

## 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3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791975

研究課題名（和文）顎顔面骨再建に向けた完全連通孔を有する高機能型人工骨の創製

研究課題名（英文）Development of high performance artificial bones for maxillofacial reconstruction

研究代表者

井川 和代（IGAWA KAZUYO）

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90512111

研究成果の概要（和文）：理想的な骨再生治療法を確立するため、生体吸収材料であるリン酸三カルシウムを原料として3D インクジェットプリンターを用いて三次元形態を忠実に再現すること、力学特性・細胞親和性を向上させるために完全連通孔を作製すること、さらに生理活性物質を完全連通孔内にプリントし骨再生を促進すること、で高機能人工骨を創製した。イヌ頭蓋骨欠損モデルにおいて、bFGF を連通孔内にプリントした人工骨は骨再生に有効であることが示された。

研究成果の概要（英文）：The ideal high performance artificial bone was developed by the fabrication of three-dimensional forms from tricalcium phosphate using a 3D inkjet printer incorporating the optimal design of pores to improve the mechanical properties and cell affinity, in conjunction with printing basic fibroblast growth factor on the pores to accelerate bone regeneration. This study indicated that printing bFGF on the pores of the three dimensional artificial bones stimulated the new bone formation in the beagle skull defects. It was suggested that the high performance artificial bone can become a new treatment modality for bone regeneration.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2010年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
|        |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：口腔顎顔面再建外科学

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域において、口唇・口蓋裂の発生率は2/1000人、骨腫瘍約4500人、その他高齢化に伴う骨疾患が増加しており、顎顔面再建治療の早期確立が必要とされている。現状では、顎顔面領域の骨欠損・変形の治療に対して、自家骨、他家骨、人工骨が主に用いられている。自家骨移植法は自家骨を採取す

る際の外科手術に伴う侵襲、疼痛、二次感染、採取量の制限などが大きな障壁となるため、自家骨に代わる材料の開発が進められてきた。欧米では他家骨が用いられているが、日本国内ではボーンバンクが未発達で、感染などの危険性もあり、あまり普及されていない。従って、日本では、人工骨への社会的期待は高く、1980年代に生体親和性に優れ、骨伝導

を有するなどの理由から骨塩に近い組成であるハイドロキシアパタイトを中心としたリン酸カルシウム系材料人工骨の開発が進められてきた。現在、臨床における骨移植手術の30%にリン酸カルシウム系人工骨が使用されている。骨には無機成分だけでなく有機成分も含まれている。特に骨形成の観点から必要なのは骨誘導能を有する生理活性物質である。そこで、人工骨の成分であるリン酸三カルシウムがドラッグデリバリーシステムとして作用し、骨誘導能因子の吸着・放出を三次元的に制御可能な人工骨を開発することで理想的な骨再生治療法を期待できる。

本研究では生体吸収材料であるリン酸三カルシウム (TCP) を原料として3Dインクジェットプリンターを用いて三次元形態を忠実に再現すること、力学特性・細胞親和性を向上させるために完全連通孔を作製すること、さらに生理活性物質を完全連通孔内にプリントし骨再生を促進すること、で高機能人工骨を創製し、理想的な骨再生治療法を試みた。

## 2. 研究の目的

先天異常、外傷及び術後等による顎顔面重度欠損症に対して、構造力学・分子生物学・生体機能材料学を融合して高機能人工骨を創製することにより、形態機能回復に関する新たな治療法を確立する。具体的には、3Dインクジェットプリンターを用いてリン酸三カルシウム (TCP) を造形することにより、(1) 三次元形態の付与、(2) 完全連通孔の付与 (3) 生理活性物質の付与、を行い、骨再生を促進する高機能人工骨を創製することを目的とする。

### (1) 三次元形態の付与

骨欠損部位のCT画像をもとに、TCP粉体を3Dインクジェットプリンターで造形することで形態適合性に優れた人工骨 (inkjet-printed custom-made artificial bones : IPCAB) の作製を目的とする。

### (2) 完全連通孔の付与

TCPは、その生体親和性、骨伝導能から人工骨として広く臨床使用されてきた。大きな骨欠損治療に使用される多孔体では、当初その気孔内に新生骨が侵入し母床骨と完全に同化することが予想されたが、長期の臨床症例の解析から新生骨の侵入は数ミリ程度に限られることが明らかになってきた。新生骨の侵入しない気孔は人工骨にとっては死腔であり、強度面で不利となり荷重部における適応に疑問が残されている。そこで、本研究では細胞や血管が十分通りうる大きさの完全連通孔を有する人工骨を作製し、その設計を

最適化することを目的とする。

### (3) 生理活性物質の付与

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、血管誘導作用とともに骨再生作用があることが報告されている。本研究では、3Dインクジェットプリンターによる人工骨造形時にbFGFを完全連通孔内へプリントし、徐放させて骨再生を促進することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 完全連通孔の力学的評価

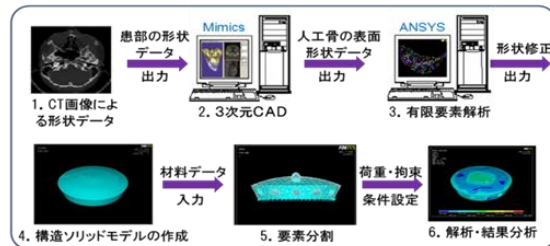


図1. 強度解析方法

直径20mm、厚み4mmの円盤状人工骨を評価対象とし、直径2mm完全連通孔の数が0-10までの範囲で圧縮試験機と有限要素法による力学解析にて評価を行った。有限要素解析では、図1の方法にて得られた解析結果から、剛性値の評価を行った。

### (2) bFGFをプリントした完全連通孔の生物学的評価

直径20mm、厚み4mmの円盤状に対し、直径2mmの完全連通孔を0-5本三次元CAD上で設計し、TCP粉体を3Dインクジェットプリンターで造形することで、完全連通孔を有するIPCABを作製する。完全連通孔内にbFGFをプリントした場合としていない場合の評価を行った。0-5本の完全連通孔をもつIPCAB上で、マウス由来の骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞を20,000cells/wellで6ウェルに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータ内で24時間前培養を行った。その後、Cell Counting Kit-8キット (同人化学) を用いて呈色反応を行いマイクロプレートリーダーにより吸光度450nmを測定し、細胞増殖能を検討した。さらに、ピシニコニン酸 (BCA) アッセイを用いて完全連通孔内にタンパク質をプリントした場合の徐放量を評価した。

### (3) ビーグル犬の頭蓋骨欠損モデルにおけるbFGFをプリントした完全連通孔の有効性と安全性の評価

ビーグル犬の頭蓋骨のCTデータより、最適化された完全連通孔を設計し、bFGF 100μg/連通孔 (本) (科研製薬) をプリントしたIPCABを作製した。ビーグル犬を腹臥位に保定し、頭頂部皮膚、側頭筋を切開した後、頭蓋骨表面を露出し、ラウンドバーを用いて頭蓋骨に

左右直径 20mm の骨欠損を形成した。グループ 1 : 完全連通孔のない IPCAB、グループ 2 : 完全連通孔を有する IPCAB、グループ 3 : bFGF を完全連通孔にプリントした IPCAB を移植した。1 か月後に安楽死させ、骨誘導性、生体親和性、免疫反応について、血液生化学的検討と、埋植部の肉眼的及び放射線学的 ( $\mu$ CT) 評価とともに、組織切片 (脱灰および非脱灰) を作製し、組織学的、力学的に骨再生能を比較、検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 完全連通孔の力学的評価

直径 20mm の円盤状に対し、直径 2mm の完全連通孔を 0-5 本、三次元 CAD 上で設計し、3D インクジェットプリンターを用いて、完全連通孔を有する IPCAB を作製した。まず、圧縮試験機を用いて IPCAB の力学的評価を行った。連通孔が増えれば増えるほど圧縮強度は低くなり、連通孔 0 本に対して、5 本のは 1/3 程度の圧縮強度であった。次に、有限解析方法を用いて、シミュレーションによる力学解析を行い、剛性値を比較した。剛性値は連通孔が増えれば増えるほど低くなり、連通孔が 0 本に対して、5 本のは、1/2 程度であった。シミュレーションの剛性値と実際の圧縮強度は相関していた。連通孔 0 に対して 60%以上の圧縮強度をもつのは、連通孔 3 本以下のもの、また、連通孔 0 に対して、60%以上の剛性値をもつのは連通孔 3 本以下のものであり、直径 20mm の円盤形状に対する最適連通孔は 3 本と考えられた。

以上より、有限解析法を用いることで、複雑な顎顔面形態において、連通孔を有する人工骨の力学的強度の向上が期待できる。

##### (2) bFGF をプリントした完全連通孔の生物学的評価

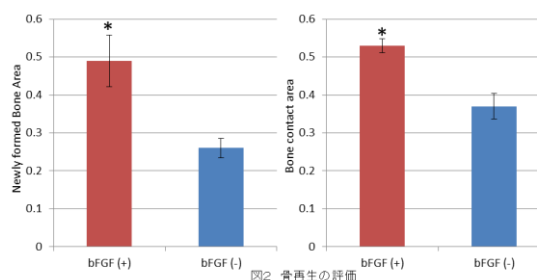
細胞増殖能を評価したところ、連通孔による有意差は認められなかった。完全連通孔内に bFGF をプリントした場合としない場合の細胞生存率を測定したところ、連通孔の数にかかわらず、bFGF を添加した IPACAB において、細胞生存率が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。また、ビンコニン酸アッセイを用いて完全連通孔内にタンパク質をプリントした場合の徐放量を測定したところ、bFGF の徐放は 7 日間以上続き、7 日間で 60%以上徐放されていることが確認された。

人工骨の連通孔内に bFGF を吸着させることで、人工骨移植術において、bFGF を患部において徐放し、未分化間葉系幹細胞の多分化能を保持させたまま細胞増殖を促進し、血管や骨を誘導し、骨再生を促進することが期待できる。

##### (3) ビーグル犬の頭蓋骨欠損モデルにおけ

る bFGF をプリントした完全連通孔の有効性と安全性の評価

術後の一般状態は臨床的に評価したところ、血液検査 (全血球算定、血液化学検査、電解質) において異常所見は認められなかった。移植 1 か月後、組織形態学的計測、CT 値による骨形態計測により、完全連通孔を有する IPCAB (グループ 2, 3) はともに新生骨が認められた。骨形態計測による新生骨量は有意差を認めなかった。組織形態学的計測において、bFGF の添加した完全連通孔を有する IPCAB (グループ 3) は、bFGF を添加しない完全連通孔を有する IPCAB (グループ 2) に対して 新生骨量、連通孔周囲の新生骨に有意差 ( $*P < 0.01$ ) を認めた (図 2)。このことは、完全連通孔内のみ bFGF を添加することで骨再生を促進すると考えられた。



##### (4) まとめ

以上の結果より、完全連通孔内に bFGF をプリントした IPCAB は、複雑な骨形態を有する顎顔面部骨再建において重要な意義があり、高機能型人工骨を用いることで理想的な骨再生治療法の可能性が示唆された。

#### 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 Choi S, Lee J, Igawa K, Suzuki S, Mochizuki M, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N. Effect of Trehalose Coating on Basic Fibroblast Growth Factor Release from Tailor-Made Bone Implants. J Vet Med Sci. 査読有, 73(12):1547-1552. 2011
- ② Choi SJ, Lee JI, Igawa K, Sugimori O, Suzuki S, Mochizuki M, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N. Bone regeneration within a tailor-made tricalcium phosphate bone implant with both horizontal and vertical cylindrical holes transplanted into the skull of dogs. J Artif Organs. 査読有, 12(4):274-277. 2009

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① Kazuayo Igawa: Chin augmentation with inkjet-printed custom-made tricalcium phosphate implant. European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Sep. 14-17, 2010, Bruges, Belgium
- ② 井川和代: 3次元有限要素モデルによるインクジェットプリンターを用いたカスタムメイド人工骨(IPCAB)の構造最適化 第54回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2009.10.09. 札幌コンベンションセンター, 日本
- ③ Kazuayo Igawa: Finite element analysis of the chin augmentation using inkjet-printed custom-made tricalcium phosphate implants. ESPRAS, Sep 21-29, 2009, Rhodes, Greece

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井川 和代 (IGAWA KAZUYO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：90512111