

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15719

研究課題名(和文)フルメタル・ティッシュメンブレンによる顎骨増幅再生療法

研究課題名(英文) Novel alveolar bone regeneration therapy with full metal barrier membrane by micro fabrication technology

研究代表者

石幡 浩志 (Ishihata, Hiroshi)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40261523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、組織再生用として開発したチタンメンブレン上にて細胞が生着・増殖する知見に着目し、従来継代法とは異なるに新しい細胞培養法として細胞を他の媒体上に遊走・定着させる技術を確立した。特にメンブレン間を細胞が遊走移動させる細胞培養の増幅法を確立した。20 $\mu$ mの純チタン膜に剣山型パンチを用いて20 $\mu$ m孔径、ピッチ50 $\mu$ mの貫通孔が形成された多孔性のチタンメンブレン上にマウス骨芽細胞様細胞株を播種して解析を進めた。GFPを用いた観察や免疫染色を用いた解析により純チタン膜上においてもコラーゲンコートされたカルチャーディッシュに匹敵する細胞の生着と増殖を認めた。宿主に還元しての組織再生を目指す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focus on the finding that cells grow on new inspired titanium membranes developed for tissue regeneration. A new cell culture method different from the conventional passage method that the cells are migrated and attached on the other media. We established a technology of cell culture amplification method in which cells could move between membranes. A osteoblast-like cell of MC3T3 was cultured on a porous titanium membrane having 20  $\mu$ m pore size and through-hole structure with proximate span of 50  $\mu$ m formed on a thin pure titanium sheet of 20  $\mu$ m. Observation using GFP and analysis using immunostaining revealed the engraftment and proliferation of cells comparable to collagen-coated culture dishes even on pure titanium film. We will use this material to regenerate alveolar bone tissue.

研究分野：生体材料学

キーワード：チタン 骨再生 マイクロ加工 レーザー プレス加工 歯周組織再生 歯周病 インプラント

## 1. 研究開始当初の背景

・日本の国力を取り戻すには、高齢者の健康増進が最大の鍵である  
・高齢者の健康増進を阻むのは、咀嚼減退による栄養不良に起因し、骨と筋肉をはじめとする運動機能の衰退である  
・運動器を回復する医療は費用対効果において優れ、医療政策における重点化が見込まれる

世界有数の長生き先進国の裏で、いわゆる“寝たきり”要介護者では200万人以上と、欧米との比較で突出する日本、その大きな原因は二つ。一つは高齢者における関節疾患および骨折治療の対応が遅れから、ロコモ・フレイルが止められないこと。具体的には人工関節や骨折プレートの8割が欧米からの輸入という状況では、人種間のサイズや形状の違いから、人工材料の適用による骨再建療法が十分機能していない。あるいは、高齢者の多くが患う変形性関節炎に対する再生療法についても、CPCなど細胞培養施設の不足、材料や費用が高額であることから公的扶助が控えられ普及が進んでいない。これら運動器治療へ支援が十分に行われぬ結果として、リハビリ技術に加え、社会復帰のためのコミュニティーも発達しない。

第二に高齢者の食生活の問題、健康に食べられる目安とされる20歯を有する国民は、80才台でまだ受診者の5割(2016年厚生労働省歯科疾患実態調査速報値)、実際は2割程度であり、大半の人々が自前の歯を無くして高齢者となる状況が招くのは、咀嚼・発音機能の低下、食事バリエーションの減少・言語QOLの低下、栄養不良や消化器疾患、全身疾患・認知症を誘発、疾病・介護対象、まさしく寝たきりへのハイウェイである。ちなみに歯の喪失の最大要因である歯周病は、若年者から諸々の全身的悪影響をもたらすことも近年解明され、循環器、心疾患および周産期で低体重児出産リスクを高め、代謝系においても糖尿病を増悪する。アルツハイマー病など高次系疾患の誘発因子であることも忘れてはならない。

介護対象者数の削減が国の命運を左右する至上命題となる今、自立の見込みのない治療への扶助を見直さざるを得ず、高齢者の社会復帰に欠かせない「ロコモ」「フレイル」「サルコペニア」などの運動器疾病および認知症予防・治療環境の整備は最優先となろう。その切り札となり得る、骨と歯の疾病克服を目指した“硬組織再生治療”が、いずれわが国の存亡を左右すると言っても大袈裟ではないだろう。

戦後、わが国では生存権の保障が明文化されている一方、“健康な社会生活”は通念上自己責任とされ、身体機能や食べる機能の維持はその範疇であった。そのため、骨や歯を治療して人の活動を支援する医療はこれま

で政策上、軽んじられていた。けれども今や急速な少子高齢化に晒され、状況は一変した。もはや健康な高齢者がもたらす社会貢献や経済効果が国家の屋台骨にならざるを得なくなり、国民が切実に望む老後の健康長寿は、国を支える核心的利益である。しかし現実には高齢者の多くが四肢の健全さと栄養摂取で共にハンデを負い、健康長寿による建設的社会参加すなわち現役化が妨げられている。

20年ほど前、咀嚼機能が低下した高齢者に必要なカルシウム量を確保するため、スキムミルクを1日800cc取ることを紹介した番組があり、以来現在にいたるまで高齢者のカルシウム不足を補う方法としてその利用が推奨される記事が後を絶たない。一方で、欧米では乳製品からのカルシウム摂取が骨粗しょう症の予防に寄与しないばかりか、心臓病または前立腺癌リスクを引き上げるとの見解がある(Harvard T.H. Chan School of Public Health)。既に欧米では栄養摂取から高齢者の運動機能を回復できるとの幻想は無く、むしろ、逆に運動器の活動が誘引するシグナルこそが栄養摂取の鍵であると立証されている。介護・医療費の増大を抑止する高齢者の健康増進には、運動機能と栄養摂取の両立が必須であり、日本人の高齢者はそのうちの運動機能の劣化が甚だしいことから、国民の健康長寿を図る最大の課題となるのが「骨と歯の欠損と機能回復」であるのは明らかである。

## 2. 研究の目的

・ヒト細胞に特化した機能素材、医学生物学において幅広く利用される組織再生、培養ツールを開発  
・細胞医療、特に高齢者の運動機能を回復する組織再生治療への発展を目指す

我々は寝たきりの無い欧米と同じく、すべての国民が健康のままに最期まで社会生活を全うする世界を目指し、運動器の要である、骨と歯を修復する画期的な治療ツールを創生する。本事業は特に高齢者の関節あるいは顎など骨組織修復に有効な医療用材料とその加工法の開発を通じて、特に関節炎や歯周病に伴う骨の実質欠損の修復に特化した新たな医療機器とする。これは従来品の移植骨を患部に長期間安定して保持する保定装置(非吸収性タイプ生体膜)の後発品としての薬事承認を目指す一方で、新たにレーザー超高精細加工技術を駆使した細胞外マトリックス機能を付与する事で、培養細胞の移植における細胞のハウジング(足場)機能を併せ持つ高耐久性スキャフォールド(担体)として完成させる。これはティッシュエンジニアリングによる培養細胞移植による次世代再生医療のためのプラットフォームであり、硬組織再生療法の効果と治療予知性を飛躍的に高め、特に高齢者における四肢の運動機能や咀嚼力を回復するに留まらず、現役レベルの

QOL の充実を達成する基幹技術への発展を目指すものである。

本開発の成果は、研究機関を中心に培養細胞ツールとしての需要が見込まれるとともに、iPS 細胞や ES 細胞などの貴重な細胞を凍結無しで安全に輸送するスキャフォールドとして新規の利用分野が開拓される可能性がある。さらにはより付加価値の高い医療機器としての利用が見込まれ、患者の運動機能を回復する再生医療への臨床応用を目指す。

### 3. 研究の方法

#### ・純チタンマイクロメッシュ生成法

金属でありながら高い生体親和性を有し、生体埋込に広く利用されている純チタンは、高活性で難加工という側面がある。例えば通常雰囲気下でレーザー等による熱切削や熱穿孔が行なわれた場合、空気中の酸素や窒素あるいは素材を保持する材料由来の元素と結合し変性、良好な生体親和性が損なわれ、物性も劣化する。すなわち、純チタンをバリアメンブレンとするための加工工程では、材料の熱変性を回避できることを前提とした微細精密加工を実現しなければならない。

そこで本研究では、純チタンに対する以下の2つの方法によるマイクロ加工を試みた。

#### (1) 長短パルス(フェムト秒)レーザー加工(非熱レーザー加工)

X-Y ステージ付レーザー加工装置を製作し、Type I CP チタンより生成した 10 $\mu$ m 厚チタン箔に対し、パルス幅ナノ・フェムト秒による高サイクル加工により、20 $\mu$ m の貫通孔を 50 $\mu$ m 間隔でピッチした約 40,000 個/cm<sup>2</sup>、あるいは 30 $\mu$ m ピッチで約 110,000 個/cm<sup>2</sup> となるように加工し、規則的配列の穿孔アレイによるマイクロメッシュを形成した。

#### (2) マイクロプレス加工

パンチ加工用超硬金属材表面を、シリコンウエハー切断用極薄砥石を用いて碁盤目状に切れ目を入れ、角錐(底辺 50 $\mu$ m・高さ 70 $\mu$ m)アレイによる微細剣山パンチを生成した。厚さ 20 $\mu$ m の純チタン膜に、この剣山型パンチを用いて大きさ 25 $\times$ 25 $\mu$ m<sup>2</sup> で間隔 50 $\mu$ m の貫通孔が形成された多孔性の新規チタン製メンブレンを生成。その後開発したメンブレン上にマウス骨芽細胞様細胞株を播種して解析を進めた。

#### (3) チタンメンブレンでの細胞の生着・増殖

開発したチタンメンブレン上にマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3 株を播種して培養した。材料上における増殖、遊走能については、SEM(走査型電子顕微鏡)像による観察を行った。次に、骨芽細胞特有の分化マーカーについては免疫蛍光染色による顕微鏡観察を行い解析した。

#### (4) 動物試験

4 匹のビーグル犬を対象に骨再生試験を実施した。メドトミジン(鎮痛および筋弛緩剤：2 アドレナリン受容体作動薬)0.005mg/kg、ミダゾラム(BZP 系の麻酔導入薬・鎮静薬)0.3mg/kg、ブトルファノール(非麻薬性オピオイド、鎮痛薬：受容体作動薬)0.05mg/kg を前肢伏在静脈に静注、その後気管挿管を行い人工呼吸下にてイソフルラン(エスカイン)吸入麻酔にて全身麻酔を維持した。次に 2%リドカイン(エピネフリン 1:80000)注射にて、下顎歯槽部位に対し局所麻酔を行う。術中・術後は電気毛布および湯たんぽ等による体温維持を行った。

下顎犬歯 - 大臼歯間において歯肉剥離掻爬術に準じてフラップ手術を実施、歯肉を全層弁にて剥離翻転し、歯槽骨部を露出した。次に、下顎両側小臼歯および大臼歯を抜歯し、周囲歯槽骨部に対し、滅菌生理食塩水注水下で歯科用エンジンによるラウンドバーにて、長さ 10mm、高さ 10mm、奥行き 5mm の窩洞 2 つを形成、歯槽骨欠損モデルとした。骨欠損部に -TCP 人工骨を充填したのち、試験対象試料である純チタン製メンブレンで被覆、歯肉弁を復位し縫合処置を行い完了した。術後には 5%ブドウ糖溶液と共に、抗生物質ユナシン S0.5g の点滴投与を行う。筋弛緩による呼吸抑制を解消するため、メドトミジン拮抗薬のアチパメゾール(2 アドレナリン受容体拮抗薬)0.1mg/kg にて覚醒処置を行い、その後回復までの数日間は注意深く観察をおこなった。術後 3 日間はメタカム 1mg(錠)を一日 2 回、セファレキシン(抗生物質)を 22mg/kg BID で 5 - 7 日間食事に含有し投与した。術後 3 ヶ月経過時に、ペントバルビタール過剰投与して安楽死を実施する。死亡後下顎骨部を離断し、10%中性ホルマリン緩衝溶液に浸漬固定後、組織標本を作成した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞培養試験

GFP (Green Fluorescent Protein)を用いた観察や免疫染色を用いた解析により純チタン膜上においてもコラーゲンコートされたカルチャーディッシュに匹敵する細胞の生着と増殖を認めた。また、SEMを用いた観察からパンチによって形成された表面性状の違いにより、生着した細胞の形態が異なることを認めた。1 週間培養後における骨芽細胞分化マーカーの発現は、コントロールの平板培養と有意な差を認めなかった。

次に、チタンメンブレン上からプラスチックカルチャーディッシュへのアウトグロースを試みたところ、チタンメンブレン上に播種しメンブレン上での生着を確認した上で別のプラスチックカルチャーディッシュに移して培養を開始し、培養 14 日目にプラスチックカルチャーディッシュ上での細胞生着を確認。その後は同一のチタンメンブレンを

別のディッシュに移しても同様の現象を確認した。

### (2) 動物試験

3ヶ月後おける骨窩洞形成部位は、充填した人工骨がほぼ自家骨様組織に弛緩し、チタンメンブレンに接する外縁部分では皮質化が見られ、一方、骨稼動の内側では海綿状の骨梁形成が認められた。骨弛緩組織内は骨芽細胞が観察されると共に、血管様組織も確認された。

### (3) 考察

本研究では、組織再生用として開発したチタンメンブレン上にて細胞が生着・増殖する知見に着目し、従来継代法とは異なるに新しい細胞培養法として細胞を他の媒体上に遊走・定着させる技術を確認した。特にメンブレン間を細胞が遊走移動させる細胞培養の増幅法を確認した。20 $\mu\text{m}$ の純チタン膜に剣山型パンチを用いて20 $\mu\text{m}$ 孔径、ピッチ50 $\mu\text{m}$ の貫通孔が形成された多孔性のチタンメンブレン上にマウス骨芽細胞様細胞株を播種して解析を進めた。GFPを用いた観察や免疫染色を用いた解析により純チタン膜上においてもコラーゲンコートされたカルチャーディッシュに匹敵する細胞の生着と増殖を認めた。宿主に還元しての組織再生への応用が期待される。さらに、動物試験においては、血流を伴う新生骨による組織再生への寄与が認められ、生活力の高い組織再生治療を応用が期待される。

細胞治療が始まる以前の20世紀におけるスキャフォールドの役割は、生体組織の自律的回復に寄与するよりも、人工材料と宿主組織の接合（人工関節、インプラント体と宿主骨組織間、人工血管と宿主大動脈間の接合）に主軸が置かれ、安全性と生体親和性さえ確保されれば、後は物性、耐久性能が満たされれば十分であった。21世紀に入り、ティッシュエンジニアリングによる細胞治療の実用化が図られ、本来の身体組織を取り戻そうとする再生医療が進展した。そこでスキャフォールドには新たな機能として、培養細胞の導入を念頭に、上述した細胞外マトリクスを模倣した、微細な多孔構造を素材に付与する工夫が施されたが、生体親和性を有する素材でそれが可能であったのは一部のポリマーと多孔セラミクスに限られた。しかし物理的強度が要求される骨組織中に介在するには強度に乏しく長期耐久性が及ばないことから、骨組織の再生治療に用いるには限界があった。現在実用化されている方法は、培養細胞を患部に直接注入するか、多層化した細胞シートを移植するもので、比較的短期間で回復可能な軽度の歯周病に有効である。しかし、あるいは歯が動揺するほど進行した歯周病では、大きな骨組織の実質欠損を生じていて、できるとしても組織の再生回復には1年以上かかる。このような長期にわたる組織修復

となると導入された培養細胞だけで達成するのはまず不可能である。実際に長期間を要する組織再生治療を行うならば、細胞を修復箇所に留め、かつ修復部位を保護できる、耐久性を持ったスキャフォールドを用いる必要がある。

以上のことから、骨組織のような再生修復に長期の持続的維持療法が要求されるケースでは、培養細胞を患部に移植する際はスキャフォールドの併用が欠かせず、そのスキャフォールドには以下の条件を満たす必要がある。

生体親和性ならびに安全性に優れる。

組織が再生するスペースを維持し続ける物理的強度と長期耐久性を有する。

患部に適合する柔軟性、付形性を有する細胞が付着し、遊走、増殖を促す微細な細胞外マトリクス構造で満たされている。

移植された細胞および組織再生を誘導する患部に栄養供給路を確保できる。

周囲からの細胞侵入や組織伸張による移植細胞へ干渉を阻止できる。

付形性の困難なセラミックは、培養細胞を修復箇所に導入するのに使いづらい。ポリマー材は最も有望と見られる素材であるが、よほど分厚く無い限り、周囲からの組織圧や外力を被る部位では耐えられない。骨再生治療に相応しいスキャフォールドは、これまでとは全く異なる発想で編み出す必要がある。

我々は、スキャフォールドとして多用される素材と言う視点を改め、実際、今、骨に用いられている材料を注目した。当然、それは“純チタン”となる。勿論、生体親和性と耐久性には申し分の無いので、の条件には適うが、いかにせん金属で、ポリマーとはあまりにも異なる素材である。しかし、たとえ高強度のチタンでも、20 $\mu\text{m}$ 以下の厚さに薄くするなら、柔軟な素材であり、をクリアする。それでもポリマーよりはるかに強い。そして、をクリアするため、わが国の得意とする精密加工技術の出番となる。チタン薄板にどのようなデザインのバイオミメテイクス構造をどのようにして設けるか、これが本開発における課題、および開発の核心である。

そして本開発が最も解決すべき課題が、ティッシュエンジニアリングを組織再生治療に応用するのに欠かせないスキャフォールドとして最も利用されている「生体親和性ポリマー」の問題である。体内埋め込み用途としては強度より柔軟性が有用となる人工血管、あるいはそれほど強度が要求されない形成用ステントとして利用されている。わが国ではポリマー製スキャフォールドをベースにした *in vitro* における研究開発が盛んに行われていて、これらはいずれ生体内での3次元的な組織再生を可能とするスキャフォールドとして、培養細胞と併せ、組織中に導入を目指している。しかし本来は脆弱な素材

であり、その多くは3次元的な組織再生の空間確保のため、体積を伴う多孔質が用いられている。これらの素材はラボでの細胞培養段階、*in vitro* においては効果が発揮されるけれども、一方で埋め込まれる組織内が、あらかじめ都合の良い空洞を用意してくれることは無い。これらポリマー製スキャフォールドが生体組織内に埋入されれば、膨満する体積が1)組織内で圧迫ストレスとなり血流障害を引き起こし、目的であるはずの「組織再生」を妨げる。また、多孔質構造内にひとたび細菌が進入すると2)莫大な細菌培養場と化し感染症を引き起こす。何より3)スキャフォールドのポリウムそのものが再生スペースの損失となる。

生体吸収性ポリマーで解決しようとする提案があるけれども、生体内における吸収は組織を破壊する細胞群が担当する。本来の目的である組織構築と逆行する作用が要求される事となり、再生治療の目的に照らして本末転倒となる。しかし、中には、ポリマー製スキャフォールドの利点を極めて有効に活かした事例がある。組織癒着防止用に開発された膜状スキャフォールドである。ポリマー製スキャフォールドの殆どが、制御されていない不均一な多孔体であるものとは一線を画し、ナノオーダーに制御された均一な多孔アレイを配列することで理想的な細胞外マトリックスを模倣し、かつ膜状で利用されることで、組織内における負荷を最小限にしている。

このような膜状スキャフォールドが現在の細胞再生医療の技術レベルを鑑みる際に有用な技術であるのは、実際に行われている再生療法が、膜状細胞シートか、ゲルに細胞を封入して細胞を組織内に導入する方法に限られるためでもある。組織内に培養細胞群を立体形状にして投入する際、早急に血管を構築して栄養供給路を確保する能力が無ければ、組織内で栄養供給に預かれる細胞群は、宿主の生活組織に隣接した数百 $\mu\text{m}$ 程度の僅かの範囲に限られ、他の細胞は死滅する。それはスキャフォールド内部が巨大な細胞壊死空間と化すことを意味する。

本開発の成果であるチタンメンブレンは、生体親和性、長期耐久性、省ポリウムという、膜状スキャフォールドにはこれまで無かった特徴を有している。膜状スキャフォールドのコンセプトは、現時点での培養細胞技術による再生治療を実用化する上、最も適切なソリューションであると言える。バイオ材料の殆どがポリマーである現状で、金属をスキャフォールドにするのは奇想天外に他ならないが、本開発の発想は、この極めて戦術的なコンセプトを発展的に応用しようとする試みから生まれたものである。

本研究の核心となる素材である、人工関節

や歯科用インプラントなどに使用されるチタン材は、失われた骨や歯の機能を受け継ぐ代替材のイメージがあった。しかし一方で骨折治療用のプレートなど、損傷した骨の原状回復の他、歯科ではインプラントの設置が困難なほどやせ衰えた顎骨に、自家骨や人工骨を移植して骨体のポリウムを増やし、インプラントの設置を可能にする骨再生誘導術(Guided Bone Regeneration: GBR)に必須となる移植骨保定器具(チタンメッシュ、チタンメンブレン)にも利用されている。これはチタンの持つ優れた生体親和性を利用したものであり、特に薄型の多孔チタン材の組織接着性が優れていることから、外傷による眼窩底破裂(吹き抜け)骨折あるいは先天性形成不全の唇顎口蓋裂など、頭部の薄い骨の損傷部に一時的に適用し、設置したチタンに沿って本来の自家骨を形成する修復治療の試みが始まっている。

純チタンは難加工製の金属材料である一方、素材加工を工夫することで生体の持つ自立回復ポテンシャルを引き出す、いわゆる生体を「癒やす」能力がクローズアップされており、その可能性をわが国の十八番である高度精密加工技術が拓くものと期待されている。

#### 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2件)

1. Ishihata H, Kanehira M, Finger WJ, Takahashi H, Tomita M, Sasaki K. Effect of two desensitizing agents on dentin permeability *in vitro*. *J Appl Oral Sci.* 25:34-41, 2017.  
doi: 10.1590/1678-77572016-0228.査読あり

2. Boreak N, Ishihata H, Shimauchi H. A photochemical method for *in vitro* evaluation of fluid flow in human dentine. *Arch Oral Biol.* 60:193-198, 2015.  
doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.09.010.査読あり

[学会発表](計4件)

1. 平成 29 年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会,2018/3/9-10,横浜  
チタン製メンブレンを用いた新規細胞培養法の開発  
向阪幸彦,丸山顕太郎,張井玉,石幡浩志,根本英二,佐々木 啓一,初澤毅,山田聡

2. 第2回生体医歯工学共同研究拠点国際シンポジウム,2017/11/9-10,東京  
Application of microperforated titanium mesh for the tissue engineered regeneration therapy  
向阪幸彦,丸山顕太郎,張井玉,石幡浩志,根

本英二,佐々木 啓一,初澤毅,山田聡

3 . 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会,2016/10/7-8,新潟

高精細微小穿孔アレイを有する骨再生用純チタン膜の効果

長谷川博,向阪幸彦,小松秀裕,丸山顕太郎,工藤聖美,金子哲治,遠藤学,山崎森里生,石幡浩志,須藤瑞樹,川股亮太

4 . 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会,2015/5/15-16,千葉

新規開発チタンメンブレンによる顎骨増生

石幡浩志,須藤瑞樹,向阪幸彦,小松秀裕,島内英俊

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石幡 浩志(Hiroshi Ishihata)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号:40261523

(2)研究分担者

兼平 正史(Masafumi Kanehira)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号:30177539

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし