

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 16日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792233

 研究課題名（和文） 補綴前骨増生治療用新規スポンジ状骨補填材の開発
—新術式に向けた研究—

研究課題名（英文） Development of biodegradable polymer-calcium phosphate composite as a bone substitute material

研究代表者

神野 洋平（JINNO YOHEI）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40507779

研究成果の概要（和文）：

骨補填材料として広く用いられている、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムに連通気孔を付与すると、その脆弱性により形態の維持が難しくなる。研究の当初の目標は、生体内分解性高分子化合物を用いて、その脆弱性を克服することであったが、内部への新生骨を誘導するという点では非常に困難な材料となった。そこで、生体内分解性高分子に連通気孔を与えると逆転の発想で、新生骨の誘導を達成しようと考えた。生体内分解性高分子の連通気孔内部に細胞を侵入させることには成功したが、骨系の細胞の侵入・新生骨の誘導はできなかった。そこで、ハイドロキシアパタイト、リン酸三カルシウムの粒子を封入し、骨補填材料としての有効性を検討した。試料内部への、大量の細胞および血管の侵入に成功し、新生骨の誘導に成功した。今後、スタチンを併用することによりさらなる新生骨の誘導を目指す予定である。

研究成果の概要（英文）：

Calcium phosphate (CaP) biomaterials such as hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (β -TCP), or their composite are commonly used as artificial bone substitute materials. Recent researches indicated that the CaP materials with porous structure exhibited the excellent biocompatibility, however, the drawback of porous CaP materials is that they are extremely brittle and fragile. We developed the novel material with interconnected pores which had CaP nanoparticle-dispersed biodegradable polymer beams. The aim of this study was to evaluate this material as the bone substitute material. In calvaria (rat study), abundant blood vessels and cells infiltration into interconnected pores were observed. In the tibia (rat study), newly-formed bone was observed within the pore of the material. In this study, both PLLA and PCL seemed to be biocompatible, without any inflammatory response. Furthermore, only PLLA displayed the cell infiltration into the pores. New bone formation was observed inside the CaP-dispersed PLLA sponge. These results suggest that the biodegradable polymer-CaP composites is expected to be a potent bone substitute material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：歯科補綴学分野

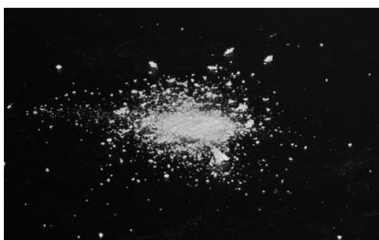
科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：骨再生、骨補填材料、生体分解性高分子化合物

1. 研究開始当初の背景

現在、歯科インプラント治療は、欠損補綴治療の一選択肢として広く普及している。治療に対する患者の要求が大きくなっており、骨量不足や骨質不良部位へインプラントを埋入する機会が増加している。それに伴い、骨増生の重要性が高まり、数多くの骨補填材料が登場した。骨補填材料にはそれぞれに利点・欠点があり、ゴールドスタンダードとなりうる人工の骨補填材料は存在していない。

我々は、市販の骨補填材にも応用されている、生体セラミクスである β -TCP と HA に着目した。しかし、生体セラミクスに海綿骨様の気孔を付与する強度が低下し（脆性材料となる）、操作性も低下する。そこで、生体セラミクスに生体内分解性高分子化合物を応用し、しなやかさと強度を兼ね備えた、新規スポンジ状骨補填材の開発を開始することとした。



生体セラミクス単体に気孔を付与すると脆性材料となる。

2. 研究の目的

近年の口腔インプラントをとりまく状況劇的に変化しており、インプラント体の表面性状の改善、外科手術の進歩などにより、骨

量が少なく骨質の悪い症例であってもインプラント治療が適応され咬合再建が行われている。近年の外科主導から補綴主導への術式の変化はトップダウンリートメントという概念を生み、最終補綴装置から逆算してインプラントの埋入位置を決定することが一般的になっている。インプラント埋入予定部位における、骨量改善はインプラント関連外科処置のなかでも最も重要度の高いものといえる。

本研究の目的は、新規スポンジ状骨補填材を開発し、動物実験により骨新生への有効性の評価を行い、早期の臨床応用を目指すことである。

3. 研究の方法

本研究は、

- (1) 生体内分解性高分子化合物単体での生体親和性の評価
 - (2) 連通気孔を付与した生体セラミクスー生体内分解性高分子化合物コーティング複合体の新生骨の評価
 - (3) 生体セラミクス粒子ー生体内分解性高分子化合物複合体の新生骨の評価
- の3点を大きな目標として、これらを実験評価するため、組織（形態計測）学的手法を用いることとした。

- (1) 生体内分解性高分子化合物単体での生体親和性の評価

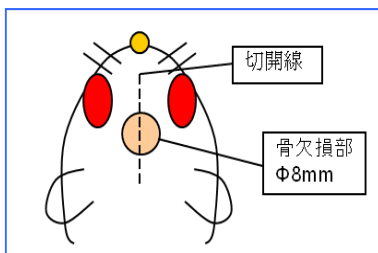
生体内分解性高分子化合物は任意に形態・硬度の調整が可能であり、さらにしなやかさを兼ね備えている。数種ある生体内分解性高分子化合物のなかでも今回は、既に臨床応用されている poly-L-lactic acid (PLLA)（整形外科領域のスクリュウ、プレート）、polycaprolactone (PCL)（吸収性

縫合糸)を採用した。

生体内分解性高分子化合物の生体親和性を検討および、既製の骨補填材料との比較を行った。比較対象はテルプラグ® (アテロコラーゲン)、セラタイト® (β -TCP+HA)とした。

ペレット状の生体内分解性高分子化合物 3g に対し 1-4 ジオキサン 47g で溶解させ、60°Cで一時間攪拌、液体窒素にて凍結、乾燥し、試料を作製した。作製した試料は SEM 像にて連通気孔を確認した。

ラット頭蓋骨に骨欠損を作製し、試料を填塞した。4 週後に非脱灰研磨標本を作製し、組織学的検討および組織形態計測学的検討を行った。



連通気孔が確認できた (SEM 像)。

(2) 連通気孔を付与した生体セラミクスー生体内分解性高分子化合物コーティング複合体の新生骨の評価

生体セラミクス単体に連通気孔を付与すると、脆弱であり、形態を維持が困難である。強度・しなやかさの向上のために表面に生体内分解性高分子化合物をコーティングし、物性の改善を図ることとした。(実験 1 で PCL と比較して、PLLA においてより高い生体親和性を確認したため、実験 2 では PLLA での

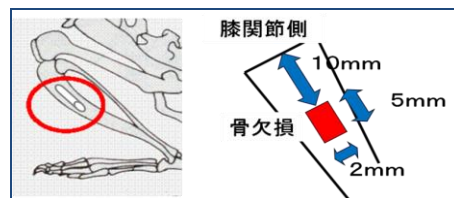
コーティングを採用した。)

海綿骨様構造を付与した生体セラミクスを実験 1 で作製した PLLA-ジオキサン溶液に浸漬し、液体窒素にて凍結、乾燥し、試料を作製した。

実験 1 と同様にラット頭蓋骨に骨欠損部を作製、試料を填塞した。4 週後に非脱灰研磨標本を作製し、組織学的検討および組織形態計測学的検討を行った。

(3) 生体セラミクス粒子ー生体内分解性高分子化合物複合体の新生骨の評価

実験 1 で作製した PLLA-ジオキサン溶液に PLLA と同質量の β -TCP あるいは HA の粒子を混和、攪拌した溶液を作製した。(実験 3 では、PLLA の分解速度の増進、操作性の向上を期待し、PLLA 濃度を実験 1 の 1/3 と 2/3 とした。) 試料作製は実験 1 に準じて行った。ラット頭蓋骨およびラット脛骨に骨欠損を作製し、欠損部に試料を填塞した。



4 週後に非脱灰研磨標本を作製し、組織学的検討および組織形態計測学的検討を行った。

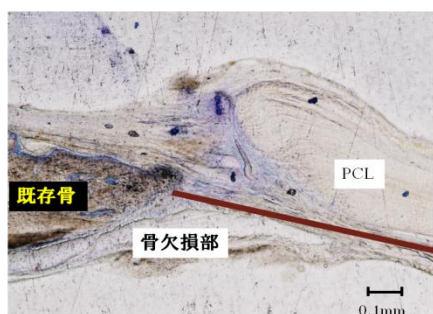
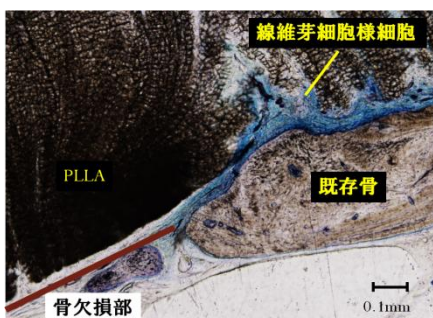
4. 研究成果

(1) 欠損群においては、骨欠損部には新生骨は認められなかった。PLLA 群では骨新生は認められなかったが、連通気孔内に線維芽細胞様細胞の侵入が認められた。PCL 群では、新生骨は認められず、試料内部に細胞の侵入も認められなかった。テルプラグ群では、母床骨に新生骨の添加が認められた。セラタイト群では、試料周囲に新生骨の添加が認めら

れた。また、全ての群において炎症所見は認められなかった。

実験 1 では、生体内分解性高分子化合物内での新生骨形成は認められず、既存骨との連続性も確認できなかった。既存骨との結合や置換が見られない等の課題が残るが、既存の骨補填材料であるテルプラグ、セラタイトと同様に炎症所見は認められなかった。良好な生体親和性が具備されていることが示唆された。

試料表面及び内部に、破骨細胞・骨芽細胞は認められず、骨へのリモデリングの可能性が低いことが予想される。試料内部への破骨細胞・骨芽細胞の侵入を促進する工夫が必要である。今回 PLLA 群にのみ線維芽細胞様細胞の侵入が確認できた。この結果より、PLLA 群は、PCL 群と比較して、細胞が侵入しやすいと考えた。

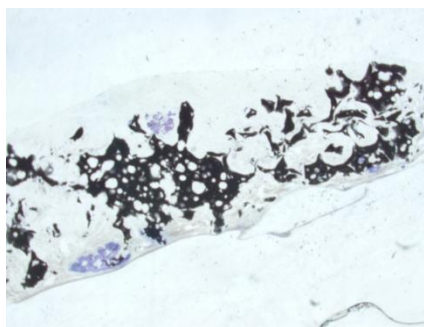


PLLA の試料内部への線維芽細胞様細胞の侵入を確認した。

(2) 連通気孔を付与した生体セラミクスー生体内分解性高分子化合物コーティング複合体の新生骨の評価

全ての群において、炎症所見は認められなかったが、新生骨も観察できなかった。

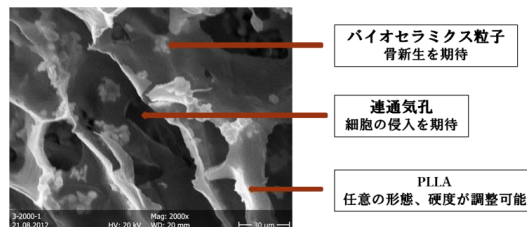
これはコーティング材料である PLLA の分解速度が遅く、生体セラミクス周囲で起こる骨リモデリングを阻害してしまったからであると考えた。当初の狙いである物性の改善は成功したものの、セラミクス本来の骨新生作用を妨げてしまったため、生体セラミクスーPLLA 複合体を全く新しいアプローチで作製する必要があることが示唆された。



試料周囲および内部に骨様の組織はほぼ確認できなかった。

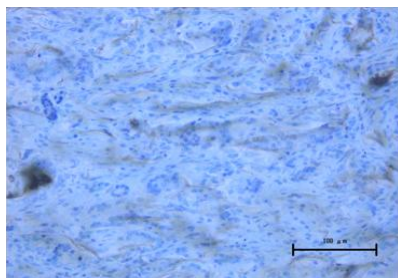
(3) 生体セラミクス粒子ー生体内分解性高分子化合物複合体の新生骨の評価

実験 2 では、試料周囲の既存骨との接触が認められず、さらに周囲および内部に新生骨は確認できなかった。実験 3 では、実験 1 で作製した PLLA に生体セラミクスの粒子を分散させ試料を作製することとした。作製した試料表面に生体セラミクスが露出していることがわかる (SEM 像)。

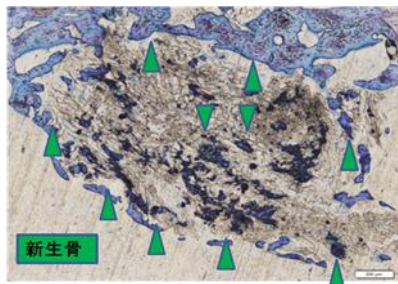


ラット頭蓋骨において新生骨は認められなかったものの、試料内部に多数の細胞の侵

入が認められた。ラット脛骨では、試料内部に新生骨が認められた。また、頭蓋骨・脛骨の全ての群において、炎症所見は認められなかった。



ラット頭蓋骨部：血管の新生も認められる。



ラット脛骨：試料内部に新生骨が認められる。

実験3では新生骨は確認できたものの、臨床応用を目指すにはさらなる検討が必要である（より多くの新生骨の獲得）。我々が研究を進めている、高脂血症治療薬スタチン（全身および局所投与における骨増生効果を報告済み。）本研究において新たに考案した複合体から、スタチンを効果的に徐放させることにより、さらなる新生骨の獲得を目指す予定である。（ドラッグデリバリーシステム（DDS）の考え方。）

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 1件）

1. Atsuta I, Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Jinno Y, Koyano K. Evaluations of epithelial sealing and peri-implant epithelial down-growth around “step-type” implants.

Clin Oral Implants Res, 23(4):459-466, 2012.

〔学会発表〕（計 3件）

- ①清水 秀夫, 神野 洋平, 鮎川 保則, 熱田 生, 古谷野 潔.

生体内分解性高分子化合物を用いた骨組織再生用新規マテリアルの開発

（社）日本口腔インプラント学会、第30回九州支部学術大会

2013年1月、大分

- ② Hideo Shimizu, Yohei Jinno, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano

Evaluation of biodegradable polymer-calcium phosphate nanoparticle composite as a bone substitute material

2013 Biennial Joint Congress of CPS-JPS-KAP

Jeju, Korea. April 2013

- ③神野 洋平.

新しい骨増生術式および骨補填材料の開発—スタチンの局所投与—

（社）日本補綴歯科学会、第122回学術大会

イブニングセッション 臨床イノベーションのための若手研究者の挑戦 バイオマテ

リアル・エンジニアリングの新たな展開

2013年5月、福岡

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

研究代表者

神野洋平 (JINNO YOHEI)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40507779