

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏 名	吉 野 文 貴
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 519 号
学位授与年月日	令和4年3月14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	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Change in Solubility over Time of the Bioactive Material Amorphous Calcium Phosphate and Precipitation of Hydroxyapatite (生体活性材料としての Amorphous Calcium Phosphate の経時的溶解性と Hydroxyapatite の析出に関する研究) Journal of Hard Tissue Biology 第31巻 第1号 1頁～8頁掲載 令和4年1月発行
論 文 審 査 委 員	主査 教授 朝 田 芳 信 副査 教授 小 林 馨 副査 教授 山 本 雄 嗣

内 容 の 要 旨

Amorphous calcium phosphate (ACP) は、骨や歯などの生体硬組織に存在するとともに、骨伝導性、生分解性、生物活性などの優れた生物学的特性を持つため、積極的に組織の再生を誘導する生体活性材料として、歯科分野ではセメントのフィラー、歯磨剤、チューインガムに配合応用されている。

ACP の溶解性 (solubility) は他のリン酸カルシウム結晶に比べて高いことが明らかとなっており、このことから唾液などの生体緩衝液にも高い溶解性を示すことが予想される。ACP を口腔内で臨床応用すると考えるならば、緩衝液中での ACP の挙動について考慮する必要がある。

Calcium (Ca) イオンとリン酸イオンの過飽和溶液から析出する結晶相についてはこれまで、リン酸カルシウム溶液から ACP が生成し、中間生成物である Octacalcium phosphate (OCP) 様の結晶を経て硬組織の主成分である Hydroxyapatite (HAp) に相転換する (Passway 1) と考えられてきた。しかし、近年の研究によってリン酸カルシウム溶液から生成した ACP が OCP を介さずに HAp が析出するケース (Passway 2)、あるいはリン酸カルシウム溶液から直接 HAp が析出するケース (Passway 3) があることも明らかとなった。

一方、緩衝液に ACP を浸漬した場合には Ca イオンとリン酸イオンが溶出する可能性が高く、この場合には HAp が直接析出する (Passway 3) 可能性がある。また、浸漬した ACP から上記の OCP を経て HAp へ (Passway 1)、あるいは OCP を経ることなく HAp へ (Passway 2)、これらいずれかの経路で最終的に HAp が析出する可能性も考えられる。

また、HAp の析出とその後の結晶成長には様々なタンパク質やイオンが影響を与えることが明らかとなっており、amelogenin や fluoride, aspartic acid (Asp) などは促進的に作用し、carbonate や magnesium, casein phosphopeptide (CPP) などは遅延的に作用することが知られている。

上述のように、ACP は他のリン酸カルシウム結晶と比較して溶解性が高く、溶出した Ca イオンとリン酸イオンは硬組織に対して効果的なイオンの供給源になり得ると考えられる。このことから ACP を生体活性材料として臨床応用する場合には、タンパク質やイオンを複合材料として加工し ACP から持続的かつ多量にイオンを遊離させる方法がとられる。

しかし前述の複合材料としてではなく、不純物を含まない ACP でかつ安定な粉体として歯質に応用することができれば、生体活性材料としての利便性も拡がると考えられる。

そこで、本研究では ACP パウダーを生化学的緩衝溶液中に浸漬し、その溶解性と沈殿物の相転換について分析を行った。このとき緩衝液としては、水に良く溶け濃厚な緩衝液が作成できる、酸解離平衡が濃度・温度・イオン組成の影響を受けにくい、金属イオンとの錯形成能が小さい、可視・紫外部に吸収を持たないために目的成分の検出が容易である、などの本実験に関わる重要な特徴を備えている Good buffer を用いた。

不純物を含まない ACP パウダーを作成した後、Good buffer の中でも細胞毒性が低く、温度による pH の変化を比較的受けにくい 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 緩衝液を用いて ACP および他のリン酸カルシウム結晶の溶出 Calcium (Ca) 量を測定した。また、HEPES 緩衝液に対するコントロールは distilled and deionized water (DW) とした。さらに、5℃、20℃、37℃の緩衝液に ACP を浸漬し、15 分後から 24 時間後までの溶出 Ca 量を測定した。析出した固相について X 線回折による解析と透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。

その結果、HEPES 緩衝液では 15 分後にすでに HAp の析出が確認された。また、すべての実験群の X 線回折において 15 分後で OCP のピークの出現は確認できなかった。したがって、HEPES 緩衝液によって Passway 1, 2, 3 のイオン交換が迅速に行われたことにより ACP の急速な相転換が生じた可能性がある。しかし、これまで OCP を介して HAp に相転換したとの報告もあるので、この 15 分間に OCP が出現する可能性は否定できない。今後、さらに短時間の結晶相の変化について詳細に調べる必要がある。

上述した ACP の急速な相転換は、溶液温度に依存するのではないかと推測した。本実験結果より、溶液温度 5℃では経時的に ACP からの溶出 Ca 量は増加したが、37℃では逆に、経時的に溶出 Ca 量は減少した。37℃で溶出 Ca 量が減少したのは、溶出した Ca が非晶質ではなく結晶質として析出した可能性が考えられた。結晶質の出現を確認するため XRD で経時的に試料の分析を行った結果、37℃では時間経過とともに HAp の回折角に一致するピークの出現が認められた。これにより溶出した Ca イオンとリン酸イオンから、または ACP から HAp が、析出したことが確認された。

本実験では不純物を含まない ACP を用いたが、この ACP は結晶と比較して溶解性が高いという報告がある。本実験においても ACP は他の結晶質よりも溶解性が有意に高いことが確認された。加えて、緩衝液は DW と比較してイオン強度が大きく、圧倒的にアニオンおよびカチオンが多いため、Ca イオンおよびリン酸イオンが溶出しやすいと考えられる。このことから HEPES 緩衝液中に ACP を浸漬すると多量のイオンが溶出し、この溶出した Ca イオンとリン酸イオンから直接 HAp が析出すると考えられ、同時に ACP からも相転換により HAp が析出すると考えられる。

XRD のピークの分析結果から 5℃、37℃どちらの温度であっても HEPES に浸漬した試料は 15 分後の時点で HAp に相転換していたが、DW に浸漬した試料は 15 分後の時点で HAp に相転換していなかった。これらの結果から、溶液温度よりも HEPES の緩衝能のほうが相転換に影響を与えたと考えられる。

本実験群において 37℃の HEPES 緩衝液に 24 時間インキュベーションした試料の析出物は、最も大きな HAp の結晶に成長した。結晶の成長因子には熱と HEPES の緩衝能の 2 つが考えられる。熱によって結晶成長が促進されるのは当然のこととして、HEPES の緩衝能も影響したと考えられる。HAp は OCP, DCPD, TCP と比較して pH7 の中性環境で安定した phase として存在することができ、本実験で HEPES の pH を 7.4 に維持したことが HAp 結晶の成長を促進した理由と思われる。

本研究によって HEPES 緩衝液に浸漬した ACP は、容易に Ca イオンおよびリン酸イオンを放出し、HAp への相転換が速やかに進行することが明らかとなった。さらに、熱力学的な作用に加えて緩衝液の作用により HAp の結晶成長が促進されたと考えられた。

審査の結果の要旨

Amorphous calcium phosphate (ACP) は、骨や歯などの生体硬組織に存在するとともに、骨伝導性、生分解性、生物活性を持つため、組織再生を誘導する生体活性材料として広く用いられている。ACP を臨床応用する場合には、タンパク質やイオンを複合材料として加工し ACP から持続的かつ多量にイオンを遊離させる方法がとられている。ACP の溶解性は他のリン酸カルシウム結晶に比べて高いことが明らかとなっており、溶出した Calcium (Ca) イオンとリン酸イオンは硬組織に対して効果的なイオンの供給源になり得ると考えられる。不純物を含まない ACP でかつ安定な粉体として歯質に使用することができれば、生体活性材料としての利便性も拡がると考えられる。

そこで、本研究では不純物を含まない ACP パウダーを生化学的緩衝溶液中に浸漬し、その溶解性と沈殿物の相転換について分析を行った。HEPES 緩衝液を用いて ACP および他のリン酸カルシウム結晶の溶出 Ca 量を測定した。HEPES 緩衝液に対するコントロールは DW とした。さらに、5℃、20℃、37℃の緩衝液に ACP を浸漬し、15 分後から 24 時間後まで

の溶出 Ca 量を測定した。析出した固相については、X 線回折による解析と透過型電子顕微鏡による形態観察を行った。

その結果、HEPES 緩衝液では 15 分後にすでに Hydroxyapatite (HAp) の析出が確認された。また、溶液温度 5℃では経時的に ACP からの溶出 Ca 量は増加したが、37℃では逆に減少した。X 線回折で経時的に試料の分析を行った結果、37℃では時間経過とともに HAp の回折角に一致するピークの出現が認められた。すなわち、HEPES 緩衝液中に ACP を浸漬すると多量のイオンが溶出し、この溶出した Ca イオンとリン酸イオンまたは ACP から HAp が析出すると考えられる。本実験群において 37℃の HEPES 緩衝液に 24 時間インキュベーションした試料の析出物は、最も大きな HAp の結晶に成長した。熱によって結晶成長が促進されたことに加え、HEPES の緩衝能も影響したと考えられる。

以上のことから、HEPES 緩衝液に浸漬した ACP は、容易に Ca イオンおよびリン酸イオンを放出し、HAp への相転換が速やかに進行することが明らかとなった。さらに、熱力学的な作用に加えて緩衝液の作用により HAp の結晶成長が促進されたと考えられた。これらの結果は、HEPES 緩衝液と ACP の併用が、HAp 析出に有効である可能性を示唆している。

本研究は、ACP の生体活性材料としての新たな臨床応用法につながる成果と考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。