原 著 論 文

Hydroxyapatite へのアミノ酸の吸着について

川崎 彰人 河野 敬一 寺田 善博 平安 亮造

Adsorption of Amino Acids onto Hydroxyapatite

Akihito Kawasaki, Keiichi Kawano, Yoshihiro Terada and Ryozi Hirayasu

Abstract : The interaction of Hydroxyapatite (HAP) with organic molecules is of biological importance, since the former is considered as the prototype mineral found in calcified tissues, such as bone and teeth. Some proteins display a high affinity for HAP and they are involved in the mineralization of bone.

Another important aspect in biological systems is the role that various molecules play as inhibitors of crystal growth.

We investigated the interaction of HAP with amino acids and thier derivatives by comparing HAP adsorption experiment with crystal growth experiment. It was reported aspartic acid or phosphoserine adsorbed onto HAP and that they inhibited the seeded crystal growth. In this work, histidine and imidazole derivatives also displayed the crystal growth inhibitory activity and its adsorption isotherm was described by a Langmuir-type model.

Key words : hydroxyapatite, amino acid, adsorption, inhibition

I. 緒 言

生体への組織親和性を利用して Hydroxyapatite (HAP) がインプラント材料として臨床で盛んに使用されているが、HAP による骨修復過程については十分には明らかにされていない。また、HAP の組織親和性が非常に高いとはいえ、全く生体に為害作用を及ぼさないものではないことから生体材料としては非免疫原性の異物であると考えられる研究者もいる¹⁾。

インプラント材料の組成および形態の違いや、生体側の個人差によって HAP の組織反応は当然異なってくる

ことが考えられる。

したがって HAP を主体としたインプラント材料と生体との関係を考える上で、HAP と骨の有機成分である蛋白質との相互作用を調べることは重要である。そこでわれわれは HAP と蛋白質との相互作用を理解するための基礎的研究として、蛋白質の構成単位であるアミノ酸に注目し、HAP とアミノ酸がどのように関わっているのかを合成 HAP を用いた種結晶の成長阻害実験から追求した^{2,3)}。その結果、L-Alanine, L-Valine のような非極性アミノ酸以外の L-Glycine, L-serine などの極性非荷電のアミノ酸や L-Glutamic acid, L-Aspartic acid のような酸性アミノ酸や特に塩基性のアミノ酸である L-Histidine に成長阻害作用が認められた。

今回は HAP とアミノ酸の吸着実験を行い、成長阻害実験の結果と比較して、HAP とアミノ酸の相互作用について検討を行った。

九州大学歯学部歯科補綴学第一講座（主任：平安亮造教授）
The 1st Dept. of Prosthetic Dentistry, Faculty of Dentistry, Kyushu Univ. (Chief: Prof. Ryozi Hirayasu)
昭和 63 年 12 月 15 日受付

II. 実験方法

HAP として市販の合成 HAP である Bio-Rad 社の Bio-Gel HTP を用いた。SEM 像 (Fig. 1) より, HAP は, $10\sim 100\ \mu\text{m}$ の板状を呈しており, その X 線回折 peak (Fig. 2) より HAP 以外のリン酸カルシウムの結晶を含まないことを確認した。

なおこの HAP の比表面積は $60\ \text{m}^2/\text{g}$ であった。

吸着質として L-Histidine, Imidazole, Histamine, L-Aspartic acid, L-Glutamic acid, *o*-phospho-L-serine, L-Alanine, Pyrrole を用いた。それぞれの吸着質溶液は, NaOH あるいは HCl にてあらかじめ pH 7.4 に調整し, 使用するまで 4°C にて保存した。HAP が $50\sim 100\ \text{mg}$ 入った plastic tube に種々の濃度の吸着質溶液 $2\ \text{ml}$

Fig. 1 SEM of Bio-Gel HTP

Fig. 2 X-ray diffraction patterns

を加え, 37°C にて 1.5 時間, TAIYO 社製の ROTATOR による攪拌を行い, 吸着質と HAP とを平衡状態にさせた。その後, 10 分間 $15,600\ \text{g}$ にて遠心分離をし, その上清を $0.22\ \mu\text{m}$ Millipore filter にて濾過した。

それぞれの濾液の濃度を日立分光光度計 220 S にて測定し, 初濃度と平衡後の濃度との差から, 各吸着質の HAP に対する吸着量を計算し, HAP の単位表面積あたりの吸着等温線を求めた。

成長阻害実験については前回の報告と同様に行った²⁾。

III. 実験結果および考察

吸着現象は一般的に, 一定温度における吸着量と平衡濃度 (平衡圧) との関係を表す吸着等温線で記述される。Fig. 3 は HAP と個々のアミノ酸およびその誘導体の吸着等温線である。

Moreno ら^{4,5)}の実験結果と同様に *o*-phospho-L-serine に強い吸着がみられたが, L-Alanine, Pyrrole には吸着は認められなかった。L-Aspartic acid と L-Glutamic acid とを比較すると構造的に側鎖の短い L-Aspar-

Fig. 3 Adsorption isotherms of adsorbates onto HAP at 37°C

Fig. 4 Adsorption isotherms plotted according to Langmuir-type model

Table 1 Effect of specific function groups on adsorption onto HAP at 37°C

Adsorbate	K (ml/μmol)	N (μmol/m²)	Correlation coefficient
L-Alanine	Not detectable	Not detectable	—
Pyrrole	Not detectable	Not detectable	—
L-Aspartic acid	1.07	0.852	0.9835
L-Glutamic acid	1.06	0.601	0.9930
O-Phospho-L-serine	3.422	2.550	0.9963
L-Histidine	0.741	0.758	0.9896
Histamine	0.528	0.949	0.9547
Imidazole	0.300	1.149	0.9378

tic acidの方が大きな吸着量を示し、Kresak⁶⁾、Hayら⁷⁾の実験結果と同様の傾向を示した。Imidazole, Histamine, L-Histidineの吸着等温線は、3者ともやや形態を異とする傾向がみられた。

吸着等温線の代表的なものには、Henry型、Langmuir型、Freundlich型、Frumkin-Temkin型、B.E.T.型、階段型、ヒステリシス型などがある。次式はそ

Fig. 5 Time plots of the amount of NaOH (0.025 N) needed to maintain pH 7.4 in seeding experiments

Fig. 6 Time plots of the amount of NaOH (0.025 N) needed to maintain pH 7.4 in seeding experiments

のなかで最もよく知られている Langmuir 式である。

$$C/Q = 1/NK + C/N$$

ここで C と Q は、それぞれ HAP と吸着質が平衡状態にあるときの吸着質の濃度と吸着質の HAP への吸着量を表す。N は飽和吸着量で HAP の表面に吸着質が最大どの程度吸着できるかを表す。K は吸着質分子が HAP にどのくらい親和性を持つか、つまり HAP との結合強さを示す。

すなわち、Langmuir 式によって吸着質が HAP とどの

ように関わっているのかを数値的に知ることができる。

Fig. 4 は Langmuir の式に従って各吸着質を plot したもので、Table 1 は plot したもののから計算によって吸着パラメーターである親和力 K と飽和吸着量 N および相関係数を表したものである。L-Alanine, Pyrrole 以外の各吸着質は、相関係数より強い直線関係を示し、Langmuir 式に従うことが認められた。

Fig. 5, 6 は HAP の種結晶を用いた成長阻害実験の結果で、HAP の種結晶の成長過程を NaOH の消費量で表したものである。NaOH の消費量が少ないことは、種結晶の成長が抑制されていることを表す。

Fig. 3 の吸着等温線と比べると、吸着を示さなかった L-Alanine には成長阻害作用はみられず、強い吸着を示した *o*-phospho-L-serine には強い成長阻害作用があることがわかる。L-Aspartic acid や L-Glutamic acid には、それぞれの吸着量に相応して成長阻害作用がみられる。Table 1 の各吸着質の親和力 K と、飽和吸着量 N の値をみると強い吸着がみられた *o*-phospho-L-serine は、親和力も飽和吸着量も他に比べて非常に大きな値を示している。L-Aspartic acid と L-Glutamic acid を比較した場合、親和力はほとんど等しいが飽和吸着量は L-Aspartic acid の方が L-Glutamic acid よりも優っている。

嶋林らは 1 価および 2 価の金属イオン、水酸基イオン、リン酸イオンの HAP への吸着について報告している⁸⁻¹²⁾。それによるとこれらのイオンの吸着は HAP 表面上にある吸着サイトに結合することにより、あるいは HAP 表面上のイオンとのイオン交換およびそれに伴うプロトンの中性化によって、あるいは HAP 表面上の格子欠陥部位に結合することによって生ずるとしている。川崎らによると HAP 表面上には C-site, P-site と呼ばれる吸着サイトが存在し P-site にはアミノ基などの陽イオンが、C-site にはカルボキシル基、リン酸基などの陰イオンが吸着するとしている^{13,14)}。

また、Juriaanse らは HAP への吸着に関して種々の幾何学的モデルを提案している^{15,16)}。

これらの研究報告とわれわれの成長阻害実験・吸着実験の結果とを比べると、成長阻害作用は阻害物質が HAP の表面に吸着することによって結晶成長部位がブロックされるために生じることが考えられる。L-Alanine が吸着を示さなかったのは、カルボキシル基と Ca のアミノ基とが近接しているために電氣的に中性を示すためではないかと思われる。同様の考え方をすると L-Aspartic acid や L-Glutamic acid の HAP への吸着に

は、側鎖のカルボキシル基が関与し、親和力は両者ともほぼ同じであることから、構造的に側鎖の長い分 L-Glutamic acid の方が吸着量が少なくなったものと考えられる。

Fig. 6 は、N 原子 1 個を含む 5 員環の複素環式化合物の Pyrrole と N 原子 2 個を含む 5 員環の複素環式化合物 Imidazole 基をもつ L-Histidine, Histamine の成長阻害実験の結果である。Pyrrole はヘモグロビンの母体となるものである。吸着実験の結果と比較すると L-Alanine と同様に、吸着を示さない Pyrrole には成長阻害作用はみられず、強い吸着を示した Imidazole, L-Histidine, Histamine に阻害作用がみられた。このことから、Imidazole 基が成長阻害および吸着に強く関与しているものと思われる。

実際、Imidazole は電子供与体で、金属イオンと配位結合することが知られているので、HAP 表面上の Ca^{2+} と結合するものと思われる。

Imidazole が L-Histidine, Histamine に比べて同程度の成長阻害作用を示すのに大きな濃度を要したのは、親和力が他の 2 つに比べて小さいことと、飽和吸着量がやや大きいにも関わらず構造的に小さいために結晶成長部位のブロックされる数が少なかったためと考えられる。

最近、人の耳下腺の唾液から Histidine-rich-polypeptide が発見され、これが獲得被膜形成の初期過程に関与している可能性の高いことが示唆されているが¹⁷⁻²⁰⁾、今回のわれわれの実験はこの Histidine-rich-polypeptide のエナメル質への強い吸着を説明するものであると思われる。

IV. 結 論

今回、われわれは HAP と骨の有機成分である蛋白質との相互作用について調べるために吸着実験を行い、成長阻害実験の結果と比較検討し以下の結論を得た。

1. HAP の種結晶の成長阻害作用は、HAP 表面上の結晶成長部位が阻害剤によってブロックされるために生じるものと考えられる。

2. *o*-phospho-L-serine, L-Aspartic acid 以外にも、Imidazole, L-Histidine, Histamine の吸着等温線は Langmuir 式に合致した。

3. 各吸着質の親和力と飽和吸着量には相違がみられ、HAP の結晶成長阻害実験の結果と比較した場合、それぞれの阻害物質によって結晶成長の阻害のメカニズ

ムが異なることが示唆された。

本論文の要旨の一部は、第 79 回日本補綴歯科学会学術大会(昭和 63 年 5 月), Sixth international symposium on calcium-binding proteins in health and disease (昭和 63 年 7 月) において発表した。

文 献

- 1) 森 雅美: 合成ハイドロキシアパタイトセラミック微粒子に対する組織反応—電顕的研究—, 新潟歯学会誌, 17: 99~115, 1987.
- 2) 川崎彰人, 河野敬一, 寺田善博ほか: ハイドロキシアパタイトとアミノ酸の相互作用について, 補綴誌, 33: 522~527, 1989.
- 3) Kawasaki, A., Kawano, K. and Hirayasu, R.: Role of histidine in the binding of proteins to hydroxyapatite, Calcium Signaling 88. Sixth international symposium on calcium-binding proteins in health and disease, abstract: 227, 1988.
- 4) Aoba, T. and Moreno, E.C.: Adsorption of phosphoserine onto hydroxyapatite and its inhibitory activity on crystal growth, J Colloid Interface Sci, 106: 110~121, 1988.
- 5) Moreno, E.C., Kresak, M. and Hay, D.I.: Adsorption of molecules of biological interest onto hydroxyapatite, Calcif Tissue Int, 36: 48~59, 1984.
- 6) Kresak, M., Moreno, E.C. and Zahradnik, R.T. et al: Adsorption of amino acids onto hydroxyapatite, J Colloid Interface Sci, 59: 283~292, 1977.
- 7) Hay, D.I. and Moreno, E.C.: Differential adsorption and chemical affinities of proteins for apatite surfaces, J Dent Res, 58: 930~940, 1979.
- 8) Shimabayashi, S., Tamura, C. and Nagasaki, M.: Adsorption of mono- and divalent metal cations on hydroxyapatite in water, Chem Pharm Bull, 29: 2116~2122, 1981.
- 9) Shimabayashi, S., Tamura, C. and Nagasaki, M.: Adsorption of hydroxyl ion on hydroxyapatite, Chem. Pharm Bull, 29: 3090~3098, 1981.
- 10) 嶋林三郎ほか: ヒドロキシアパタイトに対する塩化セチルピリジニウムの吸着, 薬学雑誌, 102: 137~142, 1982.
- 11) Shimabayashi, S., Hitomi, F. and Aoyama, T. et al: Adsorption of phosphate ion by hydroxyapatite in water, Chem Pharm Bull, 30: 3074~3081, 1982.
- 12) Shimabayashi, S. and Nagasaki, M.: Concurrent adsorption of calcium ion and hydroxyl ion on hydroxyapatite, Chem Pharm Bull, 31: 2976~2985, 1983.
- 13) 川崎 力: ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィの基本原理とその HPLC への応用, インファケム, 5: 24~32, 1984.
- 14) 川崎 力: ハイドロキシアパタイト結晶粒子を充填剤とする高速液体クロマトグラフィー, セラミックス, 20: 195~202, 1985.
- 15) Juriaanse, A.C., Arends, J. and Bosch, J.J.T.: The adsorption of acidic and basic homopolypeptides to whole bovine dental enamel, J Colloid Interface Sci, 76: 212~219, 1980.
- 16) Juriaanse, A.C., Arends, J. and Bosch, J.J.T.: The role of surface ions in a model for peptide adsorption to whole bovine dental enamel, J Colloid Interface Sci, 76: 220~226, 1980.
- 17) Baum, B.J. et al: Studies on histidine-rich polypeptide from human parotid saliva, Arch Biochem Biophys, 177: 427~436, 1976.
- 18) Hay, D.I.: Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces, Archs Oral Biol, 20: 553~558, 1975.
- 19) Baum, B.J., Bird, J.L. and Longton, R.W.: Polyacrylamide gel electrophoresis of human salivary histidine-rich-polypeptides, J Dent Res, 56: 1115~1118, 1977.
- 20) Iacono, V.J., Mackay, B.J. and Denepitiya, L. et al: Salivary histidine-rich polypeptide profiles of caries-resistant and -susceptible adults, J Dent Res, 62: 226, 1983.
- 21) Mackay, B.J., Pollock, J.J. and Iacono, V.J. et al: Isolation of milligram quantities of a group histidine-rich polypeptides from human parotid saliva, Infect Immun, 44: 688~694, 1984.
- 22) Mackay B.J., Denepitiya, L. and Iacono, V.J. et al: Growth-inhibitory and bactericidal effects of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on streptococcus mutans, Infect Immun, 44: 695~701, 1984.
- 23) Pollock, J.J., Denepitiya, L. and Mackey, B.J. et al: Fungistatic and fungicidal activity of human parotid salivary histidine-rich polypeptides on candida albicans, Infect Immun, 44: 702~707, 1984.
- 24) Miyake, M., Sanjo, O. and Kuboki, Y. et al: A histidine-rich protein isolated from human parotid saliva having a high affinity to hydroxyapatite, Jpn J Oral Biol, 29: 477~481, 1987.