

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03002

研究課題名(和文) 骨置換性炭酸アパタイト多孔体と栄養血管を利用した皮膚と骨の複合的再生療法の開発

研究課題名(英文) Fabrication of the bone and soft tissue regenerative medicine using porous carbonate apatite with replacement to new bone and blood vessels

研究代表者

宮本 洋二 (MIYAMOTO, Youji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：20200214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は生体内吸収性および骨置換性を有する炭酸アパタイト(CAp)多孔体を作製し、骨・皮膚再生用スキャフォールドとしての有用性を検証することで、新たな再生医療材料の開発を目的としている。種々の気孔径を有する多孔質CAp顆粒の開発に成功し、動物実験により最適気孔径を同定した。この多孔質CAp内にラット骨髄幹細胞を播種することで複合体を作製し、ラット背部皮下に移植することで、異所性の骨再生に成功した。また複合体周囲に栄養血管を配置することで、血管付きの再生移植組織として利用できる可能性を確認した。さらに連通気孔を有する多孔質CApブロックの開発にも成功し、より大きな骨欠損再建の可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔外科臨床では顎骨とともに粘膜や皮膚を欠損することが多く、再建法が大きな課題である。この問題を解決するために、再生医療が盛んに研究され、骨を再生することは実用段階に入っている。しかし、臨床応用で必要とされる大きさの骨の再生や、皮膚を同時に再生する研究は未だ殆どない。そこで生体内吸収性および骨置換性を有する炭酸アパタイトを利用した再生医療材料を開発し、新たな臨床応用の術式の確立を目指した。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was to develop a new regenerative medicine method using porous carbonate apatite (CAp) which could be absorbed and replaced with the bone and to verify efficiency of CAp as scaffold for the bone and soft tissue regeneration. Porous CAp granules with various pore size were successfully fabricated and the optimal pore size was found for CAp scaffold by animal experiment. We also succeeded the ectopic bone regeneration to grafting porous CAp granules and bone marrow stem cell composite into subcutaneous in syngeneic rats. Application for this composite combined with subcutaneous blood vessels may could demonstrated to be transplantable regeneration material for bone and skin. Moreover, interconnective porous CAp block was successfully fabricated and was demonstrated that it could be applied wide range of bone reconstruction.

研究分野：口腔外科

キーワード：炭酸アパタイト 多孔体 骨再生 スキャフォールド

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科臨床では顎骨とともに粘膜や皮膚を欠損することが多く、再建法が大きな課題である。この問題を解決するために、BMPやハイドロキシアパタイト等を用いた再生医療が盛んに研究され、骨を再生することは実用段階に入っている。

再生医療の3要素は、細胞とシグナル、スキャフォールド(細胞の足場)である。骨再生のスキャフォールドとしては、ハイドロキシアパタイトがよく用いられるが、体内ではほとんど吸収されない欠点がある。一方、骨もアパタイトからできているが、吸収と骨添加を受ける。これは骨のアパタイトが、純粋なハイドロキシアパタイトではなく、炭酸基を含んだ炭酸アパタイトであることと、その結晶性が低いことに起因する。すなわち、炭酸アパタイトは生体内に存在する骨置換性バイオマテリアルと言える。炭酸アパタイトを骨再建や骨再生用スキャフォールドに応用する場合、ある程度の強度と形態を付与する必要がある。そのためには、これまで高温の焼結によって焼き固めるしか方法がなかった。しかし、焼結すると、炭酸基が遊離するとともに、結晶性が上がり、体内での吸収性が低下するという課題があった。

研究代表者らは、硫酸カルシウムなどを出発物質として、溶解析出反応による炭酸化、リン酸化を行うことによって、焼結過程なしに炭酸アパタイト硬化体を作製することに成功した(特願 2003-179257、医療用骨補填材およびその製造方法、Characterization of microporous carbonate-substituted hydroxyapatite bodies prepared in different phosphate solutions, *J Mater Sci*, 42(18), 7843-7849, 2007)。さらに、臨床治験を行い、2018年からサイトランsgラニュール®として市販されている(図1)。



図1:市販されている炭酸アパタイト顆粒(サイトランsgラニュール®)

研究代表者はこの炭酸アパタイトの多孔体を用いれば、大きな骨欠損の再建ができると発想した。さらに、炭酸アパタイト多孔体内で骨髄幹細胞を培養し、これを移植すれば骨が再生できると考えた。また、この炭酸アパタイト多孔体と骨髄幹細胞の複合体に皮下の動静脈を通した後に、異所性に骨を再生させれば、より大きな骨の再生医療技術を確認できる可能性があると考えた。本研究の目的は、炭酸アパタイト多孔体の開発と、その多孔体と骨髄幹細胞の複合体による異所性の骨再生技術の開発である。さらに、複合化した炭酸アパタイト多孔体と骨髄幹細胞の周囲に皮下の血管を組み入れることによって、さらに大きな骨と皮膚の再生技術にも挑戦した。

## 2. 研究の目的

本研究は、生体内吸収性および骨置換性を有する炭酸アパタイト多孔体を作製し、骨とそれを被覆する皮膚を同時に再生する新たな再生医療を開発することを目的としている。研究代表者らは骨置換性炭酸アパタイト多孔体の合成に成功し、骨を再生できることを明らかにしてきた。しかし、臨床応用を想定すると、さらに大きな骨を、そして骨だけでなく皮膚をも同時に再生する必要がある。そこで、本研究では、臨床応用を目指すために下記の3点を明らかにする。(1)気孔径の異なる炭酸アパタイト多孔体を試作する。(2)試作した炭酸アパタイト多孔体の生体内での挙動と最適気孔径を解明する。(3)骨髄幹細胞と多孔体を複合化させ実験動物の背部皮下に移植し、異所性の骨再生を試みる。(4)さらに、再生した骨とそれを被覆する皮膚を複合移植体として、栄養血管を利用することによって、他部位へ移植するという臨床応用の可能性について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)種々の気孔径を有する炭酸アパタイト多孔体の開発

出発物質である硫酸カルシウムにナイロンファイバー(ファイバー径; 30、50、120、205  $\mu\text{m}$ )を混和し、ファイバーの重量比が10 wt%となるように混合し、混水比0.2で練和後、冷間等方圧加圧法により50 MPaの圧力下で硬化させた。硬化後、700°C(昇温速度0.13°C/分)で5時間焼成することによってファイバーを除去し、これを前駆体とした。その後、顆粒径が1.0~1.4 mmとなるように粉砕、分粒し、炭酸ナトリウム水溶液およびリン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬し、炭酸アパタイトへ組成変換を行った。変換前後における形態学的観察は走査型電子顕微鏡を用い、組成分析はX線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて解析を行った。また、押出成形機による連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体ブロックの作製にも着手し、炭酸アパタイト多孔体ブロックの作製を行い同様に物性の評価を行った。

### (2)試作した炭酸アパタイト多孔体の生体内での挙動と最適気孔径の解明

直径 30、50、120、205  $\mu\text{m}$  のファイバーを混合して調製した炭酸アパタイト多孔体顆粒(30、50、120、205 $\mu\text{m}$ )と炭酸アパタイト緻密体顆粒をウサギ頭蓋骨に形成した欠損部 ( $\phi 8\text{mm}$ ) に埋植し、術後 2、4、8 週で摘出し、非脱灰切片を作製し、ピラヌエバ・ゴールドナー染色を行い、組織学的に、新生骨の形成挙動を比較した。また、押出成形機を利用した連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体ブロックをウサギ下顎骨の辺縁切除を行い、欠損部 ( $5\times 5\times 10\text{ mm}$ ) に埋植し、術後 4、8 週で摘出し、同様に評価した。

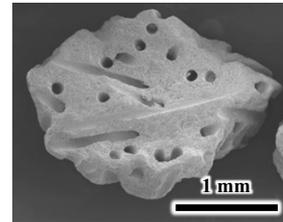


図 2：ナイロンファイバーを利用して作製した炭酸アパタイト多孔体顆粒

(3)骨髄幹細胞と炭酸アパタイト多孔体を複合化させ実験動物の背部皮下に移植し、異所性の骨再生の試み

最適気孔径を同定した炭酸アパタイト多孔体顆粒上と内部に Fischer344 系ラット大腿骨から採取・培養した骨髄幹細胞を播種し、複合体を作製した。この複合体を  $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて培養 (24 時間) し、MTT Assay を行った。また複合体を 4%パラホルムアルデヒドにて固定 (30min、 $4^\circ\text{C}$ )、エタノールで脱水、金蒸着し、操作型電子顕微鏡にて観察した。

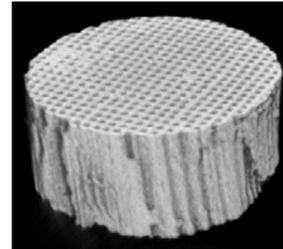


図 3：押出成型機で作製した炭酸アパタイト多孔体ブロック

さらに複合体を骨形成培地上で 2 週間培養し、同種の近交系ラットの背部皮下に移植した。摘出後に HE 染色を行い、異所性の骨形成に関して評価した。さらに骨形成の促進を図るために、背部皮下の血管を複合体の周囲に置き、同様の方法で異所性の骨再生を試みた。皮下の血管を複合体周囲に配置することで、骨再生にどのような影響があるかを評価した。

#### 4. 研究成果

炭酸アパタイトの前駆体に径の異なるファイバーを混和させる手法で種々の気孔径を有する炭酸アパタイト多孔体顆粒を開発に成功した。硫酸カルシウムから炭酸アパタイトへの変換は粉末 X 線回折およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて解析を行なったが、気孔径の違いによる変換速度に差は認めなかった。作製した顆粒の気孔径は 8.2~18.7% 縮小していたが、前駆体で形成した気孔径は閉塞せず維持されていた。以上より、種々の気孔径を有する炭酸アパタイト多孔体顆粒の作製手法を確立した (図 2)。また、押出成形機による連通気孔を有する炭酸アパタイトの作製にも着手しており、炭酸アパタイト多孔体ブロックの作製にも成功した (図 3)。

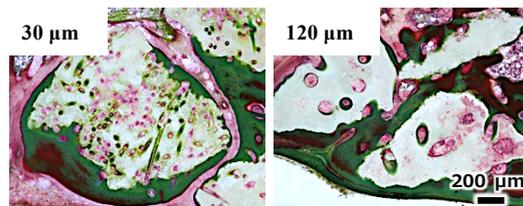


図 4：径 30  $\mu\text{m}$  (左)、120  $\mu\text{m}$  (右) のファイバーを用いて作製した炭酸アパタイト多孔体顆粒の頭蓋骨埋入部位の組織像

開発に成功した炭酸アパタイト多孔体を実験動物に埋植、評価することで、その有用性を検討した。炭酸アパタイト多孔体顆粒(30、50、120、205 $\mu\text{m}$ )と緻密顆粒をウサギ頭蓋骨に形成した欠損部に埋植し、新生骨の形成挙動を比較した。術後 2、4、8 週のいずれの期間においても炭酸アパタイト多孔体顆粒は緻密体顆粒と比較し優れた骨伝導性を示し、術後 2 週の段階ですでに気孔内部にも骨形成を認めた (図 4)。特にファイバー径 120 $\mu\text{m}$  の炭酸アパタイト多孔体顆粒が他の多孔体顆粒に比べ気孔内部で有意に多い骨形成を認めた。以上のことより、炭酸アパタイト多孔体顆粒は緻密体と比較し迅速な骨形成を可能とし、炭酸アパタイト多孔体顆粒(120 $\mu\text{m}$ )の気孔径(実測約 85 $\mu\text{m}$ )が骨再生に最もすぐれていることを同定した (図 5)。

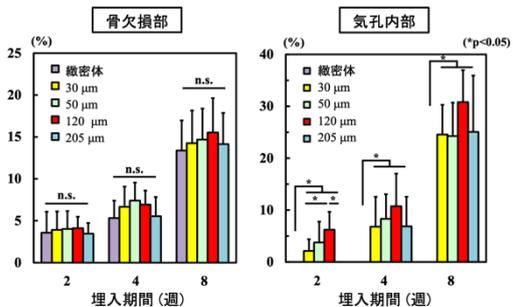


図 5：炭酸アパタイト多孔体顆粒の頭蓋骨埋入部位の骨形成量 (左：骨欠損部、右：気孔内部)

同定した最適気孔径の炭酸アパタイト多孔体顆粒とラット大腿骨から採取・培養した骨髄幹細胞との複合体を培養したところ、24 時間で炭酸アパタイト緻密体、ハイドロキシアパタイトと比較して有意な細胞増殖活性を認めた (図 6)。また走査型電子顕微鏡にて炭酸アパタイトの気孔内部に骨髄幹細胞が観察された。

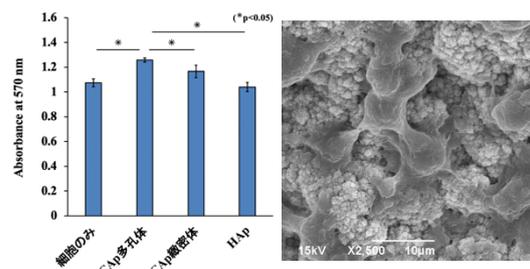


図 6：炭酸アパタイト多孔体上にラット骨髄幹細胞を播種した複合体を培養し MTT Assay した結果 (左)、電子顕微鏡像 (右)

複合体を骨形成培地で培養した後、同系ラット背部皮下に移植したところ、複合体の良好な生体親和性と安全性を確認した。さらに、気孔内部には血管の侵入と異所性に骨組織の形成を認めた(図7)。皮下の骨組織をその表面の皮膚とともに切り出すことによって皮膚と骨の同時移植に使える可能性を確認した。

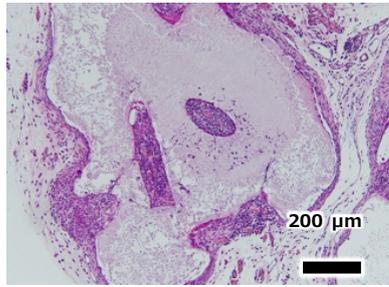


図7：炭酸アパタイト多孔体顆粒と骨髄幹細胞の複合体を背部皮下に移植した組織像



図8：炭酸アパタイト多孔体顆粒と骨髄幹細胞の複合体に背部皮下の血管を組み入れた再生医療用の移植体

さらに、骨形成の促進を図るために、背部皮下の血管を複合体の周囲に置き、同様の方法で異所性の骨再生を試みた(図8)。栄養血管を配置することによって、骨形成はやや促進されたが、有意な増強とはならなかった。しかし、この血管を使えば皮膚と骨の複合移植が可能であると思われる、この栄養血管を利用した有茎移植では移植組織として利用できることを確認した。

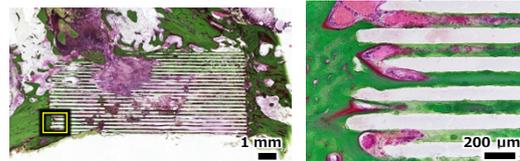


図9：押出成型機で作製した炭酸アパタイト多孔体ブロックのウサギの下顎骨埋入部位の組織像

さらに、大きな骨欠損の再建を目標とし、押出成型機で作製した連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体ブロックをウサギ下顎骨欠損部へ埋植を行った。また、気孔内部への骨新生や微小な血管新生を認め、ブロックに付与した気孔が一方向で材料内部に軟組織が貫入しないため、欠損部が陥凹する変形治癒も防げることを確認した(図9)。さらに、再建部の皮膚は材料表面に周囲の健常部分と同様の線維性結合組織が形成され、皮膚等の修復や再生に悪影響を及ぼさないことが確認された。

以上のように、皮下の栄養血管の周囲に骨髄細胞を注入した炭酸アパタイト多孔体を移植して異所性の骨再生を図ることで、栄養血管付きの骨組織と皮膚を同時に再生する新たな再生医療の開発への可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 宮本洋二, 秋田和也, 福田直志, 鎌田久美子, 栗尾奈愛	4. 巻 41
2. 論文標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイトの開発と骨再生医療に向けて	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 顎顔面補綴	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kudoh Keiko, Fukuda Naoyuki, Kasugai Shohei, Tachikawa Noriko, Koyano Kiyoshi, Matsushita Yasuyuki, Ogino Yoichiro, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 77
2. 論文標題 Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Low-Crystalline Carbonate Apatite Granules With Simultaneous Implant Installation: First-in-Human Clinical Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joms.2018.11.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Takayuki, Kudoh Keiko, Fukuda Naoyuki, Kasugai Shohei, Tachikawa Noriko, Koyano Kiyoshi, Matsushita Yasuyuki, Sasaki Masanori, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 49
2. 論文標題 Application of low-crystalline carbonate apatite granules in 2-stage sinus floor augmentation: a prospective clinical trial and histomorphometric evaluation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal & Implant Science	6. 最初と最後の頁 382-382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5051/jpis.2019.49.6.382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akita Kazuya, Fukuda Naoyuki, Kamada Kumiko, Kudoh Keiko, Kurio Naito, Tsuru Kanji, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 108
2. 論文標題 Fabrication of porous carbonate apatite granules using microfiber and its histological evaluations in rabbit calvarial bone defects	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 709-721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mano Takamitsu, Akita Kazuya, Fukuda Naoyuki, Kamada Kumiko, Kurio Naito, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 108
2. 論文標題 Histological comparison of three apatitic bone substitutes with different carbonate contents in alveolar bone defects in a beagle mandible with simultaneous implant installation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1450-1459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 宮本洋二, 栗尾奈愛, 工藤景子, 高丸菜都美	4. 巻 34
2. 論文標題 インプラント治療における口腔外科の基本手技とリスクマネジメント	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔インプラント学会	6. 最初と最後の頁 26-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 骨補填材としての炭酸アパタイトの開発と骨再生医療に向けて
3. 学会等名 第35回日本顎顔面補綴学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイトの開発ーその経緯と薬事承認、適応症ー
3. 学会等名 第38回日本口腔インプラント学会 東北・北海道支部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイトの開発と骨再生医療への展開
3. 学会等名 第22回日本顎顔面インプラント学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋田和也、福田直志、大江 剛、藤澤健司、眞野隆充、宮本洋二
2. 発表標題 ナイロンファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイトの開発
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイト顆粒の臨床応用    その特徴、適応症と再生医療への展開
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本洋二、石川邦夫
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイトの実用化と再生医療への展開
3. 学会等名 再生歯科シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤景子, 福田直志, 秋田和也, 工藤隆治, 大江 剛, 栗尾奈愛, 山村佳子, 鎌田久美子, 眞野隆充, 宮本洋二
2. 発表標題 ハニカム構造を有する炭酸アパタイト多孔体の開発と下顎骨再建への応用
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 鎌田久美子, 山村佳子, 工藤景子, 工藤隆治, 栗尾奈愛, 大江 剛, 眞野隆充, 宮本洋二
2. 発表標題 ナイロンファイバーをポロゲンとして用いた炭酸アパタイト多孔体の開発と骨再建
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田直志, 工藤景子, 秋田和也, 工藤隆治, 大江 剛, 眞野隆充, 林 幸彦朗, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトハニカムブロックの創製と下顎骨再建への応用
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮本洋二, 石川邦夫
2. 発表標題 基礎と臨床との連携 - 歯科発日本発世界初の炭酸アパタイト人工骨の開発 -
3. 学会等名 日本歯学系学会協議会、第17回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋二、石川邦夫
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイト - その特徴、適応症と再生医療への展開 - .
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と今後の展開
3. 学会等名 第24回日本顎顔面インプラント学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	工藤 隆治  (KUDOH Takaharu)  (10263865)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教   (16101)	
研究分担者	福田 直志  (FUKUDA Naoyuki)  (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教   (16101)	
研究分担者	工藤 景子  (KUDOH Keiko)  (70380029)	徳島大学・病院・講師   (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	栗尾 奈愛  (KURIO Naito)  (80622141)	徳島大学・病院・講師    (16101)	
研究分担者	石川 邦夫  (ISHIKAWA Kunio)  (90202952)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	
研究分担者	中川 貴之  (NAKAGAWA Takayuki)  (30456230)	広島大学・病院（歯）・助教    (15401)	
研究分担者	大江 剛  (OHE Go)  (60432762)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・徳島大学専門 研究員    (16101)	
研究分担者	真野 隆充  (MANO Takamitsu)  (80325125)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・准教授    (16101)	
研究分担者	玉谷 哲也  (TAMATANI Tetsuya)  (30274236)	徳島大学・病院・講師    (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------