

平成 28 年 5 月 23 日

平成 27 年度独立行政法人日本学術振興会  
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 東京医科歯科大学・講師  
氏 名 吉井 俊貴

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名 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 (英文名)
2. 研究実施期間 平成 27 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日
3. 助成金額 1,000,000 円
4. 研究の目的 吸収性人工材料ポリウレタン (PUR) scaffold は組織工学における足場材料として研究されており、心血管再生、神経再生、皮膚再生領域などで PUR の足場材料としての有用性が示されている。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。そこで応募者らは PUR 重合前に生体骨の主要成分であるハイドロキシアパタイト (HA) を高重量%使用する方法 (PUR-HA) を考案し、緻密質 PUR-HA は、同種骨を使用した場合と同様に荷重に耐えられる力学的特性が得られることが期待される。しかし一方で緻密質 PUR-HA は多孔質 PUR に比べて力学的強度に優れるが、骨伝導性に関しては劣る可能性が考えられる。そこで応募者は、両者の長所を兼ね備えた、緻密質、多孔質ハイブリッド PUR の作製を考案した。中空の緻密質 PUR-HA を作製し、内部に多孔質 PUR を充填することで、荷重は主に緻密質 PUR が担い、骨組織侵入の足場は主に内部の多孔質 PUR が担うことを目的とする。これは強度の強い皮質骨の内部に、網目状の海綿骨を有する生体骨構造と類似しており、骨組織への移植材料として合理的な構造であると考えられる。本研究の目的は、この新しいハイブリッド PUR scaffold の力学的特性、骨伝導性、生体吸収性、安全性など骨再生における有用性について検討することである。

## 5. 研究概要報告

### 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)、同じリン酸カルシウム化合物である三リン酸 (TCP) を PUR 重合前に resin component に高重量付加させて PUR を作成し (PUR-HA、PUR-TCP)、一軸圧縮試験による *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、PUR-TCP 表面での培養、増殖試験、分化誘導実験を行い、*in vitro* での骨分化能を検討した。

またラット大腿骨骨欠損モデルを使用し、これら PUR-HA、PUR-TCP 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。

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。TCP を使用した場合においても、同様の結果となった。HA を使用したもの (PUR-HA) と TCP を使用したもの (PUR-TCP) とを比較すると力学的強度は 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、PUR-TCP の Scaffold 上で培養、骨分化誘導させた。PUR-HA、PUR-TCP 両者ともに、細胞の増殖は良好であった。Calcein 染色でマーキングした骨芽細胞様細胞は PUR-HA、PUR-TCP 上で良好に増殖した。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 で少し大きい傾向にあったが、両者ともに骨芽細胞前駆細胞の有用な足場材料であることが示された。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。

### 2) 骨形成作用を有する薬剤を付加した 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。

ラット大腿骨骨欠損部に PUR インプラントを移植し、ロバスタチンを 25  $\mu$  g、100  $\mu$  g 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。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。

さらに骨形成促進効果をラット大腿骨 Segmental defect モデル (骨幹部 6mm 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。ラット大腿骨骨欠損部に PUR インプラントを移植し、ロバスタチンを 100  $\mu$  g 付加し、6 週後にサンプルを摘出、治療群では、9 例中 5 例のサンプルで骨性の架橋を認めたが、非治療群では欠損部の架橋は認めなかった。組織評価でも、欠損部の骨形成は治療群で良好であることが分かった。

### 3) 中空 PUR-HA の力学特性、*In vivo* での骨欠損再生：

PUR-HA に Manual で中空にしたものを作成し、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* での強度を検証した。中空率を 0%、30%、60% に振り分け、圧縮強度を評価した。

圧縮強度は非中空 PUR-HA (約 85MPa) に比して、中空率が増すごとに段階的に強度が減少した。30% 中空のものでは、圧縮強度が約 0% 減少し、60% 中空のものでは圧縮強度が約 30% 減少することが分かった。60% 中空のものでも、ある程度の強度が保たれることが分かったことから、60% 中空 PUR が強度と骨伝導性のバランスが良好であると推察した。

骨形成促進効果をラット大腿骨 Segmental defect モデルを用いて検証した。欠損を作成後、60% 中空 PUR に多孔質 PUR を配置したものを、欠損部に移植し、6 週後にレントゲン撮影したところ、欠損部の癒合を認めた。今後、多孔質 PUR に骨形成促進剤を付加することで、骨形成の促進、欠損部修復の促進がおこなわれるかを評価していく。

## 6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：  
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 東京医科歯科大学・講師  
氏 名 吉井 俊貴

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。  
また、別刷り2部を必ず添付してください。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

・○吉井 俊貴、頰椎後縦靱帯骨化症に対する多孔質 hydroxyapatite を使用した頰椎前方椎体亜全摘固定術の手術成績、第35回整形外科バイオマテリアル研究会、2015年12月12日

・**Yoshii T.** Anterior Decompression with Fusion vs Posterior Decompression with Fusion for Massive Cervical Ossification of Posterior Longitudinal Ligament with 50% Canal Occupying Ratio or More The 43<sup>rd</sup> Cervical Spine Research Society Annual meeting、2015年12月5日

・吉井 俊貴、特発性首下がり症のX線学的特徴とメカニズム、第24回日本脊椎インストゥルメンテーション学会、2015年11月7日

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。

また、その別刷り 2 部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。

(2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。