K. Nagata, M. Honda, G. Hayashida, K. Nakano, M. Nagaya, H. Arimura, H. Nagashima and M. Aizawa, “Development of bioresorbable calcium-phosphate cements hybridized with gelatin particles and their *in vivo* evaluation using pig’s tibia model”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 397-401(2015).
- 1-13) (*8) M. Aizawa, Y. Chibu, K. Nagata, T. Konishi, K. Ishii, H. Funao, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Honda, “*In vivo* evaluation of chelate-setting cement fabricated from hydroxyapatite including bone minerals using a rabbit’s tibia model”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 402-407(2015).
- 1-14) K. Yoshioka, K. Ishii, T. Kuramoto, S. Nagai, H. Funao, H. Ishihama, Y. Shiono, A. Sasaki, M. Aizawa, Y. Okada, S. Koyasu, Y. Toyama, and M. Matsumoto, “A novel mouse model of soft-tissue infection using bioluminescence imaging allows noninvasive, real-time monitoring of bacterial growth”, *PLOS ONE*, **9**, e106367 (2014).

- 1-15) Y. Sekine, T. Ikeda-Fukazawa, M. Aizawa, R. Kobayashi, S. Chi, J. A. Fernandez-Baca, H. Yamauchi and H. Fukazawa, “Neutron Diffraction of Ice in Hydrogels”, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 13453-13457(2014). DOI: 10.1021/jp508269b
- 1-16) S. Motojima, N. Igeta, H. Muramatsu, H. Uchida, K. Itatani, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Fabrication of apatite-fiber scaffolds with enhanced mechanical property using chemical cross-linking of type I-collagen and their biocompatibility”, *J. Soc. Inorg. Mater. Jpn.*, **21**, 278-285(2014).
- 1-17) K. Yoshioka, K. Ishii, T. Kuramoto, S. Nagai, H. Funao, H. Ishihama, Y. Shiono, A. Sasaki, M. Aizawa, Y. Okada, S. Koyasu, Y. Toyama and M. Matsumoto, “A Novel Mouse Model of Soft Tissue Infection using Bioluminescence Imaging Allows Noninvasive, Real-time Monitoring of Bacterial Growth”, *PLOS ONE* (2014) on-line publication: doi:10.1371/journal.pone.0106367
- 1-18) **(*10)** H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Antibacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103A**, 57-64(2014). DOI: 10.1002/jbm.a.35157
- 1-19) 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粉碎および表面修飾を同時に行なった湿式合成水酸アパタイト粉体からのキレート硬化型セメントの作製とその材料特性”, *J. Soc. Inorg. Mater.*, **21**, 99-105 (2014).
- 1-20) **(*10)** M. Honda, Y. Kawanobe, K. Ishii, T. Konishi, M. Mizumoto, N. Kanzawa, M. Matsumoto and M. Aizawa, “*In vitro* and *in vivo* antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route”, *Mater. Sci. Engineer. C*, **33**, 5008-5018 (2013).
- 1-21) A. Nagai, T. Hattori, M. Hirose, A. Ogura, K. Nozaki, M. Aizawa and K. Yamashita, “Mouse embryonic stem cells cultured under serum- and feeder-free conditions maintain their self-renewal capacity on hydroxyapatite”, *Mater. Sci. Engineer. C*, **34**, 214-220(2014).
- 1-22) M. Nassar, N. Hiraishi, M. S. Islam, M. Aizawa, Y. Tamura, M. Otsuki, S. Kasugai, K. Ohya and J. Tagami, “The effect of phytic acid used as etchant on the bond strength, smear layer and plupal cells”, *Eur. J. Oral Sci.*, (2013) *in press*
- 1-23) 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.*, **121**, 759-765(2013).
- 1-24) T. Sato, A. Kochi, Y. Shirosaki, S. Hayakawa, M. Aizawa, A. Osaka, and M. Kikuchi, “Preparation of injectable hydroxyapatite/collagen paste using sodium alginate and influence of additives”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **121**, 775-781(2013).
- 1-25) T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, M. Aizawa, “Biodegradable β -tricalcium phosphate cement with anti-washout property based on chelate-setting mechanism of inositol phosphate”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 1383-1394(2013). (DOI: 10.1007/s10856-013-4903-8)
- 1-26) 杉山奈未, 大野達也, 國分玲子, 相澤 守, 竹岡裕子, 陸川正弘, “人工骨材料への応用を目指したポリ(L-乳酸)/水酸アパタイト複合体の *in situ* 合成”, 高分子論文集(Kobunshi Ronbunshu), **70**, 185-192(2013).
- 1-27) 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 α -tricalcium phosphate cement set by chelating capability of inositol phosphate and its biocompatibility”, *J. Nanomater.*, **2013**, 1-11(2013). Article ID 864374 (<http://dx.doi.org/10.1155/2013/864374>)
- 1-28) T. Ikeda-Fukazawa, N. Ikeda, M. Tabata, M. Hattori, M. Aizawa, S. Yunoki and Y. Sekine, “Effects of Crosslinker Density on the Polymer Network Structure in Poly-N,N-dimethylacrylamide Hydrogels”, *J. Polymer Sci. Part B: Polymer Physics*, **51**, 1017–1027(2013).
- 1-29) Z. Zhuang, H. Yoshimura and M. Aizawa, “Synthesis and ultrastructure of plate-like apatite single crystals as a model for tooth enamel”, *Mater. Sci. Engineer. C*, **33**, 2534-2540(2013).

- 1-30) 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 Biomaterialia*, **9**, 6732-6740(2013).
- 1-31) Z. Zhuang and M. Aizawa, “Protein adsorption on single-crystal hydroxyapatite particles with preferred orientation to *a(b)*- and *c*-axes”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 1211-1216(2013).
- 1-32) N. Sugiyama, Y. Yanagi, M. Y-Fujita, M. Aizawa, Y. Takeoka, and M. Rikukawa, “DNA-templated fabrication of biphasic calcium phosphate ceramics with a bimodal pore structure for tissue engineering”, *Chem. Lett.*, **42**, 465-467(2013).
- 1-33) H. Shimizu, Z. Zhuang and M. Aizawa, “Morphological Control of Hydroxyapatite Particles by Homogeneous Precipitation Method in the Co-Presence of Various Carboxylic Acids”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 61-65(2013).
- 1-34) **(*9)** M. Nakamura, Z. Zhuang and M. Aizawa, “Fabrications of Boron-Containing Apatite Ceramics via Ultrasonic Spray-Pyrolysis Route and Their Surface Properties”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 109-113(2013).
- 1-35) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Adsorption Behavior of Sodium Inositol Hexaphosphate on the Surface of Hydroxyapatite”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 161-166(2013).
- 1-36) 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 Model”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 167-172(2013).
- 1-37) M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, “*In Vitro* Biological Evaluation of Anti-Tumor Effect of the Chelate-Setting Hydroxyapatite Cement”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 173-177(2013).
- 1-38) T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa, and N. Kanzawa, “Studies on the Anti-Tumor Action of Chelate-Setting Apatite Cements”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 178-182(2013).
- 1-39) 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 Engineering Materials*, **529-530**, 183-186(2013).
- 1-40) 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 Engineering Materials*, **529-530**, 187-191(2013).
- 1-41) 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 Engineering Materials*, **529-530**, 370-373(2013).
- 1-42) Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa, “*In vitro* evaluation of silicon-containing apatite fiber scaffolds for bone tissue engineering”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 391-396(2013).
- 1-43) **(*3)** M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura, and M. Aizawa, “Reconstruction of tissue-engineered bone using an apatite-fiber scaffold, rat bone marrow cells and radial-flow bioreactor: optimization of flow rate in circulating medium”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 397-401(2013).
- 1-44) **(*5)** K. Kayashima, R. Oyama, M. Emoto, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Three-dimensional Culture of Vascular Endothelial Cells Using Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property”, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 402-406(2013).
- 1-45) 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). (DOI 10.1007/s10856-012-4834-9)
- 1-46) Z. Gao, K. Fujioka, T. Sawada, C. Zhi, D. Golberg, Y. Bando, M. Aizawa, and T. Serizawa, "Noncovalent functionalization of boron nitride nanotubes using water-soluble synthetic polymers and the subsequent preparation of superhydrophobic surfaces", *Polymer Journal*, **45**, 567-570(2013). (DOI:10.1038/pj.2012.170)

- 1-47) E. S. Thian, T. Konishi, Y. Kawanobe, P. N. Lim, C. Choong, B. Ho, and M. Aizawa, “Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 437-445(2013).
- 1-48) Z. Zhuang, H. Yamamoto and M. Aizawa, “Synthesis of plate-shaped hydroxyapatite via an enzyme reaction of urea with urease and its characterization”, *Powder Technology*, **222**, 193-200 (2012).
- 1-49) 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).
- 1-50) **(*1)** 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).
- 1-51) 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 β -tricalcium phosphate cement”, *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 59-64 (2012).
- 1-52) 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).
- 1-53) **(*2)** Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa, “Fabrication and evaluation of silicon-containing apatite fiber scaffolds for bone tissue engineering”, *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 101-104 (2012).
- 1-54) 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).
- 1-55) 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 Engineering*, **36**, 121-127(2012).
- 1-56) 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 Engineering*, **36**, 137-143(2012).
- 1-57) **(*10)** 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”, *Infection and Immunity*, **80**, 733-741(2012).
- 1-58) H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Biochemical studies of the potential anti-tumor activity of novel chelate-setting apatite cements”, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 315-319 (2012).
- 1-59) **(*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 Engineering Materials*, **493-494**, 320-324 (2012).
- 1-60) Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted hydroxyapatite and its property”, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 370-374 (2012).
- 1-61) N. Osada, Y. Shigemitsu, M. Makita, K. Oribe and M. Aizawa, “Fabrication of organic/inorganic hybrids by infiltration of commercially-available PLGA into porous hydroxyapatite ceramics and its material properties”, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 556-560 (2012).
- 1-62) **(*14)** M. Matsueda, M. Emoto and M. Aizawa, “Preparation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470”, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 672-677 (2012).
- 1-63) **(*10)** 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”, *Key Engineering Materials*, **493-494** 678-683 (2012).

- 1-64) **(*3)** M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Effect of flow rate of medium in radial-flow bioreactor on the differentiation of osteoblasts in tissue-engineered bone reconstructed using an apatite-fiber scaffold and rat bone marrow cells”, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 878-883 (2012).
- 1-65) 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 Journal of Engineering, Supplement* **1**, 595-596 (2011).
- 1-66) H. Fukano, T. Takahashi, M. Aizawa and H. Yoshimura, “Synthesis of Uniform and Dispersive Calcium Carbonate Nanoparticles in a Protein Cage through Control of Electrostatic Potential”, *Inorg. Chem.*, **50**, 6526–6532 (2011).
- 1-67) T. Yoshimi, N. Sugiyama, Y. Takeoka, M. Rikukawa, K. Oribe and M. Aizawa, “Changes of material properties of inorganic/organic hybrids fabricated by infiltration of poly(L-Lactic Acid) into open pores of porous hydroxyapatite ceramics in a simulated body fluid”, *J. Aust. Ceram. Soc.*, **47**, 18-22(2011).
- 1-68) **(*6)** M. Honda, K. Kikushima, 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).
- 1-69) T. Sawada, N. Shirakawa, Y. Hirai, M. Hasuzume, M. Aizawa and T. Serizawa, “Detection of kinase activity using a synthetic system of gold nanoparticles in HEPES buffer”, *Chem. Lett.*, **40**, 142-143(2011).
- 1-70) S. Takahashi, T. Konishi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe and M. Aizawa, “Fabrication of novel bioresorbable β -tricalcium phosphate cement on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate and its evaluation”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **119**, 35-42 (2011).
- 1-71) **(*12)** R. Saito, Y. Ishii, R. Ito, K. Nagatsuma, K. Tanaka, M. Saito, H. Maehashi, H. Nomoto, K. Ohkawa, M. Mano, M. Aizawa, H. Hano, K. Yanaga and T. Matsuura, “Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney”, *Artif. Organs*, **35**, 80-83 (2011).

2. 著書・総説, 解説等

- 2-1) **(*3)** 相澤 守, 松浦知和, 本田みちよ, “再生医療用足場材料の開発と市場：第12章 アパタイトファイバースキャフォールド”, シーエムシー出版(2016). [解説] 印刷中
- 2-2) **(*3,*4)** 相澤 守, “生体硬組織モデルとしての異方性制御アパタイト単結晶粒子の合成とその組織工学への応用”, 月刊地球(2016). 印刷中
- 2-3) 松田信之, 相澤 守, “リンを含む無機物質の種類と製造方法”, *Phosphorus Letter*, No. 84, 46-58(2015). [解説]
- 2-4) **(*10)** 相澤 守, 本田みちよ, 江本 精, “アパタイト微粒子の合成と形態制御およびバイオメディカル分野への展開”, *バイオマテリアル*, **33**, 314-321(2015). [解説]
- 2-5) 相澤 守, 小西敏功, 本田みちよ, 松本守雄, “キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの生体吸収性と *in vitro* 溶解性との関連性 —JIS T 0330-3「生体活性バイオセラミックス 第3部：溶解速度試験方法」による検証—”, *無機マテリアル*, **22**, 220-229(2015). [解説]
- 2-6) **(*2, *3)** 相澤 守, 松浦知和, 本田みちよ, “三次元ティッシュエンジニアリング；第1編 第2章 第9節 硬組織のためのスキャフォールド”, *NTS*(2015)p.103-112.
- 2-7) 相澤 守, “バイオセラミックスの複合化：コーティングによるアプローチ”, *Phosphorus Letter*, No. 81, 41-51(2014). [解説]
- 2-8) 相澤 守, 庄 志, “異方性を制御した水酸アパタイト単結晶粒子の創製とそのタンパク質吸着特性”, *Phosphorus Letter*, No. 79, 19-26(2014). [解説]
- 2-9) **(*3, *12)** 相澤 守, 松浦知和, “動物細胞の培養を成功させる条件設定集；第2章 第4節 4項「ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた三次元培養」”, 技術情報協会(2014)p.217-223.
- 2-10) 相澤 守, “特集 先端セラミックス：バイオセラミックス”, *PETROTECH*, **37**, 161-164(2014).

- 2-11) 相澤 守, 庄 志, “異方性を制御した水酸アパタイト単結晶粒子の創製とそのタンパク質吸着特性”, *Phosphorus Letter*, No. 79, 19-26(2014). [解説]
- 2-12) 相澤 守, “特集 先端セラミックス: バイオセラミックス”, *PETROTECH*, **37**, 161-164(2014).
- 2-13) 相澤 守, “アパタイトの魅力 –これまでの20年とこれからの20年–”, *バイオマテリアル*, **31**, 207-208(2013). (巻頭言)
- 2-14) (*3) M. Aizawa, T. Matsuura, and Z. Zhuang, “Syntheses of single-crystal apatite particles with preferred orientation to *a*- and *c*-axes as models for hard tissue and their applications”, *Biol. Pharm. Bull.*, **36**, 1654-1661 (2013). (Invited Review)
- 2-15) 相澤 守, 古菌 勉, “人工材料 (無機材料)”, *人工臓器*, **41**, 207-211(2012).
- 2-16) 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).
- 2-17) 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).
- 2-18) (*10) 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).
- 2-19) (*4) 松浦知和, 斉藤良太, 石井雄二, 吉川 輝, 相澤 守, “バイオセラミックスを用いた肝再生 - 移植用バイオ人工肝臓の作製をめざして -”, *無機マテリアル*, **19**, 462-465(2012).
- 2-20) (*4) T. Matsuura and M. Aizawa, “26 Bioceramics for development of bioartificial liver”, *Polymeric Biomaterials: Medicinal and Pharmaceutical Applications, Volume 2* (2012) pp. 691-713.
- 2-21) 相澤 守, 小西敏功, 松本守雄, “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).
- 2-22) 相澤 守, 庄志, “配向性アパタイト単結晶粒子の合成とそのタンパク質吸着特異性”, *Colloid & Interface Communication*, **37**, 29-31(2011).
- 2-23) 生体関連材料部会 (小川哲朗, 相澤守, 菊池正則, 宮路史明), “生体間材料分野の発展”, *セラミックス*, **46**, 1054-1060(2011).
- 2-24) 相澤 守, 庄志, “配向性アパタイトの超微細構造観察-なぜ、人は体の部位により異なる配向性を備えたアパタイトを選んでいるのか?”, *未来材料*, **11**, 2-5(2011).

3. 特許

- 3-1) 相澤 守・中村まり子・山田清貴・永井重徳、特願 2014-192763、細胞培養基材、細胞培養基材の製造方法、細胞培養方法、及び細胞培養装置、学校法人 明治大学(出願日 2014年9月22日)
- 3-2) 谷 俊彦・相澤 守・石田明祐、特願 2014-115232、板状リン酸化合物粒子、それを含む板状リン酸化合物粉体、及び、板状リン酸化合物粉体の製造方法、株式会社 豊田中央研究所・学校法人 明治大学(出願日 2014年6月3日)
- 3-3) 木南啓司・有村英俊・相澤 守・水本みのり・小西敏功、特願 2013-167002、生体吸収性セメントおよびその製造方法、グンゼ株式会社・学校法人 明治大学・公益財団法人 神奈川科学技術アカデミー(出願日 2013年8月9日)
- 3-4) 相澤 守・小西敏功・水本みのり、特願 2012-230511、ハイドロキシアパタイト組成物及びそれから成る骨又は歯充填材、財団法人神奈川科学技術アカデミー(出願日 2012年10月18日)
- 3-5) 相澤守・清水秀樹・庄志・猪股義彦、特願 2012-231346、球状水酸アパタイト及びその製造方法、学校法人明治大学・太平洋化学産業株式会社 (2012年10月19日)
- 3-6) 本田みちよ・相澤 守、特願 2012-026921、抗菌性材料、財団法人神奈川科学技術アカデミー (出願日 2012年2月10日)
- 3-7) 相澤 守・小西敏功・水本みのり・高橋周平、特願 2011-260177、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、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 (出願日 2011年11月29日)
- 3-8) 相澤 守・高橋周平・小西敏功、特願 2011-98674 (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、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4月26日)

4. 新聞発表

- 4-1) 2012年2月8日；日経産業新聞に研究成果掲載（抗菌性人工骨 低コストで）
- 4-2) 2012年3月22日；日経産業新聞に研究成果掲載（人工骨 ペースト状材料）
- 4-3) 2012年9月11日；日経産業新聞に研究成果掲載（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）
- 4-4) 2012年9月12日；化学工業日報に研究成果掲載（サケ由来のたんぱく質利用 新規抗菌性材料を創製）
- 4-5) 2013年9月20日；化学工業日報に研究成果掲載（ペースト状の人工骨 短時間で硬化 骨粗しょう症などに）
- 4-6) 2014年12月5日；日経産業新聞に研究成果掲載（立体的な肝臓作製）
- 4-6) 2015年3月13日；化学工業日報に研究成果掲載（ペースト状人工骨 血中介在時に硬化）

5. 学会発表

- 5-1) **(*8)** 横田倫啓・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“骨ミネラル含有アパタイト粉体から作製した多孔質セラミックスの *in vitro* および *in vivo* 吸収性評価”、無機マテリアル学会 第130回 学術講演会、千葉県習志野市 日本大学生産工学部津田沼校舎、無機マテリアル学会、2015.6.4-5
- 5-2) 間 暁啓・永田幸平・本田みちよ・相澤 守、“種々のリン酸カルシウムを用いたキレート硬化型骨修復セメントの作製とその *in vitro* 溶解性評価”、無機マテリアル学会 第130回 学術講演会、千葉県習志野市 日本大学生産工学部津田沼校舎、無機マテリアル学会、2015.6.4-5
- 5-3) 内村祐太・宮澤雄太・中村まり子・本田みちよ・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による株化軟骨細胞 ATDC5 の三次元培養とその生物学的評価”、無機マテリアル学会 第130回 学術講演会、千葉県習志野市 日本大学生産工学部津田沼校舎、無機マテリアル学会、2015.6.4-5
- 5-4) 永田幸平・小西敏功・本田みちよ・相澤 守、“インジェクタブルキレート硬化型β-リン酸三カルシウムセメントの材料特性”、日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム、富山大学 五福キャンパス、日本セラミックス協会、2015.9.16-18
- 5-5) 佐藤 平・城崎由紀・相澤 守・菊池正紀、“3-グリンドキシプロピルトリメトキシシランを用いた水酸アパタイト/コラーゲンペーストの *in vitro* 細胞毒性評価”、日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム、富山大学 五福キャンパス、日本セラミックス協会、2015.9.16-18
- 5-6) **(*9)** 山田清貴・中村まり子・永井重徳・本田みちよ・相澤 守、“イノシトールリン酸を表面修飾した水酸アパタイトセラミックス上で培養したマウス脾臓由来免疫細胞の形態観察”、日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム、富山大学 五福キャンパス、日本セラミックス協会、2015.9.16-18
- 5-7) 森 祐貴・本田みちよ・相澤 守、“c面を多く露出した板状アパタイトのCa/P比の制御”、日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム、富山大学 五福キャンパス、日本セラミックス協会、2015.9.16-18
- 5-8) 沢田知也・永田幸平・本田みちよ・長屋昌樹・中野和明・浅野吉則・長嶋比呂志・木南啓司・有村英俊・相澤 守、“気孔形成剤としてゼラチン粒子を添加した生体吸収性β-リン酸三カルシウムセメントの材料特性とその骨形成能”、日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム、富山大学 五福キャンパス、日本セラミックス協会、2015.9.16-18
- 5-9) **(*10)** 鶴見秀平・本田みちよ・石井 賢・松本守雄・相澤 守、“二極化した細孔構造をもつ水酸アパタイト多孔質セラミックスへのイノシトールリン酸の表面修飾および銀イオンの固定化による抗菌性付与”、日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム、富山大学 五福キャンパス、日本セラミックス協会、2015.9.16-18
- 5-10) 井ヶ田一貴・永井亜希子・相澤 守・山下 仁大、“水酸アパタイトおよび炭酸含有アパタイトに対するマクロファージ接着が引き起こす生体反応の相違”、第25回無機リン化学討論会、山形大学 米沢キャンパス、日本無機リン化学会、2015.9.28-29（第12回 若手優秀発表賞）
- 5-11) 玉澤成記・本田みちよ・相澤 守、“電子線後方散乱回折法による異方性制御アパタイトセラミックスの微細構造観察”、第25回無機リン化学討論会、山形大学 米沢キャンパス、日本無機リン化学会、2015.9.28-29

- 5-12) 石田明祐・本田みちよ・相澤 守、”六角板状 α -リン酸ストロンチウムをテンプレートとした異方性制御 β -リン酸三カルシウムセラミックスの作製とその評価”、第25回無機リン化学討論会、山形大学 米沢キャンパス、日本無機リン化学会、2015.9.28-29
- 5-13) 並木亮太・陶山拓也・伊澤千尋・本田みちよ・深澤倫子・渡邊友亮・相澤 守、”水酸アパタイトに導入された窒素の分光学的手法による化学状態の検討”、第25回無機リン化学討論会、山形大学 米沢キャンパス、日本無機リン化学会、2015.9.28-29
- 5-14) (*3) 鈴木 来・本田みちよ・相澤 守、”間葉系幹細胞を培養したアパタイトファイバースキャフォールドのラット背部皮下埋入による生体内反応”、第25回無機リン化学討論会、山形大学 米沢キャンパス、日本無機リン化学会、2015.9.28-29 (第12回 若手優秀発表賞)
- 5-15) (*8) T. Yokota, M. Honda, M. Aizawa, “*In vitro* solubility of porous ceramics fabricated from hydroxyapatite powders including bone minerals”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (27 Bioceramics), Bali, Indonesia, 27th-29th, October, 2015
- 5-16) (*2) T. Inui, Y. Kinoshita, K. Nakano, Y. Asano, H. Matsunari, M. Nagaya, M. Honda, H. Nagashima and M. Aizawa, “Fabrication of Silicon-containing Apatite Fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property and their Bone-forming Ability in Hard and Soft Tissues”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (27 Bioceramics), Bali, Indonesia, 27th-29th, October, 2015
- 5-17) T. Sato, Y. Shirotsuki, M. Aizawa, M. Kikuchi, “Physical Property and Cytotoxicity of Hydroxyapatite/Collagen Paste with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (27 Bioceramics), Bali, Indonesia, 27th-29th, October, 2015
- 5-18) (*9) K. Yamada, M. Nakamura, S. Nagai, M. Honda, M. Aizawa, “Morphological Observation of Immune Cells Derived from Mouse Spleen to Hydroxyapatite Ceramics Surface-modified with Inositol Phosphate”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (27 Bioceramics), Bali, Indonesia, 27th-29th, October, 2015
- 5-19) N. Kanzawa, H. Takano, K. Yasuda, M. Takahara, M. Aizawa, “Studies on connexin 43, a gap-junction protein, in P19 embryonal carcinoma cells after culture on an apatite fiber scaffold”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (27 Bioceramics), Bali, Indonesia, 27th-29th, October, 2015
- 5-20) T. Sawata, K. Nagata, M. Honda, M. Nagaya, Y. Asano, K. Kiminami, H. Arimura, H. Nagashima, M. Aizawa, “*In Vivo* Evaluation of Bioresorbable β -tricalcium phosphate Cements with Pore-forming Agents Using a Pig Tibia Model”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (27 Bioceramics), Bali, Indonesia, 27th-29th, October, 2015
- 5-21) (*1,*7) 伊藤賢人・鴈本拓也・長田直生・中野和明・浅野吉則・長屋昌樹・松成ひとみ・本田みちよ・織部一弥・長嶋比呂志・相澤 守、”気孔構造を精密制御した多孔質水酸アパタイトセラミックスの生体内反応”、無機マテリアル学会 第131回 学術講演会、愛知県 名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会、2015.11.5-6 (無機マテリアル学会講演奨励賞)
- 5-22) (*13) 安田沙織・本田みちよ・長屋昌樹・浅野吉則・中野和明・長嶋比呂志・相澤 守、”筋および脂肪組織埋入による血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの組織学的評価”、無機マテリアル学会 第131回 学術講演会、愛知県 名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会、2015.11.5-6 (無機マテリアル学会講演奨励賞)
- 5-23) (*2) 乾 鷹羽・木下友花里・中野和明・浅野吉則・松成ひとみ・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、”高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの骨芽細胞による *in vitro* 評価”、無機マテリアル学会 第131回 学術講演会、愛知県 名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会、2015.11.5-6
- 5-24) 森 祐貴・本田みちよ・相澤 守、”c面を多く露出した板状アパタイトの粉体性状およびその加熱変化”、無機マテリアル学会 第131回 学術講演会、愛知県 名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会、2015.11.5-6
- 5-25) 西形慧太・永田幸平・本田みちよ・織部一弥・相澤 守、”ケイ素を含有した β -リン酸三カルシウム粉体の合成とキレート硬化型セメントへの応用”、無機マテリアル学会 第131回 学術講演会、愛知県 名古屋市 愛知県産業労働センター、無機マテリアル学会、2015.11.5-6

- 5-26) **(*1,*7)** 伊藤賢人・鴈本拓也・長田直生・中野和明・浅野吉則・長屋昌樹・織部一弥・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“気孔構造を精密制御した多孔質β-リン酸三カルシウムセラミックスの骨形成能”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10 (ハイライト講演に選定)
- 5-27) 永田幸平・小西敏功・本田みちよ・相澤 守、“生体吸収性β-リン酸三カルシウムセメントの創製と材料特性”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-28) 横田倫啓・本田みちよ・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法によるカリウム置換アパタイトセラミックスの作製とその材料特性”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-29) 間 暁啓・永田幸平・本田みちよ・相澤 守、“異なる溶解性をもつキレート硬化型リン酸カルシウムセメントの細胞毒性”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-30) 富田祐樹・相澤 守・神澤信行、“Apatite-fiber scaffold 上で培養した骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞のインテグリン発現パターンの解析”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-31) **(*10)** 鶴見秀平・本田みちよ・高山知士・中島武彦・石井 賢・松本守雄・相澤 守、“アパタイト/コラーゲン多孔体への銀イオンの固定化とその抗菌性”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-32) **(*11)** 本田みちよ・相澤 守、“三次元培養スキャフォールドを用いた骨組織再生における血管内皮細胞と骨芽細胞の関係”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-33) **(*1)** 鈴木 来・本田みちよ・相澤 守、“間葉系幹細胞を培養した多孔質足場材料のラット背部皮下埋入による生物学的評価”、第37回日本バイオマテリアル学会大会、京都市 京都テルサ、日本バイオマテリアル学会、2015.11.9-10
- 5-34) K. Nagata, M. Honda, T. Konishi and M. Aizawa, “Development of Injectable Chelate-setting β-tricalcium Phosphate Cements with Anti-washout Property and Their Material Properties”, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), Tokyo, Japan, 9th-11th, December, 2015
- 5-35) T. Yokota, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of Potassium-substituted Hydroxyapatite Ceramics by Ultrasonic Spray-pyrolysis Technique and Their Material Properties”, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), Tokyo, Japan, 9th-11th, December, 2015
- 5-36) T. Sato, Y. Shirotsaki, M. Aizawa, M. Kikuchi, “Influence of (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane concentration on hydroxyapatite/collagen bone paste”, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), Tokyo, Japan, 9th-11th, December, 2015
- 5-37) **(*10)** S. Tsurumi, M. Honda, T. Takayama, T. Nakajima, K. Ishii, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Immobilization of silver ions to porous hydroxyapatite/collagen composites and its anti-bacterial activity”, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), Tokyo, Japan, 9th-11th, December, 2015 (**Best Student SCMBB Award 受賞**)
- 5-38) **(*11)** M. Honda, and M. Aizawa, “Enhancement of osteogenesis in coculture of endothelial cells and osteoblasts in three-dimensional apatite-fiber scaffold”, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), Tokyo, Japan, 9th-11th, December, 2015
- 5-39) **(*4)** K. Suzuki, K. Nagata, T. Yokota, M. Honda, M. Aizawa, “Histological evaluations of apatite-fiber scaffold cultured with mesenchymal stem cells by implantation at rat subcutaneous tissue”, 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), Tokyo, Japan, 9th-11th, December, 2015
- 5-40) **(*5)** S. Yasuda, M. Honda, M. Nagaya, Y. Asano, K. Nakano, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Fabrication of vascular endothelial growth factor-loaded apatite-fiber scaffolds with enhanced mechanical property and their biological evaluation”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015

- 5-41) K. Igeta, K. Nozaki, M. Aizawa, K. Yamashita, and A. Nagai, “Comparison of cytokines secretions from macrophage cultured on hydroxyapatite and carbonated apatite dense ceramics”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015
- 5-42) K. Nagata, M. Honda, T. Konishi, and M. Aizawa, “Development of injectable chelate-setting β -tricalcium phosphate cement with non-fragmentation property and their material characteristics”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015
- 5-43) K. Hazama, K. Nagata, M. Honda, and M. Aizawa, “Novel chelate-setting cements with various calcium-phosphate phases for minimally-invasive treatment of bone disease: processing, material property, in vitro solubility, and biocompatibility”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015
- 5-44) A. Ishida, A. Suzumura, Y. Kishida, T. Tani, and M. Aizawa, “Fabrication of strontium fluoroapatite ceramics by reactive-templated grain growth method using hexagonalshaped tristrontium phosphate particles”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015
- 5-45) (*14) M. Aizawa, S. Yabu, K. Yano, M. Matsueda, M. Honda, and M. Emoto, “Novel chemoembolization on the basis of porous calcium-phosphate microspheres prepared by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015
- 5-46) R. Namiki, R. Umeda, R. Hashimoto, C. Izawa, M. Nakamura, M. Honda, T. Watanabe, and M. Aizawa, “Cellular responses of osteoblasts to nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics: cell attachment, proliferation, morphology, differentiation and calcification”, Pacificchem 2015, Hawaii convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December, 2015
- 5-47) 永田幸平・本田みちよ・小西敏功・相澤 守、“インジェクタブルキレート硬化型生体吸収性 β -リン酸三カルシウムセメントの材料特性”、2016 年年会、東京、早稲田大学、日本セラミックス協会、2016.3.14-16
- 5-48) 横田倫啓・本田みちよ・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法により合成したカリウム置換アパタイト粉体からのセラミックスの作製とその評価”、2016 年年会、東京、早稲田大学、日本セラミックス協会、2016.3.14-16
- 5-49) 佐藤 平・城崎由紀・長屋昌樹・浅野吉則・中野和明・長嶋比呂志・相澤 守・菊池正紀、“水酸アパタイト/コラーゲン-GPTMS 系自己硬化型ペーストの生物学的評価”、2016 年年会、東京、早稲田大学、日本セラミックス協会、2016.3.14-16
- 5-50) (*11) 本田みちよ・相澤 守、“アパタイトファイバースキャフォールドにおける骨芽細胞と血管内皮細胞の局在”、2016 年年会、東京、早稲田大学、日本セラミックス協会、2016.3.14-16 (トピックス講演に選定)
- 5-51) 永田幸平・本田みちよ・小西敏功・相澤 守、“キレート硬化型 β -リン酸三カルシウムセメントの Non-fragmentation の検証とその材料評価”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学 津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20 (トピックス講演に選定)
- 5-52) 佐藤 平・城崎由紀・相澤 守・菊池正紀、“3-グリンドキシプロピルトリメトキシシランを用いた水酸アパタイト/コラーゲン骨ペーストの作製”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学 津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20
- 5-53) 石田明祐・鈴村彰敏・堀 茂雄・谷 俊彦・相澤 守、“水熱法による針状ストロンチウムフッ素アパタイトの合成とその配向焼結”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学 津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20
- 5-54) 石田明祐・鈴村彰敏・中野秀之・谷 俊彦・相澤 守、“六角板状リン酸三ストロンチウム粒子をテンプレートとした反応性テンプレート成長法によるストロンチウムフッ素アパタイト焼結体の作製”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学 津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20
- 5-55) 鈴村彰敏・岸田佳大・中野秀之・谷 俊彦・石田明祐・相澤 守、“板状 α -リン酸三ストロンチウムより作製したアパタイトセラミックスの配向過程の分析”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学 津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20

- 5-56) 相澤 守、“生体硬組織モデルを指向した異方性制御アパタイト単結晶粒子の合成とその組織工学への応用”、第9回 バイオミネラリゼーションワークショップ、東京大学 柏キャンパス、東京大学大気海洋研究所共同利用研究集会・バイオミネラリゼーションワークショップ実行委員会、2014.12.12-13 (招待講演)
- 5-57) (*8) 安田沙織・中村まり子・本田みちよ・相澤 守、“血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの作製とその *in vitro* 評価”、第23回 アパタイト研究会、富山県 富山県民共生センター、日本アパタイト研究会、2014.12.11-12
- 5-58) 石田明祐・鈴木彰敏・堀 茂雄・谷 俊彦・相澤 守、“水熱法による針状ストロンチウムフッ素アパタイトの合成とその配向焼結”、第23回 アパタイト研究会、富山県 富山県民共生センター、日本アパタイト研究会、2014.12.11-12
- 5-59) (*12) 中村まり子・本田みちよ・前橋はるか・相澤 守・松浦知和、“アパタイトファイバースキャフォールドを用いた再生肝オルガノイドの構築とその肝機能”、第23回 アパタイト研究会、富山県 富山県民共生センター、日本アパタイト研究会、2014.12.11-12
- 5-60) 佐藤 平・N. V. L. Manchinasetty・相澤 守・菊池正紀、“アルギン酸ナトリウムとカルシウム化合物を利用した pH 制御可能な自己硬化型水酸アパタイト/コラーゲンペーストの細胞適合性”、第23回 アパタイト研究会、富山県 富山県民共生センター、日本アパタイト研究会、2014.12.11-12
- 5-61) 永田幸平・小西敏功・本田みちよ・相澤 守、“キレート硬化型β-リン酸三カルシウムセメントの血液中での Non-fragmentation の検証”、第18回 生体関連セラミックス討論会、大阪府立大学 I-site なんば、日本セラミックス協会 生体関連材料部会、2014.12.5 (最優秀発表賞)
- 5-62) 小林慧太・中島佑亮・永田幸平・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“キレート硬化型ケイ素含有アパタイトセメントの *in vivo* 評価”、第18回 生体関連セラミックス討論会、大阪府立大学 I-site なんば、日本セラミックス協会 生体関連材料部会、2014.12.5
- 5-63) 佐藤 平・N. V. L. Manchinasetty・相澤 守・菊池正紀、“アルギン酸ナトリウムとカルシウム化合物による非崩壊性ハイドロキシアパタイトコラーゲンペーストの *in vitro* 評価”、第22回 顎顔面バイオメカニクス学会大会、(株)UK デンタル長崎店、顎顔面バイオメカニクス学会、2014.11.22-23
- 5-64) (*7) 伊藤賢人・鴈本拓也・長田直生・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・織部一弥・長嶋比呂志・相澤 守、“二極化した気孔構造を備えた水酸アパタイトおよびβ-リン酸三カルシウムセラミックスの生体内反応”、無機マテリアル学会 第129回 学術講演会、佐賀県佐賀市 アバンセ、無機マテリアル学会、2014.11.20-21
- 5-65) 永田幸平・小西敏功・本田みちよ・相澤 守、“Non-fragmentation を担保したキレート硬化型β-リン酸三カルシウムセメントの材料特性”、無機マテリアル学会 第129回 学術講演会、佐賀県佐賀市 アバンセ、無機マテリアル学会、2014.11.20-21
- 5-66) (*7) 乾 鷹羽・木下友花里・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“ケイ素含有アパタイトファイバーによる高強度化スキャフォールドの作製とその骨形成能”、無機マテリアル学会 第129回 学術講演会、佐賀県佐賀市 アバンセ、無機マテリアル学会、2014.11.20-21
- 5-67) (*14) 藪 翔太郎・江本 精・中村まり子・本田みちよ・相澤 守、“表面にナノポアを備えたアパタイト中空微小球の調製とその薬剤徐放特性”、無機マテリアル学会 第129回 学術講演会、佐賀県佐賀市 アバンセ、無機マテリアル学会、2014.11.20-21
- 5-68) (*7) 伊藤 賢人・鴈本拓也・長田直生・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・織部一弥・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“多孔質リン酸カルシウムセラミックスの筋および脂肪組織埋入による骨誘導能の検証”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18
- 5-69) (*8) 横田倫啓・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とその *in vivo* 評価”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18
- 5-70) (*7) 乾 鷹羽・木下友花里・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの骨誘導能と骨伝導能の検証”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18

学会、2014.11.17-18

- 5-71) 小林慧太・中島佑亮・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・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ブタ脛骨埋入による *in vivo* 評価”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18
- 5-72) 沢田知也・永田幸平・本田みちよ・長屋昌樹・林田豪太・中野和明・木南啓司・有村英俊・長嶋比呂志・相澤 守、“気孔形成剤を添加した生体吸収性 β -リン酸三カルシウムセメントの *in vivo* 評価”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18 (ハイライト講演に選定)
- 5-73) (*11) 本田みちよ・中村まり子・相澤 守、“三次元培養スキャフォールドを用いた血管新生制御による骨組織の再生”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18
- 5-74) (*14) 藪 翔太郎・中村まり子・本田みちよ・江本 精・相澤 守、“表面にナノポアを備えたアパタイト中空微小球の調製とそのドキシフルリジン徐放特性”、第36回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18
- 5-75) K. Igeta, A. Nagai, M. Aizawa, K. Yamashita, “The effects of carbonated hydroxyapatite on macrophage behaviors”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-76) (*8) T. Yokota, T. Miki, M. Honda, M. Aizawa, “Fabrication of porous ceramics from hydroxyapatite powders including bone minerals and their material properties”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-77) (*9) K. Yamada, M. Nakamura, S. Nagai, M. Honda, M. Aizawa, “Cellular responses of immune cells derived from mouse spleen to hydroxyapatite ceramics surface-modified with inositol phosphate”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-78) T. Konishi, M. Honda, T. Yoshioka, S. Hayakawa, M. Aizawa, “Preparation of α -tricalcium phosphate powders surface-modified with inositol phosphate for cement fabrication”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-79) (*6) H. Ohsugi, J. Hatsukawa, M. Takahara, M. Aizawa, N. Kanzawa, “Real-time evaluation of effects of dexamethasone on osteoblastic cells using dual fluorescence proteins”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-80) K. Yasuda, H. Ishii, M. Takahara, M. Aizawa and N. Kanzawa, “P19.CL6 cells cultured in apatite-fiber scaffold differentiate into cardiomyocyte”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-81) (*10) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda, M. Aizawa, “Development of anti-bacterial calcium-phosphate cements consisting of β -tricalcium phosphate and silver-containing hydroxyapatite and their cytotoxicity”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-82) (*8) M. Aizawa, Y. Chibu, K. Nagata, T. Konishi, K. Ishi, H. Funao, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Honda, “*In vivo* evaluation of chelate-setting cement fabricated from hydroxyapatite including bone minerals using a rabbit’s tibia model”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.

- 5-83) K. Kiminami, K. Matsuoka, K. Nagata, M. Honda, G. Hayashida, K. Nakano, M. Nagaya, H. Arimura, H. Nagashima, M. Aizawa, “Development of bioresorbable calcium-phosphate cements hybridized with gelatin particles and their *in vivo* evaluation using pig’s tibia model”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.
- 5-84) T. Sato, N. V. L. Manchinasetty, M. Aizawa, M. Kikuchi, “*In vitro* evaluation of hydroxyapatite/collagen anti-decay paste using sodium alginate and calcium compounds”, 14th Asian BioCeramics Symposium (ABC2014), Shanghai, China, 28th-30th, October 2014.
- 5-85) 相澤 守、“セラミックスの使われ方：バイオセラミックス”、長野県ファイナセラミックス技術研究会 第2回 研究会、長野県工業技術総合センター、長野県ファイナセラミックス技術研究会、2014.10.1 (依頼講演)
- 5-86) 井ヶ田一貴・永井亜希子・相澤 守・山下仁大、“炭酸含有アパタイトの合成とマクロファージ接着に与える影響”、第24回 無機リン化学討論会、高知県高知市 高知会館、日本無機リン化学会、2014.9.25-26
- 5-87) (*8) 横田倫啓・林田豪太・中野和明・長屋昌樹・本田みちよ・長嶋比呂志・相澤 守、“骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とその *in vivo* 評価”、第24回 無機リン化学討論会、高知県高知市 高知会館、日本無機リン化学会、2014.9.25-26 (第11回 若手優秀発表賞)
- 5-88) (*9) 山田清貴・中村まり子・永井重徳・本田みちよ・相澤 守、“イノシトールリン酸を表面修飾した水酸アパタイトセラミックスに対するマウス脾臓由来免疫細胞の応答性”、第24回 無機リン化学討論会、高知県高知市 高知会館、日本無機リン化学会、2014.9.25-26
- 5-89) 清水友亮・中村まり子・本田みちよ・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法によるマグネシウム置換アパタイトセラミックスの作製および骨芽細胞を用いた *in vitro* 評価”、第24回 無機リン化学討論会、高知県高知市 高知会館、日本無機リン化学会、2014.9.25-26
- 5-90) 相澤 守、“異方性制御アパタイトの創製とその応用に関する研究”、第24回 無機リン化学討論会、高知県高知市 高知会館、日本無機リン化学会、2014.9.25-26 (学会賞受賞者講演：学術賞)
- 5-91) 永田幸平・本田みちよ・小西敏功・林田豪太・長屋昌樹・長嶋比呂志・相澤 守、“非崩壊性を担保したキレート硬化型β-リン酸三カルシウムセメントの *in vivo* 評価”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11
- 5-92) 沢田知也・永田幸平・本田みちよ・長屋昌樹・林田豪太・木南啓司・有村英俊・長嶋比呂志・相澤 守、“気孔形成剤を添加した生体吸収性β-リン酸三カルシウムセメントの材料特性とその生物学的評価”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11
- 5-93) 佐藤 平・N. V. L. Manchinasetty・相澤 守・菊池正紀、“アルギン酸ナトリウムとカルシウム化合物を用いたアパタイト/コラーゲンペーストの *in vitro* 評価”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11
- 5-94) 内村祐太・宮澤雄太・中村まり子・本田みちよ・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を用いて三次元培養した株化軟骨細胞 ATDC5 細胞の増殖と分化”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11
- 5-95) 相澤 守・梅田 遼・中村まり子・並木亮太・奥村 慧・伊澤千尋・本田みちよ・渡邊友亮、“窒素ドーピング水酸アパタイトセラミックスの *in vitro* 評価”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11
- 5-96) (*11) 本田みちよ・中村まり子・相澤 守、“アパタイトファイバースキャフォールドにおける血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11 (特定セッション若手優秀発表賞)
- 5-97) 吉川 輝・中村まり子・前橋はるか・松本喜弘・相澤 守・松浦知和、“ラジアルフロー型バイオリアクターを利用したヒト血漿蛋白質生産系の構築 -ヒトアルブミン生産系の検討-”、第32回日本ヒト細胞学会学術集会、東京慈恵会医科大学、日本ヒト細胞学会、2014.8.30-31
- 5-98) (*12) 中村まり子・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装填したラジアルフロー型バイオリアクターによる肝細胞・肝星細胞・内皮細胞の三

次元共培養”、第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会、東京慈恵会医科大学、日本ヒト細胞学会、2014.8.30-31

- 5-99) K. Nagata, T. Konishi, M. Honda, M. Nagaya, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Biological evaluation of chelate setting β -tricalcium phosphate cement with anti-washout property using pig tibia model”, International Union of Materials Research – The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan, 24th-30th, August 2014.
- 5-100) T. Sato, M. Aizawa and M. Kikuchi, “Influence of excess supplementation of calcium compound on injectable hydroxyapatite/collagen paste using sodium alginate”, International Union of Materials Research – The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan, 24th-30th, August 2014.
- 5-101) T. Konishi, K. Nagata, M. Honda, S. Hayakawa, and M. Aizawa, “Creation of β -tricalcium phosphate cement with anti-washout property using chelating ability of inositol phosphate and its evaluation”, International Union of Materials Research – The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan, 24th-30th, August 2014.
- 5-102) (*14) M. Aizawa, H. Yoshihisa, Y. Naganuma, B. Chojiamts, K. Yano and M. Emoto, “Effect of particles sizes on anti-tumorigenesis of biodegradable calcium-phosphate hollow microsphere loaded with anti-angiogenic agent”, International Union of Materials Research – The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan, 24th-30th, August 2014.
- 5-103) Y. Uchimura, Y. Miyazawa, M. Nakamura, M. Honda and M. Aizawa, “Proliferation and differentiation of chondrocyte-like ATDC5 cells three-dimensionally cultured on/in apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property”, International Union of Materials Research – The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan, 24th-30th, August 2014.
- 5-104) 石田明祐・庄 志・谷 俊彦・相澤 守、“水熱法による六角板状 α -リン酸ストロンチウムの合成とそのキャラクタリゼーション”、無機マテリアル学会 第 128 回 学術講演会、日本大学理工学部（駿河台校舎）、無機マテリアル学会、2014.6.5-6
- 5-105) (*6) 本田みちよ・中村まり子・松成ひとみ・長嶋比呂志・相澤 守、“アパタイトファイバースキャフォールドにおけるクサビラオレンジブタ由来間葉系幹細胞の骨分化に関する研究”、無機マテリアル学会 第 128 回 学術講演会、日本大学理工学部（駿河台校舎）、無機マテリアル学会、2014.6.5-6
- 5-106) (*10) 柿沼祐亮・石井 賢・石濱寛子・本田みちよ・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守、“イノシトールリン酸のキレート能を利用した銀担持アパタイトによる抗菌性 PEEK インプラントの創製とその生体適合性”、無機マテリアル学会 第 128 回 学術講演会、日本大学理工学部（駿河台校舎）、無機マテリアル学会、2014.6.5-6
- 5-107) 相澤 守、“バイオマテリアルとしてのセラミックス（合成・物性解析・応用）”、日本バイオマテリアル学会 第 2 回セミナー バイオマテリアルの基礎講座、東京医科歯科大学、日本バイオマテリアル学会、2014.5.9（依頼講演）
- 5-108) (*10) 柿沼祐亮・石井 賢・石濱寛子・本田みちよ・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守、“イノシトールリン酸のキレート能を利用した銀担持アパタイトによる抗菌性インプラントの創製とその生体適合性”、日本セラミックス協会 2014 年年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、日本セラミックス協会、2014.3.17-19（2014 年年会優秀ポスター発表賞）
- 5-109) 清水友亮・本田みちよ・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法によるマグネシウム置換アパタイトセラミックスの作製および骨芽細胞を用いた *in vitro* 評価”、日本セラミックス協会 2014 年年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、日本セラミックス協会、2014.3.17-19
- 5-110) 本田みちよ・中村まり子・相澤 守、“アパタイトファイバースキャフォールドにおける骨分化過程の解析”、日本セラミックス協会 2014 年年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、日本セラミックス協会、2014.3.17-19
- 5-111) 佐藤平・相澤 守・菊池正紀、“アルギン酸ナトリウムを用いたインジェクタブルアパタイト/コーゲンペーストの物性に与えるクエン酸カルシウム過剰添加の効果”、日本セラミックス協会 2014 年年会、慶応義塾大学日吉キャンパス、日本セラミックス協会、2014.3.17-19
- 5-112) H. Shimizu, Z. Zhuang, Y. Inomata, S. Nakagawa, N. Matsuda and M. Aizawa, “ Synthesis of hydroxyapatite particles by homogeneous precipitation method in the citric acid and phase changes during

- heating”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-113) Vivian L. Hsieh, H. Kakinuma and M. Aizawa, “Formation of apatite film on Ti-6Al-4V and Co-Cr substrates by soft solution process and immobilization of Ag⁺ ions on their surface using an inositol phosphate for anti-bacterial medical device”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-114) **(*10)** Cheolwoo Oh, H. Kakinuma, M. Honda, T. Hoshikawa, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “*In vitro* evaluation of novel anti-bacterial Ti implant fabricated via fixation of silver ions on hydroxyapatite films surface-modified with inositol phosphate route”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-115) K. Nagata, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “DEVELOPMENT OF INJECTABLE CHELATE-SETTING β -TRICALCIUM PHOSPHATE CEMENTS AND THEIR MATERIAL PROPERTIES”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-116) **(*10)** H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “Fabrication of anti-bacterial polyetheretherketone implants immobilized with Ag⁺ ion on the basis of chelate-bonding ability of inositol phosphate and their material properties”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-117) **(*13)** K. Kayashima, R. Oyama, M. Emoto, T. Matsuura, Y. Arai, M. Nagaya, H. Nagashima and M. Aizawa, “*In vitro* and *in vivo* evaluations of apatite-fiber scaffolds loaded with vascular endothelial growth factor”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-118) Y. Miyazawa, Y. Uchimura, M. Nakamura and M. Aizawa, “*In vitro* evaluation of chondrogenic cell line ATDC5 cultured on dense hydroxyapatite ceramics and in porous apatite-fiber scaffold”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-119) T. Sato, M. Aizawa and M. Kikuchi, “COMBINATION EFFECT OF ORGANIC ACID AND CALCIUM COMPOUND ON INJECTABLE HYDROXYAPATITE/COLLAGEN PASTE USING SODIUM ALGINATE”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-120) N. Mochida, Y. Kawanobe, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, Y. Habuto, N. Kanzawa and M. Aizawa, “Fabrication of anti-bacterial cement using calcium-phosphate microspheres loaded with vancomycin and its drug release”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-121) K. Matsuoka, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Kiminami, H. Arimura, and M. Aizawa, “SOME PROPERTIES OF VARIOUS α -TRICALCIUM PHOSPHATE POWDERS PREPARED UNDER DIFFERENT MILLING CONDITIONS AND THEIR APPLICATION TO CHELATE-SETTING CEMENTS”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-122) K. Kosaka, H. Ishii, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Proliferation and Differentiation of P19.CL6 Cells Cultured in Apatite-Fiber Scaffolds”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-123) J. Matsumoto, Y. Habuto, M. Aizawa, and N. Kanzawa, “Biological Evaluation of Lactoferrin-Loaded Chelate-Setting Apatite Cement”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.
- 5-124) R. Umeda, C. Izawa, M. Nakamura, T. Watanabe and M. Aizawa, “Surface property of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and *in vitro* evaluation using osteoblasts”, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Clock Tower Centennial Hall Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.

- 5-125) (*8) 横田倫啓・三木拓哉・相澤 守、“骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とその材料特性”、第 35 回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26
- 5-126) 長田直生・牧田昌士・織部一弥・春日敏宏・Wikki R. Walsh・相澤 守、“綿形状吸収性骨再生用材料の開発と *in vivo* 評価”、第 35 回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26
- 5-127) (*10) 清水友亮・川延勇介・小西敏功・本田みちよ・水本みのり・相澤 守、“抗菌性を備えた非崩壊型リン酸カルシウムセメントの作製とその細胞毒性”、第 35 回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26
- 5-128) (*10) 呉 哲宇・柿沼祐亮・本田みちよ・石井 賢・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守、“イノシトールリン酸により銀イオンを固定化させたアパタイト被覆チタンインプラントの 抗菌特性”、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26
- 5-129) (*12) 中村まり子・安生絵里奈・藤見峰彦・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と肝細胞・肝星細胞・内皮細胞との共培養による 再生肝オルガノイドの構築とその機能評価”、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26
- 5-130) (*3) 中村まり子・三浦舞子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守、“ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた再生培養骨の構築に向けたアパタイトファイバースキャフォールドの最適気孔構造の検討”、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26 (ハイライト講演に選定)
- 5-131) 本田みちよ・小西敏功・水本みのり・相澤 守、“抗菌性タンパク質を応用した新規抗菌性生体材料の開発”、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26
- 5-132) 目黒佑太・猪俣義彦・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 *in vitro* 評価”、無機マテリアル学会 第 127 回 学術講演会、山形県米沢市 上杉博物館 伝国の杜 置賜文化ホール、無機マテリアル学会、2013.11.14-15
- 5-133) 持田直輝・川延勇介・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・羽田優理・神澤信行・相澤 守、“抗菌薬を担持させた表面に細孔を備えたリン酸カルシウム微小球による抗菌性セメントの作製とその評価”、無機マテリアル学会 第 127 回 学術講演会、山形県米沢市 上杉博物館 伝国の杜 置賜文化ホール、無機マテリアル学会、2013.11.14-15
- 5-134) 清水秀樹・庄 志・猪俣義彦・中川草平・松田信之・相澤 守、“クエン酸を添加した均一沈殿法による高い比表面積を備えた球状水酸アパタイトの合成とその加熱による相変化”、無機マテリアル学会 第 127 回 学術講演会、山形県米沢市 上杉博物館 伝国の杜 置賜文化ホール、無機マテリアル学会、2013.11.14-15
- 5-135) Mamoru Aizawa, Nakashima Yusuke, Toshiisa Konishi, Minori Mizumoto, Michiyo Honda, Yoshikazu Arai, Kazuaki Nakano, Masaya Nagaya, Hiroshi Nagashima, “Development of chelate-setting cement with enhanced bioactivity using silicon-containing hydroxyapatite powder”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, Rennes, France, 27th-31th, October 2013.
- 5-136) (*9) Mariko Nakamura, Zhi Zhuang, Ryo Umeda, Shigenori Nagai, Mamoru Aizawa, “Cellular response of immunocyte to boron-containing apatite ceramics”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, Rennes, France, 27th-31th, October 2013. (Best Poster Award 受賞)
- 5-137) Ryo Umeda, Satoshi Okuyama, Mariko Nakamura, Tomoaki Watanabe, Mamoru Aizawa “*In vitro* evaluation of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics using osteoblastic cells”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, Rennes, France, 27th-31th, October 2013.
- 5-138) (*8) Tomohiro Yokota, Takuya Miki, Toshiisa Konishi, Minori Mizumoto, Michiyo Honda, Ken Ishii, Yoshiaki Toyama, Morio Matsumoto, “*In vivo* evaluation of hydroxyapatite ceramics including bone

minerals using a rabbit model”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, Rennes, France, 27th-31th, October 2013.

- 5-139) Yuta Uchimura, Yuta Miyazawa, Mamoru Aizawa, “Three-dimensional culture of ATDC5 as a model of a chondrocyte using apatite-fiber scaffolds with enhanced mechanical strength”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, Rennes, France, 27th-31th, October 2013.
- 5-140) **(*10)** Yusuke Shimizu, Yusuke Kawanobe, Toshiisa Konishi, Michiyo Honda, Mamoru Aizawa, “Cytotoxicity of anti-bacterial calcium-phosphate cement with anti-washout property”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, Rennes, France, 27th-31th, October 2013.
- 5-141) **(*8)** 横田倫啓・三木拓也・相澤 守、“骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とその材料特性”、第 23 回 無機リン化学討論会、島根県松江市 松江テルサ、日本セラミックス協会、2013.9.19-20
- 5-142) **(*13)** 茅嶋健太郎・大山 遼・江本 精・松浦知和・新井良和・長屋昌樹・長嶋比呂志・相澤 守、“血管内皮細胞増殖因子を担持し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 vitro* および *in vivo* 評価”、第 23 回 無機リン化学討論会、島根県松江市 松江テルサ、日本セラミックス協会、2013.9.19-20 (若手優秀研究発表賞)
- 5-143) **(*10)** 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リン酸カルシウムセメントの作製とその細胞毒性”、第 23 回 無機リン化学討論会、島根県松江市 松江テルサ、日本セラミックス協会、2013.9.19-20
- 5-144) 宮澤雄太・内村祐太・中村まり子・相澤 守、“水酸アパタイトセラミックス上で培養した株化軟骨細胞 ATDC5 の *in vitro* 評価”、第 23 回 無機リン化学討論会、島根県松江市 松江テルサ、日本セラミックス協会、2013.9.19-20
- 5-145) 加藤尚己・安生絵利奈・中村まり子・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をした株化肝細胞 FLC-4 の形態と機能”、第 23 回 無機リン化学討論会、島根県松江市 松江テルサ、日本セラミックス協会、2013.9.19-20
- 5-146) 相澤 守・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、“ケイ素含有アパタイトによる高い骨伝導性を備えたキレート硬化型セメントの創製とその硬組織に対する生体内反応”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-147) 永田幸平・高橋周平・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・相澤 守、“Non-fragmentation を担保したキレート硬化型 β -リン酸三カルシウムセメントの創製とその材料特性”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-148) 小西敏功・眞部弘毅・水本みのり・本田みちよ・石井 賢・船尾陽生・森末 光・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守、“キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの *in vitro/in vivo* 吸収性評価”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-149) 本田みちよ・小西敏功・水本みのり・相澤 守、“水酸アパタイトのタンパク質吸着能を利用した抗菌性生体材料の開発”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-150) 水本みのり・小西敏功・本田みちよ・木南啓司・有村英俊・新井良和・中野和明・長屋昌樹・長嶋比呂志・相澤 守、“キレート硬化型アパタイトセメントの材料特性および生体適合性に及ぼす α -リン酸三カルシウム粒子添加の影響”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-151) **(*9)** 中村まり子・永井重徳・相澤 守、“ホウ素含有アパタイトセラミックスと共存培養したマウス脾臓由来 T, B, NK 細胞の細胞比率とその免疫評価”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-152) 内村祐太・宮澤雄太・中村まり子・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を用いた株化軟骨細胞 ATDC5 の三次元培養”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6

- 5-153) (*10) 柿沼祐亮・石井 賢・石濱寛子・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守、“銀担持アパタイトを被覆したポリエーテルエーテルケトンインプラントの創製とその抗菌特性”、日本セラミックス協会第26回秋季シンポジウム、信州大学(長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6
- 5-154) (*3) 相澤 守・松浦知和、“アパタイトファイバースキャフォールドおよびラジアルフロー型バイオリクターを用いた間葉系幹細胞の三次元培養による再生培養骨の構築”、第31回日本ヒト細胞学会学術集会、所沢市民文化センター「ミュージズ」、2013.8.10-11 (依頼講演)
- 5-155) T. Konishi, S. Takahashi, K. Nagata, Z. Zhuang, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima and M. Aizawa, “Fabrication of Biodegradable β -Tricalcium Phosphate Cement with Anti-washout Property Based on Chelate-setting Mechanism of Inositol Phosphate and its biocompatibility”, 4th Asian Biomaterials Congress (4th ABMC), Hong Kong, China, 26-29 Jun 2013.
- 5-156) (*10) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “Anti-bacterial property of polyetheretherketone implants immobilized with Ag^+ ion on the basis of chelate-bonding ability of inositol phosphate”, The 7th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-7), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 19th-21st, June 2013.
- 5-157) R. Umeda, S. Okuyama, T. Watanabe and M. Aizawa, “Surface property of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and their biocompatibility evaluations using osteoblastic cells”, The 7th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-7), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 19th-21st, June 2013.
- 5-158) (*8) T. Yokota, T. Miki, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Comparative Study on Bone Formation of Hydroxyapatite Ceramics with and without Bone Minerals Using a Rabbit Model”, The 7th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-7), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 19th-21st, June 2013.
- 5-159) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Fabrication of α -tricalcium phosphate cement using chelating mechanism of inositol phosphate and Its histological evaluation”, 6th International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials (ISACB6), Nantes, France, 5th-8th Jun 2013. (Racquel LeGeros Young Scientist Award 受賞)
- 5-160) T. Sato, M. Aizawa and M. Kikuchi, “Effect of additive on properties of injectable hydroxyapatite/collagen paste using sodium alginate”, 6th International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials (ISACB6), Nantes, France, 5th-8th Jun 2013.
- 5-161) 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、船橋市民文化創造館、2013.6.6-7
- 5-162) 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、船橋市民文化創造館、2013.6.6-7
- 5-163) 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・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”、2013年日本セラミックス協会年会、東京工業大学大岡山キャンパス、2013.3.17-19
- 5-164) 宮澤雄太・相澤 守、“水酸アパタイトセラミックス上で培養した株化軟骨細胞 ATDC5 の増殖とその形態”、2013年日本セラミックス協会年会、東京工業大学大岡山キャンパス、2013.3.17-19
- 5-165) 佐藤 平・相澤 守・菊池正紀、“アルギン酸ナトリウムを用いたインジェクタブルアパタイト/コラーゲンペーストの物性に与える添加物の影響”、2013年日本セラミックス協会年会、東京工業大学大岡山キャンパス、2013.3.17-19
- 5-166) 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”、2013年日本セラミックス協会年会、東京工業大学大岡山キャンパス、2013.3.17-19
- 5-167) 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 (Development of chelate-setting calcium-phosphate cement with multi-functions: enhanced bioactivity, anti-bacterial property and/or anti-tumorigenesis)”, 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シンポジウム、名古屋工業大学(Center for Fostering Young and Innovation Researchers (CFYIR))、

2013.1.29

- 5-168) 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、“ β -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、仙台国際センター、2013.1.9-10
- 5-169) (*9) 中村まり子・庄 志・永井重徳・相澤 守、“ホウ素含有アパタイトセラミックスの作製とその免疫細胞応答性”、第 51 回セラミックス基礎科学討論会、仙台国際センター、2013.1.9-10
- 5-170) 梅田 遼・奥山 慧・渡邊友亮・相澤 守、“窒素ドーピング法により改質した水酸アパタイトセラミックスの表面特性およびその細胞応答性”、第 51 回セラミックス基礎科学討論会、仙台国際センター、2013.1.9-10
- 5-171) 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、仙台国際センター、2013.1.9-10
- 5-172) N. Mohannad, N. Hiraishi, I. M. Sofiqul, M. Otsuki, J. Tagami and M. Aizawa, “The influence of Phytic Acid Used as Etchant on Resin-Dentin Bond Strength”, 第 31 回日本接着歯学会学術大会・総会、日本歯科大学 生命歯学部、2012.12.8-9.
- 5-173) 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 Annual Meeting Registration and Information, San Francisco, CA, USA, 15th-19th, December 2012.
- 5-174) (*10) 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、千葉工業大学 津田沼校舎、2012.11.30.
- 5-175) 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、千葉工業大学 津田沼校舎、2012.11.30.
- 5-176) 清水秀樹・庄 志・猪股義彦・松田信之・相澤 守、“クエン酸を添加した均一沈殿法による球状水酸アパタイトの合成とそのキャラクターゼーション”、第 16 回生体関連セラミックス討論会、千葉工業大学 津田沼校舎、2012.11.30. (最優秀発表賞受賞)
- 5-177) 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、千葉工業大学 津田沼校舎、2012.11.30.
- 5-178) (*2) 木下友花里・S. M. Best・相澤 守、“ケイ素含有アパタイトファイバーによる骨再生用スキャフォールドの *in vitro* 評価”、第 16 回生体関連セラミックス討論会、千葉工業大学 津田沼校舎、2012.11.30. (The Division 賞受賞)
- 5-179) 相澤 守、“抗菌性人工関節の開発”、TECH Biz EXPO 2012 講演会、ポートメッセなごや、2012.11.28-30. (招待講演)
- 5-180) (*4) 安生絵利奈・藤見峰彦・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た肝細胞・肝星細胞・内皮細胞の三次元共培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能”、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター、2012.11.26-27.
- 5-181) 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、仙台国際センター、2012.11.26-27.
- 5-182) 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、仙台国際センター、2012.11.26-27.
- 5-183) (*1) 長田直生・松成ひとみ・竹内靖浩・織部一弥・長嶋比呂志・相澤 守、“細孔構造を精密制御した β -リン酸三カルシウム多孔体の作製とブタによる *in vivo* 評価”、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター、2012.11.26-27.

- 5-184) (*10) 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・戸山芳昭・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、仙台国際センター、2012.11.26-27.
- 5-185) (*1) 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、仙台国際センター、2012.11.26-27.
- 5-186) C. Oh, H. Kakinuma, T. Hoshikawa, K. Ishii, H. Funao, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Fabrication of an anti-bacterial Ti implant via fixation of silver ions on hydroxyapatite films surface-modified with inositol phosphate and its cytotoxicity”, The 29th Korea-Japan International Seminar on Ceramics, Daegu Exhibition & Convention Center (EXCO) , Daegu, Korea, 21st-24th, November 2012.
- 5-187) 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 (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012. (**Key Note Lecture; 招待講演**)
- 5-188) T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Studies on the anti-tumor action of a novel apatite cement”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.
- 5-189) K. Nagata, S. Takahashi, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting β -tricalcium phosphate cements with anti-washout ability and their material properties”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.
- 5-190) (*10) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Formation of apatite film on polyetheretherketone substrate by soft solution process and immobilization of Ag^+ ions on its surface using an inositol phosphate for anti-bacterial medical device”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.
- 5-191) K. Fujioka, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of novel calcium-phosphate cements with non-fragmentation property and their evaluation”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.
- 5-192) R. Umeda, S. Okuyama, T. Watanabe, and M. Aizawa, “Fabrication of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and its surface characterization”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.
- 5-193) T. Hattori, A. Nagai, M. Aizawa, H. Tamamura and K. Yamashita, “Polarized hydroxyapatite modulates cell cycle and promotes differentiation of SK-LMS-1 cells”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.
- 5-194) (*14) 相澤 守・江本 精、“超音波噴霧熱分解法によるリン酸カルシウム中空微小球の創製および癌化学塞栓療法への応用”、第 21 回ソノケミストリー討論会、明治大学理工学部 生田キャンパス A 館、2012.11.9-10. (**招待講演**)
- 5-195) (*1) 鷹本拓也・相澤 守、“高強度化 β -リン酸三カルシウムファイバースキャフォールドの作製とその特性評価”、無機マテリアル学会第 125 回学術講演会、名古屋大学 ES 総合館ホール、2012.11.1-2.
- 5-196) 庄 志・中村まり子・小西敏功・吉村英恭・相澤 守、“ α 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”、無機マテリアル学会第 125 回学術講演会、名古屋大学 ES 総合館ホール、2012.11.1-2.
- 5-197) (*1) 長田直生・重光勇介・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守、“骨誘導能を備えたリン酸カルシウム多孔体の作製とクサビラオレンジブタによる *in vivo* 評価”、無機マテリアル学会第 125 回学術講演会、名古屋大学 ES 総合館ホール、2012.11.1-2.

- 5-198) 塩野雄太・石井賢・永井重徳・柿沼祐亮・佐々木文・相澤 守・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“アクネ菌はインプラント関連感染症を引き起こす”、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋国際会議場、2012.10.26-27.
- 5-199) 吉岡研之・石井 賢・永井重徳・柿沼祐亮・佐々木文・相澤 守・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“整形外科領域で用いる金属製生体材料におけるバイオフィルム形成度の検討”、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋国際会議場、2012.10.26-27.
- 5-200) (*10) 石濱寛子・石井 賢・永井重徳・柿沼祐亮・佐々木文・相澤 守・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“合成樹脂製インプラントにおける新規抗菌コーティング法の開発”、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋国際会議場、2012.10.26-27.
- 5-201) T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Studies on anti-tumor action of chelate-setting apatite cements”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-202) (*5) K. Kayashima, R. Oyama, M. Emoto, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Three-dimensional Culture of Vascular Endothelial Cells Using Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-203) (*3) M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Reconstruction of tissue-engineered bone using an apatite-fiber scaffold, rat bone marrow cells and radial-flow bioreactor: optimization of flow rate in circulating medium”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-204) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, and M. Aizawa, “Adsorption Behavior of Sodium Inositol Hexaphosphate on the Surface of Hydroxyapatite”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-205) 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”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-206) H. Shimizu, Z. Zhuang and M. Aizawa, “Morphological control of hydroxyapatite particles by homogeneous precipitation method in the copresence of various carboxylic acids”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-207) H. Ishii, Y. Mukai, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Gene expression analysis and morphological observation of P19 cells cultured in apatite-fiber scaffold.”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-208) H. Ohsugi, Y. Habuto, M. Honda, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Evaluation of anti-bacterial activities of a novel chelate-setting apatite cements combined with lactoferrin”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-209) (*7) M. Nakamura, Z. Zhuang and M. Aizawa, “Fabrications of boron-containing apatite ceramics via ultrasonic spray pyrolysis route and their surface properties”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-210) 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”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-211) 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”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.
- 5-212) (*2) Y. Kinoshita, S. M. Best, and M. Aizawa, “*In Vitro* evaluation of silicon-containing apatite fibre scaffolds for bone tissue engineering”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine , 21st-24th, October 2012.

- 5-213) (*4) 安生絵利奈・藤見峰彦・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た長期三次元循環培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能”、第 22 回無機リン化学討論会「神戸大会」、神戸大学六甲台キャンパス 瀧川記念学術交流会館、2012.9.25-26 (若手優秀研究発表賞)
- 5-214) 服部竜也・永井亜希子・五十嵐香理・相澤 守・山下仁大、“分極水酸アパタイトセラミックスを用いた肉腫細胞の増殖抑制”、第 22 回無機リン化学討論会「神戸大会」、神戸大学六甲台キャンパス 瀧川記念学術交流会館、2012.9.25-26 (若手優秀研究発表賞)
- 5-215) 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 β -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「神戸大会」、神戸大学六甲台キャンパス 瀧川記念学術交流会館、2012.9.25-26
- 5-216) (*5) 茅嶋健太郎・大山 遼・江本 精・前橋はるか・松浦知和・相澤 守、“血管内皮細胞増殖因子を担持した高強度化アパタイトファイバースキャフォールドによる血管内皮細胞の三次元培養”、第 22 回無機リン化学討論会「神戸大会」、神戸大学六甲台キャンパス 瀧川記念学術交流会館、2012.9.25-26
- 5-217) 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、名古屋大学 (東山キャンパス)、2012. 9.19-21
- 5-218) (*10) 本田みちよ・川延勇介・小西敏功・水本みのり・相澤 守、“バイオフィー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、名古屋大学 (東山キャンパス)、2012. 9.19-21
- 5-219) (*3) 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・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装填したラジアルフロー型バイオリアクターによるラット骨髄細胞からの再生培養骨の構築 —培地循環速度の最適化—”、日本セラミックス協会 第 25 回秋季シンポジウム、名古屋大学 (東山キャンパス)、2012. 9.19-21 (特定セッション学生優秀発表賞)
- 5-220) (*10) 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、名古屋大学 (東山キャンパス)、2012. 9.19-21
- 5-221) 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、名古屋大学 (東山キャンパス)、2012. 9.19-21
- 5-222) 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郡山地区セミナー、日本大学工学部 50 周年記念館 (ハット NE) 3 階 大講義室およびロビー、2012.9.7 (招待講演)
- 5-223) 相澤 守・庄 志、“アパタイト単結晶の形態制御とそのタンパク質吸着性”、平成 24 年度オレオナノサイエンスシンポジウム 2012 「オレオナノサイエンスと皮膚科学」、東京理科大学森戸記念館、2012.8.23 (招待講演)
- 5-224) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Nagashima and M. Aizawa, “Enhancement of handling and mechanical property of chelate-setting α -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), Sheraton Chicago Hotel & Towers, IL, USA, 15th-19th, July 2012.
- 5-225) 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 (ICYRAM 2012), MATRIX Building, Biopolis Shared Facilities, Singapore, 1st-6th, July 2012. (招待講演)
- 5-226) (*3) M. Aizawa, M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi and T. Matsuura, “Development of tissue-engineered bone by three-dimensional cell culture of rat bone marrow cells using an apatite-fiber scaffold and a radial-flow bioreactor”, The Sixth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-6), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 26th-28th, June 2012.

- 5-227) (*10) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “Formation of apatite film on polyetheretherketone substrate by soft solution process and immobilization of Ag⁺ ions on its surface using an inositol phosphate”, The Sixth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-6), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 26th-28th, June 2012.
- 5-228) K. Yamamoto, Y. Shigemitsu, and M. Aizawa, “Fabrications of porous ceramics with well-controlled interconnected pores using roughened carbon beads and their material properties”, The Sixth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-6), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 26th-28th, June 2012.
- 5-229) (*4) E. Anjo, T. J. Fujimi, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura, and M. Aizawa, “Reconstruction of liver organoid using an apatite-fiber scaffold and its ammonia metabolism ability”, 9th World Biomaterials Congress, Century City International Convention Center (CCICC), Chengdu, China, 1st-5th, June 2012.
- 5-230) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda and M. Aizawa, “Material Properties of Chelate-setting α -Tricalcium Phosphate Cement Using Inositol Hexaphosphate”, 9th World Biomaterials Congress, Century City International Convention Center (CCICC), Chengdu, China, 1st-5th, June 2012.
- 5-231) Z. Zhuang, M. Yumoto, T. Miki and M. Aizawa, “Development of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane and Their Characterizations”, 9th World Biomaterials Congress, Century City International Convention Center (CCICC), Chengdu, China, 1st-5th, June 2012. (ポスター賞受賞)
- 5-232) (*9) M. Nakamura, W. Hiraoka and M. Aizawa, “Fabrication of boron-containing apatite ceramics via ultrasonic spray-pyrolysis technique and its response to natural killer cell”, 9th World Biomaterials Congress, Century City International Convention Center (CCICC), Chengdu, China, 1st-5th, June 2012.
- 5-233) 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 (Development of chelate-setting calcium-phosphate cement with multi-functions: enhanced bioactivity, anti-bacterial property and/or anti-tumorigenesis)”, 第 85 回日本整形外科学会学術総会、国立京都国際会館、グランドプリンスホテル京都、2012.5.17-20 (招待講演)
- 5-234) (*10) 柿沼祐亮・石井 賢・石濱寛子・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守, “溶液プロセスによるポリエーテルエーテルケトン基板上へのアパタイト膜の形成およびイノシトールリン酸による銀イオンの固定化”, 日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学 (吉田キャンパス)、日本セラミックス協会、2012.3.19-21.
- 5-235) 山本康平・重光勇介・相澤 守, “粗面加工したカーボンビーズによる多孔質水酸アパタイトセラミックスの作製とその材料特性”, 日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学 (吉田キャンパス)、2012.3.19-21.
- 5-236) (*14) 松枝 賢・江本 精・相澤 守, “硝酸カリウムを用いた塩添加超音波噴霧熱分解法による表面にナノ気孔を有するリン酸カルシウム微小球の合成とその薬剤徐放”, 日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学 (吉田キャンパス)、2012.3.19-21.
- 5-237) 水本みのり・小西敏功・本田みちよ・石井 賢・船尾陽生・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”, 日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学 (吉田キャンパス)、2012.3.19-21.
- 5-238) 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、京都大学 (吉田キャンパス)、2012.3.19-21.
- 5-239) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Zhi Zhuang and M. Aizawa, “EFFECT OF CONCENTRATION OF INOSITOL HEXAPHOSPHATE ON MATERIAL PROPERTIES OF CHELATE-SETTING APATITE CEMENT”, The 11th Asian BioCeramics Symposium 2011 (ABC 2011), Tsukuba, Ibaraki, Japan, National Institute for Materials Science (NIMS), 30th November-2nd December. 2011. (ABC 2012 Award 受賞)
- 5-240) Z. Zhuang, M. Yumoto, T. Miki, T. Konishi and M. Aizawa, “Development of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane”, The 11th Asian BioCeramics Symposium 2011 (ABC 2011), Tsukuba, Ibaraki, Japan, National Institute for Materials Science (NIMS), 30th November-2nd December. 2011.

- 5-241) H. Manabe, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda and M. Aizawa, “EVALUATION OF IN VITRO BIORESORBABILITY OF CHELATE-SETTING CALCIUM PHOSPHATES CEMENTS”, The 11th Asian BioCeramics Symposium 2011 (ABC 2011), Tsukuba, Ibaraki, Japan, National Institute for Materials Science (NIMS), 30th November-2nd December. 2011.
- 5-242) **(*2)** Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa, “FABRICATION AND EVALUATION OF SILICON-CONTAINING APATITE FIBER SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING”, The 11th Asian BioCeramics Symposium 2011 (ABC 2011), Tsukuba, Ibaraki, Japan, National Institute for Materials Science (NIMS), 30th November-2nd December. 2011. **(ABC 2012 Award 受賞)**
- 5-243) **(*1)** 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”, The 11th Asian BioCeramics Symposium 2011 (ABC 2011), Tsukuba, Ibaraki, Japan, National Institute for Materials Science (NIMS), 30th November-2nd December. 2011.
- 5-244) **(*4)** 安生絵利奈・藤見峰彦・安富由美子・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とラジアルフロー型バイオリクターを用いて構築した再生肝オルガノイドのアンモニア代謝能”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-245) 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回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-246) **(*14)** 松枝 賢・江本 精・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調製と薬剤徐放特性評価”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-247) 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回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-248) 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回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-249) 向井優哉・相澤 守・神澤信行、“Apatite-fiber scaffold 中で培養したマウス初代心筋細胞と P19.CL6 細胞の遺伝子発現解析及び形態観察”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-250) 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回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-251) **(*8)** 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回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-252) **(*10)** 川延勇介・本田みちよ・水本みのり・小西敏功・羽太優理・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回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-253) **(*9)** 中村まり子・平岡和佳子・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法によるホウ素含有アパタイトセラミックスの作製とその免疫細胞応答性”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-254) 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、京都、2011.11.21-22.
- 5-255) **(*1)** 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フォールドの硬組織適合性”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-256) 蔵本哲也・石井 賢・永井重徳・船尾陽生・相澤 守・平井政彦・佐々木文・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“骨軟部耐性菌感染症に対する新規分子標的治療法の開発—抗生物質ターゲティング療法”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.
- 5-257) 蔵本哲也・石井 賢・平井政彦・船尾陽生・永井重徳・相澤 守・佐々木文・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“抗生物質ターゲティング療法の確立へ向けた抗生剤含有・炎症プローブの開発”、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2011.11.21-22.

- 5-258) (*3) M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Effect of flow rate of medium in radial-flow bioreactor on the differentiation of osteoblasts in tissue-engineered bone reconstructed using an apatite-fiber scaffold and rat bone marrow cells”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.
- 5-259) M. Matsueda, M. Emoto and M. Aizawa, “Preparation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.
- 5-260) H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Biochemical studies on novel chelate-setting apatite cements in antitumor action”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.
- 5-261) (*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”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011. (Best Poster Award 受賞)
- 5-262) (*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”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.
- 5-263) Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted Hydroxyapatite and its property”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.
- 5-264) N. Osada, Y. Shigemitsu, M. Makita, K. Oribe and M. Aizawa, “Fabrication of organic/inorganic hybrids by infiltration of commercially-available poly(L-lactide co glycolide) into porous hydroxyapatite ceramics with bimodal pore-size distribution and its material properties”, Bioceramics23, Ceylan InterContinental Istanbul Hotel, Istanbul, Turkey, 6th-11th, November, 2011.
- 5-265) 相澤 守, “新しい硬化メカニズムによる骨修復セメントの開発”, 国際セラミックス総合展、東京ビッグサイト会議棟 6F 606 号室、2011.10.14. (総合展での招待講演)
- 5-266) (*4) 安生絵利奈・藤見峰彦・安富由美子・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た再生肝オルガノイドの構築とそのアンモニア代謝能”, 第 21 回無機リン化学討論会、名古屋工業大学 (鶴舞キャンパス)、2011.9.29-30.
- 5-267) 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、名古屋工業大学 (鶴舞キャンパス)、2011.9.29-30.
- 5-268) (*2) 木下友花里・S. M. Best・相澤 守, “ケイ素含有アパタイトファイバーによる骨再生用スキャフォールドの作製とその材料特性”, 第 21 回無機リン化学討論会、名古屋工業大学 (鶴舞キャンパス)、2011.9.29-30.
- 5-269) 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”, 12th International Conference in Asia (IUMRS-ICA2011), Taipei World Trade Center Nangang Exhibition Hall (TWTC Nangang), Taipei, Taiwan, 19th-22nd, September. 2011.
- 5-270) Z. Zhuang, T. Miki, M. Yumoto and M. Aizawa, “Ultrastructural Observation of Hydroxyapatite Ceramics with Preferred Orientation to a-plane using High-resolution Transmission Electron Microscopy”, 12th International Conference in Asia (IUMRS-ICA2011), Taipei World Trade Center Nangang Exhibition Hall (TWTC Nangang), Taipei, Taiwan, 19th-22nd, September. 2011. (ポスター賞受賞)
- 5-271) 藤岡 恵・高 正宏・澤田敏樹・ZHI Chunyi・坂東義雄・GOLBERG Dmitri・相澤 守・芹澤 武, “水溶性合成ポリマーによる窒化ホウ素ナノチューブの単一分散”, 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会、京都大学 (吉田キャンパス)、2011.9.7-10. (ポスター賞受賞)
- 5-272) (*3) 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・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とラット骨髄細胞を用いて再構築した再生培養骨の骨芽細胞の分化に及ぼすラジアルフロー型バイオリクター内の培地循環速度の影響”, 日本セラミックス協会 第 24 回秋季シンポジウム、北海道大学 (札幌キャンパス)、2011.9.7-9. (特定セッション学生優秀発表賞受賞)

- 5-273) 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作製した骨修復セメントの評価”、日本セラミックス協会 第 24 回秋季シンポジウム、北海道大学 (札幌キャンパス)、2011.9.7-9.
- 5-274) 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”、日本セラミックス協会 第 24 回秋季シンポジウム、北海道大学 (札幌キャンパス)、2011.9.7-9.
- 5-275) 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”、日本セラミックス協会 第 24 回秋季シンポジウム、北海道大学 (札幌キャンパス)、2011.9.7-9.
- 5-276) (*9) 中村まり子・三木拓也・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法により合成したホウ素含有アパタイトの焼結性および得られたセラミックスの表面特性”、日本セラミックス協会 第 24 回秋季シンポジウム、北海道大学 (札幌キャンパス)、2011.9.7-9.
- 5-277) 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”、日本セラミックス協会 第 24 回秋季シンポジウム、北海道大学 (札幌キャンパス)、2011.9.7-9.
- 5-278) (*1) 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、日本大学歯学部、2011.8.27. (優秀一般演題(口演)受賞)
- 5-279) (*3) 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守、“ラジアルフロー型バイオリクターの培地循環速度がアパタイトファイバースキャフォールドとラット骨髄由来間葉系幹細胞を用いて構築した再生培養骨内の骨芽細胞の分化に及ぼす影響”、第 20 回硬組織再生生物学会学術大会、日本大学歯学部、2011.8.27.
- 5-280) (*6) 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、日本大学歯学部、2011.8.27.
- 5-281) Zhi Zhuang and Mamoru Aizawa, “Ultrastructural Analysis of Synthetic Hydroxyapatite with Preferred Orientation to c-plane Using High-Resolution Transmission Electron Microscopy”, The 19th International conference on composites/Nano Engineering (ICCE-19), Wyndham Bund East Hotel, Shanghai, China, 24th-30th, July 2011. (招待講演)
- 5-282) 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”, The 19th International conference on composites/Nano Engineering (ICCE-19), Wyndham Bund East Hotel, Shanghai, China, 24th-30th, July 2011. (招待講演)
- 5-283) 長田直生・重光勇介・牧田昌士・織部一弥・相澤 守、“二極化した水酸アパタイト多孔体への市販 PLGA 共重合体の導入による有機/無機ハイブリッドの創製とその材料特性”、無機マテリアル学会第 122 回学術講演会、船橋市民文化創造館、2011.6.2-3.
- 5-284) (*2) 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 回学術講演会、船橋市民文化創造館、2011.6.2-3.

研究分担者：長嶋 比呂志 (明治大学)

1. 査読付原著論文 (査読つき Proceedings 含む)

- 1-1) Yokote S, Matsunari H, Iwai S, Yamanaka S, Uchikura A, Fujimoto E, Matsumoto K, Nagashima H, Kobayashi E, Yokoo T: Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. Proceedings of National Academy of Science USA 2015, 112:12980-12985.
- 1-2) Miyagawa S, Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Umeyama K, Sakai R, Takayanagi S, Takeishi S, Fukuda T, Yashima S, Maeda A, Eguchi H, Okuyama H, Nagaya M, Nagashima H: Generation of alpha1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs. Journal of Reproduction and Development 2015, 61(5):449-457.

- 1-3) Nagaya M, Arai Y, Matsunari H, Honda M, Nakano K, Maehara M, Sugimoto N, Kobayashi M, Sakai R, Asano Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H: A new system to evaluate the influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets using epigenetics analysis in a 3-dimensional culture. *Pancreas* 2015, 44(5):778-785.
- 1-4) Izuhara L, Tatsumi N, Miyagawa S, Iwai S, Watanabe M, Yamanaka S, Katsuoka Y, Nagashima H: Generation of a felinized Swine endothelial cell line by expression of feline decay-accelerating factor. *PLoS One*, 10:e0117682, 2015.
- 1-5) Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H: Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *Journal of Reproduction and Development* 61: online Feb. 20, 2015
- 1-6) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe K, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas-specific expression of green fluorescent protein. *Journal of Reproduction and Development* 60(3):230-237, 2014.
- 1-7) Hoang D-T, Matsunari H, Nagaya M, Nagashima H, Millis JM, Witkowski P, Periwal V, Hara M and Jo J: A conserved rule for pancreatic islet organization. *PLoS One*, 9(10):e110384, 2014.
- 1-8) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. *PLoS One* 9:e92219, 2014.
- 1-9) Sekijima M, Waki S, Sahara H, Tasaki M, Wilkinson RA, Villani V, Shimatsu Y, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Fishman JA, Shimizu A, Yamada K: Results of life-supporting galactosyltransferase knockout kidneys in cynomolgus monkeys using two different sources of galactosyltransferase knockout Swine. *Transplantation* 98:419-426, 2014.
- 1-10) Miyagawa S, Maeda A, Kawamura T, Ueno T, Usui N, Kondo S, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H: A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology* 24:25-38, 2014.
- 1-11) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J Reprod Dev* 60:in press. 2014.
- 1-12) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. *PLoS One* DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone. 0092219PONE-D-13-45932 [pii], 2014.
- 1-13) Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation* ,DOI: 10.1097/TP.0b013e3182a95cbc, 2013.
- 1-14) Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLOS ONE* 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone. 0076478 PONE-D-13-27603 [pii], 2013.
- 1-15) Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet* 22:4368-82, 2013.
- 1-16) Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Wuensch A, Richter A, Baehr A, Kraehe K, Burkhardt K, Flisikowski K, Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Durkovic M, Tschukes A, Kraner S, Schindelbauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schnieke A, Zimmer R, Wolf E: Factors

- influencing the efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC Biotechnol* 13:43. DOI: 1472-6750-13-43 [pii], 10.1186/1472-6750-13-43, 2013.
- 1-17) Yamamoto A, Ikeda K, Wang D, Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M, Miyagawa S: Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. *Surg Today* 43:782-6. DOI: 10.1007/s00595-012-0274-x, 2013
- 1-18) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. *Genesis*, 51(11):763-776, 2013.
- 1-19) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnology* , 13:58, 2013.
- 1-20) Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang DD, Usui N, Takeishi S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H, Miyagawa S: A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters. *Journal of Surgical Research* , 183(1):412-418, DOI 10.1016/j.jss.2012.12.037, 2013.
- 1-21) Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic pig expressing the res fluorescent protein kusabira-orange as a novel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. *Transplantation Proceedings*, 45:1808-1810, 2013.
- 1-22) Umeyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. *J Reprod Dev* 59(6): 599-603, 2013. Ikeda K, Yamamoto A, Nanjo A, Inuinaka C, Takama Y, Ueno T, Fukuzawa M, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Miyagawa S: A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from porcine endothelial cells. *Transplantation Proceedings* 2012, 44(4):1136-1138, DOI: 10.1016/j.transproceed.2012.01.092.
- 1-23) Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg L.A., Nakauchi H. (2013) Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4557-62. DOI: 1222902110 [pii]10.1073/pnas.1222902110.
- 1-24) Fujishiro S.H., Nakano K., Mizukami Y., Azami T., Arai Y., Matsunari H., Ishino R., Nishimura T., Watanabe M., Abe T., Furukawa Y., Umeyama K., Yamanaka S., Ema M., Nagashima H., Hanazono Y. (2013) Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 22:473-82. DOI: 10.1089/scd.2012.0173.
- 1-25) Klymiuk N., van Buerck L., Bahr A., Offers M., Kessler B., Wuensch A., Kurome M., Thormann M., Lochner K., Nagashima H., Herbach N., Wanke R., Seissler J., Wolf E. (2012) Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* 61:1527-32. DOI: db11-1325 [pii]10.2337/db11-1325.
- 1-26) Matsumoto K., Yokoo T., Matsunari H., Iwai S., Yokote S., Teratani T., Gheisari Y., Tsuji O., Okano H., Utsunomiya Y., Hosoya T., Okano H.J., Nagashima H., Kobayashi E. (2012) Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* 30:1228-35. DOI: 10.1002/stem.1101.
- 1-27) Nakatsu S., Takama Y., Ueno T., Inuinaka C., Takeishi S., Kondo A., Okitsu T., Nagashima H., Fukuzawa M., Miyagawa S. (2012) A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters using a lectin microarray. *Transplant Proc* 44:1134-5. DOI: S0041-1345(12)00239-4 [pii]10.1016/j.transproceed.2012.03.019.
- 1-28) Richter A., Kurome M., Kessler B., Zakhartchenko V., Klymiuk N., Nagashima H., Wolf E., Wuensch A. (2012) Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol* 12:84. DOI: 1472-6750-12-84 [pii]10.1186/1472-6750-12-84.
- 1-29) Konishi T, Takahashi S, Zhuang Z, Nagata K, Mizumoto M, Honda M, Takeuchi Y, Matsunari H, Nagashima H, Aizawa M: Biodegradable β -Tricalcium Phosphate Cement with Anti- washout Property

Based on Chelate-setting Mechanism of Inositol Phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2013, DOI:10.1007/s10856-013-4903-8.

- 1-30) Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, Kobayashi E, Zhao J, Wells KD, Critser JK, Riley LK, Prather RS: Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Medical Genomics*, 5(55), 2012.
- 1-31) Renner S, Braun C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Bahr A, Klymiuk N, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E: Permanent Neonatal Diabetes in INSC94Y Transgenic Pigs. *Diabetes*, DOI: db12-1065 [pii] 10.2337/db12-1065, 2012.
- 1-32) Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H: Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *Journal of Reproduction and Development*, 58:599-608, 2012.
- 1-33) Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi H, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H: Hollow Fiber Vitrification Provides a Novel Method for Cryopreserving In Vitro Maturation/Fertilization-Derived Porcine Embryos. *Biology of Reproduction*, DOI: biolreprod.112.100339, 2012.
- 1-34) Teratani T, Matsunari H, Kasahara N, Nagashima H, Kawarasaki T, Kobayashi E: Islets from rats and pigs transgenic for photogenic proteins. *Current Diabetes Reviews*, 8:382-389, CDR-EPUB-20120514-20 [pii], 2012.
- 1-35) Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Molecular Reproduction and Development*, 79:218-228, 2012.
- 1-36) Watanabe M, Kurome M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Shiota A, Nakauchi H, Nagashima H: The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. *Transgenic Research* 2011, 21:605-618, DOI 10.1007/s11248-011-9561-3.
- 1-37) Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Molecular Reproduction and Development* 2011, 79:218-228, DOI 10.1002/mrd.22015.
- 1-38) Klymiuk N, Mundhenk L, Kraeche K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmayer MC, Stehr M, Holzinger A, Kroner C, Richter A, Kessler B, Kurome M, Eddicks M, Nagashima H, Heinritz K, Gruber AD, Wolf E: Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *Journal of Molecular Medicine* 2011. DOI10.1007/s00109-011-0839-y.
- 1-39) Klymiuk N, Böcker W, Schönitzer V, Bähr A, Radic T, Fröhlich T, Wunsch A, Keßler B, Kurome M, Schilling E, Herbach N, Wanke R, Nagashima H, Mutschler W, Arnold GJ, Schwinzer R, Schieker M, Wolf E: First inducible transgene expression in porcine large animal models. *The FASEB Journal* 2011, 26:1086-1099. DOI 10.1096/fj.11-185041.
- 1-40) Kemter E, Lieke T, Kessler B, Kurome M, Wuensch A, Summerfield A, Ayares D, Nagashima H, Baars W, Schwinzer R, Wolf E: Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation* 2011, 19:40-51. DOI 10.1111/j.1399-3089.2011.00688.x.

2. 著書・総説, 解説等

- 2-1) 原怜史, 梅山一大, 横尾隆, 長嶋比呂志, 長田道夫: 実験的糖尿病性腎症 (大動物) . 腎と透析 2015, 78(Suppl):124-130.
- 2-2) 長嶋比呂志, 松成ひとみ: 遺伝子改変ブタを利用してヒトに移植可能な臓器を作る研究: 異種再生臓器移植へのチャレンジ. 腎と透析 77(6):881-887, 2014.
- 2-3) Kurome M, Kessler B, Wuensch A, Nagashima H, Wolf E: Nuclear transfer and transgenesis in the pig. In: *Nuclear Reprogramming* 1222:37-59, 2014.

- 2-4) 長嶋比呂志: トランスジェニック動物の作出. In: 哺乳動物の発生工学. p94-102, 東京: 朝倉書店; 2014.
- 2-5) 内倉鮎子、松成ひとみ、前原美樹、長嶋比呂志: 卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可能性、再生医療 13, 48-51, 2014
- 2-6) 長嶋比呂志: 哺乳動物胚および卵子の凍結保存. In: 繁殖生物学. Edited by 日本繁殖生物学会: interzoo; 2013: 278-289.
- 2-7) 松成ひとみ、長嶋比呂志: 動物個体内での臓器再生. In: 幹細胞研究と再生医療. 南山堂; 2013: 130-135.
- 2-8) Men H, Walters EM, Nagashima H, Prather RS: Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics. Theriogenology, 78:1720-1729, DOI: S0093-691X(12)00330-5 [pii] 10.1016/j.theriogenology.2012.06.003, 2012.
- 2-9) Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M: Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. Reproduction in Domestic Animals, 47(suppl.4):120-126, DOI: 10.1111/ j.1439-0531.2012.02065.x, 2012.
- 2-10) Nagashima H, Matsunari H, Umeyama K: Creation and conservation of genetically modified pigs: applications to genetic disease model and xenotransplantation. In: The Minipig in Biomedical Research. Edited by McAnulty PA, Dayan AD, Ganderup NC, Hastings KL: CRC Press, Boca Raton, FL, USA; 2011: 415-430.
- 2-11) Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Ikezawa Y, Kurome M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H. Cloning of homozygous α 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In: Xenotransplantation. Edited by Miyagawa S: InTech, Rijeka, Croatia; 2012: 37-54.

3. 特許

- 3-1) 長嶋比呂志、松成ひとみ、内倉鮎子: 中空糸凍結保存用具及び細胞凍結保存方法. 2015 特願 2015-003070.

4. 新聞発表

- 4-1) 明治大- 慈恵医大 腎臓再生へ基礎技術. In: 日経産業新聞. 2015.

5. 学会発表

<招待講演・海外>

- 5-1) Nagashima H: Challenge to in-vivo organ regeneration using organogenesis-disabled pig as a platform. In: REBIRTH-Special Lecture: 15 Jan 2015; Hannover, Germany.

<招待講演・国内>

- 5-2) 長嶋比呂志: ブタのゲノム編集と疾患モデル開発への応用. In: MUIBRシンポジウム2015: 13 Mar 2015; 東京
- 5-3) 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: 第14回日本再生医療学会総会: 19-21 Mar 2015; 横浜.
- 5-4) 長嶋比呂志: 難治性疾患研究に役立つ動物モデルの開発. In: 明治大学・京都大学iPS細胞研究所共催シンポジウム「iPS細胞と医農工連携: あたらしい医療を考える」: 26 Jul 2015; 東京.
- 5-5) 長嶋比呂志: ブタの発生工学の進展と医学研究との接点. In: 科研費新学術領域研究「動物における配偶子産生システムの制御」: 2-4 Sep 2015; 東京.
- 5-6) 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クローンブタを利用した再生・移植医療の進展. In: バイオマイクロナノテク研究会: 31 Aug 2015; 東京.
- 5-7) 長嶋比呂志: ブタをプラットフォームとした異種再生臓器移植の展開と周辺技術. In: 再生医療サポートビジネス懇話会: 23 Oct 2015; 京都.

- 5-8) 長嶋比呂志: Generation of genetically modified pigs by genome editing. In: 第38回日本分子生物学会: 1-4 Dec 2015; 神戸.
- 5-9) 長嶋比呂志: 発生工学による臓器創製の最先端と今後の展望. In: 第14期バイオファイナンスギルド第5回セミナー「次世代再生医療、臓器創製の夢と現実」: 11 Dec 2015; 東京

<国際学会>

- 5-10) Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Hatae S, Takeishi T, Umeyama K, Nagaya M, Miyagawa S, Hanazono Y, Nakauchi H, Nagashima H: Production efficiency of gene knockout pigs using genome editing and somatic cell cloning. In: 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 10-13 Jan 2015; Versailles, France.
- 5-11) Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Hatae S, Matsumura Y, Asano Y, Takeishi T, Nakauchi H, Nagashima H: Application of the hollow fiber vitrification method to the cryopreservation of highly cryosensitive embryos. In: 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 10-13 Jan 2015; Versailles, France.
- 5-12) Nagashima H, Uchikura A, Maehara M, Hatae S, Nakano K, Matsunari H: Direct comparison of the hollow-fiber vitrification and conventional vitrification methods. In: International Federation of Fertility Societies: 26-29 Apr 2015; Yokohama.
- 5-13) Matsunari H, Watanabe K, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Umeyama K, Yamaguchi T, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Blastocyst complementation restore pancreatic phenotype of pdx1 pigs. In: International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting: 24-27 Jun 2015; Stockholm, Sweden.
- 5-14) Matsumoto M, Watanabe K, Horiuchi K, Umeyama K, Nagashima H: Generation of FBN1 gene knockout pig model for marfan syndrome. In: 22nd International Meeting on Advanced Spine Techniques: 8-11 Jul 2015; Kuala Lumpur, Malaysia.
- 5-15) Matsumoto M, Watanabe K, Horiuchi K, Umeyama K, Nagashima H: 【the Whitecloud Award for Best Basic Science Paper】 Generation of FBN1 gene knockout pig model for marfan syndrome. In: 22nd International Meeting on Advanced Spine Techniques: 8-11 Jul 2015; Kuala Lumpur, Malaysia.
- 5-16) Miyagawa S, Sakai R, Lo P, Matsuura R, Deguchi K, Nakahata K, Eguchi H, Maeda A, Okuyama H, Kitano E, Hatanaka M, Watanabe M, Nagashima H: Studies of pig complement: measurement of pig CH50, ACH50, and components. In: 14th Congress of the Asian Society of Transplantation: 23-26 Aug 2015; Singapore.
- 5-17) Matsumoto M, Watanabe K, Horiuchi K, Umeyama K, Nagashima H: Generation of FBN1 gene knockout pig model for Marfan syndrome. In: The Scoliosis Research Society 50th Annual Meeting & Course: 30-3 Sep-Oct 2015; Minneapolis, USA.

<国内学会>

- 5-18) 松成ひとみ, 渡邊将人, 中野和明, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 福田暢, 八島紗耶香, 梅山一大, 高柳就子, 坂井理恵子, 前田晃, 江口寛, 奥山宏臣, 宮川周二, 長嶋比呂志: α -ガラクトシル抗原及び H-D 抗原を発現しない遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第 17 回日本異種移植研究会: 14 Mar 2015; 栃木.
- 5-19) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 松村和明, 玄丞侏, 長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-2. In: 第 14 回日本再生医療学会総会: 19-21 Mar 2015; 横浜.
- 5-20) 梅山一大, 渡辺航太, 渡邊将人, 堀内圭輔, 中野和明, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 松本守雄, 長嶋比呂志: Zinc finger nuclease による fibrillin 1 遺伝子ヘテロノックアウトクローンブタの作出. In: 第 47 回日本結合組織学会学術大会: 15-16 May 2015; 東京.
- 5-21) 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 梅山一大, 長屋昌樹, 宮川周士, 花園豊, 中内啓光, 長嶋比呂志: ゲノム編集を用いた遺伝子ノックアウトクローンブタの作出効率. In: 第 28 回日本動物細胞工学会 2015 年度大会: 9-10 Jul 2015; 仙台.
- 5-22) 梅木育磨, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 畑江将太, 浅野吉則, 笠井悠里, 八島紗耶香, 高柳就子, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ブタ初期胚の遺伝子型判定に関する研究. In: 第 108 回日本繁殖生物学会大会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.

- 5-23) 内倉鮎子, 中野和明, 松成ひとみ, 畑江将太, 浅野吉則, 八島紗耶香, 長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-3: 従来法との比較並びに長期保管法の検討. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-24) 浅野吉則, 饒聖分, 松成ひとみ, 中野和明, 内倉鮎子, 武石透輝, 畑江将太, 高柳就子, 渡邊将人, 梅山一大, 藤村達也, 長嶋比呂志: Myostatin 遺伝子をノックアウトしたブタクローン胚の発生能. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-25) 新井良和, 阿閉貴紀, 福川斐昭, 斎藤経, 竹内健太, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 体細胞連続核移植で作出されたクローンブタでのエピジェネティック解析: Human BeadChip を用いたゲノムワイド DNA メチル化解析の試み. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-26) 斎藤経, 新井良和, 阿閉貴紀, 竹内健太, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 次世代シーケンサーによるブタ精巣でのウルトラディープ DNA メチル化解析. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-27) 八島紗耶香, 中野和明, 浅野吉則, 笠井悠里, 勝俣佑紀, 福田暢, 高草木大地, 梅木育磨, 武石透輝, 畑江将太, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 胚盤胞補完によって救済された IL2RG 遺伝子ノックアウトキメラブタは正常な繁殖能力を有する. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-28) 畑江将太, 中野和明, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ブタにおけるキメラ胚の発達動態. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-29) 松成ひとみ, 渡邊将人, 中野和明, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 武石透輝, 福田暢, 八島紗耶香, 梅山一大, 長屋昌樹, 絵野沢伸, 梅澤あきひろ, 長嶋比呂志: 遺伝子改変疾患モデルブタの開発における胚盤胞補完法の意義: 新生仔致死性形質の救済と有性生殖への橋渡し. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-30) 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 畑江将太, 高草木大地, 梅木育磨, 福田暢, 八島紗耶香, 勝俣佑紀, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 胚盤胞補完法は IL2RG 遺伝子ノックアウト免疫不全ブタの免疫細胞を救済する. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-31) 武石透輝, 中野和明, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 福田暢, 八島紗耶香, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: クサビラオレンジを全身性に発現するミニブタ系統の開発. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-32) 勝俣佑紀, 中野和明, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 武石透輝, 八島紗耶香, 福田暢, 梅木育磨, 笠井悠里, 松成ひとみ, 長嶋比呂志: ブタ体外生産胚の発生能評価: EmbryoScope による解析. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-33) 福田暢, 中野和明, 浅野吉則, 武石透輝, 畑江将太, 内倉鮎子, 梅木育磨, 笠井悠里, 勝俣佑紀, 八島紗耶香, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: Gamete Intra Fallopian Transfer(GIFT)法による糖尿病発症ミニブタの作出. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-34) 笠井悠里, 梅山一大, 渡邊将人, 中野和明, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 武石透輝, 畑江将太, 浅野吉則, 長屋昌樹, 渡辺航太, 堀内圭輔, 松本守雄, 長嶋比呂志: Fibrillin-1 遺伝子ノックアウトによる Marfan 症候群モデルブタの開発. In: 第 108 回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 5-35) 内倉鮎子, 中野和明, 松成ひとみ, 畑江将太, 長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の性能の従来法との直接比較. In: 第 18 回日本 IVF 学会学術集会: 26-27 Sep 2015; 福岡.
- 5-36) 渡辺航太, 堀内圭輔, 梅山一大, 長嶋比呂志, 中村雅也, 松本守雄: Zinc finger nuclease による fibrillin 1 遺伝子ノックアウトブタの作出-側弯症モデルの開発をめざして-. In: 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会: 22-23 Oct 2015; 富山.
- 5-37) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 勝俣佑紀, 松村和明, 玄丞侏, 持田壤治, 長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートの長期ガラス化保存法の開発. In: 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会: 22-23 Oct 2015; 富山.

- 5-38) 絵野沢伸, 崔昌浩, 松成ひとみ, 長嶋比呂志: 凍結保存肝細胞の機能維持および移植後生着に対する天然フラボノール myricetin の効果. In: 第42回日本臓器保存生物医学学会学術集会: 13-14 Nov 2015; 盛岡.
- 5-39) 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 梅山一大, 長屋昌樹, 宮川周士, 花園豊, 中内啓光, 長嶋比呂志: 人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子ノックアウト細胞の樹立およびブタの作出効率. In: 第38回日本分子生物学会: 1-4 Dec 2015; 神戸.

研究分担者：吉村英恭（明治大学）

1. 審査付原著論文（査読つき **Proceedings** 含む）

- 1-1) Z. Zhuang, H. Yoshimura and M. Aizawa, “Synthesis and ultrastructure of plate-like apatite single crystals as a model for tooth enamel”, *Mater. Sci. Engineer. C*, 33, 2534-2540 (2013).
- 1-2) 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 Biomaterialia*, 9, 6732-6740 (2013).
- 1-3) 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).
- 1-4) 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 Engineering Materials*, 493-494, 320-324 (2012).
- 1-5) Characterization of CdTe nanocrystals during their synthesis in liquid paraffin: optical properties and particle growth, Georgi Yordanov and Hideyuki Yoshimura, Ceko Dushkin, *J Mater Sci* 46, 2338–2344 (2011).
- 1-6) Synthesis of Uniform and Dispersive Calcium Carbonate Nanoparticles in a Protein Cage through Control of Electrostatic Potential, Hiroko Fukano, Takuya Takahashi, Mamoru Aizawa and Hideyuki Yoshimura, *Inorganic Chemistry* 50, 6526-6532 (2011).
- 1-7) Micro-CT of Porous Apatite Fiber Scaffolds Studied by Projection X-ray Microscopy, Junichi Moriya, Mamoru Aizawa and Hideyuki Yoshimura, *AIP Conference Proceedings*, 1365, 407-410 (2011).
- 1-8) Synthesis of ZnO Nanoparticles in the Presence of Different Additives, B. Boche, G. Yordanov, H. Yoshimura and C. Dushkin, *Nanoscience & Nanotechnology*, 11, 58-61 (2011).

研究分担者：渡邊友亮（明治大学）

1. 審査付原著論文（査読つき **Proceedings** 含む）

- 1-1) Yuki MARUYAMA and Tomoaki WATANABE, Low-temperature synthesis of CaAlSiN₃:Ce³⁺ using the ammonothermal method, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 124 [1] 66-69 (2016)
- 1-2) Masayuki Inomata, Kazuhisa Kishida, Yuki Maruyama, Tomoaki Watanabe, Synthesis of a new scheelite-type Eu³⁺-doped Gd₂W₂O₉ red light emitting phosphor by the polymerized complex method, *Solid State Sciences* 48 (2015) 251-255
- 1-3) Chihiro Izawa and Tomoaki Watanabe, ”Direct Fabrication of LaTiO₂N Photoanode for Visible-light-driven Water Splitting”, *Chem. Lett.*, **43(9)**, 1441-1443 (2014).
- 1-4) Taiki Ihara, Ken-ichi Katsumata, Tomoaki Watanabe, Kiyoshi Okada and Nobuhiro Matsushita, “Nitrogen-doped ZnO Rods Synthesized from an Ammine-Hydroxo Zinc Complex”, *Chem. Lett. Advance Publication on the web* February 14, (2015).
- 1-5) Kazuhisa Kishida and Tomoaki Watanabe, “Photocatalytic properties of lanthanide tungstates Ln₂W₂O₉ (Ln = La, Pr, Nd, Sm, and Gd)”, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, **75**, 486-490 (2014).
- 1-6) Kazumichi Nonaka, Kazuhisa Kishida, Chihiro Izawa and Tomoaki Watanabe, Low temperature ammonothermal synthesis of europium-doped SrAlSiN₃: effect of mineralizers, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 122 [1] pp.17-20 (2014)

- 1-7) Kazuhisa Kishida and Tomoaki Watanabe, Morphological change and enhanced photocatalytic activity of tantalum nitride (Ta_3N_5) by ammonothermal treatment with mineralizer, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 122 [2] pp.156-160 (2014)
- 1-8) Kazuhisa Kishida and Tomoaki Watanabe, Photocatalytic properties of lanthanide tungstates $Ln_2W_2O_9$ ($Ln=La, Pr, Nd, Sm, \text{ and } Gd$), *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 75 pp.486-490 (2014)
- 1-9) Phanawan Whangdee, Siritida Chukasorn, Viritpon Srimaneepong, Tomoaki Watanabe and Dujreutai Pongkao Kashima, Effects of Surface Roughness and Chemical Species on Hydrophilicity of Anodized Film on Ti-6Al-4V Formed at a Low Current Density, *Advanced Materials Research* 664 pp. 774-779 (2013)
- 1-10) Sugata Ray, Yury V Kolen'ko, Kirill A Kovnir, Oleg I Lebedev, Stuart Turner, Tanushree Chakraborty, Rolf Erni, Tomoaki Watanabe, Gustaaf Van Tendeloo, Masahiro Yoshimura and Mitsuru Itoh, Defect controlled room temperature ferromagnetism in Co-doped barium titanate nanocrystals, *Nanotechnology* 23 (2012) 025702 (10pp)
- 1-11) Kazuhisa Kishida, Tomoaki Watanabe, Improvement of photocatalytic activity of tantalum nitride by ammonothermal treatment at high pressure, *J. Solid State Chemistry*, 191 (2012) 15-18
- 1-12) Tomoaki Watanabe, Kazumichi Nonaka, JinWang LI, Kazuhisa Kishida and Masahiro Yoshimura, Low temperature ammonothermal synthesis of europium-doped $SrAlSiN_3$ for a nitride red phosphor, *J. Ceramic Society of Japan*, 120 [11], 500-502 (2012).
- 1-13) Yuki Maruyama, Chihiro Izawa, and Tomoaki Watanabe, Synthesis of $BiNbO_4$ by the Flux Method, *ISRN Materials Science*, 2012 (2012), Article ID 170362, 5 pages
- 1-14) Kohei Shimada, Chihiro Izawa and Tomoaki Watanabe, Low-Temperature Synthesis of $-BiTa$ Photocatalyst by the Flux Method, *ISRN Materials Science* (2012), Article ID 719087, 6 pages
- 1-15) Tomoaki Watanabe, Keisuke Tajima, JinWang Li, Nobuhiro Matsushita, Masahiro Yoshimura, Low-temperature Ammonothermal Synthesis of $LaTaON_2$, *Chem. Lett.* 40 (2011) 1101-1102
- 1-16) Akiko Hayashi, Naoki Yokoo, Toshihiro Nakamura, Tomoaki Watanabe, Hiromichi Nagasawa, Toshihiro Kogure, Crystallographic characterization of the crossed lamellar structure in the bivalve *Meretrix lamarckii* using electron beam techniques, *J. of Structural Biology* 176 (2011) 91-96
- 1-17) Chihiro Izawa and Tomoaki Watanabe, Direct Fabrication of $La_2Ti_2O_7$ Films on Titanium Metal Substrate by Hydrothermal Reaction, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan* 36 [3] (2011) 413-416

2. 学会発表

<招待講演・海外>

- 2-1) Tomoaki Watanabe, Recent advance in nitride photocatalyst materials, 5th INTERNATIONAL SOLVOTHERMAL AND HYDROTHERMAL ASSOCIATION CONFERENCE, January 17-20, 2016, Taiwan
- 2-2) Tomoaki Watanabe, Synthesis of Nitride Photocatalyst Materials by Ammonothermal Method, International Conference on Traditional and Advanced Ceramics (ICTA2015) 8-10 Sep. 2015, Bangkok, Thailand
- 2-3) Tomoaki Watanabe, Ammonothermal Route to Nitride Photocatalyst, ICMAT2 015 & IUMRS-ICA 2015, 1 July 2015 Singapore

研究分担者：平岡和佳子（明治大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) Y. Miura, T. Sato, Y. Sakurai, R. Sakai, W. Hiraoka and T. Endo, "Hyper-O-GlcNAcylation inhibits the induction of heat shock protein 70 (Hsp 70) by sodium arsenite in HeLa cells", *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1308-1314 (2014).
- 1-2) W. Hiraoka, H. Kato, O. Nawa, A. Kato and M. Mutoh, "Role of reactive oxygen species in vitamin D₃-induced cell differentiation", *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **54 suppl.**, 112 (2014).

- 1-3) R. Fuji and W. Hiraoka “Antineoplastic effect of MHz ultrasound to leukemia cells”, Proceedings of Symposium on Ultrasonic Electronics, 34, 351-352 (2013).
- 1-4) W. Hiraoka, H. Kato and A. Kato, “Crucial role of reactive oxygen intermediates in 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and phorbol 12-myristate 13-acetate-induced monocytic differentiation of myeloid leukemia PLB-985 cells”, Free Radical Biology and Medicine, **53**, Supplement 1, S164 (2012).
- 1-5) H. Kato, T. Suzuki, O.Nawa and W. Hiraoka, “Effect of the Interaction between IP6 and ROS on Cell Proliferation and Cell Differentiation”, Free Radical Biology and Medicine, **53**, Supplement 2, S148 (2012).
- 1-6) Inositol hexaphosphate and its apatite cements-induced ROS generation and their biological effects on human cells. Aska Kato and Wakako Hiraoka, Free Radical Biology & Medicine, Vol.51, Supplement 1, S145, 2011.

2. 国際会議

- 2-1) S. Kondo, M. Yagi, K. Iwama, H. Onda and W. Hiraoka, Redox activity of metal-containing prion peptide”, ICRR2015, Kyoto, May 25-29, 2015.
- 2-2) K. Takei, H. Koura, R. Fuji and W. Hiraoka, “The biological effect induced by MHz ultrasound”, ICRR2015, Kyoto, May 25-29, 2015.
- 2-3) H. Koura, R. Fuji, A. Kato, M. Mutoh and W. Hiraoka, “Activation of caged compounds induced by ultrasound”, ICRR2015, Kyoto, May 25-29, 2015.
- 2-4) H. Tanaka, H. Saito, H. Kato, O. Nawa, A. Kato, M. Mutoh and W. Hiraoka, “Oxidative stress modulated vitamin D-induced myeloid cell differentiation”, ICRR 2015, Kyoto, May 25-29, 2015.

研究分担者：竹中麻子（明治大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) Toyoshima Y, Tokita R, Taguchi Y, Akiyama-Akanishi N, Takenaka A, Kato H, Chida K, Hakuno F, Minai S and Takahashi S-I. Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation. Endocrine Journal, 61(5): 499-512 (2014).
- 1-2) Y. Ozaki, T. Takeda, N. Akanishi, F. Hakuno, Y. Toyoshima, S-I. Takahashi and A. Takenaka. “Effects of insulin injection on enhanced insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in the liver during dietary protein restriction”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, doi: 10.1080/09168451.2014.877825, (2014).
- 1-3) Y. Toyoshima, R. Tokita, Y. Taguchi, N. Akiyama-Akanishi, A. Takenaka, H. Kato, K. Chida, F. Hakuno, S. Minai and S-I. Takahashi. “Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation”, *Endocrine Journal*, doi: 10.1507/endocrj. EJ13-0514, (2014).
- 1-4) Orié Yoshinari, Asako Takenaka and Kiharu Igarashi, “Trigonelline Ameliorates Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. “, *Journal of Medical Food*, **16 (1)**, 1–8 (2013).
- 1-5) Terada Y., Okura Y., Kikusui T. and Takenaka A. (2011) Dietary Vitamin E Deficiency Increases Anxiety-Like Behavior in Juvenile and Adult Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75(10): 1894-1899.

2. 著書・総説、解説等

- 2-1) 高木真理、橋本理恵子、竹中麻子“ビタミンE欠乏がメスラットの不安行動におよぼす影響の解析、ビタミンE研究の進歩XVI”、ビタミンE研究会編、pp40-43 (2014).
- 2-2) 大倉悠毅、寺田裕紀、橋本理恵子、大橋広弥、大谷祐貴、徳永香南子、松本康志、高木真理、中間未祈子、遠藤駿、竹中麻子 “ビタミンE欠乏と不安行動”、ビタミン(2015).
- 2-3) 竹中麻子、”食品成分と遺伝子（共著） 加藤久典・藤原葉子編、”栄養科学イラストレイティッド 分子栄養学”、羊土社(2014), p153-166.
- 2-4) 高橋伸一郎、金子元、竹中麻子、東祐輔、尾添淳文、伯野史彦, “酸化ストレスとインスリン様活性の相互作用が健康寿命延伸に果たす役割”, 医学のあゆみ, **247(9)**, 934-941 (2013).

- 2-5) 竹中麻子, “さまざまな生物におけるビタミン E の選択的体内輸送と機能“, ビタミン, **86(9)**, 521-523(2012).
- 2-6) 橋本理恵子、大谷祐貴、徳永香南子、竹中麻子, “ビタミン E 摂取量の違いがラットの不安行動におよぼす影響の解析“, ビタミン E 研究の進歩 XV, 1-5 (2012)

研究分担者：深澤倫子（明治大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) *Tomoko Ikeda-Fukazawa: Molecular dynamical investigations for effect on temperature history of forsterite glass, *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan* **23** (in press).
- 1-2) *Tomoko Ikeda-Fukazawa and Yuihiro Kawahara: Effects of empty cages on lattice distortion of tetrahydrofuran clathrate hydrate, *Journal of the Physical Society of Japan* **85** (2015) 014801 (6-pages).
- 1-3) *Takuro Kobashi, Tomoko Ikeda-Fukazawa, M. Suwa, J. Schwander, T. Kameda, J. Lundin, A. Hori, M. Döring, and M. Leuenberger: Post bubble-closeoff fractionation of gases in polar firn and ice cores: effects of accumulation rate on permeation through overloading pressure, *Atmospheric Chemistry and Physics* **15** (2015) 15711–15753.
- 1-4) Yurina Sekine, Riki Kobayashi, Songxue Chi, Jaime A. Fernandez-Baca, Kentaro Suzuya, Fumika Fujisaki, Kazutaka Ikeda, Toshiya Otomo, Tomoko Ikeda-Fukazawa, Hiroki Yamauchi, and *Hiroshi Fukazawa: Neutron Diffraction of Ice and Water in Hydrogels, *Journal of the Physical Society of Japan Conference Proceedings* **8** (2015) 033009 (6-pages).
- 1-5) Yurina Sekine, Hajime Takagi, Sayoko Sudo, Yutaro Kajiwara and Hiroshi Fukazawa, *Tomoko Ikeda-Fukazawa, “Dependence of structure of polymer side chain on water structure in hydrogels”, *Polymer*, **55**, 6320-6324 (2014).
- 1-6) Yurina Sekine, Tomoko Ikeda-Fukazawa, Mamoru Aizawa, Riki Kobayashi, Songxue Chi, Jaime A. Fernandez-Baca, Hiroki Yamauchi and Hiroshi Fukazawa, “Neutron Diffraction of Ice in Hydrogels”, *Journal of Physical Chemistry B*, **118**, 13453-13457 (2014).
- 1-7) K. Kudo, J. Ishida, G. Syuu, Y. Sekine, and T. Ikeda-Fukazawa: Structural changes of water in poly(vinyl alcohol) hydrogel during dehydration, *Journal of Chemical Physics* **140** (2014) 044909 (8-pages).
- 1-8) Y. Sekine, K. Okazaki, T. Ikeda-Fukazawa, M. Ichikawa, K. Yoshikawa, S. Mukai, and *K. Akiyoshi: Microrheology of polysaccharide nano gel-integrated system, *Colloid Polymer Science* **292** (2014) 325-331.
- 1-9) Tomoko Ikeda-Fukazawa, Naohiro Ikeda, Mayu Tabata, Masataka Hattori, Mamoru Aizawa, Shunji Yunoki, Yurina Sekine: Effects of Cross-linker Density on the Polymer Network Structure in Poly-N,N-dimethylacrylamide Hydrogels, *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, **51**, 1017-1027 (2013).
- 1-10) Y. Sekine, Y. Moritani, T. Ikeda-Fukazawa, Y. Sasaki, K. Akiyoshi: A Hybrid Hydrogel Biomaterial by Nanogel Engineering: Bottom-Up Design with Nanogel and Liposome Building Blocks to Develop a Multidrug Delivery System, *Adv. Healthcare Mater* **1**, 722-728 (2012).

2. 学会発表

- 2-1) Rentaro Netsu, Tomoko Ikeda-Fukazawa: Structural change of vapor deposited H₂O–CO₂ amorphous ice with warming, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii, USA), Dec. 2015.
- 2-2) Yu Kumagai, Tomoko Ikeda-Fukazawa: Surface structure of amorphous ice, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii, USA), Dec. 2015.
- 2-3) Masaya Aoki, Tomoko Ikeda-Fukazawa: Adsorption and Diffusion of Proton on Amorphous Ice, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii, USA), Dec. 2015.
- 2-4) Ryo Naohara, Kentaro Narita, Tomoko Ikeda-Fukazawa: X-ray diffraction study of polymer hydrogels during dehydration, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii,

- USA), Dec. 2015.
- 2-5) Yu Tojima, Yurina Sekine, Tomoko Ikeda-Fukazawa: Effects of side chain structure on dehydration process of polymer hydrogel, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii, USA), Dec. 2015.
- 2-6) Yuki Takeuchi, Tomoko Ikeda-Fukazawa: Structure of ice in poly-N,N-dimethylacrylamide hydrogel, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii, USA), Dec. 2015.
- 2-7) Junki Kodama, Yurina Sekine, Kazunari Akiyoshi, Tomoko Ikeda-Fukazawa: Water states in physically cross-linked nanogel, International Chemical Congress of Pacific Basin Society 2015, Honolulu (Hawaii, USA), Dec. 2015.
- 2-8) 青木雅矢, 深澤倫子: アモルファス氷における吸着物質の表面拡散, 第29回分子シミュレーション討論会, 新潟コンベンションセンター, 2015年11月.
- 2-9) 熊谷悠, 深澤倫子: アモルファス氷表面の構造およびダイナミクス, 第29回分子シミュレーション討論会, 新潟コンベンションセンター, 2015年11月.
- 2-10) 深澤倫子: 分子動力学計算によるアモルファス表面構造の解析, 第3回宇宙分子進化研究会, 北海道大学, 2015年10月.
- 2-11) 根津蓮太郎, 深澤倫子: CO₂を含むアモルファス氷の相転移, 第3回宇宙分子進化研究会, 北海道大学, 2015年10月.
- 2-12) 青木雅矢, 深澤倫子: アモルファス氷表面における水素原子の拡散, 第3回宇宙分子進化研究会, 北海道大学, 2015年10月.
- 2-13) 熊谷悠, 深澤倫子: アモルファス氷の相転移, 第3回宇宙分子進化研究会, 北海道大学, 2015年10月.
- 2-14) 猶原諒, 成田健太郎, 岡野佑司, 関根由莉奈, 深澤倫子: 高分子ハイドロゲル中に存在する水の構造の含水率依存性, 第64回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター, 2015年5月.
- 2-15) 猶原諒, 成田健太郎, 岡野佑司, 関根由莉奈, 深澤倫子: X線回折法による高分子ハイドロゲル中の水の構造解析, 日本化学会第95春季年会, 日本大学, 2015年3月.
- 2-16) 東島優, 関根由莉奈, 深澤倫子: ポリマーハイドロゲルにおける水の構造のポリマー種依存性, 日本化学会第95春季年会, 日本大学, 2015年3月.

研究分担者：神澤信行（上智大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) N. Kanzawa, H. Takano H, K. Yasuda, M. Takahara, M. Aizawa, “Studies on connexin 43, a gap-junction protein, in P19 embryonal carcinoma cells after culture on an apatite fiber scaffold.” *Key Enginner. Mater* (2016) in press
- 1-2) H. Ohsugi, J. Hatsukawa, M. Takahara, M. Aizawa and N. Kanzawa, “Real-time evaluation of the effects of dexamethasone on osteoblasts using dual labeling with fluorescent probes.”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 379-383 (2015).
- 1-3) K. Yasuda, M. Takahara, M. Aizawa and N. Kanzawa, “P19.CL6 cells cultured in AFS differentiate into cardiomyocytes.”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 295-299 (2015).
- 1-4) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties.”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 107-112 (2015).
- 1-5) S. Motojima, N. Igeta, H. Muramatsu, H. Uchida, K. Itatani, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Fabrication of apatie-fiber scaffolds with enhanced mechanical property using chemical cross-linking of type I-collagen and their biocompatibility.”, *J. Soc. Inorg. Mater Jpn.*, **21**, 278-285 (2014).
- 1-6) R. Okuhata, Y. Otsuka, T. Takahide, N. Kanzawa, “Mutagenesis of apyrase conserved region 1 alters the nucleotide substrate specificity”, *Plant Sig. Behav.* in press (2013)
- 1-7) M. Honda, N. Kanzawa, M. Aizawa, “In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route”, *Mater. Sci. Eng. C.* **33**, 2008-5018 (2013)

- 1-8) M. Honda, Y. Watanabe, T. Tsuchiya, N. Kanzawa, 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.* **121**, 759-765 (2013)
- 1-9) 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 Enginner. Mater.* **529-530**, 370-373 (2013).
- 1-10) 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 Enginner. Mater.* **529-530**, 187-191 (2013)
- 1-11) T. Inayama, H. Konishi, M. Aizawa and N. Kanzawa, ”Studies on the anti-tumor action of chelate-setting apatite cements”, *Key Enginner. Mater.* **529-530**, 178-182 (2013)
- 1-12) Kawanobe Y., Honda M., Konishi T., Mizumoto M., Habuto Y., Kanzawa N., Zhuang Z. and Aizawa M., “Preparation of silver-containing hydroxyapatite powder by ultrasonic spray-pyrolysis technique and its antibacterial property.” *Key Engineer. Mater.* **493-494**: 678-683 (2012)
- 1-13) Konishi H., Honda M., Aizawa M. and Kanzawa N., “Biochemical studies of the potential anti-tumor activity of novel chelate-setting apatite cements.”, *Key Enginner. Mater.* **493-494**: 315-319 (2012)
- 1-14) Liu Z., Kanzawa N. and Ono S., “Calcium-sensitive activity and conformation of Caenorhabditis elegans gelsolin-like protein 1 are altered by mutations in the first gelsolin-like domain.”, *J. Biol. Chem.* **286**: 34051-34059 (2011)
- 1-15) Ito S., Shimizu M., Nagatsuka M., Kitajima S., Honda M., Tsuchiya T. and Kanzawa N., “High molecular weight lectin isolated from mucus of the giant African snail, Achatina fulica.”, *Biosci. Biotech. Biochem.* **75** (1): 20-25 (2011)
- 1-16) Okuhata R., Takishima T., Nishimura N., Ueda S., Tsuchiya T. and Kanzawa N., “Purification and biochemical characterization of a novel ecto-apyrase, MP67 from Mimosa pudica.”, *Plant Physiol* **157**: 464-475 (2011.9)
- 1-17) Ueda M., Manabe Y., Otsuka Y. and Kanzawa N., ”Cassia obtusifolia MetE as a cytosolic target for potassium isolespedezate, a leaf-opening factor of Cassialants: target exploration by compact molecular probe strategy.”, *Chem. Asian J.* **6**: 3286-3297 (2011)

3. 学会発表

国際学会

- 3-1) K. Izawa, Y. Takeoka, M. Aizawa, N. Kanzawa, “Mechanical and biological properties of alginate-coated beta-tricalcium phosphate-fiber scaffold.” 10th World Biomaterials Congress (WBC), Montreal, QC Canada (May 17-22, 2016)
- 3-2) N. Kanzawa, H. Takano, K. Yasuda, M. Takahara, M. Aizawa, “Studies on connexin 43, a gap-junction protein, in P19 embryonal carcinoma cells after culture on an apatite fiber scaffold.” Bioceramics 27, 27th International Symposium on Ceramics in Medicine. Bali, Indonesia, (Oct 27-29, 2015)

研究分担者：本田みちよ（上智大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) M. Nagaya, Y. Arai, H. Matsunari, M. Honda, K. Nakano, M. Maehara, N. Sugimoto, M. Kobayashi, R. Sakai, Y. Asano, M. Watanabe, K. Umeyama, and H. Nagashima, “A new system to evaluate the influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets using epigenetic analysis in a three-dimensional culture”, *Pancreas*, **44**, 778-785 (2015).
- 1-2) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “Antibacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties”, *J. Biomed. Mater. Res A.* **103A**, 57-64 (2015).
- 1-3) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 107-112 (2015).

- 1-4) T. Konishi, M. Honda, T. Yoshioka, S. Hayakawa and M. Aizawa, “Preparation of *a*-tricalcium phosphate powders surface-modified with inositol phosphate for cement fabrication”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 1113-1118 (2015).
- 1-5) K. Kiminami, K. Matsuoka, K. Nagata, M. Honda, G. Hayashida, K. Nakano, M. Nagaya, H. Arimura, H. Nagashima and M. Aizawa, “Development of bioresorbable calcium-phosphate cements hybridized with gelatin particles and their in vivo evaluation using pig’s tibia model”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 397-401 (2015).
- 1-6) M. Aizawa, Y. Chibu, K. Nagata, T. Konishi, K. Ishi, H. Funao, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Honda, “In vivo evaluation of chelate-setting cement fabricated from hydroxyapatite including bone minerals using a rabbit’s tibia model”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 402-407 (2015).
- 1-7) S. Motojima, N. Igeta, H. Muramatsu, H. Uchida, K. Itatani, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Fabrication of apatite-fiber scaffolds with enhanced mechanical property using chemical cross-linking of type I-collagen and their biocompatibility”, *J. Soc. Inorg. Mater. Jpn.*, **21**, 278-285 (2014).
- 1-8) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Antibacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103A**, 57-64 (2014).
- 1-9) 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粉碎および表面修飾を同時に行なった湿式合成水酸アパタイト粉体からのキレート硬化型セメントの作製とその材料特性”, *J. Soc. Inorg. Mater.*, **21**, 99-105 (2014).
- 1-10) M. Honda, Y. Kawanobe, K. Ishii, T. Konishi, M. Mizumoto, N. Kanzawa, M. Matsumoto and M. Aizawa, “In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route”, *Mater. Sci. Engineer. C*, **33**, 5008-5018 (2013).
- 1-11) 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.*, **121**, 759-765 (2013).
- 1-12) T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima and M. Aizawa, “Biodegradable α -tricalcium phosphate cement with anti-washout property based on chelate-setting mechanism of inositol phosphate”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 1383-1394 (2013).
- 1-13) 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).
- 1-14) (*1) 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).
- 1-15) 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**, 59-64 (2012).
- 1-16) 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 *a*-tricalcium phosphate cement”, *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 105-108 (2012).
- 1-17) M. Honda, K. Kikushima, Y. Kawanobe, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, “Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray pyrolysis route”, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **23**, 2923-2932 (2012).
- 1-18) 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).
- 1-19) M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda, 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).

- 1-20) H. Konishi, M. Honda, M. Aizawa, N. Kanzawa, “Biochemical Studies of the potential anti-tumor activity of Novel Chelate-Setting Apatite Cements”, *Key. Eng. Mater.*, **493-494**, 315-319 (2012).
- 1-21) 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).
- 1-22) Y. Nakashima, M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting cement using silicon-substituted hydroxyapatite and its property”, *Key. Eng. Mater.*, **493-494**, 370-374 (2012).
- 1-23) 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).
- 1-24) (*6) 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. Aus. Ceram. Soc.*, **47**, 37-41 (2011).
- 1-25) 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. Aus. Ceram. Soc.*, **46**, 6-10 (2011).
- 1-26) S. Ito, M. Shimizu, M. Nagatsuka, S. Kitajima, M. Honda, T. Tsuchiya and N. Kanzawa, “High molecular weight lectin isolated from the mucus of the giant African snail *Achatina fulica*.”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 20-25 (2011).
- 1-27) S. Takahashi, T. Konishi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe and M. Aizawa, “Fabrication of novel bioresorbable β -tricalcium phosphate cement on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate and its evaluation”, *J. Ceram. Soc. Jpn*, **119**, 35-42 (2011).

2. 著書・総説、解説等

- 2-1) 相澤 守, 小西敏功, 本田みちよ, 松本守雄, “キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの生体吸収性と *in vitro* 溶解性との関連性 —JIS T 0330 - 3 「生体活性バイオセラミックス第3部：溶解速度試験方法」による検証—”, *J. Soc. Inorg. Mater.*, **22**, 220-229 (2015).
- 2-2) 監修：大政健史, 福田淳二, 共著者：本田みちよほか84名, 「三次元ティッシュエンジニアリング～細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで～」, エヌ・ティー・エス, 「第1編第2章第7節 硬組織のためのスキャフォールド」, 103-112 (2015)
- 2-3) 本田みちよ, “技術シーズを活用した研究開発テーマの発掘 ～抗菌性生体材料を活用した研究開発テーマの発掘～”, 712-718 (2013).
- 2-4) (*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”, 無機マテリアル学会誌, **19**, 423-429 (2012).

3. 特許

- 3-1) 特願 2012-026921、本田みちよ・相澤 守、「抗菌性材料」、財団法人神奈川科学技術アカデミー (出願日 2012年2月10日)

4. 学会発表

- 4-1) M. Honda and M. Aizawa, “Enhancement of osteogenesis in coculture of endothelial cells and osteoblasts in three-dimensional apatite-fiber scaffold”, 15th Asian Bioceramics Symposium (ABC2015), Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, 2015/12/10.
- 4-2) 本田みちよ, 相澤 守, “三次元培養スキャフォールドを用いた骨組織再生における血管内皮細胞と骨芽細胞の関係”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 2015年11月9日

研究分担者：松本守雄（慶應義塾大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) Ogura Y, (以下19名), Watanabe K₂ (以下12名), Matsumoto M, Ikegawa S: A Functional SNP in BNC2

- Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Am J Hum Genet.* (査読有り) 97:337-342, 2015.
- 1-2) Katsuyama E, (以下 12 名), Matsumoto M, (以下 2 名) : Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells. *J Biol Chem.* (査読有り) 290:716-26, 2015.
- 1-3) Sugai K, (以下 5 名), Matsumoto M, (以下 3 名): Neural stem/progenitor cell-laden microfibers promote transplant survival in a mouse transected spinal cord injury model. *J Neurosci Res.* (査読有り) 2015 [E-pub] .
- 1-4) Tohmonda T, (以下 2 名), Matsumoto M, (以下 4 名) : IRE1 α /XBP1-mediated branch of the unfolded protein response regulates osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* (査読有り) 125:3269-79, 2015.
- 1-5) Yagi M, (以下 1 名), Watanabe K, (以下 1 名), Matsumoto M: The paravertebral muscle and psoas for the maintenance of global spinal alignment in patient with degenerative lumbar scoliosis. *Spine J*, 2015. [E-pub] .
- 1-6) Hikata T, Watanabe K, (以下 6 名), Matsumoto M: Impact of sagittal spinopelvic alignment on clinical outcomes after decompression surgery for lumbar spinal canal stenosis without coronal imbalance. *J Neurosurg Spine.* (査読有り) 23:451-8, 2015.
- 1-7) Hao W, (以下 12 名), Matsumoto M, (以下 3 名) : Hyperglycemia Promotes Schwann Cell De-differentiation and De-myelination via Sorbitol Accumulation and Igf1 Protein Down-regulation. *J Biol Chem.* (査読有り) 290:17106-15, 2015.
- 1-8) Yamaguchi SI, (以下 7 名), Matsumoto M, (以下 5 名) : Synergistic antiproliferative effect of imatinib and adriamycin in platelet-derived growth factor receptor-expressing osteosarcoma cells. *Cancer Sci.* (査読有り) 106:875-82, 2015.
- 1-9) Hosogane N, Watanabe K, (以下 3 名), Matsumoto M: Scoliosis is a Risk Factor for Gastroesophageal Reflux Disease in Adult Spinal Deformity. *J Spinal Disord Tech*, 2015 [E-pub] .
- 1-10) Sharma S, (以下 6 名), Matsumoto M (以下 3 名) : A PAX1 enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females. *Nat Commun.* (査読有り) 18;6:6452, 2015.
- 1-11) Fujie A, (以下 13 名), Matsumoto M (以下 2 名): Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有り) 457:451-6, 2015.
- 1-12) Okada E, Watanabe K, (以下 5 名), Matsumoto M: Posterior correction and fusion surgery using pedicle-screw constructs for Lenke type 5C adolescent idiopathic scoliosis: a preliminary report. *Spine.* (査読有り) 40:25-30, 2015.
- 1-13) Cao K, Watanabe K, Kawakami N, Tsuji T, Hosogane N, Yonezawa I, Machida M, Yagi M, Kaneko S, Toyama Y, Matsumoto M, “Selection of lower instrumented vertebra in treating Lenke type 2A adolescent idiopathic scoliosis”, *Spine*, **39**, E253-261(2014).
- 1-14) Kiriya Y, Watanabe K, Matsumoto M, Toyama Y, Nagura T, “Quantification of the spatial strain distribution of scoliosis using a thin-plate spline method”, *Journal of Biomechanics*, **47**, 302-307(2014).
- 1-15) Tanaka N, Konno S, Takeshita K, Fukui M, Takahashi K, Chiba K, Miyamoto M, Matsumoto M, Kasai Y, Kanamori M, Matsunaga S, Hosono N, Kanchiku T, Taneichi H, Hashizume H, Kanayama M, Shimizu T, Kawakami M, “An outcome measure for patients with cervical myelopathy: Japanese Orthopaedic Association Cervical Myelopathy Evaluation Questionnaire (JOACMEQ): An average score of healthy volunteers”, *Journal of Orthopaedic Science*, **19**, 33-48(2014).
- 1-16) Hikata T, Iwanami A, Hosogane N, Watanabe K, Ishii K, Nakamura M, Kamata M, Toyama Y, Matsumoto M, “High preoperative hemoglobin A1c is a risk factor for surgical site infection after posterior thoracic and lumbar spinal instrumentation surgery”, *Journal of Orthopaedic Science*, **19**, 223-228(2014).
- 1-17) Mori T, Sato Y, Miyamoto L, Kobayashi T, Shimizu T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Iwasaki T, Kawana H, Morioka H, Matsumoto M, Saya H, Toyama Y, Miyamoto T, “TNF α promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state”, *Oncogene*, **14**; **33**, 4236-4241(2014).
- 1-18) Kanagawa H, Niki Y, Kobayashi T, Sato Y, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Watanabe R, Morita M, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T, “Mycobacterium

tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2”, *Journal of Bone and Mineral Metabolism* [Epub ahead of print].

- 1-19) Yagi M, Hosogane N, Okada E, Watanabe K, Machida M, Tezuka M, Matsumoto M, Asazuma T, “Factors affecting the post operative progression of thoracic kyphosis in surgically treated adult patient with lumbar degenerative scoliosis”, *Spine*, **39**, E521-528(2014).
- 1-20) Londono D, Kou I, Johnson TA, Sharma S, Ogura Y, Tsunoda T, Takahashi A, Matsumoto M, Herring JA, Lam TP, Wang X, Tam EMS, Song YQ, Fan YH, Chan D, Cheah KSE, Qiu X, Jiang H, Huang D, Japanese Scoliosis Clinical Research Group, TSRHC IS Clinical Group, the International Consortium for Scoliosis Genetics, Su P, Sham P, Cheung KMC, Luk KDK, Gordon D, Qiu Y, Cheng J, Tang N, Ikegawa S, Wise CA, “A meta-analysis identifies adolescent idiopathic scoliosis association with LBX1 locus in multiple ethnic groups”, *Journal of Medical Genetics*, **51**, 401-406(2014).
- 1-21) Kakinuma H, Ishii K, Ishihama H, Honda M, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M, “Anti-bacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity and anti-bacterial properties”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [Epub ahead of print].
- 1-22) Oh JK, Smith JS, Shaffrey CI, Lafage V, Schwab F, Ames CP, Matsumoto M, Baik JS, Ha Y, “Sagittal spino-pelvic malalignment in Parkinson's disease: prevalence and associations with disease severity ”, *Spine*, **39**, E833-841(2014).
- 1-23) Funao H, Ishii K, Momoshima S, Iwanami A, Hosogane N, Watanabe K, Nakamura M, Toyama T, Matsumoto M, “Surgeons exposure to radiation in single- and multi-level minimally invasive transforaminal lumbar interbody fusion; A prospective study”, *PLoS One*, **9**, e9523(2014).
- 1-24) Cao K, Watanabe K, Hosogane N, Toyama Y, Yonezawa I, Machida M, Yagi M, Kaneko S, Kawakami N, Tsuji T, Matsumoto M, “Association of postoperative shoulder balance with adding-on in Lenke type II adolescent idiopathic scoliosis”, *Spine*, **39**, E705-712(2014).
- 1-25) Watanabe K, Uno K, Suzuki T, Kawakami N, Tsuji T, Yanagida H, Ito M, Hirano T, Yamazaki K, Minami S, Taneichi H, Imagama S, Takeshita K, Yamamoto T, Matsumoto M, “Risk factors for proximal junctional kyphosis associated with dual-rod growing-rod surgery for early-onset scoliosis”, *Journal of Spinal Disorders and Techniques 2014* [Epub ahead of print].
- 1-26) Kawaguchi Y, Matsumoto M, Iwasaki M, Izumi T, Okawa A, Matsunaga S, Chiba K, Tsuji T, Yamazaki M, Fujimori T, Yoshii T, Toyama Y, “New classification system for ossification of the posterior longitudinal ligament using CT images”, *Journal of Orthopaedic Science. 2014* [Epub ahead of print].
- 1-27) Matsumoto M, Hikata T, Iwanami A, Hosogane N, Watanabe K, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, “Major complications and sequelae after total en bloc spondylectomy for malignant spinal tumors”, *Neurosurgery Quarterly* (in press) .
- 1-28) Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T, Karasugi T, Baba H, Uchida K, Kawabata S, Okawa A, Shindo S, Takeuchi K, Taniguchi Y, Maeda S, Kashii M, Seichi A, Nakajima H, Kawaguchi Y, Fujibayashi S, Takahata M, Tanaka T, Watanabe K, Kida K, Kanchiku T, Ito Z, Mori K, Kaito T, Kobayashi S, Yamada K, Takahashi M, Chiba K, Matsumoto M, Furukawa K, Kubo M, Toyama Y, Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Ikegawa S, “A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine”, *Nature Genetics* , **46**, 1012-6(2014).
- 1-29) Choi HJ, Smith JS, Shaffrey CI, Lafage V, Schwab F, Ames CP, Matsumoto M, Baik JS, Ha Y, “Coronal Plane Spinal Malalignment and Parkinson's Disease: Prevalence and Associations with Disease Severity“, *Spine Journal, 2014* [Epub ahead of print].
- 1-30) Nakayama R, Horiuchi K, Susa M, Watanabe I, Watanabe K, Tsuji T, Matsumoto M, Toyama Y, Morioka H, “Clinical Outcome after Bone Metastasis (BM) Surgery in Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma (DTC): A Retrospective Study of 40 Cases”, *Japanese Journal of Clinical Oncology, 2014* [Epub ahead of print].
- 1-31) Yoshioka K, Ishii K, Kuramoto T, Nagai S, Funao H, Ishihama H, Shiono Y, Sasaki A, Aizawa M, Okada Y, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M, ”A novel mouse model of soft-tissue infection using

- bioluminescence imaging allows noninvasive, real-time monitoring of bacterial growth”, *PLoS One*, **9**, e106367(2014).
- 1-32) Ishikawa M, Cao K, Pang L, Watanabe K, Yagi M, Hosogane N, Machida M, Shiono Y, Nishiyama M, Fukui Y, Matsumoto M, “Postoperative behavior of thoracolumbar/lumbar curve and coronal balance after posterior thoracic fusion for Lenke 1C and 2C adolescent idiopathic scoliosis”, *Journal of Orthopaedic Science*, 2014 [Epub ahead of print].
- 1-33) Matsumoto M, Watanabe K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Yanagida H, Minami S, Akazawa T, “Postoperative shoulder imbalance in Lenke Type 1A adolescent idiopathic scoliosis and related factors”, *BMC Musculoskeletal Disorders*, **15**, 366(2014).
- 1-34) Sato Y, Miyauchi Y, Yoshida S, Morita M, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T, “The Vitamin D Analogue ED71 but Not 1,25(OH)2D3 Targets HIF1 α Protein in Osteoclasts”, *PLoS One*, **9**, e111845(2014).
- 1-35) Katsuyama E, Miyamoto H, Kobayashi T, Sato Y, Hao W, Kanagawa H, Fujie A, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Niki Y, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T, “Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells”, *Journal of Biological Chemistry* 2014[Epub ahead of print].
- 1-36) Ishii K, Kaneko Y, Funao H, Ishihara S, Shinohara A, Nakanishi K, Hikata T, Fujita N, Iwanami A, Hosogane N, Watanabe K, Nagura T, Nakamura M, Toyama Y, Matsumoto M, “A novel percutaneous guide wire (S-Wire) for percutaneous Ppedicle screw insertion: Its development, efficacy, and safety”, *Surgical Innovation* 2014 [Epub ahead of print].
- 1-37) Okada E, Watanabe K, Pang L, Ogura Y, Takahashi Y, Hosogane N, Toyama Y, Matsumoto M, “Posterior correction and fusion surgery using pedicle-screw constructs for Lenke type 5C adolescent idiopathic scoliosis. A preliminary report”, *Spine* (in press).
- 1-38) Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K, “ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface”, *Cytokine*, **71**, 238-245(2014).
- 1-39) Swarkar Sharma, Douglas Londono, Walter Eckalbar, Xiaochong Gao, Dongping Zhang, Kristen Mauldin, Ikuyo Kou, Atsushi Takahashi, Morio Matsumoto, Nobuhiro Kamiya, Karl Murphy, Reuel Cornelia, John Herring, Dennis Burns, Nadav Ahituv, Shiro Ikegawa, Derek Gordon, Carol Wise, “A *PAX1* enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females”, *Nature Communications* (in press).
- 1-40) Watanabe K, Uno K, Suzuki T, Kawakami N, Tsuji T, Yanagida H, Ito M, Hirano T, Yamazaki K, Minami S, Taneichi H, Imagama S, Takeshita K, Yamamoto T, Matsumoto M, “Risk Factors for Proximal Junctional Kyphosis Associated with Dual-Rod Growing-Rod Surgery for Early-Onset Scoliosis”, *J. Spinal Disord. Tech.* (in press).
- 1-41) Hashizume H, Konno S, Takeshita K, Fukui M, Takahashi K, Chiba K, Miyamoto M, Matsumoto M, Kasai Y, Kanamori M, Matsunaga S, Hosono N, Kanchiku T, Taneichi H, Tanaka N, Kanayama M, Shimizu T, Kawakami M, “Japanese orthopaedic association back pain evaluation questionnaire (JOABPEQ) as an outcome measure for patients with low back pain: reference values in healthy volunteers”, *J. Orthop. Sci.*, **20**(2), 264-80(2015). Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition.
- 1-42) Fujie A, Funayama A, Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Hao W, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Kanaji A, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T., “Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **457**: 451-6(2015).
- 1-43) Hosogane N, Watanabe K, Yagi M, Kaneko S, Toyama Y, Matsumoto M, “Scoliosis is a Risk Factor for Gastroesophageal Reflux Disease in Adult Spinal Deformity”, *J. Spinal. Disord. Tech* [Epub ahead of print].

- 1-44) Matsumoto M(corresponding), Watanabe K, Ogura Y, Okada E, Hosogane N, Chiba K, Toyama Y: Short fusion strategy for Lenke type 1 thoracic curve using pedicle screw fixation. *Journal of Spinal Disorders and Techniques* 26:93-97, 2013.
- 1-45) Matsumoto M(corresponding), Ichihara D, Okada E, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Takahata T: Modic changes of the cervical spine in patients with whiplash injury: A prospective 11-year follow-up study. *Injury* 44:819-824, 2013.
- 1-46) Tohmonda T, Yoda M, Mizuochi H, Morioka H, Matsumoto M, Urano F, Toyama Y, Horiuchi K: The IRE1 α -XBP1 Pathway Positively Regulates PTH/PTH-related Peptide Receptor Expression and Is Involved in PTH-induced Osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 288:1691-1695, 2013
- 1-47) Konishi T, Horiguchi Y, Mizumoto M, Honda M, Oribe K, Morisue H, Ishii K, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M: Novel chelate-setting calcium-phosphate cements fabricated with wet-synthesized hydroxyapatite powder. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 24:611-621, 2013.
- 1-48) Matsumoto M(corresponding), Tsuji T, Iwanami A, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Morioka H, Toyama Y: Total en bloc spondylectomy for spinal metastasis of differentiated thyroid cancers: a long-term follow-up. *Journal of Spinal Disorders and Techniques* 26:E137-142, 2013.
- 1-49) Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, JMinami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S: A replication study for association of five single nucleotide polymorphisms with curve progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese. *Spine* 38:571-575, 2013.
- 1-50) Hosogane N, Watanabe K, Kono H, Saito M, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding): Curve progression after decompression surgery in patients with mild degenerative scoliosis. *Journal of Neurosurgery Spine* 18:321-326, 2013.
- 1-51) Kawabata S, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding): Surgical correction of severe cervical kyphosis in patients with neurofibromatosis Type 1. *Journal of Neurosurgery Spine* 18:274-279, 2013.
- 1-52) Yoda M, Kimura T, Tohmonda T, Morioka H, Matsumoto M, Okada Y, Toyama Y, Horiuchi K: Systemic overexpression of TNF α -converting enzyme does not lead to enhanced shedding activity in vivo. *Plos One* 8(1):e54412, 2013.
- 1-53) Konishi T, Takahashi S, Mizumoto M, Honda M, Kida K, Horiguchi Y, Oribe K, Ishii K, Morisue H, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M: Comparative study on bioresorbability of chelate-setting cements with various calcium-phosphate phase using rabbit model. *Key Engineering Materials* 529-530: 167-172, 2013.
- 1-54) Konishi T, Mizumoto M, Honda M, Horiguchi Y, Oribe K, Morisue H, Ishii K, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M: Fabrication of novel biodegradable α -tricalcium phosphate cement set by chelating capability of inositol phosphate and its biocompatibility. *Journal of Nanomaterials* 2013:1-11, 2013.
- 1-55) Song Y-Q, Karasugi T, Cheung KMC, Chiba K, Ho DWH, Miyake A, Kao PYP, Sze KL, Yee A, Takahashi A, Kawaguchi Y, Mikami Y, Matsumoto M, Togawa D, Kanayama M, Shi D, Dai J, Jiang Q, Wu C, Tian W, Wang N, Leong JCY, Luk KKD, Yip S-p, Cherny SS, Wang J, Mundlos S, Kelempisioti A, Eskola PJ, Mannikko M, Makela P, Karppinen J, Jarvelin M-R, Reilly PF, Kubo M, Kimura T, Kubo T, Toyama Y, Mizuta H, Cheah KSE, Tsunoda T, Sham P-C, Ikegawa S, Chan D: Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *Journal of Clinical Investigation* 123: 4909-4917, 2013.
- 1-56) Honda M, Kawanobe Y, Ishii K, Konishi T, Mizumoto M, Kanazawa N, Matsumoto M, Aizawa M: In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route. *Materials Science and Engineering: C Materials for Biological Applications* 33:5008-5018, 2013.
- 1-57) Chikuda H, Ohtsu H, Ogata T, Sugita S, Sumitani M, Koyama Y, Matsumoto M, Toyama Y: Optimal treatment for Spinal Cord Injury associated with cervical canal Stenosis (OSCIS): a study protocol for a randomized controlled trial comparing early versus delayed surgery. *Trials* 14(1):245, 2013.
- 1-58) Nagashima M, Abe H, Amaya K, Matsumoto H, Yanaihara H, Nishiwaki Y, Toyama Y, Matsumoto

- M(corresponding): Risk factors for lumbar disc degeneration in high school American football players: a prospective 2-year follow-up study. *American Journal of Sports Medicine* 41:2059-2064, 2013.
- 1-59) Chen R-Q, Watanabe K, Hosogane N, Hikata T, Iwanami A, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding): Spinal coronal profiles and proximal femur bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis. *European Spine Journal* 22:2433-2437, 2013.
- 1-60) Okada E, Watanabe K, Hosogane N, Shiono Y, Takahashi Y, Nishiwaki Y, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding): Comparison of stainless steel and titanium alloy instruments in posterior correction and fusion surgery for adolescent idiopathic scoliosis-prospective cohort study with minimum 2-year follow-up. *Journal of Medical and Biological Engineering* 33:325-330, 2013.
- 1-61) Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S: A replication study for association of 53 single nucleotide polymorphisms in a scoliosis prognostic test with progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese. *Spine* 38:1375-1379, 2013.
- 1-62) Matsumoto M(corresponding), Watanabe K, Hosogane N, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Yanagida H, Yamaguchi T: Postoperative Distal Adding-on and Related Factors in Lenke Type 1A Curve. *Spine* 38:737-744, 2013.
- 1-63) Karasugi T, Nakajima M, Ikari K, Tsuji T, Matsumoto M, Chiba K, Uchida K, Kawaguchi Y, Mizuta H, Ogata N, Iwasaki M, Maeda S, Numasawa T, Abumi K, Kato T, Ozawa H, Taguchi T, Kaito T, Neo M, Yamazaki M, Tadokoro N, Yoshida M, Nakahara S, Endo K, Imagama S, Demura S, Sato K, Seichi A, Ichimura S, Watanabe M, Watanabe K, Nakamura Y, Mori K, Baba H, Toyama Y, Ikegawa S: A genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 31:136-143, 2013.
- 1-64) Nakamura M, Iwanami A, Tsuji O, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Long-term surgical outcomes of cervical dumbbell neurinomas. *Journal of Orthopaedic Science* 18:8-13, 2013.
- 1-65) Matsumoto M(corresponding), Okada E, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Takahata T: Tandem age-related lumbar and cervical intervertebral disc changes in asymptomatic subjects. *European Spine Journal* 22:708-713, 2013.
- 1-66) Matsumoto M(corresponding), Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y: Recurrence of lumbar disc herniation after microendoscopic discectomy. *Journal of Neurological Surgery A (Minimally Invasive Neurosurgery)*74: 222-227, 2013.
- 1-67) Watanabe K, Uno K, Suzuki T, Kawakami N, Tsuji T, Yanagida H, Ito M, Hirano T, Yamazaki K, Minami S, Kotani T, Taneichi H, Imagama S, Takeshita K, Yamamoto T, Matsumoto M(corresponding): Risk factors for complications associated with growing-rod surgery for early-onset scoliosis. *Spine* 38:E464-468, 2013.
- 1-68) Miyake A, Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Ogura Y, Dai J, Qiu X, Takahashi A, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Kubo M, Tsunoda T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Qiu Y, Matsumoto M(co-corresponding), Ikegawa S, Identification of a susceptibility locus for severe adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 17q24.3. *Plos One* 8(9):e72802, 2013.
- 1-69) Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Londono D, Gordon D, Herring JA, Watanabe K, Chiba K, Kamatani N, Jiang Q, Hiraki Y, Kubo M, Toyama Y, Tsunoda T, Wise CA, Qiu Y, Shukunami C, Matsumoto M(co-corresponding), Ikegawa S. Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nature Genetics* 45:676-679, 2013.
- 1-70) Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Morioka H, Matsumoto M, Chambon P, Johnson RS, Kato S, Toyama Y, Miyamoto T: HIF1 α is required for osteoclast activation by estrogen deficiency in postmenopausal

osteoporosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:16568-73, 2013.

- 1-71) Ogura Y, Yabuki S, Iida A, Kou I, Nakajima M, Kano H, Shiina M, Kikuchi S, Toyama Y, Ogata K, Nakamura M, Matsumoto M, Ikegawa S: FOXC2 mutations in familial and sporadic spinal extradural arachnoid cyst. Plos One 8(11):e80548, 2013.
- 1-72) Kobayashi Y, Nakamura M, Tsuji O, Iwanami A, Ishii K, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Kameyama K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Nondura-based clear cell meningioma of the cauda equina in an adult. Journal of Orthopaedic Science 18: 861-865, 2013.
- 1-73) Matsubayashi K, Tsuji O, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M(corresponding): Minimally invasive endoscopic resection of a solitary bone cyst of the lumbar vertebrae: a case report. Neurosurgery Quarterly. 23:66-69, 2013.
- 1-74) Ogura Y, Watanabe K, Hosogane N, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding): Acute respiratory failure due to hemothorax after posterior correction surgery for adolescent idiopathic scoliosis: a case report. BMC Musculoskeletal Disorders 14(1):132, 2013.
- 1-75) Fukuda Y, Watanabe K, Toyama Y, Mikami S, Matsumoto M(corresponding): Metastasis of intracranial meningeal hemangiopericytoma to thoracic spine 17 years after surgical excision: a case report. Journal of Orthopaedic Science 2013. [Epub ahead of print].
- 1-76) Cao K, Watanabe K, Hosogane N, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding): Surgical correction of severe kyphoscoliosis resulting in a neurological complication in Marshall–Smith syndrome. Journal of Orthopaedic Science 2013. [Epub ahead of print]
- 1-77) Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T. OC-STAMP and DC-STAMP cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. J Bone Miner Res 27:1289-1297, 2012.
- 1-78) Watanabe K, Hosogane N, Kawakami N, Tsuji T, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M(corresponding). Increase in spinal longitudinal length by correction surgery for adolescent idiopathic scoliosis. Eur Spine J 21:1920-1925, 2012.
- 1-79) Fan YH, Song YQ, Chan D, Takahashi Y, Ikegawa S, Matsumoto M, Kou I, Cheah KSE, Sham P, Cheung KMC. SNP rs11190870 near LBX1 is associated with adolescent idiopathic scoliosis in southern Chinese. Journal of human genetics 57(4):244-246, 2012.
- 1-80) Matsumoto M(corresponding), Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Spine. Impact of Lamina Closure on Long-term outcomes of open-door laminoplasty in patients with cervical myelopathy -minimum 5-year follow-up study 37:1288-1291, 2012.
- 1-81) Nakamura M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Long-term surgical outcomes of spinal meningiomas. Spine 37:E617-623, 2012.
- 1-82) Watanabe K, Nakamura T, Iwanami A, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M(corresponding). Vertebral derotation in adolescent idiopathic scoliosis causes hypokyphosis of the thoracic spine. BMC Musculoskeletal Disorders 1471-247413:99, 2012.
- 1-83) Shiono Y, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M(corresponding). Sterility of posterior elements of the spine in posterior correction surgery. Spine 37:523-526, 2012.
- 1-84) Nakamura M, Tsuji O, Iwanami A, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Central neuropathic pain after surgical resection in patients with spinal intramedullary tumor. J Orthop Sci 17:352-357, 2012.
- 1-85) Nagashima M, Abe H, Amaya K, Matsumoto H, Yanaihara H, Nishiwaki Y, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding). A method for quantifying intervertebral disc signal intensity on T2-weighted imaging. Acta Radiol 53:1059-1065, 2012.
- 1-86) Matsumoto M(corresponding), Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Recurrence of lumbar disc herniation after microendoscopic discectomy. Journal of Neurological Surgery A (Min Invasive Neurosurg). 2012 (in press).

- 1-87) Matsumoto M(corresponding), Okada E, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Spontaneous regression of soft disc herniation in patients with cervical myelopathy. *Neurosurg Quart* 22:7-11, 2012.
- 1-88) Matsumoto M(corresponding), Okada E, Ichihara D, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Hashimoto T, Iwanami A, Ikegami T, Takahata T. Changes in the cross-sectional area of deep posterior extensor muscles of the cervical spine after anterior decompression and fusion: 10-year follow-up study using MRI. *Eur Spine J* 21:304-308, 2012.
- 1-89) Matsumoto M(corresponding), Okada E, Ichihara D, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Takahata T. Modic changes in the cervical spine prospective 10-year follow-up study in asymptomatic subjects. *J Bone Joint Surg* 94-B: 678-683, 2012.
- 1-90) Matsumoto M(corresponding), Ichihara D, Okada E, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Takahata T. Cross-sectional area of the posterior extensor muscles of the cervical spine in whiplash injury patients versus healthy volunteers -10 year follow-up MR study. *Injury* 3:912-916, 2012.
- 1-91) Kawakami N, Tsuji T, Yanagida H, Uno K, Matsumoto M, Watanabe K, Yamamoto T, Hirano T, Taneichi H, Yamazaki K, Fujiwara K. Radiographic analysis of the progression of congenital scoliosis with rib anomalies during the growth period. *ArgoSpine* 24(1-2):56-61, 2012.
- 1-92) Kaneko Y, Matsumoto M(corresponding), Takaishi H, Nishiwaki Y, Momoshima S, Toyama Y. Morphometric analysis of the lumbar intervertebral foramen in patients with degenerative lumbar scoliosis by multidetector-row computed tomography. *Eur Spine J* 21:2594-2602, 2012.
- 1-93) Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Miyamoto T, Ishii K, Niki Y, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M(corresponding). Serum cartilage metabolites as biomarkers of degenerative lumbar scoliosis. *J Orthop Res* 30:1249-1253, 2012.
- 1-94) Funao H, Tsuji T, Hosogane N, Watanabe K, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M(corresponding). Comparative study of spinopelvic sagittal alignment between patients with and without degenerative spondylolisthesis. *Eur Spine J* 21:2181-2187, 2012.
- 1-95) Funao H, Nakamura M, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Kamata M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Surgical treatment of spinal extradural arachnoid cysts in the thoracolumbar spine. *Neurosurgery* 71:278-284, 2012.
- 1-96) Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Establishment of a real-time, quantitative, and reproducible mouse model of Staphylococcus osteomyelitis using bioluminescence imaging. *Infect and Immun* 80:733-741, 2012.
- 1-97) Cui G, Watanabe K, Nishiwaki Y, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M(corresponding). Loss of apical vertebral derotation in adolescent idiopathic scoliosis: 2-year follow-up using multi-planar reconstruction computed tomography. *Eur Spine J* 21:1111-1120, 2012.
- 1-98) Miyauchi Y, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Akiyama H, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. Conditional inactivation of Blimp1 in adult mice promotes increased bone mass. *J Biol Chem* 287:28508-28517, 2012.
- 1-99) Yoshida S, Iwasaki R, Kawana H, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto H, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Nakagawa T, Miyamoto T. PDGFBB promotes PDGFR α -positive cell migration into artificial bone in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*: 18;421:785-789, 2012.
- 1-100) Hoshi H, Hao W, Fujita Y, Funayama A, Miyauchi Y, Hashimoto K, Miyamoto K, Iwasaki R, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto H, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Kitagawa K, Nakayama KI, Kawamoto T, Sano M, Fukuda K, Ohsawa I, Ohta S, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, Miyamoto T. Aldehyde-stress resulting from Aldh2 mutation promotes osteoporosis due to impaired osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res* 27:2015-2023, 2012.
- 1-101) Miyamoto H, Katsuyama E, Miyauchi Y, Hoshi H, Miyamoto K, Sato Y, Kobayashi T, Iwasaki R, Yoshida S, Mori T, Kanagawa H, Fujie A, Hao W, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T. An

- essential role for STAT6-STAT1 protein signaling in promoting macrophage cell-cell fusion. *J Biol Chem*:287:32479-32484, 2012.
- 1-102) Okada E, Matsumoto M(corresponding), Hosogane N, Watanabe K, Shiono Y, Takahashi Y, Nishiwaki Y, Chiba K, Toyama Y. Comparison of Stainless Steel and Titanium Alloy Instruments for Posterior Correction and Fusion Surgery in Adolescent Idiopathic Scoliosis. Prospective Cohort Study with Minimum 2-year Follow-Up. *J Med Biol Eng*. 2012 (in press)
- 1-103) Matsumoto M(corresponding), Ichihara D, Okada E, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Takahata T. Modic changes of the cervical spine in patients with whiplash injury: A prospective 11-year follow-up study. *Injury*. P534-7 2012 (in press)
- 1-104) Matsumoto M(corresponding), Tsuji T, Iwanami A, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Morioka H, Toyama Y. Total en Bloc Spondylectomy for Spinal Metastasis of Differentiated Thyroid Cancers: A Long-Term Follow-Up. *J Spinal Disord Tech*. 2012 (in press)
- 1-105) 山下太郎, 辻崇, 渡辺航太, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄: 腰椎圧迫骨折後に著しい後側弯変形を呈したパーキンソン病の1治験例. *関東整災外会誌* 43:6-12, 2012.
- 1-106) 河野美貴子, 辻崇, 渡辺航太, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄: Love 法術後に発生した硬膜内脱出ヘルニアの1例. *関東整災外会誌* 43:173-176, 2012.
- 1-107) 西山雄一郎, 渡辺航太, 細金直文, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 先天性多発性関節拘縮症に合併した脊柱側弯症の3例. *臨整外* 47:915-919, 2012.
- 1-108) 鈴木悟士, 中村雅也, 渡辺航太, 辻崇, 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 上位胸椎砂時計型海綿状血管腫の1例. *関東整災外会誌* 43:149-153, 2012.
- 1-109) 西田光宏, 渡部航太, 細金直文, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 後方矯正固定術後に重度の冠状面 off balance を生じた成人期特発性側弯症の1例. *臨整外* 47: 1245-1249, 2012
- 1-110) Matsumoto M, Okada E, Kaneko Y, Ichihara D, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y: Wedging of vertebral bodies at the thoracolumbar junction in asymptomatic healthy subjects on magnetic resonance imaging. *Surg Radiol Anat* 33: 223-228, 2011.
- 1-111) Okada E, Matsumoto M, Fujiwara H, Toyama Y: Disc degeneration of cervical spine on MRI in patients with lumbar disc herniation: comparison study with asymptomatic volunteers. *Euro Spine J* 20: 585-591, 2011.
- 1-112) Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Sudo H, Minami S, Kotani T, Kono K, Yanagida H, Taneichi H, Takahashi A, Toyama Y, Ikegawa S: Replication study of the association between adolescent idiopathic scoliosis and two estrogen receptor genes. *J Orthop Res* 29: 834-837, 2011.
- 1-113) Watanabe K, Matsumoto M, Ikegami T, Nishiwaki Y, Tsuji T, Ishii K, Ogawa Y, Takaishi H, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K: Reduced postoperative wound pain after lumbar spinous process-splitting laminectomy for lumbar canal stenosis: a randomized controlled study. *J Neurosurg Spine* 14: 51-58, 2011.
- 1-114) Ishii K, Matsumoto M, Momoshima S, Watanabe K, Tsuji T, Takaishi H, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K: Remodeling of C2 Facet Deformity Prevents Recurrent Subluxation in Patients with Chronic Atlantoaxial Rotatory Fixation (AARF) -A Novel Strategy for Treatment of Chronic AARF- *Spine* 36: E256-262, 2011.
- 1-115) Takahashi Y, Matsumoto M, Karasugi T, Watanabe K, Chiba K, Kawakami N, Tsuji T, Uno K, Suzuki T, Ito M, Sudo H, Minami S, Kotani T, Kono K, Yanagida H, Taneichi H, Takahashi A, Toyama Y, Ikegawa S: Lack of association between adolescent idiopathic scoliosis and previously reported single nucleotide polymorphisms in MATN1, MTNR1B, TPH1, and IGF1 in a Japanese population. *J Orthop Res* 29(7):1055-1058, 2011.
- 1-116) Cui G, Watanabe K, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Interpedicular graft using a titanium mesh cage in a patient with lumbar scoliosis associated with a congenital butterfly vertebra. *J Neurosurg Spine* 14: 215-218, 2011.
- 1-117) Yoshioka K, Watanabe K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Kyphectomy for severe kyphosis with pyogenic spondylitis associated with myelomeningocele: a case report. *Scoliosis* 6: 5, 2011.

- 1-118) Okada E, Matsumoto M, Ichihara D, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Takahata T: Cross-sectional area of posterior extensor muscles of the cervical spine in asymptomatic subjects: a 10-year longitudinal magnetic resonance imaging study. *Eur Spine J* 20(9):1567-1573, 2011 .
- 1-119) Ogura Y, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Severe progressive scoliosis due to huge subcutaneous cavernous hemangioma: A case report. *Scoliosis* 6:3, 2011.
- 1-120) Watanabe K, Okada E, Kosaki K, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M: Surgical treatment for scoliosis in patients with shprintzen-goldberg syndrome. *J Pediatr Orthop* 31:186-193, 2011.
- 1-121) Seichi A, Hoshino Y, Kimura A, Nakahara S, Watanabe M, Kato T, Atsushi O, Kotani Y, Mitsukawa M, Ijiri K, Kawahara N, Inami S, Chikuda H, Takeshita K, Nakagawa Y, Taguchi T, Yamazaki M, Endo K, Sakaura H, Uchida K, Kawaguchi Y, Neo M, Takahashi M, Harimaya K, Hosoe H, Imagama S, Taniguchi S, Ito T, Kaito T, Chiba K, Matsumoto M, Toyama Y: Neurological complications of cervical laminoplasty for patients with ossification of the posterior longitudinal ligament-A multi-institutional retrospective study- *Spine* 36:E998-E1003, 2011.
- 1-122) Ishihama H, Nakamura M, Funao H, Ishii K, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K: A rare case of spinal dumbbell tanycytic ependymoma. *Spine* 36: E612-614, 2011.
- 1-123) Matsumoto M, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y: Late instrumentation failure after total en bloc spondylectomy. *J Neurosurg Spine* 15(3):320-327, 2011.
- 1-124) Shiono Y, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Sterility of posterior elements of the spine in posterior correction surgery. *Spine* 2011 Jul 8. [Epub ahead of print]
- 1-125) Matsumoto M, Toyama Y, Chikuda H, Takeshita K, Kato T, Shindo S, Abumi K, Takahata M, Nohara Y, Taneichi H, Tomita K, Kawahara N, Imagama S, Matsuyama Y, Yamazaki M, Okawa A: Outcomes of fusion surgery for ossification of posterior longitudinal ligament of thoracic spine. Multi-center retrospective survey. *J Neurosurg Spine* 15(4):380-385, 2011.
- 1-126) Cui G, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Lenke LG, Matsumoto M: Morphologic evaluation of the thoracic vertebrae for safe free-hand pedicle screw placement in adolescent idiopathic scoliosis: a CT-based anatomical study. *Surg Radiol Anat.* 2011 (Epub ahead of print)
- 1-127) Yoda M, Kimura T, Tohmonda T, Uchikawa S, Koba T, Takito J, Morioka H, Matsumoto M, Link DC, Chiba K, Okada Y, Toyama Y, Horiuchi K: Dual functions of cell-autonomous and non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. *Blood.* 118(26):6932-6942, 2011.
- 1-128) Nakamura M, Fujiyoshi K, Tsuji O, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K. Long-term surgical outcomes of idiopathic spinal cord herniation. *J Orthop Sci* 16(4):347-351, 2011.
- 1-129) Okada E, Matsumoto M, Watanabe K, Yagi M, Ninomiya K, Horiuchi Y, Toyama Y. A case of spontaneous spinal epidural hematoma that mimicked acute cerebral ischemic stroke and was treated by a recombinant tissue-type plasminogen activator. *Neurosurg Quart.* 2011 (Epub ahead of print).
- 1-130) Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Hosono N, Kamatani N, Tsunoda T, Toyama Y, Kubo M, Matsumoto M, Ikegawa S: A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nature Genetics.* 43(12):1237-1240, 2011.
- 1-131) Matsumoto M, Watanabe K, Ogura Y, Okada E, Hosogane N, Chiba K, Toyama Y. Short fusion strategy for lenke type 1 thoracic curve using pedicle screw fixation. *J Spinal Disord & Tech* (Epub ahead of print)2011.
- 1-132) Kono H, Machida M, Saito M, Nishiwaki Y, Hosogane N, Chiba K, Miyamoto T, Matsumoto M, Toyama Y: Mechanism of osteoporosis in adolescent idiopathic scoliosis: experimental scoliosis in pinealectomized chickens. *J Pineal Res.* 51(4):387-393, 2011.
- 1-133) Shimosawa H, Matsumoto M, Yabe H, Mukai M, Toyama Y, Morioka H: Primary primitive

neuroectodermal tumor of the conus medullaris in an elderly patient: a case report and review of the literature. Case Rep Oncol. 4(2):267-274, 2011.

- 1-134) Tsuji O, Nakamura M, Fujiyoshi K, Ishii K, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Momoshima S, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M: Cervical intramedullary ependymoma masquerading as cervical spondylotic myelopathy on MRI analysis. J Orthop Sci. 2011 Oct 6. [Epub ahead of print]
- 1-135) Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y: Surgical treatment of ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) and its outcomes- posterior surgery by laminoplasty. Spine 2011 Oct 24. [Epub ahead of print]

2. 著書・総説、解説等

- 2-1) 松本守雄: 2. 特発性側弯症に対する手術手技 b) In situ bending. 側弯症治療の最前線 手術編. 川上紀明, 宇野耕吉編集. 医薬ジャーナル社, **84**, pp 59-63, 2014.
- 2-2) 松本守雄: 成人脊柱変形 外側経腸腰筋アプローチ. 側弯症治療の最前線 手術編. 川上紀明, 宇野耕吉編集. 医薬ジャーナル社, **84**, pp 359-361, 2014.
- 2-3) 宇野耕吉, 川上紀明, 松本守雄: 4. 側弯症手術の合併症とその対策. 側弯症治療の最前線 手術編. 川上紀明, 宇野耕吉編集. 医薬ジャーナル社, **84**, pp 153-168, 2014.
- 2-4) 松本守雄: 1. 早期発症側弯症 A) GROWING ROD. 側弯症治療の最前線 手術編. 川上紀明, 宇野耕吉編集. 医薬ジャーナル社, **84**, PP 170-176, 2014.
- 2-5) 岡田英次郎, 戸山芳昭, 松本守雄: X 脊髄・脊椎疾患, 髄液動態異常 特発性側弯症. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 神経症候群 (第2版) V: 株式会社日本臨床社, **30**, PP 135-138, 2014.
- 2-6) 福田健太郎, 松本守雄: 脊椎 胸椎 前方アプローチ. IN: 井樋栄二, 野原裕, 松末吉隆, EDITORS. 整形外科 サージカルアプローチ 体位から到達術野まで. 東京: メジカルビュー社, PP 202-213, 2014.
- 2-7) 高橋洋平, 黄 郁代, 松本守雄, 池川志郎: 最新基礎科学/知っておきたい 思春期特発性側弯症発症に関する新たな遺伝子 GPR126. 臨床整形外科, **49**, PP 72-75, 2014.
- 2-8) 松本守雄, 高橋洋平, 小倉洋二, 渡辺航太, 戸山芳昭: 思春期特発性側弯症の全ゲノム相関解析. 整形・災害外科, **57**, PP 295-299, 2014.
- 2-9) 松本守雄: 治療の進歩と課題 手術の可能性と限界. 理学療法 MAGAZINE, **1**, PP 79-85, 2014.
- 2-10) 松本守雄: 第60回日本小児保健協会学術集会 市民公開講座 学校保健の今, 気になる話題 児童生徒の脊柱側弯症. 小児保健研究, **73**, PP 265-268, 2014.
- 2-11) 岡田英次郎, 戸山芳昭, 松本守雄: 【頸部脊髄症の診療】 頸部脊髄症に対する片開き式脊柱管拡大術. MONTHLY BOOK ORTHOPAEDICS, **27**, PP 49-54, 2014.
- 2-12) 渡辺航太, 戸山芳昭, 松本守雄: 特集 脊椎骨粗鬆症・圧迫骨折に対する治療戦略-薬物治療を中心に 椎体骨折を合併した腰部脊柱管狭窄症の治療 手術, 薬物治療を中心に. 脊椎脊髄ジャーナル, **27**, PP 203-207, 2014.
- 2-13) 松本守雄: 脊椎疾患の自然経過解明への挑戦 頸椎症・椎間板ヘルニアによる頸髄症の自然経過. 日本整形外科学会雑誌, **88**, PP 376-379, 2014.
- 2-14) 塩野 雄太, 石井 賢, 松本 守雄: 整形トピックス アクネ菌はインプラント関連感染症を引き起こす. 整形外科, **65**, PP 442, 2014.
- 2-15) 松本守雄, 戸山芳昭: 【頸椎前方除圧固定術-術式のスタンダードと進歩】 上位頸椎疾患に対する前方手術. 脊椎脊髄ジャーナル, **27**, PP 591-598, 2014.
- 2-16) 石井賢, 塩野雄太, 船尾陽生, 磯貝宣広, 日方智宏, 松本守雄: 特集 胸腰仙椎後方 INSTRUMENTATION の進歩 経皮的椎弓根スクリュー固定の進歩. 脊椎脊髄ジャーナル, **27**, PP 909-916, 2014.
- 2-17) 松本守雄, 戸山芳昭: 圧迫性頸髄症の自然経過 頸椎症および椎間板ヘルニアを中心に. 脊椎脊髄ジャーナル, **27**, PP 829-833, 2014.
- 2-18) 日方智宏, 石井 賢, 磯貝宣広, 塩野雄大, 戸山芳昭, 松本守雄: 転移性脊椎腫瘍に対する最小侵襲脊椎安定術(MIST). 別冊整形外科, **66**, PP 213-216, 2014.

- 2-19) 千葉一裕, 川口善治, 三上靖夫, 金山雅弘, 松本守雄, 池川志郎: 腰椎椎間板ヘルニアのゲノム解析. 整形・災害外科, **57**, PP 1275-1282, 2014.
- 2-20) Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y: Chapter 17 Ossification of the posterior longitudinal ligament in the thoracic spine and its surgical management. Kim H-J, Chung CK, editors. Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament: OPLL. Seoul: Panmun.Co., Ltd. pp189-199, 2013.
- 2-21) 松崎健一郎, 伊東昌子, 金子博徳, 加藤雅敬, 日方智宏, 南郷脩史, 松本守雄, 戸山芳昭: 椎体骨梁微細構造に対する骨粗鬆症治療薬の効果 二重盲検法無作為割り付けによる介入試験の結果. Osteoporosis Japan 21:102-105, 2013.
- 2-22) 渡辺航太, 日方智宏, 岩波明生, 細金直文, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 松本守雄: 圧迫骨折を伴った腰部脊柱管狭窄症の X 線画像所見の特徴と手術成績. 東日本整形災害外科学会雑誌 25:137-141, 2013.
- 2-23) 桐山善守, 渡辺航太, 松本守雄, 戸山芳昭, 名倉武雄: 薄板スプライン法を用いた側彎形状の空間的変形分布の定量化手法の開発. 臨床バイオメカニクス 11;34:25-32, 2013.
- 2-24) 桐山善守, 渡辺航太, 細金直文, 松本守雄, 戸山芳昭, 名倉武雄: 思春期特発性側彎症患者の歩行時における下肢力学モーメントの解析. 臨床バイオメカニクス 11;34:253-258, 2013.
- 2-25) 岡田英次朗, 手塚正樹, 高橋勇一郎, 中島大輔, 小川潤, 堀内陽介, 奥山邦昌, 西田光宏, 野尻賢哉, 清水健太郎, 戸山芳昭, 松本守雄: Ankylosing spinal disorders に伴った脊椎損傷. 臨床整形外科 48:855-861, 2013.
- 2-26) 松本守雄: 特集 後縦靭帯骨化症 - 基礎・臨床の最新動向 特集にあたって. 脊椎脊髄ジャーナル 26:155, 2013.
- 2-27) 松本守雄, 戸山芳昭: 特集 後縦靭帯骨化症 - 基礎・臨床の最新動向 胸椎後縦靭帯骨化症に対する手術と治療成績. 脊椎脊髄ジャーナル 26:191-196, 2013.
- 2-28) 渡辺航太, 戸山芳昭, 松本守雄: 特集 筋温存型脊椎手術の現状 腰部脊柱管狭窄症に対する腰椎棘突起縦割式椎弓切除術. 整形・災害外科 56:233-236, 2013.
- 2-29) 松本守雄: 整形外科 外傷性頸部症候群の症状が遅延して生じる理由. 週刊 日本医事新報 4641: 79-80, 2013.
- 2-30) 渡辺航太, 戸山芳昭, 松本守雄: 第 1 章: 画像および術中解剖アトラス 腰椎・腰髄 腰椎後方アプローチ. 脊椎脊髄ジャーナル 26:333-337, 2013.
- 2-31) 松本守雄: 神経疾患治療ノート 頸椎症・OPLL・椎間板ヘルニア・腰部脊柱管狭窄症. Clinical Neuroscience 別冊 31:368-369, 2013.
- 2-32) 細金直文, 戸山芳昭, 松本守雄: 特集 脊柱矢状面アライメントの異常とその矯正手術的加療(3) 変性後側弯症に対する手術適応と術式選択. 整形・災害外科 56:865-875, 2013.
- 2-33) 平林湧, 松本守雄: 後遺障害等級認定の問題点 - せき柱及びその他の体幹骨 (脊椎・体幹). 日本職業・災害医学会会誌 61:170-174, 2013.
- 2-34) 渡辺航太, 戸山芳昭, 松本守雄: II. 小児の脊柱変形 4. Growing rod 法. 整形外科 64:748-752, 2013.
- 2-35) 松本守雄, 戸山芳昭: 特集 環軸椎高位の症候学と再建手術 頭蓋頸椎移行部・上位頸椎疾患に対する経口アプローチ. 脊椎脊髄ジャーナル 26:993-1000, 2013.
- 2-36) 松本守雄, 岩波明生, 中村雅也, 戸山芳昭: 特集 頸椎椎弓形成術の過去・現在・未来 片開き式椎弓形成術の長期成績と術式の工夫. 脊椎脊髄ジャーナル 26:1033-1039, 2013.
- 2-37) 細金直文, 渡辺航太, 戸山芳昭, 松本守雄: 腰椎変性側彎症の手術 現状と課題 後方矯正固定術後の proximal junctional kyphosis. 臨床整形外科 48:361-366, 2013.
- 2-38) 大和雄, 松山幸弘, 山崎健, 種市洋, 松本守雄, 田中雅人: 【脊柱矢状面アライメントの異常とその矯正】 QOL に悪影響を与える脊柱アライメント. 整形・災害外科 56:815-820, 2013.
- 2-39) 八木満, 町田正文, 戸山芳昭, 松本守雄: 【脊柱変形 A to Z】 思春期の脊柱変形 思春期特発性側彎症の原因. 整形外科 64:785-789, 2013.
- 2-40) 松本守雄: 整形外科 最新トピックス 思春期特発性側彎症に対する手術療法 椎弓根スクリュー法. 整形外科 Surgical Technique 3:476-480, 2013.
- 2-41) 細金直文, 松本守雄: 【胸腰椎移行部病変の病態と手術】 胸腰椎移行部病変に対する後方手術 椎体骨折に対する後方アプローチ. 脊椎脊髄ジャーナル 26:889-894, 2013.

- 2-42) 高橋洋平, 松本守雄, 池川志郎, 戸山芳昭: 第1章 遺伝子診断 1. 思春期特発性側弯症. 平澤泰介, 三浪明男, 戸山芳昭, 編 先端医療シリーズ 44 臨床医のための最新整形外科. 東京: 先端医療技術研究所. pp. 36-39, 2013.
- 2-43) 渡辺航太, 戸山芳昭, 松本守雄: 第4章 腰部脊柱管狭窄症 4. 腰部脊柱管狭窄症に対する低侵襲除圧術. 平澤泰介, 三浪明男, 戸山芳昭, 編. 先端医療シリーズ 44 臨床医のための最新整形外科. 東京: 先端医療技術研究所. pp. 96-99, 2013.
- 2-44) 松本守雄: 6 頸椎椎間板ヘルニア. 薬剤師継続学習通信講座 第IV講座 薬学科第4学年講義「疾患と薬物治療」外来で診る関節痛(リウマチ)・整形外科疾患(第2版). 東京. pp. 130, 2013.
- 2-45) 岡田英次朗, 松本守雄: Advance [MED] migrated hernia に対する MED のポイント 吉田宗人編 スキル関節鏡下手術アトラス 脊椎内視鏡下手術. 文光堂. pp. 176-179, 2013.
- 2-46) 高橋洋平, 松本守雄, 池川志郎: I 章 総論(病態, 概説) B. 病態 2. 遺伝的要因 思春期特発性側弯症の全ゲノム相関解析. 川上紀明, 宇野耕吉, 編 側弯症治療の最前線 基礎編. 医薬ジャーナル社. pp. 52-58, 2013.
- 2-47) Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K: Surgery for ossification of the posterior longitudinal ligament: Dorsal Approach. The Cervical Spine 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. pp1044-1054, 2012.
- 2-48) 渡辺航太, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 脊柱管狭窄症に対する棘突起縦割式椎弓切除術. In: 馬場久敏, editor. OS NOW Instruction 整形外科手術の新標準 腰椎の手術 ベーシックからアドバンストまで必須テクニック. 東京: 株式会社メジカルビュー社. pp. 17-27, 2012.
- 2-49) 松本守雄: 戸山芳昭. 頸椎後方 Basic 片開き式椎弓形成術(open-door laminoplasty). In: 馬場久敏, editor. OS NOW Instruction 22 整形外科手術の新標準 頸椎の手術 ベーシックからアドバンストまで必須テクニック. 東京: メジカルビュー社. pp. 94-100, 2012.
- 2-50) Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y. Surgical Treatment of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament (OPLL) and its Outcomes--- Posterior Surgery by Laminoplasty 37:E303-308, 2012.
- 2-51) Ishii K, Toyama Y, Nakamura M, Chiba K, Matsumoto M. Management of chronic atlantoaxial rotatory fixation. Spine 7:E278-285, 2012.
- 2-52) 船尾陽生, 石井賢, 蔵本哲也, 塩野雄太, 吉岡研之, 石濱寛子, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 誌上シンポジウム 整形外科領域における蛍光イメージング 整形外科の基礎研究における蛍光・バイオイメージング法 感染症領域への応用. 臨整外 47: 43-49, 2012.
- 2-53) 石井賢, 松本守雄: 特集: 腰椎内視鏡手術における私の工夫 腰椎変性疾患に対する MIS-TLIF. Monthly Book Orthopaedics 25: 33-39, 2012.
- 2-54) 松本守雄, 戸山芳昭: 特集: 腰椎内視鏡手術における私の工夫 腰椎特殊病変に対する内視鏡下手術. Orthopaedics 25: 41-46, 2012.
- 2-55) 渡辺航太, 許斐恒彦, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 松本守雄: 第6章: 腰椎各要素と腰痛(7) 筋 腰椎後方手術による医原性筋挫傷と術後腰痛 腰椎変性所見のない馬尾腫瘍手術例での検討. 脊椎脊髄 25:373-375, 2012.
- 2-56) 相澤守, 小西敏功, 松本守雄: 技術と産業を創出する KAST の研究成果 「次世代バイオセラミックス」プロジェクト(2009年10月~2013年9月) 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.
- 2-57) 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.
- 2-58) 渡辺航太, 松本守雄: 整形外科手術私のポイント 腰部脊柱管狭窄症に対する棘突起縦割式椎弓切除術. 整・災害 55:782-783, 2012.
- 2-59) 松本守雄: シンポジウム 重度後縦靭帯骨化症に対する術式選択と合併症 緒言. 臨整外 47:402, 2012.
- 2-60) 渡辺航太, 松本守雄: 整形外科手術私のポイント 腰部脊柱管狭窄症に対する棘突起縦割式椎弓切除術. 整・災害 55:782-783, 2012.
- 2-61) 長谷川徹, 佐藤公昭, 中村博亮, 長谷川和宏, 蜂谷裕道, 松本守雄, 吉本三徳, 高橋和久, 吉田宗人: 脊椎内視鏡下手術の現状 -2011年1月~12月 手術施行状況調査・インシデント報告集計結果-. 日整会誌 86:724 - 729, 2012.

- 2-62) 石井賢, 百島祐貴, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 特集 発育期における脊椎障害 上位頸椎-環軸関節回旋位固定-. 整・災害 55:45-51, 2012.
- 2-63) 松本 守雄, 戸山 芳昭, 千葉 一裕:胸椎 OPLL の治療 胸椎 OPLL に対する各種手術の成績 多施設研究の結果から. 関節外科 31: 595-600, 2012.
- 2-64) 岡田英次郎, 松本守雄: 脊椎・脊髄疾患と治療 腰椎椎間板ヘルニア: 内視鏡下ヘルニア摘出術. Clin Neurosci 脊椎・脊髄-up to date 30:1138-1140, 2012.
- 2-65) 渡辺航太, 許斐恒彦, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 松本守雄: 腰椎後方手術による医原性筋挫傷と術後腰痛 腰椎変性所見のない馬尾腫瘍手術例での検討. 脊椎脊髄 25:373-375, 2012.
- 2-66) 佐々木 康介, 関 敦仁, 宮崎 馨, 高木 岳彦, 日下部 浩, 高山 真一郎, 松本守雄: Morquio 症候群に対する整形外科手術. 日小児整外会誌 21: 136-140, 2012.
- 2-67) 渡辺 航太, 戸山 芳昭, 千葉 一裕, 松本 守雄: ワンポイントレクチャー 腰部脊柱管狭窄症に対する「腰椎棘突起縦割式椎弓切除術. J Spine Res 3: 188-192, 2012.
- 2-68) 金子 慎二郎, 塩田 匡宣, 臼井 宏, 中村 雅也, 戸山 芳昭, 松本 守雄: 【神経内科エマージェンシー 日常臨床でどこまで対応できるか】 どのような治療を行うか 実践的アプローチ 腫瘍による脊髄圧迫性病変. Medicina 49: 680-683, 2012.
- 2-69) 金子 慎二郎, 塩田 匡宣, 臼井 宏, 中村 雅也, 戸山 芳昭, 松本 守雄: 【神経内科エマージェンシー 日常臨床でどこまで対応できるか】 どのような治療を行うか 実践的アプローチ 脊髄損傷 Medicina 49: 676-679, 2012.
- 2-70) 松本守雄. 頭蓋底陥入症. In: 山下敏彦, editor. アトラス骨・関節画像診断 5 脊椎・脊髄: 中外医学社; 2011. p. 120-121.
- 2-71) 松本守雄. 腰部脊柱管狭窄症術後のこむらがえりに シロスタゾール (プレタル) . In: 米延策雄, 菊地臣一, 芝田政彦, editors. 長引く・頑固なつらい痛みの薬物療法 2011 運動器編. 東京: 株式会社シービーアール; 2011. p. 124-125.
- 2-72) 松本守雄. 頭蓋底陥入症. In: 山下敏彦, editor. アトラス骨・関節画像診断 5 脊椎・脊髄. 東京: 中外医学社; 2011. p. 120-121.
- 2-73) 松本守雄. 背骨の最新手術. 腰痛・坐骨神経痛・頰の痛みが気になるときすぐに知りたい Q & A. Gakken. pp182-217, 2011.
- 2-74) 渡辺航太, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄. 特集 高齢者の脊柱変形 高齢者の腰椎変性側弯の病態と臨床像. 整形・災害外科 109-116, 2011.
- 2-75) 松本守雄. 腰椎手術のピットフォールとトラブルシューティング. 日本整形外科学会雑誌 [教育研修講座] 85:34-42, 2011.
- 2-76) 渡辺航太, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 腰部脊柱管狭窄症に対する腰椎棘突起縦割式椎弓切除術の有効性. 別冊 整形外科 59 運動器疾患に対する最小侵襲手術 59:103-107, 2011.
- 2-77) 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 腰椎変性すべり症と腰椎変性 (後) 側弯症に対する最小侵襲椎間孔腰椎椎体間固定術の手術手技. 別冊 整形外科 59 運動器疾患に対する最小侵襲手術 59:124-132, 2011.
- 2-78) 細金直文, 松本守雄, 戸山芳昭. 腰部椎間板ヘルニアの診断と治療. 医学のあゆみ 236(5):507-512, 2011.
- 2-79) 渡辺航太, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 腰部脊柱管狭窄症に対する腰椎棘突起縦割式椎弓切除術の有効性. 別冊 整形外科 59 :103-107, 2011.
- 2-80) 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 腰椎変性すべり症と腰椎変性 (後) 側弯症に対する最小侵襲椎間孔腰椎椎体間固定術の手術手技. 別冊 整形外科 59. 124-132, 2011.
- 2-81) 岡田英次郎, 松本守雄, 戸山芳昭. MRI における健常者頸椎の加齢性変化に関する縦断的研究. 整形外科. 486-489, 2011.
- 2-82) 渡辺航太, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 脊柱管狭窄症に対する棘突起縦割式椎弓切除術. OS NOW Instruction 17-27, 2011.
- 2-83) 松本守雄, 渡辺航太, 細金直文, 辻崇, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭. 腰痛患者の現状調査. Mebio. 6月号:99-106, 2011.
- 2-84) 松本守雄. 頸椎椎間板ヘルニア (C4/5) の自覚症状 Clinician 58 (599): 27-29, 2011.

研究分担者：石井 賢（慶応義塾大学）

1. 審査付原著論文（査読つきProceedings含む）

- 1-1) M. Aizawa, Y. Chibu, K. Nagata, T. Konishi, K. Ishii, H. Funao, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Honda, “In vivo evaluation of chelate-setting cement fabricated from hydroxyapatite including bone minerals using a rabbit’s tibia model”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 402-407(2015).
- 1-2) K. Yoshioka, K. Ishii, T. Kuramoto, S. Nagai, H. Funao, H. Ishihama, Y. Shiono, A. Sasaki, M. Aizawa, Y. Okada, S. Koyasu, Y. Toyama and M. Matsumoto, “A Novel Mouse Model of Soft Tissue Infection using Bioluminescence Imaging Allows Noninvasive, Real-time Monitoring of Bacterial Growth”, *PLOS ONE* (2014) on-line publication: doi:10.1371/journal.pone.0106367
- 1-3) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, “Antibacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **103A**, 57-64(2014). DOI: 10.1002/jbm.a.35157
- 1-4) Konishi T, Horiguchi Y, Mizumoto M, Honda M, Oribe K, Morisue H, Ishii K, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M. Novel chelate-setting calcium-phosphate cements fabricated with wet-synthesized hydroxyapatite powder. *J Mater Sci: Mater Med.* 24(3):611-621, 2013.
- 1-5) Konishi T, Mizumoto M, Honda M, Horiguchi Y, Oribe K, Morisue H, Ishii K, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M. Fabrication of novel biodegradable α -tricalcium phosphate cement set by chelating capability of inositol phosphate and its biocompatibility. *J Nanomaters.* 2013.
- 1-6) Kawabata S, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Matsumoto M. Surgical correction of severe cervical kyphosis in patients with neurofibromatosis Type 1. *J Neurosurg: Spine.* 18(3):274-279, 2013.
- 1-7) Matsumoto M, Tsuji T, Iwanami A, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Morioka H, Toyama Y. Total en Bloc Spondylectomy for Spinal Metastasis of Differentiated Thyroid Cancers: A Long-Term Follow-Up. *J Spinal Disord Tech.* 26(4):137-142, 2013.
- 1-8) Tsuji O, Nakamura M, Fujiyoshi K, Ishii K, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Momoshima S, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Cervical intramedullary ependymoma masquerading as cervical spondylotic myelopathy on MRI analysis. *J Orthop Sci.* 18(2):355-358, 2013.
- 1-9) Matsubayashi K, Tsuji O, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Minimally invasive endoscopic resection of a solitary bone cyst of the lumbar vertebrae: a case report. *Neurosurg Q.* 23(1):66-69, 2013.
- 1-10) Nakamura M, Iwanami A, Tsuji O, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Long-term surgical outcomes of cervical dumbbell neurinomas. *J Orthop Sci.* 5;18(1):8-13, 2013.
- 1-11) Matsumoto M, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Recurrence of lumbar disc herniation after microendoscopic discectomy. *Journal of Neurological Surgery Part A. Cent Eur Neurosurg.* 74(04):222-227, 2013.
- 1-12) Konishi T, Takahashi S, Mizumoto M, Honda M, Kida K, Horiguchi Y, Oribe K, Ishii K, Morisue H, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M. Comparative study on bioresorbability of chelate-setting cements with various calcium-phosphate phase using rabbit model. *Key Eng Mater.* 529-530:167-172, 2013.
- 1-13) Asami T, Ishii M, Fujii H, Namkoong H, Tasaka S, Matsushita K, Ishii K, Yagi K, Fujiwara H, Funatsu Y, Hasegawa N, Betsuyaku T. Modulation of murine macrophage TLR7/8-mediated cytokine expression by mesenchymal stem cell-conditioned medium. *Mediators Inflamm.* 2013: epub ahead of print.
- 1-14) Honda M, Kawanobe Y, Ishii K, Konishi T, Mizumoto M, Kanazawa N, Matsumoto M, Aizawa M. In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route. *Mater Sci Eng C.* 33(8):5008-5018, 2013.
- 1-15) Chen R-Q, Watanabe K, Hosogane N, Hikata T, Iwanami A, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Matsumoto M. Spinal coronal profiles and proximal femur bone mineral density in adolescent idiopathic scoliosis. *Eur Spine J.* 14:1-5, 2013.

- 1-16) Kakinuma H, Ishii K, Ishihama H, Honda M, Toyama Y, Matsumoto M, Aizawa M. Antibacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties. *J Biomed Mater ResA*. 2014: epub ahead of print.
- 1-17) Ishii K, Toyama Y, Nakamura M, Chiba K, Matsumoto M. Management of chronic atlantoaxial rotatory fixation. *Spine*. 2012;37(5):1-8.
- 1-18) Funao H, Ishii K, Nagai S, Sasaki A, Hoshikawa T, Aizawa M, Okada Y, Chiba K, Koyasu S, Toyama Y, Matsumoto M. Establishment of a real-time, quantitative, and reproducible mouse model of *Staphylococcus osteomyelitis* using bioluminescence imaging. *Infection and Immunity*. 2012;80(2):733-741.
- 1-19) Matsumoto M, Okada E, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Spontaneous regression of soft disc herniation in patients with cervical myelopathy. *Neurosurg Quart*. 2012;22(1):7-11.
- 1-20) Cui G, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Lenke LG, Matsumoto M. Morphologic evaluation of the thoracic vertebrae for safe free-hand pedicle screw placement in adolescent idiopathic scoliosis: a ct-based anatomical study. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 2012;34(3):209-216.
- 1-21) Shiono Y, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Sterility of posterior elements of the spine in posterior correction surgery. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(6):523-526.
- 1-22) Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Miyamoto T, Ishii K, Niki Y, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Serum cartilage metabolites as biomarkers of degenerative lumbar scoliosis. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012;Epub ahead of print.
- 1-23) Matsumoto M, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Impact of lamina closure on long-term outcomes of open-door laminoplasty in patients with cervical myelopathy -minimum 5-year follow-up study. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;Epub ahead of print.
- 1-24) Cui G, Watanabe K, Nishiwaki Y, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Loss of apical vertebral derotation in adolescent idiopathic scoliosis: 2-year follow-up using multi-planar reconstruction computed tomography. *European Spine Journal*. 2012:epub ahead of print.
- 1-25) Ishii K, Toyama Y, Nakamura M, Chiba K, Matsumoto M. Management of chronic atlantoaxial rotatory fixation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(5):E278-285.
- 1-26) Kobayashi Y, Nakamura M, Tsuji O, Iwanami A, Ishii K, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Kameyama K, Toyama Y. Nondura-based clear cell meningioma of the cauda equina in an adult. *Journal of Orthopaedic Science*. 2012: epub ahead of print.
- 1-27) Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M. Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration – Comparison with autograft. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2012:epub ahead of print.
- 1-28) Watanabe K, Nakamura T, Iwanami A, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Vertebral derotation in adolescent idiopathic scoliosis causes hypokyphosis of the thoracic spine. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2012;13(99).
- 1-29) Nakamura M, Fujiyoshi K, Tsuji O, Konomi T, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Momoshima S, Toyama Y. Clinical significance of diffusion tensor tractography as a predictor of functional recovery after laminoplasty in patients with cervical compressive myelopathy. *Journal of Neurosurgery: Spine*. 2012;17(2):147-152.
- 1-30) Matsubayashi K, Tsuji O, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Minimally invasive endoscopic resection of a solitary bone cyst of the lumbar vertebrae: a case report. *Neurosurg Quart*. 2012:epub ahead of print.

- 1-31) Nakamura M, Tsuji O, Iwanami A, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Central neuropathic pain after surgical resection in patients with spinal intramedullary tumor. *Journal of Orthopaedic Science*. 2012 2012/07/01;17(4):352-357.
- 1-32) Funao H, Tsuji T, Hosogane N, Watanabe K, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M. Comparative study of spinopelvic sagittal alignment between patients with and without degenerative spondylolisthesis. *European Spine Journal*. 2012:1-7.
- 1-33) Funao H, Nakamura M, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Kamata M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Surgical Treatment of Spinal Extradural Arachnoid Cysts in the Thoracolumbar Spine. *Neurosurgery*. 2012;71(2):278-284.
- 1-34) Ishii M, Asano K, Namkoong H, Tasaka S, Mizoguchi K, Asami T, Kamata H, Kimizuka Y, Fujiwara H, Funatsu Y, Kagawa S, Miyata J, Ishii K, Nakamura M, Hirai H, Nagata K, Kunkel SL, Hasegawa N, Betsuyaku T. CRTH2 Is A Critical Regulator of Neutrophil Migration and Resistance to Polymicrobial Sepsis. *The Journal of Immunology*. 2012;188(11):5655-5664.
- 1-35) Nakamura M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Long-term surgical outcomes of spinal meningiomas. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(10):E617-623
- 1-36) Matsumoto M, Watanabe K, Hosogane N, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Chiba K, Toyama Y. Recurrence of lumbar disc herniation after microendoscopic discectomy. *Journal of Neurological Surgery*. 2012: epub ahead of print.
- 1-37) Nakamura M, Iwanami A, Tsuji O, Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M. Long-term surgical outcomes of cervical dumbbell neurinomas. *J Orthop Sci*. 2012 Sep 5.
- 1-38) Matsumoto M, Tsuji T, Iwanami A, Watanabe K, Hosogane N, Ishii K, Nakamura M, Morioka H, Toyama Y. Total en Bloc spondylectomy for spinal metastasis of differentiated thyroid cancers: a long-term follow-up. *J Spinal Disord Tech*. 2012 Oct 17.
- 1-39) Takagi T, Kimura Y, Shibata S, Saito H, Ishii K, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Tabata Y, Nakamura M. Sustained bFGF-release tubes for peripheral nerve regeneration: comparison with autograft. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Oct;130(4):866-876.
- 1-40) 山下太郎, 辻崇, 渡辺航太, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄. 腰椎圧迫骨折後に著しい後側弯変形を呈したパーキンソン病の1 治験例. *関東整形災害外科学会雑誌雑誌*. 2012;43(1):6-12.
- 1-41) 岡田英次朗, 渡辺航太, 小倉洋二, 高橋洋平, 細金直文, 岩波明生, 辻崇, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 思春期特発性側弯症Lenke type5カーブに対する後方矯正固定術における固定範囲短縮の試み. *臨床整形外科*. 2012;47(7):613-618.
- 1-42) 河野美貴子, 辻崇, 渡辺航太, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄. Love法術後に発生した硬膜内脱出ヘルニアの1例. *関東整形災害外科学会雑誌*. 2012;43(3):173-176.
- 1-43) 渡辺航太, 許斐恒彦, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 松本守雄. 【腰痛のサイエンス】 (第6章) 腰椎各要素と腰痛 筋 腰椎後方手術による医原性筋挫傷と術後腰痛 腰椎変性所見のない馬尾腫瘍手術例での検討. *脊椎脊髄ジャーナル*. 2012.04;25(4):373-375.
- 1-44) 鈴木悟士, 中村雅也, 渡辺航太, 辻崇, 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 上位胸椎砂時計型海綿状血管腫の1例. *関東整形災害外科学会雑誌*. 2012.04;43(2):149-153.
- 1-45) K. Ishii, M. Matsumoto, K. Watanabe, T. Tsuji, H. Takaishi, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, “Remodeling of C2 Facet Deformity Prevents Recurrent Subluxation in Patients with Chronic Atlantoaxial Rotatory Fixation (AARF) -A Novel Strategy for Treatment of Chronic AARF-” *Spine*, 36:256-262, 2011.
- 1-46) M. Matsumoto, K. Watanabe, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, K. Chiba, Y. Toyama, “Late instrumentation failure after total en bloc spondylectomy” *J Neurosurg Spine*, 15:320-327, 2011.
- 1-47) Y. Shiono, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Sterility of Posterior Elements of the Spine in Posterior Correction Surgery” *Spine*, 37:523-526, 2012.

- 1-48) M. Nakamura, K. Fujiyoshi, O. Tsuji, K. Watanabe, T. Tsuji, K. Ishii, M. Matsumoto, Y. Toyama, Chiba K, “Long-term surgical outcomes of idiopathic spinal cord herniation” *J Orthop Sci*, 16:347-351, 2011.
- 1-49) M. Matsumoto, E. Okada, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, K. Chiba, Y. Toyama, “Spontaneous Regression of soft disc herniation in patients with cervical myelopathy” *Neurosurg Q*, 26:1592-1598, 2011.
- 1-50) T. Takagi, K. Ishii, S. Shibata, A. Yasuda, M. Sato, N. Nagoshi, H. Saito, HJ. Okano, Y. Toyama, H. Okano, M. Nakamura, “Schwann-spheres derived from injured peripheral nerves in adult mice –Their in vitro characterization and therapeutic potential–” *PLOS ONE*, 6: e21497 (1-10), 2011.
- 1-51) G. Cui, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, Lawrence G. Lenke, M. Matsumoto, “Morphologic evaluation of the thoracic vertebrae for safe free-hand pedicle screw placement in adolescent idiopathic scoliosis: a CT-based anatomical study” *Surg Radiol Anat*, 34:209-216, 2011.
- 1-52) G. Cui, K. Watanabe, Y. Miyauchi, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, T. Miyamoto, M. Matsumoto, “Matrix metalloproteinase 13 in the ligamentum flavum from lumbar spinal canal stenosis patients with and without diabetes mellitus.” *J Orthop Sci*, 16:785-790, 2011.
- 1-53) H. Funao, K. Ishii, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, M. Aizawa, Y. Okada, K. Chiba, S. Koyasu, Y. Toyama, M. Matsumoto, “Establishment of a real-time, quantitative and reproducible mouse model of staphylococcal osteomyelitis using bioluminescence imaging.” *Infection and Immunity*, 80:733-741, 2011.
- 1-54) O. Tsuji, M. Nakamura, K. Fujiyoshi, K. Ishii, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, S. Momoshima, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Cervical intramedullary ependymoma masquerading as cervical spondylotic myelopathy on MRI analysis.” *J Orthop Sci*, (Epub ahead of print), 2011.
- 1-55) S. Suzuki, K. Ishii, M. Seki, Y. Izawa, S. Takahashi, Y. Toyama, M. Nakamura, N. “Suzuki, Limbic encephalitis following cordotomy in patients with malignant thoracic spinal cord astrocytoma.” *Internal Medicine*, 51:321-324, 2012.
- 1-56) N. Hosogane, K. Watanabe, T. Tsuji, T. Miyamoto, K. Ishii, Y. Niki, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Serum cartilage metabolites as biomarkers of degenerative lumbar scoliosis.” *J Orthop Res*, (Epub ahead of print), 2012.
- 1-57) M. Matsumoto, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, K. Chiba, Y. Toyama, “Impact of Lamina Closure on Long-term Outcomes of Open-door Laminoplasty in Patients with Cervical Myelopathy -Minimum 5-year Follow-up Study.” *Spine*, (Epub ahead of print), 2012.
- 1-58) Y. Kobayashi Y, M. Nakamura, O. Tsuji, A. Iwanami, K. Ishii, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Kameyama, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Nondura-based clear cell meningioma of the cauda equina in an adult.” *J Orthop Sci*, (Epub ahead of print), 2011.
- 1-59) G. Cui G, K. Watanabe, Y. Nishiwaki, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Loss of apical vertebral derotation in adolescent idiopathic scoliosis: 2-year follow-up using multi-planar reconstruction computed tomography.” *Eur Spine J*, (Epub ahead of print), 2012.
- 1-60) H. Funao H, M. Nakamura, N. Hosogane, K. Watanabe, T. Tsuji, K. Ishii, M. Kamata, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Surgical Treatment of Spinal Extradural Arachnoid Cysts in the Thoracolumbar Spine.” *Neurosurgery*, (Epub ahead of print), 2012.
- 1-61) H. Funao, T. Tsuji, N. Hosogane, K. Watanabe, K. Ishii, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Comparative study of spinopelvic sagittal alignment between patients with and without degenerative spondylolisthesis.” *European Spine J*. (Epub ahead of print), 2012.
- 1-62) M. Nakamura, O. Tsuji, A. Iwanami, T. Tsuji, K. Ishii, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Central neuropathic pain after surgical resection in patients with spinal intramedullary tumor.” *J Orthop Sci*, (Epub ahead of print), 2012.
- 1-63) M. Ishii, K. Asano, H. Namkoong, S. Tasaka, K. Mizoguchi, T. Asami, H. Kamata, Y. Kimizuka, H. Fujiwara, Y. Funatsu, S. Kagawa, J. Miyata, K. Ishii, M. Nakamura, H. Hirai, K. Nagata, S.L. Kunkel, N. Hasagawa, T. Betsuyaku, “CRTH2 is a critical regulator of neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis.” *J Immunology*, (Epub ahead of print), 2012.

- 1-64) Y. Ogura, K. Watanabe, N. Hosogane, T. Tsuji, K. Ishii, M. Nakamura, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Severe progressive scoliosis due to huge subcutaneous cavernous hemangioma: a case report” *Scoliosis*, 17:6:3, 2011.
- 1-65) G. Cui, K. Watanabe, K. Ishii, Y. Toyama, K. Chiba, M. Matsumoto, “Interpedicular graft using a titanium mesh cage in a patient with lumbar scoliosis associated with a congenital butterfly vertebra” *J Neurosurg Spine*, 14:215-218, 2011.
- 1-66) H. Ishihama, M. Nakamura, H. Funao, K. Ishii, M. Matsumoto, Y. Toyama, K. Chiba, “A rare case of spinal dumbbell tanycytic ependymoma” *Spine*, 36:612-614, 2011.
- 1-67) 渡辺航太, 細金直文, 辻崇, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄: 腰椎変性すべり症に対する棘突起縦割式椎弓切除術の治療成績. 東日本整形災害外科学会雑誌 23(1):9-14, 2011.
- 1-68) 渡辺航太, 細金直文, 辻崇, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄: 成人特発性側弯症に対する後方矯正固定術の治療成績 (30歳以上). 東日本整形災害外科学会雑誌 23(1):100-103, 2011. 栄利昌, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 軸椎脊索腫治療後の後弯変形に対し後方矯正固定術を施行した1例. 脊椎脊髄ジャーナル 24(8):819-823, 2011.
- 1-69) 森智章, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 正中および両外側仙骨動脈を栄養血管とするまれな脊髄動静脈瘻の1例. 脊椎脊髄ジャーナル 24(9):887-891, 2011.
- 1-70) 山下太郎, 辻崇, 渡辺航太, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭, 松本守雄. 腰椎圧迫骨折後に著しい後側弯変形を呈したパーキンソン病の1治験例. 関東整形災害外科学会雑誌雑誌. 43:6-12, 2012.

2. 著書・総説、解説等.

- 2-1) 石井賢. 2. 胸椎. In: 小川敬壽, editor. 新・図説単純X線撮影法 撮影法と診断・読影のポイント. 東京: 金原出版; 2012. p. 40-45.
- 2-2) 石井賢, 松本守雄. 特集: 腰椎内視鏡手術における私の工夫 腰椎変性疾患に対する MIS-TLIF. *Monthly Book Orthopaedics*. 2012:33-39.
- 2-3) 石井賢, 百島祐貴, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 特集 発育期における脊椎障害 上位頸椎-環軸関節回旋位固定-. *整形・災害外科*. 2012 1月1日:45-51.
- 2-4) 船尾陽生, 石井賢, 蔵本哲也, 塩野雄太, 吉岡研之, 石濱寛子, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 誌上シンポジウム 整形外科領域における蛍光イメージング 整形外科の基礎研究における蛍光・バイオイメージング法 感染症領域への応用. *臨床整形外科*. 2012:43-49.
- 2-5) 渡辺航太, 許斐恒彦, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 松本守雄. 第6章: 腰椎各要素と腰痛 (7) 筋 腰椎後方手術による医原性筋挫傷と術後腰痛 腰椎変性所見のない馬尾腫瘍手術例での検討. *脊椎脊髄ジャーナル*. 2012;25(4):373-375.
- 2-6) 石井賢. 最小侵襲手技による腰椎後方固定術 (MIS-TLIF). *Bone Joint Nerve*. 2012;2(2):361-364.
- 2-7) 石井賢. 第二特集 首の具合を見きわめよう!. *NHK テレビテキスト きょうの健康*. 2012:34-38.
- 2-8) 石井賢. その痛み首が原因? 頸椎椎間板ヘルニア. *NHK テレビテキスト きょうの健康*. 2012:39-43.
- 2-9) 石井賢. その痛み首が原因? 頸椎症. *NHK テレビテキスト きょうの健康*. 2012:44-48.
- 2-10) 石井賢. その痛み首が原因? 後縦靭帯骨化症. *NHK テレビテキスト きょうの健康*. 2012:49-53.
- 2-11) 石井賢. Questionnaire 全国の整形外科医 50名に聞いた、アンケート調査による診療の実態. *オルソタイムズ Ortho Times*. 2012;6(3):1.
- 2-12) 石井賢. 特集 バイオセラミックスの現状と新展開 感染症領域の光イメージング. *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan*. 2012:500-503.
- 2-13) 石井賢. 頸椎後方インストゥルメンテーションの進歩. *stryker infos spine*. 2012;5(Autumn):24-26.
- 2-14) 石井賢. 脊髄腫瘍(2)-硬膜内髄外腫瘍, 馬尾腫瘍; アトラス骨・関節画像診断 5 脊椎・脊髄, 山下敏彦編 中外医学社, 112-114, 2011.

- 2-15) 石井賢. 胸椎；新・図説単純X線撮影法 撮影法と診断・読影のポイント, 小川敬壽編 金原出版, 40-45, 2012.
- 2-16) K. Ishii, K. Chiba, Y. Toyama, M. Matsumoto, “Management of atlantoaxial rotatory fixation” *Spine*, 51:321-324, 2012.
- 2-17) 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 腰椎変性すべり症と腰椎変性(後)側弯症に対する最小侵襲椎間孔腰椎椎体間固定術の手術手技. 別冊 整形外科 59 運動器疾患に対する最小侵襲手術 59:124-132, 2011.
- 2-18) 石井賢: Technique up-to-date 最小侵襲手技による腰椎後方固定術 (MIS-TLIF) . オルソタイムズ 5(3): 3, 2011.
- 2-19) 石井賢, 千葉一裕: 内科医のための腰部脊柱管狭窄症の必須知識 2. 保存的治療: プライマリ・ケア医としての薬物療法. *Modern Physician* 31 (9) :1063-1066, 2011.
- 2-20) 松本守雄, 渡辺航太, 細金直文, 辻崇, 石井賢, 中村雅也, 千葉一裕, 戸山芳昭: 腰痛患者の現状調査. *Mebio* : 99-106, 2011.
- 2-21) 石井賢, 中村雅也: 【血管腫】 脊髄海綿状血管腫の臨床. *BRAIN and NERVE* 63 (1) : 27-30, 2011.
- 2-22) 石井賢, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄: 高齢者腰部脊柱管狭窄症に対する MIS-TLIF の有用性. 脊椎脊髄ジャーナル[特集]24(6) : 623-627, 2011. 松本守雄, 戸山芳昭. 特集: 腰椎内視鏡手術における私の工夫 腰椎特殊病変に対する内視鏡下手術. *Monthly Book Orthopaedics*. [特集]. 2012;25(1):41-46.
- 2-23) 石井賢, 松本守雄. 特集: 腰椎内視鏡手術における私の工夫 腰椎変性疾患に対する MIS-TLIF. *Monthly Book Orthopaedics*. 2012:33-39.
- 2-24) 石井賢, 百島祐貴, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 特集 発育期における脊椎障害 上位頸椎-環軸関節回旋位固定-. *整形・災害外科*. 2012 1 月 1 日:45-51.
- 2-25) 船尾陽生, 石井賢, 蔵本哲也, 塩野雄太, 吉岡研之, 石濱寛子, 中村雅也, 戸山芳昭, 千葉一裕, 松本守雄. 誌上シンポジウム 整形外科領域における蛍光イメージング 整形外科の基礎研究における蛍光・バイオイメージング法 感染症領域への応用. *臨床整形外科*. 2012:43-49.
- 2-26) 渡辺航太, 許斐恒彦, 石井賢, 中村雅也, 戸山芳昭, 松本守雄. 第6章: 腰椎各要素と腰痛 (7) 筋 腰椎後方手術による医原性筋挫傷と術後腰痛 腰椎変性所見のない馬尾腫瘍手術例での検討. *脊椎脊髄ジャーナル*. 2012;25(4):373-375.
- 2-27) 石井賢. 最小侵襲手技による腰椎後方固定術 (MIS-TLIF). *Bone Joint Nerve*. 2012;2(2):361-364.

研究分担者: 松本秀男 (慶應義塾大学)

1. 審査付原著論文 (査読つき Proceedings 含む)

英文原著論文

- 1-1) Hirata T, Kawai T, Hirose H, Tanaka K, Kurosawa H, Fujii C, Fujita H, Seto Y, Matsumoto H, Itoh H.: Palmitic acid-rich diet suppresses glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) and induces endoplasmic reticulum (ER) stress in pancreatic islets in mice; *Endocrine Research*, early online:1-8: 2015
- 1-2) Tanikawa H, Matsumoto H, Harato K, Kiriyama Y, Suda Y, Toyama Y, Nagura T.; Female recreational athletes demonstrate different knee biomechanics from male counterparts during jumping rope and turning activities; *J Orthop Sci*., 19(1), 104-111: 2014
- 1-3) Takeda K, Hasegawa T, Kiriyama Y, Matsumoto H, Otani T, Toyama Y, Nagura T.; Kinematic motion of the anterior cruciate ligament deficient knee during functionally high and low demanding tasks; *J Biomech*, 47(10), 2526-30: 2014
- 1-4) Kiriyama Y, Matsumoto H, Toyama Y, Nagura T.; A miniature tension sensor to measure surgical suture tension of deformable musculoskeletal tissues during joint motion; *Proc Inst Mech Eng H*., 228(2), 140-148: 2014
- 1-5) Iwamoto J, Sato Y, Matsumoto H.; Vitamin K2 improves femoral bone strength without altering bone mineral density in gastrectomized rats; *J Nutr Sci Vitaminol*, 60(2), 71-77: 2014

- 1-6) Tanikawa H, **Matsumoto H**, Komiyama I, Kiriyama Y, Toyama Y, Nagura T, Comparison of Knee Mechanics Among Risky Athletic Motions for Non-Contact Anterior Cruciate Ligament Injury; *J Appl Biomech*, 29(6); 749-755 2013
- 1-7) Harato K, Nagura T, **Matsumoto H**, Otani T, Toyama Y, Suda Y, Asymmetry of the knee extension deficit in standing affects weight-bearing distribution in patients with bilateral end-stage knee osteoarthritis; *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, not yet; 2013
- 1-8) Udagawa K, Niki Y, **Matsumoto H**, **Matsumoto H**, Enomoto H, Toyama Y, Suda Y, Lateral patellar retinaculum reconstruction for medial patellar instability following lateral retinacular release: A case report; *Knee*, 21(1), 336-339; 2013
- 1-9) Nagashima M, Abe H, Amaya K, **Matsumoto H**, Yanaihara H, Nishiwaki Y, Toyama Y, Matsumoto M; Risk factors for lumbar disc degeneration in high school American football players: a prospective 2-year follow-up study; *Am J Sports Med*, 41(9), 2059-2064: 2013
- 1-10) Iwamoto J, Takeda T, Sato Y, **Matsumoto H**; Effect of risedronate on speed of sound in postmenopausal women with osteoporosis; *World J Orthop*, 4(4), 316-322: 2013
- 1-11) Iwamoto J, Sato Y, **Matsumoto H**; Influence of gastrectomy on cortical and cancellous bones in rats; *Gastroenterol Res Pract*, 2013
- 1-12) Iwamoto J, Sato Y, **Matsumoto H**; Chair rising time is longer in postmenopausal women with history of nonvertebral fracture; *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 13(3), 265-272: 2013
- 1-13) Niki Y, Hakozaki A, Iwamoto W, Kanagawa H, Matsumoto H, Toyama Y, Suda Y, “Factors affecting anterior knee pain following anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction.”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*, **20(8)**, 1543-9 (2012).
- 1-14) Kaneko T, Niki Y, Matsumoto H, Ikegami H, Musha Y, “Factors affecting functional medial ligament balancing in patients undergoing total knee arthroplasty for varus knees”, *J. Med. Soc. Toho*, **59(6)**, 297-304 (2012).
- 1-15) Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H, “Strategy for prevention of hip fractures in patients with Parkinson’s disease”, *World J Orthop*, **3(9)**, 137-41 (2012).
- 1-16) Iwamoto J, Sato Y, Uzawa M, Matsumoto H, “Three-year outcome of alendronate treatment in older Japanese women with osteoporosis.”, *Rheumatology Reports*, online publication (2012).
- 1-17) Iwamoto J, Takada T, Sato Y, Matsumoto H, “Influence of treatment with alendronate on the speed of sound, an ultrasound parameter, of the calcaneus in postmenopausal Japanese women with osteoporosis: A clinical practice-based observational study.”, *Ther Clin Risk Manag*, **8**, 287-93 (2012).
- 1-18) Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H, “Whole body vibration exercise improves body balance and walking velocity in postmenopausal osteoporotic women treated with alendronate: Galileo and Alendronate Intervention Trail (GAIT).”, *J Musculoskel Neuronal Interact*, **12(3)**, 136-43 (2012).
- 1-19) Iwamoto J, Sato Y, Uzawa M, Matsumoto H, “Five-year follow-up of a woman with pregnancy and lactation-associated osteoporosis and vertebral fractures.”, *Ther Clin Risk Manag*, **8**, 195-199 (2012).
- 1-20) Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H, “Efficacy of antiresorptive agents for preventing fractures in Japanese patients with an increased fracture risk: review of the literature.”, *Drugs Aging*, **29(3)**, 191-203(2012).
- 1-21) Iwamoto J, Sato Y, Uzawa M, Takeda T, Matsumoto H, “Three-year experience with alendronate treatment in postmenopausal osteoporotic Japanese women with or without renal dysfunction.”, *Drugs Aging*, **29(2)**, 133-42 (2012).
- 1-22) Iwamoto J, Seki A, Sato Y, Matsumoto H, “Vitamin K2 improves renal function and increases femoral bone strength in rats with renal insufficiency”, *Calcif Tissue Int*, **90(1)**, 50-59 (2012).
- 1-23) Niki Y, Takeda Y, Kanagawa H, Iwamoto W, Matsumoto H, Enomoto H, Toyama Y, Suda Y, “Effects of four different surgical approaches on intra-operative joint gap in posterior-stabilized total knee arthroplasty.”, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*, **20(10)**, 2026-31 (2012).
- 1-24) Iwamoto J, Takeda T, Matsumoto H, “Sunlight exposure is important for preventing hip fractures in patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, or stroke”, *Acta Neurol Scand*, **125(4)**, 279-284 (2012).

- 1-25) Iwamoto J, Seki A, Sato Y, Matsumoto H, “Celecoxib does not significantly delay bone healing in a rat femoral osteotomy model: a bone histomorphometry study.”, *Orthop Res Rev*, **3**, 39-45 (2012).
- 1-26) Iwamoto J, Sato Y, Takeda T, Matsumoto H, “Return to play after conservative treatment in athletes with symptomatic lumbar disc herniation: a practice-based observational study.”, *Open Access Journal of Sports Medicine*, **2**, 25-31 (2012).
- 1-27) Iwamoto J, Yago K, Sato Y, Matsumoto H, “Teriparatide therapy for bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw in an elderly Japanese woman with severe osteoporosis.”, *Clin Drug Investig*, **32(8)**, 547-53 (2012).
- 1-28) Kokubo T, Hashimoto T, Nagura T, Nakamura T, Suda Y, Matsumoto H, Toyama Y, “Effect of the posterior tibial and peroneal longus on the mechanical properties of the foot arch.”, *Foot Ankle Int.*, **33(4)**, 320-5 (2012).
- 1-29) Nagashima M, Abe H, Amaya K, Matsumoto H, Yanaihara H, Nishiwaki Y, Toyama Y, Matsumoto M, “A method for quantifying intervertebral disc signal intensity on T2-weighted imaging.”, *Acta Radiol.*, **53(9)**, 1059-65 (2012).
- 1-30) Niki Y, Matsumoto H, Otani T, Enomoto H, Toyama Y, Suda Y, “A modified Larson's method of posterolateral corner reconstruction of the knee reproducing the physiological tensioning pattern of the lateral collateral and popliteofibular ligaments.”, *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.*, **4(1)**, 21 (2012).
- 1-31) Iwamoto J, Sato Y, Uzawa M, Matsumoto H, “Eleven years of experience with bisphosphonate plus alfacalcidol treatment in a man with osteogenesis imperfecta type I.”, *Ther Clin Risk Manag.*, **9**, 1-7 (2012).

邦文原著論文

- 1-32) 東宏一郎, 松本秀男: パフォーマンス向上のためのスポーツ医・科学 ・パフォーマンス向上のためのトレーニング方法・心肺機能トレーニング; 臨床スポーツ医学, 32(2), 160-164: 2015
- 1-33) 松本秀男: パフォーマンス向上のためのスポーツ医・科学 ・総論・スポーツパフォーマンスとスポーツ医・科学; 臨床スポーツ医学, 32 (2), 106-107: 2015
- 1-34) 松本秀男: 特集/下肢のスポーツ障害—押さえておきたい病態・評価・治療とリハビリテーション 膝関節のスポーツ障害—病態・評価・治療—; Monthly Book MEDICAL REHABILITATION, 182, 29-33: 2015
- 1-35) 名倉武雄, 松本秀男: ストレッチングとアイシング ・ストレッチング・ ストレッチングのバイオメカニクス—超音波診断装置による効果判定—; 臨床スポーツ医学, 32 (5), 440-444: 2015
- 1-36) 松本秀男: 超入門 関節鏡視下手術の基礎 第1回 膝関節編 関節鏡視で見えるもの 1. 関節軟骨、半月板; 整形外科 Surgical technique, 5 (3), 88-91: 2015
- 1-37) 松本秀男: 野球の医学 V 投球障害以外の病態と治療方針 膝痛; 臨床スポーツ医学, 32 臨時増刊号, 220-223: 2015
- 1-38) 松本秀男: 超入門 関節鏡視下手術の基礎 第2回 膝関節編 関節鏡視で見えるもの 2. 滑膜、十字靭帯、膝窩筋腱; 整形外科 Surgical technique, 5 (4), 91-93: 2015
- 1-39) 東宏一郎, 堀澤菜里, 田畑尚吾, 長野雅史, 新庄琢磨, 岩本潤, 石田浩之, 松本秀男: 運動内容と運動療法の効果; 日本臨床スポーツ医学会誌, 23 (3), 392-394: 2015
- 1-40) 松本秀男: 慶應義塾大学におけるスポーツ医学; 日本臨床スポーツ医学会誌, 23 (3), 399-401: 2015
- 1-41) 松本秀男: 膝関節靭帯損傷の保存療法 ・膝関節靭帯損傷の基礎・ 膝関節靭帯の機能解剖とバイオメカニクス; 臨床スポーツ医学, 32 (9), 814-817: 2015

2. 著書・総説・解説等

- 2-1) 松本秀男: 第3章 膝関節・下腿部の臨床診断各論 4. 後十字靭帯 (PCL) 損傷; 下肢臨床症候の診かた・考え方, 吉矢晋一, 帖佐悦男, 田中康仁, 南山堂, 142-143: 2015
- 2-2) 松本秀男: 第3章 膝関節・下腿部の臨床診断各論 4. 前十字靭帯 (ACL) 損傷; 下肢臨床症候の診かた・考え方, 吉矢晋一, 帖佐悦男, 田中康仁, 南山堂, 140-141: 2015

研究分担者：二木 康夫（慶応義塾大学）

1. 審査付原著論文（査読つき Proceedings 含む）

- 1-1) Kanagawa H, Niki Y, Kobayashi T, Sato Y, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Watanabe R, Morita M, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, Miyamoto T., “Mycobacterium tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2”, *J. Bone Miner. Metab.* 2014 Mar. 15.
- 1-2) Masanori Nakayama, Yasuo Niki, Toshiki Kawasaki, Yuki Takeda, Hiroyasu Ikegami, Yoshiaki Toyama, Takeshi Miyamoto, “IL-32-PAR2 axis is an innate immunity sensor providing alternative signaling for LPS- TRIF axis”, *Scientific Reports*, **3**, 2960 (2013).
- 1-3) Nakayama M, Niki Y, Kawasaki T, Takeda Y, Horiuchi K, Sasaki A, Okada Y, Umezawa K, Ikegami H, Toyama Y, Miyamoto T. : Enhanced susceptibility to lipopolysaccharide-induced arthritis and endotoxin shock in interleukin-32 alpha transgenic mice through induction of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Res Ther.* 2012 May 21;14(3):R120
- 1-4) Niki Y, Takeuchi T, Nakayama M, Nagasawa H, Kurasawa T, Yamada H, Toyama Y, Miyamoto T. : Clinical significance of cartilage biomarkers for monitoring structural joint damage in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF therapy. *PLoS One.* 2012;7(5):e37447.
- 1-5) Niki Y, Matsumoto H, Otani T, Enomoto H, Toyama Y, Suda Y. : A modified Larson's method of posterolateral corner reconstruction of the knee reproducing the physiological tensioning pattern of the lateral collateral and popliteofibular ligaments. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol.* 2012 Jun 13;4(1):21.
- 1-6) Hosogane N, Watanabe K, Tsuji T, Miyamoto T, Ishii K, Niki Y, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Matsumoto M : Serum cartilage metabolites as biomarkers of degenerative lumbar scoliosis. *J Orthop Res.* 2012 Aug;30(8):1249-53.
- 1-7) Niki Y, Takeda Y, Kanagawa H, Iwamoto W, Matsumoto H, Enomoto H, Toyama Y, Suda Y. Effects of four different surgical approaches on intra-operative joint gap in posterior-stabilized total knee arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 Oct;20(10):2026-31.
- 1-8) M. Nakayama, Y. Niki, et al, “The effects of interleukin-32 alpha on development of inflammatory arthritis and endotoxin shock in mice” ,Orthopaedic Research Society 2012 annual meeting, San Francisco, USA, 4-7 February(2012).

2. 著書・総説、解説等

- 2-1) 二木康夫, 関節破壊のバイオマーカー —CTX-II—, Key Note RA 2(2)22-26 (2014).
- 2-2) 二木 康夫, 竹内 勤 :生物学的製剤時代における血清軟骨マーカーの臨床的意義について : *Clinical Calcium* 22(2) 205-212(2012)
- 2-3) 二木康夫 : 膝複合靭帯損傷の合併症 : *臨床スポーツ医学* 29 (5) 505-509 (2012)
- 2-4) 二木康夫 : 整形外科領域における金属アレルギー : *バイオマテリアル-生体材料-* 30(2)113-116 (2012)
- 2-5) 箱崎 彰裕, 二木 康夫, 金川 裕矢, 武田 勇樹, 勝山 詠理, 松本 秀男, 大谷 俊郎, 榎本 宏之, 戸山 芳昭, 須田 康文 : 解剖学的二重束前十字靭帯再建術後の MRI 像と膝前後動揺性との経時的検討 : *JOSKAS* 37(1) 48-49(2012)
- 2-6) 二木康夫 : 膝靭帯損傷 ACL/PCL 損傷の場合 : *整形外科看護* 17(8)761-767 (2012)
- 2-7) 武田 勇樹, 二木 康夫, 勝山 詠理, 金川 裕矢, 松本 秀男, 大谷 俊郎, 名倉 武雄, 榎本 宏之, 戸山 芳昭, 須田 康文 : 人工膝関節置換術前 3D 計画の大腿骨コンポーネント設置における有効性について : *JOSKAS* 37(2) 186-187 (2012)
- 2-8) 望月 猛, 二木 康夫, 白旗 敏克, 桃原 茂樹 : TKA における大腿骨遠位の骨形態と Gap による Gender Knee を用いた大腿骨コンポーネントの検討 : *JOSKAS* 37(2) 192-193(2012)

- 2-9) 勝山 詠理, 二木 康夫, 武田 勇樹, 岩本 航, 金川 裕矢, 松本 秀男, 大谷 俊郎, 榎本 宏之, 戸山 芳昭, 須田 康文 : 両側人工膝関節置換術の周術期の問題点について 一期的両側TKAと二期的両側TKAの比較検討 : JOSKAS 37(2) 218-219 (2012)
- 2-10) 竹島 憲一郎, 須田 康文, 榎本 宏之, 二木 康夫, 戸山 芳昭 : 膝窩筋腫大腿骨付着部剥離骨折に対する保存療法後長期経過観察し得た1例 : 関東整形災害外科学会雑誌 43(4) 249-253 2012

研究分担者 : 江本 精 (国際医療福祉大学)

1. 審査付原著論文 (査読つき Proceedings 含む)

- 1-1) Emoto M. Entering the Age of Simultaneous Diagnosis and Treatment by Using Low-Intensity Ultrasound Energy (Review). J Ecosys Ecograph 3: 1000e118, 2013.
- 1-2) Emoto M. Development of a Cancer Treatment with Low-Intensity Ultrasound (Review). J Women's Health Care 2: 1000e2013, 2013.
- 1-3) Y. Negishi, M. Hamano, Y. Tsunoda, Y. Oda, C. Batsuren, Y. Takahashi, D. Omata, R. Suzuki, K. Maruyama, M. Nomizu. M. Emoto, Y. Aramaki. AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature, *Biomaterials*, **34**, 501-507 (2013)
- 1-4) M. Matsueda, M. Emoto, M. Aizawa. Prepatation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470, *Key Engineering Materials*, **493**, 672-677 (2012)
- 1-5) Emoto M., Sadamori R, Hachisuga T, Kawarabayashi T, Miyamoto S. Clinical Usefulness of Contrast-enhanced Color Doppler Ultrasonography in Invasive and Non-invasive Gestational Trophoblastic Diseases: A Preliminary Study. J Reprod Med 56,224-234 (2011)
- 1-6) Chojiamts B, Naganuma Y, Nakajima K, Kawarabayashi T, Miyamoto S, Tachibana K, Emoto M. Metronomic irinotecan chemotherapy combined with ultrasound irradiation for a human uterine sarcoma xenograft. *Cancer Sci* 102, 452-459 (2011)
- 1-7) Naganuma Y, Batsuren C, Shiota K, Nakajima K, Ogata S, Miyamoto S, Kawarabayashi T, Emoto M. *Cancer Sci* 102, 1543-1552 (2011)
- 1-8) Chojiamts B, Jimi S, Kondo T, Naganuma Y, Matsumoto T, Kuroki M, Iwasaki H, Emoto M. CD133 Cancer Stem Cell-like Cells Derived from Uterine Carcinosarcoma (Malignant Mixed Müllerian Tumor). *Stem Cells* 29, 1485-1495 (2011)
- 1-9) Matsueda M, Emoto M. Preparation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470. *Key Eng Materials* 493;672-677 (2012)

2. 著書・総説, 解説等

- 2-1) 江本 精. 低出力超音波を用いたがん治療, *超音波医学*, **39**, 251-257 (2012)
- 2-2) 江本 精. 子宮肉腫の診断と治療. 「婦人科がん-最新の研究動向」, *日本臨床社* **70**, 442-446 (2012)
- 2-3) 江本 精. 「子宮肉腫」婦人科がん化学療法ハンドブック 中外医学社 (2011)
- 2-4) 江本 精. 「子宮癌肉腫の診断と治療」婦人科がん-最新の研究動向- 日本臨床 70,442-446, 2012
- 2-5) 江本 精. 低出力超音波を併用したがん治療の開発: 診断と同時に治療を行う時代へ, *Jpn J Med Ultrasound* 39,251-257, 2012

研究分担者 : 松浦知和 (東京慈恵会医科大学)

1. 審査付原著論文 (査読つき Proceedings 含む)

- 1-1) Sugita T, Amano K, Nakano M, Masubuchi N, Sugihara M, Matsuura T. Analysis of the serum bile Acid composition for differential diagnosis in patients with liver disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2015 ; 2015:717431.

- 1-2) Abe H, Aida Y, Seki, N, Sugita T, Tomita Y, Nagano T, Itagaki M, Sutoh S, Nagatsuma K, Itoh K, Matsuura T, Aizawa Y. Aldehyde dehydrogenase 2 polymorphism for development to hepatocellular carcinoma in East Asian alcoholic liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:1376-83.
- 1-3) Matsumoto M, Matsuura T (9-2 番目). An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatol Res*. 2015;45:315-25.
- 1-4) Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Matsuura T (14-10 番目). Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 2015;45:397-404.
- 1-5) Hara M, Kirita A, Kondo W, Matsuura T, "LAP degradation product reflects plasma kallikrein-dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis.", *Springerplus*, 2014;3:221.
- 1-6) Arai Y, Arihiro S, Matsuura T, "Prostaglandin E-major urinary metabolite as a reliable surrogate marker for mucosal inflammation in ulcerative colitis.", *Inflamm. Bowel Dis.*, 2014; 20:1208-16.
- 1-7) Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Matsuura T, "Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C.", *PLoS One*, 2014;9:e97078.
- 1-8) Matsumoto M, Matsuura T, "An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line.", *Hepatol. Res.*, 2014 May 6.
- 1-9) Tsubota A, Shimada N, Atsukawa M, Abe H, Kato K, Matsuura T, "Impact of IL28B polymorphisms on 24-week telaprevir-based combination therapy for Asian chronic hepatitis C patients with hepatitis C virus genotype 1b.", *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2014;29:144-50.
- 1-10) Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohkawa R, Kudo Y, Nakagawa H, Matsuura T, "High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly-malignant potential.", *Int. J. Cancer*, 2014;134:2189-9.
- 1-11) Tanaka K, Matsuura T, Shindo D, Aida Y, Matsumoto Y, Nagatsuma K, et al. Noninvasive assessment of insulin resistance in the liver using the fasting ¹³C-glucose breath test. *Transl Res* 2013; 162: 191-200.
- 1-12) Matsumoto Y, Matsuura T, Aoyagi H, Matsuda M, Date T, Watanabe N, et al. Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PloS One* 2013; 8: e68992.
- 1-13) Nagatsuma K, Hano H, Murakami K, Shindo D, Matsumoto Y, Mitobe J, (Matsuura T), et al. Hepatic stellate cells that co-express LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis. *Liver Int* 2014; 34: 243-52.
- 1-14) 松浦知和, 池脇克則, 前橋はるか, 大川清, 松本喜弘, 田中賢, 永妻啓介, 高木一郎, "肝臓星細胞に発現するビタミン A 貯蔵酵素 lecithin:retinol acyltransferase による血中レチノール濃度の調節—還流培養系での代謝シミュレーション—", *ビタミン*, 86, 432-40(2012).
- 1-15) K. Kobayashi, A. Yoshida, Y. Ejiri, S. Takagi, H. Mimura, M. Hosoda, T. Matsuura, K. Chiba, "Increased expression of drug-metabolizing enzymes in human hepatocarcinoma FLC-4 cells cultured on micro-space cell culture plates", *Drug Metab Pharmacokinet*, 27, 478-85(2012).
- 1-16) T. Laurent, D. Murase, S. Tsukioka, T. Matsuura, S. Nagamori, H. Oda, "A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape", *J Cell Physiol*, 227, 2898-906(2012).
- 1-17) Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T. A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape. *J Cell Physiol* 2012; 227:2898-906.
- 1-18) Kuo TF, Tatsukawa H, Matsuura T. Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1130-7.
- 1-19) Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T. Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGF β stimulation. *Int J Oncol* 2011;39:1327-36.
- 1-20) Gotoh Y, Ishizuka Y, Matsuura T, Niimi S. Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. *Biomacromolecules* 2011;12:1532-9.

- 1-21) Watanabe N, Matsuura T. Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. *BBRC* 2011;407:135-40.

2. 解説記事

- 2-1) **(*4)** T. Matsuura, M. Aizawa, "Bioceramics for development of bioartificial liver" *The polymeric Biomaterials 2-Volume Set, Third Edition. Polymeric Biomaterials : Medicinal and Pharmaceutical Applications, Volume2*, Editors:Severian Dumitriu and Valentin Popa, USA : CRC Press. 691-713(2013).
- 2-2) **(*4)** 松浦知和, 斎藤良太, 石井雄二, 吉川 輝, 相澤 守, “バイオセラミックスを用いた肝再生 — 移植用バイオ人工肝臓の作製をめざして—”, *無機マテリアル学誌*, 19, 462-5(2012).

第 2 章

生命機能マテリアルによる 次世代スキャフォールドの創出

配向性アパタイトセラミックスの開発とその生命機能

庄 志¹⁾・中村まり子¹⁾・藤見峰彦²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 文教大学健康栄養学部管理栄養学科

Development of Apatite Ceramics with Preferred Orientation and Its Biological Function

Zhi ZHUANG¹⁾, Mariko NAKAMURA¹⁾, Takahiko J. FUJIMI²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Faculty of Health and Nutrition, Bunkyo University

1. 緒言

生体硬組織の主成分である水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は生体骨にインプラントすると新生骨と直接結合するという優れた生体活性を有し、実際に生体硬組織代替材料として整形・口腔外科領域で臨床応用されている[1]。HAp は結晶学的に六方晶系に属し、*a* 面と *c* 面という二つの結晶面がある [2, 3]。リモデリング (骨の新陳代謝) が活発に行なわれる骨では溶解性の高い *a* 面が、低い溶解性が望まれる歯のエナメル質では *c* 面が多く露出している構造をもつことは非常に興味深い。実際には、当研究室では、生体内の HAp の結晶構造を模倣し、既に繊維状 HAp 単結晶粒子 (アパタイトファイバー; AF) の合成に成功している [4]。また、板状 HAp 単結晶粒子の合成プロセスも確立している [5, 6]。

近年、超高齢化社会の到来に伴い、骨粗鬆症などの骨疾患を有効に治癒させるような高度医療を実現するためにも、高機能な生体材料として、HAp が世界中の研究者に注目されており、それに関連する研究が活発に行なわれている。しかしながら、「HAp がなぜ生体活性を示すのか」という疑問の本質はまだ明らかにされていないのが現状である。

本研究の目的は生体骨とエナメル質の結晶構造を模倣した「ナノ配向制御 HAp セラミックス」を創出し、配向構造と生体活性との関連性を明らかにし、その知見を活かして「高度医療・福祉」を実現する新規なバイオマテリアルの創出につなげることである。具体的には、配向性を有する HAp 単結晶粒子を出発原料として、*a* 面 (生体骨モデル) あるいは *c* 面 (エナメル質モデル) を多く露出したセラミックスを創製し、骨芽細胞や未分化間葉系幹細胞などの細胞をセラミックスの表面に播種し、その初期付着率、増殖性、石灰化レベルや分化挙動などを調査することにより、HAp の異なる結晶面が細胞に与える影響を解明する。

2. 実験方法

2-1 セラミックスの作製

AF粒子は $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0.167 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($0.100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)、 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ($0.500 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)

およびHNO₃ (0.100 mol·dm⁻³) からなる混合溶液を80 °C, 24 hで加熱したのち、さらに90 °C, 72 hで加熱することより合成した。このAFを用いて固形分1 mass%のスラリーを調製した。そのAFスラリー500 cm³に対して(NH₄)₂HPO₄ (0.12 mol·dm⁻³) 水溶液を添加し、pH 10に調整したのち、別に調製したpH 10のCa(NO₃)₂·4H₂O (0.20 mol·dm⁻³) 水溶液を滴下してAFの表面にアパタイトゲル (AG) を生成させ、そのまま24 h攪拌して熟成させた。得られた混合粉体を200 MPaで一軸加圧成形し、水蒸気雰囲気下1300 °C, 5 hで焼成した。AG添加量の異なる混合粉体の合成条件をTable 1に示す。

また、市販のアパタイト粉体 (HAp-100; 太平化学製) を成形圧 50 MPa で成形し、水蒸気雰囲気下 1200 °C, 5 h で焼成しすることによって、等方的 HAp セラミックスを作製した。

出発粉体および作製したセラミックスについて、粉末 X 線回折測定 (XRD)、走査型電子顕微鏡観察 (SEM)、高分解能透過型電子顕微鏡 (HR-TEM) およびレーザーゼータ電位計などの分析機器を用いて評価した。また、作製したセラミックスの *a* 面配向度は Eq. (1)、相対密度は Eq. (2)を用いて求めた。

$$\text{Orientation degree} = \frac{I_{(300)}}{I_{(300)} + I_{(211)} + I_{(002)}} \times 100\% \quad \dots (1)$$

I₍₃₀₀₎: Diffraction intensity of (300) reflection
I₍₂₁₁₎: Diffraction intensity of (211) reflection
I₍₀₀₂₎: Diffraction intensity of (002) reflection

$$\text{Relative density} = \frac{\text{Bulk density}}{3.16 (\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})} \times 100\% \quad \dots (2)$$

2-2 細胞の初期付着率の測定

試料片は 15.2 (±0.2) mmφ×1.5 mm の円板状とし、表面研磨処理後、160 °C, 1.5 h の乾熱滅菌を行なった。骨芽細胞のモデルとして新生児 C57BL/6 マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 を使用した。培地は牛胎児血清を 10 vol% 添加したα-最小必須培地 (α-MEM(+)) を用いた。組織培養用 24 well マイクロプレート (15.6 mmφ) に試料片の上に細胞密度 1.5×10⁴ cells·cm⁻³ の細胞懸濁液 2 cm³ を播種し、5 h の培養を行った。初期細胞付着率は、Eq. (3)に示したように播種した細胞数 (3×10⁴ cells) を 100 % とし、その値で 5 h 後に各試料片に接着していた細胞数を割ることにより求めた。このとき分散分析により、統計処理を行った。

$$A = \frac{N_5}{N_0} \times 100\% \quad \dots (3)$$

A: Initial cell-attachment efficiency
*N*₀: Numbers of the cells seeded on the specimens
*N*₅: Numbers of the cells after the culture of 5 h

3. 実験結果と考察

3-1 作製したセラミックスのキャラクターゼーション

出発粉体の XRD パターンを Figure 1 に示す。AF は通常の等方的な HAp-100 に比べて *a* 面に対応する

Table 1 Preparation conditions of AF and AG complex

Sample name	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	(NH ₄) ₂ HPO ₄	Content of AG
	cm ³	cm ³	mass %
AF	-	-	0
AG10%AF	30	30	10
AG30%AF	107	107	30
AG50%AF	250	250	50
AG70%AF	580	580	70

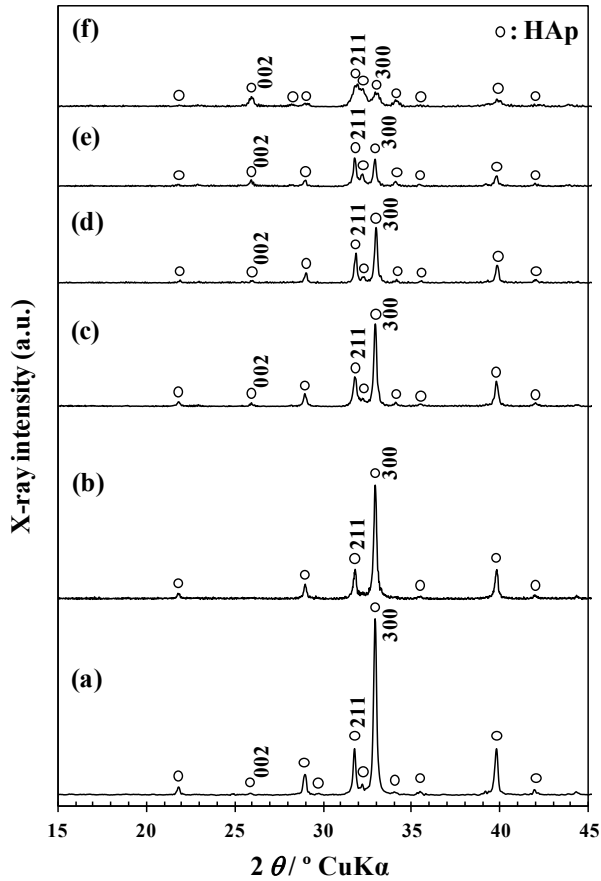


Figure 1 XRD patterns of the starting powders. (a) AF powder, (b) AG10%AF powder, (c) AG30%AF powder, (d) AG50%AF powder, (e) AG70%AF powder and (f) HAp-100 powder.

(300)面の回折強度が特異的に高かった。この結果は、合成したAF粉体はHApのa面が多く露出した構造を持つことを示している。AGの添加量が増えるにしたがって、低結晶性HApの回折が現れ、a面に対応する回折の強度が低くなった。

HR-TEMを用いて、出発粉体の微細構造観察と制限視野電子線回折(SAED)パターン撮影を行った。その結果をFigure 2に示す。AGの添加量が10~30 mass%の場合は、AF粒子の表面に微細なAG粒子が付着していることが確認できた。しかしながら、AG50%AFおよびAG70%AF粉体の場合は、AFの表面以外の場所にもAG粒子の凝集体が存在していた。このことから、AGの添加量を増やすことでAFの性質よりもAGの性質が強くなることが予測できる。また、SAEDでは、AF由来する明確な回折スポット以外に、デバイリングも現れたため、AGは多結晶であることが分かった。

作製したセラミックスのXRDパターンをFigure 3に示す。すべてのセラミックスはHApの単一相であった。

また、出発粉体と同様に、AF粉体およびAFとAGの複合粉体から作製されたセラミックスの(300)面の回折強度はHAp-100セラミックスより高かった。各セラミックスのa面配向度の結果をFigure 4に示す。この結果

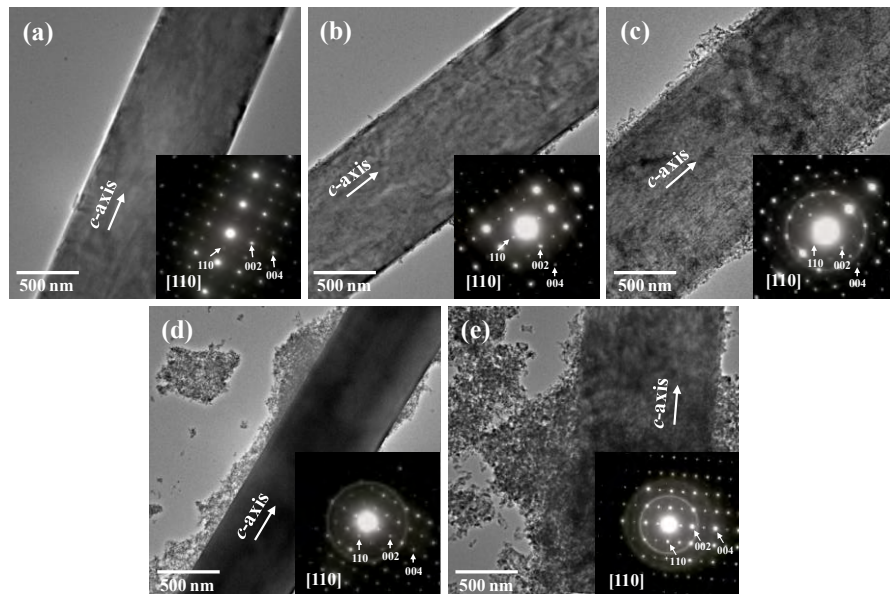


Figure 2 HR-TEM images and SAED patterns of the starting powders. (a)AF powder, (b) AG10%AF powder, (c) AG30%AF powder, (d) AG50%AF powder and (e) AG70%AF powder.

から、AGの添加量は30 mass%を超えると、*a*面配向度が著しく低下することが分かった。作製したセラミックスのSEM写真をFigure 5に示す。AFセラミックスにおいては、繊維状の形状が残っており、気孔が多

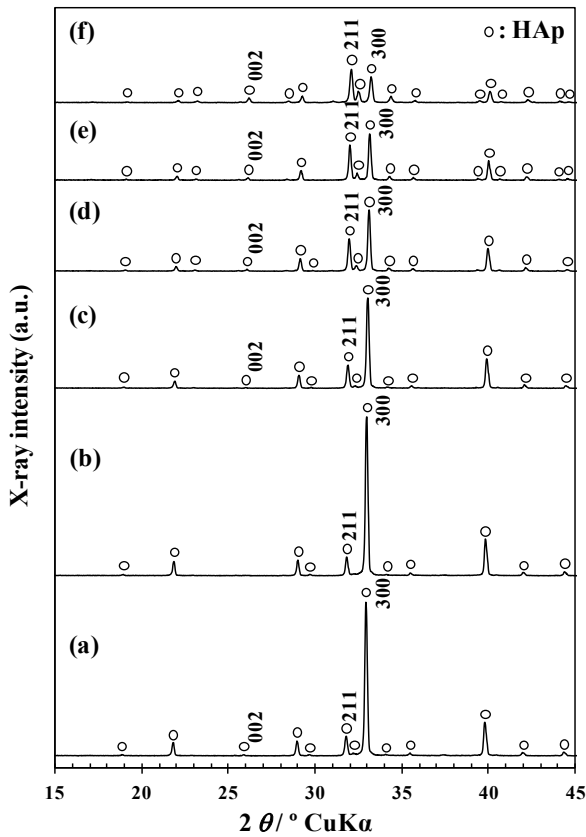


Figure 3 XRD patterns of the resulting ceramics. (a) AF ceramics, (b) AG10%AF ceramics, (c) AG30%AF ceramics, (d) AG50%AF ceramics, (e) AG70%AF ceramics and (f) HAp-100 ceramics.

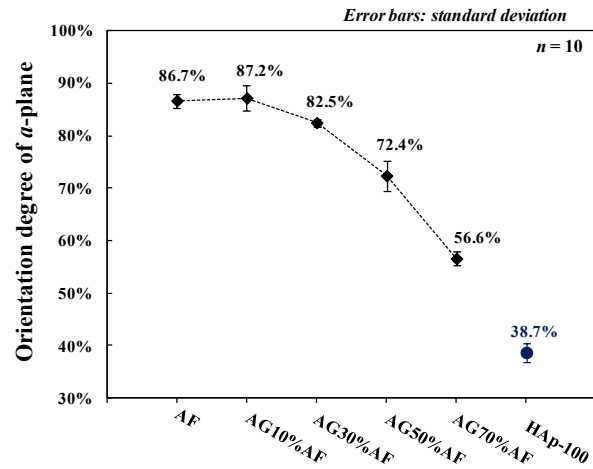


Figure 4 Orientation degrees of *a*-plane of the resulting HAp ceramics.

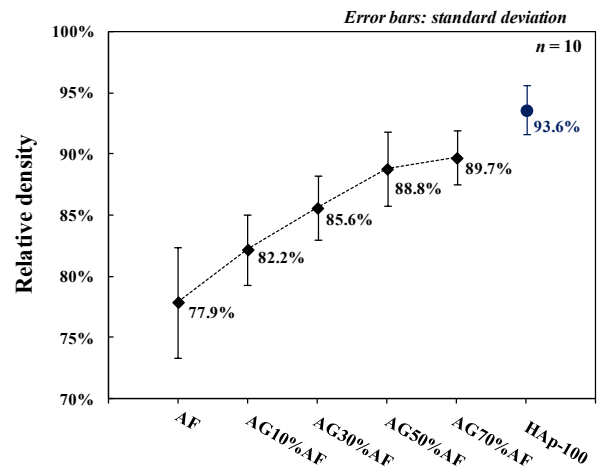


Figure 6 Relative densities of the resulting HAp ceramics.

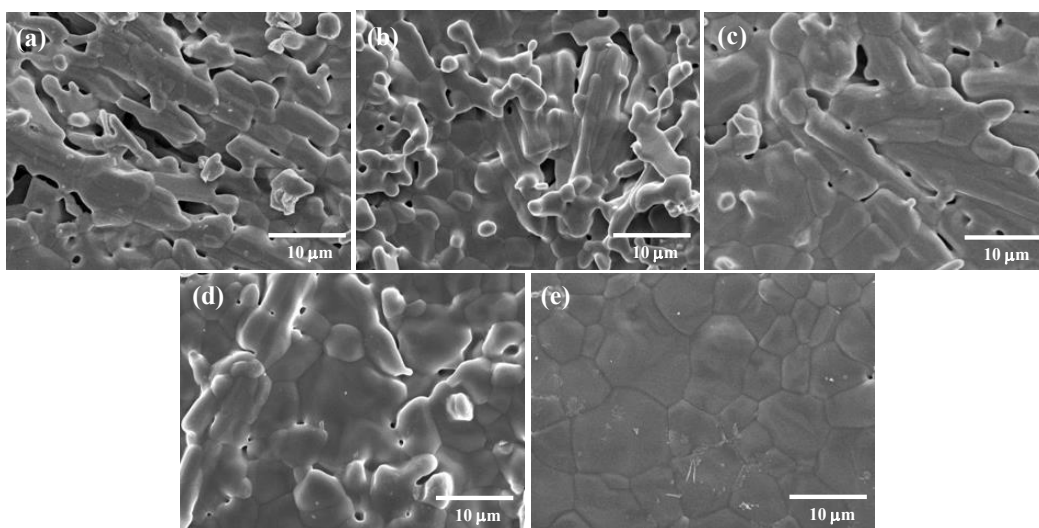


Figure 5 SEM images of the resulting ceramics. (a) AF ceramics, (b) AG10%AF ceramics, (c) AG30%AF ceramics, (d) AG50%AF ceramics and (e) AG70%AF ceramics.

く存在していた。AGの添加量が増えるとともに確認される繊維状結晶粒は少なくなっており、AFセラミックスに見られた気孔の数も減っていた。セラミックスの相対密度の結果をFigure 6に示す。この結果より、AGの添加量が増えることにより、セラミックスが緻密化されていくことが明らかになった。

作製したa面を多く露出したアパタイトセラミックスの表面ゼータ電位を測定し、等方的なHAp-100セラミックスと比較した。Figure 7にセラミックスの表面ゼータ電位測定の結果を示す。AFセラミックス、AG10%AFセラミックスおよびAG30%AFセラミックスはほぼ同程度のプラスの値を示した。AG50%AFセラミックスとAG70%AFセラミックスではAG添加量の増加に伴い、表面ゼータ電位の値はマイナスへシフトし、HAp-100セラミックスの値に近づいていった。これはセラミックスの表面における(300)面の配向度と一致する結果であり、(300)面配向度が高いほど、a面を多く露出しており、表面はよりプラス側に帯電していると考えられる。

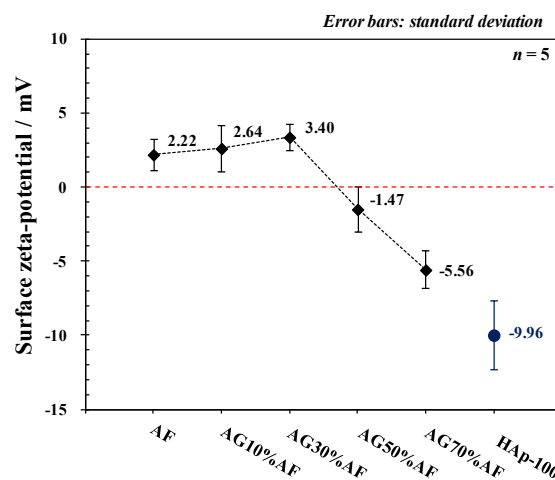


Figure 7 Surface zeta-potential of the resulting ceramics. (Measured in an aqueous 10 mmol·dm⁻³ NaCl solution; pH 7.0, 25 °C)

3-2 細胞初期付着率の測定

セラミックスの表面濡れ性は接触角で評価した。接触角は固体表面の親水性や疎水性の指標であり、一般的には表面の自由エネルギーが大きくなるにつれて、濡れ性が高くなり、接触角が小さくなる。その結果、AFセラミックスで78.6°、AG10%AFセラミックスで90.9°、AG30%AFセラミックスで73.4°、AG50%AFセラミックスで53.3°、AG70%AFセラミックスで54.4°およびHAp-100セラミックスで53.9°であった。Figure 8に作製したセラミックス表面における細胞の初期付着率を示す。a面に配向したセラミックスは等方的なHAp-100セラミックスより低い初期付着率を示した。ANOVA統計処理をおこなったところ、a面配向度の高いAFセラミックス、AG10%AFセラミックスおよびAG30%AFセラミックスはa面配向度の低い

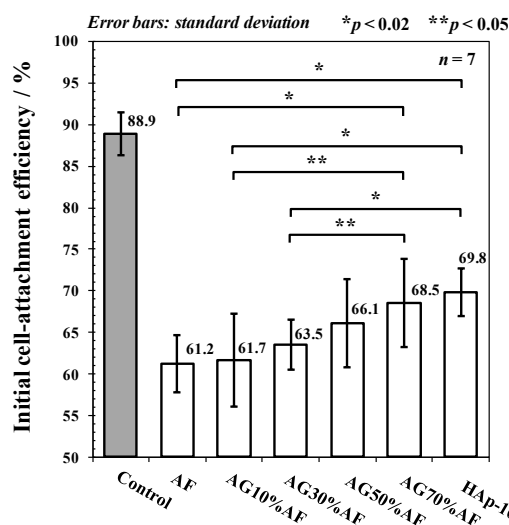


Figure 8 Initial attachment efficiencies of MC3T3-E1 cells on the resulting HAp ceramics. (Control: culture polystyrene plate)

AG70%AFセラミックスとHAp-100セラミックスとの間に有意な差が認められた。α-MEM(+)培地中(pH 7.4, 25 °C)においてMC3T3-E1細胞のゼータ電位を測定したところ、-14.29 (±0.93) mVであった。培養基材とMC3T3-E1細胞との接着ではCa²⁺イオンを介して行われるので、培養基材表面が負に帯電しているほうが初期付着率は高くなる。そのため、表面がプラスに帯電するAFセラミックス、AG10%AFセラミックスおよびAG30%AFセラミックスは、表面がマイナスに帯電するAG50%AFセラミックス、AG70%AFセラミックスおよびHAp-100セラミックスより初期付着率が低くなったと考えられる。

4. 参考文献

- [1] L.L. Hench, *J. Am. Ceram Soc.*, **81**, 1705-28 (1998).
- [2] M.I. Kay, R.A. Young and A.S. Posner, *Nature*, **204**, 1050-52(1964).
- [3] T. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **544**, 147-184(1999).
- [4] M. Aizawa, A.E. Porter, S.M. Best and W. Bonfield, *Biomaterials*, **26**, 3427-33(2005).
- [5] Z. Zhuang, H. Yamamoto and M. Aizawa, *Powder Technol.*, **222**, 193-200(2012).
- [6] Z. Zhuang and M. Aizawa, *Arch. BioCeram. Res.*, **10**, 153-56(2010).

5. 成果報告

*査読付き論文 (査読付き Proceedings 含む)

- 1) Z. Zhuang, H. Yamamoto and M. Aizawa, "Synthesis of plate-shaped hydroxyapatite via an enzyme reaction of urea with urease and its characterization", *Powder Technol.*, **222**, 193-200 (2012).
- 2) 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(5)**, 159-165 (2012).
- 3) 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**, in press (2012).
- 4) 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).
- 5) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang 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).
- 6) 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 anti- bacterial property", *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 678- 683 (2012).
- 7) Z. Zhuang and M. Aizawa, "Ultrastructural analysis of synthetic hydroxyapatite with preferred orientation to *c*-plane using high-resolution transmission electron microscopy", *World J. Eng. Suppl.*, **8(1)**, 1365-1366 (2011).
- 8) 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. Eng. Suppl.*, **8(1)**, 595-596 (2011).

*著書・総説・記事

- 1) 相澤 守, 庄 志, "配向性アパタイト単結晶粒子の合成とそのタンパク質吸着特異性", *Colloid & Interface Communication*, **37(1)**, 29-31 (2012).
- 2) 相澤 守, 庄 志, "配向性アパタイトの超微細構造観察", 未来材料, **11(7)**, 2-5 (2011).

*学会発表（国際会議）

- 1) 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, Tsukuba, Japan, November 30-December 2, 2011.
- 2) 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, Tsukuba, Japan, November 30-December 2, 2011.
- 3) 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 on Ceramics in Medicine, Istanbul, Turkey, November 6-9, 2011.
- 4) 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”, 12th International union of materials research societies- international conference in Asia, Taipei, Taiwan, September 19-22, 2011.
- 5) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Z. Zhuang and M. Aizawa, “Fabrication of chelate-setting cements from hydroxyapatite powders surface-modified with various sodium inositol hexaphosphate concentrations and their mechanical properties”, 12th International union of materials research societies-international conference in Asia, Taipei, Taiwan, September 19-22, 2011.
- 6) Z. Zhuang and M. Aizawa, “Ultrastructural analysis of synthetic hydroxyapatite with preferred orientation to *c*-plane using high-resolution transmission electron microscopy”, 19th annual international conference on composites or nano engineering, Shanghai, China, July 24-30, 2011.
- 7) 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 annual international conference on composites or nano engineering, Shanghai, China, July 24-30, 2011.

*学会発表(国内学会)

- 8) 庄 志、三木拓也、湯本みどり、相澤 守、“高分解能透過型電子顕微鏡による*a*面配向アパタイトセラミックスの超微細構造解析”、2011年度日本セラミックス協会年会、浜松（静岡大学浜松キャンパス）、日本セラミックス協会、2011. 3. 16-18.

a 面を多く露出した水酸アパタイトセラミックスの作製とその評価

玉澤成記¹⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機構

Fabrication of hydroxyapatite ceramics with preferred orientation to *a*-plane and its characterization

Masaki TAMAZAWA¹⁾, Michiyo HONDA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Properties, Meiji University

1. 緒言

生体硬組織の主要な無機成分である水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は、生体親和性が高く、硬組織と直接結合する性質を持っている。そのため、人工骨や人工歯根などの材料として臨床応用されている[1]。この HAp はそれぞれ異なる性質を持っている *a* 面と *c* 面の二つの結晶面を持っていることから、異方性があるといえる[2]。生体内に存在するアパタイトは、この異方性を持っており、生体骨の表面では *a* 面を、歯のエナメル質表面では *c* 面を多く露出した構造をとっている[3, 4]。このように、組織部位によって露出する結晶面が異なっていることから、HAp の異方性は細胞の分化などに深く関わっていると考えられる。

これまでに当研究室では、HAp の結晶面と骨形成に關与する骨芽細胞との関係を明らかにすることを目的とし、*a* 面を多く露出した HAp セラミックスを作製し、その細胞増殖性や初期付着率、細胞接着、分化などを調査してきた。そこで本研究では、前任者が確立したプロセス[5]を用いて、アパタイトファイバー (AF) から *a* 面を多く露出した HAp セラミックスを作製し、電子線後方散乱回折法 (EBSD) などを利用して、「異方性」に着目した詳細な材料特性評価を行なった。さらに、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株 MG-63 を用いてセラミックス上での細胞増殖性について調査し、HAp の異方性が細胞に与える影響についても検討した。将来的には、作製したセラミックス上で骨芽細胞の培養を行ない、そのセラミックスに対する骨芽細胞の分化誘導能を調査し、材料の異方性と細胞の持つ極性との連関性を理解する一助とする。

2. 実験方法

1) *a* 面を多く露出した HAp セラミックスの作製

AF 粉体は、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0.167 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($0.500 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ($0.100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) および HNO_3 ($0.10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) からなる試料溶液を 80°C で 24 h 加熱したのちに 90°C で 72 h 加熱して合成した。この AF 粉体を用いて固形分 1 mass%のスラリーを調製し、そのスラリーに対して $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 水溶液を添加し、pH 10 に調整した。また別に調製した $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 (pH 10) を $6 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

で滴下することによって、AFの表面にアパタイトゲル (AG) を生成させ、そのまま 24 h 攪拌して熟成させた。その後、ろ過、乾燥および粉砕して混合粉体を得た。なお、AG はこれまでの当研究室における取り組みの結果[5, 6]から、AF に対して 30 mass%の仕込み組成で添加した。この混合粉体を「AG30%AF 粉体」とする。この AG30%AF 粉体を成形圧 200 MPa で一軸加圧成形し、水蒸気雰囲気下で 1300 °C、5 h の条件で焼成し、「AG30%AF セラミックス」を作製した。また、市販の水酸アパタイト粉体 (HAp-100 ; 太平化学製) を成形圧 50 MPa で成形し、水蒸気雰囲気下で 1200 °C、5 h の条件で焼成して「HAp-100 セラミックス」を作製した。

2) 材料特性評価

作製した AG30%AF セラミックスおよび HAp-100 セラミックスの材料特性は、粉末 X 線回折法 (XRD)、走査型電子顕微鏡法 (SEM)、EBSD により評価した。また、各セラミックスの溶解性を調査するため、JIS T 0330-3 にしたがって溶解性試験を行なった。なお浸漬液には、酸性条件では酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を、中性条件ではトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸緩衝液を使用した。

3) 各セラミックス上での MG-63 の細胞増殖性試験

細胞培養に用いたセラミックスは、耐水研磨紙で鏡面研磨を行ない、160 °C で 1.5 h 乾熱滅菌を行なった。AG30%AF セラミックス、HAp-100 セラミックス、control (ポリスチレンプレート) 上に MG-63 を 3.0×10^4 個播種し、1, 3, 5, 7 日後の細胞数を計測した。培地は 10%ウシ胎児血清 (FBS) と 1%非必須アミノ酸を含む最小必須培地 (eagle MEM) を用い、細胞を剥がす際の酵素は 0.25%トリプシンを用いた。

3. 実験結果と考察

1) 各セラミックスの材料特性

得られたセラミックスの XRD パターンを図 3-1 に示す。これより、各セラミックスは HAp の単一相であることが分かった。また、AG30%AF セラミックスの (100), (200), (300) 面を示すピークの回折強度が高かったことから、このセラミックスは a 面を多く露出した構造を持っているといえる。これは、AF の表面に析出した AG が、焼結過程において AF の表面に取り込まれながら粒成長したことによって、AF の a 面の配向性を維持して緻密化し、配向性が上昇したためである。HAp-100 セラミックスは、等方的な HAp の最強線である (211) 面を示す回折強度が高くなっていたため、等方的な HAp であると考えられる。

図 3-2 に、得られたセラミックスの SEM 写真を示す。AG30%AF セラミックスは気孔が見られ、結晶粒の形態が AF のような繊維状ではなく、六角形であった。これは AF が AG を取り込みながら粒成長することによって焼結体が緻密化したためである。HAp-100 セラミックスは、気孔が見られず、

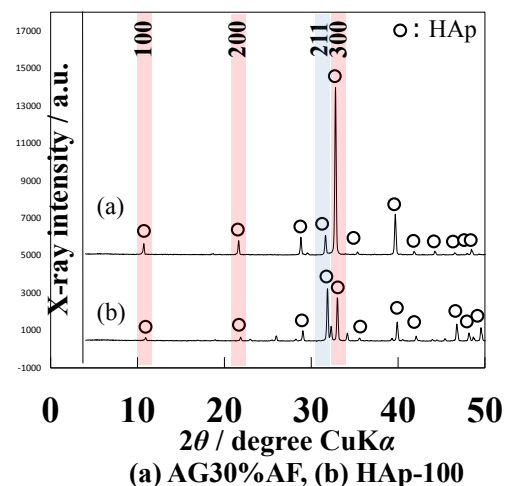
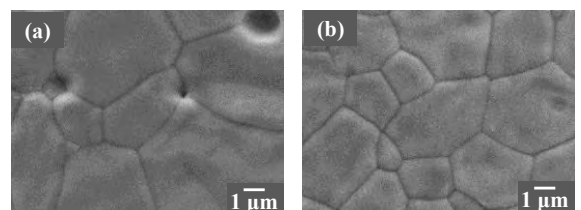


図 3-1 各セラミックスの XRD パターン



(a) AG30%AF, (b) HAp-100

図 3-2 各セラミックスの SEM 写真

結晶粒は六角形の形態を有していた。

図 3-3 に EBSD によって得られた各セラミックスの結晶方位分布図を示す。HAp-100 セラミックス表面の結晶方位分布図 ((a), (b), (c)) では、(a) はこのセラミックスの観察面である IPF Z 方向、つまりこのセラミックスの表面の結晶粒を観察した図を示しており、(b) の IPF Y および (c) の IPF X は、それぞれこのセラミックスの断面方向から結晶粒を観察した図を示している。また、それぞれの結晶方位分布図における結晶粒は、結晶面の配向ごとに色分けされており、緑で示される 010 および青で示される 110 は HAp の *a* 面を表しており、赤で示される 001 は HAp の *c* 面を表している。HAp-100 セラミックスの表面の結晶方位分布図は、(a), (b) および (c) を比較すると、結晶粒の色の違いはほとんど見られないが、(a) が他よりも少し青と緑で示されている結晶粒が多いことが観察できた。したがって、HAp-100 セラミックスの表面は少し *a* 面を露出した構造である。

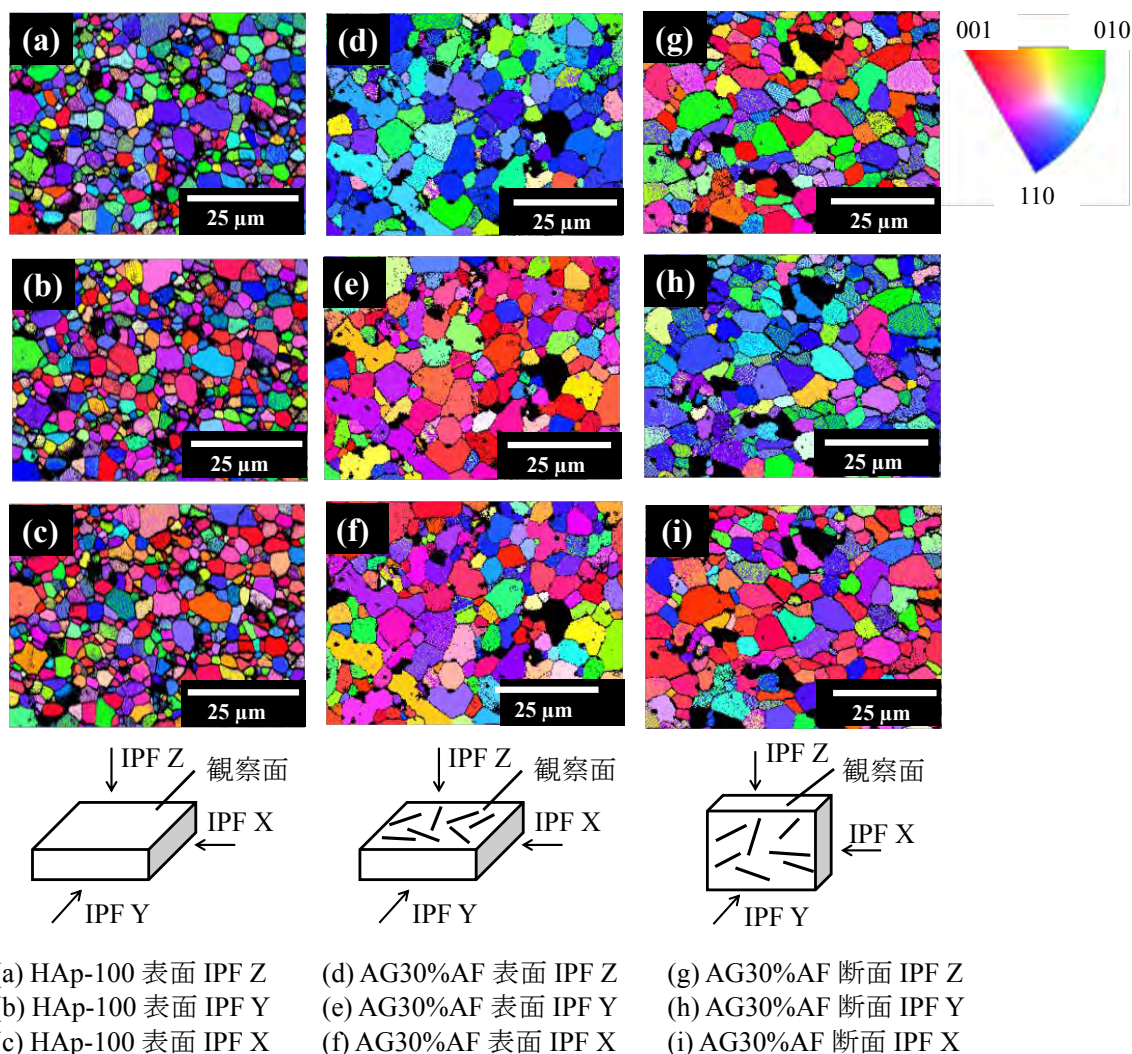


図 3-3 各セラミックスの結晶方位分布図

AG30%AF セラミックスの表面の結晶方位分布図((d), (e), (f)) は、(d) において青と緑で示される結晶粒が、(e) および (f) と比較して圧倒的に多いことが観察できた。したがって、AG30%AF セラミックスの表面は *a* 面を多く露出した構造である。AG30%AF セラミックスの断面の結晶方位分布図は、セラミックスの表面方向から結晶粒を観察した (h) が、セラミックスの断面方向から結晶粒を見ている (g) および(i) と比較して青と緑で示される結晶粒が圧倒的に多いことが観察できた。このことから、

AG30%AF セラミックスは *a* 面を多く露出した構造であると考えられる。

図 3-3 に各セラミックスにおける Ca^{2+} の溶出挙動を、図 3-4 に各セラミックスにおける 30 分までの平均溶解速度 R_{a30} を見かけの表面積で割った値を示す。 R_{a30} は以下の式 (1) を用いて求めた。

$$R_{a30} = \frac{30 \text{ 分後の Ca 濃度 } [\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}] \times \text{液量 } [\text{dm}^3] \times 10^6}{10 \times 40.08; \text{Ca の原子量 } [\text{mg} \cdot \text{mmol}^{-1}] \times 30 [\text{min}] \times 60 [\text{s} \cdot \text{min}^{-1}]} \dots (1)$$

図 3-3 および 3-4 から、溶解性は酸性および中性に関わらず AG30%AF セラミックスの方が HAp-100 セラミックスよりも高いことが分かった。これは、AG30%AF セラミックスは HAp の *a* 面を多く露出していることにより、HAp-100 セラミックスよりも材料の表面に Ca が多く存在しているためであると考えられる。また図 3-3 を見ると、AG30%AF セラミックスは時間の経過によって Ca^{2+} 濃度が平衡に近づいているが、酸性条件の HAp-100 セラミックスの結果を見ると 180 min までほぼ一定の割合で増加している。従って、AG30%AF セラミックスと HAp-100 セラミックスは Ca^{2+} の溶出挙動の機構が異なる可能性がある。このことについては、今後さらに長い時間の溶出を調査する必要がある。

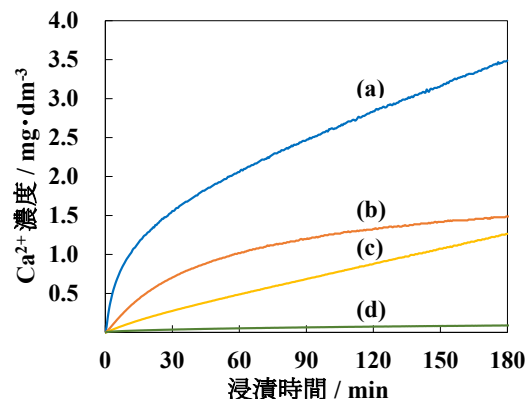
2) 各セラミックス上での MG-63 の細胞増殖性試験

1, 3, 5, 7 day における各セラミックス上での MG-63 の細胞増殖性試験の結果を図 3-6 に示す。

図 3-6 より、細胞数は control, HAp-100 セラミックス、AG30%AF セラミックスの順に高かったが、細胞の増殖性はほとんど差がないことが分かる。細胞数に関しては 1 day における細胞数の差に起因していることから、AG30%AF セラミックスは他の基材よりも細胞が接着しづらかったといえる。これについては、各基材における表面電位や接触角などの表面エネルギーの差に起因していると考えられる[5]。

4. 結論

本研究ではこれまで、作製したセラミックスについて XRD, SEM, EBSD, 溶解性試験などによって材料評価を行ない、また MG-63 の細胞増殖性試験によって各セラミックスの細胞応答性を調査した。XRD および EBSD より、AG30%AF セラミックスは表面に *a* 面を多く露出したセラミックスであることが分かった。また SEM による観察から、AG30%AF セラミックスは少し気孔が見られるものの、緻密化して



(a) AG30%AF 酸性, (b) AG30%AF 中性, (c) HAp100 酸性, (d) HAp-100 中性

図 3-4 各セラミックスにおける Ca^{2+} の溶出挙動

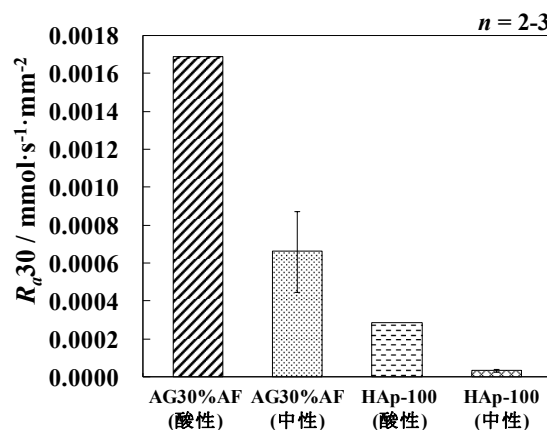
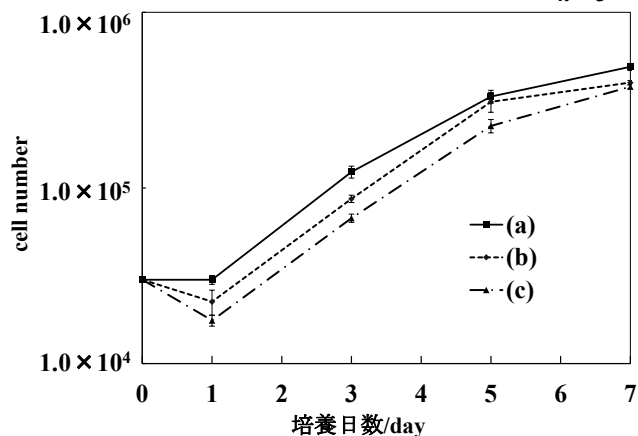


図 3-5 各セラミックスにおける R_{a30} 値



(a) control, (b) HAp-100, (c) AG30%AF

図 3-6 各セラミックス上での細胞増殖性試験

いることが分かった。溶解性試験より、AG30%AF セラミックスは HAp-100 セラミックスよりも Ca^{2+} の溶解性が高いことが分かった。また、AG30%AF セラミックスと HAp-100 セラミックスは Ca^{2+} の溶出挙動の機構が異なることが示唆された。細胞増殖性試験では、AG30%AF セラミックスは細胞の接着数の差に起因して細胞数が少なかったが、増殖性に関してはほとんど差がないことが分かった。

以上の結果から、AG30%AF セラミックスは *a* 面を多く露出することで材料特性が変化し、細胞の機能に影響を与えていると考えられる。今後、細胞を AG30%AF セラミックス上で培養し、タンパク質の定量、石灰化の評価および PCR を用いた DNA レベルの評価を行なうことで、生体内における HAp の異方性と細胞分化の関連性を明らかにできると考えられる。

5. 参考文献

- [1] L.L. Hench, *J. Am. Ceram Soc.*, **81**, 1705-28 (1998).
- [2] M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Ponsler, *Nature*, **204**, 1050-1052 (1964).
- [3] D. Carlstrom and J. B. Finean, *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 183-191(1954).
- [4] G. Daculsi and B. Kerebel, *J. Ultrastruct. Res.*, **65**, 163-172(1978).
- [5] Z. Zhuang *et al.*, *Acta Biomaterialia*, **9**, 6732-6740 (2013).
- [6] Y. Murasugi *et al.*, *Bioceramics*, **22**, 431-434 (2009).

6. 成果報告

*口頭発表

- 1) ○玉澤成記, 本田みちよ, 相澤 守“電子線後方散乱回折法によるアパタイトセラミックスの微細構造観察”, 第 25 回無機リン化学討論会, 山形大学 米沢キャンパス (山形) 2015 年 9 月 28 日

*c*面を多く露出した板状アパタイトの Ca/P 比の制御

森 祐貴¹⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機構

Control of Ca/P molar ratio of plate-shaped apatite powders with preferred orientation to *a(b)*-axis

Yuki MORI¹⁾, Michiyo HONDA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

水酸アパタイト (HAp) は生体中では歯や骨の中に含まれている物質であり、生体活性を有していることからバイオマテリアルの分野で広く利用されている[1]。HAp 結晶は六方晶系に属しており、正に帯電した面 (*a* (*b*) 面) と負に帯電した面 (*c* 面) を持っている[2, 3]。このいずれかの面を多く露出させることで、HAp に特異的な性質を付与することができる。例えば、*a* (*b*) 面を多く露出した HAp は酸性タンパク質に、*c* 面を多く露出した HAp は塩基性タンパク質に対してそれぞれ特異的な吸着能を有していると考えられる。当研究室では、すでに均一沈殿法を用いて *a* (*b*) 面を多く露出した繊維状 HAp 単結晶の合成に成功している[4]。また、気-液界面を反応場として *c* 面を多く露出した板状 HAp 単結晶の合成にも成功している[5]。しかしながら、後者の板状 HAp 単結晶の Ca/P 比は化学量論値である 1.67 よりも低いいため、セラミックス作製時にリン酸三カルシウム (TCP) に熱分解するという問題があった。

本研究の目的は、歯のエナメル質中の HAp の結晶構造を模倣した「*a* (*b*) 軸配向 HAp セラミックス」を創出することである。そこで、今回はセラミックス作製の前段階として、板状 HAp の Ca/P 比を 1.67 付近まで向上させるために、水熱処理による板状 HAp の Ca/P 比の制御について検討した。また、板状 HAp の Ca/P 比がその熱的安定性に及ぼす影響についても調査した。

2. 実験方法

1) 板状 HAp の水熱処理 (Ca 源、Ca²⁺濃度の最適条件の決定)

板状 HAp 粉体は、既報[5]にしたがい気-液界面を反応場として合成した。(以降、この粉体を合成粉体と表記する。) 得られた合成粉体を Ca²⁺溶液と共に水熱装置に入れ、120 °C で 2.5 時間加熱することで水熱処理を行なった。このとき、Ca 源としては CaCl₂ と Ca(NO₃)₂ の 2 種類を選択し、また Ca²⁺溶液の濃度は 0, 0.1, 0.5, 1.0 mol·dm⁻³ とした。さらに、水熱処理前後の粉体に対して、粉末 X 線回折法 (XRD)、走査型電子顕微鏡法 (SEM)、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) を用いて評価を行なった。

2) 板状 HAp の水熱処理 (水熱温度の最適条件の決定)

次に、2-1)項で決定した Ca 源および Ca²⁺濃度の条件を用いて、水熱温度条件の検討を行なった。合成粉体と 1.0 mol·dm⁻³ CaCl₂ 溶液を水熱装置に入れ、2.5 時間加熱することで水熱処理を行なった。このとき、水熱温度は 100, 120, 140, 160, 180 °C とした。さらに、水熱処理前後の粉体に対して、XRD, SEM,

ICP-AES を用いて評価を行なった。

3) 加熱による板状 HAp の結晶相の変化

合成粉体および 2-2)項の水熱処理粉体に対して、箱型電気炉を用いて加熱温度 1000 °C、保持時間 1 時間、昇温速度 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ で加熱を行なった。ここで、上記の条件で加熱を行なった粉体は、粉体名の末尾に(+)をつけて表記する。さらに、この加熱粉体に対して、XRD による結晶相の同定および参照強度比法による β -TCP への分解率の算出を行なった。

3. 結果と考察

1) 板状 HAp の水熱処理 (Ca 源、 Ca^{2+} 濃度の最適条件の決定)

合成粉体および代表的な水熱処理粉体の XRD パターンを図 1-1 に示す。これより、合成粉体は HAp とリン酸八カルシウム (OCP) の混合相であったが、水熱処理粉体は HAp 単一相であった。これは、水熱処理によって OCP が HAp へ加水分解したためであると考えられる。なお、同一の Ca 源を使用した粉体間では、XRD パターンに Ca^{2+} 濃度の違いによる差は見られなかった。

合成粉体および一部の水熱処理粉体の SEM 画像を図 1-2 に示す。これより、合成粉体は板状の形態を有していたが、水熱処理によってその形態はやや崩れていた。水熱処理は高压下での反応であることから、粉体同士の衝突が多く生じたため結晶が砕けてしまったと考えられる。なお、同一の Ca 源を使用した粉体間では、粒子形態に Ca^{2+} 濃度の違いによる差は見られなかった。

ICP-AES により決定した合成粉体および水熱処理粉体の Ca/P 比を表 1-1 に示す。これより、Ca 源や Ca^{2+} 濃度の条件に関わらず、水熱処理によって板状 HAp の Ca/P 比は向上した。特に、Ca 源として CaCl_2 を使用した場合の方が板状 HAp の Ca/P 比はより 1.67 に近づいた。 CaCl_2 が水に溶解すると pH は塩基性側へ、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ が水に溶解すると pH は酸性側へシフトすることから、水熱処理時の Ca^{2+} 溶液の pH の違いによって、板状 HAp の Ca/P 比の向上度合いに差が生じたのではないかと考えられる。

以上の結果より、今回調査した範囲では、板状 HAp の Ca/P 比が最も 1.67 に近づいた「Ca 源 : CaCl_2 、 Ca^{2+} 濃度 : $1.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 」を最適条件として決定した。

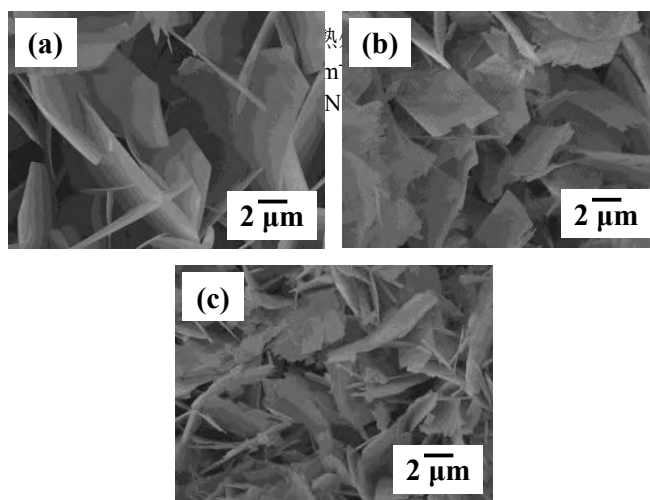
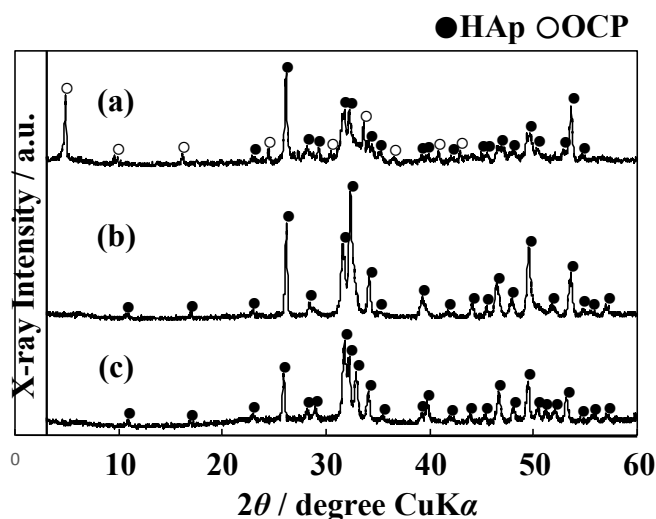


図 1-2 合成粉体および水熱処理粉体の SEM 画像
(a) 合成粉体, (b) $1.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ CaCl}_2$ 水熱処理粉体 and
(c) $1.0\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ Ca}(\text{NO}_3)_2$ 水熱処理粉体

表 1-1 合成粉体および水熱処理粉体の Ca/P 比

Ca/P比	合成粉体	Ca ²⁺ 濃度 / mol·dm ⁻³				
		0	0.1	0.5	1.0	
	CaCl ₂ 添加系	1.39	1.55	1.56	1.56	1.57
	Ca(NO ₃) ₂ 添加系	1.41	1.54	1.56	1.55	1.54

2) 板状 HAp の水熱処理 (水熱温度の最適条件の決定)

合成粉体および代表的な水熱処理粉体の XRD パターンを図 2-1 に示す。これより、合成粉体は HAp と OCP の混合相であったが、水熱処理粉体は HAp 単一相であった。これは、3-1)項と同様 OCP が HAp へ加水分解したためであると考えられる。なお、XRD パターンに水熱温度の違いによる差は見られなかった。

合成粉体および代表的な水熱処理粉体の SEM 画像を図 2-2 に示す。これより、合成粉体は板状の形態を有していたが、水熱処理によってその形態はやや崩れていた。これは、3-1)項と同様粒子同士の衝突が多く生じたためであると考えられる。なお、粒子形態に水熱温度の違いによる差は見られなかった。

ICP-AES により決定した合成粉体および水熱処理粉体の Ca/P 比を表 2-1 に示す。これより、水熱温度が高ければ高いほど板状 HAp の Ca/P 比は 1.67 に近づいた。特に、水熱温度を 180 °C とした場合、板状 HAp の Ca/P 比は 1.38 から 1.64 へと最も向上した。これは、水熱温度が高いほど HAp の溶解-析出反応が促進され、化学量論組成に近い HAp がより多く析出したためではないかと考えられる。

以上の結果より、今回調査した範囲では、板状 HAp の Ca/P 比が最も 1.67 に近づいた「水熱温度:180 °C」を最適条件として決定した。次の 3-3)項では、表 2-1 の 6 種類の粉体に対して加熱を行ない、Ca/P 比の違いが加熱後の板状 HAp の結晶相にどのような影響を与えるのかを調査した。

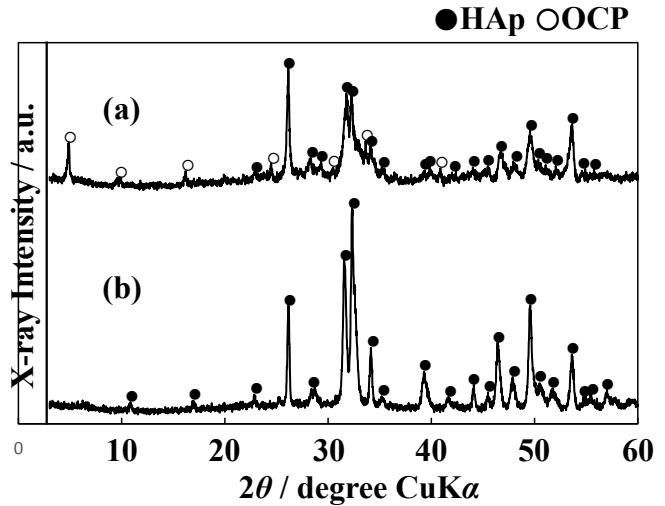


図 2-1 合成粉体および水熱処理粉体の XRD パターン (a) 合成粉体 and (b) 180 °C 水熱処理粉体

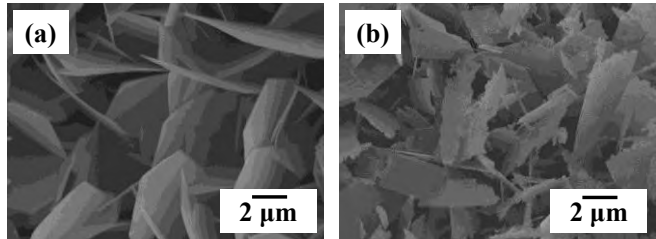


図 2-2 合成粉体および水熱処理粉体の SEM 画像 (a) 合成粉体 and (b) 180 °C 水熱処理粉体

表 2-1 合成粉体および水熱処理粉体の Ca/P 比

合成粉体	水熱温度 / °C					
	100	120	140	160	180	
Ca/P比	1.38	1.54	1.56	1.59	1.62	1.64

3) 加熱による板状 HAp の結晶相の変化

加熱粉体の XRD パターンを図 3-1 に示す。これより、加熱によって合成粉体は β -TCP 単一相に変化した。また、水熱処理粉体は HAp と β -TCP の混合相に変化した、その主結晶相は HAp であった。

そこで、加熱によって HAp がどの程度 β -TCP へ分解したのかを調査するために、参照強度比法を用いて図 3-1 の XRD パターンから加熱粉体中の β -TCP の割合を算出した。その結果を表 3-1 に示す。これより、水熱処理後の Ca/P 比の値が 1.67 に近いほど加熱粉体中の β -TCP の割合は小さかった。つまり、 β -TCP への熱分解が抑制されたと考えられる。ここで、 β -TCP の Ca/P 比は 1.50 であるため、Ca/P 比が 1.67 よりも低いということはその分だけ板状 HAp の組成が β -TCP 側へシフトしているということを示しており、板状 HAp の熱的安定性が低下し β -TCP へ熱分解しやすくなることが予想される。このことは、図 3-1 の XRD パターンの結果と一致している。

以上の結果より、板状 HAp の Ca/P 比を向上させることで、1000 °C での加熱において β -TCP への熱分解を大幅に抑制することができた。

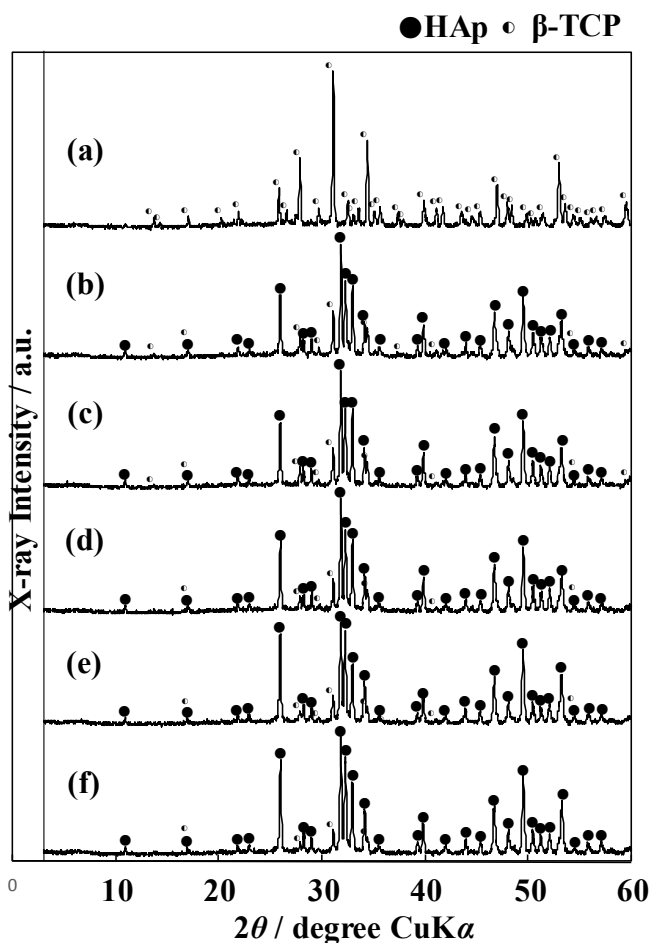


図 3-1 加熱粉体の XRD パターン (a) 合成粉体(+), (b) 100 °C 水熱処理粉体(+), (c) 120 °C 水熱処理粉体(+), (d) 140 °C 水熱処理粉体(+), (e) 160 °C 水熱処理粉体(+), and (f) 180 °C 水熱処理粉体(+)

表 3-1 加熱粉体中の β -TCP の割合

合成粉体(+)	水熱温度 / °C					
	100(+)	120(+)	140(+)	160(+)	180(+)	
β -TCP の割合 / %	100	21.9	18.3	16.0	12.6	10.7

4. 結論

本研究では、水熱処理時の各種パラメータを変動させて実験を行ない、板状 HAp の Ca/P 比の制御について検討した。その結果、今回調査した範囲での最適条件は、「Ca 源 : CaCl_2 、 Ca^{2+} 濃度 : $1.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、水熱温度 : 180 °C」であると考えられる。また、この条件で水熱処理を行なうことで、板状 HAp の Ca/P 比を 1.38 から 1.64 まで向上させ、その熱的安定性を大きく高めることができた。

5. 参考文献

- [1] L. L. Hench, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**, 1705-1728(1998).
- [2] M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner, *Nature*, **204**, 1050-1052(1964).
- [3] T. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **544**, 147-184(1999).
- [4] M. Aizawa, A. E. Porter, S. M. Best and W. Bonfield, *Biomaterials.*, **26**, 3427-3433(2005).
- [5] Z. Zhuang, H. Yoshimura and M. Aizawa, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 2534-2540(2013).

6. 成果報告

*口頭発表

- 1) ○森 祐貴, 本田みちよ, 相澤 守, “c面を多く露出した板状アパタイトのCa/P比の制御”, 公益社団法人日本セラミックス協会 第28回秋季シンポジウム, 富山大学 五福キャンパス (富山) 2015年9月17日
- 2) ○森 祐貴, 本田みちよ, 相澤 守, “c面を多く露出した板状アパタイトの粉体性状およびその加熱変化”, 無機マテリアル学会 第131回学術講演会, 愛知県産業労働センター ウィンクあいち (愛知) 2015年11月5日

異方性粒子をテンプレートとした異方性制御リン酸塩セラミックスの 作製プロセスの構築

石田明祐¹⁾・庄 志¹⁾・本田みちよ²⁾・鈴木彰敏³⁾・堀 茂雄³⁾・
岸田佳大³⁾・中野秀之³⁾・谷 俊彦³⁾・相澤 守¹⁾

- 1) 明治大学理工学部応用化学科
- 2) 明治大学研究・知財戦略機構
- 3) 株式会社豊田中央研究所

Construction of fabrication process of anisotropy control phosphate ceramics using anisotropy particles as template

Akihiro ISHIDA¹⁾, Zhi ZHUANG¹⁾, Michiyo HONDA²⁾, Akitoshi SUZUMURA³⁾, Shigeo HORI³⁾,
Yoshihiro KISHIDA³⁾, Hideyuki NAKANO³⁾, Toshihiko TANI³⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

3) Toyota Central Research and Development Laboratories, Incorporated

1. 緒言

水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) や β -リン酸三カルシウム ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; $\beta\text{-TCP}$) などのリン酸カルシウムを主成分とするバイオセラミックスは、その優れた生体適合性から、整形外科や口腔外科の領域で骨補填材として臨床応用されている。我々はこれまでに繊維状 [1] および板状 HAp 単結晶粒子 [2] の合成に成功し、HAp の異方性制御プロセスを確立した。さらに、ストロンチウムアパタイト ($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; SrAp) の異方性制御プロセスの開発にも取り組んでおり、水熱法により、針状フッ素ストロンチウムアパタイト ($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$; SrFAP) の合成 [3]、および水熱均一沈殿法により、凝集の少ない ab 面が発達した六角板状 α -リン酸三ストロンチウム ($\alpha\text{-Sr}_3(\text{PO}_4)_2$; $\alpha\text{-TSP}$) 粒子の合成にも成功している [4]。我々は、材料の異方性が生体活性の発現と制御に大いに関連があると考えており、異方性を有する新規なバイオセラミックスの創製に取り組んでいる。本研究では、異方性セラミックスを作製するための方法として反応性テンプレート粒成長法 [5] (Reactive templated grain growth method; RTGG 法) 等の方法を用い、異方性粒子をテンプレートとして異方性をもったリン酸塩セラミックスを作製し、材料評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

1) 異方性テンプレート粒子の作製

既報 [3] にしたがって、水熱法を用いた直接合成によって、針状 SrFAP 単一相粒子を合成した。Sr:P:F の組成比が SrFAP の化学量論比となるように調製した試料溶液を、水熱装置中で 200 rpm で攪拌しながら 150 °C で 6 時間水熱処理を行なうことで針状 SrFAP 粒子を合成した。

また、既報 [4] にしたがって、水熱均一沈殿法によって六角板状 $\alpha\text{-TSP}$ 単一相粒子を作製した。Sr:P:F

の組成比が SrFAp の化学量論比となるように調製した試料溶液をオイルバス中で 80 °C で 24 時間加熱し、中間生成物である α -リン酸水素ストロンチウム (α -SrHPO₄) を得た。得られた α -SrHPO₄ は一度反応溶液から回収し、遊星ボールミルを用いて 1 時間湿式粉碎した。粉碎した α -SrHPO₄ 粒子を反応溶液に戻し、水熱装置を用いて 150 rpm で攪拌しながら 150 °C で 3 時間水熱処理を行ない、六角板状 α -TSP 粒子を合成した。

2) 針状 SrFAp 粒子を用いた *a* (*b*) 面を多く露出した SrFAp セラミックスの作製

水熱法によって合成した *a* 面を多く露出した針状 SrFAp 単一相粒子を用いて、ドクターブレード法によるテープ成形を行ない、単層テープ成形体を作製した。配向性を高めるため、歯間 1 mm の櫛歯を通したテープ成形体と、櫛歯を通さないテープ成形体を作製した。その成形体を 80 °C で 20 kg·cm⁻² の加圧条件で積層し、さらに 1 cm 角に切断して、積層 SrFAp テープ成形体を作製した。積層体を 500 °C で 1 時間脱脂後、焼成条件を 1300, 1400 および 1500 °C と変えて、大気中で 5 時間焼成して焼成体を得た。単層テープ成形体は XRD 分析による極点図測定を行ない、焼結体は XRD、走査型電子顕微鏡法 (SEM)、密度測定法などにより材料特性を評価した。

3) 六角板状 α -TSP 粒子をテンプレートとした *c* 面を多く露出した SrFAp セラミックスの作製

SrFAp の化学量論比となるように、2-1) 項で合成した六角板状 α -TSP 粒子にフッ化ストロンチウム (SrF₂) 粒子を加えて、混合粉体を調製した。調製した混合粉体は、ドクターブレード法によるテープ成形を行ない、単層テープ成形体を作製した。その成形体を 80 °C で 20 kg·cm⁻² の加圧条件で積層し、さらに 1 cm 角に切断して、TSP(100)積層体 (TSP(100)-Stacked) を作製した。また、それらの積層体をロールプレスした成形体 (TSP(100)-Roll) も作製した。これらの成形体を 500 °C で 1 時間脱脂後、SrF₂ 粉体によるフッ化物雰囲気下にて 1000 °C で 10 時間焼成し、さらに 1500 °C で 2 時間焼成した。得られた焼結体の材料特性を X 線回折法 (XRD)、また SrFAp の *c* 軸配向度を Lotgering 法 [6]、SrFAp 転化率を半定量分析法などにより評価した。

4) 六角板状 α -TSP 粒子をテンプレートとした *c* 面を多く露出した β -TCP セラミックスの作製

異方性制御 β -TCP セラミックスは、2-1) 項で得られた六角板状 α -TSP 粒子をテンプレート粒子とし、マトリックス粒子として β -TCP マトリックス粉体を用いて作製した。 β -TCP-100 粉体 (太平化学) 10 g、純水 40 cm³、10 mm ϕ ジルコニアボール 50 個を遊星型ボールミル容器内に加え、回転数を 300 rpm に設定して 4 時間湿式粉碎した後、得られたスラリーを吸引ろ過し、凍結乾燥を行なって β -TCP マトリックス粉体を得た。得られた β -TCP マトリックス粉体と六角板状 α -TSP 粒子を質量混合比が 100:0, 90:10, 50:50, 10:90 および 0:100 となるように混合し、混合粉体を調製した。試料名は「TCP(x)」と表記し、括弧内の “x” は混合粉体に用いた β -TCP 粉砕体の質量混合比を示す。調製したそれぞれの混合粉体は、攪拌している純水中に加え、10 mm ϕ 塩化ビニル管へ注ぎながら吸引ろ過することで、予備成形体を得た。その後、100 MPa で一軸加圧成形し、箱型炉を用いて大気中で 1300 °C で 2 時間焼成を行なった。昇温速度は 10 °C min⁻¹ とした。得られた焼成体の材料特性を XRD、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX) などにより評価した。

3. 結果と考察

1) 針状 SrFAp 粒子を用いた $a(b)$ 面を多く露出した SrFAp セラミックスの作製

水熱処理により得られた針状粒子は凝集がなく、単一相かつ a 面を多く露出した針状 SrFAp 粒子であった (図 1)。平均粒径及び長さはそれぞれ $5.23 \mu\text{m}$ 、 $78.1 \mu\text{m}$ でありアスペクト比は 15 であった。以下、テープ成形と焼成体の方位を図 2 のように指定する。

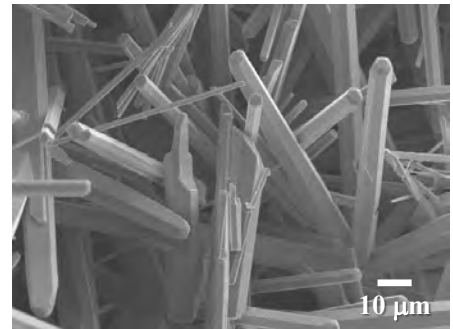


図 1 針状 SrFAp 粒子

単層テープ成形体の積層方向 (SD) 垂直面で (0002) の極点図を測定した結果を図 3 に示す。図 3 内の左側には回折強度を示している。テープ成形方向 (TCD) 近辺にピークがあり、[0001] が TCD に弱く配向していた。

また、(30 $\bar{3}$ 0) の極点図も櫛歯の有無によらず SD に強いピークを示した。この系では主としてテープ成形時のせん断応力により [10 $\bar{1}$ 0] の SD 配向と [0001] の TCD 配向の二軸配向したと推測される。1400 °C 焼成体の SD 垂直面表面 (S 面) の XRD パターンは、SrFAp の ($h0h0$) の回折強度が増大していたが、1500 °C 焼成体の S 面の XRD パターンは α -TSP であった。しかし、TCD 垂直面表面 (T 面) 及び研磨後の SD 垂直面 (研磨 S 面) の XRD パターンは、いずれの温度で焼成した焼成体も SrFAp が主相であり、テープ成形時の二軸配向性が維持されていた。1500 °C 焼成による分解は焼成体表面のみで起きていると推測される。焼成体の密度測定の結果、すべての試料で脱脂体より密度が増加していた。焼成温度の高温化により相対密度が高くなる傾向があったが、いずれの条件においても SrFAp の理論密度に対する相対密度は 60%未満であり、焼成条件の最適化が必要である。

以上より、針状 SrFAp テンプレート粒子を用いた配向焼結により、 $a(b)$ 面を多く露出した SrFAp 焼結体の作製に成功した。また、本プロセスはアパタイトを含む針状粒子の異方性制御に有効であり、さらにテープ成形を行なうと二軸配向性を示すことがわかった。

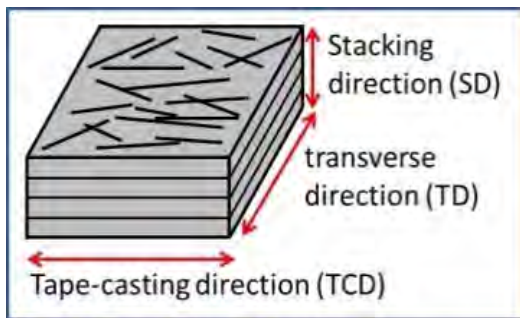


図 2. Direction names in the samples

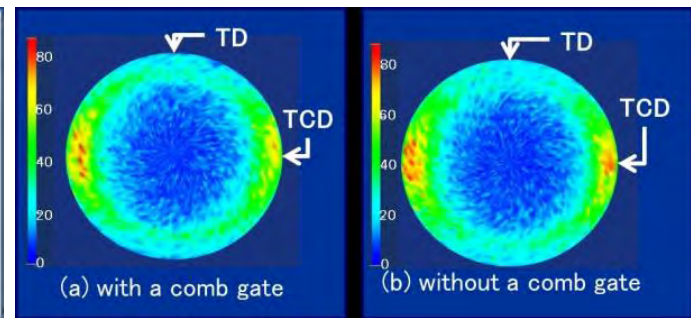


図 3 単層 SrFAp テープ成形体の (0002) 極点図

2) 六角板状 α -TSP 粒子をテンプレートとした c 面を多く露出した SrFAp セラミックスの作製

水熱均一沈殿法により得られた板状粒子は凝集がなく、単一相かつ c 面を多く露出した六角板状 α -TSP 粒子であった (図 4)。平均厚さ及び直径はそれぞれ $2.59 \mu\text{m}$ 、 $38.9 \mu\text{m}$ でありアスペクト比は 16.6 であった。

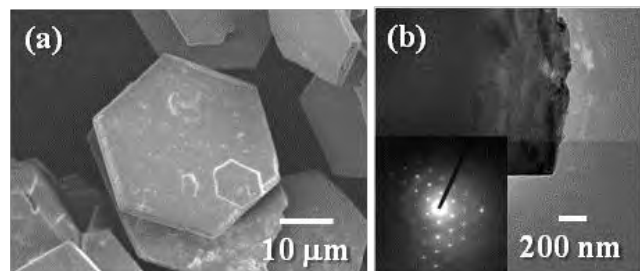


図 4 六角板状 α -TSP 粒子 (a) SEM 写真, (b)TEM 像

TSP(100)-stacked 焼結体および TSP(100)-Roll 焼結体の XRD パターン (図 5) より、結晶相はどちらもほぼ SrFAp 単一相であった。調製した焼成体の c 軸配向度と SrFAp 転化率を調べたところ、 c 軸配向度はそれぞれ 0.28 および 0.31 であり、SrFAp 転化率はどちらも 100%であった。これはフッ化物雰囲気制御により焼成中のフッ化物の消失を防ぎ、六角板状 α -TSP 粒子の方位を引き継ぐようにして SrFAp への転化反応が起こることで、SrFAp の c 軸配向性が向上したと考えられる。また、ロールプレスによって六角板状 α -TSP 粒子の c 面がテープ成形方向の垂直面方向に整列することで SrFAp の c 軸配向性が向上するということが示唆された。

ここで、 α -TSP と SrFAp の結晶構造に類似性は見られず、本プロセスはノントポタクティック転化反応であり、六角板状 α -TSP 粒子の c 面が c 軸方向へ整列することで、テラス上に SrFAp が結晶成長したのだと考えられる。

以上より、六角板状 α -TSP テンプレート粒子を用いた RTGG 法により、 c 面を多く露出した SrFAp セラミックスの作製に成功し、本プロセスは異方性制御プロセスに有効であることがわかった。

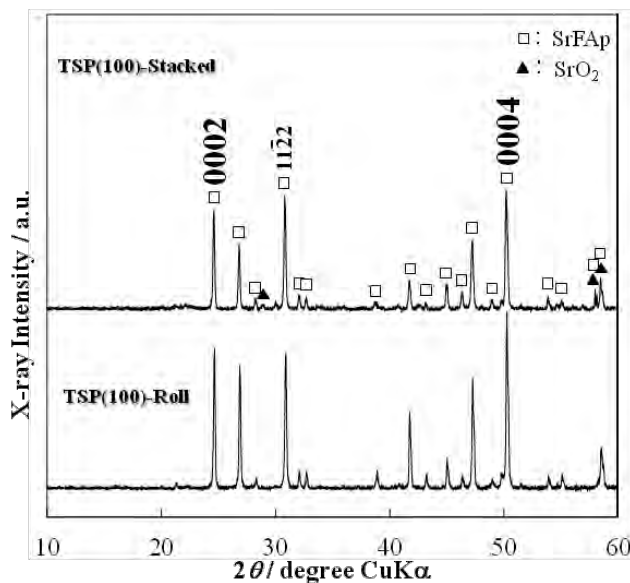


図 5 c 面を多く露出した SrFAp セラミックスの XRD パターン

3) 六角板状 α -TSP 粒子をテンプレートとした c 面を多く露出した β -TCP セラミックスの作製

1300 °C で 2 時間焼成した TCP(x)焼結体の XRD パターンを図 6 に示す。TCP(100)焼結体は β -TCP から α 相へ完全に転位してしまっていた。しかし、 α -TSP の混合比が増加するにつれて β -TCP 相が残存していることがわかる。さらに、TCP(50)焼結体では、 $\text{Ca}_2\text{Sr}(\text{PO}_4)_2$ の (0001) 面に相当する回折強度が高くなっていることがわかった。TCP(0)焼結体では、 α -TSP の (0001) 面に相当する回折強度は維持されており、 α -TSP の異方性が TCP(50)焼結体の結果に影響を及ぼした可能性が示唆された。

また、TCP(50)焼結体の表面と断面の EDX 測定により、焼成前の成形体は Sr と Ca が局在化しているが、焼成後は均一に拡散しており、 β -TCP と α -TSP が互いに固溶していることがわかった (図 7)。以上のことから、テンプレート粒子として六角板状 α -TSP 粒子を用

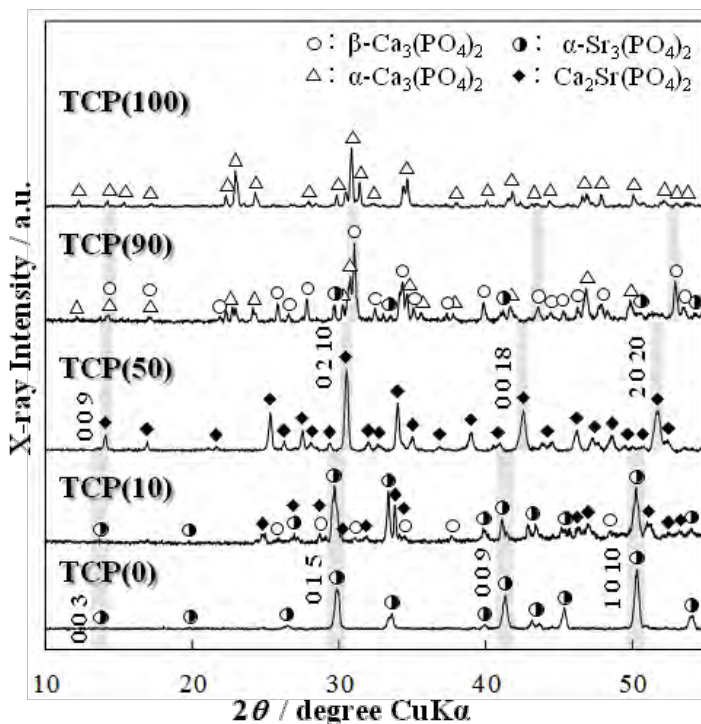


図 6 TCP(x)焼成体の XRD パターン

いることで、 β -TCP 粉体が取り込まれながら六角板状 α -TSP 粒子の方位を引き継ぐようにして異方的な粒成長をしていることがわかった。また、 β -TCP と α -TSP には結晶構造の類似性が認められ、アパタイト以外でもテンプレート粒子を利用した異方性制御は有効であることがわかった。

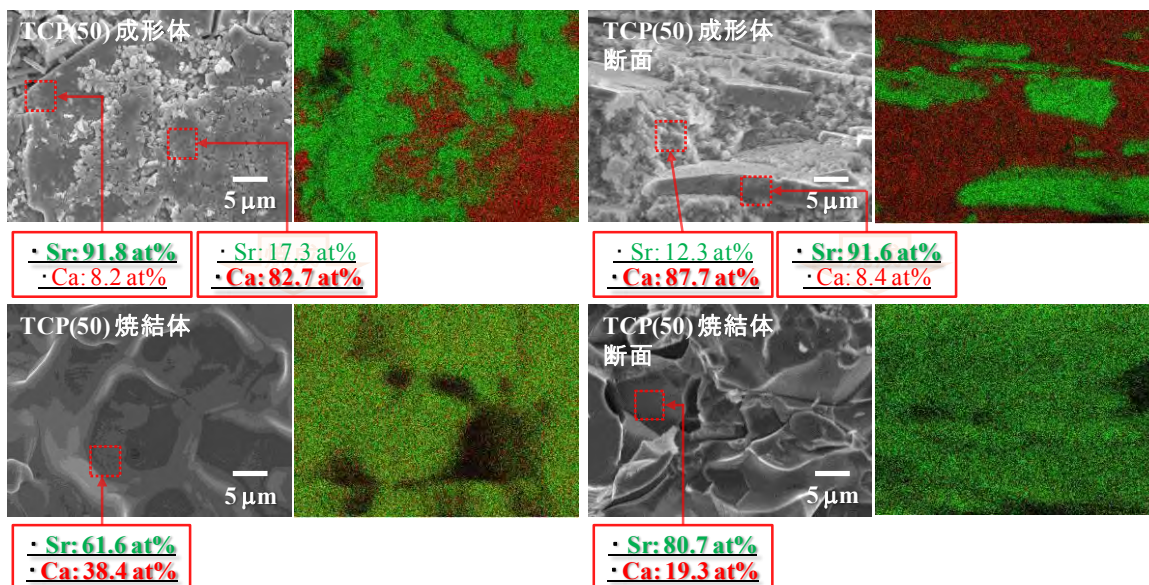


図7 TCP(50)焼成体のEDXによるマッピング測定
(Sr: 緑色, Ca: 赤色)

4. 結論

テンプレート粒子を利用した異方性制御プロセスの構築により、アパタイト結晶や結晶の類似性が認められた物質において異方性を持たせることに成功した。六角板状 α -TSP テンプレート粒子を用いたRTGG法により、 c 面を多く露出したSrFApセラミックスを作製した。また、針状SrFApテンプレート粒子を用いた配向焼結により、 $a(b)$ 面を多く露出したSrFApセラミックスを作製した。この結果により、SrFApの異方性制御プロセスの構築に成功した。さらに、本プロセスはアパタイト結晶以外の β -TCP結晶の異方性制御にも有効であることがわかった。今後更なる検討を行なうことで、様々な物質への異方性制御プロセスの適用が期待できる。

5. 参考文献

- [1] M. Aizawa, A. E. Porter, S.M. Best, W. Bonfield, *Biomaterials*, **26**, 3427-3433 (2005).
- [2] Z. Zhuang, H. Yoshimura, M. Aizawa, *Mater. Sci. Eng. C*, **33**, 2534-2540 (2013).
- [3] 石田明祐, 鈴村彰敏, 中野秀之, 谷 俊彦, 相澤 守, 日本セラミックス協会 2015 年年会講演要旨集 (2015), 1P176.
- [4] 石田明祐, 鈴村彰敏, 堀 茂雄, 谷 俊彦, 相澤 守, 日本セラミックス協会 2015 年年会講演要旨集 (2015), 2L27.
- [5] T. Tani, *J. Ceram. Soc. Japan*, **114**, 363-370 (2006).
- [6] F. K. Lotgering, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **9**, 113-123 (1959).

6. 成果報告

*口頭発表

- 1) ○石田明祐・庄 志・谷 俊彦・相澤 守、“水熱法による六角板状 α -リン酸ストロンチウムの合成とそのキャラクターゼーション”、無機マテリアル学会第 128 回学術講演会、日本大学理工学部(駿河台校舎)、無機マテリアル学会、2014.6.5-6
- 2) ○石田明祐・鈴木彰敏・堀 茂雄・谷 俊彦・相澤 守、“水熱法による針状ストロンチウムフッ素アパタイトの合成とその配向焼結”、第 23 回アパタイト研究会、富山県富山県民共生センター、日本アパタイト研究会、2014.12.11-12
- 3) ○石田明祐・鈴木彰敏・中野秀之・谷 俊彦・相澤 守、“六角板状リン酸三ストロンチウム粒子をテンプレートとした反応性テンプレート成長法によるストロンチウムフッ素アパタイト焼結体の作製”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20
- 4) ○鈴木彰敏・岸田佳大・中野秀之・谷 俊彦・石田明祐・相澤 守、“板状 α -リン酸三ストロンチウムより作製したアパタイトセラミックスの配向過程の分析”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20
- 5) ○石田明祐・相澤 守、“六角板状 α -リン酸三ストロンチウムをテンプレートとした異方性制御 β -リン酸三カルシウムセラミックスの作製とその評価”、第 25 回無機リン化学討論会、山形大学米沢キャンパス、日本無機リン化学会、2015.9.28-29

*ポスター発表

- 1) ○石田明祐・鈴木彰敏・堀 茂雄・谷 俊彦・相澤 守、“水熱法による針状ストロンチウムフッ素アパタイトの合成とその配向焼結”、日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学津島キャンパス、日本セラミックス協会、2015.3.18-20
- 2) ○A. Ishida, A. Suzumura, Y. Kishida, T. Tani, M. Aizawa, “Fabrication of strontium fluoroapatite ceramics by reactive-templated grain growth method using hexagonal-shaped tristrontium phosphate particles”, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM2015), Hawaii Convention Center, Hawaii, USA, 2015.12.15-20

*特許

- 1) 谷 俊彦・相澤 守・石田明祐、特開 2016-011247 (特願 2014-115232)、「板状リン酸化合物粒子、それを含む板状リン酸化合物粉体、及び、板状リン酸化合物粉体の製造方法、並びに板状リン酸化合物粉体を用いた結晶配向アパタイトの製造方法」、株式会社豊田中央研究所・学校法人明治大学 (出願日 2015 年 2 月 4 日)

気孔構造を精密制御したリン酸カルシウム多孔体の創製およびその気孔内での骨形成能の評価

長田直生¹⁾・松成ひとみ³⁾・竹内靖浩³⁾・長嶋比呂志^{2),3)}・相澤 守^{1),2)}

1) 明治大学大学院理工学研究科応用化学専攻

2) 神奈川科学技術アカデミー

3) 明治大学農学部生命科学科

Fabrication of Porous β -tricalcium Phosphate with Precisely-controlled Pore Structure and Evaluation of Osteogenic Ability in Its Pores

Naoki OSADA¹⁾, Hitomi MATSUNARI³⁾, Yasuhiro TAKEUCHI³⁾, Hiroshi NAGASHIMA^{2),3)}
and Mamoru AIZAWA^{1),2)}

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Kanagawa Academy of Science and Technology

3) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University

1. 緒言

現在、骨腫瘍や骨折等の治療には自家骨移植がゴールドスタンダードとして用いられるが、自家骨の採取量に限界があることや採取時の二次的侵襲といった問題がある。そのため人工骨に対するニーズが高まっており、水酸アパタイト (HAp) や β -リン酸三カルシウム (β -TCP) などのバイオセラミックスが広く臨床応用されている。しかしながら、これらの材料は骨誘導能 (骨芽細胞が存在しない部位での骨形成) を持たないため、確実な骨癒合が得られない場合がある。我々は、より高い骨形成能を担保した人工骨を開発することを目的として、これまでにアパタイトファイバー (AF) およびリン酸カルシウムファイバー (CPF) を出発物質とし、気孔形成材として粒径 150 μm のカーボンビーズ (CB) を用いて、骨侵入の可能なマクロ気孔 ($\sim 150 \mu\text{m}$) と栄養分の供給の役割を果たすマイクロ気孔 (1-5 μm) を有する HAp および β -TCP 多孔体の開発に成功している[1, 2]。本研究では、これらのリン酸カルシウム多孔体をクサビラオレンジブタの大腿筋および脂肪に埋入し、骨誘導能の発現について調査した。さらに、2種類の CB を使用し、粒径および CB の混合割合を変えて作製した β -TCP 多孔体の気孔構造の最適化および骨伝導能 (骨内に埋入したときに骨と材料が直接結合する機能) の評価を行なった。

2. 実験方法

1) 既報[1, 2]に従い、AF および CPF を合成し、粒径 150 μm の CB を CB/AF = 1/1 [w/w]、CB/CPF = 1/2 [w/w] となるように加え、40 MPa で一軸加圧成形を行なった。得られた AF 成形体を 1300 $^{\circ}\text{C}$, 5 h、水蒸気雰囲気下で焼成することで「HAp 多孔体」を作製し、また CPF 成形体を 1000 $^{\circ}\text{C}$, 5 h、空気気流中で焼成して「 β -TCP 多孔体」を作製した。作製した多孔体をそれぞれ「HAp(100-0)」および「TCP(100-0)」と表記する。*In vivo* 実験では、実験動物に赤色蛍光タンパク Kusabira-Orange (huKO) を遺伝子に導入し

たトランスジェニック・クローンブタ (huKO ブタ) [3]を用いた。作製したリン酸カルシウム多孔体 (3.8 ~ 4.0 mmφ × 7.5 mm) を huKO ブタの大腿筋および脂肪に 13 および 24 週間埋入したのち、脱灰標本を作製した。この標本にヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とマッソントリクローム (MT) 染色を施し、リン酸カルシウム多孔体の気孔内における骨形成を調べた。

2) CPF に粒径の異なる 2 種類の CB (20, 150 μm) を CB/CPF = 1/2 [w/w] となるように加え、1) と同様の方法で成形および焼成を行い、細孔構造を精密制御したβ-TCP 多孔体を作製した。粒径 150 μm と 20 μm の CB の添加量に基づき、サンプル名を “TCP(100-0)”, “TCP(75-25)”, “TCP(50-50)”, “TCP(25-75)” と表記する。なお、TCP(75-25)は 150 μm の CB を 75 mass%、20 μm の CB を 25 mass% 混合した気孔形成材を用いて作製している。作製した多孔体 (~ 4.0 mmφ × 7 mm) をブタの脛骨に 4 週間埋入後、組織学的評価より細孔構造の最適化を行なった。

3. 結果と考察

1) 作製した HAp(100-0)および TCP(100-0)は、それぞれ HAp およびβ-TCP 単一相であり、CB 焼失によるマクロ気孔 (~150 μm) とファイバーの絡み合いからなるミクロ気孔 (~5 μm) を持ち、連通性の高い気孔構造を有していた。また、HAp(100-0)および TCP(100-0)の三点曲げ強度はそれぞれ 4.3 ± 0.2 MPa および 1.5 ± 0.3 MPa であり、それらの全気孔率はいずれの多孔体も~70%であった。HAp(100-0)をブタの大腿筋に埋入した結果を図 1 に示す。多孔体の気孔内部に骨形成が誘導されているのが確認された (矢印部分)。また、埋入 13 週では骨形成の割合がおよそ 12%であったのに対し、埋入 24 週ではおよそ 33%であり、約 3 倍に増加していた。脂肪組織においては、気孔内部に繊維性の組織が入り込んでいる様子が伺え、骨形成はほとんど認められなかった。一方、TCP(100-0)を大腿筋に埋入した場合は、埋入 13 週においては気孔内部に骨形成 (骨誘導能) が確認されたが、埋入 24 週では多孔体の大部分が吸収されてしまい、骨形成はほとんど見られなかった。

これらの結果から、本研究で作製したリン酸カルシウム多孔体は「骨誘導能」を備えており、自家骨に代わりうる新規な人工骨として期待できる。

2) 作製したβ-TCP 多孔体の微細構造を図 2 に示す。全ての多孔体の結晶相はβ-TCP 単一相であり、150 μm の CB 焼失によるマクロ気孔とファイバーの絡み合いによるミクロ気孔、さらに 20 μm の CB 焼失による気孔も観察された。それらの全気孔率は、2 種類

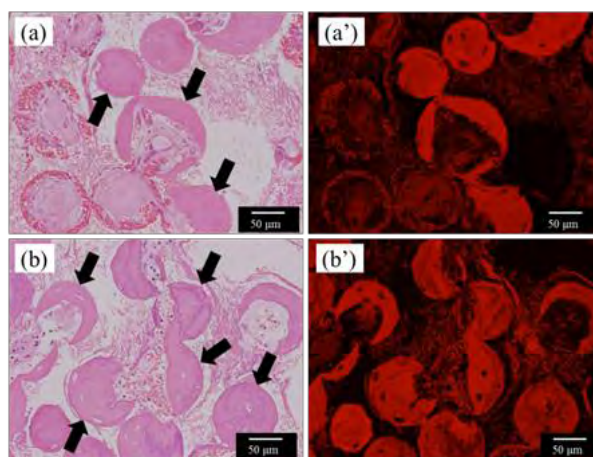


図 1 HAp (100-0)の組織学的観察 (HE 染色)
(a) 埋入 13 週, (a') 蛍光観察
(b) 埋入 24 週, (b') 蛍光観察

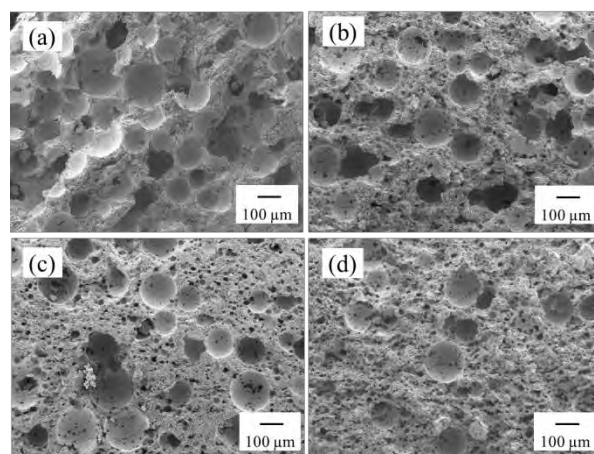


図 2 β-TCP 多孔体の微細構造
(a) TCP(100-0), (b) TCP(75-25)
(c) TCP(50-50), (d) TCP(25-75)

の CB の添加の割合に依存せず、いずれも~70% であった。β-TCP 多孔体の三点曲げ強度および圧縮強度は、TCP(25-75) > TCP(50-50) > TCP(75-25) > TCP(100-0) の順番となり、20 μm の CB の添加割合が大きいが強度も増す結果となった。ブタ脛骨に 4 週間埋入した細孔構造の最適化実験における組織切片の観察では、TCP(100-0)および TCP(75-25)において、多孔体の外周部で旺盛な骨形成が見られ、また中心部付近においても新生骨の形成が見られた。一方、TCP(50-50) と TCP(25-75)では、多孔体の連通性が低く、内部での骨形成はほとんど見られなかった。これらの結果から TCP(75-25)を最適な細孔構造と決定した。

4. 参考文献

- [1] M. Kawata, H. Uchida, K. Itatani, I. Okada, S. Koda and M. Aizawa, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **15**, 817-823 (2004).
- [2] 相澤守, 重光勇介, 長嶋比呂志, リン酸カルシウム多孔体およびその製造方法, 特願 2011-62997, 2011-03-22.
- [3] H. Matsunari, M. Onodera, N. Tada, H. Mochizuki, S. Karasawa, E. Haruyama, N. Nakayama, H. Saito, S. Ueno, M. Kurome, A. Miyawaki, H. Nagashima, *Cloning Stem Cells*, **10**, 313-23 (2008).

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表 (国内会議)

- 1) 長田直生・重光勇介・松成ひとみ・竹内靖浩・長嶋比呂志・相澤 守、“骨誘導能を備えたリン酸カルシウム多孔体の作製とクサビラオレンジブタによる *in vivo* 評価 (Fabrication of porous calcium-phosphate ceramics with osteoinductivity and *in vivo* evaluation using a transgenic-cloned pig expressing red fluorescent protein, kusabira-orange)”、無機マテリアル学会第 125 回学術講演会、名古屋大学、無機マテリアル学会、2012.11.1-2
- 2) 長田直生・松成ひとみ・竹内靖浩・織部一弥・長嶋比呂志・相澤 守、“細孔構造を精密制御したβ-リン酸三カルシウム多孔体の作製とブタによる *in vivo* 評価 (Fabrication of porous β-tricalcium phosphate with precisely-controlled pore structure and *in vivo* evaluation using a pig model)”、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、仙台国際センター、日本バイオマテリアル学会、2012.11.26-27

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

鷹本拓也¹⁾・本田みちよ^{2),3)}・水本みのり²⁾・松成ひとみ⁴⁾・竹内靖浩⁴⁾
・長嶋比呂志^{2),3),4)}・相澤 守^{1),2),3)}

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 神奈川科学技術アカデミー (KAST)

3) 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート

4) 明治大学農学部生命科学科

Verification of osteoinductivity of apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property

Takuya GANMOTO¹⁾, Michiyo HONDA^{2),3)}, Minoru MIZUMOTO²⁾, Hitomi MATSUNARI⁴⁾,
Yasuhiro TAKEUCHI⁴⁾, Hiroshi NAGASHIMA^{2),3),4)} and Mamoru AIZAWA^{1),2),3)}

3) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

4) Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST)

5) Meiji University International Institute for Bio-Resource Reserch

6) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University

1. 緒言

現在、これまで治療困難とされてきた様々な原因による不可逆性の臓器損傷を幹細胞生物学と工学的技術を駆使して治療する「再生医療 (Tissue engineering)」の研究が活発に行われている。再生医療の基本技術は、細胞や成長因子のような生理活性物質を人工材料に組み込み、特定の組織 (臓器) を再生させることである。そのための三つの重要な要素は、細胞、細胞接着・増殖の足場 (スキャフォールド)、成長因子である。

骨の再生医療の場合では、一般的に多孔質リン酸カルシウムがスキャフォールドとして用いられる。一般的に、ハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp) などの多孔質バイオセラミックスは、骨の無機成分に似ているため、骨組織再生のためのマトリックスとして使用されている。多くの研究者が、高气孔率で連通気孔、優れた生体適合性を有するリン酸カルシウムから成るハイパフォーマンスのスキャフォールドの開発を試みている。

水酸アパタイトは異なる特性を有する *a* 面と *c* 面の 2 つの結晶面を有するものとして知られている。私たちは尿素を用いた均一沈殿法により単結晶アパタイトファイバー (AF) を合成に成功している。AF は等方的な HAp 粉末よりも高い溶解度を持っている。そこで、AF を用いて、私たちは細胞の三次元培養が可能で、骨芽細胞への分化を誘導するアパタイトファイバースキャフォールド(AFS) を開発し、粒径 150 μm と 20 μm のカーボンビーズ (CB) を用いて AFS の機械的特性の向上に成功している。

本研究では、この高強度化 AFS を大型動物であるブタの大腿筋に埋入し、スキャフォールドの細孔構造と骨誘導能発現の関連性について調査した。

2. 実験方法

試料溶液は HAp の化学量論組成である Ca/P 比 1.67 となるように $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ および HNO_3 を混合して調製した。この溶液を 80°C で 24 h, ついで 90°C で 72 h 加熱して AF を合成した。得られた AF に対して質量比で 1, 3, 5 倍量のカーボンビーズ (CB) を添加し、吸引ろ過後、30 MPa で一軸加圧することで高強度化 AFS 成形体を作製した。得られた成形体を 1300°C で 5 時間水蒸気雰囲気下で焼成することで「高強度化 AFS」を得た [1]。なお、CB は粒径 $150\ \mu\text{m}$ と $20\ \mu\text{m}$ のものを併用し、CB の添加量に基づき、試験片名をそれぞれ AFS100(50-50), AFS300(50-50), AFS500(50-50) と表記する。得られた高強度化 AFS (試験片寸法: $\phi 4.2\ \text{mm} \times 7.5\ \text{mm}$) をブタの右後肢大腿部筋肉に 12, 24 週間埋入後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施すことによって、高強度化 AFS の骨誘導能の検証を行なった。

3. 実験結果と考察

作製した高強度化 AFS はいずれも、作製条件によらず HAp 単一相であった (Fig. 1)。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察より、いずれのスキヤフォールドも AF の絡み合いによるマイクロ気孔に加え、CB (粒径 $150\ \mu\text{m}$ および $20\ \mu\text{m}$) 焼失に由来するマクロ気孔や連通気孔が観察された。気孔率は大きく異なり、AFS100 で 68%、AFS300 で 83%、AFS500 で 89% であった (Fig. 2)。

ブタ大腿部筋肉への埋入 24 週後の HE 染色による組織学的評価の結果を Fig. 3 に示す。AFS100(50-50) では、スキヤフォールド外周部の気孔領域において骨組織の形成が確認できた。スキヤフォールド中心部の気孔領域では、血管の侵入が確認でき、血管内皮細胞が観察された。同様に、AFS300(50-50) でも、スキヤフォールド外周部での骨細胞を有する骨組織

の形成、中心部での血管の侵入が確認できた。しかしながら、AFS500(50-50) では、材料が生体に吸収もしくは溶解しており、試験片形状の完全性は失われていた。また、スキヤフォールドの気孔領域は線維性結合組織で満たされ、異所骨形成は確認できなかった。

以上の結果より、高強度化 AFS による骨誘導において、「気孔率」は非常に重要な因子であると考えられる。一般的に、骨誘導は、体液中を循環する骨形成タンパク質 (BMP) のスキヤフォールド上への吸着、それに続く間葉系幹細胞の骨形成

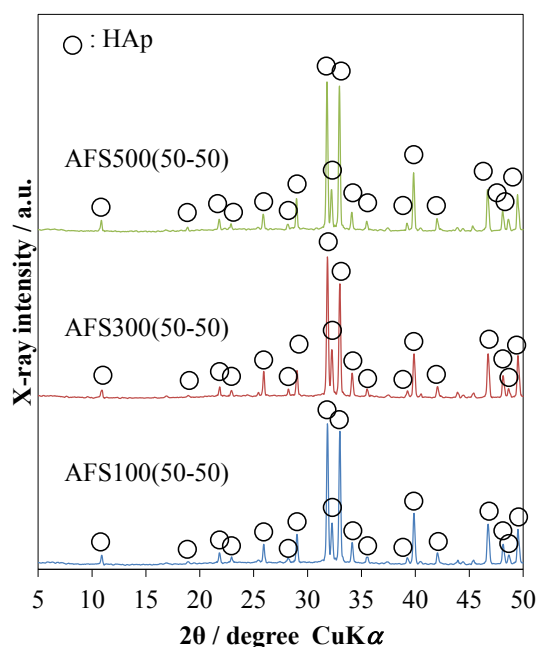


Fig.1 Powder X-ray diffraction patterns of the AFSs.

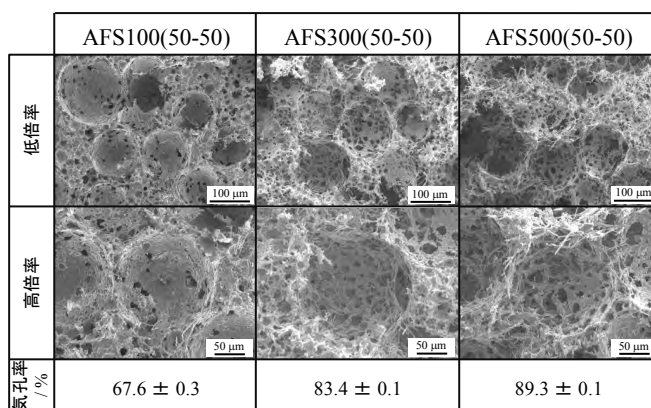
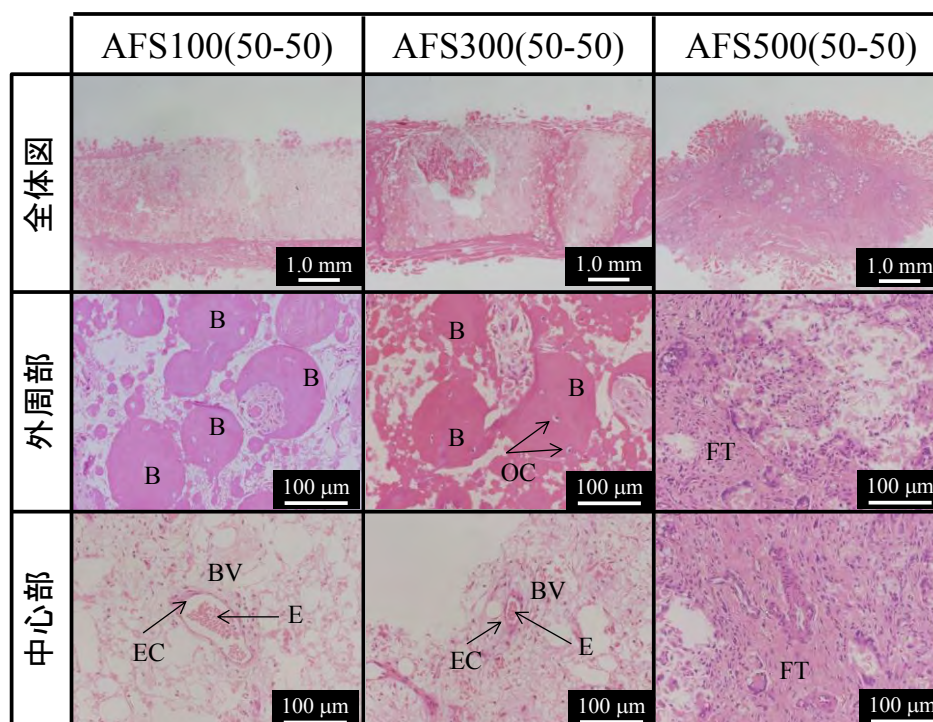


Fig.2 SEM micrographs of the AFSs.



B : Bone tissue, BV : Blood vessel, EC : Endothelial cell, E : Erythrocyte,
OC : Osteocyte, FT : Fibrous connective tissue

Fig.3 Histological evaluation of the AFSs implanted for 24 weeks into muscle of pig (HE stain)

細胞への分化によって開始される。しかしながら、気孔率が高すぎると、体液の高循環環境において、BMP をスキャフォールド内部に留めることができないため、骨誘導は生じない。つまり、BMP の吸着および細胞分化において、速い体液の循環から保護された静的な空間が異所骨形成には重要であることが示唆された。

埋入 12 および 24 週間による経時的な組織学的評価より、骨誘導のプロセスは、血管の侵入、細胞凝集体の接着、骨芽細胞への分化、骨形成の過程を経ることがわかった。したがって、より早期にスキャフォールド内部への血管侵入を可能にする気孔構造が重要であり、相互に連通したマクロ気孔は骨誘導発現において必要不可欠であることがわかった。

これまでの研究結果より、材料依存による骨誘導において、1) タンパク質の吸着や細胞の接着に有利な安定した足場、2) 速い体液の循環から保護された静的な空間、3) 血管や細胞の侵入を促進する相互連通したマクロ気孔、4) タンパク質の吸着領域を増大させるミクロ気孔が重要であることが示された。したがって、本研究で作製した高強度化 AFS300(50-50) は、高气孔率・高連通性を有し、優れた骨伝導能と骨誘導能を併せ持っていることから、再生医療に大きく貢献できるスキャフォールドとして期待できる。

4. 参考文献

[1] S. Motojima, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama and M. Aizawa, *Bioceramics*, **22**, 177-180(2009).

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表（国内会議）

- 1) 鴈本拓也・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大会シンポジウム2012、宮城（仙台国際センター）、日本バイオマテリアル学会、2012.11.26-27.

気孔構造を精密制御した多孔質水酸アパタイトセラミックスの生体内反応

伊藤賢人¹⁾・鷹本拓也¹⁾・長田直生¹⁾・中野和明²⁾・浅野吉則²⁾
長屋昌樹³⁾・本田みちよ^{3,4)}・織部一弥⁵⁾・長嶋比呂志^{2,3)}・相澤 守^{1,3)}

- 1) 明治大学工学部応用化学科
- 2) 明治大学農学部生命科学科
- 3) 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート
- 4) 明治大学研究・知財戦略機構
- 5) 昭和医科工業株式会社

Living body reaction of porous hydroxyapatite ceramics with well-controlled pore structure

Kento ITO¹⁾, Takuya GANMOTO¹⁾, Naoki OSADA¹⁾, Kazuaki NAKANO²⁾, Yoshinori ASANO²⁾,
Masaki NAGAYA³⁾, Michiyo HONDA^{3,4)}, Kazuya ORIBE⁵⁾,
Hiroshi NAGASHIMA^{2,3)} and Mamoru AIZAWA^{1,3)}

- 1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University
- 2) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University
- 3) Meiji University International Institute for Bio Resource Research
- 4) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University
- 5) Showa Ika Kogyo Co., Ltd

1. 緒言

現在、整形外科移植において自家骨移植（患者自身から採取した移植骨）は、その高い生体適合性からゴールドスタンダードとして広く用いられてきた。しかしながら、自家骨は骨の供給において量的な限界があり、採取時に患者の正常な腸骨および腓骨に二次的侵襲を与えてしまうという欠点がある[1]。そのため人工的に合成した骨補填材（人工骨）に対するニーズが高まっている。

主な人工骨として、ハイドロキシアパタイトや β -リン酸三カルシウムなどのリン酸カルシウムを主成分とするセラミックスが1980年代以降、整形外科手術において臨床応用されている。我々は、これまでにアパタイトファイバー（AF）を出発物質として、気孔形成材に2種類の異なる粒径のカーボンビーズ（CB; 20, 150 $\mu\text{m}\phi$ ）を用いることで、骨侵入可能なマクロ気孔と栄養分供給の役割を果たすマイクロ気孔を兼ね備えた「アパタイトファイバースキャフォールド（AFS）」の作製に成功している[2]。

そこで、本研究では、CBの総添加量および2種類のCBの添加割合を変化させて、気孔率および気孔構造を制御したAFSを作製し、大型動物であるブタを用いた*in vivo* 評価より骨伝導能（骨内に材料を埋入した時、材料表面に沿って骨が形成され、材料と骨が結合して一体となる機能）および骨誘導能（骨芽細胞が存在しない部位に埋入しても、骨形成される機能）を調べ、骨形成を誘導する最適な構造について検討したので報告する。

2. 実験方法

1) AFS の作製

既報[2]に従い、AF を合成した。AF を純水と同量のエタノールに加えて懸濁し、CB を AF の質量に対して 100, 300, 500, 700 mass% となるように添加したスラリーを調製し、吸引ろ過後、一軸加圧成形を行なった。得られた成形体を水蒸気雰囲気下で 1300°C, 5 h 焼成して AFS を作製した。なお、略号は CB 総添加量および粒径の異なる CB の添加割合に応じて“AFS100(100-0)”のように表記する。例えば、“AFS100(100-0)”は CB 総添加量 100 mass% であり、その割合が 150 μmφ の CB を 100%、20 μmφ の CB を 0% 添加したことを示す。

2) 材料評価

作製した AFS は、粉末 X 線回折法 (Powder X-ray Diffraction; XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy; FT-IR)、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM) を用いて評価した。また、気孔率、圧縮強度も求めた。

3) *In vivo* 実験

In vivo 実験には、4 mmφ × ~8 mm の円柱状のサンプルを使用した。各 AFS をブタの脛骨、大腿筋、腹部皮下脂肪に 13 週間埋入した後に、各染色液で染色して組織学的評価を行なった。

以下に各部位の染色法を示す。

骨組織 - ビラヌエバボン(VB)染色【非脱灰研磨標本】

筋・脂肪組織 - ヘマトキシリンエオジン(HE)染色 - マッソントリクローム(MT)染色【脱灰研磨標本】

また、VB 染色した標本の蛍光観察画像を、画像解析ソフト WinROOF を用いて骨形成量の定量を行なった。以下に骨形成率の算出式を示す。

$$\frac{\text{骨形成面積}}{\left(\text{ドリル径} - \text{材料} \right)} \times 100 = \text{骨形成率 \%}$$

3. 結果と考察

1) 材料評価

図 1 に各 AFS の XRD パターンおよび FT-IR スペクトルを示す。

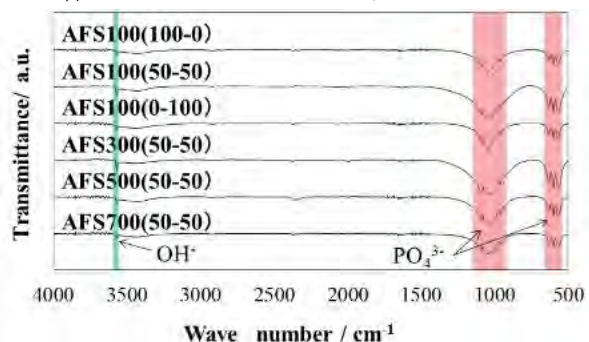


図 1 各 AFS の XRD パターン

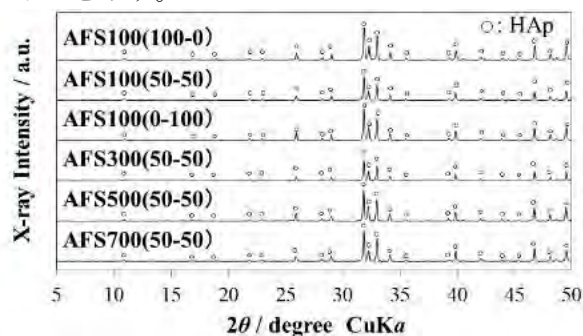


図 2 各 AFS の FT-IR スペクトル

図 1.2 の結果より、作製したすべての AFS の結晶相は HAp 単一相であった。

図 3, 4 に気孔率および気孔構造を制御した AFS の微細構造、気孔率、圧縮強度について示す。

<SEMによる形態観察>

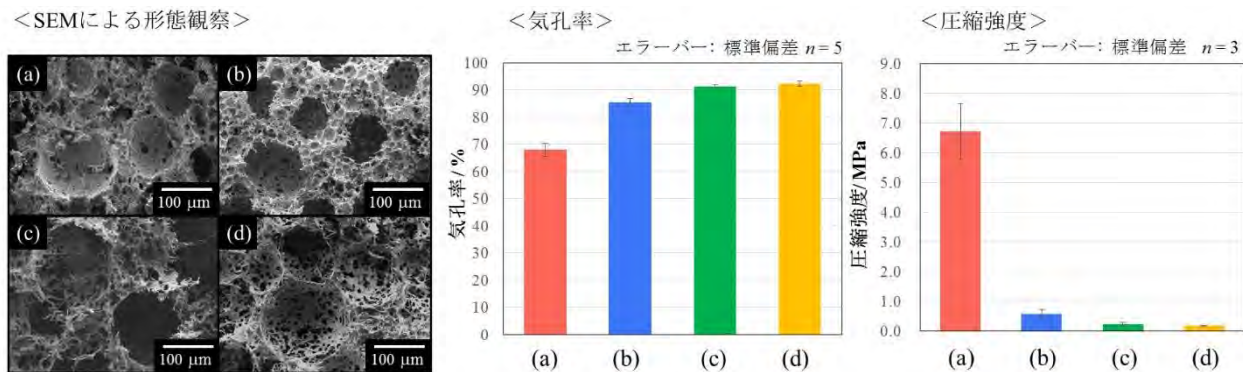


図 3 気孔率を制御した AFS の微細構造、気孔率、圧縮強度

(a) AFS100(50-50)、(b) AFS300(50-50)、(c) AFS500(50-50)、(d) AFS700(50-50)

図 2 より、AF に対して CB の総添加量が増加するに従って、CB 焼失による連通気孔の数が増加するのが観察された。また同様に気孔率が増加し、圧縮強度が減少する結果となった。これは、気孔率が低い AFS の方が、密度が高いためである。

<SEMによる形態観察>

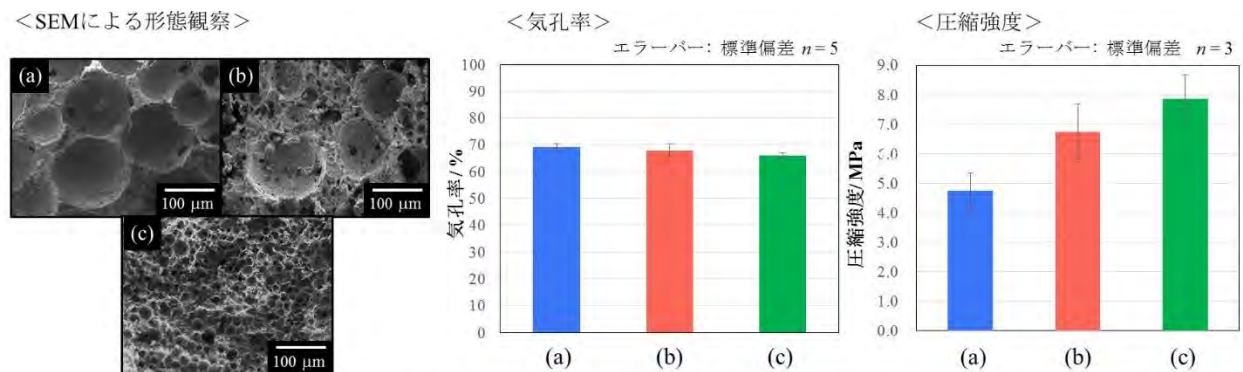


図 4 気孔構造を制御した AFS の微細構造、気孔率、圧縮強度

(a) AFS100(100-0)、(b) AFS100(50-50)、(c) AFS100(0-100)

図 4 より 150 μm に対して 20 μm の CB の添加割合が増加するに従い、より緻密な気孔構造を取り、連通気孔および骨格の数が増加しているのが観察された。また、AFS100(0-100)の圧縮強度が最も高くなったのは 20 μm の CB の増加により AF の骨格が増加し、崩壊の起点への圧力を分散するためである。

3) In vivo 実験

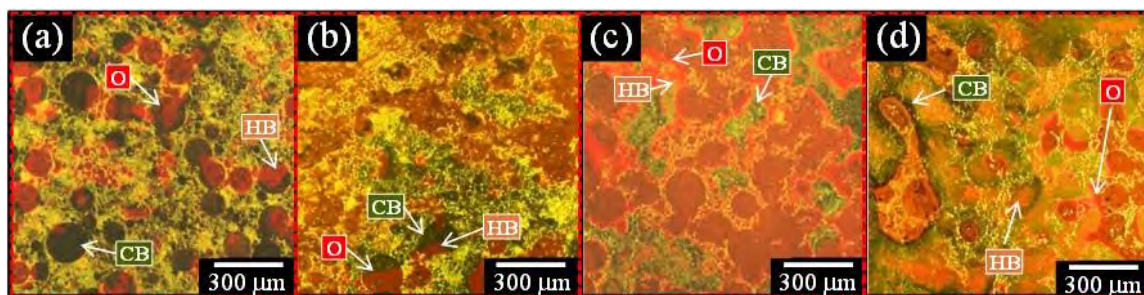


図 5 気孔率を制御した AFS の組織学的観察(VB 染色)

O: 類骨、HB: 低石灰化骨、CB: 石灰化骨

(a) AFS100(50-50)、(b) AFS300(50-50)、(c) AFS500(50-50)、(d) AFS700(50-50)

図 5 に脛骨に埋入した気孔率を制御した AFS の組織学的評価の結果を示す。

脛骨に埋入したいずれの AFS も骨組織と直接結合している様子が観察された。また、AFS100(50-50) (気孔率 68.2%)および AFS300(50-50) (84.0%)では材料中心部と周辺部で良好な骨形成が見られ、十分な連通性と優れた骨伝導能を有していることが確認された。一方、AFS500(50-50) (91.4%)と AFS700(50-50) (92.2%)では、新生骨は観察されたが石灰化骨には至っていなかった。定量評価の結果も、AFS100(50-50)および AFS300(50-50)

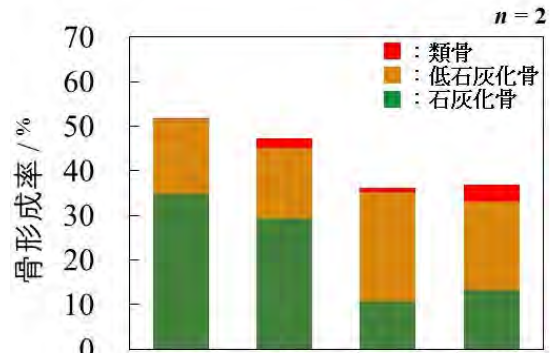


図 6 骨形成量の定量(気孔率の異なる AFS) (a) AFS100 (50-50)、(b) AFS300 (50-50) (c) AFS500 (50-50)、(d) AFS700 (50-50)

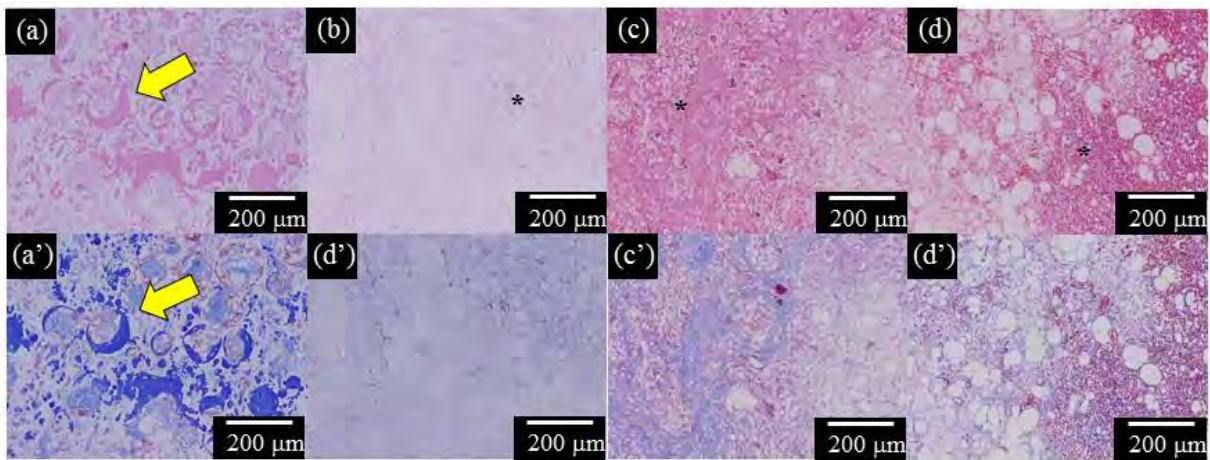


図 7 HE・MT 染色による組織学的評価(筋組織)

矢印：骨組織、*：線維性組織、(a~d)：HE 染色、(a'~d')：MT 染色

(a, a') AFS100(50-50)、(b, b') AFS300(50-50)、(c, c') AFS500(50-50)、(d, d') AFS700(50-50)

の新生骨形成量が AFS500(50-50)および AFS700(50-50)よりも多かった。このことから、気孔率には至適範囲があることが分かった。

図 7 に筋肉組織に埋入した気孔率を制御した AFS の組織学的評価の結果を示す。

筋肉に埋入した AFS100(50-50)では、材料外部から内部に渡って異所骨形成が見られ、良好な骨形成が確認できた。また脂肪に埋入した AFS100(50-50)においても異所骨形成が観察されたが明らかに骨形成量は少ないものであった。

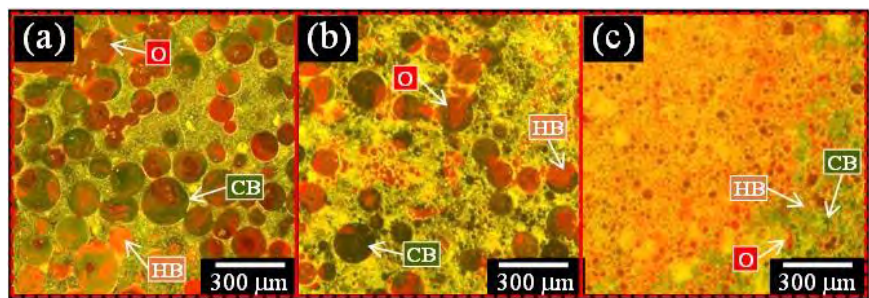


図 8 気孔構造を制御した AFS の組織学的観察(VB 染色) (a) AFS100(100-0)、(b) AFS100(50-50)、(c) AFS100(0-100)

次に、最も骨形成量の多い結果を示した AFS100 に着目し、気孔構造を変化させた AFS を用いて骨形成能を比較した。その結果を図 7 に示す。脛骨に埋入した AFS100(100-0)、AFS100(50-50)では、中心部と周辺部で良好な骨形成が観察された。しかしながら、AFS100(0-100)では周辺部で骨形成が観察されたものの、中心部では骨形成は観察されなかった。定量評価の結果からも、AFS100(0-100)が最も低い骨形成

量を示しており、20 $\mu\text{m}\phi$ の CB のみでは、細胞が侵入しづらい気孔構造であると考えられる。以上より、150 $\mu\text{m}\phi$ の CB を添加することによって中心部への細胞の侵入を容易にし、さらに骨形成を促進することができると考えられる。

図 10 に筋肉組織に埋入した気孔構造を制御した AFS の組織学的評価の結果を示す。

筋肉に埋入した AFS100(100-0) では材料の一部に、AFS100(50-50) では材料全体に異所骨形成が見られた。今回 AFS100(50-50) で特に骨誘導が確認されたのは、AFS のマクロ気孔、ミクロ気孔を有した微細構造の相

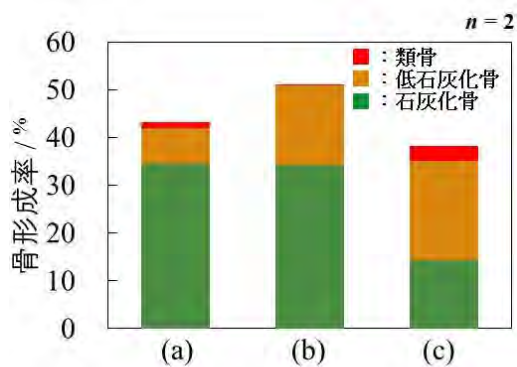


図 9 骨形成量の定量(気孔構造の異なる AFS)
(a) AFS100(100-0)、(b) AFS100(50-50)、
(c) AFS100(0-100)

乗効果により、細胞の接着・増殖・分化が促進したためと考えられる。

4. 結論

本研究で作製した AFS100(50-50) は高いハンドリング性に加え、優れた骨伝導および骨誘導能を有しており、自家骨に代わりうる新規な骨補填材として期待できる。

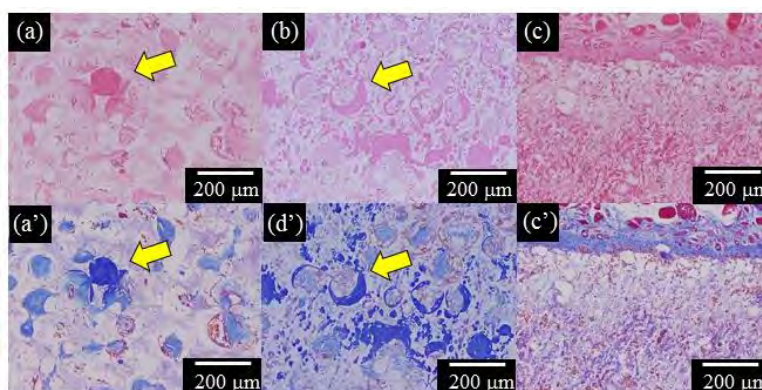


図 10 HE・MT 染色による組織学的評価(筋組織)
(a, a') AFS100(100-0)、(b, b') AFS100(50-50)、(c, c')

5. 参考文献

- [1] M. K. Sen and T. Mclau, *Injury*, **38**, 75-80 (2007).
[2] S. Motojima et al., *Bioceramics*, **22**, 177-180 (2009).

6. 成果報告

* 学会発表 (国内会議)

- 1) 伊藤賢人、鴈本拓也、長田直正、林田豪太、中野和明、長屋昌樹、本田みちよ、長嶋比呂志、相澤 守、“リン酸カルシウム組成の異なる多孔質セラミックスの軟組織内における骨誘導の検証”、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀 (船堀) 2014 年 11 月 17-18 日
- 2) 伊藤賢人、鴈本拓也、長田直正、中野和明、浅野吉則、長屋昌樹、本田みちよ、長嶋比呂志、相澤 守、“二極化した気孔構造を備えた水酸アパタイトおよび β -リン酸三カルシウムセラミックスの生体内反応”、第 129 回無機マテリアル学会、アバンセホール (佐賀) 2014 年 11 月 20-21 日
- 3) 伊藤賢人、鴈本拓也、長田直正、林田豪太、中野和明、浅野吉則、長屋昌樹、織部一弥、本田みちよ、長嶋比呂志、相澤 守、“気孔構造を精密制御した多孔質水酸アパタイトセラミックスの生体内反応”、第 131 回無機マテリアル学会、ウインクあいち (名古屋) 2015 年 11 月 5-6 日

ケイ素含有アパタイトファイバーを用いた硬組織再生用スキャフォールドの開発

木下友花里¹⁾・長嶋比呂志²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学 理工学部 応用化学科

2) 明治大学 農学部 生命科学科

Development of hard tissue regeneration scaffold from silicon-containing apatite fibers

Yukari KINOSHITA¹⁾, Hiroshi NAGASHIMA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University

1. 緒言

現在、骨欠損部位への補填用人工材料としてハイドロキシアパタイト (HAp) が臨床応用されている。人体の骨や歯の主成分である HAp は生体骨と化学的に直接結合する生体親和性を持ち、他の材料には見られない優れた機能を持つ。我々はこれまでに均一沈殿法により合成したアパタイトファイバー (AF) に、カーボンビーズ (CB) を添加して焼成することにより、細胞が材料内部まで侵入可能な三次元連通気孔をもつアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の開発に成功している[1]。また、ケイ素は骨形成を促進させる元素として報告されており、Si を含有したアパタイトファイバー (silicon-containing apatite fiber: Si-AF) の合成にも成功している[2]。

本研究の目的は、従来の AFS の骨形成促進を目指し、この Si-AF を用いて、より高機能なケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールド (Si-AFS) を開発することである。本研究では、**1)** Si 含有量の異なるアパタイトファイバー (仕込み組成: Si=0, 0.8 mass%) から Si-AFS を作製し、その化学特性および *in vitro* 生体適合性について考察した。**2)** 骨補填材への応用を指向し、力学的強度を改善した「高強度化 Si-AFS」を作製し、その化学特性を調査した。さらに、作製した高強度化 Si-AFS をブタの脛骨、筋肉、脂肪に 12 週間埋植し、*in vivo* 生体適合性 (骨伝導能 (同所性骨形成) および骨誘導能 (異所性骨形成)) について考察した。

2. 実験方法

2-1 Si-AFS の *in vitro* 評価

均一沈殿法を用いて Si-AF を合成した (Si の仕込み組成: Si=0, 0.8 mass%)。それぞれの Si-AF 粉体を固形分として 1 mass%、さらにこれに平均粒子径~150 μm の CB を 0, 10 および 20 mass%含む混合スラリーをそれぞれ調製した。この混合スラリーから成形体を作製後、水蒸気雰囲気下で 1300 $^{\circ}\text{C}$, 5 h 焼成し、各 Si-AFS を作製した。なお、スキャフォールドの表記を “x Si-AFS y” のように略記し、x は仕込みの Si 添加量 (mass%) を、y は Si-AF の質量 (g) に対する CB 質量 (mass%) を表す。本研究では、Si-AF (g) に対して CB を 0, 1000 および 2000 mass%添加したスキャフォールドを作製した。

作製した Si-AFS の *in vitro* 溶解性試験を行うために、試料片には 0.8Si-AFS0, 0.8Si-AFS1000, 0.8Si-AFS2000, AFS0, AFS1000, AFS2000 を使用し、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-塩酸緩衝液中における Si 溶出量を調べた。次に、*in vitro* 生体適合性を評価するために、培養基材にはポリスチレンプレート (Control), 0.8Si-AFS0, 0.8Si-AFS1000, 0.8Si-AFS2000, AFS0, AFS1000, AFS2000 を使用し、スキャフォールド上に播種された MC3T3-E1 細胞の細胞増殖性、細胞形態、組織学的観察を調べた。

2-2 高強度化 Si-AFS の *in vivo* 評価

高強度化 Si-AFS は、合成した Si-AF に平均粒子径が $\sim 150\ \mu\text{m}$ および $\sim 20\ \mu\text{m}$ の 2 種類の CB を用いて、30 MPa で一軸加圧成形後、1300 °C で 5 h、水蒸気雰囲気下で焼成することにより作製した。以下、スキャフォールドの表記を“0.8Si-AFSy(50-50)”のように略記し、y は Si-AF の質量 (g) に対する総 CB 質量 (mass%) を表し、(50-50) は平均粒子径が $\sim 150\ \mu\text{m}$ および $\sim 20\ \mu\text{m}$ の CB をそれぞれ同質量ずつ (50%-50%) 混合したことを表す。本研究では、Si-AF (g) に対して、CB を 100 および 300 mass% 添加したスキャフォールドを作製した。

作製した高強度化 Si-AFS の化学特性評価は粉末 X 線回折、走査型電子顕微鏡、圧縮強度試験により行なった。高強度化 Si-AFS の同所性骨形成は 0.8Si-AFS300(50-50), AFS300(50-50) (寸法 $\phi 3.8\ \text{mm} \times \sim 7.5\ \text{mm}$) をブタ脛骨に、異所性骨形成は 0.8Si-AFS100(50-50), 0.8Si-AFS300(50-50), AFS100(50-50), AFS300(50-50) (寸法 $\phi 3.8\ \text{mm} \times \sim 7.5\ \text{mm}$) をブタ筋肉および脂肪に 12 週間埋植後、組織切片を作製することにより評価した。

3. 実験結果と考察

3-1 Si-AFS の *in vitro* 評価

作製した Si-AFS はわずかに α -リン酸三カルシウムに分解していたが、主な結晶相は HAp であり、Si 含有量は 1 mass% であった。また、気孔率は Si-AFS0 が $\sim 90\%$ 、Si-AFS1000 が $\sim 98\%$ 、Si-AFS2000 が $\sim 98.5\%$ であった。Si-AFS の Si 溶出量は 1 日目に急速に増加し、3 日目以降は一定に溶出した。Si 溶出量はスキャフォールドの表面積の大きさに依存していることが分かった。Si 溶出挙動として、溶出試験初期にはスキャフォールド表面に存在する HAp に固溶していない Si が溶出し、その後 HAp に固溶している Si が AFS の溶解とともに徐々に溶出しているものと考えられる。各試料片で培養された MC3T3-E1 細胞の細胞増殖結果を Fig. 1 に示す。培養 21 日間を通して各試料片の DNA 量は Control を大きく上回る結果となり、多い順から 0.8Si-AFS2000, AFS2000 \gg 0.8Si-AFS1000, AFS1000 \gg 0.8Si-AFS0, AFS0 \gg Control であった。DNA 量は試料片の気孔率に依存し、Si 添加による培養基材間の大きな違いは見られなかった。以上の結果より、作製した Si-AFS は細胞の三次元培養が可能であり、従来の AFS と同程度の高い生体適合性を有することが示された。

3-2 高強度化 Si-AFS の *in vivo* 評価

作製した高強度化 Si-AFS の微細構造は、CB の平均粒子径に相当する 2 種類のマクロ気孔と、Si-AF の絡み合いに由来するマイクロ気孔からなる 3 種類の気孔構造を有し、連通気孔も有することがわかった。圧縮強度試験より、Si-AFS100(50-50) シリーズでは $\sim 4\ \text{MPa}$ 、Si-AFS300(50-50) シリーズでは $\sim 0.75\ \text{MPa}$ を有しており、整形外科手術時における操作性、生体内安定性への改善は達成されたといえる。

脛骨へインプラントした試料片のピラヌエバ-ボーン染色の観察結果を Fig. 2 に示す。細胞が高強度化 Si-AFS の内部まで侵入し、新生骨が形成されている様子が観察され、骨伝導能が示された。筋肉へのインプラントにおいては、Si-AFS100(50-50)シリーズのみ骨組織が観察され、骨誘導能が示された。しかしながら、脂肪へのインプラントではいずれの材料においても軟組織の侵入および血管新生は見られたが骨組織は観察されなかった。

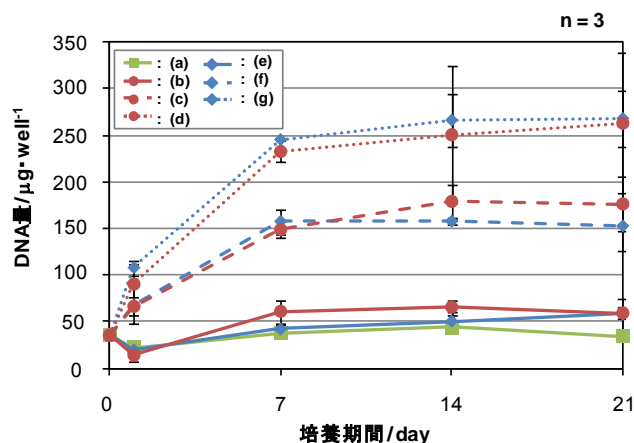
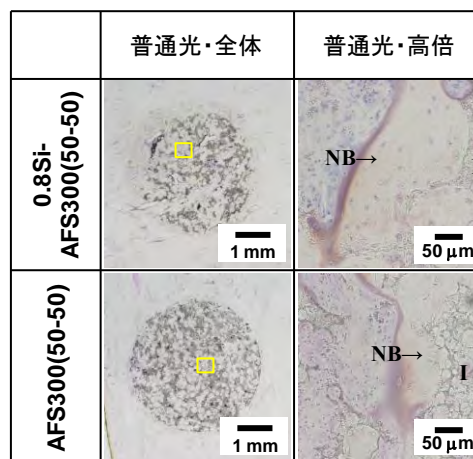


Fig. 1 各試料片における細胞増殖曲線

(a) Control, (b) 0.8Si-AFS0, (c) 0.8Si-AFS1000,
(d) 0.8Si-AFS2000, (e) AFS0, (f) AFS1000, (g) AFS2000



I: Implant, NB: New bone

Fig. 2 高強度化 Si-AFS の組織学的観察
(脛骨・ピラヌエバ-ボーン染色)

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanzawa, H. Morisue, M. Matsumoto and Y. Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 262-268 (2004).
[2] M. Aizawa, N. Patel, A. E. Porter, S. M. Best and W. Bonfield, *Key Eng. Mater.*, **309-311**, 1129-1132 (2006).

5. 本研究に関する成果報告

*論文投稿 (査読つき Proceedings 含む)

- [1] Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa, "FABRICATION AND EVALUATION OF SILICON-CONTAINING APATITE FIBER SCAFFOLDS FOR BONE TISSUE ENGINEERING", *Phosphorus Research Bulletin*, **Vo. 26**, pp.101-103, 2012.
[2] Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa, "In Vitro evaluation of silicon-containing apatite fiber scaffolds for bone tissue engineering", *Key Engineering Materials*, **Vo. 529-530**, pp.391-396, 2013.

*受賞

木下友花里, S. M. Best, 相澤 守

第 16 回生体関連セラミックス討論会 The Division 賞 (2012)

タイトル: ケイ素含有アパタイトファイバーによる骨再生用スキャフォールドの *in vitro* 評価

*学会発表 (国際会議)

Y. Kinoshita, S. M. Best and M. Aizawa, "In Vitro evaluation of silicon-containing apatite fiber scaffolds for bone

tissue engineering”, Bioceramics24, Kyushu University (Fukuoka, Japan), 21th-24th October, 2012.

***学会発表 (国内会議)**

木下友花里, S. M. Best, 相澤 守, “ケイ素含有アパタイトファイバーによる骨再生用スキャフォールドの *in vitro* 評価”,

第 16 回生体関連セラミックス討論会, 千葉工業大学 (千葉), 2012 年 11 月 30 日

高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの材料特性とその生物学的評価

乾 鷹羽¹⁾・木下友花里¹⁾・中野和明²⁾・浅野吉則²⁾・松成ひとみ³⁾・
長屋昌樹³⁾・本田みちよ^{3,4)}・長嶋比呂志^{2,3)}・相澤 守^{1,3)}

1) 明治大学工学部応用化学科

2) 明治大学農学部生命科学科

3) 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート

4) 明治大学 研究・知財戦略機構

Material properties of silicon-containing apatite fiber scaffolds with enhanced mechanical property and their biological evaluation

Takaha INUI¹⁾, Yukari KINOSHITA¹⁾, Kazuaki NAKANO²⁾, Yoshinori ASANO²⁾, Hitomi MATSUNARI³⁾,
Masaki NAGAYA³⁾, Michiyo HONDA^{3,4)}, Hiroshi NAGASHIMA^{2,3)} and Mamoru AIZAWA^{1,3)}

7) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

8) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University

9) Meiji University International Institute for Bio-Resource Research

10) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は、ヒトの骨や歯を構成する無機主成分であり、人工骨として広く用いられている。しかしながら、既存の人工骨は骨伝導能があるものの骨誘導能は乏しいことなどから自家骨に比べ臨床的な成績で劣っている。そのため、自家骨に匹敵する骨形成能を持つ人工骨の開発が望まれている。これまでに我々は、HApの*a*面を多く露出したアパタイトファイバー (AF) を均一沈殿法によって合成し、気孔形成材として直径 150 μm および 20 μm のカーボンビーズ (CB) を用いて高強度化アパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の作製に成功している[1, 2]。この AFS は CB 焼失による大孔径および AF 同士の絡み合いによる細孔径を併せ持つ微細構造を有し、容易な細胞侵入およびその後の三次元培養が可能である。また、骨形成を促進させることで知られるケイ素を添加した高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールド (Si-AFS) の作製にも成功している[3]。

本研究では、自家骨に匹敵する骨形成能をもつ骨補填材の開発を指向して、2種類のCBを用いてAFSおよびSi-AFSを作製し、それらの材料特性評価および*in vitro*生体適合性評価を行なった。さらに、作製したAFSおよびSi-AFSをクサビラオレンジ蛍光遺伝子導入ブタの脛骨、筋肉および脂肪に13週間埋入し、それらの*in vivo*環境下での生物学的評価も行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 材料作製およびその材料特性

AF および AFS、ケイ素を添加した Si-AF および Si-AFS の作製は既報にしたがって行なった[2, 3]。AFS および Si-AFS の作製時には、気孔形成剤として粒径の異なる CB (直径: 150 および 20 μm) を等量の割合で加えた。なお、略称は例えば CB の総添加量が AF の質量に対して 1 倍量であるものを “AFS100(50-50)” のように表記する。作製した AFS および Si-AFS を、粉末 X 線回折 (XRD) による結晶相の同定、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) による定量分析、走査型電子顕微鏡法 (SEM) による微細構造観察、気孔率および圧縮強度の測定により評価した。

2-2 *In vitro* 評価

In vitro 実験には、直径 15 mm、高さ 2 mm の円盤状の試料を使用し、培養細胞にはラット骨髄間葉系幹細胞 (RBMCs) を用いた。培養基材としては AFS100(50-50)、AFS300(50-50)、Si-AFS100(50-50) および Si-AFS300(50-50) を使用した。RBMCs を 28 日間培養し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびアリザリンレッド S (ARS) 染色により組織学的評価を行なった。

2-3 *In vivo* 環境下での生体適合性評価

In vivo 実験には直径 3.8 mm、高さ 7 mm の円柱状の試料を使用し、実験動物はクサビオレンジ蛍光遺伝子導入ブタ[4] (huKO ♀, 139 kg) であり、脛骨、筋肉および脂肪に埋入した。埋入試料としては AFS100(50-50)、AFS300(50-50)、Si-AFS100(50-50) および Si-AFS300(50-50) を使用した。脛骨の穿孔は直径 3.8 mm のドリルで行なった。

埋入 13 週間後に回収した脛骨試料片に、ビラヌエバ・ボーン (VB) 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うとともに、骨形成率を算出した。骨形成率の算出は、画像解析ソフトによる VB 染色の蛍光観察画像の色抽出結果より、以下の式で行なった。また、筋肉および脂肪埋入試料片の脱灰薄切切片に、HE 染色、マッソントリクローム (MT) 染色を行ない、組織学的観察を行なった。

$$\text{骨形成率 [\%]} = \frac{\text{骨形成面積} [\text{mm}^2]}{\text{ドリル穿孔面積} [\text{mm}^2] - \text{材料総面積} [\text{mm}^2]} \times 100$$

3. 結果と考察

3-1 材料特性

作製した高強度化 Si-AFS の結晶相はいずれも HAp 単一相であった。また、定量分析により Si-AFS100(50-50) および Si-AFS300(50-50) の Si 含有量は、0.67 mass% および 0.54 mass% であることがわかり、これは仕込み時の 0.8 mass% よりも低下していた。

AFS および Si-AFS の微細構造を図 1 に示す。図 1 より、CB 焼失によるマクロポア (点線部分) やファイバー同士の絡み合いによるミクロポア (四角部分) が観察された。マクロポアの重なりから、連通孔の存在も確認された。

次に、AFS および Si-AFS の気孔率を図 2、圧縮強度を図 3 に示す。

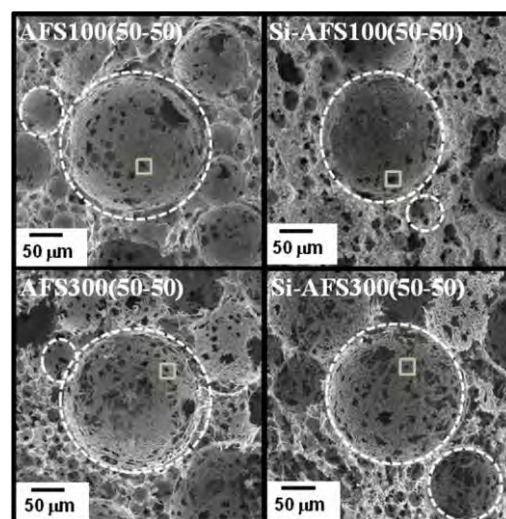


図 1 AFS および Si-AFS の微細構造

図2より、AFSおよびSi-AFSにおいてCBの添加量に応じて気孔率が高くなった。Si添加による気孔率の変化は見られなかった。図3より、AFSおよびSi-AFSにおいて気孔率の増加により圧縮強度が低下した。したがって、AFSおよびSi-AFSの気孔率および圧縮強度はCBの総添加量によりコントロールが可能であると考えられる。

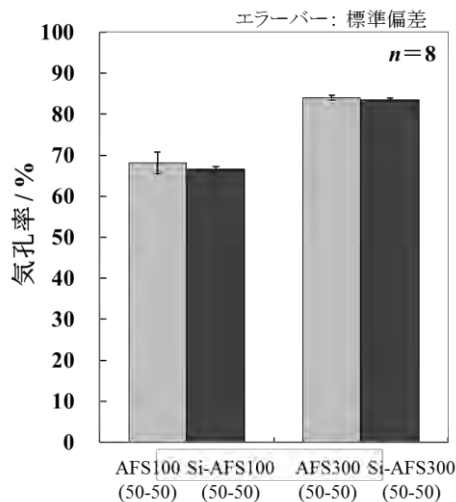


図2 AFSおよびSi-AFSの気孔率

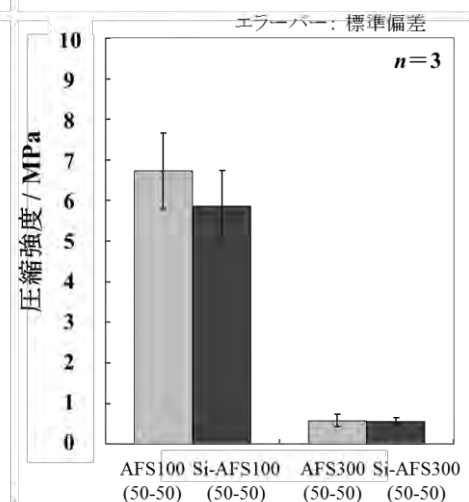


図3 AFSおよびSi-AFSの圧縮強度

3-2 RBMCsによる組織学的評価

RBMCsを一定期間培養したAFSおよびSi-AFSのHE染色による組織学的観察像を図4、ARS染色による組織学的観察像を図5に示す。図4より、スキヤフォルドの骨格に沿って、RBMCsが増殖している様子が確認された。また、播種初期の7dにおいて、AFS300シリーズの方がAFS100シリーズと比較して、細胞の存在が多く確認された。28dにおいて、AFS100(50-50)とSi-AFS100(50-50)を比較すると、細胞はSi-AFS100(50-50)の方がより多く増殖している様子が確認された。

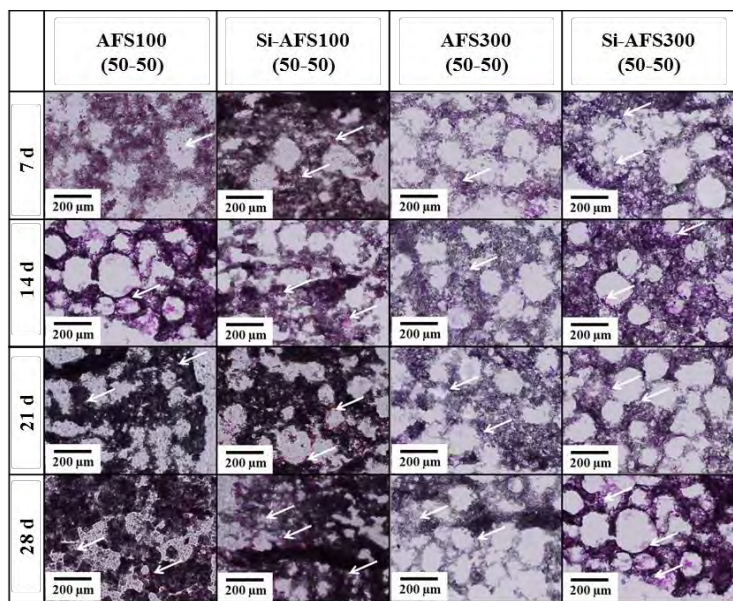


図4 RBMCsのHE染色による組織学的評価 (白矢印:RBMCs) 青色:細胞核 赤色:細胞質

図5より、7dの時点で、Si-AFS100(50-50)、AFS300(50-50)およびSi-AFS300(50-50)では、材料骨格上にカルシウムの存在が見られ、石灰化している様子が確認された。28dにおいて、石灰化箇所はSi-AFSの方がより多く確認された。細胞培養培地中へのイオン溶出量を測定すると、培地中の平均ケイ酸イオン濃度は、Si-AFS100(50-50)で0.0242 mM、Si-AFS300(50-50)で0.0183 mMであった。これは、細胞の増殖および骨形

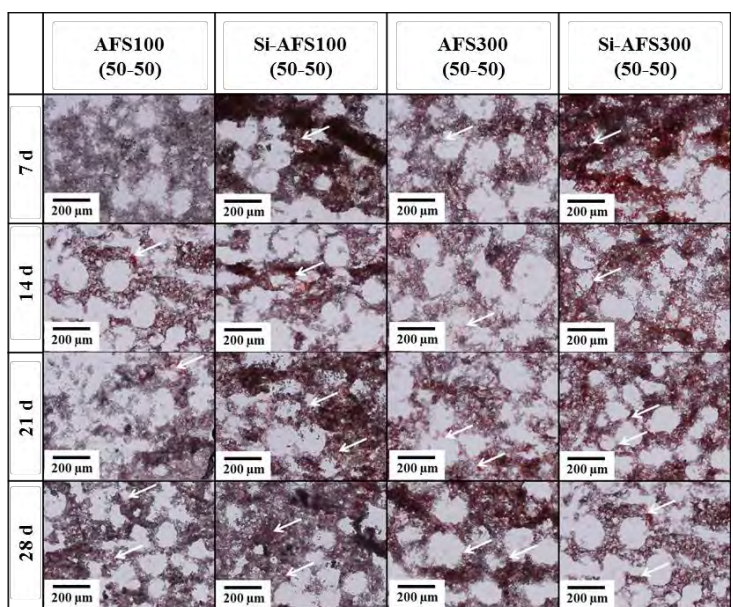


図5 RBMCsのARS染色による組織学的評価 (白矢印:石灰化部分) 橙色:カルシウム(石灰化)

成を促進すると報告されている 0.02 mM に近い値であることから、適度なケイ酸イオン濃度が RBMCs の増殖および石灰化を促進したと考えられる[5]。以上より、AFS へのケイ素の添加は、RBMCs の増殖および石灰化を促進すると考えられる。

3-3 脛骨埋入試料片の骨形成能評価

骨形成率を定量した結果を図 6 に示す。図 6 より、気孔率が同等の AFS100(50-50) と Si-AFS100(50-50) の骨形成率を比較すると、Si-AFS100(50-50) の方が約 1.2 倍骨形成率は高くなった。また、AFS300(50-50) と Si-AFS300(50-50) の骨形成率を比較すると、Si-AFS300(50-50) の方が、約 1.1 倍骨形成率は高くなった。4 種類のサンプルの中で最も骨形成率が高いサンプルは Si-AFS100(50-50) であった。したがって、気孔率が同等のスキュフォールドにおいて、ケイ素の添加が骨形成率の向上に影響することが分かった。

3-4 筋肉および脂肪埋入試料片の組織学的観察

筋肉に埋入した AFS および Si-AFS の HE 染色および MT 染色による組織学的観察結果を図 7a, 図 7b に示す。図 7a より、筋肉に埋入した AFS100(50-50) および Si-AFS100(50-50) の黒矢印部分において、骨組織の形成が見られた。一方で図 7b より、AFS300(50-50) および Si-AFS300(50-50) においては気孔内への線維性組織の侵入のみ確認され、骨組織の形成は見られなかった。以上の結果から、AFS100(50-50) および Si-AFS100(50-50) は骨誘導能を有すると考えられる。

脂肪に埋入したサンプルにおいては、すべてのサンプルで骨形成は見られなかった。これは気孔内への線維性組織の侵入により、骨組織の形成に必要な環境が失われた事によると考えられる。

4. 結論

AFS および Si-AFS の骨補填材への応用を指向し

て、RBMCs を用いた *in vitro* 評価およびクサビラオレンジ蛍光遺伝子導入ブタを用いた *in vivo* 評価を行なった。材料評価より AFS および Si-AFS は CB 焼失によるマクロポアやファイバー同士の絡み合いによるマイクロポアが存在し、細胞の三次元培養に適した材料だと考えられる。RBMCs 培養による組織

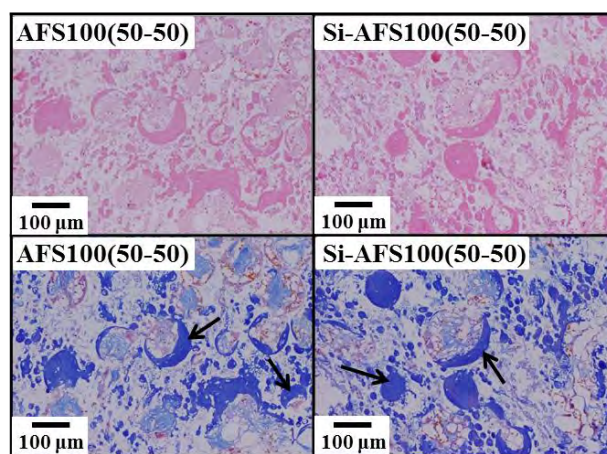
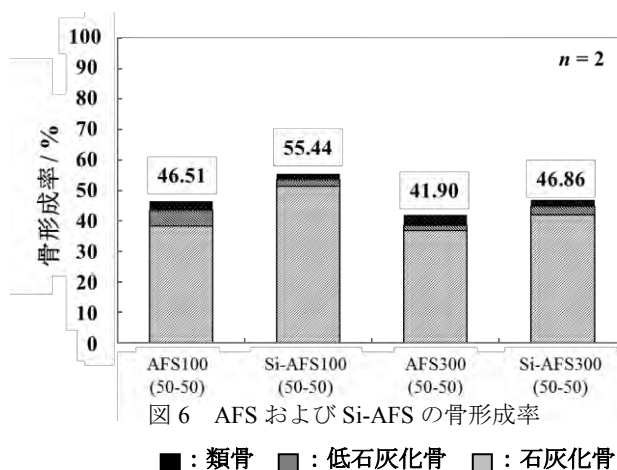


図 7a AFS100 および Si-AFS100 の組織学的観察
上図 HE 染色 青色：細胞核 赤色：細胞質
下図 MT 染色 青色：骨組織 赤色：筋線維

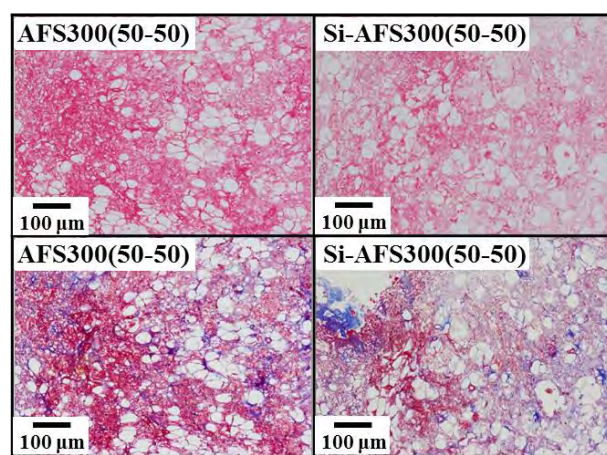


図 7b AFS300 および Si-AFS300 の組織学的観察
上図 HE 染色 青色：細胞核 赤色：細胞質
下図 MT 染色 青色：骨組織 赤色：筋線維

学的評価より AFS へのケイ素の添加は、RBMCs の増殖および石灰化を促進すると考えられる。また、クサビラオレンジ蛍光遺伝子導入ブタへの埋入による組織学的評価より AFS へのケイ素の添加は、骨伝導能を向上させると考えられる。以上の結果より、スキャフォールドへのケイ素の添加および最適な気孔率の制御が骨誘導能や骨伝導能を発現させ、骨形成の促進につながるものと結論できる。特に Si-AFS100(50-50) は今回調べたスキャフォールドのなかで最も高い骨伝導能をもち、骨誘導能を備えた良好な骨形成能をもつ材料であると考えられる。したがって、本研究で作製した Si-AFS は従来の AFS と比較して骨形成を促進させる足場材料として有効であると期待される。

5. 参考文献

- [1] M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 262-268(2004).
- [2] S. Motojima et al., *Bioceramics*, **22**, 177-180(2009).
- [3] Y. Kinoshita et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 101-104(2012).
- [4] H. Matsunari et al., *Cloning Stem Cells.*, **10**, 313-323(2008).
- [5] D. M. Reffitt et al., *Bone*, **32**, 127-35(2003).

6. 成果報告

* 口頭発表

- 1) ○T. Inui, Y. Kinoshita, K. Nakano, Y. Asano, H. Matsunari, M. Nagaya, M. Honda, H. Nagashima and M. Aizawa “Fabrication of Silicon-containing Apatite Fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property and their Bone-forming Ability in Hard and Soft Tissues”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, Discovery Kartika Plaza Hotel (Bali) 27th-29th, October 2015
- 2) ○乾 鷹羽, 木下友花里, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤 守 “ケイ素含有アパタイトファイバーによる高強度化スキャフォールドの作製とその骨形成能”, 第 129 回無機マテリアル学会, アバンセホール (佐賀) 2014 年 11 月 20-21 日
- 3) ○乾 鷹羽, 木下友花里, 中野和明, 浅野吉則, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤 守 “高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの骨芽細胞による *in vitro* 評価”, 第 131 回無機マテリアル学会, ウィンクあいち (愛知) 2015 年 11 月 5-6 日

* ポスター発表

- 1) ○乾 鷹羽, 木下友花里, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤 守 “高強度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの骨誘導能と骨伝導能の検証”, 第 36 回日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀 (東京) 2014 年 11 月 17-18 日

イノシトールリン酸のキレート能を利用した銀担持抗菌性ポリエーテルエーテルケトン インプラントの創製とその生体適合性

柿沼祐亮¹⁾・石井 賢²⁾・石濱寛子²⁾・本田 みちよ³⁾・戸山芳昭²⁾・松本守雄²⁾・相澤 守¹⁾

- 1) 明治大学工学部応用化学科
- 2) 慶應義塾大学医学部整形外科
- 3) 明治大学研究・知財戦略機構

Fabrication of anti-bacterial implants coated with silver-loaded hydroxyapatite and its biocompatibility

Hiroaki KAKINUMA¹⁾, Ken ISHII²⁾, Hiroko ISHIHAMA²⁾, Michiyo HONDA³⁾, Yoshiaki TOYAMA²⁾,
Morio MATSUMOTO²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University

3) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は骨欠損部の修復やその代替材料として最もよく利用されている材料である。また、銀イオンは、抗菌性金属の一つであり、広い抗菌スペクトルを有し、かつ薬剤耐性菌を生じにくいとされている。そこで、我々はこれまでに生体内を模倣した環境下で純チタン上に HAp をコーティングし、その表面にキレート能を有するイノシトールリン酸 (IP6) を用いて銀イオンを固定化させることで「抗菌性チタンインプラント」の開発に成功している[1-2]。

本研究では、基板を整形外科領域で注目されているポリエーテルエーテルケトン (PEEK) に代え、同様なコーティングプロセスを用いて銀イオンを修飾し、得られた材料の特性を調査した。ついで、作製した材料の細胞毒性を評価するとともに、ウサギ脛骨に材料を埋入し、生体骨との親和性を組織学的に評価したため報告する

2. 実験方法

2-1 銀担持アパタイト被覆 PEEK の作製および材料特性評価

PEEK 基板を濃硫酸に 10 分間浸漬し、純水で洗浄後、既報に従って HAp のコーティングを行なった。HAp 被膜は 110 °C に加熱した基板を尿素とウレアーゼを含む生体擬似体液 (SBF) に投入し、1 日おきに溶液を交換しながら 1 週間静置して得た。HAp を被覆後、IP6 水溶液 (1000 ppm) に 50 °C で 24 時間浸漬させ、純水で洗浄した。さらに、硝酸銀水溶液に 10 分浸漬させて銀イオンを固定した[1]。使用した硝酸銀水溶液の濃度は 0.5, 1, 5, 10 mol·dm⁻³ であり、それらに対応して試験片の略称名を Ag (0.5), (1), (5), (10) とした。得られた試験片の材料特性を薄膜 X 線回折法 (TF-XRD)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) などを用いて調べ、誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) によ

り銀の定量を行なった。

2-2 Transwell® 細胞培養試験

骨芽細胞様樹立株 (MC3T3-E1) に対する毒性試験を、Transwell® を用いた間接培養試験により評価した。MC3T3-E1 を細胞密度 $3 \times 10^4 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ に調製した細胞懸濁液 2 cm^3 を 12 孔プレートに播種し、24 時間予備培養を行なった。培養後、Transwell® 内に作製した試験片を設置し 1, 3 日目における増殖性を調査した。細胞の増殖性は、ウェルプレート上に直接培養した条件を Control として比較し、相対細胞増殖率から評価した。さらに、試験後の培地を回収し、ICP-AES を用いて銀イオン濃度を測定した。

2-3 ウサギ脛骨埋入試験

In vivo 評価では、PEEK 線材 ($2 \text{ mm} \phi \times 6 \text{ mm}$) を基材とし、同様な方法でコーティングを施した材料を用いた。試験片をウサギ脛骨端部に対し垂直に埋入し、8 週間後における検体の非脱灰研磨標本を作製しピラヌエバボン染色から組織学的所見を得た。今回の評価に用いた材料は、HAp-coated, Ag (0.5), Ag (1), Ag (5) に加え、濃硫酸酸処理を施していない Non-treated PEEK および酸処理を施した Acid-treated PEEK をコントロールサンプルとして埋入した。

3. 実験結果と考察

3-1 銀担持アパタイト被覆 PEEK の特性評価

HAp 被覆 PEEK 基板表面の結晶相を TF-XRD を用いて調べたところ、基板の回折線のほかに HAp に帰属される回折線が確認された。その HAp 被膜上に IP6 を表面修飾して硝酸銀水溶液に浸漬した試験片の SEM 観察画像を Fig. 1 に示す。SBF 浸漬により特徴的な半球状 HAp 凝集体が観察された。さらに、EDX 定性分析より、これらが銀を含有していることが分かった。

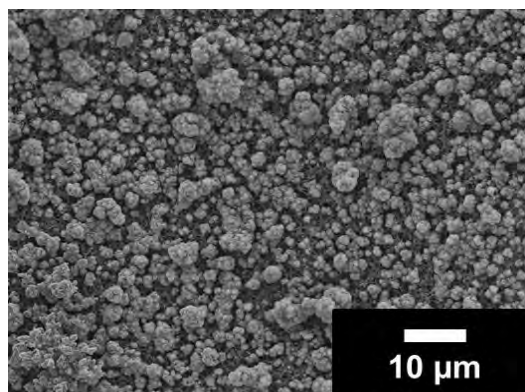


Fig. 1 試験片の表面形態画像

3-2 Transwell® 細胞培養試験

Transwell® 試験後の Control に対する相対細胞増殖率を Fig. 2 に示す。Ag (5) および Ag (10) は、培地中への銀イオン溶出により細胞数の減少がみられた。一方、Ag (0.5) および Ag (1) は、高い相対増殖率を示し、骨芽細胞の増殖をほとんど阻害しないことが分かった。また、このときの培地中の銀イオン濃度は、約 1.3 ppm 以下であることが分かった。

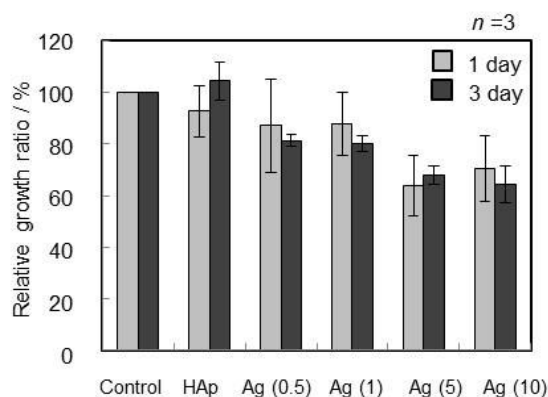


Fig.2 Control に対する細胞相対増殖率

3-3 生体硬組織適合性評価

取り出した検体から作製した非脱灰研磨標本について画像解析を行ない、骨形成を評価した。インプラント周囲における石灰化骨面積を **Fig. 3** に示す。

In vivo 評価から、Ag (0.5) および Ag (1) より溶出された銀イオンは骨形成に対し著しい悪影響を及ぼすことなく、高い骨親和性を有することが分かった。したがって、本溶液プロセス法で作製した材料は、最適な銀担持濃度を設定することで、抗菌性と生体適合性を兼ね備えた新しい抗菌性医療材料として期待できる。

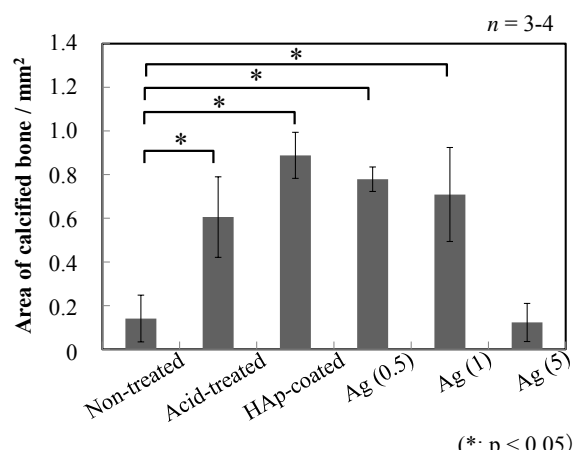


Fig. 3 インプラント周囲における石灰化骨面積

4. 参考文献

- [1] J. Nozaki, M. Aizawa, H. Uchida, K. Itatani, H. Suemasu, A. Nozue, I. Okasa, M. matsumoto, H. Matsumoto and Y. Toyama, *Key Eng. Mater.*, **240-242**, 603-606 (2003).
- [2] 日本特許, 特開 2010-268917 号.

5. 本研究に関する成果報告

*論文投稿 (査読つき Proceedings 含む)

H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto, M. Aizawa, “Anti-bacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: processing, material characterization, cytotoxicity and anti-bacterial properties”, *J. Biomed. Mater. Res.*, in press.

*学会発表 (国際会議)

(1) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, Y. Toyama, M. Matsumoto, M. Aizawa, “Anti-bacterial property of polyetheretherketone implants immobilized with Ag⁺ ion on the basis of chelate-bonding ability of inositol phosphate”, The Seventh International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-7), Mielparque-Yokohama, Kanagawa, Japan, 19th-21th, June 2013.

(2) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, Y. Toyama, M. Matsumoto, M. Aizawa, “Fabrication of anti-bacterial polyetheretherketone implants immobilized with Ag⁺ ion on the basis of chelate-bonding ability of inositol phosphate and their material properties”, 13th Asian BioCeramics (ABC2013) Symposium, Kyoto University, Kyoto, 4th-6th, December, 2013.

*学会発表 (国内会議)

(3) 柿沼祐亮, 石井 賢, 石濱寛子, 戸山芳昭, 松本守雄, 相澤 守, “銀担持アパタイトを被覆したポリエ

ーテルエーテルケトンインプラントの創製とその抗菌特性”, 公益社団法人日本セラミックス協会 2013 年秋季シンポジウム, 信州大学, 長野, 2013 年 9 月 4 日-6 日.

(4) 柿沼祐亮, 石井 賢, 石濱寛子, 本田 みちよ, 戸山芳昭, 松本守雄, 相澤 守, “イノシトールリン酸のキレート能を利用した銀担持アパタイトによる抗菌性インプラントの創製とその生体適合性”, 公益社団法人日本セラミックス協会 2014 年年会, 慶應義塾大学, 日吉キャンパス, 2014 年 3 月 17 日-19 日.

二極化した細孔構造をもつ水酸アパタイト多孔質セラミックスへの
イノシトールリン酸の表面修飾および銀イオンの固定化による抗菌性付与

鶴見秀平¹⁾・間 暁啓¹⁾・本田みちよ²⁾・石井 賢³⁾・松本守雄³⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学 理工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機構

3) 慶應義塾大学 医学部整形外科

**Surface modification of inositol phosphate to porous hydroxyapatite ceramics with bimodal pore structure
and addition of antibacterial property by immobilization of silver ions**

**Shuhei TSURUMI¹⁾, Kyokei HAZAMA¹⁾, Michiyo HONDA²⁾, Ken ISHII³⁾,
Morio MATSUMOTO³⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾**

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

3) Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

1. 緒言

近年の医療業界では、人工関節や人工骨といったインプラント材料が広く普及している。このようなインプラント材料が広く普及した一方で問題となっているのは「術後感染」である。インプラント材料を埋入した後に手術部位から細菌感染を引き起こし、病状が悪化することが懸念されている。そのため、インプラント材料に抗菌性を付与する研究が広く行なわれており、銀や亜鉛などの金属イオンや抗生物質など多くの抗菌剤が利用されている[1]。その中でも銀イオンは高い抗菌能と広い抗菌スペクトルを有し、かつ比較的毒性が低いため多く利用されている。

当研究室では、金属チタンの基板を生体擬似体液に浸漬させ、水酸アパタイト (HAp) を被覆したアパタイトコーティングチタンを作製し、さらにキレート能を有するイノシトールリン酸 (IP6) を用いて抗菌剤である銀イオンを付与することに成功している[2-3]。さらに、材料基板にポリエーテルエーテルケトン (PEEK) を使用し、同様のプロセスを用いて銀担持アパタイト被覆 PEEK を開発することに成功している[4]。また、当研究室ではアパタイトファイバー (AF) を合成し、気孔形成材としてカーボンビーズ (CB) を用いてアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) を作製し、その生体適合性を調査してきた。その結果、一部の条件で作製したスキャフォールドにおいて異所骨形成が認められ、その AFS は骨誘導能を備えていることがわかった[5]。この材料は十分な機械的強度を有しており、人工骨材料としての利用も可能であると考えられる。

本研究では、上記の二点の知見から抗菌性を備えた新規人工骨材料を創製することを目的とする。AF から多孔質 HAp セラミックスを作製し、IP6 溶液および硝酸銀溶液により表面修飾を施し、その材料特性、抗菌性および細胞毒性を調査したので報告する。

2. 実験方法

1) 銀イオン担持セラミックスの作製

均一沈殿法により AF を合成し、既報[5]に従って高強度化 AFS を作製した。CB は、AF に対し質量比で等量添加した。以下、これを「多孔質 HAp セラミックス」と表記する。作製した多孔質 HAp セラミックスは IP6 により表面修飾し、さらに銀イオンを担持して「銀イオン担持セラミックス」とした。多孔質 HAp セラミックス (~15 mm ϕ ×~2.1 mm、気孔率：~74%) を 1000 ppm IP6 溶液 3 cm³ に浸漬し、15 分間減圧脱気を行なった。脱気後、セラミックスは IP6 溶液に浸漬したままインキュベーター内で 37°C、24 h 静置した。表面修飾後のセラミックスは超純水で洗浄し、10 mM 硝酸銀溶液 3 cm³ に浸漬し、15 分間減圧脱気を行なった。浸漬後、セラミックスを再び超純水で洗浄した。このようにして得られた試料の材料特性を粉末 X 線回折法 (XRD)、走査型電子顕微鏡法 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX)、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) により評価した。

2) 銀イオン担持セラミックスの抗菌性評価

グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*, IAM 1011) を多孔質 HAp セラミックス (~15 mm ϕ ×~2.1 mm、気孔率：~74%) および銀イオン担持セラミックス (~16 mm ϕ ×~2.2 mm、気孔率：~77%) 上で培養し、バイオフィーム形成試験を行なった。*S. aureus* は LB 培地中で前培養し、 5×10^7 CFU·cm⁻³ となるように懸濁液を調製した。試験に用いる試料は乾熱滅菌後 24 ウェルプレートに設置し、菌懸濁液 1.2 cm³ を添加してインキュベーター内で 25°C、24h 静置した。培養後の試料は LIVE/DEAD[®] BacLight staining kit を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。この染色法では、生菌を緑色に、死菌を赤色に染色するため、試料上での培養直後の細菌の状態を知ることができる。培養時に用いた培地は ICP-AES によって分析し、培地中に溶出した銀イオン量を定量した。

また、同様の試料の *S. aureus* に対する抗菌性を評価するために、阻止円試験を実施した。*S. aureus* は LB 培地中で前培養し、 1×10^7 CFU·cm⁻³ となるように懸濁液を調製した。LB 培地 100 cm³ に対して寒天 1 g を加えて溶解した「トッパアガー含有 LB 培地」を調製し、この中に菌懸濁液 0.1 cm³ を加えた。次いで LB 寒天培地 5 cm³ 上に乾熱滅菌した試料を設置し、その上から菌懸濁液を含んだトッパアガー含有 LB 培地を流し込み、固化するまで静置した。その後インキュベーター内で 37°C、48 h 培養し、培養後に試料の周囲に形成された阻止円を観察した。

3) 銀イオン担持セラミックスの細胞毒性評価

Transwell[®]培養キットを用いて、銀イオン担持セラミックスの存在下で MC3T3-E1 細胞を間接培養させた時の細胞への影響を調査した。MC3T3-E1 細胞 6×10^4 個を 12 ウェルプレートに播種し、ウシ胎児血清を 10 vol% 添加した最小必須培地中(α -MEM)で 37°C、5%CO₂ 雰囲気下で 24 h 予備培養を行なった。培養後、培地を除去し、Transwell[®]内に乾熱滅菌した試料を設置して新たに培地を 1.8 cm³ 添加し、さらに培養を続けた。試料は多孔質 HAp セラミックス (~3.7 mm ϕ ×~8.7 mm、気孔率：~72%) および銀イオン担持セラミックス (~3.7 mm ϕ ×~8.4 mm、気孔率：~72%) を使用し、あらかじめ 24 ウェルプレート内の培地 0.8 cm³ 中で減圧脱気を 30 min 行なった。試料を設置して 1 および 3 日後にトリプシン処理を行ない、プレート上の細胞を剥がして細胞数をカウントした。なお、試料を設置してからは、培地交換を

行なわなかった。また、ポリスチレンプレート上での培養結果を Control として比較した。各日数での細胞数から、以下の式を用いて相対増殖率を算出した。

$$\text{相対増殖率(\%)} = \frac{\text{(試料共存下で1または3日間培養後の細胞数/プレートに播種した細胞数)}}{\text{(Controlで1または3日間培養後の細胞数/Controlに播種した細胞数)}} \times 100$$

さらに、各日数で回収した培地に溶出していた銀イオンを ICP-AES により定量した。

3. 結果と考察

1) 銀イオン担持セラミックスの材料特性

XRD による結晶相の同定の結果、AF、多孔質 HAp セラミックスおよび銀イオン担持セラミックスの結晶相はいずれも HAp 単一相であり、IP6 の表面修飾および銀イオンの担持によって結晶相は変化しなかった。図 1 に、多孔質 HAp セラミックスおよび銀イオン担持セラミックス表面の SEM 像を示す。SEM による微細構造観察では、銀イオン担持セラミックスの表面形態に一部変化が見られた。しかし、マクロ気孔およびミクロ気孔が確認されたことから、表面修飾後も多孔質 HAp セラミックスの気孔構造は維持されているものと考えられる。

図 2 に、銀イオン担持セラミックス表面および断面の EDX スペクトルを示す。EDX による定性分析の結果、銀イオン担持セラミックスの表面から HAp に由来するカルシウム、酸素およびリンの他に銀が検出された。このことから、銀イオンは試料表面に担持されていることが明らかになった。ICP-AES による定量分析では、銀イオン担持セラミックスには単位質量あたり約 1.32 mg の銀が担持されていることがわかった。

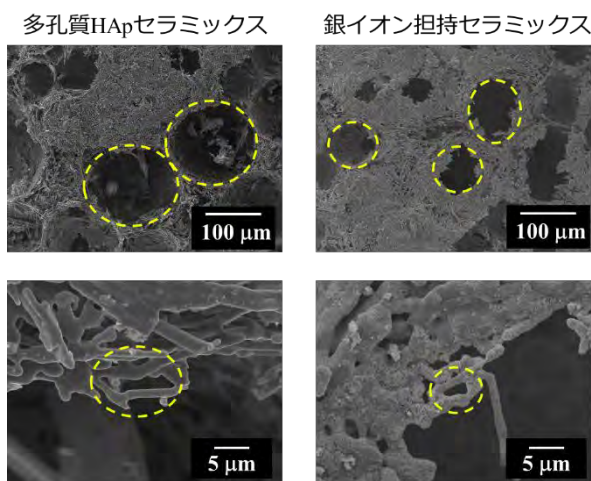


図 1. 各セラミックスの微細構造観察
(上段：マクロ気孔、下段：ミクロ気孔)

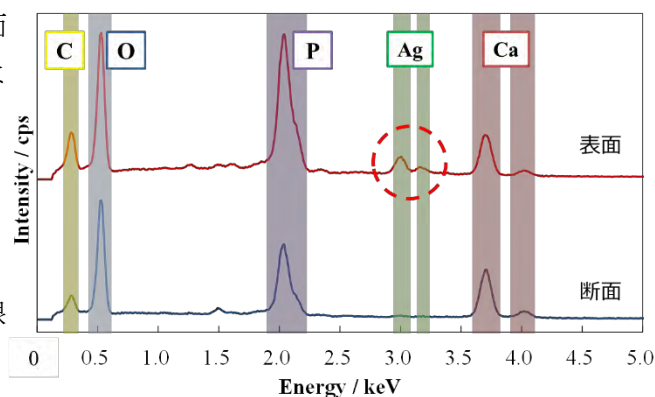


図 2. 銀イオン担持セラミックスの EDX スペクトル

2) 銀イオン担持セラミックスの抗菌性評価

LIVE/DEAD[®] BacLight staining kit による蛍光観察の結果を図 3 に示す。多孔質 HAp セラミックス上では、緑色に染色された生菌が多く見られた。一方、銀イオン担持セラミックス上では生菌の数が大幅に減少しており、ほとんど観察されなかった。このことから、銀イオン担持セラミックス上での *S. aureus* の成育が抑制されていることが明らかとなった。ICP-AES による定量分析の結果、培養後の培地には約 6.63 ppm の銀イオンが溶出していたことから、培地中に溶出した銀イオンが *S. aureus* の成育を阻害していると考えられる。また、いずれの試料上でも赤色に染色された死菌はほとんど観察されなかった。LIVE/DEAD[®] BacLight staining kit は、全ての細菌を標識する緑色蛍光色素である SYTO[®] 9 と膜を損傷し

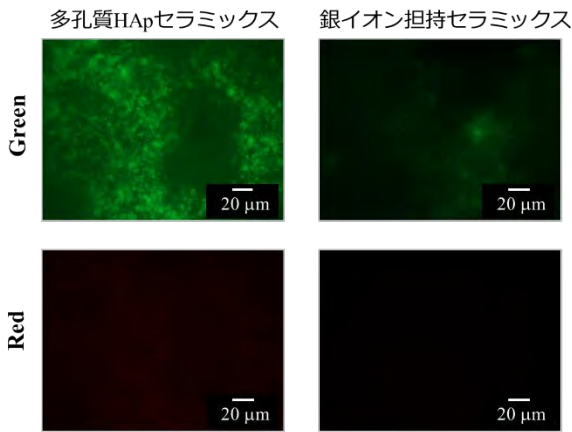


図 3. LIVE/DEAD® 染色による蛍光観察

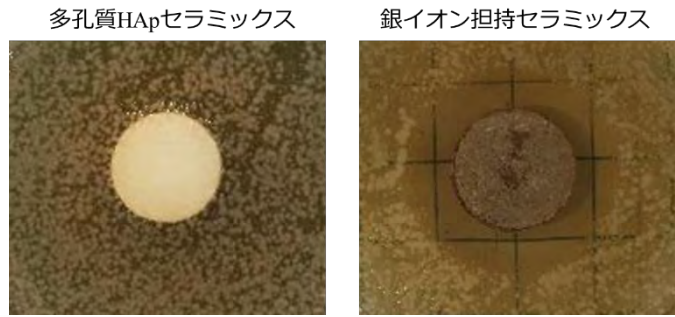


図 4. 阻止円試験の結果

た細菌にのみ透過する赤色蛍光色素であるヨウ化プロピジウムから成り、二つの色素が同時に存在した場合に緑色蛍光が减弱し、赤色蛍光を示すようになって

いる。Jung らは、0.2 ppm の銀イオン溶液にさらされた *S. aureus* の細胞膜が細胞壁から分離し、その結果細胞質が周囲に放出されたと報告している[6]。実験後の培地中の銀イオン濃度は 0.2 ppm を上回っているため同様の現象が起きていると考えられ、また細胞質が流出するほどの損傷では、蛍光色素も細胞外に流出していると考えられる。そのため、死細菌は赤く染色されず観察されなかったと考えられる。

阻止円試験の結果を図 4 に示す。銀イオン担持セラミックスの周囲で阻止円が形成され、*S. aureus* の成育が阻害されていた。これは、試料表面から溶出した銀イオンの効果によるものだと考えられ、銀イオン担持セラミックスは材料表面への *S. aureus* の付着を防ぐことが出来ると考えられる。

3) 銀イオン担持セラミックスの細胞毒性評価

Transwell®を用いて試料と M3CT3-E1 細胞を間接培養させた時の細胞数と相対増殖率を図 5、図 6 に示す。なお、図 5 および 6 において多孔質 HAp セラミックスは「HAp」、銀イオン担持セラミックスは「Ag⁺」と表記する。銀イオン担持セラミックスの共存下では、培養開始から 3 日目での細胞数が大幅に減少しており、Control と比較した時の相対増殖率は 40%程度だった。また、培養開始 3 日目の培地中の銀イオン量を ICP-AES により定量したところ約 1.39 ppm の銀イオンが溶出していた。柿沼らは、同様の条件で行なった細胞毒性試験において、細胞毒性を示さない銀イオン濃度は 1.3 ppm 以下であると報告している[4]。これより、今回作製した銀イオン担持セラミックスは細胞毒性を示すおそれがあることがわかった。今後の調査において エラーバー：標準偏差, n=3

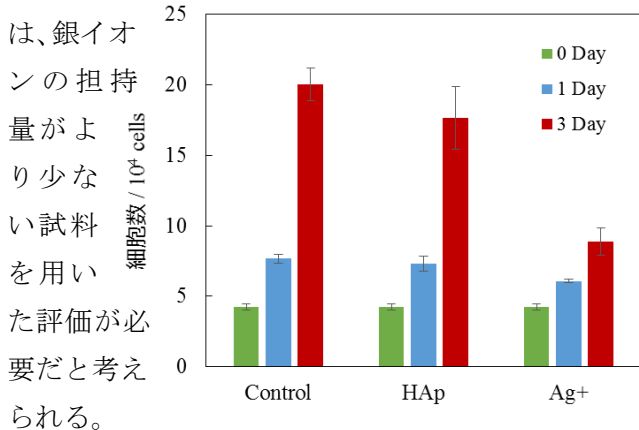


図 5. 各培養日数における細胞数

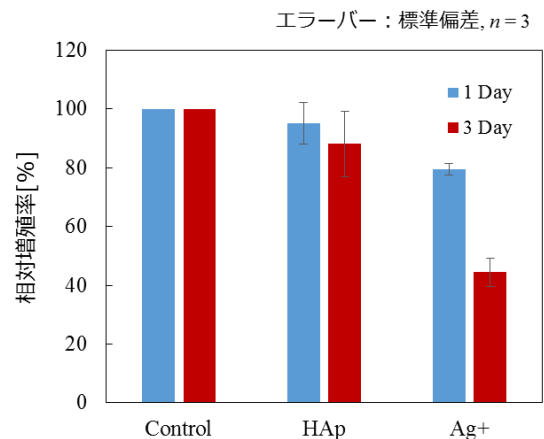


図 6. 各培養日数における相対増殖率

4. 結論

多孔質 HAp セラミックスに対して IP6 による表面修飾および銀イオンの固定化を行ない、抗菌性の付与を試みた。EDX による分析の結果、作製した銀イオン担持セラミックスの表面から銀が検出され、ICP-AES による定量分析の結果、単位質量あたり約 1.32 mg の銀が固定化されていることが明らかになった。バイオフィーム形成試験では銀イオン担持セラミックス上において *S. aureus* の成育が阻害されており、また阻止円試験では銀イオン担持セラミックスの周囲で *S. aureus* の成育が妨げられていた。一方、銀イオン担持セラミックスの存在下で MC3T3-E1 細胞を培養した結果、銀イオン担持セラミックスが細

胞増殖を阻害することが示唆された。以上のことから、本研究で作製した銀イオン担持セラミックスは *S. aureus* に対する抗菌性を有するが、細胞増殖を阻害する可能性がある。今後、銀イオンの担持量を変化させることで、抗菌性を有しつつ細胞毒性を示さない条件を検討することが必要である。

5. 参考文献

- [1] J. Gallo, M. Holinka and C. S. Moucha, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 13849-13880 (2014).
- [2] J. Nozaki, M. Aizawa, H. Uchida, K. Itatani, H. Suemasu, A. Nozue, I. Okasa, M. Matsumoto, H. Matsumoto and Y. Toyama, *Key Eng. Mater.*, **240-242**, 603-606 (2003).
- [3] 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** (2), 733-741 (2012).
- [4] H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, *J. Biomed. Mater. Res.*, **103A**, 57-64 (2015).
- [5] S. Motojima, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama and M. Aizawa, *Bioceramics*, **22**, 177-180 (2009).
- [6] W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim and Y. H. Park, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2171-2178 (2008).

6. 成果報告

*口頭発表

- 1) ○鶴見秀平, 本田みちよ, 石井 賢, 松本守雄, 相澤 守 “二極化した細孔構造をもつ水酸アパタイト多孔質セラミックスへのイノシトールリン酸の表面修飾および銀イオンの固定化による抗菌性付与”, 日本セラミックス協会第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学 五福キャンパス (富山県) 2015 年 9 月 17 日

アパタイト/コラーゲン多孔体への銀イオンの固定化とその抗菌性

鶴見秀平¹⁾・本田みちよ²⁾・高山知士³⁾・中島武彦³⁾・石井 賢⁴⁾・松本守雄⁴⁾・相澤 守¹⁾

- 1) 明治大学 理工学部応用化学科
- 2) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 3) HOYA Technosurgical 株式会社
- 4) 慶應義塾大学 医学部整形外科

The antibacterial effects of the immobilization of silver ions on porous hydroxyapatite/collagen composites

Shuhei TSURUMI¹⁾, Michiyo HONDA²⁾, Tomoji TAKAYAMA³⁾, Takehiko NAKAJIMA³⁾, Ken ISHII⁴⁾,
Morio MATSUMOTO⁴⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

3) HOYA Technosurgical Co., Ltd.

4) Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Keio University

1. 緒言

骨に類似した構造と化学組成を有する水酸アパタイト/コラーゲン (HAp/Col) 複合体からなる多孔質材料は、自家骨と同様の骨リモデリングサイクルに取り込まれる生体吸収性材料であり、骨欠損部への補填材として既に臨床応用されている[1]。しかし、一般的にこのような生体材料は抗菌性を持たないため術後感染を生じる可能性があり、手術部位から細菌感染を引き起こし病状が悪化することが懸念されている。そのため、インプラント材料に抗菌性を付与する研究が広く行なわれており、銀や亜鉛などの金属イオンや抗生物質など多くの抗菌剤が利用されている[2]。その中でも銀イオンは高い抗菌活性と広い抗菌スペクトルを有し、かつ比較的毒性が低いため多く利用されている。

当研究室では、金属チタンの基板を生体擬似体液に浸漬させ、HAp を被覆したアパタイトコーティングチタンを作製し、さらにキレート能を有するイノシトールリン酸 (IP6) を用いて抗菌剤である銀イオンを付与することに成功している[3-4]。さらに、材料基板にポリエーテルエーテルケトン (PEEK) を使用し、同様のプロセスを用いて銀担持アパタイト被覆 PEEK を開発することに成功している[5]。

本研究では、上記の知見をもとに抗菌性を備えた HAp/Col 多孔質材料を創製することを目的とする。HAp/Col 多孔体に IP6 を利用して銀イオンを固定化する際の実験条件を検討するとともに、得られた材料の材料特性および抗菌性を調査したので報告する。

2. 実験方法

1) 銀イオン担持リフィットの作製

HAp/Col 多孔体に IP6 および銀イオンによる表面修飾処理を行ない、銀イオン担持 HAp/Col 多孔体を作製した。提供された HAp/Col 多孔体「リフィット[®]」(10×10×10 mm³) を 1000 ppm IP6 溶液 20 cm³ に浸漬し、脱気した。浸漬したリフィット[®]は 50 °C のインキュベーター内で 24 h 静置し、取り出した後超純水で洗浄した。

次いで、リフィット®を硝酸銀溶液20 cm³に浸漬し、脱気して10分間静置した。硝酸銀溶液の濃度は0 mM, 1 mM, 10 mMの三種類とした。取り出して超純水で洗浄し、50 °Cのインキュベーター内で24 h 静置し乾燥させて「銀イオン担持リフィット」(10×10×9 mm³)を得た。以下、得られた銀イオン担持リフィットはAg-ReFit (x) と表記する。ここで、xは硝酸銀溶液の濃度 [mM] を表す。このようにして得られた試料の材料特性を粉末 X 線回折法 (XRD)、走査型電子顕微鏡法 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX)、誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICP-AES) により評価した。

2) 銀イオン担持リフィットの抗菌性評価

銀イオン担持リフィットの黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*; *S. aureus*, IAM 1011) に対する抗菌性を評価するために、阻止円試験を実施した。*S. aureus* はLB培地中で前培養し、 1×10^7 CFU cm⁻³となるように懸濁液を調製した。LB培地 100 cm³に対して寒天1 gを加えて溶解した「トップアガー含有LB培地」を調製し、この中に菌懸濁液0.1 cm³を加えた。次いでLB寒天培地5 cm³上に乾熱滅菌した試料(10×10×2 mm³)を設置し、その上から菌懸濁液を含んだトップアガー含有LB培地を流し込み、固化するまで静置した。その後インキュベーター内で37 °C、48 h 培養し、培養後に試料の周囲に形成された阻止円を観察した。

3. 結果と考察

1) 銀イオン担持リフィットの材料特性

XRDによる結晶相の同定の結果、銀イオン担持リフィットに含まれるHApの結晶相はIP6表面修飾前後で変化していなかった。図1に、リフィット®およびIP6表面修飾後のリフィット表面の形態を観察したSEM像を示す。IP6による表面修飾の前後で、微細構造に大きな変化は見られなかった。図2に、銀イオン担持リフィットの表面および内部のSEM像を示す。こちらも銀イオンの担持による表面お

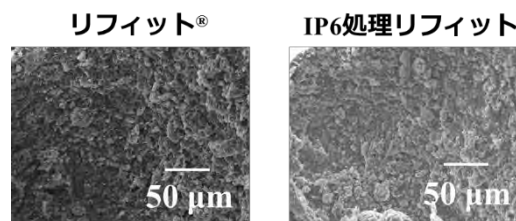


図1. IP6による表面修飾処理前後のリフィットの表面形態観察

よび内部の形態の変化は認められなかった。次に、図3に、Ag-ReFit (10) の表面および内部のEDX スペクトルを示す。EDXによる定性分析の結果、Ag-ReFit (10) の表面および断面において銀が検出された。同様の定性分析をそれぞれの試料に対して実施した結果を表1に示す。この結果から、Ag-ReFit (1) の表面に、またAg-ReFit (10) の表面および内部に銀イオンが担持されたことが明らかになった。さらにICP-AESを用いた定量分析から、

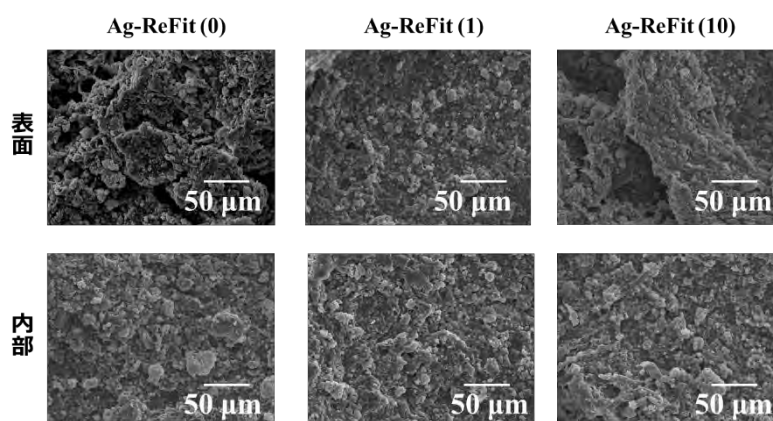


図2. 銀イオン担持リフィットの微細構造観察

Ag-ReFit (1) には単位質量あたり約0.32 mg、またAg-ReFit (10) には単位質量あたり約1.71 mgの銀イオンが担持されており、表面修飾に用いた硝酸銀溶液の濃度の上昇にしたがって銀イオンの担持量も増加することが明らかとなった。このことから、担持する銀イオン量のコントロールが可能だと考えられる。

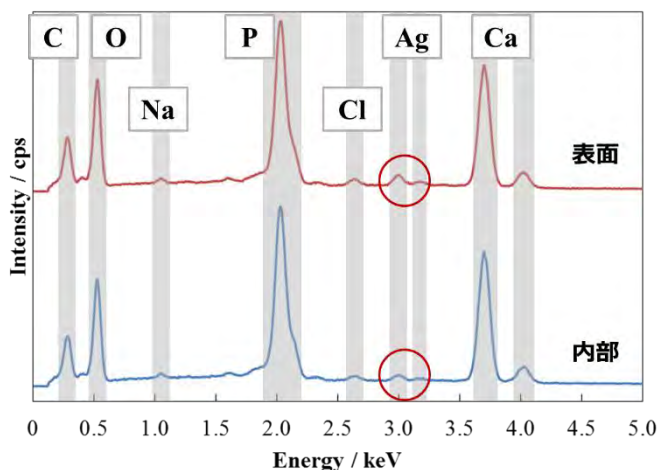


表 1. EDX による銀の定性分析の結果

試料	表面	内部
Ag-ReFit (0)	×	×
Ag-ReFit (1)	検出	×
Ag-ReFit (10)	検出	検出

図 3. Ag-ReFit (10) の表面および内部の EDX スペクトル

2) 銀イオン担持リフィットの抗菌性評価

阻止円試験の結果を図4に示す。Ag-ReFit (0) の周囲では *S. aureus* が成育していたのに対して、Ag-ReFit (1) および Ag-ReFit (10) の周囲では阻止円が形成され、*S. aureus* の成育が阻害されていた。これは、試料表面から溶出した銀イオンの効果によるものだと考えられ、銀イオン担持リフィットは材料表面への *S. aureus* の付着を抑制出来ると考えられる。

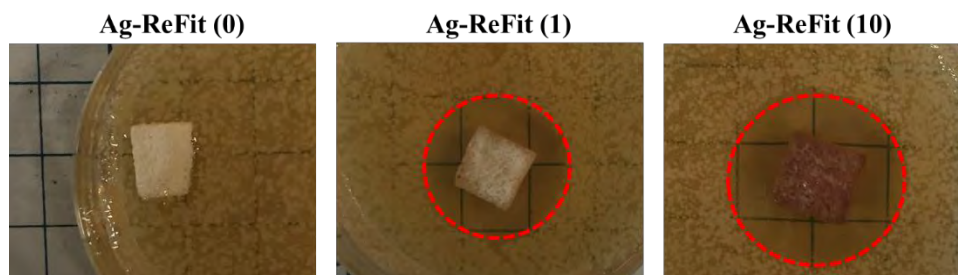


図 4. *S. aureus* に対する阻止円試験の結果

4. 結論

HAp/Col 多孔体に IP6 および銀イオンによる表面修飾処理を行ない、抗菌性の付与を試みた。表面修飾後、結晶相や微細構造の変化は見られなかった。EDX による定性分析の結果、銀イオン担持リフィットの表面および内部に銀イオンが担持されていることが明らかとなり、ICP-AES による定量分析から銀イオンの担持量は硝酸銀溶液の濃度の上昇に従って増加することがわかった。このことから、銀イオン担持量は表面修飾条件を変更することでコントロールできると考えられる。また、*S. aureus* に対する阻止円試験では、銀イオン担持リフィットの周囲に阻止円が形成され、*S. aureus* の成育が阻害されていた。このことから、銀イオン担持リフィットは *S. aureus* の材料への付着を抑制できると考えられる。今後の調査では、グラム陰性菌に対する抗菌性の評価や銀イオンの溶出による細胞毒性の評価が必要だと考えられる。

5. 参考文献

- [1] M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya and J. Tanaka, *Biomaterials*, **22**, 1705-1711 (2001).
- [2] J. Gallo, M. Holinka and C. S. Moucha, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 13849-13880 (2014).
- [3] J. Nozaki, M. Aizawa, H. Suemasu, H. Uchida, K. Itatani, A. Nozue, I. Okada, M. Matsumoto, H. Matsumoto and Y.

Toyama, *Key Eng. Mater.*, **240-242**, 603-606 (2003).

[4] 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 (2)**, 733-741 (2012).

[5] H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto and M. Aizawa, *J. Biomed. Mater. Res.*, **103A**, 57-64 (2015).

6. 成果報告

*ポスター発表

1) ○鶴見秀平, 本田みちよ, 高山知士, 中島武彦, 石井 賢, 松本守雄, 相澤 守 “アパタイト/コラーゲン多孔体への銀イオンの固定化とその抗菌性”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都府) 2015年11月10日

2) ○Shuhei Tsurumi, Michiyo Honda, Tomoji Takayama, Takehiko Nakajima, Ken Ishii, Morio Matsumoto and Mamoru Aizawa “Immobilization of silver ions to porous hydroxyapatite / collagen composites and its anti-bacterial activity”, 15th Asian BioCeramics symposium, 東京医科歯科大学 湯島キャンパス (東京都) 2015年12月10日, Best Student SCMBB Awards 受賞

窒素ドーピングにより改質した水酸アパタイトセラミックスの表面特性

梅田 遼¹⁾・奥山 慧¹⁾・渡邊友亮¹⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学大学院 理工学研究科 応用化学専攻

Fabrication of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and its surface characterization

Ryo UMEDA¹⁾, Satoshi OKUYAMA¹⁾, Tomoaki WATANABE¹⁾, Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

現在、骨腫瘍や骨折などにより生じた骨欠損部の再建には、金属材料、高分子材料、セラミックス材料が用いられている。セラミックス材料の中でも、水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は生体親和性が高く、生体骨と直接結合する骨伝導能を有しているといった特徴的な性質より、生体材料としての応用研究が活発に行われている。そもそも HAp は、哺乳類の生体硬組織の主要無機成分であり、その優れた生体適合性のため HAp セラミックスは人工骨や人工歯根といった硬組織代替材料として広く臨床応用されている[1]。

改めて、生体骨における生物学的アパタイトと人工骨としての HAp セラミックスを比較してみると、生体骨には HAp 以外にも多種多様のイオンを含んでいることが分かっている。その量や種類は年齢や部位によって異なるが、HAp 中には微量の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cl^- , F^- , CO_3^{2-} が存在し、その結晶構造には多くの欠陥構造や歪みが存在している。欠陥構造は生体材料において重要な要因であり、また生体材料の表面特性は実質的に生体組織に影響を与える。そこで、HAp セラミックス表面に生体骨を模したような欠陥構造を導入し、表面特性を向上させる必要があると考える。

材料に欠陥構造を導入する手法として、窒素ドーピング法がある。この方法は、主に光触媒材料の機能向上のために用いられている方法であり、材料表面の化学構造を変化することができる[2]。その一つの手法としては、材料を高温のアンモニア下におくことで、表面に窒素がドーピングされる。本研究では、HAp セラミックスに窒素ドーピング法を適用することで、セラミックス表面を改質し、欠陥構造の導入を試みた。

したがって、本研究の目的は欠陥構造を導入した HAp セラミックスの創製と、その表面特性の調査である。HAp セラミックス焼結体の表面を窒素ドーピング法により改質し、各種キャラクターゼーションを行った。今回はこの材料の創製とその表面特性に関する結果を以下に記載する。

2. 実験方法

市販 (太平化学製) の HAp-100 粉体 1.0 g を、金型成形器を用いて成形圧 50 MPa の一軸加圧成形で成形体を作製した。成形体を、1200 °C で 5 時間、昇温速度 10 °C·min⁻¹ の空気雰囲気下で焼成し、焼結体を作製した。得られた焼結体を #400, 600, 1000, 2000 の耐水研磨紙を用いて鏡面研磨し、EtOH 中で超音波洗浄したものを "Pure-HAp" とした。窒素ドーピング HAp は、Pure-HAp を 750, 850, 950 °C の 3 パターンで、窒化時間 5 時間、昇温速度 10 °C·min⁻¹ のアンモニア雰囲気下 (流量 200 cm³·min⁻¹) で焼成するこ

とで作製した。窒素ドーピング HAp のサンプルは、それぞれの焼成温度により、“N-doped-HAp(750) ”, “N-doped-HAp(850) ”, “N-doped-HAp(950) ” と表記する。作製した各種セラミックスの表面について、キャラクタリゼーションを行った。

3. 実験結果と考察

3-1 粉末 X 線回折 (XRD)

Pure-HAp および N-doped-HAp の XRD パターンを Fig.1 に示す。全てのセラミックスにおいて、HAp の単一相を示した。窒素ドーピング前後での結晶相に変化はなく、材料表面は Pure-HAp を維持していることが確認された。

3-2 材料表面の静的接触角と表面電位の測定

材料に純水を滴下することにより、表面の静的接触角を測定した。その結果を Fig. 2 に示す。

Pure-HAp は 74.92 ° で、N-doped-HAp(750)、N-doped-HAp(850)、N-doped-HAp(950)ではそれぞれ、43.24°、69.81°、59.24°であった。

また各種セラミックスの表面電位を測定し、その結果を Fig. 3 に示す。Pure-HAp の表面電位が -16.24 mV であったのに対し、N-doped-HAp(750)、

N-doped-HAp(850)、N-doped-HAp(950) ではそれぞれ、-26.23 mV、-25.09 mV、-24.11 mV となった。

Fig. 2 および Fig. 3 の結果の関連性は明らかではないが、Pure-HAp に窒素ドーピングを施すことで、濡れ性が向上し、表面の電位が下がることが分かった。セラミックス表面には僅かにしか窒素ドーピングされていないと思われ、そのため表面電位の観点では窒化温度での差が見られなかったものと考えられる。しかし静的接触角の結果では、N-doped-HAp(750)で最も濡れ性が向上し、N-doped-HAp(850) と N-doped-HAp(950) では大きな変化は見られなかった。窒化温度の条件の検討は行っていないが、窒化温度が 750

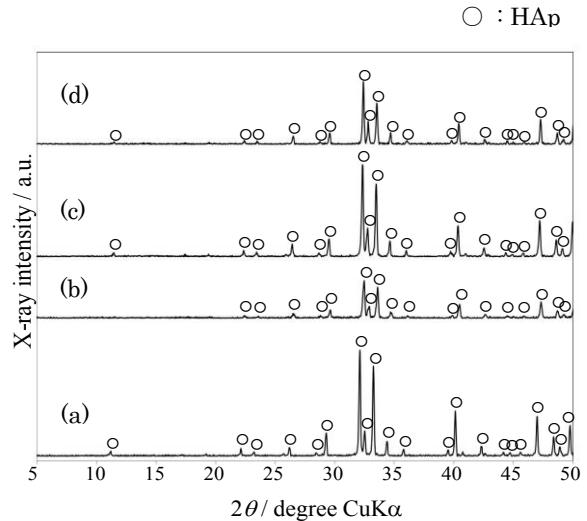


Fig. 1 Pure-HAp と N-doped-HAp の XRD パターン: (a) Pure-HAp, (b) N-doped-HAp(750), (c) N-doped-HAp(850) and (d) N-doped-HAp(950)

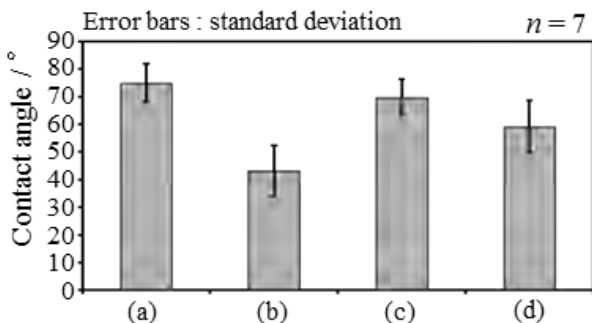


Fig. 2 各セラミックス表面における静的接触角: (a) Pure-HAp, (b) N-doped HAp(750), (c) N-doped HAp(850) and (d) N-doped HAp(950)

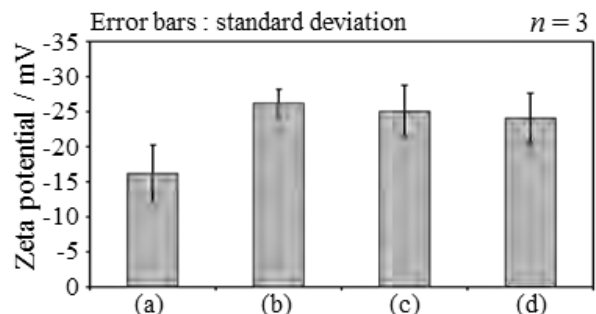


Fig. 3 各セラミックスの表面ゼータ電位: (a) Pure-HAp, (b) N-doped HAp(750), (c) N-doped HAp(850) and (d) N-doped HAp(950)

°C 付近において表面特性の変化がみられると考えられる。

3-3 X線光電子分光法 (XPS)

次に、材料表面の化学状態を確認するために、XPS による測定を行った。XPS による各セラミックスのワイドスペクトルを Fig. 4 に示す。

Fig.4 より、N-doped-HAp(850) において N 1s 軌道のピークが強く確認できた。一方で、N-doped-HAp(750) および N-doped-HAp(950) には、大きな変化が見られなかった。次に、この N-doped-HAp(850) のサンプルについて深さ方向分析を行った。N-doped-HAp(850) の表面を Ar イオンビームでスパッタリングし、経時ごとのスペクトルを Fig. 5 に示す。

HAp のスパッタリング率は SiO₂ のものを参考にし、15 nm·min⁻¹ で計算した。コンタミのカーボンは材料表面にのみ存在しており、スパッタリングを行うことで無くなることが確認された。また、窒素は内部に行くほど減少し、それに伴ってカルシウムのピークが大きくなっていくことが確認された。窒素は、材料表面から 150 nm 程度までドーピングされていることが分かった。

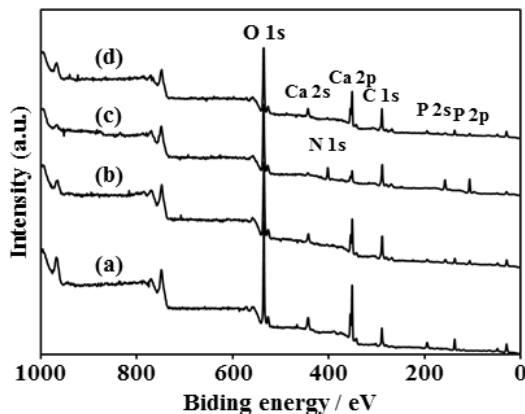


Fig. 4 各サンプルの XPS ワイドスペクトル：
(a) Pure-HAp, (b) N-doped-HAp(750), (c) N-doped-HAp(850) and (d) N-doped-HAp(950)

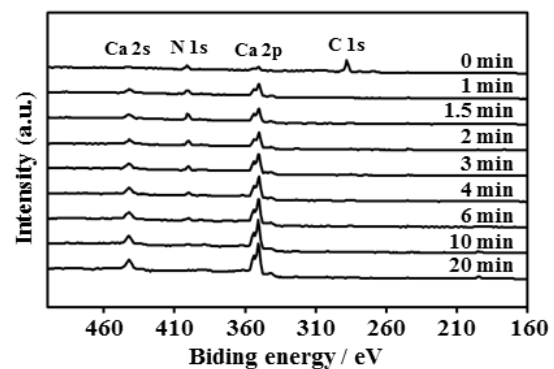


Fig. 5 N-doped-HAp(850) の XPS 深さ方向分析：
図中の時間はスパッタリング時間を示す。

3-4 考察

生体材料の表面の状態は、生体組織に直接的に影響を与える。特に、表面粗さや表面自由エネルギー (SFE)、表面電位は、細胞の増殖や分化といった応答性に影響を与える[3]。SFE は静的接触角から求めることができ、濡れ性が高いほど SFE も高くなる。本研究で作製した窒素ドーピング HAp は、濡れ性が向上し、表面電位は負の電荷を帯びた。これらの結果は骨芽細胞の細胞応答 (細胞接着、細胞分化、細胞増殖) に影響を及ぼすと考えられる。今回の結果では、N-doped-HAp(850) において表面内部までの窒素ドーピングが確認できたが、最も親水性を示した N-doped-HAp(750) では確認できなかった。また、窒素ドーピングを行ったことによる欠陥構造の有無も明らかになっていない。今後の展開として、窒化条件の検討から、さらなる窒素ドーピング HAp の特性の調査を行う必要があると考える。また細胞応答性の調査も並行して行う予定である。

4. 参考文献

- [1] L. L. Hench, *J Am Ceram Soc.*, **81**, 1705-1728 (1998).
- [2] R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, A. Aoki and Y. Taga, *Science*, **293**, 269-271 (2001).
- [3] L. Ponsonnet, K. Reybier, N. Jaffrezic, V. Comte, C. Lagneau, M. Lissac and C. Martelet, *Mater Sci Eng C.*, **23**, 551-560 (2003)

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表 (国際会議)

- 1) R. Umeda, S. Okuyama, T. Watanabe, and M. Aizawa, “Fabrication of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and its surface characterization”, 12th Asian BioCeramics (ABC2012) Symposium, the International Conference Hall, Kuang-Fu Campus, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, 18th-21st, November 2012.

*学会発表 (国内会議)

- 1) 梅田 遼・奥山 慧・渡邊友亮・相澤 守、“窒素ドーピングにより改質した水酸アパタイトセラミックスの表面特性およびその細胞応答性”、第51回セラミックス基礎科学討論会、仙台国際センター、日本セラミックス協会基礎科学部会、2013.1.9-1

窒素ドーピングにより改質した水酸アパタイトセラミックスの表面特性およびその細胞応答性

梅田 遼¹⁾・伊澤千尋¹⁾・中村まり子²⁾・渡邊友亮¹⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学 研究・知財戦略機構

Surface property of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and its cell reactivity

Ryo UMEDA¹⁾, Chihiro IZAWA¹⁾, Mariko NAKAMURA²⁾, Tomoaki WATANABE¹⁾
and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は、生体硬組織の主要無機成分である。しかし、生体骨中の生物学的アパタイトには様々なイオンが置換されており、HAp の結晶構造には欠陥構造が多く存在している¹⁾。欠陥構造は生体材料における重要な要因の一つであり、また生体材料の表面特性は実質的に生体組織に影響を与える。本研究では、従来の HAp セラミックス表面に欠陥導入および表面改質を行なうことで生体活性を向上させることを目的とした。その手法として、高温のアンモニア下で加熱する窒素ドーピング法を採用し、材料表面の化学構造を変化させた²⁾。本研究では、窒素ドーピングした HAp セラミックスの表面特性を評価するとともに、二種類の細胞を用いて生物学的な評価も行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 窒素ドーピング HAp セラミックスの作製

市販 (太平化学製) の HAp-100 粉体 1.0 g を金型成形器を用いて成形圧 50 MPa の一軸加圧成形で成形体を作製した。成形体を 1200 °C で 5 時間、空気雰囲気下で焼成し、焼結体を作製した。得られた焼結体を #400, 600, 1000, 2000 の耐水研磨紙で鏡面研磨し、“Pure-HAp” とした。窒素ドーピング HAp は、Pure-HAp を 750, 850, 950 °C で 5 時間、アンモニア雰囲気下 ($200 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) で加熱することで作製した。また、未ドーピング HAp として、Pure-HAp を 850 °C で 5 時間、空気雰囲気下で加熱した。これらのサンプルは加熱温度により “N-doped HAp(750)”, “N-doped HAp(850)”, “N-doped HAp(950)”, “non-doped HAp(850)” と表記する。作製したセラミックスについて、粉末 X 線回折、表面ゼータ電位、静的接触角などの材料特性評価を行なった。

2-2 窒素ドーピング HAp セラミックスを用いた *in vitro* 評価

作製した窒素ドーピング HAp 共存下で、マウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 骨芽細胞株およびラット骨髄由来間葉系幹細胞 (Rat Bone Marrow Cells ; RBMCs) を用いて *in vitro* 評価を行なった。

3. 実験結果と考察

3-1 窒素ドープ HAp セラミックスのキャラクタリゼーション

粉末 X 線回折より、すべてのセラミックスの結晶相は HAp の単一相であった。また、窒素ドープによる表面の微細構造への影響はなく、表面粗さは $0.1 \mu\text{m}$ 程度で統一されていた。Fig. 1 に表面ゼータ電位の結果を示す。Pure-HAp と non-doped HAp(850) の間に大きな差は見られなかったが、

窒素ドープを行なうことで窒化温度に関わらず表面電位が負の方向へシフトした。セラミックスが負電荷に帯電することで、培地もしくは生体中の金属イオンが吸着しやすくなり、細胞の接着性が増すことが考えられる³⁾。これより、Pure-HAp に窒化処理を施すことで細胞接着性が向上することが示唆される。次に、セラミックスの静的接触角の結果を Fig. 2 に示す。セラミックスの他に、細胞培養用ポリスチレンプレートの静的接触角も測定した。加熱処理のみの non-doped HAp(850) では親水性表面となり、窒素ドープすることで疎水表面性へと変化した。窒素ドープを行なうことで、セラミックス表面に多く露出している OH^- 基または PO_4^{3-} 基の状態が変化したために、濡れ性に影響が出たものと考えられる。セラミックス表面が疎水性に変化したことで、細胞の接着は広く紡錘状に伸展するのではなく、狭く丸状または菱形状に伸展すると推測される⁴⁾。

3-2 窒素ドープ HAp セラミックスを用いた *in vitro* 評価

MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* 評価では、培養 5 時間後の細胞初期付着率が、窒素ドープすることで 8% 向上した。これはセラミックス表面の電荷の違いに起因しているものと考えられる。また、7 日間の細胞増殖性評価では、non-doped HAp および N-doped HAp の間に有意な差は見られず同様の挙動となった。培養 1 日目の細胞を共焦点レーザー顕微鏡で蛍光観察したところ、ガラス上では細胞は紡錘状に仮足を伸ばしていたが、non-doped HAp(850) では、細く長い形態をしている細胞が多く存在していた。N-doped HAp(850) では、菱形状の細胞形態をしており、セラ

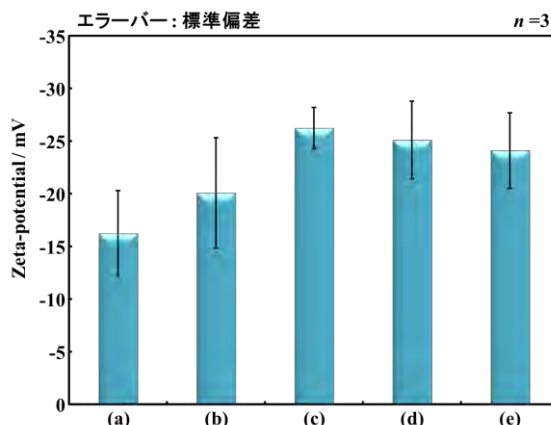


Fig. 1 Surface zeta-potential (a) Pure-HAp, (b) non-doped HAp(850), (c) N-doped HAp(750), (d) N-doped HAp(850) and (e) N-doped HAp(950)

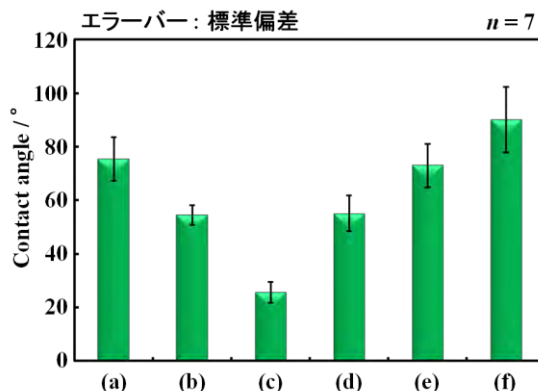


Fig. 2 Static contact angle (a) Polystyrene-plate, (b) Pure-HAp, (c) non-doped HAp(850), (d) N-doped HAp(750), (e) N-doped HAp(850) and (f) N-doped HAp(950)

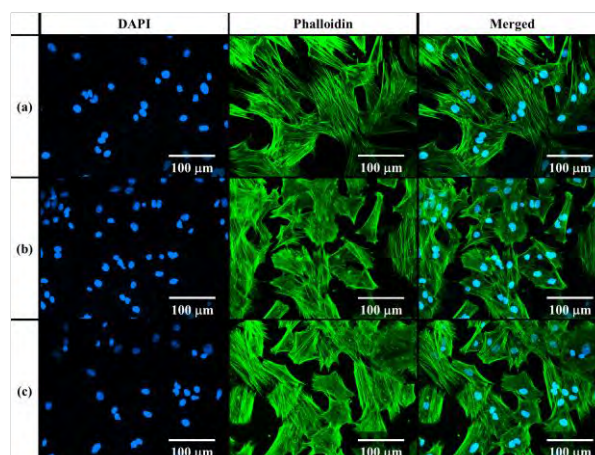


Fig. 3 Fluorescence images of actin cytoskeleton (a) glass plate, (b) Pure-HAp and (c) N-doped HAp(850)

ミックス上に乗っているような接着であった。これはセラミックスの表面自由エネルギーの差によるものだと考えられる⁵⁾。RBMCsをセラミックス上で14日間培養後の細胞形態の様子をFig. 3に示す。

4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて細胞核を青色に、Alexa Fluor[®] 488-phalloidin を用いて細胞骨格であるアクチンを緑色に染色したものである。細胞形態に大きな差異は見られず、RBMCs はセラミックス上で良好に培養されており、N-doped HAp に細胞毒性はなかったと考えられる。

以上の結果から、窒素ドーピングした水酸アパタイトの表面は負の電荷を帯びており、細胞培養時の表面自由エネルギーは増加することが明らかとなった。窒素ドーピング法を施すことによるHApの表面特性の変化は、細胞分化や石灰化などの細胞挙動の増強をもたらすことが期待される。

4. 参考文献

- [1] 青木秀希, “驚異の生体物質アパタイト”, 医歯薬出版 (1999) p.19, 29
- [2] R. Asahi, et al., *Science*, **293**, 269-271 (2001).
- [3] M.Yoshinari, et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 388-394 (2000).
- [4] M. Nakamura, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **1**, 2181-2189 (2009).
- [5] L. Huang, et al., *Acta Biomater.*, **7**, 395-405 (2011).

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表 (国際会議)

- 1) R. Umeda, S. Okuyama, T. Watanabe and M. Aizawa, “ Surface property of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics and their biocompatibility evaluations using osteoblastic cells”, The Seventh International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-7), Mielparque-Yokohama ,Kanagawa, Japan, 19th-21th, June 2013.
- 2) R. Umeda, S. Okuyama, M. Nakamura, T. Watanabe and M. Aizawa, “*In vitro* evaluation of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics using osteoblast cells”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, France, 27th-31th, October 2013.
- 3) R. Umeda, C. Izawa, M. Nakamura, T. Watanabe and M. Aizawa, “ Surface Property of Nitrogen-doped Hydroxyapatite Ceramics and *in vitro* Evaluation Using Osteoblasts”, 13th Asian BioCeramics (ABC2013) Symposium, Kyoto University, Kyoto, 4th-6th, December, 2013

窒素をドーブした水酸アパタイトセラミックスに対する骨芽細胞の細胞応答性
並木亮太¹⁾・陶山拓也¹⁾・伊澤千尋¹⁾・本田みちよ²⁾・渡邊友亮¹⁾・相澤 守¹⁾

- 1) 明治大学工学部応用化学科
- 2) 明治大学研究・知財戦略機構

Cellular responses of osteoblasts to nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics

**Ryota NAMIKI¹⁾, Takuya SUYAMA¹⁾, Chihiro IZAWA¹⁾, Michiyo HONDA²⁾,
Tomoaki WATANABE¹⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾**

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property Meiji University

1. 緒言

水酸アパタイト (Hydroxyapatite; HAp) は、組成式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表される生体硬組織の主成分である。HAp は生体組織に対して為害性はなく、生体適合性に優れ、良好な生体活性を示す代表的な硬組織代替材料である。そのため、HAp は医療分野において人工骨など広く応用されている[1]。

しかしながら、実際の生体骨にはカルシウムイオンやリン酸イオン以外にも種々のイオンが含まれている。例えば、微量のナトリウムイオン、マグネシウムイオン、塩化物イオン および炭酸イオン、その他にも様々な微量のイオンが含まれている。これらのイオンは生体骨中の $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の構造の各部位に置換しており、そのため HAp の結晶構造に欠陥や歪みが生じている[2]。

当研究室では、生体骨に含まれるミネラルを含有した Bone HAp セラミックスを創製し、Bone HAp セラミックスが *in vitro* での細胞培養試験において純粋な HAp よりも高い骨芽細胞への分化誘導能を持つことを明らかにしている[3]。これは、Bone HAp に含まれるナノレベルの欠陥構造に起因していると考えられる。

本研究では、欠陥導入の手法として金属酸化物の格子酸素を窒素と置き換えることで欠陥導入が可能である窒素ドーブ法[4]に着目した。従来、窒素ドーブ法は金属酸化物の窒化処理に用いられているが、HAp を始めとしたアパタイト系化合物への窒素ドーブは、これまで前例がない。この窒素ドーブ法を HAp セラミックスに適用することで、HAp セラミックス表面を窒化し、欠陥導入を行なった新規な HAp セラミックスである「窒素ドーブ HAp セラミックス」の創製に成功している[5]。

そこで本研究の目的は、窒素ドーブ法により表面改質および欠陥構造を導入した新規な HAp セラミックスである、「窒素ドーブ HAp セラミックス」を作製し、その材料特性、窒素ドーブ量の制御および細胞応答性の評価を行ない、セラミックス材料のナノ欠陥構造と生体活性との関連性を解明することである。

2. 実験方法

1) HAp セラミックスの作製

市販の HAp 粉体 (HAp-100; 太平化学製) を成形圧 50 MPa で成形し、空気雰囲気下 1200 °C、5 h で焼成することによって、HAp セラミックスを作製した。この HAp セラミックスを鏡面研磨したものを“Pure HAp”とした。Pure HAp を NH₃ 雰囲気下 850 °C、5 h、10 h もしくは 20 h で窒化処理することで窒素ドープ HAp セラミックス “N-doped HAp(x)” を作製した。また、窒化処理の条件と同様にして、空気雰囲気下で加熱処理したものを非窒素ドープ HAp セラミックス “Non-doped HAp(x)” とした。また、試料名のカッコ内の x は窒化もしくは加熱の保持時間を表すものとする。作製したセラミックスの評価は、粉末 X 線回折測定 (XRD)、全反射測定 (ATR) によるフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、表面のゼータ電位測定を行なった。

2) ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (RBMCs) の初代培養

4 週齢の雄ラット (Wistar 系) 2 匹の大腿骨および脛骨より骨髄を採取した。採取した骨髄は培養時の抗生剤 (ペニシリン, ストレプトマイシン) を含んだ α -Minimum Essential Medium (α -MEM) で洗浄後、培養フラスコに播種した。初代培養は 16-21 日間、37 °C、5% CO₂ に維持したインキュベーター内で行なった。培養には 10% FBS および抗生剤を含む α -MEM (以下、これを「通常培地」とする) を使用した。骨髄採取 3 日後までは毎日培地交換を行ない、それ以降は 2 日おきに培地交換を行なった。また、実験には継代を 2 回行なった細胞を使用した。

3) 骨芽細胞の細胞応答性評価

2 種類の骨芽細胞を用いて細胞応答性の評価を行なった。具体的には、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 を用いて、播種してから 5 時間後の細胞初期付着率および増殖性試験を行なった。また、RBMCs を用いて、免疫・蛍光染色による骨芽細胞の形態観察およびアリザリンレッド S 染色による石灰化の評価を行なった。なお、使用した培養基材は Non-doped HAp(5) および N-doped HAp(5) である。control は polystyrene plate を使用した。

3. 結果と考察

1) セラミックスの特性評価

作製したセラミックスの XRD パターンを図 1 に示す。すべての試料の結晶相はいずれも HAp 単一相であった。このことから、窒素ドープによる HAp 結晶相から他の結晶相への転移はないことが明らかとなった。

ATR 法によって測定した FT-IR スペクトルを図 2 に示す。すべての試料において HAp に特徴的な水酸基 (3550 cm⁻¹) およびリン酸基 (1100 cm⁻¹ ~ 3900 cm⁻¹) の吸収が確認された [6]。2010 cm⁻¹ の位置に注目すると、各種 N-doped HAp にのみ鋭い吸収が確認された。Pure HAp と Non-doped HAp では確認されない

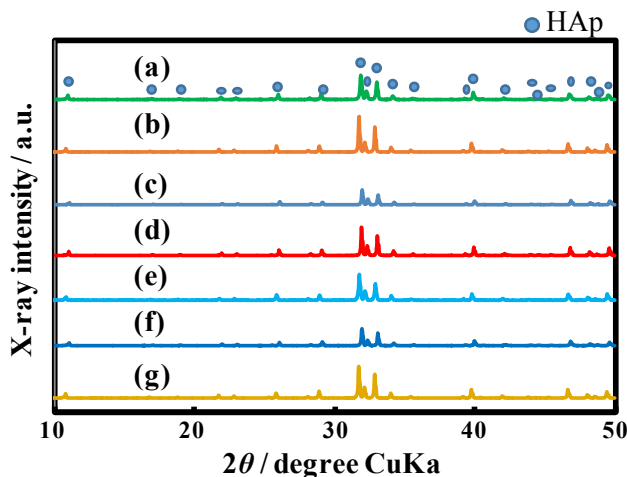


図 1 各セラミックスの XRD パターン

(a) Pure HAp (b) Non-doped HAp(5) (c) Non-doped HAp(10)
 (d) Non-doped HAp(20) (e) N-doped HAp(5)
 (f) N-doped HAp(10) (g) N-doped HAp(20)

ため、この吸収は窒素ドーピングにより HAp 結晶中に導入された窒素に由来するものである。ただし、窒化時間による吸収帯強度の大きな変化は確認できなかった。

各種セラミックスのゼータ電位の測定結果を図 3 に示す。Pure HAp のゼータ電位に比べて Non-doped HAp、N-doped HAp ともにそのゼータ電位は負の方向に値が大きくなり、その値は加熱時間を伸ばすことでさらに大きくなっていくことが明らかとなった。また、同じ加熱時間の Non-doped HAp と N-doped HAp を比較すると、N-doped HAp のゼータ電位は Non-doped HAp の値よりも大きな負の電位を示していることから、ゼータ電位が負の方向にシフトするのは加熱の影響に加えて窒素ドーピングによる影響も加味されていると考えられる。

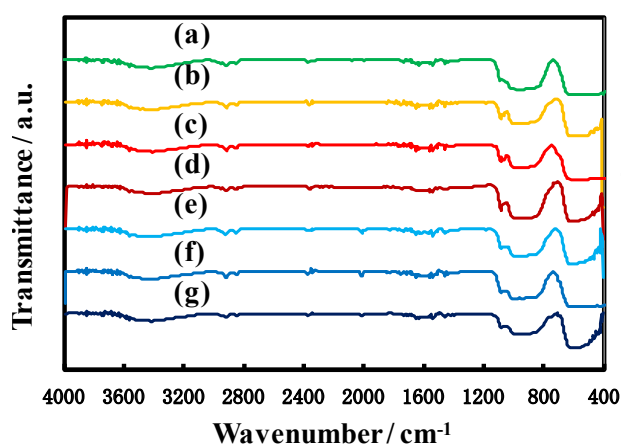


図 2 各セラミックスの FT-IR スペクトル
(a)Pure HAp, (b)Non-doped HAp(5), (c)Non-doped HAp(10), (d)Non-doped HAp(20), (e)N-doped HAp(5), (f)N-doped HAp(10), (g)N-doped HAp(20)

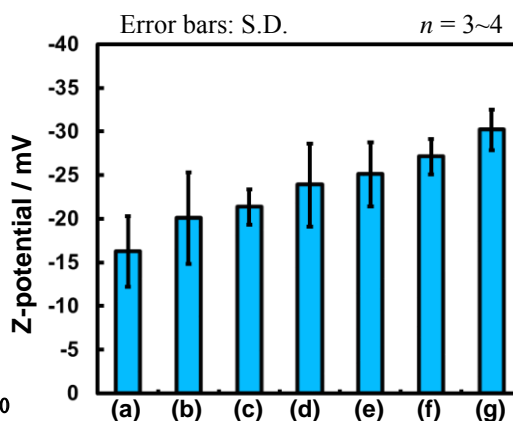


図 3 各セラミックス表面のゼータ電位
(a)Pure HAp, (b)Non-doped HAp(5), (c)Non-doped HAp(10), (d)Non-doped HAp(20), (e)N-doped HAp(5), (f)N-doped HAp(10), (g)N-doped HAp(20)

2) 骨芽細胞の細胞応答性評価

MC3T3-E1 の細胞初期付着率測定の結果を図 4 に示す。N-doped HAp(5)は Control に近い細胞付着率を示し、Non-doped HAp(5)と比較して、窒素ドーピングを行なうことで相対細胞初期付着率はおよそ 7%向上した。接着率の向上は、窒素ドーピングにより表面が負に帯電したことによってタンパク質の吸着が促進されたためであると考えられる。すべてのタンパク質は末端にアミノ基とカルボキシル基を有する。そのため、N-doped HAp の表面は静電的にタンパク質分子と結合していることが示唆される。

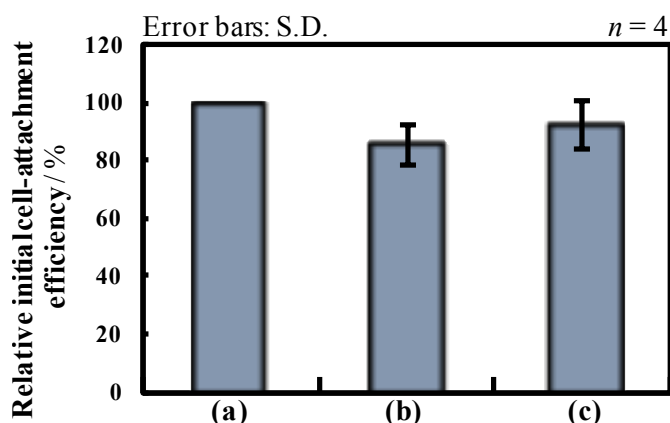


図 4 Control を 100%とした時の相対細胞初期付着率
(a)Control, (b)Non-doped HAp(5), (c)N-doped HAp(5)

図5にMC3T3-E1を使用した細胞増殖性試験の結果を示す。細胞数の計測は播種後1, 3, 5, 7日目に行なった。Controlには劣るものの、Non-doped HAp(5)とN-doped HAp(5)はともに良好な増殖性を示した。細胞増殖性試験ではNon-doped HAp(5)とN-doped HAp(5)の大きな違いは見られなかった。これらの結果から、窒素ドーピングしたHApは骨芽細胞に対して毒性がないことがわかり、細胞培養基材ならびに生体材料として使用できることが確認できた。

RBMCsを用いた細胞の形態観察の結果を図6に示す。形態観察は播種後1日目の細胞で行ない、青色は細胞核、緑色は細胞骨格(アクチン)、赤色は接着斑(ビンキュリン)を示している。ControlとNon-doped HAp(5)上で培養したRBMCsの細胞形態は広がったような形態をとっているのに対して、N-doped HAp(5)上で培養したRBMCsは細長い紡錘状の形態をとっていた。この理由としては、

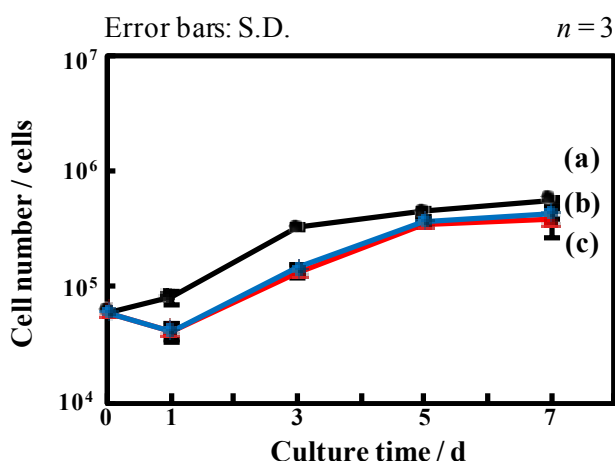


図5 増殖性試験の結果

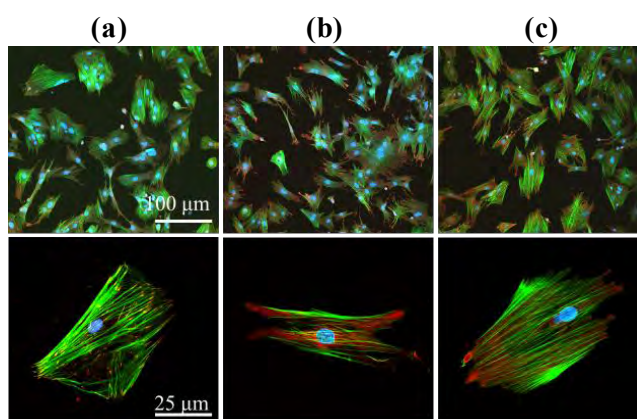


図6 培養1日目におけるRBMCsの形態観察

(a)Control (b)N-doped HAp(5) (c)Non-doped HAp(5)

(a)Control (b)N-doped HAp(5) (c)Non-doped HAp(5)

N-doped HAp(5)はNon-doped HAp(5)よりも大きい負のゼータ電位を示していたこと、もしくは導入された窒素の影響を受けていることが考えられる。

図7にRBMCsの培養14日後のアリザリンレッドS染色による細胞石灰化評価の結果を示す。なお(+)は骨芽細胞分化誘導培地を用いて、(-)は通常培地を用いて、それぞれ培養したものである。どの培養条件においても、N-doped HAp(5)およびNon-doped HAp(5)で培養したRBMCsの石灰化が確認された。中でも、N-doped HAp(5)(+)が最も大きな石灰化面積を示したことから、窒素ドーピングしたHAp表面の特性がRBMCsの石灰化を促進したと考えられる。

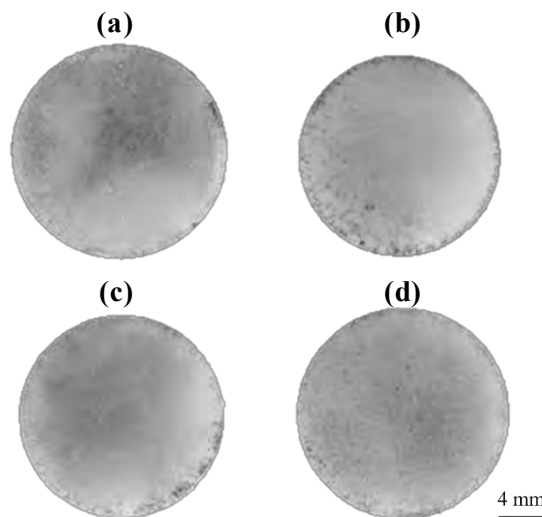


図7 アリザリンレッドS染色によるRBMCsの石灰化の評価

(a) N-doped HAp(5)(+) (b) N-doped HAp(5)(-)

(c) Non-doped HAp(5)(+) (d) Non-doped HAp(5)(-)

4. 結論

HApに窒素ドーピングすることで窒素を結晶構造中に導入し新規な材料を作成することができた。この窒素ドーピングHApはHAp単一相であり、ATR法による

FT-IR の結果から窒素が何らかの形で結晶構造中に導入されていることがわかった。この材料の表面特性は、ゼータ電位測定から負の電位を持つことが明らかになった。この影響、もしくは導入された窒素の影響からか、窒素ドーピング HAp 上で骨芽細胞を培養した場合、純粋な HAp 上で培養した場合と比較して、細胞初期付着率が向上し、細胞形態は紡錘状になることが確認された。また、増殖性試験では良好な増殖を示したため窒素ドーピングを HAp に適用しても細胞毒性を付与することはなく、生体材料として用いることが期待できる。石灰化の評価を行なったところ、すべての試料のうち N-doped HAp(5)(+)が最も大きな石灰化面積を示し、窒素ドーピング HAp が骨芽細胞の石灰化を促進したことが認められた。これらの結果より、窒素ドーピング法は HAp に欠陥を導入し、生体活性ならびに分化誘導能を強化する手法として期待できる。

5. 参考文献

- [1] L. L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**, 1705-1728 (1998).
- [2] H.Aoki, "Medical Application of Hydroxyapatite", *Ishiyaku Euro America*, Tokyo, 1994.
- [3] M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda and H. Yoshimura, *Key Eng. Mat.*, **493-494**, 320-324 (2012).
- [4] R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, A. Aoki and Y. Taga, *Science*, **293**, 269-271 (2001).
- [5] 梅田 遼, 奥山 慧, 渡邊友亮, 相澤 守, 第51回セラミックス基礎科学討論会講演要旨集(2013) p.270.
- [6] M. C. Chang and J. Tanaka, *Biomaterials*, **23**, 4811-4818 (2002).

6. 成果報告

* 口頭発表

- 1) 〇相澤 守・梅田 遼・中村まり子・並木亮太・奥村 慧・伊澤千尋・本田みちよ・渡邊友亮、
“ 窒素ドーピング水酸アパタイトセラミックスの *in vitro* 評価 (*In vitro* evaluation of nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics) ”、公益社団法人日本セラミックス協会第 27 回秋季シンポジウム、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島) 2014 年 9 月 9-11 日 (口頭発表)

* ポスター発表

- 2) 〇Ryota NAMIKI, Rina Hashimoto, Ryo UMEDA, Mariko NAKAMURA, Chihiro IZAWA, Michiyo HONDA, Tomoaki WATANABE and Mamoru AIZAWA, “Cellular responses of osteoblasts to nitrogen-doped hydroxyapatite ceramics: cell attachment, proliferation, morphology, differentiation and calcification”, The international chemical congress of pacific basin society 2015, Hawaii convention center, Hawaii, The United States of America, 15-20.12.2015

水酸アパタイトに導入された窒素の化学状態の検討

並木亮太¹⁾・陶山拓也¹⁾・伊澤千尋¹⁾・本田みちよ²⁾・深澤倫子¹⁾・
渡邊友亮¹⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機

Analysis of chemical state of nitrogen in nitrogen-doped hydroxyapatite

Ryota NAMIKI¹⁾, Takuya SUYAMA¹⁾, Chihiro IZAWA¹⁾, Michiyo HONDA²⁾,
Tomoko HUKAZAWA¹⁾, Tomoaki WATANABE¹⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property Meiji University

1. 緒言

水酸アパタイト (Hydroxyapatite; HAp) は、化学式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表されるヒトの歯や骨の主成分である。HAp は優れた生体適合性を示すため、医療分野において人工骨などのバイオマテリアルとして広く臨床応用されている。一方、実際の生体骨にはカルシウムとリン酸以外にも炭酸(CO_3^{2-})、ナトリウム(Na^+)およびマグネシウム(Mg^{2+})など種々のイオンが含まれている。これらのイオンが生体骨中のアパタイトの結晶構造中に置換することで生じる結晶構造の欠陥や歪みが HAp の高い生体活性を誘起している可能性がある[1]。

我々は HAp 結晶構造に欠陥を導入する方法として「窒素ドーピング法」を採用し、生体活性を高めた「窒素ドーピング HAp セラミックス」の創製に成功している [2]。本研究では、これまでに詳細が明らかにされていない HAp 中の窒素の化学状態について検討した。セラミックスの状態では表面だけが改質されており、詳細な分析は困難であった。そこで、同法により「窒素ドーピング HAp 粉体」を調製し、その窒素の化学状態を調査したので報告する。

2. 実験方法

市販の HAp 粉体 (HAp-100; 太平化学製) を“Pure HAp 粉体”とした。Pure HAp 粉体を $200 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ の NH_3 気流中、 850°C で 5 h, 10 h および 20 h で加熱することによって窒素ドーピング HAp 粉体 “N-doped HAp(x) 粉体” を調製した。また、窒化処理と同様の条件で、空気気流中で加熱処理したものを非窒素ドーピング HAp 粉体 “Non-doped HAp(x) 粉体” とした。ここで、試料名のカッコ内の x は窒化もしくは加熱の保持時間を表すものとする。調製した粉体の評価は粉末 X 線回折法 (XRD) による結晶相の同定と格子定数の測定、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、加熱発生ガス質量分析法 (TPD-MS) により行なった。

3. 結果と考察

図1に各粉体のXRDパターンを示す。調製した粉体の結晶相はいずれも HAp 単一相であった。このことより、窒素ドーピングによる HAp の結晶相の変化はほとんどないことが明らかとなった。その一方、格子定数の測定において、各 N-doped HAp 粉体の a 軸の格子定数は、HAp の理論値 (a 軸; 0.9418 nm, c 軸; 0.6884 nm)、Pure HAp 粉体および Non-doped HAp 粉体よりも大きい値を示した (図 2-1)。これは窒素ドーピングを施すことで、窒素が結晶内に導入され、結晶が a 軸方向に伸張したためだと考えられる。また、炭酸アパタイトやホウ素アパタイトなども OH^- サイトへ CO_3^{2-} や BO_2 が置換することにより、純粋な HAp と比較して a 軸の格子定数が大きくなることから[3]、窒素は HAp の OH^- サイトに導入されていると考えられる。なお、 c 軸の格子定数はすべての試料でほぼ同様の値を示した (図 2-2)。

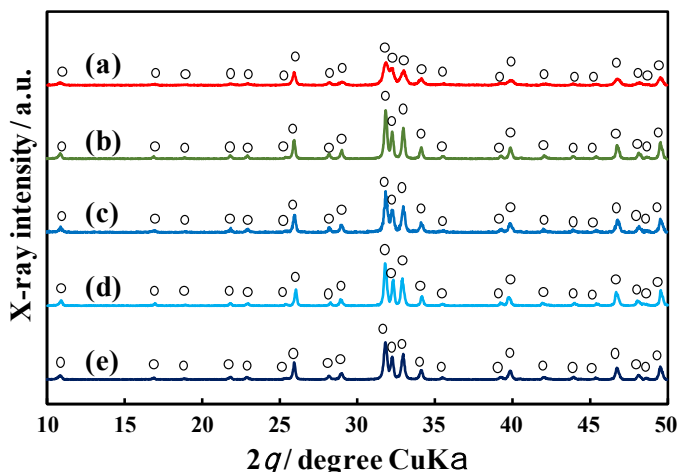


図1 各粉体の XRD パターン

- (a) Pure HAp 粉体, (b) Non-doped HAp(5)粉体,
(c) N-doped HAp(5)粉体, (d) N-doped HAp(10)粉体,
(e) N-doped HAp(20)粉体

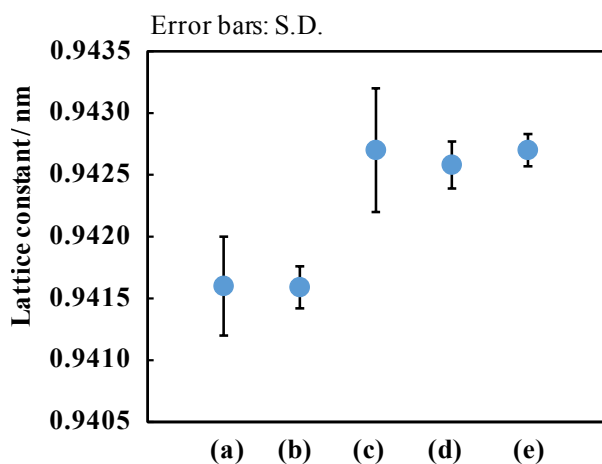


図 2-1 各粉体の XRD の a 軸の格子定数

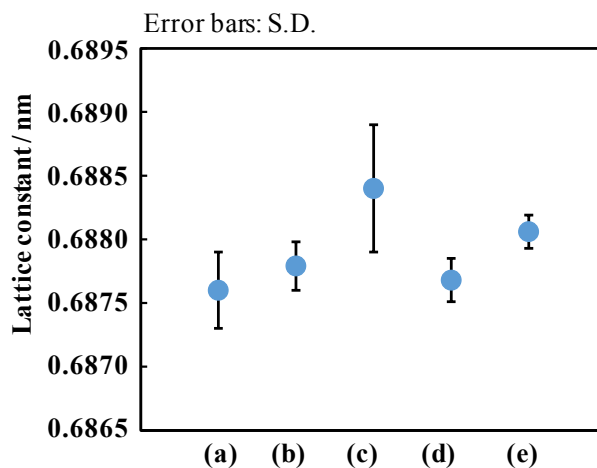


図 2-2 各粉体の XRD の c 軸の格子定数

- (a) Pure HAp 粉体, (b) Non-doped HAp(5)粉体, (c) N-doped HAp(5)粉体, (d) N-doped HAp(10)粉体, (e) N-doped HAp(20)粉体

導入されている窒素の化学状態を調べるために、FT-IR 測定を行なった。その結果を図3に示す。すべての試料において、HAp に特徴的な OH^- の O-H 伸縮振動 (3550 cm^{-1}) に基づく吸収および PO_4^{3-} の P-O 伸縮振動 ($1300 \text{ cm}^{-1} \sim 430 \text{ cm}^{-1}$) に基づく吸収が確認された。N-doped HAp 粉体に関しては、 N_2O の伸縮振動および縮重変角振動とよく一致する吸収が 2010 cm^{-1} および 699 cm^{-1} に確認された。この時、N-doped HAp 粉体に特有の吸収帯の面積から窒素量の推定を試みたが、今回の実験からは窒化時間を長くしても吸収面積に大きな変化は認められず、窒素量は窒化時間に比例しないことがわかった。これらの結果

から窒素の導入形態は N_2O であると推定できたが、 2010 cm^{-1} 付近には窒素を含む化学種で、この振動と近い位置に吸収を示すものに CN_2^{2-} , NO^+ が挙げられる。

導入された化学種が N_2O であると確認を得るために、N-doped HAp(5)粉体に対して TPD-MS 測定を行なった。その結果を図 4 に示す。分析の結果、本試料から異なるフラグメントイオン (m/z) を持つ 3 種類の化学種が確認された。図中 (a) は $m/z17$ を有するアンモニア (NH_3)、(b) は $m/z18$ を有する水 (H_2O)。そして、(c) は $m/z44$ を有する化学種である。 $m/z44$ を有する化学種は多数存在するが、当研究の実験系から考えるに、検出される可能性のあるものは N_2O と CO_2 である。しかし、図 3 の FT-IR の結果では、いずれのサンプルでも炭酸基の吸収は確認されなかつたため、検出された $m/z44$ を有する化学種は N_2O であることが示唆される。

また、アンモニアなどは $400\text{ }^\circ\text{C}$ 以上の高温領域にて発生していることから、官能基の脱離あるいは試料の分解成分の可能性、水分は $100\text{ }^\circ\text{C}$ 付近に観測されるピークは吸着水由来、 $400\text{ }^\circ\text{C}$ 以上の高温領域で観測されるピークは、試料母体との相互作用 (例えば水素結合) により保存されている水分や OH^- の縮合脱離由来の可能性が示唆される。 $m/z44$ を有する成分の $190\text{ }^\circ\text{C}$ 付近に観測されるピークは、試料に存在する細孔への吸着成分や表面上に存在する相与性のある成分に溶け込んでいる成分が脱離している可能性が示唆される。一方、 $400\text{ }^\circ\text{C}$ 以上の高温領域に見られるピークは、官能基の脱離由来である可能性が高い。

4. 結論

窒素ドーブを水酸アパタイトに施すことで格子定数の a 軸が伸張した。これは OH^- サイトへ CO_3^{2-} や BO_2 が置換した場合と同様であるので、導入された物質は水酸アパタイトの OH^- サイトに存在すること

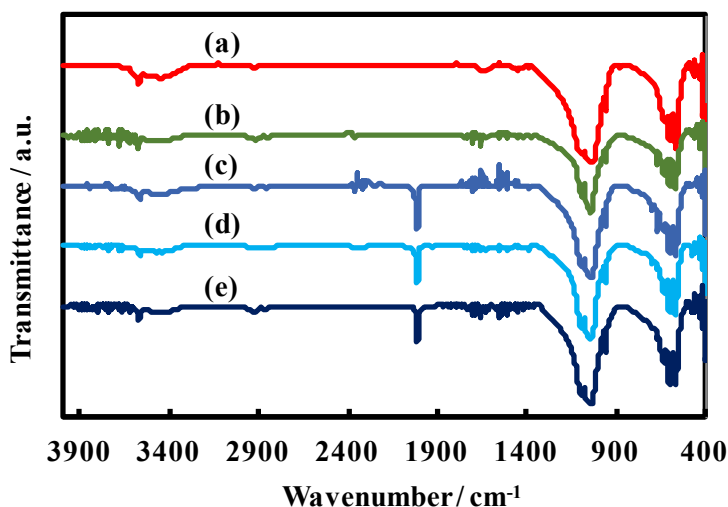


図 3 各粉体の FT-IR スペクトル

- (a) Pure HAp 粉体, (b) Non-doped HAp(5)粉体,
(c) N-doped HAp(5)粉体, (d) N-doped HAp(10)粉体,
(e) N-doped HAp(20)粉体

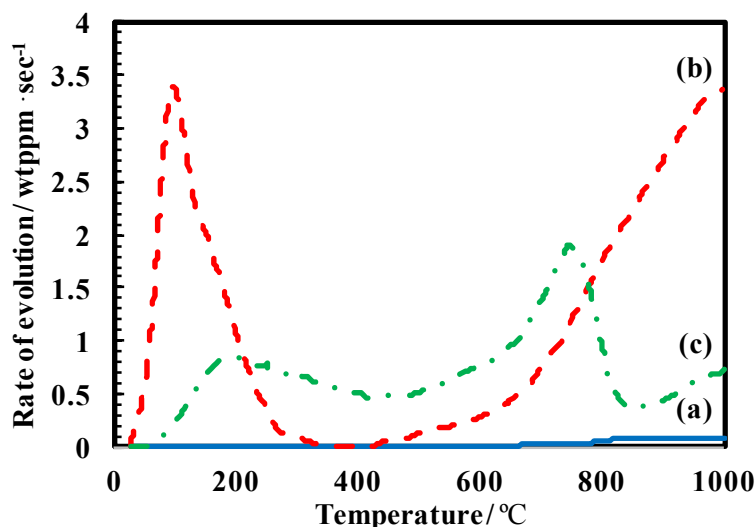


図 4 N-doped HAp(5)粉体の TPD-MS の結果

- (a) $m/z17\text{ NH}_3$, (b) $m/z18\text{ H}_2\text{O}$, (c) $m/z44\text{ N}_2\text{O}$

が示唆される。また、FT-IR と TPD-MS の結果から導入された化学種は N_2O である可能性が高いことがわかった。以上より、水酸アパタイトに窒素ドーピングを施すことで、窒素は N_2O の化学状態で結晶の OH^- サイトに導入されることが示唆された。

5. 参考文献

- [1] M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda and H. Yoshimura, "Hydroxyapatite ceramics including bone minerals promote differentiation of osteoblasts from rat bone marrow cells", *Key Eng. Mat.*, **493-494**, 320-324 (2012).
- [2] 梅田 遼, 奥山 慧, 渡邊友亮, 相澤 守, 第51回セラミックス基礎科学討論会講演要旨集(2013) p.270.
- [3] 伊藤敦夫, PHOSPHORUS LETTER No.24(1995) p.25.

6. 成果報告

*口頭発表

- 1)○並木亮太・陶山拓也・伊澤千尋・本田みちよ・深澤倫子・渡邊友亮・相澤 守、“水酸アパタイトセラミックスに導入された窒素の分光学的手法による化学状態の検討 ”、第 25 回無機リン化学討論会、山形大学 米沢キャンパス (山形) 2015 年 9 月 28-29 日

超音波噴霧熱分解法によるカリウム置換アパタイトセラミックスの作製とその材料特性

横田倫啓¹⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機構

Fabrication of Potassium-substituted Hydroxyapatite Ceramics by Ultra Spray-pyrolysis Technique and Their Material Properties

Tomohiro YOKOTA¹⁾, Michiyo HONDA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization of the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

現在、骨欠損部を補填する場合、患者自身の骨（自家骨）の利用がゴールドスタンダードであるが、二次的侵襲や採取量の限界といった問題があるため、水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) などの人工骨の開発が注目を集めている。しかし、人工骨は自家骨に比べると骨芽細胞が存在しないところに骨を形成する「骨誘導能」を持たないため、確実な骨癒合が得られないと問題がある。合成した HAp と自家骨中の生物学的アパタイトの大きな違いは、Na や Mg など様々なミネラルの置換固溶や、それに起因する結晶構造中のナノレベルの欠陥構造の有無であり、自家骨が持つナノ欠陥構造が骨誘導能を誘起している可能性を示唆している[1]。

これまでに当研究室では、ナノ欠陥構造が骨誘導を誘起しているとの考えに基づき、自家骨のモデル材料として自家骨中に含まれる微量元素を HAp に添加することにより欠陥構造を導入させた「骨ミネラル含有アパタイト (Bone HAp) セラミックス」の作製に成功している[2]。純粋な HAp セラミックスと比較して、この Bone HAp セラミックスは *in vitro* において骨芽細胞への分化を促進すること[3]、*in vivo* において材料周囲での骨形成を亢進することを明らかにした[4]。しかしながら、どのイオン種が Bone HAp の高い生体活性の発現に寄与しているのかを特定できていない。そこで、本研究では、Bone HAp 中の「カリウム」に着目し、組成制御が容易な超音波噴霧熱分解法[5]を用いて、カリウムを置換させた HAp (KAp) 粉体を合成した。ついで、得られた粉体を用いてセラミックスを作製し、その材料特性を調査したので報告する。

2. 実験方法

KAp 粉体は、超音波噴霧熱分解法により合成した。試料溶液は、出発原料に $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, HNO_3 および KNO_3 を用いて、表 1 にしたがって調製した。これらの試料溶液を超音波噴霧熱分解装置の下部に設置した超音波発振器を用いて微細な液滴とし、加熱部に導入した。導入された液滴は溶媒の除去および析出物の熱分解を経て粉体となった。超音波噴霧熱分解法の条件は、電気炉温度上部 850 °C, 下部 300 °C, 超音波振動数 2.4 MHz, 流速 $1.5 \text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ で行なった。以後、試料の略号はカリウムを添

加していないものを“Pure HAp”とし、カリウム添加量の少ない順に“KAp-1, -2, -3”と表記する。

表 1 KAp 試料溶液の調製条件

Sample	Ca(NO ₃) ₂ mol·dm ⁻³	(NH ₄) ₂ HPO ₄ mol·dm ⁻³	HNO ₃ mol·dm ⁻³	KNO ₃ mol·dm ⁻³	K添加量 mol%	(Ca+K)/P
Pure HAp	0.5000			0	0	1.67
KAp-1	0.5035			0.0125	0.250	
KAp-2	0.4973	0.3	0.4	0.01875	0.375	1.72
KAp-3	0.4910			0.0250	0.500	

得られた KAp 合成粉体を 100 MPa で二回成形し、1200 °C で 5 時間、水蒸気雰囲気下で焼成することで KAp セラミックスを作製した。得られた粉体およびセラミックスのキャラクタリゼーションを粉末 X 線回折法 (XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES)、走査型電子顕微鏡 (SEM) などにより行なった。また、KAp セラミックスの溶解性を評価するため、溶解性試験を JIS T 0330-3 「生体活性バイオセラミックスの溶解速度試験」にしたがって行ない、アパタイト形成能の調査のため、セラミックスを擬似体液 (SBF) に浸漬後、表面の微細構造観察を行なった。

3. 結果と考察

1) KAp 粉体のキャラクタリゼーション

XRD の結果より、Pure HAp およびすべての KAp 粉体は HAp 単一相であった。また、FT-IR スペクトルの結果から、HAp に特有の OH 基と PO₄³⁻ 基以外に、添加した硝酸に由来する NO₃⁻ のピークも観察された。ICP-AES による元素分析から、KAp 粉体中のカリウム含有量はほぼ仕込み量どおりに含まれていることが分かった。図 1 に KAp 粉体の SEM 観察像を示す。すべての合成粉体は 0.5 μm ~ 2.0 μm 程度の球状粒子で構成されており、K⁺ イオンの添加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。

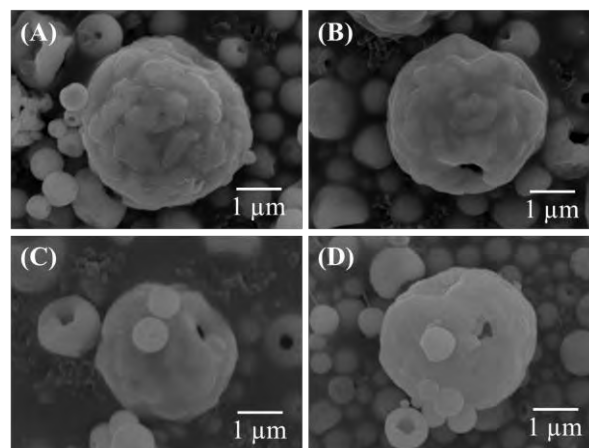


図 1 KAp 粉体の SEM 観察像

(A) Pure HAp, (B) KAp-1

(C) KAp-2, (D) KAp-3

2) KAp セラミックスの材料特性

XRD の結果から、Pure HAp および KAp セラミックスの結晶相は、カリウム添加量によらずいずれも HAp 単一相であった。FT-IR スペクトルでは、合成粉体で観察された NO₃⁻ のピークは消失し、HAp に特有の OH 基と PO₄³⁻ 基のピークが観察された。ICP-AES による KAp セラミックスの元素分析の結果を表 2 に示す。KAp セラミックスの実際のカリウム含有量は、試料溶液の仕込み濃度より減少していたが、仕込みのカリウムイオン濃度に依存して実際のカリウム含有量が増加する傾向が認められた。また、Pure HAp セラミックスの Ca/P 比は化学量論比である 1.67 より低い値であり、Ca 欠損 HAp であることが分かった。内部標準法による格子定数測定の結果より、KAp セラミックスの c 軸の格子定数は、カリウム含有量の増加に伴って膨張していた。K⁺ のイオン半径は 0.133 nm であり、Ca²⁺ のイオン半径 0.099 nm より大きいため c 軸の膨張が見られたと考えられ、このことからカリウムは HAp の結晶格子内に置き

れていると考えられる。

表 2 KAp セラミックスの元素分析

Sample	Ca	P	K		Ca/P	(Ca+K)/P
	mol	mol	mol	mol%		
Pure HAp	10.257	6.281	0.000	0.00	1.63	1.63
KAp-1	9.426	5.721	0.036	0.04	1.65	1.65
KAp-2	10.273	6.238	0.146	0.14	1.65	1.67
KAp-3	10.335	6.399	0.256	0.24	1.62	1.66

次に、KAp セラミックス表面の微細構造を図 2 に示す。Pure HAp と比較して、実際のカリウム含有量の多かった KAp-2 および KAp-3 で粒子径の増大が観察された。また、セラミックスの相対密度と圧縮強度も増加したことから、カリウムが焼結助剤として働き、KAp セラミックスの焼結性および機械的特性を向上させたものと考えられる。酸性条件

での溶解性試験では、KAp-3 が Pure HAp と比較して高い溶解性を示した。このときの平均溶解速度は KAp-3, Pure HAp でそれぞれ、 $1.44 \text{ mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ および $0.49 \text{ mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ であり、約 3 倍の溶解速度を示した。次に、SBF を用いて KAp セラミックスの生体活性能を調査したところ、浸漬 3 時間後の他のセラミックスと比較して KAp-3 セラミックス上で、多くの骨類似アパタイトが析出している様子が観察された。これは、KAp-3 セラミックスの高い溶解性のために、セラミックス表面上で Ca^{2+} イオンが局所的に飽和となり、骨類似アパタイトの析出が促進されたと考えられる。

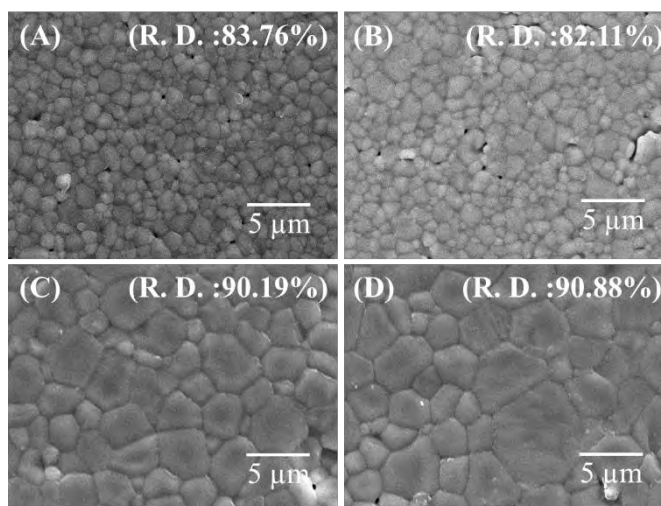


図 2 KAp セラミックスの微細構造

(A) Pure HAp, (B) KAp-1

(C) KAp-2, (D) KAp-3

R. D.: 相対密度

4. 結論

超音波噴霧熱分解法を用いることで、 K^+ イオンを HAp 構造に置換させたカリウム置換アパタイト (KAp) 合成粉体を調製した。この合成粉体を管状炉で $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ で焼成することで HAp 単一相の KAp セラミックスの作製に成功した。格子定数の測定や ICP-AES による元素分析の結果から、実際のカリウム含有量に依存的な格子定数の変動が見られ、本研究で作製した KAp セラミックスは確かにカリウムが HAp の結晶格子内に置換していると考えられる。

本研究は、「Bone HAp の高い骨形成能を発現しているイオン種を解明する」という目的のもと進めている。今回は、 K^+ イオンが材料特性に与える影響について調査を行なった。その結果、 K^+ イオンが HAp に置換することで、焼結性の向上や高いアパタイト形成能の発現することが明らかとなった。

5. 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] M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda and H. Yoshimura, *Key Engineer Mater.*, **493-494**, 320-324(2012).
- [4] 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, 石井 賢, 松本守雄, 相澤 守, 日本セラミックス協会 2013 年年会講演予稿集(2013)1J20.
- [5] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78 (2006).

6. 成果報告

*口頭発表

- 1) ○横田倫啓, 本田みちよ, 相澤 守, “超音波噴霧熱分解法によるカリウム置換アパタイトセラミックスの作製とその材料特性”, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都) 2015.11.9-10
- 2) ○T. Yokota, M. Honda and M. Aizawa, “Fabrication of Potassium-substituted Hydroxyapatite Ceramics by Ultrasonic Spray-pyrolysis Technique and Their Material Properties”, 15th Asian Bioceramics Symposium (ABC2015), Tokyo Medical and Dental University (Tokyo) 2015.12.9-11

超音波噴霧熱分解法により作製した金属イオン置換アパタイトセラミックスの材料特性と
骨髄間葉系幹細胞を用いた *in vitro* 評価

清水友亮¹⁾・中村まり子²⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機構

**Material Properties of Metallic Ion Substituted Apatite Ceramics by Ultrasonic Spray-pyrolysis Technique
and their *in vitro* evaluation using rat bone marrow stromal cells**

Yusuke SHIMIZU¹⁾, Mariko NAKAMURA²⁾, Michiyo HONDA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property Meiji University

1. 緒言

ヒトの硬組織を構成しているアパタイトは多くの微量元素を含んでいる。水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp)は人工的に合成することができるが、合成 HAp は骨誘導能を持たないため自家骨に比べ臨床的な成績で劣る。これは自家骨中に含まれる種々のイオンが骨誘導を誘起しているという可能性を示唆している。これまでに我々はそのモデルとなりうる HAp に骨ミネラルを添加した「骨ミネラル含有アパタイト (Bone HAp) セラミックス」の作製に成功している[1]。純粋な HAp セラミックスと比較して、この Bone HAp は *in vitro* において骨芽細胞の分化を促進すること[2]、*in vivo* においてセラミックス周囲での骨形成を亢進することを明らかにした。しかしながら、どのイオン種がこの Bone HAp の高い生体活性の発現に寄与しているのかをまだ特定できていない。そこで、本研究では、まず生体骨に含有されている骨ミネラル中の「 Mg^{2+} イオン」および「 Na^+ イオン」に着目し、 Mg^{2+} イオンと Na^+ イオンをそれぞれ置換した HAp (MgAp, NaAp) を超音波噴霧熱分解法により合成し、ついでセラミックスの作製およびラット骨髄間葉系幹細胞(RBMCs)による *in vitro* 評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 マグネシウム置換アパタイト (MgAp)

噴霧熱分解に適用した出発溶液の Mg^{2+} イオン濃度は、生成する HAp の組成式 $\text{Ca}_{10-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ の x の値が 0, 0.04, 0.1, 0.15, 0.25 となるように調製した。試料粉体の略号は x の値を用いて、例えば“MgAp(0.1)”のように表記する。合成粉体を 100 MPa で二回成形し、1150 °C で 5 時間、空気雰囲気下で焼成することで MgAp セラミックスを作製した。得られた粉体およびセラミックスのキャラクターゼーションを粉末 X 線回折法 (XRD)、誘導結合プラズマ発光分光法 (ICP-AES)、走査型顕微鏡法 (SEM)、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX)、ゼータ電位測定などにより行なった。次に、MgAp セラミ

ックスが RBMCs の骨芽細胞への分化に与える影響を調査するため、セラミックス上に RBMCs を直接播種して 37 °C, 5% CO₂ 雰囲気下で 14 日間培養を行ない、RBMCs 細胞のカルシウム沈着部位をアリザリンレッド S により染色した。

2-2 ナトリウム置換アパタイト (NaAp)

出発溶液の Na⁺イオン濃度は、生成する HAp の組成式 Ca_{10-x}Na_x(PO₄)₆(OH)₂ の x の値が 0, 0.25, 0.375, 0.5 となるように調製した。試料粉体の略号は、x=0 のサンプルを Pure HAp, x=0.25, 0.375, 0.5 のサンプルを順に NaAp-1, 2, 3 と表記する。合成粉体を 100 MPa で二回成形し、1200 °C で 5 時間、水蒸気雰囲気下で焼成することで NaAp セラミックスを作製した。得られた粉体およびセラミックスのキャラクタリゼーションを XRD, ICP-AES, SEM, EDX, ゼータ電位測定などにより行なった。また、NaAp セラミックスの生体活性能 (アパタイト形成能) を調査するために、セラミックスを疑似体液 (SBF) に 37 °C、湿度 78 % で 6, 12, 24, 72 時間浸漬した後、表面の微細構造観察を行なった。

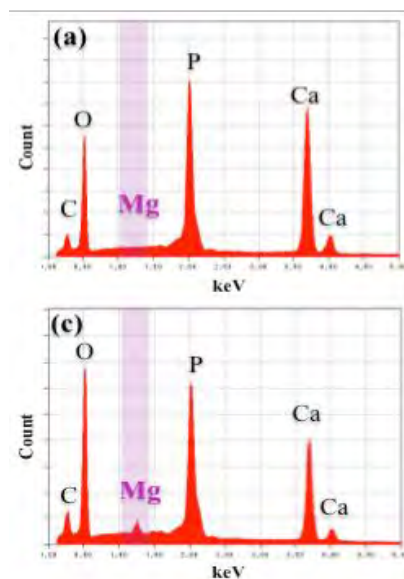


図 1 MgAp セラミックス表面の元素分析結果
(a) MgAp(0) (c) MgAp(0.25)

3. 実験結果と考察

3-1 マグネシウム置換アパタイト (MgAp)

MgAp 成形体を 1150 °C で焼成して得たセラミックスの結晶相は HAp が主結晶相であったが、Mg 添加量の増加とともにわずかにβ-リン酸三カルシウム (β-TCP) 相も認められた。また、EDX により MgAp セラミックス表面の元素分析を行なった結果、Mg のピークが検出されたことから、MgAp セラミックス表面に Mg が存在していることが明らかとなった (図 1)。*In vitro* 実験において、細胞内のカルシウム沈着は HAp (MgAp(0)) セラミックスよりも MgAp セラミックスの方が多くの箇所で確認された(図 2)。そのときの培地中の Mg²⁺イオン濃度を測定したところ、MgAp セラミックスからは Mg²⁺イオンがほとんど溶出していなかったことから、HAp に置換された Mg²⁺イオンが間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進していることを示している。

3-2 ナトリウム置換アパタイト (NaAp)

XRD の結果より、合成粉体および 1200 °C で焼成して得たすべての NaAp セラミックスの結晶相

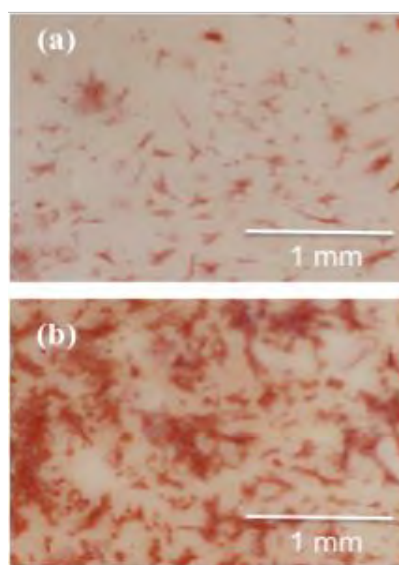


図 2 アリザリンレッド S により RBMCs を染色した結果
(a) MgAp(0) (b) MgAp(0.1)

は、HAp 単一相であることが明らかとなった。セラミックス表面の微細構造観察の結果、Pure HAp セラミックスと比較して、NaAp セラミックスの粒子径は増大していた。また、NaAp セラミックス表面の元素分析の結果、Na のピークが検出されたことから、NaAp セラミックス表面に Na が存在していることが明らかとなった。次に、SBF を用いて NaAp セラミックスの生体活性能を調査したところ、他のセラミックスと比較して NaAp-3 セラミックス上には、多くのアパタイトが析出している様子が観察された (図 3)。

3-3 結論

超音波噴霧熱分解法を用いて MgAp および NaAp セラミックスの作製に成功した。これらのセラミックスは、骨芽細胞への分化促進や生体活性能の向上が確認されたことから、Mg²⁺イオン、Na⁺イオンは Bone HAp の高い生体活性能の発現に寄与しているものと考えられる。

4. 参考文献

- [1] T. Fujino and M. Aizawa, *Arch. BioCeram. Res.*, **7**, 175-178(2007).
 [2] M. Aizawa et al., *Key Eng. Mat.*, **493-494**, 320-324(2012).

5. 本研究に関する成果報告(2014 年度分)

*論文投稿 (査読つき Proceedings 含む)

- 1) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties”, *Key Eng. Mater.*, **631**, 107-112 (2015).

*学会発表 (国際会議)

- 1) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda and M. Aizawa, “Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (26 Bioceramics), Barcelona Plaza Hotel, Barcelona, Spain, 6th-8th, November 2014.

*学会発表 (国内会議)

- 1) 清水友亮・中村まり子・本田みちよ・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法を用いたマグネシウム置換アパタイトセラミックスの作製および骨芽細胞を用いた *in vitro* 評価”、第 24 回無機リン化学討論会、高知会館、日本無機リン化学会、2014.9.25-26

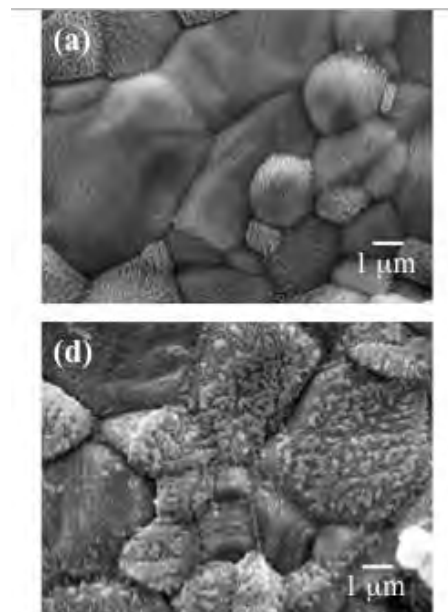


図 3 SBF 浸漬 6 時間後の NaAp セラミックスの微細構造観察
 (a) Pure HAp (d) NaAp-3

ホウ素含有アパタイトセラミックスと共存培養した
マウス脾臓由来 T, B, NK 細胞の細胞比率とその免疫評価

中村まり子¹⁾・永井重徳²⁾・相澤 守³⁾

- 1) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 2) 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子免疫学分野
- 3) 明治大学 理工学部 応用化学科

Cell population of T, B and NK cells derived from the spleen of mouse cultured with boron-containing
apatite ceramics and its immunoassay

Mariko NAKAMURA¹⁾, Shigenori NAGAI²⁾ and Mamoru AIZAWA³⁾

- 1) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University
- 2) Department of Molecular Immunology, Tokyo Medical and Dental University
- 3) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

現在、日本における死因の第一位は悪性新生物となっており、その治療法として免疫療法が期待されている。リンパ球活性の例として、フェニルボロン酸基を持つポリマーの OH 基がリンパ球の糖鎖部位として特異的に結合し、リンパ球活性能を向上させるという報告がある[1]。一方、セラミックスの原料粉体を得る方法の一つである超音波噴霧熱分解法は、出発溶液の組成比が合成粉体に直接反映しやすいという特長がある [2]。本研究では、複雑な組成を持つホウ素含有アパタイト ($\text{Ca}_{9.5+0.5x}\{(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{BO}_3)_x\}\{(\text{BO}_2)_{1-x}\text{O}_x\}$ ($0 \leq x \leq 1$); BAp) の合成を行ない、得られた粉体を用いてセラミックスを作製した。作製したセラミックスを用いて、免疫細胞応答性を調査したので報告する。

2. 実験方法

2-1 ホウ素含有アパタイトの作製

BAp の一般式に基づいて、 $x=0.4, 0.5$ および 0.6 となるように、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, H_3BO_3 , HNO_3 を出発物質に用いて試料溶液を調製し、超音波噴霧熱分解により BAp 粉体を合成した (電気炉温度: 下部 400°C , 上部 1000°C , 超音波振動数 2.4 MHz , 空気流量 $1.5\text{ dm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$)。得られた BAp 粉体 (約 0.2 g) を成形圧 100 MPa で一軸加圧成形した後、 1200°C で 5 h 焼成し、BAp セラミックスを作製した (直径 $\sim 7.9\text{ mm}$, 厚さ $\sim 1.4\text{ mm}$) [3]。なお、ホウ素を含まない水酸アパタイト (HAp) セラミックスも同様に作製した。原料粉体および作製したセラミックスについて、X 線回折測定法 (XRD)、フーリエ変換型赤外分光光度法 (FT-IR)、走査型電子顕微鏡法 (SEM) および誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) などによる特性評価を行なった。

2-2 免疫細胞の培養

免疫細胞について調査するため、マウス (C57BL/6N♀/7-12 weeks/17-24 g) から脾臓を取り出し、赤血球を取り除くことで、脾臓細胞の回収を行なった。また、脾臓細胞から、Mouse NK CELL enrichment kit (STEMCELL 社) を用いてNK細胞の濃縮を行なった。脾臓細胞およびNK細胞を 1.0×10^6 cells/cm³ の濃度で各セラミックス上に播種し、1日間培養した。細胞を回収した後、フローサイトメトリー解析を行なうことで各種免疫細胞の割合および分化段階を調査した。フローサイトメトリー解析で用いた抗体は、T細胞の表面マーカーとして「抗CD3抗体」、成熟T細胞の“ヘルパー”サブセットに発現するマーカーとして「抗CD4抗体」、成熟T細胞の“細胞障害性”サブセットに発現するマーカーとして「抗CD8抗体」、B細胞の表面マーカーとして「抗CD19抗体」、NK細胞のマーカーとして「抗NK1.1抗体」、NK細胞の成熟マーカーとして「抗CD11b抗体」および、NK細胞の活性化マーカーとして「抗CD69抗体」を使用した。

3. 実験結果と考察

3-1 BApのキャラクタリゼーション

合成したHApのXRDパターンは、アパタイト単一相であり、さらにFT-IRスペクトルの測定では、PO₄基およびOH基に帰属する吸収が認められた。また、合成粉体を100MPaで成形し1200℃で5h焼成することで、HApセラミックスを作製した。この1200℃セラミックスのXRDパターンは、アパタイト単一相であり、その相対密度は88%であった。

合成したBApのXRDパターンは、いずれの組成で合成した粉体もアパタイト単一相であることがわかり、FT-IRの測定からは、その合成粉体中にPO₄基、BO₂基およびBO₃基に帰属する吸収が確認された。また、ICP-AESにより、各仕込み組成xに対するCa, P, Bの含有量と理論値を比較した結果、超音波噴霧熱分解法を用いることにより、ホウ素がほぼ一般式に従った組成で含有されていることがわかった。これらの合成粉体を100MPaで成形し、1200℃で5h焼成することで、BApセラミックスを作製した。これらのBApセラミックスのXRDパターンは、x=0.5およびx=0.6のセラミックスはHAp単一相であったが、x=0.4では第二相としてα-リン酸三カルシウム(α-Ca₃(PO₄)₂; α-TCP)が認められ、その相対密度はx=0.4は72%、x=0.5は92%およびx=0.6は92%であった。FT-IRスペクトルでは、xの値が大きくなるにつれて、BO₃基の吸収が強くなり、代わってBO₂基の吸収が減少した。xの値が小さくなるにつれて、BO₃基は吸収が減少し、BO₂基は吸収が増加する傾向が確認できた。また、ICP-AESから焼成による化学組成の変化は確認されなかった。以上の結果から、組成の制御されたBApセラミックスの作製が可能であることがわかった。

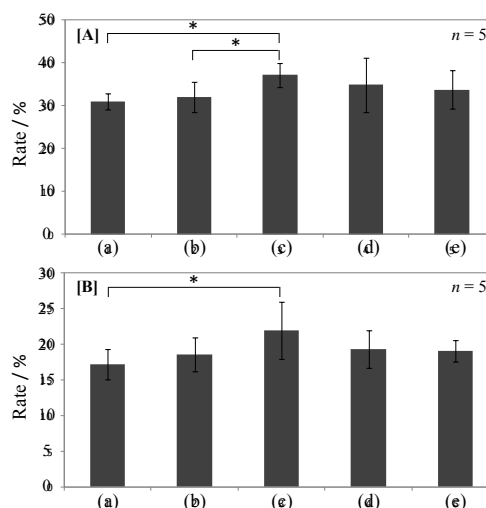


Fig.1 Rate of [A] helper T cells, and [B] killer T cells
(a) Control, (b) HAp, (c) BAp(x=0.4), (d) BAp(x=0.5) and
(e) BAp(x=0.6). Error bars : standard deviation, * $p < 0.05$

3-2 BAp 共存培養における免疫細胞のフローサイトメトリー解析

作製した HAp および BAp セラミックス共存下で免疫細胞を培養し、その増殖性および細胞比率を調査した。セラミックス共存下で 1 日間培養した脾臓細胞のフローサイトメトリー解析の結果を Fig.1 に示す。BAp セラミックス(x=0.4) において、ヘルパーT 細胞、キラーT 細胞、B 細胞の細胞群の中で、特にヘルパーT 細胞およびキラーT 細胞の割合が高い値を示した。しかしながら、T 細胞の増加に伴い B 細胞の割合は低い値を示した。

また、フローサイトメトリー解析により、培養した NK 細胞の成熟および活性化を調査した結果、BAp セラミックス は HAp セラミックスと比べて、NK 細胞の成熟および活性化を促進することがわかった。さらに、BAp および HAp セラミックス共存下で培養した細胞の増殖性は、Control (ポリスチレンプレート) とほぼ同等であった。

以上の結果から、BAp セラミックス (x=0.4) 共存下で培養することで T 細胞の割合が高い値を示し、また NK 細胞が活性化したことから、BAp セラミックス (x=0.4) は「がん免疫療法」に有用なバイオマテリアル (イムノセラミックス) として期待できる。

4. 参考文献

- [1] 宮崎浩明, 池谷武志, 片岡一則, 岡野光夫, 桜井靖久, 人工臓器, **23(3)**, 978-981 (1994).
- [2] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phosphorus Res. Bull.*, **20**, 61-78(2006).
- [3] M. Nakamura, Z. Zhuang and M. Aizawa, *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 109-113 (2013).

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表 (国際会議)

- 1) M. Nakamura, Z. Zhuang, R. Umeda, S. Nagai and M. Aizawa, “Cellular response of immunocyte to boron-containing apatite ceramics”, International Symposium on Inorganic and Environmental Material 2013 (ISIEM2013), the University of Rennes 1, France, 27th-31th, October 2013.

*学会発表 (国内会議)

- 1) 中村まり子・永井重徳・相澤守、“ホウ素含有アパタイトセラミックスと共存培養したマウス脾臓由来 T, B, NK 細胞の細胞比率とその免疫評価”、日本セラミックス協会 第 26 回秋季シンポジウム、信州大学 (長野キャンパス)、日本セラミックス協会、2013.9.4-6

イノシトールリン酸を表面修飾した水酸アパタイトセラミックス上で培養した
マウス脾臓由来免疫細胞の応答性とその形態観察

山田清貴¹⁾・中村まり子¹⁾・永井重徳²⁾・本田みちよ³⁾・相澤守¹⁾

- 1) 明治大学 理工学部 応用化学科
- 2) 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子免疫学分野
- 3) 明治大学 研究・知財戦略機構

**Responses and morphological observation of immune cells derived from mouse spleen on hydroxyapatite
ceramics surface-modified with inositol phosphate**

**Kiyotaka YAMADA¹⁾, Mariko NAKAMURA¹⁾, Shigenori NAGAI²⁾, Michiyo HONDA³⁾
and Mamoru AIZAWA¹⁾**

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Department of Molecular Immunology, Tokyo Medical and Dental University

3) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

現在、日本人の死亡原因の第一位は悪性新生物（がん）である。がんの治療法としては外科的療法、化学療法、放射線療法といった三大療法が主に用いられているが、これらの療法には人体への悪影響や副作用が報告されており、患者の生活の質（Quality of Life; QOL）の低下が懸念されている。そこで、QOL 向上が期待されるがんの治療法として、現在「免疫療法」が注目されている。この療法は人体への副作用が少ないことやがんの部位を選ばないことなどで新規のがん治療法として期待されている。

本研究では免疫療法の中でも「養子免疫療法」という患者の免疫細胞を体外で培養、増殖、活性化し、患者にその免疫細胞を戻すことで、体内の免疫細胞を活性化させがんを治療する方法に注目し、免疫細胞を体外で培養する際に用いる細胞の免疫賦活を備えた培養基材の作製を行なった。

ここで、水酸アパタイト（Hydroxyapatite; HAp）は生体硬組織の無機成分と類似した組成を有し、直接生体骨と結合することから、人工骨などのバイオマテリアルとして臨床応用されている。また、イノシトールリン酸（inositol hexaphosphate; IP6）は抗がん作用や免疫細胞を活性化させる機能を有するということが報告されている[1]。

本研究ではHApセラミックスにIP6を表面修飾したセラミックス（IP6-HApセラミックス）を作製し、それを培養基材とした際の免疫細胞の応答性を調査するとともに、その免疫細胞の応答が得られた要因を脾臓細胞と基材表面との相互作用（細胞接着）にあると仮定し、基材への細胞接着について調査したので報告する。

2. 実験方法

1) HAp セラミックスの作製

HAp 成形体は既報[2] に従って作製し、温度 1200 °C、保持時間 5 h、昇温速度 10 °C·min⁻¹ で焼成することにより HAp セラミックスを得た。その後、耐水研磨紙 (#400, #1000, #2000 の順) で鏡面研磨を行ない、研磨した試料はエタノール中で超音波洗浄し、160 °C で 1.5 時間乾熱滅菌を行なった。

2) IP6 溶液の調製

IP6 溶液は、50 % フィチン酸溶液を、濃度がそれぞれ 1000, 2000, 3000, 5000 ppm となるように希釈し、NaOH 水溶液で pH をすべて 7.3 に調整することで調製した。なお細胞培養実験に用いる IP6 溶液は 0.2 μm 滅菌フィルターで滅菌を行なった。

3) IP6-HAp セラミックスの作製

1) で得られた HAp セラミックスを 12 well plate へ設置し、2) で得られた各濃度の IP6 溶液 3 cm³ に浸漬させた。浸漬は 37 °C, 5% CO₂ 雰囲気インキュベーター内で 24 時間行なった。また、0 ppm の IP6 溶液として超純水 3 cm³ にも同様に浸漬させた。作製したセラミックスを、IP6 の濃度に応じてそれぞれ、「IP6-HAp(0)」、「IP6-HAp(1000)」、「IP6-HAp(2000)」、「IP6-HAp(3000)」、「IP6-HAp(5000)」と表記する。

4) マウス由来脾臓細胞の培養およびフローサイトメトリー解析

1.0 × 10⁶ cells·cm⁻³ の C57BL/6N マウスの脾臓から採取した細胞を 3) で得られた IP6-HAp セラミックス上に播種し、10% 牛胎児血清, 100 U·cm⁻³ ペニシリン, 100 mg·cm⁻³ ストレプトマイシン, および 50 mmol·dm⁻³ 2-メルカプトエタノールを含有した RPMI-1640 培地で、37 °C, 5% CO₂ 雰囲気インキュベーター内で 1 日間培養を行なった。なお、control としてガラスプレート上に脾臓細胞を播種し、培養を行なった。

培養 1 日後に基材に対する脾臓細胞の応答性の評価として、各免疫細胞の割合の変化をフローサイトメトリーにより解析した。抗体は、T 細胞の表面マーカーとして抗 CD3 抗体 (FITC Hamster Anti-Mouse CD3e, BD Pharmingen)、成熟 T 細胞のヘルパーサブセットマーカーとして抗 CD4 抗体 (PE Rat Anti-Mouse CD4, Beckman Coulter)、B 細胞の表面マーカーとして抗 CD19 抗体 (PerCP-Cy5.5 Rat Anti-Mouse CD19, BD Pharmingen) および成熟 T 細胞の細胞障害性サブセットマーカーとして抗 CD8 抗体 (Pacific Blue RAT anti-MOUSE CD8a, invitrogen) を使用した。なお、各免疫細胞の割合はマウスの個体により異なるため、以下の式を用いて変動率として評価した。

$$\text{変動率 [\%]} = \frac{(\text{セラミックス上で培養した細胞の割合 [\%]} - (\text{control の細胞の割合 [\%]}))}{\text{control の細胞の割合 [\%]}} \times 100$$

5) 培養した脾臓細胞の形態観察

培養 1 日後に培地を除去し、PBS(-) で 3 回洗浄したのち、10% グルタルアルデヒドで細胞の固定を行なった。その後、液体窒素で各試料片を凍結し、24 h 凍結乾燥した。乾燥した試料は白金を 90 s 蒸

着することで観察試料とし、走査型電子顕微鏡により細胞の基材表面における形態を観察した。

また、各サンプル上に残存した細胞の細胞種およびその細胞の基材への接着を確認するため、T細胞の表面マーカーである CD3 と接着因子の一つである vinculin について免疫染色を行ないその形態を観察した。

まず、各サンプル上で1日間培養した脾臓細胞を、培地を除去したのち PBS(-) で3回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで細胞の固定を行なった。0.25% TritonX-100 で細胞膜処理した後、3% Bovine serum albumin でブロッキングを行なった。その後、4°Cの遮光・湿潤下で一次抗体と一晚反応させ、洗浄したのち遮光・湿潤下で1時間二次抗体による蛍光染色を行なった。なお、CD3に対する一次抗体は Hamster anti Mouse CD3 (Clone: 145-2C11, Isotype: IgG) を用い、二次抗体は Alexa Fluor 488 Goat Anti Hamster IgG(H+L) を用いた。また vinculin に対する一次抗体は Mouse monoclonal [hVIN-1] to Vinculin (Clone: hVIN-1, Isotype: IgG1) を用い、二次抗体は Alexa Fluor 594 Goat Anti Mouse IgG1 を用いた。

3. 結果と考察

1) IP6-HAp セラミックスに対する脾臓細胞の応答性

フローサイトメトリー解析により得られた各細胞の割合の変動率を図1, 2に示す。ヘルパーT細胞、キラーT細胞ともcontrolに比較し、全てのセラミックスにおいてその細胞の比率が増加したことが確認できる。さらにヘルパーT細胞については

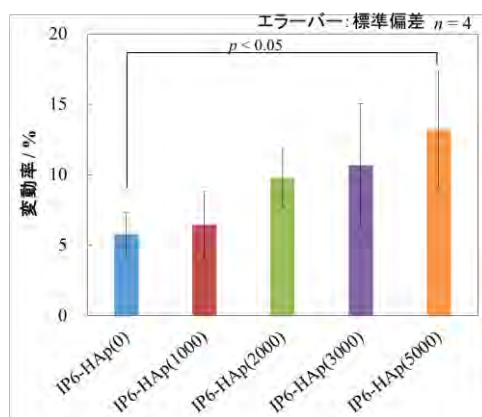


図1 ヘルパーT細胞の変動率

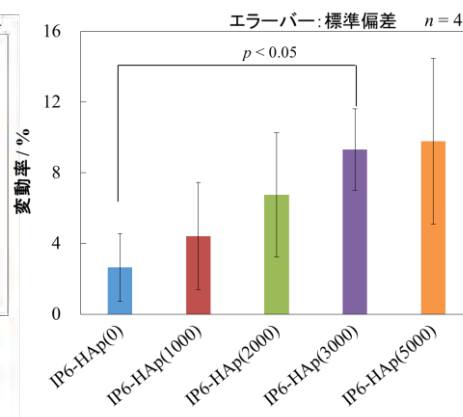


図2 ヘルパーT細胞の変動率

IP6-HAp(3000) および IP6-HAp(5000) において10%を超える増加率を示した。また、キラーT細胞についても IP6-HAp(3000) および IP6-HAp(5000) において10%近い増加率を示した。この結果が得られた要因の一つとして考えられるのは細胞の基材への接触であり、脾臓細胞は浮遊細胞であるが実際に培養する際には細胞は沈降し、基材表面に接触した状態である。そのためセラミックス表面にIP6が固定化されていることで細胞とIP6の接触が多くなり、IP6の刺激を細胞が効果的に受け取っていることが考えられる。

2) 培養した脾臓細胞の形態観察

SEMによる観察結果から、培養した脾臓細胞の一部は、洗浄等の操作後においてもガラスプレートおよびIP6-HApセラミックス上に残存していることが分かった。また、図3に

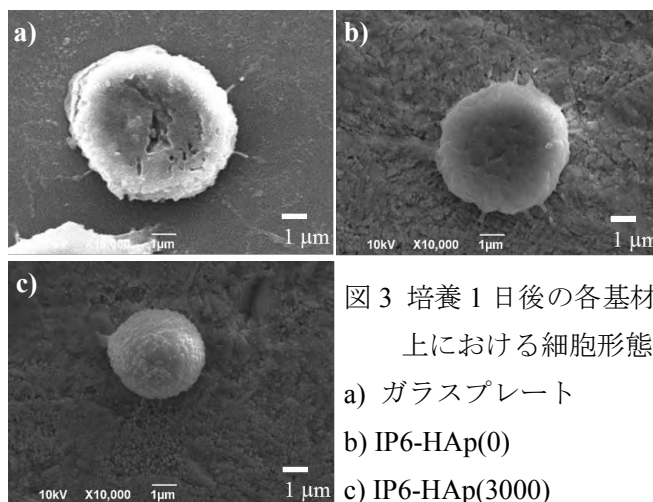


図3 培養1日後の各基材上における細胞形態
a) ガラスプレート
b) IP6-HAp(0)
c) IP6-HAp(3000)

示すように細胞は球状で、仮足を形成し各基材上に接着していると思われる様子も観察された。一方、IP6-HAp セラミックス上で脾臓細胞を培養すると T 細胞の割合が増加したことから、その要因が基材表面への T 細胞の接触であると考え、T 細胞のマーカである CD3 (緑色) と接着因子の一つである vinculin (赤色) の局在を観察した(図 4)。その結果、セラミックス上では細胞膜上に CD3 を発現した球状の細胞において、vinculin の発現が認められた。これらの結果は、基材上に接触または付着している細胞には T 細胞が含まれており、その接触または付着した T 細胞が IP6-HAp セラミックス上の IP6 の刺激を効果的に受けたことが考えられる。

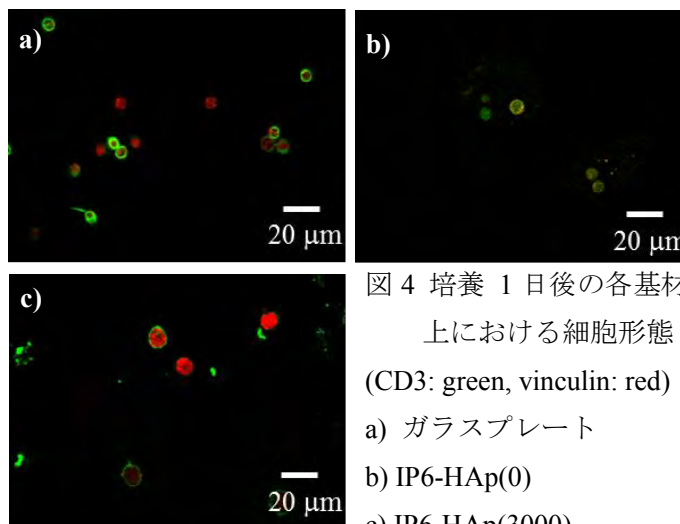


図 4 培養 1 日後の各基材上における細胞形態 (CD3: green, vinculin: red)
a) ガラスプレート
b) IP6-HAp(0)
c) IP6-HAp(3000)

これらの結果は、IP6-HAp セラミックス上で脾臓細胞を培養した際にヘルパー T 細胞およびキラー T 細胞比率が増加した要因が基材に接触した T 細胞の存在が一因となっていると推察できる。さらに、T 細胞は細胞膜外からのカルシウムイオンの流入により、増殖や分化といった応答をする[3]ため、IP6-HAp セラミックスでは、HAp セラミックス表面に修飾された IP6 のキレート化作用と、図 5 に示す IP6 の表面修飾でゼータ電位の低下による静電的な作用によって、表面近傍において局所的にカルシウムイオン濃度の上昇が起こっている可能性がある。このことから、IP6-HAp セラミックスで T 細胞比率の増加が得られたと考えられる。

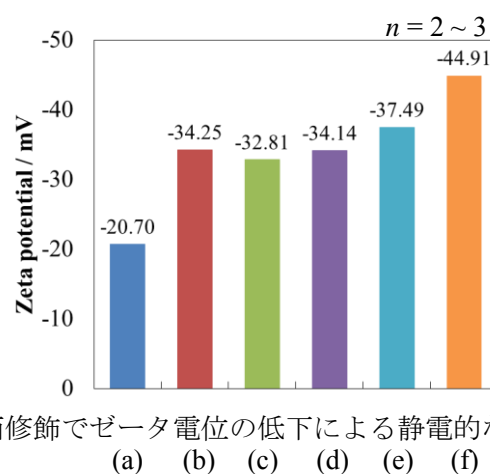


図 5 IP6-HAp セラミックスのゼータ電位
(a) IP6-HAp(0) (b) IP6-HAp(1000)
(c) IP6-HAp(2000) (d) IP6-HAp(3000)
(e) IP6-HAp(4000) (f) IP6-HAp(5000)

4. 結論

HAp セラミックスに IP6 を表面修飾した IP6-HAp セラミックス上で、マウス脾臓由来の免疫細胞を培養し、がん治療に有効な T 細胞の比率の増加が得られ、T 細胞の表面マーカである CD3 を発現した細胞が基材表面で観察された。

そのため、HAp セラミックスの基材表面に IP6 を表面修飾した IP6-HAp セラミックスは、がん治療に有効な T 細胞を効果的に活性化できる「養子免疫療法」に有用なバイオマテリアルとして期待できる。

5. 参考文献

- [1] A. M. Shamsuddin, I. Vucenic and K. E. Cole, *Life Science*, **61**, 343-354 (1997).
[2] Z. Zhuang, T. J. Fujimi, M. Nakamura, T. Konishi, H. Yoshimura and M. Aizawa, *Acta Biomaterialia*, **9**, 6732-6740 (2013).

[3] Elena M Gallo *et al.*, *Nature Immunology*, 7, 25–32 (2006).

6. 成果報告

*特許

相澤 守・中村まり子・○山田清貴・永井重徳、特願 2014-192763、「細胞培養基材、細胞培養基材の製造方法、細胞培養方法、及び細胞培養装置」（出願日 2014 年 9 月 22 日）

*口頭発表

1) ○K. Yamada, M. Nakamura, S. Nagai, M. Honda and M. Aizawa, “Morphological observation of immune cells derived from mouse spleen to hydroxyapatite ceramics surface-modified with inositol phosphate”, 27th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, Discovery Kartika Plaza Hotel, (Bali) 27th-29th, October 2015

2) ○山田清貴, 中村まり子, 永井重徳, 本田みちよ, 相澤 守 “イノシトールリン酸を表面修飾した水酸アパタイトセラミックス上で培養したマウス脾臓由来免疫細胞の形態観察”, 日本セラミックス協会第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学 五福キャンパス (富山) 2015 年 9 月 15~18 日

3) ○K. Yamada, M. Nakamura, S. Nagai, M. Honda and M. Aizawa, “Cellular Responses of Immune Cells Derived from Mouse Spleen to Hydroxyapatite Ceramics Surface-modified with Inositol Phosphate”, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, Catalonia Barcelona Plaza Hotel (Barcelona), 6th-8th, November 2014

4) ○山田清貴, 中村まり子, 永井重徳, 本田みちよ, 相澤 守 “イノシトールリン酸を表面修飾した水酸アパタイトセラミックスに対するマウス脾臓由来免疫細胞の応答性”, 第 24 回無機リン化学討論会, 高知会館 (高知) 2014 年 9 月 25~26 日

CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃ 系ガラスセラミックスの免疫細胞応答性

木造理萌子¹⁾・山田清貴¹⁾・永井重徳²⁾・本田みちよ³⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学 理工学部応用化学科

2) 東京医科歯科大学大学院 歯科学総合研究科 分子免疫学分野

3) 明治大学 研究・知財戦略機構

Cellular responses of immune cells to the glass ceramics in the CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃ system

Rihiko KIZUKURI¹⁾, Kiyotaka YAMADA¹⁾, Shigenori NAGAI²⁾, Michiyo HONDA³⁾
and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Department of Molecular Immunology, Tokyo Medical and Dental University

3) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

現在、日本の死亡率の第1位は悪性新生物（がん）である。がんの治療法として、がん三大療法（外科療法・放射線療法・化学療法）に加えて、近年免疫療法が注目されている。免疫療法とは、免疫細胞を活性化することによりがん細胞を排除しがんを治療するという治療法であり、患者自身の免疫細胞を用いるため副作用が少ないという特徴がある。また、免疫療法のひとつとして、患者自身の免疫細胞を体外で培養、活性化し、再び患者体内に戻すことにより体内の免疫細胞を活性化させ、がんを治療する養子免疫療法がある。本研究では養子免疫療法に着目し、免疫細胞を体外で培養する際の免疫賦活効果を有する培養基材の創製を目的とする。

フェニルボロン酸基を持つポリマーはリンパ球活性を有することが報告されている[1]。これは、フェニルボロン酸基中のBO₂基が糖鎖認識部位として作用するためである。これまでの研究で、アパタイト構造中にBO₂基をもつホウ素含有アパタイト (Ca_{9.5+0.5x}{(PO₄)_{6-x}(BO₃)_x}{(BO₂)_{1-x}O_x} (0 ≤ x ≤ 1); BAp) にも同様に免疫賦活効果を有することが明らかとなっている。また、ゾル-ゲル法により作製されたCaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃ (CPSB) 系ガラスセラミックスはBApを析出することが報告されている[2]。そこで本研究では、CPSB系ガラスセラミックスを作製し、それに対する免疫細胞の応答性を調査した。

2. 実験方法

1) CaO-P₂O₅-SiO₂ (CPS) および CPSB 系ガラスセラミックスの作製とその材料特性

試料溶液は表1にしたがって、出発物質としてCa(NO₃)₂·4H₂O, (NH₄)₂HPO₄, Si(OC₂H₅)₄, H₃BO₃, C₂H₅OH, およびHNO₃を用いて調製した。この溶液を50℃で約10日間静置しゲル化させた。得られたゲルを

80, 100, 150, 200 °C で 8 h 毎に加熱して乾燥させた。乾燥したゲル粉体は、か焼温度 500 °C、保持時間 1 h、昇温速度 10 °C·min⁻¹ (200 °C まで) および 1 °C·min⁻¹ (500 °C まで) でか焼した。得られた粉体を 200 メッシュのふるいを通すまでメノウ乳鉢を用いて粉碎し、か焼粉体を得た。

か焼粉体を 100 MPa で一軸加圧成形し、焼成温度 1100 °C、保持時間 1 h、昇温速度 10 °C·min⁻¹ (500 °C まで) および 1 °C·min⁻¹ (1100 °C まで) で焼成セラミックスを得た。

また、細胞培養に用いたセラミックスは、耐水研磨紙で鏡面研磨を行ない、エタノール中で超音波洗浄した後、160 °C で 1.5 h 乾熱滅菌を行なった。

得られたセラミックスは、粉末 X 線回折法 (XRD)、フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR)、走査型電子顕微鏡法 (SEM) および相対密度の測定により評価した。

2) マウス由来脾臓細胞の培養と評価

マウス (C57BL/6N ♀ 12 weeks) から脾臓を取り出し、脾臓細胞を採取した。1×10⁶ cells·cm⁻³ となるように細胞懸濁液を調製し、2-1) 項で得られたセラミックス上に播種した。また、コントロールには 24 well ポリスチレンプレートを用いた。培養 1 日後、フローサイトメーターを用いて、各種免疫細胞の割合を調査した。抗体は、T 細胞の表面マーカーとして抗 CD3 抗体 (BD)、成熟 T 細胞のヘルパーサブセットマーカーとして抗 CD4 抗体 (BECKMAN)、B 細胞の表面マーカーとして抗 CD19 抗体 (BD) および成熟 T 細胞の細胞障害性サブセットマーカーとして抗 CD8 抗体 (invitrogen) を使用した。

3. 結果と考察

1) CPS および CPSB 系ガラスセラミックスの材料特性

各セラミックスの XRD パターンを図 1 に示す。CPS 系、CPSB1.50 および CPSB1.67 においてβ-リン酸三カルシウム (β-TCP)、CPS2.00, CPS2.50 および CPSB 系において水酸アパタイト (HAp) の存在が確認された。特に CPSB2.00 は HAp 単一相であった。調製した Ca/P 比の増加とともに結晶相はβ-TCP から HAp へと変わった。また、CPSB 系において Ca/P 比が 1.50 および 1.67 の場合でも HAp が生成したことから、B₂O₃ を導入することにより HAp が生成しやすくなったと考えられる。

各セラミックスの FT-IR スペクトルを図 2 に示す。BAp の XRD パターンは HAp と酷似しているため、FT-IR スペクトルにより区別することができる。CPSB1.67, CPSB2.00 および CPSB2.50 において、BAp

表 1 サンプルの仕込み組成

試料名	CaO	P ₂ O ₅	SiO ₂	B ₂ O ₃	Ca/P 比
	mol%	mol%	mol%	mol%	
CPS1.50	37.50	12.50	50.00	0	1.50
CPS1.67	38.48	11.52	50.00	0	1.67
CPS2.00	40.00	10.00	50.00	0	2.00
CPS2.50	41.67	8.33	50.00	0	2.50
CPSB1.50	30.00	10.00	50.00	10.00	1.50
CPSB1.67	30.78	9.22	50.00	10.00	1.67
CPSB2.00	32.00	8.00	50.00	10.00	2.00
CPSB2.50	33.33	6.67	50.00	10.00	2.50

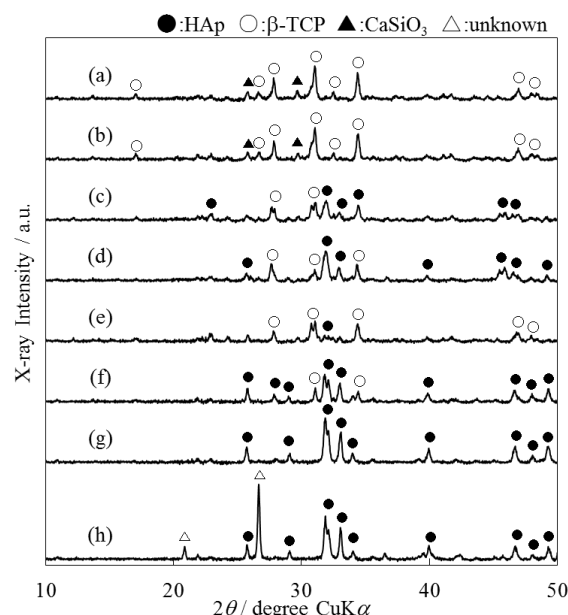


図 1 各セラミックスの XRD パターン (a) CPS1.50, (b) CPS1.67, (c) CPS2.00, (d) CPS2.50, (e) CPSB1.50, (f) CPSB1.67, (g) CPSB2.00, (h) CPSB2.50

特有の BO_2 基の吸収を示したことから、BAp が生成していることが分かった。

代表的なものとして CPS2.00 および CPSB2.00 の SEM 写真を図 3 に示す。SEM による表面形態の観察から、CPS 系では気孔が多く存在していたが、CPSB 系では気孔はほとんど観察されなかった。さらに各セラミックスの相対密度を図 4 に示す。その相対密度は、CPS 系が 61%~70% であるのに対し、CPSB 系は 84%~93% と高く緻密であることが分かる。

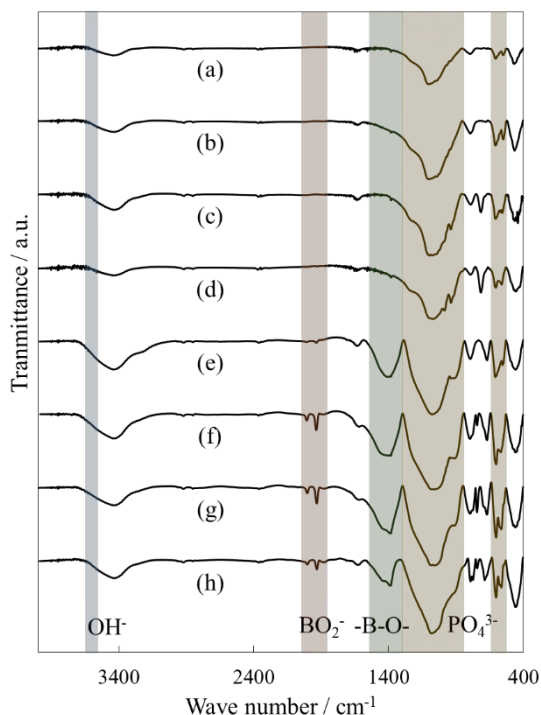


図 2 各セラミックスの FT-IR スペクトル

(a) CPS1.50, (b) CPS1.67, (c) CPS2.00,
(d) CPS2.50, (e) CPSB1.50, (f) CPSB1.67,
(g) CPSB2.00, (h) CPSB2.50

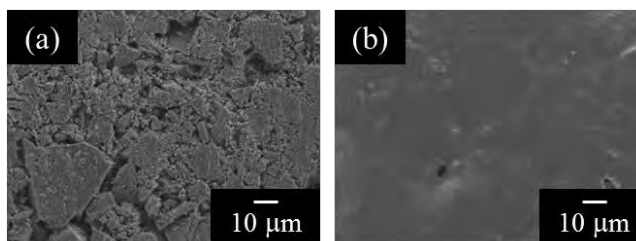


図 3 各セラミックスの SEM 写真

(a) CPS2.00, (b) CPSB2.00

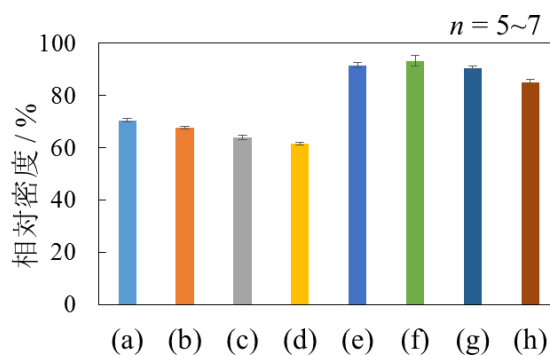


図 4 各セラミックスの相対密度

(a) CPS1.50, (b) CPS1.67, (c) CPS2.00,
(d) CPS2.50, (e) CPSB1.50, (f) CPSB1.67,
(g) CPSB2.00, (h) CPSB2.50

2) CPSB 系ガラスセラミックス上でのマウス由来脾臓細胞の応答性評価

CPSB2.00 は HAp 単一相であり、BAp の生成が確認できたことから、CPSB2.00 共存下で脾臓細胞の

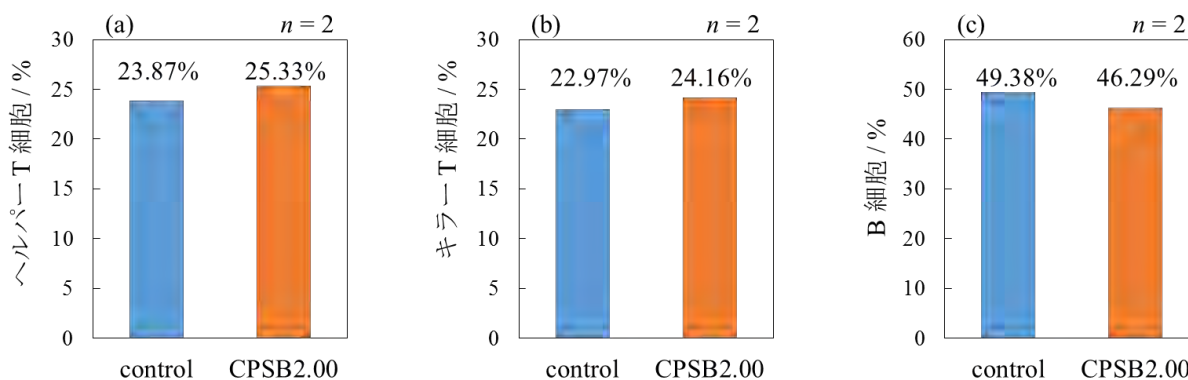


図 5 培養 1 日後の各種免疫細胞の割合

(a) ヘルパーT細胞, (b) キラーT細胞, (c) B細胞

培養を行った。CPSB2.00 上で培養した脾臓細胞のフローサイトメトリー解析結果を図 3 に示す。コントロールと比較してヘルパーT 細胞、キラーT 細胞の割合が高くなっていた。その一方で B 細胞の割合は低くなっていたが、これは T 細胞の割合が増加したため相対的に減少したものと考えられる。ヘルパーT 細胞およびキラーT 細胞の増加は、CPSB2.00 に BAp が生成しているため、BAp の BO₂ 基が糖鎖認識部位として作用したためではないかと考えられる。

4. 結論

本研究では、免疫賦活効果を有する培養基材を創製するために、ゾル-ゲル法を用いて組成を変えた CPS および CPSB 系ガラスセラミックスを作製し、その材料特性および免疫細胞応答性を調査した。材料評価の結果より、今回作製した CPSB 2.00 は HAp 単一相が得られ、BO₂ 基の吸収を示したことから、BAp が生成していることが分かった。

さらに、CPSB2.00 共存下で免疫細胞を培養し、その応答性を調査したところ、コントロールと比較して CPSB2.00 はヘルパーT 細胞およびキラーT 細胞を増加させた。以上より、CPSB2.00 は免疫賦活効果を有する可能性があり、養子免疫療法に有用なバイオマテリアルとして期待できる。

5. 参考文献

- [1] 池谷武志, 宮崎浩明, 片岡一則, 岡野光夫, 桜井靖久, 生体材料, **14(6)**, 260-266(1994).
- [2] M. Aizawa, K. Itatani, F.S. Howell, M. Kinoshita, and A. Kishioka, *J. Ceram. Soc. Japan*, **103**, 547-551(1995).

骨形成を促進させるセラミックスの創製とその生物学的評価

針谷 諒¹⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学研究・知財戦略機構

Fabrication of ceramics with osteo-promoting activity and their biological evaluation

Ryo HARIYA¹⁾, Michiyo HONDA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

再生医療は組織を形成する細胞、その細胞の足場となる材料（スキャフォールド）および細胞の成長因子を巧みに組み合わせて組織を再生する技術である。他の先進諸国に先駆けて、超高齢社会突入した我が国においては、再生医療は多くの人々の生活の質（Quality of Life）の向上を約束する医工学融合技術といえる。

本研究は、再生医療のためのスキャフォールド開発に係わる基礎研究という位置づけである。生体骨に類似した骨組織の再生を目的に、水酸アパタイト（Hydroxyapatite; HAp）と結合組織成長因子（Connective tissue growth factor; CTGF）に着目する。HAp は骨や歯を構成する主成分であり、優れた生体親和性やタンパク質吸着能などが知られている。そのため、HAp は医療分野において人工骨など広く応用されている。一方、CTGF は CCN2 と呼ばれており、CCN タンパク質・遺伝子ファミリーの一つである。CTGF は細胞接着、増殖、血管形成、軟骨形成、及び骨形成など多くの生物学的プロセスにおいて重要な役割を有している。さらに、*in vitro* において、外因性の CTGF は骨芽細胞の増殖及び分化を促進するという報告[1]がある。

そこで、本研究では、CTGF を HAp セラミックス上に担持させ、その CTGF 担持セラミックス上で骨芽細胞を培養することにより、骨芽細胞の増殖や分化に及ぼす影響について調査することを目的とした。なお、本研究では、CTGF の三次元的な組織形成への影響を調査する予備的な検討として、セラミックスを用いた二次的な評価を行なった。

2. 実験方法

1) セラミックスの作製

HAp 成形体は既報[2]に従って作製し、空気雰囲気下 1200 °C、保持時間 5 h、昇温速度 10 °C・min⁻¹ で焼成することによって、HAp セラミックスを作製した。これを、耐水研磨紙 #400, #1000, #2000 の工程で研磨処理を行ない、エタノール中で超音波洗浄を行なった。その後、160 °C, 1.5 h 乾熱滅菌を行なったものを Pure HAp とした。作製したセラミックスの評価は表面のゼータ電位測定、相対密度、表面

粗さなどを測定した。相対密度はセラミックスの直径、厚さ、質量から、かさ密度を算出し、理論密度で割ることで算出した。

2) CTGF 担持セラミックスの作製

CTGF 溶液は、異なる濃度になるように 0.1%BSA-H₂O 溶液で調製した。調製した CTGF 溶液 100 μl を Pure HAp にコーティングし、クリーンベンチ内で風乾した。コーティング処理して得た CTGF 担持 HAp セラミックスを”CTGF HAp(x)”とした。試料名のカッコ内の x はセラミックス表面上に担持させた CTGF 量 (x=0, 50, 100 ng) を表すものとする。

3) 生物学的評価

骨芽細胞のモデルとして、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 を使用した。培地はウシ胎児血清を 10 vol% 添加したα-最小必須培地(α-MEM(+))を使用した。培養基材にはコントロールとして polystyrene 24 well plate, Pure HAp, CTGF HAp (x) (x=0, 50, 100 ng)を用いた。各培養基材に細胞密度 $1.0 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ の細胞懸濁液 1 cm^3 を播種し、5 h の培養を行なった。5 h 後、0.25%トリプシン-EDTA 溶液を用いて各培養基材上の細胞を剥がした。剥がした細胞は血球計算板を用いて算出した。また、相対細胞初期付着率は、polystyrene 24 well plate への細胞初期付着率を 100% とし、以下の式を用いて計算した。

$$A (\%) = (N_5 / N_0) \times 100$$

A:細胞初期付着率

N₅:5 時間後の細胞数

N₀:0 時間後の細胞数

$$R_A = (A_S / A_C) \times 100$$

R_A:相対細胞初期付着率

A_S: Ceramics の初期付着率

A_C:Control の初期付着率

また、組織学的評価には、各培養基材上で 5 h, 24 h 培養した細胞を 4% PFA により固定し、0.25% Triton X-100 で膜処理した。その後、免疫染色を行なった。1次抗体には Anti-Vinculin antibody [hVIN-1] ab 11194 (1:400)、2次抗体には Alexa Fluor[®]594 Goat Anti-Mouse IgG1 (1:500) を使用した。なお、核染色には、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:500)、細胞骨格タンパク質 actin の染色には Alexa Fluor[®]488 Phalloidin (1:500) を用いた。

3. 結果と考察

1) セラミックスの特性評価

作製したセラミックスの研磨前後での相対密度と表面粗さについて結果を図 1 と図 2 に示す。図 1 より、緻密なセラミックスを作製できたと考えられる。また、表面粗さを 0.1 μm 以内に統一することで、セラミックスの表面はタンパク質の吸着や細胞の接着に対し、大きな影響を与えないものと考えられる。さらに、セラミックス

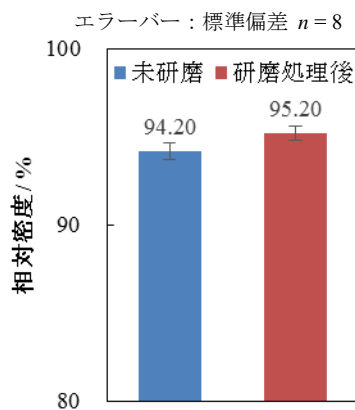


図 1 相対密度

190

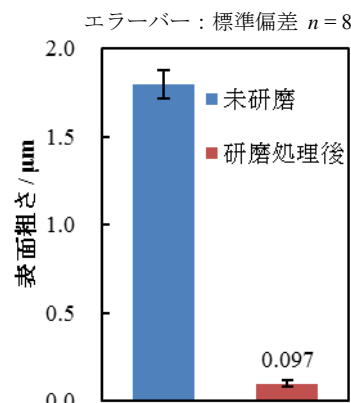


図 2 表面粗さ

のゼータ電位を測定した結果、 $-21.18 \pm (4.00)$ mV であることがわかった。

2) CTGF 担持セラミックスへの細胞接着評価

培養 5 h 後の CTGF 担持セラミックスの相対細胞付着率の結果を図 3 に示す。図 3 より、セラミックス上に接着した細胞数はセラミックスへ担持させた CTGF 量が多くなるにつれて増加する傾向が認められた。また、図 4 に 5 h、図 5 に 24 h 培養後の各培養基材における細胞形態の観察結果を示す。Phalloidin では、アクチン繊維を緑色に、vinculin では、接着斑を赤色に染色した。図 4 より、CTGF HAp (0) において細胞は球状に接着していることがわかった。これは CTGF タンパク質を溶解する際に非接着タンパク質である BSA を使用しており、この BSA のセラミックスへの吸着が原因と考えられる。一方、CTGF を吸着した CTGF HAp (50)、CTGF HAp (100) セラミックス上における細胞は、CTGF HAp (0) と類似して球状で接着しているが、担持している CTGF の刺激によって糸状仮足を形成していることがわかる。また、図 5 の観察結果からも、多くの糸状仮足が形成されていることがわかる。これらの結果は、セラミックスへ担持させた CTGF は細胞接着性を向上させる傾向にあることが分かった。

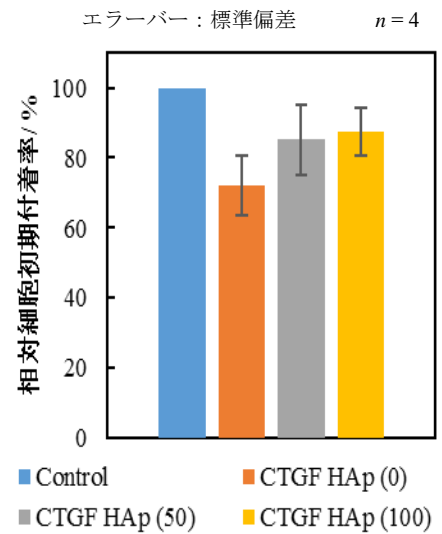


図 3 相対細胞初期付着率

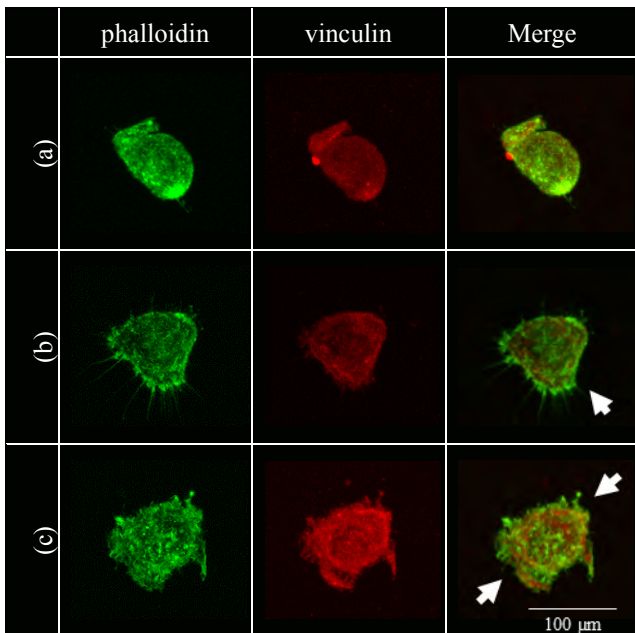


図 4 培養 5 h 後の免疫染色

(a) CTGF HAp (0), (b) CTGF HAp (50), (c) CTGF HAp (100)

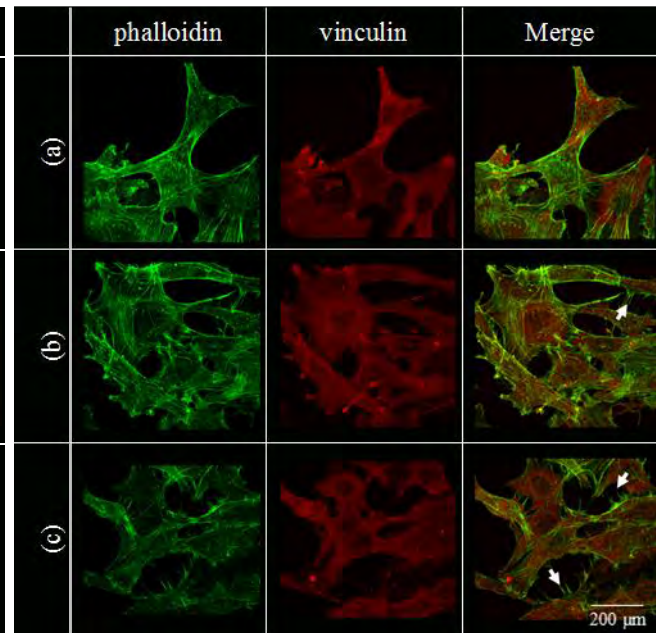


図 5 培養 24 h 後の免疫染色

(a) CTGF HAp (0), (b) CTGF HAp (50), (c) CTGF HAp (100)

4. 結論

セラミックスに成長因子である CTGF を担持させ、骨芽細胞を培養し、その生物学的評価を行なった。

その結果、CTGF は骨芽細胞の接着性を向上させる傾向にあることがわかった。CTGF 担持セラミックスは骨芽細胞の接着を促進させる傾向があり、CTGF は当研究室で開発されたアパタイトファイバースキャフォールド (Apatite-fiber Scaffold; AFS) などの三次元培養基材と組み合わせることにより、高機能を有する新たな足場材料の開発に応用できると考えられる。

5. 参考文献

- [1] T. Nishida, T. Nakanishi, M. Asano, T. Shimo and M. Takigawa, *J. Cell Physiol*, **184**, 197-206 (2000).
- [2] Z. Zhuang, T. J. Fujimi, M. Nakamura, T. Konishi, H. Yoshimura and M. Aizawa, *Acta Biomaterialia*, **9**, 6732-6740 (2013).

フォルステライトのガラス構造における温度履歴の効果

深澤 倫子

明治大学理工学部応用化学科

Effects of quenching process on structure of forsterite glass

Tomoko IKEDA-FUKAZAWA

Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

ガラスは、原子配列に長距離の周期性がなく液体状の構造を持つが、流動性はない固体である。一般的に硬質のものが多く、加工・整形が容易で材料設計がしやすいことから様々な分野で応用されている。しかしながら、ガラス物質は、原子配列に長距離周期性を持つ結晶と比べて、複雑な構造を持つことから、その構造や物性、形成メカニズム等については、不明な点が多く残されている。

当研究室では、フォルステライト（苦土かんらん石）について、ガラス化のメカニズムを明らかにしようとする研究を進めている。フォルステライトは、地球上に存在する主要な鉱物のひとつとして知られているが、ガラスについての研究例は少なく、その構造や物性には不明な点が多い。

フォルステライトの結晶は、組成 $4 \cdot \text{Mg}_2\text{SiO}_4$ の単位胞から成る空間群 $Pbnm$ の斜方晶形をとる [1]。図 1 に、フォルステライトの結晶構造を示す。フォルステライト結晶は、 SiO_4 単位の四面体構造と MgO_6 単位の八面体構造により構成される。 SiO_4 四面体構造と MgO_6 八面体構造は、互いに頂点とする酸素を共有するため、3次元のネットワーク構造を形成する。

一般的なガラスは、結晶を高温まで加熱した融液を急冷する融解法を用いて生成される。本稿では、分子動力学計算を用いて、熔融法により生成したフォルステライトガラスの構造を解析した結果を報告する [2]。

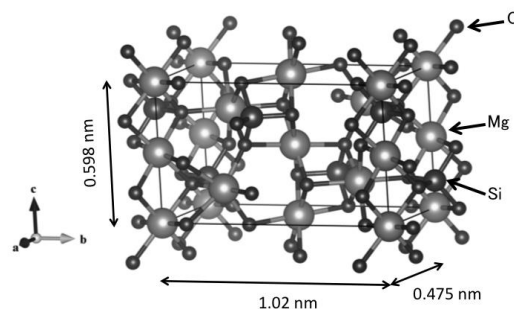


図 1 フォルステライトの結晶構造（温度 298 K、圧力 0.1 MPa） [2]。

2. 実験方法

分子動力学計算には、MXDORTO [3] を用いた。原子間ポテンシャルモデルにおける各原子のパラメーターは、フォルステライト結晶の密度、熱膨張率、圧縮率等について実験値を再現するように精密化した [2]。融解前の初期構造としては、160 個の Mg_2SiO_4 単位から成る 40 単位胞を格子とする計算系を用いた。結晶を 77 K から 3000 K までゆっくりと昇温して融解し、3000 K で十分に緩和した後に $2 \text{ K} \cdot \text{fs}^{-1}$

の速度で融点 (2171 K [4]) 以下の温度まで急冷してガラス構造を得た。図 2 に、3000 K の融液を 298 K まで急冷して生成したフォルステライトガラスの構造を示す。計算は、NTP (定温定圧) アンサンブルで行った。

3. 結果と考察

図 3 に、分子動力学計算により求めたフォルステライトのガラス化過程の密度の温度変化を示す。本研究では、フォルステライト結晶を 77 K から 3000 K までゆっくりと昇温し、融液を 3000 K で十分に緩和した後に $2 \text{ K} \cdot \text{fs}^{-1}$ の速度で融点 (2171 K [4]) 以下の温度まで急冷してガラス構造を得た。図中の▲は、昇温過程の結晶および融液の密度を、●は融液を 3000 K から各温度まで急冷して生成したガラスの密度を示す。

図 3 から、2418 K 付近で結晶の密度が急激に減少することが分かる。この密度の減少は、結晶の融解に起因する。融解は、原子の平均二乗変位 (MSD) の変化からも確認できる。図 4 に示すように、2418 K 付近で、全原子の MSD 値が急激に増加する。

図 3、図 4 の結果から、融液を急冷して生成したガラスの密度および MSD は、融液の密度と MSD 値の温度依存性の曲線を低温まで延長した線上の値をとることが分かる。この結果から、フォルステライトガラス構造は過冷却前の液体の構造に依存することが明らかになった。

さらに、詳細な構造を解析するため、フォルステライトガラスにおける Si-O 相関および Mg-O 相関の二体分布関数を計算した。この結果、Si-O 相関については結晶とほぼ同様の形状を示したが、Mg-O 相関については、最近接原子相関による 0.21 nm 付近のピークが結晶の場合と比べて距離側にシフトする傾向が得られた(図 5(a))。

二体分布関数を用いて Mg の配位数を求めた結果、図 5(b) 示すように、フォルステライトガラス中の Mg の配位数 (平均 5.6) は結晶中の配位数 (6) よりも小さくなること明らかになった。この結果から、フォルステライトガラス中の MgO_x 単位は Mg-O 結合が部分的に切断された歪んだ構造になっていると考えられる。本研究により求めた配位数は、過去に報告されている値 (4.9) よ

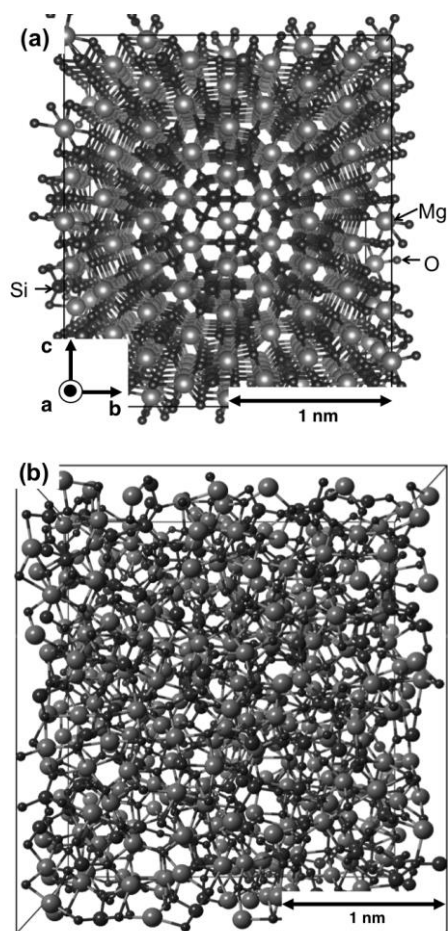


図 2 分子動力学計算によって得た 298 K における (a) フォルステライト結晶と (b) フォルステライトガラスの構造 [2]。

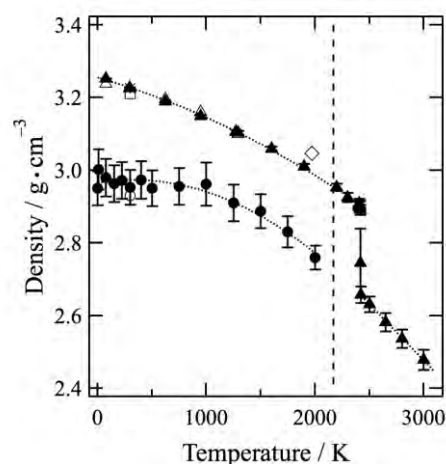


図 3 融解過程 (▲) およびガラス化過程 (●) の密度変化 [2]。

りもやや大きいため、フォルステライトガラスの構造がガラス化過程およびガラス化後の温度履歴に依存することが示唆される。当研究室では、ガラス構造における温度履歴の効果を明らかにするため、さらに研究を進めている。

4. 結論

本研究では、フォルステライトガラスの構造を解析するため、分子動力学計算を行った。この結果、液体を 1000 K 以下まで急冷することにより形成したフォルステライトガラスは、急冷前の液体構造を反映した非平衡構造を持つことが分かった。さらに、二体相関関数の解析により短距離構造の温度変化を解析した。本研究の結果として明らかになった温度履歴の効果は、星間分子雲に存在するフォルステライトガラスの機能を解き明かす上でも重要であると考えられる。

5. 参考文献

- [1] R. M. Hazen, *Am. Mineral.*, **61**, 1280–1293 (1976).
- [2] Tomoko Ikeda-Fukazawa, *J. Soc. Inorg. Mat. Jpn*, **23** (in press).
- [3] K. Kawamura, MXDORTO, *Japan Chemistry Program Exchange*, #029.
- [4] B. T. C. Davis, J. L. England, *J. Geophys. Res.*, **69**, 1113–1116 (1964).
- [5] S. Kohara, K. Suzuya, K. Takeuchi, C. K. Loong, M. Gimsditch, J. K. R. Weber, J. A. Tangeman, T. S. Key, *Science*, **303**, 1649–1652 (2004).

6. 成果報告

*論文

- 1) *Tomoko Ikeda-Fukazawa: Molecular dynamical investigations for effect on temperature history of forsterite glass, *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan* **23** (in press).

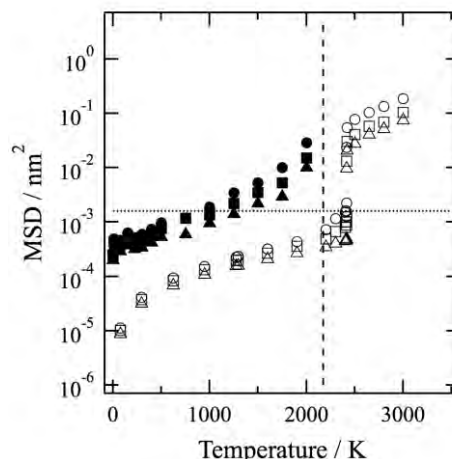


図4 融解過程 (○: Mg, △: Si, □: O) およびガラス化過程 (●: Mg, ▲: Si, ■) の平均二乗変位 (MSD) の変化 [2]。

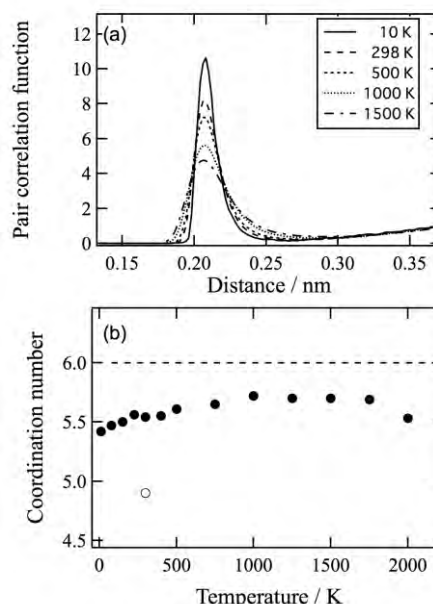


図5 (a) フォルライトガラスにおける Mg-O 相関の二体分布関数および (b) Mg の配位数の温度依存性 [2]。○は文献値を示す[5]。

第 3 章

三次元組織の構築と機能

アパタイトファイバースキャフォールドを装填したラジアルフロー型バイオリアクター
によるラット骨髄細胞からの再生培養骨の構築 —培地循環速度の最適化—

三浦舞子¹⁾・前橋はるか²⁾・松浦知和²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学工学部応用化学科

2) 慈恵会医科大学

Reconstruction of tissue-engineered bone using an apatite-fiber scaffold, rat bone marrow cells and radial-flow bioreactor: optimization of flow rate in circulating medium

Maiko MIURA¹⁾, Haruka MAEHASHI²⁾, Tomokazu MATSUURA²⁾, Mamoru AIZAWA¹⁾

11) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

12) Division of Central Clinical Laboratory, Jikei University Hospital,

1. 緒言

近年、失われた組織に対し細胞・成長因子・スキャフォールドの三要素を組み合わせる「ティッシュエンジニアリング」の研究が活発に行われている。ティッシュエンジニアリングは自己の細胞を用いて組織が再生可能であるので、臓器移植時のドナー不足や免疫拒絶反応など現在抱えている問題を打開することができる。当研究室では、均一沈殿法により合成したアパタイトファイバー (AF) にカーボンビーズ (CB) を添加して焼成することにより三次元連通気孔を持つスキャフォールド (アパタイトファイバースキャフォールド; AFS) を開発し、その *in vitro* 評価および *in vivo* 評価を行ってきた [1, 2]。さらに、我々は AFS をラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) に装填し、ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (RBMC) を三次元培養することにより再生培養骨を構築した[3]。また、AFS と RBMC を用いて再構築した再生培養骨内の骨芽細胞の分化における RFB 内の培地の流速の影響を調査し、物理的刺激により骨芽細胞の分化が促進されることを明らかにした[4]。本研究では、AFS と RBMC を用いて再構築した再生培養骨内の骨芽細胞の分化における RFB 内の培地循環速度の最適化を行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 AFS の作製

既報 1) に従って AFS を作製した。均一沈殿法により合成した AF スラリーに対し質量比で 20 倍量の CB を添加し、成形、焼成させて AFS を作製した。20 倍量の CB を加えて作製した AFS を “AFS2000” と表記する。本実験で用いた AFS2000 は直径~18 mm、高さ~16 mm の円柱状で、気孔率~98%のものであった。

2-2 ラット骨髄細胞の初代培養

4 週齢の雄ラット (Wistar 系) 4 匹の大腿骨および脛骨より骨髄を採取した。採取した骨髄は培養時の抗生剤 (ペニシリン, ストレプトマイシン) を含んだ α -Minimum Essential Medium (α -MEM) で洗浄後、

培養フラスコに播種した。初代培養は 16 日間、10%FBS および抗生物質を含む α -MEM (以下、これを「通常培地」とする) で行われ、37 °C、5% CO₂ に維持したインキュベーター内で行なった。培養培地は骨髓採取 3 日後までは毎日新しいものに交換し、それ以降は 2 日おきに新しいもの交換にした。また、RFB の実験には継代を 1 回行った細胞を使用した。

2-3 RFB による高密度三次元培養

AFS をバイオリクター内に装填し、 1.0×10^7 cells の RBMC を播種して循環培養を行った。このとき流速を 0.4, 1.3, 6.3, 11.5 および $16.5 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ に設定し、構築させた再生培養骨をそれぞれ “Bone#1, 2, 3, 4, 5” と定義する。通常培地で 1 週間培養した後、通常培地に $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ β -グリセロリン酸ナトリウム、 $200 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ L-アスコルビン酸、 $10 \text{ nmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ デキサメタゾン添加した「分化誘導培地」で 1 週間培養した。培養期間中は、培地の pH、グルコース量、乳酸値をモニタリングした。培養終了後の AFS は、組織学的観察、単位 DNA 当たりのアルカリホスファターゼ (ALP) 活性およびオステオカルシン (OC) 産生量の測定を行った。

3. 実験結果と考察

3-1 RFB による高密度循環培養

RFB での培養期間中における RBMC のグルコース消費量および乳酸産生量のモニタリング結果を Fig. 1 (a, b) に示す。これらの結果から、グルコース消費量および乳酸産生量のどちらも経時的に増加していることがわかった。これは細胞が生育し、解糖系によりグルコースが分解された後、解糖されて生じたピルビン酸が一部の嫌気的条件下において乳酸に変わったためであると考えられる。しかしながら、Bone#1 は他のサンプルと比べ生育状態が良好ではなかった。この理由として、培地の循環速度が遅すぎたためにリアクター内の細胞に新鮮な栄養や酸素が行き届かなかったことが考えられる。

3-2 組織学的評価

培養後の AFS を組織学的に評価するために、HE 染色およびアリザリンレッド染色を行なった。HE 染色およびアリザリンレッド S 染色の結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より、Bone#2~Bone#5 においては細胞が AFS の骨格に沿って存在している様子が確認できた。さらに、細胞が AFS の骨格に沿って存在

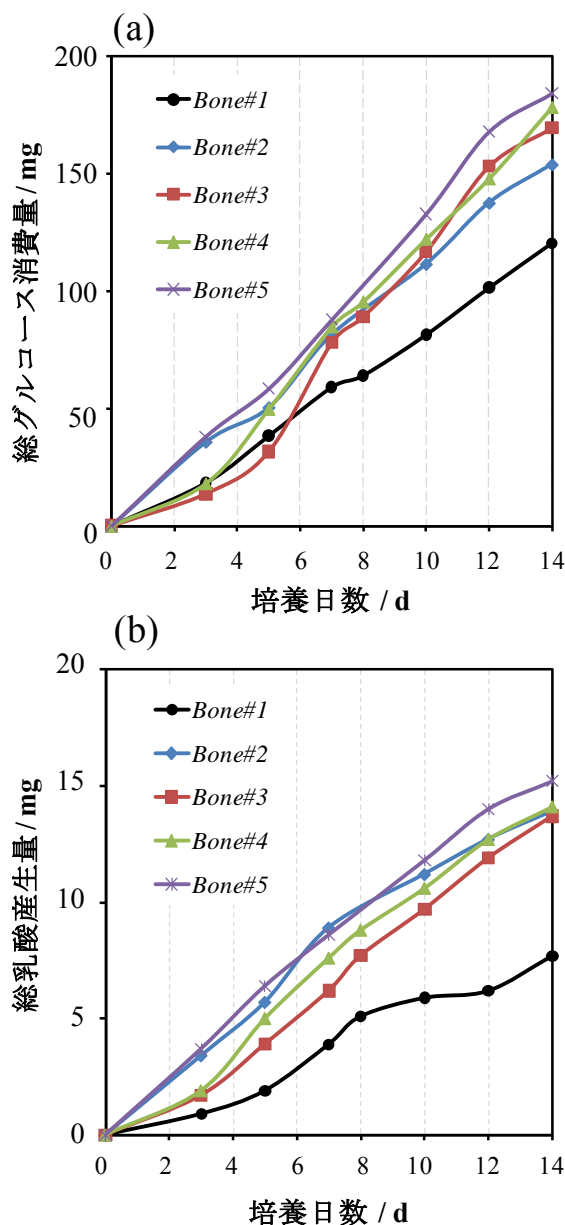


Fig. 1 Changes of the concentration of glucose (a) and lactic acid (b) in the medium

している様子は比較的均一に観察でき、三次元的に細胞が存在している様子が確認できた。しかし、Bone#1 においては、細胞の存在をほとんど確認することができなかった。この結果はグルコース消費量および乳酸産生量の推移の結果と対応しており、リアクター内部で細胞死が起こったことがわかった。

また、Fig. 2 より、Bone#2 および Bone#3 でのみ AFS の骨格に沿って赤色に染まっていることが確認できた。これは、前項の HE 染色の結果より、AFS の骨格に存在している細胞が石灰化物を産生し、その石灰化物が赤色に染まったと考えられる。しかし、bone#1 においては、石灰化物の存在をほとんど確認することができなかった。

3-3 生化学的評価

培養後の AFS における単位 DNA 量当たりの ALP 活性および OC 量の測定結果を Fig. 3 (a, b) に示す。Fig.3 (a) より、Bone#3 の培養条件で構築した再生培養骨が最も高い ALP 活性を示し、他の条件と比べ有意な差があることがわかった。さらに、Fig. 3 (b) より、Bone#3 の培養条件で構築した再生培養骨の OC 産生量も、最も高い値を示すことが分かった。これらの結果は、Bone#3 の培養条件、すなわち RFB

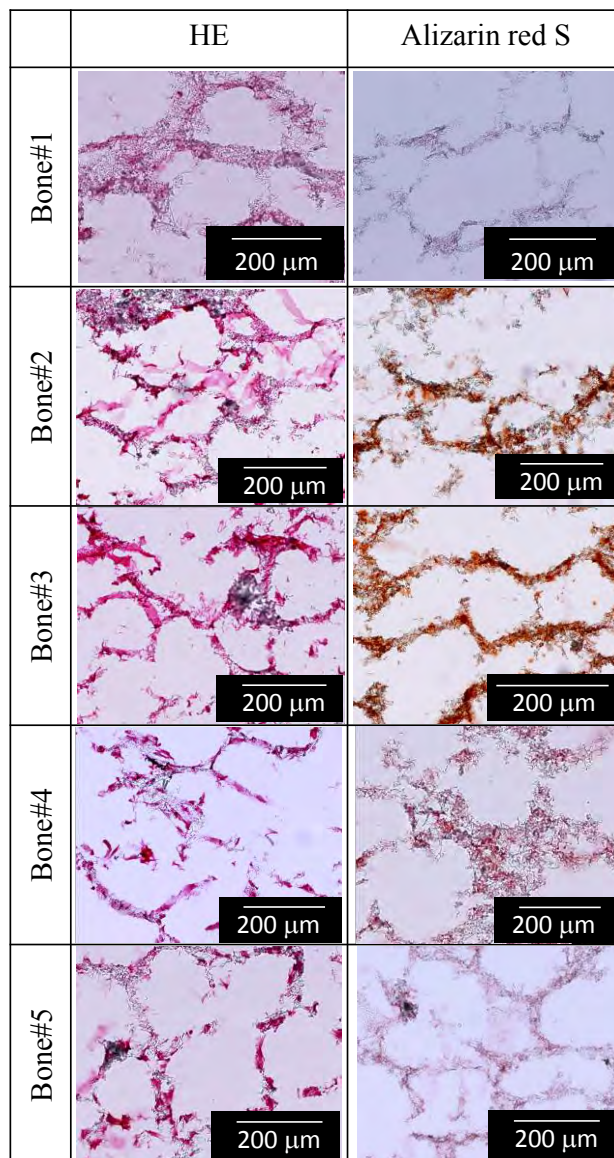


Fig. 2 HE stain and Alizarin red S stain.

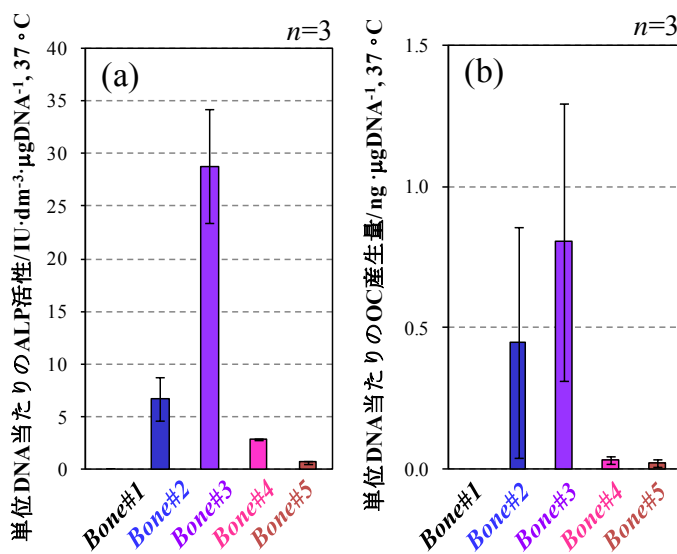


Fig. 3 Level of differentiation into osteoblasts of the RBMCs in the tissue-engineered bone:
 (a) ALP activity normalized for DNA content,
 (b) OC content normalized for DNA content.

の流速が $6.3 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ のとき、最も骨芽細胞の分化を促進することを示しており、ALP 活性の値が有意に高かったことから、骨芽細胞の初期から中期の分化を促進することが考えられる。この理由として、循環される培地による細胞への力学的負荷によるものであると考えられる。細胞に液体流動による刺激が断続的に加わることにより骨芽細胞の活性を高める可能性が考えられる。また、循環速度が速くなることで新鮮な栄養分や酸素を得やすい環境になり、細胞の生育状態が向上したことも一因として考えられる。

しかしながら、循環速度の増加に伴い分化レベルが高くなるわけではなく、Bone#3の培養条件を境に分化レベルが下がることがわかった。この理由として、過度な力学的負荷が細胞にかかり、その生育に悪影響を与えてしまったことが考えられる。以上より、RFBによる骨再生において、Bone#3の培養条件が最も骨芽細胞の分化を促進すると考えられる。

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanazawa, H. Morisue, M. Matsumoto and Y. Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17** 262-268 (2004).
- [2] H. Morisue, M. Matsumoto, K. Chiba, H. Matsumoto, Y. Toyama, M. Aizawa, N. Kanazawa, T. J. Fujimi, H. Uchida, I. Okada, *Spine*, **31**, 1194-2000 (2006).
- [3] J. Fukasawa, Y. Nakada, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, The 3rd International Congress on Ceramics (ICC3), Osaka International Convention Center, Osaka, 14-18 November 2010.
- [4] M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 878-883 (2011).

5. 本研究に関する成果報告(2012年度分)

*論文投稿 (査読つき Proceedings 含む)

- 1) M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Reconstruction of Tissue-Engineered Bone Using an Apatite-Fiber Scaffold, Rat Bone Marrow Cells and Radial-Flow Bioreactor: Optimization of Flow Rate in Circulating Medium”, *Key Eng. Mater.*, **529 - 530**, 397-401 (2012).

*受賞

- 1) 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守、日本セラミックス協会第24回秋季シンポジウム 特定セッション学生優秀発表賞 (2011)

タイトル: アパタイトファイバースキャフォールドとラット骨髄細胞を用いて再構築した再生培養骨の骨芽細胞の分化に及ぼすラジアルフロー型バイオリクター内の培地循環速度の影響

*学会発表 (国際会議)

- 1) M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, “Reconstruction of tissue-engineered bone using an apatite-fiber scaffold, rat bone marrow cells and radial-flow bioreactor: optimization of flow rate in circulating medium”, Bioceramics-24, Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, 21st-24th, October 2012.

*学会発表 (国内会議)

- 1) 三浦舞子・深澤 潤・安富由美子・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装填したラジアルフロー型バイオリクターによるラット骨髄細胞からの再生培養骨の構築 —培地循環速度の最適化—”, 日本セラミックス協会 第25回秋季シンポジウム、名古屋大学 (東山キャンパス)、日本セラミックス協会、2012. 9.19-21

- 2) Mamoru Aizawa, Maiko Miura, Jun Fukasawa, Yumiko Yasutomi, Haruka Maehashi and Tomokazu Matsuura, “Development of tissue-engineered bone by three-dimensional cell culture of rat bone marrow cells using an

apatite-fiber scaffold and a radial-flow bioreactor”, The Sixth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-6), Mielparque-Yokohama ,Kanagawa, Japan, 26th-28th, June 2012

ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた再生培養骨の構築に向けた
アパタイトファイバースキャフォールドの最適気孔構造の検討

中村まり子¹⁾・三浦舞子²⁾・前橋はるか³⁾・松浦知和³⁾・相澤 守²⁾

- 1) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 2) 明治大学 理工学部 応用化学科
- 3) 東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座

**Optimization of pore structure in apatite-fiber scaffold for reconstruction of
tissue-engineered bone using radial-flow bioreactor**

**Mariko NAKAMURA¹⁾, Maiko MIURA¹⁾, Haruka MAEHASHI²⁾,
Tomokazu MATSUURA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾**

1) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

2) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

3) Department of Laboratory Medicine, Jikei University Hospital

1. 緒言

我々はこれまでに三次元的な組織を再生させる技術を確立することを目的として、三次元的な連通気孔構造を持つアパタイトファイバースキャフォールド(AFS)を開発している[1]。本研究では、三次元的な再生培養骨の構築を目的として、気孔率の異なるアパタイトファイバースキャフォールドを装填したラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)を用いてラット骨髄由来間葉系幹細胞(RBMC)を三次元培養し、その組織学および生化学的評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 AFSの作製

既報[1]に従って、アパタイトファイバー(AF)を合成した。成形時に合成したAFスラリーに対して質量比が5, 10, 20倍量のカーボンビーズ(150 μm)を含有させ、焼失させることにより各AFSを作製した。これらを“AFS500, AFS1000, AFS 2000”と表記する。本実験で用いた各AFSは直径~18 mm、高さ~16 mmの円筒状で、気孔率はAFS500で~96%、AFS1000で~97%、AFS2000で~98%であった。

2-2 RFBによる高密度三次元培養

作製した各AFSをバイオリアクター内に装填し、10%FBSおよび抗生剤(ペニシリン, ストレプトマイシン)を含むα-MEM培地(以下、「通常培地」とする)60 cm³を注入後、RBMC細胞懸濁液2.5×10⁵ cells/cm³を40 cm³播種して循環培養を行なった。1週間培養した後、通常培地に10 mmol·dm⁻³β-グリセロリン酸ナトリウム、200 · mol·dm⁻³L-アスコルビン酸、10 nmol·dm⁻³デキサメタゾンを添加した「分化誘導培

地」で1週間培養した。培養期間中は、培地中のpH、グルコース量、乳酸値をモニタリングした。培養終了後のAFSは、組織学的観察、単位DNA当たりのアルカリホスファターゼ(ALP)活性およびオステオカルシン(OC)産生量の測定を行なった。

3. 実験結果と考察

3-1 RFBによる高密度三次元培養およびその生化学的評価

RFBによる高密度循環培養において、グルコースの消費に伴い乳酸が産生されていることが確認できた。このことから、培養基材であるAFSは気孔構造を変えてもRFBによる細胞の高密度循環培養が安定して実施できることが分かった。次に、単位DNA当たりのALP活性およびOC産生量の測定結果をfig.1に示す。AFS2000を培養基材として用いた再生培養骨が、単位DNA当たりの分化レベルが高い細胞が多く存在していることが確認された。さらに、HE染色およびアリザリンレッドS染色による組織学的評価の結果から、AFSの骨格に沿って細胞がより多く増殖しており、三次元的に細胞および石灰化物が存在していることがわかった。しかしながら、AFS500においては石灰化物の沈着をほとんど確認できなかった。

以上の結果より、今回の実験系(予備培養1週間の後、分化誘導培地を用いた培養1週間)では、AFS2000を培養基材に用いたものが最も分化の進行が早かったことから、AFS2000が再生培養骨の構築に有用なバイオマテリアルとして期待できる。

4. 参考文献

[1] M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表(国内会議)

1) 中村まり子・三浦舞子・前橋はるか・松浦知和・相澤 守、“ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた再生培養骨の構築に向けたアパタイトファイバースキャフォールドの最適気孔構造の検討”、第35回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26

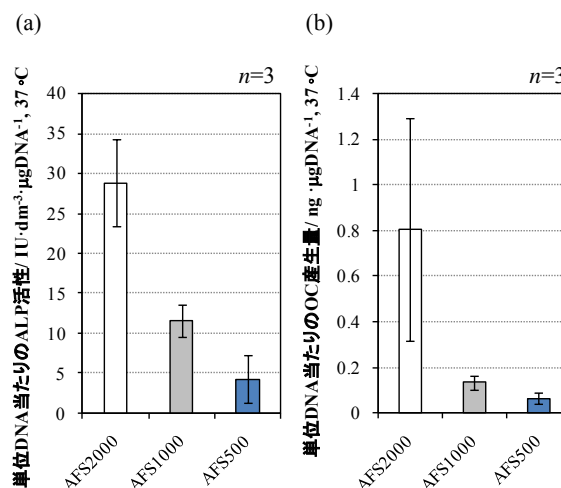


Fig.1 AFSのALPおよびOC産生量
 (a) AFS 1/4個当たりのALP活性 (エラーバー:標準偏差),
 (b) AFS 1/4個当たりのOC産生量(エラーバー:標準偏差)

間葉系幹細胞を培養したアパタイトファイバースキャフォールドの
ラット背部皮下埋入による生体内反応

鈴木 来¹⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

- 1) 明治大学工学部応用化学科
- 2) 明治大学研究・知財戦略機構

**Living reactions of apatite-fiber scaffold cultured with mesenchymal stem cells
by implantation at rat subcutaneous tissue**

Kitaru SUZUKI¹⁾, Michiyo HONDA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

近年、事故や疾病により失われた組織を再生させる“ティッシュエンジニアリング”に関する研究が活発に行なわれている。ティッシュエンジニアリングは、「細胞」、「成長因子」、「足場材料 (スキャフォールド)」の三つの要素から成り立っており、その三要素を適切に組み合わせることで組織再生が実現可能となる。

当研究室では、均一沈殿法により合成したアパタイトファイバー (AF) とカーボンビーズ (CB) を混合して焼成し、繊維の絡み合いによる細孔に加えて、CB の焼失に由来する気孔により細胞が材料内部まで侵入可能な連通気孔を有するアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の開発に成功している。この AFS は *c* 軸方向に配向した AF を用いており、溶解性を有する結晶面 (*a* 面) を多く露出しているため、生体吸収性スキャフォールドとして期待されている。また、AFS は三次元連通気孔を有するため、三次元での組織再生が可能である [1, 2]。さらに AFS をラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) に装填し、ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (RBMC) を三次元培養することにより再生培養骨の構築にも成功している [3]。本研究では RFB を用いて構築した再生培養骨を同種のラットへ埋入する予備的検討として、RBMC と AFS を組み合わせて構築した再生培養骨を同種のラットに対して埋入し、免疫拒絶の有無を調査したので報告する。

2. 実験方法

1) AFS の作製

既報 [1] に従って AFS を作製した。均一沈殿法により合成した AF をスラリーにし、AF に対する質量比で 20 倍量の CB を添加し、成形、焼成させて AFS を作製した。20 倍の CB を加えて作製した AFS を“AFS2000”と表記する。なお、本実験で使用した AFS の寸法は直径 6~8 mm、高さ 3~4 mm の円柱状であり、気孔率は~98%である。

2)RBMC の初代培養

4 週齢の雄ラット (Wistar 系) 4 匹の大腿骨および脛骨から骨髓を採取した[4]。採取した骨髓は抗生物質 (ペニシリン, ストレプトマイシン) を含んだ α -Minimum Essential Medium (α -MEM) で洗浄後、培養フラスコに播種した。初代培養は 1 週間、10%FBS および抗生物質を含む α -MEM (以下、通常培地と定義する) を用いて、37°C で 5% CO₂ に維持したインキュベーター内で行なった。

3)埋入サンプルの作製

2-1 節で作製した AFS を組織培養用 48 well polystyrene plate に入れ、通常培地に浸漬し、初代培養を行なった RBMC を細胞密度 $2.0 \times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{cm}^{-3}$ の細胞懸濁液 1 cm^3 で播種した。培養に用いる培地は通常培地、または分化誘導培地 (Osteoblast-Inducer Reagent, TaKaRa) を用いて 1 週間培養を行なった

4)ラット背部皮下へ埋入と *in vivo* 評価

In vivo 評価には、7 週齢の雄ラット (Wistar 系) を用い、背部皮下に AFS を 2 週間埋入した。サンプルには細胞培養を行なっていない AFS である Control、通常培地を用いて RBMC を培養した AFS (-)、分化誘導培地を用いて培養を行なった AFS (+) の 3 種類を使用した。埋入 2 週間後に取り出し、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) 染色およびアリザリンレッド S (ARS) 染色による組織学的評価を行なった。

3. 結果と考察

1) 埋入前のサンプルの組織学的評価

埋入を行なう前のサンプルにおいて、凍結切片を作製し、埋入後と同様の染色方法で組織学的評価を行なった。図 1 に HE 染色による結果を示す。HE 染色を用いて AFS 中の細胞の局在を調査した。図 1 より分化誘導の有無に関わらず、いずれのサンプルにおいても細胞が AFS 内に侵入していることが分かった。さらに、両サンプルとも AFS の骨格に沿って細胞が生育していることが分かった。

図 2 に ALP 染色の結果を示す。ALP 染色では、ALP 陽性の細胞、すなわち、骨芽細胞の存在を調査した。図 2 より、AFS(-)では ALP 活性陽性の細胞は確認されなかった。一方、AFS(+)では ALP 活性陽性の細胞が観察された。これらの細胞もまた、AFS の骨格に沿って存在していることが分かった。

最後に ARS 染色の結果を図 3 に示す。ARS 染色では培養した細胞の石灰化レベルを調査した。AFS(-)において、わずかな石灰化が確認

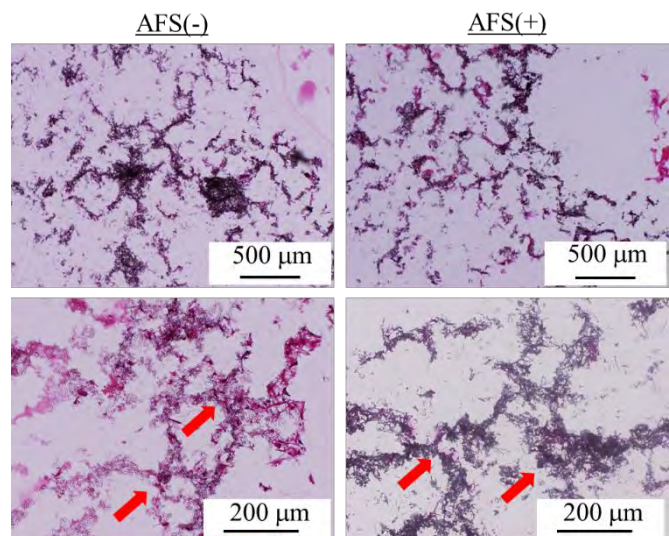


図1 HE染色による組織学的観察像

上段: 低倍率, 下段: 高倍率

矢印: 骨格に沿って細胞が生育していた部分

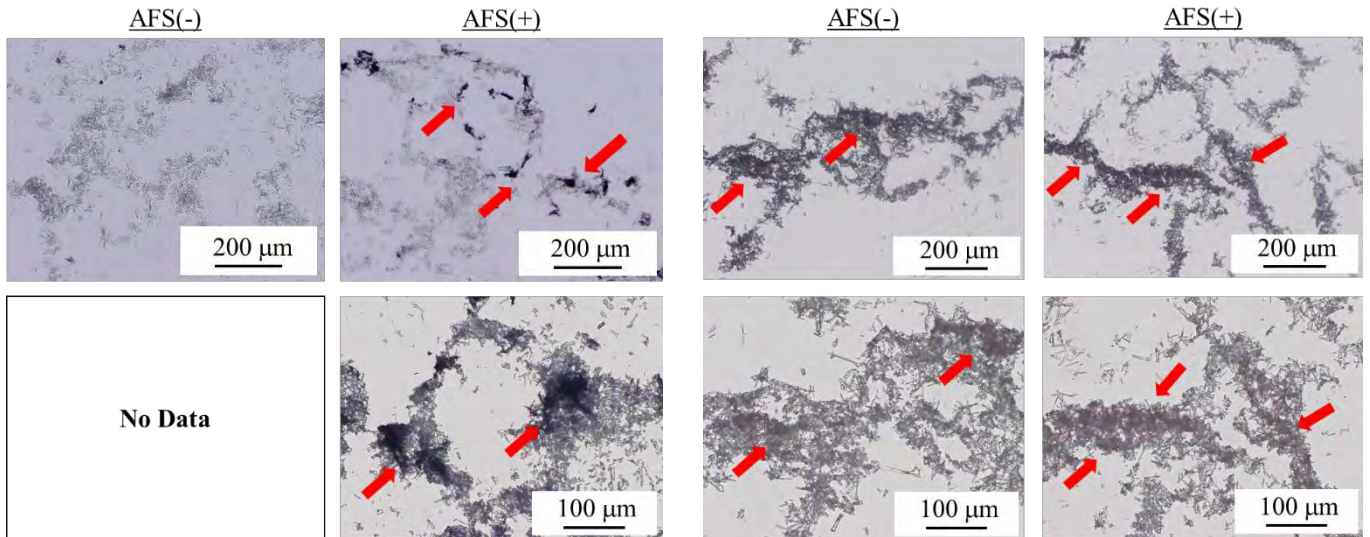


図2 ALP染色による組織学的観察像

上段: 低倍率, 下段: 高倍率

矢印: ALP活性が確認された部分

図3 ARS染色による組織学的観察像

上段: 低倍率, 下段: 高倍率

矢印: 石灰化が確認された部分

され、また AFS(+)においても石灰化が確認された。両サンプルの石灰化レベルを比較すると AFS(+)でより石灰化が起きていた。これは分化誘導を行なったことに由来すると考えられる。AFS(-)においても石灰化が確認されたことについては、水酸アパタイトが骨分化誘導を促進させることが報告されているため[5]、その影響で一部の RBMC において石灰化が確認されたと考えられる。

AFS(+)では骨芽細胞の存在が ALP 染色において明らかになっていることから、骨形成には有利な状態であると考えられる。さらに、ALP は骨分化における初期のマーカーであることから、骨分化へ向かう初期段階の細胞と石灰化した細胞がともに存在していると考えられる。

2) 埋入後のサンプルの組織学的評価

埋入後のサンプルについても埋入前の評価と同様に行なった。図4に示す HE 染色ではサンプル中の細胞の局在を観察した。図4の結果より、全ての AFS において細胞が内部まで侵入していることが分かった。また、埋入したサンプルと組織との境界面において線維性の組織の介在などが見られなかったことから、埋入に伴う炎症反応は惹起されなかったと考えられる。よって、AFS および細胞培養を行なった AFS は免疫拒絶がなく、生体親和性を有していると考えられる。

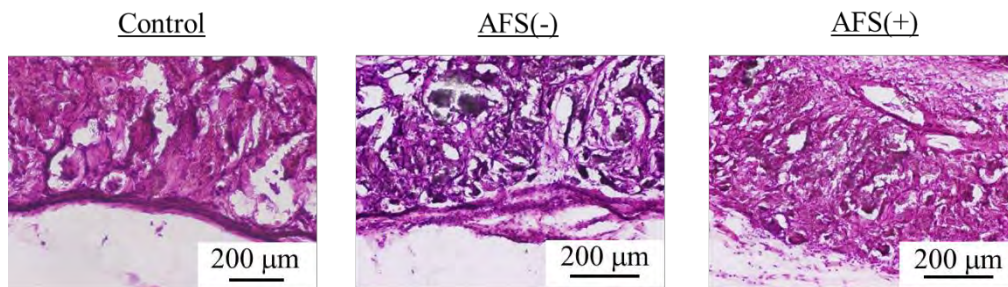


図4 HE染色による組織学的観察像

次に、静置培養時の分化誘導の有無が骨分化に与える影響について調べるために ALP 染色および ARS 染色を行なった。その結果を図 5 および 6 に示す。分化誘導を行なった AFS(+)¹のサンプルにおいては、サンプル内部まで ALP 活性陽性の細胞が観察されただけでなく、石灰化した細胞も確認できた。一方、通常培地で培養を行なった AFS(-)または AFS のみの Control の場合は、ALP、ARS 陽性の細胞の割合は少なかった。

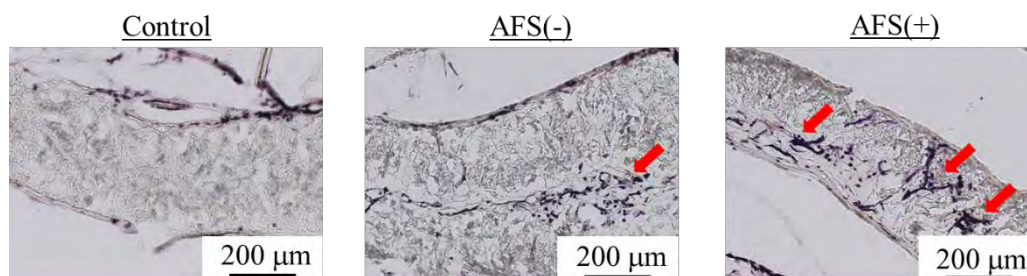


図5 ALP染色による組織学的観察像
矢印: ALP活性陽性が確認された部分

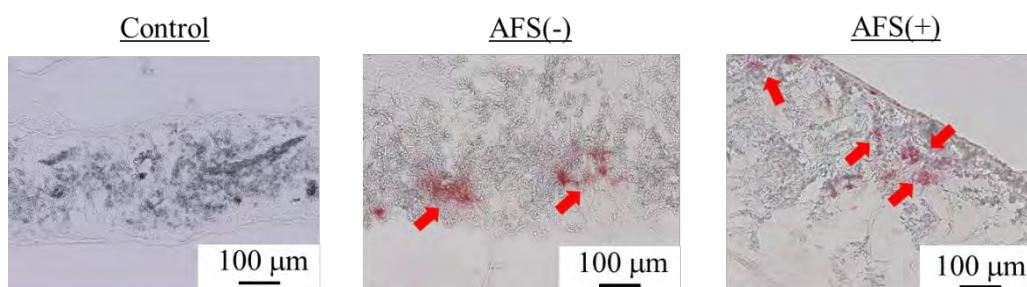


図6 ARS染色による組織学的観察像
矢印: 石灰化が確認された部分

これらの結果の違いはまず、埋入前のサンプルの状態から石灰化を多く示していた AFS(+)¹において骨形成能が強かったためと考えられる。さらに、AFS(+)¹においては ALP 活性陽性である細胞が存在していたことから、その後の骨形成に関与する細胞が多く存在していたことも影響を与えたと考えられる。ゆえに培養条件の違いから分化レベルが異なる細胞が存在し、分化誘導を行なったサンプルでは骨形成に関与する細胞が多かったと考えられる。

4. 結論

AFS と RFB を用いて RBMC を培養し作製した再生培養骨の *in vivo* 評価の予備的検討として、AFS に RBMC を播種し、静置培養後、同系のラットの背部皮下へ埋入を行ない免疫拒絶および骨形成を調査した。全ての埋入サンプルにおいて、免疫拒絶は確認されなかった。ゆえに基材および作製したサンプルは良好な生体親和性を持ったといえる。また、細胞培養を行なった AFS では ALP 活性陽性な細胞および石灰化が見られ、特に分化誘導を行なった AFS では内部にまで ALP 活性陽性な細胞が観察された。

これらの結果から、本検討より得た知見をもとに RFB を用いて構築した再生培養骨の *in vivo* 評価を行なうことで、より良い再生培養骨の構築が可能であると考えられる。また、RFB を用いた再生培養骨

の *in vivo* 評価を行なうことで骨欠損患者への治療に対する新たなアプローチとして期待出来るのではないかと考えられる。

5. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanzawa, H. Morisue and Y. Toyama, *Phosphorus. Res. Bull.*, **17**, 262-268 (2004).
- [2] H. Morisue, M. Matsumoto, K. Chiba, H. Matsumoto, Y. Toyama, M. Aizawa, N. Kanzawa, T. J. Fujimi, H. Uchida, and I. Okada, *Spine*, **31**, 1194-2000 (2006).
- [3] M. Miura, J. Fukasawa, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, *Key Eng. Mater.*, **493-494**, 878-883 (2011).
- [4] C. Maniopoulos et al., *Cell Tissue Res*, **254**, 317-330 (1988).
- [5] T. Noshi, T. Yoshikawa, M. Ikeuchi, Y. Dohi, H. Ohgushi, K. Horiuchi, M. Sugimura, K. Ichijima and K. Yonemasu, *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 621-630 (2000).

6. 成果報告

* 口頭発表

- 1) ○鈴木 来, 本田みちよ, 相澤 守 “間葉系幹細胞を培養したアパタイトファイバースキャフォールドのラット背部皮下埋入による生体内反応”, 第25回無機リン化学討論会, 山形大学 米沢キャンパス (山形) 2015年9月28日

* ポスター発表

- 1) ○鈴木 来, 本田みちよ, 相澤 守 “間葉系幹細胞を培養した多孔質足場材料のラット背部皮下埋入による生物学的評価”, 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都) 2015年11月10日
- 2) ○鈴木 来, 本田みちよ, 相澤 守 “Histological evaluations of apatite-fiber scaffold cultured with mesenchymal stem cells by implantation at rat subcutaneous tissue.”, 15th Asian Bio Ceramics symposium, 東京医科歯科大学 湯島キャンパス (東京) 2015年12月10日

アパタイトファイバースキャフォールドを用いた株化軟骨細胞の三次元培養とその機能評価

宮澤雄太¹⁾・内村祐太¹⁾・中村まり子²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学研究知財戦略機構

In vitro evaluation of chondrogenic cell line ATDC5 cultured in porous apatite-fiber scaffold

Yuta MIYAZAWA¹⁾, Yuta UCHIMIRA¹⁾, Mariko NNAKAMURA¹⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

超高齢社会を迎え、スポーツ人口も年々増加する我が国では、関節疾患の患者が増加している。これらの関節疾患に対して、患者負担の少ない根本的な治療方法の開発が望まれている。そこで注目されているのがティッシュエンジニアリングによる再生医療である。

ティッシュエンジニアリングとは、「細胞」・「細胞が増殖するための足場材料」・「増殖因子」を組み合わせて生体組織を再生させる技術である。我々は、これまでに足場材料としてアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の開発に成功している¹⁾。AFS は、細胞の三次元培養が可能であり、これまでに再生培養骨の構築などに使用してきた。

本研究では、この AFS を用いて軟骨細胞を三次元培養することで、生体外における軟骨組織の構築を究極の目標とする。その予備検討として、本研究では、AFS を用いて株化軟骨細胞 ATDC5 を培養し、AFS に対する細胞応答性を調査した。

2. 実験方法

均一沈殿法²⁾により合成したアパタイトファイバー (AF) に、等量の超純水とエタノールを加えて、1 mass% AF スラリーを調製した。このスラリーに、カーボンビーズ (CB) を添加し、内径 ~16 mmφの塩化ビニル管を用いた吸引濾過により成形した。培養基材として使用した AFS は、この成形体を焼成温度 1300 °C、保持時間 5 h、昇温速度 5 °C/min の条件で、水蒸気雰囲気下で焼成して作製した。作製した AFS は、添加した CB 量にもとづき、“AFS0”、“AFS1000”、“AFS2000”と表記する。例えば、AFS2000は、AFに対して20倍量のCB (wt/wt%) を添加して作製している (寸法: ~16 mmφ × ~2.5 mm)。作製した AFS の微細構造は、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

AFS を用いた細胞培養実験では、AFS に対する ATDC5 細胞の機能発現を明らかにするため、細胞接着および形態、さらに細胞分化について調査した。具体的には、AFS に対して 5.0×10^5 cells/個の ATDC5 細胞を播種し、37 °C に温度設定されたインキュベーターを用いて、95 %の空気と 5 % の二酸化炭素を含む加湿された環境下で 3 週間培養した。培養後のサンプルは、凍結切片の作製に使用した。

作製した凍結切片は、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とアルシアンブルー (AB) 染色により染色した。

3. 実験結果と考察

AFS0, AFS1000 および AFS2000 の微細構造を Figure 1 に示す。AFS0 の微細構造では、アパタイトファイバー同士の絡み合いにより形成されたマイクロ気孔のみ観察され、マクロ気孔が存在せず非常に緻密であることが確認された。一方で、AFS1000 および AFS2000 では、大きな空隙が内部まで連通している様子が確認された。このマクロ気孔は、~150 μm 以上であった(Figure 1; asterisk)。また、マクロ気孔同士を繋ぐ連通気孔は、細胞が内部まで侵入することを可能としている(Figure 1; arrow)。さらに、このマクロ気孔に加え、栄養分の供給、コラーゲン繊維および血球が通るのに十分なマイクロ気孔を有していることが確認された。

培養 21 日目におけるヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびアルシアンブルー (AB) 染色の結果は、Figure 2 および Figure 3 に示す。ここで、図中の asterisk は、AFS のマクロ気孔を示している。HE 染色より、AFS0 では細胞がスキャフォールド表面にのみ接着した。これに対して、マクロ気孔を有する AFS1000 と AFS2000 では、細胞がスキャフォールド内部にも分布し、スキャフォールド骨格に沿って接着したことが確認された。アルシアンブルー染色より、細胞が軟骨特異的タンパク質であるプロテオグリカンを生産したことが見て取れる。また、その分布は HE 染色の結果と対応しており、AFS 上/内部においてプロテオグリカンが確認された。以上の結果より、AFS を足場材料として用いることで三次元的な軟骨組織モデルを構築できる可能性が示された。

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanzawa, H. Morisue, M. Matsumoto and Y. Toyama, *Phosphorous Res. Bull.*, **17**, 262-268 (2004).
- [2] M. Aizawa, H. Ueno, K. Itatani and I. Okada, *J. Euro. Cera. Soc.*, **26**, 501-507 (2006).

5. 本研究に関する成果報告

* 学会発表 (国際会議)

- 1) Y. Miyazawa, Y. Uchimura, M. Nakamura and M. Aizawa, "In vitro evaluation of chondrogenic cell line ATDC5 cultured on dense hydroxyapatite ceramics and in porous apatite-fiber scaffold", 13th Asian BioCeramics Symposium, Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, Dec 2013.

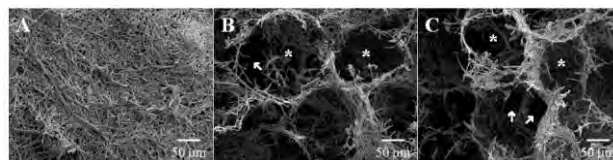


Figure 1 SEM micrographs of the resulting AFSs:
(A) AFS0, (B) AFS1000, (C) AFS2000.

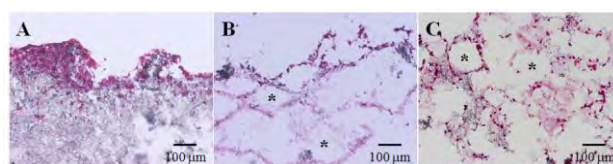


Figure 2 Histological observation by HE staining:
(A) AFS0, (B) AFS1000, (C) AFS2000.

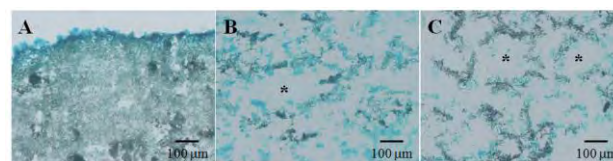


Figure 3 Histological observation by AB staining:
(A) AFS0, (B) AFS1000, (C) AFS2000.

***学会発表（国内会議）**

- 1) 宮澤雄太・内村祐太・中村まり子・相澤 守、“水酸アパタイトセラミックス上で培養した株化軟骨細胞 ATDC5 の *in vitro* 評価（*In vitro* evaluation of chondrogenic cell line ATDC5 cultured on dense HAp ceramics）”、第 23 回無機リン化学討論会、松江テルサ、2013.9.18-21.

高強度化アパタイトファイバースキャフォールドによる
株化軟骨細胞 ATDC5 の三次元培養とその生物学的評価

内村祐太¹⁾・宮澤雄太¹⁾・中村まり子²⁾・本田みちよ²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 明治大学 研究・知財戦略機構

**Three-dimensional Culture of ATDC5 as a Model of Chondrocytes Using
Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property and their Biological Evaluation**

**Yuta UCHIMURA¹⁾, Yuta MIYAZAWA¹⁾, Mariko NAKAMURA²⁾, Michiyo HONDA²⁾
and Mamoru AIZAWA¹⁾**

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

1. 緒言

軟骨は、他の組織に類をみない力学的特性を持つ。さらに、他の組織と異なり軟骨内部に血管が存在していないために一度損傷してしまうと自己治癒することができない。現在、日本では変形性膝関節症や関節リウマチなどの関節疾患の患者が多く存在している。従来の治療法として、ドリリング法やモザイクプラスチックなどの治療法が行なわれてきたが、損傷を完治させるまでには至っていない。そこで、近年失われた組織に対して細胞・成長因子・スキャフォールドの三要素を組み合わせる「ティッシュエンジニアリング」による軟骨組織再生が注目されている。

生体硬組織の主成分である水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は再生医療においてよく利用されている材料であり、これまでに当研究室では尿素を用いた均一沈殿法により繊維状の HAp 単結晶粒子 (アパタイトファイバー; AF) を合成することに成功している[1]。そしてこの AF とカーボンビーズ (CB) を混合し、細胞の三次元培養可能な連通気孔を持つ多孔質アパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の開発に成功している[2]。

本研究では、この AFS を高強度化させた「高強度化 AFS」[3]を用いて三次元培養軟骨を構築することを目標としている。そのための予備的検討として、株化軟骨細胞 ATDC5 を高強度化 AFS 上に播種し、その増殖性や生物学的評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの作製とその材料評価

試料溶液はCa/P比が1.67になるように $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0.167 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ($0.100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ($0.500 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) および HNO_3 ($0.100 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) を混合して調製した。この試料溶液を 80°C で 24 h 加熱後、 90°C で 72 h 加熱して AF を合成した。得られた AF に対して 7 倍量のカーボンビーズ (CB)

を添加し、吸引濾過後、30 MPaの成形圧で一軸加圧成形を行なった。この成形体を1300℃で5h水蒸気雰囲気下で焼成することで高強度化AFSを作製した。なお、作製した高強度化AFSは粒径150μmと20μmのCBを併用し、CBの添加割合に基づき、粒径150μmが100%、20μmが0%のものを『AFS700(100-0)』などと表記する。

合成したAFおよび作製した高強度化AFSは粉末X線回折法(XRD)、フーリエ変換赤外吸収分光法(FT-IR)、走査型電子顕微鏡法(SEM)を用いて評価を行なった。

2-2 高強度化AFSを用いたATDC5の三次元培養およびその生物学的評価

培養を行なう高強度化AFSは直径約15mm、高さ約2mmの円板状とし、細胞を播種する前に160℃、1.5hの乾熱滅菌を行なった。細胞は、株化軟骨細胞株ATDC5を用いた。培地は、ウシ胎児血清を5vol%、インスリンを0.1vol%添加したD-MED/F12培地を用いた。細胞は、 1×10^5 cells/cm³の播種密度で高強度化AFS上に播種した。軟骨組織の構築を評価するため、ATDC5細胞を、高強度化AFSを用いて14日間培養後、Sirius Red & Fast Green染色およびII型コラーゲンの免疫染色などの組織学的評価を行なった。

3. 実験結果と考察

作製したAFS700(100-0)およびAFS700(50-50)は、直径約15.0mm、高さ約2.0mmの円板状であり、XRDの結果により水酸アパタイト単一相であることが確認された。SEMによる形態観察により、作製した高強度化AFSはAFの絡み合いによるマイクロ気孔およびCB焼失によるマクロ気孔を有していることが確認された。これらの気孔は、培地などの栄養分の供給や細胞の侵入に有利に働く。

図1にDNA量測定の結果を示す。高強度化AFSはcontrol(ポリスチレンプレート)と比較して、旺盛な増殖性を示した。培養基材間において、増殖性の差はほとんどみられず、各高強度化AFSは三次元的な構造により細胞が増殖することが可能であることがわかった。

図2に7日間培養後のAFS700(100-0) (a) およびAF700(50-50) (b) 上における細胞のSEM観察像を示す。細胞はAFの絡み合いによって形成されたAFS骨格に沿って接着している様子が確認された。また、マイクロ気孔内にも細胞が凝集して存在していることがわかった。

図3に14日間培養後の各培養基材における免疫染色画像を示す。DAPI染色では、細胞核を青色に染色し、phalloidinでは、アクチン繊維を赤色に、軟骨特有の分化マーカーであるII型コラーゲンを緑色に染色した。図3のDAPIおよびphalloidin染色により、SEMの形態観察(図2)と同様に細胞がAFS骨格に沿って増殖している様子が観察された。いずれの高強度化

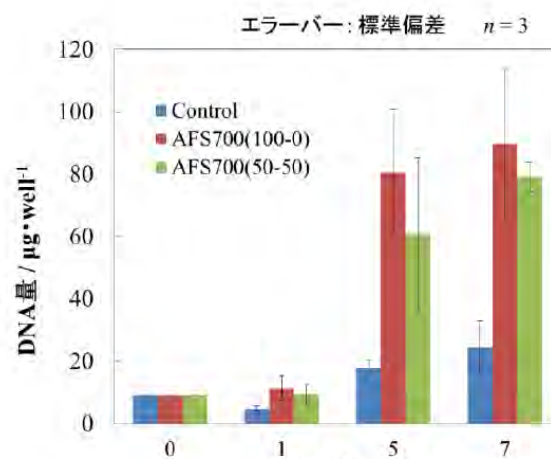


図1 DNA量の測定結果

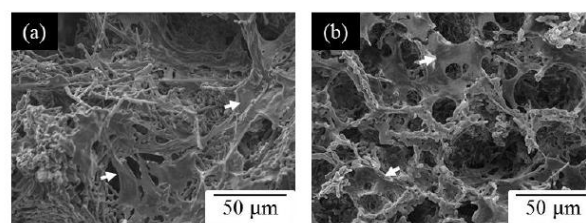


図2 各培養基材における細胞の形態観察
(a) AFS700(100-0) (b) AFS700(50-50)
(白矢印: 細胞)

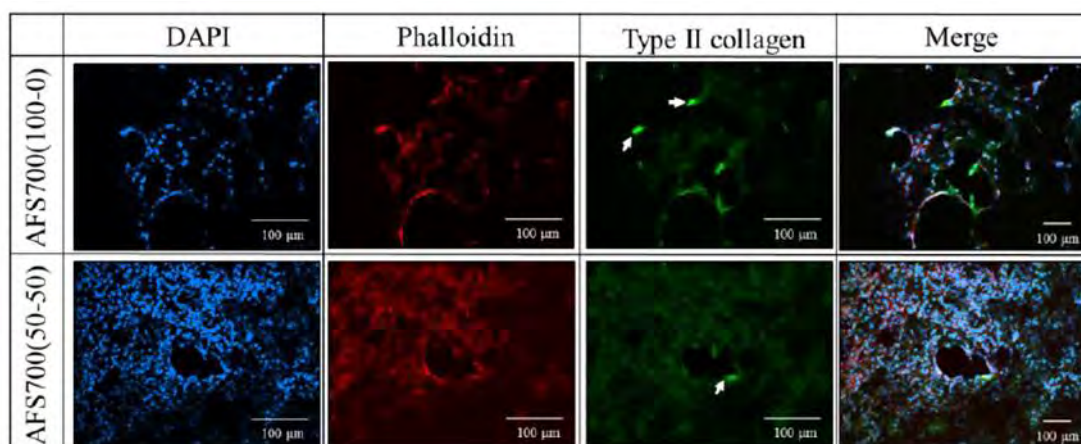


図3 各培養基材における免疫染色結果
(白矢印; II型コラーゲン)

AFSにおいても、培養5日以降からII型コラーゲンは発現しており、培養日数が増加するにつれて、II型コラーゲン発現量が増加している様子が観察された。二次元培養では、II型コラーゲンは培養日数が8日目を超えたあたりから産生されるという報告[4]がある。今回の結果において、その報告よりもII型コラーゲンの早期な発現が観察された。これは、培養初期におけるAFSのマイクロ気孔による凝集および三次元的な培養環境が原因であると考えられる。

以上の結果より、高強度化AFSは、骨再生・肝再生だけでなく軟骨再生のための足場材料としても有用であると考えられる。

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa, *et al.*, *Biomaterials*, **26**, 3427-3433(2005).
- [2] M. Aizawa, *et al.*, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).
- [3] S. Motojima, *et al.*, *Bioceramics*, **22**, 177-180(2009).
- [4] Z. Zhang, *et al.*, *J. Anat.*, **205**, 229-237(2004).

5. 本研究に関する成果報告(2014年度分)

*学会発表 (国際会議)

- 1) Y. Uchimura, Y. Miyazawa, M. Nakamura, M. Honda and M. Aizawa, “Proliferation and differentiation of chondrocyte-like ATDC5 cells three-dimensionally cultured on/in apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property”, International Union of Materials Research - The 15th IUMRS International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, Japan, 24th-30th, August 2014.

*学会発表 (国内会議)

- 1) 内村祐太・宮澤雄太・中村まり子・本田みちよ・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を用いて三次元培養した株化軟骨細胞 ATDC5 細胞の増殖と分化”、日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム、鹿児島大学 (郡元キャンパス)、日本セラミックス協会、2014.9.9-11

アパタイトファイバースキャフォールドを用いた再生肝オルガノイドの構築と機能評価

安生絵利奈¹⁾・藤見峰彦¹⁾・安富由美子¹⁾・前橋はるか²⁾・松浦知和²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 東京慈恵会医科大学

Reconstruction of liver organoid using an apatite-fiber scaffold and its functional assessment

Erina ANJO¹⁾, Takahiko J. FUJIMI, Yumiko FUKASAWA¹⁾, Haruka MAHASHI²⁾,
Tomokazu MATSUURA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Division of Central Clinical Laboratory, Jikei University Hospital

1. 緒言

多くの肝臓疾患患者に対する究極的な治療法は、現在のところ肝臓移植しかない。我が国でも、この移植の恩恵に浴する患者はごく限られている。劇症肝炎や急性肝不全では、解毒や代謝機能障害による肝毒性物質の蓄積、各種蛋白質など生体維持に必要な物質の不足をもたらすことになり、生体に致命的な障害をきたすことになる。このような観点から人工肝臓は待望の人工臓器なのであるが、肝細胞は体外では急速に機能を失う。従ってバイオ人工肝臓開発のためには、肝細胞の大量調製、肝と同等の構造、安定かつ高性能の細胞培養技術、細胞の組織化・極性発現を誘導・維持する材料とモジュール（装置）の開発という人工肝臓機能としての課題と人工肝臓内の細胞の免疫性、使用する材料の安定性などの課題をクリアすることが不可欠となっている。

当研究室では、均一沈殿法により合成したアパタイトファイバー（AF）にカーボンビーズ（CB）を添加して焼成することにより三次元連通気孔を持つスキャフォールド（アパタイトファイバースキャフォールド；AFS）の開発に成功している [1]。また、我々は、肝細胞モデルである FLC-4 [2] と AFS を装填したラジアルフロー型バイオリアクター（RFB）を組み合わせて、三次元培養を行うことにより「再生肝オルガノイド」を構築し、1 カ月間に亘る細胞の生存と形態を明らかにした [3]。

本研究では、長い移植待機時間を考慮し、3 カ月間培養における肝機能の評価としてアンモニア代謝能アルブミン産生量について検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

1) AFS の作製

既報 [1] に従って AFS を作製した。均一沈殿法により合成した AF スラリーに対し質量比で 20 倍量の CB を添加し、成形、焼成させて AFS を作製した。20 倍の CB を加えて作製した AFS を“AFS2000”と表記する。本実験で用いた AFS2000 は直径~18 mm、高さ~16 mm の円柱状で、気孔率~98%のものであった。

2) RFBによる高密度三次元培養

AFSをバイオリアクター内に装填し、通常培地 60 cm^3 を注入後、 $3.75 \times 10^5\text{ cells}\cdot\text{cm}^{-3}$ の細胞懸濁液 40 cm^3 播種して循環培養を行い、 ^{13}C -グルコース 125 mg と D-グルコース 1 g を添加した ASF104N 培地で1週間培養後、 3 mM 塩化アンモニウム添加した ASF104N 培地に切り替え、さらに11週間培養を行なった。pHは CO_2 供給装置を用いて、調整した。また、培養期間中の細胞の成長状態をpH、グルコース量、乳酸値を基にモニターした。

3) 再生肝オルガノイドの肝機能の評価

アンモニアの代謝能の評価は、アンモニア添加培地からのアンモニア窒素減少量、尿素合成量を測定することによって行った。アンモニア窒素量の定量方法には、インドフェノール法・藤井-奥田法変法定原理とする測定キット、アンモニア-テストワコー（和光純薬）を用い、その添付のプロトコル記載の容量を8分の1にスケールダウンし、吸光度は 600 nm の値を用いた。また、尿素合成量の定量方法には QuantiCrom™ Urea Assay Kit（DIUR-500）を用い、その添付プロトコルに従い、吸光度は 450 nm を用いた。

4) 再生肝オルガノイドの蛋白合成能評価

アルブミン産生能の評価は、培地内のアルブミン濃度を測定することによって行った。アルブミンの定量方法には、Human Albumin ELISA Quantitation Kit（BETHYL LABORATORIES, INC）を用い、その添付プロトコルに従って測定した。

5) 再生肝オルガノイドの組織学的評価

培養後のAFSを組織学的評価に用いた。組織学的評価ではHE（ヘマトキシリン・エオジン）染色により細胞を染色した。

3. 結果と考察

1) RFBによる高密度循環培養

RFBによる高密度循環培養においてグルコース量に伴う乳酸値を経時的に測定した結果（d45～d82）をそれぞれ図1に示す。図1からグルコースの消費に伴って乳酸値が上昇していることが分かった。これはグルコースが解糖されて生じたピルビン酸が嫌気的条件下において乳酸に変わったためであると考えられる。

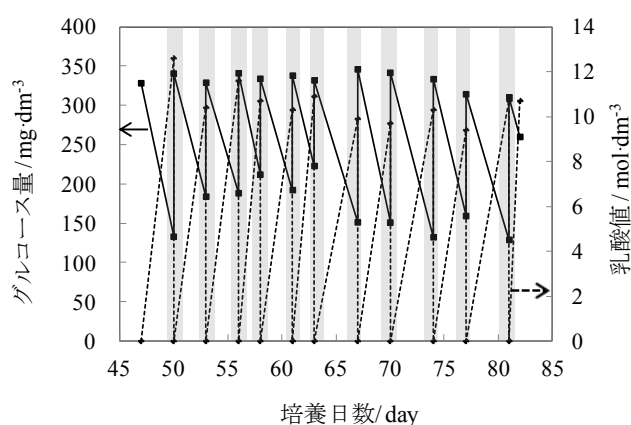


図1 グルコース量と乳酸値の経時変化

2) 再生肝オルガノイドの肝機能の評価

測定したアンモニア濃度と尿素濃度の結果

（d45～d82）を図2に示す。図2より、アンモニア濃度の低下に伴って、尿素濃度が上昇していることがわかった。これは、尿素回路が回ることで、アンモニアが代謝され、尿素が合成されていたためであると考えられる。よって、アンモニアの代謝能を持っていたことが理解できる。

3) 再生肝オルガノイドの蛋白合成能評価

測定したアルブミン産生量の結果 (d45~d82) を図 3 に示す。図 3 より、アルブミンの総産生量が経時的に増加していたことが確認できた。この結果より、培養中において、アルブミン産生能を維持できていたと考えられる。

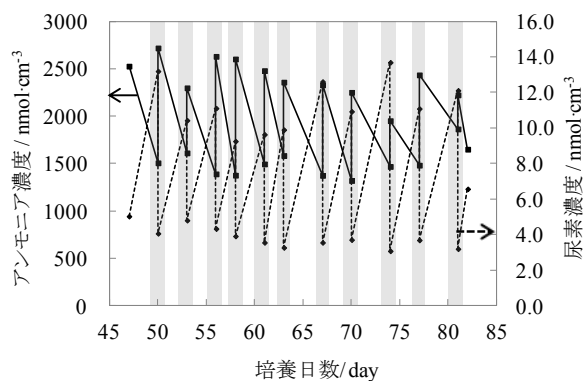


図 2 アンモニア窒素濃度と尿素濃度の経時変化

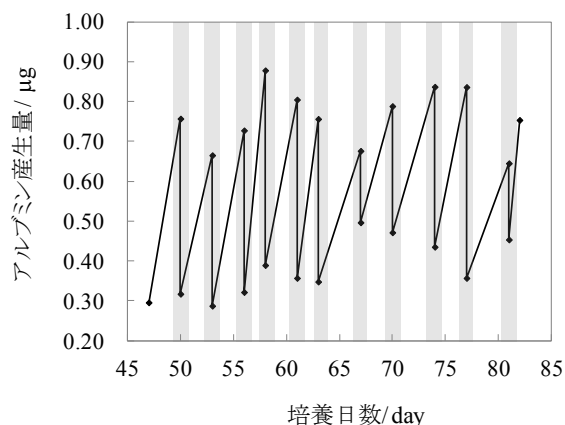


図 3 アルブミン産生量の経時変化

4) 組織学的評価

培養後の AFS を組織学的に評価するために、HE 染色を行なった。この結果を図 4 に示す。図 4 (A) より、細胞が AFS の骨格にそって三次元的に存在している様子が確認できた。また、図 4 (B) の矢印部分より、細胞が AFS の骨格のない部分 (気孔内部) にも侵入し、マクロポアを埋め尽くしている様子が確認できた。このことより、細胞が AFS 中で三次元的に存在していることが確認できた。しかし、図 4 (C) より、一部において、細胞の侵入よりも先に AFS が溶けてしまっている様子も観察された。

以上より、3 ヶ月間の長期培養において、高密度循環培養が安定して行なわれており、さらに、肝機能であるアンモニア代謝能、アルブミン産生能を維持した状態で培養できることも確認できた。

また、HE 染色の結果より、細胞がマクロポアの内部まで侵入している様子が確認できた。これらの結果から、本スキヤフォードと RFB を組み合わせて構築された再生肝オルガノイドは、長期培養において、肝機能を維持していることが分かった。

しかし、HE 染色より、一部で細胞侵入よりも先に AFS が溶けてしまっている様子も観察されたため、次年度以降は、より早い組織の導入を目指し、共培養を行なっていく予定である。

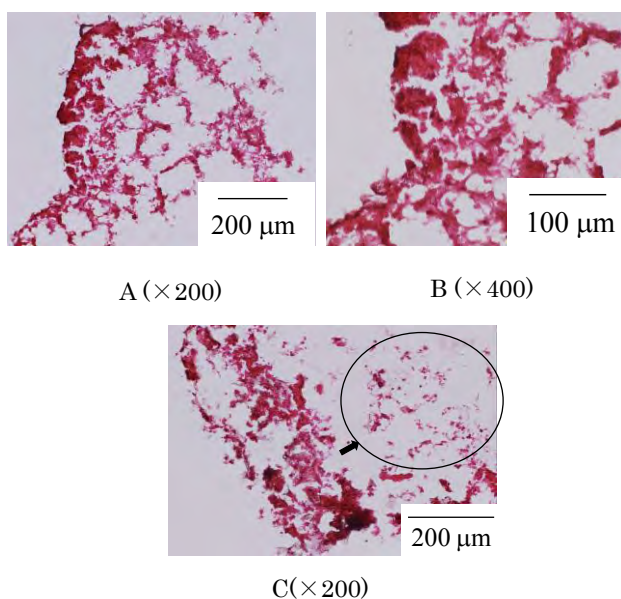


図 4 HE 染色による組織学的観察

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanazawa, H. Morisue, M. Matsumoto and Y.

Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 262-268 (2004) .

[2] 松浦知和, 組織培養工学, **23**, 288-291(1997).

[3] A. Hiramoto, T. Matsuura, and M. Aizawa, *Achives of Bioceramics Reseach.*, vol.5 238-241 (2005) .

5. 成果報告

* 学会発表

1) E. Anjo, T. J. Fujimi, Y. Yasutomi, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa “Reconstruction of liver organoid using an apatite-fiber scaffold and its ammonia metabolism ability” 9th World Biomaterials Congress (WBC2012), Chengdu, China, 2-5 June, 2012.

アパタイトファイバースキャフォールド用いた再生肝オルガノイドの構築と機能評価

安生絵利奈¹⁾・藤見峰彦²⁾・前橋はるか³⁾・松浦知和³⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 文教大学・健康栄養学部

3) 東京慈恵会医科大学

Reconstruction of liver organoid using an apatite-fiber scaffold and its functional assessment

Erina ANJO¹⁾, Takahiko J. FUJIMI²⁾, Haruka MAHASHI³⁾,
Tomokazu MATSUURA³⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Department of Health and Nutrition, Bunkyo University

3) Division of Central Clinical Laboratory, Jikei University Hospital

1. 緒言

多くの肝臓疾患患者に対する究極的な治療法は、現在のところ肝臓移植しかない。劇症肝炎や急性肝不全では、解毒や代謝機能障害による肝毒物質の蓄積など生体維持に必要な物質の不足をもたらす、生体に致命的な障害をきたすことになる。このような観点から人工肝臓は待望の人工臓器であるが、肝細胞は体外では急速に機能を失う。したがってバイオ人工肝臓開発のためには、肝細胞の大量調製、肝と同等の構造、安定かつ高性能の細胞培養技術、細胞の組織化・極性発現を誘導・維持する材料とモジュール (装置) の開発という人工肝臓機能としての課題と使用する材料の安定性などの課題をクリアすることが不可欠となっている。

我々はこれまでに三次元的な組織を再生させる技術を確立することを目的として、三次元的な連通気孔構造を持つアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) を開発している[1]。本研究では、この AFS を装填したラジアルフロー型バイオリクター (RFB) を用いて、肝細胞 (FLC-4 細胞) [2]と肝星細胞 (A7 細胞) [3]および内皮細胞 (M1 細胞) [4]との共培養を行い、「再生肝オルガノイド」を構築した。また、構築した再生肝オルガノイドの肝機能評価としてアンモニア代謝能、アルブミン合成能を評価し、RFB における細胞の足場材料としての AFS の有用性を検討した。

2. 実験方法

アパタイトファイバー (AF) は試料溶液の Ca/P 比が 1.67 になるように、 $0.167 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 硝酸カルシウム四水和物 ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、 $0.100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ リン酸水素二アンモニウム ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)、 $0.500 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 尿素 ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) および $0.10 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 を混合することにより調製し、この試料溶液を均一沈殿法により、 80°C で 24 時間、 90°C で 72 時間加熱することによって合成した。AFS は合成した AF スラリーに対し質量比で 20 倍量の CB を添加し、成形、焼成させて AFS を作製した。これを“AFS2000”と

表記する。本実験で用いた AFS2000 は直径~18 mm、高さ~16 mm の円柱状で、気孔率~99%のものであった。

AFS をバイオリアクター内に装填し、 ^{13}C -グルコース 125 mg と D-グルコース 1 g を添加した ASF104 N 培地 60 cm^3 を注入後、肝細胞モデルである FLC-4 細胞懸濁液 $2.5 \times 10^5\text{ cells/cm}^3$ を 40 cm^3 播種して循環培養を行なった。1 週間後、肝星細胞モデルである A7 細胞懸濁液 $1.0 \times 10^5\text{ cells/cm}^3$ を 100 cm^3 播種した。ついで、2 日後に 3 mM 塩化アンモニウム添加した ASF104N 培地に切り替えた。さらに 1 週間後に内皮細胞モデルである M1 細胞懸濁液 $5.0 \times 10^4\text{ cells/cm}^3$ を 100 cm^3 播種し、8 日間培養を行なった。培地の pH は CO_2 供給装置を用いて調整し、培養期間中の細胞の生育状態を培地中の pH・グルコース量・乳酸値からモニターした。また、アンモニアの代謝能の評価は、尿素サイクルにおいて最終生成物である尿素合成量を測定することによって行ない、アルブミン合成能評価は、培地中のアルブミン量を測定することによって行なった。測定結果は、肝細胞の単層培養、単一培養と比較検討した。また、培養後の AFS 内の細胞形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

3. 結果と考察

RFB による高密度循環培養において、グルコース量に伴う $^{13}\text{CO}_2$ 排出量の測定結果より、グルコースの消費に伴って $^{13}\text{CO}_2$ 変化量の値が上昇していることが分かった。また、乳酸値の測定結果より、乳酸が産生されていることが確認できた。これらの結果より、RFB による細胞の高密度循環培養が安定して実施されたことが理解できる。

測定した尿素産生量の結果を図 1 に示す。ここで、単層培養とは FLC-4 細胞を 10 cm シャーレで培養したもの、単一培養とは FLC-4 細胞を RFB によって循環培養したもの、共培養とは FLC-4 細胞、A7 細胞、M1 細胞を RFB によって培養したものを指す経時的に尿素産生積算量は増加していることが確認された。これは、尿素サイクルによってアンモニアが代謝され尿素に変わったためであると理解できる。

このことから、いずれの培養条件においても尿素産生能が維持されていたと考えられる。また、単層培養とに比較して、

単一培養と共培養のほうがともに大きな尿素産生積算量を示したことから、二次元培養よりも三次元培養のほうがアンモニア代謝能が高いことが示唆された。

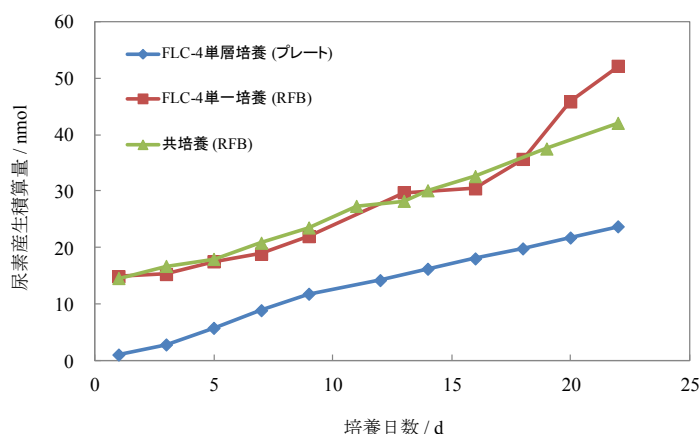


図1 各培養条件における尿素産生量の比較

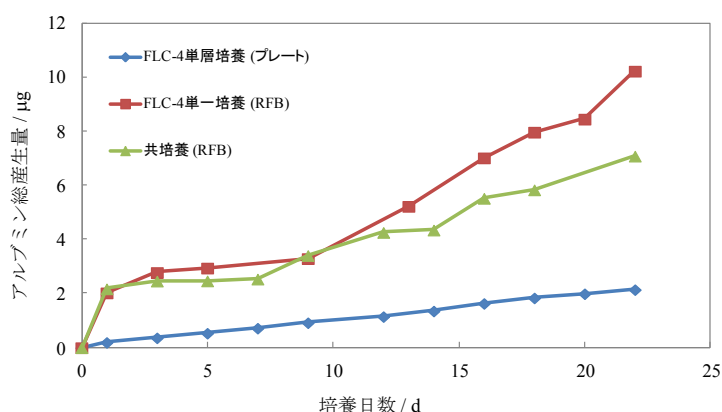


図2 各培養条件におけるアルブミン産生量の比較

次に、アルブミン産生量の測定結果を図2に示す。図2より、アルブミン産生積算量が経時的に増加していることが確認された。したがって、いずれの培養条件においてもアルブミン合成能を維持していたと考えられる。また、単層培養と比較して、単一培養と共培養のほうがともに大きなアルブミン産生量を示したことから、二次元培養よりも三次元培養のほうがタンパク合成能も高いことが示唆された。

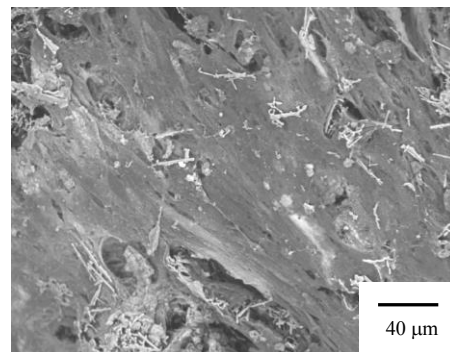


図3 SEMによる形態観察(共培養：28 day)

最後に、22日間培養後のAFSのSEM画像を図3に示す。図3より、AFSが細胞に覆われている様子が確認された。また、内皮細胞に特有の窓(100 nm～200 nmの小孔)が観察された。したがって、SEM画像の結果から、AFS外側は内皮細胞に覆われていたことが示唆された。

以上の結果から、本スキャフォールドはバイオ人工肝臓用足場材料として有用であり、RFBと組み合わせることで三次元の再生肝オルガノイドの構築が可能であると考えられる。

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).
- [2] 松浦知和, *組織培養工学*, **23**, 288-291(1997).
- [3] T. Matsuura et al., *Inter. J. Artificial Organ.*, **21**, 229-234 (1998).
- [4] Masaya Saito et al., *World Journal of Gastroenterology.*, **21**, 1881-1888(2006).

5. 成果報告

* 学会発表

1) 「アパタイトファイバースキャフォールドを用いた長期三次元循環培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能」

安生 絵利奈, 藤見峰彦, 前橋はるか, 松浦知和, 相澤 守¹⁾

2012.9.25 神戸大学 六甲台キャンパス (若手優秀研究発表賞を受賞)

2) 「アパタイトファイバースキャフォールドを用いた肝細胞・肝星細胞・内皮細胞の三次元共培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能」安生 絵利奈, 藤見峰彦, 安富由美子, 前橋はるか, 松浦知和, 相澤 守¹⁾ 2011.11.26 仙台国際センター

遺伝子改変ブタ頭蓋骨由来骨芽細胞および間葉系幹細胞の単離と培養技術の確立

本田 みちよ¹⁾・相澤 守²⁾

1) 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

2) 明治大学理工学部応用化学科

Isolation of osteoblasts derived from transgenic-cloned pig calvaria and mesenchymal stem cells (MSCs) derived from transgenic-cloned neonatal pig and establishment of cell culture technique

Michiyo HONDA¹⁾ and Mamoru AIZAWA²⁾

1) Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST), Aizawa “Next-generation Bioceramics” Project

2) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

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[1]。現在我が国では約一千万人の骨粗鬆症患者がいると推定されており、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ないと言えない。そこで、本研究ではまず、より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。続いて、再生医療にも適応されており、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する間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC) [2]に注目し、遺伝子改変ブタ(クサビラオレンジブタ)より高い分化能を有する MSC を単離し、培養する技術を確立し、バイオマテリアルの評価や再生医療への応用を目指すことを目的とした。

2. 実験方法

1) 遺伝子改変ブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の単離とその生物学的評価

分娩直後のクサビラオレンジ(humanized kusabira orange; huKO)ブタ[3] (明治大学農学部、長嶋教授より提供いただいた)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 遠沈チューブにいれて、37°C、10 分間、振とうさせた[4]。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す

た。4回目および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。増殖させた細胞をtrypsin-EDTAで剥離させ、適当な濃度に希釈し、dish, well plateなどへ播種し、以下の試験を行った。

1) RT-PCR : 12 well plate へ 6×10^4 cells/well となるように骨芽細胞様細胞を播種し、培養7日目の細胞から cDNA を合成し、各マーカー遺伝子(*Runx 2*, *type I collagen (Coll)*, *Alkaline phosphatase (ALP)*, *osteocalcin (OC)*, *GAPDH*)の発現を RT-PCR により調べた。

2) ALP 染色 : 12 well plate へ細胞を播種し、7, 14, 21, 28 日間培養した。培養した細胞を4% PFA/PBS 溶液で固定し、さらに0.25% Triton-X/PBS 溶液で膜処理をした後、ALP 染色キット(Wako)を用いて、ALP 染色を行った。これを顕微鏡により観察した。

2) 遺伝子改変新生仔ブタ由来間葉系幹細胞の単離

生後1週齢のクサビラオレンジ(humanized kusabira orange; huKO) 新生仔ブタ(約3 kg)を犠牲にし、両足大腿骨を採取した(明治大学農学部、長嶋教授ご提供)。その後、以下に示す方法で間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)を単離した[5]。

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(-)で骨髓を灌流し、出てきた溶液を70 μ 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)を行ない、上清除去後、PBS(-) 50 ml で懸濁した。懸濁液をさらに40 μ 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、培地10 mlに再懸濁し、細胞数をカウントした。この際、チュルク液とトリパンプル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、①20%FBS/D-MEM, ②SFM (human MSC medium, GIBCO)の2種を使用した。

3) MSC の分化誘導

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。2)で単離した細胞を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。

3. 結果と考察

1) 遺伝子改変ブタ頭蓋骨由来骨芽細胞の単離とその生物学的評価

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(Fig. 1)。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

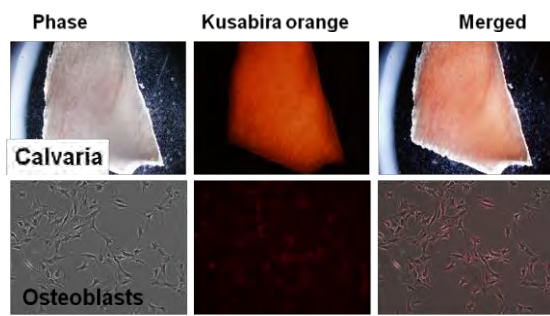


Fig. 1 Isolation of osteoblasts from pig calvaria

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 (Fig. 2)。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。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 (Fig. 3)。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。

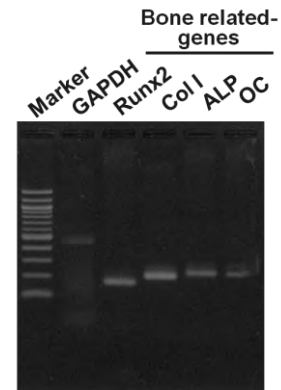


Fig. 2 Expression of bone-related genes in osteoblasts isolated from pig calvaria

最後に、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 (Fig. 4)。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際には細胞の固定、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方法は有用な方法であると判断できる。

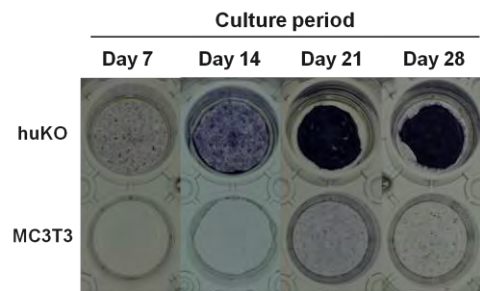


Fig. 3 Comparison of ALP activity between huKO osteoblasts and MC3T3-E1 cells

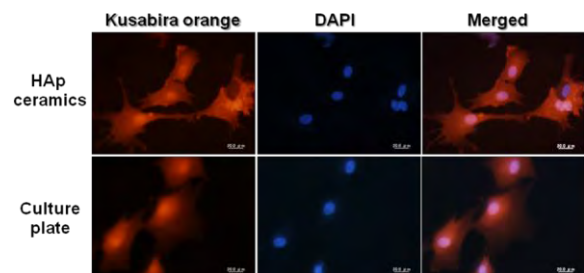


Fig. 4 Morphological observation of osteoblasts on HAp ceramics and culture plate

2) 遺伝子改変新生仔ブタ由来間葉系幹細胞の単離とその生物学的評価

生後 1 週齢の huKO ブタ大腿骨より採取した骨髓細胞を 2 種の培地を用いて培養した結果、培地② (ヒト MSC 用培地)を用いた場合の方が、その増殖性は優れていた。しかし、培地②を使用する際には、予め専用のコーティング剤を培養基材に塗布する必要があり、塗布しなかった場合は、細胞がほとんど接着できないことが分かった。

次に、培地①を用いた際の MSC の分化能について調べた。今回は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(Fig. 5)。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。続いて、骨細胞への分化能を ALP 活性染色(Fig. 6a)と Mineralization assay (Fig. 6b)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 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ったが、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(Fig. 7)。増殖培地(Non)でも骨細胞への分化が進行してしまった

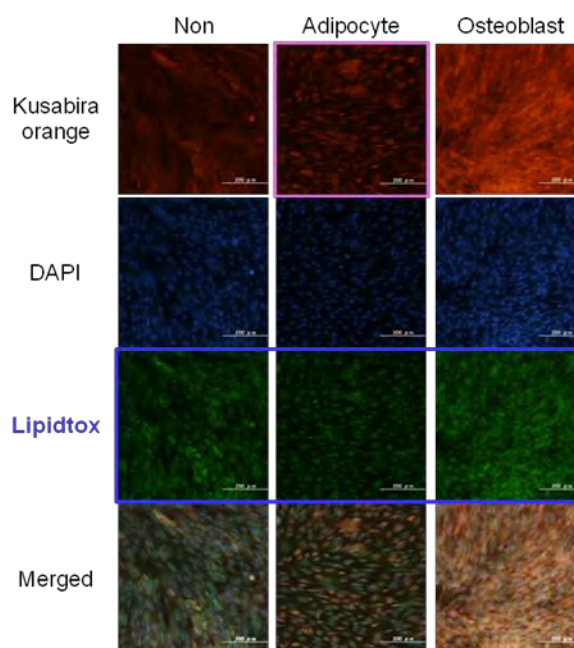


Fig. 5 huKO MSC の脂肪細胞への分化 (誘導 7 日目)

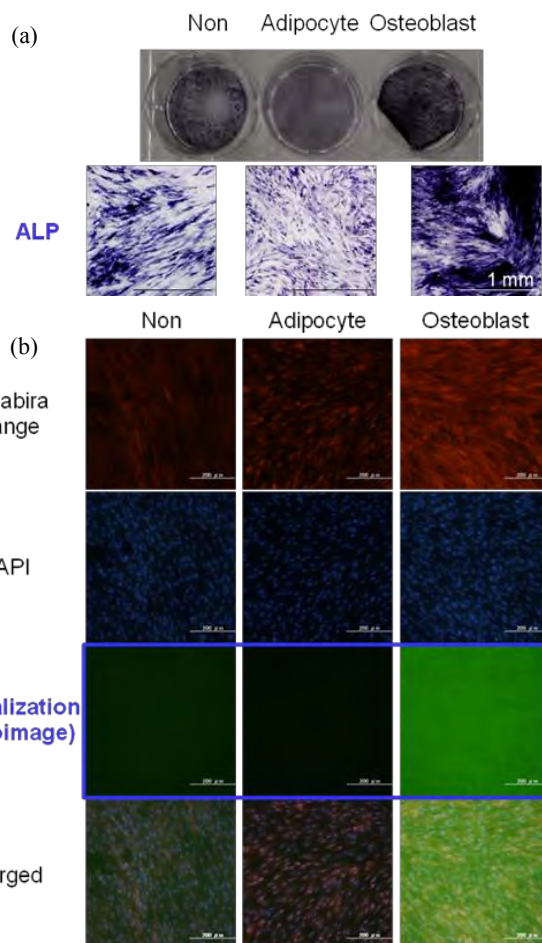


Fig. 6 huKO MSC の骨細胞への分化 (誘導 7 日目)
(a) ALP stain, (b) Osteoimage Mineralization assay

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(Fig. 8a)。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(Fig. 8b)。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。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でソートを加える必要があるが、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。

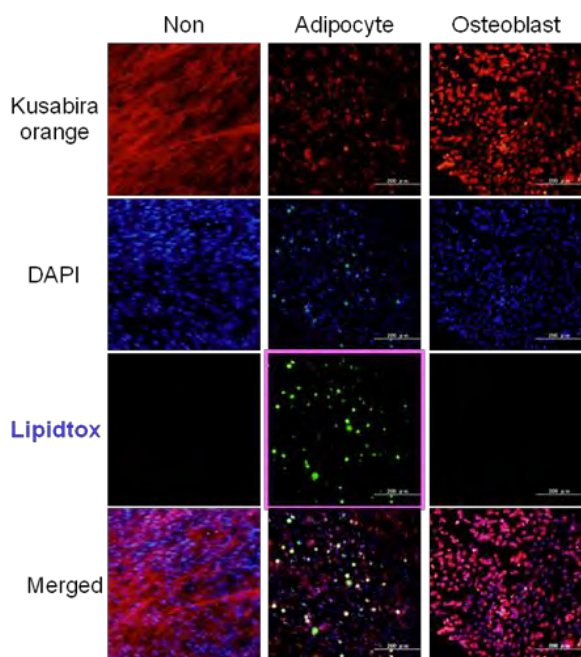


Fig. 7 huKO MSC の脂肪細胞への分化 (誘導 14 日目)

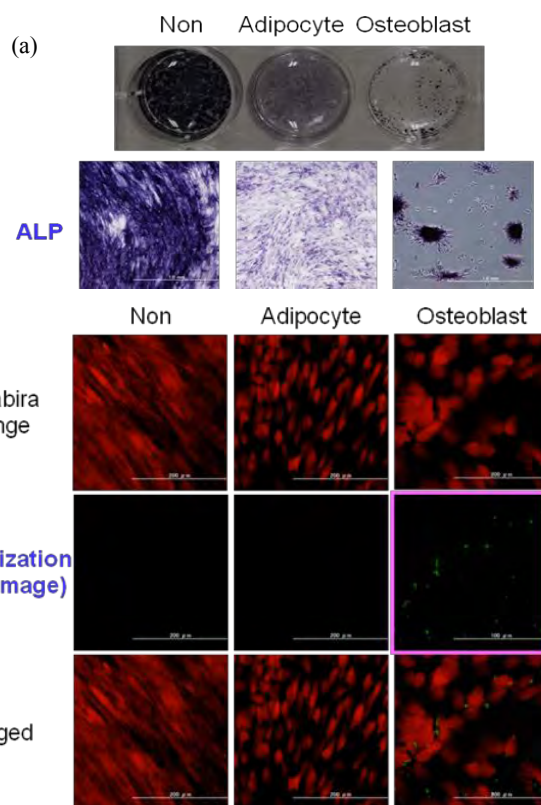


Fig. 8 huKO MSC の骨細胞への分化 (誘導 14 日目)
(a) ALP stain, (b) Osteoiimage Mineralization assay

4. 結論

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、各種骨分化マーカー遺伝子を発現する骨芽細胞を分離することができた。得られた huKO 細胞は骨芽細胞の株化細胞である MC3T3-E1 細胞と比較すると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 ALP 活性を有することが分かった。また、単離した細胞を緻密な水酸アパタイト(HAp)セラミックス上で培養し、その形態を観察する際、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際には細胞の固定、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。

一方、遺伝子改変新生仔ブタ大腿骨より得た骨髄細胞は骨や脂肪など様々な細胞へ分化可能な細胞であった。新生仔ブタを利用したが、ラットやマウスに比べ大腿骨は十分大きかったことから、多量の細胞を得ることができた。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。様々な方法で純度を向上させた MSC を用いることで、生命機能マテリアルの生物学的評価にも広く応用可能であると期待できる。

5. 参考文献

- [1] LJ. Raggatt and NC. Partridge, *J. Biol. Chem.*, **285**, 25103-25108 (2010).
- [2] MF. Pittenger, AM. Mackay, SC. Beck, RK. Jaiswal, R. Douglas, JD. Mosca, MA. Moorman, DW. Simonetti, S. Craig, DR. Marshak, *Science*, **284**, 143-147 (1999).
- [3] H. Matsunari, M. Onodera, N. Tada, H. Mochizuki, S. Karasawa, E. Haruyama, N. Nakayama, H. Saito, S. Ueno, M. Kurome, A. Miyawaki, H. Nagashima, *Cloning Stem Cells*, **10**, 313-323 (2008).
- [4] JR. Nefussi, G. Brami, D. Modrowski, M. Oboeuf, N. Forest, *J. Histochem. Cytochem.*, **45**, 493-503 (1997).
- [5] OK. Lee, TK. Kuo, WM. Chen, KD. Lee, SL. Hsieh, TH. Chen, *Blood*, **103**, 1669-1675 (2004).

6. 成果報告

*論文

- 1) 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).
- 2) 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**, 59-64 (2012).
- 3) 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 β -tricalcium phosphate cement”, *Phosphorus Res. Bull.*, **26**, 105-108 (2012).
- 4) M. Honda, K. Kikushima, Y. Kawanobe, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, “Enhanced early osteogenic differentiation by silicon-substituted hydroxyapatite ceramics fabricated via ultrasonic spray pyrolysis route”, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **23**, 2923-2932 (2012).
- 5) 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).
- 6) M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, M. Honda, 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).
- 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) 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).
- 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) 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).
- 11) 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. Aus. Ceram. Soc.*, **47**, 37-41 (2011).
- 12) 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. Aus. Ceram. Soc.*, **46**, 6-10 (2011).

*特許

- 1) 特願 2012-026921、本田みちよ・相澤 守、「抗菌性材料」、財団法人神奈川科学技術アカデミー（出願日 2012 年 2 月 10 日）

*学会発表

(国際会議)

- 1) M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, “In vitro biological evaluation of anti-tumor effect of the chelate-setting hydroxyapatite cement”, *Bioceramics 24*, 2012/10/22, Fukuoka.
- 2) 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), 2011/7/27 (Invited).

他 21 件

(国内学会)

- 1) 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, 名古屋大学, 2012 年 9 月 19 日
- 2) 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, 船橋市民文化創造館 (千葉県), 2011 年 6 月 2 日

他 25 件

*記者発表・取材

- 1) 本田みちよ, 川延勇介, 小西敏功, 水本みのり, 相澤守, 「KAST・明治大 新規抗菌性材料を創製」, 化学工業日報, 2012年9月14日.

力学的圧縮ストレス負荷が培養軟骨細胞に与えるシグナルの変化
—バイオスキャフォールドの影響について—

武田勇樹¹⁾・二木康夫¹⁾・宇田川和彦¹⁾

1) 慶應義塾大学医学部 整形外科

Characteristics of cultured chondrocytes under dynamic compressive loading ;effects of bioscaffold

Yuki TAKEDA¹⁾, Yasuo NIKI¹⁾, and Kazuhiko UDAGAWA¹⁾

1) Department of Orthopaedic Surgery, Keio University

1. 緒言

近年、軟骨再生治療（自家培養軟骨細胞移植）が一部の施設で行われているが、その成績は従来から行われている自家骨軟骨移植術と変わらないという研究報告がなされている。実際には、軟骨マトリックスの成熟に時間を要する点、4cm²を超える範囲の病巣には適応できない点などの問題を抱えている。前者では、とくに下肢荷重関節において初期から大きな力学的ストレスにさらされる点が問題となる。実は現在、この点に逆行する形でスキュフォールドフリーの軟骨細胞移植が広まりつつあるが、初期の過剰な力学的ストレスの問題は解決されていない。

本研究では、三次元力学刺激装置を用いて、圧負荷環境下で軟骨細胞を三次元培養する。これまで三次元培養環境に圧負荷を持続的に加えたものではなく、実際の *in vivo* 環境を再現すること、圧負荷に耐え且つ生物学的に適した鑄型を開発することを目的とする。力学的ストレス下に軟骨細胞を三次元培養し、バイオスキャフォールドの有無により細胞の性質や、マトリックス産生にどのような変化をもたらすのかを明らかにする。

一方で、先行研究により、インターロイキン32の関節疾患における役割とその下流シグナルの解明を行っている。ヒト細胞を用いたIL-32下流シグナルの検索を行い、siRNAの手技を用いて下流分子の候補について検討し、IL-32はとくにToll like receptor 4下流の一部の分子を介する経路に関与することが考えられた。TNF α やI型インターフェロンをmRNAレベルならびにタンパクレベルで定量し、またIL-32の受容体分子の検討を行い、IL32-PAR2 axisとLPS-TRIF axisの関連について報告した。TLR-TRIF axisを中心に変形性関節症に与える影響を、前述の三次元力学刺激装置を用いて検討していく。

2. 実験方法

2-1 KO マウスを用いた OA モデルの作製

OAモデルとしてdestabilization of medial meniscus (DMM)モデルを作製する[1]。8週齢雄のTRIF KO、Myd88 KO マウスと野生型マウス (WT) にOAモデルを作製し、術後12週にて病理組織学的検討を行う。

2-2 ATDC5 と三次元培養組織の構築

ATDC5 は、マウス EC (Embryonal Carcinoma) 細胞由来クローン化細胞株で、軟骨初期分化から後期分化に至る軟骨細胞の全分化段階を *in vitro* で忠実に再現できることが報告されている[2]。ATDC5 を、5% fetal bovine serum (FBS) 添加 DMEM (Dulbeccos modified Eagles medium) 培養液にて培養した。三次元下で細胞を培養するため、ATDC5 を単層培養した後、alginate beads に包埋した。ITS を含む培養液に、BMP2 を添加して 5 日間培養し、alginate を溶解して細胞を抽出した。5×10⁶ 個の細胞をコラーゲン溶液に混和し、コラーゲンスキャフォールド (アテロコラーゲンスポンジ MIGHTY, KOKEN) に細胞を播種し、三次元組織を作製した。

2-3 力学刺激培養

上記により作製した三次元培養組織を力学刺激下で培養するため、生体力学刺激培養装置 (Cyclic Load Stimulator, Technoview) を用いて、圧縮刺激を加える。負荷刺激は細胞培養用インキュベーター内 37°C 5% CO₂ 環境下で行い、40kPa の荷重を 0.5Hz で 3 時間行う。

2-4 力学刺激の評価

力学的刺激の効果を見るために、力学刺激終了後 6 時間で、組織から mRNA を抽出して逆転写酵素を用いて cDNA を作製し、Real Time PCR 法にて mRNA の検出を行う。また組織学的検討やタンパクレベルの分析のため ELISA を行う。負荷群と非負荷群の培養上清中の PGE₂ 濃度を測定し、組織の Col-II の発現を real time PCR にて評価する。

3. 実験結果と考察

3-1 KO マウスを用いた OA モデルの検討

TRIF KO (n=3)、Myd88 KO (n=3) マウスを用いて *in vivo* での検討を行った。術後 12 週の病理組織学的検討にて、Modified semi-quantitative grading score を用いて検討した。平均 WT 4 点、TRIF KO 2 点、Myd88 KO 2.66 点と KO マウスにて OA の進行が抑制された。TRIF、Myd88 は OA の発症に関与し、増悪させている可能性が示唆された。

3-2 力学刺激

組織学的には 5 日間の培養で、軟骨細胞は球状を呈し、細胞の成熟と軟骨基質の形成を認めた。軟骨分化因子である BMP2 の添加により Col-II の発現は増加した。またメカニカルストレスにより、培養上清中の PGE₂ と ADAMTS4 の発現は有意に増加した。

三次元での軟骨細胞実験には大量の細胞が必要であり、また周囲の基質が重要視される。ATDC5 を Alginate beads 培養することで、短期に軟骨化が可能となった。今回使用した方法は、細胞には ATDC5 を周囲基質にはコラーゲンスキャフォールドを用いることで再現性の高い研究が可能となった。細胞形態、力学負荷による反応から生体軟骨の組織変性を反映する実験モデルとして有用であると考えられた。

4. 参考文献

- [1] Glasson.SS, et al, *Osteoarthritis Cartilage.*, **15**, 1061-1069 (2007).
- [2] Shukunami.C ,et al, *J Bone Miner. Res..Int.J.Oral Maxillofac.Surg.*, **12**, 1174-1188 (1997).
- [3] Y.Akamine, et al, *.Int.J.Oral Maxillofac.Surg.*, **41**, 874-881 (2012).

3. 本研究に関する成果報告(2015 年度分)

*学会発表（国内会議）

武田勇樹・二木康夫・福原悠介・福田良嗣・宇田川和彦・菊地寿幸・宮本健史・松本守雄・中村雅也、“ATDC5 を用いたコラーゲンスポンジ三次元培養軟骨モデルとメカニカルストレスの影響 (Effect of mechanical stress for three-dimensional tissue using ATDC5) ”、第 30 回日本整形外科学会基礎学術総会、富山国際会議場、2015.10.22-23

ラジアルフロー型バイオリアクターを利用した
ヒト蛋白質性バイオ医薬品生産系確立の為の基礎的研究

分担研究者 松浦知和 (東京慈恵会医科大学・臨床検査医学講座)
協力研究者 藤見峰彦 (文教大学・健康栄養学部管理栄養学科)
吉川 輝 (明治大学・理工学部応用化学科)
松本喜弘 (東京慈恵会医科大学・内科学講座・消化器肝臓内科)
前橋はるか (東京慈恵会医科大学・臨床検査医学講座)

**Basic Analysis for Human Protein-Biological Drug Production System Using
Radial-Flow Bioreactor**

**Tomokazu Matsuura¹, Akira Yoshikawa², Yoshihiro Matsumoto³,
Haruka Maehashi¹, Takahiko J. Fujimi⁴**

- 1. Department of Laboratory Medicine, The Jike University School of Medicine,**
- 2. Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University,**
- 3. Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine,**
- 4. Faculty of Health and Nutrition, Bunkyo University**

研究要旨：ラジアルフロー型バイオリアクター (RFB) にハイドロキシアパタイト (HA) ビーズを充填した培養システムをバイオ医薬品の生産系に応用するための基礎的な検討を行った。ヒト肝癌由来株化培養細胞 FLC-4、7 及び組換え型ヒトアルブミン (rHAL) 産生型 FLC-4M#1 を用いて 2 次元及び 3 次元での高密度培養を行い、長期培養における細胞増殖・維持の適性、蛋白質生産性等の適性を調べた。FLC-4 と FLC-4M#1 を用いた蛋白質生産向上へ向けた検討では異なる培地を用いたスイッチングを試行し影響を調べた。その結果、RFB と HA ビーズを用いた 3 次元培養系は FLC-4 の長期培養に適しておりタンパク生産系への応用が十分に期待された。今後、足場材料等の検討により更なる向上の余地があると考えられる。

1. 緒言

バイオ医薬品とその生産法の開発は蛋白質性医薬品の安全かつ安定的な供給確保の上で世界的にその要求性が高い。中でもアルブミン製剤は投与単位量が多く、また種々の疾患において使用される代表的な血漿性蛋白質医薬品である。日本においてアルブミン製剤は血漿分画製剤としての国内生産量は減少傾向にあるにも関わらず組換え製剤等バイオ製剤の供給は極めて少ない^{1) 2)}。血液製剤を含め蛋白質性医薬品はその性質上、完全国産化への要求も高い。現在流通している組換えアルブミン製剤は酵母を利用した生産系である。この系は酵母由来成分の夾雑が懸念される他、将来的に多様な生産系への応用を指向した場合は修飾糖鎖の違いが生ずるという問題は不可避である。このような背景の中でヒトの細胞を用いた人工肝臓の開発とその蛋白質大量生産系への応用は、肝臓由来ヒト血漿性タンパク質医薬品の国産化と安全かつ安定的な供給に寄与する事が期待され、意義がある。

そこで本研究では、ラジアルフロー型バイオリアクター (Radial Flow Bioreactor: RFB)、多孔質ハイ

ドロキシアパタイト (HA) ビーズ、および肝癌由来株化培養細胞株 (FLC) と無血清培地を組み合わせた人工肝臓システムをアルブミン生産系モデルとし、大量蛋白質生産系開発の研究を行う事とした。

2. 研究方法

【細胞の培養特性の適性検討】人工肝に利用する肝臓癌由来株化培養細胞として FLC-4 と FLC-7 について検討した。2 セットの RFB-HA 人工肝システム (5 mL) を用いそれぞれ FLC-4, FLC-7 を同期培養させ ^{13}C -glucose 呼気試験によって培養状態を比較した。また培養終了後、両細胞の糖代謝関連遺伝子の mRNA 量をリアルタイム PCR で測定し転写レベルの比較を行った。

【rHSA 生産株利用の検討】2 セットの RFB-HA 人工肝システム (5 mL) を用い FLC-4 細胞と rHAS 産生型 FLC-4M#1 細胞を同期培養し、 ^{13}C -glucose 呼気試験によって培養状態を比較するとともに、継時的に HSA 産生量を蛍光サンドイッチ ELISA 法で測定した。培養終了後、両細胞の HAS mRNA 量をリアルタイム PCR で測定し転写レベルの比較を行った。培養は 28 日間行い、前半 14 日を ASF104N 培地で、後半 14 日を高グルコース含有の ERDF 培地にスイッチングした。

【培養液組成の影響の検討】ASF104N と、その Ornithine 欠損培地である ASOR(-)、ERDF とその Ornithine 添加培地である ERLO の計 4 種の培地について 96well plate にて FLC-4 を培養し細胞の増殖とアルブミンの生産に関して検討した。細胞増殖は抽出 DNA の定量で、アルブミン生産は蛍光サンドイッチ ELISA 法で測定した。

【Ornithine の有無によるアミノ酸代謝変化の解析】ASF104N と、その Ornithine 欠損培地である ASOR(-) を用いて、Ornithine 代謝に関する検討を行った。6well plate に FLC-4 を培養し細胞内 Polyamine 量を定量した。培養は 12 日間行い、3 日目から培地を 2 つに分け、6 日目、12 日目の細胞を回収し HPLC による分離と定量に用いた。またこれとは別に 6 日目に 3 mM の NH_4Cl を培地に添加し 9 日目と 12 日目の培養上清を回収しアンモニアと尿素の変化量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、すでに樹立した培養細胞株を用いての実験の為、研究倫理面での問題はない。

3. 結果と考察

【細胞の培養特性の適性検討】RFB へ導入する細胞は長期に安定的に培養が可能で、物質生産能を維持できることが求められる。株化培養細胞はその用に適するが、由来となる肝癌の性質が異なり検討の必要がある。FLC-4 と FLC-7、2 つの株について RFB での培養試験を行い ^{13}C -glucose 呼気試験によって培養状態の確認を行った。いずれも $^{13}\text{CO}_2$ 排出は 15~25%以内で推移し細胞の維持に問題はなかったが、FLC-4 においてその動態はより安定していた (図 1)。

両細胞の糖代謝関連遺伝子の発現を調べたところ (表 1)、FLC-4 は肝型の遺伝子発現状態をよく残している

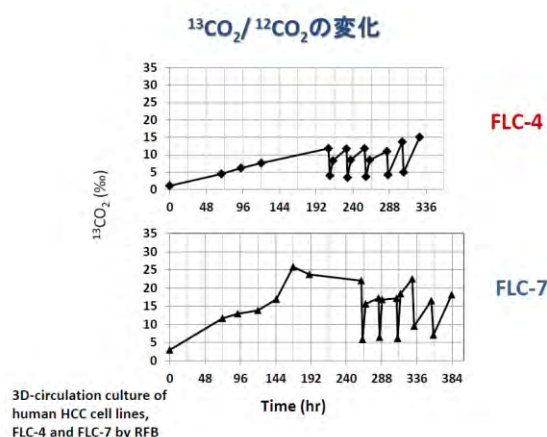


図 1 RFB 培養での $^{13}\text{CO}_2 / ^{12}\text{CO}_2$ の変化

ことが判った。これは糖代謝によって得られるエネルギーの生産効率が高い事を示すと考えられる。一方 FLC-7 は癌細胞に見られる、低いエネルギー生産効率と増殖有意な糖利用のであった。以上から RFB には以後 FLC-4 及びその改変株を用いる事とした。特徴が予想される (表 1、図 2) 発現パターン

表 1 糖代謝関連遺伝子発現の比較

gene	特徴	mRNA 量の比較	
GLUT1	癌特有	FLC-4 <	FLC-7
GLUT2	肝型	FLC-4 >	FLC-7
GLUT3	脳型	FLC-4 ≪	FLC-7
HK II	癌特有	FLC-4 ≪	FLC-7
HK IV	解糖系	FLC-4 >	FLC-7
PK	解糖系	FLC-4 >	FLC-7

【rHSA 生産株利用の検討】 FLC-4 に rHAL の発現ベクターをトランスフェクションする事で得られた rHAL 生産型 stable clone である FLC-4M#1 を用いて長期培養を行い FLC-4 と比較した。

FLC-4 細胞と FLC-4M#1 細胞でのグルコース消費量は差がなかったが、¹³CO₂ 排出量は FLC-4M#1 細胞で明らかに高値を示した (図 3)。これは FLC-4M#1 において ATP 生産の要求性が上昇している可能性が考えられた。培養 14 日後から高グルコース型培地 (ERDF) にスイッチングを行ったが、グルコース消費については変わらないものの ¹³CO₂ 排出量の差は大きくなった。

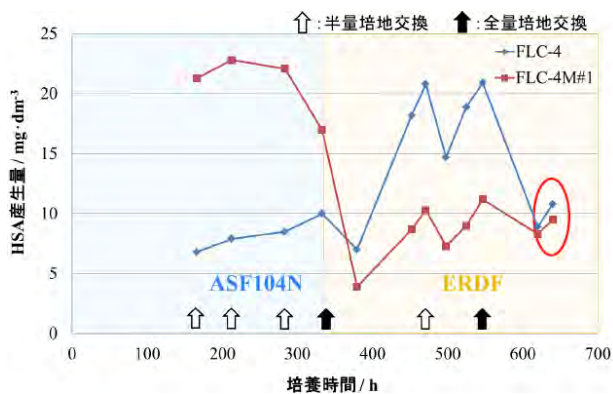


図 4. RFB 培養中の HSA 産生

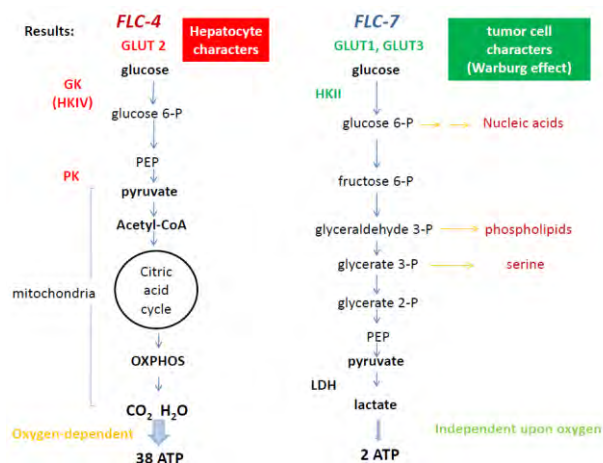


図 2. 予想される FLC-4, 7 の糖利用経路の違い

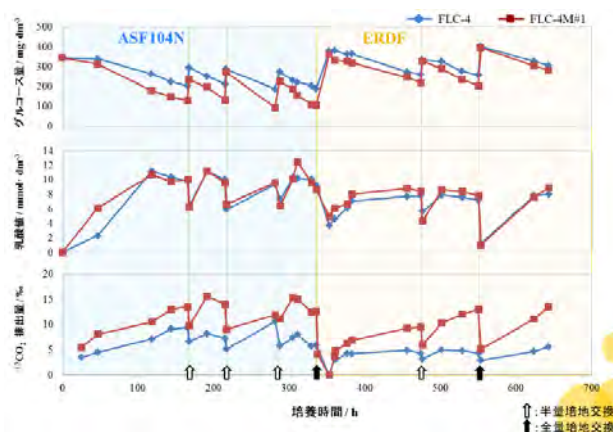


図 3. RFB での培養経過

培養期間中の抜き取り培地試料中の HAL 量を測定したところ、培地スイッチングをおよその境目として HAL 生産性に変化が見られた (図 4)。この観察結果から、ASF104N 培地と ERDF 培地の成分組成について比較検討を行ったところ、Ornithine と Arginine において大きく異なる事がわかった (表 2)。そこで、Ornithine に注目し、その意義を検討する事とした。

Category	Amino Acid & Amino Acid Metabolite				Carbohydrate	Vitamin
	L-Arg-HCl	L-ornithine-HCl	Putrescine-2HCl	L-Met	D-Glucose	Pyridoxal-HCl
ASF104N	0	100 mg/L	0.3 mg/L	30 mg/L	2000 mg/L	4.0 mg/L
ERDF	581.45 mg/L	0	0.04 mg/L	49.2 mg/L	3423 mg/L	1.0 mg/L

【培養液組成の影響の検討】Ornithine に着目して、改変培地を含む 4 種の培地{ASF104N、ASOR(-)、ERDF、ERLO}を用いて FLC-4 の培養を行った。4 種の培地のうち、ASF104N において 9 日目までの増殖性が良好であった。他の 3 種の培地には明確な差は認められなかった (図 5)。このことは細胞の増殖性においては Ornithine 単独での影響は少ないことを示していると考えられた。

培養中の HAL 生産の変化では ERLO、ERDF、ASF104N の順に HAL 量が多く、ASOR(-)では検出できなかった (図 6)。Ornithine は Arginine の代謝産物であり、ともに尿素回路を構成している分子である。図 6 の HAL 生産性の培地別順位は Ornithine と Arginine の合計量 (物質比較) の多い順に一致しており (表 2)、HAL 生産能における Ornithine、あるいはその代謝物の重要性を示唆する結果であると考えられた。

Ornithine は尿素回路を構成する一方、Polyamine 合成の出発物質としても考えられている。Polyamine は細胞内で高濃度に存在し細胞の転写、翻訳を調節して様々な生理的役割を担っている。そこで次に Ornithine 欠損培地中の Polyamine 及び尿素回路に関する代謝物の解析を行った。

【Ornithine の有無によるアミノ酸代謝変化の解析】

ASF104N から Ornithine を欠損させた ASOR(-)培地を用いた場合、代謝経路上 Polyamine 合成の上流に位置している Arginine と Ornithine が両方含まれないことになる。Polyamine レベルの減少は転写・翻訳の両方に大きな影響を与える³⁾。このことから ASOR(-)で培養した FLC-4 中では Polyamine レベルが大幅に下がっていると予想した。しかし実際に Polyamine の定量を行うと、比率に若

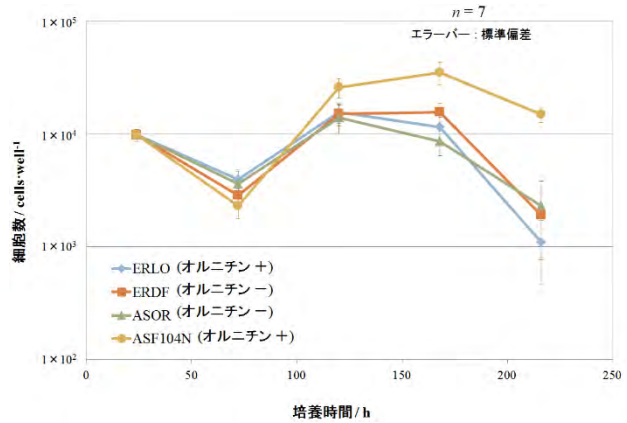


図 5 培地の違いによる増殖性への影響

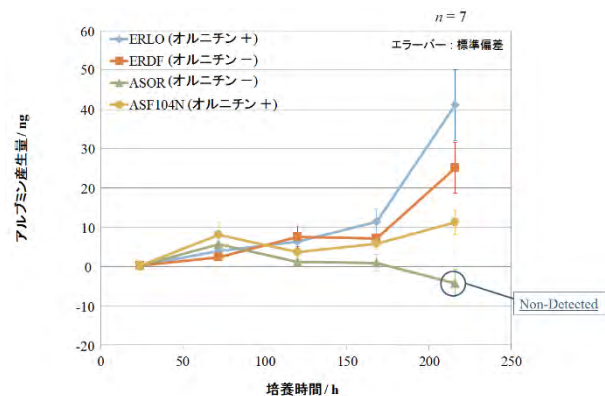


図 6 培地の違いによる HAL 生産性の比較

表 3 異なる培地で培養した FLC-4 中のポリアミン量の比較

polyamine	medium	day			
		6		12	
		(pmol/ μ g protein)	SD	(pmol/ μ g protein)	SD
Putrescin	ASF104N	0.242 \pm 0.0237		0.605 \pm 0.0529	
	ASOR(-)	0.386 \pm 0.0315		0.337 \pm 0.0331	
	ASOR(-)+Arg	0.414 \pm 0.0484		0.552 \pm 0.0762	
Spermidine	ASF104N	16.991 \pm 0.5914		26.607 \pm 1.9291	
	ASOR(-)	38.452 \pm 4.1607		41.645 \pm 0.4074	
	ASOR(-)+Arg	23.554 \pm 0.9476		24.871 \pm 1.8075	
Spermine	ASF104N	15.761 \pm 1.2981		25.228 \pm 1.4164	
	ASOR(-)	12.841 \pm 1.7907		7.087 \pm 0.5563	
	ASOR(-)+Arg	19.104 \pm 1.0003		21.961 \pm 1.1509	

干の違いがあるものの、細胞増殖や転写抑制に直結するような大幅な減少は見られなかった（表3）。

次に、Arginine と Ornithine は尿素回路を構成するアミノ酸であることから尿素回路によるアンモニア代

謝が起きているかどうかを調べた（図7）。ASF104N を用いた場合はアンモニア量の減少と尿素の合成がともに確認されたが、ASOR(-)においては培地中のアンモニア量は増加し、尿素は検出されなかった。このことは ASOR(-)で培養した FLC-4 中では尿素回路が抑制されている事を示すと考えられる。この時 HAL の mRNA 量を調べたところ、転写レベルで HAL 合成が抑制されていることが解った（図8）。また尿素回路、HAL mRNA レベルとも ASOR(-)に Arginine を添加することで回復する事がわかった。

このように12日目の時点で、Arginine と Ornithine の欠損した培地中では Polyamine 代謝経路には影響がなかったが尿素回路には影響が出ていた。尿素回路によるアンモニア代謝と HAL の合成はともに肝細胞特有の機能である。以上から、Ornithine 及び Arginine は肝機能発現と細胞増殖を共に良好に保つ上で重要である事が解った。

4. 結論

ヒト血漿蛋白質生産系を開発するために、血漿蛋白質で最大濃度の HSA 産生系の開発に挑んだ。RFB の高密度培養には FLC-4 を用いる事が適切であること、rHSA 産生型 FLC-4M#1 細胞株を利用する事で生産能が上げられる可能性があることが明らかとなった。さらに、培養液の組成においては肝細胞の機能発現と増殖性の維持には Arginine と Ornithine がともにあることが望ましい事が明らかとなった。今後 rHSA 産生型 FLC-4 の改良（promoter 検討）や RFB 足場構造の検討により更なる向上が期待される。

5. 参考文献

- 1) 厚生労働省 血漿分画製剤の需給状況と自給率
www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/.../2q/pdf/4-4.pdf
- 2) 厚生労働省 平成27年度の血液製剤の安定供給に関する計画（需給計画）（案）
www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai.../0000070544_2.pdf
- 3) Anthony E. Pegg Mammalian Polyamine Metabolism and Function. IUBMB Life. 2009 Sep; 61(9): 880–894.

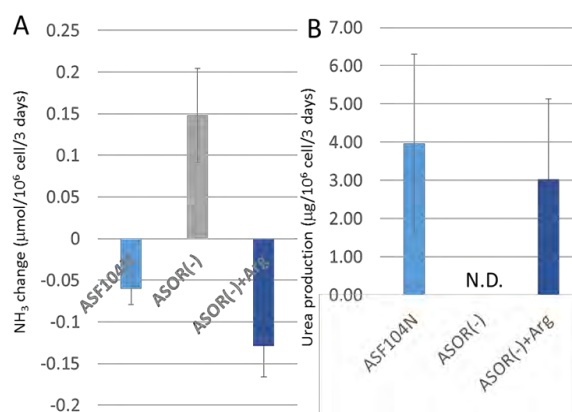


図7 アンモニア代謝の確認

A：アンモニア変化量 B：尿素合成

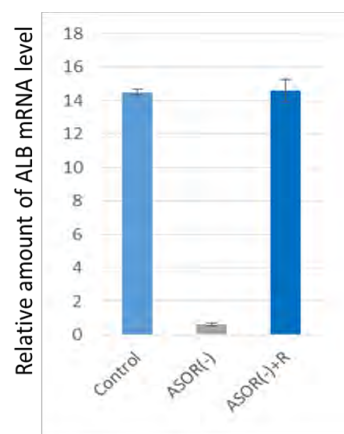


図8 異なる培地で培養した FLC-4 中の HAL mRNA 量の比較

(6well plate 培養 12 日目)

6. 研究発表

1. Sugita T, Amano K, Nakano M, Masubuchi N, Sugihara M, Matsuura T. Analysis of the serum bile Acid composition for differential diagnosis in patients with liver disease. *Gastroenterol Res Pract*. 2015 ; 2015:717431.
2. Abe H, Aida Y, Seki, N, Sugita T, Tomita Y, Nagano T, Itagaki M, Sutoh S, Nagatsuma K, Itoh K, Matsuura T, Aizawa Y. Aldehyde dehydrogenase 2 polymorphism for development to hepatocellular carcinoma in East Asian alcoholic liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:1376-83.
3. Matsumoto M, Matsuura T (9-2 番目). An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatol Res*. 2015;45:315-25.
4. Sato M, Hikita H, Hagiwara S, Sato M, Soroida Y, Suzuki A, Gotoh H, Matsuura T (14-10 番目). Potential associations between perihepatic lymph node enlargement and liver fibrosis, hepatocellular injury or hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatol Res*. 2015;45:397-404.
5. Hara M, Kirita A, Kondo W, Matsuura T (11-4 番目). LAP degradation product reflects plasma kallikrein -dependent TGF- β activation in patients with hepatic fibrosis. *Springerplus*. 2014;3:221.
6. Arai Y, Arihiro S, Matsuura T (12-3 番目). Prostaglandin E-major urinary metabolite as a reliable surrogate marker for mucosal inflammation in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20:1208-16.
7. Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Matsuura T (10-10 番目). Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One*. 2014;9:e97078.
8. Shindo D, Matsuura T, Suzuki M. Effects of prepubertal-onset exercise on body weight changes up to middle age in rats. *J Appl Physiol (1985)*. 2014;116:674-82.
9. Uranbileg B, Enooku K, Soroida Y, Ohka, Matsuura T (19-16 番目). High ubiquitous mitochondrial creatine kinase expression in hepatocellular carcinoma denotes a poor prognosis with highly-malignant potential. *Int J Cancer*. 2014;134:2189-98.
10. Nagatsuma K, Matsuura T (17-17 番目). Hepatic stellate cells that co-express LRAT and CRBP-1 partially contribute to portal fibrogenesis in patients with human viral hepatitis. *Liver Int*. 2014;34:243-52.
11. Tanaka K, Matsuura T (16-2 番目). Noninvasive assessment of insulin resistance in the liver using the fasting ^{13}C -glucose breath test. *Transl Res*. 2013;162:191-200.
12. Matsumoto Y, Matsuura T (15-2 番目). Antiviral activity of glycyrrhizin against hepatitis C virus in vitro. *PloS One*. 2013;8:e68992.
13. Sakata K, Hara M, Terada T, Watanabe N, Takaya D, Yaguchi S, Matsuura T (17-8 番目). HCV NS3 protease enhances liver fibrosis via binding to and activating TGF- β type I receptor. *Sci Rep*. 2013;3:3243.
14. 会田雄太, 關 伸嘉, 宮崎民浩, 松浦知和(11-10 番目). 組織学的に診断された NAFLD13 症例における ^{13}C -glucose 呼吸試験の有用性に関する検討. *適応医*. 2013;17:22-7.
15. Aizawa , Matsuura T, Zhuang Z. Syntheses of single-crystal apatite particles with preferred orientation to

- a- and c-axes as models for hard tissue and their applications. Biol Pharm Bull. 2013;36:1654-61.
16. 松浦知和 (8-1 番目). 肝臓星細胞に発現するビタミンA 貯蔵酵素 lecithin:retinol acyltransferase による血中レチノール濃度の調節—還流培養系での代謝シミュレーション—. Vitamins (Japan). 2012;86:432-40.
 17. Kobayashi K, Yoshida A, Ejiri Y, Matsuura T (8-7 番目). Increased expression of drug-metabolizing enzymes in human hepatocarcinoma FLC-4 cells cultured on micro-space cell culture plates. Drug Metab Pharmacokinet. 2012;27:478-85.
 18. Laurent T, Murase D, Tsukioka S, Matsuura T (6-4 番目). A novel human hepatoma cell line, FLC-4, exhibits highly enhanced liver differentiation functions through the 3-dimensional cell shape. J Cell Physiol. 2012;227:2898-906.
 19. Kuo TF, Tatsukawa H, Matsuura T (6-3 番目). Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. J Cell Physiol. 2012;227:1130-7.
 20. Marushima H, Shibata S, Asakura T, Matsuura T (11-4 番目). Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGFβ stimulation. Int J Oncol. 2011;39:1327-36.
 21. 阿倍正樹, 松浦知和, 俵木美幸, 阿倍郁朗, 谷川啓司, 海渡 健. 癌免疫細胞療法実施後に CEA 偽高値を呈した患者血清の検討. 臨病理. 2011;59:763-9.
 22. Gotoh Y, Ishizuka Y, Matsuura T, Niimi S. Spheroid formation and expression of liver-specific functions of human hepatocellular carcinoma-derived FLC-4 cells cultured in lactose-silk fibroin conjugate sponges. Biomacromolecules. 2011;12:1532-9.
 23. Watanabe N, Matsuura T (6-3 番目). Hepatitis C virus RNA replication in human stellate cells regulates gene expression of extracellular matrix-related molecules. BBRC. 2011;407:135-40.
 24. Saito R, Ishii Y, Matsuura T (14-14 番目). Transplantation of liver organoids in the omentum and kidney. Artif Organs. 2011;35:80-3.

7. 知的財産権の出願・登録状況

1. エイブル(株), 松浦知和, 大川清. 特許 発明の名称: ガス混合装置及びガス混合方法 (特許第 4868439 号) 2011/11/25 登録.

アパタイトファイバースキャフォールドにおける分化維持培養に向けた
肝細胞の栄養応答の解析

竹中麻子

明治大学農学部農芸化学科

**Basic research of hepatocyte response to nutritional signals
for application to differentiation culture in Apatite-fiber Scaffolds.**

Asako TAKENAKA

Department of Agricultural Biochemistry, School of Agriculture, Meiji University

1. 緒言

生命機能マテリアルによる三次元的な組織構築を目指して、本研究では「肝臓の三次元培養条件の最適化」の基盤研究を行った。肝臓は大部分を占める分化した肝実質細胞と、これ以外の非実質細胞群から構成されている。肝実質細胞は肝臓の機能を担う細胞であるが、分化状態を維持して生体外で培養することが非常に困難であり、肝臓特異的機能の多くは分離・培養した肝細胞では速やかに低下してしまう¹⁾。したがって、肝臓の三次元培養に際しては肝臓特異的機能が維持される条件を慎重に検討する必要がある。肝臓特異的機能の多くは肝臓がもつ特徴的な遺伝子発現パターンによって維持され、肝臓特異的転写因子群がこの遺伝子発現パターンを誘導する。したがって、肝臓特異的転写因子は肝機能維持の重要な制御因子であると同時に、肝細胞の分化状態の指標として信頼性の高いマーカーであると考えられる。一方、肝細胞の個々の機能や状態を反映する信頼性の高いマーカーの開発も同様に重要である。

肝臓は消化管で吸収された栄養素が門脈を通過して最初に到達する臓器であるため、消化吸収された栄養素の過不足の認識、栄養素の代謝および血中への輸送機能を担っている。そこで本研究では栄養素の代謝・輸送機能および栄養素の欠乏に応答した遺伝子発現変化の2点に注目し、肝細胞の機能や状態を評価するマーカー作成に向けた基盤研究を行った。

栄養素の輸送機能としては、 α -トコフェロール輸送タンパク質 (α -TTP) によるビタミン E 輸送に注目した。 α -TTP の機能不全により哺乳類はビタミン E 欠乏に陥り、身体面だけでなく精神・行動にも異常が表れる。 α -TTP は分化した肝細胞でのみ特異的に発現することが明らかになっていることから、この遺伝子の肝臓特異的転写因子による発現制御機構の解析を行い、肝臓の栄養素輸送機能のマーカーとしての特徴と妥当性を詳細に検討した。また、栄養素の不足を感知する機能として必須アミノ酸不足の認識機構に注目した。まず、アミノ酸欠乏に応答した *in vivo* 肝臓における遺伝子発現変化を網羅的に解析し、アミノ酸欠乏応答遺伝子を検索した。これらの遺伝子の中には他臓器からのシグナルに二次的に応答するものも含まれるため、アミノ酸欠乏培地で培養した肝細胞での応答性を解析することで、三次元培養時にも利用可能な栄養欠乏マーカーを検索した。

2. 実験方法

1) 肝臓特異的遺伝子の発現解析

まず、肝臓の分化状態が細胞の生体外培養によりどのように変化するかを、肝臓特異的遺伝子の発現解析により検討した。分化したラット肝臓、肝臓から分離した肝細胞、株化した肝臓由来の培養細胞

(H4IIE)、の3種のサンプルから total RNA を調製し、realtime PCR によりマーカー遺伝子発現量を解析した。肝臓特異的転写因子 (HNF-1 α 、HNF-3 γ 、HNF-4 α 、c/EBP α) および α -TTP の mRNA 量をリアルタイム PCR で解析し、サンプルごとの発現パターンを比較検討した。

2) 肝臓特異的転写因子発現細胞の機能解析

α -TTP 遺伝子の発現を維持するのに必要な転写因子の検討を行った。肝臓特異的転写因子 (HNF-1 α 、HNF-3、HNF-4) の cDNA を含む発現ベクターを構築し、培養細胞 (H4IIE) にリポフェクション法により導入し、 α -TTP 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR とウェスタンブロット分析により解析した。

3) gel shift assay

α -TTP 遺伝子と肝臓特異的転写因子の結合を解析した。 α -TTP 遺伝子プロモーター上の HNF-1 結合配列を TFSEARCH により検索し、転写開始点から -4119~-4135bp(p1), -4019~-4033bp(p2), -2790~-2803bp(p3) 付近に3カ所の結合配列を見いだした。それぞれの配列をもつ DNA 断片をビオチン標識してプローブとし、2)の肝臓特異的転写因子発現細胞の核タンパク質を混合して結合させた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。ゲルから転写後のメンブレンをストレプトアビジン-HRP で検出し、プローブの移動度から DNA-タンパク質の結合活性を検出した (EMSA Gel Shift Kit (Panomics) を使用)。

4) 肝臓特異的転写因子による α -TTP 遺伝子転写活性化の解析

肝臓特異的転写因子による α -TTP 遺伝子の転写活性化を解析した。 α -TTP 遺伝子の 5'UTR 約 5kb およびこの領域をさまざまな長さに delete した配列を含むホタルルシフェラーゼレポーターベクターを構築し、2)の肝臓特異的転写因子発現ベクターと共に培養細胞 (H4IIE) にリポフェクション法により導入した。24時間培養後のルシフェラーゼ活性を測定 (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega) することでプロモーター活性を解析した。

5) マイクロアレイ解析

6週齢の Wistar 系雄ラットにタンパク質を 15%含む対照食 (20P) あるいは 5%含むアミノ酸欠乏食 (5P) を8時間与え、16時間後に解剖して肝臓を採取した。各群3匹のラットから RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて RNA を抽出後、GeneChip 3' IVT express kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) による処理後、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)とのハイブリダイズ、Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix)を用いた蛍光強度の解析を行った。また、各群5匹の肝臓から TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science, Basel, Switzerland)を用いて RNA を抽出後、SYBR Green Real-time PCR Master Mix -Plus- (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて LightCycler 480 (Roche, Basel Switzerland) により realtime PCR 解析を行った。

6) 肝細胞のアミノ酸欠乏培地での培養

RL34 細胞、H4IIE 細胞を、10%FBS を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)でサブコンフルエントになるまで培養した。実験培地として minimum essential medium (MEM)+0.1% BSA 培地で一晩無血清培養した後、アミノ酸を含むあるいは含まない MEM (AA+, AA-) で24時間培養した。RNA を抽出後、realtime PCR 解析を行った。

3. 結果と考察

1) α -TTP 遺伝子発現制御機構の解析

α -TTP の遺伝子発現量は、ラット肝臓や分離肝細胞では高かったが、株化した培養細胞では低かった。

肝臓特異的転写因子 HNF-1 α は α -TTP 遺伝子と同様の発現パターンを示したが、他の転写因子は必ずしも α -TTP 遺伝子と一致した発現パターンを示さなかった。また、HNF-1, -3, -4 を強発現させた細胞の α -TTP 発現を検討したところ、HNF-1 発現細胞でのみ発現誘導がみられた。この結果から、 α -TTP の発現は転写因子 HNF-1 の制御下にある可能性が示された。また gel shift assay の結果から、 α -TTP 遺伝子プロモーター領域の 3 つの HNF-1 結合配列の中で、HNF-1 発現細胞の核タンパク質は-4019~-4033bp 付近の結合部位 (p2) と結合することを示した。さらに α -TTP 遺伝子のプロモーター活性の結果、HNF-1 α を高発現する細胞でのみ、 α -TTP 遺伝子 5'UTR のプロモーター活性が高くなった (Fig. 1)。また、HNF-1 α によるプロモーター活性の増加には 5'UTR の存在が必要であった (Fig. 1)。5'UTR をさまざまな長さに delete したベクターのルシフェラーゼ活性は、-4019~-4033bp, -2790~-2803bp を delete したもので低下した。以上の結果から、 α -TTP 遺伝子の転写活性は HNF-1 α によって増加すること、この増加には α -TTP 遺伝子の-4019~-4033bp, -2790~-2803bp の領域が重要であることが示された。

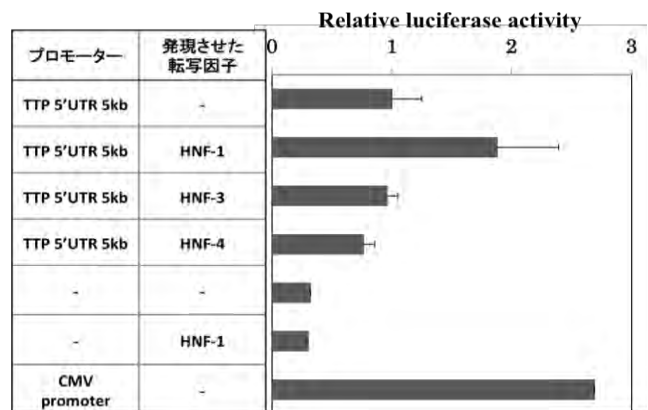


Fig.1 肝臓特異的転写因子による α -TTPプロモーター活性の制御

2) アミノ酸欠乏に応答した肝細胞の遺伝子発現応答の解析

ラット肝臓を用いたマイクロアレイ解析で、食餌中のアミノ酸欠乏に応答した発現の増加あるいは減少率が最も大きかった遺伝子を 10 ずつ選抜し、realtime PCR により発現変動の確認を行った。マイクロアレイ解析で選抜された遺伝子のほとんどの発現変動が realtime PCR でも確認された (Table 1)。さらに、アミノ酸欠乏培地で培養した RL34 細胞および H4IIE 細胞でこれら 20 の遺伝子発現を解析した結果、ASNS, PHGDH, KRT10, FGF21, IGTP, PNPLA3, FADS2, IDI1, INSIG1 は培養細胞においても in vivo と同様の発現変動を示すことが明らかとなった。さらに、アミノ酸欠乏によって活性が変化する転写因子を検索したところ、ATF4 が活性化することが示された。

UP-regulated genes	fold increase	significance
IGTP	1.00	
FGF21	7.70	
CIB2	2.79	
KRT10	1.06	
GSTA3	1.63	
GPM6A	2.76	*
PSAT1	4.14	**
UGT2b	1.65	
PHGDH	28.75	*
ASNS	7.17	*
Down-regulated genes	fold decrease	significance
INSIG1	-4.00	**
SDS	-3.93	
IDI1	-5.07	*
FADS2	-2.64	**
PCSK	-7.19	*
FADS1	-5.97	**
STAC3	-2.95	**
PNPLA3	-25.29	*
OAT	-8.85	**
FOS	-4.04	

*, p<0.5; **, p<0.01

4. 結論

本研究の結果から、 α -TTP の肝臓特異的遺伝子発現が HNF-1 α によって誘導されることを分子レベルで明らかにした。 α -TTP の発現が肝細胞の分化状態を非常に良く反映したパターンを示すことは知られていたが、発現制御機構を明らかにしたことにより、肝臓特異的機能マーカーとしての基盤を作ることができたと考える。さらに、本研究では肝細胞の

アミノ酸欠乏のマーカー遺伝子候補を選抜することもできた。今回選抜した遺伝子は、in vivo と培養肝細胞でいずれもアミノ酸欠乏によって発現が上昇しており、生体における栄養欠乏状態を培養細胞でも同様にモニターできるマーカーである。さらに、これらの遺伝子の制御因子として転写因子 ATF4 の重要性が明らかになった。ATF4 は、アミノ酸欠乏に応答して翻訳活性が増加しすることが肝臓培養細胞で明らかになっている。しかし、in vivo でもアミノ酸低栄養に応答してこの因子が活性化することはこれまで明確に示されておらず、ATF4 を介した遺伝子発現制御がアミノ酸欠乏のマーカー遺伝子を選択する上で利用可能であることが明らかとなった。三次元培養肝細胞はさまざまな目的で利用されると予想するが、細胞の状態や機能の評価にはそれぞれの目的に適したマーカーが必要となる。この際、発現制御機構が明確になっているマーカーを使うことが重要であり、本研究の成果がその一助となることを期待する。

5. 参考文献

[1] H. Oda, K. Nozawa, Y. Hitomi and A. Kakinuma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 800-805 (1995).

6. 成果報告

論文

- 1) Y. Terada, Y. Okura, T. Kikusui, and A. Takenaka “Dietary Vitamin E Deficiency Increases Anxiety-Like Behavior in Juvenile and Adult Rats.” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75(10)**: 1894-1899 (2011).
- 2) O. Yoshinari, A. Takenake, and K. Igarashi, “Trigonelline Ameliorates Oxidative Stress in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats. “, *Journal of Medical Food*, **16 (1)**, 1-8 (2013).
- 3) Y. Ozaki, T. Takeda, N. Akanishi, F. Hakuno, Y. Toyoshima, S-I. Takahashi and A. Takenaka. “Effects of insulin injection on enhanced insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in the liver during dietary protein restriction”, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **78(1)**, 130-138 (2014).
- 4) Y. Toyoshima, R. Tokita, Y. Taguchi, N. Akiyama-Akanishi, A. Takenaka, H. Kato, K. Chida, F. Hakuno, S. Minai and S-I. Takahashi. “Tissue-specific effects of protein malnutrition on insulin signaling pathway and lipid accumulation”, *Endocrine Journal*, **61(5)**, 499-512 (2014).
- 5) Y. Ozaki, K. Saito, K. Nakazawa, M. Konishi, N. Itoh, F. Hakuno, S-I. Takahashi, H. Kato and A. Takenaka Rapid increase in fibroblast growth factor 2 in protein malnutrition and its impact on growth and lipid metabolism. *British Journal of Nutrition*, **114**: 1410-1418 (2015).

解説記事

- 1) 竹中麻子, “さまざまな生物におけるビタミン E の選択的体内輸送と機能 “, ビタミン, **86(9)**, 521-523(2012).
- 2) 橋本理恵子、大谷祐貴、徳永香南子、竹中麻子, “ビタミン E 摂取量の違いがラットの不安行動におよぼす影響の解析 “, ビタミン E 研究の進歩 XV, 1-5 (2012)
- 3) 高橋伸一郎, 金子元, 竹中麻子, 東祐輔, 尾添淳文, 伯野史彦, “酸化ストレスとインスリン様活性の相互作用が健康寿命延伸に果たす役割” , 医学のあゆみ, **247(9)**, 934-941 (2013)
- 4) 高木真理、橋本理恵子、竹中麻子 ビタミン E 欠乏がメスラットの不安行動におよぼす影響の解析、

ビタミンE研究の進歩 XVI、ビタミンE研究会編、pp40-43、(2014)

- 5) 大倉悠毅、寺田裕紀、橋本理恵子、大橋広弥、大谷祐貴、徳永香南子、松本康志、高木真理、中間未祈子、遠藤駿、竹中麻子 ビタミンE欠乏と不安行動、 ビタミン (2015)
- 6) 竹中麻子 食品成分と遺伝子 (共著) 加藤久典・藤原葉子編 (2014) 栄養科学イラストレイテッド 分子栄養学 p153-166、羊土社

学会発表 (国際学会) 8 件

- 1) Yori Ozaki, Tomoya Takeda, Narumi Akanishi, Yuka Toyoshima, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi, Asako Takenaka, "Effect of short-term treatment with insulin on decreased IGF-I expression and increased liver triglycerides during protein deprivation" The 6th International Congress of the GRS and the IGF Society, Gastig, Munich, Germany, October 17-20, 2012.
- 2) Asako Takenaka and Naoko Fujita, "Sex differences of vitamin E metabolism in rats", 20th International Congress of Nutrition, Granada, Spain, September 15-19, 2013.
- 3) Mika Hino, Kanae Takeuchi, Shin-Ichiro Takahashi, Asako Takenaka, "Impaired mTORC1 activity up-regulates IGFBP-1 synthesis during dietary protein restriction." The 7th International Congress of the GRS and the IGF Society, Singapore, October 15-18, 2014.
- 4) Yasuyo Oshima, Takeshi Harada, Shun Endo, and Asako Takenaka "Effect of eicosapentaenoic acid on anxiety-like behavior in rats." 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May 14-18, 2015.
- 5) Arisa Seki, Sohei Kanisawa, Yukino Takenouchi, Yuko Obata, and Asako Takenaka. "Effect of protein restriction on hepatic uptake of very low-density lipoprotein." 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May 14-18, 2015.
- 6) Shun Endo, Mikiko Nakama, Yuki Terada, and Asako Takenaka "Effect of vitamin E deficiency on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats." 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May 14-18, 2015.
- 7) Mami Horiuchi, Tomoya Takeda, Yori Ozaki, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi and Asako Takenaka. "Effect of branched-chain amino acids on insulin secretion during feeding." 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May 14-18, 2015.
- 8) Yori Ozaki, Kenji Saito, Kyoko Nakazawa, Morichika Konishi, Nobuyuki Itoh, Fumihiko Hakuno, Shin-Ichiro Takahashi, Hisanori Kato and Asako Takenaka "Rapid increase of fibroblast growth factor 21 under protein malnutrition and its impact on growth and lipid metabolism." 12th Asian Congress of Nutrition, Yokohama, Japan, May 14-18, 2015.

学会発表 (国内学会) 50 件 (うち、シンポジウム 1 件、招待講演 1 件)

第 4 章

血管形成の制御

血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの作製と
その *in vitro* および *in vivo* 評価

茅嶋健太郎¹⁾・大山 遼¹⁾・江本 精²⁾・松浦知和³⁾・新井良和⁴⁾・長屋昌樹⁵⁾
・長嶋比呂志^{4),5)}・相澤 守^{1),5)}

- 1) 明治大学理工学部応用化学科
- 2) 国際医療福祉大学
- 3) 東京慈恵医科大学
- 4) 明治大学農学部生命科学科
- 5) 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート

***In vitro* and *In vivo* Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffold
with Enhanced Mechanical Property**

Kentaro KAYASHIMA¹⁾, Ryo OYAMA¹⁾, Masaru EMOTO²⁾, Tomokazu MATSUURA³⁾,
Yoshikazu ARAI⁴⁾, Masaki NAGAYA⁵⁾, Hiroshi NAGASHIMA^{4),5)} and Mamoru AIZAWA^{1),5)}

- 1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University
- 2) International University of Health and Welfare
- 3) Division of Central Clinical Laboratory, Jikei University Hospital
- 4) Department of Life Science, School of Agriculture, Meiji University
- 5) Meiji University International Institute for Bio-Resource Research

1. 緒言

我々はこれまでにアパタイトファイバー(AF)を合成し、このAFと直径150 μmおよび20 μmの2種類のカーボンビーズ(CB)を用いて作製した成形体に一軸加圧成形を施すことにより高強度化アパタイトファイバースキャフォールド(AFS)の作製に成功している^{[1],[2]}。本研究では、様々な気孔率を有する高強度化AFSを作製し、それらに血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を担持させ、内皮細胞を用いた *in vitro* 評価や大型動物であるブタを用いた *in vivo* 評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 材料作製

AFおよび高強度化AFSは既報^{[1],[2]}と同様のプロセスで作製した。なお、ここで得られたAFSはAFの質量に対して1, 5, 7倍量のCBを添加していることから、例えば1倍の場合には“AFS100”と表記する。また、添加するCBの比率は、すべて150 μmビーズが50 mass%、20 μmビーズが50 mass%であるので、例えば“AFS100(50-50)”と略記する。続いて、VEGF担持高強度化AFSは既報^[3]と同様のプロセスで作製した。ここで、VEGFを担持させたAFSを“AFS100(50-50)(+)”とし、担持していないものを

“AFS100(50-50)(-)”と略記する。

2-2 *In vitro* および *in vivo* 評価

AFS700(50-50)を培養基材に用いて、血管内皮細胞のモデルとしてマウス不死化肝類洞内皮細胞(M1細胞)^[4]を所定の期間培養した。そのサンプルを用いて薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色により組織学的評価を行なった。また、[バイオセラミックスの細胞侵入性評価試験プロトコル Rev(1)]^[5]にしたがって、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いて AFS への細胞侵入性評価試験を行なった。

In vivo 評価として、大型動物であるブタを用いてインプラント実験を行なった。使用サンプルは AFS100(50-50)(+), AFS100(50-50)(-), AFS500 (50-50)(+) および AFS500(50-50)(-)であった。これを脛骨に4週間埋入し、血管内皮細胞が特異的に発現するタンパク質である CD31 の定量および、材料の生体内吸収性、新生骨形成量の定量評価を行なった。

3. 実験結果と考察

3-1 *In vitro* 評価

AFS700(50-50)(+)および AFS700(50-50)(-)を用いて M1 細胞を 21 日間培養し、切片を作製して HE 染色した結果を Fig. 1 に示す。Fig. 1 より AFS700(+)の方がより多くの細胞を観察することができ、VEGF 担持 AFS は内皮細胞の増殖を促進させていることが確認できた。

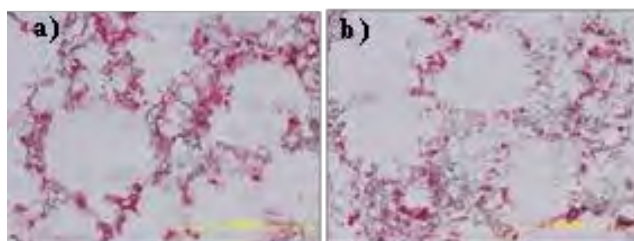


Fig. 1 切片の HE 染色画像:

a) AFS700(50-50)(+), b) AFS700(50-50)(-)

次に、AFS100(50-50), AFS500(50-50)および AFS700(50-50)を用いて細胞侵入性評価試験を行

なった結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より、AFS700 が最も長い細胞侵入距離を示した。気孔率が高い AFS ほど細胞侵入距離が長いという結果が得られた。

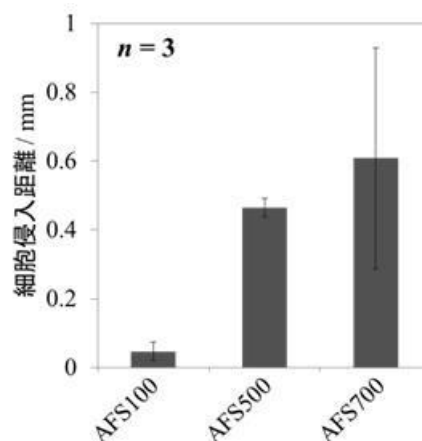


Fig. 2 細胞侵入距離

3-2 *In vivo* 評価

AFS100 および AFS500 をブタの脛骨に4週間のインプラントし、取り出したサンプルで切片を作製してトルイジンブルー(TB)染色したものを画像処理ソフトを用いて AFS 内に新生した骨を定量化した結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より、AFS100 と比較して AFS500 においてより多い骨形成率を示した。また、AFS500 において VEGF を担持させることにより、さらに骨形成を促進させていることがわかった。AFS100 において差が見られなかったのは VEGF 徐放挙動が AFS500 と比較して緩やかであることが要因として考えられる。

次に、血管内皮細胞が特異的に発現するタンパク質である CD31 を免疫染色し、その発現領域を画像解析ソフトを用いて面積率を算出した結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 より、AFS100(50-50)(-)と AFS100(50-50)(+)の間に CD31 の発現領域には差は観られなかったが、AFS500(50-50)(-)と

AFS500(50-50)(+) 間にはおよそ倍の差が観られ、AFS500(50-50)(+) が最も多くの CD31 を発現していることがわかった。CD31 の発現が観られたことから AFS 内部に周辺組織からの血管侵入あるいは血管新生が生じたものと考えられ、AFS500(50-50)(+) は最も血管を導入しうる材料であると考えられる。

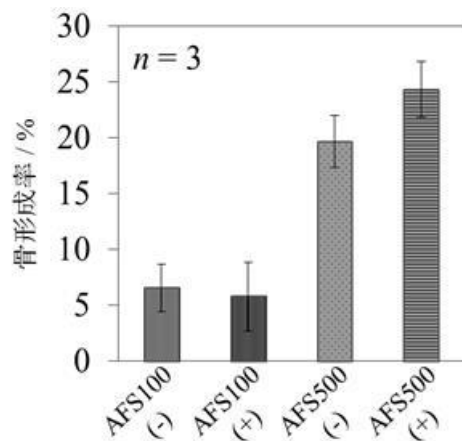


Fig. 3 骨形成率結果

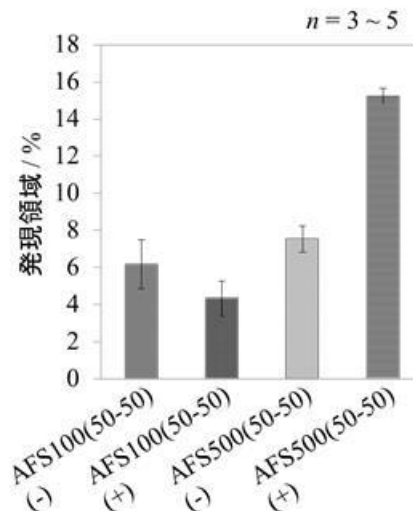


Fig. 4 CD31 発現領域の定量

以上の結果から、本研究で作製した VEGF 担持高強度化 AFS は、より多くの細胞侵入を可能とし、生体内において骨形成を促進させる DDS キャリアとして期待できる。特に、AFS500(50-50)(+)は、細胞が侵入するのに十分な細孔径を保有し、VEGF を担持可能なことから、血管新生を誘導するティッシュエンジニアリングのための新規な足場材料として有効であると期待できる。

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).
- [2] S. Motojima, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama, and M. Aizawa, *Bioceramics*, **22**, 177-180(2009).
- [3] K. Kayashima, R. Oyama, M. Emoto, H. Maehashi, T. Matsuura and M. Aizawa, *Key Engineering Materials*, **529-530**, 402-406 (2013).
- [4] T. Matsuura et al., *Inter. J. Artif. Organ.*, **21**, 229-234 (1998).
- [5] M.Kikuchi, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 836-839 (2012).

5. 本研究に関する成果報告

*受賞

- 1) 茅嶋健太郎・大山 遼・江本 精・松浦知和・新井良和・長屋昌樹・長嶋比呂志・相澤 守
日本無機リン化学会第 23 回無機リン化学討論会
若手優秀発表賞(2013)

タイトル：血管内皮細胞増殖因子を担持し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 vitro* および *in vivo* 評価

*学会発表 (国際会議)

- 1) K. Kayashima, R. Oyama, M. Emoto, T. Matsuura, Y. Arai, M. Nagaya, H. Nagashima and M. Aizawa, “*In vitro* and *in vivo* evaluation of vascular endothelial growth factor-loaded apatite-fiber scaffold with enhanced mechanical property”, 13 th Asian BioCeramics Symposium, Kyoto University, Kyoto, Japan, 4th-6th, December 2013.

***学会発表（国内会議）**

1) 茅嶋健太郎・大山 遼・江本 精・松浦知和・新井良和・長屋昌樹・長嶋比呂志・相澤 守、“血管内皮細胞増殖因子を担持し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 vitro* および *in vivo* 評価 (*In vitro and in vivo* Evaluation of Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffold with Enhanced Mechanical Property) ”、第 23 回無機リン化学討論会

日本無機リン化学会第 23 回無機リン化学討論会、松江テルサ、日本無機リン化学会、2013 9.19-20

血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの
特性評価と生物学的評価

安田沙織¹⁾・本田みちよ^{2,3)}・長屋昌樹³⁾・浅野吉則⁴⁾・中野和明⁴⁾
長嶋比呂志^{3,4)}・相澤 守^{1,3)}

- 1) 明治大学大学院理工学研究科応用化学専攻
- 2) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 3) 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート
- 4) 明治大学農学部生命科学科

**Fabrication of vascular endothelial growth factor-loaded apatite-fiber scaffolds with enhanced mechanical
property and their biological evaluation**

Saori YASUDA¹⁾, Michiyo HONDA^{2,3)}, Masaki NAGAYA³⁾, Yoshinori ASANO⁴⁾,
Kazuaki NAKANO⁴⁾, Hiroshi NAGASHIMA^{3,4)} and Mamoru AIZAWA^{1,3)}

- 1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University
- 2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University
- 3) Meiji University International Institute for Bio-Resource Research
- 4) Department of life science, School of Agriculture, Meiji University

1. 緒言

近年、事故や疾患などで失った組織を再生させるティッシュエンジニアリングが注目されている。我々は骨再生のためのスキャフォールドに着目して、尿素の加水分解を利用して合成されるアパタイトファイバー (AF) と二種類の粒径のカーボンビーズ (CB) を混合し焼失させることによって、三次元的に細胞培養可能なアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) の開発に成功している[1]。また、作製した AFS の前駆体に一軸加圧を加えることで「高強度化 AFS」の作製にも成功している[2]。本研究の目的は、組織機能を高いレベルで維持することが可能な再生組織の構築である。これを達成するためには再生組織への血管の導入が必要であると考えた。また、血管の内皮を構成する血管内皮細胞を増殖させる因子として血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) が知られている。そこで、VEGF が血管内皮細胞に与える影響をヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて調査した。また、VEGF を高強度化 AFS に担持させて「VEGF 担持高強度化 AFS」を作製した。作製した VEGF 担持高強度化 AFS を大型動物であるブタの筋および脂肪に埋入し *in vivo* 評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

1) 高強度化 AFS の作製

合成した AF の質量に対して、粒径 20 μm および 150 μm の CB を合わせて 1, 3, 5 および 7 倍量となるように添加してスキャフォールド “AFS100, AFS300, AFS500, AFS700” を作製した。なお、CB は、20 μm のものを 50 mass%、20 μm のものを 50 mass% ずつ混合して添加した。

2) VEGF 担持高強度化 AFS の作製と薬剤徐放実験挙動

AFS と VEGF は互いに正の電荷を帯びており、静電的な相互作用により、AFS へ VEGF を担持させることが難しい。そこで、負の電荷をもつウシ血清由来アルブミン溶液 (BSA) を AFS と VEGF とのバインディング剤として利用した。VEGF 担持高強度化 AFS (高さ: ~ 7.5 mm, 直径: ~ 3.6 mm) は、はじめに高強度化 AFS を BSA 中で脱気し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間浸漬させた。その後、高強度化 AFS に VEGF 溶液 (高強度化 AFS 1 個あたり 10 または 100 ng の VEGF を含んだ PBS 溶液) を滴下して減圧脱気後、凍結乾燥させた。ここで、高強度化 AFS500 に VEGF 溶液 10 ng 滴下したサンプルを “AFS500(10)” と表記する。

VEGF 担持高強度化 AFS500(10) を 50 cm^3 の遠沈管に入れ、PBS (-) 10.0 cm^3 を加えた。この遠沈管を恒温振盪槽機 (37 $^{\circ}\text{C}$, 50 回 $\cdot\text{min}^{-1}$) で、1 日毎に溶液を採取し、Human VEGF ELISA kit Quantikine[®] (R&D Systems) を用いて VEGF 放出量を測定した。

3) VEGF 添加培地による血管内皮細胞の培養

24 well plate 上に HUVEC (3.0×10^4 cells $\cdot\text{cm}^{-3}$) を播種し、7 日間培養を行なった。HUVEC の専用培地として、Endothelial Cell Growth Medium 2 kit を用いた。1 well 当たりの培地量は 1 cm^3 であり、1 well 当たりに VEGF が 10 ng または 100 ng (VEGF 濃度 : 10 ng $\cdot\text{cm}^{-3}$, 100 ng $\cdot\text{cm}^{-3}$) が添加されているように培地を調製した。培養後、細胞増殖性とヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、内皮細胞に特異的に発現がみられる CD31 および von Willebrand 因子 (vWF) の免疫染色を行なった。

4) VEGF 担持高強度化 AFS を用いた *in vitro* 評価 (Transwell[®]を用いた間接培養試験)

これまでに、*in vivo* における最適なスキャフォールドは AFS500 であることが分かっている。そこで、AFS500 に加えて、それよりもさらに気孔率の高い AFS700 および気孔率の低い AFS100 を試験片として使用し、これらに 2) と同様の方法で VEGF を担持させた (高さ: ~ 1.8 mm, 直径: ~ 14 mm)。さらに、Transwell[®] を用いて間接培養を行ない、VEGF 担持高強度化 AFS から徐放された VEGF による細胞への影響を調べるために、細胞増殖性と細胞形態を調査した。

5) VEGF 担持高強度化 AFS への細胞侵入性試験

作製した高強度化 AFS の細胞侵入性を評価するために、「バイオセラミックスの細胞侵入性評価試験プロトコル Rev(1)」[3] にしたがって実験を行なった。作製した VEGF 担持高強度化 AFS (高さ: ~ 1.8 mm, 直径: ~ 14 mm) はエチレンオキサイドガス (EOG) 滅菌により処理した。6 well plate に 5.0×10^5 cells $\cdot\text{well}^{-1}$ で HUVEC を播種し、3 日間培養しコンフレントな状態にした。そこへ AFS500(0), AFS500(10), AFS500(100) の三種類のサンプルを 1 well に一つずつ設置し、サンプルの重石として滅菌済みのステンレスリング (SUS316 stainless steel double ring) を用いた。サンプル設置 3 日後、サンプルを取り出し、ギムザ染色を行なった。

6) VEGF 担持高強度化 AFS を用いた HUVEC の三次元培養

2)で作製した VEGF 担持高強度化 AFS を 24 well plate に設置した。そこに HUVEC を播種 (3.0×10^4 cells \cdot cm⁻³) し、9 日後にサンプルを取り出し、凍結切片を作製した。形態観察では、HE 染色、CD31 および vWF の免疫染色を行なった。

7) *in vivo* 実験

2)で作製した VEGF 担持高強度化 AFS サンプルは EOG 滅菌により処理し、ブタの筋および脂肪に 4 週間埋入した。取り出し後、作製したサンプルの切片を HE 染色、CD31 および vWF による免疫染色を行なった。

3. 結果と考察

1) 高強度化 AFS の作製

XRD の結果より、すべての AFS の結晶相は水酸アパタイト単一相であった。SEM による微細構造観察より、CB 焼失部分に気孔が確認できた。また、CB 添加量の添加に伴い、気孔率および吸水率は増加し、圧縮強度は CB 添加量に伴い低下した。

表1) 高強度化AFSのキャラクタリゼーション

サンプル	AFS100	AFS300	AFS500	AFS700
気孔率 / %	67.5	84.6	89.3	91.4
吸水率 / %	71.5	214	294	410
圧縮強度 / MPa	8.2	0.67	0.19	0.10

2) VEGF 担持高強度化 AFS からの薬剤徐放挙動

図 1 に VEGF 担持高強度化 AFS からの VEGF 徐放挙動を示した。バインディング剤が BSA 溶液の場合は、VEGF は 1 日目で初期バーストが認められたものの、その後徐放量は徐々に増加した。一方、PBS 溶液を用いた場合は、VEGF の徐放はほとんど認められなかった。これらの結果から、BSA が AFS と VEGF とのバインディング剤として有効であることが分かり、以降の研究では BSA をバインディング剤として用いることを決定した。

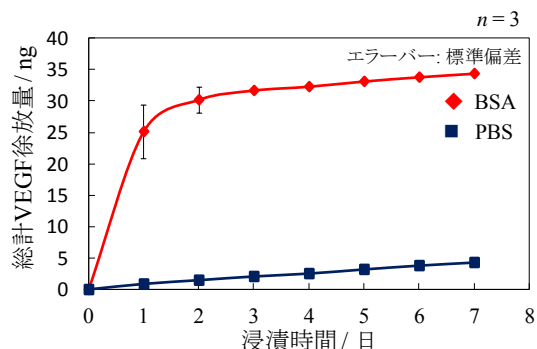


図1 VEGF担持高強度化AFS500(100)からの薬剤徐放挙動

3) VEGF 添加培地による血管内皮細胞の培養

VEGF 添加濃度に伴う細胞増殖性の違いは見られなかったが、いずれも細胞は良好に増殖していることから、VEGF の細胞毒性は見られなかった。また、図 2 に HE 染色の結果を示した。VEGF を 100 ng 添加した培地で HUVEC を培養したサンプルでは、細胞が渦を巻くような形態を示した。CD31 および vWF による免疫染色でも同様の結果が得られた。このことから、VEGF が HUVEC に与える影響は、細胞増殖よりも先に細胞形態に違いが出るのが明らかとなった。

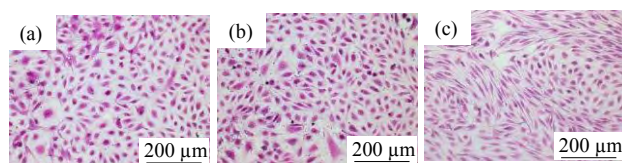


図 2 HE染色による形態観察
血管内皮細胞専用培地にVEGF (a) 0 ng \cdot cm⁻³,
(b) 10 ng \cdot cm⁻³, (c) 100 ng \cdot cm⁻³ 添加しHUVECを7日間培養した。
赤紫：細胞核、ピンク：細胞質

4) VEGF 担持高強度化 AFS を用いた *in vitro* 評価

(Transwell®を用いた間接培養試験)

図3に示した細胞増殖性の結果とHE染色、CD31による免疫染色、より、いずれのサンプルでも細胞は良好に増殖していた。しかし、サンプル毎の差はほとんどなかったことから、気孔率と強度の高いAFS500を以降の実験で用いることに決定した。

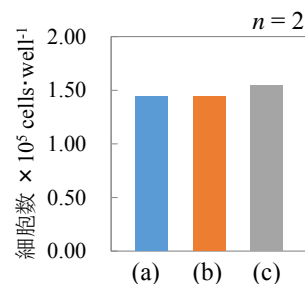


図3 間接培養における細胞増殖
(a) AFS100(100), (b) AFS500(100),
(c) AFS700(100)

5) VEGF 担持高強度化 AFS への細胞侵入性試験

各 AFS のギムザ染色後の細胞接着面の画像と AFS 除去後の well plate の染色画像を図3に示した。図3より、どの AFS においても、plate 上でコンプレントになり行き場をなくした細胞が well plate から AFS へ移動し AFS 側で多くの細胞が染色されている様子が観察された。

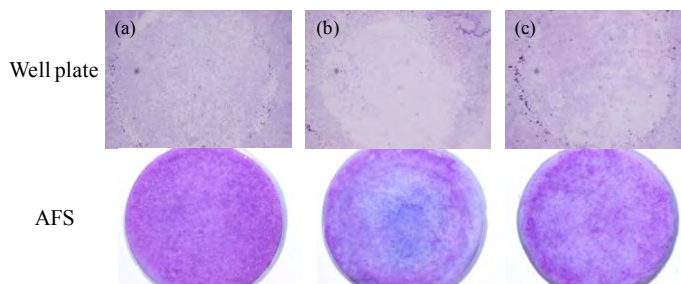


図4 ギムザ染色後のwell plateとAFSの表面
(a) AFS500(0), (b) AFS500(10), (c) AFS500(100)

6) VEGF 担持高強度化 AFS を用いた HUVEC の三次元培養

作製した切片を染色した結果を図5に示した。VEGF 担持高強度化 AFS 上で HUVEC を培養することで、細胞が AFS の骨格に沿って増殖していた。また、免疫染色により、CD31 および vWF の発現が確認された。しかし、VEGF 量に伴う有意な差は見られなかった。この要因としては、短期間の培養であるため、VEGF を効果的に活用することができなかつたためではないかと考えられる。

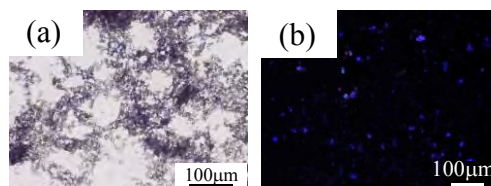


図5 AFS500(100)の形態観察
(a) HE染色, (b) 免疫染色
(a; 赤紫: 細胞核, ピンク: 細胞質,
b; 青: 細胞核, 赤: CD31, 緑: vWF)

7) *in vivo* 実験

筋に埋入したサンプルの HE 染色の結果から、いずれのサンプルでも血球が局在している様子が確認できた。特に、AFS500(100)では、血管と思われる組織が多く観察された。それらが血管であるかを確かめるために、CD31, vWF を用いた免疫染色を行なったところ、すべてのサンプルでそれぞれの発現がみられた。また、図4に示した AFS500(100)では、AFS500(0), AFS500(10)と比較すると CD31 および vWF の発現が多く見られ、血管様の組織の形成が認められた。これらの結果より、筋埋入サンプルでは AFS への VEGF 担持量に伴い、血管内皮細胞が多く存在することが分かった。続いて、脂肪に埋入したサンプルも同様に血球が集合している部分が見られ、CD31 および vWF 陽性の細胞も散見された。

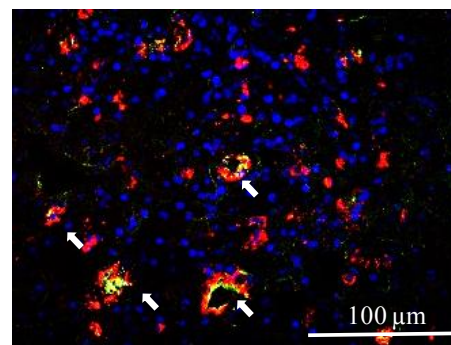


図6 筋肉埋入AFS500(100)の
免疫染色のMerge画像
(青: DAPI, 赤: CD31, 緑: vWF)

4. 結論

本研究では、高強度化 AFS を用いて、血管新生を誘導する材料を指向した VEGF 担持高強度化 AFS を作製し、血管内皮細胞の細胞応答性や大型動物のブタにおける血管形成を含む生物学的評価を行なった。

本研究で作製した高強度化 AFS は、HAp 単一相であった。

VEGF が HUVEC に与える影響を調査したところ、渦を巻くように細胞が局在しており形態に影響を及ぼすことが分かった。この VEGF を高強度化 AFS に担持させた「VEGF 担持高強度化 AFS」は、初期バーストが確認されるものの、細胞侵入性は良好であり、三次元培養のための材料としても有効であった。さらに、この VEGF 担持高強度化 AFS をブタの筋に埋入した際には、AFS500(100)では、他の材料よりも血管と思われる構造を多く観察することができた。

以上の結果から、本研究で作製した VEGF 担持高強度化 AFS500(100)は、血管新生を誘導するティッシュエンジニアリングのための新規な足場材料として期待できる。

5. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanazawa, H. Morisue, M. Matsumoto and Y. Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17** 262-268(2004).
- [2] S. Motojima, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama and M. Aizawa, *Bioceramics*, **22**, 177-180(2009).
- [3] M.Kikuchi, *Key Engineering Materials*, **493-494**, 836-839 (2012).

6. 成果報告

*口頭発表

- 1) ○安田沙織, 本田みちよ, 長屋昌樹, 浅野吉則, 中野和明, 長嶋比呂志, 相澤 守, “筋および脂肪組織埋入による血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの組織学的評価”, 無機マテリアル学会第 131 回学術講演会, ウィンクあいち (愛知県) 2015 年 11 月 5-6 日
- 2) ○安田沙織, 中村まり子, 本田みちよ, 相澤 守, “血管内皮細胞増殖因子を担持させた高強度化アパタイトファイバースキャフォールドの作製とその *in vitro* 評価”, 第 23 回アパタイト研究会, 富山県民共生センター「サンフォルテ」 (富山県) 2014 年 12 月 11-12 日

*ポスター発表

- 1) ○S. Yasuda, M. Honda, M Nagaya, Y. Asano, K Nakano, H Nagashima, M Aizawa “Fabrication of Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property and Their Biological Evaluation”, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, 15th-20th, December 2015.

表面にナノポアを備えたリン酸カルシウム中空微小球の合成と
そのがん化学塞栓療法への応用

藪 翔太郎¹⁾・中村まり子²⁾・本田みちよ²⁾・江本 精³⁾・相澤 守¹⁾

- 1) 明治大学理工学部応用化学科
- 2) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 3) 国際医療福祉大学・福岡山王病院

**Synthesis of calcium phosphate hollow microspheres with nanopores on the surface
and their application to cancer chemoembolization**

Shotaro YABU¹⁾, Mariko NAKAMURA²⁾, Michiyo HONDA²⁾, Makoto EMOTO³⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

- 1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University**
- 2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University**
- 3) International University of Health and Welfare, Fukuoka Sanno Hospital**

1. 緒言

近年、超高齢社会の到来にともない悪性新生物(がん)による死亡率が年々増加傾向にある。がん治療法には、外科的治療法や放射線療法、温熱療法などあるが、いずれもいくつかの課題がある。そこで、我々は新たな低侵襲ながん治療として抗がん剤をリン酸カルシウム微小球に担持させた薬物送達システムの開発に取り組んでいる[1]。この微小球は超音波噴霧熱分解法により合成される[2]。この方法は合成粉体の組成制御を行なうことが容易であり、さらに内部を中空とする微小球を得ることが可能である。本研究では、超音波噴霧熱分解時にフラックス成分である硝酸カリウム(KNO₃)を添加することにより、表面にナノサイズの微細孔を備えた中空微小球を調製し、その粉体性状を評価した。さらに、得られた微小球からの抗がん剤(モデル薬剤:ドキシフルリジン)の放出挙動および細胞毒性についても調査したので報告する。また、血管新生抑制剤(モデル薬剤:TNP-470)担持微小球を用いたFU-MMT-3細胞皮下植え付けヌードマウスの抗腫瘍効果の検証結果についても記載する。

2. 実験方法

試料溶液はCa/P比が1.50となるように、0.60 mol·dm⁻³ Ca(NO₃)₂·4H₂O, 0.40 mol·dm⁻³ (NH₄)₂HPO₄, 0.50 mol·dm⁻³ HNO₃ および 0.80 mol·dm⁻³ KNO₃ を混合して調製した。上記の試料溶液を用いて、超音波噴霧熱分解(熱分解温度:上部 850 °C, 下部 350 °C; 超音波振動数 2.4 MHz)を行ない、リン酸カルシウム微小球を得た。添加したフラックスは、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。得られた微小球の粉体性状を粉末 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法(SEM)等を用いて調査した。

また、実際に得られた微小球に薬剤モデルとして、抗がん剤ドキシフルリジンを担持させ、その薬剤徐放特性および細胞毒性を調査した。ドキシフルリジンを純水で 25 ppm に調製し、この溶液 12 cm³ を微小球 0.6 g に加え、混合し凍結乾燥することで薬剤を担持させ「薬剤担持微小球」を調製した。この薬剤担持を微小球生理食塩水中に浸漬させ、放出した薬剤成分を紫外可視分光光度計法(波長: 269 nm)より測定して微小球からの薬剤徐放量を決定した。また、HeLa 細胞を 10%牛胎児血清を含む D-MEM 培地で 1 日前培養し、ついで所定の濃度のドキシフルリジンを含む培地に交換することでドキシフルリジンの細胞毒性を調査した。

さらに、表面にナノポアを備えた微小球からの二段階徐放や溶解性の違いによる影響を確認するため皮下植え付けヌードマウスによる抗腫瘍効果の検証を行なった。無添加/塩添加(KNO₃ 0.8 mol·dm⁻³)洗浄粉体 0.60 g にエタノールで調製した 2000 ppm TNP-470 溶液を 12 mL 加え、24 時間凍結乾燥することで担持させた。その後、1.5 mL のマイクロチューブに凍結乾燥した TNP-470 担持微小球を 25 mg ずつ分注し、EOG 滅菌を 2 回行なった。この微小球をシリンジでマウス腫瘍近傍に 2 日に 1 回注射した。

3. 実験結果と考察

合成した微小球の SEM 画像および比表面積の測定値を図 1 に示す。SEM による形態観察により、得られた微小球は球状粒子から構成されており、それらの粒子径は 0.5 μm~5 μm の範囲であった。また、表面に微細な気孔が形成されていることが確認された。これは洗浄操作によりフラックス成分である過剰な KNO₃ が表面から消失したためだと考えられる。さらに、KNO₃ を添加すると、添加していない微小球と比較して、その比表面積は大幅に増加した。

図 2 に無添加/塩添加微小球からのドキシフルリジンの徐放プロファイルを示す。表面に微細気孔を持たない無添加微小球からの薬剤徐放は、バーストに近かったのに対し、微細気孔を備えた塩添加微小球では、より持続的な徐放を可能にし、総計徐放量も増加した。各微小球から放出した薬剤の最終濃度はそれぞれ 19.88 ppm, 24.67 ppm であった。

また、HeLa の増殖性に及ぼす培地中のドキシフルリジン濃度の影響において、20, 40 ppm では 0 ppm と比較すると増殖は抑制されていたが、細胞の増殖性に与える影響はほとんど変わらなかった。また、100 ppm においてより細胞の増殖を抑制していることが確認された。この結果と図 2 で示した 25 ppm ドキシフルリジン担持塩添加微小球の最終薬剤濃度が 24.67 ppm であったことをあわせて考えると、ナノポアを備えた微小球は腫瘍細胞の増殖を抑制するのに有効な薬剤キャリアであることが分かる。

さらに、皮下植え付けヌードマウスによる抗腫瘍効果の検証結果から、抗腫瘍効果の観点では TNP 担持セラミックスである、無添加・塩添加ともに有効であることがわかった。また、TNP-470 の抗腫瘍

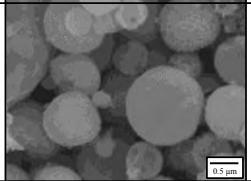
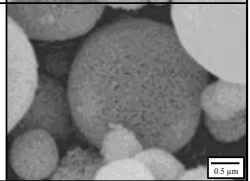
	無添加	KNO ₃ 0.8 mol·dm ⁻³ 添加
SEM像		
比表面積	14.40 m ² ·g ⁻¹	36.92 m ² ·g ⁻¹

図 1 微小球の形態観察および比表面積測定結果

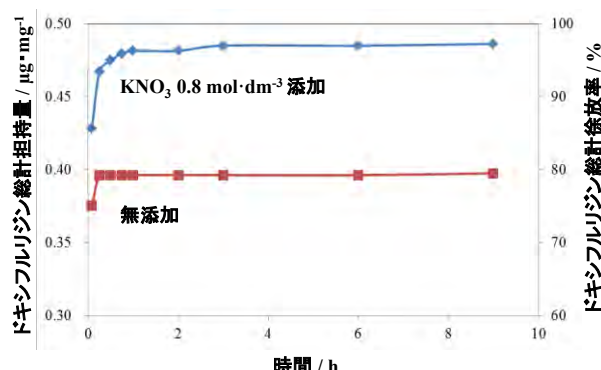


図 2 ドキシフルリジンを担持した微小球からの薬剤徐放プロファイル

効果は非常に有効であるが、無添加微小球では初期放出が早いため効きすぎることによって薬物毒性を与えることも確認された。これらのことより、塩添加微小球では抗腫瘍効果では無添加とあまり変わらないものの、安全性において無添加よりも優れていることがわかった。

以上の結果より、本研究で創製した「表面にナノポアを備えたリン酸カルシウム中空微小球」は、新しいがん化学塞栓療法のための薬剤徐放担体としての応用が期待できる。

4. 参考文献

[1] M. Emoto, Y. Naganuma and M. Aizawa et al., *Cancer Science*, **101**, 984-990(2010).

[2] M. Aizawa, K. Itatani and I. Okada, *Phos. Res. Bull.*, **20**, 61-78(2006).

5. 本研究に関する成果報告 (2014 年度分)

*学会発表 (国内会議)

1) 藪 翔太郎・中村まり子・本田みちよ・江本 精・相澤 守、“表面にナノポアを備えたアパタイト中空微小球の調製とそのドキシフルリジン徐放特性”、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2014.11.17-18.

2) 藪 翔太郎・江本 精・中村まり子・相澤 守、“表面にナノポアを備えたアパタイト中空微小球の調製とその薬剤徐放特性” 無機マテリアル学会第 129 回学術講演会、佐賀 (アバンセホール)、無機マテリアル学会、2014. 11. 20-21.

悪性子宮腫瘍株移植腫瘍に対する血管新生阻害剤を担持した KNO₃ 添加中空微小球の抗腫瘍効果と血管新生阻害能の検討

江本 精¹⁾・矢野杏子 (研究協力者)²⁾・
チョイジャムツ バトスレン (研究協力者)¹⁾ 相澤 守³⁾

- 1) 国際医療福祉大学・福岡山王病院
- 2) 福岡大学医学部病理学
- 3) 明治大学理工学部応用化学科

Anti-tumor and anti-angiogenic effects of KNO₃ Ceramics Microspheres loaded with TNP-470 for Uterine Cancer Xenografts

Makoto Emoto¹⁾, Kyoko Yano²⁾, Chojjamts Batsuren¹⁾, Mamoru Aizawa³⁾

- 1) International University of Health and Welfare and Fukuoka Sanno Hospital
- 2) Department of Pathology, School of Medicine, Fukuoka University
- 3) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

1-1 TCP アパタイトセラミックス微小球を用いた固形がんに対する新たな化学塞栓療法の開発

著者らは、難治性の固形がんに対して TCP アパタイトセラミックス微小球を用いた癌化学塞栓療法の開発を行ってきた。前回の研究では、血管新生阻害剤であるフマジリン誘導体 TNP-470 (武田薬品工業) をセラミックス微小球に担持することに成功し、我々が樹立した子宮癌肉腫細胞株 (Emoto M, et al. Cancer 1992) のマウス移植腫瘍への同微小球の投与を行った。その結果、有意な腫瘍増殖抑制効果と血管新生阻害効果が認められ、これらの効果は同微小球の化学塞栓効果に起因すると考えられた¹⁾。

1-2 より精密で安全ながん化学塞栓療法を目指して

今回の研究では、TNP-470 を担持したセラミックス微小球の「安全 (生体への侵襲が小さい) でより精密に調整された徐放」を目指すことを課題とし、KNO₃ 添加中空微小球 (表面に多数のナノポア) を作製した。

2. 実験方法

2-1 FU-MMT-3子宮癌肉腫細胞株移植腫瘍に対するKNO₃添加中空微小球を用いた治療

子宮癌肉腫は、以前から癌幹細胞腫瘍ではないかと推察されていた極めて悪性度の高い腫瘍である。我々はこれまでの研究と同様に同腫瘍から樹立したFU-MMT-3株²⁾を用いて今回の化学塞栓療法の研究を行った。また、前回の研究で開発したTCPセラミックス微小球を改良し表面にナノポアを備えた (KNO₃ 添加による) アパタイト中空微小球を用いた。

2-2 マウス有害事象の評価

これまでの研究³⁻⁶⁾と同様に、癌治療の有害事象の評価としてマウスの体重減少の有無を検討した。同時にマウスの神経学的異常 (TNP-470による有害事象) の有無も評価した。

2-3 TCPセラミックス微小球の化学塞栓効果

前回の研究と同様、治療期間が終了した後に全身麻酔下にマウスを屠殺、移植腫瘍を切除し、ホルマリン固定後にヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織内における微小球の有無と腫瘍壊死の評価を行った。

2-4 微小血管密度の評価

前回の研究と同様、治療期間が終了後に切除した移植腫瘍に対して、抗CD31抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、微小血管密度 (Microvessel Density) の評価を行った。

2-5 マウス生存率曲線

治療の効果を判定するため、マウスの生存日数を算定し、カプラン・マイヤー法にて生存率曲線を作製、ログランク検定を行った。

3. 実験結果

3-1 腫瘍体積

TNP-470 担持 KNO3 添加微小球群および TNP-470 担持無添加微小球群は、コントロール群と比較して腫瘍増殖を有意に抑制した (図 1)。しかし、両群間の平均腫瘍体積に有意差はなかった。

3-2 マウス体重

治療の有害事象の指標の一つであるマウスの体重減少については、いずれの治療群とも有意な減少は認められなかった (図 2)。また、いずれのマウスにおいても痙攣や振戦等の神経学的異常は認められなかった。

3-3 マウス生存日数

コントロール群と比較して、無添加微小球群は有意な生存日数の延長を、また TNP-470 担持 KNO3 添加微小球群と KNO3 添加微小球群は生存日数延長の傾向を認めた。TNP-470 担持無添加セラミックス微小球群は治療中に 2 匹死亡したが、TNP-470 担持 KNO3 添加微小球群では治療中の死亡はなかった。

3-4 腫瘍組織の病理組織学的検討 (HE 染色および CD31 免疫染色)

腫瘍内の多くの微小血管の中にセラミックス微小球の集簇が確認された (図 3)。いずれの治療群においても壊死領域が大きく、化学塞栓療法の組織学的効果が示唆された (図 4)。コントロールに比較

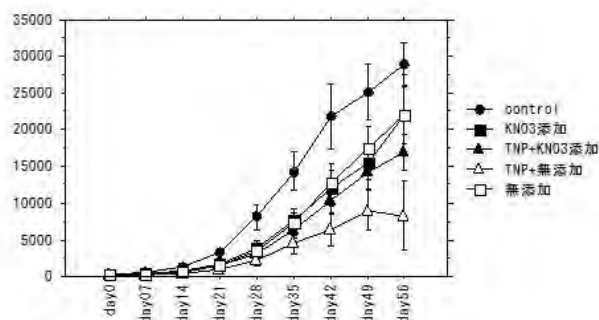


図 1: 子宮癌肉腫細胞株 FU-MMT-3 移植腫瘍の体積の推移 (縦軸は体積: 単位は mm³)

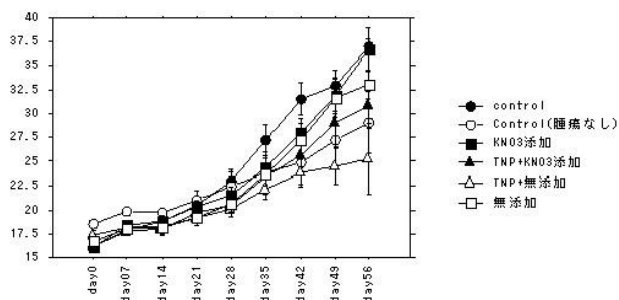


図 2: 治療期間中のマウス体重の推移 (縦軸は体重: 単位は g)

して、TNP-470 担持無添加微小球群及び TNP-470 担持 KNO₃ 添加微小球群は有意に微小血管密度の低下を認めた (図 5)。また、薬剤なしの微小球投与でも血管新生阻害効果があることも示唆された。尚、全てのマウスにおいて腫瘍の転移は認めなかった。

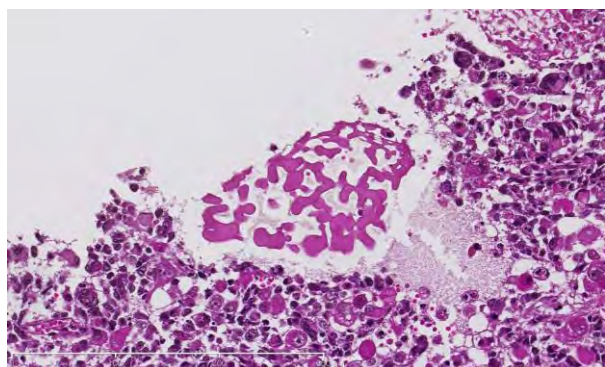


図 3: 移植腫瘍内に認められた KNO₃ 添加セラミックス微小球の集簇 (図中央: HE 染色)

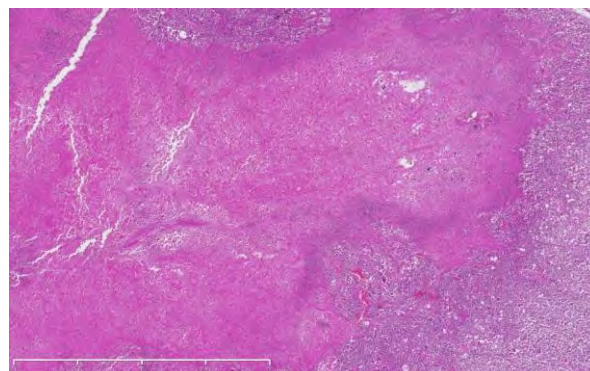


図 4: TNP-470 担持 KNO₃ 添加セラミックス微小球投与によってもたらされた広範囲な組織壊死 (化学塞栓療法効果: HE 染色)

4. 考察

これまでの研究履歴において、子宮癌肉腫細胞株の異種移植系に対する TNP-470 単独療法は治療効果が大きい反面、強い有害事象 (高度の体重減少) も認められた。今回、同薬を KNO₃ 添加セラミックス微小球に担持し化学塞栓療法を行うことにより、治療効果を損なわず、より調節された緩やかな徐放 (control release) が可能となる事が示唆された。今回の実験では無添加微小球群と KNO₃ 添加微小球群間において治療効果の有意な差はなかったが、KNO₃ 添加セラミックス微小球群では治療中の死亡例はなく、無添加セラミックス微小球と比較して KNO₃ 添加セラミックス微小球の薬剤キャリアとしての精密な徐放効果と生体に対するより高い安全性が示唆された。

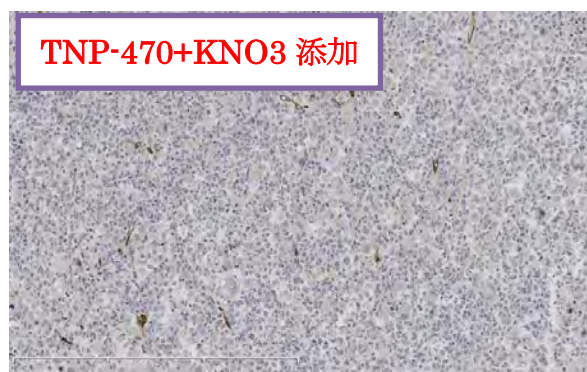


図 5: 微小血管密度 (TNP-470 担持 KNO₃ 添加セラミックス微小球投与群)

5. 参考文献

- 1) **Emoto M**, Naganuma Y, Chojamts B, Ohno T, Yoshihisa H, Kanomata N, Kawarabayashi T, Aizawa M: Novel chemoembolization using calcium-phosphate ceramic microsphere incorporating TNP-470, an anti-angiogenic agent. *Cancer Sci* 101, 984-990, 2010
- 2) **Emoto M**, Iwasaki H, Oshima K, Kikuchi M, Kaneko Y, et al: Characteristics of rhabdomyosarcoma cell lines derived from uterine carcinosarcomas. *Virchow Archiv* 431, 249-256, 1997
- 3) **Emoto M**, Charnock-Jones DS, Licence DR, Ishiguro M, Iwasaki H, Smith SK, et al. Localisation of the VEGF and angiopoietin genes in uterine carcinosarcoma. *Gynecol Oncol* 95, 474-482, 2004
- 4) Chojamts B, **Emoto M**, Kondo T, Iwasaki H, et al. CD133+ Cancer Stem Cell-like Cells in derived from Uterine Carcinosarcoma (Malignant Mixed Mullerian tumor). *Stem Cells* 29, 1485-95, 2011

- 5) **Emoto M**, Tachibana K, Iwasaki H, et al: Antitumor effect of TNP-470, an angiogenesis inhibitor, combined with ultrasound irradiation for human uterine sarcoma xenografts evaluated using contrast color Doppler ultrasound. *Cancer Sci* 98, 929-935, 2007
- 6) Negishi Y, Hamano M, Tsunoda Y, Oda Y, Batsuren C, Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, **Emoto M**, Aramaki Y. AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature. *Biomaterials* 34, 501-507, 2013

6. 成果報告

論文発表

- 1) Matsueda M, **Emoto M**, Aizawa M. Preparation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470. *Key Engineering Mat* 93, 672-677 (2012).
- 2) 江本 精. 婦人科がん-最新の研究動向:子宮肉腫の診断と治療. *日本臨床社* 70, 442-446 (2012).
- 3) Negishi Y, Hamano M, Tsunoda Y, Oda Y, Batsuren C, Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, **Emoto M**, Aramaki Y. AG73-modified bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature. *Biomaterials* 34, 501-507 (2013).
- 4) Kayashima K, Oyama R, **Emoto M**, Maehashi H, Matsuura T, and Aizawa M. Three-dimensional Culture of Vascular Endothelial Cells Using Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property. *Key Engineering Mat* 529-530, 402-406 (2013).
- 5) 江本 精. 子宮肉腫の治療法: 婦人科診療ハンドブック. *中外医学社* 343-351 (2014).
- 6) **Emoto M**. Development of a Cancer Treatment with the Concomitant Use of Low-Intensity Ultrasound: Entering the Age of Simultaneous Diagnosis and Treatment. *Diagnostics* 4, 47-56 (2014).
- 7) **Emoto M**, Yano K, Chojamts B, Sakai S, Hirasawa S, Wakamori S, Aizawa M, Nabeshima K, Tachibana K, Kanomata N. Azaspirene analogs inhibit the growth of human uterine carcinosarcoma in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 35, 2739-2746 (2015).
- 8) **Emoto M**, Yoshihisa H, Yano K, Chojamts B, Tsugu H, Tachibana K, Aizawa M. Advanced chemoembolization by anti-angiogenic calcium-phosphate ceramic microspheres targeting vascular heterogeneity of cancer xenografts. *Anticancer Res* 35, 4757-4764 (2015).

口頭発表

- 1) Matsueda M, **Emoto M**, Aizawa M. Preparation of calcium-phosphate microspheres by salt-assisted ultrasonic spray-pyrolysis technique and their drug release behavior using anti-angiogenic agent, TNP-470. *Bioceramics* 23 (Istanbul) 2011.11.8.
- 2) 江本 精. 婦人科癌化学療法における低出力超音波照射併用療法の基礎研究とその機序の解明. 第84回日本超音波医学会・特別企画「産婦人科領域における超音波治療」新高輪プリンスホテル(東京) 2011.5.25.
- 3) 相澤 守, 江本 精. 特別講演:超音波噴霧熱分解法によるリン酸カルシウム中空微小球の創製および癌化学塞栓療法への応用. 第21回日本ソノケミストリー学会:特別講演 九州大学医学部(福岡)

2012.11.10.

- 4) Kayashima K, Oyama R, **Emoto M**, Machashi H, Matsuura T, and Aizawa M. Three-dimensional Culture of Vascular Endothelial Cells Using Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Apatite-fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property. *Bioceramics* 24. Kyushu University Medical School (Fukuoka) 2012.10.22.
- 5) 江本 精. 婦人科がんの薬物療法と化学放射線療法. がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン・オンコロジーセミナー・アドバンスコース. 福岡大学医学部(福岡) 2013.2.24.
- 6) 江本 精. ガンとこれからの医療. 明治大学リバティアカデミー:これからの医療とバイオマテリアル (川崎市教育委員会連携事業) 明治大学 (川崎) 2013.10.12.
- 7) 江本 精. 婦人科がんの薬物療法と化学放射線療法. がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン・オンコロジーセミナー・アドバンスコース. 福岡大学医学部 (福岡) 2014.2.6.
- 8) Aizawa M, Yoshihisa H, Naganuma Y, Chojjants B, Yano K, **Emoto M**. Effect of Particle Sizes on Anti-tumorigenesis of Biodegradable Calcium-phosphate Hollow Microsphere Loaded-with Anti-Angiogenesis Agent. 15th IUMRS-ICA 2014. Fukuoka University (Fukuoka) 2014.8.26.
- 9) 藪 翔太郎, 江本 精, 中村まり子, 本田みちよ, 相澤 守. 表面にナノポアを備えたアパタイト中空微小球の調整とその薬剤徐放特性. 第129回無機マテリアル学会 (佐賀) 2014.11.20.
- 10) 江本 精. 子宮がん幹細胞と血管ニッチ 上智大学物質生命理工学部コロキウム 上智大学 (東京) 2014. 12.22.
- 11) 江本 精. 婦人科がんの薬物療法と化学放射線療法. がんプロフェッショナル養成基盤推進プラン・オンコロジーセミナー・アドバンスコース. 福岡大学医学部 (福岡) 2016.2.14.

5. 血管を含む組織再生

アパタイトファイバースキャフォールドを用いた再生培養骨の構築

本田 みちよ^{1,2)}・中村 まり子²⁾・相澤 守³⁾

- 1) 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
- 2) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 3) 明治大学 理工学部 応用化学科

Construction of regenerative bones using apatite-fiber scaffold

Michiyo HONDA^{1,2)}, Mariko NAKAMURA²⁾ and Mamoru AIZAWA³⁾

- 1) Kanagawa Academy of Science and Technology (KAST), Aizawa “Next-generation Bioceramics” Project
- 2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University
- 3) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

近年、幹細胞の基礎研究が進展し、iPS (induced pluripotent stem cell)細胞を含む幹細胞による臓器構築技術には期待が寄せられている。しかしながら、幹細胞の多分化能に関する研究の多くが二次元培養による成果であり、現段階では幹細胞から移植可能な三次元的な構造をもった再生臓器の構築は実現されていない。細胞・増殖因子、そして足場材料を利用して如何に三次元的な構造を有する臓器構築を試みるかが課題である。

骨組織に注目すると、骨再生を実現するためには、骨幹細胞の供給と共に、機能的な組織構築を行なうための細胞を取り巻く環境、すなわち、適切な細胞の足場(スキャフォールド)を開発することが必要である。同時に、骨再生組織への「血管新生の誘導・制御」が骨再生過程において非常に重要となる [1, 2]。そこで、本研究では、生体硬組織の再生を実現させるために、優れた生体活性を有するアパタイトファイバー(Apatite fiber; AF)からなる三次元培養可能な多孔質スキャフォールド(Apatite-fiber Scaffold; AFS)を創製した [3, 4]。はじめに AFS において骨髄間質細胞を培養し、その増殖や分化過程について解析することで、AFS が三次元的な構造を有する骨組織を再生するために適した足場材料であるかを評価した。さらに、AFS において血管内皮細胞と骨芽細胞を共培養することにより、AFS が血管侵入をサポートできる骨再生環境を提供し、骨再生と血管新生を誘導することが可能な材料であるかを解析した。

2. 実験方法

1) AF の合成と AFS の作製

試料溶液は水酸アパタイト(HAp) の化学量論組成である Ca/P 比 1.67 となるように $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ および HNO_3 を混合して調製した。この溶液を 80°C で 24 時間、ついで 90°C で 72 時間加熱して AF を合成した。得られた AF に対して質量比で 10 倍量のカーボンビーズを添加し、

φ15 mm の塩ビ管へ注ぎ、吸引ろ過することで、成形体を作製した。得られた成形体を 1300°C で 5 時間水蒸気雰囲気下で焼成すること AFS を得た [3, 4]。なお、カーボンビーズは粒径 150 μm のものを利用した。

2) AFS における骨髄間質細胞の骨分化過程の解析

AFS を 24 well plate へセットし、100% ethanol で親水処理した後に、α-MEM 培地に懸濁した bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BMSCs)を 1×10^6 cells 播種し、一定期間培養した。なお、BMSCs は 7 週齢の Wistar ラット骨髄より単離し、増殖培地には 10% FBS/α-MEM、分化誘導培地には増殖培地へ 10 nM DEX, 1 mM Naβ-GP, 200 μM ascorbic acid を添加した。

組織学的評価には、一定期間細胞を培養した AFS を O.C.T.-compound へ包埋し、cryostat を用いて凍結薄切切片を作製し、HE, Alizarin Red, Alcian Blue, Sudan IV 染色などを行なった。

遺伝子レベルでの解析を行なう際は AFS もしくは Tissue culture plates (TCPs) で一定期間培養した細胞から RNA を抽出後、cDNA を合成した。これを鋳型に RT-PCR を行ない、バンド強度を測定することにより分化マーカー遺伝子の発現レベルを半定量した。

3) 血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養

培養には、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC, Lonza)およびヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞(MG-63, Riken cell bank)を用い、任意の割合で一定期間単独もしくは共培養を行なった。HUVEC のみの培養には EGM-2 培地(Lonza)、MG-63 のみの培養には Eagle's MEM 培地 (Sigma)を用いた。なお、共培養時は EGM-2 培地を利用した。また、AFS における培養は、以下の手順で行なった。24 well plate へセットした AFS をエタノールにて親水処理し、これに MG-63, MG63+HUVEC, もしくは HUVEC 細胞の懸濁液を 0.25 ml 添加し、10 分程度静置した。その後、さらに培地 2 ml を加え、一定期間培養を行なった。この時、コントロールには 24 well Tissue culture plates (TCPs)を用いた。

4) 血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養時における生物学的評価

TCPs における細胞増殖性は、培養後 Trypsin 処理した細胞の数をカウントすることによって評価した。共培養した細胞に関しては、フローサイトメーターを用いて、骨芽細胞と血管内皮細胞の割合を決定し、各細胞の細胞数を算出した。組織学的評価には、一定期間培養した細胞を 4% PFA により固定し、0.25% TritonX-100 で膜処理した後、各種染色(HE 染色、免疫染色)を行なった。AFS に関しては、培養後の AFS を O.C.T.-compound へ包埋し、cryostat を用いて凍結薄切切片を作製した後に各種染色を実施した。骨分化レベルの解析には、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性をラボアッセイ ALP キット(Wako) を利用して測定した。ALP 活性染色は TRAP/ALP 染色キット(Wako)を用いた。石灰化の評価は OsteoImage (Lonza)により行なった。また、血管新生の評価には、培養液中の VEGF (endothelial growth factor)を Human VEGF Assay Kit (IBL)により定量した。フローサイトメトリーによる解析では、血管内皮細胞の分離に FITC-CD31 抗体(BD)を用いた。また、免疫染色には、血管内皮細胞のマーカーである von Willebrand factor (vWF, Abcam)および CD31 (DAKO)抗体を使用した。

3. 結果と考察

1) AFS のキャラクターゼーション

作製した AFS の結晶相はアパタイト単一相であり、気孔率は約 98%であった。AFS の微細構造を図 1 に示す。AFS は繊維の絡み合いによるマイクロ気孔(図 1b)に加え、カーボンビーズ (粒径 150 μm) に由来するマクロ気孔(図 1c)が観察された。

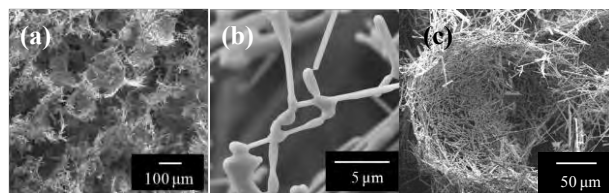


図 1. SEM による AFS の微細構造の観察像
(a) AFS の微細構造, (b) ミクロ気孔, (c) マクロ気孔

2) AFS における BMSCs の骨分化過程の解析

はじめに AFS 内部における細胞の局在について調べるために、培養 7 日後のスキヤフォードの薄切切片を作製し、HE 染色を行なった(図 2)。その結果、細胞は AFS 骨格に沿うように局在しており(図 2a)、培養日数が経過するとカーボンビーズの消失により生じたマクロ気孔を埋めるように細胞が増殖することが分かった(図 2b)。また、共焦点レーザー顕微鏡

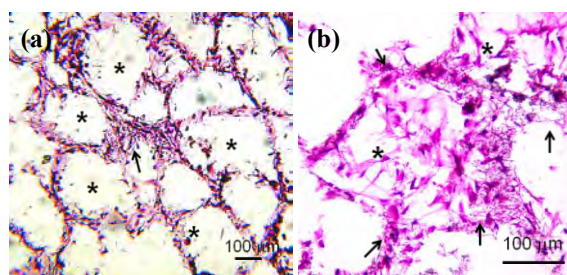


図 2. HE 染色による AFS 内部の細胞の局在観察
←: ミクロ気孔, *: マクロ気孔

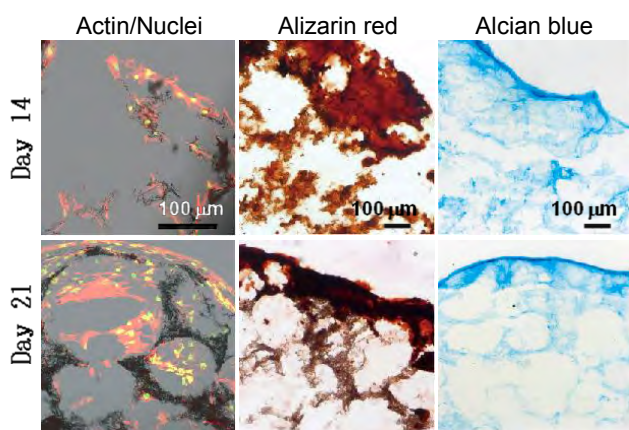


図 3. AFS における細胞の局在と骨分化の関係
培養 14 および 21 日後の AFS 内部における細胞の局在をアクチンおよび核染色により観察。Alizarin red によりカルシウムの沈着を、Alcian blue により骨基質の産生を観察。

による観察から、播種した細胞は培養時間の経過と共に AFS 内部へと侵入し、さらに、AFS 内部では細胞-細胞間の三次元ネットワークを構築していることが分かった (data not shown)。

次に、BMSCs の局在と骨分化の関係を調査した。細胞の局在観察には、細胞骨格アクチンと核を、石灰化の確認には、Alzarin red によりカルシウムの沈着を、骨基質の産生には Alcian blue により多糖類を染色した(図 3)。その結果、細胞はマイクロ気孔での増殖の後に、マクロ気孔を利用して増殖していることが分かった。また、培養 14 日目以降は石灰化が顕著に確認され、さらに AFS 外周部で多量の基質が産生されることが明らかになった。

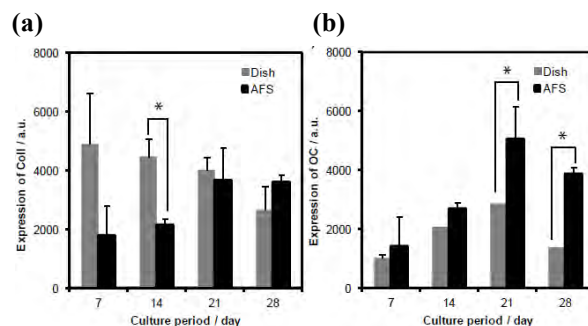


図 4. 異なる培養基材における BMSCs の骨分化マーカー遺伝子の発現量の比較
AFS または TCPs (dish) で培養した BMSCs の骨分化マーカー遺伝子(a: type I collagen; Coll I, b: osteocalcin; OC) の発現量を RT-PCR により半定量解析

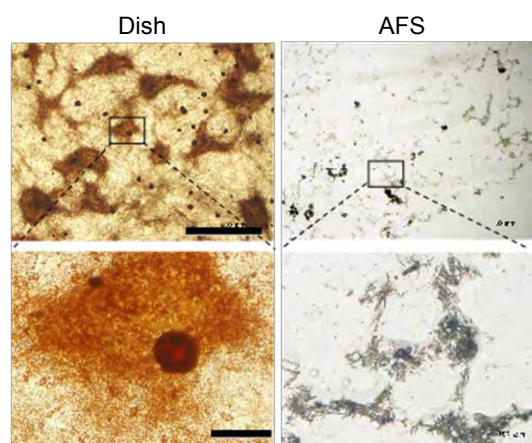


図 5. 異なる培養基材における BMSCs の脂肪細胞への分化

培養 21 日後の AFS またはポリスチレン dish で培養した BMSCs の脂肪細胞への分化を Sudan IV 染色により観察した。上段を強拡大した図が下段となり、スケールはそれぞれ 1 mm, 100 μm である。

さらに、骨分化に関して、その遺伝子発現をいくつかの骨分化段階に応じたマーカーを用いて RT-PCR により半定量解析を行なった。TCPs (dish)で培養した場合と比較すると、dish では培養初期にマーカー遺伝子の発現がピークに達し、その後減少する傾向が認められたのに対し、AFS では、培養日数の経過と共に発現量が増加し、それが維持されていることが分かった。細胞は足場の材質や三次元性から分化誘導を受けるため、AFS の提供する三次元的な培養環境が骨分化を促進している可能性が示唆された。最後に AFS の分化選択性についても評価を行なった。BMSCs は未分化間葉系細胞を含む細胞であり、骨、軟骨、脂肪、筋肉といった間葉系組織へ潜在的に分化する能力を持つ。そこで、AFS が BMSCs に対し、様々な種類の細胞へ分化可能な環境を提供できるかどうかを調べるために、中性脂肪を染める Sudan IV 染色を行なうことで、BMSCs の脂肪細胞への分化能について調べた(図 5)。その結果 dish では培養 21 日目以降になると脂肪滴の存在が確認されたが、AFS ではそれは確認されず、脂肪への分化が抑制されている可能性が考えられた。これは AFS の培養環境が細胞の分化を骨分化の方向へと誘導させる能力を持つことを示唆している[3]。

3) 二次元培養基材(TCPs)における血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養

骨は、血管分布の非常に高い組織であり、そのモデリング・リモデリングには血管新生が密接に関連していると言われている。血管新生において、最も重要な因子の一つである VEGF は、血管内皮細胞だけではなく、正常な骨芽細胞においても産生されていることからまた骨形成への血管新生の重要性を理解することができる [5]。そこで、本研究ではまず TCPs において血管内皮細胞(HUVEC)と骨芽細胞(MG-63)を共培養し、血管内皮細胞の存在が骨芽細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるかを調査した。はじめに、MG-63 と HUVEC の関係を調べるために、細胞形態の観察を行なった。なお、MG-63 と HUVEC は 1:1 の割合で播種し、一定期間培養した。観察の結果、共培養時にのみ、目視により確認できるサイズのスフェロイド状の細胞塊を形成した。次に、各細胞の形態を顕微鏡により詳細に観察した結果、MG-63 および HUVEC のみを単一培養した場合には、細胞が単層で増殖したのに対し、MG-63 と HUVEC を共培養した場合は、細胞の積層、凝集塊の形成、毛細血管網の形成が確認された。さらに共培養時の形態を継時的に解析してみると、細胞が積層した後に、管腔が形成され、その後、毛細血管網が形成されていたことが明らかになった。次に、2 つの細胞の存在比が細胞増殖能や分化能にどのような影響を与えるかを調べるために、様々な割合(MG-63: HUVEC = 1:0, 1:1, 1:2, 1:4)で混合した細胞を plate へ播種し、7 日間培養した。その結果、細胞の増殖性は 1:4 > 1:2 > 1:1 > 1:0 の順に高なり、HUVEC の割合が多くなると総細胞数が増加することが分かった。また、この時、MG-63 単位細胞当たりの ALP 活性も 1:4 > 1:2 > 1:1 > 1:0 の順に大きくなった。そこで、MG-63: HUVEC = 1:4 の割合で共培養した場合における 2 つの細胞の関係をフローサイトメトリーにより分離し、解析を行なった(図 6a)。播種時、1:4 の割合であった細胞

は、細胞形態の観察を行なった。なお、MG-63 と HUVEC は 1:1 の割合で播種し、一定期間培養した。観察の結果、共培養時にのみ、目視により確認できるサイズのスフェロイド状の細胞塊を形成した。次に、各細胞の形態を顕微鏡により詳細に観察した結果、MG-63 および HUVEC のみを単一培養した場合には、細胞が単層で増殖したのに対し、MG-63 と HUVEC を共培養した場合は、細胞の積層、凝集塊の形成、毛細血管網の形成が確認された。さらに共培養時の形態を継時的に解析してみると、細胞が積層した後に、管腔が形成され、その後、毛細血管網が形成されていたことが明らかになった。次に、2 つの細胞の存在比が細胞増殖能や分化能にどのような影響を与えるかを調べるために、様々な割合(MG-63: HUVEC = 1:0, 1:1, 1:2, 1:4)で混合した細胞を plate へ播種し、7 日間培養した。その結果、細胞の増殖性は 1:4 > 1:2 > 1:1 > 1:0 の順に高なり、HUVEC の割合が多くなると総細胞数が増加することが分かった。また、この時、MG-63 単位細胞当たりの ALP 活性も 1:4 > 1:2 > 1:1 > 1:0 の順に大きくなった。そこで、MG-63: HUVEC = 1:4 の割合で共培養した場合における 2 つの細胞の関係をフローサイトメトリーにより分離し、解析を行なった(図 6a)。播種時、1:4 の割合であった細胞

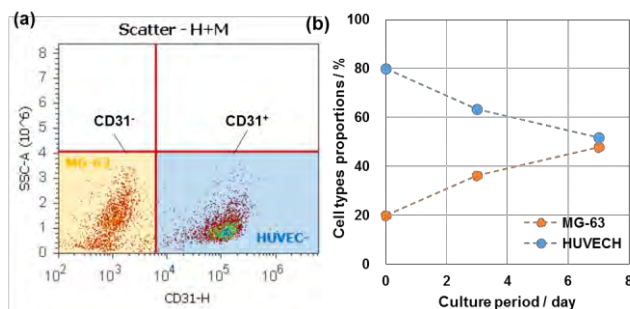


図6. MG-63およびHUVECs共培養時における各細胞の割合変化

(a) FITC-CD31抗体を用いたFACSによるドットプロット。CD31陽性細胞(CD31+)はHUVECs, CD31陰性細胞(CD31-)はMG-63を示す。

(b) 共培養時におけるMG-63およびHUVECsの各細胞割合の継時的変化

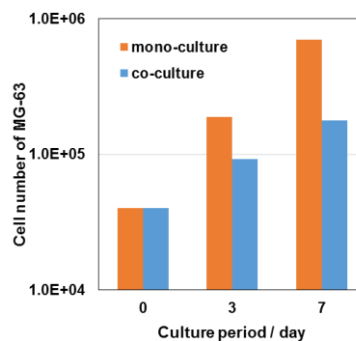


図7. 単独培養およびHUVECとの共培養時におけるMG-63細胞の細胞増殖性の比較

数は、培養時間の経過と共に、総細胞数におけるMG-63の割合が増加し、培養7日目にはMG-63とHUVECの割合が1:1に変化した(図6b)。ここで、MG-63に注目すると、HUVECと共培養することにより、MG-63を単独で培養した場合に比べ、その細胞増殖性が抑制されることが分かった(図7)。しかしながら、培養7日目のALP活性は、MG-63を単独で培養した場合に比べ、共培養した場合は、約8倍もの高い活性を示し、また、ALP活性染色のデータもこの結果を支持している(図8)。この結果は既報とも一致しており[6]、HUVECが骨芽細胞の増殖や分化を促進することを示した。

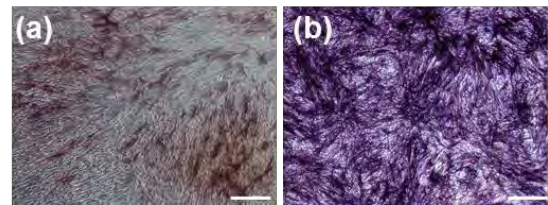


図8. MG-63細胞単独培養およびMG-63+HUVECとの共培養時におけるALP活性の比較(培養7日目)
(a) MG-63 (mono-culture),
(b) MG-63+HUVEC (co-culture), scale: 200 μm

4) 三次元培養基材(AFS)における血管内皮細胞と骨芽細胞の共培養

はじめに、AFS 三次元培養環境下における共培養時の骨芽細胞への影響についてはHUVEC: MG-63 = 1:1の条件で28日間培養した結果を以下に示す。培養28日後のAFSから作製した薄切片のHE染色の結果から、MG-63単独での培養およびMG-63とHUVECの共培養はいずれの培養条件においても、細胞はAFへ接着した後に、マイクロ気孔を利用して増殖した。より詳細にAFSにおける細胞の分布を観察すると、MG-63は、マクロ気孔の外周部から内部へと増殖し、さらにマクロ気孔を架橋するように三次元的に局在していた(図9a)。一方、共培養した場合は、マクロ気孔を充填するようにそれぞれの細胞が増殖し、一部では、管腔様の構造を形成していた(図9b)。この血管様構造について、さらに詳細に解析するために血管内皮細胞のマーカーであるvWFおよびCD31の発現について免疫染色を行なった。その結果、形成されていた管腔はいずれもvWF, CD31陽性の細胞であり、HUVEC由来の細胞から形成されていることが分かった(data not shown)。すなわち、AFSはその内部へ血管内皮細胞を誘導し、血管を形成させることが可能な三次元的な骨形成の足場を提供できるということが示された。

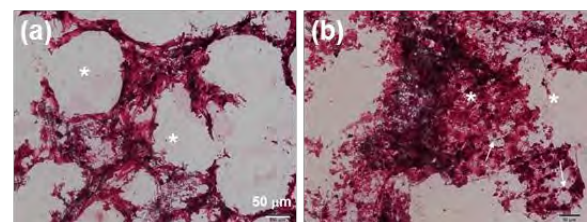


図9. HE染色によるAFSにおけるMG-63およびMG-63+HUVECの細胞局在観察
(a) MG-63 (mono-culture), (b) MG-63+HUVEC (co-culture), *:マクロ気孔, →:管腔様構造,
Scale bar: 50 μm

さらに、細胞-細胞間の相互作用を調べるために、Bulk状のAFSを染色することで、細胞の局在を観察した(図10)。細胞骨格タンパク質であるF-actin(緑色)と血管内皮細胞のマーカーであるCD31(赤色)を染色することにより、2種の細胞の局在を観察した。その結果、HUVECは播種面全体にシート状に広がって増殖していた。また、HUVECの存在しない部分にCD31(-)のMG-63が存在しており、両者が直接接触しながら増殖している様子も観察された。一方、シート状に局在していたHUVECに対し、内部に単独で存在していたHUVECでは仮足の伸展が認められず、丸い形状のまま点在していた。二次元培養の場合にも観察されたが、管腔構造の形成には多数の細胞が存在していることが重要であったことから、細胞が点在してしまうことは管腔構造の

さらに、細胞-細胞間の相互作用を調べるために、Bulk状のAFSを染色することで、細胞の局在を観察した(図10)。細胞骨格タンパク質であるF-actin(緑色)と血管内皮細胞のマーカーであるCD31(赤色)を染色することにより、2種の細胞の局在を観察した。その結果、HUVECは播種面全体にシート状に広がって増殖していた。また、HUVECの存在しない部分にCD31(-)のMG-63が存在しており、両者が直接接触しながら増殖している様子も観察された。一方、シート状に局在していたHUVECに対し、内部に単独で存在していたHUVECでは仮足の伸展が認められず、丸い形状のまま点在していた。二次元培養の場合にも観察されたが、管腔構造の形成には多数の細胞が存在していることが重要であったことから、細胞が点在してしまうことは管腔構造の

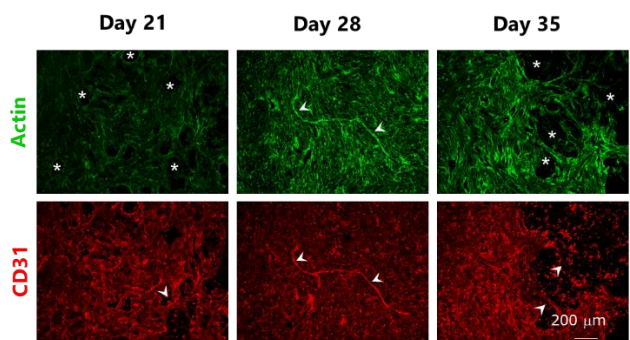


図10. AFSでの共培養時における細胞の局在
*:マクロ気孔, 矢尻:毛細管様構造

形成には不利であると考えられる。しかし、培養 21 日目以降、特に 28 日目辺りになると、シート状に存在していた HUVEC が管腔を形成し始めることが明らかになった。今回観察された管腔はいずれも播種面状に形成されており、ここを起点に内部へと侵入する可能性が見出された。しかし、培養 35 日目は MG-63 単独培養の結果と同様に、細胞数の減少が認められた。ただし、MG-63 と HUVEC を共培養していると両細胞の細胞増殖性にも影響を与えているようで、それぞれ単独で培養するよりも細胞生存率が向上している様子が認められた。なお、CLSM を用いて bulk AFS を観察した場合、細胞は播種面から約 200 μm 程度まで存在していることが分かった。しかし、単独培養に比べ、共培養した方が細胞の侵入性が高い傾向が認められた。

次に、共培養による骨芽細胞の分化への影響を調べるために、ALP 活性染色を行なった(図 11)。培養条件に関わらず、マイクロ気孔内で細胞が多数存在する箇所 ALP 活性を有する細胞が確認された。特に、共培養時に ALP 活性を強く持つ細胞が多く観察された。この結果は、三次元培養環境においても骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養すると、骨分化を促進させる傾向にあることを意味している。さら

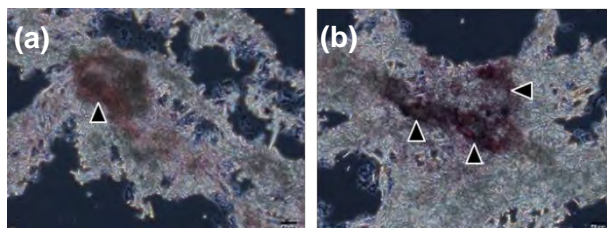


図11. AFSでのMG-63細胞単独培養およびMG-63+HUVECとの共培養時におけるALP活性の比較 (a) MG-63 (mono-culture), (b) MG-63+HUVEC (co-culture), ▼: ALP活性陽性

に、血管内皮細胞との共培養が、骨芽細胞の石灰化に対し、どのような影響を及ぼすかを検証するために、OsteoImage を用いて、石灰化レベルを評価した。その結果、MG-63 を単独で培養した場合、OsteoImage 試薬の多くは、AF へ結合しており、石灰化が進行している様子はあまり観察されなかったが、共培養系では単一培養系に比べ、細胞が局所的に集中している部分で石灰化による蛍光が強く観察された。このことから、MG-63 を単独で培養するよりも HUVEC と共培養した方が、石灰化を促進するということが明らかになった(data not shown)。最後に、血管新生に重要な VEGF 産生量について調べたところ、MG-63 におい

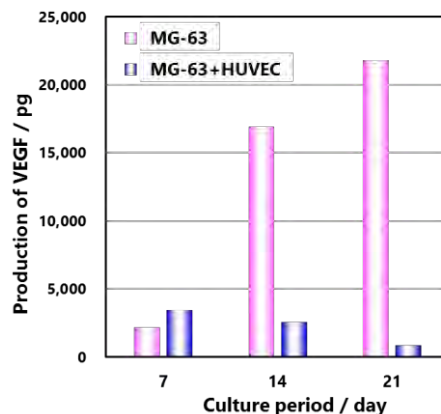


図12. AFSにおける単独培養および共培養時のVEGF産生量の比較

ては、細胞数の増加と共に VEGF 産生量の増加が認められた。これに対し、共培養した場合には培地中の VEGF 量が著しく減少することが明らかになった(図 12)。フローサイトメーターを用いた解析結果から、培養 14 日目以降の MG-63 の細胞数は培養方法に関わらず、同程度であったことから培養 14, 21 日目における VEGF 産生量には大きな差が認められないと考えられていた。しかしながら、培地中の VEGF は大きく減少しており、これは、HUVEC が VEGF を消費している可能性を示した。これらの結果から、VEGF は骨芽細胞において非常に多く産生され、この産生された VEGF は血管内皮細胞上に存在する VEGF receptor へ結合し、速やかに消費され、血管新生を誘導するカスケードに寄与している可能性が考えられる。一方、血管を介して供給される増殖因子や酸素、栄養が骨形成を促進する要因の一つとして働き、互いに作用しあうことで、骨分化、血管新生を促進していることが考えられる。以上の結果から、骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養することにより、直接的な相互作用に基づき、血管新生を伴う骨形成が促進され、AFS においては、三次元的な構造を有する再生骨の構築が可能となると言える。

4. 結論

AFS において、BMSCs を培養し、骨分化能について解析した結果、二次元培養系と比較すると、TCPs では培養初期にマーカー遺伝子の発現がピークに達し、その後減少する傾向が認められたのに対し、AFS では、培養日数の経過と共に発現量が増加し、それが維持されていることが分かった。細胞は足場の材質や三次元性から分化誘導を受けるため、AFS の提供する三次元的な培養環境が骨分化を促進している可能性が示唆された。また、AFS の分化選択性についても評価するために脂肪細胞への分化能について調査したところ、TCPs では脂肪への分化が認められたが、AFS では確認されず、脂肪への分化が抑制されている可能性が考えられた。これは AFS の培養環境が細胞の分化を骨分化の方向へと誘導させる能力を持つことを示唆している。以上の結果から、AFS は BMSCs を含む幹細胞を選択的に骨分化へと誘導する可能性を持ち、三次元的な構造を有する再生骨を構築する足場材料として期待できることを意味する。

さらに、AFS で骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養した結果、血管内皮細胞が存在することにより骨芽細胞の ALP 活性は増加し、さらにその活性はより早期に発現することが分かった。また、ALP 活性が陽性な細胞の周辺には血管内皮細胞や毛細血管様の構造を有する細胞が局在していた。この細胞-細胞間の相互作用や血管内皮細胞により産生される増殖因子などを介して骨芽細胞の分化が促進されたものと考えられた。一方、共培養を行なう上で骨芽細胞と血管内皮細胞が直接的にコンタクトできることが非常に重要であり、例えば、HUVEC のみが単独で存在してしまうと、管腔形成の起点となる血管内皮細胞のシート状の増殖が認められず、死細胞と思われる細胞が AFS 内部に点在する様子が観察された。これらの結果は、HUVEC の生存、強いては管腔の形成には、骨芽細胞との直接的なコンタクトが必要であり、そのためには、各々の細胞が適度な距離で接触できる空間を形成するスキャフォールドを創製することが重要であることが分かった。また両細胞が産生する増殖因子などが血管新生を誘導するカスケードや骨形成を促進するカスケードに寄与している可能性が考えられ、互いに作用し合うことで、骨分化、血管新生を促進していることが考えられる。従って、骨芽細胞と血管内皮細胞を共培養することにより、直接的な相互作用に基づき、血管新生を伴う骨形成が促進され、AFS においては、三次元的な構造を有する再生骨の構築が可能となると考えられる。

5. 参考文献

- [1] J.M. Kanczler and R.O. Oreffo, *Eur. Cell Mater.*, **15**, 100-114 (2008).
- [2] J. Folkman, *Nature Reviews Drug Discovery*, **6**, 273-286 (2007).
- [3] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T.J. Fujimi, N. Kanzawa, H. Morisue, M. Matsumoto, Y. Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273 (2004).
- [4] M. Honda, T.J. Fujimi, S. Izumi, K. Izawa, M. Aizawa, H. Morisue, T. Tsuchiya, N. Kanzawa, *J. Biomed. Mater. Res A.*, **94A**, 937-944 (2010).
- [5] Y. Liu, A.D. Berendsen, S. Jia, S. Lotinun, R. Baron, N. Ferrara, B.R. Olsen, *J. Clin. Invest.*, **122**, 3101-3113 (2012).
- [6] Y. Zhang, A. Schedle, M. Matejka, X. Rausch-Fan, Andrukhov O, *Cell Mol Biol Lett.*, **15**, 517-29 (2010).

6. 成果報告

* 論文

- 1) M. Nagaya, Y. Arai, H. Matsunari, M. Honda, K. Nakano, M. Maehara, N. Sugimoto, M. Kobayashi, R. Sakai, Y. Asano, M. Watanabe, K. Umeyama, and H. Nagashima, “A new system to evaluate the influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets using epigenetic analysis in a three-dimensional culture”, *Pancreas*, **44**, 778-785 (2015).
- 2) T. Konishi, M. Honda, T. Yoshioka, S. Hayakawa, and M. Aizawa, “Preparation of α -Tricalcium Phosphate Powders Surface-modified with Inositol Phosphate for Cement Fabrication”, *Key. Eng. Mater.*, **631**, 113-118 (2015).
- 3) M. Aizawa, Y. Chibu, K. Nagata, T. Konishi, K. Ishii, H. Funao, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Honda, “In vivo Evaluation of Chelate-setting Cement Fabricated from Hydroxyapatite Including Bone Minerals Using a Rabbit’s Tibia Model”, *Key. Eng. Mater.*, **631**, 402-407 (2015).
- 4) Y. Shimizu, Y. Kawanobe, T. Konishi, N. Kanzawa, M. Honda, and M. Aizawa, “Biocompatibility of silver-containing calcium-phosphate cements with anti-bacterial properties”, *Key. Eng. Mater.*, **631**, 107-112 (2015).
- 5) K. Kiminami, K. Matsuoka, K. Nagata, T. Konishi, M. Honda, G. Hayashida, K. Nakano, M. Nagaya, H. Arimura, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Development of bioresorbable calcium phosphate cements hybridized with gelatin particles and their in vivo evaluation using pig’s tibia model”, *Key. Eng. Mater.*, **631**, 397-401 (2015).
- 6) H. Kakinuma, K. Ishii, H. Ishihama, M. Honda, Y. Toyama, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “Antibacterial polyetheretherketone implants immobilized with silver ions based on chelate-bonding ability of inositol phosphate: Processing, material characterization, cytotoxicity, and antibacterial properties”, *J. Biomed. Mater. Res A*. **103A**, 57-64 (2015).
- 7) S. Motojima, N. Igeta, H. Muramatsu, H. Uchida, K. Itatani, N. Kanzawa, M. Honda, and M. Aizawa, “Fabrication of Apatite-Fiber Scaffolds with Enhanced Mechanical Property Using Chemical Cross-Linking of Type I-collagen and Their Biocompatibility”, *J. Soc. Inorg. Mater.*, **21**, 278-285 (2014).
- 8) 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粉碎および表面修飾を同時に行なった湿式合成水酸アパタイト粉体からのキレート硬化型セメントの作製とその材料特性”, *J. Soc. Inorg. Mater.*, **21**, 99-105 (2014).
- 9) M. Honda, Y. Kawanobe, K. Ishii, T. Konishi, M. Mizumoto, N. Kanzawa, M. Matsumoto, and M. Aizawa, “In vitro and in vivo antimicrobial properties of silver-containing hydroxyapatite prepared via ultrasonic spray pyrolysis route”, *Mater. Sci. Eng., C*, **33**, 5008-5018 (2013).
- 10) 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/on an apatite-fiber scaffold”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **121**, 759-765 (2013).
- 11) T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, M. Aizawa, “Fabrication of novel biodegradable α -tricalcium phosphate cement set by chelating capability of inositol phosphate and its biocompatibility”, *J. NanoMater.*, **864374**, 1-11 (2013).
- 12) T. Konishi, S. Takahashi, Z. Zhuang, K. Nagata, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Takeuchi, H. Matsunari, H. Nagashima, and M. Aizawa, “Biodegradable β -Tricalcium Phosphate Cement with Anti-washout Property Based on Chelate-setting Mechanism of Inositol Phosphate”, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **24**, 1383-1394

(2013).

- 13) 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).
- 14) M. Honda, T. Konishi, M. Mizumoto, and M. Aizawa, “*In Vitro* Evaluation of Anti-Tumor Effect of the Chelate-Setting Hydroxyapatite Cement” , *Key. Eng. Mater.*, **529-530**, 173-177 (2013).
- 15) 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”, *Key. Eng. Mater.*, **529-530**, 167-172 (2013).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) H. Ohsugi, Y. Habuto, M. Honda, M. Aizawa, and N. Kanzawa, “Evaluation of Anti-Bacterial Activities of a Novel Chelate-Setting Apatite Cements Containing Lactoferrin”, *Key. Eng. Mater.*, **529-530**, 187-191 (2013).

* 解説記事

- 1) 相澤 守, 小西敏功, 本田みちよ, 松本守雄, “キレート硬化型リン酸カルシウムセメントの生体吸収性と *in vitro* 溶解性との関連性 —JIS T 0330 - 3 「生体活性バイオセラミックス第3部：溶解速度試験方法」による検証—”, *J. Soc. Inorg. Mater.*, **22**, 220-229 (2015).
- 2) 監修：大政健史, 福田淳二, 共著者：本田みちよほか84名, 「三次元ティッシュエンジニアリング～細胞の培養・操作・組織化から品質管理、脱細胞化まで～」, エヌ・ティー・エス, 「第1編第2章第7節 硬組織のためのスキャフォールド」, 103-112 (2015).
- 3) 本田みちよほか121名, 「技術シーズを活用した研究開発テーマの発掘」, 技術情報協会, 「第17章第7節 抗菌性生体材料を活用した研究開発テーマの発掘」, 712-718 (2013).

* 学会発表

(国際会議)

- 1) M. Honda and M. Aizawa, “Enhancement of osteogenesis in coculture of endothelial cells and osteoblasts in three-dimensional apatite-fiber scaffold”, 15th Asian Bioceramics Symposium (ABC2015), Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, 2015/12/10.

他 29 件

(国内学会)

- 1) 本田みちよ, 相澤 守, “三次元培養スキャフォールドを用いた骨組織再生における血管内皮細胞と骨芽細胞の関係”, 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テルサ, 2015 年 11 月 9 日

他 57 件

アパタイトファイバースキャフォールドと肝細胞・肝星細胞・内皮細胞との共培養による
再生肝オルガノイドの構築とその機能評価

中村まり子¹⁾・安生絵利奈²⁾・藤見峰彦³⁾・前橋はるか⁴⁾・松浦知和⁴⁾・相澤 守²⁾

- 1) 明治大学 研究・知財戦略機構
- 2) 明治大学理工学部応用化学科
- 3) 文教大学健康栄養学部
- 4) 東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座

**Construction of tissue-engineered liver organoid using apatite-fiber scaffold co-cultured with hepatocytes,
hepatic stellates, and endothelial cells and its functional assays**

**Mariko NAKAMURA¹⁾, Erina ANNJO²⁾, Takahiko J FUJIMI³⁾, Haruka MAHASHI⁴⁾,
Tomokazu MATSUURA⁴⁾ and Mamoru AIZAWA²⁾**

- 1) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University**
- 2) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University**
- 3) Department of Health and Nutrition, Bunkyo University**
- 4) Department of Laboratory Medicine, Jikei University Hospital**

1. 緒言

我々は三次元的な組織を再生させる技術を確立することを目的として、三次元的な連通気孔構造を有するアパタイトファイバースキャフォールド(AFS)を開発している[1]。本研究では、再生肝オルガノイドの構築を目的として、ラジアルフロー型バイオリアクター(RFB)に AFS を装填し、肝細胞(FLC-4 [2])の三次元培養を行なった。さらに、その培養システムを用いて、肝細胞(FLC-4),肝星細胞(A7)[3]および内皮細胞(M1)[4]とを共培養し、その組織学および生化学的評価を行なったので報告する。

2. 実験方法

2-1 RFB による高密度三次元培養

既報[1]に従って作製した AFS を RFB 内に装填し、¹³C-glucose 125 mg と D-glucose 1 g を添加した ASF104 N 培地を注入後、FLC-4 細胞 1.0×10^7 cells を播種して循環培養を行なった。1 週間後、A7 細胞懸濁液 1.0×10^7 cells を播種した。ついで、2 日後に 3 mM 塩化アンモニウム添加した ASF104N 培地に切り替えた。さらに 1 週間後に M1 細胞 5.0×10^6 cells を播種し、8 日間培養を行なった。培養期間中は培地中の pH、グルコース量、乳酸値をモニタリングした。また、肝機能の評価は、尿素合成量、培地中のアルブミン量を測定して行なった。

3. 実験結果と考察

3-1 RFBによる高密度三次元培養およびその機能評価

RFBによる高密度循環培養において、グルコース量に伴う¹³CO₂排出量および乳酸値の測定結果より、グルコースの消費に伴い¹³CO₂変化量の値が上昇し、また乳酸が産生されていることが確認された。次に、測定した尿素産生量の結果をfig 1に示す。ここで、「単層培養」とはFLC-4細胞を10 cmシャーレ上で培養したもの、「単一培養」とはFLC-4細胞をRFBによって培養したもの、「共培養」とはFLC-4、A7、M1細胞をRFBによって培養したものである。fig 1から、尿素産生積算量は経時的に増加していることが確認された。これは、尿素サイクルによってアンモニアが代謝され、尿素に変わったと理解できる。このことから、いずれの培養条件においても尿素産生能が維持されていたと考えられる。また、単層培養と比較して、単一培養と共培養のほうがともに大きな尿素産生積算量を示したことから、二次元培養よりも三次元培養の方がアンモニア代謝能が高いことが分かった。また、アルブミン産生量に関しても二次元培養よりも三次元培養の方がより産生能をもつことも明らかにしている。

以上の結果から、本スキヤフォールドはバイオ人工肝臓用足場材料として有用であり、RFBと組み合わせることで三次元の再生肝オルガノイドの構築が可能であると考えられる。

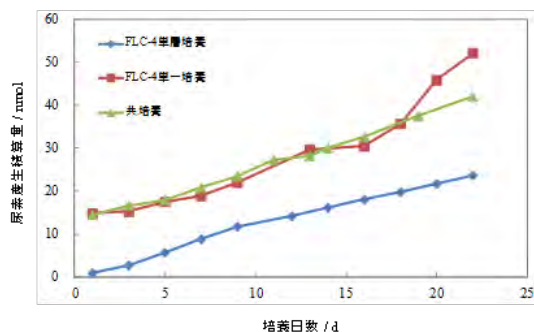


fig.1 各培養条件における尿素産生量の比較

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273(2004).
- [2] 松浦知和, *組織培養工学*, **23**, 288-291(1997).
- [3] T. Matsuura et al., *Inter. J. Artificial Organ.*, **21**, 229-234 (1998).
- [4] M. Saito et al., *World Journal of Gastroenterology.*, **21**, 1881-1888(2006).

5. 本研究に関する成果報告(2013年度分)

*学会発表 (国内会議)

1) 中村まり子・安生絵利奈・藤見峰彦・前橋はるか・松浦知和・相澤 守、“アパタイトファイバースキヤフォールドと肝細胞・肝星細胞・内皮細胞との共培養による再生肝オルガノイドの構築とその機能評価”、第35回 日本バイオマテリアル学会大会、東京都江戸川区 タワーホール船堀、日本バイオマテリアル学会、2013.11.25-26

血管を含む肝組織の構築

中村まり子¹⁾・本田みちよ¹⁾・前橋はるか²⁾・松浦知和²⁾・相澤 守³⁾

1) 明治大学 研究・知財戦略機構

2) 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座

3) 明治大学 理工学部 応用化学科

Construction of liver tissue including blood vessel

Mariko NAKAMURA¹⁾, Michiyo HONDA¹⁾, Haruka MAHASHI²⁾, Tomokazu MATSUURA²⁾
and Mamoru AIZAWA³⁾

1) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University

2) Department of Laboratory Medicine, Jikei University Hospital

3) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

多くの肝臓疾患患者に対する究極的な治療法は、現在のところ肝臓移植とされていることから、人工肝臓は待望の人工臓器である。

我々は三次元的な組織を再生させる技術を確認することを目的として、三次元的な連通気孔構造を有するアパタイトファイバースキャフォールド(AFS)を開発している[1]。また、開発した AFS を用いて肝細胞の培養にも成功している。本研究では、再生した組織の長寿命化を指向し、肝細胞として FLC-4 と血管内皮細胞として HUVEC を共培養し、評価したので報告する。

2. 実験方法

既報[1]に従って作製した AFS1000、AFS2000 および polystyrene-plate に HUVEC および FLC-4 を 5×10^5 cells/24 well となるように播種し、21 日間培養を行なった。培養期間中は培地中の pH、グルコース量、乳酸値をモニタリングした。また培養終了後に SEM による形態観察、HE 染色および免疫染色を行なったので報告する。

3. 実験結果と考察

サンプリングした培地を用いて測定したグルコース消費量を図 1、乳酸産生量を図 2 に示す。図 1, 2 よりグルコースの消費に伴い乳酸産生量が大きくなっていることから、細胞が増殖していることが確認された。また、HUVEC のみで培養した際はコンフルエントになり細胞が剥がれてしまうなどの影響から、FLC-4 との共培養と比較するとグルコース消費量が少なく、乳酸産生量が低い値を示した。更に、AFS を用いて培養することで 7 day 以降からは AFS1000>AFS2000>Control の順でグルコース消費量が大きい値を示した。このことから AFS を用いることで三次元的に培養が行なわれたと考えられる。

次いで、AFS1000 および 2000 上で培養した細胞の SEM 観察の結果を図 3, 4 に示す。図より細胞が AFS の骨格に沿って存在しており、気孔内部への侵入が見られた。また、気孔率の低い AFS1000 の方が AFS 表面上(培養面)に細胞が多く存在していることが観察された。よって、スフェロイドや細胞を初期の段階から高密度で培養するには AFS1000 が適していると考えられる。

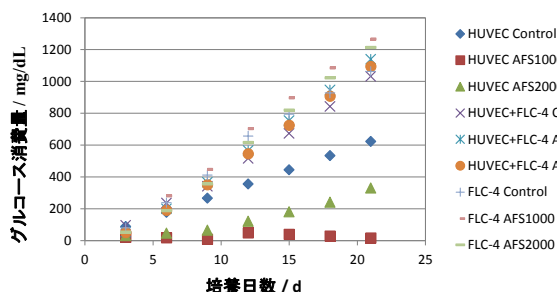


図 1. グルコース消費

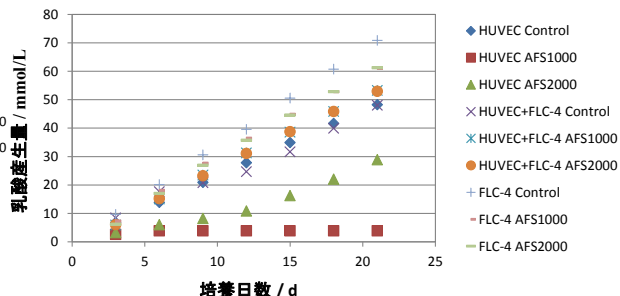


図 2. 乳酸産生量

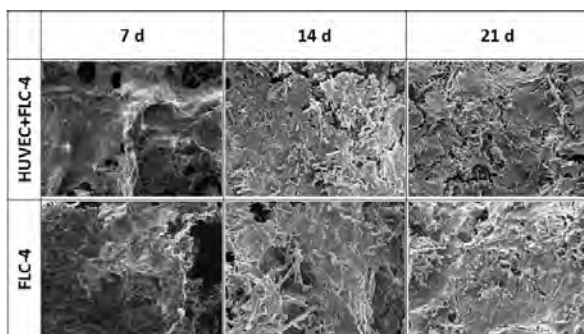


図 3. AFS1000 上で 7、14、21 日間培養した HUVEC および FLC-4 の SEM 観察

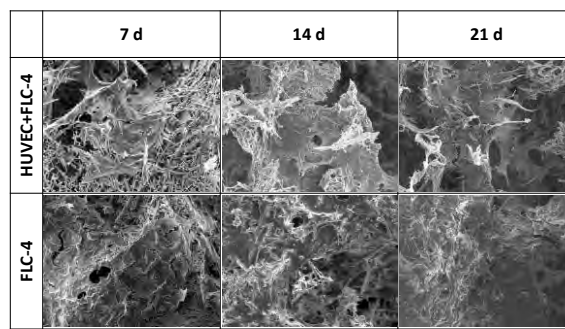


図 4. AFS2000 上で 7、14、21 日間培養した HUVEC および FLC-4 の SEM 観察

さらに、プレート上で培養した細胞の HE 染色の結果を図 5 に示す。HUVEC を単独で培養した際は単層であったのに対し、HUVEC と FLC-4 を共培養することで細胞は凝集し、管腔を形成している様子が観察された。次に、CD31 および albumin の免疫染色の結果を図 6 に示す。図 6 より HE 染色と同様に、HUVEC と FLC-4 を共培養することで管腔を形成している様子が観察された。今回の結果から、HUVEC は FLC-4 をフィーダーとして FLC-4 上で増殖すると考えられる。今回の実験では FLC-4 と HUVEC の細胞比率を 1 : 1 としたが、FLC-4 の方が倍加時間が早いため FLC-4 が大半を占めてしまっていた。よって今後は播種比率を検討する必要があると考えられる。

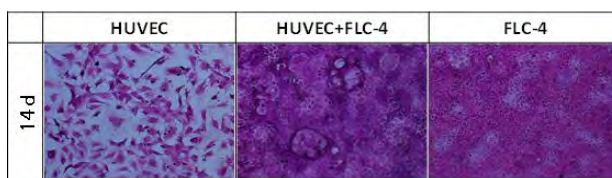


図 5. 14 日間培養した HUVEC および FLC-4 の HE 染色

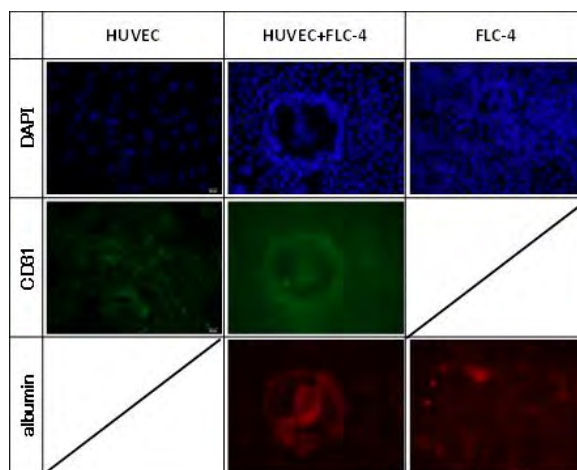


図 6. 14 日間培養した HUVEC および FLC-4 の免疫染色

以上の結果から、AFS1000 は足場材料として最適であり、細胞の播種比率を比較することで、

血管を含む肝組織の構築が可能であると考えられる。

4. 参考文献

[1] M. Aizawa et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 262-268(2004).

第 6 章

評価系の構築

バイオ人工肝臓の構築に向けた要素技術の開発

吉川 輝¹⁾・中村まり子²⁾・前橋はるか³⁾・相澤 守¹⁾・松浦知和³⁾

- 1) 明治大学理工学部応用化学科
- 2) 明治大学研究・知財戦略機構
- 3) 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座

Development of element technology for construction of bio-artificial liver

AKIRA YOSHIKAWA¹⁾, Mariko NAKAMURA²⁾, Haruka MAEHASHI³⁾,
Mamoru AIZAWA¹⁾ and Tomokazu MATSUURA³⁾

- 1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University
- 2) Organization for the Strategic Coordination of Research and Intellectual Property, Meiji University
- 3) Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine

1. 緒言

現在、肝がんや肝硬変といった重度肝疾患における完全な治療法はなく、肝臓移植が最も有効な治療法となっている。しかし、移植時の拒絶反応やドナー不足、生体肝移植の場合にはドナーへの危険性などの問題があり、体内埋め込み型のバイオ人工肝臓の開発が期待されている。その方法の一つとして、近年では細胞と足場材料、成長因子によって生体組織の再生を目指す「ティッシュエンジニアリング」と呼ばれる方法が注目されている。このティッシュエンジニアリングによりバイオ人工肝臓を構築するためには、肝細胞や成長因子、培養担体 (スキャフォールド) といった各要素の選択が重要となる。

我々はこれまでに三次元的な組織を再生させる技術を確認することを目的として、三次元的な連通気孔構造を持つアパタイトファイバースキャフォールド (AFS) を開発している [1]。さらに、この AFS が肝細胞を培養するための担体として有用であることを明らかにしている [2, 3]。しかし、どのような AFS がバイオ人工肝臓の構築に適しているのかは明らかとなっていない。また、その調査を行うためには複数条件を一度にアッセイできる系が必要である。

本研究では、96 well プレートで使用可能な小型の AFS ディスクを作製し、その有用性を他の三次元培養プレートと比較することで検討した。

2. 実験方法

アパタイトファイバー (AF) は試料溶液の Ca/P 比が 1.67 になるように、 $0.167 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 硝酸カルシウム四水和物($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、 $0.100 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ リン酸水素二アンモニウム($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)、 $0.500 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 尿素 ($(\text{NH}_2)_2\text{CO}$) および $0.10 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ HNO_3 を混合することにより調製し、この試料溶液を 80°C で 24 時間、 90°C で 72 時間加熱することによって合成した。AFS は合成した AF スラリーに対し質量比で 10

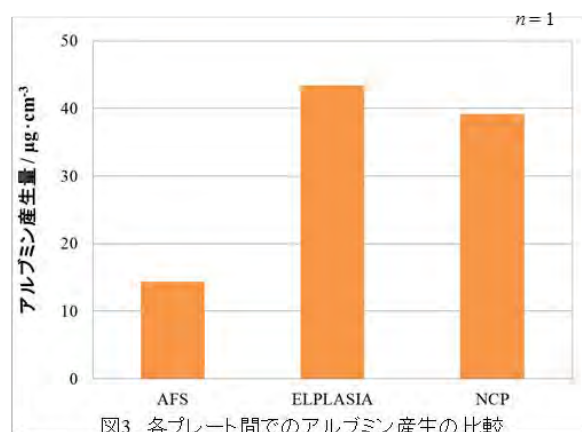
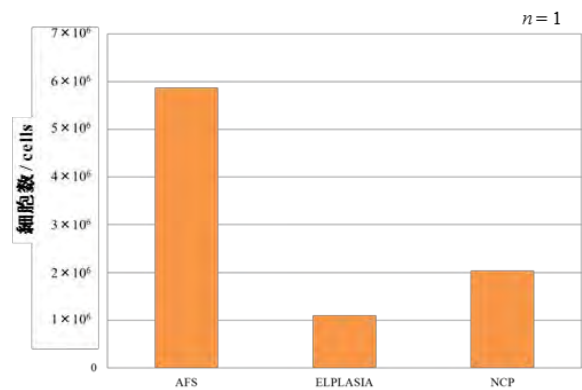
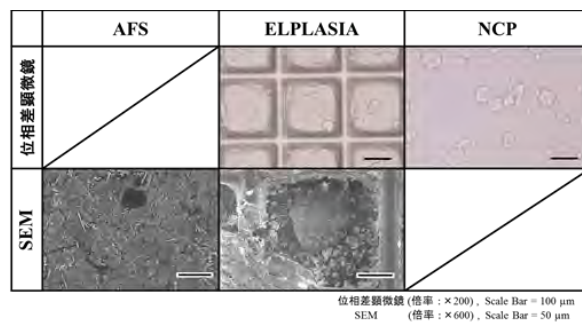
倍量のカーボンビーズを添加し、成形、焼成することで作製した。本実験では直径 6 mm、高さ 2 mm のディスク状の AFS を作製した。

この AFS を充填した 96 well プレート、三次元培養プレートである ELPLASIA および Nano Culture Plate (NPC) で肝細胞モデルの FLC-4 を培養した。FLC-4 細胞は $1 \times 10^5 \text{ cells} \cdot \text{cm}^{-3}$ の濃度の懸濁液を調製し、 $200 \text{ mm}^3 \cdot \text{well}^{-1}$ を播種した。培地交換は 2, 3 日毎に半量の 100 mm^3 を交換した。培養 30 日後、細胞形態、細胞増殖性および機能発現能を比較した。細胞形態は位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察を行った。AFS は厚さがあるために位相差顕微鏡では観察できず、SEM のみで観察を行った。また、NPC は培養面と細胞の接着が弱く、SEM で観察するための前処理の段階で細胞が剥がれてしまったため、位相差顕微鏡のみで観察を行った。細胞増殖性は Hoechst33342 を用いた細胞核染色により測定し、機能発現能は酵素免疫測定法 (ELISA) によりアルブミン産生能を測定することで調査した。

3. 実験結果と考察

位相差顕微鏡および SEM で観察した細胞形態を図 1 に示す。位相差顕微鏡の観察結果より、ELPLASIA および NPC では細胞凝集体 (スフェロイド) を形成し、細胞が三次元的に培養されていることが確認された。どちらのプレートもスフェロイドを形成するプレートではあるが、スフェロイドは ELPLASIA でより大きいものが形成された。また、SEM を用いた観察結果より、AFS では細胞が AFS の骨格に沿って増殖していることが観察された。細胞は広範囲に渡り綿状の形態を有していた。ELPLASIA では位相差顕微鏡で観察を行った際と同様に、細胞が三次元的にスフェロイドを形成していることが確認された。

細胞数の測定結果を図 2 に示す。培養 30 日後における細胞数は AFS, NPC, ELPLASIA の順で多くなった。これは AFS を用いることで他のプレートよりも細胞が増殖することができる場が増えたためであると考えられる。また、NPC 及び ELPLASIA では細胞をスフェロイドとして培養することで三次元的に培養できるが、増殖できる場は二次元に限られていることや、初期の段階でスフェロイドを形成したことで細胞増殖が抑制され、AFS よりも細胞数が少なかったのではないかと考えられる。ELPLASIA および NPC はどちらもスフェロイドを形成するプレートであるが、細胞数は NPC の方が多くなった。これは、ELPLASIA ではスフェロイド周囲の仕切りにより細胞が増殖できる場が限られているため、早い段階で



細胞密度が高まり、増殖が抑制されたためではないかと考えられる。

培養 30 日後の培養上清を採取し、アルブミン産生量を ELISA にて測定した。その結果を図 3 に示す。培養上清中のアルブミン濃度は ELPLASIA において最も高い値を示した。また、肝細胞は細胞密度が高まることで機能発現が高まると言われているが、細胞数が最も多かった AFS では他の二つのプレートと比較してアルブミン産生を示した。このことから、足場材料を介さずに細胞のみで三次元的に培養されているスフェロイドの方が機能発現は高くなることが示唆された。これらの測定結果より、AFS を用いて培養した肝細胞ではアルブミンの産生といった機能発現ではなく、細胞増殖にエネルギーが多く使われている可能性が示唆された。

以上の結果から、AFS は肝細胞が増殖するための足場として優れていると考えられる。また、小型の AFS ディスクは一度に複数のアッセイを行うことが可能であり、スクリーニングの系として有用であることが示唆された。

4. 参考文献

- [1] M. Aizawa *et al.*, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**, 268-273 (2004).
- [2] 平本篤司, 2006 年度修士論文
- [3] 安生絵利奈, 2012 年度修士論文

5. 本研究に関する成果報告

*学会発表 (国内会議)

- 1) 吉川 輝・中村まり子・前橋はるか・相澤 守・松浦知和、“ラジアルフロー型バイオリアクターを利用したヒト血漿蛋白質生産系の構築—ヒトアルブミン生産系の検討—”、第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会、2014.8.31

血漿製剤・ワクチン製造に展開可能な物質生産系の構築を目的とした
アパタイトファイバースキャフォールドの構造最適化

森田恵里香¹⁾・松浦知和²⁾・相澤 守¹⁾

1) 明治大学理工学部応用化学科

2) 東京慈恵会医科大学

**Structural optimization of apatite-fiber scaffold for the purpose of construction of expandable material
production system in plasma products vaccine production**

Erika MORITA¹⁾, Tomokazu MATSUURA²⁾ and Mamoru AIZAWA¹⁾

1) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

2) Division of Central Clinical Laboratory, Jikei University Hospital

1. 緒言

日本では海外から輸入された血漿凝固因子製剤によりヒト免疫不全ウイルスに感染したという歴史があるため、血漿製剤の国内自給を目標に掲げている。しかしながら、アルブミン製剤の国内自給はまだ成されていないため、アルブミンを安価かつ簡易的に生産する手段を得る必要がある。当研究室では、均一沈殿法により合成したアパタイトファイバー(AF)にカーボンビーズ(CB)を添加して焼成することにより三次元連通気孔を有するスキャフォールド(アパタイトファイバースキャフォールド; AFS)の開発に成功している。さらに、AFSを装填したラジアルフロー型バイオリクター(RFB)を用い、「肝細胞」または「肝細胞・星細胞・内皮細胞」を三次元的に培養すると、アルブミン産生能およびアンモニア解毒能を備えた「肝再生オルガノイド」が構築可能であることを明らかにしている[1]。本研究の最終目的は、アルブミン産生能に着目して AFS の微細構造の最適化を行なうことである。今回の実験では、RFB を用いた際に、最密充填可能な顆粒が球状であるため、AFS を球状に加工することを目的とし、最適な加工時間の決定をし、それらの微細構造を観察したので報告する。

2. 実験方法

1) AFS の作製とその材料特性

AF の合成は既報にしたがって行なった[2]。合成した AF に純水と同量のエタノールを加えて懸濁し、2 mass%スラリーを調製した。AF に対し質量比で等量のカーボンビーズ(CB)を添加し、吸引ろ過後、一軸加圧成形を行なった。得られた成形体を水蒸気雰囲気下で 1300°C, 5 h 焼成することで AFS を作製した。なお、略号は CB 総添加量および粒径の異なる CB 添加割合に応じて“AFS100(75-25)”などと表記する。例えば“AFS100(75-25)”は AF に対して CB 総添加量 100 mass%であり、その割合が 150 μm の CB を 75%, 20 μm の CB を 25%添加したことを示す。高さ 7-8 mm、直径 4 mm の円柱状 AFS および厚さ約 4.5 mm の板状 AFS を作製した。円柱状の AFS を用いて、気孔率と圧縮強度を測定した。板状 AFS は結晶

相の同定のため粉末 X 線回折法(XRD)、走査型電子顕微鏡法(SEM)を用いて微細構造観察および次項で述べる AFS ビーズの作製に用いた。

2) AFS ビーズの作製と加工時間決定

一辺が 4.5 mm の立方体を作製するため、ディスポメスを用いて板状 AFS を細断した。その後、遊星型ボールミルのジルコニア容器内に、#2000 の耐水研磨紙を張り付け、立方体の AFS を 5 g 容器に加え、ボールミルを用いて、回転数 400 rpm で加工した。所定の時間毎に試料を取り出し、質量の測定および直径不同を算出した。なお、直径不同とは試料の球の精密さを示す指標の一つであり、直径不同が 0 に近いほど精密な球であると判断できる。直径不同、直径不同率および重量比率は以下の式を用いて算出した。

直径不同 [mm] = 試料の最大径 [mm] - 試料の最小径 [mm]

t 秒後の直径不同率 [%] = t 秒後の直径不同 [mm] / 加工前の直径不同 [mm] × 100

t 秒後の質量比率 [%] = (t 秒後の質量 [g] - 加工前の質量 [g]) / 加工前の質量 [g] × 100

作製後、SEM を用いて AFS 特有の気孔構造が維持できているか観察を行なった。

3. 結果と考察

1) AFS の材料特性

作製した AFS の主結晶相は、CB の添加量に関わらず水酸アパタイトであった。図 1 および図 2 より、20 μm の CB の添加割合が多くなるにつれて、気孔率が低下し、圧縮強度は増加することが明らかになった。これは、気孔率が低下することで、AFS が密な構造となったため、圧縮強度が増加したと考えられる。

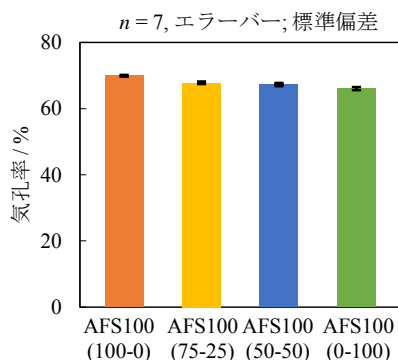


図 1 AFS の気孔率

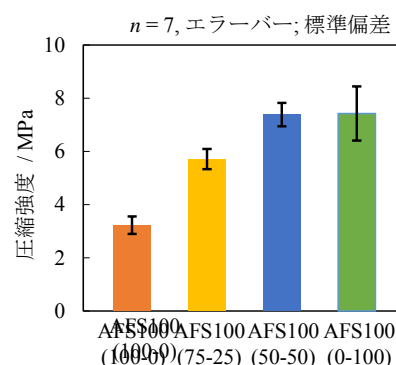


図 2 AFS の圧縮強度

2) AFS ビーズの加工時間決定

直径不同率と質量比率の関係のグラフを図 3 に示す。それぞれのグラフの交点を最適な加工時間であると本研究では定め、加工時間を決定した。図 3 より、AFS100(100-0)は 120 秒、AFS100(75-25)は 240 秒、AFS100(50-50)は 420 秒、AFS100(0-100)は 440 秒の加工時間がそれぞれ最適であると決定した。また、20 μm の CB の割合が増加するにつれて、加工時間が長くなることが明らかになった。これは、AFS の圧縮強度が増加することにより、AFS が強固になり加工時間が増加したためであると考えられる。

3) AFS ビーズの形態観察

図 4 に加工した AFS ビーズの微細構造を示す。加工した AFS ビーズは CB の焼失によるマクロ気孔(点線部)を有していることが明らかになった。このことから、ボールミルを用いて加工を行なった場合において、AFS 特有の気孔構造を維持可能であることが明らかになった。図 5 より、加工前の AFS(板状 AFS)

と加工後の AFS(AFS ビーズ)を比較すると、AFS ビーズでは、CB の焼失による気孔が表面に露出していることおよび表面と断面の構造が非常によく似ていた。これは加工時に板状 AFS の表面が削れることにより、内部の気孔構造が露出したからであると考えられる。また、AFS ビーズは多くの気孔が表面に露出しているため、細胞接着性がより高くなるのではないかと考えられる。

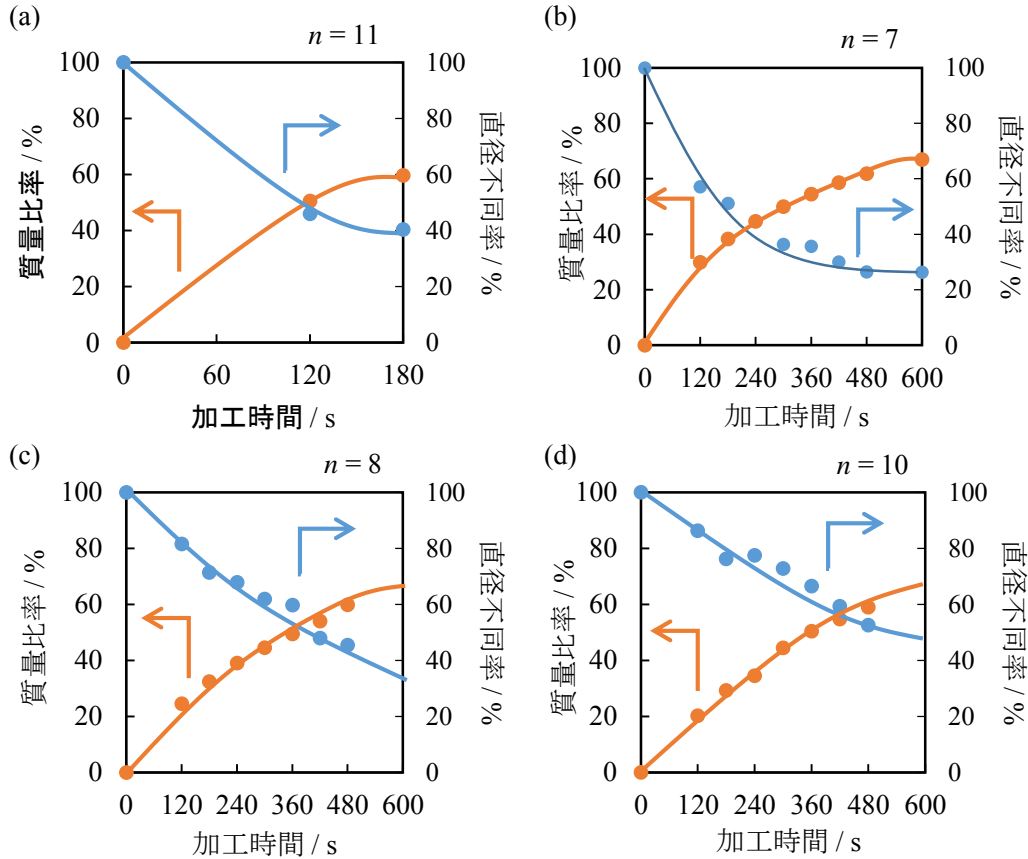


図3 加工時間と質量比率および直径不同の関係

(a) AFS100(100-0), (b) AFS100(75-25), (c) AFS100(50-50), (d) AFS100(0-100)

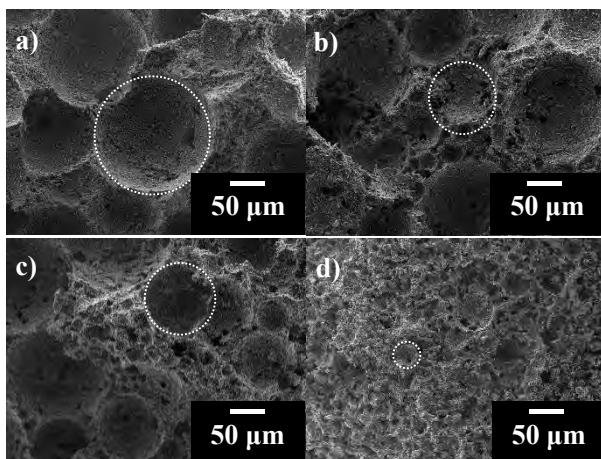


図4 AFS ビーズの微細構造

(a) AFS100(100-0), (b) AFS100(75-25),
(c) AFS100(50-50), (d) AFS100(0-100)

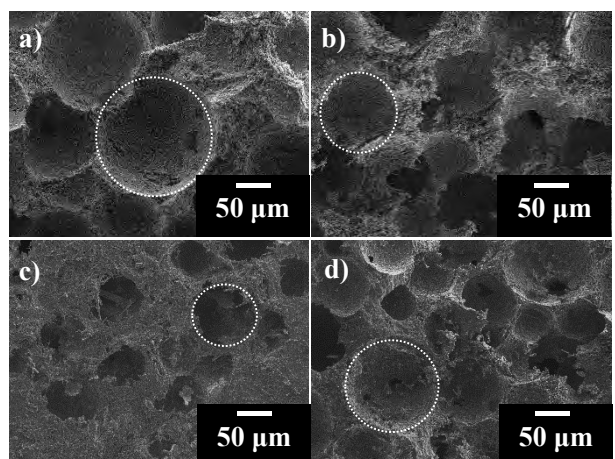


図5 加工前後の AFS100(100-0)の微細構造

(a) 加工後表面, (b) 加工後断面,
(c) 加工前表面, (d) 加工前断面

4. 結論

本研究では、RFB に用いるための球状 AFS ビーズの作製に取り組んだ。加工時間の最適化を行なったところ、AFS100(100-0)では 120 秒、AFS100(75-25)では 240 秒、AFS100(50-50)では 420 秒、AFS100(0-100)では 440 秒がそれぞれ最適であることが分かった。また、加工に用いる AFS の圧縮強度が高くなると、加工時間が長くなることが明らかとなった。また SEM による微細構造観察では、板状 AFS と AFS ビーズの表面形態が大きく変化することはない、AFS ビーズは AFS 特有の構造を維持していた。さらに、AFS ビーズの表面にはより多くの気孔が露出していた。これらの材料特性を踏まえると、*in vitro* 試験を行なうことで、通常の AFS よりも細胞接着でより良い結果が見られる可能性がある。これは、よりアルブミン産生能を高めるうえで重要になってくると考えられる。

5. 参考文献

- [1] 安生絵利奈, 学位論文, 明治大学大学院 (2012).
- [2] S. Motojima et al., *Bioceramics*, **22**, 177-180(2009).

骨再生研究に有用な赤色蛍光タンパク発現ブタ系統の樹立

松成ひとみ¹⁾・中野和明²⁾・渡邊将人¹⁾・梅山一大¹⁾・長屋昌樹¹⁾・長嶋比呂志¹⁾

1) 明治大学バイオリソース研究国際インスティテュート

2) 明治大学農学部生命科学科

Establishment of transgenic pig line expressing red fluorescent protein for osteoregeneration research

Hitomi MATSUNARI¹⁾, Kazuaki NAKANO²⁾, Masahiro WATANABE¹⁾, Kazuhiro UMEYAMA¹⁾

Masaki NAGAYA¹⁾ and Hiroshi NAGASHIMA¹⁾

1) Meiji University International Institute for Bio-Resource Research

2) Department of Life Sciences, School of Agriculture, Meiji University

1. 緒言

緑色蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光マーカーを発現する外来遺伝子導入動物がマウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウシなどで作出され、様々な研究に利用されている。

赤色蛍光タンパク質(RFP)は GFP に比べて励起および蛍光(放出)波長が長い。長波長の赤色蛍光は、生体透過性が高いので、体組織中の蛍光を検出する、いわゆる *in vivo* イメージングに適している。さらに、RFP は、生体組織に見られる自家蛍光の影響を受けにくいという優れた特徴を持つ。

我々は既に、RFP の一種である humanized Kusabira-Orange (huKO)を全身発現する遺伝子改変(Tg)ブタを作出し(Matsunari et al., 2008)、再生医学領域の研究への利用を進めている。

例えば、バイオセラミックスを用いた骨修復・再生研究への huKO ブタの利用では、赤色蛍光をマーカーとして骨芽細胞の浸潤や骨形成の過程を追跡することができる。同様に、靭帯再建研究への応用では、宿主細胞の浸潤による移植組織のリモデリング過程を、赤色蛍光を指標に解析することが出来る。

このように huKO ブタは、画期的な研究ツールとなり得るが、より有効な利用を実現するためには、外来遺伝子の組み込み様式や挙動、さらに繁殖に伴う後代への伝達と後代産仔における発現動態などについて、詳細な情報を得ることが必要である。そこで本研究では、huKO 遺伝子を組み込んだブタの系統確立と、その過程における解析を目的とした。

具体的研究課題として、(1) huKO 遺伝子の組み込み様式の解析、(2) 凍結精子を用いた体外受精による huKO ブタの生産、(3)後代産仔における huKO 遺伝子の発現、(3) レトロウイルスベクターにより導入された huKO 遺伝子が、有性生殖を経た後代産仔において発現するかの検証、(4) huKO 遺伝子を homozygous に持つ個体の作出などに取り組んだ。

2. 実験方法

1) huKO 遺伝子の組み込み位置の同定

レトロウイルスベクターを用いて huKO 遺伝子を導入されたブタ胎仔繊維芽細胞の体細胞クローニングによって得られた個体(Matsunari et al., 2008)を、founder-Tg 個体として皮膚繊維芽細胞採取に用いた。

founder-Tg 個体の人工授精で得られた後代個体(雄 1 頭)を第 1 世代 (G1) 個体とし、さらに G1 雄の交配によって得られた次世代個体(雌 1 頭)を第 2 世代 (G2) 個体として、それぞれから皮膚細胞を採取した。以上の 3 世代の huKO-Tg ブタの皮膚細胞を培養し、得られた染色体標本を FISH 法により解析して、導入遺伝子の染色体上の位置ならびにコピー数を同定した。FISH プローブのラベルには Cy3 を用い、Leica DMRA2 システムおよび Leica CW4000 FISH のソフトウェアにより画像採取・解析を行った。

2) huKO 遺伝子導入ブタの体外授精による生産

食肉処理場で回収した卵巣から未成熟卵子を採取し、体外培養により成熟卵子を得た。卵子の体外成熟培養には、10% porcine follicular fluid、10IU/ml equine chorionic gonadotropin (あすか製薬)、10IU/ml human chorionic gonadotropin (あすか製薬) を添加した HP-POM 培地 (機能性ペプチド研究所) を用いた。1mM dbcAMP (機能性ペプチド研究所) 存在下で 20 時間培養後、dbcAMP 不含の培地で更に 24 時間培養した。体外受精は Kikuchi らの方法を修正して行った。PFM 培地(機能性ペプチド研究所)中においた体外成熟卵を 1.75×10^6 /ml の濃度の精子で媒精し、8 時間培養した。媒精後受精卵を選別し、PZM5 培地によりさらに培養した。培養期間中の気相条件は、5% CO₂、5% O₂、90% N₂、38.5°C とした。培養 5 日あるいは 6 日目に胚盤胞に発達した胚を、性周期を同期化した雌の子宮内に移植した。一部の胚は、固定・染色による正常受精率の解析に用いた。

胚移植は外科的方法により行った。全身麻酔下で、レシピエントブタを正中切開し、卵巣、卵管、子宮角上部を露出し、少量の液と共に子宮腔内に胚を移植した。

3) huKO Tg ブタにおける導入遺伝子の後代への伝達と発現

Founder トランスジェニック・クローン個体 (17 ヶ月齢) に対し、卵管内人工授精および経膈的人工授精を施し、第 1 世代 (G1) 産仔を作出した。G1 世代トランスジェニック産仔の 1 頭の雄 (12 ヶ月齢) の精巣上体精子を採取し、凍結保存した。この凍結保存精子を用いて、卵管内人工授精および体外受精を行い、第 2 世代(G2)産仔を得た。G2 産仔のうち雄の個体 1 頭を 野生型雌 (Large White/Landrace×Duroc) と自然交配させ、第 3 世代(G3)産仔を得た。

各世代の産仔の尾組織からゲノム DNA を抽出し、PCR によりトランスジェニック個体を同定した。産仔を通常飼育により育成し、その間の成長率を記録した。また、一部の個体について採血を行い、血液生化学値の評価を行った。各世代の産仔の一部を剖検に供し、全身の主要臓器・組織について、蛍光発現を判定した。

4) huKO 遺伝子を homozygous に有する個体の作出

雌雄の第 3 世代 Tg 個体の交配によって、第 4 世代産仔を得た。切断した尾の組織片の蛍光強度観察、末梢白血球の FACS 解析により huKO 遺伝子を homozygous に有する個体を同定した。

3. 結果と考察

1) huKO 遺伝子の組み込み位置の同定

図 1 に示す通り、Founder-Tg 個体および後代の G2, G3 個体ともに、第 17 染色体上 q23 領域の 1 箇所に huKO 遺伝子が組み込まれていることが明らかとなった。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

では、1コピーの外来遺伝子が宿主染色体上の複数箇所に組み込まれることが知られている (Hofmann et al., 2006; Hamanaka et al., 2007)。我々の huKO ブタは染色体上の1箇所にのみ遺伝子導入された、比較的希なケースであることが明らかとなった。レトロウイルスベクターはプロモーター領域への組み込み頻度が高く、そのため複数箇所への組み込みでは insertional mutation を生じるリスクが高い。複数箇所に外来遺伝子が組み込まれた個体を繁殖に供すると、後代には導入遺伝子が分離して伝達される。その結果、様々な導入遺伝子コピー数を持った後代個体が生じることになる。複数コピーの遺伝子が組み込まれた個体間においては、導入コピー数や導入位置の影響を受けて、表現形である蛍光強度に差が生じる場合がある (Matsunari et al., 2008)。一方、我々の huKO-Tg ブタは、single copy/single site integration の特徴を持つので、世代間の蛍光強度の変動は起きないはずである。実際、これまでに得られた3世代の huKO-Tg 個体集団において、蛍光強度の世代間差は見られていない。

以上から、huKO-Tg ブタは赤色蛍光マーカーを発現する大型実験動物として、非常に優れた特徴を持つと考えられる。

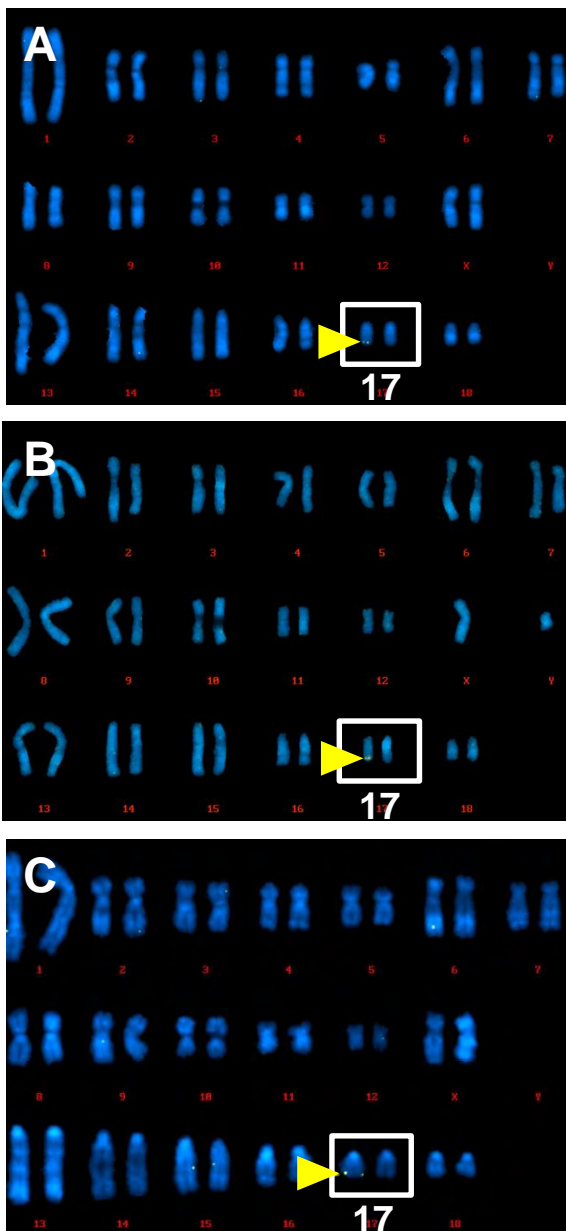


図 1. huKO-Tg ブタ 3 世代の遺伝子導入位置の FISH 解析
 Founder-Tg 個体(A)、G1 個体(B)、G2 個体(C)ともに第 17 染色体 q23 領域にシグナルが確認された(矢印)

2) huKO 遺伝子導入ブタの体外授精による生産

表 1 に示す通り、huKO ブタの凍結精子を用いた体外受精により、効率的に受精卵が得られた。正常受精率は 50.8%であった。培養に供した胚の内、52.4%が胚盤胞期にまで発達した。合計 88 個の胚盤胞 (図 2A) を 3 頭のレシピエント雌に移植した結果、全例が妊娠し、27 頭の産仔が得られた (図 2B)。これらの産仔の生時体重は 0.5~1.7 kg であり、同系ブタの正常範囲であった。また、産仔の成長も正常であった (図 3)。

得られた産仔のうち、55.6% (15/27) の個体において huKO transgene の伝達が確認された。transgenic 個体と non-transgenic 個体の間に、成長の差は認められなかった (図 4)。

以上から、体外受精による huKO ブタの効率的生産が可能であること、得られた産仔は健全に成長することが確認された。huKO 遺伝子の産仔への伝達効率はメンデルイズムから予想される率に一致していた。huKO ブタには 1 コピーの transgene が組み込まれていることが確認されているので、安定的な後代への伝達が期待される。

huKO ブタを大型実験動物として量産するための人工生殖システムが確立されたことで、今後様々な研究への利用が一層促進されることになると考えられる。

表 1. huKO ブタの凍結融解精子による体外受精成績

媒精後の 培養胚数	正常分割率 (%)	胚盤胞率 (%)	平均細胞数 (mean ± SEM)
82	45 (54.9)	43 (52.4)	112.3±10.2

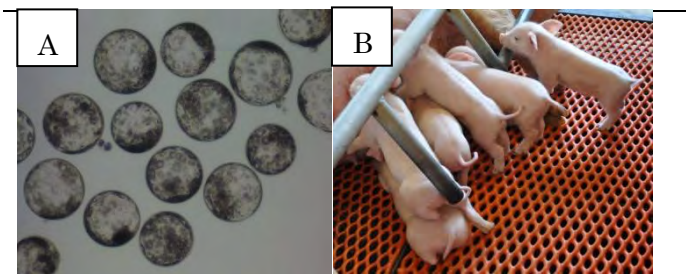


図 2. huKO ブタの凍結融解精子による体外受精で作出された胚盤胞(培養 6 日目)と産仔 (スケールバー200μm)

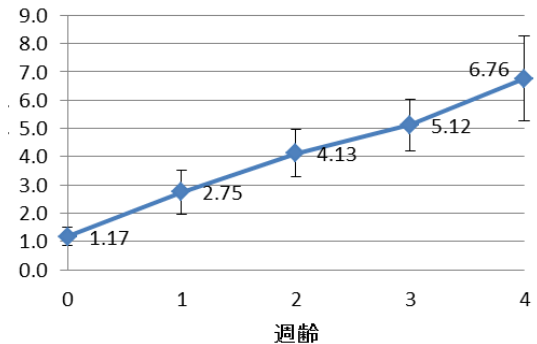


図 3. huKO ブタの凍結融解精子による体外受精で作出された産仔の体重推移 (n=22)

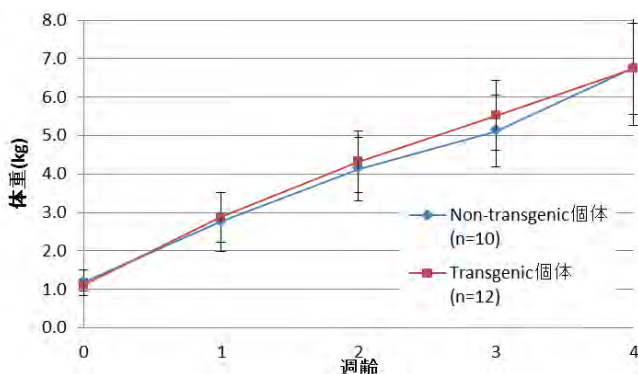


図 4. huKO ブタの凍結融解精子による体外受精で作出された Transgenic 産仔と non-transgenic 産仔の体重推移の比較

3) huKO Tg ブタにおける導入遺伝子の後代への伝達と発現

Founder 個体の繁殖に野生型精子による卵管内人工授精、経膈的人工授精を施した結果、19 頭の G1 産仔を得た。この産仔のうち 57.9% (11 頭) に huKO 遺伝子が伝達されていることが確認された。

G1 トランスジェニック産仔(雄)の凍結精子を用いた卵管内人工授精あるいは体外成熟により、12 回の分娩で合計 77 頭の産仔が得られた。これらのうち、39 頭 (50.6%) がトランスジェニック個体であった。

G2 産仔の雄 1 頭を育成し、野生型雌との自然交配により次世代(G3) 産仔を作出した。5 回の分娩によって 42 頭の G3 産仔が得られ、そのうち 22 頭 (52.4%) がトランスジェニック個体であった。

第 1 世代から第 3 世代産仔の個体の全身の臓器・組織について、蛍光発現を観察した結果を図 5 にまとめた。脳、眼球、心臓、肺、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、腎臓、膀胱、生殖腺、皮膚、骨格筋、軟骨、骨 (肋骨)、皮下脂肪などの各組織・臓器の蛍光は、ファウンダー世代から第 3 世代まで安定に維持されていることが確認された。

クサビラ・オレンジ発現ブタのファウンダー世代作出の際には、レトロウィルスベクターが用いられた。レトロウィルスベクターによって導入された外来遺伝子は、サイレンシングの影響を受ける場合が多いとされているが、我々のクサビラ・オレンジブタでは、組み込まれた単一遺伝子が、少なくとも第 3 世代まで発現を維持されていることが明らかとなった。

各世代の産仔の約半数がトランスジェニック個体であったことから、huKO 遺伝子はメンデルリズムに従って確実に後代に伝達されることが明らかになった。また、各世代のトランスジェニック産仔は、Founder 個体と同様の全身性赤色蛍光発現を維持していることが確認された。各世代の個体の成長、血液生化学値はともに正常範囲であった。

以上より、著者らが樹立した huKO トランスジェニック・クローンブタから有性生殖により作出した後代産仔は、少なくとも第 3 世代まで導入遺伝子を正確に伝達し、遺伝子発現を維持することが明らかとなった。これによって、様々なトランスレーショナル・リサーチに有用な huKO ブタの系統化が実現したと結論された。

4) huKO 遺伝子を homozygous に有する個体の作出

第 3 世代個体同士の交配により一腹の第 4 世代産仔を得た。同腹産仔 12 頭中 10 頭が Tg 個体であった。その内 1 頭が homozygous Tg 個体であった。

4. 結論

無性生殖的な個体生産システムである体細胞クローニングとレトロウィルスベクターを用いて作出されたトランスジェニック個体を、有性生殖によって繁殖 (系統化) する場合、導入遺伝子が確実に後代に伝達され、さらにサイレンシングを受けることなく発現が維持されるか否かが課題となる。そこで、1 コピーの導入遺伝子を持つことが確認された個体を Founder とし、自然交配、人工授精、体外受精などの有性生殖プロセスによって後代産仔を作出し、第 1 世代から第 3 世代における、遺伝子伝達並びに発現動態を解析した。本プロジェクトにおいて我々は、huKOTg ブタを作出・維持し、ヒドロキシアパタイト・インプラントの実験に供給し、その有用性を確認した。以上から、全身性に huKO 遺伝子を発現するブタが、有用な大型実験動物として系統化されたと言える。

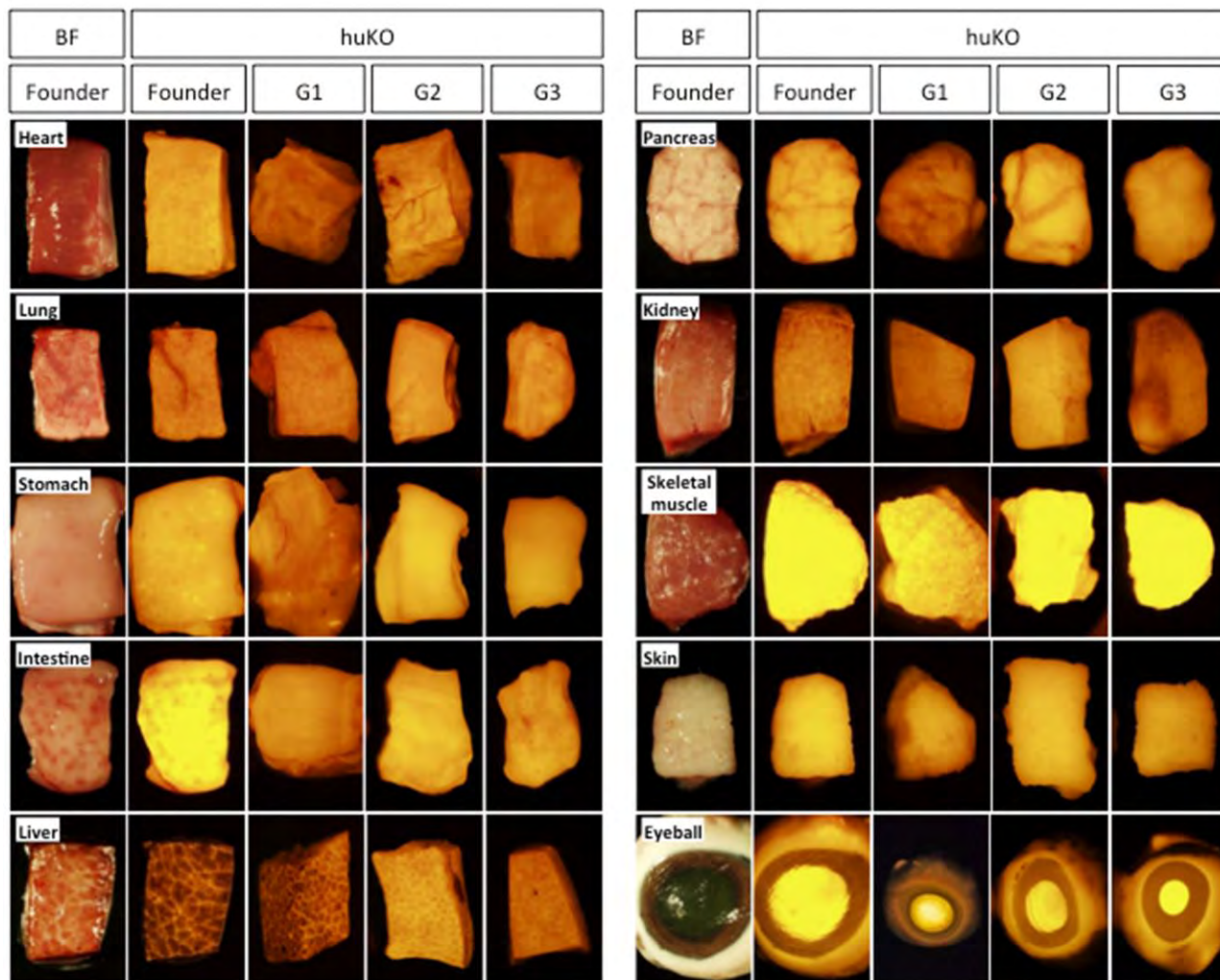


図 5. Founder 個体および後代産仔(G1~G3)の各臓器におけるクサビラ・オレンジ蛍光発現

5. 参考文献

- [1] H. Matsunari et al., Cloning and Stem Cells 10:313-324 (2008).
 [2] M. Maehara et. al., Biology of Reproduction 87:133, 1-8 (2012).

6. 成果報告

*原著論文

- 1) Watanabe M, Kurome M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Shiota A, Nakauchi H, Nagashima H:
The creation of transgenic pigs expressing human proteins using BAC-derived, full-length genes and intracytoplasmic sperm injection-mediated gene transfer. Transgenic Research 2011, 21:605-618.
- 2) Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H:
Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. Molecular Reproduction and Development 2011, 79:218-228.
- 3) Klymiuk N, Mundhenk L, Kraehe K, Wuensch A, Plog S, Emrich D, Langenmayer MC, Stehr M, Holzinger A, Kroner C, Richter A, Kessler B, Kurome M, Eddicks M, Nagashima H, Heinritz K, Gruber

AD, Wolf E: Sequential targeting of CFTR by BAC vectors generates a novel pig model of cystic fibrosis. *Journal of Molecular Medicine* 2011, 90:597-608.

- 4) Klymiuk N, Böcker W, Schönitzer V, Bähr A, Radic T, Fröhlich T, Wunsch A, Keßler B, Kurome M, Schilling E, Herbach N, Wanke R, Nagashima H, Mutschler W, Arnold GJ, Schwinzer R, Schieker M, Wolf E: First inducible transgene expression in porcine large animal models. *The FASEB Journal* 2011, 26:1086-1099.
- 5) Kemter E, Lieke T, Kessler B, Kurome M, Wuensch A, Summerfield A, Ayares D, Nagashima H, Baars W, Schwinzer R, Wolf E: Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation* 2011, 19:40-51.
- 6) Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Hayashida G, Kobayashi M, Kuramoto M, Arai Y, Umeyama K, Fujishiro S, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. *PLOS ONE*, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0061900.
- 7) Ikeda K, Yamamoto A, Nanjo A, Inuinaka C, Takama Y, Ueno T, Fukuzawa M, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Miyagawa S: A cloning of cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase from porcine endothelial cells. *Transplantation Proceedings* 2012, 44(4):1136-1138.
- 8) Klymiuk N., van Buerck L., Bahr A., Offers M., Kessler B., Wuensch A., Kurome M., Thormann M., Lochner K., Nagashima H., Herbach N., Wanke R., Seissler J., Wolf E: Xenografted islet cell clusters from INSLEA29Y transgenic pigs rescue diabetes and prevent immune rejection in humanized mice. *Diabetes* 2012, 61:1527-32.
- 9) Matsumoto K., Yokoo T., Matsunari H., Iwai S., Yokote S., Teratani T., Gheisari Y., Tsuji O., Okano H., Utsunomiya Y., Hosoya T., Okano H.J., Nagashima H., Kobayashi E: Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* 2012, 30:1228-35.
- 10) Nakatsu S., Takama Y., Ueno T., Inuinaka C., Takeishi S., Kondo A., Okitsu T., Nagashima H., Fukuzawa M., Miyagawa S.: A study of the glycoantigens of neonatal porcine islet-like cell clusters using a lectin microarray. *Transplant Proc* 2012, 44:1134-5.
- 11) Richter A., Kurome M., Kessler B., Zakhartchenko V., Klymiuk N., Nagashima H., Wolf E., Wuensch A.: Potential of primary kidney cells for somatic cell nuclear transfer mediated transgenesis in pig. *BMC Biotechnol* 2012, 12:84.
- 12) Konishi T, Takahashi S, Zhuang Z, Nagata K, Mizumoto M, Honda M, Takeuchi Y, Matsunari H, Nagashima H, Aizawa M: Biodegradable β -Tricalcium Phosphate Cement with Anti-washout Property Based on Chelate-setting Mechanism of Inositol Phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2013, 24: 1383-1394.
- 13) Walters EM, Wolf E, Whyte JJ, Mao J, Renner S, Nagashima H, Kobayashi E, Zhao J, Wells KD, Critser JK, Riley LK, Prather RS: Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model. *BMC Medical Genomics* 2012, 5(55). DOI: 10.1186/1755-8794-5-55.
- 14) Renner S, Braun C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Bahr A, Klymiuk N, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E: Permanent Neonatal Diabetes in INSC94Y Transgenic Pigs. *Diabetes* 2012, 62: 1505-1511.

- 15) Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta H, Takahashi M, Nagashima H: Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *Journal of Reproduction and Development* 2012, 58:599-608.
- 16) Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi H, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H: Hollow Fiber Vitrification Provides a Novel Method for Cryopreserving In Vitro Maturation/Fertilization-Derived Porcine Embryos. *Biology of Reproduction* 2012, 87:133.
- 17) Teratani T, Matsunari H, Kasahara N, Nagashima H, Kawarasaki T, Kobayashi E: Islets from rats and pigs transgenic for photogenic proteins. *Current Diabetes Reviews* 2012, 8:382-389.
- 18) Miyagawa S, Maeda A, Takeishi S, Ueno T, Usui N, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H: A Lectin array analysis for wild-type and a-Gal-knockout pig islets, compared with humans. *Surgery Today* 2012, 43: 1439-1447.
- 19) Umeyama K, Saito H, Kurome M, Matsunari H, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Characterization of the ICSI-mediated gene transfer method in the production of transgenic pigs. *Molecular Reproduction and Development* 2012, 79:218-228.
- 20) Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Kobayashi T, Yamaguchi T, Sumazaki R, Herzenberg L.A., Nakauchi H: Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:4557-62.
- 21) Fujishiro S.H., Nakano K., Mizukami Y., Azami T., Arai Y., Matsunari H., Ishino R., Nishimura T., Watanabe M., Abe T., Furukawa Y., Umeyama K., Yamanaka S., Ema M., Nagashima H, Hanazono Y. Generation of naive-like porcine-induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. *Stem Cells Dev* 2013, 22:473-823.
- 22) Wuensch A, Baehr A, Bongoni AK, Kemter E, Blutke A, Baars W, Haertle S, Zakhartchenko V, Kurome M, Kessler B, Faber C, Abicht JM, Reichart B, Wanke R, Schwinzer R, Nagashima H, Rieben R, Ayares D, Wolf E, Klymiuk N: Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single- and multitransgenic pigs. *Transplantation* 2013, 97:138-147.
- 23) Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Maehara M, Kanai T, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Takayanagi S, Arai Y, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. *PLOS ONE* 2013, 8:e76478. DOI: 10.1371/journal.pone.0076478 PONE-D-13-27603 [pii].
- 24) Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Burkhardt K, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Thirion C, Lochmuller H, Walter M.C, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum Mol Genet* 2013, 22:4368-82
- 25) Kurome M, Geistlinger L, Kessler B, Zakhartchenko V, Klymiuk N, Wuensch A, Richter A, Baehr A, Kraeche K, Burkhardt K, Flisikowski K, Flisikowska T, Merkl C, Landmann M, Durkovic M, Tschukes A, Kraner S, Schindelhauer D, Petri T, Kind A, Nagashima H, Schnieke A, Zimmer R, Wolf E: Factors influencing the

efficiency of generating genetically engineered pigs by nuclear transfer: multi-factorial analysis of a large data set. *BMC Biotechnol* 2013, 13:43.

- 26) Yamamoto A, Ikeda K, Wang D, Nakatsu S, Takama Y, Ueno T, Nagashima H, Kondo A, Fukuzawa M, Miyagawa S: Trial using pig cells with the H-D antigen knocked down. *Surg Today* 2013, 43:782-6.
- 27) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: DNA methylation profiles provide a viable index for porcine pluripotent stem cells. *Genesis* 2013, 51(11):763-776.
- 28) Maehara M, Sato M, Watanabe M, Matsunari H, Kokubo M, Kanai T, Sato M, Matsumura K, Hyon SH, Yokoyama M, Mochida J, Nagashima H: Development of a novel vitrification method for chondrocyte sheets. *BMC Biotechnology* 2013, 13:58.
- 29) Maeda A, Ueno T, Nakatsu S, Wang DD, Usui N, Takeishi S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H, Miyagawa S: A lectin microarray study of glycoantigens in neonatal porcine islet-like cell clusters. *Journal of Surgical Research* 2013, 183(1):412-418.
- 30) Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Kasahara M, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic pig expressing the red fluorescent protein kusabira-orange as a novel tool for preclinical studies on hepatocyte transplantation. *Transplantation Proceedings* 2013, 45:1808-1810.
- 31) Umeyama K, Honda K, Matsunari H, Nakano K, Hidaka T, Sekiguchi K, Mochizuki H, Takeuchi Y, Fujiwara T, Watanabe M, Nagaya M, Nagashima H. Production of diabetic offspring using cryopreserved epididymal sperm by in vitro fertilization and intrafallopian insemination techniques in transgenic pigs. *J Reprod Dev* 2013, 59(6): 599-603.
- 32) Matsunari H, Kobayashi T., Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas specific expression of green fluorescent protein. *J Reprod Dev* 2014, 60:230-237.
- 33) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant- negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. *PLoS One* 2014, DOI: 9:e92219. DOI: 10.1371/journal.pone. 0092219PONE-D-13-45932 [pii].
- 34) Watanabe M, Kobayashi M, Nagaya M, Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Hayashida G, Takayanagi S, Sakai R, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagashima H: Production of transgenic cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric Plum. *Journal of Reproduction and Development* 2015, 61:169-177.
- 35) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe K, Umeyama K, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Nagaya M, Hara M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas-specific expression of green fluorescent protein. *Journal of Reproduction and Development* 2014, 60(3):230-237.
- 36) Hoang D-T, Matsunari H, Nagaya M, Nagashima H, Millis JM, Witkowski P, Periwal V, Hara M, Jo J: A conserved rule for pancreatic islet organization. *PloS One* 2014, 9(10):e110384.
- 37) Sekijima M, Waki S, Sahara H, Tasaki M, Wilkinson RA, Villani V, Shimatsu Y, Nakano K, Matsunari H, Nagashima H, Fishman JA, Shimizu A, Yamada K: Results of life-supporting galactosyltransferase knockout kidneys in cynomolgus monkeys using two different sources of galactosyltransferase knockout Swine. *Transplantation* 2014, 98:419-426.

- 38) Miyagawa S, Maeda A, Kawamura T, Ueno T, Usui N, Kondo S, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Nagashima H: A comparison of the main structures of N-glycans of porcine islets with those from humans. *Glycobiology* 2014, 24:25-38.
- 39) Izuhara L, Tatsumi N, Miyagawa S, Iwai S, Watanabe M, Yamanaka S, Katsuoka Y, Nagashima H: Generation of a felinized Swine endothelial cell line by expression of feline decay-accelerating factor. *PLoS One* 2015, 10:e0117682.
- 40) Yokote S, Matsunari H, Iwai S, Yamanaka S, Uchikura A, Fujimoto E, Matsumoto K, Nagashima H, Kobayashi E, Yokoo T: Urine excretion strategy for stem cell-generated embryonic kidneys. *Proceedings of National Academy of Science USA* 2015, 112:12980-12985.
- 41) Miyagawa S, Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Umeyama K, Sakai R, Takayanagi S, Takeishi S, Fukuda T, Yashima S, Maeda A, Eguchi H, Okuyama H, Nagaya M, Nagashima H: Generation of alpha1,3-galactosyltransferase and cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase gene double-knockout pigs. *Journal of Reproduction and Development* 2015, 61(5):449-457.
- 42) Nagaya M, Arai Y, Matsunari H, Honda M, Nakano K, Maehara M, Sugimoto N, Kobayashi M, Sakai R, Asano Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagashima H: A new system to evaluate the influence of immunosuppressive drugs on pancreatic islets using epigenetics analysis in a 3-dimensional culture. *Pancreas* 2015, 44(5):778-785.

* 著書・総説・解説等

- 1) Nagashima H, Matsunari H, Umeyama K: Creation and conservation of genetically modified pigs: applications to genetic disease model and xenotransplantation. In: *The Minipig in Biomedical Research*. Edited by McAnulty PA, Dayan AD, Ganderup NC, Hastings KL: CRC Press, Boca Raton, FL, USA; 2011: 415-430.
- 2) Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Ikezawa Y, Kurome M, Kessler B, Wolf E, Miyagawa S, Nakauchi H, Nagashima H. Cloning of homozygous α 1,3-galactosyltransferase gene knock-out pigs by somatic cell nuclear transfer. In: *Xenotransplantation*. Edited by Miyagawa S: InTech, Rijeka, Croatia; 2012: 37-54.
- 3) Men H, Walters EM, Nagashima H, Prather RS: Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics. *Theriogenology* 2012, 78:1720-1729.
- 4) Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M: Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. *Reproduction in Domestic Animals* 2012, 47(suppl.4):120-126.
- 5) 長嶋比呂志: 哺乳動物胚および卵子の凍結保存. In: *繁殖生物学*. Edited by 日本繁殖生物学会: interzoo; 2013: 278-289.
- 6) 松成ひとみ, 長嶋比呂志: 動物個体内での臓器再生. In: *幹細胞研究と再生医療*. 南山堂; 2013: 130-135.
- 7) 内倉鮎子, 松成ひとみ, 前原美樹, 長嶋比呂志: 卵・組織・細胞シートのガラス化保存の現状と可

能性、再生医療 2014, 13, 48-51.

- 8) 長嶋比呂志, 松成ひとみ: 遺伝子改変ブタを利用してヒトに移植可能な臓器を作る研究: 異種再生臓器移植へのチャレンジ. 腎と透析2014, 77(6):881-887.
- 9) Kurome M, Kessler B, Wuensch A, Nagashima H, Wolf E: Nuclear transfer and transgenesis in the pig. In: Nuclear Reprogramming 2014, 1222:37-59.
- 10) 長嶋比呂志: トランスジェニック動物の作出. In: 哺乳動物の発生工学.2014, 94-102, 東京: 朝倉書店.
- 11) 原怜史, 梅山一大, 横尾隆, 長嶋比呂志, 長田道夫: 実験的糖尿病性腎症 (大動物) . 腎と透析 2015, 78(Suppl):124-130.

*特許

- 1) 相澤守、長嶋比呂志: リン酸カルシウム多孔体およびその製造方法. 2011 特願: 2011-062997
- 2) 長嶋比呂志, 前原美樹, 松成ひとみ, 佐藤正人, 玄丞然, 松村和明: 凍結細胞シートの製造方法. 2011 特願: 2011-260318.
- 3) 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 免疫抑制剤の評価方法、及び免疫抑制剤評価キット. 2014 特願2014-027655.
- 4) 横尾隆、小林英司、長嶋比呂志、松成ひとみ: 移植用臓器及び臓器構造体. 2014 特願 2014-257957
- 5) Aizawa M, Rikukawa M, Shigemitsu Y, Nagashima H: 生体適合性セラミックス/ポリマーハイブリッド及びリン酸カルシウム多孔体. 2014 米国特許 US 8,871,167.
- 6) 長嶋比呂志、松成ひとみ、内倉鮎子: 中空糸凍結保存用具及び細胞凍結保存方法.2015 特願 2015-003070.

*新聞発表

- 1) メディカルトリビューンVol.44: 2011, Jun 6. 「iPS細胞から機能的膵島形成に成功」
- 2) 京都新聞: 2013, Feb 19. 「東大・明治大チーム ブタの欠損胚に健全な細胞注入 膵臓”復活”正常に成長 移植臓器作製に道」
- 3) 産経新聞: 2013, Feb 19. 「東京大・明治大チーム ブタ体内で膵臓再生 移植用臓器作製へ前進」
- 4) 朝日新聞: 2013, Feb 19. 「東大・明大などのチーム ブタの体内で膵臓を作製 応用すれば・・・ヒトの臓器も作れる？」 電気新聞: 2013, Feb 27. “東大教授ら ブタ同士で臓器再生 糖尿病治療目指す”.
- 5) 東京新聞: 2013, Feb 19. 「東大・明大チーム ブタ体内で臓器を再生 移植用臓器 作製前進」
- 6) 読売新聞: 2013, Feb 19. 「東京大・明治大など ブタの膵臓を再生 ヒト応用には課題」
- 7) 日刊工業新聞: 2013, Feb 19. 「東大 明治大 別ブタ由来のすい臓 クローンブタで作製」
- 8) 日経産業新聞: 2013, Feb 19. 「東大と明大 ブタの膵臓再生 別個体の受精卵活用」
- 9) 日経新聞: 2013, Feb 19. 「東大と明大 ブタの膵臓再生に成功 移植用臓器作製に道」
- 10) 日経バイオテク (net) 2013.10.11.「科学技術振興機構、明治大学、自治医科大学、効率的な方法で、短期間に免疫のないブタを作ることに成功」
- 11) 時事通信社 (net) 2013.10.10.「免疫不全ブタ、半年で作成＝再生医療を促進-明大など」
- 12) 日経バイオテク (net) 2013.10.10.「明治大と自治医大、JST、mRNA を用いた ZFN と体細胞核移植

技術で免疫不全ブタを短期間で作出」

- 13) 読売新聞テレビ朝日 報道ステーション 2013.7.14.「軟骨細胞シートを使った変形性ひざ関節症の治療法」
- 14) 読売新聞テレビ朝日 報道ステーション 2013.7.14.「軟骨細胞シートを使った変形性ひざ関節症の治療法」
- 15) 時事通信社 (net) 2013.10.10.「免疫不全ブタ、半年で作成＝再生医療を促進-明大など」
- 16) 日経バイオテク (net) 2013.10.10.「明治大と自治医大、JST、mRNA を用いた ZFN と体細胞核移植技術で免疫不全ブタを短期間で作出」
- 17) 日経バイオテク (net) 2013.10.11.「科学技術振興機構、明治大学、自治医科大学、効率的な方法で、短期間に免疫のないブタを作ることに成功」
- 18) 日刊工業新聞: 2014, May 21. 「明治大など 臓器・骨格異常起こす遺伝病モデルブタ作製」
- 19) 日経産業新聞: 2014, May 23. 「明大など 手術法開発に道 骨が変形する難病 モデルのブタ作製」
- 20) 朝日新聞: 2014, Jun 2. 「「ゲノム編集」注目の的 ブタの体内でヒトの膵臓も？ 明治大・長嶋教授ら」
- 21) 化学工業日報: 2014, Jun 2. 「明治大学-慶應大学 FBN1遺伝子KOブタの開発に成功 ヒトのマルファン症候群と同じ病変発症」
- 22) 日経産業新聞: 2015, Jan 22. 「明治大- 慈恵医大 腎臓再生へ基礎技術」

* 学会発表

<海外>

- 1) Bahr A, Burck L, Wunsch A, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Seissler J, Klymiuk N, Wolf E: Establishment of LEA29Y transgenic donor pigs for xenotransplantation. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 2) Bahr A, Klymiuk N, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: Determination of transgene integration loci by inverse PCR for multi-transgenic pig breeding. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 3) Klymiuk N, Wunsch A, Wallner K, Burkhardt K, Kessler B, Kurome M, Nagashima H, Wolf E: Efficient targeting of genomic loci in the pig and production of knockout pigs by somatic cell nuclear transfer. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 4) Klymiuk N, W. B, T. R, Bahr A, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Herbach N, Nagashima H, Schwitzer R et al: Tet-controlled transgene expression in large animal models. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 5) Matsunari H, Yokoo T, Matsumoto K, Yokote S, Iwai S, Medin JA, Watanabe M, Umeyama K, Sato Y, Nakano K, Maehara M, Nagashima H, Kobayashi E: A challenge to developing humanized kidney using porcine renal anlagen as scaffold. In: Swine in Biomedical Research Conference 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 6) Umeyama K, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Takeuchi Y, Honda K, Yokoo T, Nagashima H: Development of genetically modified pigs suitable for diabetes and its complications research. In: Swine

in Biomedical Research Conference 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.

- 7) Renner S, Braun C, Klymiuk N, Blutke A, Herbach N, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Puk O, Nagashima H et al: Phenotypic characterization of diabetic INSC94Y transgenic pigs. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 8) Renner S, Klymiuk N, Streckel E, Braun C, Landbrecht-Schessl C, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Nagashima H, Aigner B et al: Transgenic pigs expressing the mutant insulin C93S for the study of pancreatic beta cell dysfunction. In: Swine in Biomedical Research 2011: 17-19 Jul 2011; Chicago, USA.
- 9) Kawano H, Ezoe K, Kagawa N, Yabuuchi A, Ochiai K, Nagashima H, Osada H, Aono F, Takehara Y, Kato O: hHg is critical for the uterine decidual response in mice. In: 16th World Congress on In Vitro Fertilization: 10-13 Sep 2011; Tokyo.
- 10) Honda K, Takeuchi Y, Matsuda T, Kanai T, Maehara M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Establishment of in vitro fertilization protocol using cryopreserved epididymal sperm for proliferation of genetically modified pigs. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 11) Maehara M, Honda K, Nakano K, Matsunari H, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H: In vitro-maturation/fertilization derived porcine morulae can give rise to efficient piglet production following vitrification by the hollow fiber vitrification(HFV)-method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 12) Matsunari H, Nakano K, Maehara M, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Nagashima H: Hollow fiber vitrification (HFV) method: a novel high performance embryo cryopreservation method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 13) Nakano K, Matsunari H, Maehara M, Takeuchi Y, Ogawa B, Matsuda T, Kanai T, Honda K, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Ohta A, Takahashi M, Nagashima H: High performance cryopreservation of porcine embryos by the hollow fiber vitrification(HFV)-method. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia.
- 14) Klymiuk N, Wuensch A, Kurome M, Kessler B, Baehr A, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: GalT-KO/CD46/hTM triple-transgenic donor animals for pig-to-baboon heart transplantation. In: Joint Congress CTS-IXA 2011: 23-26 Oct 2011; Miami, USA.
- 15) Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K: Prevention of hyper-acute pulmonary xenograft dysfunction using GalT-KO swine in an ex-vivo lung perfusion model. In: CTS-IXA 2011 Joint International Congress: 23-26 Oct 2011; Miami, USA.
- 16) Kurome M, **Zakhartchenko V**, **Kessler B**, **Güngör T**, **Richter A**, Klymiuk N, Nagashima H, **Wolf E**: Embryos produced by serial nuclear transfer can be improved by treatment with histone deacetylase inhibitors. In: 38th Annual Conference of International Embryo Transfer Society: 7-10 Jan 2012; Phoenix, USA.

- 17) Takeuchi H, Enomoto H, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y: Genetically engineered and systemically expressing Kusabira-Orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. In: 2012 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society: 4-7 Feb 2012; San Francisco, California, USA.
- 18) Takeuchi H, Enomoto H, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y: Genetically engineered and systemically expressing kusabira-orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. In: Orthopaedic Research Society: 4-7 Feb 2012; San Francisco, USA.
- 19) Matsunari H, Kobayashi T, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Shiota A, Enosawa S, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Transgenic pigs with pancreas and liver specific expression of fluorescent proteins. In: International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting: 13-16 Jun 2012; Yokohama, Japan.
- 20) Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Arai Y, Umeyama K, Fujishiro S, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Development of a feasible verification system for pluripotent stem cells using porcine Parthenogenetic embryos. In: International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting: 13-16 Jun 2012; Yokohama.
- 21) Fujishiro S, Nakano K, Mizukami Y, Azami T, Matsunari H, Arai Y, Ishino R, Nishimura T, Watanabe M, Furukawa Y, Umeyama K, Ema M, Nagashima H, Hanazono Y: Generation of naïve porcine induced pluripotent stem cells capable of contributing to embryonic and fetal development. In: International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting: 13-16 Jun 2012; Yokohama.
- 22) Wang D, Maeda A, Ueno T, Takama Y, Fukuzawa M, Matsumoto S, Okitsu T, Goto M, Kondo A, Nagashima H, Miyagawa S: Adult Pig Islets, Rich in the High-Mannose Form Compared with Humans, Were Slightly Up-Regulated, and Alpha-Linked GalNAc Was Reduced by Gal-Knockout. In: 24th International Congress of the Transplantation Society: 15-19 Jul 2012; Berlin, Germany.
- 23) Shigeta T, Hsu HC, Enosawa S, Matsuno N, Nakazawa A, Kasahara M, Uemoto S, Matsunari H, Umeyama K, Watanabe M, Nagashima H: Transgenic Pig Expressing Red Fluorescent Protein, Kusabila-Orange as a Novel Tool for Preclinical Research of Hepatocyte Transplantation. In: 24th International Congress of the Transplantation Society: 15-19 Jul 2012; Berlin, Germany.
- 24) Baehr A, Wuensch A, Burck L, Kurome M, Kessler B, Nagashima H, Seissler J, Klymiuk N, Wolf E: Beta-Cell Specific Expression of LEA29Y Prevents Cellular Rejection in Islet Xenotransplantation. In: 24th International Congress of the Transplantation Society: 15-19 Jul 2012; Berlin, Germany.
- 25) Sahara H, Nagashima H, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Matsunari H, Nakano K, Date H, Shimizu A, Yamada K: Attenuation of Hyperacute Dysfunction and Coagulopathy in GalT-KO Pulmonary Xenotransplantation In: 24th International Congress of the Transplantation Society: 15-19 Jul 2012; Berlin, Germany.
- 26) Renner S, Braun C, Blutke A, Herbach N, Wuensch A, Kessler B, Kurome M, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E: Phenotypic Characterization of Diabetic INSC94Y Transgenic Pigs. In: 24th International Congress of the Transplantation Society: 15-19 Jul 2012; Berlin, Germany.

- 27) Wuensch A, Klymiuk N, Kurome M, Kessler B, Baehr A, Nagashima H, Ayares D, Wolf E: Expression of Human Thrombomodulin on the Endothelium of Pig Xenograft Donors In: 24th International Congress of the Transplantation Society: 15-19 Jul 2012; Berlin, Germany.
- 28) Kanai T, Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Oota H, Takahashi M, Nagashima H: Hollow fiber vitrification(HFV) method enables cryopreservation of cryosensitive porcine embryos. In: 17th International Congress on Animal Reproduction: 29 Jul- 2 Aug 2012; Vancouver, Canada.
- 29) Kanai T, Matsunari H, Takeuchi Y, Honda K, Maehara M, Nakano K, Takayanagi S, Watanabe M, Umeyama K, Tada N, Onodera M, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Transmission and expression of a retrovirally introduced red fluorescent protein gene in successive generations of transgenic pigs. In: 17th International Congress on Animal Reproduction: 29 Jul- 2 Aug 2012; Vancouver, Canada.
- 30) Nakano K, Watanabe M, Matsunari H, Matsuda T, Honda K, Maehara M, Kanai T, Hayashida G, Kobayashi M, Umeyama K, Fujishiro S, Mizukami Y, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Production of chimeric porcine fetuses by aggregation method using parthenogenetic embryos. In: 39th Annual Conference of the IETS: 19-22 Jan 2013; Hannover, Germany.
- 31) Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y, Nagashima H: A hollow fiber vitrification method enables cryobanking of IVM/IVF-derived transgenic pig embryos. In: 39th Annual Conference of the IETS: 19-22 Jan 2013; Hannover, Germany.
- 32) Honda K, Takeuchi H, Matsuda T, Kanai T, Kuramoto M, Maehara M, Matsunari H, Nakano K, Umeyama K, Watanabe M, Nakauchi H, Nagashima H: Production of genetically modified pigs by artificial reproductive technologies using frozen epididymal sperm. In: 39th Annual Conference of the IETS: 19-22 Jan 2013; Hannover, Germany.
- 33) Hara S, Yokoo T, Umeyama K, Nagashima H, Nagata M: Pathological analysis of glomerular nodular lesion in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha. In: The International Society of Nephrology World Congress of Nephrology 2013: 31 May- 4 Jul 2013; Honk Kong.
- 34) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Evolution of glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor 1-alpha. In: KIDNEY WEEK 2013: 5-10 Oct 2013; Georgia, USA.
- 35) Waki S, Sahara H, Miura K, Kawai A, Sekijima M, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Tasaki M, Shimizu A, Nagashima H, Yamada K: Porcine CMV may be the causative agent of porcine kidney rejection in GalT-KO pig to nonhuman primate preclinical xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 36) Takeuchi H, Enomoto H, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H, Yoshikawa T, Okada Y, Toyama Y, Suda Y: Genetically engineered and systemically expressing kusabira-orange transgenic pigs as in vivo model to trace cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction. In: 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Society: 13-16 Oct 2013; Venice.
- 37) Nakano K, Matsunari H, Matsuda T, Kanai T, Hayashida G, Matsumura K, Kobayashi M, Kuramoto M,

- Asano Y, Sakai R, Uchikura A, Arai Y, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nagashima H: Application of blastocyst complementation to development of genetically modified pigs for xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 38) Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo generation of exogenic pancreas in apancreatic cloned pigs via blastocyst complementation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 39) Sahara H, Nagashima H, Miura K, Waki S, Kawai A, Nakano K, Matsunari H, Arai Y, Sekijima M, Tasaki M, Setoyama K, Shimizu A, Date H, Yamada K: Attenuation of hyperacute dysfunction and microangiopathy by the treatment of carbon monoxide in GalT-KO pulmonary xenotransplantation. In: 12th Congress of International Xenotransplantation Association (IXA): 10-13 Nov 2013; Osaka.
- 40) Uchikura A, Wakayama T, Wakayama S, Matsunari H, Maehara M, Matsumura Y, Nakano K, Sasaki E, Okahara J, Tsuchiya H, Nakauchi H, Nagashima H: Practical application of the hollow fiber vitrification method for cryopreservation of mammalian embryos. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
- 41) Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Matsuda T, Maehara M, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: In vivo exogenic organ generation with organogenesis-disabled cloned pigs as a platform. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
- 42) Kobayashi M, Watanabe M, Matsunari H, Nakano K, Kanai T, Hayashida G, Matsumura Y, Kuramoto M, Sakai R, Arai Y, Umeyama K, Watanabe N, Onodera M, Nagaya M, Nagashima H: Generation and characterization of transgenic-cloned pigs expressing the far-red fluorescent protein monomeric plum. In: 40th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 11-14 Jan 2014; Reno, USA.
- 43) Takeuchi H, Enomoto H, Matsunari H, Umeyama K, Nagashima H, Okada Y, Toyama Y: The analyses of collagen fascicle remodeling along with cell recruitment after anterior cruciate ligament reconstruction in Kusabira-Orange transgenic pigs. In: 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: 15-18 Mar 2014; New Orleans, USA.
- 44) Nakajima M, Ishimori A, Umeyama K, Nagashima H: Diabetic retinopathy in transgenic pigs with induced diabetes mellitus. In: The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2014 Annual Meeting: 4-8 May 2014; Florida, USA.
- 45) Hara S, Umeyama K, Yokoo T, Nagashima H, Nagata M: Diffuse glomerular nodular lesions in diabetic pigs carrying a dominant-negative mutant hepatocyte nuclear factor one-alpha, an inheritant diabetic gene in humans. In: The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology 2014: 14-17 May 2014; Tokyo.
- 46) Watanabe M, Nakano K, Matsunari H, Kobayashi M, Matsumura Y, Sakai R, Kuramoto M, Hayashida G, Asano Y, Uchikura A, Umeyama K, Nagaya M, Hanazono Y, Nagashima H: Generation of X-linked SCID pigs by genome editing and somatic cell cloning. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.
- 47) Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Hatae S, Nagashima H: Cryopreservation of porcine zona-free embryos and isolated blastomeres using the hollow fiber vitrification method. In: Swine in Biomedical Research

International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.

- 48) Umeyama K, Watanabe K, Watanabe M, Horiuchi K, Nakano K, Kimura T, Matsunari H, Nagaya M, Kosaki K, Saito M, Nagashima H, Matsumoto M: Production of fibrillin-1 gene knockout cloned pigs using zinc finger nucleases. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.
- 49) Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Kobayashi M, Umeyama K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Development of apancreatic pig by genome editing and its application in organ regeneration research. In: Swine in Biomedical Research International Conference 2014: 6-8 Jul 2014; Raleigh, USA.
- 50) Taguchi T, Ono Y, Takahashi Y, Nagano K, Tsujimoto S, Ouchi R, Kato K, Umeyama K, Nagashima H: In-Vivo Evaluation of Blood Flow Changes in Diabetic Pigs Using Diffuse Correlation Spectroscopy (DCS). In: 36th Annual International Conference IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: 26-30 Aug 2014; Chicago, USA.
- 51) Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Matsumura Y, Hatae S, Asano Y, Nagashima H: Hollow fiber vitrification of in vitro produced bovine embryos at early developmental stages. In: World Congress of Reproductive Biology 2014 2-4 Sep 2014; Edinburgh, UK.
- 52) Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Nakano K, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Transmission of lethal phenotype in a Mendelian fashion by genetically modified pigs that underwent blastocyst complementation. In: World Congress of Reproductive Biology 2014: 2-4 Sep 2014; Edinburgh, UK.
- 53) Walter MC, Klymiuk N, Blutke A, Graf A, Krause S, Wuensch A, Krebs S, Kessler B, Zakhartchenko V, Kurome M, Kemter E, Nagashima H, Schoser B, Herbach N, Blum H, Wanke R, Aartsma-Rus A, Lochmuller H, Wolf E: Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. In: 19th International Congress of The World Muscle Society: 9-10, Oct 2014; Berlin.
- 54) Kiminami K, Matsuoka K, Nagata K, Honda M, Hayashida G, Nakano K, Nagaya M, Arimura H, Nagashima H, Aizawa M: Development of bioresorbable calcium-phosphate cements hybridized with gelatin particles and their in vivo evaluation using pig's tibia model. In: 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics: 6-8 Nov 2014; Barcelona, Spain.
- 55) Matsunari H, Watanabe M, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Hatae S, Takeishi T, Umeyama K, Nagaya M, Miyagawa S, Hanazono Y, Nakauchi H, Nagashima H: Production efficiency of gene knockout pigs using genome editing and somatic cell cloning. In: 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 10-13 Jan 2015; Versailles, France.
- 56) Uchikura A, Matsunari H, Nakano K, Hatae S, Matsumura Y, Asano Y, Takeishi T, Nakauchi H, Nagashima H: Application of the hollow fiber vitrification method to the cryopreservation of highly cryosensitive embryos. In: 41th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society: 10-13 Jan 2015; Versailles, France.
- 57) Nagashima H, Uchikura A, Maehara M, Hatae S, Nakano K, Matsunari H: Direct comparison of the hollow-fiber vitrification and conventional vitrification methods. In: International Federation of Fertility Societies: 26-29 Apr 2015; Yokohama.

- 58) Matsunari H, Watanabe K, Nakano K, Uchikura A, Asano Y, Umeyama K, Yamaguchi T, Nagaya M, Nakauchi H, Nagashima H: Blastocyst complementation restore apancreatic phenotype of pdx1 pigs. In: International Society for Stem Cell Research 2015 Annual Meeting: 24-27 Jun 2015; Stockholm, Sweden.
- 59) Matsumoto M, Watanabe K, Horiuchi K, Umeyama K, Nagashima H: Generation of FBN1 gene knockout pig model for marfan syndrome. In: 22nd International Meeting on Advanced Spine Techniques: 8-11 Jul 2015; Kuala Lumpur, Maraysia.
- 60) Matsumoto M, Watanabe K, Horiuchi K, Umeyama K, Nagashima H: 【the Whitecloud Award for Best Basic Science Paper】 Generation of FBN1 gene knockout pig model for marfan syndrome. In: 22nd International Meeting on Advanced Spine Techniques: 8-11 Jul 2015; Kuala Lumpur, Maraysia.
- 61) Miyagawa S, Sakai R, Lo P, Matsuura R, Deguchi K, Nakahata K, Eguchi H, Maeda A, Okuyama H, Kitano E, Hatanaka M, Watanabe M, Nagashima H: Studies of pig complement: measurement of pig CH50, ACH50, and components. In: 14th Congress of the Asian Society of Transplantation: 23-26 Aug 2015; Singapore.
- 62) Matsumoto M, Watanabe K, Horiuchi K, Umeyama K, Nagashima H: Generation of FBN1 gene knockout pig model for Marfan syndrome. In: The Scoliosis Research Society 50th Annual Meeting & Course: 30-3 Sep-Oct 2015; Minneapolis, USA.

<国内>

- 1) 重光勇介, 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二極化した細孔構造を備えた β -リン酸三カルシウム多孔体のin vivo評価. In: 日本セラミックス協会2011年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.
- 2) 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. In: 日本セラミックス協会2011年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.
- 3) 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. In: 日本セラミックス協会2011年年会: 16-18 Mar 2011; 浜松.
- 4) 梅山一大, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 竹内靖浩, 本田香澄, 横尾隆, 長嶋比呂志: 糖尿病合併症研究に適した遺伝子改変ブタの開発. In: 第58回日本実験動物学会: 25-27 May 2011; 東京.
- 5) 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. In: 第122回無機マテリアル学会: 2-3 Jun 2011; 船橋.
- 6) 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. In: 第20回硬組織再生生物学会: 27 Aug 2011; 東京.
- 7) 天羽杏実, 橋本周, 右島理可, 山中昌哉, 中野和明, 長嶋比呂志, 高橋昌志, 笹山典久, 森本義晴: 中空糸膜デバイスを用いた凍結融解操作後の卵子回収率の検討. In: 第29回日本受精着床学会総会: 9-13 Sep 2011; 東京.
- 8) 前原美樹, 本田香澄, 中野和明, 松成ひとみ, 竹内靖浩, 金井貴博, 松田泰輔, 萩原由以, 笹山典

- 久, 白数昭雄, 高橋昌志, 渡邊將人, 梅山一大, 花園豊, 長嶋比呂志: 中空糸法でガラス化されたブタ体外成熟・受精桑実胚からの高効率産仔作出. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.
- 9) 中野和明, 松成ひとみ, 前原美樹, 竹内靖浩, 小川武甲, 松田泰輔, 金井貴博, 本田香澄, 萩原由以, 笹山典久, 白数昭雄, 太田久由, 高橋昌志, 長嶋比呂志: 中空糸法を用いてガラス化されたトウキョウX胚からの高効率産仔作出. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.
- 10) 本田香澄, 竹内靖浩, 松田泰輔, 金井貴博, 前原美樹, 松成ひとみ, 中野和明, 梅山一大, 渡邊將人, 中内啓光, 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタの凍結精子を用いた体外受精による産仔作出. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.
- 11) 松成ひとみ, 金井貴博, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 渡邊將人, 梅山一大, 中野和明, 池澤有加, 高柳就子, 中内啓光, 長嶋比呂志: シングルコピーの赤色蛍光蛋白Kusabira-Orange遺伝子を組み込んだトランスジェニックブタの系統確立. In: 第104回日本繁殖生物学会大会: 15-17 Sep 2011; 盛岡.
- 12) 梅山一大, 渡邊將人, 松成ひとみ, 中野和明, 藤原主, 日高龍路, 竹内靖浩, 本田香澄, 望月寛徳, 関口溪人, 長嶋比呂志: 糖尿病モデル・変異型ヒトHNF-1 α 遺伝子を導入したトランスジェニックブタの病態解析. In: 第25回日本糖尿病・肥満動物学会: 5 Nov 2011; 東京.
- 13) 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. In: 第33回日本バイオマテリアル学会大会: 21-22 Nov 2011; 京都.
- 14) 梅山一大, 渡邊將人, 松成ひとみ, 中野和明, 竹内靖浩, 本田香澄, 長田道夫, 横尾隆, 長嶋比呂志: 糖尿病発症遺伝子改変ブタによる結節性病変を有した腎病変の作出. In: 第23回日本糖尿病性腎症研究会: 3-4 Dec 2011; 東京.
- 15) 江副賢二, 河野博臣, 藪内晶子, 香川則子, 池澤有加, 中西彬, 青野文仁, 竹原祐志, 長嶋比呂志, 加藤修: 排卵誘発を目的としたhCG投与がマウスの子宮および着床後胚発生に与える影響. In: 第56回日本生殖医学会学術講演会総会: 8-9 Dec 2011; 横浜.
- 16) 王丹丹, 高間勇一, 上野豪久, 福沢正洋, 武石俊作, 宮川周士, 興津輝, 中野和明, 松成ひとみ, 長嶋比呂志: α Gal-knockoutブタ関連の膵島の糖鎖抗原の解析. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.
- 17) 岩井聡美, 田中友加, 寺岡義布史, 大段秀樹, 横尾隆, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 小林英司: ブタ胎仔後腎移植を用いたペット猫腎不全治療戦略-ネコにおける抗ブタ抗体の存在と対策. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.
- 18) 宮川周士, 王丹丹, 高間勇一, 上野豪久, 福沢正洋, 長嶋比呂志: 異種移植ブタ開発研究の流れ. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.
- 19) 松成ひとみ, 横尾隆, 松本啓, 横手伸也, 岩井聡美, Medin JA, 渡邊將人, 梅山一大, 佐藤有里, 中野和明, 前原美樹, 長嶋比呂志, 小林英司: 再生ヒト化腎臓作製に向けて—ブタ胎仔腎臓原基の発育と消去に関する新戦略. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.
- 20) 中野和明, 渡邊將人, 松成ひとみ, 松田泰輔, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 金井貴博, 新井良和, 梅山一大, 藤城修平, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: ブタ単為発生胚を用いた人工多能性幹

細胞のキメラ形成能検証システムの確立. In: 第34回日本分子生物学会大会: 13-16 Dec 2011; 横浜.

- 21) 竹内靖浩, 久保喜辰, 山本拓也, 本田香澄, 金井貴博, 松田泰輔, 梅山一大, 石川健次, 菅沼俊輔, 長嶋比呂志: 新規に開発した精子解析装置を用いたブタ精子凍結過程における運動性変化の解析. In: 第96回日本養豚学会大会: 22-23 Mar 2012; 東京.
- 22) 竹内靖浩, 山本拓也, 久保喜辰, 本田香澄, 金井貴博, 松田泰輔, 梅山一大, 石川健次, 菅沼俊輔, 長嶋比呂志: 新規開発した精子解析装置を用いたブタ精子運動性解析. In: 日本畜産学会第115回大会: 27-30 Mar 2012; 名古屋.
- 23) 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. In: 第85回日本整形外科学会学術総会: 17-20 May 2012; 京都.
- 24) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹: 遺伝子改変ブタ・クローンブタのトランスレーショナルリサーチへの応用. In: JALAM (日本実験動物医学会): 23 May 2012; 別府.
- 25) 梅山一大, 渡邊将人, 本田香澄, 竹内靖浩, 中野和明, 松成ひとみ, 横尾隆, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 糖尿病発症遺伝子改変ブタによるNonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)病変の作出. In: 第59回日本実験動物学会総会: 24-26 May 2012; 別府.
- 26) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司, 中内啓光: 臓器再生研究へのクローンブタの利用. In: 第55回日本腎臓学会学術総会: 1-3 Jun 2012; 横浜.
- 27) 前原美樹, 松成ひとみ, 金井貴博, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞然, 佐藤正人, 長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートの新規ガラス化保存法の開発. In: 第11回日本再生医療学会総会: 12-14 Jun 2012; 横浜.
- 28) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹: 再生医療研究のための大型動物モデルの開発. In: 第12回日本抗加齢医学会総会: 22-24 Jun 2012; 横浜.
- 29) 松成ひとみ, 金井貴博, 坂井理恵子, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 高柳就子, 小林俊寛, 山口智之, 塩田明, 長屋昌樹, 中内啓光, 長嶋比呂志: 膵・肝二色蛍光発現するトランスジェニックブタの開発. In: 第105回日本繁殖生物学会大会: 5-8 Sep 2012; つくば.
- 30) 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 松田泰輔, 本田香澄, 前原美樹, 竹内靖浩, 金井貴博, 新井良和, 梅山一大, 藤城修平, 水上義久, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: ブタ単為発生胚を用いた凝集キメラ作出法. In: 第105回日本繁殖生物学会大会: 5-8 Sep 2012; つくば.
- 31) 渡邊将人, 松成ひとみ, 小林美里奈, 中野和明, 前原美樹, 金井貴博, 松村幸奈, 林田豪太, 倉本桃子, 坂井理恵子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 遠赤色蛍光蛋白monomeric Plum を発現するトランスジェニックブタの作出. In: 第105回日本繁殖生物学会大会: 5-8 Sep 2012; つくば.
- 32) 宮川周士, 前田晃, 王丹丹, 上野豪久, 白井規朗, 興津輝, 後藤昌史, 松本慎一, 長嶋比呂志: 膵島の糖鎖構造についての検討. In: 第15回日本異種移植研究会: 8 Dec 2012; 京都.
- 33) 渚 佐, 笹山典久, 白数昭雄, 太田久由, 長嶋比呂志, 川原学, 高橋昌志: 中空糸によるマウス胚盤胞期胚のガラス化凍結保存. In: 北海道畜産草地学会第1回大会: 15-16 Dec 2012; 北海道.
- 34) 原怜史, 横尾隆, 梅山一大, 長嶋比呂志, 長田道夫: Dominant-negative変異型hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF1 α)導入糖尿病ブタにおける糸球体結節性病変の解析. In: 第56回日本腎臓学会学術総会:

10-12 May 2013; 東京.

- 35) 新井良和, 大鐘潤, 藤城修平, 中野和明, 塩田邦郎, 花園豊, 長嶋比呂志: 実物としてのマウス多能性幹細胞DNAメチル化プロフィ 長嶋比呂志: クローン動物の医学・医療への利用. In: 第5回産学連携情報交換会(農林水産省主催) : 18 Jun 2013; 東京.
- 25) ールに基づく幹細胞評価: ブタiPS細胞を例として. In: 第7回日本エピジェネティクス研究会年会: 30-31 May 2013; 奈良.
- 26) 相澤守, 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: ケイ素含有アパタイトによる高い骨伝導性を備えたキレート硬化型セメントの創製とその硬組織に対する生体内反応. In: 第26回日本セラミックス協会秋季シンポジウム: 4-6 Sep 2013; 長野.
- 27) 水本みのり, 小西敏功, 本田みちよ, 木南啓司, 有村英俊, 新井良和, 中野和明, 長屋昌樹, 長嶋比呂志, 相澤守: キレート硬化型アパタイトセメントの材料特性および生体適合性に及ぼす α -リン酸三カルシウム粒子添加の影響. In: 第26回日本セラミックス協会秋季シンポジウム: 4-6 Sep 2013; 長野.
- 28) 内倉鮎子, 松成ひとみ, 松村幸奈, 中野和明, 浅野吉則, 前原美樹, 若山清香, 若山照彦, 長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-1: 融解速度の胚生存性への影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 29) 牧野智宏, 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 新井良和, 松本守雄, 長嶋比呂志, 大鐘潤: ブタにおけるFbn1遺伝子のエピジェネティック制御解析. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 30) 東大, 内田奈緒美, 坂本望, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 骨格筋分化抑制遺伝子MstnのDNAメチル化による発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 31) 内田奈緒美, 東大, 坂本望, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 脂肪細胞分化に関わる遺伝子の発現制御. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 32) 坂本望, 東大, 内田奈緒美, 牧野智宏, 新井良和, 長嶋比呂志, 大鐘潤: ブタHnf1a, Hnf4aの肝臓特異的発現にはDNAメチル化とアンチセンス非コードRNAが関与する. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 33) 林田豪太, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎子, 前原美樹, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブFucci を発現するブタ体細胞核移植胚の作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 34) 浅野吉則, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 中野和明, 林田豪太, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 金井貴博, 松田泰輔, 新井良和, 渡邊将人, 長嶋比呂志: DNAメチル化阻害剤およびヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がブタ体細胞核移植胚の発生能に及ぼす影響. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 35) 松村幸奈, 前原美樹, 本田香澄, 林田豪太, 倉本桃子, 中野和明, 松成ひとみ, 小林美里奈, 内倉鮎子, 浅野吉則, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ガラス化保存された体外成熟/体外受精胚を用いた糖尿病モデル遺伝子改変ブタの作出. In: 第106回日本繁殖生物学会大会: 11-14 Sep 2013; 東京.
- 36) 坂井理恵子, 中野和明, 松成ひとみ, 新井良和, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 宮川周士, 長嶋比呂志: 遺伝子改変クローンブタ開発における人工生殖技術を利用した遺伝的バックグラウンドの更新.

- In: 第16回日本異種移植研究会: 10 Nov 2013; 大阪.
- 37) 坂井理恵子, 中野和明, 松成ひとみ, 新井良和, 渡邊將人, 梅山一大, 佐原寿史, 山田和彦, 長屋昌樹, 宮川周士, 長嶋比呂志: 異種移植研究における遺伝子改変ブタの作出への人工生殖技術の利用. In: 第1回日本先進医工学ブタ研究会: 12 Nov 2013; 大阪.
- 38) 内倉鮎子, 松村幸奈, 中野和明, 浅野吉則, 長嶋比呂志: 中空糸法によるマウス胚およびブタ胚のガラス化保存. In: 第58回日本生殖医学会学術講演会・総会: 15-16 Nov 2013; 神戸.
- 39) 松田泰輔, 渡邊將人, 中野和明, 松成ひとみ, 小林美里奈, 林田豪太, 倉本桃子, 金井貴博, 山口智之, 中内啓光, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ブタ卵におけるmRNA injection法を用いたZinc Finger Nucleasesによる遺伝子ノックアウト. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 40) Arai Y, Ohgane J, Fujishiro S, Nakano K, Matsunari H, Watanabe M, Umeyama K, Azuma D, Uchida N, Sakamoto N, Makino T, Yagi S, Shiota K, Hanazono Y, Nagashima H: Evaluation of porcine induced pluripotent stem cells based on the DNA methylation profile of mouse embryonic stem cell-specific hypomethylated loci. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 41) 渡邊將人, 中野和明, 松成ひとみ, 松田泰輔, 金井貴博, 小林美里奈, 松村幸奈, 坂井理恵子, 倉本桃子, 林田豪太, 浅野吉則, 高柳就子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 豊花, 長嶋比呂志: Zinc finger nuclease発現mRNAによるIL2RG遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第36回日本分子生物学会: 3-6 Dec 2013; 神戸.
- 42) 松成ひとみ, 浅野吉則, 小林美里奈, 内倉鮎子, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 中内啓光, 長嶋比呂志: 膵臓欠損ブタ胎仔を用いた外来性細胞由来膵臓形成の試み. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
- 43) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 松村幸奈, 坂井理恵子, 小久保舞美, 松村和明, 玄丞侏, 長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートのガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-1. In: 第13回日本再生医療学会総会: 4-6 Mar 2014; 京都.
- 44) 梅山一大, 渡辺航太, 渡邊將人, 堀内圭輔, 中野和明, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 小崎健次郎, 齋藤正寛, 長嶋比呂志, 松本守雄: Zinc finger nucleaseによるfibrillin 1遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第61回日本実験動物学会総会: 15-17 May 2014; 札幌.
- 45) 本田みちよ, 中村まり子, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 相澤守: アパタイトファイバースキャフォールドにおけるクサビラオレンジブタ由来間葉系幹細胞の骨分化. In: 第128回学術講演会: 5-6 Jun 2014; 東京.
- 46) 中野和明, 渡邊將人, 松成ひとみ, 小林美里奈, 松村幸奈, 坂井理恵子, 倉本桃子, 林田豪太, 浅野吉則, 内倉鮎子, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: ゲノム編集と体細胞クローニングによる免疫不全ブタの作出. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 47) 松成ひとみ, 渡邊將人, 中野和明, 内倉鮎子, 浅野吉則, 小林美里奈, 梅山一大, 中内啓光, 長嶋比呂志: ゲノム編集による膵臓欠損ブタの作出と臓器再生研究への応用. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 48) 武石透輝, 中野和明, 松成ひとみ, 林田豪太, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 大海原雅人, 渡邊將人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 全身性にクサビラオレンジを発現するミニブタ交雑種の開発. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.

- 49) 松村幸奈, 畑江将太, 内倉鮎子, 中野和明, 松成ひとみ, 前原美樹, 武石透輝, 鞍本友香, 長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-2: 非浸透性凍害保護剤の検討. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 50) 内倉鮎子, 中野和明, 松成ひとみ, 畑江将太, 松村幸奈, 浅野吉則, 長嶋比呂志: 中空糸法によるブタ透明除去胚および分離割球のガラス化保存. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 51) 倉本桃子, 小林美里奈, 林田豪太, 松村幸奈, 松成ひとみ, 中野和明, 鞍本友香, 一山琴世, 浅野吉則, 内倉鮎子, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 糖尿病発症トランスジェニックブタ凍結精子の体外受精能の評価. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 52) 小林美里奈, 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 林田豪太, 坂井理恵子, 松村幸奈, 倉本桃子, 梅山一大, 渡辺信之, 小野寺雅史, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: 遠赤色蛍光タンパク monomeric Plum を全身発現するトランスジェニック・クローンブタの作出. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 53) 渡邊将人, 林田豪太, 松成ひとみ, 中野和明, 小林美里奈, 松村幸奈, 倉本桃子, 坂井理恵子, 浅野吉則, 内倉鮎子, 新井良和, 梅山一大, 長屋昌樹, 阪上 - 沢野朝子, 宮脇敦史, 長嶋比呂志: 細胞周期可視化蛍光プローブFucci導入トランスジェニック・クローンブタの作出. In: 第107回日本繁殖生物学会大会: 21-24 Aug 2014; 帯広.
- 54) 沢田知也, 永田幸平, 本田みちよ, 長屋昌樹, 林田豪太, 中野和明, 木南啓司, 有村英俊, 長嶋比呂志, 相澤守: 気孔形成剤を添加した生体吸収性 α -リン酸三カルシウムセメントの材料特性とその生物学的評価. In: 日本セラミックス協会第27回秋季シンポジウム: 9-11 Sep 2014; 鹿児島.
- 55) 永田幸平, 本田みちよ, 小西敏功, 林田豪太, 長屋昌樹, 長嶋比呂志, 相澤守: 非崩壊性を担保したキレート硬化型 β -リン酸三カルシウムセメントの in vivo評価. In: 日本セラミックス協会第27回秋季シンポジウム: 9-11 Sep 2014; 鹿児島.
- 56) 横田倫啓, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 守 相: 骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とそのin vivo評価. In: 第24回無機リン化学討論会: 25-26 Sep 2014.
- 57) 谷良樹, 佐藤正人, 長嶋比呂志, 前原美樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田讓治: 同種移植を目指したガラス化凍結保存細胞シートを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. In: 第29回日本整形外科学会基礎学術集会: 10 Oct 2014; 鹿児島.
- 58) 松本守雄, 渡辺航太, 堀内圭輔, 戸山芳昭, 梅山一大, 渡邊将人, 中野和明, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 小崎健次郎, 齋藤正寛, 長嶋比呂志: Zinc finger nucleaseによるfibrillin 1遺伝子ノックアウトブタの作出 -Marfan症候群モデルの開発をめざして-. In: 第48回日本側弯症学会: 30-1 Oct-Nov 2014; 盛岡.
- 59) 横田倫啓, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 守 相: 骨ミネラル含有アパタイト粉体からの多孔質セラミックスの作製とそのin vivo評価. In: 第36回日本バイオマテリアル学会: 17-18 Nov 2014; 東京.
- 60) 沢田知也, 永田幸平, 本田みちよ, 長屋昌樹, 林田豪太, 中野和明, 木南啓司, 有村英俊, 長嶋比呂志, 相澤守: 気孔形成剤を添加した生体吸収性 α -リン酸三カルシウムセメントのin vivo評価. In: 第36回日本バイオマテリアル学会: 17-18 Nov 2014; 東京.

- 61) 伊藤賢人, 鷹本拓也, 長田直生, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 織部一弥, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤守: 多孔質リン酸カルシウムセラミックスの筋および脂肪組織埋入による骨誘導能の検証. In: 第36回日本バイオマテリアル学会: 17-18 Nov 2014; 東京.
- 62) 乾鷹羽, 木下友花里, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤守: 高度化ケイ素含有アパタイトファイバースキャフォールドの骨誘導能と骨伝導能の検証. In: 第36回日本バイオマテリアル学会: 17-18 Nov 2014; 東京.
- 63) 小林慧太, 中島佑亮, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 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大型動物を用いたin vivo評価. In: 第36回日本バイオマテリアル学会: 17-18 Nov 2014; 東京.
- 64) 乾鷹羽, 木下友花里, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 長嶋比呂志, 相澤守: ケイ素含有アパタイトファイバーによる高度強化スキャフォールドの作製とその骨形成能. In: 第129回無機マテリアル学会: 20-21 Nov 2014; 佐賀.
- 65) 伊藤賢人, 鷹本拓也, 長田直生, 林田豪太, 中野和明, 長屋昌樹, 本田みちよ, 織部一弥, 長嶋比呂志, 守相: 二極化した気孔構造を備えた水酸アパタイトおよび β -リン酸三カルシウムセラミックスの生体内反応. In: 第129回無機マテリアル学会: 20-21 Nov 2014; 佐賀.
- 66) 松成ひとみ, 渡邊将人, 中野和明, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 福田暢, 八島紗耶香, 梅山一大, 高柳就子, 坂井理恵子, 前田晃, 江口寛, 奥山宏臣, 宮川周二, 長嶋比呂志: α -ガラクトシル抗原及びH-D抗原を発現しない遺伝子ノックアウトブタの作出. In: 第17回日本異種移植研究会: 14 Mar 2015; 栃木.
- 67) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 高草木大地, 松村和明, 玄丞杰, 長嶋比呂志: ウサギ軟骨細胞シートガラス化保存法の開発: 実用化に向けた改良研究-2. In: 第14回日本再生医療学会総会: 19-21 Mar 2015; 横浜.
- 68) 梅山一大, 渡辺航太, 渡邊将人, 堀内圭輔, 中野和明, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 松本守雄, 長嶋比呂志: Zinc finger nucleaseによるfibrillin 1遺伝子ヘテロノックアウトクローンブタの作出. In: 第47回日本結合組織学会学術大会: 15-16 May 2015; 東京.
- 69) 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 梅山一大, 長屋昌樹, 宮川周士, 花園豊, 中内啓光, 長嶋比呂志: ゲノム編集を用いた遺伝子ノックアウトクローンブタの作出効率. In: 第28回日本動物細胞工学会2015年度大会: 9-10 Jul 2015; 仙台.
- 70) 梅木育磨, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 畑江将太, 浅野吉則, 笠井悠里, 八島紗耶香, 高柳就子, 松成ひとみ, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ブタ初期胚の遺伝子型判定に関する研究. In: 第108回日本繁殖生物学会大会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 71) 内倉鮎子, 中野和明, 松成ひとみ, 畑江将太, 浅野吉則, 八島紗耶香, 長嶋比呂志: 中空糸ガラス化法の実用化に関する研究-3: 従来法との比較並びに長期保管法の検討. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 72) 浅野吉則, 饒聖分, 松成ひとみ, 中野和明, 内倉鮎子, 武石透輝, 畑江将太, 高柳就子, 渡邊将人, 梅山一大, 藤村達也, 長嶋比呂志: Myostatin遺伝子をノックアウトしたブタクローン胚の発生能. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 73) 新井良和, 阿閉貴紀, 福川斐昭, 斎藤経, 竹内健太, 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 体細胞連続核

- 移植で作出されたクローンブタでのエピジェネティック解析：Human BeadChipを用いたゲノムワイドDNAメチル化解析の試み. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 74) 齊藤経, 新井良和, 阿閉貴紀, 竹内健太, 長嶋比呂志, 大鐘潤: 次世代シーケンサーによるブタ精巢でのウルトラディープDNAメチル化解析. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 75) 八島紗耶香, 中野和明, 浅野吉則, 笠井悠里, 勝俣佑紀, 福田暢, 高草木大地, 梅木育磨, 武石透輝, 畑江将太, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 胚盤胞補完によって救済されたIL2RG遺伝子ノックアウトキメラブタは正常な繁殖能力を有する. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 76) 畑江将太, 中野和明, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 長嶋比呂志: ブタにおけるキメラ胚の発達動態. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 77) 松成ひとみ, 渡邊将人, 中野和明, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 武石透輝, 福田暢, 八島紗耶香, 梅山一大, 長屋昌樹, 絵野沢伸, 梅澤あきひろ, 長嶋比呂志: 遺伝子改変疾患モデルブタの開発における胚盤胞補完法の意義: 新生仔致死性形質の救済と有性生殖への橋渡し. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 78) 中野和明, 渡邊将人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 浅野吉則, 武石透輝, 畑江将太, 高草木大地, 梅木育磨, 福田暢, 八島紗耶香, 勝俣佑紀, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: 胚盤胞補完法はIL2RG遺伝子ノックアウト免疫不全ブタの免疫細胞を救済する. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 79) 10. 武石透輝, 中野和明, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 福田暢, 八島紗耶香, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: クサビラオレンジを全身性に発現するミニブタ系統の開発. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 80) 勝俣佑紀, 中野和明, 浅野吉則, 内倉鮎子, 畑江将太, 武石透輝, 八島紗耶香, 福田暢, 梅木育磨, 笠井悠里, 松成ひとみ, 長嶋比呂志: ブタ体外生産胚の発生能評価: EmbryoScopeによる解析. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 81) 福田暢, 中野和明, 浅野吉則, 武石透輝, 畑江将太, 内倉鮎子, 梅木育磨, 笠井悠里, 勝俣佑紀, 八島紗耶香, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹, 花園豊, 長嶋比呂志: Gamete Intra Fallopian Transfer(GIFT)法による糖尿病発症ミニブタの作出. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 82) 笠井悠里, 梅山一大, 渡邊将人, 中野和明, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 武石透輝, 畑江将太, 浅野吉則, 長屋昌樹, 渡辺航太, 堀内圭輔, 松本守雄, 長嶋比呂志: Fibrillin-1遺伝子ノックアウトによるMarfan症候群モデルブタの開発. In: 第108回日本繁殖生物学会: 17-20 Sep 2015; 宮崎.
- 83) 内倉鮎子, 中野和明, 松成ひとみ, 畑江将太, 長嶋比呂志: 中空系ガラス化法の性能の従来法との直接比較. In: 第18回日本IVF学会学術集会: 26-27 Sep 2015; 福岡.
- 84) 渡辺航太, 堀内圭輔, 梅山一大, 長嶋比呂志, 中村雅也, 松本守雄: Zinc finger nucleaseによるfibrillin 1遺伝子ノックアウトブタの作出-側弯症モデルの開発をめざして-. In: 第30回日本整形外科学会基礎学術集会: 22-23 Oct 2015; 富山.
- 85) 前原美樹, 佐藤正人, 松成ひとみ, 内倉鮎子, 勝俣佑紀, 松村和明, 玄丞然, 持田壤治, 長嶋比呂志:

ウサギ軟骨細胞シートの長期ガラス化保存法の開発. In: 第30回日本整形外科学会基礎学術集会: 22-23 Oct 2015; 富山.

- 86) 絵野沢伸, 崔昌浩, 松成ひとみ, 長嶋比呂志: 凍結保存肝細胞の機能維持および移植後生着に対する天然フラボノールmyricetinの効果. In: 第42回日本臓器保存生物医学会学術集会: 13-14 Nov 2015; 盛岡.
- 87) 渡邊将人, 松成ひとみ, 中野和明, 梅山一大, 長屋昌樹, 宮川周士, 花園豊, 中内啓光, 長嶋比呂志: 人工ヌクレアーゼを用いた遺伝子ノックアウト細胞の樹立およびブタの作出効率. In: 第38回日本分子生物学会: 1-4 Dec 2015; 神戸.

*招待講演

<海外招待>

- 1) Nagashima H: The interface between reproductive biology and regenerative medicine. In: World Congress on Reproductive Biology (Second Scientific Meeting): 9-12 Oct 2011; Cairns, Australia; 2011.
- 2) Nagashima H, Matsunari H, Nakano K, Watanabe M, Umeyama K, Nagaya M: Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. In: 17th International Congress on Animal Reproduction: 29-2 Jul-Aug 2012; Vancouver, Canada.
- 3) Nagashima H: Tg pigs- recent progress: Multiple Tg+GalTKO. In: Joint IXA/JEXSPINE Plenary Session: 13 Nov 2013; Osaka.
- 4) Nagashima H: Challenge to organ regeneration by using organogenesis-disabled pig as the platform. In: Swine in Biomedical Research Conference: 6-8 Jun 2014; North Carolina, USA.
- 5) Nagashima H: Organ regeneration and transplantation research using genetically modified pigs : current status and issues. In: 2014 Uehiro-Carnegie-Oxford Ethics Conference: 28-29 Aug 2014; Kyoto, Japan.
- 6) Nagashima H: Challenge to in-vivo organ regeneration using organogenesis-disabled pig as a platform. In: REBIRTH-Special Lecture: 15 Jan 2015; Hannover, Germany.
- 7)

<国内招待>

- 1) 長嶋比呂志: 異種移植研究の過去・現在・未来 : ブタ発生工学の視点から. In: 第14回日本異種移植研究会: 10 Dec 2011; 広島.
- 2) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹: トランスレーショナルリサーチモデルとしての遺伝子改変ブタ・クローンブタの最前線. In: 先進医用ブタの開発と前臨床研究拠点形成プロジェクト第2回公開シンポジウム : ブタの医用動物への展開: 22 Mar 2012; 鹿児島.
- 3) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 岩井聡美, 小林英司, 中内啓光: 臓器再生研究へのクローンブタの利用. In: 第55回日本腎臓学会: 1-3 Jun 2012; 横浜.
- 4) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 横尾隆, 松本啓, 横手伸也, 岩井聡美, J.A.Medin, 渡邊将人, 梅山一大, 中野和明, 金井貴博, 小林英司: Y a m a t o n K - 2 計画: 完全ヒト化腎臓作製に向けて. In: 自治医大ビッグシンポジウム: 11 Jun 2012; 東京.
- 5) 長嶋比呂志, 松成ひとみ, 中野和明, 渡邊将人, 梅山一大, 長屋昌樹: 再生医療研究のための大型動

物モデルの開発. In: 第12回日本抗加齢医学会総会: 22-24 Jun 2012; 横浜.

- 6) 長嶋比呂志: クローンブタ・遺伝子改変ブタのトランスレショナルリサーチへの利用. In: 第1回川島腎カンファレンス: 10-11 Nov 2012; 岐阜.
- 7) 長嶋比呂志: 再生医学における凍結保存の役割: ブタ胎仔臓器原基のガラス化保存について. In: 第39回日本低温医学会総会: 21-22 Nov 2012; 東京.
- 8) 長嶋比呂志: クローンブタを用いた臓器移植・再生研究の現状と将来展望. In: 第28回福島移植フォーラム: 27 Jul 2013; 福島.
- 9) 長嶋比呂志: 生殖工学技術が拓く未来の動物生産. In: 第106回日本繁殖生物学会市民公開講座: 14 Sep 2013; 東京.
- 10) 長嶋比呂志: クローンブタをプラットフォームとするトランスレショナルリサーチ. In: 東京医科歯科大学大学院特別講義: 11 Oct 2013; 東京.
- 11) 長嶋比呂志: トランスレショナルリサーチにおけるクローンブタ・遺伝子改変ブタの可能性. In: 第5回愛宕Nephrology Forum: 26 Nov 2013; 東京.
- 12) 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クローンブタによるトランスレショナルリサーチの展開. In: 第4回東海大学テニユアトラック制度シンポジウム: 14 Dec 2013; 伊勢原.
- 13) 長嶋比呂志: 腎臓の再生医療を考える: ブタの体内nicheを利用した臓器再生戦略. In: 第59回日本透析医学会学術集会・総会: 12-15 Jun 2014; 神戸.
- 14) 長嶋比呂志: iPS技術を用いたヒト膵臓のブタでの作成について. In: 千駄木内分泌懇話会: 3 Jul 2014; 東京.
- 15) 長嶋比呂志: 受精卵凍結に学ぶ細胞・組織の凍結保存. In: 第113回医工学フォーラム: 4 Aug 2014; 京都.
- 16) 長嶋比呂志: 臓器再生・移植研究への遺伝子改変ブタの利用. In: 第17回麻布大学生殖・発生工学セミナー: 20 Sep 2014; 神奈川.
- 17) 長嶋比呂志: 受精卵凍結保存のノウハウは組織・臓器の保存にどこまで応用可能か?. In: 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会: 28-29 Nov 2014; 大阪.
- 18) 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 中内啓光: 胚盤胞補完法によるブタ体内での移植用臓器作成. In: 第41回日本臓器保存生物医学会学術集会: 28-29 Nov 2014; 大阪.
- 19) 松成ひとみ, 長嶋比呂志, 中内啓光: ブタの胚盤胞補完による臓器再生研究の現状. In: 第3回実験動物科学シンポジウム: 12 Dec 2014; 山形.
- 20) 長嶋比呂志: ゲノム編集技術を用いた遺伝子改変ブタの作製. In: 第3回実験動物科学シンポジウム: 12 Dec 2014; 山形.
- 21) 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: SKIP Symposium 2014: 22 Dec 2014; 東京.
- 22) 長嶋比呂志: ブタのゲノム編集と疾患モデル開発への応用. In: MUIIBRシンポジウム2015: 13 Mar 2015; 東京.
- 23) 長嶋比呂志: ヒト幹細胞研究のプラットフォームとしての遺伝子改変ブタ. In: 第14回日本再生医療学会総会: 19-21 Mar 2015; 横浜.
- 24) 長嶋比呂志: 難治性疾患研究に役立つ動物モデルの開発. In: 明治大学・京都大学iPS細胞研究所共催

シンポジウム「iPS細胞と医農工連携：あたらしい医療を考える」：26 Jul 2015; 東京.

- 25) 長嶋比呂志: ブタの発生工学の進展と医学研究との接点. In: 科研費新学術領域研究「動物における配偶子産生システムの制御」：2-4 Sep 2015; 東京.
- 26) 長嶋比呂志: 遺伝子改変ブタ・クローンブタを利用した再生・移植医療の進展. In: バイオマイクロナノテク研究会: 31 Aug 2015; 東京.
- 27) 長嶋比呂志: ブタをプラットフォームとした異種再生臓器移植の展開と周辺技術. In: 再生医療サポートビジネス懇話会: 23 Oct 2015; 京都.
- 28) 長嶋比呂志: Generation of genetically modified pigs by genome editing. In: 第38回日本分子生物学会: 1-4 Dec 2015; 神戸.
- 29) 長嶋比呂志: 発生工学による臓器創製の最先端と今後の展望. In: 第14期バイオフィナンスギルド第5回セミナー「次世代再生医療、臓器創製の夢と現実」:11 Dec 2015; 東京.

プリオンペプチドの選択的金属結合とその生理的機能

平岡和佳子

明治大学理工学部物理学科

Competitive binding of metal ions to the octarepeat peptide of prion protein and its biological functions

Wakako HIRAOKA

Department of Physics, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

生体内には数種類の微量な金属元素が存在しており、呼吸や電子伝達など生命の根幹を担う反応に用いられている。中でも遷移金属イオンはアミノ酸、タンパク質と結びついて酸素の運搬や酵素反応の活性中心などを形成している。また、これらの遷移金属は特定のタンパク質と結合することで、変性を引き起こす場合が知られている。アルツハイマー病、パーキンソン病に代表される神経変性疾患は脳内にタンパク質が異常凝集することで引き起こされると考えられており、中でも、プリオン病の原因であるプリオンタンパク質(Prion Protein: PrP)はオクタリピート領域や神経毒性領域に銅イオンと特異的に結合するサイトが存在することが知られている。そこで、本研究では金属とタンパク質の相互作用のメカニズムの解明とその応用と、さらには金属-ペプチド *in vitro* 系反応を生理機能発現系としてその応用を目的とし、円偏光二色性(Circular Dichroism: CD)測定法や電子スピン共鳴(Electron Spin Resonance: ESR)法を用いて、PrP の銅結合領域ペプチドの金属結合選択性や錯体構造の解明、酸化ストレスに関連した酵素様機能の発現性の解明を試みたので報告する。

2. 実験方法

1) ペプチド試料の選択と調整

本研究では、PrP r (Fig.1) のオクタリピート領域の 8 個のアミノ酸配列からなるペプチド(octapeptide)と、神経毒性領域の Cu^{2+} との結合部位を持つペプチド(PrP93-102)と、この PrP93-102 のアミノ酸配列 93 番、94 番のグリシン(G)をアラニン(A)に置換したペプチド(PrP93-102; 93,94 GG/AA)の 3 種類のペプチドを試料として使用した (Fig.2)。実験で扱ったペプチドはライフテクノロジーズジャパン(旧 invitogen japan)に合成を委託した。純度は全て $> 80\%$ 、N 末端と C 末端はそれぞれアミド化、アセチル化を行った。ペプチドは濃度が 10 mM になるよう超純水に溶かし、 $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。ペプチドの配列を以下に示す。

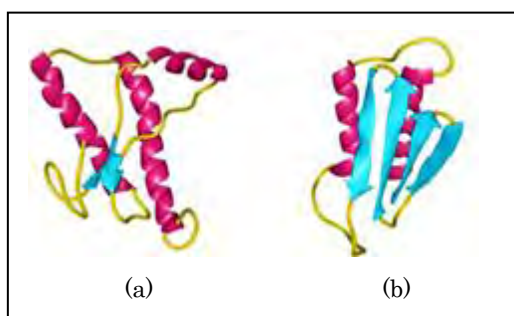


Fig. 1 プリオンタンパク質の正常構造(a)と異常構造(b)のモデル PNAS, 96, (1999), 2042-2047

octapeptide : Ac-PHGGGWGQ-NH₂
 PrP93-102 : Ac-GGTHSQWNKP-NH₂
 PrP93-102; 93,94 GG/AA: Ac-AATHSQWNKP-NH₂

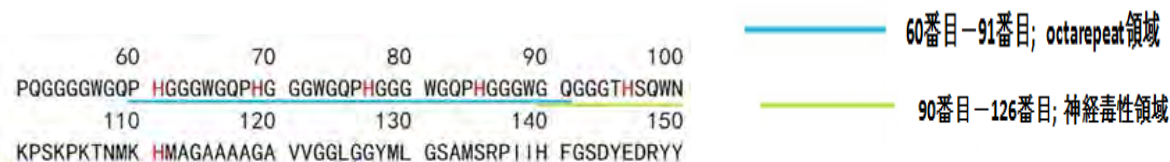


Fig. 2 octarepeat 領域と神経毒性領域のアミノ酸配

2) 試料の調整等

金属試料は CuSO₄ · 5H₂O、NiSO₄ · 6H₂O、CoCl₂ · 6H₂O、ZnSO₄ · 7H₂O、MnSO₄ · 5H₂O をそれぞれ超純水で 0.5 M に溶解し、各実験に適した濃度になるよう希釈して使用した。試料の希釈には、緩衝溶液として HEPES (10 mM ~ 100 mM) を使用し、pH の調整には 1N HCl、1N NaOH を用いた。

3. 結果と考察

1) octapeptide 金属溶液の CD スペクトルの解析

Fig. 3 に 0.8 mM octapeptide, 0.8 mM 金属イオン (Cu²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺) / 14 mM HEPES pH 7.5 に調整した試料の CD スペクトルを示した。octapeptide + Cu において 600 nm と 350 nm 付近で正の偏光吸収のピークをもつ CD スペクトルが得られた。このことから、octapeptide と Cu²⁺ は pH 7.5 において錯体を形成していることが明らかになった。この吸収のピークは結晶場理論より d-d 遷移によるものと考えられる。一方、octapeptide と Ni²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ については金属錯体を形成したことを示す特徴的なスペクトルを得られなかった。

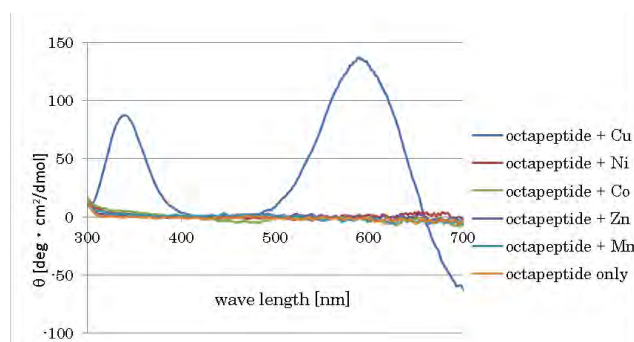


Fig. 3 octapeptide と各金属イオンを含む溶液より得られた CD スペクトル

2) octapeptide への金属競合結合

pH 7.5 において、octapeptide は Cu²⁺ とのみ特異的に結合することを利用し、一旦 octapeptide-Cu 錯体を形成させた試料に Ni²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ を加え、CD 測定を行った。その結果、Ni²⁺、Zn²⁺ を加えた試料において 600 nm 付近のピークの高さが減少した。以上の結果から、pH 7.4 ~ 7.5 において Ni²⁺、Zn²⁺ が octapeptide-Cu の錯体構造の安定性に影響を与えていることが明らかとなった。一方、Co²⁺、Mn²⁺ は、octapeptide-Cu 錯体の CD スペクトルを変化させることはなかった。続いて、octapeptide-Cu 錯体への金属競合性における pH の影響を調べるために octapeptide-Cu 錯体の試料に Ni²⁺、Co²⁺、Zn²⁺、Mn²⁺ を等モル加えて pH 7.4 ~ 7.5 と pH 7.9 ~ 8.0 において CD 測定を行った。その結果、pH 7.9 ~ 8.0 において

octapeptide-Cu に金属イオン(Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})を加えた全ての試料で 600 nm 付近のピークの減少が観察された。これらのことから、pH 7.9~8.0 においては Cu^{2+} だけでなく Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 全ての試料が octapeptide に結合する可能性が示唆され、これらの金属イオンが octapeptide-Cu 錯体へ与える影響は濃度や pH によって変化することが明らかとなった。また、本研究から octapeptide への Cu^{2+} と Zn^{2+} の結合の親和性は pH 7.5 において、 $\text{Cu} : \text{Zn} = 8 \sim 9 : 1$ だと算出された。

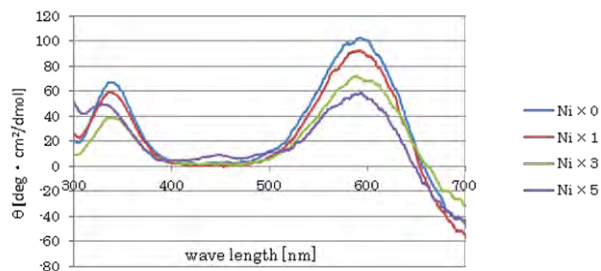


Fig.4 octapeptide - Cu 錯体の試料に Ni^{2+} を 1 倍, 3 倍, 5 倍モル当量加えて得られた CD スペクトル

3) PrP93-102 の金属結合における配列選択性

アミノ酸配列の違いが金属との結合性に与える影響を明らかにするため、PrP93-102 (GGTHSQWNKP) と PrP93-102; 93,94 GG/AA (AATHSQWNKP) を用いて CD 測定を行った。PrP93-102 の試料に Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} をそれぞれ等モル加え、CD 測定を行ったところ Cu^{2+} 錯体と、 Ni^{2+} 錯体に由来する特徴的な CD スペクトルが得られた。一方、PrP93-102 の 93 番、94 番のグリシン(G)をアラニン(A)に置換した PrP93-102; 93,94 GG/AA においても同様に、金属イオンを等モル加え CD 測定を行ったが、得られた特徴的な錯体による CD 吸収が減少、消失した。このことから、錯体形成に 93、94 番のグリシンが重要な働きをしていることが示唆され、金属に配位するアミノ酸残基の配列に選択性が示された。

4) octapeptide-Cu 錯体に対する各金属イオンの競合結合量の検討

以上の結果から、金属イオン(Ni^{2+} 、 Zn^{2+})を octapeptide-Cu 錯体の試料に加えることにより、octapeptide-Cu 錯体への金属イオン競合性より、pH 7.4~7.5 において、金属イオン(Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+})が octapeptide-Cu 錯体の安定性にどれだけ影響を与えているのかを明らかにするため、各金属イオン存在下における octapeptide-Cu 錯体のピーク位置(589.5 nm)における CD 吸収(平均残基モル楕円率)を読み取り Cu 錯体の CD 吸収を 100% として、各金属を加えた時の CD 吸収の割合を Fig.5 に示した。

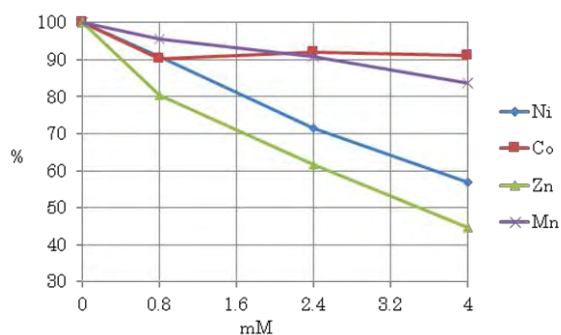


Fig.5 0.8 mM octapeptide-Cu 錯体に金属イオン(Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+}) を各倍数等量加えていったときの 589.5 nm における CD 吸収ピークの減少率

589.5 nm での octapeptide-Cu 錯体の CD 吸収は Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} の中で Zn^{2+} を加えた時に最も減少した。それでも、 Zn^{2+} の濃度が 0.8 mM Cu^{2+} の 5 倍等量である 4.0 mM でも、octapeptide-Cu 錯体の CD 吸収は 44.8% であることから、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} の 5 つの金属イオンの中での結合親和性の比較がこのグラフより明らかになった。

5) ESR スピントラッピング法による octapeptide と金属による活性酸素発生系との反応性の解明

ペプチドと金属が結合することにより、酵素活性中心のような生理機能を人工的に創出する技術の開発が現在注目されている。プリオンペプチド本来の生理的役割として酸化ストレスとの関連性が報告されているため、ここではプリオンペプチド-金属錯体と各種活性酸素との反応性について検討をおこなった。実験は ESR スピントラッピング法を用いて、ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ (Hyp-XOD)由来の super oxide (O_2^-)と過酸化水素(H_2O_2)に対して Cu^{2+} 単体とペプチド-Cu 錯体との反応性の検出を行った。スピントラップ剤として 5-(2, 2-dimethyl-1, 3-propoxy-cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide; CYPMPO(ラジカルリサーチ社)を用いた。

さらに今回の実験において 2 つの系から $\cdot OH$ の生成を行った。最初の系は、ヒポキサンチン(Hyp)とキサンチンオキシダーゼ(XOD)の酵素系に Cu^{2+} を加えて $\cdot OH$ を生成する方法である。Hyp に XOD を加えると O_2^- と H_2O_2 が生成される。この系に Cu^{2+} を加えると、 O_2^- が消去され、同時に $\cdot OH$ が生成される。生成した $\cdot OH$ をスピントラップ剤 CYPMPO で補足し ESR 測定を行った。

第二の系は H_2O_2 に Cu^{2+} を加え、 $\cdot OH$ を生成する方法である。この系で生成した $\cdot OH$ も同様に CYPMPO で補足し、ESR 測定を行った。

Fig. 6 には Hyp-XOD 系から得られた結果を示した。Hyp-XOD 系からは O_2^- とヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)に由来する 2 種のスピニアダクトが示されている。②の Cu^{2+} と、③の octapeptide-Cu 錯体存在下では、 O_2^- はすべて $\cdot OH$ に変化していることが示された。 Cu^{2+} は Hyp-XOD 系において O_2^- から $\cdot OH$ への変化を促進する働きをもつが、octapeptide と結合した場合でもその機能が維持されることが本研究により明らかとなった。

Fig. 7 には H_2O_2 の系での結果を示した。 Cu^{2+} 存在下の②では $\cdot OH$ 由来のスピニアダクトが①に比べて増幅していることが示された。一方、octapeptide-Cu 錯体存在下の③では、 $\cdot OH$ が生成されなかった。このことから、 Cu^{2+} は H_2O_2 を $\cdot OH$ へと変化させる機能を持つが、octapeptide-Cu 錯体は Cu^{2+} の働きを阻害することが示された。以上の結果から、octapeptide-Cu 錯体は O_2^- 由来の $\cdot OH$ の生成を促進し、 H_2O_2 由来の $\cdot OH$ の生成を阻害することによる活性酸素生成の制御機能があることが明らかとなった。

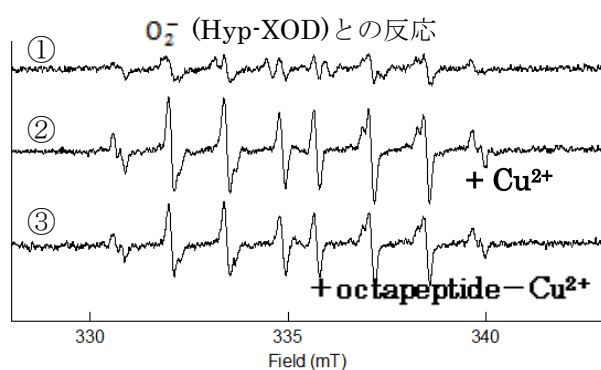


Fig. 6 octapeptide-Cu と O_2^- (Hyp-XOD 系)との反応から得られたスピニアダクトの ESR スペクトル 1.2 mM Hyp, 5 mM CYPMPO, 0.39 U/ml XOD / 80mM HEPES pH 7.4 (①)に 0.1 mM Cu^{2+} (②) or 0.1 mM octapeptide-Cu 錯体(③)を加えた

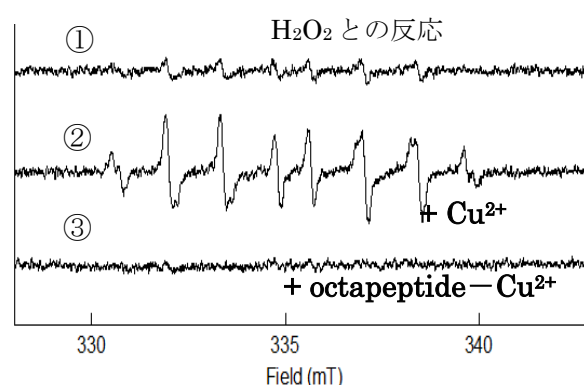


Fig. 7 octapeptide-Cu と H_2O_2 との反応から得られたスピニアダクトの ESR スペクトル 1.2 % H_2O_2 , 1 mM CYPMPO / 65 mM HEPES pH 7.4 (①)に 0.1 mM Cu^{2+} (②) or 0.1 mM octapeptide-C 錯体(③)を加えた

4 結論

CD 測定の結果から、Cu²⁺は octapeptide と高い親和性をもって結合することが明らかになった。また、pH 7.4 ~ 7.5 において Ni²⁺、Zn²⁺を octapeptide-Cu 錯体試料に加えることで、octapeptide-Cu 錯体のピーク位置における CD 吸収が減少したことから、Ni²⁺、Zn²⁺が octapeptide に結合する可能性が示唆され、pH 7.9 ~ 8.0 においては、Ni²⁺、Zn²⁺だけでなく、Co²⁺、Mn²⁺も octapeptide に結合する可能性が示唆された。octapeptide に対する親和性は Cu²⁺が最も高く、octapeptide は Cu²⁺と選択的に結合する。そして、octapeptide-Cu 錯体の安定性に Ni²⁺などの金属イオンが与える影響は、金属イオン濃度や pH などに影響されることが明らかになった。また、pH 7.5 において、Cu²⁺と Zn²⁺が octapeptide に同時に反応した場合は 7.9 : 1、octapeptide-Cu 錯体に Zn²⁺を加えた場合は 8.6 : 1 の割合で結合することが明らかになった。PrP93-102 を用いた実験では、pH 7.4 においては Cu²⁺が、pH 8.1 においては Cu²⁺だけでなく Ni²⁺も PrP93-102 と錯体形成したことに由来する特徴的な CD スペクトルを得ることができた。このことから、Ni²⁺が PrP93-102 と錯体を形成するには pH が大きく関わっていることも明らかになった。PrP93-102 の 93 番、94 番目のアミノ酸残基であるグリシン(G)をアラニン(A)に置換した PrP93-102; 93,94 GG/AA を Cu²⁺、Ni²⁺存在下において CD 測定を行った実験では、PrP93-102 が Cu²⁺、Ni²⁺と結合したことに由来する特徴的な吸収が減少、あるいは消失した。このことから、PrP93-102 と金属イオンの錯体形成には 93 番目、94 番目のグリシン(G)が錯体形成に大きく関わっていることが明らかとなった。金属イオンはペプチド中に金属結合部位であるヒスチジンがあれば結合可能なわけではなく、配位するアミノ酸に選択性があることが明らかになった。

ESR 法による実験から、octapeptide-Cu 錯体は 2 種類の構造が混在しており、Component 1 の 3N1O 錯体が構造の大半を占めていることが明らかとなった。また、ESR スピンとラッピング法から octapeptide は Hyp-XOD 系由来の・OH の生成を促進し、H₂O₂系由来の・OH の生成を阻害する機能を示した。このことから、octapeptide は Cu²⁺と錯体形成することで、H₂O₂によって Cu²⁺が還元されるのを阻害し、O₂による還元を促進する選択的な機能により、・OH の生成を制御していると考えられる。

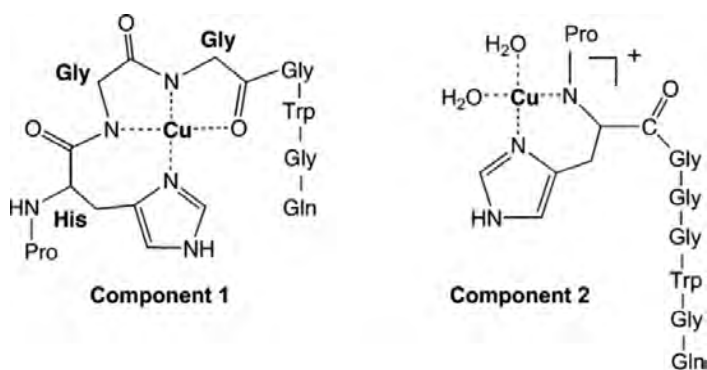


Fig.8 オクタリペイトと Cu の錯体構造

本研究は、結合性、構造、機能の面からプリオンペプチドと金属の相互作用を総合的に解明したものである。本研究は、プリオン病の進行のメカニズムの一端を解明するものであるとともに、プリオンタンパク質変性のモデル化・理論化をおこなったものであり、このシステムにより、治療薬効果のアッセイ等への利用が可能である。さらに金属-プリオンペプチドが酸化ストレスのコントロールに寄与していることから、プリオン変性と酸化ストレスとの関連性・病態解明にもつながり、さらには機能性ペプ

チド等への応用が可能であることを直接的に証明した研究結果である。

5. 参考文献

R. DeLeoncle, and O. Guillard, , *Journal of Alzheimer's Disease*, 43, (2014), 1149–1159.

J. H. Viles, F. E. Cohen, S. B. Prusiner, D. B. Goodin, P. E. Wright, and H. J. Dyson, .*PNAS*, 96, (1999), 2042–2047

6. 成果発表

*論文

1) A. Kato and W. Hiraoka, “Inositol hexaphosphate and its apatite cements-induced ROS generation and their biological effects on human cells”. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.51, Supplement 1, S145, 2011.

2) A. Kato, H. Kato, T. Suzuki, O. Nawa and W. Hiraoka, “Effect of the interaction between IP₆ and ROS on cell proliferation and cell differentiation”, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.53, Supplement 2, S148, 2012.

3) Y. Miura, T. Sato, Y. Sakurai, R. Sakai, W. Hiraoka, and T. Endo, “Hyper-O-GlcNAcylation inhibits the induction of heat shock protein 70 (Hsp 70) by sodium arsenite in HeLa cells”, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1308-1314, 2014.

*解説

1) M. Kuwabara, W. Hiraoka and O. Inanami, “Applications of the spin-trapping method in radiation biology” In: A. Lund and M. Shiotani (Eds) *Applications of EPR in radiation research*, Springer Cham, Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 353-384, 2014.

*国際会議

1) W. Hiraoka, R. Fuji and Y. Odate, “Biological effect of megahertz ultrasound on human lymphoma U937 cells”, 14th ICRR, Warsaw, Poland, September 1, 2011.

2) A. Kato and W. Hiraoka, “Inositol hexaphosphate and its apatite cements-induced ROS generation and their biological effects on human cells”, 18th Annual Meeting of Free Radical Biology and Medicine, Atlanta, November 19, 2011.

3) W. Hiraoka, H. Kato and A. Kato. “Crucial role of reactive oxygen intermediates in 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced monocytic differentiation of myeloid leukemia PLB-985 cells.” 16th Biennial Meeting of SFRR, September 6-9, London, 2012.

4) A. Kato, H. Kato, T. Suzuki, O. Nawa and W. Hiraoka, “Effect of the Interaction between IP₆ and ROS on cell proliferation and cell differentiation.” 19th Annual Meeting of SFRBM, November 14-18, San Diego, 2012.

5) M. Yagi, K. Iwama, H. Onda and W. Hiraoka, “Competitive binding of metal ions to the octarepeat region of human prion protein”, APES-IES-SEST2014, Nara, Nov 12-16, 2014.

6) H. Tanaka, H. Kato, O. Nawa, A. Kato, M. Mutoh and W. Hiraoka, “Enhancement of vitamin D₃-induced differentiation in PLB-985 cells by modulating oxidative stress”, APES-IES-SEST2014, Nara, Nov 12-16, 2014.

7) H. Koura, R. Fuji, A. Kato, M. Mutoh and W. Hiraoka, “Ultrasound-induced activation of caged compounds”,

APES-IES-SEST2014, Nara, Nov 12-16, 2014.

- 8) S. Kondo, M. Yagi, K. Iwama, H. Onda and W. Hiraoka, Redox activity of metal-containing prion peptide”, ICRR2015, Kyoto, May 25-29, 2015.
- 9) K. Takei, H. Koura, R. Fuji and W. Hiraoka, “The biological effect induced by MHz ultrasound”, ICRR2015, Kyoto, May 25-29, 2015.
- 10) H. Koura, R. Fuji, A. Kato, M. Mutoh and W. Hiraoka, “Activation of caged compounds induced by ultrasound”, ICRR2015, Kyoto, May 25-29, 2015.
- 11) H. Tanaka, H. Saito, H. Kato, O. Nawa, A. Kato, M. Mutoh and W. Hiraoka, “Oxidative stress modulated vitamin D-induced myeloid cell differentiation”, ICRR 2015, Kyoto, May 25-29, 2015.

分子標識をめざしたタンパク質内包ナノ粒子の開発

吉村 英恭

明治大学理工学部物理学科

Development of Protein Encapsulated Nanoparticles

Hideyuki Yoshimura

Department of Physics, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

フェリチンは多くの生物に存在する球状タンパク質で、特に脊椎動物では鉄を酸化物のナノ粒子として蓄え、体内の鉄イオン濃度を保つ働きをしている。フェリチンは、体内では鉄を主に取り込むが、試験管内では鉄以外にもニッケル、コバルト、インジウム、カルシウムなど様々な無機物を取り込みナノ粒子とすることを我々や他の研究グループが報告してきた。フェリチンは外径が 13nm の球状タンパク質で中心に内径 8nm の空洞が存在する。空洞は 8 カ所の親水的な通路でタンパク質外部と通じており、そこをイオンが通過できる。適当な溶液条件にすることで空洞内部に無機物のナノ粒子を形成することができる。ナノ粒子の成長は空洞の大きさで制限され、最終的に粒径のそろった粒子となる。また外側をタンパク質に囲まれているのでナノ粒子同士の凝集を防ぐことができ、水溶液中で安定に分散する。このような特徴を生かして分子標識や記憶媒体の素子とする応用を目指してきた。分子標識とする場合、タンパク質の部分に特定の分子に結合するペプチド（アプタマー）を付加することにより標識としての精度が向上する。特にフェリチンの N 端はタンパク質の外側にでており、アプタマーのアミノ酸配列をフェリチンの遺伝子の N 端部分に組み込むことで特定の分子に結合するフェリチンを容易に作成できる利点がある。また、フェリチン内部に蛍光物質のナノ粒子を形成させることで蛍光分子標識を実現できる。有機色素を使った場合に比べ、退色による消光が少ないので分子標識として優れていると考えられる。酸化鉄やガドリニウムのナノ粒子を形成させれば、MRI での特定部位の造影剤として使用できる。このような利用を目的として、ここではイットリウム (Y) またはバナジウム (V) にドーピングした希土類 (Eu, Tb, Gd, Gy) の蛍光性ナノ粒子をフェリチン空洞に形成させる事を試みた。またガドリニウムナノ粒子の作製を行い NMR におけるプロトンの緩和時間 (T1) を減少させることを確認した。

2. 実験方法

1) 蛍光性ナノ粒子の作製

蛍光ナノ粒子については CdTe ナノ粒子をタンパク質空洞内に形成させたが、蛍光量子収率が低く、分子標識とするには十分ではなかった。ナノ粒子の結晶性が悪いことが原因であると考えられる。タンパク質空洞内に形成させた CdS や CdSe など他の II-VI 族ナノ粒子半導体も同様の結果が報告されているので、II-VI 族半導体ではなく希土類ナノ粒子による発光体の作製に方針を転換した。0.1mg/ml のフェリチンに希土類の硝酸塩溶液を最終濃度が 1mM になるよう 1 時間おきに 5 回にわけて加え、室温で 19 時間放置することで、Y, Eu, Tb のナノ粒子を 20-40% の形成率で作製することができた。作製したナノ粒子の透過型電子顕微鏡像 (TEM 像) を図 1 に示すが、ほとんどの粒子はアモロファスであり結晶格子の

観察されるナノ粒子はいずれの希土類においても10%以下であった。Yを母材としたEu, Tbのナノ粒子はY中にEuまたはTbの硝酸塩を同時に加えることにより単体と同じように作製できた。Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS) によりナノ粒子は目的の元素を含むことが確認された。ナノ粒子を含むフェリチンをショ糖密度勾配遠心法により精製することにより、ほぼ100%ナノ粒子を含む溶液を得ることができた。

YVO_4 を母材とした蛍光ナノ粒子の作製は、まずYとEu(またはDy)の硝酸塩をキレート剤EDDAの存在下において4°Cで混合し、その後フェリチン(0.1mg/ml)と粉末の NH_4VO_3 40mM分を混合して4°Cで24時間反応させる。10,000gx20min遠心することで沈殿を除き、さらにゲル濾過(G25)により未反応のイオンを除いた。

2) ガドリニウムナノ粒子の作製

MRIの造影剤として使用する目的でガドリニウム(Gd)のナノ粒子をフェリチンの空洞に作製した。作製条件は先に述べた希土類ナノ粒子の作製を基本として、pH(6.6-7.6), Gd濃度(0.5-5mM), 反応時間(0-24hr), 反応温度(4-70°C)を変えて最適条件を検索した結果、pH7.0, 2mM Gd, 24hr, 50°Cで最高のナノ粒子形成率20%を得ることがわかった。反応温度については4-50°Cまで形成率自体はほとんど変わらなかったが、結晶性については温度が高い方がよかった。ただし反応温度が60°Cを超すとタンパク質の沈殿が増加するので、50°Cを最適とした。0.1mg/ml フェリチン, 2mM $Gd(NO_3)_3$, 100mM MOPS(pH7.0)の溶液で1日反応させることで図2a, bに示すようなナノ粒子を得た。

粒子の組成を調べるためにEDSを試みた結果、図2cに示すようにGdの $L\alpha$ (6.06keV), $L\beta$ (6.71keV), $M\alpha$ (1.19keV)のピークを得たことからGdを含むナノ粒子であることがわかった。Cu, Siは電子顕微鏡グリッド, 炭素支持膜由来のピークである。高分解能TEMで観察したところ、50°Cで合成した粒子は50%に結晶格子を観察することができた。この試料の制限視野電子線回折を図2dに示す。電子線回折では0.315, 0.198, 1.69 nmに対応する面間隔が観察され、同じ面間隔を持つ Gd_2O_3 の正方格子結晶であると結論した。

3) 蛍光性ナノ粒子の光学的特性の測定

得られた蛍光性ナノ粒子の蛍光スペクトルは日本分光FP-6200によりマイクロ蛍光セル(3x3 mm)を使って行った。また蛍光寿命は堀場製作所(TemPro spectrometer)に390nmの励起光源としてパルスLED(LED-390)を用いて測定した。蛍光寿命の計算はソフトウェアパッケージDAS-6を用いて1成分、2

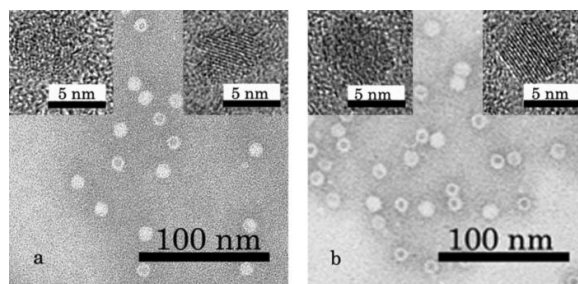


図1. 希土類ナノ粒子のTEM像 (Nano-Wによる負染色)
a) Euナノ粒子, b) Tbナノ粒子のTEM像 (挿入図は高分解能像, 左はアモルファス, 右は結晶像)

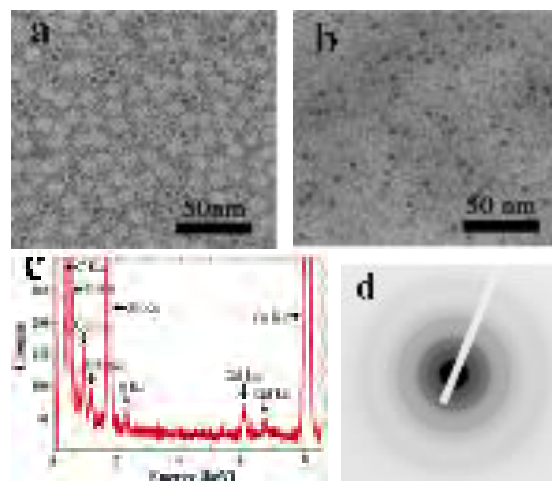


図2. Gdナノ粒子のTEM像と組成, 構造

a) Gdナノ粒子の金グルコースによるTEM負染色像, b) TEM無染色像, c) EDS, d) 電子線回折像

成分解析を行った。

4) NMR プロトン縦緩和時間の測定

Gd ナノ粒子を含むフェリチンによる縦緩和時間(T1)の影響を 10MHz (0.23T) の NMR 装置により計測した。90° パルス (約 15 μ s) の繰り返し時間 Tr を変えることによる信号強度の変化を計測することにより T1 を算定した。

3. 結果と考察

1) 蛍光性ナノ粒子の光学特性

得られた Eu ナノ粒子フェリチンの発光スペクトルは $^5D_0 \rightarrow ^7F_1$ 遷移に対応する 590nm と $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$ 遷移に対応する 614nm にピークをもち、赤色の発光も目視できた (図 3a)。一般的にはこれらの発光体は高濃度で消光がおこるために酸化イットリウム (Y₂O₃) 中に数%ドープして使用するが、作製したナノ粒子は 50%以上の濃度でも発光強度が落ちることがなかった。これは大きさがナノオーダーであり、粒子が水中に均一に分散しているために消光が起こりにくいためであると結論した。また、半導体発光粒子とは違い、アモルファスであっても十分な発光強度が得られることが示された。Tb を含むナノ粒子は $^5D_0 \rightarrow ^7F_j$ (j=3, 4, 5, 6) 遷移に対応する 488, 544, 582, 618 nm にピークが観察され (図 3b)、目視では緑色の発光がみられた。

Y にバナジウム (V) を加えることで発光強度の大幅な増加が見られた。溶液の水を重水に置換すると発光寿命が増加した (図 4)。このことは軽水中での O-H 基を介しての無輻射遷移が、重水中で O-D への置換により抑制されたためであると考えられる。この寿命測定から、Eu³⁺ に配位している OH はおよそ 2 個であることが予想される。Eu をドープした粒子においては、Y のみの母体より V を含む母体にした方が寿命が約 2 倍長くなることがわかった (図 4)。また、母体を V にすることで V-O 電荷遷移による 274nm の大きな吸収が見られ、紫外励起では Y のみを母体とした場合よりも、かなり発光効率をあげることができた。

2) ガドリニウムナノ粒子の T1

Gd は f 軌道に 7 個の不對電子があり、大きな磁気

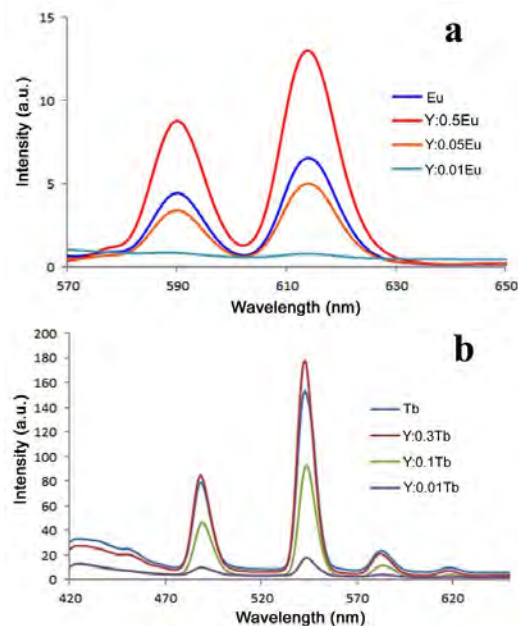


図 3 蛍光ナノ粒子の発光スペクトル
(a) Eu を含むナノ粒子 (励起 396nm) (b) Tb を含むナノ粒子 (励起 237nm)

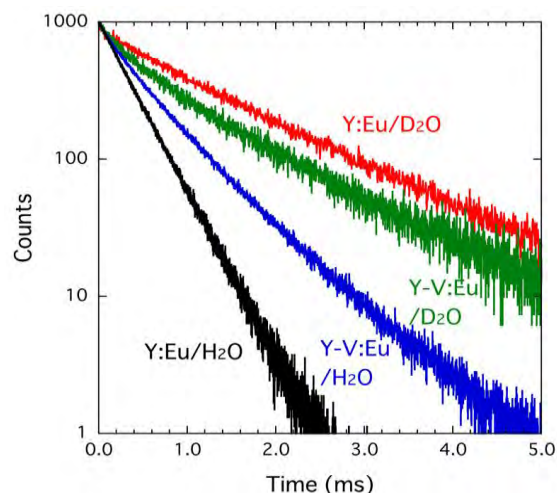


図 4 蛍光ナノ粒子の蛍光寿命
Y:Eu ナノ粒子の軽水中での寿命は 1 成分で約 0.5ms、重水中での寿命は長い成分が 2.2ms、短い成分が 0.5ms であった。

モーメントを持つため、プロトンの T1 緩和時間を大幅に減少させる。このことから MRI における造影剤として使用されているが、ガドリニウムイオンは生体に対する毒性があり、一般に錯体を形成させて利用されている。ナノ粒子として利用できれば、単位体積当たりの Gd 原子の数を大幅に増加できるので造影効果の向上があると考えられる。このためまず、10MHz での T1 緩和時間を 90° パルス繰り返し法により計測した。使用したフェリチンは 37% のナノ粒子形成率で、ナノ粒子の直径の平均は 6.1nm であった。ナノ粒子が Gd₂O₃ の結晶とした場合、密度は 7.41g/ml であるので、フェリチン 1 分子あたり Gd 原子は約 3000 個入っている計算になる。一般に緩和速度 (1/T1) は常磁性イオンの濃度に比例して増加することが知られている。測定される T1 を T_{obs}、常磁性イオンがない場合のプロトン緩和時間を T_H、常磁性イオンの濃度を C とすれば、

$$1/T_{\text{obs}} = 1/T_H + r_1 C$$

となる。この比例定数 r_1 は造影剤の効果を示す指標として "relaxivity" (緩和能) として定義されている。図 5 は $1/T_{\text{obs}}$ に対して使用したフェリチンの濃度を Gd の濃度 C に換算してプロットしたものである。この実験結果の傾きから $r_1 = 1.84 \text{ [mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$ が得られた。現在医療で使われている Gd-DOTA の r_1 は $3.9 \text{ [mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$ 程度であり、Gd を導入したフェリチン中では $20 \text{ [mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$ が報告されている [1, 2]。我々の結果はそのいずれの値より小さいが、これはフェリチン中の Gd が結晶性のナノ粒子を形成しており、表面の原子しかプロトンの緩和に関与していないためと考えられる。緩和能をフェリチン濃度で考えると $r_1 = 5500 \text{ [mM}^{-1}\text{s}^{-1}]$ となり、かなり大きな緩和効果があると考えられる。しかしこの場合無駄な Gd 原子をもっていることになり、フェリチン 1 分子当たりの Gd 原子数はもっと減らしても良いと考えられる。今後は Gd の量を調整すると共に、フェリチンからの Gd イオンの放出量も計測していく予定である。

4. 結論

水溶性球状タンパク質フェリチンの内部に希土類のナノ粒子を形成させることに成功した。蛍光性の希土類ではバルクの試料が高濃度でクエンチングを起こすのに対して、ナノ粒子ではかなり高い濃度まで蛍光強度の増加が見られた。これはナノ粒子が水溶液中に安定に分散していることを示している。また、バナジウムを母材として希土類のナノ粒子を形成させると無輻射緩和の減少に加えて、紫外領域でのバナジウムの吸収係数の増加により、希土類元素による蛍光強度が大幅に増強されることがわかった。Gd のナノ粒子も蛍光性の希土類同様にフェリチン内部に形成することができるが、Eu に比べると結晶性がよく、周囲の水との交換が少ないように考えられる。MRI の造影剤として使用するためには、Gd と水との交換相互作用が大きいことが望ましいので、今後は水との交換が起きやすいような構造をとらせることを試みる。また、蛍光性の希土類と組み合わせることにより、紫外線の照射でフェリチンが集合している部位を同定できるので、MRI での画像診断と併用して光学的な画像化もできると考えている。特定の臓器にフェリチンを特異的に結合させるためには、遺伝子工学によりフェリチンの外部にアプタ

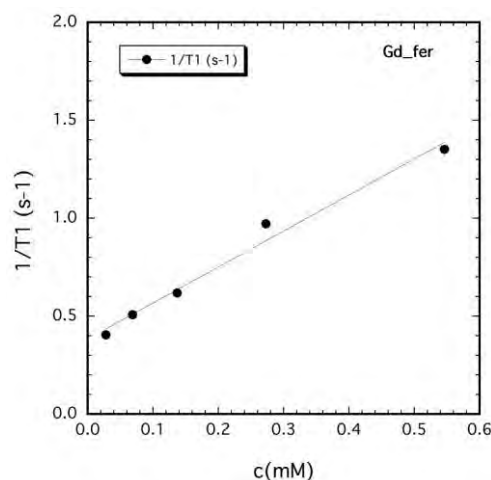


図 5 Gd 濃度に対する 1/T1

マーを付加する必要があり、今後はアプタマーの開発もすすめる。

5. 参考文献

- [1] MRI relaxation properties of water-soluble apoferritin-encapsulated gadolinium oxide-hydroxide nanoparticles, Purificación Sánchez *et al.*, Dalton Trans., (2009), 800–804.
- [2] Effective encapsulation of a new cationic gadolinium chelate into apoferritin and its evaluation as an MRI contrast agent, Akira Makino *et al.*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 7 (2011) 638–646.

6. 成果報告

* 投稿論文

1. Synthesis of Uniform and Dispersive Calcium Carbonate Nanoparticles in a Protein Cage through Control of Electrostatic Potential, Hiroko Fukano, Takuya Takahashi, Mamoru Aizawa, and Hideyuki Yoshimura, *Inorganic Chemistry* **50**, 6526-6532 (2011).
2. Micro-CT of Porous Apatite Fiber Scaffolds Studied by Projection X-ray Microscopy, Junichi Moriya, Mamoru Aizawa, Hideyuki Yoshimura, *AIP Conference Proceedings*, **1365**, 407-410 (2011).
3. Synthesis of ZnO Nanoparticles in the Presence of Different Additives, B. Boche, G. Yordanov, H. Yoshimura, C. Dushkin, *Nanoscience & Nanotechnology*, **11**, 58-61 (2011).
4. Ultrastructural analysis of hydroxyapatite nanoparticles synthesized under different initial pH conditions using high-resolution transmission electron microscopy, Zhi Zhuang, Toshiisa Konishi, Hideyuki Yoshimura, Mamoru Aizawa, *Phosphorus Research Bulletin* **26**, 081 -086, (2012).
5. Development of a,b-plane-oriented hydroxyapatite ceramics as models for living bones and their cell adhesion behavior, Zhi Zhuang, Takahiko J. Fujimi, Mariko Nakamura, Toshiisa Konishi, Hideyuki Yoshimura, Mamoru Aizawa, *Acta Biomaterialia* **9** 6732–6740 (2013).
6. Ferritin protein encapsulated photoluminescent rare earth nanoparticle, T. Harada, H. Yoshimura, *J. Appl. Phys.*, **114**, 044309(1-8) (2013).
7. Synthesis of Rare Earth Doped Yttrium-Vanadate nanoparticles Encapsulated with Apoferritin, T. Harada, H. Yoshimura, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 14947--14952 (2014).
8. Low temperature studies of the photoluminescence from colloidal CdSe nanocrystals prepared by the hot injection method in liquid paraffin, Evgenia Valcheva, Georgi Yordanov, Hideyuki Yoshimura, Tsvetan Ivanov, Kiril Kirilov, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **461**, 158-166 (2014).

* 口頭発表

1. 10th International conference on Material Chemistry (MC10), July 4-7, Manchester, England
Fabrication of CdTe Nanoparticles in a Protein Cage, T. Harada, H. Yoshimura
2. 日本生物物理学会 49 回年会 2011 年 9 月 16-18 日兵庫県立大学姫路書写キャンパス
Effect of the flagella filament length on Raman optical activity of L-type straight filament of Salmonella
A. Suga, Y. Hamada, H. Yoshimura, M. Asahina, F. Hayashi, K. Oosawa

3. 日本生物物理学会 49 回年会 2011 年 9 月 16-18 日 兵庫県立大学姫路書写キャンパス
EDTA controlled synthesis of CdTe nanoparticles in the apoferritin cavity, T. Harada, H. Yoshimura
4. 日本生物物理学会 49 回年会 2011 年 9 月 16-18 日 兵庫県立大学姫路書写キャンパス
Purification of ferritin with magnetic nanoparticles, Y. Hikichi, T. Harada, H. Fukano, H. Yoshimura
5. 日本生物物理学会 49 回年会 2011 年 9 月 16-18 日 兵庫県立大学姫路書写キャンパス
Selection of the flagella hook binding peptides using the Phage-display technique, M. Nemoto, T. Kanamaru, H. Yoshimura
6. Bioceramics 23, 06-09 Nov. 2011, Istanbul, Turkey
Hydroxyapatite ceramics including bone minerals promote differentiation of osteoblasts derived from rat bone marrow cells, M. Aizawa, T. Miki, Y. Yasutomi, H. Yoshimura
7. 21st Academic Symposium of MRS-Japan, 19-21 Dec. 2011
Synthesis of Nanoparticles utilizing cavity of proteins as the reaction chamber, H. Yoshimura
8. International Conference on Nanoscience + Technology (Icn+T), July 23-27, Paris, France
Fabrication of Lanthanoid (Eu, Y, Tb) nanoparticles in the cavity of ferritin, T. Harada, H. Yoshimura
9. 第 125 回無機マテリアル学会、11 月 1-2 日名古屋大学
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
Z. Zhuang, M. Nakamura, T. Konishi, H. Yoshimura and M. Aizawa
10. 第 73 回応用物理学会、2012 年 9 月 11-14 日 愛媛大学、松山大学
アポフェリチンを用いた希土類ナノ粒子の作成、原田知明、吉村英恭
11. 第 73 回応用物理学会、2012 年 9 月 11-14 日 愛媛大学、松山大学
フェリチンを用いた Fe₃O₄ ナノ粒子の作製と二次元結晶化、引地祐介、原田知明、深野弘子、吉村英恭
12. 第 73 回応用物理学会、2012 年 9 月 11-14 日 愛媛大学、松山大学
カーボンナノチューブの成長触媒としての硫化白金ナノ粒子の作成、伊藤誠一郎、西見大樹、本間芳和、吉村英恭
13. 日本生物物理学会 50 回年会 2012 年 9 月 22-24 日名古屋大学
Synthesis of gadolinium-based nanoparticles using the protein cage of apoferritin, Hiroko Fukano, Hideyuki Yoshimura
14. 日本生物物理学会 50 回年会 2012 年 9 月 22-24 日名古屋大学
Synthesis of rear earth (Eu, Tb, Tm and Y) nanoparticles in apoferritin cavity, Tomoaki Harada, Hideyuki Yoshimura
15. 日本生物物理学会 50 回年会 2012 年 9 月 22-24 日名古屋大学
Development of Projection X-ray Microscope for Micro-Tomography , Hideyuki Yoshimura
16. Annual World Congress of Nanomedicine 2013, H. Yoshimura, Synthesis of Protein Encapsulated Nanoparticles, Suzhou, China, 2013 年 6 月 3-5 (Invited)
17. 第 74 回応用物理学会、京都 (同志社大)、2013 年 9 月 16-20
フェリチンを用いて作製した磁性体ナノ粒子の二次元配列化、荻村史佳、引地祐介、吉村英恭

18. 第 74 回応用物理学会、京都（同志社大）、2013 年 9 月 16-20
アポフェリチンを利用したランタニド添加型 YVO₄ ナノ粒子の作製、原田知明、吉村英恭
19. 第 51 回日本生物物理学会、京都国際会館、2013 年 10 月 28-30
Insertion of ferroxidase center in horse L ferritin subunit, M. Nemoto, T. Harada, H. Yoshimura
20. 第 51 回日本生物物理学会、京都国際会館、2013 年 10 月 28-30
Photoluminescence Property of Eu and Tb Doped Y Based Nano-phosphor synthesized in an Apoferritin Cavity, T. Harada, H. Yoshimura
21. 3rd International Conference on Nanotek & Expo, December 02-04, 2013, Las Vegas, NV, USA, Hideyuki Yoshimura (Invited).
22. MRS FALL MEETING & EXHIBIT, November 30 - December 5, (2014), Boston, Massachusetts USA.
Apoferritin Encapsulated Rare Earth Luminescent Nanoparticles, Hideyuki Yoshimura,
23. Invited seminar, Dep.of Structural Biology Univ. of Pittsburgh School of Medicine October 10 2014, Protein assisted nanoparticle synthesis and regular array formation of Nanoparticles, Hideyuki Yoshimura.,
24. Gordon Research Conference: Physical Virology, January 25-30, Ventura, CA USA.
Two-dimensional crystallization of P22, H. Yoshimura, D. P. Patterson, M. Uchida, B. Schwarz, K. McCoy, E. J. Edwards, R. Roychoudhury and T. Douglas
25. Microscopic Conference 2015, Göttingen, Germany Sep 6-11 (2015).
Two-dimensional crystallization of P22 virus like particles, H. Yoshimura, E. Edwards², M. Uchida, K. McCoy, R. Roychoudhury, B. Schwarz, D. Patterson, T. Douglas
26. 日本生物物理学会第 35 回年会、金沢大学、Sep 13-15 (2015).
バクテリオファージ P22 の 2 次元結晶化、Hideyuki Yoshimura, Ethan Edwards, Dustin Patterson, Masaki Uchida, Kimberly McCoy, Rajarshi Roychoudhury, Benjamin Schwarz, Trevor Douglas

硬組織および軟組織再生のためのスキヤフォールド機能性評価と蛍光タンパク質の評価系への応用

安田圭¹⁾・富田祐樹¹⁾・大杉仁美¹⁾・石井英¹⁾・向井優哉¹⁾・相澤守²⁾・神澤信行¹⁾

1) 上智大学理工学部物質生命理工学科

2) 明治大学理工学部応用化学科

Functional evaluation of three-dimensional scaffold for the hard and soft tissue engineering using a fluorescent protein.

Kei YASUDA¹⁾, Yuki TOMITA¹⁾, Hitomi OHSUGI¹⁾, Hide ISHII¹⁾, Yuya MUKAI¹⁾, Mamoru AIZAWA²⁾,
and Nobuyuki KANZAWA¹⁾

1) Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University

2) Department of Applied Chemistry, School of Science and Technology, Meiji University

1. 緒言

生化学からのアプローチでどれだけ組織再生に、ひいては人々の幸福に貢献できるかという課題と向かい合い5年間の研究を進めてきた。日本ではすでに4人に1人が60歳以上という生活の中で、何をしたら我々の生活の質(QOL, Quality Of Life)を維持、向上できるのか? 本研究は他人事ではなく、自身のこれからのにもかかわる重要な研究である。我々はこれまで生化学のアプローチで上記問題に取り組んできた。相澤らによって創製された新規足場材料であるアパタイトファイバースキヤフォールド(AFS, apatite fiber scaffold)を用いると、その中で培養された細胞は二次元的に培養された細胞に比べ、骨分化が促進される¹⁾。この結果は相澤らによって報告され、その後我々も追試している²⁾。分化が促進される根拠としてAFS中には生体内で見られるような細胞の増殖に適当な空間が存在するため、細胞が生体内と同様に三次元的に増殖し、細胞間ネットワークを形成できることが挙げられている。しかし、細胞の分化に伴うマーカー遺伝子の発現と、細胞増殖の観察を直接結びつける根拠はなく、その因果関係は十分に検証されていない。一方で、ES細胞やiPS細胞を用いた組織再生の試みは急速に実現の域に近づいている³⁾。しかし、組織再生には限界があり、組織の種を生体に戻すことで、最終的には生体の持つ能力で組織再生を促そうとする方向に向かっている。具体的な例では、心臓すべてを人工的に作り出すことはせず、一部の組織の再生を助けることで心機能の改善を図る取り組みがなされている⁴⁾。上記の通り、より大きい組織、より高機能な組織の再構築が直近の目標となる。我々は、足場材料を含めた組織工学の手法が上記目的の達成に必要な技術になると考えている。

より良い足場材料を創製するためには、どのようなメカニズムで細胞の分化が促進されているのかを知る必要がある。生化学からの視点でモノづくり貢献するためにはメカニズムにこだわった解析が重要だと考えている。本研究では上記の考えに基づき、三次元環境と細胞分化との関係に注視しながら足場材料の機能性を評価した。また、評価系を改善するため、蛍光タンパク質の応用を試みた。一般に、材料創製を主とする研究者にとって、最初の壁となるのが細胞を用いた評価であり、細胞内から核酸を取り出す作業を含む分化マーカー遺伝子の検出はさらに困難な作業となる。統一規格となりうるような簡便な評価系が存在すれば、材料創製の開発速度を速め、上記目的に貢献できるものと考えられる。今回、

特別な染色等を必要とせず、蛍光強度や、蛍光色の変化を見るだけで細胞内の遺伝子発現状態、つまり分化マーカーの発現量がわかる細胞株の確立を目指した。

2. 実験方法

1) 細胞培養

本研究では硬組織の代表例として骨の再生を目的に MC3T3-E1 細胞を用いている。また軟組織の代表例として心筋の再生を目的に P19.CL6 細胞を用いている。

骨芽細胞の培養と分化誘導: MC3T3-E1 細胞は 10% FBS を含む α -MEM 培地を用いて 37°C、CO₂ 濃度 5% のインキュベーター内で予備培養した。なお、培地交換は 1 日おき又は 2 日おきに行い、継代培養は細胞が容器内に約 80% 飽和になった時点で行った。AFS 培養では、12-well plate に AFS (ϕ 7.5 mm × H 5 mm) を入れ、それぞれに 50 μ L の 70% ethanol で浸水処理した後、培地 500 μ L に懸濁した 5.0×10^5 個の細胞を播種した。その後、インキュベーター内で一定日数培養した。なお AFS は、180°C、2 時間の乾熱滅菌を行ったものを使用した。培地交換は 2 日おきに行った。分化誘導には、hydrocortisone を含む市販の分化誘導培地を用いた。

心筋様細胞の培養と分化誘導: P19.CL6 細胞は上記 MC3T3-E1 と同じ条件で予備培養した。分化誘導は、 7.5×10^5 cells/dish (ϕ 90 mm) の条件で細胞を播種し、5% DMSO を含む培地で 4 日間浮遊培養後、DMSO を含まない通常培地でさらに接着培養を 16 日目までした。AFS で培養する場合は予備培養後、 1.0×10^6 cells/AFS の条件で細胞を播種し、16 日目まで通常培地で培養した。AFS で培養する際には DMSO 処理をあらかじめ出来ないため、AFS 内に細胞を播種後、DMSO を含む培地と含まない培地で比較検討した。

2) AFS の作製

相澤らの既報¹⁾に従って AFS を作製した。具体的には定法に従い調製した fiber 原液を三口フラスコに入れ、冷却管と温度計をセットした。これをオイルバス中 80°C で 24 時間、90°C で 72 時間加熱し、均一沈殿法により作製した。合成した AF スラリーに対し質量比で 20 倍量のカーボンビーズを添加し、成形、水蒸気気流中で 1300°C、5 時間焼結し、AFS を得た。AFS の結晶構造に関しては X-ray diffraction (XRD) により解析し、それぞれ Hydroxyapatite (HAp) の単一層からできていることを確認した。

3) 分化マーカープラスミドのコンストラクト

骨分化に関与するマーカーをもとにした解析: MC3T3-E1 細胞からゲノム DNA を抽出し、骨分化初期マーカーである Type I collagen (*col1a1*) 及び骨分化後期マーカー遺伝子である osteocalcin gene 2 (*OG2*) の promoter をそれぞれ単離し、それを promoterless 蛍光タンパク質発現用ベクター pmCherry-1 (赤色蛍光) 及び pEGFP-1 (緑色蛍光) に組

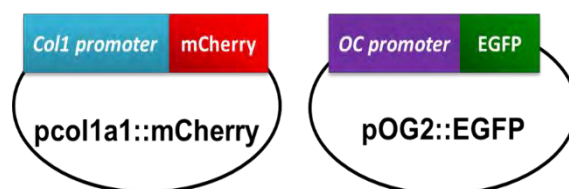


図 1. 時期特異的 promoter と結合した蛍光タンパク質発現ベクターの模式図。

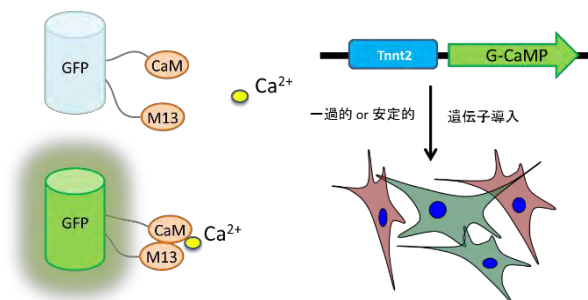


図 2. GCaMP5G の模式図と導入イメージ
GCaMP5G には通常の GFP から突き出た位置にカルシウムと結合する部位を持っており、カルシウム存在下で強い蛍光を発する。

み込んだ(図 1)

心筋分化に関与するマーカーをもとにした解析: サイトメガロウイルス(CMV)由来の promoter 下流にカルシウムの濃度に依存して蛍光強度が変化するコンストラクト(pCMV::GCaMP5G)をもとに、CMV の代わりに、心筋特異的に発現する事が期待される心筋型 troponin T type 2 promoter (Tnnt2)をマウス由来細胞のゲノムより PCR により単離し置き換えた(pTnnt2::GCaMP5G)。

4) 分化マーカー導入細胞の創製

作製したコンストラクトをそれぞれの細胞にリポフェクション法で遺伝子導入した。選択抗生物質は pcol1a1::mCherry の場合には G418 を使い、pOG2::EGFP の場合には hygromycin を用いた。pTnnt2::GCaMP5G の場合は、hygromycin を用いた。pTnnt2::GCaMP5G については蛍光タンパク質の発現が分化後期に限定されるため一過的発現での解析を行った。一方、骨分化にかかわる 2 つのプラスミドについては、遺伝子の安定導入後、解析することを試みた。安定的に遺伝子導入された細胞を得るため、上記選択抗生物質中で培養した。

5) 遺伝子発現解析

細胞分化の道筋を調べため、骨分化または心筋分化にかかわるマーカー遺伝子の発現を半定量 RT-PCR または Real-time PCR で解析した。骨分化に関しては、早期のマーカーである *colla1*、中期からのマーカーである *ALP*、終期のマーカーである *OCN* について解析した。心筋分化を解析する際には、中胚葉分化誘導因子 *BMP2*, *GATA4*、心筋分化マーカーである α -*MHC*、細胞接着に関与する *GJA1*、カルシウムチャンネルである *Cav1.2*, *Cav3.1*、心筋分化の上流に位置する *Wnt11*、未分化マーカー遺伝子である *Oct4* について解析した。

6) 抗体を用いた心筋機能分化の解析

心筋の機能性を評価するため、心筋細胞間でカルシウムの通り道として機能する gap junction タンパク質である connexin43 に着目した。Connexin43 は細胞間の情報を受け渡しすることで正常な心筋細胞の拍動の維持に関与している。今回、特異的抗体を用いて、発現の時期や局在について解析した。

3. 結果と考察

1) 骨分化マーカー遺伝子の解析

半定量 PCR により骨分化マーカー遺伝子の解析を行った(図 3)。Dish 培養、AFS 培養のどちらの条件においても、骨分化誘導をすることで、各マーカー遺伝子の発現が上昇することが確認できた。しかし、分化の初期マーカーである Type-I collagen については、解析 4 日目からすでに発現があり、その発現量は dish および AFS で大きな変化が見られなかった。中期のマーカーである ALP に関しては培養後期で発現の急激な上昇がみられることが多く、この結果は細胞培養後に ALP 活性染色した際の結果と一致している(data not shown)。AFS で培養した場合の ALP の

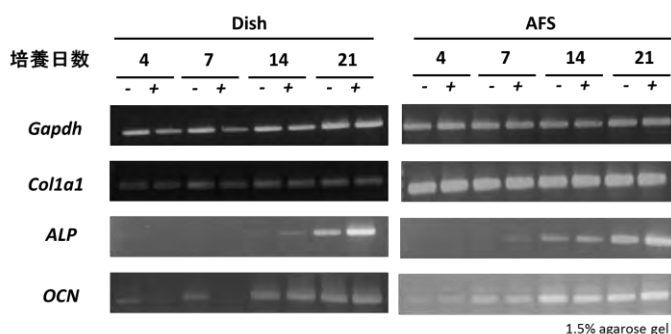


図 3.骨分化マーカー遺伝子の発現

Dish または AFS で 4, 7, 14, 21 日間培養したサンプルに対して骨分化マーカー遺伝子である Col1a1, ALP, OCN に特異的な primer を用いて PCR を行い、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動により解析した。

発現は dish 培養に比べて早期から増加することが分かった。後期マーカーである OCN に関しては、AFS 培養によって初期から顕著な発現量増加が確認できている。しかし、alizarin-red 染色による解析では、カルシウムの沈着は培養後期でしか見られず、遺伝子発現開始のタイミングと石灰化には時間的なずれがあることが考えられた。これらの結果を合わせると、AFS では dish 培養によって早期から骨分化が開始される傾向があることがわかる。実際に時間を区切って細胞を観察すると、AFS 内ではマクロポア内に侵入した細胞同士がポア内で細胞接着している様子が確認され(data not shown)、これらのネットワーク形成により分化が早期から開始されていることが想像された。しかし局所情報を含む観察の手法と、全体の平均として結果が表れる遺伝子解析の手法とにはどうしても「想像」が入り込む余地ができてしまう。そこで、リアルタイムで遺伝子発現を蛍光色としてとらえることができると考え、蛍光タンパク質を用いた解析を試みた。

2) 蛍光タンパク質を用いた骨分化解析

異なる二種のプロモーターにそれぞれ異なる蛍光タンパク質をつなげた遺伝子を MC3T3-E1 細胞に導入した。遺伝子導入体において実際に導入した遺伝子がゲノム上に組み込まれているのかを genomic southern blot および inverse PCR によって調べた(data not shown)。その結果、導入した遺伝子の1つは、内在する OC プロモーター中に挿入されていた。遺伝子導入体を dish に播種し、confluent に達してからポジティブコントロールとして分化誘導培地で培養すると、4 日目に mCherry の赤色蛍光が確認され、7 日目に EGFP の緑色蛍光を発する細胞が観察された。さらに長期的に培養し観察したところ、緑色蛍光を発する細胞は増加し、赤色蛍光を発する細胞が減少していることが確認出来た(図 4)。上記実験に加え、細胞の増殖性や石灰化等を評価したが、遺伝子導入による細胞増殖性や分化能については正常細胞との間に違いが見られなかった。上記の通り、ダブルカラー遺伝子導入体は、骨分化評価系として使用可能である事が明らかになった。

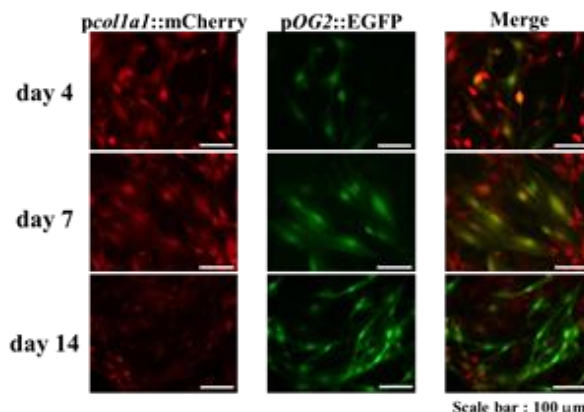


図 4. 遺伝子導入体の蛍光顕微鏡観察

Day 4, 7, 14 で遺伝子導入体の観察を行ったところ、経目的に赤色蛍光を発する細胞の減少と緑色蛍光を発する細胞の増加が観察された。

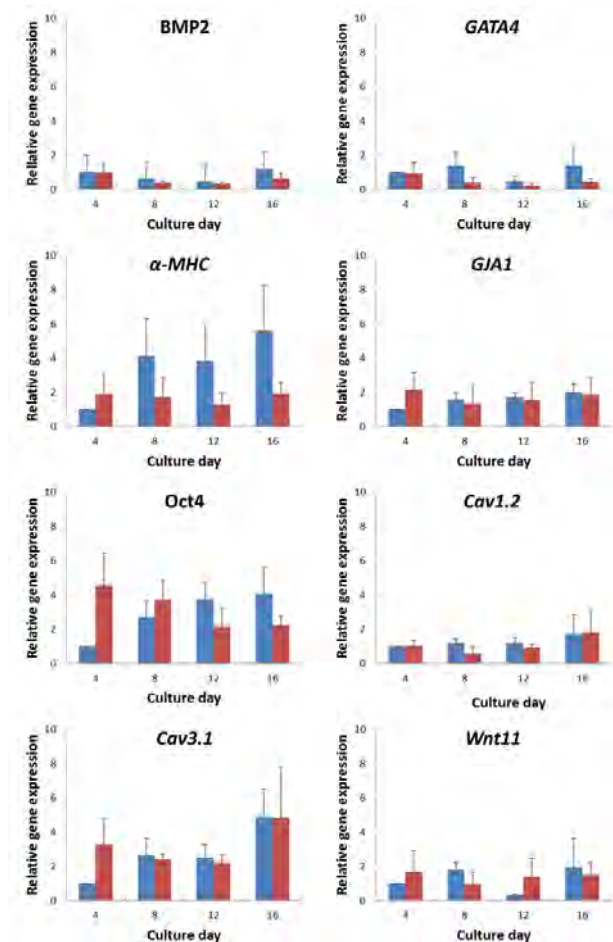


図 5. 心筋分化に関わる遺伝子発現解析

青いバーが分化誘導条件下、赤いバーが AFS 培養条件下でそれぞれ 16 日間培養した細胞に付いての各遺伝子の相対発現量を示す。GAPDH の発現をコントロールとした。

3) AFS を用いた心筋培養と分化誘導

AFS は上記のとおり骨の再生に貢献する足場材料として開発された。また繊維状の HAp をもとに作られるため、繊維同士の絡み合いからマイクロポアが形成される。さらに繊維の中にカーボンビーズを混ぜて成形し、焼結させることでマクロポアが形成される。マイクロポアは培地循環の通り道として機能し、マクロポアは細胞増殖の場として機能することが期待されている。さらにこの気孔率の高さのために AFS 自体はスポンジのような弾力性を持っている。我々はこの弾力性を軟組織の再生に利用できるのではないかと考えた。そこで今回は心筋組織再生に用いることが可能であるかについて検討を進めた。心筋細胞は発生初期に組織としての機能分化を完了し、成長に伴い細胞体積の増加は見られるものの、細胞自身の増殖はほとんど見られなくなる。我々は、マウス胚性腫瘍細胞 P19.CL6 細胞を AFS 内で培養し、その遺伝子発現を解析した。DMSO を含む分化誘導条件下と、AFS 内で DMSO 処理せず播種した細胞について培養 4, 8, 12, 16 日目に RNA を抽出し、Real time-PCR による遺伝子発現解析を行った(図 5)。中胚葉分化誘導因子 *BMP2*, *GATA4* に付いては分化誘導条件より AFS 内培養の方が若干発現量が抑えられる傾向が見られた。また細胞接着に関与する *GJA1*、カルシウムチャンネルである *Cav1.2*, *Cav3.1*、心筋分化に関与する *Wnt11* において dish 上での分化誘導条件とほぼ同等の発現量が、AFS 中の培養でも認められた。後期心筋分化マーカー遺伝子である α -MHC では、AFS 内培養において発現量は少ないものの早期から一定の発現がみられ、day 16 までに変化する事が無かった。未分化マーカー遺伝子である *Oct4* は分化誘導条件では発現量が上昇傾向にあるのに対し、AFS 内培養では経時的な発現の減少が見られた。これらのことから、骨分化で見られた時と同様に、dish 培養による分化誘導条件下では細胞の増殖と分化が同期的に進行するのに対し、AFS 内で培養された P19.CL6 細胞は、局所的に細胞分化が開始され、連続的に分化が進行していくことが考えられた。この結果から AFS 特有の分化様式が骨芽細胞以外でも起こる事が考えられた。しかし、この場合も骨分化と同様に局所的な細胞の分化と AFS 全体での分化を区別することが難しく、AFS の機能性を正確に評価できるとは言えない。

そこで細胞の機能分化の指標として成熟した心筋細胞で細胞間の情報伝達に寄与する connexin に着目した。特に connexin43 は成熟した心筋細胞に発現し、細胞間でカルシウムを介したシグナルの伝搬に寄与している。Dish 培養した P19.CL6 細胞にお

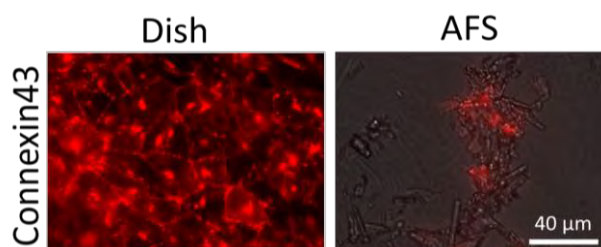


図 6. Connexin 43 の局在解析
P19.CL6 細胞を 16 日間培養し Connexin 43 特異的抗体を用いて関節蛍光抗体法によりその有無と局在を調べた。

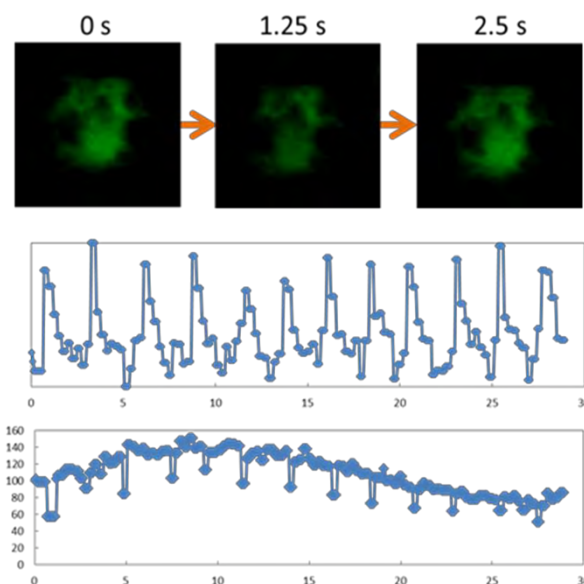


Fig. 7 *pTnnt2::GCaMP5G* で形質転換した細胞の観察
形質転換後の細胞を分化誘導条件下で培養すると、GFP の蛍光強度が変化する様子が観察された(上段)。その周期性(中段)は、明視野で細胞が収縮する振幅(下段)と一致していた。

ける connexin43 の局在は、心筋細胞同士が接する境界域にドット状または線状に局在していることが確認できた(図 6 左)。一方、AFS 中で 16 日間培養した後に切片を作製し、その局在を確認したものは、dish 培養した時とは異なり、線状の局在は示さず、AFS の絡まりあいの中で斑点状に染色されるのみであった(図 6 右)。この結果は細胞間接着が十分に形成されていない可能性を示唆している。これまで 16 日間で心筋細胞の分化は十分に進行すると考えていたが、上記遺伝子発現の結果と合わせて考えると、より長期間の培養、ないしは初期播種数の再検討が必要であることが考えられた。

我々はさらに心筋細胞が最終的に機能的/拍動性をもった細胞に分化しているかを、三次元環境下でも解析出来る評価系を確立必要があると考え、拍動に伴い蛍光強度が変化する蛍光タンパク質を導入した細胞系の確立を目指した。

4) カルシウム応答型蛍光タンパク質導入細胞の解析

今回のコンストラクトでは、心筋分化の最終段階になり蛍光タンパク質が発現することから、スクリーニングは抗生物質に対する耐性でしか実施することができない。そのため遺伝子の導入効率向上のための条件検討を、遺伝子導入後すぐに発現する pCMV::GCaMP5G を用いて実施した(data not shown)。P19.CL6 細胞へ導入効率は思わしくなく、最も高い値でも 10%程度であった。そのため、一過的導入した細胞について解析を行った。またカルシウムの細胞内流入はカルシウムイオノフォア A23187 を培地中に添加する事で確認した。その結果、16 日間の培養後も一部の細胞で拍動ともなう蛍光強度変化が観察出来、その蛍光強度の変化は、細胞が収縮する周期と一致していた(図 7)。上記の事から、遺伝子が導入された細胞では細胞が分化し、自発的な拍動を開始すると、その拍動を蛍光強度の変化として捕らえられる事が確認出来た。

4. 結論

本研究では、AFS の機能性を評価することと、その評価系に蛍光タンパク質を用いてことで、機能性の詳細を解析することを目的とした。今回の解析からわかってきたことは、AFS のような三次元の培養環境では、二次元での培養とは異なり、多くの事象が並行して起こっていること。つまり、dish 培養では細胞増殖というフェーズから分化というフェーズに同期的に変化していくのに対し、AFS 中では増殖と分化が複数個所で同時並行的に進行する。そのため細胞の播種を含め、培養環境の最適化が重要な要件として残ることが分かった。骨細胞の分化では、異なるプロモーターにそれぞれ異なる蛍光タンパク質を結合させ、発現させることで、特別な処理をすることとなる細胞分化を経時的に観察できる系を確立した。しかし、上記細胞では二度のスクリーニングを繰り返したために、細胞の継代に伴う変化が見られ、その後の解析では細胞増殖の低下が観察された。現在は、2つのプラスミドを1つにまとめたものを作り出し、一度のスクリーニングで目的の細胞を得ることを試みている。心筋細胞の分化に関しては、機能性の変化を最終的な分化の指標にすることが適切であると考え、当初は細胞間接着因子に着目した。しかし、上記のとおり AFS では局所的な分化が足場材料としての特徴であることが理解されて来たため、カルシウム応答的に蛍光が変化する蛍光タンパク質を用いた系で機能性を評価しようとした。現時点で dish 培養での蛍光を用いた機能性評価に成功したが、AFS 内部での変化は観察できていない。これは上述のとおり、三次元足場材料を用いた場合の培養環境の最適化に起因すると考えている。現在はラジアルフロー型バイオリクターを用いて、条件の最適化に努めている。

5. 参考文献

- [1] M. Aizawa, H. Shinoda, H. Uchida, I. Okada, T. J. Fujimi, N. Kanazawa, H. Morisue, M. Matsumoto and Y. Toyama, *Phosphorus Res. Bull.*, **17**: 262-268(2004).
- [2] M. Honda, T.J. Fujimi, S. Izumi, K. Izawa, M. Aizawa, H. Morisue, T. Tsuchiya and N. Kanzawa, *J. Biomed Mater Res A*. **94**: 937-944 (2010).
- [3] Miki, K., Uenaka, H., Saito, A., Miyagawa, S., Sakaguchi, T., Higuchi, T., Shimizu, T., Okano, T., Yamanaka, S and Sawa, Y. *Stem Cells Transl Med*, **1**: 430-437 (2012).
- [4] Tanaka, A., Yuasa, S., Node, K. and Fukuda, K *Int J Mol Sci*, **16**: 18894-18922. (2015).