

令和 3 年 4 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04689

研究課題名(和文) 外方性骨誘導のための膜状生体材料の創製と評価

研究課題名(英文) Fabrication and evaluation of film-like biomaterials for outward bone induction

研究代表者

鷓沼 英郎 (UNUMA, Hidero)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：30273303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨欠損や骨造成を、できるだけ短期間でかつ確実にに行わせることのできる材料を開発することである。本研究では、(1)形状復元性を有するポリマーメンブレンでの骨造成、(2)生体吸収性に優れた炭酸カルシウム系骨補填材、(3)柔軟性を有する水酸アパタイトシートの3点に着目し、これらを用いての骨再生を試みた。

(1)のポリマーメンブレンを、半円柱状に成形してウサギ頭蓋骨に載せた状態で埋入したところ、頭蓋骨とメンブレンとの空隙に新生骨形成を認めた。(2)の炭酸カルシウム多孔質焼結体をラット頭蓋骨欠損に埋入したところ、有効な骨再生を認めた。また(3)の水酸アパタイトシートは高い生体親和性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、歯科や整形外科における骨欠損部の治療を、より短期間で確実にを行うための材料をいくつか見出すことができた。第一には骨誘導再生用のPET製メンブレンであり、これは既存骨よりも一回り大きな骨を誘導再生(外方性骨誘導)するための有効な材料であった。第二には炭酸カルシウム製骨補填材であり、これは従来のリン酸三カルシウムよりも生体吸収性と骨形成促進機能が高かった。第三には柔軟性を有する水酸アパタイトシートが良好な生体適合性を示すことを確認したことである。これは全く新しい材料であり今後の応用展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：This work was conducted as an attempt to discover novel biomedical materials that assist bone formation and bone augmentation. Three kinds of materials were focused on; namely, (1) polymer membrane for guided bone regeneration, (2) calcium carbonate granules as bio-resorbable scaffolds for bone, and (3) flexible hydroxyapatite paper.

The findings are as follows; (1) when a polymer membrane made of poly(ethylene terephthalate), formed into hemispherical shape in advance, was implanted on the cranial of rabbits, newly formed bone was recognized in the space between existing bone and the membrane, (2) porous granules made from calcium carbonate demonstrated a good bio-resorbability and inducing effect of the new bone formation, and (3) flexible hydroxyapatite was evidenced in vivo to have biocompatible nature.

研究分野：無機材料科学

キーワード：骨再生 歯学 整形外科学 人工骨 骨補填材

1. 研究開始当初の背景

生体内の健康な骨をさらに増量・増成する「外方性骨誘導」は、顎顔面補綴、脳外科、歯科、形成外科等の分野で長く望まれてきた技術であり、先天性の骨形成不全症等の治療にも応用可能な術であるが、これまでそれを行うための有効な生体材料が存在しなかったために、いまだ骨組織の治療法として確立されていない。

一方、本研究の研究代表者は、これまで独自に生体材料の開発に関する研究を行い、図1に示すような外観の、「リン酸カルシウムコートPET」のメンブレンを骨欠損部に設置すると、図2に示すように短期間で骨欠損部に新生骨ができることを見出してきた。

また、図3に示すような、水酸アパタイトの極細繊維を紙状に漉いた材料（水酸アパタイトペーパー）も見出した。

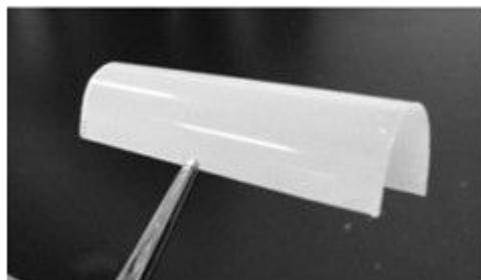


図1 リン酸カルシウムコートPET

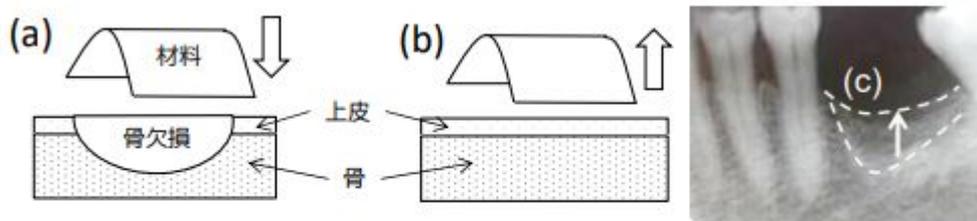


図2 研究代表者の開発したリン酸カルシウムコートPETを用いた骨再生の模式図と臨床例。(a) 材料の設置、(b) 骨再生後の摘出、(c) 30日間での骨再生の例

2. 研究の目的

本研究では上に記したような研究代表者らの知見に基づき、外方性骨誘導を実現させるための新たな材料を提案・実現するために、以下の3つの材料について、動物実験を含めて生体材料としての性能評価を行うことを目的とする。

- (1) リン酸カルシウムコートPET(ポリエチレンテレフタレート)製のメンブレンを用いた、骨膜挙上による外方性骨誘導
- (2) 従来のリン酸三カルシウムよりも、生体吸収性と新生骨形成促進能力に優れた、炭酸カルシウム製の多孔質骨補填材生体吸収性の骨補填材、および(3) これまで存在しなかった、柔軟性を有した厚さ約200ミクロンの紙状水酸アパタイト



図3 紙状水酸アパタイト

3. 研究の方法

個々の材料について、その評価方法を記す。

(1) リン酸カルシウムコートPET

厚さ125ミクロンのPETフィルムに水酸アパタイトを薄く(約10ミクロン)コートし、それを図1のように半円柱形上に成形した。水酸アパタイト層が内側になるように成形した。

ウサギの頭蓋骨の外骨膜を剥離し、部分的に削孔したあと図4左のようにPETメンブレンを設置し、頭皮を縫合した。メンブレンはその形状回復性によって、徐々にもとの形状に回復しようとするため、既存の頭蓋骨をメンブレンとの間には、骨が成長するための空間ができる(図4右)。実際の様子を図5に示す。動物を3~5週間飼育した後に、この空間に新生骨形成が起きているかどうかを、軟エックス線撮影および病理組織学的観察で評価した。

(2) 炭酸カルシウム製骨補填材

高純度(99.9%以上)の炭酸カルシウム微粉末が、常圧で相対密度96%以上に焼結できることを見出した。これに基づき、炭酸カルシウムスラリーに起泡剤を加えて攪拌し、そのままゲル化させ、乾燥・脱脂およびCO₂中での焼結を経て、気孔率10, 50, および80%の多孔質焼結体を作製した。これを1~2mmの粒径に分級し、動物実験に供した。実験動物にはWistar系ラットを用いた。頭蓋骨に直径5mmの円盤状の欠損を作製し、各骨補填材およびコントロールとしてのの

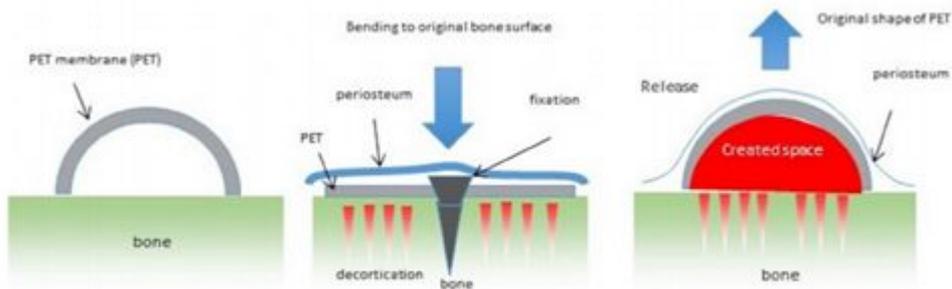


図 4 PET メンブレンの埋入の模式図

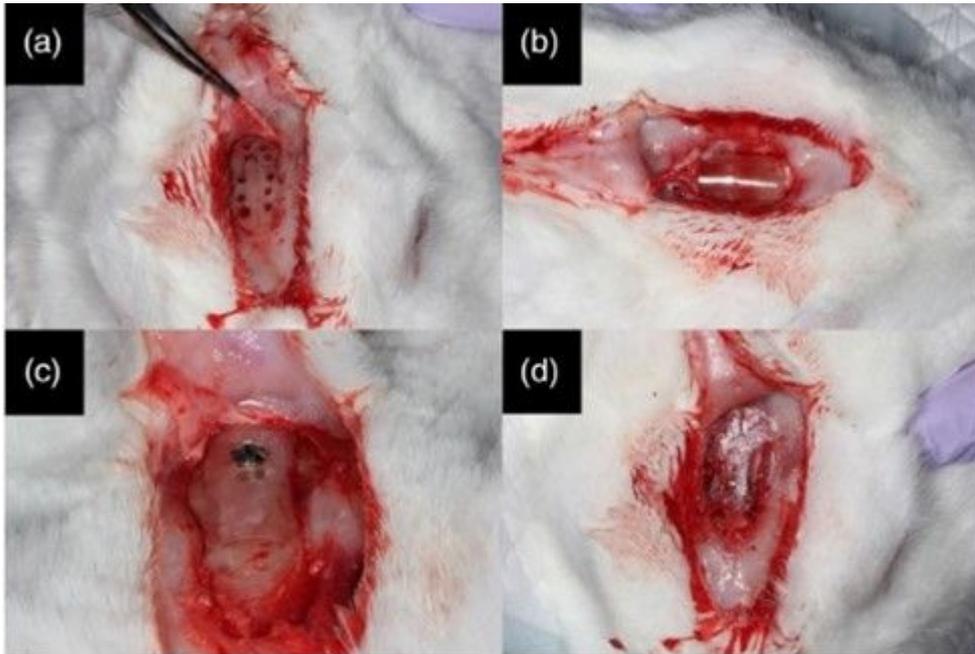


図 5 ウサギ頭蓋冠への PET メンブレンの設置

リン酸三カルシウム骨補填材 (HOYA 製スーパーポア K-3) を充填し、頭皮を縫合した。3~12 週飼育した後に実験部を摘出し、薄切切片を作製してヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行って、組織学的観察を行った。

(3) 紙状水酸アパタイト

図 6 に埋入の様子を示す。ラットの頭蓋骨に直径 8.8mm の骨欠損を作製し、紙状アパタイトを欠損の底部 (硬膜直上) に置いて皮膚を縫合した。2, 4, および 8 週経過後に実験部を摘出し、組織学的染色を行って観察に供した。

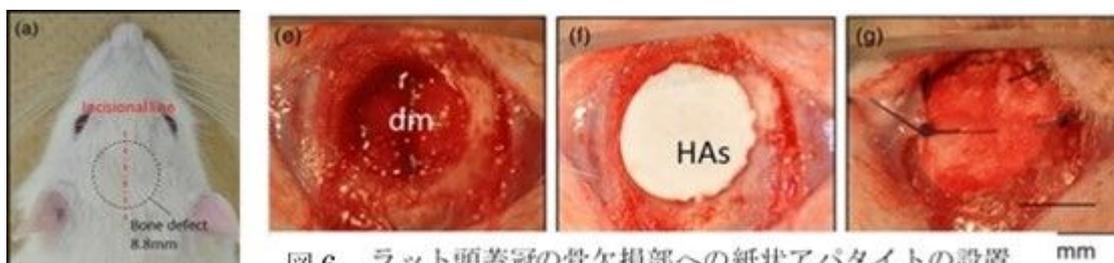


図 6 ラット頭蓋冠の骨欠損部への紙状アパタイトの設置

4. 研究成果

(1) リン酸カルシウムコート PET

図7に3週(a)および5週(b)経過後の実験部の軟エックス線写真を示す。黄色の矢印が示すように、PETと頭蓋冠の間の空間に、新生骨が認められた。また、組織学的観察とその画像解析から、新生骨形成量が有意であった。

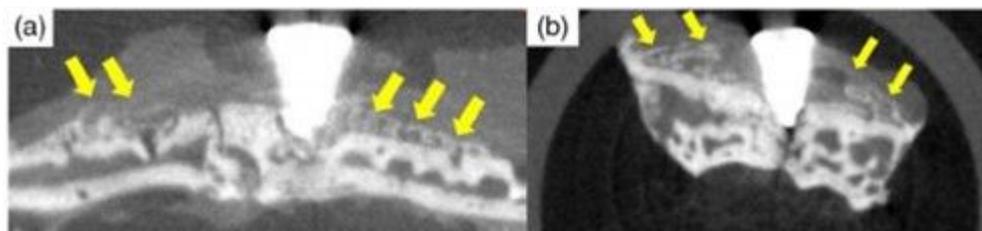


図7 3週(a)および5週(b)経過後の実験部の軟エックス線写真

(2) 炭酸カルシウム製骨補填材

図8に、炭酸カルシウム骨補填材(上段)およびコントロール(下段)の埋入後3週の組織写真を示す。赤い部分は新生骨(NB)、BVは新生血管、UMは未吸収材料、FTは線維性組織を示す。ここから、本研究で開発した炭酸カルシウム製骨補填材は、従来の β -リン酸三カルシウムよりも早期に新生骨形成を促すことが分かる。

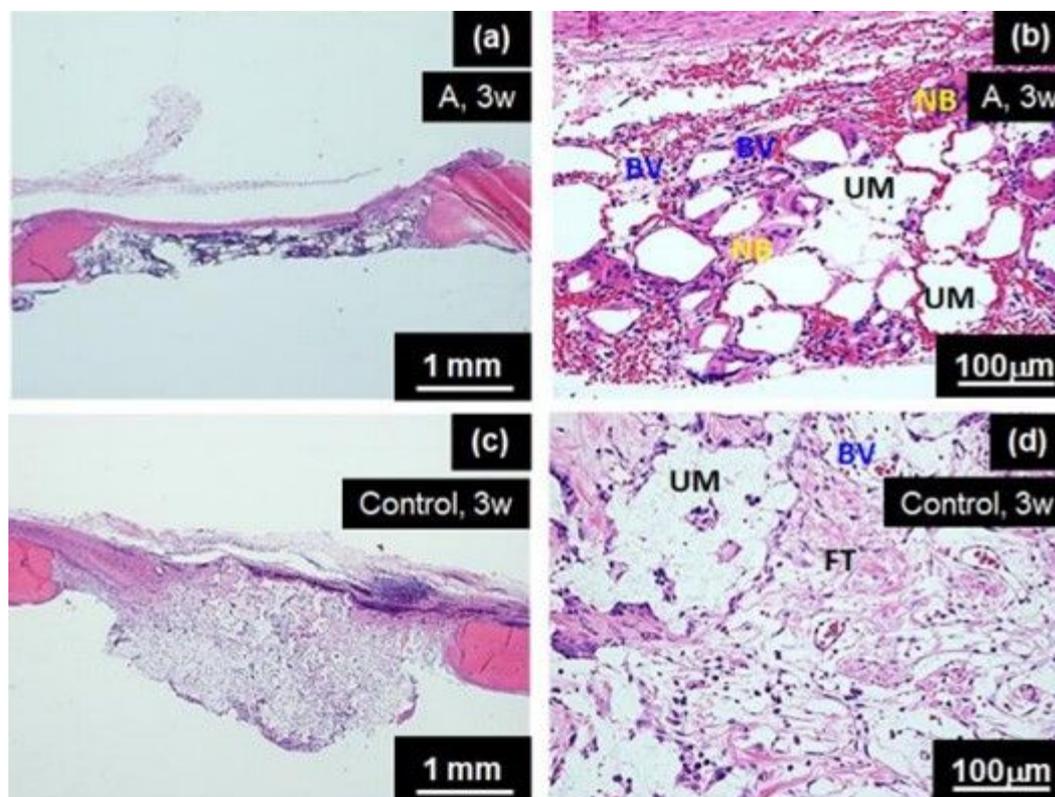


図8 炭酸カルシウム骨補填材(上段)およびコントロール(下段)の埋入後3週の組織写真

(3) 紙状水酸アパタイト

図9に、コントロール(a, b, c)および紙状水酸アパタイト(d, e, f)を設置した、ラットの頭蓋冠のマイクロCT写真を示す。紙状水酸アパタイトを設置すると、骨欠損部での新生骨形成が顕著に進行することが分かった。

また、周囲の組織の病理観察を行っても、紙状水酸アパタイトは生体の炎症等を惹起せず、高い生体親和性を示していた。

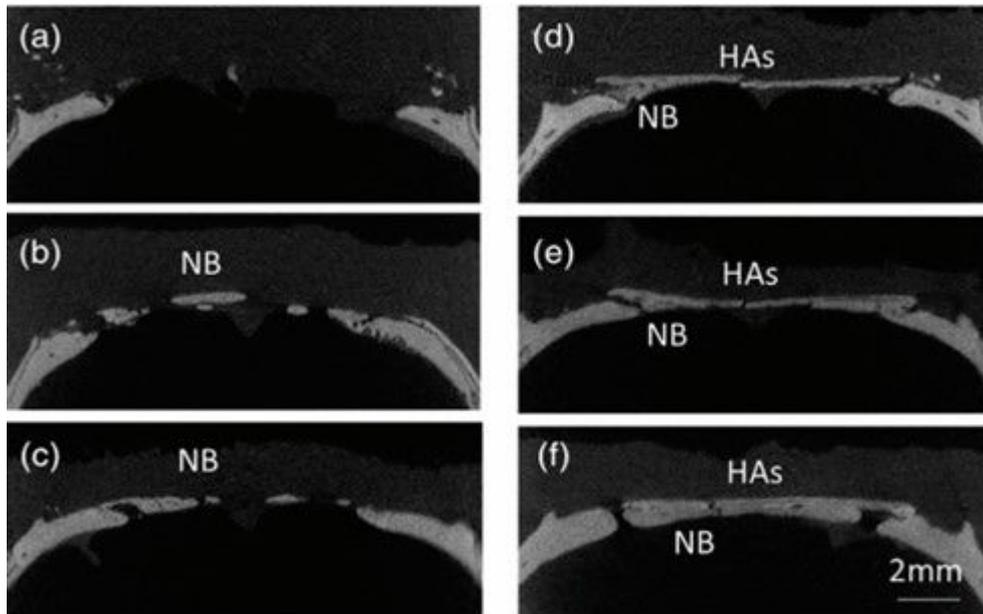


図9 コントロール(a, b, c)および紙状水酸アパタイト(d, e, f)を設置した、ラットの頭蓋冠のマイクロCT写真

以上、本研究により、新たに3種類の骨形成促進機能を持つ生体材料が提案され、それぞれが骨形成を促しうるものであることが示された。

本研究の成果は、下記の学術論文誌（いずれも査読あり）に掲載（予定含む）である。

1. K. Imoto, K. Yamauchi, K. Odashima, S. Nogami, Y. Shimizu, B. Lethaus, P. Kessler, **H. Unuma**, T. Takahashi, "Priosteal expansion osteogenesis using an innovative shape-memory polyethylene terephthalate (PET) membrane: An experimental study in rabbits", *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. (2021). doi: 10.1002/jbm.b.34793.
2. H. Kashiwada, Y. Shimizu, Y. Sano, K. Yamauchi, H. Guang, H. Kumamoto, **H. Unuma**, Y. J. Zhu, "In vivo behaviors of highly flexible paper consisting of ultralong hydroxyapatite nanowires", *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials*. (2021). doi: 10.1002/jbm.b.34819.
3. S. Umemoto, T. Furusawa, **H. Unuma**, T. Sekino, M. Tajika, "In vivo investigation on the bioresorbability and bone formation ability of high-purity calcium carbonate sintered granules", *Dental Materials Journal*. in press (2021).

本研究の結果生じた発明を、以下のように特許出願した。

1. 骨再生及び/又は骨増量用メンブレン, (発明者)山内健介、清水良央、鷗沼英郎、(出願人) 東北大学、山形大学、特願 2020-044341

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imoto Kazuhiro, Yamauchi Kensuke, Odashima Kenji, Nogami Shinnosuke, Shimizu Yoshinaka, Kessler Peter, Lethaus Bernd, Unuma Hidero, Takahashi Tetsu	4. 巻 109
2. 論文標題 Periosteal expansion osteogenesis using an innovative, shape memory polyethylene terephthalate membrane: An experimental study in rabbits	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kashiwada Hajime, Shimizu Yoshinaka, Sano Yuya, Yamauchi Kensuke, Guang Hong, Kumamoto Hiroyuki, Unuma Hidero, Zhu Ying Jie	4. 巻 109
2. 論文標題 In vivo behaviors of highly flexible paper consisting of ultralong hydroxyapatite nanowires	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 101-107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34819	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 H. Unuma, T. Furusawa, S. Umemoto, M. Tajika
2. 発表標題 Rapid Bone Formation Assisted by High-Purity Calcite Granules
3. 学会等名 Pac Rim 13 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 骨再生及び/又は骨増量用メンブレン	発明者 鷓沼英郎他	権利者 山形大学・東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-044341	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山内 健介 (Yamauchi Kensuke) (10364150)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	
連携研究者	清水 良央 (Shimizu Yoshinaka) (30302152)	東北大学・歯学研究科・講師 (11301)	
連携研究者	古澤 利武 (Furusawa Toshi take) (00745169)	山形大学・大学院理工学研究科・客員教授 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関