

令和 4 年 1 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18996

研究課題名（和文）ナノTiO<sub>2</sub>粒子に骨形成促進誘導能を付与した人工骨補填材の創製研究課題名（英文）Creative development of artificial bone substitute fillers to granted the ability to promote of induce bone on nano-TiO<sub>2</sub> particles

研究代表者

洞澤 功子（Horasawa, Noriko）

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20165567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：現在の人工骨補填材には骨誘導および骨伝導に非常に時間を要することと、感染リスクがゼロではないという問題がある。そこで本研究には、骨補填材に積極的に骨誘導能と抗菌性を付与した骨補填材の創製を目指した。素材としては、歯科材料において初めての応用となる無機材料のナノTiO<sub>2</sub>粒子を用い、骨誘導能を付与するために有機材料を複合化させて一つの材料とした。その結果、骨芽細胞の増殖を得ることができ、骨誘導能の付与に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノTiO<sub>2</sub>粒子は応用範囲の広い有望な素材でありながら、歯科材料の分野における応用は未だなかった。そこで今回初めての応用となる。また人工骨補填材に骨誘導能が付与されたことにより、歯科用インプラントの固定が早くなることが期待できる。さらに、それによって上部構造物の製作も早く行うことができ、患者の負担を著しく減少することに繋がる。

研究成果の概要（英文）：The current bone substitute filler takes a very long time for bone induction and bone conduction, there is a problem that the risk of infection is not zero. Therefore, in this study, we aimed at the creation of artificial bone substitute fillers that actively impart bone-inducing ability and antimicrobial properties to bone fillers. As the material, using the nano-TiO<sub>2</sub> particles of the inorganic material to be the first application in the dental material, and the single material by composite the organic material in order to impart bone-inducing ability. As a result, it was able to obtain the proliferation of osteoblasts on the new composite materials artificial for bone substitute filler, it was successful in imparting bone-inducing ability.

研究分野：歯科理工学

キーワード：ナノTiO<sub>2</sub>粒子 複合材料 人工骨補填材 骨芽細胞 骨形成促進誘導能 抗菌性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

**背景：** 歯科用インプラント材として用いられている純 Ti は、オッセオインテグレーションに優れている。しかし顎骨埋入後に上部構造物の作製が行えるまでに、約 3 ~ 6 か月を要する。そこで、その期間を少しでも短縮し、早期に骨形成が為されるようにするために、純 Ti 表面の改質についての研究が種々行われている。その中の一つとして我々は、細胞接着性タンパク質の一つである Fibrinogen を用いて Ti 表面の修飾を行った。その結果として、Fibrinogen が有するアミノ酸の RGD 配列が TiO<sub>2</sub> と強い化学結合をなし、さらに BMP の誘導が認められ、骨芽細胞の分化と増殖が有意に促進した (Materials Science and Engineering C 2015, 46:86-96)。これは、Fibrinogen のシャペロン類似効果によるものと考えられる。また Ti 表面を修飾する Fibrinogen の量は、一般には濃い (厚い) 方が良いと考えられていたが、本研究の実験結果から、約一分子層に相当する薄い状態が最も優れている結果も得られた (図 1)。

**動機：** インプラント埋入の際には、症例にもよるが、多かれ少なかれ骨補填材を必要とする。しかし現在市販されている人工骨補填材のほとんどは、その主成分がハイドロキシアパタイトである。ハイドロキシアパタイトは、生体に安全であるが、骨誘導または骨伝導による骨形成の促進への寄与という点における期待は小さい。そこで本研究においては、骨補填材が“骨の代用材料である”との発想を転換し、積極的に人工骨補填材に骨誘導能または骨伝導能を持たせ、骨形成を促進する骨補填材を創製しようと考えた。この発想から、無機材料のナノ TiO<sub>2</sub> 粒子に骨形成を促進する Fibrinogen と Chitosan の 2 種類の有機材料を化学結合させた複合材料を開発しようというものである (図 1)。

図1 背景と動機

- FibrinogenのRGD配列がTiO<sub>2</sub>と化学結合する。
- 純Ti上のFibrinogenがシャペロン類似効果でBMPを誘導する。



- ナノTiO<sub>2</sub>粒子にFibrinogen修飾することにより骨形成促進を図り人工骨補填材を開発
- Chitosanの抗菌効果も付与

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノ TiO<sub>2</sub> 粒子に骨形成促進能を付与するために有機材料を化学結合させた**複合材料**という、斬新な人工骨補填材の開発を行うことである。表 1 に示す骨補填材の必要性和用途を鑑みて、その形状の成型が容易であることが必要である。そこでナノ TiO<sub>2</sub> 粒子を無機材料として用いることとした。現在、市販されている人工骨補填材は、ハイドロキシアパタイト (無機材料) を用いているものが主体であり、骨形成がなされるまでに時間を要する。さらに人工材料であるため、感染リスクがゼロではないという問題点を有する。市販の人工骨補填材の問題点を表 2 にまとめ、その解決策を表 3 にまとめた。無機材料のナノ TiO<sub>2</sub> 粒子に骨形成促進を誘導する 2 種類の有機材料を化学結合させて、複合材料とすることで、表 2 の問題点の解決を図る。細胞接着性タンパク質である Fibrinogen は、アミノ酸の RGD 配列が TiO<sub>2</sub> と強い化学結合をし、さらに BMP の誘導を行うため骨形成促進を促す (Materials Science and Engineering C 2015, 46:86-96)。また天然高分子である Chitosan は、抗菌効果を材料に付与することができる。さらに、あまり知られてはいないが、Chitosan は細胞接着性にも優れているため、骨形成を助長させる効果も期待できる (Mater Sci Eng C Mater Boil Appl 2016 ; 69:733-43、Mater Sci Eng C Mater Boil Appl 2016 ; 69:505-12)。

表1 骨補填材の必要性和用途

- 骨の再生を目的に用いられる。
- 移植骨採取の手術が困難な場合に用いる。
- 自家骨の採取量が少ない場合に用いる。
- インプラント体埋入の際に骨量が不足している場合に用いる (GBR)。
- 歯周骨欠損時の歯周組織再生に用いる (GTR)。
- 歯周病変の病原摘出と歯周組織の改善に用いる (FOP)。

表2 人工骨補填材の問題点

1. 骨誘導および骨伝導に**時間が掛かる**。
2. **感染リスクがゼロではない**。



表3 問題点の改善方法

- 問題点1 — **ナノTiO<sub>2</sub>粒子をFibrinogen**で修飾する方法にてBMPの誘導を行う。
- 問題点2 — **ナノTiO<sub>2</sub>粒子をFibrinogen**で修飾したものに**Chitosan**の結合を図り、抗菌効果を持たせる。

本研究は、骨補填材は“骨の代用材料である”の発想を転換し、人工骨補填材に積極的に骨誘導能または骨伝導能を持たせ、骨形成が促進される材料の創製を考えた。そのために、無機材料のナノ TiO<sub>2</sub> 粒子に骨形成促進能の付与を期待し、Fibrinogen と Chitosan という 2 種類の有機

材料を化学結合させた複合材料の開発を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 結晶系の相違と有材料の化学結合

ナノ TiO<sub>2</sub> 粒子には結晶形の相違によってアナターゼ、ルチル、ブルッカイトの3タイプがある。そこで本研究においては、どの結晶形が最も有用であるかを見極めるために、それぞれの結晶形のナノ TiO<sub>2</sub> 粒子に Fibrinogen 処理、続いて Chitosan 処理を行なった(表4)。

Fibrinogen 処理

それぞれの結晶形に Fibrinogen 処理を行い化学結合させた。

Chitosan 処理

それぞれの結晶形に Chitosan 処理を行い化学結合させた。

Fibrinogen & Chitosan 処理

それぞれの結晶系に Fibrinogen

処理の後、さらに Chitosan 処理を行い有機材料2種類を化学結合させた。

表4 処理と略号

	Fibrinogen	Chitosan	Fibrinogen+Chitosan
Anatase	AF	AC	AF+C
Rutile	RF	RC	RF+C
Brookite	BF	BC	BF+C

#### (2) 骨芽細胞の培養とその分化、増殖の測定

(1)のそれぞれの処理後の複合材料( )、( )、( ) 上において、骨芽細胞の培養を行った。その後、骨芽細胞の培養に成功した処理試料においては、骨芽細胞の分化・増殖を1日、3日、7日間で測定した。

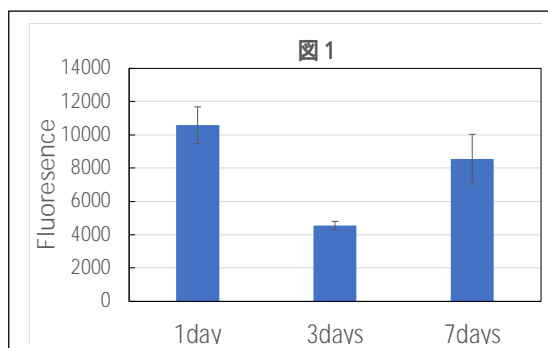
#### (3) マウス脛骨への埋入試験

(2)において骨芽細胞の分化・増殖が認められた試料について、マウス脛骨への埋入試験を行った。マウス脛骨に21G( 8mm)の注射用針を用いて孔を形成し、その孔に複合材料を埋入した。その後、摘出し、組織観察用試料を作製して、顕微鏡観察を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 骨芽細胞の培養結果

複合材料 AF、RF、AC、RC、AF+C、RF+C、BF+C 上においては骨芽細胞の培養が行えた。しかし増殖・分化の測定が行えたのは複合材料 AF、AC、AF+C のアナターゼ型のみであった。図1に複合材料 AF+C の増殖結果を示す。骨芽細胞の培養結果から、アナターゼ型のみを新しい人工骨補填材の開発に用いることとした。



#### (2) マウス脛骨への埋入試験結果

マウス脛骨に形成した孔に複合材料 AF、AC、AF+C とコントロールとして何の処理も行なわないナノ TiO<sub>2</sub> 粒子の4種類を埋入し、3日、5日、7日間後に摘出し、組織観察用試料として作製し顕微鏡観察したところ、コントロールを除いて、すべてにおいて新生骨(NB)の形成が認められた。図2は5日後の典型的な複合材料 AF+C の組織写真を示す。写真の黒い部分が埋入をした複合材料である。また、矢印 NB であらわした部分が新生骨である。複合材料 AF と AF+C においては、極めて顕著に複合材料の埋入部位に新生骨の形成が認められた。新生骨の形成は、埋入した複合材料の微細な間隙に為されたことも確認できる。

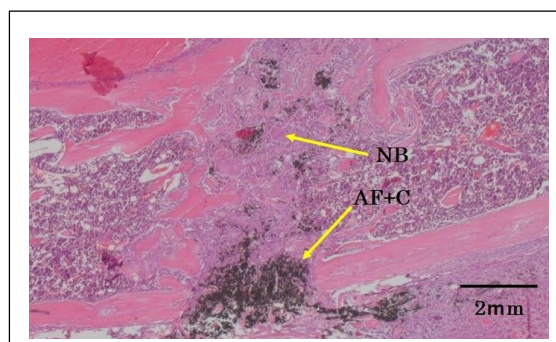


図2

**研究の主な成果:** 骨芽細胞の培養結果、ならびにマウス脛骨への埋入試験結果から本研究において開発した複合材料は、骨誘導能を有し、早期の骨形成がなされることが、明らかとなった。また現有の人工骨補填材の問題点(表2)の両方を解決することができた。以上の結果から、新しい人工骨補填材としての有用性が十分に示唆された。

**得られた成果の国内外における位置づけとインパクト:** 本研究における新しい人工骨補填材の成功は、歯科用インプラント材の固定を促進することにつながり、それは上部構造物の

早期のセットにもつながる。これにより患者の負担は、著しく軽減される。  
国内外において骨誘導能と抗菌作用を有する人工骨補填材は無く、本研究の成果のインパクトは極めて大きいものと承知している。

**今後の展望**：ナノ TiO<sub>2</sub> 粒子は結晶形に 3 タイプがあり、ルチルは化粧品に、アナターゼは光触媒として応用されている。ナノ TiO<sub>2</sub> 粒子は多くの可能性を有した、応用範囲の広い有望な素材である。すでにナノ TiO<sub>2</sub> 粒子は、我々の生活で幅広く、様々な場面で応用されているにも拘わらず、医科歯科系の材料への応用は、ほとんどなかった。それを本研究において、骨誘導能を有した新しい人工骨補填材として創製できた点だけでも、本研究のインパクトは大きい。今後の展望としては、本研究遂行の過程で得られているナノ TiO<sub>2</sub> 粒子の性質等の多くの知見を基に、それに工夫と改良を加えて、更なる医科歯科材料へのナノ TiO<sub>2</sub> 粒子の応用を図ろうと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------