

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390450

研究課題名(和文)骨芽細胞と破骨細胞の賦活化により新生骨との完全置換を促す骨代替材料の開発

研究課題名(英文)A study of bioactive materials used for filling bone defects

研究代表者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60374948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸オクタカルシウム(OCP)結晶を合成し、機械破砕によって微粒子を調整した後、天然高分子であるゼラチンに分散して多孔質のスポンジ成型体を作製した。破砕結晶はnano-submicroの範囲のサイズの粒子であった。OCP結晶含有複合体について生体活性を評価した。擬似体液浸漬で1週間までにハイドロキシアパタイトの形成が認められた。またラット頭蓋冠骨欠損へ埋入し8週間までに組織学的に骨組織の再生が認められた。材料は完全には吸収されなかったが、新生骨に置換する傾向にあった。本研究から材料の結晶性状が骨再生に影響を及ぼす可能性が示唆され、結晶の物理的パラメーターについて生体材料設計の指針が得られた。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate the effect of calcium phosphate crystal characteristics on the bioactivity of the bone substitute materials. The spongy composite consists of synthetic octacalcium phosphate (OCP) and natural polymers, such as gelatin, was prepared. OCP crystals, ground mechanically from micrometer to nano-submicro meter scale in size, were dispersed in gelatin matrix and molded. The composite was soaked in simulated body fluid for one week or implanted in rat calvaria critical-sized defect for 8 weeks and then analyzed. X-ray diffraction of the soaked materials showed that hydroxyapatite became detected with the time. Histological analysis of the decalcified specimens of the calvaria indicated that new bone was formed together with the partial biodegradation of the materials. The results suggest that the crystal characteristics may be a factor to affect the bioactivity of the composite.

研究分野：医歯薬学

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：生体材料学 リン酸カルシウム 天然高分子

1. 研究開始当初の背景

水溶液中のハイドロキシアパタイト (HA) 形成における前駆体のひとつであるリン酸オクタカルシウム (OCP) は顆粒状で皮質骨上に埋入されると骨伝導能を示すこと (Suzuki O et al., Tohoku J Exp Med 1991), また骨欠損内への埋入で生体内吸収性を示すこと (Kamakura S et al. J Electron Microsc 1997; Imaizumi H et al. Calcif Tissue Int 2006), また, コラーゲンやアルギン酸などの天然高分子と複合化することで形態付与性および骨再生能が向上することがわかっていた (Kamakura S et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006; Fiji T et al. Tissue Eng Part A 2009). 一方, OCP の結晶の物理的性質が骨再生材料としての特性にどのように影響を及ぼすかについては十分に明らかになっていなかった.

2. 研究の目的

本研究は, 異なる結晶性状を有する OCP を天然高分子のひとつであるゼラチンに分散させた複合体を作製して材料の生体活性および応答性を調べることを目的とした. ゼラチンはコラーゲンと同様に細胞親和性があることが知られ, また, 成型性があること, さらに, 研究代表者らの研究によって結晶の分散性において, 材料として比較的取り扱い易いことから基質として選択した (半田, 鈴木ほか, 第 54 回日本歯科理工学会学術講演会, 平成 22 年 4 月, 東京). 粒子のサイズを結晶性状のパラメータのひとつとし, μm サイズの合成結晶を機械破碎することで μm 以下のサイズとし, 破碎した結晶をゼラチンと混合して複合体を調整し, *in vitro* および *in vivo* における検討により, 複合体の骨再生材料としての生体活性を検討した.

3. 研究の方法

(1) 結晶の調整

OCP は先に確立した方法に基づきカルシウムおよびリン酸の過飽和溶液から湿式法によって合成した (Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 1991). 沈殿物から 100 ~ 300 μm の顆粒を調整し出発原料とした.

(2) 機械破碎粒子の調整とキャラクタリゼーション

OCP 顆粒を機械破碎装置 (ミル) によって破碎した. 得られた粒子の性質を調べるため, X 線回折 (XRD) による分析によって結晶相の同定を行った. また, 走査型電子顕微鏡 (SEM) にて破碎前後の結晶の形態を観察した. さらに, 動的散光法によって粒子サイズを測定した.

(3) 複合体の作製とキャラクタリゼーション

得られた破碎粒子をゼラチン溶液に混合・分散し, 容器内にて成型した上で凍結乾

燥し, その後, 熱架橋して複合体を得た. 複合体の性質について SEM を用いて反射電子像を撮影し, 結晶の分散状態を調べた.

(4) 生体活性の評価

無機イオン組成に関してヒト血漿と同等の濃度を持つ擬似体液 (Kokubo T et al. 1990) を作製し, 複合体を一定期間浸漬した後に回収し, 凍結乾燥した試料について, 結晶相の変化を XRD によって分析した.

(5) 複合体の骨再生能の検討

研究機関の承認を得て, 12 週齢 Wistar ラットの頭蓋冠に 9mm の臨界径骨欠損を作成し, 複合体を埋入する実験を行った. 一定期間経過後に, 複合体を含む組織を回収し, 組織固定後, 軟 X 線撮影を行った. 引き続いて, 脱灰し, パラフィン包埋薄切片を作製し, 組織学的に骨の再生および材料の残存を検索した.

4. 研究成果

機械破碎によって OCP 結晶の微粒子が得られ, 500nm 程度の粒子を含む nano-submicro の範囲のサイズであった. 微粒子を分散したゼラチンとの複合体は多孔質のスポンジ状であった XRD の分析では破碎によっても OCP 結晶相が維持されていることがわかった. SEM によると形態が板状から無定形の粒子に変化した. OCP 結晶 50wt% 含有複合体を作製し, SEM にて反射電子像を観察したところ, 結晶がゼラチン基質内に比較的均一に分散していることが確認された. この複合体の擬似体液への浸漬で 1 週間までに低結晶性の HA 様の XRD パターンが認められるようになり, HA 形成が生じていることがわかった. 次に, ラット頭蓋冠骨欠損へ 8 週間まで埋入し, X 線学的, 組織学的に検索した結果では, 骨欠損での不透過性の向上, また, 材料に対して骨組織の再生が確認された. 材料は完全には吸収されなかったが, 新生骨に置換する傾向が認められた. 本研究から OCP 結晶の微粒子化が骨再生に影響を及ぼす可能性が示唆され, 結晶性材料の物理的パラメータに関して生体材料設計の指針が得られた.

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 7 件)

Miura K, Anada T, Honda Y, Shiwaku Y, Kawai T, Echigo S, Takahashi T, Suzuki O. Characterization and bioactivity of nano-submicro octacalcium phosphate/gelatin composite. Appl Surf Sci 282: 138-145, 2013. 査読有.

dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.05.086

Suzuki O. Octacalcium phosphate

(OCP)-based bone substitute materials. Jpn Dent Sci Rev. 49: 58-71, 2013. 査読有 .
dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2013.01.001

Tanuma Y, Matsui K, Kawai T, Matsui A, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Comparison of bone regeneration between octacalcium phosphate (OCP)/collagen composite and β -tricalcium phosphate (β -TCP) in canine calvarial defect. Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol 115: 9-17, 2013. 査読有 .

doi: 10.1016/j.oore.2011.12.029.

Suzuki K, Honda Y, Anada T, Handa T, Miyatake N, Takahashi A, Hosaka M, Imaizumi H, Itoi E, Suzuki O. Stimulatory capacity of an octacalcium phosphate/gelatin composite on bone regeneration in rabbit tibia defect model. Phosphorus Res Bull 26 (Special Issue): 53-58, 2012. 査読有 .

dx.doi.org/10.3363/prb.26.53

Miura K, Matsui K, Kawai T, Kato Y, Matsui A, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. Octacalcium phosphate (OCP) collagen composites with titanium mesh facilitate alveolar augmentation in canine mandibular bone defects. Int J Oral Maxillofac Surg 41:1161-1169, 2012. 査読有 .

doi: 10.1016/j.ijom.2012.05.020

Miyazaki T, Miyauchi S, Anada T, Imaizumi H, Suzuki O. Evaluation of osteoclastic resorption activity using calcium phosphate coating combined with labeled polyanion. Anal Biochem 410: 7-12, 2011. 査読有 .

doi: 10.1016/j.ab.2010.11.014

Kawai T, Matsui K, Iibuchi S, Anada T, Honda Y, Sasaki K, Kamakura S, Suzuki O, Echigo S. Reconstruction of critical-sized bone defect in dog skull by octacalcium phosphate combined with collagen. Clin Implant Dent Relate Res 13:112-123, 2011. 査読有 .

doi:10.1111/j.1708-8208.2009.00192.x

〔学会発表〕(計 11 件)

鈴木 治, 穴田貴久. 合成リン酸オクタカルシウムの骨伝導能発現と結晶粒子特性. 日本機械学会 第 26 回バイオエンジニアリング講演会. 2014 年 1 月 11 日~1 月 12 日, 仙台 .

鈴木堅太郎, 穴田貴久, 半田拓人, 千葉晋平, 今泉秀樹, 宮武尚央, 保坂正美, 井樋栄二, 鈴木 治. ウサギ脛骨骨欠損へ埋入したリン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体の操作性と骨伝導能の検討. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013 年 10 月 17 日~10 月 18 日, 千葉 .

Suzuki O. Cell-activating

octacalcium phosphate-based scaffold materials. NIDCR-Tohoku University Dental Colloquium. May 10, 2013, Sendai.

江副祐史, 穴田貴久, 半田拓人, 高橋 哲, 鈴木 治. リン酸オクタカルシウム・ゼラチン複合体の加水分解における結晶相の変化. 第 61 回日本歯科理工学会学術講演会. 2013 年 4 月 13 日~4 月 14 日, 東京 .

Suzuki O. Octacalcium phosphate: from materials chemistry to biomaterial application. Forsyth Institute Research Seminar. April 10, 2013, Cambridge, MA USA.

神田直典, 穴田貴久, 小林司史, 高橋 哲, 鈴木 治. 多孔性ゼラチン担体の形態が骨再生に与える影響についての検討. 第 12 回日本再生医療学会総会. 2013 年 3 月 21 日~2013 年 3 月 23 日. 横浜 .

神田直典, 穴田貴久, 小林司史, 高橋 哲, 鈴木 治. ラット頭蓋骨骨欠損におけるゼラチン担体の生体親和性検討. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 . 2012 年 11 月 26 日~2012 年 11 月 27 日. 仙台 .

Kawai T, Anada T, Masuda T, Honda Y, Sakai Y, Kato Y, Echigo S, Suzuki O. Analysis of differentiation of rat mesenchymal stem cells treated in osteogenic medium with basic fibroblast growth factor. 9th World Biomaterials Congress. June 1 - June 5, 2012. Chengdu, China.

Matsui A, Matsui K, Handa T, Tanuma Y, Miura K, Kato Y, Kawai K, Suzuki O, Kamakura S, Echigo S. The architecture of regenerated bone by octacalcium phosphate and collagen composites (OCP/Col) in an alveolar bone defect model. June 1 - June 5, 2012. Chengdu, China.

三浦桂一郎, 穴田貴久, 本田義知, 鎌倉慎治, 越後成志, 鈴木 治. 骨再生材料ナノ OCP/ゼラチン複合体の合成と機能評価. 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会. 2011 年 11 月 22 日~11 月 23 日, 京都.

Miura K, Anada T, Honda Y, Echigo S, Suzuki O. Octacalcium phosphate (OCP) nano-particle dispersed gelatin composite as a bone substitute material. The 6th international workshop on nano-, bio- and amorphous materials. Aug 8, 2011, Miyagi-Zao (Togatta), Miyagi, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

鈴木 治, 穴田貴久. リン酸八カルシウム (OCP) を用いる次世代バイオマテリアルの開発. アンチ・エイジングシリーズ 3・骨研究最前線, エヌ・ティー・エス,

pp.325-333, 2013.

Shiwaku Y, Anada T, Honda Y, Morimoto S, Sasaki K, Suzuki O. Interface Oral Health Science 2011. Edits: Sasaki K, Suzuki O, Takahashi N. Synthesis of octacalcium phosphate with fluoride ions and protein adsorption onto the crystals. Springer, Tokyo, pp.237-239, 2012.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：骨再生材料

発明者：鈴木 治，穴田貴久，本田義知，三浦桂一郎，森元慎二

権利者：東北大学・ニプロ㈱

種類：特許

番号：特願 2011-2517894

出願年月日：23 年 11 月 17 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 治 (SUZUKI OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

(2)研究分担者

井樋 栄二 (ITOI EIJI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80193465

(3)研究分担者

鎌倉 慎治 (KAMAKURA SHINJI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：80224640

(4)研究分担者

穴田 貴久 (ANADA TAKAHISA)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30398466