

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861882

研究課題名(和文) 吸収性 -TCP含有ゼラチンGBR膜とFGF-2を用いた新規垂直的骨造成法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel onlay bone graft technique utilized rhFGF-2 impregnated gelatin hydrogel GBR membrane

研究代表者

則武 加奈子(Noritake, Kanako)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60624210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨造成時に創被覆時に粘膜弁内部に設置するGBR膜に、粘膜増生効果を持つFGF-2を含浸させ、骨新生・粘膜裂開防止の双方に効果的な新規骨造成法開発の基礎的研究を行った。また、FGF-2よりも骨形成へ有利に働くとしてされているFGF-18の有用性もあわせて検討した。まず改良型吸収性 -TCP含有ゼラチンGBR膜(G/T膜)の生体親和性とGBR膜としての有用性を確認した。rhFGF-2、18含浸G/T膜をラット骨上、骨掌上部に設置し粘膜治癒と骨新生への効果を確認した。手術後良好な粘膜治癒が観察され、またG/T膜がサイトカインキャリアと骨新生のスペーサーとして機能し、同部に骨新生が観察された。

研究成果の概要(英文)：A basic study for development of a novel bone graft technique which is effective not only bone neogenesis but also preventing mucosa dehiscence by utilizing rhFGF-2, which is effective for mucosa hyperplasty, impregnated GBR membrane installed at the surgical site. We also investigated the utility of FGF-18 and membrane combination because of its profitability to bone formation. First, the biocompatibility and its validity as a GBR membrane of improved gelatin hydrogel membrane containing -tricalcium phosphate (G/T) was confirmed. Then, rhFGF-2 or rhFGF-18 impregnated G/Ts were installed between rat parietal bone or with silicon dome and the above periosteum to determine their effect to mucosa healing and bone neogenesis. Well-mucosa healing was observed at surgical site and newly-formed bone was observed at the space created by the G/T worked as a space keeper while worked as the carrier of FGFs.

研究分野：骨造成 デンタルインプラント

キーワード：骨造成 GBR 吸収性メンブレン FGF-2 FGF-18

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨再生誘導法 (GBR 法) は、骨欠損となっている空間を遮蔽膜によって維持し、周囲の結合組織の侵入を排除して、膜によって維持された空間での骨再生を促進するすでに臨床の場で用いられている骨造成法である。臨床で使用できる膜はいずれも問題点を抱えているため、申請者らは、それらの問題点を解決するために、吸収性 β -TCP 含有ゼラチン GBR 膜を開発し、同膜上でのラット骨髄細胞培養実験およびラット頭蓋骨欠損モデルを用いた実験において、この膜の生体親和性および GBR 膜としての有用性を示した (Noritake et al. J Oral Tissue Engin 2011)。さらに、膜の材料として用いたゼラチンは低い等電点を持つため、高い等電点を持つ多くのサイトカインとの親和性が高く、徐放キャリアとして多用されている (Tabata J. R. Soc. Interface 2009)。ゆえに、上記の膜は、遮蔽膜としてだけでなく、サイトカインキャリアとしても利用できる特性を持つ。しかし、開発した GBR 膜は、実験の結果としては大きな影響を及ぼさなかったものの、膜の厚みが市販のコラーゲン膜の約 2.6 倍と厚いこと、グルタルアルデヒドを架橋剤に用いたという臨床応用を考えると改善すべき問題点があった。GBR 膜の厚みは、手術時に粘膜被覆に大きく影響するため、機械的強度を保ちつつ薄い膜が望ましく、また、グルタルアルデヒドは架橋後の残留による生体為害性が問題となっているからである。

(2) インプラント治療に際し、治療予定部位の骨量が不十分なため、何らかの骨造成を必要とする症例は多い。垂直的骨造成 (= オンレーグラフト、OG) 法は、他の骨造成法と比較し治療後のメンテナンスが容易で審美性も高い治療法だが、チタンメッシュ下に骨を移植し、創を閉じるために粘膜の減張切開を用いる現法では、治療期間中の粘膜裂開、裂開に伴う感染などの合併症リスクが高いという問題がある (Rocchietta et al. J Clin Periodontol 2008)。臨床の現場では予知性が高く合併症のリスクが少ない新しい OG 法の開発が望まれている。

(3) 線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) は、線維芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、軟骨細胞など様々な細胞に対する増殖活性を持つことが知られている。その強力な血管新生促進作用と、未分化間葉系細胞の多分化能を保持させたままの状態を増殖を促進する作用を持つことから、リコンビナントヒト FGF-2 (rhFGF-2) の、創傷治癒促進や組織再生誘導に対する効果が注目されており、すでに難治性皮膚潰瘍に対する治療薬 (フィブラスプレー、科製製薬) として製品化されている。また、顎口腔領域においては、歯周炎により失われた歯槽骨欠損部への rhFGF-2 局所投与により、有意な歯周組織再

生効果がサルなどの実験で確認されており、2001 年には臨床試験が実施されヒトに対しても有効であることが示され (Kitamura et al. J Dent Res 2011)、現在臨床化に向けて準備が進められている (2016 年保険導入済み)。

(4) これらの経緯から、線維芽細胞増殖作用を持ち粘膜増生への高い効果を期待して rhFGF-2 を垂直的骨造成術時に適用することで、頻発する粘膜裂開を防げるのではないかと考えた。サイトカインを創部に適用する際には何らかのキャリアを必要とし、創を被覆する際には粘膜弁内部全体に接するように GBR 膜を設置することが多いことから、先述の問題点を改良した吸収性 β -TCP 含有ゼラチン GBR 膜 (G/T 膜) が開発できれば、この膜が、GBR 膜としても、rhFGF-2 の徐放キャリアとしても利用できるため、粘膜増生に対する rhFGF-2 の効果が最大限に発揮でき、粘膜裂開のリスクを減少させる最適なコンビネーションになりうると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床応用可能な生体材料・薬剤を用いた、骨新生だけでなく粘膜裂開リスク軽減の双方に効果的な新しい OG 法開発のための基礎研究であり、具体的には、

(1) 改良型吸収性 β -TCP 含有ゼラチン GBR 膜 (G/T 膜) の開発と GBR 膜としての有用性を確認

(2) ラット頭蓋骨上における rhFGF-2 含浸 G/T 膜の骨膜と骨への影響を確認

(3) 当初の研究計画に追加し、G/T 膜に含浸させる新たなサイトカインとして、FGF-2 よりも骨形成に有利に働くとされている (Nagayama et al. Congenit Anom 2013) rhFGF-18 の有用性、各々の膜の長期的な骨膜と骨への影響を確認について検討した。

3. 研究の方法

(1) 改良型吸収性 β -TCP 含有ゼラチン GBR 膜 (G/T 膜) の開発

豚皮由来型コラーゲンをアルカリ処理した等電点 5.1 のゼラチンを注射用水に溶かし、 β -TCP 顆粒 (0.5-1.5 μ m) を混ぜ、この混合物をアクリル板に流し込み空気乾燥させ実験用に裁断し、凍結乾燥後に熱架橋を 0.075% グルタルアルデヒド架橋、凍結乾燥処理を行い、ゼラチンハイドロゲル膜を製作した。細胞培養、動物実験用に膜を直径 14mm の円状、6mm \times 13mm の長形状に各々裁断後、EOG 滅菌を行った。また、ポジティブコントロールとして現在臨床で使用されているコラーゲン膜 (コーケンティシューガイド) を用い、同様に裁断、滅菌を行った。膜の厚みをマイクロメーターで測定、微細構造の観察を SEM (S-4500, 日立製作所) で行った。また、膜の理工学的性質を評価する目的で改良型引っ張り試験を行った。湿潤

した膜をチューブ（径：9mm）に張り、その中心を球形のロッド（先端径：4mm）で圧接してG/T膜とCol膜の最小破断力を比較した。

4 継代目のラット骨髄細胞（rBMSCs）細胞を 1×10^4 個、500 μ lFBS に 24 時間含浸させた G/T 膜、コラーゲン膜上に播種し骨芽細胞分化誘導培地で培養した。培養後、4 時間、1、3、7 日後の細胞増殖を CCK-8 キット、培養後 7、14 日後に ALP 染色を行い ALP 活性の評価を行った。

27 匹の（18 週齢 Wistar）を用いて実験を行った。全身麻酔下で、頭蓋骨後方に皮膚切開、骨膜切開剥離を行い、直径 5mm の骨欠損を左右に注水下でトレフィンバーを用いて作製した。その後、9 匹には G/T 膜を、9 匹にはコラーゲン膜を用いて欠損部を覆い、残りの 9 匹は膜で覆わずに骨膜および皮膚縫合を行った。各群 3 匹ずつ術後 2、4、8 週で屠殺し固定後、 μ CT による骨欠損部における新生骨量計測を行った。さらに 10%EDTA にて脱灰包埋組織切片を作製し、H-E 染色にて組織学的評価を行った。

（2）ラット頭蓋骨上における rhFGF-2 含浸 G/T 膜の骨膜と骨への影響を確認

リタイアラット（雄、Wistar SPF）頭蓋骨上における rhFGF-2 含浸 G/T 膜（F2G/T 膜、rhFGF-2：30 μ g/匹）の骨膜と骨への影響を確認するため、全身麻酔下で頭蓋骨後方に皮膚切開、骨膜切開剥離を行い、F2G/T 膜もしくは G/T 膜のみをラット骨上、シリコンドームを用いた骨挙上部上に設置し、骨膜および皮膚縫合を行った。手術後 2、7 日後の粘膜治癒、創部の治癒を H-E 染色、アザン染色、Osteo 染色を用いた組織学的評価を行った。

（3）G/T 膜に含浸させる新たなサイトカインとして、rhFGF-18 の有用性について検討

（2）と同様の実験系、評価方法を用いて、rhFGF-18 含浸 G/T 膜（F18G/T 膜、rhFGF-18：30 μ g/匹）の骨膜と骨への影響を確認した。

そして、F2G/T、F18G/T 各々の骨膜と骨への影響を術後の短期間だけでなく、長期経過後の状態を評価する目的で、術後 14 日、4、8 週後のサンプリングを行った。また、評価には組織学的評価に加え、新生骨の放射線学的評価を加えることとした。

4. 研究成果

（1）G/T 膜の厚みは 0.12 ± 0.03 mm、コラーゲン膜の厚みは 0.08 ± 0.001 mm であった。SEM による微細形態観察から、ゼラチン膜の表面は粗造で微細なポアが観察され、コラーゲン膜の表面は比較的滑らかな網状構造であった。また、改良型引っ張り試験による G/T 膜の最小破断力は、有意差は認めなかったもののコラーゲン膜の 2.5 倍であった。各

膜上で培養した細胞は、経時的に増殖し、G/T 膜上の細胞はコラーゲン膜上と同等の ALP 活性を示した。

動物実験では、術後目立った感染等はなく、G/T 群では、他群と比較して炎症反応や癒痕形成が少なく、また早期に終了した。 μ CT を用い骨欠損部における新生骨量を計測すると、ゼラチン群では対照群と比較し、術後 4 週で G/T 群がコラーゲン膜群よりも、8 週では G/T 群とコラーゲン群が対照群よりも有意な新生骨量であった（ $p < 0.05$ ）。脱灰 H-E 染色標本での観察からは、術後 2 週で G/T 群でブリッジ形成が観察され（図 1）4、8 週とも骨の新生及び実験 2 群での膜の吸収が確認された。G/T 群における新生骨は、対照群と比較し厚みのある骨であった。

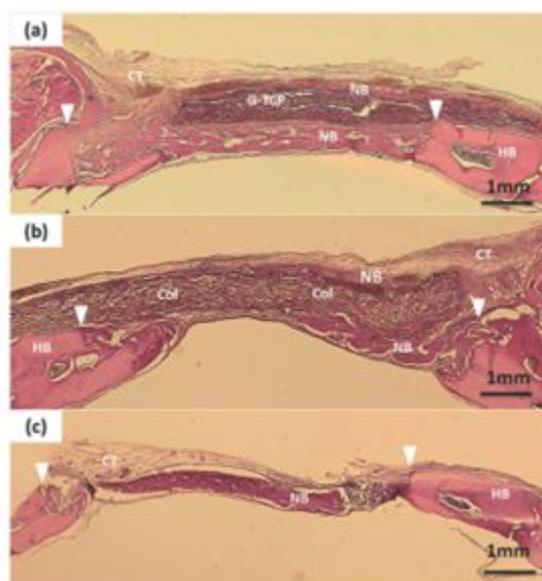


図 1：術後 2 週の H-E 像。(A) G/T 群、(B) コラーゲン群、(C) 対照群。

以上から、改良型 β -TCP 含有ゼラチン GBR 膜の生体親和性と GBR 膜としての有用性が示された（論文）

（2）手術後とくに F2G/T 群においては良好で早期での粘膜治癒が観察された。また組織学的評価からは、G/T 膜がサイトカインキャリアと骨新生を可能とするスペーサーとして機能し、膜（および膜とシリコンドーム）を設置したことで作り出された骨側縁部の空間に骨新生が術後 7 日目以降で観察された。術後 7 日目における骨新生は、G/T 膜のみ群で 50%、F2G/T 群で 100%のサンプルにおいて観察された（図 2）。（現在論文作成中）

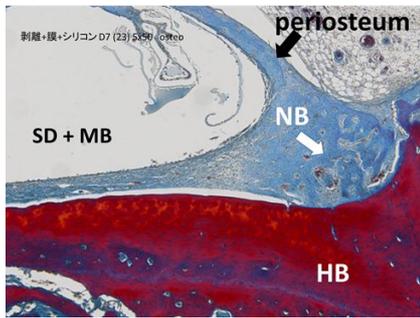


図2:術後7日目のF2G/T群における骨新生の様子。(Osteo染色)HB:母床骨、NB:新生骨、Periosteum: G/T膜及びシリコンドームで挙上された骨膜、SD+MB:ドームとG/T膜設置部

(3)F18G/T群においてもF2G/T群と同様な良好で早期での粘膜治癒が観察された。また組織学的評価からは、F18G/T群では、F2G/T群や膜のみ群では観察されなかった、挙上された骨膜に沿うように骨新生が認められた(図3)。また、 μ CTによる観察においても骨新生が確認されたが、F18G/T群がF2G/T群よりも活発に認められた(図4)。(現在、 μ CT像による新生骨量の比較、脱灰包埋組織切片の作成中)

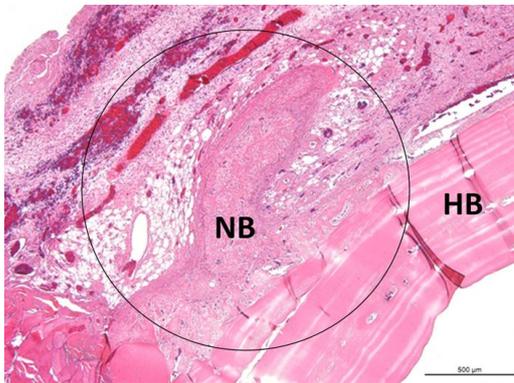
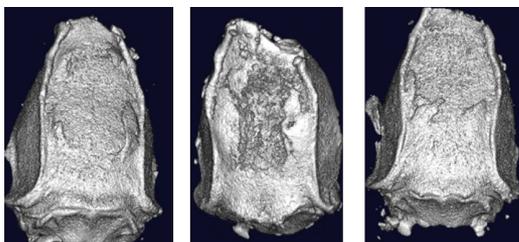


図4:術後7日目のF18G/T群における骨新生の様子。(H-E染色)挙上された骨膜に沿うように新生骨が形成された。



F2G/T群 F18G/T群 G/T群

図5: μ CTによる術後14日目の各群における骨新生の様子.F18G/T群における活発な骨新生が認められた。

現在、結果を解析中であるが、FGF18+G/T膜のコンビネーションは、FGF-2+G/T膜やG/T膜よりも骨造成部など手術部における骨新生への効果が高い可能性が示唆された。今

後、解析を進め、結果を論文にまとめていく予定である。

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6件)

Kanako NORITAKE, Shinji KURODA, Myat NYAN, Yuji ATSUZAWA, Motohiro UO, Keiichi OHYA, and Shohei KASUGAI. Use of a gelatin hydrogel membrane containing β -tricalcium phosphate for guided bone regeneration enhances rapid bone formation. *Dental Materials Journal* 33(5): 674-680; 2014

Marwa Madi, Osama Zakaria, Kanako Noritake, Masaki Fuji, Shohei Kasugai. Peri-implantitis Progression Around Thin Sputtered Hydroxyapatite-Coated Implants: Clinical and Radiographic Evaluation in Dogs. *J Oral and Maxillofacial Implants*. 28(3) 701-709, 2013.

Nyan M, Hao J, Miyahara T, Noritake K, Rodriguez R, Kasugai S. Accelerated and Enhanced Bone Formation on Novel Simvastatin-Loaded Porous Titanium Oxide Surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013.

Masaki Fujii, Makoto Shiota, Kanako Noritake, Kazuhiro Kon, Hitoshi Sato, and Shohei Kasugai. Effect of Density of Hydroxyapatite Fiber material on Bone Regeneration in Vertical Bone Augmentation Model. *J Oral Tissue Engin* 10(3) 115-122, 2013.

Kang Chen, Jia Hao, Kanako Noritake, Yu Yamashita, Shinji Kuroda, Shohei Kasugai. Effects of low intensity pulsed ultrasound stimulation on bone regeneration in rat parietal bone defect model. *Open Journal of Regenerative Medicine*. 2(1), 8-14 2013.

Sorasun Rungsriyanont, Kanako Noritake, Warunee Pluemsakunthai, Somchai Yodsanga, Somporn Swasdison and Shohei Kasugai. In vivo biocompatibility evaluation of gelatin-hydroxyapatite crosslink biomimetic scaffolds for bone regeneration. *J Nanomater Mol Nanotechnol* 2:6, 2013.

6. 研究組織

(1)研究代表者

則武 加奈子 (Kanako NORITAKE)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 60624210