

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基礎研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591910  
 研究課題名（和文）短期完全吸収骨置換型ペースト状人工骨の開発  
 研究課題名（英文）A study of injectable osteoconductive bone substitute materials  
 研究代表者  
 今泉 秀樹（IMAIZUMI HIDEKI）  
 東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
 研究者番号：70250785

研究成果の概要（和文）：  
 本研究は、骨再生用担体材料(リン酸オクタカルシウム;OCP)にヒアルロン酸(HyA)を加えてペースト状にすることで OCP の操作性を改善する複合体を作製し、実際にマウス頭蓋骨上へ移植して材料の骨形成能と吸収性を検討することを目的とした。3 年間の研究期間で、複合体は OCP の操作性を改善し、動物実験においてマウス頭蓋骨上に良好な骨新生を生じ且つ高い吸収性を示すことを明らかにした。複合体は OCP に新たな形態付与性を獲得させ整形外科領域の様々な形状、大きさの骨欠損部へ利用可能な新しい人工骨材料となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：  
 Octacalcium phosphate (OCP) crystals, having particular stoichiometric composition, have been shown to display a stimulatory capacity on osteoblastic differentiation and bone regeneration. Synthesized OCP crystals show higher biocompatibility and are expected to be an artificial bioabsorbable material. On the other hand, its brittleness based on the ceramics characteristics makes it difficult to mold the objective shape. In the present study, we created a new OCP materials combined with hyaluronan (Hya), which could be used as the injectable form, and examined their bone regenerative properties on mouse calvaria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：再生医工学  
 科研費の分科・細目：外科系臨床医学  
 キーワード：リン酸カルシウム、ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

リン酸オクタカルシウム(OCP)はハイドロキシアパタイトの前駆物質であり、アパタイトへの転換過程でカルシウムイオンを取り込みリン酸イオンを放出する際に骨伝

導を起こす。人工合成 OCP は生体親和性に優れた生体吸収性骨再生材料として期待されている(Suzuki O. Acta Biomater 6:3379, 2010)。OCPは優れた生体吸収性を示す一方、合成過程において OCP 相での焼結ができず

粉体状であるために形態維持が困難であり、操作性の問題から臨床での使用が難しい状況であった。この問題点を解決するためこれまでにいくつもの形態付与材料が検討されてきた。コラーゲンやゼラチン、PLLA や PLGA などの使用が検討され (Handa T et al. Acta Biomater 8:1190, 2012)、実際にコラーゲンとゼラチンの複合体を作製、ラット頭蓋骨欠損モデルへの埋入実験を行い、優れた骨伝導能と生体吸収性が再現され、臨床に応用可能な形態を OCP に付与できることを証明してきた。一方、整形外科領域において外傷による骨折、股関節や膝関節などの変形性関節症、骨腫瘍などの術後に生じる複雑かつ大規模な骨欠損部の補填には操作性が良くいかなる形状の骨欠損にも充填可能なペースト状人工骨の使用が望まれている。今回、生体に広く分布する細胞外基質であるヒアルロン酸 (HyA) の OCP への形態付与材料としての可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

我々は形態付与材料として使用する HyA が生体に広く存在する物質であり、既に合成された HyA が様々な臨床現場で使用されていることに注目した。HyA は適度な粘度と流動性を備えており OCP と混合することによってペースト状の複合体を作製できる可能性があると考えた。

本研究の目的は、粉体状の OCP 顆粒に HyA を加えることでシリンジに充填、排出可能な複合体を作製すること、この複合体を実際に動物へ移植できる実験モデルを確立すること、そして実際に複合体を動物へ移植しその骨形成能と生体吸収性を組織学的に評価し臨床応用への可能性を検討することである。

## 3. 研究の方法

### ①OCP/HyA 複合体材料の作製

OCP 結晶は研究分担者である Suzuki らが開発した高温下連続合成法 (特 3115642; Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 164:37, 1991) に習い作製した。顆粒の大きさが一定なるように整粒した。フーリエ変換赤外分光光度計と X 線回折装置を用いて材料の結晶構造を評価した。

続いて HyA は、すでに臨床での使用が認可され国内で市販されている関節注射様剤のうち分子量の異なる 3 種類の製剤を用意した (各々分子量約 90 万、約 190 万、約 600 万)。これらを常温下に混合し、OCP/HyA 複合体を作製した。

### ②動物実験

ICR 系マウス 8 週齢オスと SD 系ラット 8 週齢オスの 2 種類を用いて複合体の埋入実験を行った。

マウス実験モデルは、Matsui ら (Tissue Eng 16: 139, 2010) がラット頭蓋骨に行った方法を参考にして独自に開発した。全身麻酔下に、頭部へ約 15mm の皮切を行った。頭蓋骨を十分に露出させて骨膜を剥離した後、テフロン製の円筒状リング (内径 6mm 高さ 1mm) を頭蓋骨上へ直接接着した。シリンジに充填した複合体をリング内部へ注入した後、複合体のリング外への流出を予防するために 100  $\mu$ m のテフロンシートをリングの表面にかぶせた。3、6、9 週のタイムポイントでマウスを安楽死させ頭蓋骨を採取し、得られた組織を固定・脱灰後、HE 染色を行って評価した。

ラット実験モデルの作製は Kamakura らの報告を参考にして行った (J Biomed Mater Res B Appl Biomater 79: 210, 2006)。全身麻酔下にラット頭蓋骨上へ約 25mm の皮切を行った。骨膜を切開した後、歯科用トレフィンバーを用いて頭蓋骨上に直径 10mm、厚さ 1mm の骨欠損を作製した。シリンジに複合体を充填し骨欠損部に複合体を注入した。埋入後、骨膜を縫合した。4、8 週に頭蓋骨を採取し、軟 X 線と HE 染色による組織学的評価を行った。

## 4. 研究成果

前述の方法で人工的に合成した OCP は顆粒の大きさを調整し、今回使用した 3 種類の HyA との混合比がいずれも等しくなるように作製した。複合体は排出口径 2mm のシリンジに充填し排出操作が可能な状態にすることが可能であった (図 1)。

また人工合成 OCP とこれらの複合体をフーリエ変換赤外分光光度計と X 線回折装置を用いて結晶構造を同定したところ、各々に OCP が持つ特徴的なピーク値を確認することができた。以上から今回作製した OCP/HyA 複合体は OCP の特徴を持った人工骨材料であると考えられた。

ゲル状になった複合体材料はシリンジに充填可能でありシリンジのピストンを緩やかに押し出すことでシリンジ先端の排出口から容易に排出することが出来た。材料は支持性に乏しい一方で柔軟に形状を変化させることが可能であり、様々な大きさや形そして容量のことなる骨欠損モデルに隙間なく充填することが可能であった。

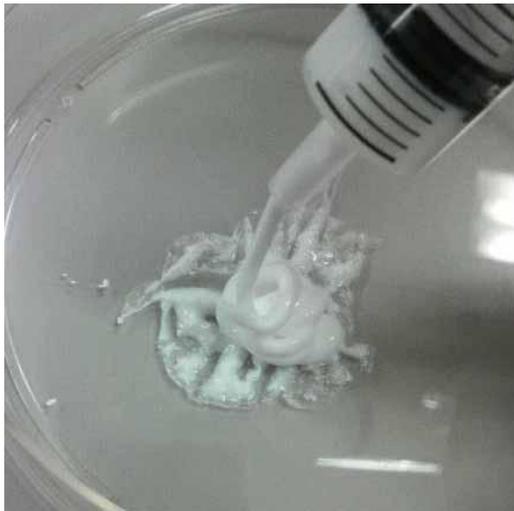


図 1. OCP/HyA 複合体

マウス頭蓋骨における埋入実験モデルは各タイムポイントで組織学的に安定した再現性が得られた。3 週のタイムポイントでは各複合体に僅かであるが明らかな骨形成がみられた。骨形成率は複合体群が OCP 担体よりやや高く、生体吸収性はほぼ同等であった。骨形成は OCP の周囲にみられ、所々に破骨細胞様細胞がみられた。6 週になると複合体群、OCP 担体共に明らかな骨形成がみられた(図 2A-D)。新生骨内には小血管を伴った骨髓腔様の構造物が形成され、特に複合体群に顕著であった。3 週に比べて各材料共に吸収されていたが OCP 担体と各複合体群の間に明らかな有意差はみられなかった。9 週になると全ての複合体群、OCP 担体ともさらに骨形成が促進されていた。また明らかな有意差はみられなかったが、OCP 担体、複合体群ともほぼ生体に吸収されていた。

ラット頭蓋骨モデルにおいて、複合体群、OCP 担体ともに 4 週の評価で軟 X 線、組織学的評価において骨欠損はほとんど埋まらず明らかな骨形成がみられなかった。8 週の軟 X 線撮影にて骨欠損部の周囲に僅かな骨形成がみられたが、組織学的に評価すると骨欠損部の骨形成量は極少量であった。この動物実験モデルの結果に関して、今後の課題として検討の余地があるが、現時点では本実験系は骨欠損および周囲組織の状況から見て injectable 材料の評価には使い難いと判断した。

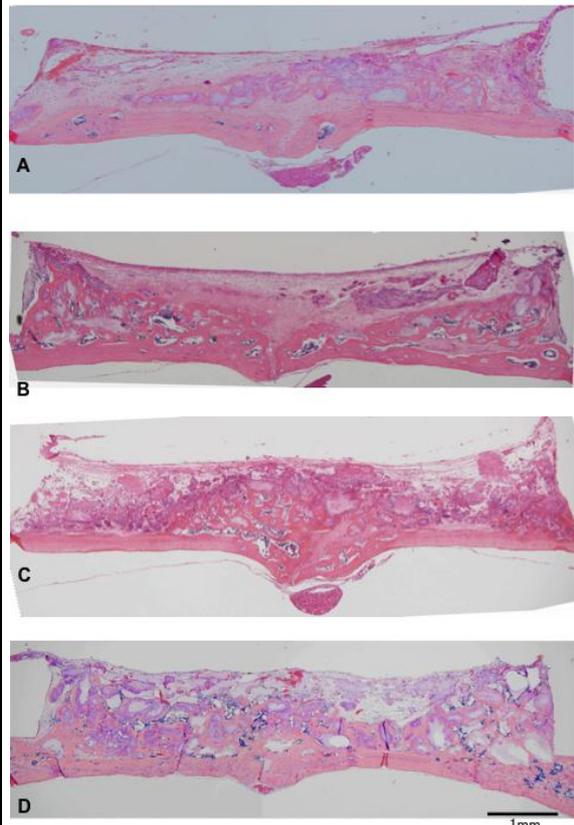


図 2. 6 週の各材料の組織図(HE 染色)、A: OCP、B: OCP/HyA90、C: OCP/HyA190、D: OCP/HyA600

今回の我々の実験結果より、HyA は OCP に injectable な形態を付与して操作性を向上させることが可能であることが分かった。また複合体は HyA の持つ適度な粘度と流動性を喪失させなかった。

また動物実験による骨形成の再現性はマウス実験モデルにおいて OCP に劣らない骨形成能を示すことで証明された。以上から OCP/HyA 複合体は OCP 担体に劣らない骨形成能を持つ材料であると考えられた。

複合体は様々な形状の骨欠損に対して簡易に充填を行うことができる OCP 材料として、臨床への応用が期待できる可能性があると考えられた。今後の実験では、まず新生骨組織の組織計測を行なって定量評価による OCP/HyA の優位性を適切な埋入期間にて確実に検証し、本実験と同様の小動物による骨形成能を十分に確認した上で、本材料を臨床に使用することを前提に中型以上の動物実験を行い、再現性の高い動物実験モデルの方法を確立させ、複合体材料の骨形成能と臨床の場での有用性を証明していく予定である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

- (1) Miyazaki T, Miyauchi S, Anada T, Imaizumi H, Suzuki O. Evaluation of osteoclastic resorption activity using calcium phosphate coating combined with labeled polyanion. Analytical Biochemistry, 410, 7-12, 2011. 査読有り

〔学会発表〕 (計 2 件)

- (1) Suzuki K, Anada T, Honda Y, Imaizumi H, Miyatake N, Kishimoto K, Itoi E, Suzuki O. Development of injectable octacalcium phosphate-hyaluronan complex as a bone substitute material. Orthopaedic Research Society, February 4-7, 2012, San Francisco.
- (2) 鈴木 堅太郎、穴田 貴久、本田 義知、今泉 秀樹、宮武 尚央、岸本 光司、井樋 栄二、鈴木 治、リン酸オクタカルシウム-ヒアルロン酸複合体材料の開発、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、2011年10月20日、21日、京都

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

今泉 秀樹 (IMAIZUMI HIDEKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師  
研究者番号：70250785

(2) 研究分担者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：60374948

井樋 栄二 (ITOI EIJI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80193465

岸本 光司 (KISHIMOTO KOUSHI)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：10344665

(3) 連携研究者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：30398466