

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390542
 研究課題名 (和文)
 連続気孔構造を有する炭酸アパタイトフォームの顎骨再建材料としての有用性
 研究課題名 (英文) Usefulness as gnathic bone reconstruction material of a carbonate apatite form with continuous porous
 研究代表者
 上山 吉哉 (UEYAMA YOSHIYA)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：00168668

研究成果の概要：本研究は骨再生のために必要な足場として炭酸アパタイトを、さらに細胞として骨髄間質性細胞を用いてその有用性を検討した。炭酸アパタイトには骨芽細胞が侵入するために連続気孔性を付与し、実験動物に埋入すると 4 週間で気孔内に骨の形成を認め炭酸アパタイトの吸収も確認できた。しかし 24 週後も炭酸アパタイトは完全に骨に置換していなかった。さらにこの炭酸アパタイトに骨髄間質性細胞を分化誘導させた細胞を注入すると骨再生の時期は少し早まったが、完全な骨への置換は認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎骨再建, 連続気孔性, 炭酸アパタイト, 生体材料

1. 研究開始当初の背景

口腔外科的疾患の治療により失った顎骨の再建は、咬合回復につながり QOL の観点からも大変重要である。そこで申請者は以前から骨欠損部への骨再生を tissue engineering の基本戦略から、骨再生の足場となる基質や骨再生の場所を確保するための材料について開発研究を行ってきた。すなわち申請者が開発した骨補填材で

ある非崩壊型アパタイトセメント (骨欠損部への足場提供) や、細胞遮断膜としての吸収性アルジネート膜 (骨再生の場の確保) を用いて骨再生に及ぼす影響についてこれまで検討してきた。その結果、アパタイトセメントは生体親和性に優れ骨欠損部の充填には有効であったが、アパタイトの骨への置換は骨と直接接している周囲に認められただけで長期間にわたる観察

においても内部のアパタイトは骨には置換されず残ったままであった。アパタイトセメントは骨欠損部の補填剤としては有用であるが欠損部が骨に置換していないためインプラントの埋入は困難である。また guided bone regeneration(GBR)膜としての吸収性アルジネート膜は、膜に覆われた骨欠損部での骨再生が認められ BGR 膜としての有用性が証明されたので臨床応用可能と考えている。ただ適用には、骨欠損の大きさや欠損部位を考慮する必要があり、特に大きな骨欠損症例では不適である。

これまでの実験結果より、ある程度大きな骨欠損に対して骨再生を行なうには骨補填材を用いた再生医療が必要であると考える。そこで骨補填材内部に骨を誘導するには今までの不連続な穴では外部から進入してくる骨芽細胞と接触できないため骨伝導性や母床骨との結合に全く関与していない。そこで申請者は連続気孔を有する骨補填剤の開発に努め、立体構造を有する発砲ポリウレタンフォームにアパタイトスラリーを含浸、焼結することにより立体構造を持ち連続した気孔を有する多孔性アパタイト焼結体を開発した。そして実際に動物の骨欠損に多孔性アパタイト焼結体を埋入し、経時的に気孔内の骨量を評価した。その結果、気孔内には骨の新生が認められ骨芽細胞の遊走により骨伝導性が高められたと考えられた。さらに多孔性の性質を利用しアパタイト内へ骨形成能を有する骨芽前駆細胞に分化する自己骨髄間質性細胞を播種し骨形成を認めた。しかし多孔性アパタイト焼結体を用いた実験では以下のような問題点が認められた、①長期間の観察でもフレームであるアパタイトはほとんど吸収せず存在してい

た。この結果多孔性アパタイト焼結体は完全には骨に置換せず、母床骨との完全な融合は得られない。また同部へのインプラントの埋入もアパタイトが残留しているため十分なオステオインテグレーションが得られないなど臨床応用しにくく理想的な骨補填材とはいえない。②多孔性アパタイト焼結体内に骨髄間質性細胞の播種を行い骨の形成は認めたものの明らかに骨形成速度を速められたとはいえなかった。

そこで骨に置換する生体材料として骨成分である炭酸アパタイトに注目し、炭酸アパタイトで連続気孔を有する骨補填剤を作成することを考案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで検討してきた多孔性アパタイト焼結体での問題点を解消すべく申請者が考案した連続気孔性を有する多孔性炭酸アパタイトフォームを作製し、連続気孔性炭酸アパタイトフォームを実験動物の骨欠損部に埋入し、経時的に気孔内への骨形成量の測定と共に炭酸アパタイトの吸収速度を検討する。さらに自己骨髄間質性細胞を骨再生の足場である連続気孔性炭酸アパタイトフォームに播種しアパタイト内部での骨形成能について検討する。

3. 研究の方法

(1)連続気孔性炭酸アパタイトフォームの作製・調整

軟質発砲ポリウレタンフォームの気孔をDMF 溶媒で溶解除去する。調整した連続気孔性ポリウレタンフォームにリン酸三カルシウム懸濁液を浸漬し、ウレタンフォームの骨梁表面にリン酸三カルシウムを付着させる。自然乾燥後、フォームを電気炉で加熱するこ

とによりウレタンフォームを焼却するとともにリン酸三カルシウムの焼結がおりフォームを形成する。作製したリン酸三カルシウムフォームを炭酸アンモニウム水溶液とともに水熱処理用ボンベに入れ 200°C のオーブンに 24 時間入れることにより炭酸アパタイトフォームを作製する。

(2) 連続気孔性炭酸アパタイトブロックの物性評価

調整した連続気孔性炭酸アパタイトフォームの組成を X 線回析装置や赤外分光光度計を用いて解析する。また SEM により形態観察するとともに、気孔率を測定する。さらに連続気孔性炭酸アパタイトブロックの圧縮強さなど機械的性質を検討する。

(3) 小動物を用いた経時的な骨形成の組織学的検討

ウサギ大腿骨に歯科用フィッシャーバーで規格化した骨欠損を形成する。骨髓腔まで貫通後、試作した連続気孔性炭酸アパタイトフォームを埋入する。動物埋入後、経時的に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った後、周囲組織と一塊に採取する。そして試料を切断しパラフィン包埋する。その後パラフィン切片を作製し H-E 染色ならびに酵素組織化学的（酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性）、免疫組織化学的染色を行い、顕微鏡で新生骨や炭酸アパタイトの状態を検討する。

(4) 自己骨髓間質性細胞 (BMSC) の分離・培養とその骨形成能の評価

BMSC はウサギ腸骨から骨髓細胞を鋭匙にて約 5ml 採取し、medium を用いて数回継代培養することにより得られる。継代培養して得られた BMSC に骨誘導因子 (β -glycerophosphate, VitaminC) を添加しさらに継代した後に骨芽細胞への分化誘導を確認するため Alkaline phosphate

(ALP) activity を測定する。さらに継代して得られた BMSC の骨形成能を *in vivo* の系で評価する。すなわち、BMSC 培養後、セラミックチューブ内に細胞を添加しヌードマウスの皮下に移植する。一定期間後、ヌードマウスよりセラミックチューブを取り出し組織切片を作成後骨形成をレントゲンで確認する。

(5) BMSC 含有炭酸アパタイトフォームの骨形成能の評価

実験 (4) 条件で BMSC に骨誘導因子を加え分化誘導させた細胞を、ウサギ背中の皮下に移植した炭酸アパタイトフォームに注入して経時的に移植周囲組織を採取し、脱灰標本を作製する。標本から骨の再生状態、炭酸アパタイトの吸収状態を評価する。

4. 研究成果

(1) 連続気孔性炭酸アパタイトフォームの作製・調整

作製した炭酸アパタイトフォームを SEM にて形態観察を行った結果、連続気孔構造（ジャングルジム構造）を有することが確認された（写真 1）。

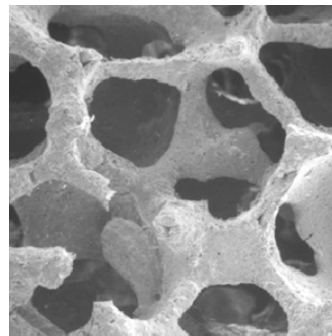


写真 1: SEM

(2) 連続気孔性炭酸アパタイトブロックの物性評価

調整した連続気孔性炭酸アパタイトフォームの組成を X 線回析装置や赤外分光光度計を用いて解析した。その結果、リン酸三カルシウムフォームを炭酸アンモニウム水溶液中で水熱処理することにより炭酸基が存在

しないハイドロキシアパタイトではなく、海綿骨と同じ炭酸アパタイトができていることが確認された。さらに連続気孔性炭酸アパタイトブロックの圧縮強さなど機械的性質を検討したが、非常に脆く操作性に欠けた。作製段階でいろいろと気孔率を変え SEM とで比較検討したが、気孔率 60~70%では SEM で連続した気孔と不連続な気孔との混在が観察された。さらに気孔率を上げて気効率が 90%であれば連続した気孔が観察されるが強度的には大変脆くなった。すなわち強度を得ようとするとき気孔率が低くなり骨芽細胞の侵入が困難となる。そのため実験動物に埋入する炭酸アパタイトフォームは気孔率60~70%の生体材料を用いた。

3. 小動物を用いた経時的な骨形成の組織学的検討

ウサギ大腿骨に骨髓腔まで貫通させた骨欠損を形成し、気孔率が 60~70%の連続気孔性炭酸アパタイトフォームを埋入した。その後経時的に試料を採取し組織学的に検討を行った。その結果、4 週目ですでに炭酸アパタイト内に骨形成が認められアパタイト周囲に TRAP 染色陽性細胞（破骨細胞）が出現して炭酸アパタイトの一部が吸収され骨に置換されていた(写真 2)。

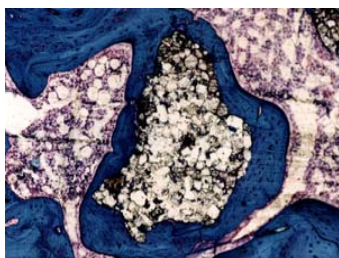


写真 2：8 週目（フキシナーメチレンブルー染色）

その後 24 週目まで検討を行った。その結果 4 週目よりは骨への置換が進んでいたが 12 週目以降は炭酸アパタイトの吸

収がほとんど起こっておらず骨への完全置換は認められなかった。

3. 自己骨髓間質細胞 (BMSC) の骨形成能

BMSC に骨誘導因子 (β -glycerophosphate, Vitamin C) を添加し継代すると ALP activity が上昇することより、BMSC から骨芽細胞への分化誘導が起こっていることが確認された(写真 3)。

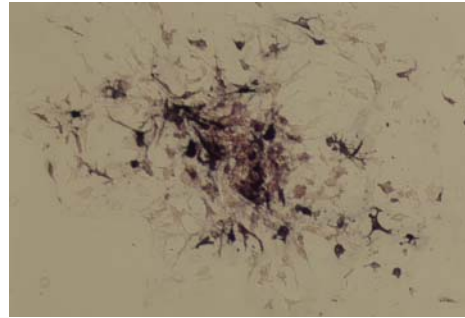


写真 3：ALP activity

そこで同様に BMSC に骨誘導因子を添加、継代培養したのちに、ヌードマウスの皮下に移植したところレントゲンの骨の形成が確認された。

4. BMSC含有炭酸アパタイトフォームの in vivoでの骨形成能

BMSCに骨誘導因子を添加し分化誘導後、ウサギ背中の皮下に移植した炭酸アパタイトフォームに注入して BMSCの添加の有無による骨形成を評価した。その結果BMSCの添加の有無にかかわらず24 週までは完全な骨置換は認められなかった。またBMSCを添加することによってわずかに骨の形成が早まったが結果的には明らかな相違は見出せなかった。

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 5 件)

- ① Karashima S, Takeuchi A, Matsuya S, Udou K, Koyano K, Ishikawa K: Fabrication of low-crystallinity hydroxyapatite foam based on the setting reaction of α -tricalcium phosphate foam. *J*

Biomed Mater Res A, 88: 628-633, 2008. 査読有

- ② Wakae H, Takeuchi A, Udoh K, Matsuya S, Munar M, LeGeros RZ, Nakasima A, Ishikawa K: Fabrication of macroporous carbonate apatite foam by hydrothermal conversion of α -tricalcium phosphate in carbonate solutions. *J Biomed Mater Res A*, 87: 957-963, 2008. 査読有
- ③ Matsuya S, Lin X, Udoh K, Nakagawa M, Shimogoryo R, Terada Y, Ishikawa K: Fabrication of porous low crystalline calcite block by carbonation of calcium hydroxide compact. *J Mater Sci: Mater Med*, 18, 1361-1367, 2007. 査読有
- ④ Munar ML, Udoh K, Ishikawa K, Matsuya S, Nakagawa M: Effects of sintering temperature over 1,300° C on the physical and structural properties of porous hydroxyapatite foam. *Dent Mater J*, 25: 51-58, 2006. 査読有
- ⑤ Ueyama Y, Koyama T, Ishikawa K, Mano T, Ogawa Y, Nagatsuka H, Suzuki K: Comparison of ready-made and self-setting alginate membranes used as a barrier membrane for guided bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 17: 281-288, 2006. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 大東文和, 竹内あかり, 都留寛治, 松家茂樹, 寺田善博, 石川邦夫. 炭酸カルシウム-第二リン酸カルシウム混合物の水熱処理による炭酸アパタイトブロックの調製—第2報—. 第53回日本歯科理工学会学術講演会 タワーホール船堀 東京都江戸川区 2009.4.11-12.
- ② Mano T, Mori Y, Uchida K, Horinaga D, Ueyama Y: The relationship between jaw deformity and scoliosis. The 19th Congress of the European Association for Cranio-Maxillofacial Surgery, September 9th-12th 2008, Bologna, Italy.
- ③ Ishikawa K: Development of synthetic bone replacement. University of Phillipine Biomaterials Seminar, September 9th 2008, University of Phillipine, Manila, Philippines.
- ④ Ueyama K: Identification of sentinel lymph node using computed tomographic lymphography in oral cancer. The 46th Congress of Korean Association of Maxillofacial Plastic and

Reconstructive Surgery, November first-second 2007, Inter-Burgo Hotel, Daegu, Korea.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上山 吉哉 (UEYAMA YOSHIYA)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00168668

(2) 研究分担者

有働 公一 (UDOH KOUICHI)

山口大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 60145266

真野 隆充 (MANO TAKAMITSU)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 80325125

(3) 連携研究者

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 90202952