

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630282

研究課題名(和文) 超親水性ケイ酸アルミニウムナノチューブを用いたポリマー系複合材料の生体機能高度化

研究課題名(英文) Improving bio-functions of polymer-based composites using hydrophilic aluminum silicate nanotubes

研究代表者

春日 敏宏 (Kasuga, Toshihiro)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30233729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、無機イオン(カルシウム、ケイ酸イオン)を徐放することで骨形成を促進し、いかなる形状にも対応できる柔軟性と延伸性を付与した人工骨材料の作製をめざしたものである。

高い延伸性を示すポリヒドロキシアルカノエートにシロキサン含有炭酸カルシウム粒子を分散して繊維化し、これを骨格とする綿状構造体を作製した。さらにその繊維表面に親水性のケイ酸アルミニウムナノチューブ(イモゴライト)を被覆することに成功した。

この材料は、適度なカルシウムイオンとケイ酸イオンを徐放し、蛋白質吸着性、細胞接着性に優れることが明らかとなり、順調に骨芽細胞様細胞の増殖が進むことが示された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this project was to prepare mechanically-flexible artificial bones, applicable to any bone-void shapes, with enhancing effect for bone regeneration through releasing inorganic ions such as calcium and silicate ions.

Siloxane-containing calcium carbonate particles were embedded in poly(hydroxylalkanoate), and the resulting composites were shaped into a cotton-wool-like structure composed of ~10 um-fiber skeletons. The fibers were successfully coated with hydrophilic aluminum silicate nanotubes (imogolite).

The materials could release calcium and silicate ions gradually, and showed an excellent protein adsorption ability and the healthy proliferation of osteoblast-like cells.

研究分野：無機材料・物性

キーワード：バイオマテリアル 綿状構造体 細胞親和性 親水性 ケイ酸アルミニウム ナノチューブ イモゴライト 炭酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において骨機能の低下に対応するため、骨形成能を高めた骨充填材が求められており、いかなる形状にも対応できる柔軟性と延伸性が望まれている。

-リン酸三カルシウムを成長因子とともに埋入した例があるが、十分に高い骨形成性が確保できるとは言えない状況である。これは、従来のセラミックス系骨伝導材料は顆粒や多孔体ブロックとしての供給であり、複雑形態への用途に適しているとは言えないことが一因である。綿状のような柔軟性のある賦形性に優れた生体吸収性材料が必要である。

筆者らは最近、ゴムのような延伸性を示す、新しい生分解性ポリ(3-ヒドロキシブチレート/4-ヒドロキシブチレート) P(3HB-co-4HB) に注目している。種々の紡糸技術を用いれば、不織布や綿状に成形できることは既に確認している。ただし、P(3HB-co-4HB)は強い疎水性を示すことは骨形成には不利である。生体内へ埋入してからの早い段階で、多くの成長因子を含む血液の湿潤とタンパクの吸着が起これば良好な骨再生に繋がるので望ましい。したがって、親水化処理が不可欠である。

一方、筆者らは、ケイ酸アルミニウムナノチューブ(イモゴライト)の超親水性と優れたタンパク吸着性を明らかにしている(日本セラミックス協会2010年会で一部報告)。イモゴライトを上記の綿状構造体の骨格繊維表面に薄く被覆することができれば、理想的な生体材料となると着想した。

筆者らは、炭酸カルシウムにシロキサンを含有させた粒子(以下、SiCC)を作製し、これをポリ乳酸に分散して細胞挙動を調べたところ、溶出する極微量のケイ酸イオンによって細胞の増殖と石灰化が促進されることを見いだした(*J. Biomed. Mater. Res.*, **85A**, 140 (2008), *Acta Biomater.*, **5**, 1163 (2009))。骨形成を高める SiCC 粒子は親水性に優れるので、P(3HB-co-4HB)に分散させればイモゴライトを付着させるためにも重要な役割を果たすと予想した。

2. 研究の目的

本研究は、ケイ酸アルミニウムナノチューブ(イモゴライト)を生分解性ポリマー系複合材料に極めて薄く被覆することで、血液や成長因子を容易に含浸できる仕組みを構築することを目的とする。柔軟性・延伸性に富む生分解性ポリマー(ポリヒドロキシアリカノエート)の強い疎水性を抑えるため、骨再生に有効な炭酸カルシウム系粒子を複合し、これにイモゴライトを相互作用させて付着させ超親水化させる材料創製手法を研究する。そのために炭酸カルシウム系粒子およびイモゴライトの構造を制御・最適化する。イモゴライト被覆複合材料のタンパク吸着性、細胞挙動について検討し、生体機能の高度化

達成を評価する。十分有益であると思われる結果が得られた場合には、生体内での組織応答性を調べ、確認する。

3. 研究の方法

本研究は、P(3HB-co-4HB)にシロキサン含有炭酸カルシウム SiCC を分散させ、この粒子との相互作用を利用してイモゴライトを薄く被覆することで、材料表面を超親水化させ、生体材料としての機能を高めようとするものである。

まず、(1) SiCC 粒子構造を明らかにした上でイモゴライト被覆用に最適化し、(2)これを P(3HB-co-4HB)に分散させた複合材料(綿状に成形)にディップ法あるいは電気泳動法を用いてイモゴライト被覆する方法を検討する。また、(3)これまで報告例がほとんど無い、組成の異なるイモゴライトのタンパク吸着性・細胞親和性を調べ、生体材料としての基礎データを収集する。そして、イモゴライト被覆綿状試料について、細胞培養により生体材料としての可能性を調査する。

4. 研究成果

(1) SiCC 粒子の作製と構造解析

アミノプロピルトリエトキシシランを含む液を用いて炭酸ガス化合法で SiCC 粒子を生成させた。SiCC 粒子中にはバテライトが 5~20 nm のラメラ状一次粒子として含有され(図1) その c 面にはシロキサンが配位していることを見出した。本研究の結果から考察されるバテライトとシロキサン界面付近の模式図を図2に示す。

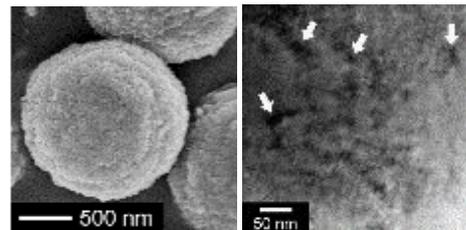


図1. 得られた SiCC 粒子の電子顕微鏡写真(左)走査型電子顕微鏡(SEM)写真(右)透過型電子顕微鏡(TEM)写真(白矢印は、バテライトの一次粒子)

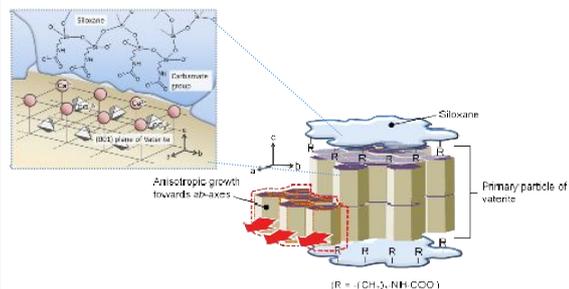


図2. バテライトとシロキサン界面付近の模式図

また、シロキサンがバテライトを安定化し、生理 pH 緩衝溶液中での溶解を律速することが明らかになった。

炭酸ガス化合法による合成の際、SiCC の前駆体内部でシラン源の縮合とバテライトの結晶化が並進し、上述の一次粒子構造の生成に寄与することを見出した。また、炭酸ガス化合法における溶媒中の炭酸イオンの溶存性に着目し、これを調節することにより、SiCC 中のバテライト一次粒子の c 面配向制御ができることを見いだした。

(2) イモゴライトの作製と評価

$\text{Na}_4\text{SiO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ および $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を水に溶かし、得られた沈殿物を遠心分離と洗浄による脱塩処理を繰り返して分離したのち、水中に分散させたまま、95 で 4 日加熱熟成し、平均 570nm のチューブ長のイモゴライトが分散した液 (イモゴライト濃度: 0.087 wt%、pH 3.8) を得た。

イモゴライトの組成を変化させるべく諸条件を調整したが、化学量論組成から大きく変化させることは難しかった。得られたイモゴライトの親水性はいずれも非常に高く有意差は見られなかった。

イモゴライトの生体親和性を MC3T3-E1 細胞を用いて培養試験により評価した。初期接着性が高いが、増殖性には影響がないことが示された。

(3) 綿状構造体の作製

SiCC を用いて、P(3HB-co-4HB) との複合材料を作製し、電界紡糸法で約 5 ~ 10 μm の繊維径の綿状構造体に成形することができた。SiCC 量は 30 wt% とした。SiCC/P(3HB-co-4HB) 綿状構造体の繊維径は平均約 16 μm であった。繊維表面には溶媒の揮発孔と SiCC と思われる粒子が確認された。

(4) 綿状構造体へのイモゴライト被覆法の検討

イモゴライトを分散した水溶液を用いて被覆を試みたが、被覆は難しかった。一方、当初計画した電着法は、膜形状ならば有望であるが、綿状構造では、得策ではない。そこで、P(3HB-co-4HB) をシリカとハイブリッド化して親水性が向上するか調査した。アミノプロピルトリエトキシシランの添加によりアミド結合を介したハイブリッド化に成功し、接触角は約 20° 減少したが十分な親水性とは言えない状況であった。

そこで、イモゴライトをエタノールに分散した溶液を用意し、ディップ法によりコーティングを行った。SEM レベルでは処理前後の表面形態に違いは見られなかった (図 3) が、エネルギー分散 X 線分析により、処理したサンプルにて、イモゴライトに由来する Al 元素の存在が確認された。

綿状構造体に水滴を落下させたところ、処理していない試料では水滴が 10 分以上浸透

しなかったのに対して、ディップコーティング後では 5 秒以内に浸透した。SiCC/P(3HB-co-4HB) 複合体表面が親水化に成功したことがわかった。

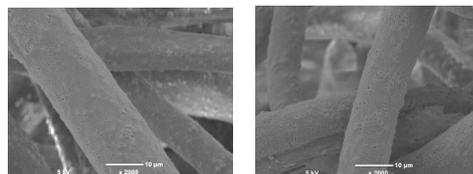


図 3. 被覆前後の綿状構造体を構成する繊維の写真 (左: 処理前、右: 被覆処理後)

(5) イモゴライト被覆した綿状構造体の生体親和性評価

まず、Lysozyme の吸着量を調べた。イモゴライトは平均長さ 570 nm のものを用いた。骨形成に関連するといわれる塩基性タンパク質 Lysozyme に絞り、より長時間の場合の吸着量を比較した。Lysozyme を HEPES 緩衝液 (11 mM) に溶かし、タンパク質溶液 (濃度: 1 mg/mL) を作製した。タンパク質溶液 (3 mL) にイモゴライトコーティングした綿状構造体 (50 mg) を入れ、インキュベータ (37 °C) 内で所定時間 (3、12、24 h) 反応させた。その後、溶液の上澄み液を採取し、Pierce BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay Kit を用いて溶液中のタンパク質量を測定した。反応前後の測定値から、吸着したタンパク質量を求めた。

図 4 に、被覆していない試料 (Noncoated)、1m (ディップコーティング作業を 1 回行ったもの)、1m×5 (同、5 回行ったもの) に吸着した Lysozyme の量を示す。3 h ではいずれの試料においても有意差は見られなかった。一方、12 h では 1m×5、1m、Noncoated の順で多くの Lysozyme 吸着が見られた。また、1m×5 では、24 h にはそれぞれの間で統計的に有意差はみられなくなった。1m×5 は 12 h でほぼ吸着が飽和したと考えられる。一方、1m および Noncoated では、12 h 以降 24 h までに吸着量が大きく増加した。Lysozyme の吸着は、1m×5 試料で十分早い (12 h 以内) ことがわかった。

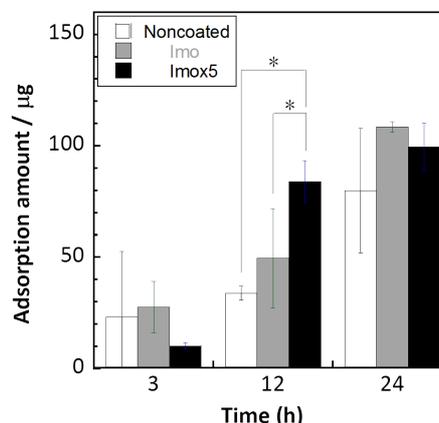


図4．各試料への Lysozyme 吸着量．* $p < 0.05$
細胞は、ヒト骨芽細胞様細胞である SaOS-2 細胞を使用した。初期接着性の評価については 6 h 培養した。この時、血清タンパク質の有無による 2 種類の培地を用いて実験した。増殖性の評価については 1-7d の培養とした。この時、培地は血清含有培地で実験を行った。生細胞数測定は WST-8 assay、細胞形態観察は SEM 観察により観察した。

細胞接着性については、無血清培地中では有意差は見られなかったのに対し、血清含有培地中ではイモゴライトコーティング物で有意に高い値を示した。また、培地浸漬 7 d 後の ATR-FTIR スペクトルでは、アミド結合に由来するピークが強く現れた。このことから、多くのタンパク質の存在が示唆された。イモゴライトが細胞接着性のタンパク質を吸着したことで接着性が向上したと考えられた。両試料とも培養期間に伴い細胞数が増加し、コーティングの有無による細胞増殖率への影響は見られなかった(図5)。

一方、キャスト膜試料上にて増殖性評価を行った際には、コーティング無よりも有意に高い細胞数及び増殖率が確認された。ナノレベルでの表面粗さ、及び材料表面の親水性が細胞増殖性に寄与することが報告されているが、キャストフィルム状ではその効果が顕著に現れたものの、綿状構造体では接着面できる表面が様々な形態であり、また 3 次元的气孔構造を有することなど、多くの因子の影響によって細胞増殖性の向上に有意差が出なかったのではないかと考えられた。

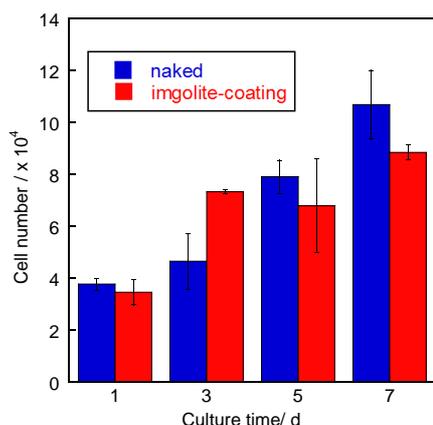


図5．培養 7 d までの細胞接着数

イモゴライトコーティングにより容易に綿状構造体の親水化が達成され、培養初期の細胞接着(6 h)において、イモゴライトによる促進効果が見られた。細胞の接着形態及び増殖性においてイモゴライトによる阻害は見られなかった。イモゴライト被覆は細胞の初期接着に有効であることが確認できた。ただし、細胞培養試験に時間を要したため、本研究の期間内に動物実験までには至らなかった。

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 7 件)

Toru Ogasawara, Takenori Sawamura, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Hitoshi Hirata, Toshihiro Kasuga, Enhancing the mechanical properties of calcium phosphate cements using short-length polyhydroxyalkanoate fibers, J. Ceram. Soc. Japan, **124**, 180-183 (2016). 査読有
DOI: 10.2109/jcersj2.15280

J. Nakamura, T. Kasuga, Enhancement of crystalline plane orientation in silsesquioxane-containing vaterite particles towards tuning of calcium ion release, J. Mater. Chem. B, **2** (9), 1250 – 1254 (2014). 査読有
DOI: 10.1039/c3tb21571g

Katsuya Kato, Keiichi Inukai, Kie Fujikura, Toshihiro Kasuga, Effective encapsulation of laccase in an aluminium silicate nanotube hydrogel, New J. Chem., **38**, 3591-3599 (2014). 査読有
DOI: 10.1039/c4nj00080c

Kie Fujikura, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Keiichi Inukai, Katsuya Kato, Toshihiro Kasuga, Preparation and rheological characterization of imogolite hydrogels, J. Nanomater., **Vol. 2014**, Article ID 727254, 7 pages. 査読有
DOI: 10.1155/2014/727254

Daiheon Lee, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Keiichi Inukai, Katsuya Kato, Toshihiro Kasuga, Aluminum silicate nanotube modification of cotton-like siloxane-poly(L-lactic acid)-vaterite composites, Adv. Mater. Sci. Eng., **Vol. 2013**, Article ID 169721, 6 pages. 査読有
DOI: 10.1155/2013/169721

Jin Nakamura, Toshihiro Kasuga, Preparation of siloxane-containing vaterite particles with red-blood-cell-like morphologies and incorporation of calcium-salt polylactide for bone regenerative medicine, J. Ceram. Soc. Japan, **121**[9], 792-796 (2013). 査読有
DOI: 10.2109/jcersj2.121.792

Akiko Obata, Takuma Iwata, Hirotaka Maeda, Hitoshi Hirata, Toshihiro Kasuga, Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co- 4-hydroxybutyrate)-based composites releasing soluble silica for bone regeneration, J. Ceram. Soc. Japan, **121**[9], 753-758 (2013). 査読有
DOI: 10.2109/jcersj2.121.753

〔学会発表〕(計 10 件)

毛利和磨、小幡亜希子、加藤且也、犬飼恵一、春日敏宏、イモゴライトコーティングした PHA 系複合材料の細胞親和性評価、平成 26 年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会、名古屋(名古屋工業大学) 2014.12.6

春日敏宏、小幡亜希子、前田浩孝、牧田晶士、長田直生、太田義夫、3 次元綿玉状バイオマテリアルの開発、東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ・日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会、仙台(東北大学金属材料研究所) 2014.10.6-7

Yuki Fujita, Jin Nakamura, Akiko Obata, Hirotaka Maeda, Hitoshi Hirata, Toshihiro Kasuga, Preparation of polyhydroxyalkanoate-siloxane hybrids for bone regeneration, 6th International Workshop on Advanced Ceramics (IWAC-06), Erlangen, Germany, 2014.9.28-30

Akiko Obata, Takuma Iwata, Hirotaka Maeda, Hitoshi Hirata, Toshihiro Kasuga, Silica/poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) composites for bone regeneration, International Union of Materials Research Societies, International Conference in Asia (IUMRS-ICA 2014), Fukuoka, 2014.8.24-30

中村 仁、前田浩孝、小幡亜希子、春日敏宏、アミノ修飾シロキサンのバテライトの結晶配向化とその溶解挙動、日本金属学会 2014 年春期(第 154 回)講演大会、東京(東京工業大学大岡山キャンパス) 2014.3.21-23

Jin Nakamura, Toshihiro Kasuga, Enhancement of crystalline plane orientation in silsesquioxane-containing vaterite particles towards tuning of calcium ion release, 3rd International Symposium on Ceramics Nanotune Technology, Nagoya, 2014.3.2-4

J. Nakamura and T. Kasuga, Preparation of siloxane-containing calcium carbonate particles consisting of *c*-face oriented vaterite and their dissolution behaviors, 13th Asian BioCeramics Symposium (ABC2013), Kyoto, 2013.12.4-6

藤倉喜恵、前田浩孝、小幡亜希子、春日敏宏、犬飼恵一、加藤且也、アルミニウムシリケートナノチューブとポリエチレングリコールを用いたゲル状複合材料の作製、日本金属学会 2013 年秋季(第 153 回)講演大会、金沢(金沢大学角間キャンパス) 2013.9.17-19

犬飼恵一、加藤且也、前田雅喜、山崎秀司、前田浩孝、小幡亜希子、春日敏宏、イモゴ

ライトのバイオ分野への展開、第 57 回粘土科学討論会、高知(高知市文化プラザかるぽーと) 2013.9.4-6

Kie Fujikura, Hirotaka Maeda, Akiko Obata, Keiichi Inukai, Katsuya Kato, Toshihiro Kasuga, Preparation of poly(ethylene glycol)-imogolite nanotube composite gels, 13th International Conference of the European Ceramic Society (ECerS XIII), Limoges, France, 2013.6.23-27

〔図書〕(計 1 件)

Jin Nakamura, Shinya Yamada, Yoshio Ota, Yoshio Sakka, Toshihiro Kasuga, Chapter 3: Structural design of siloxane-containing vaterite for application in bone reconstruction remedies in "Series: Biochemistry research trends" Calcium carbonate: Occurrence, characterization and applications, edited by Alberta Cohen, Nova Publishers, 2016, pp. 49-71. (ISBN: 978-1-63483-540-4)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 3 件)

名称: ポリヒドロキシアルカノエートを含む材料から作製された 3 次元構造体、及び骨充填材の調整用キット

発明者: 平田仁、西塚隆伸、夏目唯弘、春日敏宏

権利者: 名古屋大学、名古屋工業大学

種類: 特許

番号: 特許第 5900909 号

取得年月日: 平成 28 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 骨充填剤の製造方法

発明者: 春日敏宏、山崎秀司、加藤且也、犬飼恵一

権利者: 名古屋工業大学、産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特許第 5783554 号

取得年月日: 平成 27 年 7 月 31 日

国内外の別: 国内

名称: 骨形成誘導材料、及び骨形成誘導材料の製造方法

発明者: 春日敏宏、岩田拓馬、平田仁

権利者: 名古屋工業大学、名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許第 5776983 号

取得年月日: 平成 27 年 7 月 17 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ebm.web.nitech.ac.jp/PB/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

春日 敏宏 (KASUGA, Toshihiro)
名古屋工業大学・工学研究科・教授

研究者番号：30233729

(2) 研究分担者

小幡 亜希子 (OBATA, Akiko)
名古屋工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40402656