

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09990

研究課題名(和文) 超高密度表面電荷の付与によるポーラス  $\beta$ -TCPの骨形成能の制御研究課題名(英文) Regulation of osteoconduction using porous  $\beta$ -TCP with dense surface charge

研究代表者

山下 仁大 (Yamashita, Kimihiro)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70174670

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)：本研究では、 $\beta$ -TCPのCaイオン欠損量を制御するために、様々な濃度のナトリウムイオンの固溶体を作製した。結晶構造解析の精密化の結果より、ナトリウムイオン量の増加に伴い、欠損量が低下することが明らかとなった。電気的特性を評価したところ、加熱により交流電気伝導率が増加した。また、Naイオン固溶量増加に伴い交流電気伝導率は低下した。また、それぞれ試料を電気分極処理により分極し、蓄積電荷量を熱刺激脱分極電流測定により計測したところ、Ca欠損量の増加に伴い、蓄積電荷量が低下することが明らかとなった。このことは、超高電荷密度を有する  $\beta$ -TCPを作製するための材料設計の指針となることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非吸収性のハイドロキシアパタイト(HA)に対して  $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)は生体内で自家骨に置換される利点を持つため歯科のみならず整形外科においても人工骨として広く用いられている。しかしながら臨床応用されている  $\beta$ -TCPは吸収速度が速く生体内で骨置換の前に力学強度が低下する欠点をもつ。本研究では電気分極処理による超高密度表面電荷を  $\beta$ -TCPに誘起することにより、 $\beta$ -TCPの優れた骨伝導能を保持しながら過度の吸収性を抑制し自家骨への置換速度を制御し、同時に自己組織化(骨形成)を促進し、緩やかな生体吸収を有する  $\beta$ -TCP骨充填材料の設計指針となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to control the amount of Ca ion deficiency in  $\beta$ -TCP, solid solutions of various concentrations of sodium ions were prepared. As a result of the refinement of the crystal structure analysis, it was clarified that the amount of defects decreased as the amount of sodium ions increased. When the electrical properties were evaluated, the AC electrical conductivity increased with heating. In addition, the AC electrical conductivity decreased as the amount of dissolved Na ions increased. In addition, each sample was polarized by electric polarization treatment, and the amount of accumulated charge was measured by thermally stimulated depolarization current measurement. This is suggested to be a guideline for material design to fabricate  $\beta$ -TCP with ultra-high charge density.

研究分野：無機生体材料学

キーワード：リン酸三カルシウム 高密度表面電荷 骨補填材 電気分極

## 1. 研究開始当初の背景

骨欠損部への骨補填材の第一選択は自家骨であるが、骨採取により侵襲が大きいことや採取量に制限があることから、人工骨が用いられている。人工骨としてバイオセラミックスのハイドロキシアパタイト(hydroxyapatite: HA) と  $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -tricalcium phosphate:  $\beta$ -TCP) が広く用いられている。HA は非吸収性で移植部位のポリウムを保つことができるが、自家骨へ置換されることがない。一方、 $\beta$ -TCP は生体内で吸収され自家骨に置換されるが、新生骨で骨欠損部が充填される前に吸収されると軟組織に置換されて移植部位のポリウムが減少し、力学強度が低下することが危惧される。申請者らはバイオセラミックスの電気分極法を確立し、表面電荷( $10 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  レベル)を誘起した分極 HA を用いた骨欠損部の再生促進能について報告してきた。本研究では  $\beta$ -TCP の優れた骨伝導能を保持しながらその欠点を克服するために、電気分極処理を  $\beta$ -TCP に適用することにより、自家骨への置換速度を亢進すること、すなわち自己組織化の促進を目指す。

これまで申請者らは分極バイオセラミックスが持つ静電的自己表面場が高活性なナノバイオ界面を誘導する事を見出した。特に HA に関しては、バルク体のみならず、多孔体やナノレベルの粒状体まで電気分極処理が可能であり、in vivo において大幅な骨伝導能改善をもたらすことを証明してきた。最近では、 $\beta$ -TCP も電気分極が可能であり、HA の表面電荷  $10 \mu\text{C}/\text{cm}^2$  に対し、 $\beta$ -TCP ではその 100 倍以上の  $1\text{mC}/\text{cm}^2$  であることや末梢神経の再生に効果があることを見出した。このように高密度表面電荷を付加した  $\beta$ -TCP の生体吸収性や骨伝導能に関しては未解明であり、このような高密度表面電荷の  $\beta$ -TCP に関する報告は皆無である。本研究においてはポラス  $\beta$ -TCP を用いてさらに高密度化を図った  $10^2\text{mC}/\text{cm}^2$  を超える超高密度表面電荷の達成を目指す。

## 2. 研究の目的

ここで、 $\beta$ -TCP の金属イオン固溶体に着目した。とくに金属イオンの中でも、Na イオンを固溶した Na イオン固溶型リン酸三カルシウム (Na- $\beta$ -TCP) を本実験では使用した。Na イオンは M4 サイトの Ca イオンとカルシウム欠損に固溶することが報告されている。また、溶解性の抑制や熱的安定性の向上が報告されており、構造の安定性向上が期待できる。これにより、溶解性の抑制と骨再生能のバランスのとれた高機能性 Na- $\beta$ -TCP の開発が期待できる。しかし、Na- $\beta$ -TCP の電気分極処理によるエレクトレット化や電気特性についての報告はなく、 $\beta$ -TCP から電気特性がどのように変化するか知られていない。さらに、 $\beta$ -TCP の電気分極処理による分極メカニズムについての詳細な報告はないため、ナトリウムイオン固溶による電気特性の変化より、 $\beta$ -TCP の分極メカニズム解明の足掛かりになることが期待できる。

そこで、本研究では、高機能性 Na- $\beta$ -TCP の開発のため、Na イオン固溶による  $\beta$ -TCP の電気特性評価と構造解析を行い、 $\beta$ -TCP の分極メカニズムと Na イオンの電気特性および構造安定性の影響を調査した。

## 3. 研究の方法

### 3. 1. Na- $\beta$ -TCP の合成

Na イオン固溶量の異なる Na イオン固溶型リン酸三カルシウム ( $\text{Ca}_{20-x/2}\text{Na}_{2x}[\text{PO}_4]_{14} : \text{Na-}\beta\text{-TCP}$ ) を得るために固相反応法を行った。出発物質として炭酸カルシウムとリン酸二水素アンモニウム、炭酸ナトリウムを用いた。炭酸カルシウムとリン酸二水素アンモニウム、炭酸ナトリウムのモル比 ( $[\text{Ca}] + [\text{Na}] / [\text{PO}_4]$ ) を 1.571 になるように混合した。

その後、エタノール中、48 時間、アルミナボールを用いたボールミリング (卓上ボールミル AV-20, アサヒ理化製作所社製) にて、湿式混合を行った。その後、ロータリーエバポレーターにてエタノール除去を行った。得られた粉末を小型炉にて昇温速度  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  で、 $900^\circ\text{C}$ 、24 時間、仮焼し、Na- $\beta$ -TCP の仮焼粉体を得た。仮焼粉体を 120 時間、エタノール中でボールミル粉砕を行った。その後、Na- $\beta$ -TCP の仮焼粉体に 2 wt% ポリビニルアルコールをバインダーとして試料に対して 1:1 で混合し、 $75 - 149 \mu\text{m}$  になるように分級を行った。得られた試料に対して 3 wt% になるようにケロシンを潤滑剤として添加後、110 MPa で 4 分間、50 kN 単動シリンダーを用いて一軸加圧成形を行い Na- $\beta$ -TCP ペレットを得た。その後、Na- $\beta$ -TCP ペレットは昇温速度  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  で  $1100^\circ\text{C}$ 、12 時間で焼結した。その後、Na イオン仕込み量の異なる Na- $\beta$ -TCP 焼結体の結晶構造の同定、化学構造、表面観察、Na イオン固溶量の算出を行った。

### 3. 2. Na- $\beta$ -TCP の電気特性

固相反応法により作製した種々の濃度の異なる Na- $\beta$ -TCP 焼結体の表面を耐水性研磨紙の粒度 No.400, 800), 2000 で研磨し、アセトン、エタノールの順で超音波洗浄を行った。その後、十分に乾燥させ、ペレット側面に難燃性テープを巻き、IB-2 型イオンコーターを用いて白金蒸着を行い、ペレット表面に電極を付けた。また、試料表面の帯電を除去するために、小型プログラム電気炉を用いて  $600^\circ\text{C}$ 、10 分間、アニール処理を行った。

その後、試料の交流電気伝導率 AC を調べるために、交流インピーダンス測定で評価した。測定条件は、IMPEDANCE / GAIN-PHASE ANALYZER を用いて実行電圧は 2V、周波数は 1Hz-10MHz、

そして温度制御装置と縦型管状炉を用いて室温と 350-650 °C, 50 °C 間隔で制御し, HANDY-LOGGER MR Series を用いて 1 分間隔で温度データを取得した. また, インピーダンスのデータ取得においては, ノート PC とソフトウェア SMaRT を用いた. 得られたインピーダンス Z より, 横軸にインピーダンスの実部 ZReal, 縦軸にインピーダンスの虚部 ZImage をとり, 複素インピーダンスを作製した. 作製した複素インピーダンスより実数抵抗 R を算出し, 交流電気伝導率を算出した. また, 試料の誘電率および比誘電率を算出した.

### 3. 3. 分極 Na<sup>-</sup>-TCP の作製と表面電荷の測定

固相反応法により作製した種々の濃度の Na<sup>-</sup>-TCP 焼結体の表面を耐水性研磨紙の粒度 No.400, 800, 2000 で研磨し, アセトン, エタノール, 純水の順で超音波洗浄を行った. その後, 十分に乾燥させ, ペレット側面に難燃性テープを巻き, IB-2 型イオンコーターを用いて白金蒸着を行い, ペレット表面に電極を付けた. また, 試料表面の帯電を除去するために, 小型プログラム電気炉を用いて, 600 °C, 10 分間, アニールを行った.

その後, 装置に試料を固定し, それぞれの試料を小型プログラム電気炉を用いて, 400 °C まで昇温し, 400 °C に達したら, 直流電源装置を用いて 1 V (= 0.65 V/mm) を印加した. なお, 構造ひずみの解放を防ぐために, 室温に降下するまで, 電圧は印加し続けた.

その後, 電気分極処理を行った Na<sup>-</sup>-TCP 焼結体を熱刺激脱分極電流 (Thermally stimulated polarization current: TSDC) 測定にて評価を行った. この時, 温度制御装置と縦型管状炉にて昇温速度は 5 °C/min, 測定温度域は室温から 620 °C に制御した. また, 2001-TCSCAN 9 チャンネル・サーモカップル・スキャナにて温度を, エレクトロメータ 6514/J にて脱分極電流を測定し, 脱分極電流を HP Compaq 6000 Pro SFF PC および温度特性測定ソフトウェア ver. 1.0.3.0 を用いて取得した.

## 4. 研究成果

### 4. 1. 合成した Na<sup>-</sup>-TCP のキャラクタリゼーション

いずれの試料においても, -TCP 結晶構造に帰属する ICDD の回折パターンと一致するピークが見られた (図 1). Na イオン仕込み量の増加に伴う -TCP 結晶構造の回折パターンの著しいピークシフトは見られなかった. また, Na イオン仕込み量 12 mol% においては, 2θ = 31.5° 付近に Na イオンおよび Ca イオンを同時に含有するリン酸塩に帰属する回折パターンが見られた. また, Na イオン仕込み量増加に伴い, c 軸の縮小が認められ, 既往の報告と同様の傾向を示した. いずれの試料も 943-979 cm<sup>-1</sup> に P-O の対称伸縮振動, 1, 422-431cm<sup>-1</sup> に P-O の対称変角振動, 2, 1006-1120cm<sup>-1</sup> に P-O の非対称伸縮振動, 3, 541-606cm<sup>-1</sup> に P-O の非対称変角振動, 4 に帰属する PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> の透過スペクトルが見られた (図 2).

ICP 発光分析により作製した Na<sup>-</sup>-TCP の [Ca] / [P] 比および [Na] / [P] 比は Na イオン仕込み量増加に伴い, 減少および増加した. また, Na イオン仕込み量 12 mol% においては, Na イオンの最大固溶量 9.09 mol% の [Na] / [P] 比を超えていたため, XRD 測定より Na<sub>3</sub>Ca<sub>6</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub> の回折ピークが見られたと考えられる. また, Na イオン仕込み量 0.00 - 9.09 mol% の [Ca] / [P] 比および [Na] / [P] 比実測値はそれぞれの理論値より下回ったため, 実際の Na イオン固溶量は仕込み量より低いことが認められた. Na イオン仕込み量と固溶量の間を関係を表 2.7. に示す. 作製した Na<sup>-</sup>-TCP は 0.00-7.64 mol% の Na イオンが固溶していることが示唆された. この時, 予測される M1-M5 サイトにおける全空孔量は最大で 0.40-1.22 mol 存在することが示唆された. さらに, P イオンに対する Ca イオンおよび Na イオンの相関関係を調べたところ, ([Ca] / [P]) / ([Na] / [P]) = -0.55 であることから, Ca : Na = 1 : 2 で置換していることが考えられ, 電荷補償が保たれていることが示唆された. 以上より, -TCP 結晶構造単相を有する Na イオン固溶量 0.00 - 7.64 mol% の Na<sup>-</sup>-TCP の作製ができた.

### 4. 2. Na<sup>-</sup>-TCP の電気特性

交流インピーダンス測定より算出した各温度の複素インピーダンスプロットを作成し, Na イオン固溶したいずれの試料においても, 複素インピーダンスプロットにおいて円弧を示したため, 電気容量の成分を有し, 応答速度の遅れが見られた. また, Na イオン固溶によりいずれの

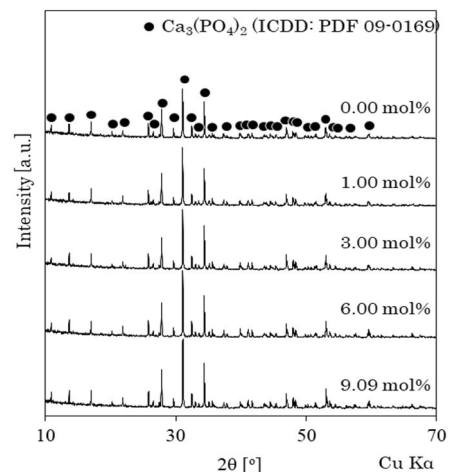


図 1 Na<sup>-</sup>-TCP の X 線回折

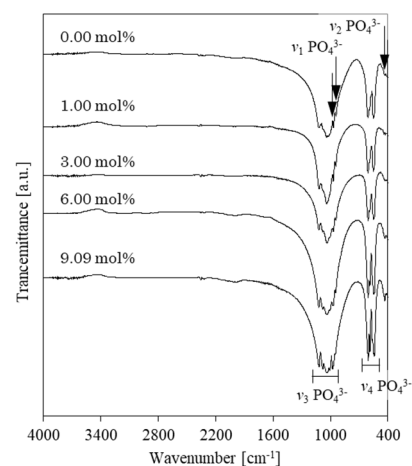


図 2 Na<sup>-</sup>-TCP の FT-IR 解析

試料においても、0.00 mol%の試料より大きな抵抗値を示した。また、温度においては4.93 mol%と7.64 mol%で抵抗値の大小が反転した。

複素インピーダンスプロットより算出した交流電気伝導率 AC よりアレニウスプロットを作製した(図3)。いずれの試料においても、400-600 °C 間で直線関係が得られた。このことより、この温度域では交流電場に応答するキャリアの拡散機構は単一であることが示唆された。また、抵抗値 R 同様に交流電気伝導率 AC は Na イオン固溶量増加に伴い減少傾向を示した。さらに、アレニウスプロットより算出した活性化エネルギーと 530 °C の交流電気伝導率 AC を求めたところ、交流電気伝導率 AC は Na イオン固溶量 2.37 mol%までリニアに減少し、2.37 mol%以上でプラトーに達した。活性化エネルギーにおいては、2.37 mol%を境に急激に減少を示した。このことより、Na イオン固溶量 2.37 mol%以上の温度域で物質移動の温度依存性の低下を示唆した。また、Na<sup>-</sup>-TCP の各温度点の誘電率及び比誘電率を求めたところ、Na<sup>-</sup>-TCP の誘電率および比誘電率は各温度点および Na イオン固溶量に影響されず、0.20-0.40 nFm<sup>-1</sup>と 25-45 となった。

以上のことより、Na イオン固溶は電気特性へ抑制的に働くことが示唆された。Na イオンは -TCP 結晶格子中の A カラムの M4 サイトの空孔及び Ca イオンに置換固溶する。この固溶形態により、Na イオンが増加すると、Ca イオンと空孔量が減少する。つまり、伝導のキャリアとして、空孔が関与することが示唆される。これにより、交流電気伝導率 AC は低下傾向を示したことが考えられる。また、活性化エネルギーにおいては Na イオン固溶量 2.37 mol%以上で低下したことから、温度依存性が低下したと考えられる。これは、Na イオンが M4 サイトに固溶することにより、M4 サイトの構造安定性が向上し、キャリアとなるイオン移動の阻害を示したと考えられる。

#### 4.3. 分極 Na<sup>-</sup>-TCP の表面電荷

電氣的分極処理を施した Na<sup>-</sup>-TCP の TSDC 曲線より(図4)、いずれの試料においても、温度上昇に伴って電流密度の増加が見られた。また、Na イオンを固溶したすべての試料において、-TCP より電流密度のピークは低下した。また、Na イオン添加量増加に伴い、電流密度は低下した。Na イオン添加量増加に伴い、ピークが高温側にシフトした。

蓄積電荷量及び電気伝導率は Na イオン添加量の増加に伴い、減少した。また、Na イオン添加量 0.0 mol% から 2.37 mol%まで急激に蓄積電荷量と電気伝導率は低下した。Na イオン添加量 2.37 mol%以上では、蓄積電荷量と電気伝導率に大きな変化見られなかった。また、本実験条件においては、2.37 mol%を以上では、分極されにくいことが示唆された。

これら Na<sup>-</sup>-TCP の電流密度や蓄積電荷量は -TCP 構造中の M4 サイトに存在する空孔が Na イオン固溶により減少したことが示唆された。また、リートベルト解析により Na イオンが M4 サイトの構造を安定化させ、交流インピーダンス測定より 2.37 mol%以上で温度依存性の低下を示した傾向と類似していた。この構造安定性と温度依存性の変化により形成される誘起双極子モメントが減少したために蓄積電荷量は減少したと考えられる。

以上より本実験条件では Na イオンを固溶することにより、-TCP の分極性能は抑制される。Na イオン固溶量に伴い抑制の形式が異なり、Na イオン固溶量 2.37 mol%以下では構造安定性の向上による抑制、2.37 mol%を超えるとさらに温度依存性が低下し、分極性能の低下につながることを示唆された。また、Na イオン固溶サイトである M4 サイトを起点として誘起双極子モメントの形成をしていることが示唆された。これにより、Na<sup>-</sup>-TCP の分極性能の抑制制御が可能であることが示唆された。

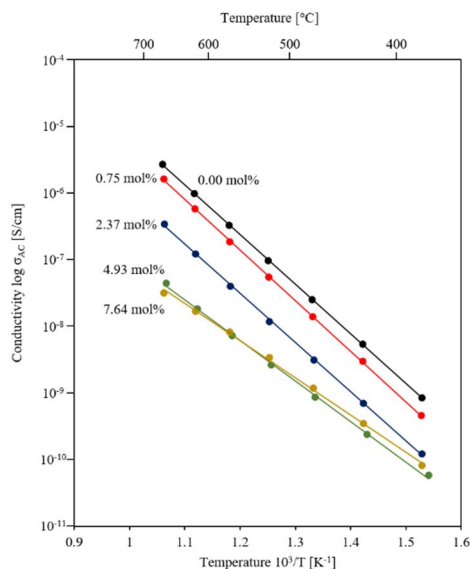


図3 アレニウスプロット

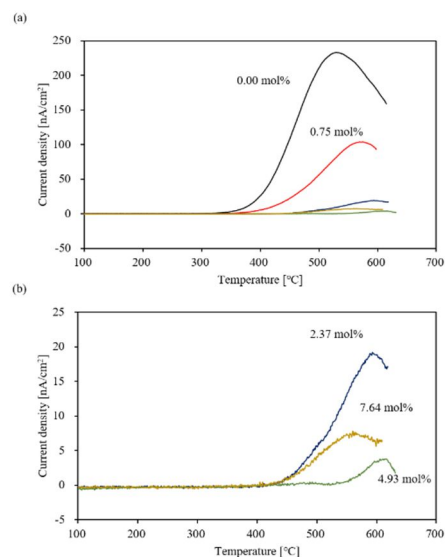


図4 TSDC 測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nozaki Kosuke, Nagai Akiko, Endo Takayuki, Hashimoto Kazuaki, Yamashita Kimihiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Electrical polarization and ionic conduction properties of $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics with controlled vacancies by sodium ion substitution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ceramics International	6. 最初と最後の頁 15791 ~ 15799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ceramint.2022.02.117	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 Nohara Kohei, Itoh Soichiro, Akizuki Tatsuya, Nakamura Miho, Fukuba Shunsuke, Matsuura Takanori, Okada Munehiro, Izumi Yuichi, Iwata Takanori, Yamashita Kimihiro	4. 巻 108
2. 論文標題 Enhanced new bone formation in canine maxilla by a graft of electrically polarized tricalcium phosphate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 2820 ~ 2826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm.b.34612	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0件

〔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	野崎 浩佑 (Nozaki Kosuke) (00507767)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師  (12602)	
研究分担者	橋本 和明 (Hashimoto Kazuaki) (90255159)	千葉工業大学・工学部・教授  (32503)	

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