

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09935

研究課題名（和文）炭酸アパタイト骨補填材の機械的強度に及ぼす構造因子の解析

研究課題名（英文）Analysis of structural factors on the mechanical strength of carbonate apatite bone replacement

研究代表者

野村 俊介（Nomura, Shunsuke）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：60710994

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）：炭酸アパタイト骨補填材は自家骨に匹敵する骨伝導性を示し、自家骨と同様に骨リモデリングに調和して新しい骨に置換されるため、理想的な骨補填材と言えるが、荷重領域に応用するには機械的強度に難点がある。本研究は、石膏を前駆体とする炭酸アパタイト骨補填材の機械的強度を高める因子を検討した。

本研究において確立した硬化時に加圧することによって前駆体の機械的強度を上昇させる方法は、炭酸アパタイト骨補填材がより緻密になり、加圧量の差による破骨細胞の分化には影響を及ぼさないことから、炭酸アパタイト上での破骨細胞の分化能を保ったまま、炭酸アパタイトの機械的強度を向上させることが可能である方法であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが開発した炭酸アパタイトは平成29年度に薬事認可されて以降、現在幅広く臨床応用されている。本研究は炭酸アパタイト骨補填材の弱点である機械的強度を改善するための先駆的な研究である。自己硬化性を示す石膏を前駆体として用いることは、様々な形態の炭酸アパタイト骨補填材の作成が可能であり、また作成法の違いにより破骨細胞の分化能が変わらないことから、様々な状況における骨欠損部位のテーラメード医療が可能となると考えられる。このことから、本研究は臨床歯学・臨床医学への貢献は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Carbonate apatite bone replacement material is an ideal bone replacement material because it shows osteoconductivity comparable to autogenous bone and is replaced by new bone in harmony with bone remodeling, just as autogenous bone is. This study investigated factors that increase the mechanical strength of carbonate apatite bone replacement materials using gypsum as a precursor.

The method established in this study to increase the mechanical strength of the precursor by applying pressure during curing makes the carbonate apatite bone replacement material denser and does not affect osteoclast differentiation due to differences in the amount of pressure applied. This method was found to be capable of improving the mechanical strength of carbonate apatite while maintaining the ability of osteoclasts to differentiate on the carbonate apatite.

研究分野：生体材料学

キーワード：炭酸アパタイト 骨補填材 機械的強度

### 1. 研究開始当初の背景

水酸アパタイト[HAp:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]焼結体は、典型的な人工骨補填材として広く臨床応用されている。水酸アパタイトは骨伝導性(骨欠損部で直接骨と結合する性質)を示すが、実質的に非吸収性材料であり、歯科矯正が必要な部位では、HApは使用できない。申請者らは骨の無機組成が水酸アパタイトではなく炭酸アパタイト[ $\text{CO}_3\text{Ap}$ :  $\text{Ca}_{10-a}(\text{PO}_4)_6-b(\text{CO}_3)_c$ ]であることに着目し(表1)前駆体を用いた溶解析出反応による炭酸アパタイトの調製法を確立した。また、水酸アパタイトは破骨細胞に吸収されないが、炭酸アパタイトは破骨細胞に吸収されること(図1)炭酸アパタイトは水酸アパタイトに比較して圧倒的に骨伝導性に優れること(図2)炭酸アパタイトは自家骨と同様に骨リモデリングに調和して骨に置換される(図3)ことも明らかにしてきた。

組成	含有量
Ca	34.8
$\text{PO}_4$ as P	15.2
<b><math>\text{CO}_3</math></b>	<b>7.4</b>
Mg	0.72
K	0.03
F	0.03
Cl	0.13

骨と同じ組成である炭酸アパタイト骨補填材は、歯科発日本発世界初の人工骨補填材として2017年にこれまで承認品がなかったインプラントを前提とした骨補填を含め全ての歯科・口腔外科に使用できる骨補填材として、薬事承認され、2018年から臨床応用されている。骨と同じ組成であり、骨と同様に骨リモデリングを受けて新しい骨に置換される炭酸アパタイト骨補填材は理想的な骨補填材となる可能性が高いが、溶解-析出法で調製されるため、焼結体と比較すると機械的強度に劣る。一方、皮質骨は比較的高い機械的強度を示す。そのため、皮質骨に匹敵する機械的強度を有する炭酸アパタイト骨補填材が開発されれば、臨床的意義は極めて大きい。

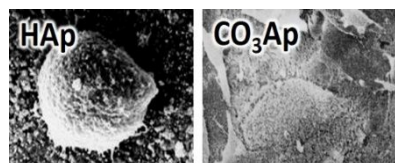


図1 水酸アパタイト(HAp)と炭酸アパタイト( $\text{CO}_3\text{Ap}$ )上で破骨細胞を培養した場合のSEM像

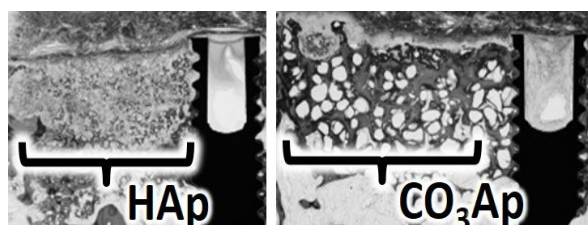


図2 ビーグル犬顎骨欠損部を水酸アパタイト(HAp)と炭酸アパタイト( $\text{CO}_3\text{Ap}$ )で再建した場合の3ヶ月後のピラヌエバゴルドナー染色像、灰色部が

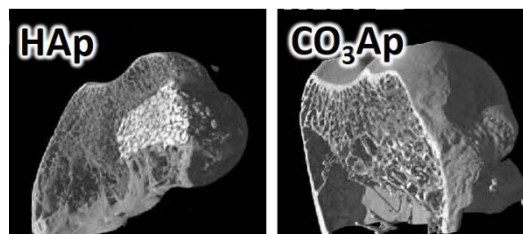


図3 兎大腿骨欠損を水酸アパタイト(HAp)と炭酸アパタイト( $\text{CO}_3\text{Ap}$ )で再建した場合の24ヶ月後の $\mu\text{CT}$ 像。

### 2. 研究の目的

炭酸アパタイトの調製法である溶解-析出反応では、前駆体の形態は維持されて、組成が炭酸アパタイトとなる。すなわち、前駆体のミクロ形態を制御することによって炭酸アパタイトのミクロ形態も制御できるはずであり、そのことによって炭酸アパタイト骨補填材の機械的強度の制御が可能となるはずである。

本研究では、機械的強度の高い炭酸アパタイト骨補填材の調製に必要な構造因子を解明するために、炭酸アパタイト骨補填材の前駆体である硫酸カルシウム(石膏)の修飾が、調製される炭酸アパタイトの機械的強度に及ぼす影響、調製された炭酸アパタイト骨補填材の破骨細胞性吸収を解析した。

### 3. 研究の方法

#### 1) 石膏の修飾が炭酸アパタイトの機械的強度に及ぼす影響の検討

普通石膏(型半水石膏)を異なる混水比にて蒸留水で練和し、前駆体である硫酸カルシウム二水和物を調製した。また、1軸加圧成型(図4)によって圧力を負荷した条件で硫酸カルシウム二水和物を調製した。調製された硫酸カルシウム二水和物については組成解析(粉末X線回折)および物性解析(圧縮強度)を行った。

次に、炭酸アパタイトの前駆体である硫酸カルシウム二水和物をリン酸水素ナトリウム-炭酸水素ナトリウム混合溶液中に浸漬し、溶解析出反応で前駆体の形態を保ったまま、組成を炭酸アパタイトに変換した。炭酸アパタイトへの組成変換反応については速度論的解析を行うとともに、調製された炭酸アパタイトの組成解析(粉末X線回折、フーリエ変換赤外分光法)および物性解析(圧縮強度)を行った。前駆体である硫酸カルシウムと炭酸アパタイトの機械的強度の関係から機械的強度の高い炭酸アパタイト



図4 1軸加圧成型機

ト骨補填材の調製に必要な構造因子を検討した。

## 2) 機械的強度の異なる炭酸アパタイト骨補填材の破骨細胞性吸収の解析

炭酸アパタイト骨補填材は骨リモデリングに調和して新しい骨に置換されることが確認されているが、機械的強度が高い炭酸アパタイト骨補填材は気孔率が小さいことが予測され、気孔率の減少は破骨細胞性吸収速度の低下につながると予想される。そのため、炭酸アパタイトディスク表面で破骨細胞を培養し、機械的強度の異なる炭酸アパタイト骨補填材の破骨細胞性吸収速度を定量化することによって、組成因子以外の形状因子が破骨細胞性吸収に及ぼす影響の有無、および影響の程度を解析した。

破骨細胞の吸収活性の測定には、炭酸アパタイトプレート上にマウスマクロファージ (RAW264.7 細胞) を播種してマクロファージコロニー刺激因子含有培地で培養し、その後、NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド含有培地中で一定期間培養した。細胞融合因子 (DC-STAMP)、酒石酸抵抗ホスファターゼ (TRAP) やカテプシン K (Ctsk) などの破骨細胞関連遺伝子の発現変化をリアルタイム定量 PCR にて解析した。なお、細胞培養プレート (TC) 上で RAW264.7 細胞を播種し、同様の実験方法で細胞が正常に分化誘導しているか観察を行った。

また、破骨細胞を試料ディスク表面に播種し、培地中で一定期間培養し、実体顕微鏡を用いて TRAP 染色された試料表面上の多核巨細胞の数を測定するとともに、走査型電子顕微鏡を用いて試料表面に形成される破骨細胞による吸収窩数および吸収窩面積を計測し定量化した。

## 4. 研究成果

### 1) 石膏の修飾が炭酸アパタイトの機械的強度に及ぼす影響の検討

普通石膏 ( 型半水石膏 ) を異なる混水比にて蒸留水で練和し、硬化後の試料の評価を行ったところ、硫酸カルシウム半水和物である 型半水石膏は硫酸カルシウム 2 水和物へ組成変換が起こり、またリン酸-炭酸混合水溶液中に作製した硫酸カルシウム 2 水和物を浸漬し、熱処理を行なったところ、すべての群で硫酸カルシウム 2 水和物から炭酸アパタイトへの組成変換が確認された。

また、圧縮強度を測定したところ、前駆体作製時の混水比が大きくなるほど前駆体の機械的強度が減少し、また組成変換した炭酸アパタイトの機械的強度も減少することが判明した ( 図 4 )。

次に、普通石膏の初期硬化時に圧力 ( 20, 40, 80MPa ) を付与し、硬化後の試料の評価を行ったところ、全ての圧力下で硫酸カルシウム半水和物は硫酸カルシウム 2 水和物へ組成変換が起こった。またリン酸-炭酸混合水溶液中で作製した硫酸カルシウム 2 水和物を浸漬し、熱処理を行なったところ、すべての群で硫酸カルシウム 2 水和物からアパタイトへの組成変換が確認された ( 図 5(A) )。また、加圧して硬化させた硫酸カルシウム 2 水和物をリン酸-炭酸混合水溶液に浸漬した前後の赤外線吸収スペクトルを測定したところ、浸漬前の試料は硫酸カルシウム 2 水和物のスペクトルと同様のスペクトルを示しているのに対して、リン酸-炭酸混合水溶液に浸漬した後の試料は水酸基およびリン酸基が炭酸基に置換した AB タイプ炭酸アパタイトであることが確認できた。

また、走査型電子顕微鏡にてリン酸-炭酸混合水溶液に浸漬する前後の試料の結晶構造を確認したところ、浸漬前において加圧量を大きくするにつれて緻密な結晶構造が認められたが、浸漬後においても同様の所見が認められた。

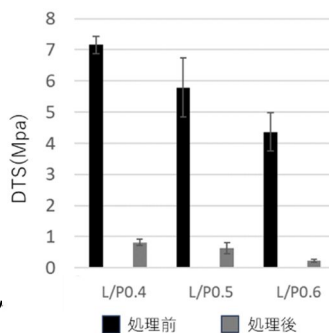


図4 圧縮強度の違い

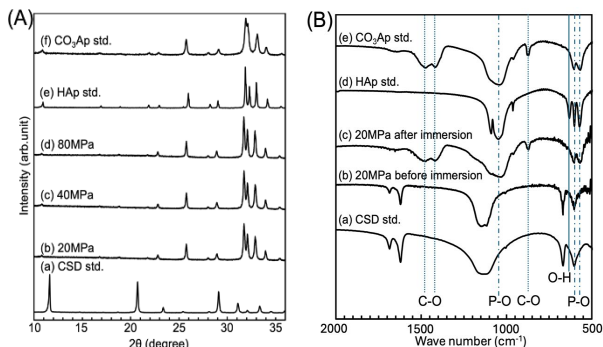


図5 異なる圧力を付与した炭酸アパタイトのX線回折パターン(A)および赤外線吸収スペクトル(B)

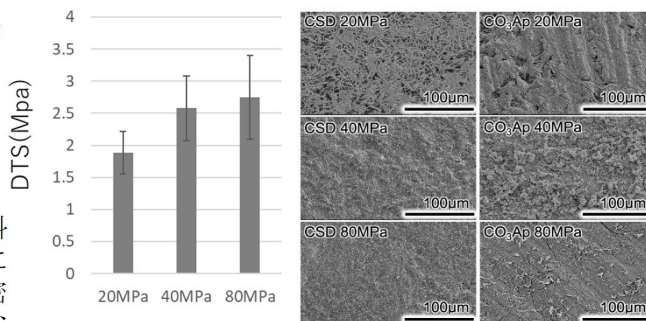


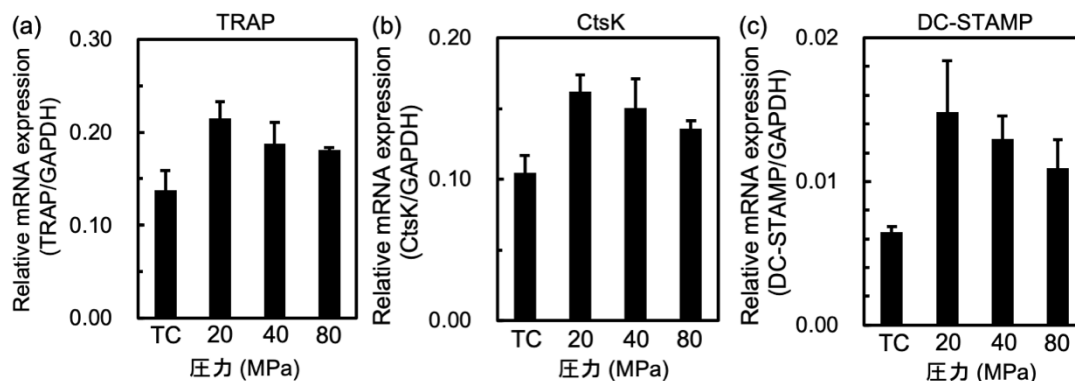
図6 圧縮強度および走査型電子顕微鏡

## 2) 機械的強度の異なる炭酸アパタイト骨補填材の破骨細胞性吸収の解析

### 炭酸アパタイトディスクの破骨細胞分化に及ぼす影響の評価

石膏硬化時に加えた圧力の差が RAW264.7 細胞から破骨細胞への分化に与える影響を検討した。破骨細胞関連遺伝子の発現変化を定量化したところ、炭酸アパタイトプレート上で RAW264.7 細胞

胞の培養を行った場合は、細胞培養プレート上で培養を行った場合と比較して破骨細胞関連遺伝子の発現量は増加する傾向にあったが有意な差は認められなかった。また、加圧量の差による破骨細胞関連遺伝子の発現量に有意な差は認められなかった(図7)。このことから、加圧量の差によって破骨細胞の分化には影響を及ぼさないということが判明した。



以上の結果から、石膏を前駆体とし、硬化時に加圧することによって前駆体の機械的強度を上昇させ、さらに変換した炭酸アパタイトの構造にも影響を及ぼすことが示唆された。さらに炭酸アパタイト上での破骨細胞の分化能を保ったまま、炭酸アパタイトの機械的強度を向上させることが可能であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 出口 佳愛, 野村 俊介, 土谷 享, 石川 邦夫, 高橋 一郎
2. 発表標題 炭酸アパタイト骨補填材中の炭酸基含有量が骨置換に及ぼす影響について
3. 学会等名 第18回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	高橋 一郎  (Takahashi Ichiro)  (70241643)	九州大学・歯学研究院・教授    (17102)	

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