

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17177

研究課題名（和文）短期・長期の骨形成促進を目指した二相性骨補填材料の開発

研究課題名（英文）Fabrication of the biphasic bone substitute for improving new bone formation

研究代表者

土谷 享 (Tsuchiya, Akira)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90722710

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は溶解挙動の異なる2種類の骨補填材を化学的に組み合わせた二相性骨補填材を創製し、骨形成に必要なカルシウムの溶出と骨関連細胞の足場としての機能のバランスを制御することで短期・長期の骨形成能力の向上を目的とする。カルシウム溶出の早いリン酸水素カルシウム二水和物をコーティングした型リン酸三カルシウムでは、リン酸水素カルシウム二水和物の析出の際に顆粒が自己硬化性を示し、骨形成に有利な多孔体構造となることを見出した。溶解性の遅いハイドロキシアパタイトコートした石膏顆粒では溶解性の極めて高い石膏の溶解性を制御することを示し、新生骨形成能力も向上することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎える日本において、高齢者のQOLの向上が課題となる。中でも、骨再生で使用する骨補填材はこれまでに多くの製品があり、その形状、化学組成については現在も広く研究されている。本研究は骨補填材の機能を向上するために化学的に2種の骨補填材を層状にコートした二相性骨補填材に関する研究成果であり、実際に骨形成能力が向上することを見出している。また、本研究で得られた二相性骨補填材の化学組成はどれも医療材料として使用されており、安全性の観点からも製品化までのロードマップは長くないと期待できる。以上のことから、本研究は口腔外科分野、整形外科分野に大きく貢献できるものであると確信する。

研究成果の概要（英文）： In this study, we tried fabrication of two types of biphasic bone substitutes for improving new bone formation ability. One was the dicalcium hydrogen phosphate dihydrate/beta-tricalcium phosphate biphasic bone substitutes. Dicalcium hydrogen phosphate dihydrate releases the calcium, which activates the osteoblast for new bone formation, and beta-tricalcium phosphate plays a role as a scaffold. We succeeded that fabrication of biphasic bone substitutes and furthermore, when dicalcium hydrogen phosphate dihydrate was precipitated on the surface of beta-tricalcium phosphate, the granules were set and fabricate porous bone substitutes. we expected this structure was also effective to penetrate bone-related cells in the bone substitute. The another was apatite/calcium sulfate biphasic bone substitutes. In this study, we revealed apatite coating can suppress the quick dissolution of calcium sulfate and improve the new bone formation.

研究分野：生体材料学

キーワード：骨補填材 生体材料 二相性顆粒 顆粒セメント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えるにあたり、高齢者の Quality of Life (QOL) 向上に向けた医療機器開発が急務である。特に骨再生については、高齢者が骨折した場合に寝たきりとなる可能性もあるため骨再生用医療機器である骨補填材の高機能化が望まれている。骨補填材にはリン酸カルシウムをベースとしたハイドロキシアパタイト (HAp)、 β 型リン酸三カルシウム (β -TCP)、整形外科分野では石膏を化学組成とする材料が用いられている。これらの骨補填材は骨芽細胞を活性化するとともに、骨関連細胞の足場としての機能を同時に果たしている。これらのバランスの制御が良質な骨の再生には重要であるが、研究開始時点でこれらの所要性質を完璧に満たす骨補填材は存在していなかった。

2. 研究の目的

1の研究背景をもとに、骨補填材の組成、形態に着目した研究が進められている。骨芽細胞の活性には骨補填材からのカルシウムイオンの溶出が重要であることが既に知られており、骨補填材の吸収および溶解に伴うカルシウムイオンの溶出により骨芽細胞は活性化する。一方で、骨補填材の吸収が早ければ細胞の足場機能が失われることとなり、良質な骨の再生が望めない。そこで、本研究では生体吸収性の異なる2種類の骨補填材を有する骨補填材を創製し、その骨再生能力について検討する。

本研究目的を達成するためには2種類の組成を有する骨補填材が必要となるが、溶解性の異なる2種の骨補填材を混合しただけでは、吸収された骨補填材が足場としての機能を果たすことはできない。そこで本研究では、骨補填材の表面に吸収性の異なる骨補填材をコートして、1つの顆粒(もしくは、ブロック)でカルシウムの溶出と長期的な足場としての機能を同時に果たす二相性顆粒を創製し、2における研究目的を達成する。

リン酸カルシウムなどのセラミックスはその溶解性の違いを利用して組成変換することができる。例えば、炭酸アパタイトは前駆体として溶解性の高い炭酸カルシウムをリン酸塩の水溶液に浸漬することで得ることが可能である。つまり、炭酸カルシウムが溶解することでイオン濃度が炭酸アパタイトに対して飽和し、カルシウムイオン、リン酸イオン、炭酸イオンを含んで析出することで炭酸アパタイトとなる。本手法を利用し、本研究では以下の2点に取り組んだ。

- (1) β -TCP 表面へのリン酸水素カルシウム二水和物 (DCPD) および石膏コーティング
- (2) 石膏系骨補填材表面へのアパタイトコーティング

3. 研究の方法

(1) β -TCP 表面への DCPD および石膏コーティング

β -TCP は中性では安定なリン酸カルシウムであるが、酸性条件では DCPD が安定相となる。つまり、 β -TCP を酸性溶液と混合すると β -TCP が溶解し、イオン濃度が飽和すると安定相の DCPD が析出すると考えられる。そこで、 β -TCP 顆粒と硫酸水素ナトリウム溶液を混合した。得られた顆粒およびブロックは X 線回折 (XRD) で組成を同定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) で表面形態観察、万能試験機により機械的強度を評価した。

(2) 石膏系骨補填材表面へのアパタイトコーティング

石膏は骨補填材として使用されているが、その溶解性は極めて高い。そこで、骨形成能力が高く、溶解性が極めて高いアパタイトを石膏顆粒表面に被覆して二相性顆粒とし、その生体吸収性および骨形成能力を評価した。具体的には、石膏顆粒をリン酸水素二ナトリウムに浸漬して 20°C、60°C でインキュベートした。得られた顆粒の組成は XRD およびフーリエ変換赤外分光法 (FT-

IR) 表面形態を SEM で評価した。また、得られた顆粒をうさぎ大腿骨に作製した骨欠損に埋入し、石膏顆粒をコントロールとして新生骨形成および吸収性を評価した。

4. 研究成果

(1) β -TCP 表面への DCPD および石膏コーティング

β -TCP 顆粒を硫酸水素ナトリウム溶液と混合すると顆粒が硬化した。XRD による組成解析では、硫酸水素ナトリウム溶液と混合することで DCPD の他に二水石膏 (CSD) が析出していることが判明した。医療用セメントとして用いられているブルーシャイトセメント、石膏は硬化後の組成がそれぞれ板状結晶の DCPD、針状結晶の CSD であり、これらの結晶が絡み合うことで硬化することが知られている。実際に、得られた顆粒を SEM にて表面観察を行ったところ、板状、針状の結晶が表面に析出しており、これらの結晶が絡み合って硬化していることが判明した。一方で、中性の硫酸二ナトリウム溶液で練和しても DCPD、CSD の析出は見られなかったことから、当初想定していたように酸性の硫酸水素ナトリウム溶液で混合したことで DCPD が析出し、かつ、硫酸イオンが存在したことから CSD も同時に析出したと考えられる。DCPD、CSD の析出量は硫酸水素ナトリウム溶液の濃度が増加するにつれて上昇しており、それに伴い硬化体の機械的強度も上昇した。

この現象は当初の研究目的のように二相性骨補填材として短期・長期の骨形成促進が期待できるだけでなく、骨欠損部に充填した後に硬化する顆粒セメントとしても有用性が期待できる。また、SEM 観察から硬化体は β -TCP 顆粒が結合して顆粒間に気孔を有する多孔体となることが判明している。多孔体の骨補填材は骨関連細胞および組織が骨補填材内部まで浸潤することが期待できることから、構造的な観点からも豊富な骨形成が期待できる。現在、実験動物での評価を行い、骨形成能力の評価だけでなく、顆粒セメントとしての有用性も同時に検討している。

(2) 石膏系骨補填材表面へのアパタイトコーティング

20°C、60°C でリン酸水素二ナトリウムに 7 日間浸漬した二水石膏顆粒は、SEM により顆粒表面に小さな板状結晶が析出したことが示された。粉末 XRD 解析では二水石膏の他にアパタイトに特有なピークが観察されており、析出した結晶はアパタイトであることが示唆された。また、エネルギー分散型 X 線分析を用いて顆粒をラインスキャンしたところ、顆粒全体からカルシウムが検出された他に、表面からはリン原子が、顆粒内部からは硫黄原子が検出された。この結果は、得られた顆粒は表面がアパタイト、内部が石膏の二相構造となっていることを示している。アパタイトコートされた石膏顆粒を Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に浸漬したところ、石膏顆粒が 1 日で完全に溶解してカルシウムを放出したのに対し、アパタイトコートした石膏顆粒は浸漬 7 日後も残存していた。また、そのカルシウム溶出量はアパタイトコートした温度が高い場合に有意に抑制されており、アパタイトコートする際の温度によりカルシウム溶出量を制御できることを示した。

得られた顆粒をうさぎ大腿骨に作製した骨欠損に 4 週間埋入したところ、欠損部に新生骨が形成されていた。特に、60°C でアパタイトコートした石膏顆粒の新生骨形成量は欠損部の約 23% であり、CSD 顆粒の新生骨形成量 (15%) と比較すると有意に向上していた。これは、石膏からのカルシウムの溶出量を抑制して足場として顆粒が機能したことに由来すると考えられる。

以上の結果から、石膏顆粒をアパタイトコートして得られたアパタイト / 石膏二相性顆粒は新生骨形成を促進することが示され、整形外科分野で使用されている石膏系骨補填材の機能向上が期待できる。現在、新生骨形成能力がより高い炭酸アパタイトコートの技術確立を試みており、より新生骨形成能力の高い顆粒状骨補填材が期待できる。

以上の成果より二相性骨補填材の有用性を示した。また、本成果では DCPD と β -TCP、アパタイトと石膏を組み合わせた二相性骨補填材について検討したが、同様の手法で様々な組成の骨補填材をコーティングすることが可能である。特に、近年販売を開始した炭酸アパタイトはその骨形成能力の高さから二相性顆粒とすることで更に高機能な人工骨補填材になるポテンシャルがあると考えられる。

現在歯科分野で使用されている骨補填材は海外製の製品が多くの割合を占めているが、炭酸アパタイトをはじめとして近年では日本発の製品が増えている。本成果は日本発の新たな骨補填材として歯科分野だけでなく、整形外科分野に大きく貢献すると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akira Tsuchiya, Marino Sato, Ichiro Takahashi, Kunio Ishikawa	4. 巻 44
2. 論文標題 Fabrication of apatite-coated gypsum granules and histological evaluation using rabbits	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 20330-20336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceramint.2018.08.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Eddy, Tsuchiya Akira, Tsuru Kanji, Ishikawa Kunio	4. 巻 33
2. 論文標題 Fabrication of self-setting -TCP granular cement using -TCP granules and sodium hydrogen sulfate solution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials Applications	6. 最初と最後の頁 630 ~ 636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0885328218808015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤まりの、土谷享、高橋一郎、石川邦夫
2. 発表標題 石膏系骨補填材のリン酸カルシウム表面被覆による溶解性制御
3. 学会等名 平成30年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土谷享、石川邦夫
2. 発表標題 アパタイト被覆による石膏系骨補填材の溶解抑制
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会第31回秋季シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土谷享、佐藤まりの、石川邦夫
2. 発表標題 アパタイト被覆による石膏系骨補填材の溶解抑制および骨伝導性評価
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----