

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19592269
 研究課題名 (和文) インジェクション型アルギン酸/TCP ビーズ複合体を用いた新規骨再構築法の開発
 研究課題名 (英文) Development of bone remodeling model using injectable alginate and TCP beads complex
 研究代表者
 橋本 典也 (HASHIMOTO YOSHIYA)
 大阪歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：20228430

研究成果の概要：

歯槽骨再生を目的として β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) スラリーを均一なサイズの球状粒径ビーズに調整する技術によって顆粒間隙も調整できる補填材の作製が可能となった。そこでアルギン酸をバインダーとして新生骨形成に最適な間隙を有する操作性に優れたインジェクタブルな三次元複合体骨補填材を開発した。さらに、*in vivo*ならびに *in vitro* 両試験において良好な生体適合性を確認したことから複合体は、局所注入可能な骨補填材ならびに間葉系幹細胞などの三次元培養担体として骨再生医療に応用可能なことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	2,000,000 円	600,000 円	2,600,000 円
20 年度	1,500,000 円	450,000 円	1,950,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：補綴・理工系

キーワード：間葉系幹細胞，骨芽細胞，再生培養骨，歯周組織再生，アルジネート， β -第三リン酸カルシウム，インジェクション型，新規骨再構築法

1. 研究開始当初の背景

本研究で使用する β -第三リン酸カルシウム (TCP) ビーズを用いたインプラント埋入を目的とした歯槽骨増生に関しては、イヌの下顎骨を用いてインプラント埋入時に e-PDGF 膜を併用して自家骨移植と比較した研究がある¹⁾。その結果、自家骨移植との有意差がなく 59~75% 骨増生が認められている。また、間葉系幹細胞 (MSC) を β -TCP ビーズを足場に培養し、さらに自家成長因子を含む PRP (多血小板血漿) を用いてゲル化し、インプラント埋入時の培養注入骨として臨床応用した研究もある²⁾。これらの報告から、 β -TCP の

骨補填材あるいは細胞・成長因子を用いた骨再生医療の担体としての有用性が伺える。一方で、人工骨として多孔体の可能性が注目されている。多孔体の理想的な作用機序としては、細胞や増殖因子などの人工骨の外側の生体由来因子を気孔に取り込み、組織に転化させた後、最終的には自身も組織に置換することと考える。したがって、生体由来因子との三次元的なインターフェイスとするための気孔孔径、孔の分布および、ネットワークが多孔体開発の重要な要素となる³⁾。

これまでわれわれは β -TCP ビーズとコーゲンによるコンポジットスポンジを作製

し、イヌ下顎骨歯槽骨増生に応用してきた³⁾。その結果、コラーゲンスポンジの薬物徐放効果⁴⁾や担体内での細胞の3次元培養を期待できる事がこれまでの骨補填材の報告にない特色が明らかとなった。しかし、この方法ではコラーゲン溶液の凍結乾燥・熱架橋処理によって β -TCPビーズがコラーゲンスポンジ内に一体化する一方で、この β -TCPビーズの大きさが不均一で、ビーズ間隙が大きく緻密化が困難で脆いという欠点があった。そこでアルギン酸ナトリウムと塩化カルシウムが反応してゲル化することに着目し、球状TCPビーズに塩化ナトリウムをコーティングすることで複合体を作成するに至った。本複合体はその場で容易に一体化し、上記のような欠点もない。さらに、球状TCPビーズを均一な大きさの粒径に調整する技術によって、ビーズ間隙も調整できることから新生骨形成に最適な間隙ネットワーク (150~200 μ m) を付与することに成功している。

ビーズ化学組成の変化に対する生体適合性の影響の調査についても取り組みたい。TCPは焼成温度によっては吸収性が異なるだけでなく、その生体適合性も異なることが知られている。さらに非吸収性のハイドロキシアパタイトのビーズを作成する技術についても持ち合わせていることから、それらの組み合わせることも視野に入れている。

2. 研究の目的

本研究期間内において、ビーズの焼成温度による化学組成の変化ならびに本複合体の圧縮強さ・吸水性などを理工学的に検討する。さらに、培養細胞に対する複合体の毒性試験、複合体がMSCの増殖・分化に与える影響、b-FGFをはじめとする成長因子や薬剤の徐放機能などを *in vitro* で検討する。さらに、マウス皮下埋入実験で本複合体が持つ骨分化誘導能についてMSCを用いた異所性骨形成により評価する。また、*in vivo* 安全性試験としてラット皮下埋入試験、イヌ脛骨埋入実験で評価する。

さらに以下の点に留意して開発を進める。

(1) 一塊となった3次元連結構造を有する複合体の形成

あらかじめアルギン酸ナトリウム溶液に骨形成促進成長因子や薬剤を混和しておくと、ビーズ表面の塩化カルシウムと反応した際にゲル化したアルギン酸が成長因子などの担体となる。その後局所におけるゲルの吸収に伴い、成長因子などを徐放する機能が期待できる。さらに、あらかじめ培養しておいた骨髄間葉系幹細胞(MSC)などの細胞をアルギン酸ナトリウム溶液に混合すると局所における3次元培養システムのscaffoldにもなる。このゲル化反応は、シリンジ内で容易に瞬時に行うことができるので、そのまま

局所に注入可能な人工骨としてのインジェクタブル機能を持つ。

(2) ビーズ径のコントロール技術—ビーズ径を大きくし、複合化すれば間隙が大きくなり、細胞や成長因子などを含んだ液性成分を人工骨の隅々まで到達させることが可能なマクロ空間ネットワークを構築できる。また、径を小さくすることで間隙もミクロナノスケールにすることも液性成分のドラッグデリバリーシステムに有利な構造もできる。

(3) 複数の化学型ビーズの獲得—1,100°CでTCPビーズを焼成することで β -TCPビーズを得ているが、さらに高温で焼成することによって α -TCPビーズが得られることが予想される。非吸収性のハイドロキシアパタイトのビーズを作成する技術も持つ。それぞれ吸収性が異なるだけでなく、生体親和性についても異なることから、症例に応じてそれらの配合組成を変化させることも可能である。

3. 研究の方法

(1) β -TCPビーズ/アルギン酸複合体(以下複合体)の作製ならびに形態観察

β -TCPのスラリー(セラミック溶液)を液体窒素に滴下して β -TCPビーズを作製した。その際、圧力・吐出時間を調節し、ふるいを用いて粒径 β -TCPビーズの粒径を500~700(中径)に調整し、CaCl₂溶液に浸漬・乾燥させた。さらに結晶化のため1100°Cで10時間焼結し、電子顕微鏡(SEM)によって観察した。また結晶性をX線回折装置で調べた。さらにそれらを1%塩化カルシウム水溶液に浸漬、蒸発・乾燥させた後にシリンジ内へ充填した。2%アルギン酸ナトリウム溶液と反応させて、 β -TCPビーズ/アルギン酸複合体(以下複合体)を作製し、SEMならびにマイクロCTによって観察した。

(2) 複合体の生体適合性試験

① ヒト間葉系幹細胞の細胞分化試験

1X10⁵cells/mLのヒト間葉系幹細胞を β -TCPビーズの粒径を500~700 μ mに調整し、CaCl₂溶液に浸漬・乾燥させた。 β -TCPビーズを1ml注射用シリンジ内に填入し、MSCを混ぜたアルジネートハイドロゲルを注入・ゲル化させ、MSC+ β -TCPビーズ/アルジネート複合体を作製した。複体内で10%牛胎児血清、b-FGF、アスコルビン酸、 β グリセロリン酸ナトリウム、デキサメタゾンを添加したDMEMによる培養した。また、2週間培養後の細胞をトリス緩衝液を用いて超音波破碎した。蛋白質定量キット(和光純薬)を用い、その吸光度を測定し検量線法によってタンパク量を測定した。また、p-ニトロフェニルリン酸を用いて染色を行い、その吸光度を測定し同じく検量線法によってアルカリフォスファターゼ(ALP)量を測定した。最終的に、

ALP量を蛋白量で除し、ALP活性を求めた。同様に、RNA抽出試薬 (MagExtractor) によってトータルRNAを抽出し、ランダムヘキサマーをプライマーとしてcDNAをReady to goを用いて合成した。Primer Express ソフトウェアを用いて骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼおよびオステオカルシンのプライマーとTaqMan Probeを設計、合成した。ABI PRISM7700 で2時間PCRを行い、Sequence Detection Systemでデータを回収し、GAPDHで補正し定量結果とした。

②ラット皮下埋植試験

ペントバルビタール・Na 麻酔下で、Wistar ラットの背部皮下に複合体を5例埋植し、脊椎を中心に反対側には陰性コントロールとして高密度ポリエチレンシートを埋植した。4週間後に移植した組織を取り出し、HE染色を行い、組織像の観察を行い、9種類の病理組織学的検査所見について4段階でスコアリングを行いコントロールと統計学的に比較した。

③ヒト間葉系幹細胞複合体のヌードマウス皮下埋植試験

10%血清およびbasic FGFを含むDMEM培養液で培養を行った5代目のヒト間葉系幹細胞 (hMSC) をトリプシンで回収し100万個をアルジネートに混合し、 β -TCP ビーズと複合体を作製した。また、イソフルラン麻酔下で、KSN ミュータント系ヌードマウスの皮下に複合体を移植した。8週間後に移植した組織を取り出し、脱灰標本作製しHE染色を行い、組織像の観察を行った。

④ビーズ粒径がマウス骨芽細胞の骨分化に与える影響

β -TCPビーズの粒径を300~500(小径), 500~700(中径), 700~850 μ m(大径)に調節しCaCl₂溶液に浸漬・乾燥させた。 β -TCPビーズを1ml注射用シリンジ内に填入し、KUSA/A1を混ぜたアルジネートハイドロゲルを注入・ゲル化させ、KUSA/A1 + β -TCPビーズ/アルジネート複合体を作製した。これを骨分化培地 (80ng/ml L-アスコルビン酸 + β -グリセロリン酸ナトリウム) にて3, 7, 14日間培養し、SEM像の観察とALP活性、オステオカルシン量を測定した。また、3種類のビーズの粒径からなる複合体についても③ヌードマウス皮下埋植試験を行った。

⑤イヌ脛骨埋植試験

イヌ脛骨に直径5mm×深さ7mmの円筒形骨欠損を形成し、小径ビーズについて1) 複合体 2) β -TCPビーズのみ 3) アルジネートのみ 4) 骨欠損のみ、新生骨形成を、マイクロCTにより評価した。

4. 研究成果

①複合体の作製ならびに形態観察

SEM観察 (図1) ならびにマイクロCT観察

によってアルジネートをバインダーとしてほぼ一定の均一な気孔を持つことが明らかとなった (図2)。またXRDにて結晶化した β -TCPの典型的なピークを確認した。

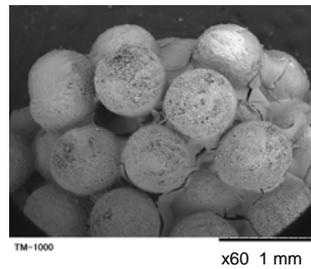


図1. 複合体のSEM観察増

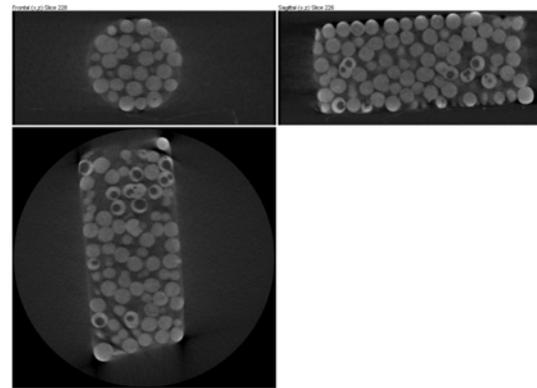


図2. 複合体のCT観察像

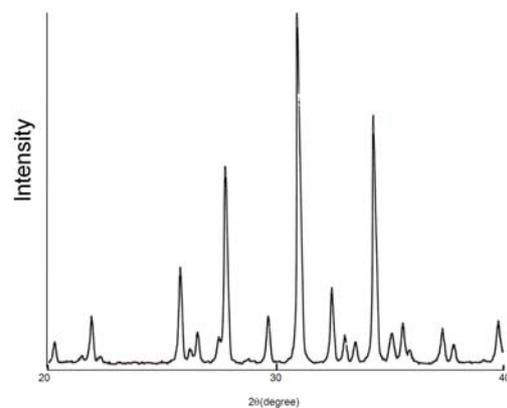


図3. X線回折による β -TCPビーズの結晶性

②ヒト間葉系幹細胞の細胞分化試験

ヒト間葉系幹細胞については、培養1, 2週目でタンパクの定量が可能となり、細胞の存在が明らかとなった。また、ALP活性発現は認められたものの2週間で低下することが明らかとなった。骨分化関連のオステオカルシン mRNA の発現は1週から2週目で上昇することが明らかとなった。

③ラット皮下埋植試験

埋植部位では、コントロール群を含むほぼ全例に共通した所見として、毛細血管の増加を伴う結合組織の増生が観察されたが複合

体とコントロール群間で差異は認められなかった。その他、埋植部周辺に発現した変化の頻度及び度合いについても陰性物質との間に大きな差異は認められなかった。

④ヌードマウス皮下埋植試験

移植した組織像の所見として、一部、 β -TCP が吸収し、その部分に硬組織様形成が認められた。また、バインダーとして用いたアルジネート部分はアルジネートが吸収し線維性の結合組織が侵入している像が観察された。

⑤ビーズ粒径がマウス骨芽細胞の骨分化に与える影響

SEM において、7 日目以降に骨基質様の小結節がビーズ表面に観察された (図 4)。ALP 活性においては、培養 3 日目に中径サイズの ALP 活性が有意に増加したが (図 5)、7、14 日目では有意差は認めなかった。またオステオカルシン発現は全ての作用時間で有意な差は認められなかった。ヌードマウス皮下埋植試験において HE 染色の組織像から小径では 8 週間皮下埋入でビーズが全て吸収し新生骨と置き換わった。一方で中径および大径ではビーズ間、ビーズ中で新生骨が現れたものの 14 週埋入でもビーズの吸収は認められなかった (図 6)。

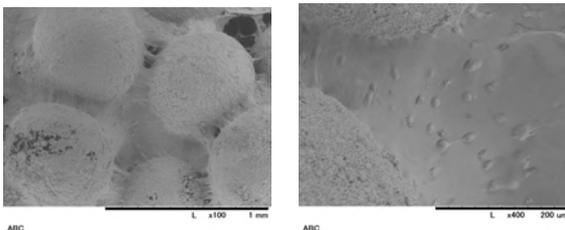


図 4. 中径サイズ細胞複合体 14 日目の SEM 像。ビーズ間は細胞外マトリックスで覆われている (目盛り: 左 1mm, 右 200 μ m)

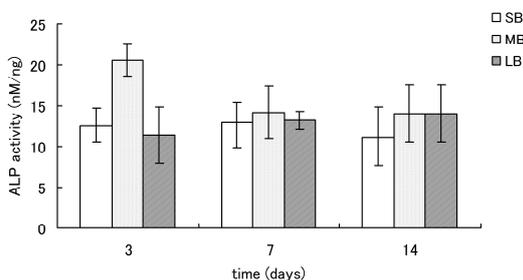


図 5. SB (小径), MB (中径), LB (大径) の 3, 7, 14 日間後の ALP 活性の比較

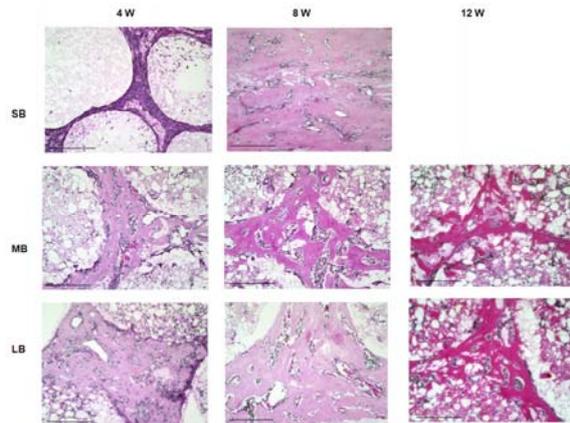
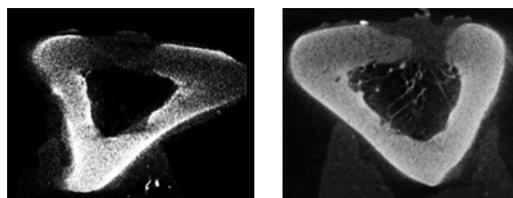


図 6. 複合体埋入 4, 8, 12 週後の HE 染色の組織像。バーは 200 μ m

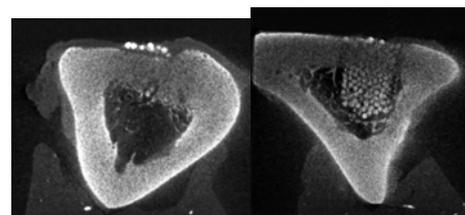
⑥イヌ脛骨埋植試験

図 7 にイヌ脛骨埋植試験の CT 像を示す。コントロール群はわずかに欠損部に不透過像が認められた。アルジネート単体群は欠損部周囲より新生骨とみられる不透過像が観察されたが新生皮質骨は連続していなかった。 β -TCP 単体群では上部にわずかに β -TCP を観察されるが骨髄内部のビーズはほぼ吸収し新生骨で覆われた。複合体群では新生皮質骨で被覆されていたが、TCP ビーズが皮質骨・骨髄内に残存し新生骨の置換途中であることが観察された。



コントロール群

アルジネート単体群



β -TCP 単体群

複合体群

⑦まとめ

図 8 に示す複合体を製造する器具を開発したことで、従来の顆粒状 β -TCP 製品に比較して格段にすぐれた操作性をもつ試作品を完成させた。さらに、*in vivo* ならびに *in vitro* 両試験において良好な生体適合性を確認したことから複合体は、局所注入可能な骨補填材ならびに間葉系幹細胞などの三次元培養担体として骨再生医療に応用可能なことが示唆された。さらにビーズ粒径については吸

収することが新生骨形成につながると考え300~500(小径)を複合体として選択することが有用であることを結論づけたい。

一方で、アルジネートをバインダーとすることで β -TCP 群より骨形成が遅延する結果については、アルジネートの存在で血管や細胞の進入が遅れ β -TCP の吸収が遅くなるのが原因であると予想される。

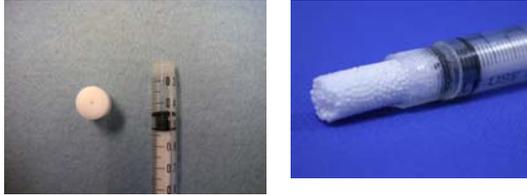


図 8. 複合体を製造する器具ならびに試作品

- 1) Int Oral Maxillofac Implants 16: 343-354, 2001
- 2) Int J Periodontics Restorative Dent 25: 129-137, 2005
- 3) 7th World Biomaterials Congress Final Program: 110, 2005
- 4) J Controlled Release 88: 55-64, 2003

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 3 件)

1. Takahiro MIYAI, Atsuo ITO, Gaku TAMAZAWA, Tomonori MATSUNO, Yu SOGO, Chiho NAKAMURA, Atsushi YAMAZAKI, Tazuko SATOH, Antibiotic-loaded poly- ϵ -caprolactone and porous β -tricalcium phosphate composite for treating osteomyelitis, Biomaterials 29 巻 140-151, 2008 査読有り
2. Gaku TAMAZAWA, Atsuo ITO, Takahiro MIYAI, Tomonori MATSUNO, Yu SOGO, Chiho NAKAMURA, Atsushi YAMAZAKI, Tazuko SATOH, Antibiotic-containing polylactide-co-glycolide and porous β -tricalcium phosphate composite for treating osteomyelitis, Key Engineering Materials, 361-363 巻 515-518, 2008, 2008 査読有り
3. Tomonori MATSUNO, Yoshiya HASHIMOTO, Seita ADACHI, Kazuhiko OMATA, Yamauchi YOSHITAKAI, Yasuyuki OZEKI, Yoshikazu UMEZU, Yasuhiko TABATA, Masaaki NAKAMURA, Tazuko SATOH, Dent Mater J 27 巻 827-834, 2008 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

1. 橋本典也, エキシマレーザーアブレーション法によるアパタイト被覆三次元チタン

繊維細胞足場の開発, 第6回日本再生歯科医学会, 平成20年9月13日

2. 橋本典也, Effect of bead size for scaffold on mouse osteoblasts, 86th General Session & Exhibition of the IADR, 平成20年7月4日, トロント, カナダ
3. 橋本典也, Cytocompatibility of hydroxyapatite-coated titanium fiber mesh scaffold, 86th General Session & Exhibition of the IADR, 平成20年7月4日, トロント, カナダ
4. 安達清太, Utility of an injectable 3D scaffold for osteoblast differentiation depends on pore size, International Dental Materials Congress 2007, 平成19年11月23日, タイ, バンコク
5. 岩崎千絵, Effect of Pore Size for Scaffold on Osteoblast Differentiation, 第55回 Annual Meeting of JDR, 平成19年11月17日, 横浜
6. 松野智宣, 局所注入型骨補填材 β TCPビーズ/アルジネート複合体を用いた骨再生, 第10回日本組織工学会, 平成19年11月9日, 東京
7. 山内由隆, β -TCP ビーズ/アルジネート複合体のビーズ粒径が骨分化に与える影響, 第5回日本再生歯科医学会学術大会, 平成19年9月22日, 東京
8. 橋本典也, 局所注入型骨補填材セラミックスビーズ/アルギン酸複合体の生体適合性, 第49回日本歯科理工学会, 平成19年5月13日, 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 典也 (HASHIMOTO YOSHIYA)
大阪歯科大学, 歯学部, 助教
研究者番号: 20228430

(2) 研究分担者

中村 正明 (NAKAMURA MASAOKI),
大阪歯科大学, 歯学部, 教授
研究者番号: 50067055
(分担期間: 2007年)

松野 智宣 (MATSUNO TOMONORI)
日本歯科大学, 歯学部, 准教授
研究者番号: 80199827

小俣和彦 (OMATA KAZUHIKO)
日本歯科大学, 歯学部, 助教
研究者番号: 00434142

(3) 連携研究者

中村 正明 (NAKAMURA MASAOKI),
大阪歯科大学, 歯学部, 名誉教授
研究者番号: 50067055
(分担期間: 2008年)