

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21792000

研究課題名（和文）薬物徐放制御能を有する高機能性骨置換型アパタイトセメントの開発

研究課題名（英文）Fabrication of the high functional bone replacement apatite cement with drug delivery control capacity

研究代表者

武知 正晃（TAKECHI MASAOKI）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00304535

研究成果の概要（和文）：骨伝導性が向上し、比較的早期にセメントが吸収し骨置換され、抗菌薬が持続的に徐放するような高機能性の非崩壊型アパタイトセメントを開発した。また家兎顎骨骨髓炎モデルを作製し、試作抗菌薬含有アパタイトセメントの抗菌効果および組織学的検討を行った結果、骨髓炎が完全に治癒し、また骨形成が良好であった。以上より、抗菌薬含有アパタイトセメントの顎骨骨髓炎において有用な DDS 材料であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We developed a high functional apatite cement which have improved osteoconduction and release antibiotic continuously. Also, after we fabricated jaw osteomyelitis model using adult rabbit, we evaluated antibacterial effect on apatite cement containing antibiotic histologically. As a result, jaw osteomyelitis perfectly recovered by using apatite cement containing antibiotic. We concluded that apatite cement containing antibiotic was a good candidate for potential use as a DDS carrier that may be useful in jaw osteomyelitis treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生体材料学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：アパタイト、抗菌薬、骨置換、骨芽細胞、細菌、セメント、破骨細胞、リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨骨髓炎は、現在においても口腔外科領域における難治性疾患の1つであり、臨床経過が長く顎骨の変形や機能障害を残しQOLの低下が問題となっており未だ絶対的な治療法が確率されていないのが現状で難治性疾患の1つにあげられる。

骨髓炎の治療にあたっては、壊死組織や病的肉芽組織を切除、搔爬に加え、病巣部への抗菌薬の局所濃度を上昇させ、ある一定期間持続的に抗菌薬の効果が発揮されることが重要であるが、静脈内に投与された抗菌薬の骨組織への移行性が悪く、健常人でも骨組織への移行は血中濃度の10～30%といわれている。

また細菌感染した組織は血流が乏しく、外科的デブリドマン後には組織内の抗菌薬濃度が十分に上昇しないことが問題とされている。局所に特異的に抗菌薬濃度を高めるため点滴注入法、閉鎖式持続洗浄法などが考案されているが、抗菌薬の高い局所濃度を維持し、局所制御を得るための投与方法について未だ一定の見解は得られていない。また顎骨骨髓炎は口腔連鎖球菌だけでなく、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)がその原因菌であることが多く、現在のMRSAは多剤耐性菌であり、バンコマイシン、テイコプラニンなど限られた抗菌薬でしか除菌できないことがさらに問題点としてあげられる。

近年、ハイドロキシアパタイトやリン酸カルシウムセメントなどを担体とした抗菌薬の drug delivery system(DDS)における顎骨骨髓炎への基礎的実験の報告が散見されるようになってきたが、様々な問題点が残されており今後、画期的な DDS 担体の開発が急務と考えられる。

一方、数年前、石膏のように硬化し、硬化体がアパタイトになるアパタイトセメントの臨床応用が欧州および北米で認可され、画期的な骨再建材料として注目されていたため、申請者らは以前よりアパタイトセメントに着目し、同セメントの高機能化研究を進めてきた。研究過程においては、従来のアパタイトセメントの欠点であった長い硬化時間と崩壊性を改善するために、硬化反応の律速段階を解除する方法で迅速硬化型アパタイトセメントを開発し、さらに同セメントを改良し練和直後のセメントペーストを血清に浸漬しても崩壊せず、約6分で硬化する非崩壊型アパタイトセメントも開発した。申請者は、さらにこの非崩壊型アパタイトセメントがスケルトンタイプの薬物徐放担体として非常に有用であることも報告しており、非崩壊型アパタイトセメントにバンコマイシンなど抗菌薬を添加すれば、薬物が病巣部など局所に長時間、持続的に徐放されると予測される。

## 2. 研究の目的

非崩壊型アパタイトセメントは、従来型アパタイトセメントの問題点をほぼ解決して

いると自負しているが、骨伝導性に関しては従来型アパタイトセメントと同程度であり、完全に骨と置換するには長期間を要する。そこで、骨伝導性が向上し、さらに比較的早期にセメントが吸収し骨置換され、それと同時に抗菌薬が持続的に徐放するようなアパタイトセメントを調整・設計し、より高機能性の非崩壊型アパタイトセメントを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

まずアパタイトセメントの粉末部に  $\alpha$ -TCP や  $\beta$ -TCP をいろいろな条件で(重量比など)添加し、各種抗菌薬をセメント内に含有させ作製する。また、練和液にこれまで中性リン酸にアルギン酸ナトリウムまたはキトサンを混合させ、基本的な徐放実験を行ってきたが、今回、より骨伝導性を高める目的で、同様の働き(非崩壊性を維持する)をもつアテロコラーゲンをを用いた検討も行う。なお、以前、申請者がアテロコラーゲンを含有させた非崩壊型アパタイトセメントにおける組織学的検討を行い、従来型と比較して良好な骨伝導性と新生骨の形成を確認している。それぞれの試作抗菌薬含有アパタイトセメントの硬化時間、機械的強度などの基本物性を測定する。続いて *in vitro* 上で徐放抗菌薬の有効濃度の持続時間など徐放特性について検討する。また、実際に顎骨骨髓炎動物実験モデル(ウサギ)を作製し、試作抗菌薬含有アパタイトセメントをウサギ顎骨内に埋入後、その治療効果について X 線学的および組織学的評価(組織親和性、骨伝導性、骨置換性)で判定し、さらに薬剤血中濃度などからその安定性についても検討する。具体的に下記の方法で行う。

### ①抗菌薬含有アパタイトセメントの作製・基本物性および細胞を用いた *in vitro* 評価

#### 1) 抗菌薬含有アパタイトセメントの調整・作製

抗菌薬としては、FMOX(フルマリン)、GM(ゲンタマイシン)、VCM(バンコマイシン)を選択する。また、セメント粉末成分をアパタイトセメントの成分の TTCP および DCPA

の等モル混合物にそれぞれ異なる重量比で $\alpha$ -TCPまたは $\beta$ -TCPを混合させる。練和液には、各種濃度のキトサンまたはアテロコラーゲンと中性リン酸の混合液を用いる。

#### 2) 試作抗菌薬含有アパタイトセメントの基本物性の検討

各種抗菌薬の添加がアパタイトセメントの硬化特性などに及ぼす影響を検討する。具体的には、硬化時間（ビカー針法）、機械的強さ（間接引張強さ、圧縮強さ）を小型万能試験機（現有設備）で行うとともに、硬化体の組成分析（粉末X線回析）および走査型電子顕微鏡（SEM）にて観察を行う。

#### 3) 抗菌薬含有アパタイトセメントからの抗菌薬の徐放特性の検討

抗菌薬含有アパタイトセメントをそれぞれバイアル瓶に入れ、5mlの無菌水を加えて、37°Cでインキュベートして溶出させ、測定日ごとに一定量を採取して抗菌薬溶出試験を行う。各試料の抗菌薬濃度は、日本抗生物質医薬品基準の力価試験法である寒天平板調整法（Agar Well法）で行う。また別の方法として、37°Cの蒸留水を環流させた2重底ビーカー内に一定量の生理食塩水を入れ、その中に抗菌薬含有アパタイトセメントを浸漬させた後、生理食塩水中に放出された抗菌薬の濃度を経時的に分光光度計で測定する。

#### 4) 疑似ラッフルボーダー実験（試作抗菌薬含有アパタイトセメント硬化体溶解性試験）

試作抗菌薬含有アパタイトセメント硬化体の破骨細胞に対する吸収活性の指標として、試作抗菌薬含有アパタイトセメントの弱酸溶液に対する溶解性を定量化する。破骨細胞が形成するラッフルボーダー内のpHが4～5と報告されているので、アパタイトセメント硬化体を37°Cの緩衝液(pH=4)に浸漬し、一定速度で緩衝液を攪拌する。pHスタット（現有設備）をもちいて、アパタイトの溶解に伴う溶液のpH増大を酸溶液滴下により補正し、酸滴定速度から試料の溶解速度を定量化する。

#### 5) 試作抗菌薬含有アパタイトセメントの破骨細胞吸収活性のin vitro評価

試作した各種抗菌薬含有アパタイトセメント硬化体のディスク上に破骨細胞を播種し、

一定期間培養する。破骨細胞の吸収活性をセメント表面の吸収窩数および吸収窩面積より定量化する。破骨細胞による吸収活性の評価と疑似ラッフルボーダー実験によるセメント硬化体の溶解速度の結果から、アパタイトセメント硬化体の溶解性が破骨細胞によるアパタイトセメント硬化体の吸収に及ぼす影響を検討する。

#### 6) 骨芽細胞を用いた試作抗菌薬含有アパタイトセメントのin vitro評価

試作抗菌薬含有アパタイトセメントをdisk状に作製し、同上に培養骨芽細胞を播種する。作製したdisk上での骨芽細胞の細胞増殖をMTT法と細胞カウントにて計測する。さらに、骨芽細胞の分化マーカーであるタイプ1コラーゲンの産生量、アルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン産生量を測定する。また、それぞれのmRNAを回収し、RT-PCR法を用いて、遺伝子の発現量についても検討する。

②家兔顎骨骨髓炎モデルを作製し、試作抗菌薬含有アパタイトセメントの抗菌効果および骨伝導能・骨形成能など組織学的検討を行う。

#### 1) 顎骨骨髓炎動物モデルの作製

2.5～3Kg 日本白色家兔をネンブタール静脈麻酔下、歯科用マイクロモーターを用いて顎骨髄腔に穿孔させる。18G注射針を挿入し臨床分離MRSA培養液を1ml ( $3 \times 10^6$ CFU) 注入する。創部を縫合して閉鎖し、経日的にX線検査および血液一般検査にて顎骨骨髓炎を判定する。

#### 2) 抗菌薬含有アパタイトセメントの抗菌効果および組織親和性と骨伝導性の検討

顎骨骨髓炎を発症した顎骨を搔爬し、死腔のまま閉鎖したcontrol群、抗菌薬の含まないアパタイトセメント、各種抗菌薬含有アパタイトセメントをそれぞれ埋入する。埋入手術後、一定期間ごとにラベリング剤（カルセイン、テトラサイクリン）を投与する。体重測定、臨床所見（腫脹など）、X線検査を経時的に行い効果を判定する。また血液検査を行い、薬剤の血中濃度を測定し、その安定性を判定する。その後、屠殺し顎骨を摘出して脱灰および非脱灰組織切片を作製し、病巣部位を組

組織学的に観察する。また、試作抗菌薬含有アパタイトセメントの骨および軟組織に対する組織親和性および骨伝導性・骨形成速度について組織学的に検討する。さらに顎骨からの骨髓液を抽出して高濃度β-ラクタム剤添加培地で培養し、MRSAの有無を測定する。

### 3) 抗菌薬含有アパタイトセメントの骨置換性の検討

上記実験と同様に試料を実験動物に埋入し、この吸収状態、骨置換状態を組織学的に観察する。組織学的検討として、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い、破骨細胞による試作抗菌薬含有アパタイトセメントの吸収状態および破骨細胞数を観察する。さらに、マイクロ CT と 3D 骨梁構造解析ソフトを用いて骨置換量を定量化する。

## 4. 研究成果

まず各種抗菌薬の添加がアパタイトセメントの硬化特性などに及ぼす影響を検討した。その結果、抗菌薬の添加量が多くなるにつれて硬化時間はやや延長し、機械的強さも軽度低下したが、硬化体のアパタイトへの変換に影響なかった。次に抗菌薬含有アパタイトセメントからの抗菌薬の徐放特性の検討を寒天平板調整法 (Agar Well 法) で行った。その結果、抗菌薬含有量が多くなるほど細菌に対する阻止円も大きくなった。また別の方法として、37°Cの蒸留水を環流させた2重底ビーカー内に一定量の生理食塩水を入れ、その中に抗菌薬含有アパタイトセメントを浸漬させた後、生理食塩水中に放出された抗菌薬の濃度を経時的に分光光度計で測定した場合においても良好な徐放効果が認められた。次に試作した各種抗菌薬含有アパタイトセメント硬化体のディスク上に破骨細胞を播種し、一定期間培養し、破骨細胞の吸収活性をセメント表面の吸収窩数および吸収窩面積より定量化した。さらに骨芽細胞を用いた試作抗菌薬含有アパタイトセメントの *in vitro* 評価も検討した。その結果、抗菌薬の添加による破骨細胞の吸収活性の抑制はほとんどみられず、抗菌薬含有アパタイトセメントにおける分化能および石灰化能が確認され優れた骨形成誘導能が認められた。続いて家兎顎骨骨髓炎モデルを作製し、試作抗菌

薬含有アパタイトセメントの抗菌効果および骨伝導能・骨形成能など組織学的検討を行った。

まず、家兎顎骨骨髓炎モデル作製のため、18G 注射針を挿入し臨床分離 MRSA 培養液を 1ml ( $3 \times 10^6$ CFU) 注入後、創部を縫合して閉鎖した。経日的に X 線検査および血液一般検査にて顎骨骨髓炎の所見が認められた。続いて、抗菌薬含有アパタイトセメントの抗菌効果および組織親和性と骨伝導性の検討を行った。顎骨骨髓炎を発症した顎骨を搔爬し、死腔のまま閉鎖した control 群、抗菌薬の含まないアパタイトセメント、各種抗菌薬含有アパタイトセメントをそれぞれ埋入後、脱灰および非脱灰組織切片を作製し、病巣部位を組織学的に観察した。その結果、control 群、抗菌薬の含まないアパタイトセメントでは、骨髓炎の所見が残ったままで治癒しなかったが、抗菌薬含有アパタイトセメントの場合、徐々に炎症が軽減し、さらに骨形成も進行する所見が得られた。最終的には骨髓炎が完全に治癒し抗菌薬含有アパタイトセメントの顎骨骨髓炎において有用な材料であることが明らかになった。

## 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 4 件)

1. Ohta, K., Nishi, H, Fukui, A, Shigeishi, H, Takechi, M., and Kamata, N. : CX3CL1 expression induced by *Candida albicans* in oral fibroblasts. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* 査読有 60(2), 2010,179-185.
2. Ohta, K, Ogawa, I, Ono, S, Taki, M, Mizuta, K, Miyauchi, M, Takechi, M., Shigeishi, H, Takata, T. and Kamata, N. : Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol-stained and -unstained areas. *Oncol Rep.* 査読有 24(1), 2010, 9-14.
3. Ohta, K., Takechi, M., Minami, M, Shigeishi, H., Hiraoka, M, Nishimura M. and Kamata, N. : Influence of factors related to implant stability detected by wireless resonance frequency analysis device. *J Oral. Rehabil.* 査読有 37(2), , 2010, 131-137.
4. Hiraoka, M., Takechi, M., Minami, M., Ohta, K. and Kamata, N. : Effect of TGF-β 1 on differentiation and mineralization of osteoblasts in interconnective porous calcium

hydroxyapatite ceramics. Archives of Bioceramics Research. 査読有 9, 2009, 303-306.

〔学会発表〕(計2件)

1. 二宮嘉昭、武知正晃、太田耕司、南 正彦、多田美里、太田 彰、湯浅哲也、石川邦夫、鎌田伸之、GM含有 $\alpha$ -TCP/ACの顎骨骨髓炎への応用に関する基礎的研究 ―基本物性と骨形成評価について―、第32回 日本バイオマテリアル学会、2010年11月30日、広島
2. 二宮嘉昭、武知正晃、太田耕司、南 正彦、平岡美里、太田 彰、湯浅哲也、石川邦夫、鎌田伸之、GM含有 $\alpha$ -TCP/AC硬化体の顎骨骨髓炎への応用に関する基礎的研究―基本物性と骨形成能について―、第31回 日本バイオマテリアル学会、2009年11月17日、京都テルサ(京都)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武知 正晃 (TAKECHI MASAOKI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
准教授

研究者番号：00304535

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：