

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 25 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463141

研究課題名(和文) 骨形成促進チタンファイバー綿製ブロックによる顎骨再建シミュレーション

研究課題名(英文) Development of a biointegrated mandibular reconstruction device consisting titanium fiber mesh

研究代表者

廣田 誠 (HIROTA, Makoto)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20347305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の手術などによって広い範囲で顎の骨を喪失することは生活の質を著しく損なうこととなる。失われた顎骨と歯の機能を再建するには骨移植及びインプラント手術が有効であるが、本研究ではより低侵襲にこれらの機能を回復するための直径20-50ミクロンのチタンファイバー綿からなる顎骨再建材料を開発した。この顎骨再建材料は87%空隙率の状態優れた骨芽細胞親和性を示し、さらに3次元構造に影響を与えない1ミクロン以下のハイドロキシアパタイト薄膜コーティングをすることで、即時に荷重がかかる自然治癒しない顎骨区域欠損であっても速やか且つ強固に顎骨と直接結合する顎骨再建材料となることが実証された。

研究成果の概要(英文)：Extensive jaw bone loss due to surgery such as malignant tumor ablation significantly impairs quality of life. Bone reconstructive surgery and dental implant therapy are effective to improve functions of tooth and jaw bone. The present study demonstrated that development of a reconstruction device of jaw bone made of titanium fiber with a diameter of 20-50 micrometers to less invasively restore those functions. The titanium fiber mesh scaffold with a 87%-porosity showed an excellent compatibility with osteoblast. A thin sub-micron hydroxyapatite (HA) coating on titanium fibers without affecting a three dimensional structure of the scaffold improved bio-compatibility with bone tissue. Mechanical simulation showed HA-coated titanium fiber mesh scaffolds ensured a rapid and strong osseointegration in an extensively resected jaw bone even in a critical-sized and immediately loaded segmental bone defect of the mandible.

研究分野：顎顔面口腔外科学

キーワード：顎骨再建 チタン材料 インプラント

1. 研究開始当初の背景

顔面外傷や口腔腫瘍切除後に生じる広範囲の顎骨欠損に対する再建治療は今日でも自家骨移植が最も確実性の高い方法である。しかし、自家骨移植では採骨手術による身体的負担も強く、自家骨移植に変わる様々な手術方法や骨組織再生のための3次元スキャホールドが開発されてきた。

顎骨形態を再現する手術として、チタン性あるいは吸収性のトレーに海綿骨骨髄を充填して移植する方法があるが、やはり自家骨採取のリスクが残される。ティッシュエンジニアリングに基づいた顎骨再生も近年試みられているが、確立された治療技術は出現していないのが現状である。

申請者はこれまで顎骨腫瘍切除後の骨再建治療に関する報告をしてきた。一方で、吸収性骨補填材料が骨形成能を有する細胞との併用で、より効果的な骨伝導能を示す実験的研究や、臨床における生理活性物質と骨補填材料を併用した骨再建治療の検討を報告してきたが、広範囲の顎骨の形態的再建には、非吸収性スキャホールドが望ましいと考え、その候補としてチタンファイバー綿に着目した。

チタンファイバー綿で作成した3次元スキャホールド内を分子プレカーサー法にてハイドロキシアパタイトを均一にコーティングすると、骨伝導能の向上が認められる。この方法はこれまでの主流である物理的蒸着法ではなく溶液法であるため、コーティングされる物質の形状に制限がない。こうして得られた3次元スキャホールド内での骨伝導能の向上は、顎骨の機能再建に有力となる歯科インプラントの再建骨での実施に有効となる。即ち、インプラントが念頭における骨再建・再生用3次元スキャホールドとするために、分子プレカーサー法によるチタンファイバー表面のアパタイト薄膜コーティングがスキャホールド内部への骨伝導能向上と細

胞誘導性の賦与を獲得する手段として有用であると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではチタンファイバー綿製顎骨再建用スキャホールドを作成し、複雑な3次元形態に簡便で正確なコーティングが可能である分子プレカーサー法によって、チタンファイバーに均一で密着性に優れたアパタイト薄膜コーティングを行う。この技術により細胞誘導性を賦与した顎骨再建用3次元スキャホールドを用いてウサギ下顎骨を再建し、力学的評価を行い、アパタイト薄膜コーティング顎骨再建材料の有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1)チタンファイバー綿製ウサギ顎骨再建用スキャホールドと吸収性スキャホールドとの比較

空隙率60%、73%、87%のチタンファイバー綿製スキャホールドを作製し、臨床応用されているTCP性スキャホールド(空隙率60%及び75%)との骨芽細胞親和性を比較した。これらのスキャホールドにヒト骨芽細胞を播種し、骨芽細胞の増殖及び分化能を評価した。培養は7、14、21日間実施し、それぞれの培養期間における細胞増殖能の評価と骨芽細胞の成熟度の評価、すなわち、骨芽細胞マーカーである型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの発現を観察した。培養後の各チタンファイバーを観察し、石灰化物の有無を実体顕微鏡にて観察した。

(2)チタンファイバー綿性3次元スキャホールドの作製とプレカーサー法によるハイドロキシアパタイト薄膜コーティングの評価

ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングを実施した顎骨再建用スキャホールドを電子顕微鏡で観察し、表面元素分析(EDX)

にてコーティングの均一性を評価した。

(3)チタンファイバー綿製スキャホールド内での骨芽細胞培養

(1)の結果から最も骨芽細胞親和性が良好であった空隙率を有するチタンファイバー綿製スキャホールドを用いてスキャホールド単体、アパタイト薄膜コーティングチタンファイバーそれぞれを培養基材とし、骨芽細胞の培養を行なった。培養は3、7、14、21日間実施し、それぞれの培養期間における細胞増殖能の評価と骨芽細胞の成熟度の評価、すなわち、骨芽細胞マーカーである型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの発現を観察した。

(4)動物実験による評価

ウサギ下顎骨欠損モデルを作製し、同材料にて再建した。ウサギは日本羽兔、21週齢とした。左下顎骨に長さ10mmの区域欠損を形成し、下顎骨の連続性を完全に喪失させたのち、長さ10mm、幅5mmのチタンファイバーブロックと、下顎骨再建用プレートおよびスクリューにて同欠損を再建した。チタンファイバー単体 アパタイト薄膜コーティングチタンファイバーとして、9週後、21週後にサンプルを評価した。肉眼所見、画像所見よりスキャホールド周囲の骨形成量を評価した。また力学シミュレーションによりスキャホールドと下顎骨との骨接合の機械的強度を評価した。

(5)微細形態学的・組織学的評価

機械的強度を評価後、試料は破断面を電子顕微鏡で観察後、MMA包埋し、マイクロカッティングマシン(ゼーゲトーム)にて25μm程度に薄切し、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色かトルイジンブルー染色を行う。スキャホールド内部の骨組織の形成率をNIHイメージにて評価し、各群間で比較

検討した。

4.研究成果

(1)吸収性スキャホールドとの比較

60、73、87%すべての空隙率のチタンファイバー綿製スキャホールドにおいて吸収性スキャホールドよりも骨芽細胞の増殖が亢進した。吸収性スキャホールドは60、73%空隙率のチタンファイバー綿製スキャホールドより骨芽細胞の分化を亢進させたが、87%チタンファイバー綿製スキャホールドがすべてのスキャホールドの中で最も高い骨芽細胞分化能を示した。細胞増殖能も含めると87%チタンファイバー綿製スキャホールドが最も骨芽細胞親和性が高かった。実体顕微鏡による石灰化物形成の評価では、87%チタンファイバー綿製、吸収性スキャホールド、その他のチタンファイバー綿製スキャホールドの順で石灰化物形成能が高かった。また、破骨細胞誘導に関する骨芽細胞分泌因子の評価を行ったところ、87%空隙率のチタンファイバー綿製スキャホールドにおいてそれらの活性が最も高かった。

(2)チタンファイバー綿製スキャホールドへのハイドロキシアパタイト薄膜コーティング

上記結果(1)より87%空隙率のチタンファイバー綿製スキャホールドを用いてハイドロキシアパタイト薄膜コーティングを行い、電子顕微鏡で観察したところ、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングを行ってもスキャホールドの3次元構造には全く影響がなかった。またEDXによる表面元素分析ではチタンファイバー綿上にCa及びPが均一に分布しており、ハイドロキシアパタイト薄膜がコーティングされていることが確認できた。

(3)骨芽細胞の培養

チタンファイバー単体、アパタイト薄膜コ

ーティングチタンファイバーそれぞれを培養基材とし、骨芽細胞の培養を行なった。骨芽細胞の接着ではハイドロキシアパタイト薄膜コーティングの影響は認められず、顕微鏡による観察においても両者に差は認められなかった。細胞の増殖に関してもハイドロキシアパタイト薄膜コーティングによる影響は認められなかったが、分化マーカーに関してはハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群における発言が有意に高く、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングによる影響が考えられた。

(4)ウサギ下顎骨再建

骨形成

9週経過後のサンプルでは、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングスキャホールドは100%固定が維持されていたが、非コーティングスキャホールドでは3分の1が固定を維持することができていなかった。21週経過後のサンプルでは、非コーティング群では50%の確率で再建材料が固定されておらず、十分な骨形成が得られていなかったのに対し、コーティング材料では約90%が再建に成功した。完全に喪失させた下顎骨の連続性に関しては、非コーティングスキャホールドでは約30%程度しか再現できなかったのに対してハイドロキシアパタイト薄膜コーティングスキャホールドは有意に高く、約90%を再現することができた。スキャホールド外部の骨形成はハイドロキシアパタイト薄膜コーティングコーティング材料において有意に高く、非コーティングスキャホールドと比較して約3倍高い骨形成であった。

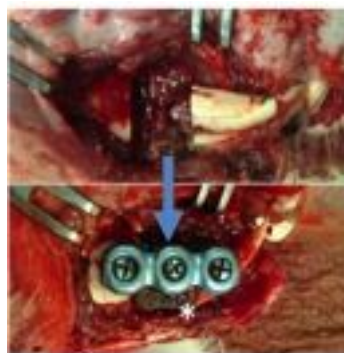


図1

上図の通り、ウサギ左下顎骨に10mmの長さの区域欠損を形成し、チタンファイバーブロックと再建プレートにて再建した。



図2

21週後の状態(図2左)とCT像(図2右)下顎骨の連続性が新生骨によって再現されていることが認められる。

力学評価によるシミュレーション

スキャホールドと下顎骨との接合部の骨接合の機械的強度を評価したところ、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群は約200Nの応力に耐えることが可能であったのに対し、非コーティングスキャホールドでは70N程度であり、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングを行うことで骨接合部の機械的強度が有意に向上し、約3倍高くなることが示された。

(5)微細形態学的・組織学的評価

破断面の電子顕微鏡的観察では、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群ではチタンファイバー綿の周囲に有意に多い量

の石灰化物が確認された。ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群ではチタンファイバー綿間の細かい空隙の間にも多量の石灰化物を電子顕微鏡的に確認することができ、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングによってスカホールドと下顎骨が強固に結合したことが示唆された。

組織学的評価では、これらの石灰化物は骨組織であり、かつチタンファイバー綿とオステオインテグレーション（骨結合）していることが確認できた。骨結合率は非コーティングスカホールドでは約 10%であったのに対してハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群では有意に高く、約 50%であった。

(6)まとめ

上記の結果より、分子プレカーサー法によってチタンファイバースカホールドの 3 次元構造に全く影響を与えずにハイドロキシアパタイト薄膜コーティングが可能となり、さらに骨芽細胞の成熟が有意に促進され、骨組織誘導能も促進されることが実証された。下顎骨再建モデルにおいては、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングによってチタンファイバースカホールドと残存骨の骨結合は促進され、かつ連続性を喪失した欠損においても、連続性を回復させることが可能であった。今後は骨結合後の機能、特に咀嚼運動に対する耐久性の評価が求められるが、組織親和性、特に骨組織親和性に関しては顎骨再建材料として十分な生体材料に成り得ると考えられる。

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 2 件)

Hirota M, Shima T, Sato I, Ozawa T, Iwai

T, Ametani A, Sato M, Noishiki Y, Ogawa T, Hayakawa T, Tohnai I. Development of a biointegrated mandibular reconstruction device consisting of bone compatible titanium fiber mesh scaffold. *Biomaterials*, 査読有, 75, 223-236, 2016.

DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.034.

Hirota M, Hayakawa T, Shima T, Ametani, A, Tohnai I. High porous titanium scaffolds showed higher compatibility than lower porous beta-tricalcium phosphate scaffolds for regulating human osteoblast and osteoclast differentiation. *Materials Science and Engineering: C Materials for biological applications*, 査読有, 49, 623-631, 2015.

DOI: 10.1016/j.msec.2015.01.006.

[学会発表](計 1 件)

Hirota M. Development of mandibular reconstruction device made of titanium fiber scaffold. *21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery ICOMS2013*, Barcelona (Spain), 2013 年 10 月 22 日.

[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]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

廣田 誠 (HIROTA, Makoto)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20347305

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

早川 徹 (HAYAKAWA, Tohru)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：40172994