

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10333

研究課題名(和文) 一方向連通気孔を持つ炭酸アパタイトによる顎骨再建と骨再生医療への応用

研究課題名(英文) Application in jaw bone reconstruction and bone regenerative medicine by uniaxially porous carbonate apatite

研究代表者

大江 剛(OHE, Go)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：60432762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、一方向連通気孔を有し骨置換性の炭酸アパタイト多孔体(uniaxially porous carbonate apatite:Up-CAP)の骨再建材料および骨再生用スキャフォールドとしての有用性を評価することである。

そのために、(1)骨芽細胞様細胞を用いたUp-CAPの細胞学的評価(2)ウサギ顎骨欠損モデルを作製し、顎骨欠損部にUp-CAPを埋植し画像的および組織学的評価を行った。以上より、Up-CAPが優れた骨再建材料および骨再生用スキャフォールドとなりうる事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔外科の臨床では、悪性腫瘍等の治療の結果、広範囲の顎骨欠損を生じることが多く、この顎骨欠損の再建法が大きな課題となっている。以前より、骨再建のゴールドスタンダードは自家骨であり、腸骨や腓骨などの自家骨を顎骨欠損へ移植する再建法が行われてきたが、自家骨採取は患者へ大きな身体的侵襲や採取量に限界があることが問題である。

本研究で使用したUp-CAPは人工的に合成可能で、均一な一方向性の連通気孔を有するため、既存のランダムな方向の気孔を持つ多孔体よりも、速やかに骨系細胞や微小血管が材料中央部にまで侵入し、かつ、側方からの軟組織の侵入を阻止できるため、迅速な骨形成と骨への置換が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the usefulness of uniaxially porous carbonate apatite (Up-CAP) as a bone reconstruction material and a scaffold for bone regeneration.

To this end, (1) cytological evaluation of Up-CAP using osteoblast-like cells and (2) imaging and histological evaluation of Up-CAP in a rabbit jaw defect model were carried out by implanting Up-CAP in the jaw defect. The results showed that Up-CAP could be an excellent bone reconstruction material and scaffold for bone regeneration.

研究分野：口腔外科学

キーワード：炭酸アパタイト 一方向連通気孔 骨再生用スキャフォールド 骨再建材料 骨再生

1. 研究開始当初の背景

口腔外科の臨床では、悪性腫瘍等の治療の結果、広範囲の顎骨欠損を生じることが多く、この顎骨欠損の再建法が大きな課題となっている。以前より、骨再建のゴールドスタンダードは自家骨によるものであり、腸骨や腓骨などの自家骨を顎骨欠損へ移植する再建法が行われてきたが、自家骨採取は患者へ大きな身体的侵襲となることが問題である。この問題を解決するために、ハイドロキシアパタイト (HAp) などが人工合成され、骨再建に用いられてきた。しかしながら、この HAp は体内ではほとんど吸収されずに長期に残留し、感染源となることがある。一方、骨もアパタイトからできているが、骨代謝に同調して吸収と添加を受ける。この違いは、骨アパタイトが純粋な HAp ではなく、炭酸基を含んだ炭酸アパタイトであることと、その結晶性が低いことに起因している。研究代表者らのグループは、水酸化カルシウムを出発物質として、溶解析出反応による炭酸化、リン酸化によって、炭酸アパタイトの人工合成に成功した。炭酸アパタイトは HAp と違って破骨細胞による吸収を受けるとともに、骨に置換することも明らかにした (Fujisawa, *Qhe et al.*, *J Mater Sci Mater Med* 29, 2018)。この炭酸アパタイト顆粒は、2017年に薬事承認を得て、2018年2月より株式会社ジーシーからサイトランス グラニューールとして市販されている。

新規骨補填材として臨床応用が始まった炭酸アパタイトであるが、現在は、緻密体の顆粒であるため、骨再生用スキャフォールドに用いることができない。スキャフォールドとして使用するためには、骨系細胞や血管が材料内部に侵入できる気孔を有した多孔体であることが必要である。申請者らはこれまでに、石膏にマイクロファイバーを混入し硬化させた後に、高温でファイバーを焼却することでファイバーの径に一致した気孔を有する多孔体を作製し、これを炭酸アパタイトに変換することに成功している。しかし、この手法ではファイバーを均等に分散させ、一方向性の気孔を付与することが不可能であった。これを解決するために、新たな手法として、水酸化カルシウムを出発物質とし、バインダーとともに押出成形機で「トコロテン」のように押し出すことにより、一方向の連通気孔を有する多孔体を作製し、これを炭酸アパタイトへ変換することに成功した。この一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体 (uniaxially porous carbonate apatite : Up-CAp) は、均一な一方向性の連通気孔を有するため、ランダムな方向の気孔を持つ多孔体よりも、速やかに骨系細胞や微小血管が材料中央部にまで侵入し、かつ、側方からの軟組織の侵入を阻止できるため、迅速な骨形成と骨への置換が期待できる。予備実験では、一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトをウサギの頭頂骨に載せるだけで、上方に向けた連通気孔に沿って骨と血管が侵入することを確認している。

以上より、一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体単独でも下顎区域切除による骨欠損を再建できる可能性があると考えている。また、連通気孔内に骨髄幹細胞などを注入、培養し、これを皮下等に埋植すれば、異所性骨再生が可能になるとも考えている。

2. 研究の目的

一方向連通気孔を有し骨置換性の炭酸アパタイト多孔体の骨再建材料および骨再生用スキャフォールドとしての有用性を評価することを本研究の目的とする。すなわち、(1) 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体単独による骨再生能、(2) 骨髄幹細胞などを注入、培養した一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体をスキャフォールドとした異所性骨再生を検証する。

3. 研究の方法

(1) 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体の作製

まず、前駆体である水酸化カルシウムを含有するバインダーを押出成形機を用い金型から押し出し、脱脂を行ったものを、炭酸化、リン酸化することで Up-CAp を作製する。炭酸化の過程で、炭酸塩水溶液の濃度、反応時間、反応温度を調整することで Up-CAp に含まれる炭酸含有量を調整できる。これにより、3~5種類の炭酸含有量の Up-CAp を作製する。

(2) 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体の物性評価

- ① 組成評価：組成と結晶性を粉末 X 線回折とフーリエ変換赤外分光光度計にて確認する。
- ② 内部構造および気孔径評価：気孔形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) および μ CT で検証する。炭酸含有量の違いによる気孔径の差異についても評価を行う。
- ③ 機械的強さ：万能試験機を用いて間接引張強さを測定する。この材料を用いた骨再建モデルを検討しているため、間接引張強さが 3MPa 以下の試料は以降の実験から除外する。
- ④ 気孔率：比表面積/細孔分布測定を行うことで気孔率を算出する。

(3) MC3T3-E1 細胞およびラット骨髄由来幹細胞 (rMSC) を用いた一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体の細胞学的評価

MC3T3-E1 細胞およびラット骨髄由来幹細胞 (rMSC) CAp 上で培養する。初期細胞接着と経時的な細胞増殖を MTT assay および SEM 観察で評価する。

(4) ウサギ顎骨区域切除モデルを用いた一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体単独による骨再建の評価

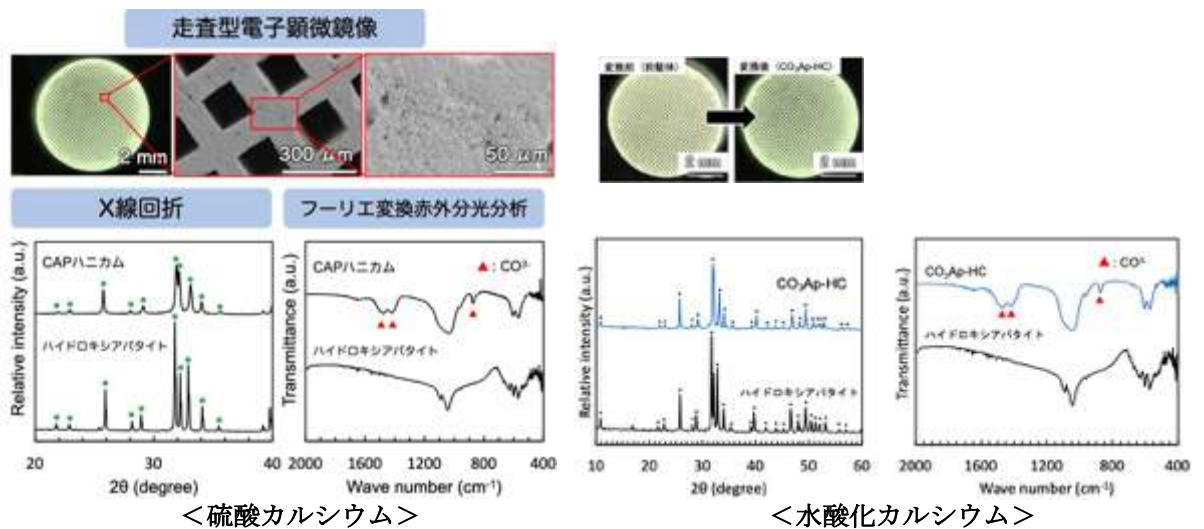
ウサギ顎骨区域切除モデルは Milora らの方法に準じて行う (J Oral Maxillofac Surg 68:1225, 2010)。ニュージーランド白ウサギの下顎骨に、5mm あるいは 10mm の間隙で区域切除を行う。顎骨欠損部に適合するよう成形しておいた Up-Cap を埋植し、チタンミニプレートで顎骨とともに固定する。対照群は一方向連通気孔を有さない炭酸アパタイトブロックとする。試料移植後 4 週、8 週および 16 週目に周囲組織と一塊に試料を摘出する。摘出試料のアルカリフオスフォターゼ活性、オステオカルシン産生量を生化学的に評価する。また、3 次元的な Up-Cap の吸収および骨への置換を μ CT で確認する。Up-Cap の組織親和性、骨伝導性、骨置換性の詳細等は病理組織学的に検索する。脱灰組織切片は HE 染色、非脱灰組織切片は Villanueva-Goldner 染色を行い、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡を用いて観察を行う。

4. 研究成果

(1) 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体の作製

ワックス系バインダーを含有する硫酸カルシウムあるいは水酸化カルシウムを押し出し成形機を用いてハニカム金型から押し出し、加熱脱脂することで硫酸カルシウムハニカムブロックを調製した。これを炭酸化、リン酸化することでハニカム形態を保ったまま組成を CAP に変換した。

(2) 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体の物性評価

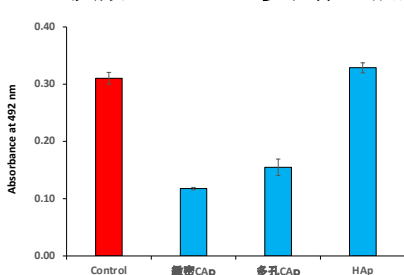


前駆体から炭酸アパタイトへの組成変換において、変換前後で形態に大きな変化は認めなかった。走査型電子顕微鏡による観察で、一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトブロックは均一な一方向の気孔を有していた。

圧縮強度：68 \pm 6 MPa
 気孔率：44.7%
 気孔サイズ：107 \pm 1 μ m
 壁厚：97 \pm 2 μ m

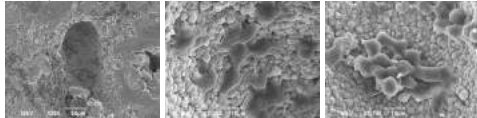
炭酸基量：8.9%

(3) MC3T3-E1 細胞およびラット骨髄由来幹細胞 (rMSC) を用いた一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体の細胞学的評価

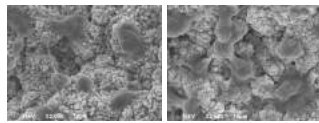


コントロール (プラスチックディッシュ)、CAP、Hap 上に MC3T3-E1 細胞を播種し、24 時間後の細胞接着性を MTT 法で評価した。多孔 CAP は緻密 CAP より優れた細胞接着性を示した。

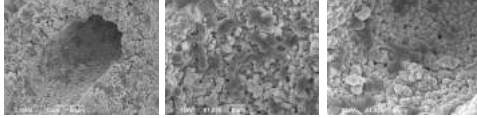
多孔CO₂Ap顆粒(エッペンチューブ)



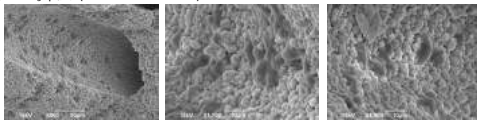
緻密CO₂Ap顆粒 (well plate)



多孔CO₂Ap顆粒(エッペンチューブOpen)



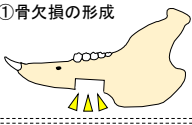

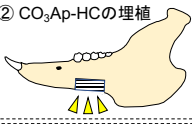

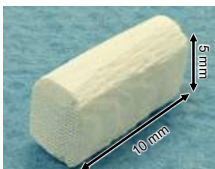
多孔CO₂Ap顆粒(エッペンチューブclose)



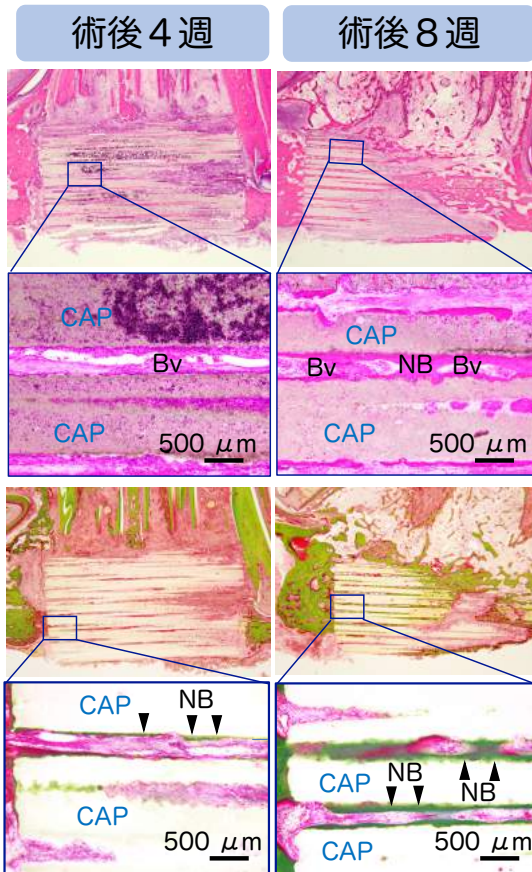
SEM像でCAP上のMC3T3-E1細胞を確認

同様にCAP上のrMSCをSEM像で確認。

(4) ウサギ顎骨区域切除モデルを用いた一方向連通気孔を有する炭酸アパタイト多孔体単独による骨再建の評価

実験条件	術式および術後評価
実験動物：日本白色ウサギ (雄性、3.5~4.0 kg) 埋入部位：下顎下縁	①骨欠損の形成  
埋入試料 CO ₂ Ap-HCを近遠心径10 mm 高さ5 mmに成形	② CO ₂ Ap-HCの埋植  
	治療期間 4週、8週 → <ul style="list-style-type: none"> ・μ-CT撮影 ・非脱灰切片作製 (Villanueva-Goldner染色)

当初は、Miloraらの方法に準じてウサギ顎骨区域切除モデルで行う予定であった。区域切除モデルでは試料を確実に固定することが困難であったため、埋入試料の安定性を考慮し、左図のような辺縁切除モデルに変更した。



<硫酸カルシウム>

【HE染色】

術後8週目までに材料に起因する炎症反応は認められず、CAPハニカムブロックが優れた組織親和性を示すことが確認された。また、術後4週目には気孔内部への血管新生を認め、8週目には血管周囲の骨新生を認めた。

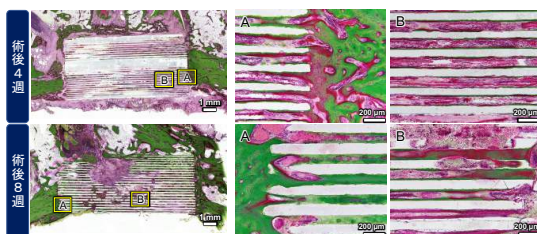
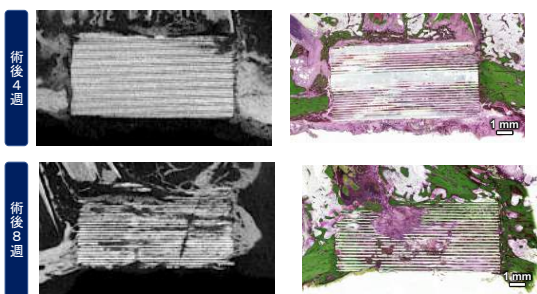
【V.G.染色】

術後4週目の段階でCAPハニカムブロックの気孔内部に気孔方向に配向した新生骨を認めており、術後経過とともに新生骨の成熟を確認した。

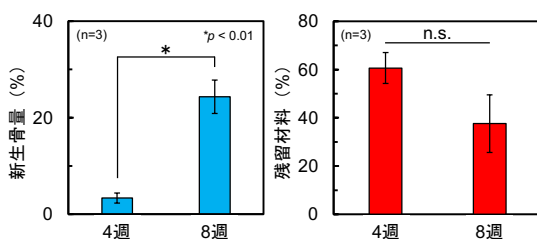
(Bv)Blood vessel, (NB)New Bone

<水酸化カルシウム>

母床骨から CO₃Ap-HC へ向かって骨伝導が進行し、術後 8 週で材料と母床骨との骨結合を確認した。また、治癒期間内に欠損部へ軟組織の侵入は認めなかった。



術後 4 週の段階で骨断端に局限して観察された新生骨は、経時的に気孔に沿って伸長し成熟した。



CO₃Ap-HC は経時的な吸収性を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kudoh Keiko, Fukuda Naoyuki, Kasugai Shohei, Tachikawa Noriko, Koyano Kiyoshi, Matsushita Yasuyuki, Ogino Yoichiro, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 77
2. 論文標題 Maxillary Sinus Floor Augmentation Using Low-Crystalline Carbonate Apatite Granules With Simultaneous Implant Installation: First-in-Human Clinical Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 985.e1 ~ 985.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joms.2018.11.026	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 該当する
1. 著者名 Fukuda Naoyuki, Ishikawa Kunio, Akita Kazuya, Kamada Kumiko, Kurio Naito, Mori Yoshihide, Miyamoto Youji	4. 巻 108
2. 論文標題 Effects of acidic calcium phosphate concentration on setting reaction and tissue response to tricalcium phosphate granular cement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 22 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.34361	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 該当する
1. 著者名 Ishikawa Kunio, Munar Melvin L., Tsuru Kanji, Miyamoto Youji	4. 巻 107
2. 論文標題 Fabrication of carbonate apatite honeycomb and its tissue response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 1014 ~ 1020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36640	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 Akita Kazuya, Fukuda Naoyuki, Kamada Kumiko, Kudoh Keiko, Kurio Naito, Tsuru Kanji, Ishikawa Kunio, Miyamoto Youji	4. 巻 108
2. 論文標題 Fabrication of porous carbonate apatite granules using microfiber and its histological evaluations in rabbit calvarial bone defects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part A	6. 最初と最後の頁 709 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.a.36850	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18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 直志, 工藤 景子, 秋田 和也, 工藤 隆治, 高丸 菜都美, 大江 剛, 栗尾 奈愛, 宮本 洋二
2. 発表標題 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトハニカムブロックの開発と顎骨再建への応用
3. 学会等名 第65回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイト顆粒の臨床応用 その特徴、適応症と再生医療への展開
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大江 剛, 秋田和也, 鎌田久美子, 福田直志, 工藤景子, 眞野隆充, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイト顆粒を用いた骨造成術の21例
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤景子, 福田直志, 秋田和也, 工藤隆治, 大江 剛, 栗尾奈愛, 山村佳子, 鎌田久美子, 眞野隆充, 宮本洋二
2. 発表標題 ハニカム構造を有する炭酸アパタイト多孔体の開発と下顎骨再建への応用
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田直志、眞野隆充、秋田和也、鎌田久美子、中島世市郎、工藤景子、工藤隆治、大江 剛、宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト顆粒を用いた上顎洞底挙上術症例の検討
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第39回中国・四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田直志、工藤景子、秋田和也、工藤隆治、大江剛、眞野隆充、林幸吉朗、石川邦夫、宮本洋二
2. 発表標題 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトハニカムブロックの創製と下顎骨再建への応用
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田直志、工藤景子、秋田和也、工藤隆治、大江剛、眞野隆充、宮本洋二
2. 発表標題 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトハニカムブロックの創製と新規GBR法の開発
3. 学会等名 第23回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤景子、秋田和也、福田直志、工藤隆治、栗尾奈愛、大江剛、眞野隆充、宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイトの開発と骨再生医療への応用
3. 学会等名 徳島県歯科医学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋二、石川邦夫
2. 発表標題 基礎と臨床との連携 - 歯科発日本発世界初の炭酸アパタイト人工骨の開発 - .
3. 学会等名 日本歯学系学会協議会、第17回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイト - その特徴、適応症と再生医療への展開 -
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田直志, 工藤景子, 秋田和也, 工藤隆治, 高丸菜都美, 大江剛, 栗尾奈愛, 宮本洋二
2. 発表標題 一方向連通気孔を有する炭酸アパタイトハニカムブロックの開発と顎骨再建への応用
3. 学会等名 第65回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と今後の展開.
3. 学会等名 第24回日本顎顔面インプラント学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 棕本 修平, 秋田 和也, 福田 直志, 高丸 菜都美, 工藤 景子, 宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト顆粒(サイトランスグラニュール)の嚢胞摘出術への応用
3. 学会等名 第49回(公社)日本口腔外科学会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 口腔領域における骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と今後の展開.
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 「歯科領域における新規の骨置換性バイオセラミックスのニーズと開発 炭酸アパタイトを中心に 」
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 直志, 秋田 和也, 高丸 菜都美, 工藤 景子, 宮本 洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイトハニカムブロックを用いたベニアグラフトの実験的検討
3. 学会等名 第25回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田直志, 秋田和也, 棕本修平, 高丸菜都美, 工藤景子, 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸アパタイト製骨補填材による広範囲骨欠損の即時再建
3. 学会等名 第51回公益財団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮本洋二
2. 発表標題 新規骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と骨再生医療への展開
3. 学会等名 第21回再生医療学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	工藤 隆治 (KUDOH Takaharu) (10263865)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	福田 直志 (FUKUDA Naoyuki) (10804156)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	宮本 洋二 (MIYAMOTO Youji) (20200214)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	中川 貴之 (NAKAGAWA Takayuki) (30456230)	広島大学・病院(歯)・助教 (15401)	
研究分担者	工藤 景子 (KUDOH Keiko) (70380029)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	栗尾 奈愛 (KURIO Naito) (80622141)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関