

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670849

研究課題名(和文) 自発的骨膜挙上能を持つ骨補填材の開発

研究課題名(英文) Development of bone scaffold for periosteum self-lifting

研究代表者

西村 正宏 (Nishimura, Masahiro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：00294570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は骨膜を低侵襲に挙上するための材料と方法を検討することである。ポリ乳酸化合物に炭酸アパタイトを含有させた膜(PLGA/apatite)をラットの頭頂骨上に移植した。アパタイト含有率が30%を超えるとシャーレ内での膨張率は低くなったが、移植すると新生骨は骨面側に形成され、骨膜側からは自発的な骨形成は生じないこと、アパタイトを50%含有するPLGA/apatiteはin vitroでは膨張率は少ないが、一旦膨張したのちに、アパタイト顆粒が支柱となって凹むことを抑制するために、膨らみが維持されること、骨膜を安定的に挙上するためには、骨面に沿うような形状の材料が必要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the way to augment periosteum by low invasive method. We used PLLA/PLGA membrane containing carbonate apatite (PLGA/apatite) onto rat calvaria model. PLGA/apatite membrane has unevenness shape, and apatite distributed at the bottom of the membrane (convex side). Swelling ratio of PLGA/apatite containing apatite over 30% showed low rate in vitro. We transplanted PLGA/apatite onto rat calvaria bone, and collected whole of the transplanted site containing recipient bone, then analyzed by histological observation. As the results, newly synthesized bone was observed only on the recipient bone side, not by periosteum side. PLGA/apatite containing 50% apatite showed low swelling ratio in vitro, however kept its volume by its strength. Finally, we found that closer distribution of the transplant material onto bone is essential for stable way to augment periosteum.

研究分野：口腔インプラント学、歯科補綴学

キーワード：骨造成 骨増生 骨膜挙上 骨再生

1. 研究開始当初の背景

高度に吸収あるいは欠損した顎堤を再建するために、これまで多くの骨造成法や仮骨延長法が開発されて臨床応用されている。これらの正しい術式によって確実な骨造成効果が得られるが、術式そのものが低侵襲とはいえず、感染のリスクも高く、その治療成績は術者の技量に大きく依存するところが多い。また骨造成法では移植骨の露出とその後の感染が大きな問題となることも多い。

そこで近年は歯肉を大きく切開せず、剥離した骨膜と骨の間に移植骨を注入するトンネル法も考案されている{Block, M.S. 2004, Hasson, O 2007, Soltan, M 2010}。

我々もこれまで中型動物にて様々な骨増生モデルを検討してきたが、大きく術野を展開することが必ずしも高い治療成績につながらなかった。

さらに最近では骨膜を拳上してスペースを確保するだけで骨が造成される事も報告されている{Schmidt, B. et al. 2002}。

また近年の高分子材料学の進歩によって、高吸水性で高膨潤性のポリマーが多数開発されており、我々もこのポリマーを骨と骨膜の間に入れることで、骨膜を低侵襲に拳上させ、一定の骨造成が図られることを見出した。

さらにこの膨潤型ポリマーにあらかじめ骨補填材を混ぜ込んで製作した膜を骨と骨膜の間に挿入すれば、口腔内側の粘膜の張力を減少させて十分なスペースを確保するのみならず、そのまま骨を造成できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

(1)炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の作製と培地中での経時的膨潤化：

炭酸アパタイト骨補填材は骨伝導能と非圧縮性が高いため、多く含有することで圧縮強度は増し、骨形成には有利だが、膨潤しないため骨膜を拳上して、骨造成領域を増加させることはできない。逆に PLGA は骨形成においては促進的効果はなく、非圧縮性も低いため、骨形成を意図する点では効果的ではないが、水分を含むことで、膨潤するため、スペースメイキングの面からは含有量が多い方が、骨膜も大きく拳上されることが期待される。そこで、どの程度の炭酸アパタイトの含有率で膨潤が可能なのかをシャーレ内で確認する必要がある。

(2)上記炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の骨膜下移植後の生体反応、組織学的評価：

それぞれの炭酸アパタイト含有 PLGA 膜を頭頂骨上に移植した際に、どのような生体反応が示され、内面に骨が形成されるかを組織学的に観察する必要がある。

3. 研究の方法

(1)炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の作製と培地中での経時的膨潤化：

炭酸アパタイト(炭酸基を 12%程度含むリン

酸カルシウム:(株)ジーシー社製)を重量%で、0%, 10%, 30%, 50%含有する直径 9mm 程度、厚みが約 1.3mm の、炭酸アパタイト含有率 PLGA 膜((株)ジーシーに依頼して製作)を一般的に間質系の細胞を培養する 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地中に、4 9 日まで浸漬し、定期的に厚みをノギスで測定した。

(2)炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の骨膜下移植後の生体反応、組織学的評価：

炭酸アパタイトはその製作過程によって、PLGA の中で一様に分布せず、下面(凸面)に偏って存在しており、また膜そのものも型から抜く際に、全くの平らな膜にはならず、凹凸が生じる。そこで、実際の炭酸アパタイト含有 PLGA 膜を 9 週齢の F344 ラットの頭頂骨の骨膜を頭後部から鋭い骨膜剥離子で剥離し、1 回目の移植時には、炭酸アパタイトが多く含有されている凸側をラット頭頂部(凸になっている側)の骨面上に配置し、骨膜と粘膜を縫合した。しかし、回収時には、移植体が骨となじまずに可動性であり、炎症細胞の浸潤がみられたため、2 回目の移植時には、移植体の凹面を頭頂骨の凸面に合う向きに移植した。移植 1 2 週後、移植体を含む頭頂骨を採取し、10%ホルマリンにて固定、脱灰後、パラフィン包埋し、薄切り切片作成後に HE 染色を行い、明視野にて観察した。

4. 研究成果

(1)炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の作製と培地中での経時的膨潤化：

図 1 に示すように、炭酸アパタイトを含有しない 100% PLGA は、明らかに大きく膨潤したが、炭酸アパタイトの含有量が増加するに従って、膨潤量は少なくな見える。

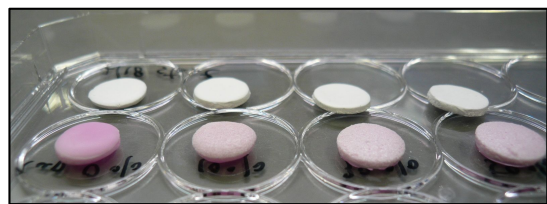


図 1 炭酸アパタイト含有 PLGA 膜を 6 日間培地浸漬後の外観(左から、炭酸アパタイト含有率 0%, 10%, 30%, 50%のもの。奥が浸漬前のサンプル、手前が浸漬後)

厚みを経時的に測定すると、図 2 に示すように 7 日後、炭酸アパタイトを含有しない 100% PLGA は、約 2 倍に、10%含有するものは約 1.6 倍、30%含有するものは約 1.25 倍、50%含有するものは約 1.23 倍になっていた。その後 42 日後まではほぼその厚みは保たれていたが、49 日後には、炭酸アパタイトを 30%含有する PLGA 膜の厚みは少し減少していた。また炭酸アパタイトを含有しない 100% PLGA は 21 日後から少しずつ厚みが減少していることから、PLGA の分解が、21

日目あたりから起こり始めるが、炭酸アパタイトを多く含むものでは、当然 PLGA の分解による割合も少ないため、厚みには変化が起きにくいことが示唆された。

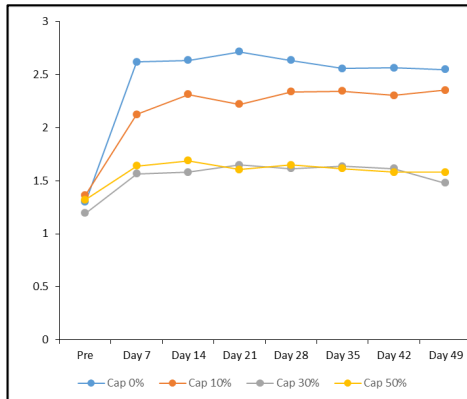


図2 炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の培地浸漬後の厚みの変化

(2) 炭酸アパタイト含有 PLGA 膜の骨膜下移植後の生体反応、組織学的評価：

1 回目の移植時には、炭酸アパタイトが骨面側に位置するほうが、骨伝導能の観点から骨再生に有利ではないかと考えて、移植体の凸面と頭頂骨の凸面を合わせて移植することになった。その結果、図3に示すように移植体がレシピエントの骨に生着するものもあれば、図4のように容易に脱離するものもあり、図5のように、炎症性細胞に取り囲まれて、浮腫を形成しているものが見られた。

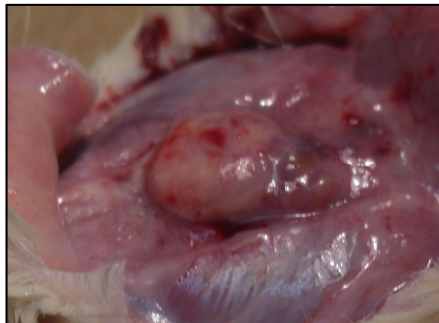


図3 移植体が頭頂骨と接着していた個体の例。

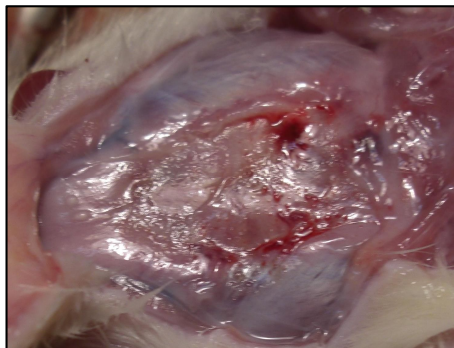


図4 移植体が頭頂骨と容易に剥がれた個体の例。



図5 移植体が炎症性細胞に取り囲まれて、浮腫を形成している個体の例。

そこで、2 回目の移植には、移植体の凹面を頭頂骨の凸面に合う向きに移植したところ、全ての移植体が炎症所見を示すことなく、生着していた(図6)。つまり、炭酸アパタイトの存在よりも、移植体のレシピエントへのフィット感のほうが、移植体の生着に重要であることが示された。

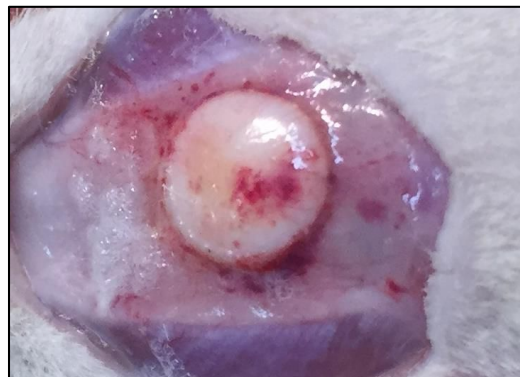


図6 炭酸アパタイト 10%含有 PLGA 膜の凹面を頭頂骨側に向けて移植して、12 週後の個体の例。

続いて組織学的観察を行った(いずれも移植 12 週後のサンプルを示す)。

炭酸アパタイト 0%含有 PLGA 膜の移植後には、以前見られたように、骨面に薄く新生した増生骨が観察された(図7)。PLGA そのものはまだ残存していたが頭頂部の厚みは確保されておらず、炎症細胞の侵入している所見は見られない。

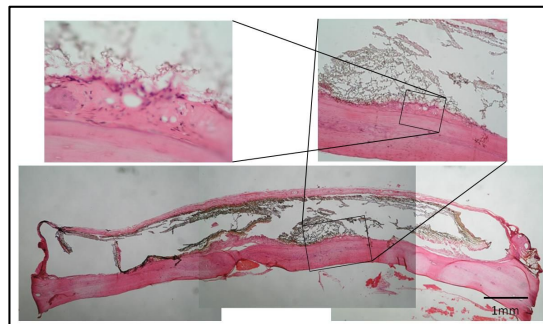


図7 炭酸アパタイト 0%含有 PLGA 膜の移植後の組織像。

炭酸アパタイト 10%含有 PLGA 膜の移植後にも骨面に薄く新生した増生骨が観察された(図8)。PLGA は移植部位周囲に残存が見られるが、炭酸アパタイトの含有量も少量であるためか、組織学的には観察されず、炎症細胞の侵入している所見は見られない。

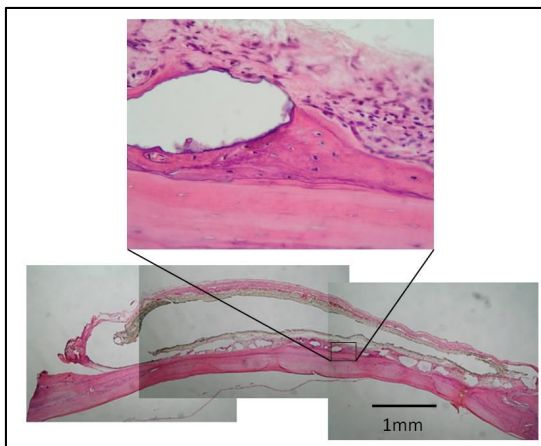


図8 炭酸アパタイト 10%含有 PLGA 膜の移植後の組織像。

炭酸アパタイト 30%含有 PLGA 膜の移植後には同様に骨面に薄く新生した増生骨がわずかに観察され、骨面から離れた部位に炭酸アパタイトの顆粒が拳上されていた(図9)。PLGA は骨上面に残存が見られるが、炎症細胞が炭酸アパタイトの周囲に侵入している所見は見られない。

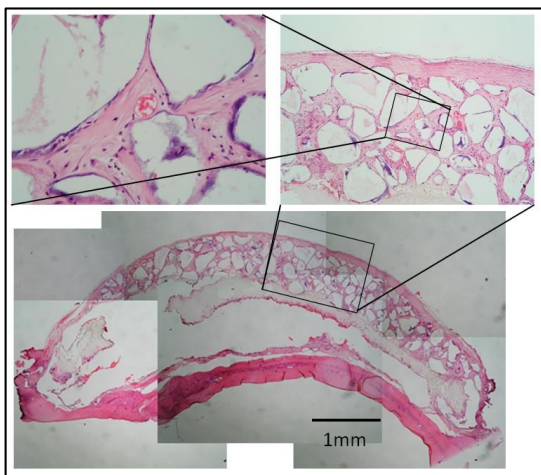


図9 炭酸アパタイト 30%含有 PLGA 膜の移植後の組織像。

炭酸アパタイト 50%含有 PLGA 膜の移植後には同様に骨面に薄く新生した増生骨がわずかに観察され、骨面から離れた部位に炭酸アパタイトの顆粒が多く拳上されていた(図10)。PLGA は骨上面側に残存しており、1.5 mm程度の厚みで炭酸アパタイトの顆粒の層が骨膜を押し上げるように分布している。その炭酸アパタイトの周囲に炎症細胞が侵入している所見は見られない。全体としては、多い所で、2.5mmは骨膜が拳上されている。

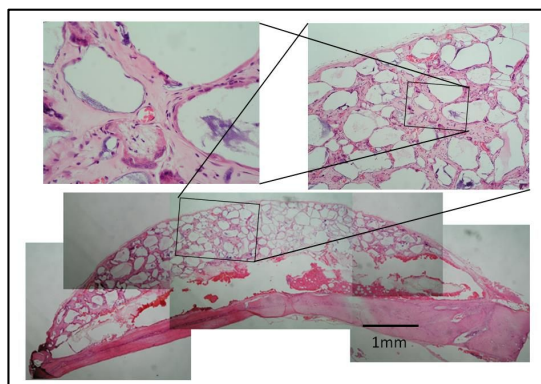


図10 炭酸アパタイト 50%含有 PLGA 膜の移植後の組織像。

しかし、炭酸アパタイトの周囲に新生骨が見られることはなかった。

以上の結果をまとめると、

- ・本実験系でも新生骨は骨面側にしか形成されず、骨膜側からは自発的な骨形成は生じないことが示唆された。

- ・炭酸アパタイトを50%程度含有させた PLGA 膜では in vitro での膨張率は少ないが、移植した場合には、一旦膨張したのちに、炭酸アパタイト顆粒が支柱となって、凹むことを抑制するため、全体の膨らみが維持されることが示唆された。

- ・骨膜を安定的に拳上するため材料としては、骨面に沿うような形状であることが必要であることが示された。

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 1 件)

末廣史雄 他、高膨潤性高分子を用いた超低侵襲な骨膜拳上材の開発、第45回日本口腔インプラント学会学術大会、2015年9月23日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/prostho2/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 正宏 (NISHIIMURA, Masahio)

鹿児島大学・学術研究院医歯学域歯学系・教授

研究者番号：00294570

(2) 研究分担者

村田 比呂司 (MURATA, Hiroshi)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教

授

研究者番号： 4 0 2 2 9 9 3

未廣 史雄 (SUEHIRO, Fumio)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属
病院・助教

研究者番号： 4 0 5 2 4 7 8 1