

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592957

研究課題名(和文)リン酸三カルシウムを基材としたベクトルマテリアルの開発

研究課題名(英文)Developmet of vector material using tricalcium phosphate cement

研究代表者

河野 文昭 (KAWANO, Fumiaki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60195120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：-TCPを出発原料とし高溶解性骨セメントの開発を試みた。溶解性を向上させるため、焼結過程を経ない粉末を練和することでセメントの低結晶化を図り、骨形成促進作用を持つストロンチウム(Sr)と骨HAPに含まれる炭酸基のHAPへの導入による溶解性向上の効果を検討した。その結果、試作したSr-HAPセメントは従来型HAPセメントと比較して高溶解性および高強度を示し、高溶解性ゆえに懸念された細胞毒性が認められなかったため、Sr含有高溶解性リン酸カルシウム系骨セメントとしての可能性が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Calcium phosphate cement (CPC) is used for bone replacing material because of its excellent biocompatibility. One of the problems of current CPC is that CPC with high solubility generally shows low strength. We have developed a solution introducing Sr and carbonate into calcium phosphate crystals to increase solubility.

-TCP and SrCO₃ were partially transformed to Sr-containing HAP crystals. The DTS of set cements containing SrCO₃ were significantly lower than that of non-Sr-containing CPC, while that without SrCO₃ was remarkably higher. The solubility of set cements using 5%SrCO₃ was twice those of set cements without SrCO₃. The probable reason is that the decrease in crystallinity is caused by incorporation of carbonate into Sr-containing HAP. Cell proliferation in the test group using 0%SrCO₃ showed no significant decrease compared with that in the control group. We have developed Sr-containing CPC with high solubility, which showed several advantages as a bone replacing material.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：-TCP 骨セメント HAP Sr 細胞毒性 高強度

1. 研究開始当初の背景

(1) 優れた硬組織代替材料(人工歯根, 骨補填材)の開発および硬組織再建法の確立は, 高齢社会を向かえた今, 歯科医療の解決しなければならない課題である。また, 口唇・口蓋裂患者の骨欠損部位に対する骨補填療法の有用性は高く, 骨補填材が骨へと置換した場合には, 歯槽骨の連続性が得られるばかりか, 新生骨部への歯の移動が可能となる。このため, 供給に関して量的制限を受けない高機能性人工骨補填材の開発が求められている。

(2) 硬組織の場合には組織を再生させるための足場的な材料が必要である。その足場材料としては, 体内で吸収または分解されるものが望ましい。さらに骨補填材に対して, 骨再生促進やその他の薬効作用が必要とされる部位への薬物供給などの要望も強い。

2. 研究の目的

本研究では, 骨補填材として研究および利用されているリン酸カルシウムセメントに高い生体吸収性と薬物徐放性を付与することを目的とする

3. 研究の方法

(1) 試料作製

セメントの基材粉末には, α 型リン酸三カルシウム(α -TCP; α -Ca₃(PO₄)₂) (太平化学, 大阪) を用いた。 α -TCP をボールミル (ANM-1000, 日陶科学, 名古屋) で粉碎し, 試験用ふるい (飯田製作所, 大阪) で平均粒径 2 μ m に調整した後, 0, 5, 10, 20 mass% の炭酸ストロンチウム (SrCO₃) (特級, キンダ化学, 大阪) 粉末を添加した。セメントの練和液には, 骨 HAP 中への Sr 導入源として有効な塩化ストロンチウム (SrCl₂) (試薬研究用, キンダ化学, 大阪) 水溶液を濃度 1.0 mol/L に調整した第 1 液と, 硬化促進剤および pH 調整剤を兼ねた濃度 0.6 mol/L のリン酸二水素ナトリウム (NaH₂PO₄ · 2H₂O) (試薬特級, 和光純薬, 大阪) 水溶液の第 2 液を等量準備した。

(2) 試作セメント内部の観察

セメントペーストを内径 6 mm 高さ 3 mm のプラスチックモールドに入れて成型し, 湿度約 100% の恒温槽中で 24 時間および 1 週間保持した。各セメント試料を真空容器に入れ真空ポンプにて約 10 Pa の条件で 8 時間吸引した後, 吸引を停止し容器を密閉したまま 16 時間静置後, 再び約 10 Pa にて 8 時間吸引後 16 時間密閉して乾燥させた。乾燥後のセメント試料に対して, 小型万能試験機 (AGS-500, 島津, 京都) を用いて間接引張り応力を負荷し, セメント試料を破断した (クロスヘッドスピードは 1.0 mm · min⁻¹)。破断した試料にイオンパッチ法による金蒸着を行い, 走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-5300, 日本電子, 東京) を用いて加速電圧 20 kV の条件で観察した。

(3) 試作セメントの生理食塩水に対する溶解性の測定

セメントペーストを内径 6 mm 高さ 3 mm のプラスチックモールドに入れて成型した円柱試料を, 真空容器に入れ真空ポンプにて約 10 Pa の条件で 48 時間吸引した後, 重量を測定した。円柱試料を生理食塩水に浸漬し, 37° C に設定した振盪機 (PIC-100S, パナソニック, 大阪) 中で 24 時間振盪した。24 時間後円柱試料を取り出し, 浸漬前と同様に約 10 Pa の条件で 48 時間吸引し十分乾燥させた

後, 重量を測定した。浸漬前後の単位表面積あたりの重量変化を算出し, セメントの溶解性評価とした。

(5) 細胞毒性試験

細胞毒性試験には, α -TCP 粉末を濃度 1.0 mol/L の SrCl₂ 水溶液および濃度 0.6 mol/L の NaH₂PO₄ 水溶液にて練和した Sr-HAP (0%) セメント, セメント練和液 2 種の濃度をそれぞれ 1/10 にしたセメント試料 (以下 0.1Sr-HAP (0%) と略記する), CaCl₂ 水溶液と NaH₂PO₄ 水溶液にて練和した Sr 無添加の従来型 HAP セメントを用いた。P/W 比は 2.0 とし, 練和液は等量使用した。セメントペーストをプラスチックモールドに入れ成型し, 直径 10 mm 高さ 3 mm の円柱状硬化体を作製した。得られた硬化体を Hanks 溶液 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) に入れ, 37° C, 5 % CO₂ 条件下で 7 日間静置し, これを試料とした。セメント硬化体対 Hanks の体積比は 1 : 10 とした。24 穴プラスチックマルチディッシュ (Nunc, Roskilde, Denmark) の各穴に 1 個ずつセメント試料を入れ, 試料上に 5.0 × 10⁴ cells/mL に調整した MC3T3-E1 細胞懸濁液を播種した。アルファ変法イーグル培地 (α -MEM; Sigma, USA) に対してウシ胎児血清 (FBS) (GIBCO, USA) を 10 % および Antibiotic-Antimycotic (GIBCO, USA) を 1 % 添加し調整した培地を用いた。セメント硬化体対培地の体積比は 1 : 10 とした。細胞は 37° C, 5 % CO₂ 環境下で 7 日間培養し, 培地交換は 2 日毎に行った。細胞懸濁液および交換培地には, 上記と同様の培地を用いた。細胞播種 1 週間後, 試料表面をダルベッコリン酸緩衝液 (DPBS; GIBCO, USA) にて洗浄後, セメント上およびマルチディッシュ底面上の細胞をトリプシン-EDTA 0.25 % (GIBCO, USA) およびスクレーパー (AGC テクノグラス, 千葉) にて MC3T3-E1 を剥離し, 細胞浮遊液を作製した。細胞生存率の定量には, MTT 法の可溶性過程を簡略化した MTS 発色タイプの生細胞数測定キット (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega, Madison, USA) を用いて, 37° C, 5 % CO₂ 条件下で 1 時間反応させた後, 波長 490 nm にて吸光度を測定した。また, あわせて生細胞数の定量をおこなうため, DNA 量の定量測定をおこなった。回収した細胞懸濁液を超音波破碎し, DNA 定量キット (プライマリーセル, 北海道) を用いて, 650 - 40 型分光蛍光光度計 (日立, 東京) にて Excitation: 356 nm および Emission: 458 nm にて蛍光測定を行い, 細胞数を定量した。

(6) ラット骨組織への埋入による組織学的検討

動物実験は, 徳島大学動物実験委員会承認の下, 徳島大学動物実験管理規則に準じて行った。埋入実験には 6 週齢の雄性 SD ラット (日本クレア) 20 匹を使用した。ジエチルエーテル (1 級, 和光純薬, 大阪) により吸入麻酔を行った後, ソムノペンチル (共立製薬, 東京) 50 mg/kg にて腹腔麻酔を行った。上顎第一および第二大臼歯間口蓋側歯槽骨をスチール製ラウンドバー (直径 1.2 mm) にて切削し, 両側に深さ 1.2 mm の骨窩洞を形成し, 生理食塩水にて洗浄した後, 窩洞を乾燥させた。 α -TCP 粉末を濃度 1.0 mol/L の SrCl₂ 水溶液および濃度 0.6 mol/L の NaH₂PO₄ 水溶液にて練和し (P/W = 2.0), ペースト状のまま切削部位に充填し, 感染防止および唾液によるセメントの溶出防止のため, スーパーボ

ンド C&B (サンメディカル, 滋賀) を用いて仮封した。反対側は同様に切削した後スーパーボンド C&B で仮封のみを行い, コントロールとした。移植 1, 2, 4 週後に上顎骨組織を摘出した。摘出後, DPBS (GIBCO) にて洗浄し, 10 %中性ホルマリン緩衝液 (関東化学, 東京) にて固定した。固定後組織を室温にて 10 日間脱灰液 (0.24 M EDTA · 2Na · 2H₂O) による脱灰の後に, パラフィン包埋を行い, 厚さ 3 μm の組織切片を作製した。作製した組織切片を脱パラフィンした後, HE 染色し, 脱水, 透徹, 封入を行い, 光学顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 試作セメント内部の観察

硬化後 1 週間では, 従来型 HPA にも OCP の板状結晶が認められ, 0% SrCO₃ には HPA 由来の針状結晶が成長した。5% SrCO₃ にも成長した板状結晶が見られた。20% SrCO₃ になると 1 つずつの板状結晶サイズが小さくなり, 蜂の巣状の結晶構造を示した。蜂の巣状の結晶構造は, 炭酸含有量の多い炭酸アパタイトに典型的な像で, 炭酸アパタイトの生成を確認した。

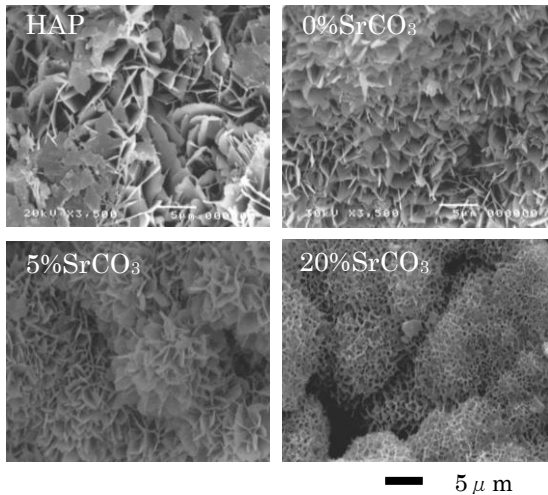


図 1 試作セメントの内部組織の SEM 像

(2) 試作セメントの生理食塩水に対する溶解性

Sr-HAP セメントの溶解性を確認するため生理食塩水への浸漬実験を行った結果, 従来型 HAP セメントと比較して SrCO₃ 無添加試料

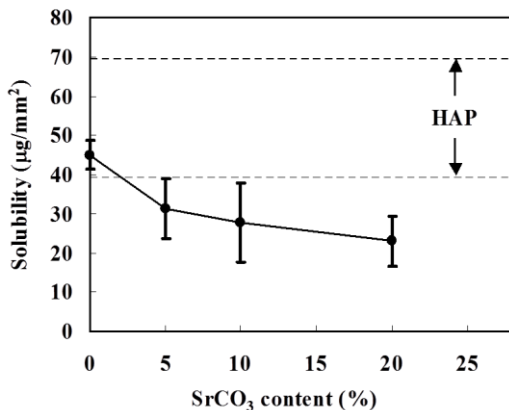


図 2 試作セメントの生理食塩水への溶解性

である Sr-HAP (0%) セメントの溶解性は上昇した。また, SrCO₃ 添加量の増加に伴いセメントの溶解性は上昇したが, α-TCP に対して 10 mass% の SrCO₃ を添加したセメント試料の生理食塩水に対する溶解性は飽和状態となった。

(3) 細胞毒性試験

MC3T3-E1 培養 7 日後の DNA 量変化を測定した結果, Sr-HAP (0%) セメントおよび 0.1Sr-HAP (0%) セメントは従来型 HAP セメントと比較して同程度の DNA 量となり, 有意差は認められなかった (p>0.01)。これらの結果より, 試作した Sr-HAP セメントの細胞毒性は極めて少ないことが確認された。

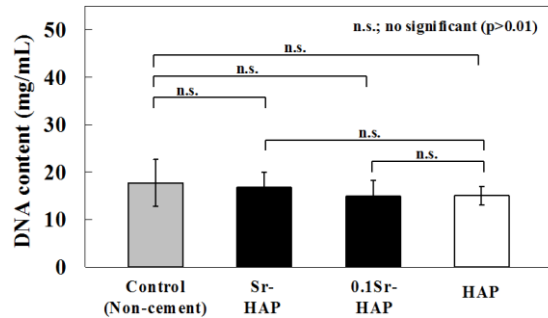


図 3 MC3T3-E1 培養 7 日後の DNA 濃度

Pre-incubate; 培養前, Control; 細胞のみ, Sr-HAP; Sr-HAP セメント, 0.1Sr-HAP; 0.1Sr-HAP セメント, 従来型 HAP; 従来型 HAP セメント。データは平均値 ± 標準偏差 (n = 15) である。(t-test)

(4) ラット骨組織への埋入による組織学的検討

ラット骨組織へセメントを移植し Sr-HAP セメントの溶出による pH 低下の影響を検討した結果, 移植後 1 週間ではコントロールおよび Sr-HAP (0%) セメント移植側ともに炎症反応が顕著に認められ, 破骨細胞が確認された。

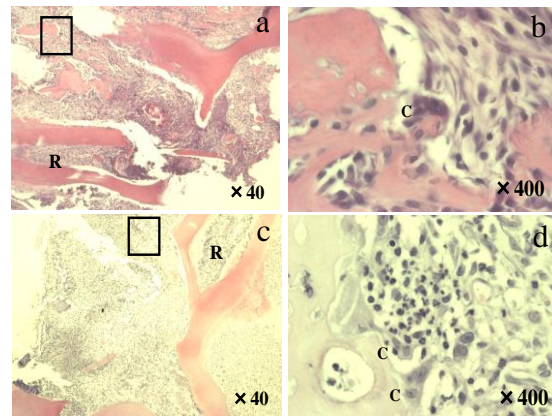


図 4 ラット骨組織への移植 1 週後の組織像
対照群 (a: 40 倍, b: 100 倍または 400 倍) および Sr-HAP (0%) セメント移植群 (c: 40 倍, d: 100 倍または 400 倍) の HE 染色像である。a), c) の枠内をそれぞれ拡大した像がそれぞれ b), d) である。(R: 歯根, C: 破骨細胞, O: 骨芽細胞, N: 新生骨, HAP: Sr-HAP (0%) セメント, 矢印: 欠損部の修復)
b), d) ヘマトキシリン好染の炎症性細胞および大型で多核の破骨細胞が認められた。

しかし、移植後2週間になるとコントロールおよび移植側において炎症反応はほとんど認められなくなり、骨芽細胞の増殖と新生骨を認めた。移植したSr-HAP (0%) セメントの周囲に骨芽細胞および新生骨が確認されたため、Sr-HAP セメントの溶出による為害性は少ないことが示された。また、移植後4週間になると、コントロールと比較してSr-HAP (0%) セメント移植側に新生骨が多く認められたため、Sr-HAP (0%) つまり SrCO₃ 無添加 Sr-HAP セメントの骨形成能が示唆された。

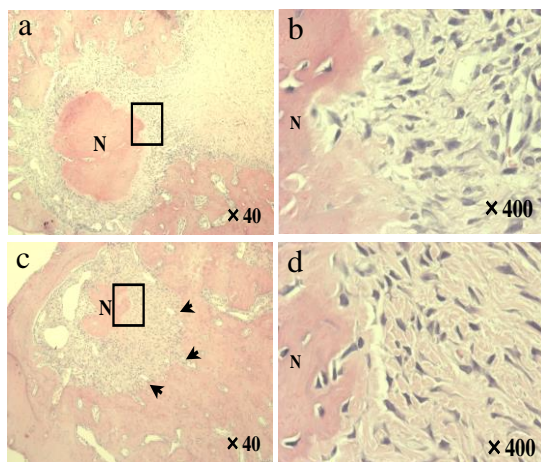


図5 ラット骨組織への移植4週間後の組織像
 対照群 (a: 40倍, b: 100倍または400倍)
 および Sr-HAP (0%) セメント移植群 (c: 40倍, d: 100倍または400倍) の HE 染色像である。a), c) の枠内をそれぞれ拡大した像がそれぞれ b), d) である。(R: 歯根, C: 破骨細胞, O: 骨芽細胞, N: 新生骨, HAP: Sr-HAP (0%) セメント, 矢印: 欠損部の修復)
 b), d) 骨芽細胞および新生骨が認められた。a) と比較すると c) において骨欠損部の修復が顕著であった。

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 0件)

[学会発表] (計 8件)

- ① 伊田百美香, 裴志英, 関根一光, 河野文昭, 濱田賢一; メカノケミカル手法で改質した β -TCP セメントの強度に粉液比が及ぼす影響. 第65回日本歯科理工学会学術講演会, 2015.4.11, 仙台市情報・産業プラザ (宮城県・仙台市)
- ② Ida Y, Bae JY, Sekine K, Kawano F, Hamada K; Strength and injectability of β -TCP based Calcium Phosphate Cement using mechano-chemical process. Materials Today Asia 2014(MYA), 2014.12.10 (Hong Kong, Republic of China)
- ③ Bae JY, Ida Y, Sekine K, Kawano F, Hamada K; The effects of high energy ball-milling on injectability and strength of β -tricalcium phosphate cement. 第52回日本人工臓器学会大会, 2014.10.18, 京王プラザホテル (北海道・札幌)
- ④ 伊田百美香, 裴志英, 関根一光, 河野文

昭, 濱田賢一; メカノケミカル手法で改質した β -TCP セメントの特性. 第64回日本歯科理工学会学術講演会, 2014.10.05, アステールプラザ, (広島県・広島市)

- ⑤ Bae J Y, Ida Y, Sekine K, Kawano F, Hamada K; Properties of β -TCP based Calcium Phosphate Cement using mechano-chemical process. 26th Annual Conference European Society of Biomaterials (ESB), 2014.09.03 (Liverpool, England)
- ⑥ Bae JY, Ida Y, Sekine K, Kawano F, Hamada K; Develop of high strength calcium phosphate cement: Effects of planetary ball milling. 高強度リン酸カルシウムセメントの開発: 遊星型ボールミリングの効果. 第53回日本生体医工学会大会, 2014.06.25, 名古屋国際センター (宮城県・仙台市)
- ⑦ Bae JY, Ida Y, Sekine K, Kawano F, Hamada K; quick setting calcium phosphate cement: Effects of planetary ball milling. 15th Meeting of the International College of prosthodontics (ICP), 2013.09.20 (Torino, Italy)
- ⑧ Kazumitsu SEKINE, Kenichi HAMADA, Jiyoung BAE, Kikuji YAMASHITA, Fumiaki KAWANO, Kenzo ASAOKA; Evaluation of Strontium Introduced Apatite Cement for Injectable Bone Substitute Developments. ASEAN plus and Tokushima joint International Conference 2012(ATIC), 2012.12.05 (Yogyakarta, Indonesia)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 文昭 (FUMIAKI, Kawano)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号: 60195120

(2) 研究分担者

濱田 賢一 (KEN-ICHI, Hamada)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・教授

研究者番号: 00301317

篠原 千尋 (CHIHIRO, Shinohara)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号: 50332820