

[原著] 松本歯学 29 : 157~169, 2003

key words : キトサン—骨補填材—ハイドロキシアパタイト

## キトサンを結合体とした自己硬化型骨補填材の研究

中島 三晴

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 生体材料開発部門

Study on self-hardening bone filling materials with chitosan as a binding agent

MITSU HARU NAKAJIMA

*Department of Bio materials, Institute for Dental Science,  
Matsumoto Dental University School of Dentistry*

### Summary

A self-curing type of bone filling material has been developed by mixing chitosan solution and admixed powder. The chitosan solution was prepared by dissolving 85% de-acetyl chitosan and 99% deacetyl chitosan with organic acids, and the powder was a mixture of hydroxyapatite particles, CaO powder, and ZnO powder.

The bone filling materials were compressed to form samples for compression tests. The Ca ions, P ions, Zn ions and pH value were measured.

The main findings were as follows ;

1. The compression strength of bone filling materials using 85% de-acetyl chitosan showed a maximum value of about 13 MPa at 1 day after immersion in physiological saline solution, followed by a continuous decrease down to 2 MPa. On the other hand, the bone filling material prepared with 99% de-acetyl chitosan did not show a remarkable decrease in compressive strength, however, it exhibited a continuous but smaller decrease by immersion time than the filling material prepared with 85% de-acetyl chitosan, because 85% de-acetyl chitosan gel could be more easily dissolved by 99% de-acetyl chitosan.
2. The changes in pH value of both 85% and 99% de-acetyl chitosan bone filling materials showed minimum values at 1 day after immersion, followed by a continuous increase with time, and the pH value of bone filling material containing 99% de-acetyl chitosan was higher than that with 85% de-acetyl chitosan material.
3. The dissolved Ca ions from the bone filling material with 85% de-acetyl chitosan reached its maximum at 28 days and minimum at 56 days after the immersion into physiological solution. The dissolved Ca ions from the bone filling material containing 99% de-acetyl chitosan exhibited its maximum at 1 day and its minimum at 28 days after the immersion, but there was no difference between these two types of materials.

4. The dissolved P ions from bone filling materials containing 85% and 99% de-acetyl chitosan had similar trends of continuous increase with time, and there was no difference between the two materials.
5. With regard to the dissolved Zn ions, the bone filling material made using 99% de-acetyl chitosan showed smaller values than that made with 85% de-acetyl chitosan, except at 56 days after the immersion.

## 結 言

現在、骨補填材としてハイドロキシアパタイト顆粒が使用されているが、顆粒が移動することによっての弊害や、キトサン系の骨補填材においては、補填材自身が生体内で崩壊と分解吸収に時間がかかるため骨形成を阻害し、骨伝導が早期に得られないことが報告されている<sup>1-6)</sup>。

キチン・キトサンは、甲殻類から抽出することが出来る物質であり、甲殻類のクチクラを希塩酸と希水酸化ナトリウム溶液中で無機塩と除タンパクを行い、キチンを抽出する<sup>8)</sup>。このキチンを水酸化ナトリウム溶液中で加熱してN-脱アセチル化を行いキトサンを抽出する<sup>8)</sup>。キトサンはキチンよりも結晶性が劣るが有機酸によって容易にゾル化することが出来る。また、キトサンは脱アセチル化度によって機械的性質や生体内での吸収速度や反応が異なる<sup>9-11)</sup>。生体内では脱アセチル化度の低いキトサンフィルムの炎症性反応が強く、肉芽組織形成も旺盛であり、骨に対する反応は骨吸収を誘発する傾向が認められた<sup>10-11)</sup>。近年、キチン・キトサンは、生体材料として吸収性縫合糸、人工皮膚、骨補填材や歯科用セメントの開発や研究が多くなされている<sup>7-12)</sup>。またキチン、キトサンは抗原性が低い物質であり、生体内でリゾチーム等の体内酵素で分解され細胞レベルで親和性がよく、創の修復を早める働きがある<sup>12)</sup>。

本研究はハイドロキシアパタイト顆粒をキトサンで固定し、よりよい骨伝導性と骨と置換する骨補填材を作製することを目的としてキトサンを結合材とした自己硬化型骨補填材について行った。使用したキトサンは生体内で吸収速度が異なる脱アセチル化度の高い2種類のキトサンを用い、有機酸でキトサンを溶解しそれぞれゾル化を行った。ついでゾルのゲル化材である酸化カルシウム粉末、酸化亜鉛粉末と骨伝導材料である平均粒径35  $\mu\text{m}$  で結晶度が高く、pH 10の球状ハイドロキ

シアパタイトを混合した<sup>5)</sup>。この両者を練和することで骨補填材は自己硬化するように構成されている。本報告は骨補填材の硬化時間の測定、擬似体液中に浸漬した骨補填材の圧縮強さの変化、pHの測定、Caイオン、Pイオン、Znイオンの溶出量の測定および浸漬前後の硬化体の表面観察と圧縮試験後の試験片の破断面の観察を行いそれぞれに検討をした。

## 材料および方法

実験に用いた材料は、Table 1に示す2種類のキトサン（脱アセチル化度85%および99%、焼津水産化学）をアスコルビン酸（関東化学）とリンゴ酸（ナカライテスク）、酸化カルシウム（和光純薬）と酸化亜鉛（ナカライテスク）、そしてFigure 1に示す球状ハイドロキシアパタイト（pH 10, 平均粒径35  $\mu\text{m}$ , 積水化成品工業）をそ

Table 1 : Chitosan powders used

Deacetylation (%)	Molecular weight ( $\times 10^6$ )
85	1.93 $\pm$ 0.35
99	1.08 $\pm$ 0.7

Manufacture : YAIZU SUISAN KAGAKU

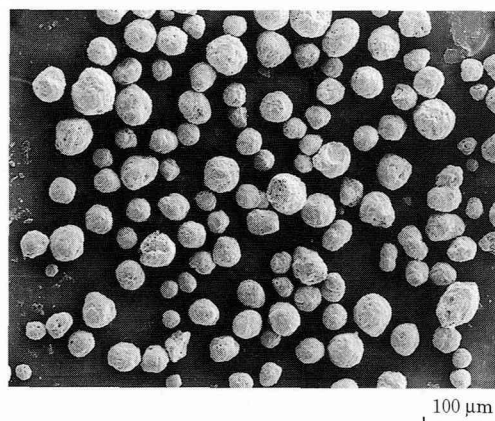


Figure 1 : Hydroxyapatite Powder.

れぞれに用いた。

#### 1. ゴルの作製

脱アセチル化度85%と99%のそれぞれのキトサン0.1gをアスコルビン酸0.02g, リンゴ酸0.08gを2mlの生理食塩水中で溶解した溶液を用い, ゴルとした。

#### 2. 粉末の作製

粉末の合成は, 球状ハイドロキシアパタイト0.4g, 酸化カルシウム0.02g, 酸化亜鉛0.04gを混合し行った。

#### 3. 硬化時間の測定

各キトサンゴルと粉末を30秒間練和し, 練和泥がエポキシ樹脂製の棒に付着しなくなった時間を硬化時間とした。測定は繰り返し3回行った。

#### 4. 圧縮強さの測定

圧縮強さの測定用試験片は, それぞれのキトサンゴルと粉末を30秒間練和し, 練和泥を10mlのシリンジに充填し, Figure 2に示す直径4mm, 高さ10mmの寸法を有する金型に注入して作製した。試験片は各条件5個作製した。以下, キトサン85%のゴルで作製した試験片をC85, キトサン99%のゴルで作製した試験片をC99と表示する。測定条件は圧縮試験機(SL-5001, 今田製作所)を用い, クロスヘッドスピード0.1mm/minにて行った。また, 測定用の試験片は硬化した後, 生理食塩水中に各5個を浸漬し, 1日, 7日, 28日そして56日経過後にそれぞれの圧縮強さを測定した。

#### 5. pHの測定

各ゴルで練和した硬化体C85とC99をそれぞれ12gを80mlの生理食塩水中に浸漬し, 浸漬後の1日, 7日, 28日そして56日後のpHをpH測定器(HM50S, 東亜電波)にて各条件3個につ

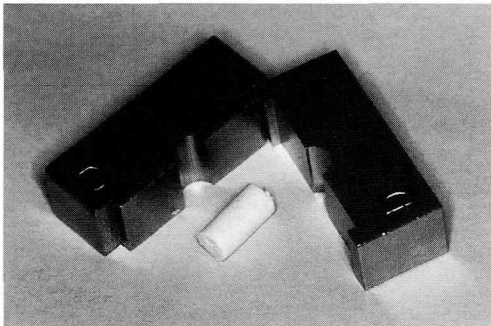


Figure 2 : Mold and Test Piece.

いて測定を行った。

#### 6. 溶出元素量の測定

pHの測定を行った後の溶液を0.45μmのシリンジフィルター(IWAKI)を用いて濾過し, それぞれの濾液について1日, 7日そして56日後のCaイオン, PイオンとZnイオンの溶出量を高周波誘導結合プラズマ質量分析装置(HP4500, 横河アナリティカルシステムズ)にて各条件3個について測定を行った。

#### 7. 硬化体の表面および破断面の観察

項目5のpHを測定するのに用いた硬化体C85とC99の硬化直後の表面および浸漬56日後のそれぞれの硬化体の表面と圧縮試験後の破断面の観察を行った。観察は金蒸着の処理した試験片についてX線マイクロアナライザー(JCXA733, 日本電子)を用いて行った。

#### 8. 分散分析

各実験の測定値を一元配置分散分析を用い, 99%の信頼限界において検討した。

## 結 果

1. Figure 3に示すようにC85の硬化時間は約4分であり, C99の硬化時間は約5分であった。測定値を分散分析した結果をTable 2に示す。キトサンの種類は硬化時間に有意( $P < 0.01$ )に寄与する結果が得られた。

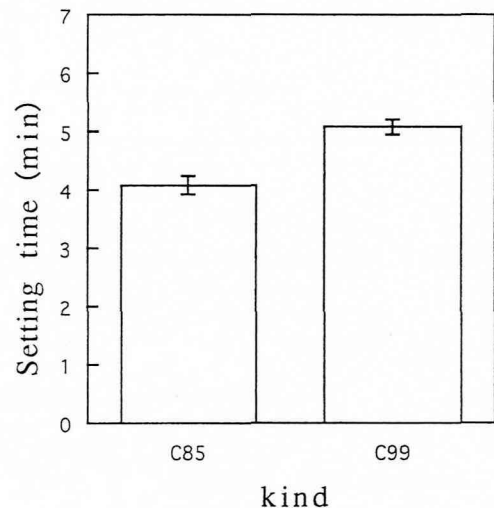


Figure 3 : Setting time.

Error bars indicate one standard deviation.

Table 2: Analysis of variance for setting time

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A: kind of chitosan	5400.000	1	5400.000	68.79**	93.13
Error	314.000	4	78.500	-	6.87
Total	5714.000	5			100.00

\*\*P&lt;0.01

## 2. 圧縮強さ

Figure 4 に C 85 の圧縮強さと浸漬期間についての関係を示す。浸漬 1 日後の圧縮強さは  $12.8 \pm 0.20$  MPa, 7 日後では  $2.04 \pm 0.28$  MPa, 28 日後では  $2.03 \pm 0.22$  MPa, そして 56 日後では  $2.22 \pm 0.21$  MPa であった。測定値を分散分析した結果を Table 3 に示す。浸漬期間は圧縮強さに有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果が得られた。Figure 5 は C 99 の圧縮強さと浸漬期間についての関係を示す。浸漬 1 日後の圧縮強さは  $3.3 \pm 0.15$  MPa, 7 日後では  $1.25 \pm 0.26$  MPa, 28 日後では

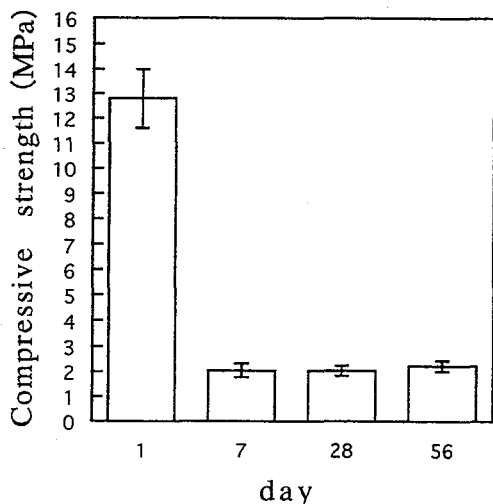


Figure 4: Relationship between immersion time and compressive strength of C85. Error bars indicate one standard deviation.

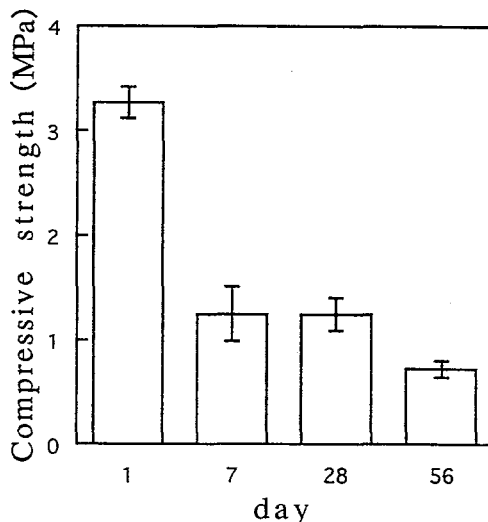


Figure 5: Relationship between immersion time and compressive strength of C99. Error bars indicate one standard deviation.

$1.25 \pm 0.16$  MPa, そして 56 日後では  $0.72 \pm 0.08$  MPa であった。測定値を分散分析した結果を Table 4 に示す。浸漬期間は圧縮強さに有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果が得られた。

## 3. pH

Figure 6 に C 85 を浸漬した溶液の pH 値を測定した結果を示す。浸漬 1 日後の pH は  $6.45 \pm 0.08$ , 7 日後では  $7.51 \pm 0.01$ , 28 日後では  $7.49 \pm 0.01$ , そして 56 日後では  $7.41 \pm 0.05$  であった。測定値を分散分析した結果を Table 5 に示す。浸漬期間は pH に有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果

Table 3: Analysis of variance for compressive strength of C85

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A: immersion time	60251.300	3	20083.8000	489.54**	98.19
Error	984.613	24	41.026	-	1.81
Total	61235.913	27			100.00

\*\*P&lt;0.01

**Table 4** : Analysis of variance for compressive strength of C99

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	2687.300	3	895.765	288.68**	96.97
Error	74.472	24	3.103	-	3.03
Total	2761.772	27			100.00

\*\*P&lt;0.01

**Table 5** : Analysis of variance for pH of C85

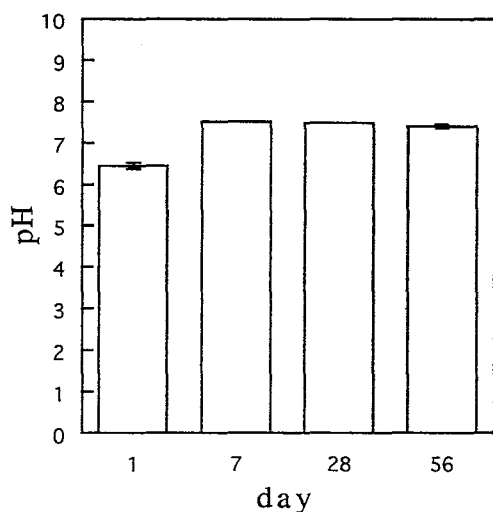
Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	2.342	3	0.781	221.51**	98.36
Error	0.028	8	0.004	-	1.64
Total	2.370	11			100.00

\*\*P&lt;0.01

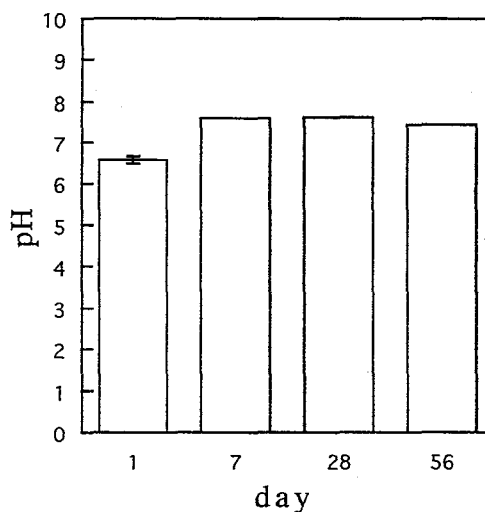
**Table 6** : Analysis of variance for pH of C99

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	2.318	3	0.773	330.61**	98.90
Error	0.019	8	0.002	-	1.10
Total	2.337	11			100.00

\*\*P&lt;0.01

**Figure 6** : Relationship between immersion time and pH of C85.

Error bars indicate one standard deviation.

**Figure 7** : Relationship between immersion time and pH of C99.

Error bars indicate one standard deviation.

が得られた。

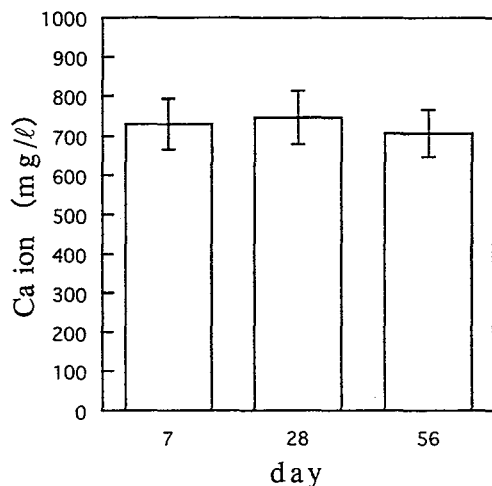
Figure 7 に C 99 を浸漬した溶液の pH 値を測定した結果を示す。浸漬 1 日後の pH は  $6.57 \pm 0.09$ 、7 日後では  $7.60 \pm 0.03$ 、28 日後では  $7.63 \pm$

$0.02$ 、そして 56 日後では  $7.45 \pm 0.03$  であった。測定値を分散分析した結果を Table 6 に示す。浸漬期間は pH に有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果であった。

## 4. 溶出元素量の測定

## 1) Ca イオンの溶出量

Figure 8 は C85 を浸漬した溶液中の Ca 量を測定した結果を示す。測定値を分散分析した結果を Table 7 に示す。有意差が認められなかった。浸漬 1 日後の Ca の溶出量は  $729.7 \pm 63.7$  mg/l, 28 日後の溶出量は  $746.7 \pm 67.1$  mg/l, そして 56 日後では  $706.7 \pm 59.2$  mg/l であった。Figure 9 は C99 を浸漬した溶液中の Ca 量を測定した結果を示す。浸漬 1 日後の Ca の溶出量は  $762.3 \pm 20.7$  mg/l, 28 日後の溶出量は  $618.0 \pm 55.5$  mg/l, そして 56 日後では  $714.0 \pm 22.1$  mg/l の溶出量であっ

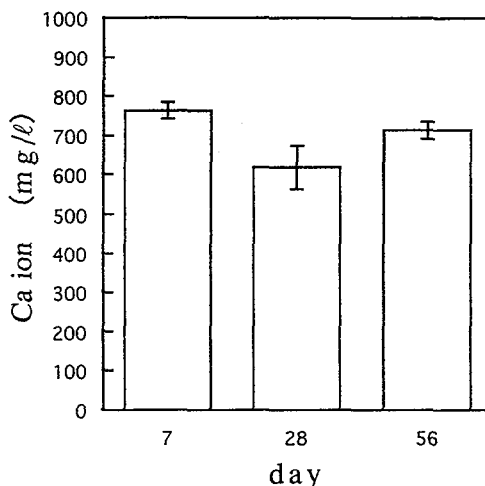


**Figure 8 :** Relationship between immersion time and released calcium from C85. Error bars indicate one standard deviation.

た。測定値を分散分析した結果を Table 8 に示す。浸漬期間は Ca の溶出量に有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果が得られた。

## 2) P イオンの溶出量

Figure 10 は C85 を浸漬した溶液中の P 量を測定した結果を示す。浸漬 1 日後の P の溶出量は  $0.08 \pm 0.01$  mg/l, 28 日後では  $0.21 \pm 0.07$  mg/l, そして 56 日後では  $0.27 \pm 0.02$  mg/l であった。測定値を分散分析した結果を Table 9 に示す。浸漬期間は P の溶出量に有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果が得られた。Figure 11 は C99 を浸漬した溶液中の P を測定した結果を示す。浸漬 1 日後



**Figure 9 :** Relationship between immersion time and released calcium from C99. Error bars indicate one standard deviation.

**Table 7 :** Analysis of variance for calcium release from C85

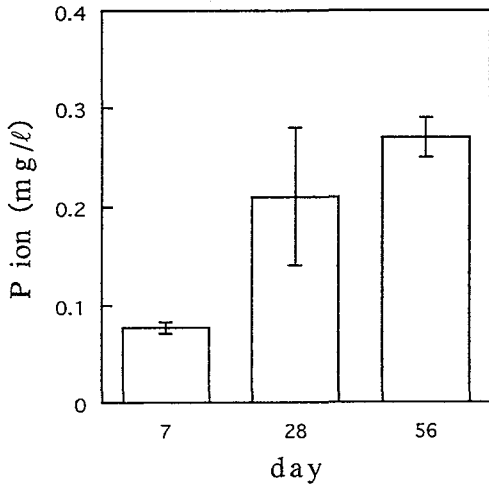
Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	3346.890	2	1673.440	0.39	0.00
Error	25675.330	6	4279.220	-	100.00
Total	29022.200	8			100.00

\*\*P<0.01

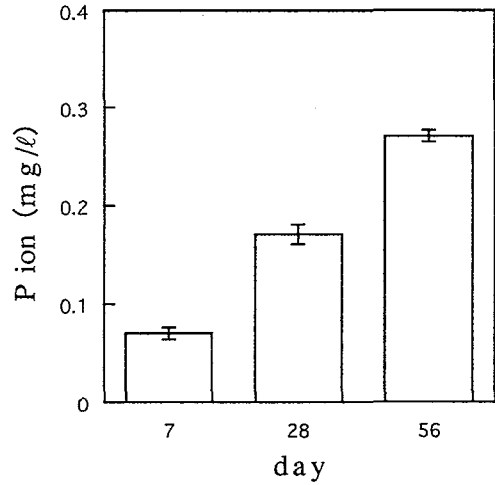
**Table 8 :** Analysis of variance for calcium release from C99

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	32384.200	2	16192.100	12.15**	73.60
Error	7996.670	6	1332.780	-	26.40
Total	40380.870	8			100.00

\*\*P<0.01



**Figure 10 :** Relationship between immersion time and released phosphorus from C85. Error bars indicate one standard deviation.



**Figure 11 :** Relationship between immersion time and released phosphorus from C99. Error bars indicate one standard deviation.

**Table 9 :** Analysis of variance for phosphorus release from C85

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	0.058	2	0.029	15.16**	77.98
Error	0.011	6	0.002	-	22.02
Total	0.069	8			100.00

\*\*P<0.01

**Table 10 :** Analysis of variance for phosphorus release from C99

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	0.056	2	0.028	504.60**	99.21
Error	0.000	6	0.000	-	0.79
Total	0.056	8			100.00

\*\*P<0.01

のPの溶出量は $0.07 \pm 0.01$  mg/l, 28日後では $0.17 \pm 0.01$  mg/l, そして56日後では $0.27 \pm 0.01$  mg/lの溶出量であった。測定値を分散分析した結果をTable 10に示す。浸漬期間はPの溶出量に有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果が得られた。

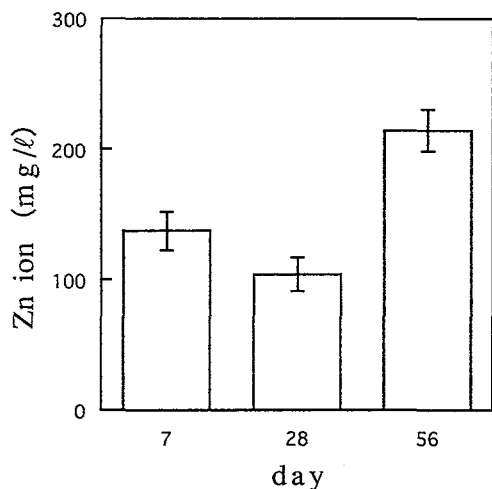
3) Zn イオンの溶出量

Figure 12はC85を浸漬した溶液中のZnを測定した結果を示す。浸漬1日後のZnの溶出量は $137.0 \pm 14.9$  mg/l, 28日後では $103.8 \pm 12.7$  mg/l, そして56日後では $214.3 \pm 16.1$  mg/lであった。測定値を分散分析した結果をTable 11に示す。浸漬期間はZnの溶出量に有意 ( $P < 0.01$ )

に寄与する結果が得られた。Figure 13はC99を浸漬した溶液中のZnを測定した結果を示す。浸漬1日後のZnの溶出量は $83.0 \pm 6.7$  mg/l, 28日後では $142.7 \pm 3.2$  mg/l, そして56日後では $136.0 \pm 13.0$  mg/lであった。測定値を分散分析した結果をTable 12に示す。浸漬期間はZnの溶出量に有意 ( $P < 0.01$ ) に寄与する結果が得られた。

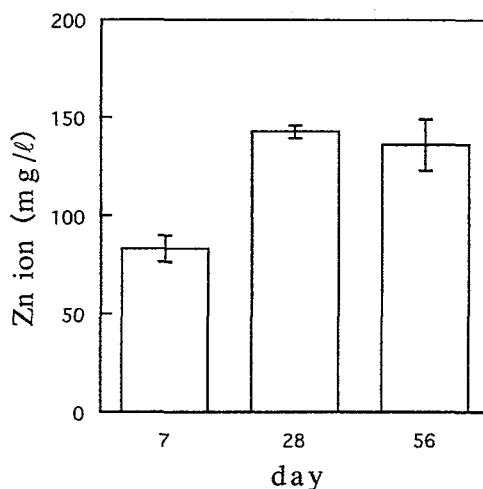
5. 硬化体の表面および破断面の観察

Figure 14のa~dは硬化体C85とC99のそれぞれの表面を観察した結果である。aはC85, bはC99の浸漬前の表面状態を観察した結果を示す。球状ハイドロキシアパタイト粒子はキトサン



**Figure 12** : Relationship between immersion time and released zinc from C85.

Error bars indicate one standard deviation.



**Figure 13** : Relationship between immersion time and released zinc from C99.

Error bars indicate one standard deviation.

**Table 11** : Analysis of variance for zinc release from C85

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	19300.300	2	9650.150	45.01**	91.67
Error	1286.450	6	214.408	-	8.33
Total	20586.750	8			100.00

\*\*P<0.01

**Table 12** : Analysis of variance for zinc release from C99

Source	Sum of square	Degree of freedom	Mean square	F value	Rate of contribution
A : immersion time	6406.050	2	3203.020	42.79**	91.26
Error	449.152	6	74.859	-	8.74
Total	6855.202	8			100.00

\*\*P<0.01

に包まれた状態で分布しており、粒子以外の部分は平滑な状態が観察された。aとbの差は認められなかった。ついでcはC85、そしてdはC99の浸漬56日後の表面状態を示す。両者ともに一部では球状ハイドロキシアパタイト粒子の輪郭が明らかとなっている。

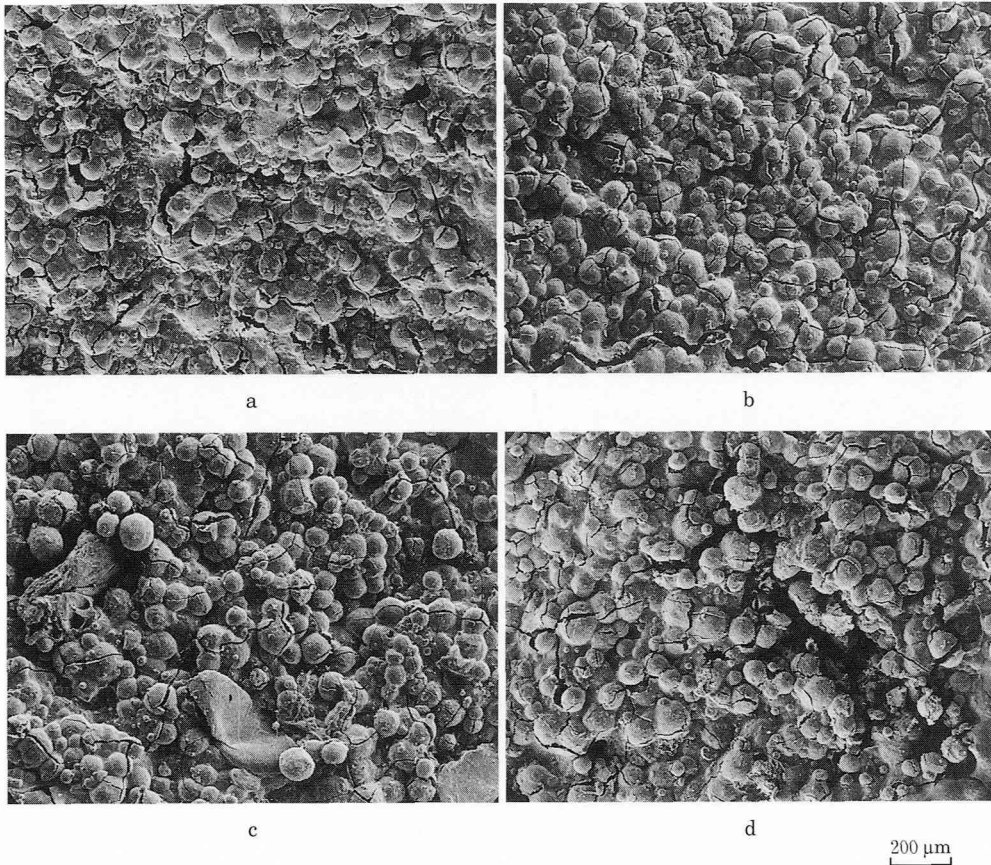
Figure 15のa~dは硬化体C85とC99のそれぞれの破断面を観察した結果を示す。aは浸漬前のC85、そしてcは浸漬56日後の破断面を示す。浸漬前よりも、浸漬56日後の破断面には多くの空隙が観察された。一方、bは浸漬前のC99、そしてdは浸漬56日後の破断面を示す。浸漬前

よりも浸漬後の破断面の空隙はわずかに多く認められた。またC85とC99の空隙について比較すると大きな差は認められなかった。

## 考 察

生体内から抽出したり、細胞培養によって得られる異所性骨誘導タンパク質を用いた研究が報告されている<sup>13-19)</sup>。しかし、臨床応用にまでは至っていない。また、燐酸カルシウム系のセラミックを用いて歯科や整形外科などの領域において、局所的な骨組織欠損の修復や再建が行われているが、十分な骨伝導が得られていない。一方、抜歯





**Figure 14** : SEM images showing the surface of C 85 and C 99.

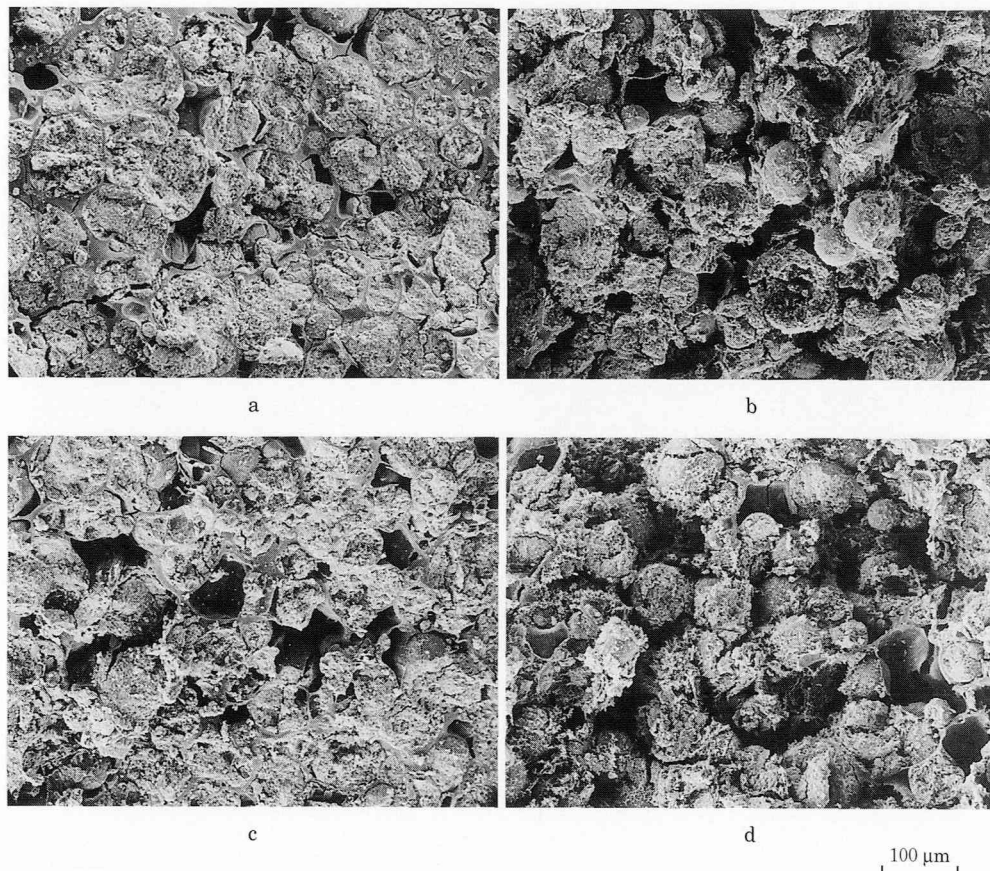
a : C 85 and b : C 99 show surfaces before immersion.

c : C 85 and d : C 99 show surfaces after 56 days immersion.

窩に充填したハイドロキシアパタイト顆粒が移動して歯肉と顎骨との間に浸入し、咬合圧によって歯肉が炎症を起こしたり感染を誘発したトラブルが報告されている<sup>1-4)</sup>。これらの欠点を補うためにキトサンを結合材とした練成方式の自己硬化型の骨補填材の開発を行い、この骨補填材の圧縮強さ、pH変化、そしてCa、P、Znの各イオンの擬似体液中での変化についてそれぞれに検討した結果、C 85の圧縮強さは浸漬1日後よりも浸漬期間が長い試験片の圧縮強さが小さくなる傾向であった。また、C 99においても同様な結果であった。しかしC 85の圧縮強さの減少率はC 99よりも大きかった。この原因は、Figure 15に示すようにC 85は浸漬後にキトサンの溶解に伴うと考えられる多くの空隙が認められている。しかし、C 99は浸漬前後の空隙には大差が認められていな

い。この現象から脱アセチル化度85%のキトサンが浸漬液によって脱アセチル化度99%よりも溶解しやすいと考えられた。

C 85とC 99で練和した両者の試験片は、湿潤状態ではシリコーンゴムのように弾性体である。この弾性体であることの利点は、顎堤と骨との間に充填した本材料が咬合圧の負荷によって、歯肉を刺激しないことである。また、従来研究されている本系の骨補填材は圧縮強さが20 MPaであり、C 85とC 99の圧縮強さよりも大きく、骨形成も十分に得られていない<sup>6,9)</sup>。しかし、C 85とC 99に関しては浸漬により圧縮強さが減少しており、Figure 14と15に示すように浸漬することによってキトサンの溶解が観察される。この現象が生体内に充填した材料に同様に生じれば、充填物の中に新生血管が浸入することが期待出来、キトサン



**Figure 15** : SEM images showing the fracture of C 85 and C 99.

a : C 85 and b : C 99 show fractures before immersion.

c : C 85 and d : C 99 show fractures after 56 days immersion.

のスペーサとしての役割が有用となる。この新生血管の浸入に伴って細胞が増加し、骨と本材料が置換することが考えられる。

材料が生体内で安定して骨伝導を維持するためには、pHが最も重要な因子となる。pHが4.5以下になると結晶は死滅することや、細胞外のpHが酸性に傾くと、破骨細胞の骨吸収活性が増すことが報告されている<sup>20,21</sup>。また、ハイドロキシアパタイトのpHによって吸着するタンパク量が異なり、細胞の動態に影響するとしており、pH 8の場合、低いpH値と比較してタンパク質の吸着量が減少することを報告している<sup>22</sup>。本材料はキトサンゾルのpH 2.8と粉末のpH 11.5を練和することによって練和泥は硬化し、硬化体のpHは暫時増加を示す。このpHが上昇する原因は溶出するイオンによって生じたものと考えられた。C

85のpHの最大値は7.5、C 99のpHの最大値は7.6であり、両者のpHは差が認められなかった。したがって、吸着するタンパク質の差は両者には認められず細胞の動態にも差がないものと思われた。また、これらのpHにおいては生体為害性は見出せないものと考えられた。

Caイオンの溶出に関しては、C 85とC 99のそれぞれの骨補填材からの溶出量は大差が認められなかった。しかし、溶出したCaイオンが測定時に増減するのが認められた。この溶出したCaイオンの増減は硬化体に再吸収されるか、リン酸カルシウムの合成に消費されることが原因したものと推察される<sup>23</sup>。Caイオン濃度が細胞外で上昇すると、破骨細胞の骨吸収活性は抑制されるが、しかし、骨芽細胞との共存においては逆に、破骨細胞の活性が認められるとしており、この機序に

については不明な点が少なくないことが報告されている<sup>24-27)</sup>。しかしながら、骨形成にはCaイオンの存在は重要であると考えられる。また、キトサンゾルをゲル化させるためにも必要な元素であり、pH値が増加する現象を左右する元素でもありとえられる。

PイオンはC85とC99のそれぞれの骨補填材からの溶出量には差が認められなかったが、浸漬時間が長くなるほど溶出量は多くなる傾向であった。Pは70kgの体重の人で約700-780gが含まれているとされている<sup>28)</sup>。キトサンフィルムからのPの溶出量が多い場合、骨吸収が生じやすい環境となることが報告されており<sup>29)</sup>、多く生じないことが望ましいと考えられる。本研究におけるPイオンの溶出量では、pHの上昇に影響する量ではないと考えられる。

Znイオンについては、C85とC99の骨補填材からの溶出量はわずかにC85が多く認められた。これはキトサンの溶解の難易により左右されたものと考えられる。このZnイオンは70kgの成人で2.3g含まれ、その1/4から1/3は骨に含まれているとしている。Znイオンの毒性については健康人の1000倍の血漿濃度でも毒性は見られなく、毒性の低いことを示している<sup>28)</sup>。また、Znイオンの骨格の発育に対しては亜鉛欠乏によって長管骨が短縮や肥厚を生じたり、骨形成が出来なくなることが報告されているが、この原因については明らかでないとしている<sup>30)</sup>。Znは核酸、たんぱく質の合成、血漿中のビタミンA濃度の維持やアルカリフォスファターゼ活性化に関与するとされている<sup>31)</sup>。このアルカリフォスファターゼに関しては骨芽細胞のマーカー酵素として報告されている<sup>32)</sup>。また、このZnイオンは本研究のキトサンゾルと結合し、ゲル化させて硬化するために必要な元素でもある。浸漬した溶液のpHが上昇した原因は、Caイオンと同様、Znイオンの溶出によって影響されたものと考えられる。今後、試作した2種類の自己硬化型骨補填材を用い、動物実験を行い、骨伝導性に優れたキトサンの特定を行う必要性が示唆された。

## 結 論

甲殻類から抽出したキトサンは、生体内で分解吸収され抗原性が低い物性である。このキトサン

は有機酸で容易に溶解することができ、ゾル状態となる。このゾルはアルカリ物質でゲル化させることが可能である。脱アセチル化度85%と99%のキトサンを結合材として用い、有機酸で溶解したキトサンゾルとハイドロキシアパタイト顆粒、CaO粉末とZnO粉末を混合した合成粉末の両者を練和することによる自己硬化型の骨補填材の開発を行った。それぞれのゾルと合成粉末を練和して作製した圧縮試験片を擬似体液とした生理食塩水中に1日、7日、28日と56日間浸漬した後に圧縮強さの測定を行った。また、浸漬液中に溶出したCaイオン、Pイオン、Znイオンについても分析を行い、各元素の溶出量の測定を行った。また、各浸漬液のpHの変化についても測定を行った。その結果、以下の結論が得られた。

1. 脱アセチル化度85%のキトサンを用いて練和した骨補填材の圧縮強さは、浸漬1日後が最大で約13MPaであり、その後、2MPaまで大きく減少した。
2. 脱アセチル化度95%のキトサンを用いて練和した骨補填材の圧縮強さは、浸漬時間が長くなるにしたがって小さくなる傾向であったが、減少率は脱アセチル化度85%と比較して小さかった。

これは浸漬液中での脱アセチル化度85%の溶解量が99%よりも多いためと考えられた。

3. 脱アセチル化度85%と99%のキトサンを用いて練和したそれぞれの骨補填材を浸漬した生理食塩水のpHは浸漬1日後が最も小さく、浸漬時間が長いと大きくなった。この現象は溶出する元素によると考えられた。両者のキトサンの差は認められなかった。
4. 脱アセチル化度85%のキトサンを用いて練和した骨補填材を浸漬した溶液中のCaイオン量はほとんど差が認められなかった。
5. 脱アセチル化度99%のキトサンを用いて練和した骨補填材を浸漬した溶液中のCaイオン量は浸漬1日後が最大であり、28日後が最も少なかった。
6. 脱アセチル化度85%と99%のキトサンを用いて練和した骨補填材を浸漬した溶液中のPイオン量は、浸漬時間が長くなるほど多くなった。両者のキトサンの差は認められなかった。
7. Znイオンの溶出量は脱アセチル化度85%の

キトサンを用いた場合、浸漬後56日目が脱アセチル化度99%よりも多く認められた。

### 謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御助力くださいました松本歯科大学総合歯科医学研究所生体材料部門・歯科理工学講座伊藤充雄教授に感謝いたします。また、本研究を遂行するに当たり、懇切なる御指導、御校閲を賜った明海大学歯学部歯科材料学講座の中島裕教授、補綴講座天野秀雄教授、口腔外科学第2講座坂下英明教授に心より感謝の意を表します。本論文の推敲のために特別な御配慮を頂きました明海大学歯学部歯科材料学講座日比野清講師に心よりお礼申し上げます。

本論文の要旨は、第36回日本歯科理工学会学術講演会（平成13年4月1日）において発表した。

### 文 献

- 長田哲次, 大石正道, 白土雄司, 樋口勝槻 (1992) 顎骨の小欠損へのヒドロキシアパタイト使用症例術後経過の検討. 口腔科誌 **41**: 695-707.
- 白川正順, 長谷川秀行, 野村 健, 宇沢俊一, 伊藤隆康, 中村慎, 咲間 茂, 都田芳弘 (1986) ハイドロキシアパタイトの臨床経過-予後不良例の検討-. 口腔科誌 **32**: 2672-80.
- 高木幸人 (1988) Hydroxyapatite による歯槽堤造成の失敗症例から学ぶ. 日本歯科評論 **543**: 57-68.
- Misiek DJ, Kent JN and Carr RF (1984) Soft tissue responses to hydroxyapatite particles of different shapes. *J Oral Maxillofac Surg* **42**: 150-60.
- 岸 祐治, 矢ヶ崎 裕, 倉本弘樹, 関口祐司, 植野晋一郎, 山根 進, 伊藤充雄 (2001) ラット頭蓋骨におけるヒドロキシアパタイトと非晶質リン酸カルシウムの骨形成の組織所見. 日本口腔インプラント誌 **14**: 185-8.
- 森 厚二, 日高勇一, 中島三晴, 鬼澤 徹, 矢ヶ崎 裕, 鈴木和夫, 五十嵐俊男, 伊藤充雄 (1999) キチン・キトサンに関する研究-その9-キチン・キトサンを結合材とする骨補填材のCa-SiO<sub>2</sub>添加に関する実験的研究: 実験動物および培養細胞における評価. 日本口腔インプラント誌 **12**: 185-92.
- 橋本孝雄, 日比野 靖 (1995) リン酸4カルシウムセメントに関する研究. 歯材器 **14**: 357-66.
- 矢吹 稔, 石川文保, 大宝 明, 島原健二 (1988) 最後のバイオマス, キチン, キトサン, 第1版. 技報堂, 東京, 11-2.
- Ito M (1991) In vitro properties of a chitosan-bond hydroxyapatite bone-filling paste. *Biomaterials* **12**: 41-5.
- 横山宏太, 森 厚二, 山倉和典, 中島三晴, 五十嵐俊男, 日高勇一, 伊藤充雄 (1997) キチン・キトサンに関する研究その4. ウサギ脛骨骨膜下における合成ハイドロキシアパタイト含有キチン・キトサンフィルムの病理組織学的観察: キチン・キトサンの脱アセチル化度および分子量の影響. 日本口腔インプラント誌 **10**: 44-50.
- 日高勇一, 森 厚二, 中島三晴, 五十嵐俊男, 矢ヶ崎 裕, 鈴木和夫, 伊藤充雄 (1998) キチン・キトサンに関する研究その8. 合成ハイドロキシアパタイト含有キチン・キトサンフィルムのラット頭蓋骨骨膜下における病理組織学的検索. 日本口腔インプラント誌 **11**: 34-41.
- 矢吹 稔 (1990) キチン・キトサンの応用第1版, 技報堂, 東京, 104-14.
- Urist MR and Strates BS (1971) Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* **50**: 1392-406.
- 田辺俊一郎 (1990) 骨形成因子の抽出と骨誘導実験. 日口外誌 **36**: 2659-69.
- 山口博雄 (1993) 骨形成タンパク質の精製とその精製物による骨形成過程の生化学的研究. 北海道歯誌 **14**: 26-48.
- 櫻井規雄 (1993) 骨誘導因子 (BMP) の精製および骨芽細胞系細胞に対する作用に関する研究. 口病誌 **60**: 169-82.
- Bentz H, Nathan R M, Rosen DM, Armstrong RM, Thompson AY, Segarini PR, Mathews MC, Dasch JR, Piez KA and Seyedin SM (1989) Purification and characterization of a unique osteoinductive factor from bovine bone, *J Biol Chem* **264**: 20805-10.
- Sampath TK, Muthukumar N and Reddi AH (1987) Isolation of osteogenin, an extracellular matrix-associated, bone-inductive protein, by heparin affinity chromatography, *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7109-13.
- Luyten FP, Cunningham NS, Muthukumar N, Hammonds RG, Nevins WB, Wood WI and Reddi AH (1989) Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation, *J Biol Chem* **264**: 13377-80.
- 松本良造, 今井弘一 (1993) 細胞回復後試験法の確立に関する基礎的検討. 初期, 細胞数と細胞回復時間について. 歯材器 **12**: 374-92.

- 21) Arnett TR and Dempster DW (1986) Effects of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology* **119** : 119-24.
- 22) Sharpe JR, Sammons RL and Marguis PM (1997) Effect of pH on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials* **18**(6) : 471-6.
- 23) Franks K, Abrahams I and Knowles JC (2000) Development of soluble glasses for biomedical use part 1. In vitro solubility measurement. *J Mater Sci* **11** : 609-14.
- 24) Zaidi M, Datta HK, Patchell A, Moonga B and Macintyer I (1989) Calcium-activated intracellular calcium elevation : a novel mechanism of osteoclast regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **163** : 1461-5.
- 25) Miyauti A, Hruska KA, Greenfield EM, Duncan R, Alvarez J, Barattolo R, Colucci S, Zamboni-Zallone A, Teitelbaum SL and Teti A (1990) Osteoclast cytosolic calcium, regulated by voltage-gated calcium channels and extracellular calcium, controls podosome assembly and bone resorption. *J Cell Biol* **111** : 2543-52.
- 26) Kaji H, Sugimoto T, Kanatani M and Chihara K (1996) High extracellular calcium stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity in the presence of osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* **11** : 912-20.
- 27) Suda T, Nakamura I, Jimi E and Takahashi N (1997) Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* **12** : 869-79.
- 28) 桜井 弘, 田中英彦 (1994) 生体微量元素第1版, 廣川書店, 東京, 196-7.
- 29) 小野 擴仁, 溝口利英, 上條 都, 矢ヶ崎 裕, 吉田貴光, 永沢 栄, 伊藤充雄 (2001) キチン・キトサンに関する研究-アパタイト含有キトサンフィルムの生体反応-. *日本口腔インプラント学会誌* **14** : 563-8.
- 30) 岡田 正, 高木洋治 (1984) 亜鉛と臨床第1版. 朝倉書店, 東京, 7.
- 31) 小鹿真理, 加藤清正 (2001) 歯学生・歯科医のための歯科栄養学, 第1版. 学健書院, 東京, 70.
- 32) 藤田拓男 (1991) 骨代謝調節因子-最近の進歩, 第1版. 羊土社, 東京, 65.