

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06295・19K21383

研究課題名(和文)アパタイト系骨補填材の組成および形態が骨伝導性および骨置換性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Bone tissue reactions to apatite-based materials: influence of material composition and morphology

研究代表者

岸田 良 (Kishida, Ryo)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90823211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：水酸アパタイト、炭酸アパタイトを組成とするハニカム構造体を作製し、in vitro (骨芽細胞様細胞を播種) および in vivo (大腿骨モデル骨欠損に埋入) 評価により新生骨への置換を調べた。in vitro 評価では、炭酸アパタイト系が水酸アパタイト系に比べて約2倍の初期骨芽細胞分化マーカーの発現を示した。in vivo 評価では、炭酸アパタイト系が埋入後12週で顕著な成熟骨形成を示したのに対し、水酸アパタイト系の吸収・成熟骨形成は限定的であった。炭酸アパタイト系について、100, 200, および300 μmの気孔径の影響を調べた結果、埋入後4週で300 μmの系に顕著な新生骨形成を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国では健康寿命の延伸が課題となっており、大腿骨近位部骨折をはじめとする高齢者の運動器障害リスクに対応するための機能性材料開発が求められている。本研究では、自家骨移植など侵襲性の高い治療法への依存から脱却しうる人工骨材料として、骨の無機成分と同様の炭酸アパタイトを組成とするハニカム構造体を提案し、古くから臨床応用されてきた水酸アパタイトとの比較を行い、生体反応評価を通して炭酸アパタイトの有用性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated bone tissue reactions of honeycomb scaffolds composed of hydroxyapatite (HAp) and carbonate apatite (CO3Ap) through in vitro (using osteoblastic cell lines) and in vivo (implanted in femoral bone defects) evaluations. In vitro experiments showed approximately the twice expression of early marker of osteoblastic differentiation for CO3Ap cases with respect to the HAp cases. In vivo experiments showed that CO3Ap cases were superior to HAp cases in terms of bone maturation with concomitant material resorption (at 12 weeks postsurgery). The present study also investigated influence of macropore size of CO3Ap honeycomb scaffolds on new bone formation (in vivo evaluation). The comparative study between 100, 200, and 300 μm of macropore sizes showed remarkable new bone formation for 300 μm cases (at 4 weeks postsurgery).

研究分野：生体材料

キーワード：炭酸アパタイト 骨補填材 骨伝導性 骨置換性 ハニカム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1970年代から人口骨補填材として臨床応用されてきた水酸アパタイトは優れた組織親和性を示し、骨伝導性(骨欠損に埋入された際に、既存骨から形成された新生骨が繊維性結合組織を介することなく材料表面に直接結合する性質)を示す材料として知られているが、非吸収性材料であるため、骨に置換されずそのまま残存する。骨には力学的機能以外にも造血機能などの生物学的機能もあり、また、残存した材料は感染巣となる懸念があるため、骨に置換される骨補填材が理想的である。一方、水酸アパタイトの水酸基およびリン酸基の一部が炭酸基に置換された、生体骨本来のアパタイトである(AB型)炭酸アパタイトは骨リモデリングに調和する形で破骨細胞性吸収を受け、新生骨に置換される。

炭酸アパタイトは他の吸収性材料(リン酸三カルシウムなど)などと異なり、中性pH下では緩慢な溶解性を示す一方で、破骨細胞性酸性pH下で選択的に吸収される。これらの性質から、炭酸アパタイトは骨欠損部で既存骨に近い領域では効率的に新生骨に置換され、既存骨から離れた領域では力学的・化学的に安定な足場として機能することが期待され、大規模骨欠損への適用も有望視される。

2017年には、炭酸アパタイト顆粒が我が国で初めてインプラント適用の可能な骨補填材として薬事承認され、2018年に販売開始された。現状では直径300から1000 μm の炭酸アパタイト顆粒が用いられているが、大規模骨欠損への適用を視野に入れるとさらに大きなサイズの顆粒やブロック状のマクロサイズスケール炭酸アパタイト骨補填材が有用であると考えられる。

炭酸アパタイトは水酸アパタイトをはじめとする他のセラミック材料と異なり、高温で炭酸基が脱離される性質のため、セラミック材料の一般的な作製法である焼結を単純に適用することができない。そこでアパタイト粉末の焼結に頼らない作製法として利用されてきたのが、溶解析出反応である。溶解析出反応は、歯科治療における模型作製(石膏の硬化反応)などに広く用いられてきた反応であり、熱力学的準安定相にある前駆体が溶液中で溶解と析出が同時に進行することで、前駆体マクロ形態を保持したまま最安定相に置換される反応である。

上記のマクロサイズスケールの炭酸アパタイト骨補填材を溶解析出法により作製する場合、前駆体とする材料の内部に溶液を浸透させて完全に炭酸アパタイトに置換することに技術的課題が存在する。また製造上の問題だけでなく、骨欠損部に埋植された際の生体反応を考えると、組織液や細胞の侵入や血管新生が材料深部に到達しなければ有効な骨置換反応を期待することはできない。

このような製造・生体反応の問題を解決し得る材料設計として有望視されるのが、材料形態の多孔体化である。溶液や細胞が侵入可能な気孔を材料に付与することで、材料全体にわたる高効率な反応が実現できる。これまでに気孔形成材やスポンジ状のテンプレートを用いる方法や、積層造形などの手法などにより多孔体作製が検討されてきたが、実用的な材料強度と気孔の連通性を両立することに技術的課題があり、また複雑な多孔体形態のため生体反応に有効な気孔サイズが文献によりまちまちであり、明確な材料設計の指導原理が存在しない。そこで、well-definedな骨伝導・生体吸収性・新生骨への置換反応を議論することができて、かつ実用的な強度を有するような骨補填材を作製し、その生体反応に関する知見を得る必要がある。一軸方向に連通気孔を有するハニカム構造体はこの要求を満たす材料候補の一つである。

2. 研究の目的

炭酸アパタイトの骨補填材へのさらなる応用可能性(マクロサイズスケール化による大規模骨欠損への適用・多孔体化による生体反応活性の向上)を追求する一助となることを目指し、材料強度と連通性を両立するハニカム構造体の作製・生体反応の評価を行った。水酸アパタイトおよび炭酸アパタイトの2組成についてハニカム構造体を作製し、組成に加えて気孔サイズが生体反応に与える影響を細胞レベルおよび実験動物モデルのレベルで評価した。

3. 研究の方法

(1) 材料の作製

セラミック原料粉末(水酸アパタイト、水酸化カルシウムなど)をワックス系バインダーで混練し、ハニカム形成用特殊金型を用いて押出成形後、脱脂・焼結を行うことでハニカム構造体を作製した。水酸アパタイトおよび炭酸カルシウムを組成とするハニカム構造体2種を作製した後、炭酸カルシウムハニカムについては、溶解析出反応を利用し、炭酸アパタイトに組成変換することで炭酸アパタイトハニカムとした。

(2) 材料の物性評価

X線回折法(XRD)、フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)により組成(結晶相・含有イオン)の同定を行った。得られたハニカムブロックの強度を評価するために、万能試験機を用いて圧縮強さを測定した。また、走査型電子顕微鏡(SEM)により材料表面性状観察を行い、X線マイクロCT($\mu\text{-CT}$)により断面を含む材料3次元形態観察を行った。さらに、水銀圧入法により細孔分布測定を行い、数 μm から数百 μm にかけて存在する気孔の分布を解析した。

(3) 生体反応評価

得られたハニカム構造体の生体反応評価として、*in vitro*評価(骨芽細胞様細胞の分化)および*in vivo*評価(兔大腿骨骨端に形成した骨欠損モデルでの新生骨への置換)を行った。前者は材料表面に播種されたMC3T3-E1細胞のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性を中心に評価

し、後者は埋入試料の立体的な吸収および骨形成を μ -CTで解析し、骨形成の詳細をヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を用いた病理組織学的検索から解析した。

4. 研究成果

(1) 物性評価

SEMおよび μ -CT観察により、規則的に配列した一軸連通気孔を有するハニカム構造体の作製に成功していることを確認した(図1)。XRDパターンから全てアパタイトの単一結晶相となっていることを見出し、炭酸アパタイトの場合、水酸基およびリン酸基(の一部)が炭酸基に置換されていることをFT-IRから確認した。水酸基セラミック原料粉末の割合や脱脂時の焼成条件により、様々な材料強度および細孔分布(主に数 μ mのマイクロポア)に調整可能であり、さらに金型サイズにより約100から300 μ mの連通気孔(ハニカム壁厚と同じサイズ)を形成することができた。圧縮強さの測定結果は、気孔率に対して負に相関する傾向が示された。

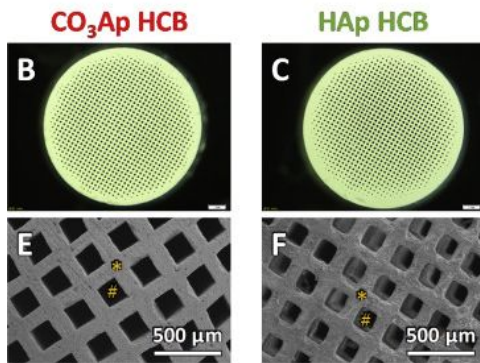


図1 作製した炭酸アパタイトハニカムブロック (CO₃Ap HCB)および水酸アパタイトハニカムブロック (HAp HCB)
(上段: 実体顕微鏡像、下段: SEM像)

(2) 生体反応評価

MC3T3-E1細胞を用いた*in vitro*評価において、炭酸アパタイトハニカムが水酸アパタイトハニカムに比べて(播種から7日後で)約2倍のALP活性を発現することが示された。

大腿骨骨欠損モデルへの埋入試験(*in vivo*評価)では、炭酸アパタイトハニカムが埋入後4週でマクロ気孔内部に成熟骨を形成し、埋入後12週で顕著な材料の吸収・骨への置換を示したのに対し、水酸アパタイトハニカムは埋入後12週でもほぼ吸収されず残存し、マクロ気孔内部への成熟骨形成は限定的であった(図2)。これにより、炭酸アパタイトの骨補填材の有用性を理解することができた。

また、マクロ気孔径(100, 200, 300 μ m)が新生骨形成におよぼす影響を調べたところ(*in vivo*評価)300 μ mの気孔径を有するハニカムに顕著な新生骨形成を認めた。すなわち、一軸方向に沿った骨伝導に有効な気孔径を理解することができた。

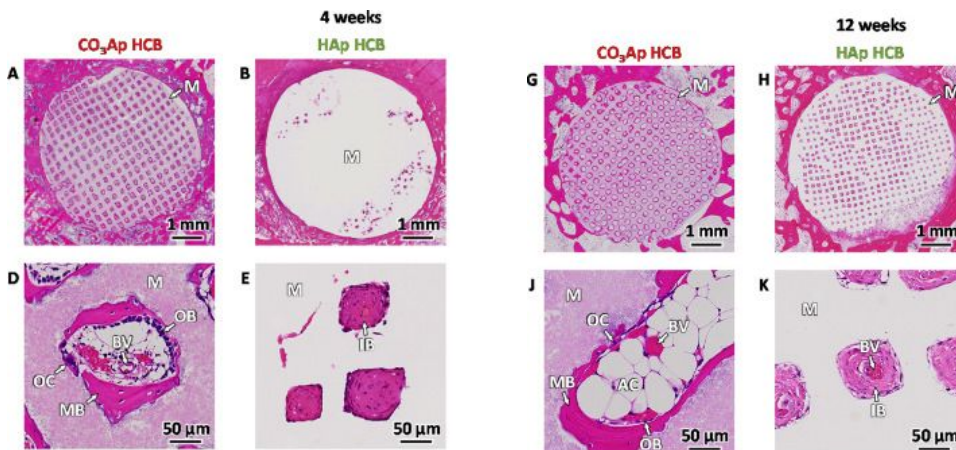


図2 大腿骨欠損モデルへの埋植試験(左から第1,2列目: 埋入後4週、第3,4列目: 埋入後12週のHE染色病理組織標本。左から第1,3列目が炭酸アパタイト、第2,4列目が水酸アパタイトの埋入検体)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi K., Kishida R., Tsuchiya A., Ishikawa K.	4. 巻 4
2. 論文標題 Honeycomb blocks composed of carbonate apatite, -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite for bone regeneration: effects of composition on biological responses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials Today Bio	6. 最初と最後の頁 100031 ~ 100031
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtbio.2019.100031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Koichiro, Kishida Ryo, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 3
2. 論文標題 Carbonate Apatite Micro Honeycombed Blocks Generate Bone Marrow Like Tissues as well as Bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Biosystems	6. 最初と最後の頁 1900140 ~ 1900140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adbi.201900140	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 -

1. 著者名 Hayashi Koichiro, Kishida Ryo, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 3
2. 論文標題 Granular Honeycombs Composed of Carbonate Apatite, Hydroxyapatite, and -Tricalcium Phosphate as Bone Graft Substitutes: Effects of Composition on Bone Formation and Maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 1787 ~ 1795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.0c00060	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----