

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3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659973

研究課題名（和文） 培養細胞治療に最適化した、フルメタル・バリアメンブレンを用いる次世代歯周再生療法

研究課題名（英文） The novel periodontal regeneration therapy optimized for tissue engineered cell culture treatment by using the full metal barrier membrane.

研究代表者

石幡 浩志 (ISHIHATA HIROSHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40261523

研究成果の概要（和文）：

従来のバリアメンブレンの厚みによる組織再生の阻害と、易感染性を解消した新規組織隔壁膜を創製し、歯周組織再生治療を向上するため、バリア機能を生み出す20 μ m貫通孔を高密度形成、微細多孔構造を構築したチタンメンブレンを製作した。ヒト歯根膜由来細胞による培養試験では、良好な細胞付着と増殖を示し、組織再生に有望であることが示された。さらにビーグル犬を用いた試験でもその有用性が確認された。

研究成果の概要（英文）：

In order to improve the physical property of the current model of the barrier membrane, the new style of the barrier membrane has implemented by using microfabrication technology to create high-density form of 20 μ m pored pure titanium membrane. It has a significant advantage on the toughness and durability to stabilized a tissue regeneration space to contribute establish to reproduce the target tissue, and also on the prevention of a contamination by oral microorganisms. The new titanium membrane is relatively saved a thickness that eliminated a tissue regeneration volume to be compromised the space in comparison with the one of the current models of barrier membrane.

On the culture test by using human periodontal ligament-derived cells, the new titanium membrane showed excellent properties supporting cell attachment, migration and proliferation to be promising the periodontal tissue regeneration successfully. Its usefulness has been confirmed in the animal test using beagle dogs.

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 | 2,700,000 | 810,000 | 3,510,000 |

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：チタン、バリアメンブレン、歯周組織再生、マイクロメッシュ、バイオミメティクス

1. 研究開始当初の背景

本研究は歯周病により失われた歯周組織の再生を目指して企図したものである。我が国の現状として、歯周病は国民の約8割が罹患しており、歯根の周りの歯槽骨が破壊され、

その多くは歯のみならず、歯槽骨の喪失とともに顎骨も大幅に減少させる。GTR法は歯周炎の治療法の一つとして、歯の喪失を回避しうる保険適応の確立された方法である。一方、歯槽骨の吸収が高度で抜歯を余儀なくされ

た場合、通常の義歯を装着しても安定が悪く、咀嚼機能の低下から消化器系への悪影響や高次中枢機能の低下につながることも危惧されている。これまで我々は長きにわたり細胞レベルのトポグラフィーを持つ生体親和性材料を基材として、tissue engineering を応用し、宿主から採取した組織から得た培養細胞をグラフト化して宿主における再生部位に適用することで、飛躍的な組織造成を達成することを目指していた。特に歯周組織再生法の一つであるバリアメンブレン法に準じて、培養細胞シートを歯周組織中に設置する方法は、東京女子医科大学および新潟大学などで臨床研究が進捗し、従来のバリアメンブレン単独によるスペースメイキング法より質・量においてより優れた歯根膜および歯槽骨再生を達成することが示されている。

本研究に先立ち、我々は、ティッシュエンジニアリングによる歯根膜由来細胞による細胞グラフトの生成に欠かせない担体(スキャフォールド)としてハニカムフィルムを用いることを提唱した。ハニカムフィルムは、疎水性高分子溶液を固体基板上に塗布し、加湿雰囲気下で製膜することにより、直径 1~30 μm における任意の直径で均一化した球状微小孔が密集整列した多孔質膜である。その微小孔内に細胞を落とし込み、細胞キャリアとすることにより、簡便な行程で培養細胞シートを調製できる。このような新規の生体材料を用いた再生治療は、組織造成を質・量共に底上げが出来る上、細胞の移植手法が極めて簡便化されることで、再生医療を広く臨床に広めることに寄与するものである。

しかし、このような外部から細胞などのリソースを宿主内に導入する方法には一つの大きな泣き所がある。それは組織再生のターゲットに再生をはぐくむ空間場を確保する必要があることである。細胞リソースを用いない組織再生療法として歯周組織再生を目的として適用される GTR 法は、骨組織再生法の中核を成すものであるが、これはまさに上記の再生場を歯周組織内に実現することで、残存す骨組織を再生リソースとして、歯槽骨を再生するものである。その再生場を生成するバリアメンブレンとしてのゴアテックス®GTR メンブレンは、ePTFE 製の生体非吸収性材料であり、動作原理は「GTR 法による組織再生のための遮断膜」とされる。その使用目的と効能は「GTR 法において、上皮の埋入や結合組織との接触を防ぎ、歯根膜細胞を根面に誘導して新付着を形成するために用いる」とされている。GTR 法では、歯根膜細胞を根面上に遊走させるために、歯周外科手術によって根面を覆っていた軟組織を周囲に排除した上で、軟組織から根面への組織の再進入を阻止するためにメンブレンが設置される。歯根膜細胞が根面に伸長するに

は最低 2 ヶ月程度を要するので、少なくともその間、メンブレンにはスペースを維持する強度が要求される。そのためゴアテックス®GTR メンブレンには数百 μm 程度の厚みがあり、かつ多孔質素材のため、メンブレン内部に口腔内の雑菌類が侵入しやすいという欠点がある。さらに設置の際は歯肉下に完全に埋設される必要があるが、そもそもヒトの歯肉は 1~2mm 程度と薄く、厚みのあるメンブレンをすべて覆うには、高度な歯周外科テクニックを要する。これには限界もあり、結局歯肉が裂開してメンブレンがひとたび口腔内に露出すればたちまち口腔内細菌の温床となってしまう、結果再生療法は失敗する。バリアメンブレンは GBR 法にも使用されるが、3 ヶ月以上の設置期間が要求されるため、使用中にしばしばメンブレンが歯肉裂開により口腔に露出し、失敗の原因となる。

2. 研究の目的

このように、組織再生を達成するのに実質的な再生プロセス管理において、細胞治療が現実化する過程において上記の課題が露呈した。すなわち、歯周組織再生治療を飛躍的に改善するために必要なスペースメイキングにおいて、それを司る現状のバリアメンブレンには、改善しなければならない以下の課題が顕在化した。

- (1) 膜が厚い。再生スペースを占有し、組織が圧迫され、あるいは被覆した歯肉(粘膜骨膜弁)への血液供給が阻害された場合は粘膜壊死が生じたり、組織再生量が低下する。
- (2) 材質的に弱く、スペース維持に耐えられないことがある。
- (3) 寿命 2 ヶ月と耐久期間が短く、顎骨再生など、半年期間時間を要する広範囲の組織再生には利用しにくい。
- (4) 材質が多孔質のため細菌がトラップされ、感染を招きやすい。そのため、メンブレンが口腔内に露出した際は、再生治療の続行は不可能となる。

我々は上記の欠点を材料学的観点から精査しゴアテックス®GTR メンブレンの弱点を克服し、より安全に、かつ効率よく歯周組織再生および顎骨増生を可能とするバリアメンブレンを達成する必要があると考え、以下の改良点を提唱した。

- (1) 高い生体親和性と安全性がある。
- (2) 誘導する以外の組織進入を阻止する組織隔壁能(バリア機能)を有する。
- (3) 再生に寄与するスペースをより多く提供するため、薄くても再生スペースを確保・維持し続ける高い強度および長期耐久性がある。
- (4) 素材に細菌が侵入してもトラップされにくい単純な内部構造。

これらの改良を達成するには、生体親和性が高く、かつ、現状の ePTFE 製とは比強度で比較にならぬほど強靱である純チタン（純度 99.6%以上）薄板を素材とし、この薄板にわたり、孔径 $\phi 20 \mu\text{m}$ の微細で均一な貫通孔を、高密度に設け、組織進入を阻止するフィルター機能を付与することを考案した。すなわちゴアテックス®GTR メンブレンのフィルター機能を、純チタン薄板を母材とした高精細金属メッシュとして実現しようとしたものである。純チタンを素材としたことで、飛躍的に強靱化がもたらされ、膜厚はゴアテックス®GTR メンブレンよりはるかに少なくても、余りある強度を確保できる。膜厚が大幅に削減されることは、かつてバリアメンブレンが占めていた体積の大半を再生スペースに振り向けられるだけでなく、組織内の圧迫による血行不良を防ぐ効果がある。また構造が単純化され、ゴアテックスの多孔質に比べれば、細菌がトラップされる機会は大幅に少ない。

これらのコンセプトを持って、我々は硬組織造成担体“Pherix TR(フェリックス TR, 仮称)”を創成した。ゴアテックス®GTR メンブレンには無い様々な利点を有する新しいタイプのバリアメンブレンである。その開発にはわが国の誇る純チタン高精度加工技術が応用されている。ちなみに“Pherix TR”の名称は、硬組織欠損部に対する再生もしくは造成法において、造成対象部位に充填した自家骨もしくは人工骨を包埋・固定する“チタンメッシュ”として、骨再生領域の外縁部に位置する膜状の素材であることから、開発品が組織再生部位の周囲において機能する“周縁設置型組織再生用媒体”

(Peripheral-allocated Matrix on the recipient site for Tissue Regeneration)として位置づけられることに由来する。本材料は、歯科における歯槽骨の復元回復および顎堤造成を目的とした、外科的手術による自家骨および人工骨など、充填した骨転化用素材を被覆するチタンメッシュとしての適用を目的として開発された。

そこで本研究では、開発材料がヒトの体内で既存のチタンメッシュ製品と同等の生体機能を達成することを実証するため、ヒト由来細胞を用いた細胞培養試験によって、その効能を評価した。

3. 研究の方法

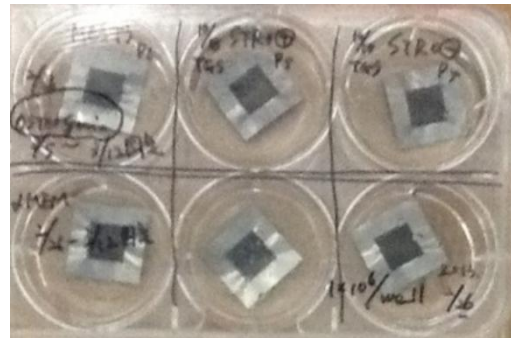
○対象となる材料

試験対象材料は、JIS Type I 純チタン材をベースとした、高精細メッシュである。厚さ $15 \mu\text{m}$ 純チタン薄板に、孔サイズ $20 \mu\text{m}$ の微細孔を、一定間隔にて並列に穿孔し、格子状のメッシュ状に成形した $10\text{mm} \times 10\text{mm}$ の細胞培養試験仕様の試験片である。実際に

ヒトを対象として使用される製品版については、これらの仕様に加え、メッシュの外形サイズおよび形状がヒト患部に応じて設定され、またその際に必要な強度を確保するために、材質と同じ純チタン材による補強用フレームを付与するタイプをラインナップとする。

○培養細胞による試験

2種類の試作チタンメッシュ（孔径 $\phi 20 \mu\text{m}$ 、孔間ピッチ $50 \mu\text{m}$ 、 $10 \times 10\text{mm}$ 、孔数約 40,000、および孔間ピッチ $30 \mu\text{m}$ 、孔数約 110,000）を培養液中に浸漬したのに対して、ヒト歯胚由来細胞（STRO-1 陽性、陰性）を、1well あたり 1×10^6 にて播種し、72 時間にわたり培養を行った（下図）。尚、コントロールとしては、既に平成 4 年に国内で承認され販売されている、マイクロ穿孔サイズの硬組織再生のための移植人工骨被覆用チタンメッシュ（Frios® Boneshield : デンツプライ三金製）を使用した。



10mm 角の純チタンマイクロメッシュ上における細胞培養

試作品上にて培養後、細胞を 37°C に暖めた PBS で洗浄、同じく 37°C に暖めた 4 % パラホルムアルデヒドにて固定した。その後、PBS 洗浄を 3 回繰り返した後、1 % 濃度 Triton X-PBS 処理（10 分間）を 3 回繰り返し、0.05 % 濃度 Tween-PBS 処理（5 分間）、10 % Goat Serum-0.05 % Tween-PBS 処理（15 分間）の後、0.05 % 濃度 Tween-PBS で洗浄した。抗体希釈液として 10 % 濃度 Goat Serum (SIGMA-ALDRICH) -PBS を使用し 100 倍希釈された抗ビンキュリン抗体（MS X Vinculin, CHEMICON）を一次抗体として処理（ 37°C 、90 分間）を行い、0.05 % 濃度 Tween-PBS 処理（10 分間）を 3 回行った。次に 1000 倍希釈された Alexa Fluor 546 標識抗マウス IgG (CHEMICON) と Alexa Fluor 488 phalloidin (Molecular Probes) を二次抗体として使用して処理（ 37°C 、60 分間）を行い、ビンキュリンとアクチンを選択的に染色した。0.05 % Tween-PBS で処理（10 分間）を 2 回繰り返し、PBS で洗浄後、DAPI solution (DOJINDO) で核を染色し、蛍光抗体染色試

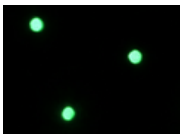
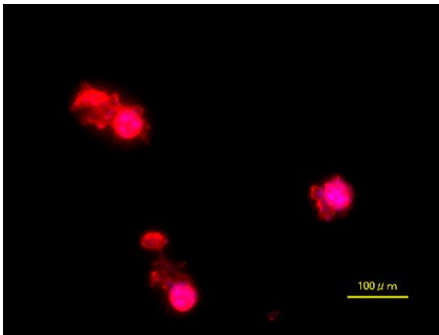
料とした。作製された試料は蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

・培養組織像

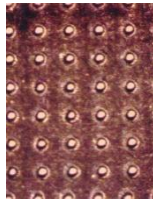
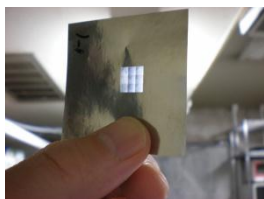
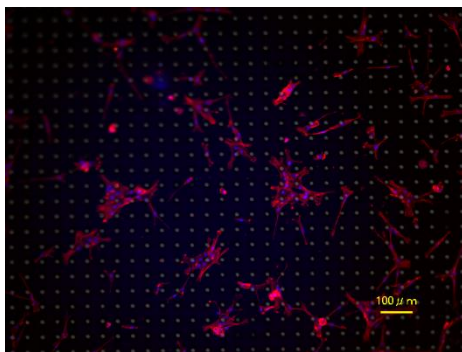
試作品上でヒト歯胚由来細胞を 72 時間培養したところ、チタンメッシュ従来品 (Frios® Boneshield) では、開孔部に細胞塊が進入しながら流出する様相を呈し、その反面、材料表面に殆ど細胞の付着が全く認められなかった(下図)。

従来品 (Frios® Boneshield)



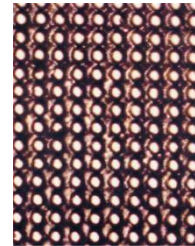
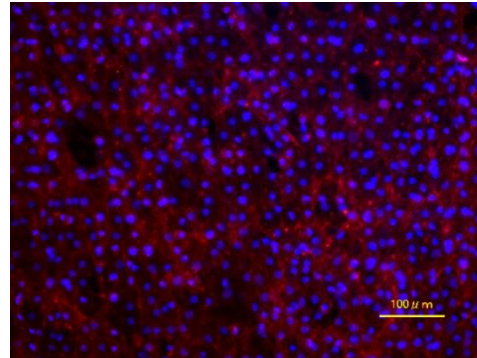
一方、製品仕様の試作品 (孔径 $\phi 20 \mu\text{m}$ 、孔ピッチ $50 \mu\text{m}$) 上では微細貫通孔をアンカーとして多数の細胞が付着・増殖していた(下図)。

開発品 (孔径 $\phi 20 \mu\text{m}$ 孔ピッチ $50 \mu\text{m}$) Boneshield)



また、細胞数は高密度の高さに応じて明らかに増加した(下図)。

開発品 (孔径 $\phi 20 \mu\text{m}$ 孔ピッチ $30 \mu\text{m}$) Boneshield)



・考察

試作品のチタンメッシュは、良好な生体親和性に加え、培養細胞の付着と増殖を促進することが示唆された。チタンメッシュ上では細胞が多数付着して盛んに進展・増殖したものの、貫通孔は専ら細胞体が支持されるアンカーとなるものの、そこに進入する細胞は見られなかった。細胞増殖数はメッシュのピッチが小さくなることで飛躍的な促進効果を得られることが明らかとなった。

本試験によって、上記いずれの培養細胞においても、その増殖度は孔の密度の高さに応じて明らかに増加しており、この結果より、開発品の良好な生体親和性が示されると共に、従来のチタンメッシュ製品と比較して培養細胞に対する増殖を賦活する効果が高いことが示唆された。その要因として開発品では微細貫通孔がアンカーとなり細胞が容易に付着できるとともに、遊走の際も足場(スキャフォールド)としての効果を示した結果、増殖を促したものと思われる。

ヒト組織細胞の通過できる最小サイズは直径 6~8 ミクロンと言われている。一方で本試験品のチタンメッシュは孔径が $20 \mu\text{m}$ であり、細胞の通過は物理的には可能である。しかし、実際には付着した細胞が貫通孔に進入する挙動は、従来品のチタンメッシュである Frios® Boneshield における推定 $50 \mu\text{m}$ 孔径サイズと比較すると盛んには生じてはならず、 $20 \mu\text{m}$ メッシュであっても十分な細胞

バリアとなることが示唆された

最も重要である製品の生体親和性についてみると、試作品試料上では歯根膜由来細胞は順調に増殖し、偽足を伴いながら表面に伸展しつつ旺盛な proliferation を示し、増殖度は極めて良好であった。レーザー加工が高密度に施された部位でも順調に細胞は生育したことから、レーザー加工が生体親和性を損なう可能性は小さいものと思われた。穿孔孔径の微小化と高密度化によって、細胞の付着と増殖が大幅に促進された。加工サイズを 20 μm に微細化した結果、細胞が形状に反応し始め、細胞足場として付着・増殖・組織化を飛躍的に促進する。この効果はスキャフォールド機能として、再生医療へ応用が見込まれる。試作品はバリアメンブレンの改良品として開発されたが、ティッシュエンジニアリングにおける培養細胞シート、人工臓器用細胞マトリクスなど、生体再生用基幹材料としてのデリバティブが期待される。

尚、併せてビーグル犬の下顎骨を用いた本開発品の生体親和性試験では、適用された部位の骨再生が順調に達成され、開発品の硬組織再生材料としての効能が裏付けられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① Ishihata, H.*, Kanehira, M., Finger, W. J., Shimauchi, H. and Komatsu, M.: Effects of applying glutaraldehyde-containing desensitizer formulations on reducing dentin. Journal of Dental Sciences 7: 105-110, 2012.

② 石幡 浩志*, 岩間張良, 下村政嗣, 島内英俊: 生体親和性ハニカムフィルムを利用したティッシュエンジニアリングによる歯周組織再生法の創生. 日本歯科医学会誌 31: 44-48, 2011.

③ Ishihata, H.*, Shimauchi, H., Kanehira, M., Komatsu, M. and Finger W. J.: Effects of glutaraldehyde, HEMA, and Gluma Desensitizer on in vitro dentin permeability. International Journal of Contemporary Dentistry 2: 3-8, 2011.

④ Ishihata, H.*, Finger, W. J., Kanehira, M., Shimauchi, H. and Komatsu M.: In vitro dentin permeability after application of Gluma® desensitizer as aqueous solution or aqueous fumed silica dispersion. Journal of Applied Oral Science 19: 147-153, 2011.

[学会発表] (計 7 件)

① Hiroshi ISHIHATA, Hiroyuki KANEKO,

Mitsuru SHIMONISHI, Masashi KOMATSU, Hidetoshi SHIMAUCHI and Keiichi SASAKI, : "Development of 20 μm Micro-pored Full-Titanium Membrane for Bone Argumentation" : 日本機械学会第 24 回 バイオエンジニアリング講演会 Japan-Korea Joint Symposium "Biomechanics and biomaterials for hard tissue" Jan 8 2012 Toyonaka Osaka University. Osaka

② Nagayoshi Iwama, Hiroshi Ishihata, Takahito Kawano, Hidetoshi Shimauchi, Masatsugu Shimomura: Application of honeycomb patterned porous films as functional scaffold for periodontal regenerative therapy: JSPS/APCPI in yonsei Univ. Joint Seminar, 韓国, ソウル, 2012. 3. 8-2012. 3. 10

③ 岩間張良, 河野喬仁, 石幡浩志, 島内英俊, 下村政嗣: 歯周病と闘う高分子多孔質素材～ハニカムフィルムを用いたヒト歯根膜由来細胞の培養～: 第 39 回東北地区若手研究会夏季ゼミナール, 秋田県仙北市 (2011. 7. 27 -2011. 7. 29)

④ 岩間張良, 石幡浩志, 河野喬仁, 下村政嗣, 島内英俊: ハニカムフィルム上における培養ヒト歯根膜由来細胞の形態とその分化、第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会, 日本, 下関市, (2011. 9. 24)

⑤ 岩間張良, 河野喬仁, 石幡浩志, 下村政嗣, 島内英俊: ハニカム状多孔質膜の歯周組織再生療法への応用: 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 日本, 京都市, (2011. 11. 21-2011. 11. 22)

⑥ 石澤知寛, 佐藤秀明, 石幡浩志, 島内英俊: グレーシースケーラーによるヒト象牙質の掻爬試験 (切れ刃のすくい角と表面粗さの関係), 2011 年日本歯科保存学会秋季学術大会 大阪 2011 年 10 月 20~21 日

⑦ 田中大資, 佐藤秀明, 佐藤秀樹, 石戸谷重晴, 石幡浩志, 小松正志: ブラシ研磨による歯科用純チタンの精密研磨, 2011 年日本歯科保存学会秋季学術大会 (2011 年 10 月 20~21 日) 大阪

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 医療用多孔プレート

発明者: 石幡 浩志, 小泉俊郎, 吉川研一

権利者: 株式会社ラステック, 新世代加工システム株式会社

種類: 特許

番号：特願 2012-43877
出願年月日：2012年2月28日
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石幡 浩志 (ISHIHATA HIRSOHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40261523

(2) 研究分担者

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70187425

(3) 連携研究者

大森 整 (OHMORI HITOSHI)

独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・主任研究員・部長

研究者番号：50233276

京極 秀樹 (KYOUGOKU HIDEKI)

近畿大学・工学部・教授

研究者番号：10258056

小松 正志 (KOMATSU MASASHI)

東北大学大学院・歯学研究科・教授

研究者番号：10005069

佐藤 秀樹 (SATO HIDEKI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：60154085