

「骨のばんそうこう」

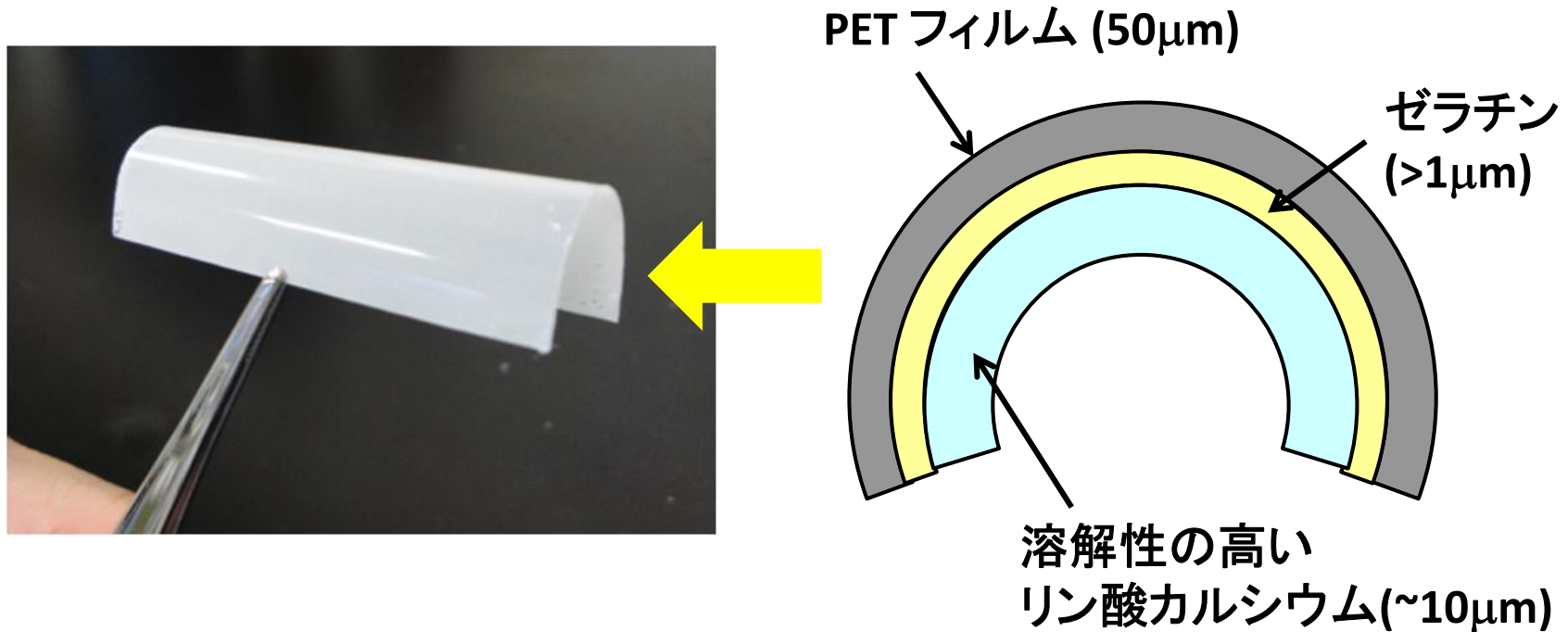
骨誘導再生用メンブレンの有効性評価

山形大学大学院理工学研究科
教授 鵜沼英郎

本講演資料の内容

1. 本研究の「骨誘導再生用メンブレン」(以下、CaPコートPET)の構造、組成、用途
2. CaコートPETの骨再生に対する有効性評価(*in vivo*)
3. CaPコートPETに対する骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)、ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)、ヒト歯根膜細胞の応答
4. まとめ

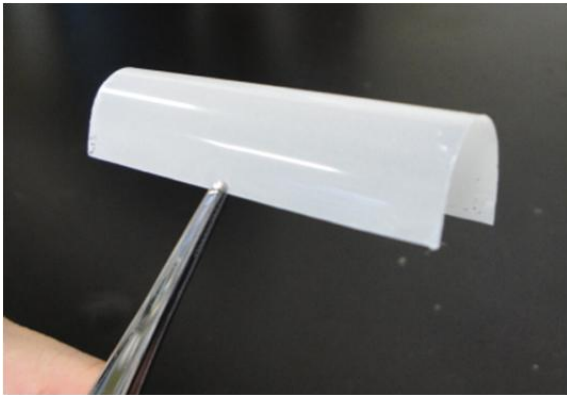
「骨誘導再生用メンブレン」(以下、CaPコートPET)の構造



演者らが開発したCaPコートPETは、厚さ50～75ミクロンのPETフィルムにゼラチンを介してリン酸カルシウムをコートした構造を有します。

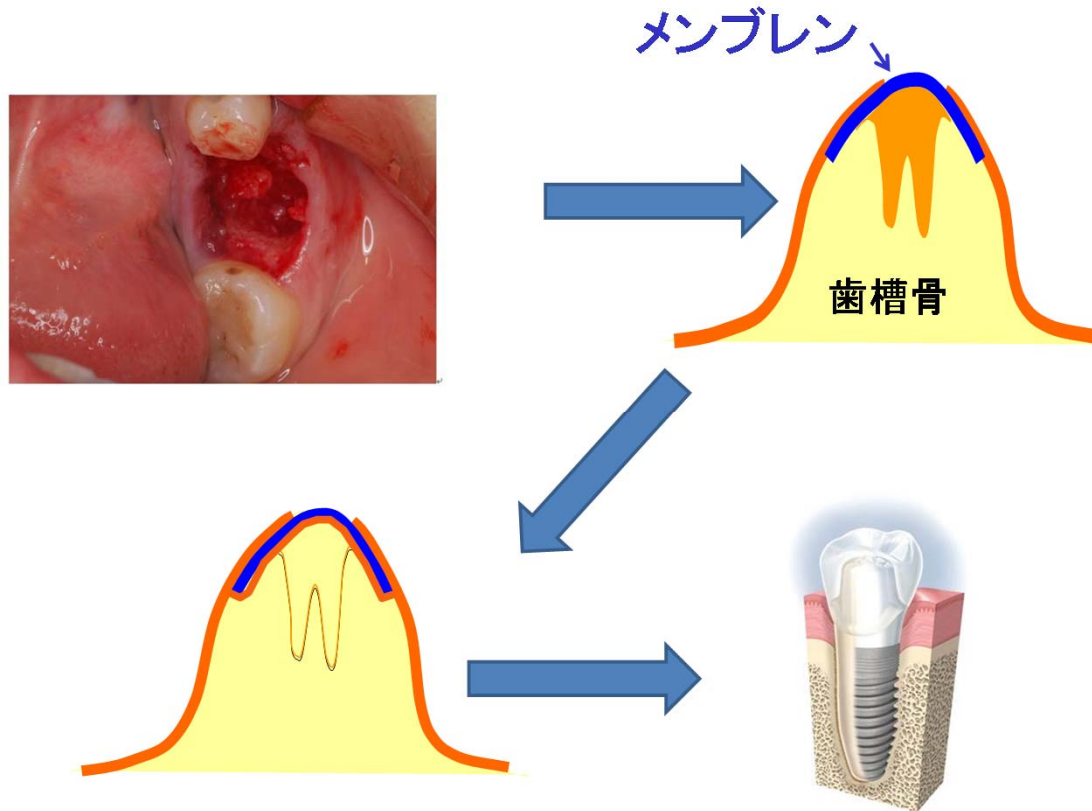
詳細のリンク: 特許電子図書館(<http://www.ipdl.inpit.go.jp/homepg.ipdl>)で「再表2011/155243」を検索してください。

CaPコートPETの組成



1. 基材にはPETが適しています。
(ほとほとの生体親和性、形状回復性、柔軟さ、平滑さ)
2. リン酸カルシウム(CaP)は、徐々に体液に溶ける性質をもつものが望ましく、OCPまたは低結晶性HAなどが適しています。
3. 中間のゼラチン層は、PETとCaP層との接着を促す役割と、CaPが溶解したあとの細胞の増殖の足場の役割を担っています。

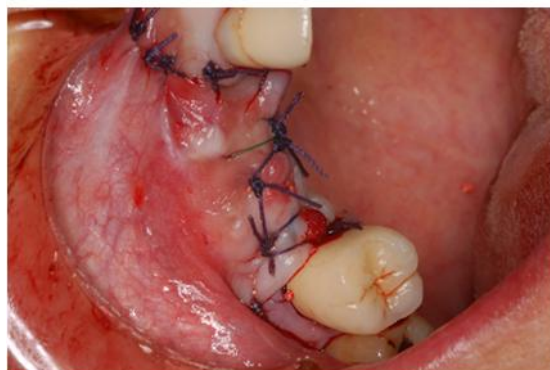
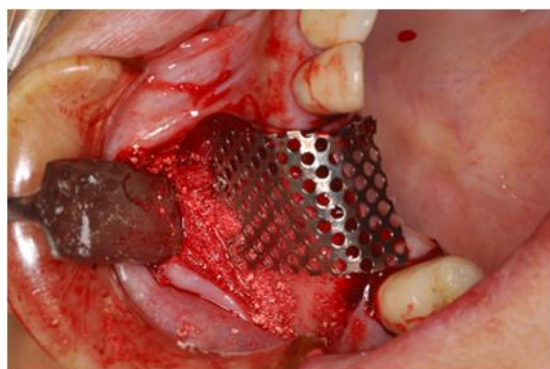
CaPコートPETの用途



1. この材料は、歯科インプラントの埋入の前の「骨造成」あるいは「骨誘導再生(GBR)」に用います。
2. 歯科インプラント(人工歯根)を埋設しようとするとき、歯を抜いた穴(抜歯窩)が大きすぎる場合には、一度患者さん自身の骨を育てて抜歯窩を満たす必要があります。
3. そのためには、従来は、抜歯窩の上に「メンブレン」と呼ばれる膜状材料をかぶせ、6か月ほど待つ必要がありました。

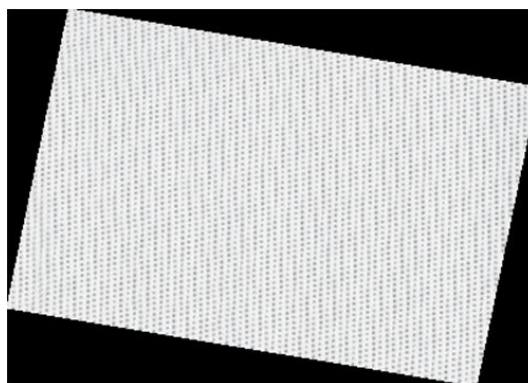
現在使用されているメンブレン

1. チタンメッシュ



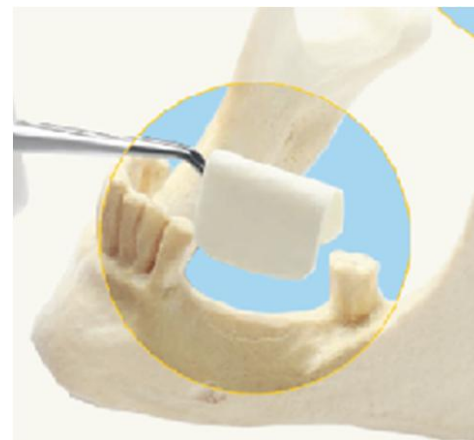
周辺組織と強く癒着
摘出が困難

2. 高密度-PTFE



感染の危険率高い

3. コラーゲン



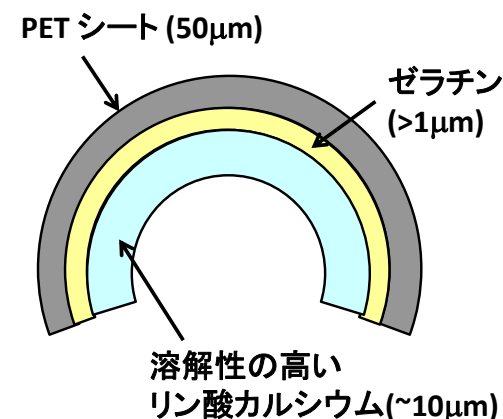
感染の危険率高い

どれも**なんらかの欠点**があり、なおかつ**骨形成を促さない**ので、骨造成の完了まで**約半年必要**です。

CaPコートPETに期待されること

従来のメンブレンが有していた欠点を、一挙に解決できる可能性があります。

1. リン酸カルシウム層が骨形成を促すため、**治療期間が短縮**できる。
2. 平滑で疎水性のPETが雑菌の侵入を防ぎ、**感染の危険性低減**。
3. 抜歯窩の中を**肉眼で観察**できる。
4. **摘出が容易**。



自主臨床研究、*in vivo*、*in vitro*で検証

自主臨床研究概要(1)

手術の写真は割愛させていただきます。

1. 1歯欠損の抜歯窩の骨造成の経過

1日目: 左下5番の抜歯、CaPコートPETを設置、縫合

4日目: 感染、炎症なし。

7日目: 感染、炎症なし。抜糸。PETはそのまま留置。

21日目: 付着歯肉が再生している様子が、PETを通して観察できる。

PETを摘出。摘出は無麻酔で行い、PETの端をピンセットでつまんで引き出すだけ。所要時間0分。

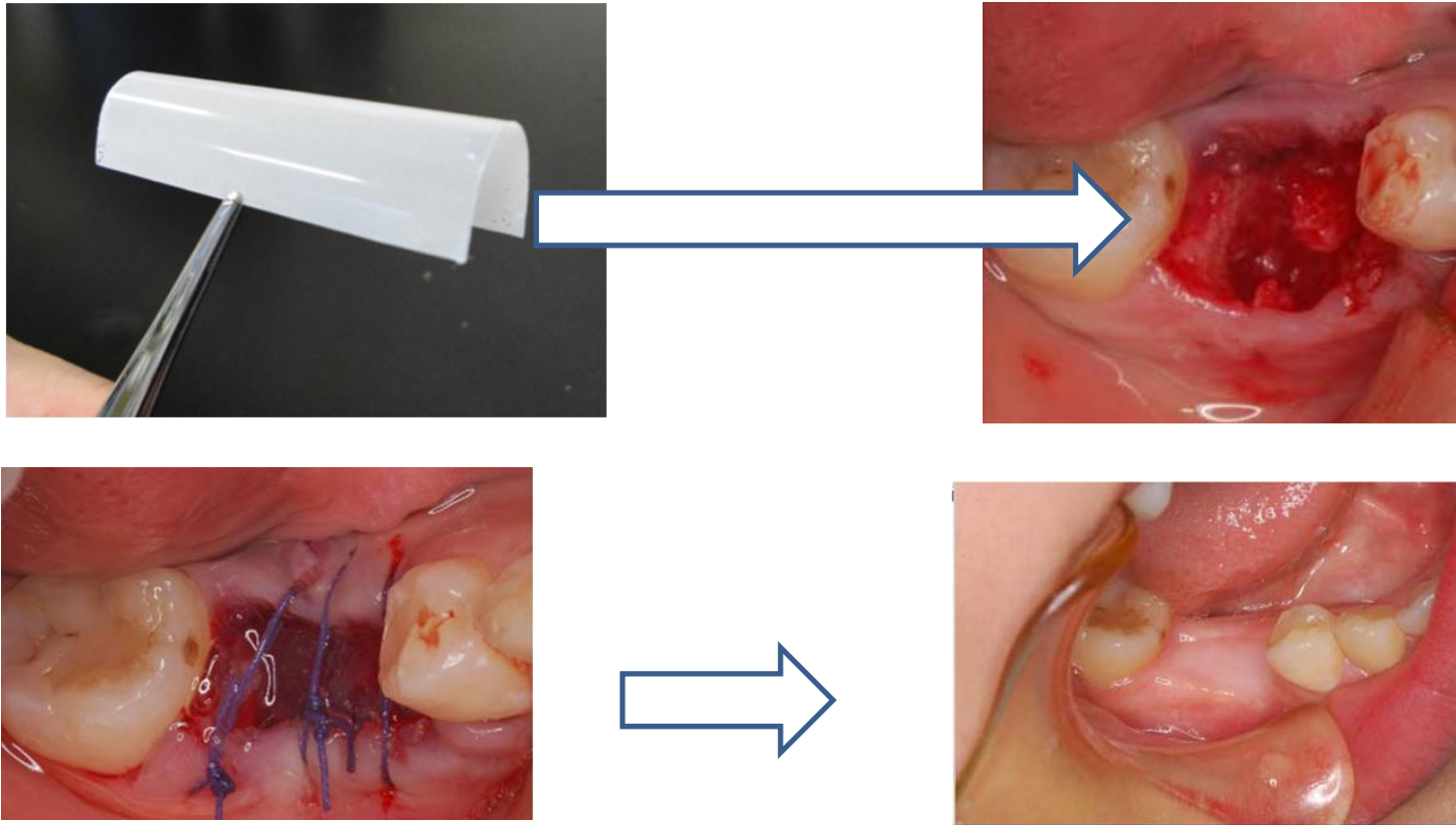
少し出血するが、すぐに止む。

63日目: レントゲンで完全な歯槽骨再生を確認。インプラント埋入。

…このように、通常半年を要する骨造成が2か月で完了します。

自主臨床研究概要(2)

前ページの内容を写真で示すと、抜歯窩をCaPコートPETで覆い、
2か月待てば、歯槽骨の再生が完了します。従来の約1/3の治療期間です。



自主臨床研究概要(3)

1. 多数歯欠損した歯槽骨の骨幅増大術の経過

1日目: ①歯肉と歯槽骨を、歯槽頂に沿って切開し、歯槽骨を外側に広げて、骨補填材を埋設。

②全体をCaPコートPETで覆って縫合

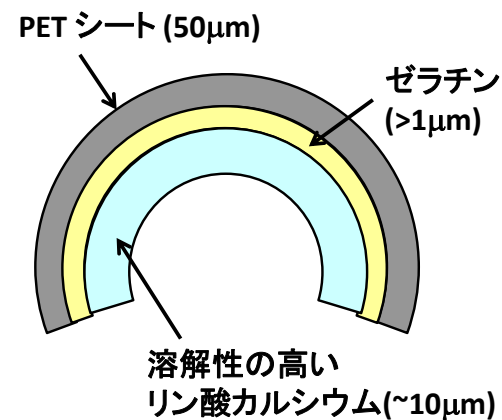
5日目: 感染、炎症なし。抜糸。PETはそのまま留置。

6日目: PETを通して、幼若歯肉が形成していることを確認。

25日目: PETを摘出。歯槽骨幅が十分に拡張されていた。

70日目: レントゲンで完全な歯槽骨再生を確認。インプラント埋入。

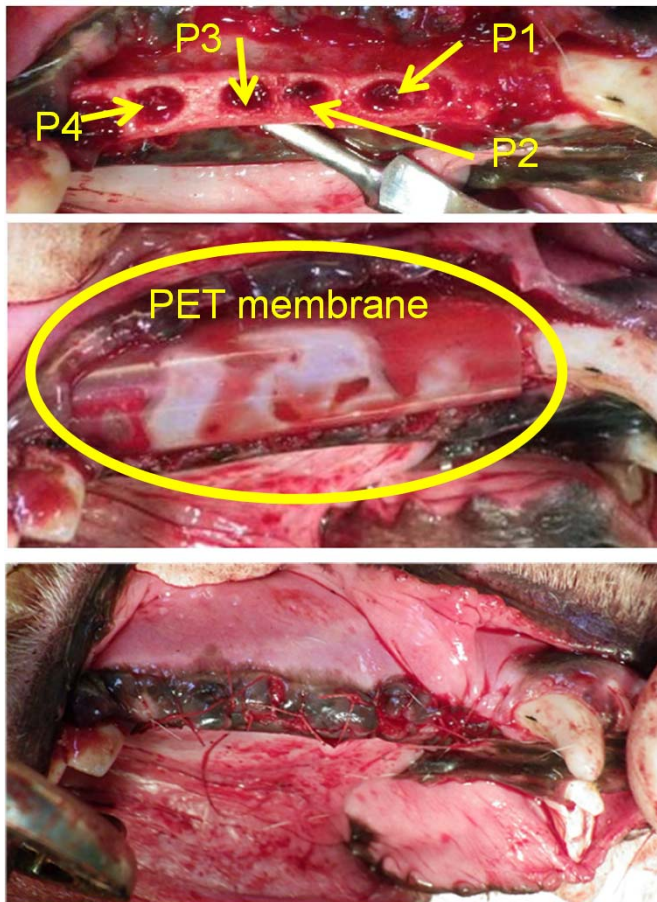
以上の自主臨床研究から、CaPコートPETは、
(1) 骨再生を速め、(2) 感染の危険性を減らし、
(3) 内部観察が可能で、(4) 摘出が容易な
骨誘導再生メンブレンであることがわかりました。



これ以降は、CaPコートPETが
どの程度骨再生を促すのか、
なぜ促すことができるのか、について
動物実験と細胞培養で調査した
結果を記します。

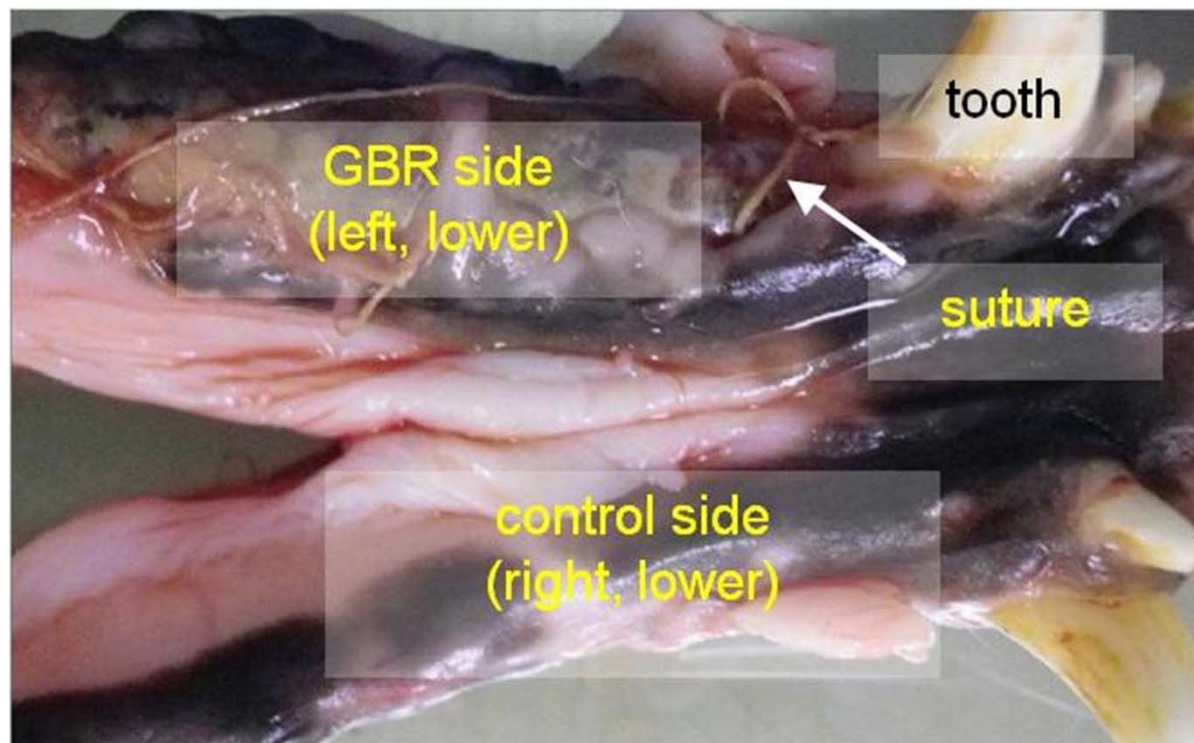
CaコートPETの骨再生に対する有効性評価 (*in vivo*)

掲載論文は、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsoi/26/2/26_236/_pdfでご覧ください。



1. 6歳の雌ビーグル犬の前臼歯 (P1～P4)を抜歯
2. 左下顎抜歯窩にはCaPコートPET設置
3. 右下顎抜歯窩には何もせず縫合
4. 14日後と30日後に組織観察

In vivo試験(2)



30日後に摘出したイヌの下顎。GBR sideと記した方の歯槽骨幅が、反対側よりも広がっています。CaPコートPETによる骨造成の結果です。

In vivo試験(3)

CaPコートPET設置

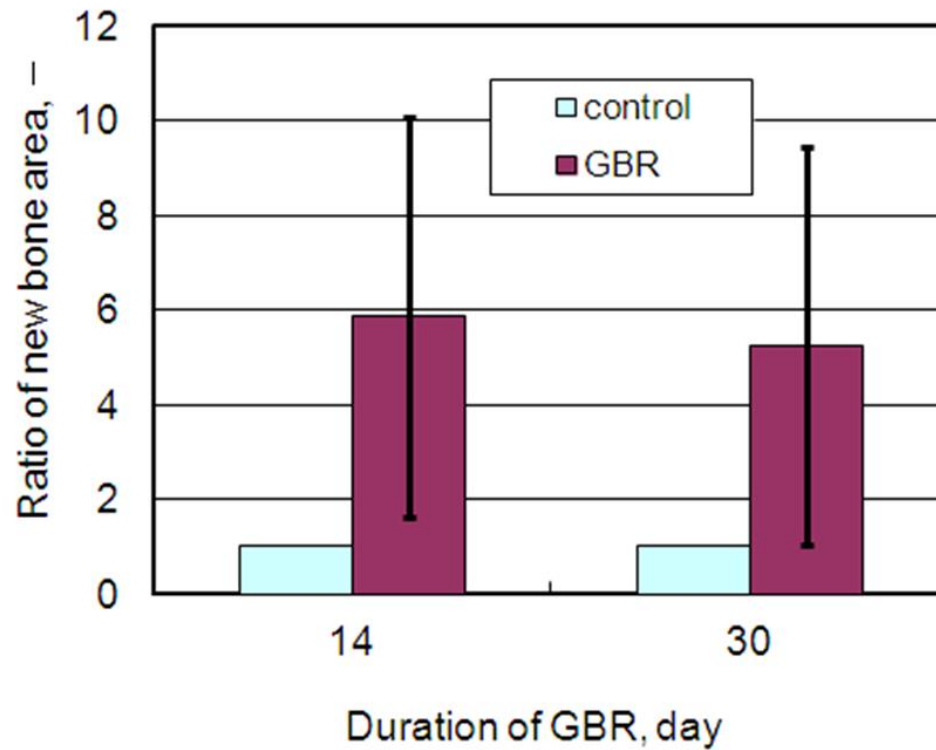


設置なし



30日経過後の、同じイヌの
左右同じ場所の組織の比較。
PETを設置しない方(右)は、抜
歯窩内での骨形成がほとんど
ないのに対し、設置した方(左)
では抜歯窩が完全に骨で満た
されています。

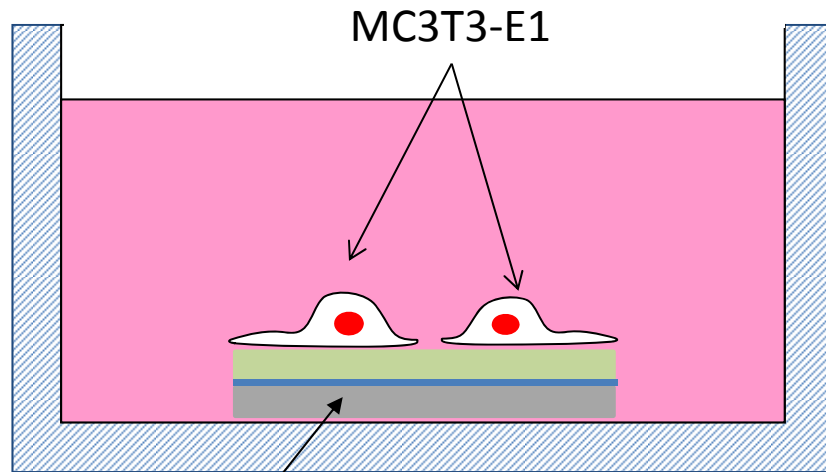
In vivo試験(4)



新生骨の面積を画像解析で測定したところ、CaPコートPETを設置すると、**宋でない場合に比べて、約6倍の骨形成**を促すことがわかりました。

CaPコートPETに対する骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1)の応答

掲載論文は、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsoi/25/4/25_699/_pdfをご覧ください。



未処理PET、ゼラチンコートPET、CaPコートPET

1. 培養皿の底に、未処理PET、ゼラチンだけをコートしたPET、CaPコートPETのいずれかを置いて、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を播種し、培地を交換しながら60日まで培養しました。
2. 培養後、各試料の断面を薄片に作製し、HE染色とvon Kossa染色を行い、細胞の増殖の程度と、石灰化の有無を観察しました。

MC3T3-E1培養(2)



説明は次頁へ。

MC3T3-E1培養(3)

前ページの説明:

まず、HE染色(上の3枚)をご覧ください

1. 骨芽細胞様細胞は、未処理PETにはまったく接着しませんでした。
2. ゼラチンをコートしたPET上では、細胞は増殖しました。
3. CaPコートPET上では、さらに著しく増殖しました。

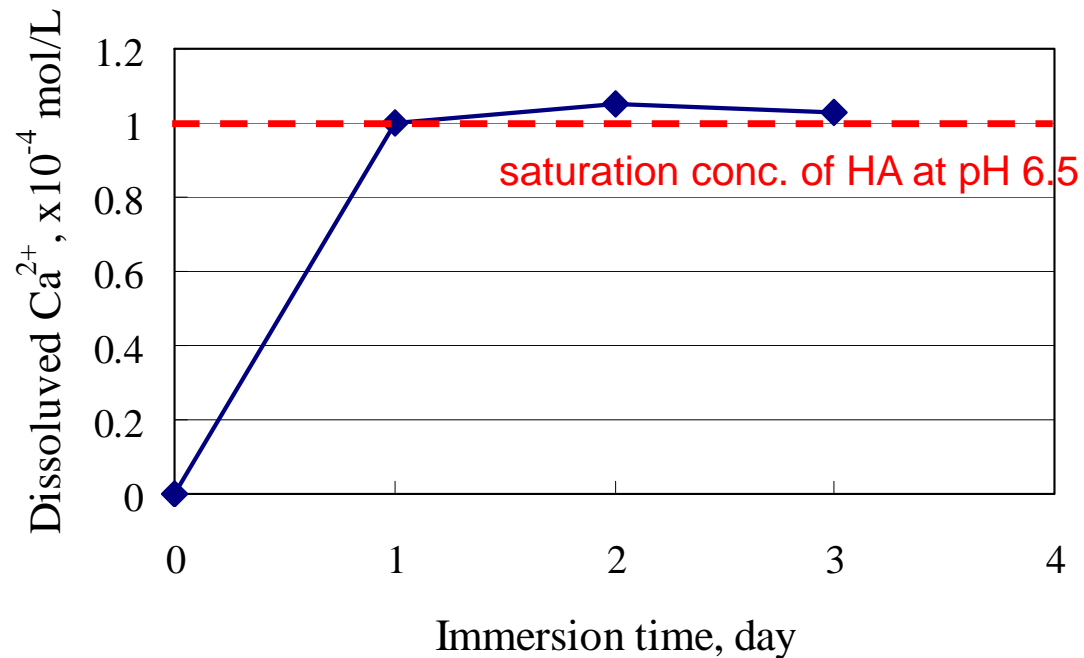
骨芽細胞は、二次元的にすきまなく増殖すると、互いに重なり合って厚く増殖するようになります。したがって、赤く見える部分が厚いほど、細胞がよく増殖していることとなります。

次に下段の2枚をご覧ください。

1. Von Kossa染色によって褐色に染まる部分は、カルシウムの存在を示しています。CaPコートPETでは、カルシウム化合物の産生、すなわち石灰化が進んでいました。なお、最初にコートしたCaP由来のカルシウムが褐色に見えているわけではありません(培養期間を変えた実験で調査済み)。

この培養結果から、CaPコートPETは、骨芽細胞の増殖と分化・石灰化を促すということがわかりました。In vivoで骨形成を促したことも説明できます。

MC3T3-E1培養(4)

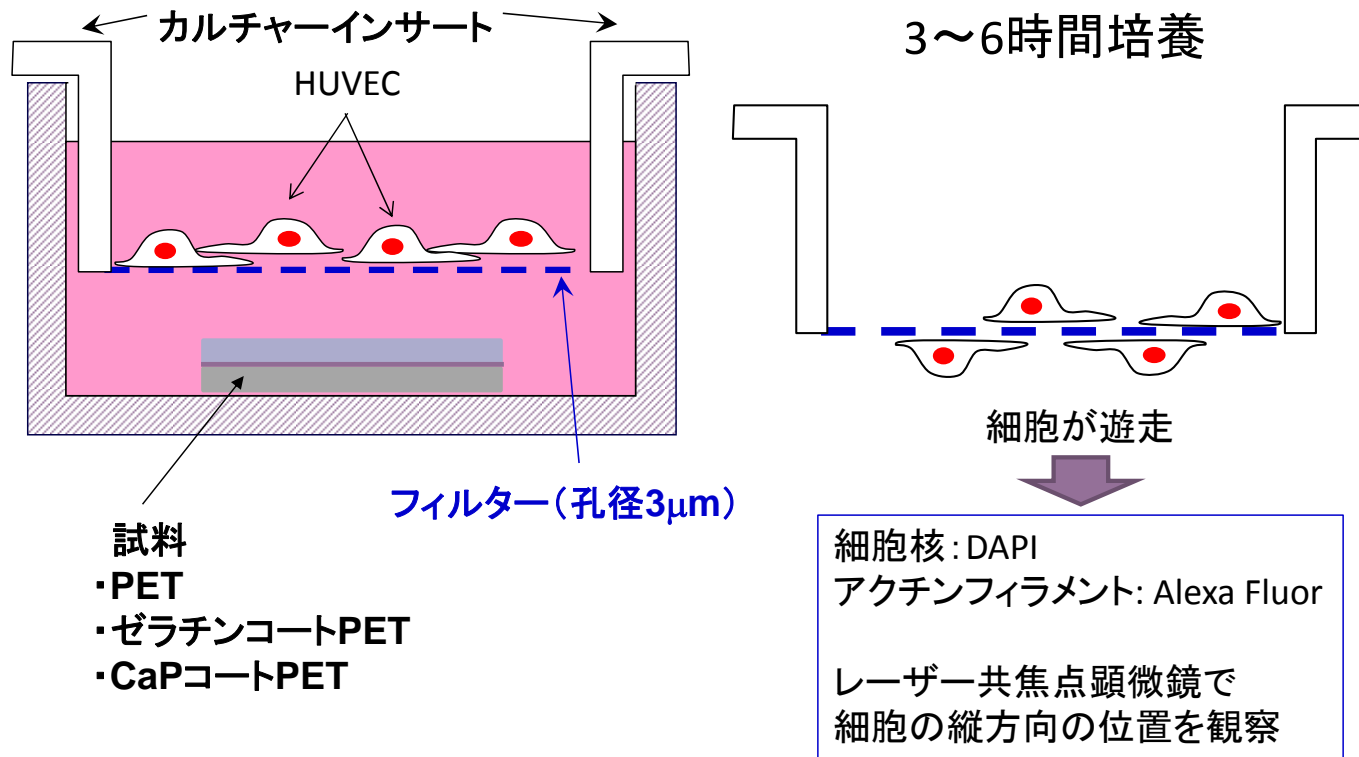


CaPコートPETを生理食塩水に浸すと、24時間以内にカルシウムが飽和濃度まで溶けるということがわかりました。つまり、CaPコートPETからは**カルシウムが溶けます**。このことが、骨芽細胞の分化促進をもたらしていると考えられます。

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)培養(1)

掲載論文は、https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsoi/27/3/27_331/_pdfでご覧ください。

実験方法の説明は次頁。



HUVEC培養(2)

実験方法の説明

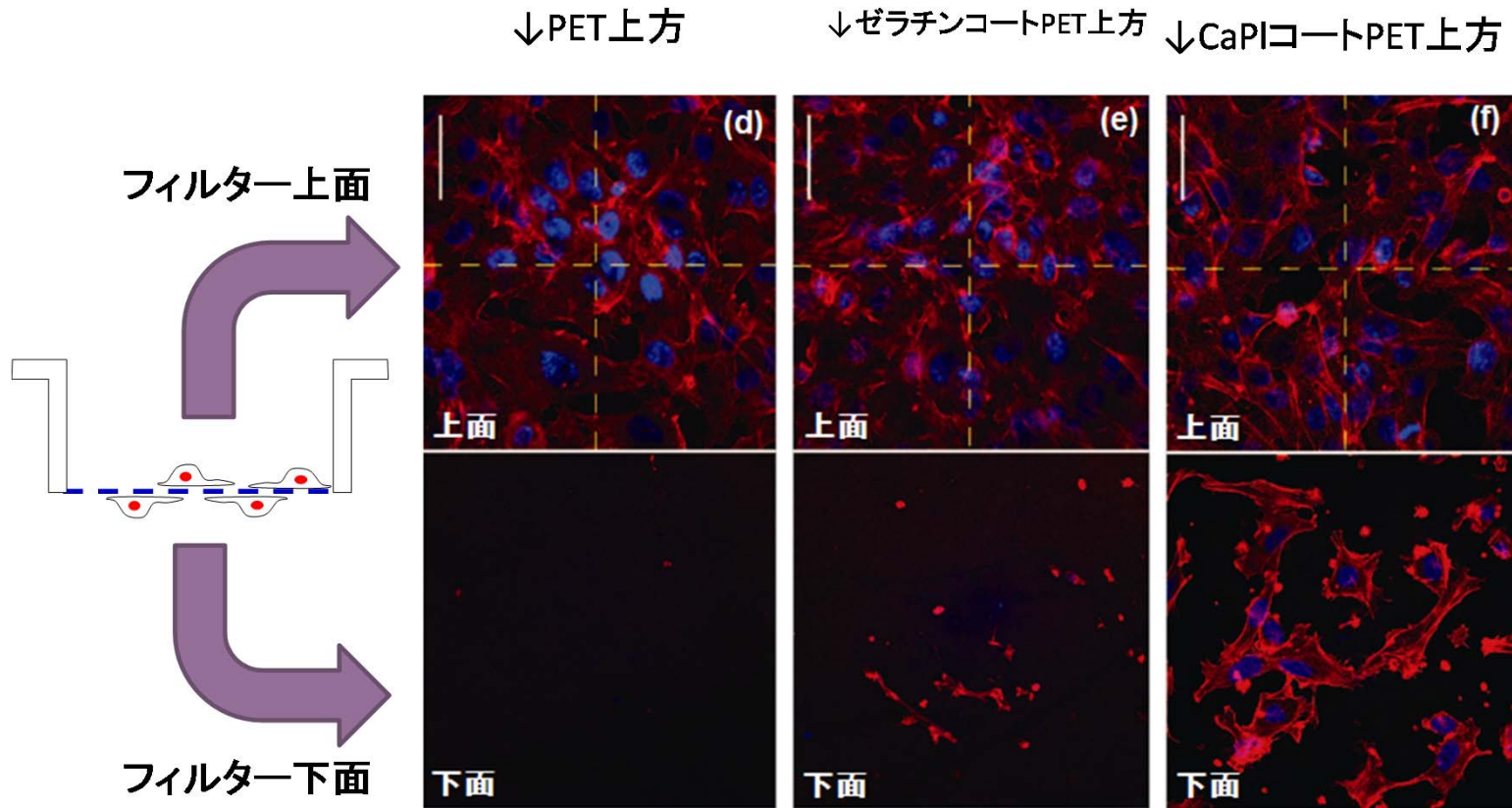
HUVECは血管形成に関わる細胞です。HUVECは通常、血液などに存在していますが、「カルシウムイオンの濃度勾配があると、濃い方に移動する」という性質があります。

CaPコートPETからはカルシウムイオンが溶け出しますから、HUVECを呼び寄せるような作用もあるかもしれないと考えました。

実験方法: 左図のように、3種の試料のうちひとつを培養皿の底に置き、そこから0.65mm離れた情報にフィルターを保持し、そこにHUVEC細胞を播きます。細胞がカルシウムイオンの濃度勾配を感じて「遊走」するなら、やがてフィルターの下部に移動してくるはずで

一定時間後に、フィルターの上面と下面にいる細胞の数を測定しました。

HUVEC培養(3)

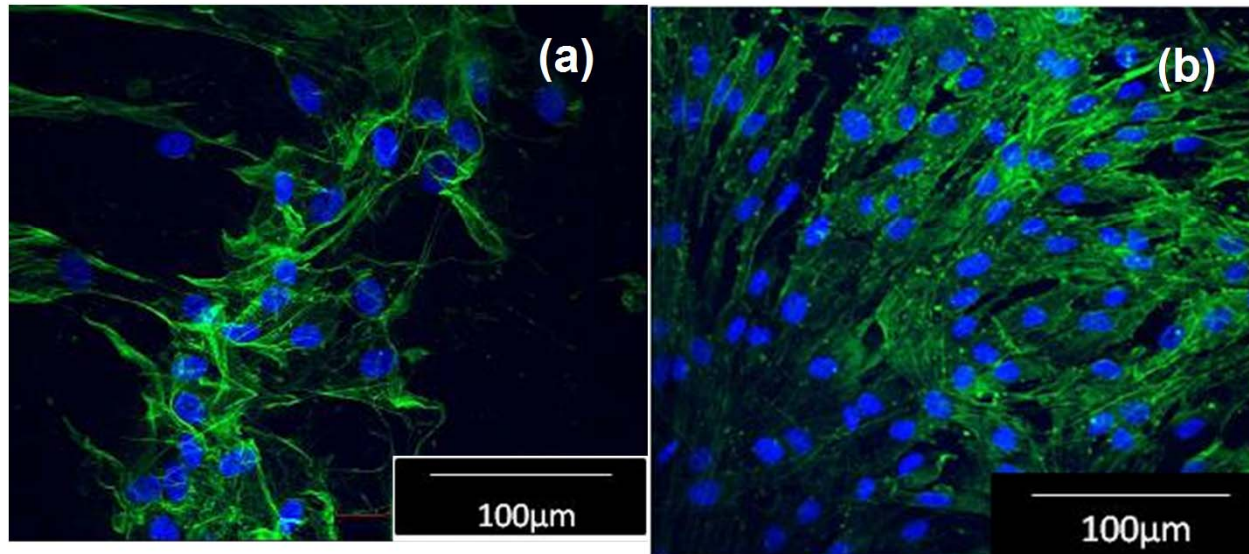


結果は、上に示すとおり、CaPコートPETに向かって、フィルターの上面から下面に細胞が遊走してきました。このことは、CaPコートPETが血管形成の促進を通じても組織再生を促すことを示唆しています。

ヒト歯根膜細胞の培養

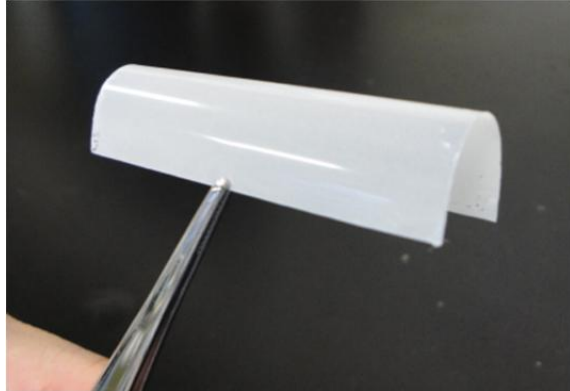
PET上

CaPIコートPET上



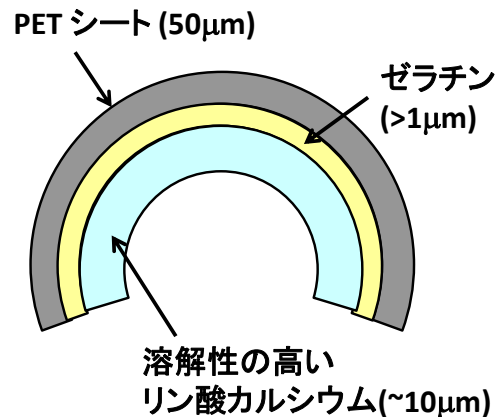
未処理PETとCaPコートPETの上にヒト歯根膜細胞を播き、7日間培養して細胞を染色しました。未処理PETの上では増殖も少なく、また細胞骨格も発達しませんでした。CaPコートPET上では、細胞の増殖と骨格の発達が確認されました。CaPコートPETは歯根膜再生の材料にも使える可能性があります。

まとめ(1)



CaPコートPETは、
(1) 骨再生を速め、(2) 感染の危険性を減らし、
(3) 内部観察が可能で、(4) 摘出が容易な
骨誘導再生メンブレンであることがわかりました。

また、表面から溶け出すカルシウムイオンが、
骨芽細胞を活性化したり、内皮細胞を引き寄せたり
細胞増殖に適した環境を提供したりするためと
考えられました。



演者らは、一日も早くこの材料を実用化して
世に出したいと願っていますが、なかなか
一筋縄ではいかないのも現状です。

次ページに、実用化のための障壁について。

まとめ(2)

実用化のためには、企業（医療機器製造販売業）が主体になっていただき、製造設備の建設、厚生労働省への承認申請や臨床試験などを行っていただく必要があります。

そのためには「億」のオーダーの費用がかかるのですが、その投資を回収できるかどうか重要な判断材料になります。

たしかに、歯科だけでは市場が小さすぎるかもしれません。できれば、整形外科、形成外科、皮膚科などに用途を広げられたらと考えています。

この材料の改良や評価にご協力頂ける方々と、是非共同で開発を進めたいと願っております。

謝辞

CaPコートPETの有効性を、in vivoとin vitroの両面から
顕彰することに対して、多大な助成を下さいました、
日本板硝子材料工学助成会とご関係の皆様方に
深く感謝申し上げます。