

コラーゲンと無機化合物の複合化

田中 順三・菊池 正紀

無機材質研究所 ☎ 305-0044 茨城県つくば市並木 1-1

(1999 年 6 月 17 日受理)

Synthesis of Collagen and Inorganic Material Composite

Junzo TANAKA and Masanori KIKUCHI

National Institute for Research in Inorganic Materials
1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044

(Received June 17, 1999)

Can we synthesize artificial composite materials that have a similar nanostructure to bone *in vitro*? From the viewpoint of self-organization, a novel apatite/collagen nanocomposite was developed. As a result, apatite nanocrystals aligned along collagen molecules, the nanostructure quite similar to bone. The self-organization in the composite concurred at the almost same condition for bone formation. Origin of self-organization was comprehended on the basis of chemical interaction between organic functional groups and surfaces of inorganic crystals.

1. はじめに

貝は貝殻や真珠を作る。脊椎動物は身体の中で骨や歯を作る。このような無機成分を含んだ硬組織が生体内で作られるプロセスは「バイオミネラリゼーション」と呼ばれている¹⁾。このバイオミネラリゼーションは、もちろん細胞の作用によって起こる。しかし、それを細かく見ていくと、その中に工学的に利用できる技術があるように思える。例えば、生体内の化学的環境を理解し、無機結晶の表面と有機高分子の官能基の相互作用を制御することによって、新しい材料の創出が可能であると予想される。

生体硬組織の典型である骨は、無機結晶アパタイトと生体高分子コラーゲンからできている。アパタイト結晶は 50 nm、コラーゲン分子は 300 nm の大きさであり、両者はナノメートルの領域から規則正しく整列している²⁾。つまり、骨は典型的な有機・無機ナノコンポジットである。このため、アパタイトの圧縮に強い性質とコラーゲンの引っ張りに強い性質が相互に補完しあって骨は硬くてしなやかな特性を示すようになる。

骨の規則正しい構造は、身体の中では骨芽細胞という細胞の働きによって形づくられていく。仮にその規則正しい構造が細胞の力を借りずに試験管のなかで実現できるようになれば、骨と同じ性質をもった素材が人工的に合成できると期待される。そこで、バイオミネラリゼーションを材料科学、特に表面科学と化学的相互作用の視点から捉え、新しいナノコンポジット材料の開発を試みた。

2. 自己組織化の制御

2.1 細胞の局所空間：バイオミネラリゼーションに学ぶ

我々の骨は、Fig. 1 のように常に骨芽細胞によって再生され、破骨細胞によって吸収されている。そこでまず、骨芽細胞によって作られる有機/無機ナノコンポジットの合成、つまり骨の形成メカニズムについて考察した。

材料科学の立場からすると、細胞は未知なるブラックボックスで不可思議なものに映る。実際、細胞内部の情報カスケードは複雑・多様であり、さらにそれに加えて細胞の周辺にはサイトカインと呼ばれる局所的な情報伝達物質が存在していて、細胞内外の情報伝達・エネルギー伝達系は相互に入り組み、連携して動作している。し

E-mail: tanakaj@nirim.go.jp

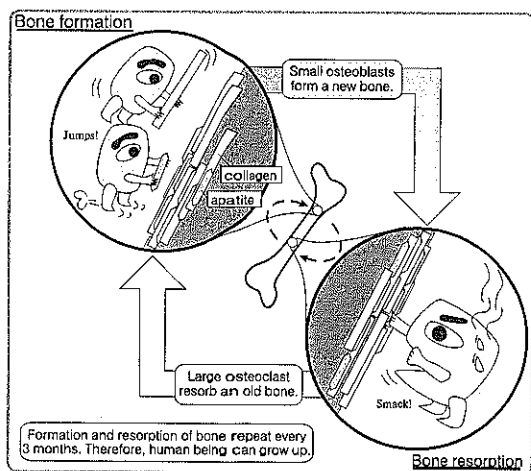


Fig. 1 Scheme of bone remodeling: roles of bone-forming cell (osteoblast) and bone-resorbing cell (osteoclast).

たがって、現状では細胞の働きを簡単な実験系で再現することはできそうにもないし、材料科学の研究領域でもないように思える。しかし、骨は細胞の外で作られる細胞外マトリックスであり、細胞の情報カスケードの最終段階として合成されるため、結論からいうと意外に材料科学の視点から理解できる。

骨が作られる時、骨芽細胞はまずコラーゲンを細胞内部で合成する。次いで、それを細胞の外に放出し、そこに有機物のスケルトンが形成される。さらに、その上にアパタイトの小さい結晶が析出してコラーゲン分子に沿って並んでいく。この細胞の周囲の局所空間で起こるプロセスは、人工的に骨を作ろうとした時に、骨芽細胞の周りの化学環境を再現すれば「コラーゲン」と「アパタイト」が自発的に並ぶ可能性を予感させる。つまり骨と同じように配列した複合材料が試験管の中で自己組織的に合成できる可能性を暗示している。

生体内の微量成分の効果を一切無視すれば、合成条件は単純に温度と pH だけに限定することができる。もちろん生体内の微量成分は骨形成の原料供給の時系列や反応速度の制御に関係しているが、自己組織化の発現には間接的な効果しか持たないと仮定しておく。さて、ほ乳類の体温は 40°C 前後であるから、自己組織化に適した条件として温度はすぐに想像できる。問題は pH である。我々の身体は pH 7.4 でほぼ中性であるが、骨芽細胞の周辺の局所空間が酸性になっているかアルカリ性になっているかは不明である。そこで、pH をいろいろ変えながらアパタイトとコラーゲンの複合化を試みた。その結果、どのような環境で自己組織化が起こるかを実験的に明らかにした。

2.2 ビーカーの中の自己組織化

骨は水溶液中で作られるから、人工的な複合化にも水溶液反応が必要とされる。そこで、セラミックスの合成でしばしば用いられる Fig. 2 のような共沈法を採用した³⁾。

図の右側のビーカーには水酸化カルシウムの懸濁液が入っている。それをチューブポンプを通して中央のビー

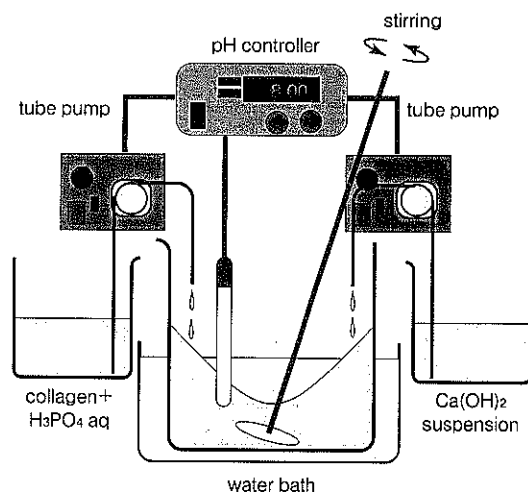


Fig. 2 Synthesis scheme of apatite/collagen composite. Calcium phosphate (apatite) was synthesized by supplying calcium ions from the right side and orthophosphoric acid from the left side. Apatite and collagen homogeneously coprecipitated when collagen was added in phosphoric acid.

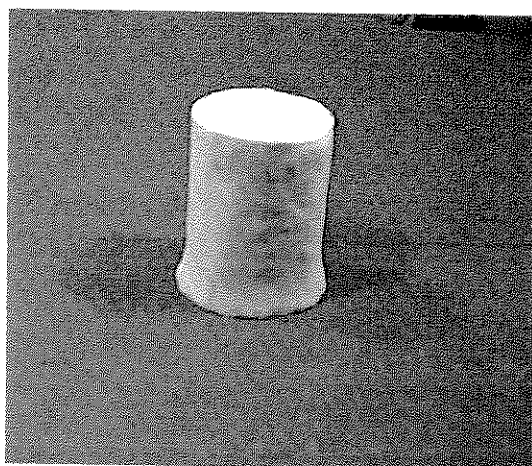


Fig. 3 The photograph of the apatite/collagen composite which consists of 80 wt % of apatite and 20 wt % of collagen. The color was white; 30 mm in diameter and 50 mm in height.

カーに少しずつ輸送する。左側のビーカーにはリン酸水溶液が入っており、同じようにそれを輸送すると、中央のビーカーで反応が起きてアパタイト $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ の微結晶が析出する。この時、リン酸水溶液に生体高分子であるコラーゲンを混ぜておくと、アパタイトとコラーゲンと一緒に析出して複合体ができる。反応条件の内、pH はチューブポンプの流量を制御して pH 7~9 の間の一定値に保持した。温度は、ウォーターバスで 25~40℃ の間の一定値に制御した。組成は、骨に近い成分「アパタイト 80 wt% + コラーゲン 20 wt%」に固定した。

共沈直後の複合体は大量の水を含んでいる。これは、コラーゲン分子とアパタイトのナノ結晶がコロイド的な性質を持っていて、多量の水和水を保持しているためで

ある。残念ながら、この水和水をとり除くために温度を上げることはできない。コラーゲンが 40℃ をこえると変性してゼラチンになるのが理由である。そこで、水和水を液相とした液相焼結の手法を使って、200 MPa で 15 時間、等方圧をかけ歪みの少ない成形体を作製した。Fig. 3 に得られた成型体を示す。

この複合体を透過型電子顕微鏡で観察すると、Fig. 4 のように小さなアパタイト結晶が方位を揃えて並ぶという特異な微構造が観測される⁹⁾。アパタイトの結晶はおよそ 50 nm の黒い小さな粒として観察され、注意してみると、その小さなアパタイト結晶は左上から右下に向かって方位を揃えて並んでいるように見える。アパタイト結晶の整列の様子は、Fig. 4 右上の電子線回折パターンからさらにはっきりする。つまり、回折パターンの外

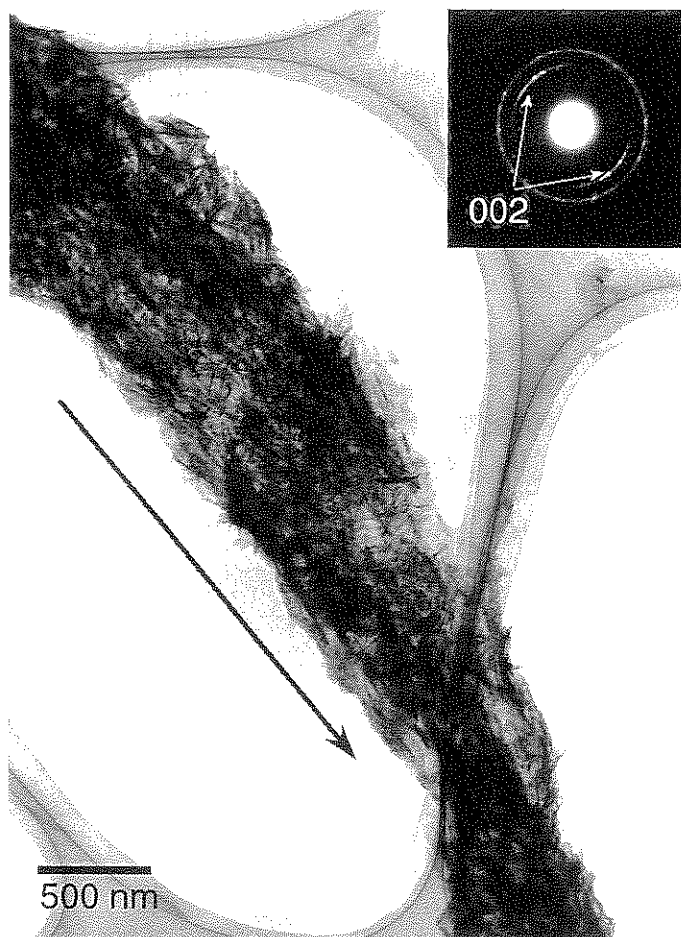


Fig. 4 The transmission electron microscopic image of an apatite/collagen composite. Apatite nanocrystals of 50 nm in size were aligned along collagen molecules of 300 nm in length. This nanostructure was quite similar to bone.

側の回折線は丸くつながったリングになっているが、内側の回折線はリングの一部が切れて三日月型になっている。この三日月型のパターンが意味するところは、結晶のある特定の方位が左上から右下に向かって並んでいるということである。三日月型の回折線はアパタイトの(002)に帰属される。つまり、アパタイト結晶の c 軸が矢印の方向に並んでいる。このアパタイト結晶の配向は、コラーゲンが存在しないと起こらず、コラーゲンが存在した時にのみアパタイト結晶は自己組織化的に配向する。Fig. 5に自己組織化の様子を模式的に示した。

さらに詳しく電子顕微鏡で観察すると、自発的に整列した集団がさらに高次の集団を形成して繊維を作っていることがわかる。合成条件によっては、その繊維の長さは20 μm 以上に達する。繊維の中では少なくともコラーゲン分子が数百個、アパタイト結晶が数千個以上並んでいると予想される。アパタイト結晶は骨の中でも c 軸

をコラーゲンの分子軸に平行に並んでいる。したがって、共沈法で合成した複合体は骨に極めて近い微構造を持っている。

2.3 自己組織化の条件

電子顕微鏡で繊維の長さや三日月の広がりを丹念に調べていくと、合成条件と自己組織化の関係が明らかになる。Table 1にその結果を示す⁹⁾。この表から、試験管の中の自己組織化は、温度40 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 8-9で最も長い距離

Table 1 Relations between self-organization and synthesis conditions of HAp/Col composites.

$t/^{\circ}\text{C}$ \ pH	7	8	9
40	Δ	$\odot$	$\circ$
35	Δ	$\circ$	$\circ$
30	$\times$	$\circ$	$\circ$

($\odot$: Apatite nanocrystals showed long-range orientation.)

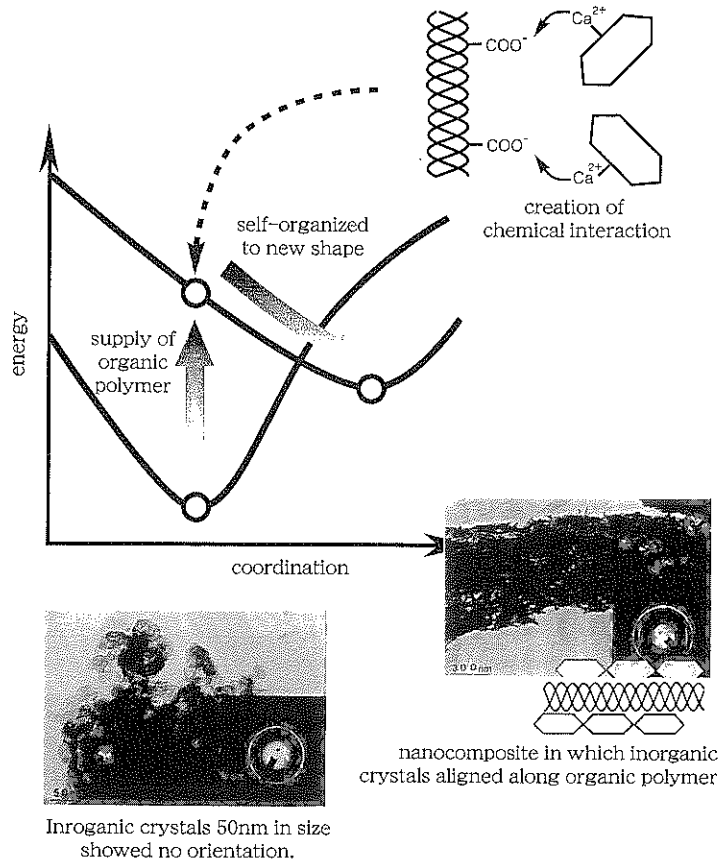


Fig. 5 Scheme of self-organization. Apatite nanocrystals are orientated by a self-organization process together with collagen, whereas they do not organize without collagen. Reaction coordination has only qualitative meaning.

にわたって、しかも整合性良く起こることがわかる。自己組織化の有無は材料の機械的強度に強く反映する。

複合体の機械的性質を測定した結果、温度 40°C, pH 8-9 で合成した試料が最も高い特性を示した。その3点曲げ強度は 50 MPa, ヤング率は 3 GPa であった。つまり、1 cm² に 500 kg の重さをかけたときに壊れる強度をもっている。典型的な骨の3点曲げ強度が 100 MPa, ヤング率が 10 GPa であるから、自己組織化した複合体の機械的強度は骨のほぼ半分の強度である。それでは、自己組織化していない複合体の強度はいくらかといえは 5-20 MPa と小さい。したがって、アパタイトとコラーゲンの複合体は自己組織化することによって強度が 2~5 倍以上大きくなり、骨の強度に近づいたことになる。以上のことから、骨が強いのはコラーゲンとアパタイトが数十ナノメートルの微細領域からきれいに配向しているためと考えられる。

硬い骨をもつ哺乳類や鳥類の体温は 30-40°C で、pH は pH 7.4 である。しかし、Table 1 の結果から、材料科学的には、骨が形成されるとき体内の局所空間はアルカリ性の pH 8~pH 9 になっていると予想される。骨を吸収する破骨細胞は、細胞と骨の間にハウシップ吸収窩と呼ばれる局所空間を作り、そこを酸性 (pH 5 前後) に制御している。それに対して、骨芽細胞は周囲の化学環境をアルカリ性に制御していると予想され、破骨細胞と骨芽細胞は化学的にも対をなしていると考えられる。

「温度 40°C/pH 8-9」の材料科学的な意味は、以下の3点である。つまり、①コラーゲンは温度 40°C でコロイド的な性質を変え水和水を放出する、②コラーゲンの等電点は pH 8-9 でありそこで整列しやすい、③アパタイトは pH 8-9 で安定して生成する、の3点である。この条件の総和が Table 1 の試験管のなかで自己組織化がおきる条件に一致している。

細胞がいったいどうして材料科学的に妥当な自己組織化の条件を探り当てたのか考えれば考えるほど不思議であるが、結果として骨芽細胞は周囲の局所空間をアパタイトとコラーゲンが自己組織化を起こしやすい環境に制御しているように思える。以上のことから、骨で観測される結晶・分子配向は、もともとアパタイトとコラーゲンが自己組織化的に並ぶという素材自身の性質に起因していて、骨芽細胞の基本的な働きは骨の素材 (Ca²⁺, HPO₄²⁻, collagen) を供給する役割と骨がでやすい化学環境 (pH 8-9) を整備する役割の2つであると考えられる。

2.4 アパタイトとコラーゲンの化学結合

自己組織化の機構について有機/無機相互作用を中心に考察した。

コラーゲンは3個のタンパク分子が水素結合によって3重らせん構造を形成している。それぞれのタンパク分子のアミノ酸残基はおおよそ 1,000 個であり、そのおおよそ 15-20% が側鎖にカルボキシル基 (-COOH) やアミノ基 (-NH₂) を持っていて、それが3重らせんの外側を向いている。一方、アパタイト結晶の表面にはカルシウム (Ca²⁺) やリン酸イオン (PO₄³⁻) が存在している。それがコラーゲンの官能基と COO⁻ 対 Ca²⁺, あるいは NH₃⁺ 対 PO₄³⁻ のような静電的な相互作用をすれば、両者は結合して自己組織化を引き起こすと期待される。

そこで、有機官能基と無機結晶の相互作用をフーリエ変換赤外スペクトル (反射スペクトル) で測定した⁹⁾。その結果、コラーゲン単体ではカルボキシル基-COO⁻ の非対称伸縮振動が 1340 cm⁻¹ に観測され、複合体になるとそれが約 5 cm⁻¹ ほど低波数側にシフトした。この -COO⁻ の振動数の red shift は、等価な 2 つの 1.5 重結合 (C=O 結合) が複合化すると弱くなることを意味しており、コラーゲンの -COO⁻ がアパタイト表面の Ca²⁺ と化学結合を作ったことを示唆している。

分子軌道計算の一種である DV-X α 法を用いて -COO⁻ と Ca²⁺ イオン間の化学結合を評価した。単純化のために、官能基イオンとして酢酸 CH₃COO⁻ を用いた。つまり Fig. 6 下の右半分を簡略化したモデルに相当する。

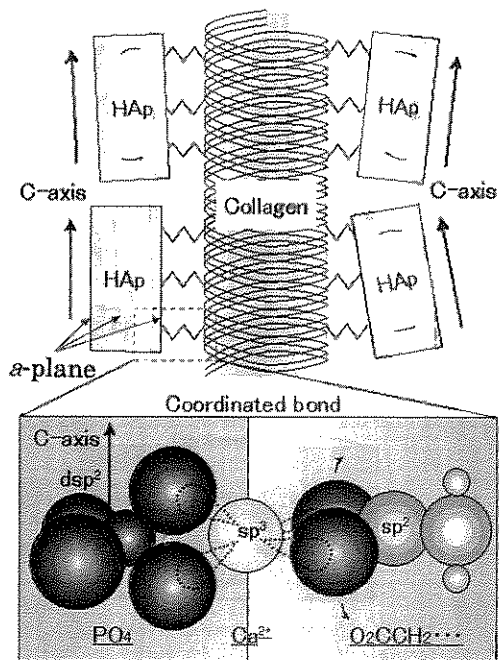


Fig. 6 A mechanism supposed for self-organization. Apatite crystals are assumed to bond with carboxyl group through calcium ion on the surface of apatite crystals.

Ca^{2+} イオンを遠くから $-\text{COO}^-$ に近づけて $\text{Ca}-\text{O}$ 間の化学結合の変化を計算すると、ボンドオーダーは0.3~0.4 nmの距離でピークを示し、 $-\text{COO}^- \cdots \text{Ca}^{2+}$ 間に共有結合が形成された。これはカルボキシル基の $\text{C}=\text{O}$ 間にあった電子が $\text{Ca}-\text{O}$ 間に移動することに対応している。 $-\text{COO}^- \cdots \text{Ca}^{2+}$ 間の距離はアパタイト単結晶の上に作製したラングミュア・ブロッジェット膜（アラキジン酸）について原子間力顕微鏡から評価された $-\text{COO}^- \cdots \text{Ca}^{2+}$ 間の距離0.3~0.4 nmにほぼ一致している⁶⁾。

Fig. 6 上はコラーゲン分子（300 nm）の周囲にアパタイト結晶（50 nm）が並んだ様子を定性的に示している。側差はカルボキシル基を意味している。その界面の原子配置を拡大して示すと、Fig. 6 下のようなになる。アパタイト結晶は a 面が発達し、その表面には、図のような配置をとるリン酸イオンが存在する。つまり、結晶の表面側に位置するリン酸イオンの半分は2つの酸素が上下（ c 軸にほぼ平行）に配置している。一方、コラーゲンの官能基はアルキルチェーンを介して主鎖に結合しているため回転することができる。さて、中心にあるカルシウムイオンに着目すると、このイオンには空の4s, 4p軌道が存在し、4配位の錯塩を形成することができる。配位結合が形成されると、カルボキシル基はFig. 6 下のような配置を取ると予想される。Fig. 6 上の図のようにコラーゲンにはカルボキシル基が多数存在するから、結果としてアパタイト結晶の c 軸はコラーゲン分子の軸方向に沿って並ぶことになる。

以上のような自己組織化のメカニズムは、核形成と結晶成長の問題が絡み、実際にはそう単純ではないかもしれない。今後、モデル実験を含め、有機・無機表面の化学的相互作用の視点から自己組織化の機構を解明していく必要がある。

3. 複合体の生体内の挙動

さて前述のように、生体内では古い骨が吸収され、新しい骨が再生されるリモデリングが起きている（Fig. 1）。このリモデリングがあるため、子供は成長することができ、軽い骨折も自然に治癒することができる。しかし、現在使われている人工骨は金属・セラミックスのようにもともと生体内に存在しない素材であるため、リモデリングのサイクルに取り込まれないでいつまでも身体の内に残存する。

それでは、骨に似た組成・微構造と機械的強度を持っているアパタイト/コラーゲン複合体は生体内でどのような挙動を示すだろうか。

複合体をラットの頭蓋骨に移植した⁴⁾。手術後、2週間間で材料の周りに骨を作る骨芽細胞（Fig. 7）が誘導さ

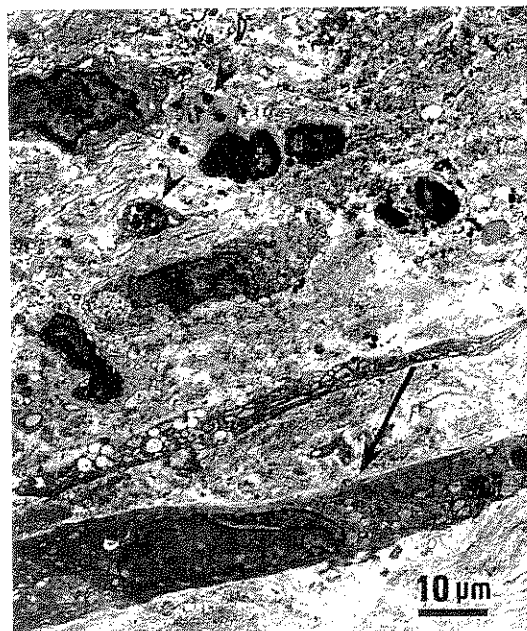


Fig. 7 The transmission electron microscopic image of rat's cranium tissue near an apatite/collagen composite. The composite is just below the photograph. An arrow shows osteoblast induced near the composite and arrowheads phagocytes. Osteoclasts are also observed near the composite.

れ、同時に複合体を吸収する破骨細胞が近くに現れた。また、犬の橈骨に円筒状の複合体を埋入したところ、手術後8週間で破骨細胞が複合体を消化吸収し始め、骨芽細胞が新生骨を再生する様子が観察された⁷⁾。特に破骨細胞が人工材料の周囲に誘導され人工材料を吸収するのは極めて珍しい現象で、この複合体でほぼ初めて観測された。

現在、複雑骨折や骨肉腫などの怪我・病気で大きな骨欠損ができた場合、本人の腰の骨をとって移植する「自家骨移植」が行われている。その場合にも、破骨細胞が自家骨を吸収し、その横に骨芽細胞が新しい骨を作っていく。したがって、アパタイト/コラーゲン複合体は骨に似た組成と微構造を持っているため、生体組織がそれを骨と認識し自家骨と同じような骨形成を開始したと考えられる。このことは、人工材料を合成するときに生体がもともと持っている構造に類似した材料が重要であり、生体内の自己組織化現象を工学的に利用することの大切さを意味している。将来、本複合体は自家骨移植の代替りの材料として医学応用されることが期待される。

4. ま と め

以上のように、細胞の働きに学び、骨に極めて類似した組成と構造をもつ複合体の合成を試みた。そして、身体の中で起こる自己組織化機構を試験管のなかで再現でき、条件を工学的に制御することによって新しい人工骨素材を得た。電子顕微鏡観察や赤外分光測定の結果から、生体高分子のコラーゲンとアパタイト結晶が配向していること、その理由として有機官能基と無機イオンの間の配位結合が関与していることを示唆した。

現在、我が国は人類史上どの国も経験したことのないスピードで高齢化が進展している。その結果、2020年には4人に1人が65歳を越えるといわれている。そのような超高齢社会では、福祉・医療にかかる経費は膨大になり社会・経済活動に影響を与えるため、家族を含めた患者のQuality of Lifeを高めることが活力ある社会の維持に直接つながると考えられている。一方、近年、生体材料の分野では新しい研究が芽生えようとしている。それは、「生物・細胞がもっている生命力を最大限に活かす」という考え方に基づいていて、従来の「人工材料の機能・特性」に頼った材料至上主義ではなく、生体と共存し組織の治癒力を高める研究といえる。しかし、そ

れに有効な材料がないのも現実であり、21世紀には、材料科学の基礎の視点に立って新しい生体材料を開発していくことが必要な時代といえる。

文 献

- 1) "Geomicrobiology: Interactions between Microbes and Minerals", Reviews in Mineralogy vol. 35, ed. by P.H. Ribbe (Mineral. Soc. Amer., Washington, D.C., 1997).
- 2) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: "骨の科学" (医歯薬出版, 1985).
- 3) 菊池正紀, 末次 寧, 田中順三, 萬代佳宣, 中谷伸一: 顎顔面バイオメカニクス学会誌 4, 42 (1998).
- 4) M. Kikuchi, K. Sato, Y. Suetsugu, J. Tanaka, Y. Manndai, S. Nakatani: Proc. 15th Korean-Japan International Ceram. Seminar (1998) p. 62.
- 5) 菊池正紀, 末次 寧, 田中順三, 平岡陽介, 萬代佳宣, 中谷伸一: 第8回インテリジェント材料シンポジウム (1999).
- 6) S. Ina, H. Monma, K. Sato, Y. Suetsugu, J. Tanaka: Trans. Mater. Res. Soc. Japan (1998) in print.
- 7) S. Itoh, T. Kawauchi, K. Shinomiya, T. Koyama, Y. Matsumoto, K. Takakuda, M. Kikuchi, J. Tanaka: J. Bone Jt. Surg. Br. Vol. submitted.