

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05118

研究課題名（和文）分解性高分子とリン酸カルシウムセメントを複合した生体内で多孔化する骨置換材の開発

研究課題名（英文）Next-generation self-hardening calcium phosphate cement containing the degradable polymer for a suitable bone substitute material

研究代表者

豊田 宏光 (Toyoda, Hiromitsu)

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50514238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルギン酸含有量の異なる4種類のリン酸カルシウムセメント（calcium phosphate cement：以下CPC）（0, 0.5, 1.0, 2.0g）を作成し、硬化時間、圧縮強度、表面構造を検証した。結果、アルギン酸を配合することで、硬化時間の短縮、圧縮強度の増加、多孔性の獲得を得ることができた。生体内では、アルギン酸2.0gを含有した群で対象群よりも早期に生体骨に置換することを確認した。また、アルギン酸2.0gを含有した硬化液群で対象群と比較して統計学的に有意に新生骨量が増加していた（ $P=0.015$ ）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工骨補填材料であるリン酸カルシウムセメント（calcium phosphate cement：以下CPC）は骨伝導能や生体親和性がある生体材料である。しかし、硬化時間が長く、崩壊性があり、強度が弱い事が欠点である。この問題点を解消するために、CPC作成時に分解性高分子を配合することに着想した。CPCにアルギン酸を配合することで、充填時の緻密体から生体内で多孔化が進み、細胞浸潤に有利な環境がもたらされ、生体骨へ置換、骨再生が促進した可能性を示すことができた。本材料は骨欠損部の補填だけでなく、骨再生や再建に寄与できると考える。

研究成果の概要（英文）：This study investigated whether mixing low viscosity alginic acid with calcium phosphate cement (CPC) causes interconnected porosity in the CPC and enhances bone replacement by improving the biological interactions. Furthermore, we hypothesized that low viscosity alginic acid would shorten the setting time of CPC and improve its strength. CPC samples were prepared with 0, 5, 10, and 20% low viscosity alginic acid. In vivo study was conducted by placing CPC in a hole created on the femur of New Zealand white rabbit. Micro-computed tomography and histological examination were performed 6 weeks after implantation. When incorporating a maximum amount of alginic acid, the new bone mass was significantly higher than the control group ($P = 0.0153$). These biological responses are promising for the translation of these biomaterials and their commercialization for clinic applications.

研究分野：整形外科

キーワード：骨セメント 骨補填材料 リン酸カルシウム アルギン酸 キトサン

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来に伴い骨粗鬆症の有病者数は1000万人を超え、増加の一途をたどっている。また、高齢化比率の上昇に伴う要介護者の増加は早急に対策を要する社会問題である。骨粗鬆症性椎体骨折は、骨粗鬆症による脆弱性骨折のうち最多で、有病率は60歳代8-13%、70歳代30-40%と報告され (Kitazawa A et al: J Bone Miner Metab. 19: 115-118, 2001)、骨折後の平均臥床日数は42日、日常生活動作が制限された平均日数は242日と報告されている (Nevitt MC et al: Arch Intern Med. 10:160(1): 77-85, 2000)。

骨粗鬆症性椎体骨折は一般的には予後良好な骨折とされているが、長期間保存治療を行っても骨癒合が得られずそのまま寝たきりとなる予後不良症例が存在する。申請者が所属する教室で行った多施設前向き研究では、一般的な保存治療を行っても骨癒合不全が約15%に発生していることを明らかにした (Tsuji T et al: Spine. 1:36(15):1229-35, 2011)。骨癒合不全に陥った椎体骨折患者は難治性の病態に移行しやすく、継続する激しい疼痛のために歩行や座位保持が困難となったり、遅発性神経障害を併発しやすく、一般的には手術療法が適応となる。近年は、骨折椎体内に骨補填材料を充填する Balloon kyphoplasty を含む椎体形成術が施行されるようになり、外科的治療の低侵襲化が進んでいる。椎体形成術は、変形した骨折部に骨補填材料を経皮的に充填し、圧潰した椎体高を還元させて安定化させる低侵襲手術であり、近年は骨癒合不全に陥ることが予想される患者に骨折部が悪化する前に早期に施行することで臨床成績が向上することが報告されている (Hoshino M et al: Spine. 15:44(2):110-117, 2019)。骨補填材料の研究開発は、骨粗鬆症性椎体骨折のみならず多くの運動器疾患の臨床成績向上に寄与する。

骨充填材料には、リン酸カルシウムペースト(calcium phosphate cement; CPC)、ハイドロキシアパタイト(Hydroxyapatite ; HA)、骨セメント(polymethyl metacrylate; PMMA)などがある。PMMAは、重合熱を発生することや骨親和性がないこと、CPCやHAは初期強度が不十分であるという問題点がある。理想的な骨補填材料は、①椎体内で速やかに最強強度まで硬化すること、②荷重等の負荷がかかっても崩壊しないこと、③生体内で異物として認識されないこと、④周囲骨組織と経時的に癒合できることの4点を満たす材料である。

2. 研究の目的

CPCは骨伝導能や生体親和性がある生体材料である。しかし、硬化時間が長く、崩壊性があり、強度が弱い事が欠点である。この問題点を解消するために、CPC作成時に分解性高分子を配合することを着想した。分担研究者の横川は、種々の分解性高分子の中からCPCに高用量アルギン酸を配合することで初期強度を克服する知見を得た。アルギン酸は生体分解性の高分子で、生体適合性があるため広く臨床応用のための基礎研究に用いられている。本研究の目的は、CPCにアルギン酸を配合することで得られる生体反応について検証し、臨床応用可能な理想的な骨補填材料となりうるか動物実験で立証することである。

3. 研究の方法

アルギン酸含有量の異なる4種類のCPC(0, 0.5, 1.0, 2.0g)を作成し、硬化時間、圧縮強度、電子顕微鏡による表面構造を比較した。また、白色家兎の大腿骨遠位外側に直径4mmの骨孔を作成し本材料を充填する実験モデルを作成し、X線、マイクロCT、組織評価を行った。

1) アルギン酸含有CPC

CPCはリン酸4カルシウムとリン酸2カルシウム2水和物を混和したものを使用し、硬化液にアルギン酸を0~2g添加して、アルギン酸含有量の異なる4種類のCPC(0, 0.5, 1.0, 2.0g)を作成した。硬化液のpH値、CPCの初期硬化時間、初期硬化後の圧縮強度を評価した。生体内での多孔性を確認するため、CPC0とCPC3を擬似体液に浸漬させ、表面構造の変化を走査電子顕微鏡を用いて比較した。

	組成	CPC0	CPC1	CPC2	CPC3
硬化液	MilliQ water (g)	10.0	10.0	10.0	10.0
	Alginate acid (g)	—	0.5	1.0	2.0
	K ₂ HPO ₄ (g)	0.2	0.2	0.2	0.2
	KH ₂ PO ₄ (g)	0.1	0.1	0.1	0.1

2) ウサギ大腿骨骨孔モデル



生体骨内反応を検証するために、ニュージーランドホワイトラビット（メス、リタイヤ、体重：4-4.5kg）の大腿骨顆部に critical defect と呼ばれる自然経過で修復されることのない直径 4mm の骨孔を作製し、上記 4 種類の CPC を充填した。サンプル数は各群 5 匹とし各種評価を行った。単純 X 線を術後、3、6 週で撮影。マイクロ CT、組織学的評価を術後 6 週に施行した。

組織像は骨孔中心を通る axial で切断した面を用いて確認し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色、Masson-trichrome (MT) 染色、TRAP 染色などを行い、CPC の溶解度や CPC 内への骨芽細胞、破骨細胞の浸潤について評価した。また、CPC 充填部の新生骨については、画像解析ソフトの image J を用いて測定し各群の新生骨量を比較した。

4. 研究成果

1) 硬化液の pH 値、初期硬化時間

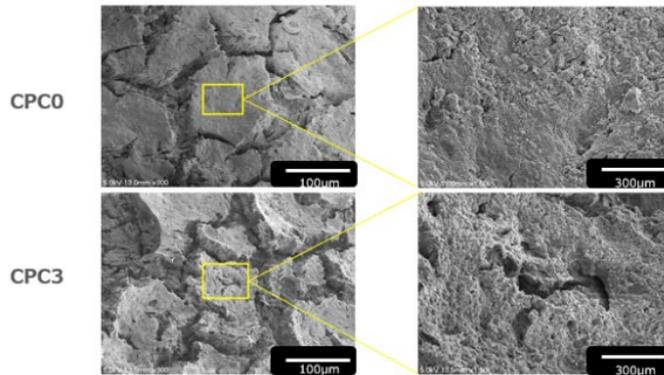
アルギン酸を配合することで、pH は低下し、硬化時間の短縮、圧縮強度の増加を認めた

	Liquid 0 (CPC0)	Liquid 1 (CPC1)	Liquid 2 (CPC2)	Liquid 3 (CPC3)
pH	7.21 ± 0.05	7.05 ± 0.04*	7.11 ± 0.03*	7.00 ± 0.05*
Setting time (min)	56 ± 4.6	20 ± 1.7*	17 ± 2.6*	11.5 ± 0.5*
Compressive strength (MPa)	7.3 ± 2.1	16.3 ± 3.7	34.9 ± 4.1*	46.7 ± 8.6*

*P < 0.05, each liquid/CPC group versus Liquid 0/CPC0 group

2) 電子顕微鏡による表面構造比較

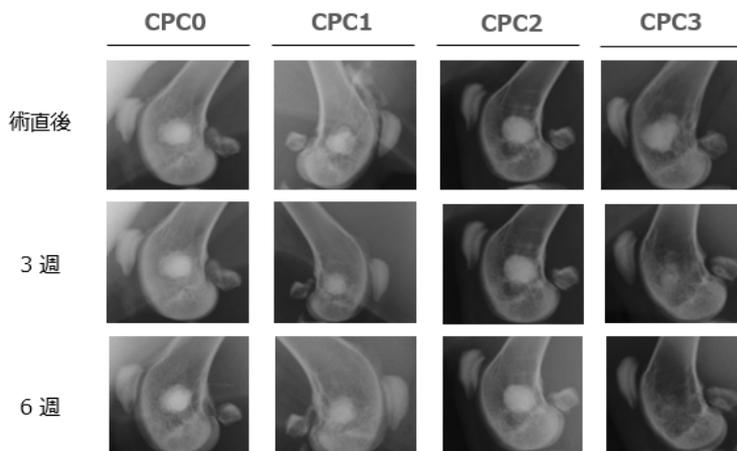
アルギン酸を配合することで表面の多孔性の獲得、細孔の拡大を認めた



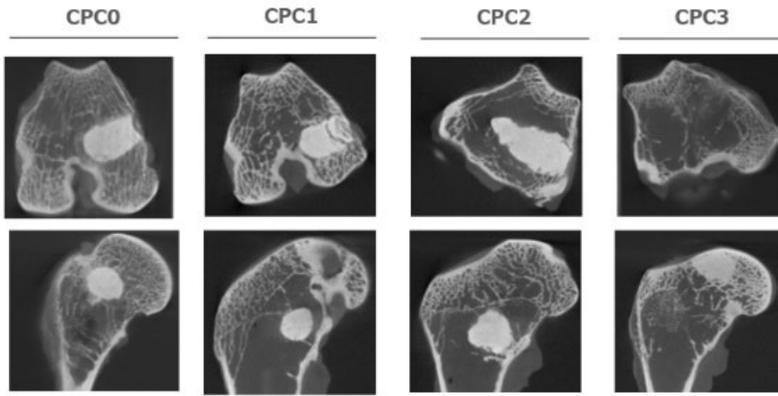
2) 単純 X 線像、マイクロ CT 画像

単純 X 線像では術後 6 週時点でアルギン酸 2 g 含有の CPC3 で CPC の吸収像がみられた。

単純X線像



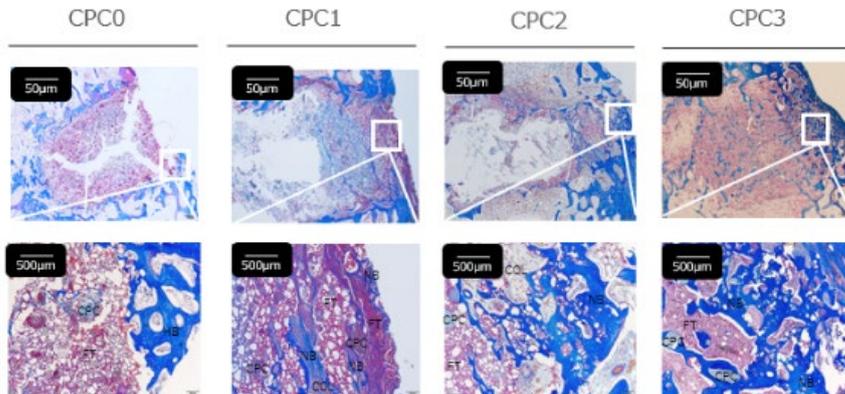
マイクロCT画像 (6週)



3) 組織学的評価

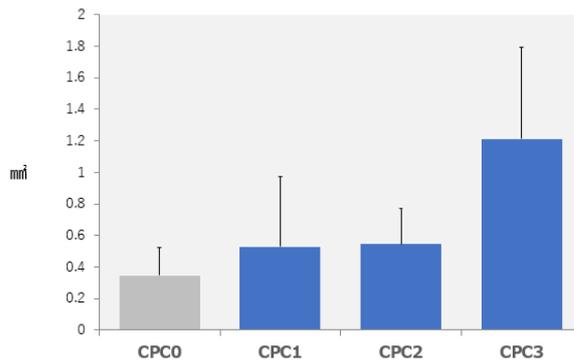
MT染色ではCPC0と比較してCPC1~3群で青く染まった新生骨領域を多く認め、生体内では、アルギン酸 2.0g を含有した群で対象群よりも早期に生体骨に置換することを確認した。また、アルギン酸 2.0g を含有した硬化液群で対象群と比較して統計学的に有意に新生骨量が増加していた ($P=0.015$)。

MT染色組織像 (6週)



COL: Collagen, FT: Fibrous Tissue, HB: Host Bone, NB: New Bone

新生骨面積 (6週)



3) まとめ

CPCは硬化後、一般的に高い密度の微細構造となるため、骨伝導能を有していても、破骨細胞等の細胞がセメント内に浸潤しにくく、周囲の生体骨に置換されにくい。CPCにアルギン酸を配合することで、充填時の緻密体から生体内で多孔化が進み、細胞浸潤に有利な環境がもたらされ、生体骨へ置換、骨再生が促進した可能性を示すことができた。本材料は骨欠損部の補填だけではなく、骨再生や再建に寄与することができた。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shimatani Akiyoshi, Toyoda Hiromitsu, Orita Kumi, Ibara Yuta, Yokogawa Yoshiyuki, Nakamura Hiroaki	4. 巻 32
2. 論文標題 A bone replacement-type calcium phosphate cement that becomes more porous in vivo by incorporating a degradable polymer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Materials Science: Materials in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10856-021-06555-1	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 嶋谷 彰芳、豊田 宏光、折田 久美、横川 善之、中村 博亮
2. 発表標題 分解性高分子を配合した生体内で多孔化する骨置換型リン酸カルシウムセメントの開発
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.osaka-cu.ac.jp/ja/news/2021/210630-2

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	横川 善之 (Yokogawa Yoshiyuki) (20358310)	大阪公立大学・大学院工学研究科・名誉教授 (24402)	

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	折田 久美 (Orita Kumi) (40748597)	大阪公立大学・大学院医学研究科・博士研究員 (24402)	

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