

平成 22 年 3 月 23 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791528

研究課題名（和文）細胞増殖因子徐放能を有する機能型 Scaffold の開発と骨再生への検討

研究課題名（英文） Fabrication of the scaffold with growth factor release and experimental study of the scaffold for bone regeneration

研究代表者

館原 誠晃（TATEHARA SEIKO）

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90380089

研究成果の概要（和文）：骨組織再生における機能型 Scaffold の開発を目的に、ポリ-D, L-乳酸-ポリグリコール酸共重合体（PLGA）、アパタイト（AP）および細胞増殖因子である bFGF を組み込んだ scaffold を作製し、骨組織における反応について検討した。Scaffold を骨組織内に埋入すると、早期に内部まで新生骨の形成を認めた。このことから、骨組織工学において、この scaffold の有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have fabricated highly interconnecting, macroporous hybrid scaffolds of poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) and apatite cement (AC) . The aim of this study was to determine the effectiveness of bFGF on bone regeneration within PLGA-AC scaffold. PLGA-AC scaffolds with bFGF (PLAC-F) were implanted into the drill hole defects of 4 mm in diameter were made in the tibiae of rabbits. After 6 weeks, PLAC-F scaffolds were significantly infiltrated with new more bone tissue in the medullary region. These findings demonstrate that PLAC scaffold incorporated with bFGF has a great advantage for bone tissue engineering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・外科系歯学

キーワード：生体材料、再生医療、セラミック、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

顎口腔外科領域において、先天異常、外傷や腫瘍切除に伴う広範囲骨欠損の再建として、新鮮自家骨移植が一般的な方法として最も多く行われている。しかし、新鮮自家骨移植は、身体の他部位に新たな外科的侵襲を加える必要があり、さらに骨採取量の制限があることや術後の移植骨の吸収などの問題点がある。

近年、自家骨移植に代わる骨再生法として組織工学が注目され、基礎的研究が活発に行われるようになってきた。組織工学による再建には細胞の足場としての担体が重要な役割を果たす。最近の報告では、細胞の足場として、生体溶解性ポリマーを用いた多孔体が作製され、その有用性についての検討が散見される。特に、ポリ-D, L-乳酸-ポリグリコール酸共重合体 (poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) : PLGA) は生体適合性が良く、操作性、形態付与性も良いため、生体溶解性ポリマーの中で近年幅広く研究が行われている。しかし、骨組織再建において、PLGA の多孔体は、機械的強度と細胞接着性が低いという欠点がある。一方、強度があり、さらに細胞接着性のある生体材料として、ハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite: HAP) などのセラミックブロックがあり、それらに関する研究が行われている。HAP は、骨伝導性を有し、細胞の接着性を有する。しかし、組織工学の担体とした、多孔体の HAP の作製に特殊な技術を要するなどの欠点がある。そこで、骨組織の成分に類似し、また、生体吸収性 (生体の骨リモデリングシステムによる吸収) のあるアパタイト (Apatite) と生体内で分解するポリ乳酸共重合体を複合したスポンジ状の Scaffold (Apatite-PLGA scaffold) を開発し、さらに細胞増殖因子の徐放効果を加えることに

より、早期に自家骨への再生が可能となることを予想した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞増殖因子徐放能を有し、早期に骨再生させる Scaffold を開発し、動物実験で骨再生を試み、臨床応用に最適な条件を見いだすことである。

3. 研究の方法

(1) Scaffold の調整

骨リモデリングにより吸収するアパタイトの調整を行った。炭酸カルシウムを炭酸化し炭酸アパタイトを作製した。まず、このアパタイトが骨組織内での反応について検討した。方法としては、粒径 300 - 500 μm の顆粒状作製したアパタイトを用い、対照として同粒径のハイドロキシアパタイト (HAP) 顆粒を使用した。実験動物は 15 - 16 週齢の雄性日本白色ウサギを用いて、両足大腿骨遠位端に径 5.0 mm、深さ 8.0 mm の埋入窩を形成し、各試料を充填した。埋入 2, 4, 12 および 24 週後に摘出し、硬組織研磨切片および脱灰切片を作製して組織学的検討を行った。

次に Scaffold の作製は、solvent-casting particulate leaching 法により行った。すなわち、PLGA (75/25) に上記で作製したアパタイトを混合 (重量比 1 : 2) させ、ジメチルスルホキシドにて溶解させた後、この混和液を直径 2 mm のショ糖が入ったモールド内に注ぎ込んだ。凍結硬化後、蒸留水を加えてショ糖を溶解させ、径 3.75 \times 5 mm の円柱状の複合体を作製した。対照群として、同様の方法で PLGA のみで PLGA 多孔体を作製した。

(2) 試作した Scaffold の物性検討

機械的強さの指標として、間接引張強さ (DTS: diametral tensile strength) を万能試験機 (AGS-500A, 島津、京都) を用いて測定した。

(3) 実験動物は 6 週齢のウサギを使用し、実

験に使用する前に標準飼料（オリエンタル酵母工業、東京）と水を自由摂取させた。なお、実験動物の取り扱いは、徳島大学動物実験倫理規定に従った。ペントバルビタール（ネンブタール[®]、大日本製薬、大阪）25 mg/kg をウサギ腹腔内投与し、エピネフリン含有 2 % リドカイン（キシロカイン[®]、藤沢薬品工業、大阪）を脛骨近位側に浸潤させた後、メスにて切開し、骨膜を剥離した。脛骨近位端を明示した後、径 4.0mm、深さ 5 mm の埋入孔を形成した。止血を行った後、径 3.75×5 mm の多孔体を埋入した。また、埋入後に形成された骨を標識するために、埋入直後に 10 mg/kg body weight のカルセイン（和光純薬、大阪）を、埋入後 6 週目に 25 mg/kg body weight のテトラサイクリン塩酸塩（和光純薬、大阪）を腹腔内投与した。

(4) Micro-focused X-ray computed tomography (マイクロ CT) による観察

埋入後 3 週と 6 週にペントバルビタールの多量投与にてウサギを屠殺後、試料を周囲組織と一塊として摘出した。摘出した試料は 10% 中性緩衝ホルマリンで浸漬固定を行った。試料は Micro-focused X-ray computed tomography (MIF-100, 日立メディコ、東京) を用いて、管電圧 50 kV, 管電流 100 μ A, 計測ピッチ 0.02 mm の条件で撮影した。

(5) 組織学的検討

試料は、Micro-CT 撮影後、上昇エタノール系列にて脱水し、リゴラック樹脂（応研商事、東京）にて包埋した。ゼーゲミクロトーム (Leica Microsystems Inc., Deerfield, IL, USA) を用いて切片を作製し、落射蛍光装置 EFD3 (ニコン、東京) にて観察した。観察後、トルイジンブルー染色を行い、組織学的に観察した。

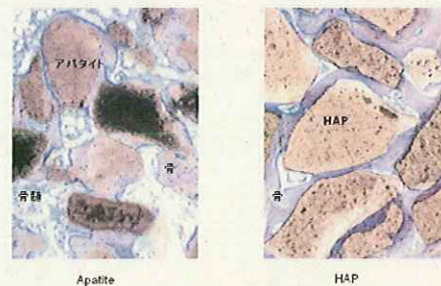
(6) 新生骨の定量的測定

トルイジンブルー染色切片を光学顕微鏡下で観察し、全自動顕微鏡写真撮影装置にてデジタル撮影し、骨欠損内に形成された新生骨組織の面積を測定した。次に scaffold の面積に対する新生骨組織の割合を算出した。なお、データの有意差の検定は Student's t-test にて行った。

4. 研究成果

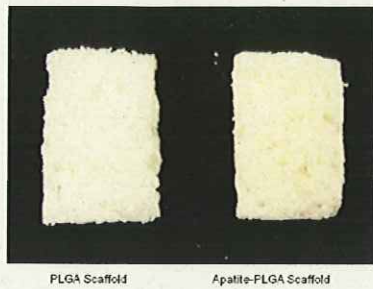
(1) Scaffold の調整

アパタイト埋入 2 週間では、既存骨辺縁から顆粒に向かって少量の骨形成が認められたが、HAP との間には差が認められなかった。埋入 4 週間では、作製したアパタイトにおいて既存骨辺縁から埋入窩中心に向かって骨形成が認められ、HAP より多く新生骨が認められた。埋入 12 週間では、埋入窩中心まで新生骨が認められ、さらに顆粒サイズは縮小し、新生骨と顆粒周囲には骨髄組織の形成が認められた(写真)。対照的に、HAP 顆粒周囲は成熟した骨で満たされ、埋入部位は、骨組織と HAP で充満した状態であった。さらに、顆粒形態について検討したところ、HAP 顆粒では埋入後 2 週から 12 週まで変化がみられなかったのに対し、アパタイト顆粒の形態は経時的に類円形に変化し、大きさは有意に減少した。この結果により、作製したアパタイトは骨形成を促進し、骨リモデリングにより吸収されること、骨置換性のアパタイトであることが示された。

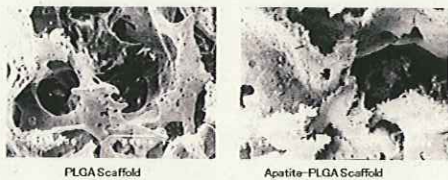


Scaffold の肉眼および SEM 像所見においては、PLGA Scaffold と Apatite-PLGA Scaffold

の実体顕微鏡像では、類似した形態をしていた (写真)。



SEM 像においては、ともに内部結合を有する連続した気孔が認められた (写真)。PLGA Scaffold の平均気孔径は約 1000 μm 、気孔率は約 97.5 %、Apatite-PLGA Scaffold の平均気孔径は約 750 μm 、気孔率は約 92 %であり、有意な差は認められなかった。



(2) Scaffold の機械的強度

Apatite-PLGA Scaffold は 0.05 ± 0.005 MPa、PLGA Scaffold は 0.032 ± 0.003 MPa であり、Apatite-PLGA Scaffold の強度は、PLGA Scaffold と比較して有意に高かった ($p < 0.05$, $n=6$)。

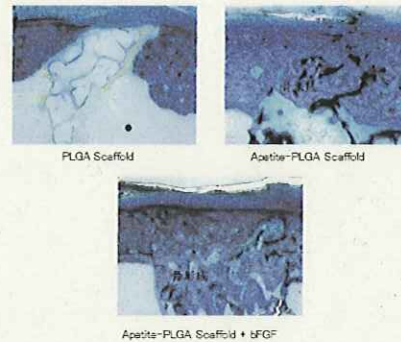
(3) Micro-CT 所見

埋入 3 週間後では、すべての Scaffold において既存皮質骨周囲に骨形成がみられたが、皮質骨欠損部中央には新生骨梁は認められなかった。埋入 6 週間後では、Apatite-PLGA Scaffold + bFGF および Apatite-PLGA Scaffold において、骨梁が骨欠損部中央部でみられた。

(4) 組織学的評価

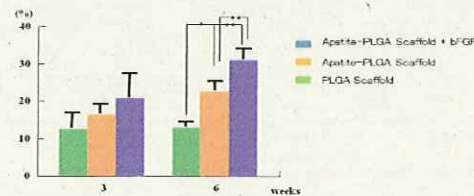
埋入 6 週後の PLGA Scaffold では、Scaffold 内部には骨組織は存在しなかった。既存の皮質骨と Scaffold 間のみ新生骨が存在してい

た。Apatite-PLGA Scaffold では皮質骨欠損部は新生骨で満たされており、Scaffold 内部まで新生骨が存在した。また、Apatite-PLGA Scaffold + bFGF のみ骨髄部の Scaffold 内部まで新生骨の形成は認められた (写真)。



(5) 新生骨の定量的評価

欠損部に形成された新生骨の面積は、ともに埋入 6 週間後まで経時的に増加した。埋入 6 週間後の Apatite-PLGA Scaffold と Apatite-PLGA Scaffold + bFGF の埋入部の新生骨の面積は、PLGA Scaffold と比較すると、有意に大きかった (図)。



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 件)

- ① 舘原誠晃 他 Osteoporosis influences the early period of the healing after distraction osteogenesis in a Rat Osteoprotic Model. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 査読有 *in press*
- ② 武知正晃 舘原誠晃 他 Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorphometric study. J

〔学会発表〕(計 3 件)

- ① 舘原誠晃 他 低結晶性炭酸含有アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 骨組織内での長期評価 第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大会 平成 21 年 10 月 10 日 札幌
- ② 高野栄之、舘原誠晃、他 低結晶性炭酸含有アパタイトによるサイナスリフトへの基礎的研究 第 39 回日本口腔インプラント学術大会 平成 21 年 9 月 27 日 大阪
- ③ 舘原誠晃 他 低結晶性炭酸含有アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究 ウサギ大腿骨内での組織学的検討 第 63 回日本口腔科学会学術集会 平成 21 年 4 月 17 日 浜松

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

舘原 誠晃 (TATEHARA SEIKO)

徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90380089