

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04462

研究課題名（和文）骨再生を誘導する骨セメントの開発とその利用によるMasquelet法の革新的改良

研究課題名（英文）Development of bone cements that induce bone regeneration and innovative improvement of Masquelet method by using them

研究代表者

上高原 理暢（Kamitakahara, Masanobu）

東北大学・環境科学研究科・教授

研究者番号：80362854

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨再生能力が高いリン酸カルシウムからなる球状多孔質顆粒を、水との反応により水酸アパタイトを形成して硬化するリン酸カルシウム粉末からなる結合材と混合してセメントとした。これにより、硬化体の気孔率が高く、ミクロ孔とマクロ孔を有する多孔質なセメントの作製に成功した。このセメントの硬化体を、我々の提案する改良型Masquelet法でラットの骨欠損部に移植したところ、断端周辺から骨再生挙動が見られることを明らかにし、作製したセメントと改良型Masquelet法の有用性を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、大きな骨欠損に対する画期的な再建法としてMasqueletらが提唱した手術法が注目され、わが国でも実施され始めている。しかし、患者自身から大量の骨の採取が必要であるため、患者の負担が非常に大きい。本研究では、患者からの骨の採取をできるだけ減らしつつ早期の骨再生を可能とする治療法の開発につながる研究である。高い骨再生能力を示す可能性のあるセメントの作製に成功し、それをを用いた新たな治療方法の可能性も示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Cements were prepared by mixing spherical porous granules made of calcium phosphate with high bone regeneration ability and the calcium phosphate powder, which sets by forming hydroxyapatite when reacting with water, as a binding material. We succeeded in preparation of porous cements with macropores and micropores. We transplanted the set cement into the bone defect site of rats using the improved Masquelet method we proposed and revealed the bone regeneration behavior from around the edge. We revealed the usefulness of the prepared cements and the improved Masquelet method.

研究分野：生体材料学

キーワード：骨再生 リン酸カルシウム セメント Masquelet法

### 1. 研究開始当初の背景

骨は再生能が高い組織であるが、大きな骨欠損は修復が困難であり、ある大きさ以上の骨欠損は自然治癒が見込めない。しかし、医療現場では大きな骨欠損を有する患者が絶えることはなく、治療法の開発は重要な課題である。近年、大きな骨欠損に対する画期的な再建法として Masquelet らが提唱した Masquelet 法( Induced Membrane 法)が注目され、わが国でも実施され始めている。Masquelet 法の概略を図 1 に示す。まず、一期手術において、骨欠損部にポリメチルメタクリレート (PMMA) 骨セメントをスペーサーとして充填し、Induced membrane と呼ばれる線維性被膜の形成を行う。4~8 週間後に、二期手術において、この被膜を温存したまま、PMMA 骨セメントを抜去し、被膜の中に患者自身から採取した自家骨を移植する。この方法では、温存された被膜が骨再生を促進することが報告されている。大きな骨欠損も治療可能となる画期的方法である。しかしながら、なぜ治療成績がよいかの理論的な裏付け研究は乏しく、PMMA 骨セメントがなぜ骨再生に適した被膜(環境)を構築できるか等不明な点が多い。また、二期手術で膜の内側の骨欠損部位に充填するのは自家骨であり、採取できる量に限りがあるとともに、大量の自家骨の採取が必要であるため、侵襲が大きいことが臨床最大の問題である。

### 2. 研究の目的

応募者らは、「スペーサーの挿入により被包化反応で創部を早期に修復させ、スペーサー除去後に自家骨移植することで骨代謝サイトカイン環境をもたらし、骨修復を促している」との独自仮説を提案している。本研究では、この修復環境を模倣できる骨再生を促す新規なリン酸カルシウムセメントを開発し、それを用いて、自家移植を伴わず大きな骨欠損が修復可能とする革新的改良型 Masquelet 法を提案し、その実現可能性を調べることを目的とした。応募者らの提案する改良型 Masquelet 法においては、骨欠損部に本研究で開発する、骨代謝を誘導する骨再生能の高いリン酸カルシウムセメントを充填する。次に、軟組織と接する部分のみ高分子膜で覆う。化学的に安定で癒着も起こさず線維性被膜をその表面に形成する高分子膜で覆うことで炎症を早期に鎮めるとともに線維組織の侵入を抑える。これにより、創部の修復を促しつつ骨代謝環境の構築を同時に行う。その後、従来 of Masquelet 法と同様に、線維性被膜の形成を行わせる。被膜形成後には高分子膜のみを抜去し、その後の骨再生を促進させる。革新的改良型 Masquelet 法を確立できれば、自家骨採取が不要になり患者の負担が減る、線維性被膜形成中にも骨端部からの骨再生が期待できるので早期の治癒が期待できる、高分子膜の抜去は硬くてバルク状の PMMA セメントの抜去よりも容易であり手術時間が短縮できる、等のメリットが期待でき、患者の負担を大きく減らすことが出来る。

本研究では、骨再生能の高いリン酸カルシウムセメントを得るために、組成と微構造を制御したリン酸カルシウムセメントの作製を試み、その特性を評価した。さらに、動物実験において Masquelet 法および改良型 Masquelet 法のモデルを構築するとともに、それらのモデルを用いた材料評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 高い骨再生能力を示すリン酸カルシウムセメントの作製と評価

改良型 Masquelet 法においては、骨代謝を誘導する骨再生能の高いリン酸カルシウムセメントが必要となる。高い骨再生能力を発揮させるセメントを得るために、組成と微構造を制御したリン酸カルシウムセメントの作製に取り組んだ。

#### 顆粒の特性がセメントの微細構造と特性に及ぼす影響の評価

リン酸カルシウム材料に高い再生能力を持たせるためには、マクロ気孔と呼ばれる 100 マイクロメートル以上の気孔と 1 マイクロメートル以下のミクロ気孔が重要であることが報告されている。そこで、リン酸カルシウムに制御したマクロ気孔とミクロ気孔を持たせる方法として、微構造を制御した顆粒がつながって硬化するリン酸カルシウムセメントの作製に取り組んだ。まずは、顆粒の気孔率や形状が得られるセメントに与える影響を調べるために、以下のモデルとなる実験を行った。

-リン酸三カルシウム( -TCP) 顆粒とリン酸溶液からなるセメント系を選択し、顆粒の特性がセメントの微細構造と特性に及ぼす影響を調べた。気孔率の高い球状多孔質 -TCP 顆粒と気孔率の低い不定形多孔質 -TCP 顆粒を作製し、これらをリン酸溶液と混合して硬化させた。硬化後のセメントについて、結晶相、気孔構造、強度、溶解特性

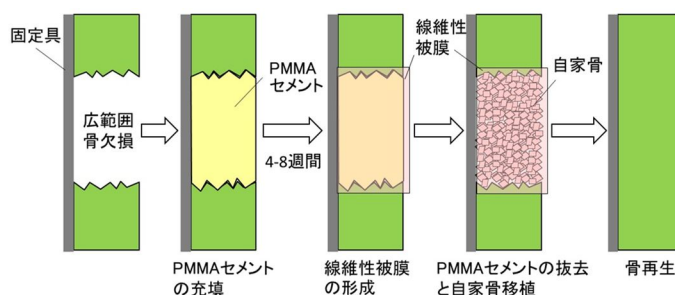


図 1 Masquelet 法の概略図 .

などを調べた。

#### 高い骨再生能力の高い顆粒を用いたセメントの作製と評価

-リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) 顆粒を作製し、これを水熱処理することにより、骨再生を促す Ca 欠損組成の水酸アパタイト (CDHA) 柱状粒子からなる球状多孔質 CDHA 顆粒を作製した。また、 $\beta$ -TCP 顆粒を酸性の酢酸緩衝液で処理することで、リン酸八カルシウム (OCP) からなる球状多孔質 OCP 顆粒を作製した。OCP は、高い骨再生能力を示すことが報告されている。これらの球状多孔質顆粒に、水との反応により水酸アパタイト (HA) を形成して硬化するリン酸カルシウム粉末とアルギン酸水溶液を混合してセメントとした。セメントの硬化挙動を 37 °C の条件で調べるとともに、ペースト硬化後のセメントについて、結晶相、気孔構造、強度、溶解特性および細胞との親和性を調べた。

#### (2) Masquelet 法モデルの構築と改良型 Masquelet 法でのセメントの評価

まず、ラットにおいて従来の Masquelet 法モデルを構築し、一期手術において PMMA セメントを移植し、その後の二期手術において PMMA セメントを抜去しそこに人工骨を埋植して、従来の Masquelet 法における PMMA セメントの役割について調べた。

次に、骨再生能力が高いカルシウム欠損水酸アパタイト (CDHA) からなる球状多孔質顆粒を、水との反応により水酸アパタイトを形成して硬化するリン酸カルシウム粉末を結合材として用いて結合させて硬化させたセメントを、我々の提案する改良型 Masquelet 法に基づいてラットの骨欠損部に移植し、セメントの生物学的評価と改良型 Masquelet 法の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) マクロ細孔とミクロ細孔を備えたリン酸カルシウムセメントの作製と評価

顆粒の特性がセメントの微細構造と特性に及ぼす影響の評価

これらのセメントは、 $\beta$ -TCP とリン酸の反応によりリン酸水素カルシウム・二水和物を生成して硬化した。図 2 に作製した高气孔率の球状多孔質顆粒と低気孔率の不定形多孔質顆粒の写真と、それらを用いて作製したセメントの硬化後の外観および微構造の写真を示す。高气孔率の球状多孔質顆粒を用いた場合、顆粒はセメント中に均一に充填され、顆粒間に形成されるマクロ気孔のサイズ分布は、低気孔率の不定形多孔質顆粒を使用して作製したセメントよりも狭くなった。高い気孔率を有する球状多孔質顆粒からは、高い気孔率を有するセメントが得られた。高い気孔率を有する球形顆粒を用いて作製したセメントは、低い気孔率を有する不定形顆粒を用いて作製したセメントよりも低い圧縮強度を示したが、高い溶解速度を示した。この結果より、マクロ気孔とミクロ気孔を制御するために多孔質な顆粒を結合させてセメントを作製することが有効であることを明らかにできた。

#### 骨再生能力の高い顆粒を用いたセメントの作製と評価

これらのセメントは、結合材成分が HA を生成することで硬化した。CDHA 顆粒を用いた場合にも OCP 顆粒を用いた場合にも、これらのペーストが、37 °C の環境下で硬化することを明らかにした。硬化体の気孔率は約 80% と高く、気孔率の高いセメントが得られた。さらに、水銀圧入試験により気孔径分布を調べると、1 マイクロメートル程度の

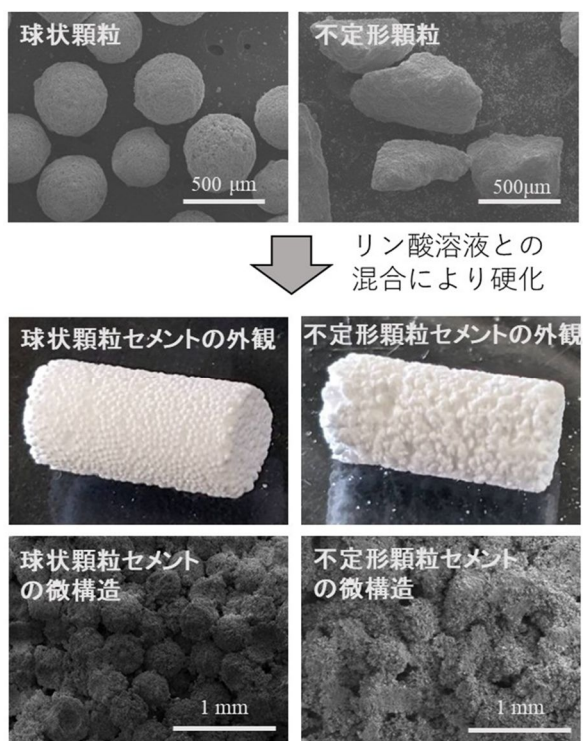


図 2 高气孔率の球状多孔質顆粒と低気孔率の不定形多孔質顆粒の写真と、それらを用いて作製したセメントの硬化後の外観および微構造の写真。

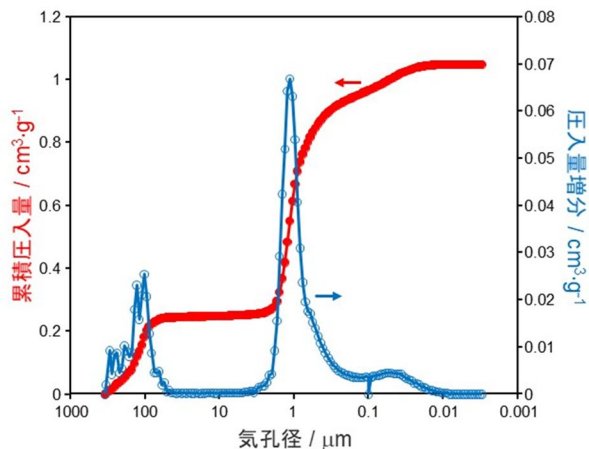


図 3 CDHA 顆粒を用いたセメントの水銀圧入

ミクロ気孔と100マイクロメートル程度の比較的な大きなマクロ気孔を有することを明らかにした(図3)。硬化体の圧縮強度を測定したところ、1 MPa程度とそれほど高い強度は示さなかったが、荷重のかからない患部には十分適用できる程度の圧縮強度を示した。酸性緩衝液を用いた溶解試験において、球状多孔質顆粒を添加して硬化させた試料は、リン酸カルシウム粉末のみで硬化させた試料に比べ高い溶解速度を示した。すなわち、球状多孔質顆粒を組み込むことで、セメントの微構造の制御に成功し、溶解性の高い新規リン酸カルシウムセメントの創製に成功した。さらに、OCP顆粒を用いたセメントの方が、CDHAセメントを用いたセメントよりも高い溶解速度を示した。これらのセメントの硬化体について、骨芽細胞様細胞および破骨細胞様細胞培養により生物学的特性を評価

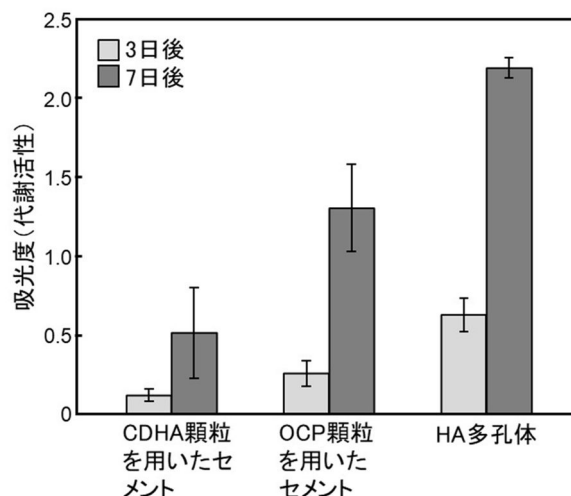


図4 各試料上での骨芽細胞様細胞の代謝活性。(HA多孔体は比較試料)

したところ、多孔体表面においても、市販されているHA多孔体人工骨と同様に、細胞が増殖すること(図4)および硬化体の内部まで細胞が侵入することを明らかにした。

## (2) Masquelet法モデルの構築と改良型Masquelet法でのセメントの評価

これまでにあまり報告例のないラットを用いたMasquelet法モデルの構築に成功した。そのモデルを用いて、従来のMasquelet法においては、一期手術においては、PMMAセメントの移植が、欠損部において骨形成環境を構築する上で、重要であることを明らかにした。

さらに、我々の提案する改良型Masquelet法である高分子フィルムで覆って埋入するという手法に基づいてラットの骨欠損部に移植し、セメントの生物学的評価と改良型Masquelet法の評価を実施した。従来のMasquelet法で必要となるPMMAセメント移植のための一期手術および自家骨なしに、断端周辺から骨再生挙動が見られることを明らかにした。一方で、骨再生は断端周辺が旺盛であったものの断端から離れたところは骨形成が不十分であったため、より骨再生能力の高いセメントを得るための改良についても取り組む必要があることも明らかになった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Masanobu Kamitakahara, Airi Ishii, Hideaki Matsubara, Masakazu Kawashita, Maiko Furuya, Hiroyasu Kanetaka	4. 巻 129
2. 論文標題 Fabrication and evaluation of ascorbic acid phosphate-loaded spherical porous hydroxyapatite/octacalcium phosphate granules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the Ceramic Society of Japan	6. 最初と最後の頁 60～65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2109/jcersj2.20170	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masanobu Kamitakahara, Kanau Asahara, Hideaki Matsubara	4. 巻 10
2. 論文標題 Calcium phosphate cements comprising spherical porous calcium phosphate granules: synthesis, structure, and properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Asian Ceramic Societies	6. 最初と最後の頁 731～738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21870764.2022.2123514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 上高原 理暢、梅津 将喜	4. 巻 106
2. 論文標題 リン酸カルシウム球状多孔質顆粒の作製とその医療応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PHOSPHORUS LETTER	6. 最初と最後の頁 7～17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 伊藤 佑一郎、加藤 大夢、梅津 将喜、上高原 理暢	4. 巻 70
2. 論文標題 球状多孔質 型リン酸三カルシウム顆粒を用いたセメントの作製と評価	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy	6. 最初と最後の頁 242～247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2497/jjspm.70.242	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kanau Asahara, Masanobu Kamitakahara, Hideaki Matsubara
2. 発表標題 Microstructure control of calcium phosphate bone cement by using granular raw materials
3. 学会等名 2019年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原叶, 上高原理暢, 松原秀彰
2. 発表標題 球状多孔体を組み込んだリン酸カルシウム骨セメントの微構造制御
3. 学会等名 金属材料研究所共同研究ワークショップ 日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原叶, 上高原理暢, 松原秀彰
2. 発表標題 リン酸カルシウム骨セメントの微構造と溶解特性の関係
3. 学会等名 無機マテリアル学会第139回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅原叶, 上高原理暢, 松原秀彰
2. 発表標題 リン酸カルシウム骨セメントの微構造制御と特性・性能評価
3. 学会等名 第58回セラミックス基礎科学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanobu Kamitakahara
2. 発表標題 Preparation of calcium phosphate ceramics for bone repair by using solution process
3. 学会等名 令和2年度化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上高原理暢
2. 発表標題 水溶液プロセスを利用したリン酸カルシウム人工骨の作製
3. 学会等名 資源・素材学会 東北支部 2021（令和3）年度 春季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤大夢、梅津将喜、上高原理暢、松原秀彰
2. 発表標題 球状多孔体を用いた多孔質リン酸カルシウムセメントの設計と作製
3. 学会等名 日本セラミックス協会 第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤大夢、梅津将喜、上高原理暢、松原秀彰
2. 発表標題 骨再生のための球状多孔体を用いた多孔質リン酸カルシウムセメントの作製
3. 学会等名 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ（金研WS）-日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤大夢、浅原叶、上高原理暢、松原秀彰
2. 発表標題 リン酸カルシウム球状多孔体を組み込んだ多孔質リン酸カルシウムセメントの作製と評価
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会 2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上高原理暢、加藤大夢、浅原叶、梅津将喜、松原秀彰
2. 発表標題 多孔質球状顆粒を用いて微構造を制御した多孔質リン酸カルシウムセメントの作製
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会・第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤大夢、梅津将喜、上高原理暢、松原秀彰
2. 発表標題 骨再生のための球状多孔体を用いた多孔質リン酸カルシウムセメントの作製と評価
3. 学会等名 第60回セラミックス基礎科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上高原理暢、加藤大夢、梅津将喜
2. 発表標題 リン酸ハカルシウム析出による硬化反応を利用した多孔質リン酸カルシウムセメントの作製
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会 2022年度春季大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 伊藤佑一郎、加藤大夢、梅津将喜、上高原 理暢
2. 発表標題 形状と気孔率の異なる 型リン酸三カルシウム顆粒を用いたセメントの作製と評価
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会 2022年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤佑一郎、加藤大夢、梅津将喜、上高原 理暢
2. 発表標題 種々の 型リン酸三カルシウム顆粒を用いた連通孔を有するセメントの作製
3. 学会等名 令和4年度 日本セラミックス協会 東北北海道支部研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaki Umetsu, Yuichiro Ito, Hiromu Kato, Masanobu Kamitakahara
2. 発表標題 Fabrication and Evaluation of Porous Calcium Phosphate Cements with Controlled Microstructure Using Spherical Porous Granules
3. 学会等名 20th Asian BioCeramics Symposium (ABC2022) (国際学会)
4. 発表年 2022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	池田 通  (Ikeda Tohru)  (00211029)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	奥田 貴俊  (Okuda Takatoshi)  (00348955)	順天堂大学・医学部・准教授    (32620)	

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