

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：52201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17919

研究課題名(和文) 生体を再生する新規透明バイオマテリアルの高機能化と再生医療加速化への挑戦

研究課題名(英文) Transparent calcium phosphate green compact by controlled particle

研究代表者

川越 大輔 (KAWAGOE, Daisuke)

小山工業高等専門学校・物質工学科・講師

研究者番号：80420008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療への実現には、増殖因子・細胞・足場(スキャホールド)の三つが必要で、材料の立場からは細胞活動に適した足場の研究をすすめる必要がある。骨に関する再生医療の材料候補としては、生体骨の無機主成分である水酸アパタイト(HA)が有用である。本研究では微粒子合成やHA粒子の微細化、有機物との複合化等により、簡易にHAの透明体を作製することを試みた。凝集していたマイクロオーダーの粒子径を、ナノサイズまで分散でき、乾燥の条件(温度・時間など)を検討することで、透明な成形体を作製することができた。得られたHA透明体を用いてMC3T3-E1細胞がHA透明成形体に接着し、増殖していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyapatite (HA) is the principal inorganic constituent of bone. In order to utilize the HA for tissue scaffolds, it must evaluate to the living cells on the using HA material. Direct observations of living cells on the transparent HA is promoted an understanding of cellular behavior. The aim of this study is try to observe the living cells on HA green compact. HA powder was synthesized by a homogeneous precipitation technique. The transparent green compact of thickness 1 mm was successfully prepared with no apparent cracks. It was able to observe of the living cells on transparent HA green compact.

研究分野：バイオセラミックス

キーワード：アパタイト スキャホールド 透明体 リン酸カルシウム 組織医工学

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療への期待は非常に大きい。その実現には、増殖因子・細胞・足場の三つが必要で、材料の立場からは細胞が活動する足場(スキャフォールド)の研究が必要である。

水酸アパタイトは、生体骨の無機主成分の炭酸アパタイトに近く、現在までに骨代替材料として多くの臨床応用例がある生体親和性の高い物質である。

スキャフォールドを再生組織と一緒に生体内に入れることができれば理想的であり、骨組織の再生医療にとっては、骨・歯の無機主成分に近く、臨床研究の成果の多い HA が有用であると考えられる。

このことから、HA を組織再生の足場材料とすることを狙い、HA 上で細胞を扱った多くの研究が進められているが、現在、細胞試験に用いられている HA 焼結体は不透明であり、ガラスやポリスチレンのような透光性を持たないことから、細胞試験において非常に重要な生きた細胞を用いた観察・検討ができていない。

つまり、材料上で培養した細胞を観察するためだけに、数週間続けていた培養を完全に中止することが必要で、ポリスチレンのような透光性を持つ材料と違い、細胞観察後に培養を継続することができない。また、生きた細胞が観察できるようにした蛍光染色をした細胞を用いた場合でも、染色による実際の生体との違いへの懸念がぬぐえず、観察はできたとしても、培養した細胞を生体内に入れることはできない。

以上のことから、申請者等は HA 透明焼結体を作製することで、生きた細胞による細胞挙動の検討ができ、また、ち密体であることから気孔率等の影響も一定とできることを報告してきたが、HA 透明焼結体の大量作製が困難で、熱間等方加圧成形や放電プラズマ焼結などの特殊な装置が必要であること、焼結により HA 中の OH 基が脱水してしまうことで生体親和性が低下する等の課題もあることから、この HA 透明体を利用した研究の展開は数例に留まっている。

以上のことから、培養していく細胞を生きたまま直接観察することができるリン酸カルシウムの透明体を、焼結することなしで、簡易的に作製することを試みた。

この作製にあたっては、リン酸カルシウムを微粒化し、さらにその凝集状態をうまく制御していくことで、加熱による拡散をさせずに、細胞試験には耐えられる程度の強度を有する成形体を作製することを試みた。また、得られたリン酸カルシウムの透明な成形体を用いて、生きた細胞による細胞試験を行った。

## 2. 研究の目的

27 年度では、湿式法の微粒子合成により、リン酸カルシウムの透明体を作製することを試みた。

28 年度では微粒子合成や、得られた HA 粒子の微細化、有機物との複合化等により、より簡易的にリン酸カルシウムの透明体を作製することを試みた。

29 年度は、リン酸カルシウム透明体を作製するために、HA 粒子の粒子径やゼータ電位を検討することを試みた。

## 3. 研究の方法

0.1 mol・dm<sup>-3</sup> の硝酸カルシウム等のカルシウムを含む水溶液と、0.06 mol・dm<sup>-3</sup> のリン酸二水素アンモニウム等のリン酸を含む水溶液を混合し、アンモニア水等にて pH をアルカリとして、リン酸カルシウムの沈殿を生成させ、種々の条件にて熟成したのち、ろ過後、乾燥したものを出発リン酸カルシウムとした。

このリン酸カルシウムを、種々の条件で成形し、また、有機物を加えるなど種々の条件でも成形条件を検討し、ペレットを作製した。

得られたペレットは透光性を示しており、XRD 測定、SEM による表面および断面観察、ペレット内の含水量測定、FT-IR 測定、密度測定等の評価を行った。

## 4. 研究成果

27 年度では、遠心分離機を用いて、種々の回転数・時間で分級したリン酸カルシウムを用いて成形し、リン酸カルシウムの透明な成形体作製に、より適した条件を見出した。

得られたリン酸カルシウム透明成形体を種々の温度・時間で水熱処理を行ったところ、成形体は失透することなく透明性を保持していることがわかった。つまり低結晶性であった成形体を水熱処理することにより、結晶性を向上することが可能であった。

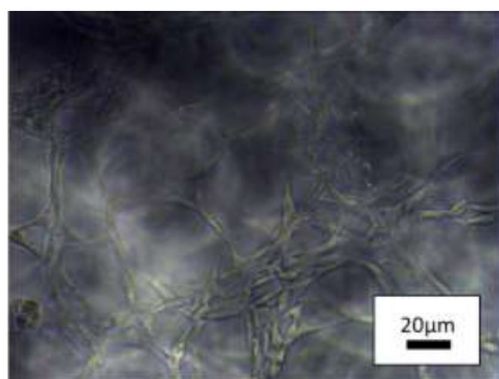
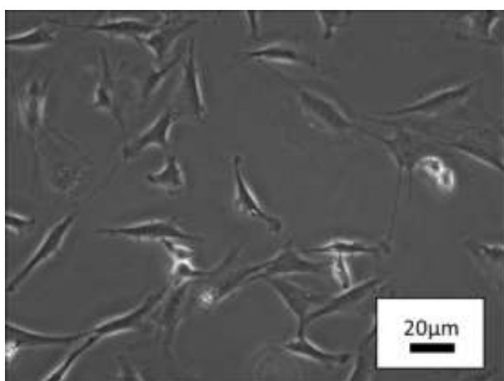


水中に 1 週間静置したリン酸カルシウム透明成形体

また、得られたリン酸カルシウム透明成形体は、擬似体液に3日間浸漬したのちも、リン酸カルシウム透明成形体は崩壊することなく、ピンセットで容易に取り扱いができる程度の強度を保持していることが明らかになっている。

28年度は、得られたリン酸カルシウム透明成形体上で、位相差顕微鏡を用いた生きた細胞のリアルタイム観察を行うことができ、MC3T3-E1細胞がリン酸カルシウム透明成形体に接着していることが確認できた。

しかし、作製したリン酸カルシウム透明体の表面状態は比較となるポリスチレンディッシュに比べて粗く、今後詳細な細胞観察を行うためには、HA粒子の粉末状態や成形方法等を検討し、より均一な表面状態とする必要があることが分かった。



生きた MC3T3E-1 細胞の挙動観察

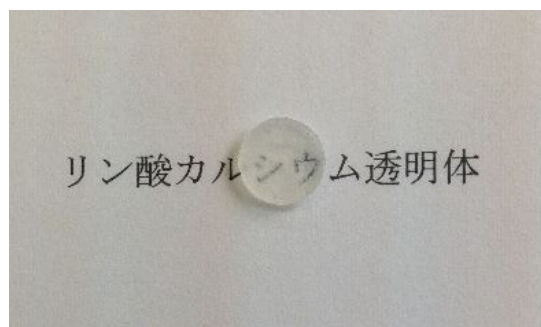
a) 比較となるポリスチレンシャーレ

b) 本研究で作製したリン酸カルシウム透明成形体

29年度は、分散剤・温度・濃度・pH・分散処理等の種々の条件を検討することで、凝集していたマイクロオーダーのリン酸カルシウムの粒子径を、ナノサイズまで分散させることができた。この分散条件を用いて得られたリン酸カルシウム粒子について、乾燥の条件(温度・時間など)を検討することで、透明な成形体を作製することができた。得られたリン酸カルシウム透明体においても、M

C3T3-E1細胞がリン酸カルシウム透明成形体に接着し、増殖していることを確認した。

従来のHA透明焼結体では研磨をすることで試料表面の粗さを平滑にすることが可能であったため、問題とはならなかったが、今回作製したリン酸カルシウム透明成形体では、強度の点から研磨が困難で、成形体の表面粗さが観察上課題となったことから、粒子の凝集・分散状態の制御、成形における乾燥時間・温度の制御等により、表面状態が均一なリン酸カルシウム透明成形体の作製を行う必要があると考えている。



ゼータ電位や粒子径の制御で作製した加熱・焼結をしていないリン酸カルシウムの透明な成形体

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

川越大輔・坪井勇真, 細胞観察に適したリン酸カルシウム透明体の作製, 日本セラミックス協会秋季シンポジウム, 2016

Daisuke Kawagoe, Yuma Tsuboi, Takakuni Tanaka and Shuntaro Yamaguchi, Preparation of hydroxyapatite nano ceramics by spark plasma sintering, ISPlasma/IC-PLANTS2016, 2016

川越大輔・岩瀬豊・鈴木達也・山中翔太・坪井勇真・高屋朋彰・廣本祥子, 生きた細胞観察のためのリン酸カルシウム透明成形体の作製, 日本MRS, 2017

川越大輔・岩瀬豊・鈴木達也・山中翔太・坪井勇真・山口駿太郎・高屋朋彰・廣本祥子, 粒子制御によるリン酸カルシウム透明成形体, 日本セラミックス協会, 2018

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

川越 大輔 (Daisuke KAWAGOE)

研究者番号: 804200008

小山工業高等専門学校・その他部局等・講師

(2)研究協力者

坪井 勇真 (Yuma TSUBOI)

岩瀬 豊 (Yutaka IWASE)

鈴木 達也 (Tatsuya SUZUKI)

山中 翔太 (Shota YAMANAKA)

山本 紗里奈 (Sarina YAMAMOTO)