

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592355
 研究課題名 (和文) リン酸カルシウム置換処理による機能性ベクトルマテリアルの開発
 研究課題名 (英文) Development of a novel zinc releasing cement by conversions of zinc phosphate into zinc calcium phosphate

研究代表者

堀内 信也 (HORIUCHI SHINYA)
 徳島大学医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：70263861

研究成果の概要 (和文)：骨形成促進効果を有する亜鉛を徐放するセメントを開発するために、歯科用セメントとして従来より使用されているリン酸亜鉛セメントの成分であるリン酸亜鉛をリン酸亜鉛カルシウムへと置換し、骨代替材料 (アパタイトセメント) へと導入したところ、アパタイトを析出しつつ硬化する亜鉛徐放性セメントを得た。このセメント上で骨を形成する細胞を培養したところ、細胞増殖が促進し、骨マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性が上昇した。

研究成果の概要 (英文)：Zinc releasing apatite cement was developed from zinc calcium phosphate derived from zinc phosphate, introduced into apatite cement. The proliferations of osteoblastic-cells and alkaline phosphatase activities were enhanced when the cells were cultured on this cement. It is suggested that this novel cement potent promotive effect as the bone cement.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：亜鉛、ハイドロキシアパタイト、骨形成、セメント

1. 研究開始当初の背景

口唇裂口蓋裂などの先天性疾患や、外傷、歯周病によって生じた骨欠損部位に対する骨補填療法の有用性は高く、歯槽骨の連続性が得られるばかりか、骨充填部への歯

の移動や、人工歯根の埋入が可能となる。現在、歯槽骨欠損に対する骨補填材として最も有効とされるのは、自家腸骨であるが、採取する際に外科的な侵襲が不可避で、ドナーへの影響が大きい。また、形成性や機

械的強度に乏しく、採取できる骨量には限界がある。こうした欠点を補い、無限に得ることができる人工骨補填材料が求められているが、現存する骨補填材には機械的な強度や操作性、骨誘導能において満足できるものは開発されていない。

我々は、リン酸亜鉛セメントの硬化体をリン酸カルシウムへと置換することによる、新しい生体埋入材料の開発を試みてきた。本法の利点は、リン酸亜鉛セメントが比較的高い機械的強度を持ち、セメントが有する良好な形成性を利用しうること、さらに、亜鉛の持つ薬理作用を期待できることである。亜鉛の薬理的作用については多くの報告があるが、特に、骨代謝に対しては、骨芽細胞の分化誘導の促進、および、破骨細胞の形成抑制作用を有し、強力な骨組織形成促進作用を発揮するとされており、亜鉛を徐放するセメントの開発は骨形成能を有する新しい骨置換材となりうるものが期待されている。

2. 研究の目的

リン酸亜鉛がリン酸カルシウムへと置換すること、置換効率、置換後の機械的な特性について検討を行い、得られたリン酸カルシウムを生体材料として応用する際に体液への溶解性について検討することが研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) リン酸亜鉛のリン酸カルシウム置換機構の解明

①リン酸亜鉛結晶のリン酸カルシウム置換機構の解明

ホーパイト試薬を蒸留水中に懸濁し、種々のカルシウムイオン含有水溶液（硝酸カルシウム水溶液）を滴下することで、リン酸カルシウムへと置換させる。置換反応中のpH変動をモニターし、反応速度論的解析を行い、反応中、反応後の粉末を採取し、粉末X線回折装置にて組成を分析する。②リン酸亜鉛セメント硬化体のリン酸カルシウム置換機構の解明

①と同様にリン酸亜鉛セメント硬化体を硝酸カルシウム含有水溶液にて処理し

リン酸カルシウムへと置換させる。また、置換後のセメント硬化体を疑似体液に浸漬し走査型電子顕微鏡にて表面性状の観察を行う。

(2) リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメント材料学的検討

①リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの硬化反応の検討

種々の濃度のリン酸亜鉛カルシウムを導入したアパタイトセメント硬化体を作製し、硬化時間、機械的強度について検討する。

②リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの結晶相の解析

①で得られたセメント硬化体を粉末エックス線回折、FTIR、走査型電子顕微鏡で観察し、結晶学的な検討を行う。

③亜鉛除法能の検討

①で得られたセメント硬化体を細胞培養培地に浸漬し、溶出した亜鉛濃度を原子吸光行動系にて測定する。

(3) リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの骨形成作用の検討

①細胞増殖能に対する影響の検討

(2) -①で得られたセメント硬化体上で骨芽細胞様細胞を培養し、細胞増殖試験と、走査型電子顕微鏡観察を行う。細胞増殖に与える影響について検討する。

②骨代謝マーカーの測定

培養細胞より産生される骨代謝マーカー（アルカリホスファターゼの活性）の測定や、遺伝子発現を測定し、培養細胞の分化、骨形成能について検討する。

4. 研究成果

(1) リン酸亜鉛のリン酸カルシウム置換機構の解明

①リン酸亜鉛結晶のリン酸カルシウム置換機構の解明

リン酸亜鉛を硝酸カルシウム水溶液にて懸濁処理することリン酸亜鉛はリン酸亜鉛カルシウムへと置換すること判明した。また、その置換反応は反応温度、硝酸カルシウム水溶液の濃度に影響を受けることがわかった。

②リン酸亜鉛セメント硬化体のリン酸カ

ルシウム置換機構の解明

リン酸亜鉛セメント硬化体を硝酸カルシウム水溶液にて処理したところ、セメント硬化体の表面がリン酸亜鉛カルシウムへと置換することがわかったが、置換反応は表面に限られセメント硬化体の中心部分の結晶相は酸化亜鉛であった。しかし、疑似体液浸漬により、セメント表面にはアパタイトが析出した。

(2) リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメント材料学的検討

① リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの硬化反応の検討

種々の濃度のリン酸亜鉛カルシウムを導入したアパタイトセメント硬化体を作製したところ、リン酸亜鉛カルシウムの含有量が 10wt% のセメントの機械的な強度が最も優れていたが、硬化時間は最も延長した。

② リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの結晶相の解析

リン酸亜鉛カルシウムの含有量が上昇するにつれセメント中のアパタイト結晶の成長が遅延した。50wt% のセメントは 2 週間の観察期間中アパタイトの析出はみられなかった。

③ 亜鉛除法能の検討

リン酸亜鉛カルシウム濃度依存的に溶出亜鉛濃度が上昇した。

(3) リン酸亜鉛カルシウム導入アパタイトセメントの骨形成作用の検討

① 細胞増殖能に対する影響の検討

リン酸亜鉛カルシウム濃度が 30wt% を超えると骨芽細胞様細胞は死滅した。しかし、10wt% のセメントはリン酸亜鉛カルシウムを含有しないアパタイトセメントと比較して細胞増殖能が高かった。



図 1. 培養細胞の電子顕微鏡像

② 骨代謝マーカーの測定

10wt% のセメントはリン酸亜鉛カルシウムを含有しないアパタイトセメントと比較してアルカリホスファターゼ活性が高かった。

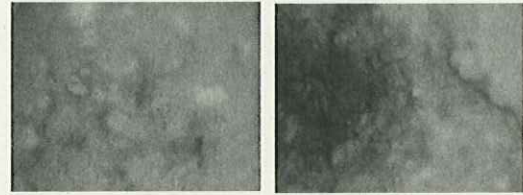


図 2. アルカリホスファターゼ染色像

遺伝子発現については現在検討中であるが、リン酸亜鉛より誘導されたリン酸亜鉛カルシウムを基材とするアパタイトセメントを作成し、骨芽細胞様細胞に対する影響も良好なものであった。今後、骨形成を司るもう一方の細胞である破骨細胞への影響を検討する必要がある。

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 3 件総件数 5 件)

1. 富田優子, 堀内信也, 田中栄二他 (6 人中 2 番目)、過去 10 年間に徳島大学病院矯正歯科を受診した顎顔面骨折患者の実態調査、査読有り、中・四国矯正歯科学会雑誌, 21, 2009, 71-75
2. Horiuchi S, Kaneko K, Asaoka A, Tanaka E, et al., Enamel bonding of self-etching and phosphoric acid-etching orthodontic adhesives in simulating clinical conditions: Debonding force and enamel surface. 査読有り *Dental materials journal*, 28, 2009, 419-425
3. Horiuchi S, Asaoka K, Tanaka E, Development of a novel cement by conversion of hopeite in set zinc phosphate cement into biocompatible apatite. 査読有り *Bio-medical Materials and Engineering*, 19, 2009, 121-131

[学会発表] (計 3 件総数 7 件)

1. 松田りえ, 堀内信也, 田中栄二他 (6 人中 2 番目)、上顎縦骨折による咬合不全に対し、急速拡大装置を逆回転することで整復した 1 例、中・四国矯正歯科学会、平成 2009 年 7 月 4 日、徳島市
2. S. HORIUCHI, K. ASAOKA, T. IZAWA, S. FUJIHARA, N. KINOCHI, S. KURODA, E. TANAKA, DEVELOPMENT OF NOVEL BIOCERAMIC BY

MODIFICATION OF ZINC PHOSPHATE CEMENT
International associations of dental
research, 2009.4.1., Miami (USA)

3. 堀内信也、日浅雅博、川上恵美、藤原慎
視、浅岡憲三、田中栄二、水硬性リン酸亜鉛セ
メントのアパタイト置換を応用した新しい
バイオマテリアルの開発、第 67 回日本矯正
歯科学会大会、平成 2008 年 9 月 17-18 日、
幕張

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀内 信也 (HORIUCHI SHINYA)

徳島大学医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70263861

(2) 研究分担者

辻 けい子 (TSUJI KEIKO)

徳島大学医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80830096

井澤 俊 (IZAWA TAKASHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：30380017

藤原 慎視 (FUJIHARA SHINJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：70403706

田中 栄二 (TANAKA EIJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号：40273693

木内 奈央 (KINOCHI NAO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：30457329