

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390373

研究課題名（和文） 移植用バイオマテリアルと再生移行組織との強固な接合技術の開発

研究課題名（英文） Development of tight adhesion system for implantable materials and regenerated host tissue.

研究代表者

松本 卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40324793

研究成果の概要（和文）：

バイオマテリアルと再生組織との強固な結合を達成するにあたり、材料の修飾は重要である。本研究ではチタンやジルコニア/アパタイトといった移植用生体材料の新しい合成方法、表面改質方法を応用することで、材料と生体組織との親和性ならびに接合性向上を達成した。また、これら材料を用いることで組織再建、再生を複合化した新しい欠損組織治療方法の提案が可能となった。

研究成果の概要（英文）：

The modification of material surface properties are crucial to achieve the tight adhesion between implanted materials and host tissue. A new synthesis method of hydroxyapatite/zirconia composite porous material and a new surface modification method of titanium material were developed in this study. These materials showed higher biocompatibility and adhesive properties against cells and tissues. Moreover, the combination of bone tissue reconstruction and regeneration for bone tissue defect treatment was succeeded by using the developed materials in this study.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2011年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生体材料学、組織工学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：硬組織修復、骨、チタン、ジルコニア、アパタイト、多孔体

1. 研究開始当初の背景

歯根膜組織は歯牙の保持、咬合力の緩衝、食感の認知など人間の生の根本である「食べる」という動作において非常に重要な役割を果たす。この組織は歯牙側のセメント質および歯牙周囲の歯槽骨との間に介在する軟組

織であり、“弾性に富む組織でありながら、生体硬組織と強固に接着する”という特殊な性質を有している。近年、人工歯根（歯科用インプラント）治療の予後向上にともない、一般的な治療として歯科用インプラントは国民に認知されてきたが、その発展として、天然歯に近い機能を有する移植インプラン

ト材の開発が渴望されている。一方、口腔外科領域における外傷、腫瘍による顎骨区域切除後に行うチタンやセラミックス材料などを用いた骨再建では咀嚼筋との接合再建ができないため、咀嚼能力の低下が問題となっている。これら2つの問題は、ともに移植生体材料（チタンやセラミックス）と生体組織（歯根膜、骨膜、腱などの軟組織）との接着性の低さに原因がある。我々は、これまでから三次元材料内での三次元細胞配置、配向制御や三次元ポーラス構造を有するアパタイトやジルコニア、生体吸収性ポリマーの作製を行い、これら課題解決に向けた研究を進めている。

2. 研究の目的

本研究ではこれら技術を組み合わせることで、移植用バイオマテリアルと宿主組織の強固な接合を目標に研究を遂行した。具体的には、①バイオマテリアルの表面構造修飾による細胞含有ゲル材料保持機能の向上、②三次元細胞パターンニングを行ったゲルによる①の基材上での歯根膜、骨膜や腱を模倣した生体移行組織構造の再現、③特殊培養系を利用したゲル内細胞の分化制御および石灰化基質沈着の早期誘導と材料-組織接合の強化。といった研究を段階的に遂行した。

3. 研究の方法

(1) 材料表面改質

本研究で使用する材料（チタン、アパタイト）について、高いタンパク質吸着性と、それにとまなう細胞接着性は知られている。そこでさらなる有機性基質との接着性向上のため、物理的保持機構となりうる表面微細ポア構造の付与を行った。

チタン材料については、陽極酸化処理によりポア構造の付与を試みた。アパタイト材料については、強度の強化も考慮にいれ、ジルコニアとの複合化を行った。この際、原料粉末サイズの異なるアパタイトの添加により表面ポア構造の付与を行った。作製材料の評価はSEMなどを用いた表面形状観察を中心にイメージソフトウェアなどを用いた定量解析も行った。

(2) 細胞、組織との親和性検討

作製した材料について、材料上での細胞、組織培養を行い、親和性の検討を行った。評価は細胞接着、増殖について、各種アッセイを利用し検討を行った。また、これらに加え細胞の骨系分化などの変化についてもリアルタイムRT-PCRや免疫染色等による検討を行った。材料とタンパク質との親和性については、一定濃度のタンパク質に一定時間材料を浸漬した後、残留タンパク質量を定量することで評価した。

(3) 新規移植材料と組織との接合性検討、材料の組織再建再生能力の検討

移植した材料と宿主組織との接合性について、新規材料を実際に骨欠損部に埋入することを通して検討を行った。この際、同時に材料が組織再建、組織再生用材料として機能するかについても検討を行った。具体的にはラット頭蓋骨に人為的に作製した骨欠損部への材料移植を行う。この場合、材料ポア部への細胞導入も同時に行った。評価は、 μ CTを用いた骨量の定量化、また、各種染色により行った。

4. 研究成果

(1) チタン表面改質

純チタンの陽極酸化処理により、チタン表面数百マイクロメートルの範囲で微小管腔構造を有するチタニアナノチューブの生成を確認した。このチタニアナノチューブのサイズは応用する電圧、電流量を変えることで制御が可能であることがわかった。これら表面性状の異なるチタン表面上で、擬似体液を用いたアパタイト形成能を調べたところ、生成されるアパタイト形状が異なることが明らかとなり、また、マイクロメートルサイズの管腔構造をもつ表面の方が早期にアパタイト生成が起こることが明らかとなった。また、これら表面上での細胞接着、増殖を検討したところ、一般的な機械研磨したチタン表面よりも高い細胞接着性、増殖性を示した。さらに、骨系分化マーカーであるオステオポンチン、オス

テオカルシンの発現を検討した結果では、マイクロメートルサイズ管腔構造表面、ナノメートルサイズ管腔構造表面を有するチタンは一般的な機械研磨したチタン表面よりも有意に骨分化が進んでいることがあきらかとなり、ナノメートルサイズ管腔構造はマイクロメートルサイズ管腔構造よりもさらに骨分化を高めることが明らかとなった。この結果は、唾液腺組織を使った組織親和性、組織成長性の検討においても同様であり、このような微細加工構造をチタン表面に付与することで、生体組織、細胞との親和性制御さらには細胞分化、組織成長をも制御できる可能性が示唆された。

(2) ジルコニア/アパタイト複合体の改質

ジルコニア/アパタイト複合体では、ポリマースポンジへの無機スラリー浸漬後、焼結することで高連通気孔を有する焼結体を作成した。また、違うアプローチとして、原料結晶サイズをコントロールしたアパタイトを使用することで、微細表面孔構造を有した焼結体を作成した。これら複合体は、ともに、高い表面積の確保につながり、結果的にタンパク質吸着、細胞接着の高い材料作成に成功した。また、材料中へのアパタイト添加量制御により、これらタンパク質、細胞親和性の制御が可能であることも見いだした。さらに、アパタイトから溶出するカルシウムイオン濃度が周囲骨芽細胞の分化、増殖といった機能に影響を及ぼすことも見いだした。

また、これら材料は積層細胞シートを使った実験により、細胞、組織に対して高い接合性を示すことが明らかとなった。

(3) ジルコニア/アパタイト複合体の硬組織修復への応用

ジルコニア/アパタイト多孔体および骨髄間

葉系幹細胞を複合化した材料を人為的骨欠損部に埋入した実験の結果、材料は埋入時の形状を残したまま、残留していること、多孔体内に新生骨の生成が認められること、これら治癒の過程は材料あるいは細胞を使用しなかった場合と比較して、有意に早期の損傷部治癒を示した。

以上の結果から、移植用生体材料の表面修飾や新規合成方法により、表面に微細な多孔質構造を付与した材料作製方法を提案した。またこれら材料は、タンパク質、細胞、組織に高い親和性、接合性を示すことが明らかとなった。さらにこれら材料を使った骨欠損部の修復は材料による再建と新生組織による再生の複合化したものであり、広範囲の硬組織欠損修復の新しい技法として、これら材料利用の有効性を示すことができた。

5. 主な発表論文等 〔学術論文〕(9件)

1. An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Nakahira A, Kim KH, Imazato S. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. *Dent Mater*, 28 (2012) 1221-1231 査読あり
2. An SH, Matsumoto T, Sasaki J, Miyajima H, Narayanan R, Imazato S, Kim KH. In vitro bioactivity evaluation of nano- and micro-crystalline anodic TiO₂: HA formation, cellular affinity and organ culture. *Mater Sci Eng C* 32 (2012) 2516-2522 査読あり
3. An SH, Matsumoto T, Miyajima H, Sasaki J, Narayanan R, Kim KH. Surface characterization of alkali- and heat-treated Ti with or without prior acid etching. *Appl Surf Sci*, 258 (2012) 4377-4382 査読あり

4. Matsumoto JT, An SH, Ishimoto T, Nakano T, Matsumoto T, Imazato S. Zirconia-hydroxyapatite composite material with micro porous structure. Dent Mater (2011) e205-e212. 査読あり
5. An SH, Narayanan R, Matsumoto T, Lee HJ, Kwon TY, Kim KH. Crystallinity of anodic TiO₂ nanotubes and bioactivity. J Nanosci Nanotech 11 (2011) 4910-4918 査読あり
6. Matsumoto T, Uddin MH, An SH, Arakawa K, Taguchi E, Nakahira A, Okazaki M. Modulation of nanotube formation in apatite single crystal via organic molecule incorporation. Mater Chem Phys 128 (2011) 495-499 査読あり
7. Matsumoto T, Mizuno A, Kashiwagi M, Yoshida S, Sasaki J, Nakano T. Cell-based fabrication of organic/omprganic composite gel material. Materials 4 (2011) 327-338. 査読あり
8. Nakamura S, Matsumoto T, Sasaki J, Egusa H, Lee KY, Nakano T, Sohmura T, Nakahira A. Effect of calcium ion concentrations on osteogenic differentiation and hematopietic stem cell niche-related gene expressions in osteoblasts. Tissue Eng Part A 16 (2010) 2497-2504 査読あり
9. Uddin MH, Matsumoto T, Ishihara S, Nakahira A, Okazaki M, Sohmura T. Apatite containing aspartic acid for selective protein loading. J Dent Res 89 (2010) 488-492 査読あり
- [学会発表] (計9件)
1. 松本卓也. 石灰化を理解するin vitroの系を作ってみました. BS in Naoshima. 2012年9月8日. 高松
2. Matsumoto T. Our approach for in vitro tissue synthesis. Biomedical Engineering Seminar, Dangkook University 2012年7月31日. Daejong, Korea
3. 玉田 宜之、長岡 紀幸、早川 聡、入江 正郎、西川 悟郎、丸尾 幸憲、吉田 靖弘、松本 卓也、尾坂 明義、皆木 省吾. ジルコニア表面のリン酸モノマーによる有機化の検討. 日本歯科理工学会. 2012年4月14日. 徳島
4. 松本卓也. In vitro tissue synthesis using engineering approach. 口腔先端応用科学研究会. 2012年1月21日. 東京
5. Matsumoto T. In vitro reproduction of endochondral ossification using 3D cell construct. Gordon Research Conference. 2011年8月2日. Holderness, USA
6. An SH , Matsumoto T, Miyajima H, Kim KH, Imazato S. Porous Zirconia/Hydroxyapatite Scaffolds for Bone Reconstruction Combined with Bone Regeneration. International Dental Material Congress. 2011年4月25日. Seoul, Korea
7. 安 相炫, 宮嶋宏行, 松本卓也. MSCs combined porous ZrO/HAp scaffold for bone tissue engineering. 日本バイオマテリアル学会 第5回関西若手研究発表会. 2010年8月6日. 京都
8. 松本卓也 (院生)、松本卓也、荘村泰治

異なる配合比を有するZrO₂/HAp複合体
の生物学的評価第55回日本歯科理工学
会 2010年4月17日、東京

9. 松本卓也、モハマッドハフィス ウディ
ン、荘村泰治 アパタイト結晶中での微
小孔構造の形成第55回日本歯科理工学
会 2010年4月17日、東京

[その他]

1. サイエンスコミュニケーション 「歯科
医療と芸術との融合」. 2013年2月1日. 岡山
市130名参加

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 卓也 (MATSUMOTO TAKUYA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：40324793

(2) 研究分担者

今里 聡 (IMAZATO SATOSHI)
大阪大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：80243244