

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22592185

研究課題名(和文)骨組織親和性をデザインしたアパタイト系骨充填材の創製

研究課題名(英文)Fabrication of apatite bone substitutes designed on bone tissue compatibility

研究代表者

Munar M・L (Munar, Melvin)

九州大学・歯学研究科(研究院)・学術研究員

研究者番号：50432919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：炭酸アパタイト骨補填材の骨置換性を向上させるため、化学組成や結晶性だけでなく、気孔構造の導入を含めて統合的に骨補填材のデザインを行った。10wt%のPMMA球状粒子を添加した石膏硬化体を作製し、PMMAの焼却と炭酸塩水溶液を用いた水熱処理によって、カルサイトから成る前駆体多孔体を作製した。この前駆体は炭酸アパタイトへ組成変換可能であり、ハンドリングに問題ない強度を有していた。ラットを用いたin vivo試験によって、多孔体の気孔内部への骨組織進入が認められたことから、本気孔形成法は炭酸アパタイト骨補填材の気孔構造設計に有効であると結論付けた。

研究成果の概要(英文)：In order to increase an ability of bone replacement for carbonate apatite bone substitutes, an integrated design including pore incorporation as well as chemical composition and crystallinity was examined in this study. 10wt% spherical PMMA particles was introduced into gypsum hardening body and burned out then subsequently hydrothermally treated with carbonate solution to obtain the precursor porous body consisting of calcite. The precursor could transform to carbonate apatite with enough handling property. In vivo experiment using rats indicated the incorporation of new bone into the pore structure of the obtained porous body. It was concluded that the present method using spherical PMMA particles would be useful to make design of porous structure for carbonate apatite bone substitutes.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：骨補填材 アパタイト 連通気孔

## 1. 研究開始当初の背景

病気や怪我で失った骨組織の機能を速やかに回復させることができる高い機能性を持つ骨補填材の創製は、高齢者の QOL 向上に大きく貢献すると期待される。

現在、市販されている骨補填材の化学組成は、主としてヒトの骨の無機組成に類似した炭酸カルシウムやリン酸カルシウムである。骨補填材の生体内吸収性は化学組成によって異なるが、結晶性によっても大きく影響され、例えば高温で焼成された結晶性の高い水酸アパタイトは生体内でほとんど吸収されない。さらに、組織の侵入といった観点から、骨補填材への気孔構造の導入も積極的に研究されている。

我々の研究グループが開発した炭酸アパタイト骨補填材は、組成が骨の無機成分とほぼ同等であること、結晶性が骨とほぼ同等(低結晶性)であることを特徴としており、*in vivo* 評価により、骨リモデリングに同調して骨置換されることがこれまでに明らかになっている。

炭酸アパタイト骨補填材の骨置換性を、さらに向上させるためには、化学組成や結晶性だけでなく、気孔構造の導入を含めた統合的なデザインが必要だと考えられる。

## 2. 研究の目的

炭酸アパタイトは加熱により炭酸基が脱離するため、一般的な焼成法は適用できない。従って、成形可能な前駆体を作製し、これを炭酸アパタイトに組成変換させる方法で合成する。即ち、まず炭酸アパタイトの構成イオンを含み適度な溶解性を持つ前駆体( $\alpha$  型リン酸三カルシウム、炭酸カルシウム、硫酸カルシウム等)を作製する。次に、不足イオンを含む溶液にこの前駆体を浸漬すると、溶解析出型反応によって炭酸アパタイトへと組成変換する。従って、炭酸アパタイト骨補填材に気孔構造を導入するためには、まず、多孔型前駆体を作製し、これを炭酸アパタイトへと組成変換する手法が最も有効である。候補となる前駆体の中でも、硫酸カルシウム(石膏)は自己硬化性を持ち硬化体の強度も高いため、多孔型前駆体を得やすいという利点を有する。

そこで本研究では、三次元プリンターやポリメチルメタクリレート(PMMA)球状粒子を気孔形成材として用いる方法によって、石膏からなる多孔型前駆体を作製し、これを組成変換させて多孔型炭酸アパタイト骨補填材を創製することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 石膏硬化体の炭酸アパタイトへの組成変換

最初に、炭酸アパタイトを作製する上で、前駆体としての石膏の有用性を評価する実験を行った。半水石膏粉末を原料として $\phi 6 \times 3$  mmのサイズの二水石膏の硬化体を作製した(混水比0.5)。次に、得られた硬化体を種々の温度のリン酸塩水溶液および炭酸塩水溶液で処理し、炭酸アパタイトへの組成変換を試みた。X線回折法(XRD)およびフーリエ変換赤外分光法

(FT-IR)を用いて炭酸アパタイトへの組成変換を調査した。CHN分析により炭酸含有量を算出し、オートグラフを用いて間接引張強さ(DTS)を評価した。

### 3-2. 三次元プリンターを用いた多孔型石膏前駆体の作製と炭酸アパタイトへの組成変換

三次元プリンター(Zprinter350)を用いて骨組織の進入に有効な気孔径(300-500 ミクロン)を有する多孔型石膏硬化体の作製を試み、炭酸アパタイトへの組成変換を試みた。さらに、石膏構造体に含まれるバインダー(有機物)除去のための焼成条件に関する検討と、引き続きリン酸塩水溶液および炭酸塩水溶液を用いた炭酸アパタイトへの相変換に関する検討を行った。オートグラフを用いて圧縮強さを評価した。

### 3-3. 石膏とPMMA球状粒子を用いた多孔型カルサイト前駆体の作製

硬質石膏粉末にPMMA球状粒子(粒度分布: 50-200  $\mu\text{m}$ )を異なる割合で導入し、混水比0.2で練和した後、型の中で石膏-PMMA複合硬化体を作製した。室温で24時間硬化させた後、高温でPMMAを焼却し多孔体を得た。その後、炭酸塩水溶液を用いて炭酸化を行い、多孔型カルサイト前駆体を作製した。XRDにより焼却前後および炭酸化後の結晶相の同定を行った。得られた試料の表面および断面の気孔構造を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察するとともに、エネルギー分散型X線マイクロアナリシス(EDX)により硫黄成分の残存を調べた。断面観察用の試料については、試料をレジン(Technovite®)に包埋し、ダイヤモンドカッターで切断した切断面を観察した。オートグラフを用いて試料の圧縮強さを評価した。

### 3-4. 病理学的評価

12週齢のWisterラットの大腿骨にインプラント用ドリルを用いて $\phi 2$  mm x 2 mmの骨欠損を形成し、ほぼ同じサイズの円柱状カルサイト多孔体を埋入した。埋入9日および21日経過後の脱灰組織標本(HE染色)を作製し、試料中に導入された三次元気孔構造への骨組織の侵入状況を観察した。

## 4. 研究成果

### 4-1. 石膏硬化体の炭酸アパタイトへの組成変換

石膏前駆体の炭酸アパタイトへの相変換に及ぼすリン酸塩水溶液および炭酸塩水溶液の種類や濃度の影響について検討を行った結果、0.4 mol/L リン酸水素二ナトリウムと0.4 mol/L 炭酸水素ナトリウムの混合溶液を用いてリン酸化と炭酸化を同時に行う手法が有用であると判明した。石膏から炭酸アパタイトへの相変換率(%)を処理時間の関数としてプロットした結果を図1に示す。処理温度が高くなると相変換速度が向上した。一方、炭酸アパタイト構造中の炭酸基含有量は処理温度が高くなると低下した。120°Cで水熱処理して得られた炭酸アパタイトの炭酸含

有量は  $6.1 \pm 0.1 \text{ wt\%}$  であり、骨の炭酸含有量とほぼ等しい値であった。組成変換前の石膏硬化体の DTS 値は  $6.0 \pm 0.3 \text{ MPa}$  であるのに対し、組成変換後の炭酸アパタイトの DTS 値は水熱処理温度に依存せず低下し、 $120^\circ\text{C}$  で水熱処理して得られた炭酸アパタイトの DTS 値は  $1.2 \pm 0.2 \text{ MPa}$  であった。石膏硬化体は二水石膏の針状結晶の絡み合いによって高い強度を有するが、組成変換によって析出する炭酸アパタイトの結晶の絡み合いは石膏に比べて著しく小さい。この様に、結晶の絡み合いによる相互作用が低下することで強度が低下したと考えられる。

以上より、組成変換による強度の低下を考慮した上で、前駆体の組成や気孔径をデザインする必要があると結論付けた。

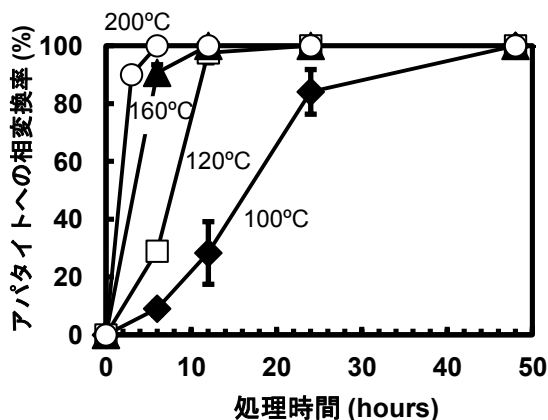


図 1 種々の温度で水熱処理した際の石膏から炭酸アパタイトへの相変換率

#### 4-2. 3D プリンターを用いた多孔型石膏前駆体の作製と炭酸アパタイトへの組成変換

3D プリンターを用いて作製した石膏構造体にはバインダーが含有しており、組成変換を目的とした水溶液処理中に形状が崩れる傾向が認められた。最初にバインダー除去のための熱処理条件について検討を行った。大気環境下では完全に除去することは不可能であったが、積極的な酸素導入による雰囲気制御でバインダーが除去可能な条件を明らかにした。次に、連通気孔を有する石膏構造体を試みた。3D プリンターで作製できる気孔径や気孔構造を検討し、比較的大きな気孔径 ( $800\text{-}1000\mu\text{m}$ ) の石膏構造体でなければ作製が困難であり、且つバインダーの除去および炭酸アパタイトへの組成変換後に著しく強度が低減することが分かった。

以上より、3D プリンターを用いて前駆体多孔体を作製する場合にはバインダーを除去するために雰囲気制御を含めた焼成プロセスが必要なこと、比較的大きな気孔構造体でなければ作製困難なことを踏まえて、連通気孔型炭酸アパタイト骨補填材を創製する必要があると結論付けた。

#### 4-3. 石膏と PMMA 球状粒子を用いた多孔型カルサイト前駆体の作製

硬質石膏粉末中に導入可能な PMMA 球状

粒子の添加量について調査した結果、 $10 \text{ wt\%}$  までは問題なく石膏泥の練和が可能で、硬化体の強さが維持できた。 $10 \text{ wt\%}$  以上添加すると石膏泥の粘性が高くなり、硬化体の作製が困難であったため、PMMA 球状粒子の添加量は  $10 \text{ wt\%}$  とした。PMMA の焼却温度については鋭意検討した結果、 $1000^\circ\text{C}$  で 3 時間熱処理することによって PMMA が完全に焼却でき多孔体が得られることが分かった。XRD より、PMMA 焼却後の焼成物は無水硫酸カルシウムであった。炭酸アパタイトの前駆体であるカルサイト多孔体を得るための相変換条件について検討を行った結果、 $4 \text{ mol/L}$  の炭酸アンモニウム水溶液を用いて  $200^\circ\text{C}$  で 12 時間水熱処理すれば、単相の多孔型炭酸カルシウムが得られることが分かった。

$10 \text{ wt\%}$  PMMA の条件で作製したカルサイト多孔体の表面および断面の SEM 像を図 2 に示す。表面観察により PMMA 粒子の焼却による気孔の形成が確認された (図 2a)。断面観察からも同様に、PMMA 球状粒子の焼却により形成された多くの気孔が認められた。所々に連結した孔の存在も認められた。高倍率で気孔壁を観察した結果から、数ミクロン程度の隙間は存在するものの、およそ  $10 \mu\text{m}$  サイズのカルサイト単結晶粒子が焼結している様子が認められた。EDX 分析では硫黄成分は検出されなかったことから、石膏は残存していないことが分かった。力学的強さについても、圧縮強さで  $1\text{-}5 \text{ MPa}$  であり、ハンドリングにも特に支障はない試料が得られた。

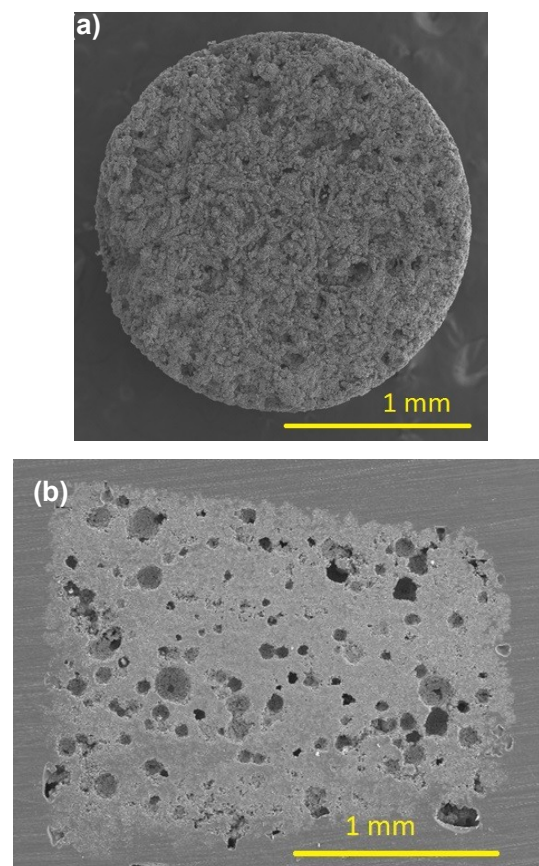


図 2  $10 \text{ wt\%}$  PMMA の条件で作製したカルサイト多孔体 (a) 表面および (b) 断面の SEM 像

以上より、PMMA 球状粒子を用いて前駆体多孔体を作製する場合には、10wt%まで添加することが可能なこと、高温焼成で多孔化が可能なこと、炭酸塩水溶液を用いた水熱処理により短時間でカルサイトからなる前駆体多孔体を作製可能なことが明らかになった。

#### 4-4. 病理学的評価

PMMA 球状粒子を用いて作製した孔構造の内部への骨侵入を確認することは、骨補填材の孔構造の設計において極めて重要なプロセスである。

ラット大腿骨欠損に円柱状のカルサイト多孔体を埋入して、21 日経過後の周辺組織の脱灰標本(HE 染色)を図 3 に示す。染色の状況から気孔内部への細胞の侵入が認められ、かなり多くの割合で骨様組織の形成も認められた。

以上より、10wt%の PMMA 球状粒子を用いて作製した気孔構造の内部には細胞の侵入や骨組織の形成が可能なことが明らかになった。

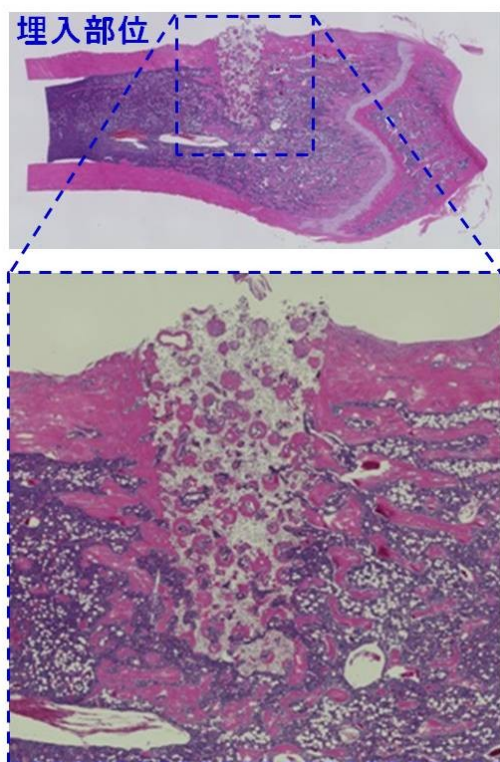


図 3 ラット大腿骨欠損に円柱状カルサイト多孔体を埋入して、21 日経過後の周辺組織の脱灰標本(HE 染色) 下図中央付近は多孔体埋入箇所、白い箇所が骨補填材(脱灰により除去)で球状に染色された箇所が気孔内部を示す。

本研究で得られた研究成果は、優れた骨置換性を有する炭酸アパタイト骨補填材を設計する上で、極めて有用である。本研究成果に基づいて、今後は、さらなる炭酸アパタイト骨補填材の機能性向上を目指す。

#### 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 件)  
発表予定

[学会発表](計 件)  
発表予定

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

Munar M•L(ムナル M•L)

九州大学・歯学研究院・生体材料学分野・学術研究員

研究者番号:50432919

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし