

骨代謝に完全に 取り込まれる 柔らかい骨補填材

Soft Bone Void Fillers Completely Incorporated into Bone Remodeling Process

Key-words : Hydroxyapatite, Collagen, Bone-like nanocomposite, Bone void fillers

菊池 正紀

Masanori KIKUCHI (National Institute for Materials Science)

1. はじめに

生体活性セラミックス (bioactive ceramics) は骨と直接結合することが知られており¹⁾、代表的な材料には、水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, hydroxyapatite: HAp), β -リン酸三カルシウム (β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, β -tricalcium phosphate: β -TCP), Bioglass[®], A-W 結晶化ガラスなどがある。これらの材料は、20世紀中は、HApのような生体では実質上溶けない生体内非溶解性と、 β -TCPのような生体内溶解性であるかによって区別がされてきた。骨を食べる細胞である破骨細胞を、HApセラミックスなどの上で培養して、これらのセラミックスも破骨細胞で溶解されることは報告されていた。しかし生体内での破骨細胞によるHApの吸収はMüllerら²⁾やTakikawaらの報告³⁾などの部分的吸収に関する知見があるのみであった。さらに、本来アパタイトナノ結晶とコラーゲン分子のナノ複合体である骨と異なり、これらセラミックスは硬くてもろく、材料が生体内に残存すると、そこを起点に二次骨折などが起きやすい。そこで、これらの欠点を改良しようとする試みは、3つの方向に向かって進んできたと考えられる。一つは、 β -TCP多孔体の物性(結晶性、焼結性、気孔構造など)の制御による、生体内での早期溶解吸収を狙ったもの(オスフェリオン[®]はこれに当たると考えられる)。二つ目は気孔率を向上させ、内部に骨組織をしっかりと侵入させることで、セラミックスが応力をほとんど受け止めないか、受け止めて壊れても周囲の骨組織で補完することを狙ったもの(ネオボーン[®]、リジェノス[®]はもちろん、最初期はアパセラム-AX[®]もそれであったと考えられる)。三つ目は、ポリマーと複合化し、骨と似た機械的性質

を狙ったもの(スーパーフィクソープ[®]は溶解吸収性も狙っているが、HAPEX[®]をはじめ、初期の複合体はすべてこれを狙ったと考えられる)である。

このような流れの中で、筆者も β -TCPとポリ乳酸系共重合体を熱混練法で材料を複合化し、骨誘導再生法(guided bone regeneration: GBR. 骨欠損部を遮断膜で覆い、欠損部を速やかに埋めようとする働きを持つ癒痕組織の侵入を防いで骨を再生させる手法で、いわゆる骨誘導 osteoinduction ではない)などへの応用を検討している⁴⁾。本特集で執筆されている春日らのグループや鶴沼らのグループなどをはじめ、セラミックス系、ポリマー系の両方の研究分野からセラミックスとポリマーの複合体が報告されてきた。例えば、筆者の作製した材料は、熱可塑性を持ち、重量比でセラミックスを80%(体積比でセラミックスがポリマーの約1.5倍)含んでいても、一見プラスチックのように見え、粘弾性が認められる、柔らかいセラミックスの先駆けの一つである。

2. 自己組織化 (self-organization) による水酸アパタイト/コラーゲン骨類似ナノ複合体の合成⁵⁾

骨は非化学量論的炭酸含有水酸アパタイトとコラーゲンを主としたナノ複合体である。そこで、HApとコラーゲンの複合体も、単純な混合物⁶⁾や、コラーゲンスポンジ中のコラーゲン線維にHApを沈着させる⁷⁾というような研究が数多く報告されている。これらの材料は、生体内での一定の吸収性は示していたものの、骨の一次構造であるHApのナノ結晶とコラーゲン線維が配向したナノ構造が実現できておらず、機械的性質や骨内反応などが、期待された性能とはかけ離れた部分も多かった。骨のナノ構造はもちろん、細胞の動きがあって作られており、コラーゲン前駆体の分泌、コラーゲンの生成と線維化、アパタイトの沈着というプロセスで形成されているとされている。しかし、HApナノ結晶は長さ方向で精々40nm、コラーゲン線維は300nmの長さを持つ分子であるので、細胞の仮足(偽足とも言う。アメーバのように細胞が移動するときなどに形成する突起)で並べることは、まず不可能であると考えられる。と言うのも、大きさの比で言えば、我々が指先で砂粒を綺麗に並べるのと同じことになるからである。そこで筆者らは、細胞の役割が原材料の供給だけではなく、骨ができる化学的環境の整備にもあると仮定した。

HApは塩基性リン酸カルシウムであるので、湿式合成系で安定な生成領域はpHで9程度である。また、

コラーゲンが線維化するために必要な等電点は pH で 7~9 の範囲にあるとされている。また、コラーゲンの線維化は変成温度近傍の 37℃ で最も促進される。そこで、図 1 のような装置を考案し、温度を制御した合成槽の中に、原料がチューブポンプで徐々に滴下されていくようにした。この時、チューブポンプを pH コントローラで制御することで、任意の pH 近傍（ほとんどの条件で、指定 pH ± 0.5 程度の制御が可能）で合成が可能である。本装置を用いて HAp とコラーゲンの線維化が同時に起こる条件を検討したところ、pH が 9 で湯浴の温度が 40℃ の条件で最も安定に水酸アパタイト／コラーゲン骨類似ナノ複合体（HAp/Col）線維が得られることが明らかとなった。また、この時の HAp/Col 重量比は少なくとも 5/5 から 9/1 の範囲で調整することが可能であったが、コラーゲンの価格や後述する粘弾性のことも考慮し、HAp/Col

の基本重量比は 4/1 で調整することとしている。

得られた HAp/Col を圧縮脱水して得た緻密体を、イヌの脛骨の長さ 2cm にわたる完全離断部に埋入して 12 週間観察したところ、図 2 の通り、HAp/Col はほとんど吸収されて無くなっており、吸収窩には新生骨ができていたことがわかった。この時、HAp/Col 上には破骨細胞と見られる酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性を示す多核巨細胞が認められ、吸収窩を挟んだ新生骨面には、骨を作る骨芽細胞と見られるアルカリ性フォスファターゼ活性を示す細胞が並んでいることがわかった。このような観察像は、自分の骨（自家骨）を移植したときなどに見られる骨リモデリングプロセスを示唆するものであり、HAp/Col はそれに取り込まれて骨に置換していく世界初の材料であることが明らかとなった。

これ以来、生体内でも骨補填材料が破骨細胞で吸収され、骨リモデリングプロセスに取り込まれるということが一般化したとみられ、これ以降、β-TCP をはじめとする生体活性セラミックスの吸収も、単純な溶解だけではなく、破骨細胞性の吸収にも拠ることが常識となっている。



図 1 合成装置のセットアップ。左のフラスコの上が水酸化カルシウム懸濁液、下がコラーゲンを分散したリン撒水溶液。中央にチューブポンプ 2 台とそれを制御する pH コントローラ、右に恒温槽と攪拌機、合成容器が見える。

3. スポンジ状の多孔体^{8),9)}

前述の通り、HAp/Col は骨リモデリングプロセスに完全にに取り込まれる材料であるということがわかったものの、医師や再生医療の研究者からは、HAp/Col 多孔体作製への強い要望が寄せられた。しかし、HAp/Col 線維を単純に凍結乾燥させると、その高い含水率から図 3 のような綿状あるいは網状の乾燥帯しか得られない。また、実用化を勘案すると、HAp とコラーゲン以外の物質を添加することは可能な限り避けたい。

そこで筆者らは、乾燥した HAp/Col に少量のコラーゲンを添加し、そのコラーゲンを HAp/Col とともにゲル化することで、HAp/Col をコラーゲン線維で固定し、凍結時に氷晶成長とともに移動しないようにすることで、均質な HAp/Col 多孔体を作製することに

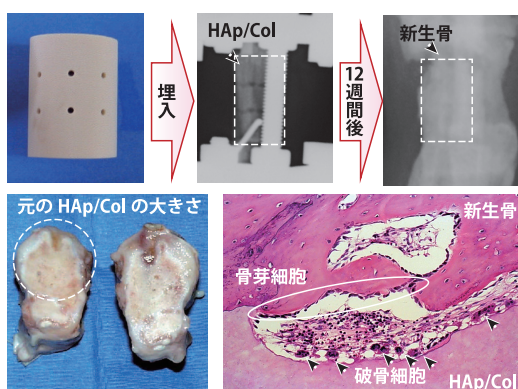


図 2 左上の HAp/Col を埋入すると、真ん中のレントゲンのように HAp/Col が薄く見える。その 12 週間後には同じ場所がしっかりと白く見え、HAp/Col が吸収され骨ができていくことがわかる。左下の 12 週後の裸眼観察でも HAp/Col らしき部分が全く見えず、右下のように顕微鏡で観察するとわずかに残った HAp/Col が、骨を食べる破骨細胞で吸収を受けている様子がわかる。



図 3 合成した HAp/Col 線維を凍結乾燥して得られる綿状の HAp/Col。

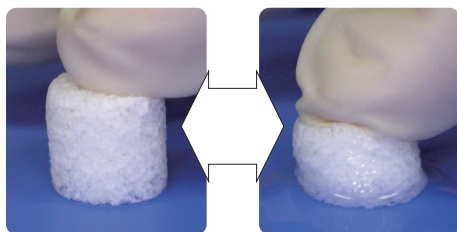


図4 スポンジ状の粘弾性を示す HAp/Col 多孔体.

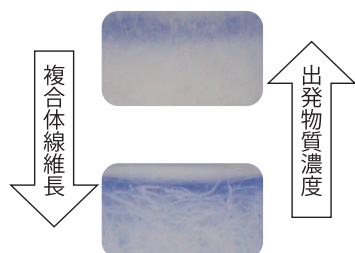


図5 合成条件と HAp/Col 線維長.

成功した。得られた多孔体は、HAp/Col がコラーゲン分子上に均一に配向して複合化していることから、含水状態で、図4のようにスポンジのような粘弾性を示す。これは、単純な HAp とコラーゲンの混合物やコラーゲン線維上への HAp の沈着では見られないため、ナノ複合化によって初めて現れる物性であると考えられる。

この材料は、整形外科医の協力もあり、2013年4月にリフィット[®]として上市されている。使用している医師からの評判も上々のようで、自家骨の併用をしないでも十分な骨再生が認められるような臨床例も報告されている。さらに、整形外科だけではなく、歯科医師にも注目されており、人工歯根インプラントに先立って、不足した顎骨を造成するための顎堤挙上において、HAp や β -TCP と比較して有効であるとの報告がなされている¹⁰⁾。

4. ろ紙のようなシート¹¹⁾

HAp/Col は出発物質の濃度や滴下速度を制御することで、図5のように複合体線維の長さを制御することもできることがわかった。これらの線維を混ぜ合わせて紙すきやろ過をすると、図6のようなろ紙のようなシートを得ることができる。さすがに完全に紙のようには行かないものの、乾燥状態でも図7に示す程度の柔軟性がある。HAp/Col シートは先に述べた β -TCP とポリ乳酸系共重合体の膜にラミネート加工するように接着させることや、図7のように緻密体と多孔体の二重構造の骨補填材を作ることでも可能である¹²⁾。

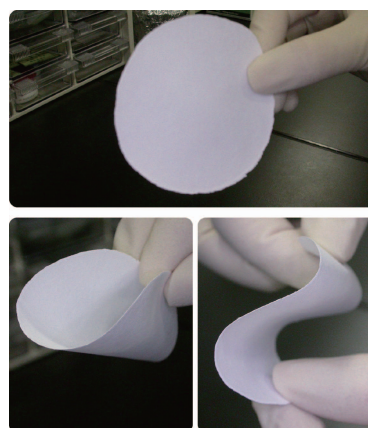


図6 ろ紙のような HAp/Col シート.

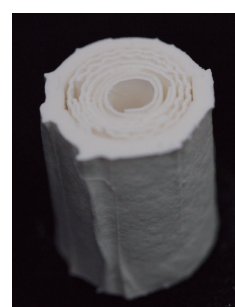


図7 シートを変形・加工して作製したコアシェル型人工骨.

5. 硬化後に粘弾性を持つ自己硬化型ペースト

市販のアパタイトセメントは、低侵襲治療に応用できることや形態付与の柔軟性から、世界中で使用されている。このセメントは、水溶液中で最も安定なリン酸カルシウムが HAp であることを利用した自己硬化型ペーストであるため、生体親和性は高いものの、硬さやもろさはもちろん、強度や生体内での骨への置換性の悪さなど問題も多い。そこで、筆者らは近年、骨への置換性や生体親和性が高い HAp/Col を低侵襲治療などに応用できないかと考え、自己硬化型のペーストの作製を試みている。HAp/Col の機能は HAp と Col のナノ構造に由来しているため、従来のセメント硬化手法は使うことができない。そこで、硬化剤としてアルギン酸ナトリウムや^{13),14)}、シランカップリング剤である(3-グリシドキシプロピル)トリメトキシシランを用いた自己硬化型ペーストを作製した。得られたペーストは図8のように1.8mm径のシリンジからの注入が可能で、30分程度で HAp/Col 含有ハイドロゲルとして硬化し、粘弾性を示すものが得られている。いずれも細胞培養試験の結果は良好であった。

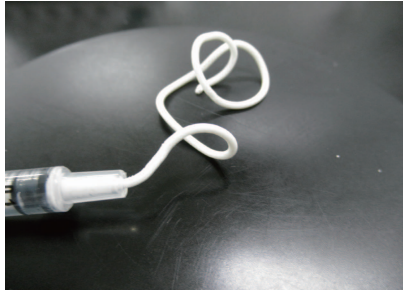


図8 自己硬化型 HAp/Col インジェクタブルペースト。

6. おわりに

骨類似のナノ構造を持った HAp/Col は骨と同様の粘弾性を示す材料であると同時に、細胞に「骨」と認識され代謝される材料であり、ナノレベルの複合化が、材料の持つ本来の生物学的性能を引き出すことを示す、という点でも興味深い材料であろう。このような生体模倣型ナノ複合化材料は今後さまざまな分野で実用化されることが期待される。

文 献

- 1) M. Neo, T. Nakamura, C. Ohtsuki, T. Kokubo and T. Yamamuro, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 999-1006 (1993).
- 2) C. M. Müller-Mai, C. Voigt and U. Gross, *Scanning Microscopy*, **4**, 613-624 (1990).
- 3) K. Takikawa and M. Akao, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **7**, 439-445 (1996).
- 4) M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Yamada, Y. Imamura, T.

- Okada, N. Shirahama, K. Akita, K. Takakuda and J. Tanaka, *Biomaterials*, **25**, 5979-5986 (2004).
- 5) M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya and J. Tanaka, *Biomaterials*, **22**, 1705-1711 (2001).
- 6) D. R. Mehlisch, A. S. Leider and W. E. Roberts, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **70**, 685-692 (1990).
- 7) K. S. TenHuisen, R. I. Martin, M. Klimkiewicz and P. W. Brown, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 803-810 (1995).
- 8) M. Kikuchi, T. Ikoma, D. Syoji, H. N. Matsumoto, Y. Koyama, S. Itoh, K. Takakuda, K. Shinomiya and J. Tanaka, *Key Eng. Mater.*, **254-256**, 561-564 (2004).
- 9) T. Yoshida, M. Kikuchi, Y. Koyama and K. Takakuda, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, **21**, 1263-1272 (2010).
- 10) 大場誠悟, 江頭寿洋, 中谷佑哉, 住田吉慶, 朝比奈 泉, *日本口腔インプラント学会誌*, **28**[suppl.], 277 (2015).
- 11) M. Kikuchi, T. Ikoma, Y. Asou, Y. Koyama, S. Itoh, K. Takakuda, K. Shinomiya and J. Tanaka, *Proc. 6th Int'l Conf. Intelligent Mater. Sys.*, 97-98 (2005).
- 12) K. Aoki, K. Edamura, Y. Koyama, M. Kikuchi and S. Tanaka, *Bioceram.*, **22**, 753-756 (2009).
- 13) T. Sato, K. Akinori, Y. Shirotsaki, S. Hayakawa, M. Aizawa, A. Osaka and M. Kikuchi, *J. Ceram. Soc. Japan*, **121**, 775-781 (2013).
- 14) T. Sato, M. Kikuchi and M. Aizawa, *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, DOI: 10.1007/s10856-017-5853-3, (2017).

筆者紹介

菊池 正紀 (きくち まさのり)

1995年早稲田大学大学院資源および材料工学専攻博士後期課程修了、博士(工学)。早稲田大学理工学総合研究センター客員研究員、ハーバード大医学部客員研究員などを経て、現職(グループリーダー)。専門はリン酸カルシウム系材料。

[連絡先] 〒305-0044 茨城県つくば市並木1-1 国立研究開発法人物質・材料研究機構

E-mail : KIKUCHI.Masanori@nims.go.jp