

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670847

研究課題名(和文)高機能化人工材料を用いた新規骨移植療法の確立

研究課題名(英文)Development of new bone regeneration method using functionalized artificial bioceramics

研究代表者

山下 仁大(Yamashtia, Kimihiro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：70174670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工材料と自家骨の併用移植療法についての新しい方法を提案するものである。セラミックス材料と手術時に摘出される自家骨に電気分極法を適用することで、それぞれの骨再生能の向上が期待できる。これらを相乗的に利用することで、併用移植療法が飛躍的な骨再生効率の向上が期待される。生体骨(ウシ大腿骨)での分極処理による電荷蓄積についても調査を行った。生体骨中の無機成分による電荷の蓄積を確認することができた。また、人工合成したハイドロキシアパタイトを用いて電気分極法によって材料表面に誘起される電荷の測定を行った。分極処理によって形成された分極による表面誘起電荷を確認できた。

研究成果の概要(英文)：This study is aim to develop a new bone regeneration method that concurrently uses artificial materials and autogenous bone graft. The electrical polarization method that our group have been proposing is employed on both bioceramic materials and autogenous bone that is extracted during the operation. As a result, an improvement of biocompatibility and osteoconductivity are expected. We investigated the electrical properties of bone (collagen fibrils and apatite minerals) and found that bone can be electrically polarized by an external voltage. In addition, we also investigated the surface properties of hydroxyapatite that was artificially fabricated. Surface charges that were induced by the poling method were evaluated by the Kelvin probe method. We confirmed the mechanism that the surface charges on the polarized hydroxyapatite are induced by the polarization which is formed by the polarization process and uniformly distributed in the polarized material.

研究分野：生体材料学

 キーワード：バイオセラミックス リン酸カルシウム ハイドロキシアパタイト 水酸アパタイト 電気分極 スキ
 ャホールド 足場材料 硬組織代替

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨の電気的特性

申請者らの研究グループは、セラミックス材料の高機能化を目指して、電気分極法を用いた材料科学研究に取り組んできた。骨補填として臨床応用されているアパタイトは、生体骨内で骨形成を誘導する骨伝導能を有する。電気分極法により電荷を蓄積したアパタイトは、骨伝導能を強化し、材料周囲に早期に新生骨を形成した (Itoh S, et al. Biomaterials 2006, 27: 5572-5579.)。また、生体骨試料にも室温で電気分極法が適用できることを発見した (Nakamura M, et al. J Biomed Mater Res 2012, 100A: 1368-1374.)。

(2) 水酸アパタイトの電気的特性

水酸アパタイト (ハイドロキシアパタイト、hydroxyapatite, HAp) は、歯や骨に含まれる無機物質に類似した化学組成、結晶構造を持つ物質である。バイオマテリアルとされる材料の中でも最も生体との親和性が高く、骨伝導能を有することから骨補填材として利用されている。水酸アパタイトについては、その電気的性質についてもプロトン伝導性、圧電性、強誘電性などが報告され興味深い。当研究グループではそのプロトン伝導性に着目し、プロトンを外部的な電場の印加により移動させることで材料内部に分極状態を形成できることを見出した。分極状態にある水酸アパタイトはいわゆるエレクトレットになり、その表面上に表面電荷が誘起されている。これまでの研究では、熱刺激脱分極電流測定法により材料が分極状態にあることを確認し、定量的に評価されている。一方で、エレクトレット表面に実際に誘起される電荷については未解明であった。

2. 研究の目的

(1) 骨の電気的特性

本研究では自家骨と人工材料の併用移植に対し、自家骨と人工材料に電気分極法を適用することで、それぞれの骨再生機能向上を実現することを目的とした。

(2) 水酸アパタイトの電気的特性

分極処理によりプロトンが移動し、分極状態が形成される。その分極状態が表面に電荷を誘起しエレクトレットとなる。この表面の電荷については定量的な研究は行われていなかった。本研究においては、ケルビンプローブ法を用いた。表面電荷の定量を試みた。この方法では、エレクトレット表面の電荷が形成する電場強度を定量することで表面電荷密度を測定することができる。

3. 研究の方法

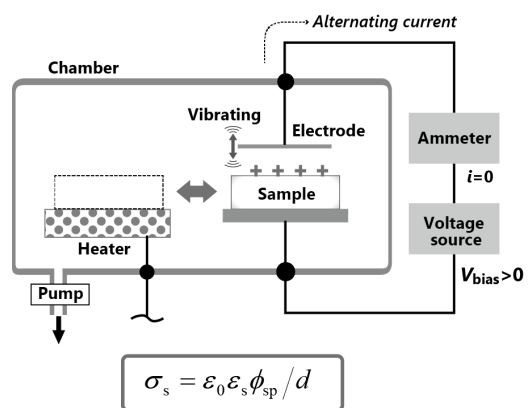
(1) 骨の電気的特性

ウシ大腿骨から骨薄片を作製し、超音波洗浄後、試料片とした。X線回折、フーリエ変換赤外分光、走査型電子顕微鏡を用いてキャラクタリゼーションを行った。骨薄片を白金板電極で挟み込み、室温、印加電圧 (1, 5 kV/cm) の条件で1時間分極処理を行った。熱刺激脱分極電流測定により蓄積電荷量を求めた。

(2) 水酸アパタイトの電気的特性

表面電荷密度を測定する装置は、自作のものを用いた。図1 aにその概略を示す。試料表面に振動電極を置く。試料上の電荷が電場を形成している場合、振動に伴って回路に交流電流が誘起される。回路に接続した直流電源にて適切なバイアス電圧を印加することで電場を打ち消し、結果として交流電流が測定されなくなる。このときのバイアス電圧から試料上の表面電荷密度を計算することができる。試料は、水酸化カルシウムとリン酸を原料とした湿式合成により得た粉末を焼結したセラミックスを用いた。焼結体を研磨し、スパッタリング法にて表面上に Pt 膜を電極として形成した。試料を加熱し、電極間に直流電圧を印加し、電圧印加を保持したまま室温まで冷却した。その後、電極は研磨紙を用いて除去した。これを洗浄後試料とした。(図1 b)

(a)



(b)

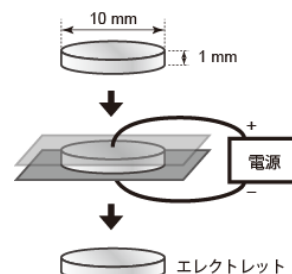


図1 (a)ケルビンプローブ法による表面電荷密度測定装置。(b)分極処理。

4. 研究成果

(1) 骨の電気的特性

キャラクターゼーションの結果、ウシ大腿骨から採取した骨は、B型炭酸含有アパタイトであることが示された。熱刺激脱分極電流測定の結果、印加電圧(1kV/cm)のとき $16 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ 、印加電圧(5kV/cm)のとき $35 \mu\text{C}/\text{cm}^2$ の電荷を蓄積していた(図2)。印加電圧を増加させることで、より多くの電荷を蓄積させることができることが確認された。

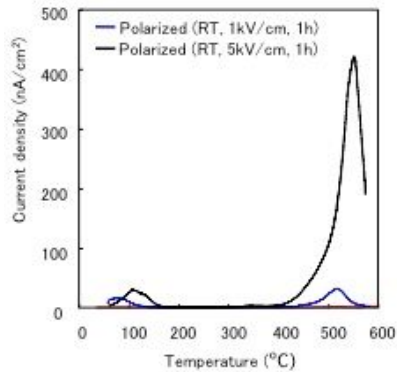


図2 熱刺激脱分極電流測定結果

(2) 水酸アパタイトの電気的特性

分極処理し、エレクトレットとなった試料をその両面から研削することで試料厚を変化させた。(図3a)このときの表面電荷密度が図3bである。正負に2グループの測定値があるのは分極処理時の電場印加方向に応じて正負反対の電荷が誘起されたことを示すものである。試料厚の減少に伴い、わずかに減少したが、1.2 mm から 0.4 mm まで減少させた場合でもその表面電荷が測定されていることがわかる。これは、分極処理によって形成された分極状態が試料内部に分布しており、その内部の分極が表面電荷を誘起していることを示す結果である。エレクトレットを骨補填材として考えた場合、破骨細胞等の働きにより材料表面が侵食されてそれまで材料内部であった部位が新しく生体との界面になる。このとき新しい界面にも表面電荷が誘起され、常にエレクトレットの効果が維持されることが期待できる。図3cは分極処理時に印加した電場強度と水酸アパタイトエレクトレットの表面電荷密度の関係である。図からわかるように、電場強度の上昇に伴い線形に表面電荷密度が上昇することがわかる。目下のところ表面電荷密度とエレクトレットの骨形成促進機能との定量的な関係は明らかになっていないが、より強力なエレクトレット、より大きな表面電荷密度を持つものを作製するためには分極処理時に高い電圧を使うことが有効であることが分かった。

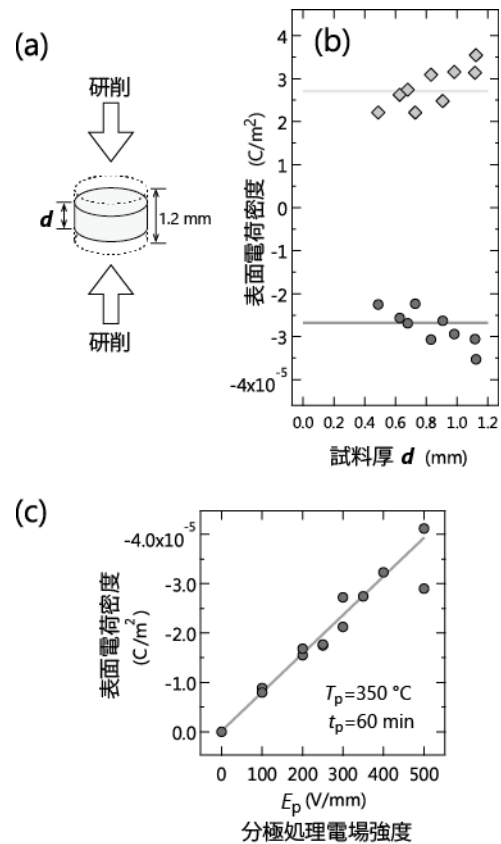


図3 (a)円柱状エレクトレットを上下両面から研削し、試料厚を変化させた。(b)試料厚と表面電荷密度の関係。(c)分極電場強度と表面電荷密度の関係。

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11件)

- 1 N. Horiuchi, J. Endo, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Katayama and K. Yamashita. Dielectric properties of fluorine substituted hydroxyapatite: the effect of the substitution on configuration of hydroxide ion chains Journal of Materials Chemistry B. 査読有, 2015, 3(33), 6790–6797
DOI: 10.1039/C5TB00944H
- 2 N. Wada, N. Horiuchi, M. Nakamura, K. Nozaki, T. Hiyama, A. Nagai and K. Yamashita. Controlled calcite nucleation on polarized calcite single crystal substrates in the presence of polyacrylic acid J. Cryst. Growth. 査読有, 2015, 415, 7–14.
DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2014.12.027
- 3 N. Horiuchi, Y. Tsuchiya, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, T. Okura and K. Yamashita. Polarization-assisted

- surface engineering for low temperature degradation-proof in yttria-stabilized zirconia ceramics J. Asian Ceram. Soc.. 査読有, 2015, 3(2), 156–159. DOI: 10.1016/j.jascer.2015.02.002
- 4 K. Nozaki, H. Koizumi, N. Horiuchi, M. Nakamura, T. Okura, K. Yamashita, A. Nagai. Suppression effects of dental glass-ceramics with polarization-induced highly dense surface charges against bacterial adhesion. Dent. Mater. J. 査読有, 2015, 34(5), 671–678. DOI: 10.4012/dmj.2014–342
 - 5 M. Nakamura, N. Hori, S. Namba, T. Toyama, N. Nishimiya, K. Yamashita. Wettability and Surface Free Energy of Polarised Ceramic Biomaterials Biomedical Materials. 査読有, 2015, 10(1), 011001. DOI: 10.1088/1748-6041/10/1/011001
 - 6 N. Wada, N. Horiuchi, K. Ohta, S. Urasaki, K. Yamauchi, K. Yamashita. Controlled in Vivo Nacre Formation in Flat Pearls with Hydroxyapatite Bioceramic Nuclei Crystal Growth & Design. 査読有, 2015, 16(1), 167-173. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01074
 - 7 木幡一博、堀内尚紘、伊藤聡一郎、山下仁大、中村美穂。ヒト生体骨内の蓄積電荷量と電流密度のパターン分類 日本生体電気・物理刺激研究会誌。査読無, 2015, 29, 37–40
 - 8 M. Nakamura, A. Kobayashi, K. Nozaki, N. Horiuchi, A. Nagai, K. Yamashita. Improvement of osteoblast adhesion through polarization of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings on metal. J. Med. Biol. Eng., 査読有, 2014, 34 (1), 44–48. <http://jmbe.bme.ncku.edu.tw/index.php/bme/article/viewArticle/2115>
 - 9 R. Hiratai, M. Nakamura, K. Yamashita. Role of Collagen and Inorganic Components in Electrical Polarizability of Bone. J. Vet. Med. Sci. 査読有, 2014, 76 (20), 205–210. DOI: 10.1292/jvms.13-0229
 - 10 N. Horiuchi, S. Nakaguki, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Katayama, K. Yamashita. Polarization Induced Surface Charge in Hydroxyapatite Ceramics, J. Appl. Phys., 査読有, 2014, 116, 014902. DOI: 10.1063/1.4886235
 - 11 M. Nakamura. A Study on Tissue Regeneration of the Functionalized Bioceramics, J. Ceram. Soc. Jpn., 査読有, 2014, 122 (9), 755–761. DOI: 10.2109/jcersj2.122.755
- 〔学会発表〕(計 21 件)
- 1 N. Horiuchi, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Yamashita. Dielectric Phenomena in Monoclinic and Hexagonal Hydroxyapatite. 15th Asian BioCeramics symposium Tokyo(Japan), Dec.09 2015.
 - 2 N. Horiuchi, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Yamashita. Dielectric Study on Reorientation Phenomena of Hydroxide Ion in Hydroxyapatite. 17th US-Japan Seminar on Dielectric and Piezoelectric Ceramics 2Matsumoto(Japan), Nov.17 2015.
 - 3 中村美穂, 堀奈央子, 難波咲, 安藤大志, 堀内尚紘, 遠山岳史, 西宮伸幸, 山下仁大. 分極ハイドロキシアパタイト表面特性における焼結雰囲気中の水分の意義. 日本セラミックス協会 第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学五福キャンパス(富山) 2015 年 09 月 18 日.
 - 4 渡辺研太郎, 堀内尚紘, 野崎浩佑, 中村美穂, 永井亜希子, 山下仁大. 塩素置換アパタイトの誘電特性評価. 日本セラミックス協会 第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学五福キャンパス(富山)2015.09 月 17 日.
 - 5 榎谷峰旦, 野崎浩佑, 堀内尚紘, 中村美穂, 山下仁大, 永井亜希子. 分極アパタイトは増殖シグナルを刺激する. 日本セラミックス協会 第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学五福キャンパス(富山) 2015.09 月 17 日.
 - 6 堀内尚紘, 野崎浩佑, 中村美穂, 永井亜希子, 山下仁大. 単斜晶ハイドロキシアパタイト中の水酸化物イオンの再配向運動. 日本セラミックス協会 第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学五福キャンパス(富山) 2015 年 09 月 17 日.
 - 7 K. Watanabe, N. Horiuchi, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Yamashita. Dielectric evaluation of chlorine substituted hydroxyapatite. The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-6) Tokyo(Japan), Jun.09, 2015.
 - 8 T. Masutani, N. Horiuchi, K. Nozaki, M. Nakamura, K. Yamashita, A. Nagai. Polarization influences on cell dynamics via ERK signaling pathways. The 6th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic

- Materials (AMDI-6) Tokyo(Japan), Jun.09, 2015.
- 9 山下仁大. 無機エレクトレットによるバイオミネラリゼーションの制御. 第9回バイオミネラリゼーションワークショップ. 東京大学柏キャンパス(東京), 2014年12月.
 - 10 榎谷峰旦, 野崎浩佑, 堀内尚紘, 中村美穂, 山下仁大, 永井亜希子. 分極アパタイト上における細胞動態の解明. 第18回生体関連セラミックス討論会, 大阪府立大学 I-site なんば(大阪), 2014年12月.
 - 11 渡辺研太郎, 堀内尚紘, 野崎浩佑, 中村美穂, 永井亜希子, 山下仁大, 塩素置換アパタイトを用いた分極バイオセラミックスの開発, 第18回生体関連セラミックス討論会, 大阪府立大学 I-site なんば(大阪), 2014年12月.
 - 12 N. Horiuchi, N. Ebe, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Yamashita. Evaluation of surface charge on polarized hydroxyapatite using Kelvin probe method, The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5), Tokyo(Japan), Nov. 19, 2014
 - 13 T. Masutani, N. Horiuchi, K. Nozaki, M. Nakamura, K. Yamashita, A. Nagai. Investigation of cell dynamics on polarized HA_p discs, The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5), Tokyo(Japan), Nov. 19, 2014
 - 14 K. Yamashita. Concept and Fundamental Properties of Ceramic Electrets as Vector Materials for Biomedical and Energy Devices. The 1st Innovation Forum of Advanced Engineering and Education. Tokyo(Japan), Nov. 2014
 - 15 永井亜希子, 服部竜也, 廣瀬美智子, 小倉淳郎, 野崎浩佑, 相澤守, 山下仁大. ハイドロキシアパタイトを足場とした胚性幹細胞の培養. 日本バイオマテリアル学会大会, タワーホール船堀(東京), 2014年11月.
 - 16 山下仁大. 生体を制御する最先端バイオエレクトロベクトルセラミックスの創製. 第33回エレクトロセラミックスセミナー. 富士通株式会社武蔵小杉オフィス(川崎), 2104年11月.
 - 17 堀内尚紘, 遠藤樹里亜, 野崎浩佑, 中村美穂, 永井亜希子, 片山恵一, 山下仁大. 誘電特性によるフッ素置換ハイドロキシアパタイトの構造評価, 第34回エレクトロセラミックス研究討論会, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京), 2014年10月.
 - 18 遠藤樹里亜, 堀内尚紘, 野崎浩佑, 中村美穂, 永井亜希子, 片山恵一, 山下仁大. 誘電特性に基づくフッ素置換ハイドロキシアパタイトの生体材料としての構造上の優位性に関する研究, 日本セラミックス協会 第27回秋季シンポジウム, 鹿児島大学(鹿児島), 2014年9月.
 - 19 難波咲, 中村美穂, 堀内尚紘, 野崎浩佑, 永井亜希子, 遠山岳史, 西宮伸幸, 山下仁大. 破骨細胞の挙動へ与える分極アパタイトの効果セラミックス協会第27回秋季シンポジウム, 鹿児島大学(鹿児島), 2014年9月.
 - 20 K. Yamashita, N. Horiuchi, K. Nozaki, A. Nagai, M. Nakamura. Fundamentals and Applications of Ceramic Electrets. The 15th IUMRS-ICA 2014, Fukuoka(Japan), Aug. 2014.
 - 21 K. Yamashita. Biointerface Engineering on the Basis of Polarized Bioceramics. The 8th International Symposium on Organic Molecular Electronics. Tokyo(Japan), May 2014.
6. 研究組織
- (1)研究代表者
- 山下 仁大(YAMASHITA, kimihiro) 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授
研究者番号: 70174670
- (2)研究分担者
- 永井 亜希子(NAGAI, Akiko)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授
研究者番号: 40360599
- 中村 美穂(NAKAMURA, Miho)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授
研究者番号: 40401385
- 堀内 尚紘(HORIUCHI, Naohiro)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号: 90598195