

氏名	かわごえ だいすけ 川 越 大 輔
授与学位	博士(学術)
学位記番号	学術(環)博第34号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院環境科学研究科(博士課程) 環境科学専攻
学位論文題目	放電プラズマ焼結によるリン酸カルシウム透明体の作製およびその生体親和性評価
指導教員	東北大学教授 石田 秀輝
研究指導教員	東北大学助教授 井奥 洪二
論文審査委員	主査 東北大学教授 石田 秀輝 東北大学教授 山崎 伸道 東北大学助教授 井奥 洪二 九州大学教授 石川 邦夫 (歯学研究院) 山口大学助教授 藤森 宏高 (大学院医学研究科)

## 論文内容要旨

### 第1章 序論

高齢化社会の到来に向け、生体内環境により適した材料の開発が求められている。金属あるいはセラミックスの人工骨は、生体骨と比較して低靱性、高弾性率であり、生体骨との力学的性質の差異が大きい。このため、長期間安定に使用するのは困難である。また、生物の自己修復能力には残念ながら限度があり、骨移植でもその採取量に限度がある。これに代わるものとして期待されるのが、骨髄細胞による骨組織の再生である。採取した間葉系幹細胞は増殖可能であり、骨芽細胞により骨基質を形成させ、この構築された骨組織を用いた骨組織再生が試みられている。

この骨再生医療を、安心して臨床応用するためには、細胞の性質と骨芽細胞への分化度、分化能力の確認が重要であり、材料と細胞の基礎的な性質の解明が必要である。そのためには、実際に細胞を培養する材料上での、細胞の直接的な観察が不可欠である。水酸アパタイト(HA)および $\beta$ -リン酸三カルシウム( $\beta$ -TCP)は、生体親和性の良い物質として知られ、細胞を培養する培体として期待されているが、今までに細胞培養試験に用いられてきたHAや $\beta$ -TCPは不透明なため、細胞を生きたまま直接観察することができなかった。このことから、HAおよび $\beta$ -TCP上での細胞の基礎的な性質を明らかにするためには、細胞培養に適したHA透明体および $\beta$ -TCP透明体の作製が必要であった。

また、これまでに各研究者が生体親和性の評価に用いたHAおよび $\beta$ -TCPの形状には特定の基準はなく、気孔率、粒子径、密度等が様々であり、材料と生体との関係を材料形状の影響を除外して考えることが困難であった。この点についても、透明緻密体には空隙が無いことから、空隙の影響を除外して材料の生体親和性について定量的に考えることが可能である。

以上より、培養骨の作製および生体親和性に関係する因子の定量的な解明のためには、HA 透明体および $\beta$ -TCP 透明体を作製することが重要と考え、従来にはない環境負荷の少ないプロセスでの透明体作製について検討した。

本章では背景として、HA および $\beta$ -TCP の焼結、透明体作製のための SPS 法、材料評価としての擬似体液(SBF)試験、細胞培養試験についてまとめ、培養骨の作製における HA 透明体および $\beta$ -TCP 透明体作製の重要性について明確にした。

## 第2章 放電プラズマ焼結による水酸基量を制御した水酸アパタイト透明体の作製

HA はその生体親和性の良さから、骨充填材、クロマトグラフィの充填材など、様々な分野において利用されている。しかし、その生体親和性が HA の何に依存しているのかという点については、いまだ明らかでない。

HA 中の OH 基を炭酸基に置換した HA と、置換していない OH 基のままの HA を用いて、細胞培養したところ、置換していない OH 基のままの HA の方が細胞増殖、細胞活性が良いという報告がある。また、血漿の無機成分を模擬した SBF 試験においても、Zr-OH、Ti-OH などに溶液中の  $\text{Ca}^{2+}$  が集まり、Zr-OH、Ti-OH などを持たないものに比べて、より多く骨類似アパタイトが析出していることが報告されている。

これらのことから、HA の骨親和性には、HA 中の OH 基が何らかの関係を持つと考えた。しかし、OH 基量に着目し OH 基量を制御した試料において評価がなされていないため、OH 基と骨親和性の関係について詳細には分かっていない。

本章では、OH 基と生体親和性の関係を考えるために、まず OH 基量を制御した HA 焼結体を作製することを試みた。ここで、OH 基量の制御は、焼結温度をうまく選択することにより行った。OH 基量を制御した HA 透明体の作製は、800 °C~1000 °C で熱間加圧成形(HP)と熱間等方圧成形(HIP)の組み合わせと SPS により行った。

900 °C で3 時間 HP した焼結体は、相対密度が 99 %以上の緻密体であり、さらに 900 °C で3 時間、HIP することにより、透光性を示した。900 °C、1000 °C で10 分間 SPS した焼結体は、透光性を示した。また、HA 焼結体に残存する OH 基量は焼結温度が高くなるにつれ減少した。

HP と HIP では二段階の焼結課程が必要であったのに対し、SPS は、一つの課程かつ 10 分間という極めて短い焼結時間で透明体を作製ができ環境負荷も小さいと考えられる。

また、原料粉末の特性は焼結に大きく影響を与える因子であり、水熱処理をした出発粉末から微細構造を持つ焼結体を作製されていることから、水熱処理 HA からの透明体作製を検討した。

200 °C で24 時間水熱処理した HA は、粒径約数百 nm の均一な非凝集性の微粒子であり、歪や組成変動はなく、凝集していないことから成形密度が高い。水熱処理をした HA 粉末からの焼結体の相対密度は、900 °C、1000 °C の焼結体ともにほぼ 100 %で透光性を示していた。また、相対密度、ビッカース硬度ともに水熱処理前の焼結体の方が高い値を示していることから、水熱処理前の HA 粉末に比べ、焼結性が良くなっていることが分かった。これは、水熱処理した HA が、非凝集性であること、大きさの均一な粒子であること、から成形密度が約 15 %程度高くなったことにより、緻密化が進んだと考えられる。

ここで、水熱処理をした HA が良い焼結性を示したことから、水熱処理前の HA に比べ、

低い温度で透明体を作製できる可能性があり、焼結体中により多く水酸基を残存できることが示唆された。

### 第3章 放電プラズマ焼結による $\beta$ -リン酸三カルシウム透明体の作製

$\beta$ -TCP は、HA と同様に生体親和性の良好な物質であり、生体内では徐々に吸収される材料として知られているが、材料形状の与える影響を除外した上での定量的検討はなされていない。そこで、本章では材料形状の影響を極力少なくすることができる形状を緻密体と考え、 $\beta$ -TCP 粉末を 800 °C~1000 °C、縦軸への加圧約 60 MPa、10 分間、昇温速度 25 °C $\cdot$ min<sup>-1</sup> で SPS した。

800 °C~1000 °C で SPS した焼結体は、すべて  $\beta$ -TCP の XRD パターンを示し、相対密度は、それぞれ 70 %、95 %、99 %であった。1000 °C で 10 分間 SPS した  $\beta$ -TCP 焼結体は透光性を示していた。走査型プローブ顕微鏡観察から、800 °C、900 °C の  $\beta$ -TCP 焼結体には空隙が観察されたのに対し、透明な  $\beta$ -TCP 焼結体には空隙は観察されず、平均粒子径は、1.5  $\mu$ m であった。

以上より、 $\beta$ -TCP と細胞の関係を調べるのに適した、 $\beta$ -TCP 透明体が作製できた。SPS は、従来の焼結法に比べ透明体作製に有効であった。

### 第4章 リン酸カルシウム透明体の擬似体液試験

人工材料が生体骨と結合する条件は材料表面に、ある種のアパタイト層を形成することであると報告されている。このアパタイトは CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>を含有した Ca 欠損組成のアパタイト (Ca/P < 1.67) であり、微粒子である点から骨のアパタイトと類似しており、それゆえ、このアパタイト層の表面では、繊維芽細胞より骨芽細胞の方が増殖、分化しやすいと言われている。そのため、周囲の骨はそのアパタイト層と直接接することができ、骨のアパタイトと材料表面のアパタイト層との間に化学結合が生じ、強く結合する。同様のアパタイトの形成は、細胞やタンパクなどの有機物を含まず、無機イオン濃度だけをヒトの細胞外液にほぼ等しくした SBF 中でも再現される。本研究で行った SBF 試験は生体外試験であり、生体内の複雑な系を単純化できる利点がある。

pH=7.25 の SBF に 2、14 週間浸漬した HA 焼結体の表面に析出した炭酸含有 HA の量は、1000 °C < 900 °C < 800 °C の順に多く、これは、HA 焼結体に残存する OH 基量とよく対応していた。

また、pH=7.25 の SBF に 2 週間浸漬した  $\beta$ -TCP には重量変化はなく、pH=5.0 の SBF に 2 週間浸漬した  $\beta$ -TCP の重量は減少していた。

以上より、作製した HA 透明体および  $\beta$ -TCP 透明体は、生体環境の無機化学反応を定量的に明らかにするのに適していると考えられる。

### 第5章 リン酸カルシウム透明体の細胞培養試験

SBF 試験が生体外の無機的試験であるのに対し、細胞培養試験は生体外の生物学的試験である。得られた HA 透明体および  $\beta$ -TCP 透明体を、無機化学的および生物学的な面から検討するために、ここでは、得られた透明体上での、ラット骨髄由来間葉系幹細胞の細胞培養試験について考察した。

骨芽細胞は、生体骨組織の表面に存在しており、この細胞を採取するのは困難であるとされている。これに比べて、骨芽細胞へ分化しうる間葉系幹細胞が含まれている骨髄細胞は、骨髄針を用いて採取可能であり、採取に関して骨組織をほとんど傷つけない。この採取した間葉系幹細胞は増殖可能であり、さらに、この間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させ、さらに、その骨芽細胞による骨基質形成も可能である。骨組織を用いての骨組織再生を行うためには、用いる細胞の性質と骨芽細胞への分化能力、分化度、など、材料上での細胞の基礎的な挙動の解明が必要となってくる。しかし、通常の透光性を示さない試験試料は、直接透過光を利用した細胞観察ができないため、細胞挙動をリアルタイム観察することができずにいた。そのため本研究では細胞培養に適した透明体を作製することを目的とし、2章、3章において10分間という短い焼結時間、一つのプロセスで細胞培養に適したHA透明体および $\beta$ -TCP透明体を作製した。

本章では、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門大串始博士の研究グループと共同して行った研究を基にして、SPS法により作製したリン酸カルシウム透明体上での、ラット骨髄由来間葉系幹細胞由来の細胞培養試に関する検討結果について述べた。

SPS法により作製したHA透明体および $\beta$ -TCP透明体上で、世界で初めてラット骨髄由来間葉系幹細胞を生きたまま観察できた。また、分化誘導後の間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化していることが確認できた。HA透明体および $\beta$ -TCP透明体は、骨組織再生を目指した細胞培養の培体として優れており、細胞挙動の定量的な評価も可能であると考えられる。

## 第6章 総合考察

人工骨ならびに経皮端子のような関連素材を対象とした生体材料にとって、空隙は非常に大きい因子であり、HAにおいては、OH基以外に生体挙動に影響を与える因子として、特に空隙、結晶性、化学的特性の影響も考えられる。材料の性質を明らかにするためには、これらの因子を除外もしくは制御し、生体への材料の影響を評価することが重要である。

これらの生体親和性に関係する因子の解明に適したバイオセラミックスとして、本研究で作製した空隙の全くないリン酸カルシウム透明緻密体を提案した。この新規なバイオセラミックスを用いることにより、材料形状の影響により見えなかった隠れた材料特性の発見やうまく整合のとれなかった研究者間のデータの定量的な比較が可能となり、QOL向上のために生体環境での応用を目指した培養骨の開発に貢献できると考える。

本研究では、SPS法によって世界で初めてHA透明体および $\beta$ -TCP透明体の作製に成功した。さらに、今回作製に成功したリン酸カルシウム透明体は、新しい可能性として人工透析治療において体内と体外をつなぐ役割をする経皮端子に用いることが考えられる。特に透過光を用いた血糖値の測定、薬剤投与、透析の自動化が可能となり、予防医学への応用が大いに期待できる。

## 第7章 結論

本研究を通して得られた知見を要約して総括した。

# 論文審査結果の要旨

人類史上経験したことのない高齢化社会を迎える我が国において、生体内環境で使用する材料の果たす役割は大きい。特に、高齢化社会を支える鍵となる骨組織の再生を実現するためには、細胞と材料との界面反応を十分に理解する必要がある。候補となる材料としては、リン酸カルシウムセラミックスが有力であり、特に、細胞挙動を確認しやすい透明体を作製することに意義がある。具体的には、水酸アパタイト (HA) 及び $\beta$ -リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) の透明体上において細胞挙動を精密に検討し、制御する必要がある。本研究では、放電プラズマ焼結 (SPS) 法によって HA および $\beta$ -TCP 透明体を世界に先駆けて作製し、材料科学的評価および生化学的評価を行った。論文は、全7章で構成されている。

第1章では、本研究の背景および目的を述べている。

第2章「放電プラズマ焼結による水酸基量を制御した水酸アパタイト透明体の作製」では、HAの骨親和性を制御するためにOH基量を制御したHA透明体の作製について検討した。SPSでは、900°C、1000°Cで60MPaの加圧下、10分間というきわめて短い焼結時間でHA透明体の作製が可能であった。また、HA透明体のOH基量は焼結温度が高くなるにつれ減少することを明らかにした。さらに、出発試料として200°Cで24時間水熱処理したHA粉体が良い焼結性を示したことから、出発試料の制御によって透明体中のOH基を制御する範囲を拡大できる可能性を示した。

第3章「放電プラズマ焼結による $\beta$ -リン酸三カルシウム透明体の作製」では、細胞培養試験の観察に適した $\beta$ -TCP透明体の作製について検討した。1000°C、60MPa、10分間SPSした $\beta$ -TCP焼結体は、透光性を示した。この $\beta$ -TCP透明体に空隙は認められず、 $\beta$ -TCP上での細胞活動を調べるのに適した $\beta$ -TCP透明体であると判断した。SPSが、従来の焼結法と比較して、透明体の作製に有力な方法であることを示した。

第4章「リン酸カルシウム透明体の疑似体液試験」では、作製したHA透明体および $\beta$ -TCP透明体のSBF試験を行った。無機イオン濃度について、ヒトの細胞外液にほぼ等しくしたSBF中へHA透明体および $\beta$ -TCP透明体を浸漬した。pH=7.25のSBFに2~14週間浸漬したHA焼結体の表面には炭酸含有HAの析出が認められた。析出量は、1000°C<900°C<800°Cであり、HA焼結体に残存するOH基量とよく対応していることを示した。一方、 $\beta$ -TCPにおいては、pH=7.25のSBFに浸漬してもほとんど析出はなく、pH=5.0のSBFでは $\beta$ -TCPの重量減少が認められた。作製したHAおよび $\beta$ -TCP透明体は、SBF試験において明確な違いを示し、生体環境における無機化学的反応を検討するために好適な試料と考えられる。

第5章「リン酸カルシウム透明体の細胞培養試験」では、産業技術総合研究所大串始博士の研究グループと共同して行った細胞培養試験について検討した。SPSにより作製した透明体を用いることにより、生きたままのラット間葉系幹細胞の観察を世界で初めて可能にした。細胞挙動の連続観察によって、HA透明体および $\beta$ -TCP透明体は、骨組織再生を目指す細胞培養の培体として優れていることが結論付けられた。さらに、HAと $\beta$ -TCPは、材料形状の工夫によって培養骨の足場材料(スキャホールド)として使用できる可能性が高いことを示した。

第6章「総合討論」では、材料性状が生体親和性に及ぼす影響として、空隙、結晶性、化学特性についてまとめ、本研究で作製した透明緻密体を用いた生体親和性評価の有効性について述べた。さらに、作製プロセスの工夫によって材料を高機能化できる可能性について示し、特に、透明体の予防医学を目指した経皮端子への応用について述べた。

第7章「総括」では、本研究で得られた内容を要約し、総括している。

以上のように、本論文は、生体環境で使用する材料の開発および評価を行い、人類のQOL向上に寄与する新規な結果を示したものであり、環境科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(学術)の学位論文として合格と認める。

