

Title	タンパク質放出制御用担体としてのヒドロキシアパタイト粉末の有効性に関する研究
Author(s)	松本, 卓也
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44503">https://hdl.handle.net/11094/44503</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

# タンパク質放出制御用担体としてのハイドロキシ アパタイト粉末の有効性に関する研究

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座

先端顎口腔バイオマテリアル学分野

松本 卓也

## 緒言

分子生物学および発生生物学の発達により、多くの新たな遺伝子やタンパク質の発見およびその機能解明、ならびに、新たな細胞分化誘導方法の開発が近年飛躍的な進歩を遂げており、このような知見をもとに再生医療実現の期待が高まっている。特に、骨や歯などの硬組織再生に関しては、硬組織細胞の増殖、分化を制御する基本的因子の解明が進んでいるため、実用化が最も期待されている分野の1つである。また、骨折や、歯周疾患など対象となる患者数は膨大で、必要性の高い分野でもある。しかし、これら分野から得られる知見を取り入れた具体的な組織再生構築技術の確立は遅れており、いまだ効率の良い硬組織再生技術は確立されていないのが現状である。複雑な生体組織の再生医療を実現するためには、その組織を構成する細胞や基質を再生必要部位に適した形態で誘導させる必要がある。さらに、より迅速に再生を促し治癒期間を短縮させる必要がある。このような問題を解決するうえで、細胞、各種成長因子、生体材料を用いた組織工学的手法は非常に有望であり<sup>1)</sup>、骨や歯といった硬組織再生に有効な生体材料としてハイドロキシアパタイト (HAp) が挙げられる。

生体内硬組織の主要無機成分である HAp は、生体親和性、骨接合性に優れ、従来から骨再建用材料として骨補填材料、人工骨などの形で整形外科領域、歯科領域において使用されている安全性の高い材料である<sup>2-4)</sup>。しかし、HAp を骨再生用材料として利用することを考えた場合、HAp 単体では骨再生能力が低いため、各種成長因子

(タンパク質)との併用が必要になる。この点において、HApはタンパク質の担体として、また、骨再生部位の場の確保として有効である。これまでも各種タンパク質とHApを組み合わせた骨再生研究が行われ、その有効性が評価されてきた<sup>5,6)</sup>。例えば、OnoらはBone Morphogenetic Protein (BMP)含浸HAp成形体を用い、その周囲における新生骨の生成を確認している<sup>7)</sup>。また、多孔質HApを用いた研究では、その多孔部への新生骨生成が確認されている<sup>8)</sup>。しかし、ここで用いられるHApの多くは生体内代謝性に劣る焼結体であるため、生体内埋入後、長期残存し、自然骨による完全な置換、再生を妨げることが懸念される。この点から、骨再生過程におけるHApの代謝性制御は重要である。さらに、これまでのほとんどの研究においてHApとタンパク質との複合化は、HAp成形体にタンパク質溶液を含浸させることにより行ってきた。この方法では、HAp成形体内のタンパク質存在量は表面と中心部が異なる不均質分布で、成形体からのタンパク質放出制御は不可能であり、タンパク質の早期消失や晩期残存の可能性が高い。骨再生過程における必要なタンパク質の種類、量は各時期において異なることが報告されている<sup>9)</sup>。例えば、basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)は骨再生初期よりも後期においてその作用が高くなることが報告されている<sup>10)</sup>。このようなことから、担体生体材料であるHApからのタンパク質放出制御は理想的な骨再生を目指すうえで非常に重要である。

そこで、本研究では、タンパク質放出制御用担体としてHAp粉末を利用することを目的とし、HAp粉末の代謝性制御方法、HAp粉末とタンパク質との複合化方法の確立およびHAp-タンパク質複合体からのタンパク質放出挙動について検討を行った。

# 材料および方法

## 1. HAp の合成

HAp 粉末の合成は、図 1 に示す装置を用いた湿式法にて行った<sup>11-13)</sup>。100 mmol/l 酢酸カルシウム水溶液（特級、和光純薬、大阪）500 ml と 60 mmol/l リン酸二水素アンモニウム水溶液（特級、和光純薬、大阪）500 ml を濃アンモニア水（特級、和光純薬、大阪）および pH コントローラー（FC2000、EYELA）により pH = 7.4 に維持した 1.3 mol/l 酢酸緩衝液（特級、和光純薬、大阪）1 l 中に等量ずつ滴下し HAp を合成した。また、HAp 合成は 40 °C、60 °C、80 °C、3 種類の異なる温度条件下にて行った。合成後、得られた沈殿物を蒸留水にて十分洗浄した後、各合成温度に設定した恒温槽にて 72 時間乾燥し粉末試料を得た。40 °C で合成した HAp を HAp40、60 °C で合成した HAp を HAp60、80 °C で合成した HAp を HAp80 と表記する。

## 2. 合成 HAp の物理化学的性質の検討

合成した HAp は、X 線回折装置（Ultima+ Rint 2000、40 kV、30 mA、CuK $\alpha$ 、理学電機）を用い粉末 X 線回折法にて同定を行った。また、本研究では、HAp 結晶における c 軸方向の配向を示す(002) 回折ピーク、a 軸方向の配向を示す(300) 回折ピークの半価幅の逆数を結晶性と定義し、その検討も行った。HAp 粉末試料を真空蒸着装置内で金蒸着の後、走査型電子顕微鏡（SEM、S-5000、日立製作所）により結晶形態の観察を行った。さらに、HAp 粉末試料 30 mg

を 200 °C で 10 分間乾燥させた後、比表面積測定装置 (BET 法、Flowsorb II 2300、Micrometrics) を用いて、HAp 粉末単位重量あたりの表面積を測定した<sup>14)</sup>。溶解性の検討として、合成した HAp 粉末 10 mg を酢酸緩衝溶液 (pH = 4.0~7.0) 10 ml 中に浸漬し、1 週間 37 °C 恒温槽中にて静置した後、上澄み溶液中の溶出カルシウムイオン濃度を原子吸光分光光度計 (AA6400F、島津製作所) を用いて定量し、見かけの溶解度とした<sup>15)</sup>。

### 3. 合成 HAp の代謝性の検討

ネンブタール<sup>®</sup> (大日本製薬、大阪) 麻酔下においてラット (SD ラット、7 週齢、雄) 脛骨に歯科用電気エンジンおよびラウンドバーを用いて人為的骨欠損 (2×3×4 mm) を無痛的に形成後、その部位に合成 HAp 粉末 (HAp40、HAp80) にヒアルロン酸溶液 (HA、和光純薬、大阪) を加えて (50 mg HAp / 0.2 ml 0.5 wt% HA) ペースト状に成形した試料 (2×3×4 mm) を埋入した。対照として同一寸法の HAp 焼結体 (900 °C) の埋入も行った。埋入 3 日、および、3 週間後、10%ホルマリン水溶液 (和光純薬、大阪) にて灌流固定を行った後、脛骨を取り出し 10%ギ酸 (特級、和光純薬、大阪) にて 10 日間脱灰、パラフィン包埋したのち薄切切片を作製した。得られた切片についてヘマトキシリン-エオジン (和光純薬、大阪) にて染色し、光学顕微鏡にて病理組織学的検討を行った。

### 4. HAp へのアミノ酸吸着実験

HAp60 粉末 10 mg を 37°C、pH = 7.4 に調節した 10 μmol/l アミノ酸溶液 3 ml に浸漬した。4 時間後、遠心分離を行い、上澄み溶液

0.5 ml を取り出した。取り出した上澄み溶液に、ニンヒドリン（和光純薬、大阪）0.8 g、ヒドリンダンチン無水物（和光純薬、大阪）0.12 g を 30 ml の 2-メトキシエタノール溶液（特級、和光純薬、大阪）に溶かして作製したニンヒドリン溶液 0.2 ml を加え、100 °C で 10 分間加熱後、室温まで放置冷却し、紫外可視分光光度計（UV150-02、570 nm、島津製作所）を用い上澄み溶液中のアミノ酸量を定量、実験前後のアミノ酸溶液濃度の差をもって HAp へのアミノ酸吸着量とした。アミノ酸定量は、各アミノ酸溶液ごとに標準溶液を作製し、外部検量線法にて行った。アミノ酸は中性アミノ酸である Gly（グリシン、pI（等電点）= 5.8）、Ala（アラニン、pI = 6.0）、酸性アミノ酸である Asp（アスパラギン酸、pI = 2.8）、Glu（グルタミン酸、pI = 3.2）、塩基性アミノ酸である His（ヒスチジン、pI = 7.6）、Arg（アルギニン、pI = 10.8）の 6 種類で、いずれも L 体を使用した（特級、和光純薬、大阪）。

## 5. HAp へのタンパク質吸着実験

骨再生に有効であることが報告されている BMP<sup>16)</sup>、bFGF<sup>17)</sup>、Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )<sup>18)</sup> などの増殖因子は pI が 9~10 の塩基性タンパク質であることから<sup>19,20)</sup>、本研究ではシトクロム C (pI = 10.2、分子量 12,000、ウマ心筋由来、和光純薬、大阪) をモデルタンパク質として選択した。HAp40、HAp60、HAp80、各 10 mg を pH = 7.4 に調節した 10  $\mu$  mol/l タンパク質溶液 3 ml に浸漬した。37 °C にて 4 時間放置後、遠心分離を行い、上澄み溶液 25  $\mu$  l を取り出した。BCA 法 (BCA protein assay kit、Pierce、Rockford、IL) を用い上澄み溶液中のタンパク質量を定量 (マイク

ロプレートリーダーMTP-32、550 nm、コロナ) し、実験前後のタンパク質溶液濃度の差をもって HAp へのタンパク質吸着量とした。また、上澄み溶液を完全に除去し、取り出した沈殿物を蒸留水にて洗浄、乾燥し、粉末試料とした。この試料 2 mg に臭化カリウム(Merck、Darmstadt) 40 mg を加え、十分に粉碎、混合した後、フーリエ変換赤外線吸収分光光度計 (FTIR、FTIR8300、島津製作所) を用いて化学構造解析を行った。対照として HAp60 単体およびシトクロム C 単体についても同様の検討を行った。また、HAp へのタンパク質吸着時におけるタンパク質溶液濃度の影響を検討するため、HAp40、HAp60、HAp80、各 10 mg を 5~120  $\mu$  mol/l 濃度のシトクロム C 溶液 3 ml に浸漬し、その吸着量の変化について同様の検討を行った。

## 6. HAp-タンパク質複合体からのタンパク質放出挙動の検討

HAp40、HAp60、HAp80、各 10 mg にシトクロム C 10  $\mu$  mol/ml を吸着後 (37°C、4 時間)、遠心分離を行い、沈殿物を取り出し、十分に洗浄、乾燥しタンパク質吸着 HAp 粉末 (HAp40-Pro、HAp60-Pro、HAp80-Pro) を得た。また、この際、各 HAp へのタンパク質吸着量を BCA 法により定量した。

破骨細胞波状縁付近の pH は 4~5 になること<sup>21,22)</sup>、および恒常的な体液の pH が 7 前後であることから、本研究では pH = 4.0 酢酸緩衝溶液および pH = 7.0 リン酸緩衝溶液の 2 種類の溶液をタンパク質放出溶液として使用した。これら 2 種類の溶液 3 ml に HAp40-Pro、HAp60-Pro、HAp80-Pro 各 10 mg をそれぞれ浸漬し、時間経過にともなうタンパク質放出量を BCA 法により定量した。また、あらかじめ吸着しているタンパク質量が各 HAp により異なる



ことから、以下の式をもとにタンパク質放出割合を算出し検討した。

$$\begin{aligned} (\text{タンパク質放出割合}) &= (\text{タンパク質放出量}) / \\ &(\text{タンパク質吸着量}) \times 100 \quad (\%) \end{aligned}$$

## 7. 統計解析

すべての定量的実験は 4 回行い、その結果から平均値および標準偏差を算出した。また、各データについて 1 元配置分散分析を行ったあと、Scheffe F テストにて有意差検定を行った ( $p < 0.01$ )。

# 結果

## 1. 合成 HAp の物理化学的性質

合成温度の低下にともない、HAp の X 線回折ピークはブロードな形状を示し、(002) および (300) 回折ピークから算出した結晶性は有意に低下した (図 2)。SEM 観察の結果では、合成された HAp は合成温度にかかわらず長軸方向に長い結晶形態であることが観察された。また、合成温度の低下にともない結晶サイズが減少し、HAp80 において長軸方向が約  $3 \mu\text{m}$  であるのに対し、HAp40 では約  $0.2 \mu\text{m}$  まで小さくなっていた (図 3)。BET 法による表面積測定は、窒素 1 分子あたりの吸着占有面積が  $1,620 \text{ nm}^2$  であることから、物質表面の窒素吸着量から算出することができる<sup>14)</sup>。この結果、単位重量あたりの表面積は、合成温度の低い HAp ほど有意に増加し、HAp40 の表面積は HAp80 の表面積と比較して約 6 倍大きかった (図 4)。

カルシウム溶出量から検討した見かけの溶解度は、どの HAp も pH の低下にともない増加し、また、低温度で合成した HAp ほど溶解度の増加傾向が明瞭であった (図 5)。

## 2. 合成 HAp の代謝性の検討

埋入 3 日後の病理組織切片において、HAp40、HAp80 両試料とも試料埋入部への骨芽細胞、血球系細胞の浸潤、新しい骨基質の産生が確認された。また、骨内において HAp40 残留量は HAp80 残留量と比較して大きく減少していた。埋入 3 週間後の病理組織切片において、HAp 焼結体が埋入時の形態を維持した状態で残存している

のに対し、HAp40、HAp80 を埋入した場合には、埋入試料が消失し、骨および骨髄に完全に置換されていた（図 6、7）。

### 3. HAp へのアミノ酸吸着実験

HAp へのアミノ酸吸着量は、アミノ酸の種類により異なることが明らかとなった（図 8a）。その違いを pI をもとに検討すると、HAp が pI = 7 前後の中性アミノ酸に対してほとんど吸着能を示さないのに対し、酸性あるいは塩基性の pI をもつアミノ酸に対しては吸着能を示し、酸性アミノ酸に対して特に高い吸着能を示した（図 8b）。

### 4. HAp へのタンパク質吸着実験

FTIR による化学構造解析の結果、タンパク質吸着実験後に得られた HAp は、シトクロム C および HAp それぞれの特異なピークを合わせ持ち、HAp とシトクロム C の複合体であることが確認された（図 9）。HAp へのタンパク質吸着実験において、異なる温度で合成した HAp へのタンパク質吸着量は、合成温度が低くなるほど有意に増加し（図 10a）、タンパク質の吸着が HAp のもつ表面積と高い相関性を持つことが明らかになった（図 10b）。また、タンパク質吸着時のタンパク質溶液濃度を変えたところ、HAp へのタンパク質吸着量は約 20  $\mu\text{mol/l}$  タンパク質溶液濃度まで一次的に増加した後、それ以上のタンパク質濃度では吸着量はほとんど増加しなかった（図 11）。

### 5. HAp-タンパク質複合体からのタンパク質放出挙動の検討

HAp-Pro を pH = 7.0 溶液に浸漬した場合、タンパク質放出は浸漬初期にわずかに起こった後、ほとんど起こらず、放出割合は

HAp40-Pro において約 13%、 HAp60-Pro において約 11%、 HAp80-Pro において約 2%であった (図 12a)。一方、HAp-Pro を pH = 4.0 溶液に浸漬した場合、タンパク質放出は長時間持続し、また、その放出割合は HAp40-Pro において約 67%、 HAp60-Pro において約 50%、 HAp80-Pro において約 20%に達し、pH = 7.0 溶液に浸漬した場合と比較して相対的に大きかった (図 12b)。また、合成温度が低い HAp ほどタンパク質放出割合は有意に大きかった。

## 考察

### ・ HAp の代謝性制御について

HAp の合成法としては、本研究で使用した湿式法<sup>23)</sup>、乾式法<sup>23)</sup>、水熱合成法<sup>24)</sup>、ゾル-ゲル法<sup>25)</sup> など、多くの合成方法がある。これらの方法において、合成条件が高温高圧であるほど合成 HAp の単結晶サイズが大きくなり、また、格子ひずみが減少することが報告されている<sup>26,27)</sup>。結晶性は、結晶サイズおよび不整格子の割合を反映した値であり、結晶サイズが大きく、かつ不整格子の割合が少ないほど高結晶性を示すことが知られている<sup>28)</sup>。このようなことから、HAp の合成温度制御は HAp 結晶成長に大きく影響を及ぼし、HAp の物理化学的性質を調節するうえで有効となる。これまでに、結晶性と溶解性は一般に逆相関関係にあることが報告されており<sup>29)</sup>、本研究で合成した HAp においても合成温度の低下にともなう結晶性の低下および結晶サイズの減少が確認され、また、低結晶 HAp の高い溶解度が確認された。

生体内に埋入した HAp 粉末の生体内吸収には 2 つの系が考えられる。1 つは破骨細胞の産出する酸による脱灰の系、もう 1 つは、貪食細胞および破骨細胞による HAp 粒子貪食の系である。破骨細胞による脱灰の過程において波状縁付近の pH は 4~5 になることが知られており<sup>21,22)</sup>、本研究で使用した HAp は、見かけの溶解度の実験結果から十分に脱灰されることが示されている。また、細胞による貪食の系では、HAp の結晶サイズが貪食に大きく影響することが考えられ、低温度で合成した結晶サイズの小さい HAp はより吸収さ

れやすいことが想定される。生体内での代謝性を検討した結果、本研究で使用した HAp 粉末は生体親和性に優れ、また、焼結体とは異なり、生体内にて完全に吸収され、消失することが確認できた。また、合成温度の異なる 2 種類の HAp 粉末を埋入した場合、HAp40 では早期における HAp 粉末の吸収および新生骨の生成さらには骨髓への置換が起こっており、HAp80 よりも残量が大きく減少していた。これらのことから HAp 合成温度を変えることにより HAp の代謝性を制御できることが明らかとなった。

#### ・ HAp とタンパク質との複合化について

これまでに著者らが行った、各種アミノ酸存在下での HAp 合成の実験において、酸性アミノ酸である Asp、Glu といったアミノ酸の存在により合成された HAp の結晶性が有意に小さいこと、また、存在させたアミノ酸が合成 HAp と複合化していることが確認された<sup>30)</sup>。その原因を考察したところ、HAp 結晶成長段階において HAp と酸性アミノ酸との吸着が起こっていることが明らかとなった<sup>31)</sup>。この結果は、タンパク質と HAp との複合化において HAp のもつこれら有機質との吸着特性が有効であることを示唆している。

組織工学における担体用生体材料とタンパク質との複合化方法を考えた場合、共有結合やイオン結合を利用した化学的複合化と静電的相互作用や疎水性相互作用を利用した物理的複合化の 2 通りの方法が考えられる。化学的結合を利用する場合、その結合力は強固である反面、タンパク質放出が起こりにくいことが考えられる。また、結合においてタンパク質構造の一部が修飾されることから、タンパク質活性も変化する可能性がある。それに対して、物理的複合化方

法ではタンパク質放出、タンパク質活性のいずれにも問題を起こさず、ドラッグデリバリーシステム<sup>32)</sup>を構築するうえで優れた複合化方法であるといえる。

HAp へのアミノ酸吸着実験の結果、HAp の吸着能がアミノ酸の種類により異なること、また、その吸着能はアミノ酸の pI に依存していることが明らかとなった。各アミノ酸は固有の pI 値を持っており、pI が 7.4 よりも低い場合、その分子は pH = 7.4 の環境において負に帯電しており、また、その逆で pI が 7.4 よりも高い場合、その分子は pH = 7.4 の環境において正に帯電している。これらのことから、酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸といった極性の強いアミノ酸は HAp と物理的吸着により複合化できることが明らかとなった。

この吸着機構は HAp の結晶構造から説明できる。HAp の結晶構造については 1960 年代にはじめて解明され、六方晶であることが明らかになった<sup>33,34)</sup> (図 13)。その六方晶中において、a 面ではカルシウム原子が周囲よりも突き出た状態で存在し、c 面では酸素原子が他より突き出た状態で存在する。分子が異なる原子の集合により構成される場合、それぞれの原子の電気陰性度により分子内での帯電分布があることが知られている。HAp の場合、電気陰性度の大きい酸素原子 (3.5) が多く露出している c 面は負に帯電し、電気陰性度の小さいカルシウム原子 (1.0) が多く露出している a 面は正に帯電している。この結果、酸性アミノ酸は HAp の a 面に吸着しやすく、塩基性アミノ酸は HAp の c 面に吸着しやすいことになる。また、長軸方向に長い結晶形態をしている HAp は a 面の面積が相対的に大きく、結果として a 面への酸性アミノ酸の吸着量が多くなると考えられる。Fujisawa らは蛍光標識したポリアスパラギン酸、ポリ

グルタミン酸を用いた実験でこれら酸性アミノ酸からなるペプチドが HAp の a 面に特異的に吸着することを報告しており<sup>35)</sup>、この結果は本実験結果と一致した。

従来から HAp はタンパク質分離精製時におけるカラム充填材として使用されており、HAp がタンパク質に高い親和性を持つことが知られている<sup>36,37)</sup>。タンパク質吸着実験後の FTIR による化学構造解析の結果、本研究で合成した HAp がタンパク質に対しても吸着能を示すことを確認した。本研究で使用したシトクロム C は 108 残基のアミノ酸からなり、その中に多くの塩基性アミノ酸を有する塩基性タンパク質である<sup>38)</sup>。アミノ酸吸着実験において明らかとなったように、タンパク質中に存在する極性をもったアミノ酸が HAp への吸着に関与したものと考えられた。しかし、タンパク質のような高分子はアミノ酸と異なり 1 分子中に多数の吸着点をもち、また、その 3 次元的な立体構造により吸着能が変化することも知られている<sup>39)</sup>。異なるタンパク質濃度溶液中での吸着実験では、約 20  $\mu\text{mol/l}$  の範囲まで一次的に増加した後、それ以上のタンパク質濃度ではほとんど増加を示さないことが確認された。この吸着等温線から HAp へのタンパク質吸着はラングミュア型の吸着であることが明らかとなり、このことからタンパク質は HAp 表面に単層で吸着していることが示された。また、この吸着等温線から実験で使用したシトクロム C の場合、約 20  $\mu\text{mol/l}$  までの範囲でタンパク質溶液濃度を変えることにより、HAp へのタンパク質吸着量を制御できることが明らかとなった。



・ HAp 粉末のタンパク質放出制御用担体としての有効性について

組織工学的手法を用いた組織再生において、細胞、各種成長因子、生体材料など異なる機能を持つ物質の複合化は有効である。生体材料の役割としては、1) 細胞や各種因子の運び屋（担体）、2) 強度、靱性、硬度、弾性といった再生目的組織特有の機械的性質の復元、3) 再生部位における他組織の侵入防止（スペース確保）、4) 組織再生時間の制御などが挙げられる。目的とする再生組織を決定し、基盤となる材料、使用する細胞、各種成長因子の選択後はいはじめて、具体的な材料と細胞、あるいは、材料と各種因子との複合化方法について検討することが可能となる。材料と細胞を複合化させる場合、材料と細胞の複合化方法、目的組織における細胞密度の状態、細胞分化の程度、栄養供給状態など多くの達成すべき条件を考慮する必要がある<sup>40,41)</sup>。材料と各種成長因子を複合化させる場合、材料と各種成長因子との複合化方法、各種成長因子の活性保持、各種成長因子の放出方法などの条件を考慮する必要がある<sup>42,43)</sup>。

本研究では、HAp 粉末の代謝性制御方法および HAp 粉末とタンパク質との複合化方法の確立を目的として研究を遂行した。再生目的組織が骨であることから、材料としては骨組織の主要無機成分である HAp を選択した。HAp は生体内での代謝により骨構成成分である Ca、P の局所濃度を高めるため、骨生成に有効に働くことが期待できる。また、タンパク質としては骨再生に有効である成長因子を想定し、塩基性タンパク質を選択した。骨組織の完全な再生を達成するうえで、使用する材料に必要な性質としては生体親和性、自然骨と同等の強度、靱性といった機械的性質、骨再生にともなう材料自体の代謝性が必要となる。しかし、単一の材料に骨組織と同等

の機械的性質と代謝性とを共存させることは非常に困難であることから、本研究では HAp の代謝性を重点的に達成することにした。この場合、完全な骨再生が達成されるまでの期間、他の材料を用いた機械的性質の保持が必要となるが、他材料の選択は再生目的部位の大きさに依存すると考えられる。狭小領域における骨再生の場合、他材料の併用は必要ない場合もありうる。

本研究で得られた結果から、HAp とタンパク質との複合化に関しては、タンパク質の HAp への吸着能を利用することが有効であることが確認され、また、タンパク質の吸着量を HAp へのタンパク質吸着時におけるタンパク質溶液濃度を変えることにより制御できることが明らかとなった。さらに、HAp の代謝性についても合成温度を変えることにより制御できることが明らかになった。これらの結果は、HAp がタンパク質放出制御用担体として有効であることを示唆するものであり、実際に *in vitro* にて行った HAp-Pro からのタンパク質放出挙動の検討において、タンパク質の放出が HAp の溶解に依存して起こることが確認され、また、異なる温度で合成した HAp を用いることにより異なるタンパク質放出割合を達成できることが明らかとなった。すなわち、必要量のタンパク質を任意の代謝性をもつ HAp に吸着させたうえで、生体内に埋入することで必要量のタンパク質を必要時期に必要な時間放出できることが可能となる。

本研究で作製した HAp-Pro の大きな特徴は粉末形状をしていることであり、最小構成単位であるマイクロ粒子の段階でタンパク質吸着量制御が行え、これを原材料として成形体作製が可能である。

実際の臨床において、骨欠損部位の大きさ、形態は個人により異なることから、オーダーメイド再生医療の実現において使用する材

料自体の成形性は重要であり、粉末である本材料は生体吸収性粘結剤で固めることにより容易に適切な形態、大きさの成形体作製が可能である。また、実際の骨再生各段階において必要な成長因子の種類、量などは異なることから、あらかじめ異なる種類、量のタンパク質を吸着させた HAp-Pro を作製し、任意の多層構造をもつ成形体を作製することで、さらに有効な骨再生材料として利用可能である。また、粉末形状のままでも、ゲル<sup>44,46)</sup> やスポンジ<sup>47,48)</sup>、膜<sup>49,50)</sup> といった異なる性状をもつ生体材料への添加材料としても利用できる。これまでに、我々は Guided Tissue Regeneration (GTR)<sup>51)</sup> への利用を想定したアパタイト含有コラーゲン膜を作製し、コラーゲン膜からのアパタイト放出制御に成功している<sup>52)</sup>。この膜材料に今回作製した HAp-Pro を添加することにより、GTR 膜からのタンパク質放出制御も可能となり歯周組織再生にも有効利用できる。このようにタンパク質放出制御用担体としての HAp 粉末は、多くの応用性を有する生体材料として広く再生医療分野での活用が期待できる。

## 結論

ハイドロキシアパタイト(HAp)を人工的に合成し、タンパク質放出制御用担体としての有効性を検討したところ、次のような結論を得た。

- ・ HAp 合成温度を変えることにより、HAp 粉末の代謝性を制御することができた。
- ・ HAp のタンパク質吸着能を利用して、HAp 粉末とタンパク質との複合体の作製が可能となった。
- ・ 吸着時におけるタンパク質濃度を変えることにより、HAp 粉末へのタンパク質結合量の制御が可能となった。
- ・ 代謝性の異なる HAp 粉末を使うことにより、タンパク質放出割合を制御することができた。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて戴き、終始、御懇篤なるご指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座 高橋純造教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり御指導、御助言戴きました広島大学大学院医歯薬学総合研究科探索医科学講座 岡崎正之教授、朝日大学 森脇 豊名誉教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、終始御理解、御協力戴きました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座先端顎口腔バイオマテリアル学分野教室員各位に厚く御礼申し上げます。

## 文献

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. Science 1993;260:920-926.
2. Ellies LG, Carter JM, Natiella JR, Featherstone JDB, Nelson DGA. Quantitative analysis of early *in vivo* tissue response to synthetic apatite implants. J Biomed Mater Res 1988;22:137-148.
3. De Lange GL, De Putter C, De Wijs FLJA. Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite-bone interface. J Biomed Mater Res 1990;24:829-845.
4. Rossa R. Hydroxyapatite: Reconstruction of facial bones. J Oral Implantol 1991;17:184-192.
5. Zambonin G, Camerino C, Greco G, Patella V, Moretti B, Grano M. Hydroxyapatite coated with hepatocyte growth factor stimulates human osteoblast *in vitro*. J Bone Joint Surg [Br] 2000;82B:457-460.
6. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Osteogenesis by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at skeletal sites. Clin Orthop 2000;375:295-301.
7. Ono I, Ohura T, Murata M, Yamaguchi H, Ohnuma Y, Kuboki Y. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morpho- genetic protein. Plast Reconstr Surg 1992;90: 870-879.

8. Yoshida K, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Enhancement by recombinant human bone morphogenetic protein-2 of bone formation by means of porous hydroxyapatite in mandibular bone defects. *J Dent Res* 1999;78:1505-1510.
9. 野田政樹. 骨のバイオロジー. 羊土社 Tokyo 1<sup>st</sup> Ed. 1998 p74.
10. Nakajima A, Nakajima F, Shimizu S, Ogasawara A, Wanaka A, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Spatial and temporal gene expression for fibroblast growth factor type I receptor during fracture healing in rat. *Bone* 2001;29:458-466.
11. Napper DH, Smythe BM. The dissolution kinetics of hydroxyapatite in the presence of kink poisons. *J Dent Res* 1966;45:1775-1783.
12. Okazaki M, Miyake Y, Tohda H, Yanagisawa T, Matsumoto T, Takahashi J. Functionally graded fluoridated apatites. *Biomaterials* 1999;20:1421- 1426.
13. Matsumoto T, Okazaki M, Taira M, Takahashi J. Inhibiting action of carbohydrates on the growth of fluorapatite crystals. *Caries Res* 2000;34:26- 32.
14. Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J Am Chem Soc* 1938;60:309-319.
15. Okazaki M, Takahashi J, Kimura H, Aoba T. Crystallinity, solubility, and dissolution rate behavior of fluoridated CO<sub>3</sub> apatites. *J Biomed Mater Res* 1982;16:851-860.

16. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities. *Science* 1988;242:1528-1534.
17. Gospodarowich D, Ferrara N, Schweigerer L. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987;8:95-114.
18. Hock JM, Canalis E, Centrella M. Transforming Growth Factor  $\beta$  stimulates bone matrix apposition and bone cell replication in cultured fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1990;126:421-426.
19. Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S, Nagata I, Kikuchi H, Aoyama I, Tamura M, Ikada Y. Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Bio-materials* 1998;19:807-815.
20. Yamamoto M, Tabata Y, Ikada Y. Growth factor release from gelatin hydrogel for tissue engineering. *J Bioact Compat Polym* 1999;14:474-489.
21. Baron R, Neff L, Louvard D, Courtoy PJ. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption. *J Cell Biol* 1985;101:2210-2222.
22. Baron R. Molecular mechanism of bone resorption by osteoclast. *Anat Rec* 1989;224:317-324.
23. Young RA, Holcomb DW. Variability of hydroxyapatite preparations. *Calcif Tissue Int* 1982;34:S17-S32.



24. Ban S, Maruno S. Hydrothermal-electro- chemical deposition of hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1998;42:387-395.
25. Breme J, Zhou Y, Groh L. Development of a titanium alloy suitable for an optimized coating with hydroxyapatite. *Biomaterials* 1995;16:239- 244.
26. Okazaki M, Moriwaki Y, Aoba T, Doi Y, Takahashi J. Solubility behavior of CO<sub>3</sub>apatites in relation to crystallinity. *Caries Res* 1981;15: 477-483.
27. 岡崎正之. 歯と骨を作るアパタイトの化学. 東海大学出版会 Tokyo 1<sup>st</sup> Ed. 1992 p18.
28. カリティ. X線回折要論. アグネ社 Tokyo 4<sup>th</sup> Ed. 1966 p265.
29. Okazaki M, Aoba T, Doi Y, Takahashi J, Moriwaki Y. Solubility and crystallinity in relation to fluoride content of fluoridated hydroxyapatites. *J Dent Res* 1981;60:845-849.
30. Matsumoto T, Okazaki M, Hamada Y, Inoue M, Taira M, Takahashi J. Crystallinity and solubility characteristics of hydroxyapatite adsorbed amino acid. *Biomaterials* 2002;23: 2241-2247.
31. 松本卓也、岡崎正之、井上雅博、高橋純造. アパタイト結晶成長過程における酸性アミノ酸の影響. 第 21 回 日本バイオマテリアル学会予稿集 1999. p154.
32. Tabata Y, Domb A, Langer R. Injectable polyanhydride granules provide controlled release of water-soluble drugs with a reduced initial burst. *J Pharm Sci* 1994;83:5-11.

33. Kay MI, Young RA, Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* 1964;204: 1050-1052.
34. Young RA, van der Lugt W, Elliott JC. Mechanism for fluorine inhibition of diffusion in hydroxyapatite. *Nature* 1969;223:729-730.
35. Fujisawa R, Kuboki Y. Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta* 1991;1075:56-60.
36. Bernardi G, Kawasaki T. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite column. *Biochim Biophys Acta* 1968;160:301-310.
37. Bernardi G, Giro M, Gaillard C. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite columns: Some new developments. *Biochim Biophys Acta* 1972; 278: 409 -420.
38. Dickerson RE, Takano T, Eisenberg D, Kallai OB, Samson L, Cooper A, Margoliash E. Ferri- cytochrome c. *J Biol Chem* 1971;246:1511-1535.
39. 竹内 節. 接着の化学. 産業図書 Tokyo 1<sup>st</sup> Ed. 2000 p130.
40. Mooney DJ, Mikos AG. Growing new organs. *Scientific American* 1999;April:60-65.
41. Ishaug-Riley SL, Crane GM, Gurlek A, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-Lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. *J Biomed Mater Res* 1997;36:1-8.

42. Whitaker MJ, Quirk RA, Howdle SM, Shakesheff KM. Growth factor release from tissue engineering scaffolds. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53:1427-1437.
43. Lee KY, Peters MC, Anderson KW, Mooney DJ. Controlled growth factor release from synthetic extracellular matrix. *Nature* 2000;408:998- 1000.
44. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 2001;101:1869-1879.
45. Kan HY, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 1999;20:1339-1344.
46. Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999;20:45-53.
47. Park YJ, Lee YM, Park SN, Sheen SY, Chung CP, Lee SJ. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. *Biomaterials* 2000;21:153-159.
48. Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, Klollebold PR, Chung CP. Tissue engineered bone formation using chitosan tricalcium phosphate sponges. *J periodontol* 2000;71:410 -417.
49. Iversen B, Albandar JM, Oydna J, Gjermo P. Bone density changes after 1 year in periodontal lesions treated surgically with or without ePTFE membrane placement. *J Clin Periodontol* 1996;23: 512-516.

50. Magnusson I, Batich C, Collins BR. New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes. *J Periodontol* 1988;59:1-6.
51. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982;9:290-296.
52. Matsumoto T, Okazaki M, Inoue M, Ode S, Chang-chien C, Nakao H, Hamada Y, Takahashi J. Biodegradation of carbonate apatite / collagen composite membrane and its controlled release of carbonate apatite *J Biomed Mater Res* 2002;60:651-656.

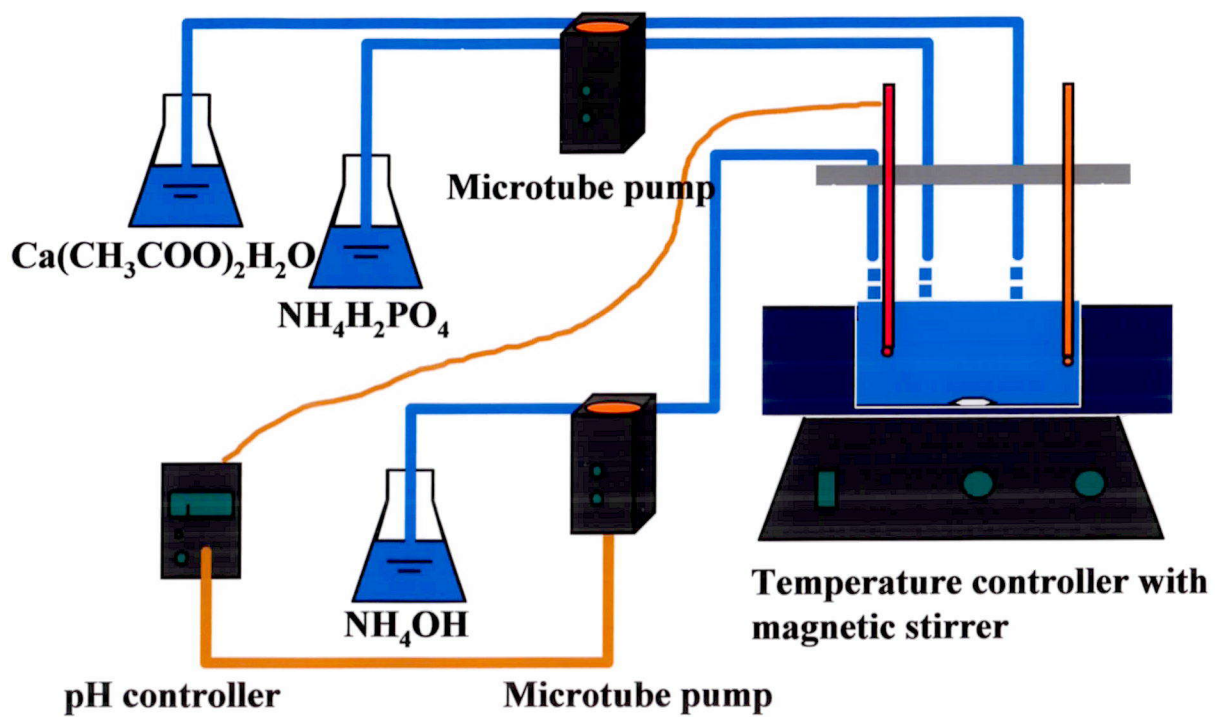


图1 HAp合成装置。

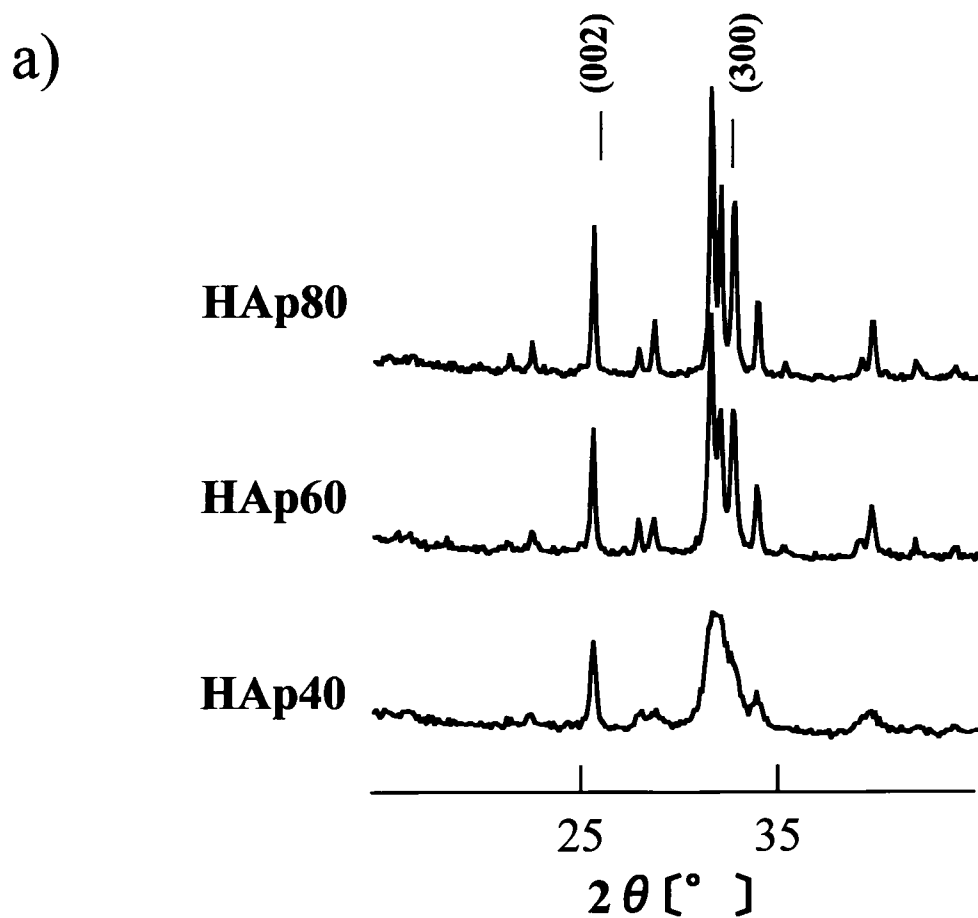


図2 合成温度の異なるHAp粉末のX線回折結果。

- a) 合成温度の低下にともない、HApの回折ピークがブロードになった。
- b) (002)回折ピークの半価幅の逆数から算出した結晶性は、合成温度の低下にともなって有意に低下した。

b)

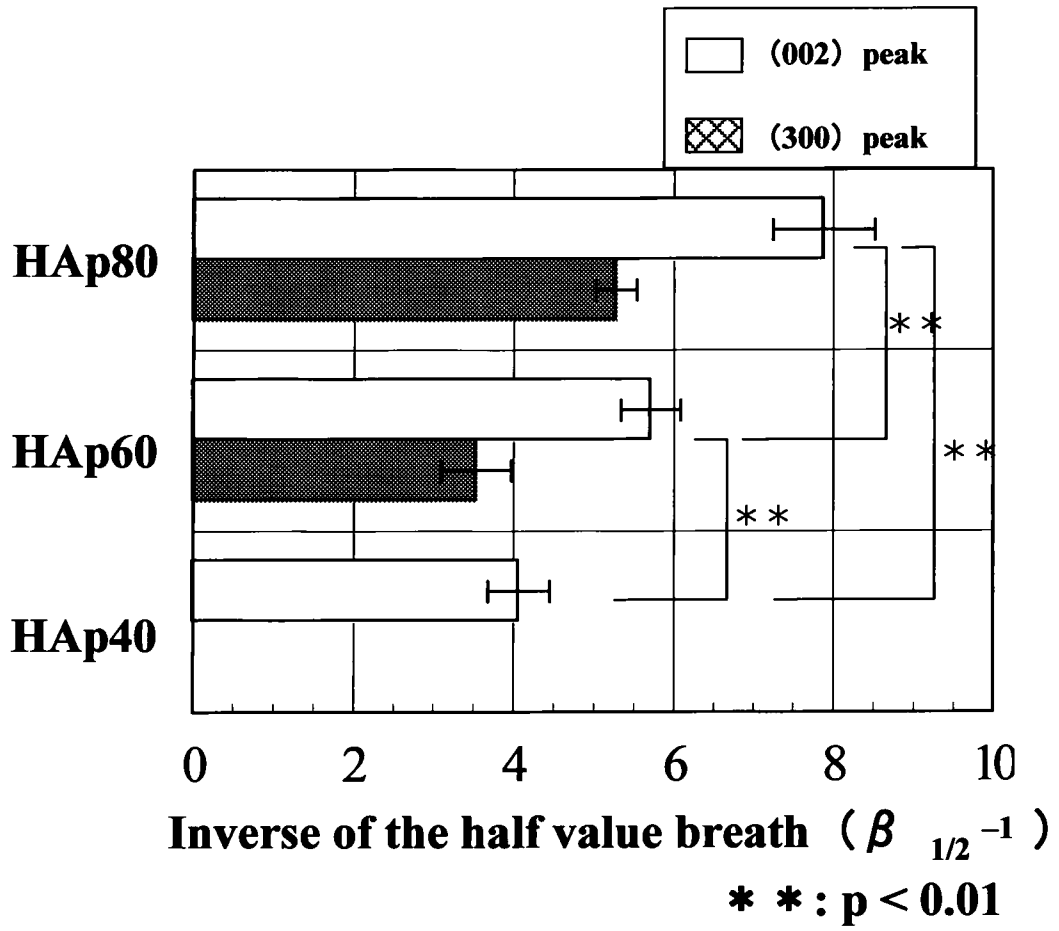
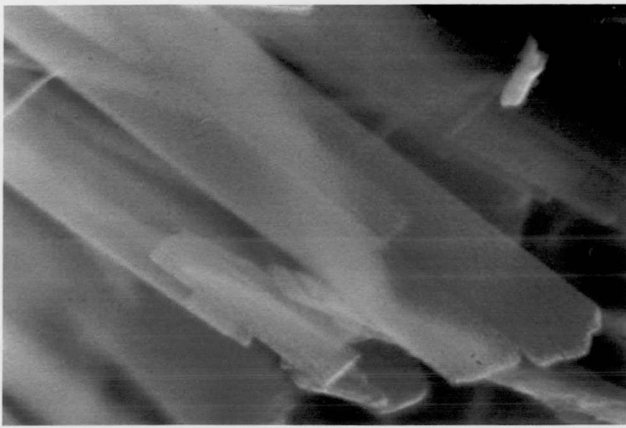


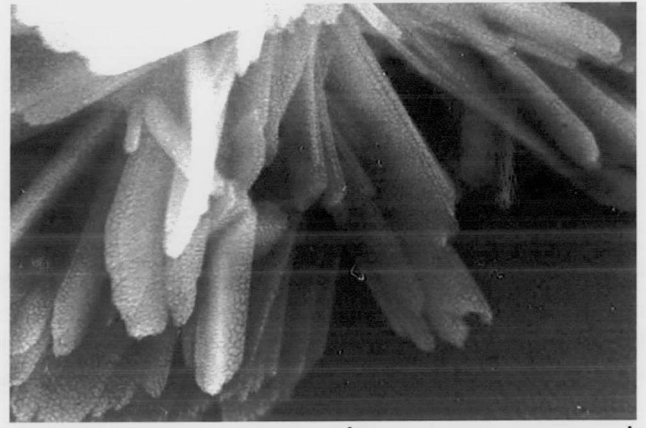
図2

**HAp80**



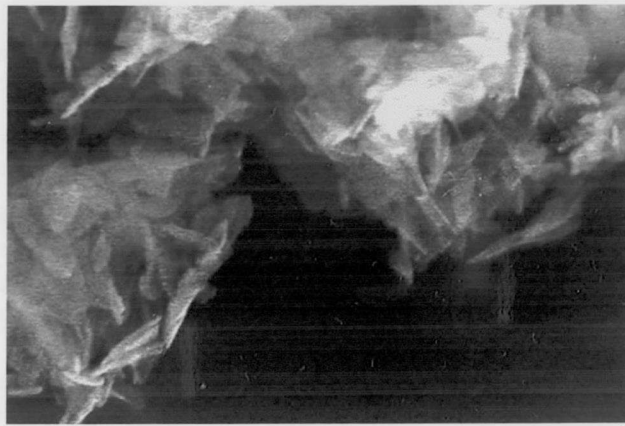
600 nm

**HAp60**



600 nm

**HAp40**



600 nm

図3 合成温度の異なるHAp粉末のSEM写真。

いずれのHApも細長い結晶形態をしていたが、合成温度の低下にともなって結晶サイズは減少した。

図3



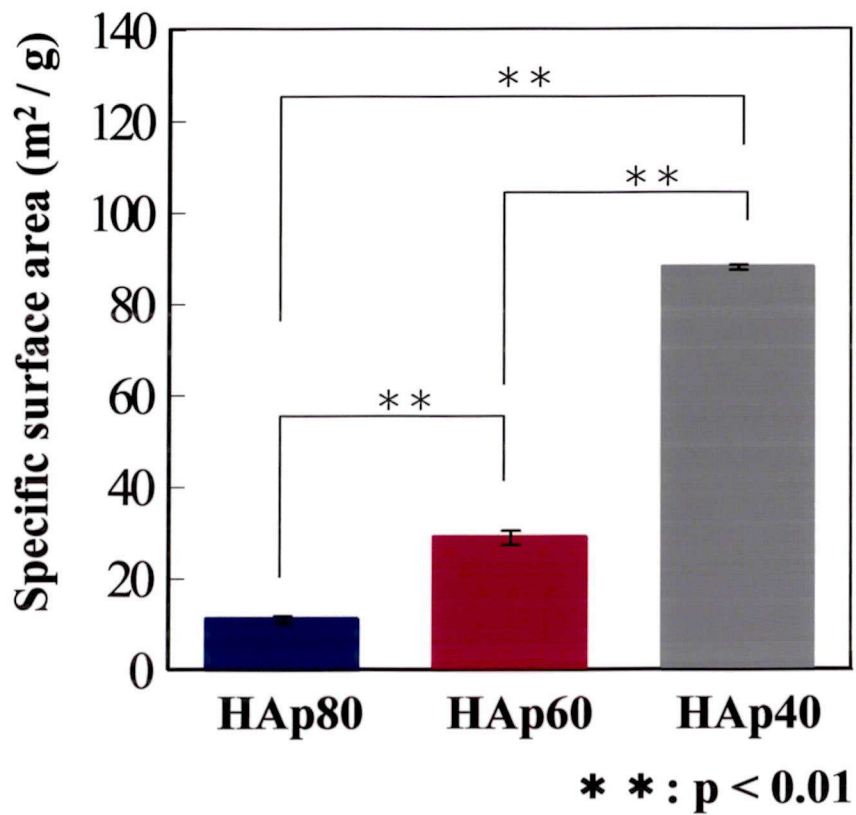


図4 合成温度の異なるHAp粉末の単位重量あたりの表面積。

合成温度の低下にともなって、表面積は有意に増加した。

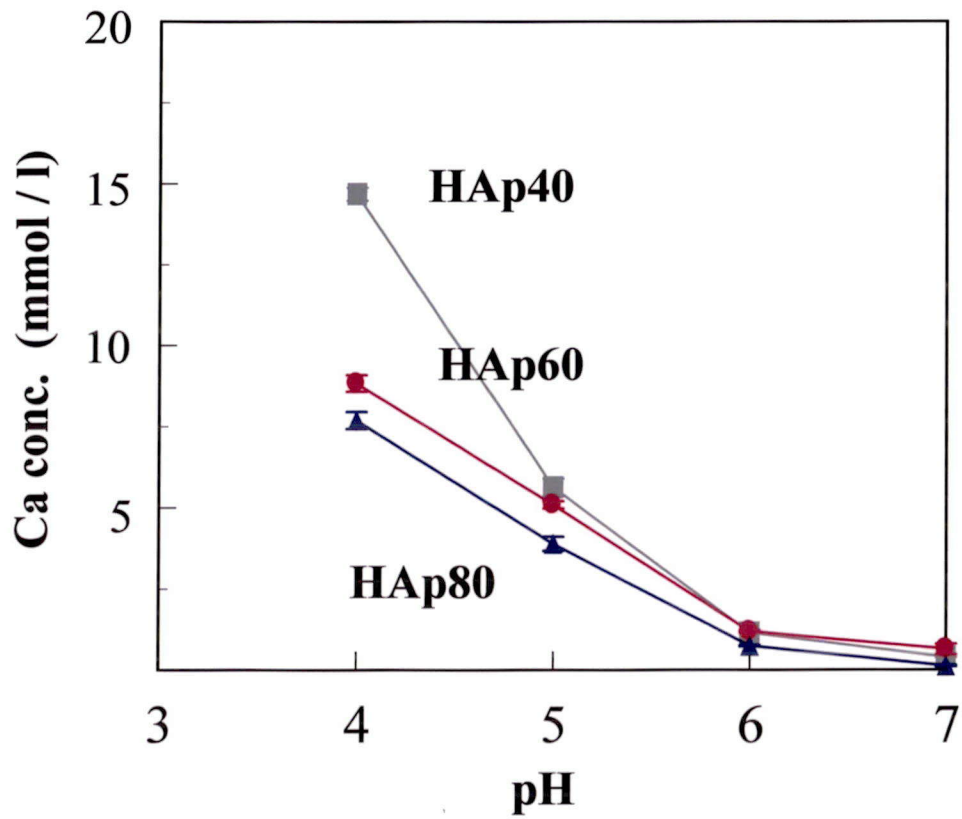
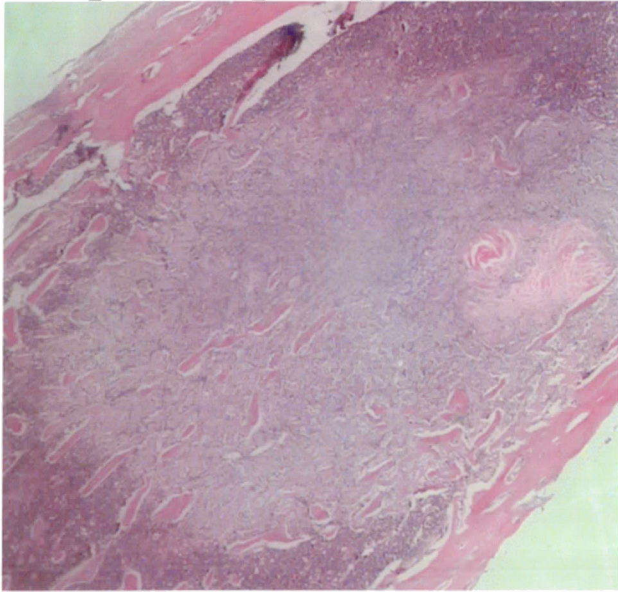


図5 合成温度の異なるHAp粉末の見かけの溶解度。

pH低下によって溶解度は上昇し、また合成温度の低下にともなって溶解度は上昇した。

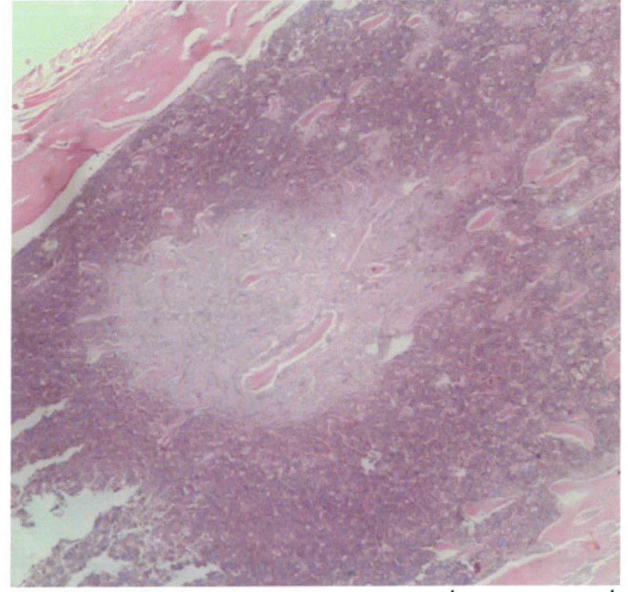
図5

**HAp80 3d post operation**



1 mm

**HAp40 3d post operation**



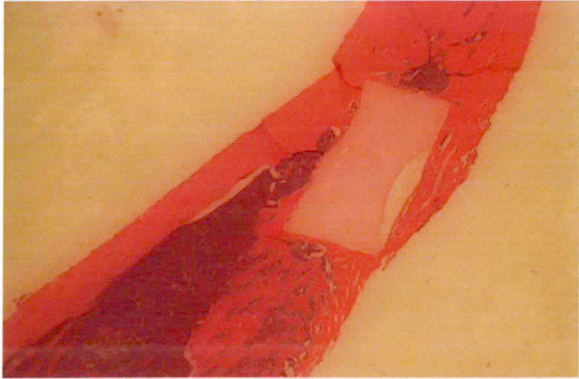
1 mm

図6 合成温度の異なるHAp粉末埋入後のH-E染色像(術後 3日)。

HAp粉末埋入部位には、骨芽細胞、血球系細胞の浸潤が見られ、多くの骨基質産生が確認された。また、HAp40ではHAp80と比べて多くの成熟した骨組織が見られると同時に、HAp残存量も少なかった。

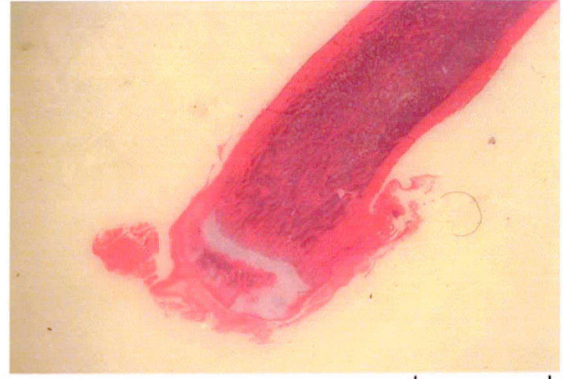
図6

Sintered HAp 3w post operation

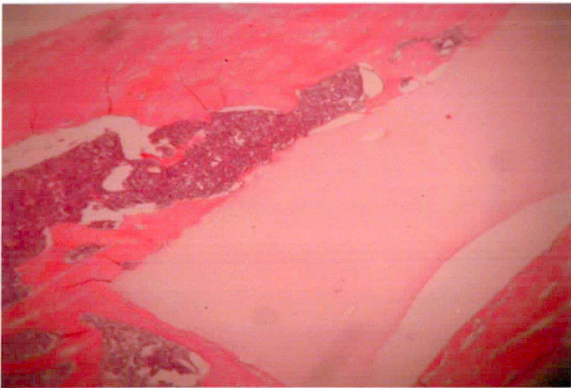


2 mm

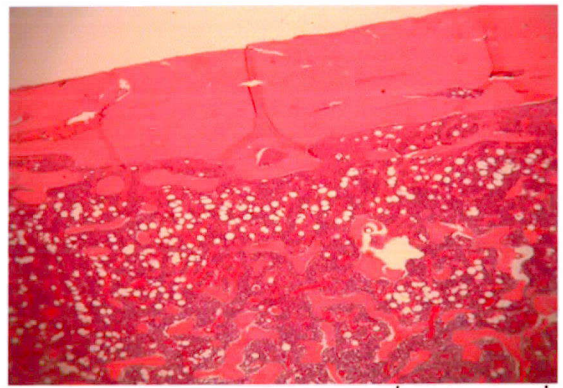
HAp40 3w post operation



2 mm



1 mm



1 mm

図7 HAp焼結体とHAp80、HAp40粉末埋入後のH-E染色像(術後 3週間)。

HAp焼結体を埋入した切片では、埋入試料が埋入時の形態を維持した状態で残存していた。一方、HAp粉末を埋入した切片では完全に埋入試料が消失し、骨組織に置換していた。



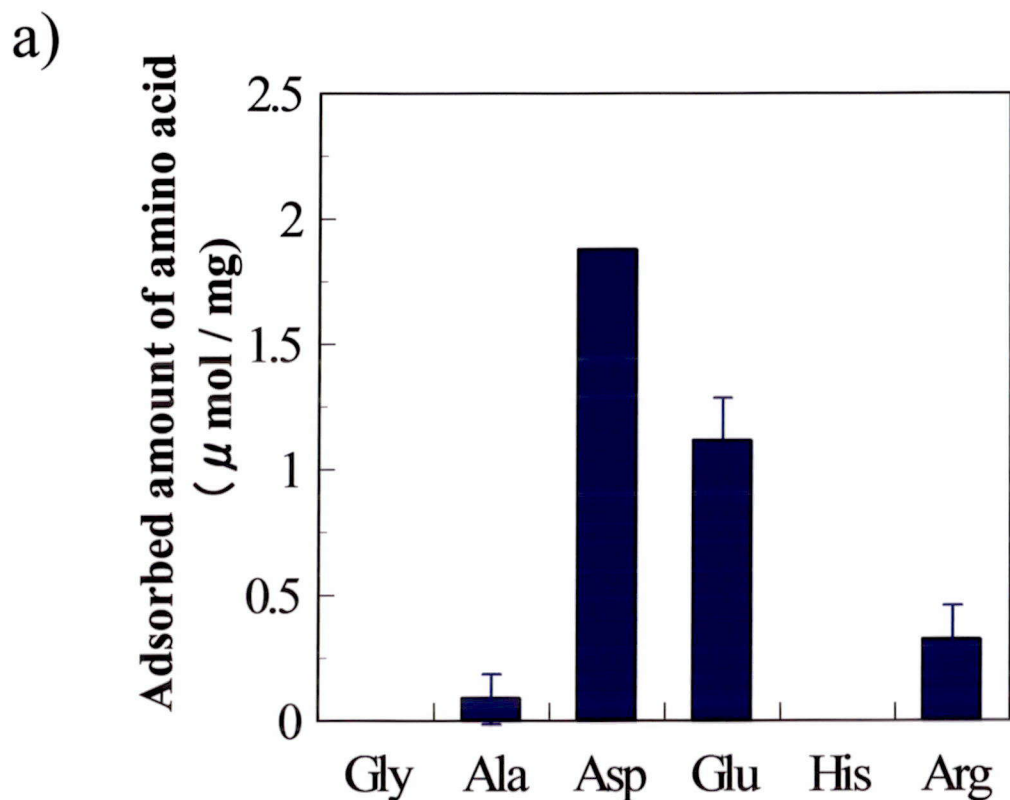


図8 HAp粉末へのアミノ酸吸着量。

- a) HAp粉末へのアミノ酸吸着量は、アミノ酸により異なった。  
 b) その違いをpI(等電点)をもとに検討すると、HApは pI = 7前後の中性アミノ酸に対してほとんど吸着能を示さず、酸性あるいは塩基性のpIをもつアミノ酸に対して吸着能を示した。

b)

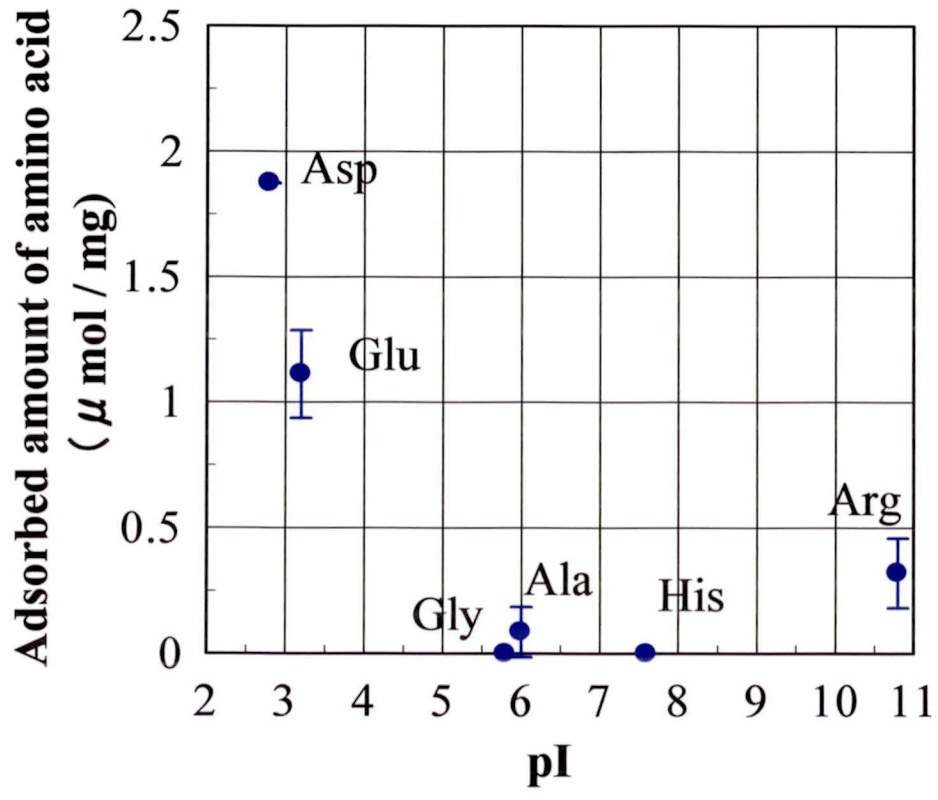


図8

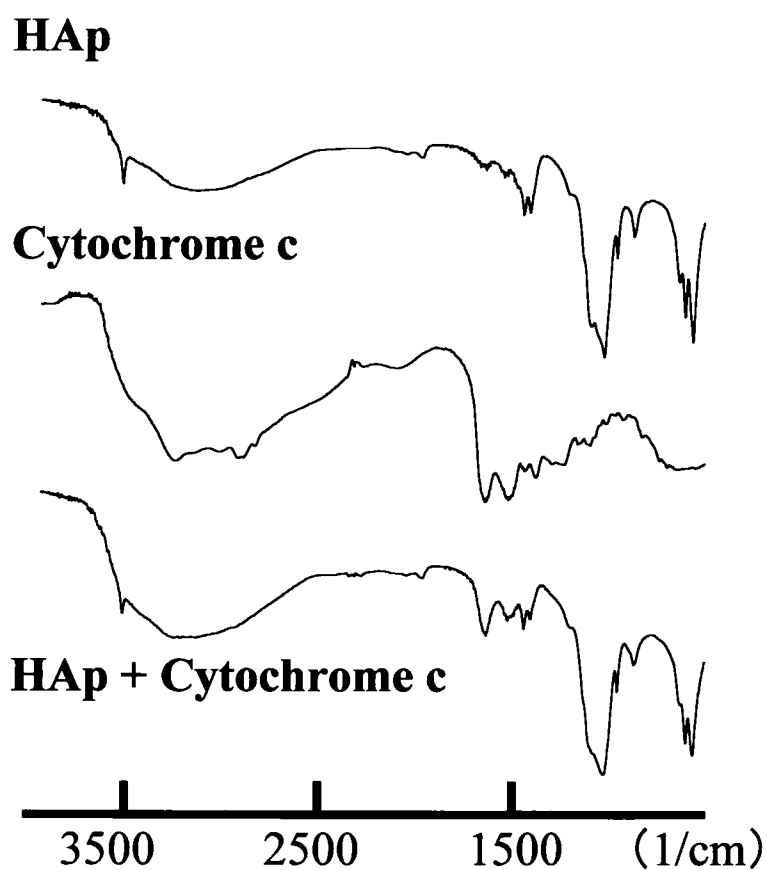


図9 HAp粉末、シトクロムC、およびシトクロムC吸着HAp粉末のFTIR結果。

タンパク質吸着実験後に得られたHApは、HApおよびシトクロムCそれぞれの特異なピークを合わせ持った。

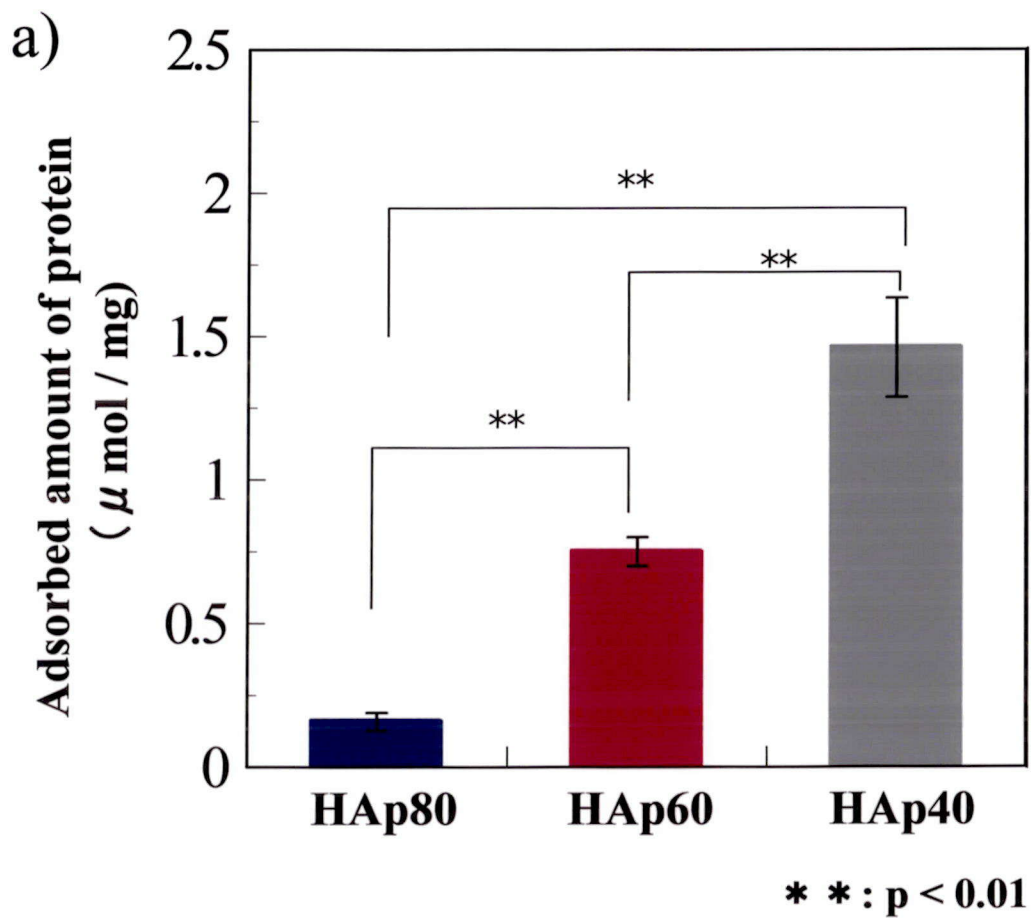


図10 合成温度の異なるHAp粉末へのタンパク質吸着実験結果。

- a) HApへのタンパク質吸着量は、合成温度が低くなるほど有意に増加した。
- b) HApへのタンパク質吸着量とHApのもつ比表面積とは高い相関性を示した。



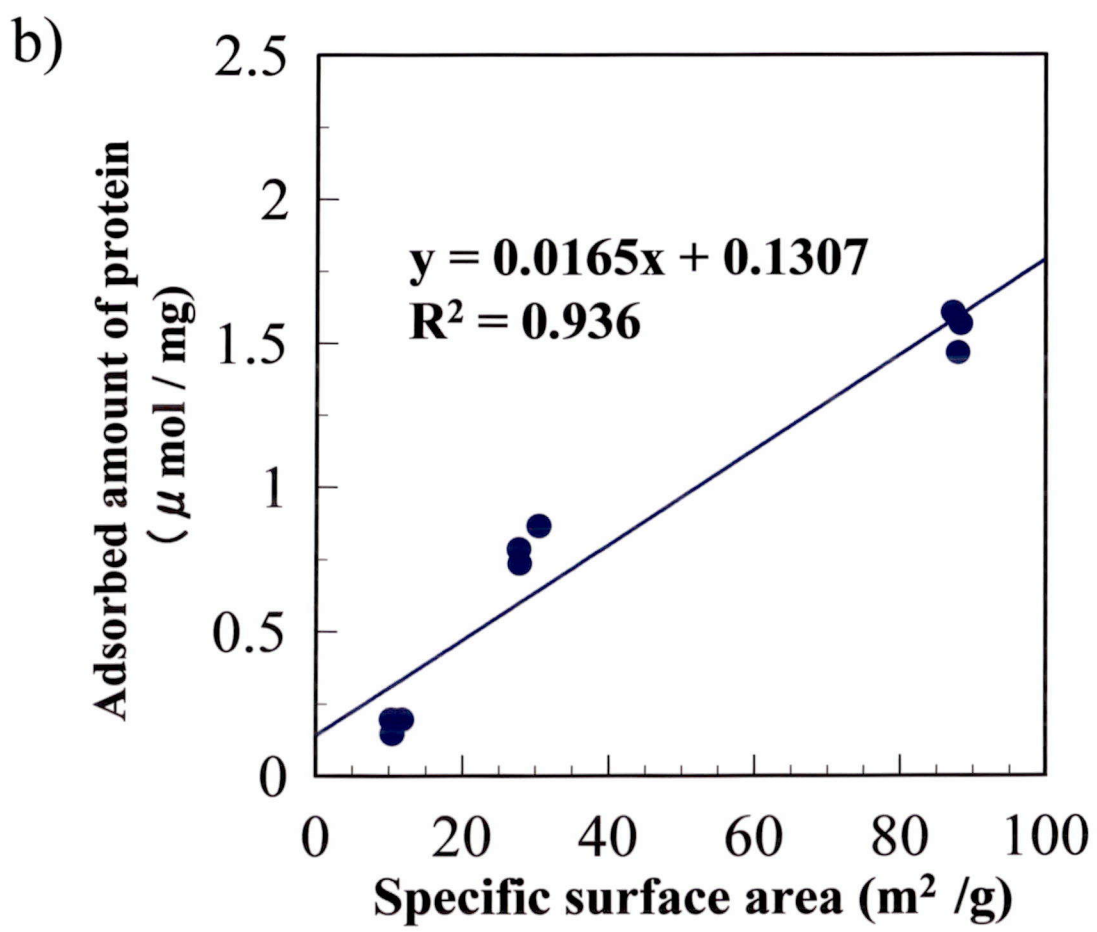


图10

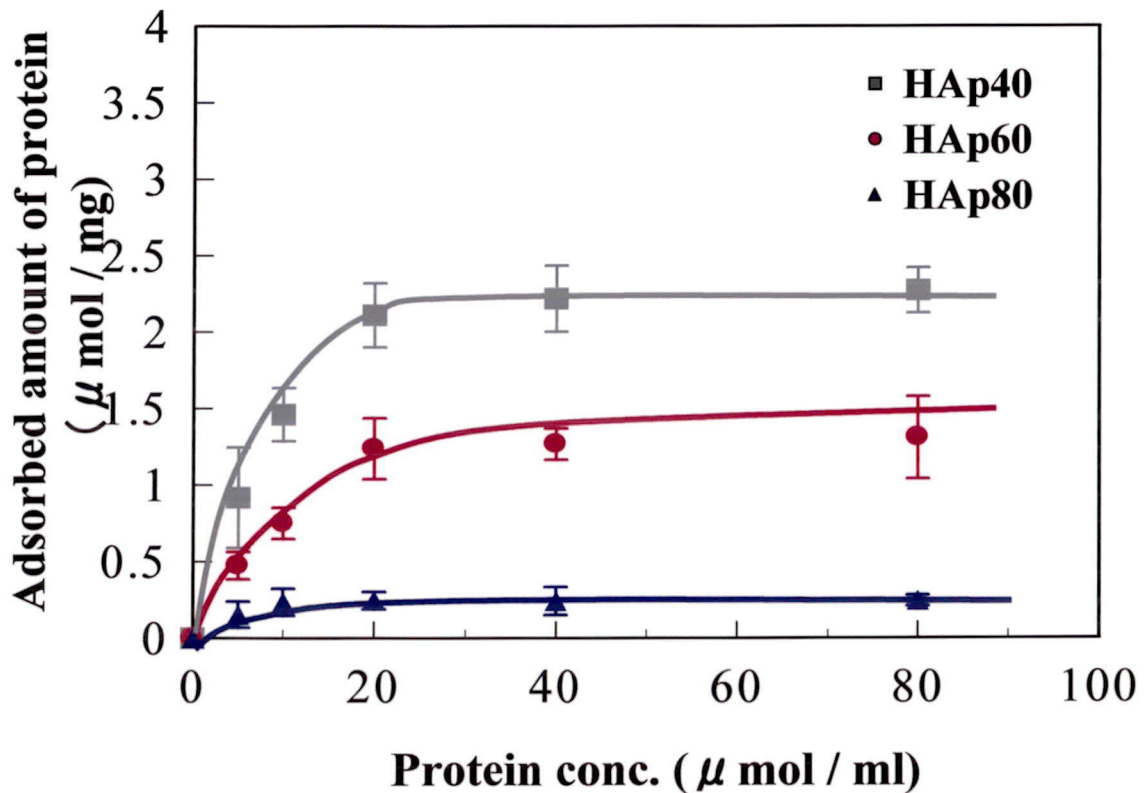


図11 合成温度の異なるHAp粉末へのタンパク質吸着量。

HApへのタンパク質吸着量は、約20  $\mu\text{mol/l}$  タンパク質溶液濃度までは一次的に増加した後、それ以上のタンパク質濃度では吸着量はほとんど増加しなかった。

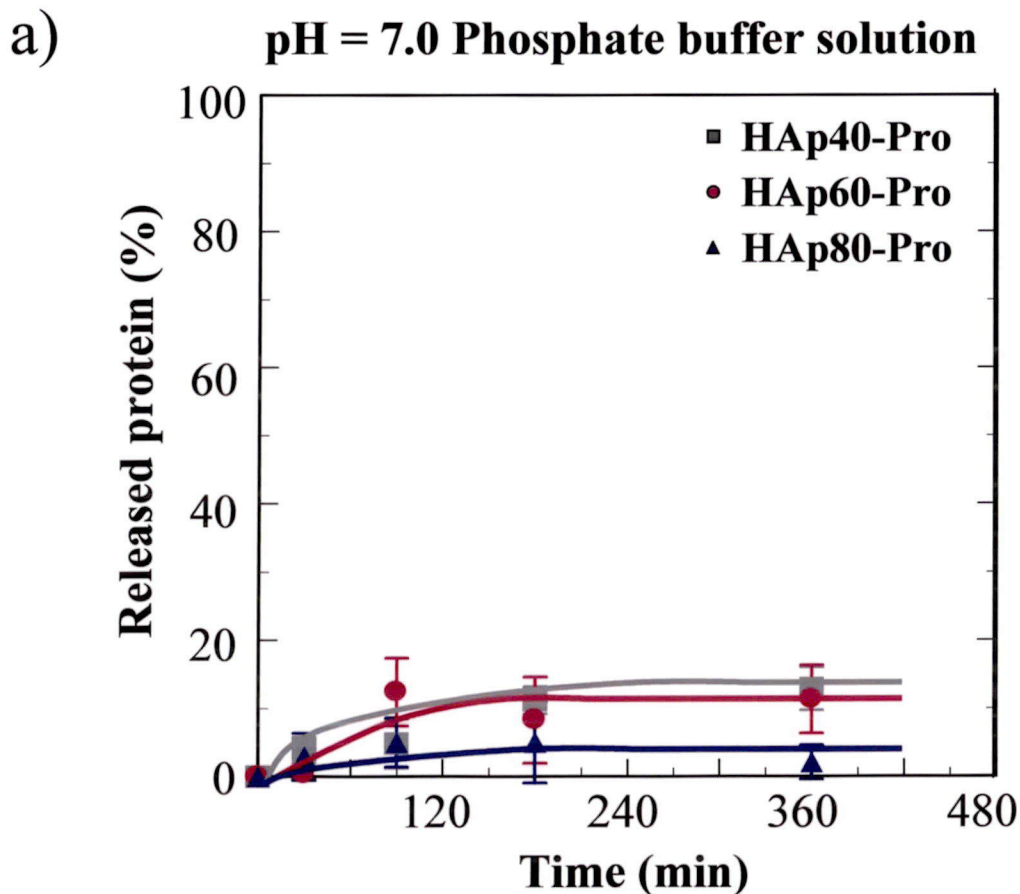


図12 異なるpH溶液でのHAp-Proからのタンパク質放出割合。

- a) pH = 7.0溶液に浸漬した場合、タンパク質放出が浸漬初期にわずかに起こった後は、ほとんど起こらなかった。
- b) pH = 4.0溶液に浸漬した場合、長時間のタンパク質放出が確認された。また、その放出割合は、どのHApにおいても、pH = 4.0溶液に浸漬した場合の方が大きかった。

b)

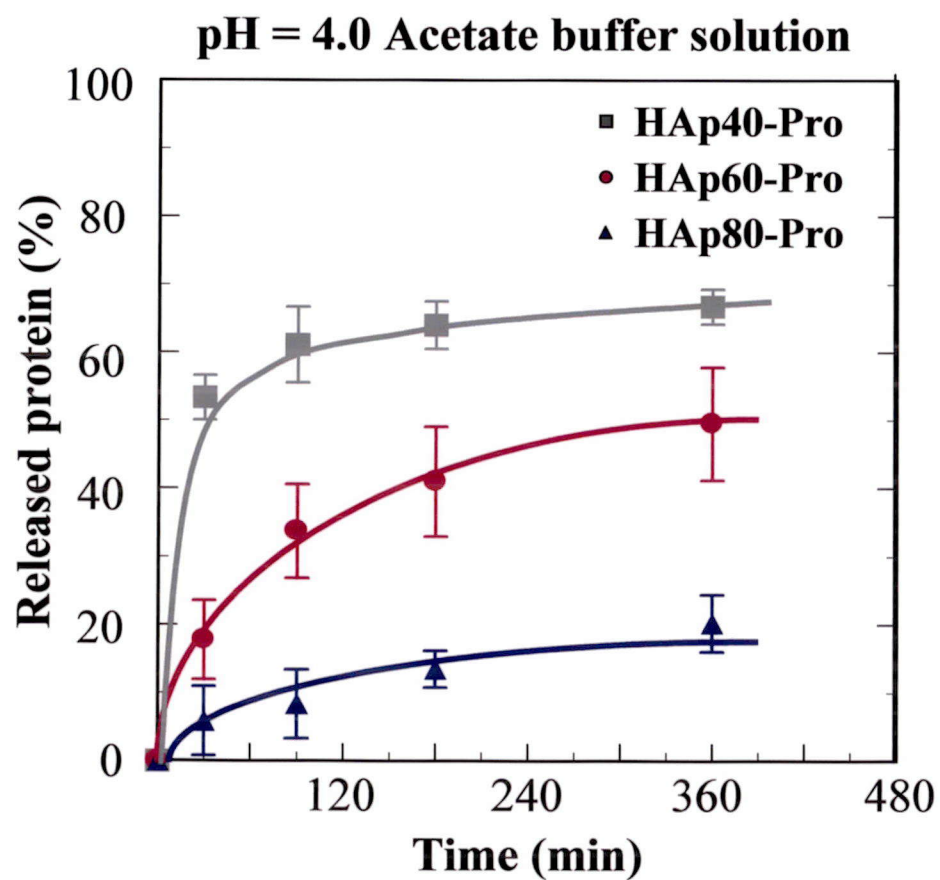


图12

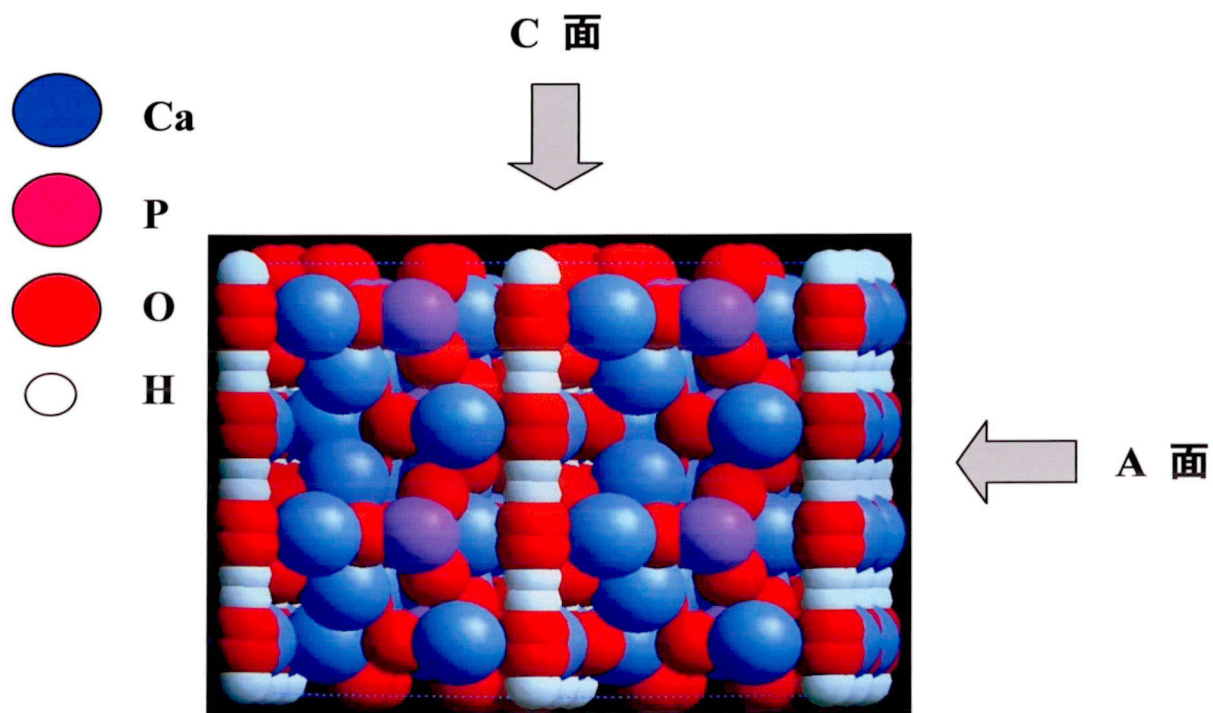


図13 HAp結晶構造のコンピューターグラフィック。