

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592993

研究課題名(和文) 骨伝導性と破骨細胞吸収性を併せ持つ高機能型GBR複合膜の開発

研究課題名(英文) Development of the high functional GBR membrane with osteoconduction and resorption by osteoclast

研究代表者

武知 正晃 (Takechi, Masaaki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：00304535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生分解性高分子のポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)に低結晶性炭酸アパタイト(CO3Ap)と各種細胞成長因子を複合化することで、上皮細胞を遮断する機能だけでなく、骨芽細胞の増殖や分化を積極的に促し、最終的には骨リモデリングに調和し、生体内で分解吸収され完全に骨に置換されるGBR膜を開発した。さらに、細胞および実験動物を用いて、開発した材料の有用性を実証した。

研究成果の概要(英文)：We developed the GBR membrane which has not only the function to interrupt an epithelium cell but also an increase and the differentiation of the osteoblasts positively, and the resolution was absorbed in harmony with finally bone remodeling in vivo, and was completely substituted for a bone by making CO3Ap and various cell growth factors composition in biodegradable high polymer PLGA. Furthermore, using a cell and a laboratory animal, I demonstrated the usefulness of the materials which I developed.

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：複合膜 骨置換 骨伝導 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨組織再生法(GBR)は画期的な骨再生法として国内外で活発に研究されるだけでなく、その原理を用いて神経再生など対象組織を拡大した組織再生が再生医学として確立されてきた。しかし、現在行われている研究のほとんどは対象組織、適応症例の検討や現存する細胞遮断膜の欠点を補うためのテクニク的なものであり、細胞遮断膜自体に骨伝導性を付与しようという研究はほとんど行われていない。現在、GBR膜として非吸収性および吸収性の材料が臨床使用されているが、それぞれに問題を抱えている。非吸収性のGBR膜における最大の欠点は遮断膜を除去する必要性があることであり、患者への侵襲は高くなる。一方、吸収性のGBR膜を用いた場合は、膜を除去する必要はないが、強度や細胞遮断機能が十分でなく、感染や不十分な骨再生を引き起こすリスクが高くなる。従って、細胞遮断機能を果たしながら骨伝導性を示し、最終的にはGBR膜が破骨細胞の吸収を受け、骨リモデリングに調和することで迅速に骨に置換されるGBR膜の開発が急務であると考えた。

本申請連携研究者の石川らは、「骨の無機組成は低結晶性の炭酸アパタイト(CO<sub>3</sub>Ap)である」こと、「低結晶性CO<sub>3</sub>Apは破骨細胞が形成するハウシッポ窩と同じ弱酸性領域において大きな溶解度を示す」ことに着目し、CaCO<sub>3</sub>を前駆体として用いた溶解-析出型組成変換反応によって低結晶性CO<sub>3</sub>Apの人工合成に成功した。この低結晶性CO<sub>3</sub>Ap顆粒は、破骨細胞に吸収されること、リモデリングにより経時的に生体骨に置換されることを見出した。HApは骨伝導性を有し、人工骨補填材のゴールドスタンダードとして臨床使用されているが、破骨細胞による吸収を受けず、生体内に長期間残存する。これに対し、CO<sub>3</sub>Apは破骨細胞性の吸収を受け骨に置換される。よって、CO<sub>3</sub>Apを用いることによっ

て骨伝導性と生体吸収性を併せ持つ材料の設計が可能となる。しかし、このCO<sub>3</sub>Apでさえ自家骨を凌ぐことはできない。なぜなら、自家骨は成長因子などの生理活性物質の機能も併せ持っているからである。GBR膜の主成分として生分解性高分子のポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)を用い、これに低結晶性CO<sub>3</sub>Apと各種成長因子を複合化することができれば、上皮細胞を遮断する機能だけでなく、骨芽細胞の増殖や分化を積極的に促し、最終的には骨リモデリングに調和し、生体内で分解吸収され完全に骨に置換されるGBR膜が開発できるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

生分解性高分子のポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)に低結晶性炭酸アパタイト(CO<sub>3</sub>Ap)と各種細胞成長因子を複合化することで、上皮細胞を遮断する機能だけでなく、骨芽細胞の増殖や分化を積極的に促し、最終的には骨リモデリングに調和し、生体内で分解吸収され完全に骨に置換されるGBR膜を開発する。さらに、細胞および実験動物を用いて、開発した材料の有用性を実証する。

## 3. 研究の方法

平成23年度は、GBR膜として機能するために必要な柔軟性を維持可能な範囲において、PLGAとCO<sub>3</sub>Apの複合化を行う。また疑似ラッフルポーター実験のデータに基づいて、PLGAとCO<sub>3</sub>Apの配合比等、膜組成の最適化を行う。さらに組成が最適化されたPLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜に対しFGF-2の複合化を試み、FGF-2徐放量の経時変化を調べる。

平成24年度以降は、FGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜について、骨芽細胞および破骨細胞を用いたインビトロ評価を行い、最終的には実験動物を用いて、組織適合性および骨形成能についての評価を行う。

#### 4. 研究成果

本研究の目的は生分解性高分子のポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) に低結晶性炭酸アパタイト (CO<sub>3</sub>Ap) と各種細胞成長因子を複合化することで、上皮細胞を遮断する機能だけでなく、骨芽細胞の増殖や分化を積極的に促し、最終的には骨リモデリングに調和し、生体内で分解吸収され完全に骨に置換されるGBR膜を開発することである。平成23年度は、GBR膜として機能するために必要な柔軟性を維持可能な範囲において、PLGAとCO<sub>3</sub>Apの複合化を行い、疑似ラッフルボーダー実験のデータに基づいて、PLGAとCO<sub>3</sub>Apの配合比等、膜組成の最適化を行った。また組成が最適化されたPLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜に対しFGF-2の複合化を試み、FGF-2徐放量の経時変化を調べた。PLGA/CO<sub>3</sub>Ap配合比の異なる複合膜を作製し、X線回折法と赤外分光法を用いて複合膜の結晶構造や炭酸含有量を検討した結果、特に構造、組成にはPLGAの添加の影響はみられず複合膜が作製することが可能であることが分かった。また、疑似ラッフルボーダー実験において、混合比1:1の複合膜が最も最適な結果となった。そのため、PLGA/CO<sub>3</sub>Ap配合比の1:1複合膜においてFGF-2の複合化を試み、FGF-2徐放量の経時変化を125IでラベルしたFGF-2を用いて、作製したPLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜を蒸留水(1mL)に浸漬し、経時的に蒸留水中のradioactivityをシンチレーションカウンターにて測定検討した。その結果、FGF-2の含有量に比例してFGF-2徐放量も多くなる傾向がみられた。

平成24年度はFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜の破骨細胞吸収活性のインビトロ評価と骨芽細胞を用いたFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜のインビトロ評価を行った。まずFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜上に破骨細胞を播種し、一定期間培養し、その後、破骨細胞の吸収活性をセメント表面の吸収窩数および吸収窩面積より定量化した。また破骨細胞による吸収活

性の評価と疑似ラッフルボーダー実験によるPLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜の溶解速度の結果から、FGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜の溶解性が破骨細胞による吸収に及ぼす影響を検討した。その結果、FGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜は破骨細胞吸収活性が高く、CO<sub>3</sub>Ap濃度に依存して高くなる傾向を示した。

次にFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜上に骨芽細胞を一定時間培養し、MTT、PICP、ALP、オステオカルシンなどから骨芽細胞の活性を評価し、FGF-2が骨芽細胞の活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、FGF-2含有の複合膜において、優れた骨分化および増殖能を認め、さらにコラーゲン合成量やALP活性も経時的に高くなる傾向を示した。以上の結果から、FGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜はインビトロ実験においては骨芽細胞の増殖や分化を促し、生体内で分解吸収される優れた複合膜となりうる可能性が示唆された。

平成25年度はFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜による骨組織修復能力の実験動物を用いた短期評価を行った。ラット脛骨にフィッシャーバーで規格化した骨欠損を形成し、同骨欠損部をFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜で覆い固定した。対照群としては、FGF-2で修飾されていないPLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜設置群および膜を設置しない群とした。術後、軟X線写真により、経時的に骨形成について検討を行うとともに、2,4,8週後に当該部位を周囲組織と一塊にして摘出し、脱灰、非脱灰組織切片を作製し、組織学的にPLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜の生体親和性について検討した。また、TRAP染色を行い、試料上の破骨細胞の観察と吸収性についての検討と骨ラベリングを利用して、骨伝導能および骨置換速度の評価と定量的に新生骨量について測定した。さらに脱灰標本からFGF-2含有PLGA/CO<sub>3</sub>Ap複合膜修飾の有無によるALP、オステオカルシン、BSP、オステオポンチンmRNAの発現量の違いをin situハイブリダイゼ

ーション法を用いて検討した。その結果、FGF-2 含有 PLGA/ CO<sub>3</sub>Ap 複合膜はすべての mRNA の発現量においてコントロール群より高かった。続いて、FGF-2 含有 PLGA/ CO<sub>3</sub>Ap 複合膜による骨造生とインプラント植立実験を行った。ウサギ脛骨に骨欠損を作成後、同部に径 2mm の純チタンインプラントを植立した。欠損部周囲の自家骨を採取し骨欠損部に骨造生を行い、その上に FGF-2 含有 PLGA/ CO<sub>3</sub>Ap 複合膜を設置した。その後インプラント周囲の骨の状態について、経時的に非脱灰組織切片を作製後、組織学的検討を行った。対照群としては、FGF-2 で修飾されていない PLGA/ CO<sub>3</sub>Ap 複合膜設置群および膜を設置しない群とした。さらに骨ラベリングを利用して、骨伝導能および骨置換速度の評価と定量的に新生骨量について測定した。その結果、FGF-2 含有 PLGA/ CO<sub>3</sub>Ap 複合膜による骨造成した群は、コントロール群と比較して良好なオッセオインテグレーションを認め、新生骨量も有意に多かった。

以上の結果より、FGF-2含有PLGA/ CO<sub>3</sub>Ap複合膜は骨芽細胞の増殖や分化を積極的に促し、最終的には骨リモデリングに調和し、生体内で分解吸収され完全に骨に置換される可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

1. Minami, M., Takechi, M., Ohta, K., Ohta, A., Ninomiya, Y., Takamoto, M., Fukui, A., Tada, M. and Kamata, N. : Bone formation and osseointegration with titanium implant using granular-and block-type porous hydroxyapatite ceramics. Dental Materials Journal. 32(5), 753-760, 2013. (査読有)
2. Takamoto, M., Takechi, M., Ohta, K., Ninomiya, Y., Ono, S., Shigeishi, H., Tada, M. and Kamata, N. : Risk of bacterial contamination of bone harvesting devices used for autogenous bone graft in implant surgery. Head Face Med. 11, doi:10.

1186/1746-160X-9-3,2013. (査読有)

3. Takechi, M., Ohta, K., Ninomiya, Y., Tada, M., Minami, M., Takamoto, M., Ohta, A., Nakagawa, T., Fukui, A., Miyamoto, Y. and Kamata, N. : 3-dimensional composite scaffolds consisting of apatite-PLGA-atelocollagen for bone tissue engineering. Dental Materials Journal. 31(3), 465-471, 2012. (査読有)
4. Shigeishi, H., Takechi, M., Nishimura, M., Takamoto, M., Minami, M., Ohta, K. and Kamata, N. : Clinical evaluation of novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics (IP-CHA) in a maxillary sinus floor augmentation procedure. Dental Materials Journal. 31(1), 54-60, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 小野重弘、二宮嘉昭、太田耕司、中川貴之、高本 愛、武知正晃 インプラント埋入時における ISQ 値と埋入トルク値に関する臨床統計学的検討 第 17 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会 2013年11月30日 東京
2. 高本 愛、太田耕司、二宮嘉昭、小野重弘、中川貴之、太田 彰、久保蘭和美、武知正晃 骨造成術において各種器具により採取した自家骨中細菌数の比較 第 33 回日本口腔インプラント学会中国・四国支部総会・学術大会 2013年11月24日 米子
3. 太田 彰、武知正晃、太田耕司、南 正彦、波多野寛子、都留寛治、石川邦夫、鎌田伸之 炭酸アパタイト/poly(D,Lactide-co-glycolic acid) 複合体の各種物性および in vitro 骨吸収性の評価 第 66 回日本口腔科学会学術集会 2012年05月18日 広島
4. 太田 彰、武知正晃、太田耕司、二宮嘉昭、中川貴之、多田美里、南 正彦、高本 愛、都留寛治、石川邦夫、鎌田伸之 炭酸アパタイト-PLGA 複合体による新規骨再生材料の開発 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 2011年11月22日 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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  
(平成23年度～平成25年6月)

太田 耕司 (Ohta Kouji)  
広島大学・病院・助教  
研究者番号：20335681

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

### (3) 連携研究者

石川 邦夫 (Ishikawa Kunio)  
九州大学・歯学研究科・教授  
研究者番号：90202952

都留寛治 (Tsuru Kanji)  
九州大学・歯学研究科・准教授  
研究者番号：50314654