

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15720

研究課題名(和文)競争的自己組織化結晶形成に基づく骨誘導性生体材料の創出

研究課題名(英文)A study of crystal growth and its relation to bioactivity of calcium phosphate materials

研究代表者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：60374948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：バッチ式および連続式にてリン酸カルシウム材料を合成し、これらを湿式および乾式で混合・複合化してラマン分光等の物理的手法にて材料学的性質を調べ、混合による各結晶相の検出が可能であることを確認した。連続法で過飽和度を調節して合成した複数のリン酸八カルシウムの細胞活性(増殖能)が異なっていたことから、結晶成長のプロセスが材料の骨芽細胞様細胞応答に影響する可能性が示唆された。以上の結果から活性を向上させ得る生体材料の設計指針が得られた。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate as to whether calcium phosphate precipitation and its crystal phases affect its bioactivity of materials used for bone substitute materials. The materials, synthesized in batch or continuous preparations, were made through wet and dry mixing procedures and subjected for analyses by physical techniques, such as Raman spectroscopy, to identify the crystal phases included. It was suggested that the activity of osteoblastic cells could be influenced by distinct crystals of octacalcium phosphates obtained in the continuous preparation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：生体材料 結晶相 セラミックス 生体活性

1. 研究開始当初の背景

失われた骨の修復では骨の無機成分と類似の組成を持ち、骨組織に高い親和性を有するハイドロキシアパタイト (HA) やリン酸三カルシウム (β -TCP) 等のリン酸カルシウム系のセラミックス材料が骨補填材として臨床応用されている。しかしながら人工材料は骨のように細胞成分や成長因子あるいは有機の基質成分を含有しないため骨再生能は未だ十分とは考えられてはならず検討の余地がある。そのため、HA と成長因子や細胞接着性高分子との複合化にて宿主細胞を活性化する等、より活性の高い生体材料の開発に向けた取り組みが行われている (Wang X et al. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2013)。しかしながら、材料自体の特性に着目して高い生体親和性を示す材料を合成しようとする試みは多くはなかった。

私達は先にリン酸カルシウム材料のひとつリン酸八カルシウム (OCP) が自身で細胞を活性化し高い骨再生能を示すことを報告した (Suzuki O et al. Biomaterials 2006; Anada T et al. Tissue Eng Part A 2008)。また、リン酸カルシウムの形態が骨形成に影響を及ぼすこと (Honda Y et al. Tissue Eng Part A 2008)、さらにリン酸カルシウムのわずかな組成の変化が材料の活性を調節し得ることを報告した (Miyatake N et al. Biomaterials 2009)。一方、リン酸カルシウムは結晶成長が結晶周囲のリン酸カルシウム析出の駆動力 (Suzuki O et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2006)、あるいは溶解性の異なるリン酸カルシウム相の共存によって影響を受けること (Kobayashi K et al. ACS Appl Mater Interfaces 2014)、また、リン酸カルシウム相間の相互作用によって材料の結晶相と活性が変化して、結果として生体内での生体親和性、すなわち実験的に用意したラット頭蓋冠骨欠損における骨再生に影響を及ぼすことが示唆された (Kobayashi K et al. ACS Appl Mater Interfaces 2014)。

本研究ではこれらの生体材料学的な情報に基づき、リン酸カルシウムの結晶相と溶解度に着目し、材料間でどのような相互作用が生じるか、材料学的にどのような特徴を示すか、細胞に対してどのような影響を与えるのか検討することを計画した。

2. 研究の目的

異なる結晶相のリン酸カルシウム系材料が共存する際のリン酸カルシウム析出の駆動力、材料間の反応性、材料のキャラクタリゼーション、細胞親和性を研究の対象とした。異なる結晶相のリン酸カルシウムは異なる溶解度を持つことから水溶液中で共存することで水溶液のそれぞれのリン酸カルシウムに関する過飽和度が増えるため (Morimoto S et al. Biomed Mater 2012)、結晶間での化学的な相互作用が生じると考

えられる。骨欠損あるいは皮質骨上で骨伝導を示すことをが解明されている OCP、非晶質リン酸カルシウム (ACP) (Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 1991)、また OCP を加水分解することで得られる非化学量論的な Ca 欠損 HA (Ca-deficient HA)、化学量論的な HA を対象とし、これらの材料の単体の生成、共析出物の生成、それぞれの材料の単体から得た混合材料の水溶液中の結晶成長、これらの材料の性状と骨芽細胞様細胞による細胞活性から、リン酸カルシウム材料として生体活性を調節できる材料学的条件を検討し、骨補填材開発に有用な材料科学的なデータ取得および生体材料学設計指針を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) バッチ式合成方法によるリン酸カルシウムの合成

OCP は Ca とリン酸の溶液組成として HA および OCP に関して過飽和、リン酸水素カルシウム 2 水塩 (DCPD) に関して不飽和の条件となるように、Ca およびリン酸濃度、pH を一定にして温水中で調整した (25 における過飽和度 $1 \times 10^{18} \sim 4 \times 10^{11}$ (Honda Y et al. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2007)。ACP は HA に過飽和となる溶液組成でかつアルカリ雰囲気となるようにアンモニア水で pH を調節した上で合成し、短時間回収を行い結晶化が生じない条件下で調整した。Ca-deficient HA は合成した OCP を温水中に再分散し、浸漬・攪拌して 48 時間まで経時的に加水分解して得た。

(2) 連続式合成方法によるリン酸カルシウムの合成

合成方法として、複数の溶液導入口と導出口を有する反応器を用いることでリン酸カルシウムが連続的に合成でき、反応条件調節によって結晶形態を含む結晶性状が制御可能な合成システムを設計した (特願 2016-35945)。上記バッチ式と同様に過飽和度を設定し、この反応器を用いて化学量論的な HA を含むリン酸カルシウム各相を合成した。Ca の原料として硝酸塩、酢酸塩、リン酸の原料としてアンモニウム塩、ナトリウム塩を用いた。バッチ式では最終的な混合濃度を用いて過飽和度を見積もるが連続式合成方法においても同様の考え方で算出し、合成条件を設定した。合成した結晶の形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

(3) リン酸カルシウム複合相の調整

既合成のリン酸カルシウム粉体をを分散させた水溶液中に Ca とリン酸を導入して異なる相のリン酸カルシウムを合成することで複合相を調整した。OCP と ACP の重量比 (25:75 ~ 75:25) の範囲となるように既合成の OCP 粉体を水中に分散させ、Ca とリン酸を研究方法 (1) で説明した方法にて導入し

て OCP/ACP 複合体を合成した。また、OCP と Ca-deficient HA はそれぞれ既合成の粉末を乾式にて機械的に混合して得た。

(4) リン酸カルシウム単相および複合相のキャラクタリゼーション

合成したリン酸カルシウム単相および複合相の粉末について、X 線回折を測定し、OCP/Ca-deficient HA 複合体については OCP あるいは HA 各々の単相における OCP (100)面、HA(100)面の強度比を 100 とし、複合体中の OCP (100) 面、HA(100)面の強度から所定の混合比と X 線回折強度比との間の相関性を見積もった。OCP/ACP については、ACP 混在による X 線回折図の非晶質化、フーリエ変換赤外分光光度 (FTIR) 測定による 1000cm^{-1} - 1200cm^{-1} の波数範囲におけるリン酸イオンの変化を比較観察した。また、ラマン分光における 1000cm^{-1} - 1050cm^{-1} におけるリン酸イオンの変化を比較観察した。

(5) 材料特性と細胞親和性の関連性解明の検討

リン酸カルシウム粉末を培養プレートにコーティングして骨芽細胞の分化マーカーを解析することでリン酸カルシウムの影響を調べる方法を確立している (Suzuki O et al. Biomaterials 2006; Anada T et al. Tissue Eng Part A 2008)。連続式合成方法で調整し、異なるリン酸濃度で得られた 2 種類のリン酸カルシウム (OCP) を 96 穴プレートのに $3\text{mg}/\text{穴}$ の比率でコーティングして間葉系幹細胞株 D1 細胞を DMEM 培地で培養して細胞増殖能を調べた。

4. 研究成果

(1) 合成リン酸カルシウムの同定

既法で合成した OCP、ACP および Ca-deficient HA はそれぞれ過去に報告された X 線回折および FTIR のパターン (Kobayashi K et al. ACS Appl Mater Interfaces 2014; Hirayame B et al. RSC Adv 2016) と一致した。すなわち、ACP は回折ピークを示さないブロードな X 線回折パターン、OCP は HA と類似のパターンに加え、OCP 特有の層状構造を反映するピークを含むパターン、また、Ca-deficient HA は低結晶性 HA と類似のパターンを示した。

(2) リン酸カルシウム複合相の結晶学的および分光学的特徴

リン酸カルシウム複合相について以下の結果が得られた。OCP/ACP 複合体では ACP の比率が 75% まで高くなると複合体中の OCP の X 線回折像は ACP の含有の影響でブロードな X 線回折像で全体的に不明瞭なパターンになった。しかしながら、OCP の特徴的なピーク ($2\theta=5^\circ$ 付近、 10° 付近、 32° 付近) は観察された。一方、FTIR では 1000cm^{-1} - 1200cm^{-1} の波数範囲における

OCP のリン酸イオンの特徴ピーク群は不明瞭になった。ラマン分光においては 1000cm^{-1} - 1050cm^{-1} においては OCP に特徴的なリン酸イオンのピークが ACP の含有量が高くなると不明瞭になった。

OCP/Ca-deficient HA 複合体については OCP/ACP 複合体とは異なり、Ca-deficient HA の含有量が低濃度であっても HA の X 線回折のピークを観察することによって判別が可能であった。FTIR では Ca-deficient HA が少量であっても 1000cm^{-1} - 1200cm^{-1} の OCP のリン酸イオンのピーク群が不明瞭になる傾向があった。複合体中の OCP (100) 面、HA(100)面の回折強度および積分強度を指標とした混合比率との相関性は比較的認められ、OCP 中の HA 相の推定が可能であることが示唆された。

(3) 連続式合成方法によるリン酸カルシウムの特徴

Ca 溶液とリン酸溶液の過飽和度の設定により、X 線回折で同定される OCP、ACP および HA の各種リン酸カルシウムの合成が可能であった。また、OCP については原料濃度を調節することで (過飽和度を調節することで) 結晶形態の異なる粒子が得られた。OCP 粒子は長軸方向に成長した板状 (長さ数 μm で幅が小さい) あるいは板状 (長さ数 μm で幅がやや大きい) であった。板状と異なる形態の粒子の混在が少ない比較的均一な結晶が得られた。

(4) リン酸カルシウム相と生体親和性との関連性

実験に用いた D1 細胞は未分化間葉系幹細胞の性質を持ち骨芽細胞様細胞に分化できることを確認している (分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ活性、I 型コラーゲン、オステオポンチンおよびオステオカルシンの mRNA 発現など) (Yamada M et al. Sens Actuators B Chem 2015; Kamoya T et al. Sens Actuators B Chem 2016)。検討対象としてバッチ式合成で得られたリン酸カルシウムとして OCP (既報の板状 OCP 結晶で連続式合成方法で得られた OCP よりも長さおよび幅が若干大きい: Hirayame B et al. RSC Adv 2016) を、また連続式合成で得られたリン酸カルシウムとして結晶形態の異なる 2 種類の OCP を選んだ。これらの材料をコーティングした培養プレートで一定期間培養して培養細胞の DNA 量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) を測定し、細胞増殖能を比較した。培養期間 7 日の時点において、バッチ式で得られた OCP と比較して連続式合成方法で得られた OCP との間で細胞増殖能に違いが見られた。特に連続式合成方法で得られた長さ数 μm で幅がやや大きい OCP はおよそ 2 倍程度増殖が高かった。

リン酸カルシウムの結晶成長では、リン酸カルシウムのスラリー濃度によってリン酸

カルシウムの存在相が変化することが知られている (Blumenthal NC et al. Calcif Tissue Int 1981). リン酸カルシウムクラスター, OCP 様結晶, また ACP の生成と HA の結晶成長など, どの結晶相が優位となるかは過飽和度の影響が大きいと考えられてきた (Habraken WJ et al. Nat Commun 2013). 本研究では異なる結晶相として OCP, ACP および Ca-deficient HA に注目してこれら複合相の材料学的特徴と過飽和度の異なる合成条件によって得られるリン酸カルシウムの特徴について研究した. 少量の混合相は物理的手法によっては限定された量のみ検出されることが明らかとなった. OCP の加水分解速度が ACP の共存によって促進され, また, 研究開始当初の背景で述べたように, ラット頭蓋冠欠損での骨形成が促進されることから, リン酸カルシウムの活性と結晶相との間に関連性が示唆されてきた (Kobayashi K et al. ACS Appl Mater Interfaces 2014). 過飽和度の異なる合成によって得られた OCP で異なる生体活性 (細胞増殖能) が認められたことから, 原料イオンからリン酸カルシウム相が析出して, OCP として結晶成長する過程を反映することが示唆され, その過程を反映すると考えられる結晶形態と生体活性が関連づけられる可能性が示唆された. これらの成果の一部は先の基礎出願特許 (特願 2015-039484) に本研究の所見を追加して成果として纏めた (特願 2016-35945). 本研究により, より高い生体活性を有する生体材料を設計するための基礎データが得られた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Saito K, Anada T, Shiwaku Y, Chiba S, Miyatake N, Suzuki K, Tsuchiya K, Suzuki O. Dose-dependent enhancement of octacalcium phosphate biodegradation with gelatin matrix during bone regeneration in a rabbit tibial defect model. *RS C Adv* 6:64165-64174, 2016. 査読有. DOI: 10.1039/c6ra07602e

鈴木堅太郎, 鈴木 治. リン酸オクタカルシウム. *臨床雑誌整形外科* 66:1192-1192, 2015. 査読なし.

[学会発表](計 3 件)

塩飽由香利, 平山聞一, 穴田貴久, 宮武尚央, 土屋香織, 中村雅典, 高橋哲, 鈴木治. リン酸オクタカルシウムとハイドロキシアパタイトの炎症性細胞浸潤の比較. 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会バイオマテリアル研究若手交流会. 2016 年 9 月 26 日, 仙台.

鈴木 治, 穴田貴久. 骨芽細胞分化促進作用を有する生体内吸収性リン酸八カルシウム骨補填材の開発. 第 89 回日本生化学会大会. 2016 年 9 月 25 日~27 日, 仙台.

Suzuki O, Anada T, Kobayashi K, Shiwaku Y. Hydrolysis of hydroxyapatite precursors and its biological relevance in hard tissue formation. *French-Tohoku Frontier* 2015. 2015 年 12 月 2 日, 仙台.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: リン酸カルシウム合成装置及び合成方法

発明者: 鈴木 治, 穴田貴久ほか

権利者: 東北大学ほか

種類: 特許

番号: 特願 2016-35945

出願年月日: 2016 年 2 月 27 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.cfe.dent.tohoku.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 治 (SUZUKI, OSAMU)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 60374948

(2)研究分担者

穴田 貴久 (ANADA, TAKAHISA)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 30398466

上家 潤一 (KAMIIE, JYUNICHI)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号: 10400269

鈴木 堅太郎 (SUZUKI, KENTARO)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 10747554

松井 有恒 (MATSUI, ARITSUNE)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：60547264

(3)連携研究者
()

研究者番号：