

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10958

研究課題名(和文) 骨補填材を応用した骨癒合促進法の開発

研究課題名(英文) Enhancement of fracture healing using HAp/Col composite

研究代表者

早乙女 進一 (Sotome, Shinichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：20401391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨補填材であるハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)を骨折部に使用することで骨折の治癒を促進できることを動物の実験モデルを用いて証明することができた。また、これにBone morphogenetic protein (BMP)を組み合わせることでさらに骨癒合を促進することも証明することができた。またHAp/Colの滅菌に用いられるガンマ線照射がHAp/Colの性能を低下させることを確認するとともに、ガンマ線照射の影響を軽減させる方法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的な骨折で生じるような小さな骨欠損においてもHAp/Colを充填することは骨癒合を促進できることが確認された。さらにBMPを併用することで飛躍的に骨癒合が促進されることも確認された。ただし、HAp/Colを滅菌するために用いられるガンマ線照射はHAp/Colのコラーゲン線維を変性させることで、骨補填材としての性能だけでなくBMP担体としての性能も著しく低下させることが確認された。また、本研究ではガンマ線照射による影響を軽減させる方法の一つを示すことに成功した。骨折治療において、「骨癒合」という生物学的な治癒過程を促進することができる可能性を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：We proved that Hydroxyapatite/collagen composite (HAp/Col), a bone void filler, enhanced fracture healing using an animal fracture model. In addition, by combining bone morphogenetic protein (BMP) with HAp/Col, the fracture healing enhancement effect of HAp/Col was further augmented.

HAp/Col is sterilized using gamma-ray irradiation. We proved that gamma-ray irradiation impaired the performance of HAp/Col as a bone void filler. To decrease the negative effects of gamma-ray irradiation on HAp/Col, we developed a method that could counteract the effects of gamma-ray irradiation.

研究分野：骨再生、人工骨、骨折

キーワード：HAp/Col BMP 骨癒合促進 ガンマ線

1. 研究開始当初の背景

[骨折治療]骨折治療の原則は、転位した骨をもとの形に戻す「整復」と、整復位を維持するための「固定」である。あとは整復位を維持した状態で「骨癒合」が完了するのを待ちつつ、リハビリを進めることになる。一連の修復過程は受傷直後より始まるが、実際に骨組織が形成され始めるのは2週間前後経過した頃からで、骨癒合が得られるまでには短く見積もっても3週間、骨折部の状況によっては数カ月を要することもある。したがって、受傷前のADLレベルに復帰するには、一般的に6-8週間程度は必要で、社会的、経済的な損失は小さくない。

[HAp/Col]HAp/Colはナノスケールのハイドロキシアパタイト(HAp)がタイプIコラーゲン線維に結合した複合線維(HAp/Col比:80/20)である。これを多孔質体に形成した多孔質HAp/Colは2012年に骨補填材として承認され、2013年より発売が開始された。多孔質HAp/Colを骨欠損に移植した動物実験では、もともと海綿骨組織が存在していた部位だけでなく、より骨幹部に近い部分(脂肪細胞や骨髄細胞で占められる骨髄腔内)においても非常に旺盛な骨形成が見られた。これは、移植したHAp/Colが周囲骨髄の幹細胞や前駆細胞の骨芽細胞分化を刺激したために生じた骨形成で、HAp/Colの高い骨伝導能を証明する現象と考えられる。また、HApはタンパク質やアミノ酸、核酸、脂質、糖質など様々な分子を吸着する特性があり、この特性がHApの骨伝導能にも関係していると考えられる。HAp/Colは前述のとおり、HApを質量比で80%含むだけでなく、含まれるHAp粒子がナノスケールで、かつ一般的なHAp製人工骨と違って焼結されていないため、HApの比表面積が1gあたり75m²と大きく、多量の薬剤を吸着することができ、薬剤担体としても優れた特性を備えていると言える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「骨癒合」という生物学的修復機転に介入することで、骨折治癒を促進する方法を開発し、骨折治療に要する期間を短縮することである。

一般的に、骨折の転位によって間隙が生じても、数mm程度であれば骨癒合することは経験的にわかっているが、我々が行った検討では、小さな間隙でも骨形成が進展する際に障害になることが確認されている。そこで、この小さな間隙を骨伝導能の高いHAp/Colで埋めることで隙間を無くし、骨形成の進展の足場を提供すると同時に、周囲の細胞の骨芽細胞分化を刺激することで、骨癒合を促進できるという仮説のもとに検討を進める。また、HAp/ColのDDSとしての優れた性能を生かすべく、BMPやFGF、PDGF(自己由来)、合成グルココルチコイドなど、骨形成を促進すると考えられる因子の併用もあわせて検討する。なお、全身性の影響を考慮し「骨折部局所での治療」とすること、手術適応のない症例も考慮し「保存的治療でも適応可能な方法」とすること、また、臨床応用を考慮し「既存の技術、薬剤などを応用すること」を基本方針とする。

3. 研究の方法

注入型インプラントの開発：

バインダーを用いて HAp/Col の早期の拡散を抑制し、HAp/Col を骨折部に留められるようなペーストを作成する。【注入型 HAp/Col の作成】生理食塩水の代わりに、バインダーの役割を果たすフィブリン(フィブリノゲン)を含む自己血漿を用いることとする。HAp/Col 線維と血漿を混合して作成した HAp/Col ペーストを骨折部に注入する際には、注入と同時に CaCl₂ 溶液を添加混合し、血漿に含まれる抗凝固剤のクエン酸のキレート効果を中和し、バインダーとなるフィブリンゲルを骨折部に形成させる。しかしながら、HAp/Col は水溶液と混合すると、Ca イオンを溶出したり吸着したりする性質があるため、血漿に含まれるクエン酸の量や、注入時に添加する CaCl₂ の量を最適化する必要がある。そこでまず、理想的な注入投与を可能にするための HAp/Col ペーストの作成条件の最適化を行う。

注入型インプラントのラット大腿骨骨切りモデルでの評価：

ラット大腿骨にプレートを設置し、K-wire、巻きワイヤーなどで固定を行ってから、骨幹部中央に 1mm 幅で骨切りを行った。骨欠損に HAp/Col ペーストを移植し、インプラントの残存や骨癒合促進効果などを評価した。評価はマイクロ CT や組織学的評価で行った。実験群は何も移植しない blank のコントロール群、HAp/Col ペースト群、コラーゲンスポンジに BMP-2 を含浸させた col+BMP 群、HAp/Col ペーストに BMP を加えた HAp/Col+BMP の 4 群とした。

ガンマ線照射の影響：

骨癒合が遅延もしくは癒合不全となるのは、生じた骨欠損が大きい場合が多い。骨欠損部に周囲の筋肉などの軟部組織が侵入し骨癒合を阻害するためと考えられる。そこで筋肉内における HAp/Col の評価を行った。ラット筋肉内に HAp/Col を移植すると移植後早期に漿液腫様の嚢腫が形成されることが分かった。ガンマ線照射によるコラーゲンの変性が嚢腫形成の原因である可能性が最も疑われた。

そこで、ガンマ線照射量の違う 4 種類のインプラント (0, 5, 35, 50kGy) を作成しラット筋肉内に移植した。

ガンマ線照射の影響を軽減する方法の検討：

ガンマ線照射は HAp/Col をインプラントとして使用するために製造の最終工程で 25 ~ 35kGy 照射される。ガンマ線照射の前にはコラーゲン線維どうしを架橋するために加熱架橋 (140 °C、14 時間) の工程がある。そこで、この順番を入れ替えて、ガンマ線照射によりコラーゲン線維が分断された後に加熱架橋を行うことで、滅菌性を担保しつつ、少なくとも架橋に関してはガンマ線照射の影響を回避できると考えた。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

既存の方法 (架橋 ガンマ線照射) で作成した HAp/Col インプラント (0, 5, 35, 50kGy) と順序を入れ替えた方法 (ガンマ線照射 架橋) で作成したインプラント (35kGy-R) を用意し、ラット筋肉内に移植を行った。

HAp/Col の BMP 担体としての性能 :

HAp/Col による骨癒合促進において BMP の併用は最も期待される手法の一つである。

そこで多孔質 Hp/Col (0, 35kGy 群、35kGy-R 群) に BMP を含浸させ、ラットの筋肉内に移植し、異所性骨誘導能の評価を行った。

HAp/Col の物理的分断の影響 :

HAp/Col はガンマ線照射により力学強度が低下する。また、架橋とガンマ線照射の順番を入れ替えることで、嚢腫形成が抑制されるだけでなく、力学的強度も向上することが確認されている。嚢腫形成が抑制される理由として、力学的に強度が向上することでインプラントが移植後に分断化しにくくなるというメカニズムが考えられる。そこで PEEK 製のケージを作成し、その中に HAp/Col (0, 35kGy 群、35kGy-R 群) を入れることで周囲組織からの力学的負荷を回避させてウサギの筋肉内に移植した。

また、これらの HAp/Col に BMP を含浸させたインプラントの移植も行い、異所性骨誘導に関して評価を行った。

4. 研究成果

注入型インプラントの開発 :

注入型 HAp/Col ペーストの作製 : 骨折部位の投与するための HAp/Col ペーストの作製を試みた。生食を混合しただけで作成したペーストが移植後早期に拡散してしまうことを受けて、拡散予防に血漿をつなぎとして使用することを考案し試作を行った。血漿はキレート剤としてクエン酸を含んだ凝固抑制剤を用いて作成したが、HAp/Col 線維と混合すると HAp/Col 自身からクエン酸のキレート効果を中和するほどの Ca イオンが溶出しだまができてしまうことが分かった。これはクエン酸の濃度を高めても改善しなかった。

注入型インプラントのラット大腿骨骨切りモデルでの評価 :

移植後 8 週において全例大腿骨を摘出した。徒手テストではコントロール群では 1 例も骨癒合していなかった。HAp/Col ペースト群では 8 例中 2 例、col+BMP 群では 8 例中 5 例、HAp/Col+BMP 群では 8 例中全 8 例で骨癒合が得られていた。マイクロ CT による欠損部での骨形成量評価でも同様の傾向で、コントロール群 < HAp/Col 群 < col 群+BMP 群 < HAp/Col+BMP 群であった。これらの結果より、HAp/Col ペーストを骨欠損部に注入することで骨癒合を促進することができ、これに BMP を添加することで劇的に骨癒合を促進できることが確認できた。

ガンマ線照射の影響：

35, 50kGy 照射群において移植後 1 週ですでに HAp/Col が嚢腫状に膨化していることが確認された。0, 5kGy 群で嚢腫が形成されなかったことから、嚢腫形成の原因はガンマ線照射によるコラーゲンの変性であることが確認された。

ガンマ線照射の影響を軽減する方法の検討

既存の方法で作成したインプラントのうち 35, 50kGy 群が嚢腫を形成したのに対し、0, 5kGy 群は嚢腫を形成しなかった。また、35kGy-R 群は 35kGy を照射したにも関わらず嚢腫を形成しなかった。嚢腫を形成した群では炎症細胞や分断化した HAp/Col を貪食していると考えられる多核巨細胞が多数認められた。このことから、ガンマ線照射後に架橋をおこなうことで、ガンマ線照射によるコラーゲン線維への影響を軽減できることが確認できた。

HAp/Col の BMP 担体としての性能：

移植後 2 週、4 週で摘出し CT 評価、組織学的評価などを行った。移植後 2 週において 0, 35kGy-R を移植した部位ではインプラントと同形状の旺盛な骨形成が認められた。それに対し、35kGy 群では嚢腫が形成され、その嚢腫に沿ったわずかな骨形成が認められただけだった。骨形成量が少ないだけでなく、嚢腫状の骨形成により本来狙っていた形状の骨形成を得ることも難しいと考えられた。

HAp/Col の物理的分断の影響：

0, 35kGy-R 群が嚢腫を形成しなかったのに対し、力学的負荷のかかりにくい PEEK ケージ内にも関わらず、35kGy 群では嚢腫を形成した。このことから嚢腫形成は力学的負荷により強度の低下した HAp/Col が分断化することが原因ではなく、ガンマ線照射によりコラーゲンが変性することが原因であることが確認された。

また BMP を併用した骨誘導実験は 0, 35kGy-R 群でインプラントと同形状の旺盛な骨形成を認めたのに対し、35kGy 群では嚢腫状（殻状）の骨形成を認めただけだった。

これらの結果より、一般的な骨折で生じるような小さな骨欠損においても HAp/Col を充填することは骨癒合を促進できることが確認された。さらに BMP を併用することで飛躍的に骨癒合が促進されることも確認された。ただし、HAp/Col を滅菌するために用いられるガンマ線照射は HAp/Col のコラーゲン線維を変成させることで、骨補填材としての性能だけでなく BMP 担体としての性能も著しく低下させることが確認された。また、本研究ではガンマ線照射による影響を軽減させる方法の一つを示すことに成功した。

本研究の成果を組み合わせることで、骨折治療において、「骨癒合」という生物学的な治癒過程を促進することができる可能性を示すことに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大木 崇宏、江川 聡、松本 連平、平井 敬悟、吉井 俊貴、湯浅 将人、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）の各種抗菌剤の吸着性とラット生体 内の経時的抗菌作用についての検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平井 敬悟、江川 聡、松本 連平、湯浅 将人、吉井 俊貴、大川 淳、中島 武彦、早乙女 進一
2. 発表標題 ガンマ線照射が多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）に与える影響—筋組織内での評価
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 連平、江川 聡、平井 敬悟、山田 剛史、湯浅 将人、吉井 俊貴、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 乳癌骨転移モデルラットに対するパクリタキセル 含浸HAp Col による局所制御実験
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早乙女 進一、松本 連平、江川 聡、平井 敬悟、湯浅 将人、吉井 俊貴、大川 淳
2. 発表標題 骨形成を促進する薬剤担体としてのハイドロキシ アパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉井 俊貴、早乙女 進一、江川 聡、平井 敬悟、松本 連平、平井 高志、湯浅 将人、猪瀬 弘之、新井 容嘉、大川 淳
2. 発表標題 当科で開発した人工骨，多孔質ハイドロキシアパタイト コラーゲン複合体の脊椎固定術における 臨床使用と骨癒合評価
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江川 聡、松本 連平、平井 敬悟、吉井 俊貴、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 ラット大腿骨急性骨髄炎モデルにおける抗菌剤含 有ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 (HAp Col) の治療効果
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平井 敬悟、江川 聡、松本 連平、早乙女 進一
2. 発表標題 ヒドロキシアパタイト/コラーゲンペーストおよび骨形成タンパク質-2による骨折治癒の増強
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江川聡，韋 雪涛，早乙女 進一，吉井 俊貴，山田 剛史，安田 裕亮，松本 連平，大川 淳
2. 発表標題 骨再生と骨癒合促進 BMP-2の担体としてハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(HAp/Col)ペーストを移植したラット大腿骨骨欠損モデルにおける骨癒合への影響に関する検討
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017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	大川 淳 (Okawa Atsushi) (30251507)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究 分担者	吉井 俊貴 (Yoshii Toshitaka) (50583754)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	