

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670829

研究課題名(和文)骨伝導能増大に寄与するリン酸カルシウム材料の表面水和構造の創製

研究課題名(英文)A study of hydrated layer of calcium phosphate surface and its osteoconductivity

研究代表者

鈴木 治 (Suzuki, Osamu)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60374948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸カルシウムの表面水和構造と骨伝導能との関連性を研究した。F含有リン酸カルシウムを合成し、FTIRカーブフィッティングによる分析から酸性リン酸塩の指標となる HP04 および HA に帰属される OH の同定を試み、F- HA への加水分解程度と HP04 の存在量の関連性が測定できることを確認した。さらに、 HA への結晶化速度を骨伝導能発現の指標とみなし、 HA 前駆体の HA への結晶化プロセスについて調べた。擬似体液中において ACP と OCP が共存すると OCP の HA への加水分解が促進されること、加水分解の進展がカーブフィッティングによる OH の表面水和構造の変化として観察できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present study was designed to investigate about whether surface hydrated structure of calcium phosphate materials is associated with their biocompatibility and osteoconductivity. Fluoride-containing hydroxyapatite was synthesized according to our previous report (Shiwaku et al. Acta Biomater 2012) and subjected to analyze non-apatitic and apatitic HP04 and OH ions in the structure by FTIR cure fitting. The hydrolysis progress was shown to relate to the change of HP04 content. Because it has been suggested that the conversion process from HA precursor to HA may be involved in increasing the osteoconductivity of the calcium phosphate materials, the degree of crystallization from the precursor phases to HA was investigated by immersing the HA precursors in simulated body fluid. It was apparent that the hydrolysis of OCP is enhanced in the co-presence of ACP and the process can be detected by monitoring the surface OH ions in the hydrated structure through FTIR cure fitting analysis.

研究分野：生体材料学

キーワード：生体材料 表面 水和 セラミックス

1. 研究開始当初の背景

骨と直接結合する骨伝導材料としてバイオガラス、ハイドロキシアパタイト (HA)、結晶化ガラス (アパタイト・ウォラストナイト結晶化ガラス AW-GC)、リン酸八カルシウム (OCP) 等が見出されてきた (Oyane A et al. *Acta Biomater* 8:2034-2046, 2012 Review). 骨伝導能は材料表面に骨様アパタイト層が形成されることで獲得されると考えられてきたが、その形成には HA 材料において表層のミネラルイオンリッチな非アパタイト様構造水和層が深く関わっているとされ、水和層の反応性が骨伝導能発現に関係することが示唆されていた (Rey C et al. *Mater Sci Eng C-Biomimetic Supramolecule Sys* 27:198-205, 2007). しかし、水和層の性質と構造を人工的に調節して高い骨伝導能を示す材料を創出しようという試みは無かった。

私達は先に独自合成の OCP と加水分解 HA を用い次の成果を得ていた。すなわち、1) OCP は *in vivo* で HA に徐々に転換し HA よりも高い骨伝導能を示す (Suzuki O et al. *Tohoku J Exp Med* 164:37-50, 1991); 2) OCP は骨芽細胞の分化を促進する ApoE (Kodama T et al. *Asian J Oral Maxillofac Surg* 19: 96-100, 2007) を HA よりも多く吸着する (Kaneko H et al. *Anal Biochem* 418: 276-285, 2011); 3) OCP は自身の結晶表面に pH により可逆的に吸脱着できる HPO_4 種を持つ (Suzuki O et al. *J Dent Res* 74: 1764-1769, 1995); 4) Zn を含有する Zn-OCP は表面層から容易に脱離する緩い結合の Zn を持つ (Honda Y et al. *Cryst Growth Design* 11: 1462-1468, 2011); 5) OCP 合成下で F を共沈・加水分解して得た F-HA は HA 構造をとるにも関わらず OCP 類似の溶解性を示す (Shiwaku Y et al. *Acta Biomater* 8: 4417-2225, 2012)。

本研究ではこれらの成果に基づき F を含有させた OCP 或は HA を合成して化学的に異なる表面水和層を持つ可能性のある材料を調整し、材料としての性質を明らかにすることを計画した。また表面の構造を明らかにするだけでなく、リン酸カルシウム材料の骨伝導能と表面水和構造との関連性を研究し、材料科学的に骨伝導能を調節できるかどうか検討することで、より活性の高い生体材料の合成の可能性について検討することを計画した。この研究を実施することにより高骨伝導を誘導する水和層構造について知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

リン酸カルシウム材料表面に存在する水和層の化学的構造を解明し、骨伝導能を調節し得るリン酸カルシウム生体材料を合成・創出することを目的とする。リン酸カルシウムの骨伝導能発現の決定因子とされる表面水和層 (hydrated layer) に異電荷のイオンをトラップさせて化学的に異なる水和層を持

つ材料表面を調整する。表面の HPO_4^{2-} 存在量が pH により可逆的に変動し、また骨芽細胞分化を促進する因子 (アポリポタンパク質 (ApoE)) を吸着することが解明されているリン酸オクタカルシウム (OCP) に、結晶格子に置換可能なフッ素 (F-) を含有させた F-OCP、またその HA への加水分解産物を調整し、リン酸カルシウム材料として骨伝導能が調節できる材料表面の物質化学的条件を決定し骨伝導材料の開発に有用な材料科学的なデータの取得を目的とする。

3. 研究の方法

(1) OCP および F 含有リン酸カルシウム、またそれらの加水分解産物の合成

OCP は確立済み合成方法に基づき (Suzuki et al. *Tohoku J Exp Med* 164:37, 1991), Ca, リン酸存在下、温度、pH を一定にし、OCP の過飽和条件下で調製した。F 塩を OCP 合成プロセス下共沈殿法により F が異なる含有量を有するように調製して合成した (Shiwaku et al. *Acta Biomater* 8: 4417-2225, 2012)。OCP、または F 含有材料を 60~70 で最大で 24 時間まで保持して段階的に HA へ加水分解した材料群を調製した。沈殿乾燥物の結晶構造は粉末 X 線回折 (XRD) および KBr 希釈法による FTIR により同定した。また、OCP を別に単独で合成し、2ppm F を含有する Tris-HCl (pH7.4, 37) に 10 日間まで浸漬して加水分解を徐々に促進させた。同様に、材料科学的なキャラクタリゼーションを行った。

(2) 表面水和構造の FTIR カーブフィッティング

得られたリン酸カルシウムの粉体を KBr 希釈法にて FTIR 測定を行い、 400cm^{-1} 付近~ 700cm^{-1} 付近の吸収帯をカーブフィッティングによりピークを分離した。HA 研究の既報を参考にして (Vandecandelaere et al. *J Mater Sci: Mater Med* 23:2593-2606, 2012), 631cm^{-1} : OH^- (HA), 617cm^{-1} : PO_4^{3-} (非 HA), 601cm^{-1} : PO_4^{3-} (HA), 575cm^{-1} : PO_4^{3-} (HA), 560cm^{-1} : PO_4^{3-} (HA), 550cm^{-1} : HPO_4^{3-} (HA) に分離した。これらのピークを参考にして、 HPO_4 と OH を加水分解進展と HA への結晶化の指標として使い、合成した材料を評価した。

(3) HA 前駆体の HA への結晶化とキャラクタリゼーションならびに表面水和構造と骨伝導能との関連性の検討

FTIR カーブフィッティングで得られる表面構造の情報と骨伝導能との関連性を調べた。セラミックス材料においては材料表面に HA が形成されることが骨伝導能を発現するメカニズムと考えられてきた (Kokubo T et al. *Biomaterials* 12:155-63, 1991)。一方、HA の前駆体が HA に結晶化する際に骨伝導能を発現するメカニズムも示唆されてきた (Suzuki O. *Acta Biomater* 6:3379-3387, 2010; Makarucha AJ et al. *Eur Biophys J*

40:103-115, 2011). 本研究では HA 形成を骨伝導の指標と仮定した.

ヒト血漿の無機イオンと類似の組成を持ち, HA 塩に関して準安定状態 (HA 結晶を投入することで添加的結晶成長が生じる環境) にある小久保らが開発した擬似体液 (SBF) を調製し (Kokubo T et al. J Biomed Mater Res 24: 721-34, 1990), SBF に整粒した粉末を一定量秤量して容器に SBF と共に入れ, 容器ごと 37 温浴に浸してスターラーで攪拌下, 2 週間浸漬した. 浸漬する結晶として HA に結晶化することが解明されている非晶質リン酸カルシウム (ACP) および OCP を用いた. ACP 単独, OCP 単独, および ACP と OCP を 25t% ~ 75wt% の割合で機械的に混合した二相系材料を用いた. 顆粒径はそれぞれ 300 ~ 500 μ m を用いた. これらの粒子を等用量となるように秤量し, SBF 浸漬に供した. 浸漬後に遠心沈降して結晶および SBF を分離し, それぞれ回収した. 結晶は洗浄後にオープンで乾燥させ, XRD, FTIR, SEM 観察等の結晶の分析に供した. 上清は Ca およびリン酸を化学分析にて定量した. HA, OCP, DCPD に関する過飽和度計算シミュレーターにて Ionic Product / Solubility Product を算出し, 過飽和度 (Degree of supersaturation) を割り出し, HA への結晶化を見積もった. 過飽和度は一つの溶液に対して, それぞれ HA, OCP, DCPD に関する過飽和度として求められ, 飽和, 不飽和の情報も得られるため, 材料のキャラクタリゼーションと合わせ, 溶液側から見た HA 形成の駆動力の高さを評価する方法として用いた.

4. 研究成果

(1) 異種イオン含有リン酸カルシウムの合成

異なる表面水和構造を持つ可能性のある無機イオンを含有するリン酸カルシウムの合成を試みた. 無機イオンとしては既報に基づいて F を用いて, F 含有リン酸カルシウム (Suzuki O et al. Cells Mater 5: 45-54, 1995; Shiwaku Y et al. J Ceram Soc Japan 118: 1-4, 2010; Shiwaku Y, Suzuki O et al. Acta Biomater 8:4417-4425, 2012) について低濃度から高濃度の種々の含有量の結晶を合成した. ひとつは, 2ppm F を含有する Tris-HCl 水溶液, pH7.4, 37 に浸漬して 10 日間保持した. もうひとつは, 既報 (Suzuki O et al. Tohoku J Exp Med 164:37-50, 1991) を応用して, 12-230ppm F をリン酸カルシウム溶液に含有させ共沈法により温水中で合成した. F は HA 形成の促進因子として知られ, また, 私達の先の研究から OCP が加水分解する際に HPO_4 の漸減傾向が化学分析により確認されている (Suzuki O et al. Cells Mater 5: 45-54, 1995). これらの材料を表面水和構造の解析に供した.

(2) キャラクタリゼーション

合成した結晶について洗浄, 乾燥後に化学分析により組成を決定し, 走査型電子顕微鏡による形態観察, XRD による結晶相の同定, また FTIR による分光学的検討を行った. F 含有リン酸カルシウムは高い濃度の F 含有溶液で合成すると結晶性の高い F 含有 HA が得られるが, 低濃度では一部 OCP の構造を維持した結晶が得られた. また, 高い濃度の F 含有溶液で合成した結晶ほど, OCP 特有の板状結晶とは異なる形態の結晶が得られた. 分光学的にはリン酸カルシウムの特徴として F 含有量が高いほど 1100 cm^{-1} 付近のリン酸基に由来する吸収帯 (1,030 cm^{-1} to 1,130 cm^{-1} のオルトリン酸のストレッチに基づく ν_3 P-O 吸収) において HA への加水分解傾向が観察された. 化学分析では F 含有 HA は化学量論的な HA でなく, Ca 欠損性の HA が得られた. これらの結果は先の報告に一致していた (Suzuki O et al. Cells Mater 5: 45-54, 1995).

(3) 表面水和構造の解析

表面水和構造の情報を得るために 400 cm^{-1} 付近から 700 cm^{-1} 付近の吸収帯に注目して, FTIR によるカーブフィッティングを検討し, 酸性リン酸塩の指標である HPO_4 および HA 構造に帰属される OH 基の同定を試みることによって, HA への加水分解傾向を検討して関連づけた. HPO_4 は合成方法によらず加水分解進展あるいは F 含有量の増加によって減少したが, HA 構造の OH 基は合成方法の影響を受けた. すなわち, 生理的環境 (pH7.4, 37) で加水分解した F 含有リン酸カルシウムは加水分解とともに OH 基が増大したが, 共沈法で得た F 含有リン酸カルシウムでは, OH と F 含有量に関連性が低かった. 先の研究で, 共沈による F 含有リン酸カルシウムでは, 上清の過飽和度の評価から, オリジナル OCP に近い溶解性を示したことと (Shiwaku Y, Suzuki O et al. Acta Biomater 8:4417-4425, 2012) 関連していると考えられた. これらの研究成果は第 25 回欧州バイオマテリアル学会 (Suzuki O et al. 25th European Conference on Biomaterials, Sep 8th-12th, Madrid, Spain, 2013) にて報告した.

(4) リン酸カルシウムの結晶と表面水和構造および骨伝導能との関連性

リン酸カルシウムの HA への結晶化のプロセスについて表面水和構造と骨伝導能の観点で検討した. 先の研究で HA への転換と骨伝導能発現に関連性があることがわかっている (Suzuki O et al. Biomaterials 27: 2671-2681, 2006). すなわち, 骨伝導能は HA 形成の過程で獲得される可能性があることを示唆している. これは, HA の前駆体から加水分解で得た HA を対照とした実験から導かれたものである. そこで HA の結晶化の過程におけるリン酸カルシウムの分光学的な特徴について FTIR カーブフィッティングの方法をより詳細に検討し, 分析した. その際に,

OCP より溶解性が高いことがわかっているリン酸カルシウムである ACP を OCP に共存させ、OCP の転換が促進されるか検討した。ACP は既報に基づき合成し (Suzuki O et al. *Tohoku J Exp Med* 164:37-50, 1991), XRD において特徴的な回折ピークの無い物質であることを確認した。HA への転換速度が骨伝導能の指標となると仮定し、ヒト血漿の無機イオンと類似の組成を持つ擬似体液 (SBF) を調整し (Kokubo T et al. *J Biomed Mater Res* 24: 721-34, 1990), SBF に攪拌下、37 °C で 2 週間浸漬することにより検討した。結晶を回収し、XRD にて分析したところ ACP の転換が最も早く、次に ACP/OCP、そして OCP の順になった。また、上清も回収して Ca およびリン酸の化学分析を実施して、上清の過飽和度を溶解度計算シミュレーションプログラムにより見積もった。その結果、XRD の結果を支持する計算結果となった。すなわち、ACP は HA に関して大きく過飽和状態になるが、OCP は OCP に関して飽和状態に近づき、OCP 単独では HA への結晶化を生じにくい、ACP が共存することにより、ACP と OCP の間の過飽和度に平衡になって到達し、HA への結晶が促進する様子が化学的にも裏付けられた。

リン酸カルシウム、特に HA は水和構造を有し、HA の成熟 (結晶化) において分光学的な変化が生じることが知られている。そこで、分析の対象としてリン酸基および HA 水酸基に注目し、結晶の表面水和層構造を解析する方法をより詳細に検討した。450 cm^{-1} から 700 cm^{-1} の波長範囲を Rey C et al. *Phosphorus Res Bull* (6, 67-70, 1996) の方法を参考にしてカーブフィッティングを行った。浸漬後に ACP を回収し、解析したところ、630 cm^{-1} と 530 cm^{-1} の比が増大した。一方、530 cm^{-1} と 550 cm^{-1} の比は変化が小さく、OCP の共存割合が高くなると影響を受けた。HA の結晶化は上述したように HA 様 OH の増加と全 P 中の HPO_4 の低下により同定される。骨伝導能の指標と仮定した HA の前駆体の HA への結晶化に関して、分光学的に特徴づけが可能であったことから、表面水和構造が骨伝導能に関連づけられる可能性が示された。これらの成果は国内学会へ報告した (小林司史, 鈴木治ほか, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 2013 年 11 月 25 日 ~ 2013 年 11 月 26 日, 東京ほか)。

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)

Nishikawa R, Anada T, Ishiko-Uzuka R, Suzuki O. Osteoblastic differentiation of stromal ST-2 cells from octacalcium phosphate exposure. *Dent Mater J* 33: 242-254 (2014)
dx.doi.org/10.4012/dmj.2013-226

Honda Y, Anada T, Morimoto S, Suzuki O. Labile Zn ions on octacalcium phosphate-derived Zn-containing hydroxyapatite. *Appl Sur Sci* 273: 343-348 (2013)
dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.02.040

[学会発表] (計 5 件)

平山 閏一, 穴田 豊久, 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が関与する生体反応と骨形成の関連性. 第 36 回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会. 2015 年 2 月 7 日 ~ 2015 年 2 月 7 日, 仙台

鈴木治, 小林 司史, 穴田 豊久, 高橋 哲. リン酸オクタカルシウムと非晶質リン酸カルシウムを用いた二相系材料の骨伝導能. 第 36 回バイオマテリアル学会. 2014 年 11 月 17 日 ~ 2014 年 11 月 18 日, 東京

平山 閏一, 穴田 豊久, 宮武尚央, 小林司史, 吉成真理子, 中村雅典, 高橋哲, 鈴木治. リン酸オクタカルシウムのラット骨欠損内における早期組織応答性. 日本骨代謝学会. 2014 年 7 月 24 日 ~ 2014 年 7 月 26 日, 大阪

小林司史, 穴田 豊久, 高橋哲, 鈴木治. 非晶質リン酸カルシウムを含有するリン酸オクタカルシウムの骨伝導能の解析. 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 2013 年 11 月 25 日 ~ 2013 年 11 月 26 日, 東京

Suzuki O, Yoshinari M, Shiwaku Y, Anada T. Surface structural properties of octacalcium phosphate and its hydrolyzates. 25th European Conference on Biomaterials. 2013 年 9 月 8 日 ~ 2013 年 9 月 12 日, Madrid, Spain

[図書] (計 1 件)

鈴木治, 穴田 豊久. ハイドロキシアパタイト前駆体の結晶化が調節する生体反応. *バイオマテリアル 生体材料*, 日本医学館, pp. 180-187, 2014

[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

上家 潤一 (KAMIIE JUNICHI)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：10400269

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

川井 忠 (KAWAI TADASHI)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50547263