



Title	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
Author(s)	和田, 進
Description	配架番号 : 2328
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12587号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12587
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65951
Type	doctoral thesis
File Information	Susumu_Wada.pdf



学 位 論 文

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)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

和 田 進

学 位 論 文

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)

2017 年 3 月

北 海 道 大 学

和 田 進

目次

発表論文目録および学会発表目録.....	1
I. 緒言	4
II. 本研究の背景	5
1. 関節軟骨損傷の病態と治療の現況	5
1. 1. 関節軟骨.....	5
1. 1. 1. 関節軟骨の構造と特徴	5
1. 1. 2. 関節軟骨の構成要素	7
1. 1. 3. 関節軟骨の役割	7
1. 1. 4. 関節軟骨の損傷と変形性関節症	7
1. 2. 関節軟骨損傷の治療法.....	8
1. 2. 1. 骨髄刺激法	8
1. 2. 2. 自家骨軟骨柱移植術	9
1. 2. 3. 培養軟骨細胞移植術	9
2. 人工軟骨に必要な基盤材料の開発	10
2. 1. 人工軟骨.....	10
2. 1. 1. 治療法としての概念	10
2. 1. 2. 過去の人工軟骨開発の報告	11
2. 2. ハイドロゲルの生体材料学.....	12
2. 2. 1. ハイドロゲルの生体材料学的特徴	12
2. 2. 2. 北海道大学における人工軟骨開発に関する研究	12
2. 3. ハイドロキシアパタイト (HAp) の生体材料学.....	13
2. 3. 1. HAp の特徴.....	13
2. 3. 2. HAp コーティングに関する研究の歴史.....	14
III. 本研究の目的	14

IV. 略語表	16
V. 実験方法	17
1. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの作製方法.....	17
1.1. DN ゲルの作製方法	17
1.2. HAp/DN ゲルの作製方法	17
2. 研究デザイン	21
2.1. 研究1 : in vitro における HAp/DN ゲルの材料特性評価..	21
2.2. 研究2 : in vivo における HAp/DN ゲルの骨接着性評価...	21
3. 手術方法	21
4. 評価方法	24
4.1. von Kossa 染色	24
4.2. 電界放射型透過電子顕微鏡 (FE-TEM)	24
4.3. 熱重量-示差熱分析 (TG-DTA)	24
4.4. 圧縮破壊試験.....	26
4.5. Villanueva 染色	28
4.6. Hematoxylin-eosin 染色 (HE 染色)	28
4.7. I 型プロコラーゲン免疫組織化学染色.....	28
4.8. 押出し力学試験.....	28
4.9. マイクロ CT (μ CT)	31
5. 統計学的解析	34
VI. 結果	34
1. 研究1 : In vitro における HAp/DN ゲルの材料特性評価	34
1.1. HAp/DN ゲル内の HAp 結晶の観察	34
1.2. HAp/DN ゲルの構成要素の重量比率	36
1.3. HAp/DN ゲルの力学特性	38

2. 研究2 : In vivo における HAp/DN ゲルの骨接着性評価	42
2.1. HAp/DN ゲルの組織学的および免疫組織化学的評価	42
2.2. HAp/DN ゲル内に起きた変化の評価	46
2.3. HAp/DN ゲルの骨接着性の力学的評価	48
2.4. HAp/DN ゲルの骨接着率の定量的評価	51
2.5. HAp/DN ゲルと骨の接着様式のナノレベルでの観察	54
VII. 考察	56
VIII. 総括および結論	58
1. 本研究から得られた新知見	58
2. 新知見の意義	59
3. 今後の課題	59
IX. 謝辞	60
X. 引用文献	61

発表論文目録及び学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Kurokawa, T., Gong, J. P., Yasuda, K.

Hydroxyapatite-coated double network hydrogel directly bondable to the bone: Biological and biomechanical evaluations of the bonding property in an osteochondral defect.

Acta Biomaterialia. Vol. 44: 125-134, (2016)

2. Nonoyama, T. *, Wada, S. *, Kiyama, R., Kitamura, N., Mredha, M. T., Zhang, X., Kurokawa, T., Nakajima, T., Takagi, Y., Yasuda, K., Gong, J. P., (* equally contributed).

Double-network hydrogels strongly bondable to bones by spontaneous osteogenesis penetration.

Advanced Materials. Vol. 28: 6740-6745, (2016)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

国際学会

1. Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Semba, S., Onodera, J., Kawaguchi, Y., Higa, K., Kurokawa, T., Gong, J. P., Yasuda, K.

Biomechanical evaluations of a novel hydroxyapatite-coated PAMPS/PDMAAm double-network hydrogel as a potential artificial cartilage having adhesive ability to the bone.

The 61st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society,
March 28-31, 2015, Las Vegas, Nevada, USA.
(Podium presentation)

2. Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Semba, S., Onodera, J., Kawaguchi, Y., Higa, K., Kurokawa, T., Gong, J. P., Yasuda, K.

Biomechanical evaluations of artificial cartilage made of a hydroxyapatite-coated PAMPS/PDMAAm double-network hydrogel.

The 12th World Congress of the International Cartilage Repair Society, May 8-11, 2015, Chicago, Illinois, USA.
(Podium presentation)

3. Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Kurokawa, T., Gong, J. P., Yasuda, K.

Anchorage of double-network hydrogel artificial cartilage to underlying bone using a surface osteoconductive approach: In vivo evaluation of the bonding behavior.

The 62nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, March 5-8, 2016, Orlando, Florida, USA.
(Podium and poster presentation)

New Investigator Recognition Award を受賞

国内学会

1. 和田進、北村信人、野々山貴行、木山竜二、仙葉慎吾、比嘉浩太郎、黒川孝幸、Jian Ping Gong、安田和則

バイオミネラリゼーションにより複合化したハイドロキシアパタイトコーティング PAMPS/PDMAAm ダブルネットワークゲルの骨接着性の評価

第30回日本整形外科学会基礎学術集会
2015年10月22日、富山県富山市

2. 和田進、北村信人、野々山貴行、木山竜二、小野寺純、仙葉慎吾、横田正司、後藤佳子、高橋恒存、比嘉浩太郎、舩田哲朗、黒川孝幸、Jian Ping Gong、安田和則

ハイドロキシアパタイト複合化 PAMPS/PDMAAm ダブルネットワークゲル
人工軟骨の圧縮力学特性と生体内骨接着の検討

第42回日本臨床バイオメカニクス学会
2015年11月13日、東京都千代田区

3. 和田進、北村信人、野々山貴行、木山竜二、黒川孝幸、仙葉慎吾、後藤佳子、小野寺純、Jian Ping Gong、安田和則

高強度ダブルネットワークゲル人工軟骨の生体内骨接着プロセスとそのメカニズムの解明

第43回日本臨床バイオメカニクス学会
2016年10月8日、北海道札幌市

4. 和田進、北村信人、野々山貴行、木山竜二、仙葉慎吾、小野寺純、横田正司、後藤佳子、比嘉浩太郎、黒川孝幸、Jian Ping Gong、安田和則

ハイドロキシアパタイト複合化 PAMPS/PDMAAm ダブルネットワークゲル
人工軟骨の関節内における in vivo 骨接着性評価

第31回日本整形外科学会基礎学術集会
2016年10月13日、福岡県福岡市

I. 緒言

関節軟骨損傷は若年者から高齢者まで広く認められ、耐え難い痛みと運動障害によって QOL (Quality of life) に大きな障害をもたらすことが知られている。関節軟骨という組織には血管がないために、一度損傷を起こすと自然に再生しないという特有の性質がある^{1,2}。損傷した関節軟骨を放置すると、やがて周囲の軟骨も変性変化をきたして最終的には変形性関節症に至る。末期の変形性関節症では、関節痛や可動域制限などにより、著しく日常生活動作に支障をきたす。国内における変形性膝関節症の患者は増加傾向にあり、現在 2000 万人以上と推定されており社会的な問題となっている³。関節軟骨損傷や変形性関節症の患者数の増加に伴い、これらの疾患に対する医療費も年々増加傾向にあり医療経済学的見地においても有効かつ合理的な治療の開発が求められている。

関節軟骨に損傷や変性が生じると、本来の硝子軟骨によって修復されることは困難であるため、これらの関節軟骨欠損に対して欠損部を再建あるいは再生させるための手術治療がしばしば選択される。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。また現在の先端治療として組織工学的手法を用いた培養軟骨細胞移植術がある⁴。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、全ての症例で満足のいく臨床成績が得られているわけではないのが現状である。

我々の研究グループでは、関節軟骨病変を人工材料で治療するという戦略のもとに研究を行い、poly-(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) (PAMPS) と poly-(N,N'-dimethyl acrylamide) (PDMAAm) の 2 つの高分子ポリマーで構成される PAMPS/PDMAAm ダブルネットワークハイドロゲル (DN ゲル) を開発することに成功した^{5,6}。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 ゲルに複合化させることによって骨に接着させることを目的に今回の研究を行った。

II. 本研究の背景

1. 関節軟骨損傷の病態と治療の現況

1.1. 関節軟骨

1.1.1. 関節軟骨の構造と特徴

関節とは相対する2つあるいはそれ以上の骨を連結する構造体をいう。可動性を有する関節を可動関節と呼び、四肢の関節の大多数がこれに属する。関節軟骨とは、関節の相対する骨端の表面を覆う2-4 mmの厚さの硝子軟骨組織である^{2,7,8}。関節軟骨の組織学的特徴は、細胞成分が全容積のわずか5%以下と少なく、血管、神経、リンパ管に乏しいことであり、関節軟骨の大部分が細胞外マトリックスで構成されている。成人の関節軟骨は、表層、中間層、深層、石灰化層の4層構造をなしており、最深層の石灰化層の下には軟骨下骨と呼ばれる骨組織があり、関節軟骨は骨と連続している(図1)。関節軟骨の最表面に位置する表層(tangential zone または superficial zone)は関節軟骨の厚さの10-20%に相当する。表層内の軟骨細胞は円盤状で関節表面と平行に並んでいる。表層内のコラーゲン線維は密に分布しており線維方向は関節面と平行に並んでいる。関節軟骨の表層の役割は、それよりも深い層を衝撃から守ることであり、特に剪断応力に対して機能することである。中間層(transitional zone)は関節軟骨の厚さの40-60%に相当する。中間層内の軟骨細胞は大型で球形を呈し、コラーゲンの線維配列は不規則である。プロテオグリカンなどのムコ多糖を豊富に含んでいるため、サフラニンO染色により赤く染色される。関節軟骨の中間層の役割は、圧縮応力に対して機能することである。深層(radial zone または deep zone)は関節軟骨の厚さの30-40%に相当する。深層内の細胞は球形であり、数個の細胞が垂直に連なって柱状に配列している。深層は4層の中で最もムコ多糖を多く含む層であり、サフラニンO染色で最も赤く染色される。深層内のコラーゲン線維は関節表面に対して垂直方向に配列しており、関節軟骨の中で圧縮応力に対して最も機能する層となっている。関節軟骨の深層と石灰化層の境界は明瞭であり tidemark と呼ばれる hematoxylin で青色に染色される波状の線がある。関節軟骨の最深層に位置するのは、tidemark の下にある石灰化層(calcified zone)である。石灰化層内のムコ多糖は少なく、サフラニンO染色での染色性は乏しい。石灰化層内のコラーゲン線維は垂直に配列し、線維間はハイドロキシアパタイト結晶を含む石灰化物で埋められている。石灰化層は関節軟骨を軟骨下骨と結合させるために重要な層となっている。

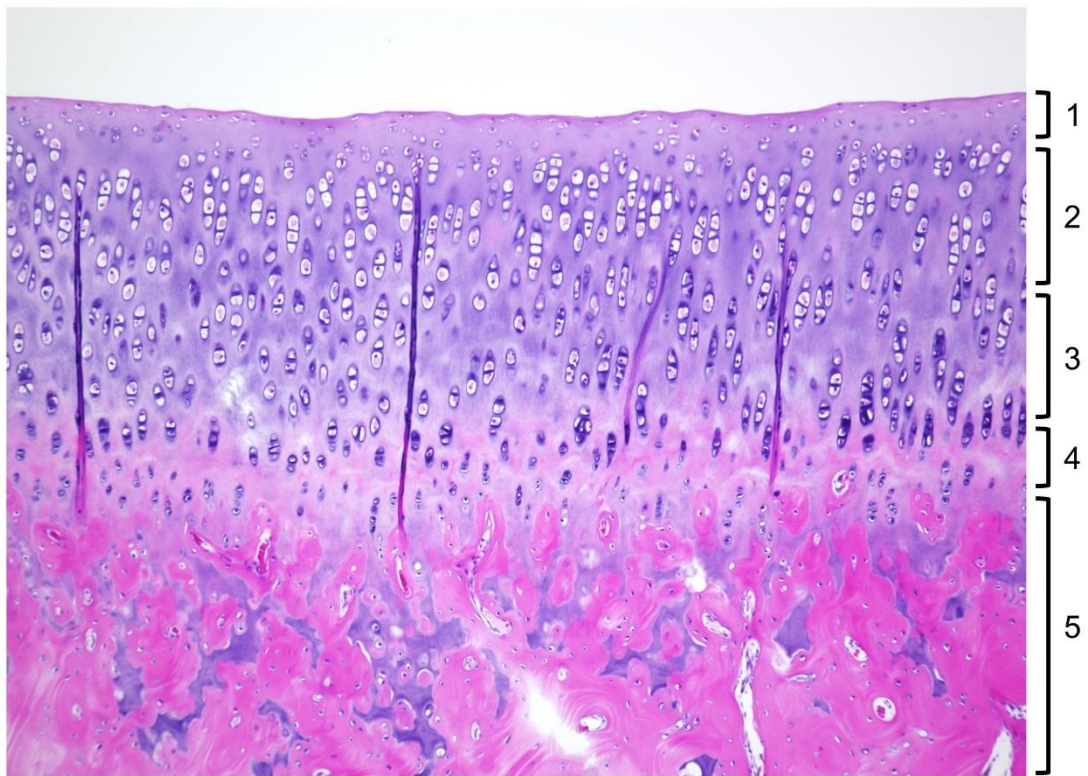


図 1. ウサギの正常関節軟骨の組織図 (Hematoxylin-eosin 染色)

1. 関節軟骨の表層 (tangential zone または superficial zone)。
2. 関節軟骨の中間層 (transitional zone)。
3. 関節軟骨の深層 (radial zone または deep zone)。
4. 関節軟骨の石灰化層 (calcified zone)。
5. 軟骨下骨。

1.1.2. 関節軟骨の構成要素

関節軟骨は、他の上皮性組織と大きく異なり、細胞成分が全容積のわずか5%以下と非常に少なく、95%以上が細胞外マトリックスと水分から構成されている。血管、神経、リンパ管に乏しい組織である。関節軟骨の栄養は主に関節腔に存在する関節液からの拡散によってもたらされている。関節軟骨の細胞外マトリックスの主成分は水分であり、湿重量の70-80%を構成している。関節軟骨の水分を除いた乾燥重量の47-66%がコラーゲン、30-35%がプロテオグリカン、15-20%が非コラーゲン性タンパク質と糖タンパク質である。コラーゲンの基本分子は約1000のアミノ酸のポリペプチド鎖からなる。関節軟骨を構成するコラーゲンの90-95%がⅡ型コラーゲンであり残りはⅥ型、Ⅸ型、Ⅺ型などのコラーゲンが存在すると言われている。プロテオグリカンはタンパク質とムコ多糖（グリコサミノグリカン）の結合したもので、分子量が 2×10^6 の巨大分子である。プロテオグリカンを構成するムコ多糖はコンドロイチン硫酸とケラタン硫酸であり陰性荷電を持つことが特徴である。コラーゲン、プロテオグリカン、非コラーゲン性タンパク質、糖タンパク質などの細胞外マトリックスは、主に軟骨細胞で産生されている。関節軟骨はコラーゲン線維とプロテオグリカンで出来た三次元網目構造をなしており、その中に水分を保持するというハイドロゲルに似た構造を有している。

1.1.3. 関節軟骨の役割

関節の主な2つの機能は、可動性と支持性であり、関節の表面を覆っている関節軟骨が大きな役割を担っている。関節が滑らかな可動性を得るために、関節軟骨の表面は非常に低摩擦な構造となっている。関節軟骨の表面の摩擦係数は 10^{-2} 程度と極めて低い⁹。また関節軟骨は支持性を得るために高い弾性を有しており荷重緩衝作用と高い耐久性を有している。正常な関節軟骨の弾性率は0.25-0.90 MPa^{10,11}であり、荷重時には関節軟骨に2.6-8.0 MPaの圧縮応力がかかると報告されている¹²⁻¹⁴。これらの関節軟骨の機能的特性は高い水分含有率と細胞外マトリックスによってもたらされている。

1.1.4. 関節軟骨の損傷と変形性関節症

関節軟骨は血管に乏しいため自己修復能に乏しく、一度損傷を受けると、自然再生しないというのが特徴であり、骨組織や上皮組織と異なる。

関節軟骨が損傷した後の治癒機転は、その損傷の深さによって異なる。関節軟骨表層から深層までの浅い損傷、すなわち tidemark よりも浅い損傷においては、血管のある軟骨下骨まで損傷が到達していないため、血液や間葉系幹細胞

胞を含んだ骨髄液が届かないため治癒機転が働かない。損傷を受けた部位の軟骨細胞がネクロシスやアポトーシスによって減少し、軟骨細胞からの細胞外マトリックスの産生が局所的に減少して軟骨の変性が進行する。一方で、関節軟骨の tidemark を超える関節軟骨全層損傷や軟骨下骨まで損傷の及ぶ軟骨損傷においては、血液や間葉系幹細胞を含んだ骨髄液などが損傷部に届くためある程度の治癒機転が働く。しかしながら、この治癒過程を経て修復される組織は、もともとの硝子軟骨組織ではなく、線維性組織や線維軟骨組織であり、力学的に硝子軟骨よりも劣るため¹⁵、やがて損傷部から変性が広がっていく。

関節軟骨はどのような損傷形態であっても、やがて変性が進行し関節全体に変形が及ぶ変形性関節症（Osteoarthritis：OA）を引き起こすと考えられている¹⁶。関節軟骨損傷の自然経過に関しては幾つかの臨床報告がある¹⁷⁻¹⁹。関節鏡で診断されたスポーツ選手の軟骨損傷は平均 14 年の経過観察において 56 %の症例で OA を発症し、30 歳以上の選手でその頻度は有意に高かったと報告されている¹⁷。また MRI を用いた 117 症例の 2 年間の追跡調査では 81 %の症例で軟骨欠損部の拡大、進行が認められたと報告されている¹⁹。

OA を発症すると、関節痛と可動域制限を生じ、日常生活動作に支障をきたすようになる。OA の重症度評価の国際的な分類に Kellgren-Lawrence（KL）分類がある²⁰。KL 分類はグレード 0-4 の 5 段階で表される分類であり、グレード 0 が正常で、グレード 4 が重症 OA と定義されている。2009 年の東京大学の Yoshimura らの ROAD study によると、日本における KL 分類グレード 2 以上の膝 OA 患者の罹患率は、60 歳以上では、男性の 47.0 %、女性の 70.2 %と報告されており、日本全体で 2000 万人以上の罹患者がいると推定されている³。限局した関節軟骨損傷を適切に治療することにより、OA を予防する、あるいは進行を遅らせることが治療における重要な点である。現在、関節軟骨損傷に行われている治療法としては、骨髄刺激法、自家軟骨移植術、培養軟骨細胞移植術などがある⁴。

1.2. 関節軟骨損傷の治療法

1.2.1. 骨髄刺激法

骨髄刺激法は関節鏡下に鋼線やマイクロフラクチャーオウルを用いて関節軟骨損傷部の母床の軟骨下骨に小さな孔をあけることで軟骨損傷部に血液と骨髄液の流出を促す治療方法である。これにより骨髄に含まれる間葉系幹細胞を軟骨損傷部に誘導して損傷部を修復させることができる²¹。骨髄刺激法は比較的小さい面積の関節軟骨損傷では最もよく行われている手術治療法である。骨髄刺激法は関節鏡視下で行えるため低侵襲であり、短期的には比較的良好な治療成績が報告されている²²⁻²⁴。またプロレベルのアメリカンフットボール選手に

において、骨髄刺激法により 76 %がスポーツ復帰することが可能であったとする報告がある²⁵。

しかしながら、骨髄刺激法により修復される組織は、もともとの硝子軟骨組織ではなく、主に線維性組織や硝子軟骨が一部混在した線維軟骨組織である^{22, 24, 26-28}。このような線維性組織や線維軟骨を含む組織は力学的に硝子軟骨よりも劣ることがわかっている¹⁵。骨髄刺激法を 15 年間にわたって長期経過観察した報告においては、32.5 %が再手術を必要とし、再手術を必要としなかった患者においても 48 %が KL 分類グレード 2 以上の変形性関節症に至ったと報告されている²⁹。

骨髄刺激法の臨床成績は短期的には比較的良好であるが、正常な硝子軟骨組織での修復が得られないために長期的には不良となる傾向があり、正常な軟骨組織やそれに近い力学特性を持つ材料での修復が必要である。

1. 2. 2. 自家骨軟骨柱移植術

自家骨軟骨柱移植術は非荷重部から専用のパンチを用いて関節軟骨と軟骨下骨を一塊にして円柱状に採取し、関節軟骨損傷部に自家移植する手術治療法である^{30, 31}。自家骨軟骨柱移植術が骨髄刺激法よりも優れている点は、表面が正常に近い硝子軟骨組織で治療できることである。

自家骨軟骨柱移植術の治療成績としては、観察期間 10 年で大腿骨の 92 %、脛骨の 87 %、膝蓋大腿関節の 79 %で良好な成績が得られていたとの報告がある³²。また 85 %で良好な成績が得られたとする報告がある³³。

しかしながら、自家骨軟骨柱移植術にも課題がある。最大の問題は、骨軟骨柱を採取するために正常な関節軟骨を取り除いてしまうことである。治療する軟骨損傷部の面積とほぼ同じ面積の健全な関節軟骨を採取する必要があり、採取部の関節軟骨に変性変化が起きてしまう。一般的な採取部は大腿骨滑車の内側や外側であるが、骨軟骨柱の採取後に同部位の変性が進み、疼痛や礫音が生じる原因となる。また骨軟骨柱の採取は非荷重部に限られており、採取量に限界がある。自家骨軟骨柱移植術では骨軟骨を一塊にして移植するにも関わらず、組織学的には移植した関節軟骨内の軟骨細胞の 24 %はネクロシスやアポトーシスにより死滅すると報告されている³⁴。ウサギモデルを用いた動物実験において、移植した骨軟骨柱内の死滅した軟骨細胞の周囲の細胞外マトリックスには変性変化が起きていたと報告されている³⁵。

1. 2. 3. 培養軟骨細胞移植術

培養軟骨細胞移植術は二期的に行う手術治療法で、1 回目の手術で正常関節軟骨を採取して軟骨細胞を体外で培養して増殖させた後に、2 回目の手術で培

養した軟骨細胞を関節軟骨損傷部に移植する治療法であり、1994 年に Brittberg らが最初に考案し報告した治療法である³⁶。培養軟骨細胞移植術の優れた点は、体外で細胞を増殖させることができるため、採取した軟骨よりも広い範囲の病変を治療することが可能である点であり、4cm²以上の大きな軟骨損傷病変も治療することが可能である。

培養軟骨細胞移植術の治療成績としては、観察期間 19 カ月で 88 %³⁷、観察期間 4 年で 76 %³⁸ の患者で良好な成績が得られたと報告されている。さらに長期の経過報告でも、Mosely らは 6-10 年で 69 %に改善が得られ、10 年生存率も 83 %であったと報告している³⁹。Peterson らも平均 12.8 年で 74 %の症例で良好であったと報告している⁴⁰。

しかしながら、培養軟骨細胞移植術にも課題がある。まずは合併症の問題がある。移植した軟骨細胞が生体に生着せずに脱落したという報告や、移植した軟骨細胞が肥大化してしまい再手術を必要としたという報告がある⁴¹。Peterson らは、平均 4.2 年の観察期間において、大腿骨の 92 %、膝蓋骨の 65 %で良好な成績が得られたが、無症状なものも含めた合併症の発生率は全体の 51 %であり決して低くなかったと報告している⁴²。この方法は、体外で軟骨細胞を培養するために約 1 カ月の期間が必要であり、さらに専用の施設と高いコストは医療経済的にも負担が大きい。また最低でも 2 回の手術を必要とすることはこの治療法の欠点である。

2. 人工軟骨に必要な基盤材料の開発

2.1. 人工軟骨

2.1.1. 治療法としての概念

人工軟骨の治療法としての概念は、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治療法である。人工軟骨による治療が実現すれば、骨髓刺激法や自家骨軟骨柱移植術などでは治療できない大きな軟骨損傷病変も、最低限の侵襲で、1 回の手術で治療できるようになる。このように人工軟骨を用いた治療には多くの利点があり、その開発を夢見て、長年、整形外科領域で開発研究が行われてきた。

人工軟骨は人体の中で長期にわたって機能することが求められるため、生物学的安全性に加え、様々な優れた性質を備えていることが必要である。発癌性が無いこと、抗原性が無いこと、毒性が無いこと、血液凝固や溶血を起こさないこと、代謝異常を起こさないこと、生体内安定性（耐熱性、耐寒性、耐放射線性、耐薬品性、経時安定性を含む）があること、生体組織適合性（炎症反応や免疫反応が起きないこと）があることなどの安全性が保証されている必要がある。

さらに人工軟骨材料に求められる条件としては、正常軟骨と同程度の高い強度と弾性、耐疲労性、耐摩耗性、可滅菌性、物質透過性、生体接着性などの特性が必要となる。具体的には、力学特性として、荷重に耐えられる十分な強度と弾性、繰り返し負荷に耐えられる耐疲労性が必要である。材料の表面は超低摩耗性でなければならず、相対する関節軟骨に損傷を起こさないことが求められる。製品化する際には可滅菌性である必要性がある。またこれらの特性に加えて、移植した部位の軟骨下骨に接着する生体接着性を有する必要性がある。正常な関節軟骨と同様の性質が求められる上に、移植した部位の軟骨下骨に接着する必要性があり、人骨軟骨材料の開発には多くの解決すべき課題がある。

2.1.2. 過去の人工軟骨開発の報告

人工材料を用いて、関節軟骨損傷を治療する方法は数多く研究されている。人工軟骨による治療は、埋植した人工軟骨材料が関節軟骨の機能を半永久的に代替することを目的としており、材料としては非吸収性の材料が使用される。人工軟骨に似た概念として、相対する2つの関節面のうち片側のみをチタンやバイタリウムなどの金属で置換するという治療法は1950年代から考案されている⁴³。硬材料である金属は材料力学特性として弾性率が200 GPa程度であり、正常関節軟骨の弾性率である0.25-0.90 MPaよりも遥かに高く、材料として弾力がなく硬すぎるため、相対する関節面に変性変化を来し、OAに至ってしまうことが問題であった。現在においても、コバルトクロムや酸化ジルコニウムを用いて局所の軟骨損傷を治療する動物実験が行われているが、相対する関節面に変性変化が生じてしまうことを防ぐことができていない⁴⁴。他の硬材料を用いた人工軟骨開発の例としては、ポリエチレン（PE）を基材に用いた研究が行われているが^{45,46}、PEも材料力学特性として硬すぎるために軟骨の代替材料としては適していない。

正常な関節軟骨の構造は、前述の通り、重量の70-80%が水分であり、コラーゲン線維とプロテオグリカンによる三次元網目構造を有している。したがって、人工軟骨に用いる材料としては、関節軟骨のように高い水分含有率と三次元網目構造を有している「ハイドロゲル」などの軟材料が適していると考えられるようになった。ハイドロゲルは材料内の水分の移動が可能であるため、正常関節軟骨が持つ物質透過性も確保されている。

ハイドロゲルを用いて人工軟骨開発を試みた世界で最初の報告は1973年のBrayらの報告であり、実験にはポリビニルアルコール（PVA）というハイドロゲルが用いられた⁴⁷。PVAは軟骨と同様に高い水分含有率を有しているために人工軟骨として期待され、PVAを用いた研究が次々に行われたが、いずれの報告においても、強度が低すぎることで、耐疲労性が低いこと、耐摩耗性が不十分であること、骨との接着性が得られないことなどが課題として残った⁴⁸⁻⁵⁰。PVA

を用いた人工軟骨の研究は継続して行われ、ようやく 2016 年に FDA (Food and Drug Administration) により、荷重がほとんどかからない小関節である中足趾関節間関節に限定して使用することが認可された⁵¹。しかしながら、膝関節や股関節などの大関節の過酷な環境下にある関節軟骨病変への使用は認められておらず、これらの関節にも適用できる十分な強度を有するハイドロゲルの開発が必要とされている。

人工軟骨に適した軟材料として、より高い強度の材料が求められ、PVA の他に、ポリメチルメタクリレート (PMMA)、ポリウレタン (PU)、N,N-ジメチルアクリルアミド (DMMAm)、N-ビニルピロリドン (NVP)、メタクリル酸テトラヒドロフルフリル (TMA)、ポリエチレングリコール (PEG) などの様々な人工軟骨材料の開発研究がなされた⁵²。しかしながら、正常軟骨と同等レベルの力学特性を有するハイドロゲルの開発には至っていない。さらに骨との生物学的接着を可能としたハイドロゲルも開発されていない。

2.2. ハイドロゲルの生体材料学

2.2.1. ハイドロゲルの生体材料学的特徴

ハイドロゲルとは三次元状の網目構造を持つ高分子が水を含んで膨らんだ物質の総称である。正常な関節軟骨はコラーゲン線維とプロテオグリカンによる三次元網目構造の中に水分を留めている構造を有しており、ハイドロゲルに似た構造であると言える。ハイドロゲルは基材に用いる分子やその膨潤度によりその水分含有率が変化する。医療分野において、人工的に作製したハイドロゲルの臨床応用が最も進んでいる分野として、眼科領域のコンタクトレンズが挙げられる。コンタクトレンズは眼球角膜の表面に接触して使用する器具であり視力の改善に用いられる。コンタクトレンズは、あくまで体外に使用する治療具であり、頻回な交換が可能であるため、人工軟骨とは異なり高い強度は必要とされない。ハイドロゲルを体内に用いる場合は、高い強度が求められる。世界中で開発研究が行われているが、生体適合性があり高い強度を有するハイドロゲルの開発には至っていない。

2.2.2. 北海道大学における人工軟骨開発に関する研究

正常な関節軟骨はコラーゲン線維とプロテオグリカンからなる三次元複合体であるため、人工軟骨を開発するためには、三次元構造を有する強度の高いハイドロゲルを作製する必要がある。2003 年に、共同研究者の Gong らは第一ネットワークとして硬くて脆い性質を持つ高分子化合物を架橋して三次元網目構造を持たせた後に、第二ネットワークとして柔軟性を持つ高分子化合物を重

合させるという、two-step sequential polymerization method という方法を用いて、高い強度を持つ DN ゲルを合成する技術を開発し報告した⁵。さらに Gong らは、DN ゲルの高い強度は犠牲結合という分子間の特殊な構造によってもたらされることを発見し、高分子科学領域に大きなインパクトを与えた。その後、2005 年に、当教室の Yasuda らは上記の手法を用いて合成した 4 種類のゲルに対して、pin-on-flat 繰り返し摩耗試験を行い、新たに開発した PAMPS/PDMAAm DN ゲルの耐摩耗性が最も高い結果を得て、この DN ゲルが人工軟骨材料として最も有望であることを報告した⁶。PAMPS は陰性電荷を持つ高分子であり硬くて脆い性質を持つのに対し、PDMAAm は電荷が中性の高分子であり柔軟性を持つ。シングルネットワークゲルである PAMPS ゲルの破断強度は 0.4 MPa と低い、PAMPS をダブルネットワーク化させた PAMPS/PDMAAm DN ゲルの破断強度は 3.1 MPa であり極めて高い値を示した^{5,6}。正常な関節軟骨の弾性率は 0.25-0.90 MPa^{10,11} であり、荷重時には関節軟骨に 2.6-8.0 MPa の圧縮応力がかかると報告されており¹²⁻¹⁴、DN ゲルは関節軟骨と比較して相応の力学的強度を有していると考えられた。DN ゲルは摩擦係数が 10^{-2} - 10^{-3} であり、正常軟骨 (10^{-2}) と同程度に摩擦係数が低い⁵³。さらに共同研究者らは、ex vivo における DN ゲルと正常軟骨の摩擦係数が 0.029 であり、正常軟骨と正常軟骨の間の摩擦係数の 0.188 と比較して有意に低かったと報告している⁵⁴。また DN ゲルを動物に用いた生体適合試験では炎症反応がほとんど起きず生体適合性が高いことが示された^{55,56}。さらに、この DN ゲルを人工軟骨としてウサギの大腿骨滑車に埋植する実験において、埋植後 12 週の期間内では、相対する膝蓋骨の関節軟骨にほとんど変性や損傷を起こさなかった⁵⁴。DN ゲルは、生体適合性、強度、耐疲労性、耐摩耗性、相対する軟骨への影響という点において、過去に人工軟骨として期待されていた他のどの材料よりも優れており、人工軟骨材料としての応用が期待されている。

しかしながら、DN ゲルを臨床応用する際に問題となるのが、「骨との強固な固着が得られていない」という点である。DN ゲルに限らず、一般的に、ハイドロゲルは高い水分含有率を有しているため、骨組織に接着しない性質を有している⁵⁷⁻⁵⁹。実際に DN ゲル上で細胞を培養すると、細胞は弱い力で容易に DN ゲルから剥がれてしまい、細胞が接着しにくい性質を有していることが確認されている⁶⁰。人工材料を体内に埋植する場合、生体に固着する生体接着性を有していることが不可欠である。そこで、我々は、DN ゲルを骨組織に接着させる方法を模索し、軟骨石灰化層および骨組織に含まれているハイドロキシアパタイト (HAp) を含む DN ゲルという新しいゲルを開発することを計画した。

2.3. ハイドロキシアパタイト (HAp) の生体材料学

2.3.1. HAp の特徴

我々は DN ゲルを骨組織に接着させるために、石灰化層および骨組織の主成分の一つである HAp に着目した。HAp は $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ という化学式で表されるカルシウムとリン酸からなる無機物であり、リン酸カルシウム塩の中で最も安定な形とされている。HAp の歴史は古く、1856 年には HAp に類似したリン酸カルシウム塩の報告がある。1964 年に X 線回折により HAp の結晶構造が同定され、六角柱の形状の無機物結晶であることが判明した⁶¹。

動物の骨組織は I 型コラーゲン鎖を HAp が架橋することによってできたコラーゲンと HAp の複合体である。HAp は骨の主成分であるため、HAp を用いて骨に関連した疾患を治療する研究は古くから行われている。1920 年に世界で最初に、HAp に類似したカルシウムとリン酸の複合体を動物に移植する実験が行なわれ、その高い骨伝導性が報告された⁶²。HAp 単体を骨に埋植すると高い強度で接着することが報告されている^{63,64}。HAp は骨の主成分であるため骨組織との親和性が高く、また HAp は人工的に作成することが可能な物質であり、すでに整形外科領域、歯科領域で広く臨床応用されている。HAp が骨組織に接着するメカニズムの 1 つに、HAp がカルシウムイオンやリン酸イオンを骨芽細胞に提供することで骨新生が起きるということが知られている⁶⁵⁻⁶⁸。

2.3.2. HAp コーティングに関する研究の歴史

特定の物質を骨に接着させる際に、高い骨伝導性を示す HAp で物質をコーティングするという手法が開発されておりすでに臨床応用されている。金属の表面に HAp をコーティングする方法は 1969 年に開発され⁶⁹、現在では様々な HAp コーティング手法が報告されている^{70,71}。実際に HAp で金属表面をコーティングすることで金属と骨の強固な固着が得られることが知られている⁷²⁻⁷⁴。

金属を HAp コーティングする手法をハイドロゲルに応用することで、ハイドロゲルを骨組織に接着させることを試みた研究も過去に行われている。しかしながら、PVA ハイドロゲルに HAp を複合化した報告では、もともと PVA の強度が弱いために骨との十分な接着を力学的に評価することが出来ていない⁷⁵⁻⁷⁷。我々が開発した高強度ハイドロゲルである DN ゲルに HAp を複合化させることができれば、世界で初めてハイドロゲルを骨と接着させることが出来、高い強度ゆえにその接着性を力学的に評価できる可能性があると考えた。我々は、HAp コーティング手法の 1 つであるバイオミネラリゼーションを応用することで、HAp を DN ゲル表層に複合化した HAp/DN ゲルを新たに開発する研究を行うに至った。

III. 本研究の目的

本研究には2つの目的がある。

1つ目の目的は、DN ゲル表層に HAp を複合化させた HAp/DN ゲルを開発することであり、in vitro 環境における材料特性を評価することである。

2つ目の目的は、HAp/DN ゲルの in vivo 環境における骨接着性を評価することである。

IV. 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AMPS	2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid
ANOVA	Analysis of variance
CT	Computed tomography
DMAAm	N,N'-dimethyl acrylamide
DN	Double network
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FDA	Food and drug administration
FE-TEM	Field-emission transmission electron microscopy
HAp	Hydroxyapatite
HAp/DN	Hydroxyapatite coated double network hydrogel
HE	Hematoxylin-eosin
HU	Hounsfield unit
KL	Kellgren-Lawrence
L-D	Load-displacement
MBAA	N,N'-methylenebisacrylamide
MMA	Methyl methacrylate
NVP	N-vinyl pyrrolidone
OA	Osteoarthritis
PAMPS	Poly-(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid)
PBS	Phosphate buffered saline
PDMAAm	Poly-(N,N'-dimethyl acrylamide)
PE	Polyethylene
PEG	Polyethylene glycol
PMMA	Polymethyl methacrylate
PU	Polyurethane
PVA	Polyvinyl alcohol
QOL	Quality of life
ROI	Region of interest
S-S	Stress-strain
TG-DTA	Thermogravimetric differential thermal analysis
TMA	Tetrahydrofurfuryl methacrylate

V. 実験方法

1. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの作製方法

1.1. DN ゲルの作製方法

PAMPS/PDMAAm DN ゲルの合成には、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) という方法を用いた⁵。合成するための原料には、2-アクリルアミド-2-硫酸化メチルプロパン (AMPS) (Toagosei Co. Ltd., Japan) と N,N'-ジメチルアクリルアミド (DMAAm) (KOHJIN Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。第一ネットワークである PAMPS ゲルを合成する方法を示す。2つのガラス板で挟まれたセルに PAMPS のモノマーである AMPS を注入し、架橋剤として 4 mol% N,N'-メチレンビスアクリルアミド (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を加え、開始剤として 0.1 mol% 2-オクソグルタル酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を加えて、アルゴンガス環境下に紫外線 (波長 365 nm) を 8 時間照射し、ラジカル重合させた。これにより板状の PAMPS ゲルが合成された。この板状の PAMPS ゲルを、0.1 mol% MBAA と 0.1 mol% 2-オクソグルタル酸を含んだ DMAAm 水溶液 (2 mol/L) に浸して、24 時間かけて平衡状態にした。その後、板状の PAMPS ゲルを 2 枚のガラス板の間に置いて、アルゴンガス環境下 (60 °C) で紫外線を 8 時間照射して、PAMPS ゲルの網目構造内に第二ネットワークである PDMAAm を重合させることで、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを合成した。この DN ゲルを 1 週間かけて純水に浸した。1 日 2 回の頻度で溶液を取り替えて未反応物質を取り除いた。完成した厚さ 10 mm の板状の PAMPS/PDMAAm DN ゲルから、直径 4.5 mm のパンチを用いて径 4.5 mm 厚さ 10 mm の円柱プラグをくり抜いた。DN ゲル円柱プラグの両端を 2.5 mm ずつ切り落として、本実験に用いる径 4.5 mm 厚さ 5 mm の DN ゲル円柱プラグを作製した (図 2)。ゲルを実験に使用する 1 週間前から、0.9% NaCl 溶液に浸して保管した。

1.2. HAp/DN ゲルの作製方法

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、DN ゲル円柱表層に HAp 層を析出させた⁷⁵。径 4.5 mm 厚さ 10 mm の DN ゲル円柱プラグを 1 M のトリス緩衝液に浸して pH 9.0 のアルカリ性に調整した。ついで 300 mM の K_2HPO_4 溶液に 110 秒間浸し、純水で 10 秒間洗浄し、500 mM の $CaCl_2$ 溶液に 110 秒間浸し、純水で 10 秒間洗浄した。この交互に浸すサイクルを 5 回繰り返した (図 3)。それにより DN ゲル円柱プラグの表層に約

500 μm の厚さで HAp が析出された HAp/DN ゲル円柱プラグを作製した。その後、円柱の両端を 2.5 mm ずつ切り落として、本実験に用いる径 4.5 mm 厚さ 5 mm の HAp/DN ゲル円柱プラグを作製した (図 2)。円柱側面は白色の HAp 層があり、円柱の両底面の大部分には透明な DN ゲル層が露出していた。ゲルを実験に使用する 1 週間前から、0.9% NaCl 溶液に浸して保管した。

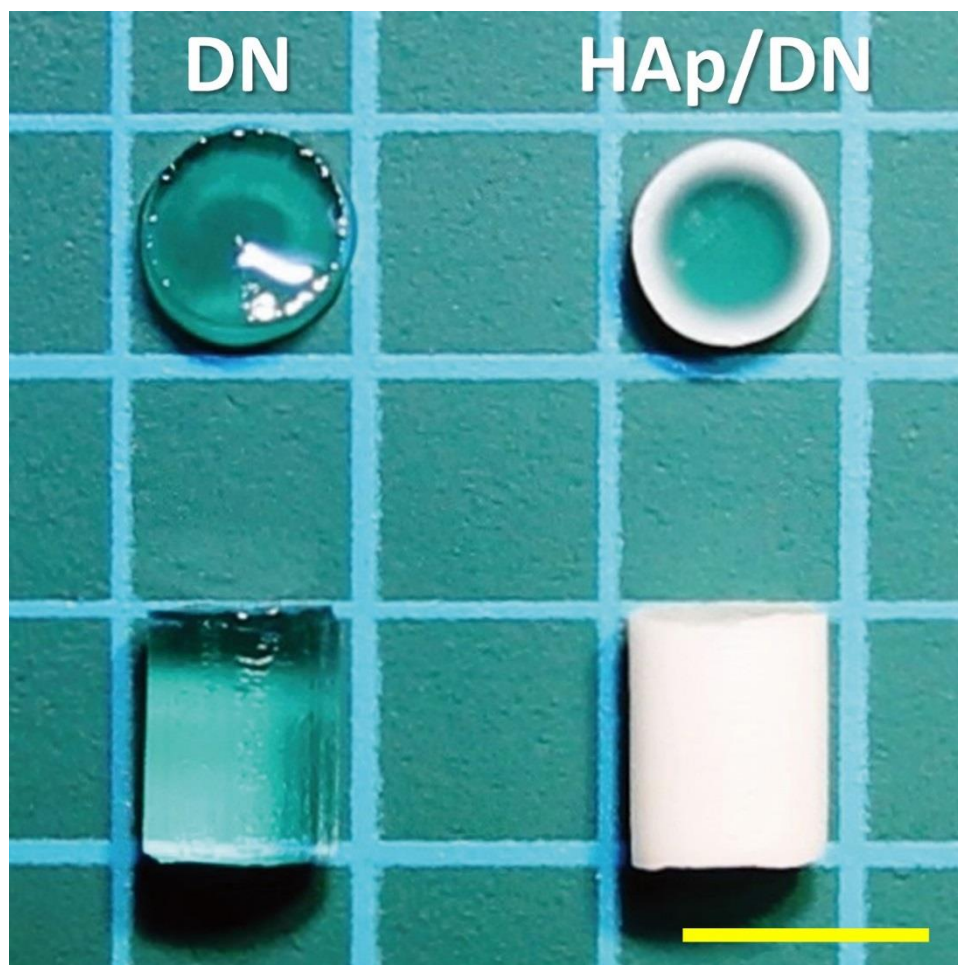


図 2. DN ゲルおよび HAp/DN ゲル
上段はゲルの断面図。下段はゲルの側面図。
スケールバーは 5 mm を示す。

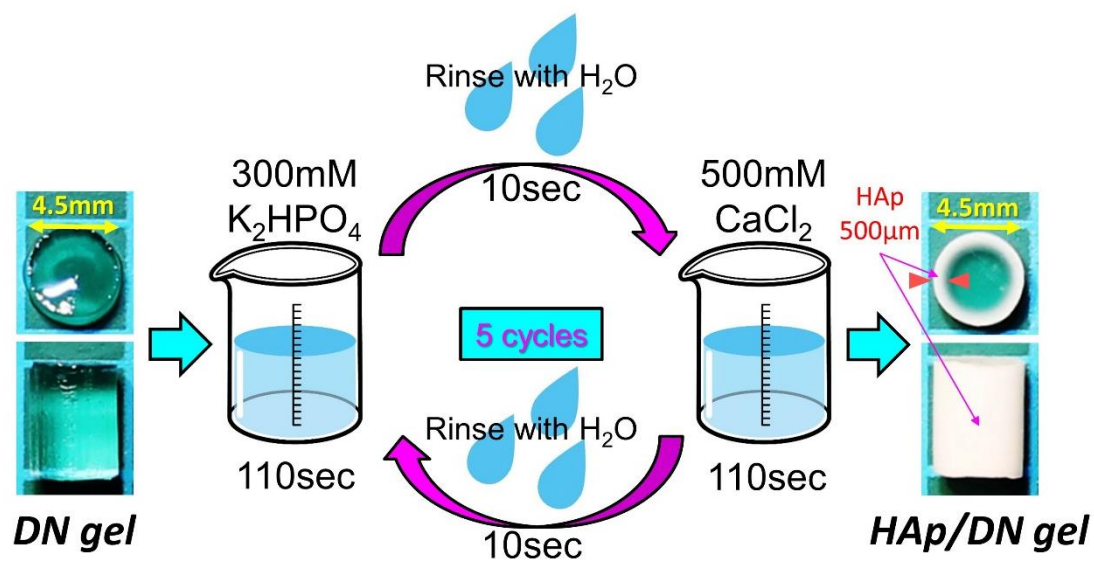


図 3. HAp/DN ゲルの作製方法

径 4.5 mm 厚さ 10 mm の DN ゲル円柱プラグを 1 M のトリス緩衝液に浸して pH 9.0 のアルカリ性に調整した。ついで 300 mM の K_2HPO_4 溶液に 110 秒間浸し、純水で 10 秒間洗浄し、500 mM の $CaCl_2$ 溶液に 110 秒間浸し、純水で 10 秒間洗浄した。この交互に浸すサイクルを 5 回繰り返した。それにより DN ゲル円柱プラグ表層に約 500 μm の HAp 層が形成された HAp/DN ゲル円柱プラグを作製した。

2. 研究デザイン

本研究は以下の 2 つの研究から構成されている。

2.1. 研究 1 : in vitro における HAp/DN ゲルの材料特性評価

最初に 14 個の HAp/DN ゲル円柱プラグと 14 個の DN ゲル円柱プラグを用いて in vitro 環境での材料特性評価を行った。ゲル円柱プラグを 3 個ずつ用いて、von Kossa 染色を行い、マイクロレベルでの顕微鏡観察を行った。ゲルプラグを 3 個ずつ用いて、電界放射型透過電子顕微鏡 (FE-TEM) でナノレベルの観察を行った。ゲル円柱プラグを 3 個ずつ用いて、熱重量-示差熱分析 (TG-DTA) を行い、含水率、有機物重量比率、無機物重量比率を測定した。最後にゲル円柱プラグの残り 5 個ずつを用いて、圧縮破壊試験を行い力学的な評価を行った。

2.2. 研究 2 : in vivo における HAp/DN ゲルの骨接着性評価

2 つ目の研究として、in vivo 環境での骨接着性を評価する研究を行った。この研究には 58 羽の日本白色家兎 (月齢 6 カ月) (3.98 ± 0.58 kg) を用いた。動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、医学研究科付属動物実験施設にて行った。全身麻酔下に、ウサギ両側大腿骨滑車に径 4.3 mm 深さ 7 mm の骨軟骨欠損を作製した。最初に骨軟骨欠損の底部にマーカージェルを埋植し、その上に厚さ 5 mm の DN ゲル円柱プラグまたは HAp/DN ゲル円柱プラグを無作為に埋植した。

術後 1 週、2 週、4 週、12 週の時点で、13 羽ずつ致死量のペントバルビタールを経静脈的に投与して安楽死させ両大腿骨遠位部を採取した。各時点で、6 検体ずつ組織学的評価および免疫組織化学的評価に用いた。組織学的評価としては、各時点で 3 検体ずつ非脱灰標本による Villanueva 骨染色を行い、ゲルと骨組織の境界を組織学的に評価した。また各時点で 3 検体ずつ脱灰標本を用いて、Hematoxylin-eosin 染色 (HE 染色) と I 型プロコラーゲン抗体を使用した免疫組織化学染色を行い顕微鏡で観察した。各時点での残り 7 検体ずつを押出し力学試験に用いて力学的評価を行った。また、組織標本に提出する前の各時点 6 検体ずつ、および押出し力学試験後の各時点 7 検体ずつをそれぞれ高解像度マイクロ CT により画像評価した。

術後 1 週と 4 週時点では、さらに 3 検体ずつ両大腿骨遠位部を採取し、FE-TEM を用いてゲルと骨との接着をナノレベルで観察した。

3. 手術方法

研究2における手術方法の詳細を示す。経静脈的にペントバルビタール（25 mg/kg）を投与して麻酔を導入し、フェイスマスクにより3-5%ハロタンを含む酸素ガスを投与しながら全身麻酔をかけた状態を維持して手術を行った。ウサギの両下肢を剃毛した後に、専用の手術台に乗せて仰臥位とした。両下肢は固定せずに可動できる状態とした。両下肢をイソジン消毒した後にドレーピングして清潔野を作製した。膝前面の皮膚を2 cm程度の長さで縦切開し、内側傍膝蓋アプローチを用いて膝関節を展開し、膝蓋骨を外側に脱臼させて大腿骨滑車を露出させた。両側大腿骨滑車に径4.3 mmのドリルを用いて、径4.3 mm深さ7 mmの骨軟骨欠損を作製した。最初に骨軟骨欠損の底部に厚さ2 mmのマーカージェルを埋植し、その上にゲル最表面が関節面と一致するように径4.5 mm厚さ5 mmのDNゲル円柱プラグまたはHAp/DNゲル円柱プラグを無作為に埋植した（図4）。マーカージェルは以下の2つの目的のために使用した。1つ目の目的はゲル円柱プラグの底面が骨と接着しないようにするためである。2つ目の目的は下記の押出し力学試験の際の目印にするためである。ゲルを埋植した後に、膝蓋骨を元の位置に整復して閉創した。術後は、外固定を用いず、ケージ（310×550×320 mm）内で飼育した。

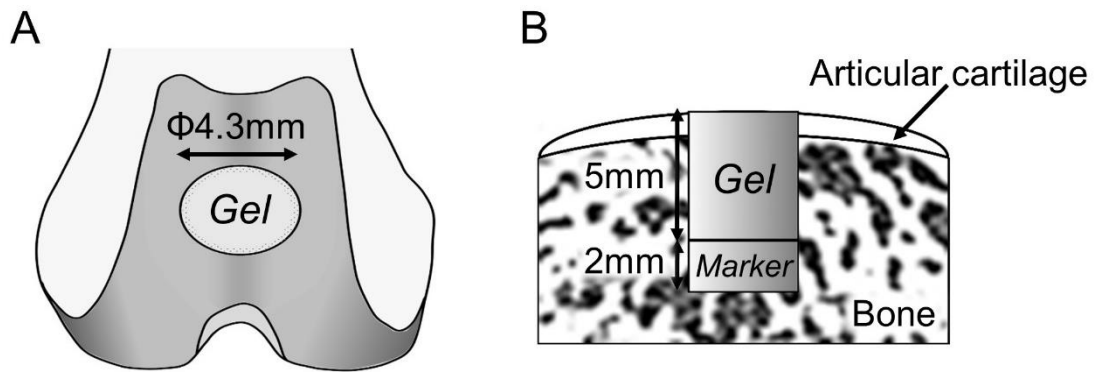


図 4. 手術方法

- A. 大腿骨滑車部の中央に径 4.3 mm の深さ 7 mm の骨軟骨欠損を作製し、ゲルを埋植した。
- B. 大腿骨滑車部にゲルを埋植した後の横断面。厚さ 2 mm のマーカーゲルの上に厚さ 5 mm のゲルを関節面と一致するように埋植した。

4. 評価方法

4.1. von Kossa 染色

DN ゲル円柱プラグと HAp/DN ゲル円柱プラグを 20 %中性緩衝ホルマリンに 3 日間固定しパラフィン包埋した。脱灰処理は行わなかった。ゲル円柱プラグの軸に対して垂直にゲルを切って厚さ 5 μm の標本を作製し von Kossa 染色を行った。5 %硝酸銀溶液に室温で 35 分間浸した後に、5 %チオ硫酸ナトリウム溶液に 5 分間浸した。純水で洗浄し、neutral red で対比染色し顕微鏡観察に用いた。

4.2. 電界放射型透過電子顕微鏡 (FE-TEM)

埋植前の DN ゲル円柱プラグと HAp/DN ゲル円柱プラグを FE-TEM (JEM-2100F, JEOL, Japan) を用いて観察した。ゲル円柱プラグを PBS (Phosphate buffered saline) に 4 週間浸した後に FE-TEM 観察を行った。ゲル円柱プラグを液体窒素で凍結乾燥し、自動凍結代替装置 (EM AFS2, Leica Microsystems, Germany) を使用してゲルに含まれる水分を acrylic resin (London Resin White, London Resin Co., UK) で置換した。ダイヤモンドナイフを備えたウルトラミクロトーム (EM UC7i, Leica Microsystems, Germany) を用いて厚さ 100 nm の切片を作製し銅製のメッシュグリッドに設置した。FE-TEM 観察には 200 kV の電圧を用いた。

また埋植後の 1 週と 4 週時点の検体も同様の方法で FE-TEM を用いて観察した。

4.3. 熱重量-示差熱分析 (TG-DTA)

熱重量測定装置 (Thermo plus Evo, Rigaku, Tokyo, Japan) を用いて TG-DTA を行った。ゲル円柱プラグを白金製専用台に乗せて、窒素環境下に 25 $^{\circ}\text{C}$ から 600 $^{\circ}\text{C}$ まで 10 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で加熱して、重量の変化量および発生した熱量を測定した。熱量がマイナスを記録している領域での重量の変化分を水分重量とした。600 $^{\circ}\text{C}$ で残存した重量を無機物重量とした。全重量から水分重量および無機物重量を差し引いた重量を有機物重量とした。水分、無機物、有機物の全体に対する重量比率を計測し、含水率、無機物含有率、有機物含有率とした (図 5)。

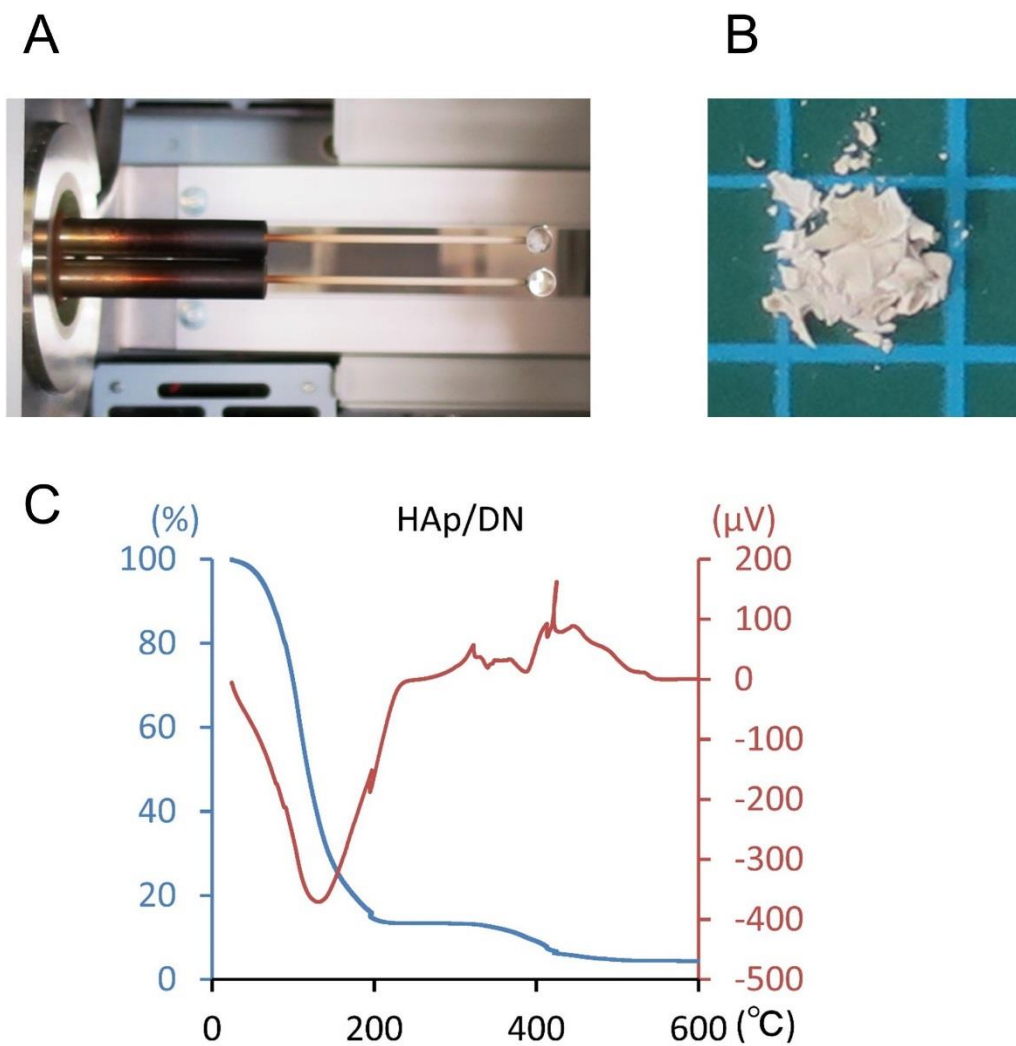


図 5. 熱重量-示差熱分析 (TG-DTA) の方法

- A. ゲルサンプルの入った白金製専用台を精密重量計に設置した。
- B. TG-DTA 後のサンプルの写真を示した。HAp/DN ゲルの焼け残りは無機物の灰となっていた。
- C. TG-DTA で得られた波形の代表例を示した。

4. 4. 圧縮破壊試験

力学試験装置 (Tensilon RTC-1310A, Orientec, Tokyo, Japan) を用いて、ゲルプラグの圧縮破壊試験を行い、得られた応力ひずみ (Stress-Strain: S-S) 曲線から、最大破断強度 (Ultimate Stress)、破断ひずみ (Strain at Failure)、弾性率 (Tangent Modulus) を測定した。厚さ 5 mm の円柱ゲルプラグを半分の厚さに切って、径 4.5 mm 厚さ 2.5 mm に採型したゲルを作製し、圧縮破壊試験に用いた。厚さ 2.5 mm のゲルプラグを下部加圧板に置き、ロードセルに接続した上部加圧板を 10 %ひずみ/分の速度で圧縮した。実験に際して、加圧板とゲルの間の摩擦を最小限にするためにシリコン油を塗布した。ひずみはゲルの厚さを 100 %とした際の減少率とした。応力は得られた荷重をゲルの初期断面積で除した数値とし、最大破断強度は応力ひずみ曲線のピーク値とした。弾性率は得られた S-S 曲線の 0-10 %での曲線の傾きとした (図 6)。

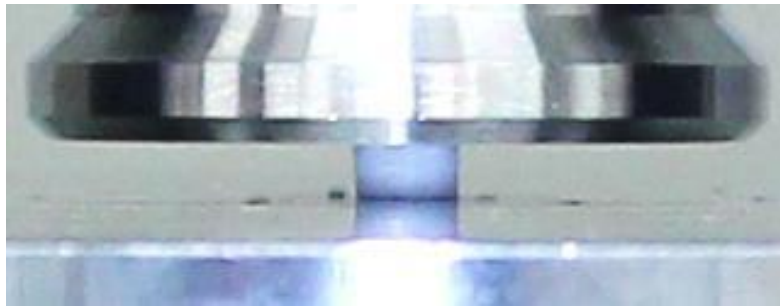


図 6. 圧縮破壊試験の方法

10 %ひずみ/分の速度でゲルの圧縮破壊試験を行った。

4.5. Villanueva 染色

採取した大腿骨遠位部検体を 70 %エタノールで固定し Villanueva 染色液に 7 日間浸し、濃度調整したエタノールとアセトンを用いて脱水処理し、methylmethacrylate (MMA) (Wako Chemicals, Kanagawa, Japan) に包埋した。脱灰処理は行わなかった。専用のミクロトーム (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) を用いて、大腿骨骨軸と平行に矢状断の方向に検体を切って厚さ 5 μm で切片を作製し、顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。

4.6. Hematoxylin-eosin 染色 (HE 染色)

採取した大腿骨遠位部検体を 20 %中性緩衝ホルマリン溶液に 3 日間浸して固定し、50 mM の EDTA 溶液に 3-4 週間浸して脱灰し、パラフィンに包埋してブロックを作製した。大腿骨骨軸と平行な矢状断の方向でパラフィンブロックを切って厚さ 10 μm の切片を作製した後に HE 染色を行い、顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。

4.7. I 型プロコラーゲン免疫組織化学染色

採取した大腿骨遠位部検体を 20 %中性緩衝ホルマリン溶液に 3 日間浸して固定し、50 mM の EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 溶液に 3-4 週間浸して脱灰し、パラフィンに包埋してブロックを作製した。大腿骨骨軸と平行な矢状断の方向でパラフィンブロックを切って厚さ 10 μm の切片を作製した。1 次抗体 (anti-pro-collagen 1A1 (A-17): sc-25973, purified goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA) と 2 次抗体 (biotinylated rabbit anti-goat IgG antibody: BA-5000, Vector Laboratories, California, USA) を使用して I 型プロコラーゲン免疫組織化学染色を行い、hematoxylin で対比染色し、顕微鏡 (BZ-9000, KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。

4.8. 押出し力学試験

採取した大腿骨遠位部後面の骨皮質をリウエル骨鉗子で掘削し、目印として骨孔の底部に埋植しておいた厚さ 2 mm のマーカーゲルを同定し、これを除去した。全ての押出し力学試験用の検体は生理食塩水に浸し、8 時間以内に押出し力学試験を施行した。大腿骨遠位部の関節面側を下にした状態で、骨セメント (Polymethyl methacrylate : PMMA) を用いてドーナツ型の金属製の台座に固定した。赤色レーザー光を台座に対して垂直に照射し、レーザー光がゲルの中

央を通過していることにより、骨孔に埋植してあるゲルの軸が台座に対して垂直となっていることを確認した。押出し力学試験には力学試験装置（Tensilon RTC-1310A, Orientec, Tokyo）を用い、ロードセルに取り付けた径 3.7 mm の円柱状 indenter を 1 mm/分の速度で動かして、大腿骨に埋植してあるゲルを押し出した。押出し力学試験で得られた荷重変位（Load-Displacement : L-D）曲線のピーク値を最大荷重（Maximum Load）とした（図 7）。

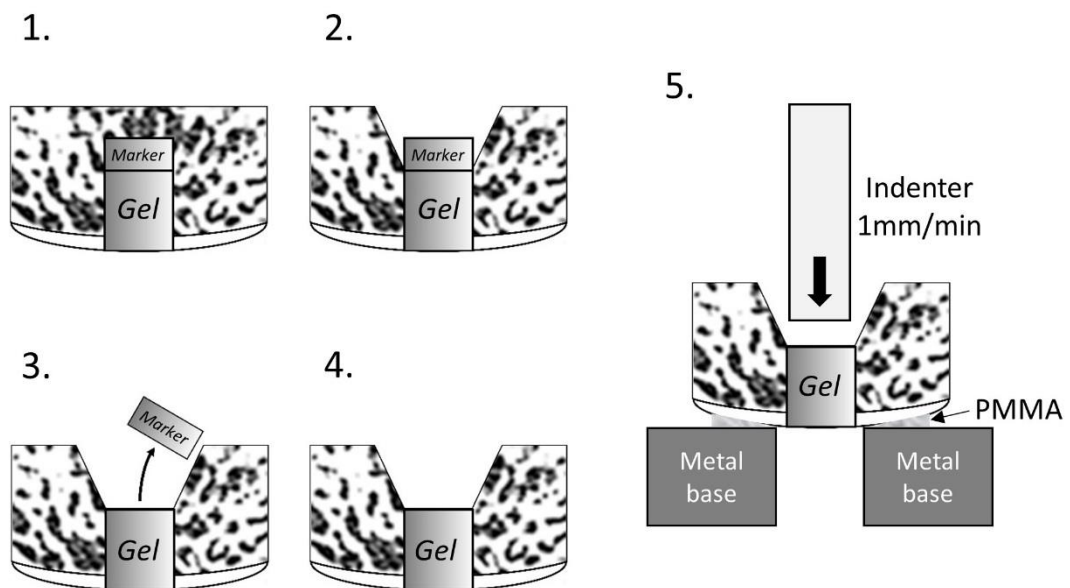


図 7. 押出し力学試験の方法

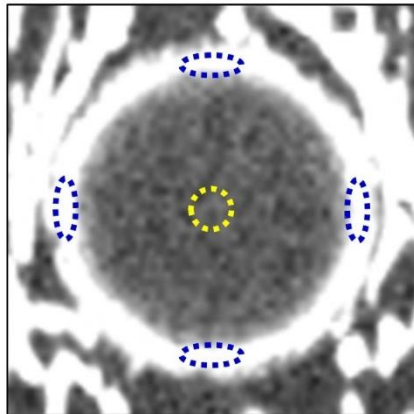
1. 採取した大腿骨遠位部検体の関節面を下向きにして置いた。
2. 大腿骨後方骨皮質をリウエル骨鉗子で掘削し、目印として骨孔の底部に埋植しておいたマーカーゲルを同定した。
3. マーカーゲルを除去した。
4. 押出し力学試験前の検体の状態を示した。
5. ドーナツ型の金属製の台座にセメント固定し 1 mm/分の速度で押出し力学試験を行った。

4.9. マイクロ CT (μ CT)

組織学的評価に使用する前的大腿骨遠位部検体と、押出し力学試験の後的大腿骨遠位部検体を、マイクロ CT (μ CT) (Latheta LCT-200, Hitachi Aloka Medical, Tokyo) を用いて評価した。 μ CT の calibration には専用の phantom を用いた。検体を 48 mm の円筒状の専用台の上に乗せ、設定はボクセルサイズ: $48 \times 96 \mu\text{m}$ 、スライス厚: $96 \mu\text{m}$ 、X 線管電圧: 50 kV とした。骨孔の軸に対して垂直な面を Axial 面と定義し、骨孔軸に平行で大腿骨軸に平行な面を Sagittal 面と定義して、画像解析ソフトウェア (ZioTerm 2009, Ziosoft, Inc, Tokyo, Japan) を用いて CT 画像を再構成して解析を行った。CT 値の設定は window level: 250、window width: 2000 とした。

各時点 6 検体ずつある組織学的評価に使用する前的大腿骨遠位部検体を用いて、ゲル内の CT 値 (Hounsfield units: HU) を計測した。関節面から 3 mm の深さでの Axial 面のスライスを利用して、ゲル中心部とゲル辺縁部に設定した関心領域 (Region of interest: ROI) の CT 値を計測した。ゲルの中心部に 0.1 mm^2 の正円の ROI を設定し、ROI 内の CT 値の平均値をゲル中心部の CT 値とした。ゲルの中心から 1.8-2.0 mm 離れた辺縁部に 0.1 mm^2 の 4 つの楕円形の ROI を設定し、ROI 内の CT 値の平均値を算出し、ゲル辺縁部の CT 値とした。参考値として、それぞれの検体的大腿骨遠位部の後方骨皮質の CT 値を計測した (図 8)。

各時点 7 検体ずつある押出し力学試験後の検体を用いて、ゲルの骨接着率を計測した。ゲルが骨孔壁に残存している領域を骨接着領域と定義し、骨孔壁全体面積に占める骨接着領域を骨接着率と定義した。 μ CT を用いて各検体の全体の骨接着率 (Bonding Area) を定量した。関節面からの距離と骨接着率の関係を調べるために、Axial 面で再構成した CT 画像を用いて、関節面から 1 mm、2 mm、3 mm および 4 mm の深さでの骨接着率 (Bonding Ratio) を計測した (図 9)。



Each circular area (ROI) = 0.1 mm²

- Center of the gel (yellow)
- Periphery of the gel (blue)

図 8. CT 値の測定方法

ゲル中心部 (Center) : 黄色の円で示した ROI 内の CT 値の平均値。

ゲル辺縁部 (Periphery) : 青色の楕円で示した 4 つの ROI 内の CT 値の平均値。

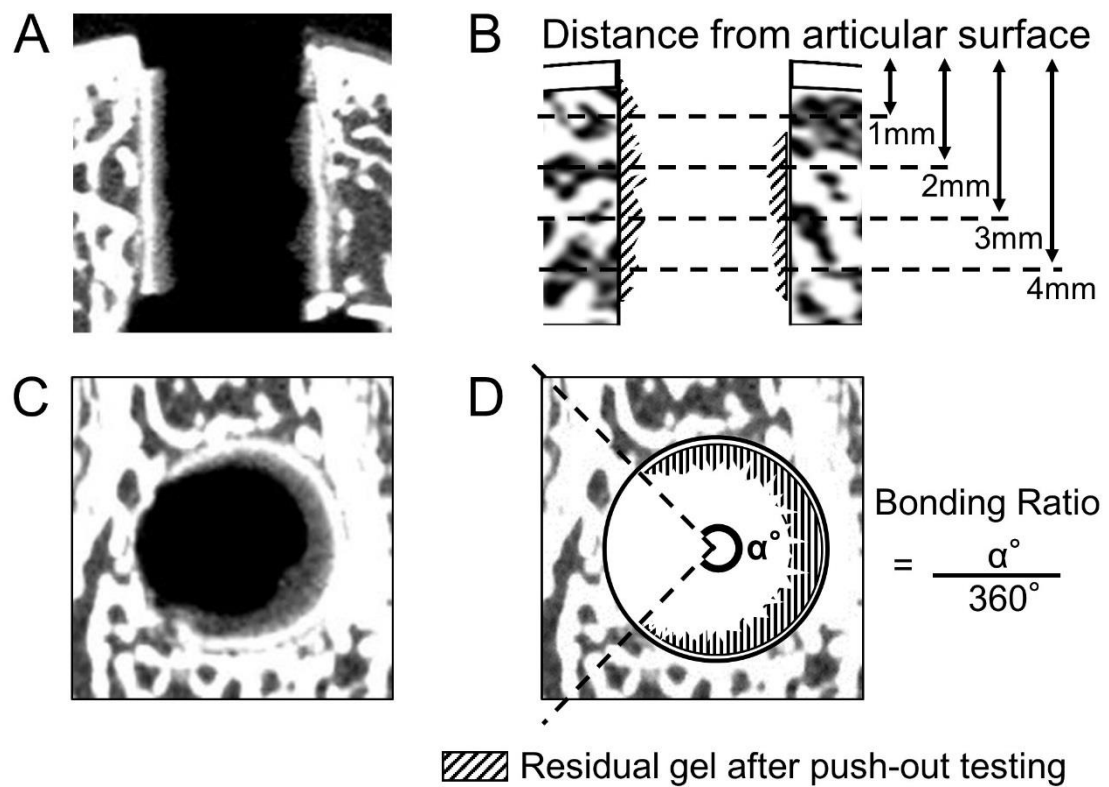


図 9. μ CT を用いた骨接着率の計測方法

- A. μ CT の Sagittal 面の再構成画像の代表例。
- B. 関節面からの距離 (Distance from articular surface) の模式図。
- C. μ CT の Axial 面の再構成画像の代表例。
- D. 骨接着率 (Bonding Ratio) の計測方法の模式図。

5. 統計学的解析

数値の表記は平均値と標準偏差とした。統計学的解析には専用ソフトウェア (JMP 11, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。TG-DTA、圧縮破壊試験の統計解析には unpaired t-test を用いた。全体の骨接着率の統計解析には、1-way ANOVA (Analysis of variance) を用い、post-hoc Tukey' s test を行った。CT 値、骨接着率、押出し力学試験の統計解析には、2-way ANOVA を用い、post-hoc Tukey' s test を行った。有意水準は 5 %とした。

VI. 結果

1. 研究 1 : in vitro における HAp/DN ゲルの材料特性評価

1.1. HAp/DN ゲル内の HAp 結晶の観察

HAp/DN ゲルの横断面の中央は透明で、辺縁部にリング状の白い HAp 層を認めた。表層の白い HAp 層は約 500 μm の厚さであった。von Kossa 染色では DN ゲル内は透明で無機物の結晶を認めなかったのに対して (図 10A)、HAp/DN ゲルでは HAp 層内に 10 μm の点状染色領域を無数に認めた (図 10B)。FE-TEM 画像により、HAp/DN ゲルの点状染色領域は、突起を有する径 200-600 nm の球型の HAp ナノ結晶の集合体であった。(図 10C)。

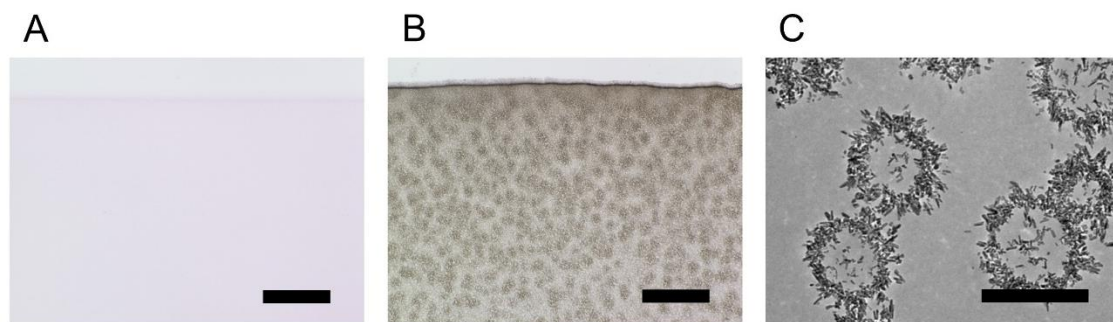


図 10. ゲルの von Kossa 染色像および FE-TEM 画像

- A. DN ゲルの von Kossa 染色像。スケールバーは 50 μm を示す。
- B. HAp/DN ゲルの von Kossa 染色像。スケールバーは 50 μm を示す。
- C. HAp/DN ゲルの FE-TEM 画像。スケールバーは 500 nm を示す。

1.2. HAp/DN ゲルの構成要素の重量比率

TG-DTA では、DN ゲルと HAp/DN ゲルは、両方とも高い含水率を認めたが、HAp/DN ゲルは DN ゲルよりもやや含水率が低い結果となった ($p = 0.0002$) (図 11)。無機物含有率に関しては、HAp/DN ゲルが DN ゲルと比較して有意に高かった ($p < 0.0001$) (図 11)。有機物含有率に関しては、HAp/DN ゲルと DN ゲルの間に有意差を認めなかった。

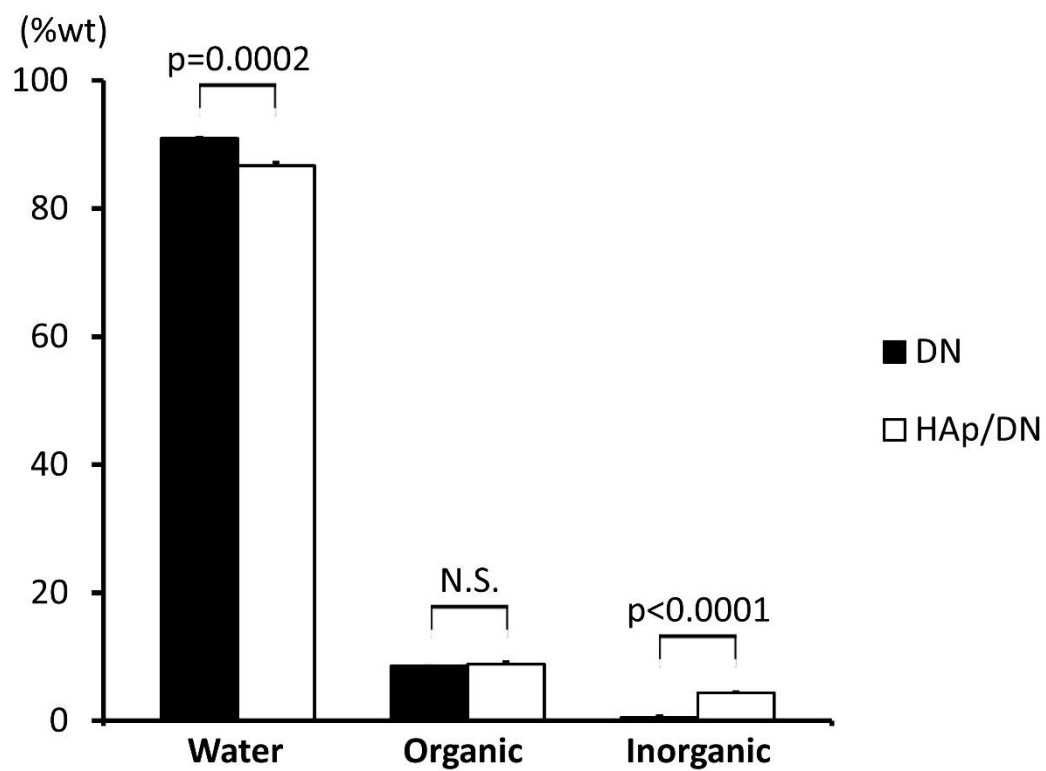


図 11. 熱重量-示差熱分析 (TG-DTA) の結果

DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの含水率 (Water)、有機物含有率 (Organic)、無機物含有率 (Inorganic) を示した。

1. 3. HAp/DN ゲルの力学特性

圧縮破壊試験において、DN ゲルと HAp/DN ゲルの破断様式は似ており、ともにゲル中心部から辺縁に向かって fracture line が形成される破断様式を示した（図 12）。圧縮破壊試験によって得られた DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの S-S 曲線を（図 13）に示した。最大破断強度に関しては、HAp/DN ゲルが 7.03 MPa、DN ゲルが 6.42 MPa であり、正常の関節軟骨と同程度の力学的強度を示した。両ゲル間に有意差を認めなかった（図 14）。

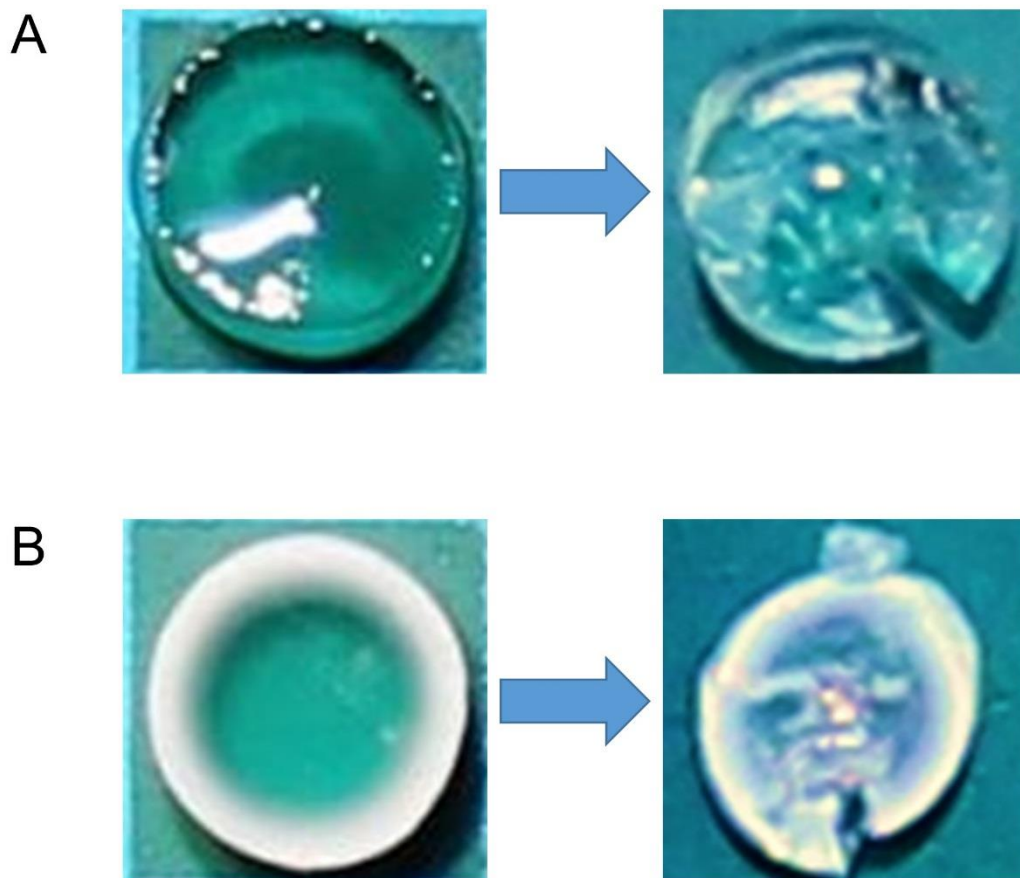


図 12. 圧縮破壊試験後のゲルの破断様式

- A. 圧縮破壊試験後の DN ゲルの破断様式。
- B. 圧縮破壊試験後の HAp/DN ゲルの破断様式。

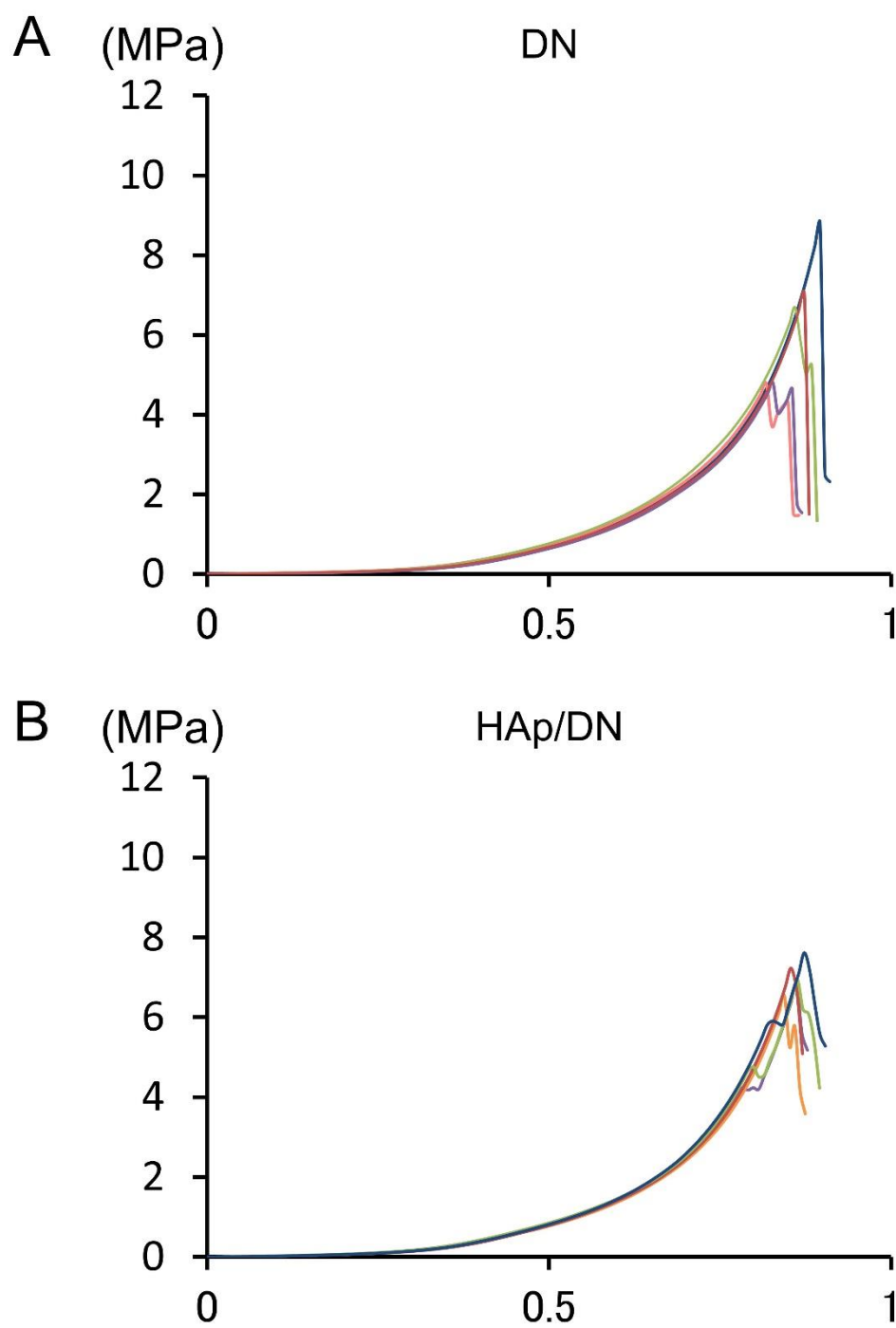


図 13. 圧縮破壊試験の結果

- A. DN ゲルの圧縮破壊試験で得られた S-S 曲線。
- B. HAp/DN ゲルの圧縮破壊試験で得られた S-S 曲線。

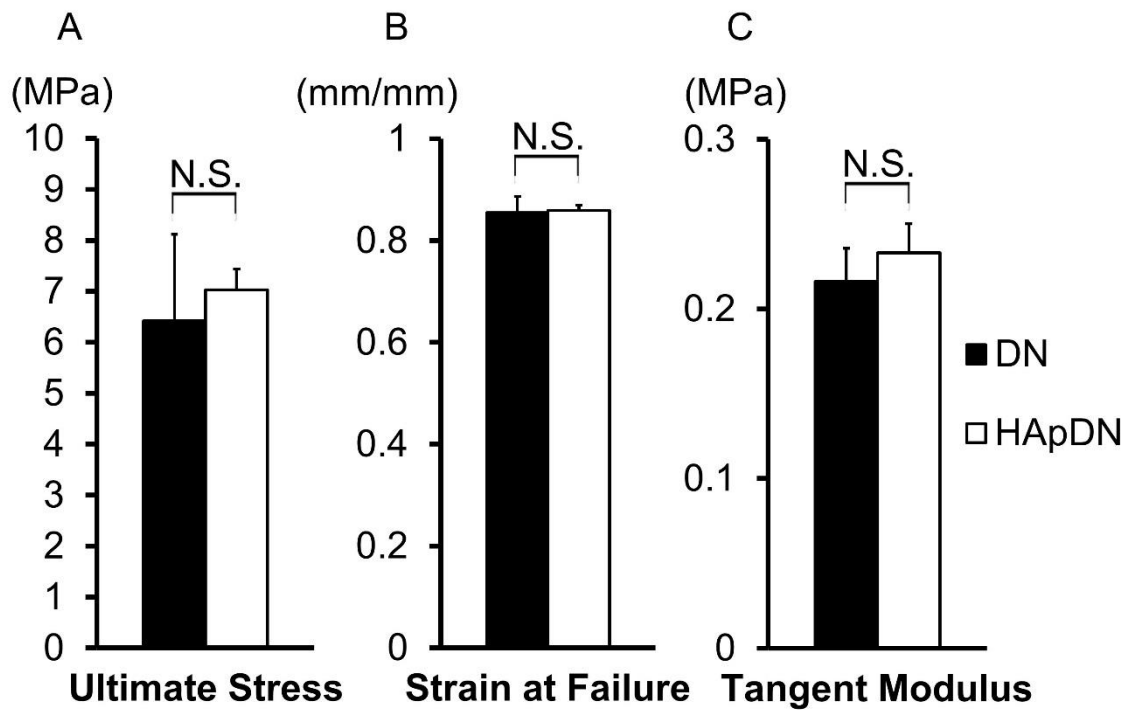


図 14. 圧縮破壊試験の結果

- A. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの最大破断強度 (Ultimate Stress)。
- B. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの破断ひずみ (Strain at Failure)。
- C. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの弾性率 (Tangent Modulus)。

2. 研究 2 : in vivo における HAp/DN ゲルの骨接着性評価

2.1. HAp/DN ゲルの組織学的および免疫組織化学的評価

Villanueva 染色および HE 染色の標本を観察すると、DN ゲルはいずれの時点でも骨接着を認めておらず、DN ゲルの表面には小円形細胞を含む線維性組織が観察された (図 15、16)。HAp/DN ゲルは、1 週では DN ゲルと同様に、線維性組織の介在を認めた。HAp/DN ゲルは、2 週ではゲル表面に幼若な類骨形成を認めた (図 15、16)。ゲル表面の類骨内には I 型プロコラーゲン陽性の幼若な骨原性細胞が存在していた (図 17)。HAp/DN ゲルは、4 週ではゲル表面の類骨層の厚さが薄くなり、部分的に成熟した石灰化骨の形成を認めた。HAp/DN ゲルは、12 週ではゲル表面の類骨がほとんど消失し、大部分を成熟した石灰化骨が占めており、HAp/DN ゲルは直接、骨組織に接着していることが観察された。Villanueva 染色の標本では、脱水処理の過程を経ているにも関わらず、HAp/DN ゲルの 2 週、4 週、12 週の標本では、ゲルが周囲の組織から剥がれずに接着していたままであった。これは HAp/DN ゲルが 2 週以降では周囲の組織と強く接着していることを示唆していると考えられた。一方、DN ゲルではいずれの期間においてもゲルが周囲の組織から剥がれていた (図 15)。

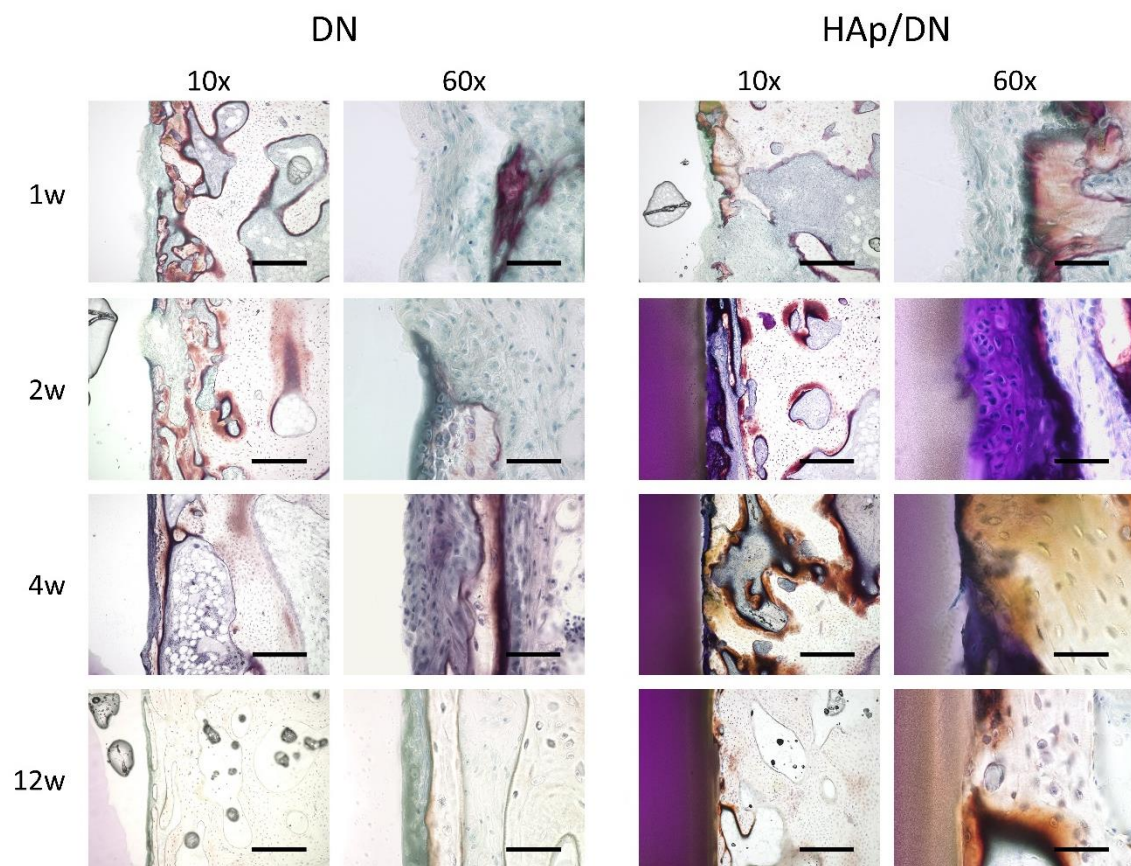


図 15. Villanueva 染色の画像

10 倍の画像のスケールバーは 300 μm を示す。

60 倍の画像のスケールバーは 50 μm を示す。

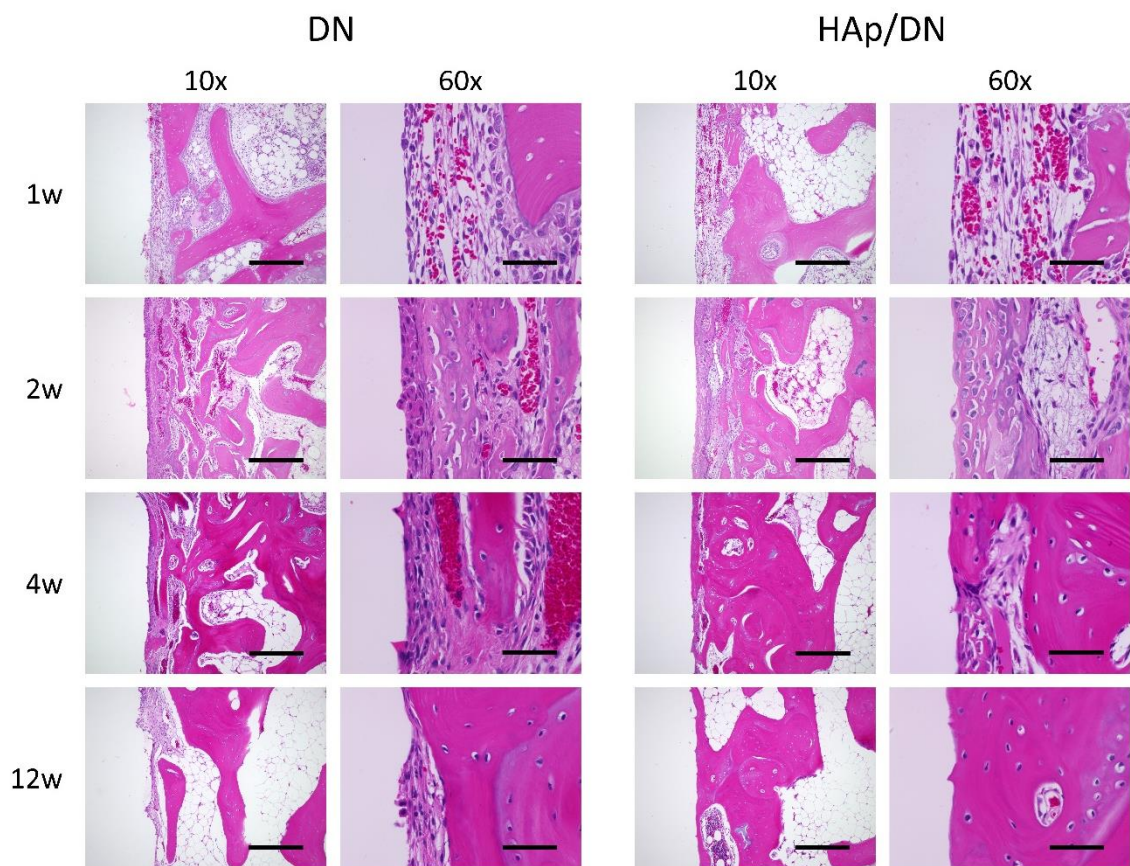


図 16. HE 染色の画像

10 倍の画像のスケールバーは 300 μm を示す。

60 倍の画像のスケールバーは 50 μm を示す。

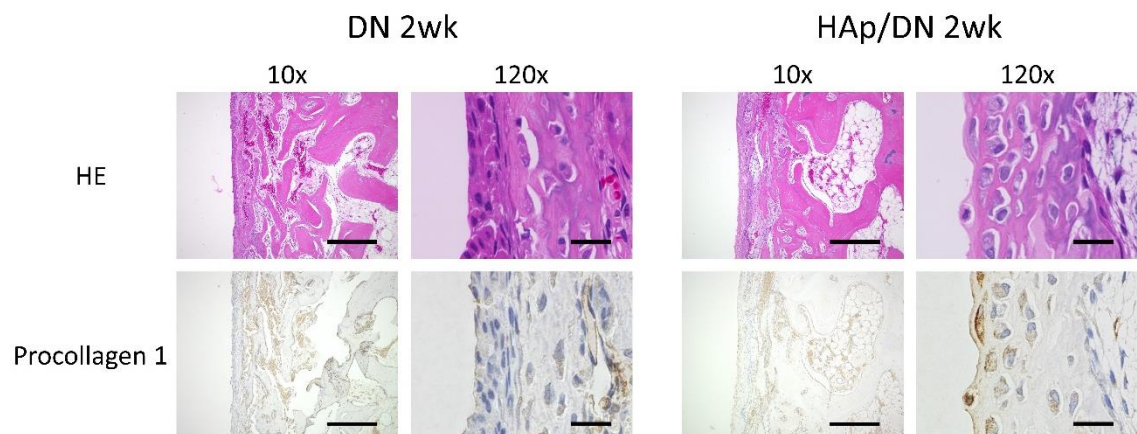


図 17. 2 週時点の HE 染色および I 型プロコラーゲン免疫組織化学染色の画像
 10 倍の画像のスケールバーは 300 μm を示す。
 120 倍の画像のスケールバーは 20 μm を示す。

2. 2. HAp/DN ゲル内に起きた変化の評価

組織染色に用いる前の検体の μ CT の Axial 面での再構成画像の代表例を示した (図 18A)。HAp/DN ゲルの辺縁部の HAp 層内の CT 濃度は明らかに上昇していることが観察された。DN ゲルの中央部と HAp/DN ゲルの中央部の CT 値は観察期間を通して 50 HU 程度と低値であり、有意差を認めなかった。HAp/DN ゲルの辺縁部の CT 値は、1 週で 585.3 HU、2 週で 1385.6 HU、4 週で 1959.2 HU、12 週で 2157.4 HU と経時的に有意に上昇しており、2 週が 1 週よりも有意に高く、4 週が 2 週よりも有意に高く、12 週が 4 週よりも有意に高かった ($p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$)。一方、DN ゲルの辺縁部の CT 値は、全観察期間を通して、46.8 - 52.7 HU 程度と低値であった。HAp/DN ゲルと DN ゲルに関して、ゲル辺縁部の CT 値を比較すると、1 週、2 週、4 週、12 週の全ての観察時点において、HAp/DN ゲルが DN ゲルよりも有意に高かった ($p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$) (図 18B)。参考値として計測した大腿骨後方骨皮質の CT 値の平均値は 3479.7 ± 154.2 HU であった。

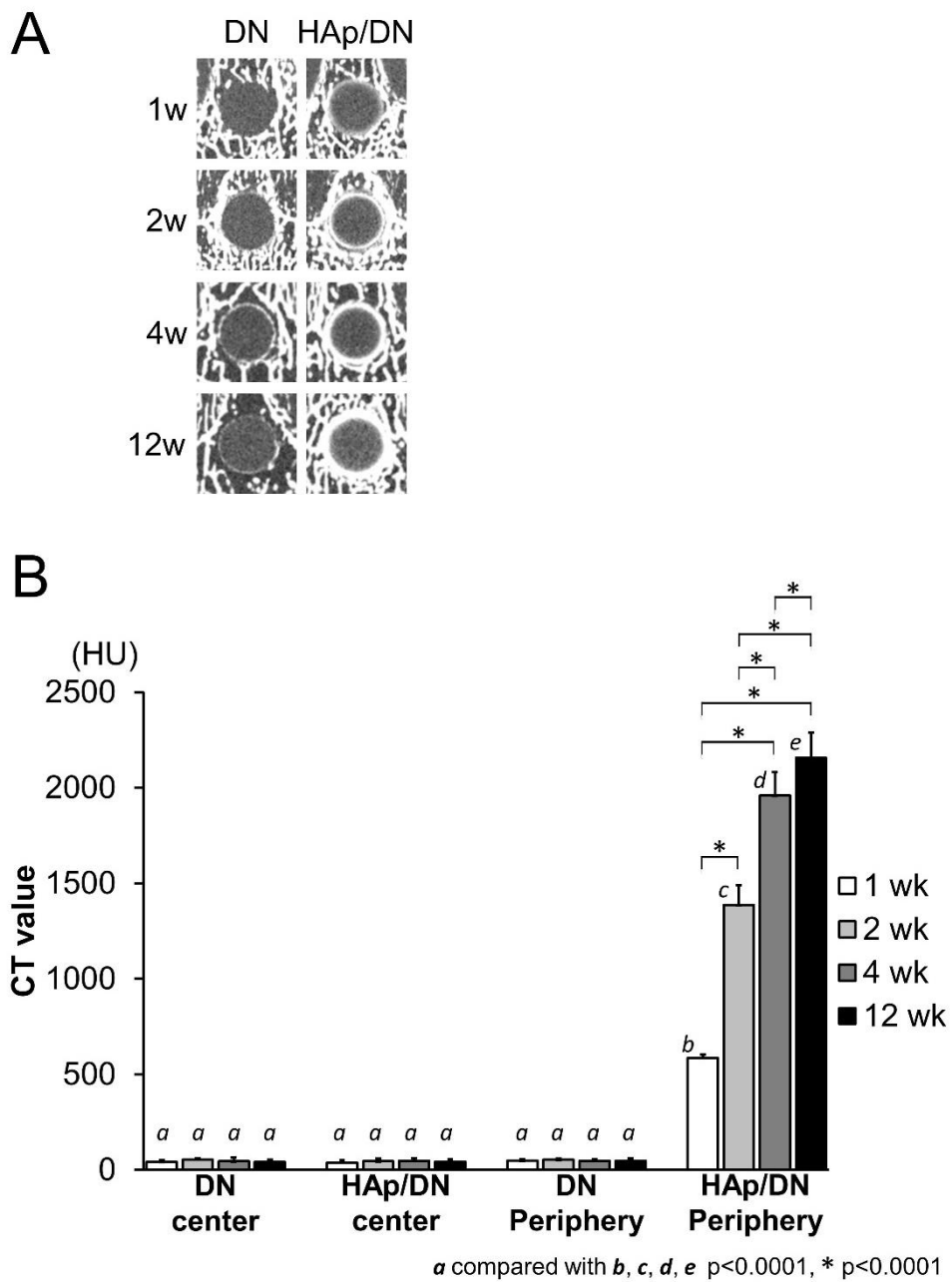


図 18. ゲルが埋植された状態でのゲル内の CT 値の測定結果

- A. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルが埋植された状態での大腿骨の μ CT の Axial 面での再構成画像の代表例を示した。
- B. DN ゲルと HAp/DN ゲルの中心部 (center) と辺縁部 (Periphery) における 1 週、2 週、4 週、12 週の CT 値を示した。

2.3. HAp/DN ゲルの骨接着性の力学的評価

押し出し力学試験後の HAp/DN ゲルの破断様式に関しては、1 週ではゲルは埋植時と同じ状態で押し出されたが、2 週では押し出されたゲル検体の 7 検体中の 5 検体で部分的に壊れており、4 週と 12 週では押し出された全てのゲルが壊れていた（図 19）。HAp/DN ゲルの 2 週、4 週、12 週で壊れて押し出されたゲルの残りの部分は骨孔壁に接着したまま残存していた。DN ゲルは全ての観察時点で埋植されたままの状態では壊れずに押し出されており、骨孔壁への DN ゲルの残存を認めなかった。

DN ゲルの最大荷重は観察期間を通して 5 N 程度と低値であり、1 週、2 週、4 週、12 週のいずれの時点と比較しても有意な差を認めなかった。HAp/DN ゲルの最大荷重は、経時的に有意に増加しており ($p < 0.0001$)、4 週では 37.54 N、12 週では 42.15 N に達していた（図 20）。4 週と 12 週の間には有意差を認めなかった。HAp/DN ゲルと DN ゲルの最大荷重を比較すると、2 週、4 週、12 週において、HAp/DN ゲルが DN ゲルよりも有意に高かった ($p = 0.0018$ 、 $p < 0.0001$ 、 $p < 0.0001$)。

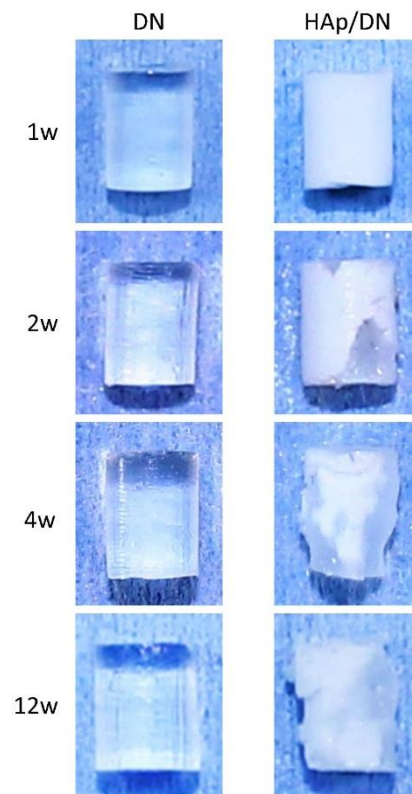


図 19. 押出し力学試験後のゲルの破断様式

- A. 押出し力学試験後の DN ゲルの破断様式。
- B. 押出し力学試験後の HAp/DN ゲルの破断様式。

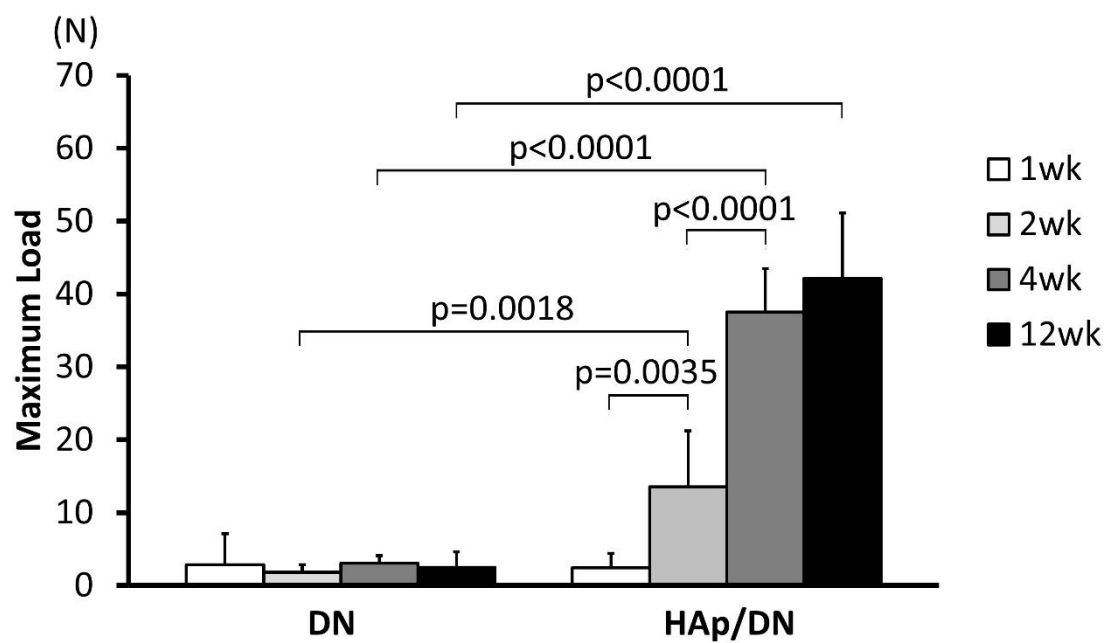


図 20. 押出し力学試験の結果

押出し力学試験における DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの 1 週、2 週、4 週、12 週の最大荷重を示した。

2. 4. HAp/DN ゲルの骨接着率の定量的評価

DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの押し出し力学試験後の大腿骨遠位部の検体の Axial 面で再構成した μ CT 画像の代表例を示した (図 21)。HAp/DN ゲルは、2 週、4 週、12 週では、ゲルは押し出される際に壊れており、CT 画像で骨孔壁にゲルが残存していることが確認された。HAp/DN ゲルの 1 週と DN ゲルの全観察時点では、押し出し力学試験によってゲルは壊れずに埋植されたままの形で押し出されたために、骨孔壁にゲルは残存していなかった。

DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの全体の骨接着率と各深さでの骨接着率を計測した。全体の骨接着率は、HAp/DN ゲルにおいて、経時的に上昇しており、4 週が 2 週よりも高く、12 週が 2 週よりも高かった ($p = 0.0005$ 、 $p < 0.0001$)。HAp/DN ゲルの 4 週と 12 週の間には有意差を認めなかった (図 22A)。関節面から 1 mm、2 mm、3 mm、4 mm の Axial 面での骨接着率に関しては、いずれの深さにおいても 4 週と 12 週が 2 週よりも有意に高い結果となった ($p < 0.0001 - p = 0.0245$) (図 22B)。1 mm の深さでの骨接着率は 2 mm と 3 mm と 4 mm の深さでの骨接着率よりも低い傾向が認められたものの、いずれの観察時点においても、関節面からの距離による有意な差は認めなかった。

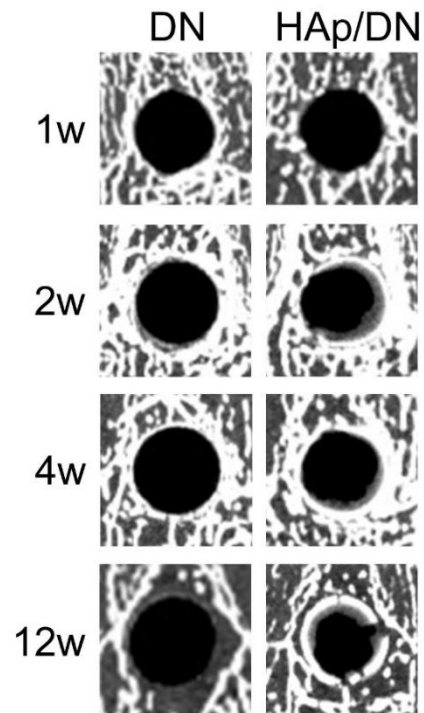


図 21. 押出し力学試験後の大腿骨遠位部の検体の μ CT 画像

DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの押出し力学試験後の大腿骨遠位部の検体の μ CT の Axial 面での再構成画像の代表例を示した。

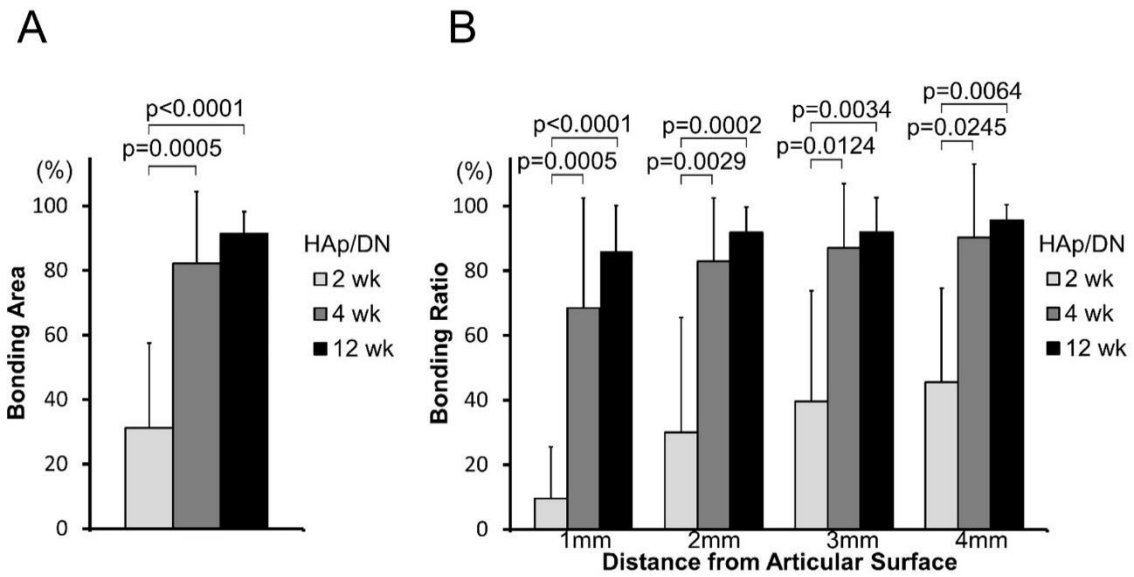


図 22. μ CT を用いた骨接着率の評価

- A. HAp/DN ゲルの 2 週、4 週、12 週における全体の骨接着率 (Bonding Area) の結果を示した。
- B. HAp/DN ゲルの 2 週、4 週、12 週において関節面から 1 mm、2 mm、3 mm、4 mm の深さにおける骨接着率 (Bonding Ratio) の結果を示した。

2. 5. HAp/DN ゲルと骨の接着様式のナノレベルでの観察

FE-TEM を用いて、埋植前と埋植後の HAp/DN ゲル内の HAp 結晶の形状を比較して HAp/DN ゲルが骨に接着する様子をナノレベルで観察した。埋植前の HAp/DN ゲルの広範囲連結 FE-TEM 画像では、突起を有する径 200-600 nm の球型の HAp ナノ結晶が HAp/DN ゲルの HAp 層内に無数に分散していることが観察された(図 23A)。HAp/DN ゲルの埋植後 4 週における広範囲連結 FE-TEM 画像では、ゲルと骨の間に明瞭な境界面が存在せず、ゲルの周囲組織からゲル内にかけて徐々に HAp の結晶濃度が低下していく傾斜勾配を有するゲルと骨のハイブリッド層の形成が認められた(図 23B)。このゲルと骨のハイブリッド層の幅は 40 μm 程度であった。埋植前の HAp/DN ゲルで観察されたような分散して分布している球型の HAp ナノ結晶は、埋植後 4 週の HAp/DN ゲルでは最表面からゲル中心部に向かって数十 μm 離れた部位において観察することが出来た(図 23B)。埋植後 4 週の HAp/DN ゲルの表面に近い部位では HAp 結晶の密度が著明に上昇しており、骨組織へと連続していた。HAp/DN ゲル内の HAp 結晶の密度が明らかに上昇しているため、HAp/DN ゲルを生体内に埋植したことによって、ゲル内に新たに HAp 結晶が形成されたことが示唆された。

FE-TEM の強拡大画像では、単一の HAp ナノ結晶の形態変化を観察することが可能であった。埋植後 4 週の HAp/DN ゲルの最表面からゲル中心部に向かって数十 μm 程度離れた部位での HAp ナノ結晶の形態は突起を有する球型の形態を呈しており、埋植前の HAp ナノ結晶と同様の形態であった。しかしながら、骨組織に近いゲル表層の HAp ナノ結晶の形態は、球型 HAp ナノ結晶の突起に更にヒゲのような結晶が新たに付着した形をしており、明らかな変化が見られた(図 23B)。骨に極めて近い部位においては、HAp ナノ結晶の周囲には骨組織に見られるような形をした HAp 結晶が密に形成されており、単一の球型の HAp ナノ結晶の境界を同定するのは困難となっていた。このゲル最表面部の HAp ナノ結晶は新たに形成された HAp 結晶と完全に融合していることが観察された(図 23B)。一方、埋植後 4 週の DN ゲルにおいては、ゲル内に HAp 結晶の形成を認めず、DN ゲルと骨組織の境界は明瞭であった。

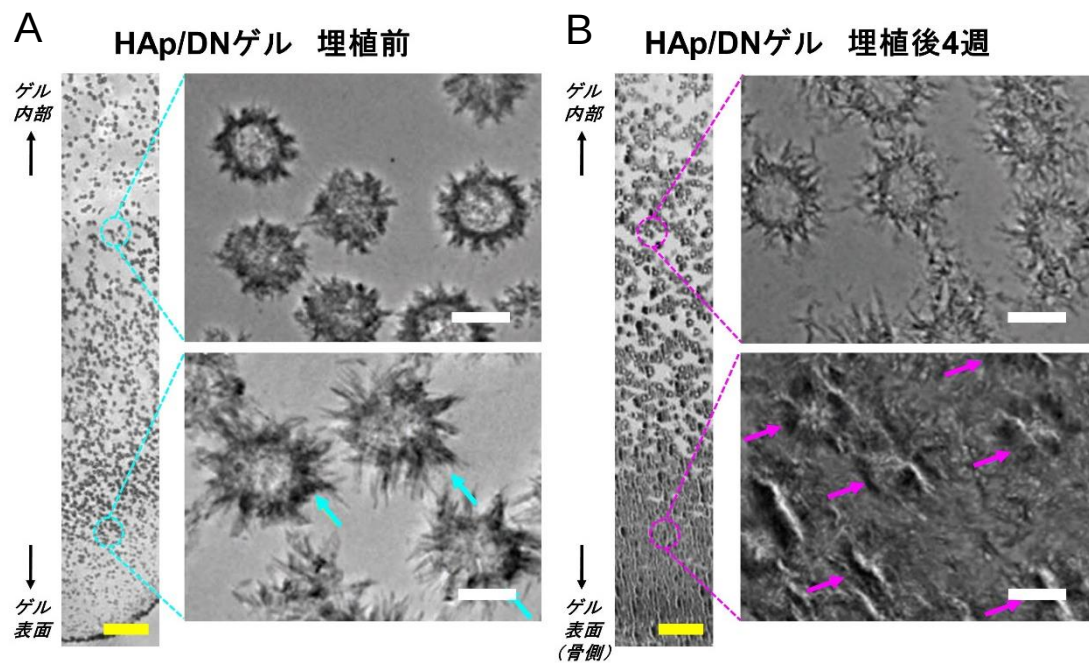


図 23. FE-TEM 画像

- A. 埋植前の HAp/DN ゲルの FE-TEM 画像。
 B. 埋植後 4 週の HAp/DN ゲルの FE-TEM 画像。

黄色のスケールバーは 5 μm を示す。

白色のスケールバーは 200 nm を示す。

VII. 考察

研究 1 により、in vitro における HAp/DN ゲルの材料特性が明らかとなった。バイオミネラリゼーションに倣って、DN ゲルを強アルカリ性の高濃度溶液に短時間浸す alternate soaking method を応用した手法を用いることで、DN ゲルの表層に 500 μm の厚さで HAp を複合化させることが可能であることを示した。HAp 層内部には径 200–600 nm の HAp ナノ結晶が集まって出来た径 10 μm の点状集合体を無数に形成していることが観察された。表層のみに限局して HAp が複合化されており、ゲル中央部のほとんどが従来の DN ゲルのままであることが本技術の特徴である。HAp/DN ゲルは総重量の 4.38 %程度が HAp で構成されており、重量の 86.72 %は水分であり、DN ゲルが有する高い含水率を維持できていることが示された。破断強度と弾性率は、DN ゲルで 6.42 MPa、0.22 MPa に対して、HAp/DN ゲルでは 7.03 MPa、0.23 MPa であり、HAp/DN ゲルは DN ゲルが有している正常軟骨と相応の力学的強度と柔軟性を維持出来ていることが示された。

研究 2 により、in vivo における HAp/DN ゲルの骨接着性が明らかとなった。押し出し力学試験により、HAp/DN ゲルは、4 週で 37.54 N、12 週で 42.15 N と高い強度で骨に接着しており、 μCT により、HAp/DN ゲルの骨接着率は 12 週で 90% を超えていて、HAp/DN ゲルが高い骨接着性を有していることが示された。組織学的評価では、HAp/DN ゲルと骨孔壁の間には、2 週という早期の段階で幼若な類骨形成が見られた。この類骨の中には I 型コラーゲン陽性の骨原性細胞が含まれていた。HAp/DN ゲルの 4 週では、ゲル表面の一部の類骨が石灰化骨へと変化しており、HAp 層と骨孔壁の間で骨芽細胞と破骨細胞が活性化されて骨リモデリングが起きたことが示唆された。FE-TEM 像を用いて、HAp/DN ゲルの 4 週でゲルが骨に接着している部位をナノレベルで観察すると、ゲルと骨のハイブリッド層が形成されることが示された。

本研究において、DN ゲルに HAp ナノ結晶を複合化することで DN ゲルに骨接着性を付加することが可能となったメカニズムについて、生物学的な側面から考察する。最近、ナノサイズの HAp 結晶が良好な骨伝導性を示すことが報告されている^{78–80}。HAp ナノ結晶は破骨細胞と骨芽細胞に影響を及ぼし、骨のリモデリングを促進することが知られている⁸¹。また HAp ナノ結晶は、間葉系幹細胞の骨原性細胞への分化を促進することにより、骨形成を早める働きがあるという報告がある^{82–85}。HAp/DN ゲル内の HAp ナノ結晶が周囲の破骨細胞が分泌した酸により溶解され、カルシウムイオンとリン酸イオンが HAp/DN ゲルと骨組織の間の微小環境へと溶出した。イオン濃度が上昇した微小環境からシグナルを受けた骨芽細胞が骨形成を促進し、同様にシグナルを受けた骨髄由来の間葉系幹細胞が骨原性細胞に分化することが促進された。このように、HAp/DN ゲルが

骨組織に接着した生物学的なメカニズムに、ゲル内に存在する HAp ナノ結晶が重要な役割を果たしていたと考えられた。

本研究において、HAp/DN ゲルの骨接着様式に関して、微細構造の面から考察する。FE-TEM 観察により、埋植後 4 週の HAp/DN ゲル内の HAp 結晶濃度の上昇が明らかとなった。マイクロ CT での HAp/DN ゲル内の CT 値計測においてもゲル内の CT 値の上昇を認めた。HAp/DN ゲルでは、2 週という早期の時点からゲル辺縁部の CT 値が上昇しており、2 週の時点ですでにゲル内の HAp ナノ結晶のリモデリングが始まっていることが示唆された。HAp ナノ結晶により引き起こされた生物学的な骨リモデリング反応の過程において、骨組織側の骨原性細胞により供給された HAp 結晶やコラーゲン線維が HAp/DN ゲル内に侵入したと考えられた。DN ゲルの網目構造は数 nm とされており、細胞はサイズが大きすぎるためにゲル内に侵入することは不可能である。一方、HAp 結晶やコラーゲン線維などはサイズが比較的小さいためにゲル内に侵入することが可能である。本研究の結果を元に、HAp/DN ゲルが骨組織に固着したメカニズムの微細構造は以下の通りであったと考察する。HAp/DN ゲルを埋植すると、ゲル内の HAp ナノ結晶が、周囲の骨原生細胞に働きかけて、類骨形成を促す。旺盛に形成された類骨が HAp/DN ゲルに接着して、やがて石灰化されて成熟骨へと変化した。この過程で、骨原性細胞が HAp 結晶やコラーゲン線維を産生し、その一部が拡散によりゲル内に侵入し、ゲル内の HAp 結晶と結合して、ゲルと HAp 結晶とコラーゲン線維と骨組織の複合体を形成し、ゲルと骨のハイブリッド層となって固着が得られた。このように、HAp/DN ゲルは骨組織からの細胞外マトリックスがゲルの中に侵入するという骨接着様式を呈しており、既存の HAp コーティング金属製インプラントの骨接着様式とは全く異なると考えられる⁸⁶。

本研究における HAp/DN ゲルの骨接着性に関して、力学的な面から考察する。押し出し力学試験により、HAp/DN ゲルは、4 週で 37.54 N、12 週で 42.15 N と力学的に高い強度で骨に接着していることが示された。4 週と 12 週ではゲルが壊れて押し出されているため、ゲルと骨の接着強度がゲルの破断強度を超えていることが示唆された。ゲルと骨の接着している強さは計測限界を超えており、実際には 42.15 N よりも高かったと推測される。

本研究の限界を示す。1 つ目の限界は、動物モデルにウサギを用いたことである。ウサギなどの齧歯類はヒトよりも再生能力が高いことが知られている。今後、ヒトへの臨床応用を考慮すると、ヒツジ、イヌ、ブタなどの哺乳類の大動物での実験が必要であると考えられる。2 つ目の限界は経過観察期間が 12 週間であったことである。臨床応用を考慮すると、6 カ月程度の長期で観察した実験が必要となる。3 つ目の限界は、HAp/DN ゲルを埋植する部位として関節内環境を選んだことである。HAp/DN ゲルを関節外環境へと埋植した場合に本研究結果と同じように骨との固着が得られるかどうかに関しては不明である。しかしながら、一般的には関節内に人工物を埋植した場合、繰り返す関節運動や関節荷

重により関節液が流入してくるためマイクロモーションや関節内圧により関節外環境よりも骨接着性が低下することが知られている^{87,88}。本研究では関節内という骨接着に不利な条件下でも高い接着強度を獲得できたことは特筆すべき点である。4 つ目の限界は、ゲルと骨の接着の力学的評価に押出し力学試験を用いたことである。in vitro 環境で2つの物質の接着強度を測定する際には、一般的に引張り試験や引き剥がし試験が用いられる。今回の実験系ではそれらの力学試験を用いることができなかった。その理由は、人工軟骨の開発を目指しているため、ゲルを関節内に埋植してゲル最表面を関節面に一致させなければならなかったからである。しかしながら、我々は、本研究でゲルと骨の接着性を十分に示すことが出来たと考えている。なぜならば、力学的評価に留まらず、様々な手法によりゲルと骨の接着性を多方面から評価することが可能であったからである。

最後に本研究のまとめを示す。DN ゲルは、生体適合性、強度、耐摩耗性、相対する軟骨への影響において今までのどの人工軟骨材料よりも優れており実用化が大きく期待されている。DN ゲルの臨床応用への展開において克服すべき「骨組織との強固な固着が得られていない」という課題は、HAp/DN ゲルの開発により解決することが出来たと言っても過言ではない。本研究の成果は、DN ゲルをはじめとした人工軟骨材料の開発研究を大きく前進させた。

VIII. 総括および結論

1. 本研究から得られた新知見

- ① 本研究は、強アルカリ性の高濃度溶液に短時間浸す alternate soaking method を応用した手法を用いて HAp を DN ゲル内に析出させることによって、DN ゲルの表層に限局して HAp を複合化することが可能であることを示した。
- ② 本研究は、新たに開発した HAp/DN ゲルの材料特性を明らかにした。HAp/DN ゲル円柱プラグの表層の HAp 層内部は 200-600 nm の HAp ナノ結晶が集まった径 10 μm の無数の点状集合体で形成されていた。HAp/DN ゲルは重量の 4.38 %程度が HAp で構成されており、重量の 86.72 %は水分であり高い含水率が維持されていることが示された。力学的には 7.03 MPa の破断強度を有していた。
- ③ 本研究は、HAp/DN ゲルが骨接着性を有することおよびそのメカニズムを明らかにした。押出し力学試験により、HAp/DN ゲルは、4 週で 37.54 N、12 週で 42.15 N と力学的に高い強度で骨に接着しており、また μCT 上 12 週で骨

接着率 90 %と高い骨接着性を有していることが示された。HAp/DN ゲルと骨孔壁の間には、2 週から幼若な類骨形成が認められ、I 型コラーゲン陽性の骨原性細胞が含まれていた。4 週でゲル表面の一部の類骨が石灰化骨へと変化しており、HAp 層と骨孔壁の間で骨芽細胞と破骨細胞が活性化されて生物学的な骨リモデリング反応が起きたことが示唆された。FE-TEM 像において HAp/DN ゲルと骨が接着している部位をナノレベルで観察すると、ゲルと骨のハイブリッド層が形成されることが示された。

2. 新知見の意義

- ① 本研究で用いたバイオミネラライゼーションに倣った HAp を表層に局限して析出させる技術は、材料特性を大きく変化させることなく DN ゲルに HAp を複合化することが可能であることを示した。この技術は将来的に他の種々の高強度ハイドロゲルにも応用することが可能であると考えられた。
- ② HAp/DN ゲルの骨接着様式は、生物学的に自然な骨リモデリング反応に由来しており、長期的にもゲルが骨に固着した状態が維持されていくことが示唆された。またゲルの周囲組織で炎症反応やアレルギー反応が起きていないため、HAp/DN ゲルは DN ゲルと同様に生体に安全に使用できる材料であることが示された。
- ③ HAp/DN ゲルは人工軟骨などの次世代の整形外科領域における治療材料に有用と考えられる。

3. 今後の課題

- ① 今回の研究結果を基盤とし、十分な数の大動物を用いて HAp/DN ゲルの長期効果に関する研究が必要である。
- ② 今後は、身体別の部位に HAp/DN ゲルを使用して引張り試験や引き剥がし試験を行い、異なる実験系においても HAp/DN ゲルが骨接着性を示すかどうかを確かめる実験を行う必要がある。
- ③ 人工軟骨材料として実用化する際に、DN ゲルのどの部分に HAp を複合化することが適切であるか、製品化に向けたデザインを検討する必要がある。将来的な展望として、DN ゲルの一方の底面のみに HAp を複合化し、ゲルの底面のみを骨に接着させる人工軟骨材料を開発する方針である。

IX. 謝辞

本研究と論文作成にあたり直接ご指導を賜りました北海道大学の安田和則副学長・理事、北海道大学大学院医学研究科機能再生医学講座スポーツ医学分野の北村信人准教授に深く感謝いたします。実験に使用するゲルサンプルをご提供頂き、ゲルの材料化学特性の評価に関してご指導を賜りました北海道大学大学院先端生命科学研究院ソフト&ウェットマター研究室の龔劍萍教授、黒川孝幸准教授、中島祐助教、野々山貴行特任助教、Tariful Islam Mredha 先生、北海道大学大学院生命科学院先端融合科学コース生命物質科学分野ソフト&ウェットマター研究室の大学院生の木山竜二先生ならびに実験助手の方々に心から感謝いたします。in vitro 実験において共同研究に携わって頂いた北海道大学大学院水産科学研究院海洋応用生命科学部門増殖生物学分野の都木靖彰教授、大学院生の張曦先生に感謝いたします。また、実験を進めていき結果をまとめる作業を行うにあたり多大なご協力を頂いたスポーツ医学分野の先生方ならびに実験助手・秘書の方々に感謝いたします。

X. 引用文献

- 1 Hunter, W. Of the structure and diseases of articulating cartilages. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 42, 514-521 (1743).
- 2 Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *J. Bone Joint Surg. Am.* 79, 600-611 (1997).
- 3 Muraki, S., Oka, H., Akune, T., Mabuchi, A., En-yo, Y., Yoshida, M., Saika, A., Suzuki, T., Yoshida, H., Ishibashi, H., Yamamoto, S., Nakamura, K., Kawaguchi, H. & Yoshimura, N. Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 1137-1143 (2009).
- 4 Bedi, A., Feeley, B. T. & Williams, R. J., 3rd. Management of articular cartilage defects of the knee. *J. Bone Joint Surg. Am.* 92, 994-1009 (2010).
- 5 Gong, J. P., Katsuyama, Y., Kurokawa, T. & Osada, Y. Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* 15, 1155-1158 (2003).
- 6 Yasuda, K., Ping Gong, J., Katsuyama, Y., Nakayama, A., Tanabe, Y., Kondo, E., Ueno, M. & Osada, Y. Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. *Biomaterials* 26, 4468-4475 (2005).
- 7 Bhosale, A. M. & Richardson, J. B. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* 87, 77-95 (2008).
- 8 Sophia Fox, A. J., Bedi, A. & Rodeo, S. A. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health* 1, 461-468 (2009).
- 9 Wright, V. & Dowson, D. Lubrication and cartilage. *J. Anat.* 121, 107-118 (1976).
- 10 Athanasiou, K. A., Rosenwasser, M. P., Buckwalter, J. A., Malinin, T. I. & Mow, V. C. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J. Orthop. Res.* 9, 330-340 (1991).
- 11 Boschetti, F., Pennati, G., Gervaso, F., Peretti, G. M. & Dubini, G. Biomechanical properties of human articular cartilage under compressive loads. *Biorheology* 41, 159-166 (2004).

- 12 Fukubayashi, T. & Kurosawa, H. The Contact Area and Pressure Distribution Pattern of the Knee: A Study of Normal and Osteoarthrotic Knee Joints. *Acta Orthop. Scand.* 51, 871-879 (1980).
- 13 Brown, T. D. & Shaw, D. T. In vitro contact stress distribution on the femoral condyles. *J. Orthop. Res.* 2, 190-199 (1984).
- 14 Brand, R. A. Joint contact stress: a reasonable surrogate for biological processes? *Iowa Orthop. J.* 25, 82-94 (2005).
- 15 Ahsan, T. & Sah, R. L. Biomechanics of integrative cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 29-40 (1999).
- 16 Buckwalter, J. A. & Mankin, H. J. Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons – Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 79, 612-632 (1997).
- 17 Messner, K. & Maletius, W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop. Scand.* 67, 165-168 (1996).
- 18 Cicuttini, F., Ding, C., Wluka, A., Davis, S., Ebeling, P. R. & Jones, G. Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: a prospective study. *Arthritis Rheum.* 52, 2033-2039 (2005).
- 19 Davies-Tuck, M. L., Wluka, A. E., Wang, Y., Teichtahl, A. J., Jones, G., Ding, C. & Cicuttini, F. M. The natural history of cartilage defects in people with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 337-342 (2008).
- 20 Kellgren, J. H. & Lawrence, J. S. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 16, 494-502 (1957).
- 21 Mithoefer, K., Williams, R. J., 3rd, Warren, R. F., Potter, H. G., Spock, C. R., Jones, E. C., Wickiewicz, T. L. & Marx, R. G. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J. Bone Joint Surg. Am.* 88 Suppl 1 Pt 2, 294-304 (2006).
- 22 Gudas, R., Kalesinskas, R. J., Kimtys, V., Stankevicius, E., Toliusis, V., Bernotavicius, G. & Smailys, A. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy* 21, 1066-1075 (2005).

- 23 Mithoefer, K., Williams, R. J., 3rd, Warren, R. F., Potter, H. G., Spock, C. R., Jones, E. C., Wickiewicz, T. L. & Marx, R. G. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87, 1911-1920 (2005).
- 24 Gobbi, A., Nunag, P. & Malinowski, K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 13, 213-221 (2005).
- 25 Steadman, J. R., Briggs, K. K., Rodrigo, J. J., Kocher, M. S., Gill, T. J. & Rodkey, W. G. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy* 19, 477-484 (2003).
- 26 Knutsen, G., Engebretsen, L., Ludvigsen, T. C., Drogset, J. O., Grontvedt, T., Solheim, E., Strand, T., Roberts, S., Isaksen, V. & Johansen, O. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-a, 455-464 (2004).
- 27 Bae, D. K., Yoon, K. H. & Song, S. J. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy* 22, 367-374 (2006).
- 28 Matsunaga, D., Akizuki, S., Takizawa, T., Yamazaki, I. & Kuraishi, J. Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis. *Knee* 14, 465-471 (2007).
- 29 Knutsen, G., Drogset, J. O., Engebretsen, L., Grontvedt, T., Ludvigsen, T. C., Loken, S., Solheim, E., Strand, T. & Johansen, O. A Randomized Multicenter Trial Comparing Autologous Chondrocyte Implantation with Microfracture: Long-Term Follow-up at 14 to 15 Years. *J. Bone Joint Surg. Am.* 98, 1332-1339 (2016).
- 30 Hangody, L. & Karpati, Z. [New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee][Article in Hungarian]. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 37, 237-243 (1994).
- 31 Hangody, L., Rathonyi, G. K., Duska, Z., Vasarhelyi, G., Fules, P. & Modis, L. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A Suppl 1, 65-72 (2004).

- 32 Hangody, L. & Fules, P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 2, 25-32 (2003).
- 33 Ozturk, A., Ozdemir, M. R. & Ozkan, Y. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in grade IV cartilage defects in the knee joint: 2- to 7-year results. *Int. Orthop.* 30, 200-204 (2006).
- 34 Huntley, J. S., Bush, P. G., McBirnie, J. M., Simpson, A. H. & Hall, A. C. Chondrocyte death associated with human femoral osteochondral harvest as performed for mosaicplasty. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87, 351-360 (2005).
- 35 Gulotta, L. V., Rudzki, J. R., Kovacevic, D., Chen, C. C., Milentijevic, D. & Williams, R. J., 3rd. Chondrocyte death and cartilage degradation after autologous osteochondral transplantation surgery in a rabbit model. *Am. J. Sports Med.* 37, 1324-1333 (2009).
- 36 Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O. & Peterson, L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 331, 889-895 (1994).
- 37 Bentley, G., Biant, L. C., Carrington, R. W. J., Akmal, M., Goldberg, A., Williams, A. M., Skinner, J. A. & Pringle, J. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* 85, 223-230 (2003).
- 38 Zaslav, K., Cole, B., Brewster, R., DeBerardino, T., Farr, J., Fowler, P., Nissen, C. & Investigators, S. S. P. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am. J. Sports Med.* 37, 42-55 (2009).
- 39 Moseley, J. B., Jr., Anderson, A. F., Browne, J. E., Mandelbaum, B. R., Micheli, L. J., Fu, F. & Erggelet, C. Long-term durability of autologous chondrocyte implantation: a multicenter, observational study in US patients. *Am. J. Sports Med.* 38, 238-246 (2010).

- 40 Peterson, L., Vasiliadis, H. S., Brittberg, M. & Lindahl, A. Autologous chondrocyte implantation: a long-term follow-up. *Am. J. Sports Med.* 38, 1117–1124 (2010).
- 41 Wood, J. J., Malek, M. A., Frassica, F. J., Polder, J. A., Mohan, A. K., Bloom, E. T., Braun, M. M. & Cote, T. R. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J. Bone Joint Surg. Am.* 88, 503–507 (2006).
- 42 Peterson, L., Minas, T., Brittberg, M., Nilsson, A., Sjogren-Jansson, E. & Lindahl, A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 212–234 (2000).
- 43 MacIntosh, D. L. & Hunter, G. A. The use of the hemiarthroplasty prosthesis for advanced osteoarthritis and rheumatoid arthritis of the knee. *J. Bone Joint Surg. Br.* 54, 244–255 (1972).
- 44 Custers, R. J., Dhert, W. J., van Rijen, M. H., Verbout, A. J., Creemers, L. B. & Saris, D. B. Articular damage caused by metal plugs in a rabbit model for treatment of localized cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 937–945 (2007).
- 45 Bavaresco, V. P., de Carvalho Zavaglia, C. A., de Carvalho Reis, M. & Malmonge, S. M. Devices for use as an artificial articular surface in joint prostheses or in the repair of osteochondral defects. *Artif. Organs* 24, 202–205 (2000).
- 46 Bavaresco, V. P., Garrido, L., Batista, N. A., Malmonge, S. M. & Belangero, W. D. Mechanical and morphological evaluation of osteochondral implants in dogs. *Artif. Organs* 32, 310–316 (2008).
- 47 Bray, J. C. & Merrill, E. W. Poly(vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular cartilage material. *J. Biomed. Mater. Res.* 7, 431–443 (1973).
- 48 Oka, M., Noguchi, T., Kumar, P., Ikeuchi, K., Yamamuro, T., Hyon, S. H. & Ikada, Y. Development of an artificial articular cartilage. *Clin. Mater.* 6, 361–381 (1990).
- 49 Gu, Z. Q., Xiao, J. M. & Zhang, X. H. The development of artificial articular cartilage--PVA-hydrogel. *Biomed. Mater. Eng.* 8, 75–81 (1998).
- 50 Kobayashi, M. & Oka, M. Composite device for attachment of polyvinyl alcohol-hydrogel to underlying bone. *Artif. Organs* 28, 734–738 (2004).

- 51 Younger, A. S. E., Baumhauer, J. F. & Glazebrook, M. Polyvinyl alcohol hemiarthroplasty for first metatarsophalangeal joint arthritis. *Curr. Orthop. Pract.* 24, 493–497 (2013).
- 52 Hunziker, E. B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463 (2002).
- 53 Kaneko, D., Tada, T., Kurokawa, T., Gong, J. P. & Osada, Y. Mechanically Strong Hydrogels with Ultra-Low Frictional Coefficients. *Adv. Mater.* 17, 535–538 (2005).
- 54 Arakaki, K., Kitamura, N., Fujiki, H., Kurokawa, T., Iwamoto, M., Ueno, M., Kanaya, F., Osada, Y., Gong, J. P. & Yasuda, K. Artificial cartilage made from a novel double-network hydrogel: In vivo effects on the normal cartilage and ex vivo evaluation of the friction property. *J. Biomed. Mater. Res. A* 93, 1160–1168 (2010).
- 55 Azuma, C., Yasuda, K., Tanabe, Y., Taniguro, H., Kanaya, F., Nakayama, A., Chen, Y. M., Gong, J. P. & Osada, Y. Biodegradation of high-toughness double network hydrogels as potential materials for artificial cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. A* 81, 373–380 (2007).
- 56 Tanabe, Y., Yasuda, K., Azuma, C., Taniguro, H., Onodera, S., Suzuki, A., Chen, Y. M., Gong, J. P. & Osada, Y. Biological responses of novel high-toughness double network hydrogels in muscle and the subcutaneous tissues. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 1379–1387 (2008).
- 57 Gong, J. P. Friction and lubrication of hydrogels—its richness and complexity. *Soft Matter* 2, 544–552 (2006).
- 58 Yang, S. Y., O’Cearbhaill, E. D., Sisk, G. C., Park, K. M., Cho, W. K., Villiger, M., Bouma, B. E., Pomahac, B. & Karp, J. M. A bio-inspired swellable microneedle adhesive for mechanical interlocking with tissue. *Nat Commun* 4, 1702 (2013).
- 59 Rose, S., PrevotEAU, A., Elziere, P., Hourdet, D., Marcellan, A. & Leibler, L. Nanoparticle solutions as adhesives for gels and biological tissues. *Nature* 505, 382–385 (2014).
- 60 Yasuda, K., Kitamura, N., Gong, J. P., Arakaki, K., Kwon, H. J., Onodera, S., Chen, Y. M., Kurokawa, T., Kanaya, F., Ohmiya, Y. & Osada, Y. A novel double-network hydrogel induces spontaneous

- articular cartilage regeneration in vivo in a large osteochondral defect. *Macromol. Biosci.* 9, 307–316 (2009).
- 61 Kay, M. I., Young, R. A. & Posner, A. S. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* 204, 1050–1052 (1964).
 - 62 Albee, F. H. Studies in bone growth: triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann. Surg.* 71, 32–39 (1920).
 - 63 Edwards, J. T., Brunski, J. B. & Higuchi, H. W. Mechanical and morphologic investigation of the tensile strength of a bone-hydroxyapatite interface. *J. Biomed. Mater. Res.* 36, 454–468 (1997).
 - 64 Ogiso, M., Yamamura, M., Kuo, P. T., Borgese, D. & Matsumoto, T. Comparative push-out test of dense HA implants and HA-coated implants: findings in a canine study. *J. Biomed. Mater. Res.* 39, 364–372 (1998).
 - 65 Dong, J., Uemura, T., Shirasaki, Y. & Tateishi, T. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 23, 4493–4502 (2002).
 - 66 Maeno, S., Niki, Y., Matsumoto, H., Morioka, H., Yatabe, T., Funayama, A., Toyama, Y., Taguchi, T. & Tanaka, J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 26, 4847–4855 (2005).
 - 67 Ono, K., Yamamuro, T., Nakamura, T. & Kokubo, T. Quantitative study on osteoconduction of apatite-wollastonite containing glass ceramic granules, hydroxyapatite granules, and alumina granules. *Biomaterials* 11, 265–271 (1990).
 - 68 Wang, J., Chen, W., Li, Y., Fan, S., Weng, J. & Zhang, X. Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae. *Biomaterials* 19, 1387–1392 (1998).
 - 69 Levitt, S. R., Crayton, P. H., Monroe, E. A. & Condrate, R. A. Forming method for apatite prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 3, 683–684 (1969).
 - 70 de Groot, K. Clinical applications of calcium phosphate biomaterials: A review. *Ceram. Int.* 19, 363–366 (1993).
 - 71 Fox, K., Tran, P. A. & Tran, N. Recent advances in research applications of nanophase hydroxyapatite. *Chemphyschem* 13, 2495–2506 (2012).

- 72 Thomas, K. A., Kay, J. F., Cook, S. D. & Jarcho, M. The effect of surface macrotexture and hydroxylapatite coating on the mechanical strengths and histologic profiles of titanium implant materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 21, 1395-1414 (1987).
- 73 Cook, S. D., Thomas, K. A., Kay, J. F. & Jarcho, M. Hydroxyapatite-coated titanium for orthopedic implant applications. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 225-243 (1988).
- 74 Cook, S. D., Thomas, K. A., Kay, J. F. & Jarcho, M. Hydroxyapatite-coated porous titanium for use as an orthopedic biologic attachment system. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 303-312 (1988).
- 75 Taguchi, T., Kishida, A. & Akashi, M. Hydroxyapatite formation on/in poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices using a novel alternate soaking process. *Chem. Lett.* 27, 711-712 (1998).
- 76 Iwatsubo, T., Sumaru, K., Kanamori, T., Shinbo, T. & Yamaguchi, T. Construction of a new artificial biomineralization system. *Biomacromolecules* 7, 95-100 (2006).
- 77 Hayami, T., Matsumura, K., Kusunoki, M., Nishikawa, H. & Hontsu, S. Imparting cell adhesion to poly(vinyl alcohol) hydrogel by coating with hydroxyapatite thin film. *Mater. Lett.* 61, 2667-2670 (2007).
- 78 Venkatesan, J. & Kim, S. K. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering--a review. *J Biomed Nanotechnol* 10, 3124-3140 (2014).
- 79 Zakaria, S. M., Sharif Zein, S. H., Othman, M. R., Yang, F. & Jansen, J. A. Nanophase hydroxyapatite as a biomaterial in advanced hard tissue engineering: a review. *Tissue Eng Part B Rev* 19, 431-441 (2013).
- 80 Zhou, H. & Lee, J. Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 7, 2769-2781 (2011).
- 81 Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. & Bizios, R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 22, 1327-1333 (2001).
- 82 Dalby, M. J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M. O., Herzyk, P., Wilkinson, C. D. & Oreffo, R. O. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 6, 997-1003 (2007).
- 83 Hu, Q., Tan, Z., Liu, Y., Tao, J., Cai, Y., Zhang, M., Pan, H., Xu, X. & Tang, R. Effect of crystallinity of calcium phosphate

- nanoparticles on adhesion, proliferation, and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem.* 17, 4690 (2007).
- 84 Huang, Y., Zhou, G., Zheng, L., Liu, H., Niu, X. & Fan, Y. Micro-/nano- sized hydroxyapatite directs differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells towards an osteoblast lineage. *Nanoscale* 4, 2484-2490 (2012).
- 85 Webster, T. J., Ergun, C., Doremus, R. H., Siegel, R. W. & Bizios, R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. *Biomaterials* 21, 1803-1810 (2000).
- 86 Sun, L., Berndt, C. C., Gross, K. A. & Kucuk, A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: a review. *J. Biomed. Mater. Res.* 58, 570-592 (2001).
- 87 Bechtold, J. E., Kubic, V. & Soballe, K. A controlled experimental model of revision implants: Part I. Development. *Acta Orthop. Scand.* 72, 642-649 (2001).
- 88 Van der Vis, H. M., Aspenberg, P., Marti, R. K., Tigchelaar, W. & Van Noorden, C. J. Fluid pressure causes bone resorption in a rabbit model of prosthetic loosening. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 350, 201-208 (1998).