

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300175

研究課題名（和文） 骨代謝に組み込まれる吸収性骨代替材料の創製

研究課題名（英文） Preparation of bioresorbable bone substitutes incorporated in bone metabolism

研究代表者

井奥 洪二（IOKU KOJI）

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：60212726

研究成果の概要（和文）：出発原料や水熱条件を選択することにより、Ca 欠損組成や構成粒子の形態を制御した HA の作製技術を確立できた。Ca 欠損組成や構成粒子の形態が生体内での挙動に影響を与える可能性があることを明らかにした。さらに、力学的性質の面でも、柱状にすることにより脆性破壊しにくい人工骨とできることを明らかにできた。これらの結果より、生体内吸収性の骨代替材料を創製するための基礎的指針を得られた。

研究成果の概要（英文）：A fabrication process of Ca-deficient HA with controlled composition and morphology of the particles which construct the HA ceramics was established by selecting the starting material and hydrothermal conditions. The possibility that the Ca-deficient composition and morphology of the particles affect the behavior of the HA ceramics in vivo was revealed. Moreover, it was revealed that the rod-shaped particles prevent the brittle fracture. From these results, we obtained the basic knowledge about the creation of bioresorbable bone substitute materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル、吸収性骨代替材料

## 1. 研究開始当初の背景

病気や事故による骨欠損の回復は、術後の患者の生活の質（QOL）の向上に欠くことのできないものである。現在、臨床ならびに研究のレベルにおいて、様々な骨修復が試みられてはいるものの、いまだに自家骨移植が最適の方法とされる現状が続いており、患者への付加的な侵襲や安全性さらには倫理的な問題点をクリアできる材料と治療法が求め

られている。このような中、骨の無機主成分である水酸アパタイト（ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  : HA）の焼結体が、骨代替材料として実用化されている。しかし、臨床応用されている現行の焼結 HA では、(i) 骨伝導性に優れているものの骨誘導能がない、(ii) 生体内で吸収されないために骨組織と置換しない、(iii) セラミックス特有の脆性破壊を起こす、といった事柄が使用上の制限となっており、広い普及

への足かせとなっている。

このような状況下で、我々は、HAは生体内で吸収されない、という従来からの常識を覆す生体内吸収性 HA の合成に成功した。この生体内吸収性 HA は、Ca の欠損した非化学量論組成の HA であり、近年臨床応用され始めた生体内吸収性  $\beta$  型リン酸三カルシウム ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ :  $\beta$ -TCP) と動物実験によって比較し、骨形成と吸収のバランスが格段に優れていることを見出した。ただし、優れた特性を示すメカニズムやその力学的特性についてはまだ明らかにできていない。これらを明らかにできれば、骨代謝に組み込まれる生体内吸収性の骨代替材料を創製するための指針が得られると期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、開発した生体内吸収性 HA の吸収される速度を最適に制御するために、HA の Ca 欠損組成や構成する粒子の形状を制御し、自家骨を用いることなく適切な治療が可能となる生体内吸収性の骨代替材料を創製するための基礎的指針を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Ca 欠損 HA の作製

HA 人工骨の創製にあたっては、それを構成する HA 粒子の組成や形態が重要な因子となる。水熱法により、Ca 欠損組成を制御した HA の作製を試みた。リン酸三カルシウム ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ : TCP) を水熱条件下で、蒸気または液相の水と反応させ、Ca 欠損 HA を作製した。図 1 に蒸気および液相の水と反応させる際の反応系モデルを示す。このような反応系において、出発原料の影響を見るために、高温安定相で反応性の高い  $\alpha$ -TCP または低温安定相の  $\beta$ -TCP を用いた。また、用いる反応溶液の種類、反応温度と時間を変化させ、その影響を調べた。

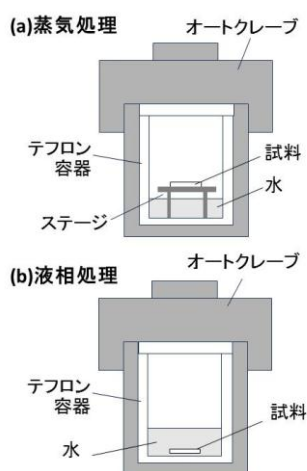


図 1 水熱法による Ca 欠損 HA の作製

得られた試料について、結晶相を X 線回折 (XRD)、形態を走査型電子顕微鏡 (SEM) により調べた。組成 (Ca/P モル比) については、Ca 欠損 HA が 900 °C で化学量論の HA と  $\beta$ -TCP に分解することを利用して、XRD により結晶相の割合を求め、そこから Ca/P モル比を計算した。

### (2) Ca 欠損 HA の力学的性質の評価

実際に人工骨として利用する場合、材料の力学的性質は重要である。 $\alpha$ -TCP 粉末を直方体に成形し、これを水熱蒸気処理した。反応温度を制御することによりアスペクト比の異なる柱状粒子からなる Ca 欠損 HA 多孔体を得た。比較として、これとほぼ等しい気孔率を有する HA 焼結体を市販の化学量論 HA 粉末を用いて作製した。これらの直方体試料について、3 点曲げ試験を行い、曲げ強度および破断ひずみを求めた。

さらに、実際に人工骨として利用する際には、球状の顆粒であれば操作性が高いと考えられるので、球状顆粒の作製も行い力学的特性の評価を行った。 $\alpha$ -TCP 粉末を球状に成形した後、水熱液相処理することにより、柱状粒子からなる Ca 欠損組成 HA 多孔質球状顆粒を得た。この球状顆粒に圧縮荷重をかけ、その挙動についても調べた。

### (3) Ca 欠損 HA の溶液化学的評価

これまでに、骨と直接結合する材料の一部は、体液と反応しその表面に HA 層を形成し、それを介して骨と直接結合することが報告されている。すなわち、体液との化学反応が生体内での材料の挙動に大きな影響を与える。そこで、体液環境下での Ca 欠損 HA の挙動を調べるために、ヒトの体液とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液に Ca 欠損 HA を浸漬した。浸漬前後の溶液中のカルシウムおよびリンの元素濃度変化を高周波誘導プラズマ発光分光分析 (ICP) により調べた。

### (4) 吸着特性の評価

材料表面での細胞の挙動は、材料表面に吸着する物質、特にタンパク質により制御されると考えられている。そこで、上記の方法 (1) で得られた組成や形状の異なる Ca 欠損 HA 粒子について、酸性タンパク質である牛血清アルブミンおよび塩基性タンパク質であるウマ心臓由来チトクローム C に対する吸着特性を調べた。また、柱状粒子からなる Ca 欠損 HA 球状顆粒と化学量論の焼結 HA 球状顆粒について、血清タンパク質に対する吸着特性を調べた。

### (5) 骨芽細胞様細胞の挙動の評価

骨代謝を考える上で、骨を作る細胞である骨芽細胞の材料表面での挙動を知ること

重要である。上記の方法(1)で得られた知見をもとに、Ca/P モル比がほぼ同じで、大きさ(太さ)の異なる柱状粒子からなる Ca 欠損ペレットを作製した。ペレット表面に骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を播種し、細胞の挙動を調べた。細胞の形態を走査型電子顕微鏡により、細胞数を細胞の代謝を利用したアッセイキットにより調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ca 欠損 HA の作製と評価

化学組成や形態を制御した HA の合成とその材料科学的評価を行い、HA 人工骨の特性の精密化に関する知見を得た。具体的には、出発原料や水熱処理条件を選択することにより、板状の HA 粒子やアスペクト比を制御した柱状 HA 粒子の合成に成功した。得られた HA 粒子は、いずれも Ca 欠損組成であり、水熱処理条件によりその組成を制御できることを明らかにした。

図2に得られた Ca 欠損 HA 粒子の SEM 写真を示す。反応温度を高くし反応時間を長くすることで、Ca/P モル比は大きくなる傾向が見られた。また、蒸気処理と液相処理を比較すると、蒸気処理の方が、生成した粒子が柱状の形態をとりやすく、Ca/P 比も出発原料の TCP に近く Ca 欠損が大きい傾向が見られた。

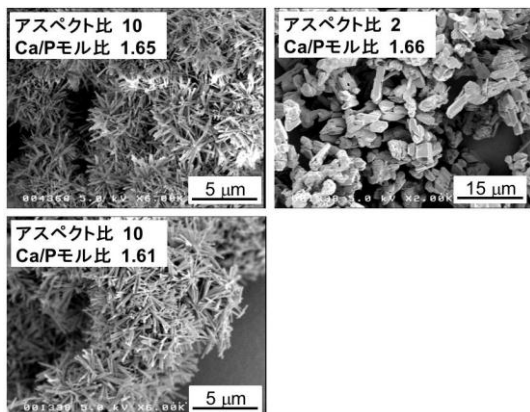


図2 形態と組成を制御した HA 粒子

##### (2) Ca 欠損 HA の力学的性質の評価

アスペクト比が 13 から 37 の柱状 HA 粒子からなる多孔体の合成に成功した。この多孔体においては、アスペクト比が大きくなるにつれて、曲げ強度および破断ひずみが大きくなった。図3に、アスペクト比 37 の柱状 HA 粒子からなる多孔体と焼結法により作製した HA 多孔体の応力-ひずみ線図を示す。ほぼ同じ気孔率にもかかわらず、柱状粒子からなる多孔体は大きな強度と変形を示し、脆性破壊しにくいことを明らかにした。さらに、柱状粒子からなる HA 多孔質球状顆粒においては、荷重をかけた場合に、脆性破壊することなく柱状粒子の絡み合いにより見かけ上塑

性変形しているような挙動を示した (図4)。

セラミックス人工骨が脆性破壊してしまうことは、臨床において非常に大きな問題となっており、この課題を解決できる可能性を示したことは大変意義深い。

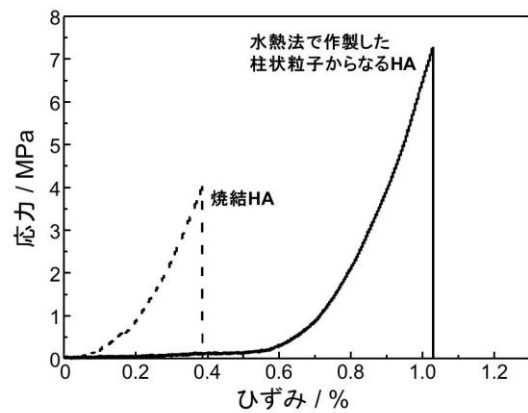


図3 柱状粒子からなる HA 多孔体の曲げ試験による応力-ひずみ線図

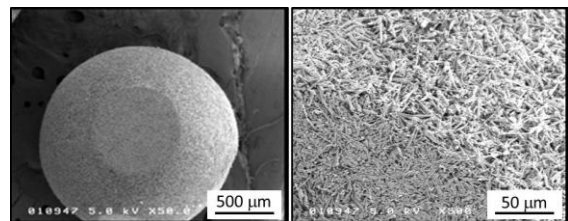


図4 柱状粒子からなる Ca 欠損 HA 球状顆粒の変形挙動

##### (3) Ca 欠損 HA の溶液化学的評価

Ca 欠損 HA を浸漬する前後の擬似体液中のカルシウムとリンの元素濃度を調べたところ、浸漬後にはカルシウムもリンも元素濃度が低下していた。このことは、擬似体液において擬似体液からカルシウムイオンとリン酸イオンを取り込んで、Ca 欠損 HA 表面に HA が析出したことを示唆する。これまでに、骨と直接結合する材料が生体内でその表面に HA 層を介して結合することが報告されている。したがって、本研究で作製した Ca 欠損 HA も生体内で体液との反応より表面に体液組成依存の HA を形成し、骨に対して高い親和性を示す可能性が示唆された。これまでに Ca 欠損 HA が高い骨再生能力を示すことを明らかにしているが、その一因に体液との反応による表面での HA 析出が挙げられる可能性がある。

##### (4) 吸着特性の評価

Ca 欠損 HA 粒子において、組成や形状を変化させると、アルブミンやチトクローム C に対する吸着特性も変化することが分かった。これは、組成により表面にある吸着サイトの

数が変わり、形態により露出する結晶面の割合が変わり吸着サイトの割合が変化するためと考えられる。また、柱状粒子からなるCa欠損HA球状顆粒と化学量論の焼結HA球状顆粒では、血清タンパク質に対する吸着特性が異なることが分かった。現状では、生体内で実際にどのタンパク質が吸着し、細胞の挙動を制御しているかまでは不明であるが、今後より研究を進めていけば、タンパク質の吸着挙動の制御により、材料表面での細胞の挙動の生後も可能になると期待できる。

#### (5) 骨芽細胞による増殖の評価

図5に、柱状粒子からなるCa欠損HA上での骨芽細胞様細胞の培養7日後のSEM写真を示す。柱の太さが3 $\mu\text{m}$ の場合の方が、柱の太さが1 $\mu\text{m}$ の場合よりも細胞が良く接着した。しかも、細胞数を調べると、柱の太さが3 $\mu\text{m}$ の場合の方が多いたことが分かった。このことから、表面形状により細胞の増殖挙動が大きく影響されることが分かった。HA人工骨において、構成する粒子のサイズを制御することにより、細胞が行っている骨代謝をも制御できる可能性が示された。

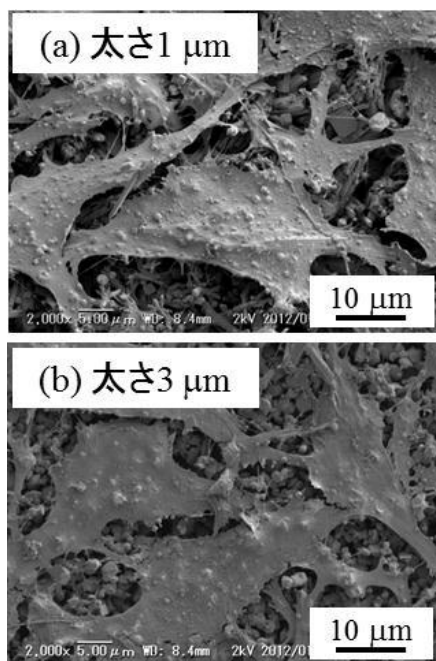


図5 柱状粒子からなるCa欠損HA上での骨芽細胞様細胞の培養7日後のSEM写真

#### (6) 総括

出発原料や水熱条件を選択することにより、Ca欠損組成や形態を制御したHAの作製技術を確立できた。Ca欠損組成や構成する粒子の形態が生体内での挙動に影響を与える可能性があることを明らかにした。さらに、力学的性質の面でも、柱状にすることにより脆性破壊しにくい人工骨とできることを明らかにできた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計21件)

- ① Setsuaki Murakami, Katsuya Kato, Yuki Enari, Masanobu Kamitakahara, Noriaki Watanabe, Koji Ioku, “Hydrothermal synthesis of porous hydroxyapatite ceramics composed of rod-shaped particles and evaluation of their fracture behavior”, *Ceram. Int.* 査読有、38巻、2012年、1649-1654.
- ② Masanobu Kamitakahara, Yuki Enari, Noriaki Watanabe, Koji Ioku, “Morphology and composition of hydroxyapatite particles synthesized hydrothermally from tricalcium phosphates”, *Trans. Mater. Res. Soc. Japan*, 査読有、36巻、2011年、405-408.
- ③ Koji Ioku, “Tailored bioceramics of calcium phosphates for regenerative medicine”, *J. Ceram. Soc. Japan*, 査読有、118巻、2010年、775-783.
- ④ Koji Ioku, Masanobu Kamitakahara, “Hydroxyapatite ceramics for medical application prepared by hydrothermal method”, *Phosphorus Research Bulletin*, 査読有、23巻、2009年、25-30.

[学会発表] (計40件)

- ① 井奥洪二、木村健士郎、上高原理暢、池田通、傾斜機能を持つCa欠損水酸パタイト複合材料、紛体粉末冶金協会、2011年10月26-28日、大阪
- ② K. Ioku, M. Kamitakahara, T. Ikeda, Calcium-deficient hydroxyapatite for metabolism of subsequently formed bone tissue, 5th Forum on New Materials, Int. Conf. Modern Materials & Technologies, 2010年6月16日、イタリア
- ③ 井奥洪二、上高原理暢、奥田貴俊、権田芳範、米澤郁穂、黒澤尚、池田通、柱状粒子から成るCa欠損水酸パタイトの骨内挙動、日本セラミックス協会2009年秋季シンポジウム、2009年9月17日、愛媛

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

井奥 洪二 (IOKU KOJI)

東北大学・大学院環境科学研究科・教授

研究者番号：60212726

(2)研究分担者

池田 通 (IKEDA TOHRU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科  
・教授

研究者番号：002110299

上高原 理暢 (KAMITAKAHARA MASANOBU)

東北大学・大学院環境科学研究科・准教授

研究者番号：80362854

渡邊 則昭 (WATANABE NORIAKI)

東北大学・大学院環境科学研究科・助教

研究者番号：60466539