

行われてきたのです。

しかし、骨粗鬆症や関節リウマチの患者さんは骨盤の骨自体が脆いので自家骨の採取は困難です。また、人工関節を設置しても骨の質が悪いため、ゆるみや破損といった合併症が多く、骨の局所再生のための優れた人工骨が求められています。移植骨の種類と推移を

みると、現在も自家骨が圧倒的に多いものの人工骨が徐々に増加しています(図2)。他人の骨を使う同種保存骨はほとんど適用されていません。

理想的な人工骨とは

骨の構成成分には、骨芽細胞と破骨細胞、

足場としての骨基質などがあります。そして、骨基質は無機質(35%)と有機基質(65%)とからなり、無機質としてはハイドロキシアパタイトが大部分を占め、有機基質はI型コラーゲンが85~90%を占めています。したがって、骨の足場として人体にやさしい材料として、ハイドロキシアパタイトやコラーゲンを使ったものが考えられます。

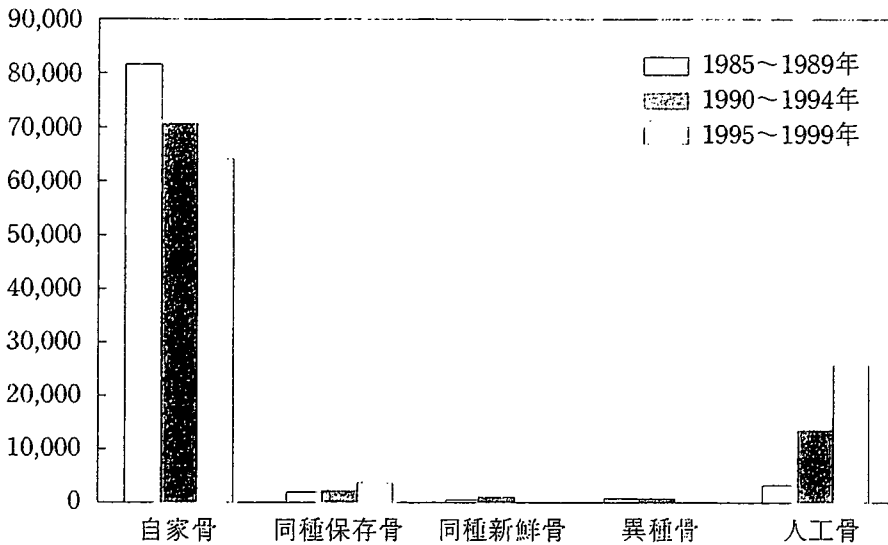
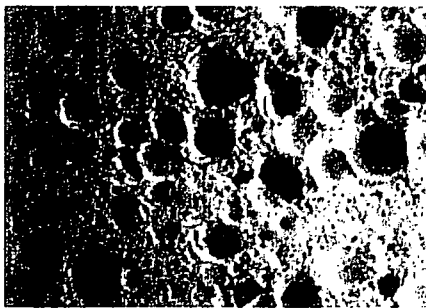


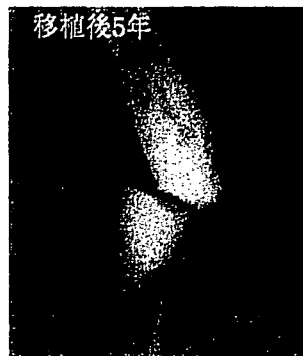
図2 移植骨の種類と年次変化

気孔間が連通していないために
気孔内に骨形成が起こらない!
細胞・たんぱく質・遺伝子導入ができない!

問題点：人工骨移植部での骨折



ヒト移植後5年



実際に、歯磨き粉などにも含まれているハイドロキシアパタイトで作製した人工骨が、十数年前から臨床使用されてきました。ところが、市販のハイドロキシアパタイトは気孔間が連通していないため、気孔内に骨形成が起こりません。顆粒と顆粒の隙間にしか骨が形成されないため、この人工骨を移植して3年とか5年すると、骨折して合併症を起こすことが少なくありませ

図3 従来のハイドロキシアパタイト人工骨の問題点

ん(図3)。また、気孔内に細胞やたんぱく質、遺伝子を導入することができないことも問題です。

従来、多孔体ハイドロキシアパタイトは図4のような方法で製造していました。すなわち、ハイドロキシアパタイトのゲルのなかにビーズをいれて焼成すると、ビーズがあった部分が空隙になります。このビーズを小さくすると連通路構造ができないかわりに強度が増し、ビーズを大きくすると連通路構造はできやすいものの強度が低下するというジレンマがありました。

ヒトの骨には連通路構造があることから(図5)、連通路構造を有するハイドロキシアパタイトを作製することを考案しました。つまり、理想的な人工骨は連通路多孔体で、多孔体のなかに骨形成細胞や骨形成たんぱく質などの因子を導入することができるものです(図6)。それによって、血管が自由に侵入して、骨再生が促進されると推察されます。

連通路多孔体 ハイドロキシアパタイトの開発

物質・材料研究機構、東芝セラミックス(株)、大阪大学の共同開発で、連通路多孔体のハイドロキシアパタイトをこの5年間、開発してきました。その製法は、ハイドロキシアパタイトのゲル状のスラリーに

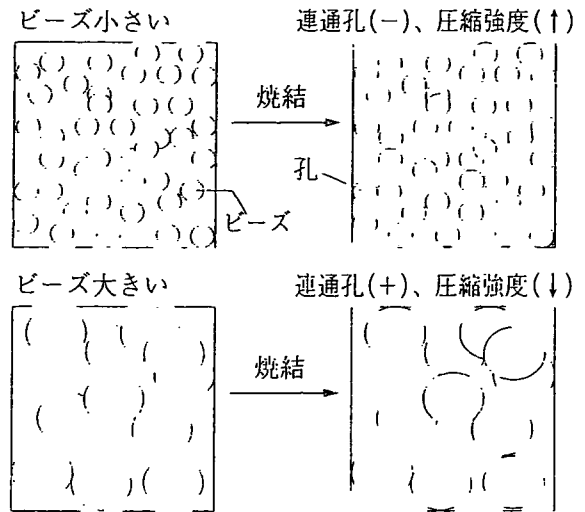


図4 従来の多孔体ハイドロキシアパタイトの製法

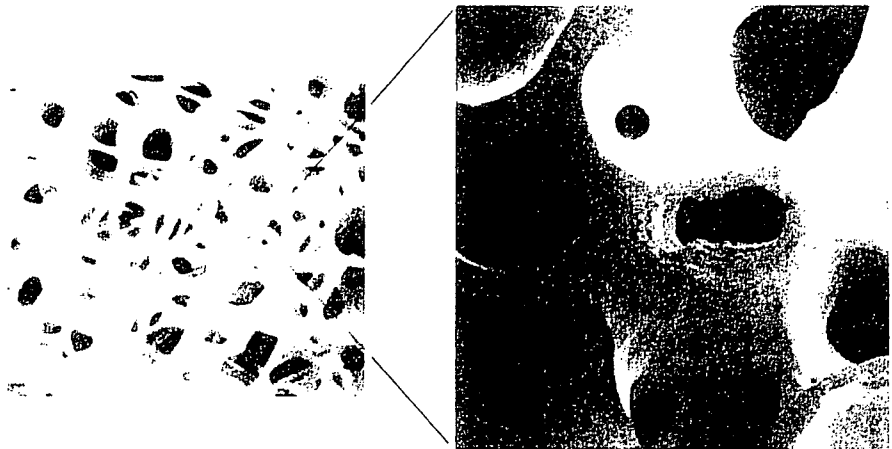


図5 ヒト骨組織の微細構造

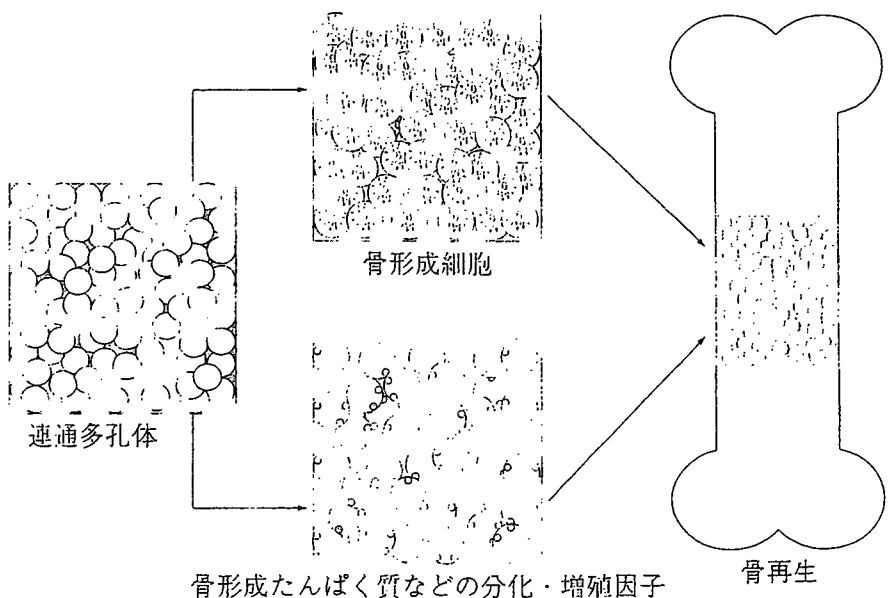


図6 理想的な人工骨

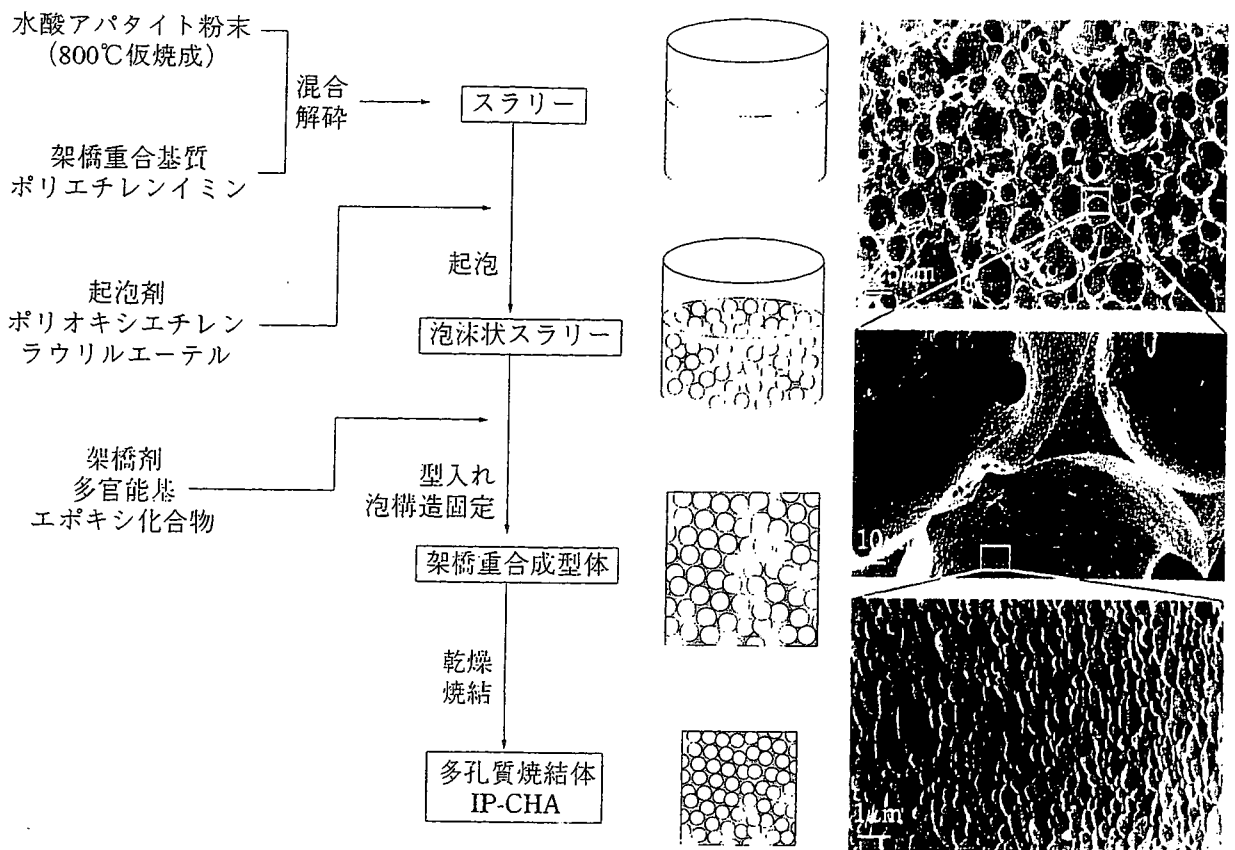


図7 連通多孔体ハイドロキシアパタイト(ネオポーン) (物質・材料研究機構：田中順三、菊池正紀、生駒俊之、東芝セラミックス(株))

泡立て用の起泡剤を添加して内部が泡でつまった状況をつくり、それを一気に重合させて焼成します。その結果、泡があった部位は孔になり、泡と泡が接触している部分が連通構

造になります(図7)。このように、細胞や血管が侵入しやすいハイドロキシアパタイトが作製できました。このアパタイトは、壁がしっかりしていて圧縮強度が約10メガパスカル

と強く、表面が非常にスムーズで規則正しいことが特徴です。

これはすでにネオポーンとして商品化されています。このネオポーンをウサギの大腿骨に円柱状に移植して、6週間まで観察した結果、移植後2週間で、孔のなかすべてで骨の再生が確認されました(図8)。2週間では中央部は出血だけで骨は再生されていませんが、6週間たつと表面はもちろん、すべての

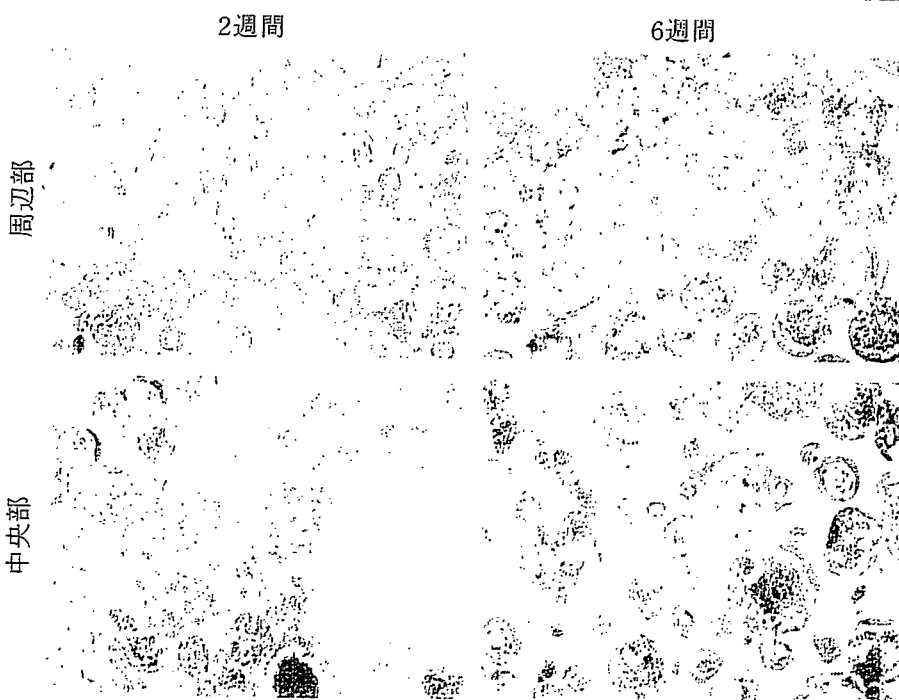


図8 ネオポーンによる骨再生能(HE染色組織像)

孔の中央部まで骨と骨髄が再生していました。

骨の再生を考えるうえで足場がもっとも重要です。力学的な強度が骨には必要だからです。細胞だけでは骨の再生は困難です。小さい骨欠損部には、足場を埋入するだけで骨細胞がはいってきて再生しますが、大きな骨欠損部や骨再生を早くしたい場合、足場だけでは不十分です。骨髄細胞や骨芽細胞、骨の増殖因子や血管の導入などの修飾が必要になります。

ラットの骨髄中の骨になる間葉系細胞を集めて培養し、その細胞をネオボーンのなかに播種してラットの背中に移植しました。ラットの背中には本来骨はありませんが、間葉系細胞を封入して移植すると(図9)、移植後8週間で、すべての孔の内部に骨が再生します。すなわち、骨髄細胞を使うと筋肉内でも骨を

再生します(図10)。内部まで骨の再生が進まないで真ん中で折れたりすることから、骨再生の評価には今後、3次元的な評価が重要になると思います。

細胞以外に骨形成因子(BMP)を人工骨に導入してウサギに埋入したところ、骨がきれいにつながりました(図11)。骨形成因子をふや

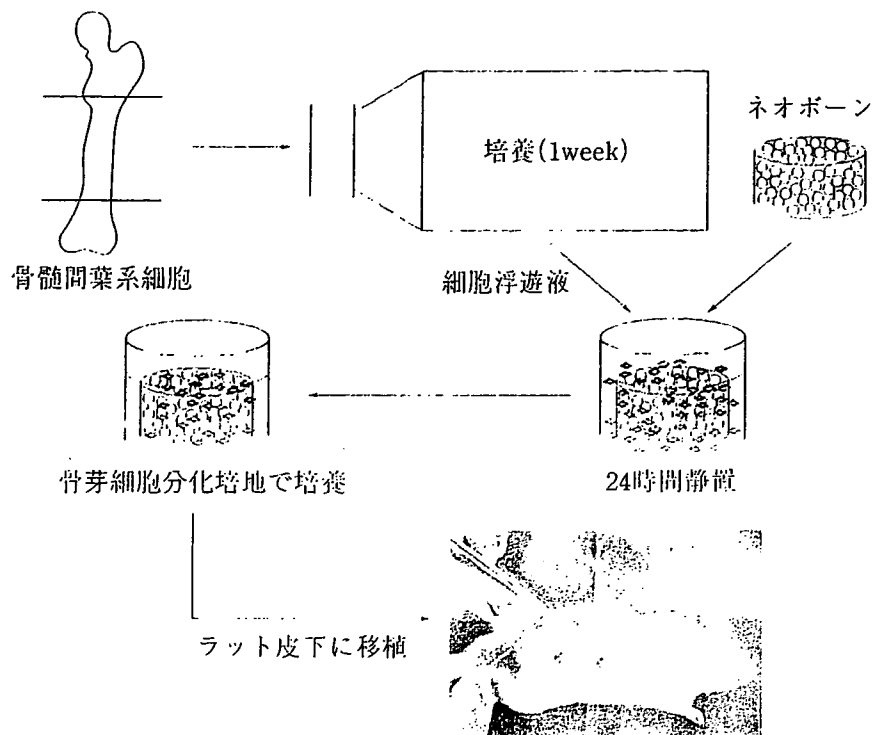


図9 骨髓間葉系細胞とネオボーンによるハイブリッド人工骨の作製

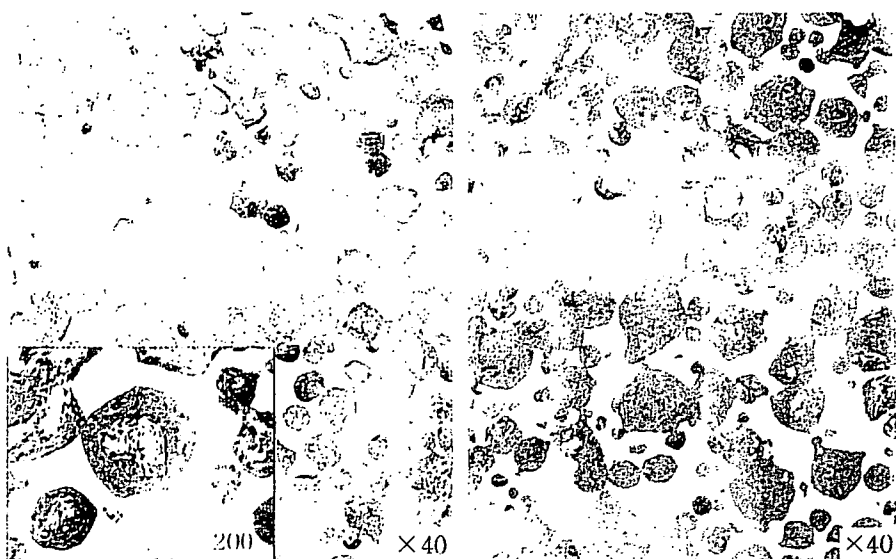
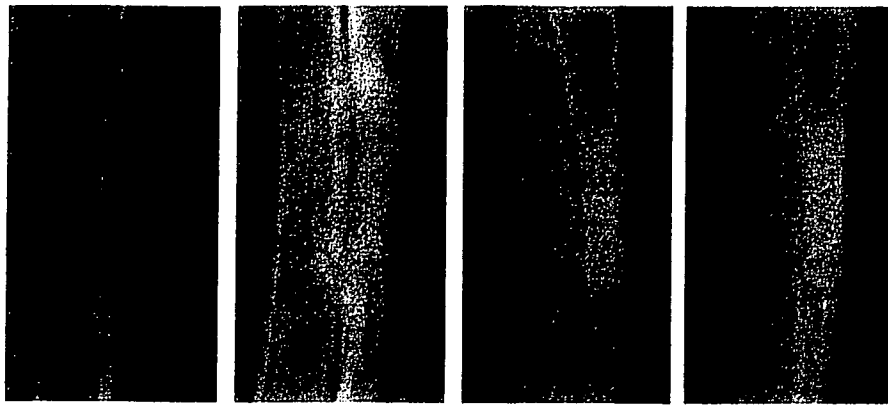


図10 骨髓間葉系細胞とネオボーンによるハイブリッド人工骨による骨再生(HE染色組織像) 移植後2週(左)と8週(右)

していくと骨が過形成されます。このように、人工骨と細胞、増殖因子を組み合わせることによって、不利な状況でも骨を形成することが期待されます。

このネオボーンは、骨腫瘍、骨折などの骨欠損60例に対し臨床治験を終了し、2003年9月に厚生労働省の薬事認可をうけ、臨床使用



移植なし ネオボーン ネオボーン+BMP 5 μ g ネオボーン+BMP 20 μ g

図11 骨形成因子 (BMP) とネオボーンによる骨再生 (ウサギ前腕骨欠損モデル、-15mm 欠損)



術前 0か月 2か月 3か月 6か月

図12 上腕骨骨嚢腫 (14歳、男)



図13 脛骨骨折難治性偽関節 (32歳、男)

が可能になっています。医療材料として発売後も副作用を示さず、術後3～6か月で良好な骨形成を認めています。

ネオボーンの臨床使用例

図12は、良性の上腕骨骨嚢腫の14歳の男子の症例です。術後2、3か月で穴のなかが真っ白くなって骨の再生が認められています。また、交通事故で膝の下の骨がばらばらになって、何回も骨盤から骨をとって移植しても治癒しなかった症例にネオボーンを移植したところ、術後2年で良好な骨が形成されました(図13)。現在、スポーツにも復帰しています。

図14は、65歳の関節リウマチの女性です。膝関節が破壊して液体がたまっていたため人工関節の設置が難しいことから、まず人工骨で足場をつくり、それから6か月後に人工関節を移植しました。このような症例に直接、人工関節を装着してもゆるみが生じて再置換が必要となることがありましたが、よ

い足場をつくっておけば、不利な骨でも人工関節を安心して設置できます。

現在、力学的強度を増すため、緻密体のハイドロキシアパタイトと、多孔体のハイドロキシアパタイトの複合体の開発を進めています(図15)。中央部のみ泡立てて、内部を多孔体、外部を緻密体にした、一体型の人体の骨に近い構造をもったものを開発して臨床治験にはいっています。

新規人工関節の開発

人工関節が必要な変形性関節症やリウマチ、骨折などの症例数が非常に多く、1年間に股関節だけで500億円の医療費がかかり、すべての人工関節では1,000億円に達しようとしています。日本では年間10万例ほどあります。この人工関節について、新しいコンセプトで開発を進めている例を紹介します。

セメントを使わない人工関節では、設置して数年後にゆるみが生じ、10年、20年もたつと、ますますゆるんで痛みの原因となって再置換が必要となりま

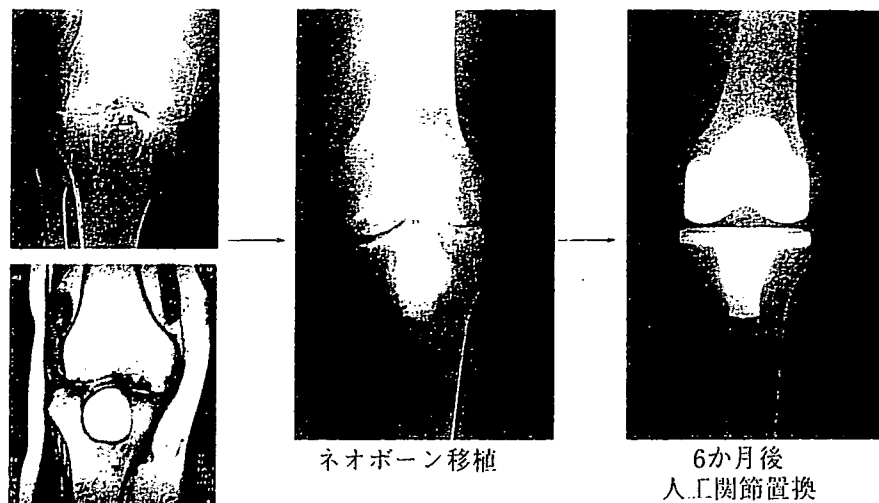


図14 関節リウマチ(65歳、女)

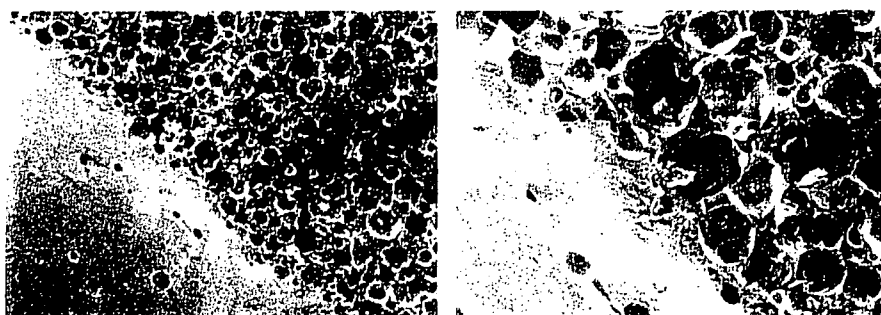


図15 緻密体-多孔体複合ネオボーンの開発(東芝セラミックス(株))

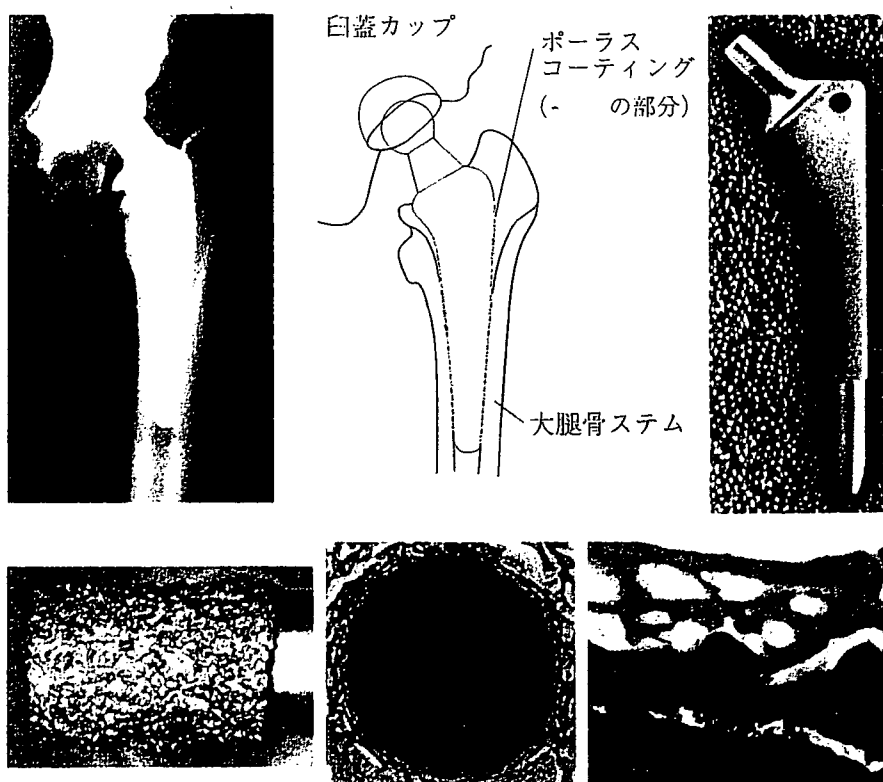


図16 ポラスコーティング法による金属表面加工

す。しかし、いれかえるといっても、骨が溶けているので安定した再置換術は容易ではありません。人工関節の寿命を決める要素として、人工関節金属ステムと骨との間のゆるみが問題です。

そこで、微細な金属やハイドロキシアパタイト粒子を噴霧後、溶着させることが考案され、現在広く使われています(図16)。カップ側も大腿骨側もポーラスコーティング法で噴霧して、骨がしっかりつくように表面をざらざらにしています。表面をポーラスにすることによって、かなりしっかりと結合しますが、

噴霧後のひび割れや、噴霧した金属粒子の剥離を100%阻止することは困難です。そこで、人工関節そのものに微細加工を行うことができれば、シンプルな人工関節ができると考えました。

大阪大学工学研究科の佐々木孝友教授との共同研究で、レーザービームによる湾曲した球面の微細加工用コンピュータソフトを開発して、円柱表面に任意の幅と深さ、模様様の溝が彫れる技術を実現しました(図17)。これによって、規則正しい溝をレーザーで加工することが可能になりました。この方法では金属

YAGレーザービームの高速・精密走査装置

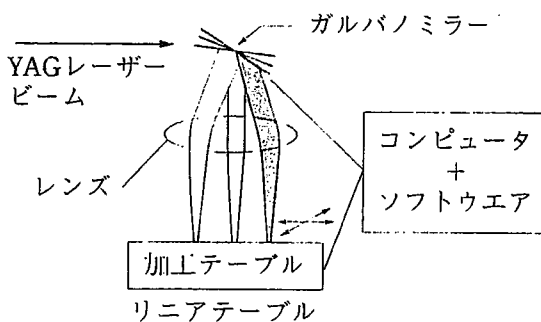


図17 レーザービームの高速・精密走査技術の開発(大阪大学工学研究科:佐々木孝友、森勇介、(株)ヤスオカ)

に熱がほとんどかからないため、金属自体が弱くなることはありません。

直径6mm、長さ15mmの円柱ピースをウサギの大腿骨に移植してみました。500 μ mの溝にすると、4週間でその溝に骨はいりました(図18)。溝の

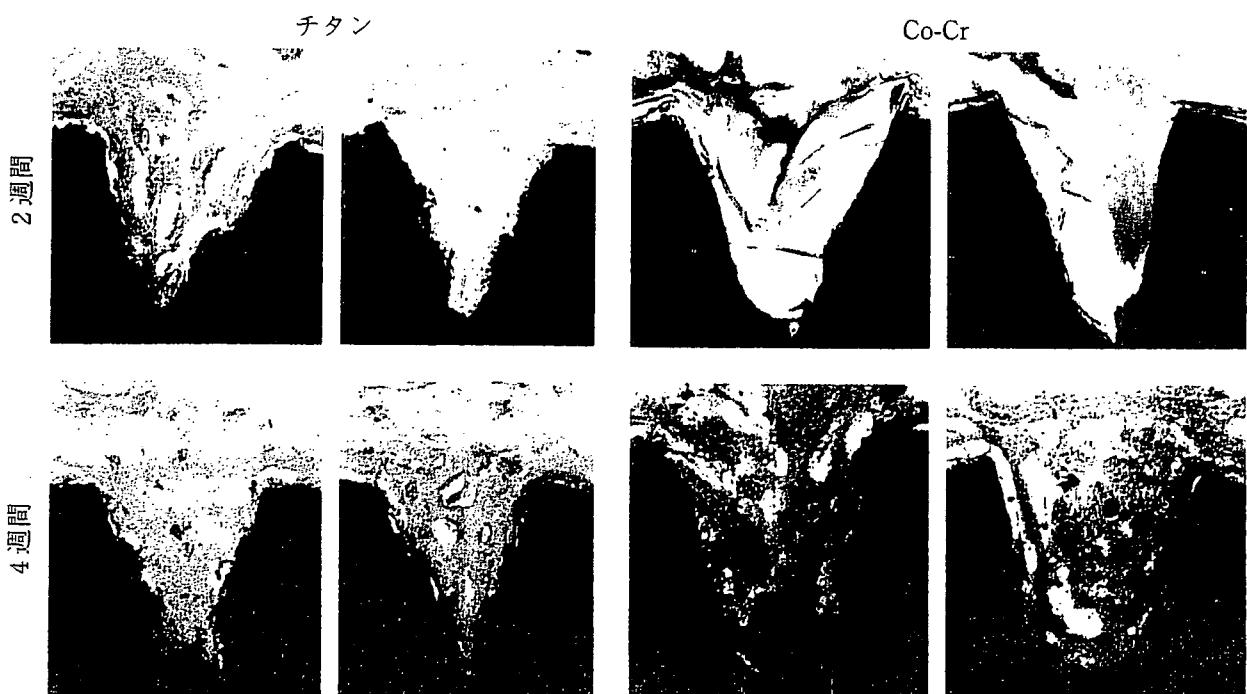


図18 レーザー溝加工表面における骨形成

幅を大きくすると骨が形成されにくくなります。もちろん、 $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ と溝が小さすぎても細胞は、はいりにくいことがわかりました。溝の幅と模様が重要です。

最初、表面にレーザーで穴をあけたものも作製しましたが、穴に骨の細胞はいりません。はいろうとしても行き止まりなのがか

っているのだと思います。しかし、今回開発した溝構造では、溝に沿って細胞が移動するため圧がありません。

現在広く使われているチタン、コバルトクロム合金でテストピースを作製して2週間、4週間と経過観察していますが、幅が $500\mu\text{m}$ 、深さも $500\mu\text{m}$ 程度の溝であると非常に骨がはいりやすいことがわかりました。このような人工関節を作製すれば、噴霧ではないので、もとのステムさえあれば、どの会社のステムにも加工が可能です。

ところで、骨と人工関節は、溝にしっかり骨がはいることによってしがみついているような状況です。そのため、引き抜き試験の結果が重要です。今回のレーザー溝加工では、従来のコーティング法の約2倍の引き抜き強度を示し、レーザー穴加工では固着が従来のコーティングより劣っています(図19)。現在、ブタでの動物実験で、ポーラスコーティング法と、レーザーによる溝加工をして術後約1か月になりますが、経過観察を行っています。また、ヒト用の人工関節もすでに完成しており、溝の幅を制御して慢性疲労試験を行っています(図20)。

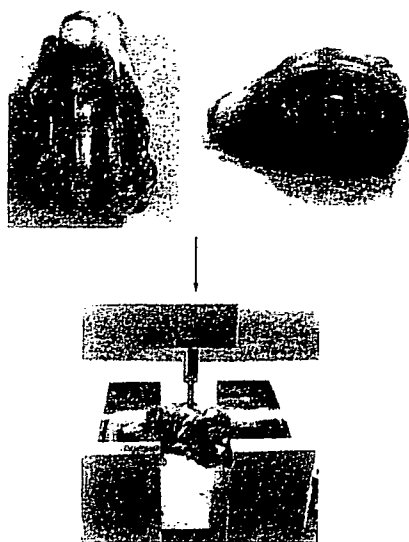


図19 レーザー溝加工と穴加工による引き抜き強度試験

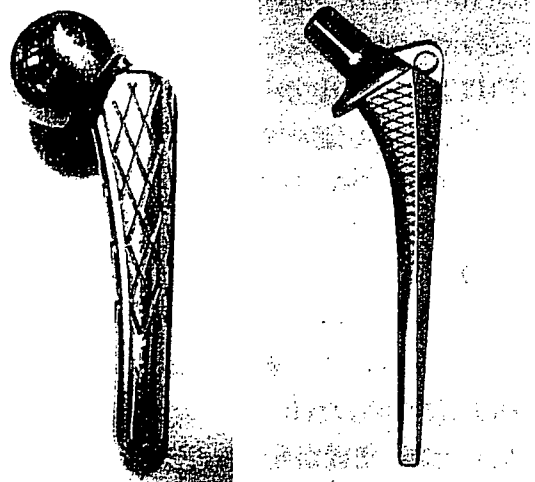
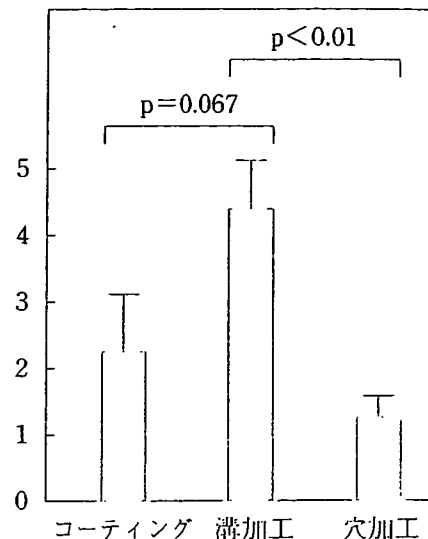


図20 レーザー溝加工によるブタ用人工関節(左)とヒト用人工関節(右)

おわりに

人工関節に加工することは新しい技術です。超高齢化社会に向かって、再置換術の必要のない人体に優しい人工関節であることや、シンプルで貼りあわせたりしていないことも重要かと思えます。ぜひ、臨床応用して人類のために貢献したいと考えています。

多くの企業、研究所、工学研究科、NEDOなどにも支援をいただいています。この場を借りて感謝いたします。

Q & A

■ Q ■

人工関節の強度は、人骨に対してどの程度の強度が要求されますか。人骨の強度や繰り返し応力は、そんなに強いとは思われませんか。あまり問題にならないのではないかと思われませんが、いかがですか。

● A ●

人工関節のステムには、最大で体重の4～7倍の力がかかると推測されています。それが10～20年、慢性的にかかるので、開発するときも10万回以上の慢性疲労テストをクリアしないと認可がおりません。非常に強い圧がかかると考えられます。

■ Q ■

インプラントの日本製のシェアがふえるには、製品性能の向上に努めるだけでよいのでしょうか。患者からすると、多く使用されている外国製のほうが安心だと思います。どのようにしたら、日本製のインプラントは安全の信頼性を得ることができるのですか。

● A ●

それは、企業側に問題があると思います。材質的には、日本製も外国製もチタン、コバルトクロム合金であるためそんなかわらないでしょう。したがって、米国の製品はマーケティングのうまさや経費の節約などで伸びています。材質によるものではないと考

えています。

■ Q ■

人工骨、関節部への筋肉、腱の付着は可能でしょうか。

● A ●

筋肉や靭帯は、ヒトの骨には結合しやすいものの金属やこれまでの人工骨には容易に結合しませんでした。それを多孔体の構造にすると、ヒトの骨に近い状態の骨が形成されるため付着しやすくなっています。

■ Q ■

内部が多孔体、周囲が緻密体の人工骨が臨床治験中のお話ですが、周囲が緻密であると、そこから内部に組織がはいりづらいのではないかと思います。どのような部位で、どのように使われるのでしょうか。

● A ●

全周性に骨欠損をしているような部位では、組織は外から侵入することはできません。そのため、4分の1とか3分の1の欠損に使用することが臨床的には一番多くなっています。その場合、一面だけが緻密体ですので、上下と奥から血管や細胞がはいることができません。確かに、緻密体からは血管ははいりません。

■ Q ■

80歳の母ですが、膝軟骨がつぶされて階段の昇降に痛みをとまっています。高齢者のため、手術をすることの良

否を、医師も患者まかせにしています。先生の材料や方法だと、骨が弱っている高齢者でも対応可能でしょうか。

● A ●

関節部分の軟骨の修復には使えません。人工関節を設置する骨の足場としてよい骨をつくっておいてから人工関節を設置するようにします。80歳であれば、人工関節の足場の骨をつくっておいて人工関節を装着するとトラブルが少ないと思います。そんなに大きな手術ではありませんので、元気な方でしたらお勧めします。

■ Q ■

金属に表面加工(溝を掘る)を施すと、靱性強度が低下して折れやすくなるのではないのでしょうか。ポーラス体や、溝のなかに生えてくる骨は皮質骨ですか。硬い丈夫な骨であれば、土台として有用だと思いますがいかがですか。

● A ●

溝を掘れば、当然、もとのものより弱くなります。しかし、コーティングした太さのものに溝を掘っているので、溝がない体積は保持でき、さらに大きなものに溝を掘るようにしているため強度は落ちません。

もうひとつの答えは、海綿骨です。骨髄内にはいるので皮質骨になる必要がなく、海綿骨で十分です。

骨を生まれ変わらせる —人工骨による骨組織再生—

海渡 貴司、名井 陽、吉川 秀樹
大阪大学大学院 医学系研究科器官制御外科学(整形外科)

はじめに —骨再生への新たな挑戦—

骨腫瘍切除、外傷、骨髄炎、慢性関節疾患、先天性奇形に伴う広範囲の骨欠損治療は再建外科にとっての大きな挑戦である。現在、自家骨移植術が一般的に行われているが自家骨移植には、骨供給量の限界、採骨部の疼痛の残存や神経損傷の危険性などの問題を抱えている。一方、同種骨移植には採骨部の問題はないが感染症の伝搬、免疫反応の危険性が存在する。この問題を解決する目的で、ハイドロキシアパタイト(HA)など種々のセラミック材料による人工骨が開発され臨床応用されている。

しかし、現在のところHAを含む人工骨は“骨補填剤”であり、骨形成細胞や骨形成細胞を誘導するサイトカインを多量に含有する自家骨移植術に取って代わるまでには至っていない。とくに、悪性腫瘍や外傷による大きな骨欠損は、金属製品や人工骨を組み合わせた治療がなされているが、骨誘導能、骨形成能を持たない人工骨では、術後長期経過後にも血管および骨形成細胞が内部まで侵入した生理的かつ機能的な骨に置換されることは難しく、結果として補填剤、固定材料の破損が生じることも少なくない。

そこで、人工骨に分子化学および組織工学の技術を組み合わせた新たなバイオマテリアルの開発が期待されている。我々は、骨再生の足場として優れた能力を持つセラミック人工骨を近年開発し、

- ①その人工骨の内部を骨形成誘導タンパク質(BMP)でコーティングし、内部への骨形成細胞の誘導を促進する方法
- ②内部に骨形成細胞を導入し骨形成能を人工骨に賦与する方法(培養骨)

- ③セラミック人工骨内部に血管を導入することにより骨形成を促進させる方法

の3つのアプローチから骨再生研究に取り組んでいる。

骨を蘇らせる階段

—骨再生のための足場(scaffold)開発—

現在、臨床で用いられている人工骨は、主として細かい穴(気孔)を有するセラミックス(多孔体と呼ばれている)で作られている。これは、骨との境界面および内部に血管、骨形成細胞が侵入することを期待した構造である。しかし、これまでの技術では、強度と気孔率の両立が難しく、強度を優先した結果、気孔の多くが互いに連通することなく独立した孔として存在するため、内部深くまでの血管、骨形成細胞の進入した“生きた骨”に置換することは困難であった。当教室は、物質・材料研究機構、東芝セラミックス(株)と共同で、力学的強度を持つ

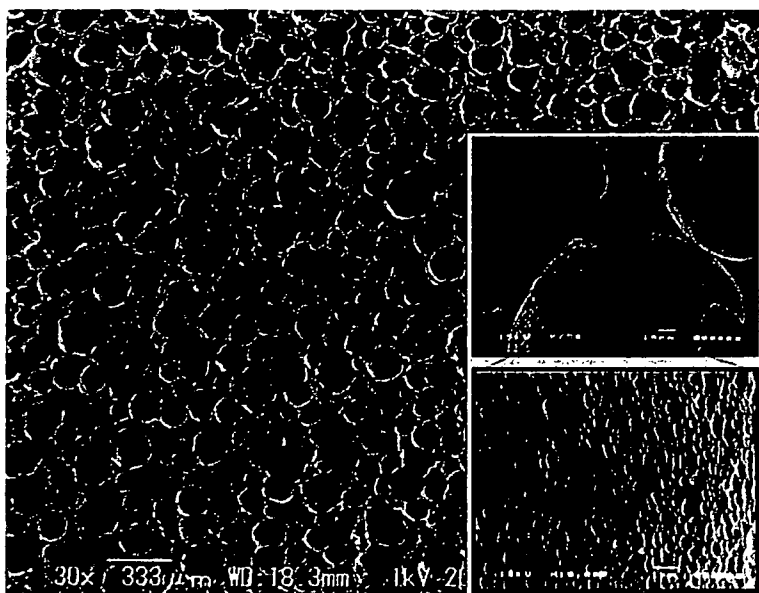


図1 IP-CHA表面構造 電子顕微鏡写真

だけでなく、幹細胞や骨増殖因子の導入が可能な骨補填剤として、気孔間連通構造を有する連通多孔体HA人工骨 (Interconnected Porous Calcium Hydroxyapatite: IP-CHA、NEOBONE®)を開発した(図1)。

“気泡ゲル化技術”により、IP-CHAはほぼ球形で比較的均一のサイズの気孔が秩序よく配列し、ほぼ全気孔が気孔間連通孔で連絡した構造をとっている。連通孔径分布は10~80 μm (平均40 μm)にあり、気孔の90%が、細胞や組織が十分に通過できる大きさの連通孔でつながっており、気孔の内部に骨髓幹細胞、血管、BMPなどの増殖因子/サイトカインや遺伝子の導入が可能である(図2)。力学的強度は、初期圧縮強度で10Mpa以上であり海面骨と同程度の強度を持つ。

ウサギ大腿骨を用いた動物実験ではIP-CHAを移植した際に、移植後わずか6週間で直径6mmの円柱の中央部まで気孔間連通気孔を経て、血管および骨形成細胞が侵入し、新生骨および骨髓を形成するという優れた骨伝導能を示した。また、IP-CHAはすでに臨床認可され、人の骨欠損治療における有効性が実証されている。この初期強度と骨伝導能を併せ持つIP-CHAを、さらにBMPや培養細胞と組み合わせ、骨伝導能のみならず骨形成能、骨誘導能を持つ人工生体材料を開発している。

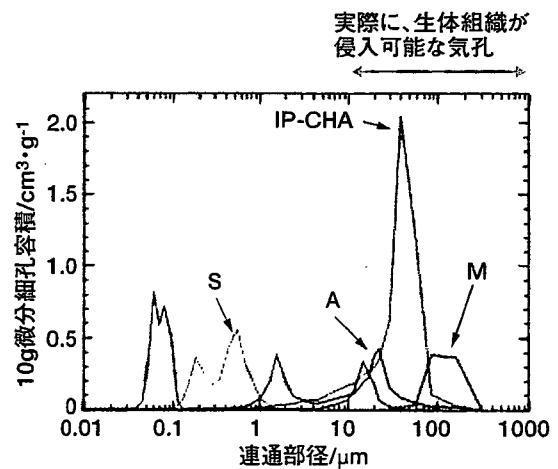
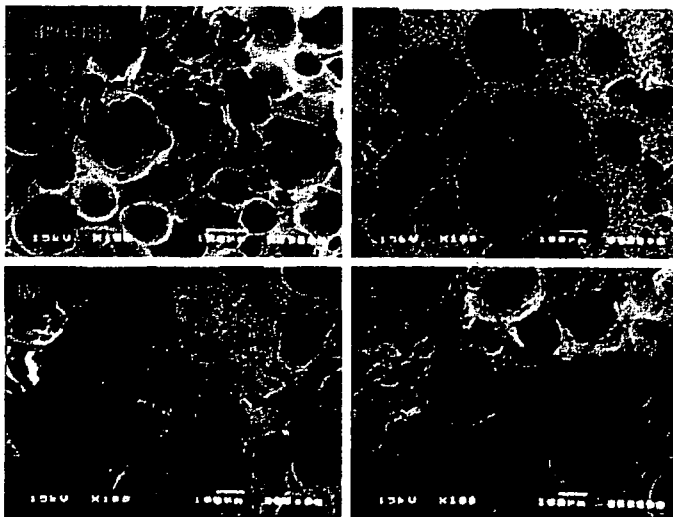
自ら骨を再生する

—骨形成因子(BMP)を用いた骨再生実験—

1965年、Uristは、塩酸脱灰骨による異所性骨誘導現象を発見し、骨基質中には軟骨・骨形成の誘導能を有する因子(骨形成因子(bone morphogenetic protein: BMP))が存在することを証明した。1988年、Wozneyらによって2種類のBMPのcDNAがクローニングされ、これを契機に約20種類のBMPファミリーの遺伝子が同定されている。現在までに、骨折治癒、骨折癒合促進、骨欠損治療などに対して、ヒト組換え型BMP-2やBMP-7を用いた臨床試験が盛んに行われ、一部はすでに欧米で認可を受け、臨床使用されている。現在、BMPを用いた骨再生医療として次の3つの手法が試みられている。

- ①細胞治療：自家骨髓間葉系細胞を患者本人から採取し*ex vivo*でBMP存在下に培養、骨形成細胞へ分化させた後、多孔体生体材料の孔内へ封入し移植する。
- ②遺伝子治療：BMPをコードする遺伝子を骨折修復部の細胞に導入し、局所の細胞にBMPを合成させ、局所的に骨形成を促進させる。
- ③サイトカイン治療：BMPとそれを保持・徐放する担体とともに局所に移植する方法。

現在までに管理、使用上の安全性より、③のサイトカ



	overall porosity (%)	calculated available porosity (%)	average pore diameter (μm)	range of pore diameter (μm)	inter-connection diameter (μm)	compressive strength (Mpa)
IP-CHA	73.4	67.1	191	30~400	39	12.0
manuf. A	50.5	28.5	242	80~500	22	32.3
manuf. M	64.5	36.7	268	40~500	15	8.0
manuf. S	47.6	2.5	176	30~400	<1	60.5

図2 既製HAとIP-CHAの構造比較

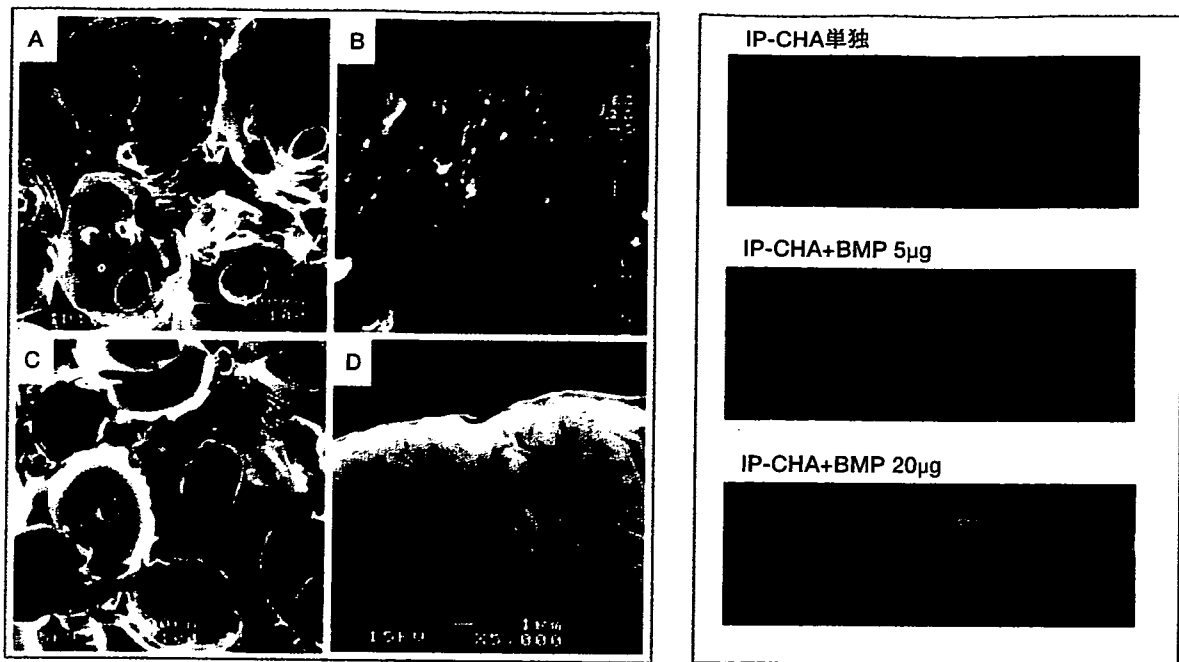


図3 IP-CHA内部のコーティング評価

(a)IP-CHAのPLA-PEGコーティング。前・後 電子顕微鏡写真、C、DでIP-CHA表面が薄くPLA-PEGにて覆われているのがわかる。(b)ウサギ機骨骨欠損部IP-CHA移植後8週の軟X線写真。両BMP群にてIP-CHA内部のレントゲン陰影が増強し、host boneとも骨性に適合している。

イン治療研究が最も進んでおりすでに多くの臨床試験結果が報告されている。しかし、これらの臨床試験によりBMPのヒトでの使用における問題点も明らかとなった。

1. BMPの臨床使用における問題点

臨床試験の結果、臨床での骨組織の再生にBMPが有効であることが実証されたが、ヒトでBMPが骨誘導能を十分に発揮するにはmg単位の多量のBMPが必要であることも明らかとなった。これは、小動物を用いた動物実験での必要量の約1,000倍に相当する。そこで現在、少量で効率よくBMPの骨誘導能を発揮させる方法が研究されている。1つは、BMPの活性促進薬の併用である。*in vivo*ではエストロゲン、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アクチン結合タンパクであるカルポニン、Rhoキナーゼ (ROCK) 阻害剤などがBMPの活性促進作用を持つことが報告されており、これらを併用することにより使用量の減少が可能であると考えられる。もう1つは、BMPと組み合わせる担体の改良である。

2. BMPの担体

BMPの担体には、1)適切なタイミングでのBMPの徐放すること、2)新生骨の足場を提供すること、3)BMPの空間的な広がりを制御すること、が求められる。現在、おもにウシやブタから採取したI型コラーゲンを、化学

処理にて抗原性を低下させたアテロコラーゲンが使用されているが、disease transmissionや免疫原性となる可能性が否定できない。また、コラーゲン単独の使用では荷重部位など強度を要する部分での使用、化学的修飾を加えてBMPの放出速度を調節することは困難である。

このため、化学的性質が調節可能な生体分解性の合成ポリマーがI型コラーゲンに変わるBMPの担体として期待されている。ポリマー単独では十分な強度および三次元的な足場を提供することが困難であるため、我々は、初期強度と骨伝導能を併せ持った三次元的足場の表面を、BMPを徐放する合成ポリマーにてコーティングすることを考案した。

三次元的足場としては、IP-CHAを、合成ポリマーにはBMPの効率的な担体として報告されているポリ乳酸ポリエチレングリコール共重合体 (以下PLA-PEG)^{2, 3)}を使用し白色家兎を使用した動物実験を行った。

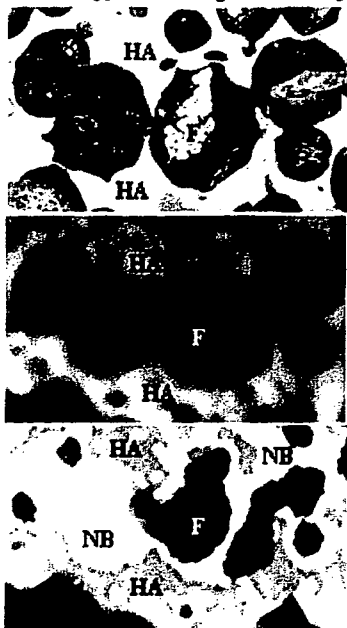
3. IP-CHA/PLA-PEG/BMP複合体による

骨再生の動物実験

実験には、気孔率 75%の円柱状IP-CHA (直径4mm、高さ15mm、気孔率 75%)およびPLA-PEG (分子量11.4kDa、PLA:PEGモル比 51:49)を使用した。

IP-CHA/PLA-PEG複合体はIP-CHAにアセトンに溶解した20mgのPLA-PEGを滴下、その後アセトンを揮発さ

Histology / CT image matching



HA : Hydroxyapatite
NB : Newly formed bone
F : Fibrous tissue or absence of tissue

3D image from CT data

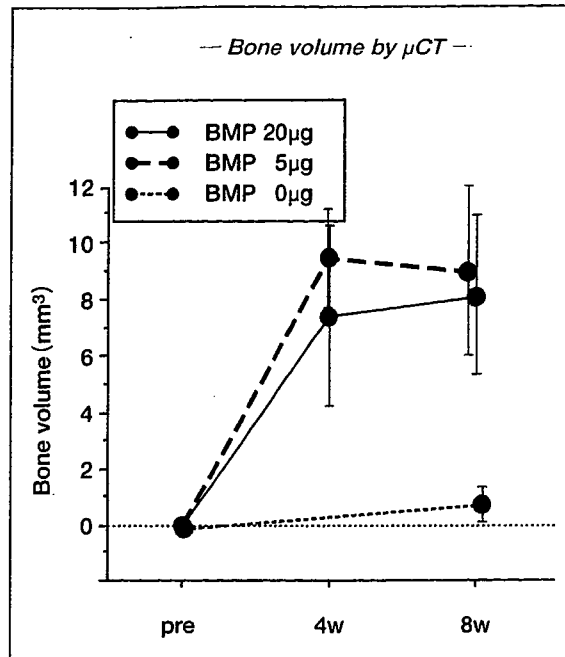
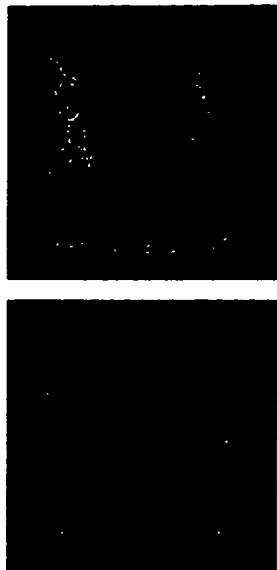


図4 IP-CHA内部のレントゲン評価

(a)組織写真とCT imageとのマッチング。最下段の黄色が骨組織として抽出された部分。(b) (a)の画像データを3次元画像化した。白い部分がIP-CHA、赤い部分が新生骨に相当する。(c)抽出した新生骨データを定量、グラフ化。術後8週の時点では両BMP群は同等の新生骨量を示す。

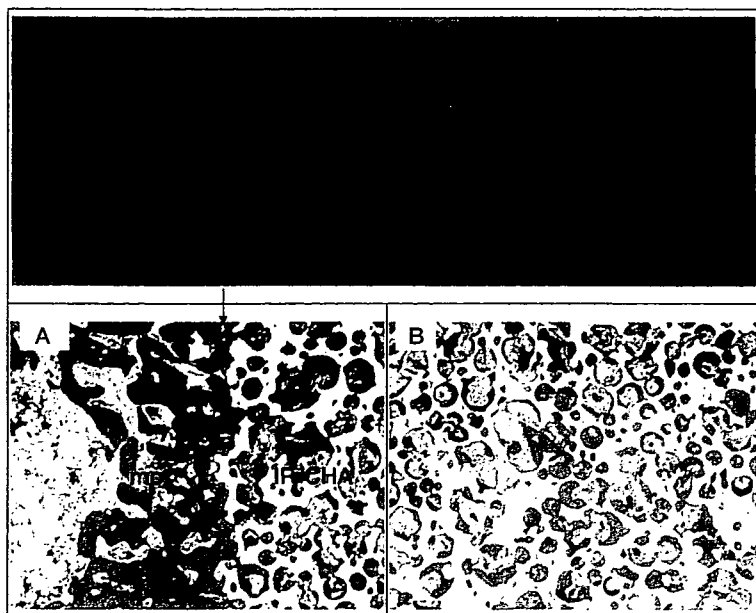


図5 BMP 5μg群、術後4週の組織像

IP-CHA内部に旺盛な骨および骨髄組織の形成を認める(下段右)。またIP-CHAに隣接する host bone骨髄腔内部にも骨形成を認める(下段左)。

せることで作製した。IP-CHA内部コーティングの評価は断面の電子顕微鏡写真撮影にて行った(図3)。白色家兎橈骨に15mm骨欠損を作製rhBMP-2(5 or 20 μg)/PLA-PEG (20mg)/IP-CHA複合体を同部に挿入、コントロールはIP-CHA単独とした。

レントゲン評価では、骨欠損群では、術後8週にても骨欠損は修復されず自然治癒しないことが確認された。同様に、IP-CHA単独群では、インプラントとhost boneの間に明らかなレントゲン透亮像を認め、いわゆる偽関節の状態であった。一方、両BMP群では、術後8週までにインプラント中央部に到達するレントゲン陰影の増強を認め、組織学的にもレントゲン評価と一致して内部に旺盛な骨および骨髄組織の形成を認めた(図4、5)。

この研究は、5または20 μgのrhBMP-2を含まれているPLA-PEG/IP-CHA複合体が、十分な強度および解剖学的形態を持ってウサギ橈骨の自然治癒しないサイズの骨欠損を修復可能であることを示したものである。術後4週の時点ではrhBMP-2用量に依存した

骨形成量の差を認めたが、術後8週の時点では両群のレントゲン像、組織像、力学強度はほぼ同一であった。また、術後8週の時点の両群の破壊強度は約800Nであったが、これは同じ部位のウサギ橈骨の強度とほぼ一致する。これらの所見はこの新たな複合体バイオマテリアルを用

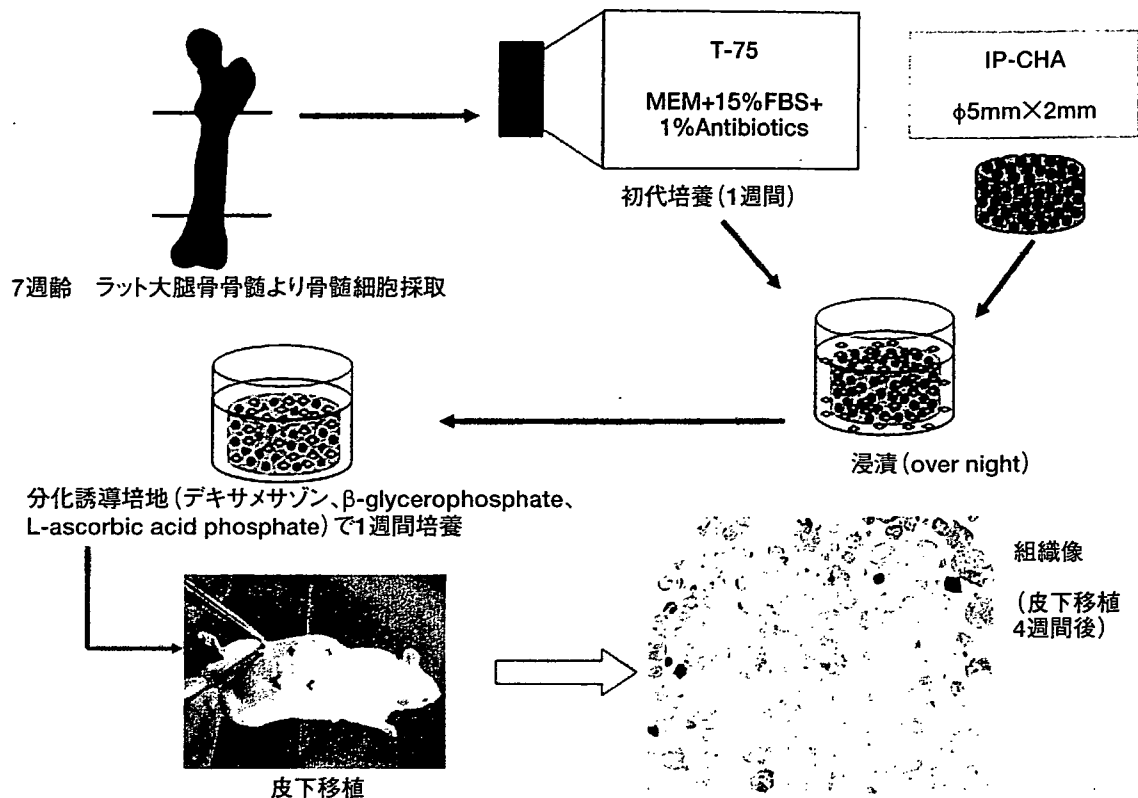


図6 ラットでの培養骨実験手順

いることで、過去の報告の約10分の1に相当するわずか5 μ gのrhBMP-2によりこのサイズの骨欠損が完全に修復されたことを示している。この低用量化には、以下に述べる各バイオマテリアルの持つ特性が貢献していると思われる。

(1) IP-CHA

- ①平均直径40 μ mの連通気孔の存在により、骨新生に必須である骨形成細胞および血管組織の内部への侵入が可能である。
- ②強度と気孔率が両立された結果、その三次元構造は骨修復の全過程において維持され、骨新生の優れた足場となる。

(2) PLA-PEG

- ①生体内分解性であり、また炎症反応をほとんど惹起しないため気孔内骨新生を阻害しない。
- ②生体内で水分を吸収しハイドロゲル化、その後徐々に分解されながらrhBMP-2を3週間かけて徐放する。
- ③吸水し膨張する特性によりhost boneとIP-CHAの間の裂隙を充填し、host boneからの細胞の侵入を容易とする。

これらの特性がうまく組み合わせることにより、低用量のrhBMP-2での形態および強度を兼ね備えた骨修復が可能になったと思われる。製造、管理が簡便であり、早期の臨床使用が期待される⁴⁾。

組織工学を用いて骨を蘇らせる

1. 骨髓由来間葉系細胞を用いた骨再生の動物実験

骨髓中に多く存在し骨、軟骨、筋、脂肪など多様な間葉系細胞に分化する多分化能と高い増殖能を併せ持つ間葉系幹細胞とIP-CHAを、組織工学の手技により組み合わせた骨再生研究も行っている。ラットを使用した動物実験の手順は、

- ①大腿骨より得た骨髓細胞のうち、培養皿に接着する細胞を培養増幅すると間葉系幹細胞を多く含む細胞集団を得る、
- ②この細胞の浮遊液中にIP-CHAを浸漬することで気孔内に細胞が侵入し気孔壁に付着、
- ③この細胞含有IP-CHAをデキサメサゾンを含む分化誘導培地でさらに培養し骨芽細胞へ分化誘導、
- ④ラット皮下に移植、

である。採取したIP-CHAの観察では、移植後2週頃からほぼすべての気孔内にきわめて旺盛な骨形成が見られ、

IP-CHAが骨髄由来間葉系細胞を用いた骨再生のscaffoldとして優れていることが確認された⁵⁾ (図6)。

2. 骨髄由来間葉系細胞を用いた骨再生の臨床試験

この実験結果を踏まえて、大阪大学医学部附属病院に新設された未来医療センターのプロジェクトとして「自家骨髄由来培養細胞導入人工骨による骨疾患の治療—第I/II相臨床試験」を開始した。未来医療センターは、再生医療や遺伝子治療などの臨床プロジェクトについて、プロトコール作製支援、医学的評価、倫理的・社会的評価を経て系統的に推進し、有効性・安全性・経済性などについて客観性の高い分析を支援している。対象は長径30mm以上の良性骨腫瘍の20歳上の患者で、1)患者から200~800mlの末梢血を採取し遠心分離にて血清を分離、2)外来処置にて骨髄穿刺を行い骨髄液15~50mlを採取、

3) 未来医療センター内に設置された細胞調整施設 (Cell Processing Center : CPC)において、骨髄細胞を自己血清を用いて培養増幅し(初期培養)、IP-CHAの気孔内に導入して骨芽細胞への分化誘導培養(2次培養)を行い、4)合計4~6週の培養ののち最終製品である“培養骨”を手術室に搬送し、良性骨腫瘍の搔爬術で生じた骨欠損に移植している(図7)。

3. 人工骨内部に血管を導入する動物実験

骨と血管の密接なかかわりは、以前より知られている。発生における骨形成過程では、骨形成に先駆け必ず血管新生が起こり、また、臨床的には以前より悪条件の骨欠損には、血管柄付き骨移植術が必要であることが知られている。さらに近年、骨芽細胞と血管内皮細胞のサイトカインを介した相互作用などの分子生物学的根拠が加わ

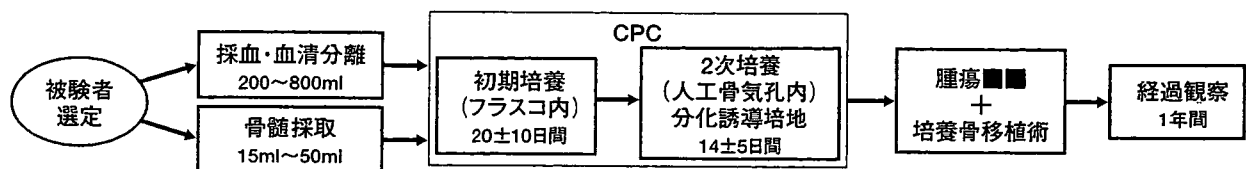


図7 自家骨髄由来培養細胞導入人工骨の臨床試験のフローチャート

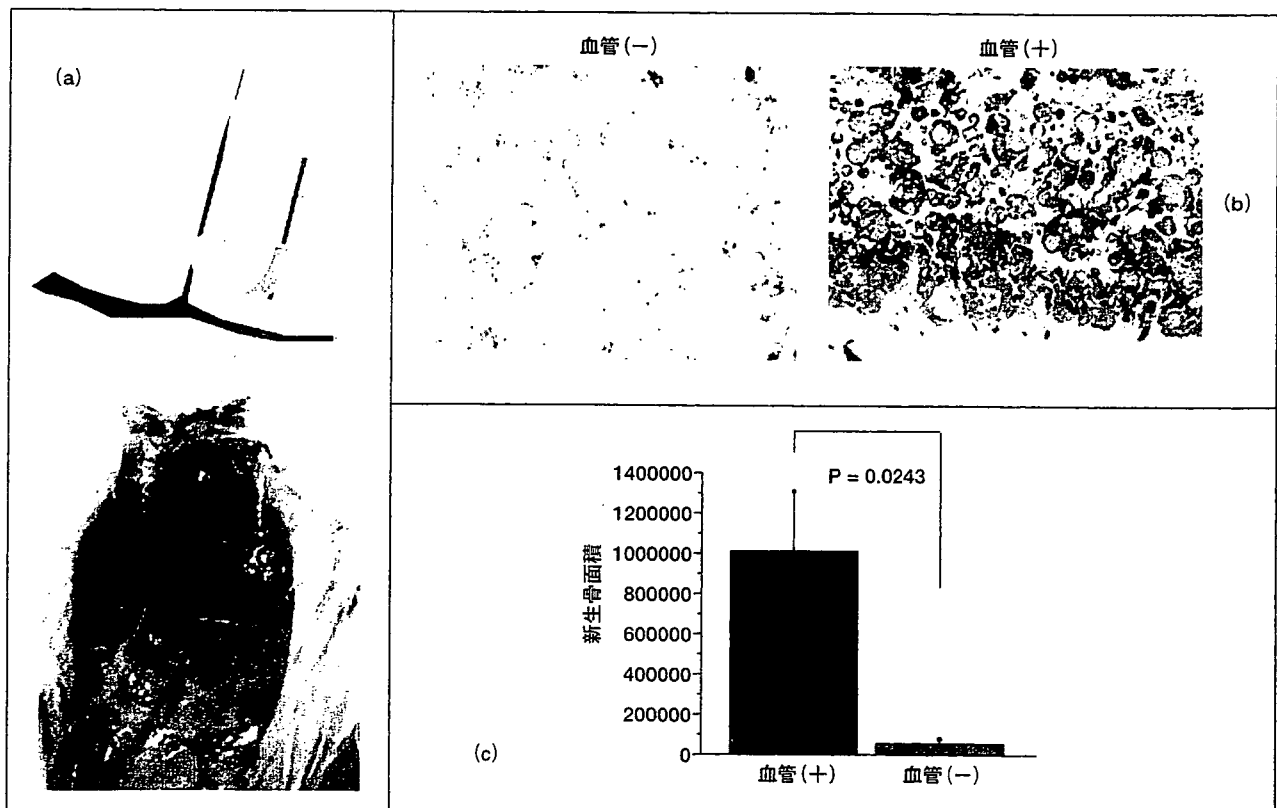


図8 IP-CHA内部への血管導入実験

(a) ラット大腿動静脈より分岐する血管を導入する模式図およびマクロ写真。(b) 血管導入群にてIP-CHA内部での骨および血管形成を認める。(c) IP-CHA内部新生骨面積。

り、骨再生医学の分野においての血管の重要性が認識されてきている。我々も、PLA-DX-PEG/BMPでコーティングした円柱状IP-CHA内部に血管を導入する研究をラットで行い、内部に血管を導入したIP-CHAでは血管周囲を中心に旺盛な骨形成を示すという実験結果を得た。このように血管導入を組み合わせることで、細胞を導入したIP-CHAあるいは、サイトカイン導入したIP-CHAにより大きなサイズの骨欠損が治療可能となると考えている⁶⁾(図8)。

おわりに

人工骨による骨再生は、骨形成のための足場のみを提供し、骨形成細胞の伝導により再生させる受動的な骨再生の時代から、サイトカインあるいは骨形成細胞を組み合わせることで積極的に骨組織を再生させる時代に進んでいる。しかし、強度、簡便性、安全性、骨への完全な置換など、骨再生にかかわる諸問題をすべて解決する生体材料・手法は未だ開発されていない。今後、材料科学、組織工学・分子生物学の進歩により新しい担体、活性促進薬の開発がなされ、骨のTissue Engineeringがさらに発展することを期待する。

謝辞

高岡邦夫教授(大阪市立大学大学院医学研究科整形外科学)、大串始先生(産業技術総合研究所・ティッシュエンジニアリング研究コンプレックス)をはじめ、本研究にかかわった諸先生に感謝申し上げます。

[参考文献]

- 1) Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, Yoshikawa H : Novel Hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo, *J. Biomed. Mater. Res.*, 59(1): 110-7, 2002.
- 2) Miyamoto S, Takaoka K, Okada T, Yoshikawa H, Hashimoto J, Suzuki S, Ono K : Polykactic acid-polyethylene glycol block copolymer: a new biodegradable sythetic carrier for bone morphogenetic protein, *Clin. Orthop.*, 294: 333-43, 1993.
- 3) Saito N, Okada T, Horiuchi H, et al : A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation, *Nat. Biotechnol.*, 19(4): 332-5, 2001.
- 4) Kaito T, Myoui A, Takaoka K, Saito N, Nishikawa M, Tamai N, Ohgushi H, Yoshikawa H : Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite, *Biomaterials*, 26: 73-79, 2005.
- 5) Nishikawa M, Myoui A, Ohgushi H, Ikeuchi M, Tamai N, Yoshikawa H : Bone tissue engineering using novel interconnected porous hydroxyapatite ceramics combined three-dimensional image analysis, *Cell Transplant*, 13(4): 367-76, 2004.
- 6) Akita S, Tamai N, Myoui A, Nishikawa M, Kaito T, Takaoka K, Yoshikawa H : Capillary vessel network integration by inserting a vascular pedicle enhances bone formation in tissue-engineered bone using interconnected porous hydroxyapatite ceramics, *Tissue Eng.*, 10(5-6): 789-95, 2004.

海渡 貴司 大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学

2002年より現所属。専門は、骨再生、骨代謝、脊椎外科。人工骨と骨形成因子による骨再生医療の研究を進めている。2004年、第37回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会・優秀ポスター賞を受賞。

名井 陽 大阪大学大学院

医学系研究科器官制御外科学(整形外科)助手

大阪大学大学院医学系研究科(医学・病理学)博士課程修了。大阪大学医学部整形外科助手、テキサス大学サンアントニオ校医学部内科内分泌代謝部門研究員を経て、1998年より現職。専門は骨軟部腫瘍、骨軟骨代謝、転移性骨腫瘍、生体材料、再生医学。血液・酸素供給と骨軟骨代謝、骨再生の関係、骨肉種転移メカニズム研究を進めている。2003年、第2回日本再生医療学会総会優秀演題賞、2004年、第13回日本がん転移学会優秀演題賞を受賞。著書に、「Biomaterials in Orthopedics」(分担執筆、MARCELDEKKER、2004年)。

吉川 秀樹 大阪大学大学院

医学系研究科器官制御外科学(整形外科) 教授

大阪大学大学院医学研究科博士課程修了。医学博士。米国カンサス大学病理学教室研究員、米国Memorial Sloan-Kettering Cancer Center整形外科研究員、大阪府立成人病センター整形外科部長、大阪大学医学部(整形外科)講師などを経て、1999年より現職。専門は、骨軟部腫瘍外科、骨再生、骨代謝。人工骨と骨形成因子(BMP)による骨の再生医療、レーザー加工による新規人工関節の開発に関心をもつ。1991年、日本整形外科学会奨励賞、1996年、日本骨代謝学会学術賞、2000年、整形外科災害外科学研究助成財団ジーンマージャパン奨励賞を受賞。著書に、「整形外科の最新医療 - 骨組織再生の促進」(分担執筆、先端医療技術研究所、2003年)など。

第14章 運動器系

1. 人工骨による骨の組織工学と再生医療

1.1 はじめに

整形外科では骨の欠損部や骨癒合の促進の目的で、古くから骨移植術が用いられてきた。骨移植は主として骨腫瘍や感染による骨欠損の補填、難治性骨折や偽関節などの修復促進、関節固定や脊椎固定の骨性架橋、人工関節の弛みによる母床骨の補填、骨粗鬆症により脆弱化した骨の補強などに用いられている。従来から、患者自身の腸骨、腓骨などから移植骨を採取し、患部に移植するという自家骨移植が広く施行されてきた。しかし自家骨移植法には、採取できる骨量に限りがあり、採取には侵襲を伴い少なからず合併症がみられる。近年、低侵襲手術が期待されていること、小児例や骨粗鬆症例などでは良好かつ十分な自家骨の採取が困難であること、大きな骨欠損の補填には自家骨移植では対応が困難であることなどの理由から、自家骨に代わり、種々の人工骨が開発され、臨床での使用が急速に普及しつつある。

人工骨は、①移植骨採取の侵襲がない、②任意の量、形状を調節できる、③生体適合性がよい、④免疫反応がないなどの利点を有するが、一方では、①力学的強度が弱い、②骨細胞の侵入が困難である、③高価であるなどの問題点も有してきた。今日まで人工骨として、アルミナ、ジルコニア、バイオガラス、ハイドロキシアパタイトなどさまざまな素材が使用されてきた。なかでもハイドロキシアパタイトはヒトの骨の無機質成

分に近く、その優れた生体親和性、骨伝導能から人工骨として最も適していると考えられ、1980年代より整形外科、歯科口腔外科、脳外科領域において骨補填剤として広く臨床使用されてきた。現在ハイドロキシアパタイト多孔体・緻密体は、良性骨腫瘍の骨欠損の補填材料として、脊椎外科領域において椎弓スペーサーとしてなど、種々の疾患に対して臨床使用されている^{1~3)}。しかし、骨の再生医療に臨床応用可能な人工骨は限られている。本稿では、骨再生医療のための新規人工骨の開発と、その臨床応用について概説する。

1.2 骨再生医療のための人工骨の開発

骨の再生医療のためには、力学的強度を有し、かつ細胞の足場として有効な人工骨の開発が必須である。しかし、既存のハイドロキシアパタイトは、気孔と気孔が細胞や血管の侵入に十分なサイズの連通路でつながっておらず、内部まで骨形成は期待できない。一方、従来の製法で連通構造を求めると、細胞の侵入は良好であるが、2~3 Mpa程度の力学的強度に劣る人工骨となり、臨床使用には適さない。筆者らは、力学的強度を有し、かつ幹細胞や増殖因子の導入、血管の導入が可能な骨補填材料として、気孔間連通構造を有する新規ハイドロキシアパタイトを“起泡ゲル化技術”により開発した⁴⁾。起泡ゲル化技術とは、起泡剤を加えて起泡・乾燥・焼結する泡セラミックの手法を取り入

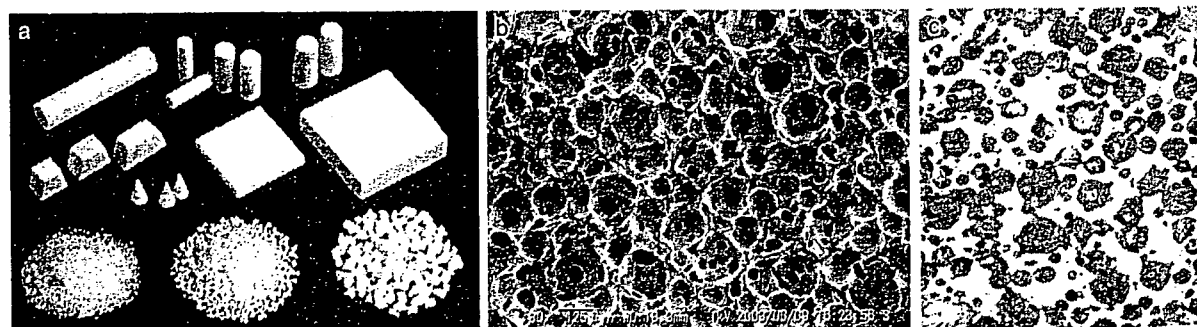


図 14.1.1 NEOBONE の構造と骨髄幹細胞導入による骨形成 (C:口絵 36 参照)

a:肉眼像、b:走査電顕像での内部気孔と連通路、c:ラット骨髄幹細胞とNEOBONE複合体を筋肉内移植後4週の骨形成

れポリエチレンイミンと水溶性の多官能基エポキシ化合物を組み合わせた架橋重合反応により、瞬時に泡沫状のスラリーを全域にわたって同時に固める手法である。新規多孔体ハイドロキシアパタイト NEOBONE は、走査電子顕微鏡所見で、ほぼ球形で比較的均一の気孔（気孔率 75%、平均気孔径 150 μm ）が秩序良く配列し、互いに気孔間連通孔で連絡している（図 14.1.1）。連通孔径分布は 10 ~ 80 μm （平均 40 μm ）であり、気孔の 90% が細胞や組織が十分通過できる大きさの連通孔でつながっている。したがって、気孔の内部に骨髄幹細胞、血管、BMP などの増殖因子/サイトカインや遺伝子の導入が可能である。力学的強度は初期圧縮強度で 12 Mpa であり、優れた数値を示した。ウサギ大腿骨に NEOBONE を移植した際に、移植後 6 週間で直径 6 mm の円柱の深層にまで気孔間連通孔を経て、豊富な血管新生を伴う新生骨、新生骨髄が観察され、優れた骨伝導能を示した。また、この骨再生に伴い、圧縮強度は移植後 9 週で初期強度の 3 倍に達した⁴⁾。

1.3 生物活性を持つ人工骨の開発

NEOBONE の気孔間連通構造は、その優れた骨伝導能を呈するのみならず、気孔の内部に活性物質や細胞を導入し生物活性を有する人工骨の開発を可能にする。それ自体生物活性を持つ“Bio-Active BONE”を開発するには、多孔体内の連通構造を利用し、骨への分化能を持つ細胞（骨髄幹細胞）、BMP (Bone morphogenetic protein) などの骨形成促進因子、新生血管を導入することなどが考えられる^{5,6)}。

1.3.1 骨髄間葉系細胞と NEOBONE のハイブリッド型人工骨の開発

骨髄には間葉系幹細胞が存在し、この幹細胞は骨を形成する骨芽細胞に分化することが報告されている。Ohgushi らの方法に従い⁷⁾、ラットより採取した新鮮骨髄細胞を培養し浮遊細胞を除去し、付着細胞を増殖させた後 NEOBONE に含浸させた。この細胞含有 NEOBONE をデキサメサゾンを含む骨分化培地でさらに培養し骨芽細胞へ分化誘導させ、同系ラット背部筋膜下に移植し異所性骨形成を観察した。NEOBONE 内での生化学的解析から、骨芽細胞への初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性は移植後 2 週でピークを示し、移植後 8 週でも高値を維持した。骨芽細胞の後期分化マーカーであるオステオカルシン量は移植後経時的に増加した。組織学的には移植後 4 週ですべての気孔内に豊富な骨形成を観察することがで

き、マイクロ CT による 3 次元評価でも新生骨が均一に形成されていることが示された。NEOBONE が骨髄由来間葉系細胞を用いた骨再生の scaffold として優れていることが確認された（図 14.1.1）⁸⁾。

1.3.2 骨形成蛋白 (BMP) と NEOBONE のハイブリッド型人工骨の開発

BMP-2 の液性担体として、合成ポリマー、PLA-PEG (ポリ乳酸、ポリエチレングリコール共重合体、多木化学社製、分子量 11.4 kDa、PLA : PEG モル比 51 : 49) を使用した⁹⁾。NEOBONE (直径 4 mm、高さ 15 mm) にアセトン溶解した 20 mg の PLA-PEG を滴下、その後アセトンを揮発させることで NEOBONE /PLA-PEG 複合体を作製した。ウサギ橈骨に 15 mm の骨欠損を作製し、BMP-2 (5 or 20 μg) /PLA-PEG (20 mg) /NEOBONE 複合体を同部に移植した。NEOBONE 単独群では、インプラントと骨の間に明らかなレントゲン透亮像を認め、いわゆる偽関節の状態であった。一方、両 BMP 群では、術後 8 週までにインプラント中央部に到達するレントゲン陰影の増強を認め、組織学的にもレントゲン評価と一致して内部に旺盛な骨および骨髄組織の形成を認めた¹⁰⁾。過去の報告の約 10 分の 1 に相当するわずか 5 μg の rhBMP-2 によりこのサイズの骨欠損が完全に修復されたことを示しており、早期の臨床使用が期待された。

1.3.3 NEOBONE 内への血管束導入による骨再生の促進

感染性骨髄炎や偽関節などの血行の悪い部位の骨欠損部に対する骨移植は、従来から血管柄付骨移植が行われてきた。しかし、追加手術が必要であること、採取量の限界があることなどから、血管柄付人工骨の開発が期待される。その基礎的研究として、顕微鏡下に血管を NEOBONE に導入するモデルを作成した。ラット下腹壁動静脈血管束を NEOBONE 円柱ブロック (直径 6 mm、高さ 10 mm) の中心部に導入し皮下に移植した結果、NEOBONE 内の気孔に微細血管のネットワークを形成できた。さらに、NEOBONE に rhBMP-2 を含浸させ気孔内の異所性骨形成で評価した結果、血管を導入した BMP 含浸 NEOBONE では血管に隣接する部位を中心にほぼすべての気孔に骨形成が観察された^{6,11)}。その新生骨形成量は血管導入をしなかった場合に比べ 10 倍以上であり、NEOBONE への血管導入は骨再生を著明に促進することが示された。

1.3.4 NEOBONE/BMP 複合体による関節軟骨の再生

関節軟骨の修復・再生には、培養軟骨細胞移植、

TGF- β やBMPの注入、BMP遺伝子の導入等さまざまな試みがなされているが、いまだ安定した成績は得られていない。前述のBMP/PLA-PEG/NEOBONE複合体を用い、軟骨下骨の骨再生および関節軟骨の良好な再生に成功した。ウサギ膝関節の軟骨全層欠損部にrhBMP-2 (20 μ g)/PLA-PEG/NEOBONE (直径4 mm、高さ4 mm) 複合体を埋入したところ、術後1週でNEOBONEの孔内に周辺骨髄から旺盛な間葉系細胞の進入が観察され、術後6週で軟骨下骨の再生と関節面には関節軟骨が再生することを明らかにした¹²⁾。再生軟骨は硝子軟骨で、柱状軟骨細胞の配列が観察され、骨へと置換されることなく関節軟骨として維持された。今後のヒトでの関節軟骨再生への新しいアプローチであると考えられる。

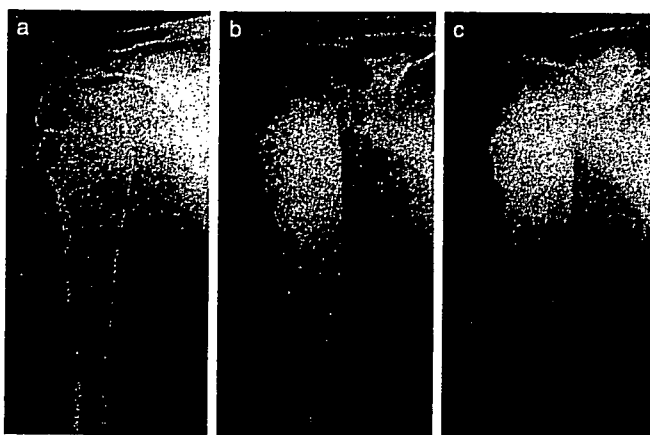


図 14.1.2 NEOBONE による骨腫瘍の治療
a : 術前 b : 術直後 c : 術後3ヵ月
14歳、男子、右上腕骨嚢腫。

1.4 NEOBONE の臨床応用

1.4.1 NEOBONE の臨床治験

大阪大学医学部附属病院およびその関連施設において、65症例に対してNEOBONEの臨床治験を行った。対象は骨折および骨腫瘍の骨欠損、骨欠損を伴った関節リウマチ、変形性関節症である。術後経過をX線所見で観察すると、移植後3~6ヵ月でNEOBONE内部あるいはNEOBONEと母床骨間に強い骨硬化像が観察でき、NEOBONE内の骨再生が示唆された。従来のはドロキシアパタイトの臨床例では6~12ヵ月を要しており、有意な骨再生の促進が認められた。図14.1.2に良性骨腫瘍に対する使用例を示すが、術後早期に良好な骨形成が観察できた。2003年9月薬事認可を得、骨再生に適応を持つ医療材料として臨床使用可能となった。さらに、骨皮質の欠損を伴う部位、下肢などの荷重部への理想的な人工骨を開発するため、緻密体/多孔体の複合体を新規開発し(東芝セラミックス社製)、臨床治験を進行中である。

1.4.2 種々の疾患に対するNEOBONEによる骨再生

NEOBONE発売後、骨腫瘍、骨折、関節リウマチ、変形矯正など、種々の骨欠損の修復・再生に臨床応用している^{13,14)}。図14.1.3は関節リウマチで人工膝関節置換が必要な症例であるが、関節近傍の骨嚢腫があり、良好な人工関節の設置が期待できない。まずNEOBONEを移植し母床骨を再生させ、2期的に人工関節置換術を施行した。図14.1.4は、変形性膝関節症に対して高位脛骨骨切り術を施行した際、骨欠損部

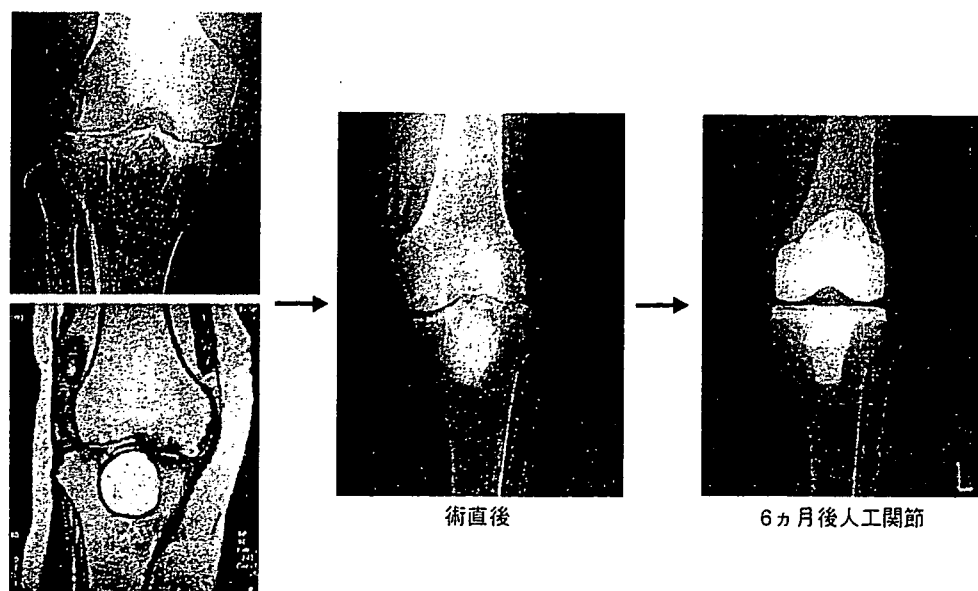


図 14.1.3 NEOBONE による人工骨移植と人工関節置換術
65歳、女性、関節リウマチ。

の 3 次元 CAD モデルを作製し、このデータを元にブロック状の NEOBONE を 3 次元切削器 (Roland DG、MDX-20) にて切削することにより欠損部に合致する ready-to-use のカスタムデザイン NEOBONE を作製

した。図 14.1.5 は、関節リウマチの人工足関節置換術後の弛みのため広範な骨欠損を生じた症例である。同様にカスタムデザイン NEOBONE を作製し、欠損部に補填し足関節固定術を施行した。NEOBONE の

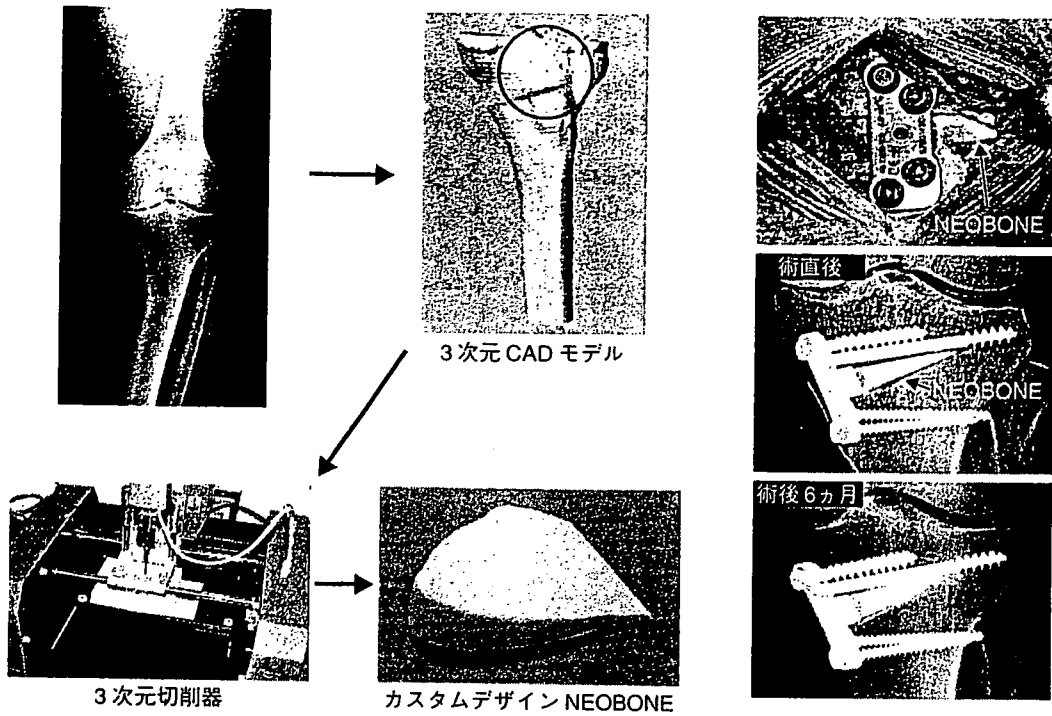


図 14.1.4 NEOBONE による変形性膝関節症の治療
高位脛骨骨切り術。62 歳、女性、左変形性膝関節症。

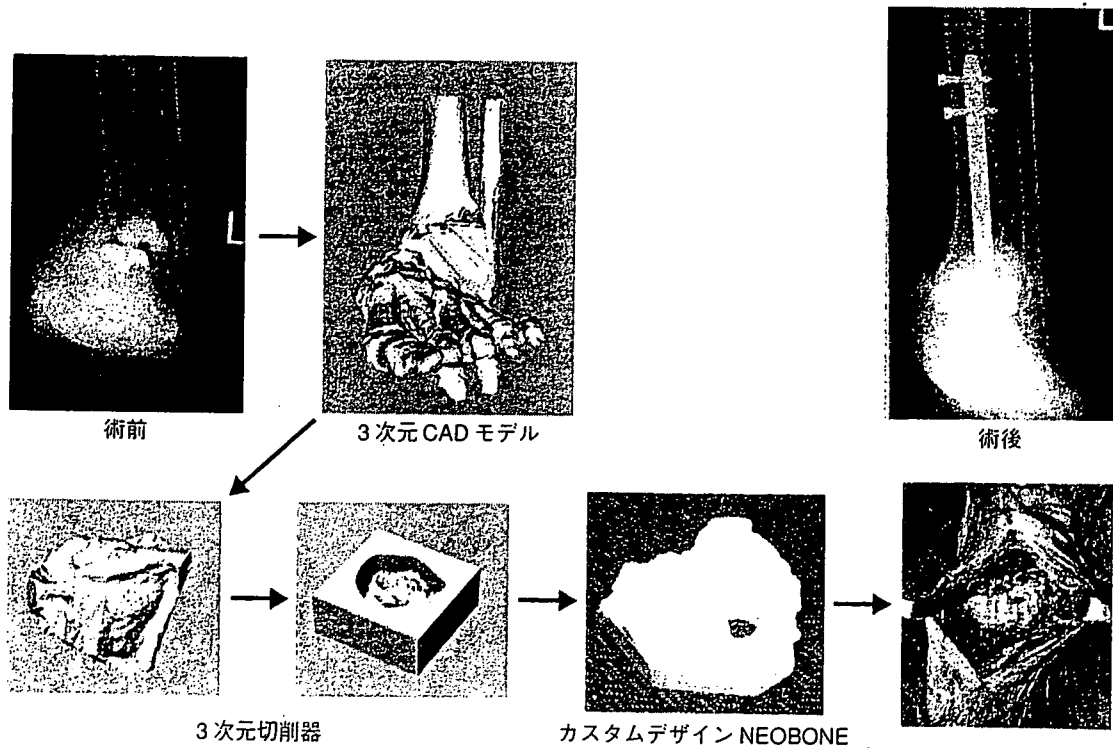


図 14.1.5 NEOBONE による関節リウマチの治療
人工関節弛みによる広範骨欠損に対する関節固定術。72 歳、女性、関節リウマチ。