

平成30年 5月22日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05035

研究課題名(和文) 骨置換型炭酸アパタイトに適したマクロ連通孔デザインの構築

研究課題名(英文) Introduction of interconnected macro pores suitable for carbonate apatite bone replacement

研究代表者

都留 寛治 (Tsuru, Kanji)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：50314654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では顆粒の連結により骨置換型炭酸アパタイト(CO3Ap)にマクロ連通気孔を導入する2つの手法を検討した。1つ目は、CO3Ap顆粒を酸性リン酸カルシウム溶液で処理し、表面に析出するブルツシャイト結晶の絡み合いを利用して顆粒連結体を作製した。2つ目は、 β -型リン酸三カルシウム顆粒を水蒸気にさらし、表面に析出するカルシウム欠損型アパタイト結晶の絡み合いを利用して顆粒連結体を作製した。いずれも前駆体として用い、溶解-析出型反応を利用した炭酸化によりCO3Ap多孔体を作製した。免脛骨骨欠損をこれらのCO3Ap多孔体で骨再建したところ、マクロ連通気孔のないCO3Apディスクより優れた骨置換性を示した。

研究成果の概要(英文)：We examined two approaches that introduced interconnected macro pores into carbonate apatite (CO3Ap) bone replacement. First, CO3Ap granules were connected using interlocking of brushite crystals precipitated on the granular surface through the reaction with acidic calcium phosphate solution in order to fabricate granular connected porous body. Second, β -tricalcium phosphate granules were connected using interlocking of calcium deficient apatite crystals precipitated on the granular surface through the reaction with water vapor followed by the heating at 1300 °C for 6 hours in order to fabricate granular connected porous body. Both porous bodies were used as precursor for the fabrication of interconnected porous CO3Ap using carbonation based on the dissolution-precipitation reaction. In vivo study using bone defect model of rabbit tibia indicated that the interconnected porous CO3Ap showed higher bone replacement ability than the CO3Ap disk without macro pores.

研究分野：生体材料化学

キーワード：生体材料 骨補填材 多孔体 骨組織再生

1. 研究開始当初の背景

骨の再建・再生においては、自家骨の骨量不足や低侵襲治療といった観点から、人工骨補填材の利用が有効であり、患者の QOL 向上に寄与する高機能型人工骨補填材の開発が望まれている。ネオボーン®に代表されるハイドロキシアパタイト人工骨補填材 (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は生体内安定性が高く長期に渡って体内に残存するため、残存した骨補填材が感染巣になることが懸念される。一方、オスフェリオン®に代表されるβ型リン酸三カルシウム骨補填材 (β-TCP: $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) は生体内吸収性を有するが、破骨細胞性吸収だけでなく化学的にも溶解するため、骨粗鬆症等の骨生成能が低下した患者には適用が難しい。これらの人工骨補填材に対し、申請代表者らのグループで開発した炭酸アパタイト骨補填材 (CO_3Ap : $\text{Ca}_{10-a}(\text{PO}_4)_{6-b}(\text{CO}_3)_c(\text{OH})_{2-d}$) は、骨の無機成分とほぼ同等の組成を有し、破骨細胞が作り出す弱酸性環境でのみ吸収を受け、骨リモデリングに同調して骨置換される画期的な人工骨補填材である。

2. 研究の目的

炭酸アパタイト骨補填材は骨置換性を有するため、連通多孔体化によって骨置換速度を飛躍的に向上できると期待される。本研究では、炭酸アパタイトの調製法を基盤技術として、炭酸アパタイト骨補填材へのマクロ連通気孔の導入を行う。発泡剤や水溶性ポロジェンを用いた既報は連通気孔が得られにくく、気孔の連通性を高めると強度が著しく低下するといった問題があるため、本研究では力学的特性を低下させずに連通気孔が得られやすい手法を新たに提案する。

球の最密充填構造は気孔率が低い (26%) 割に連通気孔構造が維持できることに着目し、リン酸カルシウムで構成された顆粒を連結させることでマクロ気孔を有する連通多孔体の作製を試みる。

3. 研究の方法

3-1. 顆粒の連結による多孔体化

(1) 炭酸アパタイト (CO_3Ap) 顆粒の酸性溶液処理により連結させる方法

CO_3Ap 顆粒と酸性溶液の反応で表面に析出するリン酸水素カルシウム二水和物 (DCPD) によって顆粒同士の連結し、 CO_3Ap 顆粒連結多孔体の作製を試みた。

株式会社ジーシー社製 CO_3Ap 顆粒 (粒径 100-200 μm , 300-600 μm) を用い、顆粒を連結させる酸性溶液としては、第一リン酸カルシウム一水和物 (MCPM: $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) と正リン酸 (H_3PO_4) の混合溶液 (MCPM: $\text{H}_3\text{PO}_4=1:0.4-0.6$) を用いた。顆粒をシリンジに充填し、酸性溶液を満たしてから直ぐ顆粒間隙に存在する余剰な酸性溶液を除去し、顆粒表面でのみ析出・硬化反応が生じるようにした。反応中、シリンジ外部から

圧力 (0.5-1.7MPa) を加え顆粒の連結が生じ易くした。

得られた顆粒連結多孔体は 60°C に保持した 1 mol/L 炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) に 24 時間浸漬 (炭酸化) して、顆粒界面に存在すると思われる DCPD の CO_3Ap への組成変換を試みた。

(2) α型リン酸三カルシウム (α-TCP)

顆粒を焼結して連結させる方法

α-TCP 粉末 (太平化学社製 αTCP-B) を原料として、W/O エマルジョン法で球状顆粒を作製した後、1300°C で 3 時間焼成し、球状 α-TCP 顆粒を作製した。篩い分けられた粒径 300-600 μm の α-TCP 顆粒を実験に用いた。α-TCP 顆粒をアクリルモールド (φ6x4 mm) に充填し、外部圧力 20 MPa, 混水比 0.75, 100°C, 相対湿度 100% の条件で 12 時間処理を行った。型から取り出した顆粒連結体を 10°C/min で 1300°C まで加熱し、6 時間保持した後、室温まで自然放冷した。

得られた顆粒連結多孔体を 80°C に保持した 1 mol/L NaHCO_3 と 0.1 mol/L リン酸水素二ナトリウム (Na_2HPO_4) に 7 日間浸漬 (炭酸化) して、α-TCP から CO_3Ap への組成変換を試みた。

3-2. 多孔体の構造および力学特性評価

得られた顆粒連結多孔体の顆粒同士の連結状況やマクロ気孔については電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察し、結晶構造の同定は X 線回折装置 (XRD)、炭酸基の同定はフーリエ変換赤外分光装置 (FT-IR) を用いた。気孔率は重量、外形容積、理論密度 (HAp: 3.16g/cm³) より算出した。力学特性はオートグラフを用い、圧縮強さもしくは間接引張強さ (DTS) で評価した。

3-3. 骨置換性評価

九州大学動物実験倫理規定に遵守し、倫理委員会の承認の元で動物実験を行った (A26-248-0, A28-166-0)。18 週齢の日本白色家兔 (3422±358g) の脛骨骨欠損 (φ6.1 x 4 mm) をマクロ連通気孔のない緻密体 (コントロール) および顆粒連結型多孔体で再建し、術後 4 週および 12 週の挙動をマイクロ CT および非脱灰組織標本 (ビラヌエバゴールドナー染色) により病理組織学的に骨置換性を比較した。

4. 研究成果

4-1. 顆粒の連結による多孔体化

(1) CO_3Ap 顆粒を連結させる方法

酸性溶液を用いて CO_3Ap 顆粒を連結させた多孔体の SEM 写真を図 1 に示す。XRD による結晶同定結果を踏まえ、顆粒の界面には DCPD が析出し、この結晶の絡み合いで硬化・連結していることが分かった (式(1))。



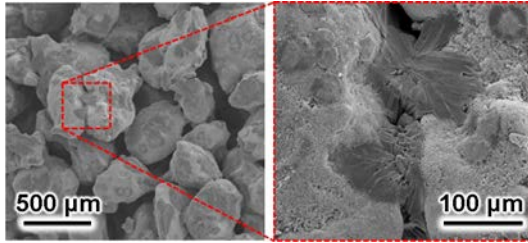
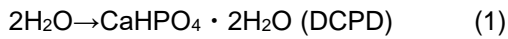


図 1. 酸性溶液を用いて CO_3Ap 顆粒を連結させた多孔体の SEM 像

炭酸化後には形態が変化するとともに DCPD の X 線回折ピークが消失し、アパタイトの回折ピークのみ検出された。FT-IR 分析より、リン酸基サイトに炭酸基が置換した構造であることが示唆された。以上の結果から、酸性溶液 ($\text{MCPM}:\text{H}_3\text{PO}_4=1:0.6$) を用いて CO_3Ap 顆粒を硬化・連結した多孔体を、 60°C の 1 mol/L NaHCO_3 溶液で 24 時間処理することによって、炭酸アパタイトを単一相とした多孔体を作製できることを明らかにした。

但し、本法では CO_3Ap 顆粒と酸性溶液の反応により炭酸ガスが発生するため、外部から圧力を加えて CO_3Ap 顆粒同士を近接させながら反応を行うこと、顆粒間隙への DCPD の過剰析出による気孔率低下を抑えるために反応溶液量を制御することが技術要素であることも同時に明らかにした。

酸性溶液については MCPM と H_3PO_4 割合の異なる混合溶液を用いた処理を検討し、 H_3PO_4 の割合が増加するにつれ、DCPD 形成量が増加し、多孔体の強度が向上することが分かった。 $\text{MCPM}:\text{H}_3\text{PO}_4=1:0.6$ の酸性溶液を用い、外部からの圧力が異なる条件で顆粒連結多孔体を作製した結果、圧力が $0.5\text{-}1.7 \text{ MPa}$ の条件でマクロ連通気孔を有する多孔体が得られ (図 2)、圧力が増加すると多孔体の圧縮強さが向上した (図 3)。

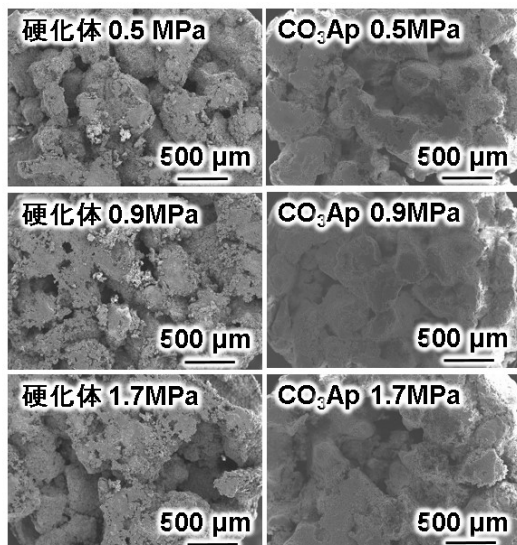


図 2. CO_3Ap 顆粒と酸性溶液の反応により得られた顆粒連結体と炭酸化後の SEM 像

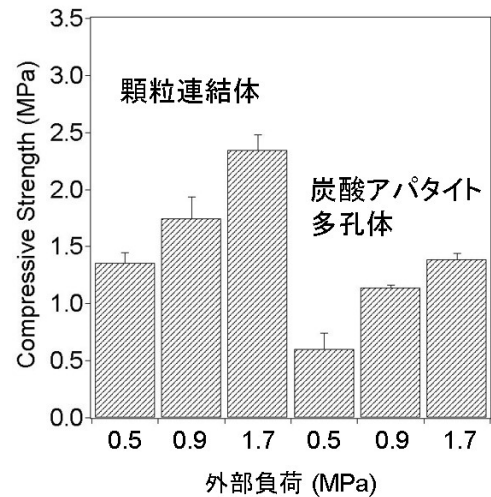


図 3. 顆粒連結体および炭酸化によって得られた炭酸アパタイト多孔体の圧縮強さ

成形圧力 1.7 MPa で作製した顆粒サイズの異なる顆粒連結型 CO_3Ap 多孔体を用いて日本白色家兔の脛骨骨欠損の再建を行った結果、マクロ気孔を持たない CO_3Ap ブロックに比べ骨への置換が加速されることが明らかになった (図 4)。 $300\sim 600 \mu\text{m}$ の CO_3Ap 顆粒を用いるより $100\sim 200 \mu\text{m}$ の CO_3Ap 顆粒を用いた方が材料は吸収されやすく、骨置換は早まることも明らかになった。 CO_3Ap 顆粒多孔体では 12 週後に皮質骨が再建されていた。

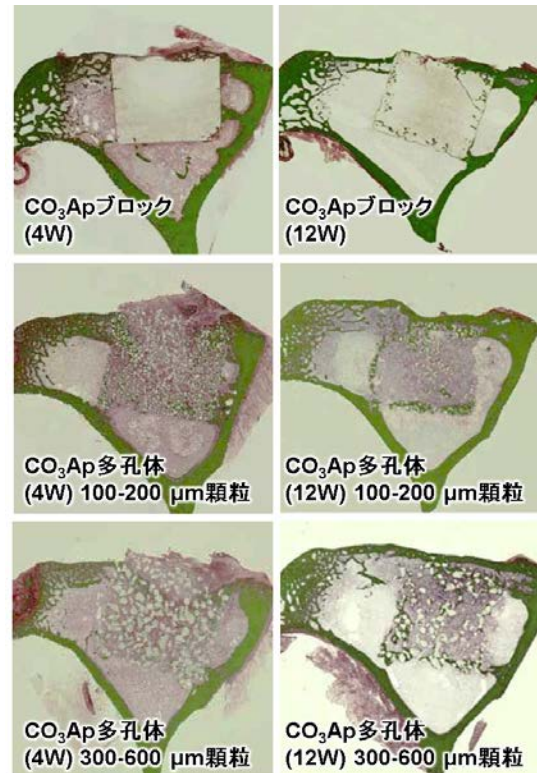


図 4. CO_3Ap ブロックおよび CO_3Ap 多孔体の兔脛骨埋入 4 週および 12 週の非脱灰組織標本 (ピラヌエバゴールドナー染色)

以上の結果から、CO₃Ap 顆粒と酸性溶液の反応により作製した顆粒連結硬化体を炭酸化し得られた CO₃Ap 顆粒連結多孔体は、導入されたマクロサイズの連通気孔によって骨との置換が著しく加速されると結論づけた。

(2) α-TCP 顆粒を焼結して連結させる方法

単純に α-TCP 顆粒をアルミナチューブに充填し、1300°Cで6時間焼成しても、部分的にしか焼結されず、顆粒連結多孔体は得られなかった。一方、α-TCP 顆粒同士が接触した状態で湿潤環境に静置し、蒸気を発生させると α-TCP 顆粒表面でカルシウム欠損型アパタイト (cdHAp) が析出し (式(2))、結晶の絡み合いで顆粒同士が連結できた (図 5)。

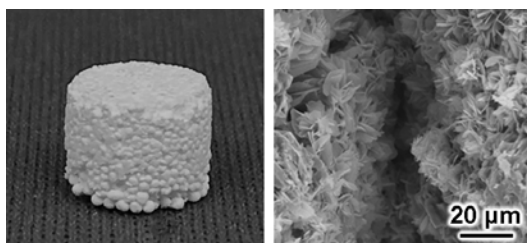
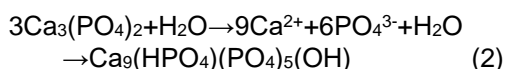


図 5. α-TCP 顆粒連結体および顆粒界面の SEM 像

ちなみに、近接させた α-TCP 顆粒を蒸留水中に浸漬する手法についても試みたところ、顆粒空隙が多量に析出した cdHAp 結晶により閉鎖されたため、この方法は不採用とした。

cdHAp 顆粒連結多孔体を 1300°Cで6時間焼成すると DTS が約 2 MPa (圧縮強度換算で約 10 MPa) の α-TCP 単相の顆粒連結体が得られた。この α-TCP 顆粒連結多孔体を前駆体として、炭酸化により CO₃Ap への組成変換を試みた。顆粒連結型 α-TCP 多孔体を 1 mol/L NaHCO₃ 溶液のみに浸漬した場合には炭酸カルシウム (カルサイト) が副生成物として生じたが、0.1 mol/L Na₂HPO₄ 溶液を含む混合溶液とすることで炭酸アパタイト単一相が得られることを見出した。

得られた CO₃Ap 連通多孔体の気孔率は約 58%であり、そのうちマクロ連通気孔の占める割合は約 22%であった。DTS は 1.8 MPa (圧縮強さに換算すると約 9 MPa) であり、市販の連通多孔体型骨補填材と遜色ない値が得られた。

日本白色家兔の脛骨欠損モデルを用い、本炭酸アパタイト連通多孔体にて骨再建を試みたところ、連通気孔内部に細胞や組織の侵入が確認され、4 週埋入後には 15%、12 週埋入後には 47%の新生骨形成が認められた (図 6)。コントロールとして用いた炭酸アパタイト緻密体 (4 週埋入後には 4%、12 週埋入後には 16%) に比べ極めて早く骨置換され

たことから、本顆粒連結法によるマクロ連通気孔の導入は骨置換速度の亢進に有効であると結論づけた。

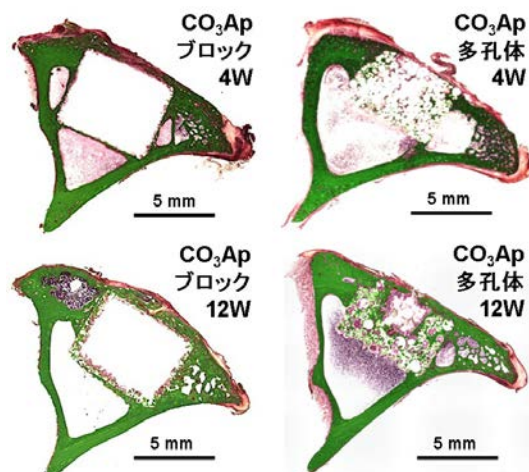


図 6. CO₃Ap ブロックおよび CO₃Ap 多孔体の免脛骨埋入 4 週および 12 週の非脱灰組織標本 (ピラヌエバゴールドナー染色)

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 6 件)

Khairul Anuar Shariff, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa: Fabrication of interconnected pore forming α-tricalcium phosphate foam granules cement. *Journal of Biomaterials Applications*. **30(6)**: 838-845, 2016.

Noriko Koga, Kunio Ishikawa, Kanji Tsuru, Ichiro Takahashi. Effects of acidic calcium phosphate concentration on mechanical strength of porous calcite fabricated by bridging with dicalcium phosphate dihydrate. *Ceramics International*. **42(7)**: 7912-7917, 2016.

Naoyuki Fukuda, Kanji Tsuru, Yoshihide Mori, Kunio Ishikawa. Effect of citric acid on setting reaction and tissue response to beta-TCP granular cement. *Biomedical Materials*, **12**, 015027, 2017.

Kanji Tsuru, Ayami Yoshimoto, Masayuki Kanazawa, Yuki Sugiura, Yasuharu Nakashima and Kunio Ishikawa. Fabrication of Carbonate Apatite Block through a Dissolution-Precipitation Reaction Using Calcium Hydrogen Phosphate Dihydrate Block as a Precursor. *Materials*, **10(4)**: 374, 2017.

Masayuki Kanazawa, Kanji Tsuru, Naoyuki Fukuda, Yuta Sakemi, Yasuharu Nakashima, Kunio Ishikawa. Evaluation of carbonate

apatite blocks fabricated from dicalcium phosphate dihydrate blocks for reconstruction of rabbit femoral and tibial defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **28**: 85, 2017.

Tya Indah Arifta, Melvin L. Munar, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa. Fabrication of interconnected porous calcium-deficient hydroxyapatite using the setting reaction of α tricalcium phosphate spherical granules. *Ceramics International*. **43**: 11149-11155, 2017.

〔学会発表〕(計 15 件)

都留寛治, 石川邦夫: 連通気孔を有した炭酸アパタイト骨補填材の創製と特性評価, 第 28 回日本セラミックス協会秋季シンポジウム(富山大学五福キャンパス), 2015 年 9 月 16-18 日。(招待講演)

Kanji Tsuru. Fabrication of interconnected macro porous carbonate apatite bone substitute using granular bridging with brushite, The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR), Fukuoka International Congress Center, 2015.10.30-31. (Oral: 31, Symposium speaker)

Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa. Introduction of Interconnected Macro Pores into Carbonate Apatite Bone Substitute: Bridging granules with brushite. 15th Asian BioCeramics Symposium in conjunction with 7th IBB Frontier symposium and 19th symposium on Ceramics in Medicine, Biology and Biomimetics, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, 2015.12.9-11 (Invited).

都留寛治, 石川邦夫: 顆粒連結法による連通気孔型骨補填材の創製, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 9-10 日。

都留寛治: QOL 向上に寄与するバイオマテリアルの創製, 岡山県医用工学研究会シンポジウム, 岡山大学鹿田キャンパス, 2016 年 2 月 26 日。(Symposium speaker)

Kunio Ishikawa, Kanji Tsuru and Song Chen. Fabrication of porous carbonate apatite based on setting reaction of carbonate apatite granules. 10th World Biomaterials Congress, Montreal Convention Center, Montreal, Canada, 5.17- 22.

Kanji Tsuru, Noriko Koga, Ichiro Takahashi and Kunio Ishikawa. Fabrication of porous

carbonate apatite based on the bridging of calcite granules followed by the phase transformation to carbonate apatite. 10th World Biomaterials Congress, Montreal Convention Center, Montreal, Canada, 5.17-22.

Tya Arifta, Melvin L. Munar, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa. Preparation of Porous Carbonate Apatite Block by Dissolution Precipitation Reaction Using Compacted α TCP Spheres as Precursor. The 28th annual conference of International Society of Ceramics in Medicine (Bioceramics28), Omni Hotel, Charlotte, North Carolina, USA, 2016, 10.18-21.

Kanji Tsuru, Melvin L. Munar, Kunio Ishikawa. Fabrication of biphasic bone substitute consisting of calcite and carbonate apatite. International Dental Materials Congress 2016 (IDMC2016), The Stone Hotel, Legian, Bari, Indonesia, 2016, 11.4-6.

土谷 享, Tya Indah Arifta, 都留寛治, 石川邦夫: α TCP を前駆体として調製した炭酸アパタイト多孔体による骨再建, 第 20 回生体関連セラミックス討論会(大阪府吹田市, 大阪大学銀杏会館), 2016 年 12 月 2 日。

都留寛治, 石川邦夫: 炭酸アパタイトの骨置換を促進する連通多孔体デザイン, 日本機械学会第 29 回バイオエンジニアリング講演会(ウインクあいち, 名古屋市), 2017 年 1 月 19-20 日。

Kanji Tsuru. Design and Fabrication of Artificial Bone Substitute for Improving Quality of Life, The 3rd seminar for Young Researchers, Kyutech, Wakamatsu Campus, Kitakyushu, 2017.02.06 (Invited).

Tya Indah Arifta, Melvin L Munar, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa. Porous CO₃Ap Block as Bone Substitute and Initial Evaluation in Vivo 平成 29 年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー, 北九州市旧大阪商船海峡ロマンホール(北九州市), 2017 年 8 月 18-19 日。

Kanji Tsuru, Ayami Yoshimoto, Masayuki Kanazawa, Yuki Sugiura, Yasuharu Nakashima, Kunio Ishikawa. Preparation and Characterization of Carbonate Apatite Block using DCPD Block as a Precursor. IU-MRS 2017, Yoshida Campus. Kyoto University, Kyoto, Japan. 2017, 8.27-9.1.

Kanji Tsuru. Design and Fabrication of Artificial Bone Substitute for Improving Quality of Life (QOL). The 4th Seminar for

Young Researchers, Japan-Asia Youth Exchange Program in Science, Fukuoka Dental College, 2018.2.5.

〔図書〕（計1件）

Kanji Tsuru, Yuki Sugiura and Kunio Ishikawa
Bone Cements Utilized for the Reconstruction of Hard Tissue: Basic Understanding and Recent Topics (Chapter 6). In Bio-Nanoceramics for Healthcare Applications. Edited by Thian Eng San, Jie Huang and Mamoru Aizawa. World Scientific, 2017; pp.151-186.

6. 研究組織

(1)研究代表者

都留 寛治 (TSURU KANJI)

福岡歯科大学・生体工学分野・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