

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18576

研究課題名（和文）二階層細孔分布を有する炭酸アパタイト三次元多孔体の創製と生体反応の評価

研究課題名（英文）Carbonate apatite artificial bones with dual pore distribution: development and histological evaluation

研究代表者

岸田 良 (Kishida, Ryo)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90823211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マクロ気孔（数十 μm ）およびミクロ気孔（ $<$ 数 μm ）が隔てて分布した炭酸アパタイト連通多孔体を作製し、その構造が生体反応に与える影響を明らかにすることを目的とするものである。石膏の結晶成長（硬化反応）を利用し、前駆体を作製し、熱処理・溶解析出反応を経て炭酸アパタイト多孔体を作製した。マクロ気孔およびミクロ気孔の制御は、それぞれ結晶成長の溶媒量および熱処理温度を制御することで検討した。溶媒量を制御することでマクロ気孔径の向上（および気孔連通率の向上）を達成した。処理温度を低くするとミクロ気孔径が小さくなり、表面積が向上した。In vivo評価を行い、これらの材料設計の有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた本邦において、骨再生術の需要が高まっており、高い骨再生能を有する人工骨が必要である。これまでに気孔サイズの骨再生の影響が概念的に体系化されてきたが、有効な気孔サイズや気孔連通性（気孔同士の接続率）との関係、マクロ気孔とミクロ気孔の好ましい組合せについては、コンセンサスが得られていない。本研究では、ミクロ気孔径を一定に保ちつつマクロ気孔径（およびマクロ気孔連通性）を制御する方法と、マクロ気孔径を一定に保ちつつミクロ気孔径を小さくする（表面積を向上する）方法を提案・開発し、その骨再生への有用性を示すことができた。本研究の結果に基づいた人工骨開発の指導原理の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to fabricate carbonate apatite blocks with distinct distribution of macropores and micropores and to investigate the biological reactions. Porous carbonate apatite was prepared by using crystal growth (setting reaction) of gypsum to prepare a precursor, followed by heat treatment and dissolution-precipitation reaction. Macropore- and micropore-distributions were controlled by limiting the amount of solvent for the crystal growth and the heat treatment temperature, respectively. Macroporosity (and pore interconnectivity) was successfully enhanced by controlling the amount of solvent. Small micropores with high surface area was achieved by lowering treatment temperatures. In vivo evaluations demonstrated the effectiveness of these material designs.

研究分野：生体材料学

キーワード：アパタイト 多孔体 人工骨 骨再生 生体吸収性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大きな骨欠損の再生には、高い骨再生能を有する移植材が必要である。人工骨の骨再生能を左右する主因子の一つは、構造(アーキテクチャー)である。人工骨に気孔を導入し多孔体とすることで、骨の再生や体内への吸収が促進されることが報告されてきた。生体反応における気孔の役割は、そのサイズによって異なっており、マクロ気孔(数十~百 μm)は材料内部への細胞の侵入に有効である一方、ミクロ気孔(< 数 μm)は材料の表面積を増加させるのに有効である。このように、気孔サイズの骨再生の影響が概念的に体系化されてきたが、有効な気孔サイズや気孔連通性(気孔同士の接続率)との関係、マクロ気孔とミクロ気孔の好ましい組合せについては、コンセンサスが得られていない。例えば、あるグループはマクロ気孔として400 μm 以上の気孔径が有効と報告しているのに対し、他のグループは100 μm 以下の気孔径の有効性を支持している。また、マクロ連通気孔の割合が重要であることが示唆されており、連通気孔率によって有効なマクロ気孔径も大きく変わると報告されている。さらに、ミクロ気孔については1 μm 以下の気孔径の影響についてin vivo評価の報告例がほとんどない。気孔サイズについて結論を得るのが難しいことの一因は、バイオセラミックスの作製が一般に焼結法で行われており、ミクロ気孔を保持したままマクロ気孔率を高く設定することや、マクロ気孔マクロおよびミクロ構造を独立に制御することが困難なことによるものと考えられる。それぞれの気孔の役割を明らかにし、人工骨開発の指導原理を確立していくためには、ミクロ気孔径を一定に保ちつつマクロ気孔の連通性を制御する方法と、マクロ気孔径を一定に保ちつつミクロ気孔径を制御する方法を開発する必要がある。

代表者は焼結法によらず骨の無機組成である炭酸アパタイトを化学合成する手法を開発してきた。本法は溶解析出反応、すなわち溶液中での結晶成長に基づく相変換を利用したものである。溶解析出反応では、前駆体のマクロ構造を維持したまま、目的の相(炭酸アパタイトなど)を得ることができ、溶液や前駆体の物理化学的条件によって、ミクロ構造も制御できる。また、炭酸アパタイトは生理環境で単純溶解はしないが、天然骨と同様に破骨細胞が産生する酸によって溶解され、骨再生能に優れていることが示されてきた。このような骨のターンオーバーとの類似性から、炭酸アパタイト人工骨は骨再生を評価する上での標準模型となる組成と考えられる。

2. 研究の目的

マクロ気孔(数十 μm)およびミクロ気孔(< 数 μm)が隔てて分布した炭酸アパタイト連通多孔体を作製し、その構造が生体反応に与える影響を明らかにすることを目的とする。特に、ミクロ気孔径を一定に保ちつつマクロ気孔の連通性を制御する方法と、マクロ気孔径を一定に保ちつつミクロ気孔径を制御する方法を開発し、マクロ気孔連通性やミクロ気孔径が生体反応に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

マクロ気孔の影響を評価するために、半水石膏顆粒(直径100-200 μm)を硬化・結晶成長させて、顆粒間の隙間をマクロ気孔とする材料設計を行った。この際に、結晶成長のための溶媒である水分量を制御することで、マクロ気孔の連通性を制御した。水分量を制御するために、密充填した石膏顆粒を水中に浸漬し、遠心分離(500 $\times g$)を行う方法を検討した。この石膏前駆体(多孔体)に熱処理・溶解析出反応処理を行い、炭酸アパタイトに変換した。

ミクロ気孔の影響を評価するために、上記と同様の方法で得られる石膏多孔体を異なる温度(600, 750, 900 $^{\circ}\text{C}$)で熱処理し、溶解析出反応によって炭酸アパタイトに変換した。

これらの炭酸アパタイト多孔体を主に水銀圧入法によって分析し、多孔体構造の違いを示した。また、骨芽細胞様細胞を播種し、細胞の材料内部への侵入を評価した。さらに、ウサギ大腿骨に形成した骨欠損に埋入し、病理組織学的に骨再生能を評価した。

4. 研究成果

マクロ気孔の制御において、石膏硬化時に水を除去するとマクロ気孔の連通性を向上させることができることを色素液浸透試験から明らかにした。石膏の硬化反応では非常に結晶成長が進行しやすく、硬化時の水分量制御が不十分であると、顆粒間の隙間が閉塞され、気孔連通性が損なわれることがわかった。遠心分離操作によって、界面張力で保持される水分のみを保持し、顆粒間の隙間に分布する水分を除去することで連通性に優れた多孔体を作製できたものと考えられる。

得られた石膏(硫酸カルシウム二水和物)多孔体を炭酸カルシウム多孔体に変換するために炭酸ナトリウム溶液に浸漬したところ、機械的強度が劇的に低下(約0.03倍)しており、人工骨として実用的でない判断された。硫酸カルシウム二水和物から炭酸カルシウムへの相変換は、理論上約50%の大きな収縮を伴うため、マクロ体積一定で相変換した場合にはミクロ気孔が過剰に形成されたと考えられる。そこで、熱処理(750 $^{\circ}\text{C}$)を行い、無水石膏に相変換した後に炭

酸ナトリウム溶液に浸漬することで、密度変化がゆるやかになるよう化学反応を 2 段階に設計した。その結果、実用的な機械的強度を達成することができた。この炭酸カルシウム多孔体をリン酸水素二ナトリウム溶液に浸漬することで、炭酸アパタイト多孔体を作製することができた。炭酸アパタイト多孔体の細孔分布を水銀圧入法で評価した。石膏硬化時に水を除去して得られた炭酸アパタイト多孔体はマクロ気孔径が 29 μm (連通気孔率 30%) であり、水分を除去しなかった炭酸アパタイト多孔体はマクロ気孔径が 19 μm (連通気孔率 15%) であった。一方、ミクロ気孔のサイズや全気孔率は両試料で同じであり、純粋にマクロな連通気孔の影響を評価する上で最適な組であると判断された。マクロ気孔径 29 μm の炭酸アパタイト多孔体は水溶液 (トルイジブルー水溶液) や細胞 (MC3T3-E1 細胞) を透過する一方、マクロ気孔径 19 μm の試料は水や細胞が透過できないことがわかった。さらに、ウサギ大腿骨に形成した骨欠損に両試料を埋入したところ、マクロ気孔径 29 μm の試料は、4 週で連通気孔の全域に新しい骨が形成され、12 週にはほぼ海綿骨に置換されていた。一方、マクロ気孔径 19 μm の試料は 4 週で試料の中心部分に骨が形成されておらず、12 週後も材料が残存していた。本結果はマクロな連通気孔の骨再生への重要性を示すものである。

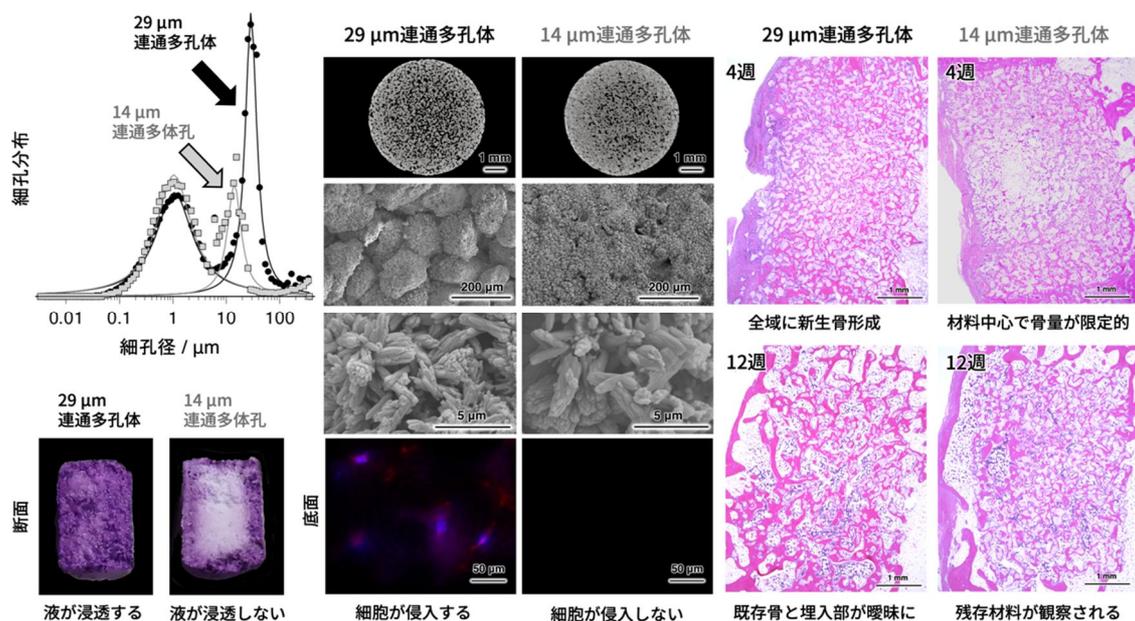


図 1. 連通マクロ気孔が骨再生に与える影響

ミクロ気孔分布の制御には、石膏多孔体の熱処理温度 (600, 750, 900 $^{\circ}\text{C}$) の調整が有効であった。熱処理温度を低くすると全気孔率は段階的に上昇 (約 60 から 70%) し、600 $^{\circ}\text{C}$ で処理して得られた試料は他の温度条件の試料に比べ、ミクロ気孔サイズが顕著に低下 (約 400 nm から 200 nm) し、比表面積が増加 (約 1.7 倍) した。これらの試料をウサギ大腿骨に形成した骨欠損に埋入したところ、600 $^{\circ}\text{C}$ で熱処理された試料は 4 週の時点で高い生体吸収性を示し、12 週ではほぼ海綿骨に置換されていた。本結果は数百 nm ~ 数 μm のミクロ気孔が骨再生に与える影響を示すものである。

本事業で行われた検討により、二階層細孔分布を有する炭酸アパタイト多孔体の作製方法とその多孔体構造が骨再生に与える影響が明らかとなった。

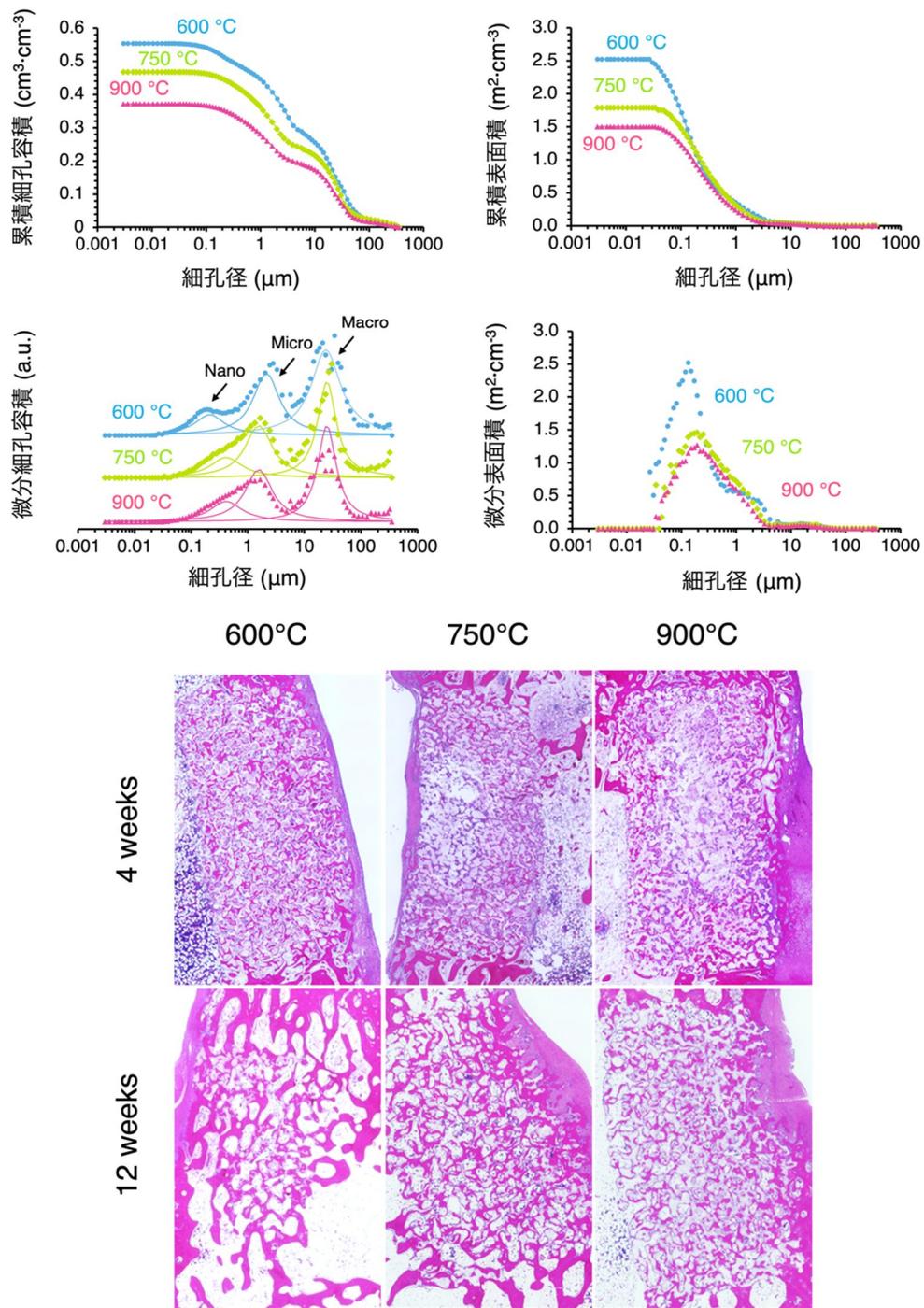


図 2. ミクロ気孔径が骨再生に与える影響

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Elsheikh Maab, Kishida Ryo, Hayashi Koichiro, Tsuchiya Akira, Shimabukuro Masaya, Ishikawa Kunio	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of pore interconnectivity on bone regeneration in carbonate apatite blocks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Biomaterials	6. 最初と最後の頁 rbac010-1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rb/rbac010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kishida Ryo, Elsheikh Maab, Hayashi Koichiro, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 47
2. 論文標題 Fabrication of highly interconnected porous carbonate apatite blocks based on the setting reaction of calcium sulfate hemihydrate granules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 19856 ~ 19863
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceramint.2021.03.324	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 Elsheikh Maab, Kishida Ryo, Hayashi Koichiro, Tsuchiya Akira, Shimabukuro Masaya, Ishikawa Kunio	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effects of Pore Interconnectivity on Bone Regeneration in Carbonate Apatite Blocks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Biomaterials	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rb/rbac010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kishida Ryo, Elsheikh Maab, Hayashi Koichiro, Tsuchiya Akira, Ishikawa Kunio	4. 巻 -
2. 論文標題 Fabrication of highly interconnected porous carbonate apatite blocks based on the setting reaction of calcium sulfate hemihydrate granules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceramint.2021.03.324	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸田良, Maab Elsheikh, 林幸吉朗, 石川邦夫
2. 発表標題 半水石膏顆粒の硬化反応に基づく炭酸アパタイト3次元多孔体の創製とその生体反応評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------