

人工骨材料(リン酸八カルシウム材料)

*¹東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野, *²東北労災病院

鈴木 治*¹, 井樋 栄二*²

Osamu SUZUKI, Eiji ITOI



鈴木 治



井樋 栄二

1. はじめに

疾病や事故で失われた骨の欠損を充填し、組織の自己修復を支援する機能を有する人工合成の無機リン酸カルシウム材料が広く臨床応用されてきた¹⁾。特に骨の結晶の無機成分であるカルシウム(Ca²⁺)および無機リン酸(Pi)のイオンを基本成分とするハイドロキシアパタイト(HA)や炭酸アパタイト(CO₃Ap),あるいはβ-リン酸三カルシウム(β-tricalcium phosphate, β-TCP)は、整形外科や歯科の領域で骨補填材として用いられている²⁾。HAは一般的に焼結させて用いられ、生体内で比較的安定して存在する非吸収性材料であり、β-TCPおよびCO₃Apは生体内で分解されやすく新生組織と置換する傾向を持つ生体内吸収性材料に位置づけられている^{1),2)}。骨欠損の修復には、高い骨形成能を有する自家骨の移植あるいは自家骨と人工材料の併用がまだ第一選択であるが^{3),4)}、健全部位からの骨採取による二次的侵襲や採取量に制限があることから、安定供給が可能な人工合成のリン酸カルシウム材料が一定の割合で使用されている。

筆者らは、HAよりも小さい分子量の材料であるリン酸八カルシウム(octacalcium phosphate, OCP)の人工骨応用を検討してきた⁵⁾。OCPは骨伝導性を示し、また、生体内で吸収され骨に置換される性質を持つ⁵⁾。骨伝導とは、骨誘導との対比で同所性に骨が直接材料に線維性被膜を介することなく結合できる性質と定義される¹⁾。OCPは近年、生体骨の石灰化開始部位に非コラーゲン性タンパク質と共

存することが示され⁶⁾、生物材料としての観点からも注目されている。近年、OCPの骨補填材としての有用性が認識され、筆者(鈴木)が開発に関わったOCP骨補填材〔OCP/collagen(ボナーク[®], 東洋紡)〕が歯科領域において使われ始めている⁷⁾。本稿では、OCP骨補填材の性質のうち、筆者らがこれまでに明らかにしてきたOCPの骨形成の特徴と、生体材料学的観点における骨形成のメカニズムを述べるとともに、新しい人工材料としての可能性について考えてみたい。

2. OCPの化学的性質について

表1にOCP, HAおよびβ-TCPのリン酸カルシウム材料としての基本情報を示す。OCPは水溶液中から析出するHAの中間体として形成され⁸⁾、骨の無機成分である骨アパタイト結晶の前駆体に位置づけられる物質である⁹⁾。カルシウム/リン(Ca/P)モル比はHAやβ-TCPよりも小さく、生理的pH環境下の溶解性はHA<β-TCP<OCPの順となる⁹⁾。β-TCPと同様に生体内吸収性材料に分類される。一方、ヒト血清はOCPに関して飽和であると見積もられており¹⁰⁾、OCPが生体内に置かれても単純溶解はせず、後述するように細胞性の吸収メカニズムが生じて生体内吸収性を示すことがわかっている⁵⁾。OCPの結晶構造は、HAに類似の化学組成を持つアパタイト層とリン酸水素カルシウム2水和物(dicalcium phosphate dihydrate, DCPD)に類似した水を多く含む水和層の積層構造からなる⁹⁾。そのため、HAに高い構造類似性を持つリン酸カルシウム材料である。HAの前駆体であるOCPは不可逆的にHAに加水分解して相転移することがわかっており、その過程においてはOCPとHAの連続相のみから構成され、他のリン酸カルシウム成分は形成されない特徴がある¹¹⁾。OCPが加

■ 著者連絡先

東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野
(〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町4-1)
E-mail. suzuki-o@tohoku.ac.jp

表1 OCPおよび関連するリン酸カルシウム材料の化学組成と生体内での挙動

材料名(英文名)	略名	化学式	Ca/Pモル比	生体内挙動
octacalcium phosphate	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	吸収性
hydroxyapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	非吸収性 (焼結体)
β -tricalcium phosphate	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	吸収性

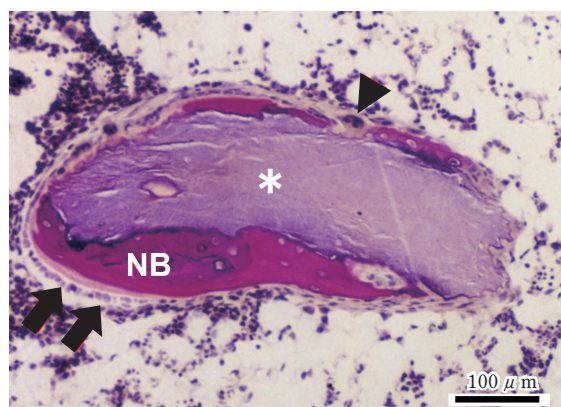


図1 家兎大腿骨骨欠損へ埋入されたOCP顆粒(500~1,000 μm)周囲の埋入後8週における骨形成非脱灰標本。骨芽細胞がOCP表面に並び、石灰化骨の形成を開始している(➡)。*: OCP顆粒。NB: 新生骨。破骨細胞様細胞がOCP表面を直接吸収する部位も観察される(▶)。Bar = 100 μm 。Elsevierから許可を得て、文献15より改変転載。

水分解して形成されるHAは理論的なCa/Pモル比1.67よりも小さいCa/Pモル比を有し、骨アパタイト結晶に類似の組成を持つCa含有量が少ないタイプのHA[Ca欠損HA(Ca-deficient HA, CDHA)]に転換する^{11)~13)}。

3. OCPの骨形成の特徴について

著者らは先に、OCPが生理的骨形成における骨アパタイト結晶の前駆体であるなら、人工合成のOCPを骨欠損部や骨近傍へ埋入すれば、前駆体の機能を代替し骨形成が促進される可能性があると考え、マウス頭蓋冠を用いて実験的に理論組成を有するHAやCDHA材料などとの比較を行って、OCPが最も高い骨伝導性を示すことを実際に確認した¹⁴⁾。図1に家兎大腿骨骨欠損に埋入したOCP顆粒の周囲で観察されたヘマトキシリン・エオジン(HE)染色像による骨形成の様子を示す(非脱灰標本)^{15),16)}。骨芽細胞がOCP顆粒表面に整列し、OCP顆粒表面から石灰化骨形成を開始している部位が観察される。また、多核巨細胞がOCP表面に接し、材料を直接吸収していると思われる部位もある。この多核巨細胞は非脱灰標本を用いた別の研究から、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)陽性の破骨細胞様細胞であることが確

認されている¹⁶⁾。さらに、OCP顆粒自体に認められるヘマトキシリン好性の部位は、生化学およびプロテオームの手法を用いた解析から、OCP表面ならびにOCPの結晶間隙に集積した α 2HS糖タンパク質などの複数の血清由来のタンパク質と一致していることが確かめられた^{17),18)}。

図2は、ラット脛骨の骨欠損に埋入したOCP顆粒周囲で観察されたHE染色による骨形成およびオステオカルシン(OCN)免疫染色を示す(脱灰標本)¹⁹⁾。上述したヘマトキシリン好性のOCP顆粒の部位に一致して非コラーゲン性タンパク質であるOCNも局在していることが示された¹⁹⁾。近年、OCNはげっ歯類およびヒト骨の石灰化開始部位に存在すること、さらには、その石灰化開始部位にはOCP結晶が存在し、HA結晶形成の核となっていることが見いだされている⁶⁾。OCNはHAに高い親和性を持つことが解明されたタンパク質であるが²⁰⁾、筆者らの研究からは、OCNはOCP埋入体に直接集積することから、骨芽細胞によるOCP上での骨形成促進に寄与する可能性が示唆されるが、詳細なメカニズムについては今後の検討課題である。

4. OCPの骨形成促進メカニズムについて

OCPの骨形成のメカニズムを明らかにするため、*in vivo*

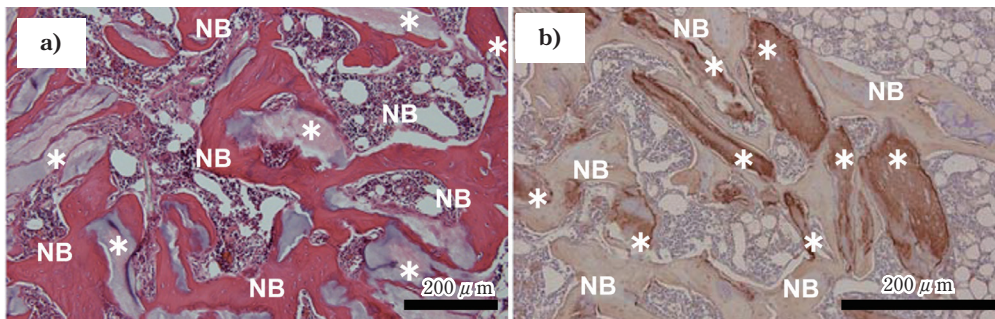


図2 ラット脛骨骨欠損へ埋入されたOCP顆粒(300~500 μm)周囲の埋入後8週における骨形成
 a)ヘマトキシリン・エオジン染色像, b)オステオカルシン免疫染色像。脱灰標本。*:OCP顆粒。NB:新生骨。
 OCP顆粒が吸収され骨との置換が進んでいる(a)。OCPの部位に一致してオステオカルシンが局在している。
 Bars = 200 μm (a), 200 μm (b)。Elsevierから許可を得て、文献19より改変転載。

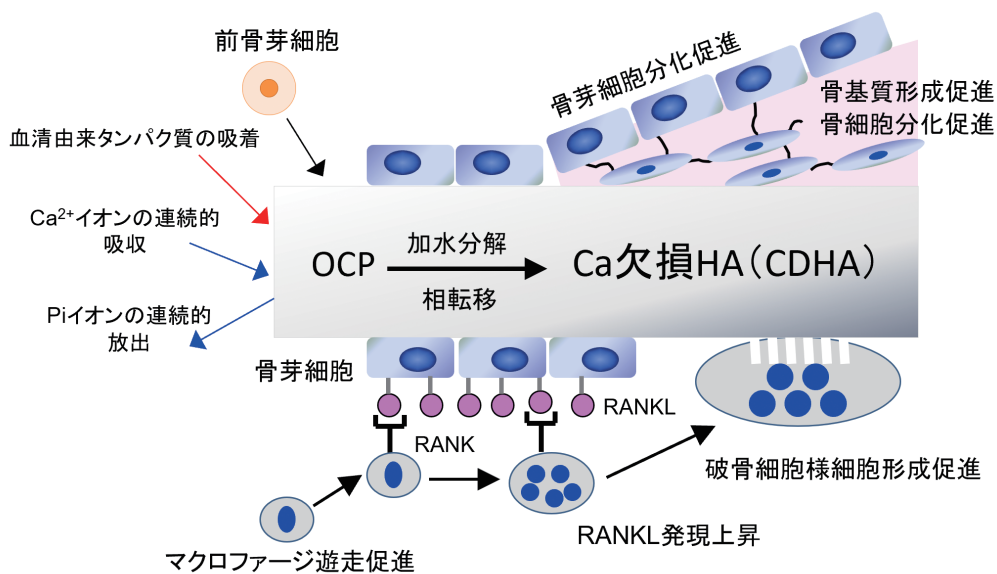


図3 実験的証拠に基づくOCPによる骨形成促進メカニズムの概念図
 Elsevierから許可を得て、文献21より改変転載。

および *in vitro* の両面から OCP の生体活性について検討してきた。図3にこれら一連の研究による実験的証拠に基づき取りまとめた OCP の骨形成のメカニズムを示す²¹⁾。OCP は、①マウス骨髄由来間質細胞あるいはマウス骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進し、その分化は OCP の用量依存的に増大する^{22),23)}、②マウス骨髄由来細胞(破骨細胞前駆細胞である骨髄マクロファージを含む細胞)とマウス骨髄由来骨芽細胞との共存培養において、破骨細胞形成因子(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)を添加することなく、骨芽細胞自身の

RANKL 発現を増大させることにより破骨細胞形成を促進する²⁴⁾、③マクロファージの OCP への遊走を促進する²⁵⁾、④OCP は *in vitro* で間葉系幹細胞(IDG-SW3)の骨細胞への分化を促進し²⁶⁾、*in vivo* で骨基質に埋め込まれた骨細胞には直接接しない離れた位置から、骨細胞の初期分化(ポドプラニンの発現)を促進する²⁷⁾。また、図3には含めていないが、⑤OCP は *in vitro* でヒト臍帯静脈内皮細胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)の血管様管腔構造形成を促進し、*in vivo* のラット頭蓋冠臨界径骨欠損への埋入では、骨再生に先立ち血管新生を促進する²⁸⁾。これら

骨組織に関連する細胞群の活性化は、いずれもOCPが加水分解してHA (CDHA) へ相転移する際に誘導されるCa²⁺およびPiのイオンの出入りに関連して生じることが明らかとなった^{11)~13), 21)~28)}。

5. OCP骨補填材について

前述したように、OCPは骨組織に関連した細胞の活性化を有する材料であると言えるが、臨床応用に際しての課題として賦形性が挙げられる。表1に示す化学式にあるように、OCPは多量の水(結晶水)を含むため、加熱により結晶構造が壊れやすく、HAやβ-TCPと異なり同一相として焼結できない。そのため、生体由来高分子や合成の生体吸収性高分子材料との複合化が試みられてきた⁵⁾。OCP/collagen (OCP/Col) は、OCP単体を含めた基礎的な研究、引き続いて行われた臨床研究および企業主導治験を経て高い骨再生能が確認され、歯科領域における骨補填材として最近上市された⁷⁾。コラーゲンの熱変性産物であるgelatin (Gel) との複合体 (OCP/Gel) は、まだ基礎研究段階にあるが家兎脛骨規格化骨欠損などへ骨補填材としての応用が研究されている²⁹⁾。その他にはpoly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) との複合体³⁰⁾や、他の研究グループによりOCP単体による成形体ブロック³¹⁾の開発も試みられている。

6. おわりに

無機材料の人工骨のひとつとして最近までに多くの研究データが蓄積されてきたOCP材料の性質を骨形成能およびその促進メカニズムの観点から取りまとめた。今後、整形外科領域における四肢骨の骨欠損への応用や、骨形成を必要とする医科領域における種々の骨欠損埋入による基礎的な実験研究を通じた非臨床成績の蓄積および骨形成の検証が進むことで、OCP材料の臨床応用が広がることを期待している。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Oyane A, Wang X, Sogo Y, et al: Calcium phosphate composite layers for surface-mediated gene transfer. *Acta Biomater* **8**: 2034-46, 2012
- 2) 石川邦夫: 顎骨再建材料ルネサンス～骨組成骨補填材を中心に～. *日歯理工会誌* **39**: 1-4, 2020
- 3) 日本整形外科学会移植・再生医療委員会: 委員会報告 整形外科における組織移植の現状(2010-2014年): 日本整形外科学会認定研修施設を対象としたアンケート集計結果. *日整形会誌* **90**: 526-31, 2016
- 4) 井上和也, 中島世市郎, 中野旬之, 他: オスフェリンDENTAL

の臨床応用. *日歯理工会誌* **39**: 29-32, 2020

- 5) Suzuki O, Shiwaku Y, Hamai R: Octacalcium phosphate bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials. *Dent Mater J* **39**: 187-99, 2020
- 6) Simon P, Grüner D, Worch H, et al: First evidence of octacalcium phosphate@osteocalcin nanocomplex as skeletal bone component directing collagen triple-helix nanofibril mineralization. *Sci Rep* **8**: 13696, 2018
- 7) Kawai T, Kamakura S, Matsui K, et al: Clinical study of octacalcium phosphate and collagen composite in oral and maxillofacial surgery. *J Tissue Eng* **11**: 2041731419896449, 2020
- 8) Meyer JL, Eanes ED: A thermodynamic analysis of the secondary transition in the spontaneous precipitation of calcium phosphate. *Calcif Tissue Res* **25**: 209-16, 1978
- 9) Brown WE, Mathew M, Tung MS: Crystal chemistry of octacalcium phosphate. *Prog Cryst Growth Charact* **4**: 59-87, 1981
- 10) Eidelman N, Chow LC, Brown WE: Calcium phosphate saturation levels in ultrafiltered serum. *Calcif Tissue Int* **40**: 71-8, 1987
- 11) Suzuki O, Yagishita H, Yamazaki M, et al: Adsorption of bovine serum albumin onto octacalcium phosphate and its hydrolyzates. *Cells Mater* **5**: 45-54, 1995
- 12) Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T, et al: Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* **27**: 2671-81, 2006
- 13) Suzuki O, Kamakura S, Katagiri T: Surface chemistry and biological responses to synthetic octacalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **77**: 201-12, 2006
- 14) Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y, et al: Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med* **164**: 37-50, 1991
- 15) Suzuki O: Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials. *Jpn Dent Sci Rev* **49**: 58-71, 2013
- 16) Imaizumi H, Sakurai M, Kashimoto O, et al: Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcif Tissue Int* **78**: 45-54, 2006
- 17) Suzuki O, Nakamura M, Miyasaka Y, et al: Maclura pomifera agglutinin-binding glycoconjugates on converted apatite from synthetic octacalcium phosphate implanted into subperiosteal region of mouse calvaria. *Bone Miner* **20**: 151-66, 1993
- 18) Kaneko H, Kamiie J, Kawakami H, et al: Proteome analysis of rat serum proteins adsorbed onto synthetic octacalcium phosphate crystals. *Anal Biochem* **418**: 276-85, 2011
- 19) Miyatake N, Kishimoto KN, Anada T, et al: Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics. *Biomaterials* **30**: 1005-14, 2009
- 20) Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, et al: Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature* **425**: 977-80, 2003
- 21) Suzuki O: Evolution of octacalcium phosphate biomaterials, Chapter 1. In: *Octacalcium Phosphate Biomaterials*. Suzuki O, Insley G, ed. Woodhead Publishing-ELSEVIER, UK, 2019, 1-15
- 22) Anada T, Kumagai T, Honda Y, et al: Dose-dependent

- osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* **14**: 965-78, 2008
- 23) Sato T, Anada T, Hamai R, et al: Culture of hybrid spheroids composed of calcium phosphate materials and mesenchymal stem cells on an oxygen-permeable culture device to predict in vivo bone forming capability. *Acta Biomater* **88**: 477-90, 2019
- 24) Takami M, Mochizuki A, Yamada A, et al: Osteoclast differentiation induced by synthetic octacalcium phosphate through receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblasts. *Tissue Eng Part A* **15**: 3991-4000, 2009
- 25) Hirayama B, Anada T, Shiwaku Y, et al: Immune cell response and subsequent bone formation induced by implantation of octacalcium phosphate in a rat tibia defect *RSC Adv* **6**: 57475-84, 2016
- 26) Sai Y, Shiwaku Y, Anada T, et al: Capacity of octacalcium phosphate to promote osteoblastic differentiation toward osteocytes in vitro. *Acta Biomater* **69**: 362-71, 2018
- 27) Saito S, Hamai R, Shiwaku Y, et al: Involvement of distant octacalcium phosphate scaffolds in enhancing early differentiation of osteocytes during bone regeneration. *Acta Biomater* **129**: 309-22, 2021
- 28) Kurobane T, Shiwaku Y, Anada T, et al: Angiogenesis involvement by octacalcium phosphate-gelatin composite-driven bone regeneration in rat calvaria critical-sized defect. *Acta Biomater* **88**: 514-26, 2019
- 29) Chiba S, Anada T, Suzuki K, et al: 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**: 2833-42, 2016
- 30) Oizumi I, Hamai R, Shiwaku Y, et al: Impact of simultaneous hydrolysis of OCP and PLGA on bone induction of a PLGA-OCP composite scaffold in a rat femoral defect. *Acta Biomater* **124**: 358-73, 2021
- 31) Sugiura Y, Munar ML, Ishikawa K. Fabrication of octacalcium phosphate block through a dissolution-precipitation reaction using a calcium sulphate hemihydrate block as a precursor. *J Mater Sci Mater Med* **29**: 151, 2018