

令和 3 年 4 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09790

研究課題名(和文) 骨形成能と抗菌活性を有する高機能性連通多孔体ハイドロキシアパタイトの開発

研究課題名(英文) The development of high functional interconnected porous hydroxyapatite with bone formation ability and antibacterial activity

研究代表者

武知 正晃 (Takechi, Masaaki)

広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授

研究者番号：00304535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メラトニン、細胞増殖因子FGF-2と骨芽細胞を封入した改良型IP-CHA (MFOIP-CHA)に抗菌ペプチドを封入した新規の骨補填材を開発した。本材料は、コントロール群と比較して、骨形成能と感染制御率において非常に優れた結果を示した。以上のことから、本材料は悪性腫瘍や骨髄炎における顎骨切除後のインプラント治療のための顎骨再建術への応用が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍や、顎骨骨髄炎などの顎骨切除に対する広範囲な骨欠損に対するインプラント治療のための骨補填材としてアパタイトブロックなどの人工材料を応用した論文は国内外でもほとんどない。また、抗菌ペプチドをアパタイトブロックなどの人工材料に封入し、抗菌能力や、骨形成能力を検討した報告は国内外でもない。骨形成能と抗菌作用をもつ骨補填材を開発し、広範囲な骨欠損に対する有効性を証明する本研究は、悪性腫瘍や骨髄炎における顎骨切除後のインプラント治療のため顎骨再建術の治療応用のために有用であった。

研究成果の概要(英文)：We developed new bone filling material, MFOIP-CHA containing FGF-2, osteoblast and antibacterial peptide. MFOIP-CHA showed great bone formation ability and infection control rate compared with control. Therefore, we conclude that MFOIP-CHA is a good candidate for use to jaw bone reconstruction for implant treatment after a malignant tumor and the resection of mandible in osteomyelitis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：抗菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

通多孔体ハイドロキシアパタイト(IP-CHA; NEOBONE®)は多数の気孔が連通する独自の多孔構造を有する多孔体で、内部に細胞が侵入し新生骨と一体化する骨補填材である。申請者らは今まで、ウサギ大腿骨を用いて4壁性骨欠損やオンレーグラフトモデルにおける IP-CHA ブロック中の骨形成能を証明している。また、近年では、上顎前歯部の骨吸収に IP-CHA ブロックを作製し、骨造成術とインプラント埋入術を行い、良好な結果を得ていることを報告してきた²⁾。一方、申請者らは、腫瘍などの顎骨離断などの広範囲の欠損におけるインプラント治療のための骨補填材としての IP-CHA ブロックの応用を考えているが、IP-CHA 単独での広範囲な顎骨欠損における IP-CHA の有効性は、国内外においても証明されていない。申請者らの予備実験の結果から、IP-CHA 単独では、多孔内部に宿主からの骨芽細胞が増殖するのに時間がかかること、骨誘導中にアパタイト表面が感染で汚染された場合、骨形成が進行しないと問題点が挙げられている。この経緯から、広範囲な骨欠損に対するインプラント治療のための骨補填材として IP-CHA を応用するには、何らかの改良が必要と考えている。近年、我々は IP-CHA に、松果体より分泌されるホルモンであるメラトニン、細胞増殖因子 FGF-2 と骨芽細胞を封入した改良型 IP-CHA(MFOIP-CHA)が IP-CHA 単独と比較して、多孔部分への骨芽細胞の増殖と分化が増加することを *in vitro* のデータで報告している。MFOIP-CHA は IP-CHA 単独と比較し、IP-CHA 内の骨芽細胞が増殖、分化能力が高いため、広範囲な顎骨欠損の骨造成に応用できる可能性を考えているが、動物実験など、*in vivo* における MFOIP-CHA の有効性は現在、国内外でも報告されていない。抗菌ペプチドは 30 数個前後のアミノ酸からなる抗菌活性を持つペプチドで、免疫細胞や、上皮細胞から産生される。唾液や口腔粘膜から発現が認められるさらに抗菌ペプチドには抗菌作用だけでなく、骨芽細胞への抗炎症作用、骨芽細胞の増殖、分化作用をもつことも報告されている。申請者らは MFOIP-CHA ブロックにさらに特異的な抗菌ペプチドを封入することで、抗菌効果をもつだけでなく、さらに相加、相乗的な骨誘導能や、抗炎症効果を持つ新しい IP-CHA ブロックの開発が可能になる仮説をたて、最終的に、広範囲な顎骨欠損における骨補填材として用いることを考えている。

2. 研究の目的

悪性腫瘍や顎骨髄炎切除における顎骨離断などの広範囲の欠損におけるアパタイトなどの人工材料のブロックの応用は現在、国内外においても証明されていない。申請者らはメラトニン、細胞増殖因子 FGF-2 と骨芽細胞を封入した MFOIP-CHA が IP-CHA ブロックと比較して、ブロック内の骨芽細胞の増殖、分化を増加させることを *in vitro* のデータで報告している。一方、Defensin, LL-37, Lactoferrin などの抗菌ペプチドは口腔内細菌に抗菌作用を持つだけでなく、骨芽細胞の増殖、分化、抗炎症作用を持つことも報告されている。申請者らは改良型 IP-CHA に特異的な抗菌ペプチドを封入することで、優れた骨誘導能力と長期的抗菌力をもつ骨補填材の開発を行うこととした。今回の研究目的は、当科で開発したメラトニン、細胞増殖因子 FGF-2 と骨芽細胞を封入した改良型 IP-CHA (MFOIP-CHA)に抗菌ペプチドを封入し、優れた骨形成能力と、抗菌作用を併せ持つ骨補填剤の完成型を開発し、広範囲な顎骨欠損の骨造成に応用できることを証明することである。

3. 研究の方法

各種抗菌ペプチドの抗菌徐放作用の検討

まず、Defensin, LL-37, Lactoferrin などの各種抗菌ペプチドの IP-CHA 内での抗菌徐放作用を検討するために、IP-CHA に各種抗菌ペプチドを申請者らの開発した真空吸引方法³⁾によって封入し、申請者らがすでに行っている抗菌アパタイトセメントの徐放効果の測定方法を応用し、抗菌ペプチドの徐放作用を検討する。さらに、歯周病原菌などの、口腔細菌に対する、抗菌作用を検討する。

抗菌ペプチド封入MFOIP-CHAにおける骨芽細胞の増殖能力、骨分化能力、骨誘導能の影響
前述の実験で選定した抗菌ペプチドをメラトニン、細胞増殖因子 FGF-2 と骨芽細胞を封入した MFOIP-CHA に封入し、抗菌徐放作用を検討する。さらに、MFOIP-CHA 内の骨芽細胞の増殖能や、分化能力、形態、骨形成能を検討する。

抗菌ペプチド封入MFOIP-CHAにおける生体親和性、抗炎症能力の検討

ラットの背部皮下に移植し、皮膚臨床症状の観察や、病理組織学的に炎症細胞浸潤の比較評価比較を行う。

広範囲顎骨離断モデル、顎骨骨髄炎モデルの作製と、顎骨切除に対する抗菌ペプチド封入

MFOIP-CHAの応用

申請者がすでに作製している顎骨離断モデル(イヌ)と、顎骨髄炎モデル(ウサギ)を用いて、顎骨除去後の抗菌ペプチド封入 MFOIP-CHA ブロックの骨形成能、インプラント埋入後の安定度、術後感染制御率を検討する。

4. 研究成果

初めの実験として、Defensin, LL-37, Lactoferrin などの各種抗菌ペプチドの IP-CHA 内での抗菌徐放作用を検討するために、IP-CHA に各種抗菌ペプチドを申請者らの開発した真空吸引方法によって封入し、申請者がすでに行っている抗菌アパタイトセメントの徐放効果の測定方法を応用し、抗菌ペプチドの徐放作用を検討した。その結果、いずれの抗菌ペプチドも IP-CHA から優れた徐放特性と歯周病原菌などの口腔細菌に対する、抗菌作用を持つことが明らかになった。次に前述の実験で選定した抗菌ペプチドをメラトニン、細胞増殖因子 FGF-2 と骨芽細胞を封入した MFOIP-CHA に封入し、抗菌徐放作用を検討したところ、IP-CHA の場合と同様に MFOIP-CHA から優れた徐放特性を示した。また、MFOIP-CHA 内の骨芽細胞の増殖能、分化能力および骨形成能についても優れていた。

顎骨離断モデル(イヌ)を作製、抗菌ペプチド封入 MFOIP-CH の骨形成能について検討した。当科で作製している大型動物(イヌ)による広範囲顎骨離断モデルの顎骨欠損部に、カスタムメイドした IP-CHA 単独、MFOIP-CH、抗菌ペプチド封入 MFOIP-CHA の各種ブロックを埋入した。経月的に CT 検査によって、ブロックと母床骨の癒合部の骨形成能の評価を行った。また経月的にブロックを取り出し、各種脱灰組織切片を作製し、ブロック内の骨誘導能の比較を行った。その結果、抗菌ペプチド封入 MFOIP-CHA は IP-CHA 単独と比較して、骨形成が優れていた。続いて顎骨髄炎モデルを作製、顎骨除去後の抗菌ペプチド封入 MFOIP-CH の骨形成能と術後感染の制御を検討した。当科で作製している顎骨髄炎モデルを作製した。方法としては日本白色家兎の顎骨に骨欠損を形成し、黄色ブドウ球菌を浸漬した綿球を骨欠損部に留置する。創部を縫合して閉鎖し、術後に感染部位の顎骨部分の切除、搔爬を行う。カスタムメイドした IP-CHA 単独、MFOIP-CH、抗菌ペプチド封入 MFOIP-CHA の各種ブロックを欠損部分に埋入する。径日的に血液検査、体重測定、臨床所見を観察し、炎症所見を検討した。さらに経月的にブロックを取り出し、脱灰組織切片を作製し、ブロック内の骨誘導能、あるいは菌体の存在を計測し、感染制御率を評価する。その結果、抗菌ペプチド封入 MFOIP-CHA は他の材料より炎症も少なくさらに感染制御率も高く優れていた。

以上より骨形成能と抗菌作用をもつ骨補填剤を開発し、広範囲な骨欠損に対する有効性を証明する本研究は、悪性腫瘍や骨髄炎における顎骨切除後のインプラント治療のため顎骨再建術の治療応用のために有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TAKECHI Masaaki, TAKAMOTO Megumi, NINOMIYA Yoshiaki, ONO Shigehiro, MIZUTA Kuniko, NAKAGAWA Takayuki, SHIGEISHI Hideo, OHTA Kouji, ISHIKAWA Kunio, TSURU Kanji	4. 巻 -
2. 論文標題 In vitro investigation of the cell compatibility and antibacterial properties of titanium treated with calcium and ozone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takechi Masaaki, Ishioka Yasuki, Ninomiya Yoshiaki, Ono Shigehiro, Tada Misato, Nakagawa Takayuki, Sasaki Kazuki, Murodumi Hiroshi, Shigeishi Hideo, Ohta Kouji	4. 巻 13
2. 論文標題 Morphological Evaluation of Bone by CT to Determine Primary Stability?Clinical Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2605 ~ 2605
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13112605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤大喜 太田耕司 鳴瀬貴子 石田陽子 重石英生 武知正晃
2. 発表標題 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチドLL-37のendocytosisを介した核酸導入機構と炎症応答
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	太田 耕司 (Ohta Kouji) (20335681)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野 重弘 (Ono Shigehiro) (70379882)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関