

平成30年6月26日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20507

研究課題名(和文)軟組織の治癒に着目した新規骨増生法の検討

研究課題名(英文)Fabrication of nobel bone grafting material with soft tissue healing enhancement

研究代表者

ラフマティア ユニアドゥイ(Rakhmatia, Yunia Dwi)

九州大学・歯学研究院・特別研究員

研究者番号：30710214

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):近年、研究者らは、健康な部位からの骨の侵襲的な収穫、病気の伝達および抗原性のリスクを回避または最小限に抑えながら、新しい骨の相対量を高くするための合成骨代用品を開発および製造している。骨再生に使用される材料の作用機序は骨伝導であり、骨組織の成長および形成を促進する足場を提供する。炭酸アパタイトブロックの生物活性を高める有望な技術は、骨誘導性成長因子または複合体に組み込まれた薬物の添加である。コレステロール低下薬であるスタチンは、骨形成に正の効果をもつことが示されている。さらに、最適濃度のスタチン溶液は、再生可能性を高めるために骨移植片と組み合わせることができず。

研究成果の概要(英文): In recent years, researchers have developed and fabricated synthetic bone substitutes to achieve a high relative amount of new bone, while avoiding or minimizing the risks of invasive harvesting of bone from a healthy site, disease transmission and antigenicity. The mechanism of action of materials used for bone regeneration is osteoconduction, which provides a scaffold for enhanced bone tissue growth and formation. A promising technique to increase the bioactivity of carbonate apatite blocks is the addition of osteoinductive growth factors or drugs incorporated into the composite. Statin, a cholesterol-lowering drug, has been shown to have positive effects on bone formation. Additionally, solutions of statin in optimal concentrations could be combined with bone grafts to enhance their regenerative potential.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：骨補填材料

1. 研究開始当初の背景

近年、研究者らは、健康な部位からの骨の侵襲的な収獲、病気の伝達および抗原性のリスクを回避または最小限に抑えながら、新しい骨の相対量を高くするための合成骨代用品を開発および製造している。骨再生に使用される材料の作用機序は骨伝導であり、骨組織の成長および形成を促進する足場を提供する。炭酸アパタイトブロックの生物活性を高める有望な技術は、骨誘導性成長因子または複合体に組み込まれた薬物の添加である。コレステロール低下薬であるスタチンは、骨形成に正の効果を有することが示されている。さらに、最適濃度のスタチン溶液は、再生可能性を高めるために骨移植片と組み合わせることができるとされています。

2. 研究の目的

本研究の目的は、スタチン含有カーボネートアパタイトの骨誘導効果を調査し、この複合体をラット切歯抽出ソケットに適用した後に誘導される骨形成の量を評価することであった。

3. 研究の方法

3.1. 標本の作成

市販の硫酸カルシウム半水和物 ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$) を水：粉末比 1：2 で蒸留水と混合した。フルバスタチン (FS) 群については、0.5mg の FS を添加し、1g の硫酸カルシウム半水和物ペーストと混合した。このペーストを円筒形ステンレス鋼型 (直径 6mm、厚さ 3mm) に充填した。金型の両面をガラス板で覆い、室温で 24 時間保持して石膏を硬化させた。

低結晶性アパタイトを製造するために、水熱処理および 1mol / L リン酸三ナトリウム (Na_3PO_4) 水溶液 15mL 中に浸漬するために、FS (HA グループ) または FS (HAFS グループ) を含有する 6 種の石膏顆粒を各容器に入れた。次に、容器を 100 のオープンに 24 時間入れた。

炭酸アパタイト試料を作製するために、0.4mol / L リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) と 0.4mol / L 炭酸水素ナトリウムの 15mL 混合物に、FS (CO 基) または FS を含む凝結石膏顆粒を浸漬した NaHCO_3 で洗浄し、水熱容器に入れ、乾燥炉中で 200 で 24 時間保持した。処理後、試験片を蒸留水で洗浄し、60 で 24 時間乾燥させた。次に、試料を X 線回折 (XRD) 分析によって特徴付け、走査型電子顕微鏡を用いて形態学的に評価した。

3.2. 動物の外科手術

この研究では、48 匹の 4 週齢の雄ラットを使用した。下顎右切歯を慎重に取り出し、HA、HAFS、CO または COFS のいずれか 60mg を充填し、これを根管プラザと凝縮させた。材料移植の 2 および 4 週間後に、全ての動物を安楽死させた。軟組織のない右の下顎を切開し、試料を 10%ホルマリン中で 1 週間固定した。

3.3. マイクロコンピュータトモグラフィー分析

60kV / 167 μA の Al-0.5 フィルターで in vivo マイクロ CT スキャナー (SkyScan 1076、Aartselaar、Belgium) を用いて未処理の下顎骨を画像化し、分析した。ROI 分析は、 mm^3 で測定した骨量 (BV) および総組織体積 (TV) の主要パラメータを評価するために行った。

3.4. 組織学的評価

盲検されていない矢状切片 (厚さ約 70 μm) を切断し、研磨し、マッソントリクローム法を用いて染色した。骨および細胞の組織応答の組織学的評価のために、サンプルを光学顕微鏡下で調べた。

3.5. 統計分析

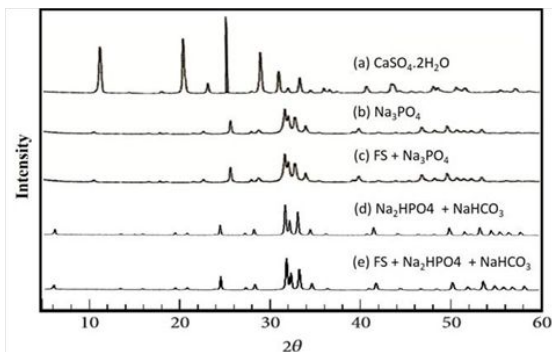
実験データは、ポストホック分析のための Tukey-Kramer 検定を用いた分散分析 (ANOVA)

によって評価した。

4. 研究成果

4.1. X線回折分析

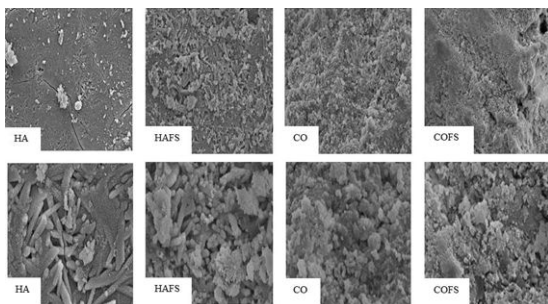
この研究で使用した粉末顆粒のXRDパターンを図1に要約する。 Na_3PO_4 溶液に浸漬したFSの有無にかかわらず石膏を置くと、広いアパタイトピークが示され、石膏から低結晶性アパタイトへの組成変化が起こったことが示される。石膏をフルバスタチンの有無にかかわらず設定し、 Na_2HPO_4 と NaHCO_3 の溶液(図3d-e)に200で48時間浸漬したところ、アパタイトのピークが広く認められました。



【図1】すべての試料の粉末XRDパターン。

4.2. 走査型電子顕微鏡分析

HA、HAFS、COおよびCOFS顆粒の走査型電子顕微鏡(SEM)画像を図2に示す。この密度は、HAFS顆粒では他の顆粒よりも幾分か高かった。HAFS顆粒は、多くの細粒状結晶で覆われた針状石膏結晶構造の形態を保持していた。COおよびCOFS顆粒の形態は、HAおよびHAFS群のものよりも小さく、絡み合っていない針状結晶の密接な絡み合いからなっていた。

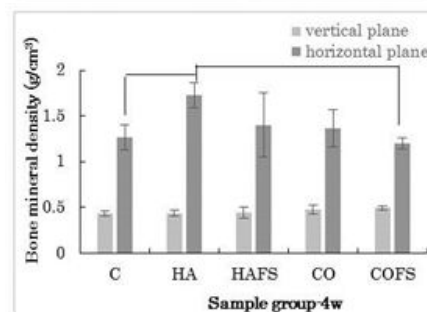
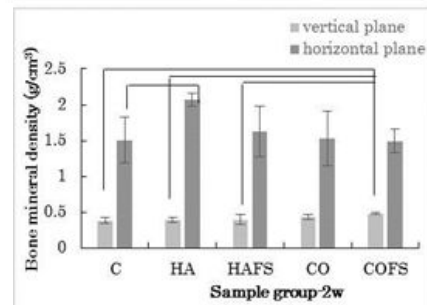
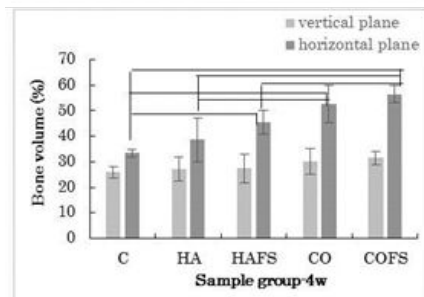
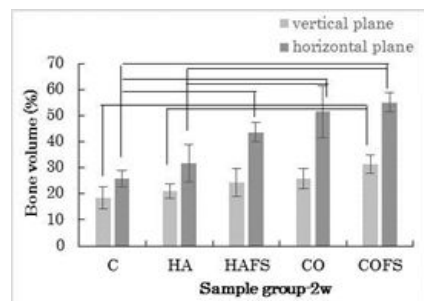


【図2】倍率x1000(上)およびx4000(下)

のすべてのグループのSEM分析。

4.3. マイクロコンピュータトモグラフィー分析

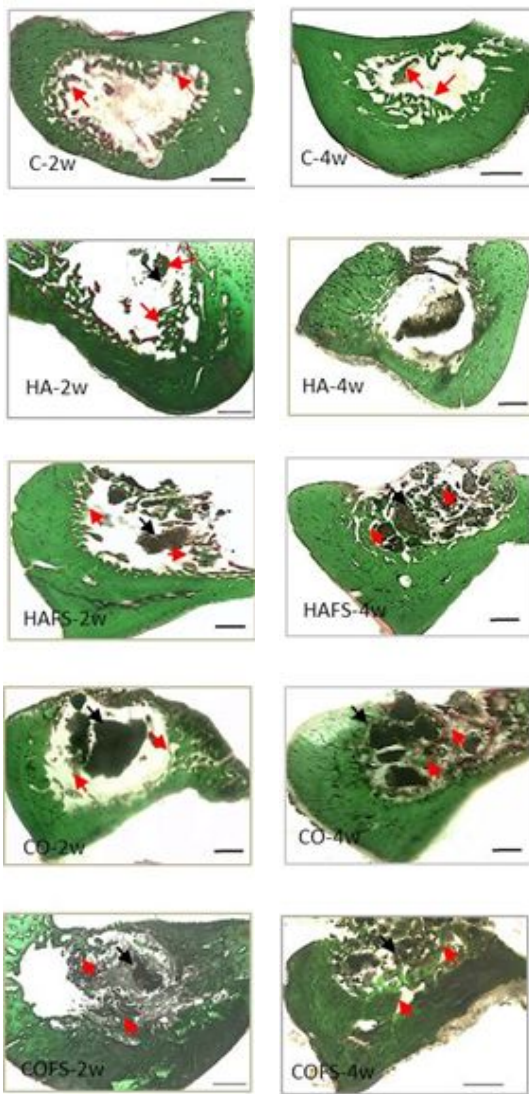
抽出後2週間および4週間の水平および垂直面内のすべてのグループのマイクロCT画像を図3に示す。COFSグループの骨量は、他のグループの骨量と比較して、水平および垂直平面抽出の2および4週間後。しかし、COFS群のBMDは、水平面ではHA群のBMDよりも低かったが、垂直面ではより高かった。水平面と垂直面間のROIの差は、実験群の骨量の差を引き起こした可能性がある。



【図3】 2週間と4週間の右下切歯摘出術のマイクロCT解析：骨量、骨密度。0.05未満のP値は有意であると考えられた。

4.4. 組織学的評価

すべての試料群において新しい骨形成が観察された。しかし、COFS群では、2週間と4週間の両方で、他の群と比較してより大きな骨形成領域が観察された（図4）。



【図4】 2週間および4週間での右下切歯摘出用ソケットの組織像。赤い矢印は新しい骨形成を示し、黒い矢印は治癒ソケットの残存骨代替物を示す。倍率：x4バー：500 μm、x20バー：50 μm。

結論：本発明者らの知見から、フルバスタチン含有するCO3Apの骨伝導性および骨誘導性機能は、抽出ソケットにおける治癒の初期段階において骨形成を促進することを示唆している。骨再生治療の新たな進展に照らして、治療中のリスクを最小限に抑えた低コストの生体材料の開発を継続することが重要であり、技術感度が低く再現性が低い。

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 8 件)

1. Haomiao Zhang, Yasuko Moriyama, Yasunori Ayukawa, Yunia Dwi Rakhmatia, Yoko Tomita, Noriyuki Yasunami, Kiyoshi Koyano. Generation and histomorphometric evaluation of a novel fluvastatin-containing poly(lactic-co-glycolic acid) membrane for guided bone regeneration. *Odontology*. May 2018 [Epub ahead of print] (査読有り)
2. Yunia Dwi Rakhmatia, Yasunori Ayukawa, Yohei Jinno, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano. Micro computed tomography analysis of early stage bone healing using micro-porous titanium mesh for guided bone regeneration: preliminary experiment in a canine model. *Odontology*, 105(4), 408-417, Oct, 2017. (査読有り)
3. Noriyuki Yasunami, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Ikiru Atsuta, Yunia Dwi Rakhmatia, Yasuko Moriyama, Tomohiro Masuzaki, Kiyoshi Koyano. Acceleration of hard and soft tissue healing in the oral cavity by a single transmucosal injection of fluvastatin-impregnated poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. An in vitro and rodent in vivo study.

Biomedical Materials, 11(1), 2015. (査読有り)

4. **Yunia Dwi Rakhmatia**, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Ikiru Atsuta, Kiyoshi Koyano, Fibroblast attachment onto novel titanium mesh membranes for guided bone regeneration, *Odontology*, 103(2), 218-226, May, 2015 (査読有り)
5. **Yunia Dwi Rakhmatia**, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano, Micro-CT and histomorphometric analyses of novel titanium mesh membranes for guided bone regeneration: A study on rat calvarial defects, *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 29(4), 826-835, July, 2014. (査読有り)
6. **Yunia Dwi Rakhmatia**, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Ikiru Atsuta, Kiyoshi Koyano. Current barrier membranes: Titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications, *J Prosthodont Res*, 57(1), 3-14, January, 2013. (査読有り)
7. Akihiro Furuhashi, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, Mami Sakaguchi, **Yunia Dwi Rakhmatia**, Koichi Yamane, Hideyuki Ookawachi, Kiyoshi Koyano, Formation of the biologic width and epithelial attachment around zirconia as an implant abutment material, *The Quintessence YEAR BOOK*, p. 184-19, March, 2012 (査読有り)
8. Akihiro Furuhashi, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, **Yunia Dwi Rakhmatia**, Noriyuki Yasunami, Kiyoshi Koyano. Influence of titanium surface topography on peri-implant soft tissue integration, *Key Eng Mater*, 529-530, 559-564, November,

2012 (査読有り)

【学会発表】(計 9 件)

1. Noriyuki Yasunami, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Ikiru Atsuta, **Rakhmatia Yunia Dwi**, Yasuko Moriyama, Kiyoshi Koyano. Accelerated healing of extraction socket and peri-implant tissue by statin. International Association for Dental Research, Boston, USA, March 2015
2. Furuhashi A, Ayukawa Y, Atsuta I, **Rakhmatia Yunia Dwi**, Yasunami N, Koyano K. Soft Tissue Response to Dental Implant Materials 日本学術振興会・頭脳循環を加速する戦略的国際研究ネットワーク推進プログラム・口腔から健康長寿を支えるプロジェクト推進に向けた研究拠点構築プログラム Kick off symposium. 福岡.2月.2015
3. **Yunia Dwi Rakhmatia**, Yasunori Ayukawa, Yohei Jinno, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano. Effectiveness of novel micro-porous titanium mesh membrane for guided bone regeneration in early stage healing of canine mandible defect. Indonesia Prosthodontic Society and Japan Prosthodontic Society Joint Meeting, Bali, Indonesia, October, 2014.
4. Akihiro Furuhashi, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, **Yunia Dwi Rakhmatia**, Noriyuki Yasunami, Mami Sakaguchi, Kiyoshi Koyano. Enhanced soft tissue integration around hydrothermal calcium-treated dental implants. International Association for Dental Research General Session and Exhibition, Seattle, Washington, USA, March, 2013.
5. Akihiro Furuhashi, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, Noriyuki Yasunami, **Yunia Dwi Rakhmatia**, Mami Sakaguchi, Kiyoshi Koyano. Effect of differences

- abutment implant material to soft tissue integration. Summer Seminar of Japan Society for Dental Materials Kyushu Branch, Nagasaki, August 2012.
6. Akihiro Furuhashi, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, **Yunia Dwi Rakhmatia**, Kiyoshi Koyano. Soft tissue response to various kinds of implant abutment materials. The 8th Congress of the Asian Academy of Osseointegration, Taipei, Taiwan, November, 2012.
 7. Akihiro Furuhashi, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, **Yunia Dwi Rakhmatia**, Noriyuki Yasunami, Kiyoshi Koyano. Influence of titanium surface topography on peri-implant soft tissue integration. The 24th Symposium and Annual meeting of International Society for Ceramics in Medicine, Fukuoka, Japan, October, 2012.
 8. **Yunia Dwi Rakhmatia**, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano. The Evaluation of newly developed titanium mesh membrane for guided bone regeneration on rat cranial defects. The 33th Annual Meeting of Japanese Society for Biomaterials, Kyoto, Japan, November, 2011.
 9. **Yunia Dwi Rakhmatia**, Yasunori Ayukawa, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano. Use of newly developed titanium mesh for guided bone regeneration: Evaluation of optimal thickness on rat calvarial defect. The 7th Biennial Meeting of Asian Academy of Prosthodontics, Shanghai, China, October, 2011.

〔図書〕(計 0件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
ユニア ドゥイ ラフマティア
(Yunia Dwi Rakhmatia)
九州大学・歯学研究院・特別研究員
研究者番号：30710214