



Title	A Study of the Apatite-Collagen Composites
Author(s)	徐, 潤
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37790">https://hdl.handle.net/11094/37790</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	徐 潤
博 士 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 0 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 3 月 9 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	<b>A Study of the Apatite-Collagen Composites</b> (アパタイト・コラーゲン複合体に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 木村 博 (副査) 教授 土谷 裕彦 講師 松尾 三郎 講師 木村 重信

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### (研究目的)

骨の主要無機成分は、炭酸イオンを数%含むいわゆる炭酸アパタイトであり、結晶性は低く、比較的溶解もし易い。一方、人工的に合成したアパタイトは生体親和性が良好なことから、最近、臨床的に広く使用されている。しかし、今まで使用されてきたほとんどの人工アパタイトは高温で焼結され、結晶性も良いため、埋植部位で骨が再生した後も代謝されず残存し、生体骨とは性状も異なっている。また、粉末、顆粒状のままでは形態維持に難点があり、ブロック状では成形加工性に問題がある。

そこで、本研究では生体親和性と形態維持性および成形加工性を備えた骨補填材を考案することにした。結晶性と化学的組成が、骨アパタイトに類似した合成非焼結炭酸アパタイトと、結合材としての酵素処理したアテロコラーゲンを混合することにより、アパタイト・コラーゲン複合体を作製し、新しい生体材料の開発に取り組んだ。

#### (研究材料および方法)

1) 炭酸アパタイト合成とアパタイト・コラーゲン複合体の作製：200mM-Ca  $(\text{CH}_3\text{COOH})_2\text{H}_2\text{O}$  溶液と60mM- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 溶液を含む120mM-NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液を攪拌中の1.3M-CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>溶液へ供給し、炭酸アパタイトを pH 7.4±0.2, 60°Cで合成した。得られた粉末試料については X 線回折による同定を行うとともに化学分析も行った。一方、酵素処理により抗原抗体反応が除去された市販牛皮由来のアテロコラーゲン（ニッピ株）を10<sup>-3</sup>N-HClで溶解しゲルを調整し、0.05N-NaOHで中和後、炭酸アパタイト粉末と混合、風乾後、成形容易なアパタイト・コラーゲン複合体ペレット（3mm φ×1mm, 5mm φ×1mm）を作製した。一方、この複合体は溶液内で容易に崩壊するので、UV線を照射する

ことによりコラーゲンの架橋を向上させ、複合体の不溶化をはかった。

- 2) 水溶液中での崩壊度の検討：複合体の溶液中での形態維持の程度を検討するため、UV 非照射および照射10wt%または5 wt%のコラーゲンを含有する複合体試料を0.9 wt%NaCl溶液中に、37°Cで一定期間浸漬後、試料の重量減少量を検討した。また、溶液中に残留する沈澱物を0.1N-HClを添加して完全に溶解した後、溶液中の全  $\text{Ca}^{2+}$  イオン濃度を原子吸光分析計で定量することにより複合体の崩壊度を検討した。
- 4) コラーゲンの溶解度の検討：コラーゲンの溶解度を分析するために、5 %コラーゲン・ゲルに異なる量のコラゲナーゼを37°Cで作用させた。また、10unit のコラゲナーゼを異なる濃度のコラーゲン・ゲルに作用させ、分解したハイドロキシプロリンの量を560m  $\mu$ で比色定量した。一方、複合体からのコラーゲンの溶解度は、UV照射および非照射複合体試料を生理食塩水中へ24時間、37°Cで浸漬後、その溶液中のハイドロキシプロリン量を定量することにより求めた。
- 4) 複合体の細胞毒性実験：複合体の生体親和性の定量的検討のため、炭酸アパタイト粉末および、UV照射した異なる濃度のコラーゲン含有複合体をMEM(Minimum Essential Medium) 中に入れ培養液を調整後、L-929 細胞を37°Cで72時間培養し、その溶液中での増殖経時変化を観察した。
- 5) 複合体を用いた動物実験：Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、UV照射アパタイト・10wt%コラーゲン複合体をラット下頸縁に埋入し、12週まで緻密骨部位で光顕(LM)的観察を行った。また、UV照射アパタイト・10wt%コラーゲン複合体と非焼結CO<sub>3</sub>アパタイト粉末を家兎脛骨に埋入し、4週間まで海綿骨部位を光顕(LM)および電顕(TEM)で観察した。

#### (研究結果および考察)

- 1) 炭酸アパタイトの合成とアパタイト・コラーゲン複合体の物性：炭酸アパタイト粉末試料のX線回折パターンは、生体骨と類似し、結晶性は低かった。また、このアパタイトは骨に類似した濃度の炭酸イオン(CO<sub>3</sub>=3.9 wt%)を含んでいた。複合体の賦形材に及ぼすUVの影響を検討するため、1週間、0.9 %NaCl水溶液中で浸漬した場合、UV 非照射 5 wt%コラーゲン複合体は、ほぼ完全に崩壊したが、UV 照射10wt%と30wt%コラーゲン複合体は崩壊しなかった。
- 2) 水溶液中での崩壊度の検討：UV 照射アパタイト・5 wt%および10wt%コラーゲン複合体試料では、1週間後の重量減少が各々2.1 %、1.3 %と少なかったが、UV 非照射試料では経的に重量が減少し、5 wt%および10wt%コラーゲンを含有する複合体試料は各々17.4%，12.3%と減少した。UV 照射10wt%コラーゲン複合体の崩壊度が最も低く、UV 非照射 5 wt%コラーゲン複合体のものが最も大きかった。Ca<sup>2+</sup> イオン濃度の定量結果でも UV 照射試料の崩壊度は1週間後も低く安定であったが、UV 非照射試料では経的に濃度が増加し、5 wt%より10wt%コラーゲンを含む試料からの溶出濃度は少なかった。
- 5) コラーゲンの溶解度の検討：コラーゲン・ゲルがコラゲナーゼで溶解されて生成するハイドロキシプロリン量は、1時間以内に増加したが、その後変化は少なかった。一方、UV 非照射複合体のコラーゲンが、コラゲナーゼで溶解されて出るハイドロキシプロリン量は1時間以内に増加し、その後、変化は少なかった。UV 照射された複合体からの溶出量は24時間の間は少量で、その後、少しづつ増加

した。特に、10wt%のコラーゲンが含有された複合体は安定であった。

4) 複合体の細胞毒性実験：複合体からの溶出物を含む MEM を作成後、その溶液中でのL-929 細胞の増殖を検討した。1 ml中の初期細胞数  $1 \times 10^5$  個の場合、複合体のコラーゲン含有量と関係なしに、4日目まで対照群とほぼ同じ程度の増殖を示し、その後は対照群の減少と同様のパターンを示した。一方、 $5 \times 10^4$  個の場合、5 wt%および10wt%のコラーゲン含有複合体からの溶出物を含む溶液中での細胞増殖は、7日目まで対照群に比べ軽度の増加を示した。

5) 複合体の生体反応：アパタイト・コラーゲン複合体をラットの下顎縁に埋入し、緻密骨部位で光顯により検討した。埋入2週後の所見では、アパタイト顆粒が、成長した骨細胞に不連続的に包囲され、周囲空間は骨芽細胞で満たされ、ハーバシアン腔も出現した。4週後では、アパタイト顆粒が正常骨に連続的に包囲されハーバシアン腔も多かったが、線維細胞は認められなかった。8週、12週後では、成熟した骨だけで満たされていた。一方、非焼結  $\text{CO}_3$  アパタイトを粉末または複合体の主成分として家兎の脛骨に埋入し、海綿骨部位で光顯および電顯により検討した。その結果、粉末あるいは複合体はいずれも海綿骨の骨梁の再生中に徐々に吸収された。また、細胞中にアパタイト結晶を含有する巨核細胞を認めた。このことはその細胞がアパタイトの吸収と密接な関係がある事を示唆した。複合体の結合材であるコラーゲン線維は、骨欠損の治癒過程を障害することなく、アパタイトが吸収される時まで良好に保持された。骨の再生では複合体を埋入した欠損群が最も早く再生され、ついで対照群、炭酸アパタイト粉末埋入群の順であった。

#### (結論)

1. 骨と類似した結晶性と化学組成を有する炭酸アパタイトの合成が可能となった。
2. UV 照射はコラーゲンの不溶化に効果的であり、UV 照射アパタイト・10wt%コラーゲン複合体は崩壊度も小さく、著名な細胞毒性を示さないことから、生体材料として有効なものとなり得ることが明かとなった。
3. 骨内へ埋入されたアパタイト・コラーゲン複合体の各組成としての炭酸アパタイトは骨欠損部位の再生中に吸収され、一方、アテロコラーゲンは骨欠損部位の治癒促進にも関係することが示唆された。以上、炭酸アパタイトをアテロコラーゲンと混合して作製した複合体は、UV 線照射により形態維持や成形加工性が付与でき、生体毒性もなく、高い生体親和性を持つことが明かとなった。また、この複合体を骨内へ埋入すると、骨再生が促進されることから、有効な骨補填用生体材料として応用可能であることが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は生体親和性と形態維持性および成形加工性を備えた骨補填材を考察することを目的としたものである。結晶性と化学的組成が、骨アパタイトと類似した合成非焼結炭酸アパタイトと、結合材としてのアテロコラーゲンを混合することにより、アパタイト・コラーゲン複合体を作製し、その物性と生

体親和性について検討している。その結果、この複合体はUV線照射により形態維持性や成形加工性が付与でき、生体毒性もなく、高い生体親和性を持つことが明らかとなった。また、この複合体をラットと家兎の骨内へ埋入すると、骨再生が促進されることから、有効な生体材料として応用できることを示唆している。本研究で得られた知見は新しい骨補填材を開発する上で価値あるものである。

従って、本研究は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。