

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820300

研究課題名(和文) 高強度ハイドロゲル中でのリン酸カルシウムのバイオミネラリゼーション

研究課題名(英文) Calcium Phosphate Biomineralization in High Robustness Hydrogel

研究代表者

野々山 貴行 (Nonoyama, Takayuki)

北海道大学・先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：50709251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：高強度ダブルネットワーク(DN)ゲルは、その高含水率に起因する低摩擦表面の特性を利用して人工軟骨及び軟骨再生用足場マトリックスとしての応用が期待される一方で、その水様性表面に如何なる接着剤も効果的に使用できず生体内での強固な接着・固定が大きな課題であった。本研究では、骨の無機主成分で骨伝導性を有するハイドロキシアパタイトをDNゲルにコーティングすることで、ウサギの大腿骨顆部においてゲル内部へ骨再生を誘導し、材料と骨組織が相互に侵入して一体化することで、無毒かつゲル母材の強度を超える強固な接着に成功した。この手法は極めて簡便で汎用的であり、続く人工靭帯モデルにおいても十分な接着強度を示した。

研究成果の概要(英文)：Taking advantage of low frictional nature of robust & tough double network (DN) hydrogels, the application for artificial cartilage and scaffold of cartilage regeneration have been expected. However, due to the water like surface of the gel based on its high water content, any glues never fix gel in vivo efficiently. Inspired that natural soft supporting tissues (cartilages, ligaments and tendons) directly and strongly connect with bone tissues, bonding to bone of DN gel was carried out. hydroxyapatite (HAp), which is main inorganic component of bone and possess osteoconduction, was coated on the surface of DN gel, and the HAp/DN gel was implanted in rabbit bone defect. For 4 weeks after implantation, HAp/DN gel robustly bonded to bone because osteogenesis penetrated into permeable DN gel matrix. This overlapped region is a kind of interpenetrating structure, so that the robust fixation of DN gel was achieved.

研究分野：高分子科学

キーワード：高強度ハイドロゲル バイオセラミックス ハイドロキシアパタイト ソフトセラミックス 骨形成

1. 研究開始当初の背景

生物の骨や歯、貝殻などの硬組織は、人工合成では達成できない美しく、機能的な秩序構造を有している。生物がこれらバイオミネラルを常温常圧で生合成するプロセスは、バイオミネラリゼーション(生物鉱化作用)と呼ばれる。バイオミネラルは、タンパク質及び糖鎖などの有機物と、リン酸カルシウム、シリカなどの無機物が融合した天然の有機・無機ハイブリッド材料であり、優れた力学物性を有すること、及び環境負荷のない合成プロセスで生成されることも相まって近年注目されている(文献 1)。先行研究として、合成ポリペプチドから成る水ゲル中で水酸化ハイドロキシアパタイト(HAp)を鉱化させると、全体としては柔軟であり、成形加工に制限がなく、かつ無機物の性質を併せ持つ HAp/ペプチドゲルを作製した。これは従来の硬くて脆いセラミックスではない「ソフトセラミックス」と新たに定義し、次世代有機・無機融合材料の可能性を見出した(文献 2)。しかしながら、このゲルは物理架橋から成るため機械的強度が乏しく、構造材料として扱うには不向きであった。

2. 研究の目的

近年、日本が世界にリードして高強度・高靱性水ゲルが盛んに研究され、次々と新たな高強度ゲル材料が開発されている。その中でもダブルネットワーク(DN)ゲルは、2003年に Gong らによって開発された極めて優れた力学物性を有するゲルである(文献 3)。DNゲルは、硬くて脆い第一網目と柔らかくてよく伸びる第二網目の相互侵入網目構造から成り、含水率が約 90 wt%にも関わらず工業ゴムに匹敵する高靱性を示す。このゲルは、高弾性、低摩擦性、生体親和性等の観点から次世代人工軟骨としての応用が期待されている。さらに、DNゲルを軟骨欠損部へ埋植すると硝子軟骨がゲルの上で再生することが報告されている(文献 4)。一方で、高い含水率に起因する水様性表面のために生体内で固定するためのあらゆる接着剤は効果的に使用できない。そこで本研究では、骨伝導性を有する HAp を DNゲルへ複合させた HAp/DNゲルの物性評価及 *in vivo* における骨接着性を評価した。

3. 研究の方法

先行研究に従って、スルホン酸基を有する 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid を第一網目、中性で生体適合性を有する Dimethylacrylamide を第二網目とする PAMPS/PDMAAm DN水ゲルを二段階ラジカル重合で合成した。平衡膨潤させた DNゲルをリン酸水素二カリウム水溶液及び塩化カルシウム水溶液に交互に浸すことで、DNゲル内部へ HAp を鉱化させた。得られた材料の骨接着性を評価するために、日本白色ウサギの大腿骨顆部及び頭頂骨部に作製した骨欠損部に HAp/DNゲルを埋植

し、各週後の接着強度、及びゲル-骨組織界面のモルフォロジーを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。

4. 研究成果

HAp/DNゲルの基礎的物性

得られた無色透明の DNゲルは交互浸漬法後に白色へ変化し、X線回折から低結晶性 HAp が形成されたことが示された(図 1)。

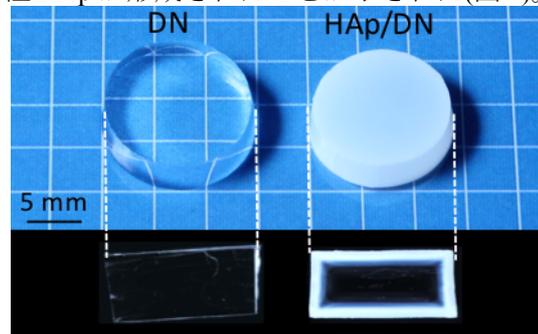


図 1 HAp 鉱化前後の DNゲルとその断面像。

この HAp はゲルの内部で形成され、交互浸漬溶液の濃度や浸漬回数を調整することで、HAp 層の厚さや含有率を制御できた。TEM の観察から、HAp は粒径約 600 nm でウニ状の中空スパイクナノ粒子の形状を形成しており、ゲルのポリマーネットワークのサイズ(数 nm)よりも十分大きいことから、ゲルの網目に物理的に拘束されることで強固に結合していることが示された(図 2)。

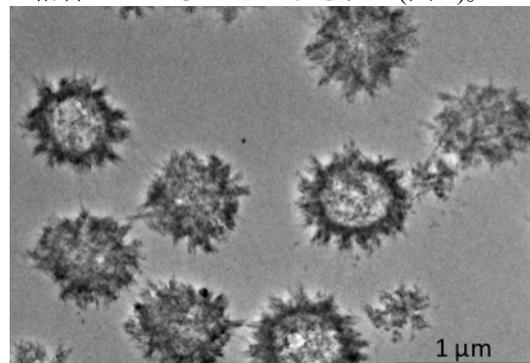


図 2 DNゲル中に鉱化した HAp の TEM 像。

この HAp/DNゲルは、HAp 含有率が 10 wt% 以下と低いにも関わらず、ゼータ電位及び接触角から評価した表面の化学的性質は市販の高密度 HAp 焼結体とほぼ同等であった。また低含有率であっても、ゲルマトリックスの弾性率及びひずみエネルギー密度の増加に寄与し機械的強度が向上した一方で、ゲル本来の柔軟性は維持された(表 1)。

	Sample	DN	HAp/DN	Sintered HAp
Composition (wt%)	Water	92	87.7	0.0
	Polymer	8.0	8.2	0.0
	Mineral	0.0	4.1	100
Contact angle of water(°)		47 ± 6	101 ± 3	103 ± 2
Zeta potential (mV)		-8.27 ± 1.23	-18.0 ± 2.43	-17.4 ± 2.11
Young's modulus (MPa)		0.035 ± 0.004	0.084 ± 0.004	414 ± 4
Stress at ε = 0.9 (MPa)		7.39 ± 0.48	9.50 ± 1.54	-
Work of compression (MJ/m ³)		0.67 ± 0.49	1.04 ± 0.18	-

表 1 DN 及び HAp/DNゲルの諸性質。

また、HAp 鈣化時に DN ゲルを延伸することで HAp 結晶の配向を厳密に制御できた。以上から高靱性ゲルと HAp の融合について、合目的なサンプル調製が可能となった。

新規骨接着強度試験による評価

最表面が HAp の化学的性質を有する HAp/DN ゲルの骨接着性を評価するために、2 つの骨接着試験系を確立した。

①プッシュアウト試験

日本白色ウサギの大腿骨顆部に欠損を作製し、そこへ円柱状の側面にのみ HAp コーティングされた DN ゲルとリファレンスとしての pristine DN ゲルを埋植した。検体摘出後、同径のインデントで円柱ゲルを押し込み、Load を計測した。埋植 1 週では、どちらにおいても接着は認められなかったが(Max Load~4N)、4 週では、HAp/DN ゲルは母材の強度を超える高い接着強度(40 N~)を示した(図 3)。

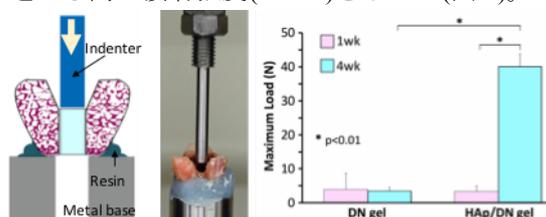


図 3 試験系と埋植 1 及び 4 週の最大荷重。

これはハイドロゲルの *in vivo* の接着においては世界最高強度を達成している。この高強度接着の構造を評価するために、HAp/DN ゲル-骨組織境界領域の TEM を観察した。埋植前では HAp/DN ゲルの最表面は明確な境界があるが、4 週ではゲル内部に骨形成が侵入し、ゲルと骨間に明確な境界のない「傾斜構造」を形成していることが観察された(図 4)。

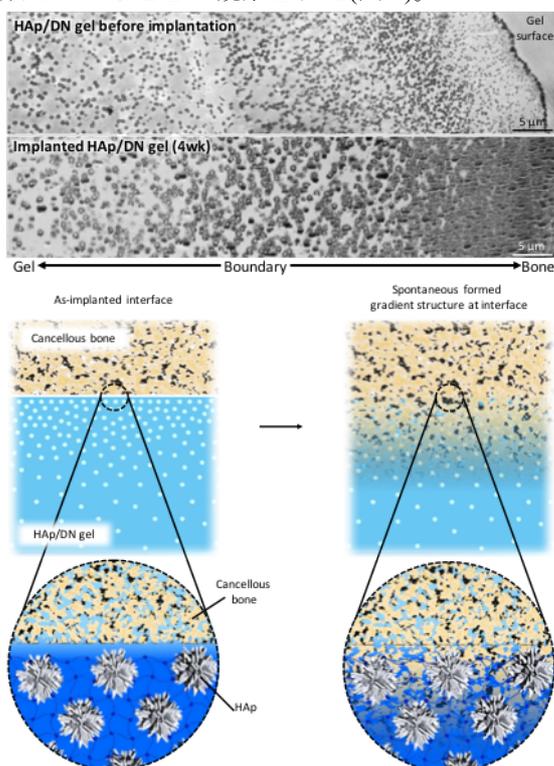


図 4 骨-HAp/DN 界面の TEM 像と骨形成侵入の概念図。

この骨形成侵入によって、化学合成ゲルと天然骨組織が融合し、一種の相互侵入構造を形成することで、DN ゲルの強靱化メカニズム同様にゲル-骨組織境界領域が高靱性化したと考えられる。

②剥離試験

比較的大面積な平面を確保できるウサギの頭頂骨に作製した平面の欠損部へシート状の HAp/DN ゲルを埋植し、2、4、6 週後に 90°剥離試験を行って接着強度を評価した。その結果、週数を追うごとに接着の確率と接着強度が向上し、2 週に比べて 6 週では約 2 倍の強度を示した。また、頭頂骨部は大腿骨顆部に比べて骨再生能が低いにも関わらず、十分な接着強度を示し、本接着手法があらゆる骨組織に対応できる汎用性が示された。

本研究の総括として、一般的に硬くて脆い HAp を高強度・高靱性 DN ゲルへ複合化させることで、母材の機械的特性を向上させるだけでなく、柔軟な物性を維持しつつ HAp の化学的性質を付加することが極めて簡便で汎用的な手法達成できた。このソフトセラミックスは、従来のゲルでは成し得なかった極めて強固な骨接着性を示し、実用に耐えうる実績を示した。これにより、高強度ゲルの人工軟骨及び軟骨再生足場材料としての応用を加速させるとともに、無機複合化による新たな強靱化手法としての可能性を見出した。

<引用文献>

1. S. Mann, "Molecular Recognition in Biomineralization", *Nature*, **1988**, 332, 119-124.
2. T. Nonoyama, H. Ogasawara, M. Tanaka, M. Higuchi, T. Kinoshita, "Calcium phosphate biomineralization in peptide hydrogels for injectable bone-filling materials", *Soft Matter*, **2012**, 8, 11531-11536.
3. J. P. Gong, Y. Katsuyama, T. Kurokawa, Y. Osada, "Double-network hydrogels with extremely high mechanical strength", *Adv. Mater.*, **2003**, 15, 1155-1158.
4. K. Yasuda, N. Kitamura, J. P. Gong, K. Arakaki, H. J. Kwon, S. Onodera, Y. M. Chen, T. Kurokawa, F. Kanaya, Y. Ohmiya, Y. Osada, "A Novel Double-Network Hydrogel Induces Spontaneous Articular Cartilage Regeneration *in vivo* in a Large Osteochondral Defect", *Macromol. Biosci.*, **2009**, 9, 307-316.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 20 件)

1. M. T. I. Mredha, N. Kitamura, T. Nonoyama, S. Wada, K. Goto, X. Zhang, T. Nakajima, T. Kurokawa, Y. Takagi, K. Yasuda, J. P. Gong, "Anisotropic tough double network hydrogel from fish collagen and its spontaneous *in vivo* bonding to bone", *Biomaterials*, **2017**, 132, 85-95. (査読有り)

2. S. Wada, N. Kitamura, T. Nonoyama, R. Kiyama, T. Kurokawa, J. P. Gong, K. Yasuda, “Hydroxyapatite-coated double network hydrogel directly bondable to the bone: Biological and biomechanical evaluations of the bonding property in an osteochondral defect”, *Acta. Biomater.*, **2016**, *44*, 125-134. (査読有り)
3. T. Nonoyama, S. Wada, R. Kiyama, N. Kitamura, M. T. I. Mredha, X. Zhang, T. Kurokawa, T. Nakajima, Y. Takagi, K. Yasuda, J. P. Gong, “Double-Network Hydrogels Strongly Bondable to Bones by Spontaneous Osteogenesis Penetration”, *Adv. Mater.*, **2016**, *28*, 6740-6745. (査読有り)
4. K. Higa, N. Kitamura, T. Kurokawa, K. Goto, S. Wada, T. Nonoyama, F. Kanaya, K. Sugahara, J. P. Gong, K. Yasuda, “Fundamental biomaterial properties of tough glycosaminoglycan-containing double network hydrogels newly developed using the molecular stent method”, *Acta. Biomater.*, **2016**, *43*, 38-49. (査読有り)
5. T. Nonoyama, J. P. Gong, “Double-network hydrogel and its potential biomedical application: A review”, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine*, **2015**, *229*, 853-863. (査読有り)
6. M. T. I. Mredha, X. Zhang, T. Nonoyama, T. Nakajima, T. Kurokawa, Y. Takagid, J. P. Gong, “Swim bladder collagen forms hydrogel with macroscopic superstructure by diffusion induced fast gelation”, *J. Mater. Chem. B*, **2015**, *3*, 7658-7666. (査読有り) 他

[学会発表] (計 181 件)

1. T. Nonoyama, S. Wada, R. Kiyama, N. Kitamura, T. Kurokawa, T. Nakajima, K. Yasuda, J.P. Gong, “Robust Bonding of Tough Double Network Hydrogel to Bone”, *APS March Meeting 2017*, **2017 Mar. 16**, New Orleans, LA, USA.
2. T. Nonoyama, S. Wada, R. Kiyama, N. Kitamura, T. Kurokawa, T. Nakajima, K. Yasuda, J.P. Gong, “Tough Hydrogel Bondable to Bone by Osteogenesis Penetration”, *ICBS2016*, **2016 Nov. 28**, The University of Tokyo, Tokyo, Bunkyo-ku.
3. 野々山貴行、和田進、木山竜二、黒川孝幸、中島祐、安田和則、グン剣萍、「傾斜融合構造による骨と直接結合する高靱性ハイドロゲル」、*日本バイオマテリアル学会 2016*、**2016 年 11 月 21 日**、福岡国際会議場、福岡県博多市。
4. T. Nonoyama, S. Wada, R. Kiyama, N. Kitamura, T. Kurokawa, T. Nakajima, K. Yasuda, J.P. Gong, “Tough Hydrogel Bondable to Bone by Osteogenesis

Penetration”, “Novel Bonding of Tough Hydrogel to Bone by Osteogenesis Penetration”, *Bioceramics28*, **2016 Oct. 18**, Charlotte, NC, USA.

5. 野々山貴行、和田進、木山竜二、黒川孝幸、中島祐、安田和則、グン剣萍、「骨と直接結合するタフハイドロゲル」、*第 65 回高分子学会討論会*、**2016 年 9 月 14 日**、神奈川大学横浜キャンパス、神奈川県横浜市。
6. T. Nonoyama, S. Wada, R. Kiyama, N. Kitamura, T. Kurokawa, T. Nakajima, K. Yasuda, J.P. Gong, “Osteogenesis Penetration into Semipermeable Tough Hydrogel for Strong Bonding”, *APS Annual Meeting of Ceramics Society of Japan 2016*, **2016 Mar. 14**, Waseda University, Tokyo, Shinjuku-ku. 他

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 体積相転移を示さない LCST を有する温度応答性ゲル及びその製造方法
 発明者: 野々山 貴行、グン 剣萍、李 永祐、太田 玖美
 権利者: 国立大学法人北海道大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-246385
 出願年月日: 2016 年 12 月 20 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

1. 北海道大学プレスリリース(日、英)
2. 日経産業新聞掲載 16.5.30
3. Chem-Station spotlight research 掲載
4. EurekAlert!(AAAS)他計 33 の科学技術系ウェブサイトに掲載

6. 研究組織

(1)研究代表者

野々山 貴行 (Nonoyama Takayuki)
 北海道大学・先端生命科学研究院・特任助教
 研究者番号: 50709251