

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700461

研究課題名（和文） バブル様不定形スキャフォールドの開発および
骨-人工物間固定性の最適化に関する研究研究課題名（英文） Research on optimization of bone-implant stability,
development of bubble like scaffold

研究代表者 松田 純平（MATSUDA JUNPEI）

新潟大学ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー研究機関研究員

研究者番号：00535271

研究成果の概要（和文）

本研究では人工関節置換術のような骨組織の結合が求められるような場合において、間隙を効率的に補填し接触領域を確保すること、さらに早期 osteointegration を獲得することを可能にするためのアテロコラーゲンおよび骨補填材料をベースとしたバブル様スキャフォールドの開発に取り組んだ。研究目的を達成するためバブル様スキャフォールドの開発およびスキャフォールドが骨芽細胞の生存、増殖、分散等に与える影響について *in vitro* 実験による解析を行った。作成されたバブル様スキャフォールドは通常のコラーゲンゲルに対して約 27 倍の体積占有率を示した。本スキャフォールドは、細胞の生存に影響しないことを確認した。骨芽細胞の活性を示すアルカリフォスファターゼ活性は、本スキャフォールド群で増加の傾向が認められた。興味深いことに、気泡間に骨芽細胞が分布して海綿骨のような網目状の構造を呈することが認められた。

研究成果の概要（英文）：

In order to improve the bone inductivity of bone and implant, we developed free-shaped bubble like scaffold. The ingredient of scaffold is collagen and propylene glycol alginate. The survival rate of osteoblast was no significant as compared with control group. Furthermore, ALP activity accelerated. The volume share of scaffold was 27 compared with the volume of only collagen.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	2,500,000	750,000	3,250,000
22年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計			4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体工学，生体材料，バイオメカニクス，再生医療，細胞・組織

1. 研究開始当初の背景
厚生労働省の統計によれば、特に関節疾患（変形性関節症，関節炎），骨粗鬆症とそれを基盤とする骨折は，要介護者総数の 10%，寝たきりの原因としては 12%を占めている。

今後，増加する高齢者に比例して，このような骨疾患を持つ人口は増加すると推測されている。QOL の改善は，社会的自立性を保つ上で健康寿命の延伸は最重要課題の一つである。

近年、骨粗鬆症に起因する骨折や変形成関節症のような骨疾患に対しては、十分な徐痛、正常な可動域の獲得、即効性があるなどの利点から人工関節置換の適用が増加している。患者の多くは骨欠損部や骨粗鬆症のように骨占有率の低い組織であり、このような組織に対してインプラントの十分な固定性を得ることは困難である。完全なインプラントの固定には骨セメントが使用されるが、低い生体親和性、再置換の難しさ、経時的変性による耐久性の低下、ルーズニングといった問題から（図1）、極力用いないことが望まれている。このような観点から、近年、高いOsseointegrationを獲得する技術への関心が高まっており、人工関節などのインプラント材として骨親和性の高いチタン合金を用いたものや、骨組織との接触面に対して微細構造（porous-coating）を施して骨形成を促したものが積極的に研究・開発され、骨との接触面で効果的に作用している。しかしながら、骨との接触領域が十分に獲得できない個体では、人工関節設計時に予定されている機能を十分に獲得しているとは言えない（図2）。さらに、人工関節表面の微細構造やコーティングによる組織の応答を調査した報告は、数多く見受けられる（Svehla M et al., 2005, Baas J et al., 2008 など）が、骨組織との空間を最適化し、接触領域の改善を図るものはなく、生体親和性を向上させるためには、骨組織と人工関節との接触領域を確保し、人工関節設計段階の機能を獲得することが必要不可欠である。さらに骨を誘導する足場としての機能、構造を力学的観点から評価する必要がある。

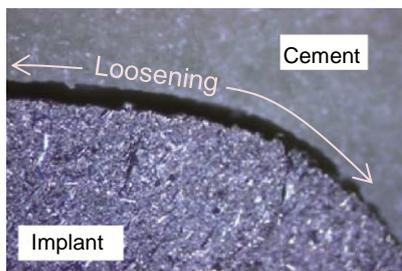


図1 筋鉤関節と骨セメント間の隙間

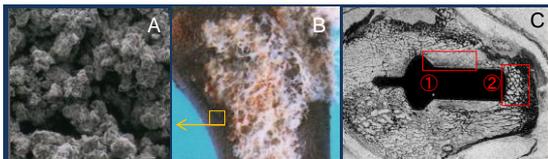


図2 骨ケイセイされた人工関節 (A:ポラスコーティング, B:部分的に骨ケイセイされた人工股関節, C:骨組織中の人工股関節 (①不明瞭な海綿骨領域, ②密な海綿骨領域))

2. 研究の目的

人工関節置換術のような人工物（インプラント）と骨組織の結合が求められるような場合において、接触領域を確保し、早期Osseointegrationを獲得する手法を構築することを目的として、本研究では、この手法によって形成された組織の組織学的および力学的特性を示すことで、具体的な使用範囲を明確に示す。これらの手法が確立できれば、人工関節置換術において固定方法の選択肢としてセメント固定とセメントレス固定の中間的役割を担う手法として導入することができる。さらに、術後の固定性の改善、早期社会復帰につながる技術的知見を得ることができる。

現在、人工関節表面への骨誘導技術に関する研究では、表面形状（ポラスの形態）や表面に対するコーティング処理によって骨誘導を惹起する研究は散見されるものの（Groessner SB et al., 1992, Sascha E et al., 2007 など）、人工関節と骨組織との間にある空間を改善し、接触領域を確保する方法について論じた研究例は見当たらないようである。再生工学的研究では、ブロック状のものや、関節軟骨を模擬したゲル状のものが開発されているが、形状に制限があり、人工関節が適用される骨梁の複雑で広範囲な空間を満たすには不十分であると思われる。本研究では、人工関節と骨組織との間にある空間を骨形成に適した環境にし、早期の骨誘導および適切な固定領域を獲得するための手法を提供する。早期臨床使用を可能にするために、医療用として実績のある、アテロコラーゲン（Koken）および β -TCP（オリンパス）（Ozawa M et al., 2000）を用いる。バブル状にすることで、広範囲を少量でカバーすることができ、コストパフォーマンスに優れ、組織中での栄養補給路の確保、骨吸収、骨形成の早期化が期待できる。このような試みはこれまで見られない手法である。さらに、スキャフォールドには、活性化ビタミンD3, BMP, ビスフォスフォネートのような追加要素を添加することが可能であり、これらの追加成分は、目的の部位に留めておくことが可能である。本研究を遂行することによって、人工関節のスペックを確実に確保する手法としてだけでなく、生体組織の欠損に対応する新しい再生医療技術として社会的に大きく貢献できる。

3. 研究の方法

先ず、本研究では、「複雑な形状に対応できる」、「インプラントとの接触領域を確保できる」、「早期の osseointegration を獲得できる」ことが目的である。したがって、骨誘導に対する有用性が報告されている β -TCP や

医用に生成されたアテロコラーゲンをを用い、生体外で培養した細胞や組織を用いないことにより、癌化や遺伝子変異などのリスクを排除した、高度な技術や複雑な作業を要することなく、容易に導入できるスキャフォールドの開発を行う。開発したスキャフォールド発生装置の概要は、手動型エアコンプレッサーから滅菌用ガスフィルタを介した圧縮空気が、50ml チューブ内のコラーゲン懸濁液に供給され、懸濁した混合ゲル中で圧縮酸素を噴射し、微細なバブルを成形させた。さらに、術中での作成を想定しているため、発生装置は容易に移動できることやコンタミネーションによる患部の感染対策を考慮した。コラーゲン懸濁液に関しては、コラーゲンのみ、 β -TCP 含有群、アルギン酸グリコール含有群とした。なお、製作初期段階では、比較的安価な Type I コラーゲン (日本ハム) を用いた。また、作業は氷上でアイシングしながら行った。 β -TCP 含有タイプについては、形状は、ポーラス成形されたブロックを粉砕して一定の大きさを持つ形状 (直径 300 μ m 程度) を作成し用いた (Kondo N et al., 2005)。

次に、*in vitro* 三次元細胞培養を行い、バブル様不定形スキャフォールドの特性および使用条件について検討した。スキャフォールドに播種した骨芽細胞 (樹立株: MC3T3-E1) の生存、分布について評価を行った。上述の方法で作成したスキャフォールドを培養用ディッシュ上に成形し、予め準備しておいた MC3T3-E1 細胞を 1×10^6 cells の密度で播種した。CO₂ インキュベーター (5%CO₂, 37°C) 内で 2 時間静置して、コラーゲンを固化させた後、培地 (10%FBS を含む α -MEM) を添加して 2 週間培養を行った。

さらに、*in vivo* 動物モデルを用いた評価として、ラット (Wister rat, 8 週齢) 大腿骨遠位にスキャフォールドを移植し、初期の生体内でのスキャフォールドの骨誘導率についての評価を行った。埋植方法は、麻酔下のラット両膝大腿骨遠位を切開した後、 ϕ 2mm の医療用ドリルを用いて ϕ 2mm x 3mm の穴を開けてスキャフォールドを埋植した。本実験で用いたスキャフォールドは、予め滅菌処理したシリコンモールドで成形および固化したものをを用いた。

4. 研究成果

バブル様スキャフォールドの開発において、気泡形成前のコラーゲン懸濁液として、シンプルに作製できるものとしてコラーゲンのみの懸濁液、気泡の安定性を考慮したカルボキシメチルセルロース (CMC) 添加コラーゲン懸濁液、アルギン酸プロピレングリコール

エステル (PGA) 添加コラーゲンについて実験的検討を行った。その結果、コラーゲンのみの懸濁液から作製したバブル様スキャフォールド (以降 BS と表記) は、バブル様に形成可能なものの気泡径が、気泡生成時で 60 μ m から 500 μ m と広く分布しており気泡径のコントロールや気泡安定化が困難であった。一方、CMC や PGA が添加された懸濁液を用いることで、20 μ m から 160 μ m サイズの微細な気泡をコントロールして生成することが可能であることが認められた (図 3)。さらに、CMC および PGA は生態適合性のある物質として広く用いられており、臨床応用の面からも BS 生成においてこれらを添加したものを使用することは有効であると考えられる (図 4)。生成された気泡サイズによるが、これらの方法によって見かけ上の空間占有率は気泡の無いコラーゲン担体に比べて 27 倍程度であった。

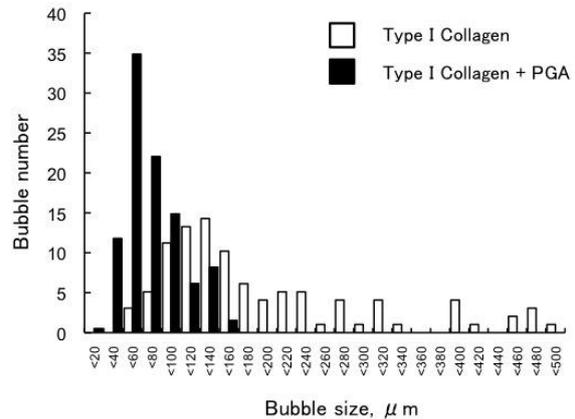


図 3 気泡サイズ分布

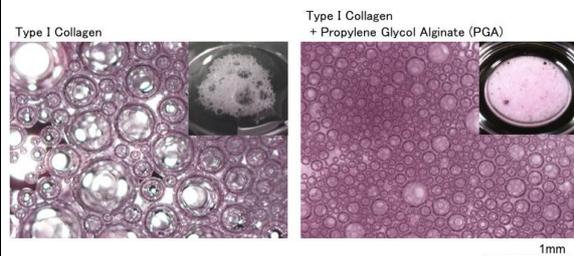


図 4 生成時のバブル様スキャフォールド (左: コラーゲンのみ, 右: アルギン酸プロピレングリコールエステル)

なお、本スキャフォールドは細胞の生存に影響しないことを骨芽細胞樹立株 MC3T3-E1 細胞を用いた生存アッセイによって確認した。さらに、骨芽細胞の活性指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は、本スキャフォールド群で増加の傾向が認められた。興味深いことに、気泡間に骨芽細胞が分布して

海綿骨のような網目状の構造を呈することが認められた (図5)。

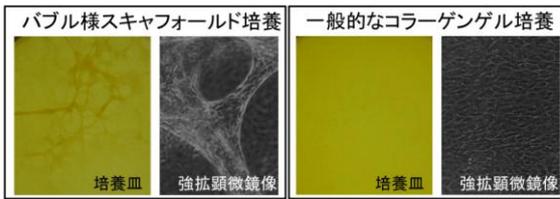


図5 骨芽細胞培養像。骨梁様の組織を形成している(左)。通常の三次元培養では見られない(右)。

さらに、BS を骨芽細胞と共に4週間の長期間静置培養を行い観察したところ、BS 重量相当 (37 μ l) のコラーゲンゲルのみ群 (コントロール群) と BS 群で比較したところ、図6に示すように BS 群のみが内部に空隙を有する骨組織様の細胞塊となった。組織培養において栄養供給不足による内部壊死が障害となっていたが、本手法をさらに検討していくことで血管新生を伴わない方法で比較的大きな組織の形成が可能となるかもしれない。今後、誘導因子や力学的環境因子などを考慮して検証していく予定である。

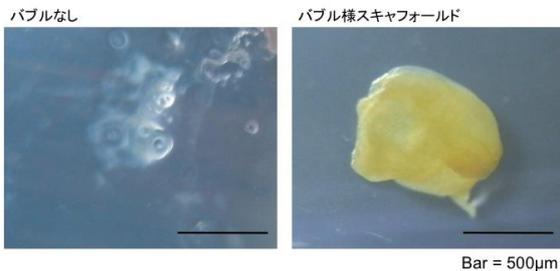


図6 長期培養後の組織像

ラット埋植実験に関しても、BS が骨誘導を亢進する傾向が認められた。現在、埋植試料が揃いつつある段階であり、今後は数を増やすことによって、微細構造の変化と力学特性との関係について検討すると共に研究結果を発表していく予定である。

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1件)

1. 松田純平, 原利昭, 遠藤直人, 圧縮荷重下の海綿骨骨梁変形と骨密度分布の関係, 日本骨形態計測学会誌, Vol.21 (2010) in press

[学会発表] (計5件)

1. Junpei MATSUDA, Toshiaki HARA, Naoto ENDO, Response of Osteoblasts on Linearly-increasing Mechanical Strain at a Culture Well., 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, No.882 (2010).
2. 松田純平, 原利昭, 遠藤直人, 圧縮荷重下の海綿骨骨梁変形と骨密度分布との関係, 第30回日本骨形態計測学会, (2010)
3. Junpei MATSUDA, Toshiaki HARA, Naoto ENDO, A Novel Method for Evaluating Response of Cells to Biomaterials Loaded Mechanical Strain, 6th World Congress on Biomechanics, in conjunction with 14th International Conference on Biomedical Engineering & 14th Asian Pacific Conference on Biomechanics (2011).
4. Junpei MATSUDA, Toshiaki HARA, Naoto ENDO, Effects of Osteoarthritis Progression on the Morphological Structure of Subchondral Plate and Bone: Results from a Rat ACLT Model., 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, No.1606 (2011).
5. 松田純平, 目良恒, 原利昭, 遠藤直人, 軟骨下骨および軟骨下骨プレートに対する変形性関節症の影響., 22年度第2回VBL成果発表会. (2011).

[図書] (計0件)

[その他]

ホームページ等
該当無し

受賞:

1. ゴールドリボン賞 (日本骨形態計測学会)
- 2.
3. 学術奨励賞 (日本骨形態計測学会)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 純平 (MATUDA JUNPEI)

新潟大学

ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー研究機関研究員

研究者番号: 00535271

(2) 研究分担者

()

研究者番号: