

**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：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750159

研究課題名(和文) 早期骨修復可能な革新的ペースト状人工骨の創製

研究課題名(英文) Fabrication of paste-like artificial bones with enhanced biological properties

研究代表者

小西 敏功 (Konishi, Toshiisa)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：10587843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、骨形成を促進する生体必須元素である「ケイ素」および血管形成を促進する「銅」を利用して、自家骨の「骨誘導能」に匹敵する「骨形成能」および「血管形成能」を備えた人工骨材料を創製することを目的とした。銅を含有したリン酸カルシウムは固相反応法および液相反応法のいずれの反応においても作製できることがわかった。また、リン酸カルシウムへ銅を添加することで、溶解過程において粒子に表面水和層(腐食抵抗性層)が形成され、その溶解が律速過程となり、溶解速度が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：With the intent to combine osteoconductivity with angiogenic property, the present study aimed to fabricate copper and silicon co-doped  $\beta$ -tricalcium phosphates ( $\beta$ -TCP). Copper-doped  $\beta$ -TCP(s) were successfully synthesized via both solid-state and liquid-phase reaction. In addition, the effect of copper on the dissolution behaviors of copper TCP (CuTCP) was also investigated. The incorporation of copper in the  $\beta$ -TCP resulted in a decrease in the dissolution rate of CuTCP, which was caused by a rate-determining dissolution process of a disordered phase around the CuTCP.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：リン酸カルシウム 銅 骨補填材 骨伝導 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

整形外科領域での骨欠損治療には、単純な生体活性を有するアパタイト(HAp)系人工骨を用いるフェーズから、自家骨が有する「骨誘導能」に匹敵する早期の骨修復を可能とする「高機能化人工骨」が求められるフェーズへと移行している。そのため、「セラミックス系人工骨への骨誘導能の付与」に関する研究は国内外を問わず競争の激しい分野である。例えば、成長因子のひとつである骨形成タンパク質(rh-BMP-2など)は骨誘導能をもつタンパク質であり、リン酸カルシウム的一种であるアパタイト(HAp)にBMPを担持させ、これを徐放させることでより確実な骨癒合を獲得させるという研究例は数多く報告されている。しかしながら、BMPは非常に高額であり、我が国の医療経済を圧迫することは明らかである。そのような社会的背景を鑑みると、もし人工材料だけで自家骨に匹敵する「骨誘導能」に匹敵する機能を備えた人工骨が開発できれば、いつでも誰でもリーズナブルな価格で利用できる人工骨となり、超高齢社会に生きる我々のQOL(Quality of Life)向上に大いに貢献できるものと期待される。

一方で、生体内の微量元素(ミネラル)は、酵素やタンパク質の構成成分として存在し、重要な生体反応や生理作用を発揮することが一般的に知られている。例えば、ケイ素(Si)は骨組織の石灰化に寄与し、銅(Cu)は内皮細胞による血管形成の補酵素として重要な役割を果たすことが報告されている。このミネラルの機能に着目し、リン酸カルシウム結晶格子内へミネラルを導入し、リン酸カルシウム系セラミックスの生物学的機能を高める研究が盛んに行われている。ケイ素を結晶格子内へ置換したリン酸カルシウムは骨形成を促進することを明らかにしてきたが、自家骨の有する「骨誘導能」には及ばない。また、銅をリン酸カルシウム結晶格子内に導入し、骨欠損などの創傷治療に必要な「血管形成」について調査した研究は申請者が知る限り見当たらない。そこで、もし、SiおよびCuを含有したリン酸カルシウムが創製できれば、「骨誘導能」に匹敵する「骨誘導能」および「血管形成能」を備えた革新的なバイオマテリアルとなりうるのではないかと着想した。

さらに、イノシトールリン酸(IP6)のキレート作用を用いた「新しい硬化メカニズムを持つ骨修復セメント」を基盤技術として「低侵襲治療型ペースト状人工骨」へと応用する。

## 2. 研究の目的

人工材料のみで「骨誘導能」に匹敵する「骨形成能」および「血管形成能」を備えた人工骨材料を創製し、さらに、上記の「骨修復セメント技術」を基に、注射器で患部に注入可能な「低侵襲治療型ペースト状人工骨」へと

応用し、臨床応用に繋がる成果を得ることを目的として、以下の3項目を推進した。

- (1) ケイ素および銅含有TCPを用いたキレート硬化型ペースト状人工骨作製法の確立
- (2) *In vitro*でのペースト状人工骨の血管形成能および生体適合性の評価
- (3) *In vivo*でのペースト状人工骨の血管形成能および骨修復能の評価

## 3. 研究の方法

固相反応法では炭酸カルシウム( $\text{CaCO}_3$ )、酸化銅( $\text{CuO}$ )およびピロリン酸カルシウム( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ )を出発原料として用い、 $(\text{Ca}+\text{Cu})/\text{P}$ モル比が1.5となるように各原料を秤量し、乳鉢と乳棒を用いて90分間アセトン中で原料粉末を混合しパッチを作製した。パッチは $\text{Cu}/(\text{Ca}+\text{Cu})\times 100$ がそれぞれ0, 0.1, 1, 5, 10 mol%となるように調製した。作製したパッチを錠剤成形器を用いて17.5 kNで加圧成形することで圧粉体を作製し、電気炉中で1000℃、12時間焼成し、 $\text{Cu}_x\text{TCP}$  ( $x = 0, 0.1, 1, 5, 10$ )を得た。

液相反応法では硝酸カルシウム四水和物( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )、硝酸銅三水和物( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )および、リン酸水素二アンモニウム( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ )を出発原料として用いて、仕込み組成が $\text{CuTCP}$ 中のCaに対するCuのmol%が0-10 mol%、 $(\text{Ca}+\text{Cu})/\text{P}$ モル比=1.5となるように合成した( $\text{Cu}_x\text{TCP}_W$ ,  $x = 0, 0.1, 1, 5, 10$ )。合成したカルシウム欠損HApを乾燥後、1000℃で4時間焼成して、 $\text{Cu}_x\text{TCP}_W$ を得た。

結晶構造を粉末X線回折法(XRD)、分子構造をマジック角高速回転法による固体核磁気共鳴分光法(MAS-NMR)およびフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)を用いて評価し、元素組成を誘導結合プラズマ(ICP)発光分光法を用いて調べた。また、試料の粒子形態は走査電子顕微鏡(SEM)を用いて観察し、粒度分布も測定した。 $\beta$ -TCPの生体吸収性の評価には、Itoらが提案した生体材料の*in vitro*吸収性評価法に基づき、pH 5.5、25℃の酢酸緩衝溶液中での試料からのCaイオン溶出量を180分間計測し、各粉末試料の溶解挙動を調べた。

固相反応法で作製した粉体の生体適合性を評価するために骨芽細胞を培養して、その増殖性を評価した。骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を6孔プレートに播種し、1日培養した後、細胞培養インサートおよび $\text{CuTCP}_S$ ペレットを静置し、さらに1, 3日間、間接的に培養して、材料から銅イオンが溶出し、細胞増殖が阻害されないか否かをMTT Assayで評価した。

## 4. 研究成果

$\text{CuTCP}_S$ 試料は仕込み組成とほぼ同量の銅イオンが含有され、 $(\text{Ca}+\text{Cu})/\text{P}$ モル比が仕

込み組成に等しい約 1.5 であった。作製した試料の粉末 XRD パターンでは  $\beta$ -TCP に帰属される回折ピークのみを検出した。IR スペクトルにおいても  $\text{PO}_4^{3-}$  の P-O 結合に帰属される赤外吸収ピーク以外は観測されなかった。これらの結果より作製した試料は全て  $\beta$ -TCP 単相であることを確認した。Cohen 法に基づき算出した格子定数の値は、銅仕込み量の増加に伴い単調減少した。Ca (1.00 Å) よりもイオン半径が小さい Cu (0.72 Å) が  $\beta$ -TCP 結晶格子内に置換固溶していると考えられる。 $^{31}\text{P}$  MAS-NMR スペクトルでは、銅含有量の増加に伴うピーク数及び緩和時間の減少を観測した。これは銅イオンの持つ常磁性緩和特性によるもので、銅イオンが  $\beta$ -TCP 結晶構造内に存在しているためであると考えられる。

溶解性試験では、銅含有量の増加に伴う Ca イオン溶解速度および溶解量の減少を確認した。銅添加が  $\beta$ -TCP の溶解挙動に及ぼす影響を考察するため、時間に対する Ca イオン溶解量を理論式で曲線近似した。まず、作製した全ての試料は  $\beta$ -TCP 単相であったことから溶解は均一であると仮定して Eq. (1) を用いて曲線近似した。しかしながら、曲線近似はできず、試料の溶解が均一であるという仮定は当てはまらないことが分かった。

$$F(t) = k[1 - \exp(-at)] \quad \dots \text{Eq. (1)}$$

( $k$ : 溶解量[mg/L],  $a$ : 溶解速度定数[ $\text{min}^{-1}$ ],  $t$ : 時間[ $\text{min}$ ])

そこで、走査電子顕微鏡 (SEM) で試料の粒子形態観察を行ったところ、溶解前の試料に関して大きな粒子と小さな粒子の存在、また、銅含有量の増加に伴い、大きな粒子の存在が支配的になり小さな粒子は減少していることが分かった。一方、銅含有量の増加に伴う Ca イオン溶解速度および溶解量の減少の原因として、粒子表面に「表面水和層 (腐食抵抗性層)」が形成された可能性がある。そこで、試料の溶解挙動は、反応初期の速い溶解と腐食抵抗性層が形成した後の遅い溶解の異なる二つの溶解成分に依存すると仮定して、式 (2) を用いて曲線近似を行った。

$$F(t) = k_1[1 - \exp(-at)] + k_2[1 - \exp(-bt)] \quad \dots \text{Eq. (2)}$$

( $k_1$ : 速い溶解成分の溶解量[mg/L],  $a$ : 速い溶解成分の溶解速度定数[ $\text{min}^{-1}$ ],  $k_2$ : 遅い溶解成分の溶解量[mg/L],  $b$ : 遅い溶解成分の溶解速度定数[ $\text{min}^{-1}$ ],  $t$ : 時間[ $\text{min}$ ])

全ての溶解曲線は速い溶解成分と、遅い溶解成分に分けて曲線近似された。その解析から得られた溶解速度定数は、速い溶解成分  $a$  は遅い溶解成分  $b$  の 10 倍程度あったがこれは腐食抵抗性層が形成された影響による差であると考えられる。また、速度定数の値はどちらも銅含有量の増加に伴い低下した。銅含有量増加に伴い Ca イオン溶解量も減少した。

銅含有量の増加に伴い、180 分の溶解試験後に溶解残留物の増加を確認した。この  $\text{Cu}_{10}\text{TCP}$  の残留物を溶液を遠心分離・乾燥することで回収し、その上清を ICP により元素組成分析した。粉末 XRD パターンより、回収したこの粒子は  $\beta$ -TCP 単相であったことから溶解試験前後で結晶構造に変化がなかったことが分かった。しかし、 $^1\text{H} \rightarrow ^{31}\text{P}$  CP-MAS NMR スペクトルより、表面にリン酸水素カルシウム二水和物 ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) やハイドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) などに由来する水和構造を有していたことが分かった。つまり、これが「腐食抵抗性層」であると考えられる。元素組成分析より、溶解試験後の  $\text{Cu}_{10}\text{TCP}$  の Cu/Ca モル比は 0.101 であったのに対して、溶解試験後の溶解液の上清は 0.086 と低かったことから、 $\text{Cu}_{10}\text{TCP}$  から Ca イオンよりも Cu イオンの方が溶出しにくいことが分かった。また、 $\text{Cu}_{10}\text{TCP}$  では、試料量を通常の半分や 2 倍量で酢酸緩衝液に 10 時間浸漬した際、Ca イオン溶解量はそれぞれ異なる値を示したことから、溶解量が低下した原因は食抵抗性層の形成に伴う溶解速度の低下であることが示唆された。これらのことから、残留物は腐食抵抗性層による溶解速度の低下により生じたものであると考えられる。この残留物を新しい緩衝液中で再度溶解試験をしたところ、その溶解曲線は  $\text{Cu}_x\text{TCP}$  の遅い溶解成分の溶解曲線と一致した。 $\text{Cu}_x\text{TCP}$  は、まず反応初期に粒子表面が速い溶解成分の挙動にしたがって溶解し、その表面が溶解する過程で粒子表面に腐食抵抗性層が形成され、遅い溶解成分の挙動にしたがって溶解したと考えられる。また、溶解曲線の曲線近似解析の結果から、試料の銅含有量の増加に伴って、各溶解成分の溶解量 (%) の比 ( $k_1/k_2$ ) は 2.44( $\text{Cu}_0\text{TCP}$ ) から 0.84( $\text{Cu}_{10}\text{TCP}$ ) へ減少した。これは、試料の銅含有量が増加すると遅い溶解成分の影響が支配的になることを示唆している。以上の結果から、銅を添加することで「表面水和層 (腐食抵抗性層) の溶解」が律速過程となり  $\beta$ -TCP の溶解速度が低下することが明らかとなった。この知見はこれまでに実験的検証に基づく報告例はなく、本研究課題にて初めて明らかにされた。さらに、溶解性試験は生体内での破骨細胞による骨吸収環境を模倣していることから、表面水和層 (腐食抵抗性層) による溶解速度の低下は破骨細胞による骨吸収速度が低下する可能性を示している。つまり、骨形成と骨吸収のサイクルである「骨リモデリング」に影響を及ぼすことを示唆している。

次いで、銅イオン (Cu) を含む  $\beta$ -TCP を液相反応法により合成することを試みた。

液相合成法では固相反応法とは異なり、液相から直接  $\beta$ -TCP を合成することができず、前駆体であるカルシウム欠損アパタイトを沈殿させ、これを熱処理することで  $\beta$ -TCP を得ることができる。そのため、沈殿物合成時の pH や温度、また攪拌熟成時のアパタイト

形成にともなう pH 降下の抑制が  $\beta$ -TCP や副相の生成に直接影響を及ぼす。様々な pH、合成温度、熟成時間で合成を行った結果、pH7.3, 30 で 15 時間熟成させる合成条件が  $\beta$ -TCP の作製に最適であることが分かった。しかし、この条件では、わずかに副相として  $\beta$ -CPP が含まれることが分かった。この原因について検討したところ、熟成中、反応溶液の pH は三段階で低下することが分かった。この際、熟成初期に起こる pH 降下を制御することが副相生成の抑制に最も効果的であることが分かった。具体的には、 $\text{Cu}_{0.01}\text{TCP}_W$  ではリン酸滴下終了後から 1 時間、 $\text{Cu}_1\text{TCP}_W$  では 1.5 時間、pH7.3 を維持することが最適条件であった。

得られた沈殿を熱処理した  $\text{Cu}_{0.01}\text{TCP}_W$  では、 $\beta$ -TCP (#09-0169) に帰属できる回折ピークのみが観測されたが、 $\text{Cu}_{5,10}\text{TCP}_W$  では、 $28.9^\circ$  付近に  $\beta$ -CPP (#09-0346) に帰属される回折ピークも確認された。FT-IR スペクトルより、 $\text{Cu}_{5,10}\text{TCP}_W$  の  $727\text{cm}^{-1}$  付近に  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  に帰属される吸収バンドが確認されたことから、生成した副相は  $\beta$ -CPP であることが分かった。格子定数の値は、銅仕込み量の増加に伴い減少傾向を示し、この傾向は固相反応法で合成した試料と一致した。

溶解性試験では、固相反応法で合成した試料と同様に、銅含有量の増加に伴う Ca イオン溶解速度および溶解量の減少を確認した。これは固相反応法で合成した試料と類似した傾向であった。そこで、曲線近似を用いて溶解挙動を考察したところ、2 種類の溶解挙動の存在を仮定することができた。得られた溶解速度定数  $k_1$  と  $k_2$  はおよそ 10 倍異なる値であった。これは「表面水和層 (腐食抵抗性層)」の存在によるものと考えられる。また、得られた  $k_1, k_2$  値および  $k_1/k_2$  比の値から、溶解の遅い成分の溶解率が大きく下がっていることが分かった。この原因として、 $\text{Cu}_{5,10}\text{TCP}_W$  では副相として  $\beta$ -CPP が観測されている。 $\beta$ -CPP は安定性が高く溶解性が低いことが知られており、この  $\beta$ -CPP 相の存在が溶解性の低下に寄与していると考えられる。以上の結果から、 $\text{Cu}_{0.01}\text{TCP}_W$  では、 $\beta$ -TCP 単相が作製でき、 $\text{Cu}_{5,10}\text{TCP}_W$  では、HAp 形成が阻害されることで、 $\beta$ -TCP と  $\beta$ -CPP の二相が形成されることが明らかとなった。

さらに、固相反応法で作製した粉体の生体適合性を評価するために、骨芽細胞を培養して、その増殖性を評価した結果、培養 2 日目では細胞数は 80% 程度に減少したが、培養 4 日目で、 $\text{Cu}_{0.01}\text{TCP}$  では細胞数が 100% 以上に回復した。しかし、 $\text{Cu}_{5,10}\text{TCP}$  では細胞数があまり増加しなかった。これは  $\text{Cu}_{5,10}\text{TCP}$  から溶出した銅が細胞増殖に影響を及ぼしたと考えられる。この結果から、 $\text{Cu}_{0.01}\text{TCP}$  は Control および  $0\text{CuTCP}$  と比較して遜色ない生体適合性を示すことが明らかとなった。 $\text{Cu}_{0.01}\text{TCP}$  は骨芽細胞による骨形成を阻害せずに、血管内皮細胞による血管新生を促進す

ることが期待される。

## 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) Z. Wang, F. Wen, P.N. Lim, Q. Zhang, T. Konishi, D. Wang, S.H. Teoh, and E.S. Thian, "Nanomaterial scaffolds to regenerate musculoskeletal tissue: signals from within for neovessel formation", Drug Discovery Today, 2017 (Accepted).
- (2) T. Konishi, M. Honda, M. Nagaya, H. Nagashima, E.S. Thian, and M. Aizawa, "Injectable chelate-setting hydroxyapatite cement prepared by using chitosan solution: fabrication, material properties, biocompatibility, and osteoconductivity", J. Biomater. Appl., 2017 (Accepted).

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 長野靖之・小西敏功・吉岡朋彦・早川 聡、「固相反応法による銅含有  $\beta$ -リン酸三カルシウムの合成とキャラクタリゼーション」, 第 55 回セラミックス基礎科学討論会、岡山コンベンションセンター、2017 年 1 月 12-13 日
- (2) 長野靖之・小西敏功・吉岡朋彦・早川 聡、「銅含有  $\beta$ -リン酸三カルシウムの固相合成」, 日本セラミックス協会 2015 年年会、岡山大学、2015 年 3 月 18 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小西 敏功 (Konishi Toshiisa)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号：10587843

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

早川 聡 (Hayakawa Satoshi)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授  
研究者番号：20263618

吉岡 朋彦 (Yoshioka Tomohiko)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・準教授  
研究者番号：50452016  
(平成27年度より連携研究者)

### (4) 研究協力者

長野 靖之 (Nagano Yasuyuki)