

機関番号：22701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791945
 研究課題名（和文）細胞誘導性を賦与したチタンファイバー綿性顎骨再建用3次元スキャホルドの創成
 研究課題名（英文）Development of reconstruction scaffold for jaw bone made of titanium fiber web with cell induction ability
 研究代表者
 廣田 誠（HIROTA MAKOTO）
 横浜市立大学・医学部・准教授
 研究者番号：20347305

研究成果の概要（和文）：

チタンファイバーを不織布状にした多孔質体であるチタンファイバーウェブによる顎骨再建材料を作製するため、同材料の有効性を検討した。このチタンファイバーウェブをハイドロキシアパタイト薄膜でその多孔質体構造に全く影響を与えずに内部まで均一にコーティングしたところ、骨芽細胞の活動性の上昇が認められ、動物実験ではコーティング群で非コーティングよりも著しく有意に早い新生骨形成が認められた。これらの結果より、チタンファイバーウェブはハイドロキシン薄膜コーティングによって、スキャホルドの構造を維持したまま骨組織との親和性が著しく上昇させられると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was evaluation of the bone regeneration properties of titanium fiber web (TW) that had been coated with a thin hydroxyapatite (HA) layer using the molecular precursor method. A thin HA film was uniformly coated on a TW by the molecular precursor method, without affecting the structure of the TW. Human osteoblasts culture on TW and HA-coated TW (HA/TW) suggested that the HA coated by the molecular precursor method maintained TW architecture and accelerated osteoblast differentiation. Then, TW discs with or without thin HA coating were implanted into rat cranial cortical bone defects, suggesting a thin HA coating enhanced the cortical bone formation through maintenance of TW porosity and promotion of osteoconductivity in the TW 3-dimensional scaffold.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：顎顔面口腔インプラント外科

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：チタンファイバー、顎骨再建、生体材料、アパタイト

1. 研究開始当初の背景

顔面外傷や口腔腫瘍切除後に生じる広範

囲の顎骨欠損に対する再建治療は今日でも自家骨移植が最も確実性の高い方法である。

しかし、自家骨移植では採骨手術による身体的負担も強く、自家骨移植に変わる様々な手術方法や骨組織再生のための3次元スキャホールドが開発されてきた。

顎骨形態を再現する手術として、チタン性あるいは吸収性のトレーに海綿骨骨髄を充填して移植する方法があるが、やはり自家骨採取のリスクが残される。ティッシュエンジニアリングに基づいた顎骨再生も近年試みられているが、確立された治療技術は出現していないのが現状である。

申請者はこれまで顎骨腫瘍切除後の骨再建治療に関する報告をしてきた。一方で、吸収性骨補填材料が骨形成能を有する細胞との併用で、より効果的な骨伝導能を示す実験的研究や、臨床における生理活性物質と骨補填材料を併用した骨再建治療の検討を報告してきたが、広範囲の顎骨の形態的再建には、非吸収性スキャホールドが望ましいと考え、その候補としてチタンファイバー綿に着目した。骨補填材料候補としても、近年、小動物を用いた研究報告がなされている。

チタンファイバー綿で作成した3次元スキャホールド内を分子プレカーサー法にてハイドロキシアパタイトを均一にコーティングすると、骨伝導能の向上が認められる。この方法はこれまでの主流である物理的蒸着法ではなく溶液法であるため、コーティングされる物質の形状に制限がない。こうして得られた3次元スキャホールド内での骨伝導能の向上は、顎骨の機能再建に有力となる歯科インプラントの再建骨での実施に有効となる。即ち、インプラントが念頭における骨再建・再生用3次元スキャホールドとするために、分子プレカーサー法によるチタンファイバー表面のアパタイト薄膜コーティングがスキャホールド内部への骨伝導能向上と細胞誘導性の賦与を獲得する手段として有用であると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では複雑な3次元形態に簡便で正確なコーティングが可能である分子プレカーサー法によって、チタンファイバーに均一で密着性に優れたアパタイト薄膜コーティングとトレシルクロリド法による細胞誘導のための生理活性物質の固定化を行う。この技術を応用し、自由に成形でき、十分な強度も有するチタンファイバー綿を用いた、細胞誘導性を賦与した顎骨再建用3次元スキャホールドを開発するための基礎的条件を明らかにする。

3. 研究の方法

1)チタンファイバー綿性3次元スキャホールドの作製とプレカーサー法によるハイドロキシアパタイト薄膜コーティング

予め成形したチタンファイバーウェブをCa/P比1.6に調整したリン酸カルシウム溶液に20分浸漬後、炉に入れて600℃まで加温することでハイドロキシアパタイト薄膜をチタンファイバー表面にコーティングした。

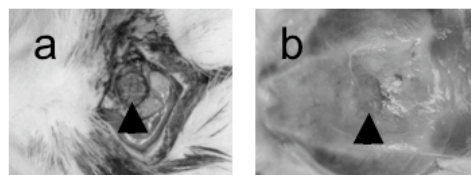
2)アパタイト薄膜コーティングチタンファイバーの生体材料としての応用を探るため、疑似体液中でのアパタイト薄膜の溶解性や石灰化物形成挙動について検討した。

3)動物実験による評価。ラット頭蓋骨欠損モデルを作製し、同材料による再建実験を行う。直径6mmの欠損を作製し、それに合わせたチタンファイバーをスキャホールド(図1)として欠損部位の再建(図2a)に、①チタンファイバー単体②アパタイト薄膜コーティングチタンファイバーとして、3週後、6週後にサンプルを評価した(図2b)。



(図1)

ラット頭蓋骨再建用に作製したチタンファイバーディスク



(図2a)ラット頭蓋骨に埋入したチタンファイバーウェブ

(図2b)取り出し時の頭蓋骨に埋入されたチタンファイバーウェブ

4)サンプル評価。試料は高性能実体顕微鏡で観察後、MMA包埋し、マイクロカッティングマシン(ゼーゲトーム)にて25μm程度に薄

切し、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色かトルイジンブルー染色を行う。スキャホールド内部の骨組織の形成率をNIHイメージにて評価し、各群間で比較検討した。

5)同様にチタンファイバー単体、アパタイト薄膜コーティングチタンファイバーそれぞれを培養基材とし、骨芽細胞の培養を行なった。

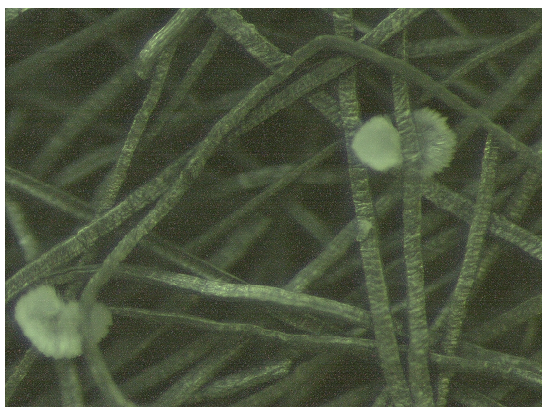
6)培養は3、7、14、21日間実施し、それぞれの培養期間における細胞増殖能の評価と骨芽細胞の成熟度の評価、すなわち、骨芽細胞マーカーであるI型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの発現を観察した。

7) 培養後の各チタンファイバーを観察し、石灰化物の有無を実体顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

1)プレカーサ法によるハイドロキシアパタイト薄膜コーティングでは、複雑なチタンファイバーの3次元構造を損なうことなく均一なハイドロキシアパタイト薄膜コーティングが行なえることが観察できた。

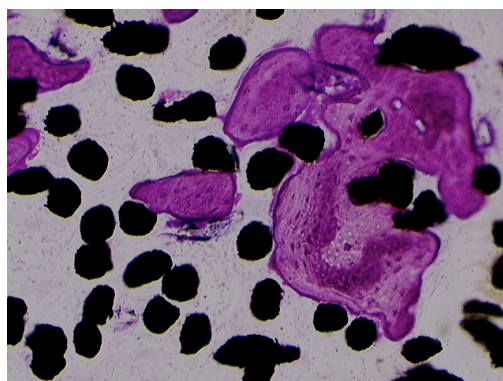
2) 疑似体液中における石灰化挙動試験では、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群において早い時期での石灰化物の析出が観察できた(図3)。



(図3) ハイドロキシアパタイトコーティングした格子状のチタンファイバーウェブ内に石灰化物が析出している。

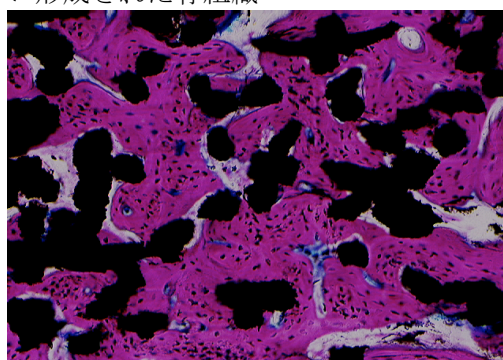
3) 非コーティング群では埋入後6週でもチタンファイバーウェブ内の約50%程度しか新生骨が認められなかったのに対し、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群では埋入3週で約30%(図4)、6週では約80%(図5)と、非コーティングよりも著

しく有意に早い新生骨形成が認められた。



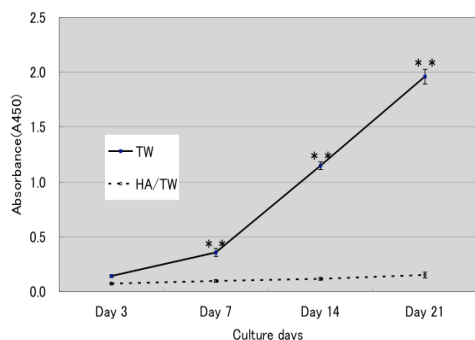
(図4)

非コーティングチタンファイバーウェブない形成された骨組織

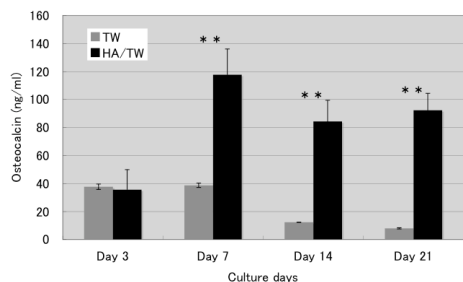


(図5) ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングチタンファイバーウェブ内に形成された骨組織。ほぼ全スペースに骨組織が形成されている。

4) チタンファイバーウェブ上での骨芽細胞培養では、チタンファイバー単体と比較してハイドロキシアパタイト薄膜コーティングチタンファイバー上における骨芽細胞の増殖能が有意に低かった(図6)。また、骨芽細胞マーカーの観察では、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群において骨芽細胞がカルシウム分泌を行なう時期のみに認めるオステオカルシンの濃度が、培養3日目から有意に高く認められた(図7)。また、培養早期より骨芽細胞による石灰化物の析出が認められた。



(図6) 骨芽細胞の増殖活性を観察したグラフ。横軸に培養期間、縦軸に生細胞数を示す。非コーティング群（実線）では培養が進むにつれて細胞数が増殖している一方で、コーティング群（点線）では細胞増殖活性はほとんど変わらず細胞数の変化が観られない。



(図7) 骨芽細胞の成熟度を示すグラフ。横軸に細胞培養期間、縦軸にオステオカルシンの定量を示す。オステオカルシンは骨芽細胞の分化の最終段階で石灰化のために分泌されるものであるため、骨芽細胞の成熟度あるいは分化度の指標になるとされる。非コーティング群（グレー）に比べて、コーティング群（黒）ではオステオカルシン量が培養7、14、21日で有意に高い。骨芽細胞がアパタイトコーティングチタンファイバーウェブ内では石灰化物の生成機能が促進されたと考えられる。

5) 上記の結果より、分子プレカーサー法によってチタンファイバーウェブの3次元構造に全く影響を与えずにハイドロキシアパタイト薄膜コーティングが可能となり、さらに骨芽細胞の成熟が有意に促進され、骨組織誘導能も促進されることが実証された。

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2件)

1. Hirota M, Hayakawa T, Ametani A 他3名: Apatite coated titanium fiber web accelerates human osteoblast functional activity. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 26, 245-5-, 2011.

2. Hirota M, Hayakawa T, Ametani A 他3名: Molecular precursor method facilitates thin hydroxyapatite coating of titanium fiber web scaffold and enhances bone formation: Experimental study in rat cranial bone defects. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 25, 888-92, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 誠 (HIROTA MAKOTO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号: 20347305

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: