

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：52201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05081

研究課題名（和文）粒子分散により骨再生医療への貢献を目指すマルチディメンジョン・バイオマテリアル

研究課題名（英文）Multi-Dimension Biomaterials for Bone Regenerative Medicine by Particle Dispersion

研究代表者

川越 大輔（Kawagoe, Daisuke）

小山工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：80420008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨再生における足場材料の候補として、生体骨の無機主成分に類似しているアパタイトが期待されており多くの研究が進められている。よりよい足場材料を作製するためには、アパタイト上での細胞試験の知見を集積することが必要である。クエン酸により分散したアパタイトから得られた透明薄膜の上で、骨分化誘導により骨芽細胞に分化するMC3T3-E1細胞を播種し、5%CO₂、37℃のインキュベーター内で一定期間培養したのち、位相差顕微鏡を用いてHA透明薄膜上の細胞を観察した。三次元スキャホールドにおいては比較となるガラス上の細胞観察に比べて、鮮明度等は劣るものの、HA透明薄膜上で生きた細胞の挙動を観察することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞の樹立により社会からの再生医療への期待は非常に大きくなっている。細胞を用いた再生医療において細胞の研究だけでは生体を再生することは難しく、細胞が増えたり新しい生体組織を構築したりするのに必要な足場材料の研究も重要である。骨再生における足場材料の候補として、生体骨の無機主成分に類似するアパタイトが期待されており、よりよい骨再生の足場材料を作製するためには、アパタイト上での細胞試験の知見を集積することが必要であり、アパタイトを透明薄膜とすることで、透明なポリスチレンやガラスのような細胞試験に適したアパタイトの作製を試みる。また、分散で得られた知見をもとに三次元バイオマテリアルにも応用する。

研究成果の概要（英文）：As a candidate scaffold material for bone regeneration, apatite, which is similar to the inorganic main constituent of living bone, is expected to be a promising candidate, and much research is underway. In order to create a better scaffold material for bone regeneration, it is necessary to accumulate knowledge from cell studies on apatite. Transparent apatite thin films dispersed by citric acid were prepared on a glass surface with a superhydrophilic contact angle. MC3T3-E1 cells, which differentiate into osteoblasts by induction of bone differentiation, were seeded on the obtained apatite transparent thin film and cultured in a 5% CO₂, 37°C incubator for a certain period of time, and then the cells on the apatite transparent film were observed using a phase contrast microscope. Although the clarity of the observation was inferior to that of the observation of cells on glass, the behavior of living cells on the apatite transparent film could be observed.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：アパタイト ナノ粒子 透明薄膜 分散

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞の樹立により社会からの再生医療への期待は非常に大きくなっている。細胞を用いた再生医療において、細胞の研究だけでは生体を再生することは難しく、細胞が増えたり新しい生体組織を構築したりするのに必要な足場材料の研究も重要である。

骨再生における足場材料の候補として、生体骨の無機主成分に類似しているアパタイトが期待されており、多くの研究が進められている。よりよい骨再生の足場材料を作製するためには、アパタイト上での細胞試験の知見を集積することが必要であり、アパタイトを透明薄膜とすることで、透明なポリスチレンやガラスのような細胞試験に適したアパタイトの作製を試みる。

この透明アパタイト薄膜の作製には、アパタイトの粒子制御が重要であり、我々はクエン酸を用いてアパタイトの粒子の形状や大きさの制御を行う。

2. 研究の目的

細胞試験の知見を集積するために、透明アパタイト薄膜を作製し、得られた透明アパタイト薄膜上で、細胞試験を行い、生きた細胞のリアルタイム観察を行うことが目的である。また、これらの知見を3次元スキャホールドの作製にも展開する。

3. 研究の方法

硝酸カルシウム四水和物とリン酸二水素アンモニウムを10:6のモル比となるようにイオン交換水で溶解し、リン酸カルシウム溶液を調製した。次に、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(トリス)をイオン交換水で溶解し、トリス水溶液を調製した。同様に、クエン酸をイオン交換水で溶解し、クエン酸水溶液を調製した。あらかじめ求めた体積比をもとに、シリンジポンプを用いてフロー流路に送液を行った。流路には、内径1.3mm、外径2.3mmのポリエチレンチューブを用いた。恒温槽を取り付け、流路の温度を35°Cで一定にした。反応槽には攪拌機を入れ、乱流での反応を行った。さらに、アパタイト粒子を分散させるためにソニケーターを用いて超音波処理を行った(図1)。

スピンコート法では回転数を検討し、ディップコート法では引き上げ速度を検討した。

細胞試験は、MC3T3-E1細胞を一定細胞濃度になるまで培養し、得られた透明アパタイト上に播種し、5%CO₂、37のCO₂インキュベーターで数日間培養したのち、位相差顕微鏡で観察した。

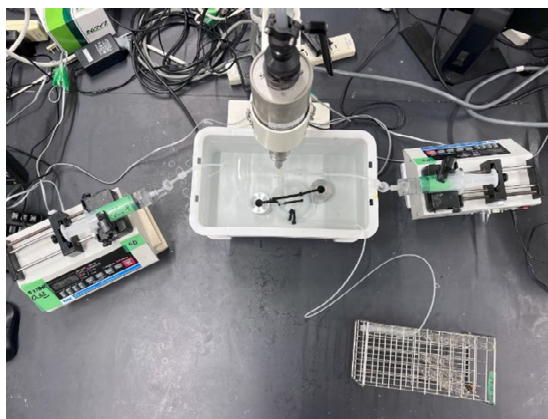


図1 アパタイトスラリーの合成装置

4. 研究成果

カルシウムとリンを含む水溶液にトリスを加えて沈殿を生成させた後、クエン酸を添加することで生成させたアパタイト粒子を分散させた。このアパタイトスラリーについて、pHや濃度などを変えて分散条件を検討し、本条件では0.002MでpH8.6としたアパタイトスラリーの分散性が高いことを確認した。

成膜に適したアパタイトスラリーの検討として、次のいくつかの検討を行った。

1つめは、本系の分散剤であるクエン酸と合わせて、分散性向上や粘度調整を目的として、さらに種々の試薬を添加した。

2つめは、アパタイトの粒子が生成してから分散剤としてクエン酸を添加する方法と、カルシウムのキレート剤として粒子生成前にクエン酸を添加し核成長の抑制やアパタイト粒子の凝集を防ぐ方法を検討した。

3つめは、粒子生成後にブレークダウン法として利用したソニケーターを、粒子生成時にも超音波照射することによって、粒子の凝集を抑制した。

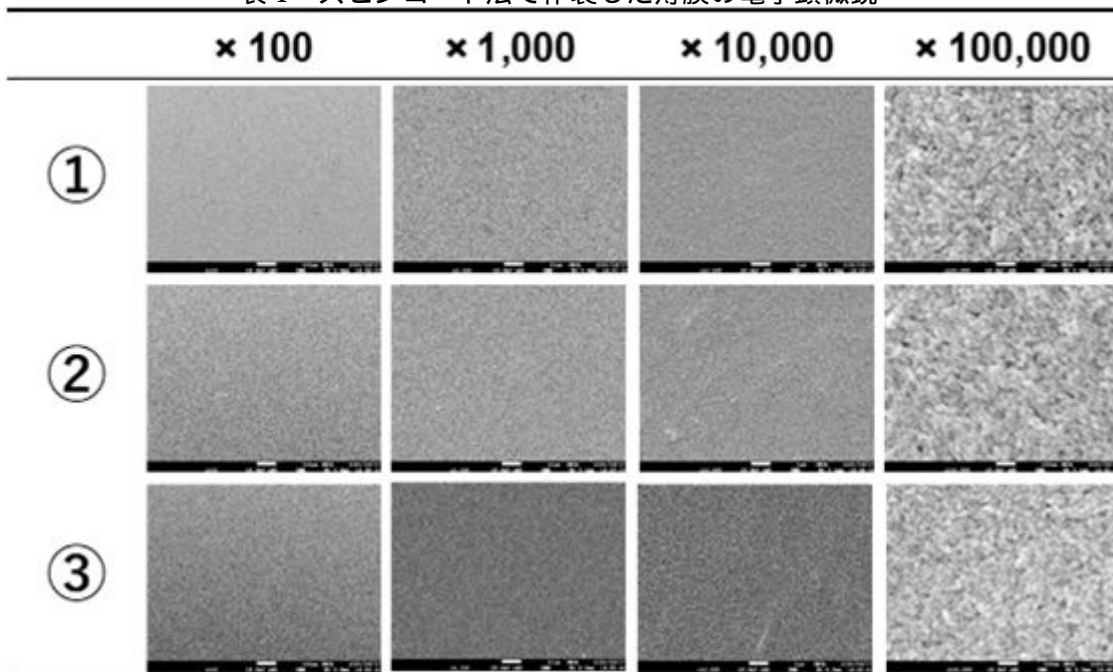
4つめは、耐圧容器を用いた水熱処理により粒子の凝集性を低下させた。

上記の種々の粒子制御を検討することで、成膜に適したアパタイトスラリーを検討した。ここでは、3つめの生成した粒子にクエン酸を添加する方法で作製した分散アパタイトスラリーについて記す。

得られた分散アパタイトスラリーをスピンコーターを用いてガラス基板にコーティングし透

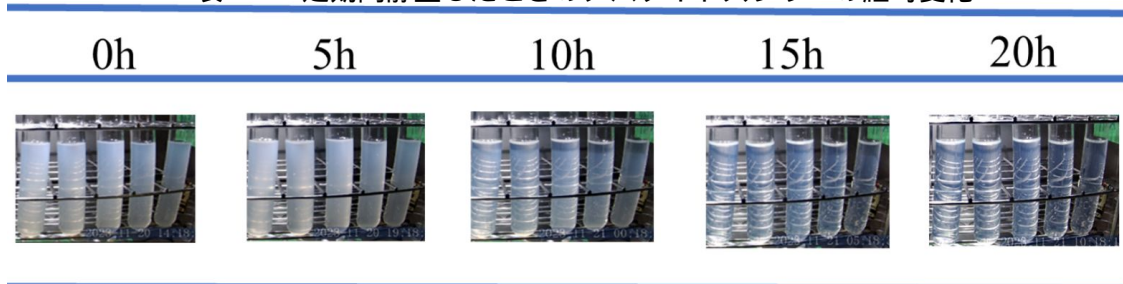
明アパタイト薄膜の作製条件を検討した。スピコートにより得られた透明薄膜を SEM 観察したところ ガラスの端、 中間地点、 回転の中心、 のどのポイントにおいても表 1 のように、均一な薄膜が観察された。

表 1 スピコート法で作製した薄膜の電子顕微鏡



さらに、クエン酸により分散したアパタイトを、一定温度下で種々の時間で静置し、アパタイトスラリー中の粒子の分散性の変化を確認した。時間の経過とともに、粒子径が小さくなっていき、沈降試験中のアパタイトスラリーの透明度も向上した（表 2）。この静置させたアパタイトスラリーを用いて、スピコート法により薄膜を作製したところ、本系の従来の透明薄膜に比べて、微細構造が均一化し、透明度も各段に向上した。

表 2 一定期間静置したときのアパタイトスラリーの経時変化



適した温度と時間を選択することで、小さい粒子径のアパタイトスラリーが作製でき、さらにスピコート法による透明薄膜が作製できた。また、生体金属材料などの 3 次元基材にも薄膜の形成が可能なディップコート法を用いて成膜したところ、均一なアパタイト薄膜が得られた。

得られたアパタイト透明薄膜の上で、骨分化誘導により骨芽細胞に分化する MC3T3-E1 細胞を播種し、5%CO₂、37 °C のインキュベーター内で一定期間培養したのち、位相差顕微鏡を用いてアパタイト透明薄膜上の細胞を観察した。比較となるガラス上の細胞観察に比べて、鮮明度等は劣るものの、アパタイト透明薄膜上で生きた細胞の挙動を観察することができた。

また、3 次元化したアパタイト透明成形体では、ガラス等の一般的に細胞培養や細胞観察に用いられる 2 次元透明体上の細胞観察に比べて、細胞の観察がしづらい結果となった。これは、作製したアパタイトの表面状態が均一でなく、表面粗さも高いことが関係すると考えられる。

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 Liu Zizhen, Kataoka Takuya, Samitsu Sadaki, Kawagoe Daisuke, and Tagaya Motohiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Nanostructural control of transparent hydroxyapatite nanoparticle films using a citric acid coordination technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 396 ~ 405
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1TB02002A	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 Liu Zizhen, Kataoka Takuya, Kawagoe Daisuke, Noda Daichi, Chai Yadong, Tagaya Motohiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Preparation of transparent hydroxyapatite/citric acid particle films	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Colloid and Interface Science Communications	6. 最初と最後の頁 100316 ~ 100316
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.colcom.2020.100316	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 KAWAGOE Daisuke, SUZUKI Tatsuya, NAMA I Reiya, Tsuboi Yuma, HIROMOTO Sachiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Addition of Citric Acid to Hydroxyapatite Slurry for Stable Dispersion of Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transactions of the Materials Research Society of Japan	6. 最初と最後の頁 73 ~ 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14723/tmrsj.45.73	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daisuke. Kawagoe, Keisuke. Ugajin, and Kiyoto. Nagai
2. 発表標題 Citric acid Dispersion of Hydroxyapatite Particles Using a Flow Reactor
3. 学会等名 第33回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川越 大輔, 三上 久理守, 竹弘 直輝, 多賀谷 基博
2. 発表標題 超音波分散によるアパタイト透明体の透過率向上
3. 学会等名 第32回日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉 自振, 三上 久理守, 川越 大輔, 多賀谷 基博
2. 発表標題 骨芽細胞培養特性に対するクエン酸配位ハイドロキシアパタイトナノ粒子膜のナノ空間効果の解明
3. 学会等名 第32回日本MRS年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上久理守, 伊澤琉佳, 多賀谷基博, 川越大輔
2. 発表標題 クエン酸添加ハイドロキシアパタイトスラリーの経時変化と細胞観察用透明薄膜の評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会 2022年年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 劉 自振, 川越 大輔, 多賀谷 基博
2. 発表標題 クエン酸含有ハイドロキシアパタイトナノ粒子膜へのタンパク質吸着挙動と細胞接着特性の評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会 2022年年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三上 久理守, 伊澤 琉佳, 多賀谷 基博, 川越 大輔
2. 発表標題 水酸アパタイトスラリーの経時観察およびクエン酸分散堆積物からの薄膜の作製
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurisu Mikami, Motohiro Tagaya, and Daisuke Kawagoe
2. 発表標題 Sedimentation behavior of calcium phosphate slurry dispersed by citric acid for preparation of transparent calcium phosphate thin film
3. 学会等名 6th STI-Gigaku 2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Haruta KUROSAKI, Osamu FUJIIU, Daisuke KAWAGOE, Sachiko HIROMOTO
2. 発表標題 The Effect of Ultrasonication on Dispersed Apatite Particles in the Presence of Citric Acid Dispersant
3. 学会等名 第30回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Osamu FUJIIU, Haruta KUROSAKI, Daisuke KAWAGOE, Sachiko HIROMOTO
2. 発表標題 Dispersed Apatite Particles Prepared by Hydrothermal Treatment in Citric Acid Solution
3. 学会等名 第30回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Natsuki Horikoshi, Aki Hatanaka, Daisuke Kawagoe, Kanan Matsunuma, Zizhen Liu, Takuya Kataoka, Motohiro Tagaya
2. 発表標題 Effect of Citric Acid Addition on Hydroxyapatite Slurry State for Forming Transparent Thin Film
3. 学会等名 5th STI-Gigaku Conference
4. 発表年 2020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
研究分担者	多賀谷 基博 (Tagaya Motohiro) (20621593)	長岡技術科学大学・工学研究科・准教授 (13102)	

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
---------	---------