

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792271

研究課題名(和文)口蓋裂モデルを用いたリン酸化プルランによる人工骨の開発に関する基礎研究

研究課題名(英文)Development of the artificial bone using phosphorylated pullulan in experimental cleft palate model

研究代表者

清流 正弘 (Seiryu, Masahiro)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80510023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラット臼歯の抜歯窩にリン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランの混合物を埋入した際の治癒過程を評価すること、口蓋裂モデルラット、ビーグルの作製をすること、それらの顎裂部にリン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランの混合物を埋入した際の実用性を評価することを目的とした。ラット臼歯抜歯窩においては、リン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランを埋入した群のCT値が他の群と比較して高い傾向があるという結果が得られた。また、マウス頭蓋骨欠損モデルを用いた実験から、最適なリン酸三カルシウムの粒径、リン酸化プルランとの混合比を決定した。さらに、ラットとビーグルの口蓋裂モデルの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is as follows, 1) To evaluate the period of bone healing in extracted sockets of first molars in rats using tricalcium phosphate and phosphorylated pullulan. 2) To create a cleft palate model of rat and beagle. 3) To evaluate the period of bone healing in the cleft palate model of rat and beagle using tricalcium phosphate and phosphorylated pullulan. The result of this study is as follows, 1) The CT value of the group of tricalcium phosphate and phosphorylated pullulan was higher than other groups. 2) The most suitable mixture ratio of the tricalcium phosphate and phosphorylated pullulan was able to determine. 3) The cleft palate model of rat and beagle were succeeded without any trouble.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯学 再生医学

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂患者の顎裂部や顎骨腫瘍切除後などの骨欠損部、抜歯窩、嚢胞摘出後の嚢胞腔、歯周病などによる病的な骨吸収に対する骨修復は歯科、整形外科分野における重要な課題である。矯正歯科の領域においても、歯の移動は、矯正力による歯槽骨リモデリングにより起こるため、病的あるいは加齢による骨吸収や抜歯窩の骨吸収に対して骨修復を行なうことが可能となれば、その意義は極めて大きい。

骨欠損修復に対しては主として自家骨移植が用いられている。しかしながら、自家骨移植は外科的侵襲が必要であり、得られる骨量に限界があることが問題点である。そのため、自家骨に代わる人工骨再生担体の開発に対するニーズが高まっている。近年、歯科領域において、骨の代謝回転を高めることを目的に様々な材料が応用され、研究が進んでいる。しかしながら、自家骨移植に匹敵した骨置換速度を得るためには、更なる生体内吸収性や形態付与能の向上が求められている。また、再生骨に対してメカニカルストレスを加えた際の骨改造機転などについてはいまだ不明な点が多い。

多糖プルランをリン酸化して合成したリン酸化プルランは、生体組織に対し低刺激かつ、生体硬組織(骨や歯)無機成分であるアパタイトに対し強固に接着する。さらに、生体内で吸収されるため異物として残存することがなく、また、薬剤を混合することにより、薬剤の局所濃度を高めるなどドラッグデリバリーのキャリアとしての機能も付与することが可能である。

本研究では、骨再生促進効果を有する生体吸収性材料の中でも、水に対する溶解度の高い -リン酸三カルシウムを、リン酸イオンの含有率の高いリン酸化プルランと混合した粉末を水と反応させて硬化させ、骨欠損部に埋入し、骨リモデリングにどのような影響を

及ぼすのか検討し、実用性を評価する。さらに、リン酸化プルランの優れた特性をビーグル等の中型動物を用いて証明することにより、臨床に近い安全性と効果が立証できる。他の骨セメントに比べて薬剤徐放能も優れていることが現在までの研究で示されており、比較的大型動物では効果がない成長因子も他のセメントで問題となる重合熱がでないこと等で効果的に使用可能であり、顎裂部における有効な骨再生が期待できる。そこで本研究では、ビーグルの口蓋裂モデルを作製し、顎裂部に -リン酸三カルシウム +リン酸化プルランを埋入した際の治癒過程の組織定量的な評価も行なう。

2. 研究の目的

このように、リン酸化プルランは、骨や歯に対して強固に接着し、生体内で吸収されることから、接着性を有する人工骨の材料としての実用化が期待されている。

本研究の目的は、

- (1) ラット臼歯の抜歯窩にリン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランの混合物を埋入した際の治癒過程を評価すること
- (2) 口蓋裂モデルラット、ビーグルの作製をすること
- (3) それらの顎裂部にリン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランの混合物を埋入した際の実用性を評価すること

である。

3. 研究の方法

(1) 抜歯窩における実験として12週齢Wistar系雄性ラットを30匹用い、上顎第一臼歯抜歯3週間後、何も埋入しない群(10匹)、リン酸化プルラン埋入群(10匹)、リン酸三カルシウムおよびリン酸化プルラン埋入群(10匹)、として材料の埋入を行い、動物用CTを撮影し、海綿骨梁幅、海綿骨梁距離、海綿骨梁数、骨密度等の組織学的形態計測を行う。リン酸

三カルシウムとリン酸化プルランの混合比は、1:1 とする。

(2) ラット口蓋裂モデル作製実験として、5 週齢雄性 Wistar rat を用いて、上顎左右 premaxilla、maxilla 縫合部（1 匹あたり 2 カ所）に注水下ラウンドバーにて顎裂部を作製する。また、ビーグル口蓋裂モデル作製実験として、20 か月齢雄性ビーグルの上顎偏側、第二第三切歯部に注水下ラウンドバーにて顎裂部を作製する。

(3) 顎裂部における実験として 5 週齢雄性 Wistar rat および 20 か月齢雄性ビーグルを用い、顎裂モデルの作製後、コントロール群、リン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランの混合物を埋入する群を設定して、顎裂部レントゲン撮影を行なう。屠殺後、動物用 CT を撮影し、海綿骨梁幅、海綿骨梁距離、海綿骨梁数、骨密度等の組織学的形態計測を行う。

4 . 研究成果

ラット抜歯窩における研究成果として、材料埋入 2 1 日後、リン酸三カルシウムおよびリン酸化プルランを埋入した群の CT 値が他の群（対照群、抜歯のみの群、リン酸化プルランのみ埋入した群）と比較して高い傾向があるという結果が得られた。また、最も効果的に骨形成を促進する材料を決定するために、最適なリン酸三カルシウムの種類、粒径、リン酸化プルランとの混合比についての結果を得た。さらに、ラットとビーグルの口蓋裂モデルを作製し、28 日後の CT 画像においても自然治癒しないことを確認した。現在顎裂部への材料埋入実験を継続しているところである。

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）

〔雑誌論文〕(計 6 件)

(1) Deguchi T, Seiryu M, Daimaruya T,

Garetto LP, Takano-Yamamoto T, Roberts WE. Decreased alveolar bone turnover is related to the occurrence of root resorption during experimental tooth movement in dogs. *Angle Orthod.* 2015 May;85(3):386-93.doi:10.2319/021714-117.1. 査読有り

(2) Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development.* 2015 Feb 15;142(4):787-96.doi:10.1242/dev.116228. 査読有り

(3) Hoshi K, Kawaki H, Takahashi I, Takeshita N, Seiryu M, Murshid SA, Masuda T, Anada T, Kato R, Kitaura H, Suzuki O, Takano-Yamamoto T. Compressive force-produced CCN2 induces osteocyte apoptosis through ERK1/2 pathway. *J Bone Miner Res.* 2014;29(5):1244-57.doi:10.1002/jbmr.2115. 査読有り

(4) Suzuki M, Deguchi T, Watanabe H, Seiryu M, Iikubo M, Sasano T, Fujiyama K, Takano-Yamamoto T. Evaluation of optimal length and insertion torque for miniscrews. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013 Aug;144(2):251-9.doi:10.1016/j.ajodo.2013.03.021. 査読有り

(5) Kim S, Seiryu M, Okada S, Kuroishi T, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y. Analgesic effects of the non-nitrogen-containing bisphosphonates etidronate and clodronate, independent of anti-resorptive effects on bone. *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 15;699(1-3):14-22.doi:10.1016/j.ejphar.2012.11.031. 査読有り

(6) Nagayama T, Seiryu M, Deguchi T, Kano M, Suzuki T, Takano-Yamamoto T, Ichikawa H. Increase of CGRP-containing nerve fibers in the rat periodontal ligament after luxation. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Apr;32(3):391-7.doi:10.1007/s10571-

011-9767-1. 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 川津正慶, 宿南知佐, 滝本晶, 岩崎将也, 清流正弘, 池田悦子, 山本照子. 矯正的歯の移動モデルを用いた歯根膜における Scleraxis の機能解析 第71回日本矯正歯科学会 盛岡 2012.9.26-28.
- (2) 滝本晶, 宿南知佐, 川津正慶, 清流正弘, 山本照子, 開祐司. 歯根膜における Scleraxis の発現とその制御 第30回日本骨代謝学会 東京 2012.7.19-21.

〔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：
出願年月日：
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

清流正弘(Seiryu Masahiro)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：80510023

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：