

令和 4 年 8 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10844

研究課題名(和文) 骨芽細胞活性化能を有する生体内分解性骨片接合材の開発

研究課題名(英文) Development of biodegradable osteosynthesis device activating osteoblast cell

研究代表者

宮武 尚央 (Miyatake, Naohisa)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60623155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸オクタカルシウム(OCP)を、高分子素材と複合体とすることで、生体内分解骨置換性を持ち合わせた人工骨として使用できることを確認した。ラット大腿骨骨欠損部への埋入実験では、OCPと乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)の複合体で新生骨形成とOCPの吸収がみられた。OCPはゼラチン(Gel)と複合体とすることで市販されている-TCPより早期に生体分解し骨形成を促進することが分かっている。今後OCP/高分子複合体は、臨床応用されているHAとポリL乳酸(PLLA)の複合体や-TCPとPLGAの複合体などの生体内分解性骨接合材と比較検討していくことで優れた骨接合材になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

優れた人工骨として期待できるリン酸オクタカルシウム(OCP)は焼結できないため、人工骨として賦形させる方法が期待された。今回、高分子素材と複合体とすることで賦形できた。OCPは-TCPやHAより早期に生体内吸収され、骨形成することが明らかにされており、今回得られた高分子素材との複合体は現在臨床応用されている生体内分解骨接合材より優れた人工骨、吸収性骨接合材として使用できる可能性が示唆され臨床的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate whether octacalcium phosphate (OCP)/ biodegradable polymer composite can be used as an artificial bone that has osteoconductivity. Bone formation was enhanced by the OCP/ poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) composites compared to PLGA alone, through enhanced osteoclastic resorption of OCP. Our earlier study showed that OCP/gelatin (Gel) composites rapidly biodegraded and promoted the formation of new bone compared to commercially available -TCP. The present study suggests that octacalcium phosphate/ biodegradable polymer composite could be used as an osteoconductive and biodegradable material through the comparative study with HA / poly-L-lactic acid (PLLA) composite or -TCP /PLGA composite which are commercially available as the biodegradable material.

研究分野：整形外科

キーワード：人工骨 生体材料

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)リン酸オクタカルシウム(OCP)は、骨や歯牙を構成する無機成分ハイドロキシアパタイト(HA)の前駆体であると考えられており、生体骨組織に存在すると報告(Crane et al, Bone 2006)されている。また、OCPは、生理的 pH 下で化学的に準安定相とされ、幾つかの物理化学的变化を伴いながら自発的、不可逆的に骨類似のアパタイト(HA)へ転換しながら生体内で骨伝導することが示されている(Suzuki et al, Tohoku J Exp Med 1991)。

(2)整形外科領域において外傷や四肢骨腫瘍の切除に伴う骨欠損の治療に骨補填材料として自家骨や同種骨が用いられてきたが、自家骨移植ではその採取量に限界があり、採骨部への侵襲も大きい。同種骨移植では既知・未知のウイルスなどの感染症や抗原性の問題が常にあげられる。これら生体骨に代わる骨補填材料であり、このような問題点を解決できるものとして生体親和性に優れた HA や、吸収性骨補填材として TCP などの人工骨が用いられてきた。このような中、OCP は HA や TCP よりも短期に吸収骨置換する素材であることがラット脛骨骨孔内埋入による動物実験で明らかになっている(Miyatake et al, Biomaterials 2009)。しかしながら OCP は形態維持のための焼結ができず操作性の問題があった。過去にリン酸オクタカルシウム-コラーゲン複合体(OCP/Col)やリン酸オクタカルシウム-ゼラチン複合体(OCP/Gel) (Handa et al, Acta Biomater. 2012)によって操作性の問題は解決され、OCP/Gel の優れた骨伝導、吸収置換性が示されている(Chiba et al, J Biomed Mater Res A. 2016)が、OCP/Gel は骨と同程度の強度は持ち合わせていなかった。そこで、OCP に骨と同等の初期強度を付与する方法として生体分解ポリマーと複合体とする方法が考えられた。

(3)生体内分解性骨片接合材は金属とは異なり生体内埋入後の抜去を必要とせず、骨接合を要する整形外科患者への身体的負担を軽減させ、医療経済的にも優れるとされている。現在市販、臨床応用されている生体内分解性骨接合材として HA 粒子とポリ乳酸(PLLA)の複合体や TCP 粒子と乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)の複合体などがあるが吸収骨置換性は完全ではないか、または吸収骨置換に長期の時間を要する状況である。そこで、HA や TCP よりも吸収骨置換性に優れるとされる OCP を用いた高分子複合体が、生体内分解性を有する人工骨として吸収骨置換性において有用なものとなると考えられた。

### 2. 研究の目的

上記のような背景から、本研究は OCP をポリプロラクトン(PCL)や乳酸・グリコール酸共重合体(PLGA)などの生体分解性高分子素材と複合体とすることで、OCP に賦形を持たせた新規人工骨を作製し、操作性を向上させることを目的とした。さらに吸収骨置換性を持つ新規材料として臨床応用できるか検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)OCP の合成

OCP は、先の報告に基づき、Ca およびリン酸の濃度、pH、温度をもとに OCP が析出する条件となる過飽和度を設定し、湿式法(Suzuki O et al, Tohoku J Exp Med 1991)にて合成した。得られた OCP の顆粒径は一定とした。

#### (2)OCP/PCL 複合体、OCP/PLGA 複合体の作製

合成した OCP 含有量の質量%をかえて、有機溶媒に溶解した生体分解高分子素材(PCL,PLGA)に添加し、OCP 複合体を形成した。得られた複合体を X 線回折、走査型電子顕微鏡で解析した。

#### (3)擬似体液を用いた OCP 複合体のアパタイト形成能評価

ヒト血漿と同等の無機イオン濃度を持つ擬似体液に複合体を浸漬し、OCP 複合体表面での石灰化挙動を評価した。

#### (4)OCP 複合体の生体埋入実験

研究機関の承認を得て、12 週齢 SD ラットの大腿骨遠位骨幹端に作製した径 3 mm の骨孔に、多孔構造を有さない OCP/PCL 複合体、OCP/PLGA 複合体と多孔構造を有する OCP/PLGA 複合体を埋入する動物実験を行った。対照として作製した多孔構造を有する PLGA 単体の埋入と現在臨床応用されている多孔構造を有さない HA/PLLA 複合体の埋入を行った。多孔構造を有さない複合体埋入実験では埋入組織を手摘出後に  $\mu$ CT による検討を行った。多孔構造を有する複合体埋入実験では埋入組織を摘出後に  $\mu$ CT による検討を行い、さらに摘出組織を脱灰した後、組織学的評価(HE 染色、TRAP 染色)を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) OCP 複合体

多孔構造を有さない緻密な OCP/PCL 複合体、OCP/PLGA 複合体と多孔構造を有する OCP/PLGA 複合体(図 1)を作製した。複合体作製後、X線回折により OCP はその結晶相を維持することを確認した。また、高分子との複合化後においても OCP の結晶形態が保たれていることを走査型電子顕微鏡で確認した。OCP は様々な生体分解ポリマーと容易に複合化できることが示され、この複合体は緻密な構造や多孔を有する構造など自由に形成できることを確認した。一方で、複合体中に含有できる OCP 量に上限があることがわかった。



図 1 OCP/PLGA 複合体

##### (2) 擬似体液を用いた OCP 複合体の生体活性評価

生体内で骨伝導性を示す材料は、擬似体液中で石灰化物であるアパタイトを表面に形成する傾向があるとされている。OCP/PCL 複合体はヒト血漿と無機イオン組成がほぼ等しい溶液である擬似体液中において石灰化物の形成がみられた。

##### (3) OCP 複合体の生体埋入実験

ラット大腿骨遠位骨幹端に作製した径 3 mm の骨孔型骨欠損部への埋入実験において、HA/PLLA 複合体、OCP/PCL 複合体とも骨孔への強固な固着がみられた(図 2a, 2b)。OCP/PCL 複合体はすでに臨床で使用されている HA/PLLA 複合体と同様に骨親和性に優れていることが明らかとなった。しかしながら  $\mu$ CT による検討では埋入 24 週において、HA/PLLA 複合体、OCP/PCL 複合体とも生体内における吸収、及び骨置換は進んでいなかった。一方で多孔構造を有さないピン状に形成した OCP/PLGA 複合体は埋入 24 週において吸収骨置換されており、埋入早期の吸収骨置換がみられた。但し、骨癒合を期待する時期より早期に生体内分解・吸収されており、強度の維持と生体内分解・吸収性を遅らせる必要が考えられた。

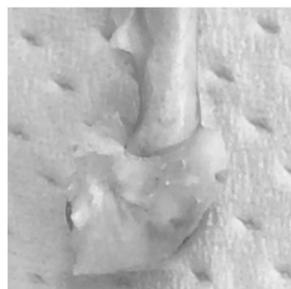
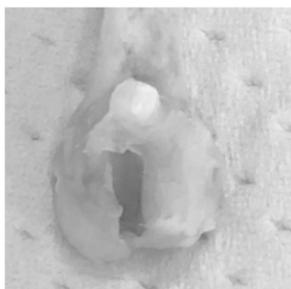


図 2a OCP/PCL 複合体埋入部正面像 図 2b OCP/PCL 複合体埋入部側面像  
埋入 24 週、OCP/PCL 複合体は骨に固着している

OCP/PLGA 複合体の生体内での詳細な情報を得るために、多孔構造を有する OCP/PLGA 複合体をラット大腿骨遠位骨幹端骨孔に埋入した。埋入後の組織を採取し、 $\mu$ CT 画像の撮影を行い、さらに脱灰組織の HE 染色による組織学的評価を行った。OCP/PLGA 複合体埋入部に骨基質と考えられる組織が見られ(図 3a, 3b)、TRAP 染色でも同部位に一致して破骨細胞様細胞が確認できた。これにより OCP/PLGA 複合体が骨伝導性と生体吸収性を示す可能性が示唆された。

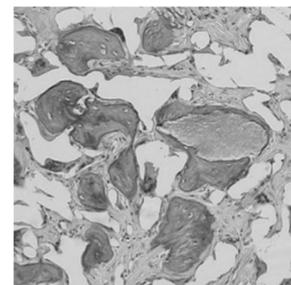
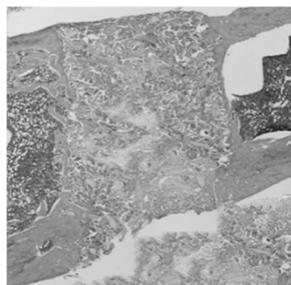


図 3a 埋入部脱灰組織  
埋入部に骨形成がみられる

図 3b 埋入部脱灰組織  
OCP 周囲に骨形成がみられる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木 治、宮武 尚央、今泉 秀樹	4. 巻 46
2. 論文標題 骨補填材リン酸八カルシウムの結晶性状多様性と骨形成活性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本結晶成長学会誌	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.19009/jjacg.46-3-05	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Osamu Suzuki, Kazuyoshi Baba, Yukari Shiwaku, Takahisa Anada, Yu Mori, Ryo Hamai, Kaori Tsuchiya, Itsuki Ooizumi, Naohisa Miyatake, Eiji Itoi
2. 発表標題 Performance of an octacalcium phosphate biomaterial in a long bone defect in ovariectomized rat
3. 学会等名 Society For Biomaterials 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場一慈、塩飽由香利、穴田貴久、濱井瞭、森優、井樋栄二、鈴木治
2. 発表標題 閉経後骨粗鬆症モデルラットにおけるリン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体が骨新生に与える影響
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuyoshi Baba, Yukari Shiwaku, Takahisa Anada, Yu Mori, Ryo Hamai, Kaori Tsuchiya, Itsuki Ooizumi, Naohisa Miyatake, Eiji Itoi, Osamu Suzuki
2. 発表標題 Assessment of the osteogenesis with octacalcium phosphates in bone defect model of osteoporotic rats with ovariectomy
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場一慈、塩飽由香利、穴田貴久、濱井瞭、森優、井樋栄二、鈴木治
2. 発表標題 骨粗鬆症モデルラットによるリン酸オクタカルシウムの骨組織応答性に関する研究
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場一慈、塩飽由香利、穴田貴久、宮武尚央、齋藤慶介、保坂正美、井樋栄二、鈴木治
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウム用量がゼラチンとの複合内の生体内吸収性と骨新生に与える影響
3. 学会等名 第37回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馬場一慈、塩飽由香利、穴田貴久、森優、井樋栄二、鈴木治
2. 発表標題 骨粗鬆症モデルラットによるリン酸オクタカルシウムの骨組織応答性に関する研究
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馬場一慈、塩飽由香利、穴田貴久、宮武尚央、森優、保坂正美、井樋栄二、鈴木治
2. 発表標題 骨粗鬆症モデルラット脛骨骨欠損埋入におけるリン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体の組織反応
3. 学会等名 第39回 東北骨代謝・骨粗鬆症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩飽由香利
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムとハイドロキシアパタイトの炎症性細胞浸潤の比較
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会 バイオマテリアル研究若手交流会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 塩飽由香利
2. 発表標題 リン酸オクタカルシウムの初期炎症反応と骨再生への効果
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鈴木 治
2. 発表標題 骨再生を促進するリン酸ハカルシウム（OCP）骨補填材の開発
3. 学会等名 整形外科バイオマテリアル研究会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大泉樹、塩飽由香利、濱井瞭、森優、穴田貴久、馬場一慈、宮武尚央、土屋香織、井樋栄二、鈴木治
2. 発表標題 リン酸ハカルシウム骨補填材によるラット長管骨の貫通型ドリル欠損の修復に関する検討
3. 学会等名 第41回 東北骨代謝・骨粗鬆症研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 堅太郎 (Suzuki Kentarou) (10747554)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師  (11301)	
研究分担者	穴田 貴久 (Anada Takahisa) (30398466)	九州大学・先導物質化学研究所・准教授  (17102)	
研究分担者	鈴木 治 (Suzuki Osamu) (60374948)	東北大学・歯学研究科・教授  (11301)	
研究分担者	今泉 秀樹 (Imaizumi Hideki) (70250785)	東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師  (11301)	
研究分担者	井樋 栄二 (Itoi Eiji) (80193465)	東北大学・医学系研究科・教授  (11301)	
研究分担者	塩飽 由香利 (Shiwaku Yukari) (80736190)	東北大学・歯学研究科・助教  (11301)	
研究分担者	保坂 正美 (Hosaka Masami) (90302124)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師  (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------