

令和元年6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11686

研究課題名(和文)薬物徐放制御能を有する次世代型人工骨としてのインテリジェントマテリアルの開発

研究課題名(英文)Development of the intelligent material as the next-generation artificial bone having drug controlled release control ability

研究代表者

二宮 嘉昭(NINOMIYA, YOSHIAKI)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：60335685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨骨髓炎は難治性疾患の1つである。これまでの研究は単一の材料を主体にした研究が行われていたため、その適応範囲や特徴を理解出来なかった。このため、有機・無機材料の欠点を補い、かつ利点を生かした複合材料の開発・研究に着目した。生体吸収性有機材料と生体吸収性無機材料の複合材料に細胞接着因子(RGD peptide)と成長因子(EGF)を配合した後、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の開発を行ったところ、長期の徐放が確認できた。骨芽細胞を用いた各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の初期接着の測定結果より、5時間培養後、すべての徐放担体において良好な初期接着を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨骨髓炎は、現在においても口腔外科領域における難治性疾患の1つであり、骨髓炎の治療にあたっては、外科的療法をはじめ、化学療法や高圧酸素療法などさまざまな方法が考案、検討されており、局所制御を得るための投与方法について未だ一定の見解は得られていない。各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体が開発されれば、国内外を通じて先駆的な研究になるとともに、顎骨骨髓炎の治療期間を短縮できるため臨床応用に即した画期的な研究になると考えている。

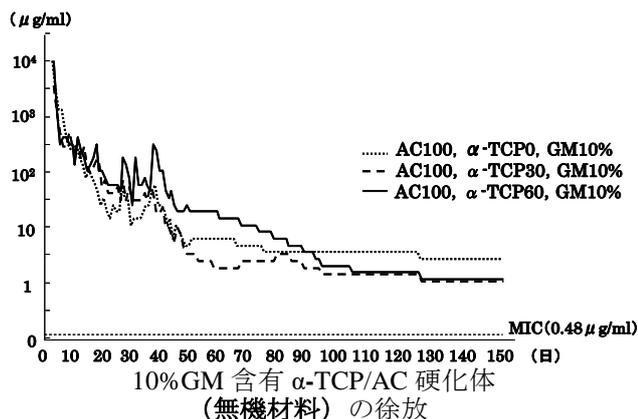
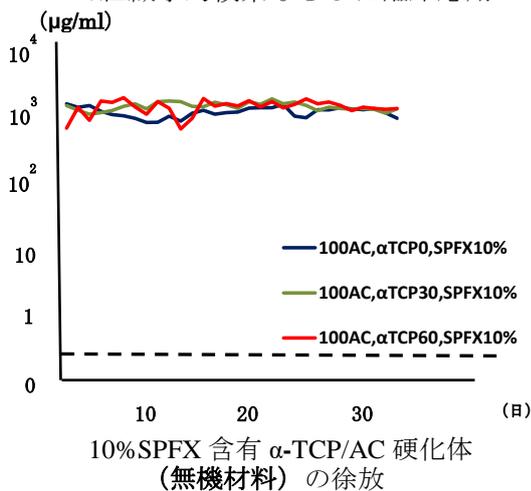
研究成果の概要(英文)：If the osteomyelitis of jaw is one of the intractable diseases, and Drug Controlled Carrier which incorporated various antimicrobial is developed, is pioneer through inside and outside the country; was studied, and accorded with clinical application because could shorten a treatment period of the osteomyelitis of jaw; is epoch-making; think that is studied. After developing the high functional drug controlled release carrier which incorporated various antimicrobial after having combined a cell adhesion factor (RGD peptide) and a growth factor (EGF) with the composite material of a bioabsorbable organic material and the bioabsorbable inorganic material, I was able to confirm long-term controlled release. I showed the good initial adhesion in all controlled release carriers after culture than the initial adherent result of a measurement of the high functional drug controlled release carrier which incorporated various antimicrobial using osteoblasts for five hours.

研究分野：口腔外科

キーワード：複合材料(ハイブリッド材料) 顎骨骨髓炎 細胞接着因子 成長因子 高機能性薬物徐放担体 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

顎骨骨髓炎は、現在においても口腔外科領域における難治性疾患の1つであり、臨床経過が長く変形や機能障害を残し QOL の低下が問題となっている。近年、各種抗菌薬の発達、医療の進歩、口腔衛生状態の向上等により発生自体が減少しているが、難治性疾患としての認識は過去より変化なく、特にびまん性に骨硬化を呈するものにおいては抗菌薬の移行が不良であるために、極めて難治性とされている。また、抗菌薬の多用や濫用により耐性菌が増加し、また医療技術の向上により易感染性患者が社会に復帰する機会が多くなる反面、実地臨床家が本疾患についての経験不足から患者の取り扱いや処置が困難になっている。このため、現代社会においても依然として難治性疾患の1つにあげられる。骨髓炎の治療にあたっては、外科的療法をはじめ、化学療法や高圧酸素療法などさまざまな方法が考案、検討されている。特に外科的療法、化学療法が一般的に適応されており、壊死組織や病的肉芽組織を切除、搔爬に加え、病巣部への抗菌薬の局所濃度を上昇させ、ある一定期間持続的に抗菌薬の効果が発揮されることが重要であるが、静脈内投与された抗菌薬の骨組織への移行性が悪く、健常人でも骨組織への移行は血中濃度の10~30%といわれている。また細菌感染した組織は血流が乏しく、外科的デブリードマン後には組織内の抗菌薬濃度が十分に上昇しないことが問題とされている。局所に特異的に抗菌薬濃度を高めるため点滴注入法、閉鎖式持続洗浄法などが考案されているが、抗菌薬の高い局所濃度を維持し、局所制御を得るための投与方法について未だ一定の見解は得られていない。また顎骨骨髓炎は口腔連鎖球菌だけでなく、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）がその原因菌であることが多く、現在の MRSA は多剤耐性菌であり、バンコマシン、テイコプラニンなど限られた抗菌薬でしか除菌できないことがさらに問題としてあげられる。近年、無機材料であるハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウムセメントなどを担体とした抗菌薬の drug delivery system(DDS)における顎骨骨髓炎への基礎的実験の報告が散見されるようになってきた。しかしながら、無機材料であるリン酸カルシウムセメントは強度を有しているものの、形態付与が困難で溶解・吸収性の面で問題点がある。生体骨とその組成が類似しており、生体内で安定とせれるハイドロキシアパタイトでさえ、形成・加工が難しく、生体内では吸収されないことが知られている。また生体材料として臨床応用されている有機材料は形態付与が容易で加水分解して生体内に吸収されるが、その分解過程で炎症を惹起することがあり、細胞接着力が低く強固な力を必要とする部位などには使用しない。申請者らは以前よりリン酸カルシウムを主体としたアパタイトセメント(AC)（リン酸二カルシウムとリン酸四カルシウムを混和させ、蒸留水などで練和させると石膏のように硬化しハイドロキシアパタイトを形成する）に着目し、その生体材料としての有効性について組織学的検索ならびに臨床応用への模索を行ってきた。



## 2. 研究の目的

これまでの研究は単一の材料を主体にした研究が行われており、広く他の生体材料に目を向けず、その適応範囲や特徴を理解出来なかったため、それぞれの欠点を補い、かつ利点を生かした複合材料（ハイブリッド材料）の開発・研究に注目しなかった。

これまで我々が研究・開発してきたインテリジェントマテリアルの

生体吸収性有機材料は、poly(L-lactic acid)(PLLA)と poly(DL-lactic-co-glycolic acid)(PLGA)の共重合体を使用してきた。

この共重合体は、従来の PLLA 単体よりも吸収性に優れ、強度も調節できる。一方、無機成分としては、リン酸三カルシウム

( $\alpha$ -TCP あるいは  $\beta$ -TCP)、AC を使用してきた。今回我々は、

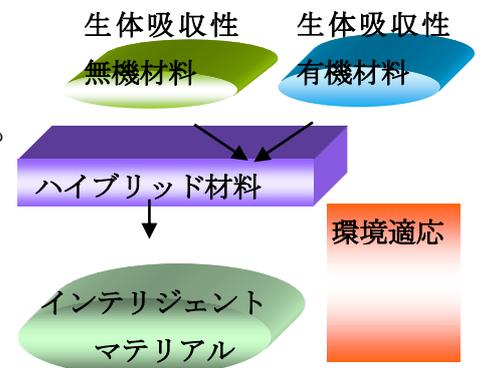
水溶液中で弱アルカリ性を示す炭酸低結晶アパタイトを生体吸収性無機材料として選択する。本材料は、生体骨と同様に炭酸基を数%含む骨類似性を示すため、生体内で吸収される。

これらは生体内で溶解すると、前者は酸性、後者は弱アルカリ性を示すことから、生体内で中和反応を起こし生体為害性がなくなる。

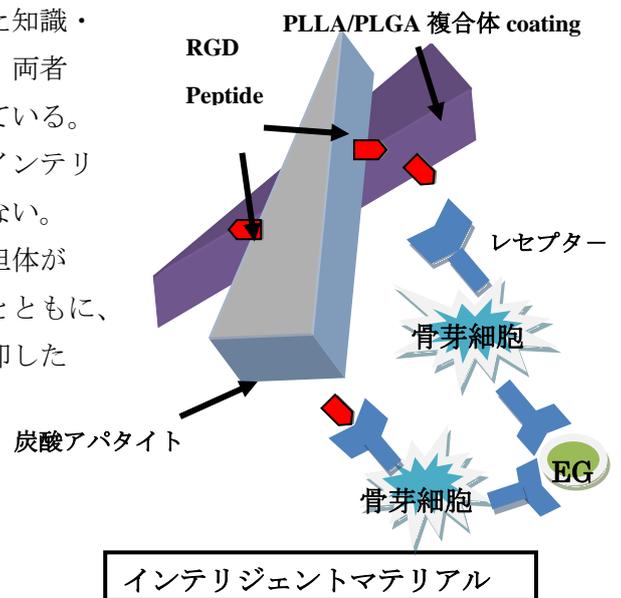
さらに、骨性治癒の観点から、細胞接着因子 (RGD peptide) と成長因子 (EGF) を配合させることで治癒促進の可能性が予測される。なぜならば、PLLA あるいは PLGA 単体は細胞との接着性が低く治癒促進の面から問題になっていたが、RGD peptide を有機材料に入れることで、細胞の足場形成を促進させるように配慮しているからだ。又、EGF は骨芽細胞の増殖に影響し、骨髄炎が治癒促進すると考えられる。このように本研究は、

生体吸収性有機材料と生体吸収性無機材料の長所を生かし、自ら生体内の環境に順応したインテリジェントマテリアルを作成し、それに各種抗菌薬を含有させ高機能性薬物徐放担体を開発することを目的としていることから国内・国外の生体材料研究における先駆的研究であると考えられる。骨髄炎治療に骨補填剤を担体とした drug delivery system の臨床応用は、一部の整形外科領域において試験的に用いられているが、基礎的な実験的研究の報告は少ない。また歯科口腔外科領域での応用はほとんどなく、基礎的なデータが不十分であるとされる。そこで、骨伝導性を有し、さらに比較的早期にセメントが吸収し骨置換され、それと同時に抗菌薬が持続的に徐放するような複合材料（ハイブリッド材料）を調整・設計し、より高機能な薬物徐放担体を開発する必要がある。具体的には、まず

poly(L-lactic acid)(PLLA)と poly(DL-lactic-co-glycolic acid)(PLGA)の共重合体（**生体吸収性有機材料**）に炭酸低結晶アパタイト（**生体吸収性無機材料**）をいろいろな条件で（重量比など）添加し、各種抗菌薬を複合材料内に含有させ作製する。また、練和液にこれまで中性リン酸ナトリウムを用いて基本的な徐放試験を行ってきたが、骨伝導性を高める目的で、メラトニンを用いた検討を行う。なお、以前、申請者がインプラント周囲にメラトニンを浸漬させ組織学的検討を行った結果、コントロールと比較して良好な新生骨の形成を確認した。その後、徐放抗菌薬の有効濃度の持続日数など抗菌薬の特異性について *in vitro* で検討する。また、顎骨骨髄炎動物実験モデルを作製し、高機能性薬物徐放担体を顎骨内に埋入後、その治療効果について X 線学のおよび組織学的評価（脱灰、非脱灰切片を作成し炎症の組織学的評価）で判定する。また、骨伝導性、骨置換性についても検討する。



本研究の開発には、有機・無機材料の両方に精通した知識・技能が必要とされ、著者はこれまでの研究経緯から、両者の特徴を十分に生かせることが可能であると自負している。本研究の概念は比較的新しいため、研究者の間でもインテリジェントマテリアルという言葉は十分に浸透していない。それ故、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体が開発されれば、国内外を通じて先駆的な研究になるとともに、顎骨骨髓炎の治療期間を短縮できるため臨床応用に即した画期的な研究になると考えられる。



### 3. 研究の方法

顎骨骨髓炎の治療期間を短縮するための臨床応用に即した基礎的研究を行う必要がある。研究計画として、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の調整・作製をまず行い、家兎顎骨骨髓炎モデルを作製し、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の抗菌効果および骨伝導能・骨形成能などの組織学的評価を行う。具体的には、顎骨骨髓炎動物モデルを作製した後、炎症の組織学的評価、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の組織親和性と骨伝導性の検討、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の骨置換性の検討を行う。

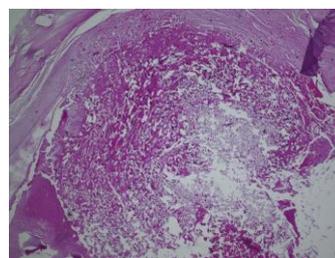
### 4. 研究成果

顎骨骨髓炎を発症した顎骨を搔爬し、死腔のまま閉創したcontrol群、抗菌薬を含まない高機能性薬物徐法担体、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体をそれぞれ埋入する。埋入手術後、一定期間ごとに、ラベリング剤（カルセイン、テトラサイクリン）を投与する。3ヶ月、6ヶ月後に屠殺し、顎骨を摘出して、脱灰、非脱灰組織切片を作製後、炎症の組織学的評価を行ったところ6か月には十分炎症が波及していた。また、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の骨および軟組織に対する組織親和性および骨伝導性についても組織学的に検討したところ、炎症所見はなく、骨形成も十分認められた。



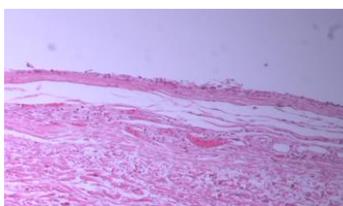
家兎の顎骨骨髓炎モデル

顎下部に膿瘍形成を認めた

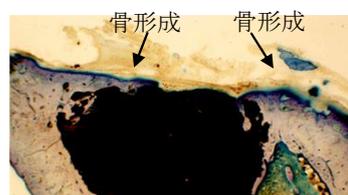


脱灰切片 (HE 染色)

顎骨骨髓炎の形成を認めた



ラット皮下移植後 6W での硬化体周囲の組織親和性



ラット脛骨移植後 6W での硬化体周囲の骨形成像

10%GM 含有  $\alpha$ -TCP30/AC100 硬化体 (無機材料) の脱灰切片 (HE 染色:左図) 非脱灰切片 (TB 染色:右図)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

- 1) Application of interconnected porous hydroxyapatite ceramic block for onlay block bone grafting in implant treatment:A case report(Review). Ohta, K., Tada, M., Ninomiya, Y., Kato H., Ishida F., Hitoshi Abekura., Tsuga K and Masaaki Takechi: EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE,14:5564-5568,2017.査読あり
- 2) Effects of Apatite Cement Containing Atelocollagen on Attachment to and Proliferation and Differentiation of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells. Takechi, M., Ninomiya, Y., Ohta, K., Tada, M., Sasaki K., Mohammad Zeshaan Rahman, Ohta A, Tsuru K and Ishikawa K: Materials, 9:1-8, 2016. 査読あり

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：武知 正晃

ローマ字氏名：TAKECHI Masaaki

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（歯）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00304535

研究分担者氏名：多田 美里

ローマ字氏名：TADA Misato

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科（歯）

職名：助教

研究者番号（8桁）：40572326

研究分担者氏名：中川 貴之

ローマ字氏名：NAKAGAWA Takayuki

所属研究機関名：広島大学

部局名：病院（歯）

職名：病院助教

研究者番号（8桁）：30456230

（平成28年度のみ研究分担者として参画）

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。