

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791471

研究課題名（和文） リン酸カルシウム系骨置換材の開発

研究課題名（英文） Development of Calcium Phosphate Bone Replacement

研究代表者

若江 皇絵（WAKAE HANAE）

九州大学・歯学研究院・研究員

研究者番号：50452719

研究成果の概要（和文）：本研究では、海綿骨の形態と組成を模倣した炭酸アパタイト（CAp）フォームを作製し、骨置換材としての有用性を検討した。 $\alpha$ -第三リン酸カルシウム（ $\alpha$ -TCP）フォームを炭酸塩水溶液中で水熱処理することで、三次元連通気孔構造は保持されたまま相変化し CAp フォームが得られた。骨芽細胞の初期接着、増殖性、分化に関して評価した結果、CAp は対照として用いたハイドロキシアパタイトと比較して優位に高い値を示した。また、破骨細胞による吸収窩も確認された。埋入 4 週間後の組織切片より、CAp フォームのマクロポアーの内部に新生骨が形成され、その近傍では活発に骨形成が行われている様子が観察された。また、埋入された材料の一部が吸収されている様子も観察された。以上の結果から、 $\alpha$ -TCP を 4mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  中に浸漬し、200°C で 24 時間水熱処理することで得られた CAp フォームは骨リモデリングサイクルに取り込まれる骨置換材料として極めて有用であると結論付けた。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料、骨置換材、炭酸アパタイト、骨吸収性、組織適合性

## 1. 研究開始当初の背景

先天奇形や悪性手術に対する切除などによる顎顔面頭蓋骨の欠落は、重篤な機能障害や審美的障害をもたらし、社会生活を送

る上での QOL を大きく損なう。これらの部位の骨を再建するためには自家骨移植が通例であるが、健全部位への侵襲や採取骨梁の制限などがあり、骨伝導性を持つハイ

ドロキシアパタイト (HAp) の顆粒やブロック体が併用される。しかし、今なお自家骨移植が骨再建のゴールドスタンダードであるのは、市販の HAp の骨再建能が不十分であると言わざるを得ない。人の海綿骨の組成や構造に着目すると、炭酸を含んだ HAp であることや細胞や組織が進入可能な連通気孔構造を有しているといった利点を有している。このような海綿骨の組成や構造を模倣した、即ち、三次元連通気孔構造を有した炭酸アパタイト (CAp) が創製できれば、骨補填材料として有用ではないかと予想される。これまでに当研究室ではアルミナフォームの製法を参考にして、ポリウレタンフォームを鋳型として用いることによって、HAp フォームが得られることを明らかにした。しかし、CAp は高温領域で不安定であるため、現状、HAp と同じ焼成法で作製するのが困難である。

## 2. 研究の目的

本研究では、熱的に安定な  $\alpha$ -リン酸三カルシウム ( $\alpha$ -TCP) フォームを中間体とし、相変換反応 (溶解 - 析出反応) により  $\alpha$ -TCP フォームの三次元連通気孔構造を保持したまま組成変換させた CAp フォームを創製する。さらに、得られた CAp フォームの骨置換材としての有用性を検討するために、細胞や実験動物を用いた組織適合性評価を行う。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1 .CAp 試料の作製とキャラクターゼーション

前述の通り、ポリウレタンフォームをテンプレートとして  $\alpha$ -TCP フォームを作製した。 $\alpha$ -TCP 粉末を蒸留水と混合して調製した  $\alpha$ -TCP スラリーをポリウレタンフォームの骨梁に付着させ、室温で乾燥した。その後、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $400^{\circ}\text{C}$  まで昇温してポリウレタンフォームを焼却し、続いて  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $1550^{\circ}\text{C}$  まで昇温して 5 時間保持するこ

とで  $\alpha$ -TCP を焼結させた。得られた  $\alpha$ -TCP フォームを炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 水溶液もしくは炭酸アンモニウム ( $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ) 水溶液とともに耐圧容器に密封して水熱処理を施すことで、海綿骨に類似した三次元連通気孔構造を有するフォームの合成を試みた。

得られた試料表面の微細構造は走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。 $\alpha$ -TCP から CAp への相転移については X 線回折装置 (XRD) を用いて調べた。HAp 結晶構造中の炭酸イオンの占有サイトについてはフーリエ変換赤外分光装置 (FT-IR) を用いて調査した。炭酸含有量は CHN 分析により評価した。

### 3 - 2 . 骨芽細胞および破骨細胞を用いた骨伝導・置換性の *in vitro* 評価

細胞実験には CAp ディスクを用いた。 $\alpha$ -TCP スラリーを  $2\text{MPa}$  で成形した圧粉体を作製し、フォーム作製時と同様の条件で炭酸化処理を施すことで CAp ディスクを得た。

ラットの大腿骨より骨髓細胞を採取し、初代培養後、グリセロフォスフェイト、アスコルビン酸およびデキサメタゾンを含む培地中にて培養し、分化させて実験に使用した。CAp ディスク上に細胞密度が  $6000\text{ cells}/\text{cm}^2$  になるように播種し、一定期間培養した。初期接着については 7 時間後の接着細胞数により評価した。増殖性については MTT 法により評価した。分化能については、アルカリフォスファターゼ活性の測定、ELISA 法による Type I コラーゲンおよびオステオカルシンの発現量の定量化、RT-PCR 法による mRNA 遺伝子の発現の探索により評価した。細胞接着性については、種々の期間培養後、試料表面に接着した細胞をグルタルアルデヒドで固定し、凍結乾燥後、SEM で観察した。さらに、破骨細胞による吸収活性も評価した。破骨細胞は、ラット大腿骨より採取した骨髓細胞から Chamber

法にて分離し，単離培養した。これをCApディスク上に播種し，種々の期間培養後，試料表面に形成された吸収窩数および吸収窩面積の定量化した。対照としては，HApディスクを用いた。

### 3 - 3 . 実験動物を用いた骨欠損再建実験

日本白色家兔にペントバルビタールナトリウムによる全身麻酔およびリドカインによる局部麻酔を行った後，切開し，脛骨にフィッシャーバーを用いて規格化した骨欠損を形成した。骨髓腔まで貫通後，生理食塩水で周囲の骨片を除去し試料を埋入した。2および4週間埋入後に試料を周辺の骨組織とともに摘出し，トルイジンブルー染色後，非脱灰標本を作製した。試料と周辺骨との界面を光学顕微鏡により観察した。対照にはHApフォームを用いた。

## 4 . 研究成果

### 4 - 1 . CAp フォームのキャラクタリゼーション

水熱処理前後のフォームの形態を巨視的に観察した結果，フォームの三元連通気孔構造は水熱処理後も保持されていた。SEM 観察の結果，水熱処理前のフォームの骨梁は平滑な表面であったのに対し，水熱処理後の骨梁は微細な結晶の集合体から構成されていた。これは，水溶液中で熱力学的に不安定な  $\alpha$ -TCP が溶解し，熱力学的に安定な CAp が析出すること(溶解 - 析出反応)により生じたと考えられる。

XRD 分析によれば， $\alpha$ -TCP フォームは水熱処理後にアパタイトに相変化していた。さらに，FT-IR 分析の結果， $1400-1500\text{cm}^{-1}$  の炭酸イオンのピークから判断して，アパタイト構造中のリン酸イオンの一部が炭酸イオンに置換された B 型 CAp が得られたことが分かった。処理に用いた炭酸塩水溶液の濃度に対して，生成物の炭酸含有量をプロットした結果を図 1 に示す。4mol/L

の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液もしくは  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  水溶液を用いて  $200^\circ\text{C}$  で 24 時間処理すれば，約 7% の炭酸イオン（海綿骨とほぼ同等）を含有した CAp フォームが得られることが明らかになった。

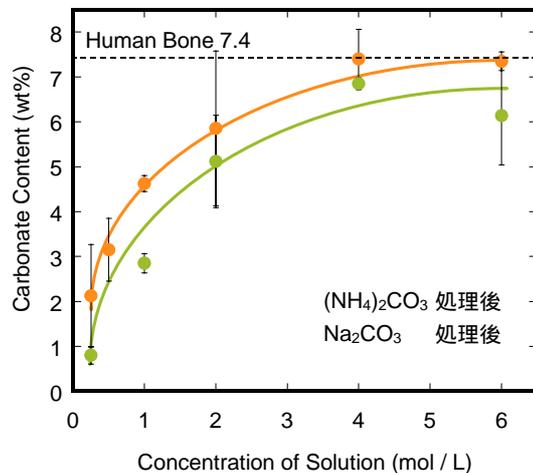


図 1 処理に用いた炭酸塩水溶液の濃度に対する生成物の炭酸含有量プロット

### 4 - 2 . 骨芽細胞および破骨細胞を用いた骨伝導・置換性の *in vitro* 評価

骨芽細胞の初期接着，増殖性，分化に関して，対照として用いた HAp ディスクと比較して，CAp ディスクは優位に高い値を示した。一例として，播種 7 時間後に材料表面に接着した細胞付着率を図 2 に示す。図より CAp ディスク表面は HAp ディスク表面より優位に細胞接着していることが分かる。

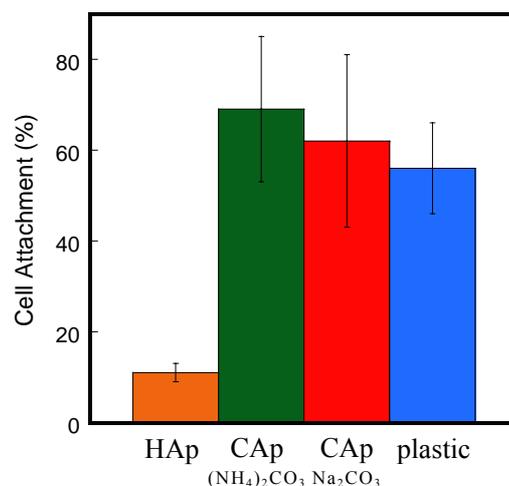


図 2 各種材料表面における初期細胞接着率 (播種 7 時間後)

SEM を用いて接着細胞を直接観察したところ、CAp ディスク表面に接着した細胞は仮足を延ばし、良好な接着状態を示していた。次に、破骨細胞に対する活性 (TRAP 陽性) を調べたところ、評価した全ての試料に対して TRAP 陽性反応が見られたが、予想に反して CAp は HAp に比べて僅かに低い値を示した。これは CAp からの  $\text{Ca}^{2+}$  の溶出により周囲の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が局所的に高まり、破骨細胞の機能が低下した可能性と SEM により観察された CAp と HAp の表面構造の違いに起因していると考えられる。また、破骨細胞による材料表面の吸収域は  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  を用いて作製された CAp と HAp には見られず、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を用いて作製された CAp にのみ顕著に観察された。この結果は CAp を構成する粒子形態に起因すると結論付けた。

#### 4 - 3 . 実験動物を用いた骨欠損再建実験

兔の頸骨に作製した骨欠損に上述の手法を用いて作製した CAp フォームを埋入し、*in vivo* で骨伝導性を評価した。4 週間埋入後の組織切片を観察すると、CAp フォームのマクロポア-の内部には新生骨が形成している様子が観察され、その近傍では活発に骨形成が行われている様子が観察された。また、埋入された材料の一部が吸収されている様子も観察された。

#### 総括

以上の結果から、 $\alpha$ -TCP フォームを 4mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  で水熱処理することで得られた CAp フォームは骨リモデリングサイクルに取り込まれる骨置換材料として極めて有用であると結論付けた。

#### 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1件)

A. Takeuchi, M.L. Munar, H. Wakae, S. Matsuya, K. Tsuru, K. Ishikawa, Effect of Temperature on Crystallinity of Carbonate Apatite foam Prepared from  $\alpha$ -Tricalcium

Phosphate by Hydrothermal Treatment, Bio-Med. Mater. Eng., **19**, 205-211, 2009.

##### [学会発表](計1件)

A. Takeuchi, M.L. Munar, H. Wakae, S. Matsuya, K. Tsuru, K. Ishikawa, "Effect of Temperature on Crystallinity of Carbonate Apatite foam Prepared from  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate by Hydrothermal Treatment", International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008), Sapporo, Japan, 16-17 June 2008 (Oral 1-004 Abstract p.4)

##### [図書](計 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

##### [その他]

ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

若江 皇絵 (WAKAE HANAE)  
九州大学・歯学研究院・研究員  
研究者番号：5 0 4 5 2 7 1 9

##### 研究協力者

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)  
九州大学・歯学研究院・教授  
研究者番号：9 0 2 0 2 9 5 2