

新たな骨誘導型生分解ポリマーを用いた指骨の再生誘導

和田 仁 孝

近畿大学医学部形成外科学教室

抄 録

(目的)これまで、われわれは、骨・軟骨組織の再生誘導を行う際、細胞の足場となる生分解性ポリマーとして poly(L-lactide- ϵ -caprolactone) (P(LA-CL)) を用いてきた。しかし、P(LA-CL) は、力学的強度が不足していた。そこで本研究では、生分解性ポリマー P(LA-CL) に、高い力学的強度と骨伝導能を有するセラミックス粒子 (Hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate) を付加して、新しい骨誘導型の生分解性ポリマーを開発した。さらに、この新型ポリマーをヒト指骨モデルに導入して、指骨の再生能と有用性について比較検討した。(方法)仔ウシ橈骨より採取した骨膜を、ヒト指骨形状を有する 3次元生分解性ポリマーと組み合わせて複合体を作成し、ヌードマウスの背部皮下に移植した。移植後、10週、20週にて標本を取り出し、(1)肉眼的観察、(2)単純X線写真による検索、(3)組織学的検索、(4)メカニカルテストを行った。実験群として、(1)P(LA-CL)群 (2)HA-P(LA-CL) (3) β -TCP-P(LA-CL) の 3群を設定した。(結果およびまとめ)肉眼的所見では、すべての群において 3次元構造が維持されていた。しかし、単純X線写真による所見および組織学的所見では、P(LA-CL)群に比較して、HA-P(LA-CL)群および β -TCP-P(LA-CL)群において、著明な骨形成が認められた。また、メカニカルテストでは、P(LA-CL)群に比較して HA-P(LA-CL)群および β -TCP-P(LA-CL)群において、有意な力学的強度の増加が認められた。これらの結果より、セラミックス粒子を含有した新たな生分解性ポリマーを足場とすることにより、早期の骨再生および 3次元構造の維持が可能となることが示唆された。

Key words : Tissue Engineering, Poly(L-lactide- ϵ -caprolactone), Hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, 骨再生

緒 言

1993年 Langer と Vacanti らによって Tissue Engineering (組織工学) の概念¹ が提唱されて以来、軟骨、骨組織などの硬組織の再生を目的とする組織工学の進歩は、目覚ましい。これまで、組織工学の臨床応用に向けて、(1)間葉系組織からの幹細胞分離や増殖技術^{2,3}、(2)回転培養装置の改良⁴、(3)培養細胞の足場となる生分解性ポリマーの開発⁵、(4)細胞増殖因子の投与方法⁶ などの基礎研究が数多くなされてきた。その中で、3次元構造を有する複合硬組織の再生は、極めて困難な問題として残されてきた。

1999年、Isogai, Vacanti⁷ らは、(1)仔牛の肩関節から採取した軟骨細胞、(2)前腕屈筋腱から採取した腱細胞、および(3)橈骨より採取した骨膜を、ヒト指骨形状を有する 3次元生分解性ポリマー (PLA, poly(L-lactide) および PGA, poly glycolic acid)

と組み合わせて複合化し、ヌードマウスの背部皮下においてヒト指骨・指関節の形状を有する複合硬組織の再生誘導を行った。この実験モデルでは、骨、軟骨、関節が同時再生され、正常なヒト指骨・関節の 3次元形状と解剖学的構造が忠実に再現された。この実験結果から、組織再生の可能性はさらに広がり、単一組織から、より複雑な組織の再生誘導が可能であることが示唆された。その後、この再生誘導技術⁸ を用いたヒト指骨・指関節モデルの長期的観察がなされ、in situ hybridization を用いた再生指骨の細胞由来⁹、再生指骨の微細構造と遺伝子発現¹⁰、MRI を用いた再生指骨の組織再生過程¹¹ に関する詳細な結果が報告された。しかし、このヒト指骨・指関節モデルでは、(1)力学的強度が不足しており、指骨の 3次元形状の長期維持が困難であること、(2)指骨・指関節組織の再生誘導に長期間を要すること、などの諸問題が明らかとなった。

近年、生体親和性に優れた多孔性セラミックスの開発が進み、生体活性型セラミックスである Hydroxyapatite や生体吸収型セラミックスに分類される β -tricalcium phosphate などのバイオマテリアルが、骨欠損部の再建材料として臨床の場で用いられるようになった。Hydroxyapatite (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は生体内で分解されないが、HA を骨欠損部に移植した場合、HA と接触する母床骨からの骨芽細胞が HA の表面に沿って増殖するため、優れた骨伝導能 (osteoconduction) を有することが知られている。この作用により、HA は生体内骨組織と強固に結合する (50 kg/cm^2 以上)。次に、 β -tricalcium phosphate (β -TCP, $(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$) は HA の前駆体物質であり、高い骨伝導能を有するが、生体内で経時的に分解・吸収される点において HA と異なっている。これらのセラミックスにおける高い力学的強度と骨伝導能を利用して、セラミックスの骨再生への応用が検討されてきた¹²⁻¹⁴。しかし、両者は、物理学的性状が脆く、採形が困難なため、複雑な 3 次元形状を有する骨組織の再生には適しておらず、また、これらのセラミックスを用いた骨再生では、その内部に形成される骨量に限界があることが報告された^{15,16}。

一方、骨・軟骨組織の再生誘導に適した新しい生分解性高分子 (poly(L-lactide- ϵ -caprolactone) (以下 P(LA-CL) と略す)) が開発され注目されている。P(LA-CL) は、poly L-lactide と poly ϵ -caprolactone の 2 種類のモノマーを block 状に重合した生分解性の共重合体であり、生体内での分解時間が比較的長く (4~6 ヶ月)、炎症反応が少なく組織適合性に優れ、軟らかく柔軟性に富んでおり、骨・軟骨組織の再生誘導に適する生分解性ポリマーであることが報告された^{17,18}。

そこで本研究では、指骨の再生誘導の促進および 3 次元形状の長期維持を目的として、採形が容易で骨再生に適する性質を有する生分解性ポリマー P(LA-CL) に、力学的強度と骨伝導能を有する HA

粒子もしくは β -TCP 粒子を付加して、新しい骨誘導型の生分解性ポリマーを開発した。さらに、この新型ポリマーを、ヒト指骨モデルに導入して、指骨・指関節組織の再生能と力学的強度を検討して、有用性について考察した。

方法および材料

実験動物は、4~6 週齢ヌードマウス (平均体重 28 g, 雄, 72 匹, Herlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN, USA) を用いた。飼育は、クリーンラック内で室温 22°C 、湿度 50%, 12 時間、明暗サイクルの条件下に行った。飼料は、放射線照射 (3 mG) にて滅菌された固形飼料を与え、飲料用水は制限なく与えた。

1. ヒト指骨形状ポリマーの作成

3 種類のヒト指骨形状ポリマー (長さ 17 mm, 幅 7 mm, 高さ 5 mm) を準備した。まず、あらかじめ準備したヒト指骨形状の鋳型に、ポリマー溶液 (5% (w/w) 1,4-dioxane および P(LA-CL) 75:25) を泡立てないように駒込ピペットにて注入して、P(LA-CL) を作成した。同様の方法にて、P(LA-CL) に直径 $30 \mu\text{m}$ の Hydroxyapatite (HA) 粒子を混合して HA-P(LA-CL) (70:30 wt%) を作成した。さらに、直径 $2 \mu\text{m}$ の β -tricalcium phosphate (β -TCP) 粒子を P(LA-CL) に混合して β -TCP-P(LA-CL) (70:30 wt%) を作成した。それぞれのポリマーを注入した鋳型を -40°C の冷蔵庫へ移し、2 時間静置した。次に、ポリマーを鋳型より取り出し、 40 Pa , -40°C , 12 時間の条件下に凍結乾燥 (TF10-80ATA, 宝製作所, 東京) 処理した。最後に真空乾燥 (60°C , 12 時間) にてモノマーおよび溶媒の除去を行い、ヒト指骨形状ポリマーを作成した。作成した P(LA-CL) ポリマーの分子量は 367000 Da 、ポリマーの内部はスポンジ構造、気孔径は $50\sim 100 \mu\text{m}$ 、空隙率は 95%, 生体内での分解速度は 4~6 ヶ月となるように調整した。走査電子顕微鏡 (JSM-5800LV, JOEL, 東京) を用いて観察したところ、

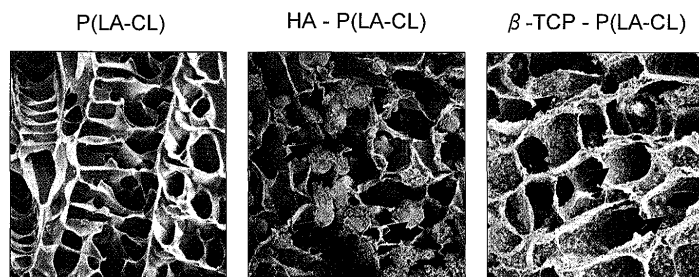


図 1 3 種類の生分解性ポリマーの走査電顕像。矢印は、HA および β -TCP 粒子を示す。P(LA-CL) (PLA:PCL 75:25 wt%) は、気孔径を $50\sim 100 \mu\text{m}$ に調整した。HA (HA:P(LA-CL) 30:70 wt%) は、粒子径を $30 \mu\text{m}$ に調整した。 β -TCP (β -TCP:P(LA-CL) 30:70 wt%) は、粒子径を $3 \mu\text{m}$ に調整した。

100 μm

HA および β -TCP 粒子は、P(LA-CL) ポリマーのスポンジ構造内部に組み込まれていた (図1)。

2. 再生ヒト指骨モデルの作成

指骨の作成：新鮮骨膜を、仔ウシ (生後1ヶ月以内) の橈骨骨幹部よりエレバラスパにて挙上、採取した。採取した骨膜を、ヒト指骨形状を有する生分解性ポリマーに全周性に巻き、吸収糸 (5-0 Vicryl®, Ethicon, Somerville, NJ, USA) を用いて縫合固定した。その際、骨形成層 (Cambium layer) から遊離される骨芽細胞や未分化間葉系細胞がポリマー内に遊走できるように、骨形成層をポリマー面に直接密着させた。作成した骨膜・ポリマー複合体に、あらかじめ10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), アスコルビン酸50 μ g/ml, ペニシリンG100 unit/ml, ストレプトマイシン100 μ g/ml, アンホテリシンB0.25 μ g/ml を添加した調整 M199培養液 (Gibco, Grand Island, NY, USA) に浸漬させ、培養器内 (37°C, 5% CO₂) にて6日間培養した。

関節軟骨の作成：Klagsbrun¹⁹ の方法に準じて、仔ウシの肩関節より軟骨組織を No. 10メスにて採取した。採取組織を5×5 mmの大きさに細切したのち、0.3% collagenase type II (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA) にて37°C, 14時間の条件下に酵素処理をした。ナイロンメッシュ (孔サイズ: 300 μ m) にて濾過した後、10%ウシ胎児血清, アスコルビン酸50 μ g/ml, ペニシリンG100 unit/ml, ストレプトマイシン100 μ g/ml, アンホテリシンB0.25 μ g/ml を添加し、調整 F12培養液 (Gibco, Grand Island, NY, USA) を加えて酵素反応を止めた。得られた軟骨細胞浮遊液は、Ca²⁺, Mg²⁺ 不含リン酸緩衝液 (PBS, Mediatech Inc, Herndon, VA, USA) にて、3回洗浄、遠心分離 (4°C, 400 G, 10分間) をした。軟骨細胞浮遊液に調製 F12培養液を加えて、細胞濃度を100×10⁶ 個/

ml に調整し、PGA ポリマー (Albany International, Mansfield, Massachusetts, サイズ: 10×10×2 mm) に播種した (最終細胞濃度100×10⁶ 個/ポリマー)。細胞・ポリマー複合体は、播種細胞をポリマー表面に細胞接着させるため、培養器 (37°C, 5% CO₂) に入れ、4時間静置させた。その後、調製 F12培養液を静かに加えて、再度、培養器内 (37°C, 5% CO₂) にて5日間培養した。

再生ヒト指骨モデルの作成：吸収糸にて、指骨 (骨膜・ポリマー複合体) の両端に再生関節軟骨 (軟骨細胞・ポリマー複合体) を縫合した。作成したヒト指骨モデルに調製 M199培養液を加え、培養器 (37°C, 5% CO₂) にて24時間培養した。

再生ヒト指骨モデルの移植と標本採取：麻酔前投薬として、ヌードマウスに硫酸アトロピン (0.04 mg/Kg, Atoropine sulfate, Phoenix Scientific Inc, MO, USA) および、トルプタミド (3 mg/kg, Trobugesic N, Dodge Animal Health, IW, USA) を皮下注射した。イソフルラン (Pittman and Moores, Mundelein, IL, USA) による全身麻酔下、ヌードマウスの背部をポピドンヨード (The Purdue Frederick Company, Stamford, CT, USA) にて消毒し、約2 cmの皮膚切開を加えた。皮下を剝離して形成した皮下ポケット内に再生指骨モデルを挿入し、5-0ナイロン縫合糸 (シグマ、長門石器械店、東京) を用いて閉創した。移植後、10週目 (n=6) および20週目 (n=6) に移植組織を摘出した。摘出組織 (n=3) は長軸方向に半切し、(1)肉眼的観察、(2)単純X線写真による検索、(3)組織学的検索による形態学的検索に用いた。さらに、移植後10週目 (n=3) および20週目 (n=3) におけるヒト指骨モデルの力学的強度を比較検討した (図2)。

実験群は、再生ヒト指骨形状モデルに用いた生分解性ポリマー別に、(1) P(LA-CL) 群、(2) HA-P(LA-CL) 群、(3) β -TCP-P(LA-CL) 群の3群を設定し

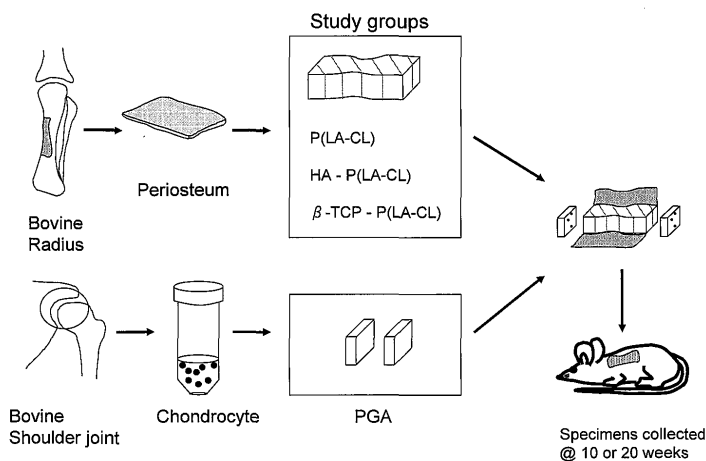


図2 実験プロトコール

た。各々の群において、指骨に骨膜を付加しない群をコントロールとした。

3. 単純X線写真による検索

単純X線撮影による検索では、採取組織をX線発生装置(Lorad MIIE, Mammoview, bedford, MA, USA)を用いて、25 kV, 2.4 mA, 0.2秒の条件下にて撮影し、標本における石灰化の有無および範囲を観察した。

4. 組織学的検索

採取組織を10%中性ホルマリンにて24時間浸漬固定し、エタノール系列により脱水した後、パラフィン切片(厚さ6 μ m)作成した。染色はプロテオグリカン産生状況を調べるためSafranin O染色、軟骨細胞の一般的性状を調べるためにToluidine blue染色、石灰化の有無および範囲を確認するためにAlizarin red染色(カルシウム)およびvon Kossa染色(リン酸)、破骨細胞の存在と分布を調べるためにTRAP染色を施行した。

5. メカニカルテスト

Instron series 5565 (Instron corporation, Canton, MA, USA)を用いて、摘出した再生骨組織およびコントロールの静的3点折り曲げ試験を行った^{20,21}。摘出標本を台座に固定した後、幅1mmの垂直板で上方から圧迫し、その応力をInstronで検出した。この際、垂直板は、標本の中央を通るように設置した。垂直板が標本に接し、さらに0.03~0.06 mm下がる時、0.02 Nの反発応力を記録したので、この点を基準点とした。続いて、垂直板を基準点から5 mm下降(20 mm/min)させ、このときの反発応力をコンピューター(FMV C24C, Fujitsu Ltd., Tokyo, Japan)に記録した。この操作によって、検体が5 mm折れ曲がったときの応力を計測した。標

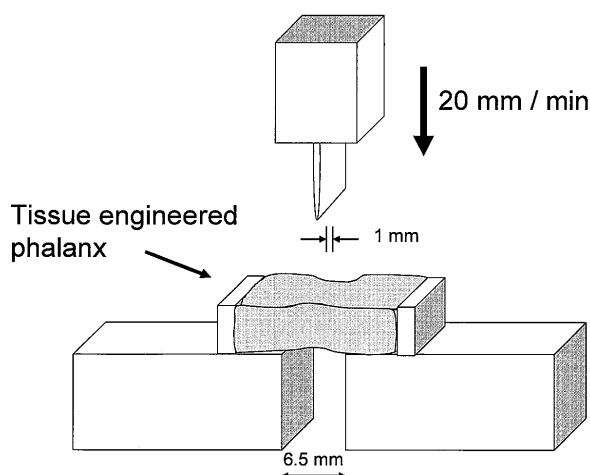


図3 静的3点折り曲げ試験によるメカニカルテスト

本の取り付けから試験が終了するまでの期間は、標本に生理食塩水を噴霧し、乾燥を防止した(図3)。

7. 統計処理

再生ヒト指骨モデルにおける静的3点折り曲げ試験の定量解析には、One-way analysis of variance (ANOVA)ならびに、多重比較検定(Post-hoc test)としてBonferroni multiple comparison testを用いて有意差検定を行った。

結 果

1. 肉眼的所見

移植後10週目および20週目における摘出標本の肉眼的所見では、いずれの再生ヒト指骨モデル群(P(LA-CL)群(図4)、HA-P(LA-CL)群(図5)、および β -TCP-P(LA-CL)群(図6))においても、ヒト指骨形状は良好に再現されていた。断面像を観察すると、いずれの群においても、再生ヒト指骨モデルの再生関節軟骨表面は白色平滑で、適度な硬度と弾性があり、光沢が認められた。一方、再生指骨の周囲には、付加した骨膜が明瞭に観察された。再生骨組織は硬く、再生関節軟骨に強固に接着していた。

一方、骨膜を付加していないコントロールでは、指骨形状ポリマーの内部はやや赤みを帯び、ポリマー辺縁には明らかな凹凸が認められた。また、骨膜を付加したヒト指骨モデルに比較して、コントロールでは、厚さの減少が認められた。この傾向は、特に、移植後10週目のP(LA-CL)群のコントロールにおいて顕著に認められた(図4)。

2. 単純X線写真による所見

P(LA-CL)群では、移植後10週目において石灰化像を認め、経時的に石灰化領域の拡大が認められた。移植後20週目では、特に、骨幹端部に著明な石灰化を認めた。一方、P(LA-CL)群のコントロール(骨膜なし)では、P(LA-CL)自体にカルシウム成分が含まれていないため、移植前の石灰化は認められなかった。また、観察中のいずれの時期においても石灰化は認められなかった(図7)。

HA-P(LA-CL)群では、移植前よりHA粒子がスリガラス様に観察された。移植後は、再生指骨内部において、石灰化によるX線透過性の低下が経時的に認められた。この結果から、HA粒子間に良好な新生骨が形成されていることが示唆された。一方、HA-P(LA-CL)群のコントロール(骨膜なし)では、移植前に認められた透過性の低下は、移植後も維持された。しかし、透過性自体の経時的変化は観察されなかった(図8)。

β -TCP-P(LA-CL)群では、移植前から β -TCP

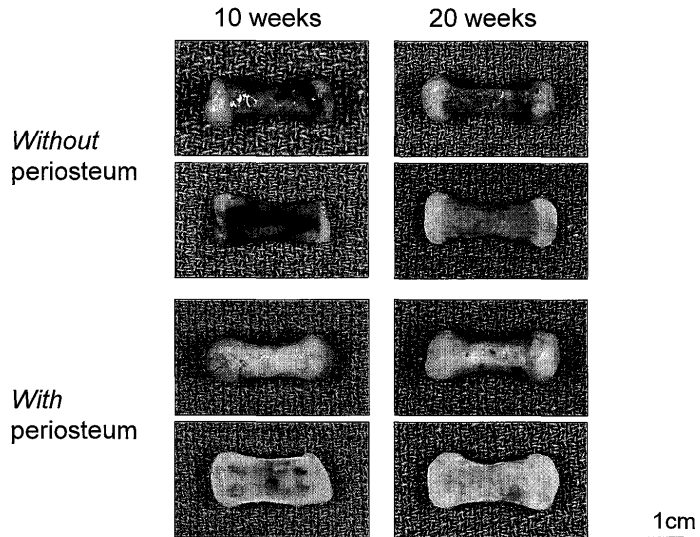


図4 P(LA-CL) 群における再生ヒト指骨モデルの肉眼所見
移植後10週目, 20週目の再生ヒト指骨モデル(下段), および骨膜を付加していないコントロール(上段)を示す。再生ヒト指骨モデルでは, ヒト指骨形状は良好に再現されていた。一方, コントロールでは, 関節軟骨部の形状は比較的維持されていたが, 骨幹部では, 内部の著明な赤色化が確認され, 血管の侵入による凹凸, 菲薄化が観察された。

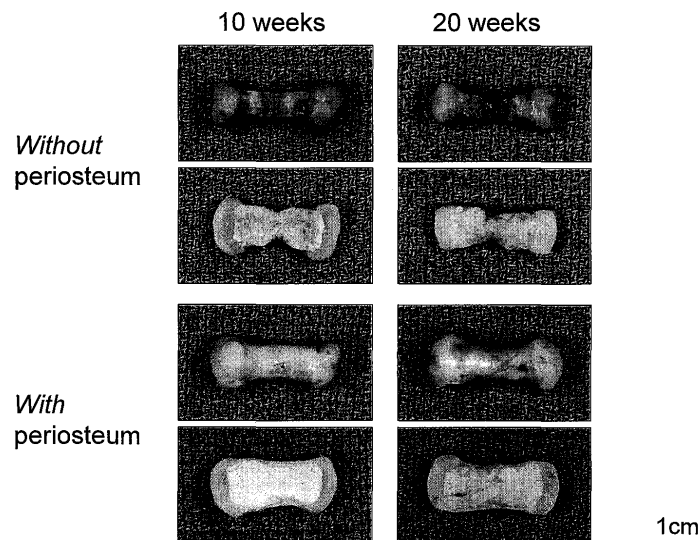


図5 HA-P(LA-CL) 群における再生ヒト指骨モデルの肉眼所見
移植後10週目, 20週目の再生ヒト指骨モデル(下段), および骨膜を付加していないコントロール(上段)を示す。再生ヒト指骨モデルでは, 骨幹部において明瞭な肥厚した骨膜が観察された。

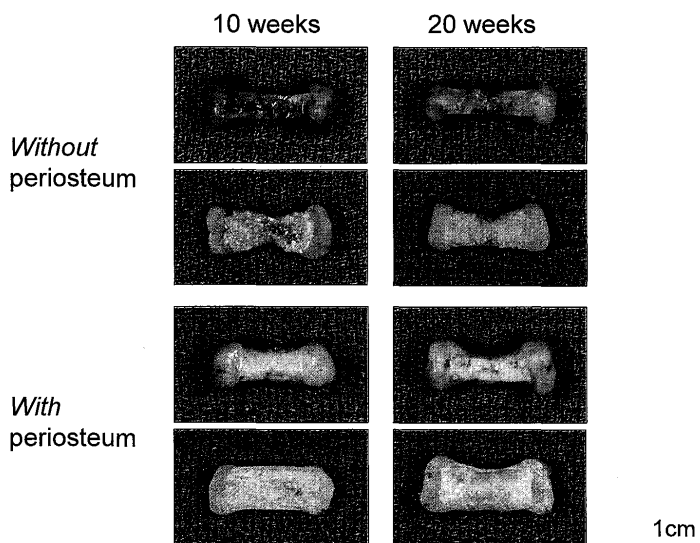


図6 β -TCP-P(LA-CL) 群における再生ヒト指骨モデルの肉眼所見
移植後10週目, 20週目の再生ヒト指骨モデル(下段), および骨膜を付加していないコントロール(上段)を示す。コントロールでは, 関節軟骨部の形状は比較的維持されていた。一方, 骨幹部では, ポリマーの吸収・融解像が観察された。

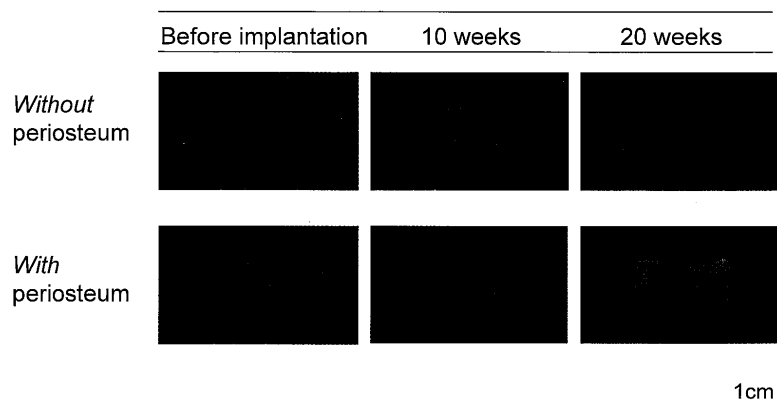


図7 P(LA-CL) 群におけるレントゲン像
再生ヒト指骨モデルでは、10週目において石灰化を認めた。経時的に石灰化領域の拡大が認められ、20週目では、骨幹端部に著明な石灰化を認めた。

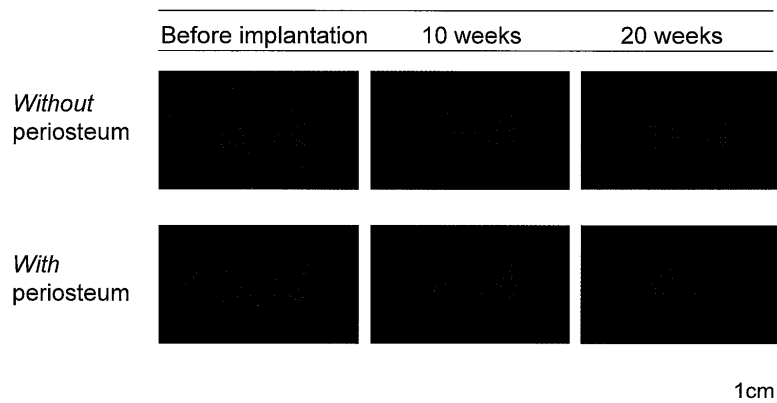


図8 HA-P(LA-CL) 群におけるレントゲン所見
HA粒子は、移植前よりスリガラス様の陰影として観察された。しかし、再生ヒト指骨モデルでは、経時的に透過性の低下が観察された。一方、コントロール（骨膜なし）では、経時的変化は認められなかった。

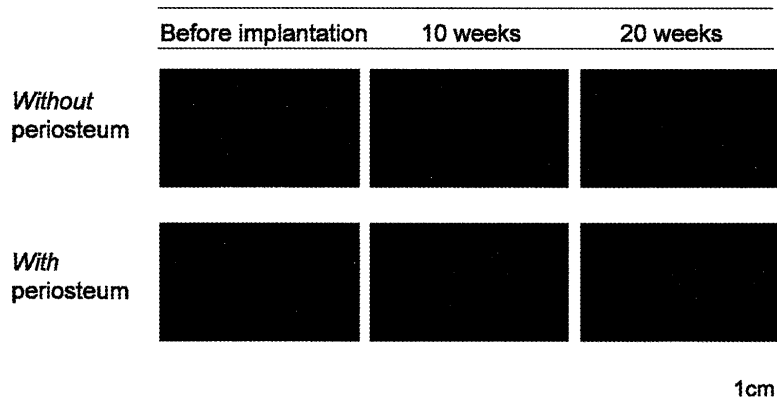


図9 β -TCP-P(LA-CL) 群におけるレントゲン所見
再生ヒト指骨モデルでは、経時的に透過性の低下が観察された。一方、コントロール（骨膜なし）では、経時的に β -TCP粒子陰影の消失を認めた。

粒子によりX線透過性は低下していた。移植後は、経時的に透過性の低下領域が、再生指骨の全体に拡大し、良好な石灰化が認められた。一方、 β -TCP-P(LA-CL) 群のコントロール（骨膜なし）では、透過性が経時的に亢進した。この透過性の変化は、 β -TCP粒子が生体内で分解吸収されたためと考えられた（図9）。

3. 組織学的所見

再生関節軟骨：移植後10週目に、再生ヒト指骨モデル群（P(LA-CL) 群（図10）、HA-P(LA-CL) 群

（図11）、および β -TCP-P(LA-CL) 群（図12））、および各々のコントロール（骨膜なし）において、Safranin O 染色により、関節軟骨の全体が陽性反応を示した。また、Toluidin blue 染色によって、関節軟骨の全体にメタクロマジーが認められた。これらの結果より、関節軟骨では、軟骨細胞外基質であるプロテオグリカンが良好に産生されたことが示唆された。

移植後20週目において、再生ヒト指骨モデルでは、関節軟骨の深層部において軟骨細胞が大型化し、規

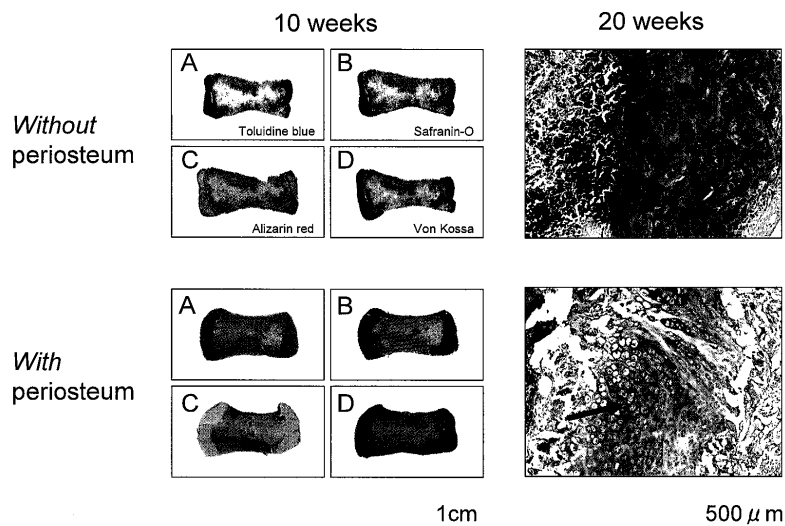


図10 P(LA-CL) 群における組織学的所見
再生ヒト指骨モデルおよびコントロール(骨膜なし)における移植後10週目の組織像(A: Toluidine blue, B: Safranin O, C: Alizarin red, D: von Kossa)および移植後20週目の組織像(Safranin O, 40×)を示す。移植後10週目において、関節軟骨部は、Safranin OおよびToluidine blue染色により陽性反応を示し、良好な細胞外基質の産生が示唆された。骨幹部は、コントロールにおいて、無染色域を認め、ポリマーの吸収・融解が示唆された。

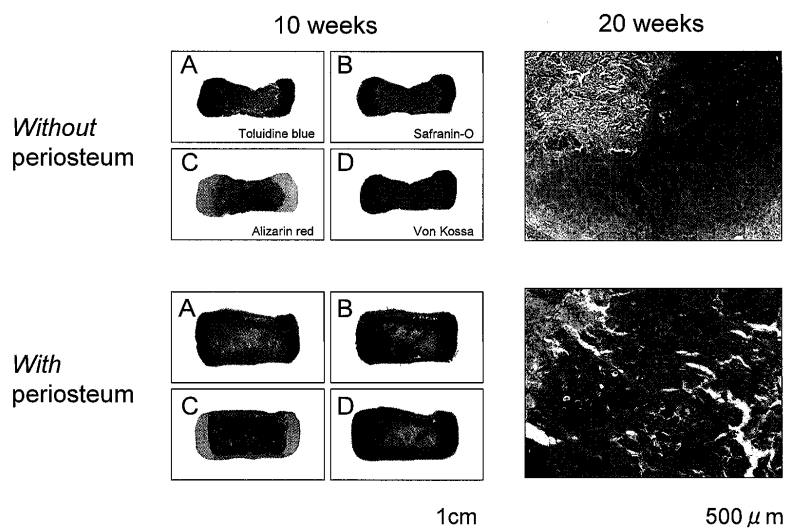


図11 HA-P(LA-CL) 群における組織学的所見
再生ヒト指骨モデルおよびコントロール(骨膜なし)における移植後10週目の組織像(A: Toluidine blue, B: Safranin O, C: Alizarin red, D: von Kossa)および移植後20週目の組織像(Safranin O, 40×)を示す。移植後10週目の再生ヒト指骨モデルでは、再生指骨内部において、Safranin O染色による陽性領域が拡大し、良好な骨伝導が示唆された。

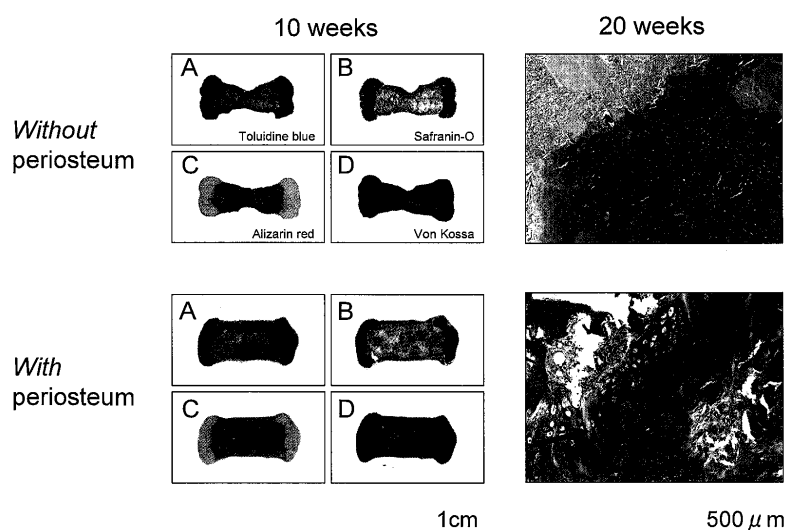


図12 β -TCP-P(LA-CL) 群における組織学的所見
再生ヒト指骨モデルおよびコントロール(骨膜なし)における移植後10週目の組織像(A: Toluidine blue, B: Safranin O, C: Alizarin red, D: von Kossa)および移植後20週目の組織像(Safranin O, 40×)を示す。移植後20週目のコントロールでは、軟骨細胞が、細胞密度が高く小型な細胞群として観察された。一方、再生ヒト指骨モデルでは、軟骨細胞は大型化し、柱状電列を示し、成長帯様構造が形成された。

則的な柱状配列を示した。この成長帯様構造は、正常関節軟骨の組織構造に近似していた。一方、骨膜

を付加していないコントロールでは、関節軟骨は、細胞密度の高い小型の軟骨細胞により構成され、成

長帯様構造は認められなかった(図10, 図11, 図12).

再生指骨：いずれの再生ヒト指骨モデル群においても、移植後10週目では、Alizalin red および von Kossa 染色による陽性反応領域が骨膜下に限局して認められた。特に HA-P(LA-CL) 群では、移植後10週目において再生指骨の内部全体が Safranin O 染色に対して陽性反応を示した。(図11).

一方、P(LA-CL)群のコントロールでは、Alizalin red および von Kossa 染色に対する陽性反応は観察されなかった。しかし、HA-P(LA-CL)群および β -TCP-P(LA-CL)群のコントロールでは、HA 粒子 および β -TCP 粒子が、Alizalin red および von Kossa 染色に対して陽性反応を示し、粒子はそれぞれ直径約30 μ m および 2 μ m の円形に染色された。

移植後20週目の再生ヒト指骨モデルに Toluidine blue 染色、von Kossa 染色および TRAP 染色を施行した。Toluidine blue 染色では、関節軟骨部はメタクロマジーを示し、良好なプロテオグリカン産生が示唆された。von Kossa 染色では、特に HA-P(LA-CL) 群および β -TCP-P(LA-CL) 群において骨部に高密度に陽性域を認め、良好な石灰化が示唆された。しかし、明らかな骨梁構造はみられなかった。また、HA-P(LA-CL)群では、HA 粒子は残存しており、その周囲に接して石灰沈着がみられ、HA 粒子と新たな石灰沈着部は容易に区別できた。一方、 β -TCP-P(LA-CL) 群では、 β -TCP 粒子に沿って石灰沈着しており、 β -TCP 粒子と新たな石灰沈着部は区別できなかった。酸フォスファターゼに対し

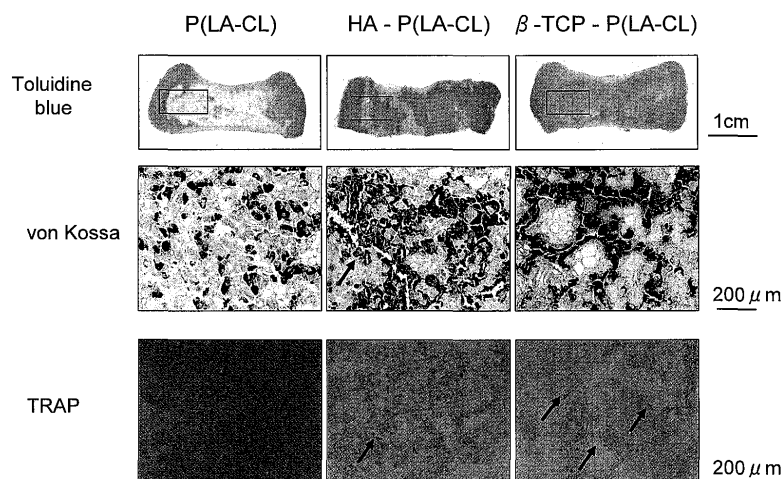


図13 移植後20週目の再生ヒト指骨モデルにおける Toluidine blue 染色、von Kossa 染色および TRAP 染色

Toluidine blue 染色 (上段)、von Kossa 染色 (中段、40 \times)、TRAP 染色 (下段、40 \times) を示す。von Kossa 染色では、HA-P(LA-CL) 群および β -TCP-P(LA-CL) 群において高密度に陽性域を認めた。明らかな骨梁構造はいずれの群においても認められなかった。HA 粒子(矢印)と新たな石灰沈着部は容易に区別できたが、 β -TCP 粒子と新たな石灰沈着部は区別できなかった。TRAP 染色陽性細胞(矢印)は、 β -TCP-P(LA-CL) 群において最も多く観察された。

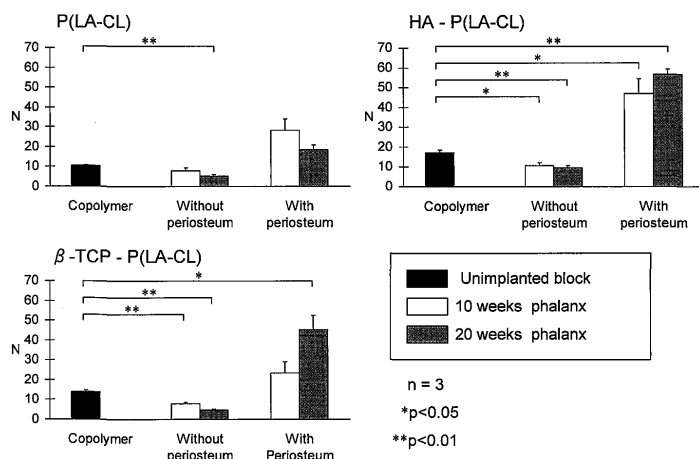


図14 静的3点折り曲げ試験によるメカニカルテスト

Instron を用いて、静的3点折り曲げ試験を行い、力学的強度を検討した。再生ヒト指形状モデルでは、移植期間中に、力学的強度の有意な増加が認められた。一方、コントロール(骨膜なし)では、経時的に力学的強度の低下傾向が認められた。

て陽性反応を示す破骨細胞を検討した。その結果、破骨細胞は β -TCP-P(LA-CL) 群において最も数多く出現していた。また、P(LA-CL)群では、破骨細胞が観察されなかった。このことから、再生ヒト指骨モデルにおいて、特に β -TCP 粒子を含有する β -TCP-P(LA-CL)群が骨組織のリモデリングに最も有利であることが示唆された (図13)。

4. メカニカルテスト

Instron を用いて静的 3 点折り曲げ試験を行い、再生ヒト指骨モデルの力学的強度を検討した。その結果、すべての再生ヒト指骨モデルにおいて、移植前に比較して、移植後に有意な力学的強度の増加が認められた。特に、移植後20週目の HA-P(LA-CL)群および β -TCP-P(LA-CL)群において力学的強度は著明に亢進していた。一方、骨膜を付加していないコントロールでは、経時的に力学的強度の低下傾向が認められた (図14)。

考 察

骨形成には、(1)骨伝導(osteconduction)、(2)骨誘導(osteinduction)、(3)骨再生(osteogenesis)の3つ機序が関与している。骨欠損部の再建材料として用いられる自家骨および同種骨などの生体材料や、HA および β -TCP などのセラミックスでは、主に骨伝導による機序により骨形成が生ずることが知られている。今回の実験において、生分解性ポリマーの内部に粒子として付加した HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) および β -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) は、ともに骨組織の無機成分であり、骨組織との成分的な類似性により、骨芽細胞がこれらの骨再建材料を足場として増殖し、骨形成が生ずると考えられている²²⁻²⁴。これまで行われた直径 $1\mu\text{m}$ 以下の細孔を有する β -TCP の埋植実験では、骨芽細胞がセラミックスの表面に接着し、この骨芽細胞が産生していると考えられるコラーゲン線維が、細孔内の深部まで入り込む様子が観察されていた²⁵。この点が良好な骨伝導能を示すことと関連していると考えられ大変興味深い。

今回の再生ヒト指骨モデルでは、単純X線写真による検索および組織学的検索から、HA 粒子を含有させた生分解性ポリマー群、および β -TCP 粒子を含有させた生分解性ポリマー群の両群において、移植後20週目に良好な骨形成が生じていることが明らかとなった。再生ヒト指骨モデルの臨床応用に際しては、形態学的条件とともに、力学的強度が満足されなければならない。今回のメカニカルテストの検討から、HA-P(LA-CL)群および β -TCP-P(LA-CL)群において良好な力学的強度が認められ、骨強

度は経時的に有意に上昇した。このことから、生分解性ポリマー P(LA-CL) を足場として用いた指骨再生誘導の弱点であった力学的強度の問題を、HA 粒子および β -TCP 粒子を付加することにより改善可能であることが示唆された。骨強度には骨塩量と骨の微細構造が関与すると言われている。力学的骨強度の増加と組織学的骨組織の成熟(皮質骨の形成や海面骨骨梁の成熟など)とが平行するかどうかに関して、今後マイクロCTを導入した検討を予定している。

良好な生体親和性を有する多孔性セラミックスの中で、HA は生体非吸収型セラミックスに、 β -TCP は生体吸収型セラミックスに分類される。生体吸収型セラミックスにおける吸収プロセスには、(1)化学的な溶解と、(2)細胞貪食による吸収の2大機序が考えられている²⁶。これまでの基礎研究から、 β -TCP を筋肉内に埋植しても吸収が進行しないのに対して、骨組織内では良好に吸収され、組織学的にも多くの多核巨細胞の浸潤が認められている。Renooij らは、イヌの大腿骨に作成した骨欠損部に β -TCP を移植した場合、術後20週目の β -TCP 表面に破骨様巨細胞が観察されたと報告した²⁷。また、Egglis らは、ウサギ大腿骨に β -TCP を移植し、移植後2~4週後に β -TCP を取り囲むように TRAP 染色陽性の破骨細胞様巨細胞が観察されたと報告している²⁸。これらの研究から、 β -TCP では、早期より細胞を介した吸収が生じていることが示唆されている。現在、種々の破骨細胞マーカーを用いた免疫染色、走査電顕による形態観察が行われている²⁹。近年、骨形成と骨吸収のバランスが重要視される骨代謝において、骨形成では、骨形成因子 BMP (Bone morphologic protein) および BMP 作用を伝達する分子としてシグナル伝達分子 Smad の関与が注目されている³⁰。一方、破骨細胞による吸収の詳細な機序として、分化誘導因子 RANKL およびそのシグナル伝達経路が検討されている^{31,32}。これらの諸因子の研究を介して、 β -TCP における骨形成と吸収のメカニズムは、今後さらに解明されると考えられる。

HA は、生体内ではほとんど吸収されないため、母床骨および新生骨と結合しながら骨組織内に残留する。この HA は、焼成することにより丸い形状となり、融解しない性質を持つ。また、焼成温度により骨伝導能が異なり、700~900°Cの条件で焼成した HA が、最も良好な骨伝導能を示し、低い温度(250°C) および高い温度(1250°C)で焼成した場合、骨伝導能が低下することが知られている³³。HA の粒子サイズも骨伝導能に影響し、粒子径が小さいほど骨伝導能が高いことが報告されている³⁴。本研究

で使用した HA は、至適条件下に焼成し、粒子径は、異物巨細胞に貪食されない³⁵ 30 μm に調整した。一方、 β -TCP を用いた場合は、 β -TCP 自体が吸収されて自家骨に置換される。このため、 β -TCP の粒子径は、異物巨細胞による貪食が可能な 3 μm に調整した。その結果、粒子を含有させた生分解性ポリマー群において、ポリマーおよび β -TCP 粒子は経時的に分解され、その後、良好な骨形成と最も数多くの TRAP 染色陽性細胞の浸潤が認められた。この結果から、 β -TCP では、骨形成の役割を担う骨芽細胞と骨吸収を促す破骨細胞の間に生物学的応答が生じ、骨のリモデリングが良好に進んでいることが示唆された³⁶。さらに、自家組織を目指した骨再生では、HA 粒子と比較して、 β -TCP 粒子が有用であると考えられた。

本研究では、ヒト指骨の 3 次元形状を有する骨再生を誘導するため、骨組織誘導型の生分解性ポリマーとして、生体内での分解が比較的ゆるやかで、炎症反応が少なく、採形性に優れた P(LA-CL) を用い、これに HA 粒子および β -TCP 粒子を配合して、高い骨伝導能と力学的強度を有する新型ポリマーを開発した。

これまで、播種細胞の細胞源および播種細胞への栄養供給が障害となり、3 次元構造を有する複合硬組織の再生は極めて困難な問題として残されてきた。播種された骨形成細胞は、ポリマーの表層から 100~300 μm の領域でのみでしか生存できないことが報告されている³⁷。そこで本研究では、3 次元生分解性ポリマーを直接骨膜で覆い、骨膜（特に骨形成層）からポリマー深部に向かって持続的に遊離される骨膜細胞により、経時的な骨形成を誘導しようと試みた。再生誘導されたヒト指骨モデルの関節軟骨の検索では、骨膜を生分解性ポリマーに付加させたすべての群において、成長過程の関節軟骨に認められる成長帯様構造が観察された。一方、骨膜が付加されていないコントロールでは、成長帯様構造は認められなかった。骨膜が軟骨細胞の増殖および分化に与える影響について、さらに詳細に検討したいと考えている。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました磯貝典孝教授に深謝申し上げます。本実験を遂行するにあたり、ご協力を頂きました Northeastern Ohio Universities College of Medicine 生化学分子病理学教室 William J Landis 教授および、島根大学医学部整形外科学教室の森隆治助教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Langer R, Vacanti J P (1993) Tissue Engineering. *Science* 260 : 920-926
2. Noel D, Djouad F, Jorgense C (2002) Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs* 3 : 1000-1004
3. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P (2003) Tissue-Engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85 : 740-747
4. Wendt D, Jakob M, Martin I (2005) Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing. *J Biosci Bioeng* 100 : 489-494
5. Banu N, Banu Y, Sakai M, Mashino T, Tsuchiya T (2005) Biodegradable polymers in chondrogenesis of human articular chondrocytes. *J Artif Organs* 8 : 184-191
6. Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, Munakata H, Tabata Y, Ikada Y, Kamiishi (2005) Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed Mater Res A* 74 : 408-418
7. Isogai N, Landis WJ, Vacanti JP (1999) Formation of phalanges and small joints by tissue engineering. *J Bone Joint Surg* 81A : 306-316
8. Isogai N, Landis WJ (2001) Phalanges and small joints. In: Atala A, Lanza R (eds) : *Methods of tissue engineering*. San Diego, Academic Press, pp1041-1047
9. Chubinskaya S, Isogai N, Landis WJ (2004) Characterization of the cellular origin of a tissue-engineered human phalanx model by in situ hybridization. *Tissue Engineering* 10 : 1204-1213
10. Landis WJ, Jacquet R, Isogai N (2005) The potential of tissue engineering in orthopedics. *Orthop Clin N Am* 36 : 97-104
11. Potter K, Isogai N, Landis WJ (2006) Non-destructive studies of tissue-engineered phalanges by magnetic resonance microscopy and X-ray microtomography. *Bone* 38 : 350-358
12. Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AC (1996) Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials* 17 : 175-185
13. Metsger DS, Driskell TD, Paularud JR (1982) Tricalcium phosphate ceramic-a resorbable bone implant: review and current status. *J Am Dent Assoc* 105 : 1035-1038
14. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D (1996) Role of bone substitutes. *Clin Orthop* 324 : 55-65
15. Hoogendoorn HA, Renooij W, Akkermans LMA (1984) Longterm study of large ceramic implants in dog femora. *Clin Orthop* 187 : 281-288

16. Kitsugi T, Yamamoto T, Nakamura T (1993) Four calcium phosphate ceramics as bone substitutes for non-weight-bearing. *Biomaterials* 14 : 216-224
17. Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Ikada Y, Iwata H, Yamamoto K (1997) Development of a dural substitute from synthetic bioabsorbable polymers. *J Neurosurg* 86 : 1012-1017
18. Yamada K, Miyamoto S, Takayama M, Nagata I, Hashimoto N, Ikada Y, Kikuchi H (2002) Clinical application of a new bioabsorbable artificial dura mater. *J Neurosurg* 96 : 731-735
19. Klagabrun M (1979) Large-scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol* 58 : 560-564
20. Gdoutos EE, Raftopoulos DD, Baril JD (1982) A critical review of the biomechanical stress analysis of the human femur. *Biomaterials* 3 : 2-8
21. Mannocci F, Sherriff M, Watson TF (2001) Three-point bending test of fiber posts. *J Endodont* 27 : 758-761
22. Ozawa M (1995) Experimental study on bone conductivity and absorbability of the pure β -TCP. *J Jpn Soc Biomater* 13 : 167-175
23. Saito M, Shimizu H, Beppu M, Takagi M (2000) The role of β -Tricalcium phosphate in vascularized periosteum. *J Orthop Sci* 5 : 275-282
24. Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T (2002) Promotion of bone formation using highly pure porous β -TCP combined with bone marrow-derived osteogenic cells. *Biomaterials* 23 : 4493-4502
25. Chazono M, Tanaka T, Fujii K (2004) Bone formation and bioresorption after implantation of injectable β -tricalcium phosphate granules-hyaluronate complex in rabbit bone defects. *J Biomed Mater Res A* 70 : 542-549
26. Jarcho M (1981) Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthesis. *Clin Orthop* 157 : 259-278
27. Renooij W, Hoogendoorn HA, Wittebol P (1985) Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clin Orthop Relat Res* 197 : 272-285
28. Eggli PS, Muller W, Schenk RK (1988) Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clin Orthop Relat Res* 232 : 127-138
29. Zhang X, Peng B (2005) Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 31 : 574-577
30. Yoon B, Lyons K (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem* 93 : 93-103
31. Xu D, Wang S, Feng X (2005) A novel RANK cytoplasmic motif plays an essential role in osteoclastogenesis by committing macrophages to the osteoclast lineage. *J Biol Chem* 22 (in press)
32. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2005) RANKL-RANK signaling osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 12 (in press)
33. Shikunami Y, Okuno M (1999) Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA). *Biomaterials* 20 : 859-877
34. Sun J, Liu H, Chang WH, Tai H (1998) Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: an in vitro study. *J Biomed Mater Res* 39 : 390-397
35. Rozema FR, Bos RRM, Jansen HWB (1992) Tissue response to pre-degraded poly(L-lactide). In: Plank H, Dauner M, Renardly M (eds) : Degradation phenomena on polymeric biomaterials. *Proceeding 4th Int ITV conference on biomaterials*, Springer, pp123-131
36. Matsushita N, Terai H, Takaoka K (2004) A new bone-inducing biodegradable porous β -tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res A* 70 : 450-458
37. Heslop BF, Zeiss IM, Nisbet NW (1960) Studies on transference of bone. I. A comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis and host reaction. *Br J Exp Pathol* 41 : 269-287