

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10180

研究課題名(和文)多孔質炭酸アパタイト・魚コラーゲン複合体をスキャフォールドとした戦略的骨再生治療

研究課題名(英文) Strategic bone reproduction using scaffold of porous carbonate apatite granules/fish-derived collagen composite

研究代表者

工藤 景子 (KUDOH, Keiko)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70380029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らが人工合成に成功した炭酸アパタイト(CAP)は、骨置換性を有する新規骨補填材として、既に臨床で使用されているが、「多孔化」やコラーゲンとの複合化による「操作性の向上」などの改良を進めている。本研究では、骨形成に最適な多孔質CAP・魚うるこコラーゲン複合体作製条件を確立することで新規骨再建材料の開発を目指した。

【結果】鑷子で把持でき、ハサミで成形可能なゲル状の多孔質CAP・魚うるこコラーゲン複合体の作製に成功した。同複合体は、in vivo実験において良好な生体親和性と骨形成能を有しており、骨再生のスキャフォールドとして骨再生治療において利用でき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

炭酸アパタイト(CAP)は、骨置換性を有する骨補填材として、既に臨床で使用されていたが、より速い骨の再生・骨結合のための「多孔化」や術中飛散や術後の移動などの問題に対しての「操作性向上」などの改善の必要があった。本研究において、鑷子で把持でき、ハサミで成形可能なゲル状の多孔質CAP・魚うるこコラーゲン複合体の作製に成功し、in vivoでの安全性および骨再生能を確認できた。特に、複合体材料として、人獣共通病原体の報告がない魚類由来のコラーゲンを用いたことにより、安全性の高い骨補填材の開発が可能となった。今後、多孔質CAP・魚うるこコラーゲン複合体の骨再生治療材料としての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Carbonate apatite (CAP) granules were approved as an artificial bone substitute and commercially available that can be used in all maxillofacial and dental fields. Although the CAP granules possess many desirable properties, those inherent accurate granulation makes problems such as intraoperative materials scattering or postoperative materials migration. In this study, we have engineered a scaffold constructed of synthetic porous CAP granules and fish-derived collagen sponge (CAP granules /FC) and investigated whether the porous CAP granules /FC composites could improve bone regeneration.

【Results】We succeeded in manufactured of porous CAP granules /FC composites which were elastic and could be greppable by forceps, bendable, and cuttable with scissors. Furthermore, the biodegradable porous CAP granules /FC composites were replaced by newly formed bone without any adverse responses. Therefore, this newly developed type of composite may be useful for bone tissue engineering.

研究分野：口腔外科、再生医療

キーワード：炭酸アパタイト 魚コラーゲン スキャフォールド 骨再生

1. 研究開始当初の背景

歯科領域では、炎症や嚢胞、腫瘍などの治療の結果として、骨欠損を生じることが多い。自家骨移植では、健常部位への外科的侵襲、採取できる骨の量や形態の制限、移植後の吸収などの問題がある。これらの問題を解決するために、ハイドロキシアパタイトなどの骨補填材が使用されてきたが、吸収性に劣るため、異物として残遺し、感染源となる問題があった (Cottrell DA et al. *J Oral Maxillofacial Surg*, 56, 935-41, 1998)。

当教室では、九州大学との共同研究で生体骨の主成分である炭酸アパタイト (以下 CAP) の人工合成に世界で初めて成功した。CAP は、生体内での反応性が高く、生体内で吸収され、骨に置換する。本材料は、治験と薬事承認を経て、2018 年 2 月に株式会社ジーシーからサイトランス グラニュール®として市販されている。歯科用インプラント埋入のための骨造成術に本邦で唯一承認された骨補填材である。

しかし、サイトランスは緻密顆粒である。より速い骨の再生、骨結合のためには、骨形成を促進する多孔化が必須である。また、顆粒は術中に飛散や術後の移動などの問題があるため操作性の向上が望まれていた。

本研究では、骨形成に最適な多孔質 CAP・魚うろこコラーゲン複合体作製条件を確立することで新規骨再生材料を開発し、最終的には顎骨再建への応用を目指した。

2. 研究の目的

(1) CAP・魚うろこコラーゲン複合体の骨形成に最良な作製条件を検討し、操作性の良い新規骨再生スキャフォールドを開発する。

(2) *in vivo*における CAP・魚うろこコラーゲン複合体の安全性と骨再生能を確認し、顎骨欠損部での臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) CAP・魚うろこコラーゲン複合体の作製

3%魚うろこコラーゲン(セルキャンパス FD08G;多木化学株式会社)と CAP 顆粒(径 300-600 μm)を混合する(CAP 顆粒の含有量は 20~40w%で調整)。両者の混合物をシリコーン製の型枠* (直径 9 mm、高さ 1 mm)に充填し、凍結乾燥したものを線滅菌し、複合体を作製する。(*シリコーンの型枠を替えれば、サイズや形を自由自在に調整可能。)

(2) CAP 魚うろこコラーゲン複合体の工学的分析

CAP・魚うろこコラーゲン複合体に対して走査型電子顕微鏡による形態学的観察や X-Ray diffractometry patterns ならびに Fourier transform-infrared spectra による分析を行う。

(3) 実験動物 (頭蓋骨の骨欠損モデル) における生体親和性と骨再生の評価

CAP・魚うろこコラーゲン複合体を、Wister 系ラット (雄、12 週齢) の頭蓋骨に直径 9 mm のトレフィンバーで作製した骨欠損に充填する (ラットの場合、クリティカルサイズは 8mm)。対照群は CAP 緻密顆粒 (径 300-600 μm) とする。移植 2、4 週後に試料を摘出し、組織像 (HE 染色) やマイクロ CT を用いて試料の吸収量、新生骨量を測定し、複合体試料

の有用性を評価する。特に、生体親和性や顆粒の飛散状況、術後の移動についての評価が重要と考えている。

(4) CAP・魚うろこコラーゲン複合体を用いた異所性骨再生能の検討

CAP・魚うろこコラーゲン複合体に近交系ラット骨髓幹細胞を含んだ細胞懸濁液を滴下する。24時間培養後に、ラット背部皮下に移植する(図1)。移植2、4週後に試料を摘出し、病理組織やマイクロCTなどにより吸収量、新生骨量を測定する。対照は細胞を含まない複合体試料とする。これにより、複合体試料をスキャフォールドとして使用した異所性の骨形成について検討する。

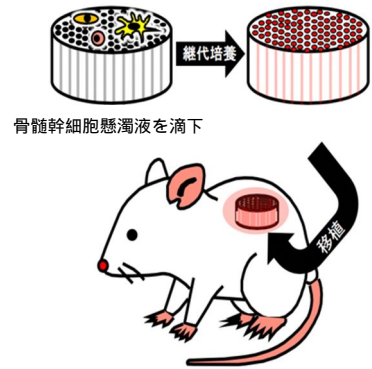


図1. 骨髄幹細胞懸濁液をCAP/魚うろこコラーゲン複合体に滴下して24時間培養し、ラットの背部皮下に移植したイメージ図

4. 研究成果

(1) 鑷子で把持でき、折り曲げや剪刀での成形可能なCAP・魚うろこコラーゲン複合体の作製に成功した(図2)。



図2. CAP/魚うろこコラーゲンの外観

走査型電子顕微鏡像(図3)

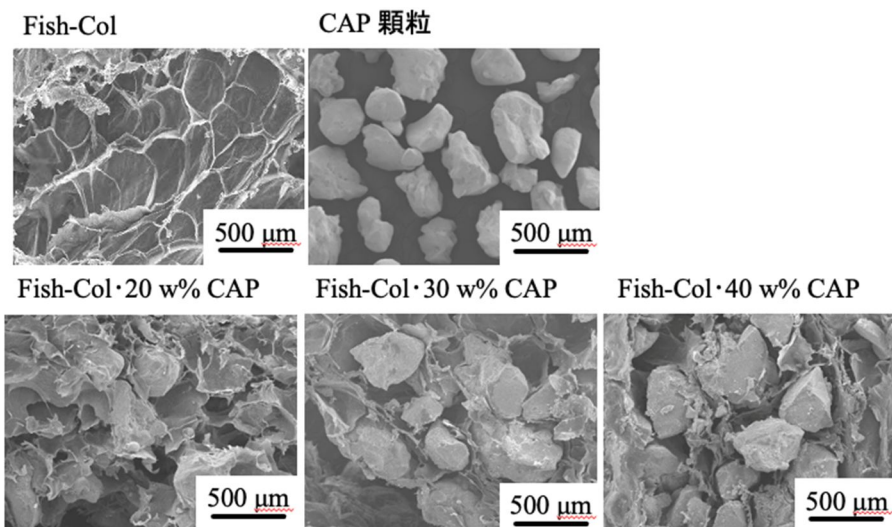


図3. CAP/魚うろこコラーゲンとCAP顆粒の走査型電子顕微鏡像

X-Ray diffractometry patterns、Fourier transform-infrared spectra (図 4)
 CAP・魚うるこコラーゲン複合体は、CAP 顆粒試料と同じ波形を示した。

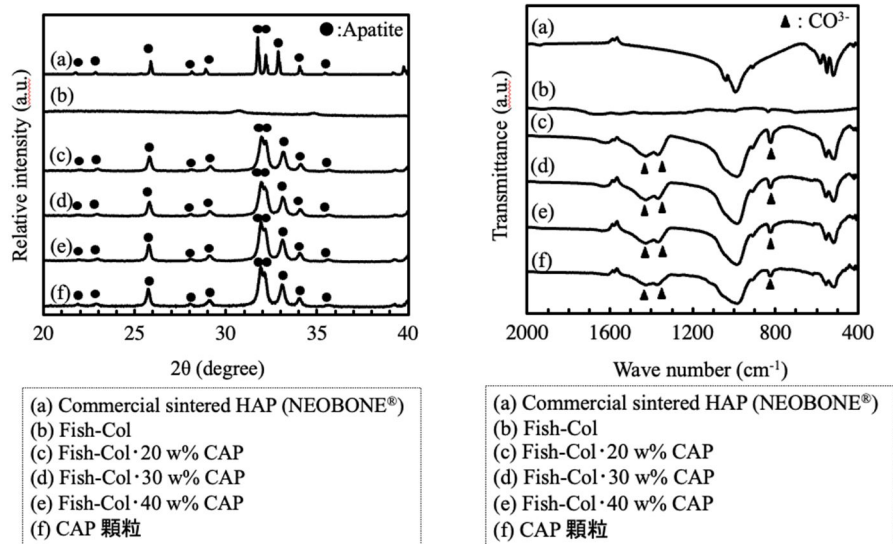


図 4 . X-Ray diffractometry patterns (左) と Fourier transform-infrared spectra (右)

(2) CAP・魚うるこコラーゲン複合体は、鑷子で把持できるため、実験動物の骨欠損部へ容易に埋植でき、CAP 顆粒試料と比較すると操作性に優れていた (図 5)。

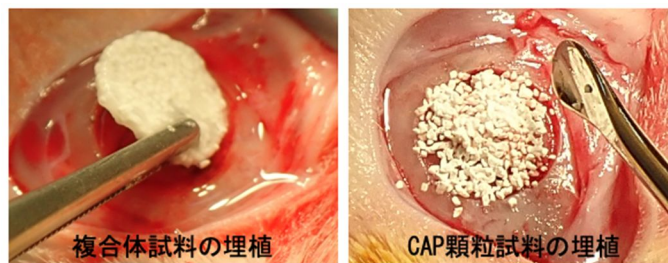


図 5 . CAP/魚うるこコラーゲンと CAP 顆粒をラット頭蓋骨骨欠損部へ埋植

(3) CAP・魚うるこコラーゲン複合体をラット骨欠損部へ埋植したところ、術後の飛散は CAP 顆粒試料よりも少なかった。一方、CAP 顆粒試料と同等の良好な生体親和性と骨形性能を有していた。

摘出体のマイクロ CT 像 (図 6)

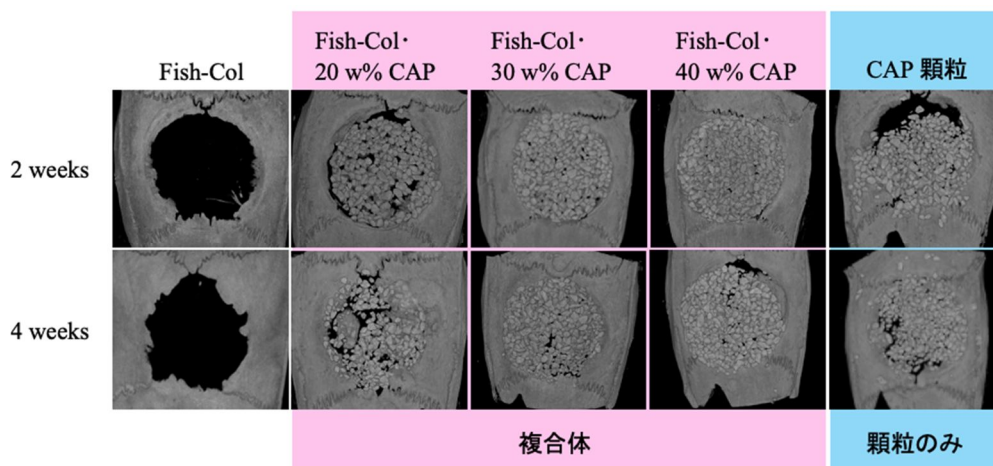


図 6 . マイクロ CT 像

摘出体の HE 染色像 (図 7)

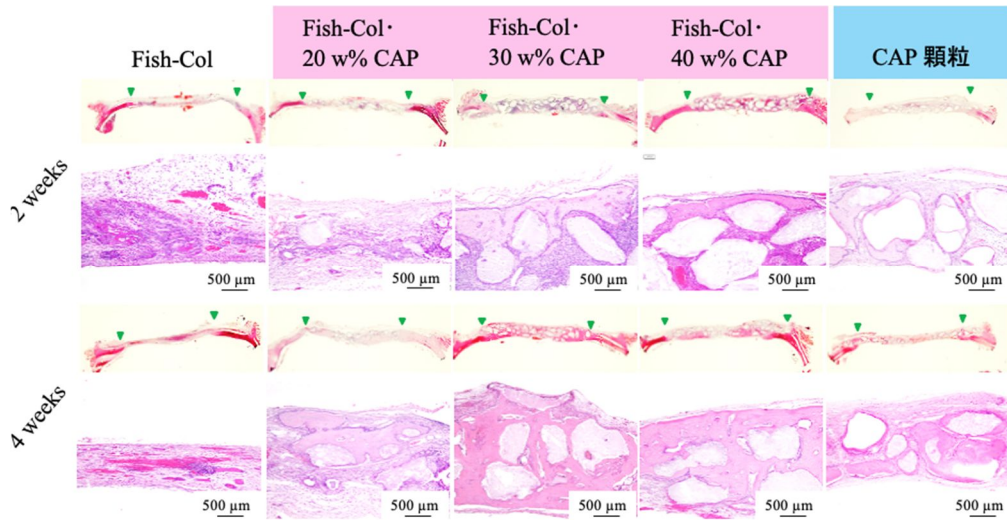


図 7 . HE 染色像

(4) CAP・魚うろこコラーゲン複合体をラット背部皮下へ埋植し、異所性の骨形性能について検討したが、明らかな骨形成は認められなかった。これについては、今後、再生医療の三要素 (細胞、シグナルおよびスキャフォールド) のうち細胞やシグナルなどの条件を検討することにより、実現出来るようにしたいと考えている。

< 結論 >

本研究において、人獣共通ウイルスの影響を受けない魚うろこコラーゲンと CAP との複合体試料を作製することに成功した。操作性に優れるだけでなく、in vivo 実験では、生体親和性も良好で、骨形性能にも優れていた。

当初は、ウサギの顎骨再建モデルへの応用も検討していたが、研究期間中に実現出来なかった。今後は、口腔外科での臨床応用を目指し、ウサギやビーグル犬などの顎骨離断モデルのような比較的大きい骨欠損部への埋植についても検討する必要があると考えている。

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 Keiko Kudoh, Naoyuki Fukuda, Kazuya Akita, Takaharu Kudoh, Natsumi Takamaru, Naito Kurio, Koichiro Hayashi, Kunio Ishikawa, Youji Miyamoto	4. 巻 34
2. 論文標題 Reconstruction of rabbit mandibular bone defects using carbonate apatite honeycomb blocks with an interconnected porous structure	5. 発行年 2023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/s10856-022-06710-2	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤景子、福田直志、秋田和也、工藤隆治、椋本修平、高丸菜都美、栗尾奈愛、鎌田久美子、宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト顆粒と魚うろこコラーゲンの複合化による新規骨補填材の開発
3. 学会等名 第66回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤景子、福田直志、秋田和也、工藤隆治、高丸菜都美、栗尾奈愛、宮本洋二
2. 発表標題 ハニカム構造を有する炭酸アパタイト多孔体によるウサギ下顎骨再建への応用
3. 学会等名 第67回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
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	宮本 洋二 (MIYAMOTO Youji) (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授 (16101)	

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	石川 邦夫 (ISHIKAWA Kunio) (90202952)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	福田 直志 (FUKUDA Naoyuki) (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教 (16101)	
研究分担者	工藤 隆治 (KUDOH Takaharu) (10263865)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教 (16101)	
研究分担者	山村 佳子 (YAMAMURA Yoshiko) (00581406)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教 (16101)	
研究分担者	栗尾 奈愛 (KURIO Naito) (80622141)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

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