

内 94-48

早稲田大学大学院理工学研究科

博 士 論 文 概 要

論 文 題 目

Preparation and Biocompatibility of
Several-Ion-Substituted Hydroxyapatite

各種イオン置換ハイドロキシアパタイトの
合成と生体親和性

申 請 者

菊池 正紀

Masanori KIKUCHI

資源及び材料工学専攻
資源科学研究

1994年 12月

ハイドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、以下HAp)は脊椎動物の歯や骨を構成する主要無機成分である。HAp焼結体は結合組織の介在なしに、生体組織と直接結合する生体活性な材料である。焼結体、顆粒体、多孔体、金属材とのコーティング複合体などの形で、医学、歯学分野に応用され、臨床的にも著しい成果を上げている。HApはその結晶構造中に、比較的容易に各種のイオンまたは原子団を取込み、その機械的強度や溶解度などの物理的・化学的性質を変化させることが知られている。しかし、陽イオンの置換サイトを決定した研究、イオン交換による新しい生体材料の開発はほとんど為されていない。運動により骨中のSr濃度が増加し骨強度を変化させるなど、生体内ではHAp中の微量元素の固溶量が環境によって変化する、骨や歯の性質を環境に合うように変化させていることが報告されている。

以上の背景を踏まえ、本研究では、Srを固溶したHApのSrの置換サイトを決定するため、Sr固溶HAp単結晶を水熱合成し、単結晶構造解析を行った。ストロンチウムハイドロキシアパタイト、バリウムハイドロキシアパタイトを湿式合成し、犬を用いた動物実験及び、細胞培養試験により、生体親和性を評価した。DNA合成抑制作用のある重水を用いて、水素を重水素と置換した重水酸アパタイトを湿式合成し、その加熱変化を調べた。また、歯や骨の発生段階における石灰化の進行度とHApの化学組成変化の関係を調べた研究はあまり為されていないので、子牛の未崩出歯を用いて成熟期エナメル質のHApを結晶化学的に評価し、エナメル質発生期および成熟期に於けるHApの化学組成の変化とエナメル芽細胞の働きについて考察した。

本論文はこれらの研究をまとめたものであり、10章より構成される。以下にその概要を述べる。

第一章は序論であり、本論文の目的と意義、背景および従来の研究について述べるとともに、本論文の構成を記述している。

第二章は水熱条件下におけるストロンチウム置換ハイドロキシアパタイト単結晶の合成に関する研究結果を述べている。反応容器は、内容積200cm³のステンレス製テストチューブ型オートクレーブを用いた。出発物質は、 CaHPO_4 及び SrHPO_4 を用いた。Sr置換HAp単結晶は $\text{Sr}_3(\text{PO}_4)_2$ と共生することが判った。出発物質のSr量、反応時間、反応温度が増加するに伴い、反応後の溶液のpHが中性領域に近付き、Sr置換HApの生成を抑えることが判った。生成したSr置換HAp中のSr量は出発物質中のSr量の増加に伴って多くなったが、Sr/(Ca+Sr)原子比で40%を越えることはなかった。格子定数はSrの置換率に伴って大きくなった。一部の生成物中にSr置換HApとともにSr端成分のストロンチウムハイドロキシアパタイト(Sr-HAp)が共生した。これはSrの優先置換サイトの存在のためと考えられた。

第三章は、ストロンチウムハイドロキシアパタイト($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、Sr-HAp)の湿式合成と、焼結体の作製に関する研究結果を述べている。Sr-HApは出発物質に

$\text{Sr}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ および H_3PO_4 を用いて合成した。合成時に超音波ホモジナイザーを用いて粒子の分散性を高めた。得られた微粒子はSr-HAp単相であった。1073Kで仮焼した試料はほぼ化学量論的なSr/P原子比1.68を示した。密度は4.00(1)g/cm³であった。格子定数は $a=9.746(2)\text{\AA}$ 、 $c=7.273(2)\text{\AA}$ であり、IRで確認された炭酸基のリン酸基への置換によるa軸の僅かな収縮が認められた。このSr-HAp微粒子の一部を1073Kで3時間仮焼後、バインダーを加え149μm以下に粉碎した。この粉末をステンレス製金型にて78.4MPaで成形し、1473Kで1時間焼成することにより相対密度96%の緻密焼結体を作製した。

第四章は、バリウムハイドロキシアパタイト($\text{Ba}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、Ba-HAp)の湿式合成と、焼結体の作製に関する研究結果を述べている。Ba-HApは出発物質に $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ および $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ を用いて合成した。途中pHを13に保つためにアンモニア水を加えた。得られた粉末はBa-HAp単相であった。これを333Kで24時間乾燥後1073Kで3時間加熱してBa-HAp仮焼粉末を作製した。Ba/P原子比は1.76と化学量論的な1.67と比較して大きかった。密度は4.725(1)g/cm³であった。格子定数は $a=10.191(3)\text{\AA}$ 、 $c=7.747(3)\text{\AA}$ であり、a軸に収縮が認められた。これはIRで見られた強いCO₃の吸収から、炭酸基のリン酸基への置換によるものと考えられた。この粉末にバインダーを加え149μm以下に粉碎したものを、直径3cmのステンレス製金型にて78.4MPaで成形した後に1073Kで12時間焼成し、相対密度92%の緻密焼結体を作製した。この焼結体の曲げ強度は29MPaで、ヤング率は27GPaであった。これはHApやSr-HAp焼結体の強度と比較して、1/2から1/3程度の値であった。

第五章は、HApのHをDで置換した重水酸アパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OD})_2$ 、DAP)の合成と、その加熱変化に関する研究結果を述べている。密閉系にてCaOおよびP₂O₅にD₂Oを加えて得た $\text{Ca}(\text{OD})_2$ および D_3PO_4 を、激しく攪拌しながら混合することによりDAP粉末を得た。DAP中のOD基は常温では蒸留水中で安定であった。しかし、高温IR測定、高温粉末X線回折測定より333K以上の加熱によりHとの置換によらずにD₂O乃至はHDOとして脱離し、オキシアパタイトとなり、それにともない1073K以上で異常な熱膨張を起こすことが判った。

第六章は、ストロンチウム置換ハイドロキシアパタイト単結晶を用いたX線構造解析に関する研究結果を述べている。第二章の結果を基に、内容積1000cm³、長さ60cmの長管型オートクレーブを用いて下部を493Kから523Kに、上部を493Kから603Kに昇温する、逆温度差徐温法にてSr置換HAp単結晶を育成した。得られた単結晶は無色透明で、最長6mmの針状結晶であった。光学的特性はHApと相違はなかった。赤外吸収スペクトルから、僅かにHPO₄基が存在することが判った。化学分析値からこの単結晶の組成は $\text{Ca}_{9.42}\text{Sr}_{0.18}\text{H}_{0.8}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ であることが判った。Weissenberg法からSr置換HApの空間群はP6₃/mと決定した。構造解析の結果Srは、Sr置換塩素アパタイトでの報告とは異なり、全てCa(1)サイトに存在し、Ca(2)サイトには存在しないことが判った。これは、溶液中で、Srが、Ca(1)チャンネルを通し

てイオン置換をしているためと考えられた。

第七章は、第三章で作製したSr-HApの生体親和性に関する研究結果を述べている。焼結体については、雑種成犬を用いた骨組織親和性の評価、およびL細胞を用いた細胞培養法による評価を行った。微粒子については、L、及びMC3T3-E1細胞を用いた細胞培養法による評価を行った。その結果Sr-HAp焼結体はHAp焼結体と同様の優れた骨親和性を示し、細胞の相対増殖率も96%と全く細胞毒性を示さなかった。0.75mMのSr-HAp微粒子を添加して培養した細胞の相対増殖率はL細胞が22%、MC3T3-E1細胞が79%であった。HAp微粒子添加対照群ではそれぞれ19%、72%であり、Sr-HAp微粒子はHAp微粒子と同程度の細胞増殖抑制効果があることが判った。培地中のCaイオンの減少が実験群、HAp微粒子添加群に認められたことから、細胞増殖抑制はCaイオン吸着によるものと考えられた。

第八章は、第四章で作製したBa-HApの細胞毒性に関する研究結果を述べている。細胞培養にはL細胞を用いた。Ba-HAp焼結体と共に培養した細胞は相対増殖率が71%と低かったが、増殖曲線の形状、焼結体に付着した細胞の形態に異常は認められず、細胞毒性を示す変化は認められなかった。0.75mMのBa-HAp粉末と共に培養した細胞の相対増殖率8%は、HAp粉末添加対照群の相対増殖率12%と比較して有意差は認められなかったが、未添加対照群に比べて増殖抑制効果が認められた。位相差顕微鏡観察では細胞の形態に異常は認められず、透過型電子顕微鏡によってBa-HAp粉末の貪食が見られた。これはHAp粉末添加対照群の細胞と全く同様であった。Ba-HAp仮焼粉末を培地中にて3日および7日間インキュベートすることにより、Caが吸着することが判ったが、吸着量は浸漬期間には影響されなかった。Ba-HApの細胞増殖抑制効果はBaイオンの存在によるものではなく、微粒子による培地中のCaイオン吸着によるものと考えられた。

第九章「成熟期牛エナメル質の結晶化学」では成熟期牛歯のエナメル質の結晶化学的研究を述べた。成熟期の牛歯エナメル質を存在するアメロブラストの形態によってN1, A1, N2, A2の4種に分類した。各段階でのエナメル質アパタイトの化学組成、格子定数を測定し、エナメル質成熟におけるアメロブラスト並びに固溶元素の影響を調べた。N1期のエナメル質アパタイトは、 CO_3 が多く存在するが、 $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{P}$ 比は1.47と低い非化学量論的HApであることが判った。 CO_3 の固溶量はその後エナメル質の成熟にともないA1期で極大値を迎えた後急速に減少して行き、 $(\text{Ca}+\text{Mg})/\text{P}$ モル比は化学量論値の1.67に近づいていくことが判った。これらの結果から、生体内でもっとも結晶性のよいエナメル質を形成して行くために、アメロブラストがCaだけでなく CO_3 などの能動輸送を行っていることが示唆された。

第十章は各章の研究結果を総括し、今後の展望を述べている。