

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07902

研究課題名(和文) 振動分光法による分子配向性ハイブリッド骨細胞スキャホールドの非破壊生体活性評価

研究課題名(英文) Nondestructive bioactivity evaluation of molecular orientated hybrid bone cell scaffold by vibration spectroscopy

研究代表者

大塚 誠 (OTSUKA, Makoto)

武蔵野大学・薬学研究所・教授

研究者番号：90160548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞セルスキャホールド(BS)として、ナノ粒子炭酸アパタイトとコラーゲン、ゼラチン、セルロース誘導体などの有機・無機複合体は分子配向性を持った医療用材料を創生し、これらの高機能生体活性を持つ医療材料の機能を非破壊・非接触で評価するためにテラヘルツ(THz)、ラマン・近赤外(NIR)スペクトルなどにより測定して解析する。また、この材料を基盤として骨形成薬剤含有BSを創生された。そのBSの細胞活性が、骨幾何学構造に依存するかどうかを非破壊・非接触なTHzやNIRにより測定し、多変量解析された。

研究成果の概要(英文)：As a cell scaffold for bone cells, organic/inorganic complexes such as carbonate apatite nano-particulates and, collagen, gelatin or cellulose derivatives complexes (BS) were created as medical materials with molecular orientation. In order to evaluate the high bioactive function of the medical materials, the organic/inorganic complexes were measured by non-destructive and non-contrastive methods such as terahertz (THz), Raman or near infrared (NIR) spectroscopy with chemometrics. In addition, BS containing osteogenic drugs were created based on this material. Whether the cellular activity of the BS depends on the bone geometry structure was measured by non-destructive, non-contact THz or NIR and multivariate analysis was performed.

研究分野：物理系薬学

キーワード：振動分光法 分子配向性 骨細胞スキャホールド 非破壊・非接触生体活性評価 有機無機複合体 テラヘルツスペクトル 近赤外スペクトル 多変量解析

## 1. 研究開始当初の背景

患者の人生に大きな影響と苦痛を与え Quality of Life を大きく低下させる寝たきり状態は、骨粗鬆症などの骨関連疾患をきっかけとして発生する場合が多い。骨粗鬆症患者の生活機能を回復させ、QOL を改善するために人工骨や人工股関節などが医療用器具として適用がなされている。体硬組織への適合性が非常に良いハイドロキシアパタイト (HAP) は、人工骨、人工関節、歯科用インプラントなどに利用されている。一方、生体親和性高分子材料から生体硬組織への新規な薬物送達方法として、ゼラチンなどの生分解性高分子材料を用いた埋め込み型薬物送達システム (DDS) が開発されている。生体親和性無機材料と生体親和性高分子材料から生体硬組織へ薬物を放出制御できる DDS の効率的な創生のために、非破壊・非接触な振動分光法を利用する。

## 2. 研究の目的

生体親和性無機材料である HAP の硬組織への親和性を活かす試みとして、合成多孔性アパタイトビーズを用い抗生物質や抗癌剤の薬物放出制御が行なわれてきた。しかし、高温で焼結した人工骨からの薬物徐放化は容易ではない。一方、練合後 HAP に転移し、自己硬化する骨セメントを材料として用いて、セメント内に薬物を埋込することにより薬物放出を徐放化することができた。これらのことから、生体親和性無機材料と生体吸収性高分子材料の特性を生かす試みとして、生体硬組織へ薬物を放出制御できる DDS の創生を検討した。アパタイト系人工骨セメントを基盤として、生体硬組織への親和性や様々な薬剤の DDS を制御し、生体吸収特性とバイオミミック技術を駆使して、病態の程度にตอบสนองして薬剤を放出するインテリジェント DDS を創生する。また、生体親和性無機材料と生体親和性高分子材料の粒子や繊維の配向性に影響する相互作用は、生体硬組織へ薬物を放

出制御や細胞活性に著しく影響する。創生した DDS 機能を有する人工骨の有機・無機材料の分子レベル相互作用とその配向性を非破壊・非接触な振動分光法により測定したスペクトラルピクデータを多変量解析法により分子間レベルで解析し、人工骨の生体親和性・生分解性、薬物放出特性を評価する。一方、我々は、これまでにリン酸カルシウム (CP) を亜鉛徐放性担体として適用した。また、神経組織を再生する新しい人工神経導管を亜鉛徐放性担体としての亜鉛含有 CP、(Zn-CP) をゼラチンの複合化させた膜材料から神経細胞再生チューブを作製し、人工神経導管を作製した。また、長期間の注射形薬物放出制御法として、薬物徐放が可能な PLGA を微粒子キャリアとして、骨形成効果を有するシンバスタチン (SMV) を封入した PLGA マイクロ粒子 (MSPs) を調製し、骨親和性を有する炭酸含有アパタイトに MSP を充填した MSPs/CAP を開発した。

## 3. 研究の方法

サンゴ由来の三リン酸カルシウムとリン酸カルシウムから自己硬化型アパタイトセメント原料を合成した。サンゴ由来自己硬化型アパタイトセメントに魚由来ゼラチン添加して自己硬化型ゼラチンアパタイト複合化セメントを調製した。この自己硬化セメント骨成長因子として SMV を加えてた。 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  と  $\text{CaHPO}_4$  を 1:1(mol) で混合した混合物 2g にゼラチン 0.1g, SMV 0.1g, リン酸水溶液 (0.01mol/L) 2.3ml を練合し 0.5mm のメッシュを用い湿式押し出し造粒を行った。得られた粒子を転動造粒し、それを湿度 100%、37 で 24hr 保存することにより球形のサンゴ由来の SMV 含有ハイドロキシゼラチンアパタイトを作製した。その性質は X 線回折試験で評価した。SMV の溶出試験は卓上型振とう恒温槽で 37、 $36\text{min}^{-1}$  にて行なった。紫外分光光度計で吸光度を測定することで評価した。また、神経組織を再生する新しい人工

神経導管を亜鉛徐放性担体としての亜鉛含有 CP, (Zn-CP)をゼラチンの複合化させた膜材料から神経細胞再生チューブを作製した。出発物質は  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{ZnO}$ 。Zn から湿式メカノケミカル合成し、Zn 徐放性 CaP 粉末を得た。豚皮由来のゼラチン水溶液に粉末粒子径の異なる Zn-CP 粉末を加え、Zn-CaP 懸濁液を調製し、チューブ状に成形・乾燥後、150℃ 熱処理により重合させ人工神経導管を作製した。一方、薬物徐放が可能な PLGA を微粒子キャリアとする注射剤として、骨形成効果を有する SMV を封入した PLGA マイクロ粒子 (MSPs) を調製した。骨親和性を有する炭酸含有アパタイトに MSP を充填した MSPs/CAP を開発した。まず、O/W エマルジョン法を用いて、MSPs を調製した。CAP は、アパタイトセメントに  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を用いて、練合後 24 時間 100% 湿度下で自己硬化させ調製した。この CAP 中に、SMV 及び MSPs を充填し、それぞれ SMV/CAP 及び MSPs/CAP を作製した。物性評価は X 線回折法及び FT-IR 法を用いて行った。また、疑似体液 (SBF) 中での溶出試験を行い、SMV の溶出メカニズムを解明するため、各複合体の溶出モデル解析を行った。さらに、マウス由来骨芽細胞様細胞を用いて、各複合体の細胞増殖能及び分化能の評価を行った。そして、ラットの卵巣摘出した骨粗鬆症モデルを作製後、頭蓋冠欠損部位での各複合体の新生骨形成効果を試験した。

#### 4. 研究成果

##### ゼラチン・ハイドロキシアパタイト球形化顆粒からの抗骨粗鬆症薬の放出制御

SMV は、骨芽細胞中の BMP-2 発現を促進させ骨形成を促進することが知られている。骨形成には時間がかかるため、SMV を徐放化させ欠損部位への投与回数を減らすことが望まれる。また、ハイドロキシアパタイトは骨親和性が高く、骨欠損部に埋入するとハイドロキシアパタイトの吸収と自家骨

の再生が繰り返され、最終的に自家骨に置換されることが知られている。また、球形顆粒は欠損部位へ投与に適した形である。サンプルを直径で 1.18~1.4mm, 1.4~1.7mm, > 1.7mm の 3 サイズに分け PBS3ml 中で 1 週間溶出試験を行なった。直径約 1~2mm のサンプルが得られた。得られたサンプルは XRD でハイドロキシアパタイトであることを確認した。溶出試験で SMV が徐放化されていることが確認された。7 日目の時点で 1.18~1.4mm で約 25%, 1.4~1.7mm, > 1.7mm で約 30% の SMV が溶出した。球形の SMV 含有ハイドロキシアパタイトを作製することができた。また、SMV が徐放化されていることが分かった。

##### 亜鉛含有リン酸カルシウム・ゼラチン複合化神経細胞再生チューブからの In-vitro 亜鉛放出制御

骨芽細胞中の BMP-2 発現を促進させ骨形成を促進する SMV (SV) を徐放化させるために、球形の SV 含有ゼラチン・ハイドロキシアパタイト (HA) 顆粒を作製し、サンゴ由来の炭酸 HA の類似化合物に SV を加えて、その混合物に豚皮膚ゼラチン、SV を混合し、リン酸水溶液 (PBS) を練合し湿式押し出し、マルメライザーで球形にした。得られたサンプルは XRD で HA であることを確認した。薬剤放出試験で SV が徐放化されていることが確認された。7 日目で約 30% の SV が溶出した。本実験により球形の SV 含有 HA から SV が徐放化されていることが分かった。一方、亜鉛 (Zn) は生体内外における必須微量元素であり、細胞の増殖・分化など促進する。我々は、これまでにリン酸カルシウム (CP) を亜鉛徐放性担体として適用した。また、神経組織を再生する新しい人工神経導管を亜鉛徐放性担体としての亜鉛含有 CP, (Zn-CP) をゼラチンの複合化させた膜材料から神経細胞再生チューブを作製した。出発物質は  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{ZnO}$ 。Zn から湿式メカノケミカル合成し、Zn 徐放性 CaP 粉末を得た。豚皮由来の

ゼラチン水溶液に粉末粒子径の異なる Zn-CP 粉末を加え、Zn-CaP 懸濁液を調製し、チューブ状に成形・乾燥後、150℃ 熱処理により重合させ人工神経導管を作製した。SEM/EDS により Zn-CP の粒子径に Ca, P, Zn が均一に分散していることが確認できた。Zn-CP の Zn の含有率の違いによって Zn の放出量が制御できることが示された。PBS 中での放出試験より Zn-HA の Zn の含有率と粒子径の違いにより Zn の放出制御が可能であった。

#### 骨再生足場材料への応用を目指した低温焼結 PLGA マイクロスフェアの開発

薬物徐放が可能で PLGA をキャリアとして、骨形成効果を有する SMV を封入した PLGA マイクロ粒子 (MSPs) を調製した。骨親和性を有する炭酸含有 HAP (CAP) に MSP を充填した MSPs/CAP を開発した。また、比較対照として、直接 SMV を CAP に含有した SMV/CAP を調製し、各複合体の *in vitro* 及び *in vivo* における骨形成能を評価した。まず、O/W エマルション法を用いて、MSPs を調製した。疑似体液 (SBF) 中での溶出試験を行い、SMV の溶出メカニズムを解明するため、各複合体の溶出モデル解析を行い、MSPs は SBF 中で約 1 か月間 SMV を放出した。MSPs/CAP は、MSPs と比較して有意に初期バースト効果が抑制され、SMV の 0 次放出を示した。一方、SMV/CAP は約 2 週間で SMV を放出した。マウス由来骨芽細胞様細胞を用いる MC3T3-E1 細胞試験では、各複合体の細胞増殖能及び分化能の評価を行い、CAP 存在下で有意に増殖することが示唆された。一方で、MSPs/CAP が有意に分化促進しており、SMV 徐放能が細胞分化能に寄与していることが示唆された。そして、ラットの卵巣摘出した骨粗鬆症モデルを作製後、頭蓋冠欠損部位での各複合体の新生骨形成効果を調べた。MSPs/CAP は、元来の骨セメントの骨結合誘導能に加えて、骨形成効果を有する SMV を徐放することで、骨再生に有利な環境を作り出していることが示唆された。

#### イブプロフェン/ニコチンアミドによるココリスタル形成過程の分子挙動とその速度論解析

難水溶性の医薬品と易水溶性の添加剤 (コフォーマー) とで構成されるココリスタル (C0) は、有効成分の化学構造の変化を伴わずに、その物理化学的性質を変えることができる。ゆえに、近年、難溶解性医薬品に易水溶性添加剤との C0 の形成により水溶性を改善して、製剤の生物学的利用能を高めることを目的に近年活発に研究が活発に行われている。されている。C0 の調製法は、として、溶媒留去法、スラリー法、混合粉砕法、溶融法等、種々の方法が知られている。C0 の作製方法は数多あるが、それらの方法で調製されたすべてで同じ C0 の性質が同一であるかの保証はないが得られるかは分からない。よって本研究ではモデル薬物をイブプロフェンとニコチンアミドとし、種々の調製方法により調製した C0 試料の物理化学的性質の差異の検証を行った。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. T. Terukina, H. Saito, Y. Tomita, Y. Hattori, M. Otsuka, Development and effect of a sustainable and controllable simvastatin-releasing device based on PLGA microspheres/carbonate apatite cement composite: *In vitro* evaluation for use as a drug delivery system from bone-like biomaterial. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 査読有, 37 74-80 (2017).  
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.10.007>
2. T. Terukina, T. Numaguchi, Y. Hattori, M. Otsuka, Development of Controllable Simvastatin- Releasing PLGA/ -TCP Composite Microspheres Sintered Scaffolds as Synthetic Bone Substitutes, *Key Engineering Materials*,

査読有、758:126-131,  
(2017),DOI10.4028/www.scientific.net/K  
EM.758.126.

3. 齊藤花江,照喜名孝之,細越貴裕,  
服部祐介,大塚 誠, シンバスタチン含有ゼ  
ラチン・ハイドロキシアパタイト球形顆粒  
の開発とシンバスタチンの放出制御, バイ  
オインテグレーション学会誌、査読有、6(1),  
63-69 (2016).
4. J. Chou, J. Hao, H. Hatoyama, B.  
Ben-Nissan, B. Milthorpe, M. Otsuka,  
Effect of biomimetic zinc-containing  
tricalcium phosphate (Zn-TCP) on the  
growth and osteogenic differentiation of  
mesenchymal stem cells, J. Tissue Eng  
Regen Med, 査読有、9(7), 852-858, (2015),  
DOI: 10.1002/term.1901

[学会発表](計 20 件)

1. 沼口 貴範, 照喜名 孝之, 服部 祐  
介, 大塚 誠, 骨誘導性機能を有する薬物徐  
放性足場材料としての低温焼結 PLGA マイ  
クロスフェアブロックの開発と in vivo の  
評価, 日本薬学会 138 年会、2018 年.
2. 佐々木 哲朗, 坂本 知昭, 大塚 誠,  
高精度テラヘルツ分光スペクトル測定によ  
る有機結晶中の高感度不純物検出, 日本薬  
学会 138 年会、2018 年.
3. 松林信人, 照喜名孝之, 服部祐介,  
大塚 誠, 佐々木哲朗、リン酸カルシウム被  
覆 PLGA ナノ粒子封入アルギン酸ビーズの  
開発と評価, 平成 29 年度生体医歯薬工学共  
同研究拠点成果報告会, 2018 年.
4. 石原聡恵, 服部祐介, 大塚 誠, 佐々  
木哲朗、イブプロフェン・ニコチンアミド  
によるコクリスタル形成過程の分子挙動と  
その速度論解析, 平成 29 年度生体医歯薬工  
学共同研究拠点成果報告会, 2018 年
5. 照喜名孝之, 齊藤花江, 沼口貴範,  
服部祐介, 大塚 誠、薬物放出性骨補填材と  
してのシンバスタチン徐放性 PLGA マイク

ロスフェア/炭酸アパタイト複合体の開発  
と評価、第 7 回バイオインテグレーション  
学会、2017 年

6. 齊藤花江, 照喜名孝之, 服部祐介,  
佐々木哲朗, 大塚 誠, 亜鉛含有リン酸カ  
ルシウムの合成機構の解明および結晶性・  
亜鉛放出性の予測, 日本薬学会 第 137 年  
会, 2017 年
7. 松林信人, 照喜名孝之, 服部祐介,  
大塚 誠, 細胞送達キャリアとしての多機能  
性アルギン酸ビーズの開発, 日本薬剤学会  
第 32 年会, 2017 年.
8. 沼口貴範, 照喜名孝之, 服部祐介,  
大塚 誠, 骨再生足場材料への応用を目指し  
た低温焼結 PLGA マイクロスフェアの開発,  
日本薬剤学会第 32 年会, 2017 年.
9. T. Terukina, T. Numaguchi, Y.  
Hattori, M. Otsuka, Development of  
simvastatin-releasing nano-  
hydroxyapatite/PLGA composite  
microspheres sintered scaffolds, 2017  
Annual Meeting of American Association  
of Pharmaceutical Scientists, 2017 年.
10. T. Terukina, T. Numaguchi, Y.  
Hattori, M. Otsuka, Development of  
controllable simvastatin-releasing  
PLGA/ -TCP composite microspheres  
sintered scaffolds as synthetic bone  
substitutes, 29th Symposium and Annual  
Meeting of the International Society for  
Ceramics in Medicine, 2017 年.
11. 齊藤花江, 細越貴裕, 服部祐介, 大  
塚 誠, シンバスタチン含有ゼラチン・ハイ  
ドロキシアパタイト球形化顆粒からの薬物  
放出制御、日本薬学会第 136 年会、2016 年
12. 大塚 誠, 鳩山宏一, J. CHOU, 服部  
祐介, 多孔性亜鉛含有リン酸三カルシウム  
球形顆粒の調製と亜鉛放出制御、日本薬学  
会第 136 年会、2016 年
13. T. Terukina, H. Saito, Y. Tomita, Y.

Hattori1, M. Otsuka, Development of controllable simvastatin-releasing device based on PLGA microspheres/carbonate apatite cement composite, International Symposium on Biomedical Engineering, 2016年

14. T. Terukina, Y. Tomita, Y. Hattori, M. Otsuka, Development of Sustainable and Controllable Simvastatin-Releasing Device Based on PLGA Microspheres/Carbonate Apatite Cement Composite Scaffold for Useful Osteoporosis Treatment, 2016 Annual Meeting of American Association of Pharmaceutical Scientists, 2016年.

15. 照喜名孝之, 齊藤花江, 富田湧矢, 服部祐介, 大塚 誠, 骨粗鬆症治療のためのシンバスタチン封入 PLGA 粒子/炭酸含有アパタイト複合体の開発, 第38回バイオマテリアル学会, 2016年11月

16. H.Saito, T.Terukina, Y.Hattori, T. Sasaki, M.Otsuka, Elucidation of the Reaction Mechanism in Mechanochemical Synthesis of Zinc Containing Calcium Phosphate, and the Prediction of Their Crystallinity by Near-Infrared Spectroscopy, 2016 Asian Near-Infrared Spectroscopy Symposium, 2016年

17. 小室 摩記, 服部 祐介, 大塚 誠, 亜鉛含有リン酸カルシウム・ゼラチン複合化神経細胞再生チューブからの In-vitro 亜鉛放出制御、日本薬剤学会第30年会、2015年

18. Y. Hattori, H. Fuji, M. Otsuka, Non-destructive Testing of Physical Property and Chemical Content of Tablets by Diffuse Transmitted Laser Beam Pattern Analysis, American Association of Pharmaceutical Scientists, 2015年

19. 大塚 誠, 小室摩記、服部祐介、亜

鉛徐放性有機・無機複合化神経細胞再生チューブからの In-Vitro 亜鉛放出制御、第37回日本バイオマテリアル学会、2015年  
20. 齊藤花江, 細越貴裕, 服部祐介, 大塚 誠, ゼラチン・ハイドロキシアパタイト球形化顆粒からの抗骨粗鬆症薬の放出制御、若手医療薬科学シンポジウム、2015年

〔図書〕(計 1件)

1. 照喜名孝之, 服部祐介, 大塚 誠, 生体吸収性材料の開発とその安全性評価(No.1927), 2章 再生医療用足場材料に用いる生体吸収性材料の開発と評価、5節 有機-無機複合体を用いた生体組織足場材料の作製、102、2017年, 株)技術情報協会.

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕(計3件)

1. 大塚 誠, 病態応答性薬物放出特性を持つアパタイト系人工骨の設計, PHOSPHORUS LETTER No.91, 6-17 (2018).
2. 大塚 誠, 服部祐介, 骨粗鬆症病態応答性亜鉛徐放特性を持つリン酸カルシウム系人工骨の設計, Biomedical Research on Trace Elements, 28(3): 127-134, (2017).
3. 照喜名孝之, 齊藤花江, 沼口貴範, 服部祐介, 大塚 誠, 薬物放出性骨補填材としてのシンバスタチン徐放性 PLGA マイクロスフェア/炭酸アパタイト複合体の開発と評価, バイオインテグレーション学会誌, 7, 59-65 (2017).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大塚 誠 (OTSUKA, Makoto)  
武蔵野大学・薬学研究所・教授  
研究者番号: 90160548

### (2)研究分担者

佐々木哲朗(Sasaki, Tetsuo)  
静岡大学・電子工学研究所・特任教授  
研究者番号: 20321630