

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463137

研究課題名(和文)ゼラチン複合型炭酸アパタイトフォームの創製と顎骨再生への応用

研究課題名(英文) Fabrication of gelatin-coated carbonate apatite foam and its application on reconstruction of jaw

研究代表者

藤澤 健司 (Fujisawa, Kenji)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：40228979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ゼラチンを用いて臨床応用可能な強度を備えた炭酸アパタイトフォームを開発し、顎骨再生医療に応用することを目的とした。ポリウレタンのスポンジを鋳型として作製した炭酸アパタイトフォームはX線回折およびフーリエ変換赤外分光光度計による解析で、アパタイト構造を有しており、B-typeの炭酸基とリン酸基のピークを有した。ゼラチン複合後もその構造を維持していた。走査型電子顕微鏡像において、フォームの気孔構造は保たれていた。圧縮強度はゼラチン濃度の上昇とともに増加したが、熱架橋の影響はなかった。熱架橋をしていないゼラチンを含んだフォームは、生食中で崩壊したが、熱架橋をしたフォームは安定であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, carbonate apatite (CO3Ap) foam was reinforced with gelatin and the effect on the resulting physical characteristics was evaluated to understand the potential value of gelatin-reinforced CO3Ap as a bone replacement. SEM images showed interconnected porous structures similar to cancellous bone were observed. XRD patterns and FT-IR spectra showed that all the specimens exhibited typical apatitic patterns and CO3Ap foam formed was B-type CO3Ap, in which the PO43- lattice site was substituted by CO32-, similar to the bone mineral apatite. The mechanical strength of gelatin-reinforced CO3Ap foam was increased significantly with the gelatin concentration. Heat treatment to cross-link the gelatin had showed little effect on the mechanical strength. However, the gelatin-reinforced CO3Ap could not maintain its shape when immersed in saline because of the swelling of saline with gelatin, and the heat treated gelatin reinforced CO3Ap was stable in the saline.

研究分野：口腔外科学

キーワード：炭酸アパタイト

1. 研究開始当初の背景

顎骨再建や骨造成には、これまで自家骨移植が行われてきた。しかし採取できる骨の量には限りがあり、形態も制限されるため、広範囲の骨欠損を再建することは困難である。この問題を解決するために、種々の生体材料や生体材料を scaffold (細胞の足場) とする再生医療の研究が盛んに行われている。骨再建用の生体材料としては、リン酸三カルシウム (TCP) やハイドロキシアパタイト (HAP) がすでに臨床応用されている。TCP は吸収性の生体材料ではあるが、元来体内に存在しない物質で、吸収も不完全であり、時に炎症を惹起する。一方、焼結体である HAP は優れた骨伝導性を示すものの、体内で吸収されず、再生された骨の中に異物として残るといった重大な欠点がある。この問題を解決するためには、生体吸収性で骨伝導性を持った材料の開発が不可欠である。骨も HAP も同じアパタイトであるが、生体内では骨は吸収され、HAP は吸収されない。この違いは、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% 含んでいることと、結晶性が低いことが大きく影響している。炭酸アパタイトを顎骨再建や骨造成に応用する場合、ある程度の強度と形態を付与することが必要であり、そのためには焼結が必要である。しかしながら、焼結操作によって、炭酸アパタイトの炭酸基が消失するとともに、アパタイトの結晶性があがってしまい、結果として生体内での吸収性を低下させることとなる。そこで、われわれは、水酸化カルシウムを出発物質として、炭酸化とリン酸化を行うことによって、焼結操作なしに低結晶性の炭酸アパタイト硬化体を作製する方法を開発した。さらに、この焼結操作なしに作製した低結晶性炭酸アパタイトが生体内で吸収されて骨に置換されること、また培養系で骨芽細胞の分化を促進することを明らかにしてきた。これらの結果から、われわれが開発した低結晶性炭酸アパタイトは生体吸収性の骨再建材料として期待できる。

2. 研究の目的

われわれのこれまでの実験では、顆粒状やブロック状の炭酸アパタイトを使用してきたが、臨床応用を考えると、より生体に近い形態が理想的である。実際的大海綿骨は気孔構造を持っていることから、われわれは低結晶性炭酸アパタイトにこの気孔構造を付与することを考え、その作製法を開発した。気孔構造によって、より生体に近い形で細胞の遊走や増殖、血管新生などが再現できると考えたが、気孔構造を付与した炭酸アパタイト (炭酸アパタイトフォーム) は極端に強度が

弱く、手で持っただけで崩れてしまう。臨床応用を考えると、フォームの強度を上げることが不可欠である。

そこで、本研究では、臨床応用に耐えうる強度をもった炭酸アパタイトフォームの作製法を開発し、それを骨再生医療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 炭酸アパタイトフォームの作製

炭酸アパタイトフォームはポリウレタンのスポンジを鋳型として用いて作製する。ポリウレタンスポンジを炭酸カルシウムとリン酸水素カルシウムの混合溶液に浸漬して、スポンジの梁構造のまわりに混合液を付着させる。60 で 1 晩乾燥させた後、400 に加熱するとポリウレタンが焼却されて、中空の梁構造が残る。さらに 1500 まで加熱すると、焼結反応が生じ、炭酸カルシウムとリン酸水素カルシウムから -TCP が生成する。これにより、ポリウレタンスポンジと同じような形を持つ、-TCP フォームを作製する。次に、この -TCP フォームを 4mol/L 炭酸アンモニウム溶液に浸漬させて、200 で水熱処理を行うと、炭酸化が起こり、-TCP が炭酸アパタイトに変換され、炭酸アパタイトフォームができる。この作製法で作製した炭酸アパタイトフォームのアパタイト構造をエックス線回折にて解析し、炭酸基の含有についてフーリエ変換赤外分光光度計にて行う。また、圧縮強度を万能試験機にて測定する。さらに、フォームの表面性状を走査型電子顕微鏡で観察する。

(2) ゼラチンによる炭酸アパタイトフォームの強化

実験(1)の方法で作製した炭酸アパタイトフォームは、Wakae らの従来法と比べて強度が高いことが予想されるが、臨床応用には強度が不足していると考えられるため、ゼラチンによるフォームの強化を図る。

フォームを 60 のゼラチン溶液に 1 時間浸漬させた後、60 にて十分に乾燥させ、155 にて 4 時間、熱架橋処理 (Heat treatment; HT) を行う。この架橋処理によって、ゼラチン分子間に結合が生じ、ゼラチンは溶けにくく、強度が向上する。ゼラチン濃度を 0, 10, 20, 30% として、炭酸アパタイトフォームを作製し、圧縮強度と気孔率を測定する。また、ゼラチン複合後のアパタイト構造と炭酸基の含有量を評価する。

4. 研究成果

(1) X 線回折による解析

作製したゼラチン型炭酸アパタイトフォームの結晶構造および炭酸基含有を評価した。

図1に、(a)ゼラチンを含まない炭酸アパタイトフォーム (b)30%ゼラチンにて被覆した炭酸アパタイトフォームで熱架橋をしていないもの (c)30%ゼラチンで被覆した炭酸アパタイトフォームで熱架橋したもののX線回折を示す。いずれも炭酸アパタイトフォームはアパタイト構造を有しており、ゼラチンの有無や熱架橋の有無による差はみられなかった。

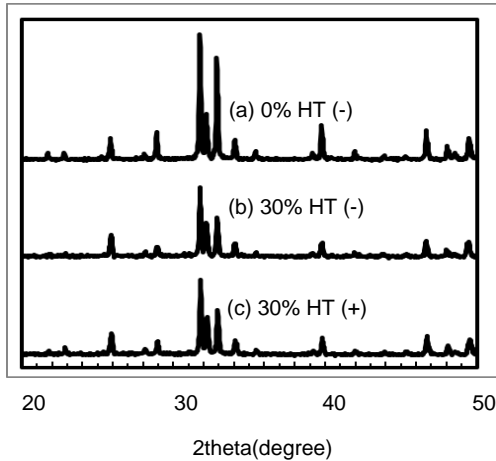


図1 X線回折

(2)フーリエ変換赤外分光光度計による解析

図2に(a)ゼラチンを含まない炭酸アパタイトフォーム (b)30%ゼラチンにて被覆した炭酸アパタイトフォームで熱架橋をしていないもの (c)30%ゼラチンで被覆した炭酸アパタイトフォームで熱架橋したもの (d)ゼラチンを熱架橋したもの (e)ゼラチンを熱架橋していないものをそれぞれフーリエ変換赤外分光光度計で解析した結果を示す。(a), (b), (c)はいずれもB typeの炭酸基のピークを1410, 145, 875 cm^{-1} に認め、980-1100 と 560-600 cm^{-1} にリン酸基のピークを認めた。

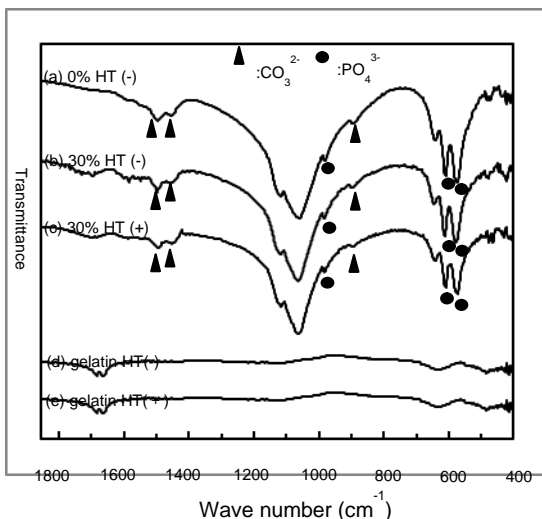


図2 フーリエ変換赤外分光光度計解析

一方、ゼラチンは明らかなピークを認めなかった。

(3)SEMによる形態観察

表3に炭酸アパタイトフォーム表面の走査型電子顕微鏡写真を示す。ゼラチンの濃度や熱架橋の有無に関係なく、炭酸アパタイトフォーム表面の気孔構造は保たれていた。熱架橋の有無による形態の違いは明らかではなかった。

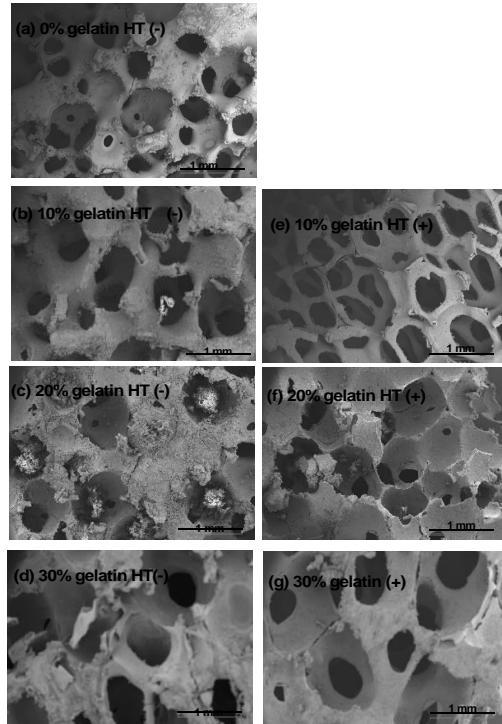


図3 炭酸アパタイト表面のSEM所見

(4)圧縮強度

図4に炭酸アパタイトフォームの圧縮強度を示す。被覆するゼラチンの濃度が高くなると圧縮強度は上昇し、30%ではゼラチンを含まないものに比較して約40倍の強度に上昇した。熱架橋の有無による影響はなかった。

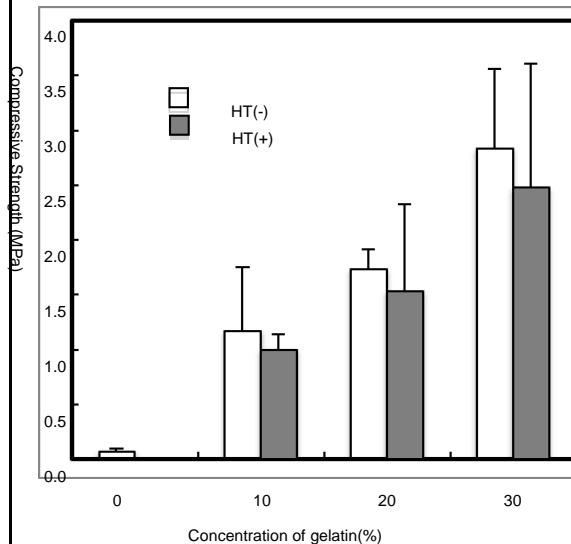


図4 圧縮強度

(5)生理食塩中での安定性

図5に、(a)ゼラチンを含まない炭酸アパタイトフォーム (b)30%ゼラチンにて被覆した炭酸アパタイトフォームで熱架橋をしていないもの (c)30%ゼラチンで被覆した炭酸アパタイトフォームで熱架橋したものを 生食中に 24 時間浸漬した後の写真を示す。熱架橋をしたものは、生食に浸漬しても形態が崩れず安定していたが、熱架橋をしていないゼラチンを含んだフォームは、生食中で形態を維持できず、崩壊した。これに対して、熱架橋をしたフォームは生食中で安定であった。

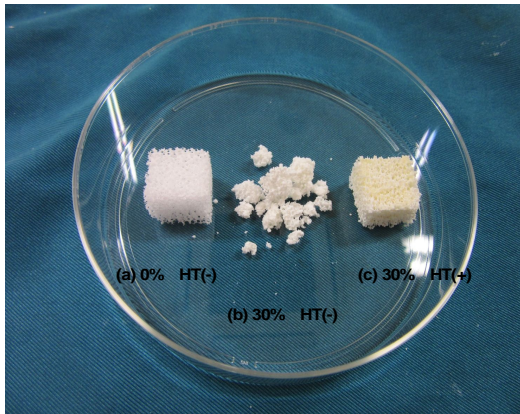


図5 生食中に 24 時間浸漬後の所見

以上の結果から熱架橋処理を行ったゼラチンによって臨床応用が可能な強度を有し、かつ生体内でも形態的に安定な炭酸アパタイトフォームが創製できた。今後、生体内での挙動を観察し、骨再建材料としての可能性について評価する予定である。

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)

[学会発表](計 9 件)

大江 剛, 鎌田久美子, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二: 低結晶性炭酸アパタイトを用いた骨再生療法に関する基礎的研究 第 19 回日本顎顔面インプラント学会 2015 年 11 月 28-29 日 メルキュールホテル横須賀 横須賀市 神奈川県

藤澤健司, 永井宏和, 高丸菜都美, 大江剛, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二: ゼラチン複合型炭酸アパタイトフォームの物理学的評価. 第 37 回日本バイオマテリアル学会 2015 年 11 月 9-10 日 京都エルサ 京都市 京都府

永井宏和, 藤澤健司, 大江 剛, 小林真左子, 高丸菜都美, 工藤隆治, 玉谷哲也, 宮本洋二: 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 第 1 報 イヌ歯槽骨欠損部への移植. 第 60 回日本口腔外科学会 2015 年 10 月 16-18 日 名古屋国際会議場 名古屋市 愛知県

永井宏和, 藤澤健司, 都留寛治, 石川邦夫,

宮本洋二: 低結晶性炭酸アパタイトの骨再建への応用 イヌ顎骨に作製した骨欠損部への移植. 第 45 回日本口腔インプラント学会 2015 年 9 月 21-23 日 岡山シンフォニーホール 岡山市 岡山県

小林真左子, 永井宏和, 藤澤健司, 都留寛治, 石川邦夫, 山中克之, 熊谷知弘, 宮本洋二: 炭酸アパタイト被覆炭酸カルシウムを用いたハイブリッド型骨補填材料による骨再生の試み. 第 36 回日本バイオマテリアル学会 2014 年 11 月 17-18 日 タワーホール船堀 東京都 江戸川区

小林真左子, 永井宏和, 原 香苗, 鎌田久美子, 工藤隆治, 藤澤健司, 宮本洋二: 炭酸アパタイト被膜炭酸カルシウムを用いた新規骨置換材料による骨再生の試み. 第 59 回日本口腔外科学会 2014 年 10 月 17-19 日 幕張メッセ 千葉市 千葉県

Masako Kobayashi, Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Kenji Fujisawa, Daisuke Uchida, Tetsuya Tamatani, Youji Miyamoto: Nobel Bone Regeneration System Using Carbonate Apatite-coated Carbonate Calcium in Vivo. American association of Oral Maxillofacial Surgeons 96th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition, September 8-13, 2014. Hawaii Convention Center, Honolulu, USA.

Hirokazu Nagai, Kanae Hara, Masako Kobayashi, Go Ohe, Tetsuya Tamatani, Kenji Fujisawa, Youji Miyamoto: Application of Low Crystalline Carbonate Apatite Combined With BMP-2 to Bone Reconstruction. American association of Oral Maxillofacial Surgeons 96th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition September 8-13, 2014. Hawaii Convention Center, Honolulu, USA.

永井宏和, 原 香苗, 小林真左子, 藤澤健司, 都留寛治, 山本克史, 石川邦夫, 宮本洋二: 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 6 報 BMP-2 との併用効果. 第 35 回日本バイオマテリアル学会 2013 年 11 月 25-26 日 タワーホール船堀 東京都 江戸川区

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・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 20200214

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号: 50282190

都留 寛治 (TSURU, Kanji)
九州大学・歯学研究院・准教授
研究者番号： 50314654