

平成22年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592245

研究課題名（和文） 高溶解性ベクトルリン酸カルシウムセメントの創製

研究課題名（英文） Development of vector calcium phosphate cement with high solubility

研究代表者

河野 文昭（KAWANO FUMIAKI）

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：60195120

研究成果の概要（和文）：本研究は、骨置換されやすい骨セメントの開発を目指し、リン酸カルシウムセメント中に Sr を導入してアパタイト（HAP）セメントの高溶解化および特性の改善に関する検討を行い、試作セメントの細胞毒性試験と組織学的検討を行った。その結果、SrCO<sub>3</sub> 無添加 Sr-HAP セメントが従来型 HAP セメントと比較して最も優れた特性を示した。作製した Sr-HAP セメントは高溶解性および骨形成能を有しており、骨セメントとして実用化できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to evaluate the strength and other properties of CPC containing Sr and carbonate, and to show its superiority to current CPC.

The DTS of set cements containing SrCO<sub>3</sub> were significantly lower than that of non-Sr-containing CPC. The solubility of set cements using 5%SrCO<sub>3</sub> was twice those of set cements without SrCO<sub>3</sub>. From histological observations implanted for 1 week, inflammatory macrophages and osteoclast cells migrated into the cavity. Results implanted for 4 weeks showed a small amount of new bone was observed, which covered the cavity. These processes were observed earlier in the group using 0%SrCO<sub>3</sub> than in the control group. We have developed Sr-containing CPC with high solubility, which showed several advantages as a bone replacing material.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工

キーワード：生体材料，硬組織代替材料，骨補填材，骨再生工学，セラミックス

### 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，高齢化社会を展望したときに現代歯科医療の解決しなければならぬ重要な課題である。また高齢者のみならず，口唇・口蓋裂患者の骨欠損部位に対する骨補填療法の有用性は高く，骨補填材が骨へと置換した場合には，歯槽骨の連続性が得られるばかりか，新生骨部への歯の移動が可能となる。現在，歯槽骨欠損などに対して最も有効とされるのは自家骨であるが，移植床に直接骨形成能を有する半面，骨採取による外科的な侵襲は不可避で，形成性や機械的強度は期待できず，さらに，採取できる骨量には限りがある。このため，供給に関して量的制限を受けない高機能性人工骨補填材の開発が求められている。一方，最近の組織再生工学の著しい発展から，近い将来，硬組織も再生工学の利用により再現できるようになるものと思われる。しかし，硬組織の場合は組織を再生させるための足場的な材料が必要である。その足場材料としては，体内で吸収または分解されるものが望ましい。さらに骨補填材に対して，骨再生促進やその他の薬効作用が必要とされる部位への薬物供給などの要望も強い。

### 2. 研究の目的

本研究では，骨補填材として研究および利用されているリン酸カルシウムセメントに高い生体吸収性と薬物徐放性を付与することを目的とする。リン酸カルシウムセメントには各種のリン酸カルシウム粉末を利用されているが，何れも水または練和液にて練和することによりハイドロキシアパタイト（HAP:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ ）を生成して硬化する。研究代表者と研究分担者は，これまでに $\alpha$ 型リン酸三カルシウム（ $\alpha$ -TCP:  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ）を基材粉末に用いて各種の検討を行ってきた（Dent Mater J 17: 223-232, 1998. Bio-Med Mater Eng 13: 247-259, 2003. Dent Mater J 24: 104-110, 2005. など）。また最近，ストロンチウムが骨吸収を阻害し，骨形成を促進するという報告がみられるようになってきた。そこで，我々はこれに着目してカルシウムよりイオン半径の大きいストロンチウムを $\alpha$ -TCP系のリン酸カルシウムセメントに導入

を試みる。セメント中に析出するアパタイト結晶にイオン半径の大きいストロンチウムが一部導入されることにより，アパタイトの結晶性が不安定になり，溶解性を向上できることが予想される。さらに練和液にもストロンチウム含有溶液を用い，硬化挙動や結晶相の状態を検討する。諸性質および擬似体液や生理的食塩水での溶解性を調べた後，最終的には細胞培養試験や動物実験を経て，材料創製を試みる予定である。また，薬物徐放については，練和液に導入することを考えている。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料作製

セメントの基材粉末には， $\alpha$ 型リン酸三カルシウム（ $\alpha$ -TCP;  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ）（太平化学、大阪）を用いた。 $\alpha$ -TCPをボールミル（ANM-1000、日陶科学、名古屋）で粉砕し、試験用ふるい（飯田製作所、大阪）にて平均粒径  $2 \mu\text{m}$  に調整した後、0, 5, 10, 20 mass%の炭酸ストロンチウム（ $\text{SrCO}_3$ ）（特級、キシダ化学、大阪）粉末を添加し、めのう乳鉢にて30分間混和した。セメントの練和液には、骨 HAP 中への Sr 導入源として有効な塩化ストロンチウム（ $\text{SrCl}_2$ ）（試薬研究用、キシダ化学、大阪）水溶液<sup>39)</sup>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。ガラス練板上に 0, 5, 10, 20 mass%の  $\text{SrCO}_3$  を添加した $\alpha$ -TCP 粉末を置き、 $\text{SrCl}_2$  水溶液で練和後速やかに  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液を加え、セメントスパチュラにて1分間練和した。比較試料として $\alpha$ -TCP を塩化カルシウム（ $\text{CaCl}_2$ ）

（1級、キシダ化学、大阪）水溶液と  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液にて同様に練和し、Sr を添加しない従来型 HAP セメントを作製した。初期硬化後のセメント硬化体を、 $37^\circ\text{C}$  湿度約 100% の恒温槽中で24時間および1週間保持し試料とした。 $\alpha$ -TCP に対して 0, 5, 10, 20 mass%の  $\text{SrCO}_3$  を添加し作製したセメント試料を、以下それぞれ Sr-HAP (0%)、Sr-HAP (5%)、Sr-HAP (10%)、Sr-HAP (20%) と略記する。Sr 成分無添加の比較試料は、従来型 HAP セメントと表記する。

#### (2) 硬化時間の測定

セメントの硬化時間測定は、国際標準規格 ISO 1566 に規定されている歯科用リン酸亜鉛セメントの硬化時間測定法に準じてピカー針法にて行った。

(3) 試作セメント内部の観察

セメント試料を破断し走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-5300、日本電子、東京) で観察した。

(4) 機械的性質の測定

直径 6 mm 高さ 3 mm の試料の間接引張り強さ (diametral tensile strength; 以下 DTS と略記する) を測定した。クロスヘッドスピードは  $1.0 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$  とした。

(5) 試作セメントの結晶相分析

セメント硬化体を乾燥させ 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  $\text{Cu} \cdot \text{K}\alpha$  を用い、管電圧 30 kV、管電流 15 mA、走査速度  $2\theta = 1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$  ( $\theta$ : 回折角度)、走査ステップ  $0.05^\circ$  の条件で測定した。

(6) 試作セメントの成分同定

粉碎した粉末に対して重量比 200 倍の赤外線吸収用特製試薬臭化カリウム (KBr) (ナカライテスク、京都) を加え、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) (FTS-40、Bio-rad、USA) にて測定した。

(7) 試作セメントの生理食塩水に対する溶解性の測定

直径 6 mm 高さ 3 mm の円柱試料を  $37^\circ\text{C}$  の生理食塩水に浸漬し、振盪機 (PIC-100S、パナソニック、大阪) 中で 24 時間振盪し、浸漬前後の単位表面積あたりの重量変化を求めた。

(8) MC3T3-E1 による細胞毒性試験

細胞毒性試験には Sr-HAP (0%) セメント、と 0.1Sr-HAP (0%), Sr 無添加の従来型 HAP セメントを用いた。硬化体を Hanks 溶液 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) に入れ、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 7 日間静置し、これを試料とした。試料上に  $5.0 \times 10^4 \text{ cells/mL}$  に調整した MC3T3-E1 細胞懸濁液を播種した。細胞は  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  環境下で 7 日間培養し、培地交換は 2 日毎に行った。試料表面の MC3T3-E1 を剥離し、細胞浮遊液を作製し細胞生存率の定量をおこなった。また、DNA 定量キットで細胞数を定量した。

(9) ラット骨組織への埋入による組織学的検討

動物実験は、徳島大学動物実験委員会承認の下、徳島大学動物実験指針に準じて行った。埋入実験には 6 週齢の雄性 SD ラット (日本クレア) 20 匹を使用した。 $\alpha$ -TCP 粉末を濃度  $1.0 \text{ mol/L}$  の  $\text{SrCl}_2$  水溶液および濃度  $0.6$

$\text{mol/L}$  の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  水溶液にて練和し (P/W = 2.0)、ペースト状のまま切削部位に充填し、感染防止および唾液によるセメントの溶出防止のため、スーパーボンド C&B (サンメディカル、滋賀) にて仮封した。反対側は同様に切削した後スーパーボンド C&B にて仮封のみを行い、コントロールとした。移植 1、2、4 週後に上顎骨組織を摘出し、HE 染色した組織切片を、光学顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) 試作セメントの特性評価について

① 試作セメントの硬化時間

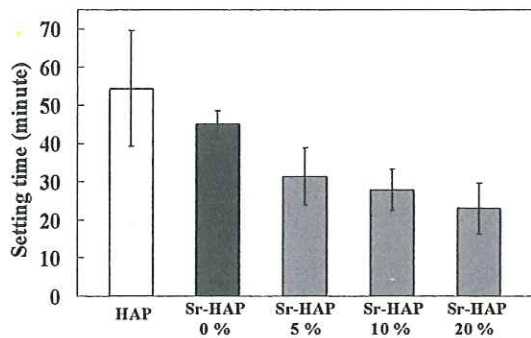
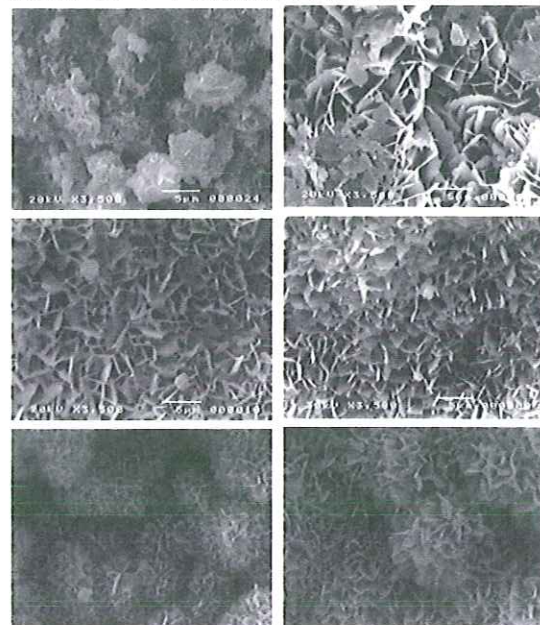


図1 試作セメントの硬化時間

従来型 HAP セメントと比較して Sr-HAP (0%) セメント、Sr-HAP (5%) セメント、Sr-HAP (10%) セメント、Sr-HAP (20%) セメントの順で硬化時間が短くなる傾向が得られた (図1)。

② 試作セメント破断面の形態学的観察



硬化後 24 時間 硬化後 1 週間

図2 セメント試料破断面の SEM 像  
硬化後 24 時間では Sr-HAP (0%) セメントは OCP の板状結晶を析出したのに対し、従来型

HAP セメントは OCP 結晶の成長段階であった。また、炭酸を添加した Sr-HAP (5%) セメントは CAP に典型的な菊花状の板状結晶を析出した。硬化後 1 週間になると、Sr-HAP (0%) セメントには緻密な HAP の針状結晶が認められたのに対して、従来型 HAP セメントには成長した OCP の板状結晶のみが認められた。また、Sr-HAP (5%) セメントは CAP 結晶を成長させた。

### ③試作したセメントの機械的性質

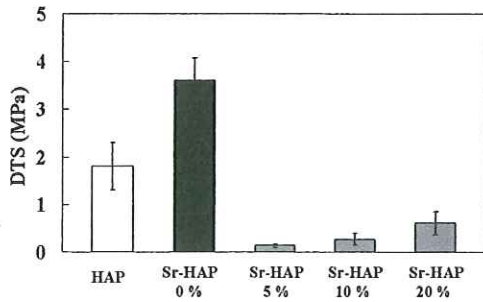


図3 試作セメントの間接引強さ

図3は1週間の試作セメントの機械的性質を測定した結果である。試作セメント試料のDTSは、従来型 HAP セメントと比較して Sr-HAP (0%) セメントの強度は上昇したのに対して、炭酸基添加試料のDTSは添加していない試料と比較して著しく低下する結果となった。しかし、炭酸基添加量の増加とともに強度は増加した。

### ④試作セメントの結晶相分析

図4に試作セメントの結晶相変化を示す。

a) は  $\alpha$ -TCP に対して 5 mass% の  $\text{SrCO}_3$  を添加

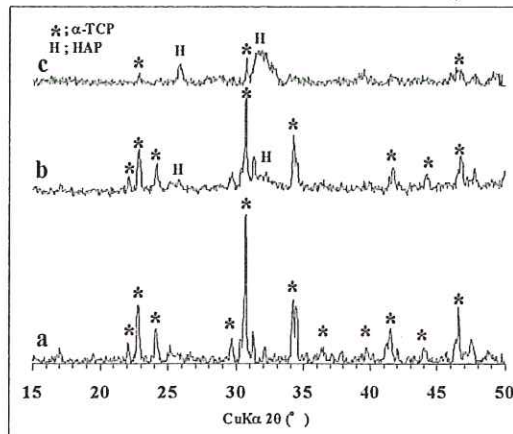


図4 5 mass% $\text{SrCO}_3$  添加  $\alpha$ -TCP 粉末と硬化後のセメントの結晶相

した粉末の XRD パターンを示し、b) が硬化後 24 時間のセメント、c) は硬化後 1 週間のセメントである。a) にはセメント原料粉末である  $\alpha$ -TCP のピークが認められた。b) には低結晶性 HAP の  $31^\circ - 34^\circ$  のピークがわずかに認められたが、ほとんどが  $\alpha$ -TCP のピークであった。しかし、硬化後 1 週間の c) にな

ると  $\alpha$ -TCP の残存が部分的に認められるものの、 $31^\circ - 34^\circ$  のピークが顕著となり、加えて  $25^\circ - 26^\circ$  付近の 002 ピークも出現した。硬化後 1 週間では、Sr-HAP のすべてのセメントの試料について  $25^\circ - 26^\circ$  付近と  $31^\circ - 34^\circ$  のピークが検出された。Sr-HAP (0%) セメントおよび Sr-HAP (5%) セメントには  $\alpha$ -TCP の残存が少なかったのに対して、Sr-HAP (10%) セメントおよび Sr-HAP (20%) セメントには多量の  $\alpha$ -TCP が残存した。

### ⑤試作セメントの成分同定

図5は硬化1週間後の FT-IR スペクトルである。a) が従来型 HAP セメントのパターンで、b) から e) がそれぞれ Sr-HAP (0%) セメント、Sr-HAP (5%) セメント、Sr-HAP (10%) セメント、Sr-HAP (20%) セメントである。a) から e) の全てに顕著な  $1000 - 1090 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収バンドと  $945 - 965 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収

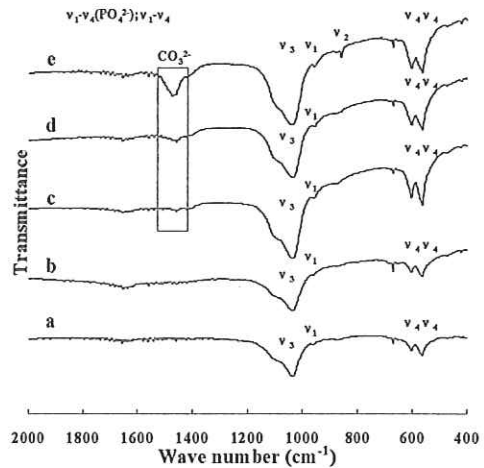


図5 試作セメントの FT-IR 分析結果  
バンドがわずかに認められた。また、炭酸基添加量が多くなるにつれて  $870 \text{ cm}^{-1}$  および  $1470 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収バンドが認められ、特に e) には顕著に認められた。

### ⑥試作セメントの生理食塩水に対する溶解性の測定

Sr-HAP セメントの溶解性を確認するため生理食塩水への浸漬実験を行った結果、従来型 HAP セメントと比較して  $\text{SrCO}_3$  無添加試料である Sr-HAP (0%) セメントの溶解性は上昇した。また、 $\text{SrCO}_3$  添加量の増加に伴いセメントの溶解性は上昇したが、 $\alpha$ -TCP に対して 10 mass% の  $\text{SrCO}_3$  を添加したセメント試料の生理食塩水に対する溶解性は飽和状態となった。

### 2. Sr-HAP セメントの毒性試験と組織学的検討について

#### ①MC3T3-E1 による細胞毒性試験

図6はセメントを Hanks 溶液に入れ、 $37^\circ \text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  環境下で 7 日間静置した後の Hanks 溶

液の pH 変化である。セメントを浸漬しない Hanks 溶液と比較して、従来型 HAP セメントを浸漬した場合の pH 低下は軽度であったのに対して、Sr-HAP (0%) セメントおよび 0.1Sr-HAP (0%) セメントを浸漬した場合の pH 低下は大きかった。

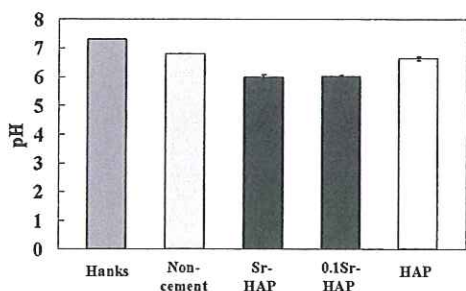


図6 7日間静置後の Hanks 溶液の pH MC3T3-E1 培養 7 日間後の生細胞数変化を、MTS 法にて測定した結果を図 7 に示す。従来型 HAP セメントと比較して Sr-HAP (0%) セメントは同程度の生細胞数であったが、0.1Sr-HAP (0%) セメントは有意に増加した ( $p < 0.01$ )。

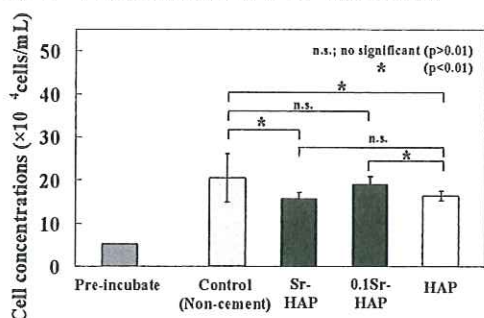


図7 MC3T3-E1 培養 7 日後の生細胞数

培養 1 週間後の MC3T3-E1 の細胞数を定量するため、DNA 量変化を測定した結果では Sr-HAP (0%) セメントおよび 0.1Sr-HAP (0%) セメントは従来型 HAP セメントと比較して同程度の DNA 量となり、有意差は認められなかった ( $p > 0.01$ )。また両者について、トリパンブルー色素排除試験による生死細胞比率判別、および顕微鏡像からの細胞形態学的な変化に差違はみられなかった。

②ラット骨組織への移植による組織学的検討  
移植後 1 週間ではコントロールおよび Sr-HAP (0%) セメント移植側の両者に破骨細胞および炎症性細胞が認められた。移植後 2 週間コントロールおよび Sr-HAP (0%) セメント移植側ともに炎症反応はほとんど認められなくなり、骨芽細胞と新生骨が確認された。移植後 4 週間ではコントロールおよび Sr-HAP (0%) セメント移植側の両者に骨芽細胞、新生骨および成熟骨が認められたが、コントロールと比較すると Sr-HAP (0%) セメント移植側において新生骨が多く認められた。

## 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 2 件)

① Sultana R, Hamada K, Ichikawa T, Asaoka, K. Effects of heat treatment on the bioactivity of surface-modified titanium in calcium solution, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 査読有り, 19 巻 193-204, 2009

② Shinohara, C, Yamashita K, Matsuo, T, Kitamura, S, Kawano, F. Effect of Carbonic Anhydrase Inhibitor Acetazolamide (AZ) on Osteoclasts and Bone Structure, *Journal of Hard Tissue Biology*, 査読有り, 16 巻, 155-123, 2007.

[学会発表] (計 3 件)

① 関根一光, 浜田賢一, 山下菊治, 河野文昭, 浅岡憲三, ストロンチウム含有アパタイトセメントの生体反応, 日本歯科理工学会, 2009.4.11, 東京

② 藤原江美, 関根一光, 浜田賢一, 山下菊治, 河野文昭, 浅岡憲三, 高溶解型ストロンチウム含有アパタイトセメントの生体反応の検討, 日本歯科理工学会, 2008.4.26, 鶴見

③ 藤原江美, 河野文昭, 浜田賢一, 浅岡憲三, ストロンチウム含有炭酸アパタイトセメントの溶解性, 日本歯科理工学会, 2007.5.12, 東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 文昭 (KAWANO FUMIAKI)

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: 60195120

(2) 研究分担者

浜田 賢一 (HAMADA KENICHI)

徳島大学・大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 00301317

大石 美佳 (OHISH MIKA)

徳島大学・大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号: 50263851

(3) 研究協力者

関根一光 (SEKINE KAZUMITU)

徳島大学・大学院・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教