

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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861905

研究課題名(和文) 最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントの調製

研究課題名(英文) Fabrication of an injectable carbonate apatite cement for minimal intervention surgery

研究代表者

丸田 道人 (MARUTA, MICHITO)

福岡歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40507802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、流動性・初期分散抑制性・硬化性を炭酸含有アパタイトセメントに付与する手法を提案し、研究を実施した。納豆のネバネバの主成分であるPGAのキレート結合能に着目することで、骨の無機主成分を組成に持つ上記特性をもつ最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントを調製することを目的とした。本研究により創製された最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントは、既存のアパタイトセメントにはない新生骨にリモデリングされる能力をもつことが明らかになった。さらに流動性・初期分散抑制性・硬化性を付与したことにより、最小侵襲外科治療による硬組織再建治療を大きく飛躍させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed an injectable carbonate apatite cement for minimal invasive surgery (MIS) with 3 different features; flowability, anti-initial dispersion and self-setting carbonated apatite (CO3Ap) cement. We focused on a chelate binding ability of PGA as the main component of the sticky natto, and it was intended to prepare a MIS CO3Ap cement with above properties. Injectable CO3Ap for MIS developed in this study demonstrated the ability of remodeled into no new bone. Furthermore, the results in this study indicated that this system has the potential to achieve the remarkable improvement of hard tissue reconstruction treatment in MIS.

研究分野：歯科理工学

キーワード：炭酸アパタイト 骨再生

1. 研究開始当初の背景

流動性・初期分散抑制性・硬化性を併せ持つ骨セメントとして、PMMA セメントがあるが、モノマーによる細胞毒性・硬化時の発熱による周辺細胞への為害性やショック死が報告されている。一方で、本研究で用いた炭酸含有アパタイトは生体骨の無機主成分であり、破骨細胞に吸収され新生骨に置換することが明らかになっている。しかし、既存の炭酸アパタイトの調製方法は、バルク体の水熱処理方法によるもので、PMMA セメントと同じように練和することにより硬化するセメントタイプのもはなかった。さらに、セメントは体液との接触により、分散し硬化しないため、十分な止血処置が必要である点もセメント型アパタイト骨補填材の課題であった。

2. 研究の目的

研究の背景で述べたとおり、流動性・初期分散抑制性・硬化性を併せ持つ炭酸アパタイトセメントはない。そこで、本研究では、流動性・初期分散抑制性・硬化性を炭酸含有アパタイトセメントに付与する手法を提案し、研究に取り組んだ。本研究では、PGA のキレート結合能に着目することで、骨の無機主成分を組成に持つ3つの特性を兼ね備えた最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントを調製することを目的し、インジェクタブルセメントの調製を目的とした。歯周組織再生・インプラント・口蓋裂治療などでは侵襲を最小限にする外科治療法開発の重要性が今後ますます高くなるのは明らかである。アパタイト系骨セメントの機能向上として、流動性・初期分散抑制性・硬化性を付与した最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントの創製が急務であると考えた。

なぜなら、市販のアパタイト系骨セメントでは液成分の増加により流動性を向上させているが、これが体液との接触による初期分散を助長し、その結果硬化時間の著しい延長を招いている。にもかかわらず、アパタイト系骨セメントは優れた骨伝導性を有し、PMMA 骨セメントに比べて、生体への侵襲がきわめて小さいため、骨粗鬆症による胸椎・腰椎の椎体骨折による骨折の予防に積極的に使用されているのが現実である。

粉液比の変化を伴わない流動性と初期分散抑制性の付与にはアルギン酸ナトリウムの添加も有効な方法の一つであるが、キレート結合能が強く、セメント硬化体の主要なマトリックスとなる。そのため、硬化後は可塑剤としての作用が大きくなり著しい機械的性質の低下を招くことが知られている。そこで、本研究では天然の生体吸収性高分子であるPGAがもつカルボキシル基とカルシウムイオンとの緩やかなキレート結合能を利用した。リン酸カルシウムへのPGAの添加は硬化後の主要なマトリックスとならないため、機械的性質の維持が可能で、初期分散

を起こさず硬化することに着目し研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 流動性の評価

流動性に影響を与える因子として粉末粒径・練和液 PGA 濃度、粉液比をパラメータとして変化させる。流動性の検討にはレオメーターを用いる。目標として初期硬化までの作業時間が5~10分のセメント試料を調製する。

粉末粒径の調製

各試料粉末を遊星ボールミル(申請備品)にて一定時間粉碎することにより、各種粒径を調製する。

練和液 PGA 濃度の調整

0, 2, 5, 10% PGA を含有した 0.25M Na_2HPO_4 溶液を用いる。

粉末成分の調整

-TCP 含有量を 10-90 mass%まで変化させた炭酸アパタイト混合粉末を調製する。

炭酸含有アパタイトの調製

水酸化カルシウム懸濁液に炭酸ガスを吹き込み沈降炭酸カルシウムを調製する。得られた炭酸カルシウムを 1M Na_2HPO_4 溶液にて 5 日間 60 で処理することにより炭酸含有アパタイトを合成する。得られた炭酸含有アパタイトは蒸留水により十分に洗浄する。

-TCP の調製

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 時間繋留しエアクエンチすることにより調製する。

(2) 初期分散性の評価

のステンレスモールドにセメントペーストを充填し 37、相対湿度 100%で 3 分間養生させた硬化試料を 37 のリンゲル液に 3 時間浸漬し、形態変化の観察と重量変化を測定する。

(3) 自己硬化性の評価

内径 6 mm、高さ 3mm の穴あきステンレスモールドにセメントペーストを充填し、37、相対湿度 100%のインキュベータ - 内で 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間養生後にアセトンクエンチして反応を停止させる。重量変化がなくなるまで十分に乾燥させた後にダイアメトラル引張り強さを測定する。

(4) 細胞生物学的検討

上記検討結果により最適化された反応条件で得られた各試料に対して、骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)を用いて初期接着性・増殖能等の評価を行う。試料は、テフロンモールドを用いて、直径 10mm の円形試料を作成する。

(5) 動物実験による吸収性の評価

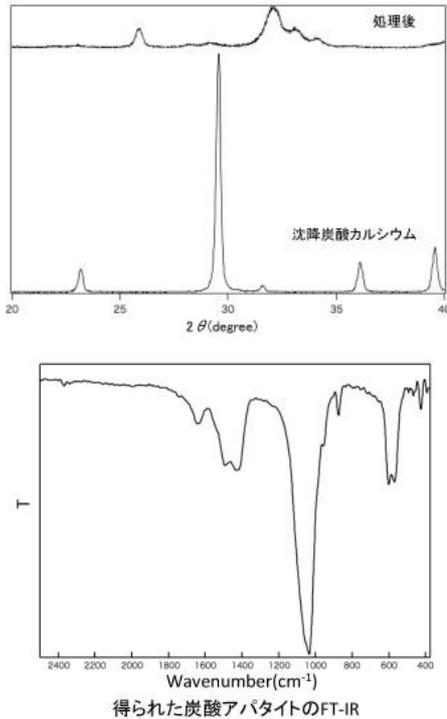
ラット頭蓋骨にクリティカルサイズの骨欠損(自然治癒しない大きさの骨欠損)を形成し、前項までの実験により最適化された最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントにて再建する。

4. 研究成果

(1)流動性の評価(粉末調製を含む)

水酸化カルシウム懸濁液に炭酸ガスを吹き込み沈降炭酸カルシウムを調製した。得られた炭酸カルシウムを 1M Na_2HPO_4 溶液にて 5 日間 60 で処理することにより炭酸含有アパタイトを合成した。下記に得られた沈降炭酸カルシウム、炭酸アパタイトの XRD パターンと炭酸アパタイトの FT-IR を示す。

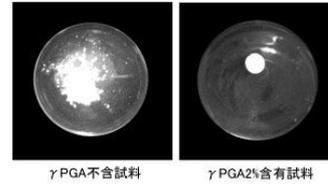
沈降炭酸カルシウムは、リン酸処理後にアパタイトへと変化し、FT-IR のパターンに見られる 1400cm^{-1} 近傍のダブルピークは炭酸基の含有を示していることから、炭酸アパタイトが調製されたことが明らかになった。



得られた炭酸アパタイトと α -TCP 含有量を 0-100 mass%まで変化させた炭酸アパタイト混合粉末を調製し、0, 2, 5, 10% PGA を含有した 0.25M Na_2HPO_4 溶液を用いて練和 (P/L=1) したところ、PGA の濃度が上がるにつれて、流動性が著しく低下した。これに対応して、初期硬化時間は流動性の低下と比例するように低下した。最も初期硬化時間が短かったのは α -TCP が 100%の試料で 5 分であった。炭酸アパタイトが 100%の試料では硬化しなかった。これは炭酸アパタイトから溶出するカルシウムイオンが α -TCP に比べて著しく低い濃度であるために、PGA に含まれるカルボキシル基とのキレート結合ができないためであると考えられる。シリンジによる操作時間内の流動性評価では、0-10% PGA の含有量試料間では優位な差は認められなかったが、PGA 含有量が上昇するにつれて、流動性が高くなる傾向が認められた。

(2)初期分散性の評価

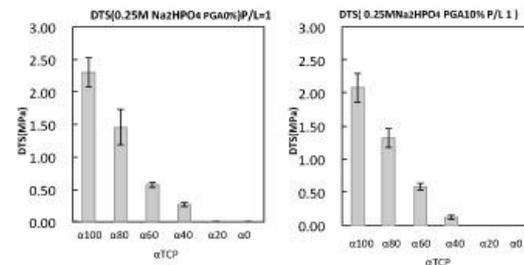
PGA 不含試料と PGA2%含有試料の初期分散性を示す。ステンレスモールドにセメン



トペーストを充填し 37、相対湿度 100% で 3 分間養生させた二種類の硬化試料を 37 のリンゲル液に 3 時間浸漬した。PGA を含まない試料は明らかな分散を示しているのに対して、PGA を 2%含む試料は全く分散を起こさないことが明らかになった。また、初期分散評価後の試料重量も軽微な低下が見られるだけであった。

(3)自己硬化性の評価

内径 6 mm、高さ 3mm の穴あきステンレスモールドにセメントペーストを充填し、37、相対湿度 100%のインキュベータ - 内で 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間養生後にアセトンクエンチして反応を停止させる。下記に 72 時間後の試料硬化体圧縮強度のデータを示す。



図より明かなように、 α -TCP の含有量が 40%以下の試料では、硬化体を得ることができなかった。 α -TCP の含有量が 60%以上の試料では硬化体の圧縮強度に優位な差はなく、PGA の添加が硬化体の強度に与える影響がないことが明らかになった。

(4)細胞生物学的検討

α -TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) は自己硬化性を持つリン酸カルシウムとして知られているが、ハイドロキシアパタイトの Ca/P 比が 1.67 であるのに対して、 α -TCP の Ca/P 比は 1.5 であるためにリン酸が過剰な状態である。そのため、細胞実験初期においてはメediumの pH の低下が避けられないために、実験前に試料をあらかじめメediumに 3 時間浸漬した。マウス骨芽細胞を用いた実験では、炭酸アパタイトの含有率が高くなるにつれて、初期接着細胞数が増加することが明らかになった。これは炭酸アパタイトが持つ炭酸基による pH 緩衝作用が効果的に作用したためである。同様の傾向が細胞増殖実験でも認められ、炭酸アパタイトを 50%以上含有すれば、増殖にも問題を与えないことが明らかになった。

(5)動物実験による吸収性の評価

これまでの試料調製の結果を踏まえて、動物実験を行った。ラット頭蓋骨にクリティカルサイズの骨欠損(自然治癒しない大きさの骨欠損)を形成し、前項までの実験により最適化された最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントにて再建した。以下

に術後二ヶ月後の試料を示す。



試料：本実験で最適化された β -TCP50%・炭酸アパタイト 50%インジェクタブル炭酸アパタイトセメント

本実験で最適化されたインジェクタブルアパタイトセメントの試料では、アパタイトセメントのみを使用した骨欠損モデルではアパタイトセメントが吸収されていなかった。それに対して、本実験で最適化された β -TCP50%・炭酸アパタイト 50%インジェクタブル炭酸アパタイトセメント硬化体は吸収され、欠損部に上皮の陥入が認められるものの、右半分はすでに再生されていることがわかる。

本研究の特色は、これまで合成困難とされてきた流動性・初期分散抑制性・硬化性を併せもつ炭酸アパタイトセメントが創製される点であった。自己硬化性を有する β -TCP($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)と炭酸アパタイトの混合粉末と PGA 含有リン酸塩水溶液を用いて研究を行った。

現在市販されているアパタイト系骨セメントの硬化反応は、溶解析出反応であり、粉末の主成分の溶解性が硬化時間を左右するため硬化時間が長い欠点があった。生体吸収性高分子である PGA のもつカルボキシル基に着目し硬化能を持たない炭酸含有アパタイトの結合材として溶解性の高い β -TCP を添加することにより、これから溶解する Ca^{2+} と PGA のキレート結合が β -TCP のハイドロキシアパタイト(HAp)への再析出より早期に起こることに着目した。さらに PGA を用いることにより有機質の添加による流動性の確保も期待できる新しい手法である。

炭酸含有アパタイトは破骨細胞による吸収を受け新生骨に置き換わる点で注目されているが、セメントのような流動性を持たず、硬化特性を付与することが不可能なため、圧力形成体によるブロック体や顆粒状で研究応用されている。本研究で申請する手法を用いればセメントと同様な使用方法が可能になり、複雑な骨欠損形態にも最小侵襲外科的アプローチが可能となる。

本研究により創製される最小侵襲外科用インジェクタブル炭酸アパタイトセメントは、既存のアパタイトセメントにはない新生骨にリモデリングされる能力をもつ。さらに流動性・初期分散抑制性・硬化性を付与することにより、最小侵襲外科治療が始まっている医科・歯科分野の硬組織再建治療を根本的

に変えるシーズとなる可能性が極めて高い。特にアパタイトセメントは超高齢化社会の日本で問題となっている骨粗鬆症による胸椎・腰椎の椎体骨折による骨折の予防に積極的に使用されており、歯科の範囲にとどまらない波及効果をもたらすことが予想される点でも研究の意義は大きいと考えられる。

本研究により液体成分の増加と硬化時間の延長を伴うことなく、炭酸アパタイトセメントに流動性・初期分散抑制性・硬化性を付与し、各特性をコントロールできる可能性が極めて高いことが示唆された。

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

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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし