

吸収性生体模倣アパタイトの開発と骨再生医療への応用

赤澤 敏之, 中村 勝男, 板橋 孝至, 稲野 浩行, 堀川 弘善, 高橋 英徳,
吉成 哲, 村田 勝*, 田崎 純一*, 日野 純*, 田畑 泰彦**,
山本 雅哉**, 埴 隆夫***, 山近 秀和****, 大森 哲也*****, 菊地 雅彦*****

Development of Bio-Absorbable and Biomimetic Apatite and its Application for Bone-Regenerative Therapy

Toshiyuki AKAZAWA, Katsuo NAKAMURA, Kohji ITABASHI, Hiroyuki INANO,
Hiroyoshi HORIKAWA, Hidenori TAKAHASHI, Satoshi YOSHINARI,
Masaru MURATA*, Junichi TAZAKI*, Jun HINO*, Yasuhiko TABATA**,
Masaya YAMAMOTO**, Takao HANAWA***, Hidekazu YAMACHIKA****,
Tetsuya OHMORI*****, Masahiko KIKUCHI*****

抄 録

動物骨由来傾斜機能アパタイト (fg-HAp) は、海面骨の細孔径と気孔率、微量金属イオンを保持したアパタイト固溶体であり、生体吸収性と体液浸透性に優れた生体模倣材料である。焼成・部分溶解析出法により多孔性 fg-HAp セラミックスを作製し、骨形成蛋白質 (rhBMP-2) を担持した rhBMP-2/fg-HAp セラミックスをマウスやラットへ埋入し、rhBMP-2 徐放性や骨誘導性を評価した。マウス背部皮下組織内へ埋入では、rhBMP-2 保持率は7日後で約60%を示し、fg-HAp は理想的な骨誘導性材料であることが示唆された。ラット頭頂骨骨膜上へ埋入4週後の fg-HAp/rhBMP-2 では、fg-HAp の崩壊と吸収、断片化した fg-HAp を包含した骨形成、fg-HAp 周囲に巨細胞、新生骨周囲に骨芽細胞が観察された。骨膜は分離摘出が可能な組織境界膜の役割を果たし、骨再生医療に有効な生体組織の設計・制御技術が提案された。市販バイオセラミックスは、超音波部分溶解・析出処理により、微細構造と結晶相を制御した生体模倣セラミックスへ容易に改質できることが判明した。

キーワード：生体模倣材料，天然アパタイト，傾斜機能，吸収性，骨再生医療，部分溶解析出，超音波処理

Abstract

Functional graded hydroxyapatite originated from animal bone (fg-HAp) which has the pore diameter, porosity, and small amounts of metal ions derived from cancellous bone, is one of biomimetic materials with excellent bio-absorption and body fluid permeation characteristics. Porous fg-HAp ceramics were prepared by the calcination and partial dissolution-precipitation methods and rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2) loaded fg-HAp (rhBMP-2/fg-HAp) ceramics were implanted into rats or nude mice. The release and osteoinduction characteristics of rhBMP-2 from the ceramics were evaluated. At 7 days after the implantation to the subcutaneous tissue of back part in nude mice, retention percentage of rhBMP-2 exhibited about 60%, suggesting that fg-HAp ceramics are ideal osteoinductive scaffolds. At 4 weeks after the implantation on the periosteum of biparietal bone in rats, degradation-bioabsorption of fg-HAp, bone formation involving fg-HAp fragmented, giant cell around fg-HAp surface and osteoblast around new bone were observed. Since the periosteum played a role of tissue boundary film possible for separation and excision, design and control-technologies of living tissues that were efficient for bone-regenerative therapy were proposed. It was clarified that commercial bioceramics were easily modified to the microstructure and crystalline phase-controlled biomimetic ceramics by the supersonic and partial dissolution-precipitation methods.

KEY-WORDS : biomimetic materials, natural apatite, functional gradation, bio-absorption, bone-regenerative therapy, partial dissolution-precipitation, supersonic treatment

* 北海道医療大学	* School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
** 京都大学再生医科学研究所	** Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University
*** 東京医科歯科大学生体材料工学研究所	*** Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
**** 株式会社北海道畜産公社	**** Hokkaido Meat Packer Incorporation
***** 早坂理工株式会社	***** Hayasaka Riko Co. LTD.
***** 株式会社ムトウ	***** Mutoh Co. LTD.

事業名：重点領域特別研究

課題名：生体機能性材料の開発と再生医療及び先進医用工学の応用に関する研究

1. はじめに

近年、高齢化社会の到来や交通事故の多発に伴う骨再生医療を目的として、多種多様な生体材料が開発されている¹⁻³⁾。特に、生体用セラミックスは、(1)生体親和性、急性・慢性の無毒性、(2)高い強度、化学的安定性、形状安定性、(3)加工性に優れているため、人工骨、人工関節、人工歯根、人工歯冠等へ臨床応用されている。生体用セラミックスは、生体不活性セラミックスと生体活性セラミックスに大別される。生体不活性セラミックスは生体内で不溶解、安定な材料であり、耐摩耗性のアルミナや高靱性のジルコニアは人工関節の骨頭等へ利用されている。一方、生体活性セラミックスは生体内で化学的に反応し、骨と自然に強く結合する材料であり、天然骨の無機成分と同じ水酸アパタイト (HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) や β -リン酸三カルシウム (β -TCP: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 等は人工骨、人口歯根及び骨充填材等へ利用されている⁴⁾。たとえば、HApは六方晶系の結晶 (格子定数: $a=b=0.942\text{nm}$, $c=0.688\text{nm}$) であり、種々のカルシウム及びリン酸系試薬を用いて、乾式法、湿式法及び水熱法により作製されている⁵⁾。試薬から合成したHApは原料と製造コストが高価、製造プロセスも複雑であり、多量な用途に即応することは極めて困難である。

HApや β -TCPは優れた組織親和性と骨伝導性を有する生体硬組織代替材料である⁶⁾。しかし、市販の試薬合成のHApは埋入部で吸収特性が低く、既存骨と均質な置換は困難であり、骨形成能が長期的に必ずしも有効な材料ではない。顎裂等の骨欠損部では、歯牙移動や埋入材料植立のために、母骨と均質な骨置換が必要である。生体内非吸収性材料は生涯異物として生体内に残存するため、歯牙移動を妨げ、組織再生を阻害することが指摘されている⁷⁻⁹⁾。

人工材料は生体にとって外来性異物であり、非吸収性材料は異物処理機転により排除され、線維や骨で被包化される。吸収が遅く骨改造機転に調和しない材料は、骨形成を阻害する。真の生きている骨を造るためには、骨形成に調和し同時吸収される材料が必要である。したがって、臨床医学及び歯学領域では、患者の埋入部位や状況に応じて、吸収速度と機械的強度が生体内で適当なバランスを保持し、手術後の骨新生・骨再生に伴い吸収、母組織に置換されるテラーメイドHApセラミックスの開発が強く要望されている。

生体組織由来材料は、生体環境中微量金属イオンの包含により、生命体が構築した粒子形態、表面構造及び化学的性質を維持している。細胞が構築した3次元的多孔質構造は細胞が増殖、分化する環境に最適である。骨主要成分のHApは生体に存在する物質であり、生体由来成分は材料が生理的な代謝システムに組み込まれる現象に有利に作用すると考えられる。

生体模倣材料は細胞や生体高分子の最適環境維持に有効な機能材と定義され、生体模倣構造は本来の部位に埋入可能な

サイズと形態を示唆している。生体の代謝システムに早期に組み込まれるHAp製品の要求性能は、組織体液の浸透性に優れ、高い表面積と適当な機械的強度を持ち、各種細胞を活性化することである³⁾。

再生医療に使える安価な生体模倣セラミックスとして、崩壊・吸収性HApの作製を試みた。すなわち、 β -TCPよりも速く吸収されるアパタイトを開発するために、天然骨構造を利用して、ナノテクノロジーにより人工的な細胞活性表面構造を付与し、血液親和性と細胞親和性に優れた細孔構造を持つ生体融和材料を創製した。

先天奇形、腫瘍摘出、外傷による骨欠損には、生体模倣材料を用いた骨再生療法が有効である。生体模倣セラミックスの臨床応用では、劣悪な骨形成環境の治療箇所、他部位で誘導した新生骨と既存骨を分離及び摘出し、自家移植する再生医療が期待される。

本報では、焼成・部分溶解析出法により吸収性傾斜機能 (fg-HAp) セラミックスを作製し、生体内 (*in vivo*) で骨形成蛋白質 (rhBMP-2) の徐放性を調べ、fg-HAp/rhBMP-2 セラミックスをヌードマウス背部皮下組織内やラット頭頂骨骨膜上へ埋入し、骨再生医療に有効な生体組織の設計制御技術を検討した。また、超音波を用いた部分溶解析出処理により、市販バイオセラミックスの微細構造と結晶相を制御し、生体模倣セラミックスへの改質方法も検討した。

2. 実験方法

2.1 動物骨を用いた生体模倣アパタイトの開発

2.1.1 生体模倣アパタイトの出発原料

畜産物の加工処理過程で多量に産出される動物骨は環境循環型社会の重要な未利用資源である^{7,10)}。牛骨は1頭につき約70kg産出され、北海道では年間8,400トン発生し、狂牛病対策処理技術の視点でもその有効活用と機能性開発が期待されている。¹¹⁾北海道畜産公社から提供された安全な動物骨原料は、トレースビリチンが明確な食肉・乳用動物の残存骨である。動物骨を用いた生体模倣性材料を設計するため、セラミックス工学の観点から、天然アパタイトの資源化技術、焼成・溶解析出技術を検討した。

2.1.2 攪拌法による傾斜機能アパタイト (fg-HAp) セラミックスの作製

ウシ大腿骨 (海綿骨・緻密骨) を冷凍保存、動物埋入実験時の適当な大きさ ($10 \times 10 \times 10\text{mm}$) に切断加工、煮沸洗浄処理、空气中773~1,373Kで段階的に焼成、生体組織由来焼成アパタイト (b-HAp) セラミックス^{5,10)}を作製した。この焼成により異常プリオンを含む有機物は完全に分解消滅された。その緻密骨由来b-HApを硝酸 (HNO_3) に完全溶解、その緻密骨由来b-HApを粉碎、 HNO_3 に完全溶解した。その

緻密骨由来b-HAp水溶液にもう一方の海綿骨由来b-HApを浸漬し、293K、300rpmで24h攪拌部分溶解後、NH₃水を添加し、298K、pH 10.5で溶解析出アパタイト (r-HAp) 結晶を再析出、24h熟成、濾過、洗浄、乾燥する工程により多孔性傾斜機能 (fg-HAp) セラミックスを作製した^{7,11-13}。

fg-HApに骨誘導能を付与するため、fg-HApを3×3×3mmの立方体に切断加工、紫外線滅菌後、遺伝子工学的に作製したりコンビナントヒト由来骨形成蛋白質 (0.5~5 μg-rhBMP-2, 米国食品医薬品局認可済み) 水溶液をfg-HApに滴下含浸し、rhBMP-2担持傾斜機能アパタイト (rhBMP-2/fg-HAp) セラミックスを調製した。

2.1.3 超音波処理法によるfg-HApセラミックスの作製

超音波溶解法により、体液浸透性に優れた生体模倣セラミックスを短時間で作製し、その微細構造に及ぼす酸処理条件の影響を検討した。攪拌法と同様にして、所定焼成温度の海綿骨由来b-HApを緻密骨由来b-HApのHNO₃水溶液に浸漬し、120W、38kHzで2~20minの超音波処理により部分溶解した^{14,15}。それにNH₃水を添加し298K、pH10.5で析出、濾過洗浄、乾燥する工程により多孔性fg-HApセラミックスを作製した。

2.2 市販多孔性バイオセラミックスの溶解析出処理

市販多孔性バイオセラミックスとして、PENTAX(株)製APACERAM AX-A4 (P-AP-AX:気孔率85%)とB-4-1010 (P-AP-B4:気孔率55%)、オリンパス(株)モバイオマテリアル(株)製OSferion A3 (O-O:気孔率75%)、Bone Ceram P (O-B:気孔率35~48%)を選定した。各種セラミックスを5×5×5mmの立方体に切断加工し、その一部を所定濃度HNO₃水溶液 (pH1) により完全溶解した後、同種セラミックスを浸漬、部分溶解した。酸処理条件は、298Kで300rpm、0.3~70hの攪拌溶解法、120W、38kHzで5~75minの超音波溶解法を採用した¹⁶。それにNH₃水溶液を添加し298K、pH6~7またはpH9~10でリン酸カルシウム結晶を析出させ、4~24h熟成、濾過洗浄、乾燥により溶解析出処理バイオセラミックスを作製した。

2.3 各種セラミックスの物理化学的特性の評価

得られた試料について、誘導プラズマ発光分光分析 (ICP) と電子線微小部分分析 (EPMA) による化学組成分析、微小X線回折 (Micro-XRD) による生成相の同定、水中アルキメデス法による気孔率の測定、窒素吸着法による細孔径分布の測定、走査型電子顕微鏡 (SEM) による焼結体破断面の微細構造観察等を行った。

アパタイトの生体親和性評価では、fg-HApとb-HAp多孔体を309.5K、pH7.4の疑似体液 (小久保法) に浸漬し、材料表面のHAp形成能を観察した¹⁷。

2.4 各種セラミックスの生物検定

生体吸収性と骨誘導特性の評価では¹⁸⁻²³、fg-HApとrhBMP-2/fg-HApをWistar系ラット背部皮下組織内または頭頂骨骨膜上へ埋入し、1~8週後周辺組織を一塊として摘出、脱灰、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色後、光学顕微鏡により形態学的な組織観察を行った。

rhBMP-2吸着・徐放特性では、¹²⁵I-labeled rhBMP-2を含浸した各種多孔性fg-HApをヌードマウス背部皮下組織に埋入、1日から4週後に摘出、γ-カウンタによりrhBMP-2の保持率の経時変化を測定した^{24,25}。

3. 結果及び考察

3.1 攪拌法による生体模倣セラミックスの設計と評価

3.1.1 多孔性fg-HApセラミックスの物理化学的特性

1,073Kで24h焼成、攪拌部分溶解したb-HApセラミックスの溶解効率では、攪拌時間の経過に伴い、溶解効率は単調に増加し15hで約60%に到達した。攪拌時間の選定により多孔性fg-HApセラミックスのb-HApとr-HApの比率の制御が可能であった。

図1に、典型的な多孔性fg-HApセラミックスの外観とSEMによる微細構造を示す。(b)で海綿骨由来のマクロ細孔 (100~800 μm) が、細孔表面(c)で約100nmの針状微結晶が集合した1~2 μmの顆粒状組織とマイクロ細孔 (10~160nm) が観察された¹³。細孔分布では、全細孔容積0.35~0.40 cm³・g⁻¹で0.1 μm以下の細孔容積が多いことが分かった。

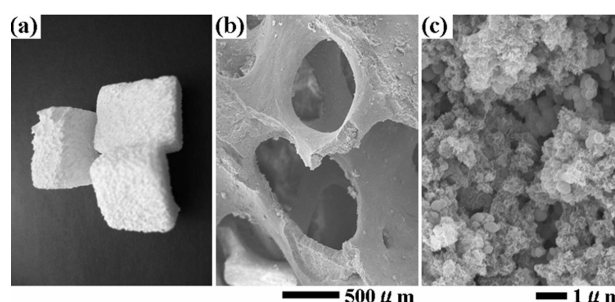


図1 多孔性fg-HApセラミックスの外観と微細構造 ((a):外観, (b):マクロ細孔, (c):細孔壁表面)

多孔性fg-HApセラミックスはICPよりb-HAp、r-HApと同様の化学組成¹²を示し、Mg²⁺、Na⁺等の微量金属イオンを含有するCa/Pのモル比1.64~1.66のCa²⁺欠損型HApであり、気孔率60~80%、比表面積30~40 m²・g⁻¹、動物の手術には十分な機械的強度を示した⁷。

図2に、多孔性fg-HApセラミックスのMicro-XRDパターンを示す^{12,13}。HAp単一相が得られ、各結晶面のピークは、表面でブロードであるのに対しバルクで鋭いことから、fg-HApは、マクロ粒子・高結晶性b-HApの表面や細孔壁に対して、

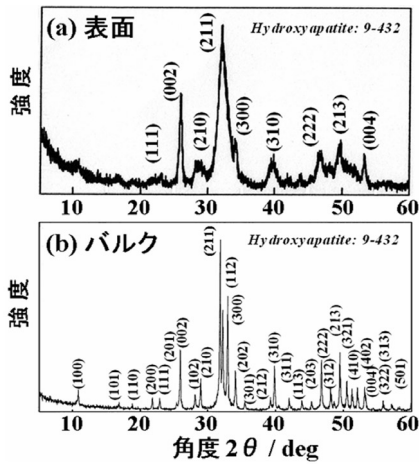


図2 多孔性fg-HApセラミックスのMicro-XRDパターン

ナノ粒子・低結晶性r-HApが析出・成長した構造であり、r-HApとb-HApの組成比が細孔壁の表層からバルク領域まで徐々に減少する傾斜機能材料であることが明らかになった。

生体親和性の評価では、多孔性fg-HApとb-HApセラミックスを疑似体液に浸漬し、材料表面のHAp形成能を調べた。図3に、309.5K, pH7.4で疑似体液へ長期間浸漬したHApセラミックスのSEMによる微細構造を示す。浸漬時間の経過に伴い骨類似HApの結晶成長が観察され、両HApの優れた生体親和性が立証された¹⁷⁾。fg-HApは8日後、b-HApは11日後で、試料表面に数10nmの骨類似微結晶が観察され、fg-HApはb-HApよりHAp形成能が速いことが判明した。

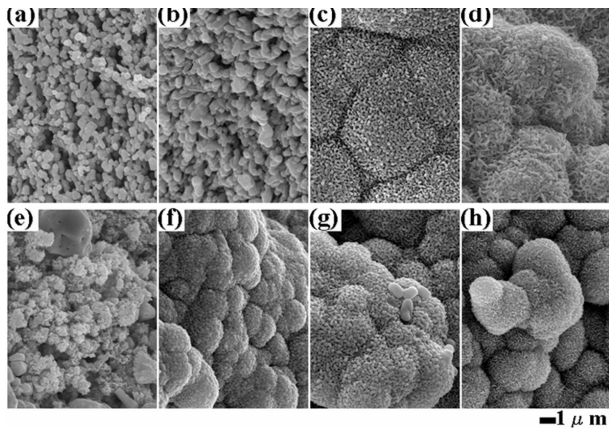


図3 疑似体液へ浸漬した多孔性HApセラミックスの微細構造 ((a):b-HAp, 1d, (b):b-HAp, 8d, (c):b-HAp, 14d, (d):b-HAp, 28d, (e):fg-HAp, 1d, (f):fg-HAp, 8d, (g):fg-HAp, 14d, (h):b-HAp, 28d, 309.5K, pH7.4)

なお、fg-HApは、帯広畜産大学大動物特殊疫病研究センター（牧野壯一教授、今井邦俊教授）の鑑定において、ウシ海綿状脳症（BSE）診断用酵素抗体反応キット（Bio-Rad社製、ELISA、プラテリアBSE）によって、BSEの異常プリオンが検出されないことが証明された^{17, 25)}。

3.1.2 多孔性fg-HApセラミックスの骨誘導能とrhBMP-2徐放特性

多孔性fg-HApセラミックスのラット背部皮下組織内への埋入では、4週後でfg-HApは顆粒表面とマイクロ細孔へ組織体液が浸透し、その周囲に疎性結合組織が形成され、マクロ細孔には多数の多核巨細胞や繊維芽細胞の進入が観察された¹⁹⁻²¹⁾。その組織体液が浸透した領域は免疫染色や電気泳動によりアルブミンが同定されたことから、fg-HApは細胞接着率と血小板粘着に優れた吸収性生体模倣材料と推測される²³⁾。また、fg-HApの崩壊断片化と活発な生体吸収が認められた。この生体吸収性は、海面骨の母組織構造を保持し、結晶性と粒子径が傾斜配列したマイクロ構造によって、体液浸透により顆粒が容易に崩壊、蛋白質を吸着し、血管侵入と細胞増殖を促進したためと推察される。

図4に、多孔性rhBMP-2/fg-HApセラミックスのラット背部皮下組織内へ埋入4週後のHE標本組織を示す^{21, 22, 24, 25)}。(a)で骨とfg-HApは全体的にモザイク状を呈し、初期の外形を維持しながら骨が表面とバルクから活発に誘導され、fg-HApが新生骨に被包化されると同時に崩壊吸収傾向にあり、形態計測より約70%のセラミックスが骨に置換された。(b)で波状fg-HAp表面には多核巨細胞が出現し、骨リモデリングを伴う骨誘導、断片化したfg-HAp、fg-HAp内に組織体液の貯留（アルブミンの吸着）、脂肪随等が観察された。埋入6、8週で造血骨髓組織が拡大し、埋入10週後でfg-HApは吸収され、骨・骨髓組織に置換された。

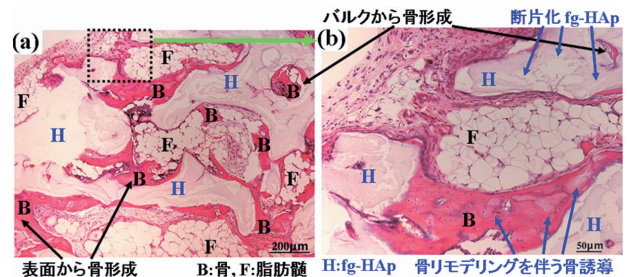


図4 多孔性fg-HAp/rhBMP-2セラミックスのラット背部皮下組織内へ埋入4週後のH-E標本組織 ((a)低倍, (b)高倍(点線領域の拡大))

図5に、多孔性HApセラミックスのrhBMP-2保持率の変化を示す^{24, 25)}。埋入18日間で、fg-HApによるその保持率は、b-HApに比べ約2～3倍高く、7日で約60%、14日で約50%を維持し、骨誘導には理想的な徐放曲線が得られた。生体組織内でrhBMP-2徐放性と骨再生現象の相関がみられたことから、fg-HApは骨誘導性スキャフォールドの有効性が検証された。

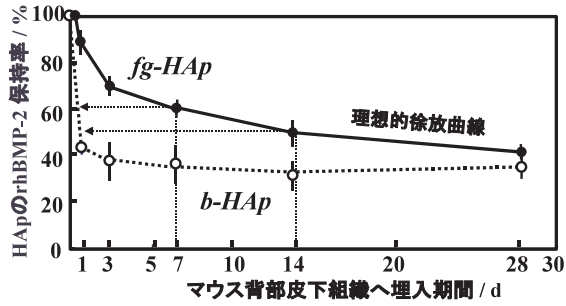


図5 多孔性 HApセラミックスのマウス背部皮下組織内へ埋入 4 週後におけるrhBMP-2の徐放特性

図6に、多孔性fg-HAp系セラミックスのラット頭頂骨骨膜上へ埋入 4 週後のHE標本組織を示す²³⁾。(a)のfg-HAp埋入ではfg-HApの自己崩壊と巨細胞による吸収がみられ、埋入時の試料高さは顕著に減少した。(b)のrhBMP-2/fg-HApでは断片化したfg-HApの包含中心部まで骨形成、fg-HAp周囲に巨細胞、新生骨の周囲に沿って骨芽細胞が観察され、埋入時の試料高さは維持された。新生骨と頭頂骨間には骨膜を含む軟組織が介在し、骨架橋は形成されなかった。

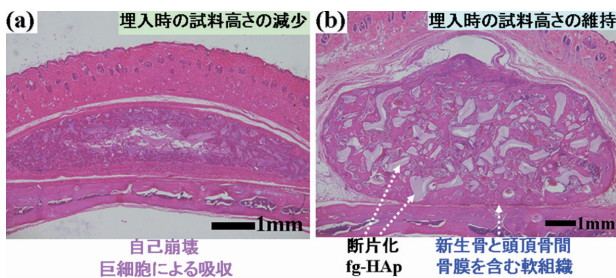


図6 多孔性 fg-HAp系セラミックスのラット頭頂骨骨膜上へ埋入 4 週後のH-E 標本組織
(a)fg-HAp, (b)rhBMP-2/fg-HAp

図7に、多孔性rhBMP-2/fg-HApセラミックスのラット頭頂骨骨膜上へ埋入 4 週後のHE標本組織を示す²³⁾。(a)の中心部では組織体液が浸透したfg-HApの周囲に巨細胞、新生

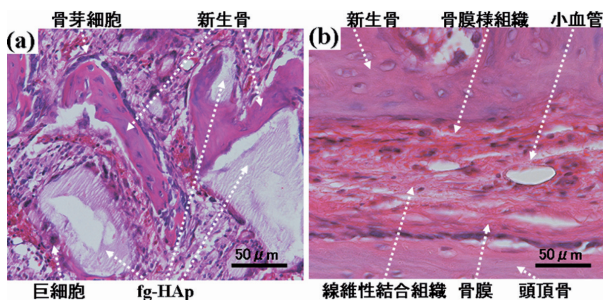


図7 多孔性rhBMP-2/fg-HApセラミックスのラット頭頂骨骨膜上へ埋入 4 週後のH-E標本組織
(a)中心部, (b)骨膜測底部

骨、骨芽細胞が観察された。(b)の骨膜側部では中央の小血管を挟んで頭頂骨側と新生骨側は同様の組織であり、骨膜は恒常性を維持した組織境界膜の役割を果たし、骨再生組織を骨膜とともに容易に剥離できることが分かった。形態計測より骨55%, fg-HAp21%であった。8 週後で試料中心部は骨髄形成が進み、脂肪髄により空洞化した。

以上の結果から、骨膜上へ埋入したrhBMP-2/fg-HApセラミックスは分離・摘出が容易な生体模倣材料として骨再生医療へ応用の可能性が示唆された。

3.2 超音波処理法による多孔性fg-HApセラミックスの設計と評価

3.2.1 多孔性fg-HApセラミックスの物理化学的特性

図8と9に、1,073~1,473Kで24h焼成、超音波処理したb-HApセラミックスの溶解効率とSEMによる微細構造を示す^{15,16)}。図8より、1,073Kのb-HApの溶解効率は攪拌法より超音波処理法の方が顕著に高く、15h攪拌と5min超音波処理の場合がほぼ同値になった。焼成温度の上昇に伴い溶解効率は減少した。この減少は、焼結により機械的強度は増加するのに対して、粒子成長により比表面積が減少し粒子とHNO₃水溶液の接触面積が減少するためと考えられる。

図9より、1,073Kで1 μm以下のc面配向したグレインと

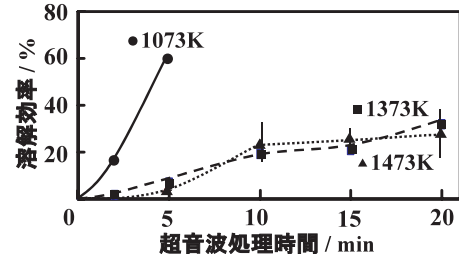


図8 超音波処理法によるb-HApセラミックスの溶解効率
(焼成:1,073~1,473K, 24h, 超音波:120W, 38kHz, pH1, HNO₃)

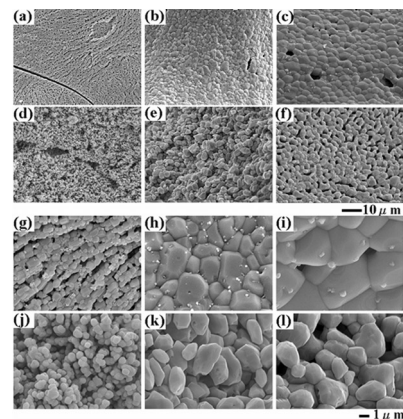


図9 超音波溶解処理前後のb-HApセラミックスの微細構造
(a),(g):1,073K,24h, (b),(h):1,273K, 24h,(c),(i):1,473K, 24h, (d),(j): (a),(g)超音波5min, (e),(k):(b),(h) 20min, (f),(l): (c),(i) 20min, 超音波:120W, 38kHz, pH1, HNO₃)

マイクロ細孔がみられ、焼成温度の上昇に伴い粒子が成長し、1,473Kで3~8 μ mの粗大化したグレインが観察された。1,373Kと1,473K焼成の場合でも、超音波処理20minによって、粒界エッチングにより角がとれた丸い粒子、多くのマイクロ細孔と進展した微小亀裂が認められた。

1,073Kで24h焼成、15min攪拌部分溶解、2min超音波処理、13min攪拌部分溶解したb-HApセラミックスでは、各工程後の溶解効率、それぞれ4、34、41%であった^{14,15)}。攪拌部分溶解と超音波処理を繰り返す工程により、部分溶解時間を1/10に短縮し、体液浸透に有効なマイクロ細孔と微小亀裂を導入することができた。

図10に、1,073Kで24h焼成したb-HApセラミックスとそれを攪拌溶解、超音波処理後、HApを再析出させたfg-HApセラミックスのSEMによる微細構造を示す¹⁵⁾。攪拌溶解のみと同様に、ナノサイズのHAp微結晶が析出したグレインと多数のマイクロ細孔が観察された。

以上の結果から、超音波部分溶解・析出は、b-HApセラミックスの部分溶解時間を短縮し、崩壊吸収と体液浸透を促進する微細構造の設計・作製に効果的な方法と考えられる。

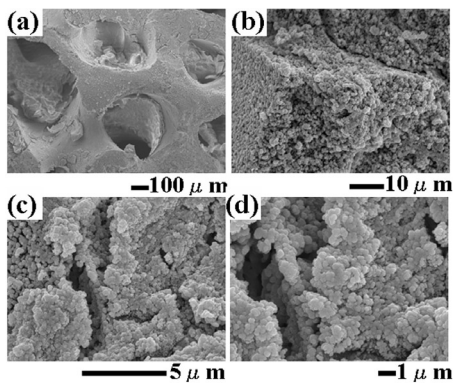


図10 攪拌・超音波部分溶解・析出法によるfg-HApセラミックスの微細構造

((a):100倍, (b):2,000倍, (c):5,000倍, (d):10,000倍, 焼成1,073K,24h, 攪拌15min-超音波2min-攪拌13min, 析出24h)

3.3 市販バイオセラミックスの改質と特性評価

3.3.1 攪拌溶解・析出法による市販バイオセラミックスの結晶相と微細構造

fg-HApセラミックスを公式に臨床応用するには、大動物を使用した安全性、優位性を立証する治験、厚生労働省の認可が不可欠である。fg-HApの作製技術を活用して、臨床現場の医師がドクターライセンスの範囲で、手術室で展開可能な方法を検討した。すなわち、吸収性生体模倣セラミックスの設計を目的として、超音波または攪拌溶解析出法により、市販多孔性バイオセラミックスを部分溶解後、リン酸カルシウム結晶を再析出、複合化したセラミックスを作製し、その微細構造と生体吸収性に及ぼす酸塩基処理条件の影響を検討した。

XRDより、市販P-AP-AX, P-AP-B4, O-BセラミックスはHAp単一相、O-Oセラミックスは β -TCP単一相が同定された。図11に、298KでpH1のHNO₃水溶液における市販バイオセラミックスの攪拌部分溶解・崩壊特性を示す¹⁶⁾。攪拌時間の経過に伴い、各種セラミックスの溶解効率は単調に増加し、O-O, P-AP-AX, P-AP-B4では、10hで溶解効率は52%以上に到達した。O-Oの溶解効率はP-AP-AX, P-AP-B4より高く、HApより β -TCPセラミックスは酸処理に必要な時間は短いことが分かった。各種セラミックスの機械的強度は溶解効率に反比例して低下し、溶解と崩壊現象が同時に進行した。

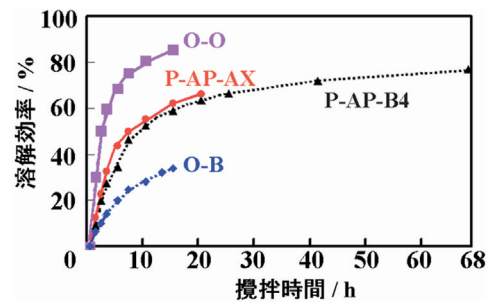


図11 攪拌法による市販バイオセラミックスの部分溶解・崩壊特性
(●:P-AP-AX, ▲:P-AP-B4, ■:O-O, ◆:O-B, 攪拌条件:298K, pH1, 300rpm, HNO₃)

図12に、1h攪拌部分溶解、pH6~7で24h析出処理した市販 β -TCP (O-O) セラミックスの微小XRDパターンとSEMによる微細構造を示す¹⁶⁾。O-Oの溶解効率は30%であり、溶解析出により β -TCP単一相からHAp、 β -TCP及び β -Ca₂P₂O₇の混合相へ転移し、1~2 μ mの顆粒、1~5 μ mのマイクロ細孔から板状凝集結晶へ変化した。

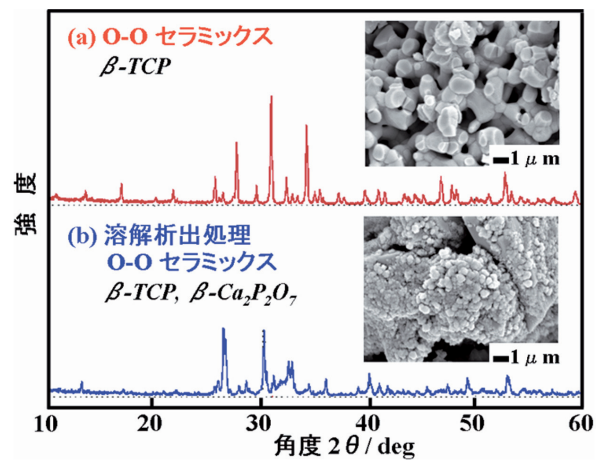


図12 溶解析出処理した市販バイオセラミックスのMicro-XRDパターンと微細構造

3.3.2 超音波部分溶解・析出法による市販バイオセラミックスの微細構造

図13に、298KでpH1のHNO₃水溶液における市販バイオセラミックスの超音波部分溶解・崩壊特性を示す¹⁶⁾。攪拌溶解法に比べ、気孔率が大きなセラミックスの溶解効率は短時間で上昇し、15minでP-AP-AXとO-Oの溶解効率はそれぞれ、約46%と56%を示した。SEMでは、体液浸透に有効な微小亀裂も多数観察されたことから、超音波溶解法は効果的な酸処理操作であることが判明した。

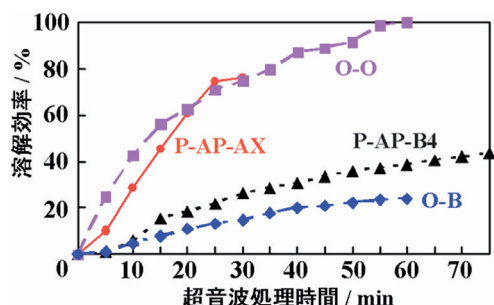


図13 超音波処理法による市販バイオセラミックスの部分溶解・崩壊特性
(●:P-AP-AX, ▲:P-AP-B4, ■:O-O, ◆:O-B, 超音波:293~308K, pH1, 120W, 38kHz, HNO₃)

図14に、超音波部分溶解・24h析出処理した市販P-AP-AXセラミックスのSEMによる微細構造を示す¹⁶⁾。超音波処理時間10minより15minの溶解効率は17%高く、HAp析出後の比表面積は高く、機械的強度は低い値になった。いずれも、1~2μmのHAp顆粒に複合化したナノサイズのHAp結晶、マクロ細孔、マイクロ細孔及び微小亀裂が認められ、優れた体液浸透性が示唆された。

図15に、15min超音波部分溶解・24h析出処理したO-OセラミックスのSEMによる微細構造を示す¹⁶⁾。セラミックスの崩壊溶解性は顕著であり、ナノサイズのリン酸カルシウム結晶とマイクロ細孔が観察され、早期の生体吸収性が推測された。

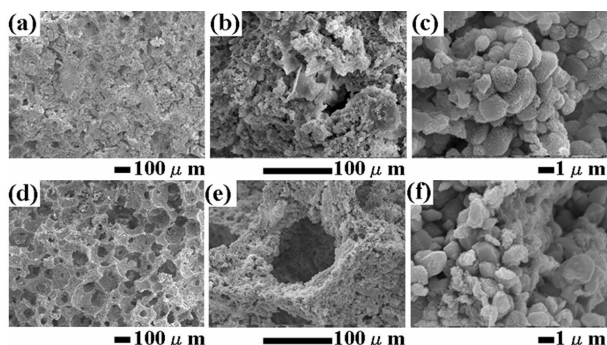


図14 溶解析出処理した市販バイオセラミックス(P-AP-AX)の微細構造
(a),(b),(c):10min, (d),(e),(f):15min, 超音波:293~308K, pH1, 120W, 38kHz, HNO₃, 析出:298K, pH10.5, 24h)

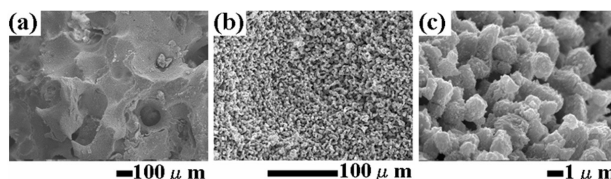


図15 溶解析出処理した市販バイオセラミックス(O-O)の微細構造
(a):100倍, (b):5,000倍, (c):10,000倍, 超音波:293~308K, pH1, 120W, 38kHz, HNO₃, 15min, 析出:298K, pH7, 24h)

以上の結果から、市販バイオセラミックスも、部分溶解・析出条件の最適化により微細構造が改質され、それらの生体吸収性や骨伝導性の改善が可能となる。特に、超音波溶解法は、部分溶解時間を短縮し、体液浸透性に優れた吸収性生体模倣セラミックスの簡易設計・作製法として有効である。

4. まとめ

安全な動物骨を原料とした多孔性fg-HApセラミックスと市販バイオセラミックスを溶解析出処理した生体模倣セラミックスを作製した結果、下記の結論が得られた。

- 1) 動物骨の高温焼成、部分溶解（攪拌、超音波）・析出処理により、多孔性fg-HApセラミックスを容易に設計することができた。
- 2) fg-HApは生体由来の微量金属イオンを含有するCa²⁺欠損型HApであり、気孔率60~80%、比表面積30~40m²・g⁻¹、動物実験の埋入に十分な機械的強度を示した。
- 3) fg-HApは、マクロとマイクロ細孔を有し、マクロ粒子・高結晶性b-HApの表面や細孔壁に対して、ナノ粒子・低結晶性r-HApが析出・成長した構造であり、r-HApとb-HApの組成比が細孔壁の表層からバルク領域まで徐々に減少する傾斜機能材料であった。
- 4) fg-HApの疑似体液への浸漬（309.5K, pH7.4）では、8日後で表面に数10nmの骨類似微結晶が観察され、生体親和性が示唆された。
- 5) ラット背部皮下組織内への埋入では、fg-HApはマイクロ細孔や微小亀裂により組織体液や血液が容易に浸透し、自己崩壊と吸収が認められ、rhBMP-2/fg-HApはrhBMP-2の優れた吸着・徐放性により早期の骨形成・リモデリングが確認された。
- 6) rhBMP-2/fg-HApセラミックスのラット頭頂骨骨膜上への埋入では、新生骨と頭頂骨間に骨膜を含む軟組織が介在し、分離・摘出が容易な生体模倣材料として骨再生医療への応用可能性が示唆された。
- 7) 攪拌・超音波法による部分溶解により、1,073K焼成のb-HApは体液浸透に有効なマイクロ細孔と微小亀裂が観察され、そのfg-HApは、HAp微結晶が析出したグレインと多数のマイクロ細孔が観察された。

- 8) 市販バイオセラミックス (O-O) の攪拌溶解・析出処理 (pH 6~7) では、結晶相は β -TCP単一相からHAp, β -TCP及び β -Ca₂P₂O₇の混合相へ転移し、微細構造は1~2 μ mの顆粒, 1~5 μ mのマイクロ細孔から板状凝集結晶へ変化した。
- 9) 市販バイオセラミックスの超音波部分溶解では、気孔率が大きなセラミックスの溶解効率は短時間で上昇し, 15minでP-AP-AXとO-Oの溶解効率は、約50%を示した。
- 10) 超音波部分溶解・pH9~11で析出処理P-AP-AXでは、処理時間10minより15minの溶解効率は17%高く, HAp析出後の比表面積は高く, 機械的強度は低い値になり, 1~2 μ mのHApグレインに複合化したHAp結晶, マクロとマイクロ細孔, 微小亀裂が認められた。
- 11) 15min超音波部分溶解・24h析出処理O-Oでは、崩壊溶解性は顕著であり, リン酸カルシウム結晶とマイクロ細孔が観察された。

したがって、リン酸カルシウム水溶液を利用する部分溶解・析出法は、b-HApや市販バイオセラミックスの生体模倣性を付加する湿式合成技術として、崩壊吸収と体液浸透を促進する微細構造設計・作製に有効である。市販バイオセラミックスについても、部分溶解・析出条件の最適化により微細構造が容易に改質され、生体吸収性や骨伝導性の改善が可能である。特に、超音波溶解法は吸収性生体模倣セラミックスの簡易設計・作製技術として、その応用が期待される。

引用文献

- 1) 相澤守・神澤信行・松本守雄：アパタイトファイバースキャフォールドのナノ構造と分化 バイオマテリアルー生体材料一, Vol.23 No.5, pp.336-342, (2005)
- 2) M. Murata・F. Maki・D. Sato・T. Shibata・M. Arisue : Bone augmentation by onlay implant using recombinant human BMP-2 and collagen on adult rat skull without periosteum, Clinic Oral Implants Res., Vol.11, pp.289-295, (2000)
- 3) 小川哲朗：骨の再生医療システムの開発ーハイドロキシアパタイトセラミックスによる骨再生一, 化学と工業, Vol.58 No.7, pp.808-811, (2005)
- 4) 社団法人日本セラミックス協会：セラミック工学ハンドブック第2版〔応用〕, 技報堂出版, pp.1487-1488, (2002)
- 5) 赤澤敏之・小平紘平・小林正義：牛骨アパタイトの機能性開発, Phosphorus Letter, No.25, pp.3-8, (1996)
- 6) 入江洋之：吸収性セラミックスの骨再生への応用, セラミックス, Vol.40 No.10, pp.835-838, (2005)
- 7) 赤澤敏之・村田勝：医療セラミックス材料の歴史と問題点 骨と歯の再生医療ー生物学的原理・問題点とその指

- 針一, 学際企画, pp.83-96, (2007)
- 8) 村田勝・赤澤敏之：細胞生物学とマテリアル工学の融合ー骨再生とバイオマテリアル一, Phosphorus Letter, No.47, pp.6-10, (2003)
- 9) M. Murata・T. Akazawa・M. Arisue : Bone engineering-Biological materials and bone morphogenetic proteins-, Phosphorus Research Bulletin, Vol.17, pp.51-58, (2004)
- 10) 赤澤敏之：牛骨に由来した人工アパタイトの製造技術, 高温学会誌, Vol.29 No.3, pp.103-110, (2003)
- 11) T. Akazawa・M. Kobayashi : Characterization of Differently Prepared Apatites by Adsorption Behavior of Albumin, Journal of Ceramic Society of Japan, Vol.104, pp.284-290, (1996)
- 12) 赤澤敏之・村田勝・有末眞・菅野亨・小林正義：生体組織由来吸収性リン酸カルシウム傾斜機能複合材料とその作製方法, 特許第3718723号
- 13) T. Akazawa・M. Murata・T. Sasaki・J. Tazaki・M. Kobayashi・T. Kanno・K. Nakamura・M. Arisue : Biodegradation and bioabsorption innovation of the functionally graded bovine-bone originated apatite with blood permeability, Journal of Biomedical Materials Research, Vol.76A No.1, pp.44-51, (2006)
- 14) 赤澤敏之・村田勝・田崎純一・日野純・中村勝男・田畑泰彦・山本雅哉・塙隆夫・板橋孝至・稲野浩行：超音波溶解析出法による吸収性生体模倣アパタイトの作製と評価, 日本セラミックス協会第21回秋季シンポジウム講演予稿集, pp.2, (2008)
- 15) 赤澤敏之・村田勝・田崎純一・日野純・中村勝男・田畑泰彦・山本雅哉・塙隆夫・菊地雅彦・山近秀和・大森哲也・吉成哲・板橋孝至・稲野浩行・堀川弘善・高橋英徳：吸収性生体模倣アパタイトの開発と再生医療への応用, 日本セラミックス協会東北北海道支部第16回北海道地区セミナー2008 講演概要集, (2008)
- 16) 赤澤敏之・村田勝・田崎純一・中村勝男・板橋孝至・田畑泰彦・山本雅哉・塙隆夫・高畑雅彦・安倍雄一郎・中島武彦・坂本美知子：超音波部分溶解・析出処理によるバイオセラミックスの機能設計, 第18回無機リン化学討論会講演要旨集, pp.50-51, (2008)
- 17) T. Akazawa・M. Murata・J. Tazaki・K. Nakamura・K. Itabashi・T. Kanno・M. Kobayashi : Surface Structure Design and Characterization of Bioabsorbable and Functionally Graded Apatites Originated from Bovine Bone, Key Engineering Materials, Vols.309-311, pp.1051-1054, (2006)
- 18) T. Akazawa・M. Murata・J. Tazaki・K. Nakamura・

- K. Itabashi • T. Kanno • M. Kobayashi : Adsorption Characteristics of Albumin on Bioabsorbable and Functionally Graded Apatites Originated from Bovine Bone, Archives of BioCeramics Research, Vol.5, pp.332-335, (2005)
- 19) T. Akazawa • M. Murata • T. Sasaki • J. Tazaki • M. Kobayashi • T. Kanno • K. Itabashi • M. Arisue : Osteoinduction by Functionally-graded Apatites of Bovine Origin Loaded with Bone Morphogenetic Protein-2, Journal of American Ceramic Society, Vol.88 No.12, pp.3545-3548, (2005)
- 20) T. Akazawa • M. Murata • J. Tazaki : Materials Design and Osteoinduction Characteristics of Biomimetic and Functionally Graded Apatites, Journal of Hard Tissue Biology, Vol.14 No.2, pp.73-75, (2005)
- 21) M. Murata • T. Akazawa • T. Sasaki • K. Ito • J. Tazaki • M. Yamamoto • Y. Tabata • M. Arisue : Blood Permeability of a Novel Ceramic Scaffold for BMP-2, J. Biomedical Material Research, Vol.81B, pp.469-476, (2007)
- 22) 赤澤敏之 • 中村勝 • 村田勝 • 田崎純一 • 日野純 • 田畑泰彦 • 山本雅哉 • 埴隆夫 • 菊地雅彦 • 山近秀和 • 田中勝 • 大森哲也 • 板橋孝至 • 稲野浩行 • 堀川弘善 • 高橋英徳 • 吉成哲 • 奈良岡美穂 • 米代武司 : 第17回無機リン化学討論会講演要旨集, pp.116-117, (2007)
- 23) 日野純 • 村田勝 • 赤澤敏之 • 田崎純一 • 有末眞 : 生体模倣傾斜機能アパタイト/rhBMP-2複合体によるラット頭部骨膜上骨誘導, 日本口腔インプラント学会誌, Vol.21 No.2, pp.327-337, (2008)
- 24) J. Tazaki • T. Akazawa • M. Murata • M. Yamamoto • Y. Tabata • R. Yoshimoto • M. Arisue : BMP-2 dose response and release studies in functionally graded HAp, Key Engineering Materials, Vols.309-311, pp.965-968, (2006)
- 25) T. Kawakami • Y. Kuboki • J. Tanaka • S. Hijikata • T. Akazawa • M. Murata • R. Fujisawa • H. Takita • M. Arisue : Regenerative Medicine of Bone and Teeth—with special references to biological principles, problems and their indicators—, Journal of Hard Tissue Biology, Vol.16 No.3, pp.95-113, (2007)