

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25年 5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890156

研究課題名（和文） 強化型炭酸アパタイト骨置換材の細胞応答性と生体吸収性

研究課題名（英文） Cellular responsibility and bioresorbability of reinforced carbonate apatite

研究代表者

松元 歌奈子 (MATSUMOTO KANAKO)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10614315

研究成果の概要（和文）：

骨欠損回復の最善策は現時点では自家骨移植だが、健全部位への侵襲、骨量の限界等の問題点がある。骨の無機主成分の炭酸アパタイト(CO₃Ap)は生体に調和し代謝により骨に置換されるため臨床応用が期待されるが強度面に改善の余地がある。これまでにカルシウム塩導入法による強化型CO₃Apの作製に成功したため、本研究では強化型CO₃Apの生体親和性・生体吸収性の調査を行った。結果、従来型に比べ吸収遅延は認められたものの、生体親和性・生体吸収性を併せ持つことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Despite the fact that autograft or bone taken from the same patient is still the golden standard for the reconstruction of bone defects, it also shares serious shortcomings. These include invasion to healthy site to gather the healthy bone, limitation of morphology and the amount of collectable bone. To overcome these drawbacks, artificial bone substitutes are used. Among these, carbonate apatite (CO₃Ap) is ideal since the biological apatite of bone is CO₃Ap and can be replaced to natural bone completely through the process of bone remodeling cycle. Although, the mechanical property of CO₃Ap is not sufficient enough, we have successfully improved its mechanical property by calcium salt introduction method. The biocompatibility and bioresorbability of reinforced CO₃Ap was investigated in this study. The result showed that reinforced CO₃Ap showed biocompatibility and bioresorbability even though its resorption is lesser than unreinforced CO₃Ap.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

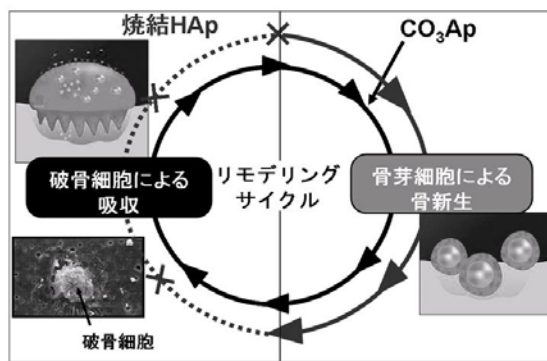
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料、炭酸アパタイト、破骨細胞性吸収、骨置換、強化

1. 研究開始当初の背景

疾患等による骨欠損を回復するための最善の方法は現時点では自家骨移植だが、健全部位への侵襲、採取可能な骨量の限界、骨採取部位への感染リスク、治療コスト等、様々な問題を抱えているのが現状である。そのため種々の人工材料が硬組織代替材料として研究されており、なかでもハイドロキシアパタイト (HAp) についてはこれまで多くの基礎・応用研究がなされてきた。HAp は優れた生体親和性と骨伝導性を示すが、リモデリングサイクルによって骨に置換されることはなく、移植後、生体内に残存する。一方、生体骨の無機主成分である炭酸アパタイト (CO_3Ap) は生体親和性と骨伝導性を示すだけでなく、破骨細胞による吸収を受けてリモデリングに調和し、骨に置換される。



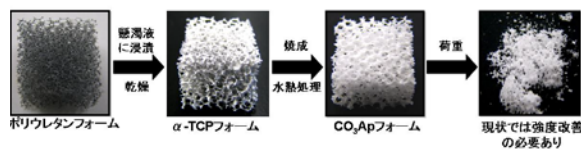
【 CO_3Ap 骨置換材のリモデリング】

焼結法によって調整可能な HAp とは異なり、 CO_3Ap は熱的に不安定で加熱により炭酸基が脱離してしまうため、 CO_3Ap 骨補填材の焼結による作製は原理的に不可能である。そこで前駆体の溶解析出反応による CO_3Ap の調製法が考案された。代表的な方法は以下の通りである。

- (1) 水酸化カルシウム圧粉体を炭酸化して作製した炭酸カルシウムを前駆体としてリン酸含有水溶液に浸漬すると CO_3Ap ブロックを調製することが可能。
- (2) ポリウレタンフォームをテンプレートとして用いて作製した α -リン酸三カルシウムフォームを前駆体とし、リン酸塩と炭酸塩を含む水溶液で水熱処理を行うと、海綿骨形態を模倣した三次元連通気孔構造を有する CO_3Ap フォームを作製することが可能。

CO_3Ap フォームは連通気孔構造のため、細胞や組織侵入が容易になり迅速な骨置換が期待できる一方で、気孔率が著しく高いため機械的強さに問題が残る。 CO_3Ap ブロックの場合、荷重負荷のない骨欠損部への充填には問題がないが、荷重負荷部への適応拡大には機械的強さの向上が求められるのが現状である。

【 CO_3Ap フォームの作製過程および荷重時の試料の様子】



そこで研究代表者は CO_3Ap フォームへの応用を視野に入れ、後期博士課程期間中に CO_3Ap ブロック内の開口気孔に CO_3Ap を析出させることによる機械的強さの向上の可能性について検討し、減圧を利用したカルシウム塩導入法を確立した。この方法によって溶解析出法で得られた CO_3Ap ブロックに存在するマイクロ気孔中に新しく CO_3Ap を析出・充填させることが可能となり、密度を高め機械的強さを

約 1.5 倍まで向上させることに成功した。

カルシウム塩導入法により強度改善がなされた強化型 CO₃Ap ブロックの化学組成は従来型 CO₃Ap ブロックと変わらないため、強化型 CO₃Ap ブロックの骨置換性についても良好な結果が得られると予想されるが、これまでに破骨細胞性吸収を示すセラミック材料の気孔率およびマイクロサイズの気孔が減少すると、破骨細胞性吸収の遅延が起こることが報告されているため、CO₃Ap の細胞応答性および生体吸収性に本法が及ぼす影響について調べる必要がある

2. 研究の目的

骨リモデリングと調和する人工骨置換材としての応用が期待される CO₃Ap の臨床適応範囲拡大を念頭に、溶解析出法で得られた CO₃Ap 成形体に存在するマイクロ気孔中に新しく CO₃Ap を析出・充填して密度を高めることにより、生体親和性・骨伝導性・骨置換性を損なわずに CO₃Ap 成形体の高強度化を図る。

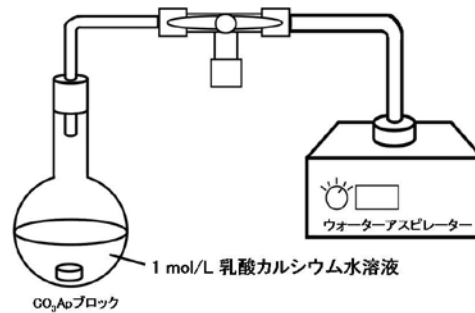
3. 研究の方法

新たに開発したカルシウム塩導入法によって CO₃Ap 成形体に存在するマイクロ気孔中に新しく CO₃Ap を析出・充填し、機械的強さを向上させた強化型 CO₃Ap ブロックの生体材料としての有用性を検討するため、細胞実験と動物実験を行う。

(1)カルシウム塩導入法を利用した強化型 CO₃Ap ブロックの作製

従来法を基に作成した CO₃Ap ブロックを 60℃の 1mol/L 乳酸カルシウム水溶液に浸漬し、ウォーターアスピレーターを用いた減圧と大気圧にさらすことで CO₃Ap ブロック内の気孔内部に溶液を導入。その後、従来法と同様に炭酸化・リン酸化を行って資料に存在するマイクロ気孔の中に新しく CO₃Ap を析出・充填することで、強化型 CO₃Ap ブロックを作製

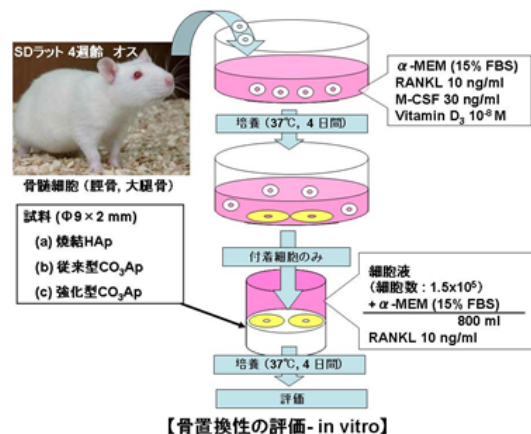
する。以上のようにして得られた試料に 160℃、3 時間の乾熱滅菌を行う。



【CO₃Apブロックへの乳酸カルシウム導入法】

(2)破骨細胞を用いた骨置換性に関する検討

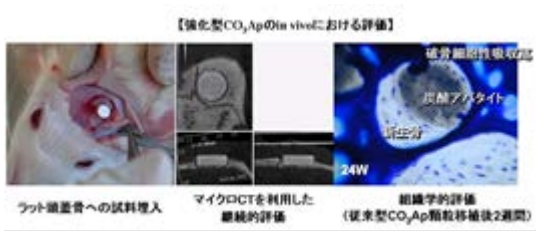
カルシウム塩導入法により強度改善がなされた強化型 CO₃Ap ブロックの骨置換性について調べるため、対照試料として焼結 HAp ブロックと従来型 CO₃Ap ブロック、目的試料として強化型 CO₃Ap ブロックを用いて細胞実験を行う。4 週齢オスの SD ラットの脛骨および大腿骨骨髓細胞から分化させた破骨細胞を各試料上で 4 日間培養し、TRAP 染色および SEM による観察を行って破骨細胞の同定・接着・伸展および破骨細胞性吸収窩の評価と吸収窩面積の測定を行う。



【骨置換性の評価- in vitro】

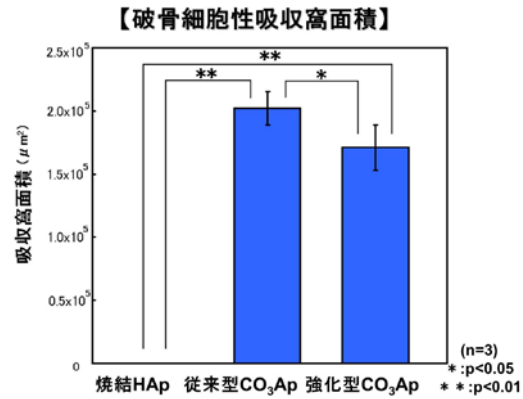
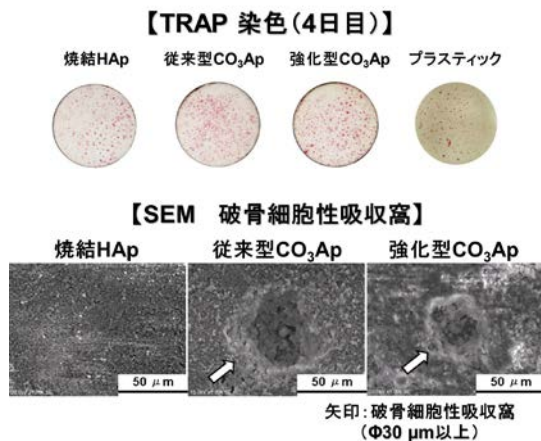
(3) *in vivo* における強化型 CO₃Ap の生体親和性・骨伝導性・生体吸収性に関する検討
カルシウム塩導入法により強度改善がなされた強化型 CO₃Ap ブロックの生体親和性・骨伝導性・生体吸収性について調べるため、対

照試料として焼結 HAp ブロックと従来型 CO₃Ap ブロック、目的試料として強化型 CO₃Ap ブロックを用いて動物実験を行う。10 週齢オス SD ラットの頭蓋骨に試料を移植し、*in vivo* での評価をマイクロ CT による継続的な画像評価と、組織標本でアパタイトが維持されるように非脱灰凍結切片の作製を行うため、特殊なフィルムとタングステンプレートを用いる川本法を採用した組織学的評価を行う。



4. 研究成果

強化型炭酸 CO₃Ap ブロックの生体親和性・生体吸収性の調査のために破骨細胞を用いた細胞実験を行ったところ、試料への破骨細胞の接着・伸展、破骨細胞吸収窩を認め、従来型 CO₃Ap ブロックに比べて強化型 CO₃Ap ブロックでは破骨細胞性吸収の遅延が起こる傾向が統計学的有意差はなかったものの認められた。細胞実験の結果から、動物実験における強化型 CO₃Ap の破骨細胞性吸収には従来型 CO₃Ap より長い時間がかかる可能性が高いことが予測された。



細胞実験の後、10 週齢オス SD ラットの頭蓋骨への試料埋入を開始した。埋入後 8 週までは麻酔下でのマイクロ CT での撮影が可能だったため継続的な画像評価を行ったが、ラットの成長に伴いマイクロ CT での撮影が困難となり、埋入後 5、35、70 週での組織学的評価を行うこととした。組織標本でアパタイトが維持されるように非脱灰凍結切片の作製を行うため、特殊なフィルムとタングステンプレートを用いる川本法を採用し、HE 染色とトルイジンブルー染色により評価を行った。すべての試料に骨伝導性を認めた一方、生体吸収性を持たない HAp では吸収が起こらず密度変化がなかったが、従来型・強化型 CO₃Ap では埋入後の期間が長くなるほど試料の辺縁からの吸収と密度低下が認められた。また、従来型・強化型 CO₃Ap では一部で破骨細胞とハウシッパ窩と思われる像も認められた。現在はこれらの結果を基に、学会発表及び論文の執筆を準備している段階である。

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 1 件)
 発表者(代表)名: 松元歌奈子
 発表表題: カルシウム塩導入による炭酸アパタイト骨置換材の機械的強さ向
 学会等名: 第 8 回九州矯正歯科学会学術大会
 発表年月日: 2013 年 2 月 2 日～2 月 3 日
 発表場所: 九州歯科大学(北九州市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松元 歌奈子 (MATSUMOTO KANAKO)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：10614315

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：