

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20560624

研究課題名(和文) 酵素反応の支援による無機生体機能材料の合成と評価

研究課題名(英文) Synthesis and Characterization of Inorganic Biomaterials with the aid of Enzymatic Reactions

研究代表者

鷗沼 英郎 (UNUMA HIDERO)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：30273303

研究成果の概要(和文): ウレアーゼ酵素の反応生成物であるアンモニアを無機材料の沈殿剤として用いることにより、生体材料としての用途に適した形態と機能を持つ無機材料を迅速かつ効率的に作製することに成功した。本研究の結果、ドラッグデリバリーシステムのキャリアとしての水酸アパタイト中空粒子、深部癌の温熱治療用材料としての中空マグネタイト粒子、骨誘導再生用メンブレンとしての PET/ゼラチン/リン酸カルシウムシートおよび早期治療を可能にするチタン/ゼラチン/リン酸カルシウムインプラントが作製された。

研究成果の概要(英文): Inorganic materials with suitable morphology and functionality for biomedical applications were successfully prepared by employing enzymatically-derived precipitant in the synthesis of the materials. This project succeeded in preparing hollow hydroxyapatite microspheres for drug delivery, hollow magnetite microspheres for hyperthermia of cancer, PET/gelatin/calcium phosphate sheet for GBR membrane, and Ti/gelatin/calcium phosphate dental implants enabling osteogenesis and promoting osseointegration.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・無機材料・物性

キーワード：生体材料、酵素反応、リン酸カルシウム、水酸アパタイト、中空粒子、骨誘導再生、メンブレン、歯科インプラント

1. 研究開始当初の背景

請者は 1997 年から酵素反応の生成物をセラミックスの合成試薬として用いる研究を継続している。酵素反応は、常温・常圧で反応が進行すること、速度を任意に制御可能なこと、酵素をテンプレートに固定化することが可能なこと、などの特徴をもつ。これまで、上記の方法を用いることによって、水

溶液からアルミナ前駆体・酸化スズ・水酸アパタイトなど各種セラミックスを中空粒子、多孔質体、コーティング、単分散粒子、短繊維、ウィスカー、有機物とのコンポジットなど、さまざまな形態で迅速に合成できることを明らかにしてきた。そこで、酵素反応を有効に利用すれば、医療用生体材料として望まれつつも、製造が困難であったために実現し

ていない多くの材料の合成が可能になるはずであると考え、本申請を行うに至った

2. 研究の目的

本研究では、他の方法では作製が困難ないし不可能な、次の二つの材料を、酵素反応の利点を活かして作製し、その性質を評価することを目的とする。すなわち、(1)癌治療用の無機中空粒子、および(2)骨形成の促進が可能な、金属(ポリマー)/ゼラチン/リン酸カルシウムハイブリッド材料である。

3. 研究の方法

(1)癌治療用無機中空粒子：直径 20~30 μm、比重 2.0 未満の、Fe₃O₄および Y₂O₃ 中空粒子、また同程度のサイズの水酸アパタイト粒子の合成は、図 1 のような、ウレアーゼを内包したテンプレートビーズを作製し、テンプレートビーズの周囲に目的とする物質の前駆体(水酸化物など)を析出させた後に、加熱焼成してテンプレートビーズを除去するという方法で行う。

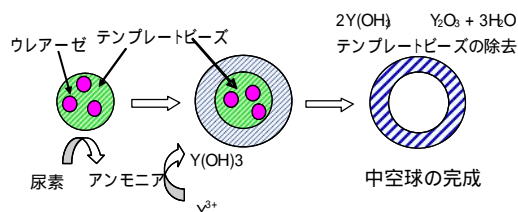


図 1 中空粒子合成過程の模式図

(2)骨形成の促進が可能な、金属(ポリマー)/ゼラチン/リン酸カルシウムハイブリッド材料は、チタンまたは PET フィルムのゼラチンを共有結合したものを作製し、そのゼラチン上にウレアーゼを固定化し、そこにリン酸カルシウムを析出させる方法で行う。

(3)生体材料としての評価：上記のうち、金属(ポリマー)/ゼラチン/リン酸カルシウムハイブリッド材料については、生体材料としての性能を細胞培養試験および動物埋入試験で評価した。

4. 研究成果

(1)癌治療用無機中空粒子

図 2 に、水酸アパタイト粒子の断面(a)、中空マグネタイト粒子(b)および中空 Y₂O₃ 粒子の電子顕微鏡写真を示す。いずれも、目的の粒径と、中空の内部構造を有していることがわかる。

これまで作製されてきた無機中空粒子は、直径 1 μm 以下または直径 100 μm 以上のものに限られていたが、体内の毛細血管内部に留まることのできる 20~30 μm の中空粒子の合成例は本研究が初めてである。

なお、中空マグネタイト粒子の合成に関す

る学術論文は、2009 年日本セラミックス協会学術論文誌優秀論文賞を受賞した。

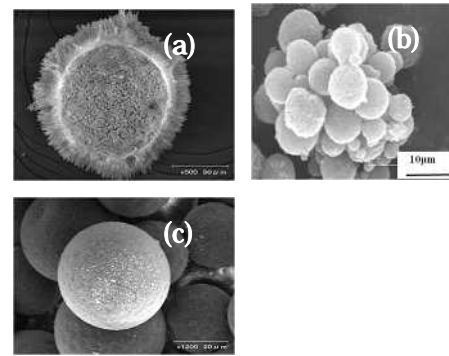


図 2 (a)水酸アパタイト、(b)マグネタイトおよび(c)Y₂O₃ 中空粒子の顕微鏡写真

(2) 金属(ポリマー)/ゼラチン/リン酸カルシウムハイブリッド材料

PET/ゼラチン/リン酸カルシウム系 GBR メンブレン

得られたメンブレンの写真を図 3 に示す。

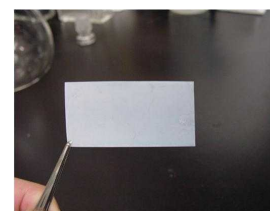


図 3 PET/ゼラチン/リン酸カルシウム系 GBR メンブレン

ゼラチンは高温への耐久性がないため、その上にリン酸カルシウム層を重ねるには本研究の方法が有効である。

このメンブレンは、極めて生体内の骨と似た表面層を有しているので、骨芽細胞様細胞の増殖・分化・石灰化を促すものと期待される。骨芽細胞様細胞の 2 ヶ月培養の結果を図 4 に示す。

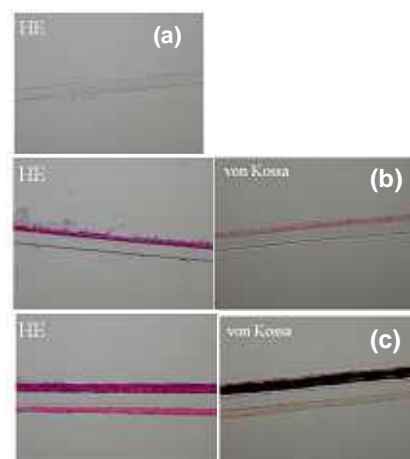


図 4 マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の 2 カ月培養後の組織写真(a)未処理 PET、(b)PET/ゼラチン、(c)PET/ゼラチン/リン酸カルシウム

図 4(a)は未処理 PET であり、PET 表面の疎水性を反映して、細胞は全く接着していない。

また、このことは、疎水性の PET 面が細菌による感染を起こしにくいことにもつながる。図 4(b)は、ゼラチンのみをコートした PET 表面での 2 ヶ月間培養の結果である。ゼラチンが細胞増殖の足場を提供しているために、旺盛な細胞増殖が認められる。しかし、von Kossa 染色の結果、石灰化は起こっていないことがわかった。

図 4(c)は、ゼラチン/リン酸カルシウムをコートしたメンブレン表面での 2 ヶ月間培養の結果である。ゼラチンのみの場合よりもさらに細胞が増殖している様子がわかる。また、von Kossa 染色で黒色に染色される部分は石灰化が起きていることを示しており、このことは本メンブレンが骨形成を積極的に促すものであることを示している。

図 5 は、下顎の歯を 6 本抜歯し、左側には本メンブレン、右側には市販のメンブレン (cytoplast) をもちいて抜歯窩を覆い、歯槽骨の再生の様子の違いを見るために行った実験である。動物埋入は 10 月中旬に行い、12 月上旬に安楽死させて解剖を行い、現在組織切片の作製を依頼しているところである。動物実験は、仙台市の古澤利武歯科医に依頼した。現在まで、組織切片が完成しておらず、その写真は掲載できないが、本メンブレンは感染・炎症を示さず良好に歯槽骨を再生させた。

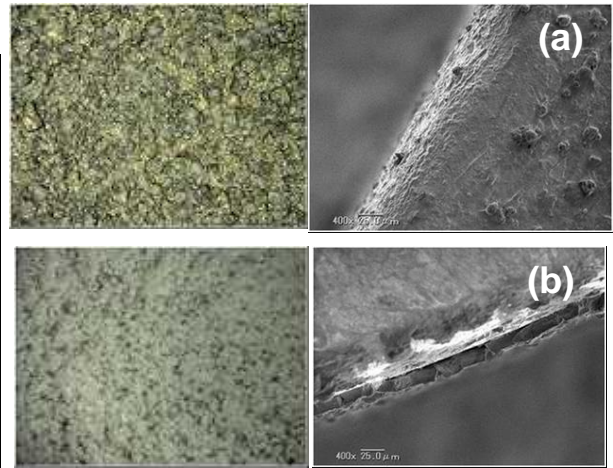


図 5 本メンブレンと市販メンブレンの動物埋入実験の様子

チタン/ゼラチン/リン酸カルシウムハイブリッド材料

これは、歯科の人工歯根 (インプラント) への応用を念頭に置いたものである。比較対象として市販のリン酸カルシウムコートチタンを選び、本研究のハイブリッド材料を用いて骨芽細胞様細胞の培養試験と、糖尿病ラットの頭蓋骨への埋入試験を行った。

図 6 は、骨芽細胞様細胞の 40 日間の培養試験結果である。(a)は比較材料、(b)は本研究のハイブリッド材料である。本研究の材料では、骨芽細胞の石灰化によって生成した粒子が一面に見られるのに対し、比較材料ではほとんど石灰化の進行が見られない。特に顕著なのは、本 4 図 6 (a)市販材料および(b)本研究のハイブリッド材料での 40 日間の骨芽細胞様細胞培養



試験結果

イブリッド材料では明確な厚みを持った石灰化層 (モノクロの写真) が見られることである。

図 7 は、直径 4.0mm、厚さ 2.0mm に成形したチタンから、(a)何も処理しないもの、(b)ゼラチンを被覆したもの、(c)ゼラチンとリン酸カルシウムを被覆した本研究のハイブリッド材料を作り、それらを糖尿病ラットの頭蓋骨に形成した直径 4.3mm の欠損に埋入し、4 週間後に作製した組織切片写真である。

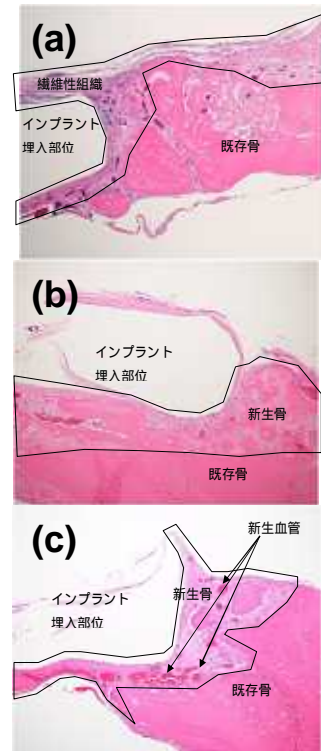


図 7 ラット頭蓋骨に (a) 未処理チタン、

(b)ゼラチン被覆チタン、(c)ゼラチン/リン酸カルシウム被覆チタンを 40 日間埋入した後の組織写真

糖尿病ラットは骨形成に障害を持つラットであるため。通常であれば骨と癒着できるチ

タン(未処理チタン、(a))も骨と癒着せず、骨とチタンのすき間が繊維性組織で埋められている。ゼラチンで被覆したチタン(b)は、新生骨の形成を促すが、さらにリン酸カルシウムで被覆したチタン(c)は、新生骨の成熟と新生血管の形成も促している。このことから、本研究で開発したハイブリッド材料は、歯科インプラントに適用した場合に、オッセointegrationを強く促して治療期間を短縮しうる材料であると考えられる。

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3件)

1. T. Kawai, H. Sekikawa, H. Unuma, Preparation of Hollow Hydroxyapatite Microspheres Utilizing Poly(divinylbenzene) as a Template, J. Ceram. Soc. Japan, 117 (2009) 340-343
2. J. Zhao, H. Sekikawa, T. Kawai, H. Unuma, Ferrimagnetic Magnetite Hollow Microspheres Prepared via Enzymatically Precipitated Iron Hydroxide on a Urease-Bearing Polymer Template, J. Ceram. Soc. Japan, 117 (2009) 344-346
3. 鶴沼英郎・松嶋雄太・川井貴裕, 酵素反応を用いたセラミックス合成 - マクロ形態制御への応用 -, セラミックス, 44 (2009) 621-625

[学会発表](計14件)

1. 鶴沼英郎、川井貴裕、田仲徳子、松岡奈央、古澤利武、佐藤正明、ゼラチン/水酸アパタイト被覆PETシートのGBRメンブレンへの応用、生体関連セラミックス討論会、2010年12月、京都
2. 鶴沼英郎、田仲徳子、松岡奈央、川井貴裕、古澤利武、佐藤正明、PET/ゼラチン/水酸アパタイト系 GBR メンブレンの作製と評価、日本バイオマテリアル学会、2010年11月、広島
3. H. Unuma, N. Matsuoka, N. Tanaka, T. Kawai, Y. Matsushima, T. Furusawa, M. Sato, Preparation and Characterization of PET/Gelatin/HA Composites for the Space-Making Membrane in Guided Bone Regeneration, 3rd Int. Conf. Ceramics, 2010年11月、大阪
4. 鶴沼英郎、コラーゲン/水酸アパタイト被覆PETシートの作製とGBRメンブレンとしての評価、日本バイオマテリアル学会東北地区講演会、2010年8月、仙台
5. 田仲徳子、川井貴裕、松嶋雄太、鶴沼英

郎、古澤利武、佐藤正明、PET/コラーゲン/水酸アパタイトメンブレンの作製と骨誘導再生法への適用、日本セラミックス協会2010年年会、2010年3月、東京

6. 宇野由華、川井貴裕、松嶋雄太、鶴沼英郎、水酸アパタイト中空球状粒子の薬剤除放特性、日本セラミックス協会2010年年会、2010年3月、東京
7. H. Unuma, Enzymatic Mineralization of Hydroxyapatite for Advanced Processing of Biomaterials, Int. Conf. on Advanced Ceramics and Composites, 2010年1月、フロリダ
8. H. Unuma, T. Kawai, Enzymatic Mineralization of Ceramics for Potential Biomedical Applications, Asian BioCeramics Symposium 2009, 2009年11月、名古屋
9. 門間康祐、川井貴裕、松嶋雄太、鶴沼英郎、ウレアーゼ内包ポリマー鑄型を用いた中空水酸化イットリウム美昇給の作製、日本セラミックス協会東北北海道支部研究発表会、2009年10月
10. 本山美香、川井貴裕、松嶋雄太、鶴沼英郎、チタン表面に迅速析出させたリン酸カルシウム層の接着性:コラーゲン固定化の影響、日本セラミックス協会第22回秋季シンポジウム、2009年9月、松山
11. 門間康祐、川井貴裕、松嶋雄太、鶴沼英郎、ウレアーゼ内包ポリマーテンプレートを用いた中空Y2O3粒子の合成、日本セラミックス協会第22回秋季シンポジウム、2009年9月、松山
12. 吉田京子、本山美香、川井貴裕、鶴沼英郎、ウレアーゼを触媒として用いたチタン/コラーゲン/アパタイト複合体の作製、日本セラミックス協会2009年年会、2009年3月
13. J. Zhao, H. Sekikawa, T. Kawai, H. Unuma, Preparation of Magnetite Hollow Microspheres through Enzyme-Assisted Liquid Phase Processing, 日本セラミックス協会東北北海道支部研究発表会、2008年11月
14. 本山美香、吉田京子、川井貴裕、鶴沼英郎、ウレアーゼを用いたチタン表面へのリン酸カルシウムの被覆、日本セラミックス協会東北北海道支部研究発表会、2008年11月

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計2件)

名称: 骨・組織再生用メンブレン

発明者: 鶴沼英郎、川井貴裕、古澤利武

権利者：山形大学
種類：特許
番号：特願 2010-130299
出願年月日：2010.6.7
国内外の別：国内

名称：骨・組織再生用メンブレン
発明者：鵜沼英郎、川井貴裕、古澤利武
権利者：山形大学
種類：特許
番号：PCT/JP2011/56638
出願年月日：2011.3.18
国内外の別：海外

取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鵜沼 英郎 (UNUMA HIDERO)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：30273303

(2) 研究分担者

川井 貴裕 (KAWAI TAKAHIRO)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：50455903

(3) 連携研究者

()

研究者番号：