

博士論文

リン酸カルシウム骨ペーストの硬化特性に対する
影響因子に関する研究

Improving the setting properties of calcium phosphate cements

2016 年

澤村 武憲

第 1 章	序論	1
1.1	背景	1
1.2	本研究の目的	3
第 2 章	無水リン酸水素カルシウム(DCPA)の粉体特性に対するリン酸カルシウム骨ペースト(CPC)の硬化時間と形態付与性に関する研究	11
2.1	緒言	11
2.2	実験方法	12
2.3	結果	13
2.3.1	DCPA の粉体特性	13
2.3.2	CPC 混練体の硬化時間	18
2.3.3	CPC 粉体の充填密度と CPC 混練体の稠度	20
2.4	考察	23
2.5	まとめ	23
第 3 章	CPC の初期硬化温度に対する圧縮強度に関する研究	26
3.1	緒言	26
3.2	実験方法	26
3.3	結果	28
3.4	考察	34
3.5	まとめ	35
第 4 章	減水剤としてメグルミンを用いた CPC の高強度化に関する研究	38
4.1	緒言	38

4.2	実験方法	39
4.3	結果	43
4.3.1	メグルミン水溶液を混練液とした CPC	43
4.3.2	メグルミン/クエン酸水溶液を混練液とした CPC	50
4.4	考察	54
4.5	まとめ	55
第 5 章	ポリヒドロキシアルカノエート短繊維を用いた CPC の 力学特性の向上に関する研究	61
5.1	緒言	61
5.2	実験方法	62
5.3	結果及び考察	62
5.4	まとめ	70
第 6 章	総括	73

第1章 序論

1.1 背景

医療技術の進歩により老年人口の増加が見込まれる中、高齢化社会における大きな課題として Quality of Life(生活の質)の向上が求められている。特に高齢者における骨粗鬆症や骨量の減少による骨強度の低下は、転倒などにより容易に骨折を来し、治療中の長期間の運動制限が、可動域の制限などの機能障害や他の疾病の誘発を招くため、整形外科領域において高齢者の骨折治療に対する早期離床、早期回復が必要とされている。また、近年、頭蓋顎顔面領域においては、機能回復と共に審美性が求められており、骨治療に対する整容面の向上も問われている。このような骨治療には、古くから腸骨から採取した自家骨を用いた骨再建術が行われているが、採骨の為の治療部位以外の手術侵襲に加え、これに伴う合併症も報告されており、患者さんへの身体的な負担は少なくない^{1),2)}。また、海外では他家骨も多く用いられているが、感染のリスクを完全に払拭することは困難である^{3),4)}。これらの課題に対し、人工材料であるセラミックを骨補填材として応用することが検討され、特に、骨の無機成分である水酸アパタイト $[HA:Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ は生体親和性、並びに骨と化学的な結合を示す⁵⁾⁻⁸⁾ことから、現在は、整形外科、形成外科及び歯科領域において、骨補填材として骨欠損の修復に臨床応用されており、その安全性及び有効性も確認されている⁹⁾⁻¹³⁾。しかしながら、HAをベースとした骨補填材はセラミック技術を基盤としたものであり、化学的に合成されたHA原料を焼き固めた焼成体であるため、症例毎に異なる形状を呈した骨欠損部に対応するためには、カスタムメイドにより骨欠損部の形状にあったものを術前に作製するか、あるいは手術時に加工が必要となる^{14),15)}。

これに対し、Monma らによって 型リン酸三カルシウム $[Ca_3(PO_4)_2]$ が水和反応により HA に転化し、その際、経時的に硬化することが見出され¹⁶⁾、これを起点として、リン酸カルシウムの水和硬化を応用した硬化型骨補填材に対する研究が盛んに行われるようになり、現在、リ

ン酸カルシウム骨ペースト(CPC)として臨床応用に至っている^{17,18)}。

CPC はリン酸カルシウム粉体と水系の混練液からなり、これらを使用時に混練し、得られた混練体を骨欠損部に補填することにより、骨を修復するものである。混練体は、粉体成分であるリン酸カルシウム化合物の水和反応により、時間経過と HA を析出するため骨結合性を示し、また、これに伴い体内で硬化するため、治療部位を修復し、機能回復に繋がる。(Fig. 1.1.1)

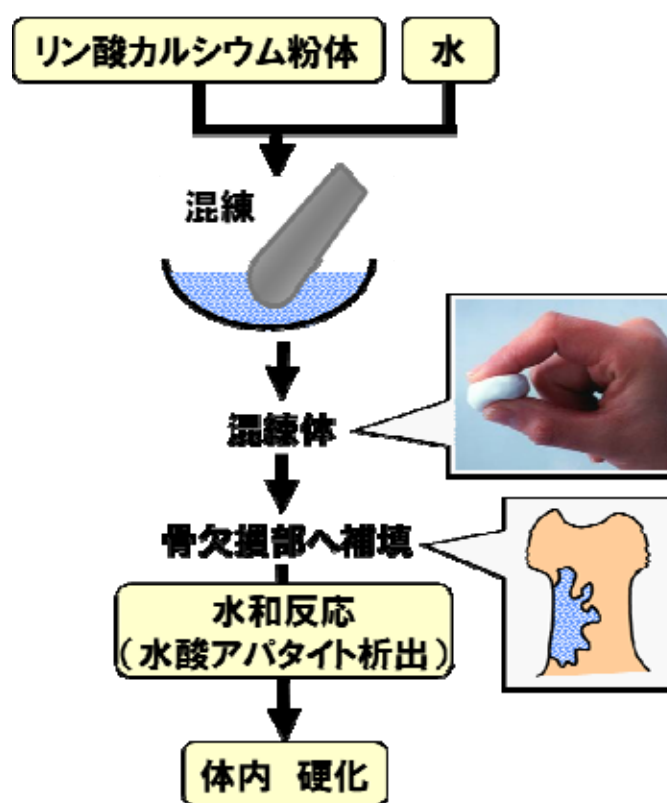


Fig. 1.1.1. Schematic image of CPC

CPC 混練体は粘土の様に变形可能であるため、HA 焼成体を応用した骨補填材では困難であった複雑な骨欠損部に緊密に補填することが可能である。更に混練時の液量を増加することにより注入補填が可能となり、皮切を最小限に留めた低侵襲な手術を可能とし、また、金属製内固定材を用いて骨折や脊椎の治療を行う場合に、CPC をスクリュー周囲に補填することにより、粗鬆化が生じた骨に対するスクリューの固定性を改善することも可能である。この様に、

CPC は従来の HA 焼結型骨補填材の課題を解決するに留まらず、手術手技も含めた新たな治療方法への展開にも繋がり、骨治療において、臨床的な有用性の向上が期待される。

1.2 本研究の目的

CPC 粉体として様々なリン酸カルシウム化合物が数多く試みられているが、基本的な構成は、カルシウムイオンの供給源となるカルシウムリッチな化合物(例:CaCO₃、Ca₄(PO₄)₂O)とリン酸イオンの供給源となるリン酸リッチな化合物(例:CaHPO₄、 α -Ca₃(PO₄)₂)の組み合わせであり、これらの水和反応に伴う HA の析出が CPC の硬化原理である。Brown と Chow によって見出されたリン酸四カルシウム[TeCP: Ca₄(PO₄)₂O]と無水リン酸水素カルシウム[DCPA: CaHPO₄]から構成される CPC は、中性領域の pH で硬化反応を示し、他のリン酸カルシウムから構成される CPC に比べ短時間で機械強度を発現する¹⁹⁾⁻²¹⁾。

一方、骨治療において CPC が有効かつ安全な骨補填材として用いられるためには、臨床使用を想定した以下のような特性を満足する必要がある。

形態付与性

混練～補填操作に必要な時間の確保(室温環境における硬化反応の緩和)

骨欠損部へ補填後の迅速な硬化(体内環境における硬化反応の促進)

骨と同等以上の強度及びその早期発現

血液接触時の崩壊抑制

形態付与性とは、混練体の操作性に繋がるものであり、クラックが生じることなく、的確に骨欠損部への補填を可能とするために、混練体に適度な柔軟性を付与することが必要である²²⁾。また、混練～補填操作を行うために必要な時間を確保する為には、これらの操作中には急速な硬化が生じることなく、一方、体内に補填後は速やかに硬化することが必要であり、そのための硬化反応の制御が重要となる²³⁾。更に、骨を修復するためには力学的な強度も必要であり、特に大腿骨や椎体 等 荷重部の治療に用いるには、十分な強度を早期に発現することが求め

られる^{24),25)}。また、骨欠損部への補填時には混練体と血液との接触を避けることは困難であり、その際、血液の浸潤による混練体の崩壊が、炎症を惹起することを低減するために、崩壊の抑制が必要とされている²⁶⁾。

本研究では、まず、リン酸カルシウム粉体として TeCP/DCPA 系を選択し、粉体特性による硬化時間及び形態付与性の制御を試みた。また、得られたリン酸カルシウム粉体に対して初期硬化における温度条件による硬化反応及び強度特性への影響を評価した。更に減水剤を用いることによる高強度化並びに生分解性高分子短繊維との複合化による強化についても試みた。以下に本論文の内容を記す。

第 1 章 序論

本研究の背景及び目的について述べた。

第 2 章 無水リン酸水素カルシウムの粉体特性に対するリン酸カルシウム骨ペースト(CPC)の硬化時間と形態付与性に関する研究

CPC の硬化時間の短縮に対し、粉体の微細化による溶解性の向上は、硬化反応の促進に繋がると考えられるが、その一方、粉体の微細化による充填密度の低下が混練に必要な水分量の増加を招き、これによる硬化体の気孔率の増大が、機械的強度の低下を引き起こすことが懸念される。ここでは、CPC 粉体の原料として 2 種類の DCPA を調製し、得られた CPC 粉体の硬化時間及び形態付与性を評価することにより、DCPA の粉体特性の違いによる CPC の特性への影響を検討した。その結果、DCPA の粉体特性を制御することにより、短時間で硬化すると共に、水分量を増加することなく優れた形態付与性を有する CPC を見出した。

第 3 章 CPC の初期硬化温度に対する圧縮強度に関する研究

形成外科において、CPC を骨欠損部の形状に合わせて成型した上で補填することが、臨床

上、有効な方法とされているが、補填前に付与した形状を維持する為には、硬化反応の促進による硬化時間の短縮が必要となり、混練開始から補填操作を終えるまでに必要な時間の確保が困難となる。

ここでは、第 2 章で得られた CPC に対して、初期硬化の過程で異なった温度で加熱することにより CPC 混練体の成形後の形状の維持を試み、その加熱温度による CPC 硬化体の圧縮強度及び水和反応への影響を検討し、その結果、初期加熱温度の上昇に伴い、初期硬化後の CPC 硬化体の圧縮強度が上昇することを見出した。

第 4 章 減水剤としてメグルミンを用いた CPC の高強度化に関する研究

CPC を大腿骨や椎体などの荷重部に用いるためには、高強度化が必要であり、また、早期離床の為には、その強度を短期間で発現することが望まれる。

ここでは、第 2 章で得られた CPC に対して、混練中の CPC 粉体の分散性の向上により、混練に必要な液量の低減及びこれによる硬化体の嵩密度の上昇を期待し、アミノアルコールであるメグルミンの混練液への添加による CPC 硬化体の高強度化を試みと共に、アルカリ性であるメグルミンによる硬化反応の遅延を想定し、クエン酸を更に添加することにより硬化時間の最適化を検討した。その結果、CPC に対してメグルミンが減水剤として作用することを見出し、高強度かつ適切な硬化時間を有し、臨床応用に向けて優れた特性を示す CPC の創出に至った。

第 5 章 ポリヒドロキシアルカノエート短繊維を用いた CPC の力学特性の向上

CPC は脆性が強く、荷重部位の骨欠損への適用が制限されるため、繊維との複合化による力学特性の向上が提案されている。

ここでは、第 2 章で得られた CPC に対して、生分解性高分子短繊維との複合化による CPC の力学特性の向上を期待し、ポリヒドロキシアルカノエートである 3-ヒドロキシ酪酸 4-ヒドロ

キシ酪酸共重合体(P(3HB-*co*-4HB))、乳酸グリコール酸共重合体及びポリ-L-乳酸短繊維のCPCとの複合化を検討した。その結果、P(3HB-*co*-4HB)短繊維とCPCの複合化は、CPCの水和反応に影響することなく、CPCの力学特性の改善に寄与することを見出した。

第6章 総括

第6章は総括であり、本研究で明らかになった主な成果をまとめた。

参考文献

- 1) Goulet JA., Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield MLV. Autogenous iliac crest bone graft: Complications and functional assessment. Clin Orthop Rel Res. 1997; 339: 76-81.
- 2) Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of Iliac Crest Bone Graft Harvesting. Clin Orthop Rel Res. 1996; 329: 300-309.
- 3) Boyce T, Edwards J, Scarborough N. Allograft bone: the influence of processing on safety and performance. Orthop Clin North Am. 1999; 30: 571-581.
- 4) Tomford WW, Starkweather RJ, Goldman MH. A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. J Bone Joint Surg Am. 1981; 63: 244-248.
- 5) Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Och T, Yoshikawa H. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior

- osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2002; 59A: 110–117.
- 6) Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, Toth JM, Ricci JL. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109: 619–630.
 - 7) Hing KA, Best SM, Tanner KE, Bonfield W, Revell PA. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 2004; 68A: 184–200.
 - 8) Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, Wilson CR, Toth JM, McIntyre BL. A 1-year study of hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: III. Comparison with autogenous bone graft for facial augmentation. *Plast Reconstr Surg*. 2005; 116: 1044–1052.
 - 9) Ogoe A, Hotta T, Kawashima H, Kondo N, Gu W, Kamura T, Endo N. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005; 72B: 94–101.
 - 10) Deie M, Ochi M, Adachi N, Nishimori M, Yokota K. Artificial bone grafting [calcium hydroxyapatite ceramic with an interconnected porous structure (IP-CHA)] and core decompression for spontaneous osteonecrosis of the femoral condyle in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008; 16: 753–758.

- 11) Kaito T, Hosono N, Makino T, Kaneko N, Namekata M, Fuji T. Postoperative displacement of hydroxyapatite spacers implanted during double-door laminoplasty. *J Neurosurg Spine*. 2009; 10: 551–556.
- 12) Tamai N, Myoui A, Kudawara I, Ueda T, Yoshikawa H. Novel fully interconnected porous hydroxyapatite ceramic in surgical treatment of benign bone tumor. *J Orthop Sci*. 2010; 15: 560–568.
- 13) Maruyama M, Tensho K, Wakabayashi S, Terayama K. Hydroxyapatite block for reconstruction of severe dysplasia or acetabular bone defects in total hip arthroplasty: operative technique and clinical outcome. *J Arthroplasty*. 2012; 27: 591–597.
- 14) Bergmann C, Lindner M, Zhang W, Koczur K, Kirsten A, Telle R, Fischer H. 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. *J Eur Ceram Soc*. 2010; 30: 2563–2567.
- 15) Briea J, Chartierb T, Chaputc C, Delagec C, Pradeauc B, Caired F, Boncoeur MP, Moreau JJ. A new custom made bioceramic implant for the repair of large and complex craniofacial bone defects. *J Craniomaxillofac Surg*. 2013; 41: 403–407.
- 16) Monma H, Kanazawa T. The hydration of α -tricalcium phosphate. *J Ceram Soc Jpn*. 1976; 84: 209–213.
- 17) Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M, Delli-Santi M, Fennell C, Leinberry C, Husband J,

- Ladd A, Seitz, WR, Constanz B. Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study. *J Bone Jt Surg Am* Vol. 2003; 85A: 2127–2137.
- 18) David L, Argenta L, Fisher D. Hydroxyapatite cement in pediatric craniofacial reconstruction. *J Craniofac Surg*. 2005; 16: 129–133.
- 19) Brown WE, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and pastes as mineralizers and cements. 1986: U.S. Patent No. 4,612,053.
- 20) Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate water setting cement. Brown PW, editors. *Cement Research Progress*. Westerville, Ohio: American Ceramic Society; 1986. pp. 352–379.
- 21) Chow LC, Takagi S, Constantino PD, Friedman CD. Self-setting calcium phosphate cements. *Mat Res Soc Symp Proc*. 1991; 179: 3–24.
- 22) Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur Cell Mater*. 2010; 20: 1-12.
- 23) Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y. Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements. *J Mater Sci Mater Med*. 1995; 6: 528–533.
- 24) Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cements: review of mechanical and

- biological properties. *Prostodont.* 2006;15:321–8.
- 25) Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancr t F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2014;10:1035–49.
- 26) Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Matsumura T, Suzuki K. Initial tissue response to anti-washout apatite cement in the rat palatal region: Comparison with conventional apatite cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 55A: 652–660.

第2章 無水リン酸水素カルシウムの粉体特性に対するリン酸カルシウム骨ペースト(CPC)の硬化時間と形態付与性に関する研究

2.1 緒言

CPC を臨床で使用するに際し、骨欠損部に補填後、速やかに硬化することが必要であり、Ishikawa らは、TeCP と DCPA から成る CPC の硬化反応は、DCPA の溶解が律速であり、HA 形成に対してリン酸供給が支配的であると報告すると共に、混練液への中性リン酸水溶液の添加による CPC の硬化時間の短縮を見出している¹⁾⁻³⁾。一方、DCPA の溶解によるリン酸イオンの供給は、その結晶構造や粒径にも依存するため、DCPA の微細化による溶解性の向上により、リン酸イオン供給量の増加に繋げることも考えられる。しかしながら、CPC 粉体が微細粒子からなる場合、粉体の充填密度の低下が生じることにより、混練に必要な水分量の増加を招き、これによる硬化体の気孔率の増大に伴い、機械的強度の低下を引き起こすことが懸念される⁴⁾。また、CPC を骨欠損部に補填するに際し、緊密に充填する為には、CPC 混練体にクラックが生じることなく適度な柔軟性を付与することも必要である⁵⁾。

本章では、混練液量の増加を来すことなく CPC の硬化時間を短縮することにより、特性に優れた CPC を創出することを目的に、CPC 粉体の原料として 2 種類の DCPA を調製し、得られた CPC 混練体の硬化時間及び形態付与性を評価することにより、DCPA の粉体特性の違いによる CPC への影響を検討した。その結果、DCPA の微細化により、CPC 混練体の硬化時間の短縮に繋がることを確認するとともに、純水で粉碎した DCPA を CPC 粉体の原料とすることにより、少ない混練液量でも CPC 混練体が高い稠度、即ち適度な柔軟性を有することを見出した。

2.2 実験方法

出発原料となる DCPA をエタノールもしくは純水で処理することにより、2 種類の DCPA を作製した。150g の市販の DCPA 粉末(Taihei Chemical Industrial, Nara, Japan, 平均粒子径: $8.0\mu\text{m}$ 、比表面積: $1.0\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)と 300mL のエタノールもしくは純水を、2000mL のアルミナポットに 500g のアルミナ玉石($\phi 5\text{mm}$)と共に投入し、74rpm で 6~48 時間 粉碎後、120 で 20 時間、乾燥を行い、エタノール粉碎品(これ以降、E-DCPA と記す)及び純水粉碎品(これ以降、W-DCPA と記す)とした。TeCP をリン酸水素カルシウム 2 水和物(DCPD: $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Kanto Kagaku, Tokyo, Japan)と炭酸カルシウム(CaCO_3 ; Kanto Kagaku)から作製した。130g の DCPD と 74.1g の CaCO_3 を 750mL の純水と共に、アルミナボールミルを用いて 24 時間 混合し、得られた混合物を 120 で 24 時間 乾燥後、1,550 で 10 時間 保持し、室温に急冷した。得られた焼成体をアルミナ乳鉢で平均粒子径 約 $200\mu\text{m}$ に整粒し、CPC 粉体の原料に用いた。

DCPA の形態観察を走査型電子顕微鏡(S-2500; Hitachi, Japan)を用いて行った。DCPA の平均粒子径はインターセプト法(ISO 13383-2012 for fine ceramics; Microstructural characterization -- Part 1: Determination of grain size and size distribution)に準じ、10,000 倍の走査電子顕微鏡像に 5 本の線を任意に描き、各々の DCPA 粒子に交差する線の長さから算出した。 N_2 ガス吸着方式による BET 法(Multisorb-12; Yuasaionics, Japan)を用いて比表面積を測定し、また、粒度分布は超音波ホモジナイザーによりエタノール中で DCPA を分散した状態でレーザー回折式粒度分布測定装置(LA-500; Horiba, Japan)を用いて測定した。評価結果間の有意差について、Student's t-test を用いて検定を行った。

67.5g の TeCP と 32.5g の DCPA を自動乳鉢を用いて機械的に混合し、CPC 粉体とした。また、得られた CPC 粉体 0.5g と純水を、液 / 粉比=0.25(重量比)でスパチュラとガラス皿を用いて 1 分間 混練し CPC 混練体を調製した。得られた CPC 混練体をステンレスリング(内径 10mm、高さ 5mm)に充填し、上面を平坦にした後、37 、相対湿度 95%の環境下に静置し、

所定時間後にビカー針(重量 300g、断面積 1mm²)を下ろし、混練開始からビカー針の痕跡が形成されなくなるまでの時間を硬化時間とした(n=5)。また、CPC 粉体をメスシリンダーに充填し、十分にタッピングを行った後の CPC 粉体の重量及び体積から、CPC 粉体の充填密度を算出した。CPC 混練体を直径 9mm、高さ 10mm に成型した後、2 分間、0.14MPa の荷重を加え、下式に従い、CPC ペーストの稠度を算出した(n=5)。

$$\text{稠度 (\%)} = (b-a) / a \times 100$$

a : 荷重前の CPC 混練体の直径

b : 荷重後の CPC 混練体の直径

2.3 結果

2.3.1 DCPA の粉体特性

Fig. 2.3.1 に、E-DCPA 並びに W-DCPA の平均粒子径及び比表面積を示す。いずれの試料も粉砕時間の増加に伴い、平均粒子径の低下及び比表面積の増大が認められた。また、W-DCPA の平均粒子径は 12、18 及び 24 時間の粉砕において E-DCPA と比較して小さく、36 及び 48 時間では有意差は認められなかった(Fig. 2.3.1a)。一方、E-DCPA の比表面積は、いずれの粉砕時間においても W-DCPA よりも大きな値を示した(Fig. 2.3.1b)。また、Fig. 2.3.1c に示す通り、同じ平均粒子径を比較した場合、W-DCPA の比表面積は E-DCPA よりも常に小さいことが確認された。

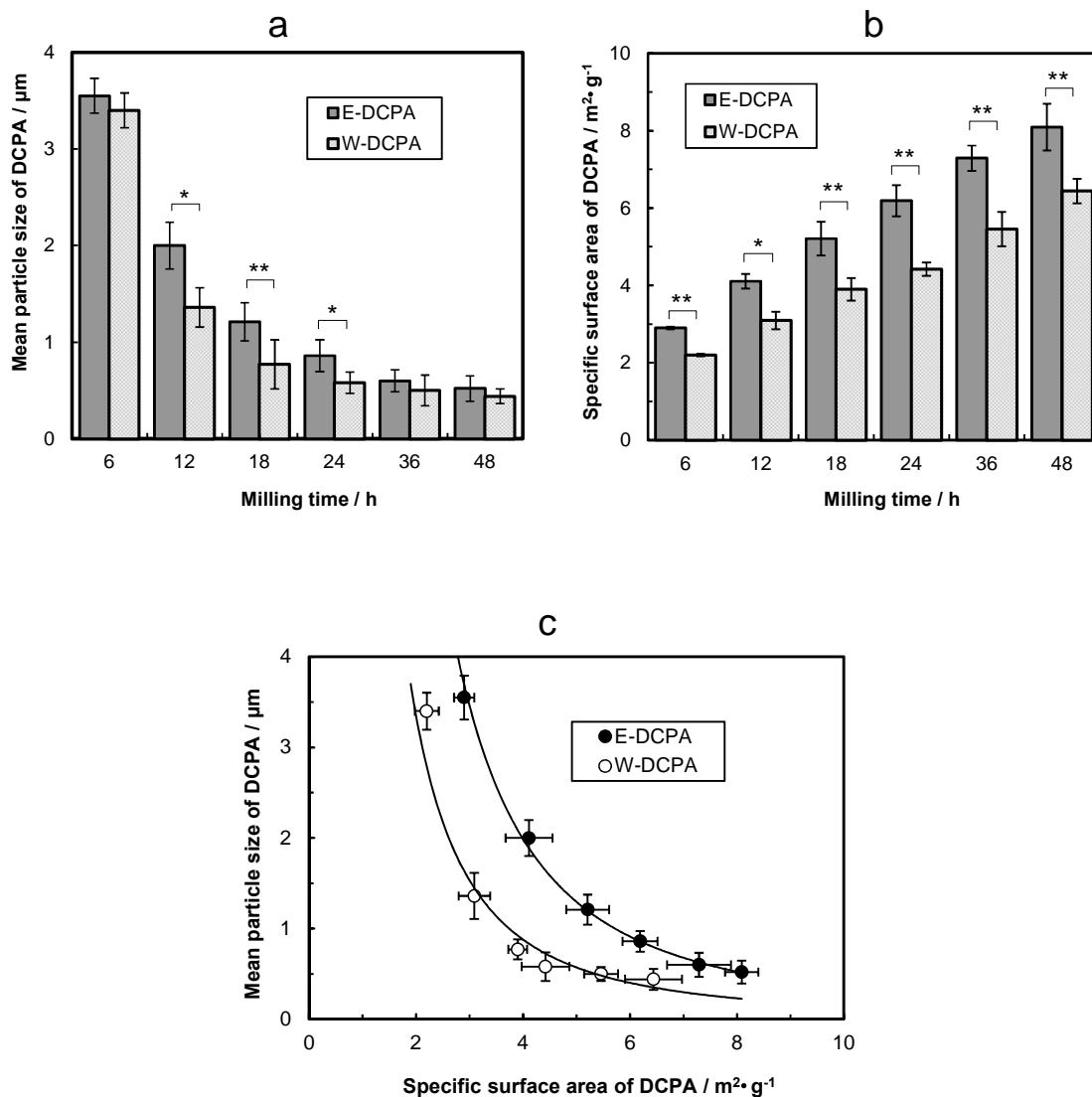


Fig. 2.3.1. (a) Mean particle size, and (b) specific surface area of DCPA milled with ethanol (E-DCPA) and distilled water (W-DCPA) as a function of milling time, and (c) mean particle size as a function of the specific surface area of DCPA. The average values with standard deviations were shown ($n=3$). Significant differences by Student's t-test was established as follows: * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Fig. 2.3.2 に、粉碎前及び 24 時間 粉碎した後の DCPA 粒子の走査電子顕微鏡像を示す。
いずれの DCPA も微細な一次粒子から成るが、E-DCPA は一次粒子が分散しているのに対し、
W-DCPA は一次粒子が凝集し、数十 μm の二次粒子を形成していることが観察された。

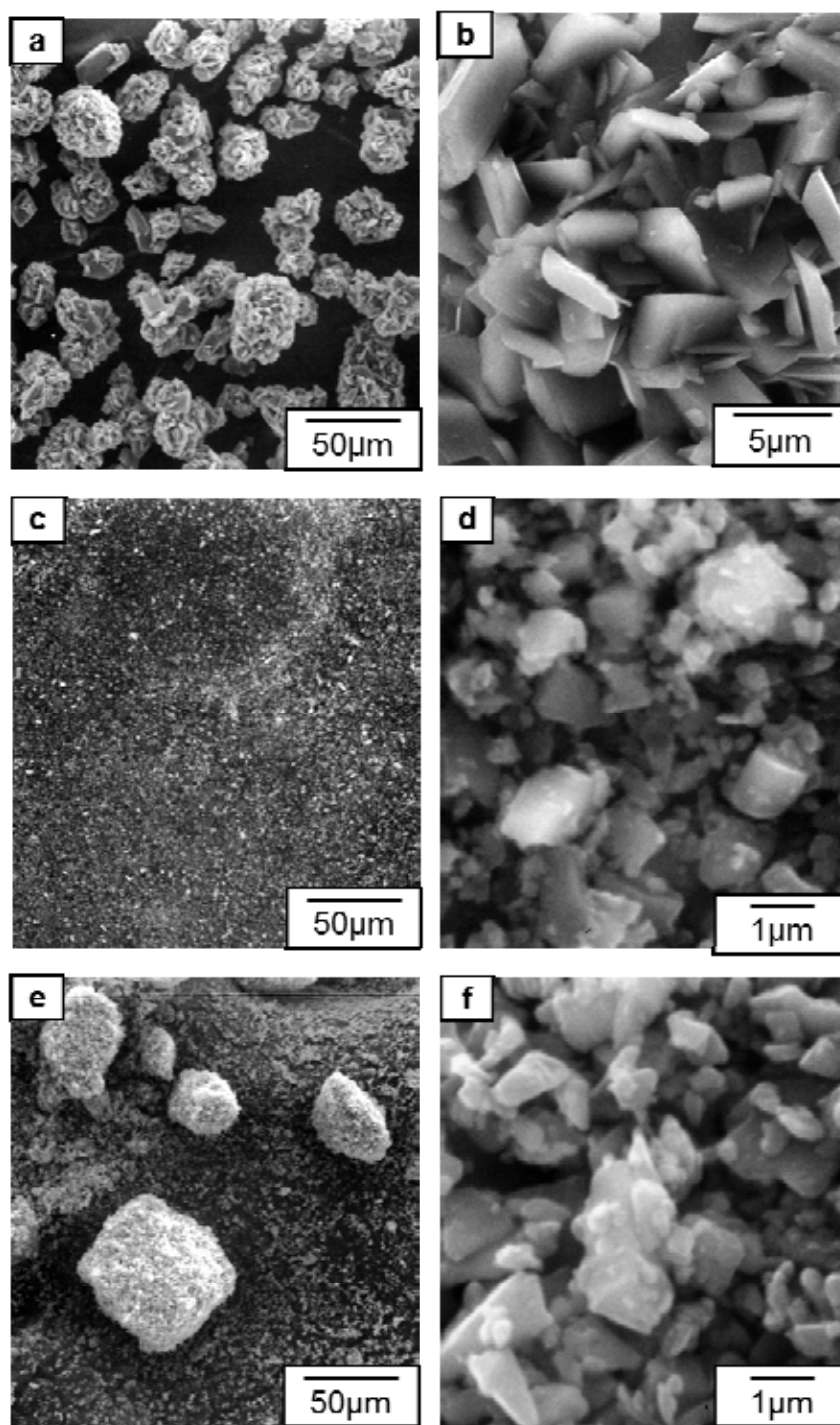


Fig. 2.3.2. Scanning electron micrographs of DCPA particles (a, b) untreated, (b, c) E-DCPA, and (d, e) W-DCPA. The milling time was 24 h.

Fig. 2.3.3 に、DCPA 粒子の粒度分布を示す。E-DCPA の場合、ほとんどの粒子が数 μm であったが、W-DCPA は 0.1 ~ 数十 μm に分散し、そのピークは約 20 μm に認められた。

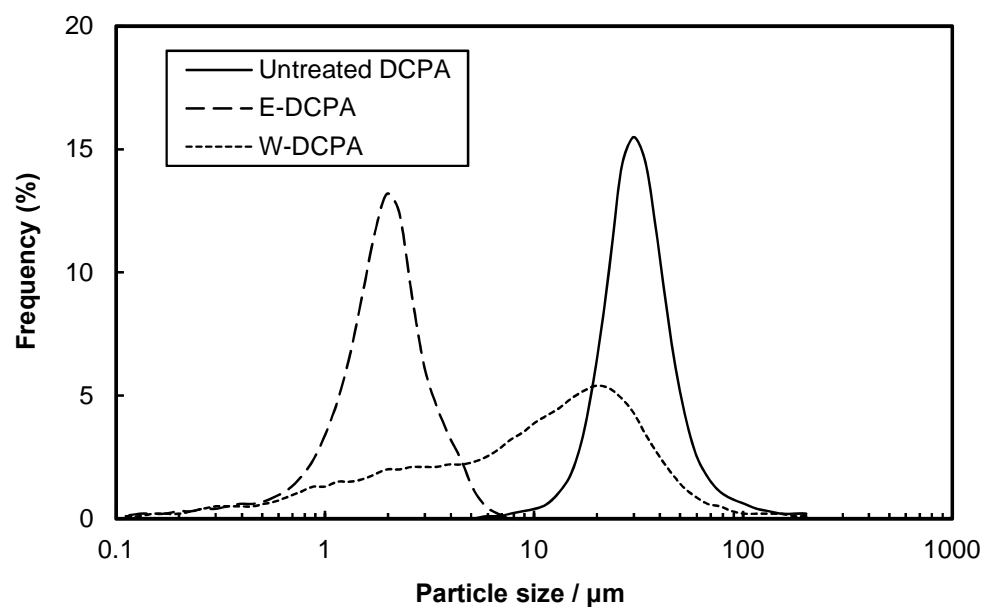


Fig.2.3.3. Particle size distribution of DCPA particles. The milling time was 24 h.

2.3.2 CPC 混練体の硬化時間

Fig. 2.3.4 に、DCPA の平均粒子径及び比表面積に対する CPC 混練体の硬化時間を示す。DCPA の処理方法に関係なく、DCPA の平均粒子径の減少に伴い CPC 混練体の硬化時間が短縮する傾向を示した(Fig. 2.3.4a)。一方、比表面積に対しては、Fig. 2.3.4b に示す通り、DCPA の比表面積が $2.0 \sim 6.0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ では、E-DCPA を用いて調整した CPC 混練体は、W-DCPA を用いた CPC 混練体と比較して長い硬化時間を示したが、 $6.0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ 以上では両者に差は認められなかった。

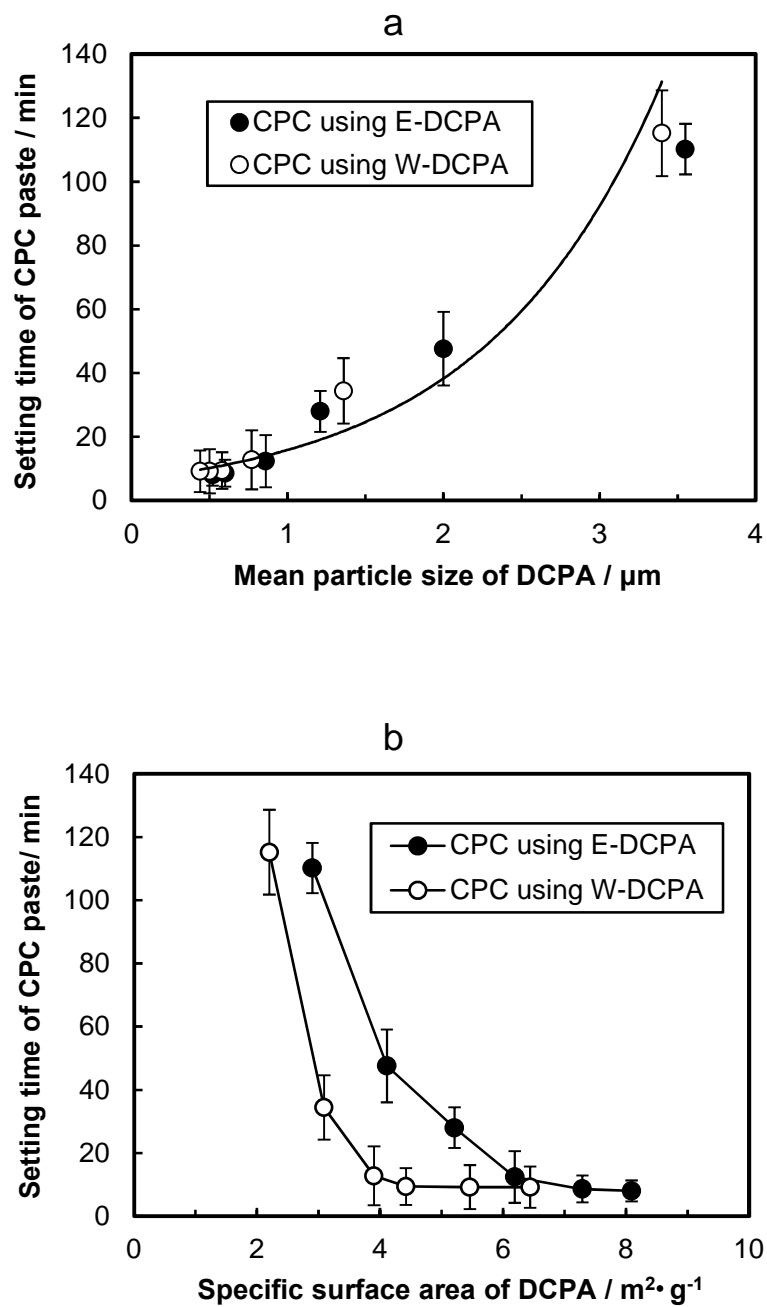


Fig. 2.3.4. Setting time of CPC pastes as a function of (a) the mean particle size, and (b) the specific surface area of DCPA. The average values with standard deviations were shown (n=5).

2.3.3 CPC 粉体の充填密度と CPC 混練体の稠度

Fig. 2.3.5 に、DCPA の平均粒子径並びに比表面積に対する CPC 粉体の充填密度への影響を示す。E-DCPA を用いた場合、平均粒子径の低下及び比表面積の増加に伴い、充填密度は低下する傾向にあった。一方、W-DCPA を用いた場合の CPC 粉体は、平均粒子径並びに比表面積に依存することなく、高い充填密度($1.4\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ 以上)を維持した。

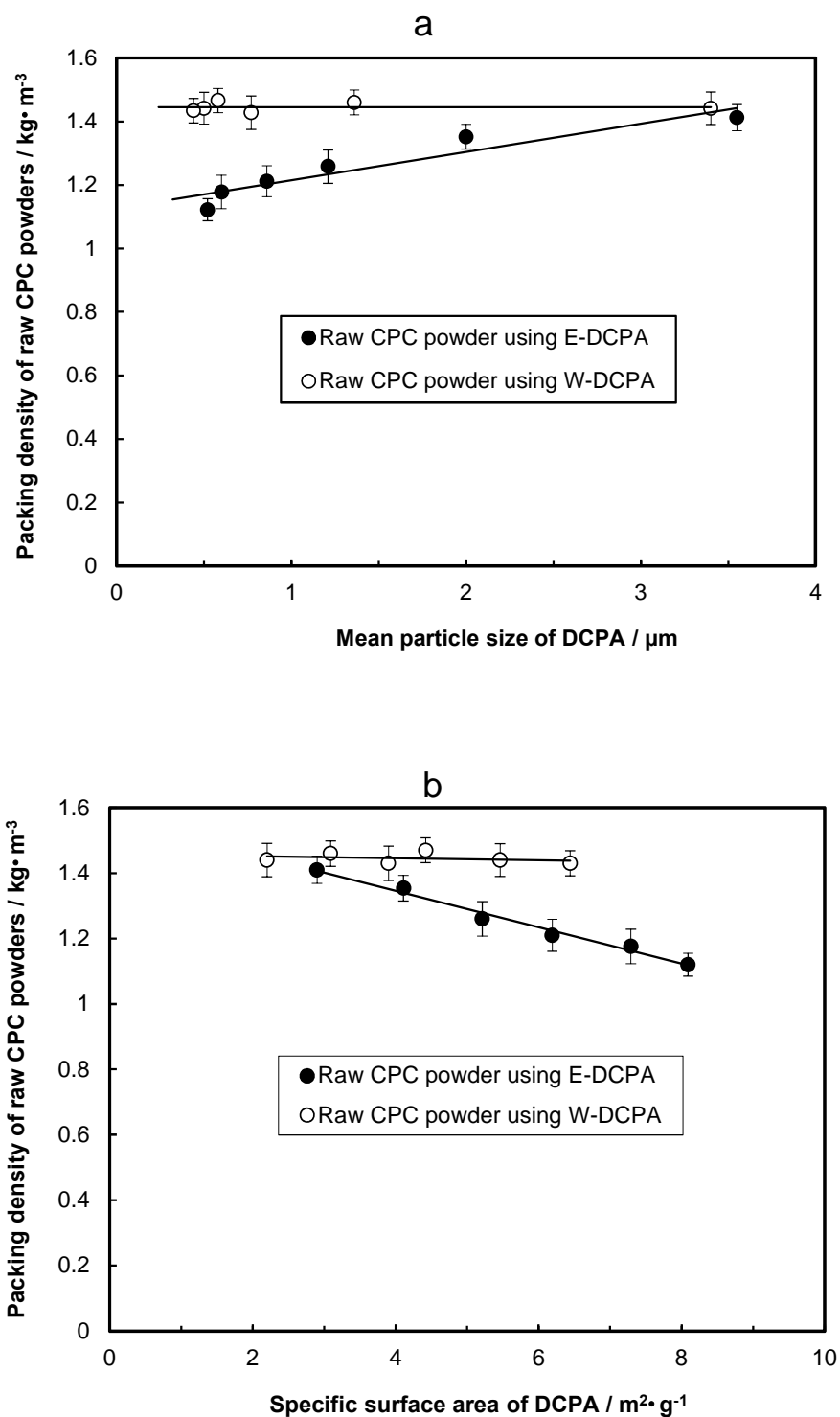


Fig. 2.3.5. Packing density of raw CPC powders as a function of (a) the mean particle size, and (b) the specific surface area of DCPA. The average values with standard deviations were shown ($n=5$).

Fig. 2.3.6 に、CPC 粉体の充填密度に対する CPC 混練体の稠度への影響を示す。CPC 混練体の稠度は CPC 粉体の充填密度に依存し、高い充填密度を持った CPC 粉体から調整された CPC 混練体は高い稠度を示した。また、W-DCPA を用いて調整した CPC 混練体は E-DCPA を用いた場合に比較して高い稠度を示した。更に稠度が 50% 以上の場合、良好な形態付与性が観察されたが、一方、50% を下回る CPC 混練体には、脆性があり、評価後にはクラックも観察された。

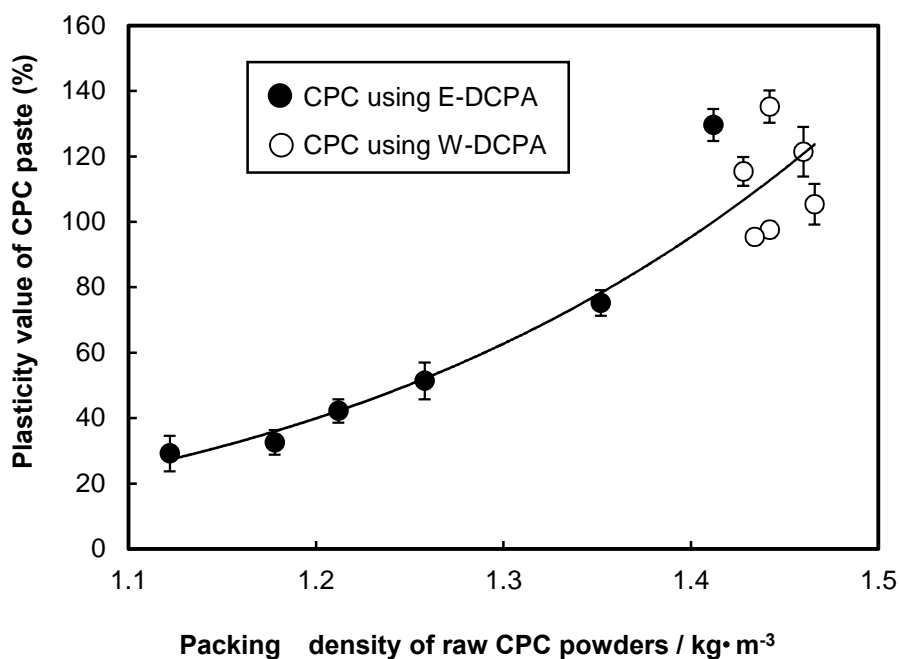


Fig. 2.3.6. Plasticity value of CPC pastes as a function of the packing density of raw CPC powders. The average values with standard deviations were shown (n=5).

2.4 考察

W-DCPA は、E-DCPA と比較し比表面積及び平均粒子径において低い値を示した。また、E-DCPA は微細な一次粒子が分散した状態であるのに対し、W-DCPA は凝集体を形成した。これは純水及びエタノールに対する DCPA の溶解度及び純水とエタノールの表面張力の違いに起因すると考えられた。25 における純水の表面張力は $71.99\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ であるのに対して、エタノールは $21.97\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ である⁶⁾。出発原料とした DCPA 粒子が、純水中では粉碎過程において一部溶解し、乾燥過程において析出、凝集したが、エタノールではこのような現象が生じなかったものと推察した。また、DCPA の粉体特性の違いは CPC の特性に影響した。DCPA の一次粒子の微細化により CPC 混練体の硬化時間は短縮したが、これは、DCPA の溶解性の上昇によりリン酸イオンの供給効率が向上し、その結果、TeCP との水和反応が促進したものと考えられた。

一方、Fig. 2.3.6 に示すように、W-DCPA を用いて作製した CPC 粉体は高い充填密度を示すと共に、比較的少量の混練液(L/P=0.25)でも良好な形態付与性を有する CPC 混練体の調製が可能であった。一般的に、タッピングを行った際の粒子の充填密度は、粒径に依存する運動エネルギーや粒子間の相互作用が影響するものであるとされており⁷⁾、大きな粒径を持つ粒子をタップした際は、細かい粒子の場合と比較して、充填性が上昇する。W-DCPA を用いて作製した CPC 混練体の優れた形態付与性は、CPC 粉体の高い充填密度によって生じたものと考えられた。

2.5 まとめ

2 種類の DCPA (W-DCPA 及び E-DCPA)を CPC 粉体の作製に用い、DCPA の粉体特性が CPC の重要特性である硬化時間及び稠度に及ぼす影響について検討を行った。その結果、CPC 混練体の硬化時間は、DCPA の平均粒子径に依存し、DCPA の平均粒子径の微細化に伴い、CPC 混練体の硬化時間の短縮が示された。また、CPC 混練体の形態付与性に相当する稠度は、

CPC 粉体の充填密度に依存し、W-DCPA から成る CPC 粉体を用いて作製した CPC 混練体は、少ない混練液量でも高い稠度を示した。これらは DCPA の微細化による溶解性の向上と、DCPA 微細粒子の凝集体である W-DCPA を用いたことによる CPC 粉体の充填密度の上昇に起因するものと考えられた。

以上の結果から、短時間で硬化すると共に、優れた形態付与性を有する CPC の創出を示した。

参考文献

- 1) Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y. Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements. J Mater Sci Mater Med. 1995; 6: 528–533.
- 2) Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H, Sawada M, Nagayama M, Kon M, Asaoka K. In vivo setting behavior of fast-setting calcium phosphate cement. Biomaterials. 1995; 16: 855–860.
- 3) 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. 1997; 37: 457–464.
- 4) Bohner M. Reactivity of calcium phosphate cements. J Mater Chem. 2007; 17: 3980–3986.
- 5) Bohner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. Eur Cell Mater. 2010; 20: 1-12.

- 6) Haynes WM, Lide DR, Bruno TJ. CRC Hand Book of Chemistry and Physics. 94th ed.
Florida: CRC Press; 2013. pp. 182.
- 7) Roller PS. The bulking properties of microscopic particles. Ind Eng Chem. 1930;22:1206-08.

第 3 章 CPC の初期硬化温度に対する圧縮強度に関する研究

3.1 緒言

形成外科における CPC を用いた有効な治療方法の一つとして、CPC 混練体を体内に移植する前に骨欠損部に近い形状に成型した上で補填する方法が知られている^{1), 2)}。一般的に、CPC 混練体を補填後は、感染を防止するために術部の縫合は速やかに行う必要があるが、CPC の硬化が不十分なまま閉創した場合、未反応の CPC 粉体が周囲の皮膚組織に付着し炎症を引き起こすことが報告されている³⁾。更に CPC の硬化が不十分な場合には、力学的強度が不足することによる CPC の破損が懸念される。従って、CPC には、成形後に適切な時間で硬化し、補填から縫合するまでの間は形状を維持することが望まれる。

CPC への有機酸の添加により CPC の水和反応を促進し、硬化時間の短縮に繋がることが報告されているが⁴⁾、硬化時間の過剰な短縮は CPC 混練体の成形性が急速に損なわれる恐れがあり、CPC 混練体の充填不良に繋がる可能性がある。また、CPC 混練体を高温で処理することによる硬化時間の短縮も報告されているが⁵⁾、加熱によって生じる CPC の力学的及び化学的特性への影響については明確にされていない。

本章では、第 2 章で見出した、純水で粉碎した DCPA を原料とした CPC 混練体を、初期硬化の過程で異なった温度で加熱し、その加熱温度による CPC 硬化体の圧縮強度及び水和反応への影響を検討した。

3.2 実験方法

第 2 章の結果に従い、市販の DCPA(Taihei Chemical Industrial, Nara, Japan, 平均粒子径: $8.0\mu\text{m}$ 、比表面積: $1.0\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)を、純水と共にアルミナボールミルにより 24 時間の粉碎を行った後、 120°C で 20 時間 乾燥し、出発原料とした⁶⁾。得られた DCPA の平均粒子径は $0.6\mu\text{m}$ であった。TeCP の調製は、第 2 章と同様に、リン酸水素カルシウム 2 水和物(DCPD: $\text{CaHPO}_4\cdot$

2H₂O:Kanto Kagaku, Tokyo, Japan)と炭酸カルシウム(CaCO₃:Kanto Kagaku)を用いた。DCPD/炭酸カルシウム=1.75/1(重量比)の混合物を 1550 °C で 10 時間、焼成した後、室温に急冷し、得られた焼成体を平均粒子径 約 200μm に整粒したものを CPC 原料とした。67.5g の TeCP と 32.5g の DCPA を自動乳鉢を用いて機械的に混合し、CPC 粉体とした。混練液にはデキストラン硫酸ナトリウム(Meito Sangyo)の 48.7mass%水溶液を用いた⁷⁾。CPC 粉体と混練液を液 / 粉比=0.26(重量比) でスパチュラとガラス皿を用いて 1 分間 混練し、CPC 混練体を調製した。得られた CPC 混練体をステンレスリング(内径 10mm、高さ 5mm)に充填し、上面を平坦にした後、37、60、80 または 100 °C で静置し、所定時間後にビーカー針(重量 300g、断面積 1mm²)を下ろし、混練開始からビーカー針の痕跡が形成されなくなるまでの時間を硬化時間とした(n=5)。また、CPC 混練体を直径 6mm、高さ 12mm に成型した後、37、60、80 または 100 °C で 5 分間、初期硬化を行った。また更に、37 °C の擬似体液(SBF)^{8), 9)}に 24 時間、浸漬した。初期硬化後、及び SBF 浸漬後の硬化体の圧縮強度を万能試験機 (Autograph AGS-5kND : Shimadzu)を用いて測定した。圧縮強度を測定した試験片をアセトンに 1 時間 浸漬し、24 時間 真空乾燥の後、粉碎し、X 線回折(XRD; RU-200; Rigaku)により結晶相を同定した。XRD パターンから下式に従い HA 相の強度比を算出した。

$$\text{HA 相 強度比 (\%)} = \{I_{HA} / (I_{DCPA} + I_{TeCP} + I_{HA})\} \times 100$$

I_{DCPA} : DCPA強度 (020), 2θ=26.4°

I_{TeCP} : TeCP強度 (200), 2θ=25.3°

I_{HA} : HA強度 (002), 2θ=25.9°

CPC 粉体及び硬化体の破面の微細構造の観察には走査型電子顕微鏡(SEM; S-2500; Hitachi)を用いた。

3.3 結果

Table 3.3.1 に、それぞれの処理温度における CPC 混練体の硬化時間を示す。処理温度の上昇に伴い硬化時間は短縮し、特に 80 または 100 における硬化時間は 2 分以下となり、大幅に短縮した。

Table 3.3.1. Setting time of CPC pastes at each initial setting temperature.

Initial setting temperature	37°C	60°C	80°C	100°C
Setting time (min)	9.2 ± 1.1	4.2 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.0 ± 0.0

Data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements.

Fig. 3.3.1 に、CPC 硬化体の圧縮強度を示す。5 分間の加熱処理後の圧縮強度は、温度が高いほど、高い値を示した。それに対し SBF に浸漬後の圧縮強度は、5 分間の加熱温度が高い CPC 硬化体の方が低下する傾向にあった。尚、SBF に浸漬中に硬化体の崩壊は観察されなかった。37 で加熱処理を行った CPC 硬化体は、5 分後の圧縮強度は 2MPa 以下であったが、SBF 浸漬後は約 50MPa の最も高い圧縮強度を示した。一方、100 で加熱処理を行った CPC 硬化体の SBF 浸漬前後の圧縮強度はそれぞれ 14MPa 及び 18MPa であった。

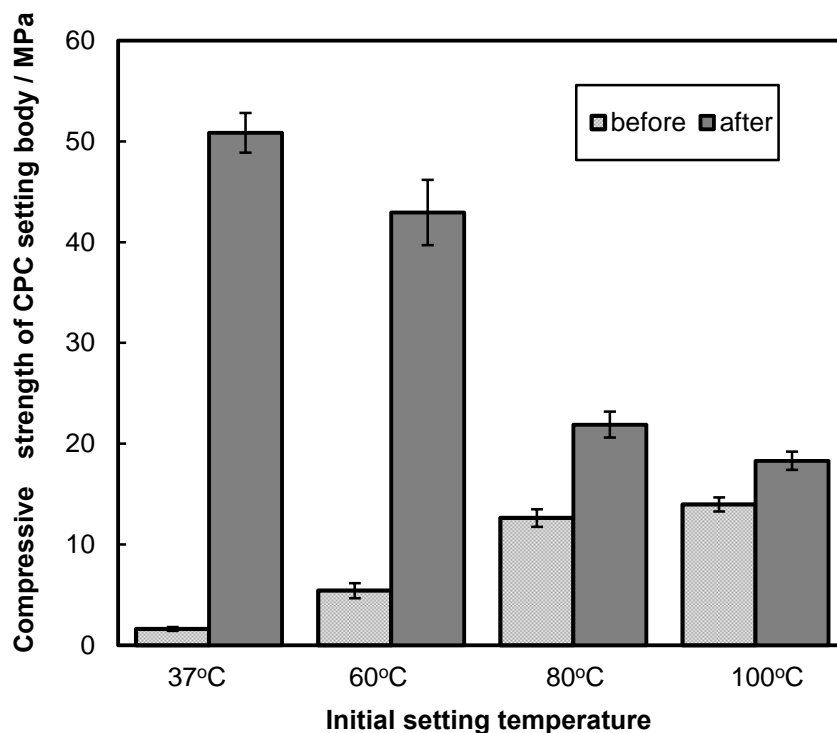


Fig. 3.3.1. Compressive strengths of the CPC setting bodies obtained at different initial setting temperatures before and after SBF soaking at 37°C for 24 h. Data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements.

Fig3.3.2 に、CPC 硬化体の XRD パターンを示す。37 ° で 5 分間加熱した CPC 硬化体の結晶相は、CPC 粉体に対して変化はほとんど認められなかったが、SBF 浸漬後には TeCP 及び DCPA に帰属するピークの減少と共に HA に帰属するピークが認められた。一方、100 ° で初期加熱を行った CPC 硬化体は、5 分間の加熱後に HA に帰属するピークの存在と TeCP 及び DCPA に帰属するピークの減少が認められたが、SBF 浸漬後のそれぞれのピークの変化はわずかであった。100 ° で初期加熱後、SBF に浸漬した CPC 硬化体と比較し、37 ° で初期加熱した後に SBF に浸漬した CPC 硬化体は、HA に帰属するピークの強度は高く、TeCP 及び DCPA に帰属するピークは低い強度を示した。

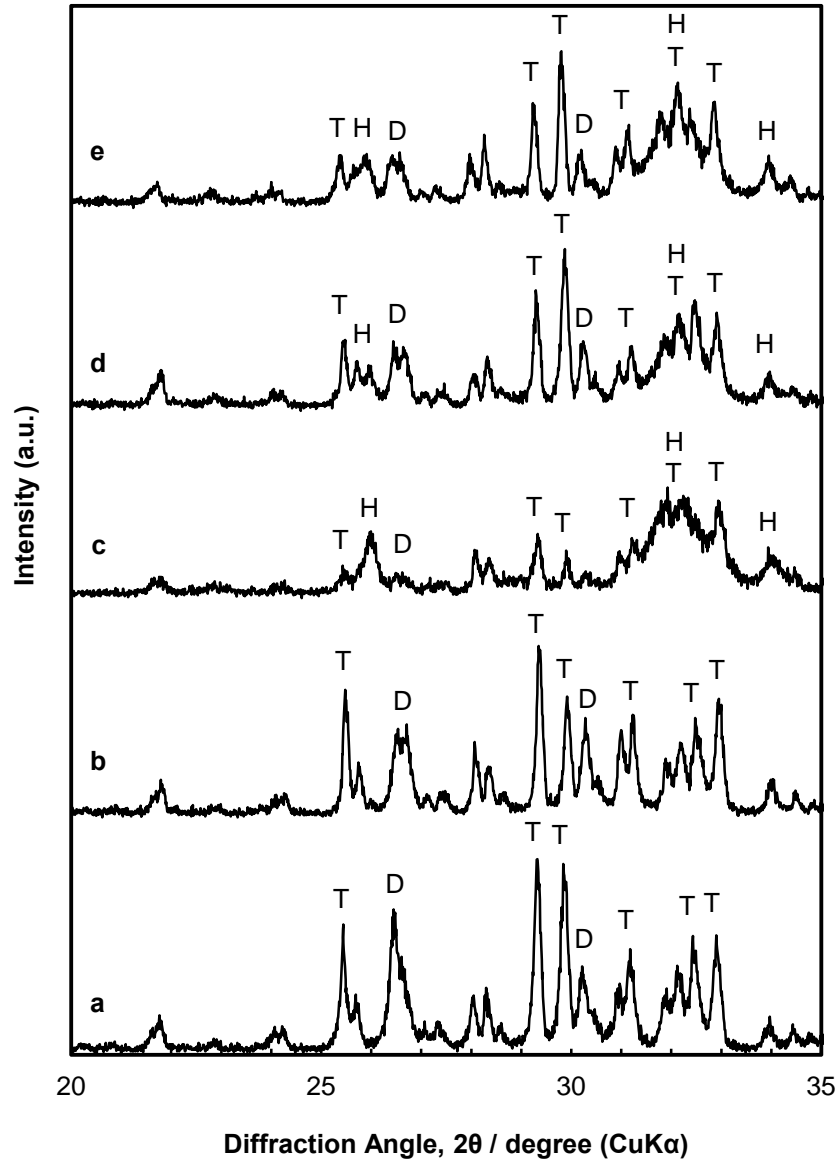


Fig3.3.2. X-ray diffraction patterns of (a) CPC powders, and CPC bodies set at 37°C for 5 min (b) before and (c) after SBF soaking and CPC bodies set at 100°C for 5 min (d) before and (e) after SBF soaking. (H) HA; (T) TeCP; (D) DCPA.

Fig3.3.3 に、CPC 粉体及び CPC 硬化体破面の SEM 像を示す。CPC 粉体では $0.5\mu\text{m}$ 以下の DCPA 粒子が明瞭に観察された。37 で初期加熱した後の CPC 硬化体には DCPA 粒子が認められたが、SBF 浸漬後には消失し、多数のサブミクロン粒子が観察され、これらは XRD パターン(Fig3.3.2.c)及び過去の報告¹⁰⁾から HA であると推察された。一方、100 で初期加熱した後の CPC 硬化体には DCPA 及び HA の粒子が観察され、SBF 浸漬後に変化はほとんど認められなかった。

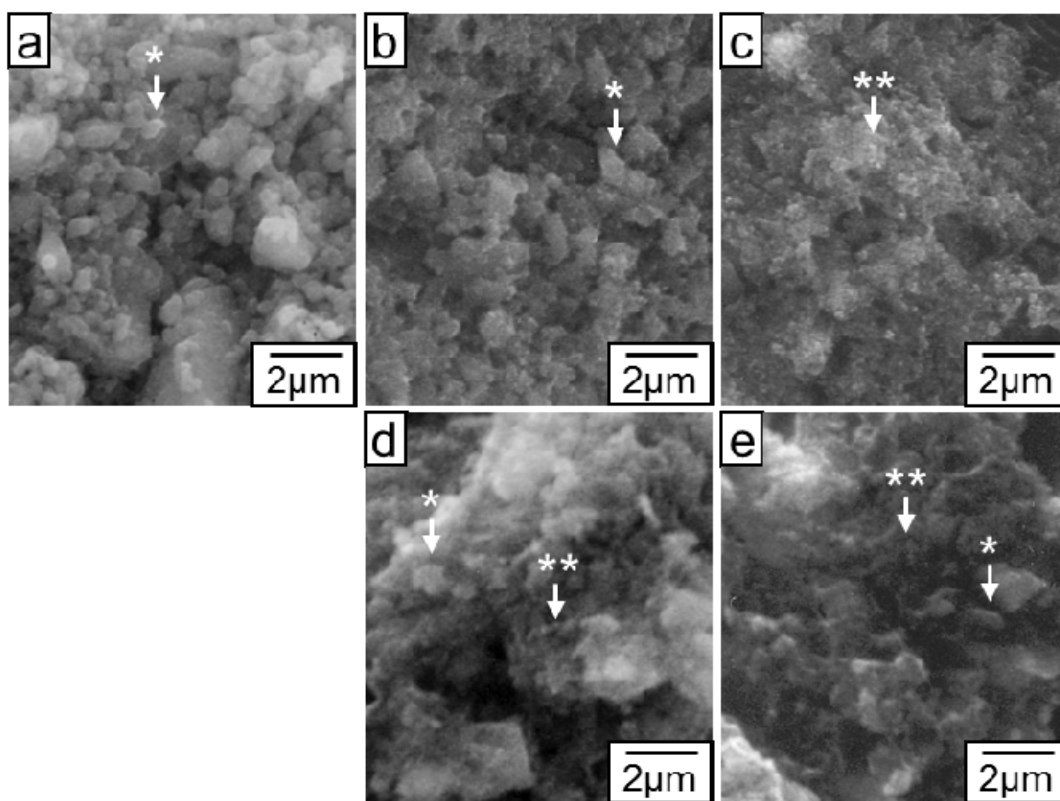


Fig3.3.3. Scanning electron microscopy images of (a) CPC powders, and fracture surfaces of CPC bodies set at 37°C for 5 min (b) before and (c) after SBF soaking and CPC bodies set at 100°C for 5 min (d) before and (e) after SBF soaking. (*) DCPA; (**) HA.

Fig.3.3.4 に、CPC 硬化体の XRD パターンにおける HA 相の強度比に対する圧縮強度を示す。HA 相の強度比の増加に伴い、CPC 硬化体の圧縮強度は上昇した。

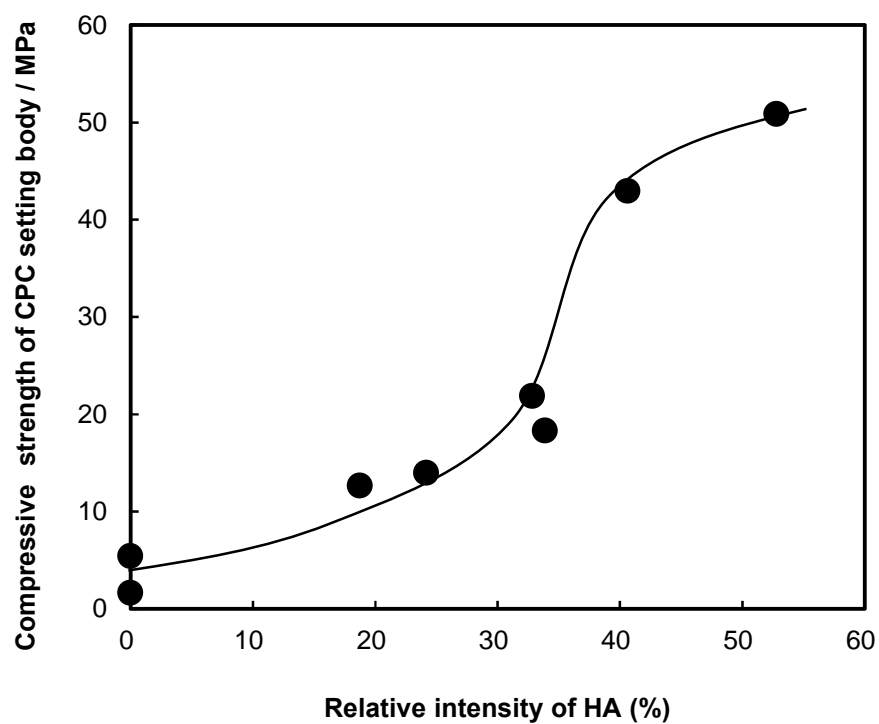


Fig.3.3.4. Compressive strengths of the CPC setting bodies as a function of the relative intensity of HA.

3.4 考察

CPC 混練体の初期加熱温度は、CPC 硬化体の圧縮強度と HA 形成に著しく影響した。これは CPC 混練体の初期加熱温度による硬化挙動と水和反応の違いに起因するものと考えられた。CPC 混練体の初期硬化における水和反応速度は、初期加熱温度の上昇に伴い加速し、圧縮強度の上昇に繋がった。一方、SBF に 24 時間浸漬した後の CPC 硬化体は、初期加熱温度の上昇に伴い圧縮強度の低下及び HA 形成の遅延を招いた。HA 形成の遅延は XRD 及び SEM の解析から確認された。中性リン酸水素ナトリウム($\text{Na}_x\text{H}_{3-x}\text{PO}_4$)を混練液とした CPC において、硬化体の引張強度は HA への転化量に依存することが報告されている¹¹⁾。本章の検討においても、CPC 硬化体の HA 量の増加と TeCP 量及び DCPA 量の減少に伴い、CPC 硬化体の圧縮強度の上昇が確認された。CPC は、TeCP 及び DCPA が徐々に溶解し、混練液中の Ca^{2+} 及び PO_4^{3-} の濃度が HA に対して過飽和となり、その結果 HA を形成する。これが初期硬化後の圧縮強度の増加に寄与したものと考えられる。一方、37 で調整した HA を CPC に添加した場合、100 で調整した HA の添加と比較して、硬化時間の短縮と圧縮強度の上昇が可能であり、これは各温度で調整した HA の結晶性の違いが影響していると報告されている¹²⁾。また、水熱合成によって調整された HA は調整温度の上昇に伴い結晶性が高くなるとの報告もされている¹³⁾。CPC で形成される HA は低結晶性であるため、本章における検討では XRD から HA の結晶性を解析することは困難であったが、CPC 混練体の初期加熱温度によって、形成する HA の結晶性が変化したものと推察した。SBF 浸漬後の水和反応は初期加熱温度の上昇により遅延し、特に 100 では顕著であったことは、高温での初期加熱により CPC 硬化体に結晶性の高い HA が形成したことによるものであり、また、加熱による TeCP 及び DCPA の溶解性に変化が生じた可能性も考えられた。

以上の結果から、CPC 混練体の初期硬化温度の調整により、CPC の水和反応速度と共に、圧縮強度の発現に影響することを見出し、臨床において CPC 混練体の崩壊に起因する炎症の防止に繋がる可能性が示唆された。

3.5 まとめ

初期加熱温度の上昇に伴い、初期硬化後の CPC 硬化体の圧縮強度は上昇したが、37 °C の SBF に 24 時間、浸漬後には顕著な強度の上昇は認められず、水和反応も遅延した。これは CPC 硬化体に形成した HA の結晶性の違いと初期硬化中の TeCP 及び DCPA の溶解度の変化が影響したものと考えられた。

参考文献

- 1) Saijo H, Chung U, Igawa K, Mori Y, Chikazu D, Iino M, Takato T. Clinical application of artificial bone in the maxillofacial region. J. Artif. Organs. 2008; 11: 171-176.
- 2) Tañag MA, Madura T, Yano K, Hosokawa K. Use of calcium phosphate cement paste in orbital volume augmentation. Plast. Reconstr. Surg. 2006; 117: 1186-1193.
- 3) Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Matsumura T, Suzuki K. Initial tissue response to anti-washout apatite cement in the rat palatal region: Comparison with conventional apatite cement. J. Biomed. Mater. Res. 2001; 55A: 652-660.
- 4) Driessens FCM, Boltong MG, De Maeyer EAP, Verbeeck RMH. Effect of temperature and immersion on the setting of some calcium phosphate cement. J. Mater. Sci. Mater. Med. 2000; 11: 453-457.
- 5) Barralet JE, Tremayne M, Lilley KJ, Gbureck U. Modification of Calcium Phosphate Cement with α -Hydroxy Acids and Their Salts. Chem. Mater. 2005; 17: 1313-1319.

- 6) Sawamura T, Mizutani Y, Okuyama M, Kasuga T. Setting time and formability of calcium phosphate cements prepared using modified dicalcium phosphate anhydrous powders. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2014; 25: 1631-1636.

- 7) Sawamura T, Hattori M, Okuyama M, Kondo K. Effects of Polysaccharides Addition in Calcium Phosphate Cement. *Key Engineering Materials.* 2004; 254-256:209-212.

- 8) Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomater.* 2006; 27: 2907–2915.

- 9) Takahashi K, Fujishiro Y, Yin S, Sato T. Preparation and compressive strength of α -tricalcium phosphate based cement dispersed with ceramic particles. *Ceram. Int.* 2004; 30: 199-203.

- 10) Ginebra MP, Fernández E, De Maeyer EAP, Verbeeck RMH, Boltong MG, Ginebra J, Dressens FCM, Planell JA. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J. Dent. Res.* 1997; 76: 905–912.

- 11) Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H, Sawada M, Nagayama M, Kon M, Asaoka K. In vivo setting behavior of fast-setting calcium phosphate cement. *Biomater.* 1995; 16: 855–860.

- 12) Takezawa Y, Doi Y, Shibata T, Wakamatsu N, Kamemizu H, Goto T, Iijima M,

Moriwaki Y, Uno K, Kubo F, Haeuchi Y, Self-setting apatite cement. . Hydroxyapatite as setting accelerator. Sikazairyou Kikai. 1987; 6: 426–431, in Japanese.

- 13) Pang YX, Bao X. J. Inffluence of temperature, riping time and calcination on the morphology and crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles. Eur. Ceram. Soc. 2003; 23: 1697–1704.

第4章 減水剤としてメグルミンを用いたCPCの高強度化に関する研究

4.1 緒言

CPCの臨床使用において、術後の早期離床及び大腿骨や椎体の様な荷重部への適用に繋げるためには、短期間で高い強度を発現することが望まれる^{1), 2)}。ポリメチルメタクリレートを主成分とする骨セメントは、整形外科分野で人工股関節置換術や椎体形成術に用いられており、硬化後70MPa以上の圧縮強度に達する^{3), 4)}が、臨床で使用されている殆どのCPCは、24時間硬化後の圧縮強度が~50MPa程度であり、荷重部へ適用するには強度的に不十分である^{5), 6)}。

CPCの強度向上の為にTiO₂、カーボンファイバー及び有機繊維の添加によるCPCの強化、並びにCPC混練体を充填する際の圧迫が検討されている⁷⁾⁻¹⁰⁾。一方、CPCの混練に使用する水分の内、水和反応に寄与するものは一部であり、その多くは形態付与性及び操作性の維持に寄与するが、この様な水和反応に関与しない過剰な水分はCPCの硬化体内部にボイドを形成し、嵩密度の低下を招くため、CPC硬化体の強度向上には混練液量の低減が効果的である¹¹⁾。第2章では、DCPAの微細粒子の凝集体を用いたCPCは、CPC粉体の充填性が上昇し、低い混練液量においても優れたCPC特性を有することを見出した¹²⁾。更に、第3章では、このCPCの初期硬化温度による強度特性への影響について調査し、初期硬化温度の上昇が短時間での強度発現に繋がることも確認した¹³⁾。

CPCと同様に水和反応を硬化原理とした工業用コンクリートにおいて、減水剤として分散剤を添加することにより、混練体の操作性を維持したまま混練時の液量の低減を図り、硬化体の嵩密度の上昇を促すことにより強度を向上させている^{14), 15)}。一般的に微細粒子は粒子間付着力により凝集体を容易に形成するが¹⁶⁾、分散剤は液体中で粒子表面に吸着し、粒子同士の接近を防ぐことにより、凝集体を分散し安定化させるものであり、その原理には大きく立体障害によるものと電荷による反発によるものがある¹⁷⁾。ポリアクリル酸塩は立体障害を原理とした減水剤の一種であり¹⁸⁾、そのアンモニウム塩の添加によるCPC混練時の減水効果が報告され

ているが、骨セメントの強度には至っていない¹⁹⁾。

メグルミン($\text{CH}_3\text{NHCH}_2(\text{CHOH})_4\text{CH}_2\text{OH}$; CAS No. 6284-40-8)はアミノアルコールの一種であり、水酸基がリン酸カルシウム粉体の粒子表面に吸着すると共に、アミノ基に H^+ が配位することにより、リン酸カルシウム粉体の粒子表面に電気的反発を生じ、CPC 混練体中での CPC 粉体の分散に寄与することが予測され、混練時の減水が CPC 硬化体中のボイドの発生を抑えることにより、CPC 硬化体の嵩密度の上昇を来し、強度向上に繋がることが期待できる。また、電荷による反発を分散原理とすることは、立体障害に比べ CPC の硬化反応を阻害する可能性が低いと考えられる。更に、少量のメグルミン添加によって CPC 粉体の分散に効果を得ることが可能であれば、CPC の生体親和性及び生体活性の阻害に繋がることもないと予測される。メグルミンは X 線造影剤の可溶化剤として広く使用され、高い安全性が認められており^{20),21)}、これらの点から、骨補填材である CPC の添加剤として適していると考えられる。

本章では、メグルミン水溶液を混練液とした CPC について検討を行った。更に、CPC の硬化が HA の析出によるものであるため、アルカリ性を示すメグルミン水溶液では水酸アパタイトの生成速度の遅延が CPC の硬化に悪影響を及ぼすことを想定し、CPC の硬化時間短縮が報告されている²²⁾クエン酸を更に添加した CPC についても検討を行った。本章における研究の目的はメグルミンの添加による高強度かつ操作性に優れた CPC の調製である。

4.2 実験方法

第 2 章の結果に従い、市販の DCPA(Taihei Chemical Industrial, Nara, Japan, 平均粒子径: $8.0\mu\text{m}$ 、比表面積: $1.0\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$)を、純水と共にアルミナボールミルにより 24 時間の粉碎を行った後、 120°C で 20 時間 乾燥し、出発原料とした¹²⁾。得られた DCPA の平均粒子径は $0.6\mu\text{m}$ であった。TeCP の調製は、第 2 章と同様に、リン酸水素カルシウム 2 水和物(DCPD: $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Kanto Kagaku, Tokyo, Japan)と炭酸カルシウム(CaCO_3 ; Kanto Kagaku)を用いた。DCPD/炭酸カルシウム=1.75/1(重量比)の混合物を 1550°C で 10 時間、焼成した後、室温に急

冷し、得られた焼成体を平均粒子径 約 200 μ m に整粒したものを CPC 原料とした。67.5g の TeCP と 32.5g の DCPA を自動乳鉢を用いて機械的に混合し、CPC 粉体とした。混練液として、純水(これ以降、DW と記す)、1~3mass%メグルミン($C_7H_{17}NO_5$; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)水溶液(これ以降、MG と記す)、及び 3mass%メグルミン/2mass%クエン酸($C_6H_8O_7$; Wako Pure Chemical Industries)水溶液(これ以降、MG/CA と記す)を用いた。CPC 粉体と混練液を、純水の場合、液 / 粉比=0.25(重量比)¹²⁾、MG および MG/CA の場合は、減水効果を評価する為に液 / 粉比=0.21(重量比) でスパチュラとガラス皿を用いて 1 分間 混練し、CPC 混練体を調製した。

得られた CPC 混練体を直径 9mm、高さ 10mm に成型した後、2 分間、0.14MPa の荷重を加え、下式に従い、CPC 混練体の稠度を算出した(n=5)。

$$\text{稠度 (\%)} = (b-a) / a \times 100$$

a : 荷重前の CPC 混練体の直径

b : 荷重後の CPC 混練体の直径

CPC 混練体をステンレスリング(内径 10mm、高さ 5mm)に充填し、上面を平坦にした後、37℃、相対湿度 95%の環境下に静置し、所定時間後にピカー針(重量 300g、断面積 1mm²)を下ろし、混練開始からピカー針の痕跡が形成されなくなるまでの時間を硬化時間とした(n=5)。

また、CPC 混練体を内径 6mm、高さ 12mm のディスクに充填し、37℃、相対湿度 95%の環境下で 1 時間、静置した後、ディスクから取り出し、37℃の擬似体液(SBF)^{23), 24)}に 24 時間、浸漬した。SBF 浸漬後の CPC 硬化体の圧縮強度を万能試験機 (Autograph AGS-5kND; Shimadzu, Kyoto, Japan)を用いて測定した。CPC 硬化体の嵩密度の測定、X 線回折による結晶相の同定及び微細構造観察を行うため、SBF 浸漬後の CPC 硬化体をアセトンに 1 時間、浸

漬した後、24 時間、真空乾燥を行った。CPC 硬化体の嵩密度は重量と体積から下式により算出した(n=5)。

$$\text{嵩密度} / \text{kg} \cdot \text{m}^{-3} = 4W / \pi r^2 h,$$

W : 硬化体の重量

r : 硬化体の直径

h : 硬化体の高さ

SBF 浸漬中の CPC 硬化体の結晶相の変化を評価する為、CPC 粉体及び 10 ~ 24 時間、SBF に浸漬した CPC 硬化体をアセトンに 1 時間、浸漬し、24 時間、真空乾燥の後、粉碎し、X 線回折(XRD; RU-200; Rigaku, Tokyo, Japan)により結晶相を同定した。XRD パターンから下式に従い HA 相の強度比を算出した。

$$\text{HA 相 強度比 (\%)} = \{I_{HA} / (I_{DCPA} + I_{TeCP} + I_{HA})\} \times 100$$

I_{DCPA} : DCPA強度 (020), $2\theta=26.4^\circ$

I_{TeCP} : TeCP強度 (200), $2\theta=25.3^\circ$

I_{HA} : HA強度 (002), $2\theta=25.9^\circ$

これらの回折角度は、DCPA、TeCP 及び HA の各ピークが分離しており、ピーク強度の定量に適した角度を選択した。SBF に 24 時間、浸漬した CPC 硬化体の破断面の観察には走査型電子顕微鏡(SEM; VE-8800; Keyence, Osaka, Japan)を用いた。

106 μm 以下に粉碎した TeCP 及び DCPA の粉末を、DW、または 3mass%MG に、5mass% で懸濁させ 1 分間、攪拌後のゼータ電位及び pH を測定した。測定には超音波方式ゼータ電位測定装置(DT-1200; Dispersion Technology, New York, NY, USA)を用いた。ゼータ電位測定に

用いた TeCP 及び DCPA 粉末の粒度分布は超音波ホモジナイザーによりエタノールに分散させた後、レーザ回折/散乱式 粒度分布測定装置(LA-500; Horiba, Kyoto, Japan)を用い、測定した。

4.3 結果

4.3.1 メグルミン水溶液を混練液とした CPC

予備試験において、3mass%を超える MG を用いた CPC 混練体は硬化に至らなかったため、本研究では 1-3mass%MG を混練液として用いた。

Fig. 4.3.1.1 に、混練液の MG 濃度に対する CPC 混練体の稠度を示す。CPC 混練体の稠度は、MG 濃度の増加に伴い上昇し、3mass%MG では 180%の高い稠度を示し、得られた CPC 混練体は外観的に形態付与性に優れていることを確認した。

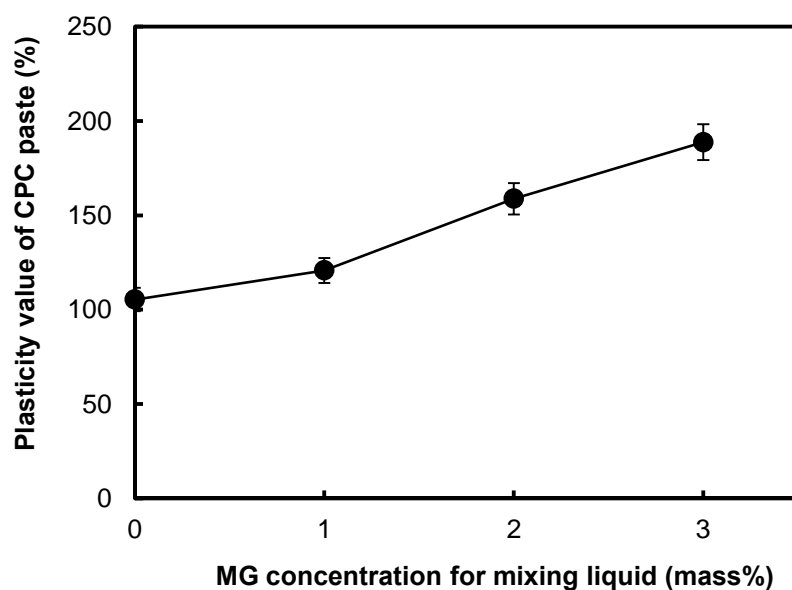


Fig. 4.3.1.1. Plasticity values of CPC pastes as a function of MG concentration for mixing liquid; data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements

Fig. 4.3.1.2 に、混練液の MG 濃度に対する SBF 浸漬後の CPC 硬化体の圧縮強度を示す。CPC 硬化体の圧縮強度は MG 濃度の増加に伴い上昇し、3mass%MG で混練した CPC 硬化体の圧縮強度は 83.1MPa に達した。尚、MG 濃度が 3mass%を超える場合は、CPC 混練体をディスクから取り出す際、硬化が不十分なため、変形が生じ、圧縮強度の評価が可能な試験片を得ることが出来なかった。

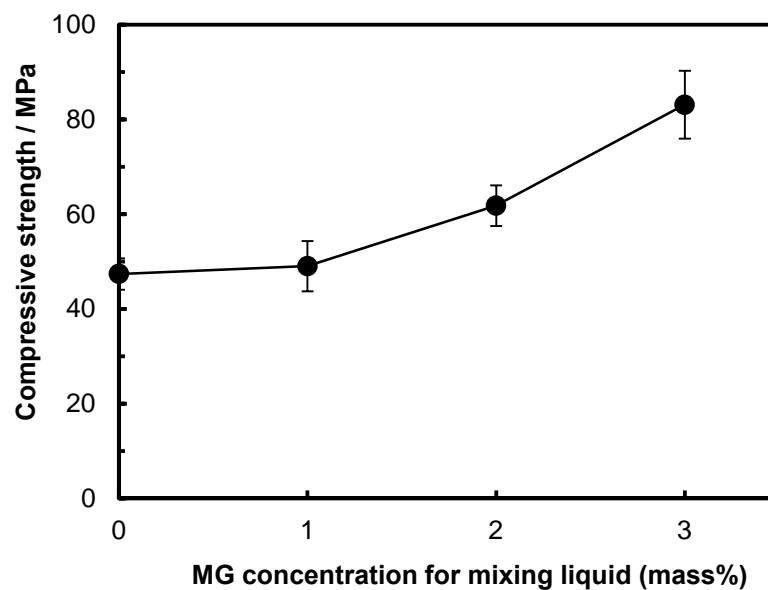


Fig. 4.3.1.2. Compressive strengths of CPC setting bodies after SBF soaking at 37°C for 24 h as a function of MG mixing liquid concentration; data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements

Fig. 4.3.1.3 に、混練液の MG 濃度に対する SBF 浸漬後の CPC 硬化体の嵩密度を示す。CPC 硬化体の嵩密度は、MG 濃度の増加に伴い上昇した。

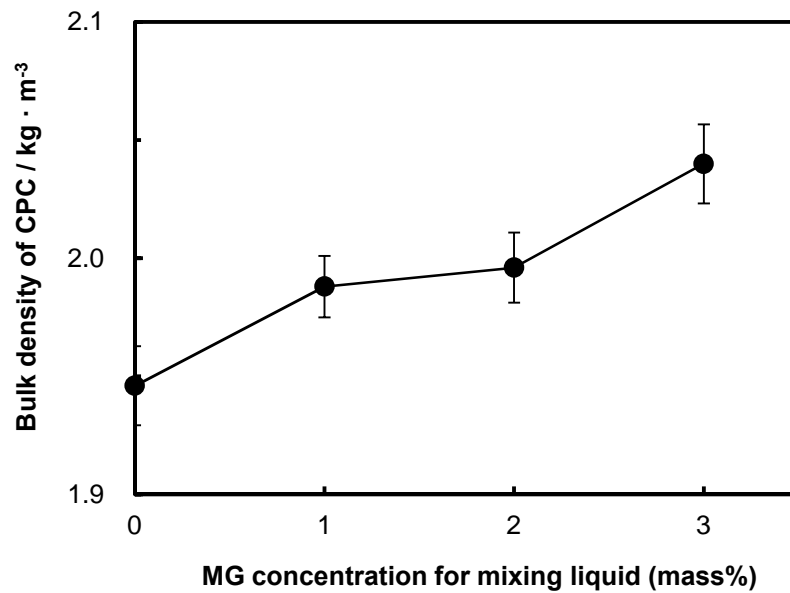


Fig. 4.3.1.3. Bulk densities of the CPC setting bodies after SBF soaking at 37°C for 24 h as a function of MG concentration for mixing liquid; data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements

Fig. 4.3.1.4 に、CPC 硬化体の嵩密度に対する圧縮強度を示す。CPC 硬化体の嵩密度の上昇とともに、CPC 硬化体の圧縮強度は上昇した。

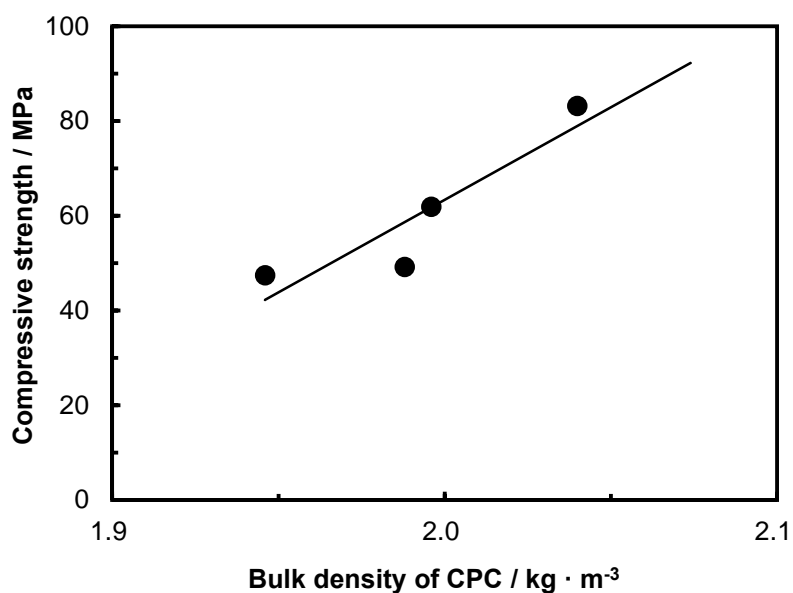


Fig. 4.3.1.4. Compressive strengths as a function of bulk densities of the CPC setting bodies after SBF soaking at 37°C for 24 h

Fig. 4.3.1.5 に、CPC 粉体、及び DW または 3mass%MG で混練した CPC 混練体を 1～24 時間、SBF に浸漬した後の CPC 硬化体の XRD パターンを示す。DW で混練した CPC 硬化体では、4 時間後に HA に帰属するピークが出現し、時間経過と共に HA に帰属するピークの強度は増加し、これに伴い TeCP 及び DCPA に帰属するピークの低下が認められた。一方、3mass%MG の場合は、4 時間後では HA に帰属されるピークは認められず、10 時間以降に、TeCP 及び DCPA に帰属するピークの低下に伴い HA に帰属するピークが認められ、24 時間後には HA に帰属するピークの強度は増加した。

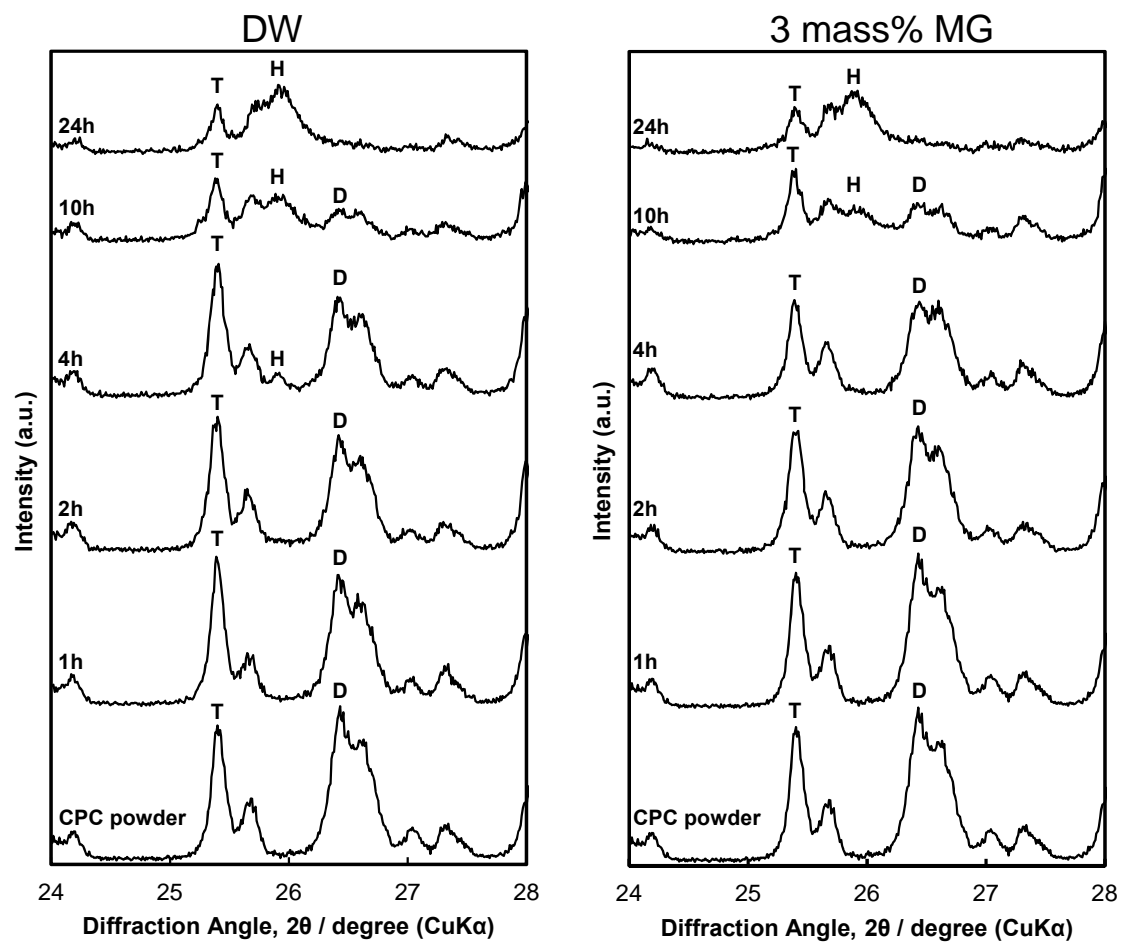


Fig.4.3.1.5. X-ray diffraction patterns of CPC powders and CPC setting bodies after SBF soaking at 37°C for times shown on the left side, and mixing with DW and 3 mass% MG; (H) HA, (T) TeCP, (D) DCPA

Fig. 4.3.1.6 に、SBF 浸漬時間に対する XRD パターンから算出した HA 相の強度比を示す。
DW を用いた CPC 硬化体の HA 相の強度比は、SBF 浸漬 4 時間以降で 3mass%MG を用いた CPC 硬化体よりも高くなり、この違いは 10 時間以降も同様であった。

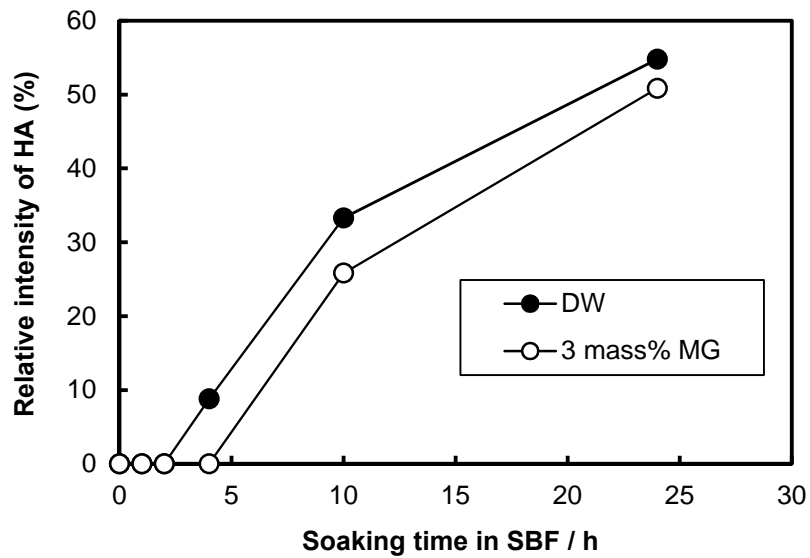


Fig. 4.3.1.6. Relative intensities of HA in XRD patterns of CPC setting bodies mixed with DW and 3 mass% MG as a function of soaking time in SBF at 37°C

Table. 4.3.1.1 に、CPC 粉体の成分である TeCP と DCPA の、DW 中及び 3mass%MG 中のゼータ電位及び測定中の pH を示す。DCPA, TeCP いずれも DW 中では負の電荷であり、それぞれ -6.5mV、-11.6mV であったが、3mass%MG 中のゼータ電位の絶対値はいずれも大きく増加し、特に DCPA は -30.8mV となり、DW 中の約 5 倍の値を示した。また、懸濁液の pH は、DW では DCPA が 7.0、及び TeCP が 10.3 を示したが、3mass%MG 中ではいずれも 11.0 を超える高い pH を示した。

Table 4.3.1.1. Zeta potentials and pH of CPC powder components; TeCP and DCPA in DW and 3 mass% MG.

	Compound	DW	3 mass% MG
Zeta-potential (mV)	DCPA	-6.5 ± 0.7	-30.8 ± 1.2
	TeCP	-11.6 ± 0.3	-23.5 ± 7.0
pH	DCPA	7.0 ± 0.04	11.4 ± 0.03
	TeCP	10.3 ± 0.03	11.5 ± 0.01

Data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements

4.3.2 メグルミン/クエン酸水溶液を混練液とした CPC

クエン酸濃度に対する予備試験の結果、3mass%MG/1mass%クエン酸を混練液とした場合には CPC 混練体の硬化時間は遅延し、3mass%MG/2mass%クエン酸の場合、大幅な硬化時間の短縮が確認されたため、本研究ではクエン酸濃度を 2mass%に決定した。

Fig. 4.3.2.1 に、DW、3mass%MG 及び MG/CA を用いた CPC 混練体の硬化時間を示す。3mass%MG を用いた CPC 混練体の硬化時間は、DW の場合と比べて、著しい遅延が認められたが、混練液へのクエン酸の添加により約 20 分に短縮され、臨床使用において問題ないと思われる特性を示した。

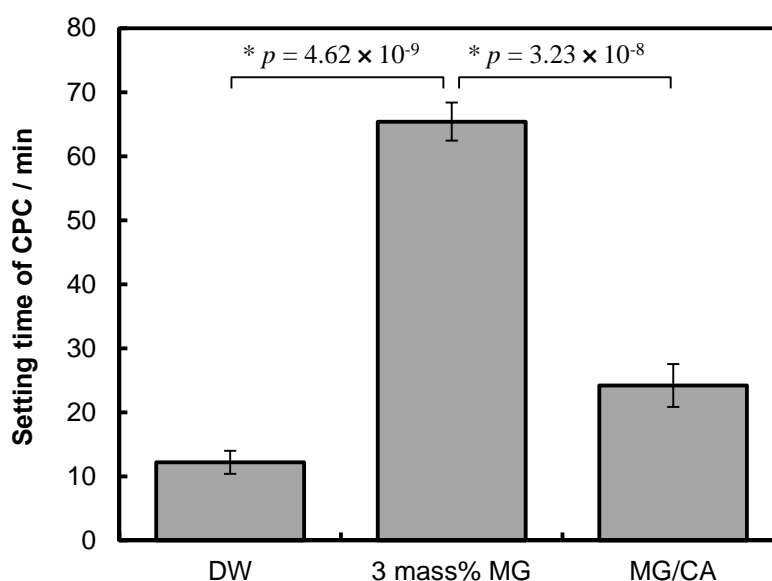


Fig. 4.3.2.1. Setting time of CPC pastes mixed with DW, 3 mass% MG, and MG/CA. Data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements. Significant differences by Student's *t*-test were established as follows: $*p < 0.05$.

Fig. 4.3.2.2 に、DW、3mass%MG 及び MG/CA を用いた CPC 硬化体の 24 時間、SBF 浸漬後の圧縮強度を示す。混練液に MG を添加することにより達成した CPC 硬化体の高い圧縮強度は、クエン酸を添加した場合も影響なく、80MPa を維持することが可能であった。

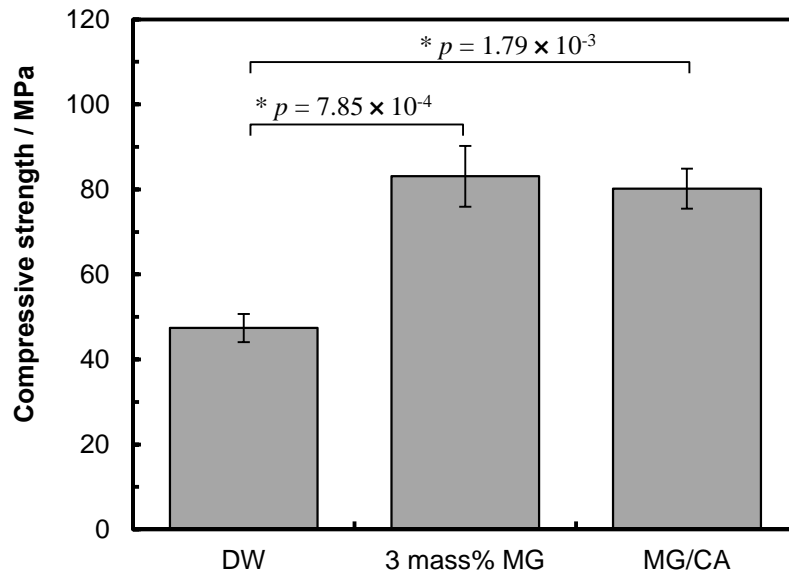


Fig. 4.3.2.2. Compressive strengths of CPC setting bodies after SBF soaking at 37°C for 24 h, which was mixed with DW, 3 mass% MG, and MG/CA; data represent average values with associated standard deviations obtained from five measurements. Significant differences by Student's *t*-test was established as follows: **p* < 0.05

Fig. 4.3.2.3 に、DW、3mass%MG 及び MG/CA を用いた CPC 硬化体の破面の SEM 像を示す。DW を用いた CPC 硬化体の破面には数十 μm の空隙が観察されたが、3mass%MG 及び MG/CA を用いた CPC 硬化体には同様の空隙は観察されなかった。

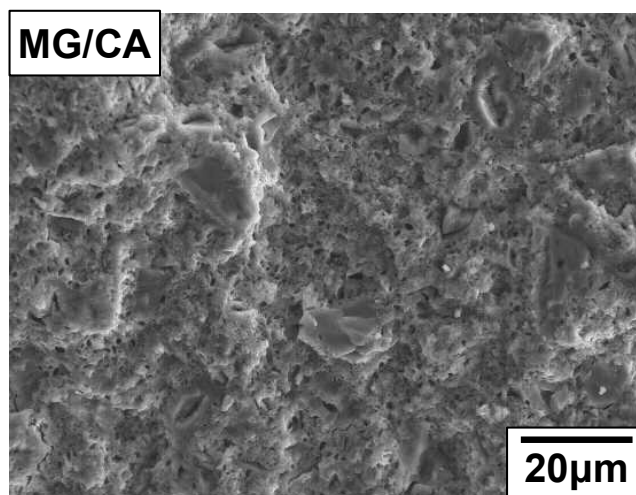
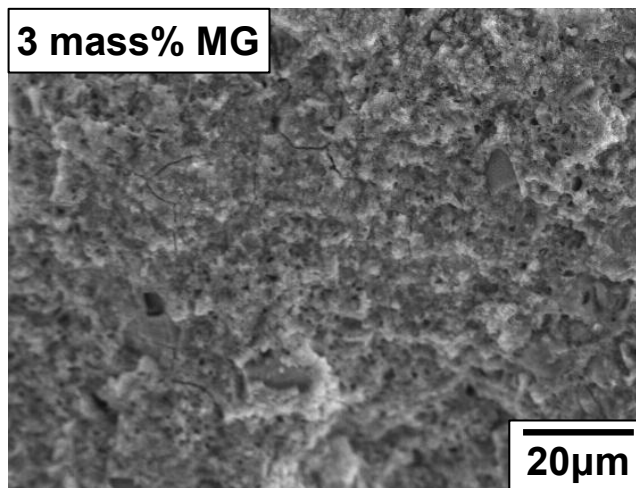
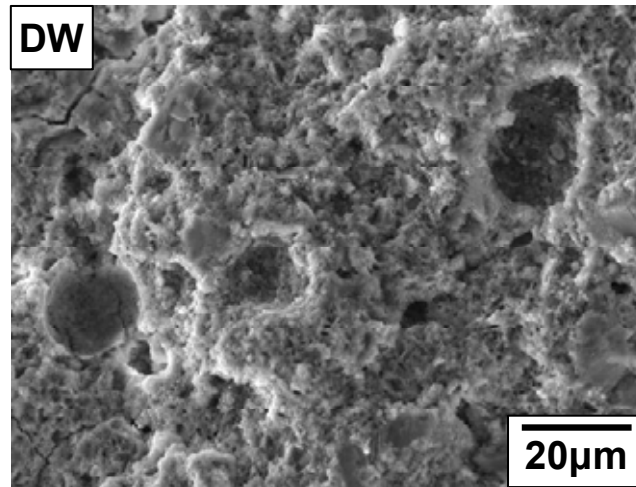


Fig. 4.3.2.3. SEM images of CPC setting bodies after SBF soaking at 37°C for 24 h, and mixing with DW, 3 mass% MG, and MG/CA

4.4 考察

MG を用いた CPC 混練体は、DW で混練可能な液量(液 / 粉 重量比=0.25)よりも少ない液量(液 / 粉 重量比=0.21)でも高い稠度を示し、Fig. 4.3.1.1 に示した通り、MG 濃度の増加と共に稠度の上昇が認められた。本章で示した CPC 混練体の稠度は、一般的な無機材料における分散性の指標となるスラリーの粘度に相当する²⁵⁾。従って、MG 濃度による CPC 混練体の稠度の上昇は、メグルミンが CPC 粉体の分散性の向上に寄与していることを示しているものと考えられる。また、Table. 4.3.1.1 に示す様に、DCPA 及び TeCP のゼータ電位の絶対値は、DW 中に比べ、3mass%MG 中の方が高く、その値は TeCP に比べ DCPA の方が高かった。ゼータ電位の評価に用いた DCPA の粒径(D_{50} 1.37 μm : 実測値)は TeCP の粒径(40.5 μm)よりも小さく、すなわち TeCP よりも DCPA の方が大きな比表面積を持つ。そのため、メグルミンの吸着量が多くなったと推察され、その結果、メグルミンに起因するゼータ電位の影響は DCPA の方が強くなり、DCPA のゼータ電位はメグルミン(-34.2mV : 実測値)に近い値を示したと思われる。また、3mass%MG の pH は 11.4(実測値)であり、更に TeCP 及び DCPA を分散させた状態でも高い pH を維持していた。pH の上昇により粒子の表面電位が負に大きくなる傾向があることが知られており^{25),26)}、分散性の向上が pH の上昇による可能性も考えられた。

24 時間、SBF に浸漬後の CPC 硬化体の嵩密度は、DW、3mass%MG 及び MG/CA でそれぞれ 1.95、2.04 及び 2.07 $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ を示した。更に、Fig. 4.3.2.3 に示した通り、DW を用いた CPC 硬化体には空隙が存在するのに対し、3mass%MG 及び MG/CA を用いた CPC 硬化体には同様の空隙はほとんど認められなかった。これらの結果から、CPC 硬化体の強度の上昇は、CPC 硬化体に存在する空隙の減少に伴う嵩密度の上昇に起因するものであり、また、空隙の減少は、混練に用いた液量の低減及び稠度の上昇により、混練時に生じる空隙が減少したためと考えられた。

一方、本章における結果では、MG を用いた混練において水和反応の遅延が確認された。TeCP

と DCPA からなる CPC の水和反応は、各々の溶解によって混練液中に Ca^{+} 及び PO_4^{3-} が供給され、HA の溶解度に対して過飽和となることで HA を析出するものであるが、この反応は中性領域において最も促進される²⁷⁾。3mass%MG は pH11.0 を超えるアルカリ性であるが、この環境下では TeCP 及び DCPA の溶解度は低下する²⁸⁾ため、これを混練液に用いた場合、CPC 粉体からの Ca^{+} 及び PO_4^{3-} の供給が HA 生成には不十分となり、硬化開始の遅延に繋がったと考えられる。しかしながら、3mass%MG を混練液に用いた CPC 硬化体でも、SBF への浸漬時間の増加に伴い、HA 生成は進行した。これは、SBF の緩衝作用により浸漬時間の進行と共に pH が中性領域に移行し、TeCP 及び DCPA の溶解が進み、HA 生成に必要な Ca^{+} 及び PO_4^{3-} の供給が促進されると共に、HA の溶解度に対する過飽和度の上昇が生じたため、水和反応が進行し、24 時間後では強度発現に十分な HA の生成に至ったものと考えられる。一方、CPC の引張強度が HA の生成量に依存すると報告されているが²⁹⁾、本章における結果では、MG を用いた CPC 硬化体は、HA の生成量に関係なく、DW を用いた CPC 硬化体より 24 時間、SBF 浸漬後に高い圧縮強度を示した。これは HA 生成の促進によるものではなく、破壊起点となる空隙の減少が大きく影響したためと考えられた。

クエン酸を混練液に添加することによる CPC の硬化時間短縮は、 Ca^{+} とのキレート形成によると報告されており²²⁾、本章の結果における硬化時間の短縮も同様のメカニズムによると考えられる。以上の結果、MG/CA を CPC の混練液とすることにより、高強度かつ短時間で硬化が可能な CPC の調製に至った。

4.5 まとめ

メグルミンを用いた CPC における硬化体の圧縮強度への影響を検討した。MG を混練液とした CPC 混練体は少ない混練液量でも高い稠度を示し、MG 濃度の増加に伴い、CPC 硬化体の圧縮強度は上昇し、これは CPC 硬化体の嵩密度の上昇とも相関が認められた。これらは、CPC 粉体表面へのメグルミンの吸着に起因した CPC 粉体の分散性の向上によるものと考えら

れた。一方、MG を用いた CPC 混練体は、DW を用いた場合と比較し、硬化時間が遅延した。これは MG の高い pH により CPC の水和反応開始に遅延が生じたためと考えられた。しかしながら、硬化時間に対しては、混練液にクエン酸を更に添加することによって短縮し、最適化が可能であった。本章における検討の結果、メグルミンを用いた CPC は高強度且つ適切な硬化時間を有し、臨床応用に向けて優れた特性を示すに至った。

参考文献

- 1) Mattsson P, Alberts A, Dahlberg G, Sohlman M, Hyldahl HC, Larsson S. Resorbable cement for the augmentation of internally-fixed unstable trochanteric fractures: a prospective, randomised multicentre study. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87B:1203–9.
- 2) Nakano M, Hirano N, Ishihara H, Kawaguchi Y, Matsuura K. Calcium phosphate cement leakage after percutaneous vertebroplasty for osteoporotic vertebral fractures: risk factor analysis for cement leakage. *J Neurosurg Spine.* 2005;2:27–33.
- 3) Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cement: mechanical and physical properties. *Orthop Clin North Am.* 2005;36:29–39.
- 4) Arora M, Chan EKS, Gupta S, Diwan AD. Polymethylmethacrylate bone cements and additives: a review of the literature. *World J Orthop.* 2013;4:67–74.
- 5) Ambard AJ, Mueninghoff L. Calcium phosphate cements: review of mechanical and biological properties. *Prostodont.* 2006;15:321–8.

- 6) Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancr  t F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2014;10:1035–49.
- 7) Barinov SM, Komlev VS. Calcium phosphate bone cements. *Inorg Mater.* 2011;47:1470–85.
- 8) Xu HHK, Eichmiller FC, Barndt PR. Effects of fiber length and volume fraction on the reinforcement of calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med.* 2001;12:57–65.
- 9) Zhang Y, Xu HHK. Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement. *J Biomed Mater Res A.* 2005;75A:832–40.
- 10) Barralet JE, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR, Knowles JC. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res.* 2002;63:1–9.
- 11) Burguera EF, Xu HHK, Sun L. Injectable calcium phosphate cement: effects of powder-to-liquid ratio and needle size. *J Biomed Mater Res B.* 2008;84B:493–502.
- 12) Sawamura T, Mizutani Y, Okuyama M, Kasuga T. Setting time and formability of calcium phosphate cements prepared using modified dicalcium phosphate anhydrous powders. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25:1631–6.

- 13) Sawamura T, Mizutani Y, Okuyama M, Obata A, Kasuga T. Compressive strength of calcium phosphate cements prepared using different initial setting temperatures. *J Ceram Soc Japan*. 2014;123:59–61.
- 14) Mehta PK. Advancements in concrete technology. *Concr Int*. 1999;21:69–76.
- 15) Li CZ, Feng NQ, Li YD, Chen RJ. Effects of polyethylene oxide chains on the performance of polycarboxylate type water reducers. *Cem Concr Res*. 2005;35:867–73.
- 16) Visser J. Particle adhesion and removal: a review. *Particul Sci Technol*. 1995;13:169–96.
- 17) Collepardi M, Valente M. Recent developments in superplasticizers. In Malhotre VM, editor. *American Concrete Institute: special publication, 8th CANMET/ACI International Conference on Superplasticizers and Other Chemical Admixtures in Concrete*; 2006. pp. 1–14.
- 18) Jiang B, Zhou S, Ji H, Liao B, Pang H. Dispersion and rheological properties of ceramic suspensions using linear polyacrylate copolymers with carboxylic groups as superplasticizer. *Colloids Surf A*. 2012;396:310–6.
- 19) Dos Santos LA, Carrodeguas RG, Boschi AO, De Arruda ACF. Dual-setting calcium phosphate cement modified with ammonium polyacrylate. *Artf Organs*. 2003;27:412–8.

- 20) Herborn CU, Honold E, Wolf M, Kemper J, Kinner S, Adam G, Barkhousen J. Clinical safety and diagnostic value of gadolinium chelate gadoterate meglumine (Gd-DOTA). *Invest Radiol.* 2007;42:58–62.
- 21) Deray G, Rouviere O, Bacigalupo L, Maes B, Hannedouche T, Vrtovsni F, Rigother C, Billiow JM, Campioni P, Ferreiros J, Davos D, Alison D, Glowacki F, Boffa JJ, Marti-Bonmati L. Safety of meglumine gadoterate (Gd-DOTA)-enhanced MRI compared to unenhanced MRI in patients with chronic kidney disease (rescue study). *Eur Radiol.* 2013;23:1250–9.
- 22) Wang X, Ye J, Wang H. Effects of additives on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate bone substitute material. *J Biomed Mater Res B.* 2006;78B:259–64.
- 23) Kokubo T, Takadama H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials.* 2006;27:2907–15.
- 24) Takahashi K, Fujishiro Y, Yin S, Sato T. Preparation and compressive strength of α -tricalcium phosphate based cement dispersed with ceramic particles. *Ceram Int.* 2004;30:199–203.
- 25) Adachi N, Sakurada O, Hashiba M. Ceramic processing using aqueous suspension. *J Soc Inorg Mater Japan.* 2005;12:463–71. [in Japanese]

- 26) Reed JS. Principles of ceramics processing. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1995. pp. 150–69.
- 27) Wang JC, Koa CL, Hung CC, Tyan YC, Lai CH, Chen WC, Wang CK. Deriving fast setting properties of tetracalcium phosphate/dicalcium phosphate anhydrous bone cement with nanocrystallites on the reactant surfaces. J Dent. 2010;38:158–65.
- 28) Chow LC, Takagi S, Constantino PD, Friedman CD. Self-setting calcium phosphate cements. Mat Res Soc Symp Proc. 1991;179:3–24.
- 29) Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H, Sawada M, Nagayama M, Kon M, Asaoka K. In vivo setting behavior of fast-setting calcium phosphate cement. Biomaterials. 1995;16:855–60.

第5章 ポリヒドロキシアリカノエート短繊維を用いた CPC の力学特性の向上に関する研究

5.1 緒言

CPC は生体親和性および形態付与性を有する為、様々な生体適用材料として用いられている。CPC はリン酸カルシウム粉体と純水から構成され、自己硬化反応と共に HA を形成する¹⁾。しかしながら、脆性が強く、荷重部位における骨欠損への適用は制限される²⁾。これに対し、CPC の破壊靱性及び強度と言った機械的特性を向上する為に、繊維強化が提案されている^{3), 4)}。

ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール酸(PGA)やこれらの共重合体、並びにポリカプロラクトン(PCL)などのポリエステル繊維は生分解性および生体親和性を示すため、広く補強材として用いられている。生分解性ポリエステルであるポリヒドロキシアリカノエート(PHA)は特殊な条件下において微生物によって産出され⁵⁾、優れた生体親和性を有することから、生体材料の用途に適しており^{6), 7)}、ポリ(3-ヒドロキシ酪酸)(P3HB)、ポリ(4-ヒドロキシ酪酸)(P4HB)及び 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシバレレート(3HBV)の共重合体(PHBV)が検討されている。

PH3B と PH4B から構成される共重合体(P(3HB-co-4HB))は、混合化合物の量に影響されることなく優れた伸長性を示す⁸⁾。この P(3HB-co-4HB)の独特な特性は、従来の CPC の機械的特性を向上させるための理想的な補強材となり得ると考えられるが、これまでに CPC と P(3HB-co-4HB)の複合化に関する研究はされていない。繊維強化 CPC の機械的特性は繊維の量及び長さに影響されることが知られている。また、繊維の量の増加は CPC の混練性や濡れ性に影響を及ぼすと考えられる。本研究では、P(3HB-co-4HB)、ポリ-L-乳酸(PLLA)及び乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)を用いた CPC の強化を試み、同じ長さの繊維を CPC に少量加え、CPC の機械的特性に対する異なった生分解性高分子の影響を検討した。

5.2 実験方法

2 章の結果に従い、67.5g の TeCP と 32.5g の DCPA を混合して得られた CPC 粉体に、3 種類の生分解性繊維を添加した。4HB を 18mol% とした P(3HB-*co*-4HB) (G5, Japn)、PLLA(LACEA®, Mitsui Chemicals, Inc, Japan) 及び PGA を 50mol% とした PLGA(Purasorb®, Corbion) をクロロホルムに溶解し、高分子溶液(5-10mass%) を調製した。各々の溶液を、ステンレス製キャピラリーチューブ (18 または 22 ゲージ) を用いて、エタノールに一定の速度で注入し、大気中、70rpm で攪拌し、直径 約 40 μ m の繊維を作製した。過去の論文で示された寸法に従い⁹⁾、この繊維をはさみで 3mm に切断した。ヒドロキシプロピルセルロースをゲル化剤として含有した CPC において、長さ 5mm の PGA 繊維を 2.5% 及び 7.5% 以下の体積含有率で複合化した場合でも良好な注入性を示したと報告されている¹⁰⁾。本研究では CPC 混練体の注入性を確保する為、CPC 粉体への繊維の添加量を 3vol% とし、各々の繊維を CPC 粉体と混合した。繊維と CPC 粉体の混合物と純水を、混合物/液比=4/1(体積比) で混練し、得られた混練体を 3 \times 4 \times 25mm 及び内径 6mm、高さ 12mm のポリテトラフルオロエチレンの型に充填した後、37 $^{\circ}$ C、相対湿度 100% で 24 時間、硬化させた。(これ以降、P(3HB-*co*-4HB)、PLGA 及び PLLA の繊維を含んだ CPC 硬化体を、それぞれ P(3HB-*co*-4HB)/CPC、PLGA/CPC 及び PLLA/CPC と記す) 比較の為、高分子繊維を含まない CPC を対照試料とした。

試料の結晶相は X 線回折(XRD)により解析し、シリコンを標準として校正した。抗折強度及び圧縮強度は試料の三点曲げ試験 (寸法 3 \times 4 \times 25mm) 及び圧縮試験 (寸法 内径 6mm、高さ 12mm) によりそれぞれ算出し、試験条件は荷重速度 1.0mm/min、最大変位 3mm とした。また、試料の嵩密度を体積と重量から算出した。更に、試料破面の形態観察には走査型電子顕微鏡(SEM)を用いた。いずれも 5 点以上の評価を行った。

5.3 結果および考察

Fig. 5.3.1. (a)に、24 時間後の CPC 硬化体の XRD パターンを示す。HA に帰属するピーク

と、粉体成分である TeCP と DCPA に帰属するピークが観察された。硬化中の HA の形成を評価する為、シリコンに対する HA のピーク積分比($I_{HA(002)}/I_{Si(111)}$)を算出した。 $I_{HA(002)}$ 及び $I_{Si(111)}$ は、それぞれ約 25.8° (HA(002))及び 28.3° (Si(111))のピークの積分を示し、それぞれの XRD パターンはフォークト関数の最小二乗法により求めた。CPC 粉体及び f-CPC 粉体と純水の混練開始からの経過時間に対するピーク積分比を Fig. 5.3.1. (b)に示す。に対する HA の形成比は、すべての試料において同様の傾向を示し、有意差は認められなかった。また、HA の形成比は経過時間の延長に伴い対数的な増加を示した。一方、TeCP 及び DCPA の量は混練開始から 8 時間後までは急速に減少し、それ以降の減少は緩やかであった。これらの結果は、CPC への繊維の添加は CPC の硬化反応に影響しないことを示すものであった。

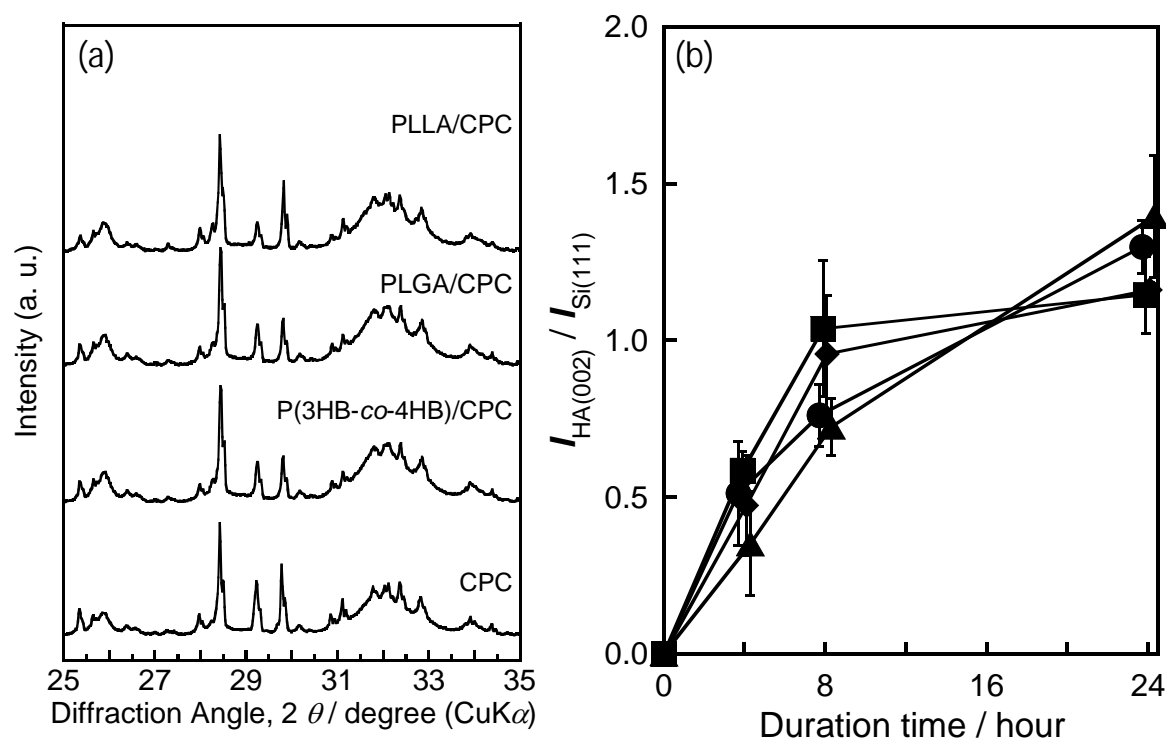


Fig. 5.3.1. (a) XRD pattern of the samples after 24 h of hardening. (Δ) TeCP, (\diamond) DCPA, (\circ) HA, and (\bullet) silicon. (b) Relationship between $I_{HA(002)}/I_{Si(111)}$ ratio for CPC (\bullet), P(3HB-co-4HB)/CPC (\blacksquare), PLGA/CPC (\blacktriangle) and PLLA/CPC (\blacklozenge), and the duration time.

Fig. 5.3.2 に、強度試験における各試料の荷重-歪み曲線を示す。CPC、P(3HB-*co*-4HB)/CPC、PLGA/CPC 及び PLLA/CPC の最大抗折強度はそれぞれ、 11.3 ± 1.2 、 12.8 ± 2.4 、 11.8 ± 2.4 及び 13.1 ± 1.6 MPa であり、いずれも同様な弾性率を示した。CPC に Vicryl®(polyglactin910) を添加した場合は、未添加の場合よりも高い強度を有しており、複合化による高強度化が示されている¹¹⁾。CPC と繊維の結合に対しては濡れ性が重要な因子となる。CPC と複合化した高分子が親水性の場合、CPC と高分子の表面結合が改善し、機械的強度の向上に繋がると報告されている¹²⁾。今回の研究の事前検討において、ゲルキャスト法によって作製した P(3HB-*co*-4HB)、PLGA 及び PLLA フィルムの接触角を、液滴法によって評価した結果、 $80 \sim 100^\circ$ であった。CPC、P(3HB-*co*-4HB)/CPC、PLGA/CPC 及び PLLA/CPC の嵩密度はそれぞれ 2.39 ± 0.11 、 2.26 ± 0.08 、 2.33 ± 0.08 及び $2.28 \pm 0.06 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ であった。今回の結果からは、高分子繊維との複合化は最大曲げ強度や弾性率への影響は認められなかった。これは、硬化体の嵩密度及び高分子の接触角に大きな差がなかったためと考えられた。また、繊維の体積含有量を 3～10%に変化させた場合も硬化体のほぼ同様の機械的強度を示し、混練体の注入性を確保するためにも 3vol%の繊維量が最適であると考えられた。

高分子繊維を含まない CPC は脆性破壊を示したが、一方、繊維強化した CPC は最大強度に達した後、異なった破壊挙動を示した。P(3HB-*co*-4HB)/CPC 及び PLGA/CPC は最大歪みに到達後も 1MPa 以上の強度を維持した。また、PLLA/CPC の強度は、歪みが約 15%に達するまで徐々に低下した。荷重-変異曲線の下部面積を試料の断面積で割った値を破壊仕事量

(WOF)¹³⁾として算出した結果、繊維を添加していない CPC の WOF は脆性が高いため、 $28 \pm 4 \text{ J/m}^2$ と低く、一方、P(3HB-co-4HB)/CPC、PLGA/CPC 及び PLLA/CPC はそれぞれ 341 ± 236 、 315 ± 213 及び $518 \pm 201 \text{ J/m}^2$ となり、繊維を複合化した CPC は高い WOF を示した。

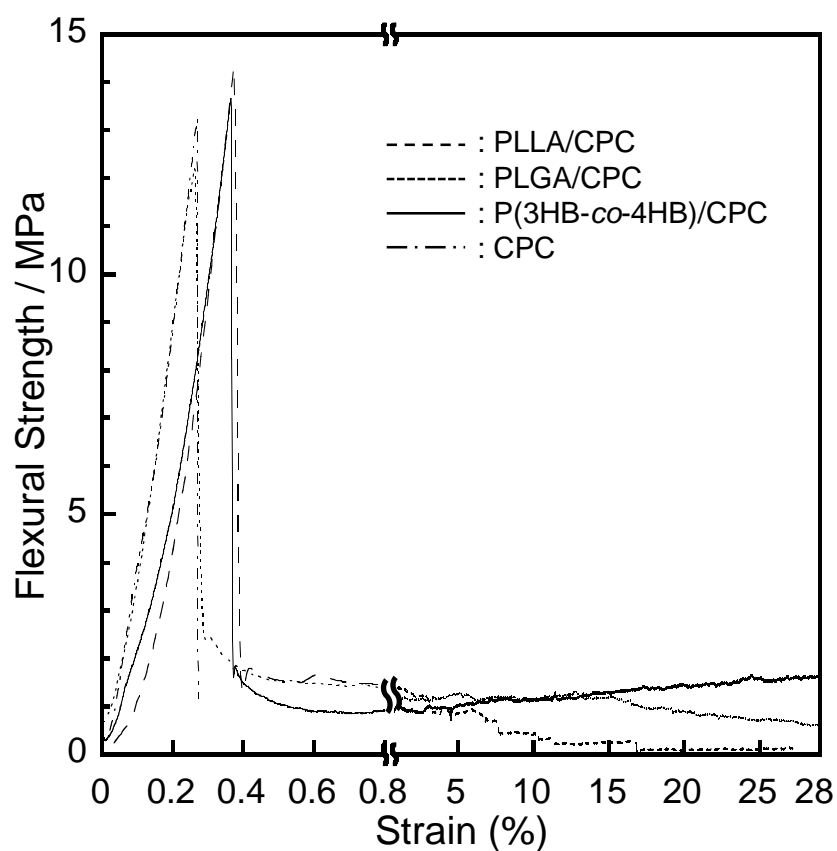


Fig. 5.3.2. Stress-strain curves of CPC, P(3HB-co-4HB)/CPC, PLGA/CPC and PLLA/CPC for the flexural strength test.

Fig. 5.3.3 に、最大変位で強度評価後の硬化体の試料破面の SEM 像を示す。Fig. 5.3.3.(a) に示す様に、P(3HB-*co*-4HB)/CPC では、最大変位後もほとんどすべての P(3HB-*co*-4HB)繊維がクラックを跨いで繋がっていた。一方、PLGA/CPC の場合、一部の PLGA 繊維の破断が観察された。P(3HB-*co*-4HB)/CPC 及び PLGA/CPC において、それぞれの繊維が延性が高いため、抗折試験における引張応力より伸びあるいは捻れが観察された。これらの結果、これらの硬化体は最大歪み後も 1MPa 以上の強度を維持したと考えられた。高分子溶液製膜法によって作製した P(3HB-*co*-4HB)及び PLGA フィルムの引張強度は 8.4 ± 1.9 及び 2.3 ± 0.3 MPa であり、ガラス転移温度は P(3HB-*co*-4HB)(<0)の方が PLGA($45 \sim 55$)よりも低いことを確認している。CPC の硬化は P(3HB-*co*-4HB)のガラス転移温度よりも高い温度で行われており、その結果、他の試料と比較し、P(3HB-*co*-4HB)繊維と CPC の界面で、より密な接着が生じたものと考えられた。また、硬化体のクラックに存在する破断した繊維の量は、複合化した高分子の引張強度及びガラス転移温度に依存したものと推察された。一方、PLLA/CPC においては、PLLA は弾性率が高くかつ伸張性が低いため、クラック内のほとんどの PLLA 繊維が破断し、結果として PLLA/CPC は P(3HB-*co*-4HB)/CPC 及び PLGA/CPC よりも高い WOF を示したと考えられた。また、P(3HB-*co*-4HB)/CPC に生じたクラックの幅は、他の硬化体に対して最も狭く、多くの P(3HB-*co*-4HB)繊維がクラックを繋ぎ止めることにより、破壊の進行が妨げられたと考えられた。

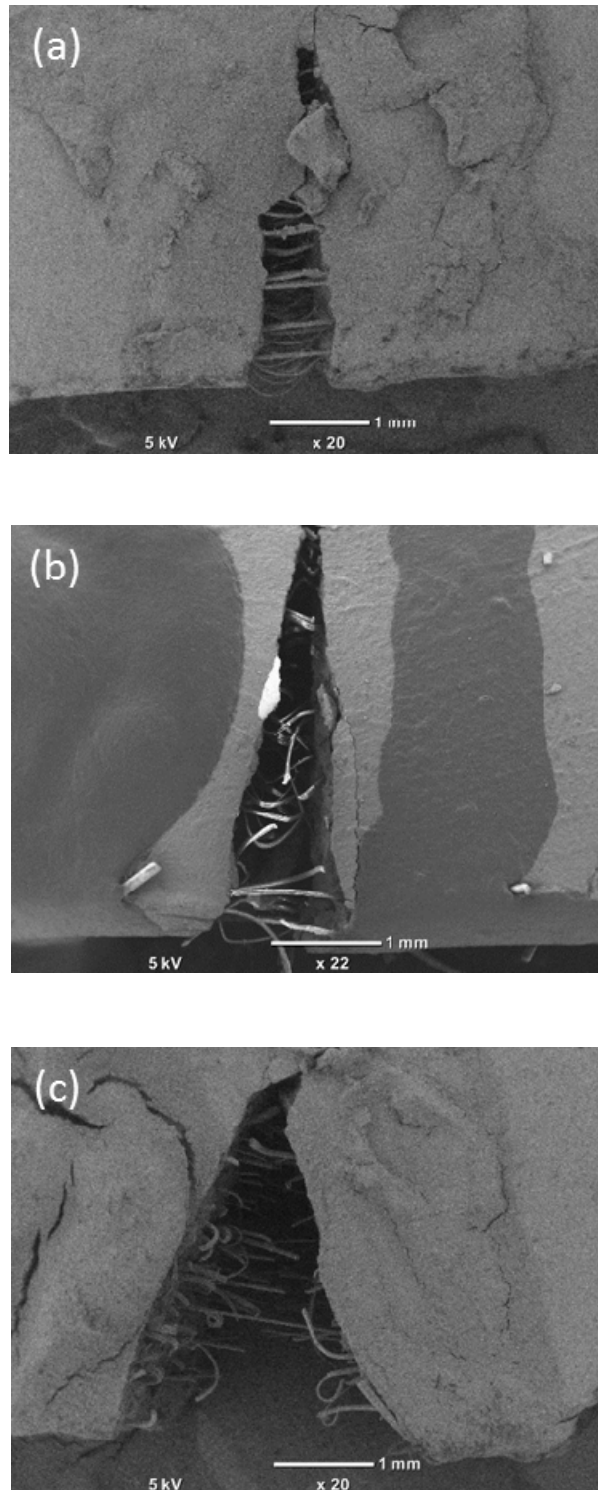


Fig. 5.3.3. SEM images of the fracture face of (a) P(3HB-co-4HB)/CPC, (b) PLGA/CPC and (c) PLLA/CPC after the maximum displacement.

CPC の崩壊抑制に対して、クラックに生じる繊維のブリッジング効果を評価する為に、繊維複合化 CPC 硬化体の 5%歪み及び 25%最大歪みにおける圧縮強度試験を行った。Fig. 5.3.4 に示す通り、5%歪みの場合、すべての試料が、クラックは生じるものの円柱形状を維持していた。一方、25%歪みにおいては、P(3HB-*co*-4HB)で強化した CPC は円柱形状を維持したが、PLLA 及び PGA 繊維で強化した CPC は、いずれも試験後に崩壊した。CPC に 3vol%の P(3HB-*co*-4HB)繊維を導入した結果、クラックに対してブリッジングが生じ、形状の崩壊抑制に繋がると考えられた。ヒアルロン酸ナトリウムを添加した 3vol% PLGA 繊維強化 CPC は構造再建性に優れることが報告されている¹⁴⁾。今回の試験条件では P(3HB-*co*-4HB)によって強化された CPC は添加剤を用いることなく構造再建性に優れることが確認され、P(3HB-*co*-4HB)繊維が CPC の強化に有効であることが示唆された。

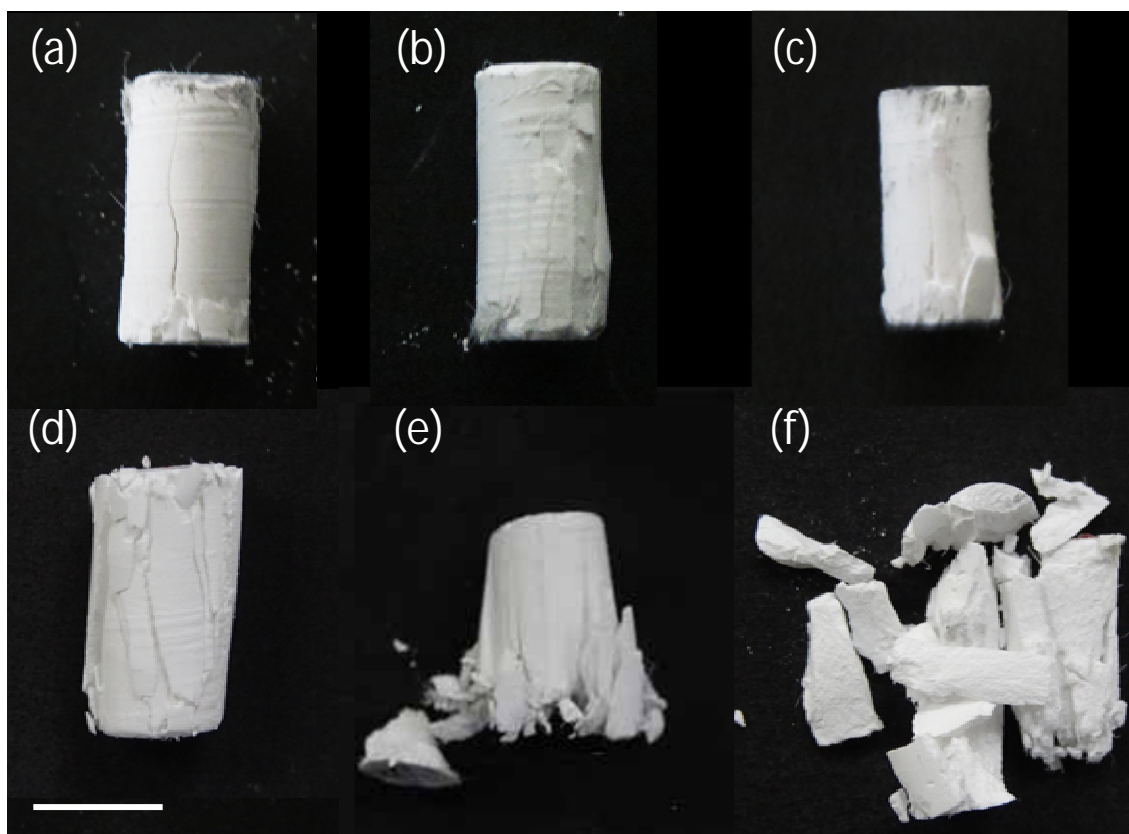


Fig. 5.3.4. Appearance of (a, d) P(3HB-co-4HB)/CPC, (b, e) PLGA/CPC and (c, f) PLLA/CPC after the compressive tests at (a-c) 5% and (d-f) 25% of the maximum strain. Bar scale shows 5 mm.

5.4 まとめ

生分解性 P(3HB-*co*-4HB)、PLGA 及び PLLA 繊維との複合化により、CPC の総合的な力学特性の向上を検討した。繊維の添加による HA 形成への影響は認められなかった。機械的試験において、高分子繊維の種類に関わらず、全ての繊維複合化 CPC は同様の抗折強度及び弾性率を示した。曲げ試験において、P(3HB-*co*-4HB)繊維で複合化した CPC は最大変位後も、ほとんどの繊維がクラックに対するブリッジングを示した。この様にブリッジングした P(3HB-*co*-4HB)繊維の存在が、圧縮試験における CPC の崩壊を抑制したものと考えられた。

参考文献

- 1) Brown WE, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and pastes as mineralizers and cements. 1986: U.S. Patent No. 4,612,053.
- 2) Böhner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials*. 2005;26:6423-29.
- 3) Xu HHK, Eichmiller FC, Giuseppetti AA. Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers. *J Biomed Mater Res*. 2000;52:107-14.
- 4) Canal C, Ginebra MP, Fiber-reinforced calcium phosphate cements: A review. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2011;4:1658-71.

- 5) Li HY, Du RL, Chang J. Fabrication, characterization, and in vitro degradation of composite scaffolds based on PHBV and bioactive glass. J Biomater Appl. 2005;20:137-55.
- 6) Chen GQ, Wu Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. Biomaterials. 2005;26:6565-78.
- 7) Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate). Macromolecules. 1995;28:4822-8.
- 8) Saito Y, Doi Y. Microbial synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Comamonas acidovorans. Int J Biol Macromol. 1994;16:99-104.
- 9) Zuo Y, Yang F, Wolke JGC, Li Y, Jansen JA. Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration. Acta Biomater. 2010;6:1238-47.

- 10) Xu HHK, Weir MD, Burguera EF, Fraser AM. Injectable and macroporous calcium phosphate cement scaffold. *Biomaterials*. 2006;27:4279-87.
- 11) Zhang Y, Xu HH. Effects of synergistic reinforcement and absorbable fiber strength on hydroxyapatite bone cement. *J Biomed Mater Res A*. 2005;75:832-40.
- 12) Lin JP, Zhang SN, Chen T, Liu CS, Lin SL, Tian XH. Calcium phosphate cement reinforced by polypeptide copolymers. *J Biomed Mater Res B*. 2006;76B:432-9.
- 13) Xu HHK, Ostertag CP, Braun LM, Lloyd IK. Short-crack mechanical properties and failure mechanisms of Si_3N_4 -matrix/SiC-fiber composites. *J Am Ceram Soc*. 1994;77:1889-96.
- 14) Losquadra WD, Tatum SA, Allen MJ, Mann KA. Polylactide-co-glycolide fiber-reinforced calcium phosphate bone cement *Arch Facial Plast Surg*. 2009;11:104-9.

第 6 章 総括

高齢化社会において Quality of life(生活の質)の向上が求められており、骨治療において、骨の無機成分である HA を用いた骨補填材が臨床に用いられているが、症例毎で異なった形状を呈する骨欠損部に対応するためには、カスタムメイドにより骨欠損部の形状にあったものを術前に作製するか、または手術時の加工が必要となる。これに対して、リン酸カルシウムの水和硬化を応用した CPC の研究が進められ、現在、整形外科分野を始めとして様々な骨治療に臨床応用されているが、実際に有効かつ安全な骨補填材として用いられるためには、臨床使用を想定した以下のような特性を満足する必要がある¹⁾⁻⁵⁾。

形態付与性

混練～補填操作に必要な時間の確保(室温環境における硬化反応の緩和)

骨欠損部へ補填後の迅速な硬化(体内環境における硬化反応の促進)

骨と同等以上の強度及びその早期発現

血液接触時の崩壊抑制

本研究では、これらの課題に対して CPC の特性向上を目的に、リン酸カルシウム粉体として TeCP/DCPA 系⁶⁾⁻⁸⁾を選択し、リン酸カルシウム粉体の特性による硬化時間及び形態付与性の制御を試み、また、得られたリン酸カルシウム粉体に対して初期硬化における温度条件による硬化反応及び強度特性への影響を評価した。更に減水剤を用いることによる高強度化並びに生分解性高分子短繊維との複合化による強化についても試みた。以下に各章の主要な結果あるいは成果についてまとめた。

第 2 章では、CPC 粉体の原料として 2 種類の DCPA を調製し、得られた CPC 粉体の硬化時間及び形態付与性を評価することにより、DCPA の粉体特性の違いによる CPC の特性への影響を検討した。その結果、DCPA の粉体特性を制御することにより、短時間で硬化すると共

に、水分量を増加することなく優れた形態付与性を有する CPC を見出した。DCPA 原料を純水中、若しくはエタノール中で粉碎後、乾燥することにより 2 種類の DCPA を調製し(純水粉碎した試料を W-DCPA、エタノール粉碎した試料を E-DCPA と記す)、これらを CPC 粉体の原料として用いた。得られた結果及び成果を以下に記す。

- DCPA は、粉碎時間の増加に伴い、平均粒子径の減少及び比表面積の増加が認められたが、同じ平均粒子径を比較した場合、W-DCPA の比表面積は E-DCPA よりも常に小さいことが確認された。
- E-DCPA は一次粒子が分散しているのに対し、W-DCPA は一次粒子の凝集による二次粒子の形成が観察された。
- CPC 混練体の硬化時間は、DCPA の平均粒子径に依存し、DCPA が細かいほど短縮した。
- W-DCPA を用いた CPC 混練体は、少ない混練液量でも、高い稠度と良好な形態付与性を示した。
- これらは DCPA の微細化による溶解性の向上と、DCPA 微細粒子の凝集体である

W-DCPA を用いたことによる CPC 粉体の充填密度の上昇に起因するものと考えられた。

以上の結果から、CPC 粉体原料として W-DCPA を用いることにより、CPC の硬化時間の短縮及び形態付与性の向上が示され、骨補填材として臨床使用における有効性に繋がることが期待できる。

第 3 章では、第 2 章で得られた CPC に対して、初期硬化の過程で異なった温度で加熱することにより、CPC 混練体の成形後の形状の維持を試み、その加熱温度による CPC 硬化体の圧縮強度及び水和反応への影響を検討した。その結果、初期加熱温度の上昇に伴い、初期硬化後の CPC の圧縮強度は上昇することを見出した。得られた結果及び成果を以下に記す。

- CPC 硬化体は、初期加熱後では、温度の上昇に伴い高い圧縮強度を示したが、37 の

SBF に 24h 浸漬後は、温度の上昇と共に、圧縮強度の上昇が抑制された。

- CPC 硬化体の圧縮強度は、XRD における HA ピーク比の増加に伴い、上昇する傾向にあった。
- これらは、高温での初期加熱による DCPA 及び TeCP の溶解度の上昇に伴う、CPC の HA 形成の促進と、SBF 中における水和反応の遅延によるものと考えられた。

以上の結果から、CPC の初期加熱は、CPC 混練体の形状を維持した状態で、骨欠損部へ補填することを可能とし、補填後の崩壊抑制が期待できるが、水和反応の抑制にも繋がることを示した。

第 4 章では、第 2 章で得られた CPC に対して、アミノアルコールであるメグルミンが CPC 混練体中での CPC 粉体の分散に寄与することにより、混練に必要な液量の低減及びこれによる硬化体の嵩密度の上昇を期待し、混練液へのメグルミン添加による CPC の高強度化を試みと共に、アルカリ性であるメグルミンによる水和反応の遅延を想定し、CPC の硬化時間短縮が報告されている⁹⁾クエン酸を更に添加することにより硬化時間の最適化を検討した。その結果、CPC に対してメグルミンが減水剤として作用することを見出し、高強度且つ適切な硬化時間を有し、臨床応用に向けて優れた特性を示す CPC の創出に至った。得られた結果及び成果を以下に記す。

- 混練液へのメグルミンの添加により、CPC 混練体は、純水での混練時より低い混練液量でも高い稠度を示し、外観的に形態付与性に優れていることを確認した。
- 混練液のメグルミン濃度の増加に伴い、CPC 硬化体の嵩密度は上昇し、また同様に圧縮強度も上昇し、SBF に 24h 時間浸漬後の圧縮強度は 83.1MPa に達した。
- 混練液へのメグルミン添加により著しい硬化時間の遅延が認められたが、更にクエン酸を添加することにより、CPC 混練体の硬化時間は約 20 分に短縮され、臨床使用において問題ないと思われる特性を示した。また、その際の CPC 硬化体の圧縮強度は、メグ

ルミンのみを添加した際と同等であることを確認した。

以上の結果から、メグルミンを用いた CPC は、骨と同等以上の強度を早期に発現し、また、適切な硬化時間を有しており、臨床使用において有用な骨補填材とし期待できることを示した。

第 5 章では、第 2 章で得られた CPC に対して、生分解性高分子繊維を補強材として用いた機械的特性の向上を試み、P(3HB-co-4HB)、PLGA 及び PLLA の繊維を複合化した CPC の水和反応及び抗折試験並びに圧縮試験における破壊挙動への影響を検討した。その結果、生分解性高分子繊維の導入は CPC の水和反応に影響することなく、P(3HB-co-4HB)繊維で強化した CPC は 25%の圧縮歪みにおいても、崩壊せず形状を維持することを見出した。得られた結果および成果を以下に記す。

- P(3HB-co-4HB)、PLGA 及び PLLA 繊維を複合化した CPC は、繊維を添加していない CPC と比較して、HA の形成速度に有意差はなく、CPC への生分解性高分子繊維の導入による CPC の水和反応への影響は認められなかった。
- 三点曲げ強度において、P(3HB-co-4HB)及び PLGA 繊維を複合化した CPC は、3mm の変位を与えた後も、1MPa 以上の抗折強度を示した。
- P(3HB-co-4HB)繊維を複合化した CPC では、曲げ強度によって生じたクラックを多くの繊維が繋ぎ止めていることが観察され、また、圧縮後も形状を維持していた。
- これらは P(3HB-co-4HB)のガラス転移温度よりも高い温度で CPC を硬化させたことにより、CPC と P(3HB-co-4HB)の界面が密に接着したことが影響したものと考えられた。

以上の結果から、P(3HB-co-4HB)繊維による CPC の複合化は、CPC の力学特性の改善に寄与し、骨補填材として CPC の有用性の向上に繋がることを示した。

参考文献

- 1) Böhner M. Design of ceramic-based cements and putties for bone graft substitution. *Eur Cell Mater.* 2010; 20: 1-12.
- 2) Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y. Properties and mechanisms of fast-setting calcium phosphate cements. *J Mater Sci Mater Med.* 1995; 6: 528–533.
- 3) Ambard AJ, Muenninghoff L. Calcium phosphate cements: review of mechanical and biological properties. *Prostodont.* 2006;15:321–8.
- 4) Zhang J, Liu W, Schnitzler V, Tancrét F, Bouler JM. Calcium phosphate cements for bone substitution: chemistry, handling and mechanical properties. *Acta Biomater.* 2014;10:1035–49.
- 5) Ueyama Y, Ishikawa K, Mano T, Koyama T, Nagatsuka H, Matsumura T, Suzuki K. Initial tissue response to anti-washout apatite cement in the rat palatal region: Comparison with conventional apatite cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 55A: 652–660.
- 6) Brown WE, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and pastes as mineralizers and cements. 1986: U.S. Patent No. 4,612,053.
- 7) Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate water setting cement. Brown PW,

editors. Cement Research Progress. Westerville, Ohio: American Ceramic Society; 1986. pp. 352–379.

- 8) Chow LC, Takagi S, Constantino PD, Friedman CD. Self-setting calcium phosphate cements. Mat Res Soc Symp Proc. 1991; 179: 3–24.
- 9) Wang X, Ye J, Wang H. Effects of additives on the rheological properties and injectability of a calcium phosphate bone substitute material. J Biomed Mater Res B. 2006;78B:259–64.

著者発表の論文リスト

- 1) “Setting time and formability of calcium phosphate cements prepared using modified dicalcium phosphate anhydrous powders”

Takenori Sawamura, Yoichiro Mizutani, Masahiko Okuyama, Toshihiro Kasuga

Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2014; 25: 1631-1636.

..... 第2章

- 2) “Compressive strength of calcium phosphate cements prepared using different initial setting temperatures”

Takenori Sawamura, Yoichiro Mizutani, Masahiko Okuyama, Akiko Obata, Toshihiro Kasuga

Journal of the Ceramic Society of Japan 2015; 123: 59-61.

..... 第3章

- 3) “Preparation of calcium-phosphate cements with high compressive strength using meglumine as a water reducer”

Takenori Sawamura, Masahiko Okuyama, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Toshihiro

Kasuga

Journal of the Ceramic Society of Japan 2016;124: in press.

..... 第4章

- 4) “Enhancing the mechanical properties of calcium phosphate cements using short-length polyhydroxyalkanoate fibers”

Toru Ogasawara, Takenori Sawamura, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Hitoshi Hirata, Toshihiro Kasuga

Journal of the Ceramic Society of Japan 2016;124: in press.

..... 第5章

謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始ご親切なご指導、ご助言を賜りました名古屋工業大学 大学院 工学研究科 未来材料創成工学専攻 春日敏宏教授に心から謝意を表し、お礼を申し上げます。さらに、ご指導とご助言を賜りました名古屋工業大学 大学院 工学研究科 物質工学専攻 橋本忍准教授、未来材料創成工学専攻 前田浩孝准教授、同 小幡亜希子准教授に深く感謝致します。

本研究の機会を与えて頂きました日本特殊陶業(株) 尾堂真一代表取締役社長、同 大島崇文代表取締役副社長、同 奥山雅彦取締役常務執行役員ならびに同 小島多喜男執行役員に心より感謝致します。

最後に、研究を実施するにあたり、常に支えと励ましとなる家族の理解と協力に感謝致します。

2016 年

澤村 武憲