

アパタイト系リン酸カルシウム生体材料の高機能化と新展開

Improvement of Functions and Novel Developments of Apatitic Calcium Phosphate Biomaterials

Key-words : Apatite, Biomineral, Biomaterial, Eco-material

菊池 正紀・末次 寧

Masanori KIKUCHI and Yasushi SUETSUGU
(National Institute for Materials Science)

1. はじめに (アパタイトと結晶学)

顎を持つ脊椎動物の歯や骨の無機成分は水酸アパタイト (hydroxyapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, HAp) によく似た結晶構造と組成を持っている。実際には、カルシウムサイトに欠損がある上 Mg^{2+} や Na^+ や K^+ が置換し、リン酸サイトには炭酸基が、水酸基は歯のエナメル質で一部が F^- と置換している。この水酸基は通常赤外吸収スペクトルで観測されるが、大量の水を含み HAp がナノ結晶からなる骨では、水酸基がほぼ検出できない場合も見受けられる。骨の中のアパタイトをはじめとする非化学量論的 HAp は六方晶系の空間群 $P6_3/m$ で、 c 軸方向に結晶成長しやすい。(化学量論的 HAp は単斜晶系の空間群 $P2_1/b$) そのため、体内を含む通常の湿式合成法ではアパタイトの晶癖にしたがった m 面リッチな結晶の集合体として得られる^{*1}。HAp は他の単結晶合成法でも通常 c 軸に成長した結晶が得られ、 c 面の発達した結晶は長年得ることができなかった。しかし、2013年に Zhuang, 相澤はついに c 面が大きく成長した HAp 結晶の合成に成功し、相澤らのグループがそれまで作製してきた c 軸伸長し、 m 面リッチなアパタイトファイバー (AF) と比較して、 m 面と c 面 ($\{001\}$ 面) でのタンパク吸着能の違いを明らかにした¹⁾。因みに、HAp の m 面と c 面の違いはそれぞれに Ca^{2+} , PO_4^{3-} が多く存在していることにより m 面が正、 c 面が負に帯電していると考えられていることが一つ、 m 面が c 面と比較すると溶解度が高いとされていることが一つである。

ところで、本協会に限らず国内外の生体材料系雑誌でも間違った表記が散見されるので、ほとんどの読者にとって蛇足になると思うがここで注釈させていただ

きたいことがある。六方晶系では a 軸 ($[100]$ 軸) と b 軸 ($[010]$ 軸), a 面 (a 軸に垂直な $(2\bar{1}0)$ 面) と b 面 (b 軸に垂直な $(\bar{1}20)$ 面) は等価 (それぞれ $\langle 100 \rangle$ 軸, $\{110\}$ 面としてまとめられる) で区別がつけられないため、それぞれ a 軸, a 面と代表すれば充分なのであるが、“ $a(b)$ 面”と表記する方がおられる。なお、六方晶系の定義に $a=b \neq c$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ と書いているのはあくまでも定義説明のためであり、格子定数を示すときには ICDD カードなどにあるように $a=0.9418$ nm と $c=0.6884$ nm とだけ示せば良く、 $a=b=0.9418$ nm のような記述する必要は全くない。これは立方晶の場合に “ $a(b)(c)$ 面” や $a=b=c=0.407864$ nm と書かないことから明らかなように、リダダントな表記であり、通常はそんな書き方はしない^{*2}。また、回折図などでも回折ピークや回折点に (hkl) と書かれている方がおられるが、括弧内の hkl はミラー指数記述の決まりとして一般的に既約である (教科書には常に既約と書いてあるものもあるが、確実に既約になるものは単純単位胞に限られる。なお、HAp は単純単位胞しかない六方晶系なので hkl は既約となる)。一方、回折現象では高次反射も同時に観測されているため、既約でない hkl を使ってその高次反射を含めた記述することになっている (逆格子点の座標を指していると理解すればわかりやすい) ので、回折ピークや回折点の指数には括弧をつけてはいけないし、単純単位胞であっても既約で表記するという制限はもろくない²⁾。もう少し詳しく知りたいという方のためには、自由にダウンロード可能な日本結晶学会誌での連載³⁾ などがある。

さて、話を HAp に戻すと、淡水や陸生に対応したと思われる生物はカルシウムだけでなく、エネルギー代謝や核酸合成に必須なリンを体に蓄えておくために、炭酸カルシウムからリン酸カルシウムへと骨格を変化させてきたと考えられている。リン酸カルシウムの中でも中性から弱塩基性の水溶液中で最も安定な HAp が硬組織として利用されるようになったと考えられるのは妥当であろう。すでに述べたとおり、HAp をはじめとするアパタイトはかなり特殊な環境でなければ c 面が成長せず、結晶の外形は生体鉱物であっても合成物であっても生体有機分子などにほとんど影響されていないことから、生物は m 面が優位である HAp に適応して進化してきたと考えられる。実際、歯や骨ではコラーゲンに対して HAp が配向しており、細胞と接触する面が m 面リッチになっている。「いや、歯のエナメル質では c 面が外を向くように配向しているのではないか」と言う意見も出るであろうが、これも c 面

が極端に大きくなっていると言うよりも、タンパクなどの働きで骨や象牙質の HAp よりも *c* 軸方向に成長した *m* 面が優位なフッ素固溶 HAp が配向しているだけであり、自然に生じる結晶面の優位性に干渉はしていない。もし本当に必要であれば、生物が一般的に不安定なアラゴナイトを骨格に持ったり、結晶の形態を変えたり、多量の Mg^{2+} を固溶したカルサイトを骨格に持ったりするように、HAp の形態を制御するだろう。

ヒトも HAp の *m* 面に適応した生物の一種であることから、(幸いにも合成しやすい) *m* 面リッチな HAp を細胞や組織の機能発現のために有効利用できるのではないかと考えられるのである。

2. HAp の *m* 面が優位になった材料は骨再生に有利か？

通常の HAp セラミックスでは結晶そのものはやはり *m* 面が優位になっているものの、その結晶が比較ランダムにパッキングされているためはっきりとした配向性は認められない。一方、相澤らの AF から作製したスキャフォールドでは *m* 面が明らかに優位に焼結体表面に存在しているため、その二重気孔構造とともに骨などの再生医療に向いていると報告されている⁴⁾。

一方我々は、骨に類似したナノ構造(配向)を持った HAp/コラーゲン骨類似ナノ複合体(以下 HAp/Col)を合成することに成功している⁵⁾。本材料は、コラーゲン上に *m* 面を外に向けるように HAp が配向しているため、*m* 面がリッチな表面を持つ材料と言うことになる。実際、HAp/Col を骨欠損部に埋入すると、自分の骨を移植した時と同様、HAp/Col が破骨細胞で吸収された窩に骨芽細胞により骨が造られていく「骨リモデリングプロセス」によって骨に替わっていくことから、HAp の *m* 面リッチな材料は骨補填材として有用であると考えることが可能である。しかし、この材料を構成する HAp はナノ結晶であり、見かけの溶解度が高く破骨細胞による吸収が継続的に可能であること(HAp セラミックスも体内で破骨細胞性の吸収は認められる⁶⁾が非常に限定的でかつ継続的ではない)や、細胞接着性に優れた I 型コラーゲンを含んでいることなどから、一概に *m* 面リッチであることのみが細胞の反応や骨組織反応に影響しているとは言いきれない。

HAp の *m* 面が重要であるという考えの中には、*m* 面と *c* 面の表面電位の違いにより吸着するタンパク質をはじめとする生体内有機分子が異なるためであるという考え方があり、前述した Zhuang らの報告のとおりその差は確かに存在する。一方で、山下らのグルー

プが検討してきた、HAp の分極が細胞増殖や機能発現、骨組織反応に与える影響は、程度の差はあれ、分極していない HAp と比較して、正に分極した面、負に分極した面ともに細胞の接着、増殖、機能発現は向上している⁷⁾。体内や培地ではイオンや分子の吸着で比較的早い段階で表面電位による選択吸着の効果はキャンセルアウトされている可能性があり、電位の違いによる吸着分子の影響は非常に限定的だとみることできる。

それでは、*c* 面に比較して高い *m* 面の溶解性が周囲の Ca 濃度を高め、骨系細胞の活性化により大きく寄与していると考えられるのはどうだろうか？実際、骨リモデリングにより骨に置き換わることができるとされている市販セラミックス製骨補填材料に β -リン酸三カルシウム (β - $Ca_3(PO_4)_2$, TCP) と炭酸含有アパタイト (CAp) があるが、いずれも溶解度が HAp セラミックスより高い一方、CAp であっても焼結体の表面が *m* 面リッチになっているというわけではない。また、溶解による Ca^{2+} イオンが骨形成を活性化するという研究が数多くあることから、この考察はある程度妥当であると考えられる。ただし、HAp/Col の場合、材料中のナノ HAp であっても、体液がそれに対して過飽和であることは間違いないので、明らかに HAp より溶解度が高い TCP や CAp とは異なった挙動を示す。すなわち、最初期にマクロファージなどで吸収されている可能性を除き、破骨細胞が出現するまで HAp/Col はほとんど吸収されないため、体液による Ca^{2+} イオンの溶解効果は TCP や CAp のように顕著ではない可能性が高い。

いずれの考察が正しい(あるいはどちらも重要)にしても、HAp の *m* 面が優位になった材料は骨再生に有利である可能性は高い。たとえば、HAp/Col をコートしたチタンでは、骨と材料が電子顕微鏡レベルの線維組織で結合する“オッセオインテグレーション”が迅速化する⁸⁾こと、その新生骨形成に関係している破骨細胞による HAp/Col の吸収が、TCP より早い 5 日目に認められる⁹⁾ことから HAp の *m* 面の大切さがうかがい知れる。

3. HAp/Col の低温コーティング

その HAp/Col をチタンにコーティングする手法は、コラーゲンを変性あるいは分解させないために、低温でのプロセスが必要である。そのため上記文献ではディップコーティングを用いているが、コーティングのはく離強度が低いこと、厚さの制御が難しいことなどから実用化に向いているとは言えない。他の低温コー

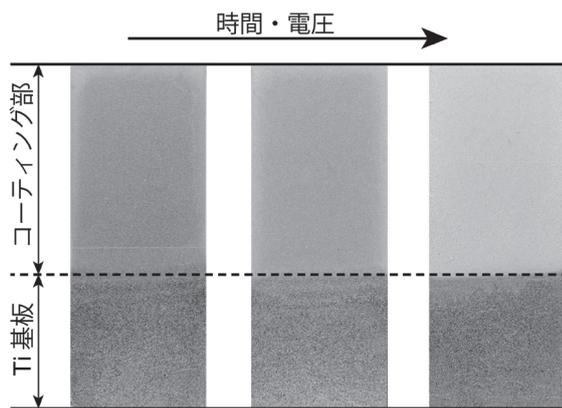


図1 析出時間や印加電圧によって厚さを制御したHAp/Col コーティング層。

ティング法としてはエアロゾルデポジション法¹⁰⁾や電気泳動堆積 (EPD) 法がある。EPD 法でははく離強度を向上させるために、一般的にはコーティング層のバインダの加熱脱脂を行ったり、蛍光体ではMg²⁺をコーティング溶液に添加したりしている。後者は完全な低温プロセスであり、Mg²⁺が骨形成を活性化させる因子であると同時に体内に多く存在する元素であることから、我々はHAp/Colにも応用できないか考えた。

まず、Mg²⁺の存在下で種々のHAp粒子をEPDコーティングしてみたところ、コーティング層と基板が十分な接着強度で密着していることが確認できた¹¹⁾。そこで、Mg²⁺の存在下でのHAp/ColのEPDコーティングを試みた。その結果、EPD用スラリーの最適形成条件を満たすことで厚さを制御した均一なHAp/Colコーティング層をチタン上に形成することに成功した(図1)。さらに、JIS K5600-5-6 (ISO2409)のクロスカット法によるテープテストの結果、Mg²⁺を無機バインダーに用いたHAp/Colコーティング層にはく離が認められず、バインダーの効果が明らかとなった。また、コーティング層細胞培養試験の結果がチタン板と比較して良好であったため、骨膜下におけるオッセオインテグレーションの迅速化について今後検討していく予定である。

4. 骨補填材の抗菌化

人工関節や骨補填材をインプラントすると、インプラント関連感染症 (IAI) を惹起することがある。IAIは日本などにおけるかなり清潔な手術室で手術されていても、人工関節で約1%、年間約1000人に降りかかっている疾病である。人工関節や骨補填材の埋入部位で感染が起こると、それらが細菌の温床となりこれらを抜去する必要があるが出てくるが、HAp/Colのよ

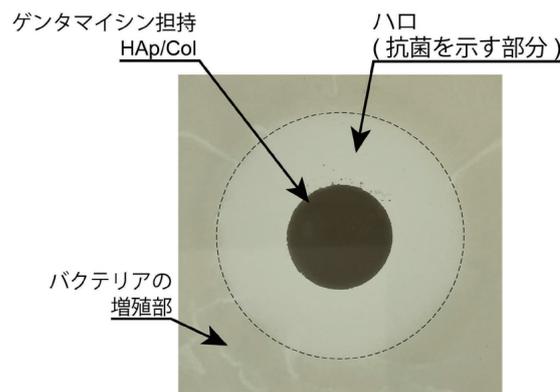


図2 GNT 担持 HAp/Col による阻止円。

うな吸収性骨補填材を用いることでそのリスクを下げるができると考えられる。また、術後3週間以内に発症する早期IAIを予防するためには、術後48時間程度までの抗菌剤投与が有効であるとする一方、5~7日まで抗生剤を投与すると薬剤耐性菌による感染症が発生する危険が高まる¹²⁾。ここでHAp/Colの吸収が埋入5日以内に開始されることも考慮すると、48~120時間抗菌性を保てれば、HAp/Col補填時の感染の危険性を大幅に減少することが期待できる。そこで我々は、抗生剤のゲンタマイシン (GNT) 担持HAp/Colを作製し、GNTの脱離挙動と抗菌性/細胞適合性の検討を行った¹³⁾。

HAp/Col粉末に対しGNTを吸着させたところ、飽和吸着量は3.4±0.7 mg/gであった。また、1日での約68%が、3日ではほぼ100%が放出されることがわかった。これは、先ほどのガイドラインで必要とされる放出時間にほぼ合致している。さらに、GNT担持HAp/Colをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浸漬して1日目と5日目の抽出液を添加して大腸菌を18時間培養したところ、いずれの抽出液でも初期に1×10⁵ CFU/mLの大腸菌を含んだ懸濁液では大腸菌が死滅し、1×10⁷ CFU/mLの大腸菌を含んだ懸濁液では大腸菌の増殖を完全に抑制できたことから、この抽出液は十分な抗菌効果 (殺菌効果および静菌効果) があると考えられる。同じ抽出液を添加した細胞培養試験では、いずれの抽出液も細胞増殖に影響を及ぼさなかった。さらに、GNT担持HAp/Col粉末を円盤状に成形した後、阻止円試験 (菌を含んだ培地に材料を静置して、菌の増殖阻止範囲を見る試験法) を行ったところ、実験期間である2日目までは図2のように抗菌性を示すことがわかった。これらのことから、GNT担持HAp/Colは細胞毒性がなく、大腸菌などに対する抗菌効果が充分にあることが明らかとなった。抗生物質を変えることで、他の細菌にも有効な抗菌性骨補填材を得られる

可能性が示唆された。現在、より抗菌スペクトルの広い銀ナノ粒子を用いた抗菌性 HAp/Col について検討中である。

5. 生体鉱物の利用

ここまでは、生体鉱物であるヒトの骨の組成とナノ構造を模倣した人工骨材料の最近の成果について報告した。一方、生体鉱物の持つ多孔質構造は簡単に模倣することができないため、ウシ海綿骨や硬質サンゴの構造などを利用した骨補填材が市販されている。サンゴの場合、二酸化炭素のリザーバーであることなどから、保護すべき資源とされており、捕獲は厳しく制限される。我々は食料として捕獲されたり、海草資源保護のために駆除されているウニに着目した。なお、これらのウニ殻は水産廃棄物となり、漁協などではその処理が問題になっていることから、その解決策としてもウニ殻の有効活用は重要である。ウニの骨はウニ殻の表皮下にあり、約 250 μm と約 20 μm のバイモーダルな気孔構造を持っていて、前者は細胞や組織の進入に、後者は体液を介した栄養などと老廃物の交換に資すると考えられる。また、ウニの骨の無機成分は Ca^{2+} に対して 11% 程度の Mg^{2+} を固溶したカルサイトであり、中性～弱アルカリ性でリン酸化を行うと、 Mg^{2+} を固溶した TCP と HAp からなる 2 相性リン酸カルシウム (BCP) が簡単に得られることが期待できる。

実際に水熱条件下でリン酸化処理を行うと、TCP が約 8 割含まれている BCP が得られた。ウニの骨は薄いドーム状をしているので、顆粒上骨補填材として使用する場合は適切な大きさに砕けばよいが、ブロックとして用いる場合はつなぎとなるものが必要である。我々はコラーゲンとゼラチンを用いてブロックを作製し、細胞培養試験にて増殖および骨形成関連遺伝子の発現を確認した。その結果、コラーゲンスポンジなどと異なり、ウニ殻由来の BCP ブロックでは細胞が内部まで侵入して増殖し、コラーゲンスポンジなどと比較して高い骨形成活性を示すことが明らかとなった¹⁴⁾。

6. おわりに

このように、アパタイト系リン酸カルシウムはナノ～マクロレベルまでの形態を制御したり、機能性有機分子と複合化することなどで、生体材料としての新しい機能を発揮できる可能性がまだ残っていると考えられる。そのためにも、材料の基礎をしっかりと抑えた上で巨視的な視点で研究を見渡すことが必要であろうと考えられる。

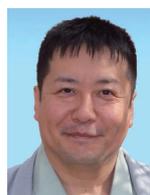
注

- *1 鉱物学で一般に使用されている Dana による結晶面の定義によると、六方晶系と六方格子で記述した三方晶系では a , c 面は各軸に垂直な面を示す。したがって、HAp が図示された際、よく“ a 面”と書かれている a 軸と c 軸に平行な $\{100\}$ 面は a 面ではなく m 面となり、 a 面は $\{110\}$ 面と言うことになる。それ以外の晶系では a , b , c 面はそれぞれ $\{100\}$, $\{010\}$, $\{001\}$ 面、すなわち b 軸と c 軸で作る平面、 a 軸と c 軸で作る平面、 a 軸と b 軸で作る平面となる。筆者らも以前は、HAp のいわゆる“ a 面”が $\{100\}$ 面と等価になることから六方晶系以外と同じ記述を受け入れていたが、本稿では、今後専門分野との議論でも混乱が生じないようにすべきと考え、鉱物学で標準的な記述を採用する。
- *2 ごく稀に相変態で結晶系が変化していく系を記述する際などに、立方晶などでも相変態後に等価でなくなるため敢えて a 軸 b 軸と分けて表記することがある。

文 献

- 1) Z. Zhuang and M. Aizawa, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **24**, 1211–1216 (2013).
- 2) 橋本功二, 浅見勝彦, 表面技術, **52**, 738–739 (2001).
- 3) ネスポロ マッシモ, 日本結晶学会誌, **59**, 150–158 (2017).
- 4) Y. Yamada et al., *J. Asian Ceram. Soc.*, **7**, 101–108 (2019).
- 5) M. Kikuchi et al., *Biomater.*, **22**, 1705–1711 (2001).
- 6) K. Takikawa and M. Akao, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **7**, 439–445 (1996).
- 7) S. Itoh et al., *Calcif. Tissue Int.*, **78**, 133–142 (2006).
- 8) M. Uezono et al., *J. Biomed. Mater. Res. Part B*, **101B**, 1031–1038 (2013).
- 9) T. Hiratsuka et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **108B**, 391–398 (2020).
- 10) 明渡 純, 溶接学会誌, **75**, 639–647 (2006).
- 11) C. Zhang et al., *J. Electrochem. Soc.*, **166**, D700 (2019).
- 12) 日本整形外科学会診療ガイドライン委員会, 骨・関節術後感染予防ガイドライン策定委員会 編, 骨・関節術後感染予防ガイドライン 2015 改訂第 2 版, 南江堂, pp.79–80 (2015).
- 13) S. Oshima et al., *Int'l J. Molecular Sci.*, **21**, Article ID 551, 551–1–551–10, DOI:10.3390/ijms21020551 (2020).
- 14) N. V. L. Manchinasetty, S. Oshima and M. Kikuchi, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **28**, DOI:10.1007/s10856-017-5993-5 (2017).

筆者紹介



菊池 正紀 (きくち まさのり)

1995 年早稲田大学大学院理工学研究科博士後期課程修了。博士 (工学)。2007 年より現所属バイオセラミックスグループリーダー。アパタイトの結晶化学、リン酸カルシウムおよびそれらと有機高分子の複合体の生体材料応用、環境浄化材料応用に関する研究と実用化を進めている。
[連絡先] 〒305-0044 茨城県つくば市並木 1-1
E-mail: KIKUCHI.Masanori@nims.go.jp



末次 寧 (すえつぐ やすし)

1993 年東京大学大学院理学系研究科修士課程修了。博士 (理学)。2001 年物質・材料研究機構主任研究員。現在に至る。各種アパタイト系化合物の合成と結晶化学的解析、水酸アパタイトセラミックス人工骨材料の開発を行っている。
[連絡先] 〒305-0044 茨城県つくば市並木 1-1
E-mail: SUETSUGU.Yasushi@nims.go.jp