

炭酸ガスレーザーによる医療用材料表面への 機能性アパタイトの溶着加工

奈良県立医科大学 医学部 整形外科学教室

博士研究員 古川 彰

(平成 28 年度 一般研究開発助成 AF-2016209)

キーワード：炭酸ガスレーザー，医療用材料，アパタイト

1. 研究の目的と背景

社会の高齢化が急速に進む中、身体的にも精神的にも健康を保ち、生きがいのある生活を出来るだけ長きにわたり維持することが望まれるが、そのためには身体の生理機能のみならず運動機能の維持も欠かすことが出来ない。整形外科領域では主に運動機能に係る疾患を取り扱うが、その中で骨や関節に関わる障害は患者の QOL (Quality of life) に直接的にダメージを与えることから、障害を取り除き機能回復に効果的であつ患者にとって負担の少ない医療を提供することが求められる。一方で、骨代謝が活発でなく骨再生能力に劣る高齢者や骨粗しょう症患者等に対応できる治療法は今のところ限られていることから、今後こうしたケースにも対応できる整形外科的治療法の開発が極めて重要となる。これまで人工関節や人工骨などの様々な整形外科用インプラントが用いられてきた。インプラントの開発において、初期には単に生体硬組織の置換材料としての利用であったが、その後生体吸収性材料としてリン酸カルシウム系材料やポリ乳酸系生分解性ポリマーなどの利用による第二世代の生体吸収性インプラントが開発されてきた。さらに今後実用化が期待される第三世代インプラント¹⁾として、それ自体が治癒を促進する作用を有する生体活性インプラントの実現が望まれている。

骨折や骨腫瘍に対して、骨欠損の大きい場合には骨移植を必要とする。骨移植には基本的には患者自身の自家骨が使用されるが、患者自身の負担が大きく採取可能な骨の量にも限度があるため、それに代わる人工骨の適用が望ましい。しかしながら、人工骨では自家骨に比べ骨の再生能力が劣ることが重大な欠点である。従って、こうした人工骨の問題を解消するために、人工骨に対して積極的に骨形成を誘導する「骨誘導性」を付与し、骨の再生を促進させるような第三世代人工骨の開発が強く望まれている。

また、関節部の疾患や外傷も頻繁に発生するが、その中で靭帯損傷は例えばスポーツ選手にとって人生を左右する大問題である。しかしながら人工靭帯は骨との接合性に問題があり、長期の使用に耐えられない事例もあることから、その適用は限定的である。このことから、人工靭帯に於いて、骨との接合性を現状より飛躍的に高めることが求

められている。従って、骨との界面における接合性を改良するために、新たに「骨誘導性」を付与した第三世代人工靭帯の開発が強く望まれている。

我々はこれまで各種インプラントの表面をストロンチウムアパタイトナノ粒子で修飾することで、インプラント表面における骨との接合を促進させる検討を進めてきた。ストロンチウムイオンは骨芽細胞を活性化させると同時に破骨細胞の働きを抑制する作用があることが知られている²⁾。今回、ストロンチウムに加えてさらに亜鉛やケイ酸イオンをドープしたアパタイトを合成した。またインプラントとして人工骨と人工靭帯を取り上げ、これらの表面にレーザー接合 (laser bonding)³⁾ によるアパタイトの固定化を検討し、さらにその表面においてラットからの培養骨髄間葉系幹細胞の培養を行い、骨芽細胞への分化による骨形成過程において、アパタイトコーティングから溶出する各種イオンの骨形成促進作用に係る影響について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 レーザー加熱試験

試験用人工骨として β 型リン酸三カルシウム人工骨 (HOYA Technosurgical、スーパーポア 5 mm ϕ ×2 mm) を用いた。人工靭帯はポリエステル製人工靭帯を利用した。これらに対して後述のように作製したストロンチウムアパタイト分散液をコーティングし、70 °C に設定した乾燥機内で乾燥後、炭酸ガスレーザー (キーエンス社 3-Axis Laser Marker ML-Z9510) により表面を照射した。レーザー照射条件として、出力 30W、working distance 300 mm、スポット径 217 μ m、スキャンピッチ 140 μ m とし、Duty 100% の条件で様々なスキャン速度を変化させ、照射中の試料の表面温度を実測した。表面温度の測定は高速デジタルパイロメーター (LumaSense Technologies Inc. IGA6/23) を使用し、デジタルオシロスコープ (Siglent Technologies, SDS1000CML) を介して PC にデータを取り込み解析した (図 1)。尚、working distance は焦点距離の約 1.5 倍にとり defocusing することでスポット部のエネルギー密度を下げアブレーションを回避した。

2.2 アパタイトの合成と分散

ストロンチウムアパタイト(SrHAP) ($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)の合成はリン酸水素ストロンチウム(SrHPO_4)を水酸化ナトリウム水溶液中で加熱して合成した⁴⁾。ケイ酸ストロンチウムアパタイト(SrSiP)⁵⁾ ($\text{Sr}_{10}(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_2$)の合成はリン酸水素ストロンチウムをメタケイ酸ナトリウム水溶液中で加熱して合成した。亜鉛置換ケイ酸ストロンチウムアパタイト(SrZnSiP) ($\text{Sr}_{10-y}(\text{Zn})_y(\text{PO}_4)_6-x(\text{SiO}_4)_x(\text{OH})_2$)の合成はSrSiPに対して塩化亜鉛を添加し、過剰のアンモニア水を加えて加熱することで合成した⁶⁾。

ストロンチウムアパタイト分散液の作製は、各々の粉体5グラムに対してクエン酸を0.25グラム添加し、100ml容量ポリプロピレン製容器内でエタノール25グラムおよびジルコニアボール(ニッカトー YZT-0.3)100グラムを加えて2日間(9時間×2日)振とう器を用いて200cpmの速度で往復運動することでアパタイト粉末を微細化し、得られた分散液をデカンテーションで分離し、これをコーティング溶液として使用した。

2.3 測定機器

解析は走査型電子顕微鏡(SEM)(日立 SU3500)および付属したエネルギー分散型X線分光器(EDS)(Ametek Inc. Octane Plus)を使用し、溶出イオン濃度測定はICP発光分析(ICP-AES)(島津 ICPS-8000CL)により定量した。

2.4 細胞培養とラットへの移植試験

細胞培養はF344ラット大腿骨から採取し培養後に得た骨髄間葉系幹細胞を 1×10^6 個/mlの浮遊液とした。これに人工骨を浸漬し、陰圧下で細胞搭載した。12ウェルプレート内で、14日間37°Cで培養した。培地はMEM培地にFBS(ウシ胎児血清)およびデキサメタゾン、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸を加えた骨形成培地を使用し、2日毎に培地交換した。骨形成マーカーとして培地中に分泌されたオステオカルシン濃度をELISA法により測定した。

移植試験は、上記の14日間目の2次培養終了後に7週齢のオスF344ラットの背部に人工骨を皮下移植し、その後4週間後に摘出しオステオカルシンの定量とアルカリフォスファターゼ(ALP)活性および摘出した人工骨の切片を切り出し、脱灰処理後常法に従いH-E染色することで新生骨の形成の様子を光学顕微鏡下で観察した。

3. 結果と考察

3.1 人工骨への各種ストロンチウムアパタイトのレーザー接合と解析

人工骨をSrSiP分散液中に浸漬して表面及び内部に万遍無く液を付着させた後、液中から人工骨を引き上げて余分な液を拭き取り70°Cに設定した乾燥機内で15分間乾燥した。コーティング後乾燥させた人工骨を炭酸ガスレーザー照射出口から300mmの距離に置き走査速度600mm/secで照射を行った場合の表面温度の時間変化を図2に示した。

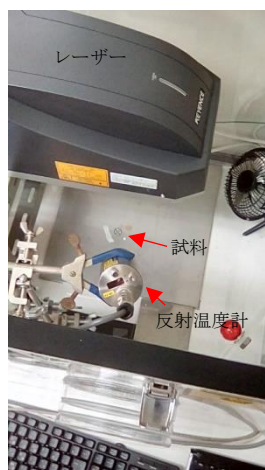


図1 (上図)炭酸ガスレーザーと測定系。装置全体をアクリル製ボックス内に設置し、ターゲットをレーザー直下に設置しレーザー照射した。

(左図) 試料の斜め上から高速反射温度計により表面温度の変化をモニターした。

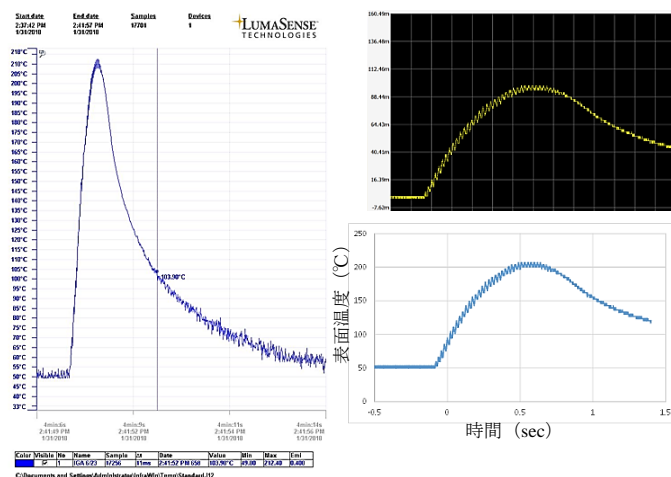


図2 人工骨に対してレーザー照射した際の表面温度の変化。(左図) 高速反射温度計の記録グラフ。(右上図) オシロスコープで捉えた波形。(右下図) PCで解析した結果。(測定条件は本文中に記載)。この場合の照射エネルギーは 27.7 J/cm^2 であり、最高到達温度は 210°C であった。

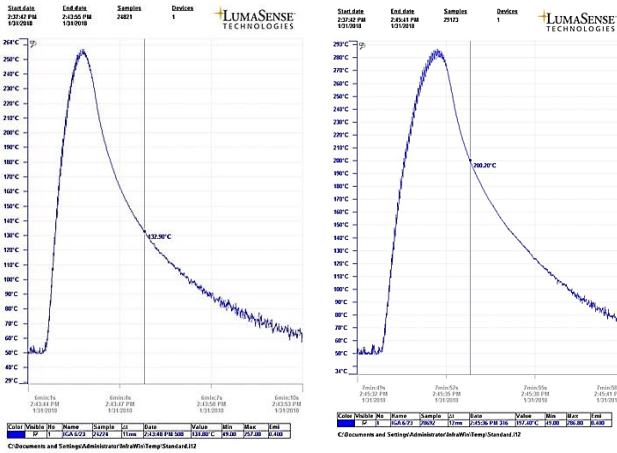


図3 走査速度を変化させた場合のレーザー照射時の人工骨表面温度の様子。(左図) 操作速度 300 mm/sec、最高到達温度 260 °C、(右図) 走査速度 200 mm/sec、最高到達温度 290 °C。

図3には走査速度を変化させた場合のレーザー照射時の人工骨表面温度の様子を示した。このように走査速度を様々に変化させることでアパタイトコーティング層表面の最高到達温度を制御することが可能であった。アパタイトコーティング層は、レーザーによる加熱処理を行わない状態では、水洗することで人工骨表面から脱離したが、レーザー照射により表面温度を様々に変化させた場合に、表面温度が 300 °C 付近まで達した場合においてコーティング層は人工骨表面に強固に接合され、水洗処理を行っても脱落しないことが確認された。通常アパタイトの焼結には 1000 °C 以上の温度が必要とされるが、この場合ストロンチウムアパタイトのリン酸基と人工骨表面のリン酸基の間で、脱水縮合によるピロリン酸の生成が接合に寄与しているものと推測される。

図4には水洗処理後の人工骨表面を SEM 観察し、表面のコーティング層の様子と表面元素分析を EDS 測定により行った結果を示した。コーティング層による元の人工骨の細孔構造への影響は認められず、人工骨の組成によるカルシウムイオンに加えて、SrSiP 由来のストロンチウム (Sr) およびケイ素 (Si) の存在が明確に認められた。

図5には SrSiP をコーティングし、レーザー加熱、水洗処理後の表面の SEM/EDS 測定による元素マッピング結果を示した。各元素の表面における分布の様子から、人工骨表面には SrSiP がほぼ均一に分布していることが明らかとなった。さらに、人工骨内部にコーティングされているアパタイト層にはレーザー光が届かないことから表面からの熱伝導による間接的な加熱しか行われないため、十分なコーティング層の接合が生じないことが懸念されたが、レーザー光照射を表裏ともに行うことで内部にも十分な熱量が伝わるように工夫した。実際に図5で用いた人工骨を表面中央部で半分破断し、破断面を同様に観察した結果を図6に示した。図6に見られるように、人工骨断面にお

いても SrSiP はほぼ均一に分布していることから、こうした炭酸ガスレーザー照射によるアパタイトの加熱接合により、人工骨表面及び内部に機能性アパタイトが強固に接合できることが明らかとなった。本研究で用いた他のアパタイトとして SrHAP および SrZnSiP についても同様に解析を行い、良好に人工骨表面及び内部に接合することが出来た。

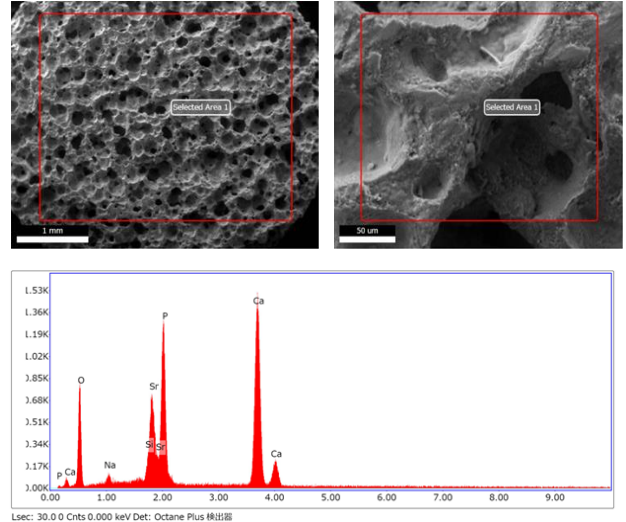


図4 SrSiP をコーティングし、レーザー照射水洗処理後の人工骨の表面分析結果。(右上) SEM 測定倍率 40 倍、(左上) 倍率 400 倍。(下図) EDS 測定による表面元素プロフィール。(レーザー照射条件は図3右図の条件)。

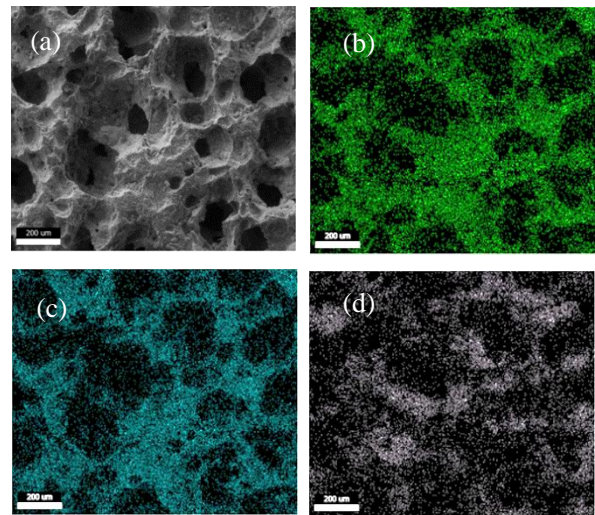


図5 SrSiP をコーティングし、レーザー照射水洗処理後の人工骨表面の SEM/EDS 測定。上部4枚の写真は夫々 (a) SEM 像、(b)リン原子の分布を示すマッピング、(c)カルシウム原子のマッピング、(d)ストロンチウム原子のマッピングを示す。

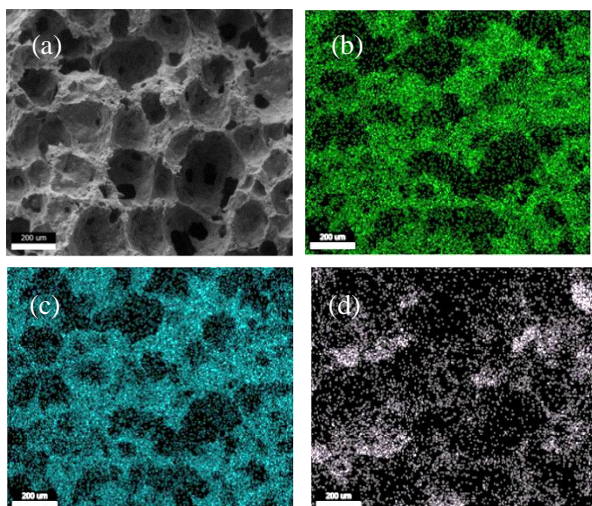


図6 SrSiP をコーティングし、レーザー加熱水洗処理後の人工骨の破断面の SEM/EDS 測定。上部 4 枚の写真は夫々(a) SEM 像、(b)リン原子の分布を示すマッピング、(c)カルシウム原子のマッピング、(d)ストロンチウム原子のマッピングを示す。

3.2 人工靭帯への各種ストロンチウムアパタイトのレーザー溶着と解析

人工靭帯に対しても同様に各種ストロンチウムアパタイトのコーティングを行い、レーザー照射してアパタイトを溶着する検討を行った。本研究で使用した人工靭帯は径が 20 μm のポリエステル繊維を編んで構成されていることから、耐熱性が無く高温で熔融、熱分解する。走査速度を様々に変化させて表面温度をモニターしながら、繊維が加熱により断裂しない最高温度を決定する検討を実施した。その結果、繊維の表面温度が反射温度計の測定値において凡そ 170 $^{\circ}\text{C}$ 以上で繊維が熔融し断裂することが判明した。

本研究で使用した反射温度計で観察するスポット径 (~3 mm) に対して、レーザー光のスポット径 (~217 μm) は 1/10 以下であり、ポリエステル繊維の熱伝導率が低いことから、中心付近の温度とその周辺でコントラストの高い熱分布が発生していると考えられる。従って、レーザー光照射部における中心温度は反射温度計で測定される見かけの温度より高いため、実際のレーザー光スポット中央部で生じる破断に達する最高温度はこれより高いことが考えられる。

図7には人工靭帯に対して SrSiP をコーティングし、先の人工骨の場合と同様にして乾燥機で乾燥後、炭酸ガスレーザーを用いて表面温度の測定値が約 160 $^{\circ}\text{C}$ になる条件で加熱を行った試料の表面の様子を SEM で観察した写真を示した。

3.3 アパタイトコーティング層から溶出するイオン濃度測定

各種アパタイトをコーティングした人工骨を 24 ウェ

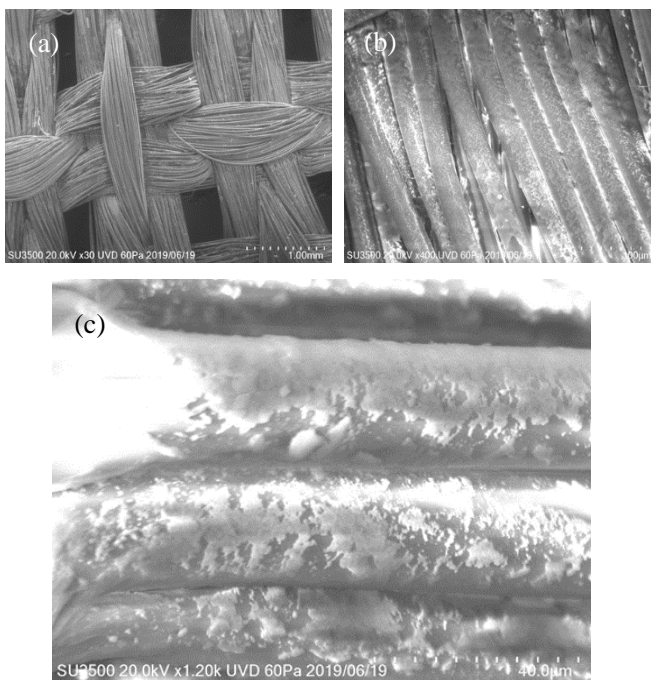


図7 SrSiP をレーザー加熱溶着した人工靭帯表面の SEM 観察写真。(a) 30 倍、(b) 400 倍、(c) 1200 倍。

ルプレート内の各々のウェルに設置し、蒸留水 1 ml を加えてこの中に溶出するイオン濃度を ICP 発光分析により測定した。蒸留水は 2 日毎に交換し、その都度交換前のサンプルに含まれるイオン濃度を測定した。溶出するイオン濃度は、アパタイトの付着量に依存することが予想されたことから、人工骨表面にコーティングを行う際に、アパタイト分散液濃度を 1 % および 10 % の 2 水準でコーティングした試料を作製して比較を行った。

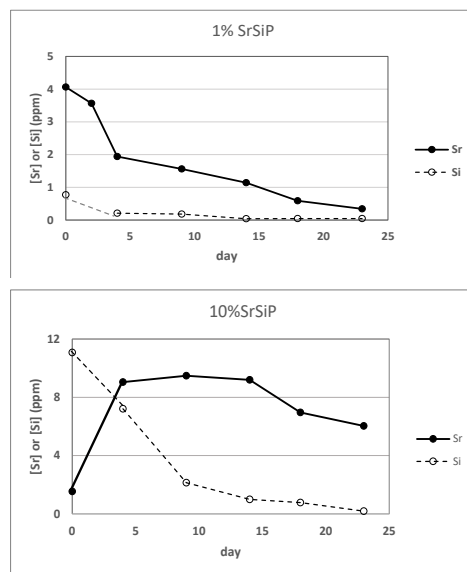


図8 SrSiP をコーティングした人工骨から溶出するストロンチウムイオン濃度とケイ酸イオン濃度の経日変化。コーティング液濃度：1 % (上図)、10 % (下図)。

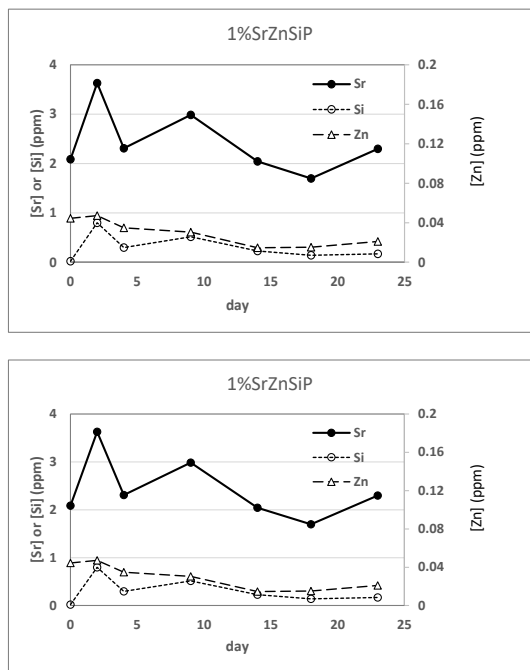


図9 SrZnSiPをコーティングした人工骨から溶出するストロンチウムイオン濃度とケイ酸イオン濃度の経日変化。コーティング液濃度：1%（上図）、10%（下図）。

図8にはSrSiPをコーティングした人工骨から溶出するイオン濃度を測定した結果を示したが、溶出するストロンチウム（Sr）イオンおよびケイ酸（Si）イオン濃度は、予想したようにコーティング時の液濃度に大きく依存し、アパタイトのコーティング付着量が増えるとともに溶出するイオン濃度も増加する傾向が見られた。さらに、1%濃度のSrSiPをコーティングした人工骨からのSrおよびSiイオン濃度は比較的早く減少する傾向を示したのに対し、10%濃度の液をコーティングした場合、Siイオン濃度の減少は初期から2週間程度で大きく低下したものの、Srイオン濃度は3週間の間6~8 ppm前後の比較的高い濃度を維持しており、安定的にSrイオンの徐放を続ける結果であった。

図9には同様にSrZnSiPをコーティングした人工骨から溶出するイオン濃度を測定した結果を示したが、1%と10%濃度のSrZnSiPをコーティングした人工骨からの各種溶出イオン濃度はSiの場合を除き比較的安定した濃度範囲で徐放される傾向を示した。

溶出イオン濃度はコーティングによるアパタイトの付着量を調整することで制御できることが明らかとなった。

3.4 アパタイトで表面コートした人工骨表面での細胞培養

人工骨表面に各種のアパタイトをコーティングすることで、これらのコーティング層から溶出するイオンの影響が、骨系細胞の培養においてどのような影響を及ぼすのか

を調査した。人工骨に対して各種アパタイトとしてSrHAP, SrSiP および SrZnSiP をそれぞれコーティングし、先に述べた方法で炭酸ガスレーザー照射により人工骨表面に固定化されたサンプルを使用して、F344 ラット骨髄から採取して得た培養骨髄間葉系幹細胞を表面において培養した。比較として、処理を行わない人工骨および炭酸ガスレーザー照射のみ行った人工骨を同時に比較実験した。実験群はn=5で実施した。

細胞培養を行い14日目に採取した培地中に含まれるオステオカルシンの濃度を比較した結果を図10に示した。骨形成に対するバイオマーカーであるオステオカルシン濃度は、SrZnSiPをコーティングした系についてやや高い印象を受けるが統計的にはコントロールと比べて有意差は認められない結果であった。

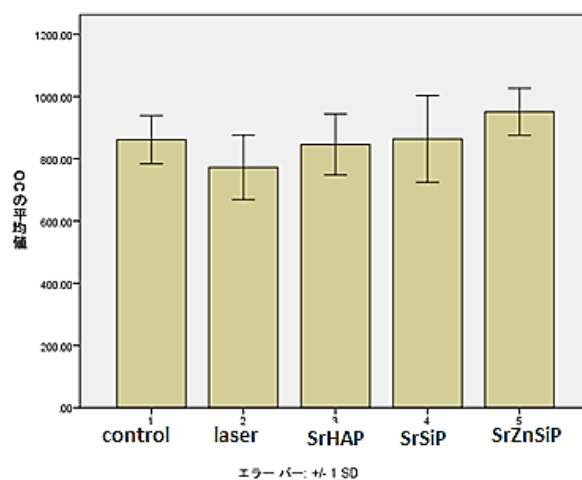


図10 人工骨表面における細胞培養で14日目に採取した培地中に含まれるオステオカルシン濃度の比較。

3.5 ラットへの移植試験

上記の細胞培養を行った各々の人工骨を培養プレートからそのままラット背部皮下に移植を行い、4週後に摘出を行い、移植した人工骨中のオステオカルシンの定量及びALP活性を評価するとともに、人工骨内部に形成された新生骨の様子を切片のH-E染色により観察した。

図11には移植後4週目のALP活性の比較を行った結果を示した。SrZnSiPをコーティングした人工骨が他のサンプルと比べ比較的高い値を示した。

図12にはオステオカルシンについての比較を行った結果を示したが、この場合いずれのサンプルについても統計的には有意差は認められない結果であった。

図13および図14には、それぞれ比較人工骨およびSrSiPをコーティングした人工骨をラット皮下に移植し、4週後に摘出した試料の切片サンプルのH-E染色写真を示した。これらを比較したが新生骨の形成には有意差は認められない結果であった。

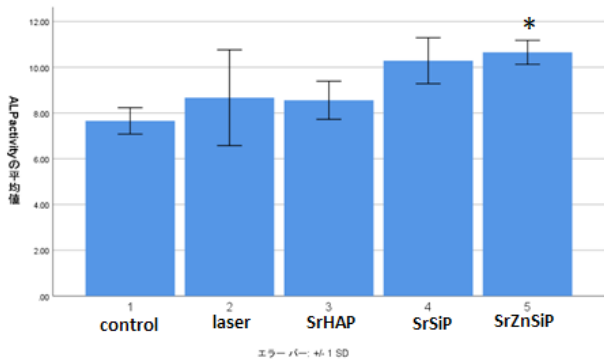


図 1 1 移植後 4 週目に摘出した人工骨の ALP 活性の比較。

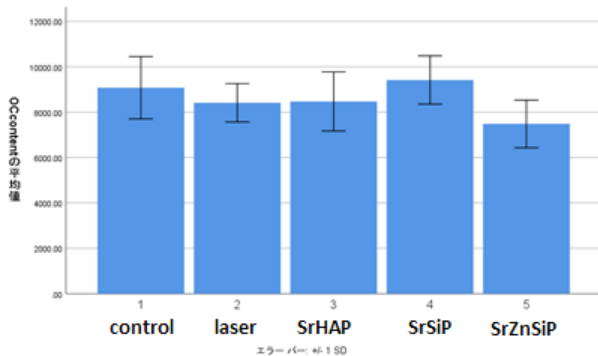


図 1 2 移植後 4 週目に摘出した人工骨中に含まれるオステオカルシン量の比較

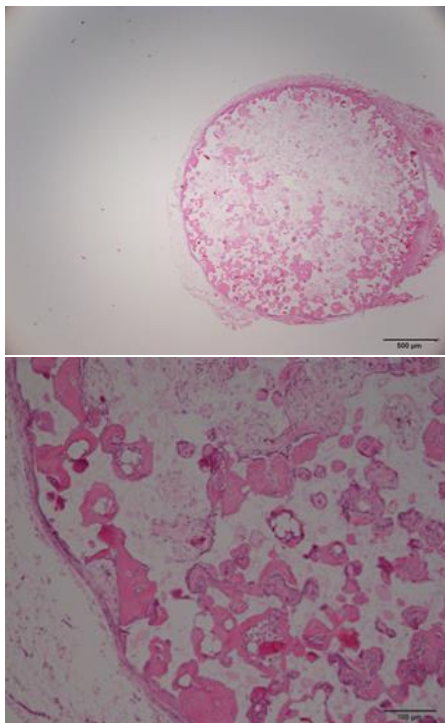


図 1 3 移植後摘出した人工骨 (コントロール群) 切片の脱灰処理後の H-E 染色写真。赤色に染色された部分が新生骨の形成を表す。上図は全体像、下図は拡大部を示す。

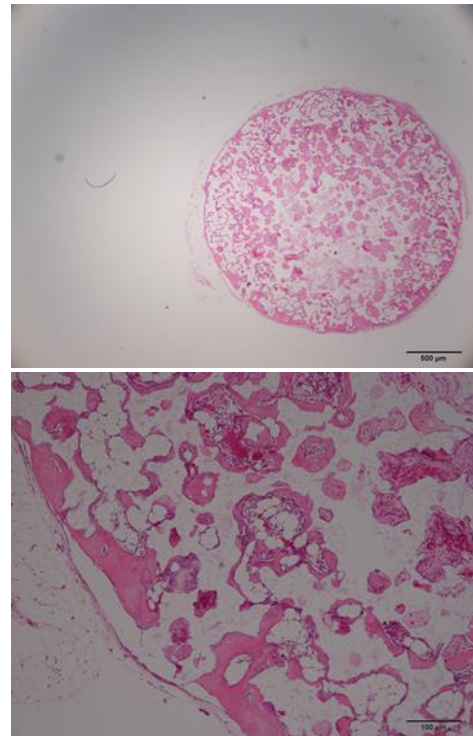


図 1 4 移植後摘出した人工骨 (SrSiP コーティング) 切片の脱灰処理後の H-E 染色写真。

結語

炭酸ガスレーザーを利用することで様々なストロンチウムアパタイトをバインダー等を持ちいることなく人工骨および人工靭帯表面に固着させることが可能であることが示された。炭酸ガスレーザーの発振波長である $10\mu\text{m}$ はアパタイトのリン酸基による赤外吸収波長と一致することから他の様々なアパタイトについても適用可能である。医療用インプラントとして今回検討した以外の様々な材料に対しての適用も今後期待される。インプラント表面に生体活性を付与する検討の一環として今回ストロンチウムアパタイトに着目したが、溶出するイオンの影響については今後さらに検討を進める必要がある。

謝辞

本研究は、公益財団法人天田財団の一般研究開発助成のご支援を受けて行われました。ここに感謝の意を表します。

参考文献

- 1) L.L.Hench, et.al., Science, (2002) 295, 1014-1017
- 2) W.Querido, et. Al., Micron, (2016) Jan; 80: 122-34
- 3) K. F. Tamrin, et.al., J. Mater. Manufac. Proc. (2013) 28 857-871.
- 4) 古川彰、特許 2013-057749
- 5) A. Furukawa, M. Akahane and Y. Tanaka, Key Eng. Mat. 782, 145-150 (2018)
- 6) 赤羽学、田中康仁、古川彰、特開 2018-76223