

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791906

研究課題名(和文) 骨内微小環境を再現した新規顔面骨組織再建法の確立

研究課題名(英文) New system for facial bone tissue reconstruction by the reproduction of a microenvironment in the bone tissue

研究代表者

渡部 聡子 (Watanabe, Satoko)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20379803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、硬組織再建に生体親和性の高い人工骨が開発され、すでに臨床応用されている。しかし現在までに頭頸顔面領域の大きな硬組織再建における低侵襲かつ安全性のある生体材料および硬組織再建法は無いのが現状である。本研究ではラットにおける完全な貫通孔を有するハニカム-TCPの硬組織形成能を組織学的に検討したところ、TCPの孔径によって良好な骨組織形成を認めた。またハニカム-TCPをラット頬骨部の全層骨欠損部に移植したところ、マイクロCTにおいて断端骨との良好な骨癒合像が認められた。以上の結果から、顔面領域の硬組織再建においてハニカム-TCPは非常に優れた生体材料となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, artificial bone having high biocompatibility have already been developed and applied to bone tissue reconstruction. However at present, there has been no less invasive and secure method for large defect of bone tissue on head and neck nor craniofacial surgery. In this study, we investigated osteogenetic ability of honeycomb-TCP with through hole on rat histologically, and adequate osteogenesis was recognized depending on size of hole diameter. This honeycomb-TCP which was transplanted to total bone defect on zygomatic bone of rat showed sufficient union at a cut end part of zygomatic bone on micro CT image. These results suggest that honeycomb-TCP can be excellent biomaterial for reconstruction of hard tissue on facial area.

研究分野：形成外科

キーワード：人工骨 人工ECM -TCP BMP-2 ティッシュエンジニアリング

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭蓋顔面領域における悪性腫瘍切除や外傷によって生じる大きな組織欠損には、機能的かつ審美的組織再建が要求される。特に硬組織を含めた再建は遊離複合組織移植を用いられるが、生体侵襲性の問題もあり患者の負担が大きい()。近年、硬組織再建に生体親和性の高いハイドロキシアパタイトや -TCP 等、様々なバイオセラミックスに代表される人工骨が広く使用されている。一部のものは細胞および血管の侵入性を考慮して、高气孔率を示す材料はあるが、ほとんどの気孔が盲端であり、血管の貫通性や骨組織置換の妨げとなっている。また高气孔率のためきわめて脆弱であるという欠点を有しており、現在までに細胞、血管進入性、強靱性の双方を兼ね備えた生体材料の報告はない。

一方、申請者らは細胞分化微小環境の重要性に着目し、(株)パイロットコーポレーションとの共同研究において新規生体材料の開発を行ってきた。その結果、世界で初めて骨内微小環境を再現可能な、貫通孔を有するハニカム -TCP の開発に成功しており、顔面領域の審美性に重要な骨組織再生において、この新規骨組織再建法を行う技術を開発している。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、ハニカム -TCP の焼結温度および孔径の骨形成能に及ぼす影響について検討しており、焼結温度が1200度、孔径300 μ mの孔を有するハニカム -TCP が最も高い骨誘導能を有する事を確認している。また同ハニカム -TCP に BMP-2 を含浸させマウス背部皮下に埋入したところ、異所条件下においても非常に高い骨形成活性をえることに成功している。このことから、本ハニカム -TCP の高い骨形成能は立証済みであり、顔面領域の新規骨組織再建法を高い確率で確立可能であるとの発想に至った。本申請研究課題では、ハニカム -TCP を用いた顔面領域の新規骨再建法の実現に向け基礎的研究を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) BMP-2 含有ハニカム -TCP の作製

4種類の孔径75 μ m(75TCP)、300 μ m(300TCP)、500 μ m(500TCP)、1600 μ m(1600TCP)の貫通孔を有する5mm長の円柱状ハニカム -TCP を加圧整形、1200度温度で焼結形成したものをを用いた(Fig1)。ハニカム -TCP の作製は以前の報告と同様の方法にて行った()。BMP-2が各孔径ハニカム -TCP に最終的に充填量1 μ g、500ng、250ng、125ng、0 μ g、の5種類となるよう濃度を調整し Matrigel®(BD Bioscience 社)と混和、各サンプルと BMP-2 含有 Matrigel®を遠心分離器にかけ(4、10,000rpm、5min)、BMP-2 含有マトリゲルを

サンプル孔内に充填した。コントロールは同様の方法で Matrigel®単独をハニカム -TCP 孔内に充填したものを作製した。

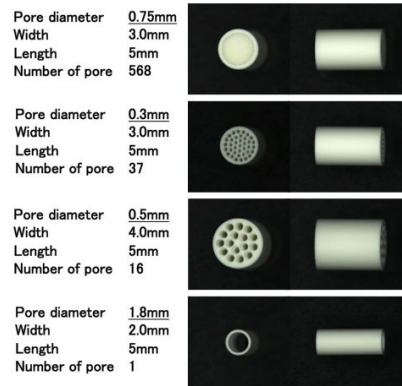


Fig1 ハニカム -TCP

(2) BMP-2 含有ハニカム -TCP の組織学的反応

ハニカム -TCP の孔径(4種)と BMP-2 量(5条件)によってグループ化し各群間で骨誘導能について比較検討を行った。(ハニカム -TCP の孔径)4種 \times (BMP-2量)5条件 合計20群)

ラット大臀筋内にポケットを作製し、各サンプルをそれぞれ単独で埋入し、3週間後に4%(Paraformaldehyd)PFA 還流固定法により組織を固定、サンプルを回収して組織学的検討を行った。抽出試料は10%EDTAにて3週間脱灰し、定法にてパラフィン標本作製し、H.E.染色標本にてサンプル孔内における新生骨組織の観察と孔内における新生骨が占める面積の割合を計測した。

(3) ラット頬骨完全欠損における骨組織再生

BMP-2 含有ハニカム -TCP の組織学的反応の結果から、最も骨誘導能の盛んであった試料を頬骨完全骨欠損部に移植して骨誘導能の評価を行った。頬骨前方に5mm完全骨欠損を作製し、コントロールはそのまま閉創した群、TCPのみを骨欠損部に移植した群、BMP-2 含有ハニカム -TCP を骨欠損部に移植した群に分け、それぞれ移植後3週間でマイクロCTによる画像評価を行った。

4. 研究成果

(1) 各 BMP 量による骨組織形成率では、コントロール群は孔径に関わらず異所性の骨形成は認められず、BMP 量125ngでは全てのTCPで骨組織の形成が認められたが、その割合は高いとは言えなかった。しかし BMP 量が増加するにつれて骨形成率が上昇し、BMP 量1000ngでは1600TCPを除いて全てのサンプルで骨形成を認めた。1600TCPでは BMP 量にかかわらず他の孔径に比べて骨形成が少ない傾向があった。(Table1)

Incidence of Bone Formation				
BMP-2 concent	β -TCP pore size			
	75 μ m	300 μ m	500 μ m	1600 μ m
0ng	0/5	0/5	0/5	0/5
125ng	4/5	3/5	3/5	1/6
250ng	3/6	5/5	4/5	2/5
500ng	4/5	4/5	5/6	1/6
1000ng	5/5	6/6	6/6	3/7

Number of bone induced samples/ Total number of samples in each group

Table1 骨組織形成率

(2) 組織学的検討

75TCP BMP 量 1000ng では線維芽細胞様の細胞とともに孔隙内に骨組織が認められたが、血管の侵入性は乏しく炎症性細胞浸潤はほとんど認められなかった(Fig2 a,b)。300TCP BMP 量 1000ng では孔内壁に添加するように骨組織形成を TCP 中央部分にまで認め、骨基質周辺には多数の多角形の骨芽細胞が一列に配列しており骨形成活性が高いことが考えられた。しかし孔隙内には海綿骨状の骨梁は殆ど形成されなかった。TCP 中央部分には内腔を貫通するように多数の血管腔形成と、一部では骨髄様組織も観察された。骨組織形成様式は BMP-2 量に関わらず同様であった。また破骨細胞の出現も認められ TCP が吸収されて骨組織に置換される像も散見された(Fig2 c,d)。

500TCP BMP 量 1000ng では、300TCP とほぼ同様に孔内壁に添加するような骨組織形成が認められ、さらに孔内に梁状の海綿骨の新生が多数認められた。しかし骨組織に囲まれた領域に明らかな骨髄組織様組織は認められなかった(Fig2 e,f)。

1600TCP では他のサンプルと異なり、BMP 量 1000ng で孔内腔中央部に孤立性、球状の骨組織形成を認めたのみで、その占有率は非常に小さく、また間質の血管と線維芽細胞は細胞数に乏しく他の孔径の試料組織と比較すると粗な組織から形成されていた(Fig2 g,h)。

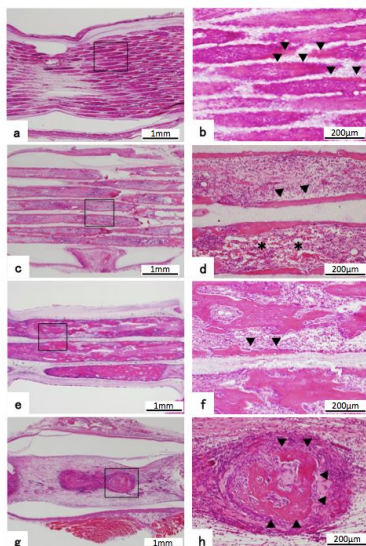


Fig2 a),b) 75TCP BMP1000ng c),d) 300TCP BMP 1000ng e),f) 500TCP BMP1000ng g),h) 1000TCP BMP1000ng

(3) ハニカム β -TCP が硬組織形成に及ぼす影響について、新生骨組織の孔隙内に占める面積の割合を計測して検討を行った(Fig3)。BMP を添加した試料では、TCP 孔径に関わらず BMP 量が増加するに従って骨形成量の増加する傾向が認められた。TCP 孔径が骨形成量に及ぼす影響については BMP 量に関係なく 75TCP から 500TCP までは孔径が大きくなるに従って骨形成量が増加する傾向が認められた。しかし 1600TCP では骨形成量の著しい減少が認められ BMP 量が上昇しても骨形成量の増加に及ぼす影響は軽微であった。

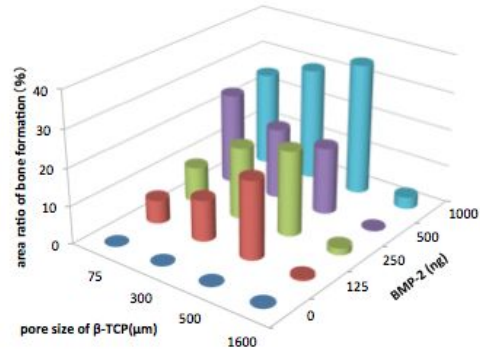


Fig3 骨組織形成の割合

(4) 頬骨欠損モデルに 300TCP 単独及び BMP 量 1000ng をそれぞれ移植したところ、マイクロ CT にてコントロールでは完全な骨欠損のまま明らかな骨形成は認められず、TCP 単独群では既存骨断端と TCP には間隙が認められ、TCP + BMP 群では既存骨断端から連続性に TCP を覆うような新生骨形成を認めた(Fig4)。

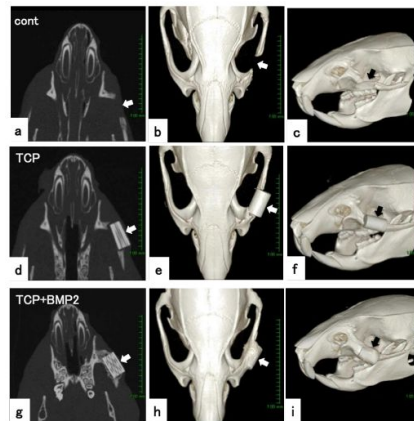


Fig4 マイクロ CT

<引用文献>

Yoshikawa, H., Myoui, A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of artificial organs : the official journal of the Japanese Society for Artificial Organs* 2005;8:131-136.

Kaltreider, S. A. Prevention and management of complications associated with the hydroxyapatite implant. *Ophthalmic plastic and reconstructive surgery* 1996;12:18-31.

Takabatake, K., Yamachika, E., Tsujigiwa, H., et al. Effect of geometry and microstructure of honeycomb TCP scaffolds on bone regeneration. *Journal of biomedical materials research Part A* 2013.

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)

[学会発表](計2件)

(1) 渡部聡子、木股敬裕、八ニカム -TCPの幾何学的構造内における細胞分化増殖の検討、第22回日本形成外科学会基礎学術集会、2013年11月7日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター(新潟)

(2) 渡部聡子、木股敬裕、八ニカム -TCPの成分解析と頭頸部領域における骨組織再建、第55回日本形成外科学会総会・学術集会、2012年4月11日、ホテルニューオータニ(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 聡子 (WATANABE, Satoko)
岡山大学・岡山大学病院・形成外科・医員
研究者番号：20379803

(4) 研究協力者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA, Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・臨床生命科学科
組織病態学研究室・教授
研究者番号：70335628