

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592179

研究課題名(和文) 注入硬化型生体吸収性人工骨補填材の開発と評価

研究課題名(英文) Development and evaluation of an injectable bone substitute with bioresorbability

研究代表者

阿江 啓介 (Ae, Keisuke)

東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：20376726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年では人工の骨補填材の開発が進み、その使用が増加している。しかし、骨補填材の移植手術は大きな侵襲を伴う。本研究では、注入することで小侵襲で移植可能な生体吸収性の骨補填材を開発することである。これまでも注入硬化型の骨補填材は存在したが、非吸収性であるなどの問題があった。本研究では骨伝導能と生体吸収性の高いハイドロキシアパタイトコラーゲンの顆粒を作製し、生体吸収性は高くないが強度のあるリン酸カルシウムセメントを混合することで、生体吸収性の注入硬化型骨補填材を作製した。力学試験では骨補填材として十分な強度が確認され、ウサギ大腿骨内への移植実験では、吸収性が確認された。

研究成果の概要(英文)：The use of artificial bone grafts have increased because of its development. In general, bone graft surgery is relatively invasive. To realize less invasive implantation, some injectable artificial bone substitutes were developed. However their resorbabilities were very low and the implants were scarcely resorbed. The aim of this study was to develop and evaluate an injectable artificial bone substitute with bioresorbability and mechanical strength comparable to that of cancellous bone. The developed injectable bone substitute was consist of dense granule of hydroxyapatite/collagen composite (HAp/Col) and calcium phosphate cement. Compression test revealed that the compression strength of the consolidated bone substitute was comparable to that of cancellous bone. Implantation experiment showed that resorption of the implant started mainly from the HAp/Col granules and the bone formation was occurred at the resorption sites.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：注入硬化型骨補填材 ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体 リン酸カルシウムセメント

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨移植

骨折や骨腫瘍などで生じた骨欠損は、小さいものであれば骨折部を整復固定したり、腫瘍を除去することで、自然に骨組織は再生し治癒する。しかし、欠損が大きい場合は、欠損の再生に非常に長い時間を要したり、治癒に至らない場合があり、骨移植を行い再生治癒を促す必要がある。骨移植に用いられる材料には自家骨、他家骨そして人工骨補填材などがある。自家骨は「生きた自分の骨」であるため、有効性、安全性ともに満足できるものであるが、健全な部位から骨を採取しなければならぬため、採骨に伴う合併症、採骨量の限界といった問題がある。他家骨は比較的高い骨形成能を有しているが、他人の骨であるため、感染症のリスクは完全には否定できず、国内では普及するに至っていない。人工骨補填材は前者で問題となるリスクがなく利用しやすいが、前者に比べ骨形成能が低く、骨移植材料における占有率は、骨移植材料のゴールドスタンダードである自家骨に遠く及ばなかった。しかし、近年の研究開発により、生体吸収性であったり、骨伝導能のみならず骨誘導能まで持ち合わせた人工骨補填材が使用されるようになり、1990年代の後半から急激に普及が進んでいる。

(2) 注入型骨補填材

近年開発されたタイプの人工骨補填材のひとつに注入型のリン酸カルシウムセメント(CPC)がある。これはリン酸とカルシウムを含む化合物をペースト状にして生体内に注入すると、生体内で化学反応を起こし硬化すると同時にハイドロキシアパタイトに変化するという骨補填材である。硬化が完了すると数十MPaもの高い圧縮強度を達成し骨補填材として十分な強度を達成している。また、生成されるハイドロキシアパタイトは焼結体のハイドロキシアパタイトに比較し、結晶性が低い骨類似ハイドロキシアパタイトであり、生体活性、骨親和性ともに高い。さらには、注入型であるため小さな注入孔から注入でき、小侵襲手術での充填が可能である。注入後早期より周囲に骨組織を誘導し、周囲の骨と直接癒合することが知られている。また、前述のように結晶性が低いため、一部は破骨細胞に吸収されることも報告されている。しかしながら、注入された後は、セメント状に一塊に硬化するために表面積が小さく、完全に吸収されるまでには時間がかかり、大部分が残存してしまうことになる。残存した場合、生体骨との力学的不適合から、長期的には問題となる可能性は否定できない。

(3) ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(HAp/Col)

開発が進められている人工骨補填材として、我々が開発を進めてきた多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体がある。研究開始時点では臨床治験が終了した段階では、市場には出ていなかったが、

2013年より発売され骨補填材として使用され始めている。多孔質 HAp/Col は非常に高い骨伝導能を有しており、また、多量の多孔質 HAp/Col を骨髄内に充填しても、破骨細胞に完全に吸収されることが動物実験で確認されている。また、既存の多孔性焼結人工骨が脆く、加工性が低いのに対し、多孔質 HAp/Col はスポンジ状の弾力性を有し、手術時の操作性、加工性にも非常に優れている。この多孔質 HAp/Col の素材である HAp/Col は、生体骨に含まれるハイドロキシアパタイトに類似した長さ約 50nm のハイドロキシアパタイトの針状結晶がコラーゲン線維に配向したナノ構造をとっており、HAp:Col の質量比も生体骨と同じ 80:20 である。そのため、含まれるハイドロキシアパタイトの比表面積は 80m²/g にもおよび、多量のタンパク質や薬剤を吸着できるため、薬剤担体としても有効であることが確認されている。

2. 研究の目的

前述のように既存の注入型骨補填材は操作性も良好で、圧縮強度も十分高いが、早期に分断化が生じてもしない限り、実質的には非吸収性であり生体内に残存してしまう。しかし、分断化が早期に生じてしまえば、一時的に移植部位の強度が著しく低下してしまう。また、多孔質 HAp/Col は非常に高い骨伝導能を有し、生体吸収性であるが、スポンジ状であるため圧縮強度は低く、内固定あるいは外固定なしには荷重部位には使用し難い。本研究の目的は、HAp/Col を使用して、力学的強度が十分な HAp/Col 顆粒(または粉末)を作成し、これをリン酸カルシウムセメント(CPC)と複合させることで、注入硬化型の生体吸収性骨補填材(CPC-HAp/Col ハイブリッド)を開発することである。吸収のメカニズムとしては、まず、HAp/Col により多くの破骨細胞が誘導され、HAp/Col を吸収すると同時に周囲に骨形成が誘導される。また、HAp/Col が吸収されることにより、CPC の表面積が激増し、誘導された破骨細胞により吸収が始まる。吸収の速度は HAp/Col より遅いが、表面積が大きくなっているために、最終的には CPC も完全に吸収されてしまうと想定している。(下図)

3. 研究の方法

(1) HAp/Col 顆粒の作製

HAp/Col 繊維と PBS を混和し、顆粒成型器(顆粒状の薬剤を成型する器械で(ペーストを小孔より射出した))を用いて HAp/Col 顆粒を成型した。成型した顆粒を十分乾燥させた後、篩にて直径 0.12 - 0.59 mm、直径 0.84 - 1.00 mm の 2 種類の粒径分布の顆粒に分けた。

(2) HAp/Col-リン酸カルシウムペースト複合体の作製

HAp/Col 顆粒と市販のリン酸カルシウムペーストの粉剤を混合した後、液剤を加え注入可能なペースト状にした。これを直径 7.5 mm、

高さ 15 mm の円筒形の型に入れ硬化させた。30 分硬化させてから型から取り出し、37 の擬似体液に浸漬した。浸漬後 24 時間および 72 時間後に取り出し、圧縮試験を行い、圧縮弾性率を求めた。なお、顆粒、粉剤、液剤の混合条件は下記表の通りである。

	顆粒径 (mm)	顆粒 (g)	粉剤 (g)	液剤 (μl)
条件 1	0.84	0.32	1.12	540
条件 2	-1.00	0.32	0.8	400
条件 3		0.32	0.64	360
条件 4	0.12	0.32	1.12	540
条件 5	-0.59	0.32	0.8	400
条件 6		0.32	0.64	360
コントロール	-	-	6	1500

(3) 移植実験

HAp/Col 顆粒とリン酸カルシウムペーストの粉剤を混合した後、液剤を加えペースト状にした。これを直径 8.0 mm、高さ 10 mm の円筒形の型に入れ硬化させた。(組成は下記表の通り) 全身麻酔下に日本白色家兎の大腿骨果部内側に直径 8 mm の骨孔を作製しインプラントを移植した。移植後 2, 4, 8, 12 週に摘出し、組織学的評価を行った。

	顆粒径 (mm)	顆粒 (g)	粉剤 (g)	液剤 (μl)
1	0.84-1.0	0.4	1.12	540
2	0.84-1.0	0.4	0.64	360
3	0.12-0.59	0.4	1.12	540
4	0.12-0.59	0.4	0.64	360

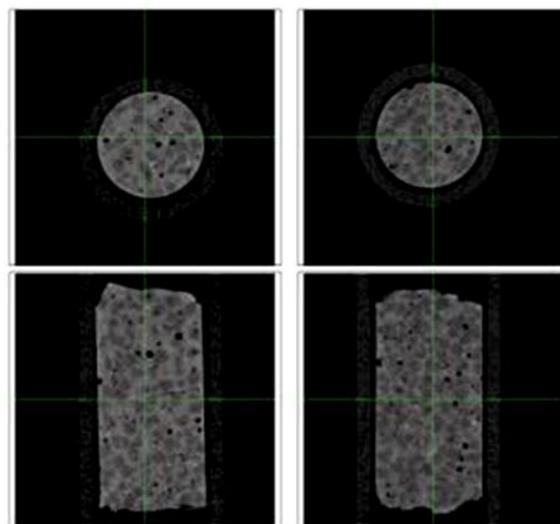
4. 研究成果

(1) HAp/Col-リン酸カルシウムペースト複合体の評価

作製した硬化体

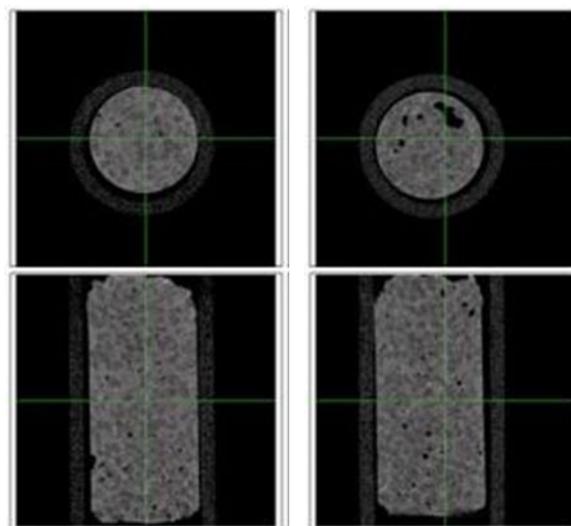
マイクロ CT

マイクロ CT では、HAp/Col 顆粒部分が低信号に、リン酸カルシウム部分が高信号に描出され、HAp/Col 顆粒のほうがリン酸カルシウムセメントに比較してカルシウム密度が低いことが分かる。条件 1, 2 のものに比較して、条件 5, 6 の方が HAp/Col 顆粒の大きさが小さく、また、リン酸カルシウムセメントの割合が多い条件 1, 5 では、それぞれ少ない条件の 2, 6 に比較して、HAp/Col 顆粒が孤立していることが確認できた。



条件 1

条件 2

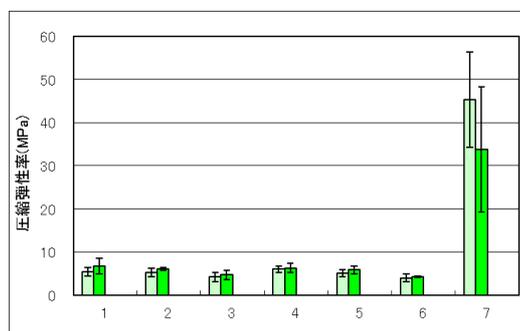


条件 5

条件 6

圧縮試験

圧縮試験では、HAp/Col 顆粒を含まないリン酸カルシウムセメントのみのコントロール(グラフ中の 7)が圧倒的に高い圧縮弾性率を示した。それに対し、HAp/Col 顆粒を含む複合体(1-6)の圧縮弾性率は 4-7 MPa 程度と低く、また、含まれる HAp/Col 顆粒の量が多くなると低下する傾向が認められた。



n=6

(2) 移植実験

破骨細胞による吸収で生じる表面の陥凹は主に HAp/CoI 顆粒部から始まっており、条件 4 のインプラントで顕著であった。また、インプラント内部では HAp/CoI 顆粒部に破骨細胞浸潤、血管増生といった吸収像が観察された。CPC の割合が多い条件 1, 3 の検体では材料の吸収が遅い傾向が認められた。

(3) 考察

本研究の結果からハイブリッド人工骨内の HAp/CoI 顆粒径が小さく、CPC の割合が少ないほど吸収性は良好であるが、力学的強度は劣る傾向がみられた。しかしながら、どの条件のインプラントも海綿骨程度の圧縮弾性率は有しており、注入型インプラントとして実用に耐えうると考えられた。今回使用したハイブリッド人工骨の生体内で起こる反応メカニズムとしてはまず吸収性の HAp/CoI 顆粒が遊走してきた破骨細胞により吸収され、HAp/CoI の吸収が進行するにつれ、CPC の接する表面積も劇的に増大し CPC の吸収も進行すると同時に骨形成も並行して進行するものと推察される。条件 4 のインプラントが最も吸収性に優れていた理由としては顆粒径の小さい HAp/CoI を混和させる方が人工骨あたりに含まれる HAp/CoI の粒子数が多くなり、HAp/CoI の骨髓腔への露出、および HAp/CoI 同士が接する面積が増大するためと考えられる。今回の検討は最も吸収性に乏しいと考えられる硬化体の状態で行ったが、既存の注入型人工骨のようなペースト状態で移植すればさらに吸収性は増大すると考えられる。

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 5 件)

Sawamura C, Matsumoto S, Shimoji T, Okawa A, Ae K. How long should we follow patients with soft tissue sarcomas? Clin Orthop Relat Res. 2014 Mar;472(3):842-8. doi: 10.1007/s11999-013-3076-6. (査読有り)

Yamada T, Yuasa M, Masaoka T, Taniyama T, Maehara H, Torigoe I, Yoshii T, Shinomiya K, Okawa A, Sotome S. After repeated division, bone marrow stromal cells express inhibitory factors with osteogenic capabilities, and EphA5 is a primary candidate. Bone. 2013 Dec;57(2):343-54. doi: 10.1016/j.bone.2013.08.028. (査読有り)

Koyanagi H, Ae K, Maehara H, Yuasa M, Masaoka T, Yamada T, Taniyama T, Saito M, Funouchi Y, Yoshii T, Okawa A, Sotome S. Massive bone reconstruction

with heat-treated bone graft loaded autologous bone marrow-derived stromal cells and β -tricalcium phosphate composites in canine models. J Orthop Res. 2013 Aug;31(8):1308-16. doi: 10.1002/jor.22368. (査読有り)

Yoshii T, Yuasa M, Sotome S, Yamada T, Sakaki K, Hirai T, Taniyama T, Inose H, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Enomoto M, Shinomiya K, Okawa A. Porous/dense composite hydroxyapatite for anterior cervical discectomy and fusion. Spine (Phila Pa 1976). 2013 May 1;38(10):833-40. doi: 10.1097/BRS.0b013e3182801390. (査読有り)

Yamada T, Yoshii T, Sotome S, Yuasa M, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Sakaki K, Hirai T, Shinomiya K, Okawa A. 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 Feb 1;37(3):E174-9. doi: 10.1097/BRS.0b013e3182269d64. (査読有り)

[学会発表](計 6 件)

Koyanagi H, Ae K, Yuasa M, Masaoka T, Yamada T, Taniyama T, Yoshii T, Saito M, Okawa A, Sotome S. Massive bone reconstruction with heat-treated bone graft loaded autologous bone marrow derived stromal cells and beta-tricalcium phosphate composites in canine models. 59th Annual meeting of the orthopaedic research society, January 26-29, 2013, San Antonio, Texas

谷山 崇、早乙女 進一、山田 剛史、正岡 智和、韋 雪濤、吉井 俊貴、上坂 優子、高山 知士、平野 昌弘、大川 淳、多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(HAp/CoI)/リン酸カルシウムセメント hybrid 人工骨の開発、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、10/17-18、2013、千葉

谷山 崇、早乙女 進一、山田 剛史、正岡 智和、韋 雪濤、吉井 俊貴、上坂 優子、高山 知士、平野 昌弘、大川 淳、多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体(HAp/CoI)/BMP-2 ハイブリッドの骨軟骨欠損修復に対する有効性の検討、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、10/17-18、2013、千葉

早乙女 進一、新規骨補填材 - 多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン

(Porous HAp/Col)の基礎と臨床、第 46 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、7/11-12、2013、東京

早乙女進一、阿江啓介、大川淳、四宮謙一、平野昌弘、石突正文、森岡秀夫；松本誠一、中村孝志、阿部哲士、別府保男、多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)の臨床応用、第 85 回日本整形外科学会学術集会、5/17-20、2012、京都

正岡智和、早乙女進一、湯浅将人、山田剛史、谷山崇、吉井俊貴、上坂優子、平野昌弘、森田定雄、大川淳、多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)移植による骨欠損治療後の骨形成、力学特性の評価、10/26-27、2012、名古屋

〔図書〕(計 1 件)

早乙女進一、間葉系幹細胞を用いた骨再生、血液フロンティア、13(4): 45(479)-52(486)、2013

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿江 啓介 (AE KEISUKE)
東京医科歯科大学医学部非常勤講師
研究者番号：20376726

(2)研究分担者

早乙女 進一 (SOTOME SHINICHI)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
寄附講座准教授
研究者番号：20401391

大川 淳 (OKAWA ATSUSHI)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科
教授
研究者番号：30251507