



# The Science Behind Cytrans Elashield

サイトランス エラシールト"

Vol. 1
Basic edition



## Index

#### ●文献

甚		

## Fabrication of Novel Poly(lactic acid/caprolactone) Bilayer Membrane for GBR Application

Gabriela L. Abe

Depertment of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry

2

#### 基礎性能評価

## Poly(lactic acid/caprlactone) bilayer membrane with slower degradation promotes bone formation in vivo

Gabriela L. Abe

Depertment of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry

4

#### 新規吸収性GBRメンブレンの生体分解性と生体安全性のin vivo評価

神野 友樹

大阪大学大学院歯学研究科 先端機能性材料学共同研究講座

6

## **Barrier Effects of New Bilayer GBR Membrane Against Bacteria Invasion**

Ririko Tsuboi

Osaka University Graduate School of Dentistry

7

#### ケースレポート

#### P(LA/CL) 二層性メンブレンGMEM-B2による デンタルインプラント埋入同時に施行した臼歯部GBR症例

朝比奈 泉

長崎大学病院顎顔面口腔インプラントセンター

8

#### ● 外部発表リスト

9

#### 【本冊子内の記述凡例】

本冊子内の記載のうち配色部分はそれぞれ下記を意味します。また、それぞれに関する詳細は転載元の原典をご参照ください。

参考和訳

解説·要約

## Fabrication of Novel Poly(lactic acid/caprolactone) Bilayer Membrane for GBR Application

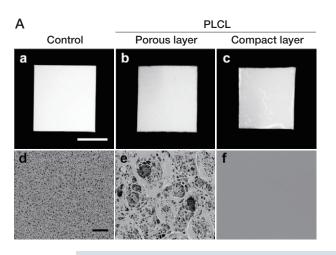
- 1) Department of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry
- 2) Department of Advanced Functional Materials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry
- 3) Department of Restorative Dentistry and Endodontology

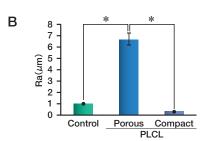
Gabriela L. Abe<sup>1)</sup>, Jun-Ichi Sasaki<sup>1)</sup>, Chihiro Katata<sup>1)3)</sup>, Tomoki Kohno<sup>2)</sup>, Ririko Tsuboi<sup>2)</sup>, Haruaki Kitagawa<sup>1)</sup>, Satoshi Imazato<sup>1)2)</sup>

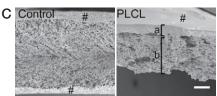


骨再生誘導法(GBR法)には軟組織のバリアとしてメンブレンが使われる。市販のメンブレンでありながらも、吸収速度が速いものは限定的なバリア性能しか発揮できない。この研究では新規P(LA/CL)二層性メンブレンの物理化学的・生物学的特性を調べ、GBR法での適応に適しているかどうかを調べた。

(Poly(lactic acid/caprolactone) = PLCL = P(LA/CL))







- 図1 P(LA/CL)二層性メンブレンの構造
- (A)外観(a-c) (スケールバー: 5 mm)とSEM像(d-f) (スケールバー: 100 μm) Control: 市販PLGAメンブレン、PLCL: P(LA/CL)メンブレン Porous layer: ポーラス層面、Compact layer: 緻密層(ソリッド層)面
- (B)メンブレンの表面粗さ測定結果
  - 二層それぞれの表面で表面粗さが異なった。 \*は群間の統計的な有意差を示す。
- (C)メンブレンの断面SEM像 (#: メンブレン表面、a: 緻密層(ソリッド層)、b: ポーラス層)

表1 in vitro 溶解試験分解試験 26,52週間後の残存重量(%) PBS浸漬後の乾燥重量を計測した結果。ISO 15814 準拠 Control:市販PLGAメンブレン, PLCL:P(LA/CL)メンブレン

	26 Weeks	52 Weeks
PLCL	45	20
Control	18	0

#### 実験方法:

P(LA/CL)二層性メンブレンについて、物理化学的な特性として引っ張り強度、表面粗さ、in vitroでの加水分解、さらには臨床的な操作性が評価された。さらに二層それぞれのメンブレン表面の上での細胞増殖及び分化に与える効果が調べられた。いずれの試験においても、市販のPLGAメンブレンが比較対照として使われた。

#### 結果:

in vitroの試験系においては、引っ張りの破断変位点が大きく、さらに引っ張り強度が適度であった。これが良好なメンブレンの操作性につながっていた。さらには、P(LA/CL) 二層性メンブレンはより吸収速度がゆっくりで安定しており、細胞増殖や骨分化を支持することが分かった。

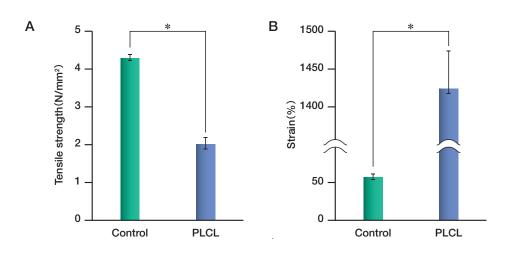


図2 メンブレンの引っ張り試験評価

(A)引っ張り強度

(B)破断距離(元の長さに対する伸び(%))

Control: 市販PLGAメンブレン、PLCL: P(LA/CL)二層性メンブレン

\*は群間の統計的な有意差を示す。

P(LA/CL)二層性メンブレンは市販PLGAよりも引っ張り強度が低くてしなやかであり、引っ張り試験に拠る破断点も大きかった。これらの結果から、柔軟な操作性であることに加えて、臨床使用上の範囲では破れにくいと想定される。

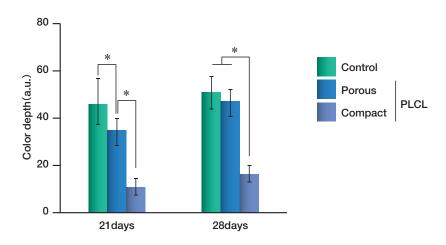


図3 メンブレン上でのhBMSC(ヒト間葉系幹細胞)骨分化培養評価21日、28日培養で生成した骨基質量をvon Kossa 染色具合の強さにより評価Control: 市販PLGAメンブレン、PLCL: P(LA/CL)メンブレンPorous layer: ポーラス層面、Compact layer: 緻密層(ソリッド層)面\*は群間の統計的な有意差を示す。

P(LA/CL) 二層性メンブレン上でvon Kossa染色により石灰化基質が確認できた。つまり、本メンブレンは幹細胞の骨分化を支持することが分かった。また、ポーラス面において緻密層(ソリッド層)面より骨分化を促進することが分かった。

本研究においてP(LA/CL)メンブレンが良好な操作性を備えながら、高い生体親和性を持ち、吸収期間が長いことが確認された。これらによりバリア性が長期化し骨再生に寄与できる。これらの性質からP(LA/CL)二層性メンブレンはGBR法に有用であると考えられた。

## Poly(lactic acid/caprlactone) bilayer membrane with slower degradation promotes bone formation in vivo

Abstruct #288

- 1) Department of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry
- 2) Department of Advanced Functional Materials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry

Gabriela Abe, Jun' ichi Sasaki<sup>1)</sup>, Tomoki Kohno<sup>2)</sup>, Ririko Tsuboi<sup>2)</sup> and Satoshi Imazato<sup>1)</sup>

## P(LA/CL)二層性メンブレンのGBR適応における有用性を物性評価(吸収特性等)及び小動物実験により評価した。

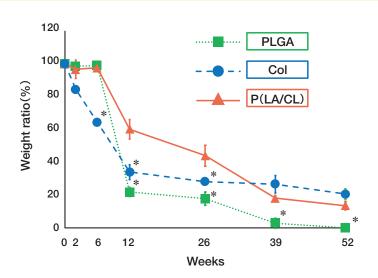


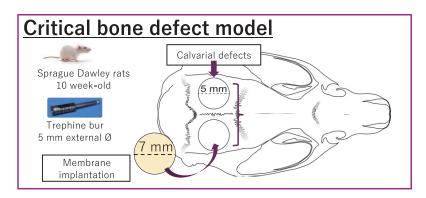
図1 in vitro吸収分解試験(ISO15814) 体液を模したリン酸緩衝液に各試料を浸漬し吸収後の残存重量(%)を評価した。 PLGA: 市販PLGAメンブレン、Col: 市販コラーゲンメンブレン P(PA/CL): P(PA/CL)二層性メンブレン

\*は各時点におけるP(PA/CL)に対するの統計学的有意差ありを示す。

#### **Abstract**

**Objective:** Previously, we fabricated a new bilayer membrane for GBR application composed of a poly (lactic acid/caprolactone) (P(LA/CL)) co-polymer, and reported its detailed structure and mechanical strength. The current study aimed to investigate in vitro characteristics of this experimental P(LA/CL) membrane, and its effectiveness to promote bone formation in vivo, comparing with two commercial membranes; collagen-based membrane (Bio-Gide®, Geistlich) and poly(lactic-glycolic-acid) (PLGA)-based membrane (GC membrane, GC).

Methods:In vitro degradation was assessed following ISO15814. Samples were immersed in PBS and their relative weight loss recorded up to 52 weeks. To assess biocompatibility, human gingival epithelial (HGEP) cells were seeded on each membrane and cultured for 12 days. By using a 3D-printed epoxy model to simulate bone defect, fitting of the experimental membrane to bone surface was measured from micro-CT images and its handling for clinical use was evaluated. In in vivo tests, each membrane was applied to critical bone defects produced in Sprague-Dawley rats calvaria and the volume of newly formed bone was quantified by micro-CT after 4 or 8 weeks.



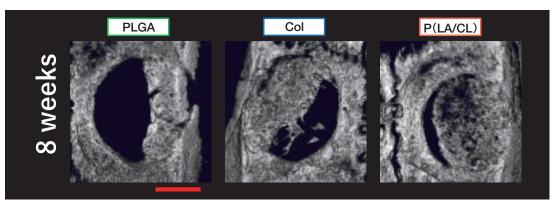


図2 in vivo試験 ラット頭蓋骨欠損へのメンブレン適応によるGBR模擬試験 10週齢のS.D.ラット頭蓋骨にに自然治癒不可な5mm径の欠損を作成し、7mm径の試験体メンブレンで被覆し、骨再生量をエックス線μCTにて評価した。

PLGA: 市販PLGAメンブレン、Col: 市販コラーゲンメンブレンP(PA/CL): P(PA/CL)二層性メンブレン

**Results:** The experimental P(LA/CL) membrane showed preservation of 20.1  $\pm$  3.1% of its original weight at 39 weeks, showing significantly slower degradation than PLGA membrane which completely degraded and collagen membrane with 26.7  $\pm$  5.2% preservation. HGEP cells could grow on all surfaces, and showed significantly higher proliferation on porous layer of P(LA/CL) membrane than PLGA membrane. Micro-CT observation of epoxy model revealed that distances between bone defect and membrane were significantly smaller for P(LA/CL) group than other groups.

Volume of the bone formed in vivo for P(LA/CL), PLGA, and collagen membranes were 52.2  $\pm$  3.8%, 39.6  $\pm$  11.7%, and 29.2  $\pm$  6.7%, respectively, and the experimental membrane exhibited significantly greater effects to promote bone formation.

**Conclusion:** This study indicated that the novel P (LA/CL) membrane is useful for GBR application.

#### ※参考(IADR-APR発表データ、発表者より事後提供) 本研究によるラット頭蓋骨欠損へのメンブレン適用によるGBR模擬試験の継続的観察結果 (エックス線μCTデータによる4週、8週間後の骨治癒率(%))

	4 Weeks	8 Weeks
PLGA	20.9 ± 11.0	52.0 ± 9.6
Col	$37.5 \pm 9.6$	$51.1 \pm 13.5$
P(LA/CL)	$31.8 \pm 16.5$	$71.8 \pm 14.6$

- ●P(LA/CL)から成る二層性メンブレンは市販のPLGAやコラーゲンメンブレンよりも分解吸収期間が長かった。
- ●P(LA/CL)二層性メンブレンがGBR法によるラット頭蓋骨再生試験において市販のPLGAやコラーゲンメンブレンよりも骨再生量が多かった。

### 新規吸収性GBRメンブレンの生体分解性と 生体安全性のin vivo評価

演題番号12

神野 友樹1)、Abe Gabriela2)、壷井 莉理子1)、北川 晴朗2)、佐々木 淳一2)、今里 聡1)2)

1)大阪大学大学院歯学研究科 先端機能性材料学共同研究講座 2)顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)

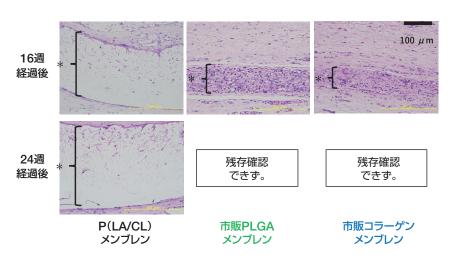


図1 ラット皮下埋植 分解性評価(16週、24週経過後のメンブレン残存状況確認) (HE標本組織像) \*メンブレン

#### 目的:

骨再生誘導法(GBR)において各種吸収性メンブレンが使用されているが、現在用いられている既存の吸収性メンブレンは生体内で比較的早期に分解するため、長期的なバリア機能を発揮するメンブレンの開発が求められている。これまで我々は、内外側面で異なる表面性状を有する二層性の乳酸ーカプロラクトン共重合体メンブレン(P(LA/CL)メンブレン)を新規に開発し、in vitro系の実験により、試作メンブレンが臨床応用可能な物性を有するとともに、市販PLGAメンブレンに比べて分解速度が遅いことを報告してきた。本研究では、試作メンブレンのin vivoにおける生分解特性と生物学的安全性を評価することを目的とし、ラットへの埋植試験を行った。

#### 方法:

被験材料として、試作P(LA/CL)メンブレン、市販PLGAメンブレン(GCメンブレン)、市販コラーゲンメンブレン(Bio-Gide)を使用した。各メンブレンをラット背部皮下に埋植し、16または24週間経過後に取り出して組織学的検討を行い、分解性を評価した。

また、試作メンブレンをラットの頭蓋骨上および背部皮下に埋植し、18週間経過後に尿検査、血液検査、器官重量測定を行って全身毒性の有無を評価するとともに、埋植部位の組織学的検討により試作メンブレンの起炎性および組織反応について評価した。コントロールには偽手術群を設定した。

#### 結果および考察:

試作メンブレンは、埋植から16週間経過後も二層構造が維持された状態で残存しており、24週間後も、一部断片化が観察されたものの残存していた。一方、GCメンブレンとBio-Gideは、16週間後の試料の残存はわずかで、残存したメンブレン内に多数のマクロファージが観察された。また、いずれも24週間後には全く残存は認められなかった。この結果より、試作P(LA/CL)メンブレンは、市販のPLGAメンブレンやコラーゲンメンブレンと比較して、生体内における分解期間が長いことが確認された。

亜慢性毒性試験の結果、尿検査、血液検査、器官重量測定のいずれにおいても、試作メンブレンの毒性に起因すると考えられる変化は認められなかった。組織学的検討でも、埋植部位に炎症所見は認められず、試料に対する組織反応は線維性被膜による被包化、およびマクロファージによる異物処理反応が主体であることが分かった。

- ●P(LA/CL)二層性メンブレンはラット背部皮下埋植24週間経過後も残存していた。
- ●同メンブレンの亜慢性毒性試験において毒性は認められず、局所の炎症所見も認められなかった。

## **Barrier Effects of New Bilayer GBR Membrane Against Bacteria Invasion**

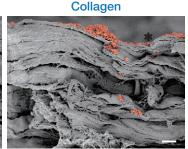
Presentation ID: 2506

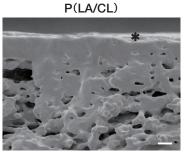
Osaka University Graduate School of Dentistry

Ririko Tsuboi, Gabriela L. Abe, Haruaki Kitagawa, Jun-Ichi Sasaki, Satoshi Imazato

## P(LA/CL)二層性GBRメンブレンの口腔内病原細菌(S. MutansおよびP. gingivalis)の付着性、およびそれらに対するバリア性能を評価した。

PLGA \*





\* Surface

図1 口腔内細菌(S.ミュータンス菌)のメンブレン内部への浸潤性評価結果 試験体メンブレンに細菌播種し24時間嫌気培養した。サンプルを洗浄・固定・液体窒素処理した後、断面をSEMを用いて観察した。(図中の細菌をオレンジ色にて図示した) PLGA: 市販PLGAメンブレン、Collagen: 市販コラーゲンメンブレン P(PA/CL): P(PA/CL)ニ層性メンブレン

P(PA/CL)でメンブレン内部へのS.ミュータンスへの浸潤は確認されなかった。 表面に付着していた細菌も洗浄により簡単に除去された。P.g.菌でも同様な結果であった。

#### **Abstract**

**Objective:** We fabricated a novel poly(lactic acid/caprolactone) (P(LA/CL)) membrane, which has the bilayered structure consisting of outer compact and inner porous layers, for guided bone regeneration (GBR). Previously, we reported that this membrane demonstrated the effects to promote bone formation due to its porous structure of the inner surface. The aim of this study was to assess the barrier effects of the experimental bilayer membrane against bacterial adherence and penetration.

**Methods:** Streptococcus mutans or Porphyromonas gingivalis suspension at 106 CFU/mL was inoculated on the outer surface (i.e. compact layer) of the experimental P(LA/CL) membrane. After anaerobic incubation for 24 hours, bacteria adherence to the surface of the membrane was evaluated by the scanning electron microscope (SEM) observation and counting the number of bacteria. To evaluate bacterial penetration into the membrane, the cross section was obtained and observed using SEM.

For comparison, two commercial membranes; collagen-based membrane (Bio-Gide®, Geistlich) and poly(lactic-glycolic-acid) (PLGA)-based membrane (GC membrane, GC) were used.

**Results:** For both S. mutans and P. gingivalis, compared with Bio-Gide and GC membrane, less bacterial attachment was observed on the experimental membrane and their numbers were significantly lower (p < 0.05, Tukey's HSD test). The SEM image analyses of the cross section revealed that the experimental membrane completely prevented invasion of bacteria from the outer surface, whereas both S. mutans and P. gingivalis penetrated through the pores of GC membrane composed only of porous layer. Bacterial penetration inside the membrane was detected also for Bio-Gide although most of them were trapped on the surface.

**Conclusions:** The novel bilayer P(LA/CL) membrane inhibited the bacterial adherence to the outer surface and prevented bacterial invasion, indicating its usefulness for GBR application.

P(LA/CL)二層性メンブレンの外側の緻密な層は市販のPLGAやコラーゲンメンブレンよりも口腔内病原細菌の付着が有意に弱く、かつ、細菌のメンブレン内部への侵入は確認されなかった。これらの結果より同メンブレンのGBR法における有用性が期待される。

### P(LA/CL)二層性メンブレンGMEM-B2\*を 用いデンタルインプラント埋入同時に施行した 臼歯部GBR症例

長崎大学病院顎顔面口腔インプラントセンター 朝比奈 泉、緒方 絹子



#### 適用部位

58歳男性 下顎左側臼歯部



#### 使用材料

サイトランス® グラニュール(Sサイズ) スクレイピング採取自家骨 (両者を1:1混合)



図1 初診時口腔内写真。

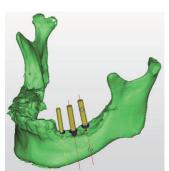


図2 シミュレーション画像。



図3 インプラント埋入後、皮質骨に穿孔。



図4 自家骨+サイトランス® グラニュー



図5 移植材料をメンブレンで被覆後、図6 5ヶ月後、骨造成が確認できる。 タックピンで固定。





図7 最終補綴。



図8 CT画像:サイトランス®グラニュー ル周囲に新生骨形成を認める。

#### 解説

患者は58歳、男性。下顎左側臼歯部欠損に対するインプラン ト補綴治療を希望して来院した。シミュレーションの結果、「567 のインプラント体の頰側が2~5mm露出することが予測された ので、インプラント埋入と同時にGBRを施行し歯槽骨造成を図 ることにした。 5 部に径3.3mm、 67 部に径4.1mm、全て長さ 8mmのインプラントを埋入した後、皮質骨に穿孔を加えた。 セーフスクレーパーで下顎骨外斜線付近から採取した自家骨と サイトランス®グラニュールSが1対1になるように混合したもの に、自己血を添加し移植材料とした。P(LA/CL)二層性メンブレ

ンGMEM-B2\*を欠損部の形態に合わせてトリミングしたのち、 タックピンで頬側縁を固定した。移植材料をインプラント体が完 全に被覆されるように填塞したのち、GMEM-B2\*を伸展させ ながら舌側を固定し、テンションを加えることで移植材料が固定 されるようにした。5ヶ月後、粘膜骨膜弁を展開すると、サイトラ ンス®グラニュールを包むように新生骨が形成されており、6 のISQ値は85と良好なオッセオ・インテグレーションの獲得が 推察できた。またCT画像でも充分な骨造成がなされていること が確認できた。

\*GMEM-B2: 開発時メンブレンのコードネーム

本症例は臨床研究法に則り、認定臨床研究審査委員会の承認を受けて実施した特定臨床研究によるものである。 (臨床研究実施計画番号:jRCTs072190012, https://jrct.niph.go.jp/latest-detail/jRCTs072190012)

## 外部発表リスト

カテゴリー	テーマ	タイトル	著者	学会·出展
in vivo	安全性	Evaluation of new synthetic resorbable membrane for GBR - Degradation and Subchronictoxicity test.	Sakai 他 (ジーシー)	EAO (European Association for Osseointegration) 27th annual scientific meeting
in vivo	吸収特性	In vitro and in vivo evaluation of novel resorbable membrane for GBR	Toyonaga 他 (ジーシー)	AAP (American Academy of Periodontology) 104th annual meeting
in vivo	有効性	In vitro an in vivo evaluation of synthetic resorbable membrane for Guided Bone Regeneration.	Sakaguchi 他 (ジーシー)	EAO (European Association for Osseointegration)28th annual scientific meeting
in vivo	操作性	伸縮性を付与した吸収性メンブレンのGTR 操作性 Operability for GTR therapy of elastic resorbable membrane.	坂口 他 (ジーシー)	第62回秋季日本歯周病学会 学術大会
in vivo	物理化学特性、 細胞親和性	In vitro evaluation of a novel poly (lactic acid/caprolactone) bilayer membrane for GBR application	Abe 他 (大阪大学)	日本歯科理工学会 第72回 秋期学術講演会
in vivo	有効性	Poly(lactic acid/caprlactone) bilayer membrane with slower degradation promotes bone formation in vivo	Abe 他 (大阪大学)	IADR-APR 4th meeting
in vivo	吸収特性	新規吸収性GBRメンブレンの生体分解性と 生体安全性のin vivo評価	神野 他 (大阪大学)	大阪大学歯学会 第128回例会
in vivo	物理化学特性、細胞親和性	Fabrication of novel poly(lactic acid caprolactone) bilayer membrane for GBR application	Abe 他 (大阪大学)	Dental Materials, 2020 May; 36(5):626.
in vivo	細菌付着性、 浸潤性	Barrier Effects of New Bilayer GBR Membrane Against Bacteria Invasion	Tsuboi 他 (大阪大学)	98th General Session & Exhibition of the IADR
臨床研究	安全性	GBR法におけるポリ(L-ラクチド・ε-カプロラクトン共重合体)生体吸収性膜の安全性・認容性に関する探索的臨床研究	緒方 他 (長崎大学)	第50回日本口腔インプラント学 会学術大会

サイトランス®ブランド製品について 詳しい情報はコチラから

https://cytrans-le.gcdental.co.jp/





Cytrans® 「サイトランスとは、細胞 "Cyto"と、置換する "Transfer" を組み合わせた、患者さん自身の細胞の働きにより 新しい組織へと置き換わっていくことをイメージした造語であり、ジーシーの組織再生材料のブランド名です。



#### 株式会社 ジーシー

東京都文京区本郷3丁目2番14号 DIC(デンタルインフォメーションセンター)

お客様窓口 TEL: 0120-416480

受付時間 9:00 a.m.~5:00 p.m.(土曜日、日曜日、祝日を除く) http://www.gcdental.co.jp