

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月30日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23760630

研究課題名（和文） 骨に働きかけ再生を促す吸収性骨修復材料の創製

研究課題名（英文） Preparation of bioresorbable bone-repairing materials which promote bone regeneration

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

骨に働きかけ再生を促す吸収性骨修復材料の創製を目指した。まず、ケイ酸を含有するリン酸三カルシウム（TCP）を合成した。その焼結体を擬似体液に浸漬したところ、ケイ酸を添加しないTCPに比べ、表面での水酸アパタイト（HA）形成が促進する傾向が見られた。ケイ酸を含有するTCPの成形体を水熱処理したところ、柱状粒子からなるCa欠損組成のHAを得ることに成功した。一方、Ca欠損組成の大きいHAほど、酸性緩衝液中で溶解しやすいことも明らかにした。基礎となる材料について合成プロセスの確立と特性評価を行えた。

研究成果の概要（英文）：

We aimed the preparation of bioresorbable bone-repairing materials which promote bone regeneration. We prepared silicate-containing tricalcium phosphate (TCP) and revealed that the sintered silicate-containing TCP showed higher apatite-forming ability in a simulated body fluid than the silicate-free TCP. When the compact of silicate-containing TCP powder was hydrothermally treated, the Ca-deficient HA ceramic composed of rod-shaped particles was obtained. On the other hand, we revealed that the dissolution rate of the Ca-deficient in the acidic buffer solution increased with the Ca-deficiency degree. We established the synthesis process and evaluated the basic materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・無機材料・物性

キーワード：機能性セラミックス

## 1. 研究開始当初の背景

骨は、我々の身体全体を支えており、さまざまな運動を可能にしている。従って、人は、骨の一箇所でも、病気やけがにより損傷を受けると、とたんに日常生活に支障をきたす。急速に高齢者が増えている我が国においては、骨疾患や骨折の患者が増加し、骨を修復する技術は一段と重要になってくると考えられる。現在、臨床において、様々な骨修復が行われているものの、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の問題点を克服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、申請者は、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 Ca 欠損 HA 上において、骨を溶かす破骨細胞の活動が活発化することを明らかにしている。また生体内吸収性 HA は、柱状粒子から構成されているため破壊進行時の粒子のプアウトにより、破壊靱性が向上する利点も確認している。

しかしながら、骨組織の再生においては、足場が吸収されると共に骨を作る骨芽細胞を活性化させることも重要である。骨形成タンパク質 (BMP) 等を足場材料に担持させることにより骨再生を促進する試みも行われているが、現時点では BMP は高価であり一般的な治療に用いることは困難である。そこで、HA に固溶でき、しかも安価なケイ酸の添加により、骨再生を促進させること検討する。これまでに、化学量論組成の HA 焼結体にケイ酸を添加した研究例はあるものの、この方法では骨形成は促進されるが、HA 焼結体自身はほとんど吸収されないために、新生骨に置き換わることはなく骨の再生は不完全なものになってしまう。それに対し、本研究では、吸収性の Ca 欠損 HA にケイ酸を固溶させることにより、ケイ酸が骨芽細胞に働きかけ骨形成を促進するとともに、Ca 欠損 HA が吸収され、これにより骨再生を実現しながらバランス良く吸収される骨修復材料が得られると期待される。また、現在吸収性の材料として利用されているリン酸三カルシウム (TCP) にケイ酸を含有させた材料も、吸収性と骨再生を促す能力を有していると期待される。

現在、細胞を足場表面で培養した後、それを移植することによって、組織の再生を目指す研究が盛んに行われている。しかしながら、骨組織においては、骨を作る骨芽細胞と骨を溶かす破骨細胞が存在し、骨は代謝により常に作りかえられているので、外部から細胞を移植しなくても骨欠損部位には、すでに代謝にかかわる細胞が存在している。したがって、細胞を移植しなくても、これらの細胞の働きを足場材料のみでうまくコントロールできれば、自家骨や細胞移植を伴わない足場材料のみの移植でも十分な骨再生が期待できると考える。

## 2. 研究の目的

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。本研究では、自家骨や細胞移植を伴わなくても早急な骨再生が期待できる骨修復材料の開発を目指し、骨に働きかけ再生を促す吸収性骨修復材料を創製することを目的とする。

ケイ酸含有 TCP を合成するとともに、得られた物質と水熱プロセスを利用することにより、骨形成を促進するケイ酸を含有させた生体吸収性 Ca 欠損 HA の作製方法を確立する。ケイ酸含有 TCP や生体吸収性 Ca 欠損 HA の評価を行うことにより、骨に働きかけ再生を促す吸収性骨修復材料の創製のための基礎的知見を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ケイ酸含有 TCP とケイ酸含有 Ca 欠損 HA の作製

これまでにケイ酸は骨形成を促進することが報告され、ケイ酸含有リン酸三カルシウムの合成が試みられてきたが、ケイ酸の存在状態を制御したケイ酸含有リン酸三カルシウムを合成できていなかった。そこで、本研究では、まず、湿式法を利用した独自のプロセスにより、酸化カルシウム、オルトリン酸、シリコンアセテートを出発原料として、固溶限界以下で種々のケイ酸含有量を有するケイ酸含有 TCP の合成を行った。水酸化カルシウム ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) 懸濁液を攪拌しながら、これにリン酸 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) を含む水溶液とシリコンアセテート ( $\text{Si}(\text{OCOCH}_3)_4$ ) 懸濁液を加えた。この際、Ca/(P+Si) のモル比を 1.5 とした。混合後、さらに、アンモニア ( $\text{NH}_3$ ) 水を滴下し、pH を調整した。沈殿物を回収したのち焼成し、ケイ酸含有 TCP 粉末を作製した。出発原料における組成において、 $X=100 \times \text{Si}/(\text{Si}+\text{P})$  として、試料名を Si-X と表記する。

水熱プロセスを用いて、柱状粒子からなるケイ酸含有 Ca 欠損 HA 多孔体の作製を試みた。ケイ酸含有 TCP 粉体成形体を水熱条件下の蒸気相と反応させ、柱状粒子からなるケイ酸含有 Ca 欠損 HA 多孔体を作製した。具体的には、ケイ酸を含まないリン酸三カルシウム (Si-0) とケイ酸含有リン酸三カルシウム (Si-5) 粉末成形体ペレットを、蒸留水とともにテフロンの内張りのあるオートクレーブに入れ 120 °C で 24 時間水熱処理した。

### (2) ケイ酸含有 TCP および Ca 欠損 HA の評価

得られた試料の形態、Ca 欠損組成、ケイ酸の含有量やケイ酸の存在状態を、走査型電子顕微鏡 (SEM)、X 線回折 (XRD) などを用いて材料科学的に調べた。

ケイ素含有 TCP の骨組織内での挙動を物理化学的に考察するため、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中でその挙動を評価した。これまでに、骨と結合する材料は、生体内でその表面に HA 層を形成し、それを介して骨と結合することが報告されている。この材料表面での HA 形成が擬似体液中でも再現できることから、擬似体液中で HA 形成能が高い材料は、生体内において

骨に対して高い親和性を示す可能性を示す。

さらに、生体内での材料の吸収挙動を予測するために、Ca 欠損 HA について溶解試験を行った。ケイ酸の影響が含まれると系が複雑になり基礎的な評価が難しくなるために、Ca 欠損 HA についてまず評価を行った。生体吸収性の骨修復材料は、骨内において破骨細胞の作り出す酸性環境により溶解されることで吸収されると考えられている。そこで、局部的な酸性環境を想定して、pH5 に調整した緩衝液中に、Ca 欠損の程度の異なる Ca 欠損 HA、および比較として化学量論組成の HA ペレットを浸漬し、溶解試験を行った。溶液中のカルシウムイオン濃度変化によりその溶解挙動を調べた。

#### 4. 研究成果

本研究では、固溶限界以下で種々のケイ酸含有量を有するケイ酸含有 TCP の合成を行った。合成した試料の結晶相を X 線回折により調べたところ、いずれも  $\alpha$  型リン酸三カルシウムであった。図 1 に ケイ素添加量と TCP の格子定数 ( $a$ ) の関係を示す。出発原料における組成において、 $100 \times \text{Si}/(\text{Si}+\text{P})$  が、0 から 5 の間において、線形的に格子定数が変化したのに対し、 $100 \times \text{Si}/(\text{Si}+\text{P}) = 10$  では、格子定数の変化が小さくなった。格子定数の変化が、ケイ酸の固溶量に比例すると仮定すると、 $100 \times \text{Si}/(\text{Si}+\text{P})$  が、7~8 の間で固溶量が飽和することが分かった。

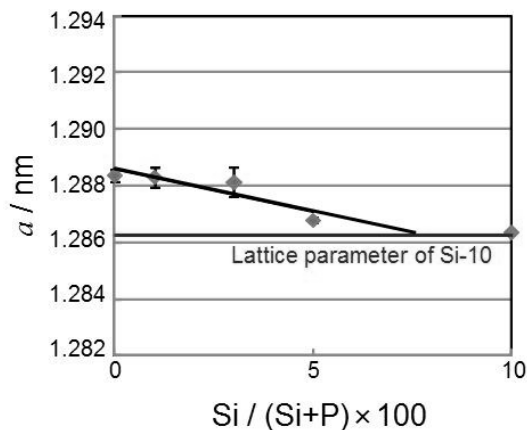


図 1 ケイ素添加量と TCP の格子定数 ( $a$ ) の関係。

図 2 に、Si-0 と Si-5 粉末成形体ペレットを水熱処理した後のペレット表面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す。ケイ酸含有の有無にかかわらず、長さ数マイクロメートルのアスペクト比の大きい柱状粒子からなるペレットが得られた。強度もピンセット等で操作するには十分な強度を示した。これは、柱状粒子による絡み合いの効果であると考

えられる。得られた試料を 900 °C で加熱すると、TCP と HA に分解したことから、Ca 欠損組成であることが分かった。柱状粒子からなる Ca 欠損組成 HA が、骨代謝に組み込まれることを報告しているため、本研究で得られた材料も骨代謝に組み込まれると期待できる。ただし、Si-5 の試料について元素分析を行ったところ、ケイ酸の含有量を調べたところ、水熱後の試料は水熱前に比べて減少している可能性が示された。

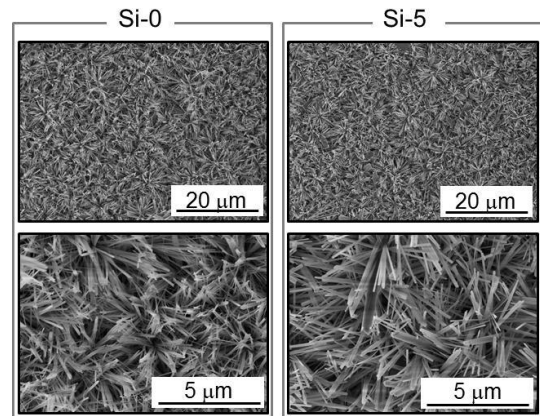


図 2 ケイ酸を含まない TCP (Si-0) とケイ酸含有 TCP (Si-5) 粉末成形体ペレットを 120 °C で 24 時間水熱処理した後のペレット表面の SEM 写真。

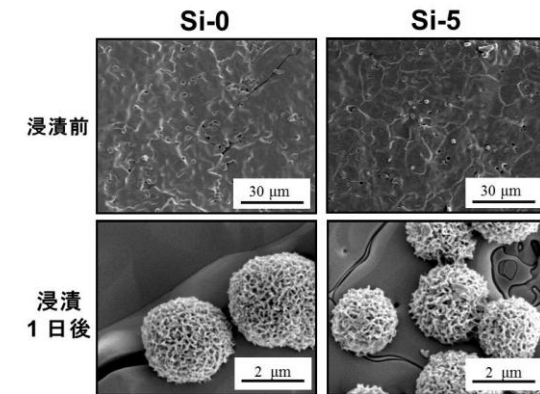


図 3 ケイ酸を含まない TCP (Si-0) とケイ酸含有 TCP (Si-5) ペレットを擬似体液に 1 日間浸漬する前後のペレット表面の SEM 写真。

形状の影響やケイ酸含有量の変化による効果を除いて、基礎的にケイ酸の添加の効果を明らかにするために、Ca 欠損 HA の作製にも成功したが、ケイ酸含有 TCP 焼結体のペレットを作製し、その評価を以下の通り行った。生体内での挙動を評価するために、擬似体液に浸漬した。図 3 に擬似体液浸漬に 1 日間浸漬する前後のペレットの表面の SEM 写真を示す。いずれの表面にも HA と考えられる析出

物が見られたが、ケイ酸含有 TCP (Si-5) 表面の方が多く析出していた。このことから、ケイ酸を含有する試料の方が、生体内で骨に対して高い親和性を示す可能性があると考えられる。

水熱合成した Ca 欠損 HA ペレットの XRD パターンとペレット表面の SEM 写真を図 4 に示す。比較試料として、化学量論組成の焼結 HA のデータも示す。いずれのペレットの結晶相も HA であった。合成の制御条件により、Ca/P 比の異なる HA 柱状粒子からなるペレットを得ることができた。図 5 に HA ペレットを浸漬した際の酸性緩衝液中のカルシウムイオン濃度の変化を示す。カルシウムイオン濃度の水熱合成した HA においては、カルシウム欠損組成の大きい HA ほど、酸性緩衝液中で溶解しやすいことも明らかにした。これは、生体内において HA が破骨細胞によって吸収される際に、カルシウム欠損組成の大きいものほど吸収されやすい可能性を示す。

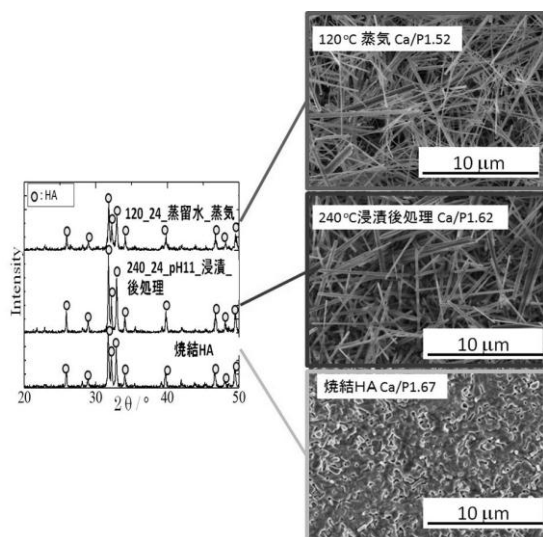


図 4 ペレットの XRD パターンとペレット表面の SEM 写真.

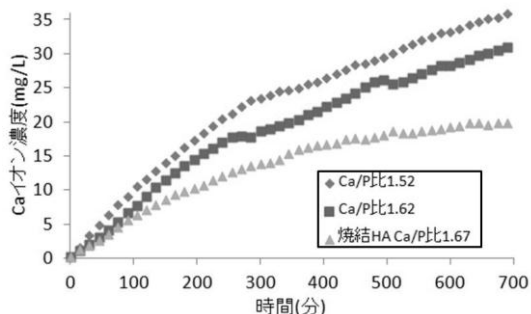


図 5 HA ペレットを浸漬した際の酸性緩衝液中のカルシウムイオン濃度の変化.

ケイ酸を添加した TCP 粉末を水熱処理して得られる Ca 欠損組成の HA は、吸収性の骨修復材料として期待できる。これらの知見は、骨に働きかけ再生を促す吸収性骨修復材料の創製をするにあたり、基礎的な材料合成プロセスの確立と得られた材料の特性評価を行えた点で、非常に有用であった。

## 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 2 件)

1. Masanobu Kamitakahara, Shota Umemoto, Koji Ioku, Characterization and In Vitro Evaluation of Silicate-Containing Tricalcium Phosphate Prepared through Wet Chemical Process, Key Engineering Materials, 査読有 529-530 巻, 2013 年 105-108.

doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.105

2. M. Kamitakahara, T. Saito, K. Ioku, Synthesis and in vitro evaluation of hydroxyapatite with controlled morphology, Journal of Physics: Conference Series, 査読有, 339 巻, 2012 年, 012002 (4pp). doi:10.1088/1742-6596/339/1/012002

[学会発表] (計 6 件)

1. 蛭子貴文、上高原理暢、井奥洪二、柱状粒子からなる Ca 欠損水酸アパタイトの特性評価、第 16 回生体関連セラミックス討論会、2012 年 11 月 30 日 千葉工業大学

2. M. Kamitakahara, S. Umemoto, K. Ioku, "Characterization and In Vitro Evaluation of Silicate-Containing Tricalcium Phosphate Prepared through Wet Chemical Process", 24th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24), 2012 年 10 月 23 日, 九州大学

3. Masanobu Kamitakahara, Yuika Uno, Koji Ioku, Behavior of Osteoblast-like Cells on Porous Hydroxyapatite Ceramics Prepared through Hydrothermal Process, International Conference on Traditional and Advanced Ceramics (ICTA2012), 2012 年 8 月 24 日, The Emerald Hotel, バンコク, タイ

4. 蛭子貴文、上高原理暢、井奥洪二、柱状粒子からなる Ca 欠損水酸アパタイトペレットの溶解挙動の検討、資源素材学会東北支部

平成 24 年度春季大会、2012 年 6 月 22 日東北  
大学

5. 上高原理暢、リン酸カルシウムの特徴を  
活用した高機能人工骨の創製、日本セラミ  
クス協会 2012 年年会、2012 年 3 月 19 日京都  
大学

6. 梅本奨大、上高原理暢、井奥洪二、ケイ  
酸含有量の異なるリン酸三カルシウムの作  
製および評価、日本セラミクス協会第 24  
回秋季シンポジウム、2011 年 9 月 8 日 北海  
道大学.

[その他]

ホームページ等

[http://ehp.kankyo.tohoku.ac.jp/ioku/in  
dex.html](http://ehp.kankyo.tohoku.ac.jp/ioku/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：