

氏名(本籍) : 佐野有哉

学位の種類 : 博士 (歯学) 学位記番号 : 歯博第639号

学位授与年月日 : 平成25年3月27日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : Evaluation of in vitro and in vivo absorbability of biodegradable hydroxyapatite granules prepared using hydrothermal synthesis (水熱合成法で作製された生体吸収性 HA 顆粒の in vitro および in vivo における吸収性評価)

論文審査委員 : (主査) 教授 佐々木 啓一
教授 鈴木 治 教授 高橋 哲

論文内容要旨

【目的】本研究では、生体吸収性を有するハイドロキシアパタイト (HA) を作製するために、水熱合成法を応用し、結晶アスペクト比およびカルシウムリン (Ca/P) 比の異なる2種のHA顆粒(直径300-500 μm および800-1000 μm) を作製した。この2種の生体吸収性HAを使用して、ラット頭蓋冠に形成したクリティカルサイズ骨欠損部への埋入実験、および炎症環境における低pH環境を模した酢酸緩衝液への浸漬実験により、HA顆粒の吸収挙動について、化学的、組織学的および形態計測学的な検討を行うことを目的とした。

【方法】アスペクト比とCa/P比の調整に関して、 α -リン酸三カルシウム粉末を下記の通り処理し、2種の吸収性HA顆粒(直径300-500 μm , 直径800-1000 μm) を作製した。一つ目は160°Cで処理し、低アスペクト比、高Ca/P比を有するHA顆粒 (SRHA) を作製した。もう一つは、硝酸水溶液 (pH3)、120°Cにて処理し、高アスペクト比、低Ca/P比を有するHA顆粒 (LRHA) を作製した。

これらHA顆粒の生体内での骨形成能・適合性を評価するため、ラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて、HA顆粒(300-500 μm)の埋入実験を行った。24匹のWistar系ラット(12週齢)の頭蓋冠に直径8.8mmの骨欠損を形成し、SRHA埋入群およびLRHA埋入群の各群12匹ずつに対し、HA顆粒20mgを埋入した。手術後4週、24週に屠殺し、マイクロCTにより新生骨形成について評価した。さらに脱灰標本作製し、HA顆粒内部への組織侵入に関して組織学的に面積計測を行った。

加えて、in vitroにおける吸収性評価のために各HA顆粒(直径800-1000 μm)を、生体内での炎症による低pH環境を模した酢酸緩衝液(pH5.0)に浸漬後、1,2日後の結晶構造の検討(SEM)を行った。さらに、in vivoにおける吸収性評価のため、各HA顆粒(直径800-1000 μm)をラット頭蓋冠の直径3.8mm骨欠損部に埋入した。手術後4週に屠殺し、凍結乾燥標本作製し、結晶の分解局在・結晶構造・細胞侵入の観察(SEM)を行った。

【結果および考察】SEM, XRD により, 2種の HA はともに HA 単相の柱状結晶を有し, アスペクト比は 11 (SRHA), 42 (LRHA) であった。Ca/P 比は 1.58 (SRHA), 1.53 (LRHA) であった。骨形成評価では, 明らかな差は見られなかった (マイクロ CT)。組織学的評価では SRHA よりも LRHA の方が顆粒内部への組織液や細胞の侵入が多く認められた (HE 染色)。酢酸緩衝液浸漬試験では, ともに柱状結晶の溶解による小孔の形成が認められた (SEM)。ラット頭蓋冠における吸収性評価では, 破骨細胞が侵入する前に柱状結晶の吸収が始まり (SEM), 酢酸緩衝液浸漬による吸収挙動と類似していた。

審査結果要旨

腫瘍や外傷などによる自己修復不可能な大きさの骨欠損が生じた際に, 自家骨移植による修復のみではなく, 人工材料による修復が多く行われている。人工材料として多く使用されているハイドロキシアパタイト (HA) は, 生体吸収性が乏しいことから, 術後, 体内に長期間残存してしまう欠点を有していた。近年の研究により, 生体内で吸収され骨に置換される特徴を持つ HA が開発された。しかし, この HA が生体内で吸収されるメカニズムに関しては未だ詳細が明らかになっていない。

本論文は, 水熱合成法を応用して作製された結晶アスペクト比およびカルシウムリン (Ca/P) 比の異なる 2種の HA 顆粒の, *in vitro* および *in vivo* における吸収挙動について, 化学的, 組織学的および形態計測学的な比較検討し, 本 HA 顆粒の吸収メカニズムを解明することを目指したものである。

研究では, アスペクト比と Ca/P 比の調整に関して, リン酸三カルシウムを出発材料として, 2つの条件, すなわち①蒸留水 (pH7), 160°Cで処理し, 低アスペクト比, 高 Ca/P 比を有する HA 顆粒 (SRHA), ②硝酸水溶液 (pH3), 120°Cで処理し, 高アスペクト比, 低 Ca/P 比を有する HA 顆粒 (LRHA) で処理し, 2種の HA 顆粒が作製された。評価としては, ラット頭蓋骨に骨欠損を設け各 HA 顆粒の埋入実験を行い, マイクロ CT を用いて生体内での骨形成能が評価された。また脱灰標本を用いた HA 顆粒内部への組織侵入に関する組織学的な面積計測と, 凍結乾燥標本を用いた HA 結晶の分解局在・結晶構造・細胞侵入の観察により *in vivo* の吸収性評価がなされた。加えて, 生体内の炎症による低 pH 環境を模した酢酸緩衝液 (pH 5.0) に各 HA 顆粒を浸漬し, 結晶構造の変化の観察により *in vitro* の吸収性評価がなされた。

その結果, SRHA および LRHA はともに HA 単相の柱状結晶を有し, アスペクト比はそれぞれ 11, 42 で, Ca/P 比はそれぞれ 1.58, 1.53 であることが判明した。骨形成評価では, 明らかな差は見られなかったが, 組織学的評価では SRHA よりも LRHA の方が顆粒内部への組織液や細胞の侵入が多く認められることが示された。酢酸緩衝液浸漬試験では, ともに柱状結晶の溶解による小孔の形成を認めている。一方, ラット頭蓋冠における吸収性評価では, 顆粒内へ破骨細胞が侵入するより前に柱状結晶の吸収が始まっていることを確認し, これが酢酸緩衝液浸漬による吸収挙動と類似していることを指摘している。

これらの結果は, HA の生体内埋入後の初期吸収は, 埋入部位周囲の炎症による pH 低下に起因すること, そして HA 合成条件を調整することで HA 吸収スピードのコントロールが可能であることを示唆したものであり, 人工材料としての HA の吸収メカニズムを解明するとともに新規材料開発に資する知見を提供したものである。よって歯科医学, 歯科医療への貢献は大であり, 博士 (歯学) に相応しいものと判断する。