

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861878

研究課題名(和文)炭酸カルシウム複合化レジンとBMP-2含浸アテロコラーゲンをを用いた骨増生法の開発

研究課題名(英文)The development of new bone augmentation technique with 4-META/MMA-TBB resin containing calcium carbonate and collagen sponge impregnated BMP-2

研究代表者

中塚 愛(Nakatsuka, Megumi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00547648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸カルシウム、TCPを複合化した4-META/MMA-TBBレジンを用いたラット頭蓋骨に接着し、レジン上面をBMP-2含浸コラーゲンスポンジで被覆したところ、レジン上面を完全に被覆する骨増生が認められ、新生骨と複合化レジンとが直接接触している部分が多く認められた。また、ビーグル犬歯槽骨類側に大きな骨欠損を作製し、複合化レジンで充填しBMP-2含浸コラーゲンスポンジで被覆すると、レジンの範囲が広範囲にも関わらず、レジン上面をほぼ被覆する新生骨の形成が認められた。これにより、複合化レジンとBMP-2を併用することで、骨の欠損形態や大きさによらず、自在に形態を回復することが可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated bone formation and direct contact ratio following BMP application on 4-META/MMA-TBB resin containing calcium carbonate or TCP on skull of rats.As a result,this technique can induce bone growth covering entire surface of the resin and increase the direct contact ratio between the resin and new bone.Furthermore,we observed that new bone was formed covering entire surface of the resin containing calcium carbonate or -TCP on bone defect of wide range of buccal alveolar bone of beagle dogs following BMP application on the composite resin. From these results,it was suggested that this technique can regenerate bone quickly for wide range and complex shaped bone defects and recover the bone form freely.

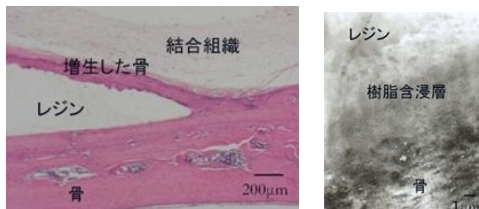
研究分野：歯周・歯内療法学

キーワード：4-META/MMA-TBBレジン 生体活性材料 複合化レジン 骨増生 BMP-2

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯科で使用されている 4-META/MMA-TBB レジン (スーパーボンド) は象牙質やセメント質への優れた接着性に長期の実績があり、また生体親和性にも優れていることが明らかにされ、根管充填や歯根破折の治療に応用されている。骨は象牙質やセメント質と同様にコラーゲンとハイドロキシアパタイトを主成分とすることから、4-META/MMA-TBB レジンは骨にも接着し生体親和性が維持されると考え、ラット頭蓋皮質骨に 4-META/MMA-TBB レジンを接着させ検討を行った。その結果、骨とレジンとは樹脂含浸層を形成して皮質骨に接着し、その構造は 12 ヶ月後も維持されていた (図 1)。

またレジンが接着した皮質骨は正常なリモデリングが行われていた。さらに硬化したレジン表面を被覆していた結合組織とレジンの間には新生骨が増生し、新生骨は結合組織を介さず直接レジンに接していた (図 1)。

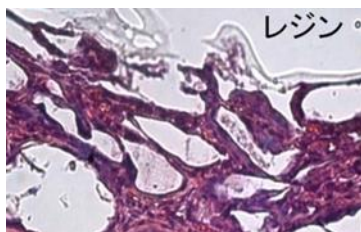


(図 1)

現在用いられている PMMA 系レジンと骨セメントは、骨と接着しないため長期間経過すると結合組織が介在して機能不全となり、臨床成績は不十分なのが現状である。一方、4-META/MMA-TBB レジンは骨や人工材料とも接着可能で、骨セメントとしても優れた機能を発揮できると考えられる。

しかし、(図 1) でみられるレジン上面に増生した骨は、形成速度が遅いことが大きな課題である。すなわち、歯槽堤増生などに応用した場合、レジン表面に骨がなく結合組織に広範囲に接していると、歯肉が薄い場合には哆開したり壊死したりする危険性がある。したがって、早期に周囲骨からレジン上面への骨形成を誘導することが重要と考えられる。

(2) 止血剤として用いられているアテロコラーゲンスポンジは、繊維が網目構造をしており、4-META/MMA-TBB レジンを塗布すると、繊維間にレジンが浸透して硬化する。これを、ラット皮下結合組織に埋入すると、繊維が吸収されて網目状の結合組織がレジンに入り込むことを明らかにしている (図 2)。

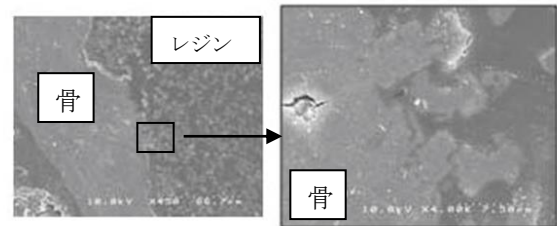


(図 2)

この繊維状止血剤に骨誘導能の高い BMP-2 保持させておくことによって、網目状の骨が 4-META/MMA-TBB レジン内に増殖すると考えられる。

(3) レジンに炭酸カルシウム粒子を複合化すると、 Ca^{2+} がわずかに溶出し、レジン表面に骨が早期に形成されて炭酸カルシウム顆粒やベースレジンと直接結合することが、光顕、SEM で観察されている (図 3)。

(図 3)



このことから、レジン表面に早期に骨を形成させるために複合化レジンと BMP-2 を併用することとし、レジンに炭酸カルシウム、 α -TCP 粒子を 0、20、40、60、80%の重量比で混和して、理工学的性質、 Ca^{2+} 溶出量を評価したところ、接着強さなど物性が許容でき、 Ca^{2+} 溶出量が多い、炭酸カルシウム濃度 40%、60%と α -TCP 濃度 40%、60%が混合材料として適当と考えられた。

上記の研究を総合し、複合化レジンと BMP-2 含浸コラーゲンスポンジを併用することにより、早期にレジン上面への新生骨の形成が誘導でき、現在の組織再生療法では不十分であった広範囲の骨欠損に対しても形態回復が可能ではないかと考えたのが、着想に至る経緯である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、4-META/MMA-TBB レジンに、炭酸カルシウム、 α -TCP を 40%、60%複合化することが、ラット頭蓋骨に接着させたレジン上への骨増生に有効であるかを評価すること、さらに骨に接着させた複合化レジン上に BMP-2 で骨を誘導し、レジン上への骨増生状態、レジンと増生骨の接触状態等を検討することである。

また、4-META/MMA-TBB レジンの面積が広くなってもレジン上に骨が形成され、結合が得られるかを、ビーグル犬を用い歯槽堤増大が可能かどうかで検討する。

3. 研究の方法

(1) 複合化レジンと BMP-2 含有コラーゲンスポンジを併用することによる、レジン上への骨増生状態、新生骨との接触状態の検討

① 実験動物

Wister 系雄性ラット 10 週齢を使用した。

② 実験材料

・複合化レジン：4-META/MMA-TBB レジン (ス

ーパーボンド C&B®) (サンメディカル) [ポリマーに炭酸カルシウムまたは、 α TCP を 0、40、60%の重量比で混和]

- ・スキャホールド：5×5×1mm のコラーゲンスポンジ (INFUSE® Bone Graft, Medtronic)
- ・rhBMP-2 溶液 (1.5mg/ml) (INFUSE® Bone Graft, Medtronic)

③手術方法

ラット頭部の皮膚を切開し、頭蓋骨中央を露出させて、骨膜を剥離した。骨面を 10 倍希釈した 10%クエン酸 3%塩化第二鉄溶液 (表面处理剤グリーン®、サンメディカル) で処理し、水洗、乾燥後、コンポジット化レジンを塗布した。複合化レジン硬化前に、BMP-2 を含浸させたスキャホールドで被覆して、皮弁を復位縫合した。

④評価方法

観察期間は 4、8 週とし、脱灰薄切標本作製、H-E 重染色して、複合化レジン上面の骨新生量、複合化レジン上面の骨とレジンの接触状態を評価した。

(2) 複合化 4-META/MMA-TBB レジン上面への骨誘導面積の検討

①実験動物 ビーグル犬 10 ヶ月齢を使用した。

②実験材料

- ・複合化レジン：炭酸カルシウム、 α TCP 40%、60%含有 4-META/MMA-TBB レジン (スーパーボンド C&B®) (サンメディカル)
- ・スキャホールド：5×5×1mm のコラーゲンスポンジ (INFUSE® Bone Graft, Medtronic)
- ・rhBMP-2 溶液 (1.5mg/ml) (INFUSE® Bone Graft, Medtronic)

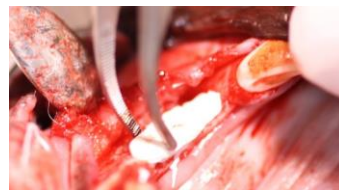
③手術方法

ビーグル犬の下顎 P3、上顎 P2 を抜歯し、頬側の皮弁を剥離、舌側の骨壁を残すようにし約 10mm×9mm の骨欠損を作製後、皮弁を復位して 1 ヶ月間治癒させた。皮弁を再度切開、骨膜を剥離し、骨欠損部の歯槽骨を露出させ

(図 4)、骨欠損形態に複合化レジンを成形し硬化させて、レジブロックを作製した。対照群は、骨面を水洗、乾燥後、同様の複合化レジン (炭酸カルシウムまたは α TCP 0%、40%、60%含有) を用いてレジブロックを接着させ (図 5)、皮弁を復位縫合した。実験群は複合化レジンと BMP-2 を併用した。すなわち、骨面を水洗、乾燥後、骨欠損形態に合わせて成形した複合化レジブロックを複合化レジンで骨に接着し、レジン表面にもう一度複合化レジンを塗布してから BMP-2 を含浸させたコラーゲンスポンジで被覆して (図 6)、皮弁を復位縫合した。



(図 4) 頬側が陥凹している。



(図 5) 複合化レジンを接着



(図 6) 複合化レジンを接着後、さらにコラーゲンスポンジを接着し BMP-2 を塗布

④評価方法

観察期間は 6 週とし、炎症の有無等を観察後、 μ CT 撮影を行った。その後、脱灰薄切標本作製、H-E 重染色して、レジン上面の新生骨の形成状態、レジン上面の骨とレジンの接触状態を観察した。

以上の結果から、大きな骨欠損でレジンの範囲が広がっても、歯槽堤増大が可能かどうかを明らかにした。

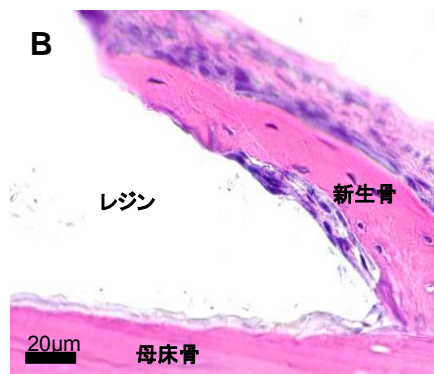
4. 研究成果

(1) 実験 1 光学顕微鏡観察結果

①複合化レジンのみを接着した場合

観察期間 4 週では、60%炭酸カルシウムまたは 60% α TCP を含有していても、レジンの大部分は結合組織で被覆されており、レジン上への新生骨形成はわずかに認められるのみであった。新生骨は薄い緻密骨で、新生骨とレジンの界面は、60%炭酸カルシウム、 α TCP 複合化レジンの場合に直接骨基質がレジンに接している部分がわずかに認められた (図 7)。

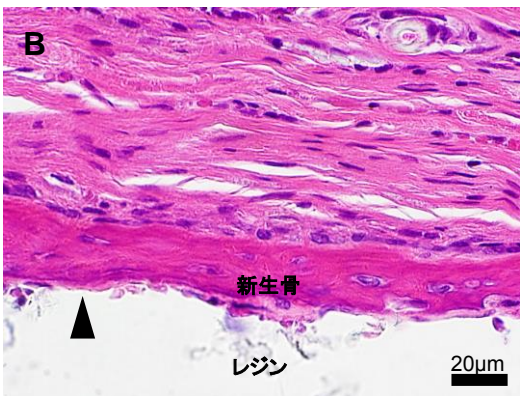
0%含有の場合は、新生骨とレジンの直接接触はほとんど認められず、界面には数層の細胞が認められた。



(図7) α TCP60%複合化レジン接着 4 週後
 A: レジン上面の大部分は結合組織によって覆われている。 ▽: 増生骨端
 B: A の拡大像。薄い緻密骨で、新生骨とレジンの界面は、細胞が数層配列している部分が多かった。

観察期間 8 週では、0%含有レジンでは 4 週後とほぼ同様の所見で、レジン上に増生した新生骨はわずかであり、直接接している部分はみられず、新生骨とレジンの界面には 1~数層の細胞が配列していた。

60%炭酸カルシウム、 α TCP 複合化レジンでは、レジン上の新生骨がやや増加し、骨基質とレジンが直接接している部分も見られた。新生骨とレジンの界面に細胞が介在している部分でも、その厚みは薄くなっていた(図8)。

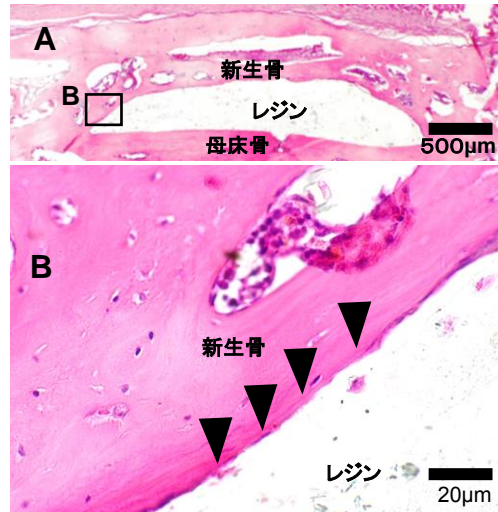


(図8) α TCP60%複合化レジン接着 8 週後
 A: レジン上に薄い骨の増生がみられる。
 ▽: 増生骨端
 B: A の拡大像。新生骨とレジンが直接接している部位 (▲) がわずかに見られた。

②複合化レジンと BMP-2 を併用した場合

観察期間 4 週で、0%でもレジンほぼ全面が新生骨で被覆されていた。60%複合化レジンでは、新生骨とレジンが直接接している部分がわずかに認められた。

観察期間 8 週では、0%でもレジン上面を厚い新生骨が全面被覆していた。新生骨は緻密化し、骨小腔が認められ、走行は規則的であった。60%複合化レジンではレジンと新生骨が直接接している部分は多くなり、接していない部分では骨基質とレジンの距離は極めて近く、細胞が散在している程度であった(図9)。



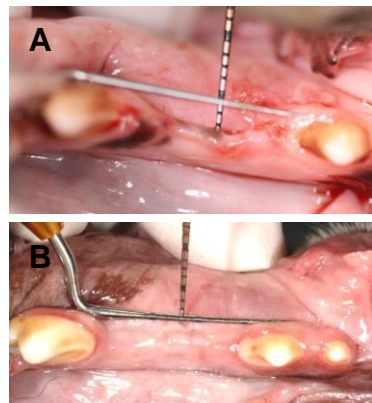
(図9) α TCP60%複合化レジン+BMP-2 8 週後
 A: レジン全面が 4 週より厚く新生骨で被覆されている。
 B: A の拡大像。新生骨は骨小腔がみられ、走行は規則的であった。レジンと新生骨が直接接している部分 (▲) は多くなっていた。

以上より、 α TCP と炭酸カルシウムを複合化することにより、レジン上の骨増生が増加し、レジンと増生骨との接触率が向上することが明らかとなった。 α TCP と炭酸カルシウムでは α TCP の方が骨との接触率がわずかに高かった。また、BMP-2 でレジン上に骨誘導するとレジン全面を骨が被覆し、レジンと骨との接触率も向上することが示唆された。

(2) 実験 2

①肉眼所見

ほとんどの標本で、複合化レジン接着 6 週後、歯肉に炎症は認められず、術前は陥凹していた歯槽堤が増大していた(図10)。しかし、BMP-2 で被覆しなかった群で、接着したレジンプロックが厚かった場合、歯肉からレジンが露出しているものが認められた。



(図10)

A: 術前 頬側歯肉に陥凹が認められる。
 B: 6 週後 歯槽堤が増大しており、歯肉に炎症は認められない。

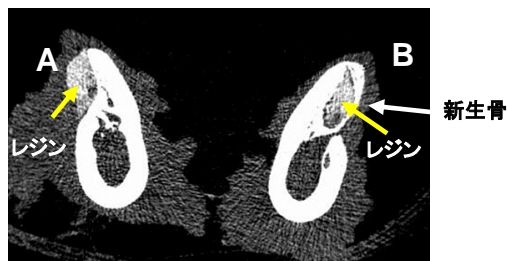
② μ CT 像

40% α TCP 複合化レジンのみを接着した場合、レジン上面に骨形成は認められなかったが(図 11A)、BMP-2 を併用することによりレジン上面を覆うように骨増生が認められた(図 11B)。60% α TCP 複合化レジンの場合でも同様の結果となった。



(図 11) ビーグル犬下顎骨冠状面断

また、40%、60%炭酸カルシウム複合化レジンのみを接着した場合も同様で、レジン上面に骨形成は認められなかったが(図 12A)、BMP-2 を併用することによりレジン上面を覆うように骨増生が認められた(図 12B)。

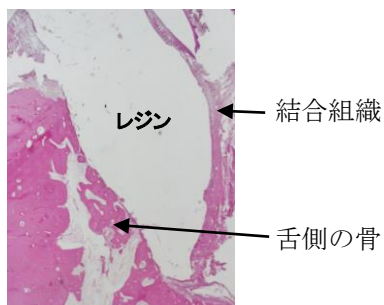


(図 12) ビーグル犬下顎骨冠状面断

接着した骨面とレジンには、一部間隙が認められるところもあり、止血がしっかりできていない部分は接着していない可能性が考えられた。

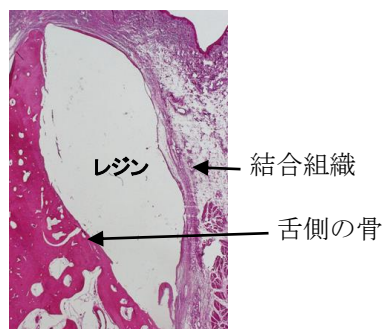
③ 光学顕微鏡観察

40%、60%TCP 複合化レジンのみでは、レジン上面に骨増生は認められず、頬側は結合組織で被包されていた(図 13)。



(図 13) 頬側のレジン上面にはほとんど新生骨の形成は認められなかった。

40%、60%炭酸カルシウム複合化レジンの場合も同様に、レジン上面に骨増生は認められず、頬側は結合組織で被包されていた(図 14)。



(図 14) レジン上面に新生骨の形成はほとんど認められず、結合組織で被覆されていた。

一方、40%、60% α TCP 複合化レジンと BMP-2 を併用した場合、レジン上面はほぼ新生骨で被覆されていて(図 15A)、新生骨とレジンが直接接している部分も多く認められた(図 15B)。接着させた骨とレジンの間には、接着している部分と結合組織の介在が認められる部分が認められた(図 15C)。

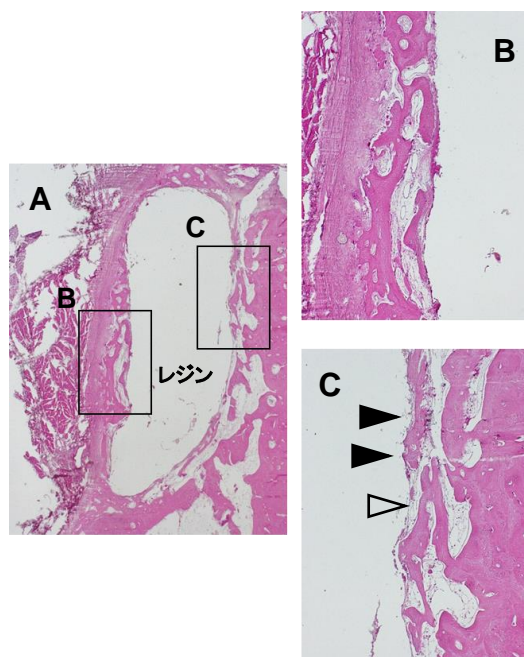


図 15 α TCP 複合化レジンと BMP-2 併用群
A: レジン上面を被覆する新生骨の形成が認められる。(左側が頬側)

B: A の拡大像 レジン上面に新生骨が形成され、直接接している部分が多く認められる。

C: A の拡大像 (接着させた舌側の骨)
接着している部分 (▲)、軟組織が介在している部分 (△)

40%、60%炭酸カルシウム複合化レジンとBMP-2を併用した場合も同様に、レジン上面は新生骨で被覆されていて(図16A)、新生骨とレジンはほぼ軟組織を介在せず直接接していた(図16B、C)。

舌側の骨とレジンの間は、結合組織の介在は認められず、接着していると考えられた(図16D)。

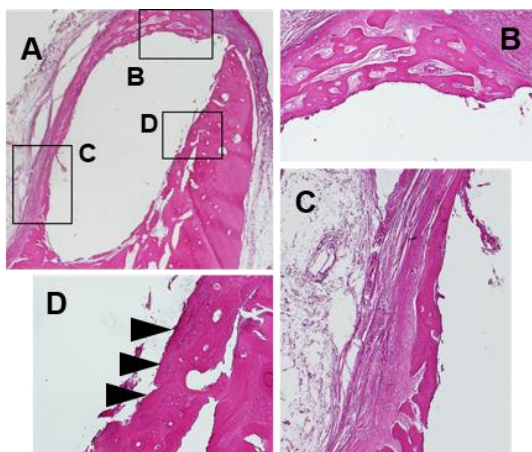


図16 炭酸カルシウム複合化レジンとBMP-2併用群

- A: レジン上面を被覆する新生骨の形成が認められる。(左側が頬側)
 B、C: Aの拡大像 レジン上面に新生骨が形成され、直接接している部分が多く認められる。
 D: Aの拡大像(接着させた舌側の骨) 接着している部分(▲)

以上より、大きな骨欠損の場合でも、4-META/MMA-TBBレジンと α TCPまたは炭酸カルシウムの複合化レジンで形態を回復後、BMP-2を併用することにより、レジン上面を被覆する新生骨の誘導が可能であることが明らかとなった。さらに、複合化させることにより新生骨とレジンの直接接触を高めることができると考えられた。実験1では、 α TCPを複合化した方がわずかに、直接接触率が高いと思われたが、実験2では明らかな差異は認められなかった。また、40%と60%でも新生骨形成量や直接接触率に大きな違いが認められなかったため、接着強さや強度を考慮すると40%複合化レジンで十分と考えられた。

本研究により、現在の組織再生療法では十分回復しなかった大きな骨欠損に対しても、内側はレジン、外側は骨という形で自在に形態を回復できる可能性が示唆された。しかし、レジンが厚く縫合時に歯肉にテンションがかかりすぎると、歯肉からレジンの一部が露出してしまうので、レジンの厚みには注意が必要と思われる。

今後の課題として、骨からの出血がある場合、骨面との十分な接着が難しいことが挙げられる。使用したスーパーボンドをデュアルキュア化することにより、わずかに出血して

いてもすぐにレジンが硬化することにより、接着していない範囲が限局的になるかもしれない。また、今回観察されたレジン上面の新生骨が長期的に消失しないかどうか、さらに母床骨に接着したレジンが骨のリモデリングによって長期的に分離されないかどうかの検討も必要である。

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0件)

[学会発表] (計4件)

①柳澤 剛、菅谷 勉、工藤(中塚) 愛、佐藤賢人、猪股慶久、川浪雅光: カルシウムを混和した4-META/MMA-TBBレジン上への新生骨の接触、日本歯科保存学会、2015年6月25日～2015年6月26日、北九州国際会議場(福岡県北九州市)

②工藤(中塚) 愛、鷲巣太郎、中谷充宣、菅谷 勉: 表面処理剤の濃度の違いによる4-META/MMA-TBBレジンと骨との接着強さの比較検討、日本接着歯学会、2014年12月13日～2014年12月14日、ニチイ学館 神戸ポートアイランドセンター(兵庫県神戸市)

③工藤(中塚) 愛、菅谷 勉、柳澤 剛、猪股慶久、佐藤賢人、中谷充宣、川浪雅光: 表面処理材の濃度の違いによる4-META/MMA-TBBレジンと骨との接着状態の比較検討、日本歯科保存学会、2014年6月19日～2014年6月20日、滋賀県立芸術劇場(滋賀県大津市)

④柳澤 剛、菅谷 勉、中塚 愛、川浪雅光: カルシウムを混和した4-META/MMA-TBBレジン上への骨形成、日本歯科保存学会、2013年10月17日～2013年10月18日、秋田県総合生活文化会館(秋田県秋田市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中塚 愛 (NAKATSUKA MEGUMI)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号: 00547648

(2) 研究分担者

なし