

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09815

研究課題名(和文) スポンジ状の弾性を有する新規炭酸アパタイト骨補填材の開発

研究課題名(英文) Fabrication of a new spongiform elasticity bone substitute using carbonate apatite

研究代表者

真野 隆充 (MANO, Takamitsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：80325125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、生体内吸収性および骨置換性を有する炭酸アパタイト(CAp)とコラーゲンを複合化することで、より操作性が高い新規生体材料を開発することを目的とする。3%コラーゲンとCAp顆粒(顆粒径:300-600 $\mu$ m)を混合(CAp:30wt%)し、急速凍結(液体窒素)、凍結乾燥、熱架橋(24時間)の手順でスポンジ状の弾性を有する複合体の作製方法を確立した。ラット頭蓋骨骨欠損に埋入したところ、顆粒単独では欠損周囲に飛散していたのに対して、コラーゲン・CAp複合体は欠損内部に維持できていた。さらにコラーゲン・CAp複合体では母床骨の厚みは維持できており、骨欠損のみと比較して有意な骨形成を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炭酸アパタイト(CAp)顆粒は内側性の骨欠損への充填には適しているが、術中の骨欠損部周囲への飛散や術後の流出といった問題がある。また、顆粒状の形態のため、スクリューやピンなどで固定できず、垂直的あるいは水平的な骨造成に用いることは困難である。そこで、研究代表者らはこれらの問題点を解決するために、アテロコラーゲンとCAp顆粒を複合化することによって、より操作性が高く、スポンジ状の弾性を有する新規生体材料の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to fabricate a good operability biomaterial using carbonate apatite (CAp) which could be absorbed and replaced with the bone and collagen. We successfully established fabrication method of collagen and CAp granules composite with spongiform elasticity in the following procedures, 3% collagen and CAp granules (granule size: 300-600 $\mu$ m) composite (CAp:30wt%) were mixed, rapid freezing (liquid nitrogen), lyophilization, dehydrothermal treatment (24 hours). Collagen and CAp granules composite was maintained in the calvarial bone defects of rat, although only CAp granules were outflowed. Moreover, collagen and CAp granules composite was demonstrated maintenance of bone thickness and larger amounts of new bone were observed in the group of composite than only bone defects.

研究分野：口腔外科

キーワード：炭酸アパタイト コラーゲン 骨補填材 弾性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまで骨補填材としてハイドロキシアパタイト(HAp:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )が主に用いられてきた。HApは高い生体親和性を示すが、焼結によって作製されるため、高結晶性となり、吸収性が乏しく、ほとんど骨に置換しない。

一方、骨内に存在する骨アパタイトはHApではなく、炭酸基を含有する炭酸アパタイト(CAp:  $\text{Ca}_{10-a}(\text{PO}_4)_{6-b}(\text{CO}_3)_c(\text{OH})_{2-d}$ )であることが知られている。研究代表者らはこれまでに高温での焼結過程なしに溶解析出反応を応用し、低結晶性の顆粒状CApの人工合成に成功した(特願 2003-179257、医療用骨補填材およびその製造方法、Characterization of microporous carbonate-substituted hydroxyapatite bodies prepared in different phosphate solutions, *J Mater Sci*, 42(18), 7843-7849, 2007)。このCAp顆粒をウサギ頭蓋骨欠損に充填し、12週後の組織学的観察により、良好な生体親和性や高い骨伝導性を示すことを確認した。また、CAp顆粒はすでに上顎洞底挙上術における骨補填材としての有効性および安全性に関する臨床治験を経て、2018年よりサイトランス®グラニュールとして市販されている(図1)。



図1：市販されているCAp顆粒  
(サイトランス®グラニュール)

しかしながら、このCAp顆粒は内側性の骨欠損への充填には適しているが、術中の骨欠損部周囲への飛散や術後の流出といった問題がある(図2)。また、顆粒状の形態のため、スクリューやピンなどで固定できず、垂直的あるいは水平的な骨造成に用いることは困難である。そこで、研究代表者らはこれらの問題点を解決するために、現在臨床使用が許可されているアテロコラーゲンとCAp顆粒を複合化することによって、より操作性が高く、スポンジ状の弾性を有する新規生体材料の試作に成功した(図3)。

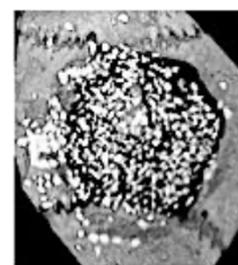


図2：ラット頭蓋骨欠損にCAp顆粒を埋入したμ-CT像

### 2. 研究の目的

本研究は生体内吸収性および骨置換性を有するCApとアテロコラーゲンの複合化による操作性の向上や形態保持を目指した新たな生体材料を開発することを目的とした。

本研究では以下の3点を明らかにした。

- (1) 濃度の異なるコラーゲンと大きさの異なるCAp顆粒を組み合わせることで複合体を作製し、物性を評価した。
- (2) 実験動物の皮下にコラーゲン・CAp複合体を移植して生体親和性、試料の飛散、移動や吸収を検討する。
- (3) 実験動物の骨欠損にコラーゲン・CAp複合体を充填して試料の吸収と骨形成を組織学的に評価し、最適な複合体作製の条件を決定するとともに骨補填材としての有用性を検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 濃度の異なるコラーゲンと大きさの異なるCAp顆粒を組み合わせることで複合体の作製と物性の評価

##### ① スポンジ状コラーゲン・CAp複合体の調整

コラーゲンとしては生体安全性が確認されているアテロコラーゲン溶液を用い(1~3%)、CAp顆粒を10~30 wt%で混合した。混合したCAp顆粒は平均粒径が30, 110, 200, 440 μmの4種を使用した。アテロコラーゲン溶液にCAp顆粒を混合し、CAp顆粒内へアテロコラーゲンを浸透させるために3000 rpm/minで、15分遠心回転を行った。混合物を円柱モールド(内径:9 mm, 厚み:2 mm)に充填し、液体窒素にて急速凍結後に凍結乾燥(24時間)、熱架橋(155°C, 24時間)を行った。



図3：コラーゲン・CAp顆粒複合体は圧縮により、スポンジ状の弾性を有していた。

##### ② スポンジ状コラーゲン・CAp複合体の物性の評価

調整した試料の表面性状を操作型電子顕微鏡にて形態学的観察を行った。組成分析はX線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて追跡を行った。

### (2) 実験動物への皮下埋入を利用したコラーゲン・CAp複合体の吸収性と生体親和性の評価

コラーゲン・CAp複合体を、12週齢Wistar系雄性ラットの背部皮下に移植した。移植後1, 2週で試料とともに周囲組織を摘出し、中性緩衝ホルマリンで固定後、脱灰し、パラフィン切片を作製、H-E染色を行い組織学的に評価した。

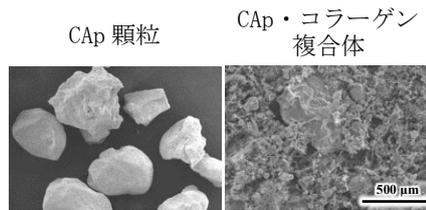


図4: CAp 顆粒 (左)、コラーゲン CAp 複合体 (右) の走査型電子顕微鏡像

### (3) 実験動物の頭蓋骨骨欠損モデルにおけるコラーゲン・CAp複合体を充填し組織学的に骨再生を評価

コラーゲン・CAp複合体を、12週齢Wistar系雄性ラットの頭蓋骨に作製した骨欠損に充填した。骨欠損はクリティカルサイズ(自然には治癒しない大きさ)である直径9.0 mmを採用した。対照群としてCAp顆粒のみと骨欠損のみを用いた。移植後2, 4, 8週に試料とともに頭蓋骨を摘出した。μ-CTにてCAp顆粒の飛散状況、術後の移動について評価した。また(2)の動物実験と同様に切片を作製し、新生骨量を測定することによって、スポンジ状コラーゲン・CAp複合体の有用性を評価した。

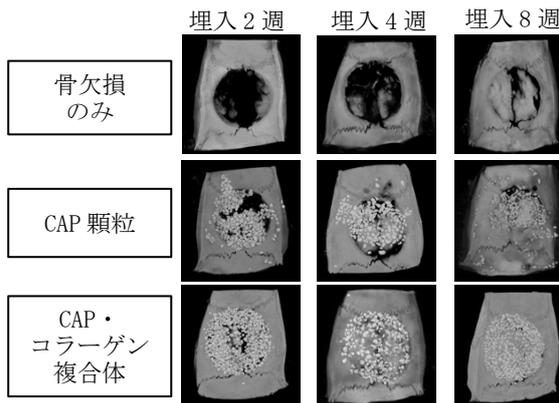


図5: 頭蓋骨骨欠損に試料を埋入したμ-CT像

## 4. 研究成果

コラーゲン・CAp複合体を試作したところ、コラーゲン濃度が高いほど弾性が高くなりスポンジ状を呈していたため、コラーゲン濃度は3%とした。CAp含有量を10wt%, 平均粒径が30, 110, 200 μmの3種を使用してラット頭蓋骨骨欠損にコラーゲン・CAp複合体の充填を行ったところ、顆粒径が大きいほど骨形成が高い傾向にあったので、使用するCApの顆粒径は300~600 μm (平均粒径: 440 μm) で調製した。またラット頭蓋骨骨欠損モデルに顆粒のみを埋入した際の顆粒量とあわせてCO<sub>3</sub>Ap含有量を30 wt%とした。3%コラーゲンとCAp顆粒(顆粒径: 300~600 μm)を混合(CAp: 30wt%)し、急速凍結(液体窒素)、凍結乾燥、熱架橋(24時間)の手順でスポンジ状の複合体の作製方法を確立した。

操作型電子顕微鏡(SEM)にてCApとコラーゲンとが密に絡まっているのを確認した(図4)。また作製したコラーゲン・CAp複合体は1時間生理食塩水中に浸漬しても、形態が保持されることを確認した。X線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて組成分析を行ったところ、CAp(サイトランス®グラニュール)と同様のピークを検出した。

作製したコラーゲン・CAp複合体を、12週齢Wistar系雄性ラットの背部皮下に移植した。移植後1, 2週後に試料とともに周囲組織を摘出し、組織学的に観察した。移植後1, 2週で顆粒の飛散はなく、コラーゲンは一部残存していたが、コラーゲン・CAp複合体による炎症は認めず、生体親和性は良好であった。

12週齢Wistar系雄性ラットの頭蓋骨に直径9mmの骨欠損を作製し、CAp顆粒、コラーゲン・CAp複合体をそれぞれ埋入し、コントロールとして骨欠損のみを用いた。2, 4, 8週後に頭蓋骨を摘出し、μ-

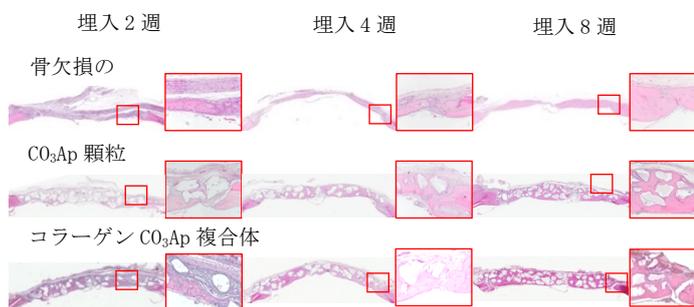


図6: コラーゲン・CAp複合体の頭蓋骨埋入部位の組織像

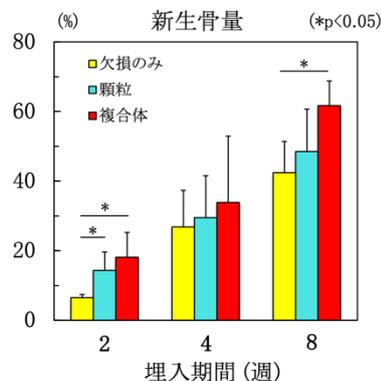


図7: コラーゲン・CAp複合体の頭蓋骨埋入部位の骨形成量

2, 4, 8週後に頭蓋骨を摘出し、μ-

CTを撮影した後、パラフィン切片を作製しH-E染色を行い、組織学的観察を行った。 $\mu$ -CTでは、CAp 顆粒のみの群では顆粒は骨欠損部より流出しているのに対して、コラーゲン・CAp 複合は骨欠損内に顆粒は維持できていた(図5)。組織学的観察において埋入2週間では、骨欠損のみでは幅の薄い新生骨が一部にみられ、顆粒のみと複合体では顆粒を取り囲むように骨新生が確認され、骨欠損のみと比べて有意な差を認めた。埋入8週間では、骨欠損のみでも欠損全体で骨形成を認めたが、母床骨の厚みは維持できていなかったのに対し、コラーゲン・CAp 複合では母床骨の厚みは維持できており、有意な骨形成を認めた(図6, 7)。

以上より、本研究は生体内吸収性および骨置換性を有する $\text{CO}_3\text{Ap}$ とアテロコラーゲンを用いてコラーゲン・CAp 複合体の開発に成功した。さらに動物実験により顆粒の流出や飛散を防げたことから、コラーゲン・CAp 複合体による操作性の向上や形態保持にも成功した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mano Takamitsu, Akita Kazuya, Fukuda Naoyuki, Kamada Kumiko, Kurio Naito, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 108
2. 論文標題 Histological comparison of three apatitic bone substitutes with different carbonate contents in alveolar bone defects in a beagle mandible with simultaneous implant installation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1450 ~ 1459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34492	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋田 和也、眞野 隆充、福田 直志、宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイトと豚コラーゲンの複合化による新規骨補填材の開発と骨再建への応用
3. 学会等名 第24回 日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2020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	福田 直志 (FUKUDA Naoyuki) (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究所(歯学域)・助教  (16101)	
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所(歯学域)・教授  (16101)	
研究分担者	中川 貴之 (NAKAGAWA Takayuki) (30456230)	広島大学・病院(歯)・助教  (15401)	削除：2020年3月18日

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	栗尾 奈愛  (KURIO Naito)  (80622141)	徳島大学・病院・講師    (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)	

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