

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20550

研究課題名(和文) 血小板凝集能を持つ新規複合材料の歯周組織再生療法への応用

研究課題名(英文) The ability of newly formed synthetic collagen of bone regeneration

研究代表者

木村 大輔 (KIMURA, Daisuke)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30632054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔外科領域や歯周病治療において骨欠損は共通点がある。自家骨移植は2回の手術が必要で採取骨の可能な量は限定される。それゆえ、外科領域に適用される生体吸収性の足場材料には優れた操作性や自己の組織に置換する特徴が必要である。そこでPro-Hyp-Glyのシーケンスで構成されたPoly(PHG)とTCPを熱架橋により作製されたスポンジ材料を開発した。そしてその移植材を下顎骨に骨欠損を作成し移植を行った。術後2週、4週ではPolyPHG/TCPグループの骨体積はその他のPoly(PHG)単体群、骨欠損のみを形成した群に比べて有意に高かった。術後8週においては骨体積に大きな差は見られなかった。

研究成果の概要(英文)： Bioabsorbable scaffolds with superior handling characteristics for surgical applications are required, which are replaceable by autologous tissue. We constructed collagen model polypeptides comprising a poly(PHG) made by polycondensation of Pro-Hyp-Gly and porous alpha-tricalcium phosphate sponge as scaffold, by dehydrothermal crosslinking, and examined them on surgically formed canine mandibular bone defects. At 2 and 4 weeks post implantation, bone volumetric densities (VD) for the poly(PHG)/-TCP group were higher than those for poly(PHG) and no-implant groups. Difference in VD was insignificant among the three groups 8 weeks post-implantation. Histological evaluation 4 weeks post-implantation revealed degraded poly(PHG) and newly formed bone on the -TCP particle surfaces. At 8 weeks post-implantation, continuous cortical bone formation with Haversian structure was observed in both implant groups. Therefore, this composite can be applied in bone defect treatment.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯槽骨再生

### 1. 研究開始当初の背景

骨欠損は歯科領域において重度の歯周炎や外傷などでしばしば遭遇する。骨欠損に対する治療法は現在においても自家骨移植がゴールドスタンダードとされているが、採取量の限界や2箇所の手術が必要なことなど様々な欠点もある。このような事象を踏まえ自己組織に置換する生体吸収性材料が必要とされている。外科領域に適用される生体吸収性の足場材料には優れた操作性や自己の組織に置換する特徴が必要である。しかしながら従来型の粒子上の材料は骨欠損に適用することが難しい場合も存在する。

例えばハイドロキシアパタイトやリン酸三カルシウムなどのリン酸カルシウム系の材料は生体安定性と生体活性に優れすでに様々な臨床症例において使用されている。またその他に骨再生に使用されている人工材料としては PLGA などのポリ乳酸を使用したものや  $\beta$ -TCP を用いたものがあるが、PLGA は炎症反応が比較的起こりやすく、そのため炎症を抑制する様々な方法が検討されているが、完全消滅までには至っていない。また  $\beta$ -TCP を用いたものは動物を用いた組織学的研究とヒトでの組織学的研究において、 $\beta$ -TCP が急速に吸収されるか結合組織で被包化され、骨形成はわずかであり、歯周組織再生も起こらないことを示した。さらに日本で市販されており歯科領域に臨床応用が認可されている足場材料として合成ハイドロキシアパタイトがあるが、動物を用いた研究やヒトの組織学的研究では骨形成は限定的で HA 粒子の多くは結合組織で囲まれ、新生骨は既存骨に近接した粒子の周囲のみであったとする報告がある。北村らは連続したポーラス構造を持った TCP を開発し、その製造行程は単純である。研究グループはポテトのデンプンと TCP の混濁液から TCP を作成し、それは 1100 に達するまで安定している。歯槽骨や口蓋骨のような広範な部位の再建を対象とする場合、機能的な足場が必要不可欠となってくる。天然コラーゲンが細胞接着性を有する為に足場として有利に利用されてきたことや足場材料に間葉系幹細胞を播種することで、生体材料が足場として機能し骨再生能がより増強するという報告を行ってきたが、安全性を保障するために厳格なガイドラインと安全性試験が課されているがアレルギーや未知のウィルスに対する対応やその他の感染因子を完全に排除できてはいない。Poly(PHG)は、炎症性を示すことなく、細胞増殖、分化のための足場としての役割を担っており、また、数々のリン酸カルシウム材料の中で、alpha-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) は生体吸収スピードが速い骨再生材料である。

臨床現場においてコラーゲンは様々な形状で使用され広く使用されている。なぜなら良好な生体分解性、生体安定性、吸収性を示すからである。例えばコラーゲンスポンジは

様々な種類の組織の足場材料として使用されている。我々の事前の研究で Poly(PHG) と TCP 粒子を犬の大腿骨に移植する実験を行った。これらの粒子は炎症を引き起こさなかった。それ以上に、完全な吸収と層板骨のリモデリングが認められた。

### 2. 研究の目的

今回の実験では、Poly(PHG)と細管構造を持つ TCP を脱水熱架橋法により構成されたスポンジを足場材料として使用して骨形成が起こるかを実験した。

### 3. 研究の方法

#### (1) Poly(PHG)

Poly(PHG)の作成には近年おもに使用されている方法で行った。PHG をリン酸塩緩衝液に溶解し、メチル-3 (3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドトリオライトと 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを混合したものを添加した後、4°C 条件下で 2 時間攪拌、さらに 20°C 下で 46 時間攪拌し、反応した混合物を 48 時間透析し全ての不純物を取り除いた。その後 5 mg/ml に濃縮した溶液を凍結乾燥した。

#### (2) $\beta$ -TCP

結晶性、X線回折装置を使用して測定し、粒子径は、レーザー回折粒子分析装置を用いて計測を行った。平均粒子径 580.0  $\mu$ m、136.2  $\mu$ m の 2 種類を使用した。

#### (3) 実験モデル

実験動物に移植する群として、3 つのグループを作成した。Poly(PHG)と TCP を混合した実験群、Poly(PHG)のみの群、対照群として骨欠損のみの群とした。それぞれイヌの下顎骨へ移植を行い、その後、2 週、4 週、8 週後に動物を安楽死させ、周囲組織を一塊として採取した。

#### (4) 実験動物

実験には 6 頭の体重 10 kg 以内の 2 歳齢のビーグル犬を使用した。実験動物は 24 週に調節された環境下で飼育を行った。実験期間を通して健康で体重に変動もなかった。

#### (5) 動物実験について

動物をペントバルビタールで鎮静後、2% リドカインで局所麻酔を行った。手術用の替刃メスを用いて骨膜に至る切開を行った後に、骨膜を剥離した。インプラント用のツイストドリルを用いて直径 4 mm、深さ 6mm の骨欠損を作製した。骨片を除去し欠損を作製、試料を埋入後、縫合した。

#### (6) 評価方法について

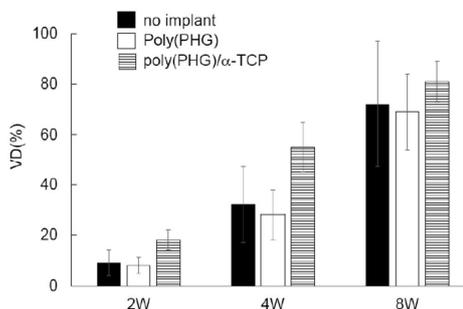
移植後 2 週、4 週、8 週で頭蓋骨を摘出しマイクロ CT による骨体積の定量的評価、HE 染色による組織学的な観察を行った。マイクロ CT (SMX-130CT, SHIMADZU) を用いて 20  $\mu$ m 厚のスライスデータを取得。それらを三次元画像

処理ソフト (VG Studio Max Ver 1.2 Volume Graphics) を用いて、三次元画像化を行い、海綿骨の骨体積比を求めた。統計解析には SPSS 12.0 for windows (SPSS, Inc, Chicago, IL) を用い危険水準は 1% とした。

#### 4. 研究成果

##### (1) マイクロ X 線画像解析

骨欠損部の 3 次元解析では、Poly(PHG) のみの群と骨欠損のみの群では 2 週から 4 週にかけて、骨欠損部は外側からリング状に新生骨形成が認められた。Poly(PHG) と TCP を混合した実験群では新生骨量は内側から時間とともに増加し、4 週にむかうにつれ、欠損部全体が骨量構造をもった新生骨で覆われつつある。新生骨の体積評価では、術後 4 週では、Poly(PHG) と TCP を混合した実験群が最も高い値を示し、骨欠損のみの群が最も低い値を示した。各群間で有意差は認められなかったが、Poly(PHG) と TCP を混合した実験群では新生骨形成スピードが最も速かった。術後 8 週では、各群間で有意差が認められなかったものの、Poly(PHG) と TCP を混合した実験群がもっとも大きな骨体積を示した。



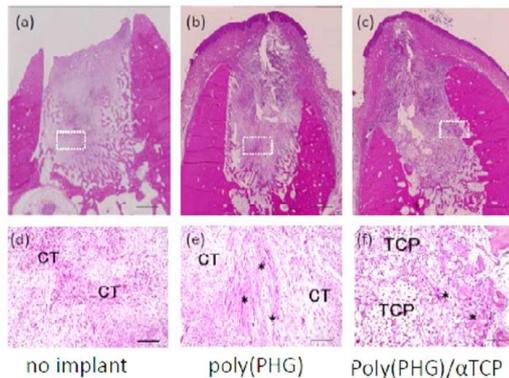
##### (2) HE 染色による組織学的評価

術後 2 週では全ての群において、poly(PHG)、-TCP とともに吸収は認められなかった。骨欠損のみの群では、Poly(PHG) は結合組織の侵入が認められるが、細胞密度と染色状態は他の 3 つの実験群でみられる結合組織とは異なっていた。新生骨は Poly(PHG) の表面に存在し、わずかな骨が細胞も表面に存在していた。実験群では、骨欠損部はほぼ TCP 粒子に覆われおり、骨様構造が -TCP 粒子の内部に認められた。しかし TCP 粒子に大きな変化はなく、Poly(PHG) はいまだ残存している。対照群は疎な結合組織が認められた。

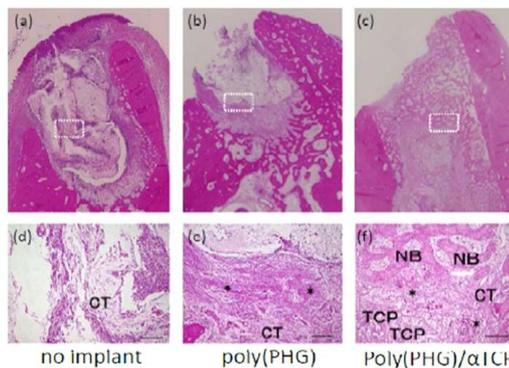
術後 4 週では、Poly(PHG) のみの群では、新生骨および骨様構造が存在し、新生骨周辺に骨芽細胞が認められ、Poly(PHG) の大きさも 2 週と比較して小さくなっていった。Poly(PHG) と TCP を混合した実験群では骨芽細胞が TCP 粒子の周囲に存在し、Poly(PHG) に吸収が認められた。また Poly(PHG) 周辺には結合組織と血管が認められた。TCP 粒子が残存しているが、本来の形状は無く、小さくなっていった。粒子の中に

は深い新生骨の陥入が認められるものもあり、TCP 粒子間のスペースはほぼ新生骨が形成されていた。

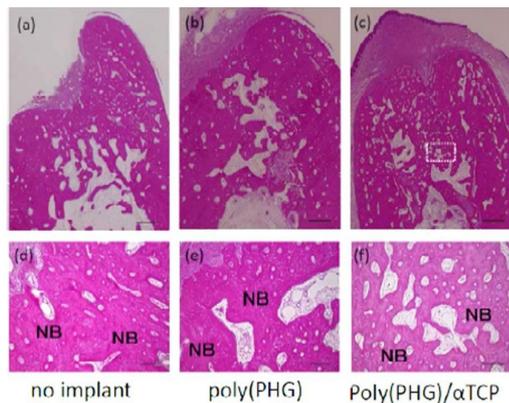
術後 8 週では、Poly(PHG) と TCP を混合した実験群と Poly(PHG) のみの群では、-TCP 粒子も Poly(PHG) も完全に吸収され、新生骨に置換されていた。新生骨は骨梁構造を呈しており、結合組織が新生骨の周辺に確認できた。本来の形状はなく、網状を呈している。



術後 2 週 H E 染色画像



術後 4 週 H E 染色画像



術後 8 週 H E 染色画像

##### (3) 考察

骨再生に利用される人工材料は、歯科、整形外科の多くの場面で自家骨移植、他家骨移植を行う際に幅広く使用されている (Guillemin G, Patat JL, Fournie J, Chetail M. The use of coral as a bone graft substitute. J Biomed Mater Res 1987; 21: 557-567.). Tanihara ら (Tanihara M,

Kajiwara K, Ida K, Suzuki Y, Kamitakahara M, Ogata S. The biodegradability of poly(Pro-Hyp-Gly) synthetic polypeptide and the promotion of a dermal wound epithelialization using a poly(Pro-Hyp-Gly) sponge. J Biomed Mater Res A 2008 Apr; 85: 133-139.) は3次元織物構造を形成した Poly(PHG)で作られたコラーゲンモデルについて公表している。我々はイヌの下顎骨欠損モデルを作製し、Poly(PHG)に様々な大きさの粒子の TCP を混合したものの骨形成能の評価を行った。

TCP 粒子のサイズは新生骨の形成に有用であることが分かった。スキャフォールドとして使用される高分子化合物は一般的に in vivo では早期に減少し、再生組織に置換する(Hickey T, Kreutzer D, Burgess DJ, Moussy F. In vivo evaluation of a dexamethasone/PLGA microsphere system designed to suppress the inflammatory tissue response to implantable medical devices. J Biomed Mater Res 2002 Aug; 61: 180-187.)。生体高分子が幅広く使用されている間は、その生体適合性や吸収性の良さから、コラーゲンがゲルやスポンジなどといった様々な形状でクリニックに便利に使用されている。アテロコラーゲンの粒子はテロペプチドを含まず、医療における身近な材料として使用するのであれば非常に抗原性が低い。Schlegel ら (Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felszeghy E, Wiltfang J. De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. Biomaterials 2004 Oct; 25: 5387-5393.) によって、ミニブタの頭蓋骨欠損部に牛のコラーゲンを埋入すると自己産生骨の形成上に新整骨の形成が起きることが証明された。しかし、アテロコラーゲンのような動物由来のコラーゲンの主な欠点として、抗原に対する抵抗性、病原菌汚染、非特異性の細胞接着性が挙げられる。それに対して、Poly(PHG)には動物由来のコラーゲンに見られるような病原菌汚染のリスクが認められず、スキャフォールドとしての poly(PHG)スポンジの有用性が我々の最近の研究で明らかとなった。我々は Poly(PHG)スポンジに MSCs を混ぜた物をミニブタの頭蓋骨欠損モデルに埋入し、Poly(PHG)は組織反応をもたらさないことが判明した(Kimura D, Baba S, Ueda M. Efficacy of bone regeneration with Poly(Pro-Hyp-Gly) synthetic polypeptide sponge as scaffold using bone marrow derived mesenchymal stem cells. Journal of Oral Tissue Engineering 2011; 8: 162-172.)。加えて Poly(PHG)スポンジに MSCs を混ぜた物は Poly(PHG)スポンジ単体と比較すると、ミニブタの頭蓋骨欠損モデルにおける骨形成能を著しく高めることが明らかとなった。幹細胞による治療は組織

再生の全ての分野において理論的に受け入れられるだろう。しかし、費用対効果の面と細胞操作とその治療法自体への規制があるため、現在、それらの臨床応用は進んでいない。

in vivo において、ヒドロキシアパタイトは新生骨形成の割合より低い吸収率をもつ生体材料である。一方、in vivo において TCP はヒドロキシアパタイトと比較し高い生体吸収能をもつ。結局、この TCP のもつ不利な物理的特性が -TCP よりも高く、早いリモデリングにつながっていると考えられる。上記のことから、生体吸収スキャフォールドにはリン酸カルシウムがしばしば混合されるのである。埋入物の中でコラーゲン繊維とその他の初期物質は埋入直後から吸収が始まる。埋入物質の吸収は Poly(PHG)/ TCP 粒子の現象により引き起こされることが組織学的評価により証明された。Poly(PHG)と TCP を混合した実験群では Poly(PHG)の吸収は埋入後 2 週で開始し、4 週間には完了した。一方 Poly(PHG)のみの群は 4 週でも残存量は多く骨再生量も十分ではなかった。このことから、埋入物質が吸収する前に新生骨が形成されることが重要であり、その間に TCP 粒子がスペースメイキングの機能を十分に果たしていることが示唆された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

木村 大輔 (KIMURA, Daisuke)  
大阪歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：30632054

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし