

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791402  
 研究課題名 (和文) 綿様アパタイト-コラーゲン複合体を応用した次世代人工骨への期待  
 研究課題名 (英文) Expectation to the next generation artificial bone of fine apatite-collagen composite  
 研究代表者  
 河野 哲 (KAWANO SATOSHI)  
 朝日大学・歯学部・講師  
 研究者番号：80340074

研究成果の概要 (和文)：アパタイト-コラーゲン複合体は、有機成分であるコラーゲンと、無機成分であるアパタイトを絶妙なバランスで配合したもので、それぞれが単体として作用するのではなく、複体として生体組織に働きかけることが考えられる。よって、口腔内での抜歯窩や感染根管の根尖病巣部などに応用することにより、アパタイトの添加が生じ、その吸収されたコラーゲンの部分にアパタイトが生成され、最終的には新生骨または硬組織に置換される。

研究成果の概要 (英文)：Apatite/Collagen Composite combined apatite(inorganic) with collagen (organic) exquisitely. Each does not act as a simple substance, and it is thought that both work on organism tissue. Therefore, addition of apatite results by applying it to infected root canal, and apatite is generated by moiety of the collagen taken in. The last is substituted neonatal bone or hard tissue for.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学、アパタイト-コラーゲン複合体、生体材料、次世代人工骨、根管治療

## 1. 研究開始当初の背景

最先端の生体材料の中でも特に注目を浴びている次世代人工骨の開発。すなわち、骨に埋め込むと、自然に消滅しながら本物の骨

に置き換わる次世代の人工骨が研究されている。従来のセラミック製人工骨の材料にタンパク質の線維を配合したものであるが、人間の骨により近い構造であるため、体内に吸

収されるのが特徴である。よって、骨の欠損部に移植すると、骨の吸収と新生骨の添加が同時に生じ、自家骨が形成されるのである。歯科においても、顎補綴や抜歯後の骨欠損、根尖病巣部への骨添加など、使用される機会が多いと推測できる。この時代の流れに乗り遅れないためにも、この研究に取り込み、歯科領域での有用性の確立を願う気持ちが、追求したいと思った所以である。

## 2. 研究の目的

アパタイト-コラーゲン複合体は、他のバイオセラミックスと違い、高圧、高温加熱処理を必要とせず、生体温度に近い状態で製作できるため、生体親和性が良好で、複合体全体として弾力性を有する硬組織様人工代用物となり、さらには硬組織を誘導する可能性が期待できる。そこで、今回製作の過程で攪拌を行うことにより、細部まで応用可能な綿様アパタイト-コラーゲン複合体複合体を作製し、難治性感染根管である大きな根尖病巣を有する歯牙への応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) アパタイト-コラーゲン複合体の作製

ブタ腱由来可溶性アテロコラーゲングル(Type I)に 200mM トリス (pH8.0、37°C) 緩衝溶液を加え、37°Cにて 24 時間静置しコラーゲンを再線維化した。その後、0.04%アルカリフォスファターゼ溶液、0.04%フォスビチン溶液、0.3%ジメチルスベロイミデート溶液を混合し、37°Cにて 6 日間作用し架橋。架橋コラーゲングルは 3 時間 0.04%アルカリフォスファターゼ溶液、0.04%フォスビチン溶液に浸漬し、その後 20 時間 6mM  $\beta$ -グリセロリン酸カルシウム ( $\beta$ -GP) 溶液に浸漬し、この一連の操作を 1~15 日間繰り返す。

### (2) 綿様複合体の作製

再線維化、架橋、石灰化の各反応において、各溶液を加える際に、試験管ミキサーにて浸盪させながら行い、できた溶液は蓋付き瓶に集め、モーターにて回転数 700rpm、5 秒ごとに回転方向を変えるよう攪拌しながら反応させる (図1)。

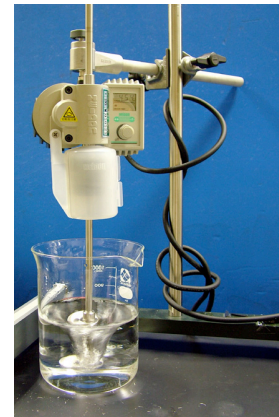


図1 装置全体像

### (3) 得られた複合体の物理化学的評価

実体顕微鏡、SEM 観察、軟 X 線写真による検討、熱分析(TG)による評価を実施し、得られたアパタイト-コラーゲン複合体の精度を確認する。

### (4) 成形体の作製と曲げ試験

凍結乾燥した石灰化度の異なる複合体 (アパタイト含有率 45、50、60、80%) を用いた。45%、50%、60%は 10mg、80%は 20mg を計量し、 $2 \times 10\text{mm}$  の金型に充填し、予備成形として 100MPa で 2 分間一軸加圧した。その後 180MPa で 20 分間 CIP することにより、厚さ約 0.5mm の加圧成形体を作製し 3 点曲げ試験用試料とした。3 点曲げ試験 (EZ graph) はクロスヘッドスピード 0.5mm/min、スパン 5mm、大気中で行った。複合体の曲げ挙動を荷重より算出した引張応力と変位で表し、3 点曲げ強さを最大荷重から求めた。曲げ試験後の破折形状を光学顕微鏡および SEM により観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 綿様複合体の物理化学的評価

#### ① 実体顕微鏡所見

凍結乾燥後の実体顕微鏡観察所見では、石灰化前のコラーゲンは、攪拌により細かい線

維状となり、全体として綿状を呈した。 $\beta$ -GP 溶液に浸漬すると、その細線維は経日的に淡白色になっていき、その線維性も失われていった。特に 10 日目以降でその傾向は顕著になり、ピンセットなどによって非常に容易にほぐれる状態となった (図 2)。

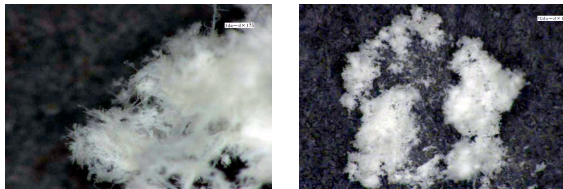


図 2 凍結乾燥後の実体顕微鏡像  
(左：架橋後 1 日後、右：10 日後)

## ②SEM 観察

$\beta$ -GP 溶液にコラーゲン線維を浸漬すると浸漬前のコラーゲン上には認めることのできない顆粒状の析出物が沈着していた。この顆粒状の析出物は  $\beta$ -GP 溶液に浸漬後 12 時間のものから既に確認でき、その量は経時的、経日的に増加していった。 $\beta$ -GP 溶液に浸漬 1 日目頃から多くのコラーゲン細線維において、微細顆粒が線維を全体的に包み込むように析出しているのが観察された。また、この顆粒はナノメートルサイズであることがわかった (図 3)。

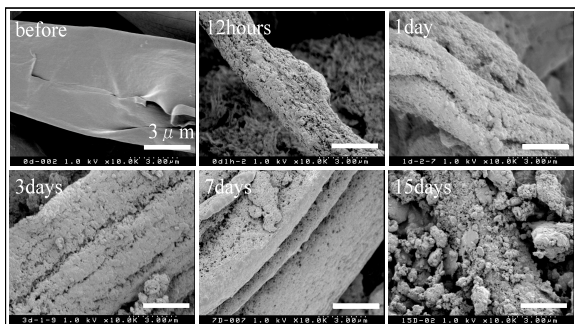


図 3 浸漬時間の異なる複合体の SEM 像

## ③軟 X 線写真による検討

図 4 に浸漬時間の異なる試料のエクス線回折図形を示す。

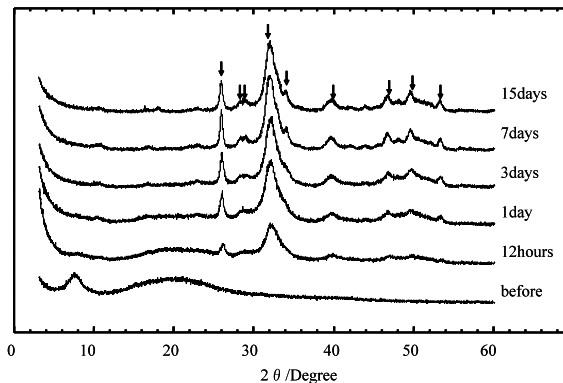


図 4 エクス線回折図

## ④熱分析

室温からおよそ 200°C までは、浸漬時間に係なく全ての試料でほぼ本質的に同様な脱水による重量減少を示した。それ以降およそ 600°C までの重量減少は試料依存性が高く、浸漬時間の短い試料ほどより急激に減少していた。600°C~1,000°C の重量減少は小さく、殊に浸漬時間の長い試料ほどこの温度範囲の重量減少は小さかった。

## (2) 成形体の作製と曲げ試験

3 点曲げ試験において、45%、50%、60%の複合体は曲げ強さは小さいが最初の破壊が起こった後も成形体は応力に抵抗する力を保持しており、その靱性が大きいことを示していた。一方 80%の AP 複合体は曲げ強さは大きいですが脆性破壊に近く、その靱性は小さかった (図 5)。

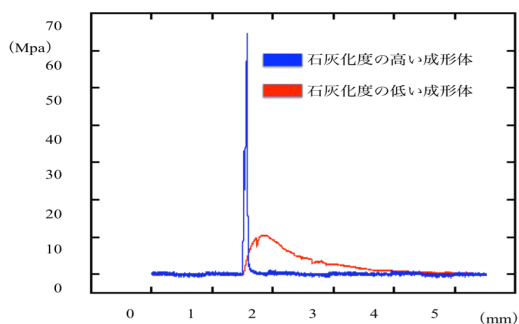


図5 石灰化度の違いと曲げ挙動

また、破壊後の光学顕微鏡像では石灰化度の低いものほど成形体内に空隙が多く線維性に富んでいたが、石灰化度の高いものは密で線維性はほとんどなかった。SEM においてコラーゲン線維上にナノメートルサイズのアパタイトの析出が確認できた。石灰化度の低いものではコラーゲン線維上のアパタイトの析出はまばらであった。一方、石灰化度の高いものでは岩石状のアパタイトの析出もみられコラーゲン線維は AP で覆われていた。このように、石灰化度の低い成形体は適度な空隙を有し、かつ、ピンセット等で把持できる強さを有することがわかった。また靱性にも富むため骨内に埋入してもかかった応力に対して抵抗できる可能性が示唆された。

## 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 2 件)

- ① Yoshihiro Takenaka, Mayumi Iijima, Satoshi Kawano, Yasumitsu Akita, Takakazu Yoshida, Yutaka Doi, Ichiro Sekine : The Development of Carbonate-containing Apatite/Collagen Composite for Osteoconductive Apical Barrier Material : Journal of Endodontics, 査読有, 34(9),

2008, 1096-1100.

- ② Yoshihiro Takenaka, Mayumi Iijima, Satoshi Kawano, Yasumitsu Akita, Takakazu Yoshida, Yutaka Doi, Ichiro Sekine : Fabrication of Fine C Apatite/Collagen Composite for Osteoconductive Apical Barrier Material : Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有, 116(1), 2008, 92-95.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 河野 哲、飯島まゆみ、伊藤彰宏、竹中祥紘、武田進平、吉田隆一、土井 豊 : 石灰化度の異なるアパタイト/コラーゲン複合体の特性評価: 第 54 回日本歯科理工学会、2009 年 10 月 1 日、鹿児島
- ② 河野 哲、伊藤彰宏、竹中祥紘、服部真丈、土井 豊、吉田隆一 : 微粒子アパタイト-コラーゲン複合体の基礎的物性 : 第 130 回日本歯科保存学会、2009 年 6 月 11 日、札幌
- ③ Satoahi Kawano, Takakazu Yoshida : Development of Apatite/Collagen Composite for Apical Barrier Material : The 15<sup>th</sup> Asian Pacific Endodontic Confederation, 2009/04/25, Tokyo

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
河野 哲 (KAWANO SATOAH I)  
朝日大学・歯学部・講師  
研究者番号 : 80340074
- (2) 研究分担者 : なし  
( )  
研究者番号 :
- (3) 連携研究者 : なし  
( )  
研究者番号 :