

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 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592216

研究課題名（和文）

薬物徐放制御能を有する高機能性生体材料の開発

研究課題名（英文）

Development of the very functional biomaterial that possess the ability of the control of the drug delivery system.

研究代表者

二宮 嘉昭（NINOMIYA YOSHIAKI）

広島大学・病院・助教

研究者番号：60335685

研究成果の概要（和文）：

局所に高濃度の抗菌薬と同時に骨形成能を保有した上級の骨補填材があれば、理想的な骨髄炎の治療は可能である。我々は、poly(L-lactic acid) (PLLA) と poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) の共重合体（有機材料）に α -TCP や β -TCP（無機材料）をいろいろな条件で（重量比など）添加し、ゲンタマイシンを複合材料内に含有させた植立を作成した。結果として in vivo と in vitro において、5 か月以上の長期に抗菌薬の徐放能を認めた。さらに、兎を用いた骨髄炎モデルにおいて、骨髄炎の進行を阻害し、局所的な骨形成を認めた。

研究成果の概要（英文）：

If a superior bone filling material were to be developed that allowed high concentrations of antibiotics that acted only locally, and allowed bone formation at the same time, an ideal method of treating osteomyelitis would become available. We created an implant composed of poly(L-lactic acid)(PLLA) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid)(PLGA), gentamicin, and α -TCP or β -TCP. The results of sustained-release testing in vivo and in vitro demonstrated the release of effective antibiotic concentrations over 5-month period. Further, when an experimental model of osteomyelitis was produced in rabbits and the implant was inserted after bone marrow curettage, the implant proved effective in preventing the progression of osteomyelitis and in achieving local bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1000000	300,000	1,300,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：顎骨骨髄炎，高機能性薬物徐放担体

1. 研究開始当初の背景

これまでの顎骨骨髄炎の研究は単一（無機）材料を主体にした研究が行われていた。無機材料は、形態付与が困難で溶解・吸収性

の面で問題点があり、有機材料は形態付与が容易で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を惹起することがある。そこで今回は、有機・無機材料の欠点を補い、

かつ利点を生かした複合材料（ハイブリッド材料）の開発を行い、その後各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の開発を行うことが、顎骨骨髓炎への基礎的研究に有効であると考えた。材料として有機材料は poly(L-lactic acid)(PLLA)

と poly(DL-lactic-co-glycolic acid)(PLGA)の共重合体を使用し、無機材料はリン酸カルシウム (α -TCP あるいは β -TCP) を複合させた材料である。溶解性に優れた本材料はインテリジェントマテリアルとして期待している。本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけとしては、欧州および北米で、無機材料であるアパタイトセメントの臨床応用が数年前から行われており、本邦においても平成 12 年にアパタイトセメントの臨床応用が許可されたため、アパタイトセメントに関する研究は国内外で活発に研究されている。本研究は、これまでの研究をさらに発展させ有機材料と無機材料の長所を生かし、生体内の環境に順応したインテリジェントマテリアルを作成し、それに各種抗菌薬を含有させ高機能性薬物徐放担体を開発することを目的としていることから国内・国外の生体材料研究における先駆的研究であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の概念は比較的新しいため、研究者の間でもインテリジェントマテリアルという言葉は十分に浸透していない。それ故、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体が開発されれば、国内外を通じて先駆的な研究になるとともに、顎骨骨髓炎の治療期間を短縮できるため臨床応用に即した画期的な研究になると考えられる。

3. 研究の方法

①各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の調整・作製（担当：二宮 平岡）

抗菌薬としては、FMOX（フルマリン）、GM（ゲンタマイシン）、VCM（バンコマイシン）を選択する。また、poly(L-lactic acid)(PLLA)と poly(DL-lactic-co-glycolic acid)(PLGA)の共重合体にそれぞれ異なる重量比で α -TCP または β -TCP を混合させる。練和液には、アテロコラーゲンと中性リン酸の混合液を用いる。

② 各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の基本物性の検討

各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の硬化特性などに及ぼす影響を検討する。具体的には、硬化時間（ビガー針法）、機械的強さ（間接引張強さ、圧縮強さ）を小型万能試験機で行うとともに、硬化体の組成分析（粉末 X 線回折）および捜査型電子顕微鏡（SEM）で観察を行う。

③ 各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体からの抗菌薬の徐放特性の検討

各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体を PBS200 μ l に 37 度、24 時間浸漬し、この内の 10 μ l を *S.aureus* 209P (10⁶CFU) を塗布した Brain Heart infusion 寒天培地に滴下し、24 時間培養後に形成された阻止円の直径を計測する。その後、希釈した抗菌薬の阻止円の直径をコントロールとし、徐放した抗菌薬の濃度に換算する。PBS 溶液は毎日、全量交換を行い、抗菌薬の徐放量を経時的に測定する。

④ 骨芽細胞を用いた各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体の初期接着の測定

各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐放担体を直径 10mm、厚さ 2mm の disk 状に作製し、24 well plate に静置する。その上に 1×10⁴ 個のヒト正常顎骨由来骨芽細胞を播種する。培地として 2 mM グリセロリン酸および 50 μ g/ml アスכולビン酸を含有

む α -MEM を用いる。5 時間培養後、トリプシン処理を行い細胞を回収し、MTT 法と細胞カウントに計測する。コントロールとしてディッシュ上で培養を行う。

⑤ 相対増殖率の測定

④の実験と同じディスク上に 1×10^4 個のヒト正常顎骨由来骨芽細胞を播種し、5 時間培養後、さらに培地を添加し 10 日間培養を行う。播種して 1・3・5・7・10 日後、MTT assay を行う。

⑥ 骨形成マーカー遺伝子の発現解析

④と同様に培養を行い、培養 7、14、21 日後の細胞から mRNA を抽出し、これを鋳型として cDNA を作成し、骨形成マーカーである Alkalinephosphatase、Type I collagen、Osteocalcine、の遺伝子発現を RT-PCR およびリアルタイム RT-PCR にて検討する。

⑦ 顎骨骨髓炎動物モデルの作製

2.5~3.0kg 日本白色家兎をネブタール静脈麻酔下、フィッシャーバー、トレフィンバーを用いて顎骨に $5 \times 5 \times 5$ mm 大の骨欠損を形成する。口腔内常在菌である *Staphylococcus aureus* (1×10^6 CFU) を綿球に浸漬し、骨欠損部に留置する。創部を縫合して閉鎖し、経日的に X 線検査および血液一般検査にて顎骨骨髓炎を判定。

4. 研究成果

顎骨骨髓炎の治療期間を短縮するための臨床応用に即した基礎的研究を行う必要がある。研究計画として、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の調整・作製をまず行い、続いて基本物性の検討、in vitro での抗菌薬の徐放特性の検討、骨芽細胞を用いた初期接着の測定の検討、相対増殖率の測定、骨形成マーカー遺伝子の発現解析を行った。その後、家兎顎骨骨髓炎モデルを作製し、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担

体の抗菌効果および骨伝導能・骨形成能などの組織学的評価を行った具体的には、顎骨骨髓炎動物モデルを作製した後、炎症の組織学的評価、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の組織親和性と骨伝導性の検討、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の骨置換性の検討を行った。顎骨骨髓炎を発症した顎骨を搔爬し、死腔のまま閉鎖した control 群、抗菌薬を含まない高機能性薬物徐法担体、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体をそれぞれ埋入する。埋入手術後、一定期間ごとに、ラベリング剤（カルセイン、テトラサイクリン）を投与する。3 ヶ月、6 ヶ月後に屠殺し、顎骨を摘出して、脱灰、非脱灰組織切片を作製後、炎症の組織学的評価を行ったところ 6 か月には十分炎症が波及していた。また、各種抗菌薬を含有させた高機能性薬物徐法担体の骨および軟組織に対する組織親和性および骨伝導性についても組織学的に検討したところ、炎症所見はなく、骨形成も十分認められた。

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 5 件)

- 1) A case of SAPHO syndrome with diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible treated successfully with prednisolone and bisphosphonate. Hatano, H., Shigeishi, H., Higashikawa, K., Shimasue, H., Nishi, H., Oiwa, H., Shindo, H., Takechi, M., Ohge, H. and Kamata, N. J Oral Maxillofac Surg. (査読有) Aug. 70, 626-631, 2012.
- 2) 3-dimensional composite scaffolds consisting of apatite-PLGA-atelocollagen for bone tissue engineering. Takechi, M., Ohta, K., Ninomiya, Y., Tada, M., Minami, M., Takamoto, M., Ohta, A., Nakagawa, T., Fukui, A., Miyamoto, Y. and Kamata, N. Dental Materials Journal. (査読有) 31(3), 465-471, 2012.
- 3) Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure. Shigeishi, H., Takechi, M., Nishimura, M., Takamoto, M., Minami, M., Ohta, K., and Kamata, N. Dental Materials Journal. (査読有) 31(1), 54-60, 2012.
- 4) 二宮嘉昭, 武知正晃, 太田耕司, 小野重弘, 奥井 岳, 高本 愛, 安部倉 仁, 赤川安正,

鎌田伸之：口蓋隆起除去骨を応用し
ISODを行った1症例 広島大学歯学雑
誌(査読無)43(1), 61-65, 2011.

- 5) 二宮嘉昭,武知正晃,太田耕司,小野重弘,
奥井 岳,太田 彰,高本 愛,鎌田伸之：
連通多孔体ハイドロキシアパタイトと
チタンメッシュを用いた垂直的骨造成
の1例 日本顎顔面インプラント学会
誌(査読有)10(1), 23-29, 2011.

〔学会発表〕(計1件)

- 1)二宮嘉昭・武知正晃・太田耕司・南 正
彦・多田美里・太田 彰・湯浅哲也・石川
邦夫・鎌田伸之 GM含有 α -TCP/ACの
顎骨骨髓炎への応用に関する基礎的研究－
基本物性と生体親和性について－第32回
日本バイオマテリアル学会大会 2010.11.29
～11.30 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 嘉昭 (NINOMIYA YOSHIAKI)
広島大学・病院・助教
研究者番号：60335685

(2) 研究分担者

武知 正晃 (TAKECHI MASA AKI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授
研究者番号：00304535

中川 貴之 (NAKAGAWA TAKAYUKI)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：30456230

鎌田 伸之 (KAMATA NOBUYUKI)
広島大学・医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：70242211

多田 (平岡) 美里 (TADA MISATO)
広島大学・病院・助教
研究者番号：40572326
(H22のみ)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：