

# 高い化学耐久性を有する無機イオン徐放型生体用 ゾルゲルリン酸塩ガラスの構造設計

産業技術総合研究所 李 誠鎬

Design of Bioactive Phosphate Glasses with High Chemical Durability  
and Ion-Releasing Ability Using Sol-Gel Method

Sungho Lee

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

リン酸塩系インバートガラスは、溶出された無機イオンが細胞機能を活性化する効果を示す。リン酸塩インバートガラスのイオン溶出能(化学的耐久性)は、中間酸化物を用いて制御することができる。本研究では、液相法によるリン酸塩インバートガラスの作製に着目した。このプロセスは、従来の熔融急冷法と比較して、常温常圧でガラスを合成できる簡便で低エネルギーなプロセスである。本研究では、液相法によりチタン含有ピロリン酸塩ガラスを作製し、その構造とイオン放出挙動を評価した。ピロリン酸塩と  $\text{TiO}_y$  多面体はガラス中の  $\text{TiO}_2$  含有量の増加とともに  $(-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{Ti}-\text{O}-)_n$  のような鎖状構造を形成した。イオン溶出実験の結果より、ガラス中の P-O-Ti 結合が形成することで化学的耐久性が向上するため、イオン溶出量は  $\text{TiO}_2$  含有量の増加とともに減少した。

Phosphate invert glasses indicate stimulation effects on cell functions by released inorganic ions. The ion-releasing ability (chemical durability) of phosphate invert glasses can be controlled using intermediate oxides. In this work, we focused on the liquid phase method for preparing phosphate invert glasses. The method is simple and low energy process, which can synthesis the glass at room temperature and pressure, comparing with the conventional melt-quenching method. In this work, titanium-containing pyrophosphate glasses were prepared with the coacervation method, and their structures and ion-releasing behavior were evaluated. Pyrophosphate and titania groups formed a chain structure, such as  $(-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{Ti}-\text{O}-)_n$ , with increasing  $\text{TiO}_2$  content in the glasses. In the dissolution test, the ion-releasing amounts from the glasses were decreased with increasing  $\text{TiO}_2$  content, since the chemical durability increased with the formation of P-O-Ti bonds.

## 1. はじめに

超高齢化社会の到来に伴い、医療・健康ニーズの多様化や医療技術・機器の高度化に伴い、バイオ材料には生体现象を制御する様々な機能が求められている。その概念として、生体組織の再建を材料から能動的に制御するバイオアダプティブ材料が提案されている。生体内に存在する微量な無機イオンは、生命活動の維持に重要な役割を担い、適切な濃度であれば生理学的活性を高める機能を有する。リン酸イオンを含む数種の無機イオンが骨形成の促進に効果的であることが見出されており、マグネシウム(Mg)は細胞接着・増殖・

分化・石灰化の促進に、亜鉛(Zn)は骨形成促進や抗菌性を示すことが報告されている<sup>1</sup>。材料の無機イオン溶出挙動を厳密に設計すれば、生理学的活性を材料から能動的に制御することが可能になると考えられる<sup>2</sup>。そこで本研究は、組成を系統的に自由度高く制御できる利点があり、構造制御からイオン溶出挙動の設計が可能な点から、生体活性ガラスが無機イオンを導入する最適な母材であると考えた。生体活性ガラスの作製法としては、熔融急冷法やゾルゲル法が主に用いられている。現在までリン酸塩系ガラスの作製に用いられてきた一般的な作製方法は熔融急冷法である。この方法は原料粉末を混合したものを高温(1000~1200℃)で加熱することによって得られた融液を急冷することによってガラスを得ることができる。一方で、インバートガラスはメタ組成と比較してガラス形成能が低いことから、ガラス化することが難しい<sup>3</sup>。ゾル-ゲル法は、熔融急冷法よりも低い温度でガラスを合成可能である。この方法は、「ゲル化」、「乾燥」、「熱処理(焼結)」の3つの過程から構成されており、熔融急冷法よりも低い温度(最大600℃)でガラスの合成が可能である<sup>4</sup>。コアセルベーション法は溶液中でガラスを合成するプロセスの一種であり、ゾル-ゲル法に類似している。Foroutanらからコアセルベーション法にて、ポリリン酸と塩化カルシウムの溶液を室温で混合してリン酸ガラスを作製した報告がある<sup>5</sup>。加えて、ピロリン酸カリウムと塩化カルシウムの溶液を室温で混合することでピロリン酸塩ガラスを合成するプロセスについても報告している<sup>6</sup>。これらのガラスは、 $Q_p^0$ および $Q_p^1$ から構成され、その組成は当グループで合成した熔融急冷法リン酸塩インバートガラスと類似していた。

本研究は上述のコアセルベーション法を改変することで生体用リン酸塩ガラスの新たな作製手法として液相法に注目し、その作製プロセスおよび構造設計指針を確立することを目標とする。液相法は室温での簡便なプロセスであり、ピロリン酸塩をリン酸源として使用することで $Q_p^0$ および $Q_p^1$ から構成される、リン酸塩インバートガラスと類似した構造を形成することが期待できる。一方、コアセルベーション法または液相法により作製するリン酸塩ガラスのイオン溶出挙動制御に関する報告は非常に少ないことから、本研究では溶融法リン酸塩インバートガラスのイオン溶出挙動制御に有効であった中間酸化物の $TiO_2$ (今後、チタンと表記)に注目した。溶融法リン酸塩インバートガラスにおいてチタンは、短いリン酸塩ユニット同士を架橋し、P-O-Ti結合を形成する<sup>7</sup>。加えてP-O-Ti結合はリン酸塩インバートガラスの化学耐久性を向上させる効果がある。本研究では、液相法によりチタン含有リン酸塩ガラスを作製し、チタン導入量がリン酸塩ガラスの網目構造に及ぼす影響に注目し、その構造解析結果について報告する。

## 2. 実験方法

ピロリン酸カリウムを3.30g秤量し純水50mLに溶解させて1時間攪拌することにより、0.2Mピロリン酸カリウム水溶液を作製した。塩化カルシウムを6.10gと塩化チタン溶液(0~4.07mL)を量り取った後に純水に溶解させ1時間攪拌することで、全量50mLの塩化カルシウム(1M)と塩化チタン(0~0.4M)の混合溶液を作製した。ピロリン酸カリウム水溶液に塩化カルシウムと塩化チタンのカチオン混合溶液を2mL/minで滴下した(図1)。その後、吸引ろ過、洗浄を行い、得られた粉末を200℃で24時間乾燥することにより、ガラス粉末を得た。サンプル名は $Ti_x$ ( $x$ : カチオン溶液中の $TiCl_4$ 濃度、mol/L)とし、 $TiCl_4$ を含まないサンプルは $Ti_0$ とした。作製したガラスのアモルファスであるかの判断

を X 線回折法 (XRD, Rigaku 製 Smalrlab SE/B1) より、組成は蛍光 X 線分析法 (XRF, Rigaku 製 ZSX Primus IV) にて、ガラス網目構造は Raman スペクトル (HORIBA 製 XploRA) および  $^{31}\text{P}$  MAS-NMR (JEOL 製 JNM-ECZR series FT NMR) にて評価した。無機イオン溶出挙動は、Tix 粉末 (15 mg) を Tris 緩衝溶液 (15 mg) に 1~7 日間浸漬し、イオン溶出量を誘導結合高周波プラズマ発光分析 (ICP-OES, PerkinElmer 製 Avio 500) を用いて評価した。作製した Tix を  $160^\circ\text{C}$  で 2 時間乾熱滅菌後、MacCOY's 5A 培地と  $1\text{ mg}/1\text{ mL}$  となるように混合し、24 時間転倒攪拌を行った。その後、 $0.22\ \mu\text{m}$  フィルターを用いて培地中のガラス粉末を除去することで、抽出培地を作製した。細胞増殖試験は、96 ウェルプレートに抽出培地とヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞 (Saos-2) の懸濁液 ( $20000\ \text{cells}/\text{mL}$ ) を各ウェルに  $100\ \mu\text{L}$  ずつ ( $n=5$ ) 播種し、1, 3, 6, 9 日間培養を行った。control はガラス粉末を加えていない MacCOY's 5A 培地を使用した。

### 3. 結果と考察

Tix の XRD の結果より、全てのサンプルにおいてハローピークが確認され、アモルファスの形成を確認した。作製した Tix は  $\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{TiO}_2-\text{K}_2\text{O}$  から構成され  $\text{P}_2\text{O}_5$  含有量は約 30 mol% とインバート組成領域であり、チタン導入量に関わらず  $\text{P}_2\text{O}_5$ ,  $\text{K}_2\text{O}$  含有量は一定で、チタン導入量の増加に伴い  $\text{TiO}_2$  が増加し  $\text{CaO}$  が減少していた (図 2)。Tix の Raman スペクトル (図 3) から、すべてのガラスにおいて  $Q_P^0$  および  $Q_P^1$  に帰属するピークが確認された<sup>8,9</sup>。チタンを導入したガラスは  $\text{TiO}_y$  ( $y=4\sim6$ ) 多面体に帰属するピークが現れ、チタン含有量の増加に伴い

$\text{P}-\text{O}-\text{Ti}$  ( $1000\text{ cm}^{-1}$ ) に帰属するピークが顕著に確認された<sup>8</sup>。熔融法リン酸塩インバートガラスでは  $Q_P^1$  と  $\text{TiO}_y$  が結合し  $\text{P}-\text{O}-\text{Ti}$  結合を形成すると報告されている<sup>7</sup>。よって、Tix においてもチタン導入量の増加に伴い  $Q_P^1$  と  $\text{TiO}_y$  多面体が架橋し  $\text{P}-\text{O}-\text{Ti}$  結合を形成したと考えられる。図 4 の  $^{31}\text{P}$  MAS-NMR に示すように、すべてのサンプルにて  $Q_P^0$ ,  $Q_P^1$  の領域に、 $\text{Ti}0.15\sim\text{Ti}0.4$  は  $Q_P^2$  領域までピークの広がりが確認された。しかし、 $\text{Ti}0.2\sim\text{Ti}0.4$  の Raman スペクトルでは  $Q_P^2$  由来のピークは確認されなかった。これらの結果から、チタン導入量が少ない  $\text{Ti}0\sim\text{Ti}0.1$  は、熔融法リン酸塩インバートガラスと類似し、リン酸塩グループを無機イオンが修飾した構造になっている (図 5 上)。一方、チタン導入量が多

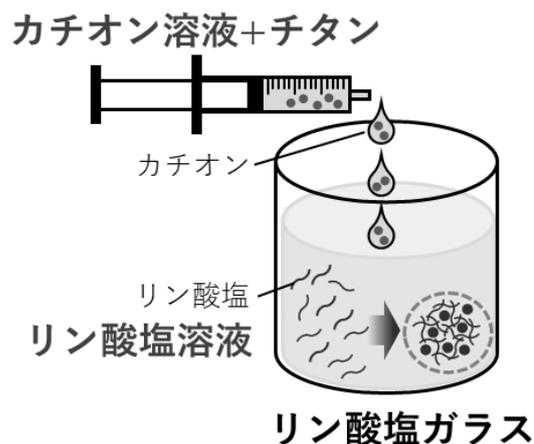


図 1. 液相法リン酸塩ガラスの作製プロセスの模式図

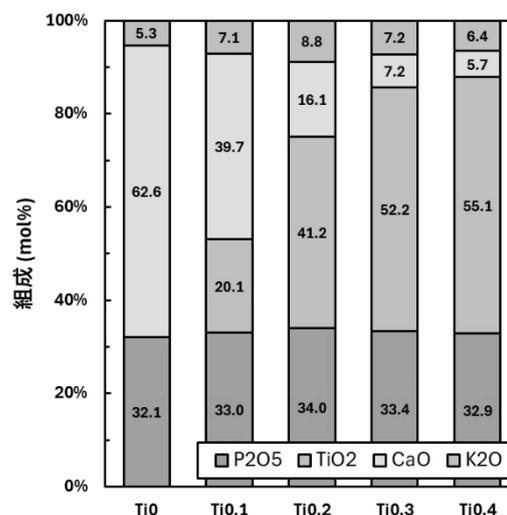
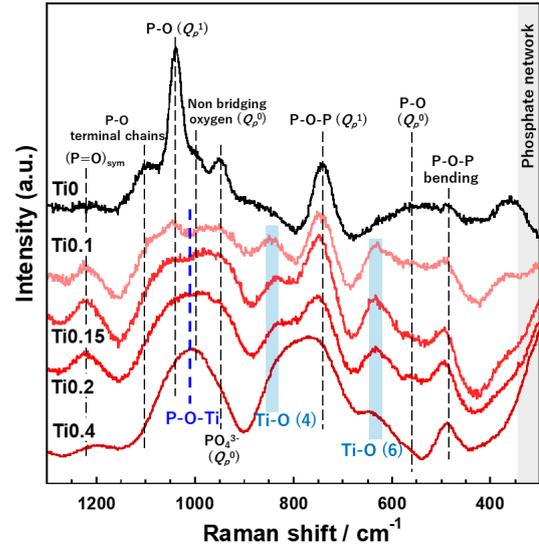
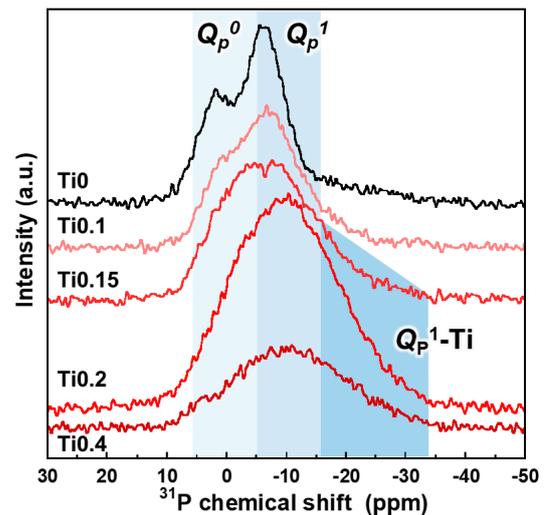
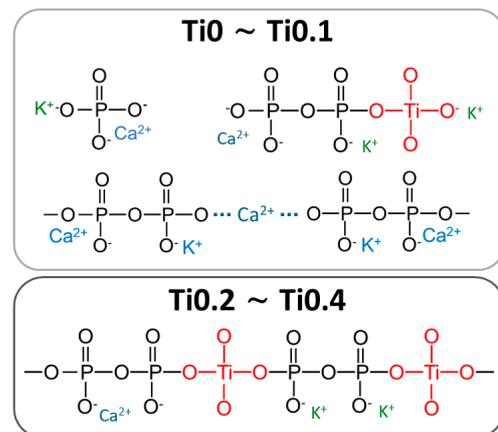


図 2. XRF より測定した Tix の組成

い場合、 $Q_p^1$  のリン酸の一部がチタンにより架橋され、架橋酸素が2つになることで NMR のピークが  $Q_p^2$  領域まで広がった。このことから、 $Ti_{0.2} \sim Ti_{0.4}$  は「(-O-P-O-P-O-Ti-O) $_n$ 」略称:  $Q_p^1$ -Ti」チェーン構造が形成されたと考えられる(図5下)。この鎖状構造は我々の知る限り、初めての報告である。さらに、組成中のチタン含有量の増加に伴い P-O-Ti 結合に帰属する Raman のピーク強度が強くなり、 $^{31}P$  MAS-NMR の  $Q_p^1$ -Ti に帰属するピーク面積も増加したことから、 $Q_p^1$ -Ti チェーン構造も増加したと考えられる。

イオン溶出挙動評価の結果では、 $Ti_0 \sim Ti_{0.1}$  と  $Ti_{0.2} \sim Ti_{0.4}$  の間で溶出挙動の違いが確認された。 $Ti_0 \sim Ti_{0.1}$  は時間経過に伴うリン酸イオンの溶出量の変化がほとんど見られない一方、 $Ti_{0.2} \sim Ti_{0.4}$  は P-O-Ti 結合の形成により化学的耐久性が向上し、イオン溶出量が減少した。加えて、 $Ti_{0.2} \sim Ti_{0.4}$  において、チタン導入量の増加に伴い、リン酸イオンの溶出量が減少していた。これは  $Q_p^1$ -Ti チェーン構造が多く形成され、ガラス全体の化学耐久性が向上したことと起因すると考えられる。細胞増殖能試験から結果より  $Ti_0 \sim Ti_{0.3}$  では、各タイムポイントにて control とほぼ同程度の細胞数を示していた。一方  $Ti_{0.4}$  に注目すると、6d, 9d の部分で他のガラスと比べ細胞数がわずかに減少していた。これは先述したように、チタン含有量の増加に伴う  $Q_p^1$ -Ti 鎖状構造の形成に起因しており、ガラスの化学的耐久性が増加し、溶出する無機イオンが減少した結果、他のガラスと比べ細胞増殖が促進されなかったと考えられる。しかし  $Ti_0 \sim Ti_{0.4}$  のすべてのガラスにおいて、時間経過に伴う大幅な細胞数の減少は見られなかったことから、作製したガラスは細胞毒性を発現することなく、細胞親和性を有していると考えられる。よって Ti-PIG は、無機イオンを徐放するガラス材料の母材として有望であると考えられる。

図3.  $Ti_x$  の Raman スペクトル図4.  $Ti_x$  の  $^{31}P$  MAS-NMR図5.  $Ti_x$  の予想構造

#### 4. 結論

液相法によりチタン含有リン酸塩インバートガラスを作製し、その網目構造、イオン溶出挙動、細胞親和性を評価した。Ti0 および Ti0.1 では、従来の溶融急冷法で作製されたリン酸塩インバートガラスと類似した構造が多く存在していた。一方、Ti0.2~Ti0.4 では、チタンはリン酸塩ユニットを架橋することにより、(-O-P-O-P-O-Ti-O)<sub>n</sub> 鎖状構造を形成すると考えられる。このような構造は、我々の知る限り初めて確認された。溶出試験では、P-O-Ti 結合の形成によりチタン含有量の増加とともに化学的耐久性が増加し、イオン溶出量は減少した。細胞実験では、作製したガラス材料による細胞毒性がないことが示された。Ti<sub>x</sub> は、イオン溶出挙動をチタン含有量によって制御できることから、生体材料用途において、治療用無機イオンのキャリア候補となりうる。

#### 5. 謝辞

本研究は、令和3年度(第43回)日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けたものである。同助成会に心より感謝いたします。

#### 6. 参考文献

1. A. Hoppe, N.S. Gldal, A.R. Boccaccini, *Biomaterials*, **32**, 2757-2774 (2011).
2. S. Lee, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **128**, 349-356 (2020).
3. T. Kasuga, Y. Abe, *J. Non-Cryst. Solids*, **243**, 70-74 (1999).
4. J.R. Jones, in *Bio-Glasses*, Edited by, (2012), pp. 29-44.
5. F. Foroutan, A. Nikolaou, B.A. Kyffin, R.M. Elliott, M. Felipe-Sotelo, J. Gutierrez-Merino, D. Carta, *Materialia*, **14**, 100939 (2020).
6. F. Foroutan, J. Mcguire, P. Gupta, A. Nikolaou, B.A. Kyffin, N.L. Kelly, J.V. Hanna, J. Gutierrez-Merino, J.C. Knowles, S.-Y. Baek, E. Velliou, D. Carta, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **5**, 6054-6062 (2019).
7. S. Lee, H. Maeda, A. Obata, K. Ueda, T. Narushima, T. Kasuga, *J. Non-Cryst. Solids*, **426**, 35-42 (2015).
8. S. Lee, CHAPTER 5: Calcium Phosphate Invert Glasses in *Phosphate and Borate Bioactive Glasses*, Edited by A. Obata, D. S. Brauer, T. Kasuga (The Royal Society of Chemistry, 2022), pp. 62-77.
9. S. Lee, H. Maeda, A. Obata, K. Ueda, T. Narushima, T. Kasuga, *J. Non-Cryst. Solids*, **438**, 18-25 (2016).