

分極ハイドロキシアパタイトの軟骨細胞への影響

東京医科歯科大学 ○江部典子、永井亜希子、野崎浩佑、中村美穂、堀内尚紘、山下仁大

Effect of polarized hydroxyapatite on chondrocytes

by ○Noriko EBE, Akiko NAGAI, Kosuke NOZAKI, Miho NAKAMURA, Naohiro HORIUCHI,
Kimihiko YAMASHITA

1. 研究目的

軟骨組織は神経・リンパ管・血管を欠くことから、損傷を受けた場合には深刻な障害を受ける為、軟骨組織再生の重要性が高まっている。近年、自家培養軟骨の作成が保険適応となったが、軟骨細胞と生体材料を組み合わせ応用した治療法に関しては未だ確立されていない。また、自家培養軟骨移植はドナー側の組織の状態に左右され、培養時間もかかる為、さらなる改良が必要である。一方、これまでの研究で、電荷を付与したハイドロキシアパタイト焼結体、分極水酸アパタイトの骨組織に対する効果や、破骨細胞への効果が論文にて報告されているが、軟骨細胞への検討は行われていない。

そこで、本研究では、分極ハイドロキシアパタイトが有用であるかどうかを検討する為、軟骨細胞の挙動を観察した。

2. 研究成果

2. 1 分極ハイドロキシアパタイト焼結体の作成

ハイドロキシアパタイト粉末を仮焼し、一軸加压成型（120MPa）で圧粉体を作成した。焼結温度は 1250 度、2 時間の水蒸気焼結を行い、放冷した後、焼結率を測定した。本研究で使用した焼結率は平均 96.8%のものを使用した。

分極処理は 30 分 400℃まで昇温した後、400℃で 20 分間維持し、電圧（5kV/cm）を印加した後、徐々に温度を降下させ、炉内が 30℃になるまで電圧を印加し続けた。その後 100℃の乾燥庫で一昼夜乾燥させた後、表面の電位をケルビンプローブにて測定した。さらに、熱刺激脱分極電流(TSDC)測定を行い、分極処理の成否確認を行った。表面電位は、負の電荷を帯びたものを N 面、正の電荷を帯びたものを P 面とした。さらに表面電位は 100V－200V のものを使用し、分極していないハイドロキシアパタイト（H 面）も同様の時間 400℃の熱をかけて放冷した。細胞培養の為、ハイドロキシアパタイトのペレットを超音波洗浄した後、培養プレート内に設置してペレット上で細胞培養を行った。

2. 2 ATDC5 細胞（未分化）における分極ハイドロキシアパタイト上の挙動

軟骨の細胞モデルとして ATDC5 細胞を用いた。ATDC5 細胞は理化学研究所から購入し、培地は (DMEM:HamF12=1:1)、5%FBS とし、細胞の増殖活性 MTTAssay を 1,3,5 日で評価を行った。その結果、細胞の増殖活性と分極ハイドロキシアパタイト（N 面、P 面、H 面）の間には有意な相関関係は認められなかった。

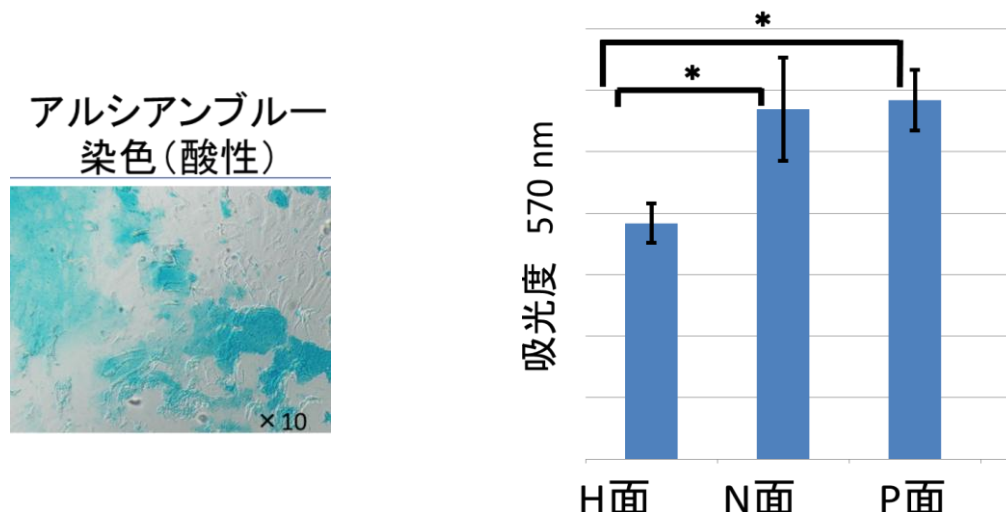
2. 3 ATDC5 細胞（分化）における分極ハイドロキシアパタイト上の挙動

ATDC5 細胞は、インスリン（10μg/ml）を添加することで細胞増殖期からⅡ型コラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外基質を産生する成熟期に移行する。まず、ATDC5 細胞のインスリンを添加した後の細胞増殖に関して、インスリン濃度の条件検討を行った。300nM と 1600nM（10μg/ml に相当）ではほとんど同等の結果が得られた。しかしながら、多くの論文ではインスリン（10μg/ml）

で使用している為、本研究でもインスリン（10 μ g/ml）で培養を行うこととした。

分極 HAp 上で軟骨細胞を培養して、インスリンにて増殖・分化を誘導したところ、培養約 3 週間で、細胞外基質量の増加が観察された。細胞外基質量の測定は、アルシアンブルー染色を行った後、6M グアニジン塩酸塩を用いて溶出させ、吸光度 570nm で測定を行った。アルシアンブルー染色では酸性ムコ物質のカルボキシル基・硫酸基とイオン結合をすることで検出する。未分極 HAp（H 面）と分極（N・P 面）の細胞外基質の量を比較すると、分極 HAp における細胞外基質量の増加が認められた。

今後、さらにインスリン存在下での分極の有無と軟骨細胞（ATDC5）の細胞外基質の量に関して検討し、生体材料としての応用方法を検討していく。



3. 参考文献

1. N. Horiuchi, S. Nakaguki, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Katayama, and K. Yamashita . Polarization-induced surface charges in hydroxyapatite ceramics
J. Appl. Phys. 116, 014902 (2014) 2.
2. Nozaki K, Wang W, Horiuchi N, Nakamura M, Takakuda K, Yamashita K, Nagai A
Enhanced osteoconductivity of titanium implant by polarization-induced surface charges.
J Biomed Mater Res A. 2014 Sep;102(9):3077-86.
3. N. Horiuchi, N. Ebe, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Yamashita,
Evaluation of surface charge on polarized hydroxyapatite using Kelvin probe method
The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel
Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5) Conjunction with 6th IBB Frontier Symposium
19 November, 2014 (東京).

「研究助成」

江部 典子 第56回秋季日本歯周病学会学術大会, シーズ育成若手奨励研究助成, 2014.4-2015.3.