

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792054

研究課題名(和文)アルギン酸 硫酸Ca三次元架橋構造をベースとするリン酸Ca徐放型骨再生材料の創製

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・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20549323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、硫酸カルシウム由来のCa²⁺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(β-TCP)を効率よく取り込むための最適な作成条件を設定し、より高い効率性と再現性を得るための手技的検討を行った。その結果作成された柔軟な賦形性を有する複合体について、材料学的評価、生体親和性、細胞接着性等のデータを加え、将来的に骨欠損の大きさ、形状に左右されることなく応用可能な生体内吸収性骨再生材料の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：We past established a method and conditions to prepare alginate/ calcium sulfate composites contain calcium phosphate most efficiently. But this method is poorly-reproducible, so we looked at the effect of the experimental technique. Then we can make the same composites constantly with 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.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：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 骨芽細胞

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、外傷あるいは先天性疾患に起因する自己修復が不可能骨欠損部位に対して、骨移植術や骨再生誘導法に代表されるような、新生骨の再生方法が図られている。しかし、現在最も効果的とされる自家骨移植では、患者本人に対する外科的侵襲性が大きく、骨採取量が制限され、一方、同じ骨移植であっても他家骨移植では、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、Ⅱ型第3リン酸カルシウム(β-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、in vitro、in vivoにおいて高い生体親和性、生体分解性を持つことが報告されている。しかしながら、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いない。また、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、そのため、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生材料の開発が行われ、近年では、これらの成果が一部では臨床応用されている。

我々もこれまで、リン酸カルシウムを用いた骨代用材料の開発を目指し、形態付与性を与える高分子化合物として、多糖類のアルギン酸に着目し、そ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。現在、リン酸カルシウムとの複合化の候補としては、ゼラチンやコラーゲンなどが挙げられ応用もされているが、動物由来の材料であるため、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ない。我々が着目した最大の利点は、アルギン酸は植物由来の材料であるため、それらの問題をクリアし、生体親和性に優れている点が挙げられる。最近では、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¹⁾、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。

組織再生において、細胞、成長因子、スキャフォールドの3要素が特に重要であることが知られている。リン酸カルシウムとの複合化により、Ca²⁺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Ca²⁺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Ca²⁺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、あるいは骨補填材料の接着材料と

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²⁾。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生材料の開発が期待できるのではと考えた。

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)Ca²⁺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生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、かつ、安定供給が得られる条件の設定を行うこと。(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、二点を大きな目的とした。

迅速な骨再生を可能とする生体材料を開発し、将来的な再建・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つなげていくことは、臨床の現場において患者の負担の軽減や、機能的・審美的な回復による患者のQOLの向上にもつながるものと期待できる。

3. 研究の方法

(1)新規複合体の作成

過飽和なCa²⁺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、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条件設定を行った³⁾。すなわち、アルギン酸ナトリウムに対してCa²⁺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、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。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)。

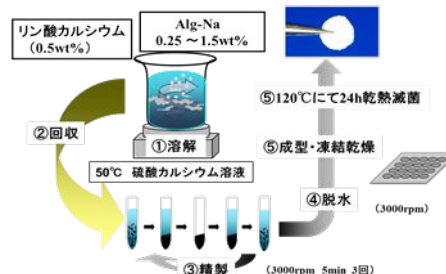


図1: 試料の作成方法

(2)複合体の材料学的評価と最適条件の設定
 これまでの研究により、フーリエ変換赤外分光分析法 (FTIR 法) では、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^{-1}) は、 β -TCP が特有のピークを有する波長域 (547、602、940、968、1054、1081、1123 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。そのため、複合体において、 β -TCP に由来するピークかの判別が困難である。

一方、X線回折法 (XRD 法) では、 β -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)。本測定で用いる試料の厚さ、測定器の解析条件等は全て一致しており、本研究では、 β -TCP に特有のピーク ($2\theta = 11.8、20.9、23.5^\circ$) 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 (図 2)。

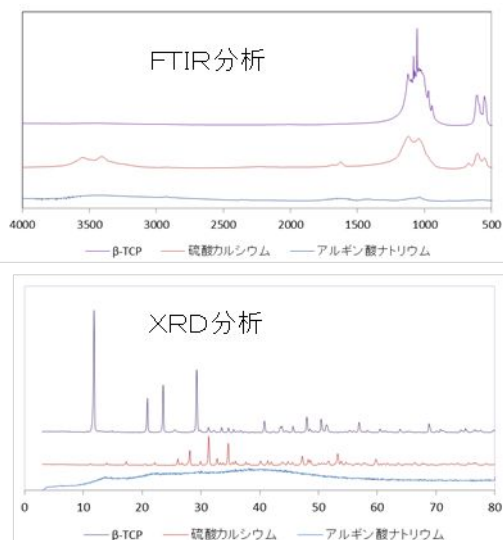


図2: 各材料のFTIRおよびXRD分析

(3)複合体作成の再現性の検証

これまでの研究により、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 β -TCP が取り込まれる可能性を報告しており、この条件を起点とした。しかしながら、再現性に乏しく、改めて条件設定の見直しが必要となった。アルギン酸ナトリウム溶解時にゲル状の核が初期形成されると、 β -TCP の取り込みの効率が悪くなることが考えられたため、具体的には、1) 湿度、2) アルギン酸溶解速度 (回転速度) の再設定を行った。

(4)複合体の生体親和性と細胞接着性の検討

骨芽細胞様細胞 (マウス骨髄由来細胞: ST-2) を用い、複合体上で細胞培養試験を行い、複合体の生体親和性、細胞接着性を評価する。また、複合体作成の条件を変え、細胞の分化、細胞接着性が最も認められる条件について検討を行った (図 3)。

<細胞接着・増殖性>

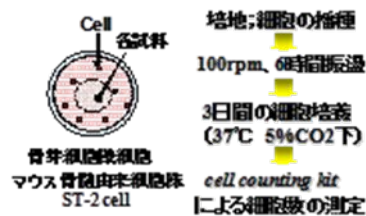


図3: 細胞試験

(5)複合体の骨形成能の評価

RT-PCR 法にて、骨基質由来タンパク質の mRNA 発現を指標とし骨形成能を評価した。

(6)生体環境下を想定した骨再生能の検討

スキャホールド内部へ進展した細胞は培養液や酸素の不足により壊死することが報告されている。そこで本研究では、還流させる培養液内の酸素濃度を制御すると共に、培養液が確実にスキャホールド内部を通過するバイオリアクターを用い、3 次元的細胞培養の検討を行った (図 4)。

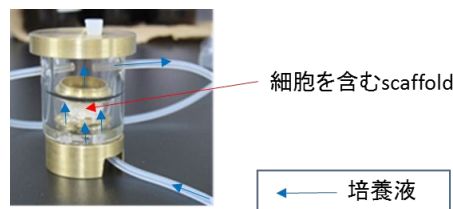


図4: バイオリアクター

4. 研究成果

反応液に加えるアルギン酸量 (wt%/min) による違いの結果を示す (図 5)。

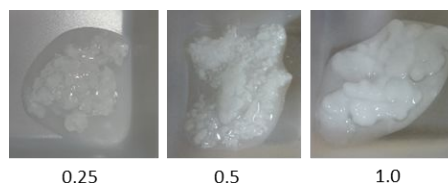


図5: 加えるアルギン酸量 (wt%/min) による違い

単位時間当たり加えるアルギン酸量の増加に伴って、不均一な白濁の反応物を含むゲルが生成され、また、XRD 分析により、 β -TCP のピークの減少が認められた。これは、アルギン酸ナトリウム溶解時に、多量のアルギン酸が溶解すると、ゲル状の核 (アルギン酸カルシウム) が初期形成されるため、 β -TCP の取り込み阻害が起こることが考えられる。すなわち、アルギン酸を一定量少量ずつ加えることが、核化を防ぎ、 β -TCP の取り込みの効率をよくすることが考えられ、今後さらに、単位時間当たり加えるアルギン酸量を小さく設定することで、取り込み効率の向上が期待できる。しかしながら、我々のこれまでの研究で、 β -TCP の取り込み効率はアルギン酸の濃度依存しないことがわかっている。これは β -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るためと考えられるが(図6)、単位時間当たり加えるアルギン酸量の違いが、 β -TCPを直接取り込むのに最適な架橋構造、気孔率、気孔径の形成に繋がっている可能性があり、今後検討が必要である。

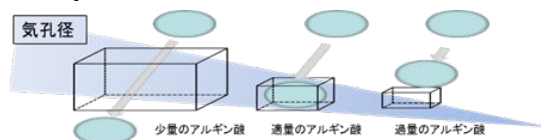


図6: β -TCPの取り込みイメージ

反応液の水流速度、すなわち攪拌スピードによる結果を示す(図7)。

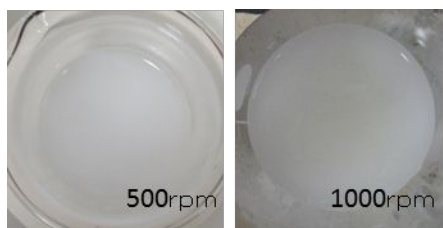


図7: 攪拌スピードによる違い

図は単位時間当たり加えるアルギン酸量を一定とし、それぞれ攪拌スピードを変化させた。ともに、ほぼ均一に白濁し、攪拌スピードによる変化は認められなかった。また、室内温度、湿度による大きな変化も認められなかった。

これらの結果から、単位時間当たり加えるアルギン酸量が、 β -TCPの取り込み効率に最も影響を及ぼし、再現性にも大きく影響を及ぼすことが考えられ、本条件を加えることで、安定した再現性を得ることに成功した。

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。今後、同バイオリアクターを用いて至適灌流速度、酸素濃度を決定していく予定である。また、MC3T3-E1骨芽細胞を用いた検討では、 Ca^{2+} が成熟骨芽細胞への分化をガイダンスするかどうかの検討、およびそれを制御するシグナル伝達分子の特定を行う予定である。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建材料の開発が期待できる。

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)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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)

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：