

平成21年 4月30日 現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19700404

研究課題名（和文） アパタイトマテリアルの生体機能発現の解明と生命科学
デバイスへの応用研究課題名（英文） The investigation of bio-affinity of apatite materials and
Development of devices for life science

研究代表者

川内 義一郎(Giichiro Kawachi)

名古屋大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：30431539

研究成果の概要：

既にアパタイト系材料は臨床現場で用いられている。しかしながら、アパタイト系材料については生体親和性や骨伝導能といった巨視的現象のみが注目され、分子レベルの微視的な変化についてはあまり解明が進んでいない。本研究では、組成や結晶形態に特徴のあるカルシウムハイドロキシアパタイトを合成し、アパタイト系セラミックスとタンパク質の相互作用に着目して研究を行った。その結果、ハイドロキシアパタイトにおいて結晶形態がタンパク質吸着に大きく影響を及ぼすことを見出し、結晶形態の制御によりタンパク質に対する親和性を制御できた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医用セラミックス

科研費の分科・細目：総合領域 人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体材料、医用セラミックス、ハイドロキシアパタイト、生体親和性、生体機能発現、タンパク質吸着、水熱プロセス、形態制御

1. 研究開始当初の背景

セラミックスの中には、生体の機能を修復するために、組織に直接接して使用される生体材料として利用されている物質がある。その中でもカルシウムハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) の焼結体は、整形外科領域や歯科領域において、骨と結合するほどの高い生物学的親和性を示す「生体活性セラミックス」として知られ、既に骨充填材と

して利用されている。この骨と結合する生体活性は、骨伝導性とも呼ばれている。さらに、近年ではカルシウムハイドロキシアパタイト焼結体の気孔形状を制御した場合に、骨組織以外の部位でも骨組織が形成される異所性骨化の現象も見られている。すなわちセラミックスだけでも骨の形成を引き起こす骨誘導能も得られる可能性も示唆されている。骨組織以外にも、カルシウムハイドロキシア

パタイト焼結体は、軟組織親和性や抗血栓性に優れているとも報告されている。すなわちカルシウムハイドロキシアパタイトは無機物質でありながら、生物学的に極めて興味ある特徴を発現する生体機能物質であると言える。この生体機能の発現は、カルシウムハイドロキシアパタイトが骨の細胞外マトリックスの主たる構成物質であることによると論じられる。しかし、なぜカルシウムハイドロキシアパタイトが特異な生物学的親和性を発現するのかは明らかにされていない。これはカルシウムハイドロキシアパタイトが広い非化学量論組成 ($\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6-y(\text{OH})_{2-z}$) を持つため、合成プロセスや使用環境により材料表面の特性が異なるためと推察できる。生体組織に埋植された材料は、まず体液に曝されるため特に材料表面の特性が体液中での反応やタンパク質の吸着に影響して生物学的親和性が左右すると予測される。そこで、本研究では組成や微構造に特徴のあるカルシウムハイドロキシアパタイトを合成し、その表面特性の違いが血液や細胞外液、体液に類似した水溶液に曝された時の初期に起こる表面反応について調べた。

2. 研究の目的

組成や結晶形態に特徴のあるハイドロキシアパタイトを合成し、生体材料としてのアパタイトセラミックスの微構造と生体の相互作用の初期過程の理解を目指し、アパタイトマテリアルの生命現象にかかわる分子レベルの微視的な変化を明らかにする。

さらに明らかにした知見に基づいて生命科学デバイスへの応用を模索する。

3. 研究の方法

本研究では、焼結法と水熱合成法を用いて微構造が異なるカルシウムハイドロキシアパタイトセラミックスを作製し、その表面及び内部構造を、粉末X線回折法、X線光電子分光法、表面電位測定、熱分析、フーリエ変換赤外分光分析、組成分析、電子顕微鏡による表面形態観察で解析すると共に、タンパク質を含む溶液に接触した際の表面の化学反応とタンパク質吸着の挙動を調べた。

(1) 材料の合成

焼結法では、化学量論組成を持つカルシウムハイドロキシアパタイトを出発原料にして多孔体を作製した。一方、水熱合成法を用いたカルシウムハイドロキシアパタイトでは、出発原料にリン酸水素カルシウム・二水和物とβ型リン酸三カルシウムを用いて水熱処理を行った。これらのリン酸カルシウムは水熱条件下でハイドロキシアパタイトを生成することが知られているが、生成速度の違いがある。これは溶解度の違いに伴うもの

であり、マイクロメートルオーダーの単結晶を得ることを目的に使用した。リン酸カルシウムは生成時の溶液の pH に応じて生成する化合物が異なる。ハイドロキシアパタイトの生成反応は中和反応の一種であり、ハイドロキシアパタイトの生成は中性以上が求められるが、ハイドロキシアパタイトの生成によって pH が低下する。そこで本研究では、とアンモニア緩衝液を用い、さらに試料量、水熱処理時間を組み合わせることでハイドロキシアパタイト生成時の pH の低下を最小限に抑えて合成を行った。

(2) 材料のキャラクタリゼーション

本研究では、特にカルシウムハイドロキシアパタイトが体液にさらされた時の初期に起こる表面反応について調べた。体液は細胞、タンパク質や糖、脂質、電解質を含む溶液である。体液を用いた場合、血液などを持ちいるため実験の安全性の確保に問題が出る。そこで体液成分のうち、タンパク質の吸着について着目してキャラクタリゼーションを行った。カルシウムハイドロキシアパタイトは高速液体クロマトグラフィーのカラム充填材として用いられるほど、タンパク質との相互作用が強い。これらはカルシウムハイドロキシアパタイトの粒子表面に酸性タンパク質と塩基性タンパク質それぞれに対する吸着サイトを持つためだと考えら、これらの比率は粒子形態に依存すると指摘されている。そこで、得られたカルシウムハイドロキシアパタイトを結晶学的に評価した。

タンパク質吸着はモデルタンパク質として酸性タンパク質はウシ血清アルブミン、塩基性タンパク質は塩化リゾチウムを用い、一種類もしくは2種類のタンパク質を含みリン酸イオン濃度の異なる溶液を用いて 37°C, pH7.4 (生理的条件) で行った。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

本研究では水熱合成法を用いることで組成と結晶形態に特徴のあるカルシウムハイドロキシアパタイトを合成することができた (図1)。焼結法と水熱法で作製したカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体を比較すると組成は、焼結法が Ca/P (モル比) = 1.67 (化学量論組成)、水熱合成法では非化学量論組成であり、は 1.65 であった。粉末X線回折パターンから特に水熱合成法で作製したカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体において 002 面の回折ピークが低く、300面のピークが高くなっていた。このことは多孔体がc軸方向に伸びた結晶から構成されていることを示唆している。そこで電子顕微鏡で観察したところ、水熱合成法で作製したカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体は柱状の粒子から構成されており、これらの結

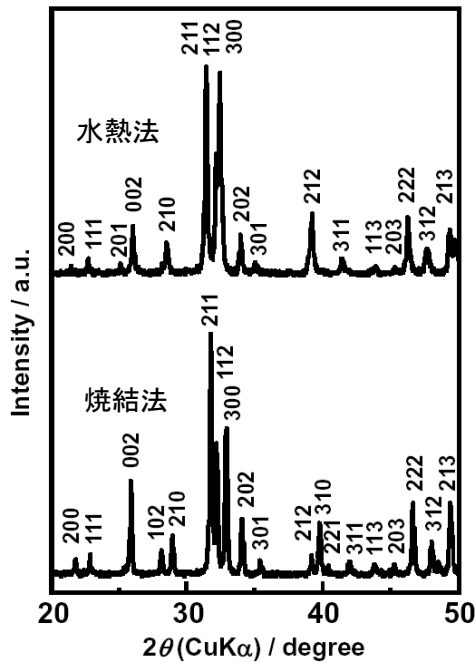


図1 本研究で得られたカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体の粉末X線回折パターン

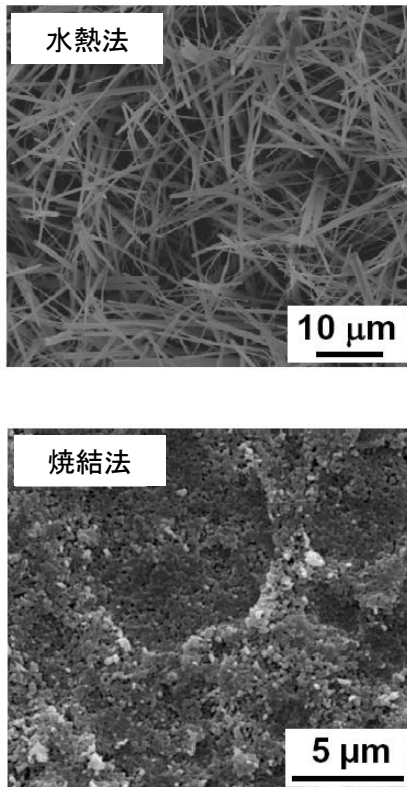


図2 本研究で得られたカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体表面の走査電子顕微鏡イメージ

晶は透過型電子顕微鏡観察によりc軸方向に伸び、a面(たとえば300面)を露出する単結晶であることを確認した。

以上のことから焼結法と水熱合成法を組み合わせることで組成や結晶形態に特徴のあるハイドロキシアパタイトを合成することができた。

次に得られた2種類のカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体を用いてタンパク質吸着について調べた。まず、ウシ血清アルブミン(BSA)とリゾチウム(LSZ)をそれぞれ単独で含む溶液で吸着特性を調べた(図3)。その結果、焼結法と水熱法でそれぞれ得られた多孔体では異なるタンパク質吸着挙動を示した。焼結法のアパタイトでは、溶液中のリン酸濃度の上昇に伴ってBSAもLSZも単調に減少した。一方、水熱法のアパタイトでは、リン酸濃度が低い領域(0~20 mM)において焼結法のアパタイトとは異なる吸着挙動を示して該当領域においてBSAは上昇、LSZは一定であった。

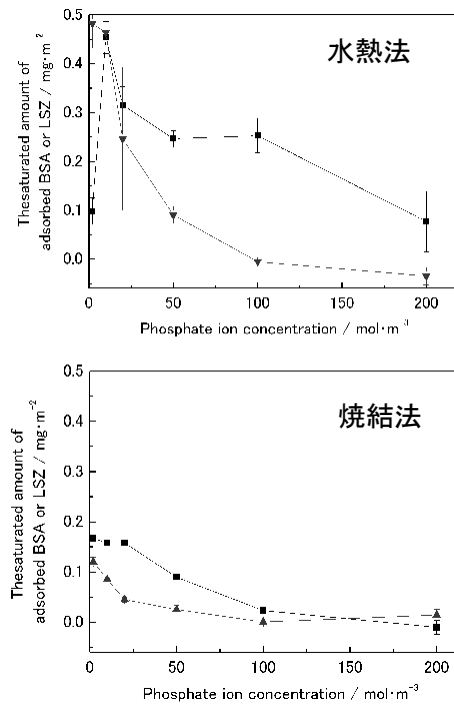


図3 本研究で得られたカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体の単一成分系におけるタンパク質吸着挙動(■; BSA、▲; LSZ)

この違いは多孔体を構成するカルシウムハイドロキシアパタイトの形態によるものと結論付けられ、水熱合成法では柱状粒子となることでBSAに対する吸着サイトが増大して吸着量が増加した。しかしながら、柱状粒子ではLSZに対する吸着サイトが低下するにもかかわらず、吸着量に差がなく、挙動に違

いが見られた。そこで、カルシウムハイドロキシアパタイトの吸着メカニズムについて見当を進めたところ、従来からの結晶面に存在するBSAとLSZのそれぞれに対する吸着サイトへの吸着ではなく、BSAもLSZも両方とも1つの吸着サイトへ結合し、特に柱状粒子となることでその吸着サイト量が増大していることを見出した。

この特異なタンパク質吸着挙動が複数のタンパク質を含む溶液でも見られるか検討した(図4)。その結果、焼結法で得られたカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体ではリン酸濃度2mM(低濃度)においてBSAもLSZの両方とも吸着し、50mM(高濃度)において脱離していた。その一方、水熱法で得られたカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体では低濃度においてBSAのみが吸着し、高濃度において両方のタンパク質が脱離していた。この現象は単一成分系で確認された現象と一致し、2種類のタンパク質が共存してもタンパク質に対する選択性が認められることを確認した。

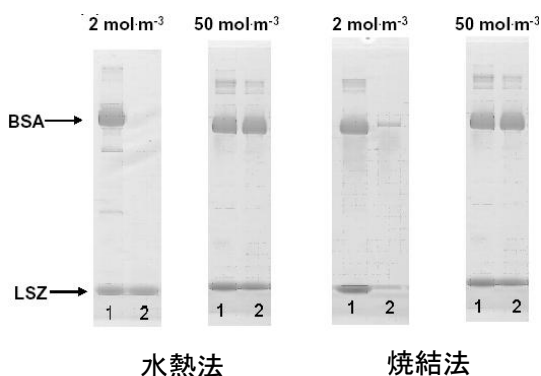


図4 本研究で得られたカルシウムハイドロキシアパタイト多孔体の2種類のタンパク質を含む溶液中におけるタンパク質吸着挙動(吸着前後の上澄み液中のタンパク質をSDS-PAGEで調べた。1:吸着前、2:吸着後)

生体内や細胞培養液中のリン酸イオン濃度は3mM程度であり、今回得られた結果から生体内においても組成や結晶形態に特徴のあるハイドロキシアパタイトを用いることによってタンパク質に対する吸着挙動を制御できることが明らかとなった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

カルシウムハイドロキシアパタイトの粒子形態が吸着に影響することは古くから研究がある。多くの研究は、粉末による粉末による測定であり、今回実施した多孔体の測定ではない。粉体として測定したとしても西遊的には材料として用いるためには多孔体にしなければならない、焼結や比表面積の低下に

伴って、粉体の場合と多孔体の場合で特性が変わる可能性がある。本研究では、そのまま高速液体クロマトグラフィーのカラム充填材や細胞培養、動物実験に応用できる多孔体を作製し、そのタンパク質挙動について調査を行った。このような研究はあまりなく学術的に高い評価がえら得ると考えている。特に組成や結晶形態に特徴のあるハイドロキシアパタイトを用いることによってハイドロキシアパタイトの吸着メカニズムについてこれまで提案されてきたメカニズムと異なるメカニズムがあることを示した。さらに柱状の形態を有するカルシウムハイドロキシアパタイトが2種類のタンパク質を含む溶液であってもリン酸濃度が低い領域で酸性タンパク質(ウシ血清アルブミン)のみを吸着した。このときのリン酸濃度は生体内や細胞培養液中のリン酸イオン濃度に該当し、生体内においても結晶形態によるタンパク質に対する特異性が発揮されることを示した。

従来から我々の研究グループではカルシウムハイドロキシアパタイトの組成と形態について横断的に研究を展開してきており、先行して動物実験も行っており、生体内の反応においてカルシウムハイドロキシアパタイトの組成や結晶形態の違いが生体反応の違いに現れる結果を得ている。本研究で得られた結果はその理解につながる一步であり、インパクトは大きいと考えている。

(3) 今後の展望

生体内においても組成や結晶形態に特徴のあるハイドロキシアパタイトを用いることによってタンパク質に対する吸着挙動を制御できることが明らかとなった。今後は本結果に基づいてタンパク質の帯電状態だけではなく、タンパク質の分子量の違いを加味して粒子形態や組成の違いによる特異な吸着挙動について検討をさらに進める必要がある。

最後に本研究によりハイドロキシアパタイトのタンパク質に対する親和性は結晶形態に強く依存することが明らかになった。本研究の成果に基づいた生命科学デバイスは柱状形態を有するハイドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーカラムや骨修復材料、ドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアなどを挙げることができ、それぞれのデバイスについて具体的な応用のための更なる研究を望む。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)
[雑誌論文] (計1件)

- ① G. Kawachi, T. Watanabe, K. Kikukta and C. Ohtsuki, "Protein Adsorption Properties of Hydrothermally Prepared Hydroxyapatite",

Key Engineering Materials, **361-363**, 71-74
(2008). 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① 川内 義一郎, 渡辺 知子, 菊田 浩一, 大槻 主税, “柱状粒子から構成されるハイドロキシアパタイト多孔体のタンパク質吸着特性”, 日本バイオマテリアル学会, 東京 (2008 年 11 月 17-18 日)
- ② G. Kawachi, K. Kikuta and C. Ohtsuki, “Protein adsorption behavior on hydroxyapatite in solution containing two proteins”, International conference on multifunctional materials and structures, Hong Kong, China (2008 年 7 月 28~31 日)
- ③ 川内 義一郎, 渡辺 知子, 菊田 浩一, 大槻 主税, “2 種類のタンパク質を含む溶液におけるハイドロキシアパタイトの吸着挙動”, 第 20 回日本アパタイト研究会, 東京都立産業技術研究センター,

東京 (2007 年 12 月 17-18 日) .

- ④ G. Kawachi, T. Watanabe, K. Kikuta and C. Ohtsuki, “Protein Adsorption Properties of Hydrothermally Prepared Hydroxyapatite”, 20th International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics20), Nantes, France (2007 年 10 月 24~26 日).
- ⑤ 渡辺 知子, 川内 義一郎, 菊田 浩一, 大槻 主税, “リン酸緩衝液中におけるハイドロキシアパタイトへのタンパク質吸着”, 日本セラミックス協会 秋季シンポジウム, 名古屋 (2007 年 9 月 12~14 日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川内 義一郎 (Giichiro Kawachi)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：30431539