

氏名(本籍)	望 ^{もち} 月 ^{つき} 千 ^ち 尋 ^{ひろ} (秋田県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博乙第117号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位授与年月日	平成26年2月27日
学位論文題目	Ca錯体を用いるアパタイト粉末合成および薄膜形成と生体硬組織再生への応用
論文審査委員	主査 佐藤 光 史 副査 木村 雄 二 大倉 利 典 門 間 英 毅(本学名誉教授・法政大学客員教授)

論文要旨

目次

- 第1章 研究の背景と目的
- 第2章 Ca錯体からのアパタイト粉末合成
- 第3章 結晶性制御アパタイトと生分解性ポリマー複合スキャフォールド
- 第4章 水溶液スプレー法の開発と形成CA薄膜評価
- 第5章 アミノ酸のCa錯体を用いるアパタイト/ゼラチン複合スキャフォールド
- 第6章 総括

本論文は、Ca錯体を用いるアパタイト粉末合成および薄膜形成と生体硬組織再生への応用に関する研究をまとめた。以下に、各章の概要を記した。

第1章 研究の背景と目的

本章では、骨再生用材料としてのアパタイトの研究背景および本研究の目的を述べた。

社会の高齢化に伴い、従来の方法で生活の質を回復することが困難な疾患や、事故による硬組織欠損部の治療に対して、代替材料であるインプラントの活用を含む再生医療が期待されている。特に、細胞と細胞の足場材料(スキャフォールド)を組合せる組織工学は、生体硬組織の再生に有効とされている。一般に、組織工学で使用する生体材料は開発コストに依存して高価で、かつ汎用性に乏しい。2013年現在の日本で、骨粗しょう症や関節症、歯周病などによる硬組織の要治療者数が年間20万人を超す背景から、量産化が可能で安全で安価な生体材料の開発が急務であり、簡便な方法による材料形成が必須である。

本論文では、生体硬組織の主成分である水酸アパタイ

ト($\text{HA} : \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)に代表される六方晶系のリン酸カルシウム化合物(CP)である各種アパタイトについて、生体材料の形成分野で用いられることの少なかった金属錯体の利用に着目した。本研究では、(1)短時間反応で再現性良く均一組成のアパタイトを与える化学合成と生成物の特徴の解明、(2)合成アパタイトと生分解性ポリマーからなる複合スキャフォールドの形成と骨再生能の評価、(3)インプラントのアパタイトコートに有効な新たなコーティング法の開発と形成材料の評価、(4)錯体を利用する生体高分子化合物をマトリックスとするアパタイト複合化スキャフォールドの新規形成法の開発を目的とした。これらの目的に対して、水溶液中におけるCa錯体の安定度を考慮し、また材料の安全性の観点から配位子としてアミノ酸類を主に用いて研究を展開した。

第2章 Ca錯体からのアパタイト粉末合成

本章では、Ca錯体の水溶液中で反応でアパタイト粉末を形成する方法を先ず検討した。現在の工業的なアパタイト合成法は湿式法で、pHの厳密な制御と長時間反応を要する欠点がある。そこで、分子プレカーサー法で炭酸アパタイト(CA)薄膜形成に用いるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)をはじめ、多座配位子のCa錯体を經由するアパタイト粉末合成を試みた。合成に当たっては、Ca錯体の水溶液中での安定度に着目し、多座配位子をEDTAからイミノ二酢酸($\text{IDA} : \text{H}_2\text{ida}$)やその異性体で天然アミノ酸のアスパラギン酸(L-Asp)を選択した。各錯体水溶液から、生体中の反応環境に近い温和な条件下での低結晶性アパタイト粉末合成を検討し、簡便な合成方法を確立した。また、得られたアパタイトには炭酸や脱離配位子が含まれていることを実証した。

EDTAのCa錯体を用いるアパタイト粉末合成では、

高濃度過酸化水素溶液中にリン酸とEDTAのCa錯体を加え、アンモニアを添加して透明溶液を得た。これを50°Cで超音波照射するとCDHA（Ca欠損型水酸アパタイト）が、還流するとCHA（炭酸水酸アパタイト）/CDHA混合粉末が選択的に得られた。CDHAとCHA/CDHAの各結晶子サイズは24と34 nmで、結晶性を制御したアパタイト粉末を得ることができた。CHA/CDHAは淡黄色を呈していたが、700°Cの熱処理により結晶子サイズ40 nmの白色結晶を得た。過酸化水素によるCa錯体の部分酸化分解により Ca^{2+} を供給できるこの方法は、煩わしいpH制御が不要で、Ca錯体によるアパタイト粉末合成の有効性を示した。

次に、より温和な反応条件下での低結晶性アパタイト粉末の合成を検討するために、EDTAの部分構造からなるIDAのCa錯体を単離した。水に溶解した錯体にリン酸を添加しても、通常 Ca^{2+} イオンと反応して析出するCPは生成しなかった。一方、この均一溶液にアンモニアを一度に添加すると常温で白色粉末が得られ、その結晶子サイズが13 nmの低結晶性CDHAだった。また、90°Cの反応溶液から得た粉末の組成はCHA/HAで、その結晶子サイズは14 nmの低結晶性で、いずれも配位子由来の有機物を含有していた。このように、IDAのCa錯体を含む均一溶液から、反応温度に寄らず低結晶性アパタイトを短時間かつ高収率で得る方法を見出し、EDTA錯体系との相違点を考察した。

以上のように、Ca錯体を用いる新たなアパタイト粉末合成法によって、生成物中にIDAを含む低結晶性アパタイト粉末を得た。そこで、IDAの構造異性体で非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸のAspを配位子とするCa錯体を原料とするアパタイト合成を検討した。より安定度が低いにもかかわらず、AspのCa錯体水溶液にリン酸を添加しても、安定な均一溶液（以下「Ca-Asp- PO_4 三元系錯体水溶液」という。）を得ることができた。常温でアンモニアを添加して得られたアパタイト粉末は、結晶子サイズ13 nmの低結晶性CDHA/HAであった。また、90°Cに加熱したCa-Asp- PO_4 三元系錯体水溶液にアンモニアを添加して得た粉末は、同一の結晶子サイズのHA/CHAであった。いずれの生成物もAspを含み、アパタイトに対する物質質量換算の含有率はIDA系と等倍か2.7倍であった。

このように、従来の湿式法に比べて極めて短時間で、生成アパタイトの種類を選択的に効率よく合成できる方法を開発した。 Ca^{2+} イオンをブロックするアミノ酸錯体形成は、リン酸が共存する均一水溶液を調製する方法として有効であった。また、Ca-Asp- PO_4 三元系錯体の安

定度が、室温の水溶液中で生成する水酸アパタイトがCa欠損型と充足型に分岐する臨界点であることを見出した。

第3章 結晶性制御アパタイトと生分解性ポリマーの複合スキャフォールド

HAやTCP（三リン酸カルシウム）のCP粉末を生分解性ポリマーと複合化した成型材料がスキャフォールドとして注目され、その生体適合性や骨再生能が盛んに研究されている。一方で、いまだ明確な材料設計指針が得られていないだけでなく、CPの結晶性に着目した研究はなかった。そこで、第2章で合成した複数のアパタイトの結晶性が骨再生能に及ぼす影響を調べるために、新たな複合スキャフォールドを形成し、in vitroとin vivoで評価した。

マトリックスとして生分解性ポリマーPLGA（ポリ乳酸-グルコール酸共重合体、70/30）を選択し、多孔性アパタイト複合スキャフォールドについて、PBS（リン酸緩衝液）やHBSS（ハanks溶液）の疑似体液中でのスキャフォールド分解挙動とCP生成挙動を検討した。その結果、アパタイトの複合化は、PBS中でスキャフォールド分解速度を抑制でき、さらにHBSS中でCPの析出速度を高めることが分かった。また、繊維芽細胞や骨芽細胞の初期付着も良好で、材料に毒性がないことを確認した。さらに、EDTAのCa錯体から得た低結晶性CDHAと複合化したスキャフォールドのウサギ大腿骨への埋入試験によって、新生骨が4週間後から生成し始め、12週間後には形成骨が皮質骨に変化し、周辺組織と良好に結合することが分かった。また、12週間後の高結晶性CHA/CDHAの複合スキャフォールドは、欠損部の一部に新生骨を形成したものの、PLGA単独では新生骨を形成しなかった。このように、低結晶性アパタイトの複合化が、骨形成に対して有効なことが分かった。

一方、IDAとAspのCa錯体を經由した低結晶性アパタイト粉末を、PLGAをマトリックスとするスキャフォールドについて、in vivo試験を実施した。その結果、低結晶性アパタイトは溶解して残存していないにも関わらず、12週間後でも骨形成が不完全で、骨髄内部にPLGA由来の残存物が混入していた。本試験に用いたPLGAマトリックスの気孔率が96%で、先に検討したEDTA錯体系の92%よりも高かったために強度が低下し、アパタイト結晶を有効に保持できなかったことが不完全な骨再生の主要因と考えられる。このようにスキャフォールドの骨再生能には、気孔率に依存するマトリックス強度が著しく影響することが示された。

第4章 水溶液スプレー法の開発と形成CA薄膜評価

硬組織代替材料であるインプラントへのアパタイトコーティングの重要性を第1章で述べた。本章では、 Ca^{2+} イオンへの配位子としてアミノ酸より単純な炭酸イオンと、リン酸イオンを同時に配位したことが推定される新規な錯体を設計して、簡便にアパタイトを析出可能なコーティング水溶液合成を検討し、得られたアパタイト膜のCP析出について *in vitro* で評価した結果を記載した。

二酸化炭素を飽和させた炭酸水素カルシウム水溶液にリン酸を添加すると、安定な酸性水溶液、 $\text{Ca-CO}_3\text{-PO}_4$ 三元系錯体水溶液を調製できた。この水溶液でアパタイトを膜状に析出させ得るか検討し、簡便なスプレーによって成膜できる水溶液スプレー (ASC) 法を考案し、静電スプレー析出法などでは避けられない揮発性有機物 (VOC) の発生しないスプレー法を開発できた。5分間の短時間スプレーによる約 $1\text{ }\mu\text{m}$ の厚さからなる膜の化学組成が $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3) \cdot 2\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ であることを明らかにし、さらにこの膜を Ar 気流中 600°C で熱処理すると、組成が $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{CO}_3)(\text{OH}) \cdot \text{CO}_2$ に変化し、そのせん断強度が飛躍的に向上することも明らかにした。

ASC法では、水溶液のスプレー時間調整で膜厚を容易に制御でき、約 $0.1\text{ }\mu\text{m}$ の薄膜も得た。これらのCA膜表面は、径が $10\sim 15\text{ }\mu\text{m}$ の膜厚に寄らない網目状構造で、約 $0.3\text{ }\mu\text{m}$ の高さの隆起で区切られていた。これらのCA膜に対する骨芽様細胞MC3T3-E1の仮足伸展について評価したところ、網目径や隆起部の高さが重要な因子であった。

以上のように、新たなVOCフリーコーティング法を提案できただけでなく、ASC法によるCA形成メカニズムを考察したほか、前章で述べたスキャフォールドに要求される材料設計指針についてもいくつかの重要な知見を得て、本章で考察した。

第5章 アミノ酸のCa錯体を用いるアパタイト/ゼラチン複合スキャフォールドの形成

本章では、 Ca-Asp-PO_4 三元系錯体を含む水溶液を用いて、アパタイト含有ゼラチンスキャフォールドの簡便な作製方法を検討し、その結果を記載した。

60°C の Asp の Ca 錯体水溶液に医療用ゼラチンを溶解し、 37°C に冷却後 Ca/P 比 1.67 となるリン酸を添加して冷蔵保存したところ、透明なゲルが得られた。合成に当たっては、ゼラチンの溶解温度を考慮して、2章3節で述べた Ca-Asp-PO_4 三元系錯体水溶液合成法とは異なる

溶液調製法を用いたが、ゲル化前の反応水溶液は無色透明だった。このゲルの上層に、非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸である Arg の水溶液を静置したところ、固液界面からゲル内部に向かって白色結晶が析出した。 Ca-Asp-PO_4 水溶液と Arg との反応で得られた粉末は、HA/CDHA 混合物で、結晶子サイズは 15 nm の低結晶性であったことから、ゲル内部に析出した白色結晶はHA/CDHA 混合物と推定される。上層の水溶液を除去し、結晶が析出したゲルを凍結乾燥したアパタイト/ゼラチン複合成型体の気孔径は、細胞増殖に好適な $100\sim 300\text{ }\mu\text{m}$ で、すでに *in vivo* の評価に着手している。

このように、Asp が Ca^{2+} イオンに錯形成して、 Ca^{2+} イオンとリン酸との直接反応を防止した水溶液を固定化したゼラチンゲルは、Arg 水溶液と固液相間で反応し、自発的にアパタイトをゲル内部に析出した。反応や形成操作は極めて簡便で、アミノ酸錯体を応用する有効性を示すことができた。

第6章 総括

以上の各章に述べたように、従来アパタイト粉末合成や薄膜形成に用いられたことがほとんどなかったCa錯体を利用して、アパタイトの簡便な合成や成膜を達成し、さらに固液界面の錯体反応による新しいゼラチン複合スキャフォールド形成反応を達成した。これらの成果について、硬組織再生材料設計に指針を与える工学的な視点から、本章で研究を総括した。

論文審査要旨

本論文は、Ca錯体を用いてアパタイト粉末合成および薄膜を形成し、生体硬組織再生材料として応用した研究を全6章にまとめたものである。応用例に乏しかったCa錯体を利用し、通常リン酸と容易に結合する Ca^{2+} をブロックして直接反応を防止し、外部刺激でアパタイトが生じる水溶液系を設計して材料形成に応用した。細胞足場材料 (スキャフォールド) とインプラントのコーティングに適用して、各材料が生体硬組織再生に有効なことを示し、発展的な新分野を拓いた。

第1章には、生体硬組織再生用材料とアパタイトに関する研究背景と目的が述べられている。スキャフォールドを活用する組織工学と、インプラントの活用を含む再生医療の重要性が記載されている。これら生体材料は一般に高価で、汎用性に乏しいが、安全で安価な生体材料開発が社会の高齢化に伴って重要である。

第2章では、Ca錯体の水溶液中反応でアパタイト粉末の合成について検討し、工業的なアパタイト合成法が、

厳密なpH制御と長時間反応を要する欠点の克服を目指して検討した。合成に当たっては、Ca錯体の水溶液中での安定度に着目し、汎用有機多座配位子や天然アミノ酸を用い、リン酸イオンが共存する各錯体水溶液から短時間で均一組成のアパタイトを得る簡便な方法を確立し、その化学組成を詳細に検討した。

まず、EDTA錯体を原料として、超音波照射で低結晶性のCa欠損型水酸アパタイト（CDHA）を、高温反応で2種類のアパタイト混合粉末を選択的に得た。過酸化水素水を用いるものの、錯体の利用で、結晶性を制御した一定組成のアパタイト粉末の短時間合成を実現した。

次いで、イミノ二酢酸（IDA）錯体を用いて、より温和な条件下の反応を検討し、過酸化水素が不要で、低結晶性アパタイトを効率良く得る方法を見出した。

さらに、IDAの構造異性体で酸性アミノ酸のアスパラギン酸（Asp）を用いて、Ca-Asp-PO₄三元系錯体水溶液を得て、常温反応で低結晶性アパタイト粉末合成を達成した。このように、リン酸が共存する均一水溶液を調製するために、Caのアミノ酸錯体の有効性を見出し、選択的で、かつ効率の良い合成法を開発した。また、アスパラギン酸錯体の安定度が、室温水溶液中で水酸アパタイトがCa欠損型と充足型に分岐する臨界点であることを見出す特筆すべき成果を得た。

第3章では、2章で合成した結晶性制御アパタイトを複合化したスキヤフォールドを形成し、その評価結果を記述している。これら複合スキヤフォールドには未だ明確な設計指針がなく、複合化するアパタイトの結晶性に着目した研究として最初の例である。

生分解性のポリ乳酸-グルコール酸共重合体（PLGA）を用いた複合スキヤフォールドについて、疑似体液中での挙動をまず検討し、複合化が材料の分解を抑制し、またCa化合物析出速度を高め、さらに細胞の初期付着も良好なことを確認した。これを基に、複数の複合スキヤフォールドをウサギ大腿骨に埋入し、低結晶性アパタイトの複合化が新生骨形成に特に有効なことを明らかとした。また、スキヤフォールドの骨再生能には、マトリックス強度の影響も大きいことを明らかにした。

第4章では、炭酸イオンとリン酸イオンを同時に配位した三元系Ca錯体を設計して、簡便に膜形成できるコーティング水溶液の合成に成功し、インプラント材料のチタン板上に得たアパタイト膜についての評価結果が記載されている。

Ca-CO₃-PO₄三元系錯体水溶液を用いて、揮発性有機物を発生しないスプレー法を考案し、アパタイト膜形成メカニズムを考察した。5分間で約1 μ m厚の膜を形成し、さらに熱処理後の膜についても化学組成を明らかにして、そのせん断強度変化について結晶学的観点から考察した。また、特徴的な網目状構造をもつより薄い膜形成も達成し、網目隆起部高さが、細胞の伸展に重要なことを見出したほか、前章のスキヤフォールドに要求される材料設計指針についても、重要な知見を得て考察した。

第5章では、2章で合成したCa-Asp-PO₄三元系錯体水溶液を応用し、アパタイト含有ゼラチンスキヤフォールドの簡便な作製方法を検討した。まず、錯体水溶液と塩基性アミノ酸のアルギニン（Arg）との反応で得た粉末が、HA/CDHA混合物で、低結晶性であることを明らかとした。そこで、錯体水溶液と医療用ゼラチンから均一透明なゲルを得て、その上層にArg水溶液を静置し、界面からゲル内部に白色結晶を析出させる独創的な方法で、アパタイト/ゼラチン複合成型体の形成に成功した。気孔径は細胞増殖に好適で、動物へのスキヤフォールド埋入手術に適用可能なことを示した。スキヤフォールド形成操作は極めて簡便で、アミノ酸錯体を活用する有効性を示した。

第6章では、これらの成果について、工学的な視点から研究を総括し、さらに非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸の錯体が有効なことから、骨のリモデリング機構解明に関わる研究への発展性について考察した。

以上のように、本論文は、生体材料創成分野で利用例の少なかった金属錯体を活用した独創的な研究成果をまとめており、工学の分野において大きな成果を得たことが認められ、博士（工学）の学位を授与するに十分値するものである。