解 説

擬似体液を利用したバイオミメティックプロセス

大槻 主税

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科, 〒630-0192 生駒市高山町 8916-5.

Biomimetic Process Utilizing a Simulated Body Fluid

Chikara Ohtsuki

Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, 8916-5, Takayama-cho, Ikoma 630-0192.

Received January 20, 2005

SYNOPSIS

Hydroxyapatite has been used not only as a bone-repairing material in clinical applications but also as a functional material in the biological field, since it shows high biological affinity and specific characteristics on protein adsorption. It is expected that coating of substrates with a layer of hydroxyapatite will increase its potential applications as the hydroxyapatite will be directly exposed to the surrounding environment, allowing it to show its biological and chemical properties without any intervening effects by coverage with an organic polymer matrix. A biomimetic process for depositing hydroxyapatite on the surfaces of organic polymers provides us with a design of novel materials showing various mechanical properties without losing the functionalities of hydroxyapatite. This paper reviews a biomimetic process for coating of hydroxyapatite layers, through exposure of an organic substrate to a solution that mimics human body fluid. The existence of carboxyl groups effectively triggers the heterogeneous nucleation of hydroxyapatite on the examined organic polymer, such as aromatic polyamide and natural silk protein. The rate of hydroxyapatite formation on the examined organic polymer in the biomimetic solutions is increased by incorporation of calcium ions. The resultant layer formed on the organic substrates consists of nano-sized fine particles of hydroxyapatite with low crystallinity. The fine particles provide a high potential for the adsorption of proteins. The adhesive strength of the hydroxyapatite layer on the organic substrate of the aromatic polyamide increased with increasing content of carboxyl groups. These findings indicate that a coating of hydroxyapatite can be achieved on organic polymers under biomimetic condition by a modification of the polymer with carboxyl groups and calcium ions.

KEY WORDS

biomimetic process, simulated body fluid (SBF), hydroxyapatite, coating, organic substrates

1 はじめに

骨の無機成分である水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は、体内で骨と直接結合する生体活性なセラミックスであり、その生体活性を利用した骨補填材料として、整形外科、形成外科などを中心に臨床使用されている^{1,2)}。水酸アパタイトは、タンパク質や核酸、細胞に対しても特異な吸着特性を示す。この性質を用いて、クロマトグラフィー用充填剤としても利用される。このように水酸アパタイトは、その高い生物学的親和性やタンパク質吸着特性を利用した機能性材料として広く利用できる物質である³⁾。しかしセラミックスである水酸アパタイトは、本質的に硬くて脆いためその利用範囲は限られ

ている。この問題を克服するために、水酸アパタイトを有機高分子と混合した複合材料が開発されている。例えば、Bonfieldらは水酸アパタイト粉末を高密度ポリエチレン (HDPE) に分散させた複合材料を合成した⁴⁾。生体活性セラミックスである水酸アパタイトの粉末をHDPEに分散させることによって、生体活性と同時に骨のヤング率に近い特性を得るための材料設計である^{5,6)}。水酸アパタイトの体積分率が約0.4 (40 vol%)までは複合体は適度な柔軟性を示すのに対して、45 vol%を越えると複合体は脆くなる。一方、生物学的特性については、水酸アパタイトの体積分率が0.2より大きくなると、材料表面へ骨組織が近接する。しかし、水酸アパタイトの体積分率が

0.2以下の場合、複合体は骨欠損部で線維性被膜によりカプセル化される。すなわち、このような手法を用いた場合、水酸アパタイトの持つ生物学的、化学的特性を支配する材料表面が、複合化の過程で有機高分子により覆われてしまい、周囲の環境に対してその機能を十分には発現することは望めない。そこで水酸アパタイトの機能を損なうことなく、有機高分子材料にハイブリッド化する技術が求められている。その手法の一つとして、体液に類似した水溶液を用いて、水酸アパタイトを有機高分子表面に被覆するバイオミメティック法が注目されている。バイオミメティック法には、加熱処理による有機高分子の劣化の懸念がなく、環境への負荷も小さい利点がある。

2 擬体液(SBF)中における材料表面への アパタイト層の形成機構

バイオミメティック法では、水酸アパタイトに対して過飽和な水溶液に基板を浸漬して、基板表面に不均一核形成を誘起し、生成した結晶核を成長させて水酸アパタイトの被膜を形成する。水酸アパタイトに対して過飽和な水溶液として、ヒトの細胞外液に無機イオン濃度をほぼ等しくした擬体液(Simulated body fluid, SBF)やSBFのイオン濃度を1.5倍に高めた水溶液(1.5SBF)を用いる^{7a)}。それら水溶液の組成をTable 1に示す。体液やSBF, 1.5SBFは水酸アパタイトに対して過飽和で準安定な水溶液であり、一旦水酸アパタイトの核が生成すると自発的に水酸アパタイトが成長する環境である。従って、これらの溶液を用いたプロセスでは、水酸アパタイトの不均一核形成を誘起する表面構造であるか否かが重要な因子となる。これまでに、材料がSBF中でその表面に水酸アパタイト層を形成するにはどのような条件が必要とされるかが報告されている。OhtsukiらはSBF中におけるCaO-SiO₂-P₂O₅系ガラスの水酸アパタイト形成の組成依存性を基礎的に調べ、CaO-SiO₂系2成分ガラスでもSBF中で表面に水酸アパタイト層が形成されることを明らかにした。CaO-SiO₂系2成分ガラスの表面で水酸アパタイトが形成される機構をFig.1に模式的

に示した。SBFにCaO-SiO₂系ガラスを浸漬すると、その表面からカルシウムイオン(Ca²⁺)を溶出し周囲の液の水酸アパタイトに対する過飽和度を上昇させる。さらにCa²⁺の溶出に伴ってガラス表面に形成されたSi-OH基がアパタイトの不均一核形成を誘起し、その結果ガラス表面に水酸アパタイトの核が選択的に生成する⁹⁾。このガラス表面に生じた水酸アパタイトの核は周囲の液からカルシウムイオン(Ca²⁺)やリン酸イオンを取り込んで均一な膜にまで成長する。この反応過程では、水酸アパタイトの形成に必要なリン酸イオンは、SBFから供給される。従って、SBF中で材料の表面にアパタイト層を生成させるためには、(1)材料表面から溶出した成分による周囲の体液のアパタイトに対する過飽和度の上昇、および(2)材料表面にアパタイトの不均一核形成を誘起する官能基の存在、の二つの因子が重要となる。シラノール(Si-OH)基の他に、体液環境下でアパタイトの不均一核形成を誘起する官能基として、Ti-OH基¹⁰⁾、Zr-OH基¹¹⁾、Ta-OH基¹²⁾、Nb-OH¹³⁾基もまたSBF中でアパタイトの不均一核形成を誘起すると報告されている。さらに、Tanahashiらは金表面に種々の官能基を有する自己組織化膜を形成させ、それらのアパタイト形成能についてSBFを用いて調べた¹⁴⁾。その結果、表面のカルボキシル(COOH)基ならびにリン酸(PO₃H₂)基がアパタイトの核形成を誘起することを明らかにした。本稿では、有機高分子への導入が容易なカルボキシル基を含有する合成および天然高分子について、体液に類似した水溶液を用いた水酸アパタイト被覆技術について解説する。

3 カルボキシル基含有芳香族ポリアミドフィルムへの 水酸アパタイト被覆

カルボキシル基がアパタイトの核形成を誘起するという知見を基に、Miyazakiらは、カルボキシル基を含有する合成高分子ポリアミド表面での1.5SBFにおける水酸アパタイト析出について調べている¹⁵⁾。実験に用いたポリアミドC(x)の構造をFig.2に示す¹⁶⁾。このカルボキシル基含有芳香族ポリアミドに種々の量の塩化カルシウム(CaCl₂)を添加してフィルム

Table 1 Ion concentrations of extracellular fluid, SBF and 1.5SBF.

Ion	Concentration (mol·m ⁻³)		
	Extracellular fluid	SBF	1.5SBF
Na ⁺	142.0	142.0	213.0
K ⁺	5.0	5.0	7.5
Mg ²⁺	1.5	1.5	2.3
Ca ²⁺	2.5	2.5	3.8
Cl ⁻	103.0	147.8	223.0
HCO ₃ ⁻	27.0	4.2	6.3
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0	1.5
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5	0.8

Fig.1 Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂ glass in body environment.

Fig.2 Structural formula of polyamide C(x)¹⁶⁾.

Fig.3 SEM photographs of the surfaces of C(x)Ca(40) (x=0, 20 and 50) films after soaking in 1.5SBF for 7 days.

Fig.4 SEM photographs of the surfaces of C(50)Ca(y) (y=0, 17, 33, 40 and 50) films after soaking in 1.5SBF for 7 days.

C(x)Ca(y), y: 塩化カルシウム含有量(mass%))を作製した。得られたフィルムを pH7.40 の 1.5SBF に浸漬し、36.5℃ で 7 日間保持した。Fig.3 に CaCl₂ の添加量を 40mass% として種々のカルボキシル基含有量で作製したフィルムを 1.5SBF に浸漬した後の表面の走査型電子顕微鏡(SEM)写真を示す。カルボキシル基の含有量を大きくしたフィルムほど、その表面に多くの析出物が見られる。X線回折によれば、この析出物は低結晶性の水酸アパタイトであった。この低結晶性の水酸アパタイトを以後アパタイトと略す。一方、カルボキシル基含有量を x=50 とした場合には、Fig.4 に示すように 40 mass% 以上の CaCl₂ を含むフィルムであればアパタイト層が均一に形成されるのに対して、CaCl₂ の含有量が小さい場合には、1.5SBF 浸漬後であってもフィルム表面にアパタイトの形成は認められなかった。フィルムに添加した CaCl₂ が溶出して 1.5SBF のアパタイトに対する過飽和度を一旦上昇させることが、この高分子フィルム表面でのアパタイトの不均一核形成に必須であったと言える。Fig.5 にカルボキシル基含有量および CaCl₂ 含有量の大きい C(50)Ca(40) フィルムを 1.5SBF に 7 日間浸漬して析出させたアパタイト層の断面を SEM で観察した結果を示す。約 10 μm の高分子フィルムの両面が 2~3 μm のアパタイ

Fig.5 SEM photograph of the cross-section of C(50)Ca(40) after soaking in 1.5SBF for 7 days.

Fig.6 FE-SEM photographs of the apatite deposited on C(50)Ca(40) after soaking in 1.5SBF for 7 days.

ト層で被覆されている様子が分かる。フィルム表面に形成されたアパタイト層を高倍率で観察すると、数十ナノメートルの微粒子で構成されている形態が観察された(Fig.6)。C(50)Ca(40) フィルム上に形成されたアパタイト層は、Scotch®テープによる剥離試験でも剥がれることなく、強固にフィルムと接着していた。フィルムとアパタイト層の接着強度は、高分子のカルボキシル基の含有量が大きくなるほど増大する傾向が認められ、カルボキシル基は、アパタイトの形成を誘起すると同時に形成されたアパタイト層との接着性の向上にも寄与することが分かった。アパタイト層が形成したポリアミドフィルムの断面を透過型電子顕微鏡(TEM)により観察すると、ポリアミドフィルムとアパタイトの微結晶が絡み合っているのが観察された(Fig.7)。この絡み合い構造がアパタイト層とフィルムの接着強度の増大に寄与していると考えられる。

4 天然高分子表面でのアパタイト形成

体液類似環境下において、カルボキシル基を含有した天然高分子表面にアパタイトを析出させる技術も提案されている。Kawashitaらは、カルボキシル基を含有するカルボキシルメチルキチンやジェランガムからなるゲルを、飽和水酸化カルシウム水溶液で処理した後に SBF に浸漬すると、その表面にアパタイトが析出すると報告した¹⁷⁾。Kokuboらは、カルボキシルメチルキチン不織布やアルギン酸カルシウム繊維を飽和水酸化カルシウム水溶液で処理すれば、SBF 中でその表面にア

Fig.7 TEM photograph of the cross-section of C(50)Ca(40) after soaking in 1.5SBF for 7 days.

Fig.8 SEM photographs of the surfaces of R-silk and N-silk before and after soaking in 1.5SBF for 7 days.

パタイトが形成することを報告した^{18,19)}。

Takeuchiらは、生糸表面を構成するタンパク質のセリシンが、1.5SBF中でアパタイトを析出しやすいことを見出している。生糸からなる織物(R-silk)を、pH7.25の1.5SBFに浸漬し、36.5°Cで7日間保持すると、Fig.8に示すように1.5SBF浸漬後のR-silkには、半球状のアパタイトの析出が観察される²⁰⁾。一方、生糸を精製して得られる絹糸からなる織物(N-silk)では、同じ処理を施してもアパタイトの形成は認められなかった。すなわち体液類似環境下におけるアパタイトの不均一核形成が、N-silk表面よりもR-silk表面で起こりやすいことが分かる。生糸および絹糸の構造をFig.9に示す^{21,22)}。生糸(R-silk)はタンパク質のセリシンが表面を覆っているのに対し、絹糸(N-silk)は精製によりセリシンが取り除かれ、タンパク質のフィブロインが表面に出ている。セリシンおよびフィブロインの組成をみると、セリシンが酸性アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸を約20 mol%含むのに対し、フィブ

Fig.9 Structure of silk^{21,22)}.

Fig.10 SEM photographs of the surfaces of R-silk treated with various concentrations of CaCl_2 solution, followed by soaking in 1.5SBF for 7 days.

ロインは、それらを約3 mol%しか含有していない。つまり、セリシンはフィブロインに比べ多数のカルボキシル基を含有している。R-silk表面を構成する蛋白質のセリシンがカルボキシル基に富むことにより、R-silk表面でアパタイトの不均一核が誘起されたと推察される。R-silkについて、予め種々の濃度の塩化カルシウム水溶液(0.01~5 mol·dm⁻³)により24時間処理し、引き続き1.5SBFに浸漬すると、予め1 mol·dm⁻³の濃度以上の CaCl_2 水溶液で処理したR-silkは、試料全面がアパタイトで覆われるほどアパタイトが生成した(Fig.10)。N-silkでは予め5 mol·dm⁻³の CaCl_2 水溶液で処理してもアパタイトは形成しなかった。CaCl₂水溶液で処理したR-silkを1.5SBFに浸漬すると、織物中に残存したCa²⁺が溶出し、これにより周囲の溶液のアパタイトに対する過飽和度が上昇して、セリシン表面でのアパタイトの核形成を促進したと考えられる。天然高分子表面であってもカルボキシル基の存在とCa²⁺の溶出を利用すれば、合成高分子と同様に体液類似環境で、アパタイト層を被覆できることが分かる。

5 官能基によるアパタイト核形成の誘起

以上のように、カルボキシル基を含有する合成高分子や天然高分子を用いて、Ca²⁺を溶出する条件を整えれば、体液類似環境下で有機高分子基板をアパタイトで被覆できることが明らかになってきた。Fig.11には、そのアパタイト形成機構の概念図を示した。SBFや1.5SBFは、アパタイトに対して過

Fig.11 Apatite nucleation induced by carboxyl groups in body environment.

飽和な状態であるので、材料表面でアパタイトの不均一核形成が起こるか否かがアパタイト層の形成を支配していると言える。ただし、なぜ特定の官能基がアパタイトの不均一核形成を誘起しやすいのかは明らかになっていない。Takadamaらは、シラノール(Si-OH)基がアパタイト形成を誘起する初期過程を報告している²³⁾。Si-OH基は、直接アパタイトの核を誘起するのではなく、まず Ca^{2+} のみを取り込み、アモルファスの SiO_2Ca and $(\text{SiO})_2\text{Ca}$ などのケイ酸カルシウムを形成する。その後、このアモルファスのケイ酸カルシウムがリン酸イオンを取り込みアパタイトの核を形成すると推定されている。Ti-OH基においても同様に、まず Ca^{2+} を取り込み、その後リン酸イオンを取り込んでアパタイトの核が形成されると推定されている²⁴⁾。これまでにアパタイト形成を誘起することが報告されている官能基は、いずれも体液環境下において負に帯電していることが知られている。従って、アパタイトの核が形成される過程においては、官能基による Ca^{2+} の取り込みが重要な役割を果たしていると予測される。この機構にならえば、カルボキシル基も直接アパタイトの核形成を誘起するのではなく、まず $-\text{COOCa}^+$ や $(-\text{COO})_2\text{Ca}$ などを形成し、その後リン酸イオンを取り込んでアパタイトの核形成を誘起していると考えられる。

6 ま と め

体液に類似した水溶液を用いて、有機高分子基板の表面にアパタイトを被覆するには、基板に Ca^{2+} を溶出する性質を与えると同時に、カルボキシル基などの官能基を導入して、基材表面での不均一核形成を誘導するサイトを与えることがきわめて重要な因子となる。これらの因子の制御が、擬似体液を利用するプロセスの成否を支配していると言える。擬似体液を用いるプロセスを利用すれば、有機高分子と水酸アパタイトのナノ粒子を複合化するための基本技術を与える。これらの基本的知見を踏まえて、今後は骨の構造に倣った、巧み

な三次元構造体を構築するための技術へと展開が広がると期待される。

文 献

- 1) M.Jarcho, J.L.Kay, R.H.Gumaer and H.P.Drobeck: "Tissue, cellular and subcellular events at bone-ceramic hydroxyapatite interface", *J. Bioeng.*, 1(1977)79-92.
- 2) R.Z.LeGeros and J.P.LeGeros: "Dense hydroxyapatite", *An Introduction to Bioceramics*, L.L.Hench and J.Wilson ed., World Scientific Publishing, (1993)139-180.
- 3) H.Aoki: "Chemical Properties", *Medical Application of Hydroxyapatite*. Japan, Ishiyaku EuroAmerica, Inc, (1994)205-224.
- 4) W.Bonfield, M.D.Grynblas, A.E.Tully, J.Bowman and J.Abram: "Hydroxyapatite reinforced polyethylene-a mechanically compatible implant", *Biomaterials*, 2(1981)185-186.
- 5) W.Bonfield: "Design of bioactive ceramic-polymer composites", *An Introduction to Bioceramics*, L.L.Hench and J.Wilson ed., World Scientific Publishing, (1993)299-303.
- 6) W.Bonfield: "In: Composite biomaterials: present and future", *Bioceramics Vol. 11*, R.Z.LeGeros and J.P.LeGeros, ed., World Scientific Publishing, (1998)37-40.
- 7) T.Kokubo, H.Kushitani, S.Sakka, T.Kitsugi and T.Yamamuro: "Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W", *J. Biomed. Mater. Res.*, 24(1990)721-734.
- 8) M.Tanahashi, T.Yao, T.Kokubo, M.Minoda, T.Miyamoto, T.Nakamura and T.Yamamuro: "Apatite coating on organic polymers by a biomimetic process", *J. Am. Ceram. Soc.*, 77(1994)2805-2808.
- 9) C.Ohtsuki, T.Kokubo and T.Yamamuro: "Mechanism of apatite formation on $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ glasses in a simulated body fluid", *J. Non-Cryst. Solids*, 143(1992)84-92.
- 10) M.Uchida, H.-M.Kim, T.Kokubo and T.Nakamura: "Structural dependence of apatite formation on titania gels in a simulated body fluid", *J. Biomed. Mater. Res.*, 64A(2003)164-170.
- 11) M.Uchida, H.-M.Kim, T.Kokubo and T.Nakamura: "Bonelike apatite formation induced on zirconia gel in a simulated body fluid and its modified solutions", *J. Am. Ceram. Soc.*, 84(2001)2041-2044.
- 12) T.Miyazaki, H.-M.Kim, T.Kokubo, H.Kato and T.Nakamura: "Induction and acceleration of bonelike apatite formation on tantalum oxide gel in simulated body fluid", *J. Sol-gel Sci. Tech.*, 21(2001)83-88.
- 13) T.Miyazaki, H.-M.Kim, T.Kokubo, C.Ohtsuki and T.Nakamura: "Bonelike apatite formation induced on niobium oxide gels in simulated body fluid", *J. Ceram. Soc. Japan*, 109(2001)934-938.
- 14) M.Tanahashi and T.Matsuda: "Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers

- in a simulated body fluid", *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**(1997) 305-315.
- 15) T.Miyazaki, C.Ohtsuki, Y.Akioka, M.Tanihara, J.Nakao, Y.Sakaguchi and S.Konagaya: "Apatite deposition on polyamide films containing carboxyl group in a biomimetic solution", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **14**(2003)569-574.
 - 16) S.Konagaya and M.Tokai: "Synthesis of ternary copolyamides from aromatic diamine (m-phenylenediamine, diamino-diphenylsulfone), aromatic diamine with carboxyl or sulfonic group (3,5-diaminobenzoic acid, 2,4-diaminobenzenesulfonic acid), and iso- or terephthaloyl chloride", *J. Appl. Polym. Sci.*, **76**(2000)913-920.
 - 17) M.Kawashita, M.Nakao, M.Minoda, H.-M.Kim, T.Beppu, T.Miyamoto, T.Kokubo and T.Nakamura: "Apatite-forming ability of carboxyl group-containing polymer gels in a simulated body fluid", *Biomaterials*, **24**(2003)2477-2484.
 - 18) T.Kokubo, M.Hanakawa, M.Kawashita, M.Minoda, T.Beppu, T.Miyamoto and T.Nakamura: "Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF", *Biomaterials*, **25**(2004)4485-4488.
 - 19) T.Kokubo, M.Hanakawa, M.Kawashita, M.Minoda, T.Beppu, T.Miyamoto and T.Nakamura: "Apatite-forming ability of alginate fibers treated with calcium hydroxide solution", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **15**(2004)1007-1012.
 - 20) A.Takeuchi, C.Ohtsuki, T.Miyazaki, H.Tanaka, M.Yamazaki and M.Tanihara: "Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid", *J. Biomed. Mater. Res.*, **65A**(2003)283-289.
 - 21) K.Shimura and Y.Katagata: *Structure of Silk Yarn. Part B. Chemical Structure and Processing of Silk Yarn*, N.Hojo ed., Science Publishers Inc., (2000)3-20.
 - 22) K.Komatsu: *Structure of Silk Yarn. Part B. Chemical Structure and Processing of Silk Yarn*, N.Hojo ed., Science Publishers Inc., (2000)21-46.
 - 23) H.Takadama, H.-M.Kim, F.Miyaji, T.Kokubo and T.Nakamura: "Mechanism of apatite formation induced by silanol groups: TEM observation", *J. Ceram. Soc. Japan*, **108**(2000)118-121.
 - 24) H.Takadama, H.-M.Kim, T.Kokubo and T.Nakamura: "An X-ray photoelectron spectroscopy study of the process of apatite formation on bioactive titanium metal", *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**(2001)185-93.