

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

2018年度 理工学研究科

博士学位請求論文（要旨）

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)

応用化学専攻
佐藤 平

1 問題意識と目的

我々の骨は非化学量論水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) とコラーゲンを主成分とし、体内において体重の支持や臓器の保護、カルシウムの恒常性維持などの重要な役割を担っている。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が、欠損の大きさが自己修復の限界を超えてしまうと欠損の中央部には骨再生以前に癒痕組織が侵入し、骨が再生できなくなる。そこで、癒痕組織の侵入を妨げ、骨再生を助けるための補填材を用いた治療が必要となる。この時の補填材は、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。一方、自家骨移植は骨を採取するために健常な部位での二次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などの副作用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。

人工骨の素材として主流なのは、骨の無機主成分とよく類似した HAp セラミックスである。しかし、HAp セラミックス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ったり、成長期の個体に使用した場合に骨の成長に影響を及ぼす可能性が指摘されている。そのため、生体吸収性を有する人工骨が開発され、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。この代表例がオスフェリオン[®] (オリンパステルモバイオマテリアル株式会社) であり、人工骨市場の拡大に貢献している。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。2018 年には歯科治療限定であるが、炭酸含有水酸アパタイトがサイトランス・グラニュール[®] (株式会社ジーシー) という名称で生体吸収性材料として市販されている。一方、既に述べたとおり、骨は HAp とコラーゲンの複合体であることから、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。それらのうち、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) [1] は、HAp とコラーゲンの自己組織化により骨と類似のナノ構造および化学組成を有した材料であり、骨欠損部に埋入すると骨リモデリングプロセスに完全に取込まれ、骨へと吸収置換される。HAp/Col 多孔体は、日本で 2013 年より Refit[®] (HOYA Technosuegical 株式会社) として臨床応用されている。

一方、自己硬化型の骨ペースト (インジェクタブル人工骨) 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として人工骨市場を拡大させた。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 であり、さらに細胞などの侵入する気孔を持っていない

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、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。

2 構成及び各章の要約

本研究ではまず、HAp/Col を主成分とするインジェクタブルな骨ペーストを作製するために、Na-Alg を硬化剤に用い、その反応速度制御のために有機酸あるいはカルシウム化合物を添加したペーストを調製した。さらに、溶液中における非崩壊性の向上に有効であったカルシウム化合物に関して、過剰量添加を行ない、ペーストの物性に与える影響を調査した。次に、硬化剤にシランカップリング剤である GPTMS を用いた HAp/Col-GPTMS ペーストの物性を調査したのち、細胞適合性試験を経て、動物実験を行なった。従って、本博士学位請求論文は、以下の六つの章から構成されている。

Chapter 1 Introduction

(緒言)

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

(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

(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

(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

(水酸アパタイト/コラーゲン-(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

(結言)

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、本研究の意義を述べた。

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 90 : 10、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の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ペーストは自壊した。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 (CaCO₃)、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。有機酸添加は、全てペーストの完全崩壊までの期間を延長したものの、ペーストは最大2日で完全崩壊した。一方、カルシウム化合物はその溶解度による違いが見られた。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、CaCO₃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、添加量に相関して崩壊時間が延長された有機酸、CaCO₃、Ca-Citのうち、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ことから候補から除いた。残りの候補であるCaCO₃あるいはCa-Citを過剰に添加したHAp/Col-Na-Algペーストを調製し、それらのうち、十分な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に従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、崩壊率11.8 mass%以下と十分な非崩壊性を示すことが明らかとなった。また、Ca-Cit添加非崩壊性ペーストは筒先内径1.8 mmのシリンジで注入可能であることを確認した。非崩壊性を示したCa-Cit添加ペーストのヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株MG-63を用いた細胞適合性を評価したところ、いずれのペーストも対照として用いた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]。これは、第三章までに述べたHAp/Col-Na-Algペーストにおける非崩壊性担保のための、対HAp/Col比で最低約30 mass%のCa-Citの添加が、HAp/Colの優れた骨組織反応性を抑制することが懸念されたためである。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1.2 mass%以下と十分に低く、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で1.83 MPaと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。HAp/Col-GPTMSペーストは液体に関して閉鎖系である細胞培養試験ではGPTMSの一定濃度以上の溶出で細胞の増殖を抑制することが示されたが、開放系である*in vivo*ではGPTMSの溶出は体液循環により無視できると考えられた。SDラット脛骨への2週間までの移植実験では、HAp/Col-GPTMSペーストの毒性は認められず、破骨細胞による吸収と吸収部位への骨再生が示された。ブタ脛骨への12週間埋入試験では、ペーストの全身毒性が認められないことと、骨へと完全吸収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。本論文で述べた自己硬化型インジェクタブル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。

参考文献

- [1] M. Kikuchi et al., *Biomaterials*, **31**, 1705-1711 (2001).
- [2] T. Sato et al., *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **121**, 775-781 (2013).
- [3] T. Sato et al., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **28**:49 (2017).
- [4] T. Sato et al., *Journal of Asian Ceramic Societies*, **6**, 322-331 (2018).