

機関番号：15401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890159
 研究課題名（和文） サイトカイン添加型バイオミメティック人工骨による骨再生促進効果
 研究課題名（英文） Effect of bone formation ability using the biomimetic bone graft material with some cytokines

研究代表者
 松浦 歩 (Ayumu Matsuura)
 広島大学・病院・歯科診療医
 研究者番号：10555155

研究成果の概要（和文）：臨床応用に向けてより高い骨形成能を目指すため、炭酸アパタイト・コラーゲン複合体にサイトカインを含浸させ、材料学的評価および *in vitro* にてその有用性を検討した。サイトカインを添加しても材料に変化はなく、3次元的な網目状構造を有していた。また、細胞増殖数においてサイトカイン添加群は非添加群と比較して優位に高い値を示していた。

研究成果の概要（英文）：In order to acquire higher bone formation ability, we fabricated carbonate apatite collagen sponges with cytokines, The aim of this study is to evaluate values of these bone graft materials from points of view of the biomaterial and *in vitro*. They had 3-dimensional structures and didn't change by addition of cytokines. In carbonate apatite collagen sponges with cytokines, number of cells significantly increased compared with controls.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般

1. 研究開始当初の背景

義歯補綴治療やインプラント治療において機能的および審美的回復を得るには、欠損部の十分な骨量が必要であり、骨吸収を伴う症例においては骨移植材を用いた骨増生が行われるなど、補綴治療における骨

再生に対する関心は高い。現在、骨増生の臨床では、自家骨、同種他家骨、異種骨などとともに生体材料が用いられている。自家骨は優れた骨形成能を持ち、自己から採取されるため免疫応答の問題もなく理想的な骨移植材といえるが、採取のための外

科的侵襲が避けられないこと、採取できる骨量が限られることなどの問題がある。同種他家骨は優れた骨形成能を有しているが、HIVなどのウィルス感染や拒絶反応といった免疫応答を起こす危険性が指摘されている。牛骨脱灰乾燥骨に代表される異種骨は構造的にヒト骨組織と類似して骨伝導能を持つが、薬事が未承認であるため使用できない。このような状況の中で、自家骨に替わる高い安全性と確実な骨形成能を有する骨移植材の開発が強く望まれている。

人工骨の代表的なものとして、リン酸カルシウムを主体とするハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, Hydroxyapatite: HA) や β 型リン酸三カルシウム ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -tricalcium phosphate: β -TCP) などがある。これらは生体親和性に優れ、供給量も安定していることから骨移植材料として用いられてきたが、生体内で長期に残存することや骨組織に置換される時期における吸収や分解のコントロールが困難であるため予知性の高い骨移植材とはいえない。

そこで申請者は、広島大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程に学び、そこで生体骨組織に存在する生体アパタイトに類似した炭酸アパタイト (Carbonate Apatite: CA) に着目し、より生体模倣性を有する安全で確実な骨形成を獲得できる骨移植材を開発する研究の一端を担った。まず、生体内の骨中の有機質の主成分であるタイプ I アテロコラーゲンを組み合わせた炭酸アパタイト・コラーゲン複合体 (CA-CS) の異なる炭酸イオン含有量が骨形成に及ぼす影響について材料学的評価を行い、ラビット大腿骨において組織学的ならびに組織形態学的に検討し、CA-CS の骨移植材としての有効炭酸イオン含有量を明らかにした (Matsuura et al, Dental Materials Journal, 2009)。

2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに培った、生体アパタイトに類似した炭酸アパタイト (Carbonate Apatite: CA) を用いた生体模倣性を有する安全で確実な骨形成を獲得できる骨移植材を開発する研究を基に、生体内の骨中の有機質の主成分であるタイプ I アテロコラーゲンを組み合わせたバイオミメティック人工

骨である炭酸アパタイト・コラーゲン複合体 (CA-CS) を作製し、実際の顎骨での骨髄による栄養供給が乏しい場合での骨増生を想定し、組織再生の鍵となるサイトカインの併用を着想、より高い骨形成能を有するサイトカイン添加型 CA-CS 人工骨の開発を目指す。

3. 研究の方法

炭酸アパタイトの合成は湿式法を用い、合成温度および pH はコントローラーにより、 $60 \pm 1^\circ \text{C}$ 、 $\text{pH} 7.4 \pm 0.2$ に保った。カルシウムイオンの供給源として 100 mmol/L の酢酸カルシウム溶液 0.5 L を、炭酸イオンとリン酸イオンの供給源として 0.06 mmol/L の炭酸アンモニウムを含んだ 60 mmol/L のリン酸二水素アンモニウム溶液 0.5 L をそれぞれ用意した。これらの混合溶液を 1.3 mmol/L の酢酸アンモニウム緩衝液中に 250 ml/hr で供給し、マイクロチューブポンプにて攪拌した。得られた沈殿物を蒸留水で洗浄濾過後、 60°C で 48 時間乾燥、0.06M 炭酸アパタイト結晶を得た。この結晶粉末と 1.0 wt% I 型アテロコラーゲン溶液を常温下で混和、10 min, 1500 rpm にて遠心分離後上澄み液を吸引除去し、ゲル状になった液体をテフロン製型枠 (直径 2.8 mm, 高さ 5.0 mm) に封入した。次いで、 -80°C で 2 時間凍結後、 -54°C で 24 時間乾燥、UV 滅菌を施し、0.06CA-CS を作製した。その後、bFGF (科研製薬) および rh-BMP2 (Pepro Tech, INC) をそれぞれ $20 \mu\text{l}$ ずつ 0.06CA-CS に含浸させ、 -80°C で 2 時間凍結後、 -54°C で 24 時間凍結乾燥させて、 -4°C で保存した。コントロールとして、サイトカインを含有していない CA-CS も用意した。これらの材料構造を SEM にて観察後、マウス骨芽細胞用細胞 (MC3T3-E1) 5×10^4 個/ μl を播種、3 日後の材料に付着した細胞数を Cell count kit および吸光度計にて計測し、細胞増殖の促進効果を評価した。

4. 研究成果

SEM 像では、bFGF/CA-CS ならびに rh-BMP2/CA-CS においてコラーゲンの網目状構造に炭酸アパタイト結晶が付着しており、コントロールと同様の 3 次元的構造はよく保

持されていた。また、bFGF/CA-CS および rh-BMP2/CA-CS でみられる細胞増殖数は有意に高かった ($p < 0.05$)。以上の結果から、サイトカイン添加型 CA-CS は従来の 3 次元的構造をよく保持した上に細胞増殖能が高いことが明らかとなった。

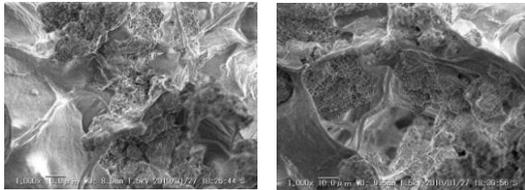


図1 SEM像 (左: bFGF/CA-CS, 右: rhBMP-2/CA-CS)

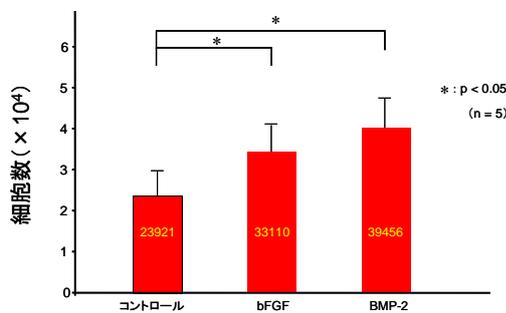


図2 播種3日後の細胞増殖数

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. Comparative evaluation of bone regeneration using spherical and irregularly shaped granules of interconnected porous hydroxyapatite. A beagle dog study Kubo T, Doi K, Hayashi K, Morita K, Matsuura A, Teixeira RE, Akagawa Y. *Journal of Prosthodontic Research*, 査読あり, 55 :104-109, 2010.
2. Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents. Matsuura, A., Kubo, T., Doi, K., Hayashi, K., Morita, K., Yokota, R., Hayashi, H., Hirata, I., Okazaki, M.,

and Akagawa, Y., *Dental Materials Journal*, 査読あり, 28: 234-242, 2009.

[学会発表] (計8件)

1. Maretaningtias D. A., Matsuura A., Hirata I., Doi K., Hayashi K., Morita K., Kubo T, Okazaki M, Akagawa Y., Development of new bone graft material using carbonate apatite-chitosan composit, The32nd Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials, 2010年11月29日, 広島市
2. Matsuura A., Hirata I., Morita K., Doi K., Hayashi K., Koretake K., Kubo T., Okazaki M. and Akagawa Y., Cell proliferative ability of newly developed carbonate apatite-collagen sponges with some cytokines, 6th Meeting of Asian Academy of Osseointegration, 2010年11月13日, ソウル (韓国)
3. Maretaningtias D. A., Matsuura A., Hirata I., Doi K., Hayashi K., Morita K., Kubo T., Okazaki M., Akagawa Y., Fabrication and cell compatibility evaluation of newly developed carbonate apatite-chitosan scaffold for bone tissue engineering, 6th Meeting of Asian Academy of Osseointegration, 2010年11月13日, ソウル (韓国)
4. Oue H., Doi K., Koretake K., Hayashi K., Matsuura A., Morita K., Okazaki Y., Kubo T., Akagawa Y., New development of interconnected porous calcium hydroxyapatite/implant complex, 6th Meeting of Asian Academy of Osseointegration, 2010年11月13日,

ソウル (韓国)

5. Maretaningtias D. A., Matsuura A., Hirata I., Doi K., Kubo T., Okazaki M. and Akagawa Y., A fabrication of newly developed carbonate apatite-chitosan composite as a bone substitute, Summer Seminar of the Japanese Society for Dental Materials and Devices, 2010年8月29日, 松山市
6. 松浦 歩, Maretaningtias Dwi Ariani, 平田伊佐雄, 土井一矢, 林 和彦, 是竹克紀, 久保隆靖, 岡崎正之, 赤川安正, 新規サイトカイン添加型炭酸アパタイト・コラーゲン人工骨の細胞増殖能, 第55回日本歯科理工学会学術講演, 2010年4月18日, 東京
7. Matsuura, A., Kubo, T., Koretake, K., Doi, K., Hayashi, K., Morita, K., Hirata, I., Okazaki, M. and Akagawa, Y., Bone formation ability of a newly developed carbonate apatite collagen sponge scaffold, 5th Asian Academy of Osseointegration, 2009年11月21日, バリ (インドネシア)
8. 松浦 歩, 久保隆靖, 土井一矢, 平田伊佐雄, 岡崎正之, 赤川安正, 新規バイオミメティック骨移植材の骨形成能, 第54回日本歯科理工学会学術講演, 2009年10月2日, 鹿児島市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 歩 (Ayumu Matsuura)
広島大学・病院・歯科診療医
研究者番号 : 10555155

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
()
研究者番号 :