

令和元年5月15日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11330

研究課題名(和文)多孔性非焼結炭酸含有アパタイトの作製と骨形成法の確立

研究課題名(英文)Osteogenesis with Non-sintered Porous Carbonate Apatite

研究代表者

笠井 唯克(Kasai, Tadakatsu)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：30319123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体に代用骨を応用した際に吸収に有利にはたらくと考え、炭酸含有アパタイト多孔体ブロックを非焼結での作製を試みた。作製した試料をX線回折、FT-IR検査にて炭酸含有アパタイトであることを確認し、 μ CT検査で気孔率約56%の多孔体であることが確認できた。作製した試料を用い、ラット骨髄細胞を2週間培養し、ラット背部皮下に移植し、埋入後2～4週間で骨が形成されることが確認された。TRAP染色にて試料の吸収が確認された。非焼結炭酸含有アパタイト多孔体の骨伝導能は、焼結炭酸含有アパタイトよりやや劣るが、両者とも時間の経過に伴って同様の骨形成・成熟過程を示すことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科並びに医科分野における代用骨の必要性は極めて高く、理想的な人工骨/骨補填材とは、材料が吸収されそれにともない新生骨が生成する性質を有する物と考えられている。われわれがこれまでに開発を進めてきた炭酸含有アパタイト多孔体は、骨伝導能を有することと吸収されることが確かめられてきた。本研究では吸収される性質をさらに高めるため、従来の焼結による製法から非焼結で生成する方法に改良し、組織内吸収が生じることと骨伝導能が保持されていることの検証を行い、確認された。本研究の成果は代用骨/骨補填材を必要とする症例への臨床応用につながる可能性を高めた。

研究成果の概要(英文)：Our purpose was development of ideal biomaterial for bone substitution, and confirmation of that was replaced with bone. Considering absorbability, we tried to make "non-sintered" porous carbonate apatite. The manufactured samples were examined by X-ray diffraction, FT-IR and micro focus CT, and confirmed those were containing several percent carbonate ion and approximately 56% porosity. We cultured rat bone marrow cells with non-sintered porous carbonate apatite blocks, and transplanted it in rat dorsal subcutaneous site. Bone formation was observed in 2 weeks or later. This suggests that the non-sintered porous carbonate apatite has ability as scaffold for bone formation. We observed absorption of the sample due to osteoclasts with TRAP staining. TRAP positive reaction was observed in specimens. The bone-forming ability of non-sintered porous carbonate apatite was slightly inferior to that of sintered one. However, both of them showed similar bone-forming and maturing with time.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨補填材 生体材料 炭酸含有アパタイト 組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科並びに医科分野における代用骨の必要性は極めて高く、自家骨もしくは他家骨が生体に最も適したものにもかかわらず、その供給量が皆無に等しく、金属及びリン酸カルシウム系等のセラミックスから或る人工骨を代用骨として使わざるをえないのが現状である。とくに、水酸化アパタイトの焼結体からなる人工代用骨は、生体親和性に優れ、種々の形状(緻密体、多孔体、顆粒状)のものが臨床応用されているが、焼結体としてのアパタイトは化学量論比に近い組成のもので、骨アパタイトと比較すると結晶性が異質な程良好で、埋植後細胞が関与する吸収はほとんど受けず、術後、半永久的に組織に残存することが知られている。従来までの水酸化アパタイトおよび β -TCP を基材とした人工代用骨/組織培養担体は、他の材料に比較して生体親和性に優れているものの代謝機能はなく、真の意味での代用骨/培養骨となっていないのが現状である。

我々はこれまでに、従来までの水酸化アパタイトに代わる炭酸含有アパタイトを新たな焼結原材料とし、本焼結体が極めて有効な骨補填材となり得ることを示唆してきた¹⁾。

2. 研究の目的

本研究では、骨置換が可能な生体材料の開発と確認を目的とした。動物実験では、開発した非焼結炭酸含有アパタイト多孔体ブロックが、宿主の骨組織とは離れた部位で培養した骨髄細胞が骨形成をする足場となり得るか否かと、開発した非焼結炭酸含有アパタイト多孔体ブロックが吸収されるか否かを検証した。また、非焼結炭酸含有アパタイト多孔体ブロックと焼結炭酸含有アパタイト多孔体ブロックの骨形成能の比較検討を行った。

3. 研究の方法

材料および方法

3-1) 多孔体の作製

非焼結炭酸含有アパタイト多孔体 (ns-CA) の作製

炭酸含有アパタイトの前駆物質として第二リン酸カルシウム二水塩 (DCPD) を用い、粒子サイズ 500~800 μm 径の顆粒糖 (グラニュー糖、(有)服部商会) を重量比 3 : 7 で混合し、その後、金型を用い 15kg / cm^3 で一次加圧を行い、8mm 高さ 5.5~5.6mm に成型した。二次加圧は静水圧装置 (200M Pa) を用い、DCPD / グラニュー糖の圧粉体を得た。糖の溶出と DCPD の CA への転移を同時に進めるため、浸漬溶液として 60 度の 1 M 炭酸水素ナトリウム溶液を用いた。DCPD / グラニュー糖の圧粉体を 60 度の 1 M 炭酸水素ナトリウム溶液に 24 時間浸漬し、多孔体を取り出し蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、多孔体ブロックとした。

焼結炭酸含有アパタイト多孔体 (s-CA) の作製

Doi ら²⁾の方法に準じて、約 12wt%の炭酸イオンを含有するアパタイト (CAP) を合成した。6 mol 炭酸二ナトリウム (Na_2CO_3) を含む 1.2mol リン酸二ナトリウム溶液 8 l に硝酸カルシウム溶液 2 l を滴下し、合成温度 100 (沸騰状態) で、 $\text{pH}9.0 \pm 0.1$ に調節しながら 3 日間反応させた。沈澱物を蒸留水で 10 回洗浄した後、その吸引濾過泥を 100 度で一夜乾燥させ、粉末とした。続いて、ns-CA と同様に CAP 粉末と粒子サイズ 500~800 μm 径の顆粒糖 を重量比 3 : 7 で混合し、金型を用い 15kg / cm^3 で一次加圧を行い、8mm 高さ 5.5~5.6mm に成型した。二次加圧は静水圧装置 (200M Pa) を用い、CAP / グラニュー糖の圧粉体を得た。同圧粉体を蒸留水に浸漬してグラニュー糖を溶出させた後、60 度の恒温室で乾燥させ、電気炉にて 700 度、1

時間加熱し、焼結を行い（焼結後の炭酸イオンの含有量は約 6wt%）多孔体ブロックとした。

3-2) 非焼結炭酸含有アパタイト多孔体の検査

(i) μ CT 観察

作製した多孔体ブロックの形状を μ CT 装置にて画像を構築し観察を行った。

(ii) X線回折

X線回折の測定は多孔体を乳鉢、乳棒にて粉碎、粉末とし、X線回折パターンを測定し同定を行った。

(iii) 赤外線吸収スペクトル (FT-IR) 分析

試料 1 mg に 400mg の臭化カリウムを加え均一混合後、ペレットを作製し、赤外線吸収スペクトル分析装を用いて分析した。

3-3) 実験動物

本実験には Fischer 系 7 週齢雄性ラットを用いた。本実験は朝日大学動物実験管理規定に基づき施行した（承認番号 2017-46）。

3-4) 骨髓細胞の採取

Fischer 系 7 週齢雄性ラットの大腿骨から骨髓細胞を採取するために、ラットに吸入麻酔をかけ、大腿骨を摘出した。次に、大腿骨の両骨端を切除し、調製した MEM 細胞培養液を 24G の注射針付きのシリンジで大腿骨断端の一方より骨髓腔へ注入し、骨髓液を洗い流すようにして骨髓細胞を採取し、骨髓細胞懸濁液を得た。

3-5) 骨髓細胞と多孔性 CA ブロックの複合体作製

多孔性 ns-CA ブロックと多孔性 s-CA ブロックが骨髓細胞の増殖の scaffold となるように、細胞と多孔性ブロックを複合させた。

3-6) 骨髓細胞・多孔性 ns-CA ブロック複合体、および骨髓細胞・多孔性 s-CA ブロック複合体の培養

CO₂ インキュベーター内で 14 日間培養した。

3-7) 培養した骨髓細胞・多孔性 ns-CA(および s-CA) ブロック複合体の実験動物への埋入

埋入の宿主となる実験動物には、骨髓細胞の採取を行った動物と同系の Fischer 系 7 週齢雄性ラットを用いた。実験試料の埋入は適切に麻酔を施して行い、メスにて背部皮膚に切開を加え、皮下の疎性結合組織を鈍的に剥離し、背部の筋層の上部で皮下の結合組織下の間隙部分で切開部より 1 センチ以上離れた部位 2 ヶ所に、培養した骨髓細胞・ns-CA(および s-CA) ブロック複合体を埋入し、皮膚を絹糸にて縫合した。

3-8) 埋入試料の摘出と μ CT 観察

ラットの皮下に試料埋入後、1, 2, 4, 8 週間後にラットを適切な麻酔下で脱血屠殺して、試料を摘出し、摘出した試料を μ CT 装置にて撮影した。

3-9) 組織学的、組織化学的観察

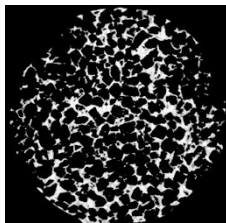
摘出した試料を 10% EDTA で約 1 週間、中性脱灰後、組織標本を作成した。組織標本は HE 染色、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色、一次抗体に抗 dentin matrix protein1 (DMP) 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

4-1) 作製した ns-CA 多孔体



外 観



μCT (水平断)

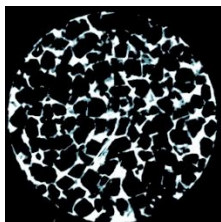
計画通り、多孔質の形態を持つ円柱形のブロックが作製され、μCT検査の結果、気孔率が約56%であることが確認された。

4-2) ns-CA 多孔体のX線回折、FT-IR 分析の結果

X線回折により $32^\circ / 2\theta$ 近傍に低結晶性のアパタイトに典型的にブロードなピークを認め、FT-IR分析により $1400 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ に炭酸基による2つの吸収ピークが認められ、生成したアパタイトが炭酸含有アパタイトであることが確認された。

4-3) ns-CA 多孔体の埋入摘出後のμCT検査結果

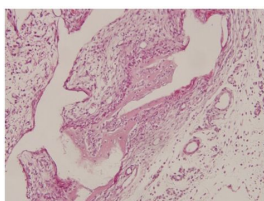
骨形成および多孔体ブロックの吸収を評価することを目的に、埋入1, 2, 4, 8週間後にμCT撮影を行い、三次元画像解析にて骨塩量(BMD)を計測したが、数値に明らかな変動はなかった。しかし、μCT画像上、経時的に気孔の鋭縁が丸みを帯びる傾向が観察された。



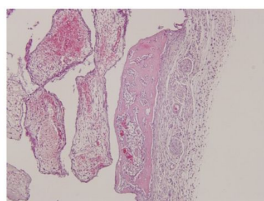
ns-CA 多孔体埋入4週間後の摘出した試料のμCT像

4-4) ns-CA 多孔体埋入摘出後の組織学的観察結果

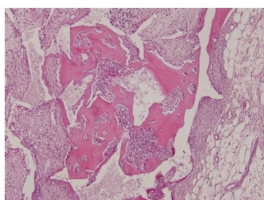
埋入1週間後で、CA多孔体ブロックのCAに接して幼弱な骨様組織が認められ、2週間後で、明らかな骨組織となった。4週間後ではCA多孔体ブロックの気孔であった空間を占めるように骨様組織が一部形成され、層板構造が見られる成熟した骨であることがうかがわれた。8週間後では、骨様組織の形成範囲が減少傾向にあった。



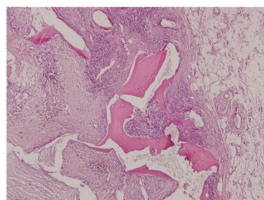
埋入1週間後



埋入2週間後

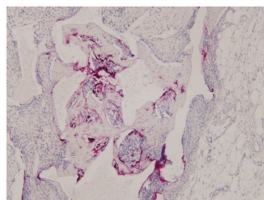


埋入4週間後

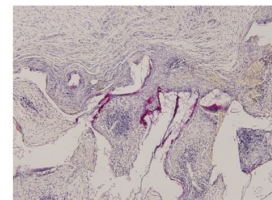


埋入8週間後

HE 染色



埋入4週間後



埋入8週間後

TRAP 染色

4-5) ns-CA 多孔体 TRAP 染色の所見

酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) は破骨細胞のマーカー酵素であり、本実験では埋入2週間後で発現し、4週間後、8週間後でも認められた。2週間後、4週間後では形成された骨様組織に関連して観察された。8週間後では骨様組織とは離れた部位でも TRAP 陽性の反応

を認めた。

4-6) ns-CA 多孔体免疫組織化学染色の結果

抗 DMP 抗体を骨細胞のマーカーとして免疫組織化学染色を行ったところ、HE 染色で骨様組織と考えた組織の封入された細胞に DMP 染色陽性反応が見られ、骨細胞であることが確認された。

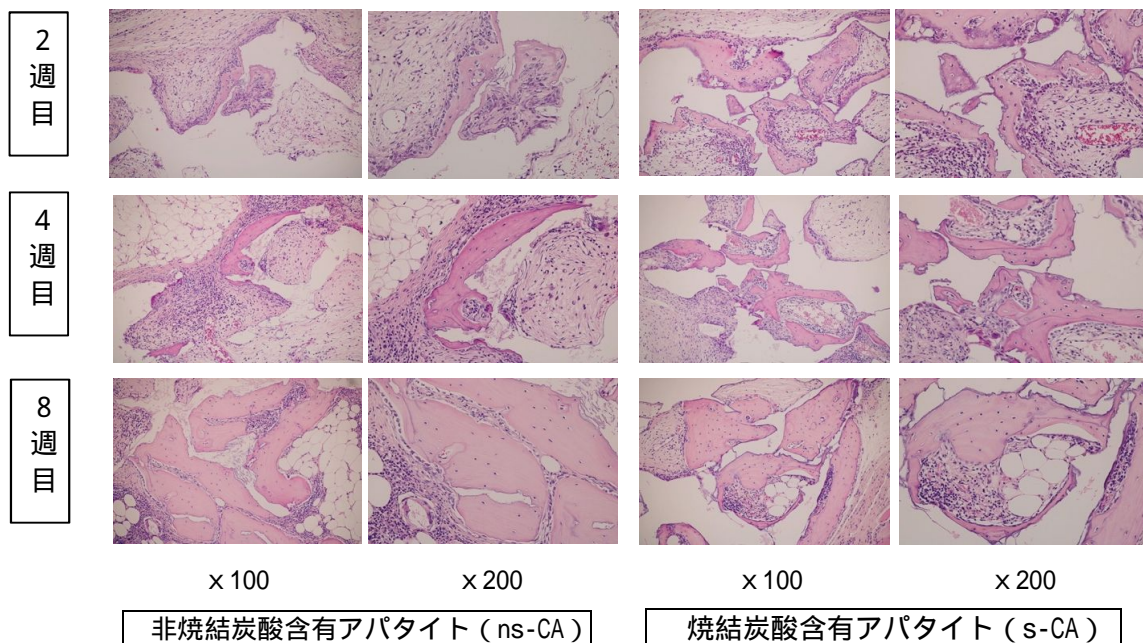
4-7) ns-CA 多孔体と s-CA 多孔体による骨形成の比較結果

組織標本の HE 染色画像は、非焼結炭酸含有アパタイト (ns-CA)、焼結炭酸含有アパタイト (s-CA) の各時期 (1 週目, 2 週目, 4 週目, 8 週目) それぞれ 8 画像得られた。骨形成が認められた割合を下表に示す。1 週目ではいずれの標本でも骨形成を認めなかった。2 週目では ns-CA では 8 個中 1 つであったのに対し、s-CA では 5 つであった。また 4 週目、8 週目において、ns-CA では 8 個中 6 つにとどまったのに対し、s-CA では 8 個全てで骨形成を認めた。

表 骨形成認められた割合

	1 週目	2 週目	4 週目	8 週目
非焼結炭酸含有アパタイト (ns-CA)	0/8	1/8	6/8	6/8
焼結炭酸含有アパタイト (s-CA)	0/8	5/8	8/8	8/8

骨形成を認めた部分を観察したところ、ns-CA、s-CA 共に、2 週目で幼弱な骨形成を認め、4 週目で骨の成熟が進み、8 週目で層板状の骨形成を認めた。ns-CA と s-CA を比較すると、ns-CA より s-CA の方が、骨形成範囲が広い傾向にあった。



まとめ

生体に応用した際に吸収に有利にはたらくと考え、炭酸含有アパタイト多孔体ブロックを非焼結での作製を試みた。作製した試料を X 線回折、FT-IR 検査にて炭酸含有アパタイトであることを確認し、 μ CT 検査で気孔率約 56% の多孔体であることが確認できた。

作製した試料を scaffold に用い、ラット骨髄細胞を 2 週間培養し、骨組織とは無縁なラット背部皮下に移植し、埋入後 2~4 週間で骨が形成されることが確認された。TRAP 染色にて破骨

細胞による試料の吸収を観察したが、TRAP 陽性反応は主に骨が形成された範囲であった。形成された骨から離れた部位では、埋入 8 週後の標本で一部確認された。

非焼結炭酸含有アパタイト多孔体の骨伝導能は、焼結炭酸含有アパタイトよりやや劣るが、両者とも時間の経過に伴って同様の骨形成・成熟過程を示すことが確認された。

引用文献

- 1) Kasai Tadakatsu, Sato Kimihiko, Kanematsu Yoshinori, Shikimori Michio, Kanematsu Nobutake, Doi Yutaka. Bone Tissue Engineering Using Porous Carbonate Apatite and Bone Marrow Cells. Journal of Craniofacial Surgery; 21(2): 473-478. 2010.
- 2) Doi Y, Koda T, Wakamatsu N, Goto T, Kamemiz H, Moriwaki Y, Adachi M, Suwa Y. Influence of carbonate on sintering of apatite. J Dent Res; 72: 1279-1284. 1994.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

T. Kasai, K. Watanabe, Y. Doi, T. Muraki, M. Shikimori, S. Sumitomo. Experimental Study of Osteogenesis with Non-sintered Porous Carbonate Apatite. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery; 44(suppl.1): e239. 2015.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1, T. Kasai, K. Watanabe, Y. Doi, T. Muraki, M. Shikimori, S. Sumitomo. Experimental Study of Osteogenesis with Non-sintered Porous Carbonate Apatite. The 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (Melbourne, Australia). 2015 年 10 月 27-30 日.
2. 笠井唯克、渡邊一弘、本橋征之、村松泰徳、住友伸一郎。非焼結炭酸含有アパタイト多孔体と骨髄細胞による実験的骨形成 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2017 年 4 月 26-28 日。
3. T. Kasai, K. Watanabe, Y. Doi, S. Sumitomo. Osteogenesis with Non-sintered Porous Carbonate Apatite. The 24th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (Rio de Janeiro, Brazil). 2019 年 5 月 21-24 日.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

渡邊一弘, Watanabe Kazuhiro, 朝日大学・歯学部, 助教, 研究者番号: 60610780

式守道夫(2015 年度), Shikimori Michio, 朝日大学・歯学部, 教授, 研究者番号: 70154193

土井 豊(2016~2018 年度), Doi Yutaka, 朝日大学・歯学部・名誉教授, 研究者番号: 40116067

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。