

令和元年6月3日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05798

研究課題名(和文)人工骨材料を目指した有機無機ハイブリッド材料の機能化

研究課題名(英文)Functionalization of organic-inorganic hybrids for artificial bone materials

研究代表者

竹岡 裕子 (Takeoka, Yuko)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：50338430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工骨材料への応用をめざし、水酸アパタイトHApと生分解性高分子の複合化を行った。連通孔を有する多孔質HAp中でポリ乳酸PLLAをIn-situ合成して得られたPLLA/HAp複合体は生体骨と同等の強度を有し、良好な細胞増殖性を示した。一方でHApとPLLAの界面接着性が低く、生体類似環境に置いた際に複合体内からPLLAが流出し、早期に機械的強度が低下することが問題となった。多水酸化合物とイソシアネートを用いて、界面接着性の向上を検討した結果、必要な期間、強度を保持する材料が得られ、曲げ強度が向上しても、過度に弾性率が上昇せず、人工骨材料の適用強度に適した材料が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、様々な生体組織代替材料が開発され、その応用範囲が広がっている。平均寿命の伸びにつれて、機能が低下、喪失した骨、及び関節などを人工骨、人工関節で補う機会も増加しつつある。生分解性高分子の体内での分解に伴い、骨芽細胞が侵入して置き換わる人工骨材料として、PLLA/HApを選択し、本研究では早期の強度低下を抑制することに成功した。患者によって必要とする強度やポリマーの保持期間がことなるため、これらの強度維持の期間を調節できた意義は大きい。さらに柔軟な生分解性高分子の導入による、軟骨材料への応用が将来的に期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared composites of hydroxyapatite HAp and biodegradable polymer PLLA for application to artificial bone material. The PLLA/HAp composites obtained by in-situ synthesis of PLLA in porous HAp having communicating holes has the same strength as that of living bone, and shows good cell proliferation. On the other hand, the interface adhesion between HAp and PLLA was low, and when embedded in a biosimilar environment, PLLA flowed out from the complex, resulting in a problem of an early decrease in mechanical strength. As a result of studying the improvement of interfacial adhesion using a multi-hydroxy compound and diisocyanate, a material which maintains strength for a necessary period is obtained, and even if the bending strength becomes higher, the elastic modulus does not increase excessively. A material suitable for the applied strength of the artificial bone material was obtained.

研究分野：高分子化学

キーワード：有機無機ハイブリッド 人工骨 生分解性高分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な生体組織代替材料が開発され、近年、その応用範囲が広がっている。平均寿命の伸びにつれて、機能が低下、喪失した骨、及び関節などを人工骨、人工関節で補う機会も増加しつつある。現在、骨欠損部の補填に利用されている材料には、水酸アパタイト(HAp)がある。化学式  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  で表される HAp は、多くの脊椎動物の硬組織の主要な無機成分に類似した物質である為、生体適合性に優れ、骨内に埋植すると、生きた骨組織と直接強く結合することが出来る。しかし、HAp の機械的特性に着目すると、圧縮強度、曲げ強度は生体骨と比べて、数倍大きく、破壊靱性値は低く、ヤング率は骨よりはるかに大きいなど、生体骨と比べて強度がかなり異なる。生体骨と比べて、著しく強度が異なると、正常骨を破壊してしまうため、生体代替材料の強度としては、生体骨と同等の力学的強度が望ましい。

これらの欠点を改善するため、複合化による、様々な新しい材料開発の試みがなされている。骨は生体高分子であるコラーゲンと HAp 等のリン酸カルシウム結晶から形成されており、典型的な有機・無機ナノ複合体といえる。この構成を模倣すれば、生体骨と同等、あるいは、より有用な材料が作製できると思われる。このような観点から、HAp に柔軟で生体適合性のある生分解性高分子を複合化し、より生体骨に近い強度を有する材料を得る研究が盛んに行われている。これらの多くは、あらかじめ金属触媒等を用いて合成した高分子と HAp 粒子を物理的に混合、又は混練する手法で得られている。生体骨はナノレベルで有機・無機成分が複合化しているのに対し、物理的な混合ではマクロレベルでの複合化となり、両成分の混和が不均一である。また、残存金属触媒の影響は長期的にみると、生体への応用の際に、無視できない問題として挙げられる。研究代表者の竹岡は、上述の問題点を解決するために、気孔径約 5  $\mu\text{m}$  程度、気孔率約 40% の HAp 多孔体の開放気孔内にモノマーを導入し、*in-situ* 合成を行う独自の手法で HAp と生分解性高分子であるポリ乳酸(PLLA)を複合化し、代替骨材料としての可能性を報告してきた<sup>(1)</sup> Y. Takeoka *et al.*, *Chem. Lett.*, **36**, 12, 1476 (2007).)。この手法により得られた PLLA/HAp 複合体はナノレ~ミクロレベルで有機と無機が複合化しており、生体骨と同等の初期強度を有し、良好な細胞増殖性を有することが明らかとなった(Y. Takeoka *et al.*, *Polym. Journal*, **47**, 2, 164 (2015).)。

一方で、人工骨材料としての本格的な応用のためには、改善すべき点も明らかとなった。本材料は、生体内に移植した後、生分解性高分子が徐々に加水分解され、分解によって生じた気孔内に骨芽細胞が侵入増殖し、石灰化を経て、やがて生体骨と完全に一体化する人工骨というコンセプトであるため、骨欠損の修復に必要な期間、生分解性高分子は必要な強度を補い、新生骨の形成とともに高分子が分解していくことが理想である。これまでに開発した材料は、曲げ強度は生体骨と比較して十分であるのに対し、弾性率は未だ高く、柔軟性の点ではまだ改善が必要である。また、骨芽細胞の侵入のためには、これまでのミクロポアより、ポアサイズが大きく、細胞の侵入が可能なマクロポアを有するセラミックスを用いる必要がある。さらに生分解性高分子と HAp 間の相互作用を強める為に、生分解性高分子の機能化を行い、骨欠損の修復に必要な期間、必要な強度を補い、新生骨の形成とともに生分解性高分子が分解する材料の設計を実現が望まれる。

### 2. 研究の目的

本研究では、より幅広い部位、及び検体に利用できるテーラーメイド人工骨材料を得ることを目的として、研究を行うことを目的とした。具体的には、多孔性のリン酸カルシウムセラミックスと種々の生分解性高分子をナノレベルで複合化し、得られた材料の強度、生体吸収性、細胞増殖性に及ぼす影響を系統的に調べることで、人工骨材料の構築に関する総合的な知見を得たいと考えた。研究項目と明らかにすべき点を以下に示した。

**新生骨誘導能の高い多孔性リン酸カルシウムセラミックスの開発  
セラミックスと生分解性高分子複合体における有機無機界面強度の増強化  
生分解性高分子の機能化による高強度低弾性率人工骨材料の実現**

HAp と PLLA の界面接着性が低く、生体に埋入した際に複合体内から PLLA が流出し、早期に機械的強度が低下することが問題点である。本研究では、HAp と PLLA の界面接着性向上のため、架橋剤として多水酸化化合物とイソシアネートの利用を検討し、これらを導入した PLLA/HAp 複合体の評価を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 多水酸化物を用いた PLLA/HAp の機能化

PLLA/HAp 複合体は人工骨材料への応用に十分な力学的強度を有し、骨芽細胞様細胞の増殖性や分化挙動に優れる。一方で、HAp と PLLA の界面接着性が低く、生体に埋入した際に複合体内から PLLA が流出し、早期に機械的強度が低下すること

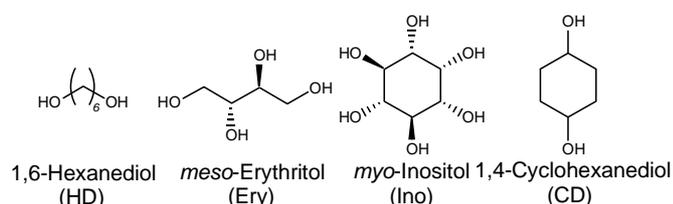


図 1. 多水酸化物の例

が問題点であった。HAp と PLLA の界面接着性向上のため、架橋剤として多水酸化化合物の利用を検討し、これらを導入した PLLA/HAp 複合体の評価を行った。図 1 に示す多水酸化化合物と lipase CAL-B を導入した多孔質 HAp (p-HAp) の気孔内に L-ラクチドを溶融導入し、130°C で 7 日間反応させ、複合体を作製した。1,6-Hexanediol (HD) と HD を p-HAp に導入した HD-HAp 複合体の FT-IR の結果、HD の-OH 伸縮振動に起因する 3309 cm<sup>-1</sup>、3381 cm<sup>-1</sup> のピークが HAp に導入後、3321 cm<sup>-1</sup>、3391 cm<sup>-1</sup> にそれぞれシフトしたことから、HD の水酸基は HAp と相互作用することが示された。図 7 に複合体をリン酸緩衝溶液 (PBS) に浸漬した際の浸漬時間と重量変化の関係を示す。架橋剤を用いずに作製した PLLA/HAp 複合体では、PBS への浸漬後、PLLA の流出に伴う重量減少が観察され、浸漬 7 日後にはほぼ全量の PLLA が流出した。一方で、架橋剤を導入した複合体では浸漬 7 日後においても重量減少が観察されず、複合体を *myo*-inositol、1,6-hexanediol により架橋することで、複体内からの PLLA の流出の抑制が可能であった。複合体では低下の抑制がみられ、複合体においては、が可能であった。

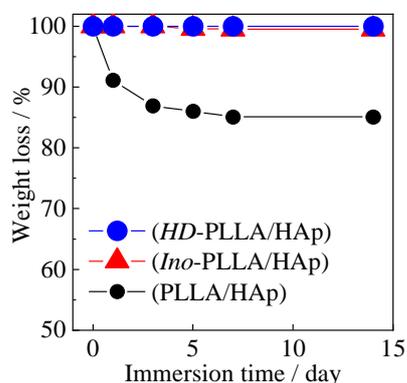


図 2. PBS に浸漬前後の HD-PLLA/HAp, Ino-PLLA/HAp, and PLLA/HAp 複合体の重量変化 (n=3)

機械的強度も同様に、架橋剤を導入した浸漬 7 日後においても機械的強度の維持

## (2) ポリウレタン構造を導入した PLLA/HAp 複合体

上述では、水酸基を足場とすることにより、複合体からの PLLA の流出を制限できることが明らかとなった。さらに、その効果を高め、材料の特性を制御することを目的として、ポリウレタンの導入と、セラミックスの二相化を検討した。早期流出の抑制を目指し、HAp と PLLA の架橋剤としてポリイソシアネートを導入し、PLLA 系ポリウレタンと HAp の複合体を作製した。また、生体適合性向上のため、HAp と骨形成誘導能に優れた β-リン酸三カルシウム (β-TCP) から成る二相性セラミックス (BCP) を用いた複合体を作製した。

繊維状アパタイト (*f*-HAp) と deoxyribonucleic acid (DNA) をある仕込み量で混合し、一軸加圧成形後、1200°C で 5 時間焼成し、多孔性 HAp (*p*-HAp) 及び BCP を作製した。XRD 測定の結果、*f*-HAp に対する DNA 添加量によって、TCP 含有率を 19-98% まで変化させることが可能であった。BCP の気孔率は DNA 添加量に伴い増加し、最大 53% であった。TCP 含有率と気孔率の増加に伴い、曲げ強度及び弾性率は減少した。

*p*-HAp 及び BCP の気孔内に PMDI (polymeric diphenylmethane isocyanate) を導入後、両末端が水酸化された分子量 4000 程度の Diol OLLA を溶融導入し、160°C で 6 時間反応させ、複合体を作製した。複合体の XPS 測定の結果、399 eV 付近に NHC(=O) 結合の N に起因するピークが観察され、ウレタン結合の形成を確認した。GPC 測定の結果、複合体中のポリマーの  $M_n$  は 13,160-16,760 g mol<sup>-1</sup> であり、分子鎖の伸長を確認した。TG 測定による重量減少率から算出した HAp 中の PIL の導入率は 16-23% であり、セラミックスの気孔率増加に伴い導入率も増加した。図 3 に複合体の三点曲げ強度試験の結果を示す。比較として Diol OLLA のみを導入した Diol OLLA/HAp の結果も示す。Diol OLLA/HAp と比較し、PIL/HAp の方が高い曲げ強度を示した。これは PIL が網目状高分子であることとウレタン基間で水素結合が生じることに起因すると考えられる。PIL/BCP ではセラミックス中の TCP 含有率と気孔率の増加に伴い、複合体の機械的強度、及び弾性率は減少した。

図 4 に複合体をリン酸緩衝溶液 (PBS) に浸漬した際の重量変化を示す。比較として L-lactide を *in-situ*

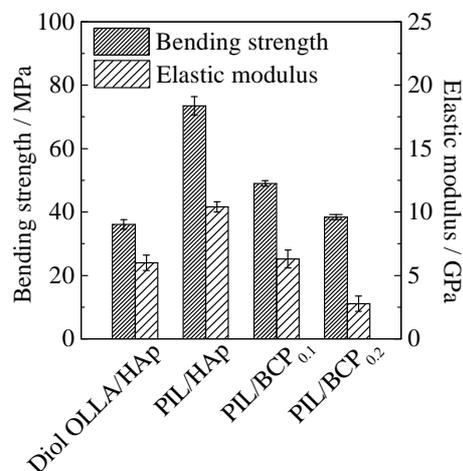


図 3. 各複合体の機械的強度 (n=3)。ウレタン化した PIL/HAp は Diol OLLA/HAp と比較して優れた力学的特性を示した。

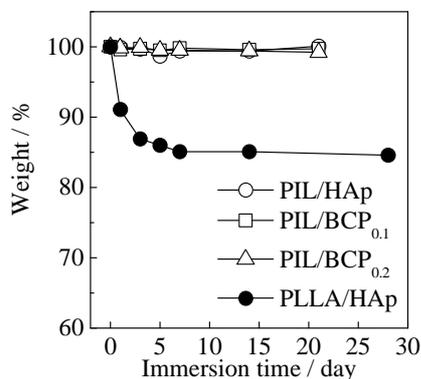


図 4. PBS に浸漬前後の Diol OLLA/HAp, PIL/HAp, PIL/BCP 複合体の重量変化 (n=3)

重合する従来の方法で作製した PLLA/HAp の結果も示す。PLLA/HAp では、PLLA の流出に伴う重量減少が観察され、7 日後にほぼ全量の PLLA が流出した。一方で、PIL/HAp、PIL/BCP では浸漬 21 日後においても重量減少が観察されず流出を抑制することが可能であった。ポリイソシアネートが HAp と Diol OLLA の OH 基と反応し架橋されていることと、PIL が網目状高分子であることにより加水分解されにくくなったと考えられる。曲げ強度は、PLLA/HAp が PLLA の流出に伴い著しく低下したのに対し、PIL/HAp、PIL/BCP は浸漬 21 日後においても強度を維持していた。

各複合体上で、骨芽細胞用細胞の培養実験を行い、得られた増殖曲線を図 4 に示す。初期接着率は 83-94%、倍加時間は 48-60 h であり、いずれの材料も良好な増殖性を示した。骨形成のマーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)染色の結果、PIL/HAp ではほぼ着色が見られなかったのに対し、PIL/BCP<sub>0.1</sub> では広範囲かつ濃い着色が見られ  $\beta$ -TCP の導入により分化誘導能の向上が可能であることが示唆された。

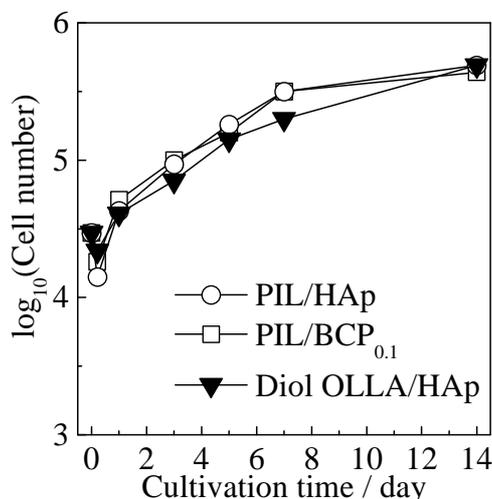


図 5. Diol OLLA/HAp, PIL/HAp, PIL/BCP 複合体上での骨芽細胞様細胞の増殖性

#### 4. 研究成果

生分解性高分子であるポリ乳酸 PLLA とバイオセラミックスを In-situ 重合法により合成することで、有機と無機が一体化した材料を作製した。有機無機間の界面強度を高める目的で、水酸基とウレタン構造をそれぞれ導入した結果、生分解性高分子の早期流出を防ぐことができた。さらに、曲げ強度が向上させると、弾性率が過度に上昇してしまう傾向にあるが、ポリウレタンの系では、弾性率の上昇を抑えることが出来、これら複合体の機械的特性は人工骨材料への応用が期待できるレベルに達したと言える。使用部位に応じた力学的強度、生分解速度を得ることも可能であり、さらに適用範囲が広がることが期待される。今後、自己修復機能の付与や軟骨材料への応用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. 竹岡裕子, 陸川政弘「人工骨材料への応用を目指した, バイオセラミックス中における生分解性高分子の In-situ 重合」*Bioindustry*, 36, 4, 50-57 (2019). 査読無
2. Y. Takeoka, K. Arai, M. Yoshizawa-Fujita, M. Aizawa, and M. Rikukawa, "Microwave-assisted fabrication of poly(L-lactic acid)/hydroxyapatite composites as artificial bone materials", *J. Microbiology and Biotech.*, 5, 3, 1-4 (2016). 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. M. Mukai, M. Fujita, Y. Takeoka, M. Rikukawa, "Preparation of porous materials using biodegradable polymers and application to scaffold materials (III) -Biodegradability of poly(L-lactic acid) monolith-", 日本化学会第 99 回春季年会, 2019
2. 向井万里香・藤田正博・竹岡裕子・陸川政弘, "生分解性高分子を用いた多孔質材料の作製と足場材料への応用 (II) - ポリ乳酸モノリスの細胞増殖性-", 第 8 回 CSJ 化学フェスタ, 2018
3. M. Saito, M. Yoshizawa-Fujita, Y. Takeoka, M. Rikukawa, Fabrication of PLLA/HAp composites with urethane bond (IV)- Effect of introduction amount of urethane bonds-, 256th ACS national meeting, 2018
4. 齋藤美佳・藤田正博・竹岡裕子・陸川政弘, "ウレタン結合を有する生分解性高分子/セラミックスを用いた人工骨材料の作製( )-リン酸カルシウムの二相化の影響-", 第 67 回高分子学会年次大会, 2018
5. 向井万里香・藤田正博・竹岡裕子・陸川政弘, "生分解性高分子を用いた多孔質材料の作製と足場材料への応用 (I) - NIPS 法を用いたポリ乳酸の多孔化-", 第 67 回高分子学会年次大会, 2018
6. Y. Takeoka, Fabrication of Organic-Inorganic Hybrids using Calcium Phosphate Ceramics and Biodegradable Polymers, SmartMtaerials-2018, 2018
7. 齋藤美佳・藤田正博・竹岡裕子・陸川政弘, "ウレタン結合を有する生分解性高分子/セラミックスを用いた人工骨材料の作製(II)-ウレタン結合の導入量による機械的特性の制御-", 第 98 回日本化学会春季年会, 2018
8. 齋藤美佳・藤田正博・竹岡裕子・陸川政弘, "ウレタン結合を有する生分解性高分子/セラミ

- ックスを用いた人工骨材料の作製(I)-機械的強度及び界面接着性評価-",第 66 回高分子討論会, 2017
9. 竹岡裕子・佐藤信吾・齋藤美佳・藤田正博・陸川政弘, セラミックス中における生分解性高分子の In-situ 合成と人工骨材料への応用, 第 66 回高分子討論会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：人工骨材料  
発明者：竹岡裕子、陸川政弘、佐藤信吾  
権利者：上智学院  
種類：特許・実用新案  
番号：特願 2016-120278 特開 2017-221524  
出願年：2016  
国内外の別： 国内

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。