

令和元年6月20日現在

機関番号：82670

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13031

研究課題名(和文)無機イオンによる人工骨の高機能化とその機能発現機構の解明

研究課題名(英文)Development of an artificial bone with enhanced biological properties and its mechanism elucidation

研究代表者

小西 敏功(KONISHI, TOSHIISA)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・事業化支援本部技術開発支援部先端材料開発セクター・研究員

研究者番号：10587843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ケイ素および銅含有リン酸カルシウム(CuSi-TCP)の合成条件を確立した。この溶解性について検討したところ、銅含有量の増加とともに溶解性、溶解速度が低下することが明らかとなった。溶解曲線の解析結果、CuSi-TCPの溶解は二成分からなる不均一溶解であり、溶解過程でCuSi-TCP表面に溶解を抑制する層が形成されることが示唆された。また、紫外可視分光分析、電子スピン共鳴分析の結果から、銅イオンはTCP結晶のCaサイト内に存在することが示唆された。さらに、抗菌性試験の結果、5、10 mol%の銅を含むCuSi-TCPにおいて抗菌性の発現が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸カルシウム構造中への微量元素の導入は、低コストで再現性に優れることを特長とし、この微量元素がトリガーとなり生体内での機能発現を促進する。そのため、血管内皮細胞増殖因子などの高価な薬剤を使用しなくてもそれと同等な治療効果が期待される。また、微量元素の機能発現はリン酸カルシウムの溶解によって制御されるため、溶解挙動を理解ことが重要である。本研究では、銅を導入したリン酸カルシウムを基にその溶解挙動を明らかにした。また、銅の溶解がその抗菌性発現にも影響することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：With the intent to combine osteoconductivity with angiogenic and anti-bacterial properties, the present study aimed to fabricate copper and silicon co-doped -tricalcium phosphates (CuSi-TCP). The CuSiTCPs were successfully synthesized via a liquid-phase reaction. The effects of copper and silicon on the dissolution behaviors of CuSi-TCP were investigated. The incorporation of copper in the -TCP resulted in a decrease in the dissolution rate of CuSi-TCP, which was caused by a diffusion-controlled dissolution process due to the formation of a hydrated layer around the CuSi-TCP. The anti-bacteria effect was shown in the CuSi-TCP containing 5 and 10 mol% copper.

研究分野：生体医工学

キーワード： -リン酸三カルシウム 銅 ケイ素 骨伝導 血管形成 骨補填材

## 1. 研究開始当初の背景

骨を作る骨芽細胞の非存在下でも骨を形成する「骨誘導能」をもつ「自家骨」は現在、骨補填材としてゴールドスタンダードである。しかし、臨床応用されている水酸アパタイト(HAp)などのリン酸カルシウム系人工骨は骨誘導能を持たないため、確実な骨癒合および早期治癒が得られない。そのため、骨形成タンパク質(rh-BMP-2)をHAp系人工骨に担持し、徐放させることで骨誘導能を発現させる研究が数多く報告されているが[1]、高額なBMPの使用が我が国の医療経済を圧迫することは明白である。

生体内の微量元素は、酵素やタンパク質の構成成分として存在し、生体反応や生理作用に寄与する。ケイ素イオンは骨形成を促進することが報告されているが[2]、自家骨のもつ「骨誘導能」には及ばない。また、銅イオンは骨欠損治癒に必要な「血管形成」に関与するが、ほとんど研究されていない。そのため、もしケイ素および銅を導入したリン酸カルシウムを創製できれば、「骨誘導能」に匹敵する「骨形成能」と「血管形成能」を備えた生体材料となるのではないかと着想した。そこで、骨形成を促進する「ケイ素」および血管形成を促進する「銅」をリン酸カルシウムに導入し、人工材料のみで自家骨の「骨誘導能」に匹敵する「骨形成能」および「血管形成能」を引き出す高機能化人工骨を創製する。

また、「ペースト状人工骨」は注射器を用いた低侵襲治療を可能とすることから、骨欠損形状に左右されない人工骨として利用されている。申請者は「イノシトールリン酸(IP6)」のキレート作用を用いた「新規メカニズムで硬化する骨修復セメント」を基盤技術として、リン酸三カルシウム(TCP)を用いた「生体吸収性ペースト状人工骨」の創製に成功している。この人工骨は生体内で骨形成と骨吸収のサイクルに適合することを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

骨形成を促進する「ケイ素」および血管形成を促進する「銅」を利用して、人工材料のみで自家骨の「骨誘導能」に匹敵する「骨形成能」および「血管形成能」を引き出す高機能化人工骨を創製する。この人工骨材料を基に「骨修復セメント技術」を用いて、注射器で患部に注入可能な「高機能化ペースト状人工骨」へと応用することを目的とする。さらに、固体核磁気共鳴を用いて、今まで明らかにされていなかったリン酸カルシウム人工骨の結晶局所構造と生物学的機能発現との関連について、その機序を追求・解明する。

## 3. 研究の方法

銅およびケイ素含有β-リン酸三カルシウム(CuSi-TCP)を液相反応法により合成した。硝酸カルシウム四水和物(Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)、硝酸銅三水和物(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O)、リン酸水素二アンモニウム((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、オルトケイ酸テトラエチル(TEOS; (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O)<sub>4</sub>Si)を出発原料として用いて、仕込み組成がCuSiTCP中のCaに対するCuのmol%が0-10mol%、Siが0.8wt%、(Ca+Cu)/(P+Si)モル比=1.5となるように合成した(Cu<sub>x</sub>Si<sub>4</sub>-TCP, x = 0-10)。リン酸滴下終了後から1時間pH7.3を維持した。合成したCuSi-TCP前駆体(カルシウム欠損HAp)を乾燥後、1000°Cで4時間焼成して、Cu<sub>x</sub>Si<sub>4</sub>-TCPを得た。

結晶構造を粉末X線回折法(XRD)、分子構造をフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)を用いて評価し、元素組成を誘導結合プラズマ(ICP)発光分光法を用いて調べた。β-TCPの生体吸収性の評価には、Itoらが提案した生体材料の*in vitro*吸収性評価法に基づき、pH 5.5、25の酢酸緩衝溶液中での試料からのCaイオン溶出量を180分間計測し、各粉末試料の溶解挙動を調べた。抗菌性試験は、グラム陰性の緑膿菌(*P. aeruginosa*)を用いてコロニー法により評価を行った。

## 4. 研究成果

得られた沈殿を熱処理したすべての試料で、β-TCP(#09-0169)に帰属できる回折ピークが観測されたが、Cu<sub>5,10</sub>Si<sub>4</sub>-TCPでは、29、30°付近にβ-ピロリン酸カルシウム(β-CPP; #09-0346)に帰属される回折ピークも確認された。FT-IRスペクトルより、Cu<sub>5,10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP、さらにCu<sub>0</sub>Si<sub>0</sub>-TCPの725 cm<sup>-1</sup>付近にP<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>4-</sup>に帰属される吸収バンドが確認されたことから、β-CPPが副相として含まれていることが分かった。XRDパターンより求めた格子定数の値は、銅およびケイ素仕込み量の増加に伴い減少傾向を示した。ICPによる元素分析の結果、合成仕込み量と同量の銅が含有されていることが明らかとなった。また、紫外可視分光分析、電子スピン共鳴分析の結果から、銅イオンはβ-TCP結晶格子のCa(4)およびCa(5)サイト内に置換したことが明らかとなった。

溶解性試験では、銅含有量の増加に伴うCaイオン溶解速度および溶解量の減少を確認した。そこで、曲線近似を用いて溶解挙動を考察したところ、2種類の溶解挙動の存在が確認されたことから、CuSi-TCPの溶解は不均一溶解であり、溶解過程でSi-Cu-TCP表面に溶解を抑制する層(表面層)が形成されることが示唆された。以上の結果から、Cu<sub>0,0.1,1</sub>Si<sub>4</sub>-TCPでは、β-TCP単相が作製でき、Cu<sub>0</sub>Si<sub>0</sub>-TCP、Cu<sub>5,10</sub>Si<sub>4</sub>-TCPでは、HAp形成が阻害されることで、β-TCPとβ-CPPの二相が形成されることが明らかとなった。

次いで、CuSi-TCPの抗菌性を評価した。100および200 mgの試料を1×10<sup>2</sup> CFU/mLの*P.*

*aeruginosa* に加え、37°C で 24 h 培養した。その後、10 倍に希釈して寒天に播種し、24 h 培養した後コロニー数をカウントした。100 mg の試料の場合、Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP において Cu<sub>0</sub>Si<sub>4</sub>-TCP に比べて有意なコロニーの減少が見られた。200 mg の試料の場合、Cu<sub>5</sub>Si<sub>4</sub>-TCP において Cu<sub>0</sub>Si<sub>4</sub>-TCP に比べて有意なコロニーの減少が見られたが、Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP では、むしろコロニーが増加した。100 mg の Cu<sub>5</sub>Si<sub>4</sub>-TCP と Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP を比較した場合、Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP の方が、Cu の溶出が多かったため、Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP において有意なコロニーの減少が見られたと考えられる。一方で、200 mg の Cu<sub>5</sub>Si<sub>4</sub>-TCP と Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP を比較した場合、Cu<sub>5</sub>Si<sub>4</sub>-TCP、Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP 共に有意にコロニーを減少させるのに十分な Cu の溶出が期待されたが、Cu<sub>10</sub>Si<sub>4</sub>-TCP では Cu<sub>5</sub>Si<sub>4</sub>-TCP よりも多くの表面層が形成され、Cu の溶出が抑制され、Cu<sub>5</sub>Si<sub>4</sub>-TCP においてのみ有意なコロニーの減少が見られた可能性が考えられる。これらの結果から、Cu<sub>x</sub>Si<sub>4</sub>-TCP の抗菌性発現には Cu<sub>x</sub>Si<sub>4</sub>-TCP の溶解性と溶解後の表面層を含む微細構造が関わっていることが強く示唆された。

#### < 引用文献 >

Morisue et al., Spine, 31 (2006).  
E.M. Carlisle, Fed. Proc., 28 (1969).

#### 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 9 件 )

**T. Konishi**, P.N. Lim, M. Honda, M. Nagaya, H. Nagashima, E.S. Thian, M. Aizawa, “Fabrication of paste-like  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement using sodium citrate and sodium alginate and its in vivo osteoconductivity”, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **106(6)** 2361-2370 (2018).

**T. Konishi**, Y.M. Lye, X. Qiu, P.N. Lim, E.S. Thian, “Anisotropic coating of a-plane oriented hydroxyapatite via a drop-on-demand micro-dispensing system”, *Mater. Technol.*, **2018**, 1-6 (2018)

P.N. Lim, **T. Konishi**, Z. Wang, J. Feng, L. Wang, J. Han, Z. Yang, E.S. Thian, “Enhancing osteoconductivity and biocompatibility of silver-substituted apatite in-vivo through silicon co-substitution”, *Mater. Lett.*, 212, 90–93 (2018).

K. Kiminami, K. Nagata, **T. Konishi**, M. Mizumoto, M. Honda, K. Nakano, M. Nagaya, H. Arimura, H. Nagashima, M. Aizawa, “Bioresorbability of chelate-setting calcium-phosphate cement hybridized with gelatin particles using a porcine tibial defect model”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **126(2)**, 1-8 (2018).

P.N. Lim, Z. Wang, L. Chang, **T. Konishi**, C. Choong, B. Ho, E.S. Thian, “A multi-material coating containing chemically-modified apatites for combined enhanced bioactivity and reduced infection via a drop-on-demand micro-dispensing technique”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 28, (2017) 3.

P.N. Lim, J. Feng, M. Chong, **T. Konishi**, L.G. Tan, J. Chan, E.S. Thian, “In-vivo evaluation of subcutaneously implanted cell-loaded apatite microcarriers for osteogenic potency”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 28 (2017) 86.

**T. Konishi**, M. Honda, M. Nagaya, H. Nagashima, E.S. Thian, and M. Aizawa, “Injectable chelate-setting hydroxyapatite cement prepared by using chitosan solution: fabrication, material properties, biocompatibility, and osteoconductivity”, *J. Biomater. Appl.*, 31(10), 1319-1327 (2017).

P.N. Lim, Z. Wang, D. Wang, **T. Konishi**, E.S. Thian, “Development in Additive Printing for Tissue-Engineered Bone and Tendon Regeneration”, *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, 2, 99-104 (2017).

Z. Wang, F. Wen, P.N. Lim, Q. Zhang, **T. Konishi**, D. Wang, S.H. Teoh, E.S. Thian, “Nanomaterial scaffolds to regenerate musculoskeletal tissue: signals from within for neovessel formation”, *Drug Discovery Today*, 22, 1385-1391 (2017).

[ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

T. Konishi, “Ceramics in China and Singapore: From Pottery to Bioceramics”, Invited talk at Hunan University, China, 20 Sep. 2017.

長野靖之・小西敏功・吉岡朋彦・早川 聡、「固相反応法による銅含有  $\beta$ -リン酸三カルシウム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。