

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19913

研究課題名(和文)骨組織の三次元構造に倣う生体活性セルロースナノファイバー人工骨の創成

研究課題名(英文)Creation of bioactive cellulose nanofiber artificial bone inspired by three-dimensional structure of bone tissue

研究代表者

藪塚 武史(Yabutsuka, Takeshi)

京都大学・エネルギー科学研究科・助教

研究者番号：20574015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液(SBF)の2倍の濃度を有する水溶液を調製した。トリスヒドロキシメチルアミノメタンを溶解してpHを上昇させ、保持することでアパタイト核を析出させた。アパタイト核をスラリー状のセルロースナノファイバーに混合してプレス成型を行い、乾燥させた。得られた試験片をSBFに浸漬し、試験片表面におけるアパタイト形成能を評価した。セルロースナノファイバーにアパタイト核を混合させて得られた試験片をSBFに1日間浸漬すると、旺盛なアパタイト形成が観察され、高いアパタイト形成能を有することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セルロースナノファイバーはそれ自身のみでは生体活性を持たない。しかし本研究で研究代表者は、セルロースナノファイバーにアパタイト核と複合化させると、高いアパタイト形成能をセルロースナノファイバーに付与することができることを実証した。セルロースナノファイバーの高次構造にアパタイト核を複合させた三次元構造を構築することでセルロースナノファイバーに高い生体活性を付与し、アパタイト核が骨結合性、セルロースナノファイバーが機械的強度を担い、最適化された両者の組成が人工骨としての理想的な弾性率を担う、従来にない画期的な機能を有する人工骨の実現が可能となる。

研究成果の概要(英文)：An aqueous solution with doubled concentration of simulated body fluid (SBF) was prepared. The pH was raised by dissolving Tris-buffer and subsequently held. By this treatment, apatite nuclei (AN) were precipitated in the solution. Thus-obtained AN were mixed with the CeNF slurry. Then the mixture was pressed and dried. The specimens were immersed in SBF at pH 7.4 at 36.5 degree Celsius to evaluate apatite-forming ability. Apatite formation was observed on the whole surface of the samples after immersion in SBF for 1 day. From these results, it was found that apatite formation was induced by AN incorporated in the CeNF matrix and high apatite-forming ability was performed.

研究分野：無機材料化学、生体材料学

キーワード：セルロースナノファイバー アパタイト核 生体活性 擬似体液 アパタイト形成能 人工骨

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般に、人工材料を生体内に埋入すると、免疫反応により線維性皮膜で材料周囲が被覆され、周辺組織から隔離される。しかし、ある種の材料を生体内に埋入すると、生体内でその表面にアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) の層を形成し、これを介して骨と結合することができる。この性質は、生体セラミックスの研究領域で「生体活性」と呼ばれており、材料が骨伝導性を示すための重要な因子の一つとして知られている。セルロースナノファイバー (CNF) は、軽量、高強度、低熱膨張性を併せ持つ植物由来材料であり、近年様々な産業分野で注目を集めている。この CNF に上記のアパタイト形成能を付与することができれば、適度な強度と弾性率、骨伝導性の 3 点を併せ持つ新規骨修復材料への展開が期待できる。ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液 (SBF) [1] の濃度、pH、温度を上昇させると、溶液中にアモルファスリン酸カルシウム微粒子が析出する。近年、我々はこの微粒子が生体模倣環境下で高活性にアパタイト形成を誘起することを見出し、この微粒子を「アパタイト核」(AN) と名付けた [2]。

2. 研究の目的

CNF と AN をミクロンスケールで融合することにより、材料機能に富む CNF に高いアパタイト形成能を付与できると考えられる。本研究では、CNF-AN 複合体のアパタイト形成能に与える AN の効果を検証するため、種々の重量割合の AN を CNF に複合させたときのアパタイト形成能を、SBF を用いた *in vitro* 試験 [3] により評価した。

さらに多くの場合、CNF は疎水化することにより化学的安定性および機械的強度を得る。そこで本研究では、アルキルケテンダイマー (AKD) 処理による CNF の疎水化を試み、AN を疎水化 CNF に複合させたときのアパタイト形成能を、SBF を用いた試験により評価した。

3. 研究の方法

SBF の 2 倍の濃度を有する水溶液を調製した。これにトリスヒドロキシメチルアミノメタンを溶解して 36.5 °C、pH 8.2 に調整し、36.5 °C の恒温槽にて 1 日間保持することで、AN を析出させた。析出させた AN を、吸引濾過により回収した。得られた AN を 0wt%、1wt%、5wt%、10wt% の重量割合でスラリー状の CNF に混合し、プレス成型を行い、50 °C の恒温槽にて 3 日間乾燥させた。上記の工程により、AN を用いて作製した CNF の複合体をダイヤモンドカッターにより切断して表面を研磨し、試験片とした。得られた試験片を 36.5 °C、pH 7.4 の SBF に浸漬し、試料表面におけるアパタイト形成能を評価した。試験片表面を電界放出型走査電子顕微鏡 (FE-SEM)、エネルギー分散型 X 線分析装置 (EDX)、薄膜 X 線回折装置 (TF-XRD) を用いて観察および分析を行った。

作製した複合体を、0.05 wt% の AKD 溶液に 1 分浸漬し、乾燥後 100 °C で 10 分加熱し、試験片とした。得られた試験片を 36.5 °C、pH 7.4 の SBF に浸漬し、試料表面におけるアパタイト形成能を評価した。試験片表面を FE-SEM、EDX、TF-XRD を用いて観察および分析を行った。

4. 研究成果

CNF に AN を複合しなかった 0wt% の試験片では、SBF に浸漬 7 日後においても試験片表面にアパタイト薄膜の形成は観察されなかった。一方、CNF に 1wt%、5wt%、10wt% の AN を混合させて得られた試験片を SBF に 1 日間浸漬すると、骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状の結晶の形成が FE-SEM で観察され、EDX における Ca と P のピークが強く検出された。さらに、TF-XRD 測定では、SBF 浸漬 1 日後の試験片においてアパタイトに帰属される回折ピークが強く検出された。なかでも、AN を 10wt% 混合して得られた試験片は、SBF 浸漬 1 日以内に試料表面が骨類似アパタイト層で完全に被覆された。これらの結果から、CNF-AN 複合体では、高いアパ

イト形成能を示すことがわかった。

AKD 処理後の CNF に 1wt% の AN を複合させて得られた試験片では、SBF に 1 日間浸漬後、アパタイト形成能は確認されなかった。また AKD 処理後の CNF に 5wt% の AN を複合させて得られた試験片では、SBF に 1 日間浸漬後、TF-XRD 測定によるアパタイトの回折ピークは検出されたものの、FE-SEM による試験片表面の観察では、試験片表面の一部でのみアパタイトの形成が観察され、大部分が SBF 浸漬前と変化が見られなかった。CNF に 10wt% の AN を複合させて得られた試験片では、AKD 処理の有無にかかわらず、SBF に 1 日間浸漬後、FE-SEM により骨類似アパタイトに特徴的な鱗片状の結晶の形成が試験片表面全体に観察され、EDX 測定における Ca と P のピーク強度が大きく増加した。また TF-XRD 測定においてもアパタイトの回折ピークが強く検出された。以上の結果から、AKD 処理を施した場合でも CNF に 10wt% 以上の AN を複合させて得られた試験片は、高いアパタイト形成能を持つことが示され、疎水化 CNF にアパタイト形成能を付与することは可能であることが分かった。

5. 参考文献

- [1] T. Kokubo and H. Takadama, *Biomaterials*, 27, 2907 (2016).
- [2] T. Yao, M. Hibino, S. Yamaguchi, H. Okada, US Patent, US8,178,066 (2012), Japan Patent, 5261712 (2013).
- [3] ISO 23317 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai, Takeshi Yao	4. 巻 782
2. 論文標題 Apatite-Forming Ability of Hydrophobicized Cellulose Nanofiber Imparted by Combination with Apatite Nuclei	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Key Engineering Materials	6. 最初と最後の頁 65-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.782.65	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeshi Yabutsuka, Takuya Yoshioka, Shigeomi Takai	4. 巻 31
2. 論文標題 Effect of Ion Release on Apatite-forming Ability of Cellulose Nanofiber-Calcium Phosphate Composites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioceramics	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai, Takeshi Yao	4. 巻 829
2. 論文標題 Effect of Apatite Nuclei on Apatite-Forming Ability of Cellulose Nanofiber	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Key Engineering Materials	6. 最初と最後の頁 114-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.829.114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣、八尾 健
2. 発表標題 セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与による新規人工骨材料の開発
3. 学会等名 セルロース学会第25回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣
2. 発表標題 セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与による新規骨修復材料の開発
3. 学会等名 第13回日本セラミックス協会関西支部学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣
2. 発表標題 セルロースナノファイバーへの生体活性付与による新規骨修復材料の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会第13回関西若手研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai, Takeshi Yao
2. 発表標題 Effect of Precursors of Apatite on Apatite-forming Ability of Cellulose Nanofiber
3. 学会等名 18th Asian Bioceramics Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai, Takeshi Yao
2. 発表標題 Impartation of Apatite-Forming Ability to Hydrophobicized Cellulose Nanofiber by Combination with Apatite Nuclei
3. 学会等名 30th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣
2. 発表標題 アパタイト核を用いた疎水化セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣
2. 発表標題 セルロースナノファイバーのアパタイト形成能に与えるアパタイト前駆体粒子性状の影響
3. 学会等名 第24回日本アパタイト研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣
2. 発表標題 疎水化セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与による新規骨修復材料の開発
3. 学会等名 第22回生体関連セラミックス討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡拓哉、藪塚武史、高井茂臣
2. 発表標題 新規インプラント材料を目指したセルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与
3. 学会等名 ニューセラミックス懇話会第235回特別研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Yoshioka, Takeshi Yabutsuka, Shigeomi Takai
2. 発表標題 Fabrication of cellulose nanofiber-apatite nuclei composite expressing high bioactivity in bio-environment
3. 学会等名 Ajou-Kyoto-Zhejiang Joint Symposium on Energy Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藪塚武史
2. 発表標題 セルロースナノファイバーへのアパタイト形成能付与による新規人工骨材料の開発
3. 学会等名 ナノセルロースフォーラム第15回技術セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立 裕, 吉岡拓哉, 藪塚武史, 高井茂臣
2. 発表標題 アパタイト核を用いたセルロースナノファイバーへの生体活性付与による新規人工骨材料の開発
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会関西ブロック第14回若手研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Yabutsuka, Takuya Yoshioka, Shigeomi Takai
2. 発表標題 Apatite-forming Ability of Cellulose Nanofiber-Calcium Phosphate Composites
3. 学会等名 The 31st Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----