

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12898

研究課題名(和文)骨融合能を有する有機-無機複合体ファイバーの創製

研究課題名(英文)Preparation of organic-inorganic hybrid fiber with bone-bonding ability

研究代表者

城崎 由紀 (SHIROSAKI, YUKI)

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：40533956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨と結合し、細胞の足場材料となり靱帯組織の再生を促した後に生体内で分解・吸収されるファイバーの作製を目的とした。細胞との親和性と生体分解性、骨結合能を持つファイバーの材料としてカニ甲羅由来の生分解性高分子であるキトサン、骨を形成する無機成分である水酸アパタイト(HAp)、およびキトサン分子を架橋可能なシロキサン結合に着目した。キトサン分子内にHApを複合体化や、キトサンをシロキサン結合による架橋構造によってキトサンファイバーの機械的強度を向上させ、骨組織に対して有効な適合性を有する可能性も分かった。さらに得られたモノファイバーを用いて、3次元の編み上げ構造を作製できた。

研究成果の概要(英文)：Chitosan-HAp composite fiber was obtained by coagulation method. Sodium hydroxide treatment after the coagulation was effective for enhancement of not only HAp precipitation but also mechanical property. A chitosan mono-fiber crosslinked using a silane coupling reagent was also produced. The tensile strength of the fibers was improved by adding an appropriate amount of the silane reagent.

研究分野：生体材料化学

キーワード：人工靱帯 キトサン 有機-無機複合体 ファイバー 骨結合性

1. 研究開始当初の背景

断裂のような大きな損傷を受けた前十字靭帯 (ACL) は、自然治癒しない。現在の再建手術は、患者自身の別部位の靭帯を移植する自家靭帯移植術が一般的である。しかし、自己組織採取の際にその部位を犠牲にしなければならず、再断裂した場合、再度自己組織を採取することが困難である。そこで、患者への負担を軽減するため、良質な人工靭帯の作製が求められている。

これまでに、合成繊維から成る人工靭帯の使用が検討されてきたが、耐久性や繊維の摩耗屑による炎症等の問題があり、日本での臨床使用は好まれていない。例えば、

合成高分子からなる人工靭帯に関してはポリエチレンテレフタレート (PET) を主成分とした人工靭帯等、長期臨床経過において、骨とのゆるみの発生、疲労による人工靭帯自体の劣化等が多く報告されている。ゴアテックス、ダクロンといったその他の素材を用いた人工靭帯に関しても、疲労によって発生した摩耗粉による炎症などの報告がある。

組織工学の発展にともない、生分解性材料を用いた新しい人工靭帯の開発が行われている。生分解性のキトサンとヒアルロン酸から湿式紡糸法を用いて作製した繊維上に線維芽細胞を播種すると、前十字靭帯の主成分である I 型コラーゲンが優位に産生されることが報告されている。また、アキレス腱由来線維芽細胞をあらかじめ培養した繊維は、*in vivo* で十分な強度を有する靭帯様組織が再生されることが報告されている。しかし、骨組織からの剥離が観察され、本繊維も骨組織との結合性は低いと考えられる。

シルク繊維から作製した網状の人工靭帯が、ヒトの前十字靭帯と同等の最大引っ張り強度を示し、ヒト骨髄前駆細胞の良好な接着・増殖に伴い I 型および III 型コラーゲンが多く産生されることも報告されている。しかし、シルク繊維はそのままでは骨組織との結合がないことはよく知られている。材料表面に骨組織類似の無機物質 (リン酸カルシウム等) を修飾する試みも多くある。しかし、この場合には、材料と骨との界面に加えて、生分解性材料と無機物質との界面の接着強度も問題となる。

2. 研究の目的

上記の問題を解決する為は、細胞が生着し、靭帯組織が再生すること、末端部分が骨組織と結合することが必要である。申請者が作製しているキトサン-ヒドロキシアパタイト (HAp) 複合ファイバーは、生分解性高分子のキトサンと骨芽細胞の足場

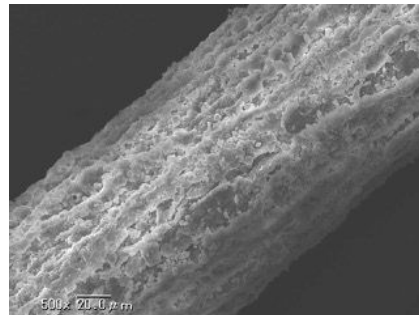


図 1 申請者が作製しているキトサン-HAp 複合体単繊維。キトサンと HAp のはっきりとした境界面は存在しない。

材料として有用な HAp からなり、乾燥時に一定の荷重をかけることにより良好な機械的特性を得る。またこの複合ファイバーは、キトサンと HAp とのマイクロオーダーでのはっきりとした境界面は存在しない (図 1)。しかし、これまでの荷重に頼るだけの方法ではキトサン繊維の配向によって強度の向上は確認できたが、最長 2 m を作製するのが限界で、人工靭帯として用いる為に 3 次元化可能な長繊維を作製することは困難であった。そこで、スピニング装置を作製し、乾燥時の巻き取り速度および速度比によって、延伸条件を制御することにした。

本研究では、キトサン-HAp 複合ファイバー作製時の各種条件 (組成、延伸条件等) を変え、それらの条件下で得られる微細構造、機械的特性および細胞適合性を調べ、ファイバーの微細構造と各種特性との関係を明らかにし、特にファイバーの機械的強度を向上させることを目的とした。また、得られたモノファイバーを 3 次元化する方法も検討した。

3. 研究の方法

(1) キトサン-HAp 系ファイバー: 0.1M 酢酸水溶液 30 mL に対してキトサンを 3.5 wt%、リン酸二水素ナトリウムを 0, 0.01, 0.02, 0.03, 0.03 M (P0, P1, P2, P3) となるように公転自転ミキサー (ARE-310, シンキー) を用いて混合した。このキトサン溶液を先端内径が 1.0 mm のシリンジに入れ、飽和塩化カルシウム水溶液とエタノールを体積比 1 : 1 で混合した凝固液に押し出し凝固させた。ファイバーを凝固液内で 30 秒程度遊走させた後、直径が 3.5 cm のローラーに緩やかに巻き取った。巻き取ったファイバーはエタノールに 5 分間浸漬し、脱水した。脱水後のファイバーを 0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液に 30 分間浸漬させた。得られたファイバーを純水に浸漬した。純水は、15 分おきに 4 回交換し、過剰な水酸化ナトリウムを取り除いた。得られたファイバーをエタノールに 1 分間浸漬して脱水した。その後、二種類のローラーの速度比が $V1/V2 = 2:3$ (10/15, 20/30, 30/45 rpm)

となるように延伸操作を行い、室温にてデシケータ内で乾燥させた。

(2) キトサン-シロキサン系ファイバー：0.2 M 酢酸水溶液 20 mL にキトサンを溶解させキトサン溶液を得た。キトサン：GPTMS = 0~1.0 (モル比) の 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMS) あるいはテトラエトキシシラン (TEOS) を 0.2M 酢酸水溶液 10 mL に加え 15 分間攪拌した。得られた溶液をキトサン溶液と混合し、3.5wt%キトサン-GPTMS 溶液、キトサン-TEOS 溶液およびキトサン-GPTMS-TEOS 溶液を得た。飽和塩化カルシウム水溶液とエタノールを体積比 1:1 で混合した凝固液に、流速 1.0 mL/min で内径 0.5 mm のノズルからキトサン溶液を押し出しローラーにて巻き取った。得られた湿潤ファイバーを、エタノールおよび 0.2M 水酸化ナトリウム水溶液にそれぞれ 5 分間および 30 分間浸漬した後、蒸留水でよく洗浄し、回転速度比が 30/45 rpm の二つのローラーで巻き取ることで延伸した。延伸後のファイバーはデシケータ内で 1 日間乾燥させた。

(3) ファイバーの構造評価：試料の結晶構造を薄膜 X 線回折法 (MXP3V, Mac Science, 線源 CuK α , 入射角 1°, 2 θ / θ スキャン, ステップ幅 0.02°, 保持時間 2 秒) を用いて調べた。フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR, FT/IR-6100, 日本分光) で分子構造を調べた。ファイバーの配向性は、偏光板を用い光学顕微鏡下で観察した。ファイバーにスパッタリング装置を用いて膜厚約 20 nm で Pt-Pd コーティングし、走査電子顕微鏡 (JMS-6010 PLUS/LA, 日本電子) を用いて表面の微細構造を観察した。エネルギー分散型 X 線 (EDS) 分枝装置を用いて表面の元素分析も行なった。ファイバーをエポキシレジンに埋め込み 65 nm の切片を作製し、透過電子顕微鏡 (JEM-2100, 日本電子) にて微細構造をより詳細に観察した。熱分析装置 (TG-DTA, 2000S, MacScience) で示差熱・熱重量測定を行いファイバー中の無機物/有機物比を見積もった。ニンヒドリン試験によりファイバーと GPTMS のエポキシ基量を見積もった。

(4) 機械的特性評価：2 cm 程に切ったファイバー (P0, P1, P2, P3, P4) の両端を 2×1 cm の紙に挟み、瞬間接着剤 (アロンアルファ一般用, 東亜合成) を用いて固定し 30 分間乾燥させた。乾燥後の試料の引張り試験をクリップメータ (RE2-3305C, 山電) で行った。

(5) 膨潤性および分解性評価：乾燥後のファイバー (P0, P1, P2, P3) を恒温槽にて 40°C で 4 時間乾燥させた後、ファイバー 10 cm に対して 10 mL の PBS 溶液あるいは 2.5 μ g/mL のリゾチーム/PBS 溶液に浸漬し、37°C で静

置した。この時の重量変化から膨潤率 (式 1) および重量減少率 (式 2) を算出した。

膨潤率 (%) = {(膨潤後の質量 - 膨潤前の質量) / 膨潤前の質量} × 100 (式 1)

重量減少率 (%) = {(浸漬後の質量 - 浸漬前の質量) / 浸漬前の質量} × 100 (式 2)

また、膨潤後の試料に関しては乾燥時と同様に引っ張り試験を行った。

(6) アパタイト成長評価：得られたファイバーを擬似体液 (SBF, pH7.4) に 37°C で浸漬した。浸漬後のファイバー表面形状を SEM で観察した。

(7) 骨芽細胞評価：得られたファイバーをポリスチレンプレート上に並べて固定した。骨芽細胞様細胞 MG63 細胞をファイバー上に播種、所定期間培養し、MTT アッセイにて細胞接着・増殖を調べた。

(8) 3次元構造体の作製：P2 のモノファイバーを用い 3次元体構造の作製を試みた。当初はロープ用の機械で 3次元化する予定であったがモノファイバーの強度が機械の速度に対して十分に満たなかったため、手で作製を行った。16 本のモノファイバーを用いて、円板を用いロープ編みにて 3次元構造体を作製した。

4. 研究成果

(1) キトサン-HAp 系ファイバー：どの組成においてもファイバーを得ることができた。ファイバー直径は添加するリン酸量に依存し、P0 = 194±3 μ m, P1 = 214±10 μ m, P2 = 225±13 μ m, P3 = 228±8 μ m であった。XRD 回折パターンの結果から、凝固直後にはいずれのピークも検出されず、水酸化ナトリウム処理後にキトサンと HAp のピークが検出された。ピークはブロードで強度も高くなかったが、リン酸添加量に伴い少しずつピーク強

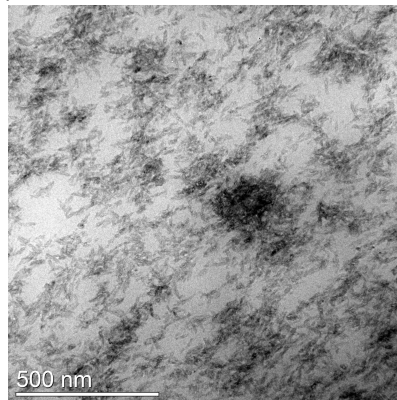


図 2 P2 ファイバーの TEM 像。HAp 粒子が一様に分布している。

度は高くなった。このことから凝固時には非晶質のリン酸カルシウムが形成するのみで、それがアルカリ環境下で HAp に転換されたと考えられる。熱分析の結果より、ファイバー内に形成する HAp 量は添加したリン酸量に依存し、P1 = 5%, P2 = 10%, P3 = 15%程度であった。

偏光子を用いた顕微鏡観察および透過電子顕微鏡の結果から、延伸操作後キトサン分子および HAp 粒子が延伸方向に対して配向していることが分かった。延伸速度を大きくする程、キトサン分子の配向性が向上し、ファイバーの最大応力は増加した。

SEM および TEM 観察より、形成した HAp 粒子はファイバー内全体にナノレベルで複合化されており、その大きさは約 20 nm(幅), 50 nm(長軸方向)であり、生体骨に含まれる水酸アパタイト(長さ約 50 nm 幅約 20 nm)の粒子と大きさや形状が類似した板状粒子であることを確認した(図2)。

PBS 中に浸漬すると、リン酸を添加しているファイバーでは、添加量に関わらず、親戚 10 分後で膨潤が大きく抑制されている様子が観察された。一方、リゾチーム溶液中では、浸漬 6 週までは、どのファイバーも重量減少率は 10%程度であったが、浸漬 9 週後では、リン酸を添加したファイバーで重量減少が抑制されていた。

機械的強度は、延伸時の二つのローラーの速度、含有する HAp 量によって異なった。延伸時のローラーの速度が早い程、引っ張り強さが大きくなった。ローラー速度を固定した場合、P2 で最も高い引っ張り破断強度を示した。湿潤環境下では、その強度は著しく減少した。

キトサン溶液中のリン酸濃度が高い程、HAp に帰属されるピーク強度が強くなり、含有無機成分も増加したことから、HAp 生成量が増加したと考えられる。よって、ファイバー内の HAp 生成量はリン酸濃度によって制御できる。HAp 生成量つまり無機成分が増加するとその脆性が強くなり、ファイバーの引っ張り破断強度の最大応力は減少した。ファイバーの膨潤率は HAp を複合させることにより抑制された。さらにそれに伴い最大応力の低下も抑制された。HAp を含むファイバーではキトサンのアミノ基と HAp が相互作用し、キトサン分子内に水分子が侵入しにくくなり、配向したファイバーの分子構造が水環境下で壊れにくくなるからであると考えられる。

SBF 中にキトサン-HAp ファイバーを浸漬すると、ファイバー内の HAp が成長することが XRD パターンおよび SEM 観察から確認された。

もっとも高強度を示した P2 ファイバーを

用いて 3 次元化を試みた(図3)。3 次元化する際、中心に円柱状の支持体を入れておくと、中空のものも作製することが可能であった。これは、神経再生足場材料等への応用も期待できる。

しかし、キトサン-HAp のみの複合体では、モノファイバーのこれ以上の機械的強度向上を期待出来ないおよび湿潤環境で著しく強度が低下するため、キトサン分子をシランカップリング剤で架橋する系に変更した。

(2) キトサン-シロキサン系ファイバー：XRD パターンよりキトサン / GPTMS = 0.5 (モル比)以上になるとキトサンに由来するピークは著しく減少した。FT-IR の結果より、GPTMS を添加した試料で C-H 伸縮振動に帰属されるピーク強度が高くなった。さらに、ニンヒドリン試験により GPTMS を添加した試料においてフリーノアミノ基量は減少していることが確認された。以上のことより、キトサンと GPTMS が反応し、ファイバー中にシロキサンのネットワークが導入されたと考えられる。さらに導入されたシロキサンネットワークがキトサン分子同士の相互作用を阻害して、キトサンの結晶性を低下させたと考えられる。

PBS 中の膨潤率は GPTMS 系では HAp 系程抑制されなかった。また GPTMS 添加量は膨潤度にはあまり影響を与えなかった。乾燥時の引っ張り強さは、キトサン / GPTMS = 0.1 (モル比)で最大となった。GPTMS 添加量をキトサン / GPTMS = 0.5 (モル比)以上に増やすと引っ張り強さは低下した。湿潤環境下でもこの傾向は変わらず、全体として強度の絶対値が低下した。

以上のことからキトサン / GPTMS = 0.1 (モル比)までは、キトサンの結晶性を損失しない程度で GPTMS がキトサン分子鎖内に導入され、さらにキトサンと GPTMS の架橋によって機械的強度が改善されたと考えられる。また GPTMS とは結合していないキトサンのアミノ基と凝固液中で配位結合を形成していたカルシウムイオンは水酸化ナトリウム処理および洗浄中に取り除かれるの



図3 16 組みロープ編みによる P2 の 3 次元構造体。

で、架橋していないキトサン分子の構造は結晶性を有する状態に戻ったと考えられる。一方、キトサン / GPTMS = 0.5 (モル比) 以上を加えた場合には、GPTMS によるシロキサンネットワークによるキトサン分子鎖間の隙間が大きくなりキトサンの結晶性を損失し、湿潤環境下では水分子がその隙間に侵入し易くなり、機械的強度の低下に繋がったに違いない。分子間の隙間が大きくなるのは、GPTMS の嵩高さに原因があると考え、分子量の小さい TEOS を加えた系でも検討した。

キトサン-GPTMS 系で最も高い引っ張り強度を示したキトサン / GPTMS = 0.1 (モル比) のファイバーに TEOS を加えた。PBS 中で膨潤度はキトサン-GPTMS 系よりも低下した。このことから、水分子が侵入可能な隙間が減少したと考えられる。引っ張り破断強度 TEOS を加えると一旦減少し、その後 TEOS 添加量にともない再度上昇する結果を得た。これは TEOS がキトサンと GPTMS 間の架橋結合を阻害するが、キトサン分子内に TOES 同士によって形成したシロキサンネットワーク (重合体) が増加し、それにともなって増加する脆性およびキトサン-TEOS 間の相互作用によると考えられる。TEOS のみを加えた系でも膨潤度、機械的特性ともに同様の傾向を示したことから、キトサン-GPTMS-TEOS 系は TEOS の構造およびキトサンとの相互作用がモノファイバーの特性に支配的であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

(1) 城崎由紀, Neves Susana, 岡田拓磨, 安富沙紀, “有機-無機複合体の創製と医用分野への応用”, ナノ学会会報, 第16巻, 第2号, 1-5頁, 2018年3月1日, 査読無

(2) Takuma Okada, Yuta Nobunaga, Toshiisa Konishi, Tomohiko Yoshioka, Satoshi Hayakawa, Maria A. Lopes, Toshiki Miyazaki, Yuki Shirosaki, “Preparation of chitosan-hydroxyapatite composite mono-fiber coagulation method and their mechanical properties”, Carbohydrate Polymers, 175 (2017) 355-360. 査読有

[学会発表] (計6件)

(1) Takuma Okada, Toshiki Miyazaki, Yuki Shirosaki, “Preparation of chitosan mono-fiber crosslinked with silane reagent”, 29th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (ISCM), Bioceramics 29, Poster 3. Composite, 2017.10.25-27, Toulouse, France.

(2) 岡田拓磨, 城崎由紀, 宮崎敏樹, “シリカカップリング剤によるキトサンファイバ

ーの架橋および機械的特性評価”, 日本セラミックス協会第30回秋季シンポジウム, 講演番号 2N25, 2017年9月19-21日, 神戸市(神戸大学: 六甲台地区)

(3) Yuki Shirosaki, Takuma Okada, Toshiki Miyazaki, “Preparation and characterization of chitosan-hydroxyapatite mono-fiber prepared by coagulation system”, International Conference on Frontiers in Materials Processing, Applications, Research & Technology (FiMPART'17), Session 11: Biomaterials 1, Invited, OP1883, 2017.07.09-12, Bordeaux, France.

(4) Yuki Shirosaki, Susana Neves, Takuma Okada, Saki Yasutomi, “Chitosan-inorganic hybrids for tissue regeneration”, 4th International Symposium on Peripheral Nerve Regeneration, Session 1: Innovative molecules and biomaterials for peripheral nerve regeneration, 2017.07.06-08, Barcelona, Spain.

(5) 岡田拓磨, 城崎由紀, 宮崎敏樹, “キトサン-HAp 複合ファイバーの微細構造及び生分解性評価”, 日本セラミックス協会第29回秋季シンポジウム, 講演番号 1F06, 2016年9月7-9日, 東広島市(広島大学: 東広島キャンパス)

(6) Takuma Okada, Toshiki Miyazaki, Yuta Nobunaga, Toshiisa Konishi, Tomohiko Yoshioka, Satoshi Hayakawa, Yuki Shirosaki, “Preparation of chitosan-HAp composite fiber for artificial ligament”, 10th World Biomaterials Congress (WBC2016), Poster Session 2B-Surface and interfaces, P.2972, p.2862, 2016.05.17-22(21), Montreal, Canada.

[その他]

ホームページ等

<http://www.che.kyutech.ac.jp/chesm29>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城崎 由紀 (SHIROSAKI, Yuki)

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 40533956

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

宮崎 敏樹 (MIYAZAKI, Toshiki)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・教授
研究者番号: 20324973

(4) 研究協力者

岡田 拓磨 (OKADA, Takuma)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・博士後期課程学生