

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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791925

研究課題名（和文）新規開発遅延型吸収性ナノゲルメンブレンを用いた骨増生における有効性の評価

研究課題名（英文）Effective of a novel cholesterol-bearing pullulan nanogel membrane for guided bone regeneration

研究代表者

小林 裕史（KOBAYASHI HIROSHI）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10570814

研究成果の概要（和文）：CHP(コレステロール置換型)ナノゲルメンブレンは生体親和性の高いドラッグデリバリー機能を有する再生医療で有力な次世代バイオマテリアルである。本研究ではラットの頭蓋骨欠損モデルで Guided Bone Regeneration(GBR)処置における CHP ナノゲルメンブレンの有効性について放射線学的、組織学的解析を行い評価した。マイクロ X 線 CT 撮影の結果より、ナノゲルメンブレン群の新生骨量は、術後 2、4 週において対照群、コラーゲンメンブレン群と比較して統計学的に有意に増加していた。また、ヘマトキシレン・エオジン染色による組織学的検討により、ナノゲルメンブレンは術後 2、4 週において他の群と比較して顕著に成熟した新生骨の形成が認められた。結論として、我々が開発した CHP ナノゲルメンブレンは GBR 用メンブレンとして有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cholesterol-bearing pullulan (CHP) nanogel is a synthetic degradable biomaterial for drug delivery with high biocompatibility. The purpose of this study was to evaluate the effects of the CHP nanogel membrane in guided bone regeneration (GBR). As a result of micro-CT analysis, new bone formation in terms of bone volume was higher in the nanogel group than in the control or collagen groups at 2 and 4 weeks. Histologically, new bone formation in CHP nanogel was prominent at 2 and 4 weeks compared with the other two groups. Notably, newly-formed bone in the CHP nanogel group was mature bone. The results of this study suggest that CHP nanogel membrane would be potentially effective as a GBR membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1600000	480000	2080000
2011 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
年度			
総計	2600000	780000	3380000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生歯学

1. 研究開始当初の背景

近年、歯牙欠損部に対する治療法として、咀嚼機能および審美的回復を図るインプラント治療は歯牙欠損補綴の有効な一手段となっている。しかしながら、インプラント埋入予定部位における歯槽骨の高さや幅の不足は適応のみならず、インプラントの予後、咬合再構成および審美的回復のすべてを損ねる因子となる。このような背景から、歯槽骨の再生はインプラント治療の適応拡大において重要な意義を有する。現在、歯槽骨の高さや幅の不足した顎堤に対するアプローチとして **guided bone regeneration** (以下 **GBR** と略す) 法により、骨の増生を試み、形態と骨量を付与する症例が多数報告されている。この **GBR** 法を用いた骨の増生によって、インプラント治療の適応が飛躍的に拡大し、機能的かつ審美的なインプラント補綴が可能となりつつある。

骨組織再生には①細胞②増殖因子③足場の三要素が必要不可欠である。**GBR** 法のメカニズムは骨の再生に不都合な軟組織をメンブレンにより排除し、骨組織に再生の足場を提供することにある。**GBR** 法に用いるメンブレンには生体吸収性膜と非吸収性膜があり、現在まで **e P T F E** 膜に代表される非吸収性膜が主流とされてきた。しかし、非吸収性膜の欠点として(1)歯肉の裂開に伴う膜の露出・感染のリスクが高い(2)術式が煩雑であり外科的侵襲が大きい(メンブレンの除去を要する)などが挙げられる。一方、吸収性膜は生体親和性が高く、感染のリスクが低い反面、バリア期間が短期間であり、スペースメーカーが十分確保できず適切な歯槽骨形態の獲得が難しい欠点を有する。

疎水化高分子の自己組織化を利用したナノゲルはタンパク質を凝集することなく取り込み機能を保持した形で放出できる分子シャペロン活性を有する。生体高分子の機能を効率よく導く分子シャペロン機能作用は、ポストゲノム研究や次世代バイオマテリアル設計において極めて重要である。疎水性の多糖からなる **CHP** ナノゲルはシャペロン機能を持つ新しいタンパク質キャリアーとして注目され、特にがん抗原タンパク質との複合ナノゲルは従来にない免疫応答を引き起こすことが明らかになり、がん免疫療法として有用であることが示された。ナノゲルは **DDS** 機能をもつ新規人工細胞外マトリックスとして再生医療で有力な次世代バイオマテリアルの創出が期待されている

2. 研究の目的

CHP ナノゲルメンブレンの **GBR** 処置における有効性について検討し、臨床応用への可能性を明らかにすることである。具体的に

ラット頭蓋骨欠損モデルに **GBR** 処置を行い、**CHP** ナノゲルメンブレンの有効性について放射線学的、組織学的に検討することである。

3. 研究の方法

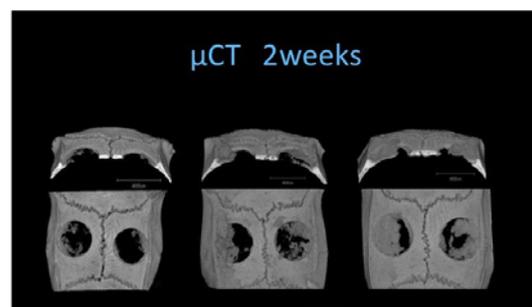
東京医科歯科大学動物実験倫理委員会の承認の上、Wistar系雄ラット(16w)36匹を使用して、頭蓋部を切開・剥離し、頭蓋骨頭頂部に左右対称に生理食塩水注水下で直径5mmのトレフィンバーで **Critical Size defect** の骨欠損を作製する。実験群として(1)未処置(コントロール群)(2)ナノゲルメンブレン(3)吸収性コラーゲンメンブレン(**Koken Tissue Guide**, Japan)の3群として **GBR** 処置を行った。各群とも観察期間を2、4、8週間とした。マイクロ X 線 CT 撮影し、骨欠損部の骨量を 3 次元的に放射線学的に解析した。**SPSS** (**SPSS**, version 11.5, **SPSS**, Chicago, IL, USA)を用い、**one-way ANOVA Tukey post hoc multiple comparison tests** を行い、統計学的に検討した。また、標本を10%ホルマリン固定後に **EDTA** 脱灰溶液にて通法に従い脱水透徹を行いパラフィン包埋した。厚さ約4mmの薄切切片を作成し、ヘマトキシレン・エオジン染色にて組織学的検討を行った。

4. 研究成果

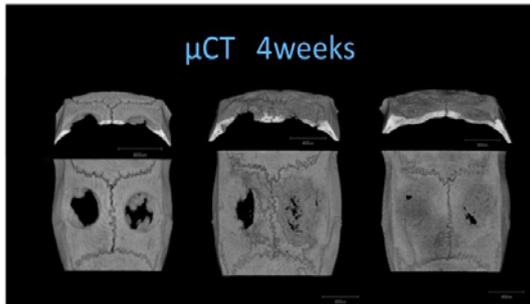
(1)放射線学的検討

マイクロ CT 撮影により、骨欠損部の新生骨の体積を測定した。2週、4週、8週ともにナノゲルメンブレン群はコントロール群と比較して統計学的に有意であった(2、4週 $P < 0.01$ 、8週 $P < 0.05$)。また、ナノゲルメンブレン群はコラーゲンメンブレン群と比較して4週で統計学的に有意であった($P < 0.05$)。

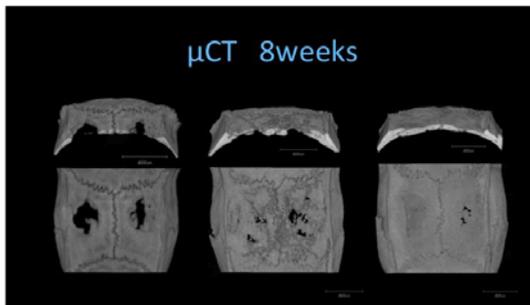
(マイクロ CT 画像)



コントロール コラーゲン ナノゲル



コントロール コラーゲン ナノゲル



コントロール コラーゲン ナノゲル

(2)組織学的検討

ナノゲルメンブレン群は、2、4週において他の群と比較して顕著に新生骨の形成が認められた。ナノゲルメンブレン直下にてできた新生骨は既存骨と差はなく成熟度が高かった。8週において再生された骨内に骨髄が認められた。コントロール群において、新生骨は既存骨と差はないが、8週において再生は不十分であった。コラーゲンメンブレン群は骨欠損部に落ち込み、その中に単核細胞が入り込み、コラーゲンメンブレンの中から石灰化が進んでいた。8週において既存骨とは異なる性状の石灰化物が再生されていた。コラーゲンメンブレン群は、メンブレンの中から石灰化が始まっていた。これはコラーゲンメンブレンの中に細胞が入り込みそこから石灰化が始まったためと考えられる。一方、ナノゲルメンブレンの架橋密度は細胞の大きさより小さく治癒期間初期において細胞を通さないため、メンブレン直下で新生骨ができたと推測できる。結論として、我々が開発したCHPナノゲルメンブレンはGBR用メンブレンとして有効であることが示唆された。

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3件)

- (1) 新規 GBR 用ナノゲルクロスリンキングメンブレン-ラット頭蓋骨欠損モデルにおけるドライタイプとウェットタイプの骨治癒比較評価-
宮原宇将, 永山友子, 小林裕史, 黒田真司, 春日昇平
第40回日本口腔インプラント学会学術大会 平成22年9月17-19日 札幌
- (2) Early Bone Regeneration by Novel Nanogel Crosslinking Membrane
Takayuki Miyahara, MyatNyan, Hiroshi Kobayashi, AsakoShimoda, Jia Hao, Reena Rodriguez, Shinji Kuroda, Makoto Shiota, Kazunari Akiyoshi, Shohei Kasugai
European Association for Osseointegration 19th Annual Scientific Meeting
October 6-9 2010 Glasgow
- (3) Novel exploitation of polysaccharide nanogel cross-linking membrane for GBR
Takayuki Miyahara, Warunee Pluemsakunthai, Myat Nyan, Asako Shimoda, Hiroshi Kobayashi, Yuki Shimizu, Tatsuya Fujimori, Makoto Shiota, Kazunari Akiyoshi, Shohei Kasugai
European Association for Osseointegration 20th Annual Scientific Meeting October 12-15 2011 Athens

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：
〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 裕史 (HIROSHI KOBAYASHI)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：10570814

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：