

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462784

研究課題名(和文) 骨内微小環境再現システムを用いた区域切除骨の新規再建法の検討

研究課題名(英文) A new reconstruction method using intraosseous microenvironment reproduction system of segmental excision bone

研究代表者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA, Hidetsugu)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：70335628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織再建材料として古くから自家骨に変わる様々な種類のセラミックスが生体材料として研究されてきた。しかしこれらの生体材料を用いて広範囲に欠如した骨組織を再建することは生着率、強度、骨誘導能効率等の点から困難であるのが現状である。本研究において口径300 μm の貫通孔を有するハニカムTCPを頬骨欠損部に適応したところ、正常に近い骨組織構築が認められ骨組織の連続性が回復していた。また長期的な観察においてハニカムTCPは吸収変形し、欠損前の骨組織とほぼ同様の形態に還元していた。以上のことから本材料は極めて優れた生体材料であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Various ceramics has been researched as biomaterials for bone reconstruction materials since long time ago. However, these biomaterials are difficult to reconstruct bone defect in view of survival rate, strength, and osteoinductive efficiency. Thus in this study, when honeycomb TCP having through holes of diameter 300 μm was applied to zygomatic bone defect, bone construction formation similar normal bone tissue was recognized, and the continuity of bone tissue was restored. Moreover, in prolonged observation, the honeycomb TCP was absorbed and deformed, and restored to almost the same form as the normal zygomatic bone. From the above, it is considered that this material is a very excellent biomaterial.

研究分野：口腔病理学

キーワード：骨組織 再生 TCP

1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域の癌は舌や歯肉など解剖学的に構造の異なった部位に発生進展する。骨組織に浸潤した癌に関しては顎骨の区域切除術が選択されることがある。現在、腫瘍等の切除により離断した下顎骨には遊離複合組織移植やチタンプレート等による再建が選択されているが、摂食・嚥下などの機能面、生体侵襲性、審美面に多大な影響を及ぼし、患者のQOLを著しく低下させている。整形外科、口腔領域では骨組織再建材料として、古くから自家骨に変わる生体材料が研究されてきた。生体材料としてはハイドロキシアパタイトや β -TCP等、様々な種類のセラミックスが広く使用されてきており、その歴史は長く信頼性は高い。近年、生体親和性の高い非金属無機材であるセラミックスの有用性が明らかとなっており、ハイドロキシアパタイト、 β -TCP等を主体として様々な形状、成分の商品が開発されている。しかしその殆どが細胞および血管の侵入性を考慮して作製されたものではなく、骨組織置換の妨げとなっている。また一部に細胞の侵入性を高めた高気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侵入性を妨げている。また高気孔率であるため極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・血管侵入性および強靱性の双方を兼ね備えた生体材料の報告は無い。そのため顎骨の区域切除などによって広範囲に欠如した骨組織をこれらの生体材料を用いて再建することは生着率、強度、骨誘導能効率等の点から困難であるのが現状である。

2. 研究の目的

これまで申請者らは、ハニカム TCP の骨形成能に及ぼす影響について検討しており、非常に高い骨形成を得ることに成功している。微小環境を再現可能な本ハニカム TCP は、形状変化により細胞分化をコントロールでき、軟骨細胞や骨芽細胞を分化誘導可能である。また、既に豊富な骨髄を形成する幹細胞培養法の確立に成功している。そこで本研究では独自に開発したハニカム TCP および幹細胞を用いて骨内微小環境再現システムの構築を行い、摂食・嚥下等の機能回復を目指し、広範囲に欠損した骨の新規骨組織再建法を確立する。

3. 研究の方法

(1) ハニカム TCP およびハニカム HAP の生体反応
リン酸三カルシウム (TCP) をハニカム構造に成型し異なる焼結温度 (1100~1500 度) で作製した。またハイドロキシアパタイト (HAP) をハニカム構造に成型した材料を用いた。作製した材料はラット側頭骨欠損部に埋入、埋入後 3 週に組織を摘出、パラフォルムアルデヒドにて固定後、定法にて HE 標本

を作製し組織学的に観察、生体親和性の高い材料、焼結温度を決定した。

(2) 培養細胞を用いた検討

培養細胞は KUSA-A1、人臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。KUSA-A1 は 10%FBS を含む α -MEM CO₂ 濃度 5%37 度で培養を行った。細胞がコンフルエントに達した後、培地を BMP-2 (100 ng/ml) を含む培地、およびアスコルビン酸 (50 μ g/ml) β グリセリン酸 (5 μ M) を含む培地に交換し誘導を行った。HUVEC は Promo Cell 社の内皮細胞用培地で CO₂ 濃度 5%37 度の条件下で培養を行った。その後培養細胞を剥離、誘導を行った KUSA-A1 単独、および KUSA-A1 と HUVEC をマトリゲルと混和した後、ハニカム TCP 孔内に充填し埋入試料とした。実験動物には 5 週令雄性 SCID マウスを用いた。マウスを全身麻酔下にて大腿部皮膚を切開、大腿部筋中に調製したハニカム TCP を埋入した。試料は埋入 3 週後に摘出、固定、EDTA による脱灰を行い、常法にてパラフィン薄切切片を作成した後、HE 染色、免疫組織化学的染色を施し組織学的に観察した。

(3) ハニカム TCP の形状についての検討
様々な口径のハニカム構造を有する TCP を作製し (口径 75 μ m から 1600 μ m) 1200 度で焼結、ハニカム TCP を作製した。ハニカム TCP には BMP-2 (0 から 1000 ng) を添加したマトリゲルを孔内に充填した。作製した試料は全身麻酔下においてラット大腿部の皮膚を切開、筋中に埋入した。埋入後 3 週目に組織を摘出、パラフォルムアルデヒドにて固定後、定法にて HE 染色、免疫組織化学的染色を施し組織学的に観察した。

(4) ハニカム TCP を用いた骨組織再生
ハニカム TCP は長さ 5 mm、口径 300 μ m の貫通孔を有する材料を用いた。マトリゲルに混和した BMP-2 をハニカム TCP 孔内に充填し埋入体とした。ラット頬骨を欠損させ、同部位にハニカム TCP を埋入し 3 週後に摘出、マイクロ CT による観察および組織学的に検討した。対照として TCP 埋入、骨欠損のみを用いた。また生体の長期的な反応、新生骨組織の経時的変化の観察のため 6 ヶ月の長期間埋入実験を行い、3 週間と同様にマイクロ CT による観察、組織学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ハニカム TCP およびハニカム HAP の生体反応
生体親和性の高い骨組織を模倣した人工生体材料を作製するため材料の選定を行った。ハニカム HAP 生体反応を組織学的に観察したところハニカム構造の内腔に好中球を中心とした炎症性細胞の浸潤が認められた。ハニカム TCP においてハニカム構造の内腔に

炎症性細胞の浸潤が認められたが、ハニカム TCP 焼結温度により生体反応性に違いが認められた。1100 度の低温で焼結したハニカム TCP では激しい炎症性細胞の浸潤が認められ、膿瘍を生じる部位も認められた。しかし炎症性細胞の浸潤はハニカム TCP 焼結温度の上昇により減少する傾向が認められ、約 1200 度で焼結したハニカム TCP が最も炎症性細胞浸潤が少なく、部分的ではあるが周囲からの誘導骨組織像が観察された。しかし 1200 度を超える焼結温度になると炎症性細胞の増加傾向が認められ、1500 度ではハニカム TCP は融解し 3 週間の埋入期間では組織中に観察されなくなった。以上のことから生体には 1200 度で焼結したハニカム TCP が最も生体親和性が高いと考えられた。

(2) 培養細胞を用いた検討

骨芽細胞への分化傾向を示す培養細胞の、骨組織形成に対する有効性について検討するためハニカム TCP 孔内に培養細胞を充填、実験動物に移植を行い、解析を行った。KUSA-A1 を充填した試料では、BMP-2 もしくは石灰化培地で誘導した細胞のいずれの実験群においてもハニカム TCP の貫通孔の両端に細胞増殖と骨組織形成が確認された。しかしながらハニカム TCP の孔中央部分には骨組織の形成は確認されず、侵入した細胞数も少数であったことから、孔中央部では血液供給が不十分であり、細胞が増殖出来なかった可能性が考えられた。

次にハニカム TCP 孔内に血流を確保する目的で HUVEC を BMP-2 もしくは石灰化培地で誘導した KUSA-A1 と共に、前記実験同様に実験動物に移植を行った。その結果 HUVEC と KUSA-A1 を同時に移植した試料においてもハニカム TCP の貫通孔両端に骨組織形成が確認されたが、孔中央部分には骨組織の形成は確認されなかった。以上のことからハニカム TCP と培養細胞を用いた実験系においては、HUVEC を用いても骨組織形成に必要な細胞の侵入・増殖と、十分な血流量を確保できないため、孔内に骨組織の形成は難しいことが考えられた。

(3) ハニカム TCP の形状についての検討

ハニカム TCP 孔内に培養細胞を充填した実験系においては十分な骨組織形成は難しい可能性が考えられたため、骨形成に関与する幹細胞をハニカム TCP 孔内に血管組織と共に誘導、孔内で骨芽細胞に分化させ十分な骨組織形成を誘導するための検討を行った。その結果、直径 300 μm の貫通孔を有するハニカム TCP で孔内壁を裏装するように新生骨の形成が認められ最も骨量も多かった。また新生骨に囲まれた部分には骨髄組織と考えられる組織の形成も認められた。以上のことから骨組織形成には 300 μm の貫通孔を有するハニカム TCP が最も適した生体材料であると考えられた。

(4) ハニカム TCP を用いた骨組織再生
ハニカム TCP の頬骨欠損部における骨組織形成の 3 週、6 ヶ月後の変化について検討した。埋入 3 週目では BMP-2 添加群では骨組織の形成が認められ既存骨の連続性は回復していた。ハニカム TCP の孔内には既存骨と同様の骨髄組織が観察され、正常の骨組織と同様の構築を示した。埋入 6 ヶ月後におけるマイクロ CT による観察では BMP-2 非添加群においても骨組織の形成が認められ既存骨との連続性は回復していた。BMP-2 添加群では埋入した円筒形状のハニカム TCP は吸収変形し、骨欠損部は既存骨とほぼ同様の形状に復元していた。トラップ染色による観察では、既存骨と連続するハニカム TCP の断端にトラップ陽性の破骨細胞はほとんど認められず、ハニカム TCP は骨組織に取り込まれるように存在していた。しかしながら既存骨に接さず、明らかに突出していると思われる部位においては、多数のトラップ染色陽性破骨細胞が認められ、元の骨組織形状を復元するようにハニカム TCP を溶解していた。以上のことから我々が使用したハニカム TCP は高い骨形成能を有しており、また既存骨の形状を復元させる能力を有している極めて優れた生体材料であると思われた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Watanabe S, Takabatake K, Tsujigiwa H, Watanabe T, Tokuyama E, Ito S, Nagatsuka H, Kimata Y. Efficacy of Honeycomb TCP-induced Microenvironment on Bone Tissue Regeneration in Craniofacial Area. *Int J Med Sci.* 1;13(6):466-476. 2016. 査読有 doi:10.1182/blood-2016-07-728337.

Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Takabatake K, Okafuji N, Shoumura M, Osuga N, Nagatsuka H and Kawakami T. Overview of Cytological Dynamics of Periodontal Ligament Inflammatory Lesions. *Int J Dent Oral Sci* S9: 001, 1-7. 2016. 査読有

Kaneko K, Matsuda S, Muraoka R, Nakano K, Iwasaki T, Tomida M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Kawakami T. Histological Evaluation of Periodontal Ligament in Response to Orthodontic Mechanical Stress in Mice. *Int J Med Sci.* 12(9):689-94. 2015. 査読有 DOI: 10.7150/ijms.12883.

Takaya T, Mimura H, Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, Kawakami T. Cytological Kinetics of Periodontal Ligament in an Experimental

Occlusal Trauma Model. *Int J Med Sci.*
12(7):544-51. 2015. 査読有
DOI: 10.7150/ijms.12217.

Takabatake K, Yamachika E, Tsujigiwa H,
Takeda Y, Kimura M, Takagi S, Nagatsuka H,
Iida S. Effect of geometry and microstructure
of honeycomb TCP scaffolds on bone
regeneratio. *Biomed Mater Res A.*
102(9):2952-2960. 2014. 査読有
DOI: 10.1002/jbm.a.34966.

〔学会発表〕(計9件)

山本 佳代子、伊藤 雄一、小越 菜保子、
寺井 陽彦、有吉 靖則、山口 誠二、辻極 秀次、長塚 仁、植野 高章、
H₂SO₄/HCL (混酸・加熱)処理を施した造
形チタンメッシュの骨形成能に関する X
線学的・組織科学的検討、第 25 回硬組織
再生生物学会学術大会・総会、2016 年 8
月 20 日、日本大学 (東京)

于 湊、高島 清文、辻極 秀次、松田 寛
之、河合 穂高、吉田 沙織、中野 敬介、
長塚 仁、GFP 骨髄移植マウスの異所性
骨形成における骨髄由来細胞の関与につ
いて、第 25 回硬組織再生生物学会学術大
会・総会、2016 年 8 月 20 日、日本大学(京
東)

高島 清文、松田 寛之、辻極 秀次、于
湊、藤井 昌江、中野 敬介、長塚 仁、
異所性骨形成微小環境における骨髄幹細
胞の関与。第 70 回 NPO 法人日本口腔科学
会学術集会、2016 年 4 月 17 日、福岡国際
会議場 (福岡)

高島 清文、辻極 秀次、于 湊、伊藤 聡、
松田 寛之、河合 穂高、信長 ひかり、
中野 敬介、長塚 仁、八ニカム β-TCP
を用いた骨・軟骨組織形成制御、第 36 回
岡山歯学会総会・学術集会、2015 年 9 月
27 日、岡山大学 (岡山)

松田 寛之、辻極 秀次、高島 清文、伊
藤 聡、藤井 昌江、野敬介、長塚 仁、
GFP 骨髄移植マウスを用いた、異所性骨
形成過程における骨髄由来細胞の役割の
検討、第 24 回硬組織再生生物学会学術大
会・総会、2015 年 8 月 22 日、大阪歯科大
学 (大阪)

金子 圭子、松田 紗衣佳、辻極 秀次、
中野 敬介、長塚 仁、川上 敏行、歯科
矯正学的メカニカルストレスによるマウ
ス歯周組織改造における細胞動態、第 26
回日本臨床口腔病理学会総会、2015 年 7
月 31 日、北海道大学 (札幌)

高島 清文、辻極 秀次、于 湊、武部 祐

一郎、伊藤 聡、藤井 昌江、松田 寛之、
河合 穂高、長塚 仁、八ニカム β-TCP
を用いた幾何学構造による骨・軟骨組織再
生制御、第 69 回 NPO 法人日本口腔科学会
学術集会、2015 年 5 月 14 日、大阪国際会
議場 (大阪)

高島 清文、辻極 秀次、武部 祐一郎、
伊藤 聡、藤井 昌江、河合 穂高、于 湊、
長塚 仁、八ニカム β-TCP を用いた細胞
外微小環境再現による硬組織再生、第 56
回歯科基礎医学学会学術大会・総会、2014
年 9 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡)

高島 清文、辻極 秀次、山近 英樹、武
部祐一郎、高木 慎、飯田 征二、長塚 仁、
硬組織形成過程における細胞外微小環境
としての八ニカム TCP、第 68 回 NPO 法
人口腔科学会学術大会、2014 年 5 月 9 日、
京王プラザホテル (東京)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：頭蓋骨接合部材
発明者：辻極 秀次、渡邊 敏之、高島 清
文
権利者：学校法人加計学園
種類：特許
番号：特許願 2016-228643
出願年月日：2016 年 11 月 25 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号：70335628

(2)研究分担者

武部 祐一郎 (TAKEBE Yuichiro)
岡山大学・歯学部・研究員
研究者番号：00714677

(平成 28 年 4 月 21 日退職により削除)

山近 英樹 (YAMACHIKA Eiki)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：10294422

長塚 仁 (NAGATUSKA Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・
教授
研究者番号：70237535