

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463061

研究課題名(和文) 培養操作を介さない末梢血由来単核細胞を利用した骨再生法の確立

研究課題名(英文) bone regeneration technique with non-cultured mono nuclear cell derived from peripheral blood

研究代表者

大場 誠悟(OHBA, Seigo)

長崎大学・病院(歯学系)・講師

研究者番号：80363456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：担体としてhydroxyapatite/collagen composite material (HA/Col)を使用し、培養操作を行わない末梢血を使用して骨再生を試みた。ヌードマウスの頭頂骨に末梢血を含んだHA/Colを移植したところ、移植後8週間で極めて成熟した骨新生が認められた。生食を含んだHA/Colを移植した場合と比較して、優位に骨新生が認められた。家兔の副鼻腔内に末梢血を含んだHA/ColあるいはHAを移植したところ、HA/Col群で優位に骨新生が認められた。以上のことより、末梢血を含んだHA/Colは骨再生に有効な材料であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone regeneration was induced by hydroxyapatite/collagen composite material (HA/Col) as a carrier and non-cultured total peripheral blood. HA/Col with peripheral blood (PB group) or normal saline (NS group) were implanted on the calvarium of nude mice. The mature bone regeneration was observed 8 postoperative weeks in PB group. The volume of new bone was significantly much in PB group. In rabbits, HA/col or HA were filled into the maxillary sinus with peripheral blood. New bone was more induced in HA/Col group same as mouse. According to these results, HA/Col with peripheral blood is considered to be useful for bone regeneration.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨再生 PRP hydroxyapatite/collagen

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では、喪失した歯槽骨・顎骨の再生は重要な課題である。再生医療の応用、特に骨髄由来間葉系幹細胞を利用した種々の試みがなされているが、その多くは培養操作を介しており、安全面、経済面、治療期間の延長など問題となる点が多い。また、骨髄採取に伴う血圧低下、皮下血腫、疼痛、感染などのリスクが存在する。また、インプラント治療に骨造成を応用することも多く、自費診療になるために可及的簡便な方法を確認するとともに、インプラント治療に関わる治療期間を短縮する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養操作を介さずに、簡便・安全かつ短期間で成熟した骨の再生法の確立である。これによりインプラント治療期間の短縮を図る。

- (1) 担体として、hydroxyapatite/collagen composite material (HAp/Col) を使用。これは結晶構造まで生活骨と類似しており、生体内で新生骨と完全に吸収置換されることが特徴。
- (2) 培養操作を介さずに有効な細胞を利用するために、plate rich plasma (PRP) を使用。短時間で精製可能であるため、処置中に可能な方法として選択。

3. 研究の方法

骨造成の検討は2つの方法で行った。

- (1) ヒトの末梢血を採取し、PRPを作成し、担体にPRPを浸漬させ、ヌードマウスの頭頂骨上に移植した。実験群は control (処置なし)、sham群(骨膜を剥離挙上したのみで移植なし)、生食群(担体+生食)、全血群(担体+末梢全血)、PRP群(担体+PRP)の4群とした。移植後4, 8週間で屠殺し、新生骨量の計測を行った。
- (2) 家兔の副鼻腔に皮膚側からアプローチし、直径6mmの交通路を形成。副鼻腔粘膜を剥離挙上し、そこに末梢血に浸した担体(HAp/Colあるいはhydroxyapatite; HA)を填塞。骨膜皮膚を縫合し、移植後、2, 4, 8週でCT撮影を行った。また同時に屠殺し組織学的評価を行った。移植後4週目にインプラントを埋入し、さらに4週後に屠殺し、インプラントと新生骨の関係を検討した。

4. 研究成果

- (1) 新生骨は、 \sim では認められず、 \sim では認められた。(図1) に対して、 \sim の新生骨量には有意の骨の新生が認められた。 \sim 間の骨新生量には有意差は認められなかった。(図2) しながら \sim では新生骨の領域内に骨髄様の組織が確認され、新生骨が成熟していることが示唆された。また、HA/Colの構成成分であるHAの残存は少なく、担体

そのものがoriginal boneのremodeling systemに取り込まれることが確認された。

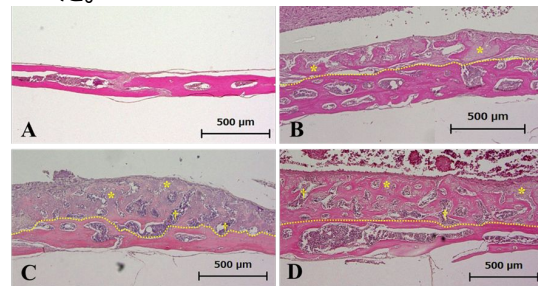


図1 : A: sham, B: 生食, C: 全血, D: PRP

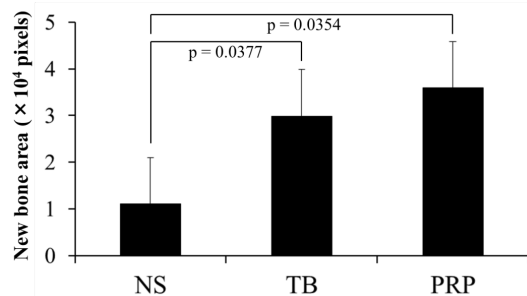


図2 : NS: 生食, TB: 全血

以上のヌードマウスを用いた結果から、HAp/ColはHAの粒子が細かく、originalの骨に類似した結晶構造をしており、骨新生能が高いといわれている。HA/Col群では移植後4週間で新生骨内に骨髄様の構造も確認でき、早期に成熟した骨を新生できると考えられる。また、HAの粒子が細かいため、自家骨に置換されるため感染などのリスクも少ないと考えられる。HAp/Colはonlay状の骨造成に有効な材料であることが示唆された。移植前のHAp/ColはあえてPRPに浸漬する必要はなく、全血で浸すことで同等の骨造成を誘導することが可能であった。このことは経費や処置時間の短縮、感染のリスク減少に寄与する。

- (2) マイクロCTの所見で骨造成量の垂直距離を測定したところ、骨造成は術後4週間ではHAとHAp/Colともに骨新生が認められ、両者間で差は認められなかったが、術後8週ではHAp/Colにより新生された骨は大きく吸収しており、術後4週と比較して有意差が認められた。HA群では術後8週であっても材料の形態が維持されていた。(図3)

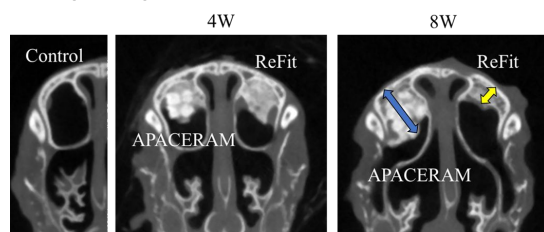
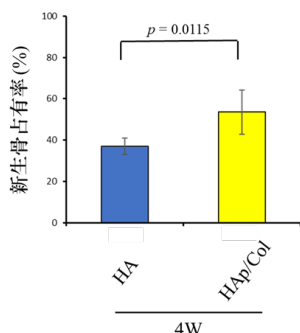


図3 : ReFit; HAp/Col

組織学的所見では、骨造成後2週間ではどちらの群も骨新生は不十分であったが、術後4週間ではHAp/Col群ではHAに比較して新生骨量が有意差を持って多かった。(図4)

図4：骨新生



インプラント埋入後4週(骨造成後8週)でのOsstellによるISQ(implant stability quotient)値は、HAp/Col群、HA群ともに60前後を示した。また、BIC(bone-to-implant contact)はHAp/ColとHA群で差は認められなかった。(図5)残存する人工骨量は、HAp/Col群よりもHA群で有意差を持って多かった。

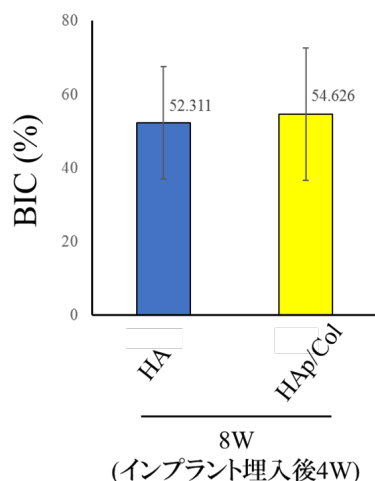


図5：インプラント埋入後4週のBIC

以上の家兎を用いた実験結果から、HAp/Colは上顎洞底挙上術に適用可能な人工骨であると考えられる。HAp/Colにより骨新生が誘導され、材料の構成成分であるHAが吸収する。従って、インプラント埋入の際にインプラントが生活骨に接する機会が増えるため、早期のosseointegrationを誘導できる可能性が示唆された。また、HAが吸収されることは将来的なインプラント周囲炎のリスクが少なくなると考えられる。しかしながらHAp/Colにより造成された新生骨は時間の経過とともに吸収する傾向にあるため、インプラント埋入時期の見極めが重要であると考えられる。

以上の結果から、HAp/Colは、従来用いられていた担体と比較して、優位に骨造成を誘導する可能性が示唆された。この際、PRPを

精製する必要性はなく、末梢血あるいは創部からの出血を利用することで、患者に与える苦痛を最小限にすることが可能であることが推測される。

しかしながら本材料の特徴である95%の気孔率のために、血液に浸漬された状態では形態の保持が困難となる。求められる形態通りの骨新生を行うのであれば、さらに工夫が必要であり現在検討中である。

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1件)

Seigo Ohba, Yoshinori Sumita, Mayumi Umebayashi, Hitoshi Yoshimura, Hisato Yoshida, Shinpei Mastuda, Hideki Kimura, Izumi Asahina, Kazuo Sano. Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma. Archives of Oral Biology 61:23-27, 2016. (査読有) doi: 10.1016/j.archoralbio

〔学会発表〕(計6件)

大場誠悟、江頭寿洋、中谷佑哉、住田吉慶、朝比奈泉：家兎上顎洞挙上術モデルに適用したhydroxyapatite/collagen composite materialによる骨造成の評価【第71回日本口腔科学会学術集会 4.26, 2017、ひめぎんホール(愛媛県・松山市)】
大場誠悟：hydroxyapatite/collagen composite material (ReFit)による骨造成【第36回日本口腔インプラント学会近畿北陸支部学術大会 12.18, 2016、富山国際会議場(富山県・富山市)】
大場誠悟：hydroxyapatite/collagen composite material (ReFit)を用いた骨造成【第46回日本口腔インプラント学会学術大会 9.17, 2016、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)】
大場誠悟、中谷佑哉、江頭寿洋、野田さわこ、住田吉慶、朝比奈泉：hydroxyapatite/collagen composite materialによる家兎の上顎洞挙上術【第19回日本顎顔面インプラント学会学術大会 11.29, 2015、ホテルメルキュール横須賀(神奈川県・横須賀市)】
大場誠悟、江頭寿洋、中谷佑哉、住田吉慶、朝比奈泉：Hydroxyapatite/collagen composite material, hydroxyapatite, beta-TCPによるonlay状骨造成能の比較検討【第45回日本口腔インプラント学会学術大会 9.21, 2015、岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市)】
大場誠悟、住田吉慶、梅林真由美、吉村仁志、佐野和生、朝比奈泉：Hydroxyapatite/collagen composite materialと多血小板血漿を併用したマウス頭頂骨

上への骨造成【第 69 回日本口腔科学会学
術集会 5.13, 2015、大阪国際会議場（大
阪府・大阪市）】

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大場 誠悟 (OHBA, Seigo)
長崎大学・病院 (歯学系)・講師
研究者番号 : 80363456

(2)研究協力者

佐野 和生 (SANO, Kazuo)

研究協力者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)

研究協力者

ロessler ジェイ ブレイク (Roessler, J,
Blake)