

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791940

研究課題名（和文） リン酸カルシウムコーティング生体吸収型ファイバーの研究と開発

研究課題名（英文） Research and development of calcium phosphate coating bioabsorption fibers

研究代表者

高野 栄之（TAKANO HIDEYUKI）

徳島大学・病院・医員

研究者番号：30380091

研究成果の概要（和文）：生体吸収線維であるファインフレックスに溶解したリン酸カルシウム（ α -TCP、 β -TCP）とハイドロキシアパタイト（HAP）のコーティングを行った。浸漬実験にて pH は中性であった。引っ張り試験では 1000℃ で焼結させたものが最も強い強度を示した。このコーティング線維をディスク状にし、その上で破骨細胞様細胞を培養すると、多数の破骨細胞の接着とその直下に吸収窩の形成が認められた。

研究成果の概要（英文）：Calcium phosphate (α -TCP, β -TCP) that dissolved to Fineflex that was living body absorption line and hydroxyapatite (HAP) were coated. It was a soaking experiment and pH was a neutral. What sintered at 1000℃ showed strongest strength in the forced duction test. When this coating fibre was made like the disk, and osteoclast-like cells were cultured on that, the formation of the resorption lacuna was admitted in bonding and the right under of a lot of osteoclasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

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：インテリジェントマテリアル、人工骨、ハイブリッド材料、次世代型

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域では、顎骨に発生した腫瘍や嚢胞の手術後に生じる骨欠損に対して、様々な試みがなされてきた。これまで、自家骨移植がゴールドスタンダードとされてきたが、量の制限や患者への二次的な侵襲などで問題点があった。それ故、近年様々な生体材料（金属、有機材料、セラミックス、セメントなど）が開発され、広く臨床応用されてきた。

しかし、これらの骨補填用生体材料は利点

だけでなく、欠点も多く有している。例えば、生体内に長期残存する際、形態付与の可否、強度、腐食・耐食性、崩壊性や溶解性などが挙げられる。金属材料は比較的強度を有するが、生体内では吸収されず長期残存することで腐食・耐食性を招き、破損や破断を生じる可能性がある。また、有機材料は形態付与が比較的容易で加水分解して生体内に吸収されるが、その分解過程で炎症反応を惹起することがあり、細胞接着力が低く強固な力を必

要とする部位などには使用出来ない。無機材料である各種リン酸カルシウムも強度を有しているものの、形態付与が困難で溶解・吸収性の面で問題がある。これらのうち、生体骨とその組織が類似しており、生体内で安定とされる hidroキシアパタイトでさえ、形成・加工が難しく、生体内では吸収されないことが知られている。このように、いかに優れた材料であっても、単独の材料には欠点があり、複雑な生体を模倣あるいは代替出来ることは困難である。したがって、今後求められる生体材料は、上記の欠点を克服した複合的な材料が望ましいと考えられた。

2. 研究の目的

バイオソルブルファイバー（生体溶解性繊維）である「ファインフレックス®」（ニチアス）は、耐熱材料としても使用されるため各種リン酸カルシウムを高温で添加することが可能であり、繊維性なので伸展性に優れ、形態付与性に富む。さらに、欧州やWHO（世界保健機関）での人工非結晶質繊維の発ガン性分類においても「発癌性なし」に分類されている優れた生体溶解性繊維である。

これに有機材料である poly(L-lactic acid) (PLLA) と poly(DL-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) の共重合体を使用し、無機成分はリン酸三カルシウム (α -TCP あるいは β -TCP) を複合させ、表面に RGD peptide を coating した材料、溶解性に優れ、細胞接着能を持つ本材料は「インテリジェントマテリアル」として期待できる。

このインテリジェントマテリアルの開発と研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 生体吸収繊維とリン酸カルシウムの調整

生体吸収繊維である「ファインフレックス®」に、溶解させたリン酸カルシウムを粉霧させ、自然乾燥させる。数回繰り返すことで、生体吸収繊維にリン酸カルシウムの coating を行う。この状態では比較的容易に剥離されると予想されるので、同材料を 1200°C の高温処理をさせ、リン酸カルシウムの高結晶化による生体吸収繊維との一体化をさせる。本研究で用いるリン酸カルシウムの候補として、数種類予定している。具体的には、リン酸三カルシウム (α -TCP, β -TCP) と hidroキシアパタイト (HAP) である。前者はリン酸三カルシウムの溶解性に注目し、後者は強度に注目したものである。いずれのリン酸カルシウムも単体としての生体適合性は優れているため、目的に応じた選択が可能である。

(2) リン酸カルシウム coating 繊維の物理

化学的な検討

リン酸カルシウム coating 繊維を蒸留水中に浸漬させ、その溶液の pH を測定する。またリン酸カルシウム量の調整を行い、焼結温度を変化させる。さらに、長期間疑似体液中に浸漬させ、生体内の吸収・溶解性のメカニズムを確認、走査型電子顕微鏡にて観察を行う。強度測定に関しては、引張り試験を行う。

(3) リン酸カルシウム coating 繊維上の破骨細胞の挙動

リン酸カルシウム coating 繊維を disc 状の形態にし、その上に家兎脛骨から採取した破骨細胞を播種する。具体的には、生後 5 日目の家兎の脛骨から採取した骨髄細胞懸濁液を、遠心分離を用いて破骨細胞様細胞を選択的に抽出し播種する。播種後 5 時間で非附着性細胞（例えば、赤血球や白血球など）を PBS で洗浄した後、5 日間培養を行う。培養後、TRAP 染色を行い、実体顕微鏡を用いて TRAP 陽性細胞数を測定する。なお、コントロールとしては、coating していない生体吸収繊維（ファインフレックス®）とリン酸カルシウム coating 繊維を使用する。

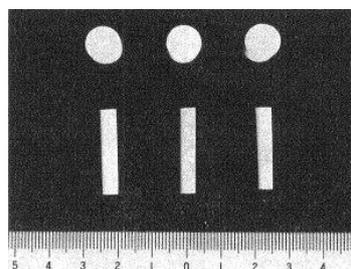
さらに、破骨細胞様細胞培養 5 日目の材料を走査型電子顕微鏡にて観察を行うため、オスミウムとグルタルアルデヒドによる 2 重固定を行い、さらに炭酸ガスによる乾燥後イオンコーティングを行う。この試料を用いて走査型電子顕微鏡による破骨細胞の接着ならびに吸収過程を観察する。

4. 研究成果

(1) リン酸カルシウムを粉体粉碎器を用いて粉碎し、ジメチルスルホアミド (DMSO) に混合させた。生体吸収繊維である「ファインフレックス®」に、溶解させたリン酸カルシウムを dipping したのち、自然乾燥を行い生体吸収繊維にリン酸カルシウムの coating を行ったのち 1200°C の高温処理をさせ、リン酸カルシウムの高結晶化による生体吸収繊維との一体化をさせた。



ファインフレックス



棒状に整形したリン酸カルシウム coating 繊維

(2) リン酸カルシウム coating 繊維の物理化学的な検討

溶出試験：リン酸カルシウム coating 繊維の直径 30mm 長さ 50mm の棒状の試料を 37.0°C に保持した生理食塩水 100ml および蒸留水 100ml に 40 日間浸漬後、各試料の重量を測定し、溶出減量を求めたところ、蒸留水では 0.5mg, 0.0196wt%, 0.06 mg/cm², 生理食塩水では 0.7mg, 0.0294wt%, 0.09 mg/cm² とわずかな溶出が認められた。また浸漬 40 日後の溶出試験液中の Ca と P 成分を定量分析したところ、蒸留水中では Ca3.6mg/dl, P4.2mg/dl, 生理食塩水中では Ca5.0mg/dl, P9.8mg/dl であった。

引っ張り強度：600°C、800°C、100°C、1200°C にて焼結を行ったのち、機械的強度の指標として、関節引っ張り強度 (diametral tensile strength) を測定した。測定には小型万能試験機 (AGS-500A, 島津, 京都) を用い、クロスヘッドスピードは 10mm・min⁻¹ とした。100°C で焼結させたものが最も強い強度を示した。

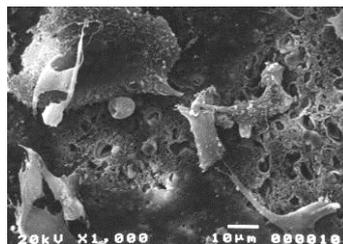
焼結温度	引っ張り強度 (kg/cm ²)
600°C	57±6
800°C	66±8
1000°C	87±20
1200°C	74±15

(3) リン酸カルシウム coating 繊維上の破骨細胞の挙動

破骨細胞の採取方法は、Chambers らの方法に準じて行った。生後 5 日齢の日本白色種雌性家兔 (日本 SLC, 静岡) の脛骨を摘出し、軟組織を除去した後、骨を長軸にそって分割し、海綿骨とともに骨髓を採取した。採取した海綿骨および骨髓を α-MEM に混濁し、ピペティング操作にて骨から遊離させた。この混濁液を 4°C, 200rpm で 20 分間遠心分離し、10%FBS を含む α-MEM 培地にて調整し、1500 個・ml⁻¹ の多核巨細胞を含む細胞混濁液を得た。リン酸カルシウム coating 繊維を直径 10mm のディスク体にし、24 穴プラスチックマイクロプレート (24 well cell culture cluster, Corning, NY, USA) 内に静置した後、ディスク体あたり 200 μl の細胞混濁液を播種した。37°C, 5%CO₂ 条件下で 2 時間培養後、非付着性細胞を PBS で洗浄した。2ml の培地が入った 24 穴マイクロプレート 1 穴にディスク体試料 1 個を移し、ついで 48 時間培養を行った。ディスク体試料上に存在する破骨細胞を確認するため、破骨細胞のマーカー染色である酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を行った。培養した細胞を 10%ホルマリン水溶液にて 20 分間固定した後、Ca²⁺ と Mg²⁺ を含

まないリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS(-) と略記する; 日本製薬, 東京) で洗浄した。その後、Takahashi らの方法に準じて TRAP 染色を行った。すなわち、20mg ナフトール AS-MX リン酸ナトリウム塩を含む 0.5ml N,N'-ジメチルホルムアミド (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, 大阪) と 388mg 酒石酸ナトリウム (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を含む 0.1mol・l⁻¹ 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 40ml を混合した溶液に、20mg のファーストバイオレット LB salt (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を加えた染色液を用いて染色した。なお、反応停止液として 0.1ml・l⁻¹ 水酸化ナトリウムを用いた。TRAP 陽性で、3 つ以上の核を有する短径 50 μm 以上の細胞を破骨細胞とみなし、実体顕微鏡を用いて細胞数を測定した。細胞数は 75 ± 12 個・cm² であった。以前に報告した焼結体アパタイトディスク上での破骨細胞数は 40 ± 13 個・cm² で有意な差を認めた (P<0.005)。

ディスク体試料上の破骨細胞数を測定した後、走査型電子顕微鏡 (Scanning electric microscope, 以下 SEM と略す; JSM-5300, JEOL, 東京) を用いて、破骨細胞および吸収窩の形態観察を行った。ディスク体試料を 2.5% グルタルアルデヒドを含む PBS(-) で 2 時間固定した後、2% 四酸化オスミウムを含む PBS(-) で 2 時間後固定を行った。その後、ディスク体試料をエタノール上昇系列により脱水した後、酢酸イソアミルに置換し、臨界点乾燥を行った。乾燥させたディスク体試料にイオンパッタ法による金蒸着を施したものを観察試料として SEM にて観察したところ、破骨細胞とその直下に吸収窩が認められた。



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)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 栄之 (TAKANO HIDEYUKI)
徳島大学・病院・医員
研究者番号：30380091

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：