

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820354

研究課題名(和文) タンパク質吸着能を高める表面状態を持つ生体材料の設計

研究課題名(英文) Design of biomaterial surface for improving protein adsorption capacity

研究代表者

前田 浩孝 (Maeda, Hiroataka)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20431538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨修復材料の高機能化を目指し、結晶性ケイ酸カルシウム水和物であるトバモライトへのリン酸カルシウムクラスターの導入を試みた。水熱反応場を制御することで、トバモライト中のナノ空間にクラスター導入できることを材料研究と理論計算の観点から明らかにした。また、クラスターを導入することにより、生体内初期界面反応であるタンパク質吸着特性や細胞親和性が向上することを見出した。

研究成果の概要(英文)：The possibility of incorporating calcium phosphate clusters into tobermorite was examined to prepare new types of biomaterials with high performance. The spectroscopic and simulation results indicated that the clusters were incorporated into the nano-sized space of tobermorite structure by a hydrothermal reaction. The existence of the clusters enhanced the biocompatibility.

研究分野：無機材料化学

キーワード：骨修復材料 ケイ酸カルシウム リン酸カルシウムクラスター 水熱合成 タンパク質吸着

1. 研究開始当初の背景

高齢化による身体機能の低下の原因の多くは、骨強度の低下に起因する。従来型の骨修復材料を用いた治療では、日常生活を再開するまでに長い時間が必要となる場合もあり、より短期間で骨修復できる材料の開発が試みられている。例えば、骨修復材料に細胞やタンパク質を組み込んだ組織工学的手法を用いた骨組織の修復が盛んに取り組まれている。

骨修復材料の機能を向上させるためには、生体内埋入後の初期界面反応であるタンパク質や細胞との相互作用を活性化することが極めて重要である。また、この種の相互作用を解明することができれば、新しい表面設計指針を構築できるものとなる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体材料科学に理論計算を取り入れ、骨修復材料の機能を高めるための表面科学を創出することである。生体材料科学の観点から、生体親和性の高いケイ酸カルシウムセラミックスを用いる。生体内埋入後の初期界面反応であるタンパク質吸着を促進するため、新たにエネルギー準位を創出し吸着サイトとして作用させることが特色である。これを実現するため、理論計算と材料合成の融合を進め、新しい表面設計指針の構築を目指す。

3. 研究の方法

種々のケイ酸カルシウムセラミックスが骨修復材料として検討されているが、本研究では層状構造を形成し、層間にナノ空間を持つトバモライト ($\text{Ca}_5\text{Si}_6\text{O}_{16}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) をマトリックスに選定した。吸着サイトを構築するため、固有の電子状態を持つ分子クラスターを、トバモライトのナノ空間内に導入することを試みた。クラスターの組成を、骨の無機主成分であるリン酸カルシウムとした。目的を達成するため、材料開発と理論計算の観点における研究方法を示す。

(1) 材料合成と評価

水熱合成における反応場の制御を行い、リン酸カルシウムクラスターを導入したトバモライトの合成を試みた。また、生体機能性評価として、タンパク質吸着特性評価を行った。

(2) 理論計算による検証

トバモライトの持つナノ空間中にリン酸カルシウムクラスターを導入したときの原子配置の安定性や電子状態を第一原理計算により評価し、その可能性を探索した。

4. 研究成果

(1) 材料合成と評価

リン酸カルシウムクラスター導入トバモライトの合成条件を検討した結果、希釈した塩酸を溶媒に用い、石英、水酸化カルシウム、リン酸水素ナトリウムからなるスラリーに

水熱反応を施した場合において、生成相としてトバモライトのみが得られ、その中にリンが含まれることを組成分析から明らかにした。また、XRD パターンより格子定数を求めた結果、クラスターの導入により c 軸のみが増加した。

クラスター導入トバモライトの FT-IR スペクトル (図 1) においては、 580 cm^{-1} 付近に PO_4^{3-} ユニット中の P-O 結合に由来するピークが見られた。また、トバモライトの層間の結合を示す 1210 cm^{-1} 付近の Si-O 結合に由来するピークがクラスターの導入により変化が見られることから、層間付近にクラスターが存在することが推測された。 ^{31}P MAS-NMR スペクトルより、 PO_4^{3-} ユニットに由来するピークの半値幅は 3 ppm 程度であり、結晶性リン酸カルシウムのピーク半値幅と比較して増加したことから、ユニット構造の歪みが推測された。これらの分光学的解析より、トバモライトとリン酸カルシウムクラスターの相互作用が示唆された。

生体機能性評価として、タンパク質吸着特性の評価を行った結果、塩基性タンパク質のモデル物質としてリゾチームを用いた場合、クラスターを導入しないものと比較して、その吸着特性が大きく向上することを見出した。また、材料上での細胞培養試験の結果、トバモライト上では細胞の増殖はほぼ見られなかったが、開発したクラスター導入トバモライトでは良好な細胞接着と増殖が確認された (図 2)。これらの結果から、クラスター導入により、生体親和性を大きく向上させることが明らかとなった。また、ケイ酸カルシウムセラミックスの骨修復材料への応用において、溶解に伴う周辺 pH の上昇が問題になる場合がある。溶解性試験により、クラスターの導入はその溶解性を低下させ、pH の上昇を阻害する効果を有することを明らかにした。

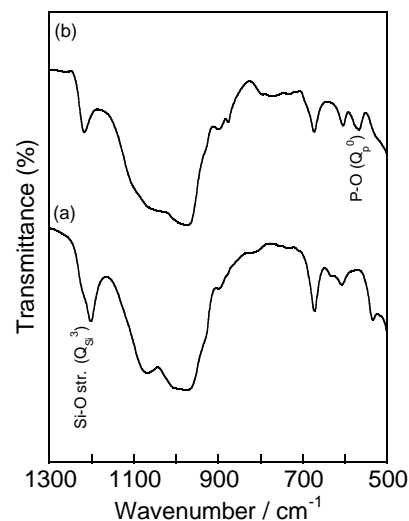


図 1. トバモライト(a)とリン酸カルシウムクラスター導入トバモライト(b)の FT-IR スペクトル

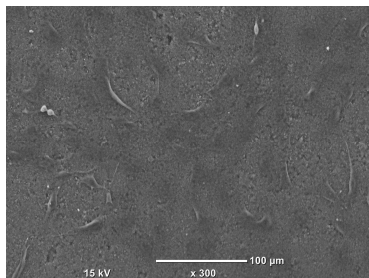


図 2. 7 日間培養し骨芽細胞用細胞接着・増殖したリン酸カルシウムクラスター導入トバモライトペレット表面の SEM 写真。

さらに、材料合成を工夫することにより、リン酸カルシウムクラスター内にマグネシウムを導入することも可能となった。これにより電子状態が変化することで、タンパク質吸着特性が変化する傾向も見られた。

(2) 理論計算による検証

トバモライトのナノ空間サイズを勘案し、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ をリン酸カルシウムクラスターとして第一原理計算により検証を進めた。クラスターの安定構造を求めた結果、 D_{3h} の対称性を持つ構造を得た。これをトバモライトのナノ空間内に配置して得られた安定構造を図 3 に示す。リン酸カルシウムクラスターの構造にひずみは生じるものの、トバモライトの原子配置構造が大きく崩壊することなかったことから、理論計算の観点からも導入の可能性が示唆された。

D_{3h} の対称性を持つクラスターと、トバモライトに導入されたクラスターのリンの電子状態密度を比較すると、トバモライト中では s、p 軌道に由来するピークがブロード化した。さらに、クラスター導入トバモライトの各元素の電子状態密度を解析した結果、水素、酸素、リンに関して同一のエネルギー位置にピークが見られたことから、これらの元素間に相互作用が生じることが示唆された。言い換えれば、トバモライトの層間に存在する Si-OH 基とクラスター中のリン酸イオン間に結合が形成することを意味する。この種の結合により、材料全体での結合強度が向上することが予測され、この結果として、クラスター導入により溶解性が低下したと推測される。これらの計算結果は材料研究で得られた分光学的結果と類似しており、両者を融合した解析・評価となっている。

以上のことから、クラスターの導入効果により生体機能性を向上させる新しい設計指針の構築が期待される。

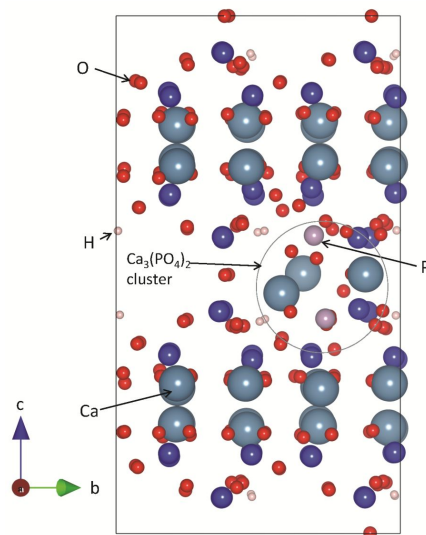


図 3. リン酸カルシウムクラスター導入トバモライトの原子配置

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. Hiroataka Maeda, “Tuning of calcium silicate ceramics for environment-friendly material applications”, Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有, Vol. 122, 2014, pp. 858-862. DOI: 10.2109/jcersj2.122.858
2. Hiroataka Maeda, Toshihiro Kasuga, “Calcium phosphate cement with silicate ion releasing ability by incorporating calcium silicate hydrate”, Journal of the Ceramic Society of Japan, 査読有, Vol. 122, 2014, pp. 591-595. DOI: 10.2109/jcersj2.122.591
3. 前田浩孝, 田村友幸, 春日敏宏, 「層状構造を持つケイ酸カルシウム系骨修復材料へのリン酸カルシウムクラスターの導入」, Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan, 査読無, 第 21 巻, 2014 年, pp. 49-23

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 前田浩孝, 加藤且也, 春日敏宏, 「トバモライトへのリン酸塩クラスター導入による高機能化」, 日本セラミックス協会 2015 年年会, 2015 年 3 月 18~20 日, 岡山大学 (岡山市)
2. 石川貴之, 前田浩孝, 加藤且也, 春日敏宏, 「マグネシウムイオンドープ型トバモライトのタンパク質吸着評価」, 日本セラミックス協会 2015 年年会, 2015 年 3 月

- 18～20日、岡山大学（岡山市）
3. 前田浩孝、「ケイ酸カルシウム系材料の高機能化を指向した電子状態のチューニング」、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、2014年12月6日、名古屋工業大学（名古屋市）
 4. 前田浩孝、田村友幸、春日敏宏、「生体材料への応用を目指したトバモライトへのリン酸塩クラスターの導入」、2014年9月25～26日、高知会館（高知市）
 5. 前田浩孝、「ケイ酸カルシウム系材料の環境調和機能化に関する研究」、日本セラミックス協会2014年年会、2014年3月17～19日、慶応義塾大学日吉キャンパス（横浜市）
 6. Hiroataka Maeda, Tomoyuki Tamura, Toshihiro Kasuga, “Incorporation of calcium phosphate cluster into calcium silicate hydrate for bone regeneration”, 2013年11月3～7日, Alberta (Canada)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔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

前田 浩孝 (MAEDA HIROTAKA)

名古屋工業大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20431538