

## 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3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791859

研究課題名（和文）リン酸カルシウム-アルギン酸-硫酸カルシウム複合化による新規骨再建材料の創製

研究課題名（英文）Calcium phosphate-alginate-calcium sulfate composite for bone regeneration

研究代表者

富士 岳志（FUJI TAKESHI）

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：20549323

研究成果の概要（和文）：硫酸カルシウム由来の  $\text{Ca}^{2+}$  を介したアルギン酸との架橋構造内に、高い骨形成能を有するリン酸カルシウム（ $\beta$ -TCP）を効率よく取り込む条件を設定した。さらに、作成された複合体は柔軟な賦形性を有しており、今後さらに材料学的評価、生体親和性のデータを加え、*in vivo* による研究も加えることで、将来的に骨欠損の大きさ、形状に左右されることがなく応用可能な生体内吸収性骨再建材料の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We established a method and conditions to prepare alginate/calcium sulfate composites contain calcium phosphate most efficiently. This composites keeps osteogenic ability from calcium phosphate and its form. The results suggest that this composites has potential to provide a better scaffold in bone defect regardless its size or shape.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：アルギン酸・リン酸カルシウム・硫酸カルシウム・骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯科や整形外科領域の再建・再生医療分野においては、骨移植術や骨再生誘導法に代表されるような、自己修復が不可能な骨欠損部位に、新生骨の再生を図ることが必要とされている。しかし、最も効果的とされる自家骨移植では外科的侵襲性が大きく骨採取量が制限され、一方、他家骨移植や骨再生誘導法では、免疫反応の問題、遺伝子レベルでの異種タンパクの影響が否定できないなどの課題は多い。そのためハイドロキシアパタイト

（HA）や、 $\beta$ 型第3リン酸カルシウム（ $\beta$ -TCP）に代表されるリン酸カルシウムを骨代用材として用い、骨再生を図る方法も以前より検討されており、一部では臨床応用されている。骨代用材料の最大の利点は、量的制限がないため、応用に際して、骨欠損部の大きさに左右されないことであるが、自家骨と比べ、必ずしも十分な骨再生能を有しておらず、粒子状での応用は骨欠損部への固定が難しいなどの問題も挙げられる。これまでも、他の高分子化合物との複合化により形態付与

が行われ、生体親和性に優れた骨再建材料の開発が行われてきた。

我々も、多糖類のアルギン酸に着目し、リン酸カルシウムとの複合化により形態を付与することで、その骨再建材料としての可能性を探索してきた。アルギン酸は、歯科の分野においては長く印象材として親しまれてきた材料であるが、最近、生体材料としての応用に広く注目されている材料であり<sup>1)</sup>、ドラッグデリバリーシステムなどで既に応用されている。我々が着目した最大の利点は、植物由来の材料であり、ゼラチンやコラーゲンなどの動物由来の材料において予想されるその免疫原性や未知の感染源などの危険性を完全に排除でき、生体親和性に優れている点が挙げられる。また、リン酸カルシウムとの複合化により、Ca<sup>2+</sup>を介した架橋構造が構築され、骨芽細胞などの細胞の侵入に必要な scaffold としての役割が期待される。これまで、塩化カルシウムをCa<sup>2+</sup>の供給源として、リン酸カルシウム(β-TCP)とアルギン酸の複合化による骨再生材料の開発が報告されている。

今回、申請者らは新たに、アルギン酸へのCa<sup>2+</sup>の供給源として硫酸カルシウムに着目した。硫酸カルシウムは歯科領域において、アルギン酸と練和されることで歯科用印象材として従来から使用され、生体親和性が認められている。また、単体としてもその骨伝導性が認められており、リン酸カルシウム(β-TCP)と併用することで、その骨形成能に相乗効果が得られることも報告されている<sup>2)</sup>。そこで三者を複合化することで、骨形成能を有し、三次元的な賦形性を有する骨再建材料の開発が期待できるのでは考えた。

## 2. 研究の目的

アルギン酸、リン酸カルシウム、硫酸カルシウムを複合化し、(1)Ca<sup>2+</sup>を介した三次元的架橋構造の構築と(2)リン酸カルシウムおよび硫酸カルシウムによる骨形成能の付与を図ることで、新しい生体内吸収性骨再建材料を開発することを目的とした。具体的には

- (1) 複合体内へリン酸カルシウムが効率的に析出し、かつ十分な形態付与性を獲得するための条件を設定すること。
- (2) 骨欠損部への埋入試験を行い、骨形成が最も効率的な条件について、in vivoでの評価を行い、将来的な臨床応用の可能性について検討すること。

以上、二点を大きな柱とし、最適な骨形成能および形態付与性を与える条件を設定することを目的とした。

迅速な骨再生は、患者の負担の軽減につながり、将来的には臨床応用され、再建・再生医療分野さらには創建医療分野における新

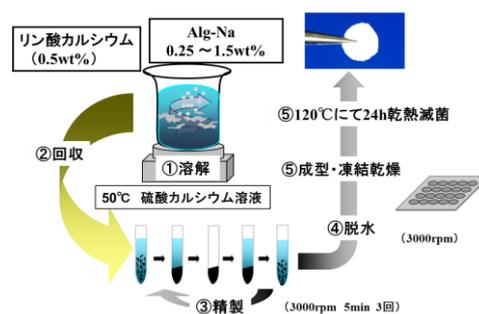
しい医療技術の開発にもつなげていくことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規複合体の作成

アルギン酸ナトリウムに対してCa<sup>2+</sup>が過飽和となる量の硫酸カルシウム粉末を蒸留水に溶解し、リン酸カルシウムとして、β型第3リン酸カルシウム(β-TCP)を0.5wt%加えた。さらに異なる量のアルギン酸ナトリウム粉末(0.25~1.5wt%)を0.25wt%刻みで加え練和することで、複合体ゲルを作製した。加える硫酸カルシウム粉末とアルギン酸ナトリウム粉末の量については、過飽和なCa<sup>2+</sup>の存在下では、β-TCPがHAへ転換し、十分な骨形成能の獲得(β-TCPの複合体内での存在)が困難であること、硫酸カルシウムとアルギン酸ナトリウムがそれぞれ2価、1価の塩基化合物であることなどを考慮し設定した。また、コントロールはCa<sup>2+</sup>の供給源を塩化カルシウムとし、硫酸カルシウムを含まない複合体とした。作成した複合体ゲルを専用の型枠に入れ予備凍結を行い、凍結乾燥により各々試験片を作成した(図1)。

図1: 試料の作成方法



### (2) 新規複合体の材料学的評価

フーリエ変換赤外分光分析法(FTIR法)およびX線回折法(XRD法)にて、β-TCPに特有のピークを観察することで、複合体中にβ-TCPが含有されていることを確認した。

### (3) 材料学的な最適条件の設定

加えるアルギン酸ナトリウム量について、条件を徐々に絞り、上記(1)を繰り返すことで、β-TCPが最も効率よく取り込まれるように、加えるβ-TCP粉末、硫酸カルシウム粉末、アルギン酸ナトリウム粉末、蒸留水の配合について最適な条件の設定を図った。

## 4. 研究成果

β-TCP、硫酸カルシウム、アルギン酸ナトリウムのフーリエ変換赤外分光分析法(FTIR法)およびX線回折法(XRD法)の解析結果を示す。FTIRにおいては、硫酸カルシウムがピークを有する波長域(554, 605, 1045, 1119, 1625, 3406, 3547 cm<sup>-1</sup>)は、β-TCPが特有のピークを有する波長域(547, 602, 940, 968、

1054、1081、1123 $\text{cm}^{-1}$ ) とほぼ同じであり、アルギン酸ナトリウムの波形はフラットであった(図2)。複合化により、波長が融合または重なるために $\beta$ -TCPに由来するピークの判別が困難であり、複合体に $\beta$ -TCPが含まれているかを確認することが困難であった。

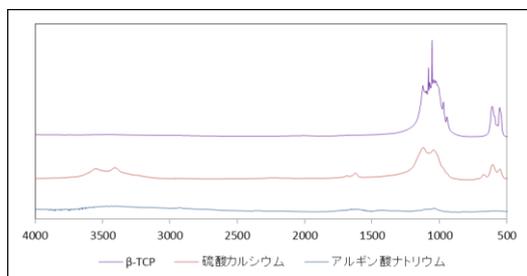


図2:各材料のFTIR分析

一方、XRDでは、 $\beta$ -TCPは $2\theta=11.8, 20.9, 23.5, 29.2, 31.3^\circ$ に、硫酸カルシウムは $2\theta=11.6, 20.9, 29.0, 31.3, 34.6^\circ$ にピークを有し、アルギン酸はフラットであった(図3)。 $\beta$ -TCPおよびアルギン酸ナトリウムは、FTIRと同様に本測定においても、ほぼ同じ入射角でピークを示したが、本測定で用いる試料の厚さ、測定器の解析条件等は全て揃っており、 $2\theta=11.8, 20.9, 23.5^\circ$ において $\beta$ -TCPが非常に大きなピークを示したことから、これをもとに実験を行った。

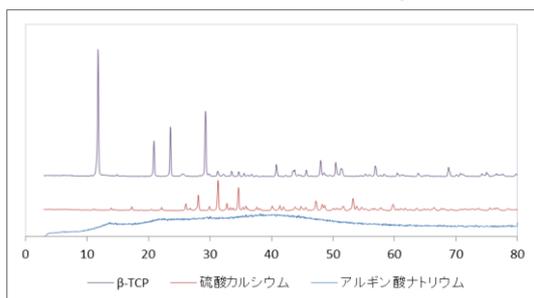


図3:各材料のXRD分析

まず、アルギン酸ナトリウム濃度を0.25、0.5、1.0、1.5wt%に調整した条件下で複合体を作成しXRD分析を行った。条件の設定にあたっては、上記方法に記載した点に加え、我々の過去のリン酸カルシウムとアルギン酸の複合体で得た結果を参考に行った<sup>3)</sup>。

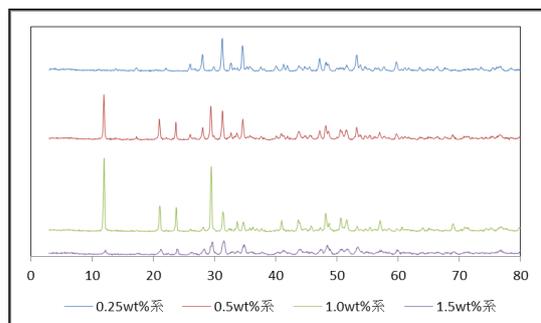


図4-1:各種アルギン酸濃度時の複合体のXRD分析

その結果、 $2\theta=11.8^\circ$  近辺のピークの変化より、アルギン酸濃度が0.5、1.0wt%近辺において、最も効率よく $\beta$ -TCPが取り込まれることが推察された(図4-1)。ここを起点に、条件を絞り、最も効率よく $\beta$ -TCPが取り込まれる条件設定を図った(図4-1, 2)。

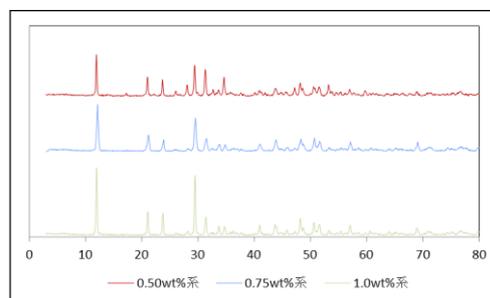


図4-2:各種アルギン酸濃度時の複合体のXRD分析

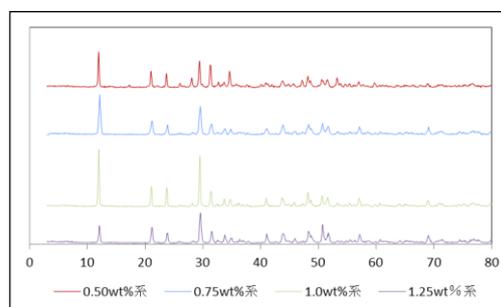


図4-3:各種アルギン酸濃度時の複合体のXRD分析

その結果、アルギン酸ナトリウム粉末1.0wt%の条件下で最も効率よく $\beta$ -TCPが取り込まれた。当初、過去の我々のリン酸カルシウムとアルギン酸の複合化に関する研究から、アルギン酸ナトリウム濃度が大きくなるに従い、取り込まれる $\beta$ -TCPの量は少なくなることが予想された。従って、最適化の条件には、作成した複合体に最低限の形態付与性を維持するだけアルギン酸量を加味することが必要と考えられた。しかしながら、今回設定したアルギン酸濃度においては、いずれの濃度においても埋入操作を実施するに十分な形態付与性を有しており、本条件が、本実験系では最も効率よく $\beta$ -TCPが取り込まれる条件と考えられる。このような結果の違いは、用いたリン酸カルシウムによるものと考えられ、今回用いた $\beta$ -TCPは比較的安定しているリン酸カルシウムであり、複合体に直接取り込まれていることが考えられる。一方我々は、アルギン酸濃度を変化させることで、架橋構造の気孔径や気孔率が変化することを報告している。あくまで推察の範囲にすぎないが、このことが $\beta$ -TCPの取り込み変化に繋がっているものと考えられ、もし正しければ $\beta$ -TCPが直接取り込まれその優れた骨形成能が維持されていることが期待できる(図5)。

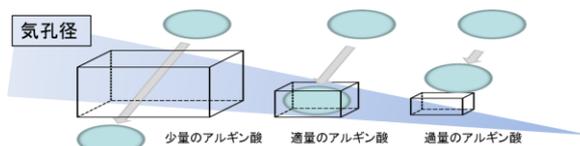


図5: B-TCPの架橋構造内への取り込み(イメージ)

我々はこれまで、複合体の精製過程における遠心分離の回転速度が、1)細胞の接着や増殖、リン酸カルシウム放出の為にScaffoldとして求められる気孔径や架橋形態、2)骨再生材料として求められる機械的強度、賦型性、形態保持性の双方の要件に影響を及ぼすことも報告している。このことを踏まえ、本条件下にて遠心分離の回転速度を変化させ、骨欠損部内での形態維持を可能とする条件を加える。また擬似体液中への浸漬実験により $\beta$ -TCP溶出濃度測定を行うことで複合体の $\beta$ -TCP放出能を評価し、より優れた骨再生能を有する材料の開発を進めていく。

一方で、高濃度のリン酸カルシウムは細胞毒性が指摘されており、骨芽細胞に対する細胞毒性を制御する濃度を探索し更なる改良を模索するために、細胞のアポトーシスのメカニズムについて基礎的な実験も行った。データについてはまだ解析中であるが、これらをさらに進めていくことで、より優れた骨形成能を有する骨再生材料の開発が期待できる。  
(参考)

- 1) Matsuno T, et al (2008) Preparation of injectable 3D-formed beta-tricalcium phosphate bead/alginate composite for bone tissue engineering. Dent Mater J 27(6):827-834
- 2) Podaropoulos L, et al (2009) Bone regeneration using beta-tricalcium phosphate in a calcium sulfate matrix. J Oral Implantol 35(1):28-36.
- 3) Fuji T, et al (2009) Octacalcium Phosphate-Precipitated Alginate Scaffold for Bone Regeneration. Tissue Engineering Part A. Volume 15, Number 11 P3525-P3535

#### 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  
富士 岳志 (FUJI TAKESHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：20549323

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：