

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14142

研究課題名(和文) 生体吸収性非晶質リン酸カルシウム薄膜を担体とした薬剤徐放型インプラントの創製

研究課題名(英文) Fabrication of drug-release type implant using amorphous calcium phosphate film as a carrier

研究代表者

上田 恭介 (Ueda, Kyosuke)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40507901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非晶質リン酸カルシウム(ACP)の生体吸収性に着目し、ACP薄膜の徐放に伴う骨形成タンパク質(BMP-2)の放出制御を試みた。ACP薄膜をBMP-2溶液に浸漬させることでBMP-2を担持させた。PBS(-)にて希釈したBMP-2溶液を用いた場合、ACP薄膜からのBMP-2放出は12 hまで続き、徐放させることができた。ヘパリンを共添加した溶液にて担持させた場合は、BMP-2は1 h以内に放出していた。以上の結果から、ACP薄膜はBMP-2の担体として有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone morphogenetic protein (BMP) was loaded on amorphous calcium phosphate (ACP) film by immersion in BMP-2 solution. The releasing behavior of BMP-2 from ACP film was evaluated. The amount of BMP-2 loaded on ACP film by immersion in PBS(-) without heparin was higher than that with heparin. The BMP-2 loaded on ACP film by immersion in PBS(-) without heparin was released continuously for 12 h.

研究分野：医用材料工学

キーワード：生体材料 材料加工・処理 非晶質リン酸カルシウム コーティング 薬剤徐放 骨形成タンパク質

1. 研究開始当初の背景

人工関節ステム部や人工歯根は骨との迅速で強固な結合が求められるために、多くの表面処理方法が国内外で検討されている。プラズマスプレー法によるハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp)コーティングが実用化されているものの、HApは生体内において安定であるため、インプラントはHApコーティングを介して骨と接触しており、長期間の埋入においてはチタンと骨との直接の結合は達成されていない。

当グループでは、RFマグネトロンスパッタリング法により、高い密着性を有する非晶質リン酸カルシウム(ACP)薄膜を作製できること、生体内において埋入2週間でACP薄膜は完全に溶解し、4週間埋入後では骨とインプラントとが直接接着すること、ACP薄膜の生体吸収性の制御方法としてNb添加に着目し、擬似体液中への溶解量はACP薄膜中Nb添加量の増加に伴い減少することを明らかにした。

一方、リン酸カルシウムは骨組織表面での骨形成能(骨伝導能)を有しているが、骨組織以外での骨形成能(骨誘導能)は有していない。そこで、インプラントの骨適合性のさらなる向上を目的として、骨誘導能を有する骨形成タンパク質(BMP)を用いた表面処理が注目されている。硬組織代替デバイスにおいては、高分子をマトリクスとして骨形成タンパク質の一つであるBMP-2を徐放させることで、骨形成能を向上させる試みが報告されている。

ステント分野においては薬剤溶出型が主流になることは確実視されている。これは、ステント表面に薬剤を含有した高分子等のマトリクスをコーティングし、血管内において徐々に溶解することで薬剤も溶出し、再狭窄を抑制するものである。しかし、高分子マトリクスとして非分解性合成高分子あるいは分解してpHを低下させ炎症を引き起こす生分解性合成高分子が使用されており、安全面に問題がある。

一方、湿式法によるリン酸カルシウムと薬剤(タンパク質)の複合化に関する研究はいくつか報告がある。これはリン酸カルシウムが薬剤徐放の担体となり得ることを意味しているものの、ウェットプロセスによる粉末合成に関する研究であり、コーティングに関する研究はこれまで報告が無い。

2. 研究の目的

これらの知見から、生体吸収性を制御したACP薄膜を担体として、BMP-2等の骨形成タンパク質を徐放させることができれば、硬組織代替デバイスの早期骨形成を達成できると考えた。そこで本研究では、ACP薄膜を担体とした薬剤徐放デバイス創製にむけた、基礎的知見の習得を目的とした。

研究を開始するにあたり、(1)タンパク質取扱い手技の獲得およびBMP-2の定量方法の確立を行った。得られた手技および知見を利用して、(2)ACP薄膜へのBMP-2複合化方法

を確立し、(3)BMP-2およびACP薄膜の放出性を、擬似体液中への溶出量を測定することで評価した。

3. 研究の方法

(1)BMP-2定量方法の確立

BMP-2の定量分析には、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)法を用いた。本法は特異性が高く、目的のタンパク質のみを測定可能、微量($62.5 \sim 4000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)のタンパク質でも測定可能、といった特徴を有している。本研究ではQuantikine ELISA assay kit (DBP200, R&D systems)を用いた。BMP-2粉末にはRecombinant Human/Mouse/Rat BMP-2 (rhBMP-2, 355-BM-010, R&D systems)を用いた。添付のマニュアルに従い、0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)含有4 mM HClにてBMP-2粉末を再構成し、 $10^8 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ のBMP-2溶液を作製した。BMP-2溶液は酢酸緩衝溶液、PBS(-)、RD5P (ELISAキット付属のタンパク質含有溶液)およびこれらに0.1%となるようBSAを共添加した溶液を用いて $4000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ まで希釈し、それぞれの溶液をELISA法にて定量した。図1に希釈系列および測定されたBMP-2濃度を示す。

なお、ELISA分析は連携研究者である金高准教授の指導および設備のもと、行った。

(2)ACP薄膜とBMP-2の複合化方法の確立

プラズマ処理チタン基板($10 \times 10 \times 1 \text{ mm}$)上に、RFマグネトロンスパッタリング法によりACP薄膜(膜厚 $0.5 \text{ }\mu\text{m}$)を成膜した。ターゲットには、ホットプレス法により作製した β 型リン酸三カルシウム($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -TCP)高密度焼結体を用いた。

各種溶媒にて希釈したBMP-2溶液($1.0 \times 10^6 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)にACPコーティングした基板を浸漬し、BMP-2とACP薄膜の複合化を検討した。

ヘパリンは血液凝固阻止作用を有する多糖類の一種であり、負に強く帯電しているため、BMP-2と結合して複合体を作製することが知られている。さらに、ヘパリンはBMP-2の活性低下を抑制する。そこで本研究においては、BMP-2とヘパリンを共添加した溶液中にACPコーティング基板を浸漬し、担持させた。なお、比較材としてACP薄膜をコーティングしていないプラズマ処理基板を同様の条件にて浸漬させ、BMP-2を担持させた。

(3)BMP-2徐放性の評価

BMP-2担持ACP薄膜からのBMP-2の放出性を、擬似体液浸漬法により評価した。擬似体液として0.1%BSA含有PBS(-)を用い、所定の期間浸漬後、試料を取り出し新しい溶液に浸漬させた。各溶液中に放出したBMP-2量をELISA法により測定し、積算放出量とした。なお、擬似体液中に溶出したACP膜は、構成元素であるCa, PをICP法により測定することで評価した。

擬似体液浸漬前後の試料は、薄膜XRDによる相同定、SEM/EDXに組成分析に供した。

4. 研究成果

(1) BMP-2 定量方法の確立

図 1 に示すように、BMP-2 の理論濃度は $4000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ であるにも関わらず、希釈溶液によっては $1000 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 未満の濃度を示した。特に希釈溶液にタンパク質(BSA や RD5P)を含まない場合、低値を示す傾向が得られた。そこで、(3)の擬似体液浸漬試験による BMP-2 の放出性評価においては、正確な定量分析が可能となるよう、0.1%BSA 含有 PBS(-)を用いた。

(2) ACP 薄膜と BMP-2 の複合化方法の確立

図 2 に、PBS(-)およびヘパリン含有 PBS(-)を用いて希釈した BMP-2 溶液に 30 分浸漬後の ACP 膜の EDX スペクトルを示す。いずれの溶液に浸漬した場合においても、ACP の構成元素である Ca, P が基板上から検出されており、ACP 膜は残存していることが分かった。このことから、BMP-2 は ACP 膜上に担持されていることが示唆された。

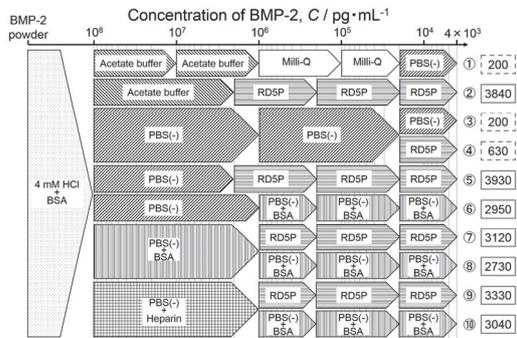


図 1 BMP-2 溶液の希釈系列と測定された BMP-2 濃度

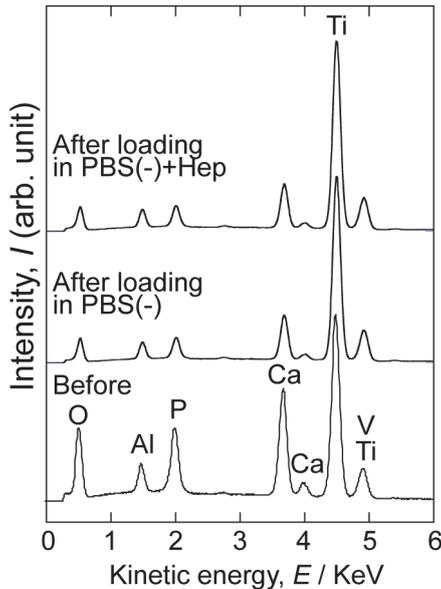


図 2 PBS(-)およびヘパリン含有 PBS(-)を溶媒として希釈した BMP-2 溶液に 30 分浸漬後の ACP 膜の EDX スペクトル

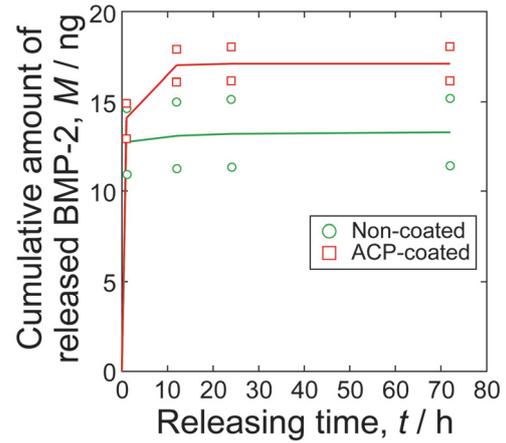


図 3 ACP 薄膜および薄膜無し基板上に担持させた試料からの BMP-2 積算放出量と浸漬時間の関係

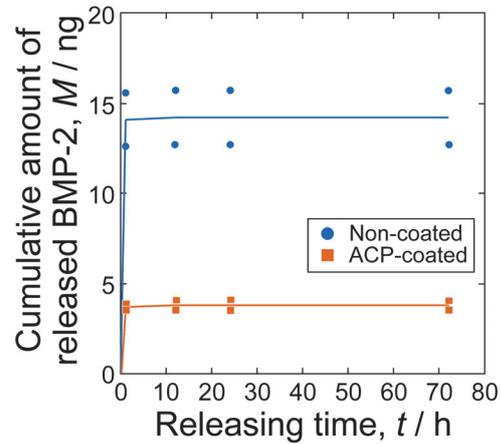


図 4 ヘパリン共添加溶液を用いて担持させた試料からの BMP-2 積算放出量と浸漬時間の関係

(3) BMP-2 放出性評価

図 3 に、ACP 薄膜上に担持させた試料からの BMP-2 積算放出量を、ACP 薄膜無し基板上に担持させた試料と比較して示す。ACP 薄膜無しの場合、BMP-2 は浸漬 1 h 後にほぼ全て放出したのに対し、ACP 薄膜上からは、12 h 後まで放出が続いた。積算放出量が一定となった際の値を担持量と仮定すると、ACP 薄膜上には BMP-2 は約 17 ng 担持されており、これは ACP 薄膜無し(13 ng)よりも高い値であった。ヘパリン共添加条件にて担持させた試料からの BMP-2 積算放出量の浸漬時間依存性を図 4 に示す。ヘパリン共添加溶液を用いた場合、ACP 薄膜の有無に関わらず、1 h の浸漬にて担持された BMP-2 は全て放出していた。BMP-2 担持量は ACP 薄膜上(4 ng)の方が ACP 薄膜無し(14 ng)よりも小さい値を示した。

このときの浸漬試験溶液中への Ca イオン溶出量と浸漬時間の関係を図 5 に示す。24 h

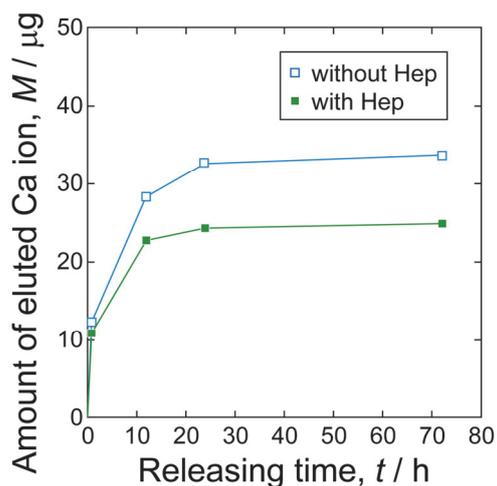


図 5 PBS(-)およびヘパリン含有 PBS(-)を溶媒を用いて ACP 薄膜上に担持させた試料からの Ca イオン溶出量と放出試験浸漬時間の関係

浸漬後まで Ca イオン溶出量は増加しており、ACP 薄膜は残存していたと考えられる。一方、72 h 浸漬終了後試料の EDX 分析からは Ca、P が検出されず、ACP 薄膜は完全に溶解していた。すなわち、BMP-2 は ACP 薄膜の溶解に伴い放出していたと予想される。

一般に、タンパク質の吸着は電気的な引力が関連することが知られており、材料表面のゼータ電位とタンパク質吸着の関係については多くの報告がある。本研究においては、担持溶液中における ACP 薄膜のゼータ電位測定を試みたものの、正確な値を得ることができなかった。同じリン酸カルシウム系材料である HAp のゼータ電位は約 -30 mV と報告されている。そこで本研究においても ACP のゼータ電位は負であると仮定した。なお、基板である Ti (TiO₂) のゼータ電位は負であるものの、その絶対値はリン酸カルシウムよりも小さい。一方、BMP-2 のゼータ電位は正であり、ヘパリンのゼータ電位は負であることから、BMP-2 との複合体も負であると予想される。すなわち、BMP-2 単体の場合は負に帯電した ACP 薄膜に吸着しやすく、ACP 薄膜無し(基板まま)よりも担持量も増えたと考えられる。一方、ヘパリン/BMP-2 複合体においては、ACP 薄膜とは反発することから、基板ままよりも担持量が少なくなったと考察した。

以上の結果から、ACP 薄膜は BMP-2 の担体として有効であることが示唆された。加えて、ACP 薄膜の溶解性を制御することで、BMP-2 の放出速度を変化できると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) 上田恭介, 成島尚之: “抗菌性をもつ生体材料開発,” 炎症と免疫, 25[2], (2017) 110-117.
- (2) O. Gokcekaya, T.J. Webster, K. Ueda, T.

Narushima, C. Ergun: “In vitro performance of Ag-incorporated hydroxyapatite and its adhesive porous coatings deposited by electrostatic spraying,” Mater. Sci. Eng. C, 75, (2017) 556-564. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.msec.2017.03.233

- (3) K. Ueda, R. Hashimoto, M. Hirohashi, T. Wada, H. Kato, T. Narushima: “Formation of porous layer with low Ni content on NiTi substrate by dealloying in metallic melts,” 粉体および粉末冶金, 63[8], (2016) 766-770. (査読有り)

DOI: 10.2497/jjspm.63.766

〔学会発表〕(計 17 件)

- (1) T. Narushima, T. Ueda, S. Sado, K. Ueda: “Surface modification of Ti using bio-ceramic coating,” 2nd Bone and Biomaterials Workshop 2016 年 8 月 8 日, Hotelli Inari, Inari, Finland. (招待講演)
- (2) K. Ueda, N. Kondo, O. Gokcekaya, T. Kasuga, A. Obata, K. Ogasawara, H. Kanetaka, T. Narushima: “Fabrication of a bioresorbable Ag-containing amorphous calcium phosphate coating film and evaluation of its antibacterial activity,” The 9th Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM9) 2016 年 8 月 2 日, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 成島尚之, 上田恭介, 上田隆統志, 佐渡翔太: “セラミックコーティングによる金属表面処理,” 歯科再生・修復医療と材料, シーエムシー出版刊, (2015), pp. 175-185. ISBN コード: 978-4-7813-1084-8

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
上田 恭介 (UEDA, Kyosuke)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 40507901
- (2) 研究分担者
成島 尚之 (NARUSHIMA, Takayuki)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 20198394
- (3) 連携研究者
金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 50292222

- (4) 研究協力者

無し