

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17122

研究課題名(和文)細胞制御機能性メンブレンの新規開発

研究課題名(英文)New development of the cell control functional membrane

研究代表者

沖 佳史(Oki, Yoshifumi)

広島大学・医系科学研究科(歯)・助教

研究者番号：80806571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：チタン薄膜は骨誘導再生術に頻用されるが、チタンは骨誘導能を持たない。従って、様々な表面改質がチタン薄膜に対して適用されている。そこで本研究ではチタン薄膜の生体活性効果について検討した。In vitroでの検討として、純チタン薄膜(コントロール群)を用意し、60℃の5N NaOHで24時間処理した(アルカリ処理群)。試料を擬似体液に浸漬し、表面構造の観察を行った。In vivoでの検討として、ラット頭蓋骨に骨欠損(直径6mm)を形成し、試料にて被覆、もしくは未被覆とし、4週間後に組織標本作製し、組織形態計測を行った。その結果、アルカリ処理群は高いアパタイト形成能および骨形成能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のような生体活性を持つチタンメンブレンは、チタンメンブレンの持つ高い機械的強度のため、広範囲における骨欠損において高い空間保持能を持つ。また、チタンに対しては多くの表面処理が検討されており、申請者の先行研究においても、チタン薄膜構造体に対するアルカリ処理は骨形成を促進することが明らかになっている。これらのことから、本研究で開発されたチタンメンブレンは、骨再生療法に用いる生体材料として有用であることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Titanium membrane is often used for guided bone regeneration, but titanium has no osteoinductive ability. Therefore, various modification methods have been applied to modify titanium. The Purpose of this study was to evaluate the bioactive effect of titanium membrane. Titanium membranes were washed with acetone and distilled water (Control group). Then, the membranes were soaked in 5 N NaOH solution at 60 °C for 24 h (Alkali group). The samples were soaked in simulated body fluid. Deposition object was observed, and the compositions were analyzed. In vivo experiment, the critical-sized bone defect was prepared in calvaria of male Sprague-Dawley rat, and covered with alkali treated and control membrane, or without membrane. Tissue blocks were harvested at 4 weeks later, and bone tissue area ratio and bone membrane contact ratio were measured. Alkali treated titanium membranes exhibited a high apatite-forming ability and high bone forming ability.

研究分野：骨再生

キーワード：骨再生 チタンメンブレン アルカリ処理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨欠損部の骨再生は周囲骨から未分化幹細胞が凝集し骨芽細胞へ分化することで骨組織の形成が起こり、また血管新生により栄養供給が行われる。その際、骨を取り囲む軟組織(特に結合組織や上皮組織)の形成は骨形成に対して早く起こり、先に欠損部に軟組織細胞の侵入が生じると骨再生が妨げられる。そのため、より確実な早期の骨治癒を得るため、骨再生の空間保持のため軟組織と骨欠損部の界面に遮断メンブレンを設置する骨組織再生誘導療法が適応される。現在、臨床では広範囲における骨欠損において、高い空間保持能を持つチタンメッシュメンブレンが用いられている。一般的に哺乳類細胞の核の大きさは10 μm以上、赤血球径は7~8 μmである。しかしながら、現在報告されているチタンメッシュメンブレンは、最小のメッシュ径のものでもその大きさは20 μmであり、細胞核より大きいことから骨欠損内に軟組織細胞の侵入を許してしまうことが懸念される。また、チタンの表面処理による骨成長因子や骨芽細胞の活性化については多くの報告があり、インプラント体にも適応されている。申請者らも、チタン薄膜構造体に対する生体活性処理の検討を行い、その有用性について報告している。これらのことから、申請者は、骨欠損部において確実な早期の骨再生を導く細胞制御機能を有する新規メンブレン開発を着想した。

2. 研究の目的

確実な骨再生を可能とする「細胞制御機能性メンブレン」を製作し、その有用性について材料特性評価、疑似体液浸漬後のアパタイト形成能および動物実験にて検討し、明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験1: 純チタン薄膜(厚径: 20 μm)に10 μmのマイクロプレス加工処理を行ったメンブレンを準備し、酸処理群: 66.3% H₂SO₄と10.6% HClの混酸, 1 h, 60 °C 処理, およびアルカリ処理群: 5N NaOH, 24 h, 60 °C 処理, および未処理群:(control: 洗浄のみ)の試料を準備した。各試料の材料特性の評価として、走査型電子顕微鏡による表面構造の観察、接触角の測定によるぬれ性の評価、腐食深度測定、また力学的評価として引っ張り試験を行った。

実験2: 未処理群およびアルカリ処理群を疑似体液(SBF)に浸漬し、析出構造体の観察、電子線マイクロアナライザーを用いた元素分析、および浸漬前後の重量変化率測定によりアパタイト形成促進の評価を行った。

*In vivo*において、雄性SDラット(8週齢21頭)の頭蓋骨に骨欠損(直径6 mm)を形成し、チタン薄膜(アルカリ処理, 未処理)にて被覆、もしくは未被覆とし、縫合した。4週間後、組織学的観察および骨新生率および骨薄膜接触率を測定した。

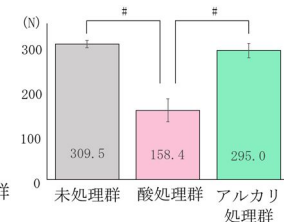
4. 研究成果

実験1の結果、アルカリ処理群では微細な網目状構造が観察され、超親水性を示した。また酸処理群は、薄膜の腐食が大きく、引っ張り試験にて有意に低い値を示したが、アルカリ処理群では未処理群との差は少なかった(表1, 図1)。

薄膜厚径 (μm) (SD)	
未処理群	20.0 ± 0.75
酸処理群	15.1 ± 0.64 #
アルカリ処理群	19.7 ± 0.46

#: P < 0.05 (n=8); vs 酸処理群

表1. 腐食の評価



#: P < 0.05 (n=6); vs 酸処理群

図1. 力学的評価

実験2の結果から SBF 浸漬後、アルカリ処理群では未処理群と比較し、成熟したアパタイト様析出物が観察された。元素分析測定結果ではCaおよびPの構成比率が両群で上昇していた(表2)。重量変化率では、アルカリ処理群が有意に高い値を示した(図2)。組織学的観察では、チタン薄膜に沿って骨伝導が観察された。アルカリ処理群では、欠損部中央部においても骨組織が新生され、骨新生率および骨薄膜接触率は高い値を示した(表3)。

	日数	元素 (wt. %)				
		C	O	Ti	Ca	P
未処理群	0 日目	0.26	5.91	93.80	-	-
	7 日目	0.64	35.02	54.27	4.52	4.36
	14 日目	0.65	42.78	40.44	7.52	7.09
	21 日目	0.44	43.13	32.40	11.01	10.28
アルカリ処理群	0 日目	2.58	23.65	73.69	0.08	-
	7 日目	0.54	42.17	36.13	9.46	8.24
	14 日目	0.71	43.94	32.75	10.27	8.83
	21 日目	1.41	38.62	38.82	9.37	8.01

表2. EPMAによる析出構造体の元素分析

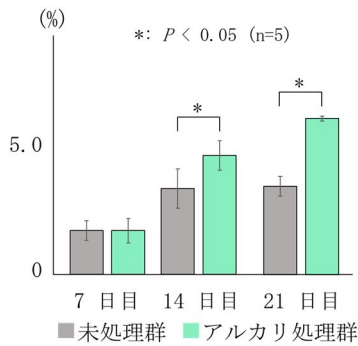


図 2 . 重量変化率

	骨新生率 (%)		骨薄膜接触率 (%)	
	全体部	中央部	全体部	中央部
未処理被覆群	35.1±20.6**	21.4±21.4*	21.6±12.1	8.0±13.7
アルカリ処理被覆群	37.9±13.0**	33.1±17.1**	42.5±28.8	41.1±29.3*
未被覆群	11.7±4.6	1.5±2.6	*: $P < 0.05$ (n=7); vs 未処理被覆群	

*: $P < 0.05$ (n=7); vs 未被覆群
 **: $P < 0.01$ (n=7); vs 未被覆群

表 3 . 骨新生率および骨薄膜接触率

実験 1 および実験 2 の結果より, アルカリ処理はチタン薄膜の機械的強度に影響することなく表面改質が可能であった。また, SBF 中でのアパタイト形成促進および in vivo での骨形成促進作用を示した。

以上より, GBR に用いる生体材料としてアルカリ処理を行ったチタン薄膜は有用となりうるということが明らかとなった。

(本学動物実験倫理委員会承認 : A18-1-00)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Hanako Umehara, Kazuya Doi *, Reiko Kobatake, Yoshifumi Oki, Yusuke Makihara, Takayasu Kubo, Kazuhiro Tsuga	4. 巻 8
2. 論文標題 Histological and Bone Morphometric Evaluation of Osseointegration Aspects by Alkali Hydrothermally-Treated Implants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app8040635	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 Hanako Umehara, Kazuya Doi, Yoshifumi Oki, Reiko Kobatake, Yusuke Makihara, Takayasu Kubo, Kazuhiro Tsuga.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a novel bioactive titanium membrane with alkali treatment for bone regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dental materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） -	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 Hanako Umehara, Kazuya Doi, Reiko Kobatake, Yoshifumi Oki, Yusuke Makihara, Takayasu Kubo, Kazuhiro Tsuga.	4. 巻 51
2. 論文標題 Effect of Autoclave heat sterilization on the surface properties of the sodium titanate hydrogel layer on the alkali-treated titanium membrane	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 廣大歯誌	6. 最初と最後の頁 85-90
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 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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土井一矢, 久保隆靖, 小島玲子, 沖 佳史, 梅原華子, 牧原勇介, 津賀一弘
2. 発表標題 新規生体活性チタンメンブレンの材料特性および生体活性の検討
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅原華子, 土井一矢, 小島玲子, 久保隆靖, 津賀一弘
2. 発表標題 生体活性チタンメンブレンのアパタイト形成についての様相
3. 学会等名 第72回秋期日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅原華子, 久保隆靖, 土井一矢, 小島玲子, 沖佳史, 津賀一弘
2. 発表標題 アルカリ処理チタン薄膜の表面性状およびアパタイト形成能の検討
3. 学会等名 第38回公益社団法人日本口腔インプラント学会中国・四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅原華子, 久保隆靖, 土井一矢, 小島玲子, 沖佳史, 牧原勇介, 津賀一弘
2. 発表標題 骨形成を促進する生体活性チタン薄膜の開発
3. 学会等名 第49回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hanako Umehara, Kazuya Doi, Reiko Kobatake, Yusuke Makihara, Yoshifumi Oki, Takayasu Kubo, Kazuhiro Tsuga.
2. 発表標題 Novel bioactive titanium membrane for bone regeneration; effect of alkali treatment.
3. 学会等名 European Association for Osseointegration 28th Annual Scientific Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hanako Umehara, Kazuya Doi, Reiko Kobatake, Yoshifumi Oki, Yusuke Makihara, Takayasu Kubo, Kazuhiro Tsuga.
2. 発表標題 The bioactive effect of alkali treated titanium membrane.
3. 学会等名 DENTISPHERE 4-International Scientific Meeting, 5th Asean plus, Tokushima joint international conference
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----