

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11810

研究課題名(和文) 培養骨膜による血管誘導を応用した垂直方向への骨再生

研究課題名(英文) Vertical bone regeneration applied angiogenesis of cultured periosteal membrane

研究代表者

佐藤 秀一 (SATO, Shuichi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：50225942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病や外傷などによって、失われた歯槽骨を垂直方向に再生させることは臨床的に非常に難しい。そこで、円柱状のプラスチックキャップ(キャップ)をラット頭頂骨に設置し、キャップ内で再生する垂直方向の骨再生について観察した。そして、キャップ天井部の透過性を変え、垂直方向から骨膜によって再生因子を供給させ、垂直方向の骨再生の動態を観察した。その結果、垂直方向の骨再生では骨膜などを用いて垂直方向から再生誘導することで促進できることが明らかとなった。さらに、この再生誘導を効果的に行うためには、再生空間を適度な遮断性と透過性があるチタンメッシュなどの遮断膜を用いることが有効なこともわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病や外傷などによって、失われた歯槽骨を垂直方向に再生させることは臨床的に非常に困難である。これまでの研究からその原因として、垂直方向では骨再生に必要な血液や幹細胞などの因子が供給されないためであると考えた。そして本研究の結果、キャップ天井部からの骨膜利用が効果的なことが示された。また、遮蔽膜に適切な遮断性と透過性の両方が必要なこと、骨補填材を填入するとさらに骨再生が促進されることが解明された。本研究によって再生が困難な垂直方向の骨再生が常に十分に可能となれば、口腔内だけでなく体の外傷や骨折ならびに奇形、さらには臓器移植患者に対する再生・再建治療への応用も可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to regenerate bone vertically that the alveolar ridge loss is due to be sever periodontitis or trauma. The cylindrical plastic caps were used to observe vertical bone regeneration on rat calvarial bone. The top of cylindrical cap was removed to change barrier permeability.

Micro-CT volumetric analysis and decalcified hematoxylin and eosin-stained sections showed that GBA barrier permeability was inversely associated with the quantity of augmented bone obtained. Masson's trichrome staining showed that collagen in newly generated bony tissue was more mature in plastic caps with three holes than in those with more-permeable or more-occlusive barriers.

Bone augmentation was inhibited in specimens exhibiting invasion of soft tissue through penetrating holes, and barrier permeability was associated with the quantity of augmented bone developed. In conclusion, moderate barrier permeability is optimal for development of mature augmented bone.

研究分野：歯周病学

キーワード：骨再生 垂直方向 骨膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病や外傷などで失われた歯槽骨を垂直方向に再生させることは臨床的に非常に困難である。歯周病や腫瘍などで失われた顎骨や頭蓋骨を再建,再生させるためには再生因子(細胞,足場,増殖因子)の適時・適切な作用が必要である。そこで申請者は,再生が困難な垂直方向の骨再生を検討することを目的とし,規格化した中空スペース内における骨再生を解析するために垂直方向骨欠損モデルを作製し,各再生因子が骨再生に与える影響について検討してきた。その結果,骨髄穿通による細胞供給,適切な足場としての骨補填材,さらに,BMP,PTH,PDGF,PTHおよびメラトニンなどの成長因子の添加によって垂直方向の骨再生が促進されることを報告した。しかし,常に十分な再生骨を垂直方向に獲得することは困難であった。この理由を解明するために,自然治癒可能な小さな骨欠損および自然治癒不可能な臨界骨欠損に対して血管新生の動態を観察した。その結果,骨再生には骨膜や既存骨から新生してきた血管が伸展し,互いに吻合し覆われると欠損部が閉鎖した。しかし,自然治癒不可能な大きな骨欠損では新生血管の伸展と吻合が不十分となるため欠損部がほとんど閉鎖しなかった。また,血管新生量も自然治癒可能な骨欠損の方が多かった。そして,同様の方法を用いて垂直方向への骨再生モデルにおける骨再生時の血管新生を検討したところ,新生血管は垂直方向(組織末梢)に行くにしがたい,細くなり減少していることがわかった。したがって垂直方向の骨再生は血管の誘導方向や誘導量によって調節されていることが解明された。

### 2. 研究の目的

これまでの研究結果から申請者は垂直方向で骨再生が困難となる原因として,垂直方向では骨再生に必要な血管新生が不十分であり血液や幹細胞などの再生因子が供給されにくいと考えた。そこで,これまでの研究で使用した垂直方向の骨再生動物モデルを用いて垂直方向から血管や細胞誘導を促進させ,効果的に垂直方向で骨を再生させることに着想した。具体的には,動物モデルの再生空間におけるプラスチックキャップ(キャップ)天井部の透過性と遮断性を変化させることによって,垂直方向からの再生因子の供給を変化させ垂直方向の骨再生に与える影響について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ラット頭頂骨にキャップ天井の透過性を变化させたキャップを設置し,垂直方向からの再生因子の供給が変わるようにし,垂直方向の骨増生を放射線学的および組織学的に検討した。

#### (1) ラット GBA モデルにおける天井の透過性が骨増生に及ぼす影響

実験には,9週齢の雄性 Fisher 系ラットを20頭用いた。吸入麻酔(イソフルラン 2%)を併用して三種混合麻酔(塩酸メドミジン 0.15 mg/kg + ミタゾラム 2 mg/kg + 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg)を腹腔内投与(0.1 mg/10 g)後,塩酸リドカイン(1/80,000 エピネフリン含有 2% キシロカイン)約 0.5 ml を局所麻酔した。その後,頭頂部に矢状方向の切開を加え,頭頂骨を露出させた。生理食塩水注水下で頭頂骨矢状縫合部左右側にトレファインバー(5.0 mm)を用いて,脳硬膜に達しない深さの円形溝を形成し,溝の内側にラウンドバー(No. 2)で骨髄穿通孔を5箇所形成し,実験母地を作製した。キャップ天井の透過性を変化させるために以下の方法でキャップを改良した。天井をすべて除去し,キャップを円柱状にした開放(OP)群(透過率:100%),天井にラウンドバー(No.4)を用いて3つ孔を形成した(TH)群(透過率:30%),天井をそのまま保存した閉鎖(OC)群(透過率:0%)の3群に分けた。それぞれのキャップを接着性レジンで溝に固定し,骨膜でキャップが完全に覆われるように骨膜を慎重に縫合した後,皮膚縫合した。

エックス線学的なキャップ内の骨増生の解析は、術直後を 0 週とし、2 週ごとに実験動物用 3D マイクロ CT による画像解析を 12 週間行った。なお、撮影はラットに吸入麻酔し、マイクロ CT 撮影台上に固定し、条件下 90 kV および 100 mA で撮影した。関心領域を画像化し、i-View ソフトウェアを用いて画像を再構成した。関心領域内における増生骨量 (BV) は、骨体積計測ソフトを用いて定量的に評価した。

組織学的解析は、12 週後のマイクロ CT 撮影後、ラットを安楽死させ、頭頂骨をキャップごと摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン中で 48 時間固定し、10% ギ酸水溶液で 18 日間脱灰し、段階的エタノールを通して脱水し、次いでパラフィンに包埋した。標本はマイクロトームを用いて矢状断面 (厚さ 4 mm) に切断し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色、または、層板骨および軟組織の観察のためにマッソントリクローム (MT) 染色し増生骨を評価した。定量分析は、光学顕微鏡下で各群の HE 染色および MT 染色切片中のキャップ内組織をデジタル画像化し、画像解析ソフト ImageJ を使用し、キャップ内における増生骨量の割合および層状骨の割合を算出した。さらに、増生骨の組織切片を光学顕微鏡下で観察し、骨芽細胞数を計測した。3 群間の比較は、one-way analysis of variance (ANOVA) に続いて、Bonferroni post hoc test を用い、危険率は 5% とした。

## (2) コラーゲン膜と骨補填材の影響

ラットの頭頂骨にトレフィンバーを用いて、左右対称に 5 mm の円形溝を形成し、外周溝の内側にラウンドバー (No.2) で出血を誘発するための骨髄穿通を行い、実験母地を作製した。キャップ天井の透過性を変化させるため、天井を除去したキャップ (OP) 群と除去した天井をコラーゲン膜 (Bio-Gide®) で被覆したキャップ (BG) 群の 2 分けた。そして、両群それぞれのキャップ内に骨補填材 (Bio-Oss®) を充填し、実験母地に設置した。

エックス線学的なキャップ内の骨増生の解析は手術日を 0 週とし、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT を用いて、12 週まで撮影し、キャップ内に増生した新生骨様組織を (1) の実験と同様に、定量分析した。組織学的解析は、パラフィン包埋切片とレジン包埋切片を 12 週後に作製し観察と (1) の実験と同様の分析を行った。

## (3) チタンメッシュの影響

ラットの頭頂骨にトレフィンバーを用いて、左右対称に 5 mm の円形溝を形成し、その内側にラウンドバー (No.2) で出血を誘発するための骨髄穿通を行い、実験母地を作製した。キャップ天井の透過性を変化させるため、キャップ天井を除去し、代わりにチタンメッシュで被覆した Ti 群とした。

そして、実験 (1)、(2) と同様、キャップ内の増生骨を観察し分析した。エックス線学的なキャップ内の骨増生の解析は手術日を 0 週とし、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT を用いて、12 週まで撮影し、キャップ内に増生した新生骨様組織を (1) の実験と同様に、定量分析した。組織学的解析は、パラフィン包埋切片とレジン包埋切片を 12 週後に作製し観察と分析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラット GBA モデルにおける天井透過性が骨増生に及ぼす影響

マイクロ CT 観察の結果、3 群すべての関心領域内に増生した骨様組織の不透過性の亢進が認められた。しかし、キャップ天井の透過性を 100% にすると BV は減少した。マイクロ CT による定量分析では OP 群の BV は他の 2 群に比較して有意に減少していた (図 1)。

BV (mm <sup>3</sup> )	4-week		8-week		12-week	
OP	4.15	( 0.45 )	5.39*	( 0.40 )	5.76*#	( 0.71 )
TH	5.81	( 0.75 )	7.72	( 0.94 )	11.13	( 1.21 )
OC	6.40	( 1.01 )	10.91	( 1.11 )	11.62	( 1.42 )

( 図 1 ) OP, TH, OC 群の経時的なエックス線学的新生骨用組織形成量

組織学的解析結果から、HE 染色および MT 染色切片の組織像からキャップ天井の内面に沿って増生骨が OP 群以外の群で観察された。また、キャップ内への軟組織の侵入が OC 群を除く群で確認された。OP 群ではキャップ内への軟組織侵入が最も多く観察され、増生骨はほとんど認められなかった。MT 染色における濃赤色部の割合は TH 群で有意に多く認められた。骨芽細胞様は、OC 群および TH 群において OP 群と比較して有意に多く観察された ( 図 2 )。

	12-week					
	newly generated bone in H.E. (%)		red reaction in M.T. (%)		osteoblast (cells)	
OP	15.26*#	( 1.20 )	0.34	( 0.08 )	87.2 ± 21.4*#	
TH	25.09	( 4.07 )	0.62*	( 0.15 )	213.2 ± 20.4	
OC	25.81	( 3.02 )	0.28	( 0.08 )	224.6 ± 15.1	

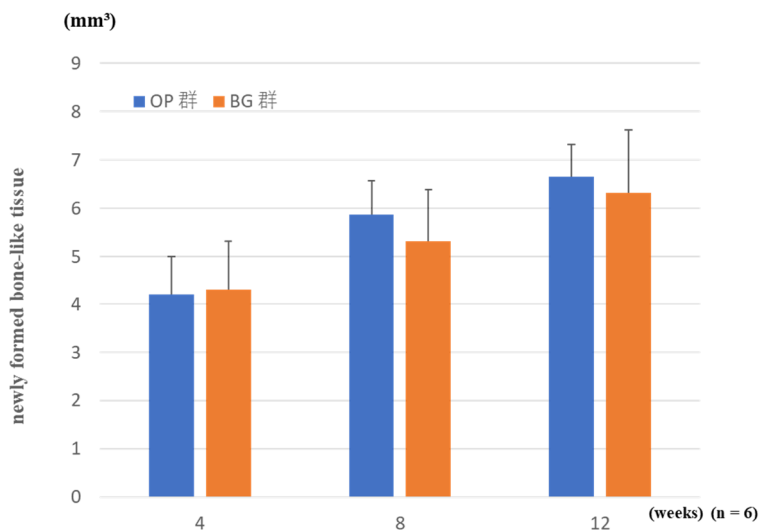
( 図 2 ) OP, TH, OC 群の 12 週後における組織学的新生骨用組織形成量

本実験の結果から、天井の透過率 100%の OP 群は、キャップ内に軟組織の侵入が増加し、BV が減少した。しかし、天井の透過率 30%の TH 群では、天井の透過率 0%の OC 群と比較し BV に有意差は認められなかったが、増生骨中の石灰化骨の割合が増加していた。

したがって、垂直方向の骨増生では遮蔽膜の透過性が高すぎると、周囲軟組織の侵入が増加し骨増生量が減少した。しかし、遮蔽膜の適度な透過性によって増生骨が増加し、石灰化が早期に亢進することが明らかとなった。つまり、垂直方向の骨増生を促進させるためには、骨増生に使用する遮蔽膜に適度な透過性が必要なことが示唆された。

## ( 2 ) コラーゲン膜と骨補填材の影響

マイクロ CT における経時的観察から BG 群および OP 群の両群で新生骨様組織の形成が認められた。新生骨様組織量において群間で有意差は認められなかった( 図 3 )。組織学的観察では、両群ともに 12 週で Bio-Oss® 周囲に新生骨形成が認められた。しかし、OP 群では BG 群と比較してキャップ上部に線維性結合組織の侵入が多く認められた。キャップ天蓋の透過性亢進により天蓋からの軟組織侵入量が増加したが、両群ともにキャップ内に新生骨形成が認められた。



(図3) BG 群および OP 群の経時的なエックス線学的新生骨様組織形成量

### (3) チタンメッシュの影響

Ti 群ではメンブレン直下に軟組織侵入が認められたが、キャップ内で骨再生や血管新生が確認された。つまり、Ti 群では軟組織侵入の一部は再生空間に侵入するが、微小血流循環の獲得が促進される可能性が示唆された。

本研究結果から、キャップ天井部を除去し、キャップ天井部の透過性を増加させると骨膜から再生因子が誘導されるようになり、垂直方向の骨再生が促進することがわかった。つぎに、キャップ天井部に透過性と再生空間の遮断性を有するチタンメッシュおよびコラーゲン膜を設置し、垂直方向の骨再生を確認した。すると、チタンメッシュやコラーゲン膜は垂直方向の骨再生に有効なことが解明された。これは、キャップ天井の透過性が増加し、さらに、再生空間の遮断性が適切に保持されたことで、垂直方向の骨膜から再生因子が誘導され、垂直方向の骨再生が増加したためと考えられた。また、キャップ内に骨補填材などの足場を填入すると骨再生はさらに促進した。つまり、適度な遮断性と透過性を有するメッシュやコラーゲン膜によって再生空間が保持され、垂直方向で骨膜から適切に再生因子が供給されると垂直方向の骨再生が促進されることがわかった。

したがって、垂直方向の骨再生は垂直方向の骨膜から再生誘導することによって促進できることが明らかとなった。さらに、骨膜を用いた効果的な再生誘導には再生空間を適切に保持し、適度に透過性があるチタンメッシュやコラーゲン膜などの遮断膜を垂直方向で用いることが効果的な可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasuike A, Ujiie H, Senoo M, Furuhashi M, Kishida M, Akutagawa H, Sato S	4. 巻 33
2. 論文標題 Pedicle periosteum as a barrier for guided bone regeneration in the rabbit frontal bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 in vivo	6. 最初と最後の頁 717-722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11530	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 久保田達也, 蓮池 聡, 津徳亮成, 小澤康正, 山本崇伸, 築根直哉, 佐藤秀一	4. 巻 133
2. 論文標題 骨粗鬆症の骨増生への影響と治療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 歯界展望	6. 最初と最後の頁 429 - 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugawara A, Fujikawa K, Sato S	4. 巻 27
2. 論文標題 Evaluation of biphasic calcium phosphate cement in rat calvarial model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 109-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.27.109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto T, Hasuike A, Koshi R, Ozawa Y, Ozaki M, Kubota T, Sato S	4. 巻 60
2. 論文標題 Influences of mechanical barrier permeability on guided bone augmentation in the rat calvarium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 453 - 459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.17-0362	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sato S, Ozawa Y, Kubota T, Ujiie H, Ando K, Hasuike A
2. 発表標題 Collagen membrane as GBR material in rat vertical augmentation model
3. 学会等名 106th American Academy of Periodontology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ozawa Y, Gojobori T, Ota H, Hasuike A, Suguro H, Nishida T, Kishida O, Saito Y, Asanmo M, Sato S
2. 発表標題 Combination of functional water with hydroxyapatite / collagen composite accelerate bone regeneration
3. 学会等名 106th American Academy of Periodontology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤康正, 蓮池聡, 久保田達也, 山本崇伸, 渡辺典久, 岸田衛, 氏家久, 増田晴美, 奥野健二, 佐藤秀一
2. 発表標題 ラットGBAモデルにおけるキャップ天蓋の透過性が骨増生に及ぼす影響 コラーゲン膜とBio-Ossの影響
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田達也, 蓮池聡, 津徳亮成, 小澤康正, 山本崇伸, 築根直哉, 好士亮介, 高山忠裕, 西田哲也, 吉沼直人, 菅野直之, 佐藤秀一
2. 発表標題 卵巣摘出ラットにおける骨増生へのPTH(1 - 34)の間歇的投与の影響
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takanobu Yamamoto, Akira Hasuike, Manami Ozaki, Yasumasa Ozawa, Tatsuya Kubota, Naoya Tsukune, Norihisa Watanabe, Ryosuke Koshi, Eiji Goke, Shuichi Sato
2. 発表標題 Influences of mechanical barrier permeability on guided bone augmentation in rat calvarium.
3. 学会等名 American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------