

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791623

研究課題名（和文） 関節軟骨、軟骨下骨を同時に再生可能なインテリジェントマテリアルの開発

研究課題名（英文） Osteochondral tissue regeneration using a functionally graded hydroxyapatite

研究代表者

笠原 靖彦（KASAHARA YASUHIKO）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：00581927

研究成果の概要（和文）：

生体内模倣傾斜機能アパタイト（functionally graded hydroxyapatite：fg-HAp）の骨軟骨欠損修復材料としての有用性について、既存の連通性多孔体ハイドロキシアパタイトセラミック（以下 IP-CHA）と比較検討した。約 20 週齢の成熟家兔の顆間窩に作成した骨軟骨欠損（直径 4.5mm、深さ 4mm）に、欠損とほぼ同サイズの fg-HAp ならびに IP-CHA を単独で移植し、術後 4、12 週で屠殺、大腿骨を摘出し、肉眼的・組織学的に比較検討した。移植後 4 週、12 週のいずれにおいても、有意に fg-HAp 群が優れていた。体液・血液を吸収し、血液親和性にきわめて優れた、吸収特性の高いバイオセラミックスである fg-HAp は、培養細胞や成長因子を必要としない骨軟骨欠損修復材料として有用である。

研究成果の概要（英文）：

We successfully developed a bioabsorbable bone-originated apatite with body fluid permeability (functionally graded apatite, fg-HAp). The purpose of this study was to determine the efficacy of this material for the treatment of osteochondral defects using a rabbit model. At 4 and 12 weeks postoperatively, the macroscopic and histological appearance of the samples was evaluated in each group (n=7) using Wayne and modified O' Driscoll scoring system, respectively. The histological findings of the fg-HAp group demonstrated that the reparative tissue of articular surface was hyaline-like cartilage with smooth surface regularity, complete integration between native and reparative tissue. Although fg-HAp bulk was stained by HE, IP-CHA bulk was not stained by HE, suggesting that body fluid hardly permeated into the bulk structure. The histological score of the fgHAp group was statistically higher than that of the IP-CHA group at 12 weeks. We succeeded in osteochondral repair with the newly developed fg-HAp alone. Our study indicates the efficacy of the fg-HAp as a bioabsorbable scaffold for the treatment of osteochondral defect without growth factors nor cultured cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨再生・生体吸収性材料・軟骨下骨

1. 研究開始当初の背景

骨軟骨損傷は、外傷性の他に、若年者では離断性骨軟骨炎、中～高齢者では骨壊死といった疾患がその原因として挙げられ、自然治癒が期待できないために整形外科分野では古くから治療に難渋してきた。骨軟骨損傷は周囲の軟骨変性を引き起こし痛みの原因となり日常生活の障害につながるばかりでなく、不可逆的疾患である変形性関節症へ進行すると人工関節置換術を余儀なくされることも多い。このような骨軟骨損傷の治療として、従来は骨髄からの細胞を動員し繊維軟骨での修復を期待する drilling や microfracture や健常の骨軟骨組織を円柱状に採取し移植する mosaicplasty (骨軟骨移植) が行われてきた。近年では自己培養軟骨細胞移植に代表される、組織工学的手法を用いた軟骨再生治療が行われている。しかし、軟骨細胞のみを使用していた第一世代の、軟骨細胞や間葉系幹細胞と scaffold を使用した第二世代の軟骨再生治療でも、従来の治療法を完全に凌駕するような軟骨再生は得られていない。その原因として、主として軟骨組織の修復・再生をターゲットにしてきたため、修復部位の力学的強度不足や修復組織と周囲の骨・軟骨との不十分な癒合・リモデリングなどが挙げられる。従って、良好な硝子軟骨を再生するためには軟骨下骨の再建が非常に重要であると考えた。

2. 研究の目的

仮説として、骨軟骨欠損部に骨髄間葉系細胞とともに本マテリアルを移植すると、軟骨下骨層では周囲の骨髄からの細胞や液性因子を接着、吸収し骨再生を、表層の軟骨層では硝子軟骨による軟骨再生が起きることが考えられる。本研究の目的は、上記仮説を証明するために家兎骨軟骨欠損に fg-HAp を自家骨髄間葉系幹細胞とともに移植し、その修復組織について評価することである。さらに、このマテリアルの前述した特性を考慮すると、細胞を移植しなくても骨軟骨欠損の修復が可能であるか証明することが第2の目的である。

3. 研究の方法

ウサギ膝関節に軟骨欠損 (径 5 mm) を作成

し、fg-HAp 群、IP-CHA 群の2群で軟骨組織再生の程度を4週ならびに12週で定量評価 (肉眼所見、組織学的所見、力学的試験) し、それらを比較することにより、fg-HAp 群移植による軟骨組織再生治療の有効性を証明する。さらに、早期 (移植後1, 2週) の fg-HAp 群の修復組織内における、生化学的解析、組織学的所見からその骨軟骨修復メカニズムを解明する。

(1) fg-HAp の準備、作成

北海道産のウシ四肢骨 (北海道畜産公社、札幌) を原材料とする。冷凍保存したウシ骨を実験に用いるサイズ ($\phi 4.5 \times 4\text{mm}$) に切断加工し、コラーゲン由来有機成分と脂肪を可及的に除去するため沸騰蒸留水で骨を煮沸処理する。室温で冷却後、乾燥機 (Convection Oven, SANYO, 東京) で 120°C 、24 時間で完全に乾燥させる。焼成炉 (超高速昇温電気炉 Super Furnace) を用いて段階的焼成 ($500 \sim 1200^{\circ}\text{C}$) により有機成分の完全除去を施した。これにより緻密骨、海綿骨由来のアパタイトが作成される。緻密骨由来のアパタイトを粉碎後、5%硝酸水溶液にて完全溶解後、硝酸溶解液中に海綿骨由来アパタイトを含浸しエッチングと部分溶解を行った、次にアンモニア水を添加し室温で pH 9 ~ 11 のアパタイト安定領域で熟成する。濾過、洗浄後、室温で乾燥させ、 120°C で 24 時間焼結することで fg-HAp が作成される。fg-HAp は表面にナノから数マイクロの人工気孔ができ、表面積は従来の HA の約 100 ~ 200 倍大きくなる。再析出した HA p は大きさ約 $1 \mu\text{m}$ の球状グレインで表面に約 10nm の針状結晶が析出している。摂子等での把持は容易であり、移植に際してのハンドリングは問題ない。

(2) 骨軟骨欠損への移植 (fg-HAp、IP-CHA の比較)

これまで本申請者らが行ってきた、家兎骨軟骨欠損モデル (体重 2.5-3.0kg の日本白色家兎の大腿骨滑車に、直径 5mm、深さ 4mm の骨軟骨欠損を作成) を用いて移植実験を行う。実験群は fg-HAp 群、IP-CHA 群の2群とする。各群 24 膝 (4 週 12 膝、12 週 12 膝) とする。なお、先行する研究結果 (Igarashi T, Iwasaki N, et al, JBMR, 2010) をもとに power analysis を行い、各評価項目の統計学的解析に必要なサンプル数を決定した。

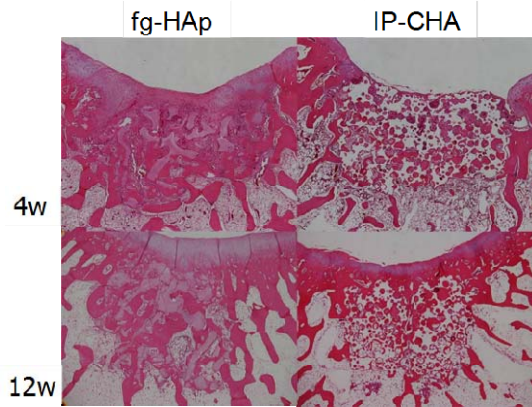
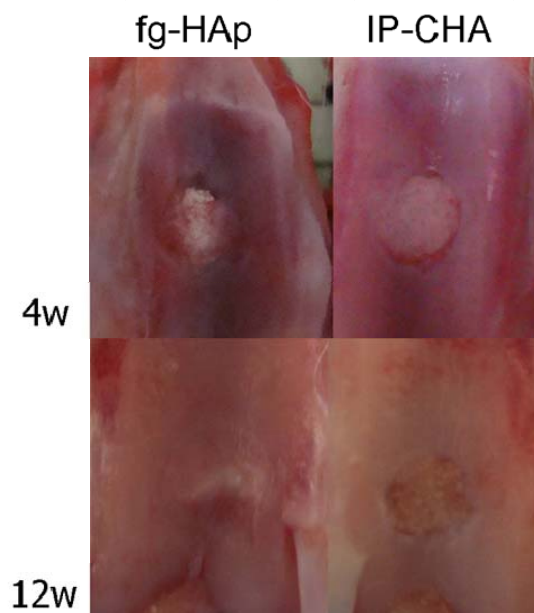
術後 4 および 12 週で各群 (n=6 at each time point) の再生組織を採取し、肉眼的評価およ

び HE、Safranin-O 染色による組織定量評価 (Niederrauer らの scoring system) を行う。さらに、HE 染色像から移植した fg-HAp、IP-CHA の残存面積を測定し、その吸収性につき定量評価を行う。力学的評価として、4 および 12 週で独自に開発した力学試験機を用いて再生軟骨の圧縮強度 (n=6 at each time point) および軟骨表面の摩擦係数の測定 (n=6 at each time point) を行う。各群の統計学的比較には ANOVA および Fisher's post hoc test を用いる ($p < 0.05$)。

(3) 移植後 1, 2 週の fg-HAp 群における評価
骨軟骨欠損部の修復組織に関して、生化学的解析 (DNA 定量、real time RT-PCR による細胞外基質の mRNA の発現量、ALP 定量) を行うとともに、組織学的評価 (HE 染色)、免疫組織化学染色 (Type I, II, X collagen)、TRAP 染色による破骨細胞数の定量などを行い、骨軟骨修復メカニズムについて明らかにする。

4. 研究成果

IP-CHA 群、fg-HAp 群の肉眼的所見は、移植後 4 週の fg-HAp 群で有意に高く、移植後 12 週では両群間に有意差を認めなかった。一方、IP-CHA 群、fg-HAp 群の組織学的所見は、移植後 4 週では両群間に有意差を認めなかったが、移植後 12 週の fg-HAp 群で有意に高かった。つまり、家兎の骨軟骨欠損部に移植した、fg-HAp ならびに IP-CHA による再生組織において、fg-HAp 群が IP-CHA 群より、正常に近い関節軟骨ならびに軟骨下骨の再生が導かれた。



fg-HAp は、既存の IP-CHA と比較し、骨軟骨欠損に対する軟骨下骨再建、関節軟骨再生の scaffold として有用であることが示唆された。体液・血液を吸収し、血液親和性にきわめて優れた、吸収特性の高いバイオセラミックスである fg-HAp は、培養細胞や成長因子を必要としない骨軟骨欠損修復材料として有用である。

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 3 件)

- ① Igarashi T, Iwasaki N, Kawamura D, Kasahara Y, et al. Therapeutic Effects of Intra-articular Ultra-purified Low Endotoxin Alginate Administration on experimental Osteoarthritis in Rabbits. *Cartilage*, January 2012 vol. 3 no. 1 70-78、査読あり
- ② Igarashi T, Iwasaki N, Kawamura D, Kasahara Y, Tsukuda Y, Ohzawa N, Ito M, Izumisawa Y, Minami A. Repair of articular cartilage defects with a novel injectable in situ forming material in a canine model. *J Biomed Mater Res A*, 2012 Jan;100(1):180-7、査読あり
- ③ 笠原靖彦, 岩崎倫政, 村田勝, 赤澤敏之, 五十嵐達弥, 河村太介, 佃幸憲, 三浪明男: 生体内模倣傾斜機能アパタイトの家兎膝関節骨軟骨欠損修復への応用、*J Orthopaedic biomaterials* 30, 29-34, 2011、査読あり

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kasahara Y, Iwasaki N, Murata M,

Akazawa T, Igarashi T, Kawamura D,
Minami A: Repair of Rabbit
Osteochondral Defects Using a Novel
Bovine Bone-originated Apatite with
Body Fluid Permeability: ORTHOPAEDIC
RESEARCH SOCIETY 57th Annual Meeting,
Long Beach, USA, Jan 13-16, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 靖彦 (KASAHARA YASUHIKO)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：00581927

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし