

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861861

研究課題名(和文) スーパーメンブレンの開発と研究

研究課題名(英文) Development and research of super-membrane

研究代表者

高藤 恭子 (TAKAFUJI, KYOKO)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：20451966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ・アパタイトとコラーゲンを複合化しプレス成形したメンブレンはラット頭蓋骨欠損部において優れた骨伝導を示したため、スーパーメンブレンと呼称するのが妥当と考えられた。当スーパーメンブレンは経時的に生分解(吸収)されたが、主役をなすのが破骨細胞であった。コラーゲンマトリックス中のナノ・アパタイト凝集塊に破骨細胞が接着し、代謝を行っていた。近傍で活発な新生骨形成活動が認められ、材料を介して骨リモデリング活動が観察された。この現象によって欠損部における骨伝導能が得られたと判断された。成長因子や薬剤の使用は不要であり、調製したスーパーメンブレンは臨床使用により近いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Membranes prepared by pressing of nano-apatite/collagen composites can be called super-membrane because they exhibited excellent osteo-conduction in rat calvarial defects. These membranes were gradually bio-absorbed while osteoclasts played a major role. Osteoclasts adhered and metabolized on aggregates of nano-apatite in collagen matrix. Near the membranes, osteoblasts actively formed new bones, leading to bone remodeling. As a result, it was considered that osteo-conduction was established. Uses of growth factors and chemicals were not needed, and it was thought that prepared super-membranes could be clinically employed in near futures.

研究分野：補綴・理工系歯科学

キーワード：生体材料 スーパーメンブレン アパタイト コラーゲン複合体 ハイドロゲル 硬組織再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 顎堤増大術の際の自家骨移植や口蓋粘膜の移植など、ドナーサイトを要する移植術を行うことによる患者の負担は大きく、また、術後の問題点も数多く報告されている。生体材料単独での骨再生が強く期待されており、スーパーメンブレンの作製と応用が有効と考えられた。

(2) メンブレン(膜)はGTR膜やGBR膜として臨床応用されているが、上皮細胞の侵入を防止することが主目的で、骨伝導能を有しない。スーパーメンブレンには骨伝導能の保持が求められた。

2. 研究の目的

(1) 軟組織再生、骨組織再生を同時に施行するスーパーメンブレンの開発を目指した。コラーゲンとナノアパタイトの複合体をプレス成形した材料を主体(吸収性ハイドロゲルメンブレン)とした。骨伝導能の評価は、主として、ラット頭蓋骨欠損部での骨修復/新生能から評価した。

(2) スタチンが生体組織内で分泌する骨形成因子(BMP-2)を一部の材料で使用し、骨伝導能を調べた。

3. 研究の方法

(1) 市販のナノ・アパタイトを医療用コラーゲンに練和し凍結乾燥後、メンブレン状に一軸プレスした生体材料を形成、ラット頭蓋骨欠損部に埋入、骨修復・再生能をマイクロCTと非脱灰薄切病理標本から評価した。具体的には、ナノサイズのアパタイトには(40 nm径品)(n-HAP)(ソフセラ社)を用いた。I型コラーゲンには(NMP PS)(日本ハム)を用いた。n-HAP粒子を中和したI型コラーゲンに混練(ハイドロゲル化)し、 -80°C 3時間の予備凍結後、12時間凍結乾燥した。プレスにはニュートンプレス装置を用い、打ち抜きによって直径6mm×厚さ1mmの試料(n-HAP/Colメンブレン)とした(図1)。試料にはエチレンオキサイドガス滅菌を施した。10週齢の雄性Wistarラットの頭蓋骨に対して直径6mmのトレフィンバーを用いて骨欠損部を形成し、術後、3日、4週および8週経過後、マイクロCTによって、骨欠損部における骨新生形成の程度をCT不透過度より評価した。8週飼育ラットについては、蛍光二重染色(術後5週でのテトラサイクリンと術後7週のカルセイン)を施し、安楽死後、欠損部を含むラット頭部をダイヤモンドバンドでブロック状に切り出し Villanueva染色後、非脱灰薄切標本とし、蛍光顕微鏡によって組織像観を行った。

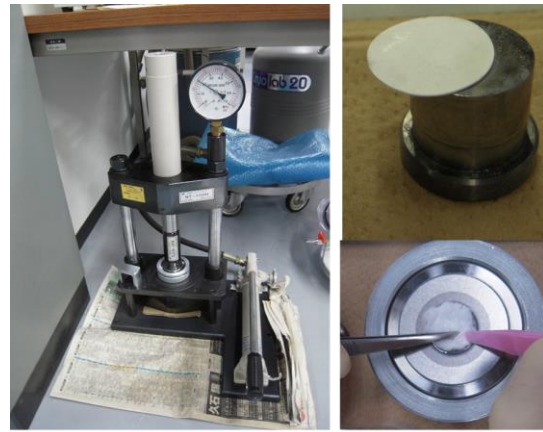


図1 スーパーメンブレン作製時のニュートンプレス機、成形金型と試料

(2) 熱可逆性ハイドロゲル(Mebiol Gel)(池田理化)にBMP2(50 μg)を配合し、ラットの大腿部筋肉内に埋入し、骨新生の程度をマイクロCTによって調べた。

(3) コラーゲンとナノアパタイトの複合体(スポンジ: プレス体の前駆体)上で骨芽細胞を最大4週間培養し、遺伝子(total RNA)を抽出し、定量PCR法によって骨系分化の程度に検討を加えた。

4. 研究成果

(1) プレス加工したn-HAP/Colメンブレンはラット骨欠損部において経時的にマイクロCT像上での不透過度を増加させた($p<0.05$)(図2と3)。組織病理像(図4)から、n-HAP/Colメンブレンは骨欠損部において多核異物巨細胞によって広範に吸収/代謝され、近傍で類骨と新生骨の形成を活発に誘導することが示唆された。二重染色によって、新生骨の動形態学的な情報が詳細に得られた。従って、n-HAP/Col(スーパー)メンブレンは吸収性と優れた骨伝導能を有すると判断された。メンブレンは経時的に生分解(吸収)されたが、主役をなすのが破骨細胞であった。コラーゲンマトリックス中のナノ・アパタイト凝集塊に破骨細胞が接着し、代謝を行っていた。近傍で活発な新生骨形成活動が認められ、材料を介して骨リモデリング活動が観察された。この現象によって欠損部における骨伝導能が得られたと判断された。

アパタイトは通常、非吸収性であるが、サイズがナノレベルに減少すると食糸系細胞等が代謝傾向をしめすため、骨伝導能が得られたと考えられる。また、成長因子(EGFやBMP2)を使用しなくても、顕著な早期骨伝導能が達成されたことは画期的と考えられた。

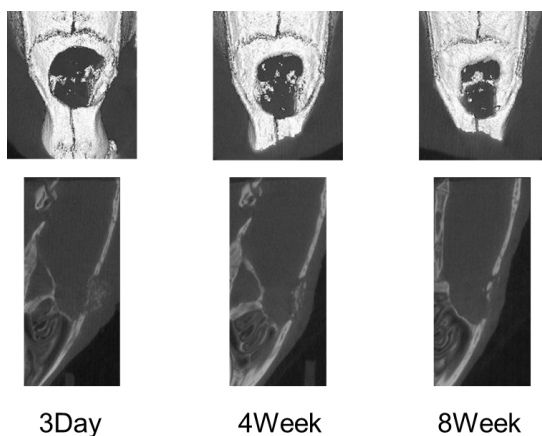


図2 ラット欠損部でのX線不透過度

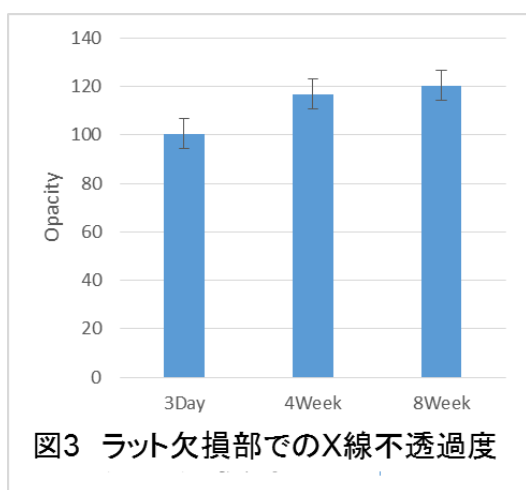
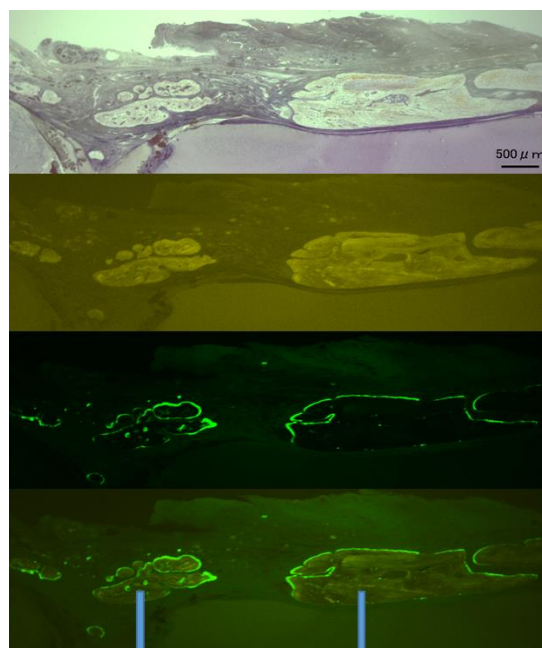


図3 ラット欠損部でのX線不透過度

(2) BMP2 を混和した熱応答性ハイドロゲルは6匹中1匹のラット大腿部筋肉内で異所性骨形成（8 週後）を生じることをマイクロCT 観察から確認した（図 5）。従って、BMP2 を(1)のスーパーメンブレンに配合することも骨伝導能の向上に効果的と類推された。

(3) 骨芽細胞 SaOS-2 は Col 単体に比べ n-HAP/Col 上で骨系分化が促進されることが確認された。特に、中期骨系分化マーカーである Bone Sialo-protein 遺伝子の発現増強に効果があり、n-HAP が骨伝導能の向上に有益と示唆された。

(4) 総括：ナノアパタイトとコラーゲンの複合体をプレス成形したメンブレン（膜）は吸収性と骨伝導能を有し、今後のインプラント治療に有益と考えられた。材料自体で吸収性と早期骨伝導能を有することは有益と考えられた。今後、臨床応用を目指した研究が期待される。



新生骨 既存骨

図4 ラット骨欠損部における組織病理像（一番上：ビラヌエバ染色，二番目：カルセイン染色，三番目：テトラサイクリン染色，四番目：カルセイン染色とテトラサイクリン染色のマージ）。注：メンブレンによって新生骨の形成が促進されている。

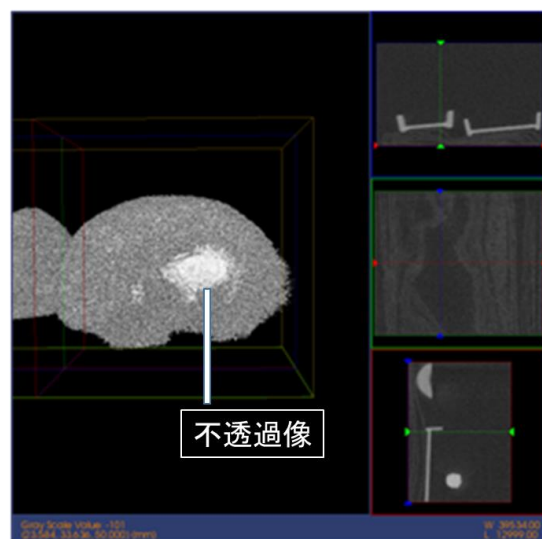


図5 BMP2によるラット大腿筋肉部での異所性骨形成 注：骨形成部はより不透過（白色）注：BMP2による筋肉部での異所性骨形成が達成されている。

は下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

① Hatakeyama W, Taira M, Takafuji K, Kihara H and Kondo H: Bone-regeneration trial of rat critical-size calvarial defects using nano-apatite/ collagen composites. Nano Biomed. 5(2): 95-103, 2013.

② Hatakeyama W, Taira M, Ikeda K, Takafuji K, Kihara H, Kondo H, Hattori M. In vivo evaluation of noble porous apatite disks implanted in rat critical-size calvarial defects by Micro-CT and histological observations. J Oral Tissue Eng. 12(1): 13-19, 2014.

③ Taira M, Hatakeyama W, Yokota J, Chosa N, Ishisaki A, Takafuji K, Kihara H, Kondo H, Hattori M. Tracking GFP-labeled transplanted mouse MSC in nude mice using in vivo fluorescence imaging. Nano Biomed. 6(2):73-77, 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

① 嶋山航, 平 雅之, 鬼原英道, 高藤恭子, 近藤尚知. アパタイト/コラーゲン複合体中のアパタイト粒子の違いが骨芽細胞様細胞の骨系分化挙動に及ぼす影響評価. 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 福岡市, 2013 年 9 月

②

③

④

⑤

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://implant.iwate-med.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高藤 恭子 (Takafuji Kyoko)

岩手医科大学歯学部助教

研究者番号 : 20451966

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :