

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23593006

研究課題名(和文)骨置換可能な多孔性炭酸含有アパタイトによる組織工学の確立

研究課題名(英文) Establishment of tissue engineering method for osteogenesis with absorbable porous carbonate apatite

研究代表者

笠井 唯克 (Kasai, Tadakatsu)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：30319123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体内での吸収に有利にはたらくと考え、非焼結で炭酸含有アパタイト(CA)多孔体ブロックの作製を試みた。作製した試料にX線回折、FT-IR検査、 μ CT検査を行い、気孔率約56%のCA多孔体であることを確認した。

作製した試料をscaffoldに用い、ラット骨髓細胞を2週間培養後、ラット背部皮下に移植した。埋入後2～4週間で骨形成を認め、作製した非焼結CA多孔体ブロックが骨形成の足場として有用性であることが示唆された。TRAP染色にて破骨細胞による試料の吸収を観察したところ、TRAP陽性反応は主に骨が形成された部位であった。骨形成から離れた部位では、埋入8週後の標本の一部で確認された。

研究成果の概要(英文)：In this study, our purpose was development of ideal biomaterial for bone substitution, and confirmation of that was replaced with bone.

Considering absorbability, we tried to make "non-sintered" porous carbonate apatite. The manufactured samples were examined by X-ray diffraction, FT-IR and micro focus CT, and confirmed those were containing several percent carbonate ion and approximately 56% porosity.

We cultured rat bone marrow cells with non-sintered porous carbonate apatite blocks as scaffold in CO₂ incubator for two weeks, and transplanted it in rat dorsal subcutaneous site. Bone formation was observed in 2 weeks or later. This suggests that the non-sintered porous carbonate apatite has ability as scaffold for bone formation. We observed absorption of the sample due to osteoclasts with TRAP staining. TRAP positive reaction was almost observed near by bone formation. However in a part of the specimen in 8 weeks, TRAP positive reaction was observed out of bone formation site.

研究分野：口腔外科学

キーワード：生体材料 再生医学 細胞・組織 炭酸含有アパタイト

1. 研究開始当初の背景

歯科並びに医科分野における代用骨の必要性は極めて高く、自家骨もしくは他家骨が生体に最も適したものにもかかわらず、その供給量が皆無に等しく、金属及びリン酸カルシウム系等のセラミックスから或る人工骨を代用骨として使わざるをえないのが現状である。とくに、水酸化アパタイトの焼結体からなる人工代用骨は、生体親和性に優れ、種々の形状(緻密体、多孔体、顆粒状)のものが臨床応用されているが、焼結体としてのアパタイトは化学量論比に近い組成のもので、骨アパタイトと比較すると結晶性が異質な程良好で、埋植後細胞が関与する吸収はほとんど受けず、術後、半永久的に組織に残存することが知られている。この性質は焼結水酸化アパタイトを人工歯根として応用する際には極めて優れたものとなるが、材料が吸収されそれにともない新生骨が生成する目的で用いられる骨補填材/組織培養担体としての用途の場合には短所となる。一方、リン酸三カルシウム(-TCP)は生体内で吸収され、吸収性の点では水酸化アパタイト焼結体に優り、骨補填材としては -TCP の方が良いとする報告も多い。しかしながら、-TCP は組織に対しては異質な材料で、組織液中でも溶解及び崩壊し、さらに異物巨細胞により貪食され、炎症性細胞の浸潤も極めて顕著で生体親和性の点では水酸化アパタイト焼結体に劣るとする報告が多い。生体骨は周知の如く改造現象を繰り返しながら新生され、生体機能に合致した代謝機能を有していることを考えると、従来までの水酸化アパタイトおよび -TCP を基材とした人工代用骨/組織培養担体は、他の材料に比較して生体親和性に優れているものの代謝機能はなく、真の意味での代用骨/培養骨となっていないのが現状である。

我々はこれまでに、従来までの水酸化アパタイトに代わる炭酸含有アパタイトを新た

な焼結原材料とし、本焼結体が極めて有効な骨補填材となり得ることを示唆してきた¹⁾。例えば、炭酸含有アパタイト焼結体(6wt%の炭酸イオンを焼結アパタイト格子中に含有)の弱酸中での溶解挙動は、比較として用いた脱有機骨と本質的に同じであり、両者とも -TCP と同程度の溶解性を示し、従来までの水酸化アパタイト焼結体に比較して極めて溶解し易いことを明らかにしてきた。物理化学的溶解性の点では -TCP に匹敵し、生体親和性の点では水酸化アパタイトに匹敵することを明らかにしてきた。さらに、骨髓細胞由来骨芽細胞培養系でも本焼結体が水酸化アパタイトおよび -TCP に何ら遜色ないことも確認し、本焼結多孔体及び顆粒を用いて骨髓細胞の三次元培養を遂行し、骨芽細胞への分化・増殖を促せば炭酸含有アパタイト・骨芽細胞ハイブリッド体の創生も可能となり、新たな骨誘導性骨補填材、すなわち自家骨様培養骨となり得る。このように、代謝機能を有し、生体親和性に優れた炭酸含有アパタイト・骨芽細胞ハイブリッド体を開発することは、組織工学的骨再建法を可能とし、生体組織内の破骨細胞が関与する吸収を可能とし、他家骨にも劣らない人工代用骨/培養骨の作製を実現可能とするものと思われる。

2. 研究の目的

本研究では、骨置換が可能な生体材料の開発と確認を目的とする。動物実験では、開発した多孔体ブロックが、宿主の骨組織とは離れた部位で培養した骨髓細胞が骨形成をする足場となり得るか否かと、開発した多孔体ブロックが吸収されるか否かを検証する。

3. 研究の方法

材料および方法

3-1) 多孔体の作製

非焼結炭酸含有アパタイト多孔体(CA)の作

製

炭酸含有アパタイトの前駆物質として第二リン酸カルシウム二水塩 (DCPD) を用い、粒子サイズ 500~800 μm 径の顆粒糖 (グラニュー糖、(有) 服部商会) を重量比 3 : 7 で混合し、その後、金型を用い 15kg / cm^3 で一次加圧を行い、8mm 高さ 5.5~5.6mm に成型した。二次加圧は静水圧装置 (200M Pa) を用い、DCPD / グラニュー糖の圧粉体を得た。糖の溶出と DCPD の CA への転移を同時に進めるため、浸漬溶液として 60 の 1 M 炭酸水素ナトリウム溶液を用いた。DCPD / グラニュー糖の圧粉体を 60 の 1 M 炭酸水素ナトリウム溶液に 24 時間浸漬し、多孔体を取り出し蒸留水で洗浄後、凍結乾燥し、多孔体ブロックとした。

3-2) 非焼結炭酸含有アパタイト多孔体の検査

(i) μCT 観察

作製した多孔体ブロックの形状を μCT 装置 (Scanmate RB090SS150, Comscan, 東京, 90kV, 89 μA , 8W) にて撮影後、三次元画像解析ソフト (3D BON, RATOC, 東京) にて画像を構築し観察を行った。

(ii) X線回折

X線回折の測定は多孔体を乳鉢、乳棒にて粉碎、粉末とし、X線回折パターンを測定 (RINT2500V, 56kV, 200mA) し同定を行った。

(iii) 赤外線吸収スペクトル (FT-IR) 分析

試料 1 mg に 400mg の臭化カリウムを加え均一混合後、ペレットを作製し、赤外線吸収スペクトル分析装置 FT-IR4200 (島津, 京都) を用いて分析した。線形吸収モードを用い、4000 cm^{-1} ~500 cm^{-1} の波形範囲のスペクトルを観測した。

3-3) 実験動物

本実験には Fischer 系 7 週齢雄性ラットを用いた。ラットはラット用固形飼料 (オリエンタル酵母 MS) と水を十分に与え、一定の環

境下でケージ内にて飼育した。本実験は朝日大学動物実験管理規定に基づき施行した (承認番号 11-24)。

3-4) 骨髓細胞の採取

Fischer 系 7 週齢雄性ラットの大腿骨から骨髓細胞を採取するために、ラットに吸入麻酔をかけ、大腿骨を摘出した。次に、大腿骨の両骨端を切除し、15% FBS (Sigma), 100IU/ml ペニシリン G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ファンギソン, 10mM β -グリセロリン酸ナトリウム (キシダ科学株式会社, 大阪), 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸 (キシダ科学株式会社), 10^{-8}M デキサメタゾン (Sigma) を添加した MEM (Sigma, St. Louis U.S.A) 細胞培養液を 24G の注射針付きのシリンジで大腿骨断端の一方より骨髓腔へ注入し、骨髓液を洗い流すようにして骨髓細胞を採取し、骨髓細胞懸濁液を得た。

3-5) 骨髓細胞と多孔性 CA ブロックの複合体作製

多孔性 CA ブロックが骨髓細胞の増殖の scaffold となるように、下記の方法にて、細胞と多孔性 CAP ブロックを複合させ、複合体を作製した。6 穴のマルチウェルプレートの 1 ウェルに 2 個の CA 多孔体ブロックつきを置き、10ml の骨髓細胞懸濁液を試料に滴下してウェルを細胞懸濁液で満たした。

3-6) 骨髓細胞・多孔性 CA ブロック複合体の培養

CO_2 インキュベーター内で 14 日間培養した。培養条件は温度 37.0 とし CO_2 を 5% に保ち、培養液の交換は 3 日に一度行った。

3-7) 培養した骨髓細胞・多孔性 CA ブロック複合体の実験動物への埋入

埋入の宿主となる実験動物には、骨髓細胞の採取を行った動物と同系の Fischer 系 7 週齢雄性ラットを用いた。実験試料の埋入は以下のように行った。ラット (体重 140-150g) に、ペントバルビタールナトリウム (ネンブタール®, Abott 社: 体重 100g あたり 0.05ml

使用)を腹腔内投与して麻酔した。ラット背部に浸潤麻酔(1%キシロカイン®1.0ml, 1/10万エピネフリン含有)を行い,メスにて背部皮膚に切開を加え,皮下の疎性結合組織を鈍的に剥離し,背部の筋層の上部で皮下の結合組織下の間隙部分で切開部より1センチ以上離れた部位2ヵ所に,培養した骨髓細胞・CAブロック複合体を埋入し,皮膚を絹糸にて縫合した。

3-8) 埋入試料の摘出とμCT観察

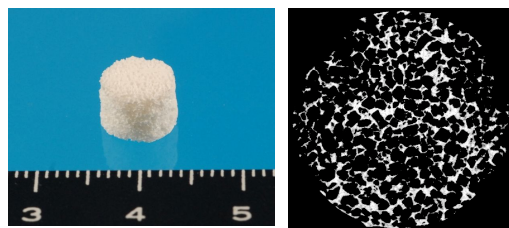
ラットの皮下に試料埋入後,1,2,4,8週間後にラットを吸入ガス麻酔下で脱血屠殺して,試料を摘出した。摘出した試料は10%ホルマリン液を用いて固定後,まず,μCT装置にて撮影後,三次元画像解析ソフトにて画像を構築し観察,計測を行った。

3-9) 組織学的,組織化学的観察

摘出した試料を10%EDTAで約1週間,中性脱灰した。脱灰終了後,通法にしたがってパラフィン包埋し,約4μmの連続切片を作成した。各摘出時期の連続切片の1枚ずつにHE染色を施し,骨髓細胞によりCA表面に形成された骨の有無とその様相を観察した。連続切片標本を用いて,酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)染色と一次抗体に抗dentin matrix protein1(DMP)抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

4. 研究成果

4-1) 作製した多孔体



外観

μCT(水平断)

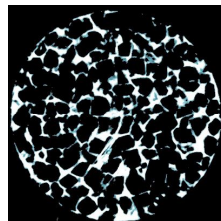
計画通り,多孔質の形態を持つ円柱形のブロックが作製され,μCT検査の結果,気孔率が約56%であることが確認された。

4-2) X線回折,FT-IR分析の結果

X線回折により32°/2θ近傍に低結晶性のアパタイトに典型的にブロードなピークを認め,FT-IR分析により1400~1600cm⁻¹に炭酸基による2つの吸収ピークが認められ,生成したアパタイトが炭酸含有アパタイトであることが確認された。

4-3) 埋入摘出後のμCT検査結果

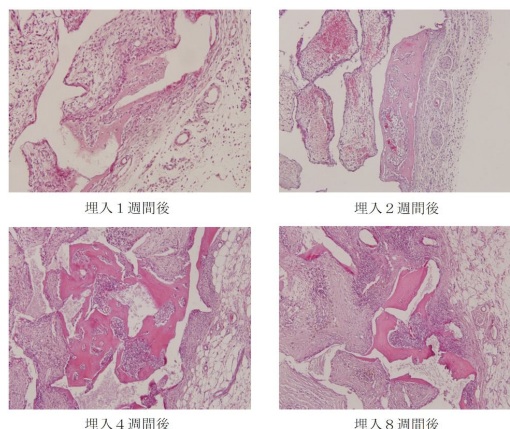
骨形成および多孔体ブロックの吸収を評価することを目的に,埋入1,2,4,8週間後にμCT撮影を行い,三次元画像解析にて骨塩量(BMD)を計測したが,数値に明らかな変動は無かった。しかし,μCT画像上,経時的に気孔の鋭縁が丸みを帯びる傾向が観察された。



埋入4週間後の摘出した試料のμCT像

4-4) 埋入摘出後の組織学的観察結果

埋入1週間後で,CA多孔体ブロックのCAに接して幼弱な骨様組織のが認められ,2週間後で,明らかな骨組織となった。4週間後ではCA多孔体ブロックの気孔であった空間を占めるように骨様組織が一部形成され,層板構造が見られる成熟した骨であることがうかがわれた。8週間後では,骨様組織の形成範囲が減少傾向にあった。



埋入1週間後

埋入2週間後

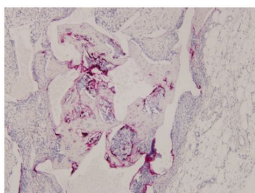
埋入4週間後

埋入8週間後

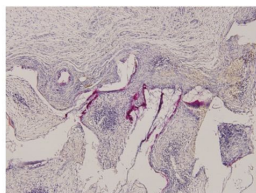
4-5) TRAP染色の所見

酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)

は破骨細胞のマーカー酵素であり、本実験では埋入2週間後で発現し、4週間後、8週間後でも認められた。2週間後、4週間後では形成された骨様組織に関連して観察された。8週間後では骨様組織とは離れた部位でもTRAP陽性の反応を認めた。



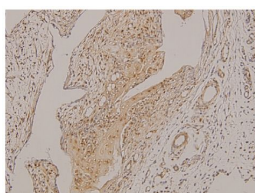
埋入4週間後



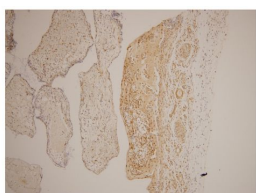
埋入8週間後

4-6) 免疫組織化学染色の結果

抗DMP抗体を骨細胞のマーカーとして免疫組織化学染色を行ったところ、HE染色で骨様組織と考えた組織の封入された細胞にDMP染色陽性反応が見られ、骨細胞であることが確認された。



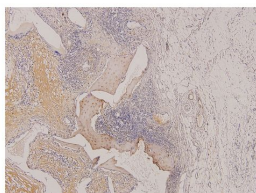
埋入1週間後



埋入2週間後



埋入4週間後



埋入8週間後

まとめ

生体に応用した際に吸収に有利にはたらくと考え、炭酸含有アパタイト多孔体ブロックを非焼結での作製を試みた。作製した試料をX線回折、FT-IR検査にて炭酸含有アパタイトであることを確認し、 μ CT検査で気孔率約56%の多孔体であることが確認できた。

作製した試料をscaffoldに用い、ラット骨髓細胞を2週間培養し、骨組織とは無縁なラット背部皮下に移植し、埋入後2~4週間で骨が形成されることが確認された。TRAP染色にて破骨細胞による試料の吸収を観察したが、TRAP陽性反応は主に骨が形成された範

囲であった。形成された骨から離れた部位では、埋入8週後の標本で一部確認された。

引用文献

1) Kasai Tadakatsu, Sato Kimihiko, Kanematsu Yoshinori, Shikimori Michio, Kanematsu Nobutake, Doi Yutaka. Bone Tissue Engineering Using Porous Carbonate Apatite and Bone Marrow Cells. Journal of Craniofacial Surgery. 21(2): 473-478. 2010.

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

渡邊一弘、笠井唯克、土井 豊、式守道夫：多孔性非焼結炭酸含有アパタイトによる骨補填材の開発と物性の検討。第58回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会(福岡市)。平成25年10月11-13日

笠井唯克、渡邊一弘、土井 豊、式守道夫：多孔性非焼結炭酸含有アパタイトの作製と骨形成。平成26年度(社)日本歯科理工学会中部地方会夏期セミナー(岐阜市)。平成26年8月23日

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠井 唯克 (KASAI, Tadakatsu)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号： 30319123

(2)研究分担者

土井 豊 (DOI, Yutaka)
朝日大学・歯学部・名誉教授
研究者番号： 40116067

式守 道夫 (SHIKIMORI Michio)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号： 70154193