

ナノ組織制御による先進構造材料・生体再建材料の開発と信頼性評価  
 ~ 生体硬組織の再生と結晶配向性による再生過程評価 ~

大阪大学・工・マテリアル科学専攻 中野貴由、馬越佑吉

1. はじめに

歯や骨といった生体硬組織は、体液内のカルシウム代謝機能を制御するとともに、自重を支えたり、臓器を保護したりといった構造材料としての重要な役割を果たす<sup>(1)</sup>。そのうちBAP(生体アパタイト)は、ナノオーダーサイズのイオン結晶であり、図1に示すように、六方晶をベースとする異方性の高い結晶構造を持つ<sup>(2, 3)</sup>。その結果、弾性定数、塑性挙動、耐環境性、生体親和性といった硬組織としての構造・機能特性は、*a*軸、*c*軸といった結晶方位に強く依存することが期待される<sup>(4)</sup>。さらにBAPナノ結晶の*c*軸方向は、線維状コラーゲンの走行方向と一致することから、生体硬組織内でのアパタイト/コラーゲン複合体としての優先的な配向分布は、硬組織の機能を支配する重要な因子となる可能性がある。しかし、硬組織の組織や機能は、現状では、レントゲンによるBAP密度(骨密度、骨量)によってほとんどの場合評価され、力学機能を直接的に反映すると思われるBAPの異方性を考慮した結晶学的なアプローチは行なわれていない。

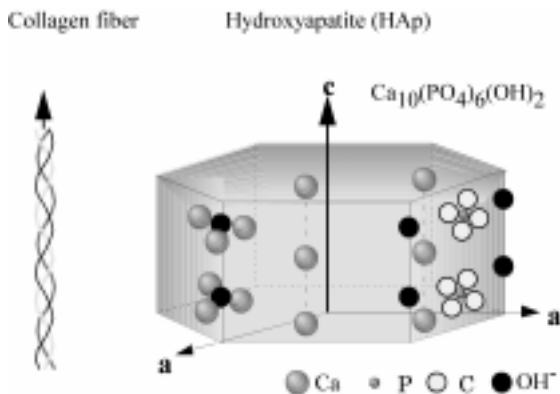


図1 アパタイトの結晶構造とコラーゲン線維の走行方向。アパタイトは六方晶をベースとする異方性の高い構造を示す。

一方、近年の再生医学分野における目覚ましい進歩により、外的形態が生体内の原組織に酷似した再生組織を得るための手法が確立されつつある<sup>(5-8)</sup>。これは、硬組織の欠損に対し、従来の金属系材料をはじめとする体内に残留するような代替材料の適用を避け、生体本来の持つ自己治癒能力を最大限発揮させることで、原組織の構造、機能を取り戻させるものである。例えば、硬組織においては、従来の手法では再生困難であった巨大な欠損部でさえも、細胞、機能性タンパク質、溶解性材料等を複合的、有機的に組み合わせることで、非常に早い段階での外見的な修復が可能となっている。しかしながら、いわば強制的にしかも高速に再生された組織が、生体の本来的に持つ機能や構造を取り戻しているかどうか、そして、生体に対する弊害がないかどうか、といった臨床に向けた、機能や安全面でのチェックが必要となっており、再生組織の機能発現に向けた適正な評価法の確立が急務となってい

る。さらに、生体組織と類似の機能を早期に回復させるための技術を確認するには、生体に学ぶべく、生体硬組織そのものの微細構造を今一度見つめなおす努力が必要となる<sup>(9)</sup>。

そこで本稿では、近年我々のグループで取り組んでいる材料科学的立場からの、生体内硬組織の微細構造の解明、ならびに硬組織の再生過程の解析法について紹介する。とりわけ、微小領域X線回折法による硬組織への結晶学的アプローチのうち、BAPの配向性を新たな指標とすることで、生体硬組織、再生硬組織の機能、特徴に現状でどこまで迫ることが可能であるかを中心に最近の成果を中心に報告する。

2. 研究手法とその特徴

硬組織に対する結晶学的アプローチとして、微小領域X線回折法(M18XHF<sup>22</sup>-SRA, CuK $\alpha$ , 3.6kW, マックサイエンス)を用いて、形状(長管骨、扁平骨、不定形骨)ならびに骨化過程(内軟骨性骨化、膜性骨化)の異なる代表的生体骨部位を用いて、結晶配向性を測定した。入射X線はコリメーターにより10~100 $\mu$ m $\phi$ に絞ることが可能であり、微小領域での回折情報が得られる。また、一定条件下での試料揺動( $\omega$ :8.4-22.8 $^\circ$ ,  $\chi$ :-0.6-0.6 $^\circ$ ,  $\phi$ :0-360 $^\circ$ )により回折強度の平均化を行っている。その結果、(002)、(310)面の法線ベクトルが、図2の領域に含まれる場合に、回折線が検出可能となる。尚、回折X線は湾曲型PSPCを用いることで、対称反射以外の回折も含めて、2 $\theta$ に対し同時計測を行った。評価項目は、(1)リン酸カルシウム物質に代表される生体内イオン結晶の結晶構造(構成相の同定)、(2)BAPの(310)面と(002)面との回折強度比(特定方向への*a*軸、*c*軸配向性の評価)、(3)極点図測定(*a*軸、*c*軸の3次元分布測定と配向度評価)であり、硬組織の力学的機能を規定すると予想されるBAPの結晶配向性が、間接的には、コラーゲンの線維伸長方向が、高精度に測定可能となる。さらに結晶子サイズによって主として決定される結晶性、ならびに(002)面間隔については、次世代型半導体検出器X' Celeratorを装備した全自動多目的X線回折装置(X' Pert-Pro, CuK $\alpha$ , 2.2kW, Philips)を用いて、平行ビーム系により評価された。

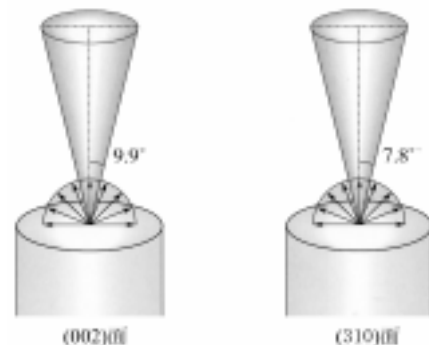


図2 (002)、(310)面から回折が得られる領域。いずれも試料面法線から10 $^\circ$ 前後傾いた範囲までの回折情報が得られる揺動角を選択している。

また、家兎尺骨については、5mm~20mm の完全欠損、家兎頭蓋骨については直径 6mm の硬膜までの欠損を導入した後、b-FGF 含有ゼラチンハイドロゲル(含水率 85%)により組織再生を試みるとともに、再生過程における BAp 配向性を評価した。猿下顎骨の再生については、サイトカインとして r-BMP を用いた。

### 3. 生体硬組織に見られる生体アパタイトのユニークな優先配向性

我々の身の回りにある多結晶結晶性材料の多くは、人工的な組織制御法により、特定の方向に対する優先的な配向性、いわゆる集合組織が与えられ、適切な機能を発揮している。電磁鋼板における Goss 方位は、その典型例であり、容易磁化方向である [001] が特定方向に配列するよう加工・熱処理が施されている<sup>(10)</sup>。生体硬組織においても、長い進化の過程の中で、構造、機能の取捨選択を繰り返し、現状での最も適切な状態を保持しているものと予想されることから、その集合組織の形成が期待される。一方、硬組織は、骨密度の高い皮質骨とスポンジ状の形状を持つ海綿骨に分類され、それぞれ、荷重支持機能と Ca 代謝機能を特に強く発揮する。そこで以下には、機能に応じて変化する両骨組織それぞれについて、結晶学的特徴、特にユニークな BAp 配向性について解説する。

#### 3-1 皮質骨における生体アパタイトの配向性

皮質骨は部位に応じ様々な形状を示し、*in vivo* (生体内環境下)での負荷応力分布も異なっている。図3には、そうした代表的な生体硬組織部位である尺骨(長管骨)、頭蓋骨(扁平骨)、下顎骨、椎骨について、3軸方向からのX線回折強度比を示したものである<sup>(11)</sup>。この図における縦軸の回折強度比は、XRD プロファイルにおける(002)回折強度を(310)回折強度で規格化したものであり、無配向時には2となる<sup>(12, 13)</sup>。す

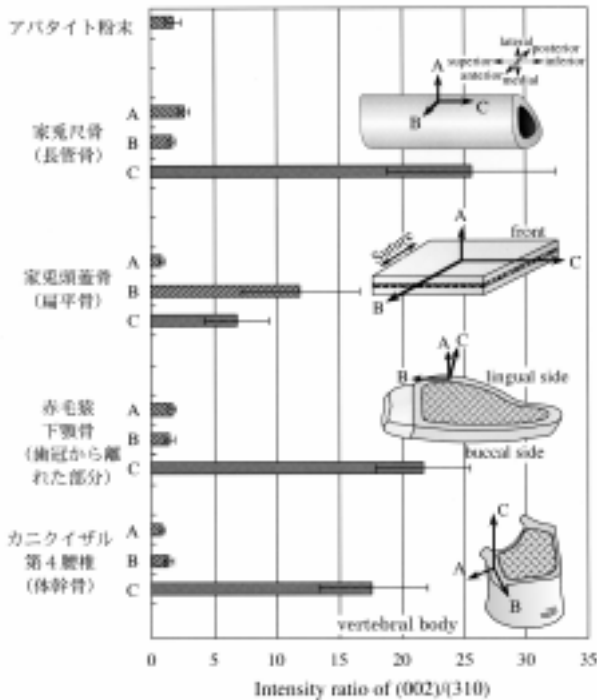


図3 様々な生体硬組織の生体アパタイト配向性。この強度比が高いほど c 軸の配向したアパタイトが多く分布していることを示す。

なわち、この値が2より大きくなるほど、c 軸の優先配向性が高くなることを示している。各硬組織部位では、期待した通り特徴的でユニークな生体アパタイトの c 軸配向分布を示している。家兎尺骨、下顎骨、椎骨では、それぞれ、長手方向、近遠心方向、頭尾軸方向のいずれも C 方向に沿ってのみ、優先的な c 軸配向性を示すことから、一軸配向性を持つといえる。一方、扁平骨の代表である家兎頭蓋骨では、B、C 方向を含む骨面に沿った 2 次元配向性を示す。こうしたユニークな配向性は、*in vivo*での応力分布と深くかかわっており、特に強い c 軸配向性の認められた方位は、生体内での最大負荷荷重方位と一致している。このことは、同じ一軸配向性を示す硬組織でも、優先配向性の程度が、尺骨、下顎骨、椎骨の順に低下し、負荷応力分布の多次元化とも対応していることからより明確になる。

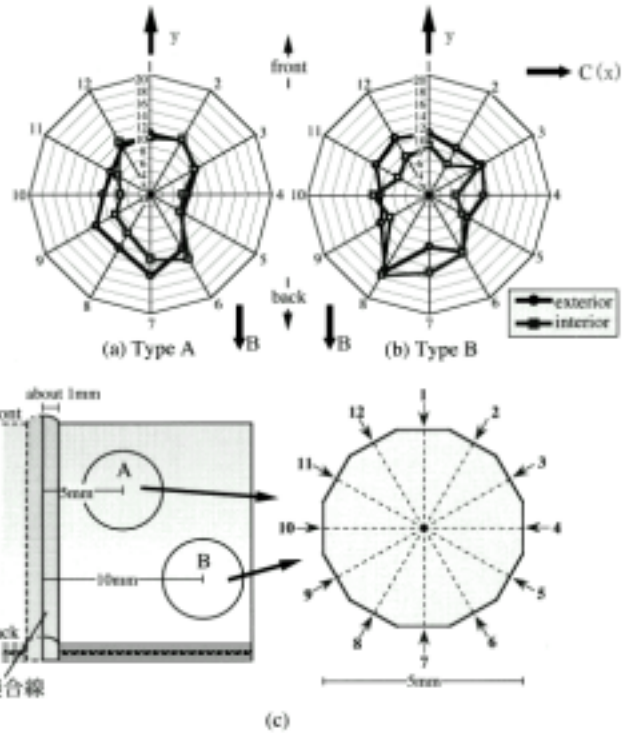


図4 家兎頭蓋骨内におけるアパタイト c 軸の 2 次元分布。縫合線から近い方を A、遠い方を B としている。外板、内板についてそれぞれ示している。

さらに家兎頭蓋骨では、骨面内にて、図4で示されるような、縫合線(suture)に沿った長軸を持つ楕円形状の配向分布を示す。この楕円分布を以下の式によって近似した際のそれぞれの短軸(a)、長軸(b)、b/aの値を表1にまとめて示す。

$$x^2/a^2 + y^2/b^2 = 1$$

$$r = (x^2 + y^2)^{1/2}$$

$$r = a \cdot b / (a^2 \sin^2 \theta + b^2 \cos^2 \theta)^{1/2}$$

楕円分布は、縫合線からの距離や外内板に依存し、極めて敏感に変化する。例えば、A 領域では b/a 比は 1 から大きくはずれ、明瞭な楕円分布を示すのに比べ、B 領域ではもはや楕円としての統計学的優位性は認められなくなる<sup>(11)</sup>。こうした 2 領域間での *in vivo* 応力分布の差は、ほとんど存在しないことから、BAp 配向性はその応力分布のみならず、組織形成

過程にも依存している。すなわち、縫合線は、コラーゲン線維が自由に行き来することのできない障害物として機能するのである。

distance from suture	lamina	a	b	b/a	$\Sigma(r-r_i)^2$
5mm	ext.	7.38	11.95	1.62	18.5
	int.	6.38	11.13	1.74	28.7
10mm	ext.	8.96	10.80	1.21	33.0
	int.	6.92	11.12	1.61	83.9

表 1 頭蓋骨外板、内板の A、B 領域における骨面内の楕円近似を行った際の短軸(a)、長軸(b)、b/a

ただし、生体硬組織の配向性を決定付ける最大の環境因子は、負荷荷重である<sup>(11, 12)</sup>。例えば、図 5 には、歯冠直下での BAp の c 軸配向性を、A、B、C、3 方位に対して示している。図 1 にも示したように、下顎骨は基本的には C の近遠心方向に沿って優先配向性を示すが、歯冠直下ではその配向性が急激に低下し、代わって咀嚼荷重方位である B 方位に最大の優先配向性を示すようになる。この傾向は咀嚼荷重を受けやすい形状の頬側 (buccal side) で強く現れ、咀嚼荷重負荷による応力分布の変化が直接的に BAp の配向性を決定している根拠となる。さらに、咀嚼荷重は、歯根、スポンジ状海綿骨を通して分散するため、配向性の変化、すなわち咀嚼荷重の影響を直接的に受ける領域は、歯冠直下 2mm 程度までと、限定されていることも特筆すべき点である。

結論として、生体内皮質骨の BAp / コラーゲンの配向性は、各々の生体部位での負荷応力分布に対応するかのごとく、集合組織を変化させることで、最適の力学機能を発揮しているものと言える。逆に、集合組織の測定により、力学機能を評価することも可能となる。

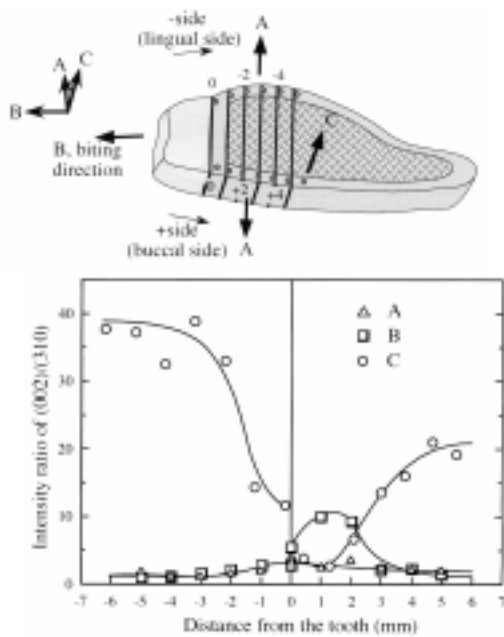


図 5 赤毛サル下顎骨における、アパタイト配向性。A、B、C の 3 方位について示してある。歯冠直下では、咀嚼荷重方向へ c 軸優先配向性が変化している。

### 3-2 海綿骨にも認められる生体アパタイトの優先配向性

海綿骨は、皮質骨に比べ比表面積が大きいことから、カルシウムの代謝機能を強く発揮するとともに、構成する骨梁の方向性が荷重軸と一致する、いわゆる Wolff の法則に支配されることから、荷重支持機能をも持ち合わせることが期待される。しかしながら海綿骨梁内の BAp 配向性分布についてはこれまで全く知られていない。

図 6 には、豚大腿骨骨頭部に近い長管骨に存在する海綿骨の外観とその各方位に対する BAp 配向性の部位依存性について示している。この部位では、一次骨梁が長手方向である L 方位に沿って発達しているのが特徴である。それに対応するかのごとく、回折強度比は、L に沿って最大であり、海綿骨においても骨梁に沿った BAp の優先的な c 軸配向性の存在が確認された。このことは、個々の骨梁に対する電子線回折図形の解析からも証明された。これまで海綿骨は、骨梁の幾何学的形状の最適化により負荷応力を支えているものと考えられていたが、骨梁内では BAp の優先配向化により、さらなる高機能化を達成していることは明らかである。すなわち海綿骨においても、皮質骨ほどの強い BAp 配向性を示さないまでも、負荷応力分布に対応した適切な微細構造を有している。海綿骨は代謝の活発な組織であるため、高齢化社会の最大の難病である骨粗鬆症の診断にも用いられる。海綿骨内の BAp 配向化の発見は、現状の骨量のみ注目する手法から骨質を評価する診断法へとその方法を更に適正化していく可能性をも秘めている。

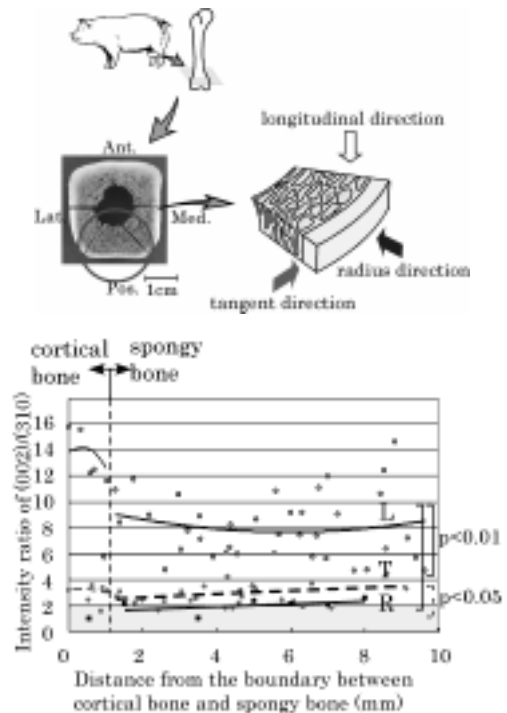


図 6 海綿骨の外観と各方位に対する BAp の c 軸配向性。骨長手方向に沿って有意に大きな BAp の c 軸の配向性が示された。

### 4. 生物の直立歩行を可能とした生体アパタイトの高配向化

生体硬組織内での BAp 配向性は、生体での荷重支持機能に対し極めて敏感に対応し密接に関わっている。その結果として、生物が数十億年に渡って多様化 (進化) してきた過程を

も、硬組織内部にしっかりと刻み込んでいる。

図7には、脊椎動物の代表例として、ブリ、ラット、家兎、猿の脊柱内、腰椎での皮質骨、海綿骨 BAp 配向性の変化を表している。いずれも成熟骨について測定を行ったものであり、その構成無機成分のほとんどが BAp であったことから、頭尾軸方向に沿った BAp の c 軸優先配向性について示してある。これから明らかなように、水中生活から陸上生活へ、そして直立歩行へと変化する度に、皮質骨、海綿骨ともに配向性がステップ的に上昇している。また、運動状態は異なるものの、類似の体型であるラットと家兎の間で配向性の差は小さいことも特徴的である。椎体断面内に注目して見ると、直立歩行を始める前後で、腹部側から背部側へと頭尾軸に沿った BAp 配向性は相対的に上昇していることから、直立歩行に対応するため、背部の配向性が高まったことが示唆される。以上の結果は、生物が進化の過程で生活の場や運動形態を変えるに従って、硬組織の微細構造が柔軟に対応し、機能するように変化していることを意味している。言い換えれば、我々が陸上で生活し、さらには二足での直立歩行ができるのも、BAp が優先的な配向性を持つよう変化したためであるとも理解できる。

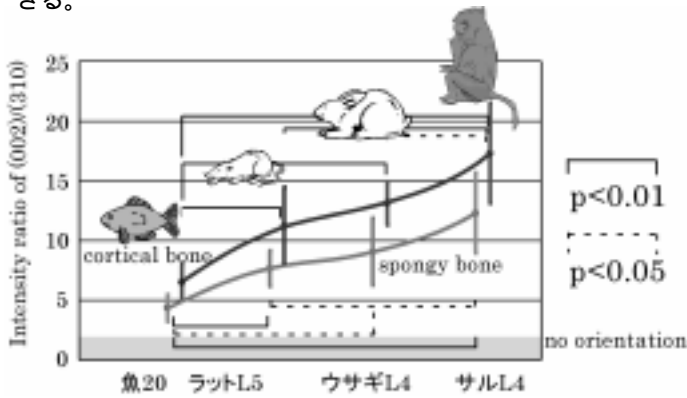


図7 進化の過程に伴う、椎骨頭尾軸方向へのアパタイト配向性（皮質骨と海綿骨）の変化。生物の進化にともなって配向性が上昇していく様子が認められる。

## 5. 生体アパタイトの配向性変化を指標とした硬組織再生過程の評価

BAp の配向性は、ここまで述べてきたように硬組織部位に強く依存し、力学機能を直接反映する指標となる。そこで、最新の再生医工学的的手法により再生された硬組織に対して、BAp 配向性をはじめとする結晶学的なアプローチが、再生組織の機能や、再生過程、再生度合いを評価するための指標となりうるかどうかについて、検討を行った。以下に、骨化過程や形状の異なる硬組織に対して、欠損を導入後、機能性タンパクにより硬組織再生を図った場合について、紹介する。

### 5-1 長管骨の再生過程の評価

長管骨はその長手方向の最大荷重負荷方向にそって、元来、強い BAp の c 軸配向性を示す。長管骨の代表である家兎尺骨では、平行してトウ骨が存在するため、欠損を導入した際でも外部固定する必要がなく、欠損モデルとしては最適である。そこで、家兎尺骨欠損部の再生過程について、BAp 配向性を用いて評価した<sup>(13-15)</sup>。例えば、図8では家兎尺骨上に5mmの完全欠損を導入後、最先端の再生医工学的的手法である b-FGF 含有ゼラチンハイドロゲルを埋入し4週間後の外観と配向度の

部位依存性を示している。ただし配向度は、RD、ND、TD 方向に対する (002) 回折強度の分解成分として計算された。一般に3次元空間すべてに渡って回折強度を測定した場合には、無配向の試料にて、それぞれの配向度は0.333となる。本研究においては、試料面から(002)回折面が70°以上傾斜した場合には、測定が困難であったため、その場合を除いた無配向の値を算出し、無配向からのずれ値を用いて配向度を表した。

図8において骨外観では欠損の大部分が修復され、皮質骨は見かけ上つながり、再生している。しかしながら再生部における BAp 配向度からは、荷重軸方向に沿って、かなり低い c 軸配向性を示すことがわかる。つまり、見かけ上完全再生した骨密度の比較的高い組織であっても、この段階での配向度の回復は不十分であり、原組織と同程度までの力学的機能の回復は期待できない。ただし、極点図形を個々に解析した場合には、再生部では、不完全でしかも正常部より配向度合いは低いものの、BAp 結晶子の c 軸配向中心が存在し、その中心は尺骨長手方向へと広く分布することが理解された。このことは、長管骨の特徴である一軸配向性を回復する様に、骨再生が進行していることを示唆している。つまり、コラーゲン線維を含めた、BAp の再生は、無秩序にはなく、一定の配向性を保つように遷移することで、健全な骨への再生が行われているのである。その結果、図9に示すように、骨外観の修復に2W遅れた6W後では、再生部において正常部とほぼ同様の配向性を示すようになり、力学機能の回復が見込ま

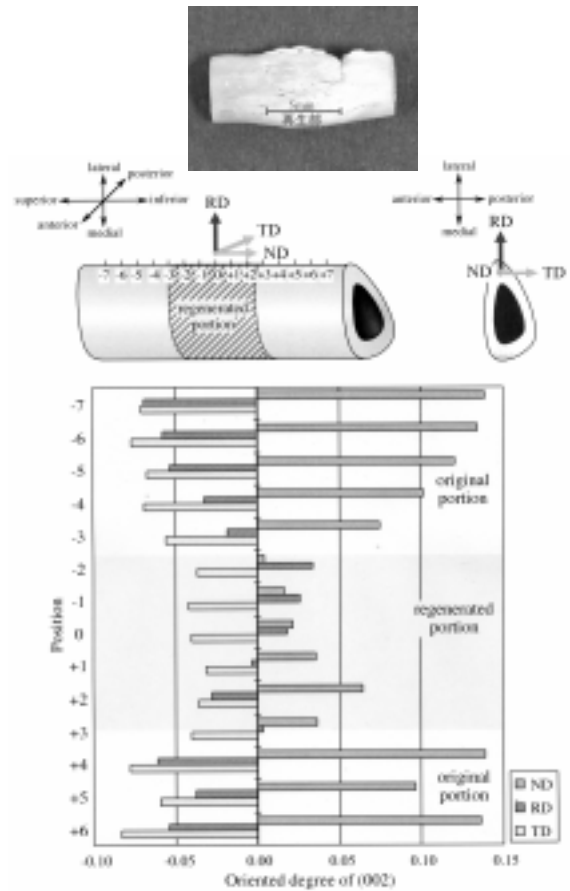


図8 家兎尺骨欠損部(5mm)の b-FGF を4週間除放した後の修復部近傍の外観と c 軸配向度。見かけの修復を完了しても、配向度の回復は達成されておらず、機能回復には至っていないものと考えられる。

れる。このことは、硬組織欠損部の再生が、欠損部の組織充填、それに引き続く荷重負荷により進行していることを意味している。実際に、巨大欠損を導入した際の詳細な解析からは、硬組織の再生は、再生途中での *in vivo* での荷重応力の大きさと一対一の対応を持って進行することが証明されている。

さらに再生部位での BAp は、配向性のみならず、その結晶性や *c* 軸長さも、再生とともに極めて敏感に対応し変化する。例えば、再生途中の部位では、Sherrer の式から算出される平均結晶子サイズは小さく、(002) 面間隔も小さい。このことは、硬組織の再生が、骨芽細胞と破骨細胞との連携によるリモデリングによって進行することに起因し、再生部位での骨代謝が活発であること、再生部の BAp 結晶の完全性が低いことを示唆している。したがって、BAp の結晶学的情報は、硬組織の再生に対し、極めて敏感に対応し、再生過程を直接的にモニターすることから、再生度合いを評価する重要な指標となることは明らかである。

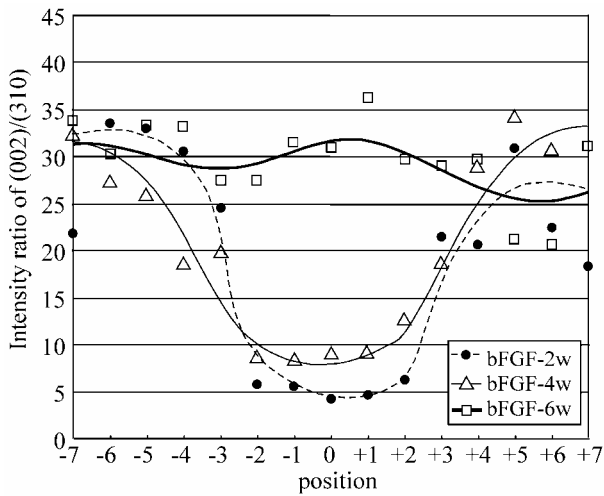


図9 家兎尺骨欠損部(5mm)の b-FGF 除放にともなう再生部の配向性の回復。4~6W の間で急速に改善されている。

### 5-2 膜性骨化した頭蓋骨の再生過程

BAp の二次元配向性を示す頭蓋骨においても、その組織再生は、石灰化による BAp の析出、BAp の部位に応じた配向化によって進行する。図 10 には、6mm の欠損を頭蓋骨に導入し、b-FGF を徐放後、12 週目の欠損部再生組織を示す。この段階では、欠損部の再生は不完全で、石灰化組織によって修復されておらず、再生組織周辺には空洞部が残存する。16 週後にはこうした空洞部もほぼ完全に封鎖され、b-FGF を徐放しない場合は、欠損部が見かけ上も修復されないことは大きく異なっている。こうして再生された組織について、外板側、内板側からそれぞれの法線方向に対して、BAp の *c* 軸配向性の測定を行った。頭蓋骨においては、2 次元配向性に起因して、原組織のこの方位に対応する *c* 軸配向性は極端に低い。図 10 には、外板、内板についての配向性を示す 2 次元マップを示すが、この値が大きい部分ほど BAp の配向性に関する再生度合いが低いことを意味する。A-B 切断面に沿った BAp 配向性を見た場合、内板が正常値とほぼ同程度の低い値を示すのに対し、外板では比較的高い値を示す。このことは、外板に比べ、内板の組織再生が早く進行していることを意味

している。この違いは、内板には正常な硬膜が残存しているためであると考えられ、骨芽細胞の供給経路が骨膜であることと深く関わっている。こうした骨膜近傍からの硬組織の早期再生は、長管骨でも認められ、硬組織再生に対しては、幹細胞の分化を制御する機能性タンパクの徐法とともに、そのもととなる幹細胞の供給経路を確保する、もしくは同時供給することが重要になることを示している。

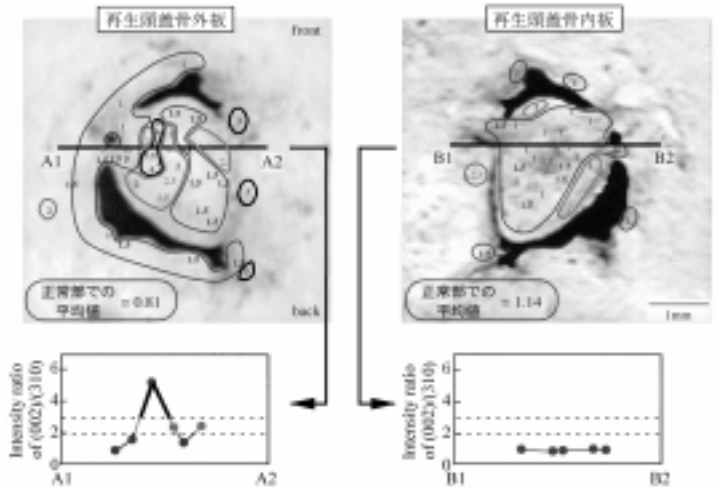


図 10 b-FGF 除放後の家兎頭蓋骨欠損部(6mm)の再生組織外観と骨面垂直方向への BAp の *c* 軸配向性分布。

### 5-3 下顎骨再生過程における咀嚼荷重の影響

下顎骨の欠損を再生する場合には、Ti 等のプレートにより下顎骨が再生に至るまで荷重応力を除去し、その後、顎骨へ応力負荷、さらにはインプラントによる咀嚼荷重負荷を行う。今、図 11 には、3cm の下顎骨の区域切除から、咀嚼負荷までのタイムテーブルとそれに伴う近遠心方向への BAp 配向性の変化について示す。これから明らかなのは、Ti プレート除去前後では、見かけの下顎骨の再生は図られるものの、配向性の急速な回復には至らない。ところが、インプラント構築後、咀嚼荷重を負荷することによって、下顎骨のうち、海綿骨を通じて咀嚼荷重の負荷される底部の配向性は、著しく上昇し、正常部に近い値まで回復する。このことは、顎の荷重を支えるための近遠心方向への配向性回復には、ほぼそれに垂直方向への咀嚼荷重負荷が不可欠であり、長管骨の再生と同様、荷重応力が重要な役割を果たしていることを示してい

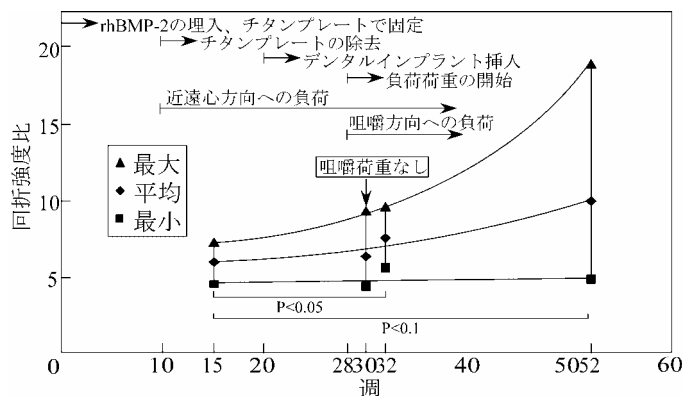


図 11 3cm の下顎骨の区域切除から、咀嚼負荷までのタイムテーブルとそれに伴う近遠心方向への BAp 配向性の変化。

る。こうした、咀嚼荷重の役割は、マウスの成長、咀嚼にと  
もなう近遠心方向の BAp 優先配向性の発達でも確認された。  
さらに、歯根膜の回復を伴わないインプラントの使用に対し、  
こうした BAp の配向性の評価は、最適なインプラント選択の  
ための指標にもなる。いずれにしても、下顎骨の早期再建に  
は、デンタルインプラントによる咀嚼荷重導入による、骨再  
生の促進効果が重要となる。

### 6. 生体硬組織再建材料への配向性の付与

生体部位に依存した BAp 配向性の存在は、今後の一つの展  
開として、テーラーメイド医療に則した材料設計の必要性を  
示している。硬組織欠損部の補填材としては、その生体親和  
性の高さから、BAp に極めて類似の構造、組成を持つハイド  
ロキシアパタイト (HAp) がしばしば利用される<sup>(16, 17)</sup>。利用  
時の形状は様々であるが、一般には粉末を焼結することによ  
って製造され、緻密体もしくは多孔質体として使用される。こ  
うしてできた従来のアパタイトは無配向多結晶体であり、本  
来の硬組織の微細構造とは全く異なるものである。そこで硬  
組織欠損部の骨再生を早期に誘導するための一つの方策とし  
て、これまでほとんど知られることのなかった生体硬組織の  
アパタイト配向性を、骨補填材にも付与することが考えられ  
る。

生体硬組織は部位に応じた配向性を持つことから、アパ  
タイト材料に配向性を与えるには、部位に応じてその配向性を  
変える必要がある。完全にそれを人工的、材料学的に行うこ  
とも今後は可能になるものと思われる。例えば、一軸配向性  
を与えるには、アパタイト結晶子が c 軸に伸長する傾向を利用  
し、湿式磁場下にて配向性を整えたり、ダイス中での押し  
出し法を利用することが考えられる。2 次元化としては、セ  
ラミックスの薄片化に用いるドクターブレード法や一軸荷重  
下での整形などが挙げられる。ただし、生体アパタイトに含  
まれる微量元素の制御や細胞活着性付与のための多孔質化を  
考えた場合、本質的に配向性を持つ生体硬組織そのものを利用  
することが一つの近道であると考えられる。

図 12 には、牛大腿骨を出発材料として、初期に 600、100  
時間のコラーゲンならびに遺伝子情報を持つ骨関連細胞除去  
のための熱処理後、温度を変えて各 1 時間熱処理を行った際

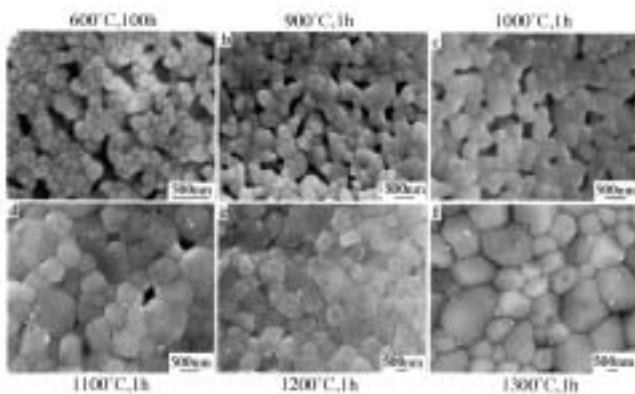


図 12 牛大腿骨を用いて作製された配向性アパタイトの SEM 像。600、100 時間熱処理(図(a))の後、900 (図(b))、1000 (図(c))、1100 (図(d))、1200 (図(e))、1300 (図(f))のそれぞれの温度で 1 時間、大気中熱処理が施されている。観察面は、長管骨長手方向の垂直断面である。

の骨長手断面の SEM 組織を示す。牛大腿骨は、皮質骨部が 1  
cm 程度と非常に厚く、またこれを利用した多孔質アパタイト

も臨床応用がなされており、利用可能な生体組織の一つである<sup>(18)</sup>。図 12(a)に示すように、600 熱処理後、コラーゲン線  
維等の細胞外マトリックスは消滅し、多孔質アパタイトの多  
結晶体が出来上がっており、一般のセラミックス焼結体と類  
似の組織を呈している。空隙間は複数のアパタイト結晶子で  
満たされており、結晶粒界が明瞭に認められる。熱処理温度  
の上昇とともに、空隙間の結晶粒は粗大化し、一つの結晶子  
が空隙で囲まれるようになるとともに、空隙率も低下する。  
さらに熱処理温度が上昇すると目立った空隙が認められなく  
なり、結晶粒の粗大化が一層促進される。以上は、粒界面積  
の減少、粒界エネルギーの低下と空隙に囲まれる表面エネル  
ギー減少を駆動力として、焼結が進行することを意味してい  
る。

図 13 には、結晶粒度、気孔率、アパタイトの c 軸配向性を  
示す回折強度比の熱処理温度の上昇に伴う変化を示している。  
重要なことは、温度上昇に伴う結晶粒成長により、c 軸配向  
性が顕著に上昇する点である。このことは、一軸配向性生体  
硬組織中で、本来的に多く存在すると考えられる低傾角粒界  
に対して、エネルギー、モビリティの高いと考えられる僅  
かに存在する高傾角粒界が優先的に消滅することによるもの  
であり、本来の生体組織よりも、さらに配向性の高いアパ  
タイトセラミックスの作製が可能であることを示している。こ  
うしてできた配向性アパタイト材料は、長手方向にそって比  
較的高い破壊強度を持つことから、骨補填材として発揮すべ  
き力学機能をも持ち合わせている。

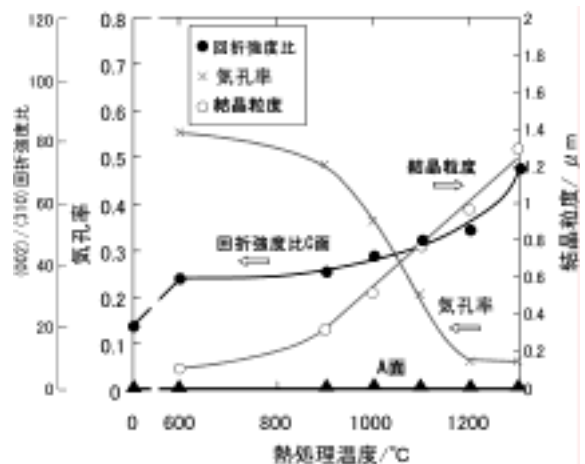


図 13 牛大腿骨を出発材料とした場合の熱処理温度の増加に伴う、結晶粒度、気孔率、配向性の変化。温度の上昇とともに c 軸配向性が発達する。

しかしながら、熱処理を製造プロセスに含むアパタイトセ  
ラミックスは、従来のアパタイト焼結体と同様に、生体アパ  
タイトよりも、結晶粒径が極端に大きく、溶解性、吸収性の  
低下が問題となる。溶解性の向上は、粉末レベルでは、合成  
温度を低下することやメカニカルグライディング法 (MG 法)  
を用いることで、アパタイト結晶の結晶性を低下によって達  
成されている<sup>(19, 20)</sup>。ただし、バルク化されたアパタイトの場  
合、こうした方法は利用できない。そこで、真空中熱処理に  
より、アパタイト表面層や結晶粒界を溶解性の優れたリン酸  
四カルシウム (TTCP) や  $\alpha$  第三リン酸カルシウム ( $\alpha$ -TCP) へ  
置き換える方法も検討されている<sup>(21, 22)</sup>。さらに生体硬組織に  
限りなく近い組織を持つ再建用材料として、HAp を自己組織  
化反応により、コラーゲン線維上にナノ析出させ、強磁場下

で配向性を付与する試みも現在進行中である。

## 7. 生体アパタイトの配向性から理解されるその他事項と今後の可能性

生体内のアパタイトの配向性を利用することにより、その他にも様々なことが理解される。例えば、*in vivo* 応力環境の変化やホルモン投与によりリモデリングのバランスが崩れた際にも、骨密度のみならず、BAP 配向性が敏感に対応し変化する。これまでの結果から、例えば、無重力空間で長時間生活をしたり、骨折後長期間外部固定を行った場合には、骨量とともに、BAP の配向性も低下することが予想される。また、遺伝子の操作や、応力環境の変化により、成長時の骨化、石灰化過程を変更した場合にも、結果として BAP 配向性は大きく変化する。こうした力学機能を直接反映する BAP の配向性は、応力環境をはじめとする生体内刺激により制御されており、骨関連細胞として知られる、骨芽細胞、破骨細胞、そして骨細胞の働きと強く関連しているものと考えられる。したがって、今後は、細胞レベル、さらには情報伝達をつかさどる分子のレベルからも、*invivo*, *invitro*(生体擬似環境)での BAP の配向化過程の解析や配向化を決定する支配因子の解明が必要となるものと考えられる。

実用的な観点からは、BAP 配向性に注目した硬組織評価法の導入は、硬組織に関する疾患の診断や再生組織の構造、機能診断を可能とするものと期待される。また一風変わった適用法として、古人骨への結晶学的アプローチにより、先史古代人の生活、文化、習慣等の生活スタイル全般に関わる情報である骨考古学に対して貢献できる可能性もある<sup>(23)</sup>。

## 8. 終わりに

本稿では、本年度から始まった 21 世紀 COE プログラム「構造・機能先進材料デザイン研究拠点の形成」の研究プロジェクトのうち「生体再建材料の設計開発」に関連してこれまでに得られた知見、ならびに今後の展開について、その一部を紹介した。硬組織再建にあたっては、結晶学的立場からの生体硬組織、再生硬組織へのアプローチが極めて適切な方法であるものと考えられる。とりわけ、BAP の *c* 軸配向性やその他の結晶学的パラメータを利用することにより、これまで手の届かなかったレベルにまで、硬組織の微細構造や対応する機能が理解できるようになるものと考えられる。中でも BAP 配向性は、骨量測定に代わる新たな指標として有望であり、硬組織評価、疾病診断から材料設計に至るまでの幅広い領域に渡って、今後その応用が期待される。

尚、本研究は、大阪大学大学院工学研究科マテリアル科学専攻 海原一裕君(現松下電産(株))、土田裕基君(M1)、石本卓也君(B4)、京都大学再生医科学研究所 田畑泰彦教授、山本雅哉助手、長田奈津紀医師、岡山大学大学院医歯学総合研究科山本敏男教授、大阪大学大学院歯学研究科 恵比須繁之教授、今里聡助教授、豊澤悟講師、東京医科歯科大学医歯学総合研究科 榎本昭二教授(現名誉教授)、丸川恵理子医師との共同研究として実施されたものである。さらに、研究の一部は、(財)島津科学技術振興財団からの支援を受けている。ここに謝意を表す。

## 9. 文献

- (1) 例えば、米田俊之、骨のバイオサイエンス、羊土社、(2002) 1.
- (2) J.C. Elliot, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier Science,

Amsterdam, (1994) 1.

- (3) G. Daculsi, J. M. Bouler and R.Z. LeGeros, International Review of Cytology, **172** (1997) 129.
- (4) T. Nakano, T. Awazu and Y. Umakoshi, Scripta Mater., **44** (2001) 811.
- (5) Jr C. W. Patrick, A. G. Mikos and L. V. McIntire, Frontiers in Tissue Engineering, Pergamon, U.K., (1998) 1.
- (6) R. Ranger and J. P. Vacanti, Science, **260** (1993) 920.
- (7) K. Yamada, Y. Tabata, K. Yamamoto, S. Miyamoto, I. Nagata, H. Kikuchi and Y. Ikada, J. Neurosurg., **86** (1997) 871.
- (8) Y. Tabata, K. Yamada, S. Miyamoto, I. Nagata, H. Kikuchi, I. Aoyama, M. Mamura and Y. Ikada, Biomaterials, **19** (1998) 807.
- (9) 中野貴由, 藤谷渉, 土田裕基, 馬越佑吉, 田畑泰彦, 山本敏男, 生体硬組織に学ぶ材料設計, Boundary, **18** [10] (2002) 2.
- (10) 例えば, 村上陽太郎ら, 金属材料学, 朝倉書店, (1994) 1.
- (11) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Tabata, N. Nagata, S. Enomoto, E. Marukawa and Y. Umakoshi, Bone, **31** (2002) 479.
- (12) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Umakoshi and Y. Tabata, Proceedings in The Fourth Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM 4), Ed. by S. Hanada, Z. Zhong, S. W. Nam and R. N. Wright, The Japan Institute of Metals, (2001) 225.
- (13) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Tabata, N. Nagata, S. Enomoto, E. Marukawa and Y. Umakoshi, Proc. of TETU-6, Ed. by Y. Ikada, Y. Umakoshi and T. Hotta, Elsevier, (2002) 95.
- (14) 中野貴由, 海原一裕, 馬越佑吉, 田畑泰彦, 長田奈津紀, 洪流, 榎本昭二, 丸川恵理子, 再生医学と材料工学の融合 ~ HAp 結晶の配向性を利用した生体硬組織の評価, Boundary, **17** [8] (2001) 10.
- (15) T. Nakano, K. Kaibara, T. Ishimoto, Y. Tabata and Y. Umakoshi, Tissue Engineering, **8** (2002) 1232.
- (16) 岡崎正之, 歯と骨をつくるアパタイト, 東海大学出版会, (1992) 1.
- (17) 青木秀希, 驚異の生体物質アパタイト, 医歯薬出版, (1999) 1.
- (18) M.T. Mushipe, P.A. Revell and J.C. Shelton, Biomaterials, **23** (2002) 365.
- (19) T. Nakano, A. Tokumura, S. Imazato, A. Ehara S. Ebisu and Y. Umakoshi, Journal of Materials Science in Medicine, **12** (2001) 703.
- (20) T. Nakano, A. Tokumura and Y. Umakoshi, Metallurgical and Materials Transaction A, **33A** (2002) 521.
- (21) T. Nakano, K. Kaibara, Y. Umakoshi, S. Imazato, K. Ogata, A. Ehara, S. Ebisu and M. Okazaki, Mater. Trans., **43** (2002) 3105.
- (22) A. Ehara, K. Ogata, S. Imazato, S. Ebisu, T. Nakano and Y. Umakoshi, Biomaterials, **24** (2003) 831.
- (23) 片山一道, 古人骨は語る, 角川書店, (1999) 1.

