

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23112

研究課題名（和文）炭酸基量を制御することによるランダム型多孔質炭酸アパタイトの骨再生医療への展開

研究課題名（英文）Development to the bone regenerative medicine of the porous carbonate apatite by controlling the carbonate contents

研究代表者

秋田 和也（AKITA, Kazuya）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教

研究者番号：70876028

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は生体内吸収性および骨置換性を有する多孔質炭酸アパタイト顆粒の炭酸基量を制御することによって、骨形成の促進と炭酸アパタイトの吸収性を調節した新規骨再生医療用スキャフォールドを開発することを目的とした。炭酸アパタイト製造の工程で使用するリン酸溶液の温度を変えることによって、含有する炭酸基量の調整に成功した。リン酸化温度が低いほど炭酸アパタイト内の炭酸基量は増加し、結晶性は低くなった。組織切片による観察では、炭酸基量が多いほど、顆粒は多く吸収され、骨に置換する傾向があった。また炭酸アパタイトと骨髄幹細胞との複合体を開発し、スキャフォールドとしての可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多孔質炭酸アパタイト顆粒は顆粒内外からの優れた骨形成が望め、さらにそれ自身が骨に置換するという特徴により、体内に残留しない理想的な新規骨再生医療用スキャフォールドになり得ると考えている。しかし、スキャフォールドは使用する部位によって、吸収速度を調節する必要があり、また骨形成もさらに亢進させる方が望ましい。そのためには、含まれる炭酸基量を調整することが必須である。そこで本研究では炭酸基量の異なる多孔質炭酸アパタイト顆粒を開発し、その物性評価と生体内での挙動を評価し、さらにスキャフォールドとしての有用性を評価した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to fabricate the scaffold for the newly bone regenerative medicine which could adjust the promotion of bone formation and absorbency of the carbonic apatite by controlling the carbonate contents of the porous carbonate apatite granule which could be absorbed and replaced with the bone. I succeeded in adjustment of the carbonate contents by changing the temperature of the phosphoric acid solution to use in a process of the carbonate apatite production. The carbonate contents increased and the crystal characteristics became low as the phosphorylation temperature lowered. Granules tended to be absorbed and to be replaced bone so that there was much carbonate contents by the histological observation. Moreover, I fabricated the carbonate apatite and the marrow stem cell composites, which found the possibility as the scaffold.

研究分野：生体材料

キーワード：炭酸アパタイト 炭酸含有量 スキャフォールド

## 1. 研究開始当初の背景

骨補填材としてハイドロキシアパタイトは広く用いられてきたが、ハイドロキシアパタイトは生体内で殆ど吸収されない欠点がある。一方、骨モアパタイトで構成されているが、吸収と骨添加を受ける。この相違に着目して、研究代表者は九州大学との共同研究により生体骨の主成分で骨置換性を有する低結晶性の炭酸アパタイト ( $\text{CO}_3\text{Ap}$ ) の人工合成に世界で初めて成功した。本材料は 2018 年から市販されているが、緻密体であるため、骨や血管が顆粒内部に侵入できず、顆粒内部からの骨新生が望めないという欠点があった。

そこで、研究代表者は顆粒を多孔化する事で顆粒内部からの骨新生が生じ、迅速な骨再生が可能になると考え、ファイバーを混入した石膏を前駆体とし、溶解析出反応により組成変換を行うことで、ランダムな 3 次元気孔構造を有する多孔質  $\text{CO}_3\text{Ap}$  顆粒 ( $\text{p-CO}_3\text{Ap}$ ) を開発した (図 1)。この  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  は、緻密顆粒にはない気孔内部の骨形成や血管新生を可能とし、優れた骨形成能を有することを既に示した (Akita K *et al.* J Biomed Mater Res A 108:709-721, 2020)。

$\text{p-CO}_3\text{Ap}$  は顆粒内外からの優れた骨形成が望め、さらにそれ自身が骨に置換するという特徴により、体内に残留しない理想的な新規骨再生医療用スキャフォールドになり得ると考えている。しかし、スキャフォールドは使用する部位によって、吸収速度を調節する必要があり、また骨形成もさらに亢進させる方が望ましい。そのためには、含まれる炭酸基量を調整することが必須である。しかし、これまでに開発した  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の炭酸含有量は 1 種類である。研究代表者は、 $\text{CO}_3\text{Ap}$  製造の工程で使用するリン酸化過程の温度を変えることによって、含有する炭酸基量を変化できると発想した。

そこで本研究では  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の炭酸含有量を調整できるか否かを検討し、種々の炭酸含有量を有する  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  を作製し、骨形成と  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の吸収性に与える影響を評価した。さらに  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  と骨髄幹細胞を複合し、骨再生の指標である異所性骨再生能を評価することで、新規骨再生医療用スキャフォールドとしての有用性を検討した。

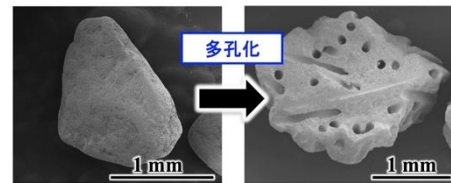


図 1：緻密体の炭酸アパタイト顆粒と開発した多孔質炭酸アパタイト顆粒の走査型電子顕微鏡像

## 2. 研究の目的

本研究は生体内吸収性および骨置換性を有する  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の炭酸基量を制御することによって、骨形成の促進と炭酸アパタイトの吸収性を調節し、より高機能なスキャフォールドを開発することを目的とした。本研究では以下の 3 点を明らかにした。

- (1)  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の炭酸含有量を調整できるか否かを確認した。
- (2) 種々の炭酸基量を有する  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  を作製し、骨形成と  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の吸収性に与える影響を評価した。
- (3)  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  に骨髄幹細胞を注入した複合体を開発し、異所性骨再生実験を行い、新規骨再生医療用スキャフォールドとしての有用性を検討した。

## 3. 研究の方法

- (1)  $\text{p-CO}_3\text{Ap}$  の炭酸含有量を調整できるか否かを確認した。

硫酸カルシウム ( $\text{CaSO}_4$ ) とファイバー (ファイバー径;  $120 \mu\text{m}$ ) を、ファイバーの重量比が 10 wt% となるように混合し、混水比 0.2 で練和後、冷間等方圧加圧法により 50 MPa の圧力下で硬化させた。硬化後、 $700^\circ\text{C}$  (昇温速度  $0.13^\circ\text{C}/\text{分}$ ) で 5 時間焼成することによってファイバーを除去し、これを前駆体とした。その後、顆粒径が  $1.0 \sim 1.4 \text{ mm}$  となるように粉碎、分粒し、多孔質  $\text{CaSO}_4$  顆粒を作製した。次に 4 M の炭酸ナトリウム水溶液に浸漬し炭酸カルシウムに組成変換後、100、120、140 M のリン酸水素ナトリウム水溶液に浸漬し、 $\text{CO}_3\text{Ap}$  へ組成変換を行った。変換前後における形態学的観察は走査型電子顕微鏡を用いて行った。組成分析は X 線回折装置およびフーリエ変換赤外分光光度計を用いて行い、CHN 分析にて炭酸含有量を測定した。

(2) 種々の炭酸基量を有する p-CO<sub>3</sub>Ap を作製し、骨形成と p-CO<sub>3</sub>Ap の吸収性に与える影響を評価した。

(1) で作製した炭酸含有量を調整した p-CO<sub>3</sub>Ap を、日本白色ウサギの大腿骨に移植した。移植後 4、12 週で試料とともに周囲組織を摘出し、中性緩衝ホルマリンで固定後、非脱灰切片を作製、ピラヌエバゴールドナー染色を行い組織学的に評価した。

(3) p-CO<sub>3</sub>Ap に骨髄幹細胞を注入した複合体を開発し、異所性骨再生実験を行い、新規骨再生医療用スキャフォールドとしての有用性を検討した。

7 週齢の Fischer344 系ラットの大腿骨から骨髄を採取し、p-CO<sub>3</sub>Ap に骨髄細胞を播種し、複合体を作製した。この複合体を CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養 (24 時間) し、MTT Assay を行った。また複合体を 4% パラホルムアルデヒドにて固定 (30min、4°C)、エタノールで脱水、金蒸着し、操作型電子顕微鏡にて観察した。さらに複合体を骨形成誘導培地上で培養し、同種の近交系ラットの背部皮下に移植して異所性の骨再生能を評価した。

#### 4. 研究成果

前駆体である CaSO<sub>4</sub> は炭酸ナトリウム水溶液に 7 日間浸漬することで炭酸カルシウムに組成変換し、これを 100、120、140 のリン酸水素ナトリウム水溶液に 14 日間浸漬することで CO<sub>3</sub>Ap へ組成変換できた (図 2)。元素分析 (CHN 分析) にて炭酸含有量を測定したところ、100、120、140 でリン酸化した試料の炭酸基含有量はそれぞれ 8.5、3.6、2.2% とリン酸化温度が低いほど増加した。さらに X 線回折装置を用いて結晶性を測定したところ、リン酸化温度が低いほど結晶性は低くなった。したがって、リン酸化温度を調整することで、異なる炭酸含有量を有する p-CO<sub>3</sub>Ap の開発に成功した。

開発に成功した異なる炭酸含有量を有する p-CO<sub>3</sub>Ap を実験動物に埋植、評価することで、生体内での挙動を評価した。ウサギ大腿骨に直径 7 mm、高さ 7 mm の骨欠損を作製し、異なる炭酸含有量を有する多孔質炭酸アパタイト顆粒を埋入した。埋入後 1、3 か月後に摘出し、研磨切片を作製し、組織学的に評価した。埋入後 1、3 か月後において炭酸含有量が多いほど、顆粒は多く吸収され、骨に置換する傾向があった (図 3、4)。したがって、炭酸基量の制御により、CO<sub>3</sub>Ap の吸収速度と骨形成が調整できる可能性が示唆された。

p-CO<sub>3</sub>Ap 上に Fischer344 系ラット大腿骨から採取・培養した骨髄幹細胞を播種し複合体を作製した。p-CO<sub>3</sub>Ap とラット大腿骨から採取・培養した骨髄幹細胞との複合体を培養したところ、24 時間で CO<sub>3</sub>Ap 緻密体、ハイドロキシアパタイトと比較して有意な細胞増殖活性を認めた。また走査型電子顕微鏡にて炭酸ア

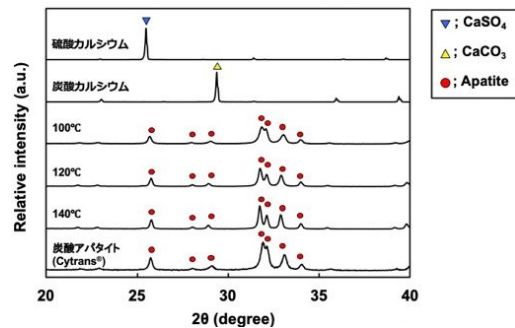


図 2: リン酸化温度を変え作製した炭酸アパタイトの X 線回折の結果

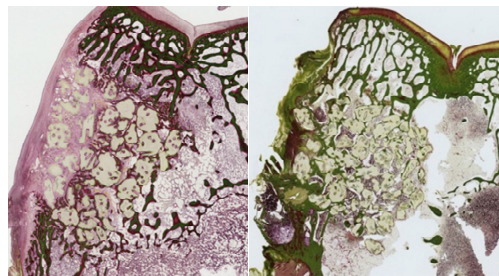


図 3: 多孔質炭酸アパタイト顆粒をウサギ大腿骨に埋入した組織像 (左: 埋入 1 ヶ月、右: 埋入 3 ヶ月)

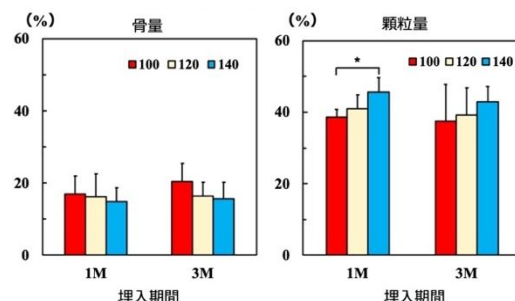


図 4: 異なる炭酸含有量を有する多孔質炭酸アパタイトの大腿骨埋入部位の骨形成量 (左) 顆粒量 (右)

パタイトの気孔内部に骨髄幹細胞が観察された(図 5)。この複合体を骨形成培地上で培養した後、同系ラット背部皮下に移植した。移植後 4,8 週後に周囲組織を含めて摘出、組織標本を作製し観察を行ったところ、複合体周囲には炎症性細胞は認めず、複合体の良好な生体親和性と安全性を確認した。さらに、気孔内部には血管の侵入と異所性に骨様硬組織の形成を認めた(図 6)。したがって、開発した  $p\text{-CO}_3\text{Ap}$  と骨髄幹細胞の複合体の新たな骨再生医療用材料としての可能性を見出した。

以上のように、 $\text{CO}_3\text{Ap}$  製造工程のリン酸化温度を調整することで、炭酸含有量を制御した  $p\text{-CO}_3\text{Ap}$  の開発に成功した。また  $p\text{-CO}_3\text{Ap}$  と骨髄幹細胞の複合体による新規骨再生医療用スキャフォールドの可能性が示唆された。

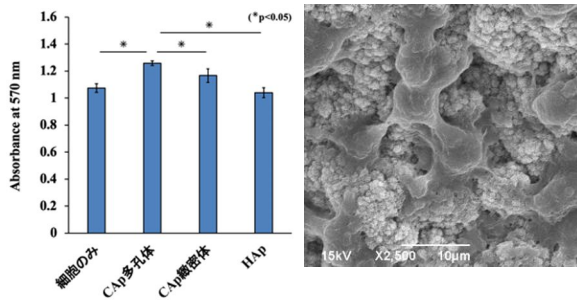


図 5: 炭酸アパタイト多孔体上にラット骨髄幹細胞を播種した複合体を培養し MTT Assay した結果 (左) 電子顕微鏡像 (右)

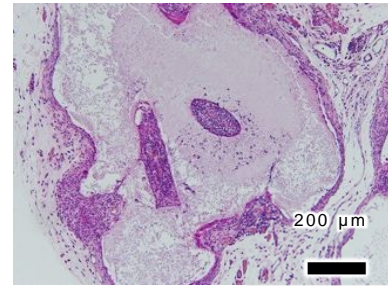


図 6: 炭酸アパタイト多孔体顆粒と骨髄幹細胞の複合体を背部皮下に移植した組織像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 宮本洋二, 福田直志, 秋田和也, 工藤景子, 栗尾奈愛	4. 巻 20
2. 論文標題 骨補填材としての炭酸アパタイトの現状と今後の展開	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本顎顔面インプラント学会誌	6. 最初と最後の頁 88-95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋田和也, 福田直志, 椋本修平, 高丸菜都美, 工藤景子, 都留寛治, 石川邦夫, 宮本洋二
2. 発表標題 炭酸含有量の異なる多孔質炭酸アパタイト顆粒の開発
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 秋田和也, 福田直志, 椋本修平, 鎌田久美子, 高丸菜都美, 工藤景子, 栗尾奈愛, 宮本洋二
2. 発表標題 マイクロファイバーを用いた多孔質炭酸アパタイトの開発とウサギ頭蓋骨における組織学的評価
3. 学会等名 第75回 NPO法人日本口腔科学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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