

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792301

研究課題名(和文) ソフトプロセスによる低結晶アパタイト透明体の構造設計と歯科材料としての機能評価

研究課題名(英文) Fabrication and evaluation of low crystallinity and transparent hydroxyapatite via soft processing

研究代表者

岡田 正弘 (OKADA, Masahiro)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70416220

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：従来のアパタイト透明体の製造法であるハードな高温・高圧プロセスでは高結晶性かつ結晶粒の大きな透明体しか得られない。本研究課題では、ソフトプロセス(低温操作)によるナノ粒子集合化について詳細な検討を行うことで、生体骨ミネラルに近い低結晶性アパタイトナノ粒子からなる透明体の開発とその組成制御および構造制御に成功した。さらに、開発した低結晶性アパタイト透明体上での細胞挙動を観察し、歯科材料としての機能発現に係るナノ構造の影響を検討した。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyapatite (HAp) exhibits excellent cell adhesion because of favorable adsorption capacity of its surface for bioactive substances such as cell-adhesive proteins. Although transparent HAp ceramics are prepared via a high-temperature and high-pressure sintering process, the composition and structure of the sintered HAp have limited variety, and are largely different from natural bone apatite. In this study, a low-crystallinity transparent HAp was developed via a low-temperature nanoparticle assembling conditions. The low-crystallinity transparent HAp developed here had nanosized pores among the particles, and showed low crystallinity with high surface area, which is largely different from the conventional transparent HAp sintered ceramics. Cell adhesion and proliferation on the low-crystallinity transparent HAp could be directly observed with an optical microscope, and significantly influenced by the nanostructure of the transparent HAp.

研究分野：医歯薬学

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：バイオセラミックス ハイドロキシアパタイト ナノ粒子 ナノプロセス 結晶性 細胞接着

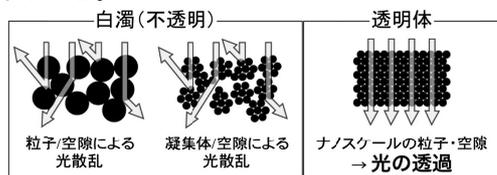
1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイト(以下、アパタイト)は、歯や骨などの硬組織の主成分であり、タンパク質吸着性やイオン交換性に優れる。人工的に製造されたアパタイトも硬組織およびその関連細胞との親和性が高く、骨補填材などとして既に臨床応用されている。このような生物学的特性を評価する場合、あるいは、再生医療を実現するための体外培養用細胞増殖基材としてアパタイトを応用する場合、細胞の直接観察が可能となる透明な基材が望まれる。しかし、一般的な操作によって製造されたアパタイトセラミックスは白色で不透明である。

光を材料に入射した場合、一般に、材料自体による光吸収、および、光の波長程度の大きさの粒子(あるいは粒子間の空隙)による光散乱を経て、残ったものが透過光として観察される。アパタイト自体には可視光領域の光吸収はないため、材料自体による光吸収については考慮する必要がない。つまり、原料となる粒子の粒子径を可視光線の波長よりも十分小さくし、さらに、材料作製時に生成する粒子間隙による光散乱を低減することで透明体が得られる(図1)。

これまでに、高温高圧下における焼結操作(例えば、熱間等方圧加圧成形法;水熱ホットプレス法;放電プラズマ焼結法など)を行うことで粒子間隙を除去したアパタイト透明体が作製されている。これらは高温・高圧条件が必須のため、設備・コストの点では不利である。また、高温処理時にアパタイトは結晶化してマイクロ~サブマイクロサイズの結晶粒となる。現実の生体骨で見られるような数十ナノメートルサイズの低結晶性アパタイトを用いて透明体を作製した例は、これまでになかった。

そのような中で、申請者はこれまでに、エマルション法(制限されたミセル内でのナノ粒子作製法)によって数十ナノメートルサイズの低結晶性アパタイト粒子を調製し、精製後に得られるアパタイトナノ粒子分散水溶液を室温で乾燥させるソフトプロセスによって透明体(ナノ粒子集合体)が得られることを見出している。さらに、アパタイトナノ粒子を作製する方法を、より一般的な湿式法(水中での沈殿反応)に変更した場合でも同様の透明体が見出されるという基礎的知見を得ている。



光散乱係数(レイリー散乱)

$$k_s = \frac{2\pi^6}{3} n \left( \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right)^2 \frac{d^6}{\lambda^4} \frac{1}{m} \frac{1}{\lambda} n_p$$

$d$ : 粒子径     $n_p$ : 粒子数  
 $m$ : 反射係数     $\lambda$ : 光の波長

図1. 光散乱による不透明化と透明ナノ粒子集合体の概念図

2. 研究の目的

(1) 出発材料となるアパタイトナノ粒子の組成および形態を変化させることで、上述したソフトプロセスによって得られるアパタイトナノ粒子集合体の組成および構造の制御を行う。

(2) 作製したアパタイトナノ粒子集合体を用いて細胞培養試験を行い、ナノ粒子集合体の構造が細胞の初期接着性および増殖性に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) ナノ粒子集合体の組成および構造制御:  
カルシウム塩水溶液とリン酸塩水溶液を用いた湿式法によって、ソフトプロセスの出発材料となるアパタイトナノ粒子を作製した。この際、反応温度(室温~80 )および添加塩の種類を変化させることで、アパタイトナノ粒子の組成および形態の制御を試みた。作製したナノ粒子の形態および粒子径は走査型電子顕微鏡によって観察・測定し、X線回折法によってその結晶構造を同定した。また、フーリエ変換赤外分光光度計および誘導結合プラズマ発光分光分析装置を用いてアパタイトナノ粒子の化学組成を求めた。

次に、作製したナノ粒子分散液を乾燥させることで、透明ナノ粒子集合体を作製した。この際、アパタイトナノ粒子分散液の濃度および全量を変化させ、また、乾燥温度を室温~60 の範囲で変化させた。得られたナノ粒子集合体の表面および断面の形態は走査型電子顕微鏡によって観察した。また、水銀圧入法によってナノ多孔質構造(孔径および孔隙率)の解析を行った。

(2) ナノ粒子集合体上での細胞挙動:

作製したアパタイトナノ粒子集合体を60 にてエチレンオキサイドガス滅菌した後、マウス結合組織由来 L929 線維芽細胞様細胞株、あるいはマウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 骨芽細胞様細胞株を播種した。培地としてウシ胎児血清を 10 vol.% 加えた MEM を用いた。細胞播種後、所定の時間間隔において、倒立型光学顕微鏡を用いてサンプル表面に接着した細胞を観察した。また、各サンプルに対する細胞の初期接着性および増殖性を評価した。この際、細胞数はテトラゾリウム塩を発色基質とした比色法によってプレートリーダーを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) ナノ粒子集合体の組成および構造制御:  
まず、アパタイトナノ粒子の作製条件について検討を行った。その結果、湿式法の条件を変化させることで粒子径が約 30~300nm のナノ粒子を作製することができた。

次に、作製したナノ粒子分散液を各条件で乾燥させることで、ナノ粒子集合体を作製した。この際、ナノ粒子が小さいほど透明性が高くなることを見出した(図2)。ここで、各サンプル断面の走査型電子顕微鏡観察が

ら、サンプルの透明性の向上は、粒子径の減少および粒子間パッキングの緻密化による光散乱性の低下が主な原因であることを確認している。

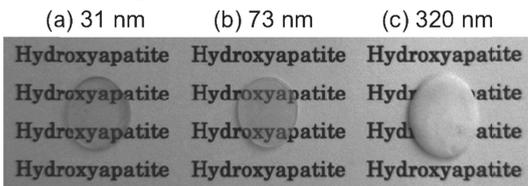


図2．粒子径の異なるアパタイトナノ粒子を用いて作製したナノ粒子集合体の外観写真

また、サンプル作製時のナノ粒子分散液の濃度を高くすることやナノ粒子分散液の全量を多くすることで、得られる透明体の面積を容易に制御することが可能であった(図3)。また、乾燥時の温度による透明性への影響はほとんど見られなかった。

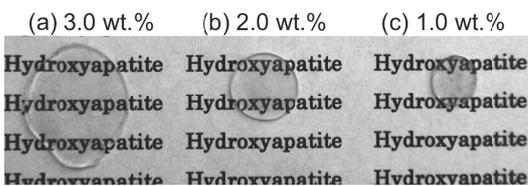


図3．異なる濃度のアパタイトナノ粒子分散液を用いて作製したナノ粒子集合体の外観写真

次に、X線回折測定を行った結果、得られた透明体中のアパタイトは低結晶性であり、さらに特定の結晶配向性は示さないことが確認された(図4)。ここで、乾燥温度が比較的低い(～60℃)ことから、ナノ粒子集合体中のアパタイトの結晶性は、出発原料であるナノ粒子の結晶性とほぼ同じとなることも明らかとなった。

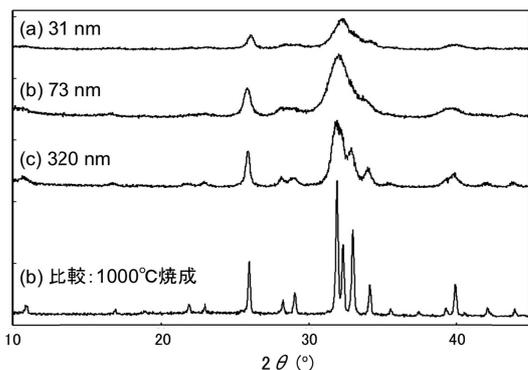


図4．粒子径の異なるアパタイトナノ粒子を用いて作製した集合体のX線回折パターン

さらに、透明体の機械的特性を評価した結果、出発原料となるナノ粒子の粒子径が小さいほど材料強度が高くなることが明らかとなった。ここで、透明体断面の電子顕微鏡観察から、得られた透明体には粒子間隙に由来するナノ多孔質構造が存在することが確認された。そこで、水銀圧入法によりナノ多孔質構造を評価した結果、ナノ多孔質構造は集合化したナノ粒子の間隙に由来するもので

あり、原料として用いたナノ粒子の粒子径が小さいほど孔径が小さくなることが明らかとなった(図5)。

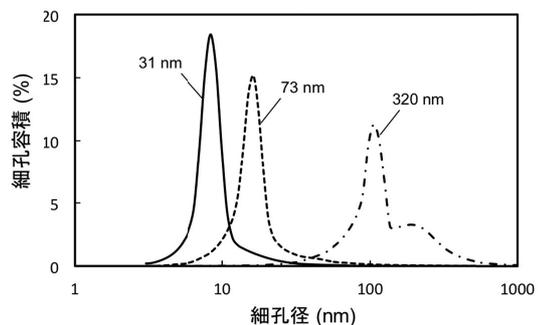


図5．粒子径の異なるアパタイトナノ粒子を用いて作製した集合体の細孔径分布

また、低結晶性アパタイト透明体の組成を制御するために、共存イオン種(陽イオンあるいは陰イオン)を加えてアパタイトナノ粒子を作製したところ、マグネシウムイオンあるいは炭酸イオンを添加した場合、得られるナノ粒子の結晶性が低下することを確認した。さらに、組成制御のために加えた共存イオン種によってナノ粒子の分散性が異なり、ナノ粒子の表面電位が高くなる場合には孔径および気孔率が小さくなることが明らかとなった。

以上のように、低結晶性アパタイトナノ粒子の作製条件およびソフトプロセス条件について検討を行うことで、低結晶性アパタイト透明体の開発とその構造制御および組成制御に成功した。

## (2) 低結晶性アパタイト上での細胞挙動：

作製したナノ粒子集合体の細胞試験を行った。この際、透明性の高いナノ粒子集合体を用いた場合には、播種した細胞を前処理することなく光学顕微鏡で直接観察することが可能であった(図6)。

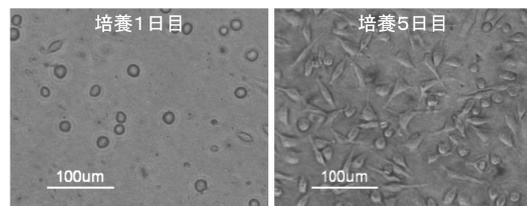


図6．アパタイトナノ粒子集合体に接着した細胞の光学顕微鏡写真

表面構造(粒子径および細孔径)の異なるアパタイトナノ粒子集合体について、いくつかの細胞を用いて初期細胞接着性を評価したところ、骨芽細胞様細胞のアパタイトナノ粒子集合体に対する初期接着性は、高温高压プロセスにより得られるアパタイト緻密体よりも有意に高く、また、市販培養シャーレと同程度に高いことが確認された(図7)。この際、アパタイトナノ粒子集合体の粒子径あるいは細孔径に最適値があることが明らか

かとなった。一方で、線維芽細胞を用いた場合には接着細胞数が全体的に低下することが確認された。

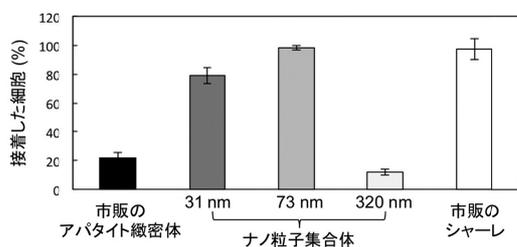


図7 各種の基材に接着したMC3T3-E1骨芽細胞様細胞の数 (培養時間: 3時間)

さらに、ナノ粒子集合体上で各種細胞を増殖させたところ、細胞増殖性についてもナノ粒子集合体の粒子径あるいは細孔径に最適値があることが確認された。

以上のように、本研究を遂行することで、ソフトプロセスによって得られるアパタイトナノ粒子集合体の組成および構造の制御に成功した。さらに、作製したアパタイトナノ粒子集合体を用いて細胞培養試験を行い、ナノ粒子集合体の表面構造が細胞接着および増殖挙動に与える影響を明らかとすることで、新規な歯科材料の創出に向けて重要な知見を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3件)

- K. Fujiwara, M. Okada, S. Takeda, N. Matsumoto. A novel strategy for preparing nanoporous biphasic calcium phosphate of controlled composition via a modified nanoparticle-assembly method. *Mater. Sci. Eng., C*, Vol. 35, No. 1, 2014, pp. 259–266, DOI: 10.1016/j.msec.2013.11.019 (査読有)
- M. Uehira, M. Okada, S. Takeda, N. Matsumoto. Preparation and characterization of low-crystallized hydroxyapatite nanoporous plates and granules. *Appl. Surf. Sci.*, Vol. 287, 2013, pp. 195–202, DOI: 10.1016/j.apsusc.2013.09.117 (査読有)
- M. Okada, T. Furuzono. Hydroxyapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* Vol. 13, No. 6, 2012, ID: 064103 (14 pages), DOI: 10.1088/1468-6996/13/6/064103 (査読有)

### 〔学会発表〕(計 10件)

- 岡田正弘, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之, 武田昭二. カルシウム欠損型アパタイトナノ粒子集合体を利用した二相性リン酸カルシウムナノ多孔質体の組成制御. *日本セラミックス協会2014年会*, 2014.3.18, 横浜
- M. Okada, Y. Omori, N. Matsumoto, S. Takeda. Novel route for the synthesis of

nanostructured hydroxyapatite crystals. *6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH)*, 2013.10.29, Nagoya (Japan)

岡田正弘, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之, 武田昭二. ナノ多孔質構造をもつリン酸カルシウムの組成制御. *第62回日本歯科理工学会学術講演会*, 2013.10.19, 新潟

岡田正弘, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之, 武田昭二. ナノアパタイト単結晶集積表面の設計. *第6回日本再生歯科医学会シンポジウム*, 2012.10.7, 帯広

岡田正弘, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之, 武田昭二. 低結晶性アパタイトナノ粒子が集合化した透明体の作製と評価. *日本セラミックス協会第25回秋季シンポジウム*, 2012.9.19, 名古屋

岡田正弘, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之, 武田昭二. ナノ多孔質構造を有する低結晶性アパタイト透明体の評価. *第6回ナノ・バイオメディカル学会大会*, 2012.7.10, つくば

岡田正弘, 武田昭二, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之. 低結晶性ハイドロキシアパタイト透明体内部への液体浸潤. *日本セラミックス協会2012年会*, 2012.3.19, 京都

岡田正弘, 武田昭二, 上平真代, 藤原敬子, 松本尚之, 古蘭勉. ハイドロキシアパタイトナノ粒子集合化による透明体の作製. *第33回日本バイオマテリアル学会大会*, 2011.11.22, 京都

M. Okada, S. Takeda, M. Uehira, K. Fujiwara, N. Matsumoto, T. Furuzono. Preparation of low-crystallized hydroxyapatite transparent body by low temperature process. *24th European Conference on Biomaterials*, 2011.9.7, Dublin (Ireland)

M. Okada, S. Takeda, M. Uehira, K. Fujiwara, N. Matsumoto, T. Furuzono. Nanoparticle-assembly approach toward fabrication of transparent hydroxyapatite with low crystallinity. *The Fifth International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics (STAC-5)*, 2011.6.22, Yokohama (Japan)

### 〔図書〕(計 0件)

### 〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0件)  
取得状況 (計 0件)

### 〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

岡田 正弘 (OKADA, Masahiro)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 70416220