

Bioinspired Hybrid Materials Composed of Calcium Phosphate and Organic Polymers

Tadashi MIZUTANI

(Received January 25, 2021)

Composites of polymers and calcium phosphate attract interest for a possible application to artificial bones and teeth as well as mechanical materials with lightweight, high elastic moduli, and high toughness. We review three protocols of hybridization: (1) direct mixing of polymer and calcium phosphate powder, (2) polymerization of monomer in the presence of calcium phosphate powder, and (3) crystallization of calcium phosphate in the presence of polymer. The first two protocols have been studied for composites of non-polar polymers such as polyethylene and polylactic acid. The third protocol has been used for composites with water-soluble polymers. In terms of mechanical properties, the direct mixing protocol afforded satisfactory composites. However, use of water-insoluble polymers is not environmentally benign, and the recent advances in the third protocol with water-soluble polymers are discussed.

Keywords: polymer-mineral composite, bone, biomineralization, mechanical properties

キーワード: 高分子-鉱物複合材料, 骨, バイオミネラリゼーション, 力学的性質

リン酸カルシウムと高分子からなるバイオインスパイアード複合材料

水谷 義

1. はじめに

1. 1 骨について

骨は、重量分率で約 70%のヒドロキシアパタイトとコラーゲン、非コラーゲタンパク質、水などの複合体である。骨は部位によって空隙率も変化するが、みかけの密度は 0.2–1.0 g/cm³ と軽量で、弾性率は、5–22 GPa と大きく、また、力が加わると、弾性変形のうち、塑性変形を経て大きなエネルギーを吸収して破断するという高靱性な性質をもったユニークな複合材料である。骨の構造については、Barthelatらの総説²⁾、骨の力学的性質については、Wagnerらの総説³⁾に述べられている。無機相とコラーゲンの

界面については、Stock の総説⁴⁾に説明されている。

骨のヒドロキシアパタイトのサイズは小さく、部位や年齢によっても異なるが、50 nm × 25 nm × 1–4 nm の板状結晶とされている³⁾。この大きさの結晶では、密度を 3.1g/cm³ とすると 1g 当たりの比表面積は理論上、210 m²/g となりゼオライトよりも少し小さいが、高比表面積の触媒などに匹敵する大きな界面をもつことになり、有機高分子とヒドロキシアパタイトとの界面での構造や相互作用が骨の力学特性に重要な役割をはたしている。一般に無機結晶に欠陥があると、その欠陥に応力の集中が起き破壊が起きやすくなるが、30 nm 以下の大きさの結晶で

*Department of Molecular Chemistry and Biochemistry, Doshisha University, Kyoto
Telephone: +81-774-65-6623, FAX:+81-774-6801, E-mail: tmizutan@mail.doshisha.ac.jp

は、欠陥をもつ結晶も完全結晶と同じ強度をもち、骨のヒドロキシアパタイトの結晶サイズは破壊力学的に最適化されている⁹⁾。

Baker, Liu ら⁶⁾は、バイオポリマー（コラーゲン、キトサン、シルクフィブロイン、ヒアルロン酸など）とヒドロキシアパタイトの複合体について、人工骨として利用する立場から、生物的、医学的な研究を詳しく解説している。

Taubert ら⁷⁾は、ポリマー、特にホモポリマー、ブロック共重合体とヒドロキシアパタイトの複合化について詳しく解説している。また、ゼラチン、アミノゲニン、生分解性高分子や多糖などとの複合化についても言及している。Taubert ら⁸⁾の2013年の総説では、ポリマー存在下でのヒドロキシアパタイトの結晶化において、高分子の側鎖のカチオンの重要性に注目し、また、ビスホスホネートによる骨の再吸収の阻害（骨粗鬆症の治療薬）におけるアミノ基の重要性などが述べられている。

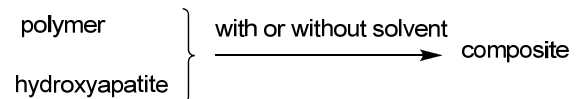
1. 2 ヒドロキシアパタイトについて

ヒドロキシアパタイトは化学式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表され、六方晶の結晶である。骨のヒドロキシアパタイトは、アニオンのリン酸イオン、水酸化物イオンが一部炭酸イオンで置換した炭酸アパタイトであり、また、カチオンのカルシウムイオンは、一部マグネシウムイオンなどで置換されたものとなっている。炭酸アパタイトは、ヒドロキシアパタイトの OH の部分を炭酸イオンで置き換えた A 型炭酸アパタイトとリン酸イオンを炭酸イオンで置き換えた B 型炭酸アパタイトが知られている。ヒドロキシアパタイトは、コラーゲンの繊維の空隙および、表面に板状結晶として成長するとされている。コラーゲンの繊維の方向とヒドロキシアパタイトの *c* 軸の方向が平行になるように配向しており、骨は異方的な力学的性質を示す。生体内での骨の生成には、コラーゲン以外のタンパク質（オステオポンチン、オステオカルシンなどの非コラーゲンタンパク質 (NCP))⁹⁾ が関与している。これらは、カルボキシ基やセリン側鎖のリン酸エステルなどのアニオン性官能基を多く

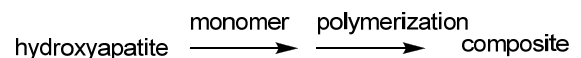
持っている。また、溶液からヒドロキシアパタイトの結晶が直接生成するのではなく、非晶質のリン酸カルシウムを経て結晶化するとされている¹⁰⁾。In vitro のヒドロキシアパタイトの結晶化も、条件によるが、非晶質のリン酸カルシウム、リン酸一水素カルシウム二水和物 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、リン酸八カルシウム ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) を経て生成すると提案されている¹¹⁾。いろいろなリン酸カルシウムの組成、溶解度、安定な pH 領域などは例えば Dorozhkin の総説¹²⁾にまとめられている。

Preparation of polymer-hydroxyapatite composites

(1) Direct mixing



(2) Polymerization in the presence of hydroxyapatite



(3) Crystallization in the presence of polymer

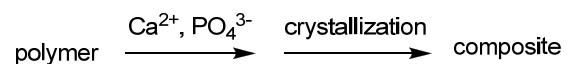


Fig. 1. Three protocols of hybridization of polymer and hydroxyapatite.

2. 高分子とリン酸カルシウムの複合化の方法

高分子とヒドロキシアパタイトの複合化の方法は、Fig. 1. に示すように大きく分けて (1) ~ (3) の3つの方法が行われている。

(1) は、高分子、ヒドロキシアパタイトそれぞれを別々に合成し、これらを混合する方法である。混合するとき高分子が溶解する溶媒を用いる場合もあり、あるいは、ヒドロキシアパタイトと高分子を直接混合し温度を上げて高分子を融解してヒドロキシアパタイト結晶を均一に分散させるという方法もある。(2) は、適切なサイズや形態のヒドロキシア

パタイトの結晶をあらかじめ合成し、これに高分子のモノマーを加えて重合させる方法である。ポリ乳酸などで行われている。(3)は、高分子をあらかじめ作っておき、ここにカルシウムイオン、リン酸イオンを加えることで、高分子の存在下でヒドロキシアパタイト結晶を成長させ複合化させる方法である。3つ目の方法では、高分子ゲルを用いて、ゲルにカルシウムイオン、リン酸イオンを拡散させる交互浸漬法¹³⁾、高分子溶液にカルシウムイオン、リン酸イオンを加えて共沈させる方法^{14,15)}、半透膜を用いて水酸化物イオンをゆっくりと拡散させヒドロキシアパタイトの結晶化を促すなどの方法がある。骨のヒドロキシアパタイトは、コラーゲン繊維の隙間や表面に非晶質のリン酸カルシウムが析出し、これが結晶化してヒドロキシアパタイトとなるとされており、(3)の方法が、最も骨などの生合成に近い方法といえる。バイオミメティックなアプローチによる骨のような構造体の合成については、Stupp ら¹⁶⁾によって総説が書かれている。

複合化の方法は、高分子が水溶性か、脂溶性かによって大きく異なる。脂溶性高分子の場合、高分子とヒドロキシアパタイトを直接混合して複合化する方法が報告されている。脂溶性のポリエチレンやポリ乳酸では、ヒドロキシアパタイトの粉末をポリエチレンと混合し融点以上に加熱して成形体を作るなどの方法が多い。このような方法で作った複合体の弾性率は、ヒドロキシアパタイトの体積分率と直線関係にあり、体積分率を0-0.6に変化させると、1-12 GPaの間の値をとるので、骨の弾性率(2-35 GPa)に近い複合材料を作ることができる¹⁷⁾。これらの材料を人工骨などに適用するとき、弾性率が大きすぎても小さすぎても骨に損傷を与えるなどの問題があるが、複合則¹⁸⁾に従ってヒドロキシアパタイトの体積分率によって複合体の弾性率が調整できることは優れている。

なお、高分子が脂溶性であっても、複合材料としての耐水性がよいとは限らない。ポリ乳酸とヒドロキシアパタイトの複合材料は、ポリ乳酸をクロロホルムやジクロロメタンに溶解し、ヒドロキシアパタイト粉末を加えて、加熱して溶媒を除去する方法で

合成されている。Ritchie ら¹⁹⁾は、L-ポリ乳酸とヒドロキシアパタイトの複合体成形物を高い湿度下で37°Cで12時間置いておくと、その曲げ強度は、20 MPaから3 MPaまで80-90%低下することを報告している。

これまでのいろいろな複合化の研究を比較すると、(1)の高分子とヒドロキシアパタイトを混合する方法が(2)や(3)などの方法と比べて、力学特性(強度や弾性率など)においては、最も満足すべき結果を与えている。しかし、ナノメートルサイズのヒドロキシアパタイトを効率よく高分子中に分散させることは、特にヒドロキシアパタイトの重量分率が高くなると容易ではない。Trau ら²⁰⁾は、ナノメートルサイズのヒドロキシアパタイトにまずヘパリンを吸着させることで、脂溶性高分子への分散性が向上し、引張強度や弾性率が複合則に従うことを報告している。また、ポリエチレンなどの脂溶性高分子を用いることは、廃プラスチックなどの環境問題を考えると問題がある。

一方、水溶性高分子の場合によく利用される方法が、(3)の共沈法である。水溶性高分子とカルシウムイオン(水酸化カルシウム、硝酸カルシウム、塩化カルシウムなど)、リン酸イオン(リン酸、リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウムなど)を水中で反応させることで、複合体粉末を沈殿させる方法である。コラーゲンやキトサンのような水溶性高分子を用いて、共沈法による複合化が詳しく検討されている。

Stupp らは¹⁴⁾、ポリグルタミン酸ナトリウム、ポリリジン塩酸塩、ポリアクリル酸のそれぞれの1 mMの水溶液中で、0.832 g Ca(OH)₂と0.0135 M H₃PO₄(500 mL)を混合し、pHを7.4に保って37°Cで反応させ、有機高分子とヒドロキシアパタイトの複合体粉末を合成した。Stupp らはこの複合体を有機アパタイト(organoapatite)と呼んでいる。いずれも結晶性の悪いヒドロキシアパタイトの生成がX線回折(XRD)で確認された。複合体のCa/Pの比は、高分子なしで合成すると、理論値の1.6に近いものが得られたが、これらの高分子存在下で合成すると、Ca/P比は、1.4-1.5となり、カルシウム欠乏のヒドロキシ

アパタイトが生成した。また、ポリアクリル酸の場合、濃度を 10mM–30mM にあげると、XRD では、ヒドロキシアパタイトの回折ピークはほとんど見えなくなり、高濃度のポリアクリル酸は、ヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害することが示された。骨の表面積は $122 \text{ m}^2/\text{g}$ ²¹⁾であり、Organoapatite も窒素吸着で求めた表面積は、 $174\text{--}226 \text{ m}^2/\text{g}$ であった。共沈法では、ヒドロキシアパタイトの小さな結晶が生成していることを示している。

骨の主たる有機成分であるコラーゲンは、親水基をもたないアミノ酸であるグリシン 32.6%、プロリン 22.6%、アラニン 12.6%を含むタンパク質で、アスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニン、リシンなどのイオン基をもつアミノ酸は合わせて 16.2%しか含んでいない²²⁾。コラーゲンの溶解度は、コンフォーメーションやフォールディングによって変わるので、単純に水溶性、脂溶性とは言えないが、変性したものは、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノールや 0.5 M 酢酸水溶液に溶解する。後者の溶液には、1 mg/mL 以上溶解するが、コラーゲンの種類によっては不溶の場合もあると報告されている。

3. ヒドロキシアパタイトの結晶形態の有機分子による制御

ヒドロキシアパタイトは六方晶の結晶であり、*c* 軸方向に成長した針状や板状の形態をとることが多い。しかし、結晶化させるときに有機分子を存在させると、生成する結晶の形態をコントロールすることができる。5wt%以上のエチルアミンを使ってヒドロキシアパタイトの水熱合成を行うと板状結晶が得られ、板状の法線方向が *a* 軸であると報告されている²³⁾。メタノールを添加してヒドロキシアパタイトを合成しても同様の形態の結晶が得られる²⁴⁾。これは、ヒドロキシアパタイトの水酸化物イオンがメトキシドイオンに置換され、*c* 軸方向への結晶成長が抑制されるためとされている。Neira らは²⁵⁾、硝酸カルシウムとリン酸水素二アンモニウムの pH 3 の溶液に尿素を加え、温度を 25°C から 90°C まで変化させて、イオン濃度や温度変化のパターンによって、板状、ヘキサゴナルプリズム、針状、細かい板状の

ヒドロキシアパタイトを作り分けることを報告している。このなかで、ヘキサゴナルプリズムの結晶は、*c* 軸方向に成長したものであるが、細かい板状の結晶は、(102),(211)方向に成長したものであることを、透過電子顕微鏡の制限視野電子線回折から明らかにしている。

Zhu らは²⁶⁾、硝酸カルシウム、リン酸水素二ナトリウムの水溶液にグルタミン酸を加えて 160°C で 24 時間加熱するという水熱合成を行い、リボン状の形態をもつヒドロキシアパタイトを合成している。リボンの幅が 500 nm、長さが、8 μm のものを合成している。結晶は *c* 軸方向に成長している。

Chane-Ching²⁷⁾らは、硝酸カルシウム、リン酸アンモニウム、アンモニアに、添加剤として Ca^{2+} に対してモル比で 2 となるようにアミノ酸である Gly, Ala, Ser, Lys, Arg, Asp を加えて 80°C, pH 9 の条件でヒドロキシアパタイトの結晶を合成した。透過電子顕微鏡 (TEM) 観察によって *c* 軸方向に成長した棒状の結晶が得られることがわかり、結晶の *cla* のアスペクト比は、アミノ酸の種類によって変わり、Lys の 3 から Asp の 43 までの違いがあった。Asp は、分子内に 2 つのカルボキシ基をもち、これらが 2 つの炭素を介して結合しているため、ヒドロキシアパタイトの *c* 軸と平行な面に選択的に吸着するためであるとされている。

ヒトの皮質骨には、ほぼ一定の重量分率 ($2.0 \pm 0.1 \text{ wt}\%$) のクエン酸が含まれており、死後約 100 年間で減少するので、クエン酸の量を定量することで死後の年数を見積もることができるとされている²⁸⁾。したがって、クエン酸とヒドロキシアパタイトとの相互作用は興味深い。

Cifuentes らは²⁹⁾、塩化カルシウム、リン酸水素二ナトリウムにクエン酸三ナトリウムを加え、pH 10–10.5、室温で 45 分反応させて、クエン酸を含むヒドロキシアパタイトを合成した。合成するときのクエン酸の濃度を高くすると、ヒドロキシアパタイトに含まれるクエン酸の重量分率は、6%–10%にまで増大した。クエン酸を加えずに合成したヒドロキシアパタイトよりもクエン酸を加えて合成したヒドロキシアパタイトは、Ca/P 比が大きく、クエン酸はヒド

ロキシアパタイトの表面のリン酸イオンを置換していることが分かった。

Hu らは、固体 NMR の検討から³⁰⁾骨のヒドロキシアパタイトの表面にはクエン酸が吸着しており、有機物の 5.5 wt% がクエン酸であると見積もられている。c 軸と平行な面(1010)にクエン酸が吸着し、CH₂基が外を向くので、コラーゲンの疎水基と接触し安定化していると考えられている。

また、Mann ら³¹⁾によると、糖類の存在下でヒドロキシアパタイトの結晶を生成させると、ヒドロキシアパタイトの結晶形態が変化することが見出されている。塩化カルシウムとリン酸水素二ナトリウムを含む溶液からのヒドロキシアパタイト結晶の生成では、ヒドロキシアパタイトの板状結晶が得られるが、ここに、グルコース、ガラクトース、マンノース、グルクロン酸、N-アセチルグルコサミン、フルクトースをリン酸イオンの 1/6 モル加えると c 軸方向に成長した針状のヒドロキシアパタイトが生成する。ソルビトールや 1,2-ブタンジオールも同様の効果がある。ヒドロキシアパタイトのアスペクト比は、ソルビトール = 1,2-ブタンジオール > フルクトース > グルコース = ガラクトース = マンノース = グルクロン酸 = N-アセチルグルコサミンの順となった。このような効果は、糖類がヒドロキシアパタイトの結晶核から塩化物イオンを取り除く効果、および、ヒドロキシアパタイトの{001}面への糖類の吸着によるものと考えられている。

シリカゲルなどケイ酸塩の無機物は岩石や土の成分として地球上に大量に存在するのに対して、ヒドロキシアパタイトの成分であるカルシウムやリンのクラーク数はそれぞれ 5 番目、13 番目であり、地殻中に豊富に存在する元素とは言えない。実際、珪藻や稲などは、シリカを無機成分として利用している。しかし、シリカゲルは基本的にカチオンを吸着するが、アニオンは吸着しない。これは、ケイ酸が酸でありプロトンを解離してアニオンとなりやすいためである。珪藻などのシリカからなるバイオミネラルは、ポリカチオン（ポリアミン）を含むタンパク質がそのミネラル化に関与している^{32,33)}。一方、ヒドロキシアパタイトのミネラル化に

は、アニオン性の高分子、カチオン性の高分子³⁴⁾、また、アニオンとカチオンの協同効果³⁵⁾が示唆されている。ヒドロキシアパタイトは、結晶面によってカチオンもアニオンも吸着し、特に、c 軸に垂直な面はアニオンをよく吸着するとされている。タンパク質やいろいろな分子との界面の結合がヒドロキシアパタイトの方が多彩であり、多くの生物の硬組織の無機相としてヒドロキシアパタイトが利用されているのではないと思われる。ヒドロキシアパタイトの吸着性を利用してクロマトグラフィーの固定相としてタンパク質、DNA、糖類などの分離に利用されている³⁶⁾。

4. いろいろな高分子との複合化

4. 1 脂溶性高分子

4. 1. 1 ポリ乳酸

Ritchie ら¹⁹⁾は、L-ポリ乳酸、DL-ポリ乳酸、ポリ乳酸-グリコライド (75/25, 50/50)、ポリ(ϵ -カプロラクトン)などのポリマーとヒドロキシアパタイトの接着力を表面張力の測定により評価した。複合形成物の曲げ強度は界面の接着力の増加とともに大きくなった。また、この複合体を高湿度下で 37°C で 12 時間置いておくと、曲げ強度は、L-ポリ乳酸-ヒドロキシアパタイトでは、20 MPa から 3 MPa まで 80-90%強度が低下した。

春日ら³⁷⁾は、ポリ L-乳酸 (PLA) のジクロロメタン溶液とヒドロキシアパタイトの結晶と混合して得た複合体 (ヒドロキシアパタイトの重量分率 0-60wt%) を、40 MPa, 180 °C で一軸加圧成形した。成形体の曲げ弾性率は、ヒドロキシアパタイトの重量分率とともに直線的に増加し 5-10 GPa であった。破断伸びは、ヒドロキシアパタイトの重量分率の増加とともに小さくなった。

De Groot ら³⁸⁾は、ヒドロキシアパタイトとモノマーの L-ラクチドを混合し重合させて複合体を得ている。ポリ乳酸のみ、30wt% ヒドロキシアパタイト含む複合体、50wt% ヒドロキシアパタイトを含む複合体の引張強度は、それぞれ 21.8, 30.8, 10.3 MPa となり、30 wt% ヒドロキシアパタイトを含む複合体が最も引張強度は大きかった。複合材は、山羊の体内、

もしくは、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で 3 週間まで曲げ強度は 50% に低下することが分かった。

Dean ら³⁹⁾は、poly(DL-Lactide-co-glycolide) とナノヒドロキシアパタイトを electrospinning 法で複合化した。ヒドロキシアパタイトの重量分率が 1-20 wt% のものを作っている。ヒドロキシアパタイトの重量分率が 20wt% を超えるとヒドロキシアパタイトの凝集が起こる。ガラス転移点は、ヒドロキシアパタイトの重量分率の上昇とともに上がった。この複合材料では、ヒドロキシアパタイトの重量分率が 1-5% では、ヒドロキシアパタイトは複合材料の強化剤として、10-20% では欠陥として働くことが示されている。

4. 1. 2 ポリエチレン

Bonfield らは¹⁷⁾、ポリエチレンとヒドロキシアパタイトの複合体を両者を混合することで、ヒドロキシアパタイトの体積分率 V_f が 0-0.6 の範囲で合成し、複合体のヤング率がヒドロキシアパタイトの体積分率と直線関係で増加することを示した。

4. 1. 3 ポリアリルエーテル

Wang らは⁴⁰⁾、ポリアリルエーテルとヒドロキシアパタイトの複合体をヒドロキシアパタイトの重量分率が 60% までの範囲で合成した。ポリアリルエーテルをクロロホルムに溶解し、ここにヒドロキシアパタイトの結晶粉末を加えてクロロホルムを留去することで複合化した。複合体のヤング率がヒドロキシアパタイトの重量分率が増加するにつれて大きくなった。

4. 2 親水性高分子

4. 2. 1 コラーゲン

菊池、田中ら^{41,42)}は、リン酸とコラーゲンの水溶液と水酸化カルシウムの水懸濁液を 25, 30, 35, 40°C で pH 7, 8, 9 で混合することでコラーゲンとヒドロキシアパタイトの複合体を合成した。複合体粉末を一軸加圧成形ののち、200 MPa, 16 時間の冷間等方圧プレスで成形し 3 点曲げ試験を行った。曲げ強度は pH 9, 40°C で複合化したものが最大で 40 MPa であった (ヒドロキシアパタイトの重量分率 81-93%)。これは、骨の強度の約 4 分の 1 である。コラーゲンのカ

ルボキシレート基がヒドロキシアパタイトの *c* 軸に垂直な表面のカルシウムイオンと相互作用し、コラーゲンの繊維とヒドロキシアパタイトの針状結晶が平行に配向して複合化したものが得られている。このコラーゲン-ヒドロキシアパタイト複合体をグルタルアルデヒド架橋を行うと、21 日間 PBS に浸漬した時の水の吸収率はグルタルアルデヒドの架橋率とともに減少し、架橋によって耐水性が向上することがわかった⁴³⁾。

4. 2. 2 多糖類

Reid らは⁴⁴⁾、骨のヒドロキシアパタイトと有機相の界面にある分子はコラーゲンなのかどうかを固体 NMR を用いて検討した。³¹P-¹³C の磁気双極子の空間的カップリングを利用して、リン原子から 5-6 Å 以内にある炭素のシグナルを特定し、その化学シフト値から、糖の 2 級水酸基が結合している炭素とアノマー炭素がヒドロキシアパタイトの表面に存在すると報告している。糖の種類までは NMR からは判定できていないが、ヒアルロン酸、ケラタン、コンドロイチンなどではないかと考えられている。貝殻の有機-無機複合体は、炭酸カルシウムとキチンからなることもあり、多糖類とヒドロキシアパタイトの複合体の研究は活発に行われている。

4. 2. 3 キトサン

キチンの *N*-アセチル基を加水分解してアミノ基に変換したキトサンは、水溶性であり、キトサンとヒドロキシアパタイトの複合体の研究例は非常に多い。Yubao ら⁴⁵⁾は、キトサンを 2% 酢酸水溶液に溶解し、リン酸、水酸化カルシウムを室温で加えて共沈し、2 日間の熟成ののち乾燥して複合体をえている。ヒドロキシアパタイトの重量分率が 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100% を合成している。圧縮強度は、重量分率が 70% のもので 120 MPa であり、生分解性や bioactivity がある。

また、複合体の耐水性評価も行っている。37°C で疑似体液 (SBF) 溶液に浸漬させた後の吸水率と浸漬による重量減少を評価したところ、重量減少は、1, 2, 4, 8 週間後 10-30% であり、4 週間後の重量減少の 30% が最大であった。吸水率は、50-250% であった。

Fang らは⁴⁶⁾、キトサンの膜を半透膜として利用し、

水酸化物イオンをカルシウムイオン、リン酸イオン、キトサンを含む溶液に拡散させることによって、キトサン-ヒドロキシアパタイトの複合体が作られた。ヒドロキシアパタイトの重量分率が 0-70%の複合体を合成した。まず、キトサン、水酸化カルシウム、リン酸を共沈させ、これをキトサンでコートした半透膜チューブに入れ、このチューブを水酸化ナトリウム水溶液に浸して、OH⁻イオンを拡散させ、ヒドロキシアパタイトの結晶化を促した。得られた複合体を、100°C、200 MPa で成形し、その圧縮強度はヒドロキシアパタイトの重量分率が 50-70%のときに最大となり、170 MPa、弾性率は、1.7 GPa であった。

Zhang らもキトサンを架橋した半透膜を介して水酸化物イオンを拡散させ、ヒドロキシアパタイトの重量分率 0, 5, 10, 20, 40%の複合体を合成し、曲げ強度 133 MPa、曲げ弾性率 6.8 GPa の成形体を得ている⁴⁷⁾。

田中ら⁴⁸⁾は、キトサンとヒドロキシアパタイトを 25°C で共沈しヒドロキシアパタイトの重量分率が 20-80%の複合体を合成した。この複合体を 20 MPa で一軸加圧成形すると、ヒドロキシアパタイトとキトサンの繊維が平行に配向したものが得られた。この複合体の成形物は、機械的に柔軟であり、120°C で 20 分水蒸気で処理すると柔軟性が向上した。ヒドロキシアパタイトの重量分率が 50% のもので曲げ強度は、5-9 MPa、破断時の伸びは $\epsilon = 15-105\%$ となり、有機-無機複合体としては、非常に柔軟性があるものが得られている。

山口ら⁴⁹⁾は、キトサン-ヒドロキシアパタイト複合体を共沈法で合成するとき、カチオン性高分子であるキトサンとヒドロキシアパタイトの重量分率が変わると粒子サイズが変化し、キトサンが 25% のとき、粒子サイズは最大の 17 μm となり、この時ゼータ電位は 0 であることを示している。共沈時にクエン酸を添加しても、粒子サイズが大きくなり、これは、クエン酸とキトサンがイオンコンプレックスを作るためであると考察している。圧縮強度は粒子サイズが最大るとき最大となった。

Moladian-Oldak ら⁵⁰⁾は、貝殻の階層構造の構築を目的として、キトサンとマレイン酸から層状の会合

体を作り、これにリン酸二水素ナトリウムと塩化カルシウム水溶液を加えてモネタイトの板状結晶をキトサン-マレイン酸集合体の層間でつくった。この複合体を NaOH 中 70°C で 5 分間加熱することで、モネタイトからトポタクティック相変化により板状のヒドロキシアパタイトの結晶に変換させ、レンガ-モルタル構造をもったキトサン-マレイン酸-ヒドロキシアパタイト複合体を得た。この複合体を 10 MPa、130 °C で 48 時間加圧成形を行った。この成形体の弾性率は 9-13 GPa、硬度は、0.4 GPa であり、歯の象牙質と同じレベルの硬度と弾性率をヒドロキシアパタイトの重量分率が 89.4%の複合体で達成した。

4. 2. 4 デンプン

Miculescu ら⁵¹⁾によって、デンプンとヒドロキシアパタイトの複合体の総説が報告されている。

Sadjadia ら⁵²⁾は、小麦デンプン、0.2, 0.5, 0.8 g を 70 mL の水に分散させ、塩化カルシウムを加え、リン酸水素二ナトリウムを加えて室温で 1 晩反応させた。デンプンの濃度が高いほど、XRD のピークはブロードであり、高濃度のデンプンはヒドロキシアパタイトの結晶成長を阻害した。

われわれ⁵³⁾は、天然のデンプンのグルコースはわずかにリン酸エステル化されていることに注目し、リン酸化タピオカデンプンとリン酸基を含まないタピオカデンプンを共沈法によってヒドロキシアパタイトと複合化した。リン酸化デンプンと複合させたものの方が、X 線回折のヒドロキシアパタイトのピークはブロードであり、リン酸エステル基によってヒドロキシアパタイトの結晶成長が抑制されることが示された。また、曲げ強度もリン酸化デンプンとの複合体の方が大きく、デンプンのリン酸エステル基は、ヒドロキシアパタイトの結晶成長や有機-無機界面の結合などに関与していることが示唆された。Li ら⁵⁴⁾は、コラーゲンにおいてもリン酸化したコラーゲンをヒドロキシアパタイトと複合化させると、リン酸基をもたないコラーゲンとの複合体と比べて曲げ強度が 32 MPa から 49 MPa に大きくなることを報告している。

4. 2. 5 セルロース

Salama は⁵⁵⁾、セルロース、セルロースマイクロ結晶、ナノ結晶、TEMPO 酸化セルロース、バクテリアセルロース、カルボキシメチルセルロースとリン酸カルシウムとの複合化についてのレビューを報告している。

大槻ら⁵⁶⁾は、セルロースを TEMPO 酸化し、グルコースの 0–27%が酸化されたセルロースナノファイバー (CNF) を合成した。この酸化セルロースを SBF に浸漬し、36.5°Cで7日間ヒドロキシアパタイトの結晶生成を追跡したところ、9.9%酸化した CNF が最も多くのヒドロキシアパタイトを生成することが分かった。棚橋ら⁵⁷⁾の研究でリン酸イオンやカルボン酸イオンはヒドロキシアパタイトの結晶生成を促進することが分かっているが、ヒドロキシアパタイトの結晶生成にとって CNF 上のカルボン酸イオンの最適な量が存在することを明らかにしている。

われわれ⁵⁸⁾は、TEMPO 酸化 CNF がセルロース鎖のグルコースユニットの1つおきの1級ヒドロキシ基が酸化されカルボキシ基になっていることに注目し、TEMPO 酸化 CNF の分散液にリン酸イオン、カルシウムイオンの順で加えて共沈させたとき、カルシウムイオン、リン酸イオンの順で加えて共沈させたものの複合体について曲げ試験などを行って評価した。前者の方法で作った複合体は曲げ試験でも脆性的に破壊せず、その破面をみると 140 μm くらいの長さの繊維状の集合体が観察され、TEMPO 酸化 CNF が鋳型となってヒドロキシアパタイトと複合化し繊維状の構造を作ったのではないかと考えている。

4. 2. 6 アルギン酸

Dalas ら⁵⁹⁾は、アルギン酸の存在下でのヒドロキシアパタイトの結晶成長速度を求めている。アルギン酸濃度が 0.2–1.3 μM で、速度は、42–86%低下することが示された。これは、アルギン酸がヒドロキシアパタイト表面に強く吸着するためである。

4. 2. 7 ポリビニルアルコール (PVA)

Pramanik ら⁶⁰⁾は、リン酸化 PVA とヒドロキシアパタイトを水中で混合しヒドロキシアパタイトの重量分率が 10–60%の複合体を得た。この複合体の引張強度は 13–26 MPa であった。

われわれ⁶¹⁾は、PVA のヒドロキシ基を 5, 10, 20%リン酸エステル化したものに、カルシウムイオンを加えてゲル化し、リン酸イオン、カルシウムイオンを交互浸漬させて複合体を合成した。リン酸エステルを多く含むものほど、X 線回折のピークはブロードとなり結晶成長が遅いことが分かった。また、10%のリン酸エステルを含む PVA で複合化させたものが破断伸びが最大であり、最も高靱性であることが分かった。

4. 2. 8 ポリアクリル酸 (PAA)

岩坪ら^{62,63)}は、PVA-PAA ゲル (凍結—融解の繰り返しでゲル化)、キトサン—PAA ゲル、ゼラチン—PAA ゲル (加熱でゲル化)、ポリメタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) -PAA ゲルを作り、これを $\text{CaCl}_2\text{--K}_2\text{HPO}_4$ 溶液に浸して複合化した。これらのゲルは、ヒドロキシ基やカルボキシ基をもち、コラーゲンと非コラーゲタンパク質 (NCP) のモデルとなっている。PVA-PAA ゲルから得られたヒドロキシアパタイトの重量分率 65%の複合体の引張強度は 80 MPa、弾性率は、2.9 GPa であった。

Bigi ら^{64,65)}は、PAA 存在下で硝酸カルシウムとリン酸アンモニウム、アンモニアを反応させヒドロキシアパタイトの合成を行った。PAA の量は複合体中に 15wt%まで含まれたものができている。PAA が増えると *c* 軸方向に伸びたヒドロキシアパタイトが生成し、これは、PAA がヒドロキシアパタイトの *c* 軸と垂直な面に選択的に吸着するためである。

Zhu ら⁶⁶⁾は、オレイン酸存在下で、リン酸水素ナトリウム、塩化カルシウム、水酸化ナトリウムを水—メタノール溶媒中で混合し、180°Cで24時間圧力容器中で加熱して、長さが数百マイクロン、直径が 10 nm の非常に長いヒドロキシアパタイト繊維の結晶を合成した。この分散液を、シリンジからゆっくりと無水エタノール中に導入し繊維を得た。また、ヒドロキシアパタイト繊維の結晶の分散液とポリアクリル酸ナトリウム (PAAS) を混合することで複合化させて、同様に湿式の紡錘して長繊維ヒドロキシアパタイト—PAA 複合繊維を作成した。これは、貝殻のようなレンガ—モルタル構造をもった複合体となっている。PAA とヒドロキシアパタイトの重量比が 0,

0.1, 0.2, 0.3, 0.4 もので、引張試験を行うと、重量比が 0.2 のものが最も引張強度が高く、200 MPa 以上、重量比が 0.3 のものが最も引張弾性率が高く 25 GPa であり、骨の強度や弾性率をしのぐものであった。長繊維のヒドロキシアパタイトの合成方法の開発と湿式紡糸によって配向した繊維ができるということで、大変興味深い研究成果である。

彼らは⁶⁷⁾、塩化カルシウムとリン酸二ナトリウムの中での反応で、ヒドロキシアパタイトが生成する過程の速度を検討した。このとき、ポリアクリル酸、リン酸基をもつポリアクリル酸、スルホン酸基をもつポリアクリルアミド、ポリアリルアミンなどの水溶性高分子を加えて、これらの水溶性高分子の効果を検討した。核生成の速度や結晶成長の速度は、カルシウムイオン、高分子の種類や濃度、高分子の分子量によって変化し、ポリアクリル酸は、塩化カルシウム 10 mM、リン酸水素二ナトリウム 6 mM、ポリアクリル酸 5 mM の濃度条件、温度が 20°C で、ヒドロキシアパタイトの核生成と結晶成長を加速することが示されている。

5. まとめと今後の展望

骨や歯の優れた力学特性は、ナノメートルサイズの結晶が配向して有機相と結合し、レンガーモルタル構造をとることによるとされている。そのためには、ヒドロキシアパタイトの結晶をサイズや形態を制御して作る方法の開発が重要である。また、適切な官能基・疎水性をもつ高分子の存在下でリン酸カルシウムの結晶化を行うことで、生体骨に似た構造をつくることができると期待される。一方、有機相と無機結晶の界面の結合や界面における水の状態など、骨においても人工的な複合材料においても不明な点が多い。特に水溶性高分子の場合、複合材の力学特性に水がどのような影響を与えるのか、分子設計によって水の効果をコントロールできるのか、を明らかにすることは、今後の検討課題と考えられる。これらの研究は、人工骨などの医学的な応用以外にも、軽量で環境負荷の小さい高性能な力学材料として多方面での応用が期待できる。

参考文献

- 1) J.-Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, "Mechanical Properties and the Hierarchical Structure of Bone", *Medical Engineering & Physics*, **20**, 92-102 (1998).
- 2) F. Barthelat, Z. Yin, M. J. Buehler, "Structure and Mechanics of Interfaces in Biological Materials", *Nature Rev. Mater.*, **1**, 16007 (2016).
- 3) S. Weiner, H. D. Wagner, "THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations", *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **28**, 271-298 (1998).
- 4) S. R. Stock, "The Mineral-Collagen Interface in Bone", *Calcif. Tissue Int.*, **97**, 262-280 (2015).
- 5) H. Gao, B. Ji, I. L. Jager, E. Arzt, P. Fratzl, "Materials Become Insensitive to Flaws at Nanoscale: Lessons from Nature", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**, 5597-5600 (2003).
- 6) J. Li, B. A. Baker, X. Mou, N. Ren, J. Qiu, R. I. Boughton, H. Liu, "Biopolymer/Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Adv. Healthcare Mater.*, **3**, 469-484 (2014).
- 7) S. Schweizer, A. Taubert, "Polymer-Controlled, Bio-Inspired Calcium Phosphate Mineralization from Aqueous Solution", *Macromol. Biosci.*, **7**, 1085-1099 (2007).
- 8) K. Bleek, A. Taubert, "New Developments in Polymer-Controlled, Bioinspired Calcium Phosphate Mineralization from Aqueous Solution", *Acta Biomaterialia*, **9**, 6283-6321 (2013).
- 9) A. George, A. Veis, "Phosphorylated Proteins and Control over Apatite Nucleation, Crystal Growth, and Inhibition", *Chem. Rev.*, **108**, 4670-4693 (2008).
- 10) L. B. Gower, "Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization", *Chem. Rev.*, **108**, 4551-4627 (2008).
- 11) J. A. M. van der Houwen, G. Cressey, B. A. Cressey, E. Valsami-Jones, "The Effect of Organic Ligands on the Crystallinity of Calcium Phosphate", *J. Crystal Growth*, **249**, 572-583 (2003).
- 12) S. V. Dorozhkin, "Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine", *Materials*, **2**, 399-498 (2009).
- 13) D. Ogomi, T. Serizawa, M. Akashi, "Bioinspired Organic-Inorganic Composite Materials Prepared by an Alternate Soaking Process as a Tissue Reconstitution Matrix", *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **67**, 1360-1366 (2003).
- 14) S. I. Stupp, G. W. Ciegler, "Organoapatite: Materials for Artificial Bone. I. Synthesis and Microstructure." *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 169-183 (1992).
- 15) J. Tanaka, M. Kikuchi, "Development of Biomaterial Using Biomimetic Method", *セラミックス*, **34**, 543-546 (1999).
- 16) L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoecke, S. I. Stupp, "Biomimetic Systems for Hydroxyapatite

- Mineralization Inspired By Bone and Enamel”, *Chem. Rev.*, **108**, 4754-4783 (2008).
- 17) W. Bonfield, M. D. Grynopas, A. E. Tully, J. Bowman, J. Abram, “Hydroxyapatite Reinforced Polyethylene - a Mechanically Compatible Implant Material for Bone Replacement”, *Biomaterials*, **2**, 185-186 (1981).
- 18) A. P. Jackson, J. F. Vincent, R. M. Turner, “The Mechanical Design of Nacre”, *Proc. R. Soc. Lond. B*, **234**, 415-440 (1988).
- 19) R. E. Neuendorf, E. Saiz, A. P. Tomsia, R. O. Ritchie, “Adhesion between Biodegradable Polymers and Hydroxyapatite: Relevance to Synthetic Bone-Like Materials and Tissue Engineering Scaffolds”, *Acta Biomaterialia*, **4**, 1288-1296 (2008).
- 20) B. Rai, W. Noohom, P. H. Kithva, L. Grondahl, M. Trau, “Bionanohydroxyapatite/Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Composites with Improved Particle Dispersion and Superior Mechanical Properties”, *Chem. Mater.*, **20**, 2802-2808 (2008).
- 21) A. S. Posner, “The Structure of Bone Apatite Surfaces”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 241-250 (1985).
- 22) S. Kunii, K. Morimoto, “Separation of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ Chains from Chicken Type I Collagen by Normal Phase Chromatography”, *Mem. School B.O.S.T. Kinki University*, **22**, 25-32 (2008).
- 23) F. Nagata, M. Toriyama, K. Teraoka, Y. Yokogawa, “Influence of Ethylamine on the Crystal Growth of Hydroxyapatite Crystals”, *Chem. Lett.*, 780-781 (2001).
- 24) F. Nagata, Y. Yokogawa, M. Toriyama, Y. Kawamoto, T. Suzuki, K. Nishizawa, “Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Crystals in the Presence of Methanol”, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **103**, 70-73 (1995).
- 25) I. S. Neira, Y. V. Kolen’ko, O. I. Lebedev, G. V. Tendeloo, H. S. Gupta, F. Guitian, M. Yoshimura, “An Effective Morphology Control of Hydroxyapatite Crystals via Hydrothermal Synthesis”, *Crystal Growth & Design*, **9**, 466-474 (2009).
- 26) H. G. Zhang, Q. Zhu, “Glutamic Acid-Mediated Synthesis of Ultralong Hydroxyapatite Nanoribbons under Hydrothermal Conditions”, *Chem. Lett.*, **34**, 788-789 (2005).
- 27) R. Gonzalez-McQuire, J.-Y. Chane-Ching, E. Vignaud, A. Lebugle, S. Mann, “Synthesis and Characterization of Amino acid-Functionalized Hydroxyapatite Nanorods”, *J. Mater. Chem.*, **14**, 2277-2281 (2004).
- 28) H. P. Schwarcz, K. Agur, L. M. Jantz, “A New Method for Determination of Postmortem Interval: Citrate Content of Bone”, *J. Forensic Sci.*, **55**, 1516-1522 (2010).
- 29) I. Cifuentes, P. F. Gonzalez-Diaz, L. Cifuentes-Delatte, “Is There a ‘Citrate-Apatite’ in Biological Calcified Systems?”, *Calcif. Tissue Int.*, **31**, 147-151 (1980).
- 30) Y.-Y. Hu, A. Rawal, K. Schmidt-Rohr, “Strongly Bound Citrate Stabilizes the Apatite Nanocrystals in Bone”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **52**, 22425-22429 (2010).
- 31) D. Walsh, J. L. Kingston, B. R. Heywood, S. Mann, “Influence of Monosaccharides and Related Molecules on the Morphology of Hydroxyapatite”, *J. Crystal Growth*, **133**, 1-12 (1993).
- 32) N. Kroeger, R. Deutzmann, M. Sumper, “Polycationic Peptides from Diatom Biosilica That Direct Silica Nanosphere Formation”, *Science*, **286**, 1129-1132 (1999).
- 33) T. Mizutani, H. Nagase, N. Fujiwara, H. Ogoshi, “Silicic Acid Polymerization Catalyzed by Amines and Polyamines”, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 2017-2022 (1998).
- 34) M. Junginger, K. Kita-Tokarczyk, T. Schuster, J. Reiche, F. Schacher, A. H. E. Mueller, Helmut Coelfen, A. Taubert, “Calcium Phosphate Mineralization beneath a Polycationic Monolayer at the Air/Water Interface”, *Macromol. Biosci.*, **10**, 1084-1092 (2010).
- 35) B. Palazzo, D. Walsh, M. Iafisco, E. Foresti, L. Bertinetti, G. Martra, C. L. Bianchi, G. Cappelletti, N. Roveri, “Amino Acid Synergetic Effect on Structure, Morphology and Surface Properties of Biomimetic Apatite Nanocrystals”, *Acta Biomaterialia*, **5**, 1241-1252 (2009).
- 36) T. Kawasaki, S. Takahashi, K. Ikeda, “Hydroxyapatite High-Performance Liquid Chromatography: Column Performance for Proteins”, *Eur. J. Biochem.*, **152**, 361-371 (1985).
- 37) T. Kasuga, Y. Ota, M. Nogami, Y. Abe, “Preparation and Mechanical Properties of Poly(lactic Acid) Composites Containing Hydroxyapatite”, *Biomaterials*, **22**, 19-23 (2001).
- 38) C. C. P. M. Verheyen, J. R. de Wijn, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot, “Evaluation of Hydroxyapatite/poly (L-lactide) Composites: Mechanical Behavior”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 1277-1296 (1992).
- 39) M. V. Jose, V. Thomas, K. T. Johnson, D. R. Dean, E. Nyairo, “Aligned PLGA/HA Nanofibrous Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering”, *Acta Biomaterialia*, **5**, 305-315 (2009).
- 40) X. Jiang, Y. Yao, W. Tang, D. Han, L. Zhang, K. Zhao, S. Wang, Y. Meng, “Both Phosphonic Acid- and Fluorine-Containing Poly(aryl ether)-hydroxyapatite Biocomposites: Toward Enhanced Biocompatibility and Bone-like Elastic Modulus”, *ACS Appl. Bio Mater.*, **3**, 9019-9030 (2020).
- 41) M. Kikuchi, T. Ikoma, S. Itoh, H. N. Matsumoto, Y. Koyama, K. Takakuda, K. Shinomiya, J. Tanaka, “Biomimetic Synthesis of Bone-Like Nanocomposites Using

- the Self-Organization Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen”, *Compos. Sci. Technol.*, **64**, 819-825 (2004).
- 42) M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya, J. Tanaka, “Self-Organization Mechanism in a Bone-Like Hydroxyapatite/collagen Nanocomposite Synthesized in vitro and its Biological Reaction in vivo”, *Biomaterials*, **22**, 1705-1711 (2001).
- 43) M. Kikuchi, H. N. Matsumoto, T. Yamada, Y. Koyama, K. Takakuda, J. Tanaka, “Glutaraldehyde Cross-Linked Hydroxyapatite/collagen Self-Organized Nanocomposites”, *Biomaterials*, **25**, 63-69 (2004).
- 44) E. R. Wise, S. Maltsev, M. E. Davies, M. J. Duer, C. Jaeger, N. Loveridge, R. C. Murray, D. G. Reid, “The Organic-Mineral Interface in Bone Is Predominantly Polysaccharide”, *Chem. Mater.*, **19**, 5055-5057 (2007).
- 45) Z. Li, L. Yubao, Y. Aiping, P. Xuelin, W. Xuejiang, Z. Xiang, “Preparation and in vitro Investigation of Chitosan/nano-Hydroxyapatite Composite Used as Bone Substitute Materials”, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **16**, 213-219 (2005).
- 46) C. Y. Zhang, J. Chen, Z. Zhuang, T. Zhang, X. P. Wang, Q. F. Fang, “In Situ Hybridization and Characterization of Fibrous Hydroxyapatite/Chitosan Nanocomposite”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **124**, 397-402 (2012).
- 47) X.-M. Pu, Z.-Z. Sun, Z.-Q. Hou, Y. Yang, Q.-Q. Yao, Q.-Q. Zhang, “Fabrication of Chitosan/hydroxylapatite Composite Rods with a Layer-by-Layer Structure for Fracture Fixation”, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **100B**, 1179-1189 (2012).
- 48) I. Yamaguchi, K. Tokuchi, H. Fukuzaki, Y. Koyama, K. Takakuda, H. Monma, J. Tanaka, “Preparation and Microstructure Analysis of Chitosan/hydroxyapatite Nanocomposites”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 20-27 (2001).
- 49) I. Yamaguchi, S. Iizuka, A. Osaka, H. Monmad, J. Tanaka, “The Effect of Citric Acid Addition on Chitosan/hydroxyapatite Composites”, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **214**, 111-118 (2003).
- 50) Q. Ruan, D. Liberman, Y. Zhang, D. Ren, Y. Zhang, S. Nutt, J. Moradian-Oldak, “Assembly of Layered Monetite-Chitosan Nanocomposite and Its Transition to Organized Hydroxyapatite”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **2**, 1049-1058 (2016).
- 51) F. Miculescu, A. Maidaniuc, S. I. Voicu, V. K. Thakur, G. E. Stan, L. T. Ciocan, “Progress in Hydroxyapatite/Starch Based Sustainable Biomaterials for Biomedical Bone Substitution Applications”, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **5**, 8491-8512 (2017).
- 52) M. S. Sadjadi, M. Meskinfam, B. Sadeghi, H. Jazdarreh, K. Zare, “In situ Biomimetic Synthesis, Characterization and in vitro Investigation of Bone-Like Nanohydroxyapatite in Starch Matrix”, *Materials Chemistry and Physics*, **124**, 217-222 (2010).
- 53) K. Okuda, K. Hirota, T. Mizutani, Y. Aoyama, “Co-Precipitation of Tapioca Starch and Hydroxyapatite. Effects of Phosphorylation of Starch on Mechanical Properties of the Composites”, *Results in Materials*, **3**, 100035 (2019).
- 54) Y. Zhou, Q. Liu, Z. Zhao, W. Wang, L. Zheng, Z. Li, “Preparation and Characterization of Phosphorylated Collagen and Hydroxyapatite Composite as a Potential Bone Substitute”, *Chem. Lett.*, **42**, 83-85 (2013).
- 55) A. Salama, “Cellulose/calcium Phosphate Hybrids: New Materials for Biomedical and Environmental Applications”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **127**, 606-617 (2019).
- 56) S. Morimune-Moriya, S. Kondo, A. Sugawara-Narutaki, T. Nishimura, T. Kato, C. Ohtsuki, “Hydroxyapatite Formation on Oxidized Cellulose Nanofibers in a Solution Mimicking Body Fluid”, *Polymer Journal*, **47**, 158-163 (2015).
- 57) M. Tanahashi, T. Matsuda, “Surface Functional Group Dependence on Apatite Formation on Self-Assembled Monolayers in a Simulated Body Fluid”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 305-315 (1997).
- 58) K. Okuda, T. Mizutani, K. Hirota, T. Hayashi, K. Zinno, “Nonbrittle Nanocomposite Materials Prepared by Coprecipitation of TEMPO-Oxidized Cellulose Nanofibers and Hydroxyapatite”, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **9**, 158-167 (2021).
- 59) P. Malkaj, E. Pierri, E. Dalas, “The Crystallization of Hydroxyapatite in the Presence of Sodium Alginate”, *J. Mater. Sci., Mater. Medicine*, **16**, 733-737 (2005).
- 60) N. Pramanik, S. K. Biswas, P. Pramanik, “Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/Poly(Vinyl Alcohol Phosphate) Nanocomposite Biomaterials”, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.*, **5**, 20-28 (2008).
- 61) A. Kusakabe, K. Hirota, T. Mizutani, “Crystallisation of Hydroxyapatite in Phosphorylated Poly(vinyl alcohol) as a Synthetic Route to Tough Mechanical Hybrid Materials”, *Mater. Sci. Eng. C*, **70**, 487-493 (2017).
- 62) T. Iwatsubo, R. Kishi, T. Miura, T. Ohzono, T. Yamaguchi, “Formation of Hydroxyapatite Skeletal Materials from Hydrogel Matrices via Artificial Biomineralization”, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 8793-8799 (2015).
- 63) T. Iwatsubo, K. Sumaru, T. Kanamori, T. Shinbo, T. Yamaguchi, “Construction of a New Artificial Biomineralization System”, *Biomacromolecules*, **7**, 95-100 (2006).
- 64) E. Bertoni, A. Bigi, G. Falini, S. Panzavolta, N. Roveri,

- “Hydroxyapatite/polyacrylic Acid Nanocrystals”, *J. Mater. Chem.*, **9**, 779-782 (1999).
- 65) A. Bigi, E. Boanini, M. Gazzano, M. A. Kojdeckic, K. Rubini, “Microstructural Investigation of Hydroxyapatite-Polyelectrolyte Composites”, *J. Mater. Chem.*, **14**, 274-279 (2004).
- 66) R.-L. Yang, Y.-J. Zhu, F.-F. Chen, D.-D. Qin, Z.-C. Xiong, “Bioinspired Macroscopic Ribbon Fibers with a Nacre-Mimetic Architecture Based on Highly Ordered Alignment of Ultralong Hydroxyapatite Nanowires”, *ACS Nano*, **12**, 12284-12295 (2018).
- 67) K. Kato, Y. Eika, Y. Ikada, “In situ Hydroxyapatite Crystallization for the Formation of Hydroxyapatite/polymer Composites”, *J. Mater. Sci.*, **32**, 5533-5543 (1997).