

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670839

研究課題名(和文)任意形態アパタイト顆粒と遮断膜による骨再生システムの創製

研究課題名(英文)Fabrication of bone regeneration system by spherical apatite and sealing membrane

研究代表者

松家 茂樹 (MATSUYA, SHIGEKI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00108755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：TCP微少球状粒子を最密充填後にPGA含有リン酸塩溶液で硬化させた連通気孔を有す迅速硬化型顆粒状凝集体およびPGAを基材とした遮断膜創製技術の確立を目的とした。PGA濃度の増加により硬化時間は減少した。PGAを脱水縮合剤を用いてリジン塩酸塩により架橋して遮断膜ゲルが調製できた。家兎大腿骨の骨欠損部にTCP顆粒球凝集体を埋入し、PGA遮断膜で被覆した。1ヶ月後には埋入した顆粒の溶解または吸収が開始し、2ヶ月後には完全に消失していたが、再生皮質骨の石灰化亢進が確認された。本研究の骨再生システムを発展させるために、今後はゲル強度改善と球状粒子の簡便な調製法の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish fabricate methods for fast-setting spherical -TCP particle aggregates with continuous pore structure and for sealing membrane made of crosslinked -PGA. Setting time for the spherical particles mixed with 0.25M disodium hydrogen phosphate solution containing 0-5% -PGA was increased with -PGA concentration. It was possible to prepare -PGA gel sealing membrane by cross-linking with lysine. Bone defect in femur of Japanese rabbit (17w, male) was filled with -TCP microsphere aggregates and sealed with -PGA hydrogel seat. One month after the operation, the microspheres began to dissolve or absorbed and two month later they completely disappeared from the bone defect. However, calcification of regenerated cortical bone was promoted. It was concluded that further study was needed to develop the bone regeneration system.

研究分野：歯科理工学

キーワード：アパタイト

1. 研究開始当初の背景

現在市販され、臨床応用されているアパタイト系骨補填材は、顆粒体(粉体)・ブロック体・セメントに大別される。顆粒体やブロック体には通常ハイドロキシアパタイトの焼結体(高温で焼き固めたもの)が用いられていた。しかし、ブロック体の場合、複雑な形態を呈する口腔内の硬組織欠損への充填には形態調整が著しく困難であり、充填後の遮断膜の設置も緊密性(封鎖性)に問題がある。さらに、顆粒体の場合、充填後の維持が難しく充填部からの流出が問題視されており、緊密な充填を可能にする硬組織再生システムの開発が求められていた。

一方、アパタイトセメントは流動性を持ち微少で複雑な欠損形態を呈する口腔内の硬組織欠損に緊密に充填することが可能であるが、海綿骨のような連通気孔構造を有しないため、細胞進入性・血管進入性・体液進入性に著しく劣り、新生骨の形成が遅延する恐れがある。

上記問題点を解決するために本研究ではPGA(ポリグルタミン酸)添加型セメントの硬化特性を利用し、術中に任意形態で迅速硬化可能な連通気孔構造を有する顆粒球凝集体作成技術と充填部を緊密に被覆する遮断膜の開発を提案する必要があった。

2. 研究の目的

本研究ではPGAに含まれているカルボキシル基とTCPの溶解反応によるカルシウムイオンとのキレート結合に着目し、迅速硬化特性を付与した球状アパタイト粒子とPGAハイドロゲル遮断膜を用いた骨再生システムを提案する。PGAはグルタミン酸を重合単位とするポリペプチドの一種であり、最終的には二酸化炭素と水として分解される生分解性高分子である。

本研究により、既存のアパタイト骨補填材では不可能であった顆粒同士の接着が可能になり、充填後の漏出問題を克服することが可能になる。さらにPGAハイドロゲル遮断膜を作製することにより、テフロン遮断膜のようなテクニクセンシティブなGBR法を劇的に容易にする新しい骨再生システムの構築を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料粉末の調製

アパタイト試料粉末の主成分としてリン酸三カルシウム(TCP)を用いた。TCPは炭酸カルシウムとリン酸二水素カルシウム(DCPA)を混合し、900℃で仮焼した後に1300℃で5時間繫留しエアクエンチすることにより調製した。硬化特性は粉末粒子径に大きく影響を受けるため、得られたTCPを遊星ボールミルを用いて一定時間粉碎し、各種粒径を調製することにより粒子表面積を変化させた。

(2) PGAの添加量

市販されているPGAをTCPに0, 2, 5mass%添加したリン酸ナトリウム溶液を用

いて球状粒子を調製した。

(3) 初期硬化性の検討

硬化途中の球状粒子を短時間で離形するためには、初期硬化性の評価が欠かせないため、上記(1)(2)を用いてPGA濃度等、練和条件による初期硬化時間への影響を調べた。

(4) 球状粒子の凝集力および連通気孔の評価
内径10mm、高さ10mmの円柱内にテフロンで作製した球状硬化用モールドより取り出した硬化初期(5分後)の顆粒を充填し、インキュベータ内にて0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 168時間養生した。各時間後にアセトンクエンチし一塊として取り出し、凝集力を評価するために圧縮強度測定を行った。

(5) アパタイトへの変換率の検討

セメントのアパタイトへの変換に関しては(3)と同様の方法で試料を作成し、粉末X線回折法によって定量化し、PGAのアパタイト相への変換に与える影響を評価した。

(6) 遮断膜ゲルの調製

低分子ジアミンまたはL-リジンを用いてアミド結合をPGAとの間に形成させ架橋させることによりハイドロゲルを作製した。また、分解速度の異なるハイドロゲルとして、シクロヘキサデキストリンを用い、エステル結合で架橋したものを作製する。

(7) 病理組織学的検討

家兔脛骨を用いた検討

大型の実験動物(ウサギ)を用いて検索を行う。ウサギの脛骨にクリティカルサイズ以上の骨欠損を形成し、連通気孔を有する球状粒子凝集体を充填し、その上を遮断膜ゲルで封鎖することにより骨欠損部を再建した。

4. 研究成果

(1) 試料粉末の調製

試料粉末のTCPは研究の方法に従い合成を行った。以下に得られたTCPの粉末エックス線パターンを図1に示す。

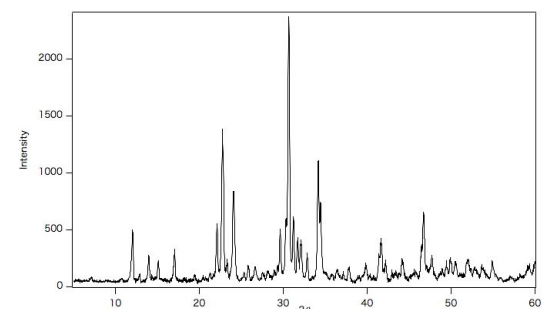


図1. 調製したTCPの粉末エックス線回折パターン

(2) PGAの添加量

PGAをTCPに0, 2, 5mass%添加したリン酸ナトリウム溶液を用いて球状粒子を調製した。PGAの添加量が増加するにつれて、成形が容易になった。これはPGAのカルボキシル基とTCPからのカルシウムイオンが

図2のようにキレート結合を形成し、網状のネットワークを形成することで、PGAを用いない場合に比べて、初期硬化時間が短縮されるためと考えられた。

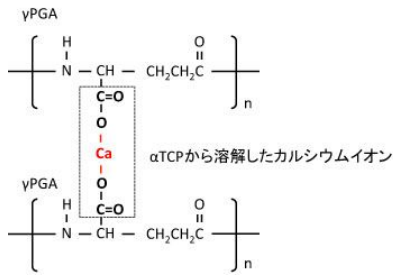


図2 . 硬化機序の模式図

(3)初期硬化性の検討

初期硬化時間を検討するために、レオメーターを用いて操作時間と硬化時間の検討を行った。下記に 0.25M Na_2HPO_4 を用いて L/P 比 0.5 で練和した時の結果を表 1 に示す。

表 1 . PGA 濃度が操作時間と硬化時間に与える影響

L/P	操作時間(min)	硬化時間(min)
0% 0.5	4' 22"	9' 38"
2% 0.5	2' 43"	7' 09"
5% 0.5	1' 22"	5' 12"

表 1 から明らかなように、PGA の濃度が上昇するに従って、操作時間、硬化時間ともに著しく減少していることが明らかになった。

(4)球状粒子の凝集力および連通気孔の評価

シリコンモールドにより球状粒子の作製を行い、凝集状態を SEM 観察にて行った。硬化させるために球状粒子は図 3 のようなアクリルモールド内に転入した状態で、相対湿度 100% で最大 24 時間硬化反応を促進させた。



図 3 . 硬化容器

図 4 に示した SEM 像からも明らかなように、低倍率像では球体同士がネックを形成して結合している様子が観察できた。このネック部分を拡大してみると、高倍率像ではアパタイト様の結晶が成長していることがわかる。

また、構造も連通気孔構造を有しており、その気孔径も十分な大きさを保持していることがわかる。(球直径が約 1mm の場合)

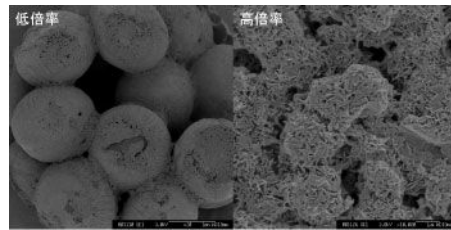


図 4 . 凝集球状塊の SEM 像

これは TCP がリン酸塩溶液 (図 3 では 0.25M Na_2HPO_4) で練和することによりアパタイトへと変化しているためと考えられた。硬化生成物の定性分析を行うために 0% および 5% PGA 添加試料の粉末エックス線回折を行ったところ図 5 の結果を得た。

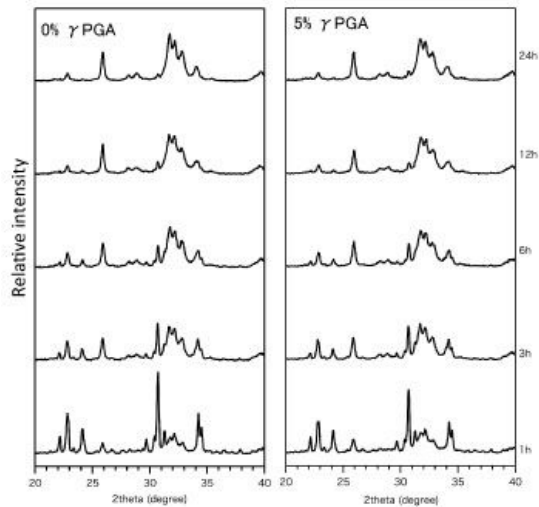


図 5 . 硬化生成物の粉末 X 線回折結果

硬化生成物は養生時間の経過に従い TCP からアパタイトへと変化していることがわかる。また、PGA が TCP のアパタイトへの相変換を阻害していないことも明らかになった。(5)の結果より)

(5)アパタイトへの変換率の検討

PGA 濃度 (0, 2, 5%) の Na_2HPO_4 水溶液を用いて L/P 比 0.5 で TCP を練和し、球状粒子を得た後に、粉末エックス線回折によりアパタイトへの変換率を測定した。図 4 の粉末 X 線回折の結果からも明らかなように、PGA の濃度によらず、すべての試料で 12 時間後にはほぼ 100% アパタイトへと変化していることが明らかになった。

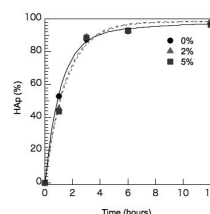


図 5 . アパタイトへの変換率

(6)遮断膜ゲルの調製

遮断膜ゲルの調製には PGA とリジン塩酸塩、脱水縮合剤を用いた。脱水縮合剤にはトリアジン系縮合剤である DMT-MM を用いた。

PGA はグルタミン酸が 位のカルボキシル基で重合した構造をしている。そのため、DMT-MM を用いて L-リジン塩酸塩と架橋することが可能であった。しかしながら、PGA は保水ゲルなどとしても利用されている高分子化合物であり、作成されたゲルは無色透明であるものの、含水率が高いハイドロゲルであった。ハイドロゲルを調製後、脱水縮合剤の余剰成分を除去するために流水で 2 4 時間洗浄を行った。その後、ミクロトームカッターにて約 500 μm の厚さに切りそろえた。また、吸水後のゲルは架橋度が低く十分なゲル強度を有していなかった。

(7)病理組織学的検討

深麻酔下で無痛下に、約 3kg (17w) の家兎の大腿骨遠位端外側に切開を加え、直径 7mm 高さ 5mm の円筒状の骨欠損を作成した。骨欠損に任意形態顆粒球凝集体 (約 150mg) を埋入後厚さ 1mm の PGA 遮断膜で被覆しすみやかに縫合した。移植後 1 ヶ月程度で埋入されたビーズ状 TCP 顆粒は溶解または吸収が早くも始まっており、二ヶ月後には完全に消失していることが病理組織標本観察より確認された。また、得られた試料にピラヌエバ染色を行ったところ、埋入後二ヶ月の試料では埋入部位の再生した皮質骨には石灰化の亢進が確認された。

本研究ではセメント粉末成分として自己硬化性をもつ TCP、液成分には PGA を添加したリン酸塩溶液を使用しカルボキシル基をもつ PGA と TCP から溶解するカルシウムイオンのキレート結合を利用して、微少球状粒子の最密充填による連通気孔を有す迅速硬化型アパタイトセメント顆粒状凝集体の創製技術と PGA を基材とした遮断膜創製技術を確立することを検討した。

本実験で確立された術中迅速硬化性任意形態顆粒球凝集体と遮断膜による骨再生システムを発展させるために、今後はゲル強度の改善と球状粒子の簡便な調製方法を模索する必要があると考えられた。

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 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 :
出願年月日 :
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

松家 茂樹 (SHIGEKI MATSUYA)
福岡歯科大学・生体工学分野・教授
研究者番号 : 108755

(2)研究分担者

丸田 道人 (MARUTA MICHITO)
福岡歯科大学・生体工学分野・講師
研究者番号 : 40507802

荒平 高明 (ARAHIRA TAKAAKI)
福岡歯科大学・生体工学分野・助教
研究者番号 : 30706958

(3)連携研究者

該当なし