慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	キレート硬化型骨セメントをスキャフォルドとした再生骨の脊椎固定術への応用
Sub Title	Development of chelate-setting cements for bone grafting
Author	松本, 守雄(Matsumoto, Morio) 相澤, 守(Aizawa, Mamoru)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	我々はイノシトール燐酸のキレート能による新しい硬化メカニズムを備えたペースト状人工骨を開発した。従来品と異なりアパタイト単一相での精製が可能な点がもっとも大きな特徴であり, In vitroおよびIn vivoの実験により良好な生体適合性, 高い細胞分化誘導能や骨伝導能を持つことが明らかとなったことから, 今後新たな脊椎への骨補填材料として応用可能と考えられる。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2009～2011 課題番号：21591905 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21591905seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

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 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21591905
研究課題名（和文）　キレート硬化型骨セメントをスキャフォルドとした再生骨の脊椎固定術への応用
研究課題名（英文）　Development of chelate-setting cements for bone grafting

研究代表者
松本　守雄（MATSUMOTO MORIO）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：40209656

研究成果の概要（和文）：
我々はイノシトール燐酸のキレート能による新しい硬化メカニズムを備えたペースト状人工骨を開発した。従来品と異なりアパタイト単一相での精製が可能な点がもっとも大きな特徴であり，In vitro および In vivo の実験により良好な生体適合性，高い細胞分化誘導能や骨伝導能を持つことが明らかとなったことから，今後新たな脊椎への骨補填材料として応用可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：
We have successfully developed novel “chelate-setting apatite cement” using hydroxyapatite particles surface-modified with inositol phosphate. As we have examined the biocompatibility of this apatite cement, it showed good cell differentiation, attachment and proliferation, and bone induction both In vitro and In vivo. Thus, this present study demonstrates that this apatite cement can be useful as a new bone substitute for bone grafting in the spine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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： 外科系臨床医学・整形外科学
キーワード： (1) 移植・再生医療 (2) 再生医学 (3) 臨床 (4) 骨移植

１．研究開始当初の背景

脊椎疾患の治療には、自家骨を部分的に採取して病変部に移植する自家骨移植術がある。この手法は安定した臨床成績が得られるものの、骨採取量の限界や、手術部以外から骨を採取するため採骨痛が発生することなどが問題視されている。そのため、水酸アパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$; HAp)などの無機材料（バイオセラミックス）が骨充填材料として開発、主に整形外科領域で活発に利用されている。

バイオセラミックスは、緻密体、多孔体、顆粒およびセメント（ペースト状人工骨）な

どの材料形態で利用されている。中でもペースト状人工骨は、任意の形状に手術室で加工可能であり、注射器で注入可能なため汎用性が高く、脊椎疾患のみならず様々な整形外科疾患の治療に利用され、その有用性が認められている。

２．研究の目的

我々は，イノシトールリン酸(IP6)という生体関連物質をアパタイトなどの出発原料の表面に修飾し、IP6 のキレート能により粒子同士を結合し硬化させるという，従来とは全く異なる硬化メカニズムを備えたペースト状人工骨を開発した（図１）。今研究の目的は，in vitro 系および in vivo 系の両面からこのセメントの生体適合性を調査し，新規のペースト状人工骨として応用可能か，その有用性を評価することである。

３．研究の方法

（1）In vitro評価

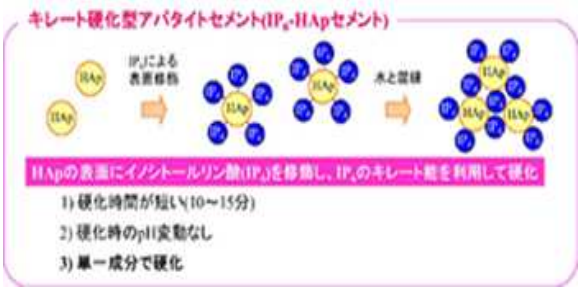
セメント試料片上に株化骨芽細胞であるMC3T3-E1細胞を播種し、細胞の接着性、増殖性および分化を調べている。なお、対照試料(Control)には細胞培養用のポリスチレンプレートを用いた。細胞の試験片に対する接着性（初期付着率）は、培養5時間後における各培養基材（Control, HApセメント, IP6-HAp セメント）上の細胞数を数えることによって相対細胞初期付着率を算出して評価した。増殖性は、上記と同じ培養基材上に細胞を播種し、培養1, 3, 5, 7日後における細胞数をカウントして細胞増殖曲線を作成し、その形態をSEMにより観察した。さらに、各培養基材上で培養された細胞の遺伝子レベルでの分化について、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法を用いて調査した。

また、ラット骨髄間葉系幹細胞(RBMC)を用いた実験も行った。細胞の分化では、培養7, 14, 21, 28日後の単位DNA量当たりのアルカリフォスファターゼ（ALP）活性およびオステオカルシン（OC）産生量を測定し、石灰化はアリザリンレッドで各培養基材上の細胞を染色することによって評価した。

（2）In vivo 評価

実験動物を用いた in vitro 評価では、IP6-HAp セメントを 4, 8, 12, 24 週間ウサギ脛骨に埋入した後、非脱灰研磨標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色およびトルイジンブルー（TB）染色による組織学的観察を行った。また、Control には現在臨床で用いられているペンタックス社製 BIOPEX®-R を用いた。

図１

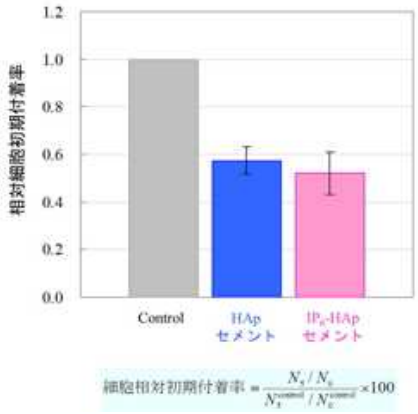


４．研究成果

（1）In vitro評価

セメント試料片に対する初期付着率はControlと比較すると低下する傾向があるが、IP6の有無ではほぼ同様であり、IP6の有無は細胞接着性にはほとんど影響がなかった（図２）。セメント試料片上に接着した細胞の増殖性も良好であり、増殖速度はControlのそれとほぼ同様であり、その形態にも異常は観察されなかった。

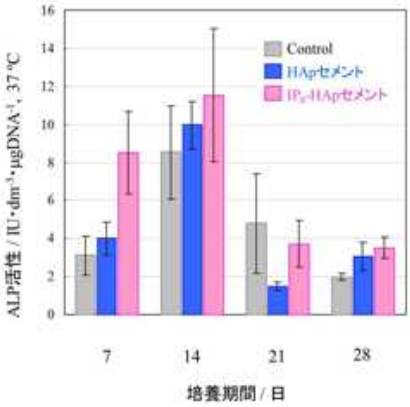
図２　細胞相対初期付着率



RT-PCR法を用いた細胞分化の評価では、後期の骨芽細胞の分化マーカーである骨シアロ酸タンパク（BSP）のmRNAの発現が、IP6で表面修飾されたHApセメント上で培養した細胞のみで観察された。BSPは後期の骨芽細胞の分化マーカーであることから、IP6で表面修飾したHApセメントは骨芽細胞の分化を促進させている可能性が高いと考えられた。

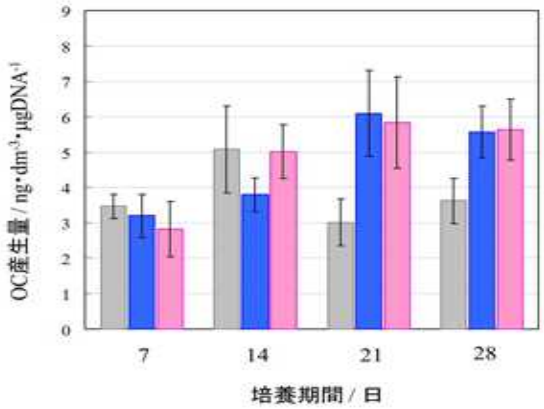
RBMCをIP6-HApセメントおよびHApセメント上に播種し、所定の期間経過後のALP活性（骨芽細胞の初期・中期の分化マーカー）を測定した結果，ALP活性はすべての培養基材で培養14日目まで高まった後、21日目で減少した。しかしながら、IP6-HApセメント試料片上では、培養7日目から他の培養基材よりも有意に高い活性値を示した（図３）。

図３　単位DNAあたりのアルカリフォスファターゼ活性



同様に、骨芽細胞の後期の分化マーカーであるOC産生量は、培養21日目および28日目のControlと比較すると、HApセメントおよびIP6-HApセメントは有意に高い産生量を示し、セメント同士で有意差は認められなかった(図４)。

図４単位DNAあたりのオステオカルシン産生量



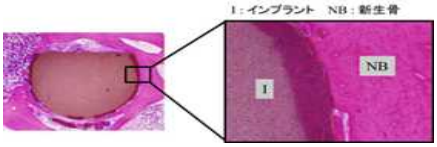
また、アリザリンレッドによる石灰化の評価では、IP_6-HApセメント試料片上ではより顕著な石灰化が観察された。

（2）In vivo評価

ウサギ脛骨中のセメントの生体硬組織反応を24週まで組織学的に調べた結果，炎症な

どの材料毒性を示す兆候は現れず、埋入4週目でセメント試料片の周囲において、多くの新生骨が観察され、セメント試料片と骨とが繊維性の組織を介在することなく、直接結合している状態が観察された。また、埋入期間が経つにつれて、新生骨の量は増加し、骨組織が成熟した（図５）。

図５セメント試料と周囲新生骨
（埋入後24週、HE染色）



これらのin vitro/in vivo評価の結果から、IP6-HAp セメントの生体適合性は良好であり、高い細胞の分化誘導能や骨伝導性をもち、生体活性があることがわかった。よって、IP6-HApセメントは、現行のアパタイトセメントの問題点を解決し得る新規のアパタイトセメントとして有効であると考えられる。

既にわれわれは脊椎への移植モデルを確立しており、今後は脊椎移植後の同セメントの動態の評価を進めていく予定である。

さらに今後の展望としては，脊椎疾患患者に臨床的に適用しても確実かつ安定した骨癒合が期待でき、さらに医師が安心して使用でき、患者の方々のQOLを向上させるには、このセメントに新たな機能を付与させる必要があると考えている。具体的には、ペースト状人工骨の材料に骨形成を促進させる微量成分を加えることで、骨誘導能を持つ材料開発を目指し、骨代謝の低下した高齢者に使用しても充分な骨形成を促すような生体活性の高い材料の開発、細菌などへの感染に対して抵抗性のあるペースト状人工骨の開発などである。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計２件）

1. 審査付原著論文（査読付き Proceedings を含む）

H. Funao, K. Ishii, S. Nagai, A. Sasaki, T. Hoshikawa, M. Aizawa, Y. Okada, K. Chiba, S. Koyasu, Y. Toyama and M. Matsumoto, “Establishment of a Real-Time, Quantitative, and Reproducible Mouse Model of Staphylococcus Osteomyelitis Using Bioluminescence Imaging”, Infection and Immunity, **80,** 733-741(2012).

2. 著書・総説，解説等

相澤 守, 小西敏功, 松本守雄, “低侵襲治療を指向したペースト状人工骨の開発”, 工業材料, **60**, (2012). (印刷中)

〔学会発表〕（計５件）

（1）水本みのり・小西敏功・本田みちよ・石井 賢・船尾陽生・戸山芳昭・松本守雄・相澤 守、“キトサンを添加したインジェクション型アパタイトセメントのウサギ脛骨への埋入による硬組織適合性評価”、日本セラミックス協会 2012 年年会、京都大学（吉田キャンパス）、日本セラミックス協会、2012.3.19-21.

（2）千布悠貴・小西敏功・水本みのり・本田みちよ・松本守雄・石井 賢・相澤 守、“骨ミネラル含有アパタイトから作製したキレート硬化型セメントの生体適合性評価”、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、日本バイオマテリアル学会、2011.11.21-22.

（3）川延勇介・本田みちよ・水本みのり・小西敏功・羽太優理・神澤信行・石井 賢・松本守雄・相澤 守、“超音波噴霧熱分解法により合成した銀担持ハイドロキシアパタイト微小球の抗菌性評価”、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、日本バイオマテリアル学会、2011.11.21-22.

（4） 蔵本哲也・石井賢・永井重徳・船尾陽生・相澤守・平井政彦・佐々木文・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“骨軟部耐性菌感染症に対する新規分子標的治療法の開発—抗生物質ターゲッティング療法”、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、日本バイオマテリアル学会、2011.11.21-22.

（5）蔵本哲也・石井賢・平井政彦・船尾陽生・永井重徳・相澤守・佐々木文・岡田保典・千葉一裕・小安重夫・戸山芳昭・松本守雄、“抗生物質ターゲッティング療法の確立へ向けた抗生剤含有・炎症プローブの開発”、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、京都、日本バイオマテリアル学会、2011.11.21-22.

〔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〕
ホームページ等
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
松本　守雄（MATSUMOTO MORIO）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：40209656

(2)研究分担者
相澤　守（AIZAWA MAMORU）
明治大学・理工学部・教授
研究者番号：10255713