

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K04167

研究課題名(和文)最適微視構造を有するコラーゲン/ハイドロキシアパタイト人工骨の創製原理の構築

研究課題名(英文) Development of Creation Principle of Collagen/Hydroxyapatite Artificial Bone with Optimized Microstructures

研究代表者

田中 基嗣 (Tanaka, Mototsugu)

金沢工業大学・工学部・教授

研究者番号：30346085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コラーゲン分子とアパタイト結晶を用いてボトムアップ式に創製・最適化した微視構造をもつ骨単位の設計・実現手法を確立することを目的とした。その結果、電気泳動により束化したコラーゲン線維およびハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合線維の引張強度の電流値上昇による変化には線維配向度と線維損傷によるトレードオフ関係が存在すること、HAp析出の前後どちらか一方ではなく前後ともにオステオネクチンを作用させることにより複合体としての引張強度が最大化されること、が示唆された。また、複数のハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合線維束をねじることによりオステオン様構造を作成するシステムを構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、コラーゲン/ハイドロキシアパタイト骨様複合線維束について、微視構造因子が各スケールにおける力学特性に及ぼす影響とその発現メカニズムを明らかにした上で、これらの因子の複合効果をパラメータステイ的に評価することで、骨組織と同じ(あるいはそれを上回る)力学特性を発現させる複合化・階層化微視構造を最適設計する手法を構築しようとするものである。従来存在しない手法を新しく確立する取り組みであり、この点に学術的独自性があると言える。また、その結果として、骨組織そのものを人工的に創出できる原理を構築し、従来に存在しない極限性能を持つ素材を創製する試みであり、この点に創造性があると言える。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop the principle to design and create the bone unit with the microstructures created and optimized using collagen molecules and apatite crystals with the bottom-up approach. As a result, it was suggested that the trade-off relation of fiber-orientation and fiber-damage would be existing in the change of the tensile strength of collagen fibers and hydroxyapatite/collagen composite fibers bundled by the electrophoresis by the increase of the electrophoresis current value. It was also suggested that the tensile strength of hydroxyapatite/collagen composite fiber bundles would be maximized by coating osteonectin both before and after the deposition of hydroxyapatite crystals. Finally, the preparation system of the osteon-like structures could be developed by twisting hydroxyapatite/collagen composite fiber bundles.

研究分野：複合材料学

キーワード：人工骨 コラーゲン ハイドロキシアパタイト 微視構造最適化 微小力学試験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会における健康寿命の増進は、我が国のみならず、世界的にも喫緊の課題と言える。高齢者に多く運動機能の著しい低下につながる骨疾患や骨欠損のなかでも、骨腫瘍や事故などに起因する大規模な骨欠損は自己修復が困難であるため、生体親和性の高い材料で作成された人工骨を埋植する方法が従来から多く採用されている。しかしながら、人工骨埋植部周囲の健全骨と比較して、セラミックスやチタン合金などの材料の場合は剛性が高すぎるためにストレスシールドिंगにともなう骨吸収が生じるリスクがある上に、長期的には劣化を避けることは難しく、再手術を必要とするデメリットがある。また、ポリ乳酸あるいはその複合材料などの生体吸収性人工骨の場合は、背骨や大腿骨など高負荷部位に適用できるほどの力学特性を実現するのは難しいために低負荷部位への適用が主となるだけでなく、力学特性の高い生体吸収性ポリマーは生体吸収速度が骨形成速度に比して遅く、溶け残った部分の力学特性が低くなる可能性が高いと考えられる。そのため、力学特性と生体吸収性を高度に両立させるための微視構造最適化が試みられているところである。これに対して、骨欠損部位にそもそも存在していた骨組織そのものを人工的に再現することが可能となれば、周囲の健全な骨組織との親和性がきわめて高い人工骨となるだけでなく、周囲の骨組織との接合が達成されれば治療が完了するため、骨欠損部位の治療期間を飛躍的に短縮できると期待される。骨組織においてはコラーゲン線維とアパタイト結晶が複雑に複合化・階層化されることにより優れた力学特性が発現するため、骨組織そのものを人工的に創製できるようにするためには、微視構造因子の及ぼす影響とそのメカニズムを解明しながらミクロスケールからマクロスケールに至るボトムアップ式手法により微視構造を最適化できる原理を構築することが必須となる。

2. 研究の目的

本研究では、コラーゲン単線維、コラーゲン/ハイドロキシアパタイトの複合線維、複合線維を一方に束ねたコラーゲン/ハイドロキシアパタイトの階層構造化骨様複合線維束、それをらせん状に巻いた円柱状骨単位について、変形・破壊特性に及ぼす微視構造因子の影響をパラメータスタディ的に評価することにより、コラーゲン分子とアパタイト結晶を用いてボトムアップ式に創製・最適化した微視構造をもつ骨単位的设计・実現手法を確立することを目的とした。これにより、個々の欠損部位に埋植するだけで治療が完了する究極の人工骨カートリッジのテーラーメイド微視構造最適設計の実現に寄与することを目指した。

3. 研究の方法

(1) コラーゲン線維の作成

fish コラーゲンペプチドを用いて 0.1[wt%]のコラーゲン水溶液を作成するとともに、リン酸二水素ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムを用いて 40[mmol/L]のリン酸ナトリウム緩衝液を作成した。リン酸ナトリウム緩衝液に、1.00~2.00[mol/L]の塩化ナトリウムと 5[mmol/L]の水溶性カルボジイミド(1-ethyl-3-carbodiimide hydrochloride: EDC)を投入して混合した後、コラーゲン水溶液と混合し、fish コラーゲン変性温度より低い保温温度 25[]で約 7 日間湯せん・冷却保存した。

(2) HAp/コラーゲン複合線維の作成

トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩とトリス塩基を蒸留水に投入してトリス塩酸バッファーを作成し、200[mmol]の塩化カルシウムを混合して Ca 溶液を作成した。120[mmol]のリン酸水素二ナトリウムと蒸留水を混合し、P 溶液を作成した。デジタル卓上高温水槽を用いて 37 に設定した Ca 溶液および P 溶液に対して、コラーゲン線維を 50[s]ずつ交互浸漬した。

(3) 接着タンパクのコーティング

HAp/コラーゲン複合体を接着タンパクでコーティングするために、オステオネクチン(SPARC/BM-40, ヒト, 組換え体) 50[μ g], 蒸留水 100[μ L]を用意した。蒸留水をオートクレーブで滅菌し、滅菌した蒸留水とオステオネクチンを混合した。次に、HAp/コラーゲン複合体に対して、交互浸漬をおこなう前のみ、交互浸漬をおこなった後のみ、交互浸漬をおこなう前および交互浸漬をおこなった後にマイクロピュレットを用いてオステオネクチンをコーティングした。

(4) コラーゲン線維および HAp/コラーゲン複合線維の束化

電気泳動法により、コラーゲン線維および HAp/コラーゲン複合線維を束化した。下部槽に約 420[mL], 上部槽に約 80[mL]の塩化ナトリウム水溶液を入れ、下部槽に上部槽をセットした泳動槽にコラーゲン線維または HAp/コラーゲン複合線維を入れ、30[μ min]泳動をおこなった。

(5) 微小力学試験

微小力学試験(図 1)は、デジタルマイクロスコープを用いておこなった。レンズには 50~

500 倍のレンズを用いた。摘出した試験片を、ガラス繊維・ボロン繊維の順に接着した。ボロン繊維をマイクロメータのスピンドルに平行に固定し、ガラス繊維をボロン繊維に対して垂直に固定した後、マイクロメータでボロン繊維を引張ることにより、ガラス繊維にたわみを与えた。試験片が円形断面を有すると仮定し、コラーゲン線維が破断したときのガラス繊維のたわみ量より、片持ちはりの原理を用いて引張強度を求めた。

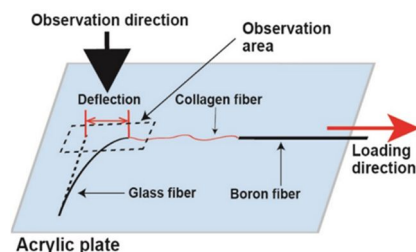


図 1 微小力学試験原理の模式図

(6) オステオン様構造の作成

オステオン様構造は、複数の HAp/コラーゲン複合線維束の一端を固定し、他端を回転させてねじることで作成した。オステオン様構造を作成するための装置の模式図およびオステオン様構造を作成する手順を、図 2 に示す。アクリル板上で HAp/コラーゲン複合線維束の一端にボロン繊維を接着し、微小力学試験装置のスピンドルに平行に固定した。他端にもボロン繊維を接着し、ねじり装置のロッドにボロン繊維を接着した後、ねじり装置側を回転させた。

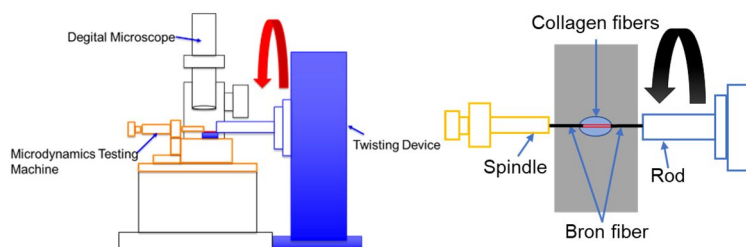


図 2 オステオン様構造作成のための装置および作成手順の模式図

4. 研究成果

(1) コラーゲン線維束の微小力学試験結果

微小力学試験により得られたコラーゲン線維束の微小力学試験結果を、図 3 に示す。これより、比較のために作成・評価した束化していないコラーゲン線維単体と比較して、コラーゲン線維束の引張強度は同程度あるいは低い引張強度を示した。その要因として、コラーゲン線維束の引張強度が、ばらつきを有するコラーゲン線維のうちもっとも弱い引張強度をもつ線維に依存するためと推察される。また、電気泳動時の電流値の増加にともない、コラーゲン線維束の強度が増加した後低下した。一般的に、このような現象のメカニズムとして、相反する二つ（以上）の効果が存在することが想定される。電気泳動を用いたコラーゲン線維束の作成における電流付加の効果としては、コラーゲン線維の配向がそろって束となる効果と、コラーゲン線維そのものを損傷させる効果が存在することが推察される。これら両方の効果は、電流値が増大するにともなって大きくなることが予想されるため、電流値が低いとき十分に束化・配向せず、電流値が高すぎるとコラーゲン線維自体を傷つけるトレードオフの関係があると考えられる。本研究の範囲では、電気泳動時の電流値 4 [mA] のときに、コラーゲン線維束の引張強度が最大化された。

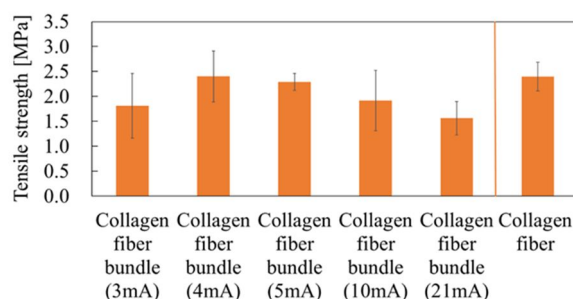


図 3 コラーゲン線維束の微小力学試験結果

(2) HAp/コラーゲン線維束の微小力学試験結果

微小力学試験により得られた HAp/コラーゲン線維束の微小力学試験結果を、図 4 に示す。これより、比較のために作成・評価した束化していない HAp/コラーゲン線維単体と比較して、HAp/

コラーゲン線維束の引張強度は低い引張強度を示した。その要因として、HAp/コラーゲン線維束の引張強度が、ばらつきを有する HAp/コラーゲン線維のうちもっとも弱い引張強度をもつ線維に依存するためと推察される。特に、柔軟性を有するコラーゲン線維にぜい性的なセラミック材料である HAp を複合化することによって、コラーゲン線維と比較して HAp/コラーゲン線維がよりぜい性的な破壊挙動を示すようになると考えられ、それにともなって引張強度のばらつきはより大きくなると予想される。そのため、束化によって引張強度が大きく低下したと考えられる。また、電気泳動時の電流値の増加にともない、HAp/コラーゲン線維束の強度が増加した後低下した。したがって、コラーゲン線維束の場合と同様に、HAp/コラーゲン線維束においても、電流値が低いとき充分に束化・配向せず、電流値が高すぎるとコラーゲン線維自体を傷つけるトレードオフの関係があると考えられる。本研究の範囲では、コラーゲン線維束の場合と同じく、電気泳動時の電流値 4 [mA] のときに、HAp/コラーゲン線維束の引張強度が最大化された。

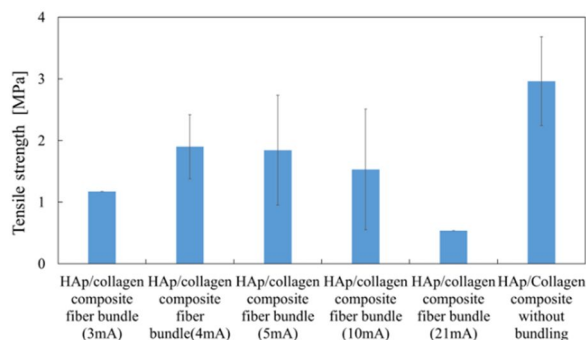


図4 HAp/コラーゲン線維束の微小力学試験結果

(3) オステオネクチンを導入した HAp/コラーゲン複合線維束の微小力学試験結果

オステオネクチンを導入した HAp/コラーゲン複合線維束の微小力学試験結果を、図5 に示す。交互浸漬をおこなう前および交互浸漬をおこなった後にそれぞれ 0.5[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] のオステオネクチンを 2.5[μL] 導入して、その後、電気泳動法を用いて作成した HAp/コラーゲン複合線維束の引張強度が最大となった。その要因として、交互浸漬前後にオステオネクチンを導入して作成した HAp/コラーゲン複合線維束は、コラーゲンと HAp の間および HAp 間にオステオネクチンが接着し、コラーゲンと HAp の間および HAp 間の接着強度が高くなり、接着の弱い部分からの破断が起こりづらくなり、引張強度が最大になったと考えられる。

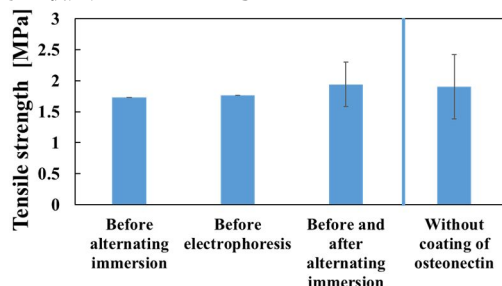


図5 オステオネクチンを導入した HAp/コラーゲン複合線維束の微小力学試験結果

(4) オステオン様構造の作成

HAp/コラーゲン複合線維束をねじった結果の例を、図6 に示す。なお、ねじる角度は骨のらせん角を参考に算出することを考える必要があるが、ここではまず、らせん角を 30° に設定し、2本の HAp/コラーゲン複合線維束をねじった。ねじる前後を比較すると、線維束間の距離が短くなっており、オステオン様構造の作成が可能になったと考えられる。

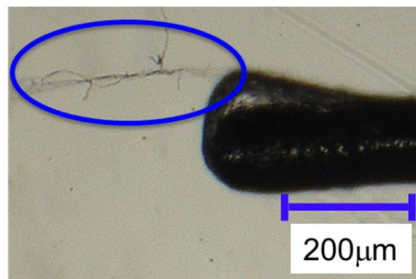


図6 オステオン様構造の作成結果の例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 田中基嗣, 狛谷健, 長谷川優太, 石井大雅	4. 巻 49
2. 論文標題 電気泳動により形成したHAp/コラーゲン複合線維束の引張強度に及ぼす泳動電流の影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本複合材料学会誌	6. 最初と最後の頁 100-106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 狛谷健, 長谷川優太, 田中基嗣, 金原勲
2. 発表標題 電気泳動条件がHAp/コラーゲン複合線維束の力学特性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本材料学会第71期学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 狛谷健, 田中基嗣, 金原勲
2. 発表標題 HAp/コラーゲン複合線維束における電気泳動条件最適化
3. 学会等名 日本機械学会 2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中基嗣, 狛谷健, 金原勲
2. 発表標題 最適な微視構造を有するHAp/コラーゲン複合線維束創製の試み
3. 学会等名 日本複合材料学会第47回複合材料シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Komatani, K. Tanaka, M., Kimpara, I.
2. 発表標題 Optimization of preparation condition of HAp/collagen composite fiber bundles prepared by electrophoresis
3. 学会等名 The 6th International Conference on Materials and Reliability (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 狛谷健, 石井大雅, 田中基嗣, 金原勲
2. 発表標題 電気泳動法を用いて作成したHAp/コラーゲン複合線維束の引張強度に及ぼす架橋剤濃度の影響
3. 学会等名 日本機械学会北陸信越支部2023年合同講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中基嗣, 石井大雅, 狛谷健, 金原勲
2. 発表標題 HAp/コラーゲン複合線維束の燃りによるオステオン様構造創製の試み
3. 学会等名 第14回日本複合材料会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 狛谷健, 長谷川優太, 田中基嗣, 金原勲
2. 発表標題 電気泳動法を用いて作成したHAp/コラーゲン複合線維束の力学特性に及ぼす作成条件の影響
3. 学会等名 日本機械学会北陸信越支部2022年合同講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------