

【目的】 骨アパタイト結晶の前駆物質と見做されているリン酸八カルシウム (octacalcium phosphate、OCP : $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) は、高い骨伝導性を示すことから骨欠損の治療が必要とされる医療分野で人工合成の骨補填材としての使用が期待されている材料である。OCP は、生体内で血清由来タンパク質に高い親和性を示すことから、特定の化学環境下で骨の形成に関わるタンパク質の集積を促進して、材料を活性化できるかどうかを調べることを目的として、モデルタンパク質を用いてその親和性を検討した。そのために、モデルタンパク質、カルシウムおよびリン酸のイオンを含む水溶液の過飽和度を調節して、酸性および塩基性のモデルタンパク質の吸着および徐放の特性を調べた。

【方法】 α -ラクトアルブミン (α -lactalbumin、等電点 4.8) およびシトクロム c (cytochrome c : cytC、等電点 9.6) を吸着質とした。異なる濃度のカルシウムイオン (Ca^{2+}) および無機リン酸 (inorganic phosphate、以下 Pi) のイオンを含み、OCP に関して飽和あるいは過飽和な組成を持つ pH7.4 のトリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris) - HCl 緩衝液にこれらのタンパク質を溶解した。過飽和度は溶液上清を分析して、それらのイオン活動度積 (IP) を溶解度積 (Ksp) で除することで算出した。OCP を湿式合成で調製して 53 μm 径に整粒した OCP を吸着媒とした。OCP を cytC あるいは α -lactalbumin を含む緩衝液に浸漬し、吸着平衡後に OCP を回収して凍結乾燥した後、OCP 上に吸着した状態のタンパク質をラマン分光法で同定した。

【結果】 ラマン分光の分析から、OCP のリン酸基由来の振動や変角のモードが 400~600 cm^{-1} および 1,000 cm^{-1} 前後に検出されるが、ラマンシフトが 1,300~1,700 cm^{-1} の範囲に cytC もしくは α -lactalbumin に固有の振動モードが検出され、塩基性タンパク質 cytC および酸性タンパク質 α -lactalbumin が過飽和環境により吸着が促進されていると考えられた。タンパク質上清の分析から算出した吸着量の解析では、タンパク質の平衡濃度により吸着促進が生じることがわかった。この結果は先に報告した血清アルブミンの過飽和環境による吸着促進 (Hamai R et al. Materials 12, 2019) を支持する結果となった。次に、cytC の OCP からの徐放挙動を分析した。過飽和環境下で cytC を吸着させた OCP を 37°C のリン酸緩衝液 (PBS) に浸漬した後、上清を回収し、cytC 濃度を測定することで OCP から放出された cytC の積算量を算出した。過飽和環境下で吸着した cytC は、浸漬初期に急激な放出は生じず緩やかに PBS 中に放出される傾向にあった。本研究と同様の条件で血清アルブミンを用いて検討した過飽和環境下では OCP 上に新たな微細な結晶が添加的に形成されることで吸着が促進されることが示唆されている。今後は、本研究で得られたモデルタンパク質の吸着と徐放のメカニズムを生体由来タンパク質に適用し、OCP 骨補填材の活性化の可能性およびそのメカニズムについて生体材料学の観点で明らかにする。

Cytochrome c および α -lactalbumin が吸着した OCP のラマン分光スペクトル

