

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：33703
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21592505
研究課題名（和文）リボン状 OCP/アパタイト複合結晶を用いた高靱性コラーゲン複合体の開発
研究課題名（英文）Development of ribbon-like OCP/apatite mixed crystals and collagen composite with toughness
研究代表者
飯島 まゆみ（Iijima Mayumi）
朝日大学・歯学部・助教
研究者番号：80164838

研究成果の概要（和文）：高い強度と靱性を有する、即ち、硬くて粘り強い骨代替材の開発を目指して、オクタカルシウムリン酸塩（OCP）/アパタイト複合結晶とタイプ I コラーゲンから成る複合体を作製し、力学的性質を向上させる加圧成形条件を模索した。複合体を圧力 200MPa で、試料の状態（乾燥、湿潤）と成形温度（室温、40℃）の異なる4つの条件で板状に成形し、3点曲げ試験によりその強さ、靱性（粘り）、Young 率（硬さ）を測定した。成形体の強さと靱性は、湿潤 40℃成形で増加し、Young 率は、乾燥 40℃成形で増加した。

研究成果の概要（英文）：We have been developing an osteoconductive composite with both strength and toughness, using octacalcium phosphate (OCP)/apatite crystal and type I collagen. Composite was consolidated at room temperature or 40℃ under dry and wet conditions. Mechanical property of the consolidated blocks was measured by 3-point bending tests. It was found that the consolidation temperature and wetness were critical to increase the strength and toughness. While, Youngs' modulus was increased by dry consolidation at 40℃.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：生体材料・コラーゲン・オクタカルシウムリン酸塩・アパタイト・曲げ強さ・靱性・Young 率

1. 研究開始当初の背景

骨組織代替材料としてこれまでに作製されて来たアパタイト・コラーゲン複合体は、コラーゲン繊維上にアパタイトを析出させたものがほと

んどである。また、多くのコラーゲン複合体は、Cold Isostatic Pressing (CIP)によって加圧成形されている。一般に、複合体の強度は、アパ

イト添加により向上するが、コラーゲン基質が本来持っている靱性は低下するため、強度と靱性を合わせ持つのが得られ難い。加温下でコラーゲン基質に応力をかけると可塑性を示し、複合体がより緻密になり、複合体の力学的性質の向上に一定の効果があると予想された。加圧成形法にはCIPの他に80℃まで加熱可能な温水静水圧成形装置(WIP)もあるが、これまでにWIPによるアパタイト・コラーゲン複合体成形の報告は見当たらない。

2. 研究の目的

本研究は、高い靱性と強度を有するオクタカルシウムリン酸塩(OCP)/アパタイト・コラーゲン複合体の開発を目指している。その手段として、アスペクト比の大きいリボン状形態のOCP/アパタイト複合結晶をコラーゲンマトリックスの強化フィラーとして用い、WIPによる加温高圧成形を行った。リボン状の結晶は、フレキシブルなため、複合化してもコラーゲン基質の靱性を低下させることなく強度を向上できると考えられた。本研究では、コラーゲン基質の緻密化に対するWIPの効果を検討するために、乾燥状態、湿潤状態、WIP、CIPの組み合わせで複合体を加圧成形し、成形条件と力学的性質の関係を調べた。さらに、ビーグル犬の下顎骨と大腿骨の強さ、靱性およびYoung率を同一方法で測定し、複合体と比較した。

3. 研究の方法

(1) OCP/アパタイト複合結晶作製：陽イオン交換膜(セレミオン、旭ガラス(株))によりカルシウムイオンの拡散を制御した実験系リボン状結晶を育成した。結晶中のOCP/アパタイトの比率は、溶液中のフッ素濃度によって制御した。図1にリボン状のOCP/アパタイト複合結晶のSEM像を示す。

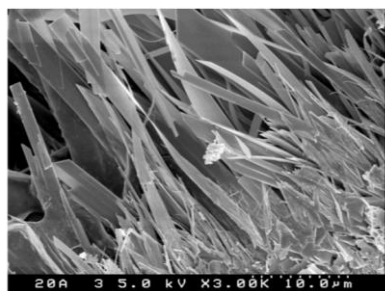


図1 リボン状OCP/アパタイト結晶のSEM像

(2) 結晶とコラーゲンの複合化：所定の割合で、

結晶、Tris-HCl 緩衝溶液(pH8.6)と Cellmatrix (TypeI-A, 新田ゼラチン(株))を混合し、37℃でコラーゲンの再線維化・架橋を行った。反応終了後、複合体を遠心分離し、凍結乾燥した。結晶とコラーゲンの混合割合を変えることにより複合体のコラーゲン含有率を約40-70%の間で変えた。結晶を混合しない再線維化コラーゲンのみの試料も作製した。

(3) 成形体の作製：凍結乾燥した複合体約10mgを2x10mmの金型に充填し、乾燥条件ではそのまま、湿潤条件では蒸留水により湿潤化した。予備

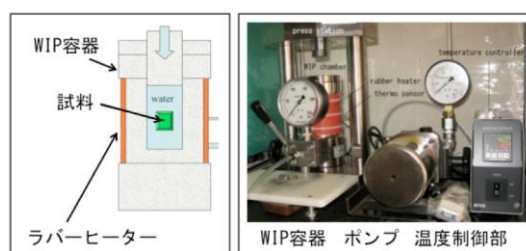


図2 WIP装置

成形後、WIP成形(NPaシステム(株), 図2)では40℃、CIP成形では室温約20℃にて、200MPaで30分間加圧した。これらを組み合わせた4つの条件(表1)で複合体を加圧成形した。

表1 成形体作製条件

条件	温度	試料の状態	名称
1	室温	乾燥	乾燥CIP
2	室温	湿潤	湿潤CIP
3	40℃	乾燥	乾燥WIP
4	40℃	湿潤	湿潤WIP

(4) 力学的性質の測定と曲げ挙動の評価：成形体の3点曲げ試験(EZ graph, 島津製作所)を、クロスヘッドスピード0.5mm/min、スパン5mm、大気中で行なった。成形体にかかった荷重(N)と成形体のサイズから応力(MPa)を計算し、応力(MPa)-変位(mm)曲線から成形体の曲げ強さ、靱性、Young率を求めた。成形体にかかった最大荷重(N)と成形体のサイズから曲げ強さ(MPa)を求めた。成形体は、初め弾性的に変形し、次いで、非線形的な変位を続け、最大応力に達する。その後も破断せず、下部支点に支えられた状態で変位が続くため、破断点を示さない。そこで、靱性の指標として、変位0mmから最大応力に達した時点の変位

(mm)までの応力-変位曲線の面積を用いた。Young率は、初期の線形領域の勾配を用いて計算した。

5) 比較試料

凍結乾燥したウシのアキレス腱とビーグル犬(5歳雄)の下顎骨と大腿骨緻密骨から本成形体と同一サイズの試験体を切り出した。アキレス腱切片は、複合体と同じ条件で加圧成形した。切出した骨は測定までハンクス平衡塩溶液(Mediateck Inc.)中で冷凍保存し、使用直前に解凍して曲げ試験を行った。朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認番号: 11-013、11-023

4. 研究成果

(1) 3-(2)の方法によって、コラーゲン繊維の間に3-(1)で育成したりボン状結晶が分散した複合体が得られた。図3に複合体のSEM像を示す

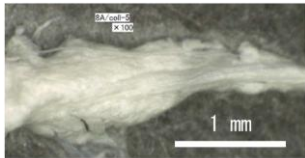


図3 凍結乾燥後の複合体の顕微鏡像

(2) 複合体の成形条件により、曲げ挙動が異なっていた。図4に、4つの条件で作製した成形体の典型的な応力(MPa)-変位(mm)曲線を示す。いずれの条件で作製した成形体も、応力を加えると、初期に弾性的な挙動を示し、次いで、非線形的な変位をした後、最大応力に達した。さらに、応力を加えて続けても部分的な断裂が進行するのみで、2つに分断される事はなかった。

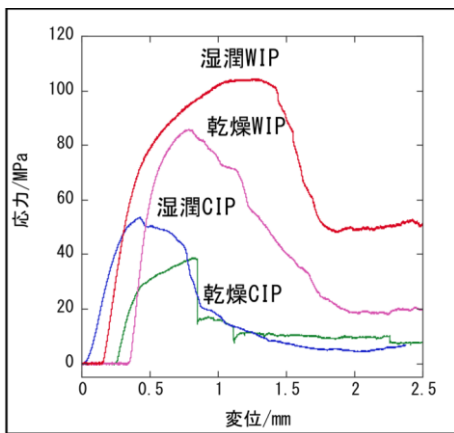


図4 応力(MPa)-変位(mm)曲線

(3) 成形体の応力(MPa)-変位(mm)曲線をもとに

して求めた曲げ強さ、靱性、Young率を表2に示す。乾燥CIP、湿潤CIP、乾燥WIP、湿潤WIPにおいて、成形体の曲げ強さおよび靱性は、乾燥条件よりも湿潤条件、CIPよりもWIPで成形したものの方が大であった。一方、Young率は、湿潤条件よりも乾燥条件、CIPよりもWIPで成形したものの方が大であった。曲げ強さおよび靱性は、湿潤WIPにおいて最も大きく、Young率は、乾燥WIPにおいて最も大きかった。湿潤条件では、WIP成形により、CIP成形体よりも強さは約1.4倍、靱性は約2倍、Young率は約1.3倍であった。乾燥条件では、WIP成形により、曲げ強さ、靱性およびYoung率はCIP成形体の約2倍であった。

表2 各条件で作製した成形体及びビーグル犬の骨の曲げ強さ、靱性、Young率およびcollagen含有量

	曲げ強さ MPa	靱性 MPa・mm	Young率 GPa	collagen wt%
乾燥CIP n=7	37±8	10±8	2.5±1	60±2
湿潤CIP n=7	66±8	25±14	2.2±0.5	60±2
乾燥WIP n=6	74±17	20±11	5.4±0.9	60±2
湿潤WIP n=7	94±12	43±18	3.5±0.5	60±2
下顎骨 n=11	171±43	29±11	13±3	32±1
大腿骨緻密骨 n=13	280±54	35±8	15±4	35±1

(4) WIP成形体と犬の骨の力学的性質を比較すると、WIP成形したものは、曲げ強さは骨の20~30%、Young率は、30~40%であったが、靱性は2倍近くになった。これは、今回の成形体のコラーゲン含有量が骨の2倍ほどであった事も関係すると考えられる。今後は、結晶量を増やす事により、強さとYoung率をどこまで向上できるか、また、それに伴い靱性がどのように変化するかを測定し、本複合体がどこまで骨の力学的性質に近づけるかを追求する予定である。

(5) 各成形体のSEMによる観察において、成形条件と成形体の構造の相違は明確ではなかった。一方、成形体の曲げ試験後の顕微鏡像には、破折状態に顕微鏡レベルの構造の相違が反映されていた。

(6) 図5に、成形体の曲げ試験により、破折した部位の顕微鏡像を示す。成形体の破折状態は、成形条件により異なっていた。乾燥CIPしたものが応力により破壊した範囲が最も大きく、乾燥WIPではそれよりも破壊の程度が小さかった。乾燥成形

したものは、collagen 繊維がほぐれるように破壊しており、湿潤成形したものは、CIP、WIP 共に大きなスケールで破壊が起こっており、collagen 繊維がほぐれるような破壊はほとんど見られなかった。

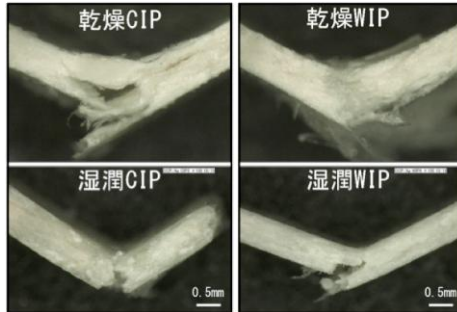


図5 曲げ試験後の成形体の顕像

(7) 成形体の組織は、顕像レベルではあるが、湿潤成形、WIP 成形したものは、乾燥成形、CIP 成形した場合より緻密で、collagen 繊維がほぐれるような破壊はほとんど見られなかったことから、collagen 繊維同士の間が一体化が起こっていると推察された。

(8) ウシのアキレス腱は、湿潤 WIP 成形により、強さ、Young 率、靱性が CIP 成形のおよそ2倍となった(表3)。また、アキレス腱は、結晶を含

表3 Achilles腱成形体の曲げ強さ、靱性、Young率

	曲げ強さ MPa	靱性 MPa・mm	Young率 GPa
湿潤CIP $n=7$	57±2	58±13	1.6±0.1
湿潤WIP $n=7$	106±16	102±30	2.7±0.4

まないにも拘らず、同一成形法の複合体と比べ、強度は同程度、靱性は約2倍、Young 率はやや小さかった。曲げ試験後のアキレス腱成形体の顕像

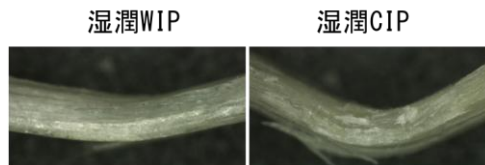


図6 曲げ試験後のAchilles腱成形体の顕像

像(図6)は、曲げ応力によりコラーゲン繊維が

ほとんど破断されておらず、コラーゲン繊維同士がよく一体化していることが示された。このことから、湿潤条件での加圧成形はコラーゲン基質の力学的性質の向上に一定の効果があり、その効果は室温よりも40℃において大きい事が示された。

(9) collagen 含有量 40%、60%および70%の成形体の曲げ強さ、Young 率、靱性は、collagen 含有量と必ずしもlinerな関係になく、これらの力学的性質を向上させるパラメータが異なっている事が示唆された。今回は、collagen 含有量60%を中心に成形条件と成形体の力学的性質の関係を調べた。今後は、材料設計の指針を得るために、広い範囲で collagen 含有量を変えて、成形体の強さ、Young 率、靱性および破折/破壊挙動の関係を調べる。

(10) アキレス腱は、結晶を含まないにも拘らず、曲げ強度は同一成形法の複合体と同程度であった。アキレス腱ではコラーゲン繊維がその繊維軸の方向に非常に揃った緻密な組織である。このような構造のコラーゲン基質を湿潤温熱条件で加圧成形し、図6のような非常に緻密な成形体となった事が、力学的性質の向上に寄与した可能性がある。このことから、複合体内での結晶とコラーゲン繊維の配列をさらに制御し、力学的性質との関連を検討する事も今後の課題となった。

5. 主な発表論文

①飯島まゆみ、若松宣一、亀水秀男他、オクタカルシウムリン酸塩/アパタイト複合結晶とコラーゲン複合体の成形条件と曲げ挙動、第59回日本歯科理工学会学術講演会、2012年4月15日、徳島県郷土文化会館

②M. Iijima, N. Wakamatu, H. Kamemizu et al, Flexural behavior of octacalcium phosphate (OCP)/apatite-type I collagen composite consolidated by warm isostatic pressing, 12th-International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2012年1月25日, Nagoya University

③飯島まゆみ、若松宣一、亀水秀男他、オクタカルシウムリン酸塩/アパタイト複合結晶とコラー

ゲン複合体の曲げ挙動-温水等方圧プレスの効果,
第58回日本歯科理工学会学術講演会, 奥羽大
学

④ M. Iijima, N. Wakamatu, H. Kamemizu et al,
Flexural Behavior of Collagenous Matrix
Consolidated by a Warm Isostatic Pressing,
International Dental Materials Congress 2011,
2011年5月27-29日, Seoul, Korea

⑤ 飯島まゆみ, 若松宣一, 亀水秀男 他、オクタ
カルシウムリン酸塩(OCP)/アパタイト複合結晶
コラーゲン複合体の曲げ挙動: 湿潤成形の効果に
ついて, 第55回日本歯科理工学会学術講演会,
2010年4月17日, 船堀コンベンションセンター
(千葉県)

6. 研究組織

1) 研究代表者

飯島 まゆみ (Iijima Mayumi)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号: 80164838

(2) 研究分担者

若松 宣一 (Wakamatsu Nobukazu)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号: 00158594

亀水 秀男 (Kamemizu Hideo)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号: 00152877