

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17211

研究課題名(和文)炭酸基組成が炭酸アパタイトの骨置換速度に及ぼす影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of effect of carbonate group composition on bone replacement rate of carbonate apatite

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨と同じ組成であり、骨と同様に骨リモデリングを受けて新しい骨に置換される炭酸アパタイト骨補填材は理想的な骨補填材と言えるが、炭酸アパタイトの炭酸基含有量が生体内での吸収性に及ぼす影響は検討されていない。本研究は、炭酸基含有量の異なる炭酸アパタイトの調製法の確立および炭酸含有量が生体内での吸収性に及ぼす影響を検討した。

石膏を前駆体とした溶解析出型組成変換反応で炭酸アパタイトを調製する系において、用いる炭酸溶液の種類、濃度を変えることで炭酸量を調製できることが判明した。また、炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が多いほど初期段階の溶解速度および骨置換速度が速いことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが開発した炭酸アパタイトは平成29年度に薬事認可され、今後のますますの臨床応用が期待される。本研究はその次世代型人工骨置換材の機能をさらに高める先駆的な研究である。また自己硬化性を示す石膏を前駆体として用いることで、様々な形態の炭酸アパタイト骨補填材の作成が可能であり、またその骨置換速度を調整できる可能性が示唆されたことで、様々な状況における骨欠損部位のテーラメイド医療が可能となると考えられる。このことから、本研究は臨床歯学・臨床医学への貢献は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carbonate apatite, which has the same composition as bone and undergoes bone remodeling to be replaced with new bone in the same manner as bone, can be said to be an ideal bone substitute, but the effect of the carbonate group content of carbonate apatite on the absorbability in vivo has not been investigated. The purpose of this study was to establish the preparation method of carbonate apatite with different carbonate content and to examine the effect of carbonate content on the in vivo absorbability.

In the method of preparing carbonate apatite by the dissolution-precipitation reaction using gypsum as a precursor, it was found that the carbonate group content can be adjusted by changing the kind and concentration of the carbonate solution used. It was also suggested that the higher the carbonate group content in carbonate apatite, the faster the dissolution rate and bone replacement rate in the initial stage.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：炭酸アパタイト 溶解析出反応 炭酸含有量 石膏 硫酸カルシウム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイト[HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]焼結体は代表的な人工骨補填材として広く臨床応用されている。HApは優れた骨伝導性(骨欠損部で直接骨と結合する性質)を示すが、実質的に非吸収性材料であり、特に歯科矯正における骨再建では問題も多い。申請者らは骨の無機組成がHApではなく炭酸アパタイト[CO₃Ap: $\text{Ca}_{10-a}(\text{CO}_3)_b(\text{PO}_4)_{6-c}(\text{OH})_{2-d}$]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。また、自家骨は骨リモデリングによって骨に置換される。そこで、破骨細胞を試料表面で培養すると、水酸アパタイトは破骨細胞に吸収されないが、炭酸アパタイトは破骨細胞に吸収されること、そのため、炭酸アパタイトは骨リモデリングに調和して骨に置換されることも明らかにしてきた。炭酸アパタイトは、研究開始当初、多施設治験を実施中であったが、認可されている人工骨補填材がない歯科インプラントを前提とした骨再建術を含める全ての歯科用途の骨補填材として平成29年12月に薬事承認された。

炭酸アパタイトが破骨細胞に吸収され、骨リモデリングに調和して骨に置換される原因はアパタイトに炭酸基が存在し、破骨細胞が形成する弱酸性環境において溶解度が高いためであると考えられるが、炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が、生体内での吸収性に及ぼす影響は検討されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究においては、石膏(硫酸カルシウム)を前駆体として溶解析出型組成変換反応で炭酸アパタイトブロックを調製する系において、炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が炭酸アパタイト人工骨置換材の骨置換速度に及ぼす影響を検討した。

具体的には①炭酸基含有量が異なる炭酸アパタイトを調製し、②調製した炭酸アパタイトを用いて、炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が溶解に及ぼす影響を解析した。③実験動物を用いて、炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が炭酸アパタイトの骨伝導性および骨置換速度に及ぼす影響を検索した。これらの実験結果から、④炭酸アパタイト人工骨置換材の骨置換速度を飛躍的に加速した炭酸アパタイト組成を決定した。

3. 研究の方法

①炭酸アパタイトの調製及び分析

(1) 炭酸基含有量の異なる炭酸アパタイトの調製

炭酸アパタイトの前駆体となる石膏硬化体は、硫酸カルシウム半水塩を蒸留水で練和し、分割金型(直径6ミリ、厚さ3ミリ)に入れて調製した(図1)。次に、前駆体である石膏硬化体をリン酸水素ナトリウム/炭酸水素ナトリウム混合溶液もしくはリン酸水素ナトリウム/炭酸ナトリウム混合溶液中に浸漬し、溶解析出型組成変換反応で前駆体の形態を保ったまま、組成を炭酸アパタイトに変換した。この際に炭酸水素ナトリウムおよび炭酸ナトリウムの濃度を変動させることによって、炭酸基含有量が異なる炭酸アパタイトブロックの調製を試みた。

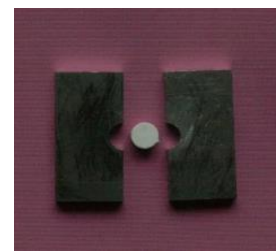


図1 炭酸アパタイト前駆体ディスクの調製

(2) 調製した炭酸アパタイトの組成・物性の検討

調製した炭酸アパタイトの組成分析は粉末X線回折装置および赤外分光分析、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析装置およびCHNコーダーを用いて、炭酸含有量を含めて解析した。また、形態および物性は、走査型電子顕微鏡で解析した。

②炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が炭酸アパタイトの骨伝導性、骨置換速度に及ぼす影響の検索

(1) 動物実験用試料の作成及び分析

硫酸カルシウム半水塩を蒸留水で練和したペーストをガラス練板上に伸ばし、硬化後に粉碎および篩かけをし、300-600 μm サイズの二水石膏顆粒を作成した。前述での実験で得られた結果をもとに、二水石膏顆粒を濃度の異なるリン酸水素ナトリウム-炭酸ナトリウム混合溶液中に浸漬し、炭酸量の異なる炭酸アパタイト顆粒を調製した。調製した顆粒は前述と同様に同定を行った。

(2) 動物実験用骨欠損の作製および炭酸アパタイトによる再建術

12週齢のWisterラットの頭蓋骨に骨欠損を作成し、調製した炭酸含有量の異なる炭酸アパタイトで再建した。まず、ラットを密閉容器に入れて2.5%気化濃度のイソフルランで麻酔し、同濃度のイソフルランで鼻当てを介して維持麻酔を行ったのち、頭蓋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、頭蓋骨を露出させ、骨欠損は歯科用エンジン及びトレフィンバーを用いて、直径7mm高さ2mmの骨欠損を形成した。骨欠損部に炭酸量の異なる



図2 頭蓋骨骨欠損部に埋入した炭酸アパタイト顆粒

炭酸アパタイト顆粒を埋入し（図2）、創を閉じた。治癒期間は術後4, 12週間とした。

③-2 炭酸アパタイトの骨置換状態および新生骨形成の解析

埋入4, 12週後に、麻酔薬の過剰投与でラットを安楽死させた後、速やかに開胸して左心室より大動脈、右心房より大静脈に留置針を挿入して、固定液（10%中性緩衝ホルマリン液）を用いて灌流固定を行い、周囲組織と一塊に骨再建部を摘出した。

骨の形成および炭酸アパタイト顆粒の骨置換状態は、マイクロCT（Skyscan1706）を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 炭酸アパタイト基の異なる炭酸アパタイトの調製

前駆体である石膏硬化体を種々のリン酸-炭酸混合溶液中に浸漬し、溶解析出型組成変換反応で前駆体の形態を保ったまま、炭酸基含有量が異なる炭酸アパタイトに変換が可能か検討した。

リン酸源は 0.4mol/L のリン酸水素ナトリウム水溶液に固定し、炭酸源は 0.2~0.8mol/L の炭酸水素ナトリウム水溶液もしくは炭酸ナトリウム水溶液を使用した。極力低い温度で組成変換するほうが吸収されやすい低結晶性アパタイトが生成されること、また 100 度以下では処理時間に2週間以上の時間がかかることを理由に処理温度は 100 度、処理時間は 48 時間とした。結果として、石膏硬化体をいかなるリン酸炭酸混合溶液中に浸漬して反応させた場合でも、形態を保ったまま組成変換が可能であることが判明し、また組成変換後もハンディングプロパティ的に問題がない強度をもっていることが確認された。処理後の組成を確認するために X 線粉末回折を行った結果、炭酸ナトリウムを用いて組成変換させた場合は、いかなる濃度でもアパタイトに変換されたが、炭酸水素ナトリウムを用いて組成変換させた場合は低濃度においてアパタイト以外のピークを認め、完全にアパタイトに組成変化しないことが分かった。（図3）このことから、炭酸溶液を用いて前駆体から炭酸アパタイトを作成する場合、炭酸源によって異なる反応を示すことが示唆された。

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、アパタイトに変換されたすべての資料で炭酸基を示すピークを認め、作製されたアパタイトは炭酸アパタイトであり、また炭酸基を占めずピークの大きさに違いを認めた（図5）。

また CHN 分析を用いて組成変換させたアパタイト中の炭酸基量を比較した結果、用いた炭酸溶液の濃度に比例して炭酸含有量が増加していることが分かり、また同濃度の炭酸水素ナトリウムおよび炭酸ナトリウムで比較した場合、炭酸ナトリウムを用いて組成変換させた炭酸アパタイトは約 2 倍に増加することが判明した。以上のことから溶液から炭酸を取り込んで前駆体を炭酸アパタイトに組成変換させる場合、用いる炭酸溶液の濃度を変えることで、炭酸量を自由に調整できること、また炭酸含有量は用いる炭酸溶液で大きく異なることが判明した。

(2) 炭酸基含有量の異なる炭酸アパタイトの溶解度測定

次に炭酸基含有量の異なる炭酸アパタイトのカルシウム溶解度を比較検討した。0.08 mol/L の酢酸/酢酸ナトリウム混合溶液 (pH 5.5) 40mL にそれぞれ異なる濃度の炭酸ナトリウムで処理した炭酸アパタイト 100 mg を 24 時間室温で浸漬し、カルシウム溶解度の変化を調査した。結果、炭

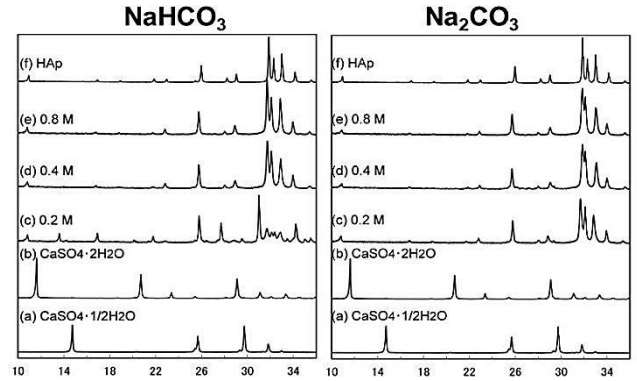


図3 各顆粒の X 線回折結果

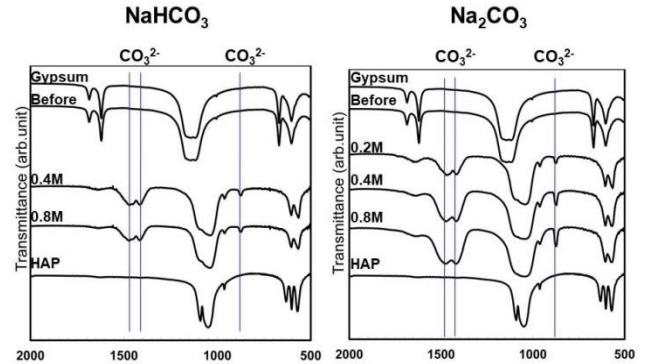


図4 各顆粒の赤外分光法のピーク

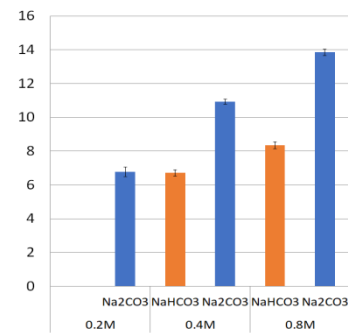


図5 炭酸量の比較

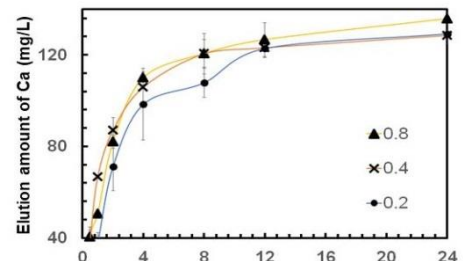


図6 Ca 溶出量の比較

濃度が低いほど溶解は緩やかに進み、濃度が高いほど開始直後の吸収が早いことが判明した。また最終的な溶解度に関して炭酸基含有量の差で大きな差は認めなかった。

このことから、炭酸基を含むアパタイトは炭酸基量に関係なく弱酸性領域下で溶解し、またアパタイト中の炭酸基量が多いほど、初期段階における溶解速度が速いことが示唆された。

(3) 炭酸アパタイト中の炭酸基含有量が炭酸アパタイトの骨伝導性、骨置換速度に及ぼす影響の検索

次に実験動物を用いて炭酸アパタイト中の炭酸基含有量で骨伝導性、骨置換速度に違いがあるか比較検討した。埋入試料として異なる炭酸基含有量の炭酸アパタイト顆粒を前述の通りに作成した。作成した顆粒を同定した結果、ディスクで作成したものと組成および炭酸基量は同じであることが確認された。

埋入する炭酸アパタイト顆粒中の炭酸基量は6%, 10%, 14%とし、埋入部位は12週齢のWisterラットの頭蓋骨に作成した直径7mm高さ2mmの骨欠損とした(図7)。

埋入4週後において、それぞれの試料で大きな差はみられなかったが、埋入12週後において、炭酸基含有量の多い炭酸アパタイトは新生骨が顆粒方向に伸び、また顆粒が吸収している像が見られた(図8)。

以上より、生体内において炭酸基含有量が炭酸アパタイトの骨伝導性および骨置換速度に影響を及ぼすことが判明し、また早い骨置換を求める場合、高炭酸基含有炭酸アパタイトを埋入するほうが有利であることが示唆された。

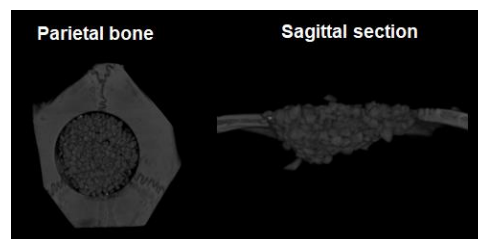


図7 骨欠損部に埋入した炭酸アパタイト顆粒

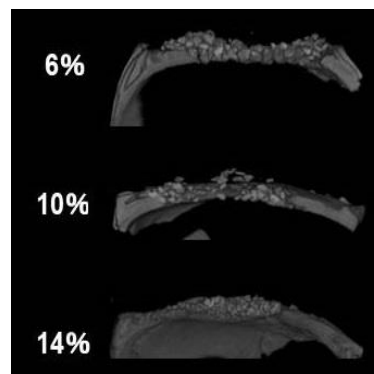


図8 骨欠損部に埋入した異なる炭酸含有量の炭酸アパタイト顆粒(埋入12週後)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 出口佳愛、野村俊介、石川邦夫、高橋一郎
2. 発表標題 石膏を用いた炭酸基含有量の異なる炭酸アパタイト顆粒の調製
3. 学会等名 令和元年度日本歯科理工学会九州支部夏季セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村 俊介、春山 直人、野口 健志、林田 裕子、吉崎 恵悟、高橋 一郎
2. 発表標題 Pierre Robin sequenceを伴った上下顎前歯先天性欠損を有する両側口唇顎裂の一症例
3. 学会等名 第42回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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