

平成21年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19599019

研究課題名（和文） 二相性炭酸アパタイト骨置換材の創製

研究課題名（英文） Fabrication of a biphasic carbonate apatite bone replacer

研究代表者

林 欣 (XIN LIN)

九州大学・大学院歯学研究院・研究員

研究者番号：40452718

研究成果の概要：本研究で創製された炭酸アパタイトと易溶性カルシウム塩を構成成分とする二相性炭酸アパタイトブロックは、骨欠損部において、炭酸アパタイト単相よりも骨芽細胞による骨形成が促進された。よって、二相性リン酸カルシウム骨置換材は炭酸アパタイトと同様に破骨細胞による吸収性を有し、炭酸アパタイトと同程度、或いはそれ以上の骨分化能を示していると結論づけた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：歯科理工

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：生体材料

1. 研究開始当初の背景

硬組織再建術式の第一選択は、患者本人から採取した自家骨の移植であるが、自家骨の採取には、様々な重篤な問題が伴う。このような問題を回避するために自家骨に代わる人工骨補填材の開発が熱望されている。

自家骨移植が第一選択とされる理由は、自家骨がリモデリングにより吸収され、経時的に生体骨と置換されるためである。しかし、人工骨補填材の主流であった水酸アパタイト焼結体 (HAp) は、優れた骨伝導性 (線維

性皮膜の介在なしに生体骨と結合する性質) を示すものの、破骨細胞による吸収を受けなため生体骨と置換されることはない。骨と置換可能な骨補填材としてβ型リン酸三カルシウム (β-TCP) が注目を集めているが、β-TCP の吸収プロセスは物理化学的な溶解であり骨形成に調和したものではないため、骨形成能が優れる症例においては生体骨に置換されるが、骨形成能に劣る部位においては予後不良が報告されている。申請者らは、生体骨の無機成分が炭酸アパタイト (CAp :

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{x}(\text{CO}_3)_\text{x}(\text{OH})_2$ であること、さらに、破骨細胞が骨を吸収する際に形成するハウシッポ窩と同じ弱酸性の環境下において、CAp の溶解が促進されることに着目して、CAp ブロックを調製した。さらに、この CAp ブロックは新生骨の形成に合わせて吸収され経時的に生体骨に置換されることを見出し、既に製品化に向けた臨床治験が進んでいる。申請者のこれまでの材料設計は、CAp が骨伝導性を示すため骨芽細胞による骨形成には十分に調和しているとの考えから、破骨細胞による吸収にのみ注目したものであった。しかし、生体骨により迅速に置換されるためには骨芽細胞による骨形成の活性化も不可欠である。

HAp よりも優れた骨伝導性を示す人工骨補填材として二相性リン酸カルシウム (HAp と TCP の混合焼結体) が米国で注目を集めており、既に臨床使用されている。二相性リン酸カルシウムが HAp よりも優れた骨伝導性を示すのは、TCP の溶解により放出された Ca^{2+} イオンにより骨芽細胞が活性化されるためであると推測されている。この現象に基づけば、CAp と易溶性カルシウム塩を成分とする二相性炭酸アパタイトブロックを創製できれば、CAp 単相よりも骨芽細胞による骨形成が促進され、より迅速に骨と置換されることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、二相性炭酸アパタイトブロックを調製し、骨欠損部で CAp 単相よりも骨芽細胞による骨形成が促進され、より迅速に骨と置換される人工骨置換材人工骨置換材としての有用性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 二相性炭酸アパタイトブロックの調製条件の最適化

水酸化カルシウム粉末の圧粉体を作製し、これを二酸化炭素に暴露して炭酸化することにより、 CaCO_3 ブロックを調製した。続いて、得られた CaCO_3 ブロックを第一、第二、第三リン酸ナトリウム水溶液に種々の温度で 60 日間までリン酸化し、CAp への相変換を試みた。リン酸塩の種類や濃度、反応温度、反応時間を変動因子として、種々の条件で相変換反応を行い、二相性炭酸アパタイトブロックの調製を試みた。得られた二相性炭酸アパ

イトブロックについて、粉末 X 線回折装置 (XRD) およびフーリエ変換赤外分光分析装置 (FT-IR) により生成相の同定を行うとともに、形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。生成した CAp の炭酸含有量を明らかにするために、生成物の CHN 分析を行った。さらに、万能試験機を用いて機械的強度を測定した。

(2) 二相性炭酸アパタイトブロックの溶解挙動の評価

体内環境を模擬して、pH 7.4 の擬似体液 (0.03M リン酸塩緩衝液)、あるいは、破骨細胞により形成させるハウシッポ窩を模擬して、pH 5.0 の擬似体液 (0.2M 酢酸緩衝液) を調製し、これに第二リン酸ナトリウム水溶液に各時間 (12 時間、1 日、3 日、5 日) で処理した二相性リン酸カルシウムブロックを浸漬し、擬似体液中へのカルシウムイオンの溶解挙動を調べた。擬似体液中のカルシウムイオン濃度は、原子吸光光度計を用いて測定した。

(3) 骨芽細胞の接着・増殖・分化能の評価

4 週齢の SD ラットの骨髄細胞 (BMC) を用いて、二相性リン酸カルシウム骨置換材及び炭酸アパタイト試料の上で培養し、細胞接着能、細胞増殖能を検討した。さらに同骨髄細胞を各試料の上で 14 日間培養し、Real Time RT-PCR 遺伝子発現定量法によって、osteopontin、BMP-2 および osteocalcin などの各骨分化マーカーの mRNA 発現レベルを検討した。

(4) 破骨細胞による吸収性評価

破骨細胞の形態および破骨細胞により吸収窩の形成することを観察するために、生後 4 日の SD ラットの骨髄細胞から活性型ビタミン D3 によって分化させた破骨細胞を用いて、各試料の上で培養した。その後、TRAP 染色を用いて、破骨細胞分化能力を検討した。また四日間培養後の試料表面を操作型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、破骨細胞による骨吸収性について検討した。

(5) 実験動物を用いた組織学的検討

第二リン酸ナトリウム水溶液で処理した CAp とコントロールとして HAp を用いた。10 週齢のオス SD ラットの頭蓋骨に直径 8mm の欠損を作製し、それぞれの直径 200

～400 μm の試料を埋入後、2、4、8、12、24 週後に屠殺し、試料を周囲組織と一塊に摘出し、1 μm 切片で組織を観察し、病理組織学的に試料の組織親和性、骨置換速度を検討した。

4. 研究成果

(1) 二相性炭酸アパタイトブロックのキャラクタリゼーション

種々の条件で作製した二相性炭酸アパタイトブロックの SEM 写真より、処理前後を比較すると、大きな形態の変化は認められなかった。

リン酸ナトリウム処理で得られた試料の XRD パターンは、いずれも焼結 HAp のパターンよりブロードであり、焼結 HAp より低結晶性であった。図 1 に第二リン酸ナトリウム水溶液で各時間処理後の試料の XRD パターンを図 1 に、カルサイト (calcite) およびアパタイト (apatite) の含有量を図 2 に示す。時間の経過と共に calcite のピークの強度、あるいは calcite の含有量は減少し、apatite の XRD 強度および量が増加し、60 日間後には完全に apatite に相転移していることが分かった。

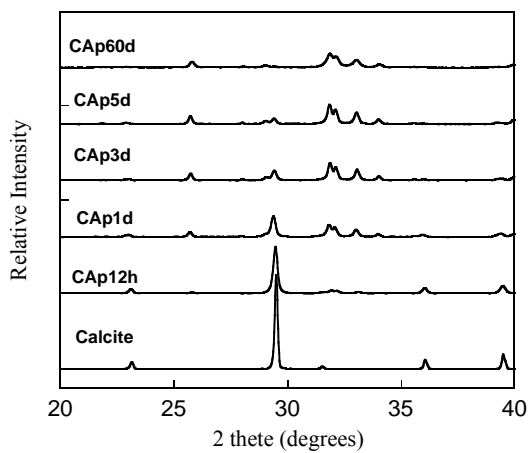


図 1 第二リン酸ナトリウム水溶液で各時間処理後の試料の XRD パターン

表 1 第二リン酸ナトリウム水溶液で各時間処理後の試料のカルサイト、アパタイトの含有量

	Calcite(%)	Apatite(%)
CAp12h	67.81	32.19
CAp1d	33.24	66.76
CAp2d	11.23	88.77
CAp5d	6.50	93.50

フーリエ変換赤外吸光 (FT-IR) 分析の結果から、いずれの試料においても炭酸基のピークが 1455、1410 cm^{-1} および 875 cm^{-1} に観察され、apatite のリン酸イオンの一部が炭酸イオンに置換された B タイプ CAp が得られることが分かった。最終生成物の CHN 分析の結果より、いずれの試料においても炭酸含有量は骨アパタイトと同じか少し多く、第二塩を用いた場合が最も多く、約 15wt% であった。リン酸ナトリウム塩により処理した試料の間接引張強さ (DTS) の結果から、処理前強度は 3.3MPa であったのに対し、リン酸塩処理後には強度が増加して、最終生成物の強度は 5~7MPa となった。第二塩を用いた処理により得られた試料の DTS 値が最も高く、7MPa であった。海綿骨の引張り強さは約 3MPa と報告されており、本研究で合成された試料は海綿骨より強く、非荷重部への骨充填材として利用可能であると考えられる。それぞれの結果を比較と検討して、第二リン酸ナトリウム水溶液で処理した二相性リン酸カルシウムブロックが最も理想的だと結論付けた。

(2) 二相性炭酸アパタイトブロックの溶解挙動

pH 7.4 の環境では、微量な Ca 溶出が検出された。Ca²⁺ 溶出量は、炭酸カルシウム含有量が多い二相性リン酸カルシウムブロックほど多かった。図 2 に示されるように、pH 5.0 では、Ca 溶出傾向は pH 7.4 の場合と同じであったが、顕著な Ca 溶出が観察された。

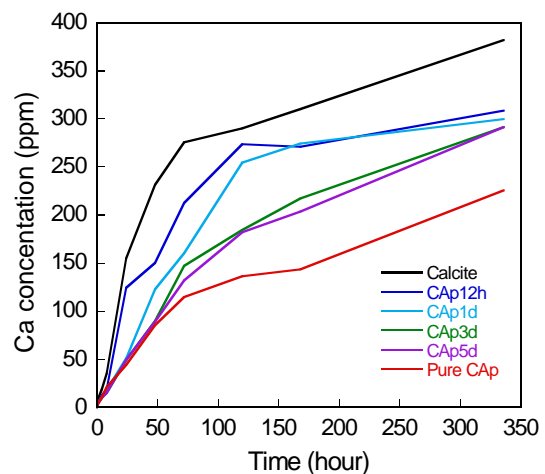


図 2 第二リン酸ナトリウム水溶液で各時間処理後の試料が pH 5.0 の環境でカルシウムイオン濃度変化

(3) 骨芽細胞の接着・増殖・分化能の評価

各試料の骨髄細胞（BMC）増殖試験の結果を図3に示す。リン酸塩処理時間が長いほど、骨髄細胞接着率および細胞増殖率が高くなる傾向は認められた。

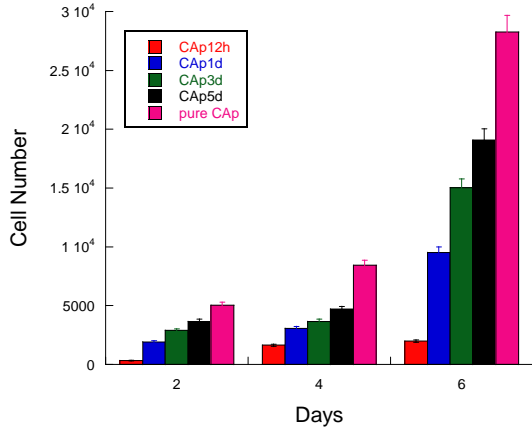


図3 細胞増殖変化

骨分化マーカーの osteopontin および osteocalcin においては、すべての試料について、ほぼ同程度の mRNA 発現量を示した。BMP-2 においては、1 日間でリン酸塩処理した試料は他の試料より高い mRNA 発現量を示した（図4）。

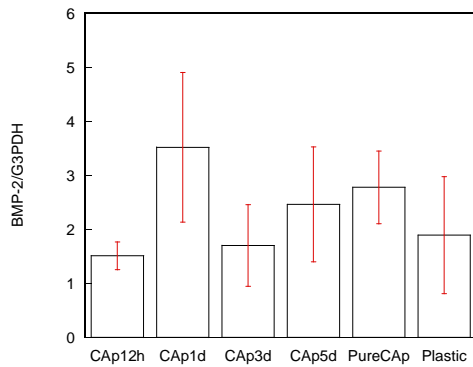


図4 BMP-2

(4) 破骨細胞による吸収性評価

TRAP 染色において、二相性リン酸カルシウム及び炭酸アパタイト試料表面に TRAP 陽性、つまり破骨細胞が確認された。さらに、SEM 観察の結果、すべての試料表面に破骨細胞による吸収を示すハウシップ窩が表面に認められた。第二リン酸ナトリウム水溶液で処理を施した炭酸アパタイトブロックの表面で破骨細胞を四日間培養した後の表面の SEM 写真を図5に示す。

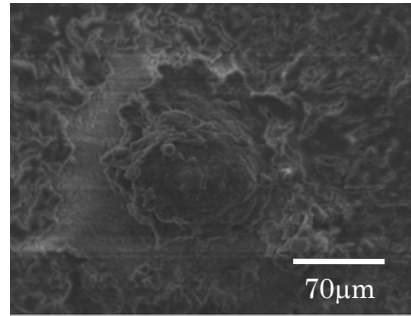


図5 第二リン酸ナトリウム水溶液で処理を施した炭酸アパタイトブロックの表面で破骨細胞を四日間培養した後の表面の SEM 写真

(5) 実験動物を用いた組織学的検討

埋入2週間後、両組とも埋入された試料の周囲には少量の新生骨が観察された。また顆粒の形態は、CAp は丸く見えるが、焼結 HAp の場合はほぼ最初埋入した時の形を保っていた。埋入12週間後、両組とも埋入された試料の周囲新生骨は形成が続き、試料と新生骨との直接的な接触が認められた。また、試料周囲に炎症反応および新生骨と試料の間に軟組織の介入はまったく認められない。

24 週間後、埋入された焼結 HAp の形状は埋入2週間後とほとんど変化しておらず、吸収されていないことがわかった。ところが、図6に示されるように、炭酸アパタイトは、更に吸収され、破骨細胞による吸収窩が観察された。

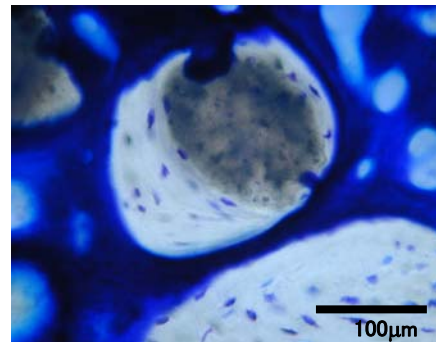


図6 第二リン酸ナトリウム水溶液で処理後の炭酸アパタイト顆粒を埋入24週間後の組織像

以上の結果から、二相性リン酸カルシウム骨置換材は炭酸アパタイトと同様に破骨細胞による吸収性を有し、炭酸アパタイトと同程度、或いはそれ以上の骨分化能を示している。骨リモデリングサイクルによって迅速に骨に置換される理想的な人工骨置換材として期待される。

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 欣 (XIN LIN)

九州大学・大学院歯学研究院・研究員

研究者番号：40452718

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：