

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592260  
 研究課題名（和文）ビスフォスフォネート固定化チタンファイバーの3次元スキャホールドとしての応用  
 研究課題名（英文）Application of bisphosphonate-immobilized titanium fiber as a three-dimensional scaffold  
 研究代表者  
 早川 徹（HAYAKAWA TOHRU）  
 日本大学・松戸歯学部・准教授  
 研究者番号：40172994

研究成果の概要：本研究では、分子プレカーサー法を用いて炭酸含有アパタイト(CA)薄膜コーティングを施したチタン(Ti)ファイバーに、骨粗鬆症の治療薬であるビスフォスフォネート(BP)を固定化し、3次元スキャホールドとしての有効性について検討した。BP固定化チタンファイバーはファイバー内部での骨形成が良好に起こっており、ファイバー内部への骨侵入度も優れていた。また、BP濃度により、CA薄膜コーティングTiファイバー周囲にBPゲルを形成でき、ドラッグデリバリーシステムへの応用などが考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴理工系歯学

キーワード：ビスフォスフォネート，チタンファイバー，3次元スキャホールド，分子プレカーサー法，炭酸含有アパタイト，薄膜コーティング，ゲル，骨形成

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート（BP）は破骨細胞の活性化を抑制し、強力な骨吸収抑制作用を示して骨密度を増加させることから、骨粗鬆症の治療薬として臨床で使用されている。近年、BPが破骨細胞だけでなく骨芽細胞にも作用して骨吸収を間接的に抑制し、骨形成を促進するという報告がなされている。また、リン酸カルシウム薄膜コーティングチタンインプラント表面にビスフォスフォネートが良

好に固定化する事ができ、かつ、リン酸カルシウム薄膜を介してビスフォスフォネートを固定したチタンインプラントが骨形成に有効であることが報告されている。一方、硬組織再建のための3次元スキャホールドとして、今までにポリ乳酸に代表される吸収性高分子材料が主に検討されてきたが、骨などの荷重のかかる部位での適応には限界がある。非吸収性材料であるチタン（Ti）ファイバーは機械的性質に優れており、硬組織再建のた



した。予備実験で、このゲル形成 CA 薄膜コーティング Ti ファイバーを動物に埋入したが、骨形成は認められなかった。

そこで、動物実験用には、濃度の低い 0.005M の BP 水溶液に CA 薄膜コーティング Ti ファイバーを浸漬して、BP 固定化 Ti ファイバーを作製した。この場合、ゲル状物質は形成しなかった。

#### (5) 動物埋入実験

動物埋入実験は松戸歯学部動物実験倫理委員会の指針に従って行った(承認番号 08-0019)。ウサギ(日本白色種、3 ヶ月齢)の大腿骨関節内側顆部の海綿骨部に、無処理 Ti ファイバー、CA 薄膜コーティング Ti ファイバー、BP 固定化 Ti ファイバーを埋入した。埋入 12 週間後に Ti ファイバーを組織ごと取り出し、ホルマリン固定、アルコール系列による脱水後、メチルメタクリレート樹脂にて包埋し、厚み約 50  $\mu\text{m}$  の非脱灰研磨標本を作製した。トルイジンブルーにて染色後、光学顕微鏡下で、Ti ファイバー内部での骨の形成状態、骨の侵入度などを病組織学的に検討した。

## 4. 研究成果

### (1) シリンダー状 Ti ファイバー内部への CA 薄膜コーティング

シリンダー状 Ti ファイバー内部での CA 薄膜の形成状態を EPMA によって検討した結果を図 3 示す。

分子プレカーサー法を用いることによって、複雑な形状を有するシリンダー状 Ti ファイバー内部にまで良好に CA 薄膜が形成できる事が判明した。

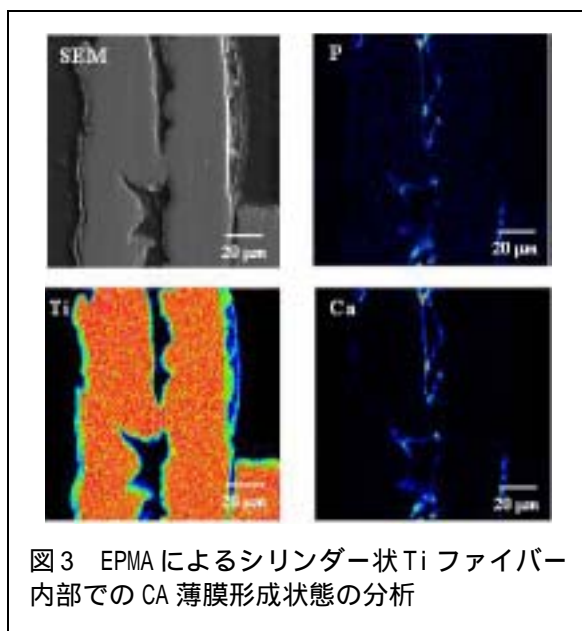


図3 EPMAによるシリンダー状Tiファイバー内部でのCA薄膜形成状態の分析

### (2) CA 薄膜コーティング Ti ファイバー上でのゲル状物質形成

CA 薄膜コーティング Ti ファイバーを  $10^{-2}\text{M}$  の BP 水溶液に浸漬したところ、1 日浸漬後で溶液の粘性が高くなっていった。

図 4 に示す様に容器を逆さまにしても、CA 薄膜コーティング Ti ファイバーの場合には、溶液が流れず、溶液の粘性がかなり高くなっている事が分かる。これは BP 水溶液のゲル化によるものと推察された。

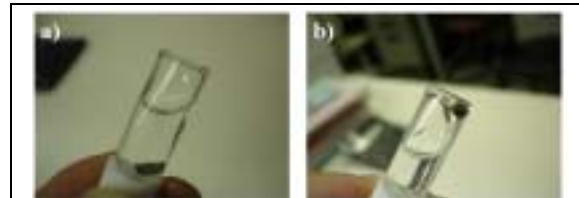


図4 BP水溶液にTiファイバーを1日浸漬後に容器を逆さまにした写真

- a) 無処理 Ti ファイバー
- b) CA 薄膜コーティング Ti ファイバー

BP 水溶液に浸漬した Ti ファイバーを取り出した。図 5 に示すように、CA 薄膜コーティング Ti ファイバーを浸漬した場合、ファイバー周囲にゲル状物質が形成されていた。

無処理の Ti ファイバーの場合、ゲル状物質は生成せず、溶液の粘性にも変化は見られなかった。

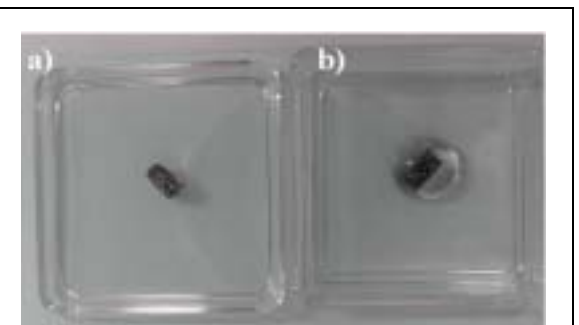


図5 BP水溶液から取り出したTiファイバー

- a) 無処理 Ti ファイバー
- b) CA 薄膜コーティング Ti ファイバー

この事から、BP のリン酸基と Ti ファイバーにコーティングされた CA のカルシウムとの相互作用により局所的に BP 濃度が高まってゲルが形成されたと思われる。また、アパタイトコーティングしたディスクを同濃度の BP 水溶液に浸漬しても、ゲル状物質は生成しない事から、Ti ファイバーの 3 次元構造が BP のゲル形成を促進する要因となっている事が示唆された。



予備動物実験の結果では, BP ゲルを形成した Ti ファイバーは良好な骨形成を示さなかったが, BP ゲルに何らかの薬物やサイトカインなどを含有させることによって, それらのリリースを制御するドラッグデリバリーシステムへの応用などが考えられる. また, 他の BP 化合物や, BP 類似の構造を有する化合物, 或いは, カルシウムとの反応が期待される化合物を用いた時のゲル形成能について今後の検討課題としたい.

### (3) 動物埋入実験

無処理 Ti ファイバーおよび BP 固定化 Ti ファイバーを埋入した時の病理組織学所見を図 6 に示す. 骨密度の低い海綿骨部に 12 週間埋入し, 骨形成状態を病理組織学的に検索した結果, BP 固定化 Ti ファイバーはシリンドラー内部で骨形成が良好に起こっており, Ti ファイバーへの骨侵入度も最も優れていた.

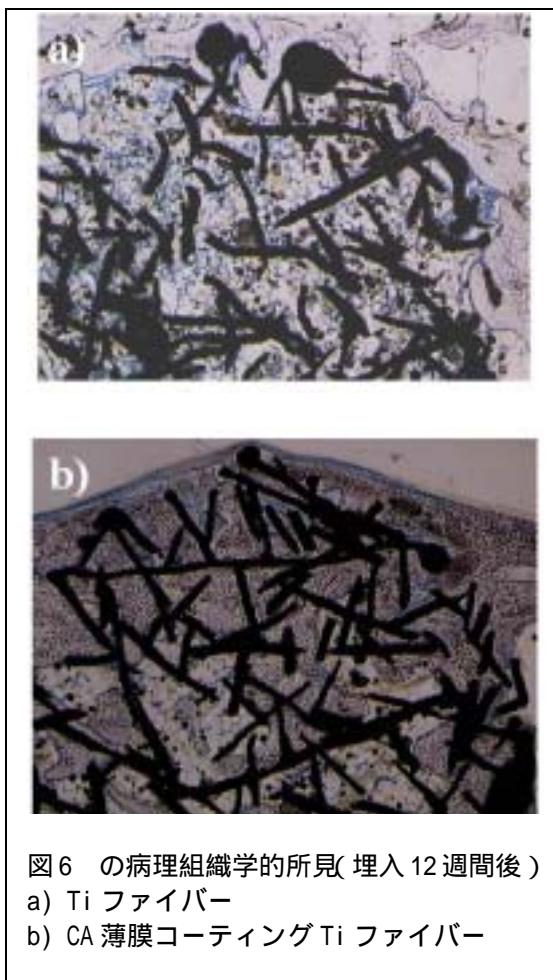


図 6 の病理組織学的所見(埋入 12 週間後)

a) Ti ファイバー

b) CA 薄膜コーティング Ti ファイバー

CA 薄膜コーティング Ti ファイバーを埋入した場合でも, 無処理 Ti ファイバーよりは骨形成は良好であったが, BP を固定化することにより, 骨形成がより促進されていた.

今までに, BP 固定化チタンが骨芽細胞様細

胞培養実験において, アルカリフォスファターゼの活性を向上させることが報告されている. 本研究でも, Ti ファイバーに固定化された BP が骨芽細胞の増殖, 分化を促進し, さらに破骨細胞の活性を抑制した結果, BP 固定化 Ti ファイバー内部で骨形成が良好に進行したものと考えられる.

現在, BP 薬剤投与による顎骨壊死が報告されている. BP 固定化 Ti ファイバーからの適切な BP リリースが制御できれば, 上記の問題を解決できる可能性もある. 今後, 固定化された BP の徐放, BP の濃度依存性など, より詳細検討が必要である.

### (4) まとめ

分子プレカーサー法を用いて作製した CA 薄膜コーティング Ti ファイバーに BP を固定化すると, 骨適合性が向上することが判明した. BP 固定化 Ti ファイバーは再生医療のための 3 次元スキャホールドとして有望であることが示唆された. また, BP 濃度により, CA 薄膜コーティング Ti ファイバー周囲に BP ゲルを形成でき, ドラッグデリバリーシステムへの応用などが考えられた.

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 13 件)

Chihiro S. Mochizuki, Tohru Hayakawa (他 7 名, 5 番目), Crystallinity controlled apatites through a Ca-EDTA complex and their porous composites with PLGA, J Biomedical Mater Res Part B, In press. 査読有

Yamanishi Yasufumi, Tsuneda Yukinari, Izumi Atsuyoshi, Furuta Nobuaki, Hayakawa Tohru, Thin Apatite Coating on Titanium by Molecular Precursor Method, 日本口腔インプラント誌, In press. 査読有

Tohru Hayakawa, Tadao Fukushima, Takeshi Wada, Masao Yoshinari, Mitsunobu Sato, Hydrogel formation of bisphosphonate around apatite coated titanium web, J Oral Tissue Engin, 6, 189-193, 2009. 査読有

Tohru Hayakawa, Chihiro Mochizuki, (他 6 名, 1 番目), Influence of apatite crystallinity in porous PLGA/apatite composite scaffold on cortical bone response, J Hard Tissue Biol, 18, 7-12, 2009. 査読有

Minoru Kawaguchi, Tadao Fukushima, Tohru Hayakawa, Yusuke Inoue, Jun Ohno, Pre-intercalated DNA/Lipid/PLGA film

as a drug carrier, J Oral Tissue Engin, 6, 97-105, 2008. 査読有

Tadao Fukushima, Tohru Hayakawa (他 7 名, 3 番目), Complexation of DNA with cationic polyamino acid for biomaterial purposes. J Oral Tissue Engin, 6, 24-32, 2008. 査読有

Nobuyuki Yamamichi, Tohru Hayakawa (他 5 名, 6 番目), Gene Expression Monitoring in osteoblasts on Fibronectin Derived Peptide Coated Titanium, Dent Mater J, 27, 744-750, 2008. 査読有

Sen-ichi Suzuki, Tohru Hayakawa, Naoto Kamasaki, Hiroyuki Okada, Hirotsugu Yamamoto, Conformational analysis of bisphosphonate/calcium complex, Int J Oral-Med Sci, 7, 45-49, 2008. 査読有

Tohru Hayakawa, Haruhiko Tsutsumi, Nobuyuki Yamamichi, Yoshimitsu Abiko, Gene Expressions in Osteoblasts on Fibronectin and Its Peptide (GRGDSP)-coated Titanium, 医学と生物学, 152, 286-291, 2008. 査読有

Tohru Hayakawa, Kenichi Takahashi, (他 5 名, 1 番目), Effect of thin carbonate-containing apatite (CA) coating of titanium fiber mesh on trabecular bone response. J Mater Sci: Mater Med, 19(5), 2087-2096, 2008. 査読有

Watanabe Nobuyuki, Kamolparn Pugdee, Hayakawa Tohru, Abiko Yoshimitsu, Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing gene expression in osteoblasts on fibronectin derived peptide coated titanium. 日口腔インプラント誌, 21, 1-6, 2008. 査読有

Tohru Hayakawa, Tadao Fukushima, Minoru Kawaguchi, Yusuke Inoue, Preparation and tissue response of lipid-coated b-FGF. J Oral Tissue Engin, 5, 96-103, 2007. 査読有

Tadao Fukushima, Minoru Kawaguchi, Tohru Hayakawa, Shoji Takeda, Yusuke Inoue, Jun Ohno, Kunihisa Taniguchi: Drug Binding and Releasing Characteristics of DNA/lipid/PLGA film. Dent Mater J, 26, 854-860, 2007. 査読有

[学会発表](計 6 件)

早川 徹, 望月千尋, 原 広樹, 佐藤光史: EDTA/Ca 錯体を用いた結晶性の異なるアパタイト合成およびその PLGA 複合体の骨適合性, 日本バイオマテリアル学

会シンポジウム 2008, 2008 年 11 月 17 日. 東京

早川 徹, Kamolparn Pugdee, 山道信之, 吉成正雄, 安孫子宣光: トレスルクロリド法によるフィブロネクチン由来ペプチド (GRGDSP) のチタン表面への固定化および細胞培養実験, 第 6 回日本再生歯科医学会学術大会, 2008 年 9 月 30 日. 東京

T. Hayakawa, M. Yoshinari, M. Sato: Biological Effect of Thin Carbonate-containing Apatite Coating of Titanium Web. 8<sup>th</sup> World Biomaterials Congress, 2008 年 5 月 30 日. オランダ

早川 徹, 吉成正雄, 佐藤光史: 分子プレカーサー法によるチタンウェブへのアパタイト薄膜形成と骨適合性, 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会, 2007 年 11 月 26 日. 大阪

早川 徹, Kamolparn Pugdee, 柴田恭子, 吉成正雄, 安孫子宣光: トレスルクロリド法を用いたチタン表面へのタンパク質固定とその生物学的効果, 第 5 回日本再生歯科医学会学術大会, 2007 年 9 月 22 日. 東京

早川 徹, 福島忠男, 川口 稔, 井上勇介, 岡畑恵雄: DNA/キトサン複合体の特性および加工性, 第 36 回医用高分子シンポジウム, 2007 年 7 月 31 日. 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川 徹 (HAYAKAWA TOHRU)  
日本大学・松戸歯学部・准教授  
研究者番号: 40172994