

# 傾斜機能構造を有する連通多孔体 2 相性リン酸カルシウムブロックの結晶構造および微細形態の解析と皮下埋植における組織学的評価

著者	南田 康人
学位名	博士（歯学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成26年度
学位授与番号	30110甲第262号
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00010295/">http://id.nii.ac.jp/1145/00010295/</a>

## 論文題目

傾斜機能構造を有する連通多孔体 2 相性リン酸カルシウム  
ブロックの結晶構造および微細形態の解析と皮下埋植における  
組織学的評価

平成 26 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

南田 康人

## 【緒言】

現在使用されている無細胞性生体材料は、ハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite: HAp) や  $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\beta$ -TCP) 等のリン酸カルシウム系セラミックスが多く、生体親和性に優れて骨伝導能を有する (Tamai et al., 2002 ; Ogoose et al., 2006 ; Tanaka et al., 2008). 近年では、セラミックスの構造自体に着目して、海綿骨構造を模倣した多孔体が主流となっているが、気孔自体に死腔が多いため移植後の気孔内への骨侵入は表層より数 mm 程度であると報告 (Ayers et al., 1998) されており、骨のリモデリングには組み込まれず生体と調和のとれたセラミックスではない。

本研究では、特徴的な 3 重連通気孔構造を有する多孔質  $\beta$ -TCP block (SUPERPORE<sup>®</sup>, 焼結温度: 1050°C, 気孔率: 75%, 圧縮強度: 6 MPa) を用いて部分溶解析出処理法により PDP-TCP (Partial Dissolution-Precipitation technique-TCP) block を創製して、その構造をナノレベルで評価するとともに、生体親和性に関して骨のリモデリングにどのように組み込まれるかを検証することを目的として、ラット背部皮下組織に埋植して H-E 染色と TRAP 染色を行い、破骨細胞様細胞の動態と PDP-TCP block の吸収を組織学的に観察した。

## 【方法】

### 1 PDP-TCP block の作製と材料工学的解析

原材料として 3 重気孔構造を有する  $\beta$ -TCP (SUPERPORE<sup>®</sup>, 焼結温度: 1050°C, 気孔率: 75%, 圧縮強度: 6 MPa) を実験に用いるサイズ (5×5×5 mm<sup>3</sup>) に切断加工した。この  $\beta$ -TCP block を、Ca<sup>2+</sup> と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> を含んだ 2%硝酸溶液 (50 cm<sup>3</sup>) に含浸させた後に、超音波処理 (120 W, 38 kHz) による部分溶解処理を 2-30 分行った。処理前後の重量変化により  $\beta$ -TCP block の溶解率を算出し、SEM と FE-SEM で微細構造を観察した。

次に、PDP-TCP block 作製のため  $\beta$ -TCP block に超音波部分溶解処理を 7 分行った後、アパタイトの安定領域である pH 9~11 に調整するためアンモニア水を滴下 (滴下速度 1ml/min もしくは 2ml/min) して、24 時間攪拌混合 (300 rpm) することにより表層に HAp 結晶を析出させた。その後、濾過、洗浄、乾燥工程

を経て PDP-TCP block を完成した。この PDP-TCP block 表層及び内部の表層の構造を SEM と FE-SEM で観察するとともに、EDX で Ca/P のピーク強度比を確認し、XRD で結晶性の評価測定を行った。また、各工程での block 内部の気孔構造を  $\mu$ -CT で観察して形態測定を行った。

## 2 PDP-TCP block の細胞性吸収における組織学的評価

PDP-TCP 群、 $\beta$ -TCP 群と PDP-TCP/rhBMP-2 (1  $\mu$ g 添加) 群をウイスター系ラット背部皮下に埋植した。使用した PDP-TCP block は、市販  $\beta$ -TCP block を超音波処理 7 分後、アンモニア水滴下速度 1 ml/min で析出処理し作製した。埋植 1, 2, 4, 8 週後に摘出し TRAP (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase) 染色と H-E 染色を行った。H-E 染色標本は、薄切標本の四隅および中央の 1 mm<sup>2</sup> 内に存在する  $\beta$ -TCP block と PDP-TCP block の血管新生数を光学顕微鏡下で測定し、TRAP 染色標本も同様に破骨細胞様細胞数を計測後経時的変化を比較した (n=15)。BMP-2 添加群においては埋植後 4 週間後に摘出し、H-E 染色を行い骨の有無を観察した。得られた測定値は、医療統計解析ソフト GraphPad Prism5 (MDF, 東京) にて統計学的検討を行った。統計処理は t 検定を用いて危険率が 5%未満の場合に有意差ありと判断した。

### 【結果】

#### 1 工学的特性評価

$\beta$ -TCP block の溶解率は超音波部分溶解処理 2 分後で  $10 \pm 0.5\%$ 、3 分後  $16 \pm 0.6\%$ 、7 分後  $36 \pm 1.9\%$ 、15 分後  $56 \pm 3.2\%$ 、25 分後に  $82 \pm 3.0\%$  に達した (n=3)。微細構造は、市販  $\beta$ -TCP block で緻密な直径 1-3  $\mu$ m の結晶構造を示して、直径 100-300  $\mu$ m の球状気孔と気孔間をつなぐ幅 50-150  $\mu$ m の連通孔によりバルク内部まで連続した 3 重気孔構造を認めた。一方、超音波部分溶解処理後の  $\beta$ -TCP block の表層は、短時間で粗造な形態を呈しており、超音波処理 7 分後には  $\beta$ -TCP 粒子間の接合部が溶解したため明瞭な粒子界面を示した。超音波処理 8 分後ではさらに溶解の進行を認め、超音波処理 25 分後には板状様構造の結晶を認めた。超音波部分溶解処理 7 分後の  $\beta$ -TCP block を二等分に分割した断面の微細構造は粗造な形態を示したが、表層よりもエッチング効果は減少した。 $\beta$ -TCP

block の微細構造は 8 分以上の超音波部分溶解処理により粒子間隙の拡大を明瞭に認め、粒子同士の結合が脆弱化したため動物実験でのハンドリング強度を考慮して、適切な超音波部分溶解処理時間を 7 分と定めた。

超音波部分溶解処理時間を 7 分に設定し作製した PDP-TCP block (滴下速度 1 ml/min もしくは 2 ml/min) の表層の構造を SEM と FE-SEM で観察した結果、PDP-TCP block の表層には、滴下速度に関わらずナノオーダーの HAp 結晶が析出していた。しかし内部微細構造は、滴下速度 2 ml/min で析出処理し作製した PDP-TCP block で針状結晶を認め、滴下速度 1 ml/min で作製した PDP-TCP block では表層と同じ直径約 100 nm の球状結晶の析出を認めた。すなわち、block 内部も含めたすべての表面で、粒子径において表層から深部へ結晶構造が異なる傾斜機能を付与された構造を創成できた。さらに、滴下速度 1 ml/min で作製した PDP-TCP block 断面を EDX で分析した結果、表層から内部に向けて Ca/P のピーク強度比は、表層で 1.19、中間 0.99、中心部 0.92 であり block 内部に向かうに従い強度比の減少を認め、傾斜構造の特性を示した。これにより、block 表層から内部へ向けて粒子の構造自体が連続的に変化する機能構造であることが示唆された。XRD パターンでは析出物は HAp と同定された。また、内部の気孔構造を確認するため各工程での block を  $\mu$ -CT で検査した結果、超音波部分溶解処理 7 分後の  $\beta$ -TCP block では、均一な溶解を認め気孔径が増加し、PDP-TCP block でも気孔構造の保持を確認した。block の体積は部分溶解処理 3 分後の  $\beta$ -TCP block で  $12 \pm 4.0\%$  減少し、超音波部分溶解処理 7 分後では  $28 \pm 2.7\%$  減少した。さらに、この超音波部分溶解処理 7 分後の  $\beta$ -TCP block に滴下速度 1 ml/min で作製した PDP-TCP block の体積は、析出処理前と比較し  $3 \pm 4.1\%$  増加した (n=3)。

## 2 組織学的評価

埋植 1 週後で、 $\beta$ -TCP 群と PDP-TCP 群は共に block 周囲に菲薄な線維による被包化を認めた。 $\beta$ -TCP 群は、単位面積当たりの血管数が埋植 1 週後に  $4.0 \pm 0.7$  本/mm<sup>2</sup> で、2 週になると  $7.8 \pm 0.9$  本/mm<sup>2</sup>、4 週  $14.5 \pm 4.4$  本/mm<sup>2</sup>、8 週で  $17.9 \pm 1.8$  本/mm<sup>2</sup> となった。PDP-TCP 群では、1 週後には、 $7.6 \pm 1.5$  本/mm<sup>2</sup>

で、2週  $12.0 \pm 2.0$  本/mm<sup>2</sup>、4週  $15.1 \pm 0.2$  本/mm<sup>2</sup>、8週で  $16.9 \pm 1.6$  本/mm<sup>2</sup>であった。PDP-TCP 群は、 $\beta$ -TCP 群と比較して1週と2週において血管数に有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。また、1 mm<sup>2</sup>内に存在する破骨細胞様細胞数は、 $\beta$ -TCP 群で埋植1週後に  $3.1 \pm 1.5$  個/mm<sup>2</sup>、2週になると  $8.0 \pm 2.0$  個/mm<sup>2</sup>、4週  $9.5 \pm 4.4$  個/mm<sup>2</sup>、8週で  $12.0 \pm 4.5$  個/mm<sup>2</sup>となった。PDP-TCP 群では、1週後には、 $11.0 \pm 1.7$  個/mm<sup>2</sup>、2週  $13.7 \pm 0.8$  個/mm<sup>2</sup>、4週  $14.0 \pm 0.2$  個/mm<sup>2</sup>、8週  $21.9 \pm 3.9$  個/mm<sup>2</sup>であった。PDP-TCP 群は、 $\beta$ -TCP 群と比較して1週 ( $p < 0.01$ )、2週 ( $p < 0.05$ )、8週 ( $p < 0.001$ )において有意差を認めた。破骨細胞様細胞の形態は、経時的に胞体の大きな細胞質を有する多核巨細胞であった。BMP-2 添加群では埋入4週後で骨形成を認め、形成部位は block 表層より1mm 内部や中心部であり、特異的な気孔構造を通じ中央部深部気孔内骨形成を確認した。

### 【考察】

市販  $\beta$ -TCP block を活用して部分溶解析出処理 (PDP) 条件の選定により材料工学的観点からユニークな構造特性を認める PDP-TCP が作製可能になった。この新規セラミックスは  $\beta$ -TCP オリジナルと比較して、高い体液浸透性や細胞遊走能だけでなく、破骨細胞様細胞数の有意な増加を認め血管成長を観察した。本結果より、PDP 処理を施した  $\beta$ -TCP block は自己溶解性吸収だけでなく細胞性吸収が向上するため、骨のリモデリングに移行を促す活性型スキャフォールドであると考えられた。

### 【文献】

Ayers RA, Simske SJ, Nunes CR & Wolford LM. Long-term bone ingrowth and residual microhardness of porous block hydroxyapatite implants in humans. J Oral Maxillofac Surg 56 : 1297-301, 1998.

Ogose A, Kondo N, Umezu H, Hotta T, Kawashima H, Tokunaga K, Ito T, Kudo N, Hoshino M, Gu W & Endo N. Histological assessment in grafts of highly purified beta-tricalcium phosphate (OSferions) in human bones. Biomaterials 27 : 1542-1549, 2006.

Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T & Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 59 : 110-117, 2002.

Tanaka T, Kumagai Y, Saito M, Chazono M, Komaki H, Kikuchi T, Kitasato S & Marumo K. Bone formation and resorption in patients after implantation of beta-tricalcium phosphate blocks with 60% and 75% porosity in opening-wedge high tibial osteotomy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 86B : 453-459, 2008.