

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業  
産学連携医療イノベーション創出プログラム セットアップスキーム (ACT-MS)  
事後評価報告書

公開

## I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 組織再生自己硬化型細胞遮断膜の創製  
(英語) Fabrication of self-setting barrier membrane

研究開発実施期間：2017年10月10日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 石川邦夫  
(英語) Kunio Ishikawa

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
(日本語) 国立大学法人九州大学 大学院歯学研究院 教授  
(英語) Kyushu University, Faculty of Dental Science, Professor

## II 研究開発の概要

和文：

骨再生誘導法 (GBR : Guided Bone Regeneration) は再生医学に用いられる手法の一つである。基本的には、骨欠損部表面に細胞遮断膜 (barrier membrane) を設置することによって、骨組織以外の組織由来の細胞の侵入を防止する。そのことによって骨組織由来の細胞のみを骨欠損部に遊走・増殖させ、骨組織によって欠損部を再生させる。骨欠損部表面に細胞遮断膜がない場合には、結合組織が骨欠損部に侵入し、骨欠損部が骨で再生されることはない。しかし、細胞遮断膜を設置することによって、結合組織由来の細胞が遊走・増殖できないため、骨欠損部は骨組織で再生される。

骨再生誘導法は極めて有用な組織再生手法であるが、骨再生誘導法に用いられている細胞遮断膜はテフロン、コラーゲンや乳酸-グリコール酸共重合体の二次元膜であり、三次元形態の骨欠損部表面を二次元膜で緊密に封鎖することは原理的にも不可能である。骨欠損表面を緊密に封鎖できない場合には、骨欠損部に結合性組織が侵入して、骨は再生されない。また、二次元膜であるため力学的強さが限定的であり、細胞遮断膜が形態を保てない場合には骨が再生されなかったり、凹状に陥没した膜形態と同じ、凹状に陥没した骨が再生されたりする。このため、骨欠損部に骨補填材を埋植したり、ピンやインプラントで細胞遮断膜の形態を維持したりする手技も行われているが、細胞遮断膜の形態保持は必ずしも十分ではない。さらに、骨欠損部表面に可及的速やかに骨を形成する必要があるが、現在の細胞遮断膜には骨形成能がない。

本研究開発は、細胞遮断膜に骨形成能と自己硬化性を付与し、さらに骨と置換されることが知られている炭酸アパタイト骨補填材と組み合わせることによって、現在の細胞遮断膜の問題点を一挙に解決しようとするものである。

## 現在の細胞遮断膜

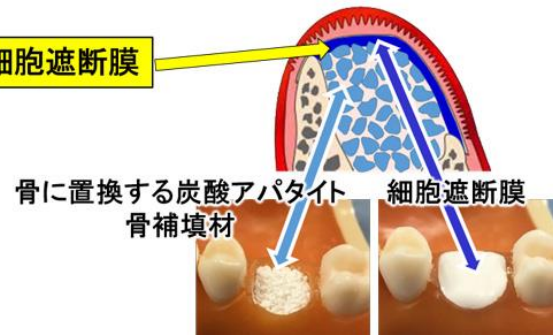
- ・二次元膜で三次元骨欠損部を被覆するのは原理的に無理
- ・細胞遮断膜に骨形成能がない。



## 細胞遮断膜

## 自己硬化型細胞遮断膜

- ・自己硬化性(セメント)によって簡便、かつ、緊密に骨欠損部を被覆
- ・骨形成能を有する細胞遮断膜。



自己硬化型細胞遮断膜の組成としては、骨形成能付与の観点からリン酸三カルシウムおよび炭酸アパタイトとした。

### 【リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜】

$\beta$  型リン酸三カルシウム ( $\beta$  TCP :  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) は骨形成能を有するリン酸カルシウムであり、骨補填材としても臨床応用されている。しかしながら、自己硬化性を示さない。リン酸カルシウムの熱力学的安定性は図1に示すように pH に大きく依存する。そこで、酸性リン酸カルシウム水溶液を練和液として混合すると低 pH で安定相であるリン酸水素カルシウム二水和物 (DCPD:  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) が形成され、形成したリン酸水素カルシウム二水和物結晶が  $\beta$  型リン酸三カルシウムを橋架けして硬化することが明らかになった (図2)。

リン酸三カルシウムと酸性リン酸カルシウム水溶液の組み合わせの場合、止血が十分である場合には問題ないが、出血部では硬化阻害が認められる。これは、血液などがリン酸三カルシウムと酸性リン酸カルシウム水溶液の混合物 (ペースト) の内部に浸透し、粉末の間を引き離すため、形成されるリン酸水素カルシウム二水和物結晶がリン酸三カルシウムを橋架けできなくなることが原因であった。

そこで、ペースト内部への血液等の浸透を抑制するため、ゲル化剤の添加を検討した。酸性領域で十分なゲル化能を示し、かつ、生体材料として用いられるゲル化剤は限定的であったが、ヒアルロン酸などが有効なゲル化剤であることがわかった。ただ、ヒアルロン酸を練和液である酸性リン酸カルシウム水溶液に混合すると経時的な粘性低下が確認された。これらの結果から、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜の場合、止血を十分に行う前提で、 $\beta$  型リン酸カルシウム粉末と酸性リン酸カルシウム水溶液の組み合わせで実用化するか、 $\beta$  型リン酸カルシウム粉末、酸性リン酸カルシウム水溶液、増粘剤の三者を混合する組み合わせで実用化する選択があると結論した。

リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜の有効性に関しては、実験動物を用いて評価を行った。兎大腿骨調製した骨欠損部に人工骨補填材顆粒を充填し、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜で封鎖した。現在、臨床応用されている二次元膜の細胞遮断膜では封鎖が困難であったが、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜では極めて簡単に骨欠損部表面を封鎖できた。埋入4週および12週の段階でも骨欠損部への結合性組織の侵入は見られず細胞遮断膜としての機能が確認された。さらに、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜の表面に新生骨が形成されており、自己硬化型細胞遮断膜自体にも、新しい骨に置換されている所見が認められた。

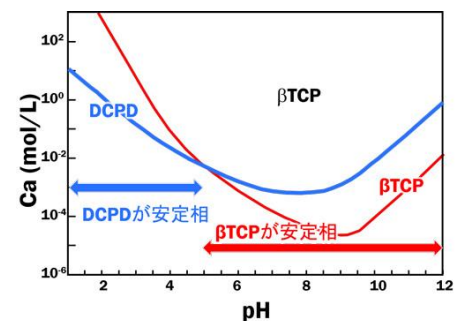


図1 リン酸カルシウムのpH に対する相図。pHが低い領域ではDCPDが

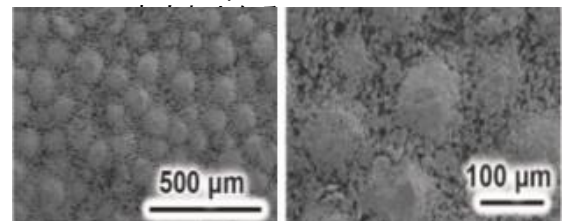


図2  $\beta$ 型リン酸三カルシウムを酸性リン酸カルシウム水溶液で練和した場合の硬化体の走査型電子顕微鏡写真。リン酸水素カルシウムに水和物結晶が  $\beta$ 型リン酸三カルシウムを橋架けしていることがわかる。

これらの結果から、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜は理想的な細胞遮断膜となる可能性が示唆された。

#### 【炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜】

$\beta$  型リン酸カルシウムは臨床応用されている典型的な骨補填材の一つであるが、生理環境でも溶解されるため、骨リモデリングには調和していない。一方、骨組成である炭酸アパタイト骨補填材が 2017 年に薬事承認され、2018 年から臨床応用されている。炭酸アパタイト骨補填材は自家骨と組成が同じであるため、自家骨と同様に骨リモデリングに調和して新しい骨に置換され、自家骨に匹敵する骨形成能を示す。そこで、本研究開発においても、炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜の検討を行った。

まず、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜と同じ概念で硬化性を検討した。すなわち、炭酸アパタイトを酸性リン酸カルシウム水溶液で練和し、その硬化挙動を検討した。炭酸アパタイトは、組成中に炭酸基を含有しているため、酸性リン酸カルシウム水溶液で練和すると泡が発生した。硬化挙動は確認できたが、機械的強度が限定的であり、また、泡による形態変化も問題であった。炭酸アパタイトのサイズを大きくすることによって形成される泡が抜けるように設計することによって泡による形態変化は抑制できたが、機械的強度は限定的であった。

そこで、酸性リン酸水素カルシウム水溶液の練和による硬化反応は適切でないと判断し、炭酸アパタイトが析出し硬化する自己硬化型細胞遮断膜の創製を検討した。炭酸アパタイトの組成 ( $\text{Ca}_{10-a}(\text{CO}_3)_b(\text{PO}_4)_{6-c}$ ) から各種の混合物を検討した結果、 $\alpha$  型リン酸三カルシウムと炭酸カルシウムの混合物が硬化性を示し、硬化体が炭酸アパタイトになることを見出した。出血部位で硬化させるには、増粘剤の添加が必要と思われたが、リン酸水素カルシウムと炭酸カルシウムの混合物の場合には、増粘剤を添加しない場合でも硬化が確認された。これは両者の溶解速度を調整するために粒度調整を行い、微粉末化しているため粉末同士の凝集力が強いためであると考えられる。

炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜の有効性に関しても、実験動物を用いて評価を行った。兎大腿骨調製した骨欠損部に人工骨補填材顆粒を充填し、炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜で封鎖した。リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜と同様に、極めて簡単に骨欠損部表面を封鎖できた。埋入 4 週の段階でも骨欠損部への結合性組織の侵入は見られず細胞遮断膜としての機能が確認された。さらに、炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜表面には、リン酸三カルシウム系自己硬化型細胞遮断膜以上に新生骨の形成が確認された。また、自己硬化型細胞遮断膜自体も、新しい骨に置換されている所見が認められた。これらの結果から、炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜は理想的な細胞遮断膜となる可能性が示唆された。

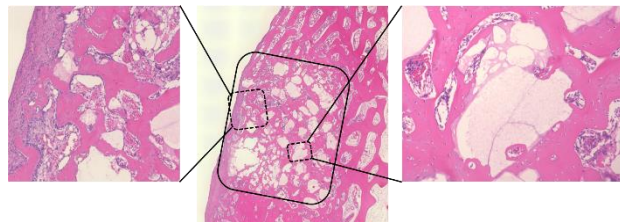


図3 炭酸アパタイト系自己硬化型細胞遮断膜で GBR を施術した場合の4週目のヘマトキシリン-エオジン染色像。骨欠損部への結合性組織の侵入は完全に遮断できている。細胞遮断膜表面にも新しい骨が形成され、骨欠損部にも新しい骨が形成されている。

英文：

Guided Bone Regeneration (GBR) is one of methods employed in regenerative medicine. Basically, invasion of the tissues other than bone tissue is prevented by placing a barrier membrane on a surface of bone defect. Although GBR is useful for the regeneration of bone tissue, placement of the barrier membrane at the bone defect is not easy.

Objective of this study is to fabricate self-setting barrier membranes based on the setting reaction of calcium phosphate and evaluate its usefulness as the barrier membrane.

Beta-tricalcium phosphate [ $\beta$ -TCP:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] and carbonate apatite [ $\text{CO}_3\text{Ap}$ :  $\text{Ca}_{10-a}(\text{CO}_3)_b(\text{PO}_4)_{6-c}$ ] were chosen as composition of the barrier membrane because these two are known to show good osteoconductivity and resorbability.

#### “ $\beta$ -tricalcium phosphate type self-setting barrier membrane”

$\beta$ -TCP is one of the typical artificial bone substitutes. Unfortunately, it does not show setting ability. On the other hand, thermodynamical stability of calcium phosphate is dependent on pH. In other words,  $\beta$ -TCP is the stable phase at neutral pH whereas dicalcium phosphate dihydrate [DCPD:  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] is the stable phase at lower pH region. Therefore,  $\beta$ -TCP is mixed with acidic calcium phosphate solution so that DCPD crystals formed by the dissolution of  $\beta$ -TCP into the acidic calcium phosphate solution would bridge  $\beta$ -TCP one another.  $\beta$ -tricalcium phosphate type self-setting barrier membrane thus fabricated was set on the surface of bone defect when the bone defect was free from blood exposure. However, the barrier membrane was washed-out upon exposure to blood before its setting reaction. Gelling agent was found to show to suppress the wash-out properties. Complete barrier effects were confirmed when the membrane was used for GBR of the rabbit femur bone defect. In addition, new bone formation and partial replacement to bone was observed. Based on these results good potential value was found for the  $\beta$ -tricalcium phosphate type self-setting barrier membrane.

#### “Carbonate apatite type self-setting barrier membrane”

$\text{CO}_3\text{Ap}$  is the composition of bone and shows good osteoconductivity like autograft. Moreover,  $\text{CO}_3\text{Ap}$  is replaced to new bone based on so-called bone remodeling process.  $\text{CO}_3\text{Ap}$  is approved as bone substitute in 2017 and commercially available from 2018. Mixing  $\text{CO}_3\text{Ap}$  with acidic calcium phosphate solution result in bubble ( $\text{CO}_2$ ) formation leading the difficulty in maintain the structure. This is thought to due to  $\text{CO}_3$  component in the apatitic structure. Therefore, carbonate apatite type self-setting barrier membrane would not be fabricated based on the same concept of  $\beta$ -tricalcium phosphate type self-setting barrier membrane. Therefore, self-setting barrier membrane that forms  $\text{CO}_3\text{Ap}$  is studied. Among the combination of several calcium phosphates, combination of alpha-tricalcium phosphate [ $\alpha$ -TCP:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] and calcium carbonate [ $\text{CaCO}_3$ ] shows setting ability and forms  $\text{CO}_3\text{Ap}$ . Anti-washout properties are anticipated in this case as well since blood is penetrated in to the mixture. Interestingly, no wash-out was observed in the case of carbonate apatite type self-setting barrier membrane. Small particle size may be effective to supers the anti-washout properties due to its relatively strong aggregation.

Usefulness of the carbonate apatite type self-setting barrier membrane was also evaluated using experimental animals; rabbits. Femur bone defect was filled with  $\text{CO}_3\text{Ap}$  granules followed by placing the carbonate apatite type self-setting barrier membrane. As a result of GBR procedure, the bone defect was completely isolated from the fibrous tissue. No inflammatory response was observed. As early as four weeks after GBR procedure, new bone was formed on the surface of carbonate apatite type self-setting barrier membrane. No fibrous tissue was observed inside the bone defect barriered by the self-setting barrier membrane. Moreover, some portion of the carbonate apatite type self-setting barrier membrane was replaced to new bone.

It was concluded that carbonate apatite type self-setting barrier membrane has good potential value to be an ideal barrier membrane for GBR method.

### III 事後評価総合所見

研究開発期間中に リン酸三カルシウム セメントおよび炭酸アパタイトセメントによる自己硬化型細胞遮断膜の組成を検討し、実験動物にて有効性を示せたこと、期間中に PMDA による RS 事前面談まで達成できた点は評価されました。

一方で、セットアップ企業の貢献が少なく、事業化に向けた取組としては満足に行くものではありませんでした。今後、適切に医療機関・産側のパートナーとの連携を行い、ビジネスモデルおよび知財戦略を構築し、製品化に向けた明確な方針を決めて研究開発を推進いただくことを期待します。