The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ハイドロキシアパタイト－可溶性リン酸カルシウム複合体の生体親和性と骨再生能に関する研究
Author(s)	緒方, 維教
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44023
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【8】

氏　　名	緒方維教（おがたこれのり）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　17726　号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学　位　論　文　名	**ハイドロキシアパタイト－可溶性リン酸カルシウム複合体の生体親和性と骨再生能に関する研究**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　恵比須繁之 （副査） 教　授　高橋　純造　　助教授　松本　　憲　　講　師　北村　正博

論文内容の要旨

【研究目的】

ハイドロキシアパタイト（HAp）は、生体親和性が高く骨伝導能に優れていることから、骨補填材としての有用性に関する多くの研究が行われ、歯科領域や整形外科領域においてすでに臨床応用されている。しかしながら、HApは、溶解性が低く吸収されにくいため、骨欠損部に埋入した後も生体内に長期間残留し、新生骨への置換が阻害されることが問題となっている。そこで、より有益なHAp系骨補填材を開発することを目的に、市販のHApブロックを真空環境下で熱処理し、表層および粒界にα-リン酸三カルシウム（α-TCP）、リン酸四カルシウム（TetCP）および非晶質の酸化カルシウムを析出させて、HApコアと可溶性リン酸カルシウムからなる複合体を試作した。本研究では、このHAP－可溶性リン酸カルシウム複合体（HAp/SCaP複合体）の溶解性を調べるとともに、MC3T3-E1細胞培養系を用いて、HAp/SCaP複合体上での骨芽細胞様細胞の付着・増殖と、複合体からの溶出物が細胞の分化と石灰化に及ぼす影響について検討した。さらに、ビーグル犬の抜歯窩に埋入したHAp/SCaP複合体に対する組織反応を検索し、本複合体の生体親和性と骨補填材としての有用性について検討を加えた。

【方法】

緻密性のHAp（ボーンセラムK、φ8.0×2.0 mm）および多孔性のHAp（ボーンセラムP、5.0×3.0×2.0 mm）を真空環境下で1350℃にて1時間あるいは10時間熱処理し、HAp/SCaP複合体試料を作製した。

1．HAp/SCaP複合体からのCa溶出量の測定

緻密性のHAp/SCaP複合体試料を、pH 4.0の酢酸緩衝溶液あるいはpH 7.2のリン酸緩衝溶液に浸漬し、原子吸光分析法によりCaの溶出濃度を経時的に測定した。

2．α-TCPやTetCPが細胞の増殖、分化および石灰化に及ぼす影響の検討

分化誘導培地に1 μMか10 μMのα-TCPあるいはTetCPを添加し、12時間から7日間MC3T3-E1細胞を培養した後に、細胞数の計測とAlkaline Phosphatase（ALP）活性の測定、ならびにRT-PCR法によるtype I collagen、osteopontin、osteocalcinのmRNAの発現の検索を行った。さらに、石灰化物の生成を4日間から14日間培養後に観察した。

3．HAp/SCaP複合体試料上での細胞の付着・増殖状態の評価

緻密性の HAp/SCaP 複合体試料上に MC3T3-E1 細胞を播種し、12 時間から 10 日間培養後、走査型電子顕微鏡（SEM）による細胞付着状態の観察と試料上の細胞数の計測を行った。さらに、試料を培地に浸漬した後の表面性状の変化を SEM にて観察した。

4．HAp/SCaP 複合体からの溶出成分が細胞の分化と石灰化に及ぼす影響の検討

緻密性の HAp/SCaP 複合体試料を 37℃にて 4 時間浸漬して可溶性成分を溶出させた培地を用いて 12 時間から 7 日間 MC3T3-E1 細胞を培養し、細胞の ALP 活性、骨分化マーカーの発現および石灰化物の生成について検討した。

5．HAp/SCaP の複合体の *in vivo* における吸収性と骨再生状態の観察

6－8 カ月齢雄性ビーグル犬の抜歯窩に多孔性の HAp/SCaP 複合体試料を埋入し、1 および 3 カ月経過後に非脱灰研磨標本を作製して、試料の内部と周囲での骨再生の状態を観察した。

【結果】

1．HAp/SCaP 複合体からの Ca 溶出量

酸性あるいは中性いずれの環境下でも HAp/SCaP 複合体からの Ca の溶出が認められ、浸漬初期における溶出濃度は、複合体の熱処理時間が長いほど高かった。

2．α-TCP や TetCP が細胞の増殖、分化および石灰化に及ぼす影響

いずれの濃度のα-TCP あるいは TetCP を添加しても培養後の細胞数には影響が認められなかったが、α-TCP や TetCP の添加により ALP 活性の有意な上昇と type I collagen mRNA の発現の増強が認められた。また、α-TCP あるいは TetCP の存在下では、より早期に多量の石灰化物が生成することが確認された。

3．HAp/SCaP 複合体試料上での細胞の付着・増殖状態

HAp/SCaP 複合体試料上では、良好な細胞の付着と増殖が観察され、培養 7 日目以降には熱処理を施していない HAp 試料に比べて細胞数が有意に多くなった。また、HAp/SCaP 複合体試料表面は、培地への浸漬 1 日後には明らかに粗造となっており、10 時間熱処理を施した試料で粗造化がより顕著であった。

4．HAp/SCaP 複合体からの溶出成分が細胞の分化と石灰化に及ぼす影響

HAp/SCaP 複合体からの溶出成分を含む培地を用いて培養を行った場合、培養 3 日後の ALP 活性が有意に上昇し、培養 12 時間および 1 日後において type I collagen mRNA の発現が増強された。さらに、多量の石灰化物の生成が早期に誘導された。これらの効果は、熱処理時間が長いほど顕著であった。

5．HAp/SCaP 複合体の *in vivo* における吸収性と骨再生状態

熱処理を施していない HAp の場合は、抜歯窩に埋入後 3 カ月経過しても骨様組織の侵入が表層にとどまっていたのに対し、HAp/SCaP 複合体では、試料表面から吸収が生じ、試料体の深部まで骨様組織が浸入している像が観察された。

【考察および結論】

MC3T3-E1 細胞を用いた *in vitro* での実験において、HAp/SCaP 複合体からの可溶性成分の溶解によって表面の粗造化が生じ、細胞の付着が促進された。また、これらの溶解成分は ALP 活性および type I collagen mRNA の発現を増強し、さらに、多量の石灰化物の形成を早期に誘導した。すなわち、HAp/SCaP 複合体からの溶出成分によって MC3T3-E1 細胞の分化と石灰化が促進されることが明らかとなった。一方、ビーグル犬を用いた *in vivo* 実験により、HAp/SCaP 複合体を顎骨内に埋入すると、複合体の表層より吸収が起こり、骨様組織に置換されることが確認された。

以上のように、HAp/SCaP 複合体は、生体親和性に優れ、α-TCP や TetCP が溶解して骨新生を促進することから、臨床応用する上で大きな利点を有していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ハイドロキシアパタイト（HAp）ブロックを真空環境下で熱処理することにより得られた HAp－可溶性リン酸カルシウム複合体（HAp/SCaP 複合体）の生体親和性と骨再生能を、*in vitro* における骨芽細胞様細胞との相互作用と動物実験での組織反応という観点から評価したものである。その結果、HAp/SCaP 複合体中の可溶性成分

であるα-TCP と TetCP が溶解することにより、骨芽細胞様細胞のアルカリフォスファターゼ活性および type I collagen mRNA の発現が増強され、石灰化物の形成が促進されることが明らかにされた。また、ビーグル犬顎骨内に HAp/SCaP 複合体を埋入すると、表層より吸収が生じて骨組織に置換されることが明らかとなり、本複合体がすぐれた生体親和性と骨再生能を有していることが示された。

以上の研究成果は、骨補填材として現在応用されている HAp の欠点を補い、より有用な HAp 系材料を実現する上で貴重な知見を提供するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。