

アパタイトナノクリスタルと3Dプリンタの研究

伊藤清香

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野
〒890-8544 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1

要旨

超高齢化社会の到来に伴い、歯周病に罹患している人の数は年々増加している。また、骨粗鬆症などの加齢に伴う疾患も増加しており、それによる骨折や、腫瘍などで生じる骨欠損部への機能性充填素材（骨補填材）の開発が盛んに行われている。

本研究では、リン酸カルシウムと水を用いてアパタイトナノクリスタルスラリーをボールミルによる粉碎によって合成する。破骨細胞分化抑制作用をもつ機能性素材として合成されたアパタイトナノクリスタルスラリーを押し出し式セラミック3Dプリンタに装填する。

3Dプリンタによって合成された造形物は、XRD、FT-IRによりアパタイトナノクリスタルであることが確認できた。押し出し式セラミック3DプリンタでCADデータの概形は造形可能である事が確認できた。スラリーの性状や造形条件、3Dプリンタでの造形精度は改善の余地がある事がわかった。

それぞれの骨欠損部に応じた形状をCTなどの画像データからCADにてデザインし、バイオセラミック3Dプリンタにて造形できればテーラーメイドな骨補填材の作成が可能となり、適応症例の範囲が広がる可能性や術式の簡略化、術者依存的ではなく標準的な治療となる可能性がある。

1, 緒言

近年は超高齢化社会となっており、歯周病に罹患している人の数も増加している。また、骨粗鬆症などの加齢に伴う疾患も増加しておりそれによる骨折や、腫瘍等も増加している。それらによって生じる骨欠損部への骨補填材料の開発は重要な課題である。また、現在臨床現場においても、人工の骨補填剤は数多く使用されている。

3Dプリンタを用いて生体適合性材料を造形している文献は数多くある。以下に例を示す。3DプリンタのUV照射であるLCDを用いた生体適合性材料の研究としては、

ゼラチンメタクリロイル系の研究があり、これらとアパタイトをはじめとするリン酸カルシウムとの複合 hidroゲルが骨搔把部などに適応可能であることが示唆される。¹⁾ Ye らは、 β -TCP を含んだ PHA のフィラメントを合成して FDM 3D プリンタによって造形した。サンプルは骨芽細胞の活性を高めて、造形物は生体適合性を示したと報告している。²⁾ Luo らは、3D プリンタを使ってアルギン酸とゼラチンからなる足場を作り、その上にアパタイトを蒸着させて細胞の足場を作った。3D プリンタで作られた足場は、骨分化を促進することがわかった。³⁾ Wattanaanek らは、3D プリンティングを使用して、アルギン酸塩/セルロース複合足場を備えた非晶質リン酸カルシウム (ACP)/硫酸カルシウム半水和物 (CSH) を作製し、特性評価している。⁴⁾ これらの論文では、FDM 方式、LCD 方式を用いている。

そこで本研究方法としてはメカノケミカル合成によってアパタイトナノクリスタルセメントを合成し、Slurry Deposition Modeling (SDM) 式積層 3D プリンタによって成形する。粉末 X 線回折、FT-IR、Raman 分光法を用いて、合成されたアパタイトナノクリスタルの評価を行う。万能試験機にて圧縮強さを評価する。

本研究では、非加熱で SDM 式積層 3D プリンタを用いてアパタイトナノクリスタルを造形する。他方式の 3D プリンタとしては、前述した光造形方式である LCD プリンタや熱溶解積層方式である FDM プリンタとが挙げられる。それらの方式は、セラミックス単体の造形物を得るためには熱をかける必要がある。SDM 式積層 3D プリンタの利点としては、熱をかける必要がなくアパタイトを造形できる点である。SDM 式積層 3D プリンタは熱をかけずに造形物を得られるため熱に弱い BMP などのタンパクや骨新生を誘導する薬剤などを混ぜ入れて、機能性の骨補填材を開発することも可能なのが利点である。

2, 実験方法

2-1, CAD データの作成

CAD ソフト (Fusion360) を用いて、直径 10mm、高さ 10mm の円柱状の CAD データを作成した。

2-2, アパタイトナノクリスタルスラリーの合成

リン酸水素カルシウム二水和物 (DCPD) 88.6g と水酸化カルシウム 25.4g を蒸留水 52.4mL とともに容量 300mL のメノウジャーに入れた。メノウ製のボール (直径 10mm) もメノウジャーに共にいれ、Milling machine (P6, FRITSCH) で 500RPM、12 時間混合粉砕してアパタイトナノクリスタルスラリーを得た。

2-3, アパタイトナノクリスタルスラリーの 3D プリンタによる造形

合成したアパタイトナノクリスタルスラリーを押し出し式セラミック 3D プリンタのタンクに填入した。一定の速さでアパタイトナノクリスタルスラリーを押し出して造形した。造形後はガラス板上に移動させて常温にて乾燥させ、アパタイトナノクリ

スタル造形物を得た。

2-4, XRD パターンの測定

合成したアパタイトナノクリスタル造形物を粉末にして X 線回折 (XRD) パターンを測定した。X 線回折計 (UltimaIV) を使用してデータを得た。測定は、CuK α 線 (40 mA、40 kV) 下、3.00° から 60.0° まで 0.02° の 2 θ ステップで行った。

2-5, FT-IR スペクトルの測定

FTIR スペクトルを測定した。赤外スペクトルは、ダイヤモンド型 ATR アクセサリーを装備したフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光計 (FT/IR-4200) を使用して得た。調製した試料の FTIR スペクトルを 400-4000cm⁻¹ の範囲で 4.0cm⁻¹ の分解能で測定した。スペクトルを 64 回収集し、その積算平均を求めた。

2-6, 寸法の測定

ノギスで直径と高さを 1 サンプルにつき 3 箇所、計 3 サンプル測定した。

2-8, SEM 画像の撮影

導電性向上のため資料を Au-Pd でスパッタリングした。SEM(TM -4000Plus II) で表面性状を撮影した。

2-9, 圧縮試験

万能試験機 (EZ Test EZ-LX、島津製作所、日本) でサンプルの長さ方向にクロスヘッドスピード 2 mm/min で圧縮試験をし、最大圧縮荷重を求めた。それを試験前の外径から求めた断面積で割って最大圧縮強さとした。3 サンプルを試験に用いた。

3, 結果

3-1, 造形物の写真

造形された骨充填材と XRD を図に示す。Fig. 1 は CAD によって設計し印刷された造形物の写真である。造形物は円柱構造を保っており白色で積層されていることが確認できる。Fig. 2 は合成されたサンプルの XRD パターンを示す。ピークが 32° においてみられた。



Fig. 1 造形物の写真

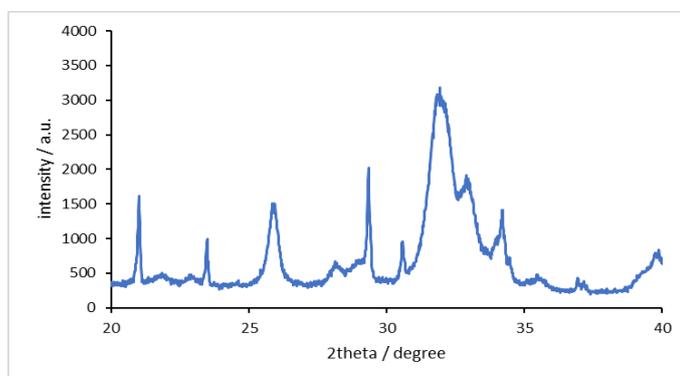


Fig. 2 アパタイトナノクリスタルの粉末 X 線回折パターン

Fig. 3 には、アパタイトナノクリスタルの FT-IR スペクトルを示す。ピークが 1084、1016、962 cm^{-1} 付近においてみられた。

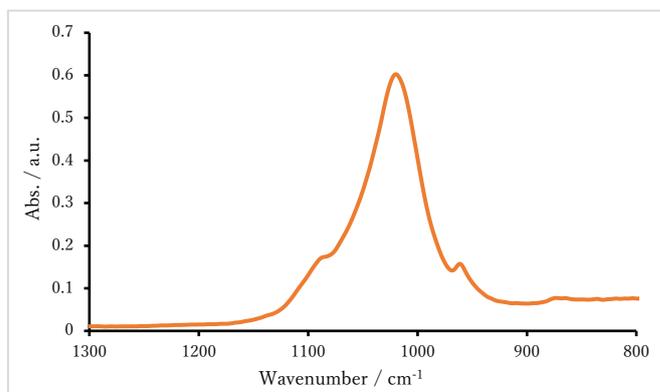


Fig. 3 アパタイトナノクリスタルの FT-IR スペクトル

3-2, 寸法

高さ と 直径 の 平均 値 は それ ぞ れ 直 径 9.92mm、 高 さ 9.03mm で あ っ た。

3-3, SEM 画像

Fig. 4 に 造 形 物 の SEM 画 像 を 示 す。 粒 子 が 小 さ く 結 晶 構 造 は 認 め ら れ ない。

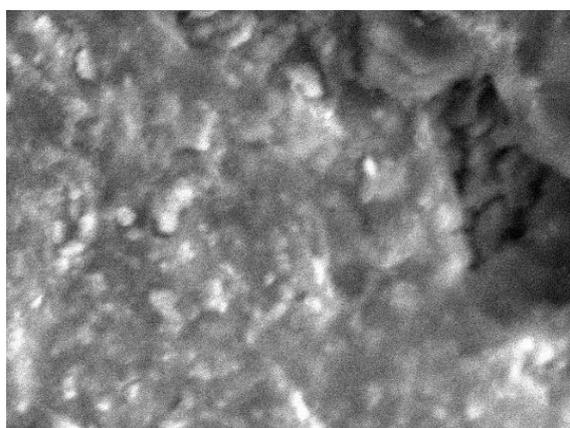


Fig. 4 アパタイトナノクリスタルの SEM 画像

3-4, 圧縮強さ

最 大 圧 縮 強 さ の 平 均 値 は、9.49MPa で あ っ た。

4, 考察

XRD パターンにおいてアパタイトナノクリスタルの特徴的なブロードなピークが 32° でみられたため、機能性素材である人工骨であることを示した。これは、リン酸とカルシウムが低結晶性であり、ある程度の規則的に配列され、六方晶の結晶構造を持っていることが考えられた。合成されたナノクリスタルアパタイトはリン酸カルシウムと炭酸から構成され、バイオマテリアルとして広く応用されている。哺乳類の歯および骨はナノクリスタルアパタイトとコラーゲンから構築される。アパタイトナノ

クリスタルは生体環境下において長期にわたり安定的な骨置換能を持つことが知られている。アパタイトナノクリスタルの生体適合性が高い理由として、免役応答性や異物反応性が極めて低いことが挙げられる。

高さと直径の平均値はそれぞれ直径 9.92 mm、高さ 9.03 mm であり、設計値の 10 mm より小さく造形された。直径は約 0.8 mm、高さは約 0.97 mm の設計値との誤差があり、高さは積層される 1 層の高さを検討する必要がある。また、3 サンプル内でも誤差範囲がおおきいことからスラリーの性状や押し出すスピード等の条件も見直す必要がある。しかし、これらの誤差は、臨床において骨補填材を削ったりセメントスペースとして活用したりすることで補正できる許容範囲であると考えられた。

圧縮強さは、9.49 MPa 程度であった。許容可能な機械的強度である 1.5 MPa 以上の値となり十分な強度を有することが示唆された。3D プリンタを用いた骨補填材造形に成功し、一定の成果を得た。造形された骨補填材は十分な強度を持ち合わせていた。

SEM 画像では、アパタイトナノクリスタル特有の粗造な表面状態が確認できた。本研究の結果から、水溶性のポリマー等を利用することで細胞成分や新生骨は入るための連通孔などの複雑な構造を、付与できることが考えられた。これが実現できれば今後の骨補填材の発展が飛躍的に進む可能性がある。また、アパタイトの結晶性や結晶相の制御によって針状結晶や板状結晶などに変化することが考えられる。VGG16 や InceptionV3 などの畳み込みニューラルネットワークを利用することで、これらアパタイト相のキャラクタリゼーションが可能になることが示唆された。

動物実験までに至らなかったが、骨補填材としての機能を発揮することができることが考えられた。3D プリンタを利用した骨補填材の造形に関する研究がバイオマテリアル分野で再生医療のブレイクスルーポイントとして躍進している。本研究で合成されたナノクリスタルアパタイトには、その構造的特性から、薬剤封入能を有しており、ドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用が可能であることが示唆された。特にナノ粒子から構成されることから結晶性が低く、破骨細胞の貪食によって薬物が放出される機構が優位に働くことが考えられた。加えてボールミル粉碎工程を利用することで、アパタイトナノ粒子の形成と同時に消炎鎮痛剤やステロイド、さらには骨誘導因子タンパク質などの生理活性物質の封入が技術的に可能である。これは単なるアパタイト系骨補填材にとどまらず、局所的に制御されたドラッグリリースコントロールが可能であることを意味し、新しいタイプのドラッグキャリアの役割を果たすことが期待される。特に骨誘導因子タンパク質を含んだ次世代型の骨補填材としての応用展開が考えられる。

5, 謝辞

本研究を遂行するにあたって、研究助成をいただいた公益財団法人サンケイ科学振興財団に深く感謝いたします。

6, 引用文献

- 1) C.I. Codrea, D. Baykara, R.-A. Mitran, A.C.Ç. Koyuncu, O. Gunduz, A. Fikai, 3D-Bioprinted Gelatin Methacryloyl-Strontium-Doped Hydroxyapatite Composite Hydrogels Scaffolds for Bone Tissue Regeneration, *Polymers* 16 (2024) 1932. <https://doi.org/10.3390/polym16131932>.
- 2) X. Ye, Y. Zhang, T. Liu, Z. Chen, W. Chen, Z. Wu, Y. Wang, J. Li, C. Li, T. Jiang, Y. Zhang, H. Wu, X. Xu, Beta-tricalcium phosphate enhanced mechanical and biological properties of 3D-printed polyhydroxyalkanoates scaffold for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules* 209 (2022) 1553–1561. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.056>.
- 3) Y. Luo, Y. Li, X. Qin, Q. Wa, 3D printing of concentrated alginate/gelatin scaffolds with homogeneous nano apatite coating for bone tissue engineering, *Materials & Design* 146 (2018) 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.03.002.8>
- 4) N. Wattanaanek, S. Suttapreyasri, B. Samruajbenjakun, 3D Printing of Calcium Phosphate/Calcium Sulfate with Alginate/Cellulose-Based Scaffolds for Bone Regeneration: Multilayer Fabrication and Characterization, *JFB* 13 (2022) 47. <https://doi.org/10.3390/jfb13020047>.

Modeling of apatite nanocrystals using a 3D printer

Sayaka Ito

Department of Periodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

Tel: +81-99-275-6202 Fax: +81-99-265-6209

E-mail: ito_saya@dent.kagoshima-u.ac.jp

With the advent of a super-aging society, the number of people affected by periodontal disease is increasing every year. In addition, age-related diseases such as osteoporosis are increasing, and the development of functional filling materials (bone replacement materials) for bone defects caused by bone fractures and tumors has been actively pursued. In this study, apatite nanocrystal slurries are synthesized by ball milling using calcium phosphate and water. The apatite nanocrystalline slurry synthesized as a functional material with osteoclast differentiation inhibitory activity is loaded into an extrusion-type ceramic 3D printer.

The modeling material synthesized by the 3D printer was confirmed to be apatite nanocrystals by XRD and FT-IR. It was confirmed that the extrusion type ceramic 3D printer can produce the approximate shape of the CAD data. We found that there is room for improvement in the properties of the slurry, the molding conditions, and the molding accuracy of the 3D printer. The following advantages can be realized if the shape of each bone defect can be designed by CAD from CT or other image data and fabricated by a bioceramic 3D printer. The creation of a tailor-made bone replacement material will be possible, which may expand the range of applicable cases, simplify the surgical procedure, and make it a standard treatment rather than a surgeon-dependent procedure.