

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592375

研究課題名(和文) 次世代型人工骨としてのインテリジェントマテリアルの開発と発展

研究課題名(英文) the development of intelligence materials for article bone in the next generation

研究代表者 湯浅哲也 ( YUASA TETSUYA )

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70332822

## 研究成果の概要(和文)：

近年、インテリジェントマテリアルはその特質から注目されている。著者らは、さらに進化させた人工骨を検討するために、その特徴を有する新規の材料を開発した。同材料は、疑似体液中で表面上にアパタイト形成を行い、骨芽細胞の骨形成能を誘導する。さらに、ラット頭蓋骨に填入した場合、骨形成を認めた。以上のことから、臨床応用可能な有益な材料と考えられる。

## 研究成果の概要(英文)：

In late years, the intelligent material attracts attention from the characteristic. The authors developed the new materials to examine the artificial bone which I evolved more. The material performed the apatite formation on the surface in para-body fluid and gave the ability of osteogenesis to osteoblastic cells *in vitro*. Furthermore, *in vivo* the material guided osteogenesis when the material was implanted in the rat skull. Based upon the foregoing, it is thought about a useful material for clinical application.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：次世代型、人工骨、インテリジェントマテリアル

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では、顎骨に発生した嚢胞や腫瘍などの手術後に生じる骨欠損あるいはインプラント植立時の骨量不足に対し、自家骨移植が主に用いられてきた。しかし、自家骨移植には、移植出来る骨の形態、量の制限や二次的浸襲などの問題があるため、近年、様々な生体材料(金属、有機材料、セラミックス、

セメントなど)が開発され、広く臨床応用されてきた。しかし、これらの骨補填用生体材料は利点だけでなく、欠点も有している。

例えば、金属材料は比較的強度を有しているが、生体内では吸収されず長期残存することで変質・改質を招き、破損や破断を生じる場合がある。また、有機材料は形態付与性を有し加水分解して生体内に吸収されるが、そ

の分解過程で炎症反応を惹起することがあり、細胞接着力が低く強固な力を必要とする部位などには使用出来ない。無機材料である各種リン酸カルシウムも強度を有しているものの、その溶解・吸収性の面で炎症を惹起するという問題点がある。また、生体骨とその組成が類似し、比較的体内で安定とされるハイドロキシアパタイトでさえ、形成・加工が困難であり、体内では吸収されないことが知られている。

これまでの研究者が単一の材料にこだわり、広く他の生体材料に目を向けず、その適応範囲や特徴を理解出来なかったため、それぞれの欠点を補う相補的な複合材料（ハイブリッド材料）の開発・研究に比較的注目しなかった。近年、臨床応用されるようになったハイブリッド材料の中には、poly(L-lactic acid) (PLLA) に代表される生体吸収性有機材料と、骨伝導性を有するハイドロキシアパタイトを複合させたものがあるが、必ずしも体内の環境を配慮し、更なる治癒期間の短縮や骨形成機能の亢進に寄与している材料とは言い難い。前者の有機材料は吸収性という点では改善されておらず（通常完全吸収されるのに数年を要する）、また後者の無機材料は強度の改良を目的に使用されているが、本来の柔軟性を失って脆くなり、複雑な手術部位への使用には制限が生じている。何よりも、生体適合性と治癒促進の面では改善されていない。これは、ハイブリッド材料ではあるが、インテリジェントマテリアルとは異なる。

これまで我々が研究・開発してきたインテリジェントマテリアルの生体吸収性有機材料は、poly(L-lactic acid) (PLLA) と poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) の共重合体を使用してきた。この共重合体は、従来の PLLA 単体よりも吸収性に優れており、その配合により強度も変化できる。一方、無機成分として、炭酸含有低結晶ハイドロキシアパタイトを使用してきた。この材料は、低結晶アパタイトであることから、体内で吸収され得るとともに、生体骨と同様に炭酸基を数%含む骨類似性を示す。さらに、何よりも溶解すると、前者は酸性となり、後者は炭酸基を有しているので弱アルカリ性を示す。このように、体内の環境により溶解性を変化させ、材料自らが微小周囲環境に合わせる材料をインテリジェントマテリアルと呼ぶ。

このハイブリッド材料にわれわれは着目し、これまでの研究をさらに進め、互いに欠点を補い、かつ体内で適応する複合材料の特徴を最大限生かした自己体内適合材料（インテリジェントマテリアル）の開発・研究の

必要性を感じた。

## 2. 研究の目的

口腔外科領域では、自家骨移植以外にも金属、有機材料、セラミックス、セメントなどが使用されているが、溶解性、加工の複雑性、生体親和性の面で様々な問題がある。われわれは、各材料の欠点を補い、互いに補完し合い、かつ体内で適応するハイブリッド材料の特徴を最大限生かした自己体内適合材料（インテリジェントマテリアル）の研究・開発を行う。この材料は、体内の微小周囲環境を察知し、経時的に周囲組織と馴染み、骨性治癒を促すと同時に治癒促進の可能性がある。本研究を遂行することにより、今後の生体材料の発展に寄与するとともに、口腔外科分野における臨床応用について示唆を得られると著者は考えている。

## 3. 研究の方法

本研究は、新規の生体材料（インテリジェントマテリアル）の開発・臨床応用を目的にしている。その際に、まず物理化学的な利点・欠点を検討した後に、細胞に与える影響を検討する。最後に、実験動物を用いてその有効性と臨床応用への可能性を検討する。

具体的には、平成20年度は、有機材料の至適混合率の調整、有機材料および無機材料から成るインテリジェントマテリアルの作成、RDGpeptideを添加した試作インテリジェントマテリアルの作成を行う予定である。平成21年度は、細胞を用いた実験を行う。具体的には、試作インテリジェントマテリアル上における培養骨芽細胞の骨添加実験、培養破骨細胞によるインテリジェントマテリアルの吸収実験を計画している。平成22年度は、動物実験を主として、試作インテリジェントマテリアルのラット腹部皮下埋入実験による炎症反応について、試作インテリジェントマテリアルのラット頭蓋骨埋入実験による生体骨との親和性について実験を予定している。

## 4. 研究成果

平成20年度は、人工骨の骨子となるハイブリッド材料の開発を行った。具体的には、有機材料である PLLA と PLGA をジメチルスルホキシドに溶解させ、板状の試料片を作成した。その試作片を万能小型試験機を用いて機械的強度を測定した。さらに、蒸留水に浸漬させたのちに、重量測定を行い、浸漬前後の乾燥重量について測定を行った。有機材料の機械的強度は延性を持ち得ることがわかった。さ

さらに、乾燥重量は浸漬前後を比較した結果、時間経時的に軽くなっていることがわかった。さらに、酸-塩基平衡を確認するため、pHを測定した結果、時間経時的にpHの変動が見られた。これは、浸水させることにより、表面から溶出していることがわかった。

さらに、ハイブリッド材料を作成するため、有機材料に無機材料である炭酸アパタイトを十分に混和させた。混和することにより、強度に著しい劣化がないことを確認するため、炭酸アパタイトの量を変化させ、上記手法と同様に板状の試料片を作成し、万能小型試験機にて測定を行った。その結果、炭酸アパタイトの量が増えると強度が弱くなることがわかった。

平成21年度の報告として、RGD-peptideを添加した試作インテリジェントマテリアルの作成を行った。昨年度に得られたハイブリッド材料を、粒径のさらに小さなsugarcystal中に埋入した。細胞接着を促進させるタンパクArg-Gly-Asp (RGD)を含む有機材料をさらにsugar crystal中に注入し、脱泡するとともに、格子状のハイブリッド材料の表面をcoatingしたインテリジェントマテリアルの試作品を作成した。

さらに、疑似体液中における試作インテリジェントマテリアルの挙動を検討した。具体的には、Kokuboらが開発した疑似体液中に浸漬させ、骨組織親和性のスクリーニング法を用いて、pH測定、疑似体液中のCa、Pの濃度変化を測定した。その結果、粉末X線回折装置を用いて、リン酸カルシウムの構造物の組成分析を行い、インテリジェントマテリアル表面にリン酸カルシウムの添加が行われていることを確認した、さらに、フーリエ変換型赤外線分光光度計を用いて無機成分の構造変化を確認した。

平成22年度の報告として、試作インテリジェントマテリアル上における培養骨芽細胞の骨添加実験を行った。具体的には、作成したインテリジェントマテリアルの試料上にMC3T3-E1細胞を播種し、増殖測定をMTT法にて、分化をタイプIコラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンのmRNA量の発現を測定した。その結果、初期の細胞接着能が亢進しており、経時的な細胞増殖と各種骨分化マーカーの細胞分化能の亢進を認めた。

培養破骨細胞によるインテリジェントマテリアルの吸収実験を行った。生後7日目の

日本白色ウサギの脛骨および大腿骨より得られた多核巨細胞をインテリジェントマテリアル上に播種し1週間培養し走査型電子顕微鏡を用いて観察した結果、インテリジェントマテリアル上に吸収窩を形成し、広く強く吸着していることがわかった。

試作インテリジェントマテリアルをラット腹部皮下に埋入し、炎症反応について実験を行った。2週間後には若干の炎症反応があるものの、4週間後にはほぼ炎症反応がなくなっていた。

さらに、試作インテリジェントマテリアルをラット頭蓋骨に埋入実験を行った。歯科用エンジンにてラット頭蓋骨欠損部を作製した後、試作インテリジェントマテリアルを補填し骨膜を戻して縫合を行った。埋入後2週、4週、8週、16週、32週に、ラットを屠殺し、脱灰組織切片ならびに非脱灰組織切片を作製した。その結果、2週間後には炎症反応はほぼなくなり、8週間後には既存骨から新生骨の伸張を認めていた。16週間では骨置換反応を示し、36週間後には骨で置換されている部分を認めた。

以上の結果から、試作したインテリジェントマテリアルは十分臨床応用可能な優れた材料であることが示唆された。

#### 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0件)

[学会発表] (計1件)

湯浅哲也 低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 第4報: イヌ顎骨内における組織反応 第32回日本バイオマテリアル学会大会 2010年11月29日~30日 広島

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯浅哲也 (YUASA TETSUYA)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号：70332822

### (2) 研究分担者

桃田幸弘 (MOMOTA YUKIHIRO)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：00304543

藤澤健司 (FUJISAWA KENJI)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：40228979

高野栄之 (TAKANO HIDEYUKI)  
徳島大学・病院・医員  
研究者番号：30380091

舘原誠晃 (TATEHARA SEIKO)  
徳島大学・病院・助教  
研究者番号：90380089  
(H21)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：