

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 27日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792229

研究課題名（和文） テーラーメイド型生体材料の骨形成促進機能付与

研究課題名（英文） Enhancement of bone conductivity for tailor-made biomedical materials

研究代表者

内藤 禎人 (NAITO YOSHIHITO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：20509773

研究成果の概要（和文）：

テーラーメイド型骨代替材に、骨形成能を有する薬剤を封入した薬剤徐放能を有するマイクロスフェアカプセルを組み込むことで、より安定した骨結合を得られる薬剤徐放担体の開発を目的とした。チタン多孔体の形状最適化、薬剤設計（薬剤の選定、マイクロスフェア粒子調整）は順調に進んでいる。今後は、チタン多孔体表面へのマイクロスフェア設置方法、条件の検討、さらには *in vivo* における骨反応評価を行っていく。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to develop the drug delivery scaffolds that achieve more stable bone conductivity using the porous titanium which is produced by moldless process and the microsphere capsule which has good controlled-release ability. We have already determined the drug design (the selection of drug, the particle adaptation of microsphere). We will evaluate the way to load of microsphere into the pore of porous titanium and the bone response of it *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：生体材料、テーラーメイド医療、チタン、薬剤徐放担体、骨補填剤

1. 研究開始当初の背景

骨造成には、免疫反応の問題から自家骨を使用した移植が第一選択である。しかし、放射線治療、外傷や先天欠損による広範囲の顎骨欠損症例においては、自家骨の採取量に制限があることから、人工骨や生体材料であるチタンを用いて再建する。

チタンは生体親和性に優れた材料であるが、骨に比べると弾性率が大きすぎるため、周囲骨との強度のミスマッチにより、骨吸収してしまう”Stress-shielding”現象を引き起こすことが知られている。改善策として、内部に気孔を持たせて弾性率を低下させた多孔体の応用が提案されているが、チタン多孔体は成形性に難があり、患者個々の欠損形

態にあった形状を得るには、高価なモールド（型枠）が必要となり、コストがかかりすぎるのが問題である。

我々は、モールドを用いずに、成形と焼成が可能なチタン多孔体の作製方法を開発した。チタン多孔体は骨に近似した機械的性質を再現できる上に表面に多くの空孔があり、骨との結合が得られやすい性質を持っている。

これらの性質を最大限に応用するために、徐放担体としての応用を考えた。つまり、多孔体に多く存在する空孔を利用し、そこに薬剤を設置することで、薬剤徐放担体としての応用を試みることにした。

空孔に薬剤を設置する際に、単純に薬剤を

浸漬させるだけでは、生体内に入った瞬間に放出され、周囲組織に反応してしまい、徐放担体としての機能を果たさないと考えられる。そこで、従来より薬剤徐放分野で研究がなされているマイクロカプセルの応用を考えた。我々の用いたマイクロカプセルは、PLGA 基材よりなり、生体内で加水分解することで、内部に封入した薬剤を放出するものである。つまり、マイクロスフェアの粒子径をコントロールすることで、徐放速度を制御することができる。カプセル崩壊後は、代謝経路に組み込まれ、H₂O と CO₂ に分解されるため、生体安全性は保証されている材料である。

そこで、我々の開発した技術に対して、さらなる改善を加え、より早期での骨結合、また安定した骨結合の獲得を目指し、薬剤徐放能を有するマイクロスフェアカプセルを組み合わせた機能化を試みることにした。

2. 研究の目的

我々の考案した、患者個々の欠損形態に成形可能なチタン多孔体に対し、空孔径や、表面形状を最適化し、薬剤設計を行い、より早期での骨結合を得るための薬剤徐放担体、スキャフォールドとしての応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) チタン多孔体の形状最適化

もともと我々が使用していたチタン多孔体は、平均粒径 120 μm のチタン粉末を使用しており、空孔径は平均 30μm であった。空孔内部への、骨細胞の侵入を期待するならば 100μm 以上の空孔径を有することが望ましいとされている。また、多孔体表面にマイクロスフェア粒子を設置するためにも、粒子径に調和した空孔径が必要であった。

そこで、多孔体の空孔径制御を目的として、従来のモールドレスプロセスに、スペースホルダー法を組み合わせ、空孔径と、多孔体強度の最適化をはかった。スペーサーとしては、今回用いた PMMA 粉末以外にも、数種類の材料を試したが、成形性や焼成状態を評価して、PMMA 粉末を用いて実験を行うことにした。

(2) マイクロスフェア粒子の調製

HMG-CoA 還元酵素阻害薬で、脂質異常症治療薬である Simvastatin (SMV) は骨芽細胞に作用して骨形成促進効果があることが確認されている。そこで、効率よく骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の骨形成能を促進できる薬物システムを開発するために、徐放性基材の一つである poly(D, L-lactic/glycolic acid)、すなわち PLGA を用いて O/W 水中乾燥法と W/O/W 水中乾燥法によって SMV 含有マイクロ粒子を調製した。

具体的には、質量比を SMV : PLGA = 1:10、

外水相には界面活性剤である Poloxamer 188 を用いて、従来の方法とは異なる O/W マイクロ粒子と W/O/W マイクロ粒子を調製した。そして、走査型電子顕微鏡で粒子形状を観察して、粒度分布を測定した。また、示差走査熱量計で熱量分析し、粒子の物性評価を行った。その後、HPLC を用いて SMV の充填率及び封入率を求めた。

(3) シンバスタチンを封入したマイクロスフェアの骨芽細胞への影響を検討

調製した PLGA マイクロスフェアの封入率を測定し、その結果から、24 well 内の SMV 濃度を 100 μM となるように設定した。MC3T3-E1 の細胞懸濁液を通法の手法で調製し、細胞数は 1.25×10^5 個とした。そこに PLGA マイクロスフェアを MC3T3-E1 細胞に添加した。

(4) チタン多孔体スキャフォールドへのマイクロスフェア担持方法の検討

生分解性があり、生体親和性が確保されているキトサンゲルを使用した。キトサンゲルに有効量のマイクロスフェア粒子を混和し、一定減圧条件下で 2 時間留置し、多孔体の含浸量を測定した。

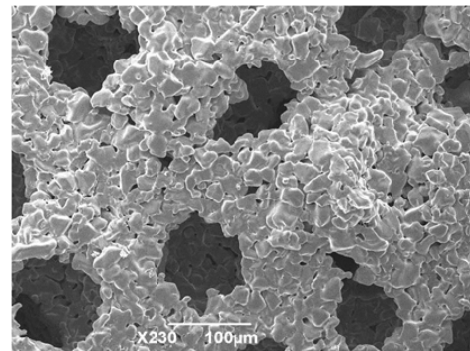


図1 チタン多孔体のSEM像

4. 研究成果

(1) チタン多孔体の空孔径制御と機械的強度の最適化

スペースホルダーとして、100, 200, 600μm の PMMA 粉末を用いた。図 1 に示すように、

mixing ratio(mass%)	shrinkage(%)	porosity (%)	elastic modulus (GPa)
Ti81-wax12-PMMA7	5.0±0.6(5)	26.5±2.1(5)	63.3±4.4(5)
Ti78-wax12-PMMA10	6.9±1.1(5)	42.4±1.7(5)	45.7±2.3(5)
Ti75-wax12-PMMA13	10.4±0.9(5)	50.6±2.1(5)	24.2±2.3(5)

図2 チタン多孔体の機械的性質

多孔体表面層にスペーサーによる空孔の形成

が確認された（写真は 200 μ m の PMMA を使用したもの）。空孔周囲のチタン粉末の強固な焼結も認められた。また、空孔径を変化させた 3 条件の機械的性質は図 2 のとおりであった。皮質骨の強度は約 22 GPa 以下といわれている。Ti75-Wax12-PMMA13 の条件では骨に近似した弾性率を実現できた一方で、寸法変化率は非常に大きいものとなった。今回の実験条件において、寸法変化率を最小に抑えることができた Ti81-Wax12-PMMA7 の条件においても、弾性率は 63 GPa という値を示した。チタン合金の弾性率が 110 GPa 付近であることを考えれば、弾性率を大幅に抑えることに成功したと言える。今度も焼成条件や、使用材料の形状、粒径を最適化し、寸法変化率を制御する。

(2) マイクロスフェア粒子の調製

O/W マイクロ粒子や W/O/W マイクロ粒子を調製する際に、薬物封入率を高めるため、質量比を SMV : PLGA = 1:4 に設定したところ、SMV が PLGA から漏出したので 1:10 に変更した。そこで、改めて相性の良い界面活性剤をスクリーニングし、Poloxamer 188 を選択した。この結果、SMV が漏出することなく O/W もしくは W/O/W SMV 含有マイクロ粒子を調製することができた（図 3）。また、疑似体液における 30 日までの徐放試験を行った（図 4）。初期バーストが認められず、理想的な徐放曲線が得られた。

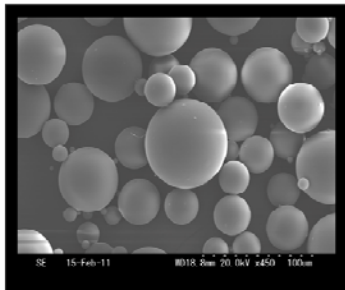


図3 シンバスタチン封入マイクロスフェア粒子のSEM像

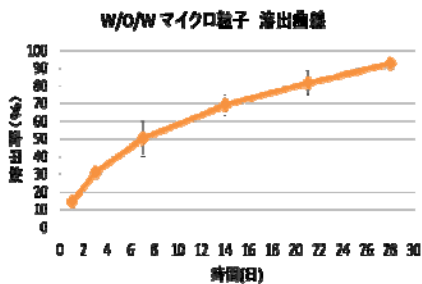


図4 シンバスタチン封入マイクロスフェア粒子の徐放曲線

(3) 骨芽細胞との反応

図 5 のように、マイクロスフェア粒子を添加すると、設定したほとんどの条件において、骨芽細胞が死滅している像が確認された。

しかしながら、予備実験において、マイクロスフェアの原材料である PLGA 基材とシンバスタチン単体を加工せずにセル内に設置して骨芽細胞親和性実験を行ったところ、細胞数は増加し、最適なシンバスタチン濃度が 10 nM 付近にあることが示唆された。このことより、PLGA とシンバスタチンはともに、細胞に対して親和性が高く、しかもシンバスタチンは骨芽細胞の増殖に対して有効であることが考えられた。

今回、封入した試料でこのような結果になった原因としては、マイクロスフェア崩壊時の浸透圧の変化が細胞に対して悪影響を与えているか、もしくは余剰溶媒が残存し、それが細胞に悪影響を与えているかのふたつが考えられた。結果を受けて、溶媒と薬剤の比率を変化させ、マイクロスフェア崩壊時に溶媒が極力溶けださないような、粒子調整条件を検討しているところである。また、徐放期間は短くなるものの、崩壊時の浸透圧が問題であれば、ナノスフェアの利用も検討する。

当初はチタン多孔体へ組み合わせた実験を想定していたものの、マイクロスフェア調整に時間がかかってしまい、基礎実験に終始してしまった。まずは、マイクロスフェア単体の評価や、骨セメントに複合させた場合の in vitro、in vivo 評価を行った後に、最終的には、チタン多孔体へのマイクロスフェア設置条件を検討後、同様に in vitro、in vivo 評価を行っていく予定である。

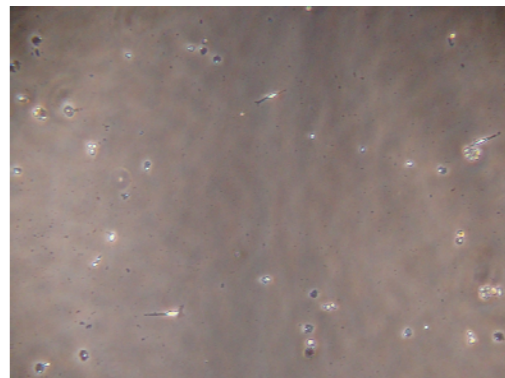


図5 SMV封入マイクロスフェアを添加したときのMC3T3-E1細胞

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 1 件)

① Yoshihito Naito, Jiyoung Bae, Yoritoki Tomotake, Kenichi Hamada, Kenzo Asaoka, Tetsuo Ichikawa

Formability and mechanical properties of porous titanium produced by a moldless

process
Journal of biomedical materials research
B
査読有, 2013. DOI: 10.1002/jbm.b.32919.

[学会発表] (計2件)

- ① Y. Naito, H. Suito, Jiyoung Bae, K. Hamada, T. Ichikawa
Fabrication of porous titanium using moldless and space holder technique
90th International Association for Dental Research, 2013.6.20-23, Iguazu Falls (Brazil)
- ② 水頭英樹, 内藤禎人, Bae Ji-Young, 浜田賢一, 市川哲雄
スペースホルダー法を用いた医用チタン多孔体の気孔径制御
第59回日本歯科理工学会、2012.4.14-15、郷土文化会館(徳島県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 禎人 (NAITO YOSHIHITO)
徳島大学・病院・助教
研究者番号: 20509773

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: