

令和元年6月19日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11626

研究課題名(和文) 3D-Printerで容易に成形できるリン酸カルシウムセメントの創製

研究課題名(英文) Development of calcium phosphate cement which can be formed easily with 3D-Printer

研究代表者

河野 文昭 (KAWANO, Fumiaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：60195120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高強度で骨親和性の高く、3Dプリンターで形態付与が容易な硬組織代替材料を創製するため、ジルコニア粉末と繊維を用いてリン酸カルシウムセメント(CPC)の強度の向上を図った。その結果、ジルコニア繊維では、間接引張強さに影響を与えなかった。ナノサイズ(約100nm)のジルコニアでは、3%含有で有意に増加した。ナノサイズのジルコニア粉末を加えることにより、高強度化がはかれることが示唆された。3Dプリンターで用いるために、ポロキサマーをゲル化剤として添加した結果、高さ約5 mmまで形状を維持した積層が可能となった。連続射出量を増やすことができれば、さらに積層は可能と期待できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3Dプリンターの医療への応用は、CTとのリンクで手術部の模型や再生医療にも応用されている。リン酸カルシウムを用いたカスタムメイド人工骨の作製についても報告されているが、強度が低い点が問題である。そこで、ジルコニア粉末と繊維を用いてリン酸カルシウムセメント(CPC)の強度の向上を図った。その結果ナノサイズのジルコニア粉末を加えることにより、高強度化がはかれることが示唆された。また、ポロキサマーをゲル化剤として添加すれば、高さ約5 mmまで形状を維持した積層が可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop new Calcium Phosphate Cement(CPC) with high strength and excellent bone affinity, and easy to form in 3D printer. This modified CPC has an advantage of CPC such as excellent biocompatibility. The strength of CPC was improved using zirconia powder and fibers. As a result, the addition of the zirconia fiber to CPC powders did not affect the indirect tensile strength. On the other hand, in the case of nano-sized (about 100 nanometer) zirconia powder, the content was significantly increased at 1% content. It was suggested that the strengthening could be achieved by adding nano-sized zirconia powder to CPC. When beta-TCP was mixed with NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub> solutions to increase the viscosity, it became possible to make the shape to a height of about 5 mm. When the paste container can be enlarged to increase the continuous injection amount.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：リン酸カルシウムセメント ジルコニア ポールミリング 間接引張り強さ 圧縮強さ 3Dプリンター ゲル化剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

優れた硬組織代替材料(人工歯根、骨補填材)の開発および硬組織再建法の確立は、高齢社会を展望したときに歯科医療の解決しなければならない重要な課題である。人工骨に求められる要件として、構造支持体として十分な強さ、形態調整が可能な加工性・取扱い易さ、骨組織との親和性、生体内での分解吸収性、骨形成を促進する活性が挙げられる。これらの要件を満たす材料としてリン酸カルシウム系のものが現在広く用いられている。しかし、最近のリン酸カルシウム系人工骨は極めて高い気孔率を持つものが多く、初期強さを犠牲にして bone ingrowth を重視する傾向にある。現在は、型リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP;  $\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )に骨形成を促進する生理活性物質を複合化する研究が主流となっているが、基剤となる  $\beta$ -TCP に荷重負荷に耐えうる初期強さと骨親和性を両立させことも重要な研究課題であると考えられる。我々は、再生医療の進歩を見据え、リン酸カルシウムセメント(CPC)に着目し、高い生体吸収性と薬物徐放性を付与することを目的に、カルシウムよりイオン半径の大きいストロンチウムを  $\beta$ -TCP 系のリン酸カルシウムセメントへの導入を試み、アパタイトの結晶性を不安定にして溶解性の向上と骨形成の促進を図った<sup>1)</sup>。しかし、初期強さが弱い欠点があった。

一方、3Dプリンターの医療への応用は、CT とのリンクで手術部の模型や再生医療にも応用されている。リン酸カルシウムを用いたカスタムメイド人工骨の作製についても報告されている<sup>2)</sup>が、強さの向上が課題となっている。3Dプリンターの再生医療への応用は今後広がるものと考えられ、これらに適応できる生体材料の開発が急務である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、高強度で骨親和性の高い新しい自己硬化型骨補填材を創製し、3Dプリンターで形成可能なように材料設計を行うことである。

生体内では結晶性の高い水酸アパタイトが直に生成するのではなく、まずコラーゲン間にアモルファス状のリン酸カルシウムが生成し、成長および結晶化を経て水酸アパタイトを形成する。従って、アモルファス状のリン酸カルシウムは、アパタイトの前駆物質といえる。そこで、支持骨体として十分な強さを得るために、 $\beta$ -TCP を基剤としてボールミリング法を用いてアモルファス化することにより、初期強さの向上を試みた<sup>3)</sup>。我々は、 $\beta$ -TCP をジルコニアボールでボールミリングしてアモルファス状態の粉末にし、練和後の注入性、強さについて調べたところ、従来の  $\beta$ -TCP に比べ注入できる時間が非常に長いことが示された。間接引張強さにおいては、練和1日後、49.6 MPa を示し、従来の  $\beta$ -TCP の 2.6 MPa の約 19 倍の値を示し、初期強さの向上が認められた<sup>3)</sup>。

そこで、本研究では、ボールミリングによって  $\beta$ -TCP に添加されたジルコニア粉末が CPC セメントの強さを向上させるメカニズムを明らかにすることを目的とした。また、硬化時間を延長し、3Dプリンターで形成可能にすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料作製

セメントの基材粉末には、型リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP;  $\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (太平化学, 大阪) を用いて、以下の3種類の異なる補強材を含有した試料を作成した。 $\beta$ -TCP をジルコニア製ボールミル(ANM-1000, 日陶科学, 名古屋) で24時間粉碎し、その後塩酸に浸漬し、1~6%のジルコニアミリング粉末が残留し、セメント基材が総重量8gになるように調整した(eZR)。市販の水溶性ナノジルコニア分散液を遠心分離し、上澄み液を取り除き、乾燥させ抽出した粒径100nmのナノジルコニア(Zirconium oxide, Sigma-aldrich.Co. USA) を  $\beta$ -TCP に重量比1~6%を添加し総重量8gになるように調整した(nZR)。市販の直径6~10  $\mu\text{m}$  の安定ジルコニアファイバー(巴工業株式会社, 東京) を  $\beta$ -TCP に重量比1~6%を添加し総重量8gになるように調整した(fZR)。

セメントの練和液には、塩化カルシウム( $\text{CaCl}_2$ ) (試薬特級, 和光純薬, 大阪) 水溶液を濃度1.0 mol/Lに調整した第1液と、硬化促進剤およびpH調整剤を兼ねた濃度0.6 mol/Lのリン酸二水素ナトリウム( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (試薬特級, 和光純薬, 大阪) 水溶液の第2液を等量準備した。

#### (2) 試作セメントの結晶相分析

作製したセメント硬化体の結晶相の分析は、試料を乾燥させHAP転換を停止させた後、めのう乳鉢で試料を粉碎し、粉末X線回折装置(XRD) (Miniflex, 理学電機, 神奈川) にて結晶相分析を行った。X線源にはCu・K $\alpha$  を用い、管電圧30 kV, 管電流15 mA, 走査速度 $2\theta = 1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$  (  $2\theta$ : 回折角度), 走査ステップ $0.05^\circ$  の条件で測定した。

#### (3) 機械的性質の測定

粉液比 powder :  $\text{CaCl}_2$  :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 = 4:1:1$  で練和したセメントペーストを内径6 mm高さ3 mmのプラスチックモールドに入れて成型し、37  $^\circ\text{C}$ , 湿度約100%の恒温槽中で1週間保持した。小型万能試験機(AGS-500, 島津, 京都) を用いて間接引張り応力と圧縮応力を負荷し、セメント試料を破断した(クロスヘッドスピードは10  $\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

(4) 破断面の観察

破断した試料にイオンスパッタ法による金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-5300, 日本電子, 東京) を用いて加速電圧 20 kV の条件で観察した。

(5) 3D-プリンターでの成形

ジルコニアボールミルでボールミリングした -TCP にゲル化剤 10% Lutorol F68 または Kolliphor P188 (BASF JAPAN, 東京) を添加し,  $\text{CaCl}_2 : \text{NaH}_2\text{PO}_4 = 4 : 1 : 1$  で練和した。3D プリンターのノズルとして 2 条ネジテーパーノズル TPND-20G (Musashi Engineering, Thailand) を用いて射出成形し, その形状を評価した。

4. 研究成果

(1) 試作セメントの結晶相分析

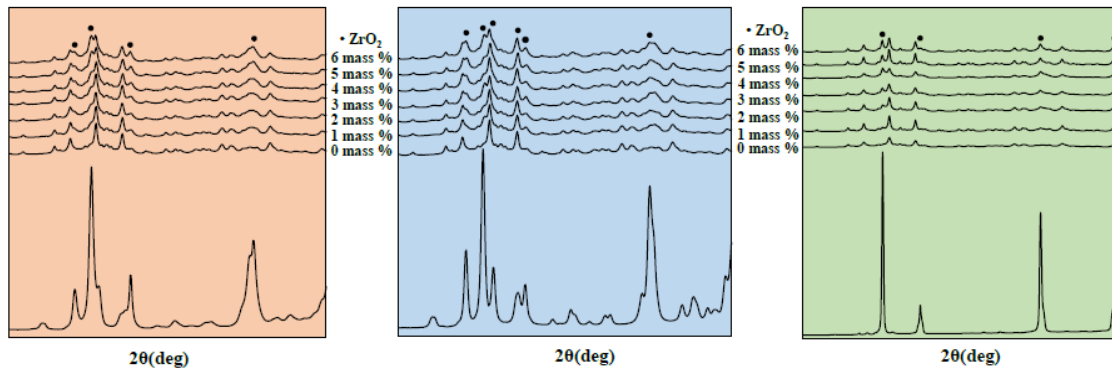


図 1 各試料の結晶相 (左から eZR, nZR, fZR)

すべての試料で, -TCP 粉末に添加したジルコニア補強材の添加量が増すと, 酸化ジルコニアのピーク強さが大きくなった。

(2) 機械的性質

間接引張り強さと圧縮強さを図 2 に示す。

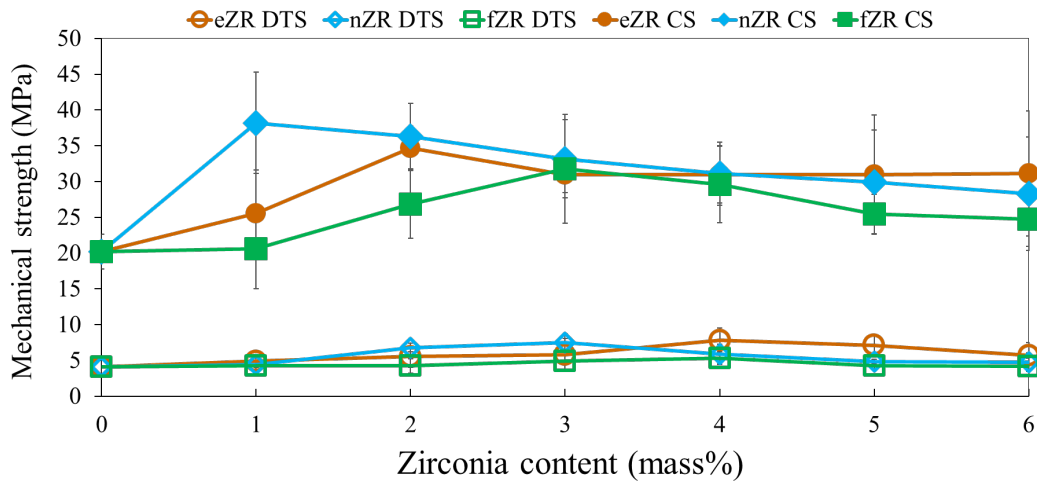


図 2 間接引張り強さおよび圧縮強さに及ぼすジルコニア含有量の影響

間接引張り強さは eZR と nZR ではジルコニア含有量が 1% から補強材の含有量が増すにつれて増加した。一方, fZR では, 補強材の含有量によって間接引張り強さは変化せず, 補強効果は認められなかった。eZR と nZR では 4% eZR と 3% nZR で最高値を示し, それぞれ 7.8 MPa と 7.5 MPa であった。fZR で最高値を示した 4% fZR の 5.4 MPa よりも有意に高い値を示した。

圧縮強さは, nZR では 1% で, eZR では 2% で, fZR では 3% で最も高い値を示し, それ以上の補強材の含有量では減少した。3 種類の補強材の中で 1% nZR が有意に高い圧縮強さを示した。

(3) 破断面の観察 (SEM 像)

eZR および fZR では, 小さな白色の結晶が観察され, 破面に多数の細孔が観察された。一方, nZR では, 角粒状構造が見られ, 粒子間の細孔は少なかった。

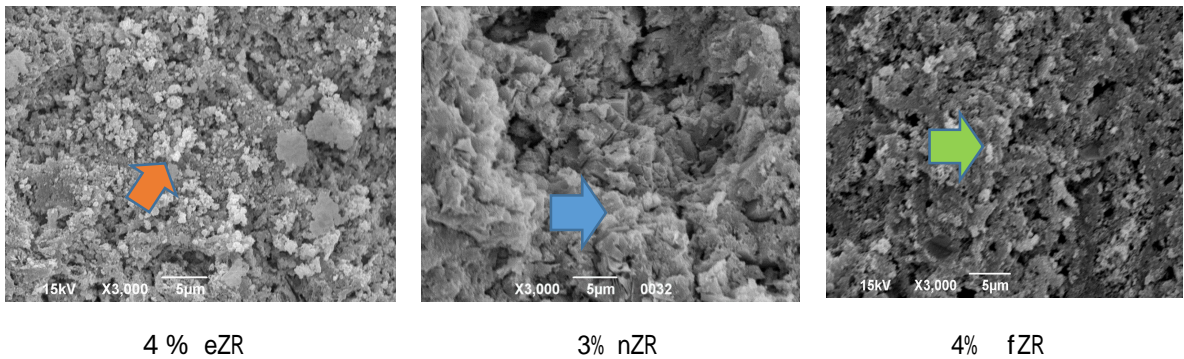


図3 硬化1週間のセメント試料破断面

#### (4) 3D-プリンターでの成形

図4に、ゲル化剤として逆温度ゲルKolliphorP188を添加した試料の3Dプリンティングを示す。粉液比とゲル化剤濃度を様々に組み合わせて試作した結果、高さ約5mmまで形状を維持した積層が可能となった。また、ペースト容器を大きくして連続射出量を増やすことができれば、さらに積層は可能と期待できた。一方、射出口が細いとペーストがらせん状に射出され、形状再現性に問題があった。その原因は未解明だが、ゲル化剤濃度により射出されたペーストの形状が異なることから、射出口のサイズと形状の最適化が必要と考えられた。

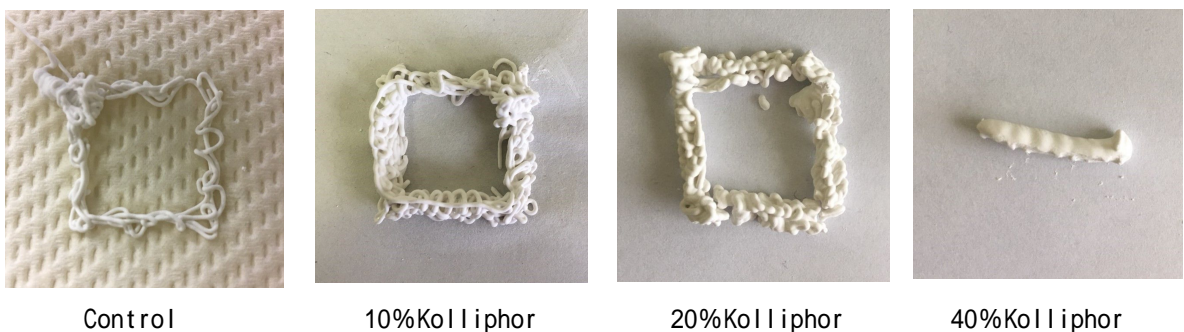


図4 3D プリンティングの結果

#### 引用文献

- 1) Fujihara E et.al.: Solubility of strontium and carbonate-substituted calcium phosphate bone cement mixed with  $\text{SrCl}_2$  solution. J.J.Dent.Mater. 26. No2 194,2007.
- 2) Klammert U et.al.: 3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects. J Craniomaxillofac Surg.38 Vol.8:565-70,2010.
- 3) Bae J et.al.: Effects of high-energy ball-milling on injectability and strength of -tricalcium-phosphate cement. J.Mechan.Behav.Biomed. Mater.Vol 47 77-86,2015.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Yumika Ida, Jiyon Be, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada: Effects of powder-to-liquid ratio on properties of -tricalcium-phosphate cements modified using high-energy ball-milling, Dental Materials Journal, 査読有り, Vol.36, No.5, 590-599, 2017. DOI:10.4012/dmj.2016-341

〔学会発表〕(計10件)

金 藝殷, 裴 志英, 伊田 百美香, 関根 一光, 河野 文昭, 浜田 賢一: 高強度 -TCP セメントの開発: ジルコニアファイバー添加の効果, 第72回日本歯科理工学会学術講演会, 2018年10月.

伊田 百美香, 裴 志英, 関根 一光, 河野 文昭, 浜田 賢一: メカノケミカル手法で改質した -TCP セメントの in vivo 評価, 第72回日本歯科理工学会学術講演会, 2018年10月

Kim Yeeun, Jiyon Be, Yumika Ida, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada :

Three types of zirconia particle addition to calcium phosphates cement for strengthening, 29th European Conference on Biomaterials (ESB2018), Maastricht, Sep. 2018.

Kim Yeeun, Jiyon Be, Yumika Ida, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada : Setting Properties and Strengths of  $\beta$ -TCP Cements Set in Vivo and in SBF, 28th European Conference on Biomaterials (ESB2017), Athens, Sep. 2017.

Jiyon Be, Yumika Ida, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada : Zirconia Particle Addition to Calcium-Phosphates-Cement for Mechanical Property Enhancement, 28th European Conference on Biomaterials (ESB2017), Athens, Sep. 2017.

Jiyon Be, Yumika Ida, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada : Effects of zirconia particle addition on mechanical properties of calcium phosphate cement, International Dental Materials Congress 2016, Bali, Nov. 2016.

伊田 百美香, 斐 志英, 関根 一光, 河野 文昭, 浜田 賢一 : ボールミリング法で改質した  $\beta$ -TCP セメントの in vivo での圧縮強度の評価, 日本バイオマテリアルシンポジウム 2016, 2016年11月.

Jiyon Be, Ida Yumika, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada : Zirconia particle addition improves mechanical properties of calcium phosphate ceramic, 94th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul, Jun. 2016.

Ida Yumika, Jiyon Be, Kazumitsu Sekine, Fumiaki Kawano and Kenichi Hamada : Powder/liquid ratio effects on mechanical properties of modified  $\beta$ -TCP cement, 94th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, Seoul, Jun. 2016.

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：浜田 賢一

ローマ字氏名：(HAMADA, Kenichi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名大学院医歯薬学研究部 (歯学域)

職名：教授

研究者番号 (8桁)：00301317

### (2) 研究分担者

研究分担者氏名：篠原 千尋

ローマ字氏名：(SHINOHARA, Chihiro)

所属研究機関名：徳島文理大学

部局名：保健福祉学部

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：50332820

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。