

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659862

研究課題名(和文) 超臨界反応場による組成変換反応を利用した骨置換材の創製

研究課題名(英文) Fabrication of bone substitutes using phase transformation under supercritical reaction field

研究代表者

都留 寛治 (Tsuru, Kanji)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50314654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炭酸アパタイト骨補填材の調製に重要な水酸化カルシウム圧粉体の炭酸化過程において、超臨界二酸化炭素の有用性を調査した。その結果、水酸化カルシウム圧粉体の炭酸化には水の存在が鍵であること、反応性の高い酸化カルシウム焼成体を用いれば炭酸化が可能になったことが明らかになった。得られた結晶相はカルサイトであり、1mol/l Na₂HPO₄溶液に200℃で24時間水熱処理することにより炭酸アパタイトに相変換できた。さらに、本法で作製した炭酸アパタイトは、従来法で作製した炭酸アパタイトと同等のin vitro細胞適合性およびin vivo骨伝導性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, usefulness of supercritical carbon dioxide was investigated on carbonation process of calcium hydroxide compact that was important for fabrication of carbonate apatite bone substitute. As a result, this study revealed that the existence of water was the key for carbonation of calcium hydroxide compact, and carbonation was possible when high reactive sintered calcium oxide was used. The obtained crystal phase was calcite and it could transform into carbonate apatite after hydrothermally-treated with 1 mol/l Na₂HPO₄ at 200 degree C for 24 hours. Moreover, in vitro cytocompatibility and in vivo osteoconductivity for the carbonate apatite obtained in this study compared favorably with the carbonate apatite fabricated using conventional method.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体材料 骨補填材 アパタイト 超臨界二酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

骨置換性を有する炭酸アパタイト(CO_3Ap)骨補填材の調製法として、炭酸カルシウム(CaCO_3)硬化体を前駆体として用いる方法が提案されている。この CaCO_3 前駆体は水酸化カルシウム($\text{Ca}(\text{OH})_2$)圧粉体の炭酸化によって硬化させ調製される。この手法では $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体を炭酸ガス雰囲気暴露して炭酸化を行うが、試料の外側から炭酸化が進行するため、試料サイズが大きくなると炭酸化に長時間を必要とする。

2. 研究の目的

本研究では、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体内部への二酸化炭素の浸透を促進することによって $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体を迅速に炭酸化することを目的とする。この目的を達成するために、超臨界二酸化炭素を用いることとした。二酸化炭素の超臨界条件(31.1°C , 7.39 MPa ; 図1参照)は比較的容易に調整可能で、極めて拡散性に優れるため、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の炭酸化に応用できると考えた。そこで本研究では、超臨界二酸化炭素による $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の炭酸化条件を検討し、得られた CaCO_3 前駆体から調製した CO_3Ap 成形体の有用性を細胞および実験動物を用いて調査する。

3. 研究の方法

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の調製

0.1gの $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 粉末(和光純薬)をステンレス製のモールドに入れ、油圧プレスを用いて20 MPaの成形圧で円柱状(6 x 3 mm)の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体を作製した。

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の炭酸化

ステンレス製耐圧容器(図2)に試料、 CO_2 ガスおよびドライアイスをつまみ入れ、 40°C に加熱した。圧力計が8 MPa以上を示している条件下で CO_2 の超臨界状態(図1)であると判断し、12時間炭酸化処理を行った。一方、炭酸ガスに暴露する方法(従来法とする)で比較試料を作製した。室温、相対湿度100%、 CO_2 ガス導入速度200ml/minの条件下で、反応容器の中に試料を2週間静置して炭酸化した。 CaCO_3 への相変換はX線回折装置(XRD:D8Advance, Bruker)を用いて調査した。

CaCO_3 硬化体のリン酸化

CaCO_3 硬化体を1mol/l Na_2HPO_4 溶液に浸漬し、 200°C で24時間水熱処理した。 CO_3Ap への組成変換はXRDを用いて調査した。処理前後の試料の表面構造変化や気孔構造は走査型電子顕微鏡(SEM:S-3400N, Hitachi High-Technologies)で観察した。

CO_3Ap 骨補填材の生体親和性評価

ラット大腿骨から採取した骨髄細胞懸濁液を骨芽細胞に分化させ、 CO_3Ap ディスク上に 1cm^2 当たり6,000個播種し、培地中で一定期間培養した。初期胞接着性を評価するとと

もにPrestBlue® Cell Viability Reagentを用いて細胞増殖性を評価し、従来法で作製した CO_3Ap ディスクを用いた場合と比較した。ラット頭蓋骨に直径9 mmのクリティカルサイズの骨欠損(自然治癒しない大きさの骨欠損)を形成し、本研究で作製した CO_3Ap 顆粒(300-600 μm)を用いて骨欠損を再建した。マイクロCT(Skyscan 1075 KHS)を用いて埋入した顆粒周辺組織の経時変化を観察した。2週埋入後の試料を含む頭蓋骨より、脱灰組織切片(HE染色)を作製し、オールインワン蛍光顕微鏡(KEYENCE, BZ-X710)を用いて CO_3Ap 顆粒周辺の新生骨形成を病理組織学的に評価した。

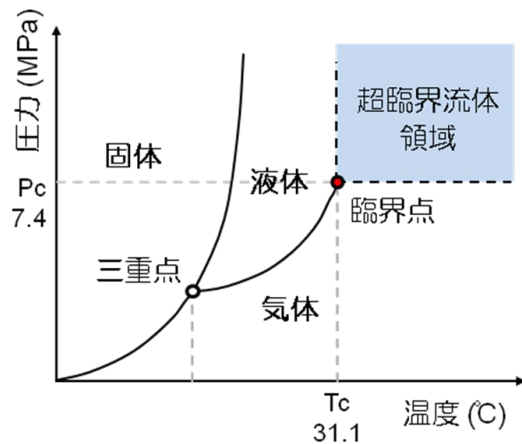


図1 二酸化炭素の超臨界流体領域



図2 実験で使用した耐圧反応容器

4. 研究成果

$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の炭酸化

二酸化炭素の超臨界条件下で $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体を処理し、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と CaCO_3 のX線回折強度比から炭酸化率を求めた結果、20%以下であった。試行錯誤した結果、少量の水の添加が $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の炭酸化に効果的であることが判明し、炭酸化率は約60%まで向上した。水の量の増加は二酸化炭素の超臨界条件に影響を与えるため、室温で炭酸ガスに暴露する従来法において、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 圧粉体の炭酸化に及ぼす水の影響を調べることにした。

Ca(OH)₂ 圧粉体の炭酸化に及ぼす水の影響

Ca(OH)₂ 圧粉体を室温で炭酸ガスに暴露する方法で炭酸化する際に、相対湿度の異なる条件 (0, 50, 100%) で処理を行った。Ca(OH)₂ と CaCO₃ の X 線回折強度比から炭酸化率を求めた結果を図 3 に示す。相対湿度 100% の時は 2 週間で 100% 炭酸化するが、湿度が低下すると炭酸化率が低下し、湿度 0% では炭酸化しないことが分かった。この結果から、室温における Ca(OH)₂ の炭酸化は Ca(OH)₂ の溶解 - 析出型反応によって進行すると考えられる。即ち、湿度 100% では Ca(OH)₂ 表面に水が存在するため、Ca(OH)₂ が溶解して Ca²⁺ イオンを溶出する。CO₂ ガス雰囲気なので水には CO₃²⁻ イオンが溶解しており、Ca²⁺ イオンと CO₃²⁻ イオンが反応して CaCO₃ を析出する。この反応 (炭酸化) が外部から内部に徐々に進行する。

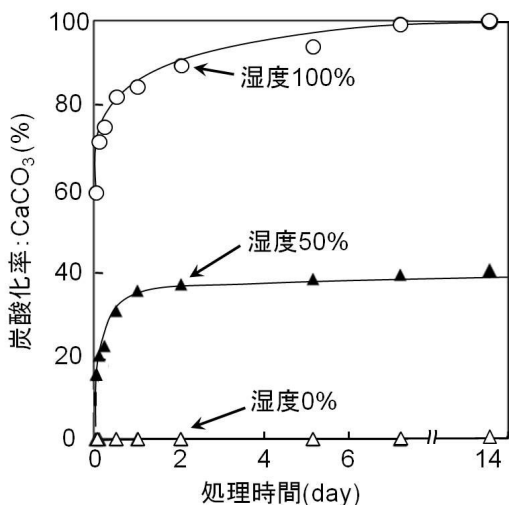


図 3 Ca(OH)₂ 圧粉体を異なる相対湿度で炭酸ガスに暴露した際の炭酸化率の経時変化

本研究では、Ca(OH)₂ 圧粉体内部への CO₂ ガスの拡散効果を期待して、超臨界二酸化炭素による炭酸化を検討した。恐らく、圧粉体内部へのガスの拡散は生じているが、系の中に水がわずかにしか存在しないために、ほとんど炭酸化が進行しなかったと考えられる。超臨界条件で水の影響を調査するのは困難なため、超臨界状態の二酸化炭素を Ca(OH)₂ と直接反応して炭酸化させることを断念した。

CaO 焼成体の炭酸化

低温での炭酸化は溶解 - 析出型反応で進行するが、原料の反応性が高まれば、イオン状態を経由せずに直接炭酸化させることができると考えられる。そこで、次に Ca(OH)₂ 圧粉体を焼成して CaO 焼成体として、これを超臨界二酸化炭素で炭酸化させる検討を行った。

Ca(OH)₂ 圧粉体を 1,100°C で 6 時間焼成した後、超臨界二酸化炭素を用いて炭酸化を試み

た。CaO 焼成体の炭酸化前後における X 線回折パターンを図 4 に示す。処理後の試料からは CaO に帰属されるピークは検出されず、CaCO₃ を主ピークとしてわずかに Ca(OH)₂ に帰属されるピークが検出された。Ca(OH)₂ と CaCO₃ の X 線回折強度比から炭酸化率を求めた結果、約 95% であった。

超臨界二酸化炭素を用いた CaO 焼成体の炭酸化によって、CaCO₃ 硬化体を得ることができた。

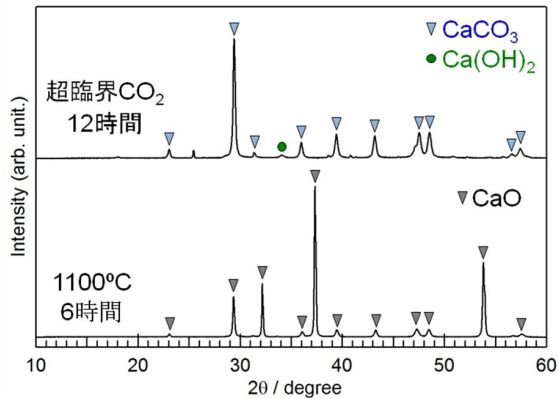


図 4 CaO 焼成体の炭酸化前後における X 線回折パターン

CaCO₃ 硬化体のリン酸化

CaCO₃ 硬化体を 1mol/l Na₂HPO₄ 溶液に浸漬し、200°C で 24 時間水熱処理した結果、CO₃Ap に組成変換することが XRD によって確認された。

CO₃Ap 骨補填材の生体親和性評価

本法で作製した CO₃Ap ディスクに対する初期細胞接着性は、従来法で作製した CO₃Ap ディスクのそれとほぼ同等であった。さらに、細胞増殖性についても、両者に有意差がないことが確認された。従って、CO₃Ap 骨補填材を作製する際の CaCO₃ 前駆体の作製方法の違い (Ca(OH)₂ 圧粉体の CO₂ ガス暴露による炭酸化と CaO 焼成体の超臨界二酸化炭素による炭酸化) は、得られる CO₃Ap 骨補填材の細胞応答に影響を及ぼさないと結論付けた。

本法で作製した CO₃Ap 顆粒をラット頭蓋骨骨欠損に 2 週間埋入した後の脱灰組織標本 (HE 染色) を図 5 に示す。母床骨に近い部位の顆粒周辺において局所的に新生骨の形成が認められた。BZ-X710 付属の画像解析ソフトウェアを用いて、骨欠損領域に対する新生骨形成率 (%) を評価し、本法で作製した CO₃Ap 顆粒と従来法で作製した CO₃Ap 顆粒について、2 週間埋入後の新生骨形成量を比較した結果を図 6 に示す。試料埋入 2 週間で、約 1 mm² の新生骨形成が認められ、両者に有意差は認められなかった。従って、CO₃Ap 骨補填材を作製する際の CaCO₃ 前駆体の作製方法の違い (Ca(OH)₂ 圧粉体の CO₂ ガス暴露による炭酸化と CaO 焼成体の超臨界二酸化炭素による炭酸化) は、得られる

CO₃Ap 骨補填材の新生骨形成に影響を及ぼさないと結論付けた。

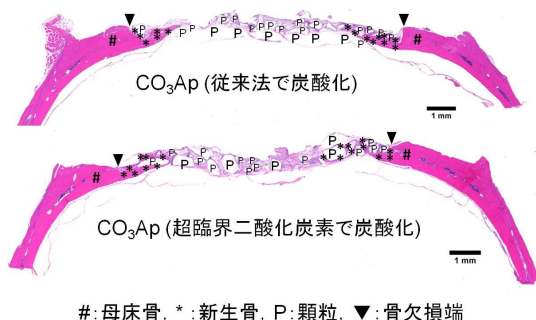


図5 本法で作製したCO₃Ap顆粒をラット頭蓋骨骨欠損に2週間埋入した後の脱灰組織標本(HE染色)

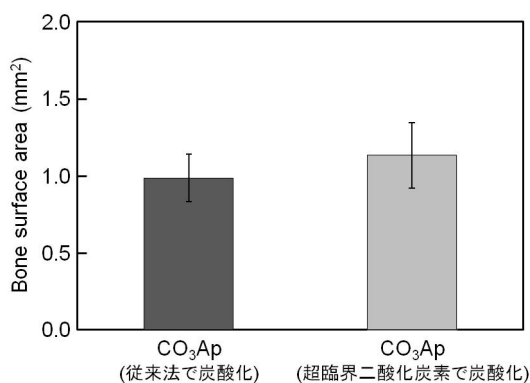


図6 異なる条件で炭酸化したCaCO₃前駆体を用いて作製したCO₃Ap顆粒の新生骨形成比較

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2件)

都留寛治 QOL向上に寄与する生体材料の開発 九州大学テクノロジーフォーラム 2014 東京国際フォーラム 2014.12.3

都留寛治 Tram Xuan Thanh Nguyen, 丸田道人, 松家茂樹, 石川邦夫 連通気孔型炭酸アパタイトの力学的強さ改善 第18回生体関連セラミックス討論会 2014.12.5 大阪府立大学 I-site なんば

6. 研究組織

(1) 研究代表者

都留 寛治 (TSURU KANJI)

九州大学・歯学研究院・生体材料学分野・准教授

研究者番号：50314654

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)

九州大学・歯学研究院・生体材料学分野・教授

研究者番号：90202952