

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390502

研究課題名(和文) 生体内骨誘導用光硬化型レジン-BMP 複合体の開発

研究課題名(英文) Development of a light cured resin-BMP composite material intending to induce new bone formation *in vivo*

研究代表者

河合 達志 (Kawai Tatsushi)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：60167351

研究成果の概要(和文)：

骨形成因子(BMP)と生体移植用レジンとを複合化し、生体内において、個々の症例に対して適切な3次元形状に新生骨を誘導する新規移植材料を開発することを研究目的とした。すなわち、X線マイクロCTからの3次元DATAを元に、3次元形態を反映したレジンスキャフォールドを3次元造形システムにより作製後、これに骨形成因子を複合化し、生体内で新生骨を誘導するシステムを構築した。この結果3次元形態を有するスキャフォールドの周囲に新生骨を誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：

In order to develop an implant material that has a potential to induce new bone formation adequate to the 3-dimensional shape that reflects to each clinical situation, a resin with BMP composite was assembled. According to the 3-Dimensional data obtaining from micro X-ray CT system, resin scaffold was made by means of 3D-SLS system, then combined with BMP. The composite material was implanted *in vivo* and new bone formation occurred surrounding tissue of the scaffold.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料、生物・生体工学、再生医療、光造形、biomaterial, tissue engineering, biological engineering, 3D modeling

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはBMPを用いた新生骨誘導実験には20年の蓄積を持ち、BMP用のスキャフォールドを開発してきた。また、骨形成のみならず歯の発生、形態誘導とBMPとの関連も視野に入れ、新生骨誘導実験を行ってきた。これ

ら一連の研究の過程において、誘導新生骨の3次元形態を制御することはきわめて重要であるとの視点を得たが、個々の症例に適確に対応するスキャフォールドの開発は困難であった。そこで、当グループはまず生体内移植用光硬化型レジンを開発し、生体内に

おける新生骨形態誘導の第1歩を築いた。さらに近年のX線CTの精度、取り込み速度の向上に着目し、X線CTのデータを元に予定する3次元形態を有するスキャフォールドを、前記光硬化型レジンを用いて、光造形システムにより作製することを創案した。

## 2. 研究の目的

顎骨欠損部に適合するスキャフォールドを3次元造形法により作製し、これに骨形成因子を複合化して、望む形状の新生骨誘導が可能であるかを実験することを研究の目的とした。この目的を達成するために以下の実験目標を設定した。

- (1) 光造形用の光硬化型生体内移植用レジンの開発。
- (2) X線CTデータに基づく光造形システムによる、上記光硬化型レジンの3次元スキャフォールド化。
- (3) 骨形成因子との複合化による新生骨誘導実験

## 3. 研究の方法

(1) 光造形用の光硬化型生体内移植用レジンの開発

MMA系のモノマーが細胞に接触した場合にGST(グルタチオンSトランスフェラーゼ)等の解毒代謝系遺伝子が早期にupregulateすることを確認しており、これらの遺伝子の定量を行ないつつ、適したモノマーのスクリーニングを行なった。骨セメントなどの移植用レジンとは主としてMMAレジンが用いられているが、より生体親和性を得るために、高分子粉末にはethyl methacrylateを用い、モノマーには前述のスクリーニング結果を勘案し、既発表のアクリレートを用いた。(特許番号：特願 2005-118345) ISO10993シリーズ並びにISO 7405に基づき生体安全性試験を行なった。さらに、胎児筋肉培養をレジン上にて行ない、軟骨誘導が可能であるか実験した。また、実験の途上においてこのレジンに特定の溶剤を添加すると粘弾性挙動が変化することから、将来の幅広い応用をめざして、添加剤によるレオロジー的なコントロールを試みた。また、3次元造形後のスキャフォールドを生体内に適用する際に細部調整のため、光硬化型生体内移植用レジンに直接体内において光硬化させることも想定されるため、重合発熱測定システムも模索することとした。さらに、アクリレート以外の薄膜用レジンの検索のため、ポリ塩化ビニリデンに着目し、今後の実験の展開のための基本情報の蓄積も行なった。

(2) Nylon系樹脂による3次元スキャフォールドの作製。

実験開始の時点では大前提としてこれまで開発してきた生体移植用レジンの生体適合

性が良好であることに実験系の基本を置いていた。実際に、細胞毒性試験あるいは生体内移植実験ではコントロール群と有意差のない良好な生体親和性を示していたが、器官培養系においては全く新規開発レジンに機能を果たすことができなかった(後述)。この原因は重合時に残留する未反応モノマーの存在であるものと推定している。このため、3次元スキャフォールドの作製を当初計画と変更し、高分子重合体を熔融積層するSSL(粉末積層焼結法)を新たに採用し、Nylon12系樹脂によりスキャフォールドの作製を行なった。試料形状dataの製作および、CAD dataからSTL dataへの変換をMagics software package(マテリアライズ ジャパン株式会社)で行ない、STL dataを元に3次元造形装置(SEMplice®、株式会社アスペクト)で試料を製作した。この3次元造形製作物に対して(1)項と同じ生物学的安全性試験を行ない、結合実験を行なった。

(3) スキャフォールドとBMPの結合実験

生体安全性が確保されたスキャフォールドとBMPとの複合化を行ない骨形成が生じるかの確認を行なった。得られた複合体をマウス大腿部筋肉間空隙に移植し、新生骨誘導の状態をX線マイクロCT並びに組織標本から評価した。図1に当初の実験の流れ全体を記載した。

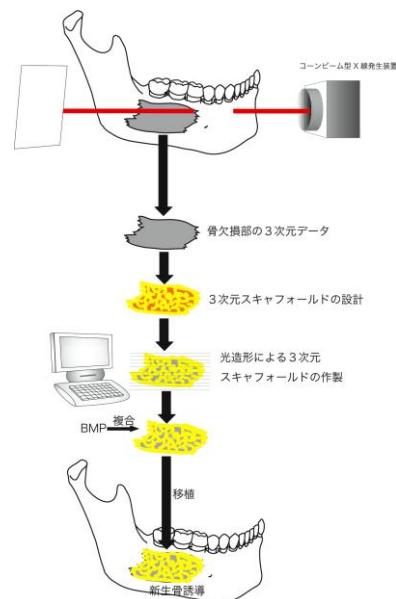


図1

また、BMPによる新生骨が長期間に涉って存続するか否かはこれまでに知られておらず、このデータは臨床応用の際には不可欠であると考えられるため、300日を越える移植期間において継続的にX線CTスキャンを行ない、誘導骨組織の動態を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 光造形用の光硬化型生体内移植用レジ

ンの開発

ISO10993-5 による細胞毒性試験において、新規開発レジンは良好な生物学的安全性を示した。しかしながら、器官培養系においては培養組織全てが新生軟骨を誘導することに失敗し、このレジンの採用を断念した。これに替わって、事項に述べる Nylon 系樹脂を積層造形法により 3 次元造形し、スキャフォールドを製作することに方針を転換した。紆余曲折して得た結論ではあったが、この実験過程中に模索したことから、形状記憶レジンが創出され特許取得にまで至っている。(特願 2011-28328, PCT/JP2011/68065) 図 2 に新規光硬化型生体内移植用レジンにアルコール添加を行なった際の弾性係数の変化を示す。

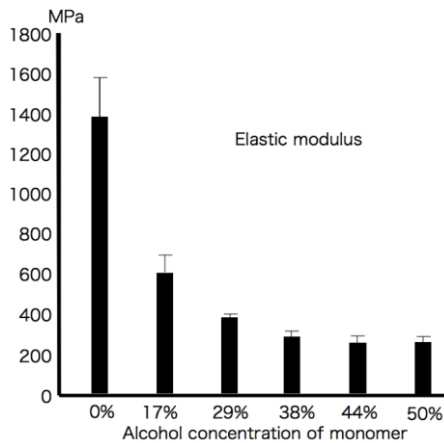


図 2

アルコール添加と共に弾性係数は低下し、応力に対して変形が顕著となる。50℃以上においてこれらの試験片を変形した後、20℃程度の室温に保留するとその変形は維持される。再度、50℃以上に温度を上昇すると、元の形状に復帰し、形状が記憶されていたことが分かる。

図 3 に示したように、37℃では形状の復帰は 50%程度であるが、50℃あるいは 60℃では弾性回復が 100%であり、形状記憶

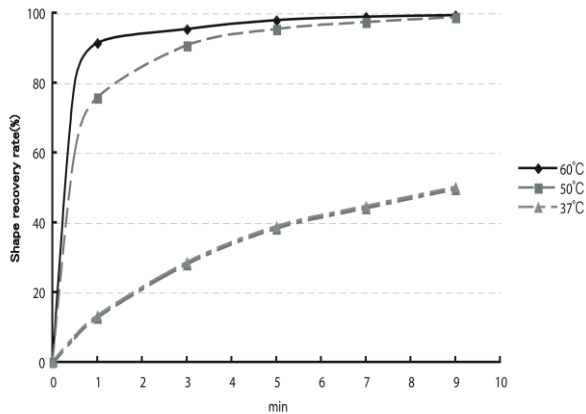


図 3

効果を有することを示している。

レジンの重合発熱に関する実験では米粒大のレジンであっても重合時に 60℃以上の高温に達することが新規開発の USB 基盤を用いた実験系により判明し、生体内においてレジン系材料を光硬化する場合には発熱防御対策を立てる必要性が提起された。薄膜のポリ塩化ビニリデンは in vivo, in vitro のいずれにおいても生体安全性を示すことが確認され、今後の移植用材料として有望であることが示唆された。

(2) Nylon 系樹脂による 3 次元スキャフォールドの作製。

図 4 に円盤状に造形した 3 次元スキャフォールド上において細胞培養を行なった結果を示す。

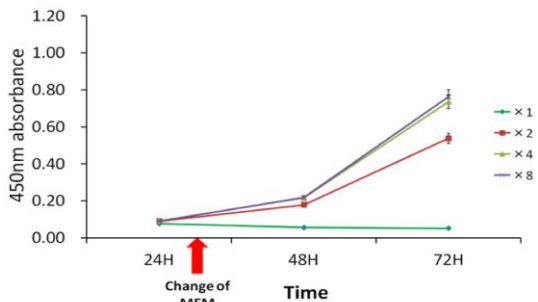
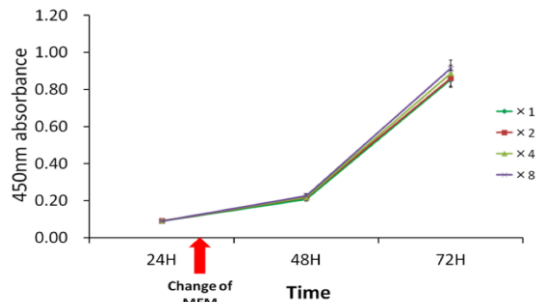
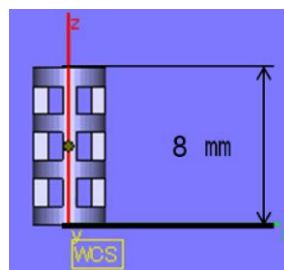


図 4

上段が本実験のスキャフォールド用樹脂の結果であり、細胞の増殖は阻害されてはいない。一方下段は陽性対照であり、細胞の増殖が抑制され細胞毒性を示している。

このように全ての試験片において毒性は認められなかった。in vivo における実験においても、術後炎症以外は炎症性の組織像は認められず、細胞培養試験と同様に生物学的安全性が確認された。

最終的に試作された円筒状スキャフォールド



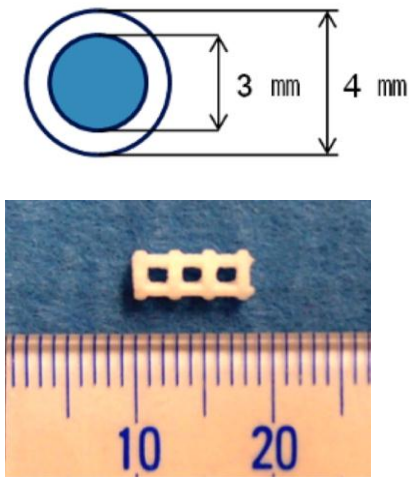


図 5

ドを図 5 に示す。

このスキャフォールドと BMP を複合化した。

(3) スキャフォールドと BMP の結合実験

BMP の生産は年 2000mg を維持することが可能であり、マウスに単独で移植された BMP による誘導新生骨は 300 日を越えても存在し、徐々に骨密度が高くなることが判明した。新生骨は図 6 に誘導された新生骨の X 線 CT 像を示す。



図 6

この BMP と Nylon 系樹脂による 3 次元スキャフォールドを複合化し、同様の移植実験を行なった結果移植体周囲に新生骨誘導が生じることが確認された (図 7)。



図 7

円筒状のスキャフォールドの骨格を覆い尽くすように新生骨の不透過像が観察される。しかしながら、BMP を保持するキャリアーを使用しない場合にはスキャフォールド内部に新生骨が形成されることはなくスキャフォールド周囲のみに限定された。キャリアーの有望な候補としてデキストリンがスク

リーニングされ、これに関する特許取得も行った。(特許 12879858)

以上記載した一連の実験より、目標として設定した「3次元造形によるスキャフォールドに骨形成因子を結合し、新生骨誘導を図る」という目的を達成した。歯科領域における顎骨欠損部を補填する新たなスキャフォールドシステムの端緒となるものと考えられる。しかしながら、当初予定していた特許取得レジンでは器官誘導系には使用することができないことが判明し、実験の大幅な遅延を余儀なくされた。このため実際の臨床応用への道のりには未だ距離があり、さらなる実験継続が必要である。一方、実験経過の過程上得られた形状記憶プラスチックは今後の歯科臨床への応用が強く期待され、本プロジェクト開始時には予想していなかった成果が得られたものと考えられる。

## 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 6 件)

- ① Masuda, T., Miyazawa, K., Ueda, N., Hata, Y., Kawai, T., Goto, S: Development of an orthodontic elastic material using EMA-based resin combined with 1-butanol. Dental Materials Journal, 30 (5) :664-671, 2011.
- ② Hamajima, S., Hayashi, T., Sato, Y., Sasaki, K., Kawai, T.: Osteoanagenesis after transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells using polyvinylidene chloride film as a scaffold. Dental Materials Journal, 30 (5) :707-716, 2011.
- ③ Wanibe, H., Yamamoto, M., Nakata, K., Kawai, T., Nakamura, H: Selected physical properties of a PEMA-based resin for possible use in a root canal filling material. Dental Materials Journal, 30 (1) :52-57, 2011.
- ④ Asai, T., Hayashi, T., Kuroki, K., Okano, M., Kiriyama, T., Kawai, T.: In vitro biocompatibility of dextrin: the addition of a low-concentration of dextrin in the medium promotes the cell activity of L929 mouse fibroblasts. Cell Biology International, 35:645-648, 2011.
- ⑤ Iseda, A., Ishikawa, A., Kawai, T., Sato, Y., Abe, A., Hamajima, S., Asakura, M., Mi

zuno, T., Murakami, H., Hattori, M: Fundamental research on the mechanical properties of resin products using selective laser sintering molding. Aichi Gakuin Dent Sci, 23:1-8, 2010

- ⑥ Murata, M., Kawai, T., Kawakami, T., Akazawa, T., Tazaki, J., Ito, K., Kusano, K., Arisue, M: Human acid-insoluble dentin with BMP-2 accelerates bone induction in subcutaneous and intramuscular tissues. Journal of the Ceramic Society of Japan 118(6):438-441, 2010.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Ueda, N., Kawai, T., Hayashi, T., Tsuruta, S., Taniyama, M., Hamajima, S., Sato, Y., Kobayashi, S., Ohno, Y., Uematsu, Y: Osteoinductive activity of BMP-Metal composite material. The international dental materials congress 2011(seoul), 2011. 5. 29.
- ② Hayashi, T., Asai, T., Asakura, M., Sasaki, K., Uematsu, Y., Mieki, A., Kataoka, H., Kawai, T.: Bone-like tissue induced by rhBMPs in vitro has Ossification potential in vitro. The international dental materials congress 2011(seoul), 2011. 5. 29.
- ③ Asai, T., Hayashi, T., Kuroki, K., Miei, A., Kataoka, H., Kawai, T.: The Basic experiment about the effective of sintered titanium dioxide as a bone filling material. The international dental materials congress 2011(seoul), 2011. 5. 28.
- ④ Muraji, N., Iwata, T., Kawai, T., Ueda, N., Miyazawa, K., Goto, S., Tanaka, Y: Surface analysis of titanium influenced by plasma glow discharge. The international dental materials congress 2011(seoul), 2011. 5. 28.
- ⑤ Hayashi, T., Asai, T., Miei, A., Kataoka, H., Hamajima, S., Sato, Y., Asakura, M., Kawai, T.: rhBMPs induce immature muscular tissue to differentiate into bone-like tissue. 88th General Session & Exhibition of IADR (Barcelona), 2010. 7. 14-17.

- ⑥ Asai, T., Hayashi, T., Miei, A., Kataoka, H., Hamajima, S., Kiriyama, T., Kawai, T.: Application of Dextrin as a crude BMP Carrier. IADR 88th General Session Exhibition of IADR (Barcelona) 2010. 7. 15.

- ⑦ Asai T., Hayashi T., Hamajima S., Miei A., Kataoka H., Kawai T.: Development of Bone Filling Material Made from the Dextrin Complex. 87th General Session & Exhibition of IADR (Miami), 2009. 4. 4.

- ⑧ Hamajima S., Hayashi T., Asai T., Kataoka H., Miei A., Kawai T.: PVDC Film Decreases the Toxicity of Bonding Agents. 87th General Session & Exhibition of IADR (Miami), 2009. 4. 3.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ① 名称: 形状記憶樹脂及びそれを用いた歯列矯正器具、並びに形状記憶樹脂の粘弾特性の制御方法  
発明者: 河合達志、他 4 名  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: PCT/JP2011/068065  
出願年月日: 2011 年 8 月 8 日  
国内外の別: 国内
- ② 名称: 形状記憶樹脂及びそれを用いた歯列矯正器具、並びに形状記憶樹脂の粘弾特性の制御方法  
発明者: 河合達志、他 4 名  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-028328  
出願年月日: 2011 年 2 月 14 日  
国内外の別: 国内
- ③ 名称: Bone filling material comprising sintered titanium dioxide and dextrin and method for reconstructing bone defects using the same  
発明者: 河合達志、他 1 名  
権利者: 愛知学院大学、松谷化学工業(株)  
種類: 特許  
番号: 12879858  
出願年月日: 2010 年 9 月 9 日  
国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河合 達志 (Kawai Tatsushi)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：60167351

(2) 研究分担者

鶴田 昌三 (Tsuruta Shozou)  
愛知学院大学・歯学部・准教授  
研究者番号：40183488

林 達秀 (Hayashi Tatsuhide)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：70367621

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：