

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293417

研究課題名(和文)リン酸カルシウムの結晶多様性が誘導する生体活性機序の解明と骨再生材料の開発

研究課題名(英文)A study of materials property and osteoconductive capacity of bone substitutes

研究代表者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60374948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨補填材が細胞性の生体内吸収性発現に関係しているかどうかの観点で破骨細胞の前駆細胞(マクロファージ)の動態を調べ、リン酸八カルシウムがその遊走性を促進することを明らかにした。マトリクス材料gelatinはOCP結晶子サイズや加水分解速度に影響を及ぼし、gelatinとの複合体はラット骨欠損内埋入で配向性を有する骨マトリクスを形成した。また家兔骨欠損埋入で天然骨に類似の圧入強さを持つ皮質骨を再生した。Gelatinマトリクス内のリン酸八カルシウムは再生骨の性質に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate as to whether calcium phosphate in matrix polymer materials affects oriented bone formation. Octacalcium phosphate without the matrix stimulated macrophage-like cells migration. The presence of gelatin controls the crystallite size and the hydrolysis rate. Octacalcium phosphate in gelatin matrix affects the production of oriented bone formation in rat calvaria defect. The composite stimulated the formation of cortical bone having strength compatible to natural bone in rabbit tibia defect (push-in-test). The presence of octacalcium phosphate in the matrix material could be associated with the quality of newly formed bone.

研究分野：生体材料工学

キーワード：生体材料 組織工学 骨再生

1. 研究開始当初の背景

リン酸カルシウム系セラミックス材料はその組成が骨の無機成分と類似しており、骨との親和性が高いことから骨欠損を補填して骨再生を促す人工材料として臨床応用がなされてきた。骨アパタイトの基本型とされるハイドロキシアパタイト (HA) は水溶液中でリン酸八カルシウム (OCP) 等の前駆体を經由して形成されるという考えが支持されてきた (Akiva A et al. J Am Chem Soc 2016)。研究代表者らは人工合成の OCP が骨伝導を示し、HA 等の合成で得た人工材料と比肩し得る生体親和性を有することを明らかにしてきた (Suzuki O. Japanese Dent Sci Rev 2013)。一方、OCP は加水分解により骨伝導能が変化し得ることを報告している (Miyatake N et al. 2009)。また、合成時に共存するタンパク質分子、例えば collagen 分子により結晶性状が影響を受けることがわかってきた (Honda Y et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007)、タンパク質の種類や加水分解に及ぼす影響は十分に解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、生体内吸収性を示すリン酸カルシウムである OCP の吸収性細胞に対する応答性、マトリクス材料とその複合化が結晶性状に及ぼす影響 (結晶子および加水分解速度)、また、再生骨の性質に及ぼす影響を調べることを目的とした。吸収性細胞応答として破骨細胞の前駆細胞であるマクロファージの遊走性を *in vitro* および *in vivo* で調べた。また、マトリクス材料として変性 collagen の再構成材料である gelatin を用い、gelatin 中での OCP 調整、また、gelatin 存在下での OCP 加水分解速度の検討を行った。また、OCP/Gelatin 複合体の骨再生をラット頭蓋骨欠損および家兎脛骨骨欠損への埋入を行い調べ、並行して再生骨の基質 (collagen) の配向性、また、天然骨と比較した圧入試験による力学的性質を評価した。Gelatin 単体のラット頭蓋骨欠損における組織応答性も検討し、OCP 結晶の役割について考察した。

3. 研究の方法

(1) 材料の調整

既法に基づき、Ca およびリン酸の濃度、pH、温度をもとに OCP が析出する条件となる過飽和度を設定して OCP を合成した (Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 1991)。

(2) 吸収性細胞の応答性の検討

OCP 自体が破骨細胞の前駆細胞であるマクロファージの遊走性に関係するかどうか、ラット脛骨に作製した骨欠損への埋入、また、マクロファージ様細胞によるセラカルチャーインサートをを用いた培養により、OCP の化学的性質 (溶解性) が細胞遊走性に及ぼす影響を調べた。

(3) マトリクス材料が加水分解に及ぼす影響の検討

合成した OCP を種々の濃度に調整した gelatin 水溶液に分散して温水中に浸漬・攪拌し、gelatin が加水分解速度に影響を及ぼすかどうか調べた。

(4) マトリクス材料中で調整する結晶の性状と骨再生に及ぼす影響の検討

Gelatin 中で合成した OCP の活性を調べるため、gelatin 存在下で OCP を合成した後、OCP 結晶を gelatin 中から回収し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察による結晶サイズ、また、X 線回折による結晶子サイズを算出し性状を決定した。さらに、回収 OCP を再度、gelatin マトリクス中へ分散させ、成型、凍結乾燥、熱架橋を行い、ラット頭蓋骨欠損および家兎脛骨骨欠損へ一定期間埋入を行い、骨再生率、材料の吸収性を定量的に評価した。また、再生骨の骨質の指標としてラット頭蓋骨の再生骨基質の配向性、家兎脛骨における天然骨と比較した再生皮質骨の力学的性質を圧子圧入荷重値にて評価した。マトリクス自体の影響を見積もるため、gelatin 単体のラット頭蓋骨欠損における組織応答性も検討した。

4. 研究成果

(1) 結晶の加水分解が炎症性細胞浸潤に及ぼす影響

生体内吸収性リン酸カルシウムが破骨細胞性吸収を受けることに注目し、埋入初期の生体反応を炎症と再生の観点で分析した。そのため、結晶相は異なるが類似形態を有するリン酸カルシウムとして材料の性状を既に明らかにしている二つの材料、HA 前駆体 (OCP) とその加水分解産物 (Suzuki O et al. Biomaterials 2006) を用いて免疫担当細胞の反応性を解析した。これらの材料を再度調整し、X 線回折と FTIR、化学分析にて所望の結晶であることを確認した。埋入の形態として顆粒を用いた。ラットの脛骨に 3mm 径の骨欠損にそれぞれ、未埋入、300-500 μ m の顆粒状の OCP、300-500 μ m の顆粒状 OCP 加水分解産物 (hydrolyzate) を同用量となるように充填し、一定期間経過後に埋入組織を回収して脱灰し、HE 染色、TRAP 染色および炎症性細胞のマーカーとなる抗体を用いた免疫染色を行った。その結果 OCP がマクロファージ様細胞の集積がより高く、また、*in vitro* においても OCP がマクロファージ様細胞の遊走促進に作用することが示唆された。また、破骨細胞様細胞の集積も認められ、マクロファージ様細胞の遊走と関連することが示唆された。このことから、リン酸カルシウムの特定の結晶相が再生に関係すると考えられた (Hirayama B et al. RSC Adv 6: 57475-57484, 2016)。

(2) タンパク質の共存が結晶成長と結晶の性状に及ぼす影響

リン酸カルシウム結晶の加水分解の影響について研究した。一定濃度の gelatin を含有した水溶液中で OCP を合成した。単独合成の OCP を水溶液中から回収して乾燥させ、OCP を水溶液に再分散させた水溶液、また共沈による OCP/Gelatin 溶液をそれぞれ温水中で最長で 48 時間まで保持した後、それぞれ結晶を回収し、乾燥させた後、結晶の性質を物理的手法(制限視野電子線回折ほか)によって解析した。その結果、共沈殿から得た OCP の方が、共沈を経ないで単独合成した OCP よりも加水分解速度が速い方がわかった。並行して単独合成した OCP を分散した水溶液中に gelatin を共存させると、gelatin の濃度に依存して加水分解が促進する傾向があった。このことから、gelatin と結晶が相互作用する可能性が示唆された(Ezoe Y et al. *J Nanopart Res* 17:140, 2015)。

(3) 再生骨の性質に及ぼすマトリクス材料へのリン酸カルシウム含有の影響

リン酸カルシウム結晶の成長および特性が共存する天然高分子の影響を受けるかどうか、また、その結晶の特性が骨組織応答にどのように作用するのを検討した。Gelatin 溶液内でカルシウムおよびリン酸のイオンを含有させ共沈殿させた。懸濁液を再度 gelatin 溶液に再分散させ最終的な生成物における OCP の含有量が 17-44wt% となるように OCP/Gelatin 複合体を作製した。また、結晶性状確認の分析のため、懸濁液から結晶を水洗して回収した。回収した結晶の性状を X 線回折、X 線回折データから結晶子サイズの算出、SEM 観察による結晶サイズの算出、FTIR による分光学的解析を行った。その結果、単独で合成した場合の結晶と比較して共沈殿による結晶は特定の方向へ伸長する傾向があることが明らかとなった。X 線回折図による比較では共沈殿による結晶は単独合成による結晶と比較してブロードなパターンとなる傾向が認められ、合成における天然高分子の共存が結晶性状に影響を及ぼすことが明らかとなった。17-44wt% 含有 OCP/Gelatin 複合体からディスク状試料を成型して、ラット頭蓋冠骨欠損へ埋入し、一定期間経過後に試料埋入部を回収して組織の染色を行い、骨再生率、また、再生骨の基質タンパク質であるコラーゲンの配向性を組織形態計測学的に定量的に評価した。その結果、共沈殿で得た OCP 結晶を含有する複合体は含有しない場合(Gelatin 単独)と比較して、再生骨の基質コラーゲンの配向性が高くなることがわかった。以上の結果から生体材料の生体活性に及ぼす影響として、結晶成長の材料学的パラメータを定量的に取り纏めた(Ishiko-Uzuka R et al. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2016 in press.

doi:10.1002/jbm.b.33640)。

(4) マトリクス材料の構造が骨再生に及ぼす影響

マトリクス自体が骨を再生するのかわか、gelatin スポンジを作製して検討した。酸抽出あるいはアルカリ抽出由来の gelatin を成型、凍結乾燥および熱架橋にてディスク状試料を作製した。SEM 写真の画像を用いてポアサイズを定量的に評価したところ、ポアサイズ大(500 μ m以上)およびポアサイズ小(500 μ m以下)に分類できた。これらの試料を、ラット頭蓋冠骨欠損へ埋入し、一定期間経過後に試料埋入部を回収して組織の染色を行い、骨再生率、また、再生骨の基質タンパク質であるコラーゲンの配向性を組織形態計測学的に定量的に評価した。酸抽出・ポアサイズ小の試料は有意に高い骨形成を認めた。しかしながら再生骨基質の配向性は母床骨と比較して低いことがわかった(Kanda N et al. *Macromol Biosci* 15: 1647-1655, 2015)。

(5) 再生骨の性質に及ぼす吸収速度の影響

骨再生材料の吸収速度が再生骨の力学的性質に影響を及ぼすかどうか検討した。生体内吸収性を示す gelatin および OCP/Gelatin(共沈法にて調整、OCP44wt%含有)、 β -TCP(市販の多孔質 β -TCP セラミックス)の円柱状試料を試料サイズの家兎脛骨骨欠損(直径 6 mm、深さ 7 mm)に埋入し、8 週後に埋入体部位を含む骨を回収し、EDTA にて脱灰し組織切片を作製して組織染色、組織形態計測により骨形成および材料の吸収率を測定した。また、回収後の非脱灰標本を用いて μ CT 撮影および骨欠損作製部位の圧入試験を行い再生骨の力学強度(破断荷重値)を評価した。Gelatin は最も吸収が早く生じたが骨形成率は最小であった。 β -TCP は比較において最も吸収が遅かったが材料表面へ骨伝導が生じた。Gelatin/OCP は材料吸収および骨形成が連動するように生じる傾向があった。Gelatin/OCP による再生骨は対照である天然骨と力学的性質(圧子圧入荷重値)が同等であった。一方、Gelatin 埋入部は天然骨よりも低く、 β -TCP 埋入部は天然骨よりも高かった。後者は吸収されないで残存する割合が高いため材料自体の強度を反映して天然骨よりも高い強度を示しているものと考えられた。以上の結果から再生骨の性質は骨再生材料の吸収速度および骨形成能に関連することが示唆された(Chiba S et al. *J Biomed Mater Res A* 104: 2833-2842, 2016)。

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 7 件)

Chiba S, Anada T, Suzuki K, Saito K, Shiwaku Y, Miyatake N, Baba K, Imaizumi H, Hosaka M, Itoi E, Suzuki O. Effect of resorption rate and osteoconductivity of biodegradable calcium phosphate materials on the acquisition of natural bone strength in the repaired bone. *J Biomed Mater Res A* 104: 2833-2842, 2016. 査読有. DOI: 10.1002/jbm.a.35828

Hirayama B, Anada T, Shiwaku Y, Miyatake N, Tsuchiya K, Nakamura M, Takahashi T, Suzuki O. Immune cell response and subsequent bone formation induced by implantation of octacalcium phosphate in a rat tibia defect. *RSC Adv* 6: 57475-57484, 2016. 査読有. DOI: 10.1039/c6ra10834b

Ishiko-Uzuka R, Anada T, Kobayashi K, Kawai T, Tanuma Y, Sasaki K, Suzuki O. Oriented bone regenerative capacity of octacalcium phosphate/gelatin composites obtained through two-step crystal preparation method. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2016 in press. 査読有. DOI:10.1002/jbm.b.33640

Kanda N, Anada T, Handa T, Kobayashi K, Ezoe Y, Takahashi T, Suzuki O. Orthotopic osteogenicity enhanced by a porous gelatin sponge in a critical-sized rat calvaria defect. *Macromol Biosci* 15: 1647-1655, 2015. 査読有. DOI: 10.1002/mabi.201500191

Miyazaki T, Miyauchi S, Anada T, Tawada A, Suzuki O. Chondroitin sulfate-E binds to both osteoactivin and integrin α V β 3 and inhibits osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 116: 2247-2257, 2015. 査読有. Doi: 10.1002/jcb.25175

Ezoe Y, Anada T, Yamazaki H, Handa T, Kobayashi K, Takahashi T, Suzuki O. Characterization of partially hydrolyzed OCP crystals deposited in a gelatin matrix as a scaffold for bone tissue engineering. *J Nanopart Res* 17:140, 2015. 査読有. DOI: 10.1007/s11051-015-2864-1

Kawai T, Echigo S, Matsui K, Tanuma Y, Takahashi T, Suzuki O, Kamakura S. First clinical application of octacalcium phosphate collagen composite in human bone defect. *Tissue Eng Part A* 20: 1336-1341, 2014. 査読有. DOI: 10.1089/ten

〔学会発表〕(計 18 件)

鈴木 治. 骨再生を促進するリン酸八カルシウム (OCP) 骨補填材の開発. 整形外科バイオマテリアル研究会, 2016 年 12 月 3 日, 大阪

塩飽由香利, 平山聞一, 穴田貴久, 宮武尚央, 土屋香織, 中村雅典, 高橋哲, 鈴木

木治. リン酸オクタカルシウムの初期炎症反応と骨再生への効果. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016 年 11 月 21 日 ~ 22 日, 福岡

Suzuki O, Sakai S, Anada T, Tsuchiya K, Yamazaki H, Margolis HC. Analysis of dissolution behaviour of octacalcium phosphate and β -tricalcium phosphate bone substitute materials. International Dental Material Congress 2016, 2016 年 11 月 5 日, Bali, Indonesia

Suzuki O, Anada T, Chiba S, Ishiko-Uzuka R, Shiwaku Y, Sasaki K, Itoi E. Relation between biodegradability and osteoconductivity in octacalcium phosphate-based bone substitute material. 28th Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 28). 2016 年 10 月 18 日 ~ 21 日, Charlotte, USA

鈴木 治. 天然高分子とリン酸八カルシウムの複合体を活用する生体活性型骨補填材の開発. 2016 ライフサイエンスバイオマテリアル研究会. 2016 年 9 月 30 日, 京都

Suzuki O, Anada T, Shiwaku Y. Crystal maturation process of calcium phosphate in the preparation of bone substitute material and bone regeneration capacity. E-MRS 2016 Fall Meeting and Exhibition, 2016 年 9 月 19 日, Warsaw, Poland

Suzuki O, Anada T, Tsuchiya K, Ishiko-Uzuka R, Sasaki K. Effect of gelatin molecules on the structural characteristics during precipitation and hydrolysis of octacalcium phosphate and the bioactivity of the composite. the 10th World Biomaterials Congress (WBC 2016), 2016 年 5 月 20 日, Montreal, Canada

平山聞一, 穴田貴久, 塩飽由香利, 宮武尚央, 土屋香織, 中村雅典, 高橋 哲, 鈴木 治. リン酸オクタカルシウムによる早期骨再生のメカニズムの解明. 第 67 回日本歯科理工学会学術講演会. 2016 年 4 月 17 日, 福岡

鈴木 治. バイオマテリアル表面と石灰化組織の再生, 第 70 回精研シンポジウム, 2016 年 3 月 11 日. 横浜

Suzuki O, Anada T, Kobayashi K, Shiwaku Y. Efficacy of calcium phosphate-based scaffold materials on mineralized and non-mineralized tissue regeneration. 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. 2016 年 1 月 18 日 ~ 19 日, 仙台

Hirayama B, Anada T, Shiwaku Y, Miyatake N, Tsuchiya K, Nakamura M, Takahashi T, Suzuki O. Comparative study on early tissue response by synthetic octacalcium phosphate and hydroxyapatite. 15th Asian BioCeramics symposium. 2015

年 12 月 10 日, 東京

江副祐史, 神田直典, 穴田貴久, 小林司史, 高橋 哲, 鈴木 治. ラット頭蓋冠臨界骨欠損部における多孔性ゼラチンスポンジの骨再生能について. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会. 2015 年 11 月 9 日 ~ 10 日, 京都

平山聞一, 穴田貴久, 宮武尚央, 土屋香織, 中村雅典, 高橋 哲, 鈴木 治. リン酸オクタカルシウムによる骨再生能の解明 ~ 特に細胞応答性について ~. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会. 2015 年 11 月 9 日 ~ 10 日, 京都

平山聞一, 穴田貴久, 宮武尚央, 土屋香織, 中村雅典, 高橋 哲, 鈴木 治. リン酸オクタカルシウム骨再生材料の埋入早期における生体反応. 第 69 回口腔科学会総会, 2015 年 5 月 15 日 ~ 17 日, 大阪

江副祐史, 穴田貴久, 山崎元, 半田拓人, 小林司史, 高橋哲, 鈴木治. 加水分解処理されたリン酸オクタカルシウム (OCP) 析出ゼラチン複合担体の生体材料学的評価. 第 14 回日本再生医療学会総会, 2015 年 3 月 19 日 ~ 21 日, 横浜

千葉晋平, 穴田貴久, 齋藤慶介, 宮武尚央, 鈴木堅太郎, 保坂正美, 今泉秀樹, 井樋栄二, 鈴木治. リン酸オクタカルシウム/ゼラチン複合体の家兎脛骨骨欠損における骨置換促進能の検討. 第 36 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会, 2015 年 2 月 7 日, 仙台
鈴木 治. 骨置換再生能を有するリン酸八カルシウム (OCP) ベース骨代替材料. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014 年 7 月 26 日, 大阪

石河理紗, 穴田貴久, 佐々木啓一, 鈴木治. ラット頭蓋冠臨界骨欠損の骨再生におけるゼラチン/OCP 複合体埋入の有効性. 平成 26 年度春季第 63 回学術講演会. 2014 年 4 月 12 日 ~ 13 日, 東京

〔図書〕(計 2 件)

Miyazaki T, Suzuki O. Royal Society of Chemistry. 「Calcium: Chemistry, Analysis, Function and Effects. Chapter 8: Using Fluorescent Polyanions to Assay for Osteoclastic Calcium-Resorption Activity」, 2015, 111-125 ページ

埴 隆夫, 新家光雄, 鈴木 治, 成島尚之, 中野貴由, 吉川秀樹, 石原一彦, 中村美穂, 高野直樹, 多根正和, 小林千悟, 池田勝彦, 上田恭介, 富代光陽, 岡崎義光, 萩原幸司, 稗田純子, 浜田賢一, 仲井正昭. 日本金属学会 (編) 「バイオマテリアル研究の最前線」Ca 欠損ハイドロキシアパタイトへの転換プロセスが 関与する OCP の骨形成促進作用— OCP の骨伝導能発現のメカニズム—, 2014, 125-126 ページ

〔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
<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 治 (SUZUKI, OSAMU)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 60374948

(2) 研究分担者

井樋 栄二 (ITOI, EIJI)
東北大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 80193465

増本 博 (MASUMOTO, HIROSHI)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・教授
研究者番号: 50209459

穴田 貴久 (ANADA, TAKAHISA)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 30398466

川井 忠 (KAWAI, TADASHI)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号: 50547263

(3) 連携研究者

新井史人 (ARAI, FUMIHITO)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90221051