

1998-0049

アパタイトセメントの骨置換速度に 影響を及ぼす因子の検討

(課題番号 H10-特別-017)

平成10年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)
総括研究報告書

平成11年4月

主任研究者 石川邦夫
(岡山大学歯学部助教授)

アパタイトセメントの骨置換速度に影響を及ぼす因子の検討

主任研究者 石川邦夫 岡山大学歯学部助教授

研究要旨

本研究は硬化するとアパタイトになるアパタイトセメントの高機能化研究の一環であり、硬化体が迅速に骨と置換される性質を持つ新規アパタイトセメントを開発する研究の第一段階としてアパタイトセメントの骨置換速度に影響を及ぼす因子を検討することを目的とした。

本研究期間内に1)焼結体アパタイトとアパタイトセメント硬化体の細胞学的検討、を行い、①アパタイトセメント硬化体は焼結体アパタイトと比較すると著しく高い吸収活性を示すが、骨と比較するとその吸収活性は約7.0分の1であり、現在のアパタイトセメントが骨と置換されるには相当の期間を要することが予測され、迅速に骨と置換する新規アパタイトセメントを設計する必要性が示唆された。

また、2)炭酸アパタイトへの誘導がセメント特性および骨置換性に及ぼす影響に関する検討、を行い、②セメント粉末に炭酸水素ナトリウムを添加すると、Bタイプ炭酸アパタイトが形成され硬化体の弱酸溶液への溶解速度は増大するが、硬化時間はやや遅延し、硬化体の機械的性質は低下することがわかった。また炭酸アパタイトセメントは従来のアパタイトセメントと比較するとセメント内部への骨侵入を増進することがわかった。しかし、この結果が組成の炭酸アパタイト化によるものか硬化体の低強度化に由来するヒビ等への骨伝導の結果に由来するものかは明らかにできなかった。

さらに、3)セメント硬化体の多孔体化がセメント特性および骨伝導性に及ぼす影響、を検討した結果、③連続気孔を形成したセメント硬化体内部には相当量の骨が侵入することがわかった。したがって、アパタイトセメント硬化体の骨置換速度を増大させるにはセメント硬化体を多孔性に設計することが極めて有用であることがわかった。

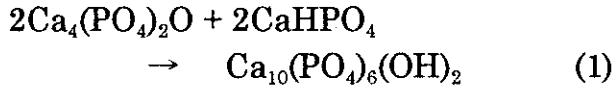
A. 研究目的

超高齢化社会の到来に伴い、骨再建術式が急増している。骨欠損部の再建においては自家骨移植が第一選択であるが、移植骨の採取に伴う新たな侵襲、採取できる骨の量や形態の制限、移植骨の吸収など、幾つかの問題が指摘されている。一方、骨の無機主成分はアパタイトであり、化学合成したアパタイトも優れた組織親和性と骨伝導

性を示すことからブロック状や顆粒状の焼結体アパタイトが骨補填材として臨床応用されている。しかし、ブロック状のアパタイトの場合には術中に骨欠損形態にあわせて整形する必要があり、顆粒状アパタイトの場合には術後の移動、流出が問題となっている。

アパタイトセメントは1983年にBrownとChowによって発明された生体活

性セメントで、石膏のように硬化特性を示し、硬化体が生体骨の無機主成分であるアパタイトになるため優れた組織親和性と骨伝導性を示す（式1）。



そのため、現在臨床応用されているブロック状および顆粒状アパタイトの問題点を一挙に解決する画期的な生体材料として期待され、欧州及び米国にて臨床応用が認可され、日本でも臨床治験が行われている。しかし、欧米のいずれにおいてもアパタイトセメント（以下従来型アパタイトセメントと呼ぶ）の臨床症例の増大に伴い予後不良症例などが報告されてきた。本研究者は従来型アパタイトセメントの臨床応用における問題点の原因と考えられる硬化時間および初期の機械的強さを改善した迅速硬化型アパタイトセメント（添付資料4～6）、さらに崩壊性（硬化前のセメントペーストが体液と接触すると硬化せず、崩れてしまう。図1参照）を改善した非崩壊型アパタイトセメント（添付資料7～12）を開発した。なお、欧米のアパタイトセメント組成は昨年迅速硬化型アパタイトセメントに変更さ

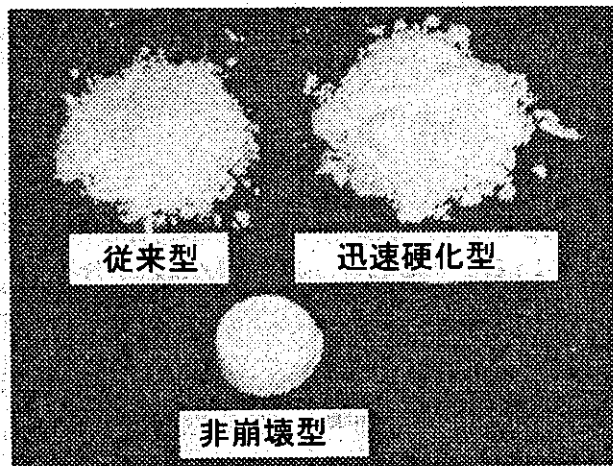


図1 各種アパタイトセメントを練和直後に血清に浸漬した場合の挙動

れた。（迅速硬化型も硬化前に多量の体液と接触すると硬化せず崩れてしまい、そのような場合は炎症反応を惹起すると考えられる。したがって、非崩壊型の臨床応用が望まれるが、最も臨床応用の認可基準が寛容である北米においても非崩壊型アパタイトセメントは現在認可されていない）

さて、硬化特性以外のアパタイトセメントの大きな特徴の一つは骨との置換である。骨には力学的機能以外にも骨髄機能などの生物学的機能があることを勘案すると理想的な骨欠損部の再建は骨による再建であり、アパタイトセメントに関して報告されている骨との置換はアパタイトセメントの有用性を飛躍的に増進させる可能性が高いと考えられる。

しかしながら、本研究者がこれまでに行った実験動物を用いた検討においては1年以内にアパタイトセメントが完全に骨と置換された例はなく、また迅速硬化型アパタイトセメント、非崩壊型アパタイトセメントの骨伝導性に関しても従来型アパタイトセメントと同様であり、迅速硬化型アパタイトセメント、非崩壊型アパタイトセメントの骨置換速度が従来型アパタイトセメントと比較してより迅速に骨置換されると期待される所見は全く見あたらない。従って、アパタイトセメントの骨置換には少なくとも数年単位の期間が必要と考えられる。

そこで本研究においてはアパタイトセメントの高機能化研究の一環であり、硬化体が迅速に骨と置換される性質を持つ新規アパタイトセメントを開発する研究の第一段階としてアパタイトセメントの骨置換速度に影響を及ぼす因子を検討することを目的とした。

具体的に本研究期間内には

- 1) アパタイトセメントが本当に骨と置換する可能性があるのかどうかを明らかにする目的で焼結体アパタイトとアパ

タイトセメント硬化体の破骨細胞による吸収性を検討する。

- 2) 現在のアパタイトセメント硬化体の組成を骨アパタイトのアパタイト組成である炭酸アパタイトに誘導し、炭酸アパタイトへの誘導がセメント特性および骨置換性に及ぼす影響を検討する。
 - 3) セメント硬化体の多孔体化がセメント特性および骨伝導性に及ぼす影響を検討する。
- ことを研究目的とした。

B. 研究方法

アパタイトセメントの調整

リン酸四カルシウムはリン酸水素カルシウム（ナカライテクス、京都）と炭酸カルシウム（ナカライテクス）を等モルで湿式混合し、電気炉中1500℃で24時間焼成後、室温まで急冷し調整した。調整したリン酸四カルシウムの固まりを乳鉢で粉碎後、乾燥シクロヘキサン（ナカライテクス）中に分散し遊星式ボールミル（Retsch PM4、Brinkman、NY）で粉碎し、平均直径を約10ミクロンに調整した。リン酸水素カルシウムは市販品を90%イソプロピルアルコールに懸濁し、遊星式ボールミルにて平均直径約1.1ミクロンまで粉碎した。等モルのリン酸四カルシウムとリン酸水素カルシウムを攪拌機で混合し、アパタイトセメントの基本構成とした。調整したアパタイトセメントは使用直前まで60℃に設定した減圧乾燥機で保管した。必要に応じてアパタイトセメントに炭酸水素ナトリウム（ナカライテクス）を添加した。アパタイトセメントの練和液は従来型アパタイトセメントの場合は蒸留水、迅速硬化型アパタイトセメントの場合は0.2モル濃度中性リン酸ナトリウム水溶液、非崩壊型アパタイトセメントの場合は0.5%アルギン酸ナトリウム（ナカライテクス）含有0.2

モル濃度中性リン酸ナトリウム水溶液とした。0.2モル濃度中性リン酸ナトリウム水溶液は0.2モル濃度の第一リン酸水素ナトリウム水溶液と0.2モル濃度の第二リン酸水素ナトリウム水溶液を37℃でpHが7.4になるように混合し調整した。また必要に応じて炭酸水素ナトリウム水溶液を添加した練和液を調整した。

細胞評価用アパタイトセメント硬化体の調整

従来型、迅速硬化型、非崩壊型アパタイトセメントを粉液比2.0で練和し、気泡形成を抑制する目的で、弱真空下でバイブレーターを用いペーストに振動を与え直径10mmの型枠に充填した。約1分間弱真空およびバイブレーターによる振動を与えた後、バイブレーターおよび真空を解除し、37℃相対湿度100%のインキュベーター内で24時間硬化させた。

焼結体アパタイトの調整

アパタイト粉末（太平化学）を約1.5MPaで加圧、粉末成形体を毎分5℃で加熱し、1200度にて2時間焼成、炉冷し調整した。

骨片の調整

定法に従い、ウシ大腿骨より調整した。

表面荒さの測定

レーザー式非接触表面荒さ計（SE-2300、コサカ実験機器）を用いて試料の平均表面荒さ（Ra）を測定した。なお、検出器にはPU-OS100を用いた。

破骨細胞の分離

10日齢の日本白色種家兔の大腿骨および脛骨より骨髄を採取（破骨細胞形成法）するとともに、破砕骨片を振動させ付着骨

芽細胞を採取（破骨細胞分離法）した。培養液中に懸濁した細胞から沈降法により分離した破骨細胞用細胞を実験に用いた。得られた破骨細胞用細胞の数は1 mL中に約 1×10^4 個であった。

破骨細胞の播種および培養

調整した各種アパタイトセメント硬化体、焼結体アパタイト、骨片をEOG滅菌し、直径1.0 mmの細胞播種用ウォールに設置、0.2 mLの培養液（10%牛血清、50 mg/mLアスコルビン酸、2 mmol/L β グリセロリン酸含有 α MEM）を添加した後に、破骨細胞様細胞懸濁液0.2 mLを播種した。

その後37度、5%炭酸ガス環境下のインキュベーターで48時間保存した。

形態観察

培養後の各試料は試料表面に接着していない細胞を除去する目的で0.1モル濃度のPBSで洗浄後、2.5%のグルタルアルデヒド含有0.1モル濃度のPBSを用い4℃で2時間固定した。N,N'ジメチルホルムアミド含有ナフトールAS-MX、レッドバオオレットLB塩、タートレートナトリウムより調整した色素を0.1規定酢酸ナトリウムバッファーでpH5.0とし、染色し、0.1規定水酸化ナトリウム水溶液で固定した。その後光学顕微鏡で観察した。

光学顕微鏡観察後の試料を2.5%グルタルアルデヒド、2%オスミニウム含有0.1モル濃度PBSを用いて室温で2時間再固定し、エタノールで脱水、臨界点乾燥し、SEM観察した。SEM観察により吸収窩と判断された面積はNIHイメージを用いて計測した。

組成分析

試料の組成は必要に応じて粉末X線回折、フーリエ変換分光光度計で分析した。粉末X線回折は理学Rint2000を用い、管電圧40 kV、管電流30 mAの条件で測定した。赤外吸収スペクトルはバイオラッド製FTS-40を用いて測定した。

アパタイトセメントの硬化時間の測定

アパタイトセメントの硬化時間はリン酸亜鉛セメントの硬化時間に関わるISO規格1566に準じて測定した。本法は直径1 mmのビカー針に400 gの加重を負荷し、ビカー針がセメント表面に痕跡を残せなくなった時間を硬化時間と定義している。なお、アパタイトセメントの粉末部と練和液との粉液比は3.5とした。また、規格では室温、30%以上の湿度で測定すると規格されているが、アパタイトセメントは生体内での臨床応用を目的としているために、インキュベーター内で測定した。その結果、温度は37℃、相対湿度は100%とした。試料数は一条件につき5~7とした。

アパタイトセメント硬化体の機械的強さ

アパタイトセメント硬化体の機械的強さの指標として間接引張強さを測定した。セメントを練和後に直径6 mm高さ3 mmの円柱状分割モールドに約1 MPaの圧力で充填し、インキュベーター内で24時間硬化させた。万能試験機を用いてクロスヘッドスピード毎分10 mmで試料を粉砕し、破壊値から間接引張強さを測定した。試料数は一条件につき10とした。

実験動物へのインプラント

実験動物としてはラット、家兎、ビーグル犬を用いた。定法に従い、ラットと家兎についてはネンブタールを用いて麻酔を施し、ビーグル犬についてはラボナールを用

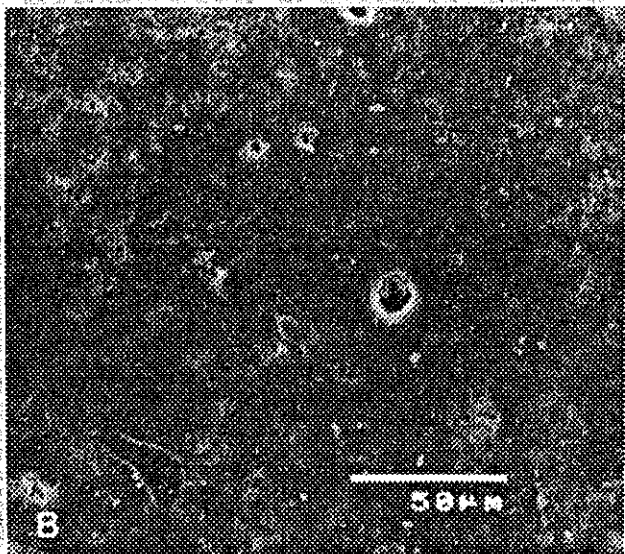
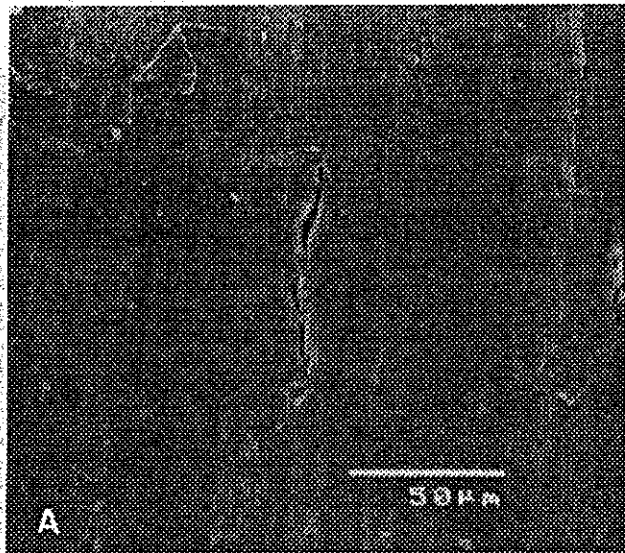


図2 試料表面のSEM像：
A 骨片 B 焼結体アパタイト
C アパタイトセメント

いて全身麻酔を施した。その後規格化ツイストドリルを用いて脛骨に骨欠損を形成し、同部をアパタイトセメントで再建した。

アパタイトセメントの多孔体化が骨置換速度に及ぼす影響を検討する際には、剣山状の気孔形成器中でアパタイトセメントを硬化させ、硬化体に 1 cm^2 あたり100個の直径 0.4 mm の連続気孔を形成し、同試料を骨欠損部にインプラントした。

組織学的評価

試料埋入後、所定の期間経過後に試料を周囲組織と一塊に摘出し、10%中性ホルマリンで固定、アルコール脱水し、ポリエステルレジンで包埋した。50ミクロンの研磨標本作製、トルイジンブルー染色し、光学顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

1. 破骨細胞によるアパタイトセメントの吸収活性について

図2に破骨細胞による吸収性を検討した各種アパタイトセメント、焼結体アパタイトおよび骨片の表面SEM像を示す。いずれの試料においても表面には直径50ミクロン以上の気孔が認められず、破骨細胞による吸収活性を検討する試料として適切であることがわかる。

表1には各試料の表面荒さを非接触表面荒さ計で測定した結果を示す。

表1 各種アパタイトセメント、焼結体アパタイト、骨片の表面荒さ

試料	Ra(μm)
従来型アパタイトセメント	1.72 ± 0.25
迅速硬化型アパタイトセメント	1.82 ± 0.27
非崩壊型アパタイトセメント	1.66 ± 0.10
焼結体アパタイト	1.78 ± 0.22
骨	0.33 ± 0.09

各種アパタイトセメントおよび焼結体アパタイトの表面荒さは約1.7ミクロンであり、著名な差異は認められなかった。一方、骨片の表面荒さは0.3ミクロンであり各種アパタイトセメントや焼結体アパタイトと比較しては滑沢であることがわかった。図3には各種試料の粉末X線回折パターンを示す。アパタイトセメントはいずれの場

合にも低結晶性のアパタイトに転換してい

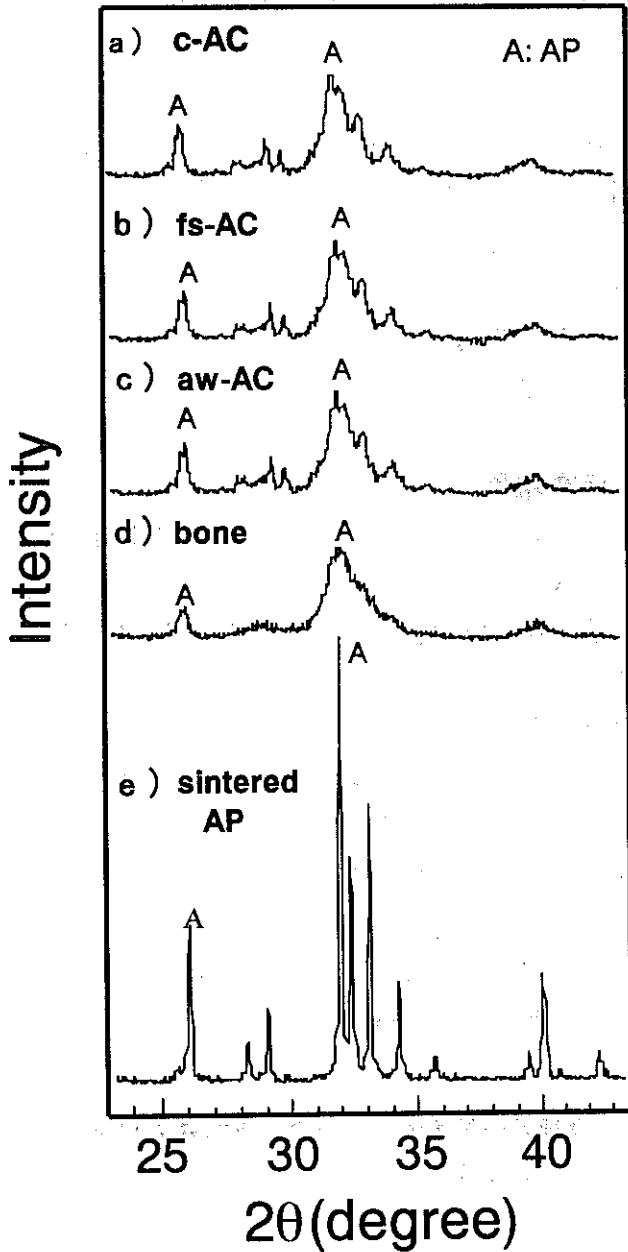


図3 粉末X線回折パターン a) 従来型アパタイトセメント硬化体 b) 迅速硬化型アパタイトセメント硬化体 c) 非崩壊型アパタイトセメント硬化体 d) 骨片 e) アパタイト焼結体

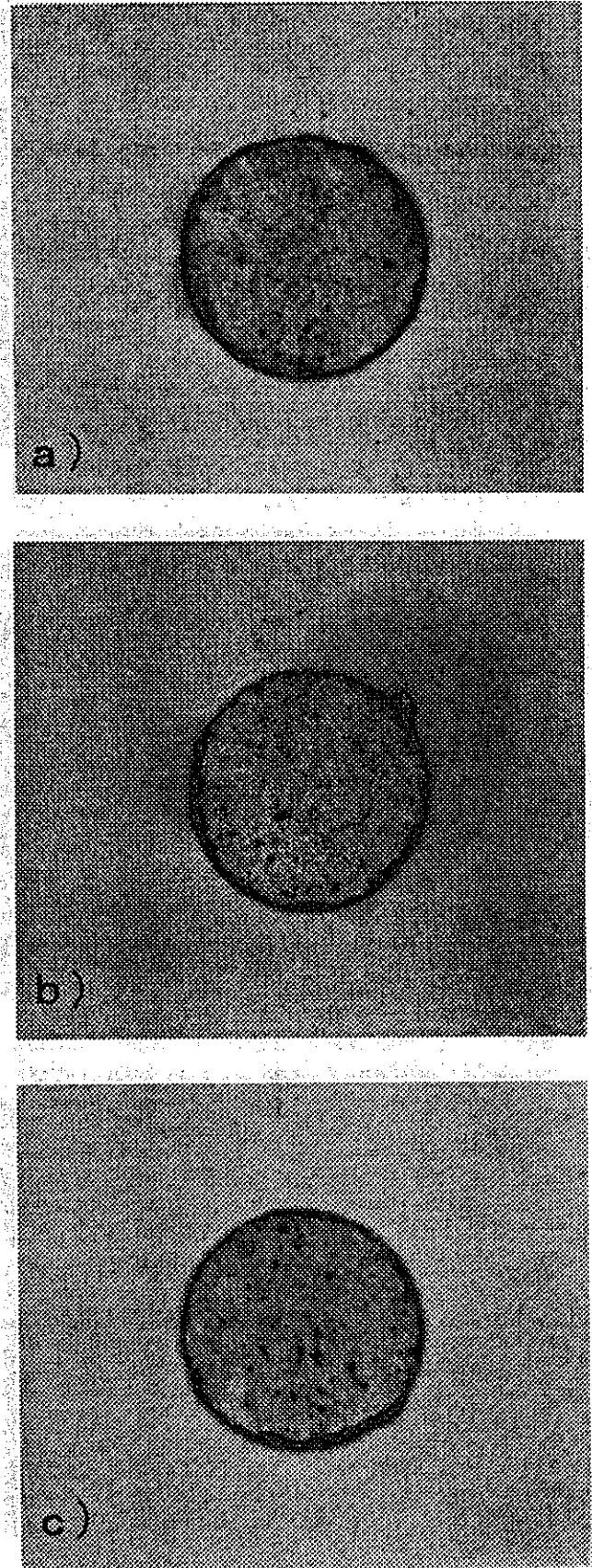


図4 TRAP染色後の試料 a) 骨片 b) 迅速硬化型アパタイトセメント硬化体 c) 焼結体アパタイト

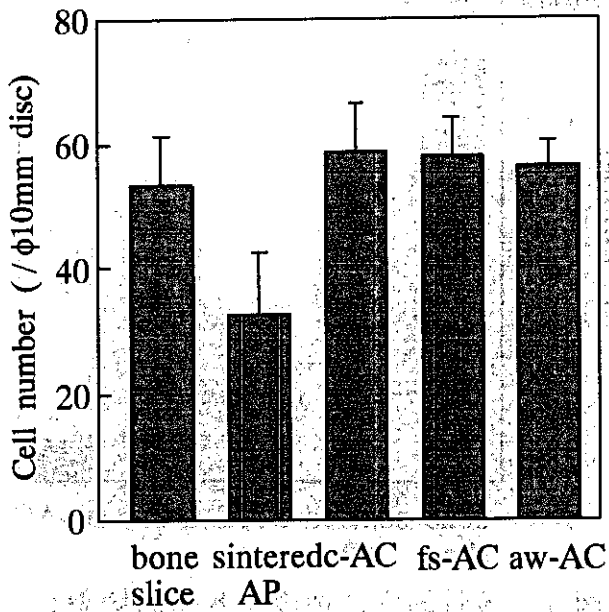


図5 各試料上に付着したTRAP陽性細胞の数

ることがわかる。また、未反応のリン酸四カルシウムがいずれの場合も検出された。一方、焼結体アパタイトは結晶性が極めて高く、不純物を含有していないことが確認された。

図4には各種アパタイトセメント硬化体、焼結体アパタイト、骨片上に破骨細胞を播種、MEM中で48時間培養し、TRAP染色した後の光学顕微鏡写真を示す。このように破骨細胞であると思われるTRAP染色陽性の細胞が多数観察された。

図5に直径10mmの試験片上に認められたTRAP陽性細胞であり、かつ細胞の直径が50ミクロン以上であるため破骨細胞と認められた細胞数を示す。試験片上に付着していた破骨細胞数は骨片およびアパタイトセメントにおいては約6.0個であり、有意な差異は認められなかったが、焼結体アパタイトでは約半数しか認められなかった。

図6には同試料のSEM観察像を示す。破骨細胞用細胞が試料表面に付着していることがわかる。

図7には各種アパタイトセメント、焼結体アパタイト、骨片表面に見られた吸収高のSEM像を示している。

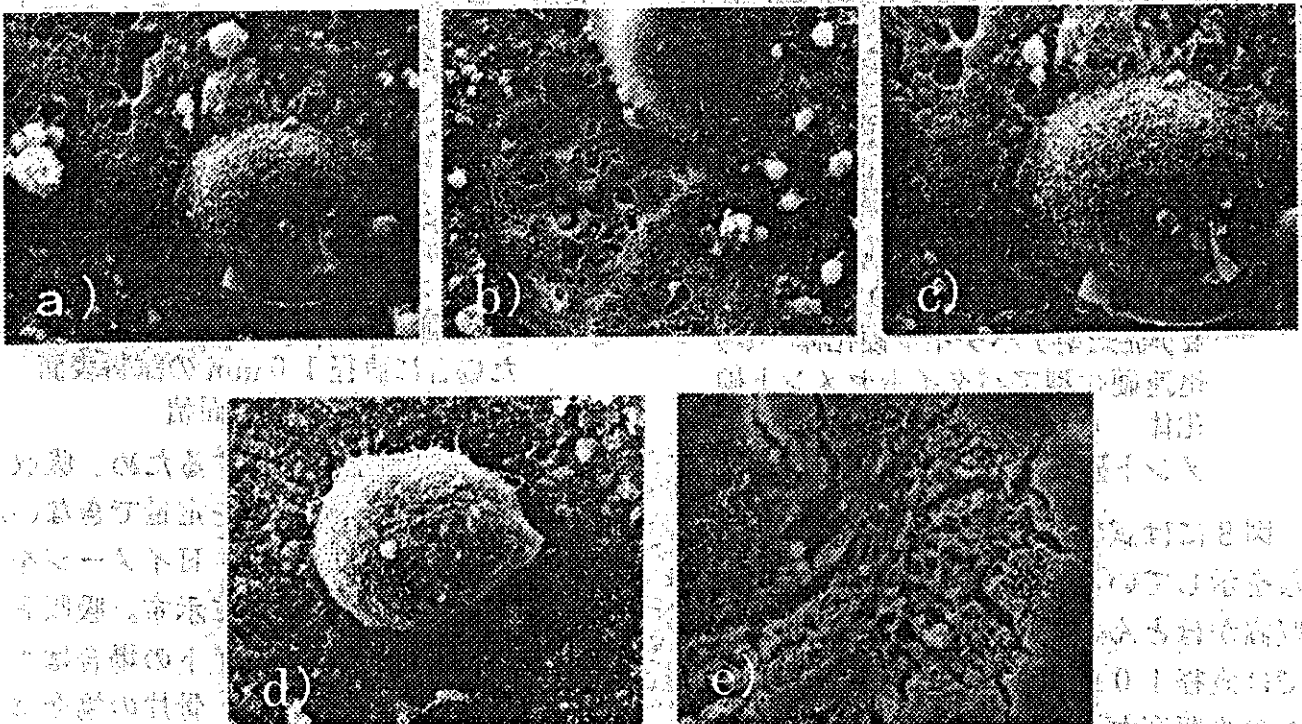


図6 破骨細胞を播種し、48時間培養した後の各試料の表面SEM像 (a) 従来型アパタイトセメント硬化体 (b) 迅速硬化型アパタイトセメント硬化体 (c) 非崩壊型アパタイトセメント硬化体 (d) 焼結体アパタイト (e) 骨片

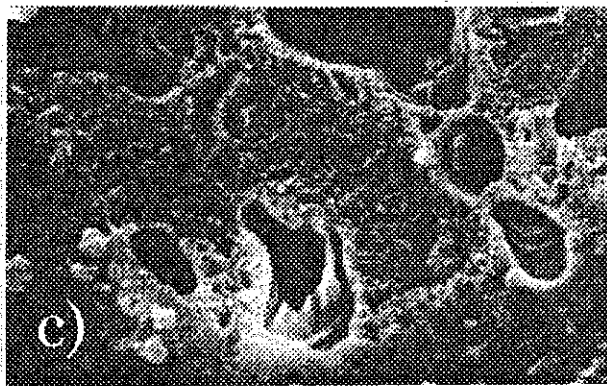
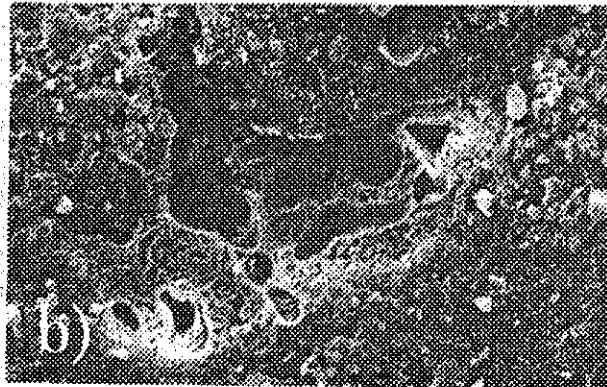
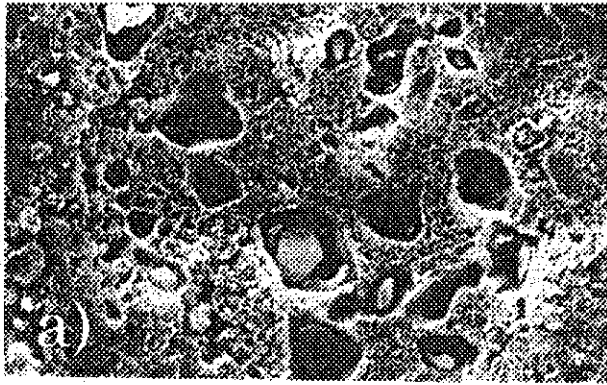


図7 破骨細胞播種後、48時間培養した場合の試料表面のSEM像
a)従来型アパタイト硬化体 b)迅速硬化型アパタイトセメント硬化体 c)非崩壊型アパタイトセメント硬化体

図8には試料表面に認められた吸収窩の数を示している。焼結体アパタイトには吸収窩がほとんど見られないのに対して骨片では直径10mmの試験片上に約700個もの吸収窩が認められた。一方、アパタイトセメントの場合は約55個の吸収窩が認められたが、アパタイトセメントの種類による吸収窩数の差異は認められなかった。

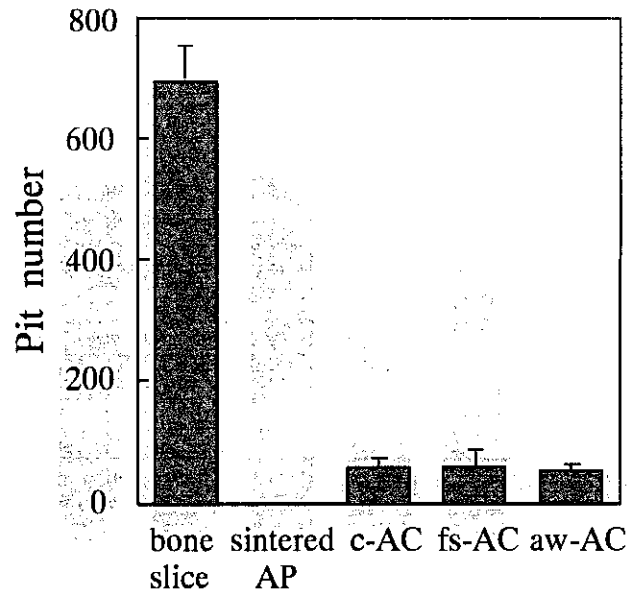


図8 破骨細胞播種後48時間培養した場合に直径10mmの試料表面に認められる吸収窩数

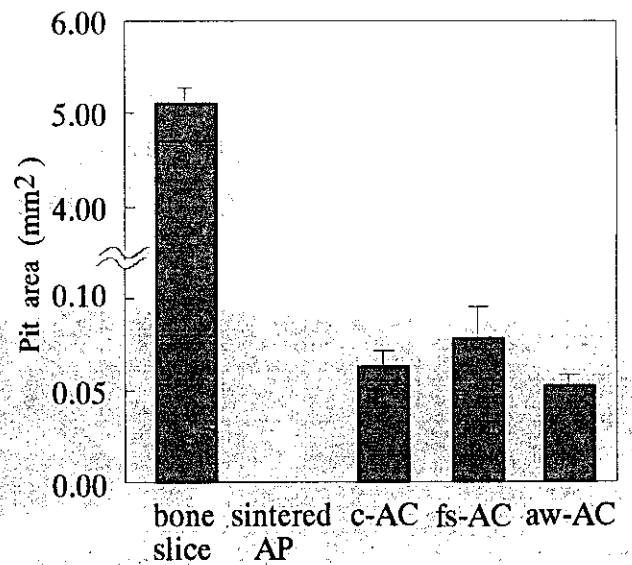


図9 破骨細胞播種後48時間培養した場合に直径10mmの試料表面に形成される吸収窩面積

破骨細胞は試料上を遊走するため、吸収窩数だけでは試料の吸収量を定量できない。そこで、吸収窩の面積をNIHイメージを用いて測定した結果を図9に示す。吸収窩数が0である焼結体アパタイトの場合は当然、吸収窩面積は0であり、骨片の場合は直径10mmの円形試験片上にあたり5mm²の吸収が認められた。アパタイトセメントの吸収窩面積は0.05mm²~0.1

mm²であり、吸収窩面積においてもアパタイトセメントの種類に依存する差異は認められなかった。

2. 炭酸アパタイトへの誘導がセメント特性におよぼす影響について

図10に添加した炭酸水素ナトリウムにおける炭酸基相当量とアパタイトセメント硬化体に含有された炭酸量の関係を示す。アパタイトセメントに添加した炭酸水素ナトリウム量が増大するにつれてほぼ比例的にアパタイトセメントに含有される炭酸基量が増大することがわかった。しかし、アパタイトセメント硬化体に導入された炭酸基量は炭酸水素ナトリウムで添加した炭酸量に比較して低い値であり、一部の炭酸基が二酸化炭素として蒸発したことがわかる。また、アパタイトセメントに炭酸水素ナトリウムを添加しなかった場合においてもアパタイトセメント硬化体に炭酸基が導入されていることがわかった。これはアパタイトセメントの練和中に空中の二酸化炭素を

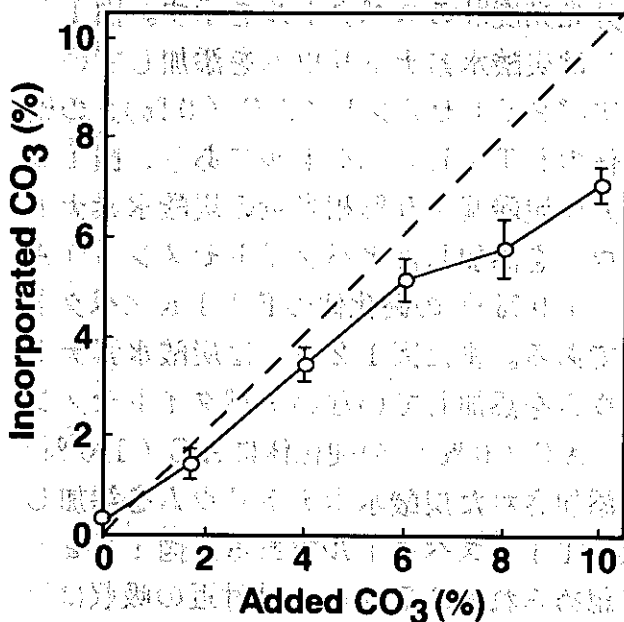


図10 アパタイトセメントに添加した炭酸基量とアパタイトセメント硬化体に含有された炭酸量の関係

吸収したためにアパタイトセメント硬化体に炭酸基が導入されたと考えられる。

図11には炭酸水素ナトリウムを添加した場合に得られるアパタイトセメント硬化

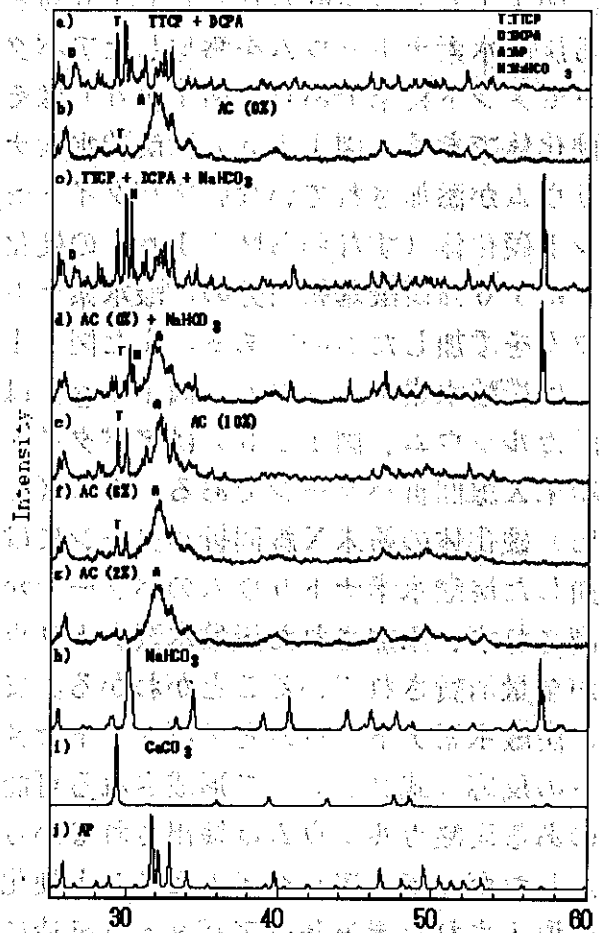
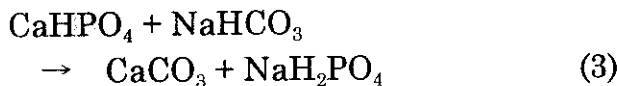
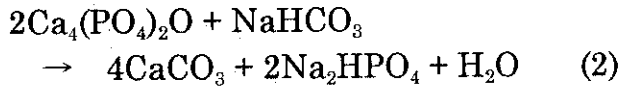


図11 粉末X線回折パターン a)アパタイトセメント粉末部 b)炭酸水素ナトリウムを添加していないアパタイトセメント硬化体 c)アパタイトセメント粉末部に炭酸水素カルシウムを添加したもの d)炭酸基を添加していないアパタイトセメント硬化体に炭酸水素ナトリウムを混合した粉末 e)炭酸基10%相当含有アパタイトセメント硬化体 f)炭酸基6%相当含有アパタイトセメント硬化体 g)炭酸基2%相当含有アパタイトセメント硬化体 h)炭酸水素ナトリウム i)炭酸カルシウム j)焼結体アパタイト

体の組成分析を目的とした粉末X線回折結果を示す。図11 a) は炭酸水素ナトリウムが添加されていないアパタイトセメント粉末であり、図11 b) はその硬化体である。図11 c) は炭酸基量として10%となる炭酸水素ナトリウムを添加したアパタイトセメント粉末であり、図11 d) はその硬化体である。図11 e) は炭酸水素ナトリウムが添加されていないアパタイトセメント硬化体（すなわち図11 b) の硬化体）に10%炭酸基相当分の炭酸水素ナトリウムを添加したものである。また図11 f) は炭酸水素ナトリウム、図11 g) は炭酸カルシウム、図11 h) はアパタイトの粉末X線回折パターンである。AC（10%）硬化体の粉末X線回折パターンには添加した炭酸水素ナトリウムのパターンが観測されず、添加された炭酸水素ナトリウムが全量消費されていることがわかる。また、炭酸水素ナトリウムとアパタイトセメントの反応（式2、3）で形成される可能性のある炭酸カルシウムは検出されなかった。したがって、アパタイトセメント硬化体に導入された炭酸基はアパタイト構造に導入されていると考えられる。



また、炭酸水素ナトリウムを導入した場合には導入していない場合に比較して練和24時間段階のアパタイトセメント硬化体により多量の未反応リン酸四カルシウムが確認された。したがって、アパタイトセメントへの炭酸水素ナトリウムの添加はアパタイト形成を抑制している可能性が示唆された。

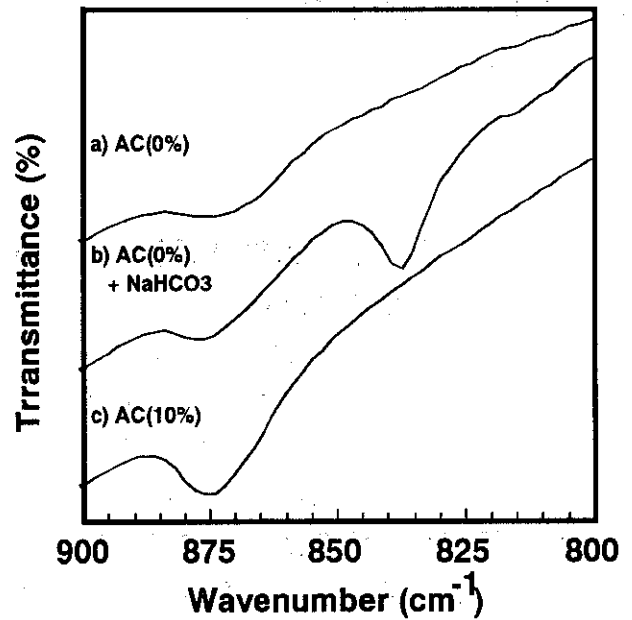


図12 赤外線分光スペクトル a) 炭酸基を添加していないアパタイトセメント硬化体 b) 炭酸基を添加していないアパタイトセメント硬化体に炭酸水素ナトリウムを添加した試料 c) 10%炭酸基相当分の炭酸水素ナトリウムを添加したアパタイトセメント硬化体

図12にアパタイト構造中に導入された炭酸基の同定を目的としたフーリエ変換赤外分光光度計のスペクトルを示す。図12 a) は炭酸水素ナトリウムを添加していないアパタイトセメント（AC（0%））の硬化体のFTIRスペクトルであり、図12 c) は炭酸基10%相当量の炭酸水素ナトリウムを添加したアパタイトセメント（AC（10%））の硬化体のFTIRスペクトルである。また図12 b) は炭酸水素ナトリウムを添加していないアパタイトセメント（AC（0%））の硬化体にAC（10%）に添加された炭酸水素ナトリウムを添加したFTIRスペクトルである。図12 a) に認められる875 cm⁻¹付近の吸収はHPO₄に由来する吸収である。この試料にAC（10%）に対応する炭酸水素ナトリウムを添加した試料のFTIRスペクトルで

ある図12b)には 875 cm^{-1} 以外に 830 cm^{-1} 付近にも新たな吸収が観測され 830 cm^{-1} 付近の吸収は炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) の CO_3 に起因する吸収であることがわかる。図12c)からは 830 cm^{-1} 付近の吸収が消失しており、粉末X線回折の結果とともに添加された炭酸水素ナトリウムが全量消費されていることを示している。また、 875 cm^{-1} 付近の吸収強度がAC(0%)と比較して大きくなっている。炭酸基がアパタイトのリン酸カラムに導入された場合には炭酸アパタイトの炭酸基由来の吸収がリン酸基由来の吸収と重なって 875 cm^{-1} 付近に現れることが知られていることから、炭酸水素ナトリウムをアパタイトセメントに導入した時に得られるアパタイトはBタイプの炭酸アパタイトであることがわかった。

表1は炭酸水素ナトリウムの添加量がアパタイトセメントの硬化時間に及ぼす影響をまとめたものである。炭酸水素ナトリウムを添加していない場合に比較して炭酸水素ナトリウムを添加するとやや硬化時間は遅延 ($p < 0.1$) したが炭酸基相当量として10%までの炭酸水素ナトリウムを添加しても2%の場合と比較して有意な遅延は認められなかった。

表1 炭酸水素ナトリウムの添加量がアパタイトセメントの硬化時間に及ぼす影響

導入炭酸基量 (%)	硬化時間 (分)
0.0	31.8 ± 0.3
2.0	39.7 ± 0.4
4.0	37.4 ± 3.2
6.0	39.4 ± 4.5
8.0	40.0 ± 5.2
10.0	41.6 ± 4.3

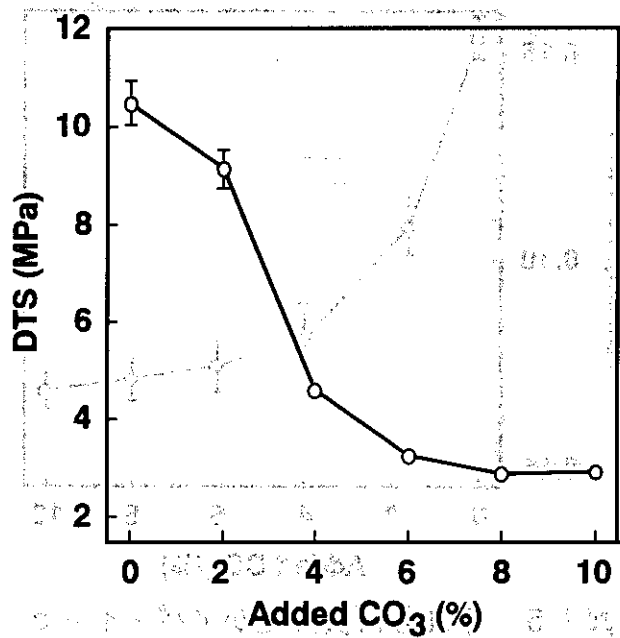


図13 添加した炭酸基量がアパタイトセメント硬化体のDTS値に及ぼす影響

アパタイトセメント硬化体の機械的強さに及ぼす影響の指標として測定した間接引張強さ(DTS)の測定結果を示す。炭酸基の導入に伴いDTS値が著明に低下することがわかった。

図14には形成されるアパタイトの結晶

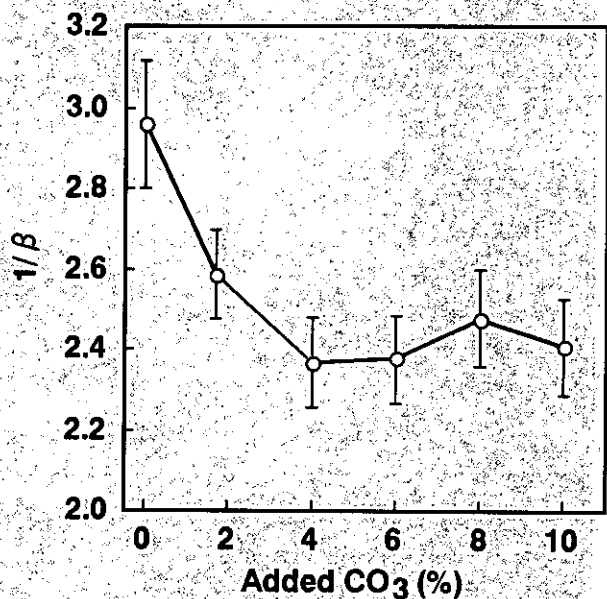


図14 添加した炭酸量がアパタイトセメント硬化体の結晶性(1/β)に及ぼす影響

図13に炭酸水素ナトリウムの添加がア

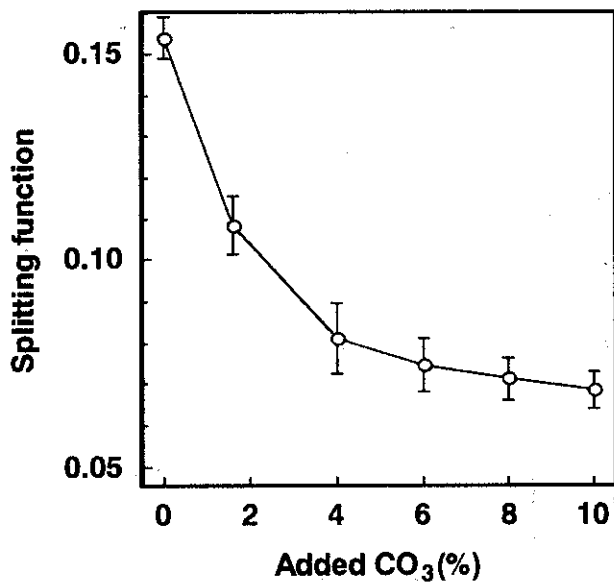


図15 添加した炭酸量がアパタイトセメント硬化体の結晶性 (Splitting function) に及ぼす影響

性の指標として粉末X線回折パターンから測定した $1/\beta$ の値を炭酸基導入量に対してプロットしている。炭酸基の導入に伴い、

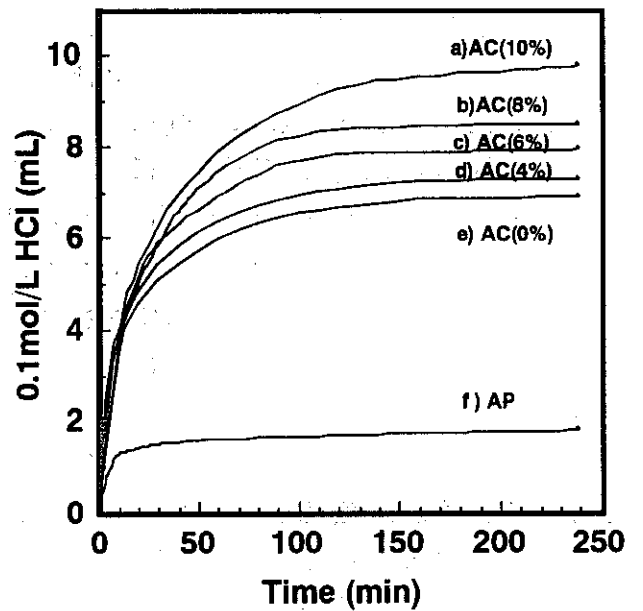


図16 各種懸濁液を pH 5.5 に持続するのに要した 0.1mol/L HCl 水溶液の滴下量

アパタイトセメントの結晶性が低下していることがわかる。

同様に FTIR のスプリッティングファ

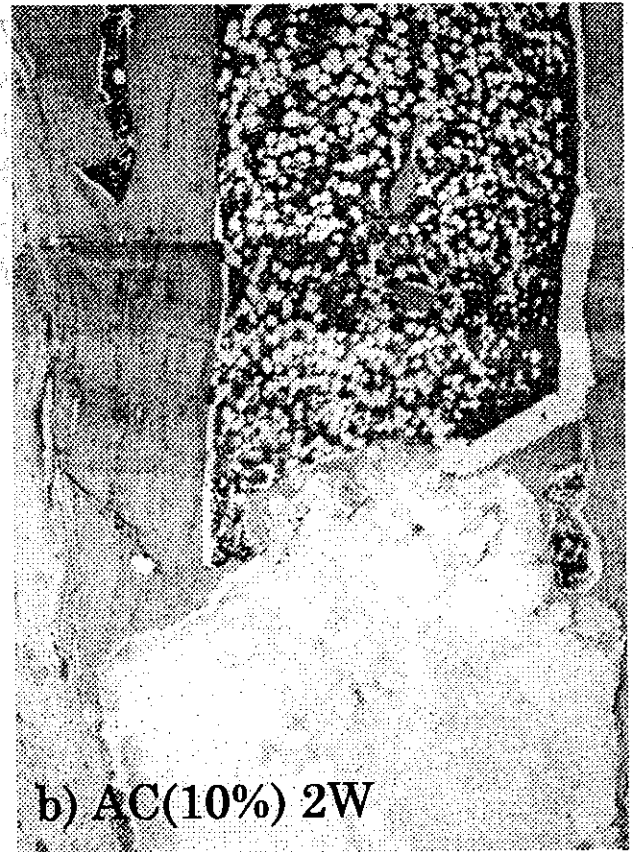
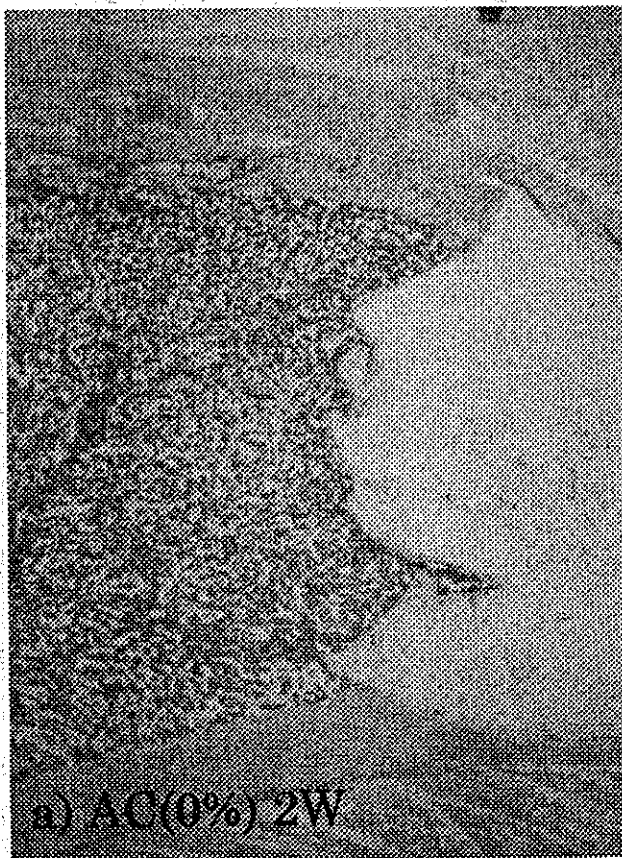


図17 埋入2週後の組織像

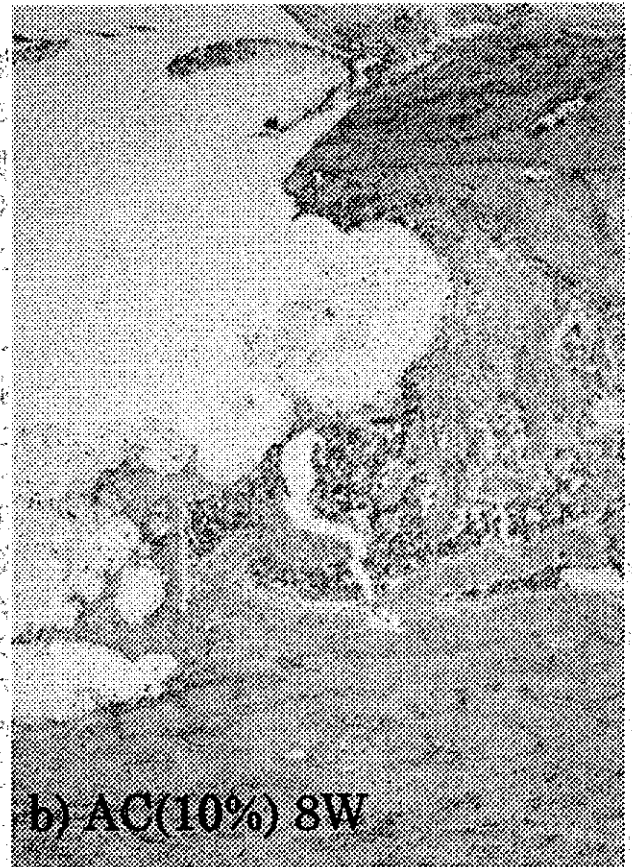
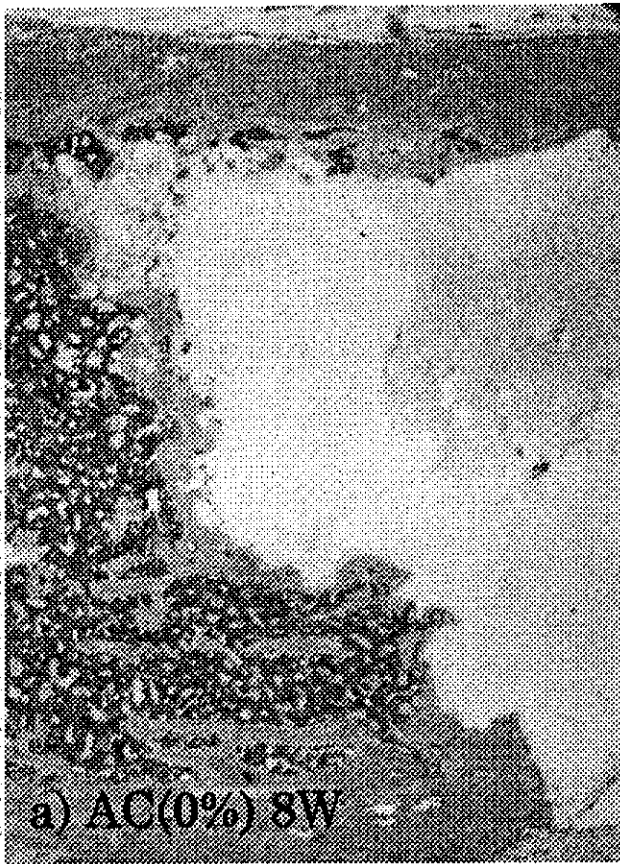


図18 埋入後8週目の組織像 a) 炭酸基を添加していないアパタイトセメント
b) 炭酸基換算8%NaHCO₃添加アパタイトセメント

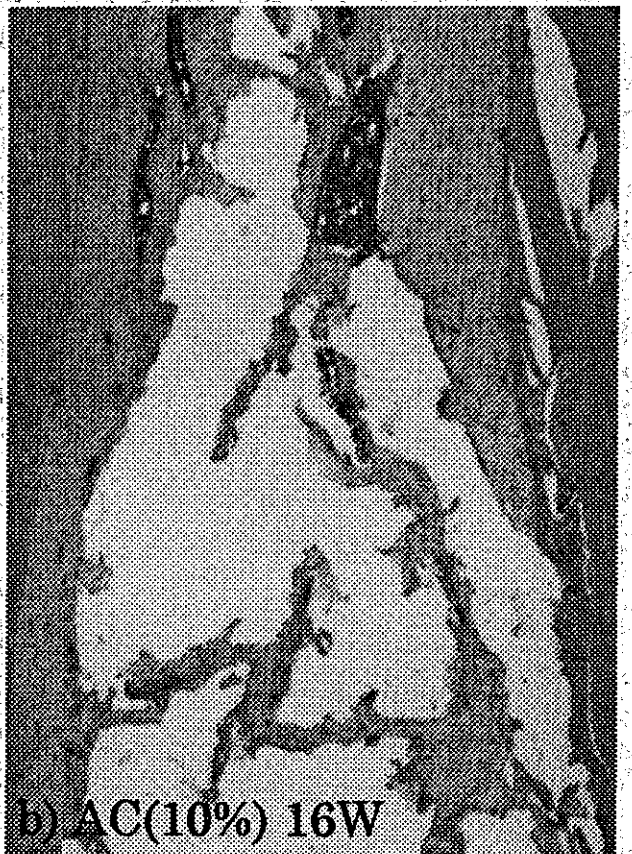


図19 埋入後16週目の組織像 a) 炭酸基を添加していないアパタイトセメント
b) 炭酸基換算8%NaHCO₃添加アパタイトセメント

クターからアパタイトセメント硬化体の結晶性を測定した結果を図15に示す。粉末X線回折パターンから測定した $1/\beta$ の測定結果と同様に、炭酸基の導入に伴いアパタイトセメント硬化体の結晶性が低下していることがわかる。

図16は形成された炭酸含有アパタイトセメントの弱酸水溶液(pH5.5)に対する溶解度をpHスタットにより検討した結果をまとめてある。縦軸にはアパタイトセメント硬化体の溶解に伴うpH上昇を相殺するために添加した0.1規定塩酸の滴下量をとっており、この量がアパタイトセメント硬化体の溶解量の指標となる。このように炭酸基導入量の増大に伴い、アパタイトセメントの弱酸水溶液する溶解速度が増大することがわかった。

3. 炭酸アパタイトへの誘導がセメント硬化体の骨置換性に及ぼす影響について

図17にアパタイトセメントをインプラント後2週目の組織像を示す。いずれのアパタイトセメントも優れた組織親和性を示しており、著名な炎症反応は認められなかった。この段階では新生骨の形成もアパタイトセメントの吸収も認められなかった。

図18にアパタイトセメントをインプラント後8週目の組織像を示す。いずれのアパタイトセメントにも炎症反応は認められなかった。また、いずれのアパタイトセメントの場合も新生骨の形成が認められた。破骨細胞様細胞は観測されなかった。

図19にアパタイトセメントをインプラント後、16週目の組織像を示す。炭酸基を添加していないアパタイトセメントの場合は8週目と同様にアパタイトセメント硬化体の表面に新生骨が認められアパタイトセメントが良好な骨伝導性を示すことがわかる。しかし、セメントの内部には骨侵入が認められず、またセメント表面から骨に

置換している所見も認められない。一方、炭酸水素ナトリウムを炭酸基換算10%添加したアパタイトセメントの場合には新生骨がアパタイトセメント硬化体内部に侵入している所見が認められた。

4. 多孔性アパタイトへの誘導がセメント硬化体の骨置換性に及ぼす影響について

連続気孔を形成していないアパタイトセメントをインプラントした場合にはセメント表面に骨伝導を認める所見が得られたが、多孔性アパタイトセメント硬化体インプラントした場合には8週目においてアパタイトセメントに形成された連続気孔に沿って新生骨がセメント内部に侵入していることがわかった。連続気孔の孔径が0.4mmであったためか、連続気孔の内部には骨組織だけでなく、結合性組織の侵入も認められた。

D. 考察

破骨細胞を用いたアパタイトセメントの吸収性に関する検討結果から、焼結体アパタイトが実験期間中に破骨細胞に全く吸収されないのに対して、アパタイトセメントは破骨細胞により吸収されることが見いだされた。破骨細胞によるアパタイトセメントの吸収はアパタイトセメント硬化体が骨と置換する必要条件であり、焼結体アパタイトが長期的にも骨と置換されないのに対してアパタイトセメントが長期的にでも骨と置換されるという報告と一致する。しかし、アパタイトセメントの吸収活性は骨と比較すると70分の1であり、破骨細胞によるアパタイトセメントが骨置換の律速段階であると仮定すればアパタイトセメントが骨と置換するためには骨のリモデリングに必要な期間の70倍の期間が必要となり、骨のリモデリングにおいても数年を要して

いることを勘案すれば現在のアパタイトセメントは骨置換材というよりは骨と置換しない材料であると考えられる。

破骨細胞による吸収活性を増大するためにアパタイトセメントに炭酸水素ナトリウムを添加した場合にアパタイトセメント硬化体はBタイプの炭酸含有アパタイトになることがわかった。Bタイプ炭酸含有アパタイトは実際に骨に認められるアパタイトの組成であり、炭酸基を含有していない水酸アパタイトと比較して著しく溶解性が高いアパタイトとして知られている。本研究におけるpHスタットを用いた疑似ラッフルボーダー内部溶解実験においても炭酸基の導入量の増大に伴い、アパタイトセメント硬化体の溶解速度と溶解量のいずれもが増大することがわかった。本研究においては実験期間の関係で破骨細胞による炭酸含有アパタイトセメントの吸収活性の評価を行っていないが、炭酸基を導入していないアパタイトセメントと比較してより高い吸収活性を示すことが示唆される。

一方でアパタイトセメントへの炭酸水素ナトリウムの添加はアパタイトセメントの硬化時間の遅延、硬化体の機械的性質の低減という問題点を惹起した。本研究においては単純な系で炭酸水素ナトリウムの添加効果を検討するためにベースセメントとして従来型アパタイトセメントを用いている。従来型アパタイトセメントにおける30分から45分への硬化時間の遅延は迅速硬化型をベースセメントとして用いることにより十分に補えると考えられる。しかし、機械的強さの低減は顕著であり、迅速硬化型アパタイトセメント等をベースセメントとして用いても低減は避けられないと予測される。

図20はアパタイトセメントのDTS値を気孔率に対してプロットした図であり、本研究で得られたデータ以外にもこれまで

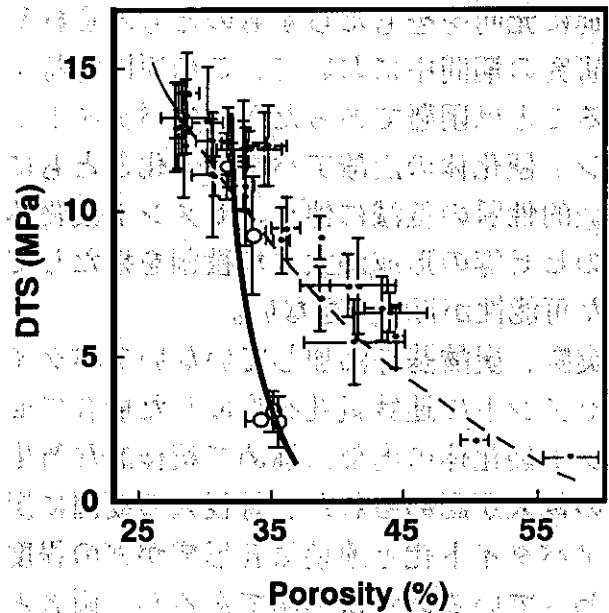


図20 アパタイトセメント硬化体のDTS値と気孔率の関係(○本研究 ●報告データ)

の研究(添付資料13)にて得られたデータを同時にプロットしている。一般にアパタイトセメントのような気孔性材料は気孔率の増大に伴い対数的に機械的強さが低減する。本研究のアパタイトセメントも炭酸水素ナトリウムの添加に伴い気孔率が増大して、その結果、機械的強さが低減している。しかし、気孔率の増大に対する機械的性質の低減の程度は通常的低減と比較して著しく大きく、炭酸水素ナトリウム添加によるアパタイトセメントの機械的強さ低減の要因は結晶性の低下など炭酸アパタイト形成に本質的な問題であると考えられる。

実験動物を用いた実験期間中には、炭酸基を添加していないアパタイトセメント硬化体の内部への骨の侵入は認められなかった。しかし、16週目の組織像に見られる様に炭酸基を導入したアパタイトセメントにおいてはセメント硬化体内部への骨の侵入が著名であった。セメント硬化体内部への骨侵入はアパタイトセメントの骨置換の過程であり、極めて望ましいものであり、アパタイトセメントの骨置換速度の飛躍的

増進に光明ををもたらすものと考えられる。本研究の期間中において、この原因を特定することは困難であったが、アパタイトセメント硬化体の炭酸アパタイト化とともに機械的性質の低減に伴う、セメント硬化体へのヒビ等の形成が大きな役割を果たしていた可能性が否定できない。

実際、炭酸基を添加していないアパタイトセメントに連続気孔を形成した場合にセメント硬化体の内部に極めて積極的な新生骨の侵入が認められた。骨侵入の要因に炭酸アパタイト化と連続気孔形成がどの程度関わっているのかは不明であるが、両者ともにアパタイトセメントの骨置換を促進する方向で機能することは確かである。一方で両者ともアパタイトセメント硬化体の機械的性質の低減化をもたらすことも明らかである。今後はより長期の検討を行い、また各種要因がアパタイトセメントの骨置換速度に及ぼす影響を定量化して検討する必要があると考えられる。

著名な骨

E. 結論

アパタイトセメントは焼結体アパタイトと比較して破骨細胞による吸収活性が高く、骨と置換される可能性はあるが、骨と比較した吸収活性は著しく低く、現在のアパタイトセメントが短期間で骨と置換するとは考えにくい。アパタイトセメントの硬化体を炭酸アパタイトに誘導することは骨置換速度を増大する効果があると考えられるが、硬化体の機械的強さを著しく低減させる。一方、アパタイトセメントに連続気孔を形成させることはセメント表面と細胞との接触面積を増大させるという観点から極めて有用である。骨と迅速に置換するアパタイトセメントの開発は臨床医学、臨床歯学における貢献が極めて大きく、本研究結果を礎にさらに当該研究を発展させる必要があ

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

投稿論文および投稿準備中論文に関しては添付資料参照

2. 学会発表

1. 湯浅哲也, 宮本洋二, 石川邦夫, 武知正晃, 藤武智, 長山勝, 鈴木一臣: 破骨細胞によるアパタイトセメントの吸収: 第20回日本バイオマテリアル学会大会(千葉市:平成10年11月16日~17日):第20回日本バイオマテリアル学会大会予稿集86頁.
2. 湯浅哲也, 宮本洋二, 石川邦夫, 武知正晃, 藤武智, 長山勝, 鈴木一臣: 破骨細胞によるアパタイトセメントの吸収: 第20回日本バイオマテリアル学会大会(千葉市:平成10年11月16日~17日):第20回日本バイオマテリアル学会大会予稿集86頁.
3. 上山吉哉, 真野隆充, 小山貴弘, 松村智弘, 石川邦夫, 鈴木一臣: 非崩壊型アパタイトセメントの生体親和性について-従来型アパタイトセメントと比較して-:第20回日本バイオマテリアル学会大会(千葉市:平成10年11月16日~17日):第20回日本バイオマテリアル学会大会予稿集116頁.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし
3. その他
該当なし

添付資料

本研究に関する投稿論文及び投稿準備中論文

- 資料 1 Taketomo Toh, Kunio Ishikawa, Youji Miyamoto, Masaru Nagayama, Kazuomi Suzuki: Effect of added NaHCO₃ on the basic properties of apatite cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, submitted.
- 資料 2 Kunio Ishikawa, Shozo Takagi, Laurence C. Chow, Kazuomi Suzuki: Reaction of Calcium Phosphate Cements Consisting of Different Amounts of Tetracalcium Phosphate and Dicalcium Phosphate Anhydrous. *Journal of Biomedical Materials Research*, in press.
- 資料 3 Yoshiya Ueyama, Kunio Ishikawa, Takamitsu Mano, Tokahiro Koyama, Tomohiro Matsumura, Kazuomi Suzuki: Tissue response to anti-washout apatite cement in the rat palatal region – comparison with conventional apatite cement-. *Journal of Biomedical Materials Research*, submitted.

添付資料

迅速硬化型アパタイトセメントに関する論文

- 資料 4 Kunio Ishikawa, Shozo Takagi, Laurence C Chow, Yoshiko Ishikawa: Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6(9), 528-533, 1995.
- 資料 5 Youji Miyamoto, Kunio Ishikawa, Hirokazu Fukao, Masahiro Sawada, Masaru Nagayama, Masayuki Kon, Kenzo Asaoka: In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. *Biomaterials*, 16(11), 855-860, 1995.
- 資料 6 Youji Miyamoto, Kunio Ishikawa, Masaaki Takechi, Taketomo Toh, Yoshida Y, Masaru Nagayama, Masayuki Kon, Kenzo Asaoka: Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37(4), 457-464, 1997.

非崩壊型アパタイトセメントに関して

- 資料 7 Kunio Ishikawa, Youji Miyamoto, Masayuki Kon, Masaru Nagayama, Kenzo Asaoka : Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Composite with sodium alginate. *Biomaterials*, 16(7), 527-532, 1995.
- 資料 8 Youji Miyamoto, Kunio Ishikawa, Masaaki Takechi, Miwako Yuasa, Masayuki Kon, Masaru Nagayama, Kenzo Asaoka: Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Setting behaviour in calf serum and its tissue response. *Biomaterials*, 17(14), 1429-1435, 1996.
- 資料 9 Masaaki Takechi, Youji Miyamoto, Kunio Ishikawa, Miwako Yuasa, Masaru Nagayama, Masayuki Kon, Kenzo Asaoka: Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement using chitosan. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 7(6), 317-322, 1996.
- 資料 1 0 Kunio Ishikawa, Youji Miyamoto, Masaaki Takechi, Taketomo Toh, Masayuki Kon, Masaru Nagayama, Kenzo Asaoka: Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: Hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium alginate. *Journal of Biomedical Materials Research*, 36(3), 393-399, 1997.
- 資料 1 1 Masaaki Takechi, Youji Miyamoto, Kunio Ishikawa, Masaru Nagayama, Masayuki Kon, Kenzo Asaoka, Kazuomi Suzuki: Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39, 308-316, 1998.
- 資料 1 2 Youji Miyamoto, Kunio Ishikawa, Masaaki Takechi, Taketomo Toh, Tetsuya Yuasa, Masaru Nagayama, Kazuomi Suzuki: Basic properties of calcium phosphate cement containing atelocollagen in its liquid or powder phases. *Biomaterials*, 19(8), 707-715, 1998.
- 試料 1 3 Kunio Ishikawa, Kenzo Asaoka: Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29(12), 1537-1543, 1995.

19980049

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「添付資料」をご参照ください。