

学位論文

抗菌薬含有アパタイトセメント/ α -リン酸三カルシウム硬化体の
臨床応用に関する基礎的研究

学位申請者

佐々木 和起

広島大学大学院医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻

(主指導教員：菅井 基行 教授)

2015 年度

目次

I. 緒言	3
II. 実験材料および実験方法	5
III. 結果	9
IV. 考察	13
V. 結論	17
VI. 謝辞	18
VII. 参考文献	19
VIII. 表および図	23
IX. 付図説明	35

I. 緒言

口腔外科領域において顎骨骨髓炎は難治性疾患の一つである。顎骨骨髓炎の治療には主に外科的治療法が用いられるが、外科的治療の問題点として病巣切除後の顎骨周囲に十分な量の抗菌薬を移行させることが困難であることや、外科療法後の骨欠損における骨組織の再生がしばしば困難であることがあげられる¹⁾。

この問題点を改善するためには、局所への抗菌薬の徐放と骨欠損部への人工材料等の移植が有効であること、すなわち、抗菌薬を含有した骨補填材を顎骨切除部に用いることにより、抗菌薬の徐放と骨欠損部での新生骨の形成の両方が可能になると考えられる。一般的な骨欠損部の骨補填材として、現在臨床応用されているものにはリン酸カルシウムセメントがある。リン酸カルシウムセメントには、アパタイトセメント、 α -リン酸三カルシウム(以下 α -TCP と略記)、 β -リン酸三カルシウム(以下 β -TCP と略記)等があり、それぞれにおいて骨伝導性や溶解性で異なる特徴を認める。

アパタイトセメント(従来型アパタイトセメント)は、1986年に Brown と Chow により開発されたセメントで、優れた生体親和性と骨伝導性を示す。しかしながら、従来型アパタイトセメントの問題点として、硬化時間が長い(30~60分)ことがあげられる²⁾⁻¹²⁾。石川らのグループはアパタイトセメントの硬化機構を検討し、硬化時間をより短縮した迅速硬化型アパタイトセメントを開発し、現在臨床で広く利用されている¹³⁾⁻¹⁸⁾。アパタイトセメントは一部が骨に置換されると考えられるが、一般的に、骨への置換には長期間を要する^{7)8),10)-12)}。一方、 α -TCP は物性、生体親和性はアパタイトセメントに類似した特徴を示し、リン

酸カルシウムセメントの中で最も高い溶解性を示す¹⁹⁾。このことから α -TCP は骨欠損部において速やかに新生骨に置換されることが期待される。

以上より、優れた骨伝導能を有す迅速硬化型アパタイトセメントと溶解性が高く、骨置換に優れた α -TCP の複合体が骨欠損部の補填材として有効ではないかと考えられた。

そこで今回、顎骨欠損部での、新生骨の形成および長期間にわたる抗菌薬の徐放効果を期待して、抗菌薬を付与したアパタイトセメントと α -TCP の複合体を作製し、*in vitro* での基本物性や動物実験を用いた移植部位での骨形成能を検討することとした。

II. 実験材料および実験方法

1. セメント硬化体の作製

本研究で用いたアパタイトセメント(以下 AC と略記)は九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復講座生体材料学より供与いただいた。

AC と α -TCP(α -TCP B[®], 太平化学, Japan)を 10:3 または 10:6 に混合した複合体を作製することとした。さらにゲンタマイシン硫酸塩(以下 GM と略記)(Sigma)を AC 単独, AC/ α -TCP(10:3), AC/ α -TCP(10:6)に調整した粉末に重量比 10%および 20%で添加した試料を作製した。

続いて、セメント粉末と練和液 0.2M 中性リン酸水素ナトリウム (pH7.4) 水溶液を粉液比 3.5 で練和し、セメントペーストを高さ 2mm,直径 5mm となるようにプラスチックモールドに充填し、37°C, 相対湿度 100%の恒温器で 24 時間硬化させ、AC/ α -TCP 硬化体を作製した。

2. 走査型電子顕微鏡による形態学的観察

走査型電子顕微鏡(Scanning Electric Microscope : 以下 SEM と略記, VE-8800, Keyence, Japan)を用いて観察した。イオンスパッタ法²⁰⁾によって試料表面に金蒸着を施した後、加速電圧 15kV の条件で観察を行った。

3. 硬化時間測定試験

セメントを練和後プラスチックモールドに充填し、37°C, 相対湿度 100%の恒温器に置き、経時的に取り出し、300g の自重のある直径 2mm の平坦な先端を有する針を試料表面に下ろし、その圧痕がつかなくなった時を硬化時間とした。

4. 機械的強さの測定

セメント硬化体の機械的強さの指標として、間接引張強さを測定した。各試料は直径 5mm、高さ 2mm の円柱状に形状を作製した。測定には小型万能試験機(AUTOGRAPH AGS-J, Shimadzu, Japan)を用い、クロスヘッドスピード 1mm/min の条件で間接引張強さを測定した。

5. 組成分析

各種硬化体の組成を粉末 X 線回析装置(D8 Advance, Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germany)を用いて分析した。37°C、相対湿度 100%の条件下で 24 時間硬化させた試料を乳鉢で粉砕し、粉末 X 線回析装置により分析した。測定は、 $2\theta = 1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ (θ : 回析角度)、管電圧 40kV、管電流 100mA、ターゲット : Cu, フィルター ; Ni の条件下で行った。

6. 抗菌薬徐放試験

2000 $\mu\text{g/ml}$ から 0.48 $\mu\text{g/ml}$ まで蒸留水で 2 倍希釈した抗菌薬 GM を *Staphylococcus aureus* 209P(10^6 Colony Forming Unit(以下 CFU と略記))を塗布したトリソイ 寒天培地に滴下し、24 時間後に形成された阻止円の直径を計測し、各種抗菌薬の濃度と阻止円の直径を用いて検量線を作製した。

続いて抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体を PBS200 μl に 37°C、24 時間浸漬し、この内の 10 μl を *Staphylococcus aureus* 209P(10^6 CFU)を塗布したトリソイ 寒天培地に滴下し、24 時間培養後に形成された阻止円の直径を計測し、検量線を用いて抗菌薬の濃度を算出した。なお、PBS 溶液は毎日全量交換を行い、抗菌薬の徐放量を経日的に計測した。

7. 実験動物および埋入方法

実験動物は、10週齢、Wistar系雄性ラットを使用した。本研究における動物実験は、広島大学動物実験委員会により承認され、また、広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野ライフサイエンス教育支援部動物実験施設内規および利用細則に従い、同実験施設で行った。

(ラット皮下へのセメントペーストの埋入方法)

ペントバルビタール(ソムノペンチル[®]、共立製薬、Japan)0.5mg/kgをラット腹腔内に投与し、練和したセメントペーストを1cm³プラスチックシリンジを用いてラット皮下に埋入した。埋入1, 4週後にラットを屠殺し、試料を周囲組織と一塊にして摘出した。摘出後粉末X線回析装置による組成分析およびヘマトキシリン-エオジン染色(以下H-E染色と略記)を行った。

(ラット脛骨へのセメントペーストの埋入方法)

また、ペントバルビタール0.5mg/kgをラット腹腔内に投与し、エピネフリン含有2%リドカイン(キシロカイン[®]、藤沢薬品工業、Japan)を脛骨付近に浸潤させた後、メスにて切開し、骨膜を剥離した。脛骨近位端を明示した後、デンタルラウンドバーにて5×10×5mmの骨窩を形成した。止血後緊密にセメントペーストを窩洞内に充填した。埋入3, 6週後にラットを屠殺し、試料を含む脛骨を周囲組織と一塊にして摘出した。また、埋入後に形成された骨を標識するために、屠殺3日前よりカルセイン(和光、Japan)(10mg/kg body weight)を皮下に投与した。

8. ヘマトキシリン-エオジン染色

摘出した試料を周囲組織と共に10%中性緩衝ホルマリンで48時間浸漬固定し、メタノールで脱脂した。急速脱灰溶液(K-CX[®]、ファルマ、Japan)にて脱灰後、

通法通り上昇エタノール系列にて脱水，パラフィン包埋した．次いでマイクロトームを用いて，厚さ 4 μ m に薄切した．薄切切片は，H-E 染色を施し，光学顕微鏡(Microscope BZ9000, Keyence, Japan)で観察した．

9. トルイジンブルー染色

試料を含むラット脛骨を一塊として摘出し，10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間浸漬固定後上昇エタノール系列にて脱水し，リゴラック樹脂(応研, Japan)にて包埋した．マイクロトームを用いて切片を作製し，トルイジンブルー染色を行い，組織学的に観察した．また共晶点レーザー顕微鏡(LMS5Pascal, Carl Zeiss Germany)による観察を行った．

III. 結果

1. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体の走査型電子顕微鏡による形態学的観察

作製した抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体の写真を示す(図 1A).

各種セメント硬化体表面の SEM 像を図 1B に示す. 抗菌薬を含有していない AC/ α -TCP 硬化体は密な結晶構造を示した. 一方抗菌薬を含有した硬化体では抗菌薬と考えられる粒子が硬化体表面に析出している像が確認された.

2. 硬化時間測定試験

各種硬化体の硬化時間の測定結果を表 1 に示す. 抗菌薬を含有していない試料では, AC は約 6 分, AC/ α -TCP(10:3)は約 11 分, AC/ α -TCP(10:6)は約 15 分で α -TCP の添加量が増加するにつれ硬化時間は延長した. また, GM を添加した試料においても同様の傾向を認め, さらに GM の添加量が増加するにつれて各種試料の硬化時間は延長した. AC/ α -TCP における α -TCP の添加量と GM の添加量が増加することにより, 硬化時間は延長したが, 最も長い硬化時間を示した 20%GM 含有 AC/ α -TCP(10:6)の硬化時間は約 20 分であった.

3. 機械的強度の測定

各種セメント硬化体の間接引張強さの結果を図 2 に示す. AC に α -TCP を加えることにより, 間接引張強さの減少が認められた. また, AC に GM を添加した場合, 間接引張強さは減少傾向を示した. また, AC/ α -TCP においても, GM 添加により間接引張強さは減少したが, AC/ α -TCP(10:3)と 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3)においては大きな間接引張強さの変化は認めなかった.

4. 組成分析

各種試料の粉末 X 線回析結果を図 3 に示す。一般に、アパタイトセメントはアパタイトに変換すると粉末 X 線回析にて 25.9° と 31.8° にてピークを示す。AC 単独, GM 含有 AC, GM 含有 AC/ α -TCP 硬化体では粉末 X 線回析にて 25.9° と 31.8° においてピークを認め、各種硬化体はヒドロキシアパタイトの組成を示した。

5. 抗菌薬徐放試験

10%GM 含有 AC/ α -TCP 硬化体を用いて、抗菌薬徐放試験を行った。10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3), 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:6)硬化体により形成された阻止円を図 4 に示す。阻止円の直径を測定後、作製した検量線(図 5)を用いて徐放された抗菌薬の濃度を算出した。

抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体は、0 日において、 $10^4 \mu\text{g/ml}$ の抗菌薬の徐放を認め、その後は徐々に減少し、50 日目には約 $10 \mu\text{g/ml}$ まで減少を認めた。しかしながら 50 日以降は抗菌薬の徐放濃度は $1 \mu\text{g/ml}$ 以上で推移した。さらに、150 日まで観察を続けたところ、*Staphylococcus aureus* の最小発育濃度 minimal inhibitory concentration(以下 MIC と略記)である $0.48 \mu\text{g/ml}$ 以上の抗菌薬の徐放が得られることを確認した(図 6)。

6. ラット皮下への AC/ α -TCP セメントペーストの埋入後の組織学的検討

ラット皮下に AC/ α -TCP(10:3), 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3)セメントペーストを埋入し、埋入後 1 週後と埋入後 4 週後の組織学的変化について検討を行った。埋入後 1 週後の AC/ α -TCP 硬化体と 10%GM 含有 AC/ α -TCP 硬化体の H-E 染色像を示す(図 7A 写真左, 写真右)。硬化体周囲組織において、異物巨細

胞や炎症性細胞浸潤は認められなかった。

さらに、埋入後 4 週後の 10%GM 含有 AC/ α -TCP 硬化体周囲組織には異物巨細胞や炎症性細胞浸潤は確認されず、明らかな炎症反応を認めなかった(図 7B)。

7. ラット皮下に埋入した AC/ α -TCP の粉末 X 線回析

図 8 は埋入後 1 週後の AC, 20%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3), 20%GM 含有 AC/ α -TCP(10:6)の粉末 X 線回析パターンを示す. AC および GM 含有 AC/ α -TCP とともに, 25.9° と 31.8° において hidroキシアパタイトの組成を示すピークを認めた. このことから AC および抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体はともに組織内においてアパタイトセメントが hidroキシアパタイトに変換されたことが示唆された.

8. ラット脛骨への AC/ α -TCP セメントペースト埋入後の組織学的検討

図 9 はラット骨欠損に AC, AC/ α -TCP(10:3), 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3)を充填し, 3 週後にトルイジンブルー染色を行った結果を示す. AC 単独の硬化体周囲にはほとんど新生骨は認められなかった(図 9 写真左). 一方, AC/ α -TCP および抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体は, とともにセメント硬化体上方で既存骨から伸長した新生骨の形成を確認した(図 9 写真中央, 写真右).

図 10A は AC, AC/ α -TCP(10:3), 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3)セメントを充填し, 6 週後にトルイジンブルー染色を行った結果を示す. AC 単独硬化体では一部にトルイジンブルー陽性部位を認めた(図 10A 写真左). AC/ α -TCP および 10%GM 含有 AC/ α -TCP 硬化体では, 3 週後と比較して, 埋入したセメントの上方により多くの新生骨の形成を認めた(図 10A 写真中央, 写真右). さらに 10%GM 含有 AC/ α -TCP 硬化体内における新生骨の形成を検討するため, カルセイ

ン染色を行ったところ、既存骨およびセメント内部において明らかなカルセイン陽性部位を認めた(図 10B)。このことからセメント周囲のみならず埋入したセメント内部においても新生骨の形成が確認された。

IV. 考察

リン酸カルシウムセメントは、優れた骨伝導性と生体親和性を有する骨補填材として、広く整形外科領域で臨床応用されている。

そのなかでも、AC (従来型 AC)は、1986 年に Brown と Chow より開発され、リン酸四カルシウム(TTCP: $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$)とリン酸水素カルシウム(DCPA: CaHPO_4)の等モル混合物からなる²³⁾。蒸留水等で練和すると硬化し hidroキシアパタイトに変換するが、硬化時間が長く(30~60 分)、硬化前のセメントペーストが血液等の体液と接触すると硬化せず崩壊するという欠点があり、臨床に用いる際には完全な止血が必要とされる^{5)・12)}。

石川らのグループは AC の硬化機構を検討し、AC の硬化反応の律速段階がセメント構成成分であるリン酸水素カルシウムの溶解に基づくリン酸イオンの供給であることを見出した¹³⁾。また、練和液として中性リン酸水素ナトリウムを用いることにより、AC における硬化反応の律速段階を解除し、硬化時間を約 5 分に短縮した迅速硬化型 AC を開発した。しかしながら、AC は、硬化後溶解性が低く吸収されにくいいため、骨欠損部に充填した後も生体内で長期間残留すると考えられている。武知らは、ラット脛骨へ AC を充填後 16 週後の組織像で、破骨細胞やマクロファージによるセメントの明らかな吸収像は認められなかったと報告しており、移植した AC の骨置換はほとんど得られなかった²¹⁾。

一方、 α -TCP はアパタイトセメントと比較し、溶解性が高く、骨欠損部に充填後は速やかに骨に置換される¹⁹⁾。羽尾らは、ラット大腿骨に α -TCP 系骨補填材を充填したところ、20 日目には、 α -TCP の一部が既に骨に置換されたと報告している²²⁾。このことは、 α -TCP の優れた骨置換能を示唆する。

以上より、AC の骨伝導性と α -TCP の骨置換能の両方を示す AC と α -TCP の

複合体がより優れた骨補填材になりうるのではないかと考え本研究を行った。

AC/ α -TCPセメントの硬化時間は α -TCPおよびGMの添加量が増加すると共に硬化時間は延長を示した。NAKAGAWA²³⁾らの報告でも、ACに α -TCPを添加することに硬化時間の延長が認められたことを報告している。 α -TCPの添加による硬化時間延長の詳細なメカニズムは、解明されていないが、 α -TCPの添加により、ハイドロキシアパタイト形成が阻害されるため、硬化時間が延長した可能性が考えられる。

間接引張強さは、AC単独硬化体と比較し、 α -TCPの添加量が増加するにつれ減少傾向を示した。しかしながら、ACと α -TCPを10:3から10:6の比率に増加しても、間接引張強さには大きな変化は認めなかった。さらに、10%GM含有AC/ α -TCP(10:3)は3MPa以上の強度を示し、実際にin vivoでの移植に用いてもほとんど問題無い強度であると考えられる。

粉末X線回析では、AC単独と同様にAC/ α -TCPでアパタイトへの変換が認められた。このことから、 α -TCP添加によりACのアパタイトへの変換には大きな影響はないと考えられる。

抗菌薬含有AC/ α -TCP硬化体の抗菌薬徐放試験の検討では、150日間と長期間にわたり、*Staphylococcus aureus*のMIC以上の徐放効果を示した。

抗菌薬GMはアミドグリコシド系の抗菌薬であり、広い抗菌スペクトルと熱耐性を有するため、整形外科領域では慢性骨髄炎の治療の際、骨補填材と共に用いられることがある。大森らは抗菌薬バンコマイシンとGMを封入したハイドロキシアパタイトをヒト脛骨慢性骨髄炎に埋入、感染が鎮静した症例を報告している²⁴⁾。

骨補填材からの抗菌薬の徐放能についてShintoらはHAでは気孔率と抗菌薬の溶解性が関与すると報告している²⁵⁾。また鈴木らは抗菌薬含有ペーストの徐

放効果について検討したところ、抗菌薬濃度 5%で、バンコマイシンの総溶出量は 58%、GM が 47.4%、フロモキシセフナトリウムが 2.1%と溶出する抗菌薬の濃度に違いが認められた²⁶⁾。

実際フロキシセフナトリウムを AC/ α -TCP 粉末に添加して行った抗菌薬徐放試験では、徐放期間は約 5 日間で GM と比較し短期間であった。このことより溶解性の高い抗菌薬は早期に溶出することで徐放効果を失うのではないかと考えられる。

抗菌薬含有 AC/ α -TCP セメントのラットへの皮下埋入試験では、AC/ α -TCP (10:3)、抗菌薬含有 AC/ α -TCP(10:3)セメントともに、埋入 1, 4 週後の H-E 染色像では、異物巨細胞や炎症性細胞の浸潤はほとんど認められなかった。また埋入 1 週後の粉末 X 線回析では、ハイドロキシアパタイトへの変換を示すピークを認めた。従来型 AC および迅速硬化型 AC のラット皮下への埋入試験では、迅速硬化型 AC では、異物巨細胞や炎症性細胞の浸潤は認められず、従来型 AC では、浮腫を認め、硬化体周囲に異物巨細胞や炎症性細胞の浸潤が認められた。迅速硬化型 AC は従来型 AC と比較し、1)迅速にアパタイトへ変換する 2)硬化時間が短いという特徴がある。このため、従来型 AC では皮下埋入試験において硬化に長時間を要するため、崩壊し、炎症反応を惹起したと考えられた。今回使用した抗菌薬 AC/ α -TCP セメントでは、従来型 AC と比較し、硬化時間が短く、粉末 X 線回析ではハイドロキシアパタイトへの変換が認められたことから、ラット皮下内で早期に硬化し、ハイドロキシアパタイトへ変換したため、炎症反応を惹起しなかったと考えられる。

抗菌薬含有 AC/ α -TCP セメントのラット脛骨への埋入試験では、埋入 3,6 週後で AC/ α -TCP(10:3)硬化体および抗菌薬含有 AC/ α -TCP(10:3)硬化体上方にトルイジンブルー陽性部位を認め、抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体上方に既存骨が

ら伸長した新生骨の形成が認められた。また、埋入 6 週目の抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体では硬化体周囲だけでなく、硬化体内部にも新生骨の形成を認めた。羽尾らは、ラット大腿骨に α -TCP 系骨補填材を充填したところ、術後 20 日目で α -TCP の一部が骨に置換されたと報告している。

このことより、AC に骨置換速度の速い α -TCP を混合することで AC 単独よりも早期に硬化体の骨置換を引き起こすと考えられる。また、今回は硬化時間が AC/ α -TCP(10:6)セメントより短く操作性に優れる AC/ α -TCP(10:3)セメントにて埋入試験を行ったが、AC/ α -TCP(10:6)セメントを埋入試験に用いた場合、より早く硬化体が骨置換すると考えられる。

本研究より、AC/ α -TCP 硬化体に添加された抗菌薬は、セメント硬化体の物性を低下させたが、各種硬化体でハイドロキシアパタイトの組成を認めたことから、臨床応用には影響しないと考えられた。また、AC/ α -TCP 硬化体は抗菌薬の徐放を示し、骨形成能を有することが示唆された。

今後の展望として、顎骨骨髄炎(図 11 写真最上段)の病変切除後に生じる広範な骨欠損や(図 11 写真上段 2 段目)、局所へ十分な抗菌薬を移行させることの難しさといった問題点を改善するため、病変切除後抗菌薬含有 AC/ α -TCP セメントを利用し(図 11 写真中央)、最終的に骨置換を生じることによって(図 11 写真下段 2 段目)今まで困難であったインプラントによる咬合機能の回復が可能となることが期待された(図 11 写真最下段)。

V. 結論

本研究は、顎骨骨髓炎術後の骨欠損部での、新生骨の形成および長期間にわたる抗菌薬の徐放を目的として、今回、抗菌薬を付与した AC と α -TCP の複合体を作製し、その基本物性や移植部位での骨形成能を行い、以下の結果を得た。

1. AC/ α -TCP 硬化体に添加された抗菌薬は、セメント硬化体の物性を低下させたが、臨床応用には影響しないと考えられた。
 2. AC/ α -TCP 硬化体は抗菌薬の徐放が可能な担体であることが明らかとなった。
 3. 骨欠損部に移植した抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体において骨形成を認めた。
- 以上より、AC/ α -TCP 硬化体は、抗菌薬徐放の担体として、顎骨骨髓炎治療後の骨欠損部へ臨床応用できる可能性が示唆された。

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり、この様な研究の機会を与えて頂き、丁寧なご指導を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究院応用生命科学部門口腔外科学 故鎌田伸之教授，基礎生命科学部門細菌学 菅井基行教授に深甚なる感謝の意を表します。また，本研究に対して終始ご指導，御高閲を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復講座生体材料学分野 石川邦夫教授，ならびに同教室 都留寛治准教授に心から感謝いたします。また，本研究のまとめに際し，御助言，御校閲を賜りました本学基礎生命科学部門生体材料学 加藤功一教授，本学応用生命科学部門先端歯科補綴学 津賀一弘教授，本学統合健康科学部門公衆口腔保健学 杉山 勝教授に深甚なる謝意を表します。また，本研究にあたり御助言，御支援頂きました本学基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学 高田 隆教授に感謝いたします。そして，本研究の立案から遂行について，終始御指導いただきました本学応用生命科学部門口腔外科学 武知正晃准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたって様々な御助言，多大な御援助さらに励ましの言葉をいただきました。また，共に学び，時には実験のご協力を頂きました広島大学口腔外科学の皆様，博士研究院の皆様，研究生活を支えてくださった家族，友人など全ての皆様に深く感謝いたします。

VII. 参考文献

- 1)吉位尚, 麻柄真也, 吉川朋宏, 古土井春吾, 中尾 薫, 古森 孝英. :慢性下顎骨骨髓炎における外科的療法施行例の検討-X線所見と患者背景, 治療成績について-.:歯科薬物療法.;19:14-21.(2000)
- 2)Brown WE, Chow LC.:Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US. Patent,No.4,612,053.(1986)
- 3)Brown WE, Chow LC : A new calcium phosphate , water-setting cement in Cements Research Progress (ed. P.W .B rown.): American Ceramic Society , Westerville (OH).;351-379.(1986)
- 4)Chow LC, Takagi S.:Self-setting calcium phosphate cements , in Specialty Cements With Advanced Properties, ed. B.E. Scheetz, A.G. Landers, I. Odler, and H. Jennings. 179. Materials Research Society, Pittsburgh, PA:3-24.(1989)
- 5)Chow LC: Development of self-setting calcium phosphate cements.:J Ceram Soc Jpn.;99:954-964.(1991)
- 6)Chohayeb AA, Chow LC, Tsaknins PJstantino.:Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material.:J Endodont.;13: 384-387.(1987)
- 7)Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA.: Hydroxyapatite cement. I: basic chemistry and histologic properties.:

- Arch Otolaryngol Head Neck Surg.;117:379-384.(1991)
- 8)Friedman CD, Costantino PD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA.:
Hydroxyapatite cement. II: obliteration and reconstruction of the cat
frontal sinus.:Arch Otolaryngol Head Neck Surg.;117:385-389.(1991)
- 9)Sugawara A, Nishiyama M, Kusama K, Moro I, Nishimura S, Kudo I,
Chow LC, Takagi S.:Histopathological reaction of calcium phosphate
cement.:Dent Mater J.;11:11-16.(1992)
- 10)Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA.:
Experimental Hydroxyapatite cement cranioplasty.:Plast Reconstr
Surg .:90:174-185.(1992)
- 11)Sindo ML, Costantino PD, Friedman CD, Chow LC.:Facial skeletal
augmentation using hydroxyapatite cement.:Arch Otolaryngol Head Neck
Surg.;119:185-190.(1993)
- 12)Fujikawa K, Sugawara A, Murai S, Nishiyama M, Takagi S,Chow LC.:
Histopathological reaction of calcium phosphate cement in periodontal
bone defect.:Dent Mater J.;14:45-57.(1995)
- 13)Ishikawa K, Kuwayama N, Takagi S, Chow LC.:The development of
fast-setting calcium phosphate cement. :Jap J Dent
Mater.;12:222-223 .(1993)
- 14)Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y, Eanes ED, Asaoka K.:
Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in
vitro.:Dental Materials.;10:26-32.(1994)
- 15)Ishikawa K and Asaoka K.:Estimation of ideal mechanical strength and
critical porosity of calcium phosphate cement.:J Biomed Mater Res.;29:

- 1537-1543.(1995)
- 16)Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y.: Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cement.:J Mater Sci Mater Med.;6:528-533.(1995)
- 17)Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao K, Sawada M, Nagayama M, Kon M, Asaoka K.:In vivo setting behavior of fast-setting calcium phosphahate cement.:Biomaterials.;16:855-860.(1995)
- 18)Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yoshida Y, Nagayama M, Kon M, Asaoka K.:Tissue response to fast-setting calcium phosphate cement in bone.:J Biomed Mater Res.;37:457-464.(1997)
- 19)吉成正雄.:インプラント材料とその表面 インプラント材としてのアパタイト.:歯学学報.;103(6):481-490.(2003)
- 20)Hirano S, Iijima K, Oguri K, Sakamoto T.:T-butyl alcohol freeze-drying system for microstructure observation of fragile samples. Frontier Res on earth evolution. Vol.2
- 21)武知正晃.:キトサンを用いた非崩壊型アパタイトセメントの作製とその生体親和性.:四国歯学会雑誌.;11(1):161-176.(1998)
- 22)羽尾博嗣.:自己硬化型 α -TCP 系骨補填材に対する骨組織の反応.:新潟歯学会.;33:115-116.(2003)
- 23)Nakagawa A, Matsuya Shigeki, Takeuchi A, Ishikawa K.: Comparison of the Effects of Added α - and β - Tricalcium Phosphate on the Basic Properties of Apatite Cements.:Dental Material Journal.;26(3):342-347.(2007)
- 24)大森貴夫, 高橋欣吾, 寺井祐司, 太田裕介, 臼井正明, 渡辺唯志.:抗生剤含有

有ハイドロキシアパタイトを使用した骨・関節感染症の治療経験.:中四整会誌.;13(1):31-34.(2001)

25)Shinto Y, Uchida A, Korkusuz F, Araki N, Ono K.:Calcium hydroxyapatite ceramic used as a deliverysystem for antibiotics.:J Bone Joint surg Br.;74(4):600-604.(1992)

26)鈴木昌彦, 付岡正, 常泉吉一, 金泰成, 山中一, 中村裕義, 北田光一, 梅田智広, 竹内啓泰, 守屋秀繁.:抗生剤含有リン酸カルシウム骨ペーストの強度と徐放効果.:臨床整形外科.;39(3):309-314.(2004)

VIII. 表および図

AC/ α -TCP(重量比)	硬化時間(min) GMの重量%		
	0%	10%	20%
AC	6.3 \pm 0.5	8.0 \pm 1.1	12.3 \pm 1.3
AC/ α -TCP(10:3)	11.0 \pm 0.8	13.0 \pm 0.6	16.5 \pm 2.1
AC/ α -TCP(10:6)	15.0 \pm 1.1	18.0 \pm 1.3	21.0 \pm 1.2

表 1. AC/ α -TCP の硬化時間

A



図 1A. 作製した抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体

B

AC/ α -TCP(10:3)

AC/ α -TCP(10:3),GM10%

AC/ α -TCP(10:3),GM20%

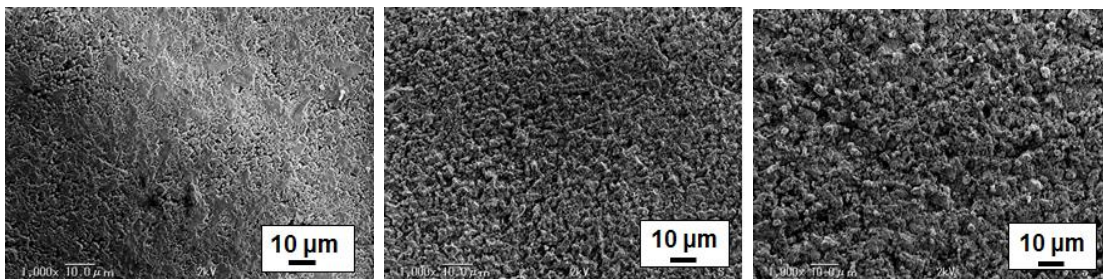


図 1B. AC/ α -TCP 硬化体表面の構造観察 (SEM 像)

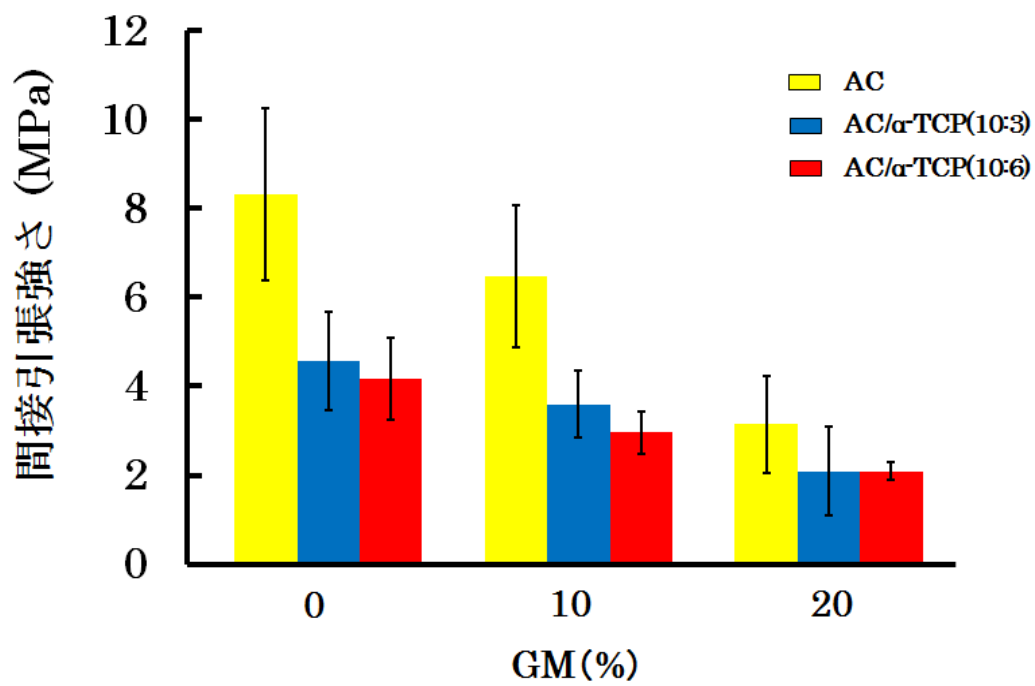


図 2. AC/α-TCP 硬化体の間接引張値強さ

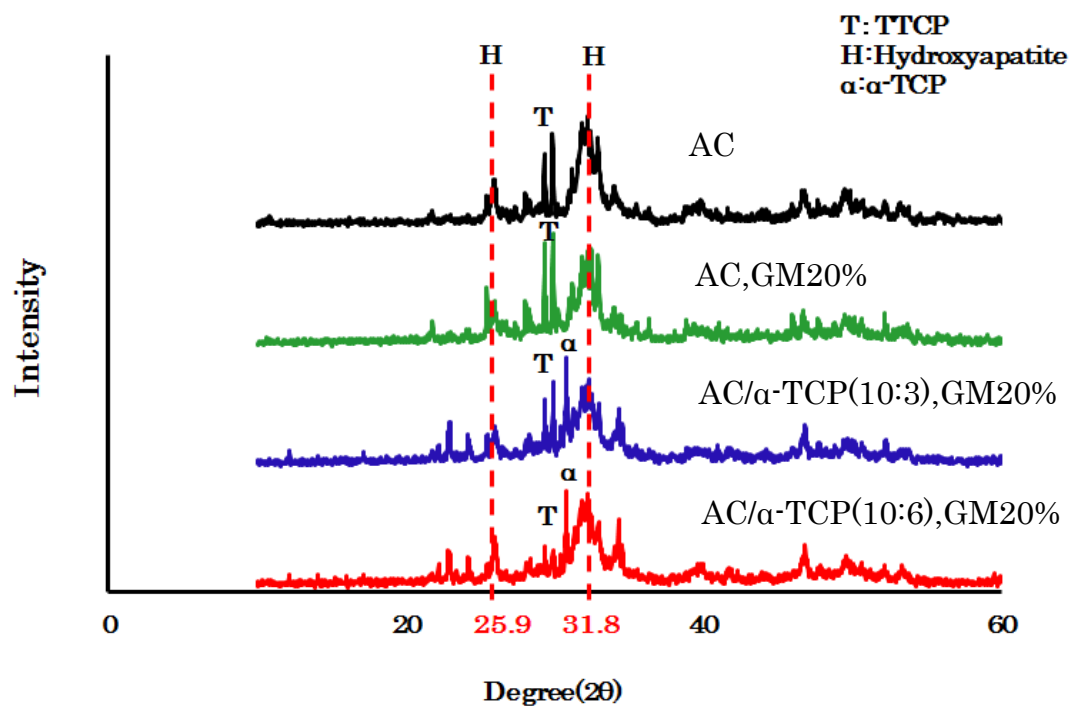


図 3. 抗菌薬含有 AC/α-TCP 硬化体における粉末 X 線回析パターン

Control

AC/ α -TCP(10:3),GM10%

AC/ α -TCP(10:6),GM10%

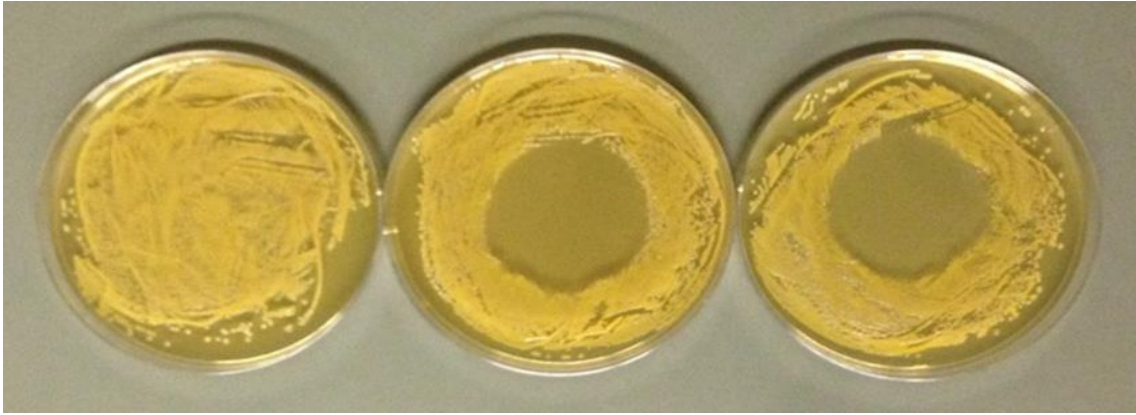


図 4. 硬化体より徐放された抗菌薬により形成された阻止円

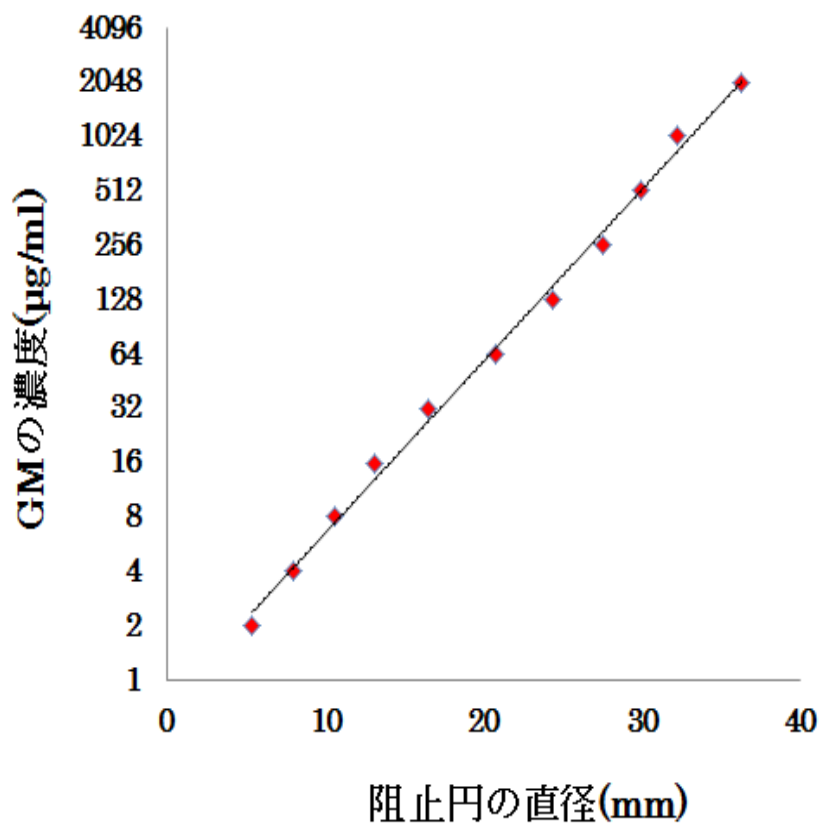


図 5. 各種 GM の濃度と阻止円の直径より算出した検量線

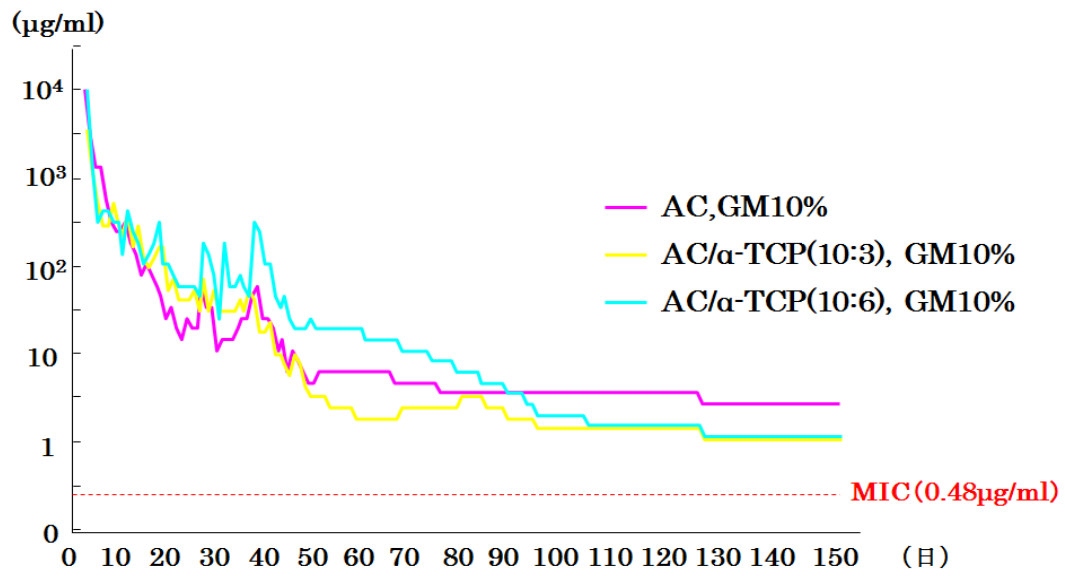
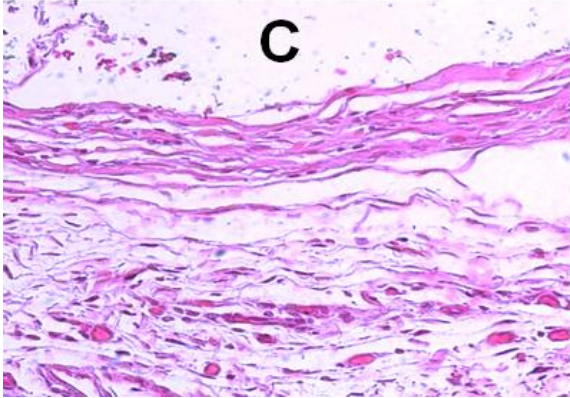


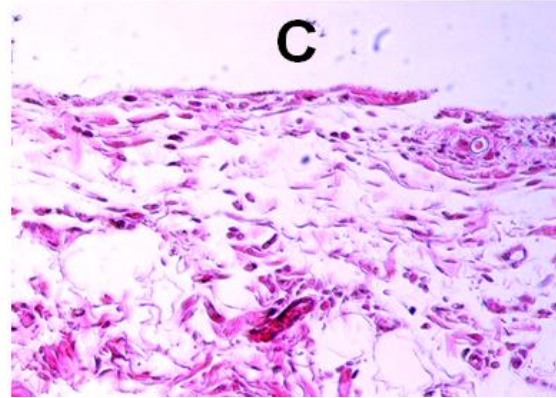
図 6. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体の徐放試験

A

AC/ α -TCP(10:3)



AC/ α -TCP(10:3),GM10%



B

AC/ α -TCP(10:3),GM10%

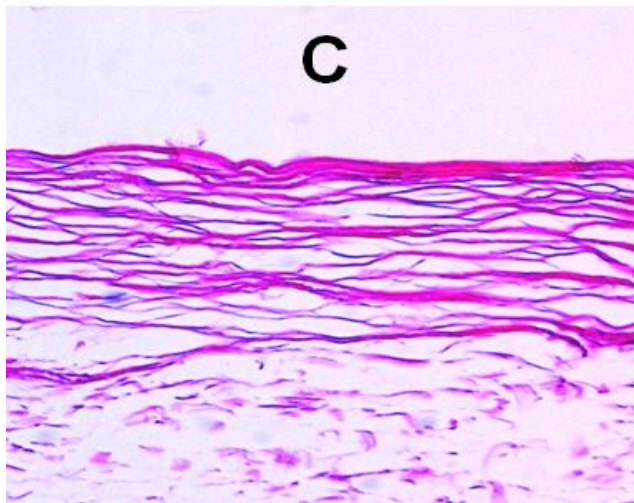


図 7. ラット皮下に埋入した AC/ α -TCP および周囲組織の H-E 染色像

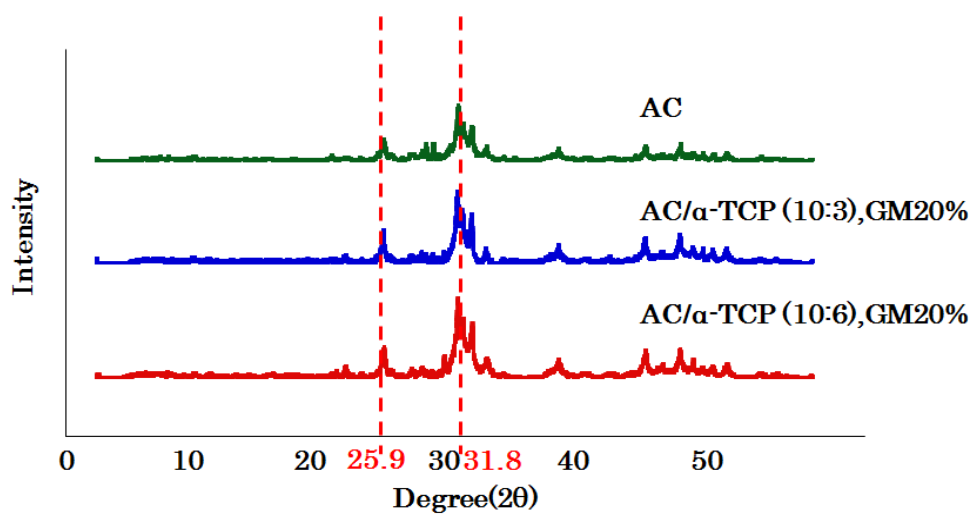


図 8. ラット皮下に埋入した AC/α-TCP の粉末 X 線回析パターン

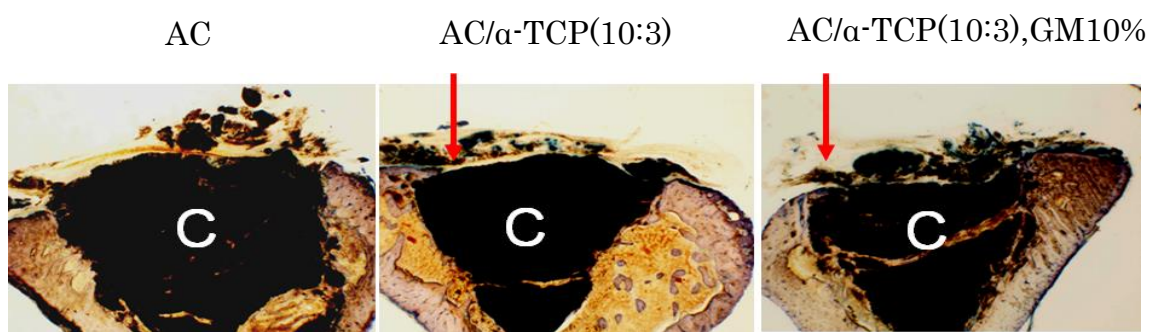
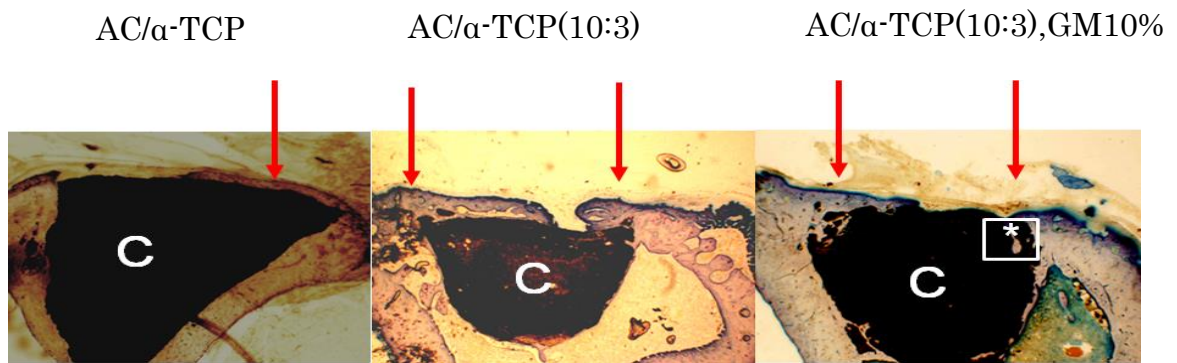


図 9. ラット脛骨に埋入した AC/ α -TCP および周囲組織のトルイジンブルー染色像
(埋入 3 週後)

A



B

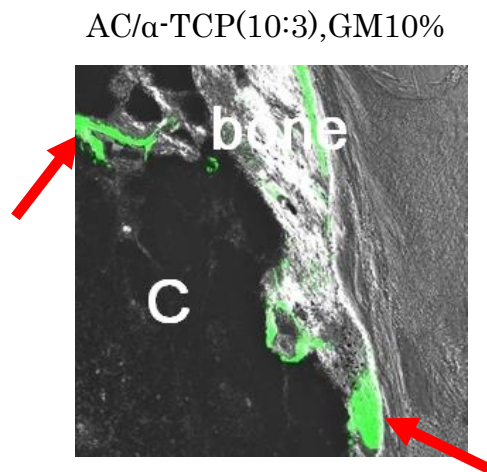


図 10. ラット脛骨に埋入した AC/ α -TCP および周囲組織の
トルイジンブルー染色像
および共焦点レーザー顕微鏡像(埋入 6 週後)

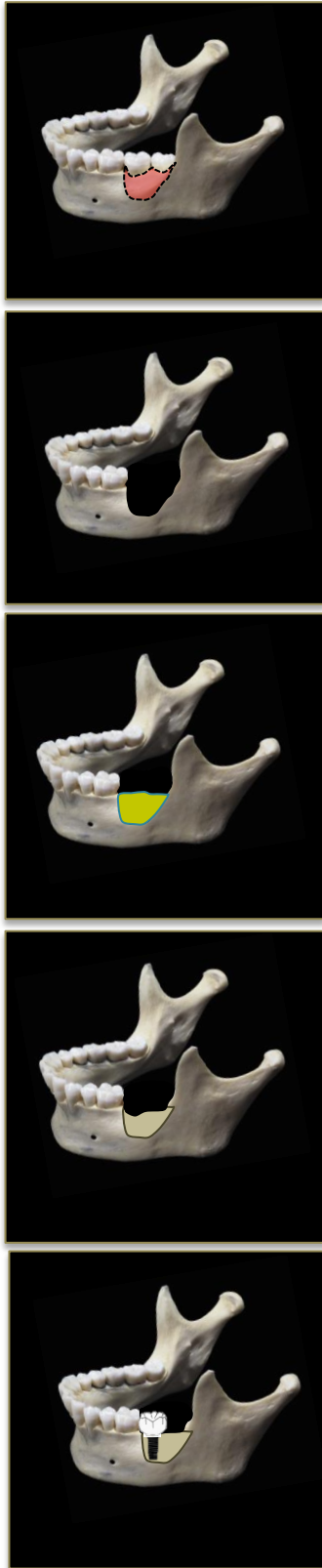


図 11. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP セメントによる顎骨再建

IX. 付図説明

表 1. AC/ α -TCP セメントの硬化時間

図 1.

A. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体

B. AC/ α -TCP 硬化体表面の構造観察(SEM 像)

写真左 : AC/ α -TCP(10:3)硬化体表面の SEM 像を示す.

写真中央 : 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3)硬化体表面の SEM 像を示す.

写真右 : 20%GM 含有 AC/ α -TCP(10:3)硬化体表面の SEM 像を示す.

図 2. AC/ α -TCP 硬化体の間接引張強さ

図 3. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体の粉末 X 線回析パターン

図 4. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP 硬化体より徐放された抗菌薬により形成された
阻止円

写真左 : Control

写真中央 : 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10 : 3)硬化体より徐放された抗菌薬により
形成された阻止円を示す.

写真右 : 10%GM 含有 AC/ α -TCP(10 : 6)硬化体より徐放された抗菌薬により
形成された阻止円を示す.

図 5. 各種 GM の濃度と阻止円の直径より算出した検量線

図 6. 10%GM 含有各種 AC/ α -TCP 硬化体の抗菌薬徐放試験

図 7. ラット皮下に埋入した AC/ α -TCP および周囲組織の H-E 染色像

A. 写真左 : AC/ α -TCP(10:3)セメントペースト埋入 1 週後の硬化体と周囲組織
の H-E 染色像を示す.

写真右：10%GM含有 AC/ α -TCP(10:3)セメントペースト埋入1週後の硬化体と周囲組織のH-E染色像を示す。

B. 10%GM含有 AC/ α -TCP(10:3)セメントペースト埋入4週後の硬化体と周囲組織のH-E染色像を示す。

(C：硬化体)

図8. 粉末X線回析パターン

AC, 20%GM含有 AC/ α -TCP(10:3), 20%GM含有 AC/ α -TCP(10:6)含有セメントペースト埋入1週後の硬化体の粉末X線回析を示す。

図9. ラット脛骨に埋入した AC/ α -TCP 硬化体および周囲組織のトルイジンブルー染色像(埋入3週後)

写真左：ACセメント埋入3週後

写真中央：AC/ α -TCP(10:3)セメント埋入3週後

写真右：10%GM含有 AC/ α -TCP(10:3)セメント埋入3週後

(C：硬化体, 矢印：新生骨)

図10..

A. ラット脛骨に埋入した AC/ α -TCP 硬化体および周囲組織のトルイジンブルー染色像(埋入6週後)

写真左：ACセメント埋入6週後

写真中央：AC/ α -TCP(10:3)セメント埋入6週後

写真右：10%GM含有 AC/ α -TCP(10:3)セメント埋入6週後

(C：硬化体, 矢印：新生骨)

B. 共焦点レーザー顕微鏡像(図10A写真右の*部位の拡大像)を示す。矢印で標識した緑色の蛍光染色像が新生骨である。

(C：硬化体)

図 11. 抗菌薬含有 AC/ α -TCP セメントによる顎骨再建

写真最上段：顎骨骨髓炎

写真上段 2 段目：病変切除後

写真中央：抗菌薬含有 AC/ α -TCP セメントの充填

写真下段 2 段目：骨置換後

写真最下段：インプラントによる咬合機能回復