生体高分子を用いたアパタイト骨セメントの調製とその圧縮強度および薬物溶出特性

Mechanical Strength and Drug Release Characteristics of Bioactive Bone Cement Using α -Tricalcium Phosphate and Biopolymer

大佐々 邦久, 吉富 晋, 岩井 志帆

Kunihisa Osasa, Makoto Yoshitomi, Shiho Iwai

Received 20 March 2002 ; Accepted 8 July 2002

New bioactive bone cement was developed using α -tricalcium phosphate as bioactive powder and poly (sodium-glutamate) (PSG), bovine serum albumin (BSA) and malic acid as additives. The performance of cements was evaluated in terms of the compression strength and the drug release rate. The compression strength increased with the amount of additives, and became larger in order of malic acid, BSA and PSG with the same amount of additives. The maximum strength was obtained when PSG was used because of the heat denaturation of PSG and the conversion from PSG to polyglutamic acid. The maximum strength was almost equal to that of polymethylmethacrylate cement (about 68 MPa). The drug release process was solved numerically by the diffusion equation for cylindrical pellets. The apparent diffusion coefficient decreased with increase in the amount of additives, and became smaller in order of malic acid, BSA and PSG with the same amount of additives.

Keywords : Bioactive bone cement, α -Tricalcium phosphate, Poly (sodium-glutamate), Compression strength, Drug release rate

1. 緒 言

セラミックスは金属やプラスチックに比べて、生体親和性に優れ、さらに腐食や拒絶反応が起きないので、人工骨、人工関節あるいは人工歯などへの応用が進んでいる。中でも、リン酸三カルシウム $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (以下 TCP) は骨や歯のミネラル組成に近い特徴を有するため、生体親和性材料として様々な応用が期待されており、特に、外傷や腫瘍などによる骨欠損部補填材として広く使用されるようになってきた¹⁾。

このようなバイオセラミックスは、生体親和性に併せて機械的強度も要求される。現在までの開発例は、大別すると3種類に分けられよう。最初に実用化されたのは、アパタイトの自己硬化性を利用したアパタイトセメント²⁾で、リン酸四カルシウムとリン酸水素カ

ルシウムとの混合物の硬化体である。次いで、骨親和性 Ca ガラスと種々の高分子 (たとえば polymethylmethacrylate³⁾, bisphenol-a-glycidyl methacrylate⁴⁾, triethylene-glycol dimethacrylate⁵⁾ および有機酸⁶⁾ など) との複合体がある。これら複合体の中には、炎症などを防ぐ目的でドラッグデリバリーの機能を持たせるために、消炎剤や抗がん剤などの薬物を包埋させたものもある。また、前二者とは調製法がやや異なるが、TCP と HAP (水酸アパタイト) との二相構造⁷⁾ をもつ緻密質焼結体も骨補填材として上市されている。

本研究では、第二グループに属するアパタイト粒子と高分子との複合体を開発することにより、骨補填材への応用を目指した。従来、高分子には PMMA に代表される合成高分子が使用されてきたが、ここでは安全性や生体親和性を考慮し、新たにポリグルタミン酸ナトリウムや牛血清アルブミンなどの生体高分子を取り上げて複合体を調製した。本報告では、このような複合体を、例えば骨補填材料として使用する場合に問題となる圧縮強度特性、および、ガンの再発防止や

第39回粉体に関する討論会 (2001年11月, 東広島) にて発表
山口大学工学部応用化学工学科
(〒755-8611 宇部市常盤台2-16-1) TEL 0836-85-9251
Department of Chemical Engineering, Yamaguchi University
(2-16-1 Tokiwadai, Ube 755-8611)

Table 1 Properties of powder

Sample	$D_{p50}(\mu\text{m})$	$\sigma_g(-)$	$S_w(\text{m}^2/\text{kg})$
Raw powder	5.8	1.6	54
Mortar milling powder	3.4	1.5	65
Ball milling powder	2.9	1.3	90

消炎などを目的に材料に包埋させた薬物の溶出特性などについて、実験的に調べることを主眼とした。したがって、ペレット内部の微細構造までは調査していない。また、生体高分子との比較のため、従来から複合体調製に利用されている有機酸として、カルボン酸を添加した場合についても同様な実験を行った。

2. 実験試料と方法

2.1 試料

α -TCP 粉末 ((株) 和光純薬, 真密度 $2600\text{kg}/\text{m}^3$) は、原粉末と粉碎法の異なるもの 2 種類の併せて 3 種類を用いた。ここで粉碎粉末は、メノウ製乳鉢内で 3 分間すり潰すことで得られた粉末 (以下、乳鉢粉碎)、および、容量 0.25dm^3 のテフロン容器に高密度アルミナボールを入れ、24hr 乾式粉碎した粉末 (以下、ミル粉碎) である。Table 1 には、各粉末の 50 % 平均径 D_{p50} 、幾何標準偏差 σ_g および比表面積 S_w を示す。なお、粒度分布は顕微鏡で測定し、対数正規分布線図にプロットすることにより粒度特性値を得た。比表面積は空気透過式測定装置 ((株) 島津製作所) を用いて測定した。

添加物は、主に Fig. 1 に示す構造のポリグルタミン酸ナトリウム (以下 PSG, 分子量 $3000 \sim 7000$, (株) 味の素提供) を用いた。PSG は PMG をアルカリでケン化することで得られ、PSG をリン酸などで処理すると不溶性の PGA が得られる。PSG は最近、納豆由来の生体高分子として、発酵法で生産することも行われている。PSG との比較を目的に、他に牛血清アルブミン (以下 BSA, 分子量約 6 万, (株) 和光純薬, 組織培養グレード) や有機酸 (リンゴ酸: $\text{HOOCCH}_2(\text{OH})\text{COOH}$, (株) 和光純薬, 試薬特級) も使用した。溶出実験に用いた薬物は抗がん剤の 5-フルオロウラシル (5-FU, (株) 和光純薬, 試薬特級) である。

2.2 ペレット調製法

ペレット調製は以下に行った。 α -TCP 粉末 1g と薬物 0.03g を精秤し、所定量の添加物を純水に溶かした溶液 0.45ml を加え乳鉢内で混合した。得られたペーストを、厚さ 3mm, 直径 3mm の孔 24 個を

Fig. 1 Structure of PSG

開けたプラスチック板に充填した。なお、乳鉢粉碎した粉末を用いた場合には、粉碎後直ちに薬物と溶液を加え混練した。ペレットは室温で数時間放置し、適度な硬さになったところで型から取り出した。その後、リンゴ酸で調製したペレットは、デシケータ内で乾燥後、実験に供した。PSG および BSA の場合、ペレットは密閉ステンレス製反応器を用いて加熱調製した。すなわち、反応器内のテフロン製容器に少量の水を入れ、ペレットを水に触れないよう容器内に設置したステンレス金網上に置き、反応器を密閉した後、恒温乾燥器内で温度あるいは時間を変えて加熱した。その後、ペレットはデシケータ中に保存した。

2.3 薬物溶出特性および圧縮強度の測定

薬物溶出特性は以下のようにして測定した。250 ml トールビーカに純水 200ml を入れ、ビーカ直径と同じ寸法のステンレス金網製バスケットを液高さのほぼ中央にセットし、金網上にペレット 10 個を置いた。ビーカは最大 6 個まで恒温槽 (298K) に浸し、それぞれマグネチックスターで攪拌できる。所定時間経過後、ビーカ内の全溶液を純水と入れ替え、採取溶液の薬物濃度を吸光度計で測定した。溶出実験は薬物を検出しなくなるまで、最長 3 週間継続した。溶出実験終了後、積算溶出量は予定全量 2mg にほぼ等しくなった。

圧縮強度 $E(\text{MPa})$ は、円筒形のペレットを縦に置き、その一方の円形面に $12\text{kg}/\text{min}$ の載荷速度で垂直に荷重を加えて行き、ペレットが破壊した時の荷重を読み取りペレットの円断面積で割ることで求めた。

ペレットの空隙率は、添加物の添加率 α (kg/kg -apatite) および 1 個のペレットの質量と体積から算出した。体積は実体顕微鏡を用いて測定した寸法から求めた。測定は 5 ~ 6 個のペレットについて行い、空隙率は測定値 (平均値に対して $\pm 10\%$ 程度の偏差) の平均とした。

3. 実験結果および考察

3.1 ペレットの圧縮強度

Fig. 2 には、リンゴ酸添加時の圧縮強度 $E(\text{MPa})$ に及ぼす粉碎度合いの影響を添加率を変えて示した。同

Fig. 2 Influence of amount of addition of malic acid on compressive strength using various powder

一添加率の場合、強度は乳鉢粉碎した粉末を用いた場合が最大で、以下ミル粉碎粉末、原粉末の順になった。乳鉢粉碎した粉末で最大強度が得られたのは、乳鉢粉碎した直後の粉末を用いてペレットを調製したことにより、粒子表面の変化（例えば酸化など）が進行していないと考えられるため、添加物と表面との付着性あるいは結合性に優れていたことによると推測される。そこで、以下の実験はすべて乳鉢粉碎した粉末を用いて行った。

Fig. 3 は、PSG 添加下で強度に及ぼす加熱時間 θ の影響を加熱温度 T をパラメータに示した。強度は初め急増し、最大値を経て漸減する傾向を示した。強度が漸減した理由としては、後にも述べるように、PSG が長時間の加熱で流動性を有しペレット内を移動したため、ペレット内の場所で添加物量に偏りが生じ強度

Fig. 3 Effect of heating time and temperature on compressive strength of pellets

(a) before heating

(b) after heating ($T=323K$, $\theta=48h$)

Fig. 4 SEM micrographs of pellets (PSG, $\alpha=0.053$)

低下を招いたと推測される。 E が最大値に達する時間は、温度が高いほど短くなり、最大値は高温ほど若干大きくなることが分った。加熱により強度が増すのは、PSG の熱変性による硬化に加えて、Fig. 1 に示すように PSG の PGA への変化が相乗的に働いたためと思われる。実際、PSG は酸処理 (H_3PO_4 が最も効果的とされている) により不溶性の PGA に変化することを利用して PGA 繊維などに応用されている⁸⁾。そこで、このような酸処理の可能性を調べるため、5g のアパタイト粒子を 10ml の純水中に分散させ、テフロン製容器に密閉し 8hr, 353K で加熱したところ、初期 pH は約 8 から約 4 まで低下した。この pH 低下は、 α -TCP の加水分解反応により、水酸アパタイト ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) および H_3PO_4 が生成したことによるとと思われる¹⁾。ペレット調製時においても、飽和水蒸気下でペレットを加熱することで H_3PO_4 が生成したため、PSG から PGA への転換が進行したのであろう。Fig. 4 には、PSG を添加した場合の調製前後のペレット断面の SEM 写真を示す。加熱調製前では、PSG は薄片あるいは糸状に粒子間に存在する

Fig. 5 Effect of heating time and temperature on compressive strength

が、長時間の加熱で PSG が流動性を有し粒子間や表面に固着することにより、断面は平滑となっている様子が観察された。このように PSG が加熱時に流動性をもつことは、後に述べるペレットの圧縮強度特性にも影響を及ぼす。

Fig. 5 には、BSA を用いた場合の強度に及ぼすペレット調製条件の影響を示した。加熱温度を 373K とした場合、強度が約 55MPa と一定値になるためには約 60min の時間を要し、加熱時間を 30min とした場合は、強度が一定となるのは加熱温度 433K 近傍である。なお、加熱温度が 433K を超えると、ペレットは茶褐色に変色し焦げたような状態を呈したので、図に示していない。BSA はタンパク質であるから、硬化の原因は主に熱変性にあると思われる。

次に Fig. 6 には、高分子種類を換えた場合の圧縮強度に及ぼす高分子添加率の影響を示した。BSA およびリンゴ酸では、強度は添加率の増大とともに大きくなった。PSG の場合、強度は、添加率が約 0.05 までは添加率の増加とともに増大したが、それ以上では減少した。同様に調製した添加剤なしのペレット強度は小さく、添加剤を加えた場合に比べればほぼ無視できる程度であった。同一添加率では、強度はリンゴ酸、BSA、PSG の順に大きく、特に PSG では、少量の添加で高い強度が得られた。しかし PSG では、前記のように添加率が 0.05 以上で、強度が低下する現象が見られた。この調製条件下のペレットを観察すると、内部から溶け出したと思われる PSG の影響で、通常ざらざらしたペレット表面が滑らかで光沢を帯びた状態を呈していた。このことによりペレット内部の

Fig. 6 Change in compressive strength with amount of additives

PSG 量が減少し、前述のような圧縮強度の低下を招いたと推測される。なお、溶出実験前後の強度を測定したところ、リンゴ酸添加の場合、強度は実験前に比べて低下した。これは、実験後、溶液中のリンゴ酸濃度を測定波長を変えて分光光度計で調べたところ、リンゴ酸の溶出が観察されたことに起因すると思われる。BSA では、実験前後の強度に差はなかった。PSG では、実験後のペレット強度は実験前よりも増大し、添加率が 0.09 以下においても 60MPa に近い値となった。これは、ペレットが溶出実験中 (2~14 days) 水中に置かれたため、ペレット内部で常温下でも H_3PO_4 が生成し PSG から PAG への転換がさらに進んだためと思われる。なお、溶出実験後にペレットから BSA および PSG が溶出していないことは、分光光度計を用いた測定で確認した。

次に、添加物存在下における強度の増大が、単に空隙率の減少によるものかどうかを確かめた。Fig. 7 には、添加物種類ごとに空隙率 ε と添加率 α の関係を示した。空隙率は添加物種類によらず添加率の増大とともに減少した。添加率が 0.0135 と最大の場合を除いて、空隙率が全体として PSG や BSA に比べてリンゴ酸の場合に大きいのは、ペレット内部の生成物の密度を比べると、PSG や BSA の密度 (共に約 1000kg/m³) に比べてリンゴ酸由来の生成物の密度 (約 1600 kg/m³)⁶⁾ の方が大きいため、同一添加率ではリンゴ酸由来の生成物のペレット内で占める体積が小さくなったためであろう。Fig. 7 には、強度と空隙率との関係も併せ示した。強度は空隙率の減少に伴って増大するが、同一空隙率では Fig. 3 と同様に、PSG で最大で以下 BSA、リンゴ酸の順となった。したがって、強度は空隙率に依存するだけでなく、添加物の種

Fig. 7 Change in compressive strength with void fraction, and change in void fraction with amount of additives

類によっても、かなり異なることが分かる。

本実験条件下において、最大強度はPSGで添加率0.08、加熱温度353K、加熱時間10hrの調製条件下で約66MPa、BSAでは同じく0.14、373K、2hrで約56MPa、またリンゴ酸では添加率0.14で約37MPaと得られた。したがってPSGおよびBSAの場合、最大強度は同程度であるが、添加率が少なく済むPSGの方が添加物として優れていると言える。なお、PSGやBSAで得られた最大強度の値は、試験材料の寸法や形状および強度測定法が異なるので直接的な比較はできないが、高分子にpolymethylmethacrylateを用いた場合の値³⁾である約68MPaにほぼ匹敵する。

3.2 薬物溶出特性

Fig. 8には、BSAについて加熱温度一定下で加熱時間 θ をパラメータに、ペレット内薬物残留率 τ と経過時間 t との関係を示した。加熱時間 θ の増大とともにBSAの変性・硬化が進むため、溶出速度が低下しているのが分かる。PSGおよびリンゴ酸でも、強度の大きいペレットほど、溶出速度が低下する傾向が見られた。

薬物担体からの溶出モデルには、Higuchiモデル⁹⁾がよく用いられている。ここでは、ペレットが円柱形で寸法も大であることから、薬物溶出過程を拡散モデルで解析した。リンゴ酸の場合、薬物は粒子間に形成されたカルボン酸複合体（カルボン酸添加により溶出したカルシウムイオンとカルボン酸とが反応して生成した非晶質体⁸⁾）中に、また、PSGやBSAでは硬化した高分子内部に包埋されていると思われる。薬物はこれらの結合層中を拡散後、空隙部分を経て外部

Fig. 8 Change in fraction of drug release with time

に溶出する。ここでは、拡散係数はペレット内の場所が変わらないとして、ペレット全体で定義される見掛け拡散係数（以下、拡散係数）で溶出度合いを評価した。

縦横同寸法の円柱形ペレットの中心に原点をとる円柱座標系を採用することにより、多孔性固体の乾燥過程を表す拡散方程式¹⁰⁾を使用できて、式は以下のように与えられる。

$$\frac{\partial m}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 m}{\partial r^2} + \frac{\partial m}{r \partial r} + \frac{\partial^2 m}{\partial x^2} \right) \quad (1)$$

ここで、 m はペレット内の単位質量あたりの薬物量である。初期条件および境界条件は以下のように与えた。

$$t=0, m=m_0 \quad (2.1)$$

$$r=0, x=0, \frac{\partial m}{\partial r}=0, \frac{\partial m}{\partial x}=0 \quad (2.2)$$

$$r=a, x=a, m=0 \quad (2.3)$$

Eq. (2.3)で表される境界条件は、ビーカー内液中の薬物濃度が低く留まるよう溶液全量を入れ替えていること、および、溶液を充分攪拌していることから、ペレット表面における境膜抵抗を無視できるとして決定した。なお、ペレット中に初めに包埋された薬物量と溶液中に溶出した量とほぼ一致したので、ペレット内に残留する薬物量は無視できるとした。Eqs. (1)～(2.3)の諸式から級数解が得られている¹⁰⁾。拡散係数 D は溶出実験からの実測結果と計算値を直接比較する手法、いわゆるfitting法を用いて次式から算出した。

$$D = (Dt/a^2)_{\text{theo}} / (t_{\text{exp}}/a^2) \quad (3)$$

Fig. 9には、Eq. (3)から計算した図中の表に示す

Fig. 9 Change in fraction of drug release with dimensionless time

拡散係数を用いて、 τ と無次元時間 Dt/a^2 との関係を示した。実測値は加熱温度によらずほぼ一本の曲線上にあり、計算値との一致もよい。したがって、ペレット内の溶出過程はEq. (1)で表される拡散方程式でほぼ近似できると思われる。

Fig. 10には、Fig. 6に示す α vs. E の調製条件と同じ条件下で行った薬物溶出実験結果を α vs. D で示した。拡散係数は、添加物種類によらず、添加率 α の増大とともに減少しているが、PSGおよびBSAでは、 α が約0.1以上でほぼ一定となる傾向を示す。また、同一添加率では圧縮強度の場合とは逆に、拡散係数はPSGが最も小さく、以下BSA、リンゴ酸の順となるが、添加率が0.1以上ではPSGおよびBSAの値は、ほぼ同程度となった。

なお、今後ペレット内の微細構造を調査することにより、本論文で得られた実験結果との対応について検討する必要があると思われる。

Fig. 10 Comparison between diffusion coefficient and amount of additives

4. 結 言

骨代替材料や薬物溶出用担体の開発を目的に、生体親和性をもつアパタイト微粒子とPSGやBSAなどの生体高分子との組み合わせでペレットを調製し、その圧縮強度や薬剤溶出特性（見掛け拡散係数）について実験的に検討し、以下の知見を得た。

- 1) ペレット圧縮強度は、同一高分子添加率では、PSGが最大で以下BSA、リンゴ酸の順となった。最大強度は、PSGで添加率0.08、加熱温度353K、加熱時間10hrの調製条件下で約66MPaと得られた。この圧縮強度は、添加剤にpolymethylmethacrylateを用いた場合の強度約68MPaにほぼ匹敵した。
- 2) ペレットからの薬物溶出過程は、多孔性固体の乾燥過程を表す拡散方程式で解析できた。
- 3) 見掛け拡散係数は、PSGで最小となり、以下BSA、リンゴ酸の順となった。

Nomenclature

a : dimension of pellet	(m)	t : drug release time	(h)
D_{p50} : median diameter	(m)	x : distance along the axis of pellet	(m)
E : compression strength	(Pa)	α : mass ratio of additives to apatite powder	(kg/kg-apatite)
m : amount of drug contained in pellet	(kg/kg-apatite)	ε : void fraction of pellet	(-)
m_0 : initial amount of drug contained in pellet	(kg/kg-apatite)	θ : heating time	(h)
r : distance from the center of pellet	(m)	σ_g : geometric standard deviation of particle size distribution	(-)
S_w : specific surface area of apatite powder (m ² /kg)		τ : fraction of drug release ($=m/m_0$)	(-)
T : heating temperature	(K)		

References

- 1) Monna, H., M. Goto and T. Kohmura : "Effect of Additives on Hydration and Harding of Tricalcium Phosphate", *Gypsum and Lime*, **188**, 11-16 (1984)
- 2) Otsuka, M., Y. Matsuda, Z. Wang, J. L. Foxs and W. I. Higuchi : "Effect of Sodium Bicarbonate Amount on In Vitro Indomethacin Release from Self-Setting Carbonated Apatite Cement", *Pharm. Res.*, **14**, 444-449 (1997)
- 3) Saha, S. and S. Pal : "Mechanical Properties of Bone Cement, A Review", *J. Biomed. Mater. Res.*, **18**, 435-462 (1997)
- 4) Tamura, J., K. Kawanabe, T. Yamamoto, T. Nakamura, T. Kokubo, S. Yoshihara and T. Shibuya : "Bioactive Cement : The Effect of Amounts of Glass Powder and Histologic Changes with Time", *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 551-559 (1995)
- 5) Otsuka, M. and Y. Sugiyama : "Development of Drug Delivery Systems using Bioactive Calcium Glass/ Polymer Complex Bone Cement", *Hosokawa Powder Tech. Foundation, Annual Report*, **7**, 82-88 (1999)
- 6) Toyama, T., T. Yasue and Y. Arai : "Preparation of Hardened Hydroxyapatite Bodies from Amorphous Calcium Phosphate", *J. Ceramic Soc. of Japan*, **106**, 984-988 (1998)
- 7) Kondo, K., M. Okuyama and H. Ogawa : "Preparation of High-Strength Apatite Ceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, **67**, 222-223 (1984)
- 8) Fujimoto, Y. ed. : "Poriaminosann no Ouyou to Tenbou", p. 342, Kodansha, Tokyo (1974)
- 9) Higuchi, T : "Rate Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension", *J. Pharm. Sci.*, **50**, 874-876 (1961)
- 10) Newman, A. B. : "The Drying of Porous Solids : Diffusion Calculations", *Trans. A. I. Ch. E.*, **27**, 1310-1333 (1931)