

# 生体無機組織形成に倣う ヒドロキシアパタイトカプセルの創成

京都大学 大学院エネルギー科学研究科

藪塚 武史

## Development of Hydroxyapatite Capsules Mimicking Bioinorganic Tissue Formation

Takeshi Yabutsuka

Graduate School of Energy Science, Kyoto University

### 1. はじめに

骨の主要な無機成分であるヒドロキシアパタイト (HA:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) は、生体組織や細胞との親和性が極めて高く、人工骨や骨補填剤などの骨修復材や、細胞培養のための3Dスキャホールド等に応用されている。さらに、HAはタンパク質、酵素、核酸等とも高い親和性を有することから、セラミックバイオマテリアル研究において最も重要な物質の一つとして位置づけられる。このような魅力的な物性を具備するHAをカプセル状に成型し、内部に種々の機能性物質を内包することができれば、薬物や遺伝子のデリバリー機能や、高効率な環境浄化機能を具備した、画期的な機能性微粒子の開発につながる。本稿では、筆者らが近年取り組

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HAカプセルの開発について紹介する。

### 2. 「アパタイト核」のHA形成能に着目した生体活性材料設計

体内で骨と結合し一体化する「生体活性セラミックス」の多くは、体内でその表面にHAの層を形成し、このHA層を介して骨と結合することが知られている。このような、生体内における材料表面でのHA形成能の発現は、多くの場合、ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度に調節した水溶液である擬似体液 (SBF) <sup>[1]</sup> に材料を浸漬することでも再現される。しかし、HA形成能を有する材料は、Bioglass<sup>®</sup> <sup>[2]</sup> やHA焼結体 <sup>[3]</sup>、結晶化ガラス A-W <sup>[4]</sup> など、基本的にごく一部のセラミックスに限られている。

SBFのpHを上昇させると、溶液中にリン酸カルシウムの微粒子が析出する。八尾らは、この微粒子が体液模倣環境下で早期にHA形成を誘起することを見出し、この微粒子を「アパ

〒606-8501

京都市左京区吉田本町

TEL 075-753-9129

FAX 075-753-9115

E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

タイト核」(AN)と名付けた<sup>[5]</sup>。さらに筆者らは、細孔を有する基材の表面近傍にANを担持させることで、多種多様な基材に高いHA形成能を付与できることを見出し<sup>[6]</sup>、ステンレス鋼<sup>[7]</sup>、Co-Cr合金<sup>[8]</sup>、イットリア安定化ジルコニア<sup>[9]</sup>、ポリエーテルエーテルケトン<sup>[10]</sup>等の生体不活性な材料に、短期間で発現する高いHA形成能を付与することに成功している。これらの知見は、ANを用いたHA形成能付与が、金属、セラミックス、ポリマーに至る幅広い基材選択性を有することを示唆している。さらに、一部の材料については動物実験を進めており、材料が良好な骨結合能を発現することを明らかにしている<sup>[11]</sup>。

### 3. 生体無機組織形成に倣うHAカプセル形成プロセス

ANを用いたHA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ており、微粒子にも適用が可能である。コアとなる微粒子にANを担持させ、これをSBFに浸漬すると、微粒子に担持したANがHA形成を誘起する。その結果、コア微粒子をHAで内包したHAカプセルを作製することができる(図1)<sup>[12]</sup>。本手法は、生体無機組織形成を模倣した常温常圧下の水溶液プロセスであり、高温高压処理を必要としない。そのため、医薬品や遺伝子など、熱で変性しやすい物質をHAカプセルに内包することも可能である。

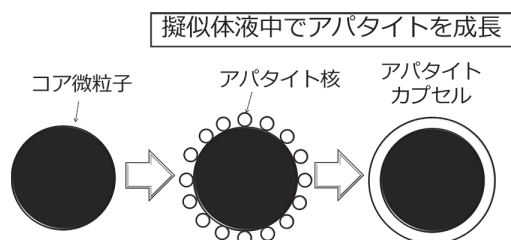


図1 生体模倣反応を利用したHAカプセルの作成フロー。

### 4. 固体微粒子内包HAカプセル

筆者らは、平均粒径 $1.71\ \mu\text{m}$ の銀微小球にANを担持させ、SBFに浸漬すると、銀微小球が球体の形状を保ったままHAの鱗片状結晶で完全に被覆されることを明らかにした<sup>[13]</sup>(図2(a))。SBF中で形成されるHAは無数の鱗片状結晶の集合体で構成されており、多孔質様の形状を有する。したがって、内包されたコア物質は外殻のHAが形成する空隙から徐々に放出され、徐放性を示すと考えられる。そこで、銀微小球内包HA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)中で検証したところ、銀の放出量は未処理銀微小球の約1/10に抑制され、徐放性を示すことがわかった(図2(b))。さらに筆者らは、本手法がレボチロキシシン微粒子<sup>[14]</sup>やシリカゲル微小球<sup>[15]</sup>を内包したHAカプセルの作製にも適用可能であることを見出し、金属、セラミックスからポリマーに至る各種微粒子の内包に有効であることを明らかにした。

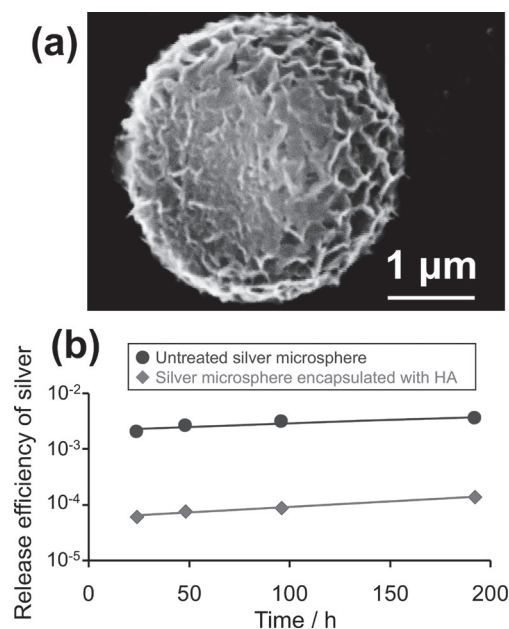


図2 (a) 銀微小球内包HAカプセルの走査型電子顕微鏡(SEM)写真。(b) PBS中における、未処理銀微小球もしくは銀微小球内包HAカプセルからの銀放出率変化。

## 5. 軟物質内包 HA カプセル

上述の HA カプセルは固体微粒子のみならず、やわらかい物質を内包することも可能である。油脂やヒドロゲルに薬物を担持させ、これを HA で被覆すれば、薬物が持続的に放出されるのみならず、液状の物質を固形物として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担体の開発につながる。

例えば、AN を担持したコーン油エマルションを 1.5SBF (SBF の 1.5 倍の無機イオン濃度を有する水溶液) に浸漬することで、コーン油エマルションを内包した HA カプセルを形成することができる (図 3 (a))<sup>[16]</sup>。親油性薬剤のモデル物質としてイブプロフェンをエマルションにあらかじめ含有させておくと、HA カプセルは内部のイブプロフェンを一気に放出せず、徐々に放出する (図 3 (b))。また、HA カプセルに内包するコア物質としては、コーン油のような疎水性高分子のみならず、親水性高分子も適用可能であり、筆者らはアガロースヒドロゲルを内包した HA カプセルにも本手法が有効であることを実証している (図 3 (c))<sup>[17]</sup>。以上の知見から、本手法が固体微粒子の内包のみならず、油脂やヒドロゲルのような軟物質にも適用可能であることが示唆された。

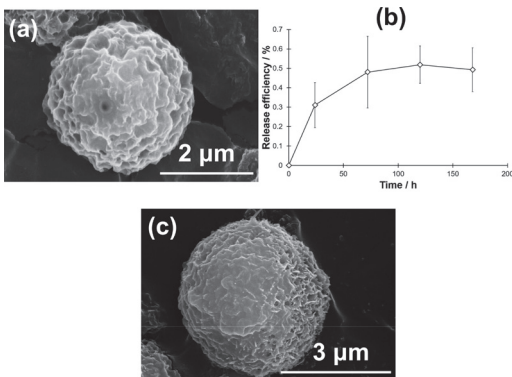


図 3 (a) コーン油エマルションを内包した HA カプセルの SEM 写真。 (b) 緩衝溶液中におけるコーン油エマルション内包 HA カプセルからのイブプロフェン放出率変化。 (c) アガロースヒドロゲル内包 HA カプセルの SEM 写真。

## 6. 磁性 HA カプセルによる酵素の高効率回収

筆者らは、HA を高効率な固定化酵素担体として用いることを目的として、磁性微粒子を HA に内包した磁性 HA カプセルの作製に着手している。酵素と高い親和性を有する HA のカプセルが磁性を示すことにより、HA カプセルの表面に固定化した酵素を磁場により水溶液中から回収することが可能である (図 4)。

一例として筆者らは、マグヘマイト ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) 微粒子を内包した磁性 HA カプセルを作製している<sup>[18]</sup>。磁性 HA カプセルの酵素回収能を検証するため、磁性 HA 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

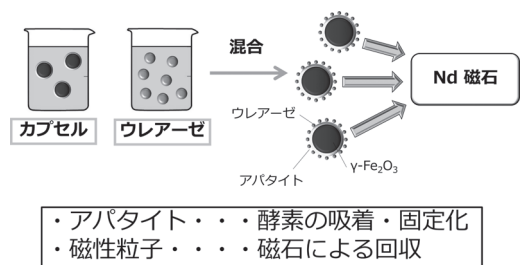


図 4 磁性 HA カプセルを用いた固定化酵素技術の概略図。

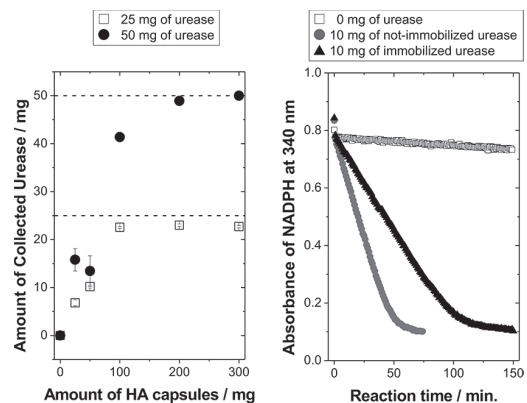


図 5 (a) ウレアーゼ 25 mg もしくは 50 mg を分散した水溶液中における、ウレアーゼ回収量の磁性 HA カプセル添加量依存性。 (b) ウレアーゼ 0 mg、ウレアーゼ 10 mg、もしくはウレアーゼ 100 mg を固定化した磁性 HA カプセルを分散した尿素水溶液中における、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の吸光度変化。吸光度が低いほど尿素分解が進行していることを示している。

定化後、カプセルをネオジム磁石で回収し、ウレアーゼ回収量を調べた。その結果、添加カプセル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 5 (a))。さらに、カプセルに固定化した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完全に尿素を分解し、固定化後においてもウレアーゼは良好な尿素分解能を示すことがわかった (図 5 (b))。

## 7. おわりに

生体模倣環境で HA 形成を高活性に誘起する AN を用いることで、種々の生体不活性材料への HA 形成能付与が可能となる。基材の種類選択性ならびに形状選択性の広い本手法を応用し、固体微粒子や軟物質、さらには磁性物質の HA カプセルへの内包が可能である。今後、種々の機能性物質と、生体親和性に優れる HA をミクロンスケールで融合させる本手法を発展させ、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、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、および大倉和親記念財団研究助成のご支援により遂行した。

## 参考文献

- [1] T. Kokubo, H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2907-2915 (2006).
- [2] L.L. Hench et al., *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **2**, 117-141 (1971).
- [3] M. Jarcho et al., *J. Bioeng.*, **1**, 79-92 (1977).
- [4] T. Kokubo et al., *Bull. Inst. Chem., Kyoto Univ.*, **60**, 260-268 (1982).
- [5] T. Yao et al., *US Pat.* 8178066 (2012), *JP Pat.* 5261712 (2013).
- [6] T. Yao, M. Hibino, T. Yabutsuka, *US Pat.* 8512732 (2013), *JP Pat.* 5252399 (2013).
- [7] T. Yabutsuka et al., *Materials*, **11**, 1334 (2018).
- [8] T. Yabutsuka et al., *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 143-147 (2018).
- [9] H. Zamin et al., *Materials*, **13**, 3045 (2020).
- [10] T. Yabutsuka et al., *Mater. Sci. Eng. C*, **81**, 349-358 (2017).
- [11] K. Masamoto et al., *Acta Biomater.*, **91**, 48-59 (2018).
- [12] T. Yabutsuka, *Recent Advances in Porous Ceramics*, U. Basheer (eds.), InTechOpen, London, pp.11-29.
- [13] T. Yabutsuka et al., *Key Eng. Mater.*, **361-363**, 709-712 (2008).
- [14] T. Yabutsuka et al., *Key Eng. Mater.*, **758**, 172-177 (2017).
- [15] S. Yamane et al., *Key Eng. Mater.*, **396-398**, 519-522 (2009).
- [16] T. Matsunaga et al., *Key Eng. Mater.*, **720**, 12-16 (2017).
- [17] H. Nakamura et al., *Phosphorus Res. Bull.*, **31**, 9-14 (2016).
- [18] T. Yabutsuka et al., *J. Ceram. Soc. Japan*, **128**, 883-889 (2020).