

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659348

研究課題名（和文）骨膜非剥離小規模骨増成法の新規開発

研究課題名（英文） Establishment of small scale bone augmentation without the reflection of periosteum

研究代表者

魚島 勝美 (UOSHIMA KATSUMI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50213400

研究成果の概要（和文）：インプラント適用を目的とした小規模骨増成を骨膜を剥離することなく行う方法の新規開発を目的として、自己硬化型 $\alpha$ -TCPを主な成分とするバイオペックスと各種サイトカインとを混合して用いる動物実験を行った。バイオペックスと BMP-2、EGF、FGF-2、PDGF とをそれぞれ混合したものを 18G 注射針にてラット頭蓋骨骨膜下に注入し、組織学的に観察したところ、バイオペックス単体で用いるよりも、BMP-2、EGF、PDGF を混合したもので良好な骨形成が観察された。

研究成果の概要（英文）：To establish a new technique of small scale bone augmentation for dental implant application without the reflection of periosteum, animal experiments were carried out using mixtures of Biopex-R ( $\alpha$ -TCP) and several cytokines. Biopex-R and BMP-2, EGF, FGF-2, PDGF were mixed respectively and applied under rat calvarial periosteum using 18G needle. As a result of histological investigations, mixtures of Biopex-R and BMP-2, EGF, PDGF showed better bone formation in comparison to Biopex-R only.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	540,000	3,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般

## 1. 研究開始当初の背景

インプラントを前提とした骨増成に関する研究では様々な材料と方法が試みられているが、いずれもその安全性と予後と言う点で完全な術式が確立されていない。代表者はハイドロキシアパタイトの多孔質顆粒を用いて顎堤形成を行い、増成した骨にインプラ

ントを応用できる可能性を示した(魚島 勝美：Apatite implant 適用を目的とした顎堤形態の改善に関する実験的研究. 口病誌, 56(2):314-346, 1989.)。しかしながら、残存するハイドロキシアパタイトが生体にとって有利に働かない可能性があることなど、問題点も明確になっている。また、近年では自

己硬化型  $\alpha$ -TCP によるインプラント周囲の骨増成を行い、インプラント周囲に良好な骨形成が起こることを報告した(中舘 正芳、魚島 勝美、網塚 憲生、織田 公光、前田健康、野村 修一 インプラント周囲に充填した自己硬化型  $\alpha$ -TCP 系骨補填材に対する組織反応。第 113 回日本補綴歯科学会学術大会、大阪、2005 年 5 月 14 日)。一方、BMP-2 や FGF-2 などの骨形成関連の増殖因子に関する研究が進み、適切なスキヤフォールドとの併用により良好な骨形成が得られることも報告されている。

そこで、任意の形態で硬化する  $\alpha$ -TCP と骨形成関連増殖因子との併用により、インプラント周囲の小規模な骨増成を、骨膜を切開剥離することなく確実にこなえれば、患者の負担を軽減することが可能で、臨床的に非常に大きな意義がある。これは、硬化前は流動性を持ち、硬化後には一定の形態を維持する  $\alpha$ -TCP を用いることで初めて実現可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、デンタルインプラント埋入にあたってフィクスチャーの上部が一部露出する場合や、上顎前歯部のインプラント先端部頰側の骨が不足することが予想される場合などに用いることができる、骨膜の切開・剥離を必要としない小規模骨増成方法の新規開発である。

デンタルインプラント適用を目的とする骨増成の手段としては自家骨移植が現在のゴールドスタンダードである(魚島 勝美、星名 秀行、青柳 貴之、吉田 恵子:インプラント骨増成の現在と近未来を探る. ザ・クインテッセンス, 26(9):131-138, 2007.)。しかしながら大規模な骨増成は言うまでもなく、小規模であっても患者の身体的負担は大きく、自家骨を移植せずとも必要な部位に必要な骨を増成することができる材料と方法が求められている。

そこで、具体的には以下の 2 点を検索することを目的として研究を行った。

(1) 自己硬化型  $\alpha$ -TCP と bFGF ないしは BMP-2 との併用が可能か? 骨膜下に適用した時に骨形成がどの程度得られるか?

(2) 自己硬化型  $\alpha$ -TCP の硬化前の流動性をコントロールして、シリンジによる骨膜下への適用を骨膜非剥離で行なえるか? さらに、治癒後のインプラント適用に問題が無いか?

## 3. 研究の方法

(1) FGF-2/バイオペックス混合試料を用いた実験

① FGF-2 とバイオペックスとを混合し、バイオペックス単体と同様に正常な硬化が起こることを確認する。

② バイオペックス内の FGF-2 濃度は  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とする。

③ ラット頭蓋骨表面における FGF-2 とバイオペックス混合物周囲骨形成の検索を行う。8 週齢ラット 10 匹程度を用いて予備実験を行なう。

④ パラフィン標本は通法に従って作製し、H-E 染色を施して光学顕微鏡下に観察する。

⑤ BMP-2、EGF、PDGF についても上記と同様の実験を行なう。

(2) バイオペックスの流動性に関する実験

① 市販のバイオペックスの流動性は非常に高く、シリンジと針によるアプリケーションは実現しやすい。しかしながら、骨膜下に注入する場合にはこの流動性が不利になる可能性があるため、流動性を若干下げる工夫が必要である。

② バイオペックスの流動性を下げる手段として、 $\alpha$ -TCP の濃度を変えたり、コラーゲンなど市販の生体材料との混和を検討する。

(3) シリンジと針による簡便な骨増成法の開発

① 14 ゲージまたは 18 ゲージの針とシリンジを用いて、ラット上顎臼歯の頰側粘膜炎骨膜下にバイオペックスを注入し、手技の確立を目指す。

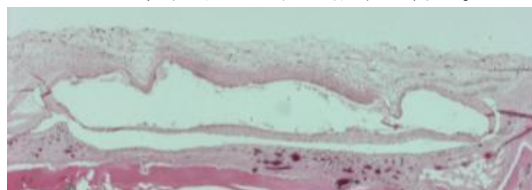
## 4. 研究成果

(1) FGF-2/バイオペックス混合試料を用いた実験

① バイオペックスの液体に最終濃度が  $0.01 \sim 0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるように FGF-2 を混和したところ、バイオペックス単体と同様に一定時間で硬化することが確認できた。

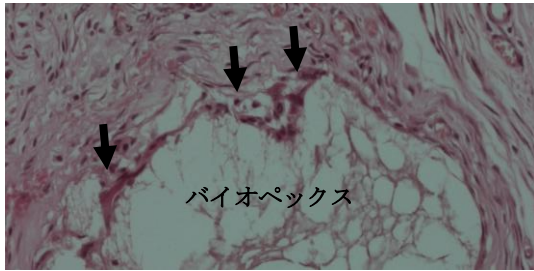
② ~ ④ バイオペックスの液体に FGF-2 の最終濃度が  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるように混合し、8 週齢のラット頭蓋骨表面骨膜下に注入したところ、同量の生理食塩水を用いたコントロールと比較して明らかな変化が見られなかった。

⑤ そこで、BMP-2 と EGF については最終濃度が  $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるように、PDGF については最終濃度が  $0.1 \text{ng}/\mu\text{l}$  となるように混和し、上記と同様にラットの骨膜下に注入した。2 週間後に、同部を骨と共に標本として摘出し、厚み  $5 \mu\text{m}$  のパラフィン切片を作製して観察したところ、以下のような結果を得た。



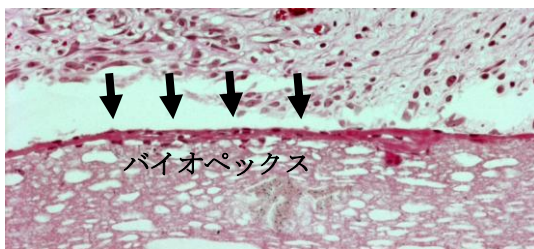
【コントロールの組織像 1】 下方が頭蓋骨、上方が皮膚である。空洞に見える部分がバイ

オペックスの存在した領域で、脱灰してあるため、バイオペックスはほとんど観察されない。また、バイオペックス周囲にほとんど骨形成は観察されない。



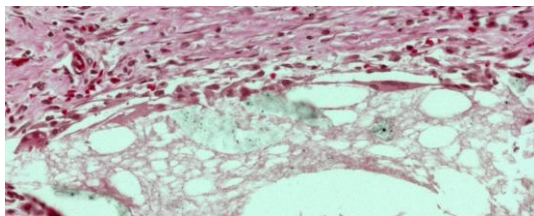
【コントロールの組織像 2】

バイオペックス周囲に観察される破骨細胞の数は限定的である。



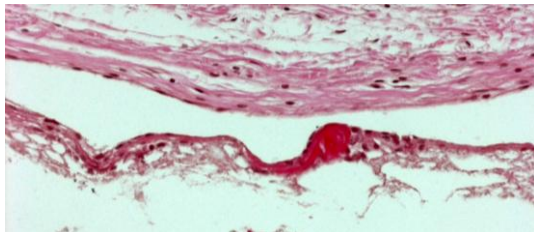
【BMP-2 の組織像 1】

バイオペックス表面に骨形成が観察される。一般的にラットではヒトに比較して早期に骨形成が観察されるが、上記コントロールではほとんど骨形成が観察されないことから、BMP-2 混和による骨形成促進効果が見られると考えられる。



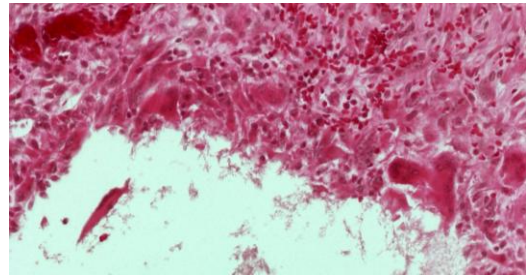
【BMP-2 の組織像 2】

バイオペックス周囲にはコントロールと同様、破骨細胞様の細胞は多く観察されない。



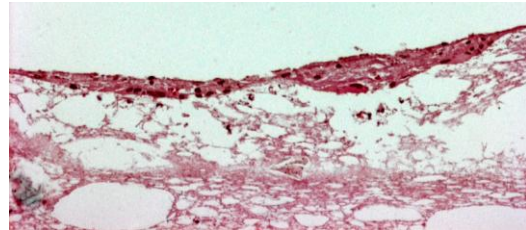
【EGF の組織像 1】

バイオペックス表面には BMP-2 と同様、2 週間後において、幼若な骨形成が認められ、コントロールと比較して、明らかに骨形成が促進されていることが確認できる。



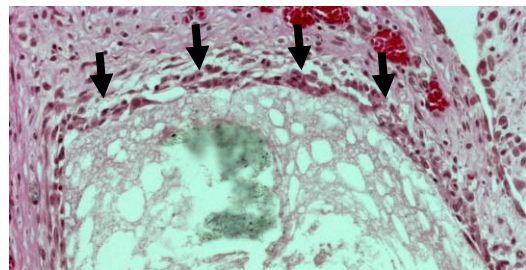
【EGF の組織像 2】

部分的に多数の破骨細胞様細胞が観察され、その数はコントロール、BMP-2 に比較して明らかに多い。



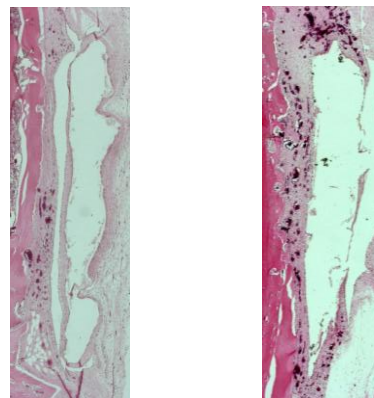
【PDGF の組織像 1】

EGF と同様、バイオペックス表面には多くの新生骨が形成されている。一般的に BMP-2 の骨形成促進作用が強いとされているが、本実験の結果からは、PDGF の作用が最も強かった。



【PDGF の組織像 2】

バイオペックス周囲で、未だ骨が形成されていない領域では、多くの破骨細胞様細胞が観察される。



【バイオペックス周囲に形成された血管】

左がコントロール、右が PDGF である。図中濃く見える部分が血管であるが、コントロールと比較して、新たに形成された血管は PDGF で非常に多く観察された。



以上の結果から、0.1ng/ $\mu$ l という非常に低い濃度で用いたにも関わらず、PDGF とバイオペックスを混和して用いることにより、血管新生や破骨細胞の出現頻度、表面での骨形成いずれも最も効果が期待できると考えられる。

#### (2) バイオペックスの流動性に関する実験

バイオペックスの流動性について、シリンジと 18G 注射針を用いるアプリケーション法開発という観点から検討したところ、やはり、業者指定の粉液比では流動性が高すぎて、骨膜下に注入した後の拡散を制御できないことが分かった。そこで、液体の量に対して若干 (10%程度) 粉の量を多くすることにより、骨膜下での拡散を抑えることができる可能性があることが見出された。

#### (3) シリンジと針による簡便な骨増成法の開発

骨膜を剥離せずに、18G 注射針を用いたバイオペックス注入を、その形態をコントロールしながら行うことは、手技として大変困難であり、熟練が必要である。さらに太い針や細い針による注入も比較検討したが、18G の注射針が比較的適切であるという結論に至った。

#### (4) 問題点と今後の展望

##### ① 骨膜下に確実に注入する方法について

18G の注射針を用いて、皮膚を切開せずにバイオペックスを注入するにあたって注意すべきことは、確実に骨膜下に注入することである。刺入の際に針の先端の切断面が確実に骨面に平行に当たるようにして注入することが肝要で、これを不適切に行うと、部分的に骨膜上にバイオペックスが注入されることになる。この場合、バイオペックス単体ではもちろんのこと、BMP-2、EGF、PDGF 等を混和したとしても、これらには骨誘導能は無く、意図した形態で骨形成を期待することはできない。本研究の結果、骨膜を剥離せずに、PDGF とバイオペックスを混和して注入することにより局所の骨形成が期待できることが見出されたが、使用する注射針の先端の形状等を工夫する必要があると思われる。

##### ② 長期の骨形成とバイオペックスの代謝について

本研究ではバイオペックス注入後 2 週間の骨形成を観察し、一定の成果を得たが、従前バイオペックスの長期残存については、同部位にインプラントを適用するにあたっては問題となっていることから、長期のバイオペックス周囲の骨形成およびその代謝とバイオペックスの残存については今後検討すべきである。

#### 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)

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

魚島 勝美 (UOSHIMA KATSUMI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50213400

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

ハイドリアン ナスリ モハマッド エ

ドリス (HAIDARIAN NASRI MOHAMMAD EDRIS)

新潟大学・大学院・学生