

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870016

研究課題名(和文)多孔質体を形成するエマルジョン骨ペーストの歯周病治療への応用

研究課題名(英文) Application of emulsion bone paste forming porous structure to periodontal treatment

研究代表者

加藤 昭人(KATO, Akihito)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40507571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：組織再生の細胞が内部に入りやすい空隙を多数形成するβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)とポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)微粒子から成るエマルジョン骨ペーストを開発し、骨再生材料としての能力を生体内外で評価した。その結果、エマルジョン骨ペーストは生体内での硬化で良好な生体親和性を示し、PLGA添加により多くの細胞の材料内への侵入を認めた。この新しい骨ペーストを歯周病で失われた骨に応用できれば、硬化後に周りから大量の細胞が入り込んで、従来の骨移植材以上の再生効果が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)： We developed bone paste using particle emulsion of β-Tricalcium phosphate (β-TCP) and Poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA), and evaluated the ability as bone regeneration material in vivo and in vitro. As a result, emulsion bone paste showed good biocompatibility in vivo, and more cell invasion into the material was observed by PLGA addition. If this new bone paste can be applied to periodontal disease, it is expected that a large amount of cells in the surrounding will invade the material, and it will be possible to obtain the effect of regeneration over conventional bone graft material.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織再生 エマルジョン 骨ペースト 多孔質体 骨増生効果 生体親和性 イングロース スキヤフォルド

1. 研究開始当初の背景

歯周病は生活習慣病の一つであり、歯を失う原因として増加の一途をたどっている。歯周病による組織破壊で失われた骨や歯根膜を治療によって回復することは難しく、現在いくつかの再生治療が臨床応用されているが、十分な再生量が得られていないことから、これまでとは異なるコンセプトを持った治療法の開発が必要とされている。

報告者は組織再生において、再生の場となるスペース内に細胞が早期に侵入・増殖することが非常に重要であることに注目し、組織再生での細胞の足場となるスキャフォールドの研究開発を行ってきた。そして現在までの研究結果から歯周組織の再生には、創傷治癒の初期に周囲の細胞がスキャフォールドや歯根表面に大量に侵入・増殖することが重要であるという考えに至った。

一方、歯周病が進行した大きな骨破壊では、歯槽骨の大幅な骨再生が咬み合わせや口腔内の安定に必要となってくる。大きな骨欠損の治療には整形外科や口腔外科の分野でブロック状の骨補填材が以前から使われているが、近年、流動性があり、さまざまな欠損形態に応用できるペースト状の骨補填材(骨ペースト)が脚光を浴びてきている。そこで報告者は賦形性の高いこの骨ペーストを歯周治療へ応用できないかと考えた。しかしながら、今までの骨ペーストはただ単に欠損を埋めることを目的としたものであり、生体内で硬化した骨ペーストが周囲の骨に完全に置換し自己組織化するものは得られていない。その原因として従来の骨ペーストの硬化体は内部構造が緻密であるため、周りの細胞が材料内に侵入しにくくなり、既存骨との生着が上手くいかないまま徐々に吸収されてしまうことが挙げられている。骨ペーストが硬化しても組織再生のスキャフォールドのように多量の細胞がイングロースし、周囲既存骨に完全に置換される骨ペーストが理想である。

そこで従来型骨ペーストの低い細胞浸潤性の問題点を細胞が侵入しやすい多孔質構造を有する新規骨ペースト材を開発することで克服し、歯周病で大きく破壊された歯槽骨に対する再生効果の可能性を検討した。注目したのが、先ごろ発表されたコロイド界面科学を応用した新しいタイプの骨ペーストである。これは水系にて植物油の一種であるヒマシ油を α -リン酸三カルシウム(α -TCP)微粒子や生分解性ポリマーの乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)微粒子で分散安定化したエマルジョンを生成し、このエマルジョンペーストを高湿下で静置することによって自発的に硬化させ、ハイドロキシアパタイトからなる多孔質体を得るものである。医療材料として実績のある成分のみを用い、均一性に優れた多孔質構造を積極的に構築できる骨ペーストであるため、この新しいバイオアクティブなエマルジョン骨ペーストを歯

周組織欠損に充填すれば、再生が起こりにくい欠損形態でも骨ペーストの硬化後に大量の細胞が侵入して、スキャフォールド同様にそれ以上の再生効果が得られると期待される。

2. 研究の目的

(1) 多孔質構造を有する新規骨ペースト材である α -TCP/PLGA 微粒子エマルジョン骨ペーストの調製

(2) α -TCP/PLGA 微粒子エマルジョン骨ペーストの生体適合性を組織学的に評価

3. 研究の方法

(1) α -TCP/PLGA 微粒子エマルジョン骨ペーストの調製

α -TCP (粒径 25 μm , 太平化学産業) と PLGA (粒径 20-30 μm , SIGMA-ALDRICH) の微粒子をヒマシ油と混和後に純水を添加、超音波を5分間照射してエマルジョン骨ペーストを作製(図1)。

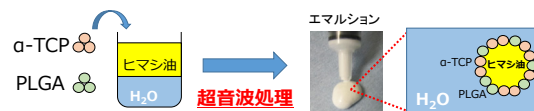


図1 エマルジョン骨ペーストの調製

(2) α -TCP/PLGA 微粒子エマルジョン骨ペーストの生体適合性を組織学的に評価

① In vitro における評価

1. 表面構造の観察

走査型電子顕微鏡(SEM)を用いてエマルジョン骨ペースト硬化体の表面構造の観察を行った。

2. 細胞付着性試験

24 well plate にエマルジョン骨ペーストを注入し、温度 37°C、湿度 95% で 7 日静置後、MC3T3-E1 細胞 (1.0×10⁴ cell/ml) 1ml を所定の時間培養し、LDH アッセイにより細胞数を求めた。

② 生体適合性試験

α -TCP/PLGA 微粒子の混合比は、30wt% α -TCP + 0wt% PLGA (α -TCP のみ)、30wt% α -TCP + 10wt% PLGA (10% PLGA)、30wt% α -TCP + 20wt% PLGA (20% PLGA) の 3 種類とし、Wistar 系ラット (10 週齢) の背部皮下にエマルジョン骨ペースト 0.2ml または生体外で完全に硬化させたエマルジョン硬化体 (直径 7mm、厚さ 2mm) を埋入した。10 日後に生体親和性評価として組織学的観察と細胞侵入率、イングロースした細胞の DNA 量を計測した (DNA 量計測は骨ペーストのみ・抽出した試料をホモジナイズ処理後、含まれる細胞の DNA 量を測定)。埋入手術 20 日後には組織学的観察を行った。

4. 研究成果

(1) In vitro における評価

① 表面構造の観察

硬化体内部にエマルションをテンプレートとした多孔質構造を認めた(図2).

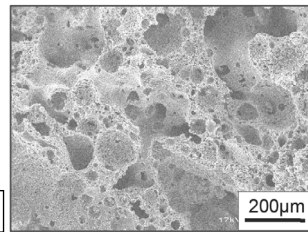


図2 硬化体SEM像

② 細胞付着性試験

LDHアッセイにより培養1日後の細胞接着数に有意差はなかった. エマルション骨ペースト硬化体上で細胞の増殖が確認できた.

(2) 生体適合性試験

① エマルション骨ペースト

埋入10日後, 20日後とも試料内部への細胞や血管のイングロースが観察され, またセラミクス表面に多数の巨細胞が認められた(図3). 10日後のエマルション骨ペーストへの細胞侵入率は, α -TCPのみ, 10%PLGAで約50%, 20%PLGAで80%前後であった.

10日後のDNA量は, α -TCPのみが $24.2 \pm 12.8 \mu\text{g/PCS}$, 10%PLGAが $54.9 \pm 43.4 \mu\text{g/PCS}$, 20%PLGAが $136.2 \pm 27.5 \mu\text{g/PCS}$ であり, 20%PLGAが最も多く, α -TCPのみと比べて約5.6倍であった(図4).

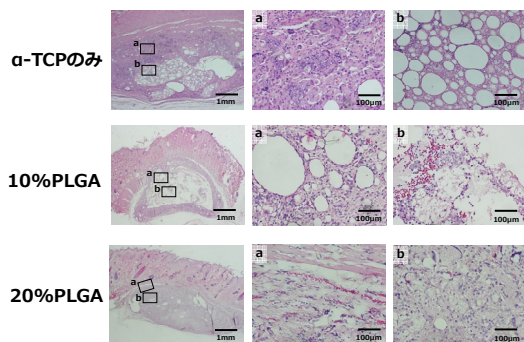


図3 10日後エマルション骨ペーストの組織像

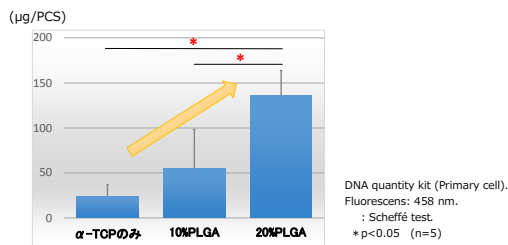


図4 10日後エマルション骨ペーストDNA量計測

② エマルション硬化体

10日後の組織学的観察では巨細胞が観察されたが, 細胞のイングロースはわずかであった(図5). 20日後の組織像は10日後とほぼ同じ所見であった. 10日後のエマルション硬化体への細胞侵入率は, すべての試料で10%程度であった.

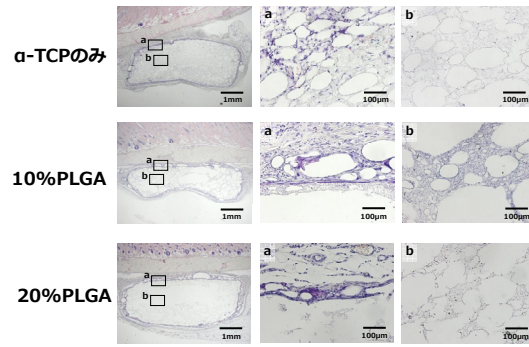


図5 10日後エマルション硬化体の組織像

以上の結果から, エマルション骨ペーストは生体内での硬化で良好な生体適合性を示し, PLGA添加により細胞のイングロースが促進された.

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7件)

- ① K Ogawa, H Miyaji, A Kato, Y Kosen, T Momose, T Yoshida, E Nishida, S Miyata, S Murakami, H Takita, B Fugetsu, T Sugaya, M Kawanami. Periodontal tissue engineering by nano beta-tricalcium phosphate scaffold and fibroblast growth factor-2 in one-wall infrabony defects of dogs. J Periodont Res, 査読有, 51, 2016, 758-767. DOI:10.1111/jre.12352
- ② 加藤昭人, 宮治裕史, 他8名. β -三リン酸カルシウムナノ粒子配合コラーゲンスキャフォールドのイヌ抜歯窩骨形成促進効果. 日歯保存誌, 査読有, 59, 2016, 351-358. DOI: 10.11471/shikahozon.59.351
- ③ S Tanaka, H Miyaji, E Nishida, K Inoue, S Miyata, A Kato, I Kanayama, S Murakami, K Kawamoto, B Fugetsu, T Tanaka, H Takita, T Iizuka, M Kawanami. Modification of composite resin surface with carbon nanotubes enhances cell proliferation. Nano Biomedicine, 査読有, 8, 2016, 27-34. DOI: 10.11344/nano.8.27
- ④ T Momose, H Miyaji, A Kato, K Ogawa, T Yoshida, E Nishida, S Murakami, Y Kosen, T Sugaya, N Kawanami. Collagen hydrogel scaffold and fibroblast growth factor-2 accelerate periodontal healing of class II furcation defects in dog. The open

dentistry journal, 査読有, 10, 2016, 347-359.

DOI:10.2174/1874210601610010347

- ⑤ E Nishida, H Miyaji, A Kato, H Takita, T Iwanaga, T Momose, K Ogawa, S Murakami, T Sugaya, M Kawanami. Graphene oxide scaffold accelerates cellular proliferative response and alveolar bone healing of tooth extraction socket. Int J Nanomedicine, 査読有, 11, 2016, 2265-2277. DOI:10.2147/IJN.S104778
- ⑥ E Nishida, H Miyaji, J Umeda, K Kondoh, H Takita, I Kanayama, S Tanaka, A Kato, B Figetsu, T Akasaka, M Kawanami. Biological response to nanostructure of carbon nanotube/titanium composite surfaces. Nano Biomedicine, 査読有, 7, 2015, 11-20. DOI: 10.11344/nano.7.11
- ⑦ A Kato, H Miyaji, R Ishizuka, K Tokunaga, K Inoue, Y Kosen, H Yokoyama, T Sugaya, S Tanaka, R Sakagami, M Kawanami. Combination of root surface modification with BMP-2 and collagen hydrogel scaffold implantation for periodontal healing in beagle dogs. The open dentistry journal, 査読有, 9, 2015, 52-59. DOI:10.2174/1874210601509010052

[学会発表] (計7件)

- ① 川本康平, 宮治裕史, 加藤昭人, 他7名. 酸化グラフェンスキャフォールド埋植による歯周組織治癒促進効果. 第59回秋季日本歯周病学会学術大会, 平成28年10月17日, 新潟コンベンションセンター(新潟県・新潟市).
- ② 降籙友和, 宮治裕史, 西田絵利香, 川本康平, 小川幸佑, 百瀬赳人, 舘山彰人, 長尾敬志, 吉田崇, 加藤昭人, 川浪雅光. 酸化グラフェン配合スキャフォールドによる骨形成効果. 第59回春季日本歯周病学会学術大会, 平成28年5月20日, かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市).
- ③ 加藤昭人, 宮治裕史, 舘山彰人, 西田絵利香, 岩崎泰彦, 藤井秀司, 他7名. 多孔質体を形成するエマルジョン骨ペーストの開発. 第15回日本再生医療学会総会, 平成28年3月17日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市).
- ④ 西田絵利香, 宮治裕史, 滝田裕子, 岩永

敏彦, 加藤昭人, 川浪雅光. 組織再生用ナノ酸化グラフェンスキャフォールドによる骨新生効果. 日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会(第143回), 平成27年11月13日, 文京シビックホール(東京都・文京区).

- ⑤ 吉田崇, 宮治裕史, 西田絵利香, 加藤昭人, 他4名. GlcNAc 架橋ゼラチン・キトサンスキャフォールドとFGF-2による骨新生効果. 第37回日本バイオマテリアル学会大会, 平成27年11月10日, 京都テルサ(京都府・京都市).
- ⑥ 舘山彰人, 宮治裕史, 加藤昭人, 西田絵利香, 岩崎泰彦, 藤井秀司, 他7名. α -TCP/PLGA 微粒子エマルジョン骨ペーストの生体適合性評価. 第36回日本バイオマテリアル学会大会, 平成26年11月17日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区).
- ⑦ 加藤昭人, 宮治裕史, 他9名. ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドの抜歯窩治癒促進効果. 日本歯科保存学会2014年度春季学術大会(第140回), 平成26年6月20日, 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール(滋賀県・大津市).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/tissue-engineering.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 昭人 (KATO Akihito)

北海道大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号: 40507571

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

西田 絵利香 (NISHIDA, Erika)

舘山 彰人 (TATEYAMA, Akito)