

層状構造をもつ無機化合物を応用した 医用機能材料の創製

中村 仁*

1. はじめに

骨組織は運動機能の中枢を担う臓器であり、損傷した骨組織を速やかに修復する材料の創出はとくに超高齢社会における健康寿命の延長に直結する。事故や疾病に伴う自己治癒の困難な骨損傷は、骨移植によって修復される。自家骨が主な移植片であるが、採取による健常部の損傷や採取量の制限があり人工の骨修復材料が併用されている。リン酸やケイ酸を含む化合物には骨と化学的に結合するものがあり、骨修復材料として用いられる。しかしながら、宿主由来の組織からなる自家骨に比べて組織再生を誘引する能力が乏しい。そのため、積極的な組織再生の誘引や細菌感染の抑止などの機能を備えた骨修復材料が求められている。人工材料に骨組織再生を導く機能を与える因子として、骨形成を促すタンパク質や薬剤、生命機能を司る無機イオンが注目されてきた。無機イオンの例としては水溶性のケイ酸イオン種やコバルトイオンがあり、これらは特定の元素濃度域において細胞の骨組織形成に向けた成熟(分化)や低酸素応答に寄与し組織再生を促す⁽¹⁾⁽²⁾。

筆者らは、これらの因子を組織再生に好適な濃度と期間で徐放する骨修復材料を創ることで、生体の自己治癒に呼応した組織修復の促進が可能になるとの考えから、ケイ酸やリン酸を含む無機化合物を骨格構造として、生体内での活動に必要な無機イオンを複合化した材料の構築に取り組んできた。ここではその一端をご紹介します。

2. 有機修飾された層状ケイ酸カルシウムからのイオン徐放制御

ケイ酸カルシウムを主要成分とするガラス(Bioglass® 45S5, 組成: 45 wt% SiO₂, 24.5 wt% CaO, 24.5 wt% Na₂O, 6.0 wt% P₂O₅)がヒトの骨組織と結合する現象が見出されて以来、ケイ酸カルシウム化合物は人工骨の重要な構成要素となっている⁽³⁾。この種の化合物は生体内で体液と反応し、ハイドロキシアパタイトを形成する特性をもつ⁽⁴⁾。これらのハイドロキシアパタイトを介して、骨組織との結合が生じる。これは、カルシウムイオンが周囲の体液に溶け出し、ハイドロキシアパタイトに対する過飽和度を高めることで実現できる。さらに、ケイ酸カルシウム化合物と体液との反応により溶出される水溶性のイオン種は、骨芽細胞を遺伝的に刺激し、増殖、分化、石灰化をもたらすことが知られている⁽⁵⁾⁽⁶⁾。

ケイ酸カルシウム水和物(C-S-H, Ca_xSi_yO_{x+2y}·zH₂O)は、CaO多面体と直鎖状のケイ酸からなる数原子分の厚さを持つ層(図1)が、イオンとの静電相互作用や水素結合により積み重なった異方性の結晶構造をもつ⁽⁷⁾。C-S-Hの層間にはシラノール基が存在し、層間のナノ構造の形成に寄与する。さらに、任意のオルガノシランを出発原料に用いることで、層間距離が柔軟に変化し、有機官能基を層間に組み込むことが可能である。従来、1種類の有機官能基を修飾した層状ケイ酸カルシウム(有機修飾LCS)を沈殿プロセスにより合成できることが報告されており⁽⁸⁾⁽⁹⁾、層状カルシウムケイ酸塩の層間距離は、オルガノシラン分子の有機鎖長に伴って直線的に増加することが報告されている。しかし、これまで2種類の有機官能基を用いて有機修飾LCSを合成した報告は

* 九州工業大学大学院生命工学研究科; 准教授(〒808-0196 北九州市若松区ひびきの2-4)

Preparation of Medical Functional Materials Using Inorganic Compounds With Layered Structures; Jin Nakamura (Kyushu Institute of Technology, Kitakyushu)

Keywords: *medical functional material, layered compound, organic-inorganic hybrid, therapeutic inorganic ions, ion release, calcium silicate, zirconium phosphate*

2022年9月17日受理[doi:10.2320/materia.61.750]

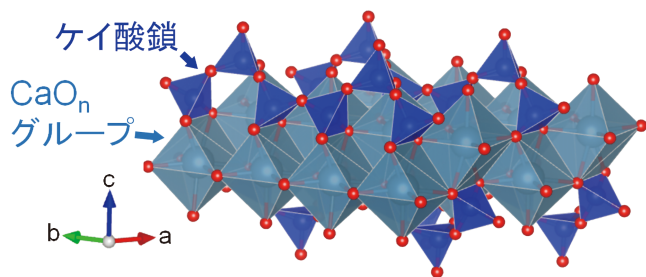


図1 ケイ酸カルシウム層の構造。(オンラインカラー)

ない。筆者らは、層状ケイ酸カルシウムを2種の有機官能基で修飾し、その比率を変えることで層間距離や疎水性を連続的に変化させ、体液に対する化学耐久性を制御できるとの考えから、層間に2種の有機官能基を任意の比率で組み込むことによる、有機修飾LCSからの水溶性イオン種の徐放制御を試みた⁽¹⁰⁾。

従来法である沈殿プロセスにて2種のオルガノシランを用いると、両者の縮合速度の違いから、一方のみが単独で縮合した副生成物が生じ、層状構造の化合物が生成しないことが分かった。筆者らは、2種のオルガノシランと硝酸カルシウムを出発原料に用いてソルボサーマル手法(図2左)により合成できることを示した。ここでは、アミノプロピルトリエトキシシラン(APS, $\text{NH}_2\text{C}_3\text{H}_6\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$)、フェニルトリエトキシシラン(PhS, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$)および硝酸カルシウム四水和物を出発原料に用いた。APS:PhSの仕込み比率は $(100-x):x$ (mol ratio, $x=0, 25, 50, 75, 100$)とした。有機官能基の脱離を抑制しながらシラン分子の相溶性を高めるため、これらを120°Cの水-エタノール混合溶媒中でソルボサーマル合成を実施した。比較試料のC-S-Hは、同様の手法でテトラエトキシシラン($\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$)をケイ素源として用いることで作製した。

得られた試料のフーリエ変換赤外分光(FT-IR)スペクト

ル(図3(a))よりアミノプロピル基のN-HとC-H結合、およびフェニル基のC-H結合に由来するピークが検出された。さらに、全オルガノシラン中のPhSの仕込み比率を0~100 mol%で増大させると、PhS由来のピーク比強度も増大する傾向がみられた。元素分析からもこれらの有機官能基の含有比率がほぼ仕込み組成に従うことが分かった。試料の粉末XRDパターンを図3(b)に示す。C-S-Hの29°および51°の回折ピークはAPSおよびPhSを用いて作製した複合材料においても検出された。これらは層の周期構造に起因する回折であり、両者が同様の構造の層を含むことを示す。さらに、2~10°の回折ピーク(※印)は層状化合物の層間距離に起因する回折であり、複合材料の層間距離(1.5~1.9 nm)はC-S-H(1.3 nm)より拡大していることが示された。C-S-Hでは特徴的な直鎖状のケイ酸が層の形成に寄与している。本手法で得た複合材料の核磁気共鳴法(NMR)スペクトルからはオルガノシラン由来のSi原子が隣接する2個のSi原子と酸素を介して結合した構造が検出され、直鎖状の有機修飾ケイ酸が含まれることが明らかになった。以上の結果から、図2右側に示すようなアミノ基およびフェニル基が層間に導入された有機修飾LCSが形成したことが示された。

この材料は体液中において層が徐々に加水分解し、水溶性ケイ酸イオン種とカルシウムイオンを溶出する。オルガノシランの仕込み組成が異なる5種の有機修飾LCSをトリス塩酸緩衝溶液に浸漬(36.5°C, 24 h, 100 mg/10 ml)し、溶液中におけるSiおよびCa元素濃度を誘導結合プラズマ原子発光分光分析(ICP-AES)で測定した。出発原料中のPhSの仕込みモル比と溶液中の各元素濃度の関係を図3(c)に示す。両元素の溶出量は、PhSの仕込み比率を0 mol%から75 mol%まで段階的に増加させることに伴い減少した。このことから、有機修飾LCS中の有機官能基の種類と修飾比率により化学耐久性を変化させることで、複合材料からのイオン徐放制御が可能であった。材料中に含まれる直鎖状ケイ酸の鎖長は、有機修飾に伴い短縮されることも分かっており、溶

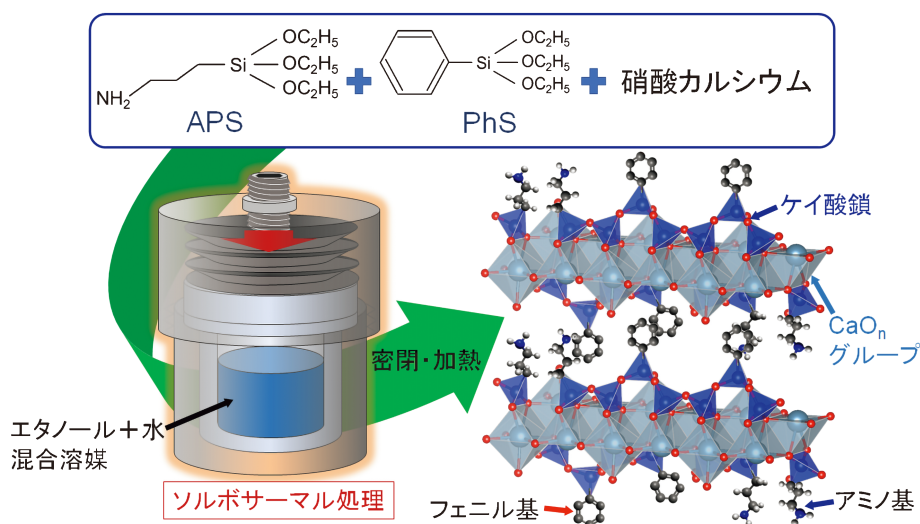


図2 (左)ソルボサーマル合成と(右)有機修飾層状ケイ酸カルシウムの構造の模式図。(オンラインカラー)

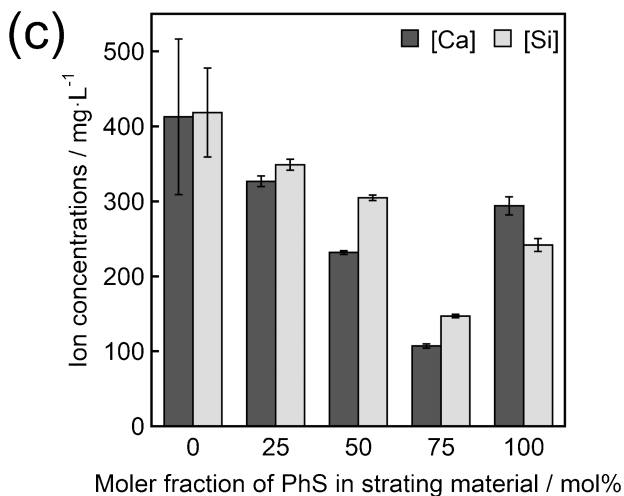
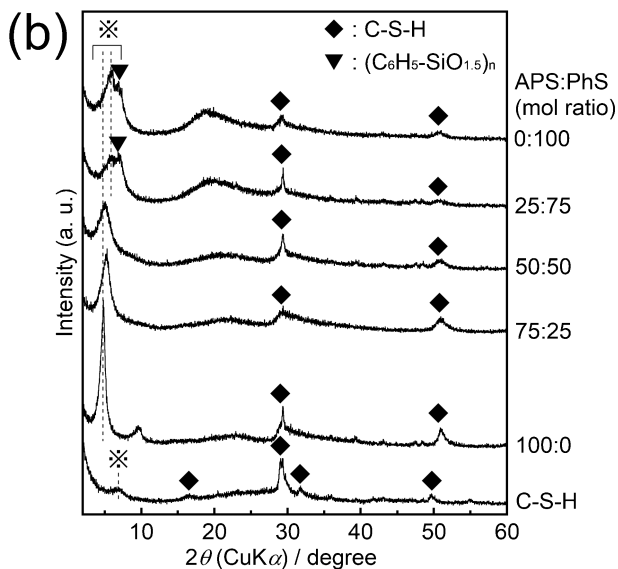
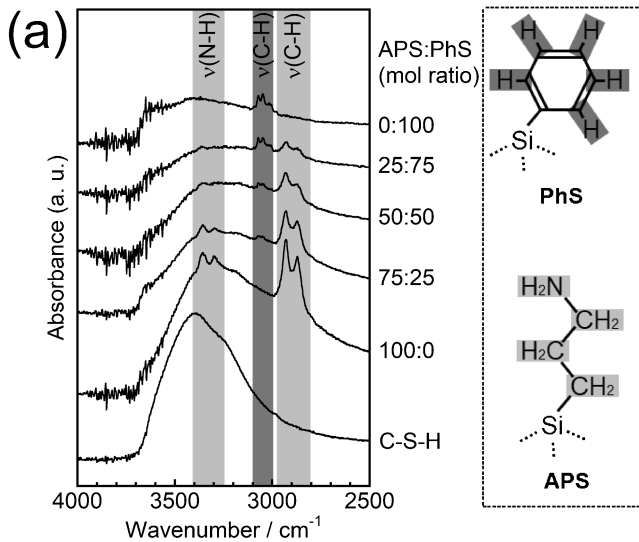


図3 有機修飾層状ケイ酸カルシウムとケイ酸カルシウム水和物(C-S-H)の(a) FT-IR スペクトル, (b) 粉末 XRD パターンおよび (c) 有機修飾 LCS を浸漬した緩衝溶液中の元素濃度(いずれも文献(10)より改変).

出物の分子サイズや哺乳類細胞応答との相関について現在検討を進めている。

3. 層状リン酸ジルコニウムの有機修飾による化学耐久性の向上

リン酸層状化合物は異方性の構造をもつ代表的なリン酸化合物の一つであり、なかでもオルトリン酸層状化合物(α 型: $M^{IV}(HPO_4)_2 \cdot H_2O$, γ 型: $M^{IV}(H_2PO_4)(PO_4) \cdot 2H_2O$, M^{IV} : 四価金属)については幅広い研究報告がある⁽¹¹⁾⁻⁽¹³⁾。著者らは、ジルコニウムを含む合金やジルコニアセラミックスなどの生体材料用基材との複合化の見込み、 α 型リン酸ジルコニウム(LZP, $Zr(HPO_4)_2 \cdot H_2O$)について注目してきた。この化合物はジルコニウム原子とリン酸グループからなる層(図4)が水分子を介して積み重ねられた層状化合物である。LZPの層間はリン酸基(-PO-H⁺)に富み、イオン交換反応に基づいて種々の無機イオンを担持可能である⁽¹¹⁾⁽¹⁴⁾。他方で、体液などのイオンに富む水溶液中に浸した際、層間に水溶液由来の無機イオンやイオン性分子が挿入されることで膨潤と層間剥離が生じる。LZPに生命機能を司る無機イオンを組み込み、それらを徐放する骨格として層状リン酸化合物を用いる上で、化学耐久性を向上させることが重要となる。筆者らは、LZPの層間に種々の割合でフェニル基を導入することで化学耐久性の向上をめざした⁽¹⁵⁾。

フェニル修飾層状リン酸ジルコニウム(LZPh)は、オキシ塩化ジルコニウム(ZOC)とリン酸(PA)、フェニルホスホン酸(PhPA)を出発原料とした還元法により合成した。PA:PhPAの仕込み比率は(100-x):x(mol ratio, x=25, 50, 75, 100)とした。比較試料のLZPは、同様の手法でZOCとPAを出発原料として合成した。得られた試料のXRDパターンを図5(a)に示す。LZPの20°および34°の回折ピークは層の周期構造に起因する。複合材料ではこれらの回折角にてブロードなピークが検出されたことから、LZPと同様の構造の層を含むことが分かった。LZPにおける12°付近の回折ピーク(※印)は層間距離(0.8 nm)に由来する。複合材料ではこのピークが6°付近にシフトしており、ZPに比べて層間距離(1.5 nm)が拡大していた。異なるPA:PhPAの仕込み比率で合成したLZPhのFT-IRスペクトルからは、PhPAの仕込み比率の上昇に伴いリン酸グループに対するフェニル基由来の吸収の比強度が大きくなる傾向が見られた。このことか

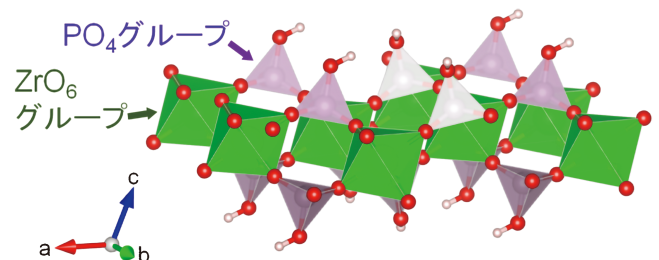


図4 リン酸ジルコニウム層の構造。(オンラインカラー)

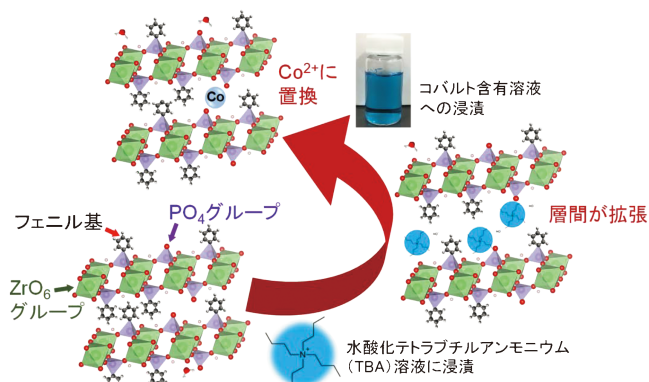
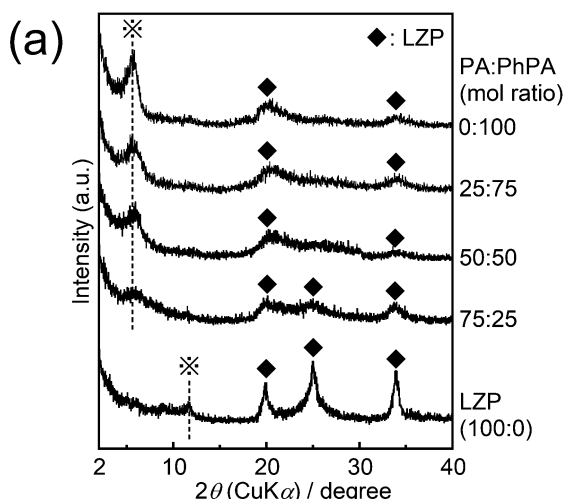


図6 (左下) フェニル修飾層状リン酸ジルコニウム, (右) TBAの導入構造および(左上)コバルトイオン担持構造の模式図。(オンラインカラー)

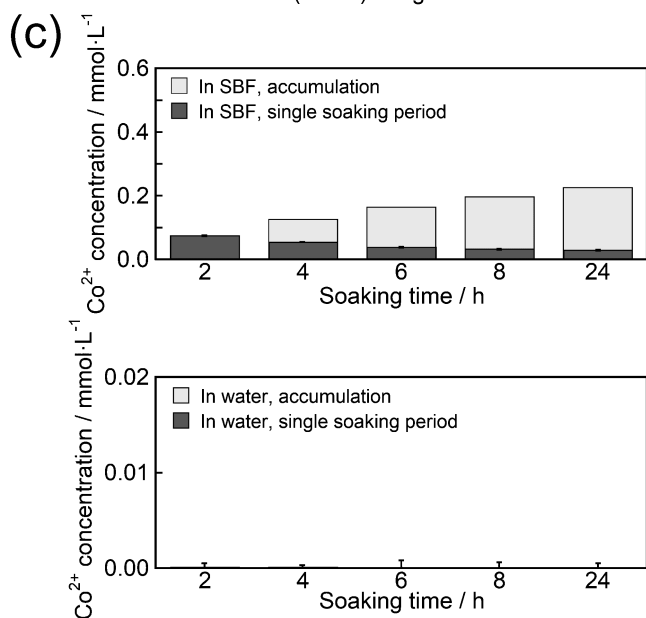
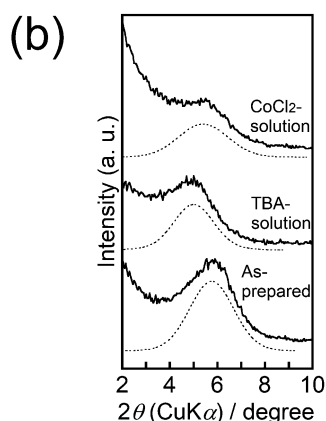


図5 (a) フェニル修飾層状リン酸ジルコニウム (LZPh) と α 型リン酸ジルコニウム (LZP) の粉末 XRD パターン, (b) 合成直後 (As-prepared), TBA 溶液浸漬後 (TBA-solution) および TBA 溶液浸漬し CoCl_2 溶液中で振盪後 (CoCl_2 -solution) の LZPh の粉末 XRD パターン, (c) LZPh を浸漬した SBF および水中の Co 元素濃度 (いずれも文献 (15) より改変).

ら, 得られた複合材料が ZP 様の層状構造を有しており, その層間に仕込み組成に応じた量のフェニル基が導入されることが示された (図 6 左下). 層間のフェニル基は化学耐久性の向上に寄与する一方で, 医用無機イオン導入時の反応も緩慢になる. 筆者らは, 層間のサイズに見合う粗大なカチオン性有機分子を用いて一時的に層間を拡張させ, イオン交換効率の向上を試みた. PA : PhPA の仕込み比率が 50 : 50 (mol ratio) の条件で作製した LZPh について, テトラブチルアンモニウムイオン (TBA, 分子サイズ : 1.1 nm) を含むアセトニトリル溶液 (TBA 溶液) に浸漬 (25°C, 48 h) した. 浸漬後の試料の XRD パターン (図 5 (b) 中段) からは, 層間距離に由来するピークが低角側にシフトしており, 層間距離が 1.8 nm に増大した. このことは, 有機修飾 LZP の層間に TBA が挿入された (図 6 右) ことに基づく. さらに TBA イオンを導入した有機修飾 LZP を塩化コバルト水溶液中で振盪攪拌 (25°C, 48 h) した. 攪拌後の試料の XRD パターン (図 5 (b) 上段) からは, 層間距離に由来するピークが再び高角側にシフトしており, 層間距離が 1.6 nm まで減少した. このことは Co^{2+} イオンにより TBA イオンが置換され, 層間距離が縮小した (図 6 左上) ことを示す. 以上より, α -ZrP の層間における P-OH 基を部分的にフェニル基に置換することで, イオン性分子や無機カチオンを含む水溶液中でも剥離せず, イオン交換反応が生じることが明らかになった.

この材料は体液中において, 層間に導入された無機イオンが体液中のイオンとのイオン交換反応により徐放される. Co^{2+} を導入した複合材料をヒト体液の無機イオン濃度を模倣した緩衝溶液 (SBF) と水にそれぞれ浸漬 (25°C, ~24 h) し, 溶液中における Co の元素濃度を ICP-AES で測定した. 浸漬時間と溶液中の各元素濃度の関係を図 5 (c) に示す. SBF 中の Co 元素濃度は試料浸漬から 2 h 以内に 0.074 mmol/l に達し, 24 時間後まで継続的に濃度上昇した. 一方, 試料浸漬後の水中の Co 元素濃度は実験期間を通じて検出限度以下であった. これらの結果から, Co を担持した有機修飾 LZP は体液に応答したイオン徐放性を示すことが明らかになった.

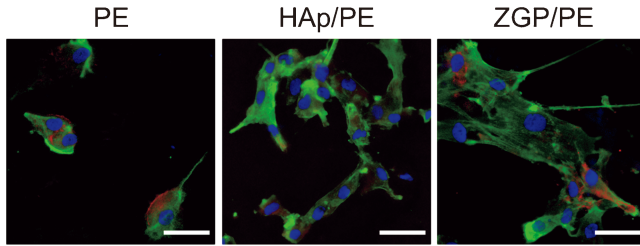


図7 ポリエチレン(PE)基板, β -GP 修飾層状リン酸ジルコニウム(ZGP)を担持したPE基板(ZGP/PE)およびヒドロキシアパタイト(HAp)を担持したPE基板(HAp/PE)上で24時間培養したヒト由来幹細胞の蛍光染色像(青:細胞核, 緑:アクチン骨格, 赤:ビンキュリン, スケールバー: 40 μ m, 文献(16)より改変). (オンラインカラー)

4. 骨形成を誘導するリン酸エステル分子による層状リン酸ジルコニウムの修飾

ZPのリン酸グループを対象とした有機修飾手法については上述のフェニル基以外にも幅広く検討がなされている⁽⁵⁾。筆者らはZPの骨格に薬剤分子を担持することで、組織修復を促進する複合材料が得られるとの考えから β -グリセロリン酸(β -GP)分子の修飾を試みた⁽¹⁶⁾。この分子は骨分化を誘導する機能をもつリン酸エステルである。

ZPはオキシ塩化ジルコニウム八水和物とリン酸水溶液を出発原料とした還流法(100 $^{\circ}$ C, 24h)により合成できる。しかしながら、この反応条件においては β -GP分子のエステル結合が加水分解する。筆者らは、還流法にて合成したZPを70 $^{\circ}$ Cの β -GP水溶液中で再び還流することで目的の複合材料(ZGPと表記)の合成に成功している。得られた材料はFT-IRをはじめとする分光分析より、ZPの層間の水分子由来の吸収が見られず、代わりに β -GP由来のオキシプロパンジオール基(-CH(CH₂OH)₂)の吸収が検出された。さらに、XRDパターンの回折角から求めたZGPの層間距離は0.9 nmであり、ZP(層間距離: 0.8 nm)に比べて0.1 nm程度拡大していた。これらの結果より、ZGPでは層間に β -GP由来のオキシプロパンジオール基が導入されたことが分かった。ポリエチレン(PE)基板, ZGPを担持したPE基板(ZGP/PE)およびヒドロキシアパタイトを担持したPE基板(HAp/PE)上で24時間培養したヒト由来幹細胞の蛍光染色像を図7に示す。PE上では楕円形状の細胞, ZGP/PEおよびHAp/PE上では紡錘状に伸展した細胞が旺盛に接着する様子が見られた。ZGPを担持した基板上では代表的な骨修復材料であるヒドロキシアパタイトを担持した基板と同様の良好な細胞接着性を示すことが分かった。

5. おわりに

本稿では、無機層状化合物を骨格構造とし、それらの層間に有機修飾を施すことにより、水溶性ケイ酸種やコバルトイオンなどの生体組織再生に資する無機イオン種の徐放機能や細胞親和性をもつ複合材料が得られることを述べた。生体材料への応用を目指す上で、今後は試料から溶出した化学種の構造を特定するとともに、それらへの*in vitro*における細胞応答の評価が望まれる。

本研究の一部は文部科学省卓越研究員制度、大倉和親記念財団、日本学術振興会科学研究費助成事業若手研究(20K18572)の助成により行われたものである。図の一部はVESTAソフトウェアを用いて作製した。

文 献

- (1) I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. Buttery, L. L. Hench and J. M. Polak: J. Biomed. Mater. Res., **55** (2001), 151–157.
- (2) E. Quinlan, S. Partap, M. M. Azevedo, G. Jell, M. M. Stevens and F. J. O'Brien: Biomaterials, **52** (2015), 358–366.
- (3) L. L. Hench: J. Mater. Sci. Mater. Med., **17** (2006), 967–978.
- (4) C. Ohtsuki, T. Kokubo and T. Yamamuro: J. Non Cryst. Solids, **143** (1992), 84–92.
- (5) I. D. Xynos, M. Hukkanen, J. Batten, L. Buttery, L. L. Hench and J. M. Polak: Calcif. Tissue Int., **67** (2000), 321–329.
- (6) I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. Buttery, L. L. Hench and J. M. Polak: Biochem. Biophys. Res. Commun., **276** (2000), 461–465.
- (7) X. Cong and R. J. Kirkpatrick: Adv. Cem. Based Mater., **3** (1996), 133–143.
- (8) J. Minet, S. Abramson, B. Bresson, C. Sanchez, V. Montouillot and N. Lequeux: Chem. Mater., **16** (2004), 3955–3962.
- (9) J. Minet, S. Abramson, B. Bresson, A. Franceschini, H. Van Damme and N. Lequeux: J. Mater. Chem., **16** (2006), 1379–1383.
- (10) J. Nakamura, Y. Suzuki, R. Narukawa, A. Sugawara-Narutaki and C. Ohtsuki: J. Asian Ceram. Soc., **9** (2021), 113–123.
- (11) A. Clearfield and S. D. Smith: J. Colloid Interface Sci., **28** (1968), 325–330.
- (12) L. Sun, W. J. Boo, R. L. Browning, H.-J. Sue and A. Clearfield: Chem. Mater. **17** (2005), 5606–5609.
- (13) B. M. Mosby, A. Díaz and A. Clearfield: Dalton Trans., **43** (2014), 10328–10339.
- (14) A. Clearfield and J. M. Kalnins: J. Inorg. Nucl. Chem., **38** (1976), 849–852.
- (15) J. Nakamura, R. Ito, R. Kozaki, A. Sugawara-Narutaki and C. Ohtsuki: Sci. Tech. Adv. Mater., **22** (2021), 1000–1012.
- (16) J. Nakamura, K. Endo, A. Sugawara-Narutaki and C. Ohtsuki: RSC Adv., **10** (2020), 36051–36057.



中村 仁

★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★
 2014年3月 名古屋工業大学大学院工学研究科博士
 後期課程修了
 2014年4月 物質・材料研究機構外来研究員
 2016年11月 名古屋大学大学院工学研究科助教
 2021年11月 同講師
 2022年4月より現職
 専門分野: 医用, 環境浄化用の有機無機複合材料
 ◎液相プロセスを軸とした有機無機複合材料合成法の
 開拓と応用に従事。
 ★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★★