

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592219

研究課題名(和文) 骨芽細胞活性化能を示す新規人工骨による家兔長管骨欠損の再生

研究課題名(英文) REGENERATION OF A RABBIT TIBIA BONE USING A NEW BONE SUBSTITUTE MATERIAL ACTIVATING OSTEOBLAST CELL

研究代表者

宮武 尚央 (naohisa, miyatake)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：60623155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨の主要成分であるリン酸カルシウム的一种であるリン酸オクタカルシウムを人工的に作製し、ゼラチンと混ぜることで新規の人工骨材料を作製した。この材料は、これまでの材料と比較し骨の再生能力に優れ、また、既存の人工骨よりも材料が早く吸収されるため、骨本来の再生能も阻害しないといった利点がある。この材料を用い、兔の下腿骨を用いてその有用性について実験を行った。その結果、作製した新規材料はこれまでの材料と比較して骨の再生能においても材料の吸収能においても優れた材料であるといった結果を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to investigate whether an octacalcium phosphate/gelatin (OCP/Gel) composite can repair a defect created in rabbit tibia for 2, 4, 8 weeks. Histological, histomorphometrical and microCT studies showed that implantation of OCP/Gel composite enhanced bone regeneration in the defect compared to other bone substitute materials such as hydroxyapatite and b-TCP. Furthermore, the results demonstrated that OCP/Gel composite was a highly biodegradable material in rabbit tibia. The present study suggests that the OCP/Gel composite is a bone substitute material in which the stimulatory capacity of OCP crystals in new bone formation can be expressed even in the defect of long bone.

研究分野：整形外科学分野

キーワード：リン酸オクタカルシウム ゼラチン 骨置換能 材料吸収性

1. 研究開始当初の背景

現在の骨移植手術では、自家骨移植・他家骨移植・人工骨移植といった移植方法が主に用いられている。自家骨移植は現在のところ最も効果のある治療法だが、採骨部の疼痛や、摘出できる量の制限などの問題がある。また、他家骨移植においては感染症の問題や倫理的な観点から本邦においてはほとんど行われていないのが現状である。

人工骨は疼痛や摘出量、肝炎等の感染といった危険性はない材料だが骨の再生を考えると自家骨や他家骨と比較し骨に置換するのが遅いといった欠点がある。

リン酸オクタカルシウム(以下 OCP)は、生体の骨の無機成分、ハイドロキシアパタイト(以下 HA)結晶と同様にカルシウム、リン酸等から成る結晶であり、HAの前駆体に位置づけられる物質で、従来から人工骨として用いられてきた合成の HA と比べ、OCP は顆粒状において、高い骨形成能、新生骨との置換能を示し、また骨芽細胞を活性化する作用を持つことがこれまでの研究から明らかになっている。

(Suzuki O, Acta Biomater, 6:3379-3387, 2010)

2. 研究の目的

OCP は顆粒状の材料であるため、ゼラチンと複合化することで、形状の調整が可能な材料とした。OCP とゼラチンの複合体はラットの頭蓋骨を用いた実験では OCP の持つ骨芽細胞の活性化という特性を失うことなく骨の再生がおこなわれていることがわかっている。(Handa T et al Acta Biomater 8: 1190-1200, 2012)

そこで本研究では、より臨床に近い方法で実験をおこなうことで、新規人工骨材料として臨床応用に向けた研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料の作成

人工 OCP は独自の高温下連続合成法(特 3115642)や室温合成法を用いて作製した。実験用豚皮由来ゼラチンを用いて前述の条件の OCP を共沈させ、さらに型枠で採型し凍結乾燥させることで様々な形状の OCP-ゼラチン複合体(以下 OCP/ゼラチン)を作製することが可能であった。(特 5647432)複合体について OCP 含有率、電子顕微鏡、X 線回析、FTIR を用いた評価を行い OCP の特徴を喪失していない材料であることが分かった。得られた複合材料を直径 6 mm、深さ 7 mm の円柱状に成形した。家兎動物実験モデル(Suzuki Ket al, Phosphorus Res Bull 26:53-58, 2012)に埋入し骨形成を評価した。比較用の材料は -TCP(気孔率 71~80% 及び気孔率 60%)・ゼラチン単体とした。ゼラチンは実験用豚皮由来ゼラチンを用い OCP と同様の方法を用いて作製を行った。

(2) 手術手技

兎は日本白色兎の雄で 3.0~3.5 kg を使用した。

兎に塩酸ケタミン 10mg/kg と塩酸キシラジン 3mg/kg を静脈内投与し全身麻酔し、術中の緊急事態に備え、麻酔中は生食による点滴を継続した。麻酔がかかっていることを確認し、両膝周囲の剃毛後、脛骨近位内側に約 3cm の切開を加え皮下組織、骨膜を十分に剥離し骨を露出した。脛骨結節から約 1cm 遠位、脛骨内側にドリルで直径 6.0cm x 深さ 7.0cm の埋入窩(骨孔)を作成し、あらかじめ骨孔と同じ形態、サイズに成型しておいた OCP/ゼラチンを入れた。埋入後、創部をよく洗浄しナイロン糸にて縫合した。骨孔は可及的に止血し皮下組織で縫合した。

術後 2・4・8 週でペントバルビタール 100mg/kg 過量投与により安楽死させ脛骨を取り出した。経過中に大腿骨・脛骨の骨折、などを生じてしまった場合は、動物の苦痛を取るため速やかに安楽死を選択した。

各タイムポイントにおいて OCP/ゼラチン群・TCP(気孔率 71~80%)群・-TCP(気孔率 60%)群・Gelatin 群で各々 n=4 とした。

(3) 埋入材料の評価

採取した脛骨は速やかに軟 X 線撮影と μ CT による撮影を行った。採取後 24 時間 4% パラホルムアルデヒドで固定後、70% エタノールで一晩脱脂処理を行った後、10% EDTA 液を使用し 4 週で攪拌しながら脱灰した。約 8 週間脱灰した後、パラフィンワックスで包埋しマイクロームで 4~5 μ m 厚に薄切した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った後、組織形態計測学的定量解析をおこない、骨の形成、材料の残存率を計測した。

4. 研究成果

(1) OCP/ゼラチンのキャラクタリゼーション

作製した材料は走査型電子顕微鏡にて試料の表面構造の観察、X 線回析装置を用いた結晶相の評価を行った。作成した材料の気孔率、OCP 含有量は先の報告(Handa T et al Acta Biomater 8: 1190-1200, 2012)で最も骨再生に優れた量と同等の気孔率、含有量であった。電子顕微鏡ではゼラチンの結晶基質上に OCP 特有の板状結晶が構成されていた。この構造は、先の研究で報告された結果と同等であった。また、X 線回析では、 $2\theta=4.8^\circ$ でピーク値をとり、報告されている(Mathew M, J Crystallogr Spectrosc Res, 8:235-250, 1988) OCP 単体の材料で見られるピーク値と同様であった。

(2) μ CT を用いた肉眼所見

Gelatin は比較的早期に材料が吸収され肉眼的には確認することが出来なかった。気孔率 60% -TCP は長期埋入後も材料が残存していることが確認された。気孔率 71~80% -TCP では比較的早期から材料の吸収が生じ始めていた。OCP/ゼラチンにおいては比較的早期に材料を肉眼的に確認することが出来なかった。以上の結果より、肉眼的にはいずれの材料においても吸収性が確認されたが吸収速度に

関しては材料間に差がある所見となった。

(3)組織形態計測学的定量解析

定量解析は HE 染色後の切片を脱灰した標本を ImageJ を用い組織形態計測を行った。骨皮質部の骨形成率、骨髄部での骨形成率および材料の吸収率を測定した。早期での骨形成率は骨髄内で OCP /ゼラチンが他材料に比較し有意差を生じていた。

中期での骨髄内ではゼラチンの骨形成が最も遅く、OCP /Gel と有意差を生じた。また、皮質骨の部分では TCP の多孔率のものと OCP/ゼラチン複合体で有意差を生じる結果であった。材料の残存量においては早期にゼラチンは吸収されており、後期の段階では OCP/ゼラチンも材料がすべて吸収されていた。気孔率の異なる 2 種類の -TCP と比較すると材料の吸収は有意差を認めた。OCP/ゼラチンは材料の吸収に伴っており良好な人工骨材料となると考えられる。

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 2 件)

著者名: Itoigawa Y, Suzuki O, Sano H, Anada T, Handa T, Hatta T, Kuwahara Y, Takahashi A, Ezoe Y, Kaneko K, Itoi E. The role of an octacalcium phosphate in the re-formation of infraspinatus tendon insertion. Journal of Shoulder Elbow Surgery:2015,in press,DOI : 10.1016/j.jse.2015.01.011 (査読 有)

著者名: Suzuki K, Anada T, Miyazaki T, Miyatake N, Honda Y, Kishimoto KN, Hosaka M, Imaizumi H, Itoi E, Suzuki O. Effect of addition of hyaluronic acids on the osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate,10 : 2014 : 531-543 DOI : 10.1016/j.actbio.2013.09.005. (査読 有)

[学会発表](計 5 件)

千葉 晋平・穴田 貴久・斎藤 慶介・宮武 尚央・鈴木 堅太郎・保坂 正美・今泉 秀樹・井樋 栄二・鈴木 治:リン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体の家兔脛骨欠損における骨置換足機能の検討第36回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会:2015年2月7日,仙台

千葉 晋平・穴田 貴久・斎藤 慶介・宮武 尚央・鈴木 堅太郎・保坂 正美・今泉 秀樹・井樋 栄二・鈴木 治 :リン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体の材料吸収性・骨形成能に関する研究他材料との比較第34回 整形外科バイオマテリアル研究会:2014年12月6日,大阪

鈴木 堅太郎・穴田 貴久・今泉 秀樹・宮武 尚央・保坂 正美・井樋 栄二・鈴木 治:リン酸オクタカルシウム複合材料の開発と臨床応用への期待第28回 日本整形外科学会基礎学術集会(招待講演):2014年10月9日~10月10日,鹿児島

鈴木 堅太郎・穴田 貴久・半田 拓人・千葉 晋平・今泉 秀樹・宮武 尚央・保坂 正美・井樋 栄二・鈴木 治:ウサギ脛骨欠損へ埋入したリン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体の操作性と骨伝導性の検討第28回日本整形外科学会基礎学術集会:2013年10月17日~10月18日,幕張メッセ

Suzuki K, Hayasi K, Miyatake N, Honda Y, Saito K, Hosaka M, Imaizumi H, Itoi E, Suzuki O :Repair of rabbit tibia defect by implantation of octacalcium phosphate/gelatin composite.:2013Orthopaedics Research Society Annual Meeting:2013年1月26日~1月29日,San Antonio,Texas,USA

[図書](計 1 件)

鈴木 治:技術情報協会,セラミックスの高機能化および複合化「体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件」2013年,403-405.

[その他]

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮武 尚央 (NAOHISA MIYATAKE)
東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師
研究者番号: 60623155

(2) 研究分担者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60374948

今泉 秀樹 (HIDEKI IMAIZUMI)
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：70250785

井樋 栄二 (EIJI ITOI)
東北大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：80193465

保坂 正美 (MASAMI HOSAKA)
東北大学・医学(系)研究科・講師
研究者番号：90302124