

体液模倣環境における有機高分子表面での 水酸アパタイト析出の誘起

奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科

大槻 主税・川井 貴裕

Induction of hydroxyapatite deposition on organic polymer under a condition mimicking body fluid

Chikara Ohtsuki, Takahiro Kawai

Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

1. はじめに

骨や歯、貝殻などの無機成分を主体とした生体組織は、コラーゲンをはじめとする有機基質のテンプレートに水酸アパタイトやアラゴナイト（ CaCO_3 ）、非晶質シリカ（ SiO_2 ）等の無機固体が沈着し、それが三次元的に巧みに組織化した構造でできている¹⁾。これらは有機物質と無機物質が高度に複合化された有機-無機ハイブリッドであると言える。しかも生体はこのような高度な組織体を、水溶液からの無機固体の析出反応により常温常圧の下で見事に合成している。生体が骨や貝殻を作る石灰化反応（バイオミネラル化）を模倣したプロセスで、有機高分子の表面にアパタイトを被覆したハイブリッド材料を合成する方法であれば、高度な機材を用いることなく、環境に対する負荷も小さい条件で新素材の合成が可能になる。本稿では、体液を模倣した水溶液を用いて、有機高分子表面に水酸アパタイトを析出させる研究

について紹介する。

2. 生体活性ガラスと体液の反応

生体活性ガラスと呼ばれるある種のガラスは、骨欠損部においてその表面が水酸アパタイトの薄層で覆われ、そのアパタイト層を介して骨と直接結合することが知られている。この水酸アパタイトの形成を生体外で再現するために開発された水溶液に、Kokubo らの提案した擬似体液（SBF）がある^{2),3)}。SBF は、細胞やタンパクなどの有機物を含まず、無機イオン濃度だけをヒトの細胞外液のそれにほぼ等しくした水溶液である。図 1 に SBF のイオン濃度を示す。SBF の pH は、トリス緩衝剤（トリスヒドロキシメチルアミノメタン（ $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$) 50 mol/m³ と塩酸約 45 mol/m³）によって 36.5°C で 7 付近に調整される。

それでは体液類似環境下において表面にアパタイト層を形成するには、どのような組成や構造を有する基板材料が適しているのだろうか。SBF を用いて $\text{CaO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$ 系における、体液環境下での表面アパタイト層の形成を調べる

〒630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5

TEL 0743-72-6121

FAX 0743-72-6129

E-mail: ohtsuki@ms.aist-nara.ac.jp

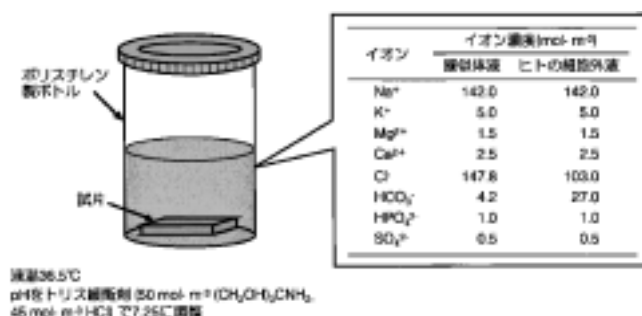


図1 ヒトの体液（細胞外液）とほぼ等しいイオン濃度を有する擬似体液（SBF）。

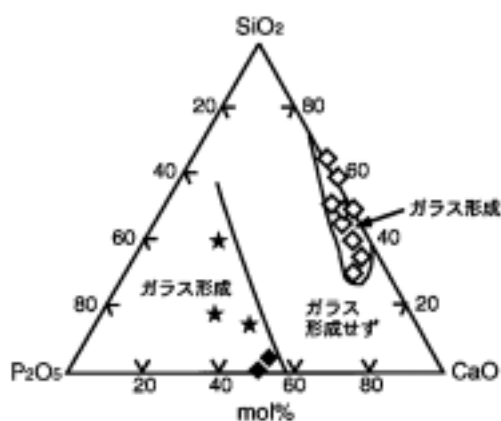


図2 CaO-SiO₂-P₂O₅系ガラスにおいて擬似液中で表面にアパタイトを形成する組成域（浸漬期間 30 日）⁴⁾。◇アパタイト層生成，◆アパタイト層生成せず，★ガラスが著しく溶解。

と図2の結果が得られる。この結果は、アパタイト層を形成するのはCaOとP₂O₅を主成分とする組成域ではなくCaOとSiO₂を主成分とする組成域であることを示している⁴⁾。ヒトの体液やSBFは水酸アパタイトに対してはすでに飽和濃度を越えるカルシウムとリン酸イオンを含有している。それにも関わらず、通常の状態ではSBFから水酸アパタイトの自発的な沈澱は生じない。これは、アパタイトの核形成に要するエネルギー障壁が高いためである。CaOとSiO₂を主成分とするガラス表面にアパタイト層が形成されるのは、ガラスから溶出するCa²⁺が周囲の液のアパタイトに対する過飽

和度を上昇させると同時に、表面に生成する水和したシリカゲルのSi-OH基がアパタイトの不均一核形成を誘起するためである^{5),6)}。一旦核が出来ると、既にアパタイトに対して過飽和である周囲の体液からカルシウムやリン酸イオンを取り込んで結晶は成長してアパタイトの層となり表面を覆う。

以上の知見からSBF中で水酸アパタイトが形成される過程において考慮すべき因子は、(1)SBFの水酸アパタイトに対する過飽和度、ならびに(2)材料表面が水酸アパタイトの選択的な結晶核形成（不均一核形成）を誘起する能力、であると言える。SBFの水酸アパタイト(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂)に対する過飽和度を上昇させるには、その構成イオンであるCa²⁺、PO₄³⁻もしくはOH⁻を溶出する成分を用いればよい。ただし、過飽和度を大幅に上昇させると、材料表面のみの核形成だけでなく、溶液中での均一核形成を引き起こしてしまう。従ってより不均一核形成の生じやすい表面を有する基板を、均一核形成が生じない程度に過飽和度を上昇させた環境に置くことが必要となる。生体活性ガラス表面での水酸アパタイト層の形成機構によれば、シラノール(Si-OH)基が材料表面での水酸アパタイトの不均一核形成の誘起に有効と言える。

3. 擬似体液（SBF）中で水酸アパタイトを形成する有機-無機ハイブリッド

上述の機構に基づけば、SBF 中で水酸アパタイトを形成させるためには、 Ca^{2+} を放出する成分と Si-OH を生成する成分を有機高分子に付与すればよいと考えられる。 Si-OH 基を含有する有機物質を合成するプロセスとして、アルコキシシラン化合物の加水分解と縮重合を利用するゾル-ゲル法が知られている。例えば Mackenzie らにより報告されたポリジメチルシロキサン（PDMS）とテトラエトキシシラン（TEOS）を出発原料に用いた有機修飾したケイ酸塩化合物は ORMOSILS（Organically Modified Silicates）と呼ばれ、シリカの化学的・熱的安定性と PDMS の柔軟性を持つ有機-無機ハイブリッドとして知られている⁷⁾。Osaka らは、ORMOSILS 型の有機-無機ハイブリッドが多くの Si-OH 基を含有することに着目し、PDMS と TEOS に加えて硝酸カルシウムを導入してゾル-ゲル法で無機成分と有機成分を分子レベルで複合化したハイブリッド材料を合成した⁸⁾。得られたカルシウム塩含有型 ORMOSILS は、生体活性ガラスと同じように SBF 中で表面に水酸アパタイトの層を形成する。

有機成分の導入法としてビニルトリメトキシシラン（VS; $\text{H}_2\text{C}=\text{CHSi}(\text{OCH}_3)_3$ ）や 3-メタ

クリロキシプロピルトリメトキシシラン（MPS; $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COO}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ ）を出発原料に用いる合成法も報告された^{9),10)}。ビニル基やメタクリロイル基を重合して炭素鎖を形成させた後、カルシウムを含む溶媒中でゾル-ゲル過程を経て得られた有機-無機ハイブリッドも、SBF 中で表面に水酸アパタイトを形成する。最近では、さらに有機成分を多く含む有機-無機ハイブリッドが合成されている¹¹⁾。 Si-OH 基を与えるアルコキシシランを有し有機分子中に導入可能な出発原料として MPS を用い、2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA; $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ）を主成分としたポリマーを調製する。得られた高分子溶液に CaCl_2 を添加した後、乾燥させてアパタイト形成を誘導する成分を導入したハイブリッドとする（図 3）。得られた有機-無機ハイブリッドを SBF に浸漬すると、HEMA の量が 9 割を占める MPS:HEMA=0.1:0.9（mol 比）で合成した試料であっても、7 日以内に表面がアパタイト粒子で覆われている。この種の有機-無機ハイブリッド材料は、それ自体で柔軟性と生体活性を併せ示す材料となり得るだけでなく、機械的特性の優れた有機高分子にコーティングする^{12),13)} ことや従来の高分子材料にブレンドすることで、より広範囲に応用できる可能性がある。例えば、ポリメチルメタクリレート（PMMA）系セメントに MPS と CaCl_2

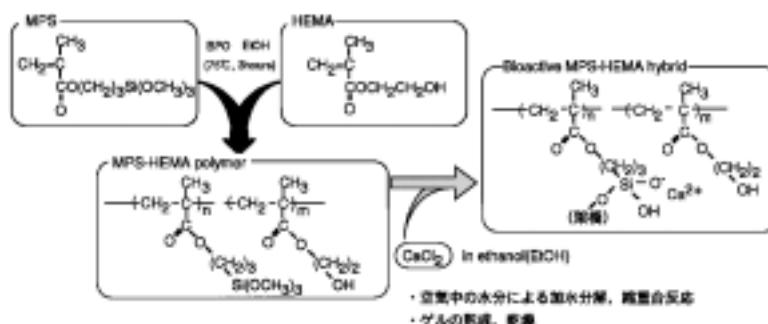


図3 メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン（MPS）と2-ヒドロキシエチルメタクリレート（HEMA）を用いた有機-無機ハイブリッドの合成。

を添加すれば、SBF 中でアパタイトを形成することも確かめられている¹⁴⁾。

4. 水酸アパタイトの核形成を誘起する官能基

SBF 中でアパタイトの不均一核形成を誘導する官能基として Si-OH 基以外の化学種の利用も進んでいる。チタニア (TiO_2) ゲル上の Ti-OH 基も SBF 中でアパタイトを形成する。特にアナターゼ構造を有するチタニア表面の Ti-OH 基はルチル構造や非晶質構造を有するチタニア表面のそれよりもアパタイトの核形成に有効であることが示されている¹⁵⁾。Si-OH や Ti-OH 基の他に水酸アパタイト層の形成を誘起し易い官能基を明らかにするため、Tana-hashi らは種々の官能基を有する自己組織化膜を金表面に形成させ、それらのアパタイト形成能を調べた¹⁶⁾。その結果カルボキシル ($-\text{COOH}$) 基も水酸アパタイトの不均一核形成を誘起する官能基として働くことが報告された。従って、 Ca^{2+} イオンを溶出すると共に表面にカルボキシル基が生成する有機高分子であれば、体液類似水溶液に浸漬するだけで、表面に骨類似アパタイトが析出した複合膜が得られると考えられる。この考えに基づき Miyazaki らは、ポリアミド-アパタイト系ハイブリッドの合成を目的として、カルボキシル基を含有する芳香族ポリアミドフィルムを種々の量のカルシウム塩で修飾し、そのアパタイト形成能を擬似体液の 1.5 倍のイオン濃度を有する水溶液 (1.5SBF) を用いて調べた^{17),18)}。図 4 に示す構造を有する芳香族ポリアミド (C (x)) に、カルボキシル基を $x=50$ で導入し、40 mass% 以上の CaCl_2 を添加した C (50) フィルムは、1.5SBF に 7 日間浸漬した後は、図 5 に示すように水酸アパタイトの膜で表面が被覆されていた。アパタイトの形成量は、フィルム中のカルボキシル基の量が増加するにつれて増加した。従って芳香族ポリアミドフィルム中のカル



図 4 カルボキシル基を含有する芳香族ポリアミド (C(x))。

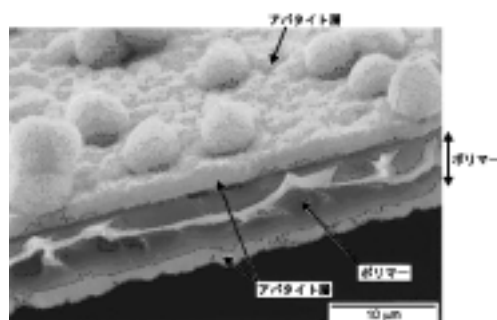


図 5 1.5SBF に 7 日間浸漬した後の 40 mass% の CaCl_2 を添加した C (50) フィルム断面の走査電子顕微鏡写真。有機高分子フィルム (ポリマー) の表面が水酸アパタイトの層 (アパタイト層) で覆われている。

ボキシル基の導入量は、材料表面での水酸アパタイトの形成を促進する重要な因子であると言える。表面に形成されたアパタイト層はスコッチ®テープを用いた剥離試験では剥がれることなく高分子フィルムに固着していた。これらの結果から、カルボキシル基を有するポリマーに塩化カルシウムを導入すれば、体液を模倣した環境下で表面に自発的に水酸アパタイトを析出する性質が得られることが明らかになった。体液環境で生成する水酸アパタイトは、微構造が骨のアパタイトに類似しているので、より高い生物学的な活性が期待される。

5. おわりに

水酸アパタイトはすでに骨補填材料として、整形外科、形成外科、口腔外科、脳神経外科などにおいて臨床の現場で重要な役割を果たしている。ただし従来の素材では、その材料が本質

的に持っている物性のために使用上の限界もある。セラミックスは骨に比べて脆く、ヤング率が高すぎる。そのため、材料自身が割れたり、骨組織に不自然な荷重を与える恐れがつきまとう。有機高分子表面に水酸アパタイトを析出させる技術は、骨結合性と種々の力学的性質を併せ示す生体活性な有機-無機ハイブリッドなどの新しい組織修復材料の設計指針を与えている。さらに、水酸アパタイトは、その生体親和性やタンパク質吸着特性を利用した生体機能材料として用いられている。体液環境下の析出反応を利用したバイオミメティックな合成法で水酸アパタイトが有機高分子の表面に被覆できれば、水酸アパタイトの持つ生物的、化学的特性を支配する材料表面が、合成過程で有機高分子により覆われることなく、その機能が最大限に活用される。しかも熱処理によって水酸アパタイトが他相に変わる恐れもなく、その利用価値の高い合成法となりうる。生体類似環境における化学反応を用いれば、水溶液の構成イオンの割合を変化させたり、種々のイオンを添加して、成長条件の異なる水酸アパタイトの膜を合成することも可能になる。これらの技術が確立されれば、時代の要請に即した環境への負荷が少ない合成プロセスにもなると期待される。

参考文献

- 1) R. J. P. Williams, in *Biomineralization*, ed. by S. Mann et al., VCH Publishers, New York, 1989, pp. 1-34.
- 2) T. Kokubo et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 331-343 (1990).
- 3) T. Kokubo et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 24, 721-734 (1990).
- 4) C. Ohtsuki et al., *J. Ceram. Soc. Japan*, 99, 1-6 (1991).
- 5) C. Ohtsuki et al., *J. Non-Cryst. Solids*, 143, 84-92 (1992).
- 6) P. Li et al., *J. Am. Ceram. Soc.*, 75, 2094-2097 (1992).
- 7) Y. Hu et al., *J. Mater. Sci.*, 27, 4415-4420 (1992).
- 8) K. Tsuru et al., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 9, 479-484 (1998).
- 9) A. Osaka et al., in *Bioceramics*, Vol. 8, ed. by J. Wilson et al., Elsevier Science Ltd., Oxford, 1995, pp. 441-445.
- 10) T. Yabuta et al., *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, 19, 745-748 (2000).
- 11) C. Ohtsuki et al., in *Bioceramics*, Vol. 13, ed. by S. Giannini et al., Trans Tech Publications Ltd., Switzerland, 2001, pp. 39-42.
- 12) Y. Aburatani et al., in *Bioceramics*, Vol. 12, ed. by H. Ohgushi et al., World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1999, pp. 457-460.
- 13) K. Tsuru et al., *J. Sol-Gel Sci. Tech.*, 13, 237-240 (1998).
- 14) C. Ohtsuki et al., *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 12, 895-899 (2001).
- 15) T. Kokubo et al., in *Mineralization in Natural and Synthetic Biomaterials*, ed. by P. Li et al., Materials Research Society, Warrendale, 2000, pp. 129-134.
- 16) M. Tanahashi et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 34, 305-315 (1997).
- 17) T. Miyazaki et al., in *Bioceramics*, Vol. 14, ed. by S. Brown et al., Trans Tech Publications Ltd., Switzerland, 2002, pp. 133-136.
- 18) Y. Akioka et al., in *Bioceramics*, Vol. 14, ed. by S. Brown et al., Trans Tech Publications Ltd., Switzerland, 2002, pp. 137-140.