

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28日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21560720

研究課題名（和文） 熱溶解積層法により造形した生体内吸収性四次元骨修復材料の開発

研究課題名（英文） Assessment of bone biology using 3-D structured bone substitute manufactured by rapid prototyping technology.

研究代表者

藤林 俊介 (FUJIBAYASHI SHUNSUKE)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30362502

研究成果の概要（和文）：

熱溶解積層法およびレーザー溶融積層法を用いて作成し三次元構造を制御した生体材料における骨伝導性と骨誘導性の in vivo 評価を行い、至適な三次元構造の解明を行った。骨伝導は 1200 μm の径が骨侵入には適しており、骨誘導は 500 μm の径が骨形成には適しており、周囲から 5mm ほど深部が骨誘導に適した環境となり、人工骨表面のサブミクロンサイズの微細構造は骨バイオロジーにとって重要な役割を果たすことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

3-D structured bone substitute was manufactured by rapid prototyping technology. Optimal 3-D structure of biomaterial for both osteoconduction and osteoinduction was assessed using animal model. The results of this study revealed that 1200-micron size pore was suitable for osteoconduction and 500-micron size pore was suitable for osteoinduction. And submicron-size surface structure was also important for bone ingrowth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生体材料

科研費の分科・細目：材料工学、構造・機能材料

キーワード：生体内吸収材料、三次元構造、構造解析、経時的变化、熱溶解積層法

1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍掻爬後の骨欠損修復、脊椎固定術などにおいてはしばしば骨移植が必要となるが、自家骨採取に伴う問題、同種骨使用における倫理面や感染などの問題から理想的な人工骨の開発が望まれている。既存の人工骨は緻密体や多孔体としてのセラミックスや活性化ガラスなどがあるが、骨伝導性、強度などにおいては解決しなければならない

様々な問題点がある。また、関節軟骨欠損などにおいては軟骨修復と軟骨下骨修復を同時に行う必要があり、現在、自家骨軟骨移植がその主流となっているが、健全部位からの骨軟骨プラグの採取にともなう侵襲の問題があり、軟骨と軟骨下骨を同時に修復できる人工骨の開発が望まれている。

理想的な人工骨の条件

- (1) 骨伝導性および骨誘導性が自家骨と同等あるいはそれ以上に優れている
- (2) 力学的強度が優れている(荷重下で用いることができる)
- (3) 骨と置換する
- (4) 部位や用途に応じた形状や強度が調節できる
- (5) 成長因子や細胞移植の担体となりうる

研究代表者らは生体材料が多孔体構造あるいは骨類似の三次元構造を有することで、これまでには成長因子や骨細胞を付加しなければ獲得できなかった骨誘導性を獲得することができ、自家骨に匹敵する生体活性能を有する可能性があることを明らかにした(Fujibayashi S. Osteoinduction of porous bioactive titanium metal. *Biomaterials*. 2004 Feb;25(3):443-50.)。同時に生体内吸収性材料であるポリ-L-乳酸(PLLA)と骨伝導性を有するハイドロキシアパタイト(HAp)の多孔体コンポジット材料の生体内での有効性を報告してきた(Hasegawa S, Fujibayashi S. In vivo evaluation of a porous hydroxyapatite/poly-DL-lactide composite for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2007 Jun 15;81(4):930-8.)。多孔体コンポジット材料は骨伝導性、骨誘導性を有するのみでなく、生体内吸収性を有するために骨と置換する能力を有する。しかし、発泡体を用いた従来の製造方法では構造の制御は困難であり、荷重下など用途に応じた力学的強度の獲得は困難であった。また、生体内での吸収性あるいは骨へと置換する動態に関しては課題を残していた。

研究代表者らはHApとPLLAのコンポジット材料を熱溶解積層法(Fused Deposition Modeling:FDM)を用いて造形する技術を開発した(図1)。通常のインクジェット法では粘稠度の高いPLLAなどを射出することは困難であるが、独自に開発した空圧ディスペンサーを用いることで、直接造形が可能となった。この方法を用いることにより、外形状のみならず内部構造を制御し、さらに材料の吸収性と骨伝導性を生かした新しい人工骨の開発が可能となる。この方法で造形した人工骨は構造による三次元性に加えて、ミクロンサイズの微細構造を意図的に操作し、材料吸収、骨形成を時間軸で制御できることから四次元的なダイナミズムを実現することができる、全く新しい発想の人工骨となる可能性を秘めている。骨欠損部位のみならず、骨軟骨欠損部の修復に対しても、内部構造および組成の傾斜を制御することで、対処することが可能となる。本研究においては熱溶解積層法により直接造形し作成した人工骨を生体内に埋入し、経時的な材料の吸収性と骨形成性

び組成の傾斜を制御することで、対処することが可能となる。本研究においては熱溶解積層法により直接造形し作成した人工骨を生体内に埋入し、経時的な材料の吸収性と骨形成性変化を組織学的に観察するとともに、両者の構造・機能変化をイメージベースモデリングおよび応力解析により定量的に評価することで、理想的に骨に置換する構造・機能を有する骨類似微細構造の開発を目指す。すでにこの造形方法により作成したロッドの生体内での骨伝導性および安全性は確認している。



図1：熱溶解積層法で作成した3D構造体

2. 研究の目的

多孔体の生体材料が骨伝導性のみならず、骨誘導性に優れており、新しい多機能生体材料として期待できることをこれまでに報告してきた。同時に生体内吸収性材料であるポリ-L-乳酸(PLLA)と骨伝導性を有するハイドロキシアパタイト(HAp)の多孔体コンポジット材料の生体内での有効性を報告してきた。研究代表者らはHApとPLLAのコンポジット材料を熱溶解積層法(Fused Deposition Modeling:FDM)を用いて造形する技術を開発した。通常のインクジェット法では粘稠度の高いPLLAなどを射出することは困難であるが、独自に開発した空圧ディスペンサーを用いることで、直接造形が可能となった。この方法を用いることにより、外形状のみならず内部構造を制御し、さらに材料の吸収性と骨伝導性を生かした新しい人工骨の開発が可能となる。この方法で造形した人工骨は構造による三次元性に加えて、ミクロンサイズの微細構造を意図的に操作し、材料吸収、骨形成を時間軸で制御できることから四次元的なダイナミズムを実現することができる。骨欠損部位のみならず、骨軟骨欠損部の修復に対しても、内部構造および組成の傾斜を制御することで、対処することが可能となる。本研究においては熱溶解積層法により直接造形し作成した人工骨を生体内に埋入し、経時的な材料の吸収性と骨形成性

変化を組織学的に観察するとともに、両者の構造・機能変化をイメージベースモデリングおよび応力解析により定量的に評価することで、理想的に骨に置換する構造・機能を有する骨類似微細構造の開発を目指す。

3. 研究の方法

空圧ディスペンサーを用いた熱溶解積層法により直接造形した直径400ミクロン径および800ミクロン径のHA-PLLA幾何学的三次元構造体の円柱(6x15mm)を作成する。コンポジットはHAp(平均粒径0.1-1.0 μ m)を20w%混和させた分子量13,000のPLLAである。インプラントをウサギ大腿骨顆部に埋入し、埋入後3,6,12,54週で摘出し、実態顕微鏡、マイクロCT、走査型電子顕微鏡を用い組織学的に材料の溶解と骨の新生を計測すると同時に脱灰標本を作成し、光学顕微鏡にて材料と骨との関係を観察する。21年の実験結果をもとに三次元構造を制御し、22年度の実験に移行する。応力解析はスキャホールドの劣化・吸収と新生骨の形成・リモデリングを数理モデルとして表現しボクセル有限要素法と組み合わせ合わせた方法を用いる。

4. 研究成果

21年度:空圧ディスペンサーを用いた熱溶解積層法により直接造形した直径400ミクロン径および800ミクロン径のHA-PLLA幾何学的三次元構造体の円柱(6x15mm)を作成し、インプラントをウサギ大腿骨顆部に埋入し、組織標本を観察した(図2)。

- (1) 骨侵入は大きな骨孔ほど良好
 - (2) いずれの三次元体でも骨侵入は良好
- であり、構造による骨侵入の違いは見いだす事ができなかった。しかし、埋入3週をピークに骨量が減少する傾向にあり、経時的な変化が認められた。

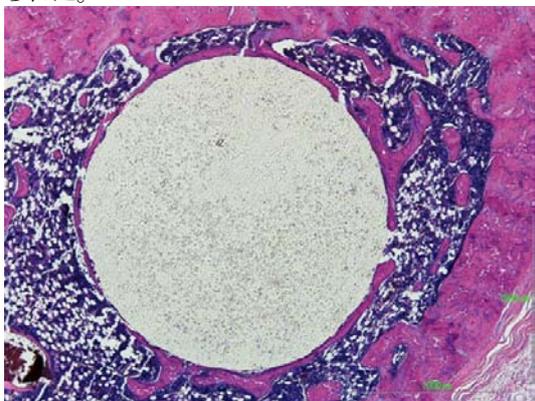


図2:インプラントと骨との良好な骨親和

22年度:生体吸収性材料の供給および加工が困難となり、レーザー溶解法により作成したチタ

ン金属材料を用い、骨伝導性の三次元体を用いた骨修復評価を同様の方法で行った。インプラントは直径3.3mm長さ15mmの円柱内に500、600、900、1200 μ mの4つの径の孔を長軸方向に作成したものを用いた。インプラントを動物(犬および日本白色家兔)骨内に埋入し、周囲からインプラントの長さのうちどこまで骨が進入したかの指標としてPercent Bone Formation Length(PBFL)、インプラントの中に侵入した骨の総量をそれぞれの骨孔において計測し、その値をTotal Bone Formation Volume(TBFV)として4つの孔で比較した。

PBFLは犬骨内では大きな骨孔の方が小さな骨孔より骨侵入に有利であり、日本白色家兔でも同様の結果が得られた。

一方、TBFVは犬、兎ともにPBFL同様に大きな骨孔の方が小さな骨孔より骨形成量が多いことが判明した(図3)。



図3:4つの孔に形成した新生骨

23年度:ミクロンサイズの微細構造の影響およびさらに微細のサブミクロンサイズの表面構造が骨侵入に及ぼす影響の詳細を調査した。

インプラントは選択的溶解法を用い、直径3.3mm長さ15mmの円柱内に500、600、900、1200 μ mの4つの径の孔を長軸方向に作成したものを用いた。骨侵入の指標としてPBFL、インプラントの中に侵入した骨の総量をそれぞれの骨孔において計測し、その値をTBFVとして4つの孔で比較した。サブミクロンサイズの表面構造の制御にはアルカリ加熱処理を用いた。骨内でのバイオロジーとして犬・兎での骨伝導、骨外でのバイオロジーとして犬での骨誘導を調査した。

骨伝導(犬):PBFLは4群間で有意差を認めず、TBFVは1200 μ mの径で有意に高い値となった。表面処理を行った群は4群ともに非処理群に比

べ有意に高い値となった(図4)。

骨伝導(兎):PBFLは4群間で有意差を認めず、TBFVは1200 μ mの径で有意に高い値となった。表面処理を行った群は4群ともに非処理群に比べ有意に高い値となった。

骨誘導(犬):表面処理を行わない群では骨誘導は認められず、表面処理を行った群ではPBFLは500 μ mの径で有意に高い値となり、周囲から5mmの部位で高い骨誘導を認めた(図5)。

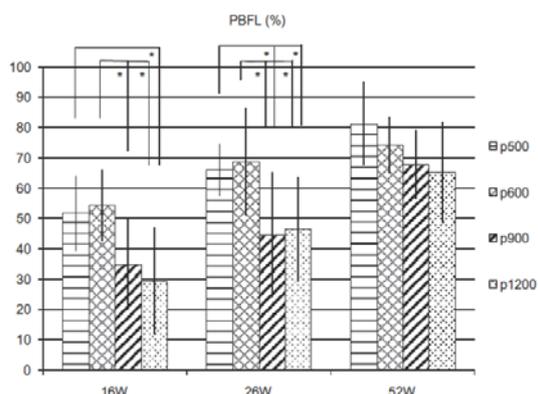


図4:各群でのPBFLの変化

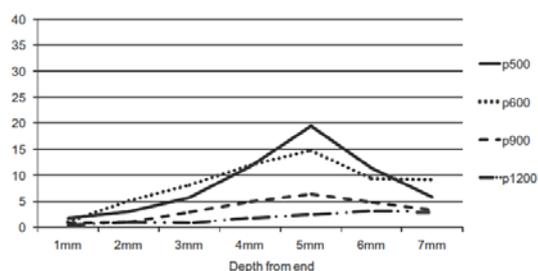


図5:各群での16週での骨誘導。周囲からの距離と骨形成量との関係

以上の結果から骨伝導は1200 μ mの径が骨侵入には適しており、骨誘導は500 μ mの径が骨形成には適しており、周囲から5mmほど深部が骨誘導に適した環境となり、人工骨表面のサブミクロンサイズの微細構造は骨バイオロジーにとって重要な役割を果たすことが判明した。

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)

- (1) Fukuda A, Takemoto M, Saito T, Fujibayashi S, Neo M, Pattanayak DK, Matsushita T, Sasaki K, Nishida N, Kokubo T, Nakamura T. Osteoinduction of porous Ti implants with channel structure fabricated by selective laser melting. Acta Biomater. 2011

May;7(5):2327-36. 査読有

DOI: 10.1016/j.actbio.2011.01.037

- (2) Pattanayak DK, Fukuda A, Matsushita T, Takemoto M, Fujibayashi S, Sasaki K, Nishida N, Nakamura T, Kokubo T. Bioactive Ti Metal Analogous to Human Cancellous Bone: Fabrication by Selective Laser Melting and Chemical Treatments. Acta Biomater. 2011 Mar;7(3):1398-406. 査読有
DOI: 10.1016/j.actbio.2010.09.034

[学会発表] (計3件)

- (1) Fukuda A, Fujibayashi S et al: Development of porous bioactive titanium by rapid prototyping. 22nd European Conference on Biomaterials. 2009.9.9. LAUSANNE
- (2) Fukuda A, Fujibayashi S et al: Bone Ingrowth into Pores of Lotus-type Bioactive Titanium Fabricated Using Rapid Prototyping. Bioceramics 22. 2009.10.27. Daegu
- (3) 福田明伸、藤林俊介、他: Rapid prototypingで作製した生体活性処理レンコン状チタン材料の各孔における bone ingrowth 評価 第31回日本バイオマテリアル学会大会 2009.11.16 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤林 俊介 (FUJIBAYASHI SHUNSUKE)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号: 30362502

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

安達 泰治 (ADACHI TAIJI)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号: 40243323