

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06910

研究課題名(和文) 出血部位でも硬化する新規骨補填再建材料としての  $\beta$ -TCP顆粒セメントの開発

研究課題名(英文) Fabrication of beta-tricalcium phosphate granular cement with self-setting property on bleeding site

研究代表者

福田 直志 (FUKUDA, Naoyuki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：10804156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工骨補填材である  $\beta$ -TCP顆粒同士をリン酸水素カルシウムによって橋架け、硬化させる自己硬化型  $\beta$ -TCP顆粒セメントに増粘剤を添加することで出血部位での硬化特性を付与し、その有用性を評価することを目的とした。練和液である酸性リン酸カルシウム水溶液のリン酸濃度は、20 mmol/Lでも  $\beta$ -TCP顆粒硬化体が十分な強度および気孔率を示し、増粘剤であるカルボキシメチルセルロースの練和液への最大添加量は10wt%であった。実際にラット頭蓋骨欠損部を止血を行わずに増粘剤添加  $\beta$ -TCP顆粒セメントで再建した場合にも、硬化性を示すことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果において、既に開発している  $\beta$ -TCP顆粒セメントに、出血がある状況でも硬化が阻害されない性質を付与できることを確認した。これにより、現在臨床応用されている  $\beta$ -TCP顆粒の問題点である充填後の骨欠損部からの移動や流出が克服できることが期待される。さらに、出血部位でも硬化することで、骨からの出血に対する止血剤としても応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed for fabrication and evaluation of beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) granular cement ( $\beta$ -TCP GC) with self-setting property on bleeding site.  $\beta$ -TCP GC, using the 20 mmol/L acidic Ca-P solution as liquid phase, was recommended as this concentration allowed surgical techniques to be performed easily and provided good mechanical strength. The maximum amount of carboxymethyl cellulose as thickening agent was 10wt% to the liquid phase. In fact, this new material was set even in the bleeding site of rat calvarial bone defects, and it was suggested that it would be an attractive material.

研究分野：外科系歯学

キーワード：骨補填材 リン酸三カルシウム 顆粒セメント 自己硬化性 リン酸水素カルシウム 増粘剤

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

### 1. 研究開始当初の背景

型リン酸三カルシウム[-TCP:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] は組織親和性、骨伝導性を併せ持つだけでなく、骨置換性を有する人工骨補填材である。歯科領域では顆粒状のものが普及しているが、臨床において、顆粒状の補填材は術中や術後早期の患部からの移動、流出という重篤な問題があり、十分な骨量を担保できないことがある。

-TCP 顆粒に硬化性を付与すれば理想的な骨補填材が開発できると考え、これまで研究に着手してきた。各種リン酸カルシウムは周囲の pH に依存し溶解性に差があることが知られており、

-TCP 顆粒自体には硬化性がないが、pH が 6 以下では -TCP ではなく、リン酸水素カルシウム [DCPD:  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ] が安定相となることがわかっている。この原理を利用し、-TCP 顆粒を酸性リン酸カルシウム水溶液で練和することによって、-TCP 顆粒表面の pH を 6 以下となるように設定し、-TCP 顆粒と酸性リン酸カルシウム水溶液との反応でリン酸水素カルシウム結晶が表層に析出、顆粒間をリン酸水素カルシウム結晶が橋架けすることで自己硬化性を示し、多孔体を形成することを見出した(図1)。

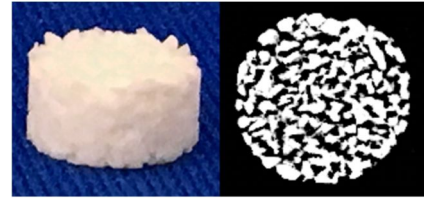


図1. -TCP 顆粒セメント硬化体およびそのマイクロCT像

この自己硬化型 -TCP 顆粒セメントの組織親和性および骨形成能に関しては、ラット頭蓋骨欠損モデルを用いて検討したが、自己硬化型 -TCP 顆粒セメントは硬化性が付与されているため、充填操作が極めて容易なだけでなく、-TCP 顆粒群(対照群)と比較して、骨形成能が優れることがわかった。

しかしながら、骨欠損部からの出血が激しい場合には、血液が -TCP 顆粒表面の酸性リン酸カルシウム水溶液を洗い流し、その結果、-TCP 顆粒セメントの硬化反応が阻害されることがあった。また、自己硬化型 -TCP 顆粒セメント硬化体は骨に置換されると予測されるが、長期の病理組織学的解析は行われていないことが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究においては、練和液である酸性リン酸カルシウム水溶液に増粘性を付与することによって、-TCP 顆粒と酸性リン酸カルシウム水溶液の反応を担保し、これによって、出血が激しい場合においても硬化する血液中硬化性 -TCP 顆粒セメントを創製することを目的とする。さらに、実験動物を用いて、-TCP 顆粒セメントの組織反応を初期だけでなく、中長期的にも探索し、その有用性を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) リン酸カルシウム溶液濃度が自己硬化型 -TCP 顆粒セメントに及ぼす影響  
酸性リン酸カルシウム水溶液濃度の最適化

リン酸濃度を 0 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L、200 mmol/L、600 mmol/L に調整した酸性リン酸カルシウム水溶液を作製した。

-TCP 顆粒と各種練和液を練和し、それぞれの硬化反応解析、硬化時間、硬化体の強度および気孔率について評価を行った。硬化反応の解析は粉末 X 線回折および走査型電子顕微鏡観察により行った。

ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた自己硬化型 -TCP 顆粒セメントの病理組織学的評価  
各種練和液を用いた自己硬化型 -TCP 顆粒セメントの組織親和性および骨形成能について、ラット頭蓋骨欠損モデル(止血を行った状況)を再建することで検証した。

(2) 血液中硬化性 -TCP 顆粒セメントの創製  
添加する増粘剤の検討および最適化

3.(1)の結果をもとに選択した練和液(酸性リン酸カルシウム水溶液)へ添加する増粘剤量に関して、操作性および生理食塩水中での硬化性、さらには硬化時間および硬化後の強度の観点から最適化した。なお、本研究においては、生体への応用が認められているカルボキシメチルセルロースを採用した。

血液中硬化性 -TCP 顆粒セメントを用いたラット頭蓋骨欠損再建および病理組織学的評価  
3.(2) で調整した血液中硬化性 -TCP 顆粒セメントの操作性および組織親和性に関して、出血している状況のラット頭蓋骨欠損モデルを再建することで検証した(対照群:血液中硬化性なし)。

### 4. 研究成果

(1) リン酸カルシウム溶液濃度が自己硬化型 -TCP 顆粒セメントに及ぼす影響  
酸性リン酸カルシウム水溶液濃度の最適化

いずれの試料も新たに析出したリン酸水素カルシウムで顆粒同士が橋かけされることにより硬化を示した。また、-TCP 顆粒セメントの硬化時間は酸性リン酸カルシウム水溶液の濃度依存

的に短縮する傾向を示したが、概ね 1 分程度であった。硬化に關するリン酸水素カルシウムの形成量および硬化体の強度はリン酸濃度が 20mmol/L までは、濃度依存的に増大するが、それ以降はほとんど増大しないことが判明した(図 2)。また、硬化体内部の気孔率はリン酸の濃度依存的に低下する傾向を示したが 55%以上を維持していた。

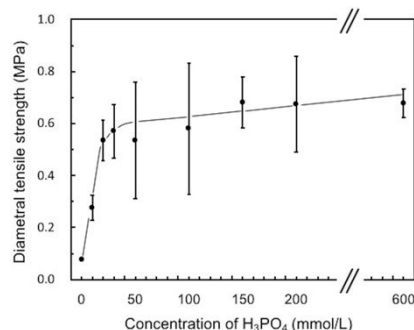


図 2. 各  $\beta$ -TCP 顆粒セメント硬化体の強度

ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた自己硬化型  $\beta$ -TCP 顆粒セメントの病理組織学的評価

術後 2 週および 4 週の新生骨量に有意差は認められなかったが、 $\beta$ -TCP 顆粒セメント群内において、低濃度リン酸カルシウム溶液を用いた場合、有意な炎症性細胞の減少を認めた(図 3)。

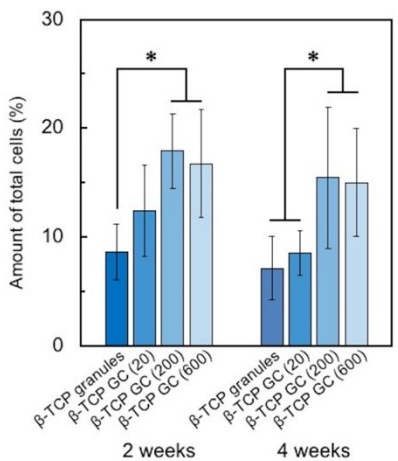


図 3. 各  $\beta$ -TCP 顆粒セメント再建後の炎症性細胞数の比較

4. (1) および (2) の研究成果は論文にて報告した。  
[Naoyuki Fukuda, Kunio Ishikawa, Kazuya Akita, Kumiko Kamada, Naito Kurio, Yoshihide Mori, Youji Miyamoto, Effects of acidic calcium phosphate concentration on setting reaction and tissue response to  $\beta$ -tricalcium phosphate granular cement. Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials (2019) doi: 10.1002/jbm.b.34361. (査読あり)]

(2) 血液中硬化性  $\beta$ -TCP 顆粒セメントの創製  
添加する増粘剤の検討および最適化

4. (1) の成果をもとに、練和液の組成として  $\beta$ -TCP 顆粒硬化体が十分な強度および気孔率を示すリン酸濃度 20 mmol/L に調整したものをを用いた。増粘剤としてはカルボキシメチルセルロースを採用したが、水溶液に対する増粘剤添加量が 10wt% を超えたところから、粘稠な溶液から完全なゲル化を認め、溶液としての使用が困難であったためにこれを最大添加量とした。この 10wt% の増粘剤を添加した溶液と  $\beta$ -TCP 顆粒を練和した  $\beta$ -TCP 顆粒セメントは練和後に生理食塩水中に浸漬しても硬化性を示すことを明らかにした。

血液中硬化性  $\beta$ -TCP 顆粒セメントを用いたラット頭蓋骨欠損再建および病理組織学的評価  
4. (2) の結果をもとに調整した  $\beta$ -TCP 顆粒セメントの有用性は、ラット頭蓋骨欠損を出血している状態で再建することで検証した。出血部位に使用した場合でも硬化性を示すことが確認できたが、術後に血腫を形成しやすいことが判明した。これは、出血している環境においても硬化性を維持できるように混合した増粘剤の影響で試料が粘稠なスラリー状になった結果、硬化体の気孔が溶液で封鎖されてしまい、閉鎖された環境の中に血液が滞留した結果である可能性が高いと推察され、今後さらなる改良が必要であることがわかった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Naoyuki Fukuda, Kunio Ishikawa, Kazuya Akita, Kumiko Kamada, Naito Kurio, Yoshihide Mori, Youji Miyamoto, Effects of acidic calcium phosphate concentration on setting reaction and tissue response to  $\beta$ -tricalcium phosphate granular cement. Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials (2019), doi: 10.1002/jbm.b.34361. (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

福田 直志、秋田 和也、眞野 隆充、宮本 洋二、リン酸カルシウム溶液濃度が自己硬化型  $\beta$ -TCP 顆粒セメントに及ぼす影響、第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大会(2018 年 11 月)

Naoyuki Fukuda, Takamitsu Mano, Kazuya Akita, Kumiko Kamada, Takayuki Nakagawa, Youji Miyamoto. Effects Of Acidic Calcium Phosphate Concentration On Setting Reaction To  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Granular Cement. 24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery (2018 年 9 月)

福田 直志、秋田 和也、鎌田 久美子、高丸 菜都美、中川 貴之、大江 剛、藤澤 健司、宮本 洋二、硬化遅延剤としてのクエン酸が自己硬化型  $\beta$ -TCP 顆粒セメントに及ぼす影響、第 37 回日本口腔インプラント学会 中国・四国支部学術大会(2017 年 11 月)

福田 直志、秋田 和也、森 悦秀、宮本 洋二、新規骨補填再建材としての自己硬化型  
-TCP 顆粒セメントの開発、第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会（2017 年 10 月）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。