

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591479

研究課題名（和文）多孔体人工骨を用いた自己生体内骨組織工学技術の開発

研究課題名（英文）Development of *in vivo* bone tissue engineering using porous biomaterials

研究代表者

藤林 俊介（FUJIBAYASHI SYUNSUKE）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30362502

研究成果の概要：

臨床の現場では難治性の骨折や腰椎の再建、骨腫瘍での切除後の再建術などの移植骨としては自家骨を用いるが、採取に伴う様々な問題がある。今回の研究では、多孔体人工骨を用いた生体内骨誘導によって得られる異所性骨が移植骨として自家骨と同程度の能力がある可能性が示唆された。この方法を用いることができれば移植骨に関する様々な問題を解決する可能性が期待できる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：人工骨、多孔体、骨誘導、組織工学、動物実験

1. 研究開始当初の背景

これまで臨床の現場では難治性の骨折や腰椎の再建、骨腫瘍での切除後の再建術などの移植骨としては自家骨を用いることが gold standard である。しかし、採骨部の痛みや感染、採骨量にも制限があり、自家骨移植に代わるものとして様々な人工骨の研究、開発が行われている。しかし人工骨自体の生体活性能には限界があり、自家骨と同等以上の生体活性能を有するには培養した骨前駆細胞や BMP などの骨誘導因子を付加する必要がある。tissue engineering の応用として *in vitro* にて生体材料に培養細胞や骨誘導因子

を組み合わせることで生体内へ移植する研究が臨床応用に向けて盛んに行われているが、培養細胞では免疫学的や感染の危険性などの問題、BMP 等のタンパクでは生体に対する影響や担体の抗原性の問題、費用の問題などがあり臨床応用には多くの諸問題を抱えている。

一方、これまでの研究からポーラス（多孔）構造を有する一部の生体親和性材料（リン酸カルシウム）セラミック、チタン金属などを犬筋肉内に埋入した場合、骨誘導因子を付加することなくポーラス構造内部に骨形成を認めることがわかっている（骨誘導能）。

我々も骨前駆細胞や骨誘導因子を含まないポーラス構造を有する一部の生体親和性材料（リン酸カルシウム系セラミック、チタン金属など）で骨組織の誘導に成功している。この現象を応用することにより、生体内（in vivo）で材料内に自家の骨前駆細胞や骨誘導因子を増加させ、生体活性を向上させた状態を取り出し、それを移植骨としてさらに骨欠損部や脊椎固定術等に使用し良好な骨癒合が可能と考える（in vivo bone tissue engineering）。この方法を用いることができれば移植骨に関する様々な問題を同時に解決する可能性が期待できる。

2. 研究の目的

(1) 犬筋肉内で骨誘導によってポーラス体に新生骨を形成させ、それを取り出し移植骨として応用した場合、移植骨として臨床で使用されている既存の人工骨や自家骨と比較して有用であることを明らかにする。

(2) 新鮮骨髄細胞移植による生体活性の向上は術中に可能な手技であり（in vivo tissue engineering）に合う方法であり、すでに臨床で応用されている方法である。新鮮自家骨髄細胞移植は筋肉内での骨誘導をさらに向上させ、より有効な in vivo bone tissue engineering となりうると考える。

まず、材料のみでの骨誘導を認めにくいウサギやげっ歯類など小動物において、新鮮骨髄細胞を材料に付加することで筋肉内の骨誘導を起こすことを明らかにする。

(3) 小動物においても骨誘導が認められれば、(1) 同様に新鮮骨髄細胞移植を用いて筋肉内で骨誘導させた材料を移植骨として用いる実験をおこない、それにより in vivo bone tissue engineering においてより生体活性を向上させられる有効な方法となることを証明する。

3. 研究の方法

(1) はじめに筋肉内で骨誘導させたポーラス体を用意する。まず、ポーラス体をビーグル犬背筋に埋入した。埋入後3ヶ月で摘出し、移植骨として用いた。

＜腰椎後方固定術での骨移植実験モデル＞

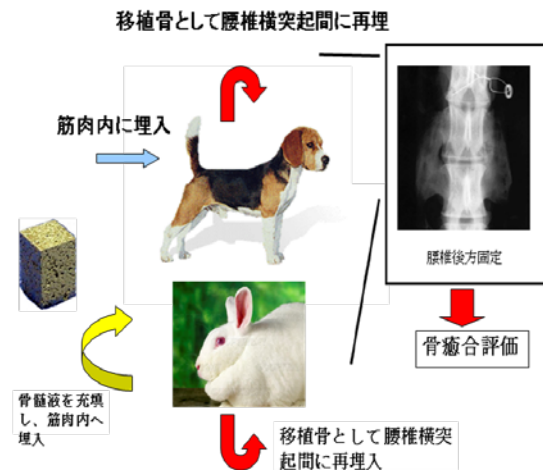
ビーグル犬の第5-6椎間の椎間関節をスクリューにて固定し、次に第5、6腰椎の横突起間に各試料を骨移植した（骨誘導させた材料では同じ犬を用いて行った）。12週で固定腰椎を全摘出し、マイクロCTによる形態的骨癒合評価、骨移植部の組織学的観察による評価を行い各試料間での骨癒合率を比較した。

(2) 新鮮骨髄細胞を用いての筋肉内骨誘導研究

材料のみによる骨誘導を認めないウサギを用いた。新鮮骨髄細胞と組み合わせる材

料として、犬筋肉内で骨誘導を認めているポーラス ハイドロキシアパタイト (HAp) (A群) と骨誘導能を認めていないポーラス HA p (B群) の2種類を使用し比較した。麻酔下に骨髄液を大腿骨より採取し、そのまま各材料の孔内に充填させた。骨髄液を充填させた各材料をウサギの臀筋内に埋入、4、8、12週で試料を摘出、組織評価を行い、新生骨の観察、さらに新生骨の量を数値化することで各試料の骨誘導能を評価した。

(3) 生体内での移植骨の評価に、本実験においてもウサギを使用した。(2)の方法と同様に骨髄液を採取し、そのまま各材料の孔内に充填させ、臀筋内に埋入した後、筋肉内骨誘導研究にて得られる指摘埋入期間後に試料を摘出し、移植骨として第5-6腰椎横突起間に埋入した。比較する試料としては自家腸骨、ポーラス体単独、新鮮骨髄細胞+ポーラス体（犬筋肉内で骨誘導を認めているポーラス HA p と骨誘導能を認めていないポーラス HA p の2種類）を用いた。12週後、移植骨を含め腰椎固定部を全摘出し、徒手的な骨癒合評価、経時的Xp、マイクロCTによる形態的骨癒合評価、力学的試験による強度測定、骨移植部の組織学的観察による評価を行い各試料間での骨癒合率を比較した。



4. 研究成果

(1) ビーグル犬を用いての腰椎後方固定術予備実験として4匹のビーグル犬を用いた。移植骨として、筋肉内で骨誘導させたポーラス体群と自家腸骨群に分けそれぞれ2匹ずつ腰椎後方固定を行った。12週後の採取検体は4匹ともに骨癒合は認めなかった。コントロール群としての自家骨群においても骨癒合が得られず、この実験を行う上ではまず実験系を確立する必要がある。(図1) 今後の展望として自家骨を用いて確実に骨癒合が期待できる腰椎後固定術モデルを確立させた上で犬における骨誘導骨の移植骨として有用性を評価していきたい。

次に本研究においては腰椎後方固定術に用いる移植骨の評価方法が一般的に確立しているウサギを用いた腰椎後方固定術モデルを用いての実験を進めた。

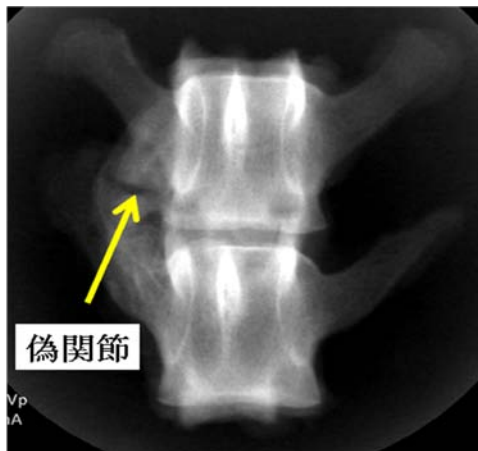


図1 自家骨での犬腰椎後方固定術 Xp

(2) A群、B群ともに4週後より筋肉内での骨誘導能を認め、12週まで経時的に新生骨量が増加していった。定量評価において材料の吸収性を認めるA群では吸収に伴い骨量が増加していく傾向が認められた。A、B群ともに12週後で新生骨量は最大となり、骨量に有意な差は認めなかった。骨髄細胞を用いるといずれの群においてもウサギの筋肉内で良好な骨誘導を認める結果となった。(図1)

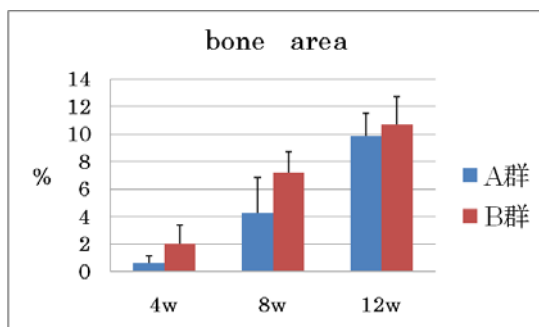


図2

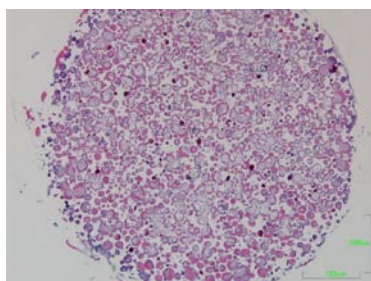


図3. A群における骨誘導

(3) <日本白色家兎における腰椎後側方固定術 (PLF) での評価>

A群ではPLFを行った4羽中いずれも骨癒合は認めなかった。B群では7羽中4羽に骨癒合を認め、骨癒合率は自家腸骨移植を用いたPLF (6/10)と同程度であった。力学的強度も自家腸骨を用いたPLFの値と同程度であった。(図4) 組織学的評価において、骨癒合を認めたB群の検体では固定術を施行した横突起間に皮質骨の連続性を認め、多孔体内にも新生骨と骨髄組織を認めた。A群の検体では筋肉内で骨誘導によって形成された骨組織はPLF後壊死している像を示した。A群は新鮮骨髄細胞を用いることでウサギ筋肉内に骨誘導を起こすことはできたが、さらに移植骨として用いる場合には材料の吸収により適切な三次元構造が崩壊し、骨癒合を導く足場として機能しなかったと考えられた。一方、B群は吸収性が少ない材料であり、筋肉内から取り出した後に移植骨として用いても足場として機能し、生体内 (in vivo) で材料内に増加した自家の骨前駆細胞や骨誘導因子による骨癒合を可能にしたと考えられた。(図5)

犬筋肉内で骨誘導を起こす材料は吸収性を認める材料が多く、今回の実験結果から考えると犬における *in vivo* Tissue Engineering 骨を用いたPLFは難しく、材料の吸収が少なくかつ骨誘導が起こる材料の開発が望まれる。一方、新鮮骨髄細胞と吸収性の少ない材料を用いての *in vivo* Tissue Engineering は低侵襲であり、当初の目的である自家骨の合併症を解決できる方法となりうると考えられた。

	strength (N)	stiffness (N/cm)
自家骨	173.6 ± 35.7	804.7 ± 237.3
A群	98.3 ± 54.5	403.2 ± 133.7
B群	182.6 ± 68.4	865.3 ± 236.5

図4

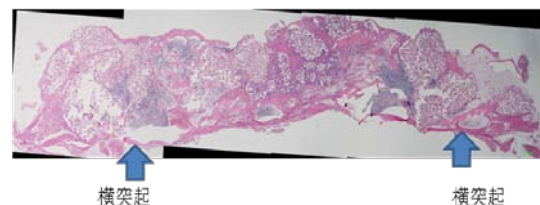


図5. A群での腰椎後方固定

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

① 田中耕次郎、竹本充、藤林俊介、敷波保夫、中村孝志、骨髄穿刺液のscaffoldとしての多孔体 uHA/PDLLA composite の有用性の検討 : ウサギ腰椎後側法固定術modelを用いての検討、骨軟部吸収性材料フォーラム、2009年2月20日、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤林 俊介 (FUJIBAYASHI SYUNSUKE)

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

根尾 昌志 (NEO MASASHI)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 80311736