

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791526

研究課題名(和文) 緻密質、多孔質ポリウレタンを組み合わせた新しい骨欠損補填材料の開発

研究課題名(英文) Development of porous/dense composite polyurethane scaffold for bone tissue repair

研究代表者

吉井 俊貴 (Yoshii, Toshitaka)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：50583754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：吸収性人工材料ポリウレタン(PUR)の骨再生における足場材料としての有用性が報告されている。PURの強度を改善させるために、重合前にリン酸カルシウム(CaP)を付加し、その力学的特性、In vitroでの骨伝導性を検証した。力学試験では、70%、79%の重量%でCaPを付加し、良好な力学強度を得た。また骨芽細胞前駆細胞をインプラント上で培養、分化させ、良好な細胞増殖、骨分化がおこることを確認した。このPUR-CaPを中空状に形成し、内部に多孔質PURを組み込むCompositeタイプを作成し、力学的特性の検討をおこなった。またラット骨欠損モデルにて、その骨再生促進に対する効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of polyurethane (PUR) scaffold has been reported as a scaffold in bone tissue engineering. To improve mechanical strength of PUR scaffold, we have added calcium phosphate (CaP) to resin component before polymerization. The mechanical property of PUR-CaP and in vitro osteoconductivity were evaluated. Favorable mechanical strength was obtained by adding 70 and 79 weight % of CaP. In vitro preosteoblast culture showed good proliferation and osteogenic differentiation of the cells on the PUR/CaP. Furthermore, we made hollow-shaped PUR/HA combined with highly porous PUR. The mechanical property of this composite PUR was evaluated. In vivo osteoconductivity of the composite PUR was examined in rat bone defect model.

研究分野：整形外科学

キーワード：ポリウレタン scaffold 骨再生

1. 研究開始当初の背景

骨欠損治療に自家骨移植が、従来行われてきたが、採取部での合併症や、採取量の制限などの問題がある。近年、骨欠損部を補填するために人工の生体材料の開発が盛んにおこなわれている。多孔質 PUR scaffold は連通性多孔質構造を有し組織侵入に優れ、生体吸収性であり、また適度な弾性を有することから組織欠損部での適合性に優れる。また重合前、resin component に薬剤を付加することで、足場材料としてだけでなく、薬剤担体としても使用することが可能である。このように多孔質 PUR は組織再生の足場材料として非常に有用であるが、一方で多孔体であるが故に圧縮強度は低く、荷重部での単独使用には適さないと考えられる。そこで、優れた骨伝導性を有し、かつ荷重に十分に耐え得るような強度を有したタイプの PUR 人工骨補填材料の開発が望まれる。

2. 研究の目的

そこで、PUR の力学的強度を向上させるために、ハイドロキシアパタイトを付加する方法 (PUR-HA) を考案し、その強度や骨伝導性を検証した。また、PUR にスタチンなどの bone anabolic effect を有する薬剤を添加し、in vivo での骨形成への影響を検証した。また PUR-HA を中空にして内部に高多孔質 PUR を配置する複層 PUR を考案し、その強度、骨再生への効果を検証した。

3. 研究の方法

1) ハイドロキシアパタイトを付加した PUR の検証: ハイドロキシアパタイト (HA) を PUR 重合前に resin component に高重量付加させて PUR を作成し (PUR-HA)、圧縮試験による in vitro の力学的特性の評価を行った。また骨芽細胞様細胞を用いて、PUR-HA 表面での分化誘導実験を行い、in vitro での骨分化を検討した。またラット大腿骨骨欠損モデルを使用し、これら PUR-HA の移植実験を行い、in vivo での骨伝導性の評価を行った。マイクロ CT 及び、脱灰組織標本により、骨形成評価を行った。

2) スタチンを付加した PUR の骨形成能評価: in vivo での骨形成促進効果をラット大腿骨 plug defect モデル (遠位部 3mm 欠損) を用いて検証した。Sample を移植 4 週後に摘出し、マイクロ CT で評価、ホルマリン固定後に、組織切片にて新生骨形成の定量評価を行った。

3) PUR-HA を中空にして内部に高多孔質 PUR を配置する複層 PUR の検証: 中空 PUR-HA の中空比を振り分け、一軸圧縮試験をおこない、in vitro での圧縮強度を検証した。ラット segmental defect モデルにて骨修復の効果を検証した。

4. 研究成果

1) PUR-HA の in vitro 特性:

HA を加えた場合の PUR scaffold は良好な力学的特性を示し、HA の重量%を上げた方が、強度が向上することが明らかとなった。

(Fig1) コントロールとして同じリン酸カルシウム化合物である三リン酸 (TCP) を使用したが、力学的強度は PUR-HA の方がより大きい結果となった。

また骨芽細胞様細胞を PUR-HA、の Scaffold 上で培養、骨分化誘導させた。アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は経時的に上昇し、良好な骨分化がおこることを、In vitro で確認した。骨分化に関しては、TCP で大きい傾向にあった (Fig2)。また、Calcein 染色でマーキングした骨芽細胞様細胞は PUR-HA 上で良好に増殖した (Fig3)。

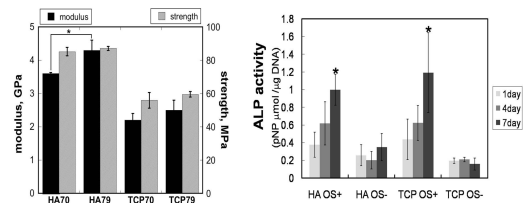


Fig1

Fig2

PUR-HA の in vivo 特性:

次にラット大腿骨骨欠損モデルを使用し、これら PUR-HA の移植実験を行い、4 週後にサンプルを摘出、マイクロ CT、脱灰組織標本 (HE 染色) にて in vivo での良好な骨形成を確認した。(Fig4、Fig5)

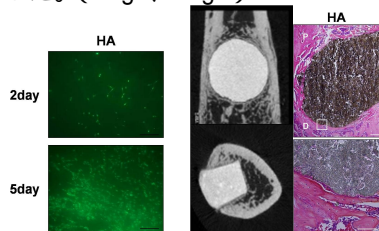


Fig3

Fig4

Fig5

2) スタチンを付加した PUR の骨形成能評価: ラット大腿骨骨欠損部に PUR インプラントを移植し、スタチンを 25 μg、100 μg 付加し、4 週後にサンプルを摘出、マイクロ CT 写真にて、良好に骨形成が促進されることを確認した (Fig5)。また脱灰組織標本 (HE 染色) でも良好に Dose dependent に骨形成が促進されることを確認した。

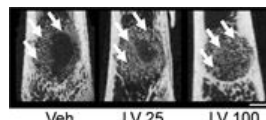


Fig5

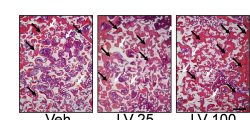


Fig6

3 中空 PUR-HA の力学特性:

中空率を 70%、50%、30% に振り分け、圧縮強度を評価したところ、0% PUR-HA (約 85MP%) に比して、中空率が増すごとに段階的に強度が減少した。

また 50% 中空 PUR-HA に多孔質 PUR を配置したものを、6mm 欠損のラット segmental

defect モデルに移植し、6 週後に Xp 撮影 (Faxitron) 欠損部の癒合を認めた (Fig7)

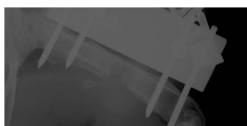


Fig7

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 14 件) 全て査読あり

1: Taniyama T, Hirai T, Yoshii T, Yamada T, Yasuda H, Saito M, Inose H, Kato T, Kawabata S, Okawa A. Modified K-line in magnetic resonance imaging predicts clinical outcome in patients with nonlordotic alignment after laminoplasty for cervical spondylotic myelopathy. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 Oct1;39(21):E1261-8.

2: Yuasa M, Mignemi NA, Barnett JV, Cates JM, Nyman JS, Okawa A, Yoshii T, Schwartz HS, Stutz CM, Schoenecker JG. The temporal and spatial development of vascularity in a healing displaced fracture. *Bone*. 2014 Oct;67:208-21. doi: 10.1016/j.bone.2014.07.002. Epub 2014 Jul 10. PubMed PMID: 25016962.

3: Yoshii T, Ueki H, Kato T, Tomizawa S, Okawa A. Severe kyphotic deformity resulting from collapses of cemented and adjacent vertebrae following percutaneous vertebroplasty using calcium phosphate cement. A case report. *Skeletal Radiol*. 2014 Oct;43(10):1477-80.

4: Araya N, Inose H, Kato T, Saito M, Sumiya S, Yamada T, Yoshii T, Kawabata S, Okawa A. Spinal deformity caused by hyperimmunoglobulin E syndrome: clinical article. *J Neurosurg Spine*. 2014 Aug;21(2):292-5.

5: Kawaguchi Y, Matsumoto M, Iwasaki M, Izumi T, Okawa A, Matsunaga S, Chiba K, Tsuji T, Yamazaki M, Fujimori T, Yoshii T, Toyama Y. New classification system for ossification of the posterior longitudinal ligament using CT images. *J Orthop Sci*. 2014 Jul;19(4):530-6.

6: Arai Y, Hirai T, Yoshii T, Sakai K, Kato T, Enomoto M, Matsumoto R, Yamada T, Kawabata S, Shinomiya K, Okawa A. A prospective comparative study of 2 minimally invasive decompression procedures for lumbar spinal canal stenosis: unilateral laminotomy for bilateral decompression (ULBD) versus muscle-preserving interlaminar decompression (MILD). *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 Feb 15;39(4):332-40.

7: Sasaki K, Inose H, Kawabata S, Yoshii T, Kato T, Saito M, Okawa A. Combined surgical and radiosurgical treatment for a symptomatic cervical metastasis in a case of malignant paraganglioma: a case report. *BMC Res Notes*. 2013 Dec 1;6:494.

8: Yoshii T, Yamada T, Hirai T, Taniyama T, Kato T, Enomoto M, Inose H, Sumiya S, Kawabata S, Shinomiya K, Okawa A. Dynamic changes in spinal cord compression by cervical ossification of the posterior longitudinal ligament evaluated by kinematic computed tomography myelography. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2014 Jan 15;39(2):113-9.

9: Yamada T, Yuasa M, Masaoka T, Taniyama T, Maehara H, Torigoe I, Yoshii T, Shinomiya K, Okawa A, Sotome S. After repeated division, bone marrow stromal cells express inhibitory factors with osteogenic capabilities, and EphA5 is a primary candidate. *Bone*. 2013 Dec;57(2):343-54.

10: Koyanagi H, Ae K, Maehara H, Yuasa M, Masaoka T, Yamada T, Taniyama T, Saito M, Funouchi Y, Yoshii T, Okawa A, Sotome S. Massive bone reconstruction with heat-treated bone graft loaded autologous bone marrow-derived stromal cells and  $\beta$ -tricalcium phosphate composites in canine models. *J Orthop Res*. 2013 Aug;31(8):1308-16.

11: Yoshii T, Yuasa M, Sotome S, Yamada T, Sakaki K, Hirai T, Taniyama T, Inose H, Kato T, Arai Y, Kawabata S, Tomizawa S, Enomoto M, Shinomiya K, Okawa A. Porous/dense composite hydroxyapatite for anterior cervical discectomy and fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013 May 1;38(10):833-40.

12: Yoshii T, Hafeman AE, Esparza JM, Okawa A, Gutierrez G, Guelcher SA. Local injection of lovastatin in biodegradable polyurethane scaffolds enhances bone regeneration in a critical-sized segmental defect in rat femora. *J Tissue Eng Regen Med*. 2014 Aug;8(8):589-95.

13: Kuroiwa T, Yoshii T, Sakaki K, Inose H, Tomizawa S, Kato T, Kawabata S, Shinomiya K, Okawa A. Vertebral locking lesion following cervical spine fracture in ankylosing spondylitis. *Orthopedics*. 2012 Jun;35(6):e1005-8. doi: 10.3928/01477447-20120525-54. PubMed PMID: 22691645.

14: Yoshii T, Dumas JE, Okawa A, Spengler DM, Guelcher SA. Synthesis, characterization of calcium phosphates/polyurethane composites for weight-bearing implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Jan;100(1):32-40.

〔学会発表〕(計 14 件)

1. Yoshii T. Long-term radiological outcomes in short segment posterior lumbar interbody fusion using expandable cages. The 41st Annual Meeting of International Society for the Study of the Lumbar Spine (ISSLS). (20146.3-7)Seoul,Korea
2. Yoshii T. Safe Cervical Pedicle Screw Placement Using Intraoperative Computed Tomography Imaging With A Mobile Scanner Gantry. Japanese Orthopedic Association Annual Meeting (English session) (20145.22-25).神戸市、兵庫県
3. Yoshii T. Comparison of surgical outcomes between anterior decompression with fusion and posterior decompression with fusion for cervical ossification of longitudinal ligament with over 50% canal-occupying ratio. Cervical Spine Research Society Asia Pacific (CSRS-AP) the 5th annual Meeting (2014.4.3-5).Ho Chi Minh City,Viet Nam
4. Yoshii T. Cervical Pedicle Screw Placement Using Intraoperative Computed Tomography Imaging With A Mobile Scanner Gantry. Cervical Spine Research Society Asia Pacific (CSRS-AP) the 5th annual Meeting (2014.4.3-5).Ho Chi Minh City,Viet Nam).
5. Yoshii T. Dynamic Changes in Spinal Cord Compression in Cervical Ossification of Longitudinal Ligament evaluated by kinematic CT myelography. The 60th Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting. (20143.15-18).New Orleans,USA
6. Yoshii T. Hydroxyapatite block for use in anterior corpectomy and fusion for cervical ossification of longitudinal ligament. Japanese Orthopedic Association Annual Meeting (English session) (2013.5.23-26).広島市、広島県
7. Yoshii T. Porous/Dense Composite Hydroxyapatite for use In Anterior Cervical Discectomy and Fusion. Japanese Society for Spine surgery and Related Research Annual Meeting (English poster session) (20134.25-27).宜野湾市、沖縄県
8. Yoshii T. Dynamic Changes in Spinal Cord Area in Cervical Ossification of Longitudinal Ligament evaluated by kinematic CT myelography. Cervical Spine Research Society Asia Pacific (CSRS-AP) the 4th annual Meeting (20134.11-13).Seoul,Korea
9. Yoshii T. Porous/Dense Composite Hydroxyapatite In Anterior Cervical Discectomy and Fusion. The 59h Orthopaedic Research Society (ORS) Annual Meeting. (2013.1.26-29). San Antonio,USA
10. Yoshii T. Dynamic Changes in Spinal Cord Compression in Cervical Ossification of the

Posterior Longitudinal Ligament Evaluated by Kinematic Computed Tomography Myelogram. Cervical Spine Research Society (CSRS) 40th Annual Meeting Best paper session (2012.12.6-8)Chigago,USA

11. Yoshii T. Porous/Dense Composite Hydroxyapatite For Use In Anterior Cervical Discectomy and Fusion. Cervical Spine Research Society (CSRS) 40th Annual Meeting (2012.12.6-8)Chigago,USA
12. Yoshii T. Hybrid Grafting using bone marrow aspirate combined with porous beta-tricalcium phosphate and trephine bone for lumbar posterolateral spinal fusion. A prospective, comparative study versus local bone grafting. International Society for the Study of the Lumbar Spine (ISSLS) 39th Annual Meeting(20125.28-6.1)Amsterdam, Holland
13. Yoshii T. Anterior cervical discectomy and fusion using hybrid graft of hydroxyapatite spacer and percutaneously harvested trephine bone. Cervical Spine Research Society Asia Pacific (CSRS-AP) 3rd annual Meeting (2012.4.21-22)博多市、福岡県
14. Yoshii T. Synthesis, Characterization of Calcium Phosphates/Polyurethane Composites for Weight Bearing Implants. Orthopedic Research Society (ORS) 58th Annual Meeting (2012.2.4-7)San Francisco,USA

〔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〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉井 俊貴 (TOSHITAKA YOSHII)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号 : 50583754

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし