

令和元年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11649

研究課題名(和文) 自己硬化型 型リン酸三カルシウム骨補填材の創製とその病理組織学的検索

研究課題名(英文) Fabrication of beta-tricalcium phosphate cement and their tissue responses

研究代表者

Munar M・L (Munar, Melvin)

九州大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：50432919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 型リン酸三カルシウム(-TCP)顆粒をNaHSO<sub>4</sub>水溶液に浸漬することで、硫酸カルシウム二水和物(CSD)でコーティングされた -TCP顆粒を作製した。その後、この顆粒を加熱することで、CSDの脱水が生じ、硫酸カルシウム半水和物(CSH)でコーティングされた -TCPが得られた。CSH被覆 TCP顆粒を生理食塩水と混合すると、CSHの硬化反応が生じ、 -TCP顆粒からなるセメントが得られた。このCSH-被覆 -TCP顆粒をウサギ大腿骨欠損に埋入したところ、欠損部でセメント化し、埋入後4週間時点で約28%の新生骨が形成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で作製したCSH被覆 -TCP顆粒は、中性で自己硬化性を示す顆粒セメントである。このセメントは、顆粒から成るため、骨欠損部において多孔体が形成されるという特徴がある。これは粉末から成るセメントにはない特徴であり、セメント内への細胞やタンパク等の侵入を容易にする。この顆粒セメントは、母床骨と顆粒、顆粒同士との連続性が確保されている。また、顆粒をそのまま埋入する場合に比べて高い骨形成能が得られることを確認している。以上より、この顆粒セメントは、歯科や整形外科領域において有用であると思われる。

研究成果の概要(英文)： Calcium sulfate dihydrate (CSD)-coated -tricalcium phosphate (TCP) granules were produced by immersing -tricalcium phosphate in NaHSO<sub>4</sub> solution. The CSD-coated -TCP granules were heated, resulting in the formation of calcium sulfate hemihydrate (CSH)-coated -TCP granules. When the CSH-coated -TCP granules were mixed with saline, they set to be cement composed of -TCP granules. The CSH-coated -TCP granules were implanted into the defect of rabbit femur. The CSH-coated -TCP granules set in the defect. At four weeks after implantation, 28% of new bone was formed.

研究分野：生体材料

キーワード：顆粒セメント 骨補填材 -TCP

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントにおける骨造成、腫瘍治療に起因する骨再生など歯科医療においては骨再建・骨再生が求められる場合が多い。自家骨採取が困難な骨再建・骨再生術式においては、水酸アパタイト顆粒や $\beta$ 型リン酸三カルシウム（ $\beta$ TCP）顆粒などの人工骨補填材が用いられる。また、欧米では吸収性に優れる硫酸カルシウム二水和物（CSD）も人工骨補填材として臨床応用されている。しかしながら、現在臨床応用されている人工骨補填材はいずれも自家骨と比較して骨伝導性に劣る。また、骨補填材顆粒単独での垂直的骨欠損の再建は困難である。そのため、高機能性骨補填材の創製が社会的要請となっている。骨欠損部における再生治療においては、①母床骨から欠損内部までの連続性、②顆粒の動揺防止、③適切な気孔確保、④細胞の活性化、などが重要な因子であることから、顆粒に硬化性を付与すれば理想的な骨補填材が創製できると考えられる。これまでに申請者は、酸性領域においてはリン酸水素カルシウム二水和物（DCPD:  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）が最安定相であることに着目し、 $\beta$ TCP顆粒と酸性リン酸カルシウム水溶液から構成され、 $\beta$ TCP顆粒がDCPDで橋架け硬化される顆粒セメントを創製し、その有用性を検討してきた。しかし、酸性のためか、十分な骨形成が認められないことが明らかになった。一方で、硬化性はないが、 $\text{Ca}^{2+}$ が顆粒から遊離されるDCPD被覆 $\beta$ TCP顆粒は、 $\beta$ TCP顆粒と比較して、圧倒的に優れる骨伝導性を示すことがわかった。この実験結果から、中性で硬化し、 $\text{Ca}^{2+}$ を遊離する骨補填材顆粒が理想的な骨補填材であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、中性環境で自己硬化する $\beta$ TCP顆粒を創製し、実験動物を用いて自己硬化型 $\beta$ TCP顆粒セメントの有用性を病理組織学的に実証することを目的とする。硬化性組成物としてはすでに検討した骨欠損部が酸性環境となるDCPD形成セメント以外にアパタイト形成セメントや硫酸カルシウム（石膏）が知られている。両者とも骨欠損部は中性領域となるためDCPD形成セメントの問題点は回避できるが、アパタイト形成セメントは予備実験から顆粒では硬化時間が長くなり、実用的でないことがわかっている。そこで本研究においては $\beta$ TCP顆粒に硫酸カルシウム半水和物を被覆し、骨欠損部内で硬化する硫酸カルシウム被覆 $\beta$ TCP顆粒の検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### ① $\beta$ 型リン酸三カルシウム顆粒の調製

炭酸カルシウムとリン酸水素カルシウムをCa/Pモル比が1.5となるように湿式混合し、電気炉にて $800^\circ\text{C}$ で仮焼した後に、 $5\text{MPa}$ で仮焼した粉末を圧粉した。次に、圧粉体を $1150^\circ\text{C}$ で8時間焼成し、炉冷した。得られた焼成体を粉碎し、 $300\text{-}500\mu\text{m}$ の顆粒（ $500\mu\text{m}$ のふるいを通過、 $300\mu\text{m}$ のふるいを通過しない顆粒）を調製し、以降の実験に用いた。顆粒の組成が $\beta$ TCP顆粒であることは粉末X線回折装置で確認した。また、 $\beta$ TCP顆粒の形態はSEMにて観察した。

#### ② 硫酸カルシウム半水和物被覆 $\beta$ 型リン酸三カルシウム顆粒の調製

①で調製した $\beta$ TCP顆粒を硫酸水素ナトリウム水溶液に浸漬した。 $\beta$ TCP顆粒の浸漬に伴い、 $\beta$ TCPが酸性の硫酸水素ナトリウム水溶液に溶解し、 $\text{Ca}^{2+}$ が遊離された。遊離された $\text{Ca}^{2+}$ と硫酸水素ナトリウム水溶液中の $\text{SO}_4^{2-}$ が反応し、硫酸カルシウム二水和物（CSD:  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）として析出した。硫酸水素ナトリウム水溶液の濃度、温度、処理時間を変動因子として硫酸カルシウム二水和物（CSD）の形成を検討した。得られたCSD被覆 $\beta$ TCP顆粒を $100^\circ\text{C}$ で熱処理し、CSDを脱水して硬化性を示す硫酸カルシウム半水和物（CSH）とし、CSD被覆 $\beta$ TCP顆粒をCSH被覆 $\beta$ TCP顆粒とした。粉末X線回折装置にて組成分析するとともに、SEMにて表面形態を観察した。

#### ③ 硬化体の物性評価

②で調製したCSH被覆 $\beta$ TCPを練和液で硬化させ、硬化時間、硬化体の圧縮強さ、気孔率、気孔径を測定した。硬化後のセメントの $\mu\text{CT}$ およびSEM観察を行った。

#### ④ 実験動物による自己硬化型 $\beta$ TCP顆粒セメントの新生骨形成能評価

家兎の大腿骨にクリティカルサイズ骨欠損を形成し、自己硬化型 $\beta$ TCP顆粒セメントで再建する。対照として硬化性がない $\beta$ TCP顆粒を埋入した。再建して4週後に試料を周囲組織と一塊に摘出し、材料残存状態を $\mu\text{CT}$ (Skyscan 1706)を用いて定量的に解析した。骨形成は病理組織学的に評価した。

### 4. 研究成果

$\beta$ TCP顆粒を $\text{NaHSO}_4$ に浸漬した後のXRDにおいて、 $\beta$ TCPとCSDによる回折線が確認された（図1）。SEM画像より、 $\beta$ TCP顆粒表面にCSDの針状結晶が析出しており（図2）、CSD被覆 $\beta$ TCP顆粒が得られたことを確認した。このCSD被覆 $\beta$ TCP顆粒を $100^\circ\text{C}$ で熱処理することにより、 $\beta$ TCP顆粒表面のCSDがCSHに組成変換され、CSH被覆 $\beta$ TCP顆粒が得られた（図1および図2）。

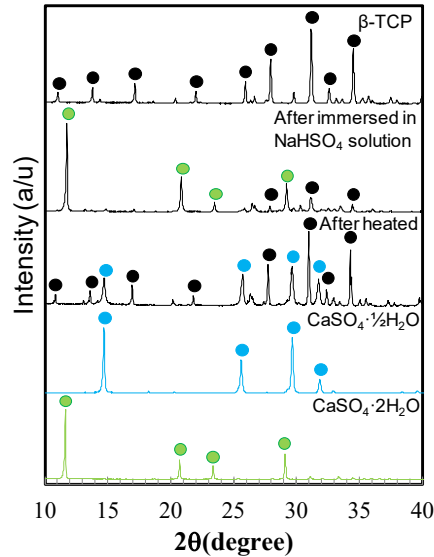


図 1. XRD パターン：上から、β TCP、β TCP 顆粒を NaHSO<sub>4</sub> 浸漬後の生成物（CSD 被覆 β TCP 顆粒）、CSD 被覆 β TCP 顆粒の熱処理後の生成物（CSH 被覆 β TCP 顆粒）、CSH、CSD

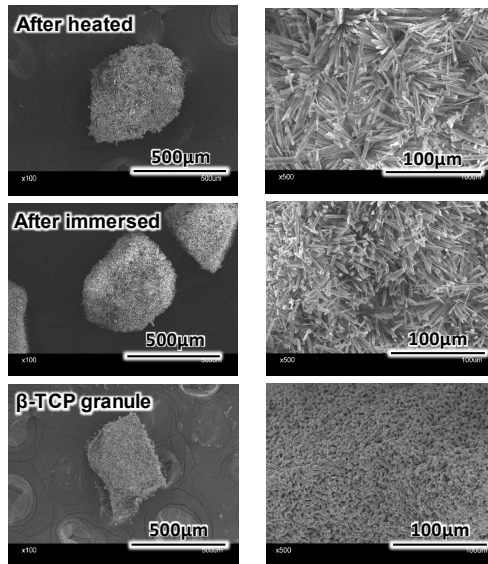


図 2. SEM 像：上から、CSD 被覆 β TCP 顆粒の熱処理後の生成物（CSH 被覆 β TCP 顆粒）、β TCP 顆粒を NaHSO<sub>4</sub> 浸漬後の生成物（CSD 被覆 β TCP 顆粒）、β TCP

CSH 被覆 β TCP 顆粒を生理食塩水と混合したところ、約 10 分で硬化し、顆粒セメントが得られた（図 3）。μ CT 画像（図 4）から、顆粒同士が連結していることが確認された。この顆粒の連結は、β TCP 顆粒表面において CSD 結晶が絡み合うことにより生じていることが SEM 像から明らかになった（図 5）。



図 3. CSH 被覆 β TCP 顆粒を生理食塩水と混合した際の硬化の様子

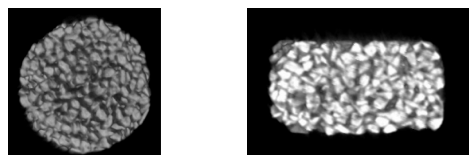


図 4. CSH 被覆 β TCP 顆粒を生理食塩水と混合した後の μ CT 画像

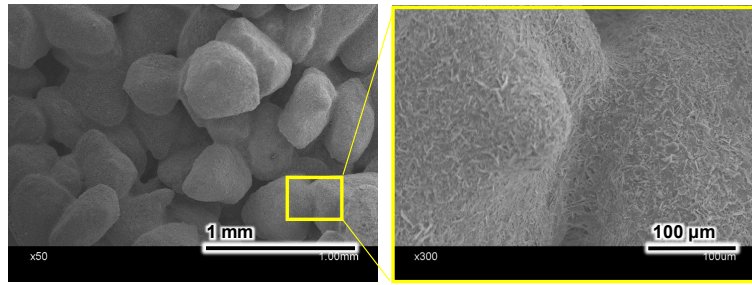


図 5. CSH 被覆  $\beta$  TCP 顆粒を生理食塩水と混合した後の SEM 像

$\beta$  TCP 顆粒セメントのダイアメトル引張強さは顆粒表面の CSH 割合増加するにつれて向上し、CSH が 20、50、75wt% のとき、それぞれ、0.1、0.5、1.1 MPa であった (図 6 右)。また、気孔率も顆粒表面の CSH 割合に依存し、CSH が 20、50、75wt% のとき、それぞれ、68、65、62% であった (図 6 左)。

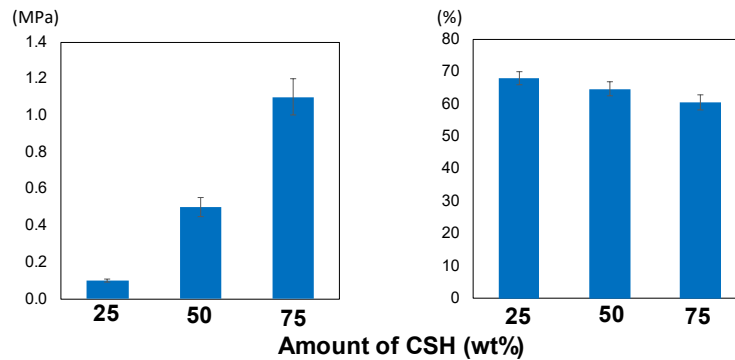


図 6.  $\beta$  TCP 顆粒セメントのダイアメトル引張強さ (左) と気孔率 (右)

CSH 被覆 (25、50、75wt%)  $\beta$  TCP 顆粒をウサギ大腿骨欠損に埋入したところ、欠損内で硬化することを確認した。埋入してから 4 週後に埋入部位の HE 標本を作製し、顆粒表面に新生骨が形成していることを確認した (図 7)。25、50、75wt% CSH 被覆  $\beta$  TCP 顆粒を埋入した場合の新生骨割合は、それぞれ、約 15、20、28% であった (図 8)。 $\beta$  TCP 顆粒を埋入した場合の新生骨割合は約 20% であったため、CSH 含有量 75wt% の  $\beta$  TCP 顆粒セメントは  $\beta$  TCP 顆粒をそのまま埋入するよりも新生骨形成割合が高く、セメント化の効果が確認された。

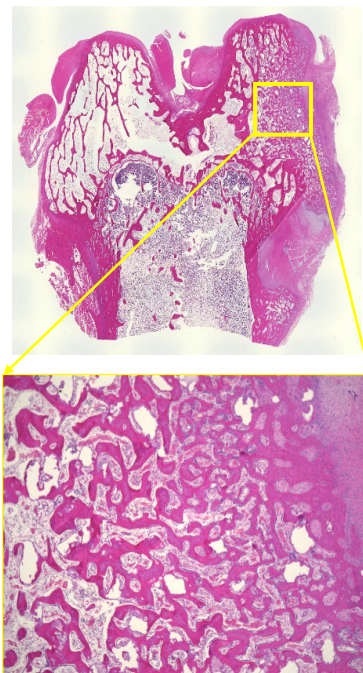


図 7. CSH 被覆 (75wt%)  $\beta$  TCP 顆粒埋入後 4 週時の HE 染色画像

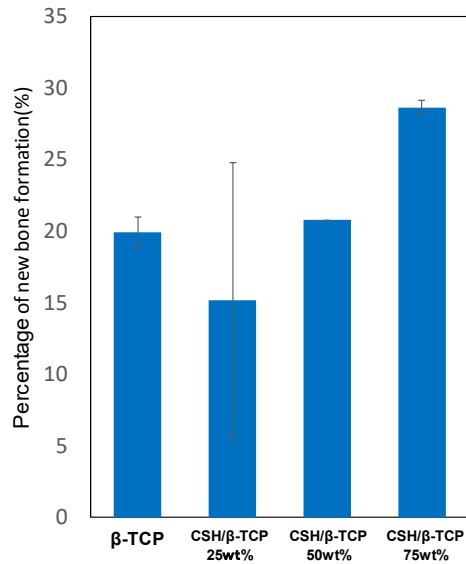


図 8.  $\beta$  TCP 顆粒および CSH 被覆  $\beta$  TCP 顆粒埋入後 4 週時の新生骨形成割合

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：石川 邦夫

ローマ字氏名：Kunio Ishikawa

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90202952

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：都留 寛治

ローマ字氏名：Kanji Tsuru

※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。