

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11752

研究課題名(和文) 硫酸カルシウムから作製した多孔質炭酸アパタイトと骨髄幹細胞による骨再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of the bone regenerative medicine with the porous carbonate apatite made from calcium sulfate and bone marrow stem cell

研究代表者

藤澤 健司 (Fujisawa, Kenji)

徳島文理大学・保健福祉学部・教授

研究者番号：40228979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：硫酸カルシウムとファイバーを混和して硬化させた後に、高温に加熱してファイバーを焼却し粉砕することで多孔質の顆粒を作製し、溶解析出反応で低結晶性の炭酸アパタイト多孔体を作製した。組成および形態学的分析で、炭酸アパタイトへの組成変換と気孔の維持を確認した。この多孔体をウサギ頭蓋骨欠損部に埋入したところ、顆粒周囲と気孔内部に新生骨の形成が確認できた。このことから炭酸アパタイト多孔体は骨補填材として有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨の欠損や萎縮などの部位に対して骨補填材が移植されるが、異物とならずに自家骨のように吸収され、骨に置換する材料が求められる。われわれは、生体骨に類似した炭酸アパタイトに着目し、炭酸カルシウムを出発物質として、溶解析出反応で低結晶性の炭酸アパタイト硬化体を作製する方法を開発した。これまでは緻密体の材料であったが、これを多孔化することにより速い骨の再生が可能になるとともに、新たな骨再生医療の開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Porous carbonate apatite(CO3Ap) granules were successfully fabricated maintaining pores corresponding to the size of microfiber. These granules showed good osteoconductivity at 2, 4, and 8 weeks after implantation regardless of pore size. Lager amount of new bone in the whole defect area tended to be formed in the group of porous CO3Ap granules made using microfiber with 50 μm and 120 μm in diameter compared to those of the dense CO3Ap granules group and the group of porous CO3Ap granules made using microfiber with 30 μm and 205 μm in diameter. Also, the amount of new bone in the pores of CO3Ap granules made using microfiber with 120 μm in diameter was significantly largest among the porous CO3Ap granules at 2 weeks after implantation.

It is concluded, therefore, porous carbonate apatite granules may be useful for bone substitute material compared to dense CO3Ap granules, and pore size with 120 μm would be suitable for new bone formation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：多孔質炭酸アパタイト

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨の再建では、骨移植がゴールドスタンダードとして行われてきたが、骨移植では採取できる骨の量や形、移植後の感染や吸収などの問題がある。さらに最も大きな欠点は、健常部に二次的な侵襲を加えることである。この問題を解決するために、種々の生体材料や生体材料をスキャフォールド(細胞の足場)とする再生医療が研究されている。骨の再生を考える場合、これらの生体材料が体内に残留することは問題であり、完全に骨と置換することが望ましい。たとえば、ハイドロキシアパタイト(HAP)は優れた骨伝導性を示すが、体内ではほとんど吸収されず、後に感染源となることもある。一方、骨もアパタイトからできているが、HAPとは異なり吸収と骨添加を受ける。これは骨のアパタイトがHAPではなく、5-8%の炭酸基を含んだ炭酸アパタイトであるからである。われわれは、炭酸カルシウムを出発物質とした溶解析出反応で炭酸アパタイトが調製できることを見出した。さらに炭酸アパタイトが経時的に骨に置換することも確認した。この炭酸アパタイト顆粒は、多施設臨床治験を終了し、2018年2月より株式会社ジーシーからサイトランsgラニュール®として発売された。しかし、開発した炭酸アパタイトは緻密体である。骨補填材としては多孔質材料にする方が骨形成は促進され、また表面積が増えるため、骨との置換も向上すると予想される。さらに、骨再生用のスキャフォールドとしての利用を考えた場合、多孔質の顆粒を作製することは重要である。

## 2. 研究の目的

本研究はより高度な骨形成能を有する多孔質炭酸アパタイトを作製し、骨補填材としての有用性を検討するとともに、多孔質炭酸アパタイトをスキャフォールドとし、骨髄幹細胞を併用することによって新たな骨再生医療を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)多孔質炭酸アパタイト顆粒の作製

炭酸アパタイトの前駆体として硫酸カルシウム(石膏)を使用した。直径30, 50, 120, 205 $\mu$ mのファイバーと硫酸カルシウムを重量比1:9にて混合し、混水比0.2で練和を行い50MPaの圧力下で硬化させた。これを700℃で5時間加熱し、ファイバーを焼却し粉碎することで、前駆体である多孔質硫酸カルシウムの顆粒を作製した。作製した顆粒を炭酸溶液およびリン酸溶液に浸漬し、炭酸アパタイトへ組成変換を行うことで多孔質炭酸アパタイト顆粒を作製した。

### (2)炭酸アパタイト多孔体の組成および形態学的分析

炭酸アパタイトへの組成変換についてはX線回折およびフーリエ変換赤外光光度計で分析を行った。さらに作製した多孔質炭酸アパタイト顆粒の形態や気孔の状態を走査型電子顕微鏡像にて観察した。

### (3)ウサギ頭蓋骨欠損部における多孔質炭酸アパタイト顆粒の骨形成

体重 3.0-3.5kg の日本白色ウサギの頭蓋骨に、トレフィンバーにて径 8mm の円柱形の欠損を作製した。それぞれの径の多孔質炭酸アパタイト顆粒とコントロールとして炭酸アパタイト緻密体顆粒を骨欠損部に埋入を行った。2、4、8 週経過後に摘出し、マイクロ CT 撮影を行った後、摘出した組織を通法のごとく固定と脱水の後に非脱灰切片を作製し、ピラヌエバゴールドナー染色を行って形態学的な観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 多孔質炭酸アパタイト顆粒の組成および形態学的観察

炭酸溶液、その後にリン酸溶液に浸漬することによって、X 線回折で、硫酸カルシウムのピークが消失し炭酸アパタイトのピークを認め、組成変換を認めた。フーリエ変換赤外光光度計による計測では、炭酸アパタイトと同様に炭酸基を含む事を確認した。電子顕微鏡での観察で、それぞれファイバーの径に合った気孔をもつ顆粒が作製できていることが観察された(図 1)。気孔径を組成変換の前後で比較したが、気孔径が維持されていた。

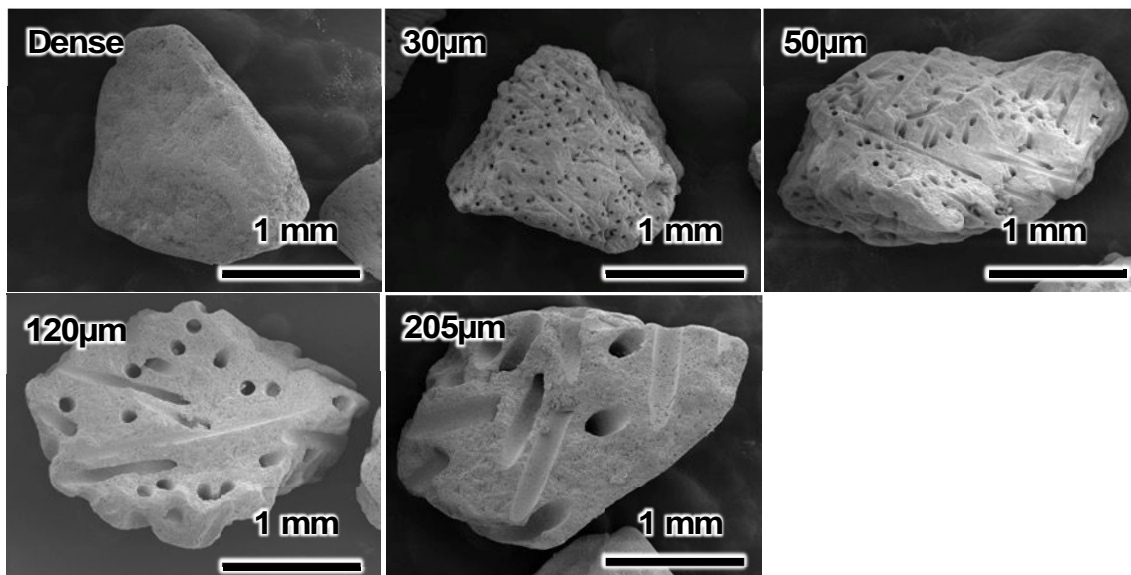


図 1 多孔質炭酸アパタイト顆粒の走査型電子顕微鏡像 Dense : 炭酸アパタイト緻密体 他は多孔質炭酸アパタイトで混和したファイバー径を表示

## (2)ウサギ頭蓋骨欠損部における骨形成

摘出体のマイクロCT所見では、全ての顆粒で内部に気孔が存在することを確認した。骨形成は経時的に増加し、8週では大部分の顆粒の周囲で新生骨の形成を認めた。

組織像では緻密体は顆粒辺縁のみに新生骨が認められたが、2週で気孔径50、120 $\mu\text{m}$ の多孔質顆粒はすでに気孔内部にも新生骨が形成されていることが確認できた。4週では顆粒周囲の新生骨が増加しており、強拡大像では欠損中央でも顆粒周囲と気孔内部に新生骨の形成が確認できた。8週になると、欠損部全体で骨形成を認め、強拡大像でも緻密体と比べ、多孔体は顆粒内部の骨形成も顕著に進んでいた(図2)。

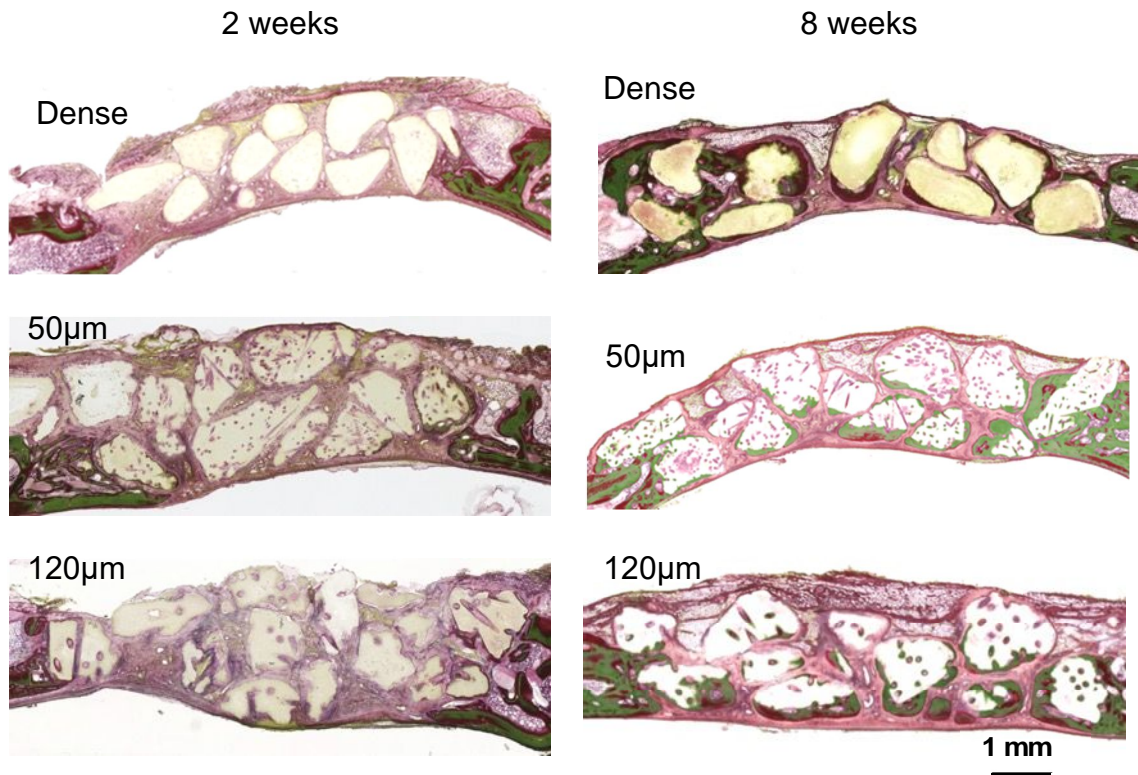


図2 2週および8週後の組織所見(ピラヌエバゴールドナー染色)  
それぞれの表示は図1と同様

骨形成率を欠損部総面積に対する新生骨面積の割合で算出したところ、それぞれの埋入期間において、緻密体と比較して気孔径 50 $\mu\text{m}$  と 120 $\mu\text{m}$  の顆粒の骨形成率が高い傾向にあった(図3)。次に気孔径による骨形成の影響を比較するために、気孔内部における骨形成率を気孔総面積に対する気孔内部の新生骨の割合で算出したところ、埋入2週では気孔径 120 $\mu\text{m}$  の顆粒は 30 $\mu\text{m}$  と 205 $\mu\text{m}$  より骨形成率が有意に高かった。埋入4週、8週では有意差を認めなかったが、気孔径が 120 $\mu\text{m}$  の顆粒は、他の気孔径の顆粒より骨形成率が大きい傾向にあった。

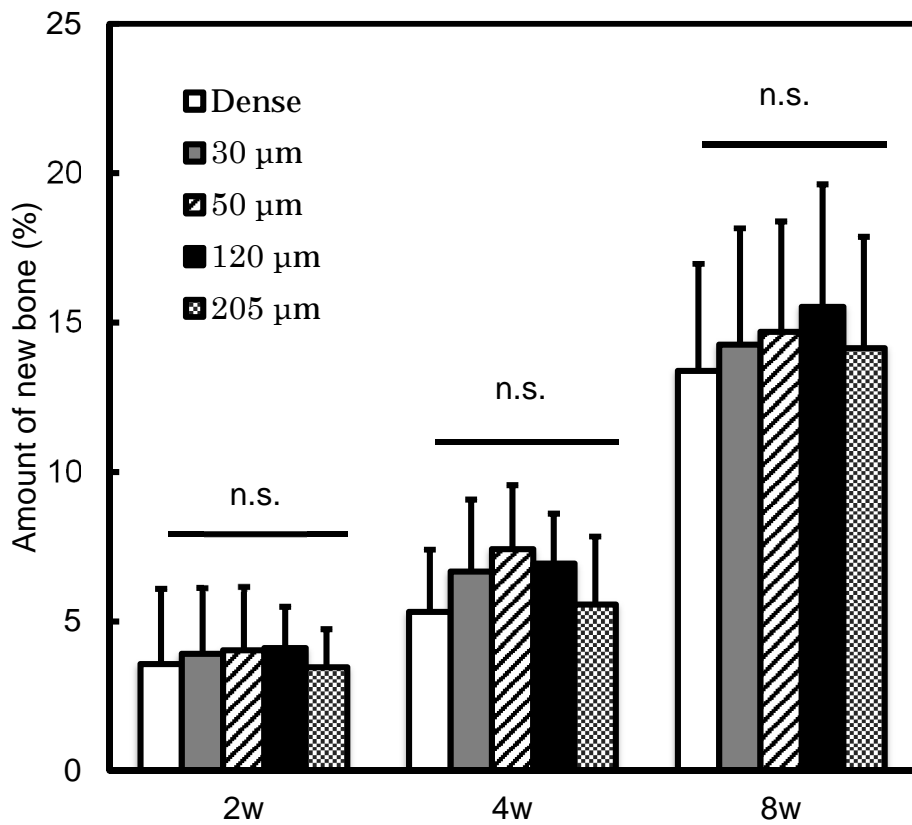


図3 移植2、4、8週後の骨欠損全体に占める新生骨の割合

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hara K, Fujisawa K, Nagai H, Takamaru N, Ohe G, Tsuru K, Ishikawa K, Miyamoto Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Fabrication and physical evaluation of gelatin-coated carbonate apatite foam.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma9090711.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fujisawa K, Akita K, Fukuda N, Kamada K, Kudoh K, Ohe G, Mano T, Tsuru K, Ishikawa K, Miyamoto Y	4. 巻 29
2. 論文標題 Compositional and histological comparison of carbonate apatite fabricated by dissolution-precipitation reaction and Bio-Oss.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Material Science and Material Medicine	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10856-018-6129-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujioka-Kobayashi M, Tsuru K, Nagai H, Fujisawa K, Kudoh T, Ohe G, Miyamoto Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Fabrication and Evaluation of Carbonate Apatite-coated Calcium Carbonate Bone Substitutes for Bone Tissue Engineering.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 2077-2087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.2742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akita K, Fukuda N, Kamada K, Kudoh K, Kurio N, Tsuru K, Ishikawa K, Minamoto Y.	4. 巻 108
2. 論文標題 Fabrication of porous carbonate apatite granules using microfiber and its histological evaluations in rabbit calvarial bone defects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Material Research part A	6. 最初と最後の頁 709-721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.a.36850.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤澤健司, 永井宏和, 高丸菜都美, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 低結晶性炭酸アパタイトのインプラント領域への応用 - イヌ顎骨へのインプラント体との同時埋植 -
3. 学会等名 第46回大会日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤澤健司, 永井宏和, 大江 剛, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 - 各種骨補填材との比較 -
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2016
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤澤健司, 秋田和也, 福田直志, 大江 剛, 高丸菜都美, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 低結晶性炭酸アパタイト顆粒の骨再建への応用 - ウサギ大腿骨内における組織学的検討 -
3. 学会等名 第47回大会日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 大江 剛, 藤澤健司, 真野隆充, 宮本洋二
2. 発表標題 ナイロンファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイトの開発
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 鎌田久美子, 大江 剛, 真野隆充, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二.
2. 発表標題 マイクロファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイト顆粒の開発と骨再建への応用
3. 学会等名 第48回大会日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 大江 剛, 真野隆充, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二.
2. 発表標題 マイクロファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイト顆粒の作製およびその骨形成への応用
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮本 洋二  (MIYAMOTO YOUJI)  (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授   (16101)	
研究分担者	永井 宏和  (NAGAI HIROKAZU)  (50282190)	東北大学・歯科研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	大江 剛  (OHE GO)  (60432762)	徳島大学・病院・助教   (16101)	



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高丸 菜都美  (TAKAMARU NASYUMI)  (40513031)	徳島大学・病院・助教    (16101)	
研究 分 担 者	石川 邦夫  (ISHIKAWA KUNIO)  (90202952)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	