

平成21年5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18390533
研究課題名（和文） 骨置換性カーボネイトアパタイトによる顎骨再建と骨再生用スキャフォールドへの応用
研究課題名（英文） Applications of bone-replaceable carbonate apatite for jawbone reconstruction and for scaffold of bone regeneration
研究代表者 宮本 洋二 (YOUJI MIYAMOTO) 徳島大学・大学院・ヘルスパイオサイエンス研究部・教授 研究者番号：20200214

## 研究成果の概要：

腫瘍などの治療の結果、骨が欠損することは多い。これまでは自家骨移植で治療されていたが、骨移植は患者に大きな侵襲を与える欠点があった。本研究では生体内で吸収して骨と置換する人工生体材料（カーボネイトアパタイト）を合成して、骨移植をせずに骨欠損を治せる医療技術の開発を行った。カーボネイトアパタイトは各種の実験動物の骨欠損を修復することができ、骨再生用スキャフォールドにも応用可能なことを明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,700,000	0	8,700,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	15,600,000	2,070,000	17,670,000

## 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：アパタイト、骨再建、再生医療、バイオマテリアル、スキャフォールド、骨

## 1. 研究開始当初の背景

顎骨の再建は、口腔外科臨床の重要なテーマである。従来、骨移植による再建がゴールドスタンダードとして行われてきたが、骨移植にも採取できる骨の量や形、移植後の感染や吸収などの問題がある。そして、最も大きな欠点は、健常部に二次的な侵襲を加えることである。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スキャフォールド（細胞の足場）とする再生医療が研究されてきた。骨の再生を考える場合、これらの生体材料が体内に残留することは問題であり、完全に骨と置換することが望ましいと考えられる。

骨再建材や骨再生用スキャフォールドと

しては、ハイドロキシアパタイト(HAP)やリン酸三カルシウム(TCP)が臨床応用されている。HAPは優れた骨伝導性を示すが、体内ではほとんど吸収されない。TCPは吸収性材料ではあるが、元来体内には存在しない物質で、また、その吸収も完全ではなく、時に炎症を惹起する。骨はアパタイトからできているが、吸収と骨添加を受ける。この原因は骨のアパタイトが、炭酸基を含んだカーボネイトアパタイトを5～8%含有していることと、その結晶性が低いことに起因する。すなわち、カーボネイトアパタイトは生体内に存在する骨置換性バイオマテリアルと言える。カーボネイトアパタイトを骨再建や骨再生用スキャフォールドに



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となる。そのためには、これまで高温の焼結によって、焼き固めるしか方法がなかった。しかし、焼結操作によって、炭酸基が消失するとともに、結晶性が上がり、これらは体内での吸収性を低下させることとなる。

われわれは、水酸化カルシウムを出発物質として、炭酸化、リン酸化を行うことによって、焼結過程なしにカーボネイトアパタイト硬化体を作製することに成功した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、高温での焼結過程なしで作製したカーボネイトアパタイトを用いて、骨の再建材料としての有用性を確認すると共に、骨再生医療用 scaffold を作製することである。すなわち、(1) 試作したカーボネイトアパタイトの評価と作製法の検討、(2) 培養骨髄細胞を用いてカーボネイトアパタイトが骨髄細胞の増殖および骨芽細胞への分化に及ぼす影響を評価する、(3) 実験動物に各種の骨欠損を作成してカーボネイトアパタイトで再建し、カーボネイトアパタイトの吸収と骨置換および生体親和性を細胞レベルで組織学的に評価する、(4) 骨再生医療用 scaffold として連続気孔を有するカーボネイトアパタイト多孔体を作製する。

## 3. 研究の方法

### (1) カーボネイトアパタイト (CAP) の作製

水酸化カルシウムの粉末をステンレス製のモールド内に入れて、2MPa で加圧し、直径 10 mm、厚さ 2 mm のディスク状の水酸化カルシウムを作製し、この水酸化カルシウムディスクを炭酸ガス中に室温で 3 日間静置して炭酸化して、炭酸カルシウム硬化体を作製した。さらに、この炭酸カルシウム硬化体を 60°C のリン酸水素 2 ナトリウム溶液中に 14 日間、浸漬してリン酸化し、CAP 硬化体を作製した。

CAP 硬化体の物性を、粉末 X 線回折解析、フーリエ変換赤外分光光度計分析、ダイアメトラル引張強度試験を行って解析した。

### (2) CAP がヒト骨髄細胞の接着、増殖および骨芽細胞への分化に与える影響の評価

CAP がヒト骨髄細胞の接着、増殖および骨芽細胞への分化に与える影響について、ハイドロキシアパタイト (HAP) と比較検討した。細胞の接着および増殖については MTT assay にて評価し、骨芽細胞への分化は RT-PCR 法により骨芽細胞分化マーカー遺伝子 (I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンなど) の発現を調べた。

### (3) 動物実験によるカーボネイトアパタイトの骨再建への応用に関する検討

実験動物は、ラット、ウサギおよびイヌの 3 種類を用いた。ラットでは頭蓋骨に直径 8mm の骨欠損を作製し、直径 200~400  $\mu\text{m}$  の CAP 顆粒 80mg を充填した。ウサギでは大腿骨の近位端に直径 5mm、深さ 8mm の円筒状の骨欠損を作製し、直径 300~500  $\mu\text{m}$  の CAP 顆粒を充填した。イヌではビーグル犬の歯 (下顎第二、三、四前臼歯および第一後臼歯) を抜歯し、抜歯窩の治癒を 3 か月間待った後、イヌの下顎骨に直径 3.85mm の移植窩を形成し、CAP と HAP とを充填した。

埋入した試料は摘出し、ホルマリン固定した後に、樹脂包埋し、非脱灰研磨切片を作製して、光学顕微鏡にて観察した。なお、対照としては、ほぼ同じ直径の HAP 顆粒を用いた。また、より詳細な生体親和性の評価と CAP の生体内での吸収機序の解明のために、試料をラットの皮下に埋入して、脱灰薄切切片と非脱灰研磨切片を作製し組織学的検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 作製したカーボネイトアパタイトの分析

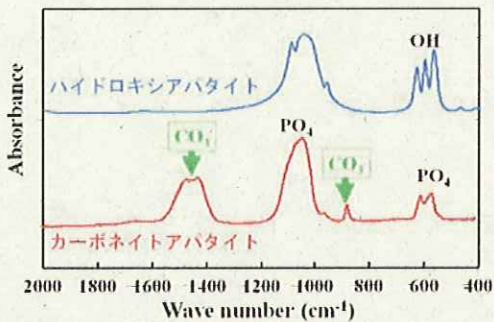
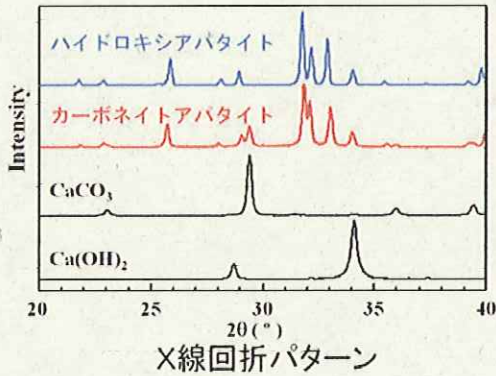
予備実験段階では、水酸化カルシウム粉末を一軸加圧成形した圧粉体を、室温で 2 週間、二酸化炭素に暴露し、炭酸カルシウム ( $\text{CaCO}_3$ ) ブロックを調製して、これをリン酸化することによって CAP を作製していたが、炭酸カルシウムブロック中に微量の水酸化カルシウムが残存することが判明した。水酸化カルシウムの残留は反応不足と考えられたため、反応時間を伸ばして反応完了に必要な時間を検討した。その結果、通常条件では 8 週間以上の時間を要することがわかった。8 週間は実際の製造工程では長すぎるので、気相系での製造は断念し、水溶液系での製造を試みた。すなわち、二酸化炭素に 24 時間暴露し、初期硬化させた水酸化カルシウム圧粉体 (組成はほぼ炭酸カルシウム) を、室温、60°C、80°C の 0.5 mol/L の炭酸水素ナトリウム水溶液中に浸漬し、炭酸化を検討した。その結果、80°C にて 8 日間炭酸化することにより水酸化カルシウムが完全に消失し、炭酸カルシウムとなることがわかった。これを 60°C の 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  水溶液を用いて 2 週間リン酸化すると、炭酸アパタイトが調製できることを確認した。

粉末 X 線回折解析では、作製した硬化体にアパタイトのピークが確認された。ピークのシャープさと重なりからアパタイトの結晶性が低いことが明らかとなった。

FT-IR 解析では、吸収ピークが 1450、1410、875  $\text{cm}^{-1}$  に観察され、このアパタイトが B 型カーボネイトアパタイトであること



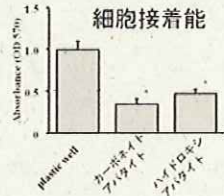
が明らかとなった。炭酸イオンの含有量は15.5 wt%、ダイアメトラル引張強度は5.55 MPaであった。



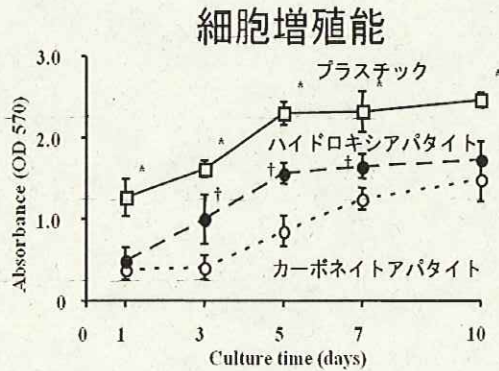
フーリエ変換赤外分光光度計分析 (FT-IR)

(2) CAP がヒト骨髄細胞の接着、増殖および骨芽細胞への分化に与える影響の評価

細胞接着では、CAP に接着した細胞は培養プラスチックより少なかったが、ハイドロキシアパタイト (HAP) とは差がなかった。



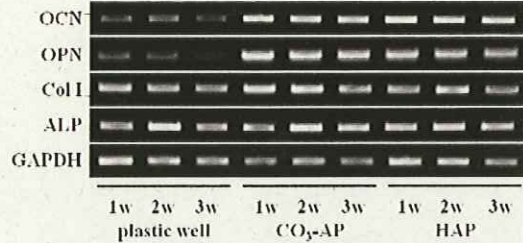
細胞増殖では、HAP と比べると、CAP 上で培養した骨髄細胞は、培養7日目までは増殖能が低かったが、10日目では有意差は認められなかった。



骨芽細胞への分化では、CAP および HAP 上で培養した細胞では、培養プラスチック

と比べて、オステオポンチン、オステオカルシンの遺伝子発現が上昇した。I型コラーゲンとアルカリフォスファターゼの発現には明らかな上昇はなかった。

## 骨関連の遺伝子発現

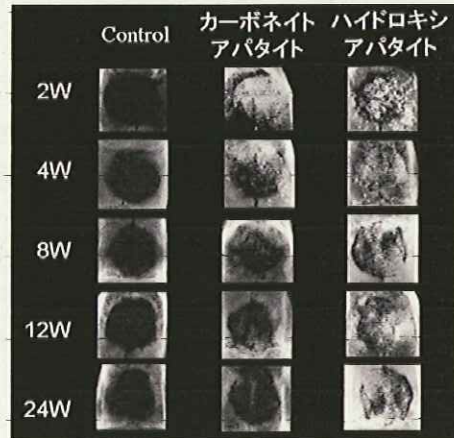


以上より、CAP のヒト骨髄細胞との接着能、細胞増殖能および骨芽細胞への分化促進能は HAP と同程度であることが明らかとなった。HAP は既に骨再建材料や骨再生用のスキヤフォールドとして臨床応用されていることから、CAP も同様に骨再建材料や骨再生用スキヤフォールドへの応用が可能であることを示唆している。

(3) 動物実験によるカーボネイトアパタイトの骨再建への応用に関する検討

① ラット頭頂骨の再建実験

ラット頭頂骨に埋入した HAP 顆粒には 2~24 週の観察期間でレントゲンの変化はなかったが、CAP 顆粒の X 線不透過性は経時的に低下した。これは CAP 顆粒が吸収し、周囲から新生した骨と置換していることを示唆している。



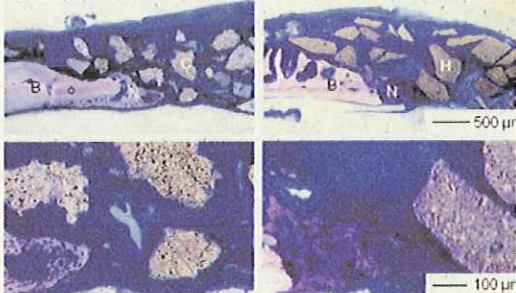
## 頭頂骨のX線写真

埋入後2週では、既存骨から新生骨が伸び始めているが、CAP、HAP 顆粒ともに骨とは直接接触していなかった。HAP 顆粒の大きさ、形態には変化はなかったが、CAP 顆粒の表面は粗糙になり、顆粒の大きさも小さくなっていた。これは、CAP が既に吸収を開始していることを示している。



埋入後8週では、CAP、HAP 顆粒ともに、ほとんどの顆粒が新生骨に取り囲まれている。両顆粒共に、周囲には同心円状の骨が形成され、新生骨との間には線維性組織の介在はなく、両者とも優れた骨伝導性と生体親和性を有することが判る。HAP 顆粒の大きさと形態には変化はないが、CAP 顆粒は小さくなると共に、形態が丸く変化している。これはCAPが吸収されながら骨と置換していることを示している。

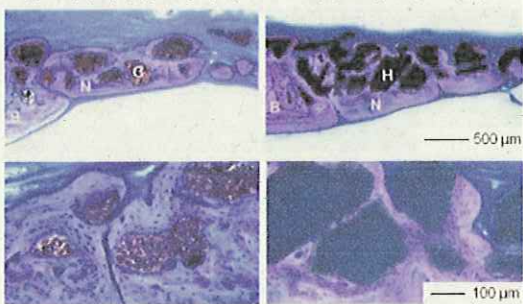
カーボネイトアパタイト      ハイドロキシアパタイト



### 埋入後2週 (トルイジンブルー染色)

(B: 既存骨, C: CO<sub>3</sub>-AP顆粒, H: HAP顆粒, N: 新生骨)

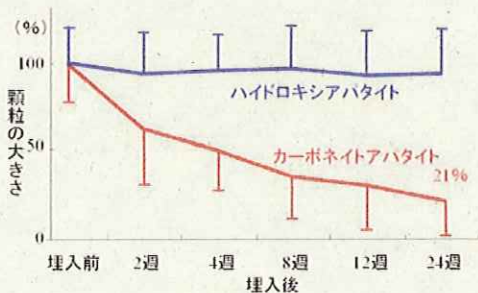
カーボネイトアパタイト      ハイドロキシアパタイト



### 埋入後8週

CAP、HAP 顆粒の大きさを計測すると、実験期間中、HAP 顆粒の大きさには変化がなかったが、CAP 顆粒は移植後 24 週には大きさが 21%に減少した。

### 骨内における顆粒の大きさの経時変化



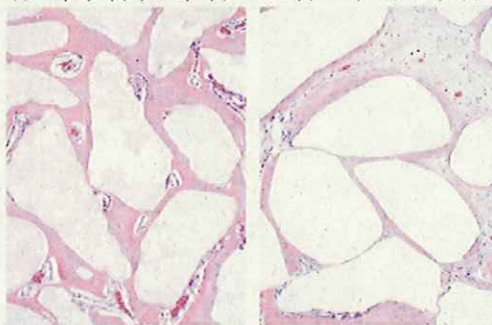
以上の結果より、CAP は骨置換性の骨再建材料となりうることが明らかとなった。

### ②ウサギ大腿骨の再建実験

埋入後 4 週では、CAP 顆粒の多くは幼弱

な新生骨に取り囲まれている。HAP 顆粒も一部で幼弱な新生骨で取り囲まれているが、CAP に比べてその範囲は少ない。両顆粒とも、線維性組織で接している部分では殆ど炎症性細胞浸潤は見られない。この所見は、CAP が優れた骨伝導性と生体親和性を有することを示している。

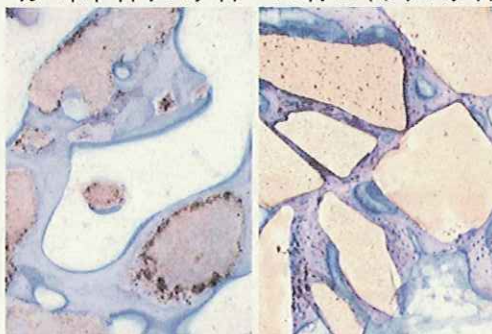
カーボネイトアパタイト      ハイドロキシアパタイト



### 埋入後4週 (脱灰切片、HE染色)

埋入後 12 週では、両顆粒とも多くの部位で新生骨によって取り囲まれている。HAP 顆粒は大きさ・形態に変化はないが、CAP 顆粒は大きさが小さくなると共に、形態が丸く変化している。CAP 顆粒はその周囲に骨を形成しつつ吸収している。この所見は、CAP が骨置換することを示している。

カーボネイトアパタイト      ハイドロキシアパタイト

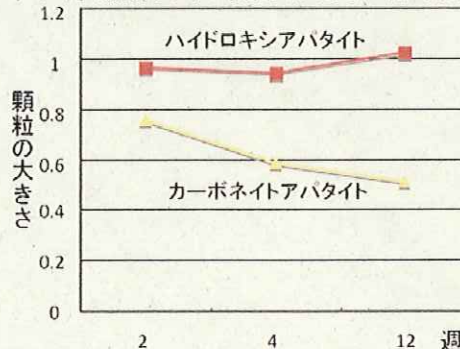


### 埋入後12週

(非脱灰切片、トルイジンブルー染色)

ウサギ大腿骨内の CAP と HAP 顆粒の大きさの経時的変化を測定した。ラットの実験と同じく、HAP 顆粒の大きさには変化がな

### ウサギ大腿骨内での顆粒の大きさの経時変化

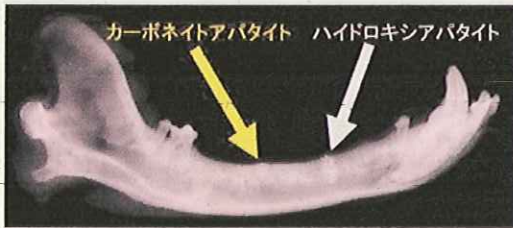




かったが、CAP 顆粒は移植後 12 週には大きさが 60% に減少した。ラットの実験と比較して、吸収速度はやや遅い傾向であった。この原因としては、ウサギの実験に使用した顆粒がやや大きいことと動物種による違いが関連している可能性が示唆された。

### ③ イヌ下顎骨の再建実験

試料を移植したイヌの歯肉や粘膜には炎症等の異常な臨床所見は観察されなかった。また、全身的にも異常はなく、イヌは全頭とも実験を行った 6 か月間健康であった。レントゲン観察では、埋入後 6 か月では、CAP 顆粒が小さくなると共に、周囲の骨と同化している像が確認できた。



イヌ顎骨へ埋入後6か月のX線像

移植後 6 か月の非脱灰組織切片では、CAP 顆粒の周囲には異常な炎症や感染所見は観察されなかった。顆粒のサイズは小さくなり、形も丸まってきたことから、吸収が進んでいることが判った。一部の顆粒は骨と直接結合しており、骨との間に線維性組織の介在がないことから、CAP が優れた生体親和性と骨伝導性を有しているものと考えられた。



埋入後6か月のカーボネイトアパタイト

### (4) カーボネイトアパタイトの骨再生医療用 scaffold への応用

骨再生用スキャフォールドとして、連通気孔を有する CAP 多孔体の作成を試みた。ウレタンの多孔体フォームを水酸化カルシウム溶液に浸漬させ、乾燥させた後に、700~800°C でウレタンを酸素・炭酸ガス雰囲気下で焼結した。このフォームを  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$  中に浸漬することによって、溶解析出反応を利用し、CAP の連通気孔体を作成することに成功した。気孔径が

700  $\mu\text{m}$  の連通孔を有する CAP 多孔体を作製し、動物実験を行った。移植後 1 か月では CAP の表面に沿って骨が伸長して、新生骨がその表面を覆った。その間、CAP は吸収されて、さらに骨との置換が進んでいた。炎症反応も軽微で骨再生医療に有用であることが示唆された。

### 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 5 件)

- ① Zaman C.T., Takeuchi A., Matsuya S., Zaman Q.H., Ishikawa K., Fabrication of B-type carbonate apatite blocks by the phosphorization of free-molding gypsum-calcite composite. Dental Materials Journal, 27, 10-715, 2008. (査読：有)
- ② Minamiguchi S., Takechi M., Yuasa T., Momota Y., Tatehara S., Takano H., Miyamoto Y., Satomura K., Nagayama M., Basic research on aw-AC/PLGA composite scaffolds for bone tissue engineering. J Mater Sci Mater Med., 19, 1165 - 1172, 2008. (査読：有)
- ③ Lee Y., Hahm Y.M., Matsuya S., Nakagawa M., Ishikawa K., Characterization of macroporous carbonate-substituted hydroxyapatite bodies prepared in different phosphate solutions. Journal of Materials Science, 42, 7843-7849, 2007. (査読：有)
- ④ 館原誠晃, 武知正晃, 桃田幸弘, 湯浅哲也, 高野栄之, 徳山麗子, 宮本洋二, 長山 勝, HAP-PLGA複合体による顎骨再生への応用に関する実験的研究. 日本口腔外科学会雑誌, 53, 588-593, 2007. (査読：有)
- ⑤ Takechi M., Miyamoto Y., Ishikawa K., Momota Y., Yuasa T., Tatehara S., Takano H., Minamiguchi S., Nagayama M., Histological evaluation of apatite cement containing atelocollagen. Dental Material Journal, 26, 194-200, 2007. (査読：有)

[学会発表] (計 9 件)

- ① Ishikawa K., Fabrication of carbonate apatite blocks and histomorphological evaluation, The 4<sup>th</sup> International Symposium on Apatites and Correlative Biomaterials, September 11, 2008, Manila.
- ② 宮本洋二, 館原誠晃, 湯浅哲也, 桃田幸弘, 藤澤健司, 中田 憲, 高野裕史, 永井宏和, 福田雅幸, 低結晶性炭酸アパタ



イトの骨補填材への応用に関する研究、第9回日本口腔顎顔面外傷学会総会・学術大会、2007年7月28日、名古屋。

- ③ 宮本洋二、顎骨再建の現況と課題。シンポジウムテーマ：「先進骨再生材料と骨再生治療の最前線」、第22回日本歯科産業学会、2007年7月22日、徳島。
- ④ 中田 憲、永井宏和、岩波洋一、高野裕史、福田雅幸、宮本洋二。歯由来細胞株を用いた歯の再生医療の開発。第2報：象牙芽細胞株の樹立と炭酸アパタイトのスキヤホールドとしての有用性。第61回日本口腔科学会総会・学術集会、2007年4月19日、神戸。
- ⑤ 福田雅幸、宮本洋二、岩波洋一、中田 憲、高野裕史、永井宏和、桃田幸弘、武知正晃。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：生体内での吸収機転の解明。第61回日本口腔科学会総会・学術集会、2007年4月20日、神戸。
- ⑥ 福田雅幸、宮本洋二、柏木 了、中田 憲、高野裕史、永井宏和、武知正晃、松家茂樹、石川邦夫。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：皮下における生体内挙動。第28回日本バイオマテリアル学会大会、2006年11月27日、東京。
- ⑦ 福田雅幸、宮本洋二、岩波洋一、中田 憲、大貫敬嘉、永井宏和、桃田幸弘、武知正晃。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3報：長期の動物実験結果。第60回日本口腔科学会、2006年5月12日、名古屋。
- ⑧ 永井宏和、中田 憲、大貫敬嘉、岩波洋一、湯浅哲也、武知正晃、福田雅幸、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2報：ヒト骨髄細胞の増殖および骨芽細胞への分化に与える影響。第60回日本口腔科学会、2006年5月12日、名古屋。
- ⑨ 南口知穂、武知正晃、湯浅哲也、桃田幸弘、館原誠晃、高野栄之、石川邦夫、宮本洋二、長山 勝。低結晶性炭酸アパタイト含有PLGA複合体が多核巨細胞に与える影響。第60回日本口腔科学会、2006年5月12日、名古屋。

[図書] (計 1件)

- ① Fukuda M., Miyamoto Y. Biomaterials for cleft lip and palate surgery. In Kawai T., Natsume N. and David S. Precious eds, Current Experimental Study for Treatment of Cleft Lip and Palate. Chapter1, Basic research concerning treatment of cleft lip and/or palate (CL/P), pp103-111,

Quintessence Publishing - Co., Ltd,  
Tokyo, 2008.

[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) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

- ・石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：90202952 (H18、19年度)
- ・松家 茂樹 (MATSUYA SHIGEKI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：00108755 (H18、19年度)
- ・福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)  
秋田大学・医学部・准教授  
研究者番号：20272049
- ・永井 宏和 (NAGAI HIROKAZU)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授 (H18年度)  
研究者番号：50282190
- ・高野 裕史 (TAKANO HIROSHI)  
秋田大学・医学部・助教 (H18年度)  
研究者番号：30282172
- ・中田 憲 (NAKATA AKIRA)  
秋田大学・医学部・助教  
研究者番号：50400510 (H18年度)
- ・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 (H19、20年度)
- ・玉谷 哲也 (TAMATANI TETSUYA)  
徳島大学・医学部歯学部付属病院・講師  
研究者番号：30274236 (H19、20年度)
- ・茂木 勝美 (MOTEGI KATSUMI)  
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：20335805 (H19、20年度)

### (3) 連携研究者

- ・石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：90202952 (H20年度)
- ・松家 茂樹 (MATSUYA SHIGEKI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：00108755 (H20年度)