

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500429

研究課題名（和文） 生体注入型セラミックス粉体の分極処理と骨再生促進効果

研究課題名（英文） Acceleration of bone regeneration by the injectable electrically polarized hydroxyapatite micro-granules

研究代表者

伊藤 聡一郎 (ITO SOICHIRO)

東京医科歯科大学・歯学部口腔保健学科・非常勤講師

研究者番号：10242190

研究成果の概要（和文）：ハイドロキシアパタイト(HA)と炭酸アパタイト(CA)粉体の電気分極法を確立した。多血小板血漿(PRP)に分極あるいは未分極HA粉体、あるいはCA粉体を混合したゲルを製作して日本白色家兎の大腿骨へ埋入した。HA粉体をPRPに混合すると骨原性細胞が活性化され、骨新性が促進された。HAの電気分極処理によりこの効果は増強されたが、CA粉体は早期に吸収され新生骨形成促進効果は弱かった。

研究成果の概要（英文）：We have developed a technology for electrical polarization of hydroxyapatite (HA) and carbonated apatite (CA) micro-granules. HA or CA micro-granules with or without electrical polarization / platelet-rich plasma (PRP) composite gel was implanted into femoral condyle of rabbits. In combination with HA, PRP activated osteogenic cells, resulting in enhanced bone formation. This effect was enhanced by electrical polarization treatment in HA micro-granules, however, not in CA micro-granules because they were absorbed rapidly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：ハイドロキシアパタイト、炭酸アパタイト。電気分極法、多血小板血漿

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸カルシウム化合物の中でも特にハイドロキシアパタイト(HA)は優れた生体親和性と骨伝導性により、骨代替材料として広く臨床応用されている。また、炭酸アパタイト(CA)も骨を形成しているアパタイトの組成に近く、良好な生体親和性と吸収性により近年注目されている。粉体は、表面積が大きく、担体中で均一に分散し、骨原性細胞が侵入しやすいだけでなく、あらゆる骨欠損部の形態に適合可能である。しかし、粉体

の欠点としては、埋入時の操作性が悪いこと、移植部位に長く保持することが困難であることが挙げられる。このため、フィブリン、コラーゲン、ヒアルロン酸ナトリウム、脂質等の担体と混合する方法が考案されている。担体に求められる条件は、非免疫原性、生体吸収性、生体親和性、骨伝導性、易操作性である。このような条件を満たす担体として、多血小板血漿(PRP)が挙げられる。PRPはPDGF(Platelet-Derived Growth Factor)、TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1)、

TGF- $\beta$ 2, IGF (Insulin-like growth factors), EGF (Epidermal Growth Factor) 等多くの成長因子を含む安全な自己血由来のゲルである。さらに、骨や軟組織の治癒を促進する効果も報告されており、HA あるいは CA 粉体の有効な担体となることが期待される。

一方、HA セラミックスの電気分解処理により蓄積された表面電荷は骨原性細胞を活性化し、初期の骨形成を促進することが知られている。さらに帯電したセラミックス粉体は各種のイオンやタンパクを吸着するため、移植局部で生存する細胞が分泌したサイトカインや細胞接着因子を吸着することが期待される。しかし、HA は長期に渡って体内に残存し、時には再生された骨組織中で異物となって骨形成を逆に阻害することもある。これに対し CA は良好な生体親和性と吸収性を持っているが、骨欠損部へ埋入後自家骨に置換されることはまだ確認されていない。

## 2. 研究の目的

バイオセラミックスの電気分極処理技術を確立し、HA および CA 粉体に蓄積される電荷量を確認した。さらに、分極 HA あるいは CA 粉体混和 PRP ゲルを作製してウサギの骨欠損部に埋入し、骨組織再生促進効果を比較した。

## 3. 研究の方法

### HA 粉体の作製

HA 粉体は硝酸カルシウム ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) とリン酸水素アンモニウム ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) の沈殿反応により合成した。硝酸カルシウム水溶液の混濁液中にリン酸水素アンモニウム水溶液を徐々に加え、水溶液の pH を 10.5 に維持した。得られたスラリー状の懸濁液は濾過後凍結乾燥した。

### CA 粉体の作製

炭酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 63.6g を、3.0w%リン酸水素ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) へ溶解後、硝酸カルシウム四水和物 ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ ) を 12 時間 500 $\mu\text{l}/\text{sec}$  の速度で滴下し、pH を  $9.0 \pm 0.1$  に維持した。4 日間静置後凍結乾燥した。

### HA および CA 粉体の特性評価

4kW X 線発生装置、銅標的、グラフアイト分光器を備えた X 線制御装置にて、HA および CA 粉体の X 線回析を行った ( $N=3$ )。さらに、KBr ペレット法を用いてフーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) を用いて赤外吸収スペクトル測定を行った ( $4000 \sim 400\text{cm}^{-1}$ ,  $N=3$ )。

### HA および CA 粉体の電気分極

HA および CA 粉体を詰めたアルミナリング (直径 2.0cm、高さ 0.5cm) を白金電極で挟んで固定し、大気中で 4kV/cm、400°C の条件で 1 時間電気分極を行った。分極状態のまま試料を室温まで冷却後、熱刺激脱分極 (TSDC) 測定を行った ( $N=3$ )。大気下で、室温から 600°C 以上まで 5.0°C/min の速度で上昇させ、pA meter で測定し蓄積電荷量を計算した。

### 混和ゲルの作製

日本白色家兔 (2.0-2.5kg、15-16 週齢) を使用した。耳より 2-4ml の動脈血を採取し、3.8w%クエ

ン酸ナトリウムを加え、4°C 2400 回転で 8 分間遠心分離した。上層の血漿成分を採取し、0.15ml の PRP を得た。1 晩冷蔵保存後、埋入直前に 0.06g の分極あるいは未分極の HA 粉体、CA 粉体とトロンビン 10 $\mu\text{l}$ 、 $\text{CaCl}_2$  50 $\mu\text{l}$  を 0.15ml の PRP に混和させて、混和ゲルを作製した。

### 埋入実験 I

家兔の大腿骨内側顆部に直径 3mm、高さ 5mm の骨孔をドリルで形成した。この骨孔へ、下記のごとく PRP にセラミックスを混和したゲルを埋入した (各群  $N=6$ )。分極あるいは未分極 HA (pHA あるいは HA) + PRP 群、分極あるいは未分極 CA (pCA あるいは CA) + PRP 群。粉体 0.06g のみ (pHA、HA、pCA、CA 群) と PRP ゲルのみ、あるいはスポンゼルを挿入した群をコントロールとした (PRP 群、骨孔群、各  $N=6$ )。埋入位置の印付けのため、PRO-ENDO ガッタパーチャポイントも骨孔に埋入した。6 週後、ペントバルビタール静脈注射により兔を抹殺した。埋入標本は、周囲骨を少なくとも 5mm の範囲まで含めて摘出した。試料は 70% エタノールで固定後 Scan Xmate にて  $\mu\text{CT}$  撮影を行ない 3次元再構築した。

### 組織学的評価

標本を半割し、一方を GMA レジン包埋後 300 $\mu\text{m}$  の厚さに切断し、マイクロームにて 15 $\mu\text{m}$  の厚さに薄切した。これをトルイジンブルーと酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) で 2 重染色し、骨芽細胞と破骨細胞の活動を評価した。

### 骨芽細胞の活動性:

新生骨表面における立方体型骨芽細胞の長さ/骨孔内の新生骨表面の長さ (ObL/TBL)

### 破骨細胞の活動性:

新生骨表面に接着している多核 TRAP 陽性細胞数/骨孔面積 (NOc/Tar)

また、半側の標本を Villanueva bone 染色粉末 5mg/ml を含む 70% エタノールで固定し、1 週間室温に置いた後 MMA に包埋した。これを 300 $\mu\text{m}$  の厚さに切断後、さらに 15 $\mu\text{m}$  の厚さに薄切して、Villanueva Goldner (VG) 染色した。この標本を用いて新生骨領域を計測した。

### 新生骨領域:

新生骨の面積/骨孔の面積 (BAr/TAr)

組織学的な定量は Image Pro Plus 6.0 を用い、多重比較検定を行った。

### 埋入実験 II

HA を用いた群については、同様の移植実験系で術後 3 週でも評価を行った (各群  $N=6$ )。

## 4. 研究成果

### HA および CA の特性評価

合成した HA 粉体と CA 粉体の XRD パターンは類似したピークを示し、既定の HA や CA のピークと一致した。FTIR も同様の結果だった。

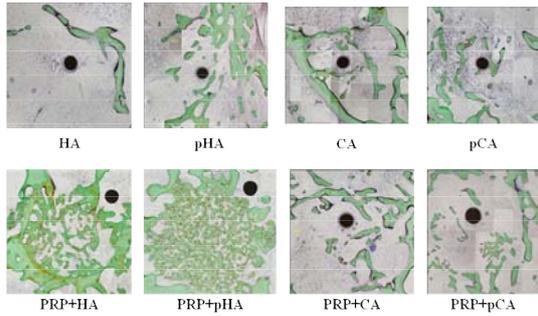
### HA と CA の電気分極

分極 HA 粉体と分極 CA 粉体の TSDC スペクトルより計算した蓄積電荷量の平均値はそれぞれ  $28.3 \pm 4.8 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、 $18.5 \pm 6.6 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  だった。

### $\mu\text{CT}$ と組織学的観察

**μCT:** 大腿骨内側顆の適切な位置に骨孔が作製され、埋入位置が正確にマークされていることが確認された。新生骨と埋入されたセラミックス粉体の識別は困難だった。

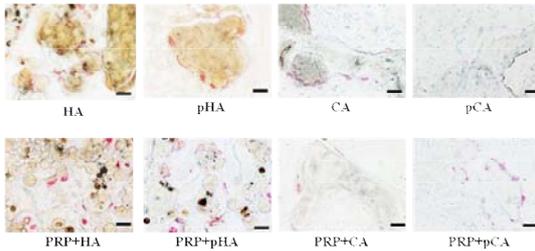
**VG 染色:** 骨孔群と PRP 群では新骨が形成されず、線維組織が骨孔を満たしていた。HA 粉体を埋入した各群、特に、PRP+pHA 群で新骨形成促進が顕著だった。CA 粉体を埋入した各群では分極処理による骨形成促進効果ははっきりしなかった。



移植後 6 週の VG 標本

**TRAP/トリジンブルー二重染色:**

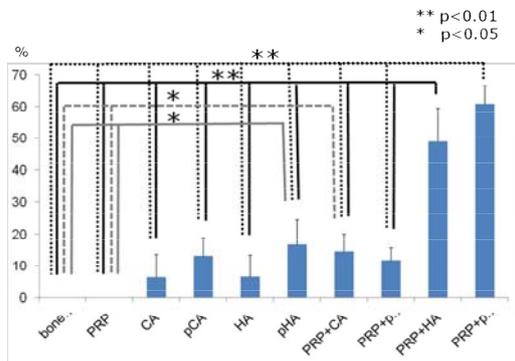
HA 粉体を埋入した各群で立方体型の骨芽細胞と多核 TRAP 陽性細胞が新生骨上に多数見られたが、CA を埋入した各群では少数だった。



移植後 6 週の二重染色標本

**新生骨領域の割合**

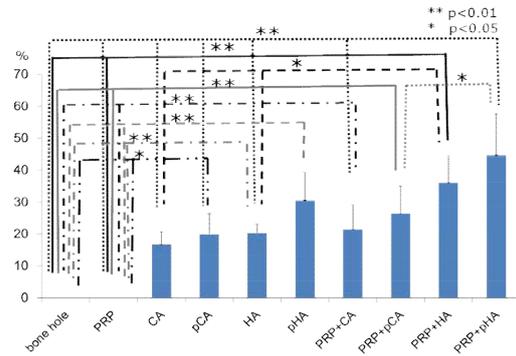
埋入後 3 週で新生骨は PRP+分極 HA 群において有意に多く形成されていた。6 週間後では PRP+分極 HA、PRP+未分極 HA が他群より有意に大きく、分極 HA 粉体が対照群より大きかった。



移植後 6 週の新骨領域

**骨芽細胞接着領域**

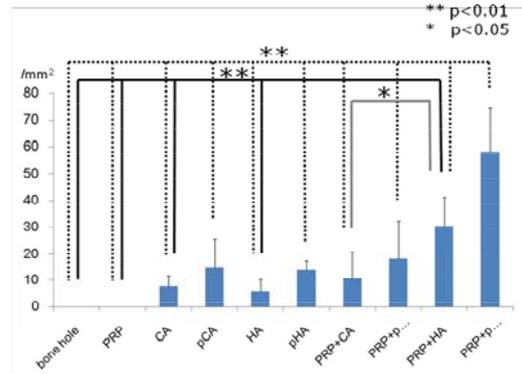
骨孔における新生骨の割合と同様の傾向が見られた。



移植後 6 週の骨芽細胞接着領域

**破骨細胞数**

埋入後 3 週で PRP+分極 HA、PRP+未分極 HA が対照群より大きく、6 週間ではこの 2 群、特に前者が他群より有意に大きかった。



移植後 6 週の破骨細胞数

**考察**

PRP は、PDGF、TGF-β1、TGF-β2、IGF、EGF 等多くの成長因子を含んでおり、前駆細胞の存在下において骨形成を促進することが期待される。しかし、PRP ゲルのみでは骨孔内に新生骨形成がみられなかったことにより、PRP の骨芽細胞や破骨細胞活性化効果は弱いことが示唆された。PRP と HA または CA 粉体と混和させることで骨原性細胞が活性化され、骨形成を促進することにより、PRP はバイオセラミックス粉体の良い担体として機能することが示された。HA または CA 粉体と PRP を混和したゲル中では、PRP のフィブリン網にセラミックス粉体が補足されることでゲル全体に広く分散し、長くその中に留まっていることが可能となる。これらの粉体は骨原性細胞の足場となり骨形成を促進すると考えられる。

PRP+分極 HA と PRP+未分極 HA の 2 群で骨芽細胞の活性が増強され、その結果新生骨形成が促進された。しかし、この効果は分極 HA と PRP を複合化することでより早期に生じることが示唆された。さらに、この 2 群で破骨細胞がより

早期から活性化されるが、PRP+分極 HA 群でこの効果が長く持続した。これはHA粉体の分極により骨のリモデリングが長く持続することを示唆している。

バルク体や多孔体は、骨原性細胞が進入するスペースを提供するため吸収される必要があるが、吸収速度が速すぎると残層の食食をするためマクロファージが多数進入して強い炎症反応が起こるとともに機械的強さが低下する。従って、骨再生のためには最適な吸収速度が重要である。本研究で、HA粉体は残存したが、CA粉体は吸収されてしまった。また、新骨形成はHA粉体の分極処理で促進されたが、CA粉体ではこの効果が弱かった。CA粉体は吸収速度が速すぎたため、破骨細胞や骨芽細胞の足場として利用できず、電気分極しても蓄積電荷がこれらの細胞を活性化するために十分な期間刺激できなかったことが原因と考えられる。従って、CAの炭酸含有量を調節して吸収速度を最適化することが必要である。

### 結論

PRPはセラミックス粉体の優れたキャリアであり、分極HA粉体を混合することにより、早期から骨原性細胞を活性化して、骨形成を増強することが示唆された。

### 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14件)

②伊藤聡一郎、山下 仁大、山本直輝、王巍、バイオセラミックスの電気分極による骨接合促進、化学療法研究所紀要、査読無、39巻、2009、6-14

②Wang W., Itoh S., Konno K., Kikkawa T., Ichinose S., Sakai K., Ohkuma T., Watabe K., Effects of Schwann cell alignment along the oriented electrospun chitosan nanofibers on nerve regeneration. J. Biomed. Mater. Res. 91A. 査読有, Vol. 91, 2009, 994 - 1005.

②Wang W., Itoh S., Tanaka Y., Nagai A., Yamashita K., Comparison of enhancement of bone ingrowth into hydroxyapatite ceramics with highly and lowly interconnected pores by Electrical Polarization. Acta Biomater., 査読有, Vol. 5, 2009, 3132 - 3140.

②Nakamura S., Kobayashi T., Nakamura M., Itoh S., Yamashita K., Electrostatic surface charge acceleration of bone ingrowth of porous hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate ceramic. J. Biomed. Mater. Res. A. 査読有, Vol. 92, 2010, 267 - 275.

⑤伊藤聡一郎、王巍、山本直輝、山下仁大、バイオセラミックスの電気分極、日本生体電気・物理刺激研究会誌、査読有、24巻、2010、17-21

⑥Sagawa H., Itoh S., Wang W., Yamashita K. Enhanced bone bonding of the

xyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate composite by electrical polarization in rabbit long bone. Artif. Organs. 査読有, 34, 2010, 491 - 497.

⑦Wang W., Itoh S., Yamamoto N., Okawa A., Nagai A., Yamashita A., Electrical polarization of  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics. J. Am. Ceram. Soc. 査読有, Vol. 93, 2010, 2175 - 2177.

⑧Nakamura S., Kobayashi T., Itoh S., Yamashita K., Electrostatic Surface Charge Boosting Bone Ingrowth of Porous Ceramics. J. Biomed. Mater. Res. A, 査読有, Vol. 92, 2010, 267 - 275.

⑨Wang W., Itoh S., Yamamoto N., Okawa A., Nagai A., Yamashita K., Enhancement of nerve regeneration along the chitosan nanofiber mesh tube on which electrically polarized  $\beta$ -tricalcium phosphate particles are immobilized. Acta Biomater., 査読有, Vol. 6, 2010, 4027 - 4033.

⑩伊藤聡一郎、電気分極処理したセラミックス粉体による神経架橋促進、整形外科、査読無、61巻、2010、1302.

⑪大庭聖子、王巍、伊藤聡一郎、山下仁大、分極アパタイト粉体の骨形成促進効果とPRPの担体としての有用性、日本生体電気・物理刺激研究会誌、査読有、22巻、2011、21 - 26.

⑫伊藤聡一郎、電気分極処理したセラミックス粉体による組織再生促進、整形外科、査読無、62巻、2011、998.

⑬伊藤聡一郎、王巍、山本直輝、山下仁大、バイオセラミックスの電気分極、日本生体電気・物理刺激研究会誌、査読有、24巻、2010、2-7

⑭Ohba S., Wang W., Itoh S., Takagi Y., Nagai A., Yamashita K.: Acceleration of new bone formation by the electrically polarized hydroxyapatite micro-granules/platelet-rich plasma composite. Acta Biomater., 査読有, in press.

[学会発表](計12件)

②伊藤聡一郎、山下仁大、山本直輝、王巍、バイオセラミックスの電気分極、第37回日本生体電気刺激研究会、2010、東京

②伊藤聡一郎、王巍、山下仁大、分極処理した $\beta$ -TCP粉体による神経架橋形成促進、第24回日本整形外科学会基礎学術集会、2009、横浜

②伊藤聡一郎、王巍、永井亜希子、中村美穂、山下仁大、電気分極セラミックス粉体を用いた軟組織の再生医療、日本セラミックス協会年会、2010、東京

②Kikuchi M., Yoshida T., Koyama Y., Sotome S., Itoh S., Takakuda K., Shinomiya K., Edamura K., Tanaka S. Hydroxyapatite A./Collagen Nanocomposite Materials Mimicking Bone Nanostructure for Bone Regeneration. Irie Indo-Japan Workshop on Nanobiotechnology & Nanodevices. 2009, Tamil Nadu, India.

②Kikuchi M., Koyama Y., Edamura K., Itoh S., Sotome S., Takakuda K., Tanaka S., Shinomiya K.

Development of Artificial Bone with Bone-Like Nanostructure using Self-Organization of Hydroxyapatite and Collagen. 2nd Asian Biomaterials Congress. 2009, Singapore.

伊藤聡一郎、王巍、永井亜希子、中村美穂、山下仁大、電気分極処理したセラミックス粉体による組織再生促進、第25回日本整形外科学会基礎学術集会、2010、京都

Itoh S., Ohba S., Wang W., Yamashita K., Enhanced effects of electrical polarization to form new bone on hydroxyapatite and availability of platelet-rich plasma as a carrier. Orthopedic Research Society 2012 Annual Meeting. 2012. San Francisco

伊藤聡一郎、新たな神経架橋技術の導入 - 脱細胞化神経と電気分極処理セラミックスによる神経再生の促進-、第34回末梢神経を語る会、2011、青森

Seiko Ohba, Wei Wang, Soichiro Itoh, Yuzo Takagi, Kimihiro Yamashita. Enhanced effects of electrical polarization to form new bone on hydroxyapatite micro-granules and availability of platelet-rich plasma as a carrier. The 1<sup>st</sup> Tri-University Consortium on Oral Science and Education. 2011. Bangkok

大庭聖子、永井亜希子、山下仁大、分極ハイドロキシアパタイトの骨形成促進効果とPRPゲルの担体としての有用性、第58回日本歯科理工学会学術講演会、2011、郡山

大庭聖子、王巍、伊藤聡一郎、山下仁大、分極ハイドロキシアパタイトとPRP混和ゲルの骨形成促進効果、第38回日本生体電気・物理刺激研究会、2011、東京

大庭聖子、王巍、伊藤聡一郎、永井亜希子、山下仁大、PRPあるいはヒアルロン酸を担体として用いた分極処理ハイドロキシアパタイト微粒子の骨形成促進効果比較、第39回日本生体電気・物理刺激研究会、2012、鹿児島

[図書] (計 1 件)

Kikuchi M., Koyama Y., Edamura K., Irie A., Sotome S., Itoh S., Takakuda K., Shinomiya K., Tanaka S. Synthesis of Hydroxyapatite/Collagen Bone-Like Nanocomposite and Its Biological Reactions. Advances in Nanocomposites - Synthesis, Characterization and Industrial Applications. 2011, 14.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤聡一郎 (ITOH SOICHIRO)  
東京医科歯科大学・歯部口腔保健学科・非常勤講師  
研究者番号：10242190

(2) 研究分担者

山下仁大 (YAMASHITA KIMIHIRO)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
研究者番号：70174670

王巍 (OU GI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教  
研究者番号：60451944

(3) 連携研究者

なし