

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月18日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07064

研究課題名(和文) DCPD被覆による炭酸アパタイト連通多孔体の機能向上

研究課題名(英文) Enhancement of the osteoconductivity of carbonate apatite bone replacement by coating its surface with dicalcium phosphate dehydrate

研究代表者

田中 のり子(古賀のり子)(Tanaka, Noriko)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：40778734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：DCPD被覆炭酸アパタイトブロック体の調整と、DCPDの被覆量の最適化、及び生体内での有用性を確認するため、埋入実験を行った。炭酸アパタイト顆粒に酸性リン酸溶液を滴下することにより、十分な強度、高い気孔率を有し、骨伝導が起こる際に細胞侵入しやすいと思われる連通多孔形態を有するDCPD被覆炭酸アパタイトを調整することができた。

得られたDCPD被覆炭酸アパタイト人工骨補填材をラビット脛骨に埋入し生体内での反応を検討した所、埋入後12週においてほとんど全ての材料が吸収され、生体骨に置換されていた。炭酸アパタイトのみと比較すると、明らかにDCPDを被覆した場合の方が良好な生体内吸収性を認めた。

研究成果の概要(英文)：In this study, carbonate apatite covered with dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) was fabricated and its effectiveness was evaluated using experimental animals. First, carbonate apatite covered with DCPD was made by bridging the carbonate apatite granules with DCPD crystals that could be precipitated by exposing the carbonate apatite granules to acidic calcium phosphate solution under loading condition. Fabricated carbonate apatite covered with DCPD has enough compressive strength, high porosity and interconnected porous structure which is suitable for cell penetration in new bone formation. Fabricated carbonate apatite covered with DCPD were implanted in rabbit tibia for 3 and 12 weeks. Twelve-week post implantation, most of the carbonate apatite covered with DCPD at cortical bone area was resorbed and replaced to a new bone. In conclusion, the interconnected porous CO3Ap fabricated in this study have a good potential value to be used in clinics as a bone replacement.

研究分野：矯正歯科学、生体材料学

キーワード：炭酸アパタイト 人工骨補填材 リン酸水素カルシウム

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来に伴い、骨再建術が急増しており、骨形成能が低下している高齢者等においても良好な骨形成が期待できる高機能骨補填材の創製が喫緊の課題である。

申請者らはこれまでに、骨に学ぶという観点から骨補填材の開発研究を行い、骨の無機組成、および、骨の構造に着目した研究を実施してきた。

骨の組成に関しては、骨の無機組成が水酸アパタイト(HAp)ではなく炭酸基を含む炭酸アパタイト(CO₃Ap)であることに着目し、前駆体を利用した溶解析出型組成変換で調製した炭酸アパタイトと水酸アパタイトを比較し、炭酸アパタイトが圧倒的に骨伝導性に優れることを見出した。

骨の構造については、海綿骨が細胞の侵入に最適な連通多孔体であることから、炭酸アパタイト顆粒同士を固定することを考えた。炭酸アパタイト顆粒を酸性リン酸水溶液に浸漬すると表面にリン酸水素カルシウム(CaHPO₄・2H₂O:DCPD)が形成され、リン酸水素カルシウムの橋架けで炭酸アパタイト顆粒が硬化し多孔体が形成される。次に炭酸水素ナトリウム水溶液に浸漬すると、リン酸水素カルシウムが炭酸アパタイトに組成変化する。このようにして調製した炭酸アパタイト多孔体は炭酸アパタイト緻密体に比較して迅速に骨に置換されることがわかった。

炭酸アパタイト連通多孔体調製の予備実験を行っている際に著しく高い骨伝導性を示す結果が得られた場合があった。これは炭酸アパタイト連通多孔体形成の際に、間違えてリン酸水素カルシウム形成のみを行い、その後の炭酸アパタイトへの組成変換を行っていない試料であった。リン酸水素カルシウムは溶解度が高く、生体内においてCa²⁺とPO₄³⁻を周囲に送達する。このCa²⁺とPO₄³⁻の送達が骨伝導性を著しく向上させた可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究においては、リン酸水素カルシウムからのCa²⁺とPO₄³⁻のイオン送達が骨芽細胞を活性化させ、その結果、著しく高い骨伝導性が発揮されるとの作業仮説を設定し、当該仮説を検証する。

作業仮説の検証を目的として、炭酸アパタイト表面へのリン酸水素カルシウム被覆を行う。いずれの場合も、まず、イオン送達を担うリン酸水素カルシウムの形成量を最適化する。また、多孔体の圧縮強さや気孔率などの機械的性質も測定する。さらに、実験動物を用い、炭酸アパタイトを対照として、リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトの骨伝導性を病理組織学的に検索する。

3. 研究の方法

リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイト

ト多孔体の調整

炭酸アパタイト顆粒(100~200 μm)を酸性リン酸カルシウム水溶液に浸漬し、顆粒をリン酸水素カルシウムで橋架けしたリン酸水素カルシウム橋架け炭酸アパタイト多孔体を調製する。次に炭酸ナトリウム水溶液に浸漬し、リン酸水素カルシウムを炭酸アパタイトに組成変換し、炭酸アパタイト多孔体を調製する。一部の試料は、さらに酸性リン酸カルシウム水溶液に浸漬し、炭酸水素カルシウム多孔体表面にリン酸水素カルシウム被覆を行い、リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイト連通多孔体を調製する。炭酸アパタイトを酸性リン酸カルシウム水溶液に浸漬し、炭酸アパタイト表面にリン酸水素カルシウムを形成させる組成変換反応において、形成されるリン酸水素カルシウム量は酸性リン酸カルシウム水溶液の濃度によって制御される。そのため、カルシウム濃度を変動させた酸性リン酸カルシウム水溶液を調製し(0.0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mol/Lリン酸溶液にリン酸カルシウムを過飽和溶解させる)、当該水溶液を用いて、上記多孔体等の調製を行う。

調製された多孔体の組成は粉末X線回折装置および赤外分光分析で行う。表面構造は走査型電子顕微鏡で観察し、多孔体の気孔率や連通性はμCTにより定量化し、多孔体の機械的強さは圧縮強さを指標として定量化する。

リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイト多孔体の病理組織学的検索

[1] 実験動物への骨欠損の作製及び骨補填材の埋入

雄の日本家兎(18週齢)をケタミンとセラクタールの混合麻酔薬にて全身麻酔を行い、頸部の皮膚を切開、周囲の筋肉を剥離し脛骨を露出させる。骨膜を剥離した後、トレフィンバーを用いて直径6mm、深さ5mmの骨欠損を形成する。骨欠損部を、リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイト多孔体、炭酸アパタイト多孔体、で再建し、創を閉じる。術後、患部をイソジンで消毒し、ゲンタマイシンを投与する。埋植期間は術後3、12週とする。

[2] 骨補填材周囲組織の病理組織標本の作製

埋植期間経過後、周囲組織と一塊に試料を摘出し、アルコール脱水、樹脂包埋する。立体的なリン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイト連通多孔体の吸収および骨への置換はマイクロCT(Skyscan1706、東陽テクニカ)および骨梁構造解析装置(3D-BON、ラトックシステムエンジニアリング)を用いて解析する。

リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイト連通多孔体の組織親和性、骨伝導性、骨置換の詳細は病理組織学的に検索する。非脱灰組織切片はVillanueva-Goldner染色を行い、

光学顕微鏡およびオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710、キーエンス) にて観察を行う。

4. 研究成果

リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトの調整

炭酸アパタイト顆粒 (100~200 μm) に酸性リン酸カルシウム溶液を滴下すると、二酸化炭素が勢い良く発生し、炭酸アパタイト顆粒同士が連結できず多孔体化は困難であった。炭酸アパタイトに酸性溶液を反応させると、副生成物として二酸化炭素が発生し、顆粒間に気泡が発生することにより炭酸アパタイト顆粒同士が連結することが阻害されたと考えられた。

よって、反応の際に外部から圧力を加えることで炭酸アパタイト顆粒同士の接触を維持することを考え、酸性リン酸カルシウム溶液を顆粒に滴下する際、圧力を加える事で、多孔体を作成することに成功した。

このようにして得られた硬化体の断面を μCT で確認してみると (図 1)、内部は顆粒間の隙間が連通しており、連通多孔形態を保持していた。また、硬化体の断面を SEM (弱拡大) で観察すると、炭酸アパタイト顆粒の表面に析出物が認められ、リン酸溶液の濃度が上昇するにつれ析出物が増加する傾向が認められた (図 2)。

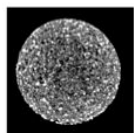


図1 得られた硬化体断面のμCT像

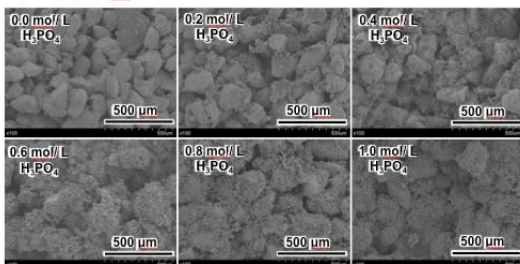


図2 断面のSEM像 (弱拡大)

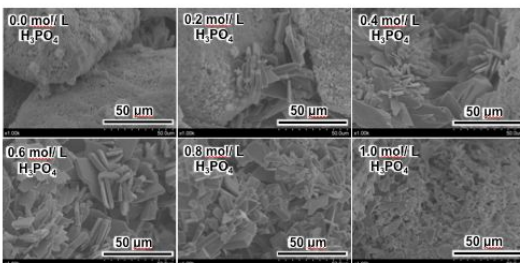


図3 断面のSEM像 (強拡大)

さらに硬化体の断面を SEM (強拡大) で観察すると、炭酸アパタイト顆粒表面、顆粒間に、板状の析出物が認められ、リン酸溶液の濃度が上昇するにつれ、析出物の量が増加していた (図 3)。

得られた試料を XRD で組成分析を行った。

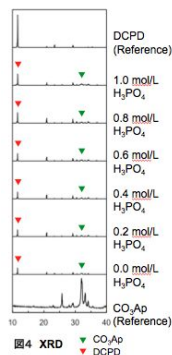


図4 XRD

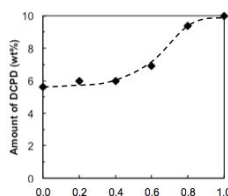


図5 リン酸溶液の濃度とDCPD量

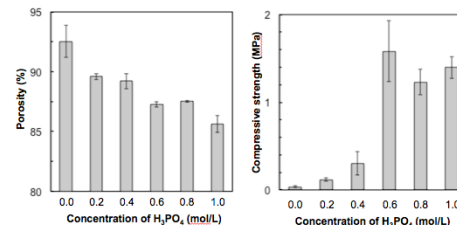


図6 気孔率

全てのリン酸濃度において、炭酸アパタイトとリン酸水素カルシウムのピークが認められ、炭酸アパタイトの表面の析出物はリン酸水素カルシウムであることがわかった (図 4)。さらに XRD の結果から、析出したリン酸水素カルシウム量を定量化すると、リン酸溶液濃度が上昇する程、リン酸水素カルシウムの析出量が増加している傾向が認められた (図 5)。

続いて、得られた DCPD 被覆炭酸アパタイトブロック体の気孔率は、リン酸溶液濃度が上

昇するに従い気孔率が減少した (図 6)。これはリン酸溶液濃度が上昇する程、炭酸アパタイト顆粒間のリン酸水素カルシウムの析出量が増加したためと考えられる。

圧縮強度については、リン酸溶液濃度が 0.4 mol/L 以下では 0.2 MPa 以下であったが、リン酸溶液濃度が 0.6 mol/L の場合に 1.8 ± 0.2 MPa まで増加し、0.6 mol/L 以上では圧縮強度に有意差は認められなかった (図 7)。

これは、炭酸アパタイト間のリン酸水素カルシウム結晶の析出量が一定以上になると、結晶同士の絡み合いにより、ブロック体の強度が増加したためと考えられた。

これは、炭酸アパタイト間のリン酸水素カルシウム結晶の析出量が一定以上になると、結晶同士の絡み合いにより、ブロック体の強度が増加したためと考えられた。

圧縮強度については、リン酸溶液濃度が 0.4 mol/L 以下では 0.2 MPa 以下であったが、リン酸溶液濃度が 0.6 mol/L の場合に 1.8 ± 0.2 MPa まで増加し、0.6 mol/L 以上では圧縮強度に有意差は認められなかった (図 7)。

ラビット脛骨への埋入実験及び in vivo 評価

得られたリン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトブロックと、対照として炭酸アパタイト単独ブロックをラビット脛骨に埋入し、3 週後の μCT 像においては、炭酸アパタイト単独の場合と比較して、リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトの方が良好な生体内吸収性が認められた (図 6)。埋入後 12 週においては、炭酸アパタイト単独およびリン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトの両方で、材料は全て吸収され、新生骨に置換されていた。

Villanueva Goldner 染色像においては、炭酸アパタイト単独の場合、リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトの場合の双方において、良好な生体適合性が認められた。埋入後 3 週において、炭酸アパタイト単独の場合と比較すると、リン酸水素カルシウム被覆炭

酸アパタイトの方が良好な生体内吸収性が認められた(図7)。埋入後12週においては、炭酸アパタイト単独の場合、材料が骨内に残存しており、新生骨の形成量も少なく、骨欠損部が新生骨の置換途中である像が認められたが、リン酸水素カルシウム被覆炭酸アパタイトでは、材料はほぼ全て吸収されており、骨欠損部はすべて十分な量の新生骨で置換されていた。

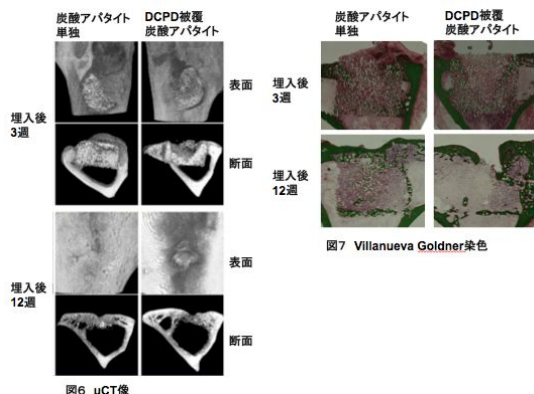


図7 Villanueva Goldner染色

これらの結果から、リン酸水素カルシウムを被覆したことにより炭酸アパタイトの骨伝導性が向上した可能性が示唆されたが、さらに埋入数を増やし、定量的検索(新生骨の形成量、材料の吸収量等)が必要であると考えている。また、埋入12週においては、新生骨への置換が完了していたことから、12週よりも埋入期間を短縮した実験を追加し、リン酸水素カルシウムを被覆したことによりどの程度骨伝導性が向上したかについてより詳細な検索を行うべきと考えている。

また、リン酸水素カルシウムを被覆した事により、周囲組織へのリン酸イオン、カルシウムイオンの送達が増加したかについてICPを用いた追加実験が必要であり、各種イオンが増加したことにより生体内でどのような反応が起こるかについて、骨芽細胞、破骨細胞等を使用した細胞実験を追加する予定である。

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 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：炭酸カルシウムブロックの製造方法
 発明者：石川邦夫
 権利者：同上
 番号：PCT/JP2018/010193

出願年月日：2018/3/15

国内外の別：国内

取得状況(計 0 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

田中のり子(古賀のり子)(TANAKA, Noriko)
 九州大学・大学病院・学術研究員
 研究者番号：40778734

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()