

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390524
 研究課題名（和文）：薬物送達システムを利用した生体多機能化による即時荷重インプラントの開発
 研究課題名（英文）：Development of immediate implant system with biofunctionalization using drug delivery system
 研究代表者
 吉成 正雄（YOSHINARI MASAO）
 東京歯科大学・歯学部・教授
 研究者番号：10085839

研究成果の概要：即時荷重インプラントは、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献することが広く認識されていることから、安全確実な即時荷重インプラントを開発するために、タンパク質活性化薬剤の徐放システムにより早期骨形成と早期のオッセオインテグレーションを達成し、同時に抗菌性合成ペプチドを固定し機能させることにより細菌感染を防止するインプラント表面を開発することを目的とした。本研究結果より、合成ペプチドを利用した薬物送達システムによるインプラントの表面改質法は、早期の骨結合能とバイオフィーム抑制能を併せ持つ多機能性を有し、即時荷重インプラントに適した方法であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2007 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯科インプラント、薬物送達システム、シンバスタチン、抗菌性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

即時荷重インプラントは、治療期間を短縮し患者の QOL の向上に貢献することが広く認識されているが、インプラントの表面に対する改質法に関する検討は殆どなされていないのが現状である。

早期荷重や即時荷重を成功させるための表面設計において、表面形状については大きな凹凸と小さな凹凸を組み合わせた SLA タイプが優れることがほぼ定着しつつある。しかしインプラント素材は相変わらずチタンが使用されており、その表面改質（修飾）技術についての報告は殆どない。僅かにリン酸カルシウムコーティング表面について言及されているが、従来の溶射法によるコーティング法にとどまっており新たな発展はない。

我々は、チタンの表面改質によって、骨組織接触部位、上皮下結合組織、上皮組織、および口腔内露出部位、全てに適合する表面を持つ「生体多機能化(組織適合型)インプラント」の開発研究を行ってきた。そのなかで、従来のリン酸カルシウム・コーティング・インプラントの膜剥離による問題点を明らかにし、薄膜の形成法とその物理化学的・生物学的性質を検討して、緻密で密着性に優れたリン酸カルシウム薄膜の形成が可能であること、これらの膜は *in vitro*, *in vivo* においてもチタンより骨形成能が優れることを示した。

一方、骨形成関連の機能性タンパク質の応用に関しては、抗原性、変質、コストなどの問題が山積し臨床応用の実現性は少ない。し

たがって、それらのタンパク質の機能性を発現する Simvastatin や Bisphosphonate の薬物送達システム (DDS) の開発、あるいは抗原性の少ない機能性ペプチドなどの応用が有効であると考えられる。具体的には、低温プラズマ処理を利用した官能基の導入やリン酸カルシウム薄膜を介したチタンへの薬剤の固定化などが方略として考えられる。また、インプラント植立後、血餅で被われている創傷の治癒の段階からインプラント周囲に早期の骨形成を促すことも成功の重要な要件である。そのためには、固定された薬剤を徐放させその機能を発揮させることが必要となる。

細菌感染が歯科インプラントの予後不良の大きな要因となることは認知されている。この対策として、汚染除去療法、殺菌剤や抗生剤による治療などが試みられているが、これらはあくまでも罹患後の療法であり予防策ではない。また、現在行われている予防策としてのプラークコントロールは消極的な手段であり、抗菌性処理などバイオフィーム形成を抑制する積極的な表面処理法の検討は殆ど行われていない。我々は、Histatin のような天然の抗菌性タンパク質を用いてきたが、理想的には、配列が短く、活性が高く、細菌群に効果的なペプチド配列を合成して用いるのが望ましい。このような条件を満たすペプチドは、天然の抗菌性タンパク質配列の一部から合成したペプチドを用い、細菌増殖阻害アッセイを行うことによって探すことが可能である。

近年、チタン表面に結合するペプチドをファージ提示法と呼ばれる手法を用いて合成する技術、そして多機能ポリペプチドを創製する技術が紹介された。このように、タンパク質の機能性を特化した合成ペプチドの有効性が認識されるに伴い、それらの合成開発に関する研究も急ピッチで進められており、合成された抗菌性ペプチドの応用化が現実のものとなりつつある。

以上より、タンパク質を活性化する薬剤や機能性ペプチドの徐放システムにより早期骨形成と早期の骨結合を達成し、同時に抗菌性合成ペプチドを固定し機能させることにより細菌感染を防止するインプラント表面を開発するというこれまでにない新しい技術により、安全確実な即時荷重インプラントを開発することが可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、安全確実な即時荷重インプラントを開発するために、タンパク質活性化薬剤や機能性ペプチドの徐放システムにより早期骨形成と早期のオスセオインテグレーション (骨結合) を達成し、同時に抗菌性合成ペプチドを固定し機能させることにより細菌

感染を防止するインプラント表面を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 炭酸アパタイコーティング、および Bisphosphonate の徐放性制御

① チタンメッシュ製スカホールドに分子ブレイカー法にて炭酸アパタイトをコーティングする方法、およびその物性について検討するとともに、動物埋入試験を行った。

② Bisphosphonate を炭酸アパタイトに固定し、徐放性と TRAP 染色法及び Pit formation assay にて破骨細胞の活性度を評価した。

2) Simvastatin のチタン基材の固定性の検討

① 鏡面、粗面に調製した表面形状の異なるチタン基板に、プラズマ重合法により有機質薄膜を形成した後、酸素プラズマ処理により酸素官能基の導入を行った。

② Simvastatin を加水分解した Simvastatin Acid (SVA) を上記基板に固定し、SVA 吸着量を水晶共振子マイクロバランス (QCM-D) 法にて検討した。

3) Simvastatin Acid (SVA) の徐放性の検討
骨芽細胞の BMP-2 産生を促進するシンプラスチンを利用して有効な骨形成の改善に結びつけるために、シクロデキストリンに本剤を包接し、SVA の徐放特性を検討した。

① グルコースがドーナツ状に結合したシクロデキストリンを用い、pH を変化させて SVA を包接した。

② 37℃ における SVA の徐放量を UV spectrometer にて測定した。

4) チタン結合タンパクと BMP-2 との融合タンパク質による骨形成能試験

チタンと特異的に結合するチタン結合タンパク質 (TBP-1) と BMP-2 との融合タンパク質を合成し、スカホールドおよびチタン板に結合させて *in vitro*, *in vivo* 試験を行い、骨形成能を検討した。

① SD ラットの腹直筋より採取した細胞を、TBP-1 と BMP-2 の融合タンパク混合培養液で培養し、7 日後に RT-PCR 解析を行い、骨関連タンパクの mRNA 発現 (Runx-2, ALP, OCN) を検索した。

② TBP-1 と BMP-2 の融合タンパクを固定したチタンメッシュスカホールドを SD ラット腹直筋内に埋入し、埋入 3 日および 7 日後にメッシュ内の細胞から mRNA を抽出して RT-PCR 解析を行い、骨関連タンパクの mRNA 発現 (Runx-2, ALP, BSP, OCN) を検索した。また、融合タンパクを固定したチタン板を腹直筋内に埋入した後、腹直筋ごと摘出し、トルイジンブルー染色による病理組織学検索を行った。

5) チタン結合ペプチドと抗菌性ペプチドの合成およびその活性試験

チタン結合ペプチドと唾液中に存在する抗菌性ペプチドを共役したペプチドを作製し、歯周病原菌に対する抗菌活性を検討した。

- ① 抗菌性ペプチド Histatin5 と Lactoferricin を合成するとともに、これらのペプチドとチタン結合ペプチドを共役したペプチドを合成した。
- ② これらのペプチドのチタンに対する結合特性を水晶発振子マイクロバランス (QCM-D) 法によって検討した。
- ③ これらのペプチドをチタン上に固定し、*P. gingivalis* に対する抗菌活性を検討した。

4. 研究成果

- 1) 炭酸アパタイト(CA)コーティング薄膜の評価、および Bisphosphonate の徐放性評価
 - ① 炭酸アパタイトがスカホールド内部までコーティングでき、分子プレカーサー法は複雑な形状のスカホールドの CA コーティングに有効な方法であることが明らかとなった。また、動物埋入試験においても本処理法の有効性が確認された。
 - ② Bisphosphonate の徐放性は担体となるリン酸カルシウム膜の溶解性を制御することにより可能となった。また、Bisphosphonate-HA 複合体は破骨細胞の活性を有意に減少させることが明らかとなった。以上より、Bisphosphonate の DDS による局所投与法の可能性が見いだされた。
- 2) SVA のチタン基材への固定性
 プラズマ重合法により有機質薄膜を形成した後、酸素プラズマ処理を行った表面は有意に SVA の固定量が増加した。したがって低温プラズマ法は、酸素官能基の導入により SVA の有効な固定法であることが明らかとなった (図 1)。

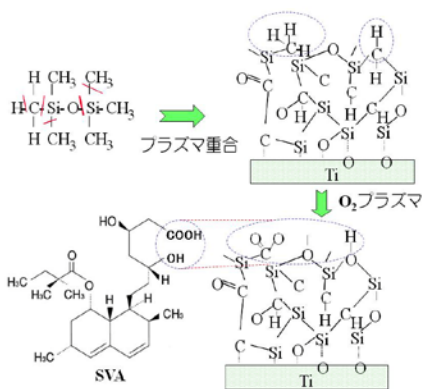


図 1 Simvastatin Acid (SVA) のチタンへの吸着メカニズム

3) Simvastatin Acid (SVA) の徐放特性

シクロデキストリン/SVA 溶液の pH を変化させることにより、シンバスタチンの徐放性を制御できることが明らかとなった (図 2)。

これにより、SVA を温度依存的に徐放するシステムが開発できた。

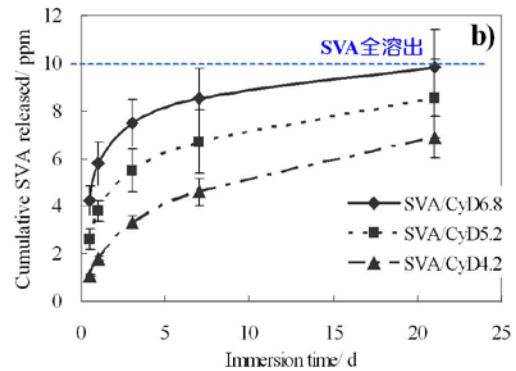


図 2 pH を変化させた SVA の徐放特性

4) チタン結合タンパクと BMP-2 との融合タンパク質の骨形成能試験

In vitro, *in vivo* の両者の試験において、BMP-2 添加群は、コントロール群と比較して Runx-2、ALP および OCN の mRNA の発現量が明らかに増大し、合成した BMP-2 は骨誘導能を有していることが明らかとなった。

また、腹直筋内に埋入した TBP-1+BMP-2 固定チタン板の周囲に異所性の骨形成を認めた (図 3)。

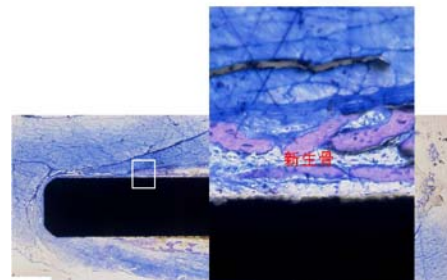


図 3 TBP-1+BMP-2 固定チタン板の異所性骨形成

5) チタン結合ペプチドと抗菌性ペプチドの抗菌性

チタン結合ペプチドと抗菌性ペプチドを共役した合成ペプチドによるインプラントはバイオフィーム抑制能を併せ持つことが証明され、これらペプチドによる表面改質法はインプラント治療に有効な手段であることが明らかとなった。

以上の研究成果より、特に合成ペプチドを利用した薬物送達システムによるインプラントの表面改質法は、早期の骨結合能とバイオフィーム抑制能を併せ持つ多機能性を有し、即時荷重インプラントに適した方法であることが明らかとなった。

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 16 件)

- ① Kashiwagi K, Tsuji T, Shiba K, Directional BMP-2 for functionalization of titanium surfaces, *Biomaterials*, 30: 1166-1175, 2009, 査読有
- ② Yamaza T, Kido MA, Wang B, Danjo A, Shimohira D, Murata N, Yoshinari M, Tanaka T., Distribution of substance P and neurokinin-1 receptor in the peri-implant epithelium around titanium dental implants in rats, *Cell and Tissue Research*, 335, 407-415, 2009, 査読有
- ③ Hayakawa T, Hukushima T, Wada T, Yoshinari M, Sato M, Hydrogel formation of bisphosphonate around apatite coated titanium web, *J Oral Tissue Engin*, 6, 189-193, 2009, 査読有
- ④ Kokubun K, Kashiwagi K, Yoshinari M, Inoue T, Shiba K, Motif-programmed artificial extracellular matrix, *Biomacromolecules*, 9, 3098-3105, 2008, 査読有
- ⑤ Hayakawa T, Takahashi K, Okada H, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Yamamoto H, Sato M, Effect of thin carbonate-containing apatite (CA) coating of titanium fiber mesh on trabecular bone response, *J Mater Sci: Matern Med*, 19, 2087-2096, 2008, 査読有
- ⑥ Markiewicz MR, Nishiyama K, Yago K, Okada M, Asanami S, Yoshinari M, Hirayama M, Margarone JE 3rd, Chuang SK, Draining orocutaneous fistula associated with a failing subperiosteal implant: report of a case, *J Oral Implantol*. 2007;33:347-52. 査読有
- ⑦ Matsuzaka K, Sato D, Ishihara K, Hashimoto S, Yoshinari M, Katakura A, Inoue T, Age-related differences in the localization of beta-defensin-2 in human gingival epithelia, *Bull Tokyo Dent Coll*, 47, 167-170, 2007, 査読有
- ⑧ Wei J, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Liu B, Oda Y, Adhesion of mouse fibroblasts on hexamethylsiloxane surfaces with wide range of wettability, *J Biomed Mater Res*, 81B, 66-75, 2007, 査読有
- ⑨ Yoshinari M, Matsuzaka K, Hashimoto S, Ishihara K, Inoue T, Oda Y, Ide T, Tanaka T, Controlled release of simvastatin acid using cyclodextrin inclusion system, *Dental Materials J*, 26, 451-456, 2007, 査読有
- ⑩ Pugdee K, Shibata Y, Yamamichi N, Tsutsumi H, Yoshinari M, Abiko Y, Hayakawa T, Gene expression of MC3T3-E1 cells on fibronectin-immobilized titanium using tresyl chloride activation technique, *Dent Mater J*, 26:647-55, 2007, 査読有
- ⑪ Hayakawa T, Takahashi K, Yoshinari M, Hara H, Sato M, Nemoto K, Thin carbonate apatite layer deposited on titanium using molecular precursor method, *J Oral Tissue Engin*, 3, 139-146, 2006, 査読有
- ⑫ Hayakawa T, Yoshinari M, Kimiya N, Fibronectin adsorption onto plasma-polymerized hexamethylsiloxane coating, *J Oral Tissue Engin*, 3, 153-160, 2006, 査読有
- ⑬ Yoshinari M, Hayakawa T, Matsuzaka K, Inoue T, Oda Y, Shimono M, Ide T, Tanaka T, Oxygen plasma surface modification enhances immobilization of simvastatin acid, *Biomedical Research*, 27, 29-36, 2006, 査読有
- ⑭ Yoshinari M, Kato T, Matsuzaka K, Hayakawa T, Inoue T, Oda Y, Okuda K, Shimono M, Adsorption behavior of antimicrobial peptide histatin 5 on PMMA, *J Biomed Mater Res*, 77B, 47-54, 2006, 査読有
- ⑮ Seshima H, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Inoue T, Oda Y, Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules, *J Biomed Mater Res*, 78B, 215-221, 2006, 査読有
- ⑯ Hayakawa T, Takahashi K, Yoshinari M, Okada H, Yamamoto H, Sato M, Nemoto K, Trabecular bone response to titanium implants with a thin carbonate-containing apatite coating applied using the molecular precursor method, *Int J Oral Maxillofaci Impl*, 21, 851-858, 2006, 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Yoshinari M et.al. Bio-functionalization of Dental Implants with Cold-plasma Surface Modification, Sino-Japanese Conference on Stomatology 2008, 2008.9.29, Xi'an
- ② Yoshinari M et.al. Surface modification of titanium for controlled release of Simvastatin, 8th World Biomaterials Congress, 2008.5. 30, Amsterdam
- ③ 吉成正雄,ほか5名, 抗菌性とチタン結合を含有した共役ペプチドによるチタン表面改質, 第51回日本歯科理工学会学術講演会, 2008年4月27日, 鶴見
- ④ Yoshinari M: Controlled release of simvastatin acid using cyclodextrin inclusion system, 平成19年度東京歯科大学口腔科学研究センターワークショップ, 2008.2.29, 千葉市
- ⑤ 吉成正雄, ほか5名: プロタミン酵素分解

- 物の PMMA への固定化および抗真菌性,
第 7 回日本再生医療学会総会, 2008.3.13,
名古屋市
- ⑥ 吉成正雄, ほか 3 名: チタン表面処理による歯周病原菌の増殖抑制, 第 21 回歯科チタン学会学術講演会, 2008.2.16, 鳴門市
- ⑦ 吉成正雄, ほか 5 名: シンバスタチン-シクロデキストリン複合体の DDS への応用, 第 29 回日本バイオマテリアル学会大会, 2007.11.27, 豊中市
- ⑧ 吉成正雄: アンチエイジング治療と再生医療 再生医療によるアンチエイジング, 第 5 回日本再生歯科医学会学術大会, 2007.9.23, 東京
- ⑨ Yoshinari M: Technological aspects of binding pharmaceuticals to titanium surfaces, 1st IQ:NECT Scientific Board Meeting "Biofunctional surfaces" 2007.6.16. Zell am See, Austria
- ⑩ Yoshinari M, Oda Y: Bio-functionalization of titanium with plasma-surface modification for dental implants, The 6th International Symposium on Titanium in Dentistry, 2007, 6.5, Kyoto
- ⑪ 吉成正雄, ほか 3 名, シクロデキストリン包接によるシンバスタチンの徐放特性, 第 48 回日本歯科理工学会学術講演会, 2006 年 10 月 29 日, 名古屋
- ⑫ Yoshinari M, et. al: Control of bisphosphonate release using hydroxyapatite granules by regulating the sintering temperature, 33rd Annual meeting of the Controlled Release Society, 2006.7.24, Vienna, Austria

[図書] (計 4 件)

- ① Masao Yoshinari, Springer, Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants, 2009, 312 (155-172)
- ② 吉成正雄, 南山堂, 臨床エビデンスー口腔インプラントの常態と病態ー, 2008, 124 (13-19, 106)
- ③ 吉成正雄, 学建書院, 新編歯科理工学第 4 版, 2007, 306 (127-168, 178-196, 150-258)
- ④ 吉成正雄, 医歯薬出版, 臨床歯科理工学, 2006, 406 (271-277)

○出願状況 (計 0 件)
なし

○取得状況 (計 0 件)
なし

[その他]

平成 19 年度日本歯科理工学会論文賞:
Yoshinari M, et al, Controlled Release of Simvastatin Acid using Cyclodextrin Inclusion

System, 2008.4.26, Dental Materials J, 26, 451-456, 2007, 鶴見

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉成 正雄 (YOSHINARI MASAO)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 10 085839

(2) 研究分担者

芝 清隆 (SHIBA KIYOTAKA)
癌研究会・癌研究所蛋白創製研究部・部長
研究者番号: 40196415

(3) 連携研究者

井上 孝 (INOUE TAKASHI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20 125008
石原 和幸 (ISHIHARA KAZUYUKI)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 00 212910