

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870392

研究課題名(和文)自己硬化型炭酸アパタイトセメントの創製

研究課題名(英文)Self-curing carbonate apatite cement for bone tissue regeneration

研究代表者

戸井田 力(Toita, Riki)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40611554

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): HApセメントは、硬化中に大気中、体液中より炭酸イオンを吸収し、表層にのみ骨類似成分である炭酸アパタイト(CAp)が形成することを見出し、HAp表層が新生骨に置換されるメカニズムのひとつとして提唱し、新生骨置換におけるCApの重要性を示した。硬化してCApとなるセメントの創製を行った。粉末成分の炭酸カルシウムを安定相のカルサイトから不安定相のバテライトに置換すると、硬化時間の大幅な短縮、CApへの転化効率の向上が認められた。動物実験にて、CApセメントは従来型HApセメントより優れた骨伝導性を示した。CApセメントの優れた骨伝導性と形態形成性を兼備した新規な骨補填材として期待される。

研究成果の概要(英文): Hydroxyapatite (HAp) cement is a clinically applicable bone substitute having excellent osteoconductivity. In this study, we found that surface of HAp cement became carbonate apatite (CAp), a bone-like component, after setting, and thus could be replaced by new bone. Upon this result, we tried to create a new CAp cement, where CAp was formed during setting reaction. Calcium carbonate is one of the powder component in CAp cement, and has three polymorphisms, including calcite and vaterite. Vaterite has larger solubility than calcite. CAp cement containing vaterite showed shorter setting time and greater conversion rate to CAp than that containing calcite. Most importantly, CAp cement showed greater osteoconductivity than that of HAp cement. CAp cement having excellent osteoconductivity, bioresorbability, and easy morphogenesis would be expected as a new bone substitute that overcome problems of traditional HAp cement.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：炭酸アパタイト セメント 骨補填材

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会における大きな問題が骨折などの硬組織疾患、寝たきりによる痴呆などの合併症であり、骨折→寝たきり→合併症の増悪シークエンスを断ち切り、医療費軽減とともに Quality of Life (QOL) の高い生活を提供しうる安心・安全社会の構築が喫緊の課題である。超高齢化社会の到来で、骨再建術式が急増している現状において、形態形成が容易で、骨に置換されうる材料の開発が切望されている。現在、臨床応用されている水酸アパタイト (HAp) は優れた組織親和性と骨伝導性 (新生骨形成を促進する作用) を示すが、破骨細胞によって吸収されないため (図 1)、骨リモデリング (図 2) に調和せず、骨置換されない (図 3)。一方、骨と類似成分である炭酸アパタイト (CAp) は破骨細胞に吸収される (図 1) ため骨リモデリングによって骨に置換される (図 3)。

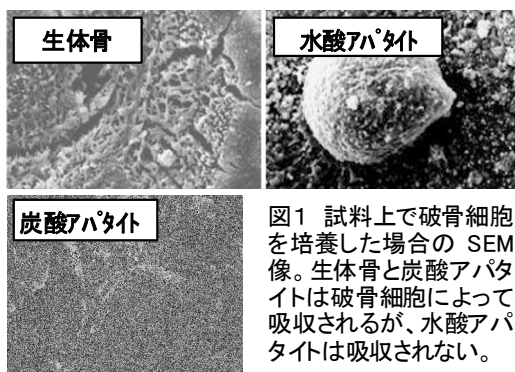


図1 試料上で破骨細胞を培養した場合の SEM 像。生体骨と炭酸アパタイトは破骨細胞によって吸収されるが、水酸アパタイトは吸収されない。

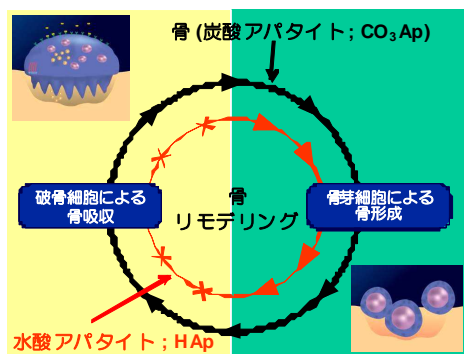


図2 骨リモデリングの模式図

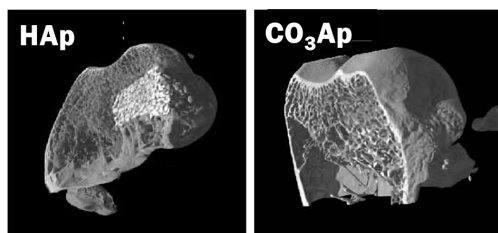


図3 家兎脛骨の骨欠損を水酸アパタイトおよび炭酸アパタイトで再建した場合の 24 週目の挙動。

HAp 顆粒やブロックは骨欠損部への形態形成や安定性の観点から問題があったが、HAp セメント (工業用セメントのようにスラリーが硬化し HAp を形成) の登場でこの問題が一気に解決された (図 4)。さらに、HAp セメントの表面が骨置換されるため着目されたが、表層から 1 mm 程度であり、完全な骨置換には至っていない。先述のしたように、HAp は破骨細胞吸収性を示さないためである。したがって、骨補填材料が完全に骨置換されるには、CAp であることが必須である。しかしながら、CAp は HAp と比較して、形態形成が極めて困難であり、硬化反応により CAp を形成するセメント (CAp セメント) を創製することができれば理想的な骨補填材料となりうる。

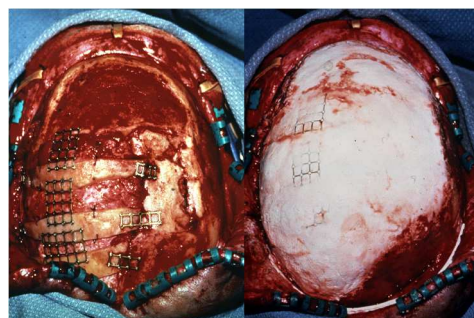


図4 水酸アパタイトによる頭蓋骨の再建。自己硬化性を示すため、既存骨と密接してアパタイトが形成される。また、任意形状のアパタイト硬化体が形成される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、①HAp セメントの表層および内部の結晶系の同定、②CAp セメントの硬化時間の短縮、および③作製した CAp セメントの動物を用いた評価の 3 点である。

①HAp セメントの表層および内部の結晶系の同定

一般的に HAp 表面は新生骨に置換されないとされているが、HAp セメントの表層は新生骨に置換されることがすでに知られている。しかしながら、その理由は明確に分かっていない。我々は、この理由として HAp セメントの硬化中に、大気中や体液中の炭酸イオン (CO_3^{2-}) を吸収することで、HAp セメント表層のみ CAp が形成され、この表層に形成された CAp 部分が新生骨に置換されると考えた。本研究では、HAp セメントの表層および内部の結晶相を同定し、本仮説が正しいか実証する。

②CAp セメントの硬化時間の短縮

③作製した CAp セメントの動物を用いた評価

アパタイトセメントの硬化機構は石膏と同じ溶解-析出反応と析出した結晶の絡まりあいによる硬化であり、CAp は熱力学的最安定相である。したがって、CAp

(Ca_{10-a}(PO₄)_{6+b}(CO₃)_c(OH)_{2-d})の構成成分であるCa²⁺、PO₄³⁻、CO₃²⁻を反応場に供給するセメント系がCApセメントとなる可能性が高い。これまで当研究室では、炭酸カルシウムの多形の一つであるカルサイト(CaCO₃)とリン酸水素カルシウム無水物(DCPA, CaHPO₄)の混合物を粉末成分としたCApセメントを検討してきたが、反応性が乏しく、硬化時間が極めて長いため、実用化には難があった。我々は、この原因がカルサイトの溶解性に起因すると考えた。すなわち、CApセメントの硬化反応には、反応場にCApに対して過飽和のCa²⁺、PO₄³⁻、CO₃²⁻が供給され、CAp結晶が析出されなければならない。そこで、我々は炭酸カルシウムの多形で最安定相(溶解度が小さい)であるカルサイトではなく、不安定相(溶解度が大きい)であるバテライトを炭酸カルシウムとして選択することを発案した。本研究では、Ca²⁺およびCO₃²⁻ソースとしてバテライトとPO₄³⁻ソースとしてDCPAを粉末相に含むCApセメントを創製する。調製したCApセメントの硬化時間、表面構造、組成、動物実験による吸収性の評価を目的とする。

3. 研究の方法

① HApセメントの表層および内部の結晶相の同定

粉末部(第4リン酸カルシウム, DCPA)と液部(超純水)を液粉(L/P)比0.3で混和し、片面をガラススライドで閉鎖させたテフロンモールド(直径10 mm, 高さ10 mm)に充填した。100% CO₂, 5% CO₂(95% N₂), 100% N₂雰囲気下、37°C、100%相対湿度で24時間でHApセメントを硬化させた。硬化したHApセメントを約1 mm厚で切断し、大気開放面に近い方から順にLayer 1-7とした。Layer 1-7の組成を粉末X線回折(XRD)、フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)にて決定した。

② 各種環境下で硬化させたHApセメントの吸収性評価

テフロンモールドを用いて、上記した粉液組成のHApセメント(直径2 mm, 高さ)を100% CO₂, 5% CO₂(95% N₂), 100% N₂雰囲気下、37°C、100%相対湿度で24時間条件で調製した。陰性対照として、同サイズの焼成HApも調製した。

10週齢ラットの脛骨に2 mm直径の骨欠損を形成し、各種HApセメントおよび焼成HApを埋入した。0, 30および180日後、マイクロCTにてHApセメントおよび周辺骨組織を撮像し、吸収率を計測した。

③ 炭酸カルシウム多形のCApセメント硬化時間および結晶組成に対する影響

炭酸カルシウム多形であるバテライト(溶解性大)、カルサイト(溶解性小)とDCPAを粉末部とした。液部は0.8 Mのリン酸水素二ナトリウムとし、液粉比は0.45とした。

粉末部と液部を混合し、ビッカー針にて硬化時間を決定した。また、XRD測定により、CApへの転化率の経時変化を調査した。

④ 各種リン酸ナトリウム溶液のCApセメントの物性に対する影響

粉末部をバテライトとDCPAとした。液部は0.8 Mリン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸三ナトリウムとし、液粉比は0.45とした。ビッカー針にて硬化時間を決定した。CApセメント硬化体の表面構造を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察するとともに、気孔率およびダイアメトル引張強さ(DTS)を測定した。

⑤ CApセメントとHApセメントの動物評価

12週齢のラットの脛骨に4 mm直径の骨欠損を作製し、骨欠損にCApセメントおよびHApセメント(陰性対照)を埋入した。30, 90および180日後、マイクロCTを撮像し、セメントの吸収性および骨伝導性を評価した。

4. 研究成果

① HApセメントの表層および内部の結晶相の同定

XRD測定の結果から、HAp相の形成が認められた。HApの形成量や結晶性は、100% CO₂, 5% CO₂(95% N₂), 100% N₂雰囲気下で、ほとんど同等であった。FT-IRにて、結晶中の炭酸基を定性的に評価した(図5)。100% N₂環境にて硬化させたHApセメントは炭酸基に由来する873, 1420, 1470 cm⁻¹のピークを示さなかった。一方、5% CO₂環境にて硬化させたHApセメントは、すべての層で炭酸基が検出された。また、炭酸基の含有量は大気開放面から遠くなるにつれて、減少する傾向が認められた。100% CO₂環境にて硬化させたHApセメントも、5% CO₂環境と同様に、すべての層で炭酸基が検出され、炭酸基の含有量は大気開放面から遠くなるにつれて、減少する傾向が認められた。しかしながら、同じ層で比較すると、100% CO₂で硬化させたHApセメントの方

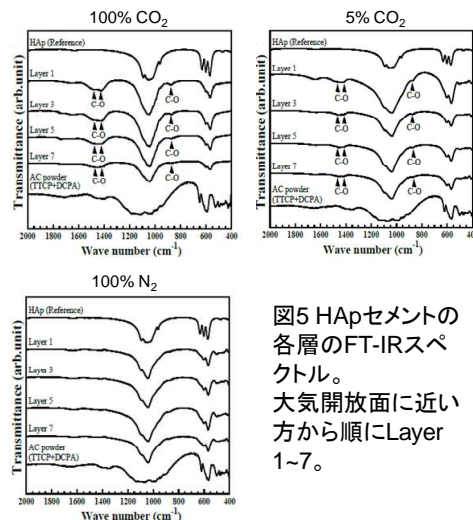


図5 HApセメントの各層のFT-IRスペクトル。大気開放面に近い方から順にLayer 1-7。

が、炭酸基の含有量が大きかった。以上の結果より、HAp セメントは硬化中に、大気中 CO_2 および液相に溶解した CO_3^{2-} を取り込み、CAp を形成することが明らかとなった。

② 各種環境下で硬化させた HAp セメントの吸収性評価

30 日後においては、いずれのサンプルも大きな吸収を認めなかった (図 6)。100% CO_2 および 5% CO_2 下で硬化させた HAp セメントの角部が丸まっておき、わずかに吸収されていることが分かった (data not shown)。しかし、100% N_2 HAp セメントおよび焼成 HAp はそのような吸収は認められなかった。180 日後において、陰性対照である焼成アパタイトは吸収は認められなかったが、HAp セメントは吸収が認められた。180 日後の各種 HAp セメントの吸収率は、100% CO_2 HAp セメント: 約 30%, 5% CO_2 HAp セメント: 約 20%, 100% N_2 HAp セメント: 約 10% であり、表層の CAp 形成量 (図 5) に依存し吸収率が大きくなった。以上の結果より、HAp セメントの表層が新生骨に置換されるのは、表層が CAp を形成しているのが一つの理由であると結論付けた。

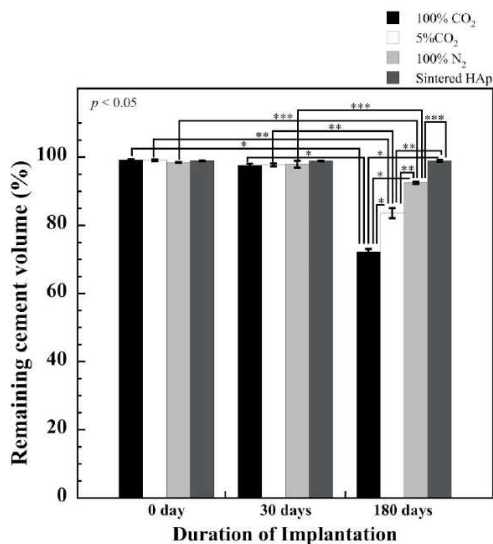


図 6 各種 HAp セメントの吸収性の評価
セメント表層の CAp 形成量に依存した吸収性の増大が認められた

③ 炭酸カルシウム多形の CAp セメント硬化時間および結晶組成に対する影響

従来型のカルサイト型 CAp セメントの硬化時間はおよそ 19 分であったのに対して、新型のバテライト型はおよそ 11 分であった。また、カルサイト型は 10 日後においても、CAp への転化率はおよそ 80% に留まったのに対して、バテライト型はわずか 2 日で完全に CAp に転化することが明らかとなった (図 7)。これは、カルサイトと比較して、熱力学的不安定相であるバテライトが比較的容易に溶解し、反応場により高濃度の Ca^{2+} および CO_3^{2-}

を供給できるため、CAp 結晶の形成および絡み合いがより速く起こったためである。当初の予想通り、安定な炭酸カルシウム多形であるカルサイトを不安定なバテライトに変更することで、硬化時間の短縮、CAp への転化効率の向上に成功した。

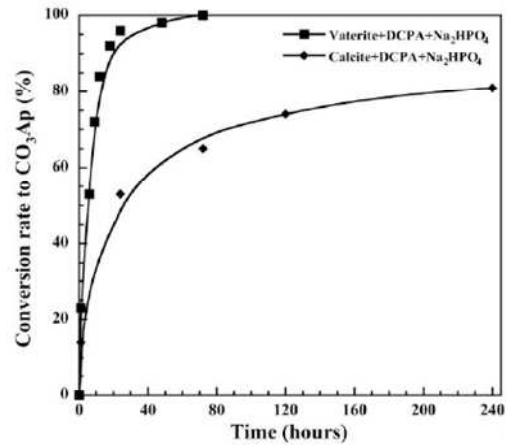


図 7 炭酸カルシウム多形の CAp セメント硬化時間に対する影響
不安定相であるバテライトを用いると、CAp への転化速度が増大

④ 各種リン酸ナトリウム溶液の CAp セメントの物性に対する影響

硬化時間は、リン酸二水素ナトリウム型: およそ 11 分、リン酸水素二ナトリウム: およそ 11 分、リン酸三ナトリウム: およそ 17 分であった。SEM にて硬化体の表面構造を観察したところ、いずれの硬化体も表面におよそ 1 μm 程度の気孔が認められた。これに起因し、気孔率がおよそ 60% と比較的大きかった。また、DTS はいずれの硬化体もおよそ 3.5 MPa であり、臨床応用に十分な機械的強度を有していた。

⑤ CAp セメントと HAp セメントの動物評価

30 日後、CAp セメント、HAp セメントの表面に、薄い新生骨が部分的に観察された。90 日後、HAp セメントの場合、完全には骨欠損部が回復しなかったのに対して、CAp セメントの場合、ほぼ完全に欠損部が封鎖された。180 日後、CAp セメントでは、骨の連続性が回復するとともに、骨質も周囲骨とほぼ同等のように観察された。一方、HAp セメントは欠損部の完全な回復は認められなかった。また、どちらのセメントも大きな吸収は観察されなかった。これは、硬化後のセメントの気孔が小さく、また内部にはほとんど空孔は存在しないため、セメント吸収を行う破骨細胞のセメント内部への浸潤が充分でないためであると推察した。また、本研究では、セメント周辺および新生骨の病理組織観察による詳細な検討がきておらず、今後の課題として残った。

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3件)

① Arief Cahyanto, Riki Toita, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa, Effect of particle size on carbonate apatite cement properties consisting of calcite (or vaterite) and dicalcium phosphate anhydrous, Key Engineering Materials, 査読有, Vol. 631, 2015, pp. 128-133.

② Riki Toita, Sunarso, Ahmed Nafis Rashid, Kanji Tsuru, Kunio Ishikawa, Modulation of the osteoconductive property and immune response of poly(ether ether ketone) by modification with calcium ions, Journal of Materials Chemistry B, 査読有, Vol. 3, 2015, pp. 8738-8746.

③ Kunio Ishikawa, Nguyen Xuan Thanh Tram, Kanji Tsuru, Riki Toita, Fabrication of porous calcite using chopped nylon fiber and its evaluation using rats, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 査読有, Vol. 26, 2015, pp. 94-101.

[学会発表] (計6件)

① “Basic properties of FGF-2 adsorbed carbonate apatite granular”, Kunio Ishikawa, Takako Yoshida, Riki Toita, Kanji Tsuru, 26th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 2014), Barcelona (Spain), 2014. 11.

② “Adsorption and desorption of FGF-2 from carbonate apatite granular”, Kunio Ishikawa, Takako Yoshida, Riki Toita, Kanji Tsuru, Society for Biomaterials 2014 Annual Meeting & Exposition, Denver (USA), 2014. 4.

③ 「バテライトとリン酸水素カルシウムを原料とした炭酸アパタイトセメントの創製」, 都留寛治、アリフチャヤント、戸井田力、丸田道人、松家茂樹、石川邦夫, 第 63 回日本歯科理工学会学術講演会, 東京, 2014. 4.

④ 「炭酸アパタイトセメントの創製—基礎的性質の評価」, 都留寛治、アリフチャヤント、戸井田力、石川邦夫、丸田道人、松家茂樹, 日本セラミックス協会 2014 年年会, 東京, 2014. 3.

⑤ 「自己硬化型炭酸アパタイトセメントの基礎的評価」, 戸井田力、Arief Cahyanto、都留寛治、石川邦夫, 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム, 長野, 2013. 9.

⑥ 「炭酸アパタイト顆粒への FGF 吸着挙動」, 吉田貴子、戸井田力、都留寛治、石川邦夫, 日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム, 長野, 2013. 9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸井田 力 (TOITA, Riki)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：40611554