

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 和田 進

学 位 論 文 題 名

骨との固着能を有する高強度ハイドロゲルの開発およびその生物学的固着機序の解明
に関する生体材料学的研究

(A biomaterial study on development of double network hydrogel directly bondable
to the bone and elucidation of the biological bonding mechanism)

【背景と目的】 関節軟骨損傷は若年者から高齢者まで広く認められ、疼痛と運動障害によって QOL に大きな障害をもたらすことが知られている。関節軟骨には血管がないために、一度損傷すると自然には再生せず、関節軟骨損傷を放置しておく、やがて周囲の軟骨に変性変化をきたして、最終的には変形性関節症に至る。現在、限局した関節軟骨損傷に対する一般的治療法として、マイクロフラクチャー法などの骨髄刺激法、自家骨軟骨柱移植手術などが行われている。また先端治療として組織工学的手法を用いた培養軟骨移植術がある。しかしながら、これらの手術治療法にはそれぞれ利点とともに課題があり、新たな治療法として関節軟骨の病変部のみを関節軟骨に似た構造の人工材料で置換する人工軟骨による治療の実用化が期待されている。

我々の研究グループでは、実用可能な人工軟骨の開発を目指した一連の研究を行っており、2003 年にダブルネットワーク (DN) ゲルを開発した。この DN ゲルは 90 %以上の水分を含みながら、高靱性、高弾性という力学特性を持ち、かつ優れた低摩耗性を有している。しかしながら、これまでのハイドロゲル材料と同様に、「骨との強固な固着が得られていない」という課題が残されていた。この DN ゲルを臨床応用するためには、生体内で骨組織に接着させて安定化させることが不可欠と考えられる。そこで我々は骨の主成分であるハイドロキシアパタイト (HAp) に着目し、HAp を DN ゲルに複合化した HAp/DN ゲルを新たに開発した。

本研究の目的は、HAp/DN ゲルの *in vitro* における材料特性を評価することと、HAp/DN ゲルの *in vivo* における骨接着性を評価することである。

【材料と方法】 DN ゲルは、過去に我々の研究グループが報告した二段階重合法によるネットワーク形成技術 (two-step sequential polymerization method) を用いて合成した。HAp/DN ゲルは、バイオミネラリゼーションに倣った手法である alternate soaking method を応用して作製した。これによって DN ゲル円柱表層に 500 μm の厚さで HAp を複合化した HAp/DN ゲルが完成した。DN ゲルおよび HAp/DN ゲル円柱プラグを径 4.5 mm 厚さ 5 mm に採型し以下の実験に用いた。

in vitro におけるゲルの材料特性を評価するために以下の実験を行った。von Kossa 染色によりマイクロレベルで、電界放射型透過電子顕微鏡 (FE-TEM) によりナノレベルでゲルを観察した。熱重量-示差熱分析 (TG-DTA) を行い、ゲルの含水率、有機物重量比率、無機物重量比率の成分分析を行った。圧縮破壊試験によりゲルの力学的評価を行った。

in vivo におけるゲルの骨接着性を評価するために以下の動物実験を行った。実験には、

58 羽の日本白色家兔（月齢 6 カ月）（ 3.98 ± 0.58 kg）を用いた。全身麻酔下に、両側大腿骨滑車に径 4.3 mm の骨軟骨欠損を作製し DN ゲル円柱プラグまたは HAp/DN ゲル円柱プラグを最表面が関節面に一致するように無作為に埋植した。術後 1、2、4、12 週の時点で、両大腿骨遠位部を採取し以下の方法で評価した。Villanueva 骨染色と Hematoxylin-Eosin 染色による組織標本および I 型プロコラーゲン抗体を用いた免疫組織化学標本を作製し、生物学的な反応を顕微鏡で観察した。押出し力学試験を用いて骨接着性を力学的に評価した。高解像度マイクロ CT (μ CT) によりゲル内の CT 値の変化および押出し力学試験後の骨接着率を画像評価した。また、術後 1 週と 4 週時点では、更に FE-TEM を用いてゲルと骨との接着様式をナノレベルで観察した。

【結果】 in vitro 実験では、von Kossa 染色と FE-TEM により、HAp/DN ゲルの HAp 層内部に径 200-600 nm の HAp ナノ結晶が集まって出来た径 10 μ m の点状集合体が無数に形成されていることが観察された。TG-DTA では、DN ゲルと HAp/DN ゲルはともに 85 %以上の高い含水率を有していた。HAp/DN ゲルの無機物率は 4.4 %であり、DN ゲルと比較して有意に高かった ($p < 0.0001$)。圧縮破壊試験における最大破断強度、破断ひずみ、弾性率は両群間に有意差を認めなかった。

in vivo 埋植試験後の組織学的評価において、DN ゲルはいずれの観察時点においても骨接着を認めず、ゲルと骨孔壁の界面に小円形細胞が観察されるのみであった。一方、HAp/DN ゲルでは、埋植後 2 週でゲル表面に類骨形成を認め、類骨内に I 型プロコラーゲン陽性の幼若な骨原性細胞が観察された。埋植後 4 週と 12 週の HAp/DN ゲルでは、ゲルと骨孔壁の境界に成熟した骨組織が観察された。 μ CT によりゲル内の CT 値を計測すると、HAp/DN ゲルの辺縁部の CT 値は、経時的に有意に上昇していた。押出し力学試験における DN ゲルの最大荷重は、いずれの観察時点においても 5N 程度と低値であった。一方、HAp/DN ゲルは最大荷重が経時的に増大し、4 週では 37.54 N、12 週では 42.15 N に達していた。HAp/DN ゲルと DN ゲルの群間比較では、2、4、12 週において HAp/DN ゲルが DN ゲルより有意に高かった ($p < 0.001$)。 μ CT では、DN ゲルは全ての観察時点で骨接着領域を認めなかった。HAp/DN ゲルは埋植後 1 週では骨接着領域を認めなかったが、2 週で表面積の 31.2 %、4 週で 82.2 %、12 週で 91.4 %の骨接着率を認め、4 週と 12 週の骨接着率は 2 週に比べて有意に高かった ($p < 0.001$)。FE-TEM による評価では、埋植後 4 週の HAp/DN ゲルにおいて、ゲルと骨の境界領域に幅 40 μ m の傾斜勾配を有するゲルと骨のハイブリッド層が形成されていた。

【考察】 本研究では、HAp/DN ゲルの in vitro における材料特性は DN ゲルとほぼ同等であり、HAp/DN ゲルの in vivo における骨接着性は DN ゲルと比較して有意に優れているということが明らかとなった。骨接着には、HAp/DN ゲル内の HAp ナノ結晶が周囲の骨原性細胞に働きかけて生物学的な骨リモデリング反応を促進し、境界領域にゲルと骨のハイブリッド層を形成して接着が得られたとい機序が考えられた。

【結論】 本研究は、力学強度を損なうことなく DN ゲルに HAp を複合化することが可能であることを証明し、かつ強固な骨接着能を付加できることを示した。この技術は様々な機能を持つゲルを含めた疑似軟組織材料の骨への固定を可能にし、人工軟骨を含めた DN ゲルの生体応用の可能性を大きく前進させた。