

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：	15501
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2010～2012
課題番号：	22592184
研究課題名（和文）	骨補填材として不適とされた α 型リン酸三カルシウムの再評価
研究課題名（英文）	Reevaluation of α -tricalcium phosphate foam which is not suitable for bone substitute material
研究代表者	
有働 公一 (UDOH KOH-ICHI)	
山口大学・大学院理工学研究科・准教授	
研究者番号：	60145266

研究成果の概要（和文）：

連通気孔を持つ α 型リン酸三カルシウム(α -TCP)フォームの調製がポリウレタンフォーム法を用いることで可能になった。この方法では、 α -TCPスラリーをウレタンフォーム表面に付着、乾燥させた後、1450～1550℃の温度で焼結させる事で α -TCPフォームを作成した。この α -TCPフォームは90%程度の気孔率および50～250kPaという適度な圧縮強度を持っていることがわかった。この α -TCPフォームが骨補填材あるいは足場材として適しているか細胞培養実験等で確認することが望まれる。

研究成果の概要（英文）：

Fully interconnected α -TCP foam was able to be fabricated using the polyurethane foam method, whereby polyurethane foam coated with α -TCP slurry was sintered at 1,450–1,550°C and that no quenching was performed. The α -TCP foam had extremely high porosity ranging between 90 and 95% and exhibited reasonable compressive strength ranging between 50 and 250 kPa. Based on these initial findings, it is highly recommended that *in vivo* evaluation be carried out to explore the possibility and suitability of α -TCP foam as a bone substitute and/or scaffolding material for tissue engineering.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、歯科医用工学・再生歯学

キーワード： α 型リン酸三カルシウム、骨補填材、足場材、フォーム

1. 研究開始当初の背景

リン酸カルシウムは、セラミックス系骨補填材として広く使われており、その代表的なものとして、ハイドロキシアパタイト、炭酸

アパタイト、 β 型リン酸三カルシウム等がある。これらの骨補填材にはほぼ永久的に体内に残存するもの（ハイドロキシアパタイト）、体内で化学的に溶解し骨と置換するもの（ β

型リン酸三カルシウム)、破骨細胞により吸収され骨のリモデリングサイクルにより骨と置換されるもの(炭酸アパタイト)がある。天然の骨と同様にリモデリングサイクルにより吸収置換される炭酸アパタイトが、骨補填材として最も優れていると考えられるが、骨補填材の吸収速度が破骨細胞に依存するために、吸収速度をコントロールすることがほぼ不可能で、体内でほとんど吸収されないハイドロキシアパタイトと同様に長時間体内に残存してしまう可能性がある。骨欠損の症例によっては骨の吸収速度を任意にコントロールできた方が好ましい場合もある。リン酸三カルシウムには上述した 1120°C以下の温度で安定な β 型のほかに 1120°C以上の温度で安定な α 型リン酸三カルシウムもある。この α 型リン酸三カルシウムは反応性が高く、体内で容易に溶解しハイドロキシアパタイトに変換されてしまう。この過程で副生成物としてリン酸が産生され、 α 型リン酸三カルシウム近傍の pH が低下することで周辺の細胞が死滅してしまう。この事実から α 型リン酸三カルシウムは骨補填材として不適であると言われてきた。しかしながら、 α 型リン酸三カルシウム粉末で繊維芽細胞を用いて毒性試験を行うとほとんどの細胞が死滅してしまうが、我々が行った焼結体を用いた細胞増殖試験では、ハイドロキシアパタイトよりも α 型リン酸三カルシウムの方が遙かに良い結果が得られた。

細胞毒性試験では、粉末試料あるいは圧粉体を用いられるので、我々が細胞増殖試験で用いた焼結体とでは試料の重量当たりの表面積が大きく異なると思われる。そこで体内での α 型リン酸三カルシウムの重量当たりの表面積を任意に変えること、体内での溶解量をコントロールできるのではないかと考えた。溶解量をコントロールできれば α 型リン酸三カルシウムも他のリン酸三カルシウムと同様に骨補填材として利用できる可能性がある。

2. 研究の目的

α 型リン酸三カルシウムの体内における溶解度をコントロールするために、重量当たりの表面積の異なる連通気孔を持つフォームを作成する。これらのフォームを用いて細胞増殖試験を行い、骨補填材に適したフォームの作成条件を求める。また、ハイドロキシアパタイトとリン酸三カルシウムを共存させた骨補填材の可能性についても検討する。

3. 研究の方法

α 型リン酸三カルシウム、あるいは α 型リン酸三カルシウムとハイドロキシアパタイトを共存させたフォームを作成する。フォームは、試料粉末スラリーをウレタンフォー

ムの表面に付着、乾燥させた後に 1400~1500°Cの温度で焼結させる事により作成する。 α リン酸三カルシウムが共存するハイドロキシアパタイトは化学量論的組成よりカルシウム濃度が低いアパタイトを用いると焼結温度で α -TCPと量論的組成のアパタイトに分解されることで調整可能である。細胞増殖試験は骨芽細胞様細胞 MG63 を用いて行った。

4. 研究成果

Fig. 1 にウレタンフォーム(a)、1400°C(b)および1550°C(c)で焼結した試料を示す。

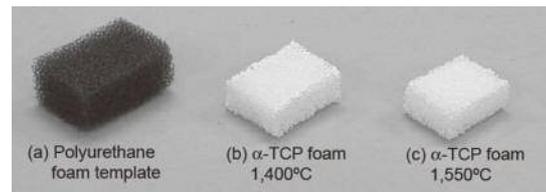
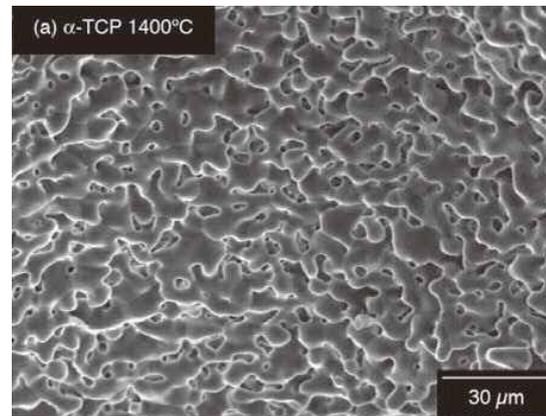


Fig. 1 Typical morphologies of: (a) polyurethane foam; (b) α -TCP foam at 1400°C; and (c) α -TCP foam sintered at 1550°C.

高い温度で焼結するほど焼結後の収縮率が高い事がわかる。

1400~1550°Cで焼結させた試料の表面を走査型電子顕微鏡により観察した結果をFig. 2に示す。



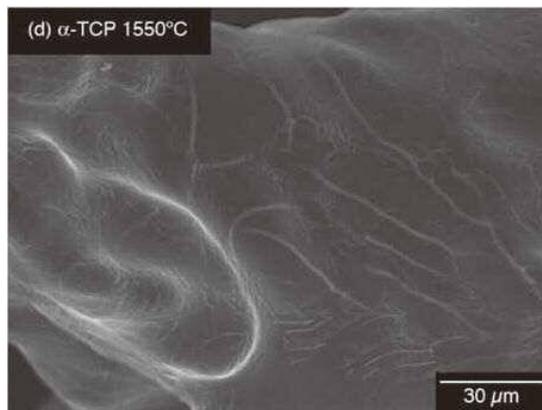
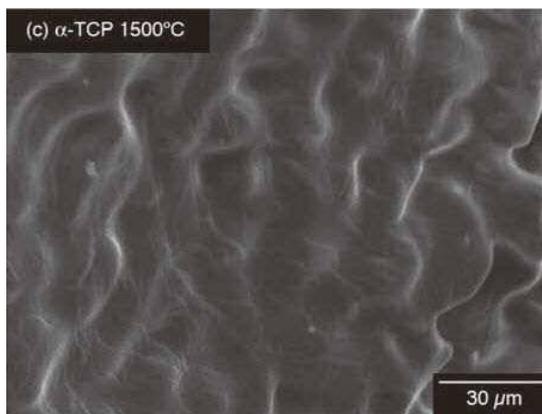
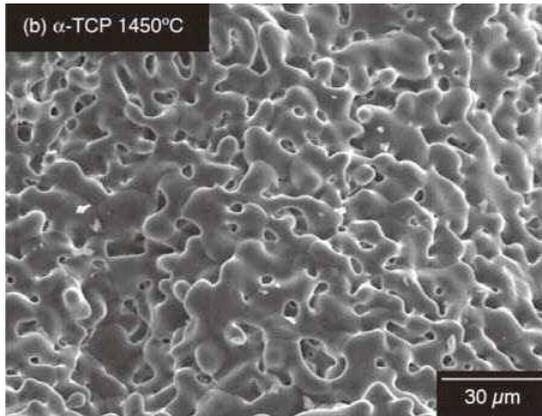


Fig.2 Typical SEM images of α -TCP foams at: (a) 1400°C, (b) 1450 °C, (c) 1500°C, (d) 1550°C.

焼結温度の低い 1400°Cあるいは 1450°Cでの試料の表面は焼結前の粒子のサイズがわかる程度にしか焼結が進行していないのに対して、1500°C以上の温度では焼結が進行しほぼ一体化している。フォームの表面積は測定するまでもなく 1400°Cあるいは 1450°Cの

試料の方が明らかに大きいことがわかる。

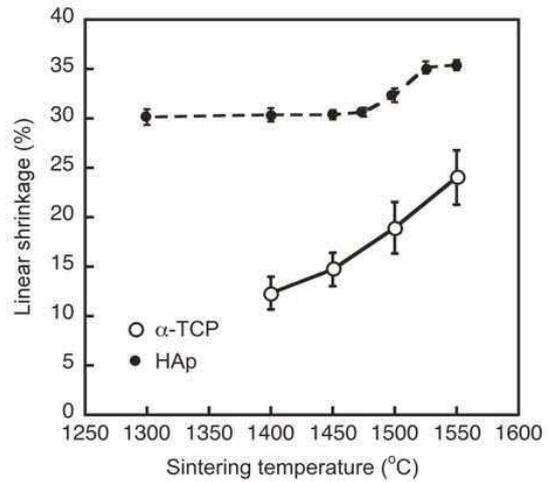


Fig.3 Effect of sintering temperature on the linear shrinkage of α -TCP and HAp.

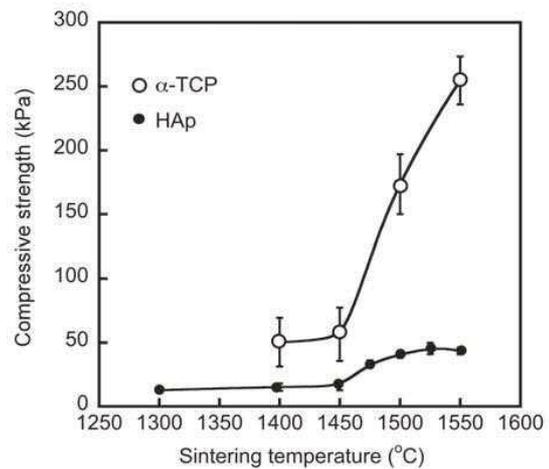


Fig.4 Average compressive strength of α -TCP and HAp foam sintered at different temperatures.

Fig. 3, Fig. 4 に 1400~1550°Cにおける α -TCP フォームの収縮率と圧縮強度、および 1300~1550°Cにおける α -TCP フォームと同一条件で焼結したハイドロキシアパタイトフォームの収縮率と圧縮強度を示す。 α -TCP フォームは 1450°C以上の焼結で圧縮強度が大きく増加している。これは Fig. 2 の SEM 写真からもわかるように焼結が大きく進行したためと思われる。一方、ハイドロキシアパタイトは α -TCP に比べて収縮率が大きく焼結そのものは大きく進行しているものの、圧縮強度に大きな変化は見られない。

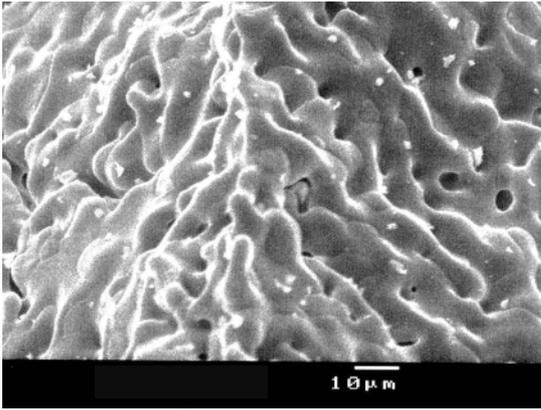


Fig.5 SEM image of HAp foam at 1550°C.

Fig.5に1550°Cで焼結したハイドロキシアパタイト試料表面のSEM写真を示す。Fig.2(d)で示したα-TCPフォーム表面の状態と比べるとHApフォームの方が焼結が進行していないのがわかる。α-TCPフォームの圧縮強度が大きいのは試料粉末の焼結度の違いによることが推察される。

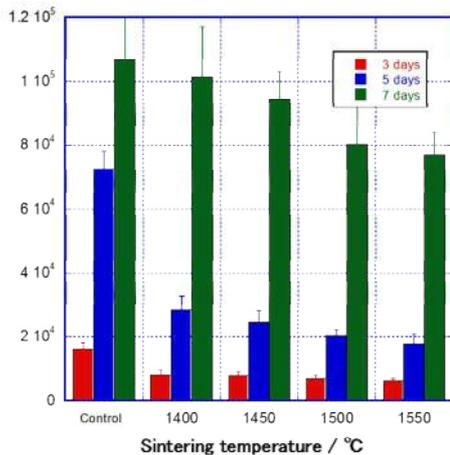


Fig.6 MG63 cell proliferation test for α-TCP foam after 6 hours incubation.

Fig.6 および Fig.7 に骨芽細胞様細胞 MG63 を用いた細胞増殖試験の結果を示す。骨補填材として不適と言われたα-TCPフォームの方が高い増殖率を示している。α-TCPは反応性が高いため増殖試験の初期段階より溶解が進行しカルシウムおよびリン酸イオンが培養液中に溶出し、カルシウムイオン濃度が適度に上昇したために高い増殖率を示したと思われる。反応性の高くないHApでは培養液中のカルシウムイオン濃度はα-TCPほど上昇せず、細胞増殖率の上昇は見られなかった事

が推察される。

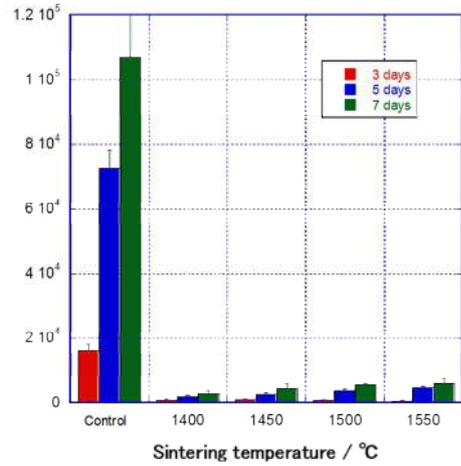


Fig.7 MG63 cell proliferation test for HAp foam after 6 hours incubation.

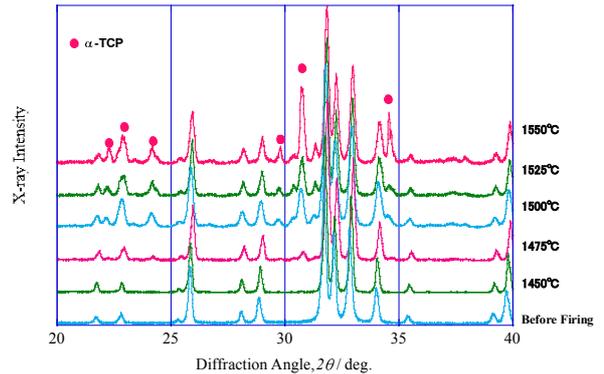


Fig.8 X-ray diffraction pattern changes of HAp foam in sintering temperatures.

Fig8にHApフォームの粉末X線回折の測定結果を示す。HAp粉末を濃度分析したところ、化学量論的濃度よりカルシウム濃度が低い事が明らかになった。従ってFig.7のX線粉末回折図形からもわかるように1475°Cより高い焼結温度ではハイドロキシアパタイトはα-TCPと量論的組成のハイドロキシアパタイトに分解した事がわかる。この結果からHApフォームで焼結温度の上昇にともなって増殖率が上昇しているのは、焼結温度で分解生成したα-TCPの存在によるものと思われる。

これらの結果から反応性の高いα-TCPの表面積をコントロールする事で、骨芽細胞の増殖に必要なカルシウムイオン濃度が調節可能であることが示唆された。骨芽細胞増殖初期のカルシウムイオン濃度の調節に用いることで新たな骨補填材が開発可能であるこ

とが明らかになった。

今回の実験で焼結温度が低い α -TCP フォームが骨補填材として最も適しているという結果が得られたが、Fig.4 に示したように本研究で得られたフォームの圧縮強度は弱いと言わざるを得ず、手指の力で簡単に崩壊してしまう。重量当たりの表面積を大きくすると圧縮強度が低くなってしまうので、他の圧縮強度の高いリン酸カルシウムと共存させた骨補填材の開発や、 α -TCP 単体でも圧縮強度の高い試料調製法の開発が望まれる。

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4件)

- ① Harada T, Harada K, Ueyama Y. The enhancement of tumor radioresponse by combined treatment with cepharanthine is accompanied by the inhibition of DNA damage repair and the induction of apoptosis in oral squamous cell carcinoma, *Int J Oncol*, 2012; 41, 565-572, 査読有
- ② 原田豊子, 原田耕志, 上山吉哉. 口腔扁平上皮癌における分子標的薬Bortezomib と TS-1 の併用効果についての基礎的研究, 頭頸部, 2011年, 37巻, 536-541頁, 査読有
- ③ Mano T, Ishikawa K, Harada K, Uchida H, Ueyama Y. Comparison of apatite-coated titanium prepared by blast coating and flame spray methods-Evaluation using simulated body fluid and initial histological study-, *Dental Materials Journal*, 2011; 30, 431-437, 査読有
- ④ Udoh K., Munar M.L, Maruta M, Matsuya S, Ishikawa K. Effects of sintering temperature on physical and compositional properties of α -tricalcium phosphate foam, *Dent Mater J*, 2010; 29, 154-159, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有働 公一 (UDOH KOH-ICHI)
山口大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：60145266

(2) 研究分担者

上山 吉哉 (UEYAMA YOSHIYA)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00168668