

令和 3 年 5 月 28 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：17K11811

研究課題名（和文）骨増生に最適な硬度を付与した多孔性三次元配向性コラーゲンマテリアルの開発

研究課題名（英文）Development of porous three-dimensional oriented collagen material with optimum hardness for bone growth

研究代表者

池田 貴之（IKEDA, Takayuki）

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：30366603

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：コラーゲンシームレスチューブとコラーゲンシートを組み合わせた円柱状の三次元配向性コラーゲンマテリアルを製作した。この担体の細胞接着は対照群よりも高い値を示した。ALP活性においては総数では高い値を示すが、細胞単位では対照群と同程度となった。ラット大腿骨に製作した担体を垂直に埋入した。埋入後大腿骨を摘出し非脱灰切片としVillanuevaGoldner(VG)染色を行った。染色結果から対照群と比較し骨断面が広いため皮質骨の厚さは薄くなるが骨量自体は増加しており、骨梁の伸展も広く長く認められた。製作した三次元配向性コラーゲンマテリアルの骨増生能から、骨増生に有用な材料であるため、特許申請を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3次元配向性コラーゲンマテリアルは医科では実験的に用いられているが、歯科で応用されたという事例は無い。開発した3次元配向性コラーゲンマテリアルは生体に多く含まれるコラーゲンのみで構成されているため、生体に対する為害性が少なく、この担体を用いて随意方向への歯槽骨再生を可能にすることは学術的な意義が高い。さらに、この技術の成就是、コラーゲンのみで構成されているため安価であり、他の骨増生担体と比較して扱いやすい形状をしているため、術者を選ばずに安全に骨増生を可能にする。インプラントの適用範囲の拡大や予後の向上につながり、患者のQOLを向上させることができることから社会的な意義も大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：A columnar three-dimensional oriented collagen material was produced by combining a collagen seamless tube and a collagen sheet. The cell attachment of this carrier showed a higher value than that of the control group. The total number of ALP activities was high, but the cell unit was similar to that of the control group. The prepared carrier was vertically implanted in the rat femur. After implantation, the femur was removed and used as a non-decalcified section, which was stained with Villanueva Goldner (VG). From the staining results, the bone cross section was wider than that of the control group, so the thickness of the cortical bone became thinner, but the bone mass itself increased, and the extension of the trabecula was widely observed for a long time. A patent application was filed because it is a useful material for bone growth due to the bone growth ability of the produced three-dimensional oriented collagen material.

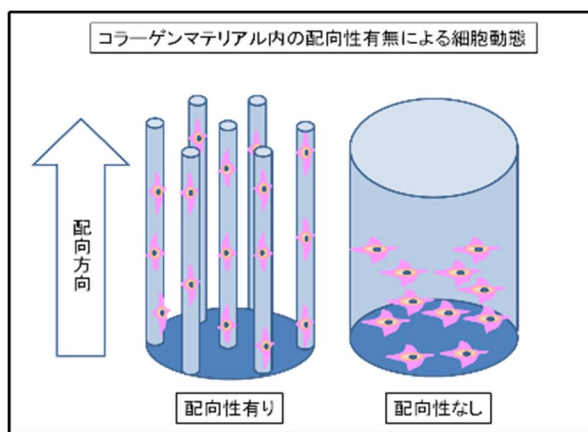
研究分野：歯科補綴学

キーワード：三次元配向性コラーゲン 骨増生担体 骨増生

1. 研究開始当初の背景

自家骨移植は医学における組織移植において最も歴史が古く本世紀初頭に、すでに臨床応用されていた。自家骨の抗原性の低さや骨誘導能による高い成功率が、歯科における自家歯槽骨移植が早くから行われてきた理由である。しかし、自家骨移植には補填する骨採取による外科的侵襲が大きいことと、適用範囲も限られる欠点があることから、自家骨に変わる多くの人工骨(人工材料)が研究、開発され臨床に应用されてきた。現在臨床に应用されている人工骨の形態は顆粒状のため成型性に乏しく、メンブレン等を併用しなければならない。一方で、メンブレンのみを用いる組織再生誘導法は、欧米において1986年から臨床応用されているが、外科的手技が複雑になるうえ自家骨と同様の骨量を再生することは困難である。自家骨、人工骨およびメンブレンを併用する手法もさらに外科手技が複雑になることから、多くの経験や修練を持つ専門医のみによって行われている。したがって、安全かつ確実なインプラント治療を普及させるには、より簡便で確実な増骨法の開発が望まれる。現在、抜歯創保護剤として使用されているテルプラグなどのコラーゲンマテリアルは、すでに、臨床応用された安全な材料であるが、強度が弱いいため既存の残存骨を越える増骨が困難である。従って、増骨を目的とした再生医療には応用されていない。

組織工学において細胞の担体として最も汎用されている生体材料としてコラーゲンが挙げられる。コラーゲンは細胞の挙動を支配する中心的な役割を担っている細胞外基質として広く研究されているが、前述したように、架橋(強度)が弱いことから、歯槽骨再生における増骨のための担体としては適正ではなかった。米国スタンフォード大学化学工学部のG.Fuller教授らのグループは、細胞外基質の分子構造、形態、配向性が細胞の接着、成長等に影響を与え、ひいては組織全体の物理的特性、機能にも影響を与えることから、配向性を自由に設計できるコラーゲンマテリアルの研究開発を行ってきた。従来、配向性を付与する方法として磁場を利用する方法等が研究されていたが、商業ベースでの生産までにはいたらなかった。しかし、近年3次元配向性コラーゲンマテリアルを設計、作製する技術としてコラーゲン線維にてコラーゲンシートを作製し、これを積層することで3次元配向性を付与する技術の開発に成功した。この配向性コラーゲンは50μmのコラーゲンシートを積層することから、従来のコラーゲンマテリアルよりも架橋が強く、強度も向上した。すでに、この技術を応用し、3次元配向性コラーゲンシートをチューブ状に成型することで血管やリンパ管の再生、シートの配向性を同心円状にすることで角膜の再生等、多くの医科分野において動物実験が始められている¹⁾。しかし、歯科での応用は無いことから、前述理由を元に、歯科領域でこそ、この担体の有効性を発揮できると考えて、スタンフォード開発グループと協力しながら、歯科での応用を検討することが必要と考えた。



2. 研究の目的

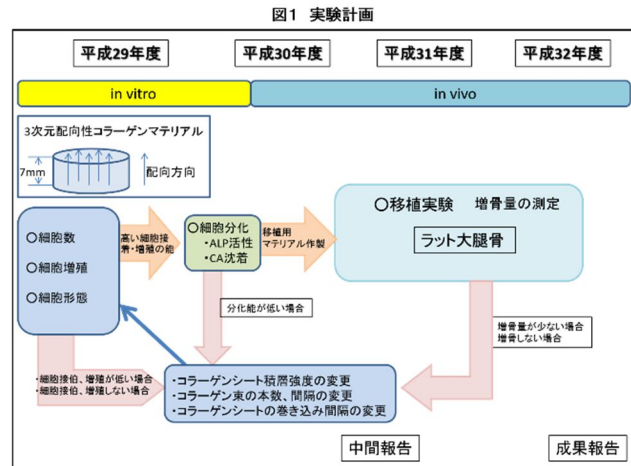
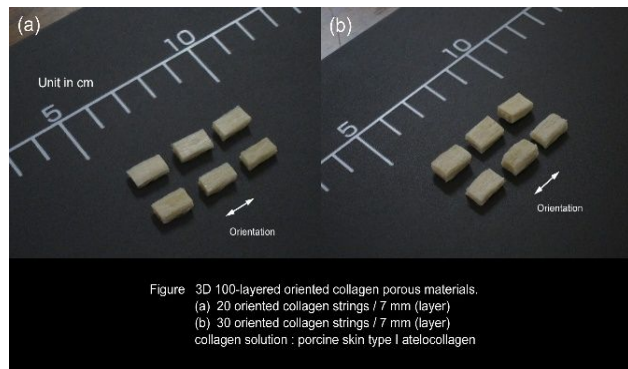
長期的に予後良好な歯科インプラント治療を追求するために簡便で確実な歯槽骨の増骨法が求められている。そのために、これまで研究開発した細胞の配列を誘導する担体(配向性コラーゲンマテリアル)を積層することで作製した三次元配向性コラーゲンマテリアルは、in vitro においては配向性を持たないコラーゲンマテリアルよりも多くの細胞を接着させ in vivo においては既存骨から垂直方向に延びる類骨状の硬組織をCT画像で確認することができた。この結果は、増骨材料としての可能性を示唆したと考えられる。しかしながら、コラーゲン束の幅径やコラーゲン束間の距離および積層する際の接着強度により担体強度が大きく変化するため、実験結果が安定しなかった。そこで、この課題では安定した骨増生に最適なコラーゲン配向性担体を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

ラット骨髄由来骨芽細胞を使用し、初期接着細胞数をWST-を用いて測定する。コラーゲン内での細胞分化についてALP活性を測定する。動物実験は3次元配向性コラーゲンマテリアルをラット大腿骨に欠損部位を作製し、欠損部にコラーゲン担体を移植する。治癒後大腿骨を摘出しVillanueva Goldner(VG)染色を行い観察する。

(1) 3次元配向性コラーゲンマテリアル

配向性を付与したコラーゲン線維で形成されたシートを積層することで3次元的な形態が構築できる。コラーゲンシートのコラーゲン線維の数、コラーゲン線維の幅径を変更することで空間密度を変更できる。初年度はこれまで研究成果からコラーゲン線維幅径 0.1mm コラーゲン線維数 20本のシートを積層し、厚さ 7mm、直径 10mm の立方体に成型したコラーゲンマテリアルを作製する。コラーゲンシート積層時の接着強度を密にしたものと、疎にしたものの2種類を作製する。また、移植用コラーゲンマテリアルとしてコラーゲン線維間の間隔を線維数 20本と同様にした一枚のコラーゲンシートをコラーゲンチューブに巻き込んで作製した厚さ 7mm の円柱状コラーゲンマテリアルも同時に作製する。積層はコラーゲン間隔を一定に保ち正確な形態を付与することが可能であるが、積層の接着強度（密および疎）により強度が異なり、積層部位から剥離しやすい特性がある。一方コラーゲンシートを巻き込んだ場合、シートが一枚であるため、コラーゲン間隔を正確に設定することが難しいが、剥離する可能性を少なくすることが可能となる。コラーゲン束の配向は垂直方向（増骨のために）に付与する（図1）。



(2) ラット骨髄由来間葉系幹細胞

細胞はラット骨髄由来間葉系幹細胞を8週齢の雄 Sprague-Dawley ラットから採取する。細胞採取後4日目までに100mmセルカルチャーディッシュに付着した細胞のみを分離、継代を行う。培養7日目までの細胞を使用する。セルカルチャーディッシュに播種する細胞濃度は 3×10^4 個/cm²とする。また全ての実験の比較対照群としてテルプラグを用いる。

(3) 初期接着細胞数

上記の配向性コラーゲンマテリアルにおいて最も細胞を接着させやすいマテリアルを選択するために、コラーゲン設置後、24時間細胞を培養し、担体を別のセルカルチャーディッシュに移動させ WST-8(Roche Applied Science)を用い吸光度計(ELISA)にて測定。さらに、その担体を EDTA-4Na にて処理し、を血球計算盤にて細胞数を測定する。

(4) 細胞増殖

マテリアル設置後、培養2日目および4日目に、マテリアルを別のセルカルチャーディッシュに移動させ BrdU(Roche Applied Science)を投与。投与後、吸光度計(ELISA)にて測定する。

(5) ALP 活性

マテリアル設置後、10日間培養し ALP 陽性細胞を 0.9mM naphthol AS-MX と 1.8mM fast red TR にて染色後、マテリアルを円柱の正中で縦断し縦断面の染色面積を測定する。さらに、ALP 活性の定量を p-nitrophenyl-phosphate (LabAssay ATP, Wako Pure Chemicals) を用いて行う。

(6) 埋入

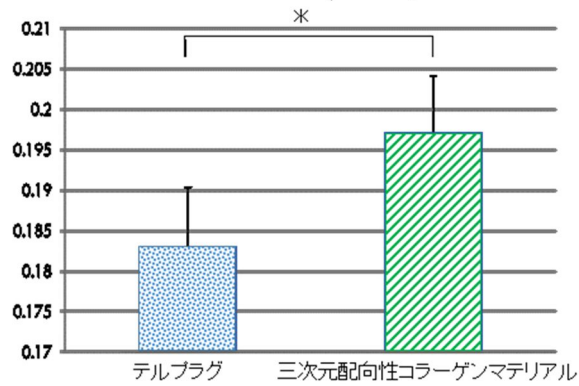
ラット大腿骨に直径 2.7mm 深さ 2mm の骨欠損を膝蓋骨から約 10mm の部位に作製し、欠損部位に膨張時の直径 3mm 高さ 4mm の移植用 3次元配向性コラーゲンを移植する。移植後3ヶ月後に摘出し、非脱灰切片を製作し Villanueva Goldner(VG)を行う。

4. 研究成果

(1) 初期細胞接着

三次元配向性コラーゲン担体は配向性を持たないコラーゲンマテリアル(テルプラグ)よりも初期細胞接着が約 2 倍多く有意であった。初期細胞接着はその後の細胞増殖および細胞分化に重要な因子であり細胞増殖率を考えた場合、細胞増殖率は低くなるが始めから細胞数が多いため早期に細胞分化に移行することが出来る。これは、骨増生を目的とした担体にとって骨増殖を早期に獲得できる有益な因子と言える。

Attached cells(WST-8)

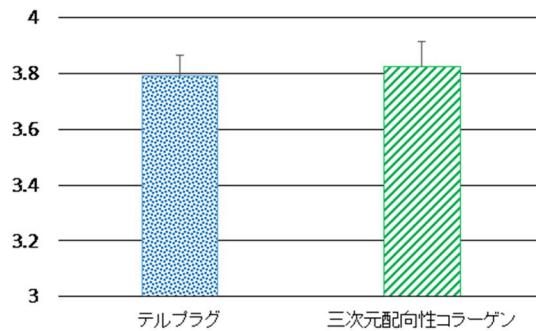


(2) 細胞増殖

細胞増殖はテルプラグと三次元配向性コラーゲンマテリアルに有意な差は認めなかった。

BrdU は DNA 複製中にチミジンに置き換わるため、BrdU が細胞に取り込まれるということはその細胞は活発に DNA の複製を行っている、つまり増殖していると言える。一定数の細胞数に達した場合細胞増殖は同程度になると考えられ、この結果から三次元配向性コラーゲンマテリアルは細胞増殖に影響を与えないことが分かる。

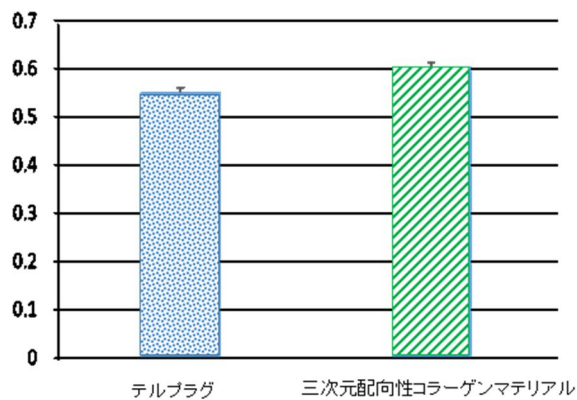
Cell proliferation (BrdU incorporation/cell)



(3) ALP 活性

ALP 活性はテルプラグと三次元配向性コラーゲンマテリアルに有意な差は認めなかった。ALP は、リン酸エステルを無機リンとアルコールに分解する酵素で、ALP 活性の測定は p-ニトロフェニルリン酸を基質としてアルカリホスファターゼによって生成される p-ニトロフェノール量を測定することにより、アルカリホスファターゼ活性を測定する。ALP 活性は骨形成もしくは骨代謝マーカーと呼ばれ、骨芽細胞の活性時に高くなるため、細胞分化のマーカーでもある。図は ALP 活性/細胞数であるため、細胞自体の ALP 活性に三次元コラーゲン担体は影響

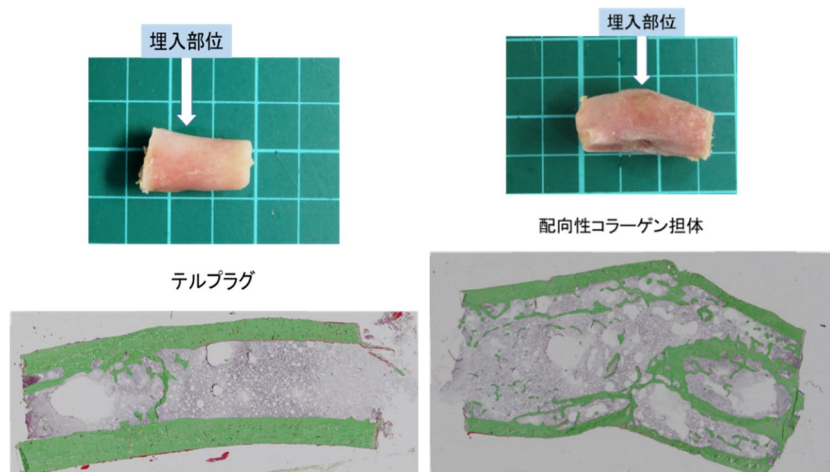
ALP activity / cell



を与えないことがわかる。しかしながら、三次元コラーゲン担体の初期細胞接着数が多いことから担体全体での ALP 活性はテルプラグよりも高いと言える。

(4) 埋入

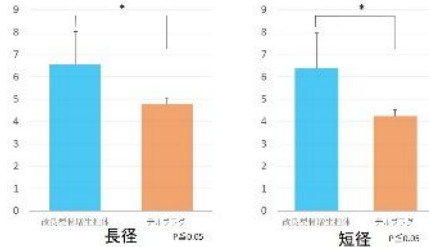
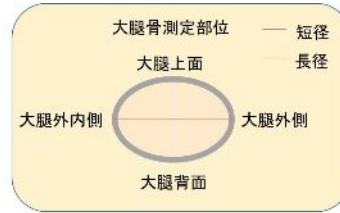
三次元配向性コラーゲンマテリアルを移植した大腿骨を非脱灰切片とし Villanueva Goldner(VG) を行った。三次元配向性コラーゲンマテリアルを移植された大腿骨は埋入方向に膨隆し大腿骨全体の長径、短径が増加しており、内部に緑色で示す石灰化骨を多く含むことが明らかである。海綿骨



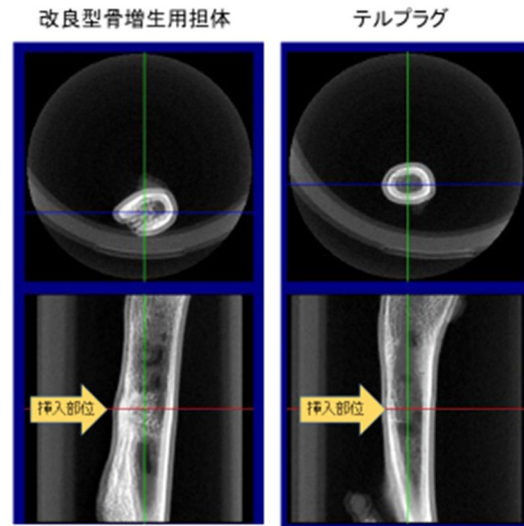
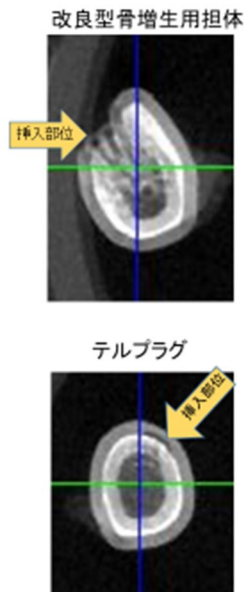
周囲の皮質骨の厚みは減少しているように見えるが骨量全体が増加しているためこのまま経過を追うことで表面の皮質骨量も増加すると考えられる。また、赤色で示される類骨も少ないことから、骨質も良好であることがうかがえる。

さらに、最終的に構築した形状の配向性コラーゲンマテリアルを埋入した結果においても長径、短径ともテルプラグよりも大きく、有意であることが判明した。

CT画像において骨に置換する前の担体の形態および、挿入部位から大腿骨中央にかけて海綿骨様の不透過像がみとめられ、皮質骨も厚いことが判明した。また、挿入方向に骨を延長させていることが判明した。一方比較群(テルプラグ)は、挿入部位が治癒しているが全体的に小さく、皮質骨も薄かった。



	長径	短径
改良型骨増生用担体	6.544444	6.377778
テルプラグ	4.777778	4.244444



CT画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. IKEDA, T. NARITA, Y. SHIODA, Y. ISOBE, M. YAMAGUCHI, M. HONDA
2. 発表標題 In vitro effect of Cylindrical 3D oriented collagen scaffold
3. 学会等名 第47回 AADR（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨増生用担体	発明者 池田貴之、本田雅規、磯部仁博、佐久太郎、磯部峻興	権利者 日本大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-074322	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究成果について第2回ファーマラボEXPO、医薬品研究・開発展（2020年11月25日～11月27日、幕張メッセ）にて発表を行った。
--

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
研究分担者	塩田 洋平 (SHIODA Youhei) (00508624)	日本大学・歯学部・専修医 (32665)	削除済み

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	成田 達哉 (NARITA Tatuya) (50508629)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	削除済み
研究分担者	本田 雅規 (HONDA Masaki) (70361623)	愛知学院大学・歯学部・教授 (33902)	

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