

# 生体模倣環境を反応場とした環境調和型アパタイトカプセルの合成

Synthesis of Environmentally Compatible Hydroxyapatite Capsules under Biomimetic Condition

**Key-words** : Hydroxyapatite, Microcapsule, Apatite nuclei, Simulated body fluid, Biomimetic reaction

藪塚 武史

Takeshi YABUTSUKA (Kyoto University)

## 1. はじめに

水酸アパタイトは、一般には化学式  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  で表され、ヒトの骨や歯を構成する主要な無機成分として知られている。整形外科領域や歯科領域において、アパタイトは極めて重要な物質である。なぜならアパタイトは生体骨や細胞への親和性が極めて高いためである。人工骨や人工歯根、骨充填剤等さまざまな生体適合材料として臨床応用されており、アパタイトは生体関連セラミックス領域において最も重要な材料として認識されている。このような魅力的な性質を有するアパタイトをカプセル状に成型し、その内部に種々の機能性物質を封入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、さらに固定化酵素技術への応用を指向した画期的な高機能マイクロ粒子への開発につながる。本稿では、筆者らが近年精力的に取り組んでいる生体模倣プロセスにより、生体親和性が高く、さらに環境への負荷が少ないアパタイトで構成された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

1970 年代初頭に Hench らが世界で初めて骨と結合する材料 (Bioglass<sup>®</sup>)<sup>1)</sup> を発明して以来、焼結水酸アパタイト<sup>2)</sup> や結晶化ガラス A-W<sup>3)</sup> をはじめ数種の骨と結合するセラミックス (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する性質 (アパタイト形成能) を示し、このアパタイト層を介して骨と結合する<sup>4)</sup>。このような生体内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 (Simulated body

fluid; SBF) に材料を浸漬することで再現できることが、小久保らにより見いだされている<sup>5)</sup>。

## 3. 「アパタイト核」を用いた生体活性材料設計指針

SBF は生理的 pH においてすで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、溶液のアパタイトに対する過飽和度がさらに増大し、リン酸カルシウムの微粒子が均一核生成により析出する。八尾らはこの微粒子が SBF 中、あるいは生体環境下においてアパタイト形成を早期に誘起することを見だし、この微粒子を「アパタイト核」と名付けた<sup>6)</sup>。

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、種々の骨と結合しない材料 (生体不活性材料) に高いアパタイト形成能を付与できる<sup>7)</sup>。この手法を用いて筆者らは、チタン<sup>8)</sup>、チタン合金<sup>9)</sup>、ステンレス鋼<sup>10)</sup>、コバルトクロム合金<sup>11)</sup>、ジルコニウム<sup>9)</sup>、ポリエーテルエーテルケトン<sup>12)~14)</sup>、超高分子量ポリエチレン<sup>15)</sup>、ポリ乳酸<sup>16)</sup> 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。現在、一部の材料について動物実験も進めており、良好な結果が得られつつある<sup>17)</sup>。これらの知見は、アパタイト核を用いた生体活性処理が金属から高分子材料まで幅広い基材選択性を有することを示唆している。

## 4. 生体模倣環境を反応場とするアパタイトカプセルの合成

アパタイト核を用いた上記の生体活性処理は、基材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のみならず、マイクロ微粒子へのアパタイト形成能付与にも有効である。コアとなるマイクロ微粒子の表面にアパタイト核を付着させ、さらにこれを SBF に浸漬することにより、微粒子表面のアパタイト核が SBF 中でアパタイト形成を誘起する。その結果、マイクロ微粒子をアパタイトで被覆したコアシェル型のカプセルを作製することができる<sup>18)</sup> (図 1)。この手法は生体環境を模倣した水溶液法により行われ、高温熱処理を必要としない。そのため、医薬品や遺伝子<sup>19)</sup> 等、熱で変性してしまう物質をアパタイトに内包することも可能である。

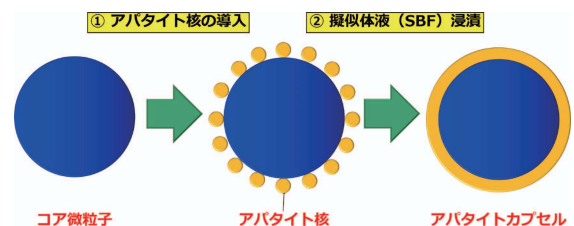


図 1 生体模倣環境を反応場とするアパタイトカプセルの合成フロー。

## 5. 固体マイクロ微粒子被覆アパタイトカプセル

それでは、筆者らがこれまでに取り組んできたアパタイトカプセル研究の具体例を紹介させていただく。まず、コア物質として銀微小球を用いた例<sup>18),20)</sup>を紹介し、アパタイトカプセルの基本作製プロセスについて概説する。

筆者らは、平均粒径  $1.71\mu\text{m}$  の銀微小球表面にアパタイト核を付着させ、SBF に浸漬すると、銀微小球が球体の形状を保ったまま、アパタイトの針状結晶で完全に被覆されることを明らかにした (図 2)。筆者らは、本手法がセラミックスやポリマーのマイクロ微粒子の被覆にも適用可能であることを見だしており、シリカゲル微小球<sup>18),21)</sup>、ポリ乳酸微小球<sup>18)</sup>、レボチロキシニ微粒子<sup>22)</sup> をアパタイトで被覆したカプセルの作製にも取り組んでいる。

SBF 中で形成されるアパタイトは無数の針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 (図 2(b))。このようなアパタイトで内包されたコア物質は、針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、銀微小球被覆アパ

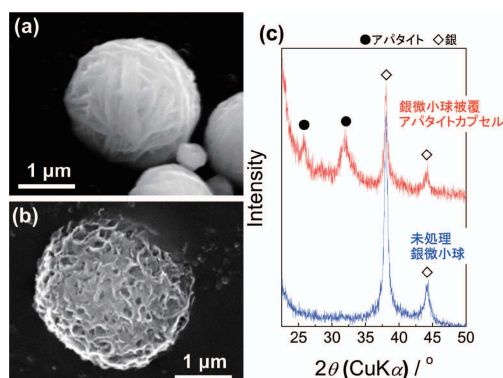


図 2 (a) 未処理銀微小球の SEM 写真, (b) 銀微小球被覆アパタイトカプセルの SEM 写真, (c) XRD 測定結果.

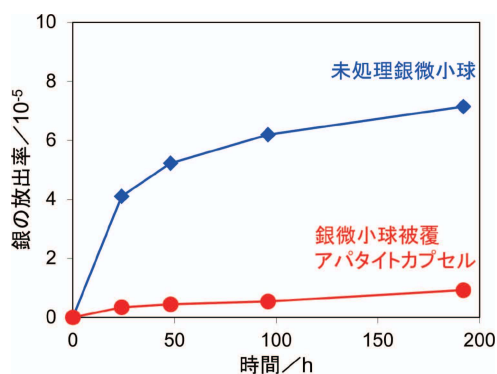


図 3 PBS 中での未処理銀微小球および銀微小球被覆アパタイトカプセルからの銀放出率変化。銀の放出率は、PBS 中で検出された銀の量を銀微小球の初期量で割って算出した。

イトカプセルからの銀の放出挙動を評価したところ、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) 中での銀放出量が未処理銀微小球の約 1/10 に抑制され、銀の徐放性を示すことがわかった (図 3)。また、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明らかにしている<sup>23)</sup>。

## 6. エマルションおよびゲル内包アパタイトカプセル

アパタイトカプセルは固体微粒子のみならず、エマルションやゲル等の柔らかい物質を内包することも可能である<sup>19)</sup>。エマルションやゲルに薬剤を担持させ、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カプセルの開発に着手している<sup>24)</sup>。親油性薬剤のモデル物質としてイブプロフェンを含むコーン油エマルションの表面にアパタイト核を付着させ、SBF に浸漬することで、イブプロフェン含有コーン油を内包したアパタイトカプセルを作製した (図 4(a))。このアパタイトカプセルを  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  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、アパタイトカプセルは担持したイブプロフェンを一気に放出せず、徐々に放出することがわかった (図 4(b))。

アパタイト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カプセルの作製にも取り組んでいる<sup>25)</sup> (図 4(c))。このアパタイトカプセルにビタミ

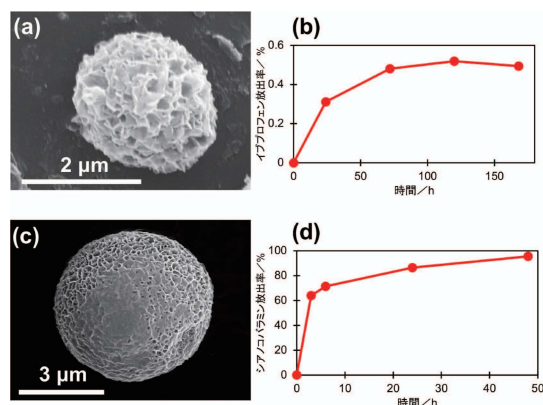


図 4 コーン油エマルション内包アパタイトカプセルの (a) SEM 写真, (b) リン酸緩衝液中での含有イブプロフェン放出率変化, およびアガロースゲル内包アパタイトカプセルの (c) SEM 写真, (d) 純水の中での含有シアノコバラミンの放出率変化。

ン  $B_{12}$  の一種であるシアノコバラミンの水溶液を含ませると、初期バーストが認められるものの、シアノコバラミンが持続的に放出されることを確かめている<sup>26)</sup> (図4(d))。以上の知見から、本手法が固体マイクロ微粒子の内包のみならず、エマルションやゲルにも適用可能であることが示唆された。

## 7. 磁性アパタイト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等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。また、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等、無機触媒にはない特徴とメリットを有している。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等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さまざまな方法があるが、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、磁性マイクロ微粒子をアパタイトに内包した磁性アパタイトカプセルを作製した。アパタイトカプセルが磁性を示すことにより、水溶液中の酵素を直接回収するのではなく、表面に酵素を固定化したカプセルを磁場の印加により容易に回収し、その結果として、水溶液中から酵素を高効率に回収することが可能である (図5)。

筆者らは、 $Fe_3O_4$  微粒子<sup>27)</sup> および  $\gamma-Fe_2O_3$  微粒子<sup>28)</sup> を内包した磁性アパタイトカプセルの作製に取り組んでいる。得られた  $\gamma-Fe_2O_3$  内包磁性アパタイト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。このような大きな比表面積は、SBF から得られるアパタイトの特徴の一つであり、無数の針状アパタイトで構成されているためである。

磁性アパタイトカプセルの酵素回収能を検証するため、 $\gamma-Fe_2O_3$  内包磁性アパタイト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、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。その結果、添加カプセルの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)。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<sup>29)</sup> 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十分な酵素活性を示すことがわかった (図7)。

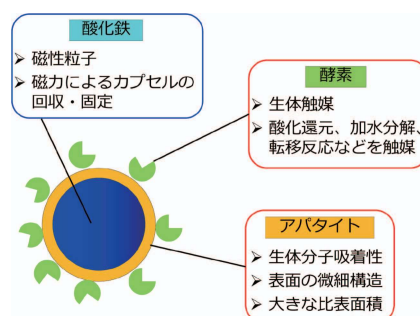


図5 固定化酵素技術への応用を指向した磁性アパタイトカプセルの具備する機能。

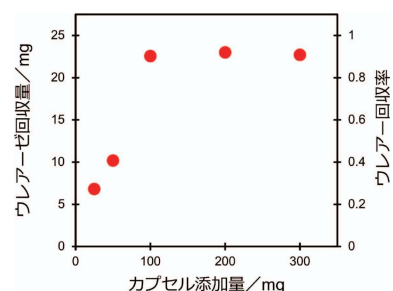


図6 ウレアーゼ溶液中に分散した  $\gamma-Fe_2O_3$  内包磁性アパタイトカプセルのウレアーゼ回収率のカプセル添加量依存性。

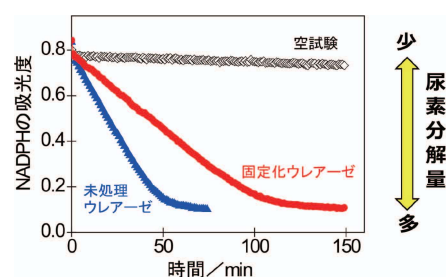


図7 ウレアーゼ固定化  $\gamma-Fe_2O_3$  内包磁性アパタイトカプセルを分散した尿素溶液、ウレアーゼのみを分散した尿素溶液、およびウレアーゼ未添加尿素溶液 (空試験) 中におけるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッン酸 (NADPH) 吸光度変化。

## 8. 磁性アパタイトカプセル表面での酵素吸着挙動

酵素の固定化挙動は等電点によって異なると考えられる。そこで筆者らは、 $\gamma-Fe_2O_3$  内包磁性アパタイトカプセル表面に異なる等電点の酵素を PBS 中で固定化し、アパタイトカプセル表面における固定化率と等電点の相関を調べた<sup>30)</sup>。

図8(a)に、 $\gamma-Fe_2O_3$  内包磁性アパタイトカプセル表面に固定化された酵素の等電点と固定化率の相関を、図8(b)に分散媒として用いた PBS の pH と酵素の等電点の差 ( $|pH-pI|$ ) と固定化率の相関を示す。図8(b)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

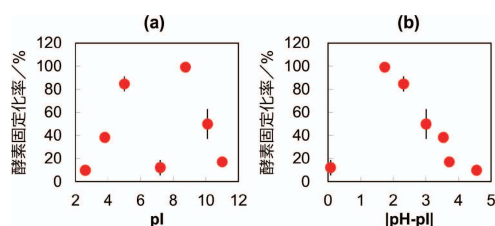


図8 PBS中における磁性アパタイトカプセル表面における酵素固定化率の(a)等電点 (pI) 依存性, (b)  $|\text{pH}-\text{pI}|$  依存性.

を意味している. 横軸を等電点にした図8(a)では, 酵素固定化率にはっきりとした相関は見られなかった. 一方,  $|\text{pH}-\text{pI}|$  を横軸にとった図8(b)では, 酵素固定化率が  $|\text{pH}-\text{pI}|$  の増加に伴って直線的に増加あるいは減少するのではなく,  $|\text{pH}-\text{pI}|=1\sim2$  で最大値をとる傾向を示した. このことから, アパタイト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あるのではなく, ファンデルワールス力や局所的なイオン間相互作用等さまざまな要因によって起こると考えられる.  $|\text{pH}-\text{pI}|=1\sim2$  のとき, 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るため,  $|\text{pH}-\text{pI}|=1\sim2$  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能を付与できる「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, 基材選択性および形状選択性の幅広い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マイクロ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, 生体親和性が高く, 環境への負荷が少ないアパタイト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.

## 文 献

- 1) L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen and 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 and H. P. Drobeck, *J. Bioeng.*, **1**, 79-92 (1977).
- 3) T. Kokubo, M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro and 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 and T. Kokubo, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26**, 255-267 (1992).

- 5) T. Kokubo and H. Takadama, *Biomaterials*, **27**, 2907-2915 (2006).
- 6) T. Yao, M. Hibino, S. Yamaguchi and H. Okada, *US Pat.* 8178066 (2012), *JP Pat.* 5261712 (2013).
- 7) T. Yao, M. Hibino and T. Yabutsuka, *US Pat.* 8512732 (2013), *JP Pat.* 5252399 (2013).
- 8) T. Yabutsuka, M. Hibino, T. Yao, K. Tanaka, M. Takemoto, M. Neo and T. Nakamura, *Bioceram. Dev. Appl.*, **1**, D110122 (2011).
- 9) Y. Kidokoro, T. Yabutsuka, S. Takai and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **720**, 175-179 (2017).
- 10) T. Yabutsuka, R. Karashima, S. Takai and T. Yao, *Materials*, **11**, 1334 (2018).
- 11) T. Yabutsuka, H. Mizutani, S. Takai and T. Yao, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 143-147 (2018).
- 12) T. Yabutsuka, K. Fukushima, T. Hiruta, S. Takai and T. Yao, *Mater. Sci. Eng. C*, **81**, 349-358 (2017).
- 13) T. Hiruta, T. Yabutsuka, K. Fukushima, S. Takai and T. Yao, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 149-152 (2018).
- 14) T. Yabutsuka, K. Fukushima, T. Hiruta, S. Takai and T. Yao, *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, **106**, 2254-2265 (2018).
- 15) T. Yabutsuka, S. Takai and T. Yao, *J. Jpn. Soc. Powder Powder Metallurgy*, **43**, 207-210 (2018).
- 16) T. Yabutsuka, S. Takai and T. Yao, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 139-142 (2018).
- 17) 正本和誉, 藤林俊介, 大槻文悟, 藪塚武史, 昼田智子, 奥津弥一郎, 後藤公志, 松田秀一, 第33回日本整形外科学会基礎学術集会, 1-PD-4 (2018).
- 18) T. Yao and T. Yabutsuka, "Biomimetics, Learning from Nature", InTech (2010) Chapter 13, pp.273-288.
- 19) T. Yao, T. Yabutsuka, Y. Shimada and S. Yamane, *WO2012137967* (2012).
- 20) T. Yabutsuka, S. Tsuboi, M. Hibino and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **361-363**, 709-712 (2008).
- 21) S. Yamane, T. Yabutsuka, M. Hibino and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **396-398**, 519-522 (2009).
- 22) T. Yabutsuka, S. Takai and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **758**, 172-177 (2017).
- 23) S. Yamane, T. Yabutsuka, M. Hibino and T. Yao, *Bioceramics*, **22**, 551-554 (2009).
- 24) T. Matsunaga, T. Yabutsuka, M. Hibino and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **720**, 12-16 (2017).
- 25) H. Nakamura, M. Sakaguchi, T. Yabutsuka, S. Takai and T. Yao, *Phos. Res. Bull.*, **31**, 9-14 (2016).
- 26) T. Yabutsuka, K. Iwahashi, H. Nakamura and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **631**, 326-331 (2015).
- 27) T. Yabutsuka and T. Yao, *Energy Procedia*, **9**, 532-538 (2011).
- 28) T. Yabutsuka, S. Kumazawa, D. Hisashuku, H. Mizutani, K. Fukushima, S. Takai and T. Yao, *Key Eng. Mater.*, **696**, 259-264 (2016).
- 29) 田畑勝好, 臨床検査, **22**, 1273-1285 (1978).
- 30) M. Yamamoto, T. Yabutsuka, S. Takai and T. Yao, *Trans. Mat. Res. Soc. Japan*, **43**, 153-156 (2018).

## 筆者紹介

藪塚 武史 (やぶつか たけし)

2009年京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻博士課程修了 (博士 (エネルギー科学)). 日本学術振興会特別研究員DC1, 同PDを経て, 2009年より京都大学大学院エネルギー科学研究科エネルギー基礎科学専攻助教. 生体活性骨修復材料の開発および環境調和型アパタイトカプセルの開発を展開.  
[連絡先] 〒606-8501 京都市左京区吉田本町  
京都大学大学院エネルギー科学研究科  
E-mail: yabutsuka@energy.kyoto-u.ac.jp

