

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21088

研究課題名（和文）バイオチタンメッシュメンブレンの開発

研究課題名（英文）the development of bioactive titanium membrane

研究代表者

梅原 華子（Umehara, Hanako）

広島大学・病院（歯）・助教

研究者番号：60911253

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：低結晶性Ca-Pメンブレンが低Ca環境下においてはCaイオンを徐放し，高Ca環境下ではCaのリザーバーとなること，また細胞増殖において，生体活性メンブレンと同等の効果が得られることを明らかにした。またSDラット生体内における骨再生優位性の検討を行ったところ，骨再生量に有意な差を認めなかった。骨欠損部中央における骨新生の有無を比較すると，未処理のメンブレンに比べ骨新生が認められる数が多かった。低結晶性Ca-Pは，低Ca環境下で血清中への溶出が早いことが利点と考えられるが，健常モデルの動物においては，Caのリザーバーとして働き，有意差が得られなかったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低結晶性Ca-Pメンブレンが低Ca環境下においてはCaイオンを徐放し，高Ca環境下ではCaのリザーバーとなること，また骨芽細胞様細胞の細胞増殖を阻害しないことを明らかにした。健常モデルにおいては骨再生への優位性は認めなかったが，低Ca環境下においては，治癒初期の一時的Ca濃度の上昇により骨形成能が改善される見込みがあると考えられる。従って，低Ca状態や骨密度が低下した状況に用いる生体材料としての可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The low-crystallinity Ca-P membrane was found to release Ca ions in a low-Ca environment and to act as a Ca reservoir in a high-Ca environment, and to be as effective as bioactive membranes in cell proliferation. In addition, the study of the bone regeneration using SD rats showed no significant difference in the amount of bone regeneration between control membrane and low-crystallinity Ca-P membrane. The number of osteogenesis in the center of bone defects was higher than that of control membranes. Low-crystalline Ca-P may have an advantage in that it is rapidly leached into serum under low-Ca conditions, but in healthy animal models, it may act as a Ca reservoir and no significant differences were observed in this study.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨再生 歯科用インプラント GBR

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯の欠損により顎骨吸収が生じて骨量が不足する際、骨誘導再生療法としてバリアメンブレンテクニックが適応される。このメンブレンには欠損腔の骨再生のための空間保持や骨形成を阻害する上皮系細胞の侵入阻止などの機能が要求されるが、未だ十分な機能を有するメンブレンは無い。申請者はこれまでに水酸化Naを用いたアルカリ処理法がチタン薄膜構造体の強度を減少させることなく、材料表面に生体活性作用を持つ超親水性網目状酸化膜を構築し、骨伝導による骨形成を促進することを明らかにしてきた。また、この生体活性チタン薄膜は疑似体液(SBF)中で低結晶性のCa-P構造体を析出させる。Ca-P化合物は、生体内でイオンとして溶出され、細胞接着因子の発現、骨芽細胞の増殖、骨芽細胞分化の促進作用等を発揮し、骨形成に適した骨代謝機転とすることが報告されている。そこで生体活性チタン薄膜表面にCa-P化合物を析出させた新規メンブレンは、表層に存在するCaイオンの早期溶出による、骨形成に適した骨代謝機転、および親水性網目状酸化膜の生体活性作用による骨伝導促進により、骨形成をより確実とすることが期待できると考えた。

これらを実証することで「骨誘導および骨伝導促進機能を持つバイオチタンメンブレンを用いた骨誘導再生療法の確立」を目指す

### 2. 研究の目的

本研究の目的は生体活性チタン薄膜の表面に低結晶性Ca-P構造体を形成した、骨誘導および骨伝導促進機能を持つバリアメンブレンの新規開発である。本素材はチタン表面に超親水性網目状酸化膜層を、さらに上層に低結晶性Ca-P析出層を構築している。骨欠損部において、表層のCaイオンが早期に溶出することで骨誘導促進による骨形成に適した骨代謝機転とし、イオン溶出後に露出する生体活性作用を持つ酸化膜上での骨伝導促進が生じることで、骨粗鬆症など骨再生に不利な場合において、確実な骨再生を達成することを狙っている。

またバリアメンブレンとしては、骨形成を妨げる上皮組織の遮断および血管からの栄養供給が重要となる。そこで申請者はマイクロプレス加工を用いることで、上皮細胞の侵入を防ぎ、かつ赤血球の通過に適した約15 $\mu$ m径のマイクロメッシュ孔を付与したチタン多孔膜を着想し、開発に携わってきた。これらの技術を統合させることで、生体不活性材であるチタンへの骨誘導および骨伝導作用の付与、確実な上皮細胞の遮断と栄養供給の確保といった選択的な細胞制御機能、これらを併せ持つ新規性の高いバリアメンブレンの開発につながると考えた。

### 3. 研究の方法

厚さ20 $\mu$ m、孔径15 $\mu$ mのチタンメッシュメンブレンを、5N水酸化Na水溶液中にて振盪(60 $^{\circ}$ C, 24h)し、表面に網目状酸化膜を形成させた(生体活性メンブレン)。その後Hank's平衡塩溶液に14日間浸漬し、Ca-P構造体の析出したバイオチタンメッシュメンブレン(SBFメンブレン)を作製した。作製したメンブレンに対して、SEMによる表面正常の評価、生理食塩水および培養液(MEM $\alpha$ )中でのCa溶出量の測定を行った。また、メンブレン上に骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を播種し、細胞増殖能を評価した。また、雄性Sprague-Dawley(SD)ラット(8週齢)を用いて、ラット頭蓋骨に骨欠損(直径6mm、深さ2mm)を形成後、各条件のメンブレン(未処理メンブレン、生体活性メンブレン、低結晶性Ca-Pメンブレン)にて被覆し、縫合閉鎖した。4週間後、組織ブロックを採取し非脱灰研磨標本作製した。トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡による骨形成の様相を組織学的に観察し、新生骨面積率(新生骨領域/骨欠損領域)および骨接触率(骨接触長/メンブレン長)の測定を行った。

また、雌性SDラットにメチルプレドニゾロン酢酸エステルを1週間に1回、計4回経皮投与し骨粗鬆症モデルラットの作成を行った。

### 4. 研究成果

- (1) SEMによる表面正常の観察では、生体活性メンブレンではチタン水酸化物と予測される網目状の微細な構造物を認めた。低結晶性Ca-Pメンブレン上では上記網目構造の上に、Ca-Pと考えられる構造物の析出を認めた。
- (2) 生理食塩水中のCa濃度測定では、低結晶性Ca-PメンブレンはCaイオン濃度が低い場所では徐放されていくが、培養液のようなCaイオン濃度が豊富な環境では、Caイオンの流出と取り込みがプラトーに達し、溶液内が一定のCaイオン濃度を保つことが示された(図1)。そのため、Caイオンの取り込みが活発な骨新生部位においては、低結晶性Ca-Pメンブレンは骨新生に有用なCaイオンを徐放すると考えられる。
- (3) 細胞増殖においては、一日目の未処理メンブレンでのみ有意差が見られた。しかし最終的な細胞増殖能においては全てのメンブレンにおいて差がなく、低結晶性Ca-Pメンブレンが細胞増殖を阻害しないことが示された(図2)。
- (4) 動物実験において、各メンブレン埋入後4週での評価を行った。新生骨面積率および骨メンブレン接触率を算出したところ、有意差を認めなかった。骨欠損部中央における骨新生の有無を比較すると、未処理のメンブレンに比べ生体活性メンブレンおよび低結晶性Ca-Pメンブレンでは骨新生が認められる数が多かったが、有意差は認めなかった(図3)。

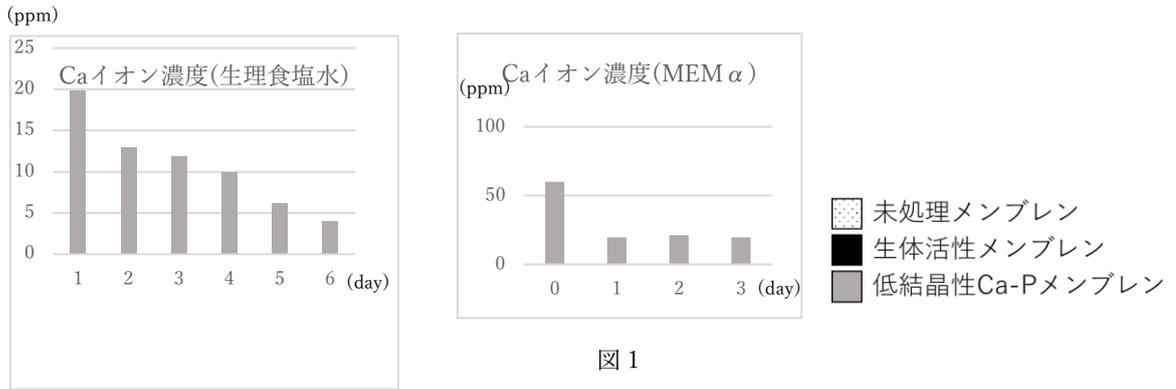


図 1

低結晶性 Ca-P メンブレンは表層の Ca-P 化合物が低 Ca 環境下で血清中への溶出が早いことが利点と考えられる。骨形態計測においては有意差が得られなかったものの、低結晶性 Ca-P メンブレンは骨接触率において、未処理メンブレンよりも高い値を示した。また、骨欠損部中央における骨新生の有無は、未処理メンブレンよりも低結晶性 Ca-P メンブレンで多く観察された。従って、メンブレン表面での骨新生は低結晶性 Ca-P メンブレンが有利である可能性がある。今回使用した健常モデルの動物においては、創傷部において低結晶性 Ca-P メンブレンが Ca のリザーバーとして働き、有意差が出なかったことが考えられる。

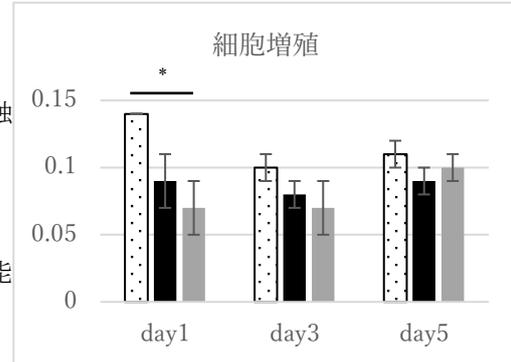


図 2

そこで骨粗鬆症のような、既存骨の Ca 含有状態が不利である状況においては、低結晶性 Ca-P メンブレンが優位に働くことが期待できると考えた。骨粗鬆症モデルラットの作成を試みたが、今回用いたメチルプレドニゾロン酢酸エステルを投与する方法では、骨粗鬆症モデルが健常ラットと比較して体重に差が出すぎてしまい、実験実施が停滞してしまった。今後の研究課題として、骨粗鬆症モデルのように骨密度が低下している状況における骨欠損に対しては、低結晶性 Ca-P メンブレンは治癒初期の一時的 Ca 濃度の上昇により骨形成能を改善する見込みがあると考えられる。

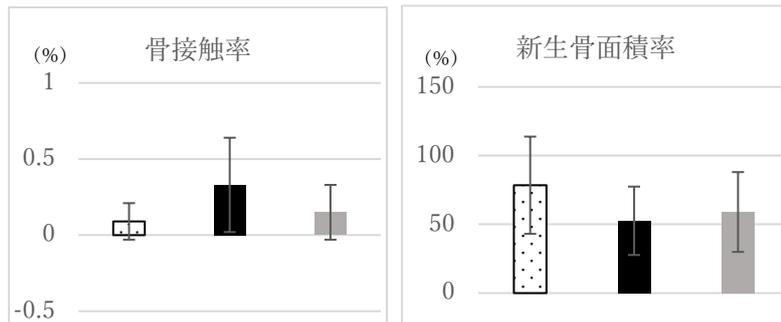
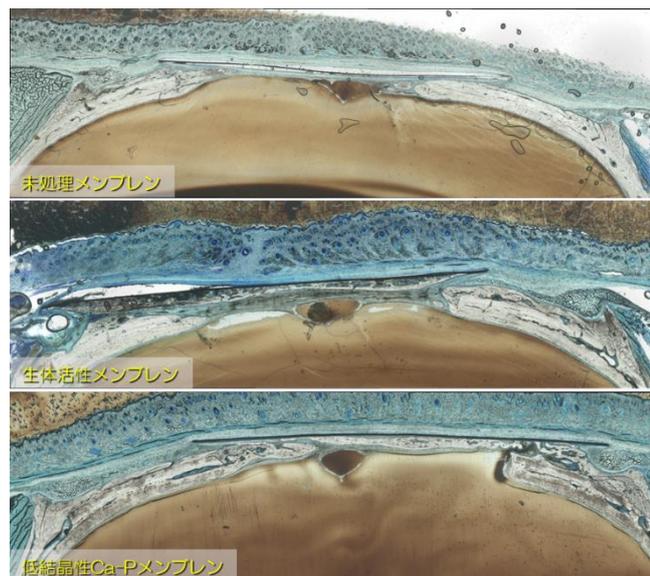


図 3



非脱灰研磨標本

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------