

平成30年6月1日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11206

研究課題名(和文) 生体吸収性を制御した TCPインジェクタブル骨補填材の創製

研究課題名(英文) Fabrication of bioabsorbable alpha-betaTCP composite injectable bone substitute material

研究代表者

丸田 道人 (Maruta, Michito)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：40507802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、alpha TCP が 1050度以下でbeta TCP に相転移することに着目した。相に 相を析出させることにより溶解速度の制御を可能にする手法を検討した。alpha TCPを一定温度で処理することにより、alpha TCP球にベータ相を析出させることができた。また得られたalpha-beta複合型 TCP を、臨床で利用可能なヒアルロン酸等と組み合わせることでシリンジを用いた簡便な充填と骨補填材漏出の防止し骨再生の促進を示す知見を得られた。今後さらに小球自体の結晶性をコントロールすることで、埋入後1ヶ月程度で自壊し、その隙間を利用して新生骨の形成を促進する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the fact that alpha TCP easily transformed to beta-TCP at 1050 degrees [Celsius]. or lower. We established a new method to control dissolution rate by precipitating beta phase in alpha phase by changing processing temperature and time. By treating alpha TCP at a prescribed temperature, it was possible to precipitate the beta phase in the alpha TCP sphere. In addition, by combining the obtained alpha-beta complex type TCP with clinically available hyaluronic acid and the like, the results obtained in this study indicated that simple filling using a syringe and prevention of leakage of bone substitute material and promotion of bone regeneration was obtained. In the future, by further controlling the crystallinity of the small spheres themselves, self-destruction occurred in about one month after implantation, indicating the possibility of promoting the formation of new bone using the gaps.

研究分野：歯科理工学

キーワード：アパタイト 相変換 複合材料

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸三カルシウム( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )は現在市販され臨床応用されている骨補填材の基本成分である。しかしながら、溶解速度の制御が課題であった。リン酸三カルシウムには、高温安定相の $\alpha$ TCPと低温安定相の $\beta$ TCPがある。 $\alpha$ TCPは溶解が早く、スペースメイキングに劣るため新生骨の形成が十分に行われない。一方、生体吸収性材料であるにもかかわらず $\beta$ TCPは骨への置換速度が遅いという問題を抱えていた。本研究では、 $\alpha$ TCPが $1050^\circ\text{C}$ 以下で $\beta$ TCPに相転移することに着目した。処理温度・時間を変化させ $\alpha$ 相に $\beta$ 相を析出させることにより溶解速度の制御を可能にする手法について研究を行った。 $\alpha$ TCPと $\beta$ TCPは同じ化学式( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )で表されるが、生体内溶解性が大きく異なる。ハイドロキシアパタイト(HAp)の生体内溶解性を1とすると、 $\alpha$ TCPがHApの10倍なのに対して、 $\beta$ TCPは高々2倍程度である。

HApが生体内でほとんど溶解しないことを考慮すれば、 $\beta$ TCPが埋入後半年経過しても完全には溶解されず、新生骨に置換していないことが多いのは当然である。溶解性を向上させるために粒子の微細化・多孔質化による表面積の拡大が行われているが、本質的な解決には至っていない。

リン酸三カルシウム( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )は現在市販され最も臨床応用されている骨補填材の基本成分であるが、溶解度の制御が最大の課題であり、 $\beta$ TCP単独での制御には限界があった。そこで、本研究では、溶解性の高い $\alpha$ TCPが $1050^\circ\text{C}$ 以下で徐々に $\beta$ TCPに相転移することに着目した。処理温度・時間を変化させ $\alpha$ 相に析出する $\beta$ 相の割合を変化させた $\alpha$ - $\beta$ 複合型TCPを調製することで、溶解速度の制御を可能にする手法の検討が必要であった。

## 2. 研究の目的

リン酸三カルシウム( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )は現在市販され臨床応用されている骨補填材の基本成分であるが、溶解度の制御が課題である。リン酸三カルシウムには、高温安定相の $\alpha$ TCPと低温安定相の $\beta$ TCPがある。 $\alpha$ TCPは溶解が早く、スペースメイキングに劣るため新生骨の形成が十分に行われない。 $\beta$ TCPは骨への置換度が遅い。

本研究では、 $\alpha$ TCPが $1050^\circ\text{C}$ 以下で $\beta$ TCPに相転移することに着目した。処理温度・時間を変化させ $\alpha$ 相に $\beta$ 相を析出させることにより溶解速度の制御を可能にする手法を提案する。さらに、 $\alpha$ - $\beta$ 複合型TCPを、臨床で利用可能なヒアルロン酸・FGF-2と組み合わせる。これにより、シリンジを用いた簡便な充填と骨補填材漏出の防止・FGF-2による骨再生の促進を達成することを目的に実験を行った。

## 3. 研究の方法

### $\alpha$ TCP球の調製

最適な気孔径が得られる直径1mmの球状 $\alpha$ TCPを調製することを目的に実験を行った。1~5wt%ゼラチンを含むアルギン酸水溶液を使用した。リン酸カルシウムスラリーを含むこの水溶液に懸濁液を25G、10mLのシリンジポンプ(ASONE SPS-1)にて液体窒素に滴下し、凍結乾燥(EYELA FDU-1200)させた。得られた球状体をマッフル炉(AS ONE HPM-1N)にて $1200$ 、 $1250$ 、 $1280^\circ\text{C}$ で3時間焼結させ $\alpha$ TCPを得た。

### 粒子径の測定

ImageJの標準マクロ(Analyze Particle)を使用して画像処理により得られた $\alpha$ TCP粒子径を測定した。

### 相転移の分析

$\alpha$ から $\beta$ への相転移の閾値は約 $1050^\circ\text{C}$ であるので、粒径の調製で得られた $\alpha$ TCP球を $800$ 、 $900$ 、 $1000^\circ\text{C}$ で長時間処理して $\beta$ 相への変化率を評価した。具体的には上記3種類の温度で一定時間繋留し粉末X線回折を用いて $\alpha$ 相と $\beta$ 相の割合を測定した。

### 機械的性質の検討

圧縮強さの測定では、内径6mm高さ12mmの分割アクリルパイプを使用して、柱上硬化体を作成した。処理温度 $37^\circ\text{C}$ 相対湿度100%の環境下で、アクリルパイプ内部を1Mリン酸水素二ナトリウムで満たした状態で $37^\circ\text{C}$ 24時間、相対湿度100%で硬化させた。

### 溶解性の検討

$\alpha$ - $\beta$ 複合型TCP球を1g入れた15mLの遠沈管に10mLになるように生理食塩水を入れ、 $37^\circ\text{C}$ の恒温槽に静置した。1.2.5.10.20日後の溶液に含まれるCaとPの濃度を測定した。生理食塩水は毎日取り替えた。 $\beta$ 含有量が0-100mass%に変化させた試料を使用した。

### ヒアルロン酸・FGF-2との複合化

$\alpha$ - $\beta$ 複合型TCP球とヒアルロン酸・FGF-2を複合化させた。ヒアルロン酸に分散させるFGF-2の濃度は0または100ng/mLとした。 $\alpha$ - $\beta$ 複合型TCP球の $\beta$ 含有量が0-100mass%と変化させたものと混合した。

### 骨芽細胞破骨細胞を用いた細胞学的評価

骨芽細胞用細胞(MC3T3-E1)を多孔体上に播種し、培地中で一定期間培養する。初期細胞接着を評価するとともに、経時的に細胞増殖を計測した。

### 実験動物を用いた病理組織学的検討

ラット頭蓋骨に骨欠損を形成し、ディスク状多孔性制御炭酸アパタイト骨置換材にて再建する。移植後56日に試料を含む頭蓋骨を摘出した。アルコール固定し、非脱灰切片を作成し、組織親和性と骨の置換の状態を病理組織学的に評価した。

## 4. 研究成果

焼結法により調整された出発物質として使用した $\alpha$ TCP球（1250℃焼結）の実体顕微鏡画像を図1に示す。

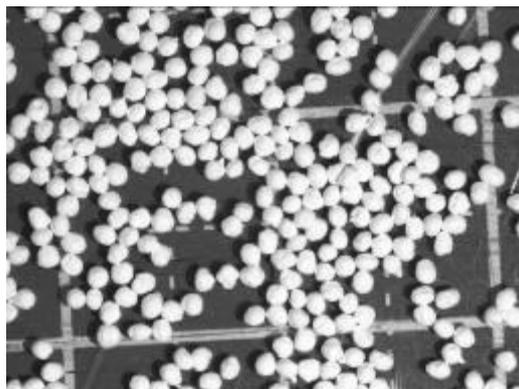


図1  $\alpha$ TCP球（1200℃焼結）

本実験では、高温安定相の $\alpha$ TCPから低温安定相の $\beta$ TCPへと相変換する手法を用いたため、係留時間の延長による焼き締めではなく係留時間による球の直径の変化に有意差は認められなかった。以下に焼結温度と得られた $\alpha$ TCP球の直径（ $\alpha$ TCP割合100%）を表1に示す。

表1 焼結温度と球の直径

焼結温度 (°C)	球の直径 (mm)
1200	1.21 ± 0.33
1250	1.13 ± 0.24
1280	1.08 ± 0.13

球の直径は、ImageJの標準マクロ（Analyze Particle）を使用して画像処理により測定した。オリジナル画像との比較も行い補正を行った。その結果、焼結温度の上昇に伴い球の直径が小さく変化した。これは、焼結密度が高くなるためである。次に得られた焼結球の粉末X線測定を行った。

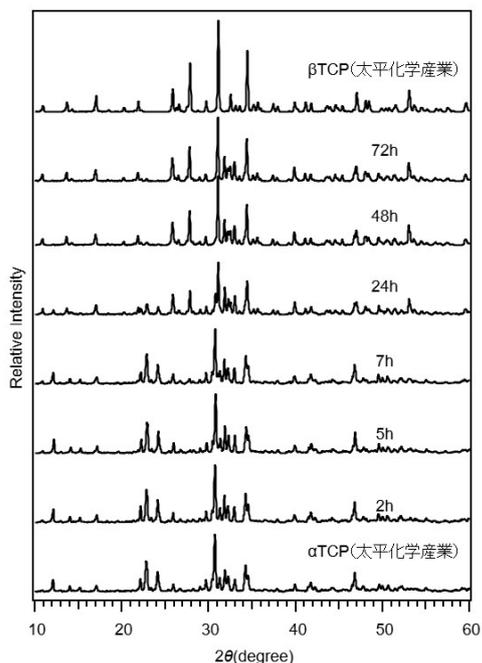


図2 係留時間と析出相の関係

図2に1200℃で焼結させた後に、1000℃で最大72時間まで係留した $\alpha$ TCP球の粉末X線パターン回折結果を示す。

コントロールとして太平洋化学産業の $\alpha$ TCPと $\beta$ TCPを示した。測定の結果、係留時間が24時間経過してきた頃より、典型的な $\beta$ TCPのピークが観察された。また、1200℃での焼結では $\alpha$ TCP- $\beta$ TCP-Hydroxyapatiteの3相であることがわかった。

小球作成時に起こる水和反応によるアパタイト層を除去するために焼結温度をあげることで、Hydroxyapatite相の出現をコントロールした。

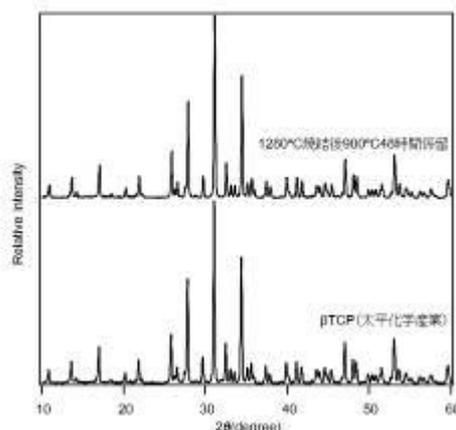


図3 焼結温度の違いによる相のコントロール

図3に小球作成時の焼結温度を約1300度にしたときの粉末X線回折測定結果を示す。1280℃で焼結した場合は72時間で $\beta$ 単相へと変換することが明らかになった。

次に、1Mのリン酸水素二ナトリウムを用いて、24時間37℃相対湿度100%で柱状の硬化体の実体顕微鏡写真を図4に示す。

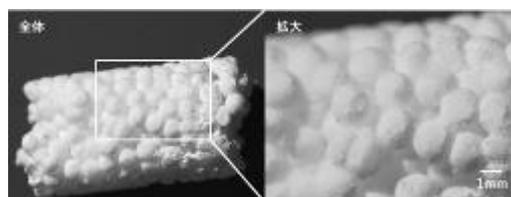


図4 柱状硬化体（ $\alpha$ TCP-100%）の実体顕微鏡写真

圧縮強さの測定では、内径6mm高さ12mmの分割アクリルパイプを使用して、柱上硬化体を作成した。37℃24時間相対湿度100%下で養生した。最大圧縮強さは $\alpha$ TCP割合が100%の場合で、1.63 ± 0.76kPaであった（図5）。 $\beta$ TCPの生成量が増加するに連れて、硬化は著しく困難になり、 $\alpha$ TCPの割合が40%を下回

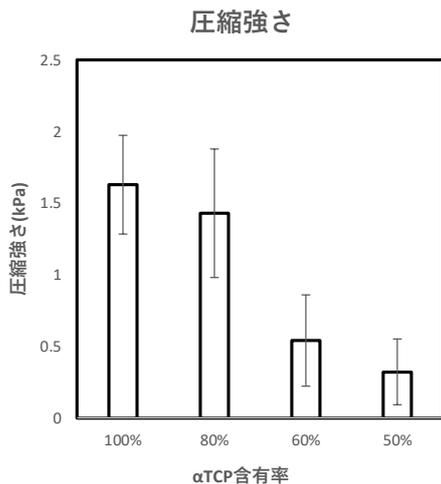


図5 圧縮強さとαTCP含有率の関係

った試料では24時間では硬化しなかった。これは、熱処理により出発物質であるαTCP中のβTCPの割合が増加して単位面積あたりのαTCP量の低下を招き接触面積の減少下からであると考えられた。また、αTCP自体の溶解量の減少が複合して生じるためであると推察された。

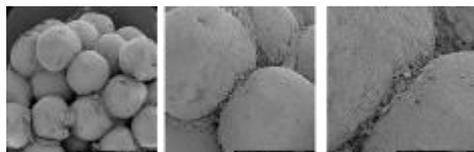


図6 柱状硬化体(αTCP-100%)の電子顕微鏡写真

球同士の結合状態を確認するために、走査型電子顕微鏡撮影を行った。柱状硬化体の小球が集合している様子を図6に示す。低倍率(左)では小球の密集のみが観察されたが、高倍率(中央)では小球同士の間溶解析出反応により形成されたブリッジが観察された。これを更に拡大すると球と球の接触面に析出物があり両者をつないでいることが明らかになった。この接触面の今回SEM画像を図7に示す。

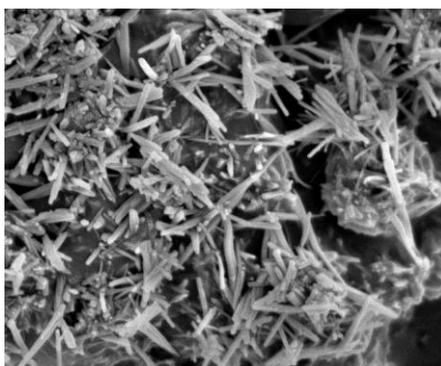


図7 球と球の接触面の拡大写真

反応に使用したリン酸カルシウムは弱アルカリ領域であることから、小球同士を連結させている析出物は hidroksiapatit であり SEM 画像からもアパタイト様の針状結晶の絡み合いが確認された。

#### 溶解性の検討

α-β複合型TCP球を1g入れた15mLの遠沈管に10mLになるように生理食塩水を入れ、37°Cの恒温槽に静置し最大20日後の溶液に含まれるCaとPの濃度を測定した。また、生理食塩水は毎日取り替えた。試料はα含有量が0-100mass%に変化させた試料を使用した。αTCPの量が多いほど初期のカルシウム濃度(αTCP100%で初日は約6mg/L)は高かったが、37°Cでは10日以降では大きな変化はなかった。これはαTCP表面が水和反応により hidroksiapatit に覆われたため、それ以上の反応が抑制されるためであることがわかった。

#### ヒアルロン酸・FGF-2との複合化

α-β複合型TCP球とヒアルロン酸・FGF-2を複合化させた。ヒアルロン酸に分散させるFGF-2の濃度は0または100ng/mLとした。α-β複合型TCP球のβ含有量が0-100mass%と変化させたものと混合した。ヒアルロン酸との複合化の目的は埋入時の分散防止であり、分散してしまう原因は球同士の接着が埋入初期の24時間では十分に得られないことが図5の結果からもわかる。α-β複合型TCP球にヒアルロン酸を用いたところ生食下に滴下しても分散を抑制することができた。

#### 細胞学的評価

今回の実験では骨芽細胞用細胞を主に用いた。骨芽細胞分化培地を調製して、細胞を通常に従って播種培養し培養容器底面への接着芯店が確認されてから骨芽細胞分化培地に変更して2週間(14日)培養した。培地の交換は3日に一度行った。実験に際して、予備実験を行ったところ、αTCPの含有量が大きい場合(50%以上)ではメディアの全量交換ではpHを一定に保つのが困難だったため、緩衝作用が発揮できる最低量の100mgの試料を用いて実験を行った。培養時にはセルカルチャーインサートを使用した。初期接着(6時間)では試料による差が認められなかったのに対して、アルカリフォスファターゼ染色(21日)では、αTCP含有量60%βTCP40の試料で良好な染色結果を得た。

#### 実験動物を用いた病理組織学的検討

下記に埋入56日後のβTCP(左)顆粒とα-βTCP複合体(右)のヘマトキシリンエオジン染色の典型例を示す。(図8)

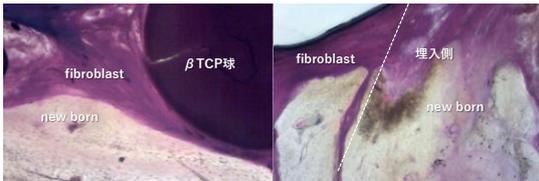


図8 HE染色像(埋入56日目)

実験では対照資料として $\beta$ TCPとハイドロキシアパタイトの焼結小球を利用した。ハイドロキシアパタイトは骨伝導性がよく、球の直下に新整骨が認められたが、球の形状には変化は認められず、吸収されていなかった。それに対して、 $\beta$ TCPはハイドロキシアパタイトに比べて骨伝導性には劣るものの部分的には一層の軟組織を介して新整骨が認められた。それに対して、今回使用した $\alpha$ - $\beta$ TCP複合体では埋入した球が粉碎した状態で、一部では完全に溶解している場合も認められた。

今後さらに小球自体の結晶性をコントロールすることで、埋入後1ヶ月程度で自壊し、その隙間を利用して新生骨の形成を促進する可能性が示された。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

丸田道人, 荒平高章, 松家茂樹, 生体吸収性を制御した $\alpha$ - $\beta$ TCPインジェクタブル骨補填材の調製, 第23回日本歯科医学会総会, 福岡, 10月21-23日, 2016年

〔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〕

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

丸田 道人 (MARUTA Michito)

福岡歯科大学 生体工学分野・講師

研究者番号: 40507802