

インジェクタブル自己硬化型水酸アパタイト／コーゲン骨ペーストの作製

メタデータ	言語: en 出版者: 公開日: 2019-07-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/20276

「博士学位請求論文」審査報告書

審査委員 (主査) 理工学部 専任教授

氏名 相澤 守 ⑩

(副査) 理工学部 専任教授

氏名 長尾 憲治 ⑩

(副査) 理工学部 専任教授

氏名 渡邊 友亮 ⑩

(副査) 物質・材料研究機構 グループリーダー

氏名 菊地 正紀 ⑩

1 論文提出者 佐藤 平

2 論文題名 Fabrication of injectable and self-setting hydroxyapatite/collagen bone paste
(インジェクタブル自己硬化型水酸アパタイト/コラーゲン骨ペーストの作製)

3 論文の構成

以下の六つの章から構成されている。

Chapter 1 Introduction

(第一章 緒言)

Chapter 2 Preparation of injectable hydroxyapatite/collagen paste using sodium alginate and influence of additives on its physical properties

(第二章 アルギン酸ナトリウムを用いた水酸アパタイト/コラーゲンペーストの調製と物性に対する添加物の影響)

Chapter 3 Influences of excess supplementation of calcium compounds on physical and biological properties of hydroxyapatite/collagen paste using sodium alginate

(第三章 アルギン酸ナトリウムを用いた水酸アパタイト/コラーゲンペーストの物理学的および

び生物学的性質に対するカルシウム化合物過剰供給の影響)

Chapter 4 Preparation of anti-decay self-setting paste of hydroxyapatite/collagen utilizing (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane

(第四章 (3-グリシドキシプロピル) トリメトキシシランを用いた水酸アパタイト/コラーゲンの非崩壊性自己硬化型ペーストの調製)

Chapter 5 Biological evaluation of hydroxyapatite/Collagen- (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane paste

(第五章 水酸アパタイト- (3-グリシドキシプロピル) トリメトキシシランペーストの生物学的評価)

Chapter 6 Conclusion

(第六章 結言)

4 論文の概要

我々の骨は水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) とコラーゲンを主成分とし、体内において重要な役割を担っている。そして、骨は疾病や怪我により小さな欠損が生じて、自己修復が可能な生体組織である。しかし、欠損の大きさが自己修復の限界を超えてしまうと骨が再生する前に癒痕組織が侵入し、骨が再生しない部位ができてしまう。そこで、癒痕組織の侵入を妨げ、骨の再生を助けるための補填材を用いた治療が必要となる。補填材を必要とする欠損の治療では、自分の腸骨や腓骨などを用いた自家骨移植が最も治療効果が高いと考えられており、医学歯学を通じてゴールドスタンダードとなっている。なぜならば、自家骨移植は細胞を含めた患者自身の骨を移植するので、拒絶反応が起きないことに加え、移植骨に含まれた細胞や細胞外基質中からサイトカインなどが供給されて骨の再生を支援し、最終的には骨代謝に取り込まれるからである。しかし、自家骨移植は骨を採取するための手術が必要になること、採取する骨の大きさや形に制限があること、術後の採取部位に疼痛が生じることなどの問題がある。そこで、これらの問題を解決するために人工の骨補填材、すなわち人工骨が自家骨の補助として用いられている。

人工骨の素材に注目すると、従来は骨の無機主成分である HAp を用いたセラミックスなどが人工骨として応用されてきたが、HAp は生体内吸収性が乏しく、埋入後、長期間にわたって体内に残存し、周囲骨との機械的性質の違いから埋入部位に二次的骨折を引き起こすことがあり問題となった。そのため、現在は生体吸収性を有する人工骨が長期の材料残留による二次骨折を防止するために望まれている。臨床応用されている生体吸収性材料の代表的なもの1つは β -リン酸三カルシウム (β -TCP) であり、体液に対して HAp よりも約 2 倍高い溶解度を有する。しかしながら、 β -TCP の生分解メカニズムはいまだ不明な部分があり、臨床試験では大量の β -TCP は破骨細胞による吸収が観察されなくなる事例が報告されている。近年はより高い生体吸収性を実現するために、より生体骨に近い HAp とコラーゲンの複合体が複数報告されている。その中のひとつに Kikuchi らによって報告された同時滴下法による HAp/コラーゲンナノ複合体 (HAp/Col) がある [1]。同時滴下法とは、温度を体温付近に保った反応容器に $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液、リン酸-コラーゲン溶液を同時に滴下することで、pH をコントロールしながら HAp/Col を合成する手法である。この手法では、自己組織化により整列したコラーゲン線維を持つ HAp/Col 複合体を得ることができる。この HAp/Col は、骨と類似のナノ構造および化学組成を有し、骨リモデリングプロセスに完全に取り込まれ、骨へと吸収置換されることが報告されており、現在日本では Refit®として臨床

応用されている。

一方で人工骨の使用形態としては緻密体、多孔体、顆粒、ペーストが臨床応用されている。中でもペースト状人工骨は医療の現場において、低侵襲手術が可能であること、不定形の骨欠損に容易に使用できること、手術中の加工が必要ないことなどから、従来の材料形態ではカバーできない治療法を可能にする有用な形態である。しかし、臨床応用されている骨ペーストは、硬化時の最終生成物が HAp であるため、前述の長期残存問題があり、生体吸収性のインジェクタブル人工骨が望まれている。

そこで、本研究では同時滴下法により合成された HAp/Col 骨類似ナノ複合体を用い、自己硬化型インジェクタブル HAp/Col ペーストの作製を目的とした。具体的には、HAp/Col 粉末をペーストの粉末部として、アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) 水溶液あるいは(3-グリシドキシプロピル)トリメトキシシラン (GPTMS)水溶液を硬化剤に用いたペーストを調製し、液成分の濃度および粉末/液成分比などについて検証を行なった。それらのペーストの物性試験より自己硬化型インジェクタブルペーストとして最適な条件を決定し、ペーストの生物学的評価を行なった。

各章の要約を以下に述べる。

第一章では、本論文の研究対象である HAp/Col および人工骨の現状について概説し、本研究を行なう意義について示した。

第二章では、Na-Alg を用いた HAp/Col ペーストの注入に最適な調製条件の決定を行なった。さらに、HAp/Col-Na-Alg ペーストの非崩壊性を向上させるために有機酸あるいはカルシウム化合物を添加し、その物性を調査した[2]。ペーストの最適条件の決定に際し、Na-Alg の粘度、HAp/Col と Na-Alg の質量比およびペーストの粉液比について、それぞれの条件でペーストを調製し、その物性を評価して検討した。その結果、80-120 cP の Na-Alg を使用し、HAp/Col : Na-Alg の質量比を 9:1、粉液比を 0.60 としたペーストが注入に最適であった。この条件で作製された HAp/Col-Na-Alg ペーストは、混練直後では注射器で押し出せる程度に流動性を有しており、およそ 1 日間インキュベータに静置すると Ca-Alg 架橋構造ができてその流動性は失われて、パテ状の性質を示した。さらに、長時間静置すると、よりペースト中で Ca-Alg 架橋構造の形成は進んだ。2 日以内にはペーストはゲル化し、4 日間静置後ではおよそ 400 KPa の圧縮強度を得た。しかし、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中でのペーストの安定性を調査したところ自壊することが明らかとなった。そこで Na-Alg のゲル化を促進させることを目的として、有機酸あるいはカルシウム化合物をペーストに添加した。有機酸はクエン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、グリコール酸を選択し、カルシウム化合物は炭酸カルシウム (CaCO_3)、クエン酸カルシウム (Ca-Cit)、硫酸カルシウム二水和物、水酸化カルシウムを選択した。有機酸の添加は、その種類によらずペーストの完全崩壊までの期間を延長したが、2 日以内に完全崩壊してしまい、十分な非崩壊性は得られなかった。一方で、カルシウム化合物は種類による違いが顕著に見られた。Na-Alg と Ca イオンの反応等量 (1.67 mmol/1g-Na-Alg) の 2 倍までカルシウム化合物を添加して調査した結果、 CaCO_3 および Ca-Cit は崩壊までの時間を延長したが、硫酸カルシウム二水和物および水酸化カルシウムは崩壊を抑制しないことを明らかとした。

第三章では、有機酸、 CaCO_3 および Ca-Cit はいずれも添加量に相関して崩壊までの時間を延長したが有機酸の増量は生体内において炎症を誘起する恐れがあるため、 CaCO_3 および Ca-Cit について、その添加量を増やして HAp/Col-Na-Alg ペーストの調製を行ない、非崩壊性を獲得できた

Ca-Cit 添加ペーストの細胞適合性を調査した[3]。JIS の規格に従って行なった崩壊性試験において、Na-Alg と Ca イオンの反応等量の 8 倍以上 Ca-Cit を添加したペーストは十分な非崩壊性を示すことが明らかとなった。また、Ca-Cit 添加非崩壊生ペーストは筒先内径 1.8 mm のシリンジから注入可能であることを確認した。そこで非崩壊性を示した Ca-Cit 添加ペーストに対してヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株 MG-63 を用いて細胞適合性を評価した。対照には HAp/Col 緻密体を用いた。細胞培養試験の結果、いずれのペーストも対照の HAp/Col 緻密体と同等の細胞増殖性を示すことが明らかとなった。

第三章までに述べた HAp/Col-Na-Alg ペーストは非崩壊性を獲得するために、HAp/Col に対しておよそ 30 mass% 以上の Ca-Cit の添加が必要であり、細胞毒性は示されなかったものの、HAp/Col の優れた性質が発揮されないことが予想された。そこで第四章では、シランカップリング剤である GPTMS を硬化剤とした HAp/Col-GPTMS ペーストの調製について述べた[4]。HAp/Col-GPTMS ペーストは HAp/Col 粉末と GPTMS 水溶液を混練することにより調製した。ペーストの調製にあたり、GPTMS 水溶液の濃度および紛液比 (P/L 比; g/cm³) を検討し、調製したペーストの混練時の様子、崩壊性、粘稠性、硬化挙動、圧縮強度を評価した。ペーストの混練時の様子は GPTMS 濃度によらず P/L 比 0.33-1.50 の範囲で成形可能かつ筒先内径 1.8 mm のシリンジで注入可能であった。ペーストの崩壊性は紛液比 0.33-1.50 で十分に低く、P/L 比 1.00 で最も低くなる傾向が見られた。粘稠性は P/L 比に大きく依存し、P/L 比が高くなるほどペーストの粘性が大きくなった。硬化挙動試験より、ペーストは混練開始から 30 分以内に急激に反応が進行し、その後緩やかに硬化していくことが明らかとなった。圧縮強度は GPTMS 濃度が高いほど大きくなる傾向が見られ、最も高い濃度を使用した場合は P/L 比 1.00 が最大の圧縮強度を示した。

第五章では、HAp/Col-GPTMS ペーストの生物学的な評価を行なった。細胞培養試験により HAp/Col-GPTMS ペーストは GPTMS 含有量が多いほど細胞の増殖を抑制することが示された。しかし、培地量の増量により毒性は見られなくなったことから、実際の使用に際しては体液循環により無視できることが示唆された。SD ラットの脛骨への移植実験において、破骨細胞によりペーストが吸収されることが示され、ブタ脛骨への長期埋入試験で骨へと完全置換されることが明らかとなった。

第六章では、第二章から第五章で得られた知見を総括し、研究全体を結論付けた。本論文で述べたインジェクタブルな自己硬化型 HAp/Col ペーストは生体吸収性骨ペーストとして有望な候補であると思われる。

5 論文の特質

本論文は、低侵襲治療を可能にする新しいペースト状人工骨の開発に係わる研究について論じており、その特質は i) 従来の骨ペーストと異なる二通りの硬化機序を提案したこと、ii) ペースト状人工骨として必要な条件を満たす HAp/Col ペーストの作製に成功したことにある。当該研究により開発されたペースト状人工骨は、今後、バイオセラミックスの分野に新しいエポックを築く研究として位置づけられる。

6 論文の評価

この研究成果を足掛かりとすることにより、超高齢社会に対応した高度医療・福祉に

資する低侵襲治療を実現することが可能であり、当該研究の工学的価値は非常に高い。

7 論文の判定

本学位請求論文は、理工学研究科において必要な研究指導を受けたうえ提出されたものであり、本学学位規程の手続きに従い、審査委員全員による所定の審査及び最終試験に合格したので、博士（工学）の学位を授与するに値するものと判定する。

以 上