

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006 ～ 2008  
 課題番号：18592194  
 研究課題名（和文） BMP-2 含有アパタイトコーティングチタンインプラントの開発と評価  
 研究課題名（英文） Development and evaluation of apatite-coating titanium implants containing BMP-2  
 研究代表者  
 高橋 哲 (TAKAHASHI TETSU)  
 九州歯科大学・歯学部・教授  
 研究者番号：60226850

## 研究成果の概要：

骨形成を促進する働きを持つ BMP-2 と、BMP の作用を増強させる Heparin を用い、活性を失うことなくチタン表面に固定し強力な生体活性を示すインプラント材料を開発した。本材料を *in vitro* で生物学的に評価し、マウスの骨芽細胞に対して強い骨形成を誘導することを明らかにした。さらにラット脛骨を用い、*in vivo* においても強い骨誘導能を持つことが示され、臨床応用も十分可能であることが示された。

## 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野: 口腔外科

科研費の分科・細目: 歯学・外科系歯学

キーワード: インプラント、アパタイト、BMP-2、生物学的コーティング、骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在チタンインプラントの治療期間として3～6か月が必要である。そこでこの治癒期間の短縮を期待として、骨伝導をはじめ更なる改良が求められている。

BMP-2は、間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化を促進する働きを持っている。今回

この蛋白に注目し、ハイドロキシアパタイトの表面に、BMP-2を固定することができれば、さらに強力な生体活性を示し、治癒期間の短縮を可能にする材料になると考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は、チタン表面をア

ルカリ加熱処理した後、擬似体液に浸漬することによってチタン表面にアパタイトを析出させる方法を応用し、さらにBMP-2を取りこませた協力的な生体活性を示すインプラントを開発するとともに、それを in vitro および in vivo にて評価することを目的とする。これは単なる材料の開発ではなく、組織細胞学的見地から生体材料として好ましいか、生物学的に検討するとともに、その臨床応用をも見すえた研究たることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 培養骨芽細胞を使つての in vitro での骨形成の評価

チタン表面に生物学的に析出した骨様アパタイトを、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、骨形成能を調べる。

チタン表面上に生物学的に析出した BMP-2 を取り込んだ骨様アパタイトを、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて骨形成能を調べる。

##### 【分化増殖期】

- a. 接着骨芽細胞数。
- b. 細胞接着分子 (integrin, focal adhesion kinase, vinculin など) の発現。

##### 【石灰化開始期】

- a. Alkaline phosphatase 活性測定
- b. Osteopontin, osteocalcin 等の骨タンパクの発現測定。

##### 【骨形成期】

- a. 石灰化結節形成量の計測  
以上の計測結果より、BMP-2 含有アパタイト郡と非含有アパタイトの生物活性を評価する。

#### (2) ラット脛骨を用いての成体内骨誘導能の検討

BMP-2 をコーティングしたチタン棒 (直径 1 mm、長さ 2 mm) を用いてラット脛骨に埋め込

んで、Calcein、alizerin を用いた骨標識により骨形成の促進効果を検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養骨芽細胞を使つての in vitro での骨形成の評価

BMP-2 は、骨形成を促進する働きを持っている。さらに、Heparin は BMP の作用を増強させることが報告されている。そのため、BMP-2 と Heparin を同時に、活性を失うことなくチタン表面に固定する事ができれば、強力な生体活性を示すインプラント材料になると考えられる。BMP-2 の担体として Hydroxyapatite (HA) は有用である。そこで我々はチタン表面をアルカリ加熱処理した後、擬似体液 (SBF) に浸漬することによって HA 層を生物学的にコーティングする方法に着目した。この方法を応用して HA 層に BMP-2 および Heparin を取り込ませる事を試みた。

純チタン金属にアルカリ加熱処理を施し、SBF 中に 10 日間浸漬した。一部の試料には SBF に BMP-2 および Heparin を加え、さらに 4 日間浸漬した。SEM および EDX を用いて表面分析を行った。免疫金コロイド電顕法を用いて析出 HA 表面の BMP-2 を標識した。

MC3T3-E1 細胞を播種し、培養 8 日目に ALP 活性を測定した。培養 14 日目に RT-PCR 法にて osteocalcin の mRNA を半定量的に測定した。

SBF に浸漬後、アルカリ加熱処理チタン表面に HA がコーティングされた。BMP-2 を加えた試料では、析出 HA 上に BMP-2 の存在が確認できた。培養 8 日目に ALP 活性が BMP-2 濃度依存的に増加し、Heparin を入れたものではさらに増強した。培養 14 日目では osteocalcin の発現においても同様の結果であった。

生体環境下に限りなく近い状態でコーティ

ングが遂行されたため、BMP-2 は活性を失うことなく HA に取り込まれた事が示唆された。また、高価な BMP-2 に Heparin を作用させる事により、少量の BMP-2 で、骨形成が増強される可能性が示唆された。本研究は、Int Journal of Oral and Maxillofacial Implant に掲載された。

(2) ラット脛骨を用いての成体内骨誘導能の検討

インプラント材料の臨床応用に近づくために in vivo において骨誘導性を検討した。直径 1mm 長さ 2mm のインプラント体を作製し、ラット脛骨に埋入を行い、このインプラント周囲での新生骨形成能を評価した。埋入後1週および3週における新生骨量および、埋入後3週でのインプラント骨界面の骨接触率を測定し、組織形態学的分析により評価を行なった。

インプラント周囲の新生骨(垂直的増加量、水平的増加量  $\mu\text{m}$ )は、埋入後1週においては明確な有意差は認められなかったが、埋入3週後では純チタンインプラント( $1129.8 \pm 46.4$ ,  $121.7 \pm 9.2$ )に対して、BMP-2/Heparin 含有アパタイトコートインプラント( $1516.9 \pm 55.8$ ,  $305.4 \pm 20.7$ )は有意に増加した。また、インプラント骨界面の骨接触率(%)においても、純チタンインプラント( $47.4 \pm 2.7$ )に対して、BMP-2/Heparin 含有アパタイトコートインプラント( $74.3 \pm 3.0$ )は有意に増加した。これらの結果より、埋入後3週におよぶ BMP-2 の活性が維持されたことが示唆された。in vivo において BMP-2/Heparin 含有アパタイトコートインプラントは、強い骨誘導能を持つ有用なインプラントであることが明らかとなった。本研究結果は国内、外の多くの学会で発表するとともに誌上発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- ① Kodama T, Goto T, Ishibe T, Kobayashi S, Takahashi T: Apolipoprotein E stimulates osteogenic differentiation in vitro. Asian J Oral Maxillofac Surg 19: 96-100, 2007 (査読有)
- ② Kodama T, Goto T, Miyazaki T, Takahashi T: Bone formation on apatite-coated titanium incorporated with bone morphogenic protein and heparin. Int J Oral Maxillofac Implants 23: 1013-1019, 2008 (査読有)
- ③ 児玉 崇、後藤哲哉、宮崎敏樹、小林 繁、高橋 哲: 生体活性型アパタイトコーティングチタンについての研究 北九医工誌 17: 23-26, 2007 (査読無)
- ④ 児玉 崇、後藤哲哉、石部 徹、宮崎敏樹、小林 繁、高橋 哲: Growth factor を用いた新しいインプラント材料の開発 北九医工誌 17: 81-87, 2007 (査読無)
- ⑤ 石部 徹、後藤哲哉、児玉 崇、小林 繁、高橋 哲: アポリポプロテインチタン表面における骨形成促進作用について北九医工誌 18: 23-26, 2008 (査読無)

[学会発表](計 19 件)

- ① Kodama T, Goto T, Miyazaki T, Kobayashi S, Takahashi T: Development of titanium coated with apatite incorporating BMPs 84<sup>th</sup> IADR 2006 年 6 月 28 日、アデレード、オーストラリア
- ② 児玉 崇、後藤哲哉、石部 徹、宮崎敏樹、小林 繁、高橋 哲: 骨誘導性チタンインプラント材料の開発と評価—Heparin による BMP-2 の骨形成促進作用を応用— 第 36 回日本口腔インプラント学会総会・学術大会、2006 年 9 月 16 日、新潟市

- 2008年5月31日、北九州
- ③ 児玉 崇、後藤哲哉、石部 徹、宮崎敏樹、小林 繁、高橋 哲: Heparin 添加による BMP 含有アパタイトコートチタン上の骨形成促進効果 第 61 回 NPO 法人日本口腔科学会 2007 年 4 月 20 日、神戸
- ④ Takahashi T: Praradigm shift of dental implants surfaces in the use of oral and maxillofacial surgery. 48<sup>th</sup> Annual Meeting of Korean Academy of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2007 年 4 月 27 日、ソウル、韓国
- ⑤ 児玉 崇、後藤哲哉、石部 徹、小林 繁、高橋 哲: BMP-2/Heparin 含有アパタイトコーティングインプラント周囲の骨形成についての in vivo での検討 第 67 回九州歯科学会総会 2007 年 5 月 19 日、北九州
- ⑥ 石部 徹、後藤哲哉、児玉 崇、小林 繁、高橋 哲: アポリポプロテイン E2 のチタン表面における骨形成促進作用について 第 38 回北九州医工学会総会 2007 年 6 月 29 日、北九州
- ⑦ 石部 徹、後藤哲哉、児玉 崇、宮崎敏樹、小林 繁、高橋 哲: 骨誘導性チタンインプラント周囲における新生骨形成-Heparin による BMP-2 の骨形成促進作用を応用- 第 37 回(社)日本口腔インプラント学会総会 2007 年 9 月 15 日、熊本
- ⑧ 児玉 崇、後藤哲哉、石部 徹、小林 繁、高橋 哲: Apolipoprotein-E2 は in vitro でチタン上の骨形成を促進する。第 37 回(社)日本口腔インプラント学会総会 2007 年 9 月 15 日、熊本
- ⑨ 石部 徹、後藤哲哉、児玉 崇、小林 繁、高橋 哲: BMP-2/heparin 含有アパタイトコーティングインプラントの新生骨形成促進効果。第 62 回第 61 回 NPO 法人日本口腔科学会 2008 年 4 月 17 日、福岡
- ⑩ 高橋 哲、児玉 崇、石部 徹、西原達次、後藤哲哉: 骨誘導性チタンインプラント材料の開発と評価-BMP-2 の骨形成促進効果を応用- 第 68 回九州歯科学会総会、
- ⑪ 川田 健太郎、児玉 崇、石部 徹、田中謙光、後藤 哲哉: Apolipoprotein E のチタン上での発現および作用について、第 68 九州歯科学会総会、2008 年 5 月 31 日、北九州
- ⑫ Kodama T, Goto T, Ishibe T, Takahashi T: Development of apatite-coated titanium incorporated with rhBMP-2 and Heparin. Second Astra Tech World Congress 2008 2008 年 6 月 4 日、ワシントン DC, USA
- ⑬ 石部 徹、後藤 哲哉、児玉 崇、小林 繁、高橋 哲: 生体活性型チタンインプラントの in vivo での骨形成に関する研究、第 41 回北九州医工学会総会、2008 年 6 月 20 日、北九州
- ⑭ T Ishibe, T Goto, T Kodama, T Miyazaki, K K Gunjikake, S Kobayashi, TTakahashi.: In vivo bone formation on apatite-coated titanium incorporating BMP-2/Heparin. IADR 86th General Session & Exhibition 2008 年 7 月 2 日トロント、カナダ
- ⑮ 石部 徹、後藤 哲哉、児玉 崇、小林 繁、高橋 哲: ラットにおける BMP-2/Heparin 含有アパタイトコートチタンインプラントの骨誘導能の検討、第 38 回日本口腔インプラント学会総会・学術大会、2008 年 9 月 12 日、東京
- ⑯ 後藤哲哉: ハイドロキシアパタイト上での細胞動態について。日本セラミック協会第 21 回秋季シンポジウム、2008 年 9 月 18 日、北九州
- ⑰ 高橋 哲: 骨を作る歯科インプラント材料の開発。第 42 回北九州医工学会総会、2008 年 10 月 10 日、北九州
- ⑱ 後藤哲哉: 生体材料上での細胞動態について;再生補綴医学研究会第 1 回学術会議、2008 年 11 月 28 日、名古屋
- ⑲ KODAMA T, GOTO.T, ISHIBE T, TAKAHASHI.T: Development and

Evaluation of osteoinductive implant using BMP-2 /heparin coated on titanium. 8<sup>th</sup> Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 2008年11月15日、バンコク、タイ

なし

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高橋 哲(TAKAHASHI TETSU)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号:60226850

### (2)研究分担者

後藤哲哉(GOTO TETSUYA)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号:70253458

小林 繁(KOBAYASHI SHGERU)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号:10118078

宮崎敏樹(MIYAZAKI TOSHIKI)  
九州工業大学・工学部・助手  
研究者番号:20324973

### (3)連携研究者