様式Ｃ－１９

# 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　５月１４日現在

機関番号：12602
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2010～2011
課題番号：22890055
研究課題名（和文）　注入型多孔質ポリウレタンｓｃａｆｆｏｌｄを使用した骨再生

研究課題名（英文）Bone regeneration using injectable polyurethane scaffold

研究代表者
吉井　俊貴（YOSHII TOSHITAKA）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50583754

研究成果の概要（和文）：In vitro での注入型ポリウレタン（PUR）scaffold の形態を、電子顕微鏡写真にて観察し、連通性多孔質構造を有することを確認した。またハイドロキシアパタイト、β三リン酸を加えた場合の PUR scaffold が良好な力学的特性、骨伝導性を有することを確認した。注入型 PUR の実際の骨欠損部での形態評価を行い in vivo で良好な多孔質構造を形成することを確認した。また PUR 注入後 2、4 週にラットを Sacrifice し、欠損部の骨形成について観察を行い、良好な骨形成を確認した。また PUR に Bone anabolic effect を有するスタチン（ロバスタチン）を加えると骨形成が促進される傾向にあった。今後、注入型 PUR と Bone anabolic effect を有する薬剤による効果的な骨再生が期待される。

研究成果の概要（英文）：Abstract: We observed morphology of the injectable polyurethane (PUR) scaffold in *in vitro* using scanning electron microscope, which demonstrated porous structures with interconnected pores. An addition of calcium phosphate (hydroxyapatite, tricalcium phosphate) to PUR resulted in good mechanical property and onsteoconductivity. In vivo injection of PUR also revealed a formation of 3-D porous scaffold, which contributed to repair of bone defects in rat femora. Lovastatin promoted new bone formation in PUR scaffold implanted in the rat femoral bone defects. A combination of injectable PUR and bone anabolic drugs can be useful approach for effective bone regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| 2010 年度 | 1230000 | 369000 | 1599000 |
| 2011 年度 | 1130000 | 339000 | 1469000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総　計 | 2360000 | 708000 | 3068000 |

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：整形外科学
キーワード：骨再生, ポリウレタン, Scaffold

## １．研究開始当初の背景

骨欠損治療に自家骨移植が、従来行われてきたが、採取部での合併症や、採取量の制限などの問題がある。近年、骨欠損部を補填するために人工の生体材料の開発が盛んにおこなわれている。一方、整形外科領域において近年、小侵襲手術が頻繁におこなわれるようになってきており、高齢者の骨折頻発部位である脊椎椎体骨折や橈骨遠位部骨折においても、人工骨補填材料を経皮的に骨欠損部に充填する小侵襲の手技が開発され、広くおこなわれるようになってきている。それに伴い経皮的に注入可能な骨補填材料の必要性が高まっている。現在、骨セメントPoly(methyl methacrylate (PMMA) やリン酸カルシウム骨セメント（CPC）が椎体骨折や橈骨遠位部骨折に対する形成術に臨床使用されているものの、PMMA は骨伝導性を有さず重合熱を発するなどの問題があり、CPC は骨伝導性を有するものの生体吸収性に乏しく、力学的特性上、圧潰しやすいなどの問題がある。今後、骨伝導性、生体吸収性、良好な力学的特性を有する注入型人工骨補填材料の開発が望まれる。

## ２．研究の目的

近年、人工材料ポリウレタン (PUR) scaffold は組織工学における足場材料として研究されている。多孔質 PUR は適度な弾性を有し組織欠損部での適合性に優れ、生体吸収性であり、かつ材料も安価であることから再生医療における新しい人工材料として期待されている。PUR は polyol を中心とした resin component と isocyanate の重合体であるが、重合前には液状であり、これらを混ぜ合わせた後、重合し多孔体を形成するのに 10 分-15 分程度の時間を要する。われわれはこの特性に着目し、シリンジ内で isocyanate と resin component を混ぜ合わせ、粘性を有する前に速やかに注入し、生体内で多孔体を形成させる方法を考案した。本研究では PUR scaffold の特性を活かし、経皮的に注入可能な‘注入型 PUR scaffold’の開発を目指す。

## ３．研究の方法

1）注入型 PUR の in vitro 特性：シリンジ内で isocyanate と resin component を混ぜ合わせ、注入型PURを作成し、経時的にScaffold形成を観察する。また 2.5%グルタルアルデヒド固定電子顕微鏡（SEM）写真にて、材料構造の観察を行う。

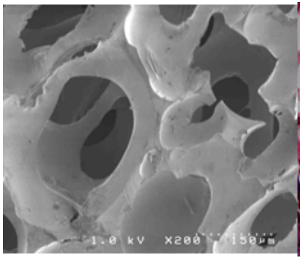
2)骨内へのPUR注入実験:ラット大腿骨に3mmの欠損をエアドリルにて作成し、18G 注射針を使用し注入型 PUR を欠損部に注入する。Sample を直後に摘出し、ホルマリン固定後に、組織切片にて形態評価を行った。

3）リン酸カルシウム付加した PUR の特性：リン酸カルシウム-ハイドロキシアパタイト (HA)、トリカルシウムフォスフェート (TCP) -付加による PUR の力学特性、骨伝導性：重合前に resin component に HA、TCP を付加させた PUR を作成し、圧縮試験による in vitro の力学的特性の評価を行った。また骨芽細胞様細胞を用いて、PUR scaffold での分化誘導実験を行い、in vitro での骨分化を検討した。またラット大腿骨骨欠損モデルを使用し、これら PUR-HA、PUR-TCP の移植実験を行い、in vivo での骨伝導性の評価を行った。

4）In vivo 骨欠損修復モデル：8 週齢 SD ラットを使用し、大腿骨遠位部に 3mm の monocortical 骨欠損を作成、欠損部に注入型 PUR インプラントを移植（注入）する。2、4 週後にラットを sacrifice、sample を摘出し、インプラント内新生骨の評価を行う。また Bone anabolic effect を有するスタチン（ロバスタチン）を PUR scaffold に加え、同様のラット大腿骨欠損モデルにて新生骨形成の評価を行い、PUR と薬剤の組み合わせによる骨再生の評価を行う。

## ４．研究成果

1）注入型 PUR の in vitro 特性：
注射シリンジ内で In vitro で resin と isocyanate を混合させ（2－3 分)、注射針を通してプレパラートに滴下した。滴下後、常温下 5－10 分で、安定した Scaffold を形成した。15 分後に固定し、電子顕微鏡写真にて観察したところ、安定して連通性多孔質構造を形成することを確認した。気孔径 200-600 μm、気孔率は＞90％であった。（Fig1）



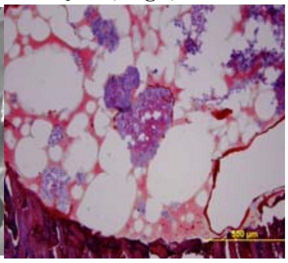


Fig1　　　　　Fig2

2）骨内への PUR 注入実験：ラット大腿骨欠損部に、注入型 PUR を充填し 15 分経過して Scaffold を形成した後に、固定、組織切片にて形態評価を行った。髄腔内の出血による凝血塊などが混在するものの、注入型 PUR は注入後 In vivo でも気孔径 100-600μm の多孔質構造の Scaffold を形成することを確認した。Host bone との Adaptability は非常に良好であった。（Fig2）

3）リン酸カルシウム付加した PUR の特性：
HA、TCP を加えた場合の PUR scaffold は良好な力学的特性を示し、HA,TCP の重量%を上げた方が、強度が向上することが明らかとなっ

た。（Fig3）

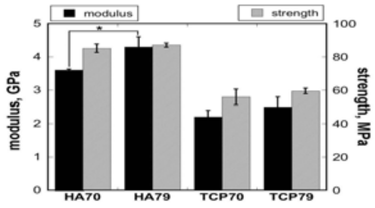



Fig3

また、骨芽細胞様細胞を PUR-HA、PUR-TCP の Scaffold 上で培養、骨分化誘導させ、経時的に良好な骨分化がおこることを、In vitro で確認した。(Fig4)

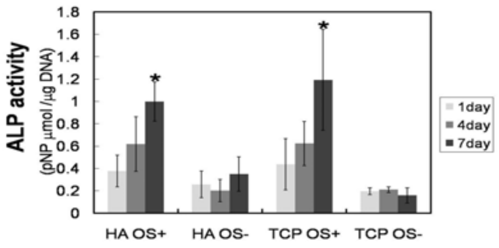



Fig4

次にラット大腿骨骨欠損モデルを使用し、これら PUR-HA、PUR-TCP の移植実験を行い、4 週後にサンプルを摘出､組織写真にて in vivo での良好な骨伝導性を確認した。(Fig5)

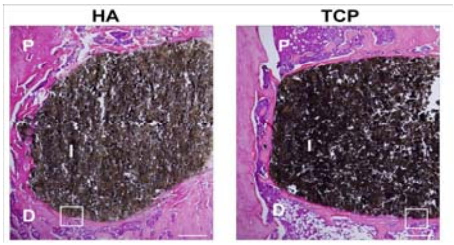



Fig5

4) 注入型 PUR　In vivo 骨欠損修復モデル：ラット大腿骨骨欠損部に注入型 PUR インプラントを移植し、2、4 週後にサンプルを摘出、マイクロ CT 写真にて、経時的に新生骨形成が増加することを確認した。注入型 PUR 移植による有害事象などは認めなかった。

また注入型 PUR に Bone anabolic effect を有するロバスタチン（LV）100μg を加えると骨形成が促進される傾向にあった。(Fig6)

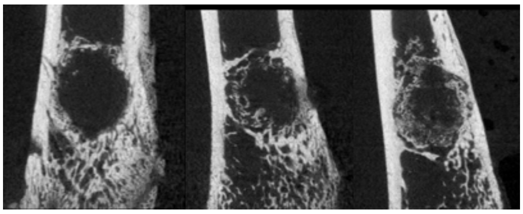


Fig6　2W　　　　　　4W　　　+LV 4W

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　2　件）

Yamada T, Yoshii T, Sotome S, Yuasa M, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Sakaki K, Hirai T, Shinomiya K, Okawa Hybrid grafting using bone marrow aspirate combined with porous β-tricalcium phosphate and trephine bone for lumbar posterolateral spinal fusion: a prospective, comparative study versus local bone grafting.　Spine (Phila Pa 1976).2012;37:E174-9

Yoshii T, Dumas JE, Okawa A, Spengler DM, Guelcher SA.
Synthesis, Characterization of Calcium Phosphates/Polyurethane Composites for Weight Bearing Implants. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012;100:32-40

〔学会発表〕（計　4　件）

The58th Orthopaedic Research Society annual Meeting　2012/2
Yoshii T, Dumas JE, Okawa A, Spengler DM, Guelcher SA.
Synthesis, Characterization of Calcium Phosphates/Polyurethane Composites for Weight Bearing Implants.

第 84 回日本整形外科学会学術総会　2011/5
吉井俊貴、湯浅将人、早乙女進一、富澤將司、加藤剛、川端茂徳、四宮謙一、大川淳
A Hybrid Graft of Hydroxyapatite (HA) ceramic spacer and Percutaneously Harvested Autologous Iliac Bone For Anterior Cervical Discectomy and Fusion

第 84 回日本整形外科学会学術総会　2011/5
吉井俊貴、山田剛、早乙女進一、富澤將司、加藤剛、川端茂徳、四宮謙一、大川淳
経皮的採取海綿骨、新鮮骨髄穿刺液人工骨を用いた腰椎側方固定術

第83回日本整形外科学会学術総会　2010/5

吉井　俊貴、早乙女　進一、Andrea Hafeman、Scott Guelcher、四宮　謙一

HMG-CoA還元酵素阻害薬（スタチン）、ポリウレタン人工材料を使用した骨再生

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

〔その他〕
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◇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

６．研究組織
(1)研究代表者
吉井　俊貴（TOSHITAKA YOSHII）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・整形外科学講座・助教
研究者番号：50583754
(2)研究分担者
なし
研究者番号：

(3)連携研究者
なし

研究者番号：