

平成23年 4月 11日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890162

研究課題名（和文） しなやかな炭酸含有アパタイト骨置換材の創製

研究課題名（英文） Fabrication of elastic carbonate apatite foam

研究代表者

丸田 道人 (MARUTA MICHITO)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：40507802

研究成果の概要（和文）：

従来型のアパタイト骨補填材にはない海綿骨が持つ「しなやかさ」を模倣するためにコラーゲンとの複合化を行った。フォームの調整にはポリウレタンフォームを鋳型として利用した。反応焼結法を用いて炭酸カルシウムフォームを作成し、これを複数回繰り返すことにより炭酸含有アパタイトフォームの機械的性質の向上が認められた。また、*in vivo (vitro)*による実験結果からも本手法で調製された骨補填材が有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, apatite-collagen complex foam was prepared to mimic the elasticity of human cancellous bone. For this preparation, polyurethane foam was used as a template of calcite foam to mimic the human cancellous bone. In the preparation of calcite foam, reaction sintering was used. In order to improve the mechanical strength of the foam, multiple deposition of slurry was used.

The results obtained in this study indicated that the use of this foam might be effective as a bone replacement material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：生体材料，セラミックス

## 1. 研究開始当初の背景

現在臨床応用されている水酸アパタイト骨置換材は、再生の要素である細胞・増殖因子が内部に入り込めない生体非模倣型足場材料としてデザインされています。さらに、リモデリングされず硬くて脆い水酸アパタイト骨置換材は、生涯にわたり外力による破断・感染という危険性から逃れられないのです。そのため、移植後すみやかにリモデリングされ新生骨に置き換わるしなやかな自家

移植骨が、健全部位への侵襲、それに伴う健全部位の術後障害と感染の危険性や入院期間の延長、さらに、採取できる骨形態や骨量の制限などの医療提供者・受給者の双方に負担の多い問題点があるにもかかわらず、依然として硬組織再建術のゴールドスタンダードとして広く施術されている。

ところが、超高齢化社会に突入している我が国では、高齢者特有の骨疾患(骨粗鬆症による骨の脆弱化 など)が増加し、自家骨移植に

耐えられない患者が著しく増加しています。自家骨を超える新しいアパタイト骨置換材のニーズが今後増加することは明らかである。

## 2. 研究の目的

金属・高分子・ガラス・セラミックスなど数ある医用材料の中で、アパタイトは骨格系医用材料として唯一骨と直接結合する理想的な能力(骨伝導性)をもつ(チタンなど広義の骨伝導性材料は除く)にもかかわらず、硬組織再建術式のゴールドスタンダードになることができないのは、「しなやかさ」のない硬くて脆い、吸収されない材料である。現在市販され臨床応用されているアパタイト骨置換材は、粉体・顆粒・成形体など適応される部位に応じて様々な形態があるが、これらのアパタイト骨置換材は化学的に合成が容易な水酸アパタイト[Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>]を瀬戸物のように高温で焼き固める方法(焼結法)で作成されている。そのため「しなやかさのない硬くて脆い材料」である。また、この方法で合成された水酸アパタイト骨置換材の成分を実際の骨と比較してみると組成にも大きな違いがあることが知られている。骨の無機組成は水酸アパタイトではなく、炭酸基を含んだ炭酸含有アパタイトであり、炭酸基を含まない水酸アパタイト骨置換材は破骨細胞により吸収されないことが明らかにされている。そこで本研究では、アパタイトの優れた骨伝導性を生かし、これに生体骨の組成・形態・しなやかさを付与することにより、従来の水酸アパタイト骨置換材の問題点を一挙に解決できる「自家骨を超えるしなやかなアパタイト骨置換材を創製」を目的とした。

## 3. 研究の方法

申請者が新たに考案した特殊装置を用いて三次元連通気孔構造をもつ炭酸カルシウムフォームを作製した。この装置により高温で酸が遊離しない方法を確立した。具体的には、まず、ポリウレタン(ブリジストン:エバライトSF20HR)を海綿骨形態の鋳型として、その表面を水酸化カルシウムで被覆。それを特殊装置で高温焼成すると同時に炭酸化処理することにより、鋳型のポリウレタンを焼却し前駆体となる炭酸カルシウムフォームを調製した。続いて、得られた炭酸カルシウムフォームをリン酸塩水溶液中で炭酸含有アパタイトへ組成変換した。炭酸含有アパタイトへの組成変換に用いるリン酸塩の種類や濃度、炭酸アパタイト骨置換材の骨梁径を変動させることにより炭酸基含有量、機械的強さ、気孔率、結晶性の観点から、炭酸含有アパタイトフォームの調製条件の最適化を行った。作成されたフォームのマイクロな気孔部に

コラーゲンを充填することで硬くて脆いアパタイト骨置換材にしなやかさを付与した。その具体的な方法は、炭酸含有アパタイトフォームの骨梁部中空内に、コラーゲン水溶液を真空チャンバー中で凍結し、炭酸含有アパタイトフォームを凍結体表面に置き、真空状態にして炭酸含有アパタイトフォーム内部を抜気した後に、コラーゲン水溶液を溶融することで、炭酸含有アパタイトフォームのマイクロな気孔部にコラーゲンを導入します。導入したコラーゲンはUV照射(一部は架橋剤処理)により架橋させ、柔軟性を付与した。

炭酸含有アパタイトフォーム上に骨芽細胞様細胞を播種し、 $\alpha$ MEM中で一定期間培養します。骨芽細胞の細胞付着性・増殖性・分化能の検討・埋入実験を行った。

## 4. 研究成果

炭酸カルシウム懸濁液にポリウレタンフォームを浸漬後、炭酸基の遊離を防止するために焼成温度の低下を目的として管状炉にて反応焼結を行った。すなわち、粉液比1.0に調整した水酸化カルシウム懸濁液に、ポリウレタンフォームを浸漬し、水酸化カルシウムでポリウレタン表面を被覆したフォームを得た。乾燥後、所定の温度まで昇温させ、6時間保留後、室温まで管状炉内で徐冷した。なお、炭酸化とともにポリウレタンの焼却を目的として酸素・炭酸ガス雰囲気下(O<sub>2</sub> 20ml/min, CO<sub>2</sub> 250ml/min)での反応焼結とした。得られた炭酸カルシウムフォームを60°C、1mol/Lリン酸水素ニナトリウム水溶液に2週間浸漬した。分析としては粉末X線回折、赤外線吸光分析、圧縮試験、CHN分析、走査型電子顕微鏡観察を行った。

炭酸ガス酸素雰囲気下での反応焼結により炭酸カルシウムフォームを作成した。

700°C未満の焼結温度では得られた炭酸カルシウムフォームの鋳型として利用したポリウレタンが焼却されずに残留することが明らかになった(図1)。

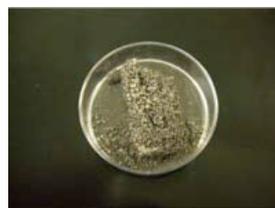


図1 未焼却ポリウレタンによる黒変

そこで、700°C~900°Cの間で反応焼結を行い、粉末エックス線回折を行った。その結果、850°C以上では少量の酸化カルシウムが生成されていることが認められた(図2)。

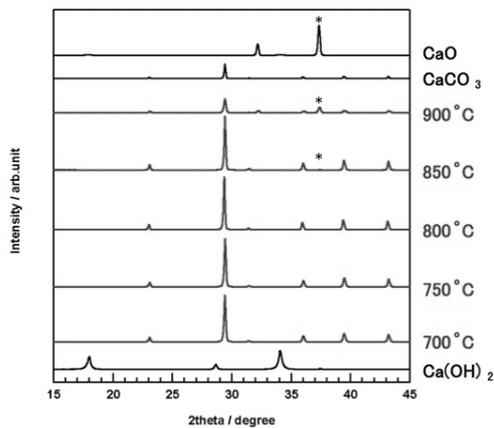


図 2 フォームの粉末X線測定結果

これらのフォームを60°C、1mol/Lリン酸水素二ナトリウム水溶液に2週間浸漬したところ、いずれの焼結温度で焼結した炭酸カルシウムフォームも、リン酸塩処理後には組成がアパタイトになることが明らかになった (図 3)。

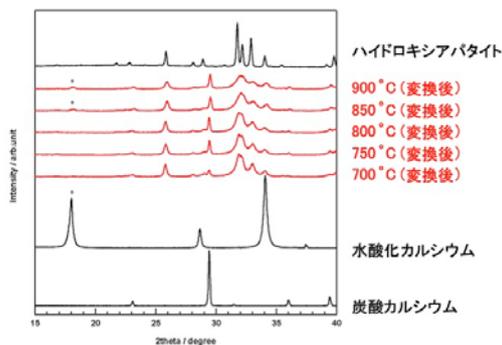


図 3 リン酸塩処理後の粉末X線測定結果

しかし、850°C以上で反応焼結を行った炭酸カルシウムフォームではリン酸塩処理後にフォームの形態を維持することができなかった (図 4)。



図 4 リン酸塩処理後のフォーム

リン酸塩処理後の処理溶液のpH変化からは850°C以上の焼結フォームで急激に処理後の溶液がアルカリ性を示していることがわかった。(図 5)。

これはフォームの粉末X線測定結果 (図 2) からより、850°C以上の焼結では少量の酸化カルシウムが認められており、これに起因する水酸化カルシウムの生成(1)によるものと考えられる。

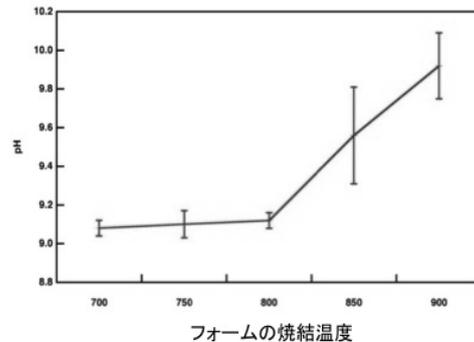
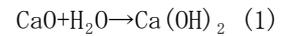


図 5 相変換反応時の処理溶液の pH 変化

水酸化カルシウムの生成による密度の変化がフォームの形態維持に大きな影響を与えていると考えられ、炭酸カルシウムフォームを前駆体とした炭酸アパタイトフォームの調製では少量の酸化カルシウムの生成でも、形態の維持には大きな問題を生じることが明らかになった。

このことから、炭酸ガス酸素雰囲気下における700~800°Cでも焼結が低温でのポリウレタンの効率的な焼却と水酸化カルシウムの炭酸化促進、高温時では炭酸基の遊離を抑制することを可能にすることが明らかになった。

調製された炭酸含有アパタイトフォームには赤外分光分析 (FT-IR) から、700°Cから800°Cで焼結された炭酸カルシウムフォームがリン酸塩処理後に炭酸基を含有していることが示された。

CHN分析により、炭酸基を最大12wt%含有する炭酸アパタイトが形成されていることが明らかになった (図 6)。

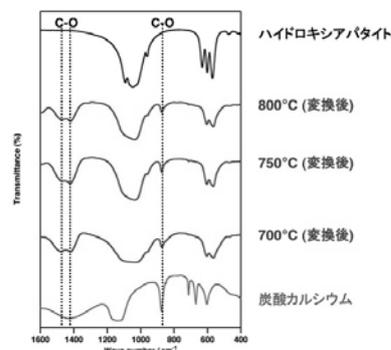


図 6 リン酸塩処理後のフォーム

このフォーム最大の圧縮強さは25kPaであり、さらに多数回浸漬を行うことにより機械的性質の向上が認められたが、気孔径の縮小に伴い連通気孔形態の維持が困難になる傾向が認められた。

本研究から炭酸カルシウムフォームの作製には炭酸ガス酸素雰囲気下での反応焼結法が効果的であり、これをリン酸塩処理することにより炭酸アパタイトフォームの機械的性質をしく向上させることが可能であることが示された。

また、コラーゲンとの複合化においては、チャンバー法を用いたコラーゲンとの複合化には前駆体となるフォームそのものの機械的強さの向上が必要であったために多数回浸漬による機械的性質の向上が必須であることが明らかになった。

また、海綿骨形態でのUV架橋はフォーム内へのUV深度と方向性に限界があるために、架橋剤を併用する必要が生じた。

炭酸アパタイトフォームと同一条件下で調製された炭酸含有アパタイトペレット（以下C Ap）上に骨芽細胞様細胞を播種し、 $\alpha$  MEM中で一定期間培養し、骨芽細胞の細胞付着性、細胞増殖および分化能の検討を行った。対象試料として用いたハイドロキシアパタイトペレット（以下H Ap）と比較してもC Apは同程度の結果が得られ、骨芽細胞様細胞との親和性に問題がないことがわかった。

さらに、破骨細胞による吸収活性測定のためにH Ap、C Ap試料上に破骨細胞を播種し、 $\alpha$  MEM中で一定期間培養し、試料表面に形成された吸収窩数および吸収窩面積により定量化した。試料表面のSEM観察からは、C Apでは比較試料のH Apに比べて、破骨細胞によるものと思われる吸収窩が明瞭に認められた。

実験動物の頭蓋骨に規格化骨欠損を形成し、作製した有機無機ハイブリッド炭酸アパタイトフォームを埋入した。埋入後、一定期間ごとに骨にラベリングを行い、骨の形成をマイクロCTと骨梁構造解析装置を用いて定量的に解析した。マイクロCT観察からは経時的にC Apフォームの気孔径が大きくなっていることが観察され、本調整法によるフォームが吸収されることが明らかになった。また、脱灰標本を作成し、組織学的に試料の組織親和性、骨置換性を検討した。その結果、本複合体はコラーゲンがまず吸収され、さらに経時的にC Apフォーム-自体も吸収された。連通気孔内部には吸収に伴い新生骨の生成が認められ、複合体C Apフォームの有効性が示唆された。

## 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0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸田 道人 (MARUTA MICHITO)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：40507802

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし