

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：平成 18 年 4 月 1 日～平成 21 年 3 月 31 日

課題番号：18390517

研究課題名 (和文) 破骨細胞吸収型骨置換材の創製

研究課題名 (英文) Fabrication of osteoclast-resorbable bone substitute

研究代表者 松家 茂樹 (MATSUYA SHIGEKI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00108755

## 研究成果の概要：

炭酸アパタイトの優れた破骨細胞吸収性に着目し、炭酸アパタイトブロックの調製法ならびにその材料学的特性、骨伝導性および吸収性を調べ、骨置換材としての有用性を検討した。石膏の硬化性を利用して任意形状のカルサイト／石膏複合硬化体のペレット状試料を作製し、各種リン酸塩水溶液中での水熱処理による炭酸アパタイトブロックの調製を試みた。水熱処理により形態変化することなく炭酸アパタイトへと転化することができた。処理後の強度は石膏含有量に依存したが、ダイアメトラル法による引張強度値で 2-4MPa の値が得られた。Na 塩で処理した場合に処理後の強度が最も大きくなった。XRD による結果では、24 時間水熱処理により石膏およびカルサイトはアパタイト相へと転化していたが、一部カルサイトの残存が認められた。処理時間を延ばすことによりカルサイトも消失しアパタイトへと転化した。炭酸カルシウムのうち、カルサイトより溶解性の高いバテライトを用いた場合は、転化速度が大きくなる傾向にあった。FT-IR 分析、熱分析および CHN 分析結果を総合すると、B タイプの炭酸アパタイトが主に生成しており、アパタイト中に含まれる炭酸イオン含有量は 10～22% の範囲にあり、アンモニウム塩<カリウム塩<ナトリウム塩の順に高くなっていった。また、同一塩で比較すると塩基性の高い塩ほど炭酸イオン含有量が高くなる傾向にあった。Na 塩を用いた水熱処理で得られた炭酸アパタイトブロック上での骨芽細胞の細胞付着性、細胞増殖はコントロールとしての HAP 焼結体とほぼ同程度であった。ALP 活性およびオステオカルシンといった分化マーカーについては、第 3 リン酸ナトリウムで調製した炭酸アパタイトでは HAP 焼結体より有意に増加していた。一方、HAP 焼結体では、破骨細胞による吸収窩は観察されなかったが、炭酸アパタイト上では吸収窩が観察され、調製した炭酸アパタイトの吸収性が確認できた。本研究結果は、任意形状の炭酸アパタイト系骨置換材の調製法として期待できることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	7,900,000	2,068,000	9,968,000
平成19年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成20年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,318	19,718,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：炭酸アパタイト、骨置換材、骨芽細胞、破骨細胞、石膏、炭酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

炭酸アパタイト焼結体が骨伝導性と生体吸収性を示すために理想的な骨置換材として注目を集めている。湿式合成で得た炭酸アパタイト粉末の焼結により炭酸アパタイト焼結体を調製でき、またこの焼結体が破骨細胞によって吸収されることが報告されていた。しかし、焼結温度を高くすると炭酸基が遊離するため、低温での焼結を余儀なくされ、得られた焼結体の機械的強さは極めて小さい。申請者は水酸化カルシウム圧粉体と二酸化炭素の反応で得た炭酸カルシウムブロックをリン酸塩中で常温反応させると、ブロック形状を保持したまま、炭酸アパタイトになることを確認した。しかし、この方法では、出発物質の水酸化カルシウムを加圧成型して作ることが必要であった。一方、我々は石膏硬化体のリン酸塩処理によりヒドロキシアパタイトブロックを製造できることを確認していた。石膏は水との練和により硬化することは古くより知られている。そこで、炭酸を導入するために、石膏の硬化性を利用して、石膏と炭酸カルシウム複合硬化体を作成しそれを水熱処理することにより炭酸アパタイトに転化させることを考えた。本研究で

は、石膏と炭酸カルシウムの混合比や水熱処理条件等を広範に変え、最適な調製条件を決定し、得られた炭酸アパタイトブロックを用いて、骨伝導性や吸収性等の生物学的評価を行い、骨置換材としての利用可能性を検討した。

2. 研究の目的

石膏の硬化性と炭酸アパタイトの優れた破骨細胞骨吸収性を利用した新しい骨置換材の創製を目的として、石膏／炭酸カルシウム複合硬化体のリン酸塩処理による炭酸アパタイトブロック創製条件の最適化、得られた炭酸ブロックの破骨細胞吸収性および骨芽細胞による骨伝導性を検討して、炭酸アパタイトブロックの組織親和性、骨置換性の評価を行い、骨置換材としての有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 石膏-カルサイト硬化体からの炭酸アパタイトブロック創製条件の最適化  
カルサイトおよび半水石膏混合粉末（重量比10～90%）を水で練和し、ステンレス製分割モールド内で硬化させる。硬化時間に対する混水比ならびに無機塩類等の硬化促進

剤の影響を調べる。最適条件で作製した石膏-カルサイト複合硬化体を50～150℃のリン酸塩水溶液により水熱処理を行う。処理温度、処理時間、各リン酸塩濃度を系統的に変えて炭酸アパタイトへの転化過程を検討する。水熱ホットプレスによる処理についても検討を行う。得られた炭酸アパタイトブロックの組成を粉末X線回折およびFT-IRで検討するとともに、炭酸アパタイトブロックの強度測定も行う。処理条件と炭酸アパタイトブロック中の炭酸基含有量の関連を明らかにする。

#### (2)炭酸アパタイトブロックの吸収性の検討

①酢酸緩衝液に対する溶解度：炭酸アパタイトブロックを37℃、pH4の酢酸緩衝液に一定期間浸せし液中のカルシウムおよびリン酸イオン濃度を原子吸光分析装置ならびに分光光度計で測定する。炭酸アパタイトブロック中の炭酸イオン含有量に対するCaおよびP溶出量の変化から吸収性を評価する。  
②破骨細胞による吸収活性：家兎大腿骨から採取した破骨細胞を、Chambers法にて分離し、単離培養する。炭酸アパタイトブロック上に破骨細胞を播種し、αMEM中で一定期間培養する。破骨細胞による吸収活性をブロック表面に形成された吸収窩数および面積により評価する。

#### (3)骨芽細胞による細胞付着性、増殖性、分化能の検討

炭酸アパタイトブロック上に骨芽細胞を播種し、αMEM中で一定期間培養する。骨芽細胞の細胞付着性、細胞増殖（細胞数計測またはMTT法）および分化能（アルカリフォスファターゼ活性、TypeIコラーゲンおよびオステオカルシン発現量）を検討する。

## 4. 研究成果

### (1)石膏-カルサイト硬化体からの炭酸アパタイトブロック創製条件の最適化

図1はG40C60硬化体の処理前および100℃24時間処理後の外観を示す。リン酸3カリウム(K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)処理の場合のみ処理後に形態が崩れているが、他の試料では、元の形態を保持したままであることがわかる。

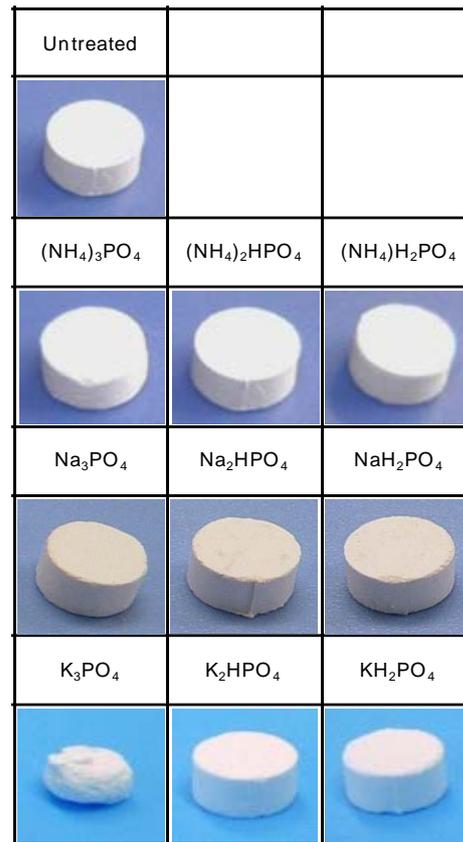


図1 G40C60硬化体の処理前および各種リン酸塩水溶液中、100℃24時間処理後の外観

#### ①SEM観察

図2は、ナトリウム塩で処理前後のG40C60硬化体表面および破断面のSEM観察像を示す。処理前には立方体状のカルサイトが針状の二水石膏結晶に取り囲まれている様子が良くわかる。処理後の結晶形態は第1から第3塩になるにつれてかなりの変化が見られる。第1塩では薄板状の結晶が表面に析出しているが、第2、3塩では、明確な結晶形態は

認められず、結晶子サイズも第3塩ではより微細になっていることがわかる。一方、破断面では、いずれの場合も明瞭な輪郭をもった結晶は認められない。アンモニウム塩およびカリウム塩の場合も第1塩処理後に表面に生成した結晶形態は多少異なるもののほぼ同様の傾向を示した。

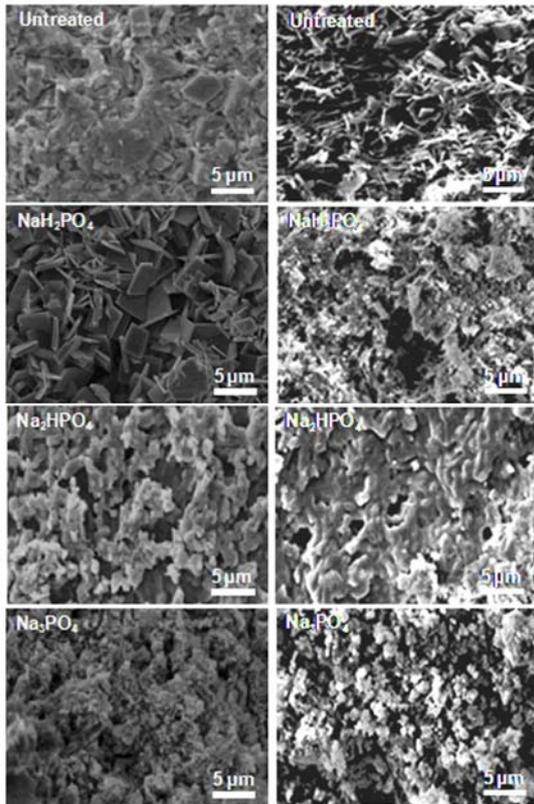


図2 ナトリウム塩で処理前後のG40C60硬化体表面および破断面のSEM観察像

## ② X線回折

図3は、第1、第2、第3アンモニウム、ナトリウムおよびカリウムリン酸塩水溶液で処理後のG40C60硬化体のXRDパターンを示す。第1塩以外の各水溶液処理では、アパタイトが主生成相であった。しかし、第1塩の場合には、pHの高いナトリウムやカリウム塩ではアパタイトの生成が認められたが、モネタイト( $\text{CaHPO}_4$ )も生成しており、特にアンモニウム塩の場合はモネタイトが主生成相になっていた。これは、液のpHが低いため、アパタイトよりもモネタイトが安定である

ためと考えられる。

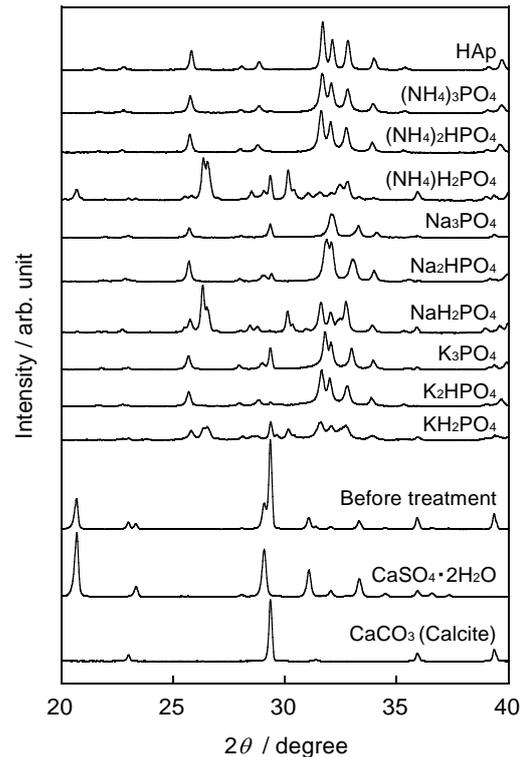


図3 各種リン酸塩水溶液で処理後のG40C60硬化体のXRDパターン

## ③FT-IR

図4は、第1、第2、第3アンモニウム、ナトリウムおよびカリウムリン酸塩水溶液で

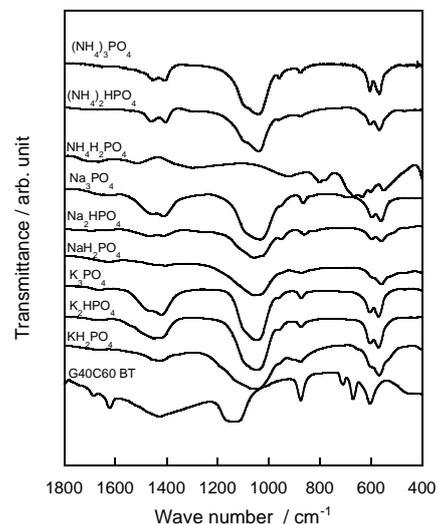


図4 各種リン酸塩水溶液で処理後のG40C60硬化体のFT-IRスペクトル

処理後のFT-IRスペクトルを示す。リン酸塩処理後のスペクトルでは、リン酸イオンに帰属される吸収ピークが、 $980\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ と

560-600 $\text{cm}^{-1}$ に観察される。XRD パターンでアパタイト相の生成を示していた第1塩以外の硬化体では、1455、1410  $\text{cm}^{-1}$ にB-タイプ炭酸アパタイトに特有の  $\text{CO}_3^{2-}$ イオンによる吸収ピークが観察される。

#### ④硬化体の強度

第1、第2、第3アンモニウム、ナトリウムおよびカリウムリン酸塩水溶液で処理後のG40C60硬化体強度をダイヤモンド法による引張強度(DTS)測定により評価した。処理前の硬化体強度は約2MPaであったが、処理後には、例外はあるがいずれの場合にも強度が増加する傾向にあった。ただ、塩の種類により処理後の強度増加傾向は異なっていた。アンモニウム塩とカリウム塩では最大強度(約3.5MPa)は第1塩で得られ、第2、第3塩では強度が低下した。一方、ナトリウム塩の場合は、逆に第3塩で最大強度(約4MPa)が得られた。

#### ⑤炭酸含有量

処理後に生成した炭酸アパタイト中の炭酸含有量も、5.6~21.6%と処理塩の種類によって異なるが、ナトリウム塩の場合がもっとも含有量が大かった。また、第1から第3塩と、液のpHが高くなるほど炭酸含有量は大きくなった。これは、ナトリウム塩の場合、特にB型炭酸アパタイトにおいては、一対の  $\text{Ca}^{2+}-\text{PO}_4^{3-}$ が一対の  $\text{Na}^+-\text{CO}_3^{2-}$ と置換することにより、電気的中性が保たれ、炭酸基との置換が容易に起こるためと考えられる。

#### (2)骨芽細胞の初期接着・増殖

G40C60硬化体の第2および第3リン酸ナトリウム水溶液処理により調製した炭酸アパタイトブロック上に骨芽細胞を播種し、 $\alpha$ MEM中で一定期間培養後に、骨芽細胞の細胞

付着性、細胞増殖(細胞数計測ならびにMTT法)を検討したところ、初期接着量はコントロールとしてのプラスチックプレートおよびHAP焼結体とほぼ同程度であった。また、図5に示すように、7日間にわたる増殖実験でもプラスチックプレートよりやや劣るものの、HAP焼結体との間に有意差は認められなかった。また、ALP活性およびオステオカルシンといった分化マーカーも第3リン酸ナトリウムで調製した炭酸アパタイトではHAP焼結体より有意に高くなっていた。

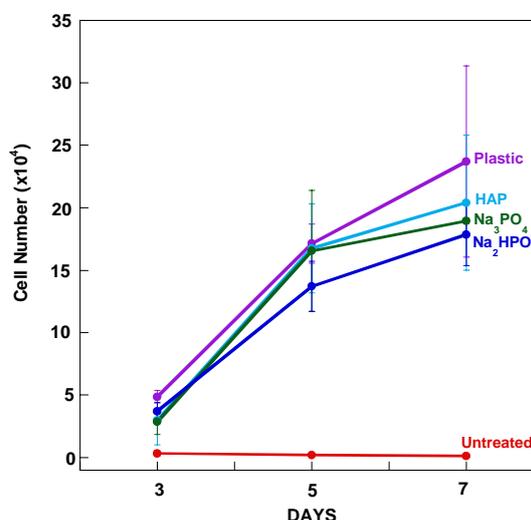


図5 リン酸2および3ナトリウム水溶液で処理前後のG40C60硬化体および焼結体HAP上での骨芽細胞の増殖

#### (3)破骨細胞による吸収性の確認

図6にG40C60硬化体の第2および第3リン酸ナトリウム水溶液処理により調製した炭酸アパタイトペレットならびに焼結体HAP上での破骨細胞を4日間培養後の表面SEM写真を示す。いずれの表面にも破骨細胞の存在が認められる。G40C60硬化体の処理前後の試料でいずれも破骨細胞による吸収窩が観察された。一方、焼結体HAPでは、吸収窩が観察されない。これは、焼結体HAの溶解度が低

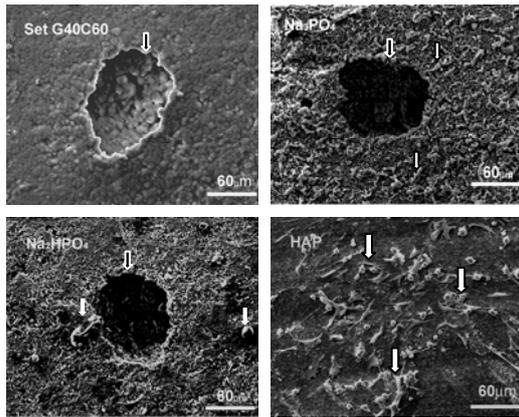


図6 リン酸二および三ナトリウム水溶液で処理前後のG40C60硬化体および焼結体HAP上で4日間破骨細胞を培養後の表面のSEM写真、黒矢印：吸収窩、白矢印：破骨細胞

いことが関係している。このように、炭酸アパタイト硬化体は破骨細胞によって容易に吸収されることがわかる。

#### 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6件)

- ① C.T.Zaman, A.Takeuchi, S.Matsuya, Q.H. Zaman, K.Ishikawa, Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite *Dental Materials Journal* 27,710-715,2008、査読有
- ② 松家茂樹：炭酸アパタイト系骨補填材福岡歯科大学学会雑誌 33, 119-131,2007、査読有
- ③ S.Matsuya, K.Udoh, M.Nakagawa, K.Ishikawa, Preparation of Carbonate Apatite Monolith by treatment of the set Gypsum containing Calcite in trisodium phosphate solution, *Key Eng Mater* 309-311, 125-128, 2006、査読有
- ④ C.T.Zaman, A.Takeuchi, S.Matsuya, M.Nakagawa, K.Ishikawa, Fabrication of Carbonate Apatite Monolith from Calcite-Gypsum Composite as Bone Substitutes, *Proc. 6th Asian Bioceramics Symposium*, 71-74,2006、査読有
- ⑤ A.Takeuchi, M.Maruta, S.Matsuya, M.Nakagawa, K.Ishikawa, Preparation of Carbonate Apatite Block from Gypsum by the Hydrothermal Treatment., *Proc. 6th Asian Bioceramics Symposium*, 99-102,2006、査読有
- ⑥ X.Lin, S.Matsuya, A.Takeuchi, M.Nakagawa, Y.Terada, K.Ishikawa, Fabrication of Carbonate Apatite Monolith by Treatment of Calcite in Phosphate Solutions, *Proc. 6th Asian Bioceramics Symposium*,37-39,2006、査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 竹内あかり, ザマンタニラ, 松家茂樹, 都留寛治, 石川邦夫, 石膏-カルサイト複合体の組成変換反応による炭酸アパタイト骨置換材の創製、第52回日本歯科理工学会学術講演会、平成20年9月20日大阪
- ② 松家茂樹, 炭酸アパタイト系骨置換材の調製：日本歯科理工学会九州支部夏期セミナー、平成19年8月24日鹿児島市
- ③ A. Takeuchi, M. Maruta, S. Matsuya, M. Nakagawa, K. Ishikawa, "Preparation of Carbonate Apatite Block from Gypsum by Hydrothermal Treatment", 6th Asian BioCeramics Symposium 2006, Bangkok, Thailand, 7-10 November 2006

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松家茂樹 (MATSUYA SHIGEKI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：00108755

(2) 研究分担者

宮本洋二 (平成18-19年度) (MIYAMOTO YOUJI)  
秋田大学・医学部・教授  
研究者番号：20200214  
中川雅晴 (平成18-19年度) (NAKAGAWA MASAHARU)  
九州大学・歯学研究院・講師  
研究者番号：60145266  
石川邦夫 (平成18-19年度) (ISHIKAWA KUNIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：90202952  
竹内あかり (平成18-19年度) (TAKEUCHI AKARI)  
九州大学・歯学研究院・助手  
研究者番号：40432918

(3) 連携研究者

宮本洋二 (平成20年度) (MIYAMOTO YOUJI)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号：20200214  
中川雅晴 (平成20年度) (NAKAGAWA MASAHARU)  
九州大学・歯学研究院・講師  
研究者番号：60145266  
石川邦夫 (平成20年度) (ISHIKAWA KUNIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：90202952  
竹内あかり (平成20年度) (TAKEUCHI AKARI)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：40432918