

有機物質を用いた階層構造制御によるバイオセラミックスの創製

Development of Bioceramics with Controlled Hierarchical Structures by Using Organic Molecules

Key-words : Calcium phosphate, Bioceramics, Hierarchical structures

横井 太史

Taishi YOKOI (Tokyo Medical and Dental University)

1. はじめに

本格的な高齢社会を迎えた我が国では、病気やけがで失われた生体の機能を、患者の負担を最小にして治療する医療材料・医療技術の発展が強く望まれている。損傷を受けた生体の機能の修復や代替、支援を目的にして、身体表面や内部の組織あるいは体液と接触して用いられる材料は生体材料（バイオマテリアル）と呼ばれている。セラミックス系生体材料はバイオセラミックスとも呼ばれ、主に骨などの硬組織の修復を目的とした材料の研究・開発が進められている。

骨を修復する材料（以下、人工骨）としては、ヒドロキシアパタイト（HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ）や β -リン酸三カルシウム（ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ）の焼結体が実用化されてきた。また複雑な形状の骨欠損に対応するため、手術の現場で形状を加工可能な材料としてリン酸カルシウム多孔体や雲母を析出させて機械加工性を付与した結晶化ガラスが開発された。さらに、ペースト状のリン酸カルシウムセメントも実用化されている。これらの材料は優れた形状付与性を持つが、加工に伴う機械的強度の低下やセメント混練の手技による硬化時間の変動など、使用状況や術者によって材料特性がゆらぐ懸念がある。これに対して、近年、新たに実用化された材料として、HApやリン酸八カルシウム（OCP, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）とコラーゲンの複合体がある。従来の材料との大きな違いは、スポンジ状で柔らかいという点である。これらの複合体は操作性に優れていて骨欠損部に詰めて使用することを前提としており、セメントのように調製プロセスに依存して材料特性がゆらぐことを心配する必要が無い。柔らかい人工

骨の登場によって注目を集めたハンドリング性の指標は今後も人工骨の開発において重要な材料パラメータになると考えられる。加えて、これからは材料のハンドリング性を高めると同時に骨修復促進能や抗菌性などを付与し、自家骨を超える材料科学的・生物学的特性を有する人工骨を目指して高機能化が進められると予想される。

筆者らは人工骨の開発動向を鑑みてハンドリング性と機能性を両立する新しいリン酸カルシウム／高分子複合体の研究を進めてきた。特に、複合体の合成プロセスの高度化に注力し、人工骨としての機能向上に資するマクロからナノスケールまでの複合体の階層構造制御を可能にしてきた。また、複合化の過程で有機物質を積極的に利用することが複合体の微細構造の精密制御に有用であることを見出した。本稿では、有機物質を利用して階層構造を精密に制御したリン酸カルシウム／高分子複合体の構築について紹介する。

2. マテリアルデザイン

セラミックスの特性は、材料のマクロな形態、材料を構成する粒子のサイズや形態、粒界構造、結晶配向、結晶相および組成など、巨視的から微視的まで様々な材料パラメータの影響を受ける。複合材料においても同様で、ヒトはこのようなマクロからナノスケールまでの材料パラメータを巧みに制御することによりHApとコラーゲンを用いてしなやかで強靱な機械的性質を有する骨組織を構築している。筆者らは、ヒトの骨の形成に学び、階層構造を精密に制御することにより、従来材料よりも天然骨に近い材料科学的・生物学的性質を持ちつつ、さらに天然骨に無い特性の付与も可能な新しい人工骨の創製を目指して研究を進めてきた。

筆者らが目指している材料の階層構造を模式的に図1に示す。材料はマクロスケールで見るとOCPとポリマーの複合体である。OCPとポリマーの複合化プロセスについては3節で述べるが、水和ゲルを反応場とした結晶成長法（ゲル法）によって無機フィラー

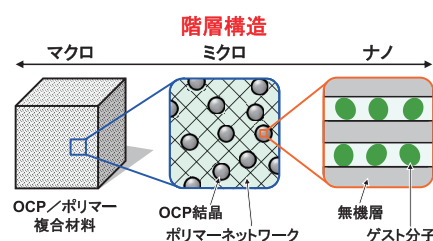


図1 リン酸八カルシウム（OCP）／高分子複合体の階層構造の模式図

となる OCP マイクロ粒子と高分子の複合化をワンステップで行う。OCP を球状とすることにより、材料は等方的な機械的特性を示すようになる。球状 OCP の表面構造制御にはポリマーマトリックスを結晶成長のテンプレートとして利用することが有用であることを 4 節で述べる。さらに、フィラーとして用いる OCP のナノ構造も精密に制御する。OCP は層状構造を持ち、その層間に有機分子（主にジカルボン酸イオン）を導入することができる。このような性質を持つリン酸カルシウム系化合物は OCP だけであり、これがフィラーとして OCP を用いた最大の理由である。この OCP のユニークな性質を利用することで、従来のリン酸カルシウム系人工骨が持ちえない性質を本複合体は獲得できる。5 節では、OCP へのジカルボン酸イオンの導入によるナノ構造制御について述べる。

3. マクロ構造制御

ヒトの骨は HAp とコラーゲンの複合体である。骨は細胞の働きによって構築されているが、物理化学的な視点からは、コラーゲンの水和ゲル中における HAp の析出によって形成されていると見做してもよい。このバイオミネ랄化にヒントを得て、筆者らはゲル法による人工骨の創製に着手した。ゲル法でリン酸カルシウムを合成する場合、リン酸イオンを含有する水和ゲルを調製し、その水和ゲルの上にカルシウムイオンを含有する水溶液を注いで静置する。次第にゲル中にカルシウムイオンが拡散し、リン酸イオンと反応してリン酸カルシウムが析出する。ゲル反応場としてリン酸カルシウムと複合化したい合成高分子ゲルや天然高分子ゲルを用いれば、自己組織的に複合体が形成される（図 2）。

リン酸カルシウムと高分子の複合体を作製する際に、リン酸カルシウムの結晶相の選択は材料のパフォーマンスに大きな影響を与えるため重要なパラメータとなる。リン酸カルシウムを湿式法で合成する場合、結晶相は反応場の pH と温度に強く依存する¹⁾。そこで筆者らは、ゲルの初期 pH を変えながら種々の温度でリン酸カルシウムを合成した。析出物の結晶相を調べた結果を図 3²⁾ に示す。高温・高 pH 条件で HAp が生成し、低 pH 条件ではリン酸水素カルシウム系化合物が生成した。OCP はこれらの中間条件でリン酸水素カルシウム系化合物と共に生成した。一般に、水溶液中でリン酸カルシウムが生成すると、リン酸の解離平衡反応によって反応系の pH は低下する。リン酸カルシウムの各相の安定性は pH に強く依存するので、反応初期では OCP が生成し、その後、反応系の pH 低

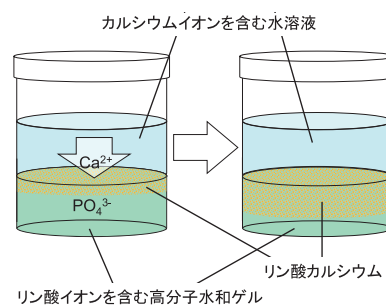


図 2 ゲル法によるリン酸カルシウム／高分子複合体作製の反応系の模式図

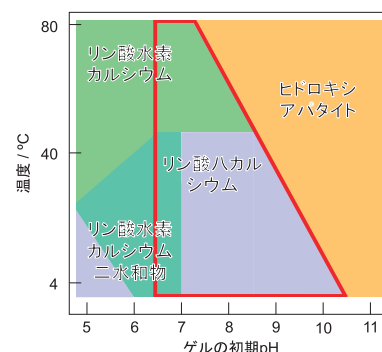


図 3 ゲル法でリン酸カルシウムを合成した際に生成する結晶相と合成条件（pH と温度）の関係

下によって OCP よりも酸性条件下で安定なリン酸水素カルシウム二水和物（DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）が生成する場合がある³⁾。リン酸カルシウムの生成にともなう pH 変動によって単相試料が得られない場合には、カルシウムイオンとリン酸イオンの濃度を低下させて、反応系中のリン酸カルシウムの析出量を低減させることが有効である。また、pH 緩衝剤を添加し、pH 変動を小さくすることも効果的である。ゲル法において実験者は反応の初期条件を決めることはできるが、リン酸カルシウムの析出反応は自発的に進行するため、その制御には工夫が必要である。しかし、合成条件の最適化により単相試料を得ることは十分に可能であり、実際にポリアクリルアミドゲル中に OCP を単相で析出させて複合体を得ることに成功した⁴⁾。

析出するリン酸カルシウムの結晶相に影響を与えるゲル法に特有な因子としてゲルの官能基があげられる。ポリアクリルアミドは極性官能基を持たず、カルシウムやリン酸イオンと積極的な相互作用は起こさないと考えられる。このポリアクリルアミドゲルを用いた場合には OCP が生成する条件であっても、アクリルアミドの一部をアクリル酸に置き換え、カルボキシ基をゲルの官能基として導入すると生成する結晶相は HAp に変化する⁵⁾。興味深いことに、反応場に遊離したカルボン酸を共存させても、結晶相は OCP のま

まで変化しなかった⁶⁾。つまり、ゲルの官能基としてカルボキシ基があることが結晶相の変化には重要であると言える。リン酸カルシウムの過飽和溶液中における様々な官能基を持つ基板上への析出実験の結果から、カルボキシ基は HAp の不均一核形成を誘起することが知られている⁷⁾。したがって、ゲルのカルボキシ基が不均一核形成のサイトとして作用し、リン酸カルシウムの核形成に必要な過飽和度を低下させたことが結晶相を OCP から HAp に変化させた理由であると考えられる。

4. ミクロ構造制御

図2に示したようにゲル法ではイオンの拡散によって析出反応が進行するので、イオンの拡散方向に沿った配向組織が形成される場合がある。しかし、材料を骨欠損部に詰めて使用することを考えれば、医師が材料組織の配向性を考慮することは難しい。そのため、材料は等方的な組織であることが望ましい。結晶成長理論によれば、過飽和度（結晶成長の駆動力）が小さい環境では結晶成長は界面カイネティクス律速で平衡形に近い多面体の結晶が生成し、過飽和度が大きい環境では結晶成長は拡散律速となって等方的に成長した球状結晶が生成する。したがって、等方的な材料を作製する場合には、過飽和度が大きな反応条件（＝拡散律速となる条件）とするのがよい。図4に反応温度によって結晶成長の律速過程を界面カイネティクス律速から拡散律速にすることで、析出するリン酸カルシウムを配向組織から等方組織に制御した例を示す。結晶成長理論に則った反応条件の選択により、材料の組織を系統的に制御できるようになっている⁸⁾。

図4に示した等方組織を有するサンプルから球状結晶を取り出して形態を観察すると、ウニのような形であることが分かった。細胞の増殖挙動は、増殖の足場となる材料の表面構造に強く依存する⁹⁾。ウニ状結晶のように細胞の接着点が離れた構造よりも、フラットで連続的な構造の方が細胞の増殖には有利である。そこで、真珠層の形成過程に学んだバイオインスパイア

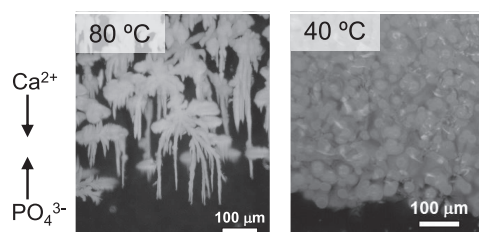


図4 反応温度によるゲル中に生成するリン酸カルシウムの配向性の制御（左：配向組織，右：等方組織）

ドなアプローチにより、球状結晶の表面構造制御を行った。

真珠層はアラゴナイト板状結晶が規則正しく積層した構造を有しており、この構造が真珠層特有の光学的性質の起源となっている。このアラゴナイト結晶の規則配列構造は、ポリマーが鋳型となる規則正しいセル構造を形成し、その内部においてアラゴナイト結晶が生成することによって構築されている。すなわち、アラゴナイト結晶の配列は、ポリマー鋳型によって支配されている。ゲル法においても、無機結晶はポリマーマトリックス中で成長するため、これを鋳型として積極的に用いれば、球状結晶の表面構造を制御できる可能性がある。そこで、反応場となるポリマーマトリックスの密度をパラメータとし、生成するリン酸カルシウムの形態を調べた。図5に、様々なアクリルアミドモノマー濃度の溶液をラジカル重合して作製したゲル中で生成した OCP 結晶の形態を示す¹⁰⁾。低密度のゲル中ではウニ状の結晶が生成し、ゲル密度の上昇とともに針状結晶を架橋する結晶が現れる。さらにゲル密度を上昇させると、架橋結晶が球状結晶表面を覆い、まるで毛糸玉のような形態となる。球状結晶が等方的に成長する際には、結晶周囲のポリマーを押し退けながら成長すると考えられる。ポリマー密度の上昇によって、押し退けたポリマーは球状結晶の周囲に壁を形成するようになる。ポリマー密度が高く、壁を押し退けてまっすぐに成長することが困難になれば、結晶は壁に沿って成長するようになる。これがウニ状結晶の針同士を連結する架橋結晶となる。さらにポリマー密度が上昇すると、架橋結晶の量が増大し、結果的に毛糸玉状結晶が形成されたと考えられる。この毛糸玉状結晶であれば、その表面において細胞が増殖することは十分に可能であると推察される。このように、有機分子を無機結晶の結晶成長制御因子として積極的に利用することは、材料のミクロ構造制御や特性向上に対して有用であることを実証した。

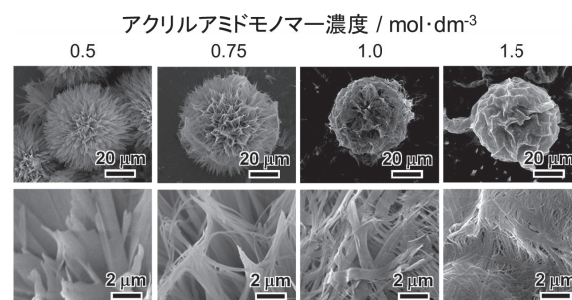


図5 反応場となるポリアクリルアミドゲル密度の上昇による OCP 球状結晶の表面形態変化（Elsevier から許可を得て文献 10 より転載。）

5. ナノ構造制御

セラミックス材料の中には、層状の結晶構造を持ち、その層間に様々なイオンや分子を導入できる性質を示すものがある。OCP も層状構造を持ち、その層間にジカルボン酸（1分子中に2個のカルボキシ基を持つ分子）を中心とした有機化合物を導入できる性質を持つ。この性質を利用すれば、結晶構造をナノレベルで有機修飾することにより、OCP が本来持たない性質を新たに付与できる可能性がある。これにより、抗がんや抗菌などの機能性を持った人工骨が得られると期待される。筆者らは OCP に導入可能な代表的なゲストであるコハク酸（ $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ）を薬剤モデル分子として用い、これを OCP が生成する反応条件に共存させた。その結果、ゲル法によるコハク酸導入 OCP/合成ポリマー複合体の作製に初めて成功した（図6）¹¹⁾。また従来、OCP の層間に導入できるゲスト分子は単一種類毎に調べられてきたが、2種類のゲスト分子を同時に導入することが可能であることを見出した¹²⁾。加えて、導入するゲスト分子の割合やゲスト分子の側鎖の種類¹³⁾を変えることによって層間距離をサブナノメートルレベルで精密制御できることを明らかにした。

この OCP のナノ構造制御技術の工学的応用に関しては研究報告が増えてきており、近年注目が高まっている。バイオマテリアル応用についても OCP がゲスト分子を層間に取り込む性質を利用すれば、一般的なリン酸カルシウム系材料では発現できない性質を付与できる可能性があり、革新的なバイオマテリアルの開発に繋がると強く期待される。現在のところ、OCP に導入できる物質は低分子有機化合物に限定されており、薬剤効果が期待できる分子の導入には至っていないのが現状である。今後は、OCP への薬剤分子の導入を可能にする新しい合成技術が必要であると考えられる。

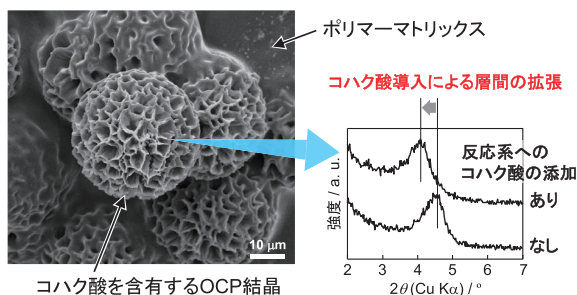


図6 コハク酸を添加した反応系におけるコハク酸を結晶中に導入した球状 OCP の生成（日本セラミックス協会から許可を得て文献 11 より転載。）

6. おわりに

本稿では、筆者らが進めてきたマクロからナノスケールまでの階層構造の制御による高機能な人工骨の創製について述べた。OCP が有機分子を層間に取り込む性質を活用することで、従来のリン酸カルシウム/高分子複合体では得られない特異な性質を持った階層構造制御型複合体を開発できる可能性を示すところまで研究が進んできた。今後は骨欠損の早期回復を実現できるように材料の複合機能化を進めていきたいと考えている。もう一つの方向性として、治療だけでなく診断にも活用できる材料も開発していきたい。人工骨は、骨欠損部位に埋入して用いられるため、材料の周囲の情報を外部に取り出すことができれば、材料の状態だけでなく、骨欠損部位の炎症や感染の状態が分かるようになるかもしれない。そのようなセラノスティクス（Theranostics は Therapeutics（治療）と Diagnostics（診断）からなる造語）の視点からの次世代材料設計・材料開発が今後は重要になると考えられる。

文 献

- 1) H. Monma, *J. Mater. Sci.*, **15**, 2428-2434 (1980).
- 2) T. Yokoi, M. Kawashita, G. Kawachi, K. Kikuta and C. Ohtsuki, *J. Mater. Res.*, **24**, 2154-2160 (2009).
- 3) T. Yokoi, M. Kawashita, K. Kikuta and C. Ohtsuki, *J. Cryst. Growth*, **312**, 2376-2382 (2010).
- 4) T. Yokoi, M. Kawashita, K. Kikuta and C. Ohtsuki, *Mater. Sci. Eng., C*, **30**, 154-159 (2010).
- 5) T. Yokoi, M. Kawashita and C. Ohtsuki, *J. Asian Ceram. Soc.*, **1**, 15-162 (2013).
- 6) T. Yokoi, M. Kawashita and C. Ohtsuki, *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, **18**, 192012 (2011).
- 7) M. Tanahashi and T. Matsuda, *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 305-315 (1997).
- 8) T. Yokoi, I. Y. Kim, M. Kawashita and C. Ohtsuki, *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 24-28 (2013).
- 9) S. Okada, H. Ito, A. Nagai, J. Komotori and H. Imai, *Acta Biomater.*, **6**, 591-597 (2010).
- 10) T. Yokoi, M. Kawashita and C. Ohtsuki, *J. Cryst. Growth*, **383**, 166-171 (2013).
- 11) T. Yokoi, H. Kato, M. Kamitakahara, M. Kawashita and C. Ohtsuki, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **118**, 491-497 (2010).
- 12) T. Yokoi, H. Kato, I. Y. Kim, K. Kikuta, M. Kamitakahara, M. Kawashita and C. Ohtsuki, *Dalton Trans.*, **41**, 2732-2737 (2012).
- 13) T. Yokoi, M. Kamitakahara and C. Ohtsuki, *Dalton Trans.*, **41**, 7943-7950 (2015).

筆 者 紹 介

横井 太史（よこい たishi）

2012 年名古屋大学大学院工学研究科結晶材料工学専攻修了、博士（工学）取得。東北大学大学院環境科学研究科助教、ファインセラミックスセンター上級研究員を経て、2019 年 9 月より東京医科歯科大学生体材料工学研究所准教授。専門分野はセラミックス系生体材料。

〔連絡先〕 〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 2-3-10 (21 号館 301B 室)
東京医科歯科大学 生体材料工学研究所
E-mail : yokoi.taishi.bcr@tmd.ac.jp

