

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463013

研究課題名(和文) ナノサイズのアパタイト粒子を応用した硬組織伝導デバイスの開発

研究課題名(英文) Preparation of osteo-conductive device using nano-size apatite particles

研究代表者

平 雅之(Taira, Masayuki)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60179398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノサイズのアパタイト粒子を医療用コラーゲンに配合し、ラットの頭蓋骨欠損部に埋入して骨再生の程度をマイクロCTと組織観察によって評価した。その結果、スポンジ状では4週で得られた骨形成能が8週で失われたが、プレス加工を施し高密度化すると、4週、8週と経時的に骨伝導能が維持され、新規の骨補填材として有用と思われた。

また、ナノ・アパタイト粒子をBMP配合/架橋型ヒアルロン酸ハイドロゲルに混和した複合体を調製し、マウスの頭蓋部皮下、大腿部筋肉および背部皮下に注入し、組織反応(骨形成)を評価した所、いずれも高確率で新生骨形成が得られ、注入型(ゾルーゲル反応式)硬組織伝導デバイスになりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We prepared collagen/nano-apatite composites by blending, and implanted them in rat cranial defects. It became evident that sponge composites were absorbed, but pressed composites had good osteo-conductive properties, leading to much new bone formation. It was suggested that pressed collagen/nano-apatite composites are new bone substitute materials.

We also prepared crosslink-type hyaluronic acid/nano-apatite/BMP sols, and implanted them in mouse head, back and muscle. The materials (gel) induced bone formation at high rates. It was speculated that crosslink-type hyaluronic acid/nano-apatite/BMP composite might be used as safe injectable (sol-gel reaction type) osteo-conductive medical device.

研究分野：歯科理工学

 キーワード：生体材料 ナノアパタイト コラーゲン 複合体 硬組織再生 医療デバイス 架橋型ヒアルロン酸 B
MP

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療では顎骨造成のため骨補填材が頻繁に使用されている。現在使用されている骨補填材の骨伝導能は必ずしも高くなく、骨伝導能を著しく向上させた新規の骨補填材の開発が望まれていた。

工業界ではナノ材料の開発が進み、歯科医療への応用展開が可能になりはじめていた。また、ナノ材料は成長因子を担持させる DDS キャリアーとしての応用展開も期待される状況にあった。

併せて、ナノ材料 (ナノ・アパタイト) を利用した硬組織再生医療用デバイスの開発を行う社会的ニーズが存在していた。

2. 研究の目的

本研究では、単分散性のナノ・アパタイト粒子を用いて新規・硬組織伝導デバイスの開発を目指した。ナノ・アパタイトを用いてコラーゲンとの複合 **スポンジ体**、コラーゲンとの複合 **プレス体**、及びナノ・アパタイト配合ヒアルロン酸 **DDS キャリアー** を調製し、動物実験から骨伝導システムとしての可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) ナノ・アパタイトの材料学的評価：使用したナノ・アパタイト (ソフセラ社) (nHAP) について透過型電子顕微鏡観察 (TEM)、X線解析 (XRD) やレーザーによる粒子径計測を行った。

(2) ナノ・アパタイトと医療用コラーゲン複合 **スポンジ体** の骨伝導能： nHAp (0.3g) を中和した医療用コラーゲン (日本ハム社) (1g/水 28ml) (Co1) に混練し、 -80°C 3 時間の予備凍結後、12 時間凍結乾燥 (図 1) し、6mm ϕ \times 1mm の円盤状試料に打ち抜いた (Co1/nHAp)。対照としてコラーゲンのみの試料 (Co1) も作製した。試料はエチレンオキサイド滅菌を施した。



図 1 凍結乾燥工程

動物実験倫理委員会の承認を得た後、雄性 Wistar ラット 10 週齢 12 匹の頭蓋骨に対して直径 6mm のトレフィンバーを用いて骨欠損部

を形成した。頭蓋骨欠損部には 2 種類の試料を各 3 匹ずつ埋入し縫合した。術後、4 週および 8 週経過後、ラットを安楽死させ、マイクロ CT によるエックス線学的評価を行った。(3) ナノ・アパタイトと医療用コラーゲン複合 **プレス体** の骨伝導能：(2) の試料にニュートンプレス (図 2) をかけプレス体とし、同様の動物実験を行った。非脱灰薄切試料を準備し、ビラヌエバ染色と蛍光二重染色 (テトラサイクリンとカルセイン) による組織学的評価も行った。



図 2 ニュートンプレスとプレス体

(4) ナノ・アパタイトと **合成コラーゲン** 複合スポンジ体の骨伝導能：

また、合成コラーゲンに n-HAP を分散させた複合スポンジ体を調製し、ラット頭蓋骨欠損部における硬組織反応について検討を加え、非動物由来の安全な硬組織伝導デバイスの開発を目指した。プロリン、ヒドロキシプロリンとグリシンからなるトリペプチドを出発材料とし、カルボジイミドと HOBT (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) による重縮合を行い合成コラーゲンとした (図 3)。



図 3 縮重合反応式

(5) 架橋型ヒアルロン酸/BMP/ナノ・アパタイト **複合ゲル** による骨伝導能：同複合ゲルをマウス頭蓋部皮下、大腿部筋肉および背部皮下に注入し、組織反応 (骨形成) を評価し、外科的侵襲の少ない注入型硬組織伝導デバイスの開発を試みた。ゾルには架橋型ヒアルロン酸 (Hystem) (CHY) を用い、脱ガス水に溶解した。ナノ・アパタイトには nHAP を用いた。BMP には、rhBMP-2 (Recombinant 人/マウス/ラット型) を用い 1ml 中に $8\mu\text{g}$ とした。nHAP はゾルに事前に配合し、BMP も予め脱ガス水に溶解した。試験材は、CHY・nHAP・BMP で、対象材は CHY・nHAP および CHY・BMP であった。ゾルはマウス頭蓋部皮下、大腿部筋肉内および背部皮下の 3 箇所にて 22G の注射筒を用い 1 から 2.5ml の分量にて注入し、

生体内でゲル化（約 20 分）させた。注入後 1 週、4 週、8 週に渡り μ CT にて不透過像の経過を観察した。8 週経過後、残存材料を含む生体組織を摘出し通法に従い組織像の HE 染色観察を行なった。

4. 研究成果

(1) nHAP は TEM 観察の結果 40nm の単分散性の粒子であり、XRD から高結晶性のアパタイトであることが判明した（図 4）。水に分散させた場合の粒子径は 40nm と 230nm の二つの粒子径ピークを有し、nHAP は若干、凝集性を有することが確認された。

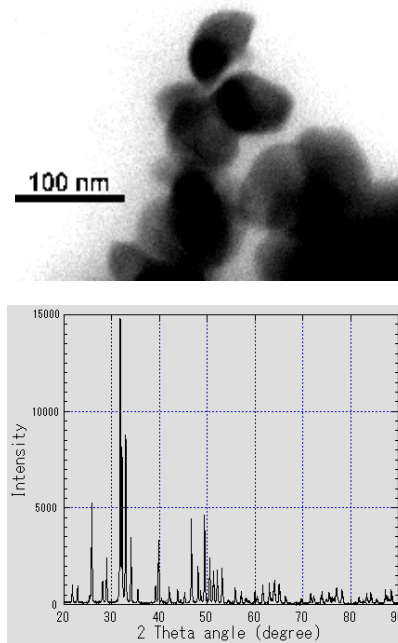


図 4 nHAP の TEM 像(上)と XRD チャート(下)

(2) 4W, 8W に至る骨欠損部における骨再生の程度は、複合体(CoI/nHAp)埋入で大きく、CoI 単独埋入で相対的に小さかった。複合体スポンジ(CoI/nHAp)埋入時、新生骨量は 4W で最大となり 8W で減少したが（図 5）、破骨細胞の活動が緩慢なことからマクロファージの nHAP 粒子の貪食が活発なためと考えられた。

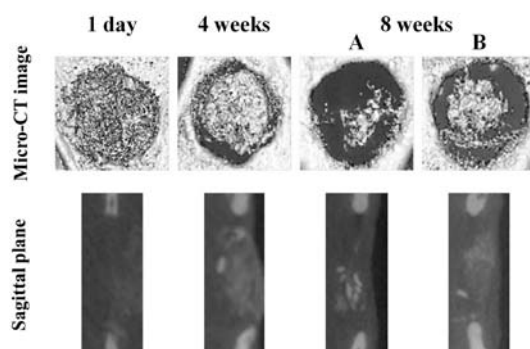


図 5 nHAP/CoI スポンジによる骨形成

(3) プレス加工した CoI/nHAP 複合体はラット骨欠損部において経時的にマイクロ CT 像

上での不透過度を増加させ ($p < 0.05$) (図 6), 優れた骨伝導能を有すると判断された。組織像から、n-HAP/CoI は骨欠損部において多核異物巨細胞によって広範に吸収/代謝され、近傍で類骨と新生骨の形成を活発に誘導することが示唆された。二重染色によって、新生骨の動形態学的な情報が詳細に得られた（図 7, 8）。従って、プレス加工した CoI/nHAP は新規の骨補填材として有用と考えられた。

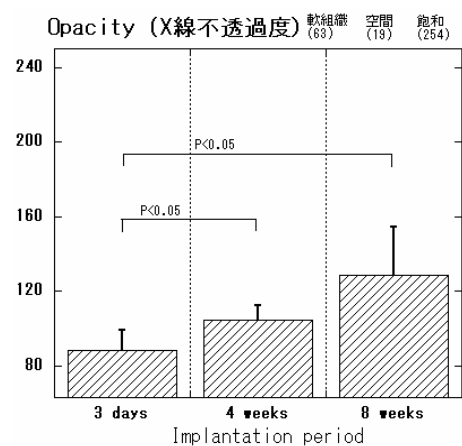
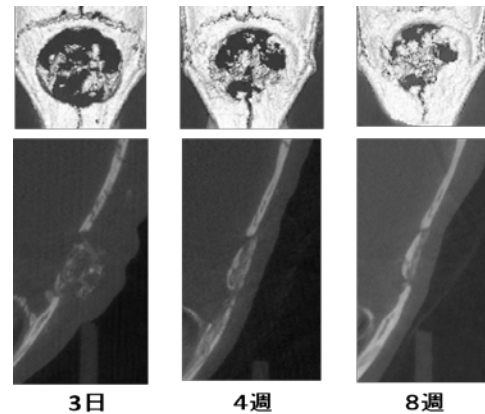


図 6 nHAP/CoI プレス体による骨形成

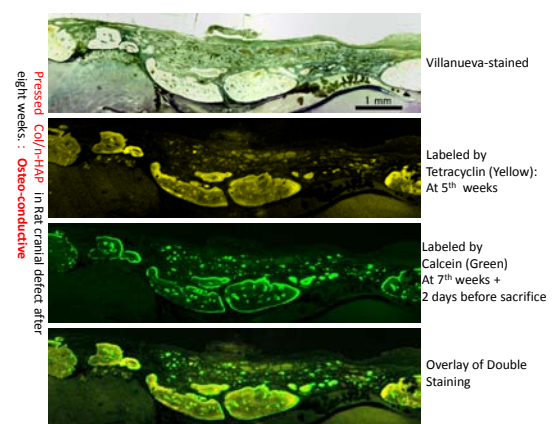


図 7 nHAP/CoI プレス体による新生骨形成 TC (黄) は 5 週目投与、CS (緑) は 7 週目投与 (8W 中の)。

Pressed Col/n-HAP in Rat cranial defect
after eight weeks. : Osteo-conductive

Villanueva-stained

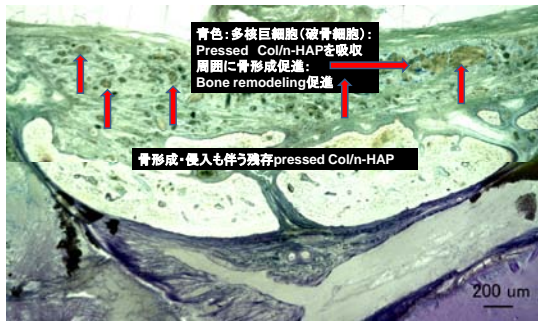


図8 異物多核巨細胞による複合体の代謝と直下における活発な新生骨形成

(4) 合成コラーゲンを使用した複合体 (aCol/nHAP) は欠損部から浮き上がりやすく、0週から4週、8週 (図9) にかけての経時的な骨再生挙動が些少で明瞭には確認できなかった。合成コラーゲンは親水性が高く、これまでの動物由来コラーゲンと異なる生体反応を惹起したと思われた。合成コラーゲン自体は貪食系細胞によって経時的に代謝され、炎症の程度は軽微であった。今後、術式と生体材料の適応方法の改善で骨伝導の改善が見込まれると推察された。

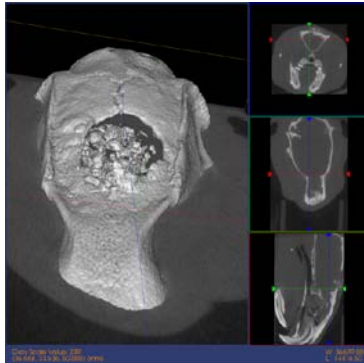


図9 aCol/nHAP スポンジによる骨形成, 8週

(5) CHY・nHAP・BMP複合体は、マウス頭蓋骨皮下、大腿部筋肉内および背部皮下において高率 (約35%確率で)、経時的に μ CT像上での不透過度を増加させる事を確認した (図10)。不透過部は肉眼的には、残存材料および白色の物質状であった。HE組織像から、複合体材料が生体内で一部吸収され、軟組織を主体とする硬組織前駆状態であった (図11)。一方、CHY・nHAPおよびCHY・BMPの対照材注入部では、 μ CT上での不透過像はほとんど得られなかった。試験材 (CHY・nHAP・BMP複合体) ではBMPはnHAPに保持、徐放され長期骨形成能が維持されうると考えられた。また、注入部位での創傷治癒に伴う血管新生が顕著な場合に骨形成が有意と考えられた。今後、研究が継続され、臨床応用に繋がることを期待された。

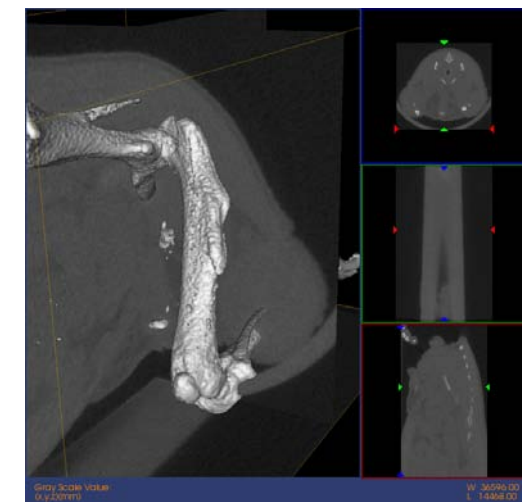


図10 CHY・nHAP・BMPによる硬組織形成上: 頭皮下と背皮下, 下: 足筋肉内

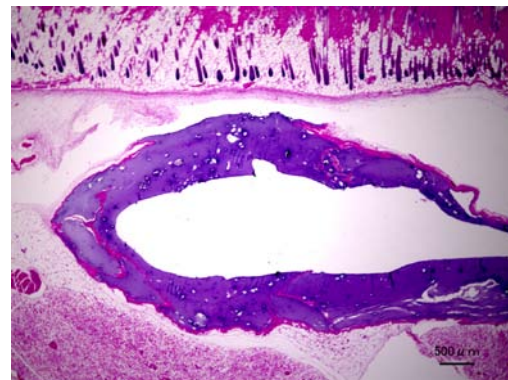


図11 CHY・nHAP・BMPによる軟組織反応: 紫部分が硬組織前駆組織

(6) 以上の結果から、nHAPを利用した硬組織形成デバイスの開発の可能性が2方向から示された。今後、継続的な研究を続け実用化を目指す予定である。

1 方向目：下記に結論を表に要約した。

結論		
プレス加工Col/nHAPは早期骨伝導能、中期骨伝導能を有し、顕著な骨の再生を誘導した。		
生体材料	骨伝導能	特長
Col	弱い	(抜去窩埋入スポンジ)
Col/n-HAP スポンジ	早期骨伝導能持続しにくい	骨再生には不十分な継続的骨伝導能
Col/nHAP プレス加工体	早期および中期骨伝導能持続性有り	ある程度継続的、顕著な骨伝導能

2 方向目：架橋型ヒアルロン酸・ナノアパタイト・BMP (CHY・nHAP・BMP 複合体) は注入式骨補填材になりうると考えられた。

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 2 件)

- ① Taira M, Hatekeyama W, Yokota J, Chosa N, Ishisaki A, Takafuji K, Kihara H, Kondo H, Hattori M. Tracking GFP-labeled transplanted mouse MSC in nude mice using in vivo fluorescence imaging. Nano Biomed. 6(2):73-77, 2014. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/nano/6/2/6_73/_pdf
- ② Hatakeyama W, Taira M, Ikeda K, Takafuji K, Kihara H, Kondo H, Hattori M. In vivo evaluation of noble porous apatite disks implanted in rat critical-size calvarial defects by Micro-CT and histological observations. J Oral Tissue Eng. 12(1): 13-19, 2014. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jard/12/1/12_13/_article

[学会発表] (計 5 件)

- ① 池田功司, 平 雅之, 高藤恭子, 近藤尚知. ラット頭蓋骨欠損部におけるプレス加工ナノ・アパタイト/コラーゲン複合体を用いた骨再生. 第 45 回口腔インプラント学会学術大会. 岡山市, 2015 年 9 月 22 日
- ② 島山 航, 平 雅之, 池田功司, 鬼原英道, 近藤 尚知. ラット頭蓋骨欠損部におけるハイドロキシアパタイト多孔体ディスクを用いた骨再生の試み. 第 44 回日本口腔インプラント学会. 東京都, 2014 年 9 月 13 日

- ③ 島山 航, 平 雅之, 鬼原 英道, 近藤 尚知. 多孔質アパタイト粒子コラーゲン複合体によるラット頭蓋骨クリティカルサイズ骨欠損部における骨再生の試み. 第 62 回日本歯科理工学会学術講演会. 新潟市, 2013 年 10 月 20 日
- ④ 島山航, 平 雅之, 鬼原英道, 高藤恭子, 近藤尚知. アパタイト/コラーゲン複合体中のアパタイト粒子の違いが骨芽細胞様細胞の骨系分化挙動に及ぼす影響評価. 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 福岡市, 2013 年 9 月 15 日
- ⑤ 島山 航, 平 雅之, 鬼原英道, 近藤尚知. ナノアパタイト/コラーゲン複合体に対する生体反応の評価: 骨芽細胞応答、軟組織反応および硬組織反応. 日本歯科理工学会 北海道東北地方会夏期セミナー. 盛岡市, 2013 年 9 月 1 日

[その他]

ホームページ等

<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/dmst/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)

岩手医科大学・歯学部・准教授

研究者番号:60179398