

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26708026

研究課題名(和文) 高強度キチンナノファイバー多孔体を用いた骨再生用足場材料の開発

研究課題名(英文) Preparation of bone regeneration material by using porous and strong chitin nanofiber composite

研究代表者

伊福 伸介(Shinsuke, Ifuku)

鳥取大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70402980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はカニ殻からキチン質のナノファイバーを製造することに成功している。本研究ではキチンナノファイバーの微細な形状(10ナノ)と優れた力学的強度、多彩な生体機能を活かし、ハイドロキシアパタイトと複合した骨再生のための足場材料を開発した。本材料は成形外科や歯科治療において優れた成形性・操作性を有する。また、炎症を誘発することなく骨や歯の欠損部において足場として安定に存在し再生する。治癒後は体内で消化される。そのような全くの新規の骨や歯の再生材料は、高齢化の進む現代社会において、人々の健康を増進していくだろう。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in preparing for the chitin nanofibers from crab shell. The chitin nanofiber has 10 nm in diameter, efficient mechanical properties, and variety of biological properties. In this study, a calcium phosphate/chitin nanofiber composite material was prepared for bone tissue engineering. Chitin nanofiber offered a useful template with which to form calcium phosphate crystal as with the biomineralization of crab shell in nature. Calcium phosphate improved the mechanical properties of the hydrogel. This unique inorganic/organic nanocomposite modeled on nature is expected to expand the application of chitin nanofibers in medical and dental fields by utilizing their morphological, mechanical, and biological properties.

研究分野：生体高分子化学

キーワード：ナノ材料 バイオマス 生体材料

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨再生材料「ハイドロキシアパタイト」骨欠損部位の修復には周囲の骨と強固に接着し、治癒するまでの間、高い機械的強度を維持できる足場が必要である。ハイドロキシアパタイト(以下、アパタイト)は高い骨伝導性と生体適合性を併せ持つため、人工骨として成形外科や歯科において使用されている。しかし、アパタイトは固くて脆いため、成形性と操作性に劣る。この欠点を解決する手段として、アパタイトと高分子材料の複合化が挙げられる。

キトサンはカニやエビの外皮に含まれるキチンを脱アセチル化処理することによって得られる天然由来の高分子である。キトサンはアパタイトとの親和性が高く、生体吸収性や熱安全性に優れているため、アパタイトとキトサンを複合したスポンジ状の骨再生材料が報告されている。しかし、この複合体は体液環境下では急激な強度低下をおこすため、骨欠損部の足場として十分な役割を果たすことができない。また、キトサンはカチオン性高分子であるため、体内において炎症反応を引き起こす。

(2) カニ殻由来のナノ繊維「キチンナノファイバー」

申請者はカニ殻に含まれているキチン質のナノファイバーを簡単に単離することに成功している(Ifuku *et al.*, *Biomacromol.*, 2009)。本材料は極めて細く均一である。また、結晶性の高い繊維であるため、高強度・高弾性である。そして、多彩な生体機能を備えている(Ifuku *et al.*, *Nanoscale*, 2012)。本研究ではキチンナノファイバーとアパタイトを複合した、全くの新規な骨再生材料の開発を提案する。なお、本研究を進めるにあたり、キチンナノファイバーについて、以下の予備的知見を得ている。

従来のキチン粉末と異なり、キチンナノファイバーは水中で均一に分散できる。物性が優れているため、複合化によって素材を強化する補強材として機能し、素材の機械的強度を大幅に向上できる(Ifuku *et al.*, *Green Chem.*, 2011)。

生体内のリゾチームと呼ばれる酵素によってゆっくりと分解を受ける。

生体適合性に優れ、体内に埋設しても炎症を誘発する好中球を活性化しない。

2. 研究の目的

本研究では「キチンナノファイバー/アパタイト複合体」からなる新規な骨再生材料を開発した。上述の ~ の予備的知見は骨再生材料の開発にあたってそれぞれ次の効果が期待できる。

- (1) スポンジやゲル、シート、セメントなど用途に応じて所望の形状に成形できる。
- (2) アパタイトの物性が向上し、操作性が改善する。また、治癒するまでの間、骨欠

損部の足場として維持できる。

- (3) 治癒後は生体内で消化され、足場としての役割を終える。
- (4) 生体内に埋設しても異物として認識されず、炎症反応を引き起こさない。

以上、キチンナノファイバーとアパタイトを複合した骨再生材料を作成する。成形性と操作性に優れ、骨欠損部の足場として治癒するまで保持し、良好な生体親和性を持つ高性能・高機能の新素材を開発する。

3. 研究の方法

本研究では、キチンナノファイバーの特徴的な形状、物性、機能を活かして、キチンナノファイバーを基材として用いた複合材料を作成し、外科や歯科治療に利用可能な新規な高機能・高性能の骨再生材料を開発する。具体的には(1)~(4)の項目について検討する。

- (1) キチンナノファイバーの規格化
- (2) キチンナノファイバー/ゼラチンフィルムの製造とその評価
- (3) キチンナノファイバー/ゼラチン複合ゲルの製造とその評価
- (4) キチンナノファイバー/アパタイト複合体の製造とその評価

4. 研究成果

(1) キチンナノファイバーの規格化

キチンを水酸化ナトリウム(濃度: 5 ~ 30 重量%)で脱アセチル化を行うことにより、ナノファイバー化の効率が向上した。これは、表面に正の荷電が生じ、表面の荷電は静電的な反発や浸透圧を生じるためである。そのため、より軽微な粉砕によって、ナノファイバーを得ることができた。得られたナノファイバーについて、詳細な物性データの集積を行った。

収率: 水酸化ナトリウム処理に伴う収率を重量より求めた。収率はアルカリの濃度に依存せずおよそ80%程度であった。

脱アセチル化度: 水酸化ナトリウム処理に伴うキチンナノファイバーの脱アセチル化度を元素分析および電気伝導度滴定により求めた。水酸化ナトリウムの濃度に依存して脱アセチル化度が増加した。5 ~ 30 重量%のアルカリ濃度で処理することにより、脱アセチル化度をおよそ5 ~ 30%に制御できた。また、脱アセチル化度は赤外分光光度計を用いたスペクトルデータとも一致していた。

表面荷電: 水酸化ナトリウム処理に伴うキチンナノファイバーの表面の荷電をゼータ電位計により測定した。酸性条件において脱アセチル化度の増加に伴い、アンモニウム塩が生じるため正のゼータ電位が4.6から5.7に増加した。

分散性: キチンナノファイバー分散液の分散性を評価するため、可視分光光度計を用いて透過率を測定した。水酸化ナトリウムの濃

度の増加に伴って、分散液の分散性が向上し、その結果、透過率が大幅に上昇した。30重量%の水酸化ナトリウムで処理した場合、600nmにおける分散液の直線透過率は34%から80%に増加した。これは表面の荷電の増加に伴い、ナノファイバー間の静電的な反発が生じて、凝集を抑制し、分散性が向上したためと考える

形状：キチンナノファイバーの形状を電解放出型走査型電子顕微鏡を用いて観察した。水酸化ナトリウムの濃度の増加に伴ってキチンナノファイバーの平均的な繊維幅がより細くなった。これは、ナノファイバーの表面の荷電の増加に伴って、静電的な反発と浸透圧が増加して、より軽微な粉碎で微細化が可能になったためである。

表面積：キチンナノファイバーの相対的な表面積をパルスNMR装置を用いて評価した。アルカリの濃度と溶媒の緩和時間は負の相関があった。すなわち、水酸化ナトリウムの濃度に伴ってナノファイバーの表面積は増加した。この結果は走査型電子顕微鏡による形状観察の結果と一致している。

結晶性：広角X線散乱法によってキチンナノファイバーの結晶性を評価した。キチンナノファイバーの結晶領域と非晶領域を比較して相対的な結晶化度を見積もった。アルカリの濃度に依存せず相対的な結晶化度はおよそ85%に保持されていた。すなわち、脱アセチル化反応は表面にのみ起こっており、内部の結晶構造は保持されていることを示唆している。

(2)キチンナノファイバー/ゼラチンフィルムの製造とその評価

フィルムの作成：キチンナノファイバー/ゼラチン複合フィルムを作成した。キチンナノファイバー分散液にゼラチンを加熱して溶解したものを乾燥し、キャストフィルムを得た。複合フィルムはいずれも透明であった(図1)。これはナノファイバーのサイズ効果によるものである。フィルムの破断強度ならびに弾性率は高く、また、キチンナノファイバーとゼラチンの配合比によって大きく変化した。

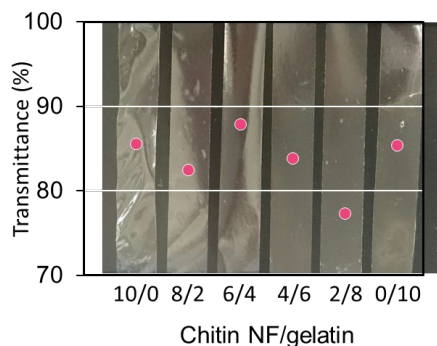


図1 複合フィルムとその透明性

これは高弾性のキチンナノファイバーと柔軟なゼラチンの複合効果によるものである。複合フィルムの吸水率はゼラチンの配合比に依存して直線的に増加した。これは、ゼラチンの吸水性が高いためである。

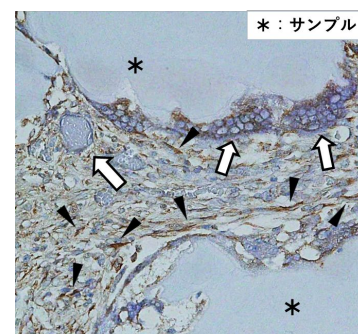
複合フィルムの埋設試験：6週齢の雌のマウスの背面にキチンナノファイバー/ゼラチン複合フィルムを埋設した。3, 7, 14日後に組織を採材し、標本を作製し、状態を組織学的に評価した。複合フィルムは対照群と比較して強い急性炎症性細胞数が少なく、例えば3日目の急性炎症細胞数は対照群が2.4であったのに対して、キチンナノファイバー投与群では0.6であった。すなわち、炎症反応を惹起することなく、線維芽細胞の増生が確認できた。すなわち、作成した複合フィルムは優れた生体適合性を備えている。

(3)キチンナノファイバー/ゼラチン複合ゲルの製造とその評価

複合ゲルの作成：キチンナノファイバーにゼラチンを加熱溶解した後、ゲンピンを架橋剤として加え複合ゲルを得た。複合ゲルは反応後もナノファイバーの形状が保持されており、その補強効果によって高強度、高弾性であり、それぞれが40%、60%向上した。

複合ゲルの埋設試験：複合ゲルをマウスの背面に埋設し、1, 2, 4週後に採材して組織学的に評価を行った。従来のゼラチンゲルは好中球の集簇に伴う重度の炎症反応が起こり、2週後にはゲルは崩壊していたが、一方でナノファイバーを配合したゼラチンゲルは炎症は比較的軽度であり、4週後も複合ゲルは安定に組織内に存在していた。

次いで、ウサギの大腿骨の軟骨および軟骨下骨をくり抜き、直径4mm、高さ7mmの複合ゲルを埋設した。4週後に組織を採材して軟骨組織を観察した。染色によってII型コラーゲンの産生は認められず、軟骨組織の再生は確認できなかった。一方、I型コラーゲンの産生が認められ、すなわち、骨の成分の再生が確認でき、その周囲には線維芽細胞の集簇が見られた(図2)。すなわち、キチンナノファイバー/ゼラチン複合ゲルは骨の再生を促進する足場材料として有効であることが認められた。



↑：未熟な骨芽細胞 ▲：コラーゲン

図2 複合ゲルは骨芽細胞を集簇させてコラーゲンを産生する。

(4)キチンナノファイバー/アパタイト複合体の製造とその評価

複合体の作成：キチンナノファイバー/アパタイト複合体を作成した。イカの甲由来のキチンナノファイバーを35%水酸化ナトリウム水溶液に室温下、24時間浸漬することによりヒドロゲルを得た(図3)。これはキチンナノファイバー結晶の膨潤とそれに伴う繊維間の架橋によるものである。キチンナノファイバーゲルを0.6Mのリン酸水素二アンモニウム水溶液に室温下、1日浸漬した。その後、1.0Mの硝酸カルシウム4水和物に40℃、0.5~5.0日間浸漬してアパタイトの析出を行った。電子顕微鏡によりアパタイトの析出が確認でき、析出量は浸漬時間に応じて増加した。また、析出量に応じて弾性率ならびに破断強度が増加した。これはアパタイト結晶がヒドロゲルの物性を向上しているためである。

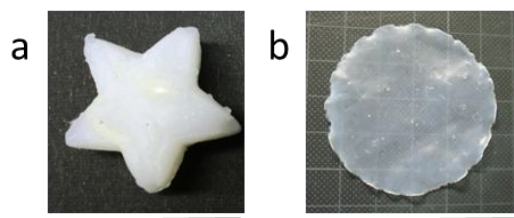


図3 キチンナノファイバーヒドロゲル。(a) 5%、(b) 2.5%濃度。Scale bar: 30mm

アパタイト複合体の埋設試験：6週齢の雄のラットの頭頂骨をくり抜き消毒後にアパタイト複合体を埋設し、外科用ステープラーで切開部を閉塞した。術後に組織を採材しホルマリンで固定し標本とし、顕微鏡を用いて組織学的に評価した。アパタイト複合体を埋設した群について、皮下組織において石灰化が確認でき、その周囲には骨芽細胞が集簇していた。また、線維芽細胞ならびにコラーゲンが産生し、対照群と比較してより重厚な組織となっていた(図4)。

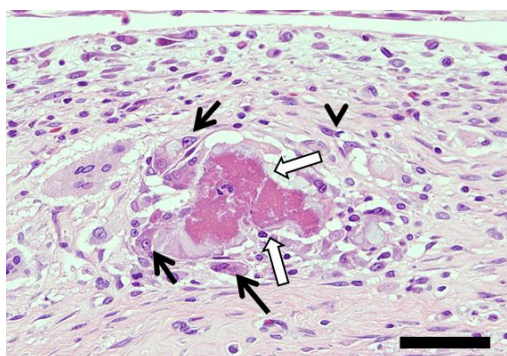


図4 アパタイト複合体は骨欠損部の石灰化を促進する。白抜き矢印：石灰化、黒矢印：骨芽細胞、矢頭：線維芽細胞

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計24件)

Yoko Ogawa, Kazuo Azuma, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Kosuke Ochi, Tomohiro Osaki, Norihiko Ito, Yoshiharu Okamoto, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku, Preparation and biocompatibility of a chitin nanofibre/gelatin composite film International Journal of Biological Macromolecules, 査読有, in press, <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.041>

Yihun Fantahun Aklog, Tomone Nagae, Hironori Izawa, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku, Effect of grinder pretreatment for easy disintegration of chitin into nanofiber, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 査読有, 17, 2017, pp. 5037-5041, doi:10.1166/jnn.2017.14223

Yihun Fantahun Aklog, Mayumi Egusa, Hironori Kaminaka, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku, Protein/CaCO₃/chitin nanofiber complex prepared from crab shells by simple mechanical treatment and its effect on plant growth, International Journal of Molecular Science, 査読有, 17(10), 2016, pp. 1600, doi:10.3390/ijms17101600

Ryo Tabuchi, Kazuo Azuma, Ryotaro Izumi, Tsubasa Tanou, Yoshiharu Okamoto, Tomone Nagae, Daisuke Iohara, Kaneto Uekama, Masaki Otagiri Fumitoshi Hirayama, Shinsuke Ifuku, Makoto Anraku, Biomaterials based on freeze dried surface-deacetylated chitin nanofibers reinforced with sulfobutyl ether β -cyclodextrin gel in wound dressing applications, International Journal of Pharmaceutics, 査読有, 511, 2016, pp. 1080-1087, <http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.08.019>

Yihun Fantahun Aklog, Tomone Nagae, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku, Preparation of chitin nanofibers by surface esterification of chitin with maleic anhydride and mechanical treatment, Carbohydrate Polymers, 査読有, 153, 2016, pp. 55-59, <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.060>

Mari Kawata, Kazuo Azuma, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku, Biomineralization of calcium phosphate crystals on chitin nanofiber hydrogel for bone regeneration material, Carbohydrate Polymers, 査読有, 136, 2016, 964-969, <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.009>

Makoto Anraku, Ryo Tabuchi, Shinsuke Ifuku, Takako Ishiguro, Daisuke Iohara, Fumitoshi Hirayama, Surface-deacetylated chitin nano-fiber/hyaluronic acid composites as potential antioxidative compounds for use in extended-release matrix tablets, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 16, 2015, pp. 24707-24717, doi:10.3390/ijms161024707

Kazuo Azuma, Tomone Nagae, Takeshi Nagai, Horonori Izawa, Minoru Morimoto, Yusuke Murahata, Tomohiro Osaki, Takeshi Tsuka, Tomohiro Imagawa, Norihiko Ito, Yoshiharu Okamoto, Hiroyuki Saimoto, Shinsuke Ifuku, Effects of surface-deacetylated chitin nanofibers in an experimental model of hypercholesterolemia, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, 16, 2015, pp. 17445-17455, doi:10.3390/ijms160817445

Shinsuke Ifuku, Takeshi Urakami, Hironori Izawa, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto Preparation of a protein-chitin nanofiber complex from crab shells and its application as a reinforcement filler or substrate for biomineralization, RSC Advances, 査読有, 5, 2015, pp. 64196-64201, DOI: 10.1039/c5ra12761k

Jose Guillermo Torres-Rendon, Tim Femmer, Laura De Laporte, Thomas Tigges, Felix Gremse, Sara Zafarnia, Wiltrud Lederle, Shinsuke Ifuku, Matthias Wessling, John G. Hardy, Andreas Walther, Bioactive Gyroid Scaffolds Formed by Sacrificial Templating of Nanocellulose and Nanochitin Hydrogels as Instructive Platforms for Biomimetic Tissue Engineering, Advanced Materials, 査読有, 27, 2015, pp. 2989-2995, DOI: 10.1002/adma.201405873

Kazuo Azuma, Ryotaro Izumi, Tomohiro Osaki, Shinsuke Ifuku, Minoru Morimoto, Hiroyuki Saimoto, Saburo Minami, Yoshiharu Okamoto, Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials, Journal of Functional Biomaterials, 査読有, 6, 2015, pp. 104-142, doi:10.3390/jfb6010104

[学会発表](計39件)

伊福伸介, ひと味違う CNF「キチンナノファイバー」とヘルスケア、日本化学会第97春季年会アドバンス・テクノロジー・プログラム、2017年3月16日、慶応義塾大学(神奈川・横浜)

Shinsuke Ifuku, Preparation of chitin nanofibres extracted from crab shell for

reinforcement filler of plastics、第三回先端複合材料会議、2017年1月4日、バンコク(タイ)

Shinsuke Ifuku, Preparation of a protein/chitin nanofiber complex from crab shells and its application as a reinforcement filler or substrate for biomineralization, 第11回アジア太平洋キチン・キトサン会議、2016年9月11日、コーチン(インド)

伊福伸介, カニ殻から抽出した「キチンナノファイバー」の実用化を目指した機能の探索、ナノファイバー学会第七回年次大会、2016年7月1日、京都大学(京都・宇治)

Shinsuke Ifuku, Preparation, modification, and biological applications of chitin and chitosan nanofibers from crab shell, 2015 Material Research Society Fall Meeting & Exhibit, 2015年12月2日、ボストン(アメリカ)

Shinsuke Ifuku, Preparation of chitin nanofiber from crab shell and the applications, 2015 International Conference on Small Science, 2015年11月5日、プーケット(タイ)

伊福伸介, キチンナノファイバーの製造と実用化に向けた機能の探索、第29回キチン・キトサン学会大会、2015年8月20日、東海大学(熊本・熊本)

伊福伸介, カニ殻由来の新素材「キチンナノファイバー」の実用化に向けた機能の探索、第45回繊維学会夏期セミナー、2015年7月30日、北九州国際会議場(福岡・北九州)

伊福伸介, カニ殻由来の新素材「キチンナノファイバー」の製造とその利用開発、日本農芸化学会2015、2015年3月29日、岡山大学(岡山・岡山)

伊福伸介, キチンナノファイバーの製造とその生体機能、第23回ポリマー材料フォーラム、2014年11月7日、奈良新公会堂(奈良・奈良)

伊福伸介, カニ殻由来の新繊維「キチンナノファイバー」の製造とその利用開発、日本応用糖質科学会平成26年度大会、2014年9月25日、朱鷺メッセ(新潟・新潟)

伊福伸介, セルロースとの差別化を指向したキチンナノファイバーの利用開発、第28回キチンキトサンシンポジウム、2014年8月8日、順天堂大学(東京・文京)

〔図書〕(計7件)

伊福伸介、NTS、バイオマス由来の高機能材料、2016、237-246

伊福伸介、上中弘典、阿部賢太郎、技法堂出版、キッチン・キトサンの最新科学技術、2016、125-139

伊福伸介、シーエムシー出版、抗菌技術と市場動向 2016、2016、100-109

伊福伸介、シーエムシー出版、機能性化粧品素材 素材開発と安全性 、2016、143-150

伊福伸介、NTS、糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック 創薬・医療から食品開発まで、2015

伊福伸介、技術情報協会、セルロースナノファイバーの調製、分散・複合化と製品応用、2015、185-190

〔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

伊福伸介ホームページ

<http://saimotolab.sakura.ne.jp/ifuku/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊福 伸介 (IFUKU Shinsuke)

鳥取大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：70402980