

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20482

研究課題名(和文)炭酸アパタイト連通多孔体の気孔制御が骨置換速度に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of pore control of interconnected porous carbonate apatite on the bone replacement rate

研究代表者

野村 俊介 (Nomura, Shunsuke)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60710994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸アパタイトは骨リモデリングと調和し、自家骨のように骨に置換する。申請者は炭酸アパタイトの骨への置換を飛躍的に加速するために石膏小球を前駆体とした炭酸アパタイト連通多孔体を調製する方法を確立した。本研究では当該方法を用いて、気孔径を制御し、気孔径が炭酸アパタイト連通多孔体の骨置換速度に及ぼす影響を検討した。

日本家兎大腿骨に形成した骨欠損部に異なる気孔径を持つ炭酸アパタイト連通多孔体を埋入し、新生骨の形成を評価した。結果として、ブロック体と比較し、多孔体は早期に埋入部への新生骨の侵入を認めた。また、気孔径が小さいほど早期に新生骨が深部まで侵入しており、多孔体が吸収されていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Carbonate apatite is harmonized with bone remodeling and replaced with bone like autogenous bone. We have established a method for producing an interconnected porous carbonate apatite using gypsum spheres as a precursor in order to greatly promote substitution to bone. In this study, we investigated the influence of pore size on the bone substitution rate of porous carbonate apatite by controlling the pore size using this method.

The bone defect formed in the femur of the rabbit was implanted with interconnected porous carbonate apatite bodies having different pore size to evaluate the formation of new bone. As a result, compared with the block body, the porous body was observed early penetration of new bone into the implantation part. In addition, the smaller the pore diameter, the earlier the invasion of new bone into the deep part and the porous body was absorbed.

研究分野：生体材料

キーワード：炭酸アパタイト 連通多孔体 気孔径 骨置換

1. 研究開始当初の背景

申請者らは骨の無機組成が水酸アパタイトではなく炭酸アパタイトであることに着目し、前駆体を用いた溶解析出反応による炭酸アパタイトの調製法を確立した。水酸アパタイトは破骨細胞に吸収されず、骨には置換されないが、炭酸アパタイトは破骨細胞に吸収され、骨に置換される。炭酸アパタイト骨補填材の骨置換は、細胞によって行われるため、海面骨(図1)のように連通多孔体化によって骨置換速度の飛躍的加速が期待される。

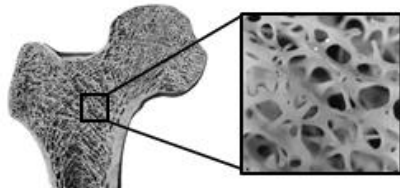


図1 細胞の侵入に最適な連通構造の海綿骨

そこで申請者は連通多孔体化のために球体の六方最密充填構造(図2)に着目した。六方最密充填された球同士の間には空間(気孔)が形成され、またその気孔同士はお互いに連通している。すなわち、球が連結されてできた骨補填材は完全連通気孔をもつ骨補填材となり、また球径を変えることで、球間に形成される気孔径を制御することができると考えた。

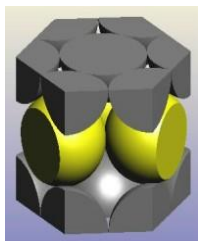


図2 六方最密充填構造

球を最密充填するには、形態のそろった球体を作成する必要性があり、申請者は油の中に水滴を落とすと界面張力によりその水滴が球形になる現象を用いた W/O エマルジョン法(図3)で球体を作成した。

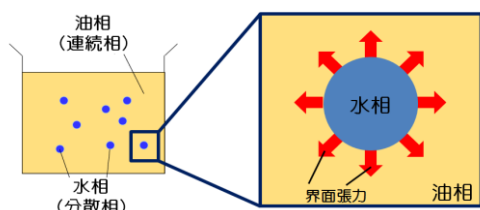


図3 W/O エマルジョン

完全な球体を作成するためにはエマルジョンの中で水相成分が固まる必要があるため、自己硬化性のある半水石膏をもちいて球形を作成した。

また球体を連結させるために石膏の脱水

反応を用いた。W/O エマルジョン法で作製した石膏小球は硬化した二水石膏であるため球体同士は結合しない。そこで自己硬化性を付与するために一度加熱して半水石膏小球にすることで自己硬化性を再度付与し、そして、その半水石膏小球を積層した状態で二水石膏に再度硬化させることで石膏連通多孔体の作製が可能であることを開発した。また申請者は石膏を前駆体とした炭酸アパタイト作成法を確立しており、同様の方法で、作製した石膏連通多孔体は炭酸アパタイト連通多孔体(図4)に組成変換が可能であることを開発した。

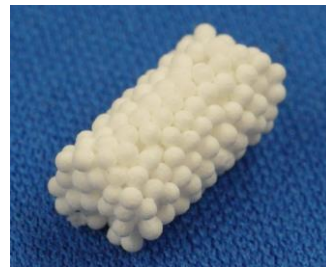


図4 炭酸アパタイト連通多孔体

論文では一般的に約 $300\mu\text{m}$ の気孔に細胞が入りやすいと言われているため、申請者は約 1mm の球を用いて約 $300\mu\text{m}$ の気孔を有する炭酸アパタイト連通多孔体を調製したが、動物実験では $50\mu\text{m}$ の気孔にも細胞が侵入していることが分かった(図5)。

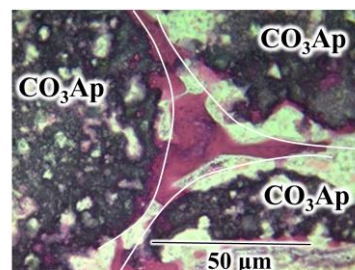


図5 炭酸アパタイト連通多孔体の小気孔に細胞が侵入した組織像

骨補填材の気孔径を小さくすることができるということは、体積あたりの骨補填材の表面積が増やすことができることを意味する。すなわち、細胞がより多く骨補填材に付着することができるため、細胞によって行われる炭酸アパタイト骨補填材の骨置換速度が飛躍的に加速されることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では申請者が開発した小球を用いた連通気孔体作成法を用いて気孔径を制御し、気孔径が炭酸アパタイト連通多孔体の骨置換速度に及ぼす影響を検討することとした。

まず第一に、炭酸アパタイト連通多孔体の気孔制御が可能であるかを検討した。申請者が開発した炭酸アパタイト連通多孔体の気

孔径は球径の大きさによって容易に制御できると考えられた(図6)。

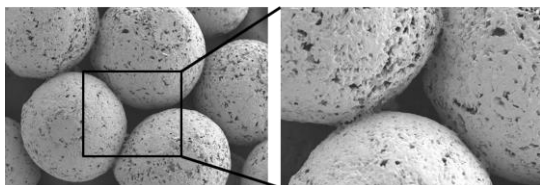


図6 炭酸アパタイト連通多孔体の気孔形態

石膏小球から気孔径の異なる石膏連通多孔体を調製し、組成変換させて炭酸アパタイト連通多孔体を調製するとともに材料学的検討を行うこととした。

次に、実験動物を用いての病理組織学的解析を行うこととした。実験動物に骨欠損を形成し、気孔径の異なる炭酸アパタイト連通多孔体を埋入し、細胞侵入性、骨置換速度などを病理組織学的に解析することとした。

3. 研究の方法

1. 炭酸アパタイト連通多孔体の気孔制御

①W/O エマルジョン法による石膏小球の球径制御

炭酸アパタイトの前駆体である石膏小球の調製をW/O エマルジョン法で行った。蒸留水と半水石膏の粉末を混合し、スラリー化させ、攪拌しているオレイン酸に滴下した。半水石膏は時間経過とともに二水石膏に組成変化し硬化するため、硬化するまで攪拌した。硬化後、オレイン酸の除去のためにアセトンで洗浄を行い、洗浄後ふるい分けし、球径の異なる石膏小球を調製した(図7)。

攪拌速度が上昇するほど、せん断力が増加し、スラリーが細分化されるため、球径が小さくなる。攪拌速度を変動因子とし、攪拌速度と得られる石膏小球の球径の関係を求めた。



図7 W/O エマルジョン法で調製した石膏小球

②石膏連通多孔体の調製

作製した石膏小球は二水石膏小球であるため硬化性がない。石膏小球に自己硬化性を付与するために、二水石膏小球を120℃で加熱して脱水させ、半水石膏小球にした。得られた半水石膏小球を直径6mmのガラス管に高

さ12mmになるよう積層したのち、蒸留水に浸漬し、球体周囲の余剰水を遠心分離機で除去した(図8)。表面張力を利用して石膏球接触部に水を残し、当該水を利用して、硬化反応がすすみ、二水石膏連通多孔を形成した。

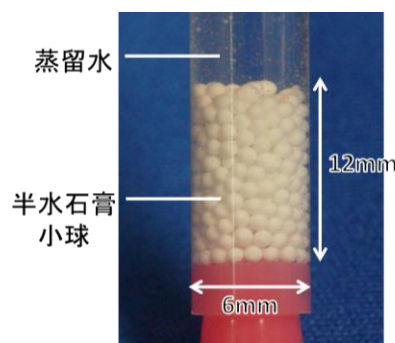


図8 小球の積層充填

③炭酸アパタイト連通多孔体への組成変換

石膏連通多孔体から炭酸アパタイト連通多孔体への組成変換反応には水熱処理を用いた。調製した石膏連通多孔体を水熱容器内でリン酸水素ナトリウム-炭酸水素ナトリウム混合溶液に浸漬し、水熱処理を行い、炭酸アパタイトへの組成変換を行った。

④炭酸アパタイト連通多孔体の組成・物性の検討

調製した炭酸アパタイト連通多孔体の組成分析、物性分析を粉末X線回折装置および赤外分光分析を用いて行った。微細構造に関しては走査型電子顕微鏡で観察を行った。万能試験機を用いて、圧縮強度を測定した。

2. 実験動物を用いての病理組織学的解析

⑤炭酸アパタイトブロック体の調製

動物実験において対照試料とする炭酸アパタイトブロック体を調製した。直径6mm高さ3mmに作製した二水石膏ブロック体を水熱容器内でリン酸水素-炭酸水素ナトリウム混合溶液に浸漬し、水熱処理を行い、炭酸アパタイトブロック体への組成変化を行った。得られた炭酸アパタイトブロック体の組成に関しては④記載の方法で解析した。

⑥炭酸アパタイト連通多孔体による骨欠損の再建

日本白色家兎(17週齢、オス)の大腿骨に骨欠損を作成し、調製した骨補填材で再建を行った。まずケタミン塩酸塩-キシラジン塩酸塩混合液にて全身麻酔を行い、大腿部の剃毛およびイソジンによる消毒を行った。皮膚および骨膜を剥離し、大腿骨を露出させた。骨欠損は歯科用エンジン及びラウンドバーを用いて、直径6mm高さ3mmの骨欠損を形成した(図9)。骨欠損部に炭酸アパタイト連通多孔体、対照試料として炭酸アパタイトブロック体をそれぞれ埋入し、創を閉じた。炭酸

アパタイト連通多孔体としては気孔径の異なる4種類を用いた。術後1週間は、感染予防のために患部をイソジンで消毒し、ゲンタマイシンの投与を1日1回3日間行った。

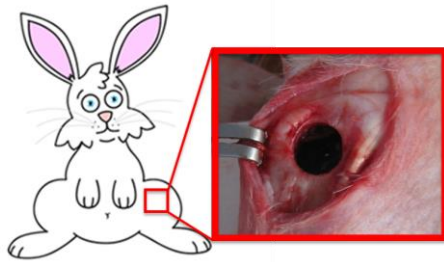


図9 日本白色家兎大腿骨への埋入部

⑦病理組織学的解析

埋入4, 8週後に麻酔薬の過剰投与で安楽死させ、大腿骨及び周囲組織をとりだし、固定液(10%中性緩衝ホルマリン液)を用いて固定を行った。標本は一般組織染色(H&E染色)を行い、補填材の吸収程度、新生骨のリモデリングを評価し、作製した骨補填材が有用であるか検討した。

4. 研究成果

①W/O エマルジョン法による石膏小球の球径制御に関する結果

攪拌速度を変動因子とし、攪拌速度と得られる石膏小球の球径の関係を求めた。結果、攪拌速度が上昇するにつれて、得られる石膏小球は小さくなるのが分かったが(図10)、400rpm以下では300 μ m以下の小さい石膏小球ができず、また1000rpmを超えると、直径1mm以上の球が作製されなくなることが分かった。(図11)

また攪拌速度を変えたことによる球形態に違いは見られないことが分かった。

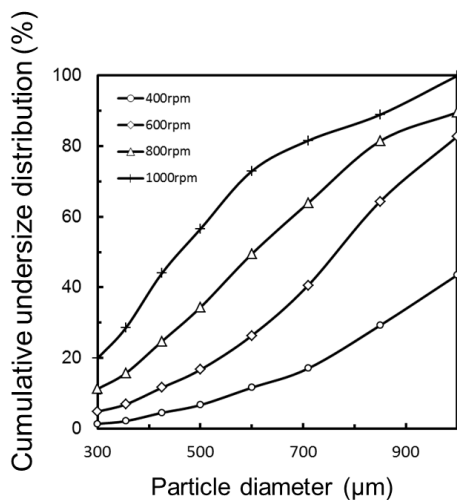


図10 積算篩下分布 攪拌速度が上昇するにつれて、大きい目の篩を通過する球の量が増加している。

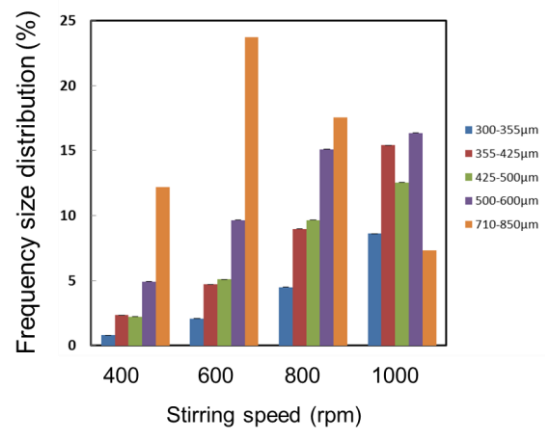


図11 攪拌速度と粒度分布の関係

②石膏連通多孔体の調製に関する結果

異なる直径の石膏小球で連通多孔体の作製が可能かを検討した。推定気孔径が400、300、200、100 μ mになるように小球のサイズを直径1.00-1.18、0.71-0.85、0.50-0.60、0.21-0.30mmに分類し、それぞれ異なる大きさの小球で連通多孔体の作製を行った。①の結果より、各小球を効率よく作成するために攪拌速度は800rpmとし、すべての小球は同じ条件で作製した。

結果、それぞれの球径において石膏連通多孔体の作製が可能であることが確認できた(図12)。また小球のサイズを小さくすることで、各多孔体における気孔のサイズも小さくなることが確認され(図13)、本作製法を用いて多孔体の気孔径を制御することができるということが判明した。

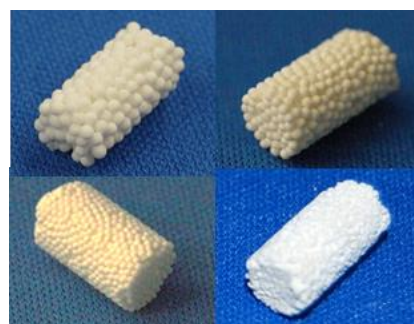


図12 異なるサイズの石膏小球で作製した連通多孔体

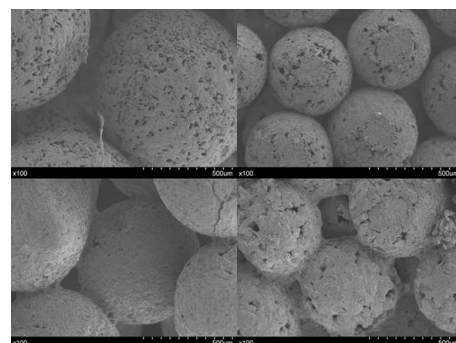


図13 各多孔体の気孔形態 (SEM像)

③石膏連通多孔体から炭酸アパタイト連通多孔体への組成変換及び組成・物性の検討に関する結果

各小球で作製した石膏多孔体が水熱処理を用いて（3. 研究の方法③参照）炭酸アパタイトへ組成変化しているかをX線回折を用いて確認した結果、すべての多孔体がアパタイトと同じピークを示し、石膏からアパタイトへ組成変化されていることが確認された（図14）。

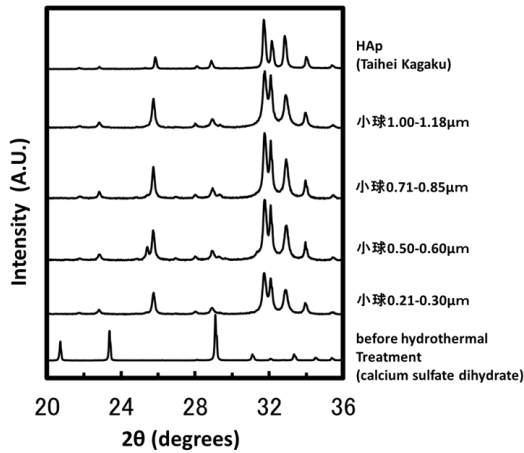


図14 各多孔体のX線回折結果

また、作製されたアパタイトが炭酸基を含有しているかフーリエ変換赤外分光法で分析した結果、すべての資料で炭酸基を示すピークを認め、作製された多孔体が炭酸アパタイトであることが確認された。（図15）

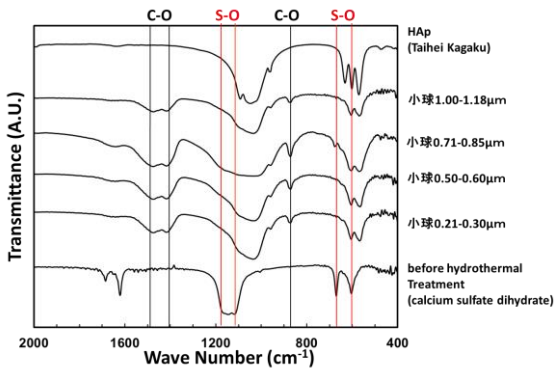


図15 各多孔体の赤外分光法のピーク

また、万能試験機を用いて、圧縮強度を測定した結果、用いた小球の大きさが小さくなるにつれて、機械的強度は増加することが分かった。一方、どの小球を用いても炭酸アパタイト連通多孔体に組成変化させた後の機械的強度は石膏連通多孔体より低下することが分かった。（図16）

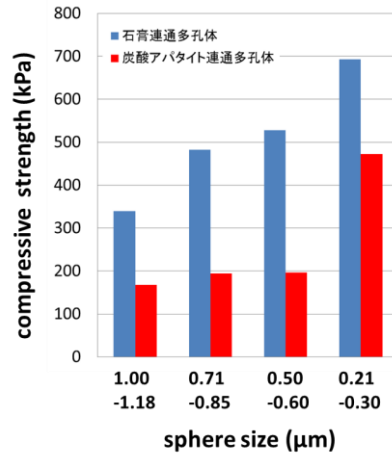


図16 各多孔体の圧縮強度

④実験動物を用いた病理組織学的解析結果

日本白色家兎（17週齢、オス）の大腿骨に骨欠損を作成し、異なる小球サイズ（直径1.00-1.18、0.71-0.85、0.50-0.60、0.21-0.30mm）で作製した炭酸アパタイト連通多孔体で再建を行った。また、対照試料として直径6mm高さ3mmの炭酸アパタイトブロック体を調製し、同様の方法で再建を行った。

埋入4週間において、骨欠損部には治癒が見られず、また炭酸アパタイトブロックで再建を行った部位には新生骨の形成が見られなかった。一方、炭酸アパタイト連通多孔体で再建した部位は、残存骨に接触している部位から新生骨が気孔間を通るように形成されており、気孔径が小さいほうが深部まで骨形成が顕著であることが分かった（図17）。

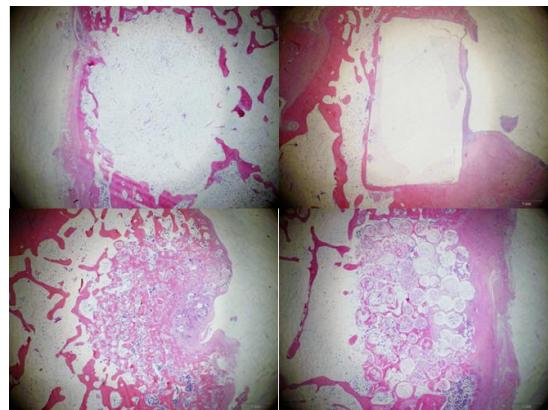


図17 4週における組織像（左上：骨欠損、右上：ブロック体、左下：直径0.21-0.30mmの石膏小球で作製した炭酸アパタイト連通多孔体、右下：直径0.50-0.60mmの石膏小球で作製した炭酸アパタイト連通多孔体）

また、埋入8週間においては、すべての炭酸アパタイト連通多孔体の気孔、また小球内部においても新生骨および血管の形成が見られた（図18）。また、直径0.21-0.30μmの石膏小球で作製した炭酸アパタイト連通多

孔体は埋入した多孔体は欠損部にほとんど認められず(図 19)、他の多孔体と明らかに吸収の差があることが判明した。

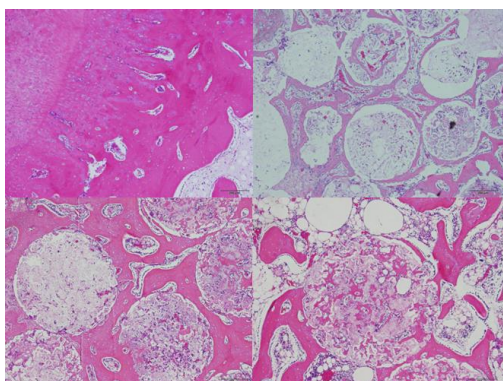


図 18 8週における炭酸アパタイト連通多孔体で再建した部の組織像(左上: 0.21-0.30mm、右上: 0.50-0.60mm、左下: 0.71-0.85、右下: 直径 1.00-1.18mm)

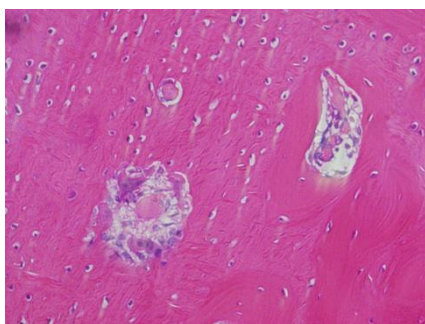


図 19 新生骨内に残存している炭酸アパタイト

以上より、炭酸アパタイト連通多孔体はブロック体と比較し、早期に埋入部への新生骨の侵入を認め、また、気孔径が小さいほど早期に新生骨が深部まで侵入しており、多孔体が吸収されることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

辻 恭子, 春山 直人, 野村 俊介, 村田 直久, 吉崎 恵悟, 光安 岳志, 高橋 一郎. 口蓋裂単独群に見られる顎顔面形態の特徴とそれに影響を与える因子について 第 74 回日本矯正歯科学会大会 福岡 2015 年 11 月 18 - 20 日

宮崎 佳奈子, 春山 直人, 野口 健志, 野村 俊介, 吉崎 恵悟, 高橋 一郎. アレンドロネートの周期的静脈投与を受けている成長期骨形成不全症患者 3 症例の顎顔面形

態の特徴 第 76 回日本矯正歯科学会学術大会 札幌 2017 年 10 月 18 - 20 日

[図書] (計 0 件)

[産業財権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 俊介 (NOMURA, Shunsuke)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号: 60710994

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()