

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592889

研究課題名(和文)再生医学と低結晶性炭酸アパタイトを応用した新規骨再生法の開発

研究課題名(英文)Fabrication of hydroxyapatite block from gypsum block based on (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> treatment.

研究代表者

鈴木 裕美子 (Suzuki, Yumiko)

九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20432916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：歯科領域では骨増生術の必要性が高まっている。そこで本研究では骨リモデリングサイクルに組み込まれる炭酸アパタイトと骨新生促進効果や軟組織治癒促進効果、感染防止効果が報告されているスタチンとを組み合わせることで新規骨補填材料を開発することとした。今回の研究では1)炭酸アパタイトースタチン複合体の調製を行った。その結果、スタチンを炭酸アパタイトに封入することに成功した。2)調製した炭酸アパタイトースタチン複合体をラット骨内に埋入し、組織学的に骨補填材料としての評価を行った。その結果、コントロール群と比較して有意に高い骨新生を確認した。今回の研究を通して本手法の有効性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the feasibility of fabricating low-crystalline, porous apatite block using set gypsum as a precursor based on the fact that apatite is thermodynamically more stable than gypsum. The transformation reaction caused a release of sulfate ions due to an ion exchange with phosphate ions, thus leading to a decrease in the pH of the solution. Then, due to decreased pH, dicalcium phosphate anhydrous--which has similar thermodynamic stability at lower pH--was also produced as a by-product. Apatite formed in the present method was low-crystalline, porous B-type carbonate apatite that contained approximately 0.5 wt% CO<sub>3</sub>, even though no carbonate sources--except carbon dioxide from air--were added to the reaction system. We concluded therefore that this is a useful bone filler fabrication method since B-type carbonate apatite is the biological apatite contained in bone.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：アパタイト 骨 インプラント

## 1. 研究開始当初の背景

近年、インプラント治療は歯の欠損部を補填する優れた治療法として歯科治療に深く浸透している。またその技術発達によりインプラント治療の適応も著しく広がっている。それでも尚、難症例とされているのが広範な骨の欠損であり、骨の再建はインプラント治療だけでなく歯周病治療など歯科領域全体における重要な課題である。

## 2. 研究の主旨

現在、骨欠損部再建術の第一選択は骨移植、特に自家骨移植である。しかし、自家骨採取では健全部位への侵襲、採取可能な骨形態、骨量の制限などがあり、近年では自家骨に代わる補填材として人工骨が注目を集めている。実際、国内外できわめて活発に研究が行われているものの、自家骨と同様に機能する人工骨補填材はいまだに開発されていない。

なぜなら人工骨を自家骨へ近づけるには大きく3つの難関があるためである。置換性(スペースメーカーと吸収のバランス) 活性(基質内での細胞の存在) 生着性(血管の侵入など)である。

### 新生骨への置換性について

自家骨と同様に人工骨も置換されることが重要である。これは骨の欲しい空間を維持しつつ、吸収もされていく実に巧妙な仕組みである。このような置換をさせるためには人工骨の吸収速度を生体反応と同等にする。すなわち組成を生体骨に近づけることが不可欠であろう。低結晶性炭酸アパタイトの創製である。骨の無機主成分は炭酸アパタイトだが(表1)、現在臨床応用されている骨補填剤は熱的に安定なヒドロキシアパタイトである。さらにヒドロキシアパタイトは高結晶性であるため破骨細胞により溶解されない(Fulmer et al. 2002 他)。

### 人工骨の活性と生着性について

自家骨は採取直前まで生体の中で血流を与えられ、多くの細胞の住処となっている。そのため移植後の生着率は非常に高い。それに比べ人工骨では乾燥状態で保存されており、添加後に血液とともに浸透してくる浮遊細胞だけが頼りである。移植時までに材料内で骨芽細胞の培養や血管内皮細胞の増殖などなされていればより確実な骨再生を期待できる。本研究では移植前に循環培養により人工骨内で十分な骨再生環境を整え、より円滑に生体へと取り込まれていく全く新しい方法である。

## 3. 研究の方法

本研究は人工骨として骨組成に近い低結晶性炭酸アパタイトを創製、吸収性や骨置換速度を細胞および動物実験にて検索する。これにより本材料が、自己由来の移植骨に限りなく近い骨補填剤であることを確認する。

## 4. 研究成果

次元連通気孔を有する炭酸アパタイトースタチン複合体調整法の確立  
スタチンを混入させたセッコウ硬化体を作製し、種々の濃度比のリン酸三 Na と炭酸 Na 混合水溶液中で処理し炭酸アパタイトへと相変換させた。その過程で「起泡ゲル化技術」を応用することで三次元連通気孔を有する炭酸アパタイトースタチン複合体を調製する予定であった。しかし、炭酸アパタイトは脆性材料であったためうまく連通気孔を維持することができず、粉末状となってしまった。そこで以下の解析ではブロック状の試料を用いた。上記の処理法で調整した調製したアパタイトが炭酸基を含むことが示された。

調製した新規スタチン-炭酸アパタイト複合体の生体活性の確認

#### A)細胞実験

炭酸アパタイト-スタチン複合体ブロックに骨芽細胞様細胞を播種し、一定期間培養した。骨芽細胞様細胞の細胞増殖 (MTT 分析法) を行った。

右図中の低結晶性 HAP が今回の炭酸アパタイトに相当するが、細胞増殖活性は著しく低い値となった。

これは試料の結晶性が低いことに由来してメディウム中にカルシウムイオンが溶出してしまったせいであると考えた。従って、閉鎖環境内の細胞培養実験では良好な結果を得ることが困難であると判断し、研究目標で示したBのステップを割愛して動物実験を行うこととした。

#### B)動物実験

実験動物 (ラット) の大腿骨 (リモデリングが旺盛な部位) に規格化した骨欠損を形成し、以下の4群の試料を填入した。炭酸アパタイト単体、スタチン含有炭酸アパタイト、石膏、またコントロールとして何も填入しない群を用いた。4週後に固定を行い、非脱灰研磨標本を作製し、組織学的に試料の組織親和性、骨置換速度を検討した (右図参照)。

その結果、すべての群で欠損部への骨の添加を認めた。また、すべての群で炎症所見や異物としての被包化は認められず、良好な組織親和性が示唆された。

組織形態計測学的な所見として、骨石灰化度の計測を行った。

炭酸アパタイト群はコントロール群 (何も入れていない) セッコウ群 (GY群) と比較して有意に多い骨形成を認めた。また、炭酸アパタイトにスタチンを含有させた群ではさらに多くの骨新生が認められた。

これらの結果より、スタチン含有炭酸アパタイトは組織親和性が高く、骨新生促進効果があり、骨補填材料として有用であることが示唆された。

実用化までの道筋としては薬事法の認可を得る必要があり、臨床応用までにはまだ数多くのステップが残されているのが現状であろう。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Masuzaki T, Ayukawa Y, Atsuta I, Jinno Y, Kono T, Koyano K. Newly fabricated osteoconductive carbonate apatite bone graft material. An in vivo study. European association for osseointegration. 2013.10.18

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 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

( )

研究者番号：

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：