

自己組織化機構によるナノコンポジット構造の制御 —骨類似アパタイト・コラーゲン複合体—

独立行政法人 物質・材料研究機構 生体材料研究センター

菊池 正紀, 田中 順三

Synthesis of Bone-Like Nanocomposites using Self-Organization —Mechanism of Hydroxyapatite and Collagen—

Masanori Kikuchi, Junzo Tanaka

Biomaterials Center, National Institute for Materials Science

1. はじめに

自己組織化は、自然界にひろく現れる現象であり、特に生体を構成している物質は多くが自己組織化によって作られている。たとえば、細胞は、外側に脂質二重膜からなる細胞膜をもち、外界と個体の境界を造っている。細胞内小器官もまたタンパク質からなる自己組織化集合体である。さらに大きいところでは、細胞外基質である皮膚、腱、靭帯、骨なども生体環境下で自己組織化によって構築されている。

本稿では、骨の自己組織化機構に注目し、それを工学的に利用することによってアパタイト/コラーゲン複合体を合成する技術について述べる。

2. 骨の構造と自己組織化

骨の主成分は、無機材料のアパタイト（重量比で約 65%）である。次いで有機材料のコラーゲンが約 25%を占めている。したがって、骨は全く異なるアパタイトとコラーゲンという 2つの材料からできている。骨の微構造を調べると、有機材料のコラーゲンが長い繊維を構成していて、その上にアパタイトのナノ結晶（～40 nm）が規則正しく配列している（図 1）。骨は有機材料と無機材料のナノコンポジットである。しかし、その規則構造がどのようにして作られるか、その機構については意外によくわかっていない。

骨は骨芽細胞によって形成される。骨芽細胞の役割で良く調べられている点は、コラーゲンを細胞内で合成し細胞外に放出すること、さらに骨形成のカスケードや生化学的な役割などである¹⁾。しかし、工学的に骨と類似した材料を合成しようとするれば、コラーゲンとアパタイトがどのような条件で規則正しい構造を作るか、すなわち自己組織化が起こる化学的な機構について知ることが大切である。

〒305-0044 茨城県つくば市並木 1-1
独立行政法人物質・材料研究機構
生体材料研究センター
TEL 0298-58-5649
FAX 0298-51-8291
E-mail: TANAKA.Junzo@nims.go.jp

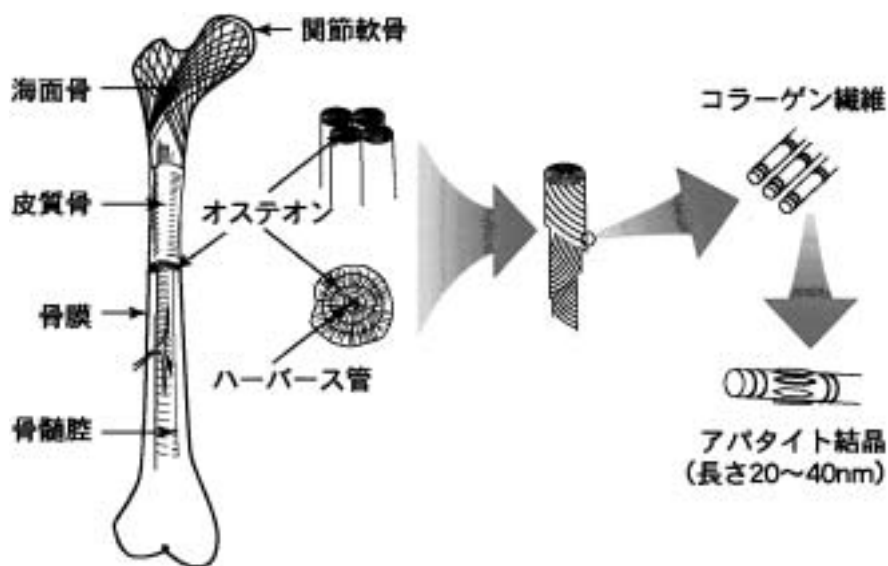


図1 骨の微構造。コラーゲン繊維の上にアパタイトの微結晶が規則正しく配列している。

破骨細胞の骨吸収のプロセスを見ると、その化学的な役割の大筋が理解できる。破骨細胞が骨に接着すると、細胞内カスケードが動きはじめ、まずプロトンポンプが働いて細胞と骨の間の局所空間を酸性にする。酸性の化学的環境では、アパタイトを自発的に溶解する。それと同時に、破骨細胞は酸性で作用する酵素（コラーゲナーゼ）を局所空間に放出する。そのため、コラーゲンの分解・吸収が起こる¹⁾。したがって、破骨細胞は、周囲の化学的環境を整える働きをしており、骨は細胞によって制御された局所空間の中で化学的な反応として吸収されていく。

この考察を骨形成に演繹すると、骨芽細胞は周囲の化学的環境の調整する役割を果たし、骨の主成分であるアパタイトとコラーゲンは材料自身の相互作用によって自発的に構造を構築すると予想される。したがって、骨芽細胞が制御している化学的な条件がわかれば、自己組織化によって骨の構造は工学的に構築できると期待される。ここでは、骨芽細胞が制御している骨形成の局所空間の化学的環境を試験管実験（*in vitro*）によって調べる。

3. アパタイトとコラーゲンの自己組織化²⁾

アパタイトとコラーゲンの自己組織化は、両者の表面に存在するイオン種と官能基の相互作用により引き起こされると考えられる。そこで我々は、副産物として他種イオンが生成されない水酸化カルシウムとオルトリン酸の中和反応を用いて、アパタイトとコラーゲンの自己組織化条件を求めることにした。同じ理由で緩衝溶液は使用せず、図2の装置を用いて反応温度とpHを制御した。

出発物質は、高純度の水酸化カルシウム懸濁液、リン酸水溶液、豚皮膚由来のアテロコラーゲン（非抗原性コラーゲン）とした。アテロコラーゲンはリン酸水溶液に分散した。出発物質は、HAp/Colの重量比が生体内に近い80/20となるように調整した。反応温度は豚の体温に近い40°Cが最も合理的な値であると考えられることと、コラーゲンが40°C以上でゼラチン化することを考慮して、40°Cを最高温度として5°Cおきに室温（25°C）までの4点を設定した。また、pHについては体液のpHが7.2

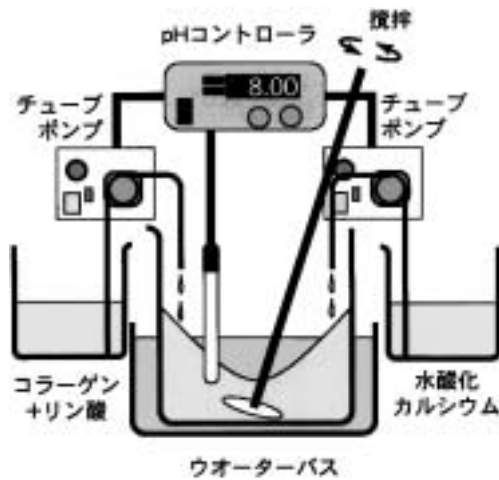


図2 複合体の合成装置。pHコントローラでチューブポンプを制御し、合成時のpHを一定にしている。反応温度は湯浴で制御している。

～7.4であることと、アパタイトの安定生成領域を考慮して、7, 8, 9に設定した。

各条件で合成実験を進めた結果、反応温度40°C, pH8-9の条件で、図3に示す様な長さ20mmに到達するHAp/Col複合体繊維が得られた。この繊維上でのアパタイト微結晶は、写真右上に挿入された電子線回折像からコラーゲン繊維の伸長方向にc軸配向していることがわかった。また、複合体の反射赤外スペクトルからコラーゲンのカルボキシル基の吸収が、複合化により赤方偏移していることがわかった。したがって、得られた複合体は、アパタイトとコラーゲンの表面相互作用に起因した自己組織化機構により、制御された微構造を構築したことがわかった。また、この微構造は骨組織で認められるアパタイトとコラーゲンの微構造によく似ており、生体内でも骨芽細胞が周囲の化学的環境を制御することで、アパタイトとコラーゲンが自己組織化的に規則正しい構造を構築していることが示唆された。

それではこの時の化学的環境を工学的な視点から考察してみよう。まず、反応温度の40°Cについては、コラーゲンの水和水の脱水温度に

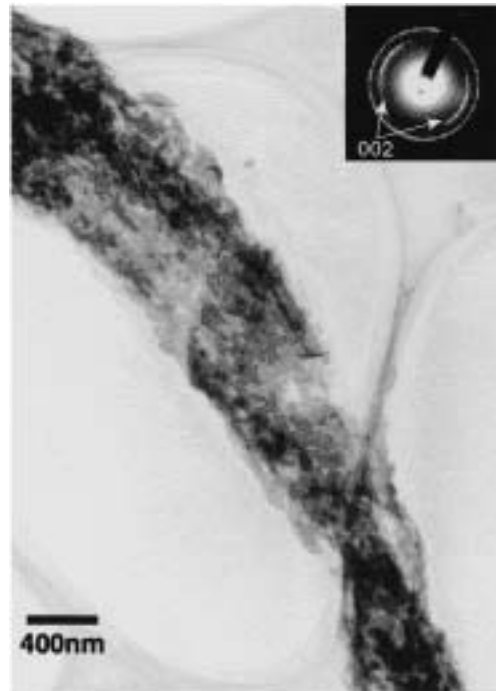


図3 複合体の透過型電子顕微鏡写真。図右上に挿入してある電子線回折像より、アパタイトのc軸がコラーゲン繊維に沿って配向していることがわかる。

一致している³⁾。また、pHの8-9については、コラーゲンの等電点、およびアパタイトの安定生成領域⁴⁾と一致している。したがって、この条件は工学的に見ても、合理的であるといえる。生体が骨という器官を獲得し、その後上陸した時に、必須元素であるリンとカルシウムを保管するため、水溶液中で最も安定で難溶性のリン酸カルシウムであるアパタイトを選択したことは非常に合理的であるが、アパタイトとコラーゲンの自己組織化とその条件を何らかの方法で見だし、内骨格として利用してきたことは驚嘆に値する。

4. HAp/Col 自己組織化複合体の骨組織反応

それでは、得られた複合体は生体内でどのよ

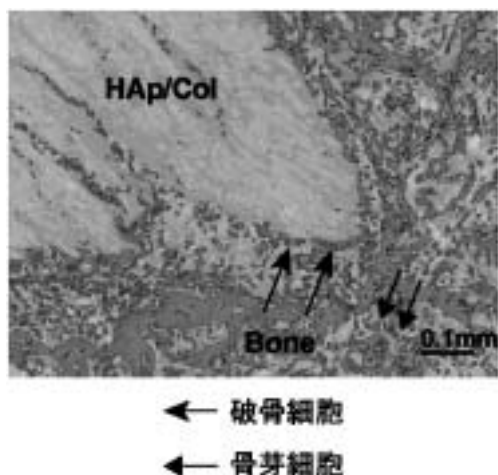


図4 SD系Ratに埋入7日目のHE染色像。破骨細胞が複合体表面に、骨芽細胞が新生骨形成部に存在している。

うな反応を示すだろうか。我々のグループは、SD系のRat脛骨に開けた直径2mmの骨孔に複合体を埋入し、骨組織反応を詳細に検討した⁵⁾。その結果、埋入後5日以内に破骨細胞による複合体の吸収が認められ、それとほぼ同時に複合体周囲への骨芽細胞の誘導と、ALP活性の増大が認められた(図4)。これは、埋入された複合体が細胞により「骨」と認識されることで、破骨細胞による吸収が始まり、それに刺激されて複合体周囲及び吸収窩に骨芽細胞による骨形成が始まることを示唆している。複合

体は12週間以内にすべて吸収され、新生骨に置換されていた。このことから、得られた複合体は骨に類似の組成と微構造を持っているため、生体内の骨代謝に取り込まれて骨に置換する初めての材料であることがわかった。この材料をビーグル犬脛骨の20mmの骨離断部に埋入して、骨の治癒機構を検討したところ12週間で、離断部がほぼすべて新生骨に置き換わることが明らかとなった²⁾。

これらの結果から、本複合体は、自家骨移植の適応症例に対して有効な骨補填材料としての応用が期待される。

参考文献

- 1) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: “骨の科学”, 医歯薬出版, 東京, 1985, pp41-64, p449-154.
- 2) Kikuchi, M., Itoh, S., Ichinose, S., Shinomiya, K., Tanaka, J.: *Biomaterials*, 22(13), 1705-1711 (2001).
- 3) 菊池正紀, 末次寧, 趙晟佰, 田中順三, 萬代佳宣, 中谷伸一, 森村正博: ハイドロキシアパタイト/コラーゲン複合体の作成と強度, 日本セラミックス協会第10回秋季シンポジウム講演予稿集, 長野, 1997, p73.
- 4) Aoki, H.: *Medical Applications of Hydroxyapatite*, Ishiyaku-Euro America (1994) 176-178.
- 5) 松本裕子, 小山富久, 高久田和夫, 宮入裕夫, 菊池正紀, 田中順三: 第27回日本臨床バイオメカニクス学会抄録集, つくば, 2000, p88.