

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

関番号：16101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592260
 研究課題名（和文） 骨置換性炭酸アパタイトの既成スペーサーを用いた骨移植を必要としないサイナスリフト
 研究課題名（英文） Sinus floor elevation put in ready-made spacer build up with low crystalline carbonate apatite and without bone graft.
 研究代表者
 藤澤 健司（FUJISAWA KENJI）
 徳島大学・病院・講師
 研究者番号：40228979

研究成果の概要（和文）：われわれは水酸化カルシウムを出発物質として、焼結反応なしに低結晶性炭酸アパタイトの開発に成功している。炭酸アパタイトの粒径の違いによる吸収と骨形成に及ぼす影響を検討したところ、顆粒径の小さいものほど吸収が大きく、また骨形成が大きくなることが示された。さらにウサギのサイナスリフトの実験では、骨置換性と吸収性に優れ、骨補填材として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in developing low crystalline carbonate apatite from calcium hydrate without sintering. We searched the effect of particle size of the carbonate apatite on the resorption of the particle and the bone formation. The degree of decrease the particle size was much in small particle than large particle. The amount of bone formation was much in small particle than in large particle. And we used carbonate apatite as rabbit sinus lift materials, exhibited the materials useful for the bone defect with absorbed and replace with bone.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：炭酸アパタイト サイナスリフト スペーサー

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療の際に上顎臼歯部は骨量が少ないため、適応が難しい場合が多い。その解決法として、サイナスリフト（上顎洞底挙手術）を併用しなければならないことがしばしばある。従来のサイナスリフトは骨移植を行なうか、骨補填材を使用する必要があった。骨移植には骨採取部の侵襲や合併症、

使用できる骨の量などの多くの問題がある。人工の骨補填材としては、ヒト凍結脱灰乾燥骨や Bio-Oss（ウシ由来骨補填材）も使用されるが、HIV やプリオンなどの感染症の問題がある。また、ハイドロキシアパタイト（HAP）は非吸収性のため異物として永久に残存する。リン酸三カルシウム（TCP）は吸収性であるが、元来体内には存在しない物質で、そ

の吸収も完全ではなく時に炎症を惹起する。

そこで、われわれは、予め何かの材料で上顎洞底を挙上するスぺーサーを作っておいて、これを上顎洞底に挿入する方法が、簡単で確実性が高いと考えた。そしてその材料としては、われわれがこれまで開発を行ってきた骨置換性の炭酸アパタイトが最良であると考えた。われわれが開発した骨置換性炭酸アパタイトは、HAP に5～8%の炭酸基を含有させた新規のバイオマテリアルである。HAP は生体内で吸収されないが、アパタイトからできている骨が吸収と添加をうけるといふ性質の違いは、骨のアパタイトが炭酸基を含んだ炭酸アパタイトを5～8%含有していることと、その結晶性が低いためである。炭酸アパタイトを骨再建に応用する場合、ある程度の強度と形態が必要になる。そのためには、これまで高温の焼結にて焼き固めるしか方法がなかった。しかし焼結によって、炭酸基が消失するとともに、結晶性が上がり、体内での吸収性が低下する。われわれは、水酸化カルシウムを出発物質として、相析出反応を利用することによって、焼結過程なしに炭酸アパタイト硬化体を作製することに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、炭酸アパタイトのスぺーサーを開発し、その骨置換性と骨伝導性を評価し、臨床応用の可能性について検討することを目的としている。

(1) 炭酸アパタイトで各種スぺーサーを試作する。

(2) 試作したスぺーサーの吸収性、骨伝導性を培養系と動物実験にて評価する。

(3) 3種類程度のスぺーサーを選択して、実際にウサギのサイナスリフトに応用してその有効性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 炭酸アパタイトスぺーサーの試作

炭酸アパタイトの合成は、水酸化カルシウム (Ca(OH)_2) を出発物質として開始する。 Ca(OH)_2 粉末をステンレス製モールドに入れ、油圧プレス機で一軸加圧成型し、ディスクを作製する。成型したディスクを室温での飽和水蒸気を含む CO_2 ガスを流通させたデシケータ中で3日間放置して、炭酸化をはかる。その後、リン酸水溶液中で一定期間放置して、リン酸化を行い、炭酸アパタイトを調整する。なお、対照とするハイドロキシアパタイトは、ハイドロキシアパタイト粉末を加圧成形し、通法に従って 1280°C で焼結して作製する。

(2) 試作した炭酸アパタイト・スぺーサーの機械的強度および内部の評価

試作した炭酸アパタイト硬化体の機械的

強度を万能試験機にて測定する。さらに切断面を走査型電子顕微鏡で観察し、気孔率を測定する。

(3) 培養骨髄細胞の骨芽細胞への分化能を指標として炭酸アパタイト・スぺーサーのスクリーニング

試作した種々の炭酸アパタイト・スぺーサーが骨髄細胞の骨芽細胞への分化に及ぼす影響を検討することによって、動物実験の試料として有望な5種類程度のスぺーサーを選定する。近交系ラットの大腿骨から骨髄細胞の細胞懸濁液を調整し、作製した各種のスぺーサーの上に播種し、培養を行なう。経時的に細胞増殖、アルカリフォスファターゼ活性、タイプIコラーゲン合成、オステオカルシン産生を測定し、細胞レベルにおける骨形成に関する指標としては評価を行い、適切な炭酸基含有量、結晶性などのスクリーニングを行なう。対照群としてはハイドロキシアパタイトを用いる。

(4) ラットおよびウサギ皮下における生体親和性と吸収速度の評価

上記実験で選定した5種類の炭酸アパタイトを、ラットあるいはウサギの皮下に移植して生体親和性を評価する。試料を取り出し、中性管緩衝ホルマリンにて固定後、脱灰し、パラフィン切片を作製、病理組織学的に評価する。また、一部の試料はリゴラックに包埋して非脱灰切片を作製する。NIH image とマイクロCTを用いて、吸収状態を評価する。

(5) ウサギのサイナスリフト実験にて術式および炭酸アパタイト・スぺーサーの有用性を評価する。

3種類の炭酸アパタイト・スぺーサーを用いて、ウサギのサイナスリフト実験を行なう。術後顎骨を含めて試料を摘出し、摘出した試料は、まず、マイクロCTをと骨梁構造解析装置を用いて、骨形成量と炭酸アパタイトの骨置換を定量的に解析する。試料を固定後、テクノビット樹脂に包埋して、非脱灰切片を作製する。骨の新生速度は、テトラサイクリン、カルセイン、キシレノールオレンジなどの骨ラベリング法に検討する。また、炭酸アパタイトと骨との界面はEBSP (Electron Back Scatter Diffraction Pattern) 解析装置付走査型電子顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

(1) 炭酸アパタイトの粒径の違いの影響

顆粒状の炭酸アパタイトの粒径の違いが、炭酸アパタイトの吸収や骨形成に及ぼす影響を組織学的に検討した。

試料は、粒径 $300\text{--}600\ \mu\text{m}$ 、 $600\text{--}1000\ \mu\text{m}$ 、

1000-1400 μm の 3 種類の顆粒状の炭酸アパタイトを用いた。実験動物には15週齢の雄性日本白色ウサギを用いて、大腿骨遠位端に径 5mm、深さ8mmの埋入窩を形成し、各試料を充填した。埋入、2、4、12週後に摘出し組織学的検討を行った。いずれの炭酸アパタイト顆粒においても、埋入後から経時的に顆粒径が小さくなり、顆粒の吸収が観察された。顆粒径の減少は、300-600 μm の顆粒が最も小さく、1000-1400 μm が最も大きかった。すなわち、顆粒径が小さいほど、顆粒の吸収が大きくなる傾向がみられた。骨形成については、埋入初期では既存骨辺縁から顆粒に向かって少量の骨形成がみられたが、埋入12週後では、埋入窩中心部にまで新生骨が認められた。また、顆粒を含む周囲の骨組織には骨髓の形成もみられた。骨の形成量は、顆粒径が小さいほど、多くなる傾向がみられた。以上のことから、炭酸アパタイトの粒径は、その吸収性と骨形成に影響することが明らかとなった。

(2) ウサギサイナスリフトにおける炭酸アパタイトの挙動について

ウサギを使用してサイナスリフトを行い炭酸アパタイト顆粒の移植実験を行なった。日本白色ウサギ 10 週齢、体重3.5-4.0Kgを用いた。上顎洞底挙上モデルは、Watanabe らの方法に準じて作製した (Watanabe K, Niimi A, Ueda M: Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **88**(1):26-32, 1999)。洞粘膜を挙上してできたスペースに炭酸アパタイト顆粒 (粒径300-500 μm) を充填し、術後2週、4週、12週後に顎骨を含めて試料を摘出した。対照として、 β -TCPとハイドロキシアパタイト (HAP) を使用した。

摘出した試料は、まず、マイクロCTと骨梁構造解析装置を用いて、骨形成量と炭酸アパタイトの骨置換を定量的に解析した。試料を固定後、テクノビット樹脂に包埋して、非脱灰切片を作製した。骨の新生速度は、テトラサイクリン、カルセイン、キシレノールオレンジなどの骨ラベリング法にて検討した。組織写真では、顆粒周囲に新生骨の形成が認められた。炭酸アパタイトは粒径の類円形の変化が認められた。 β -TCPは顆粒の形態は吸収による形態変化が著明であった。HAPは顆粒の形態変化はほとんど認められなかった。本研究から、炭酸アパタイトは骨置換性と吸収性にすぐれ、サイナスリフトの補填剤として有用であることが明らかとなった。

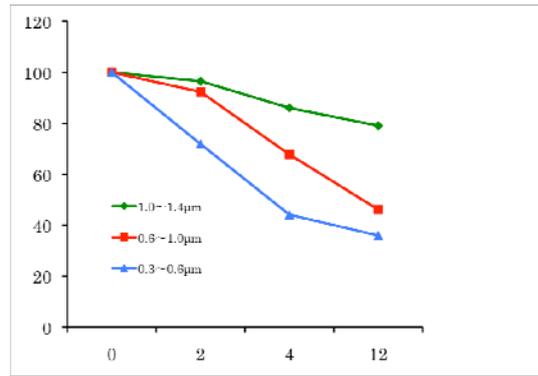


図1 顆粒サイズの経時的变化 (縦軸は大きさ% 横軸は週)

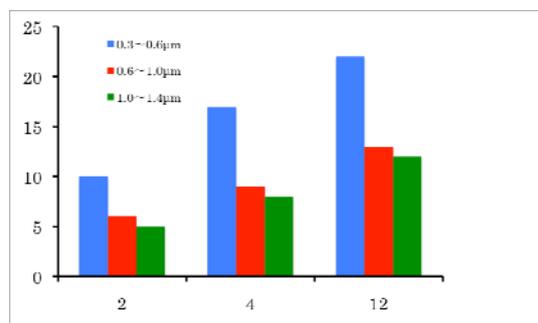


図2 骨占有率の経時的变化 (縦軸は% 横軸は週)

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3件)

- ① 原 香苗、ゼラチン複合型炭酸アパタイトフォームの創製、2012, 11, 26, 第34回 日本バイオマテリアル学会、仙台国際センター (仙台市)
- ② 藤澤 健司、低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究第5報 -炭酸アパタイトの顆粒径が組織反応に及ぼす影響-、2010, 11, 30, 第32回 日本バイオマテリアル学会、グランドプリンスホテル広島 (広島市)
- ③ 湯浅 哲也、低結晶性炭酸アパタイトの顎骨再建への応用に関する基礎的研究第4報 -炭酸アパタイトのイヌ顎骨内での組織反応-、2010, 11, 30, 第32回 日本バイオマテリアル学会、グランドプリンスホテル広島 (広島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤澤 健司 (FUJISAWA KENJI)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：40228979

(2) 研究分担者

宮本 洋二 (MIYAMOTO YOUJI)
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：20200214

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：90202952

湯浅 哲也 (YUASA TETSUYA)
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：70332822