

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 1 月 21 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390454

研究課題名(和文) 多糖類-骨形成因子複合化3次元造形スキャフォールドによる骨誘導性移植材料の開発

研究課題名(英文) development of implantable osteoinductive materials using polysaccharide and bone morphogenetic protein (BMP) combined 3D fabricated scaffold

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：金属用3次元造形機を用いて、メッシュ形態を持った金属フレームを作製し、骨形成因子を複合化し、マウスに移植をおこなった結果、移植3週後に新生骨の誘導に成功した。メッシュの細孔のサイズを適正にした場合には、インプラント体の表面のみならず、メッシュ内部においても新生骨が誘導された。デキストリンは骨形成因子の優秀なキャリアであることが判明した。本プロジェクトにより開発された当該システムは歯科、整形外科あるいは他の医学領域における臨床への応用が近い将来可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Implantable metal frames that had mesh like shapes were formed by means of 3 dimensional direct manufacturing for metal (ARCAM). This equipment is an only one system that can produce 3 dimensional forming for metals using electron beam which enable to make no porosity of target products, eventually could achieved highest mechanical property. Bone morphogenetic protein was combined on the surface of each 3 dimensional implant, then was implanted in the mouse. At 3 weeks after implantation, new bone formation was observed. When adequate pore size of mesh was formed in the implant, new bone formation was occurred not only on the surface of embedded implant but also inside of the mesh area of the implant. Dextrin showed excellent property as a carrier of recombinant BMP to scaffold. Consequently, the developed system in this project could applicable as a new method for clinical application in dentistry, orthopedics and other medical areas in near future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体材料 スキャフォールド BMP 3次元造形

1. 研究開始当初の背景

口腔領域における種々の顎骨欠損性の疾患において、骨欠損部位の新生骨誘導を速やかにかつ望む形状に行なうことはきわめて重要である。当研究グループはこれまで、レジン系、金属系、セラミック系材料と BMP(骨形成因子)とを複合化した骨誘導性材料を開発してきた。近年では、多孔質チタンあるいは光硬化型薄膜レジン(特願 2005-118345)と骨形成因子との複合材料により、生体内において機能的に新生骨を誘導する材料の開発に成功している(米国特許 12/879,858)。しかしながら、これまでに開発した骨形成因子複合材料はいずれも優秀な骨形成能を示したが、誘導される新生骨形状の制御と耐高負荷物性の両者を満たす材料を開発するには至っていない。一方、補綴系製作物の 3 次元造形技術に関して当研究グループは臨床応用レベルに達しており、複雑な形状を有したレジン系補綴物あるいは金属系補綴物を作製することに関しては十分な蓄積を有している(特願 2010-181511)。さらに近年電子ビームを金属粉末に照射溶解し鑄造体よりも高強度の金属 3 次元造形技術を有する HTL 社と歯科用の金属造形機の開発を試みている。これらの研究背景から、BMP(骨形成因子)による新生骨誘導系の実験系と 3 次元造形によるスキャフォールド作製の実験系の両システムを統合化し、望む形状に新生骨を誘導する事が可能な新規複合材料を開発する事を本研究の目的とした。

2. 研究の目的

腫瘍、嚢胞、外傷、歯周疾患などに起因した口腔領域における顎骨欠損部には高負荷が加わり、かつ複雑な形状を有することが多い。この部分の再建には高負荷に耐え、かつ欠損部の 3 次元形状を忠実に再現するフレームワークあるいはスキャフォールドが必要となる。そこで、本実験においては、患部の骨欠損形態の 3 次元データを X 線 CT で入手後、金属系 3 次元造形スキャフォールドを作製し、BMP(骨形成因子)との複合化により新生骨誘導を行なう事を目的とした。電子ビームを用いた金属系 3 次元造形スキャフォールドと骨形成因子との複合化は世界で初めてである。

3. 研究の方法

2011-13 年度研究成果の方法

以下 4 項目の実験を行なった。

(1) 骨欠損形状に合致した 3 次元造形金属スキャフォールドの作製

ARCAM 社製の金属 3 次元造形造形機を用いて grade2 の純チタン粉末から純チタン製スキャフォールドを作製した。また、骨欠損を大腿骨に作製し、その 3 次元データを STL データの形式で作製できるかの確認を行なった。使用したスキャフォールドは 600~1000 μm 程

度の細孔を有するメッシュ状である。なお、骨欠損部分の 3 次元データ構築に関してはウサギ 7 週齢右側大腿骨に約 10mm 程度の欠損を作製し、骨欠損部を重付加型シリコン印象材により印象採得し、この印象を Amannirrbach 社製光学スキャナーにより 3 次元取り込みを行なった。附属ソフトにより積層マルチファイルから STL データを作成し、3 次元モデリングソフトの blender に転送し、基本データとした。

(2) プラズマ処理ならびに多糖類による金属スキャフォールドの表面改質

プラズマ処理を純チタン表面に施す計画を当初しており、予備実験として、純チタンのみならず各種レジン表面のプラズマ処理を行い、ぬれ性の確認を行なった。

(3) BMP(骨形成因子)と金属スキャフォールドの複合化

予備実験として、1000 μm の細孔を有するスキャフォールドにデキストリン溶液をキャリアーとして使用してブタ皮質骨から抽出した骨形成因子を複合化した。予備実験結果を元に、同様に人工合成骨形成因子を用いて複合化し、本実験の移植を行なった。

(4) BMP-スキャフォールド複合体による新生骨誘導

作製した骨形成因子-スキャフォールド複合体をマウス 5 週齢の左側大腿筋間空隙に移植した。移植後同一個体をコーンビーム型 X 線 CT 装置により経時的に撮影を行ない、移植後 3 週間にて安楽死後新生骨形成を確認した。すなわち非脱灰切片標本を通常に従いトルイジンブルー染色を行ない組織像を観察した。また、同部位の EPMA 像を撮影するとともに、Ti, P, Ca の特性 X 線像を撮影した。

4. 研究成果

(1) 骨欠損形状に合致した 3 次元造形金属スキャフォールドの作製

骨誘導用スキャフォールドとして、外側形状が円柱であり、メッシュ構造を有する純チタン製のスキャフォールドを金属用電子ビーム 3 次元造形機により作製した(図 1)。

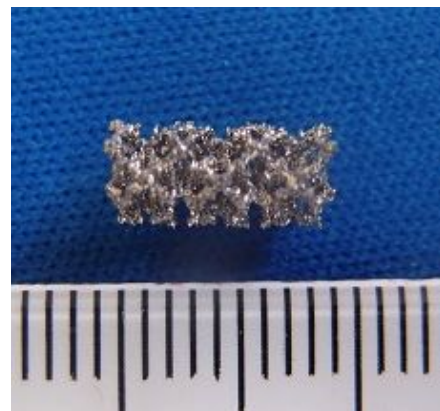


図 1

メッシュの細孔径は 1000 μm である。また、ウサギ骨欠損部分の 3 次元構築の結果を図 2

に示した。

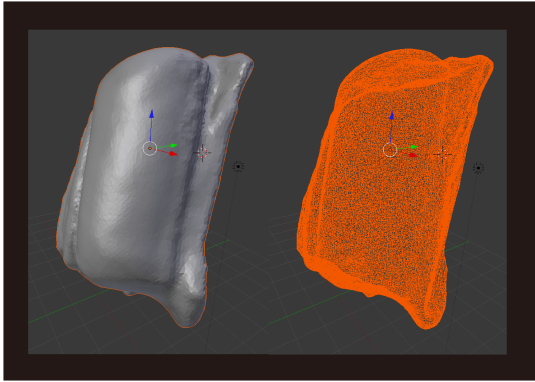


図 2

左側はソリッドデータであり、右側はワイヤーデータ表示をしている。シリコン印象面の光学 3 次元印象により十分に STL データが構築可能なことが判明した。

(2) プラズマ処理ならびに多糖類による金属スキャフォールドの表面改質

アクリルレジン、ポリカーボネート、ポリ塩化ビニリデンならびに、純チタンはいずれもプラズマ表面処理によりぬれ性が向上し、レジン系材料は細胞増殖能が増加することが判明した。なお、表面処理温度の上昇が被処理物質表面の構造を変化することを考慮し低温プラズマを応用したアルゴンイオンボンバードメントによる処理方法を新たに開発し実用化した(特願: JP2013/83008)。しかしながら、その後の実験の進行から、デキストリンによるスキャフォールドへの骨形成因子吸着がきわめて効果的であり、実験当初予定していたプラズマ処理をする必要性がないことが判明したため、予備実験段階で、この系の実験は終了した。

(3) BMP(骨形成因子)と金属スキャフォールドの複合化

ブタ皮質骨を出発原料とした、天然抽出部分精製骨形成因子はスキャフォールドに吸着する際に粘性が高く、移植体外側部分のみにしか新生骨が誘導されなかった。この所見と、骨形成因子単独移植を行なった後の移植初期の新生骨誘導結果から、重要な結論が導出された。すなわち、骨形成因子をメッシュ状 3 次元スキャフォールドの細孔全体に充填した場合には、メッシュ内部に新生骨が誘導されず、移植後 12 時間程度の間周囲組織と接触した部分、すなわちスキャフォールド外側部分にしか新生骨が形成されないものと結論された。従って、メッシュ内部の深部にまで新生骨を誘導するにはスキャフォールドの深部を構成するメッシュの表面のみに限局して骨形成因子を吸着する事が必要であることが判明した。3 次元形状を有するスキャフォールドによる骨誘導成功は世界で初めてであり、特許出願を行なった(特願: 2014-19237)。

(4) BMP-スキャフォールド複合体による新生骨誘導

移植 3 週間後の CT 画像から 3 次元造形機により作製されたスキャフォールド周囲に新生骨が誘導される事が証明された(図 3)。



図 3

また、非脱灰薄切標本の組織像からメッシュ内部に新生骨が誘導されていることが判明した(図 4)。

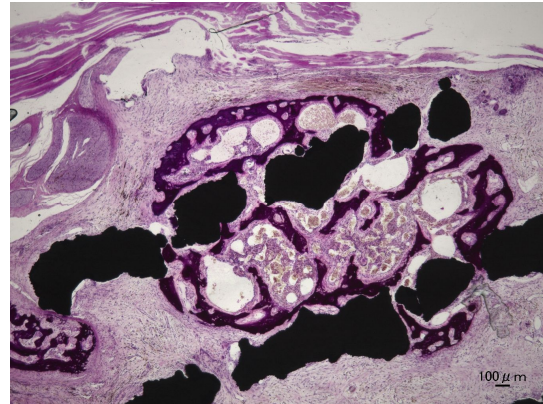


図 4

また、この部分の XMA による解析により、純チタンメッシュに近接する部分の Ca 特性 X 線像から新生骨が誘導されていることが示唆された。この知見はこれまで当研究グループが行なって来た新生骨誘導実験中初めての成功であり、複雑な 3 次元形状を有するスキャフォールドであっても内部に骨誘導能を持つ細胞を誘引し得る事を証明した。

総括

このように、本実験で試みた手法により自由な形状のスキャフォールドを金属 3 次元造形機により作製し、望む形状の新生骨を誘導することが可能となった。また、さらにスキャフォールドの深部にまで新生骨を誘導する事に成功したため、純チタン製 3 次元スキャフォールドが移植後生体内部においてより安定することが期待される。この実験結果は臨床応用にきわめて近接した位置にあり、今後歯科における展開のみならず、広く隣接医科領域における応用もめざす予定である。

なお本年(2014年)Arcam社製3次元造形機(Q10)が本講座に導入され、これまでメーカーの好意により作製していたスキャフォールドを当講座内で作製する事が可能となり、さらに実験展開が容易となった。

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 7 件)

Fuyamada H, Miyane S, Hayashi T, Kawai T, Hattori M: Osteoinductive activity of 3D-modeling titanium scaffold with BMP
Journal of Oral Tissue Engineering, 13(3): in printing 査読有

Abe A, Kobayashi S, Fuyamada H, Yamaguchi D, Matsumura S, Ueno A, Nakamura Y, Takeuchi K, Murakami H, Kawai T, Hattori M: Biocompatibility of nylon resin discs fabricated by selective laser sintering
J Oral Tissue Engin, 11(1): 42-50, 2013. 査読有
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=di3ortis/2013/001101/005&name=0042-0050e&UserID=163.214.2.25>

Okeya H, Asakura M, Hayashi T, Ueno A, Ito M, Ohno Y, Kawai T, Noguchi T: Three-dimensional analysis and longitudinal observation for osteoinductivity induced by bone morphogenetic protein
Oral Tissue Engin, 11(1): 1-8, 2013. 査読有
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=di3ortis/2013/001101/001&name=0001-0008e&UserID=163.214.2.25>

Sato Y, Hayashi T, Hamajima S, Asakura M, Abe A, Kawai T: Long-term observation of ectopic bone formation using in vivo microcomputed tomography
Journal of Hard Tissue Biology, 22(3): 343-350, 2013. 査読有
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhtb/22/3/22_343/article/-char/ja/

Higa T, Ueno A, Hayashi T, Abe A, Ohno Y, Kawai T, Kurita K: Utility of prototype porous titanium as a bone regeneration scaffold
Oral Tissue Engin, 10(3): 163-171, 2013. 査読有
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=di3ortis/2013/001003/006&name=0163-0171e&UserID=163.214.2.25>

Nakamura A, Wanibe H, Iwama A, Kitamura N, Shibata N, Nakata K, Tsuruta S, Kawai T, Nakamura H.: A NEWLY DEVELOPED SEALER CONTAINING ANATASE-TYPE TITANIUM OXIDE.
Aichi Gakuin Dent Sci, 25: 17-23, 2012. 査読有
<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ch9agdsm/2012/002500/004&name=0017-0023e&UserID=163.214.2.25>

Asai T, Hayashi T, Kuroki K, Okano M, Kiriya 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. 査読有
DOI: 10.1042/CBI20100264

[学会発表](計 12 件)

川瀬真由, 林 達秀, 佐々雅祥, 中野 禅, 萩原 正, 清水 透, 河合達志: マウス線維芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞のTi-6Al-4V合金シート上での増殖能
第35回日本バイオマテリアル学会大会(東京), 2013.11.26.

T. Hayashi, K. Yoshihara, M. Kawase, A. Miki, S. Hamajima, T. Kawai: rhBMP-2 induces immature muscular tissue to differentiate into bone-like tissue in vitro
BIOCERAMICS 25(Romania), 2013.11.7-10.

普山田宏成, 宮前 真, 松村亜希子, 上野温子, 林 達秀, 河合達志, 服部正巳: 金属系三次元スキャフォールドと rhBMP-2 の複合化による骨誘導
第 62 回日本歯科理工学会学術講演会, (新潟), 2013.10.20.

加藤彰子, 樋口直也, 中田和彦, 内藤宗孝, 河合達志, 有地榮一郎, 中村洋, 大野紀和: 歯内治療における術前シュミレーションへの3次元造形模型の可能性
第 81 回愛知学院大学歯学会, (愛知), 2012.12.2.

Hayashi T, Kobayashi S, Miki A, Kataoka H, Kawai T: Bone-like tissue induced by rhBMP-2, rhBMP-4 and ehBMP-7 in vitro has ossification potential after implantation.
TERMISWorldCongress2012, (Austria), 2012. 9.5-25.

Asai T, Hayashi T, Miki A, Kataoka H, Tomino M, Kawai T: Possibility of

Sintered Titanium Dioxide as a Bone Filling Material.
90th General Session of the IADR,(Iguacu Falls),2012.6.22

Hayashi T,Kobayashi S,Asai T,Mieki A,Kataoka H,Uematsu Y,Kawai T:Promotion of rat calvarial defect healing by induced bone-link tissue.
90th General Session of the IADR,(Iguacu Falls),2012.6.20.

普山田宏成,宮前真,上野温子,阿部亜希子,竹内一夫,服部正巳,河合達志:電子ビーム粉末積層造形法を用いたチタン製三次元多孔質スキャフォールドの開発
第 29 回日本顎顔面補綴学会学術大会,(愛知),2012.6.16.

普山田宏成,小林周一郎,岡部栄治郎,上野温子,宮前真,服部正巳,林達秀,河合達志:金属三次元スキャフォールドの開発
第 59 回日本歯科理工学会学術講演会,(徳島),2012.4.15.

林達秀,小林周一郎,朝倉正紀,桐山喬司,佐々木敬一,後藤陽一,河村純,河合達志:未成熟筋組織-rhBMP-ePTFE による骨誘導の可能性
第 33 回日本バイオマテリアル学会,(京都),2011.11.21.

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.

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.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 2 件)

名称:細胞増殖用材料、組織再生及び組織再生方法
発明者:河合達志他 6 名
権利者:同上
種類:特許、PCT
番号:JP2013/83008
出願年月日:2013 年 12 月 9 日

国内外の別: 国外

名称:骨形成促進材
発明者:河合達志他 6 名
権利者:同上
種類:特許
番号:2014-19237
出願年月日:2014 年 2 月 4 日
国内外の別: 国内

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

河合 達志 (KAWAI, Tatsushi)
愛知学院大学・歯科理工学講座・教授
研究者番号: 60167351

(2)研究分担者

前田 初彦 (MAEDA, Hatsuhiko)
愛知学院大学・口腔病理学講座・教授
研究者番号: 30175591

研究分担者

鶴田 昌三 (TSURUTA, Shozo)
愛知学院大学・歯科理工学講座・准教授
研究者番号: 40183488

研究分担者

林 達秀 (HAYASHI, Tatsuhide)
愛知学院大学・歯科理工学講座・准教授
研究者番号: 70367621

研究分担者

上野 温子 (UENO, Atsuko)
愛知学院大学・高齢者歯科学講座・助教
研究者番号: 70469013

(3)連携研究者

()

研究者番号: