原 著 論 文

骨補填材を目的としたCM-キチン-コハク酸含有型 リン酸カルシウムセメントの開発

横山 敦郎 山本 悟 小松原浩実 武石 篤典
川崎 貴生 向後 隆男* 中須 正義**

Development of Calcium Phosphate Cement Containing Carboxymethyl-Chitin and Succinic Acid for Bone Substitute

Atsuro Yokoyama, Satoru Yamamoto, Hiromi Komatsubara, Atsunori Takeishi,
Takao Kawasaki, Takao Kohgo* and Masanori Nakasu**

Abstract : The purpose of this study was to develop a new calcium phosphate cement as a bone substitute. The cement consisted of liquid and powder components. The powder component consisted of α -tricalcium phosphate, tetracalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate. Two types of liquid component were used; one contained carboxymethyl-chitin, succinic acid and disodium hydrogen phosphate solution (SA cement), and the other distilled water (DW cement). The mechanical properties and biocompatibility of the two cements were investigated. After combining the powder and liquid components, the SA cement was found to develop a "putty-like" consistency that could be molded into any desired shape. However, the DW cement could not be molded. The compressive strength was higher in the SA cement than in the DW cement. Histological examination showed that inflammation around the DW cement grafted on the subcutaneous tissue in rats was a little less than that around the SA cement at 1 week after grafting. At 4 weeks, the SA cement grafted on the bone had bound to the bone as efficiently as the DW cement. The results suggested that this new calcium phosphate cement using succinic acid and carboxymethyl-chitin in the liquid component is suitable as a bone substitute.

Key words : calcium phosphate cement, succinic acid, carboxymethyl-chitin, bone substitute material

I. 緒 言

吸収が高度に進行した顎堤に対する処置の1つに、顎堤挙上¹⁾があげられる。相対的な顎堤の挙上方法として、口腔

前庭拡張術¹⁾が、また、絶対的な顎堤挙上方法としては、自家骨移植²⁾が従来より行われている。近年、自家骨移植に替わるものとして、種々の人工材料が開発されてきた。なかでも、ハイドロキシアパタイトは優れた生体親和性・骨伝導性を有することから、多くの基礎的研究がなされ骨補填材^{3,4)}、デンタルインプラント用材料^{5,6)}として臨床にも応用されている。しかし、骨補填材、特に顎堤挙上術の材料としてハイドロキシアパタイトを用いる場合、顆粒においては散逸、形態保持の困難さ⁷⁾、またブロックに関しては被覆粘膜の壊死、穿孔等が問題となっている⁸⁾。また、骨補填部の形態に合わせて任意の形態を与えることは、顆粒、ブロックいずれの場合も困難である。これらの

北海道大学歯学部歯科補綴学第一講座 (主任: 川崎貴生教授)

*北海道大学歯学部口腔病理学講座 (主任: 向後隆男教授)

**旭光学工業株式会社ニューセラミックス部

Department of Removable Prosthetic Dentistry, Hokkaido University School of Dentistry (Chief: Prof. Takao Kawasaki)

*Department of Oral Pathology, Hokkaido University School of Dentistry (Chief: Prof. Takao Kohgo)

**New Ceramics Division, Asahi Optical Co, Ltd.

平成11年7月26日受付

問題を解決するため、顆粒状のハイドロキシアパタイトをフィブリン糊などで成型する方法が考案されてきた⁹⁾。著者らも、ハイドロキシアパタイトを任意の形態に成型するため実験的にハイドロキシアパタイトの顆粒をアテロコラーゲンと複合し、ラット頭頂部に埋入した。その結果、アテロコラーゲンと複合することにより任意の形態を付与することは可能であったが、機械的強度は弱く、またアテロコラーゲンは埋入後ほぼ1週で吸収されることを報告した¹⁰⁾。このような焼結したリン酸カルシウムの粉末を使用する成型方法とは別に、粉材と液材を練和成型し硬化させるリン酸カルシウムセメントについての研究が最近数多くなされている¹¹⁻¹⁷⁾。著者らも、任意の形態を与えることが可能な骨補填材を開発することを目的とし、ハイドロキシアパタイトセラミックスを減圧熱分解して得られた α -リン酸3カルシウム(α -TCP)とリン酸4カルシウム(TeCP)の混合物からなる粉材とクエン酸、キトサン、グルコース溶液からなる液材の2成分から構成されるリン酸カルシウムセメントを開発し、使用するクエン酸の濃度が、機械的性質、生体親和性に影響することを報告した¹⁸⁾。今回の研究においては、この結果をもとに、付型性・操作性に加え、機械的性質、生体親和性に優れたリン酸カルシウムセメントを開発することを目的に、粉材として α -TCPとTeCPに加え、水和硬化を促進するためリン酸カルシウム2水和物(DCPD)を混合し、液材として新たに開発、調整したコハク酸、CM-キチン(carboxymethyl-chitin)、リン酸水素2ナトリウム水溶液と蒸留水の2種を実験に用いた。本研究の目的は、これらのリン酸カルシウムセメントの機械的性質を比較するとともに、軟組織内および顎堤挙上を想定した骨膜下への埋入を行い、その生体親和性を比較検討することである。

II. 材料および方法

1. 材料

本実験に使用した材料は、粉材、液材の2成分より構成される。粉材としては、湿式合成したハイドロキシアパタイトスラリーを平均粒径が10~12 μ mになるように、乾燥造粒した粉体を減圧熱分解(10⁻²~10⁻³ Pa, 1,200°C, 1時間)することにより得られた α -リン酸3カルシウム(α -TCP)とリン酸4カルシウム(TeCP)の混合物に、平均粒径が20~22 μ mになるようメノウ乳鉢で粉碎したリン酸水素カルシウム2水和物(DCPD)を加え、 α -TCP, TeCP, DCPDのモル比が、2:1:3となるように配合した。7.7%コハク酸、8.7%リン酸水素2ナトリウム、4%CM-キチンとなるよう調整した水溶液を液材として用いたものをSAセメントとした。一方、蒸留水を液材として用いたものをDWセメントとした。粉液比は、予備実験から得られた硬化時間、練和時の操作性および強度

の結果をもとに、SAセメントで2.5, DWセメントで3.5とした(DWセメントの粉液比を2.5とした場合、ラットへの埋入実験において操作上十分な機械的強度が得られないため3.5とした)。

2. 方法

1) 凝固時間

ISO 9917 に準じて測定した(n=5)。

2) 走査型電子顕微鏡による観察

硬化後、生理的食塩水に浸漬し、2週間後に走査型電子顕微鏡(日立製作所製S-4000)にて表面を観察した。

3) 圧縮強度

直径9 mm, 長さ18 mmの円柱状試験片を37°C, 100 mlの生理的食塩水に浸漬し、1時間後、1, 3, 5, 10日後の圧縮強度を島津製作所製島津オートグラフDSS-5000型にてクロスヘッドスピード0.5 mm/minで測定した(n=5)。

4) カルシウム溶出試験

直径9 mm, 長さ18 mmの円柱状試験片を100 mlの生理的食塩水に浸漬し、1, 3, 6, 14, 28日後の生理的食塩水中のカルシウムの濃度を島津製作所製原子吸光フレーム分光光度計AA 640-13を用いて測定した(n=3)。

5) pHの変動

直径9 mm, 長さ10 mmの円柱状試験片を100 mlの生理的食塩水に浸漬し、5, 10, 20, 60, 120分後のpHを測定した(n=3)。

6) 転化率

直径21 mm, 長さ10 mmに成型した試験片を100 mlの生理的食塩水に浸漬し、1, 3日後、1, 2週後の試験片表面のX線回折を、粉末X線回折装置(リガク製RINT 2200 V)を用いて行った。測定は $2\theta=20\sim35^\circ$ の範囲で行い、粉材におけるDCPD, TeCP, α -TCPのメインピークの強度($P_{DCPD(0)}$, $P_{TeCP(0)}$, $P_{\alpha-TCP(0)}$), 計測時点(t)のDCPD, TeCP, α -TCP, HAPのメインピークの強度($P_{DCPD(t)}$, $P_{TeCP(t)}$, $P_{\alpha-TCP(t)}$, $P_{HAP(t)}$)および反応終了後のHAPのメインピークの強度($P_{HAP(\infty)}$)から、Ishikawaらの報告¹⁹⁾に準じ次式のように転化率を算出した(n=3)。

$$\text{転化率 (\%)} = 1/2 \{ (P_{HAP(t)}/P_{HAP(\infty)}) + 3/6(1 - P_{DCPD(t)}/P_{DCPD(0)}) + 2/6(1 - P_{\alpha-TCP(t)}/P_{\alpha-TCP(0)}) + 1/6(1 - P_{TeCP(t)}/P_{TeCP(0)}) \} \times 100$$

7) 生体親和性

実験動物として、6週齢の雄性ウィスター系ラット18匹を用いた。SAセメント, DWセメントともに所定の粉液比で練和したものを、直径4.5 mm, 厚さ1.5 mmの円盤状に成型し、硬化直後にラットの頭頂部骨膜下および腹部皮下に埋入した。埋入1, 2, 4週間後に屠殺し、試験片を周囲組織とともに摘出した。10%中性ホルマリンにて固定後、通法に従い脱灰パラフィン標本を作製し、ヘマト

キシリン・エオジン染色を施し組織学的に検索した。

8) 統計処理

DW セメント, SA セメントの測定結果は Mann-Whitney U test を行い, 危険率 5% で有意差検定を行った。

III. 結 果

1. 硬化時間

硬化時間は, SA セメントにおいては, 11.6 ± 0.5 分, DW セメントにおいては, 10.0 ± 0.6 分であった。

なお, SA セメントにおいては, 粉材と液材を練和すると図 1 に示すようにパテ状を呈し, 任意の形態を付与することが可能であったが, DW セメントにおいては, パテ状を呈さず任意の形態に成型することは困難であった。

2. 走査型電子顕微鏡による観察

DW セメントにおいては, 数 μm から 10 μm 程度の球状あるいは多角形の構造物が重なっているのが観察された (図 2(a))。SA セメントにおいては, 数 μm から数十 μm の球状の構造物が板状, 塊状の基質の上に認められた (図 2(c))。強拡大においては, DW セメントにおいては薄板状の, SA セメントにおいては針状の結晶構造が観察された (図 2(b), (d))。

3. 圧縮強度

図 3 に, 生理食塩水中での圧縮強度の変化を示す。両セメントともに, 浸漬 3 日後でほぼ最終的な強度に達した。また, 計測したどの時点においても, SA セメントの値は, DW セメントの値に比較し有意に高い値を示した。

4. カルシウムイオンの溶出量

図 4 に, 生理的食塩水中でのカルシウムイオン濃度を示す。浸漬 1 日後では, ほぼ同様な値を示したが, 3, 6 日後, 2, 4 週間後では, SA セメントのほうが有意に高い値

図 1 SA cement showed a putty-like consistency after mixing
練和後, SA セメントはパテ状を呈した

図 2 Images of SEM

(a), (b) : DW cement. Crystals like lamella can be seen. (c), (d) : SA cement. Crystals like needles can be seen

SEM 像

(a), (b) : DW セメント。薄板状の結晶が観察される。(c), (d) : SA セメント。針状の結晶が観察される

図 3 Compressive strength when incubated in the physiological saline
生理的食塩水浸漬時の圧縮強度

図 4 Concentration of Ca ion in the physiological saline in which the samples were incubated
生理的食塩水浸漬時の溶出カルシウムイオン濃度

図 5 The pH values of the physiological saline in which the samples were incubated
材料浸漬後の生理的食塩水の pH の変動

図 6 X-ray diffraction patterns
(a) : DW cement, (b) : SA cement
X線回折図
(a) : DW セメント, (b) : SA セメント

を示した。

5. 材料を浸漬した生理的食塩水の pH の変動

図 5 に、試験片浸漬後の生理的食塩水の pH の変化を示す。浸漬 10 分後の pH は、DW セメントでは 7.29、SA セメントでは 6.34 であり、その後経時的に上昇した。DW セメントでは浸漬 30 分後に 7.74 となり、それ以後値は変化しなかった。SA セメントでは徐々に上昇し、120 分後には 6.76 となった。各計測時点において、SA セメントの値のほうが有意に低い値を示した。

6. 転化率

図 6 に両セメントの X 線回折図を、図 7 に転化率の経時変化を示す。両セメントとも、1 日後では、DCPD、TeCP のピークはほとんど認められず、わずかな α -TCP

のピークとハイドロキシアパタイトのピークが認められた。その後経時的にハイドロキシアパタイトのピークは強くなった。転化率については、1, 3日後では、DW セメントのほうが有意に高い値を示した。DW セメントにおいては、1週では値にばらつきが認められ、完全にハイドロキシアパタイトに転化するには2週間を要したが、SA セメントにおいては1週にてハイドロキシアパタイトに転化していた。

7. 組織学的検索

1) 腹部皮下組織埋入について

(1) DW セメント埋入群

術後1週では、埋入した試験片は毛細血管、細胞成分に富む数層から十数層の線維性結合組織に被覆されていた。

図7 Transformation rate to hydroxyapatite
ハイドロキシアパタイトへの転化率

結合組織中には、わずかな数の円形細胞が観察され、軽度の炎症反応が認められた。線維性結合組織に接する試験片表面には、好酸性に染色される網状の構造が認められ、一部表面には異物巨細胞が観察された(図8(a))。術後4週では、試験片周囲は菲薄化した細胞成分の少ない線維性結合組織で被覆されており、炎症反応は認められなかった。試験片表面の異物巨細胞の数も減少していた(図8(b))。

(2) SA セメント埋入群

術後1週では、DW セメント埋入群と同様に、埋入した試験片は毛細血管、多くの間葉細胞を含む線維性結合組織に被覆されており、リンパ球を主とする軽度の円形細胞浸潤が認められた。炎症の程度は、DW セメント埋入群に比較しわずかに強い傾向を示した。試験片表面の一部には、DW セメント埋入群では認められなかった塩基好性に染色される部分が認められた。試験片表面の異物巨細胞の数は、DW セメント埋入群に比較し、やや多い傾向を示した(図9(a))。術後4週では、埋入した試験片は数層の線維性結合組織に被覆されており、異物巨細胞の数も減少していた。術後1週において観察された塩基好性に染色される構造は、4週においても認められた(図9(b))。

2) 骨膜下埋入について

(1) DW セメント埋入群

術後1週では、埋入した試験片を被覆する頭蓋骨膜は肥厚しており、多数の間葉細胞が観察され、一部にはリンパ球を中心とする軽度の円形細胞浸潤が認められ、軽度の炎症反応が観察された(図10(a))。試験片表面には、異物巨細胞が認められ、特に小さく分離した試験片の小片の表面に多く観察された。埋入した試験片の辺縁部には毛細血管、間葉細胞に富む肉芽組織が観察され、母床骨の表面に幼弱な新生骨が認められたが、試験片と直接接していな

図8 Light micrographs of tissue around DW cement grafted in subcutaneous tissue
(a) : At 1 week after grafting, a slight inflammatory response is seen around the DW cement, and foreign body giant cells can be seen on the surface of the DW cement, (b) : At 4 weeks after grafting, the DW cement is covered by fibrous connective tissue. Original magnification $\times 100$. DW : DW cement, arrow : foreign body giant cell
皮下組織埋入におけるDW セメント周囲組織の光顕像
(a) : 埋入1週後、セメント周囲には軽度の炎症反応が認められ、セメントに接して異物巨細胞が観察される。(b) : 埋入4週後、セメントは線維性結合組織に被覆されている。原図100倍、DW : DW セメント、矢印 : 異物巨細胞

図 9 Light micrographs of tissue around SA cement grafted in subcutaneous tissue

(a) : At 1 week after grafting, the inflammatory response around the SA cement is a little more prominent than that around the DW cement, and there are more foreign body giant cells on the surface of SA cement than on the surface of DW cement. A structure stained with hematoxylin can be seen on part of the surface of the SA cement, (b) : At 4 weeks after grafting, the SA cement is covered by fibrous connective tissue. The structure stained with hematoxylin is similar to that at 1 week after grafting. Original magnification $\times 100$. SA : SA cement, arrow : foreign body giant cell, arrow head : structure stained with hematoxylin

皮下組織埋入における SA セメント周囲組織の光顕像

(a) : 埋入 1 週後、セメント周囲の炎症反応は DW セメントに比較しわずかに強く、異物巨細胞も多く観察される。セメント表層の一部には、ヘマトキシリンに染色される構造が認められる、(b) : 埋入 4 週後、セメントは線維性結合組織に被包されている。1 週同様、セメントの表層の一部には、ヘマトキシリンに染色される構造が認められる。原図 100 倍、SA : SA セメント、矢印 : 異物巨細胞、矢頭 : ヘマトキシリンに染色される構造

かった (図 10 (b))。術後 4 週では、試験片周囲の炎症反応は消退し、母床骨からの新生骨は試験片と直接接していた。この新生骨には、一部に骨髓組織、改造線も認められた (図 10 (c), 10 (d))。

(2) SA セメント埋入群

術後 1 週では、DW セメント埋入群と同様に埋入した試験片は、軽度の円形細胞浸潤を伴う肥厚した頭蓋骨膜で被覆されていた (図 11 (a))。皮下組織への埋入と異なり、DW セメント埋入群とはほぼ同様の炎症の程度であった。試験片辺縁部における新生骨の形成も同様であったが、DW セメント埋入群とは異なり、試験片表層の一部には塩基好性に染色される構造が認められた (図 11 (b))。術後 4 週では、DW セメント埋入群と同様に試験片周囲の炎症反応は消退し、新生骨と試験片が直接接しており、骨髓組織、層板構造も一部に観察された (図 11 (c), 11 (d))。

IV. 考 察

1. リン酸カルシウムセメントについて

リン酸カルシウムセメントは、粉材と液材を混合・練和することにより硬化させるという従来のリン酸カルシウム系セラミックスにはない性質を持った生体材料として期待されており、その研究・開発については、Monma ら¹¹⁾、Brown ら¹²⁾ 以来、多くの報告¹³⁻¹⁷⁾がなされている。本研究において開発した材料もこのリン酸カルシウムセメントの一種であり、粉材として α -TCP と TeCP の混合物に

水和硬化を促進する目的で DCPD を加えた。このため、液材として蒸留水を使用した場合でも硬化させることが可能となった。一方、液材には CM-キチン、リン酸 2 水素ナトリウムおよびコハク酸を蒸留水に添加したものを新たに開発、調整し、蒸留水単独で用いた場合と比較した。キチンは、エビ、カニ殻に含まれる多糖類であり、医用材料・生体材料として最近注目されている¹⁹⁾。CM-キチンは、キチンをカルボキシメチル化したものであり、水溶性、粘性を有しており²⁰⁾、練和物をパテ状とし付成型・操作性を与えるため添加した。リン酸 2 水素ナトリウムは、pH 調整のための緩衝材として添加した。

リン酸カルシウムセメントについて、門間は有機酸水溶液硬化型と水、希リン酸など無機水溶液による水和硬化型に分類しており、有機酸硬化型のリン酸カルシウムセメントでは、有機酸とカルシウム間にキレート結合により形成される難溶性ゲルの架橋構造マトリックスにより初期凝結し、その後徐々にアパタイトへ転化していき、水和硬化型では、主に粒子表面上に析出したハイドロキシアパタイト、あるいはオクタカルシウムフォスフェイトの微細結晶が絡み合って粒子間を結合させると考察している²¹⁾。本研究においては、同一の粉材を用いてコハク酸を用いた有機酸硬化型 (SA セメント) と水和硬化型 (DW セメント) の 2 種のリン酸カルシウムセメントの機械的性質および生体親和性に関しての比較を行った。

図 10 Light micrographs of tissue around DW cement grafted on bone

(a) : At 1 week after grafting, the periosteum covering the DW cement is thickened, and there is only a slight inflammatory response around the DW cement. Original magnification $\times 10$, (b) : At 1 week after grafting, newly formed bone from the parietal bone can be seen, but it is not directly bound to the DW cement. Original magnification $\times 50$, (c) : At 4 weeks after grafting, newly formed bone is directly bound to a part of the DW cement. Original magnification $\times 10$, (d) : At 4 weeks after grafting, bone marrow and a lamellar structure can be seen in the newly formed bone bound directly to the DW cement. Original magnification $\times 50$. DW : DW cement

骨膜下埋入における DW セメント周囲組織の光顕像

(a) : 埋入 1 週後, 骨膜は肥厚し, 軽度の炎症反応が認められる。原図 10 倍, (b) : 埋入 1 週後, 頭頂骨からの新生骨が観察されるが, セメント表面には直接接していない。原図 50 倍, (c) : 埋入 4 週後, 新生骨とセメント表面の一部は直接接している。原図 10 倍, (d) : 埋入 4 週後, セメント表面に直接接する新生骨中に骨髄組織, 層板構造が観察される。原図 50 倍, DW : DW セメント

2. 機械的性質について

有機酸硬化型である SA セメントは, 水和硬化型である DW セメントに比較し圧縮強度は有意に大きい値を示したが, これは粉材中のカルシウムとコハク酸の間に形成されたキレート結合によるものと考察される。このキレート結合によるマトリックスの形成は, 特に練和直後, すなわち硬化初期のハイドロキシアパタイトの結晶の絡み合いが十分でない場合であっても, 材料の強度の保持に有利に働くものと考えられる。臨床においても, 初期における機械的強度は手術部位への材料の保持, 固定といった手術操作に有効であろう。しかし, キレート反応によるマトリックスの形成は, 水との接触を阻害することにより水和反応を抑制するとも考えられる。図 7 に示すように浸漬 1, 3 日後で, SA セメントのハイドロキシアパタイトへの転化が DW セメントに比較し遅延したのは, この水和反応の抑制や両セメントの粉液比の違いが関係しているものと推察される。なお, 7 日後において転化率が逆転したのは,

SA セメントにおいては計測した 3 例すべてがハイドロキシアパタイトに転化したが, DW セメントにおいてはハイドロキシアパタイトへの転化にばらつきが認められたためと考えられる。Ishikawa らは, ハイドロキシアパタイトへの転化率と機械的強度には強い相関関係があると考察している¹⁷⁾が, 本研究においても, 図 3 および 7 から, ハイドロキシアパタイトの形成が圧縮強度と関係することが推察された。しかし本研究において, SA セメントではハイドロキシアパタイトへの転化が DW セメントに比較して遅いにもかかわらず, 圧縮強度は高いという結果が得られたのはキレート形成によるものと考えられる。

硬化時間に関しては, キレートの形成のため SA セメントのほうが硬化時間は速くなると推察される。しかし本研究においては, 実験時の操作上の強度を得るため, 粉液比を DW セメントのほうを大きくしたため DW セメントのほうが硬化が速くなったものと考えられる。

走査型電子顕微鏡による観察においては, SA セメント

図 11 Light micrographs of tissue around SA cement grafted on bone

(a) : At 1 week after grafting, the periosteum covering the SA cement is thickened, and only a slight inflammatory response is observed around the SA cement. Original magnification $\times 10$, (b) : At 1 week after grafting, newly formed bone from the parietal bone can be seen, but it is not bound to the SA cement. A structure stained with hematoxylin can be seen on part of the surface of the SA cement. Original magnification $\times 50$, (c) : At 4 weeks after grafting, newly formed bone is directly bound to a part of the SA cement. Original magnification $\times 10$, (d) : At 4 weeks after grafting, bone marrow and a lamellar structure are seen in the newly formed bone bound directly to the SA cement. Original magnification $\times 50$. SA : SA cement, arrow head : structure stained with hematoxylin

骨膜下埋入における SA セメント周囲組織の光顕像

(a) : 埋入 1 週後, 骨膜は肥厚し, 軽度の炎症反応が認められる。原図 10 倍, (b) : 埋入 1 週後, 新生骨がセメント周囲に観察されるが, セメントとは直接接していない。原図 50 倍, (c) : 埋入 4 週後, 新生骨とセメント表面の一部は直接接している。セメント表層の一部には, ヘマトキシリンに染色される構造が認められる。原図 10 倍, (d) : 埋入 4 週後, セメント表面に直接接する新生骨中に骨髓組織, 層板構造が観察される。原図 50 倍, SA : SA セメント, 矢頭 : ヘマトキシリンに染色される構造

において認められた塊状, 板状の構造はキレートにより形成されたマトリックスと推察される。また, 強拡大像において, ハイドロキシアパタイトと考えられる結晶が DW セメント, SA セメントともに観察されたが, その形態は DW セメントで薄板状, SA セメントで針状であったが, この構造の差異については今後さらなる研究が必要と考えられる。

試験片浸漬後生理的食塩水中の pH の変化に関しては, 両セメントともに α -TCP, TeCP, DCPD の溶解により, 経時的に上昇したが, SA セメントのほうが DW セメントに比較して有意に低い値を示した。これは, 試験片の余剰のコハク酸によるものと考えられる。生理的食塩水中浸漬時のカルシウム濃度については, 余剰の酸による粉材成分や形成されたハイドロキシアパタイトの溶解などの理由により, SA セメントのほうが高い値を示したものと考えら

れる。

3. 生体親和性について

軟組織埋入においては, 埋入初期である 1 週において, 埋入した試験片周囲に軽度の炎症反応が認められた。炎症の程度は, 試験片周囲の肉芽組織の厚さ, 円形細胞浸潤の程度, 試験片表面の異物巨細胞の数から考えると, SA セメント埋入群のほうがわずかに強い傾向を示した。この差は, 生理的食塩水中における pH の変化からも推察されるように, 余剰のコハク酸による炎症反応と考えられる。酸の影響については, 著者らが行ったクエン酸を液剤に使用した実験においても, 20% のクエン酸に比較し 45% のクエン酸を用いたほうが炎症は強い結果を得ている¹⁸⁾。また, in vitro の細胞毒性の研究においても, 大島らは酸の濃度が細胞毒性に関与すると報告している²²⁾。しかし, 埋

入後4週ではSAセメント埋入群、DWセメント埋入群ともに試験片周囲の炎症反応は消退し、数層の線維性結合組織に被包されていることから、軟組織に対して良好な反応を示すものと考えられた。また、DWセメント埋入群とSAセメント埋入群の差異であるが、SAセメント埋入群においては試験片表面に塩基好性に染色される構造が観察された。DWセメント群においては、このような構造は観察されなかった。この構造は、その染色性から石灰沈着が推察され、in vitroにおけるカルシウムイオンの溶出量の結果からも、溶出したカルシウムの材料表面への沈着が生じたものと考えられる。

骨膜下埋入に関しては、埋入後1週においては、試験片周囲に軟組織内埋入同様に軽度の炎症が認められたが、DWセメント埋入群とSAセメント埋入群の間の炎症反応に大きな差異は認められなかった。この結果に関しては、手術時の出血が関係しているものと推察される。骨膜下への埋入においては、手術において骨膜の切開、剥離を行うため、軟組織内への埋入手術に比較し出血が多い。このため、血液の緩衝作用が余剰の酸による影響を少なくさせたものと思われる。埋入後4週においては、DWセメント埋入群、SAセメント埋入群ともに骨組織と軟組織を介さずに直接接しているのが認められ、リン酸カルシウムセメントを頭頂部骨膜下に埋入したKurashinaらの報告²³⁾と同様に、良好な骨親和性を有することが示唆された。リン酸カルシウムセメントの生体内における吸収性であるが、倉科らは軟組織、骨組織内のいずれにおいても吸収が生じると報告し²⁴⁾、畦崎らは骨組織内で吸収が生じたと報告している²⁵⁾。一方、Miyamotoらは骨内埋入8週においては、材料の吸収は認められなかったと報告している²⁶⁾。本研究においては、SA群、DW群ともに、埋入4週という比較的短期間の観察ではあるが、明確な吸収像は認められなかった。埋入した動物の種、材料の組成、ハイドロキシアパタイトへの転化率などが関与しているものと考察されるが、材料の吸収や骨組織への置換については長期的な研究が必要と考えられる。また、従来より研究、臨床応用されている焼成型のリン酸カルシウムとの比較であるが、本研究では直接比較検討していないが、著者らの以前の多孔質のハイドロキシアパタイトを用いた研究¹⁰⁾と比較すると、骨膜下埋入においては、埋入1週の比較的初期では、本材料により惹起される炎症が焼結型のハイドロキシアパタイトに比較して、わずかに強い傾向を示した。これは、材料の結晶性などが関与しているものと考えられるが、4週では骨組織と直接接しており、焼成型のセラミックスと同様の骨親和性を有すると考えられる。しかし、生体内でのセメントの吸収、溶解に加え、セメント周囲の組織の変化を検索するためには、さらに長期にわたる研究が必要と考えられる。

V. 結 論

1. 粉材として α -TCP, TeCP, DCPDを、液材としてコハク酸、CM-キチン、リン酸水素2ナトリウム溶液を用い、練和時にパテ状を呈し、自由な形態を付与することが可能なリン酸カルシウムセメントを開発した。液材として蒸留水を使用した場合は練和時、パテ状を示さず成型性・操作性は劣っていた。
2. 液材としてコハク酸、CM-キチン、リン酸水素2ナトリウム溶液を用いたセメントは、硬化時間は11.6分、生理食塩水浸漬時の圧縮強度は39.4 MPaであった。液材として蒸留水を使用した場合、硬化時間は10.0分、生理食塩水浸漬時の圧縮強度は29.70 MPaであった。生理食塩水浸漬時のpHは、液材として蒸留水を使用した場合のほうが、より中性に近い値を示した。
3. 皮下組織内および骨膜下に埋入した結果、いずれのセメントも、軟組織に対しても骨組織に対しても、良好な親和性を有することが明らかとなった。
4. 以上のことから、本研究で開発した液材にCM-キチンおよびコハク酸を添加したリン酸カルシウムセメントの骨補填材としての可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kazanjian VH. Surgery as an aid to more efficient service with prosthetic dentures. J Am Dent Assoc 22 : 566-581, 1935.
- 2) Baker RD, Connole PW. Preprosthetic augmentation grafting-autogenous bone. J Oral Surg 35 : 541-551, 1977.
- 3) 田中 收, 平井敏博, 村瀬博文. ハイドロキシアパタイト顆粒を用いた下顎無歯顎堤形成法に関する補綴学的検討 第1報 顎堤形態の分析と評価. 補綴誌 32 : 1345-1357, 1988.
- 4) 田中 收, 平井敏博, 村瀬博文. ハイドロキシアパタイト顆粒を用いた下顎無歯顎堤形成法に関する補綴学的検討 第2報 義歯の咀嚼機能と総合的評価. 補綴誌 33 : 1466-1476, 1989.
- 5) 小木曾 誠, 金田浩之, 塩田 真ほか. Apatite 2-Piece Implant 第3報 臨床治験について. 補綴誌 32 : 523-533, 1988.
- 6) Kent JN, Block MS, Finger IM et al. Biointegrated hydroxyapatite-coated dental implants : 5-year clinical observations. J Am Dent Assoc 121 : 138-144, 1990.
- 7) Desjardins RP. Hydroxyapatite for alveolar ridge augmentation : Indications and problems. J Prosthet Dent 54 : 374-383, 1985.
- 8) Hupp JR, McKenna SJ. Use of porous hydroxylapatite blocks for augmentation of atrophic mandibles. J Oral Maxillofac Surg 46 : 538-545, 1988.
- 9) Wittkampf ARM. Augmentation of the maxillary alveolar ridge with hydroxylapatite and fibrin glue. J Oral Maxillofac Surg 46 : 1019-1021, 1988.
- 10) 小松原浩実, 武石篤典, 横山敦郎ほか. リン酸カルシウム系セ

- ラミックスに関する実験的研究—骨形成タンパク質-ハイドロキシアパタイト-アテロコラーゲン複合体の骨膜下移植について— 補綴誌 37 : 705-712, 1993.
- 11) Monma H, Kanazawa T. The hydration of α -tricalcium phosphate. J. Ceram Soc Jpn 84 : 209-213, 1976.
- 12) Brown WE, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patents 4612053, 1986.
- 13) 澄田政哉. キトサン-リン酸カルシウム複合骨補填材の開発. 機能材料 9 : 26-32, 1989.
- 14) 畦崎泰男, 江藤隆徳, 井上 宏ほか. 骨充填材としてのリン酸 4 カルシウム・リン酸カルシウム 2 水和物・クエン酸硬化体の基礎的研究. 補綴誌 37 : 61-66, 1993.
- 15) Kurashina K, Kurita H, Hirano M et al. Calcium phosphate cement : in vitro and in vivo studies of the α -tricalcium-dicalcium phosphate dibasic-tetracalcium phosphate monoxide system. J Mater Sci Mater Med 6 : 340-347, 1995.
- 16) Ishikawa K, Takagi S, Chow LC. Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements. J Mater Sci Mater Med 6 : 528-533, 1995.
- 17) Ishikawa K, Miyamoto Y, Kon M et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement : composite with sodium alginate. Biomaterials 16 : 527-532, 1995.
- 18) Yokoyama A, Kamiura M, Takahashi R et al. Experimental study of self hardening hydroxyapatite for bone substitute material. J Dent Res 73 : 914, 1994.
- 19) 戸倉清一. キチン, キトサンの生理活性について. 別冊フードケミカル. I. 5-11, 東京 : 食品化学新聞社, 1987.
- 20) 栗田恵輔. キチンの水溶性誘導体—調整とキャラクターゼーション. 別冊フードケミカル. I. 18-27, 東京 : 食品化学新聞社, 1987.
- 21) 門間英毅. リン酸カルシウムセメントの材料化学. 生体材料 15 : 24-30, 1997.
- 22) 大島 浩, 畦崎泰男, 詫間 巖ほか. リン酸 4 カルシウム・リン酸カルシウム 2 水和物・クエン酸硬化体の細胞毒性について (in vitro). 補綴誌 40 : 470-476, 1996.
- 23) Kurashina K, Kurita H, Kotani A et al. Experimental cranio-plasty and skeletal augmentation using an α -tricalcium phosphate/calcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement : preliminary short-term experiment in rabbits. Biomaterials 19 : 701-706, 1998.
- 24) 倉科憲治, 栗田 浩, 小林啓一ほか. Calcium phosphate セメントの口腔外科領域での臨床応用に関する研究 第 II 報 : α -TCP/DCPD/TeCP 系セメント硬化体のウサギ埋入実験. 日口科誌 42 : 822-828, 1996.
- 25) 畦崎泰男, 竜門 宏, 福島卓司ほか. 形成可能な骨充填材としてのリン酸 4 カルシウム・リン酸カルシウム 2 水和物・クエン酸硬化体の研究—骨埋入時の反応—. 補綴誌 42 : 409-414, 1998.
- 26) Miyamoto Y, Ishikawa K, Takeuchi M et al. Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone. J Biomed Mater Res 37 : 457-464, 1996.

著者連絡先 : 横山 敦郎

〒060-8586 北海道札幌市北区北 13 条
西 7 丁目

TEL : 011-706-4270

FAX : 011-706-4903