

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592821

研究課題名(和文)ストロンチウム含有生体活性ガラスによる新規骨補填材の開発

研究課題名(英文)Development of new bone filling materials using Sr-containing bioactive glasses

研究代表者

泉 利雄 (Izumi, Toshio)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40248547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で骨形成を促進するSrは、骨粗鬆症の薬として使われている。骨補填材骨と一体化するため骨補填材として使われるガラスにSrを添加して作製した試作ガラス粒子は、骨再生を促進する可能性があることが示唆された。ガラスから骨組織内へSrが徐放されるためと考えられる。

試作ガラス粒子を硬化させ骨内欠損部を埋めるために酸と練和して硬化体を作製した。ポリグルタミン酸を使用した場合は骨欠損部から硬化体が流出しやすいが、骨形成を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Strontium (Sr) that has been proved to promote bone formation in vivo is used as an anti-osteoporotic oral drug. The bioactive glass can bond chemically to bone through formation of bone-like hydroxyapatite layer on its surface, and is used as a bone substitute material. We prepared trial products of Sr-containing bioactive glass particles, and it was suggested that they could promote bone regeneration in rat calvarial defects. There may be an association with the controlled release of Sr to the bone tissue, which occurred by dissolution of the glass particles.

Hardened cement pastes were made by mixing acid and the Sr-containing glass particles in order to fill densely the rat calvarial defects. When polyglutamic acid was used, a cement paste was easy to flow out of the defects, but it was suggested that the paste should promote formation of new bone.

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：生体活性ガラス ストロンチウム ポリグルタミン酸 骨補填材

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体活性ガラス Bioactive glass (以下 BAG)は、骨内に埋入されると表層にハイドロキシアパタイト層が生じ、この層を介して骨と一体化する骨伝導能があるとされる。さらに骨芽細胞を活性化し骨形成を促進する働きもある。しかし、骨髄の少ないラットの頭頂骨の骨欠損モデルでは骨形成能が示されていない。Srには前骨芽細胞から骨芽細胞への分化を促進し、破骨細胞の働きを阻害することで骨形成を促進する作用がある。そこで Sr 含有 BAG を作製し、Sr の骨形成促進効果を BAG に導入することを考えた。

(2) 人工関節を骨に埋め込む場合や椎骨形成に、自己硬化し機械的強度の高い骨セメントとして、Polymethyl methacrylate (PMMA)系セメントが使われてきたが、骨との接着性・骨形成能がない。そこで Sr 含有 BAG を組成の一つとする新たな骨セメントの創製を目指す。

### 2. 研究の目的

骨補填材として使用されている BAG に改良を加え、骨の再生に寄与する新しい骨補填材の開発を目指す。そのために

(1) 骨芽細胞・破骨細胞に働きかけて骨形成を促進する Sr を BAG 粒子に導入し、Sr 含有 BAG 粒子の骨伝導能・細胞活性化能を *in vivo* で検討する。

(2) 自己硬化し高い機械的強度が求められる骨セメントに骨との接着性・骨形成促進能を付与するため、Sr 含有 BAG を酸で練和し硬化させセメントを作製する。骨組織との親和性を *in vivo* で検討する。

### 3. 研究の方法

(1) Sr 含有試作 BAG の作製；Sr を含まない BAG(Sr0)の組成は SiO<sub>2</sub> 53wt%；CaO 20wt%；Na<sub>2</sub>O 23wt%；P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 4wt% である。このうち CaO の 20% を SrO に置換した BAG(Sr20)、CaO の 75% を SrO に置換した BAG(Sr75)、および CaO 全部を SrO に置換した BAG(Sr100)を溶融法によって合成し、生じたガラスを粉碎後ふるいに通し粒径 300-500 μm の粒子を得た。また溶融ガラスを内径 10mm のカーボン鑄型に流し込んでロッド状に固化させ、低速ダイヤモンドカッター (Isomet, Buehler, USA) で厚さ 1mm に切断しディスク状にした。これら試料は生体内に用いる前にオートクレーブ内で乾熱滅菌 (200℃ 30分) を行った。

(2) 7週齢、体重 180g の雄性 SD 系ラット 6 匹を用いた。イソフルラン (フォーレン吸入麻酔液、アボットジャパン) による吸入麻酔後、ラット背部を剃毛し、約 15mm の切開線を 4 か所背骨に沿って入れ、皮下にポケットを作製した。ディスク状の Sr0 あるいは Sr20 を右側に、ディスク状 HAP を対照として左側に、各々 2 個ずつ埋入した後、創面の皮膚を縫合した。

処置の 4 週間後、4%パラホルムアルデヒド

液 (以下 PFA) で灌流固定を行い、ディスク周囲の組織を一塊として摘出した。通法に従いアルコール脱水を行いパラフィン包埋し、厚さ約 6 μm のパラフィン切片を作製した後、キシレンで脱パラフィンして

Hematoxylin-Eosin 染色 (以下 HE 染色) を施した。切片標本の鏡検は光学顕微鏡 (BX-53, Olympus 社) で行った。

(3) 各 Sr 含有試作 BAG の骨形成能評価；雄性 SD 系ラット (12 週 ~ 14 週齢) 36 匹を使用した。ラット頭頂部を切開し、皮膚および骨膜を剥離した。露出した骨にトレフィンバーで直径 9mm の欠損部を作製し、各 Sr 含有 BAG 粒子を填入した。骨膜と皮膚をそれぞれ縫合した。骨欠損部に何も埋入しないものを対照とした。骨欠損部の骨形成状態をマイクロ CT (Skyscan) で同一個体を経時的 (1 カ月・3 カ月・6 カ月) に検索した。

(4) Sr- BAG 粒子を含有したセメントの作製；粒子径 40 μm 以下の Sr0、Sr75 および Sr100 を用いた。

12 週齢の雄性 SD 系ラットの左右頭頂骨にトレフィンバーを用いて直径 5mm の骨欠損を作り、BAG 粒子とポリグルタミン酸 (以下 PGA) (5%wt) との混和物を埋入した。骨欠損部に何も埋入しないものを対照とした。術後 1 カ月・2 カ月・3 カ月および 4 カ月にマイクロ CT を使用して新生骨の形成状態を経時的に観察した。その後屠殺し 4%PFA で固定、EDTA で脱灰後、パラフィン切片を作製した。切片に対して HE 染色を施し光学顕微鏡で鏡検した。

同様の実験を、BAG 粒子とポリアクリル酸 (以下 PAA) を練和して得られたペーストを用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 皮下包埋実験

皮下包埋 1 カ月後、Sr0 ディスクおよび Sr20 ディスクもやや厚い結合組織で覆われ、周囲組織の反応は軽微であった。また、いずれのディスク周囲にも硬組織の形成を認めなかった。

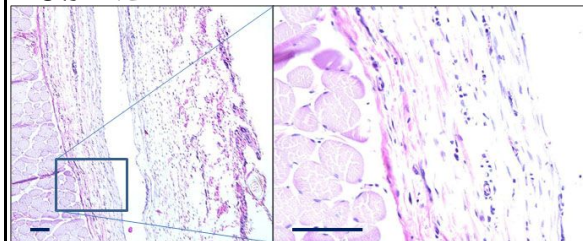


図 1. 皮下包埋後 1 カ月 Sr20 ディスク周囲の組織像 bar=100μm

#### (2) ラット頭頂骨の骨欠損部への埋入実験 対照群

術後 1 カ月では、欠損部は疎な結合組織で満たされており軽度の炎症性細胞浸潤を認めた。欠損部の中央では本来の骨の厚みよりも薄くなっていた。3 カ月後および 6 カ月後

には結合組織の線維成分が増加したが、欠損部縁から離れた箇所での骨形成を認めなかった。

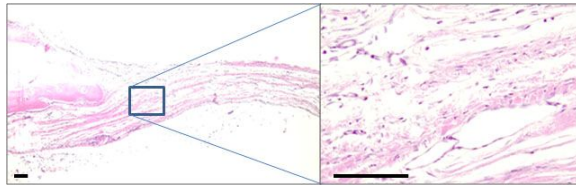


図2．対照群 1ヶ月後の欠損部組織像  
bar=100 $\mu$ m

マイクロCTによる検索では、術後1カ月から6か月まで欠損内に不透過像の増加を認めなかった。

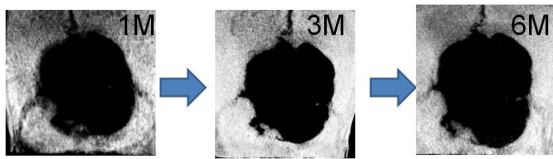


図3．対照群 マイクロCT像

Sr0群 術後1カ月では、BAG粒子周囲を立方形の細胞が取り囲み、一部に多核巨細胞を認めた。粒子間には軽度の炎症性細胞浸潤を伴う疎な結合組織を認めた。欠損縁にわずかに反応性の骨形成を認めるが、BAG粒子周囲には硬組織の形成を認めなかった。

術後3カ月では、BAG粒子周囲の細胞数が減少し、BAG粒子内のヒビと、その中のエオジン好性の不定形物質の貯留の増大が認められた。粒子間の結合組織はやや線維成分が増加したが、BAG粒子周囲には硬組織の形成を認めなかった。

術後6カ月では、BAG粒子周囲には細胞がほとんど認められなくなり、一部の粒子は溶解、分割により小さくなっていった。粒子はさらに密な線維性結合組織で囲まれていたが、硬組織の形成を認めなかった。

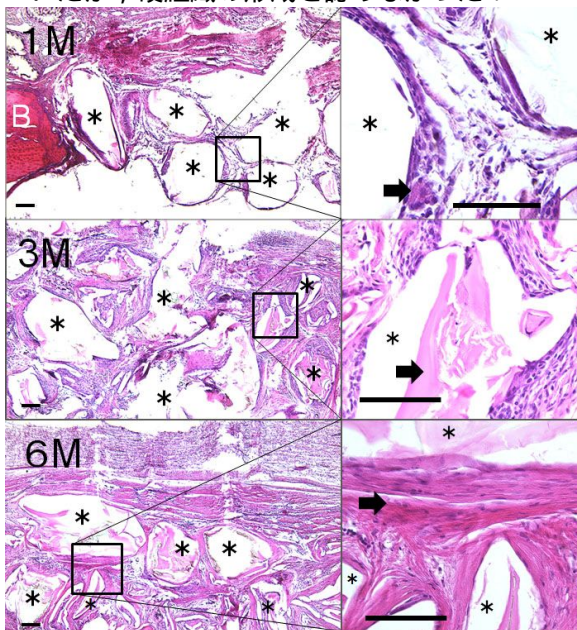


図4 Sr0群 埋入後の組織像 bar=100 $\mu$ m  
\* ; BAG粒子

マイクロCTによる検索では、術後1カ月から6か月まで欠損内にBAG粒子の不透過像を認め、粒子周囲の不透過像の増加を認めなかった。

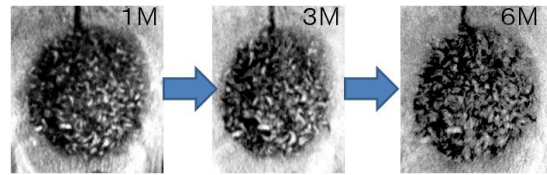


図5．Sr0群 マイクロCT像

Sr75Sr100群 術後1カ月では、BAG粒子周囲を立方形の細胞が取り囲み粒子内のヒビに細胞が侵入している像を多く認めた。粒子間には疎な結合組織を認め、粒子周囲に硬組織の形成を認めなかった。Sr0と比較して粒子の溶解・分割が多く認められた。

術後3カ月ではBAG粒子はさらに細分化され粒子周囲の細胞数が減少していた。粒子間の結合組織の線維成分が増加した。粒子から離れた骨膜側あるいは硬膜側に、島状の新生骨形成を認めた。

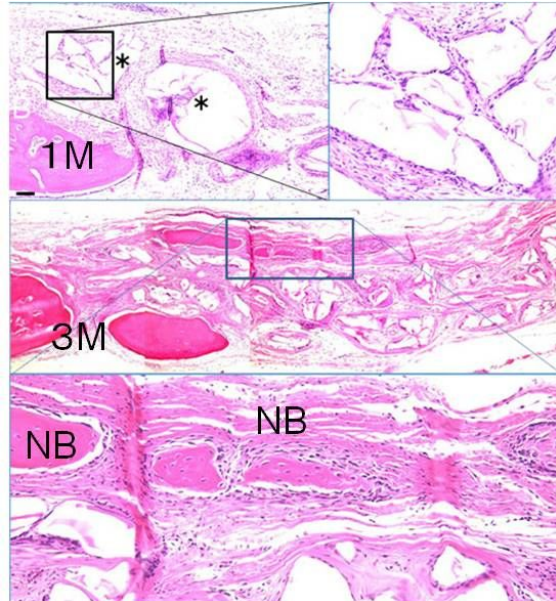


図6．Sr100群 埋入後1カ月・3か月の組織像 \* ; BAG粒子  
NB; 新生骨

術後6カ月では粒子数は減少し、粒子周囲は密な結合組織で囲まれていた。欠損部の骨膜側および硬膜側に新生骨が形成され、一部は欠損部を覆っていた。

Sr75Sr100粒子を核とした新生骨形成は生じなかったが、対照群・Sr0群では認められなかった、欠損部内で新生骨形成が生じていた。

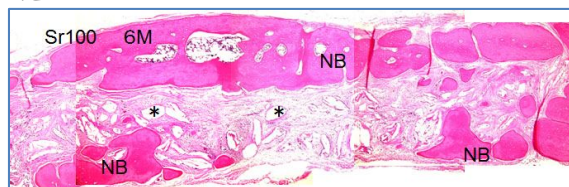


図7．Sr100群 埋入後6カ月の組織像 \* ; BAG粒子 NB; 新生骨

マイクロCTによる検索では、術後3カ月から欠損内の不透過像が増加し、6カ月では一部周囲の骨と一体化していた。

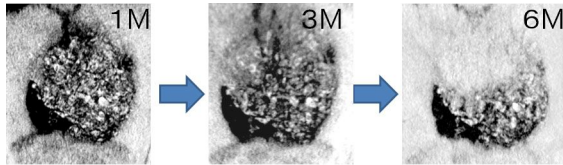


図8 . Sr100 群 マイクロCT 像

(3) Sr-BAG を含んだセメントの創製と骨組織との親和性

Sr-BAG・PGA 練和ペースト例のマイクロCTによる検索: 対照群およびSr0 群では、実験期間内に欠損部周囲からの反応性新生骨形成を認め、欠損部中央からの新生骨形成を認めなかった。

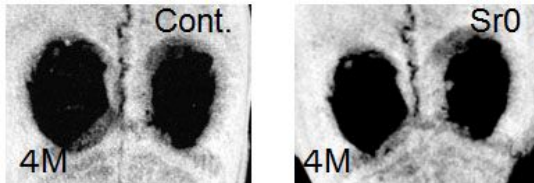


図9 術後4カ月 対照 Sr0 マイクロCT 像

Sr75 群および Sr100 群の一部では、術後2カ月に異所性新生骨と考えられる不透過像の出現を認め、3カ月、4カ月と経つにつれ不透過像は増大した。

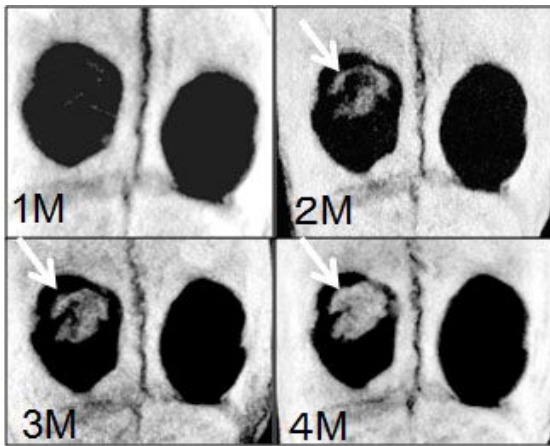


図10 PGA と Sr75 粒子の練和物のマイクロCT 像; 矢印は新生骨

術後4カ月の組織標本では、欠損部に新生骨を認め、BAG 粒子とPGA のペーストは欠損部には残存しておらず、異物反応も生じていなかった。新生骨が認められない欠損部は線維性結合組織で満たされていた。

多くの Sr75 群および Sr100 群では、新生骨形成を認めなかった。欠損部の出血がコントロール出来ていないと、ペーストが血液や組織液と接触する部分で溶解し、BAG 粒子が流失してしまった可能性がある。

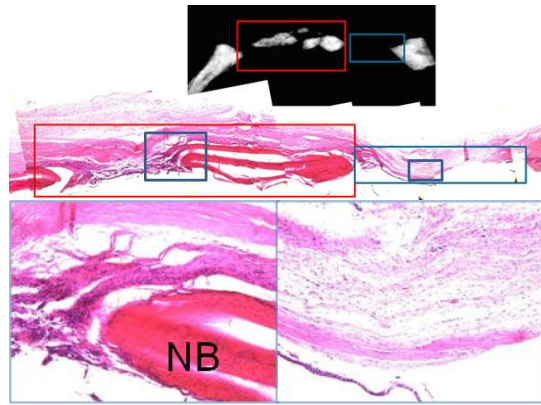


図11 PGA と Sr75 の練和物の4カ月のマイクロCT 画像(断面)と組織像(HE 染色) NB; 新生骨

Sr-BAG 粒子と PAA を練和すると硬化体が得られ、CT 像では経時的にエックス線不透過性が減少した。

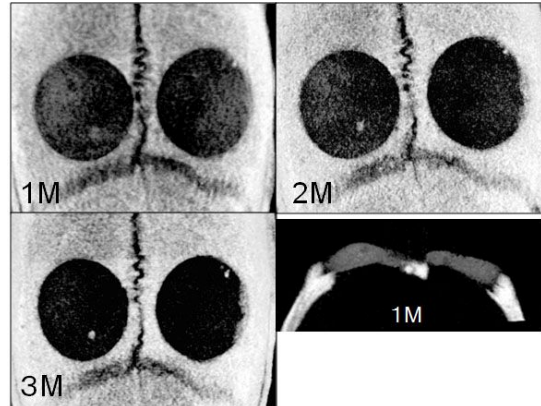


図12 PAA と Sr75 粒子の練和物のマイクロCT 画像

(4) 考 察

Sr0 は、ラット頭頂骨の骨欠損モデルにおいて過去の報告と同様に新生骨形成を促進しなかった。Sr-BAG は、骨欠損内で粒子を核とする骨形成を促進しなかったが、粒子の溶解に伴い粒子から離れた骨膜・硬膜での新生骨形成を促進した。

BAG 粒子の溶解に伴い組織中に徐放される Ca イオン、Si イオンに加えて Sr イオンが新生骨形成に関与したと推察される。BAG に Sr を含有させることで、Sr 徐放体として骨形成を促進させる骨補填材の開発が期待できる。

Sr-BAG 粒子と PGA との練和ペーストは、骨損内で BAG 粒子を保持するには不十分で出血により流失する可能性がある。欠損内でペーストが残存硬化すれば骨形成を促進する可能性が示唆された。

Sr-BAG と PAA との練和硬化体は、骨欠損内で BAG 粒子を保持する事は可能だったが、硬化体周囲の骨形成を促進しない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)

[学会発表](計3件)

泉利雄 板家圭祐 水上正彦 中山英明  
松本典祥 畠山純子 阿南壽 Sr含有試作  
生体活性ガラスの骨形成能の病理組織学的  
検討 日本歯科保存学会 2014年6月20日  
滋賀

諸富孝彦 北村知昭 泉利雄 水上  
正彦 西崎竜司 稲永晃子 阿南壽  
ストロンチウム置換生体活性ガラスは in  
vitro において象牙芽細胞様株細胞の分化を  
促進する. 日本歯科保存学会学 2013年10  
月17日 秋田

泉利雄 福田泰子 板家圭祐 春名千英  
子 松本典祥 諸富孝彦 阿南壽  
Strontium 含有試作 Bioactive glass の生体親  
和性. 日本歯科保存学会 2012年11月23日  
広島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泉利雄 (IZUMI, Toshio)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授  
研究者番号: 40248547

### (2) 研究分担者

阿南壽 (ANAN, Hisashi)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号: 80158732

### (3) 連携研究者

松家茂樹 (MATSUYA, Shigeki)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号: 00108755