

## 異なる気孔率を有する炭酸含有アパタイト多孔体の生体吸収性と骨形成評価

東京医科歯科大学 ○野崎浩佑、江部典子、堀内尚紘、中村美穂、山下仁大、永井亜希子

Evaluation of degradation and bone formation of porous carbonated apatite block

By ○Kosuke NOZAKI, Noriko EBE, Naohiro HORIUCHI, Miho NAKAMURA,

Kimihiko YAMASHITA, Akiko NAGAI

### 1. 研究目的

近年、歯科インプラント治療や歯周外科治療において、骨補填材の使用が拡大している。骨補填材には、自家骨や他家骨、人工骨があり、症例に応じてそれぞれを選択する[1]。人工骨は生体安全性に優れていることや、多量に失われた欠損部分を補填することができることから、幅広く臨床応用されている。

骨の無機主成分であるハイドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HAp) は人工骨の原材料の一つであるが、骨欠損部に埋入した場合、長期にわたり残存し[2]、生体骨と置換されにくいことから改良が求められている。そこで、HAp のリン酸基の一部を炭酸基に置き換えた炭酸置換型 HAp (CA) を用いた新規人工骨の開発が行われている[3]。生体骨の詳細な解析により、無機主成分の HAp は、リン酸基が炭酸基によって 4-8% 置換され、炭酸基の置換量の増加に伴い、生体内において吸収が亢進することが報告されており、CA は生体内に埋入後、生体骨と置換可能な人工骨として期待されている[4]。我々は昨年度、炭酸含有アパタイトを用いて多孔体を作製し、その骨形成と生体吸収性を評価した。その結果、CA 多孔体は HAp と比較して吸収・溶解される傾向にあるが、埋入部位によりその量は異なり、特に骨髄領域でその減少が顕著となった。しかしながら、骨リモデリングが必要と考えられる海綿骨や皮質骨領域では生体吸収性は低く、改善が必要であることが示唆された。

多孔性骨補填材は、その気孔率や組成を制御することにより骨伝導能や生体吸収性が制御できると考えられることから、本実験では、海綿骨、皮質骨、骨髄に骨欠損を作製し、種々の気孔率を有する HAp および CA 多孔体をそれぞれの欠損部に埋入し、骨形成能と生体内の挙動を比較することにより、適応部位における最適な材料の開発を行うことを目的とする。

### 2 研究成果

#### 2. 1 アパタイト多孔体の作製

HAp は湿式合成法にて作製した[5]。CA は、硝酸カルシウム四水和物、炭酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウムを出発原料として湿式法により合成し、CA 粉末を得た。それぞれの粉末を用いて直径 3 mm、高さ 5 mm になるように成形し、2 種の気孔率を有する多孔体を作製した。作製した多孔体をマイクロ CT (Inspixio SMX100ct, 島津製作所) および解析ソフト (TRI3D/Bon, ラトックシステムエンジニアリング) を用いて、気孔率を算出したところ、HAp および CA の気孔率はそれぞれ、 $59.2 \pm 0.5$  (HAp50),  $71.6 \pm 2.4$  (HAp75),  $52.7 \pm 4.2$  (CA50),  $62.5 \pm 3.5$  (CA75) であった。また、X 線回折にて結晶構造を解析したところ、それぞれ HAp に帰属するピークが観察された。CA は 002 面のピークが低角度側に、および 300 面のピークが高角度側にずれたことから、a 軸の減少と、c 軸の増加が推測され、作製した CA は、リン酸イオンが炭酸イオンに置換した B タイプ CA であることが分かった[6]。また、炭酸イオンの置換量の推定のため、フーリエ変換赤外吸収分光光度計測定により、 $1409\text{cm}^{-1}$  付近の炭酸イオンのピークと、 $567\text{cm}^{-1}$  付近のリン酸イオンのピークの比を算出した[7]。検量線を用いて炭酸イオンの含有量を求めたところ、 $8.0 \pm 0.8\text{wt}\%$  であり、これは生体骨の炭酸含有量である 4~8wt% と類似した結果となり、より生体骨の無機主成分に近似した材料が作製されたと考えられる。

#### 2. 2 生体内でのアパタイトの挙動とその骨形成能

実験動物として、10 週齢雄日本白色家兔を用いた。全身麻酔後、左右大腿骨内側上顆および左右脛骨内側面にインプラント窩形成用のリーマーを用いて直径 3 mm、深さ 5 mm の骨欠損を形成し、作製したそれぞれの多孔体を埋入した。埋入後、4, 12 週間後に、多孔体を含む大腿骨および脛骨を摘出しパラホルムアルデヒドにて固定後、通法に従い[8] 樹脂標本を作製した。(東京医科歯科大学動物実験委員会承

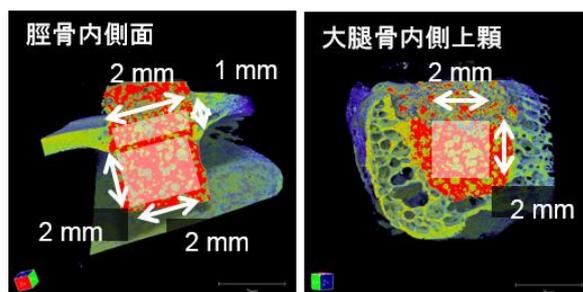


図1 マイクロCTによる解析範囲

認番号：0160019A)

作製した樹脂標本をマイクロ CT および解析ソフトを用いて、図 1 に示すように解析範囲を定め、多孔体内に形成された骨密度および多孔体密度を計測した。埋入 1 ヶ月後では、海綿骨および骨髄領域において HAp は CA と比較して優れた骨伝導能を示したが、皮質骨領域において差は認められなかった。埋入 3 ヶ月後では、特に皮質骨領域において CA 周囲の骨形成量が増加した。生体内に埋入された HAp は埋入 1, 3 ヶ月後ともに生体内において安定し、多孔体の形態を維持していたが、CA は 1 ヶ月後より減少し、3 ヶ月後では埋入前と比較して有意に減少していた。本研究結果では、多孔体の気孔率の違いは骨形成量および生体内吸収性に影響を及ぼさなかったが、マクロ気孔およびミクロ気孔のサイズやその分布はそれぞれの因子に影響を及ぼすことから、今後さらなる改良が必要と考えられる。

また樹脂標本を厚さ約 30 $\mu$ m に薄切し、トルイジンブルーにて染色し、組織学的評価を行った。HAp および CA 多孔体いずれも、骨とアパタイトが直接結合するオッセオインテグレーションが確立されていた。また、皮質骨や海綿骨領域では、HAp 多孔体はマクロ気孔およびミクロ気孔いずれも辺縁が明確であったのに対し、CA 多孔体は、気孔壁が不明瞭になっていた。骨髄領域では、この傾向が顕著となり(図 2)、島状に点在する CA 周囲に一層の骨形成が認められた。HAp は骨髄領域においても、その多孔体の形状を維持し、気孔を充填する骨の形成が観察された。

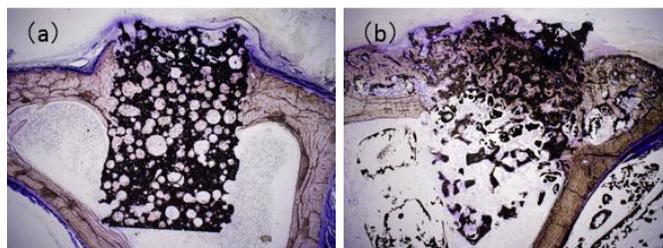


図2 脛骨に埋入されたアパタイト多孔体(a)HAp, (b)CA

以上より、CA 多孔体は HAp と比較して吸収・溶解されるが、埋入部位によりその量は異なり、特に骨髄領域でその減少が顕著となった。骨髄領域は、損傷治癒後に骨髄を貯蔵する必要があることから、優れた吸収性を有する CA 多孔体の利用が推奨される。また、歯科インプラント治療における骨増大術の際に、骨補填剤を用いた際には、埋入された歯科用インプラントが骨と直接結合するだけでなく、将来、力学的負荷により骨リモデリングが生じ、その周囲の骨梁は力学的負荷に対応した構造を有することが必要となる。その際に、本研究により作製された CA 多孔体は、HAp 多孔体と比較して、吸収・溶解の作用を受けることから、リモデリング可能な次世代の骨補填剤になりえる可能性が示唆される[9]。また、HAp は吸収・溶解の影響を受けにくく、欠損部分を早期に充填可能であることから、扁平骨や不規則形骨の利用の際に有利となる可能性が示唆される。

### 3. 参考文献

- [1] Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2006;3(1):49-57.
- [2] Uchida A, Araki N, Shinto Y, Yoshikawa H, Kurisaki E, Ono K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 1990;72(2):298-302.
- [3] Akiko N, Tanaka K, Tanaka Y, Nakamura M, Hashimoto K, Yamashita K. Electric polarization and mechanism of B-type carbonated apatite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011;99A(1):116-24.
- [4] Doi Y, Shibutani T, Moriwaki Y, Kajimoto T, Iwayama Y. Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res*. 1998;39(4):603-10.
- [5] Yamashita K, Oikawa N, Umegaki T. Acceleration and deceleration of bone-like crystal growth on ceramic hydroxyapatite by electric poling. *Chem Mater*. 1996;8(12):2697-&.
- [6] Zapanta-Legeros R. Effect of Carbonate on the Lattice Parameters of Apatite. *Nature*. 1965;206(4982):403-4.
- [7] Featherstone JDB, Pearson S, LeGeros RZ. An Infrared Method for Quantification of Carbonate in Carbonated Apatites. *Caries Res*. 1984;18(1):63-6.
- [8] Nozaki K, Wang W, Horiuchi N, Nakamura M, Takakuda K, Yamashita K, et al. Enhanced osteoconductivity of titanium implant by polarization-induced surface charges. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014;102(9):3077-86.
- [9] Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - from space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(8):706-18.