

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10848

研究課題名(和文) 生体骨を模した新しい複層型人工骨の開発とdrug delivery

研究課題名(英文) Development of new composite artificial bone and drug delivery

研究代表者

吉井 俊貴 (YOSHII, Toshitaka)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：50583754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、強度の強い低気孔率人工骨と骨伝導性の優れた多孔体を組み合わせて、強度と骨伝導性の両面を兼ね備えた複層人工骨の開発を目指す。中空HApの圧縮強度試験を行ったところ、中空率と力学的強度も負の相関を示した。BMP2を含浸させたHAp/ColはIn vitroで持続性の除放を示した。BMP2を付加したHAp/ColはラットSegmental defectモデルにて良好な骨形成を示した。ウサギ脛骨欠損モデルに複層HApを移植し、BMP使用群では骨形成が良好である傾向にあった。HAP/Colへの吸着、持続徐放性が良好なVCMを使用し、ラット骨髄炎モデルに移植、良好な骨再生を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、骨欠損を補填する方法として主に自家骨や同種骨の移植、人工の生体材料の移植等がおこなわれている。自家骨を移植するためには健常部から移植骨を採取しなければならないが、採取部の合併症や、採取量の制限などの問題がある。同種骨が普及していないわが国では、人工骨補填材料への需要が高く、これまでリソカルシムを中心とした様々な人工骨が研究されてきている。一般にリソカルシムを使用した人工骨は骨伝導性の優れた多孔体は強度が弱く、強度の強い緻密質ないし低気孔率人工骨は骨伝導性に劣るという問題がある。本研究で開発した複層HApは強度と優れた骨伝導性を兼ね備え、今後の骨補填材料として期待される。

研究成果の概要(英文)：Osteoconductive material is generally highly porous, which does not possess mechanical strength. On the other hand, dense material has enough mechanical strength but less osteoconductive. Therefore, we aimed to develop porous/dense composite hydroxyapatite (HAp) based artificial bone in this study. Dense HAp has a hollow shape that can contain highly porous HAp/collagen inside. We examined the mechanical strength of the hollow HAp and found that the mechanical strength was negatively correlated the porosity and hollow rate. HAp/col showed excellent ability of retaining BMP2 and antibiotics which were sustainably released. In vivo rat model showed a good bone regeneration of BMP2 loaded HAp/col in femoral segmental bone defect model and rabbit model showed an acceptable bone reconstruction in tibia defect model. VCM loaded Hap/col showed an excellent antibiotic and bone reconstruction ability in rat infection model.

研究分野：整形外科

キーワード：ハイドロキシアパタイト 複層 骨再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

現在、骨欠損を補填する方法として主に自家骨や同種骨の移植、人工の生体材料の移植等がおこなわれている。自家骨を移植するためには健常部から移植骨を採取しなければならないが、採取部の合併症 (~40%) や、採取量の制限などの問題がある。同種骨は感染症のリスクや管理の問題があり、国内ではほとんど普及していない。同種骨が普及していないわが国では、人工骨補填材料への需要が高く、これまでリソ酸カルシウムを中心とした様々な人工骨が研究されてきている。一般にリソ酸カルシウムを使用した人工骨は骨伝導性の優れた多孔体は強度が弱く、強度の強い緻密質ないし低気孔率人工骨は骨伝導性に劣るという問題がある。本研究では、強度の強い低気孔率人工骨と骨伝導性の優れた多孔体を組み合わせて、強度と骨伝導性の両面を兼ね備えた複層人工骨の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

中空の低気孔率ハイドロキシアパタイト (HAp) を作成し、内部に当科で開発した高气孔率ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体 (HAp/Col) (図1) を組み込んだ複層体を作成し、力学的特性を検討する。また作成した複層体 (図2) の骨再生における有用性を検討する。また HAp/Col に BMP2 や抗菌剤などを付加し、その効果を検証する。

## 3. 研究の方法

- 1) 中空 HAp の力学的強度の検証: 気孔率 15%、30%、40% の HAp の力学的特性を検討した。またその後、それぞれの気孔率の HAp を中空率 0%、30%、60% とふりわけ、圧縮強度試験を行い、気孔率および中空率が人工骨の強度に与える影響について検討を行った。図1 HAp/Col 図2 複層 HAp
- 2) 中空 HAp の内部に配置する HAp/Col に骨形成たんぱくである BMP2 を含浸させ、その徐放について In vitro 実験にて検討を行った。
- 3) ラット Segmental defect モデルにて BMP2 を付加した HAp/Col の骨形成能について評価を行った。
- 3) ウサギ脛骨に骨欠損モデルを作成し、複層 HAp を挿入、プレート固定を行った。8 週後に検体を取り出し、In vivo での骨形成の評価を行った。
- 4) HAp/Col に抗菌剤を含浸させ、その効果を In vitro、In vivo にて評価を行った。

## 4. 研究成果

- 1) 気孔率 15%、30%、40% の HAp の力学的強度は気孔率と負の相関を示した。またその後、それぞれの気孔率の HAp を中空率 0%、30%、60% とふりわけ、圧縮強度試験を行ったところ、中空率と力学的強度も負の相関を示した (図3)。
- 2) BMP2 を含浸させた HAp/Col の In vitro での生理食塩水への除放を調査したところ、持続性の除放を示した (図4)。

図3

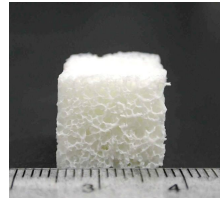
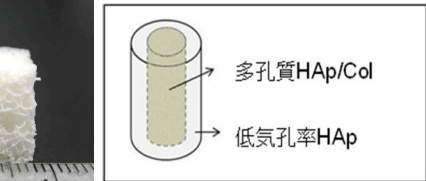
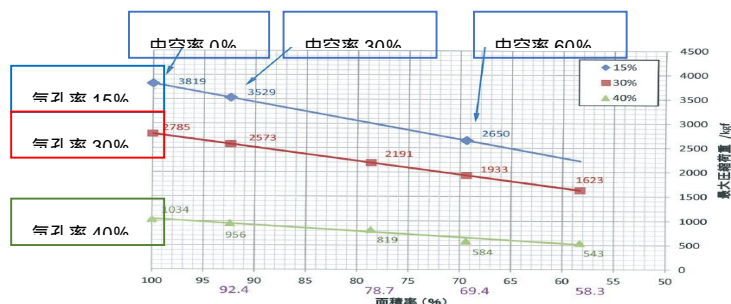
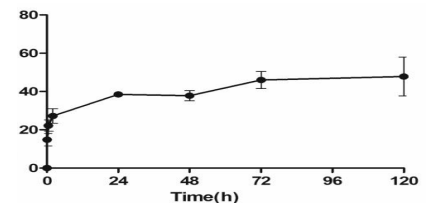


図4



- 3) BMP2 を付加した HAp/Col はラット Segmental defect モデルにて良好な骨形成を示した。

欠損部にインプラント移植し、8 週後に摘出を行った。BMP2 を付加しない HAp/Col では、骨欠損部の架橋を認めなかったが、BMP2 群では良好な骨形成、骨架橋を認めた。マイクロ CT を使用した新生骨定量にて BMP2 使用群で良好な骨形成を認めた (図5)

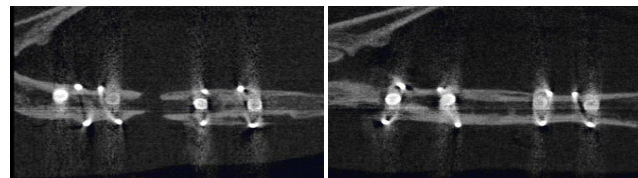
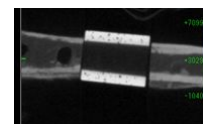


図5 HAp/Col

HAp/Col+BMP2

- 4) ウサギ脛骨欠損モデルに複層 HAp を移植 (図6) し、8 週後に摘出、骨形成についての評価を行った。BMP 使用群では、HAp/Col 単体での使用よりも骨形成が良好である傾向にあった。

図6



- 5) In vitro にて各種抗菌剤 (CEZ, CTM, DPT, MINO, PIPC, TEIC, VCM) の HAp/Col への吸着を評価したところ、DPT, MINO, TEIC, VCM の順に良好であった。また In vitro での MSSA を使用した抗菌作用評価では、HAp/Col +MINO, TEIC, VCM で持続的に有効性を認めた。

これらの結果をふまえて HAP/Col への吸着、持続徐放性が良好な VCM と不良な CEZ を使用し、ラット骨髄炎 (+Plug defect) モデルにて抗菌作用および骨形成を評価した。その結果、VCM にて持続性の抗菌作用と欠損部での良好な骨再生を認めた。

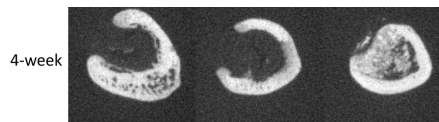


図 7 Control CEZ VCM

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

【全て査読有】

1. Kuroiwa T, Yoshii T, Okawa A et al. Activation of cancer-related and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in human mature osteoblasts isolated from patients with type 2 diabetes. Bone Rep. In press, 2019.
2. Yuasa M, Yoshii T, Okawa A et al Unexpected timely fracture union in matrix metalloproteinase 9 deficient mice. PLoS One. 31;13(5) :e0198088 2018
3. Sielatycki J. Alex, Saito Masanori, Yuasa Masato, Moore-Lotridge Stephanie N., Uppuganti Sasidhar, Colazo Juan M., Hysong Alexander A., Robinette J. Patton, Okawa Atsushi, Yoshii Toshitaka, Schwartz Herbert S., Nyman Jeffrey S., Schoenecker Jonathan G. Autologous chondrocyte grafting promotes bone formation in the posterolateral spine. JOR Spine. 1. e1001~e1001.2018
4. Wei Xuetao, Egawa Satoru, Matsumoto Renpei, Yasuda Hiroaki, Hirai Keigo, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Nakajima Takehiko, Sotome Shinichi. Augmentation of fracture healing by hydroxyapatite/collagen paste and bone morphogenetic protein-2 evaluated using a rat femur osteotomy model. Journal of Orthopaedic Research. 36(1).129-137.2017.
5. Yoshii T, Hirai T, Yamada T, Inose H, Kato T, Sakai K, Enomoto M, Kawabata S, Arai Y, Okawa A. Intraoperative evaluation using mobile computed tomography in anterior cervical decompression with floating method for massive ossification of the posterior longitudinal ligament. J Orthop Surg Res.12(1).12 2017.
6. Yoshii T, Hirai T, Sakai K, Sotome S, Enomoto M, Yamada T, Inose H, Kato T, Kawabata S, Okawa A. Anterior Cervical Corpectomy and Fusion Using a Synthetic Hydroxyapatite Graft for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Orthopedics.40(2).e334-e339.2017.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 吉井 俊貴, 湯浅 将人, 平井 高志, 加藤 剛, 山田 剛史, 猪瀬 弘之, 坂井 顕一郎, 新井 容嘉, 川端 茂徳, 大川 淳 腰椎椎体間固定術における新しい人工骨, 多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の臨床使用-局所骨との前向き比較研究- 第 47 回 日本脊椎脊髄病学会学術集会 2018
2. 齊藤 正徳, 湯浅 将人, Stephanie Moore-Lotridge, 吉井 俊貴, Jonathan Schoenecker, 大川 淳 重症外傷患者に対する新たなビスフォスフォネートを用いた治療法 第 91 回 日本整形外科学会学術総会 2018
3. 松本連平, 江川聡, 平井敬悟, 山田剛史, 湯浅将人, 吉井俊貴, 大川淳, 早乙女進一 乳癌骨転移モデルラットに対するパクリタキセル含浸 HAp/Col による局所制御実験 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会 2018
4. 吉井 俊貴, 早乙女 進一, 江川 聡, 平井 敬悟, 松本 連平, 平井 高志, 湯浅 将人, 猪瀬 弘之, 新井 容嘉, 大川 淳 当科で開発した人工骨、多孔質ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の脊椎固定術における臨床使用と骨癒合評価 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 2018
5. 平井 敬悟, 江川 聡, 松本 連平, 湯浅 将人, 吉井 俊貴, 大川 淳, 中島 武彦, 早乙女 進一 ガンマ線照射が多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)に与える影響 筋組織内での評価 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会 2018
6. 江川 聡, 松本 連平, 平井 敬悟, 吉井 俊貴, 大川 淳, 早乙女 進一 ラット大腿骨急性骨髄炎モデルにおける抗菌剤含有ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)の治療効果 第 33 回 日本整形外科学会基礎学術集会 2018
7. 平井 敬悟, 江川 聡, 松本 連平, 吉井 俊貴, 大川 淳, 中島 武彦, 早乙女 進一 ガンマ線照射が多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp/Col)に与える影響 第 40 回 日本バイオマテリアル学会大会 2018
8. Satoru Egawa, Keigo Hirai, Renpei Matsumoto, Toshitaka Yoshii, Atsushi Okawa, Shinichi Sotome Therapeutic Effect of Antibiotic-loaded Hydroxyapatite Collagen(HAp/Col)Composite on Acute, Bone-Destructive Osteomyelitis in Rats Orthopaedic Research Society 2019 Annual Meeting 2018
9. 吉井 俊貴, 平井 高志, 山田 剛史, 猪瀬 弘之, 江川 聡, 大川 淳 硬膜欠損を伴う脳表へモジデリン沈着症における欠損部同定(MRI balanced sequence 法の有用性)第 46 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2017.
10. 吉井 俊貴, 湯浅 将人, 新井 容嘉, 大川 淳, 早乙女 進一 新しい人工骨、多孔質ハイド

ロキシアパタイト/コラーゲン複合体の臨床使用 第 39 回日本バイオマテリアル学会  
2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 早乙女 進一

ローマ字氏名: SOUTOME, Shinichi

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科

職名: 寄附講座准教授

研究者番号(8桁): 20401391

研究分担者氏名: 大川 淳

ローマ字氏名: OKAWA, Atsushi

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 大学院医歯学総合研究科

職名: 教授

研究者番号(8桁): 30251507

研究分担者氏名: 榎本 光裕

ローマ字氏名: ENOMOTO, Mitsuhiro

所属研究機関名: 東京医科歯科大学

部局名: 医学部附属病院

職名: 非常勤講師

研究者番号(8桁): 90451971

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 平井 敬悟

ローマ字氏名: HIRAI, Keigo

研究協力者氏名: 江川 聡

ローマ字氏名: EGAWA, Satoru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。