

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02987

研究課題名(和文)人工骨-母床骨界面の物理化学的インターフェイス制御による骨系細胞の活性化

研究課題名(英文) Activation of Bone-related Cells by Physicochemical Regulation at the Interface between Artificial Bone Substitute and Matrix Bone

研究代表者

都留 寛治 (Tsuru, Kanji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：50314654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：市販の型リン酸三カルシウム顆粒に対して、熱処理による結晶相制御と型リン酸三カルシウムの加水分解によるCa欠損型ヒドロキシアパタイトの表面析出反応を応用して表面微細構造を制御した。表面構造制御群は未処理群と比較して培養9日目の細胞数が24倍高くなり、アルカリフォスファターゼ活性は4倍高くなった。さらに、アパタイトセメントの硬化反応を応用して、結晶性と気孔率が制御されたヒドロキシアパタイト単相ブロックを作製した。結晶性と気孔率は初期細胞接着性にほとんど影響を及ぼさなかったが、吸収性に大きく影響を与えた。結晶性と気孔率の制御はヒドロキシアパタイトブロックの吸収性デザインに有効と結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

十分な咀嚼を実現可能な歯科インプラントは高齢者のQOL向上に大いに貢献できる。骨量不足のインプラント植立には骨増成が必要であり患者自身の骨(自家骨)が優先的に用いられるが、自家骨量の不足や健全部位への侵襲などの問題が生じるため、人工骨補填材を併用するのが一般的である。人工骨補填材としては、現在、非吸収性のヒドロキシアパタイト(HAp)および吸収性の型リン酸三カルシウム(TCP)が主に臨床使用されているが、それらの骨伝導性は自家骨に劣る。従って、HApやTCPの骨伝導性を向上させ自家骨に近づける研究は、人工骨補填材の適用範囲を拡大し、患者のQOL向上に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：The surface microstructure of commercially available β -tricalcium phosphate (TCP) granules was regulated by crystalline phase transition through heat treatment and applying the surface precipitation reaction of Ca-deficient hydroxyapatite by hydrolysis of β -tricalcium phosphate. Compared to untreated TCP granules, the cell count of these TCP granules was 24 times higher and alkaline phosphatase activity was 4 times higher on the 9th day of incubation. Hydroxyapatite (HAp) single-phase blocks with controlled crystallinity and porosity were prepared by applying the setting reaction of apatite cement. Crystallinity and porosity were found to have little effect on initial cell adhesion, but a significant effect on bioresorbability. We conclude that controlling crystallinity and porosity is effective for the bioabsorbable design of HAp blocks.

研究分野：生体材料化学

キーワード：人工骨補填材 構造制御 ヒドロキシアパタイト 型リン酸三カルシウム 表面構造制御 結晶性制御 気孔

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

十分な咀嚼を実現可能な歯科インプラントは高齢者の QOL 向上に大きな貢献が期待される。骨量不足のインプラント植立には骨増成が必要であり患者自身の骨(自家骨)が優先的に用いられるが、自家骨量の不足や健全部位への侵襲などの問題が生じることから人工骨補填材を併用するのが一般的である。

人工骨補填材としては、非吸収性のハイドロキシアパタイト (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) および吸収性の β 型リン酸三カルシウム (β TCP: $\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) が主に臨床使用されているが、それらの骨伝導性は自家骨に劣る。従って、HAp や β TCP の骨伝導性を向上させる試みは人工骨補填材の適用範囲を拡大し、患者の QOL 向上に繋がると期待される。

金属チタンやチタン合金においては、骨形成促進を目的にサンドブラストやアシッドエッチング等を利用した表面処理が行われており、処理後の表面微細構造が骨形成を促進することは周知の事実である。従って、HAp や β TCP の骨伝導性向上にも表面構造制御は有効と推察される。特に、吸収性の β TCP は生体骨への置換性が HAp と比較した利点であるが、その骨伝導性は HAp と比べて劣るため、その向上化が求められている。一方、市販されているほとんどの HAp 骨補填材は吸収性に乏しい。これは、高温焼成法により成形されるため、その結果として高い結晶性を持つことが起因している。従って、結晶性の高くない低温において HAp ブロックが作製できれば吸収型 HAp 骨補填材の創製に繋がると期待される。

2. 研究の目的

本研究では人工骨-母床骨界面を物理的・化学的にインターフェイス制御して周囲に存在する骨系細胞の活性化させ、セラミックス人工骨補填材の骨伝導性や生体吸収性を向上させることを目的とする。その目的を達成するため、 β TCP に対しては骨伝導性の向上化を目的とした表面構造制御を検討する。具体的には熱処理温度により TCP の結晶相制御 ($\alpha \leftrightarrow \beta$) を行いながら、 α 型リン酸三カルシウム (α TCP) の加水分解反応による Ca 欠損型ハイドロキシアパタイト (cdHAp) 微結晶の析出による骨補填材表面への微細構造付与(粗面化)を試みる。表面に微細構造を有する β TCP の細胞応答性を未処理 β TCP と比較することで表面構造の有用性を明らかにする。一方、HAp に対しては吸収性に影響を及ぼすと考えられる結晶性や気孔率の制御を検討する。具体的には室温で硬化するリン酸カルシウムセメントに着目し、低温で HAp 単相ブロックが得られる条件を見出す。さらに、HAp ブロックを作製する際の熱処理温度、粉液比、圧力負荷条件を変化させ結晶性や気孔率が制御された HAp ブロックを調製する。得られた HAp ブロックの骨伝導性や吸収性を評価し、これらの因子が骨伝導性や吸収性に与える影響を調査する。

3. 研究の方法

3-1. β TCP 顆粒の表面微細構造制御による骨系細胞の活性化

・ β TCP 顆粒の表面処理とキャラクタリゼーション

本実験では 500-700 μm に粒径制御した市販 β TCP 顆粒 (OSFerion, Olympus Terumo Biomaterials) を用いた。3 段階の処理により β TCP 顆粒の表面構造制御を試みた。最初に β TCP 顆粒を 5°C/min で 1300°C まで昇温し 12 時間熱処理した。引き続き相対湿度 100% の雰囲気下 100°C で 12 時間水熱処理を施した。最後に 1100°C で 12 時間熱処理を施した。処理前および各処理後の顆粒について、X 線回折法 (XRD: D08 Advance, Bruker AXS) で結晶構造を評価し、電子顕微鏡 (SEM: S-3400N, Hitachi) で表面構造を観察した。

・ラット骨髄細胞 (RBMCs) を用いた接着、増殖および骨分化の *in vitro* 評価

前述の方法で表面構造制御した β TCP 顆粒および比較対照として未処理の β TCP 顆粒を用いた。顆粒は試験前に 170°C で 3 時間の条件で乾熱滅菌を施した。48well-plate の 1well に対し顆粒 100 mg を配置し、 5×10^4 個/well の RBMCs を 500 μl の培地とともに播種した。播種して 1, 5 および 9 日後の細胞数を細胞計測キット (Cell Counting Kit-8, Dojindo) およびマイクロプレートリーダー (Infinite M200, TECAN) を用いて評価した。また、培養 7 日後のアルカリフォスファターゼ (ALP) の定量を ALP アッセイキット (LabAssay™ ALP, FUJIFILM Wako) で行い、同時にタンパク質濃度を定量キット (Bio-Rad) で評価した。総タンパク質当たりの ALP 活性を算出した。

3-2. HAp 骨補填材の結晶性および気孔率が生体吸収性に及ぼす影響

・結晶性および気孔率の異なる HAp 単相ブロックの作製

リン酸カルシウムセメントの出発原料粉末であるリン酸四カルシウム (TTCP) は無水リン酸水素カルシウム (DCPA: 太平化学産業) と炭酸カルシウム (CaCO_3 : 富士フィルム和光純薬) から調製した。DCPA と CaCO_3 の等モル混合粉末に 2-プロパノール (富士フィルム和光純薬) を加えた湿式条件にてボールミル (pulverisette7, FRITSCH) を用いて粉砕 (400rpm, 6時間) した。得られた試料は 80°C で 12 時間乾燥後、10°C/分で 1500°C まで昇温して 1 時間保持し、その後室温まで冷却した。さらに、2-プロパノールを加えた湿式条件でボールミル粉砕した (400rpm, 24時間) ものを原料粉末の TTCP とした。もう一つの原料粉末である DCPA は市販の粉末に対し 2-プロパノールを加えた湿式条件にてボールミル粉砕した (400rpm, 24時間) ものをを用いた。

Ca/Pがモル比で1.67になるようにはかり取ったTTCPとDCPAの混合粉末を10分間乳鉢で混合した。1.0gの混合粉末に対して窒素ガスをバブリングした脱イオン水を粉液比 (P/L) 1.33 および1.67で試料を調製してテフロン型 (φ9 x 2mm) にセットした。P/L=3.33の試料についてはスラリーをステンレス型 (φ9) に入れた後、100MPaもしくは150MPaの圧力を負荷した。これらの試料は相対湿度100%、37°Cのオーブンに6時間静置した後、引き続き相対湿度100%、80°Cのオーブンに72時間静置した。その後、P/L=3.33で150MPaの負荷をかけた試料 (HAp4) を除くすべての試料を10°C/分で850°Cまで昇温して12時間保持した (HAp1, 2, 3)。加えて、水酸アパタイト粉末 (HAp-100: 太平化学産業) 0.2gをステンレス型 (φ9) に入れ、10MPaで成形した圧粉体を10°C/分で1000°Cまで昇温して5時間保持し、試料を調製した (HAp5)。水酸アパタイト粉末 (HAp-200: 太平化学産業) 0.2gをステンレス型 (φ9) に入れ、100MPaで成形した圧粉体を5°C/分で1200°Cまで昇温して6時間保持し、調製した試料をコントロール (HAp焼結体) とした。

・作製したブロック試料のキャラクタリゼーションおよび骨伝導性・吸収性の *in vitro* 評価

作製したブロックの結晶構造をXRD (MiniFlexII, Rigaku) で同定した。さらに、得られたXRDパターンからPDXLソフトウェア (ver1.8.1, Rigaku) を用いて結晶子サイズを求めた。見かけの気孔率 (%) はブロックの質量、体積および水酸アパタイトの理論密度 (3.16 g/cm³) から算出した。比表面積 (Specific Surface Area (SSA): cm²/g) はBET-N₂ガス吸着法 (Belsorp max, MicrotracBEL) で求めた。試料の断面はSEM (JCM-6000, JEOL) を用いて観察した。

それぞれのブロックに対し、初期 (6h) における総タンパク質吸着量とMC3T3E1細胞の接着性を評価するとともに、破骨細胞のハウシップ窩環境を模倣したpH5.5の緩衝液によるブロックの溶解実験 (JIS T 0330-3(2012)) を行った。ブロックから溶出したカルシウム濃度はCaイオン電極 (Laqua 8203-10C, Horiba) を用いて評価した。

4. 研究成果

4-1. βTCP 顆粒の表面微細構造制御による骨系細胞の活性化

・表面処理による βTCP 顆粒の結晶構造および表面微細構造変化

未処理の顆粒は βTCP 単相であり、粒子間に多くの隙間 (図 1a) を有していた。この顆粒を1300°Cで12時間処理すると、結晶相は βTCP から αTCP に相転移するとともに高温で焼結・粒成長し、マイクロサイズの連通路構造 (図 1b) を形成した。また、表面は焼結体の典型的な様相であるなめらかな表面 (図 1b) を有していた。引き続き相対湿度 100%の雰囲気下 100°Cで12時間水熱処理すると、結晶相は αTCP から cdHAp に相転移し、マイクロサイズの連通路構造は維持されたまま表面には加水分解で生じたサブミクロンサイズの微細な結晶の析出が見られた (図 1c)。最後に 1100°Cで12時間処理すると、結晶相は cdHAp から βTCP に相転移し、粗い表面を有するマイクロサイズの連通路構造体 (図 1d) が得られた。

TCP の αβ 転移温度は 1180°Cであり、この温度より上の領域では αTCP、下の領域では βTCP が熱力学的安定相である。この TCP の熱的安定性を利用した熱処理による相転移と、以下に示される αTCP の加水分解反応を利用した微細な cdHAp 結晶の析出反応を利用することで、サブミクロンスケールの微細構造を表面に有する βTCP 顆粒の作製に成功した。

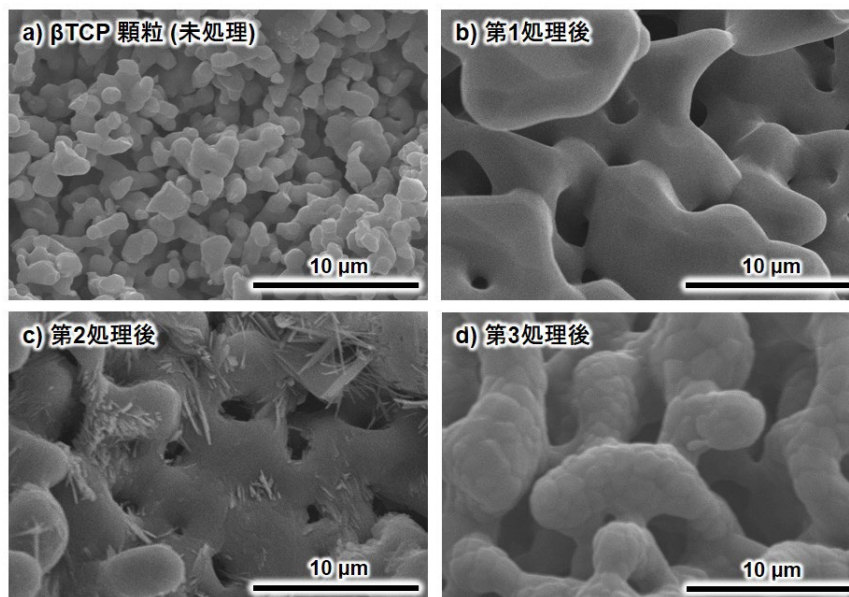
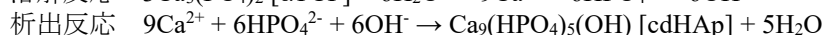
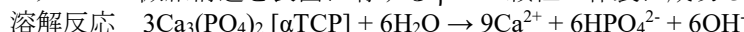


図1. 未処理 βTCP 顆粒 a)および第1処理後 b)、第2処理後 c)、第3処理後 d)の顆粒表面の電子顕微鏡像

・未処理βTCP 顆粒と処理βTCP 顆粒の細胞接着・増殖性および骨分化能の比較

処理βTCP 群は未処理βTCP 群に比べ、すべての培養期間で有意に高い細胞数を示した (図 2 a)。特に、培養 9 日目の処理群の細胞数は未処理群に比べて 2.4 倍高くなった (図 2 a)。また、培養 7 日目の処理群の ALP 活性は未処理群に比べて 4 倍高くなった (図 2 b)。以上の結果から、本手法により βTCP 顆粒表面に作製した表面微細構造は骨系細胞の活性化に有効と結論づけた。

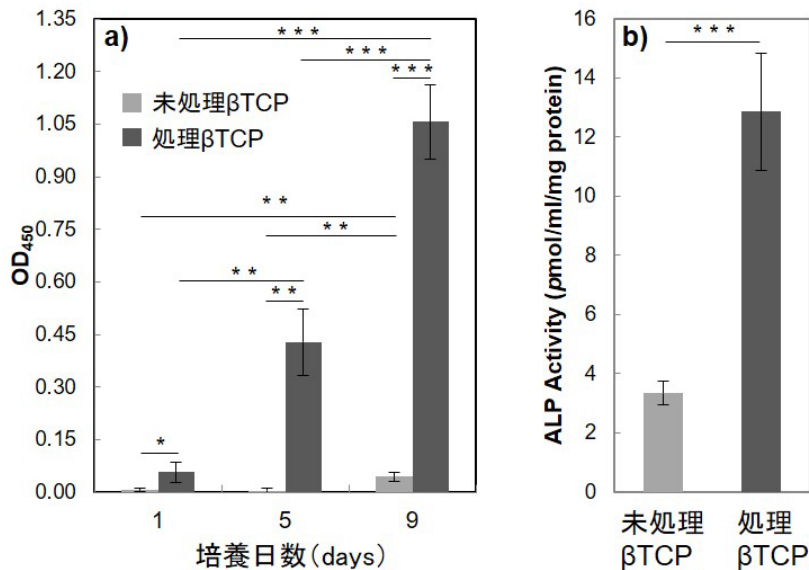


図 2. βTCP 顆粒および表面処理で微細構造を付与した βTCP 顆粒に播種した細胞数の経時変化 (a) および 7 日培養後の ALP 活性 (b)

4-2. HAp 骨補填材の結晶性および気孔率が生体吸収性に及ぼす影響

・作製したブロック試料のキャラクタリゼーション

リン酸カルシウムセメントの出発原料粉末の反応性やセメント硬化体の養生条件を鋭意検討し、3-2 に記載した実験条件において HAp 単相ブロックが作製できることを見出した。さらに、作製時の粉液比および圧力負荷の条件を変化させることによってマイクロ気孔を制御し、熱処理温度を変化させることによって結晶性を制御した。その結果、結晶性は一定で気孔率が異なる HAp ブロック (表 1 : HAp1, HAp2, HAp3) および気孔率は一定で結晶性が異なる HAp ブロック (表 1 : HAp3, HAp4, HAp5) を作製することに成功した。

リン酸カルシウムセメントは原料粉末と水との溶解-析出反応によってアパタイト結晶相が得られるため、①ボールミル粉砕により原料粉末の反応性を高めたことと、②反応初期に硬化体表面に形成する HAp により内部の溶解析出反応が抑制されない養生温度条件に設定したことが HAp 単相を得るための重要なポイントと考察した。セメントの硬化反応を利用すると硬化体内部に水が存在してそれが気孔となるため、粉液比の調整により気孔率を制御した HAp ブロックを作製できた。

表 1 作製した HAp ブロックの結晶子サイズ, 気孔率および比表面積

試料名	Crystallite size (nm)		Porosity (%)	SSA (m ² g ⁻¹)
	002	300		
HAp1	43.1	37.8	68.0 ± 0.4	23.35
HAp2	40.9	37.6	58.2 ± 0.8	19.74
HAp3	42.5	37.8	42.9 ± 0.2	11.00
HAp4	31.2	16.1	42.8 ± 0.4	29.93
HAp5	49.8	51.0	42.0 ± 0.7	10.86
HAp焼結体	56.0	57.8	5.1 ± 0.6	6.08

・骨伝導性・吸収性の *in vitro* 評価

作製した HAp ブロックを用いて初期のタンパク質吸着量を評価したところ、気孔率（比表面積）が大きいほど吸着量が多くなる傾向（HAp1>HAp2>HAp3, HAp4>HAp3>HAp5）がみられたが、結晶性との相関は認められなかった。初期の細胞接着性は気孔率、タンパク吸着量および結晶性のいずれにも依存せず、評価したすべての HAp ブロックにおいて良好な細胞接着性を示した（図 3）。破骨細胞が作るハウシップ窩を模倣した pH5.5 の緩衝液中における HAp ブロックの溶解性は気孔率（比表面積）が高くなると大きくなる傾向が認められた（図 4）。

気孔率（比表面積）が大きいほどタンパク質吸着量が増えた理由はタンパク質が吸着するサイト（有効表面積）が増加したためと考えられる。一方、タンパク質吸着量は初期細胞接着性にほとんど影響を及ぼしていないことから、HAp 焼結体を含むすべての HAp ブロック上には細胞接着に必要な十分量のタンパク質が吸着していたと考えられる。気孔率の増加により溶解性が高まったのは、緩衝液との接触面積が増加したため、結晶性の低下により溶解性が高まったのは、結晶子サイズが小さいと比表面積が大きくなるため、結果として溶液との接触面積が増加することが起因したと考えられる。以上の結果から、本手法による低結晶化とマイクロ気孔の導入は HAp ブロックの生体吸収性向上に有効と結論づけた。

リン酸カルシウムセメントの硬化反応を利用して作製した HAp ブロックは気孔率および結晶性の制御が可能であり、その結果、*in vitro* 生体吸収性を高めることができた。本研究により、生体吸収性 HAp 骨補填材創製の可能性が示唆された。

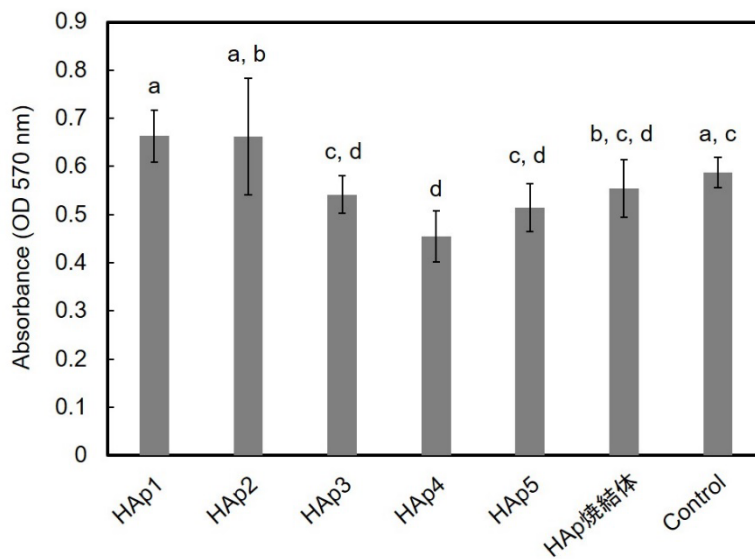


図 3. 培養 6 時間後における MC3T3E1 細胞数（同じアルファベット間に有意差なし：p<0.05）

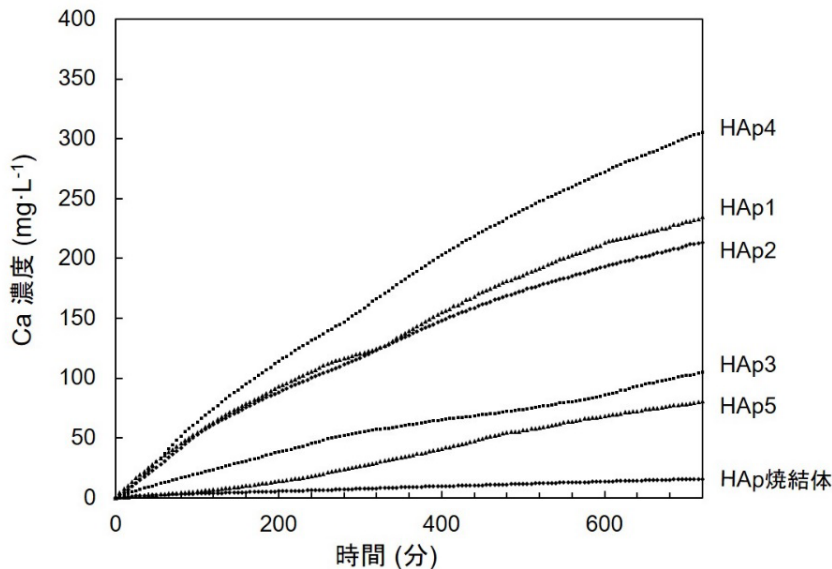


図 4. HAp ブロックを浸漬した緩衝液の Ca イオン濃度経時変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tansza Setiana Putri, Sunarso, Koichiro Hayashi, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa	4. 巻 48
2. 論文標題 Feasibility study on surface morphology regulation of β -tricalcium phosphate bone graft for enhancing cellular response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 13395-13399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceramint.2022.02.200	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹山光栄, 丸田道人, 梶本 昇, 松浦尚志, 都留寛治
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイトの骨伝導性に影響する因子の基礎的検討
3. 学会等名 令和元年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹山光栄, 丸田道人, 梶本 昇, 松浦尚志, 都留寛治
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイトの骨伝導性に影響する材料学的因子の基礎的検討：結晶性制御
3. 学会等名 第46回福岡歯科大学総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 都留寛治
2. 発表標題 QOL向上に寄与するバイオマテリアルの創製
3. 学会等名 平成30年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹山光栄, 丸田道人, 梶本 昇, 松浦尚志, 都留寛治
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイトの生体適合性に及ぼす材料学的因子の影響 (第1報)
3. 学会等名 第75回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都留寛治
2. 発表標題 生体に学ぶ 骨リモデリングに同調し骨組織の再生を促す人工骨補填材の創製
3. 学会等名 第48回福岡歯科大学総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021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	佐藤 平 (Sato Taira) (80866715)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	
研究分担者	梶本 昇 (Kajimoto Noboru) (30824213)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	
研究分担者	丸田 道人 (Maruta Michito) (40507802)	福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授 (37114)	

6. 研究組織（つづき）

	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	荒平 高章 (Arahira Takaaki) (30706958)	福岡歯科大学・口腔歯学部・助教 (37114)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関