

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791477

研究課題名 (和文) 生体高分子ハイドロゲルと骨髄間葉系幹細胞の複合型骨充填材

研究課題名 (英文) A biocomposite material coordinated with a biopolymer hydrogel and mesenchymal stem cells for bone repair

研究代表者

柴田 陽 (SHIBATA YO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30327936

研究成果の概要 (和文) : HA および TCP ナノ微粒子上で骨芽細胞様細胞を培養することにより、リン酸カルシウムと生体界面に析出する石灰化組織の物理・化学的特性を検討した。HA および TCP ナノ微粒子は徐々に溶解し、一週間後には両サンプル上に石灰化組織が析出した。細胞培養後にみられる HA および TCP サンプル上の石灰化組織は X 線回折分析の結果、結晶構造的には違いがなく、アパタイト様の石灰化組織が析出していた。しかし、赤外分光分析および X 線光電子分光分析法でさらに追究すると、TCP サンプル上の石灰化組織は細胞外マトリクスと無機成分であるリン酸カルシウムの反応性が高く、HA サンプル上の石灰化組織と比較して、高架橋の骨様複合体であることが判明した。赤外分光分析では細胞培養後の TCP サンプル上の石灰化組織でリン酸基の重合反応が検出された。このため TCP サンプル上では細胞が産生したコラーゲンマトリクスと無機イオンとの架橋反応が促進される。化学構造の違いは、力学的性質にも影響した。ナノインデンテーション法による分析で、TCP サンプル上の石灰化組織の値は、硬さ・弾性係数ともに象牙質および海綿骨の値とほぼ一致し、これらと同様粘りのある構造体であるといえる。一方、HA サンプル上の石灰化組織は硬さ・弾性係数ともにきわめて高く、たわみが少なく、もろい構造体であることが判明した。過去の文献から、皮質骨の値であっても海綿骨の 2 倍から大きくても 3 倍程度であり、HA サンプル上の石灰化組織は少なくとも物理的には骨と全く異なる構造体である。

研究成果の概要 (英文) : The biomechanical stability of osseointegrated implants is of particular importance, especially the stability which is achieved from structural manipulation at the interface between the implant surface and the bone tissues. Nanoscale β -tricalcium phosphate-immobilized titanium was prepared by discharge into a physiological buffered saline solution. Compared with hydroxyapatite, it has been shown to be effective in generating a bone-like chemical structure on the surface by cooperative interaction between osteoblastic cells and the β -tricalcium phosphate. The present study, after cell cultivation, investigates the nanostructures and biomechanical property differences of a mineralized layer formed on two samples of nano-calcium phosphate-immobilized titanium. A scanning probe microscope study revealed that the mineralized tissue formed on the β -tricalcium phosphate samples after 1 week of cell culture showed significantly higher roughness, compared with hydroxyapatite samples. Nanoindentation micromechanical evaluation of the in vitro generated multilayered structures exhibited thicker bone-like mineralized layers on the β -tricalcium phosphate samples. A successful modification of titanium implants through the cooperative interaction between osteoblastic cells and nano β -tricalcium phosphate is anticipated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2900000	870000	3770000
2009年度	500000	150000	650000
年度			
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

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：リン酸カルシウム，コラーゲン，骨充填材料

1. 研究開始当初の背景

現在，インプラント体の形状や表面構造の改良により，骨組織との結合能が向上している．しかし埋入部位によっては骨量の不足により，インプラント補綴が困難である．このため，欠損部位に対して自家骨移植やバイオセラミックの骨充填材を利用した術式が検討されてきた．しかし，自家骨移植はドナー部位および骨採取量の制限，人工の骨充填材は強度および吸収性の問題からいずれも広範囲の骨欠損には対応できない．

そこで広範囲の骨欠損に対応すべく，リン酸カルシウム系バイオセラミックを主とした骨充填材と採取した自家骨を併用する手法が利用されてきたが，

①自家骨に存在する骨髄細胞の増殖能

②骨充填材の吸収性と再生の場としての機能

③チェアーサイドでの操作性

に限界があり，完全な新生骨への置換は不可能であった．

①の解決法として，骨髄間葉系幹細胞による再生医療の応用が考えられる．近年再生医療の進歩から単離が可能となった骨髄間葉系幹細胞は，通常の骨髄細胞に比較して増殖能が著しく高く，さらにサイトカインの添加により分化方向のコントロールが容易であることから，インプラント周囲の骨増生に対して利用価値が高い．しかし，*in vivo*で広範囲の骨欠損に対応するケースでは，患部に幹細胞や分化・増殖因子を維持することが困難であり，再生の場として優れたキャリアー

材料の開発が必要である．

②③に対応する骨充填材としては，高分子を利用したハイドロゲルが考えられる．生分解性ポリマーやコラーゲンなどの生体高分子ハイドロゲルは操作性が良好であり，*in vitro*では骨芽細胞などのスキャフォールドとして優れた再生の場を供給することが知られている．同時に，幹細胞の成長・分化誘導因子の添加と徐放が容易である．またリン酸カルシウム系バイオセラミックなどに比べて吸収性に優れており，再生の場としての役割を終えた後は速やかに分解吸収されることが期待できる．しかし，生分解性ポリマーやコラーゲンなどの生体高分子ハイドロゲルは，優れた再生の場（スキャフォールド）である一方で，歯科用インプラント補綴を補助する骨充填材のベースとしては物理的強度に問題があるため複合化が不可欠である．天然の硬組織である骨の構造を模倣した材料という観点からは，リン酸カルシウムとコラーゲンの複合化が考えられる．しかし，両者の反応性が低く，生物学的安定性に乏しいため，少なくとも*in vivo*でハイドロゲルとして用いることはできない．

2. 研究の目的

現在のリン酸カルシウム・コラーゲン複合体は，ハイドロゲルとして生体内で用いることはできない．これまで利用されたリンカルシウム微粒子はコラーゲンとの反応性が低く，ゲル化が困難であり，*in vivo*での安定性が低い．このため，幹細胞のキャリアーあるいはスキャフォールドとして用いること

ができない。申請者はこれまでの研究で、無機イオンのみから調整した擬似体液中での液中放電により、ナノスケール (100nm) のアルカリ性コロイド状リン酸カルシウムを作製することに成功した。このうち β 三リン酸カルシウム (β -TCP) はハイドロキシアパタイト (HA) にくらべ酸性コラーゲン溶液との反応性がきわめて高く、速やかにゲル化するという画期的な所見を認めた。本材はナノ結晶が溶解することにより発生した高エネルギー重合リン酸塩の触媒反応によるコラーゲン分子とリン酸カルシウムの高架橋ハイドロゲルであり、チェアーサイドでの操作性および生物学的安定性に優れている。他期間においてもコラーゲン骨充填材が検討されているが、フリーズドライ処理後にブロック状に加工されたものであるため操作性に劣り、骨髄間葉系幹細胞との複合化は不可能である。これは直径の大きい HA を充填材のフィラーとして用いているため、コラーゲンマトリックスとの反応性が低く、ハイドロゲルの状態で安定性が低いためと考えられる。本リン酸カルシウム/コラーゲンハイドロゲルはチェアーサイドで幹細胞に対する各種増殖・分化因子を容易に添加できることから、人工の骨充填材あるいはハイドロゲル単体での利用よりもはるかに再生能力が高いと考えられ、臨床的にきわめて有効であると考えられる。

3. 研究の方法

液中放電法を用いて、チタン試料表面にナノスケールの HA および TCP 微粒子をコーティングし、試料とした。HA および TCP ナノ微粒子上で骨芽細胞様細胞を培養することにより、リン酸カルシウムと生体界面に析出する石灰化組織の物理・化学的特性を検討した。石灰化組織の化学特性は X 線光電子分光分析法および全反射法を併用した赤外分光分析法にて検討した。石灰化組織の微小力学的特性は原子間力顕微鏡を併用したナノインデンテーション法にて測定した。

4. 研究成果

HA および TCP ナノ微粒子は徐々に溶解し、一週間後には両サンプル上に石灰化組織が析出した。細胞培養後にみられる HA および TCP サンプル上の石灰化組織は X 線回折分析の結果、結晶構造的には違いがなく、アパタイト様の石灰化組織が析出していた。しかし、赤外分光分析および X 線光電子分光分析法でさらに追究すると、TCP サンプル上の石灰化組織は細胞外マトリックスと無機成分であるリン酸カルシウムの反応性が高く、HA サンプル上の石灰化組織と比較して、高架橋の骨

様複合体であることが判明した。赤外分光分析では細胞培養後の TCP サンプル上の石灰化組織でリン酸基の重合反応が検出された。このため TCP サンプル上では細胞が産生したコラーゲンマトリックスと無機イオンとの架橋反応が促進される。化学構造の違いは、力学的性質にも影響した。ナノインデンテーション法による分析で、TCP サンプル上の石灰化組織の値は、硬さ・弾性係数ともに象牙質および海綿骨の値とほぼ一致し、これらと同様粘りのある構造体であるといえる。一方、HA サンプル上の石灰化組織は硬さ・弾性係数ともにきわめて高く、たわみが少なく、もろい構造体であることが判明した。過去の文献から、皮質骨の値であっても海綿骨の 2 倍から大きくても 3 倍程度であり、HA サンプル上の石灰化組織は少なくとも物理的には骨と全く異なる構造体である。歯科用生体材料と骨との界面組織は、咬合力を負担する機能材料としてきわめて重要な生体構造物であると考えられる。HA の骨形成能が高いことは疑いようがないが、単に組織切片を染色するだけではわからない、物理的性質が骨と大きく異なる構造体を HA と骨組織との界面に析出している可能性がある。また、液中放電により作成したナノ TCP 微粒子は、齶蝕象牙質の再石灰化においても有効であった。アルカリ性に調整したコロイド状のナノ TCP 微粒子を、齶蝕象牙質に作用させると、象牙質の弾性係数が健全象牙質と同等にまで回復した。象牙質は管周象牙質と管間象牙質があり、コラーゲンリッチな管周象牙質の層にアルカリ性のナノ微粒子が作用し、架橋結合を回復することで、齶蝕象牙質の弾性係数が上昇したと考えられる。このようにナノ TCP 微粒子は、骨様の複合体作成だけでなく、新たな生体材料として非常に応用範囲が広いことが判明した。

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 8 件)

1) Deng J.Y., Arimoto T., Shibata Y., Omori S., Miyazaki T., Igarashi T.: Role of the chloride formed on anodized titanium surfaces against an oral microorganism. **J Biomater Appl** (in press)

2) S. Omori, Y. Shibata, T. Arimoto, T. Igarashi, K. Baba, T. Miyazaki: Micro-organisms and cell viability on antimicrobial modified titanium. **J Dent Res** 88:957-962 2009

3) Tanimoto Y., Shibata Y., Murakami A., Miyazaki T., and Nishiyama N.: Effect of

varying HAP/TCP ratios in tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics on response *in vitro*. **Journal of Hard Tissue Biology** 18:71-76 2009

4) Tanaka R., Shibata Y., Manabe A., Miyazaki T.: Mineralization potential of polarized dental enamel. **PLoS One**. 4: e5986 2009

Yo Shibata, Li Hong He, Yuriko Toda, Yu Kataoka, Naoki Fujisawa, Takashi Miyazaki and Michael V. Swain: Micromechanical evaluation of mineralized multilayer. **J Biomech** 41:3414-8 2008

5) R. Tanaka, A. Fujishima, Y. Shibata, A. Manabe, T. Miyazaki: Cooperation of phosphate monomer and silica modification on zirconia. **J Dent Res** 87:666-670 2008

6) Tanimoto Y., Shibata Y., Kataoka Y., Miyazaki T., Nishiyam N., Osteoblast-like cell proliferation on tape-cast and sintered tricalcium phosphate sheets. **Acta Biomaterialia** 4:397-402 2008

7) Yo Shibata, Li Hong He, Yu Kataoka, Takashi Miyazaki, Michael V. Swain: Micro mechanical property recovery of human carious dentin achieved with colloidal β -tricalcium phosphate. **J Dent Res** 87:233-237 2008

8) Yuriko Toda, Yo Shibata Yu Kataoka, et al: Interfacial assembly of bio-inspired nano structure mediated by super sensitive crystals. **J Biomed Mater Res A** 84A:869-874 2008 (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- 1) 国際歯科医学会 2008年7月 トロント
- 2) 日本歯科理工学会 2008年9月 大阪
- 3) 再生補綴医学研究会 2008年11月 名古屋
- 4) 国際以下医学研究会 2009年4月 マイアミ

[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
柴田 陽 (SHIBATA YO)

研究者番号 : 30327936