

《解説 III》

常温常圧プロセスによる生体・環境適合アパタイトマイクロカプセルの開発

Development of Biocompatible and Environmentally Compatible Apatite Microcapsules by Ordinary Temperature and Pressure Processes

京都大学大学院エネルギー科学研究科

藪塚 武史

Takeshi YABUTSUKA

1. はじめに

アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は、哺乳動物の硬組織を構成する主要な無機成分として知られている。アパタイトはヒトの硬組織や細胞への親和性が極めて高く、整形外科領域や歯科領域において極めて重要な物質として位置づけられており、人工骨や人工歯根、骨充填剤など様々な生体親和性マテリアルとして臨床応用されている。このような魅力的な性質を有するアパタイトの内部に種々の機能性物質を内包したマイクロカプセルを作製することができれば、ドラッグデリバリーや遺伝子デリバリー、さらには固定化酵素担体等の環境材料への応用を指向した画期的な高機能微粒子の開発につながる。本稿では筆者らが取り組んでいる、常温常圧の水溶液法をベースとした生体模倣プロセスによるアパタイトマイクロカプセルの開発事例について紹介する。

2. 生体活性セラミックスならびに擬似体液を用いたアパタイト形成

はじめに、本稿で紹介する常温常圧下でのアパタイトマイクロカプセル作製プロセスの基礎となる、生体活性セラミックスおよび擬似体液を用いたアパタイト形成について概説する。

1970 年代初頭に Hench により世界で初めて骨と

結合する材料 (Bioglass®)¹⁾が開発されて以来、焼結水酸アパタイト²⁾や結晶化ガラス A-W³⁾をはじめ数種の生体活性セラミックスが開発されてきた。一般に、人工材料を生体内に埋入すると、免疫反応により材料表面が線維性被膜で覆われ、周辺の組織から隔離される。しかし、生体活性セラミックスの多くは生体内でその表面にアパタイトの層を形成し、この層を介して骨と結合する⁴⁾。このような生体活性セラミックス表面でのアパタイト形成反応は、ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液 (SBF) に材料を浸漬することで再現できることが見出されており⁵⁾、SBF 浸漬試験は、生体内における材料表面での骨結合能を予測するためのスクリーニング法として ISO で規定されている⁶⁾。

3. アパタイト核を用いた生体不活性材料へのアパタイト形成能付与

SBF は生理的 pH において既にアパタイトに対して過飽和であるが、SBF の pH をさらに上昇させると、低結晶性のリン酸カルシウム微粒子が析出する。八尾らはこの微粒子が高活性にアパタイト形成を誘起することを見出し、この微粒子を「アパタイト核」と名付けた⁷⁾。

この手法を応用し、細孔を有する基材の表面お

よび細孔内にアパタイト核を析出させることで、種々の生体不活性な基材に高いアパタイト形成能を付与できる⁸⁾。一例として筆者らは、チタン合金^{9,10)}、ステンレス鋼¹¹⁾、コバルトクロム合金¹²⁾、ジルコニウム合金¹³⁾、イットリア安定化ジルコニア¹⁴⁾、ポリエーテルエーテルケトン (PEEK)¹⁵⁻¹⁸⁾、超高分子量ポリエチレン¹⁹⁾等に高いアパタイト形成能を付与することに成功している。また、一部の材料については動物実験を進めており、PEEK ならびに炭素繊維強化 PEEK において良好な骨結合能が得られることを明らかにしている^{20,21)}。これらの知見は、アパタイト核を用いたアパタイト形成能付与、生体活性付与が金属、セラミックスからポリマーに至る幅広い基材に適用が可能であることを示唆している。

4. アパタイト核を用いたアパタイトマイクロカプセルの合成

アパタイト核を用いた上述のアパタイト形成能付与は、基材の種類選択性だけでなく形状選択性にも優れ、棒状および板状基材へのアパタイト形成能付与に有効であるのみならず、様々な機能性微粒子をアパタイトで被覆することもできる。具体的には、コアとなる微粒子の表面にアパタイト核を導入し、これを SBF もしくは SBF をベースとしたアパタイトに対して過飽和な水溶液に浸漬することにより、微粒子表面のアパタイト核がアパタイト形成を誘起する。その結果、機能性微粒子をアパタイトで被覆したアパタイトマイクロカプセルを作製することができる (図 1)。本稿では、アパタイト核を用いた常温常圧プロセスによるアパタイトマイクロカプセルの開発例として、銀微小球、コーン油エマルジョン、アガロースゲル、 γ -Fe₂O₃ 微粒子をコア物質としたアパタイトマイク

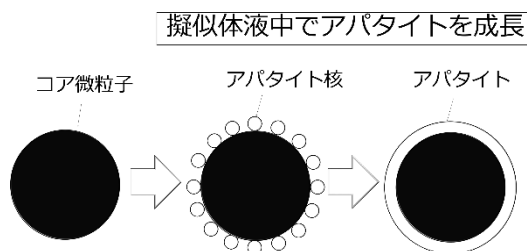


図 1 常温常圧プロセスによるアパタイトマイクロカプセルの作製フロー

ロカプセルの開発を中心に紹介する。

5. 固体微粒子を内包したアパタイトマイクロカプセル

まず、コア微粒子として銀微小球を用いた例^{18,20)}を紹介し、アパタイトマイクロカプセルの概略について説明する。筆者らは前項のプロセスにより、平均粒径 1.71 μm の銀微小球表面にアパタイト核を導入し、SBF に浸漬することで、銀微小球を内包したアパタイトマイクロカプセルを作製した²²⁾。図 2(a)-(c)に、銀微小球内包アパタイトマイクロカプセル表面における走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) スペクトル、ならびに X 線回折 (XRD) パターンを示す。銀微小球が球体の形状を保ったまま、SBF 浸漬により生体活性セラミックス表面で形成されるアパタイトに特徴的な鱗片状結晶で被覆されることがわかった (図 2(a))。また EDX では銀のピークに加えてカルシウムとリンのピークが検出され、XRD では銀の回折ピークに加えてアパタイトの回折ピークが検出された (図 2(b)(c))。筆者らは、本手法がセラミックス微粒子やポリマー微粒子の被覆にも適用可能であることを見出しており、シリカゲル微小球²³⁾、ポリ乳酸微小球²⁴⁾、レボチロキシン微粒子²⁵⁾をアパタイトで被覆したマイクロカプセルの作製にも取り組んでいる。SBF 中で形成されるア

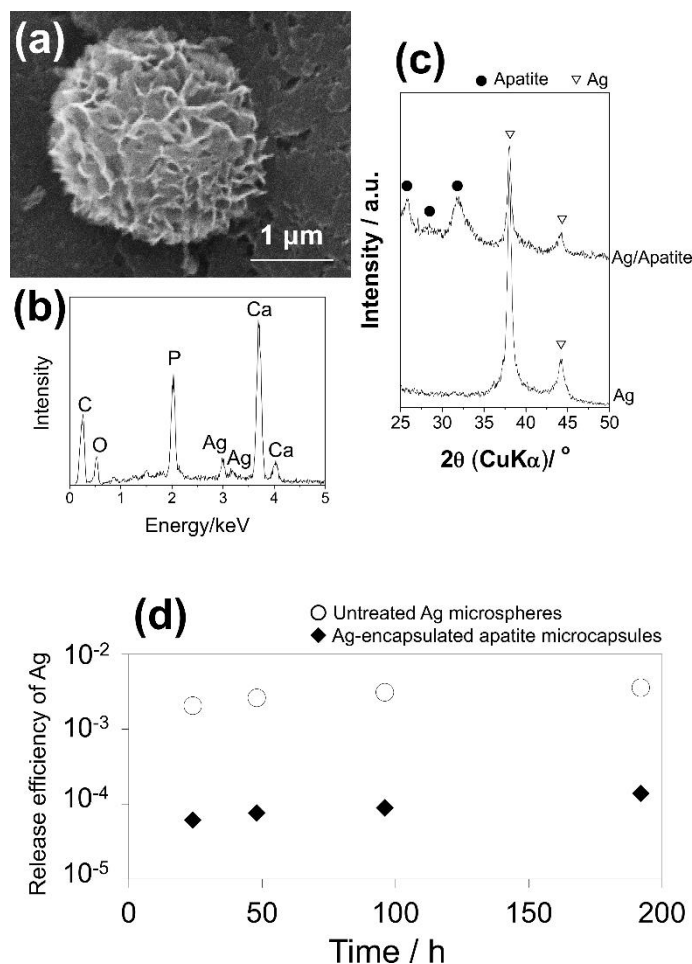


図2 銀微小球内包アパタイトマイクロカプセルの(a) SEM 写真および(b) EDX スペクトル, ならびに未処理銀微小球および銀微小球内包アパタイトマイクロカプセルの(c) XRD パターンおよび(d) PBS 中における銀放出率の経時変化

パタイトは無数の鱗片状結晶の集合体で構成されており, 多孔質形状を有している。このようなアパタイトで内包されたコア物質は, 鱗片状結晶がつくる多孔質構造の細孔から徐々に放出され, 徐放性を示すと考えられる。そこで内包物質の放出挙動を検証するため, 銀微小球内包アパタイトマイクロカプセルからの銀の放出挙動をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で評価したところ, アパタイトで被覆することにより銀の放出量が未処理銀微小球の約 1/10 に抑制され, 銀が徐放されることがわ

かった (図 2(d))。また筆者らは, レボチロキシン微粒子をアパタイトで被覆することでレボチロキシンが徐放されること²⁵⁾, さらにはシリカゲル微小球にインスリン水溶液を含ませ, これをアパタイトで被覆することで, インスリンが徐放されることも確かめている²⁶⁾。

6. エマルションならびにゲルを内包したアパタイトマイクロカプセル

アパタイトマイクロカプセルは, 金属, セラミッ

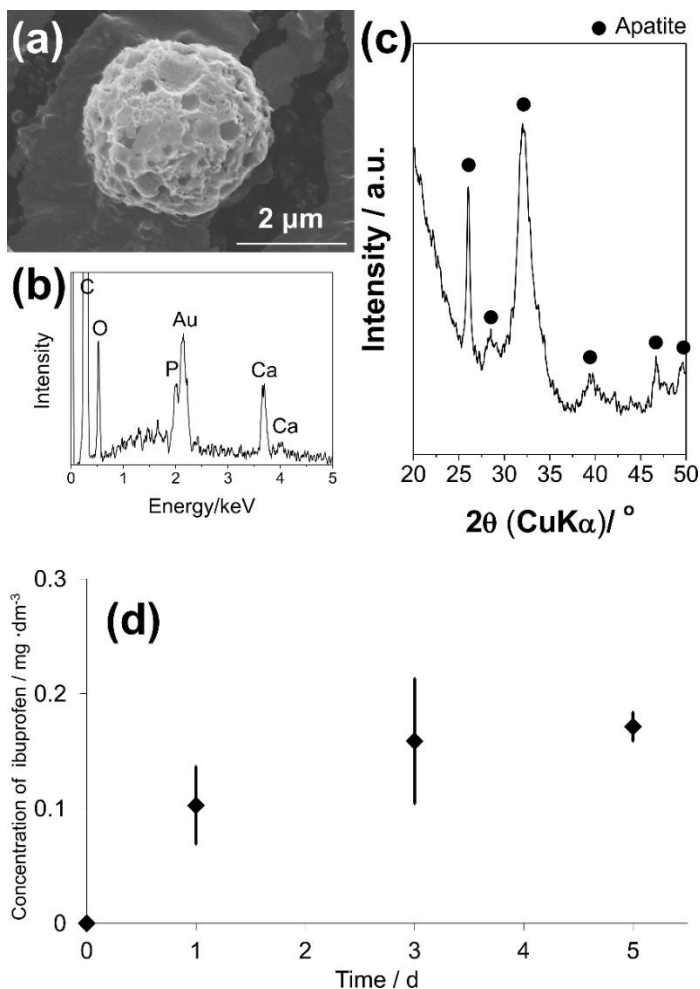


図3 イブuproフェン含有コーン油内包アパタイトマイクロカプセルの(a) SEM 写真, (b) EDX スペクトル, (c) XRD パターンおよび(d) リン酸緩衝液中におけるイブuproフェン濃度の経時変化

クス, ポリマー等の固体微粒子のみならず, エマルションやゲルなどの柔らかい物質を内包することも可能である。エマルションやゲルに薬剤を持持させ, これをアパタイトで被覆すれば, 薬剤が持続的に放出されるのみならず, 油状物質を固形物質のように取り扱うことも可能となるため, ハンドリングに優れた薬物キャリアの開発にもつながる。

筆者らは, 油性物質であるコーン油のエマルションを内包したアパタイトマイクロカプセルの開発に着手している²⁷⁾。親油性薬剤のモデル物質と

してイブuproフェンを含有させたコーン油エマルションの表面にアパタイト核を導入し, SBF の 1.5 倍のイオン濃度に調節した 1.5SBF に浸漬することで, イブuproフェン含有コーン油を内包したアパタイトマイクロカプセルを作製した。図 3(a)-(c)に, コーン油エマルションにアパタイト核を導入し, これを 1.5SBF に浸漬したときに得られるアパタイトマイクロカプセルの SEM 写真, EDX スペクトル, ならびに XRD パターンを示す。コーン油にアパタイト核を導入し, これを 1.5SBF に浸漬するこ

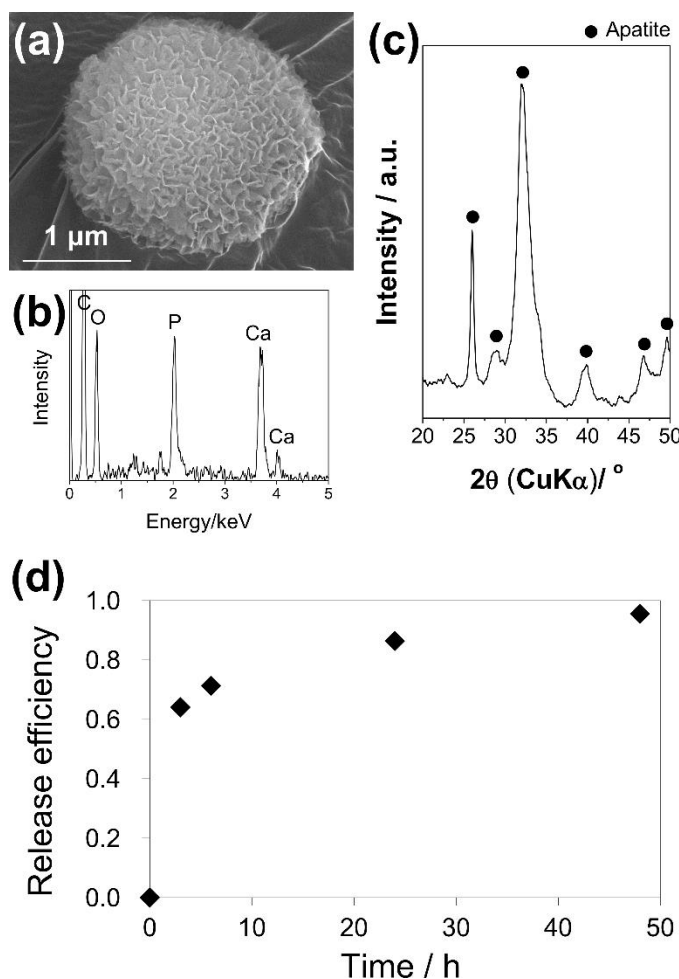


図4 アガロースゲル内包アパタイトマイクロカプセルの(a) SEM 写真, (b) EDX スペクトル, (c) XRD パターンおよび(d) 超純水中におけるシアノコバラミン放出率の経時変化

とで、アパタイトの鱗片状結晶で構成されるマイクロカプセルが得られることがわかった(図3(a))。また EDX ではカルシウムとリンのピークが検出され、XRD ではアパタイトの回折ピークが検出された(図3(b)(c))。このアパタイトマイクロカプセルをリン酸緩衝液に浸漬し、溶液中のイブプロフェン濃度の経時変化を評価したところ、アパタイトマイクロカプセルは含有させたイブプロフェンを徐々に放出することがわかった(図3(d))。

アパタイトマイクロカプセルに内包するマトリ

ックスとしては、コーン油のような疎水性高分子のみならず、水溶性高分子も適用可能であり、筆者らはアガロースゲルを内包したアパタイトマイクロカプセルの作製にも取り組んでいる²⁸⁾。図4(a)-(c)に、アガロースゲルにアパタイト核を導入し、これを SBF に浸漬したときに得られるアパタイトマイクロカプセルの SEM 写真, EDX スペクトル, ならびに XRD パターンを示す。アガロースゲルにアパタイト核を導入し、これを SBF に浸漬することで、アパタイトの鱗片状結晶で構成されるマイク

ロカプセルが得られることがわかった (図 4(a))。また EDX ではカルシウムとリンのピークが検出され、XRD ではアパタイトの回折ピークが検出された (図 4(b)(c))。類似の手法により作製したアガロースゲル内包アパタイトマイクロカプセルにシアノコバラミンを含有させると、シアノコバラミンが持続的に放出されることがわかった²⁹⁾(図 4(d))。以上の知見から、本手法によるアパタイトマイクロカプセルの合成は、固体微粒子の内包のみならず、エマルションやゲルの内包にも有用であることが示唆された。

7. 磁性アパタイトマイクロカプセルによる酵素の高効率回収

アパタイトは表面にタンパク質や酵素などの生体分子を吸着する性質を有する。酵素は固定化することによって pH や熱に対する安定性が向上し、回収による再利用が可能となる。酵素は基質特異性や反応特異性を持ち、穏やかな条件下で反応を

触媒するなど、無機触媒にはない特徴と利点を有している。一方で、至適温度や至適 pH による反応条件の制限や、反応溶液中からの回収が困難であるなどのデメリットもあるが、酵素の固定化によってこのデメリットを解消し、酵素の有用な活用が可能となる。酵素を固定化するには様々な方法があるが、アパタイトへの酵素の固定化は、簡便かつ低コストであるといった特徴を有する。そこで筆者らは、アパタイトを高効率な固定化酵素担体として用いるため、磁性微粒子をアパタイトマイクロカプセルに内包した磁性アパタイトマイクロカプセルを作製した。アパタイトマイクロカプセルが磁性を示すことにより、アパタイト表面に固定化された酵素を磁場の印加により容易に回収することが可能である。

筆者らは、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子を内包した磁性アパタイトマイクロカプセルの作製に取り組んでいる^{30,31)}。図 5 に、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子内包磁性アパタイトマイクロカプセル表面における SEM 写真, EDX ス

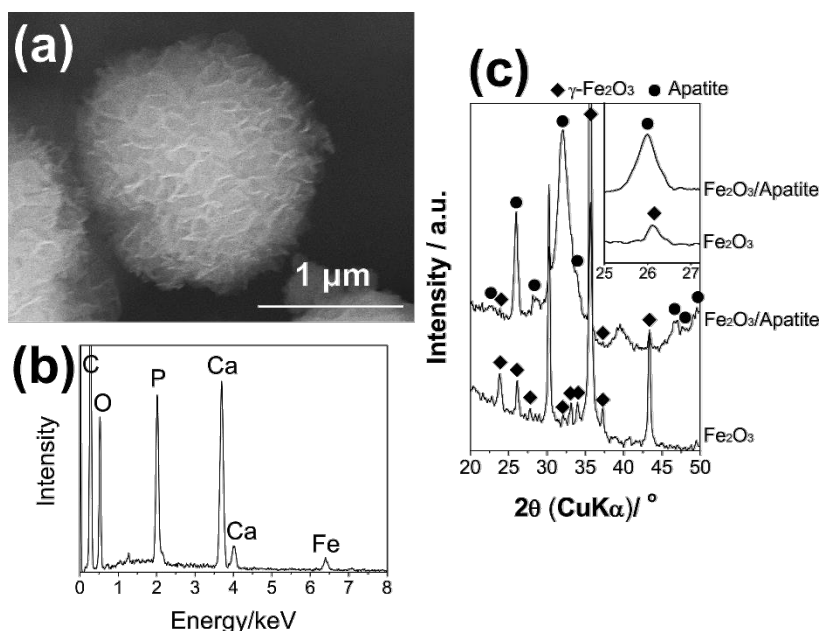


図 5 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 内包磁性アパタイトマイクロカプセルの(a) SEM 写真および(b) EDX スペクトル, ならびに(c) 未処理 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子および $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 内包磁性アパタイトマイクロカプセルの XRD パターン

ペクトル,ならびに XRD パターンを示す。 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 微粒子にアパタイト核を導入し,これを $\text{pH}=7.60$ に調整した SBF に浸漬することで,アパタイトの鱗片状結晶で構成されるマイクロカプセルが得られることがわかった (図 5(a))。また EDX 分析では鉄のピークに加えてカルシウムとリンのピークが検出され, XRD では $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ の回折ピークに加えてアパタイトの回折ピークが検出された (図 5(b)(c))。得られた $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 内包磁性アパタイトマイクロカプセルの比表面積を測定したところ,市販の水酸アパタイト微粒子の約 27 倍の比表面積を有することがわかった。

磁性アパタイトマイクロカプセルの酵素回収能

を検証するため, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 内包磁性アパタイトマイクロカプセルをウレアーゼ溶液に分散させてウレアーゼを表面に固定化後,マイクロカプセルをネオジム磁石で回収し,ウレアーゼの回収率を評価した³⁰⁾。その結果,マイクロカプセルの添加量の増加に伴ってウレアーゼ回収量は増加し,ほぼ全量のウレアーゼが回収されることがわかった (図 6(a))。さらに,固定化ウレアーゼの酵素活性を調べるため,ウレアーゼ・L-グルタミン酸脱水素酵素法³²⁾により尿素分解試験を行ったところ,時間経過に伴いほぼ全量の尿素を分解し,固定化後においても酵素活性を示すことがわかった (図 6(b))。

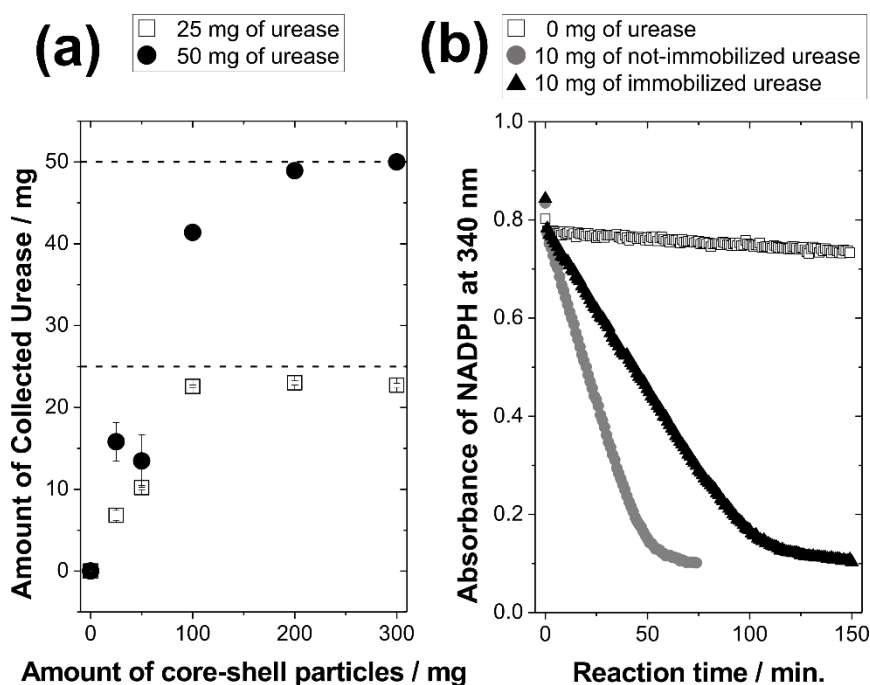


図 6 (a) ウレアーゼ 25 mg もしくは 50 mg を分散した水溶液中における, ウレアーゼ回収量の $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 内包磁性アパタイトマイクロカプセル添加量依存性, ならびに (b) ウレアーゼ 0 mg, ウレアーゼ 10 mg, もしくはウレアーゼ 10 mg を固定化した $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 内包磁性アパタイトマイクロカプセルを分散した尿素水溶液中における, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の吸光度変化。吸光度が低いほど尿素分解が進行したことを示している

8. 磁性アパタイトマイクロカプセル表面での酵素吸着挙動

ウレアーゼの等電点 (pI) は約 5 であり, 酸性タンパク質に分類される。しかし, 酵素の固定化挙動は等電点や周辺環境の pH によって異なると考えられる。そこで筆者らは, PBS (pH=7.4) ならびに炭酸-重炭酸緩衝液 (CBB, pH=10.0) 中において, γ -Fe₂O₃ 内包磁性アパタイトマイクロカプセルに異なる等電点の酵素を固定化し, 酵素の固定化率と等電点, ならびに溶液の pH の相関を調べた³¹⁾。

図 7(a)に, pH=7.4 の PBS 中における, γ -Fe₂O₃ 微粒子内包磁性アパタイトマイクロカプセル表面に固定化させた酵素の等電点と pH の差 ($|pH-pI|$) と固定化率の相関を, 図 7(b)には PBS に代えて pH=10.0 の CBB を用いた場合における結果を示す。

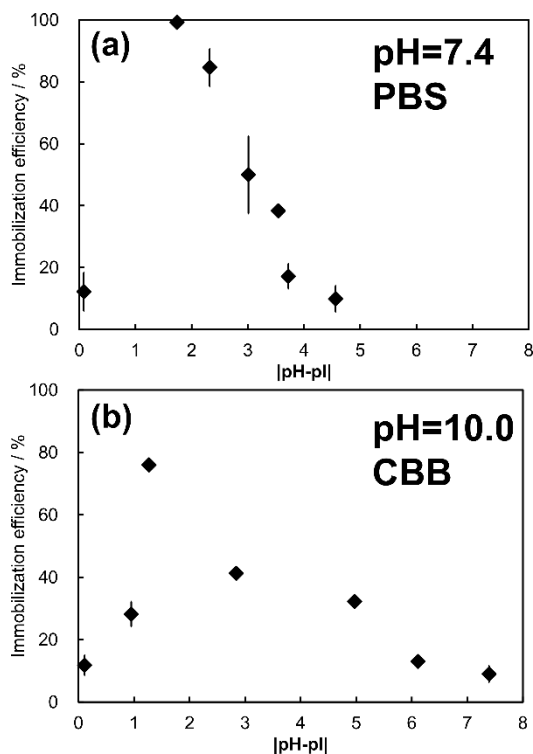


図 7 (a) pH=7.40 の PBS 中および (b) pH=10.0 の CBB 中での, γ -Fe₂O₃ 内包磁性アパタイトマイクロカプセル表面における酵素固定化量の $|pH-pI|$ 依存性

図 7 は, $|pH-pI|$ が 0 に近いほど酵素は電氣的に中性となり, $|pH-pI|$ が大きくなると酵素は強く帯電することを意味する。 $|pH-pI|$ を横軸にとると, pH=7.40 の PBS 中において, 酵素固定化率が $|pH-pI|$ の増加に伴って直線的に変化するのではなく, $|pH-pI|=1-2$ で最大値をとる傾向を示した。また興味深いことに, pH=10.0 の CBB 中でも同様の酵素吸着の傾向を示すことがわかった。このことから, アパタイトマイクロカプセルへの酵素固定化は, 電気二重層による相互作用のみが支配的ではなく, ファンデルワールス力や局所的なイオン間相互作用など様々な要因によって起こると考えられる。中性領域ならびに塩基性領域では, $|pH-pI|=1-2$ のときにアパタイトと酵素間の相互作用が最も大きくなると考えられ, $|pH-pI|=1-2$ となるような溶媒を用いることで, 種々の酵素を高効率に固定化できる可能性が示唆された。

9. おわりに

一般に, 生体物質と類似のものを化学合成することは至難の業である。これに対し, 生体模倣環境でアパタイト形成を高活性に誘起する「アパタイト核」を用いる手法は, 種々の生体不活性材料へのアパタイト形成能付与を可能にするのみならず, 様々な基材に適用が可能である本手法を最大限応用し, 高温熱処理等を伴う他法では困難である微粒子やエマルション, ゲル等のアパタイト被覆を可能にする点で, 魅力的な手法であると考えている。今後, 種々の機能性物質と生体親和性および環境調和性に優れたアパタイトのミクロンスケールで融合させる本手法を発展させることで, 従来にない新たな機能の創出へと展開していくことが期待される。

謝辞

本稿の研究の一部は、科学技術振興機構 A-STEP 機能検証フェーズ、京都発革新的医療技術研究開発助成事業、関西エネルギー・リサイクル科学研究振興財団研究助成、大倉和親記念財団研究助成、京都大学創立 125 周年記念ファンド「くすのき・125」、ゼロエミッションエネルギー研究拠点事業により遂行した。

引用文献

- (1) L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee Jr., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **2**, 117-141 (1972).
- (2) M. Jarcho, J.F. Kay, K.I. Gumaer, R.H. Doremus, H.P. Drobeck, *J. Bioeng.*, **1**, 79-92 (1977).
- (3) T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, *Bull. Inst. Chem., Kyoto Univ.*, **60**, 260-268 (1982).
- (4) M. Neo, S. Kotani, Y. Fujita, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Bando, C. Ohtsuki, T. Kokubo, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 255-267 (1992).
- (5) T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2907-2915 (2006).
- (6) ISO 23317. Implants for Surgery—In vitro evaluation for apatite-forming ability of implant materials (2014).
- (7) T. Yao, M. Hibino, S. Yamaguchi, H. Okada, *US Pat.* 8178066 (2012), *JP Pat.* 5261712 (2013).
- (8) T. Yao, M. Hibino, T. Yabutsuka, *US Pat.* 8512732 (2013), *JP Pat.* 5252399 (2013).
- (9) T. Yabutsuka, H. Mizuno, S. Takai, *J. Ceram. Soc. Japan*, **127**, 669-677 (2019).
- (10) T. Yabutsuka, Y. Kidokoro, S. Takai, *IET Nanobiotechnol.*, **14**, 688-694 (2020).
- (11) T. Yabutsuka, R. Karashima, S. Takai, T. Yao, *Materials*, **11**, 1334 (2018).
- (12) T. Yabutsuka, H. Mizutani, S. Takai, T. Yao, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 143-147 (2018).
- (13) N. Hashimoto, T. Yabutsuka, S. Takai, *IET Nanobiotechnol.*, **14**, 701-706 (2020).
- (14) H. Zamin, T. Yabutsuka, S. Takai, H. Sakaguchi, *Materials*, **13**, 3045 (2020).
- (15) T. Yabutsuka, K. Fukushima, T. Hiruta, S. Takai, T. Yao, *Mater. Sci. Eng. C*, **81**, 349-358 (2017).
- (16) T. Yabutsuka, K. Fukushima, T. Hiruta, S. Takai, Yao, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, **106**, 2254-2265 (2018).
- (17) C. Ishizaki, T. Yabutsuka, S. Takai, *Coatings*, **10**, 191 (2020).
- (18) Y. Yamane, T. Yabutsuka, Y. Takaoka, S. Ishizaki, S. Takai, S. Fujibayashi, *Materials*, **14**, 6691 (2021).
- (19) T. Yabutsuka, S. Takai, *IET Nanobiotechnol.*, **14**, 673-639 (2020).
- (20) K. Masamoto, S. Fujibayashi, T. Yabutsuka, T. Hiruta, B. Otsuki, Y. Okuzu, K. Goto, T. Shimizu, Y. Shimizu, C. Ishizaki, K. Fukushima, T. Kawai, M. Hayashi, K. Morizane, T. Kawata, M. Imamura, S. Matsuda, *Acta Biomater.*, **91**, 48-59 (2019).
- (21) Y. Takaoka, S. Fujibayashi, T. Yabutsuka, Y. Yamane, C. Ishizaki, K. Goto, B. Otsuki, T. Kawai, T. Shimizu, Y. Okuzu, K. Masamoto, Y. Shimizu, M. Hayashi, N. Ikeda, S. Matsuda, *Sci. Rep.*, **13**, 1443 (2023).
- (22) T. Yabutsuka, S. Tsuboi, M. Hibino, T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **361-363**, 709-712 (2008).
- (23) S. Yamane, T. Yabutsuka, M. Hibino, T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **396-398**, 519-522 (2009).

- (24) T. Yao, T. Yabutsuka, *Biomimetics, Learning from Nature*, edited by A. Mucherjee, InTech, Vukovar, pp. 273-288 (2010).
- (25) T. Yabutsuka, S. Takai, T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **758**, 172-177 (2017).
- (26) S. Yamane, T. Yabutsuka, M. Hibino, T. Yao, *Bioceramics*, **22**, 551-554 (2009).
- (27) T. Matsunaga, T. Yabutsuka, S. Takai, T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **720**, 12-16 (2017).
- (28) H. Nakamura, M. Sakaguchi, T. Yabutsuka, S. Takai, T. Yao, *Phos. Res. Bull.*, **31**, 9-14 (2016).
- (29) T. Yabutsuka, K. Iwahashi, H. Nakamura, T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **631**, 326-331 (2015).
- (30) T. Yabutsuka, S. Kumazawa, S. Takai, *J. Ceram. Soc. Japan*, **128**, 883-889 (2020).
- (31) T. Yabutsuka, M. Yamamoto, S. Takai, *J. Ceram. Soc. Japan*, **130**, 74-80 (2022).
- (32) 田畑勝好, 臨床検査, **22**, 1273-1285 (1978).