

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19390503

研究課題名（和文） 骨誘導能を発現する炭酸含有アパタイト多孔体の創製

研究課題名（英文） Development of osteoinductive porous carbonate apatite ceramics

研究代表者

土井 豊 (DOI YUTAKA)

朝日大学・歯学部・歯科理工学分野・教授

研究者番号：40116067

研究成果の概要（和文）：炭酸含有アパタイト(CA)多孔体セラミックの骨誘能を検討するため、気孔率の異なる焼結並びに非焼結 CA 多孔体を作製し、ビーグル犬皮下に埋入し新生骨の有無を調べた。埋入 3 ヶ月及び 6 ヶ月後に組織を取り出し、脱灰前に  $\mu$ CT で材料の吸収性と新生骨の有無を定性的に調べた。その結果、非焼結 CA 多孔体は市販  $\beta$ TCP に比較し吸収性に優れ、6 ヶ月試料では 16 例中 7 例で材料の確認が出来ない程であった。新生骨は CA 多孔体で有望視されたが脱灰試料で更に検討中である。

研究成果の概要（英文）：Sintered and non-sintered carbonate apatite ceramics with different porosities were prepared and implanted into the skin of dogs to investigate their bioresorbability and also to see if they have an osteoinductive potential or not. At 3 and 6 months postoperatively, the tissues containing materials were subjected to  $\mu$ -CT analysis before decalcification for light microscopy. Compared to commercially available porous  $\beta$ -TCP, non-sintered CA resorbed to an appreciate extent and in 7 of 16 specimens no CA materials were confirmed. Although not so evident on  $\mu$ -CT images, newly formed bone was indicated with non-sintered CA ceramics at 6 months.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 9,000,000  | 2,700,000 | 11,700,000 |
| 2008 年度 | 4,100,000  | 1,230,000 | 5,330,000  |
| 2009 年度 | 1,700,000  | 510,000   | 2,210,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,800,000 | 4,440,000 | 19,240,000 |

研究分野：医歯薬学

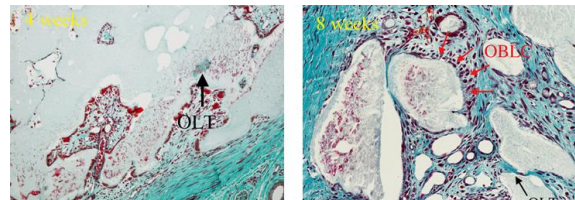
科研費の分科・細目：歯学・補綴理工学系歯学

キーワード：歯科用材料・歯科理工学

### 1. 研究開始当初の背景

硬組織の無機成分を構成する元素からなるリン酸カルシウム系基材は生体内で決して抗原抗体反応を惹起せず、組織親和性も高く、極めて生体親和性に富み、種々の形状のものが生体材料として高く評価されている。リン酸カルシウム系基材の中でも水酸化アパタイト (HA) とβリン酸三カルシウム (βTCP) の評価は極めて高くすでに臨床応用されている。骨組織にこれらリン酸カルシウム系基材を埋入すると母床骨からの骨生成を妨げず、基材組成の違いで差はあるものの、骨生成を助長することが知られている。この性質は一般的には「骨伝導」として理解され、用いられる基材は骨補填材もしくは骨置換材と称される。βTCP に比較し HA は組織内ではほとんど吸収されないが、骨伝導性の点ではβTCP に優ることが知られている。一方、βTCP は組織内で経時的に吸収されるため、骨補填材としては HA に比べβTCP が優るとする考えがある。いずれにしても、兎、ラット、マウスなどの小動物の骨組織以外の組織、例えば皮下、に HA およびβTCP を単独で埋入しても新生骨は決して生成しない。しかしながら上述したように組織親和性は極めて良好で、近年では組織工学 (殊に、骨組織) の担体としての有用性も再認識され、骨誘導蛋白 (BMP) を始めとする種々の成長因子および骨芽細胞とのハイブリット体などが臨床応用されようとしている。このハイブリット体は軟組織においても骨を形成し得る能力 (骨誘導能) を有する。我々は、これまでに HA に遜色ない骨伝導能を有し、βTCP に匹敵する生体内吸収性を有する新規基材として炭酸含有アパタイト (CA) に着目し、骨芽細胞 [骨補填材としての焼結炭酸含有アパタイトの培養細胞での評価、ならびに破骨細胞培養系およびラット、兎、マウスなどの実験系でその有用性を評価してきた。たとえば、破骨細胞培養系では CA は HA および比較として用いた骨片と同程度の付着性を有し各基盤上の破骨細胞は本質的に同様な活性、形態を保持していたこと、HA および

βTCP では吸収窩は認められなかったが、CA では骨片と同様な形態の吸収窩を認めたこと、などを明らかにし、殊に、破骨細胞吸収性の点ではβTCP とは比較にならないほど骨に類似していることを立証してきた。破骨細胞吸収性はラット、兎、マウスなどの動物実験系でも確認し、CA 基材は、いわゆる代謝機能を有した骨補填材と言える。これらの動物実験系では骨欠損部への埋入を試みたもので、埋入 1 週目の初期で比較すると、骨伝導能は CA ≥ HA > βTCP となり、CA が最も優れることも示されている [骨補填材としての炭酸含有アパタイトの有用性に関する研究、山口健一、岐歯学誌 32:47-65,2005]。一方、ビーグル犬を用いた予備実験で CA 多孔体を歯槽粘膜に埋入し、4 週目の組織を観察すると左図に示すように類骨様組織を認め、8 週目の組織では右図に示すように骨様組織が形成されることが示された。この結果は CA に骨誘導能があることを意味し、これまでの定説「セラミックはいかに優れようと骨伝導能しかなく骨誘導能はない」を覆すものであり、文献調査をすると、スポンジ状 poly-HEMA を豚の皮下に埋入しすると 2 ヶ月 (62 日) 後に骨が形成されることが判明した。さらに、HA、βTCP、HA-βTCP にも骨誘導能があることが報告され始めた。これらの実験系で共通することは、基材は「多孔質」で動物はビーグル犬、ヒヒ、ヤギ、蟹悔いサルなどに限られることであった。しかし



CA 多孔体をビーグル犬歯槽粘膜に埋入後 4 週 (右図) と 8 週後 (左図) の Masson 染色。OLT: 類骨組織、OBL: 骨芽細胞様細胞

ながら、結果の普遍性は疑わしく、ヤギの系では HA-βTCP に骨誘導能が認められたが、HA では認められないとする報告、ビーグル犬を用いた長期実験系では骨誘導能は HA > HA-TCP > β-TCP > α-TCP であったとす

る報告、さらには同様な HA 多孔体でも製造法の違いにより骨誘導能の可否が異なる報告があり、必ずしも普遍性があるとは言えないのが現状である。しかしながら、HA に関しては複数の研究室からの結果が一致しており、合成多孔体 HA でも珊瑚から水熱変換して得た HA でもビーグル犬を用いれば骨誘導能が認められる。HA に関する動物種の違いに関する報告では、埋入 60 日後の評価であるが、骨誘導能はヒビ>サル>犬>兎で、ヒビが一番骨生成が顕著であったとする報告があり、動物種依存性が最も大きな要因と思われる。しかし報告の多くは多孔体を構成するマクロな気孔に加え、これらマクロな気孔を連結するミクロな気孔がより重要な役割を果たしていること示唆している。いずれにせよ、これら基材は微視的環境における成長因子を保持・蓄積でき、周囲未分化細胞を骨芽細胞へと分化させ骨（異所性石灰化）生成を開始するものと想像される。CA は HA に類似するが、原料がより微結晶からなり、加えて、焼結温度が低いため再結晶が大きくは起こらず焼結体は微細な結晶粒で構成される。そのため、焼結体ではあるもののその表面はミクロな凹凸を呈するなどの他のリン酸カルシウム系基材では認められない特徴を有する。また、焼結時に結晶格子内の炭酸イオンの一部は炭酸ガスとなって焼結体から消失するが、この時数ミクロンの連続ミクロ気孔を形成する。本研究ではこれら CA の特徴を利用し、マクロ気孔がミクロ気孔で連続した多孔体を作製し、ビーグル犬皮下に埋入し、骨伝導能を定量的に評価することを第一目的とする。

## 2. 研究の目的

ミクロ気孔で連続したマクロ気孔を有する円柱状 CA 多孔体を作製する。この時、マクロ気孔の試料内存在状態（密度）に傾斜を与え、例えば、試料上部では 80% の気孔を有し、下部では 40% 程度のものを作製する最適条件を確立する。試作気孔率傾斜型多孔体をビーグル犬背部皮下に埋入し、どの気孔率部位に骨生成が認められるのかを検索する。埋入期間は上述した予備実験および文献検索より、3ヶ月および6ヶ月とする。材料の吸収性および骨生成の評価は試料脱灰前にマイクロCTによる定性評価を試み、その後、通常のHE染色に加え、可能ならば類骨を優先的に染色す

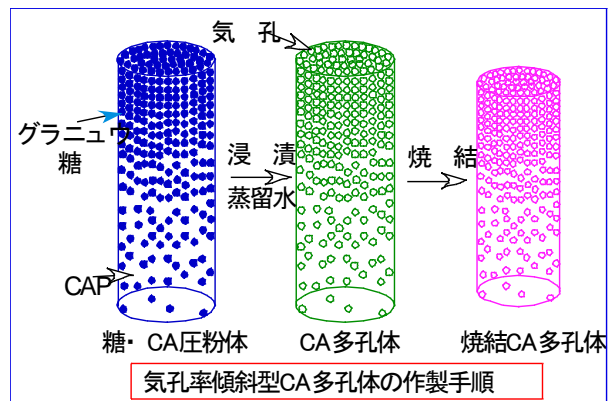
るMasson染色変法を試みる。また、結果の再現性、および市販リン酸三カルシウム（ $\beta$  TCP）多孔体との比較検討も研究目的に含まれる。

## 3. 研究の方法

### (1) CA 多孔体の作製

#### ① 焼結 CA 多孔体

約12wt%の炭酸イオンを含有するアパタイト (CA) を湿式合成し、乾燥後に粉砕し  $32\mu\text{m}$  以下に粒度調整した。このCAに粒度が  $300\sim 500\mu\text{m}$  で形も比較的均一で球状に近い市販グラニュー糖を種々の割合で加え、予備加圧



し円柱状試料を作製し、その後静水圧処理 (200MPa) をした。この圧粉体試料を蒸留水中に浸漬し、グラニュー糖の溶出を図り、得られた多孔体試料を  $750^{\circ}\text{C}$  で 2 時間焼結し、焼結 CA 多孔体を作成した。なお、CA 圧粉体の嵩密度は水圧処理後の直方体の体積及び重量から  $1.69\pm 0.01\text{ g/cm}^3$  と求められ、グラニュー糖の密度は  $1.59\text{ g/cm}^3$  のため添加量の重量% が概ね焼結前の気孔率（マクロおよびミクロの合計）に相当することがわかる。

#### ② 非焼結 CA 多孔体

CA の前駆物質として第二リン酸カルシウム二水塩 (DCPD) を用い、粒子サイズ  $500\sim 650\mu\text{m}$  の市販グラニュー糖を重量比 7 : 3 で混合し、その後、金型を用い  $15\text{ kg/cm}^2$  で一次加圧を行った。二次加圧は静水圧装置 (200MPa) を用い、DCPD/グラニュー糖の圧粉体を得た。糖の溶出と DCPD の CA への転移を同時に進めるため、浸漬溶液として  $60^{\circ}\text{C}$  の 1M 炭酸水素ナトリウム溶液を用いた。

糖溶出が完了した DCPD 多孔体を  $60^{\circ}\text{C}$  で 100ml の 1M 炭酸水素ナトリウム溶液に浸漬し、糖溶出開始から 3, 6, 9 時間, 1, 2, 3 日後に取り出し蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し

た。転移の程度および多孔体の表面性状は実体顕微鏡, FT-IR, X線回折および走査型電子顕微鏡(SEM)で評価した。

## (2) ビーグル犬皮下での評価

### ①実験動物

ビーグル犬(年齢1から2歳、雄8頭、体11~13kg)を用い、施術部位は左右背筋内とした。

### ②材料

焼結CA、非焼結CAおよび比較のため市販βTCP(オスフェリオン、オリンパステルモマテリアル株式会社、日本)を用いた。非焼結CAは浸漬時間(9時間および48時間溶液に漬浸)が異なる2種類を用意した。

以上4種類の補填材と補填材にgrowth factorとして塩基性線維芽細胞増殖因子(フィブラストスプレー250、科研製薬株式会社、日本)を250μgを1mlの生理食塩水に溶解させ含浸させた8群について検索した。

### ③実験方法

手術方法は塩酸キシラジン(スキルペン、三共株式会社、日本)を1ml筋肉注射後、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル、共立製薬株式会社、日本)を6ml上腕内側静脈内注射による全身麻酔および塩酸リドカイン(キシロカイン、藤沢薬品、日本)局所麻酔下で筋肉内左右対称4か所ずつの計8か所に埋入した。その後吸収性糸で筋肉縫合、非吸収性糸で皮膚縫合を施し手術を終了した。術後の観察期間は3カ月、6か月とし、塩酸キシラジンを1ml筋肉注射後、上腕内側静脈にペントバルビタールナトリウムを徐々に静注し屠殺後、試料を取り出し4%ホルマリン溶液で固定した。脱灰前にすべての試料をマイクロCT撮影した。

## 4. 研究成果

### (1) CA多孔体

焼結CA多孔体の強度は当然ながら気孔率に支配され、糖90%添加の場合では糖溶出後の多孔体が操作中に破壊し、焼結操作に移行できなかった。また、糖80%点添加では焼結後に破壊し、現実的には80%以下の添加でない多孔体ができないことが解った。一円柱状試料に各1/3部位に糖を80%、60%なら

びに40%添加した、いわゆる気孔率傾斜多孔体を試作した。しかしながら、ビーグル犬を用いた予備実験で40%添加部位ならびに60%添加部位では、1ヶ月後の組織評価から気孔部への組織の進入も芳しくなく気孔率傾斜多孔体の埋入に換え、糖を70%添加して作製した焼結多孔体を埋入した。

非焼結CA多孔体は前駆物質のDCPDを用い炭酸水素ナトリウム溶液中で糖の溶出と同時にDCPDからCAへの移行を図った。そのため、まずDCPD→CAの移行挙動をX線回折から検討した。溶出並びに移行反応時の温度は60℃とし、炭酸水素ナトリウムの濃度は1Mとした。

図1はDCPDのCAへの転移におけるX線回折結果である。3時間の浸漬で出発材料としてのDCPDに加え、32°/2θ近傍に低結晶性のアパタイトに典型的にブロードなピークおよび、5°/2θ近傍にリン酸八カルシウム(OCF)が検出できた。DCPDおよびOCFのピークは経時的に減少したが、DCPDのほうが消失速度が速く6時間浸漬後では殆ど検出できなかった。9時間浸漬後ではOCFは僅かに確認できたが殆どはアパタイトに移行していた。浸漬1日後でアパタイト単相と確認でき、FT-IRで炭酸イオンを含有することが示され、今回の実験ではDCPD→OCF→CAの転移反応が進行し、浸漬1日でCA単相の多孔体が得られることがわかった。

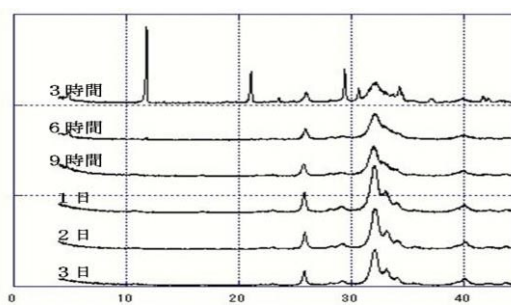


図1 60℃の1M炭酸水素ナトリウム水溶液中に浸漬した試料のX線回折

図2は浸漬前と浸漬1日後の試料の実体写真を比較したもので、浸漬後では多孔体ができていることが理解できる。

図3は同一試料のSEM像で、グラニュー糖が溶出し、その部位に気孔ができている様相が低倍率像(図3a)からわかる。気孔を構成する壁の一部を高倍率で観察(図3b)す

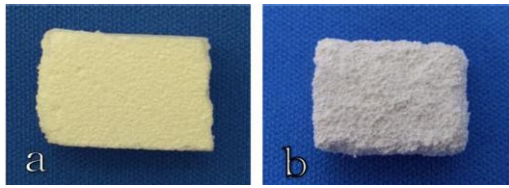


図2 浸漬前(a)と1日浸漬後(b)の実体像

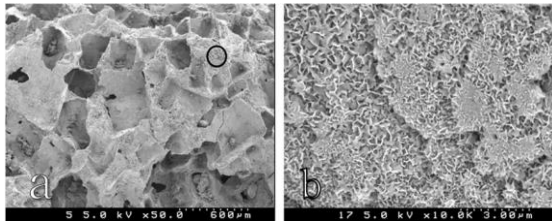


図3 浸漬1日で作製した非焼結 CA 多孔体

ると、微細なフレーク状の結晶が多く認められ、この集合体で多孔体が形成されていることが明らかとなった。

動物実験では市販  $\beta$  TCP との比較も本件では重要な意味をもつため、気孔率が同程度となる糖を70%添加（浸漬時間は9時間と48時間の2種類）して作製した試料を多くの系で用いた。

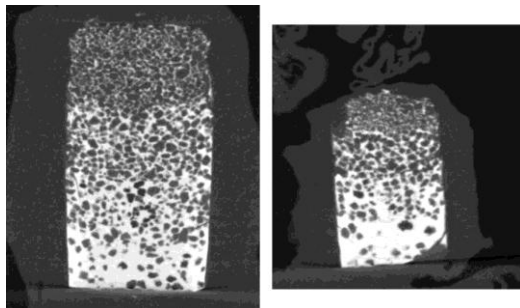


図4 3ヶ月(左)と6ヶ月(右)試料の $\mu$ CT

#### (2) ビーグル犬でのマイクロCT評価

気孔率傾斜 CA 多孔体の組織反応の一例を図4に示す。

気孔率は約80%、60%及び40%の傾斜で、6ヶ月後では多くの試料で80%気孔率部位の一部が崩壊もしくは消失していた。興味ある点は80%部位に骨組織と同程度のX線不透過領域が気孔内に散見されることである。これに反し、60及び40%部位では明瞭な変化は何ら認められず、焼結 CA を用いた以降の実験では70%気孔率の CA 多孔体を用いた。また、非焼結 CA 多孔体は70%糖添加で作製

した試料を用いた。

図5はCA、非焼結CA及び $\beta$ TCP多孔体の3ヶ月試料で、4試料の中から1試料を任意に抽出した。また、図6はこれら多孔体に成長因子bFGFを含浸した系の結果である。成長因子を含浸させたものとさせないものを含め、非焼結CA多孔体では3ヶ月埋入後に16例中の9例でその残骸すら認められず、また残っている多孔体でもその体積は大きく減少し、形状もかなり変化していた。これに反し、焼結CA多孔体は形状の変化ほとんど認められず、 $\beta$ TCPでは吸収されていると思われる像と、ほとんど吸収されていないと思わ

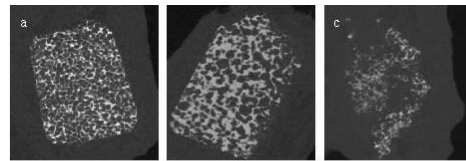


図5 3ヶ月後の焼結CA (a)、 $\beta$ TCP (b)、非焼結CA (c)の $\mu$ CT像

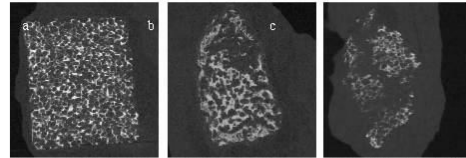


図6 3ヶ月後のbFGF含有焼結CA (a)、 $\beta$ TCP (b)、非焼結CA (c)の $\mu$ CT像

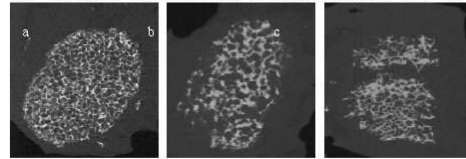


図7 6ヶ月後の焼結CA (a)、 $\beta$ TCP (b)、非焼結CA (c)の $\mu$ CT像

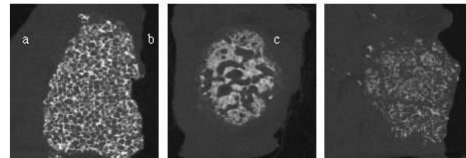


図8 6ヶ月後のbFGF含有焼結CA (a)、 $\beta$ TCP (b)、非焼結CA (c)の $\mu$ CT像

れる例が混在していた。

図7及び図8は6ヶ月後の試料の代表例で、図7が成長因子なし、図8が成長因子含有の系である。前述したように非焼結CA多孔体は16例中7例で見つからず、また、組織として確認できたものでも図7c及び図8cで示すように形状は原型を留めていなかった。焼結CA及び $\beta$ TCPも形状は丸みを帯び、殊にこの傾向は $\beta$ TCPで顕著で、吸収性は非焼結CA> $\beta$ TCP>焼結CAの順であった。材料に関わらず、6ヶ月試料では気孔内に材料のX線透過性と異なる、周囲骨と同程度のX線透過性を呈する領域が認められ、現在脱灰試料でこの領域部位が新生骨か否か検討中である。また同様に新生骨に対する成長因子の影響に

についても不明で、脱灰試料での検討に加え、CT像の定量解析を現在進行中である。

#### 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 13 件)

- ① K. Kanayama, M. Kitago, M. Shiraki, Y. Doi and T. Shibutani : Induction of new bone by bFGF-loaded porous carbonate apatite implants in femur defects in rats. *Clin Oral Impl Res*, 20: 560-565, 2009.
- ② Y. Yamaguchi, M. Adachi, M. Iijima, N. Wakamatsu, H. Kamemizu and Y. Doi : Biomimetically-coated Thin Carbonate Apatite Layer on SAM-Ti Substrate Surfaces. *Arch BioCeram Res*, 9, 391-394, 2009.
- ③ M. Iijima, N. Wakamatsu, H. Kamemizu, M. Adachi and Y. Doi : Relationship between composition, structure and flexural behavior of OCP/apatite-type I collagen composite. *Arch BioCeram Res*, 9, 339-342, 2009.
- ④ K. Kanayama, S. Wantida, H. Shimokawa, Y. Doi and T. Shibutani : The responses of osteoblasts and osteoclasts to hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, carbonate apatite and titanium. *Arch BioCeram Res*, 9, 379-382, 2009.
- ⑤ M. Kawaguchi, J. Ohno, T. Iwahashi, T. Fukushima, T. Hayakawa and Y. Doi : Bone response of DNA-chitosan-apatite complexes. *J Oral Tissue Engn* 7(2), 89-98, 2009.
- ⑥ Y. Takenaka, M. Iijima, S. Kawano, Y. Akita, T. Yoshida, Y. Doi and I. Sekine : The Development of Carbonate-containing Apatite/Collagen Composite for Osteoconductive Apical Barrier Material. *J Endod* 34(9): 1096-1100, 2008.

[学会発表] (計 16 件)

- ① K. Kanayama, S. Wantida, H. Shimokawa, Y. Doi and T. Shibutani : The responses of osteoblasts and osteoclasts to hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, carbonate apatite and titanium. The 9<sup>th</sup>

Asian BioCeramics 2009(ABC2009), Nagoya, Japan., December 8-11, 2009.

- ② K. Kanayama, M. Kitago, Y. Doi and T. Shibutani: Regeneration of class3 furcation defects with basic fibroblast growth factor associated with porous carbonate apatite. American Academy of Periodontology 95<sup>th</sup> Annual Meeting, Boston, MA, September 12-15, 2009.
- ③ 芝辻篤史、金山圭一、北後光信、白木雅文、土井豊、澁谷俊昭 : 吸収置換型材料としての炭酸含有アパタイト多孔体, 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2008 年 10 月 19 日
- ④ T. Shibutani, K. Kanayama and Y. Doi : Porous Carbonate Apatites as Growth Factor Carrier for Bone Graft. AADR/IADR, Metro Toronto Convention Centre Exhibit Hall D-E, July 4, 2008

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

土井 豊 (DOI YUTAKA)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号 : 40116067

##### (2) 研究分担者

足立 正徳 (ADACHI MASANORI)  
朝日大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 60076057  
亀水 秀男 (KAMEMIZU HIDEO)  
朝日大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 20454275  
金山 圭一 (KANAYAMA KEICHI)  
朝日大学・歯学部・助教  
研究者番号 : 60076057