

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：32619

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18387

研究課題名(和文) 歯周靭帯機能を有する「インプラント/歯周靭帯一体型の人工歯周組織ユニット」の創製

研究課題名(英文) Preparation of "dental implant/PDL integrated artificial periodontal tissue unit" with PDL function

研究代表者

中村 奈緒子 (Nakamura, Naoko)

芝浦工業大学・システム理工学部・助教

研究者番号：70754878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周靭帯を再構築するための材料としてシート状に加工した脱細胞化靭帯を用いた「インプラント/歯周靭帯一体型の人工歯周組織ユニット」の創製を目的とした。歯周靭帯はコラーゲン線維束が歯槽骨に対して垂直に配列しており、歯槽骨の内部に突き刺すように結合している。そこで、縦方向のコラーゲン線維配列を有する靭帯を薄層化し、脱細胞化手法を用いて、歯周靭帯構造を模倣したコラーゲン線維束配向型の脱細胞化靭帯シートを開発した。本研究課題では、脱細胞化靭帯シートの調製のための種々の脱細胞化処理方法の条件検討、皮下および骨近傍移植による生体適合性、コラーゲン線維の配向性および骨結合の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題は、人工材料のインプラント材料と生体組織の骨とを、脱細胞化靭帯を介して結合させるという独創的な観点に立つ研究である。これにより、従来は発現されなかった噛みごたえの感覚や歯の生理的な移動等の生体機能の発現が可能になると考えられる。さらに、靭帯組織との結合に必要な材料の表面特性を明らかにすることで、従来的人工材料の広範な活用が期待できる。本研究課題で得られる知見および技術は、生体に許容される材料開発における工学的基盤となり、歯科インプラント治療に限らず医学、歯学、医工学に広く貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to prepare the "dental implant/PDL (periodontal ligament) integrated artificial periodontal tissue unit" that uses sheet-shaped decellularized ligament as a material for reconstructing the PDL. The collagen fiber bundles of the PDL are arranged perpendicularly to the alveolar bone, and are bonded so as to pierce the alveolar bone. Therefore, we have developed the collagen fiber bundle-oriented decellularized ligament sheet that mimics the PDL structure by thinning the ligament having longitudinal collagen fiber arrangement and using the decellularization method. In this research, we investigated the various decellularization treatment methods for the preparation of decellularized ligament sheets, and evaluated the biocompatibility, the orientation of collagen fibers, and osseointegration by subcutaneous and bone implantation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：歯周靭帯 歯根膜 脱細胞化 歯科インプラント コラーゲン線維

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究課題の核心をなす学術的「問い」は、硬組織と軟組織などの異なる物性組織の結合を目指す「ストレスリンキング材料」の開発に関する実現可能性である。本研究課題に関する学術的背景として、硬組織と軟組織の結合の複雑さおよび人工的な再現の困難さが挙げられる。軟組織である靭帯は主にコラーゲン線維で構成されており、この線維は引張の力に対し強く、さらに、靭帯のコラーゲン線維は配列が密で走行が張力の方向に沿った配向した束状構造を取り、骨格を動かすために非常に強い力に耐えうる重要な役割を担っている。靭帯は硬組織である骨と骨を繋いでいるが、その結合部位は、軟組織である靭帯のコラーゲン線維が、硬組織である骨の内部に突き刺すような構造で結合している。この複雑な構造は、組織の発生の段階で構築されたものと考えられており、現時点では人工的に再現することは困難である。この学術的背景の解決のため、本研究課題では歯周靭帯（歯根膜）に着目する。歯周靭帯は骨と歯を繋ぐ靭帯であるが、力学的に歯を支えるだけでなく、多くの血管や神経を含み、歯への栄養供給や噛みごたえの感覚を司る役目、また、細菌感染の予防などの役割も担っている。現在の歯科治療において、歯科インプラントは欠かせない治療法の一つであるが、歯科インプラント治療はインプラントを歯槽骨に直接埋入して結合させるため、本来の歯と歯周組織が有する歯周靭帯の機能が欠如している。そのため、インプラント材料と歯槽骨の間に歯周靭帯様の軟組織を再構築し、歯周靭帯の機能を付与させることが期待されるが、現状では硬組織と軟組織の結合の人工的な再現の困難さから実現には至っていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、歯周靭帯を再構築するための材料としてシート状に加工した脱細胞化靭帯を用いた「インプラント/歯周靭帯一体型的人工歯周組織ユニット」の創製(図1)を目的とした。歯周靭帯はコラーゲン線維束が歯槽骨に対して垂直に配列しており、また歯槽骨の内部に突き刺すように結合している。そこで、縦方向のコラーゲン線維配列を有する靭帯を薄層化し、脱細胞化手法を用いることで、歯周靭帯構造を模倣したコラーゲン線維束配向型の脱細胞化靭帯シートを開発できると考えた。脱細胞化技術とは生体組織から細胞外マトリックスの構造や成分を維持したまま細胞成分を除去することであり、組織再生のための移植材料として研究・応用が進められている。本研究課題では、脱細胞化靭帯シートの調製のための種々の脱細胞化処理方法の条件検討、皮下および骨近傍移植による生体適合性、コラーゲン線維の配向性および骨結合の評価を行った。

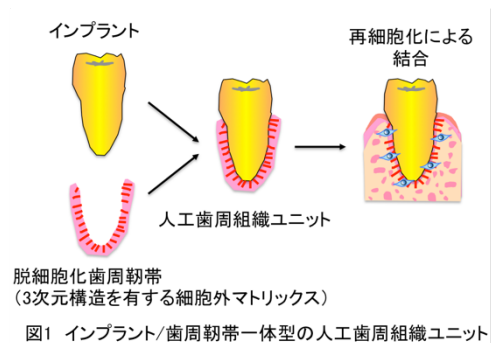


図1 インプラント/歯周靭帯一体型的人工歯周組織ユニット

3. 研究の方法

脱細胞化靭帯のインプラント材料表面との結合の検討、および脱細胞化靭帯の生体骨との結合の検討を実施した。

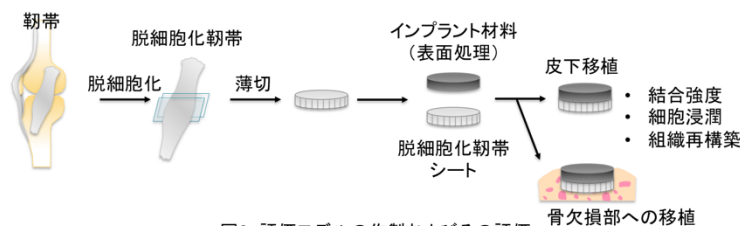


図2 評価モデルの作製およびその評価

(1) 歯周靭帯マトリックス様の脱細胞化靭帯組織シートの作製

ブタ靭帯組織を用いて種々の脱細胞化処理方法により、3次元組織構造を維持可能な調製方法について検討した。具体的には、採取したブタ靭帯組織を厚さ2mmのシート状に成形し、抗菌処理を行った。化学的手法である界面活性剤(SDS, SDC, TritonX-100)および物理的手法である高静水圧印加(HHP)を用いた脱細胞化法により細胞膜を破壊した。DNase溶液によるDNA分解、80%EtOHによる脱脂処理を行った。細胞核の除去と組織構造の維持を評価のため、核およびコラーゲン線維を染色した。DNA除去の検討のため、乾燥重量を測定し、Picogreen®試薬を用いた蛍光色素結合法にて、乾燥重量当たりの残存DNA量を算出した。

(2) 皮下移植実験による脱細胞化靭帯の細胞浸潤および炎症性の検討

結合に必要な材料の表面特性を明らかにするため、ラット(Wister, male, 6週齢)の皮下に埋植し、1週間後に試料を採取して、脱細胞化歯周靭帯シートの生体内での反応を評価した。また、交互浸漬法にて表面処理を施したインプラント模倣材料と脱細胞化靭帯組織シートを密着させ、インプラント材料表面/歯周靭帯マトリックスの結合のための評価モデルを作製し、同様の方法で移植した。各種染色法により、細胞浸潤の浸潤性、配向性、組織再構築能、毛細血管網の構築について評価した。

(3) 骨近傍移植実験による脱細胞化靭帯の生体骨との結合の検討

ラット頭蓋骨に欠損を作製し、欠損部への脱細胞化靭帯シートの移植を行った。4週間後に試料を採取し、各種染色法により脱細胞化靭帯シートと骨の結合部を観察し、脱細胞化靭帯シートのコラーゲン線維の配向性の維持、細胞浸潤、および評価モデルの骨への安定的な生着について検討した。

4. 研究成果

(1) 靭帯マトリックス様の脱細胞化靭帯組織シートの作製

脱細胞化処理後の試料の HE 染色像より、全ての条件で細胞核が除去されたことがわかった(図3)。また、SDS 試料では未処理と比較してコラーゲン線維束間での間隙が大きく、組織構造の損傷が観察された。一方で、HHP, SDC, TritonX-100 で処理した試料ではコラーゲン線維束間での間隙が小さく、組織構造が維持されていることが分かった。DNA 残存量は、未処理と比較して大幅に減少し、88~99%の DNA 除去効率を示した(図4)。これらの4条件の試料の DNA 量は、未処理試料と比較して有意な差があった。また HHP, SDC, Triton X-100 試料は、Badylakらの脱細胞化基準 50 ng/mg 以下を満たした。SDS 試料の DNA 量が多かった原因として、SDS 試料に残存した SDS が DNase による核分解を阻害したことが考えられる。

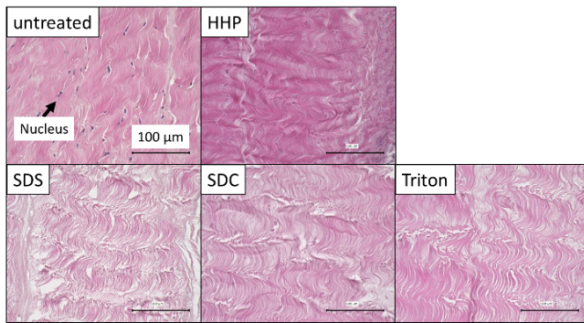


図3 種々の方法で調製した脱細胞化靭帯のHE染色

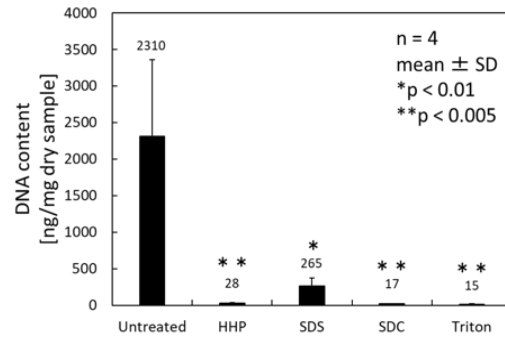


図4 残存DNAの定量

(2) 皮下移植実験による脱細胞化靭帯の細胞浸潤および炎症性の検討

皮下移植 1週間後では、肉眼的所見における発赤や腫脹は無く、顕著な炎症反応は確認されなかった。また脱細胞化靭帯シートの組織構造は維持され、全ての条件で線維芽細胞が浸潤し、再細胞化された(図5)。したがって、種々の脱細胞化処理により異種組織の移植による拒絶反応は抑制されたと考えられた。また、交互浸漬法にて表面処理を施したインプラント模倣材料と脱細胞化靭帯組織シートを密着させて皮下移植を行ったところ、両者の間隙には細胞が浸潤しているものの、結合している様子は観察されなかった。

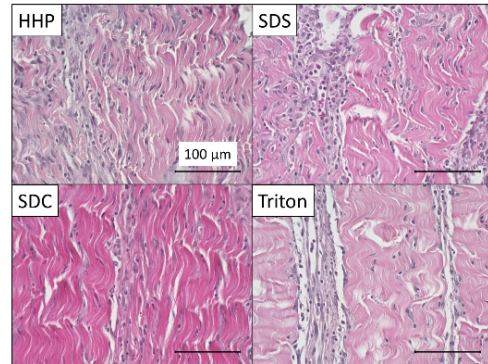


図5 脱細胞化靭帯シートの皮下移植結果

(3) 骨近傍移植実験による脱細胞化靭帯の生体骨との結合の検討

骨近傍への移植の結果、脱細胞化靭帯シートは再細胞化され、顕著な炎症反応は確認されなかった。また、脱細胞化靭帯シートのコラーゲン線維の配向はまばらであり、SDC 試料ではコラーゲン線維束間に間隙が生じた。骨近傍での接触部分は、SDC 試料では横方向に線維が配向しており、靭帯様の配向性は観察されなかった。一方、HHP, SDS, TritonX-100 試料ではコラーゲン線維は骨に対して垂直方向に配向した。また垂直方向に並んだ脱細胞化靭帯シートのコラーゲン線維束の厚みは 100 μm 程あり、コラーゲン線維束の間隙には細胞が密に浸潤していた。これらの構造は、靭帯の骨表面と同様の構造を示した(図6)。

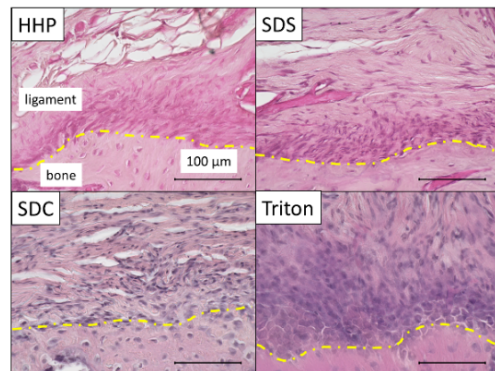


図6 脱細胞化靭帯シートの骨近傍移植結果

以上より、種々の脱細胞化法により、コラーゲン線維束配向型の脱細胞化靭帯シートの作製に成功した。皮下移植より脱細胞化靭帯シートが過度の炎症を惹起しないことが示され、頭蓋骨近傍への移植よりコラーゲン線維束が骨表面に向かって垂直に配向していることが分かった。したがって、靭帯組織の代替としての応用可能性が示された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakamura Naoko, Ito Ai, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio	4. 巻 20
2. 論文標題 Extracellular Matrix Induces Periodontal Ligament Reconstruction In Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3277 ~ 3277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20133277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 春風宏樹, 木村剛, 岸田晶夫, 中村奈緒子
2. 発表標題 歯周靭帯再構築を目指したコラーゲン繊維束配向型の脱細胞化靭帯シートの調製に関する研究
3. 学会等名 第29回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoko Nakamura, Hiroki Harukaze, Yoki Kato, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida.
2. 発表標題 Preparation of decellularized ligament and tendon sheets for reconstruction of periodontal ligament.
3. 学会等名 IFAO 2019 The 8th Meeting of the International Federation for Artificial Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村奈緒子, 春風宏樹, 大平涼太, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 歯周靭帯再建を目指した靭帯ECMシートの開発
3. 学会等名 第58回日本生体医工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masahiro Yamada, Tsuyoshi Kimura, Naoko Nakamura, H. Yoshioka, Hidenori Shinno and Hiroshi Egusa.
2. 発表標題 Biomimetic titanium nano-surfaces promote induction of periodontal ligaments
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Nakamura, Hiroki Harukaze, Ryota Ohira, Masahiro Yamada, Toshiya Fujisato, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida.
2. 発表標題 Integration of decellularized ligament and artificial material through recellularization for periodontal reconstruction
3. 学会等名 Society for Biomaterials 2019 Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村奈緒子, 春風宏樹, 大平涼太, 木村剛, 岸田晶夫
2. 発表標題 歯周靭帯再建を目指した靭帯ECMシートの開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春風宏樹, 木村剛, 岸田晶夫, 中村奈緒子
2. 発表標題 歯周靭帯再構築を目指した脱細胞化靭帯シートの開発に関する研究
3. 学会等名 第28回ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村奈緒子, 春風宏樹, 大平涼太, 木村剛, 山田将博, 岸田晶夫
2. 発表標題 歯周靭帯再生を目指した靭帯マトリクス-人工歯の結合モデルの開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村奈緒子, 春風宏樹, 大平涼太, 木村剛, 山田将博, 藤里俊哉, 辻孝, 岸田晶夫
2. 発表標題 歯周靭帯の開発を目指した靭帯マトリクスシートの調製
3. 学会等名 第56回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	岸田 晶夫 (Kishida Akio)		
研究協力者	木村 剛 (Kimura Tsuyoshi)		
研究協力者	山田 将博 (Yamada Masahiro)		