

〔総説〕 松本歯学 21 : 269~279, 1995

key words : ハイドロキシアパタイト - キトサン - 生体材料

アパタイト含有キトサンフィルムの諸性質について

伊藤充雄

松本歯科大学総合歯科医学研究所 生体材料部門 (主任 伊藤充雄 教授)

Various Properties for Chitosan Films Containing Apatite

MICHIO ITO

*Department of Biomaterials, Institute for Dental Science, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. M. Ito)*

Summary

Chitosan is a polysaccharide extracted from crustacea. Chitosan sol is produced by dissolving chitosan in a solution of organic acids. Chitosan film can be fabricated from chitosan sol, which has been neutralized with 5% polyphosphate solution and gelatinized. Chitosan film is characterized by both its elasticity and in vivo absorption capacity. Although the chitosan film become inelastic when dried, they will return to an elastic state when soaked in water. It is of practical importance to determine the amount of calcium ions dissolved from the hydroxyapatite which is kneaded with the chitosan film. In the present study, the relationship of various amounts of added hydroxyapatite and chitosan to shrinkage, hardness, tensile strength and elongation of the chitosan film was determined in addition to the amount of dissolved calcium ions.

The following results were obtained. The shrinkage during drying was decreased by increasing the amount of hydroxyapatite added. The hardness showed a maximum value at the ratio of hydroxyapatite : chitosan sol = 4 : 11. The hardness was increased by increasing the amount of chitosan. The tensile strength of the chitosan films kneaded with hydroxyapatite exhibited a higher value than those without hydroxyapatite. Elongation showed the highest value when the ratio of hydroxyapatite : chitosan sol = 2 : 11. The tensile strength and elongation were increased by increasing the amount of chitosan. The amount of calcium ion dissolution showed the highest value when the ratio of hydroxyapatite : chitosan sol = 4 : 11. When chitosan film was soaked in physiological saline, the original level of elasticity was restored.

はじめに

近年、抜歯窩の骨形成を早期に行う目的でハイドロキシアパタイトの顆粒や焼結体を用いられている。特に顆粒状のハイドロキシアパタイトの有効率は、65.3%であるとしている¹⁻³⁾。顆粒を填入しても移動してしまい、骨形成に作用しなかったりすることが報告されている^{4,5)}。また、歯周病学の領域では、Guided Tissue Regeneration(GTR)が注目されている。このフィルムは四フッ化エチレン樹脂系のゴアテックス[®]が用いられる。このフィルムの使用方法としては、歯周外科手術時に上皮組織が手術部位に増殖すると予後が悪く、骨の再生も難しいため、フィルムを用いて上皮組織の増殖を防止し、歯槽骨の再生を誘導するためである。このフィルムの生体実験で骨様組織が認められたのは13.3%であり、露出したケースが60%あったことが報告されている⁶⁾。また、このフィルムは、生体吸収性の材質ではない。

したがって、骨形成を早期に進行させるために、生体親和性に優れ、生体吸収性で骨伝導しやすいフィルムの製造を目的に甲殻類から抽出される天然高分子のキトサンの応用を試みた。このキトサンは、現在、縫合糸、人工皮膚、薬の徐放材、タンパク質の回収、重金属の回収等に用いられている。このキトサンは、生体内で分解、吸収される性質を有している。キトサンは、カルボン酸で溶解され、キトサンゾルとすることが出来る。このゾル中にハイドロキシアパタイト粉末を練り込み、一定の肉厚になる様にシャーレ中に注入し、5%のポリリン酸ナトリウム水溶液で中和を行い、フィルムを作製する。このフィルムは、滅菌時の乾燥に対しては硬く、もろくなるが、使用する時点では生理食塩水中に浸漬することでゴム状の弾性体とすることが出来る。このフィルムを顎堤上に埋入しても、咬合圧によって歯肉に炎症が生じたりはしない。また、ハイドロキシアパタイト粉末も移動することはない。これらキトサンフィルムの性質が練り込むハイドロキシアパタイト量とキトサン量によって、どのように影響されるかについて検討した結果を以下に述べる⁷⁻¹⁰⁾。

ハイドロキシアパタイト量とキトサンフィルムの諸性質について

キトサンゾルはマロン酸(ナカライテスク)0.5gを10mlの生理食塩水で溶解した水溶液にキトサン(甲腸ケミカル)0.5gを溶解して作製した。このキトサンゾル中にハイドロキシアパタイト(三井東庄、平均粒径10um、以下HAと表示する)を2.0, 3.0, 4.0, 5.0g(以下キトサンゾル11gとの比で2/11, 3/11, 4/11, 5/11と各々に表示する)各々に練り込み、肉厚1.5mmになるようにガラスシャーレ中にセットした。これらの練和液をポリリン酸ナトリウム(ナカライテスク)5%の水溶液を用いて中和を行い、図1に示すフィルムを作製した。

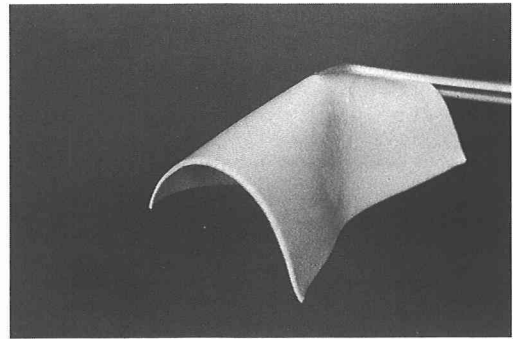


図1：キトサンフィルム

ハイドロキシアパタイト量とpH値との関係

図2はキトサンゾルのpH値とHAを各々に練り込んだpH値の測定結果である。キトサンゾルだけのpH値は2.8であり、2/11が5.0, 3/11が5.2, 4/11と5/11が5.3であった。HA量が増加するにしたがって、pH値は、大きくなった。一方、中和後のpH値は、7.2~7.4であった。

ハイドロキシアパタイト量と収縮率の関係

図3は、中和時の収縮率である。キトサンだけの収縮率は、約20%、2/11では、約8%、3/11では、約6.4%、4/11の約4.8%、5/11では、約2.6%であった。HA量が増加するにしたがって収縮率は、小さくなった。一方、乾燥後の収縮率は図4に示す。この図によると、キトサンのみの場合、約30%、2/11の約21%、3/11では約21%、3/11では約15%、4/11では、約12.5%、そして5/11のキトサンフィルムの収縮率は約9.5%であった。HA

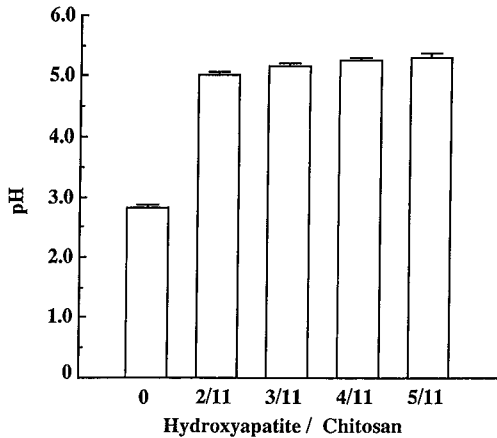


図2：pH値とHA含有量の関係

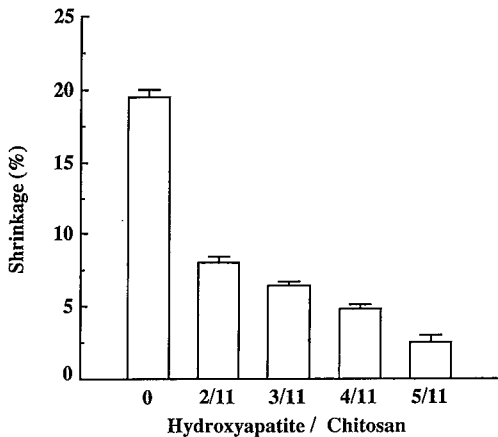


図3：中和後の収縮量とHA含有量の関係

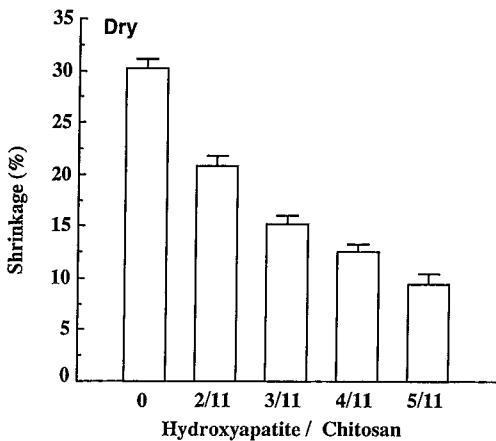


図4：乾燥後の収縮量とHA含有量の関係

量が増加するにしたがって収縮率は小さくなった。これは、アパタイト粒子がキトサンの収縮を阻害するためと考えられる。

ハイドロキシアパタイト量と硬さとの関係

図5は、キトサンフィルムの中和後の硬さの測定結果である。キトサンだけの硬さは、約27 Hs、2/11の硬さは、約32 Hs、3/11は、約33 Hs、4/11では、約37 Hs、そして5/11では約35 Hsであった。HAを練り込むことによって、硬さは、大きくなった。図6は、乾燥したキトサンフィルムを生理食塩水中に浸漬した後の硬さの測定結果である。キトサンだけのフィルムの硬さは、約69 Hs、2/11では、約70 Hs、3/11では、約72 Hs、4/11では、約80 Hsそして5/11のキトサンフィルムの硬さは、約75 Hsであった。最大の硬さは4/11のときに得られた。

ハイドロキシアパタイト量と引張強さおよび伸びの関係

図7は、キトサンフィルムの中和後の引張強さと、図8は伸びの測定結果である。キトサンだけの引張強さは、約3.3 gf/mm²、2/11では、約10.0 gf/mm²、3/11では、約14 gf/mm²、4/11では、約20.0 gf/mm²、そして、5/11では、約8.6 gf/mm²であった。引張強さの最大値は、4/11で得られた。一方、キトサンのみの伸びは、約38%、2/11では、約73%、3/11では、約62%、4/11では、約55.0%、そして5/11の伸びは、約47%であった。伸びの最大値は、2/11で得られた。

図9は、キトサンフィルムの乾燥後、生理食塩水中で吸水させた場合の引張強さと図10は、伸びの測定結果を示す。キトサンのみのフィルムの引張強さは、約24 gf/mm²、2/11では、約48 gf/mm²、3/11の引張強さは、約45 gf/mm²、4/11では、約47 gf/mm²、そして、5/11では、約42 gf/mm²であった。2/11から4/11までは引張強さに差が認められなかったが、5/11ではわずかに減少する傾向にあった。一方、キトサンフィルムだけの伸びは、約65%、2/11では、約90%、3/11では、約62%、4/11では、約55%そして、5/11の伸びは、約42%であった。最大の伸びは、2/11で得られた。HA量が増加するにしたがって、HA粒子同士が接触する面積が増加し、キトサンとの接触面積が少なくなり、結合材としてのキトサンの効力が減少するためと考えられる。

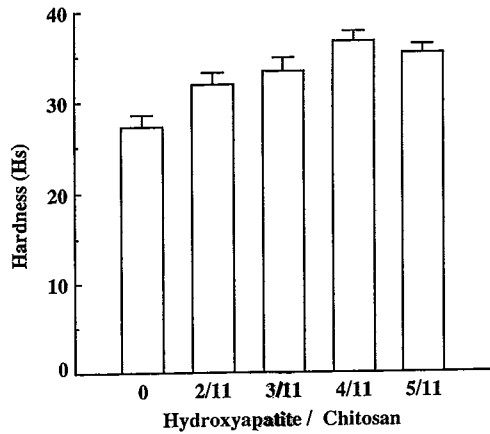


図5：中和後のフィルムの硬さとHA含有量の関係

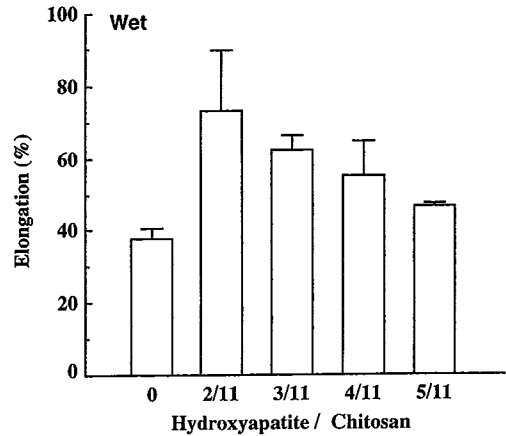


図8：中和後のフィルムの伸びとHA含有量の関係

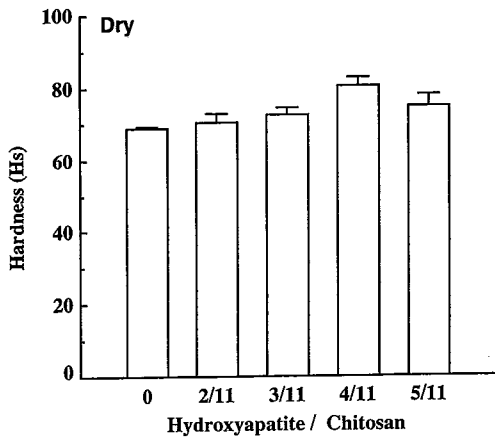


図6：乾燥後、吸水したフィルムの硬さとHA含有量の関係

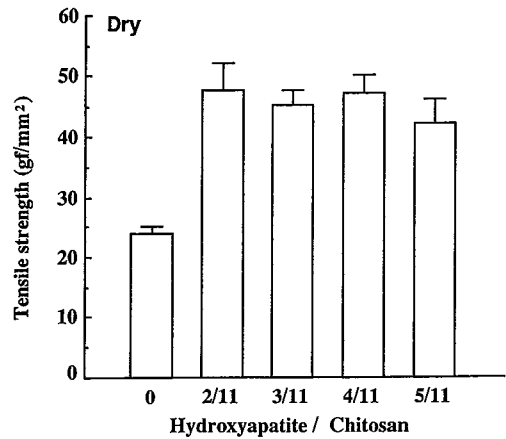


図9：乾燥後、吸水したフィルムの引張強さとHA含有量の関係

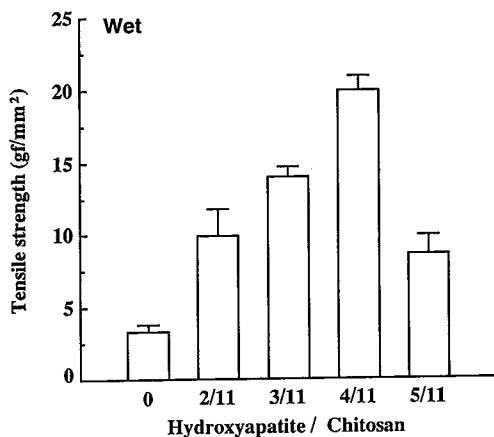


図7：中和後のフィルムの引張強さとHA含有量の関係

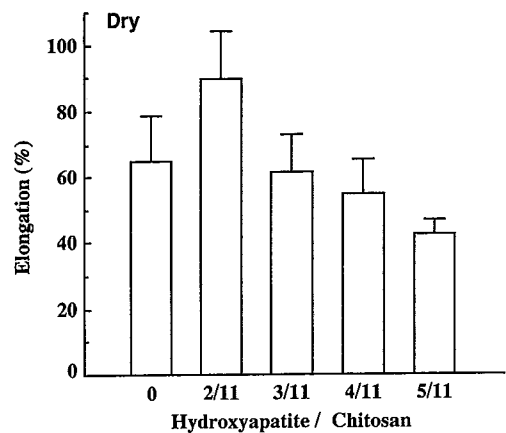


図10：乾燥後、吸水したフィルムの伸びとHA含有量の関係

ハイドロキシアパタイト量と Ca イオンの溶出について

図11は、HA を練り込んだ各々のキトサンフィルムを2週間、37℃の生理食塩水中で振盪した後、溶出したCa イオン量について分析した結果である。キトサンだけのフィルムのCa イオン量は、0.04 mg/l、2/11では、1.29 mg/l、3/11では、1.34 mg/l、4/11では、1.72 mg/lそして、5/11では、1.22 mg/lの溶出量であった。最大溶出量は、4/11であった。この原因は、各キトサンフィルムの表面の観察結果から推察することが出来る。図12は、生理食塩水中に浸漬する前の各キトサンフィルムであり、図13は、浸漬後の各キトサンフィルムの表面状態を示す。図12によるとHA 量が増加すると、表面の凹凸が減少し、平滑になる傾向が認められる。これらのキトサンフィルムを浸漬した結果、図13に示すように、キトサン部分が溶出し、2/11から4/11までは、大きな空隙が観察されている。しかし、5/11の空隙は他の試験片と比較して少ない。ハイドロキシアパタイト粒子が生理食塩水と接触する面積は、4/11が最大で、5/11では、粒子同士が接触する面積が多く、生理食塩水と接触する面積が減少するためにCa イオンの溶出量が少なかったものと考えられる。Ca イオン量が増

加するにしたがって、pH 値が高くなる。骨形成には、Ca イオンとコラーゲン・オステオネクチン複合体上でアパタイト結晶の核が形成され、成長することが、報告されている¹¹⁾。また、骨補填材を填入したとき、新生される血管等によって骨形成が進行することも報告されている^{12,13)}。骨芽細胞が早く発生する環境作りをすることが必要であり、そして填入した骨補填材と骨とが早期に置換することが理想的である。

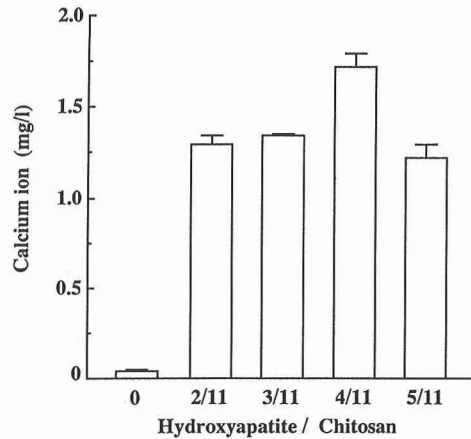


図11：Ca イオンの溶出量と HA 含有量の関係

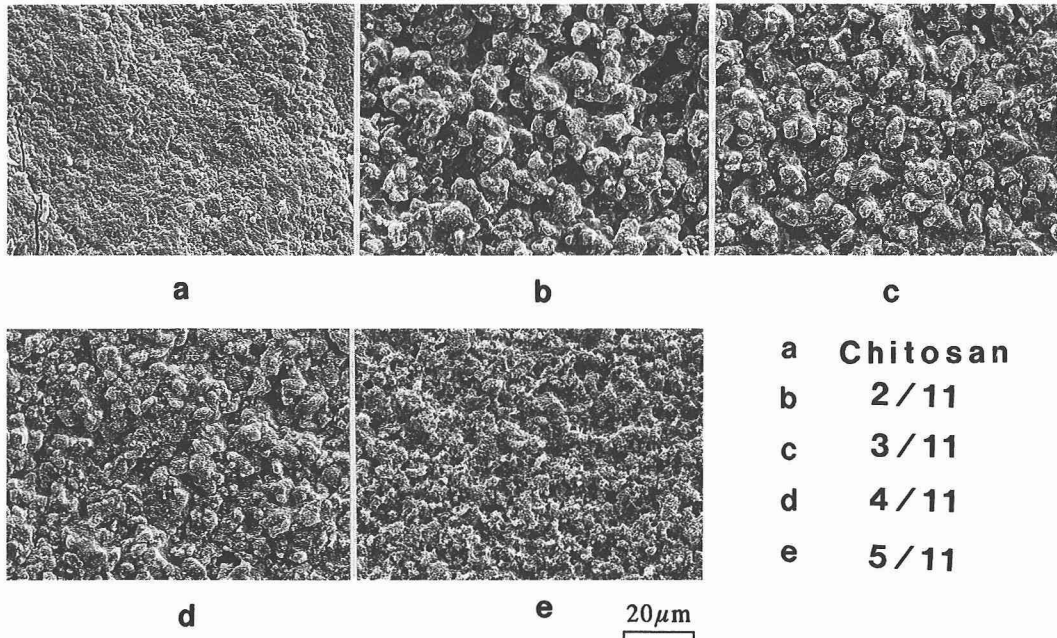


図12：HA の練り込み量とキトサンフィルムの表面状態（生理食塩水中に浸漬前）

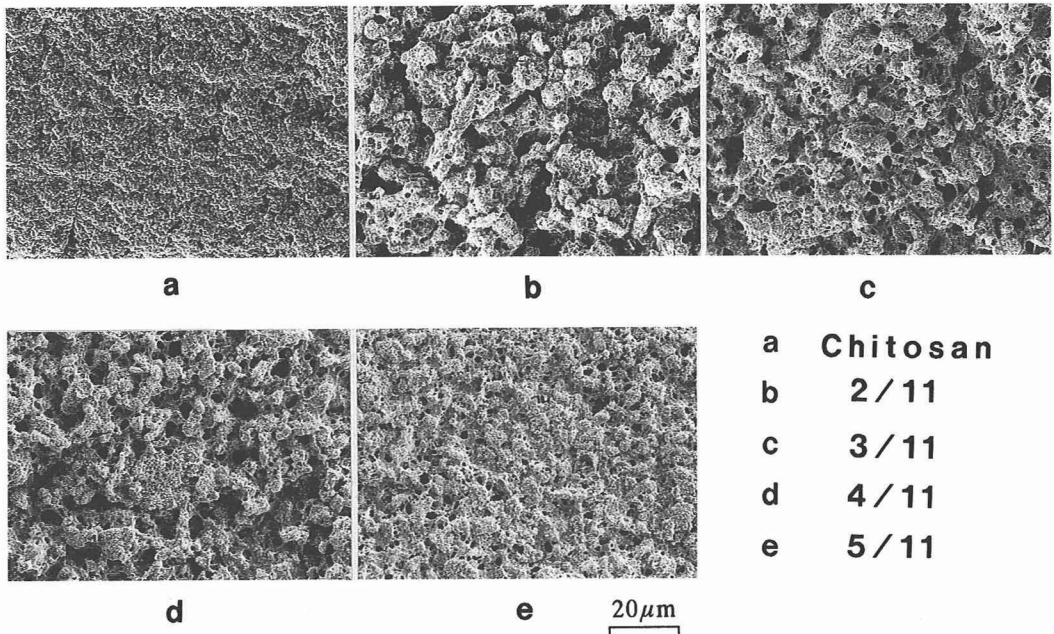


図13：HAの練り込み量とキトサンフィルムの表面状態（2週間生理食塩水中に浸漬後）

キトサン含有量と諸性質について

表1は、キトサン含有量のことになったフィルムの成分を示す。キトサン0.4、0.5と0.6gを各々に用い、マロン酸(ナカライテスク)0.5gとリンゴ酸(ナカライテスク)0.5gを各々に用いて、10mlの生理食塩水中で溶解し、キトサンゾルを作製した。それぞれのゾル中にハイドロキシアパタイト(三井東庄)0.4gを練り込み、肉厚1.5mmとなるようにガラスシャーレ中にセットした。中和は、中和滴定機を用いて5%ポリリン酸ナトリウム(ナカライテスク)溶液にてpH7.2に調整を行った。以下、試験片の文中での表示は表中に示す略号にて行う。

キトサン量とキトサンフィルムの硬さについて

図14は、中和後のキトサンフィルムの硬さ測定結果である。MC4の硬さは、約36 Hs、MO4の硬さは、約36 Hs、MC5は、約43 Hs、MO5は、約41、MC6は、約46、MO6は、約45であった。MCとMOの差は、ほとんど認められず、キトサン量が多くなると硬さは大きくなる傾向であった。一方、図15は、乾燥後、生理食塩水中に浸漬した試験片の硬さであり、MC4の硬さは、約77 Hs、MO4は、約75。MC5は、約80 Hs、MO5は、約81 Hs、MC6

の硬さは、約87 Hs、そしてMO6は、約85 Hsであった。乾燥後もマロン酸とリンゴ酸との差はなく、キトサン含有量が増加するほど硬さは大きくなる傾向であった。硬さが大きくなってもゴム状の弾性を有していた。このキトサンフィルムの性質によって咬合圧が負荷されても歯肉の炎症が生じない利点がある。

キトサン量と引張強さおよび伸びについて

図16と17は、中和後のキトサンフィルムの引張強さと伸びの測定結果を示す。MC4の引張強さは、約7 gf/mm²、MC5では、約12 gf/mm²、MC6では、約18 gf/mm²であった。MO4の引張強さは、約3.5 gf/mm²、MO5では、約6.5 gf/mm²、MO6では、約11 gf/mm²であった。キトサン量が多くなると引張強さは、大きくなり、リンゴ酸で溶解したキトサンゾルを用いたフィルムの引張強さは、マロン酸を用いるよりも大きくなった。一方、伸びについては、図17に示す。MC4の伸びは、約85%、MC5は、約84%、MC6では、約90%であった。つぎにMO4の伸びは、約35%、MO5では、約58%、MO6は、約65%であった。キトサン量が多くなると伸びは、大きくなり、リンゴ酸を用いたほうがマロン酸を用いた場合よりも伸びは、大きくなる傾向であった。

表1：キトサンフィルムの成分について

Code	Chitosan (g)	Malic (g)	Malonic (g)	Hydroxyapatite (g)	Physiological Salt Solution (ml)
MC 4	0.4	0.5	—	2.0	10
MC 5	0.5	0.5	—	2.0	10
MC 6	0.6	0.5	—	2.0	10
MO 4	0.4	—	0.5	2.0	10
MO 5	0.5	—	0.5	2.0	10
MO 6	0.6	—	0.5	2.0	10

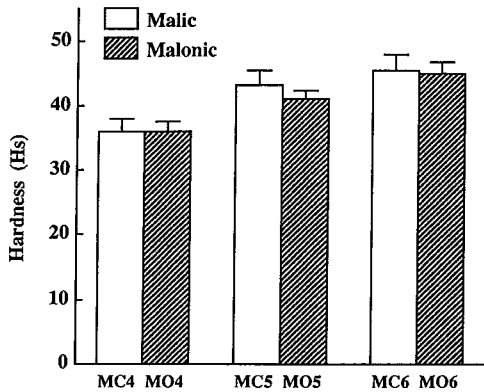


図14：キトサン量とキトサンフィルムの硬さについて (中和後)

Malic：リンゴ酸でキトサンを溶解
 Malonic：マロン酸でキトサンを溶解

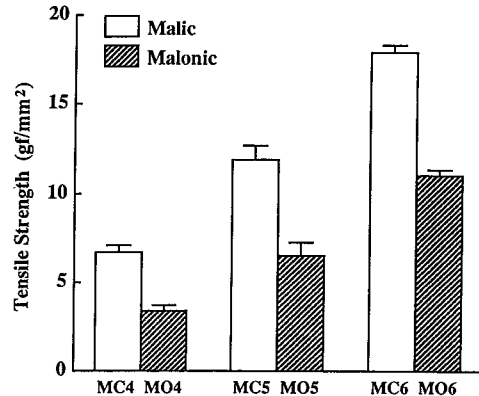


図16：キトサン量とキトサンフィルムの引張強さについて (中和後)

Malic：リンゴ酸でキトサンを溶解
 Malonic：マロン酸でキトサンを溶解

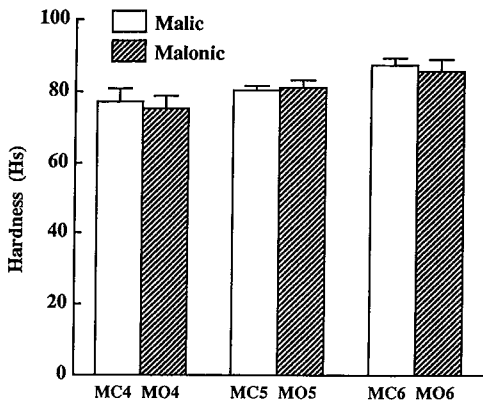


図15：キトサン量とキトサンフィルムの硬さについて (乾燥後)

Malic：リンゴ酸でキトサンを溶解
 Malonic：マロン酸でキトサンを溶解

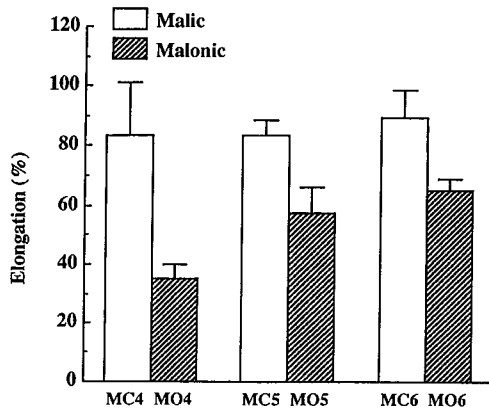


図17：キトサン量とキトサンフィルムの伸びについて (中和後)

Malic：リンゴ酸でキトサンを溶解
 Malonic：マロン酸でキトサンを溶解

図18は、乾燥したキトサンフィルムを生理食塩水中に浸漬した後、引張強さを測定した結果である。MC4の引張強さは、約17 gf/mm²、MC5では、約31 gf/mm²、MC6では、約48 gf/mm²であった。一方、マロン酸を用いたMO4の引張強さは、約15 gf/mm²、MO5は、23 gf/mm²、MO6では、約36 gf/mm²であった。キトサン量が多くなると引張強さは、大きくなり、中和後よりも乾燥後、吸水させたキトサンフィルムの引張強さが大きくなった。

図19は、乾燥後、吸水させたキトサンフィルムの伸びについて示す。MC4の伸びは、約20%、MC5は、約29%、MC6では、約38%であった。一方、MO4の伸びは、約16%、MO5では、約25%、そしてMO6では、約36%であった。キトサン量が多くなるほど伸びは、大きくなった。

骨形成を早期に行うためには、骨芽細胞の発生する環境作りが必要であり、埋入したキトサンフィルム中に新生される血管が多くなることが必要不可欠となる。したがって、キトサンフィルムの生理食塩水中での経時変化について検討した。図20は、リンゴ酸で溶解したキトサンを用いたキトサンフィルムの引張強さの経時変化について検討した結果である。MC4の1日後の引張強さは、約17 gf/mm²、7日後では、6 gf/mm²、14日後では、測定出来なかった。MC5の1日後では、約31 gf/mm²。7日後では、約22 gf/mm²、14日後では、測定出来なかった。つぎに、MC6の1日後の引張強さは、約48 gf/mm²、7日後では、約37 gf/mm²、14日後では、約18 gf/mm²であった。浸漬する時間が長くなるにしたがって、引張強さは、低下する傾向にあった。一方、マロン酸で溶解したキトサンを用いた場合の引張強さの経時変化の測定結果を図21に示す。MO4の1日後の引張強さは、約15 gf/mm²、7日後では、約59.5/mm²。14日後では、測定出来なかった。MO5の1日後の引張強さは、約23 gf/mm²、7日後では、約22 gf/mm²、14日後では、約7 gf/mm²であった。MO6の1日後の引張強さは、約36 gf/mm²、7日後では、約23 gf/mm²。14日後では、約17 gf/mm²であった。浸漬時間が長くなるにしたがって、引張強さは、減少する傾向であった。また、キトサン量が少ないほど短期間で測定が出来なくなる結果であった。この傾向は、リンゴ酸で溶解したキトサンにおいて著しく認められた。したがって、早い時期にフィル

ムの強さを減少させ骨と置換させたい部位に使用するときは、キトサン量を少なくして、リンゴ酸で溶解したキトサンゾルを用いることによって得られるものと考えられる。

図22は、伸びの経時変化を示す。MC4の1日後の伸びは約20%、7日後では約15%、14日後では、測定が出来なかった。MC5の1日後の伸びは、約29%、7日後では、約41%、14日後では、測定出来なかった。MC6の1日後の伸びは、約38%、7日後では、約43%、14日後では、約31%であった。MC5とMC6については、7日後の伸びは1日目よりも大きくなる傾向であった。つぎに図23は、

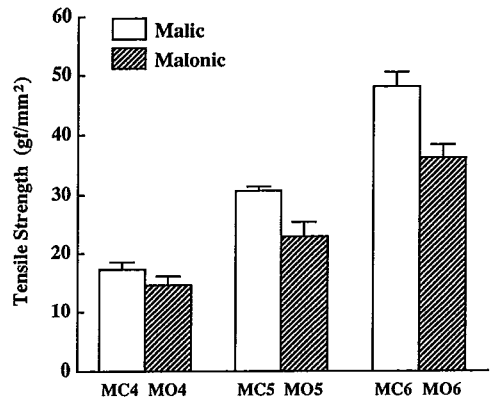


図18：キトサン量とキトサンフィルムの引張強さについて（乾燥後）

Malic：リンゴ酸でキトサンを溶解
Malonic：マロン酸でキトサンを溶解

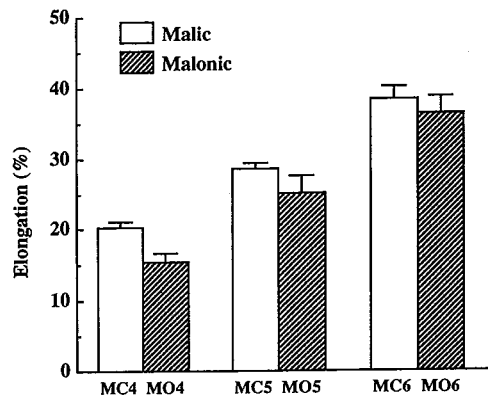


図19：キトサン量とキトサンフィルムの伸びについて（乾燥後）

Malic：リンゴ酸でキトサンを溶解
Malonic：マロン酸でキトサンを溶解

マロン酸で溶解したキトサンを用いた伸びの測定結果である。MO4の浸漬1日後の伸びは、約16%、7日後では、約14%、14日後では、測定できなかった。MO5の浸漬1日後の伸びは、約25%、7日後では、約30%、14日後の伸びは、約13%であった。つぎに、MO6の1日後の伸びは、約36%、7日後では、約34%、14日後の伸びは、約28%であった。MO5の伸びは、7日後に大きくなり、14日後では、減少した。MO6では、浸漬時間が長くなるほど伸びは小さくなった。浸漬することによって、引張強さや伸びが減少するのは、図24と25に示すよう

に、キトサンが溶出し、空隙が多く生じていることが原因していると考えられる。また、生体中に埋入したキトサンフィルムにこの様な現象が生じることによって、フィルムの空隙に新生される血管が増加し、早期に骨と置換出来るものと考えられる。

ま と め

キトサンフィルムに練り込むハイドロキシアパタイトの量は、フィルムの操作性、Caの溶出の観点からするとキトサン量11に対してハイドロキシン

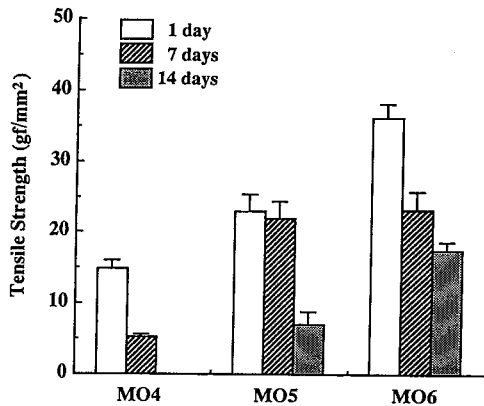


図20：キトサンフィルムの生理食塩水中での引張強さの経時変化について（リンゴ酸でキトサンを溶解）
□：1日後 ▨：7日後 ▩：14日後

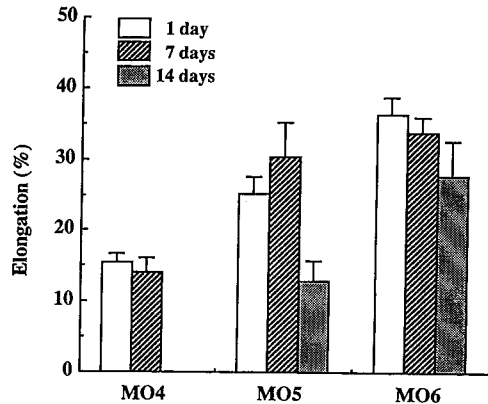


図22：キトサンフィルムの生理食塩水中での伸びの経時変化について（リンゴ酸でキトサンを溶解）
□：1日後 ▨：7日後 ▩：14日後

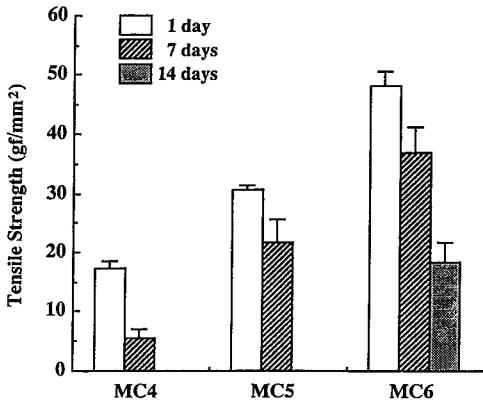


図21：キトサンフィルムの生理食塩水中での引張強さの経時変化について（マロン酸でキトサンを溶解）
□：1日後 ▨：7日後 ▩：14日後

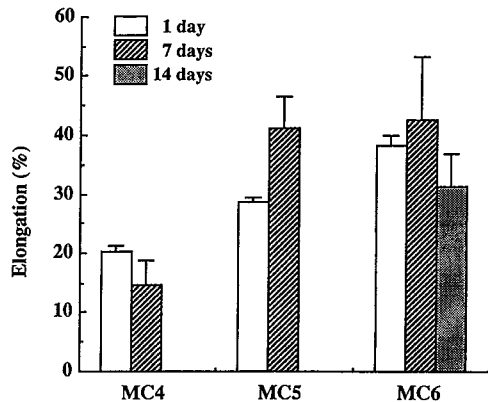


図23：キトサンフィルムの生理食塩水中での伸びの経時変化について（マロン酸でキトサンを溶解）
□：1日後 ▨：7日後 ▩：14日後

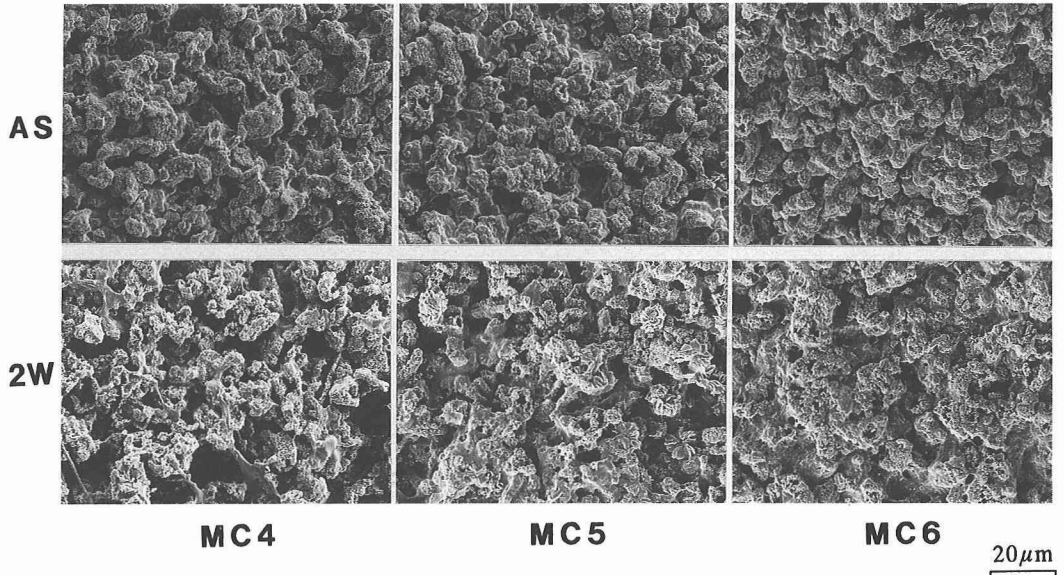


図24：キトサンフィルムの浸漬前と浸漬後の表面状態（リンゴ酸でキトサンを溶解）
AS：浸漬前 2W：浸漬した2週間後

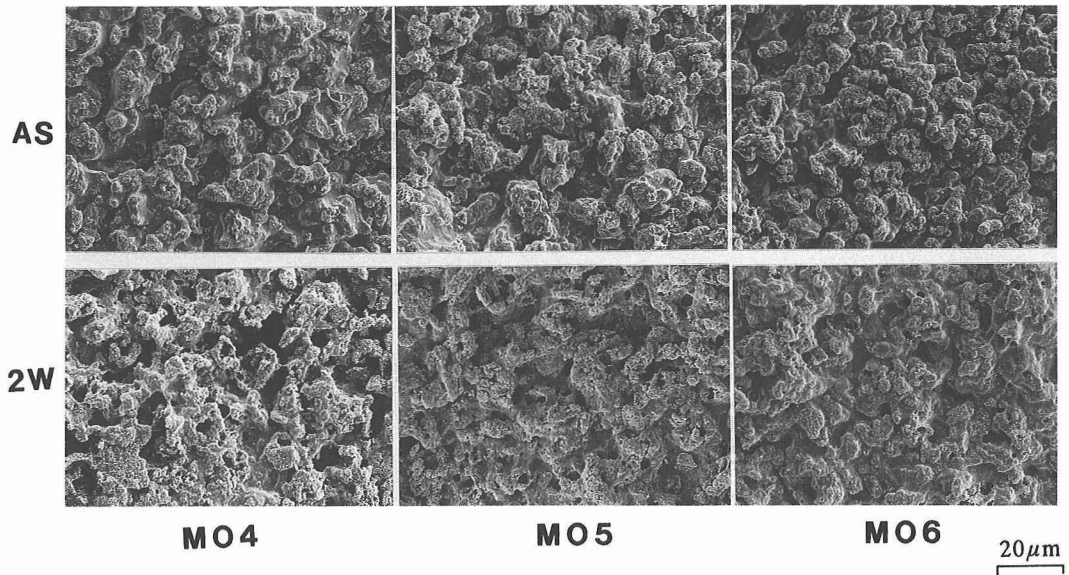


図25：キトサンフィルムの浸漬前と浸漬後の表面状態（マロン酸でキトサンを溶解）
AS：浸漬前 2W：浸漬した2週間後

アパタイト量は4であれば良好な結果となると考えられる。また、抜歯窩への軟組織の侵入を防止し、骨形成を早期に進行させるのに用いるフィルムは、キトサン量を多くし、マロン酸で溶解したキトサンゾルで、作製すればよいと考えられる。一方、顎定上にフィルムをセットし、骨形成を行

うためには、早く骨と置換出来る材質が良好な結果を生むと考えられる。したがって、キトサン量を少なくし、リンゴ酸で溶解したキトサンゾルで作製したフィルムが適していると考えられる。今後、動物実験を行い種々検討したいと考えている。

文 献

- 1) 久野吉雄, 宮下幸久, 原田 康, 栗原由紀夫, 柿澤 卓, 野間弘康 (1985) ハイドロキシアパタイト (Clacitite) の臨床使用経験. 日口外誌, **31**: 1602—1611.
- 2) 山田 了, 大須賀豊, 野村 篤, 道 健一, 長谷川幸司, 大澤毅晃, 大野康亮, 鴨井久一 (1986) Periograf の垂直性骨欠損部への応用に関する臨床的研究. 日歯周誌, **28**: 144—160.
- 3) 若月達也, 中島信也, 築瀬一彦, 大島みどり, 佐藤徹一郎 (1987) 多孔質 Hydroxy-apatite 顆粒の臨床応用. 口科誌, **3**: 82—95.
- 4) Nent, J., Quinn, J. H., Zide, M. F., Finger, I. M., Jarcho, M. and Rothstein, S. S. (1982) Correction of alveolar ridge deficiencies with nonresorbable hydroxyapatite. J. Am. Dent. Assoc., **105**: 993—1001.
- 5) 高木幸人 (1988) Hydroxyapatite による歯槽堤造成の失敗症例から学ぶ. 日本歯科所論, **543**: 57—68.
- 6) 渡辺孝夫, 瀬戸暁一 (1992) 効果 GTR (ゴアテックス膜による骨造成術), 135—146. 日本医療分化センター.
- 7) 伊藤充雄, 新納 亨, 森 厚二, 横山宏太, 中山優子, 山岸利夫 (1994) 生体材料に関する研究 (その6) キトサンフィルム of 機械的性質とハイドロキシアパタイト含有量の関係. 歯材器, **13**: 351—357.
- 8) 伊藤充雄, 新納 亨, 森 厚二, 横山宏太, 竹内勝泉, 中山優子, 山岸利夫 (1995) 生体材料に関する研究 (その7) 乾燥したキトサンフィルムの機械的性質について. 歯材器, **14**: 175—180.
- 9) 伊藤充雄, 竹内勝泉, 孔 泰寛, 森 厚二, 横山宏太, 五十嵐俊男, 山岸利夫 (1995) 生体材料に関する研究 (その8) キトサンフィルムの機械的性質とキトサン含有量について. 歯材器, **14**: 484—491.
- 10) 伊藤充雄, 竹内勝泉, 孔 泰寛, 森 厚二, 横山宏太, 五十嵐俊男, 山岸利夫 (1995) 生体材料に関する研究 (その9) キトサンフィルムの引張強さと浸漬時間との関係. 歯材器, **14**: 492—498.
- 11) 羽毛田慈之, 久米川正好 (1987) 骨芽細胞の機能と多様性. 歯科ジャーナル, **26**: 887—896.
- 12) 野間弘康 (1966) 抜歯創の血管新生およびその経過に関する実験的研究. 歯科学報, **66**: 288—365.
- 13) 島田純治 (1989) 抜歯創の骨性治癒における血管構築の変化について. 歯基礎誌, **31**: 19—34.