

学位論文題名

歯槽骨再生材料としての
キトサン／ハイドロキシアパタイトナノ複合体の
力学的および生物学的特性

学位論文内容の要旨

【目的】 現在まで歯槽骨再生材料としてのハイドロキシアパタイト (HAp) とキトサンの複合体に関しては多くの報告があるが、炎症を引き起こすなど理想的な生体材料ではなかった。この研究の目的は、共沈殿法により均質な構造のキトサン/HAp ナノ複合体および多孔質体を作製し、その力学特性、形態および生体親和性を評価し、歯槽骨再生材料としての有用性を検討することである。

【方法】 共沈殿法によるキトサン/HAp ナノ複合体の作製を行った。共沈殿法によりキトサンと HAp の割合を変え、キトサンと HAp の割合を 20/80, 50/50, 70/30, 80/20 であるキトサン/HAp ナノ複合体を作製し単動型シリンダで一軸方向に 20MPa の圧で 24 時間圧縮、脱水し、キトサン/HAp ナノ複合体の緻密体を得た。

多孔性キトサン/HAp ナノ複合体は、ポローゲンリーチング法を用いて作製した。ポローゲンとしては粒径を 100~300 μm とした塩化ナトリウムを用いた。キトサン/HAp ナノ複合体 100 重量部に対し、塩化ナトリウムの添加量を 100, 500, 1000, 2000 重量部と変えて多孔質体の作製を試みた。なお、キトサン/HAp ナノ複合体中のキトサン含有量は 80wt% に一定とし、キトサン粉末は脱アセチル化度が 96% のものを使用した。

作製したキトサン/HAp ナノ複合体のキトサン含有量を熱重量分析・示差熱分析 (TG-DTA) 同時測定装置を使用し、熱分析測定で化学的特性の検討およびキトサンの含有量の測定を行った。

脱アセチル化度 96% のキトサンを使用し、キトサンと HAp の合成比率を 20/80, 50/50, 70/30, 80/20 としたキトサン/HAp ナノ複合体の力学的特性の検討を行った。試料は材料剪断機で $2.0 \times 5.0 \times 20.0\text{mm}$ の切片に加工し、高圧蒸気滅菌器を用い 120°C 、2 気圧で 0, 20, 40, 60 分の蒸気加圧熱処理を行ったものを使用した。各試料に対し卓上型材料試験機でクロスヘッド速度を $0.5\text{mm}/\text{min}$ 、幅 14mm で 3 点曲げ試験を行った。同条件で 5 回測定を行い、その平均値を破断ひずみと弾性率 (Young 率) とした。

脱アセチル化度 96% でキトサンと HAp の合成比率が 80/20 で作製した多孔性キトサン/HAp ナノ複合体に関しても、同様に $2.0 \times 5.0 \times 20.0\text{mm}$ の切片に加工し、 120°C 、2 気圧で 0, 40, 60 分の蒸気加圧熱処理を行ったものに対し、3 点曲げを行い、破断ひずみと弾性率 (Young 率) を測定した。

多孔質体の気孔率の測定はアルキメデス法を用い測定した。また、作製した各キトサン/HAp ナノ複合体の多孔質体を減圧乾燥し、白金ハラジウムコーティング後、走査電子顕微鏡による多孔質体構造の観察を行った。

脱アセチル化度 74, 84, 90, 96%でキトサン/HAp 複合体の合成比率を 80/20 とした試料 (1.0×10.0×10.0mm) を SD ラット背部皮下に埋入し、埋入後 1, 3, 7, 14 日目、各 2 匹ずつから埋入した複合体とそれを取り囲む組織を採取、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下にて組織学的観察を行った。組織学的観察と記録は光学顕微鏡にて行った。

【結果】熱分析により作製した各キトサン/HAp ナノ複合体中に含まれるキトサンの含有量は、仕込比に対して約 8~9 割程度となった。また、キトサン/HAp ナノ複合体 250℃までの耐熱性を有し、高圧蒸気滅菌処理が可能であった。

3 点曲げによる力学特性試験において、キトサン/HAp ナノ複合体のキトサン含有量の増加に伴い延性と弾性が増加した。また、この特性は蒸気加圧熱処理によりさらに増強された。

多孔性キトサン/HAp ナノ複合体は気孔率の相違に関わらず、緻密体と比較して破断ひずみの減少を認め、延性が低下した。弾性率 (Young 率) は緻密体と比較し、著しく減少し、材料の弾性が増加した。

SEM により多孔質体構造を観察したところ、塩化ナトリウム添加量が 100 重量部の場合、ポローゲンの割合が少ないため気孔が認められなかった。次に塩化ナトリウム添加量が 500 重量部の場合では、100~200 μm の孔が形成しているものの、数が少なく連通孔とはなっていなかった。さらに塩化ナトリウム添加量を 1000, 2000 重量部に増やすと、100~200 μm の連通孔が形成され、塩化ナトリウム添加量が多いほど、多孔質体中の気孔の割合も増加した。気孔率はアルキメデス法で測定し、塩化ナトリウム添加量が 1000 重量部の場合 60.6%, 2000 重量部の場合 87.1%であった。

SD ラット背部皮下埋入実験において、埋入後 3 日では脱アセチル化度に関わらず、移植試料に接して好中球を主体とする著しい炎症性細胞浸潤を認めた。埋入後 14 日目には脱アセチル化度に関わらず、炎症性細胞浸潤はほとんど認められず、移植試料は線維性結合組織により被包されていた。

【考察】各キトサン/HAp ナノ複合体の融解温度は 250~600℃の範囲にあり、複合体としては 250℃までの耐熱性を有しているため、高圧蒸気滅菌が可能であると考えられた。一般に高分子生体材料は熱に弱いためガス滅菌が行われることが多いが、本材料は高圧蒸気滅菌が可能であり、ガスの残留がないため、生体材料にとって重要である安全性に優れると考えられる。

現在まで骨補填材として使用されてきたセラミックスはその堅さと脆性のため、外部からの衝撃に脆く、操作性、成形性にも難があった。作製したキトサン/HAp ナノ複合体の弾性率は 2.5~23.0MPa の範囲であり、一般に皮質骨が 18.0GPa, ゴムが 1.5~5.0MPa であるので、本材料はやや硬いゴムの力学特性を持つものと考えられる。よって、本材料は今までの骨補填材にはなかった柔軟性と易成形性、易操作性を併せ持つため、複雑な形態を呈する歯槽骨を再生する生体材料として適した特性を持っていると考えられる。

多孔質体のスポンジ様の力学特性は、様々な形状の骨欠損部に密に充填することが可能であるため、歯槽骨再生の生体材料として適していると考えられる。また、骨芽細胞の成長に適した連通孔を併せ持つことから、海綿骨類似の形態と機能を持つ生体材料として利用できる可能性がある。

キトサン/HAp ナノ複合体 100 重量部に対し、粒径を制御した塩化ナトリウムの添加量を 1000, 2000 重量部とした場合、100~200 μm 程の連通孔を持ち、気孔率が各々 60.6%, 87.1%である多孔性キトサン/HAp ナノ複合体を作製することができた。これは形態的に骨芽細胞の成長が可能な骨再生の足場材料であると考えられる。

キトサンの脱アセチル化度の相違による組織反応の明らかな違いは認めなかったが、比較的良好な生体親和性を持つ

ことが示唆された。

【結語】 以上より、キトサン/HAp ナノ複合体は、良好な成形性を有しており複雑な形態を有する歯槽骨欠損部へ応用可能な生体材料となることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農夫男

副 査 教 授 亘 理 文 夫

副 査 教 授 大 畑 昇

学 位 論 文 題 名

歯槽骨再生材料としての キトサン／ハイドロキシアパタイトナノ複合体の 力学および生物学的特性

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

現在まで骨再生材料としてのハイドロキシアパタイト (HAp) とキトサンの複合体に関しては多くの報告があるが、材料の均質性や炎症反応を惹起するなどの問題から骨再生材料としての応用にはいたっていない。本研究は、共沈殿法により均質な構造のキトサン／HAp ナノ複合体の緻密体と多孔質体を作製し、その力学特性、形態および生体親和性を評価し、歯槽骨再生材料としての有用性を検討したものである。

共沈殿法によりキトサン／HAp ナノ複合体の緻密体と多孔質体を作製した。キトサンと HAp の割合 (キトサン/Hap) を 20/80, 50/50, 70/30, 80/20 にしたキトサン／HAp ナノ複合体を作製し、単動型シリンダで一軸方向に 20MPa の圧で 24 時間圧縮、脱水し、キトサン／HAp ナノ複合体の緻密体を得た。キトサン粉末は脱アセチル化度が 96% のものを使用した。多孔性キトサン／HAp ナノ複合体は、ポロージェンリーチング法を用いて作製した。ポロージェンとしては粒径を 100～300 μ m とした塩化ナトリウムを用いた。キトサン／HAp ナノ複合体 100 重量部に対し、塩化ナトリウムの添加量を 100, 500, 1000, 2000 重量部と変えて多孔質体の作製を試みた。なお、キトサン／HAp ナノ複合体中のキトサン含有量は 80wt% に一定とし、キトサン粉末は脱アセチル化度が 96% のものを使用した。キトサンと HAp の割合を変えて作製したキトサン／HAp ナノ複合体の緻密体に関し、熱分析測定、3 点曲げによる力学特性試験を行った。次に、多孔性キトサン／HAp ナノ複合体に関し、SEM による観察、気孔率測定および 3 点曲げによる力学特性試験を行った。また、本材料の生体親和性については、脱アセチル化度 (74, 84,

90, 96%) が異なるキトサンを使用したキトサン/HAp 複合体 (合成比率: 80/20) を作製し, これらを SD ラット背部皮下組織に埋入し, 埋入後 1, 3, 7, 14 日目における周囲組織の炎症反応を組織学的に観察した。

本材料は熱分析により 250℃までの耐熱性を有しており, 高圧蒸気滅菌処理が可能であった。3点曲げによる力学特性試験において, キトサン/HAp ナノ複合体はキトサン含有量の増加に伴い, その延性と弾性は増加した。また, この特性は高圧蒸気滅菌処理によりさらに増強された。SEMにより多孔質体構造を観察したところ, 塩化ナトリウム添加量が 1000, 2000 重量部の場合, 100-200 μm の連通孔が形成されており, 骨芽細胞の成長が可能な足場材料になると考えられた。さらに SD ラット背部皮下埋入実験において, 埋入後 7 日目以降では炎症性細胞浸潤はほとんどみられず, 生体親和性は良好と考えられた。

以上より, キトサン/HAp ナノ複合体は, 歯槽骨再生に適した力学特性と形態および生体親和性を持ちあわせた生体材料であることが示唆された。

論文について概要が説明された後, 各審査員より, 本研究の背景, 方法, 結果, 考察および関連の研究について質問がなされた。主な質問事項は 1) キトサン/HAp ナノ複合体の特徴, 2) キトサン/HAp ナノ複合体の炎症反応, 3) キトサン/HAp ナノ複合体の吸収性, 4) 材料の力学的特性に関するものであった。論文提出者はいずれの質問に対しても明確かつ的確に回答し, さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

よって, 学位申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認められた。

試問の結果, 本論文はキトサン/HAp ナノ複合体が歯槽骨再生に適した力学特性と形態および生体親和性を持ちあわせた生体材料であることを示唆し, 今後の歯科医学の発展に大きく寄与するものと評価した。さらに, 学位申請者は, 本研究を中心とした専門分野はもとより, 関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって, 学位申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認められた。