

令和元年6月24日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2018

課題番号：25861919

研究課題名(和文) 吸収性ハイドロキシアパタイト線維による総合的骨再生システムの検討

研究課題名(英文) Comprehensive bone regeneration system by Resorbable Hydroxyapatite Fiber

研究代表者

尾関 真帆(OZEKI, Maho)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60596865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)： 歯科領域における骨補填材料についてさまざまな開発・研究がなされているが、自家骨移植に代わる代替材料は未だ開発されていない。本研究では、骨補填材として有用性が示されている吸収性ハイドロキシアパタイト線維(以下、HF)と、骨補填材と組織誘導膜としての機能が期待されるHFを加工した吸収性ハイドロキシアパタイト膜(HF膜)および培養骨髄細胞を併用した骨再生システムの開発を目指していた。本研究では、臨床応用を目標とし、一定の強度を有し、臨床的に操作性のよい膜デザインを数種類特定したうえで、従来使用されている組織誘導再生膜との比較を計画した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラント治療は、咀嚼機能の回復に有用な手法であるが、治療予定部位の骨量が不足している場合、骨造成処置が必要となる。自家骨が、骨補填に有効であるものの、採取量が制限されること、骨採取部への追加の外科処置が必要となり、課題となっている。したがって、他の骨補填材の開発が行われている。本研究では、吸収性ハイドロキシアパタイトファイバーを作成し、このファイバーを膜状に加工し、骨髄間葉系細胞と共に移植を行い、有効性の評価を目的とした。また、既存の製品との比較検討を行い、本材料との比較検討も計画した。

研究成果の概要(英文)： In dentistry, bone substitute is widely developed. However, autogenous bone graft is gold standard and most reliable procedure for implant site development. In this study, Resorbable Hydroxyapatite Fiber(HF), available bone graft material, and HF processed membrane combination graft with incubated bone marrow stem cell were plan to developed.

In this study, aiming at clinical application, we identified several types of membrane designs with enough strength and prefer clinical operability, and planned to compare with conventionally available tissue-guided regenerative membranes.

研究分野：骨再生

キーワード：骨補填材 吸収性材料

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に突入した我が国において、歯の喪失による摂食機能障害は社会問題となっている。

歯周病を原因とする歯の喪失は歯槽骨の吸収を伴うため、咬合機能回復に有効である歯科インプラント治療においては埋入のための骨を確保するために骨造成術による骨再生が必要となる。広範囲の骨欠損に対しては、バリアメンブレンを併用した骨誘導再生法 (GBR 法) が行われる。

現在、骨造成術に際し用いる移植材として、自家骨が第一選択とされているが、患者侵襲が大きいことや採骨量に限界があることが問題となっている。歯科領域では患者由来の自己骨髄細胞培養を用いた骨再生医療についても臨床研究がなされているが、細胞採取時の侵襲や培養時のコンタミネーションといった技術的課題もある。研究開始当初、iPS 細胞による再生医療も注目されているが、その安全性、有効性は確立されておらず、研究開始当初では実用化の目的は立っていないかった。

一方、骨補填材と併用されるバリアメンブレンは現在 GBR 法の効果・効能の承認を有する製品はなく、十分な性能を有するメンブレンが必要とされている。バリアメンブレンには非吸収性と吸収性のものがあるが、非吸収性メンブレンは、GBR 法手術後に膜除去のための追加手術が必要であること、高分子などの吸収性メンブレンでは、早期のメンブレン吸収により十分な遮蔽効果が得られないことや、分解産物である酸により内部補填材が吸収し、十分な骨再生が得られず治療の予知性が低くなることが問題である。(図1)そのため、非吸収性メンブレンのような膜除去を必要とせず、かつ適切な骨再生を促進するメンブレンと骨補填材を同時に開発することが現場では強く望まれている。

現在、歯科領域では、自家骨代替材料として非吸収性骨補填材であるハイドロキシアパタイト (HA)、吸収性骨補填材である TCP、ウシ骨由来の Bio-Oss 等が広く臨床応用されているが、いずれの骨補填材も最適化されたメンブレンの組み合わせは示されていない。

申請者の所属する研究室では、これまで線維状のハイドロキシアパタイト (以下、HF; 直径 5 ~ 15  $\mu\text{m}$ ) を開発し、様々な動物実験を行い、骨補填材としてのその性能を明らかにしている。(Machida et al. J Oral Tissue Engin 2010)

この HF は形状を線維状にしたことにより表面積が飛躍的に向上したため、動物実験により生体内吸収性を有するハイドロキシアパタイトであること、その際の適切な充填密度について我々は先の研究で明らかにしてきた。

これまで研究を行ってきた HF をシート状に加工することを検討し、一定の厚みを持つ膜状の HF シートの作製を試みた。このシート状 HF (以下、HF 膜) は、HF を圧延することで作製するため、原材料の HF と同じく純粋なハイドロキシアパタイトとし、膜デザインにより HF 同様に吸収性を有することが期待される。これはハイドロキシアパタイトの特性である骨伝導能をもった吸収性のバリアメンブレンとしても使用可能と考えられる。

申請者はこれまで骨髄細胞培養におけるペプチドゲルを用いた 3 次元培養の有用性について示してきた (Ozeki et al. J Biomater Appl 2011)。HF 膜についても線維状の三次元構造であることから、骨髄細胞の三次元培養のための足場としての有用性も期待できると考えていた。

そこで、本研究では、培養骨髄細胞と骨補填材と骨置換能を有す吸収性バリアメンブレンとしての効果が期待できる HF 膜および HF を用いた骨再生システムの開発を行い、骨欠損への同一材料による骨補填および遮断膜を応用した。

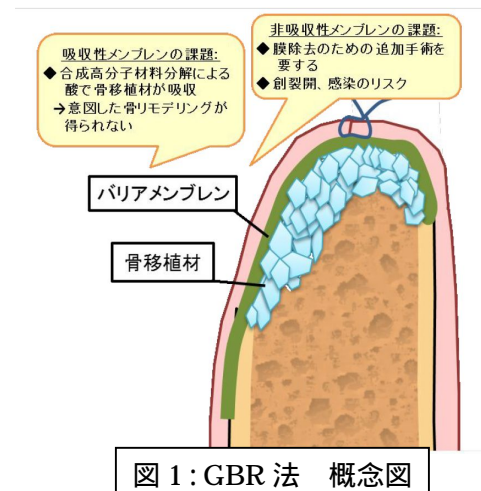
## 2. 研究の目的

本研究は、同一材料による骨再生治療の確立を目的とした。

HF を膜状に加工することにより、HF と HF 膜を使用した、同一材料による骨補填および遮断膜による骨造成能を、細胞培養系および動物骨欠損モデルによる評価を行い、有効性の評価を行う計画とした。

## 3. 研究の方法

未加工の HF と骨髄細胞 (以下 BMC) の評価を共培養により、材料の基礎的な検討を行った。雄性 Wistar Rat の大腿骨より骨髄細胞を得たのち、10%ウシ胎児血清添加 MEM にて培養を行った。骨誘導培地 (0.01  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ascorbic acid, 10  $\text{mM}$  ,



-glycerophosphate) 下にて、HF と BMC の共培養を行い、経時的な DNA 量の計測を行った。

上記の結果を踏まえ、密度の異なる HF 膜を複数作成し、BMC を播種した in vivo 実験を行うことを計画した。作成した HF 膜と骨髄間葉系細胞の培養を骨誘導培地下にて行い、骨芽細胞マーカーである Col1, ALP, OPN, OCN の発言を qRT-PCR にて mRNA の発現の比較検討を計画した。また、in vitro 実験により、有効性が高いと思われる HF 膜を推定し、この HF 膜と HF を共に in vivo 実験 (動物骨欠損モデル) に応用することを計画した。

#### 4. 研究成果

HF と BMC の共培養においては、経時的な DNA 量の増加が認められた。

HF 膜の原料となる HF の作成方法の調整を継続して行った。温度や湿度といった作成条件や、HF 作成機器の調整 (射出方法、射出圧) を行いながら、HF 膜の作成を行っていた。しかしながら、当初の想定とは異なり、HF を膜に加工することが非常に困難であった。

試作品として作成された HF 膜について、細胞培養系における評価を行う予定であったが、HF 膜の作製について難渋した。

原材料となる HF について、さまざまな製作にかかわる条件を検討し、HF 膜製作に適する物性を付与すべく、繰り返し HF の作製を試みた。HF ファイバーは脆性材料であり、圧延加工により、繊維が断片化し、膜への加工が困難で、生体適応に供する十分な物性が担保できなかった。脆性材料であることを改良するために、焼成温度と基材濃度を変化させ、HF ファイバーに弾性を付与することを試みた。ある程度の弾性の付与は可能となったが、圧延加工に耐えうるような、ハイドロキシアパタイト繊維自体に十分な弾性を付与することができなかった。

結果として、細胞および生体への応用に耐えうる適正な物性をもつ HF 膜の作製は、困難であることが示された。しかし、HF 作成にかかわる焼成温度、基材濃度、材料の射出方法および射出圧に変化を加えることにより、HF の弾性といった物性の変化がみられることが分かった。

今後は、HF の加工方法や原材料の探索を行い、吸収性のハイドロキシアパタイト材料であることを担保しながら、膜状への加工を可能しながらも、細胞および生体内でも骨再生に寄与する HF の作成方法の検討が必要であると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)(すべて査読あり)

Kon K, Shiota M, Sakuyama A, Ozeki M, Kozuma W, Kawakami S, Kasugai S. Evaluation of the Alteration of Occlusal Distribution in Unilateral Free-End and Intermediate Missing Cases. J Oral Implantol. 2017 Feb;43(1):3-7.

Kon K, Shiota M, Ozeki M, Kasugai S. The effect of graft bone particle size on bone augmentation in a rabbit cranial vertical augmentation model: a microcomputed tomography study. Int J Oral Maxillofac Implants. 2014 Mar-Apr;29(2):402-6.

[学会発表](計 4 件)

Kazuhiro Kon, Yoshitaka Tanabe, Makoto Shiota, Wataru Kouzuma, Sawako Kawakami, Maho Ozeki, Shohei Kasugai Potentially risk factors of remaining tooth extraction in Long term cases of implant therapy: Retrospective study in 10 years follow up patients. The 26th Annual Scientific Meeting of the European Association for Osseointegration (EAO) 2017.10.5 - 10.7 Spain

今 一裕, 田辺 功貴, 上妻 涉, 尾関 真帆, 塩田 真, 春日井 昇平 HbA1c はインプラント周囲骨吸収を招くか? 3 年後ろ向き臨床研究 (Does HbA1c cause peri-implant bone resorption? Three years clinical retrospective study) (English Session) 第 21 回 公益社団法人 日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会 2017 年 12 月 3 日 - 4 日 東京

今一裕, 塩田真, 尾関真帆, 春日井昇平. 長期経過臨床症例におけるインプラント治療のプラーク非関与の生物学的合併症. 日本口腔インプラント学会第 35 回関東・甲信越支部学術大会 2016.2.13-14 東京

今 一裕, 塩田 真, 堀田 達也, 尾関 真帆, 春日井 昇平 インプラント補綴長期経過症例における残存歯の生存に関連する要因: 後ろ向き比較研究 第 44 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 2014 9/12-14 (優秀研究発表) 東京

## 6 . 研究組織