

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592823

研究課題名(和文)骨芽細胞組み込み型人工骨による顎堤再建へのGBR法の応用

研究課題名(英文) Application of guided bone regeneration to the cultured artificial bone for the reconstruction of jaw

研究代表者

大堀 ことは(Ohori, Kotoha)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：10374539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラット頭頂骨骨膜下に、HAPブロック上で骨髄幹細胞を培養した培養人工骨を移植したものと、さらにこれに骨誘導再生(GBR)法を応用したものを、HAPブロック単体の場合と比較し、その効果を検討した。その結果、培養人工骨を埋入することによって、より多くの骨形成が観察され、さらにGBR法を応用することで、骨形成量の増加傾向が認められ、骨形成期間の短期化が可能になることが示された。

研究成果の概要(英文)：This research sets 4 groups; the 1st group grafted the artificial bone, was cultured the bone marrow stem cells on the HAP block, the 2nd group applied guided bone regeneration(GBR) method to the cultured artificial bone, the 3rd group grafted the HAP block, and the 4th group applied GBR to the HAP block under the parietal bone of rat were investigated the effects. Extensive bone formation was observed in the 1st group in comparison with the 3rd group. Also, the efficacy of bone formation was observed in the application with GBR. It suggested that the cultured artificial bone and the application with GBR to it made possibly bone formation period shortnig.

研究分野：医歯薬学

キーワード：培養人工骨 GBR法 骨形成

1. 研究開始当初の背景

近年、広範囲に及び顎堤欠損に対して、顎堤挙上がなされており、その多くで自家骨が用いられ、良好な成績を上げている。しかし、自家骨移植の場合、生体への2次の侵襲、骨量や形態の制限などの問題点が報告されている。そこで、骨代用材としての人工材料として、我々が、以前、生体適合性、骨伝導性に優れていることを確認したハイドロキシアパタイト (HAP) を用いることにした。また、HAP ブロックを骨膜下に埋入にした際、ブロックと母床骨との間に線維性結合組織が侵入し、骨形成が阻害されることから、我々は、骨誘導再生 (Guided bone regeneration: GBR) 法を応用し、GBR 膜としてポリテトラフルオロエチレン (e-PTFE) 膜 (非吸収性膜) を、スペースメーカー材料として HAP を用い、GBR 膜下での骨形成の検索を行い、これまでの研究で、すでに良好な結果を得ている。しかし、膜により同時に必要な細胞成分の遮断も行い、スペース内に十分骨芽細胞を誘導できないことも推察された。そこで次に、ブロック上で骨髄幹細胞を培養し、骨芽細胞へ誘導した培養人工骨を用いることを考案した。この培養人工骨を用いることにより、膜によって完全に外部から遮断され、細胞成分が存在しない状況下においても十分な骨形成が可能となることが期待される。

今回、人工材料として培養人工骨に着目したが、培養人工骨として、HAP 上で骨髄幹細胞を培養し、これが骨再生に有効であるという研究は以前よりなされている。また、動物実験において、培養人工骨の軟組織への異所性移植で、骨形成が確認されたとする報告はなされているが、骨への同所性移植の報告でも臨床報告が多く、基礎実験における報告はあまりなされておらず、培養人工骨の移植における骨再生機構は十分解明されていない。さらにこの培養人工骨の移植に GBR を応用したとの研究はまだされていないため、骨再生機構の解明と、GBR 法の効果の確認をするため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、臨床において広範囲に吸収した顎堤を再建することを目的に行う基礎研究であり、培養人工骨の移植における骨再生機構の解明と、さらにこれに GBR 法を応用することによる効果を検討するものである。

3. 研究の方法

(1) 予備実験

培養人工骨の作製

Maniatiopoulos らの方法に準じて、ラットの大腿骨を摘出し、大腿骨骨断端より注射針にて骨髄幹細胞を採取し、初代培養を行った。1、2、3、4 週間培養した後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性 (図 1)、DNA 量 (図 2)、Ca (カルシウム) 量 (図 3) を測定し、

予備実験で、順調な骨形成が認められることを確認した。

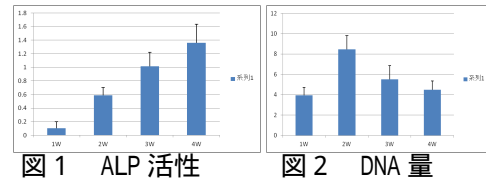


図 1 ALP 活性

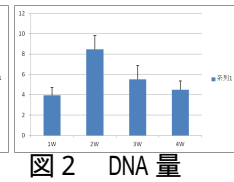


図 2 DNA 量

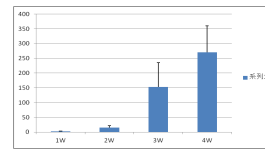


図 3 Ca 量

また、初代培養を行い、付着した細胞を回収した後、多孔質 HAP 気孔内で培養し、デキサメサゾンで誘導することにより、骨髄幹細胞から骨芽細胞へ分化させ、培養人工骨を作製した。

培養期間

上記条件で、2、4 週間培養して作製した培養人工骨を、ラットの背部に埋入し、2 週間後、埋入部位である軟組織を摘出し、ALP 活性 (図 4)、骨組成のマーカであるオステオカルシン (Oc) のタンパクの発現 (図 5) を測定した。その結果、2 週間には骨芽細胞が増加し、その後 4 週にかけては骨細胞が増加する傾向が認められた。

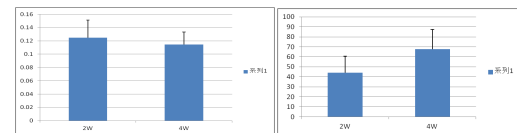


図 4 ALP 活性

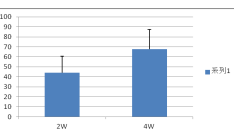


図 5 Oc タンパク発現量

病理組織学的には、2 週培養、4 週培養ともに、骨再生は、HAP 上部には認められるが、HAP 中央部には認められず、骨量は、2 週培養の方が多い傾向にあった。本実験では、2 週培養の培養人工骨を用いることにした。

(2) 材料の埋入

埋入材料：直径 5 mm、厚さ 2 mm、焼成温度 1, 200 の多孔質 HAP ブロックを埋入材料として用いた。GBR 用膜として、本実験で予定していた生体内吸収性のポリ乳酸 (PLA) 膜は、予備実験において、生体内で明確な炎症反応を示さないことは、病理組織学的にも確認したが、滅菌や十分な成形が難しかったため、生体内非吸収性膜の e-PTFE 膜を使用した。

埋入方法：ラット頭頂部皮膚に骨面に達する半月状の切開を加え、皮膚・骨膜を剥離した。以下の 4 群に関する実験を行った。4 群は、HAP ブロックを正中部頭頂骨上に位置し、皮膚・骨膜を縫合したものを 群、培養人工骨を正中部頭頂骨上に位置し、皮膚・骨膜を縫合したものを 群、HAP ブロックを正中部頭頂骨上に位置し、これを e-PTFE 膜で被覆し、皮膚・骨膜を縫合したものを 群、培養人工骨を正中部頭頂骨上に位置し、これを

e-PTFE 膜で被覆し、皮膚・骨膜を縫合したものを 群とした。培養人工骨は 2 週培養のものを使用し、実験期間は、2、8 週とした。
データの解析：摘出した埋入部位である頭蓋骨を試料とし、一部は、脱灰標本とし、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE 染色) を施し、HAP ブロックおよび e-PTFE 膜周囲の組織反応を病理組織学的に検索した。また、培養人工骨の生化学的分析、確認も行った。

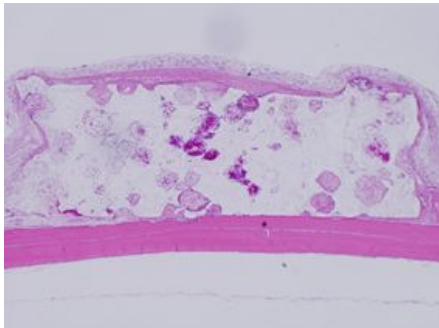
4. 研究成果

(1) 生化学的分析

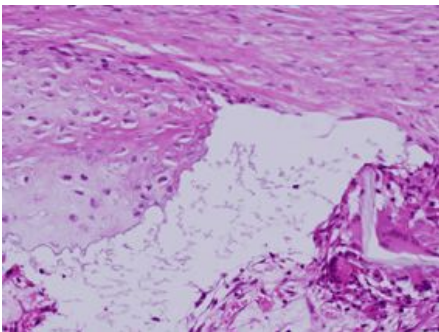
Maniatopoulos らの方法に準じて、2 週間培養して作製した培養人工骨に関して ALP 活性、DNA 量の分析を行い、活性が認められ、順調に骨芽細胞が増加していることが確認された。

(2) 病理組織学的結果

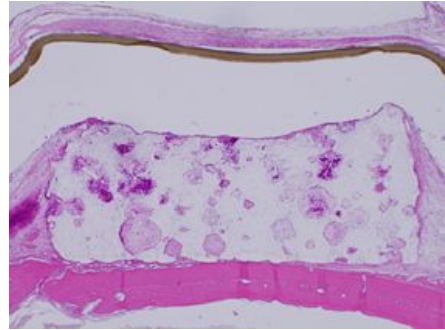
2 週間後では、新生骨は母床骨側に認められるが、 群ではブロック上部にも新生骨が認められるものもあり、破骨細胞も認められた。ブロック上部に比較すると、ブロック中央部には新生骨は少なかった。また、 群では、新生骨がブロック中央部に認められるものもあったが、 群と比較して、ブロック上部に認められる新生骨量は少なかった。HAP と膜と母床骨との間隙にも、膜の遮蔽効果による新生骨が認められた (図 6、7)。



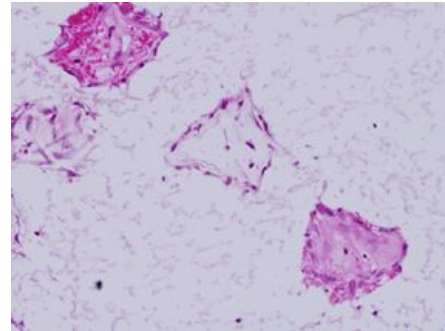
弱拡大



強拡大
図 6 群 2 週組織像



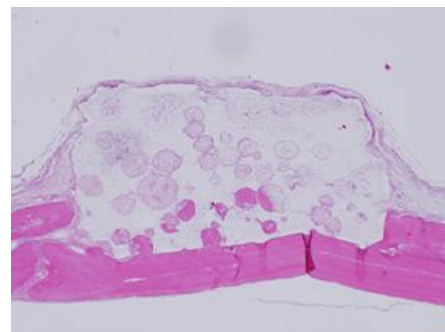
弱拡大



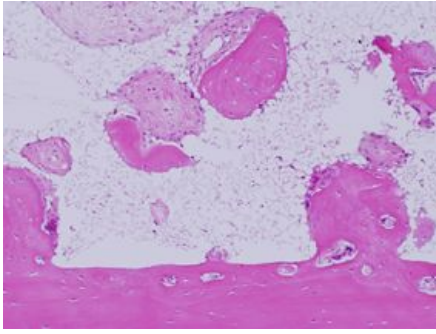
強拡大

図 7 群 2 週組織像

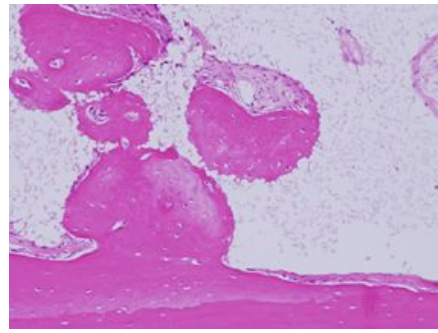
8 週後では、4 群ともに母床骨上に成熟した新生骨が認められた。また、 群、 群では、HAP 上部には新生骨はほとんど認められなかったが (図 8、10)、培養人工骨を用いた 群、 群では、HAP 中央部から上部にかけて成熟した新生骨が多い傾向にあり (図 9、11)、 群では、膜に接して新生骨を認めたものもあった (図 11)。 群、 群では、膜の遮蔽効果による新生骨も確認され、 群と 群を比較すると、 群の新生骨量が多い傾向にあった。いずれも、HAP 内では新生骨上に、多くの破骨細胞を認めた。4 群を比較すると、HAP と培養人工骨とでは、膜の有無に関わらず、培養人工骨を用いた場合の方が、新生骨はブロック中央部にも多く認められ、その量も多い傾向にあった。これは、HAP 上で培養された骨芽細胞の効果であることが示唆される。



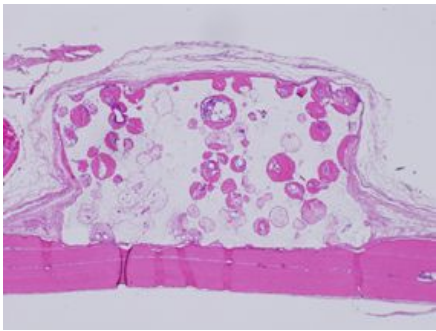
弱拡大



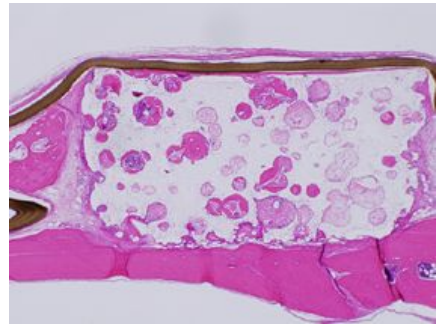
強拡大
図 8 群 8 週組織像



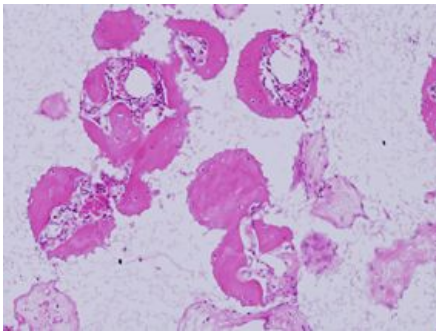
強拡大
図 10 群 8 週組織像



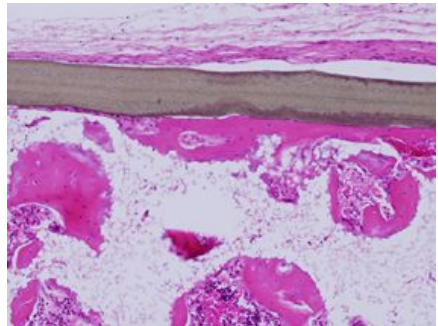
弱拡大



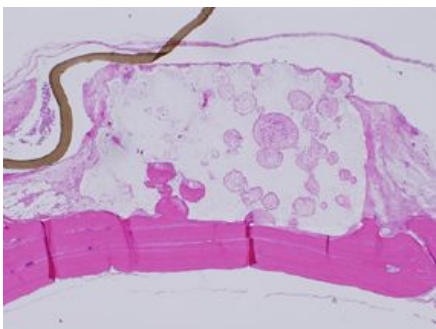
弱拡大



強拡大
図 9 群 8 週組織像



強拡大
図 11 群 8 週組織像



弱拡大

以上より、HAP 上で骨髄幹細胞を培養した培養人工骨を埋入することによって、より多くの骨形成が観察され、さらに、結合組織の外部からの侵入を遮断する GBR 法を応用することで、新生骨量の増加傾向が認められ、骨形成期間の短期化が可能になることが示された。この結果は、特に、骨芽細胞数の少ない、あるいは活性の弱い高齢者や有病者には多大な効果が期待でき、今後の骨再生医療への貢献となるものと考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大堀 ことは (OHORI KOTOHA)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：10374539

(2) 研究分担者

横山 敦郎 (YOKOYAMA ATSUROU)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：20210627

小松原 浩実 (KOMATSUBARA HIROMI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50221247

山本 悟 (YAMAMOTO SATORU)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10344524