

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：87402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05050

研究課題名(和文)セルロース/アパタイト複合球状粒子を用いたバイオアクティブセラミックスの開発

研究課題名(英文)Development of bioactive ceramics using cellulose/apatite composite spherical beads

研究代表者

城崎 智洋 (Shirosaki, Tomohiro)

熊本県産業技術センター(ものづくり室、材料・地域資源室、食品加工室)・その他部局等・研究参事

研究者番号：70554054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：粒径やカルボキシ基量の異なるセルロースマイクロ球状粒子を13種類調製し、ラインナップ化した。得られた粒子をテンプレートとしてセルロース/アパタイト複合体を調製し、焼成することによってセルロース球状粒子を除去し、多孔質のリン酸カルシウムを得ることができた。得られたリン酸カルシウムの圧縮強度や結晶構造は、テンプレートとなるセルロース球状粒子のカルボキシ基量によって制御することが可能であった。更に、テンプレートとしてセルロースマイクロファイバーを球状粒子と同時に用いることによって、連続孔を持ったアパタイトを調製することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した多孔質セラミックスのテンプレートとして用いたマイクロ球状粒子は、植物由来のセルロースを原料としており、脱石油由来マイクロビーズとして期待される材料を、セルロースナノファイバーを調製する技術を応用して更に発展させたものである。簡便な方法で均質で連続した空孔を持ち、骨や歯の代替材料として十分な強度をもったアパタイトを得る方法を確立し、アパタイトの結晶構造へのテンプレート粒子の影響を科学的に検証しており、社会的意義と共に学術的意義も高い成果である。

研究成果の概要(英文)：Carboxylated cellulose microbeads with different particle size and the amount of carboxy groups were prepared. Cellulose/apatite composites were prepared using the carboxylated cellulose microbeads as template. Macroporous ceramics were prepared by calcination of the composites. The compressive strength and crystal structure of the resulted macroporous calcium phosphate ceramics could be controlled by the amounts of carboxyl groups of cellulose spherical microbeads and additional amounts of the template microbeads. Furthermore, macroporous ceramics with continuous pores could be prepared using cellulose microfibrils and microbeads at the same time.

研究分野：高分子化学

キーワード：セルロース 球状粒子 リン酸カルシウム ヒドロキシアパタイト リン酸三カルシウム 多孔質材料

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は骨や歯の主成分であり、人工的に調製されたものでも生体親和性が非常に高い。骨組織内に埋入されるとすぐにアルブミンや血液細胞などの吸着・皮膜の形成が起き、比較的短時間で新生骨に覆われる。骨の再生を誘導する足場となるためには、骨芽細胞などが侵入するために有効な多孔質構造であることが重要である。これまでに発泡法や押し出し法、フリーズドライ法などによってアパタイト多孔体の調製が行われてきているが、工程が煩雑であり、アパタイトの空孔が不均一になるため、応力の偏りが生じて強度が低くなる、などの欠点がある。

本研究では、ヒドロキシアパタイト結晶の成長の起点として、カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子の表面にアパタイト核を複合化させた、セルロース/アパタイト複合球状粒子を用いる簡便な方法を提案している。人の血漿と同じ濃度の無機イオン (Ca^{2+} 、 HPO_4^{2-} 、 Na^+ など) を含有する擬似体液の過飽和度が增大すると、均一核形成によってアモルファスなリン酸カルシウムの微粒子(アパタイト核)が析出する。カルボキシル化セルロース球状粒子のカルボキシ基は、ヒドロキシアパタイトを構成するカルシウムイオンとイオン対を形成するため、擬似体液中においてセルロース粒子表面にアパタイト核が形成されることが期待される。得られたセルロース/アパタイト複合球状粒子を起点としてヒドロキシアパタイトの結晶を成長させた後、焼成することによってセルロース粒子を除去すると、均一な連続孔をもった高結晶性アパタイトが得られると考えられる。

2. 研究の目的

- (1) セルロースマイクロ球状粒子を TEMPO 触媒で処理することによって、粒子の外縁部のセルロースを酸化し、カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を調製する。
- (2) カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子の表面にヒドロキシアパタイト核を形成させ、コア-シェル型のセルロースアパタイト複合球状粒子を調製する。
- (3) セルロース/アパタイト複合粒子を起点としてヒドロキシアパタイトを成長させることによって、結晶性を制御したヒドロキシアパタイトを調製する。
- (4) セルロース/アパタイト複合粒子を起点として成長させたアパタイト結晶を焼成することによってセルロースを除去し、均一な連続孔を持つ高結晶性ヒドロキシアパタイトを調製する。

3. 研究の方法

(1) 最適なカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子の調製

平均粒子径がそれぞれ、10 μm 、50 μm 、100 μm 、200 μm のセルロースマイクロ球状粒子を、TEMPO、臭化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウムの存在下で、pH10~10.5 の水中においてかき混ぜることによって、カルボキシル化する。添加する次亜塩素酸ナトリウムの量を変化させることによって、セルロース粒子に導入されるカルボキシ基の量を制御する技術をすでに確立しており(特開 2018-002879、特願 2017-249696)、セルロース粒子が球状を保ちながら、粒子表面にアパタイト核が形成されるのに最適な条件を見出すために、カルボキシ基量の異なる一連のセルロース粒子を調製する。

(2) コア-シェル型セルロースアパタイト複合球状粒子の調製

カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を添加した擬似体液中でアパタイト核を形成させることによって、球状粒子表面にアパタイト核が複合化したコア-シェル型複合球状粒子を調製する。使用するセルロース粒子のカルボキシ基量や擬似体液の濃度、反応時間などを精密に調節することによって、アパタイト結晶生成の起点として最適な複合粒子を調製する。

※アパタイト核がセルロース粒子表面に複合化しない場合は、予め単独で調製しておいたアパタイト核を使用し、弱酸性条件下においてカルボキシル化セルロース球状粒子との複合化を試みる。

(3) 空孔を持ったアパタイト結晶の調製

セルロース/アパタイト複合球状粒子を起点として、擬似体液法によりアパタイト結晶を成長させる。セルロース粒子に複合化したアパタイト核の量や、セルロース/アパタイト複合粒子の配合量、粒子サイズによってアパタイトの結晶構造を制御することを試みる。

得られたセルロース/アパタイト複合体を焼成することによってセルロース粒子を除去し、空孔を持ったアパタイト結晶を調製する。焼成時の温度や昇温速度を調節することによって、アパタイト結晶の構造や空孔の構造を制御し、骨再生に適した構造のアパタイト結晶体を調製する。

※擬似体液法によって空孔を持ったアパタイト結晶体が得られない場合は、炭酸カルシウムにりん酸を滴下する滴下法によってアパタイト結晶を成長させる。

4. 研究成果

(1) 最適なカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子の調製

ヒドロキシアパタイト等の空孔のテンプレートとして用いるのに最適なカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を得るために、平均粒子径がそれぞれ $10\ \mu\text{m}$ 、 $50\ \mu\text{m}$ 、 $100\ \mu\text{m}$ 、 $200\ \mu\text{m}$ のセルロースマイクロ球状粒子を、2, 2, 6, 6-テトラメチルピペリジン1-オキシル (TEMPO) を触媒として酸化することによって、カルボキシ基の導入量が異なる 14 種類のカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を調製することができた。

(2) コア-シェル型セルロースアパタイト複合球状粒子の調製

カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を添加した擬似体液中でアパタイト核を形成させることによって、球状粒子表面にアパタイト核が複合化したコア-シェル型複合球状粒子を調製することを試みたが、カルボキシル化セルロース球状粒子表面に変化が観られなかったため、先にアパタイトの成長の核となるアパタイト核を擬似体液法によって調製し、セルロース粒子に複合化させることにした。NaCl、NaHCO₃、KCl、K₂HPO₄・3H₂O、CaCl₂、MgCl₂・6H₂O、Na₂SO₄ を水に加え、pH 8.2 になるようにトリスヒドロキシアミノメタンを添加し、37°C で 12 時間かき混ぜた。析出物をろ過し、水で洗浄した後、減圧乾燥することによって、Ca と P の比が 1.25 : 1 で、粒径約 $0.1\ \mu\text{m}$ のアパタイト微粒子を得た。得られたアパタイト微粒子を、予め塩化カルシウム水溶液中でカルシウム塩化したカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子と共に水に加え、25°C で 2 時間かき混ぜた。反応混合物をろ過し、水およびエタノールで洗浄した後、減圧乾燥によって白色粉末を得た。SEM 観察の結果、Fig. 1b に示すようにセルロース球状粒子の表面にアパタイト微粒子が固定化されていることが確認された。

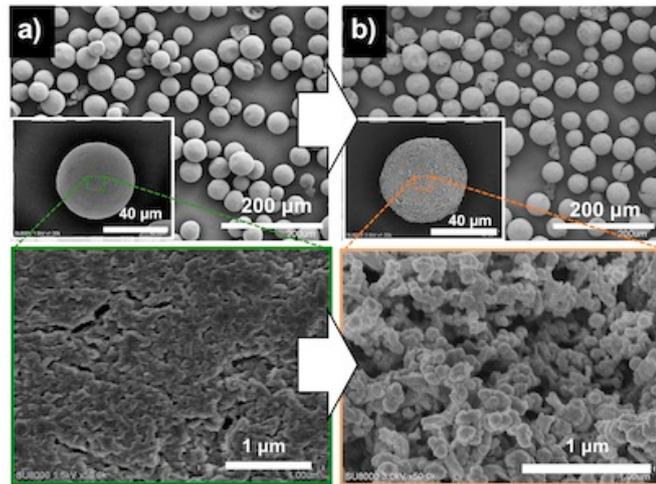


Fig. 1 SEM images of original cellulose microbeads (a) and cellulose/hydroxyapatite composite spherical microbeads (b).

熱重量測定の結果、調製時のアパタイト微粒子の添加量が増大するにしたがって、TEMPO 酸化セルロース球状粒子に複合化されたアパタイト微粒子の量が増加していることが確認された。得られた複合球状粒子のシェルであるアパタイトはアモルファス状を維持しており、結晶成長の核となると考えられた。

(3) 空孔を持ったアパタイト結晶の調製

得られた複合粒子を、アパタイト核を調製した時と同様の組成の擬似体液に浸漬して、アパタイト結晶を成長させることを試みたが、結晶成長速度が非常に遅く、骨代替材料として実用に耐えうる大きさの結晶を得ることは困難であると考えられた。そこで、カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子と水酸化カルシウムを pH7.5 のトリス緩衝液に分散させ、リン酸を滴下することによって、セルロース/アパタイト複合体を調製することとした。

① 滴下法による多孔質アパタイトの調製

pH 7.0 の Tris-HCl 緩衝液に Ca(OH)₂ を添加後、粒径 $100\ \mu\text{m}$ のカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を分散させ、10 分を要して H₃PO₄ を滴下し、60°C で 2 時間かき混ぜた。得られた白色固体をろ取及び洗浄した後、金属製の型に充填し、100°C で 2 時間加熱乾燥した。得られた円柱状の固体を 1000°C で 3 時間焼成することによって有機成分を除去し、空孔を持った円柱状のリン酸カルシウム結晶を得た (Fig. 2)。

光学顕微鏡観察により、カルボキシル化セルロース球状粒子 (TC) を用いたリン酸カルシウムが巨孔化することを確認した (Fig. 3)。



Fig. 2 Preparation process of macroporous calcium phosphate.

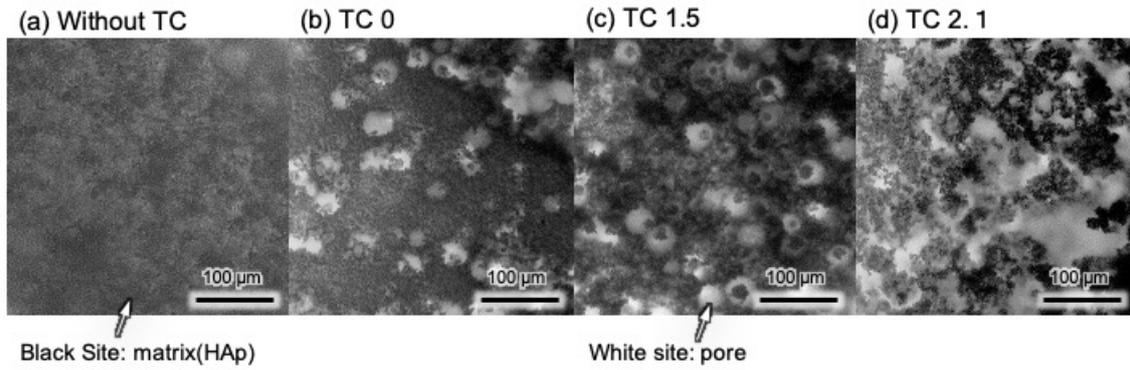


Fig. 3 Optical micrographs of calcium phosphate prepared without TC (a) or with TC (amount of COOH: (b) 0 mmol g⁻¹, (c) 1.5 mmol g⁻¹, (d) 2.1 mmol g⁻¹). Calcination temperature: 1000°C.

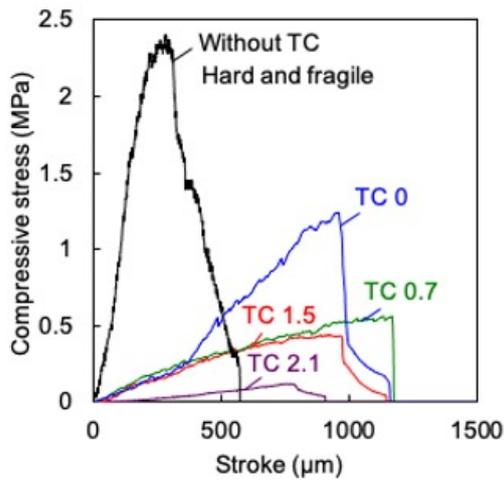


Fig. 4 Compressive stress of calcium phosphates prepared with TC (amount of COOH: 0, 0.7, 1.5, 2.1 mmol g⁻¹) or without TC. Calcination temperature: 1000°C.

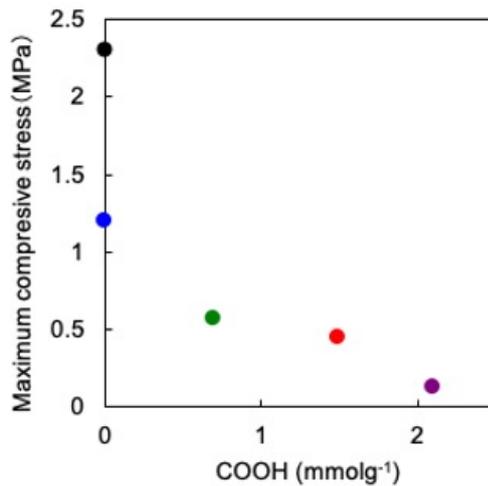


Fig. 5 Maximum compressive stress of calcium phosphates prepared with TC (amount of COOH: 0, 0.7, 1.5, 2.1 mmol g⁻¹). Calcination temperature: 1000°C.

②セルロース粒子のカルボキシ基量によるリン酸カルシウムの圧縮強度変化

Fig. 4にカルボキシ基量の異なるセルロースマイクロ球状粒子 (TC) をテンプレートとして調製したリン酸カルシウムの応力ひずみ曲線を、Fig. 5にテンプレートのセルロース粒子のカルボキシ基量に対して最大圧縮強度をプロットしたグラフを示した。これらの結果より、テンプレートとして用いたセルロースマイクロ球状粒子のカルボキシ基量が多くなるにつれて最大圧縮強度は低下するが、変位は大きくなることが分かった。つまり、テンプレートとして用いるセルロース球状粒子のカルボキシ基量が多いほど柔らかいリン酸カルシウムが得られており、リン酸カルシウムの強度と延性をテンプレート粒子のカルボキシ基量で制御できることが分かった。

③セルロース粒子のカルボキシ基量によるリン酸カルシウムの結晶組成変化

Fig. 6に調製したリン酸カルシウムのXRDパターンを示した。セルロースマ

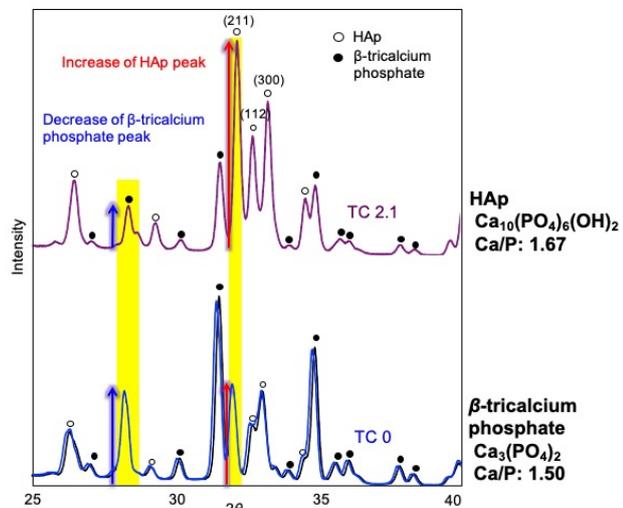


Fig. 6 XRD pattern of HAp prepared with TC (COOH amount: 0, 2.1 mmol g⁻¹), or without TC.

イクロ球状粒子を用いずに調製すると、得られたリン酸カルシウムは、リン酸三カルシウムとなっていた。これに対してカルボキシ基量の多いセルロースマイクロ球状粒子をテンプレートとして用いてリン酸カルシウムを調製すると、ヒドロキシアパタイトの存在量が増えていることが分かった。エネルギー分散型X線分光法による分析から求めたCa/P比も同様の結果を示していた。セルロース粒子のカルボキシ基に配位したカルシウムからリン酸カルシウムの結晶成長が起こる場合、結晶が成長する方向が制限され、ヒドロキシアパタイトの構造を取りやすくなっていると考えられた。この現象を利用することによって、骨充填材等に用いる場合、強度が必要であり、ある程度の期間は生体に吸収されずに存在させたい場合は、リン酸三カルシウムが多くなるようにカルボキシ基量の少ないセルロース球状粒子をテンプレートに用いてリン酸カルシウムを調製し、逆に、強度を必要とせず、比較的早く生体に吸収されて自家骨置換が起こってほしい場合には、ヒドロキシアパタイトが多くなるようにカルボキシ基量の多いセルロース粒子をテンプレートとして用いると良いと考えられる。

④セルロースマイクロ球状粒子及びセルロースマイクロファイバーを用いた多孔質リン酸カルシウムの調製

セルロースマイクロ球状粒子をテンプレートとしてリン酸カルシウムを調製することによって、多孔質なリン酸カルシウムを調製することができたが、セルロース球状粒子を除去することによって生じる空孔がマクロなレベルでは独立孔となってしまった。自家骨置換を起こす骨代替材として用いるためには、体液等が空孔内に侵入することが必須であるため、連続孔にすることが必要である。そこで、セルロースマイクロ球状粒子と同時にセルロースマイクロファイバーをテンプレートとして用いることによって連続孔を持ったリン酸カルシウムを調製することを試みた。

pH7.5のトリス緩衝液に繊維径 $50\mu\text{m}$ のセルロースマイクロファイバーを分散させ、カルボキシ基量 0.74mmol g^{-1} のカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を加え、 60°C で10分間かき混ぜた。さらに水酸化カルシウムを加えてかき混ぜた後、 1M リン酸を滴下し、2時間かき混ぜた。生成した白色固体を濾取し、水で洗浄した後、 100°C で2時間、加熱乾燥した。得られたリン酸カルシウム/セルロース複合体を 1000°C で3時間焼成することによって、リン酸カルシウムを得た。

得られたリン酸カルシウムの破断面をコンフォーカル顕微鏡によって観察したところ、セルロース球状粒子とセルロースマイクロファイバーが離脱した跡が空孔になっており、連続孔になっていると考えられた。

カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子とセルロースマイクロファイバーを1:1.5の割合になるように添加した場合、得られたリン酸カルシウムの最大圧縮強度は 1.7MPa であった。多孔性を高めるため、セルロースマイクロ球状粒子に対してセルロースマイクロファイバーを1:3の割合で添加した場合、最大圧縮強度は 1.2MPa であり、目標とする 1MPa を超える圧縮強度のリン酸カルシウムを得ることができた。かさ密度より求めた空孔率は 57% であり、十分な空孔率であると考えられた。

結果として、カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子とセルロースマイクロファイバーを併用してテンプレートとして用いることによって、実用に耐えうる強度を保ちながら、体液等が侵入することが可能な連続孔を高い割合でもったリン酸カルシウムを調製することができた。テンプレートのセルロース球状粒子のカルボキシ基量を変えることによってリン酸三カルシウムとヒドロキシアパタイトの割合を、テンプレートとなるセルロースの添加量によって空孔率を制御することが可能であり、用途に応じて特性をチューニングすることができるリン酸カルシウムを調製する技術を確認することができた。

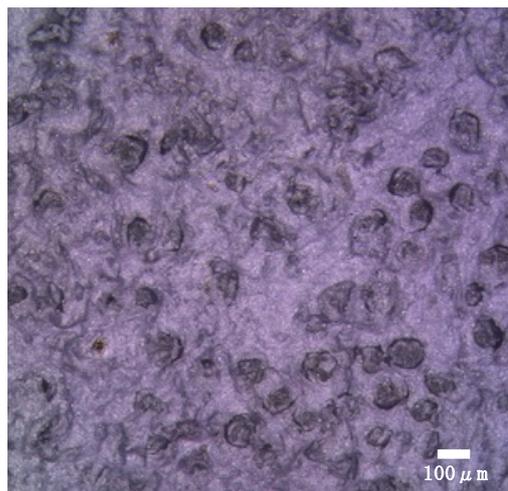


Fig. 7 Optical micrograph of calcium phosphate prepared with cellulose microbeads and microfiber.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 城崎智洋, 藏屋眸, 龍直哉, 堀川真希, 高藤誠, 永岡昭二, 伊原博隆
2. 発表標題 TEMPO酸化セルロースマイクロビーズを利用したバイオアクティブヒドロキシアパタイトの開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城崎智洋
2. 発表標題 TEMPO触媒酸化反応による吸水性セルロースマイクロ球状粒子の開発と応用展開
3. 学会等名 令和2年度第2回CNF・公設試研究者向け勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藏屋眸, 城崎智洋, 堀川真希, 佐藤崇雄, 高藤誠, 永岡昭二, 伊原博隆
2. 発表標題 バイオアクティブセラミックスのためのTEMPO酸化セルロース・アパタイト複合粒子の開発
3. 学会等名 セルロース学会第26回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Kuraya, Tomohiro Shirotsuki, Makoto Takafuji, Shoji Nagaoka, Hirotaka Ihara
2. 発表標題 TEMPO-treated cellulose/apatite core-shell microbeads for scaffold of bone substitute materials
3. 学会等名 Pusan-Gyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium on High Polymers (19th) and Fibers (17th) (PGKS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城崎 智洋, 蔵屋 眸, 高藤 誠, 永岡 昭二, 伊原 博隆
2. 発表標題 カルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子を利用したバイオアクティブセラミックスの開発
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 城崎智洋
2. 発表標題 TEMPO酸化反応によるカルボキシル化セルロースマイクロ球状粒子の開発と応用
3. 学会等名 第4回 繊維学会西部支部若手講演会(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 望月正嗣, 田中周平, 兼廣春之, 寺田通弘, 岡国正雄, 植松正吾, 糸賀公人, 金高武志, 岡本昌司, 土井幹雄, 長濱宅磨, 金子達雄, 山口有朋, 宇山浩, 花市岳, 内村元一, 城崎智洋, 永岡昭二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 343
3. 書名 生分解性プラスチックの素材・技術開発～海洋プラスチック汚染問題を見据えて～	

1. 著者名 久保田健, 宇山浩, 永岡昭二, 城崎智洋, 伊原博隆, 加部泰三, 花市岳, 岩村武, 亀田豊, 吉川雅之, 吉田昭介, 橘賢也, 金高武志, 熊谷将吾, 兼橋真二, 権藤壮彦, 国岡正雄, 佐々木啓光, 坂井久純, 山中克浩, 酒井富美子, 小屋敷修, 小坂彦二, 小林広和, 小林史典, 松下敬通, 松村晴雄, 新居田恭弘, 森良平, 人見清貴, 須藤篤, 水口仁	4. 発行年 2020年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 560
3. 書名 生分解, バイオマスプラスチックの開発と応用	

〔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
研究分担者	高藤 誠 (Takafuji Makoto) (50332086)	熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・教授 (17401)	
研究分担者	龍 直哉 (Ryu Naoya) (90743641)	熊本県産業技術センター(ものづくり室、材料・地域資源室、食品加工室)・その他部局等・研究主任 (87402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関