

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630310

研究課題名(和文)環境応答性を示すリン酸カルシウム系ハイブリッド材料の創成

研究課題名(英文)Development of Calcium Phosphate-based Hybrids indicating Environmental Responsiveness

研究代表者

大槻 主税(OHTSUKI, Chikara)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00243048

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 本研究課題では、リン酸カルシウム系化合物を基材に酵素に応答する機構を付与したハイブリッド材料とすることで、環境に応答する新規な人工骨用バイオマテリアルの創製を目的にした。本研究の実施により、体液模倣環境(擬似体液、SBF)において、リン酸エステルのカルシウム化合物からのヒドロキシアパタイト(HAp)生成が、アルカリフォスファターゼ(ALP)の存在によって促進されることを見出し、酵素の存在に依存したHAp生成が可能となった。さらに、ブチルリン酸のエタノール溶液を用いた表面処理によって、 α -リン酸三カルシウムにブチルリン酸のカルシウム化合物を複合化できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文): In this study, fundamental conditions for modification of calcium phosphate-based materials were investigated to develop novel bone substitutes responsible to existence of enzyme in surrounding environment. Alkaline phosphatase (ALP) was used as an enzyme, which enhances hydrolysis of phosphoric esters. Formation of hydroxyapatite (HAp) from calcium salts of phosphoric esters was examined in a simulated body fluid (SBF) containing ALP. The dissolution of calcium salts of phosphoric esters and their hydrolysis by ALP allow increase in concentration of calcium ions and phosphate ions, resulting in formation of HAp. Formation rate of HAp from calcium salts of phosphoric esters with different alkyl chain length mainly depends on the hydrolysis rate of the corresponding phosphoric esters by ALP. Alpha-Tricalcium phosphate (TCP) ceramic was successfully modified with butylphosphate to result in coating of calcium salts of butylphosphoric acid on bioabsorbable body.

研究分野：工学

キーワード：ハイブリッド材料 セラミックス 生体材料 ヒドロキシアパタイト 擬似体液

1. 研究開始当初の背景

本格的な高齢社会を迎えたわが国では、病気やけがで不全となった臓器を修復するバイオマテリアルが治療において果たす役割はきわめて大きい。骨や歯を治療するためのバイオマテリアルとして、リン酸カルシウム系化合物が用いられている。中でも、水酸アパタイト(ヒドロキシアパタイト; HAp)の焼結体は広く臨床で使用されている。HAp焼結体は、体内に埋入されると骨と直接結合する性質を示すので、長期に骨組織に固定される部位に、有用な材料である。しかし、埋入された人工骨に亀裂が生じた場合、材料の劣化を阻止することはできない。人工骨が自己修復能を獲得すれば、長期にわたって安定した機械的特性を持つと期待される。

HApと同様に人工骨として利用されている素材にリン酸三カルシウム(TCP)がある。TCPには、低温で安定なβ型TCP(β-TCP)と高温で安定なα型TCP(α-TCP)がある。β-TCPとα-TCPはともに、生体吸収性を示すセラミックスとして知られている。α-TCPの水への溶解度は、β-TCPよりも大きく、適当な反応条件を選択すれば、HApに転化することが知られている。この性質を利用して、α-TCPは自己硬化性のペースト状人工骨として利用されている。

したがって、水溶液中でおこるα-TCP表面の反応を制御することは、HApへの転化や生体吸収性が設計された材料の創成に繋がる。さらに、HApの生成は、埋植された人工骨に生じた亀裂の自己修復にも繋がると期待される。しかし、環境の変化を感知してα-TCPからのHAp生成反応が誘引される材料設計は達成されていない。この現状に対して研究代表者は、α-TCPなどの溶解性の高いリン酸カルシウムを基板に用いて、酵素により作用をうけるリン酸エステルのカルシウム化合物とハイブリッド化することで、酵素の存在に作用する環境応答性を付与できるとの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、溶解性の高いリン酸カルシウムを基板とし、その表面にリン酸エステル分子をハイブリッド化することにより、酵素に反応する材料の開発を目指した。そのために、まず酵素の存在で、HApの析出が抑制、促進されるために必要となる材料の基本的な性質の解明に取り組んだ。それらの材料が機能を発現するための基礎的知見に立脚して、α-TCPの表面に酵素応答性が発現する材料の開発を進めた。

生体内に存在する酵素として、アルカリフォスファターゼ(ALP)を取り扱った。ALPは骨芽細胞や肝臓、腸管といった生体器官から放出される酵素であり、生体内のリン酸エ

ステルをオルトリン酸とアルコールに分解する機能を持つ。特に、骨の周囲の環境においては、間葉系幹細胞から骨前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞への分化においてALPの活性が高まることから、骨形成マーカーとして利用されている。本研究課題では、擬似体液(SBF)を用いた生体外(in vitro)試験により評価を進めた。SBFに添加したALPが、材料からのHAp生成に影響する条件を探索し、その機構を推定した。

3. 研究の方法

ALPの存在に反応する材料を作製するための基礎となる条件を探索した。SBFは、ヒトの血漿成分と無機イオン濃度をほぼ等しくした水溶液であり、トリス緩衝剤でpHを7.4にしている。まずSBF中でALPのリン酸エステル加水分解が起こる条件を探索した。このための物質として、フェニルリン酸カルシウムを用いた。さらにリン酸エステルのカルシウム化合物を数種類選び、ALPを含有するSBF中におけるHAp生成挙動を調べ、これにより酵素によるHApの生成の促進や抑制を可能にするための因子を検討した。得られた知見に基づきながら、研究の進捗に最適なリン酸エステルのカルシウム化合物を選択した。さらに、リン酸カルシウムの基材としてα-TCPを選び、基材となるα-TCPセラミックスの合成法を検討するとともに、その表面をリン酸エステルのカルシウム化合物にするためのプロセスについて合成条件を探索した。

試料の性質とその特性付け(キャラクターゼーション)ならびにSBFの元素濃度変化については、X線回折(XRD)、フーリエ変換赤外(FT-IR)分光分析、誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析、X線光電子分光分析(XPS)、走査電子顕微鏡(SEM)により行った。それらの結果から、複合化した試料の組成、結晶相、微構造に関する変化の過程を解析し、ALPの存在による材料の構造変化を評価した。

これらの知見を総括して、ALPの存在に反応してHApが生成する材料を構築するための知見をまとめる。

4. 研究成果

(1) 体液模倣環境におけるフェニルリン酸カルシウムのヒドロキシアパタイトへの転化

ALPにより加水分解が促進される物質として、フェニルリン酸カルシウム(PhPCa)が知られている。この材料であれば、体液環境で酵素の存在に反応して、HApの生成が促進されると期待される。ただし、体液模倣環境で、PhPCaがALPにより加水分解される挙動について、反応条件やALP存在量の依存性の詳細は明らかにされていない。そこで本研

究では、ヒトの血漿成分の無機イオン濃度を模倣して作製した擬似体液（SBF）中において、PhPCa が起こす加水分解の挙動に ALP の存在量が与える影響を調べた。

pH を 10 に調節した $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ のフェニルリン酸水溶液と $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ の塩化カルシウム (CaCl_2) 水溶液をそれぞれ等量 (250 cm^3) 混合し、PhPCa の粉末を得た。この粉末 0.50 mmol を、 $0 \sim 7.5 \text{ unit}$ の ALP を添加した擬似体液（SBF、pH 7.4） 25 cm^3 に浸漬し 36.5°C で保持した。ALP は SBF に毎日添加した。所定の期間経過後に、粉末をろ過して回収し、超純水で洗浄して試料を得た。得られた試料について、結晶相の同定と形態観察を行った。

XRD パターンから PhPCa の HAp への転化率を見積もった結果、PhPCa は ALP 添加量が 7.5 unit の場合、ALP を添加しない場合に比べて 1 日目から HAp の生成量が多かった。一方、ALP 添加量が 2.5 unit および 1.25 unit の場合、HAp の生成量は 3、7 日目に、ALP を添加しない場合よりもそれぞれ多くなった。したがって、ALP の添加により、PhPCa の転化は促進されたと言える。7 日間反応させた試料の形態を SEM で観察したところ、数 $10 \mu\text{m}$ 程度の PhPCa の板状結晶が、ALP 添加量が 1.25 unit の場合数 100 nm 程度の粒子となり、ALP 添加量を 2.5 、 7.5 unit と増やすに従い $1 \mu\text{m}$ 程度の板状結晶へと変化していた。

以上より、ALP 添加量が増えるに従い HAp の生成が促進され、転化速度が大きくなることが明らかとなった。SBF は、生体内での生体活性セラミックス表面での骨類似 HAp の形成を評価する水溶液である。したがって、ALP の濃度に依存して、生体内における材料表面での HAp 生成速度が変化する材料が PhPCa を利用して設計できると言える。

(2) リン酸エステルの種類が HAp 生成に与える影響

ALP により加水分解して HAp を形成するためにリン酸エステルカルシウムが必要とする性質を明らかにするために、3 種のリン酸エステルカルシウムについて、HAp が生成する挙動を対比した。リン酸エステルカルシウムとしては、図 1 に示すフェニルリン酸、ブチルリン酸、ドデシルリン酸を選び、それらのカルシウム塩（それぞれ PhPCa、BuPCa、DoPCa）を合成した。

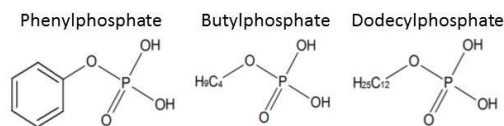


図 1. 実験に用いた 3 種のリン酸エステルの化学構造.

3 種のリン酸エステルカルシウム粉末 0.50 mmol を、SBF (pH 7.4) 25 cm^3 にそれぞれ浸漬した。24 時間毎に ALP を 1.25 units 加えながら、 36.5°C で 7 日間保持した。

XRD によれば、PhPCa において浸漬前に見られた PhPCa 由来のピーク強度が減少し、HAp に帰属されるピークが検出された。BuPCa では、浸漬後に HAp のピークのみを検出した。一方、DoPCa では浸漬後の結晶相は、浸漬前と同じであった。HAp への転化率を見積もったところ、BuPCa が最も高い割合で HAp へと転化していた。SEM で試料の形態を観察した結果、HAp の生成は、浸漬前に観察された板状結晶がより微細な析出物となることから確認された。

ALP が存在した場合でも、DoPCa では HAp への転化は見られず、 $\text{DoPCa} < \text{PhPCa} < \text{BuPCa}$ の順に HAp への転化が速く進行することが分かった。

リン酸エステルの種類により、HAp の生成速度が異なることが確かめられた。HAp の生成は、リン酸エステルのカルシウム化合物が溶解する速度と加水分解により生じるイオン種にも影響を受けると考えられた。

(3) HAp 生成に与えるリン酸エステルの有機鎖の効果

ALP の介在による加水分解でリン酸エステルのカルシウム化合物は、HAp に転化する速度が異なる。リン酸 ($\text{O}=\text{P}(\text{OH})_3$) の水素が有機基で置換されたリン酸エステルには様々な化学構造のものが存在する。それらの化学構造とカルシウム化合物からの HAp 生成の相関は明らかにされていない。HAp 形成の機構を明らかにするには、より単純な系での比較実験が有効である。そこで、アルキル鎖長の異なる 3 種のリン酸モノエステル（図 2）を選び、これらのカルシウム塩からの HAp 生成挙動の違いを調べた。

ALP を添加した SBF に、メチルリン酸カルシウム (MePCa)、エチルリン酸カルシウム (EtPCa)、またはブチルリン酸カルシウム (BuPCa) を浸漬し、これらが HAp へと転化する挙動を比較した。3 種のリン酸エステルカルシウム粉末について、窒素吸脱着測定により BET 比表面積を求めるとともに、 36.5°C の水に対する溶解度積を誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) による元素濃度の

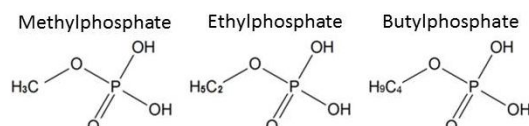


図 2. 実験で対比した直鎖の異なるリン酸エステル.

測定から見積もった。調製したリン酸エステルカルシウム粉末の BET 比表面積と溶解度積を求めた結果、ならびに各リン酸エステルの ALP による加水分解速度の文献値を化合物の性質として表 1 にまとめた。BET 比表面積は BuPCa > EtPCa > MePCa の順に大きくなった。溶解度積は MePCa と EtPCa が同等の値を示し、それらに比べ BuPCa は小さい値であった。一方これらのリン酸エステルの加水分解速度は、pH 8、20 °C の条件において、アルキル基の鎖長が長いほど低下すると報告されている。

表 1. 実験に用いた化合物の性質 .

	合成したカルシウム化合物の実測値		リン酸エステルの k_{cat}^* [s ⁻¹]
	比表面積 [m ² g ⁻¹]	溶解度積 [mol ² m ⁻⁶]	
MePCa	13.4	2.28×10^{-7}	5.7
EtPCa	55.0	2.36×10^{-7}	7.0×10^{-1}
BuPCa	63.3	2.37×10^{-8}	$5.1 \times 10^{-1}^{**}$

* Turnover number of the corresponding phosphoric esters at pH 8, 20 °C.

** Estimated value.

cf. R. Han, J. E. Coleman, *Biochemistry*, **34**, 4238-4245 (1995).

SEM 観察によれば、SBF に浸漬する前には、いずれのリン酸エステルのカルシウム化合物も板状の形態であった。これらを ALP を添加しない SBF に 7 日間浸漬すると、いずれも板状物質の表面に微細な析出物が形成する様子が観察された。ALP を添加した SBF に浸漬した場合には、MePCa、EtPCa、BuPCa の全ての試料において浸漬前に見られた板状結晶はほぼ見られなくなり、粒子の析出が顕著に見られた。XRD で結晶相の変化を調べた結果から、MePCa と EtPCa ではリン酸エステルカルシウム由来のピークが消失し、HAp になること、ならびに、MePCa では浸漬 3 日目にすでに HAp のピークを検出できた。これらより、ALP を含む SBF における HAp への転化の速さは MePCa > EtPCa > BuPCa の順であるといえた。

HAp が形成される速さの順は、リン酸エステルカルシウムの溶解度よりも、ALP による加水分解速度に一致する傾向を示した。したがって、リン酸エステルカルシウムの HAp への転化はリン酸エステルの加水分解が律速過程になっていると結論された。

(4) α -TCP へのブチルリン酸カルシウムのハイブリッド化

上記の結果から、ブチルリン酸カルシウム (BuPCa) は、SBF 中における溶解度は比

較的小さく、しかも ALP 存在による HAp の生成の促進が現れる物質であることが解った。そこで、BuPCa を生体吸収性セラミックスである α -TCP 焼結体にハイブリッド化することで、酵素の存在に反応して HAp の生成が起こると考える。その材料の模式図を図 3 に示した。生体吸収性材料を比較的溶解度の低いブチルリン酸カルシウムで被覆することにより、体液への生体吸収材料の溶出を抑制することが可能になると考えられる。この材料を実現するための合成条件を検討した。

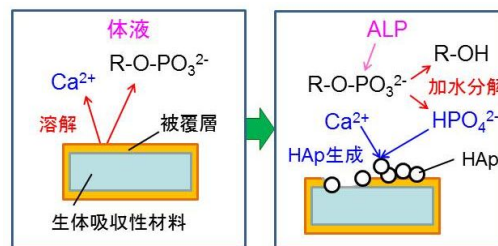


図 3 . 生体吸収性材料表面へ被覆した層からの生体内における HAp 生成の概念図 .

α -TCP 焼結体については、粉末の成形体を電気炉にて、1400 °C まで昇温した後、すぐに 1300 °C まで降温させ、これを 12 時間保持した後に室温まで降温するプロセスで作製した。この工程において、すべて昇温 5°C / min、降温 10°C / min の条件とした。

得られた焼結体を、水、リン酸ブチルを含む水溶液またはリン酸ブチルを含むエタノール溶液 (それぞれ BuP/W、BuP/EtOH と略記) を用いて、図 4 に示す手順で処理した。

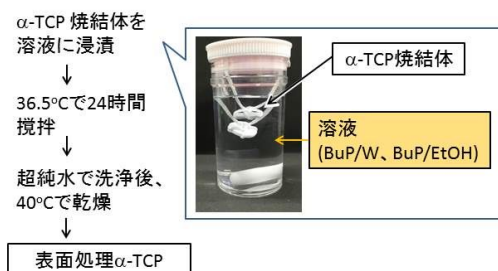


図 4 . 表面処理の手順 .

それぞれの溶液で表面処理した試片表面の走査電子顕微鏡像を図 5 に示す。Control は、表面処理なしの試片である。BuP/W で処理した場合は、表面処理なしの表面形態と同じであった。これに対して、BuP/EtOH で処理した試料の表面は、気孔を埋めるように滑

らかで平坦な表面が形成されていた。XRD によると BuP/W で処理しても、表面処理しない試片と同じで α -TCP の単相であった。これに対して BuP/EtOH で処理した試片にブチリン酸カルシウム (BuPCa) に帰属される回折線を検出した。これらのことから、ブチリン酸を含有するエタノール溶液で α -TCP 焼結体を処理することにより、表面にブチリン酸カルシウムの被覆層をハイブリッド化できることが明らかになった。ただし、本条件で生成したブチリン酸カルシウムは、基材の α -TCP が観察できる程度の量であった。さらに最適化を進め、試片の表面全体に厚い被覆層をハイブリッド化できる条件を明らかにすることで、ALP の存在にตอบสนองした HAp 生成の促進が起こる材料になると考えられる。

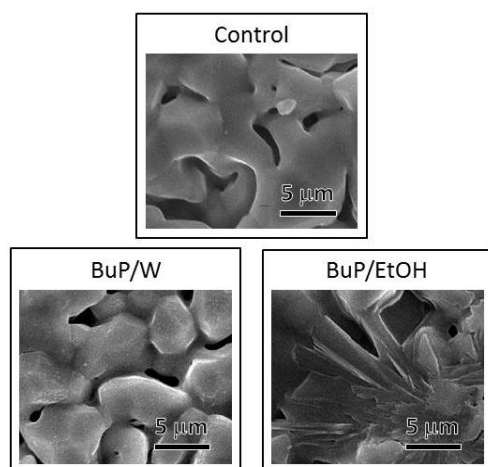


図5 . BuP/W または BuP/EtOH で表面処理した α -TCP 焼結体表面の走査電子顕微鏡像。
Control : 表面処理なしの試片 .

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 12 件)

三尾明義, 宇治山竜己, 鳴瀧彩絵, 大槻主税, 横井太史, “体液模倣環境におけるフェニルリン酸カルシウムのヒドロキシアパタイトへの転化”, 第4回 CSJ 化学フェスタ 2014, タワーホール船堀, 東京, 2014 年 10 月 14-16 日.

三尾明義, 鳴瀧彩絵, 大槻主税, 横井太史, “酵素によるリン酸エステルカルシウムの加水分解反応を利用するヒドロキシアパタイトのバイオミメティック合成”, 平成 26 年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会, 名古屋工業大学, 名古屋, 2014 年 12 月 6 日.

三尾明義, 鳴瀧(菅原)彩絵, 大槻主税, 横井太史, “体液模倣環境中における酵素

反応を利用したリン酸エステルカルシウムからのヒドロキシアパタイトの合成”, 公益社団法人日本セラミックス協会 2015 年年会, 岡山大学, 岡山, 2015 年 3 月 17-19 日.

Chikara Ohtsuki, “Enhancement of Hydroxyapatite Formation in Acellular Solutions Mimicking Human Blood Plasma”, *The 11th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies*, ICC Jeju, Korea, Aug. 30- Sep. 4, 2015.

Akiyoshi Mio, Taishi Yokoi, Ayae Sugawara-Narutaki, and Chikara Ohtsuki, “Formation of Hydroxyapatite by Using Enzymatic Reaction in Biomimetic Solution: Effect of Organic Groups in Calcium Phosphate Esters”, *15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015)*, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Dec. 9-11, 2015.

Kazuki Sakakiyama, Ill Yong Kim, Ayae Sugawara-Narutaki, and Chikara Ohtsuki, “Synthesis of Calcium Phosphate with Mesoporous Structure”, *15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015)*, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Dec. 9-11, 2015.

Takuya Shii, Ill Yong Kim, Ayae Sugawara-Narutaki, and Chikara Ohtsuki, “Preparation of Porous Beads Consisting of α -Tricalcium Phosphate by Freeze-Drying Process”, *15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015)*, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Dec. 9-11, 2015.

大槻主税, “骨の機能回復を支援するインプラント素材の開発”, 名古屋大学予防早期医療創成センター第 5 回ワークショップ, 名古屋大学, 名古屋, 2015 年 8 月 5 日.

大槻主税, 三尾明義, 鳴瀧彩絵, 横井太史, “体液模倣環境における酵素反応を利用したヒドロキシアパタイトの合成: リン酸エステルカルシウム塩の有機基の効果”, 第 64 回高分子討論会, 東北大学, 仙台, 2015 年 9 月 15-16 日.

四井拓也, 鳴瀧彩絵, 大槻主税, “凍結乾燥法による α 型リン酸三カルシウム多孔質球の調製”, 日本セラミックス協会第 28 回秋季シンポジウム, 富山大学, 富山, 2015 年 9 月 16-18 日.

荒木康志, 金 日龍, 鳴瀧彩絵, 大槻主税, “ α 型リン酸三カルシウムへの酸処理によるリン酸カルシウム複合粉末の合成”, 粉体粉末冶金協会 平成 27 年度秋季大会 (第 116 回講演大会), 京都大学 百周年時計台記念館, 京都市, 2015 年 11 月 11-12 日.

榊山一規, 金 日龍, 鳴瀧彩絵, 大槻主税,

“メソポーラス構造を持つリン酸カルシウムの合成”，粉体粉末冶金協会 平成 27 年度秋季大会（第 116 回講演大会），京都大学 百周年時計台記念館，京都市，2015 年 11 月 11-12 日.

〔その他〕

ホームページ等

名古屋大学大学院工学研究科結晶材料工学専攻

<http://www.xtal.nagoya-u.ac.jp/xtal/3-1.html>

教員詳細-大槻主税

http://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100003664_ja.html

大槻研究室の研究業績

http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/ketsu5/Achievement/Achievement_2015.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大槻 主税 (OHTSUKI, Chikara)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：0 0 2 4 3 0 4 8