

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11748

研究課題名(和文) 光重合型架橋性ビニルエステルを用いた新規多孔型吸収性骨補填材の開発

研究課題名(英文) Development of new porous absorbent bone substitute material using photopolymerizable crosslinkable vinyl ester

研究代表者

原 哲也 (Hara, Tetsuya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60238160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：BMP2を含有した光重合型アジピン酸ジビニル(DVA)で表層を補強したコラーゲンスポンジの吸収性骨補填材としての有用性を評価した。光重合したDVAには細胞毒性は認められなかった。試料をラット頭蓋骨上に埋入した結果、試料内には新生骨の形成が認められ、BMP2含有試料には非含有試料に比べて有意に多くの新生骨が認められた。これらのことから、BMP2含有光重合型DVAで表面処理したコラーゲンスポンジは骨伝導性と生体適合性および骨誘導性を示し骨補填材ならびにBMP2担体として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アジピン酸ジビニル(DVA)を用いて生体吸収性を有する新規骨補填材の開発を行った。コラーゲンスポンジを核として多孔質構造としてコラーゲン表層をDVAでコーティングすることでその構造を維持しつつ強度を確保した。さらにDVAの重合に光重合法を用いることで、生体活性を有する材料をDVA内に含有させることを可能とした。その結果、BMP2含有光重合型DVAで表面処理したコラーゲンスポンジは骨伝導性と生体適合性および骨誘導性を示し骨補填材ならびにBMP2担体として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to evaluate the usefulness of collagen sponge whose surface layer is reinforced with photopolymerized divinyl adipate (DVA) containing BMP2 as a resorbable bone substitute. No cytotoxicity was observed in the photopolymerized DVA. As a result of implanting the sample on the rat skull, new bone formation was observed in the sample, and significantly more new bone was found in the BMP2-containing sample than in the non-containing sample. From these results, it was suggested that collagen sponge surface-treated with BMP2-containing photopolymerizable DVA shows osteoconductivity, biocompatibility and osteoinductivity, and may be useful as a bone substitute and BMP2 carrier.

研究分野：補綴理工系歯学

キーワード：ビニルエステル アジピン酸ジビニル 光重合 BMP2 骨補填材 吸収性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷後あるいは骨腫瘍切除後に広範な骨欠損が生じた場合、これを補填する手段として一般に自家骨の移植が行われる。しかし、自家骨を採取するには健常部に外科的侵襲を加えなければならず、また、その採取骨量にも限度があるため、その自家骨の代わりとなる人工骨補填材の開発が行われてきた。

人工骨補填材としては、骨の無機質の主成分であり骨と直接結合するハイドロキシアパタイト (HA) や生体内で吸収されるリン酸3カルシウムなど種々のバイオセラミックスが開発されてきた。これらのバイオセラミックスは材料の強化のため、700℃以上での焼成処理が不可欠であり、骨形成タンパク (BMP) を表面に含浸させることはできても、含有できないので徐放性の薬効を期待できない。

本研究で注目したジビニルエステルモノマー (VE) は分子内に分解性を有するエステル基と重合時に架橋性を示すビニル基を有することが特徴である。我々は VE のうちアジピン酸ジビニル (DVA, 図1) をコラーゲンスポンジ表面に加熱重合法 (65℃/60min + 100℃/90min) することで、連通多孔性の生体吸収性補填剤の作製に成功し、この材料が骨伝導性を有することを報告した。しかし、加熱重合法では 100℃での加熱処理が必要となり、BMP を含有させることはできない。ジビニルエステルモノマーの重合には多様な重合手段を選択することが可能であり、光重合法によって加熱すること無く重合させることも可能である。

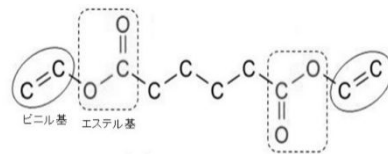


図1 DVAの構造式

2. 研究の目的

アジピン酸ジビニル (DVA) の重合体 (PDVA) はエステル結合に基づいた架橋構造であり、加熱重合型 PDVA は生体内のエステラーゼによって加水分解されることで生分解性を有し、骨補填材として有用であることが確認されている。BMP-2 は骨誘導性を有する蛋白であり、臨床応用に向けて有用な担体の開発が進められているが、高温処理によって生物学的活性が低下する。本研究の目的は、熱処理を必要としない BMP-2 含有光重合型 PDVA で表層を補強したコラーゲンスポンジの吸収性骨補填材としての有用性および骨形成因子 BMP-2 の担体としての可能性を評価することである。

3. 研究の方法

DVA には光増感剤としてカンファーキノン (CQ) 1.2w/v%, 重合促進剤として第3級アミンである 4-(ジメチルアミノ)安息香酸エチル (EDMAB) 4.8w/v% を添加した。直径 8mm のコラーゲンスポンジを厚さ 2mm にトリミングして、D 群には DVA, DB 群には rhBMP-2 (10µg/30µLDVA) 含有 DVA を表面にコーティングし、DVA/コラーゲンスポンジ質量比 13/2 とすることで気孔率 70% として、嫌気条件下で 180 秒間光重合させた。対照群はコラーゲンスポンジとした。

D 群試料の細胞毒性試験には MC3T3-E1 細胞を用い、陽性対照をコラーゲンスポンジ、陰性対象をアクリル板として細胞に 24 時間曝露させた。MTS assay を用いて試料曝露のない細胞の生存率を 100% として各試料の細胞生存率を測定した。骨石灰化試験は PDVA ブロック体上で MC3T3-E1 細胞を用いて骨分化誘導させ、アリザリンレッド染色を行った。

動物埋入試験には D 群、DB 群および対照群試料を用いた。動物は 8 週齢 Wistar 系雄性ラット 45 匹を 15 匹ずつの 3 群に分け、麻酔下で各群の試料を頭蓋骨上正中に位置付けて骨膜と皮膚を縫合した。術後、1, 2 および 4 ヶ月後に各群 5 匹ずつに対して灌流固定を施し、頭蓋骨ごと試料を採取し、病理組織学的観察ならびに骨形態計測を行って骨量 (BV/TV)% を算出した。

統計学的解析は分散分析の後 Tukey 法による多重比較、あるいは t 検定を行い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

細胞生存率はアクリル板では有意に低値を示したが、D 群では有意差を認めず、低毒性であることが示された (図2)。

アリザリンレッド染色では PDVA ブロック体試料表面は赤く染色され、石灰化物の沈着が認められた。これらの結果から、PDVA 細胞毒性は低く生体内で骨芽細胞が接着し骨再生の足場となる可能性があることが示唆された (図3)。

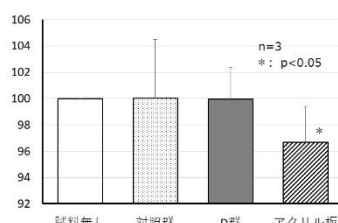


図2 細胞生存率
MC3T3-E1細胞の細胞生存率はD群のPDVAブロックによって影響を受けなかった。

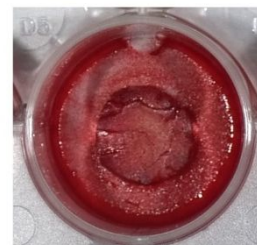


図3 アリザリンレッド染色

PDVAブロック体表面においてMC3T3-E1細胞を石灰化誘導因子含有培地で28日間培養し、アリザリンレッド染色を行った結果、PDVAブロック体試料表面は赤く染色され、石灰化物の沈着が認められた。

また動物埋入試験においてD群およびDB群試料は4ヶ月後においても骨膜下で試料の形態を保っていたことから、本研究試料は骨再生の足場としての強度を有することが示された(図4)。対照群では新生骨の形成は認められなかったが、D群、DB群では全観察期間において部分的に既存骨表面から試料内部への新生骨の形成が認められ、細胞増殖が可能なサイズの連通路構造を有することが示された(図5)。骨量(BV/TV)%はD群、DB群ともに1ヶ月後と比較して2ヶ月後および4ヶ月後において有意に高値を示した。D群では2ヶ月後までは新生骨量は増加したが、その後はほぼ同程度であった。一方、DB群の新生骨量は観察期間を通して増加した。D群とDB群の新生骨量を比較すると、1ヶ月後および2ヶ月後には有意差を認めなかったが、4ヶ月後にはDB群ではD群より有意に高値を示した(図6)。

このことから、DB群試料は動物埋入後にPDVAが徐々に生体内で分解され、それに伴い徐放されたBMP-2が生物学的活性を示して骨形成を持続したと考えられた。

以上の結果から、本研究試料のBMP-2含有光重合型PDVAで表層を補強したコラーゲンスポンジは、生体適合性と骨伝導性およびBMP-2徐放による骨誘導性を示したことから、骨補填材ならびにBMP-2担体として有用である可能性が示唆された。



図4 動物埋入試験DB群4ヶ月後の骨膜下の試料
4ヶ月後においても頭蓋骨上に埋入した試料の形態は保たれていた。

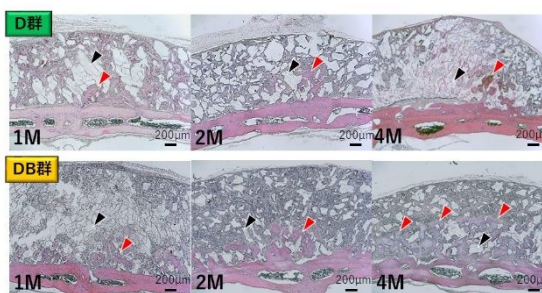


図5 動物埋入試験 (HE染色)

D群：試料内には線維性組織、新生骨(黒色矢印)、PDVA(白色矢印)を認めた。
DB群：試料内には線維性組織、新生骨(黒色矢印)、PDVA(白色矢印)を認め、観察期間を通して新生骨の増加傾向を示した。4ヶ月後においても頭蓋骨上に埋入した試料の形態は保たれていた。

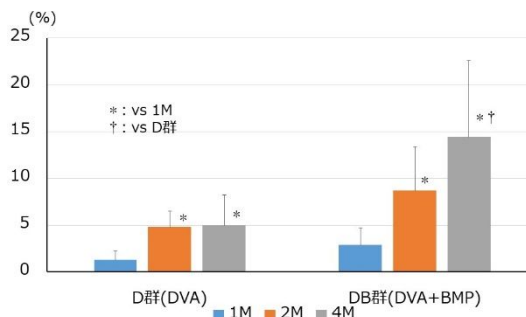


図6 骨量 (BV/TV)

D群：1ヶ月後と比較して2、4ヶ月後は有意に高値を示した。
DB群：1ヶ月後と比較して2、4ヶ月後は有意に高値を示した。4ヶ月後においてD群より有意に高値を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurozumi Akimasa, Hara Tetsuya, Sakamoto Shunichi, Araki Daisuke, Iida-Tamada Sachiyō, Kuroda-Ishimine Chisa, Minagi Shogo	4. 巻 63
2. 論文標題 Effects of the loss and reconstruction of molar occlusal support on memory retrieval and hippocampal neuron density in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research	6. 最初と最後の頁 283 ~ 287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.jpor.2018.12.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田知枝, 原 哲也, 田仲持郎, 清瀧優也, 村上明日香, 桑原実穂, 伊志嶺（黒田）知沙, 坂本隼一, 荒木大介, 玉田（飯田）祥与, 宮崎貴子, 皆木省吾
2. 発表標題 BMP2含有光重合型PDVAで補強したコラーゲンスポンジによる吸収性骨補填材
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第127回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田祐子, 片岡 有, 田仲持郎, 原 哲也, 堀田康弘, 宮崎 隆
2. 発表標題 粉液混和型高性能PMMA/MMA系レジンの開発(その2) - MMAに添加した架橋モノマーが重合反応性に及ぼす影響 -
3. 学会等名 日本歯科理工学会 第71回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田祐子, 片岡 有, 田仲持郎, 原 哲也, 堀田康弘, 宮崎 隆
2. 発表標題 粉液混和型高性能 PMMA/MMA 系レジンの開発(その 3) - MMA に添加した架橋モノマーが硬度に及ぼす影響 -
3. 学会等名 日本歯科理工学会 第72回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 哲也, 村上明日香, 山田知枝, 桑原美穂, 皆木省吾
2. 発表標題 八方向放射状迷路を用いた想起に関する連続学習法と分散学習法の比較
3. 学会等名 認知症と口腔機能研究会第1回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 持郎 (Tanaka Jiro) (40171764)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	皆木 省吾 (Minagi Shogo) (80190693)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究協力者	山田 知枝 (Yamada Chie)	岡山大学・医歯薬学総合研究科 (15301)	