

針状ヒドロキシアパタイトの特徴と応用

高機能材料研究所 第五研究グループ 高木 修

ヒドロキシアパタイト（以下HApと略す）は、特にタンパク質等の生体高分子の分離に有用なことで知られていたが、合成方法を研究する者と、それをを用いる者が別々であった為、これまで十分な応用研究がなされなかった。また、従来、HApは板状結晶であった為、カラム充填剤として用いた場合、流速が低下するなどの現象が認められ、使い難い材料であった。この問題に関して岩村ら¹⁾は、HApを湿式合成する際に、反応温度を調整することによって、大粒子のカラム通液性の高いHApが生成することを発見した。

今回、筆者等は、この大粒子のHApを加熱処理した場合のタンパク質吸着挙動の変化や、HApを用いたカラムクロマト分離の際の溶液のpH変化に対するタンパク質溶出パターンの変化などについて検討を行い、本HApの特性について考察を行った。

その結果、大粒子のHApの形状は、従来のHApの板状結晶に対して、針状の凝集体になっており、表面電位及び、タンパク質の分離吸着挙動でも、従来品との差が有ることが分かった。即ち、結晶学的にa面が多いと思われる針状結晶は、主に正に帯電していると思われる酸性タンパク質のBSAをより多く吸着することがわかった。また、HApを加熱すると、部分的な炭酸化が起こり、タンパク質吸着性能が変化する現象も認められた。加熱処理温度が高くなると、BSAの吸着量は更に減少していった。

この大粒子HApをカラムに充填し、反応基質の吸着剤として用いる、新規な固相合成（反応）法について検討を行った。その結果、HApを固相として、IgGの酵素標識化、蛍光標識化等の反応に用いることに成功した。また吸着させたIgGをペプシンで分解させて、F(ab')₂を得ることも出来た。

以上から、HApを固相として、様々な固相反応が行える可能性が見出せた。

1 緒言

磷酸カルシウム的一种であるヒドロキシアパタイト（Hydroxyl Apatite:以下HAp）は、蛋白質を分離精製する吸着クロマトグラフィー担体として研究されてきた²⁾。

クロマトグラフィー担体としてHApを用いると、他の分離モードでは説明できない特異的な分離パターンを示すので、今まで分離できなかった有用物質を分離する事の出来る有用な分離剤の一つと考えられてきた。

しかし実際には、従来のHApは板状結晶の為、カラム充填した場合に、通液方向と垂直に配向してしまい、目詰まりする（流れない）という欠点がある。そこでHApは、特徴はあるが使い難い分離剤、言わば「他の分離剤で分離できない場合の最終手段」として広く知られるようになってしまった。岩村ら¹⁾は、この欠点を改良する検討を行い、大粒径HApの合成法を見出した。

本報告では、このHApの特徴と分離モード、更に、新規用途である固相合成法について検討した結果を述べる。

2 実験

2.1 原材料

塩化カルシウム2水塩、リン酸水素二ナトリウム・12水塩、

リン酸二水素一ナトリウム2水塩、水酸化カリウムはキシダ化学(株)製、試薬特級を用いた。

生成したHApを洗浄する為に、0.5M - リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.8：以下PBSと略す。またPBSの濃度を図表中に示す場合には、PB conc.と略した。Mはモル濃度：mol/lを表す）を調製した。

2.2 HApの合成

岩村等の方法に従って、大粒径HApを合成した¹⁾。

(1) モネタイトの生成

1段目の反応として、0.5M - 塩化カルシウム水溶液と0.5M - リン酸二ナトリウム水溶液からモネタイトを生成させる。反応式は、



反応条件は、以下のようである。

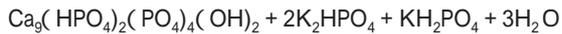
反応温度：95～100℃。マントルヒーター使用。
フラスコ：ガラス製3L4つ口フラスコ。冷却管付き。
滴下条件：1L/4hrs.同時滴下。ローラーポンプ使用。
攪拌速度：100rpm.

(2) 熟成

攪拌速度、反応温度を保持し、30分熟成。

(3) HAp化 (アルカリ添加による脱リン)

1M - 水酸化カリウム水溶液を添加するとモネタイトは以下の反応をする。



反応条件は、以下のようである。

反応温度：95 ~ 100 。

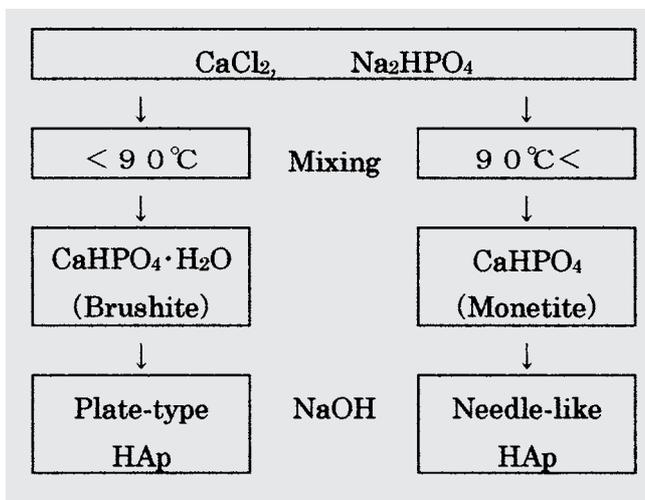
滴下条件：0.6L/hrs.KOH滴下。ローラーポンプ使用。

攪拌条件：100rpm。

(4) 洗浄

デカンテーションにより上澄みを廃棄してから、リン酸ナトリウム緩衝液により吸着タンパク質を除去し、更に純水による洗浄を実施した。

以上の合成法 (以下、岩村法) と従来の板状HApの合成方法との比較をScheme 1に示した。尚、岩村等によれば、反応温度を45 にしても大粒子HApが得られるとあるが、筆者は得ることが出来なかった。



Scheme.1 Synthetic method of HAp

2.3 形状観察

走査型電子顕微鏡 (日本電子(株)製：以下SEM) を用い、観察を行った。

2.4 タンパク質吸着量の測定

BSA (和光純薬製牛血清アルブミンFractionV.) 及び塩化リゾチーム (和光純薬製from eggwhite) を用いて、下記の2方法でタンパク質吸着量を測定した。タンパク質濃度は、プロテインアッセイ法 (バイオラッド製：タンパク質濃度測定キット) により測定した。

(1) フロー法

装置：東ソー(株)製CCPMポンプ

カラム：1cm ガラス製カラム (バイオラッド製)

流速：1ml/分

吸着量測定手順

タンパク質を10mM-リン酸緩衝液 (pH6.8、以下10mM - PBSと略す) に、1mg/ml濃度となるように溶解した。

HAp2gをカラム充填し、10mM - PBS (pH6.8) で平衡化させた。

カラム出口の溶出液を光学密度OD280nmでモニターし、タンパク質が破過 (飽和吸着) するまで、タンパク質溶液をカラムに連続通液した。

10mM-PBS (pH6.8) でカラムを十分洗浄し、未吸着タンパク質を除去した。

300mM-PBS (pH6.8) を通液し、HApに吸着したタンパク質を溶出させた。

溶出液中のタンパク質濃度と溶液量から、HApに対するタンパク質吸着量を算出した。

(2) バッチ法

試験管：10ml-ポリチューブ (蓋付き)

吸着量測定手順

所定のpHの10mM - PBSにタンパク質を溶解させ、10mg/mlにした。

試験管にHAp 1gとタンパク質溶液 5mlを封入した。

室温で2時間振とうした。

メンブレンフィルターで濾過した。

濾液のタンパク質濃度を測定し、吸着量を算出した。

2.5 タンパク質溶出パターンの測定

BSA、塩化リゾチーム、及びチトクロームC (和光純薬製) を吸着させたHAp充填カラムからの、タンパク質溶出パターンを以下の条件で測定した。

装置：東ソー製CCPMポンプ

溶出液：リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)

溶出法：10 ~ 300mM - PBSによるリニアグラジエント法

検出：OD280nm

2.6 表面電位の測定

電位計 (MALVERN製ゼータマスター) を用い、表面電位を測定した。測定液のpHは、0.1M - 硝酸、水酸化カリウム系溶液で調整した。

2.7 試料の加熱処理

試料の加熱は、200 までを送風乾燥器 (ヤマト製DN61) で、200 以上については、カンタル炉 (ヤマト製FP31) で24時間処理した。

2.8 化学組成分析

化学組成分析は、高周波プラズマ分光分析液 ICP で測定した。

2.9 通液性能の測定

直径1cmのガラス製カラムにHApを充填し、ヘッドボリュームを一定にして通液速度を測定した。

2.10 細孔分布測定

島津 - マイクロメリティックスポアサイザ9310形で水銀圧入法により細孔分布を測定した。

2.11 IR測定

フーリエ変換赤外分光法により官能基の変化を測定した。

3 結果と考察

3.1 結晶外観

SEM写真をPhoto 1 (従来法) 及びPhoto 2 (岩村法) に示した。岩村法によるHApが針状結晶凝集体であることが判った (以下針状HApまたはneedle-like HAp)。

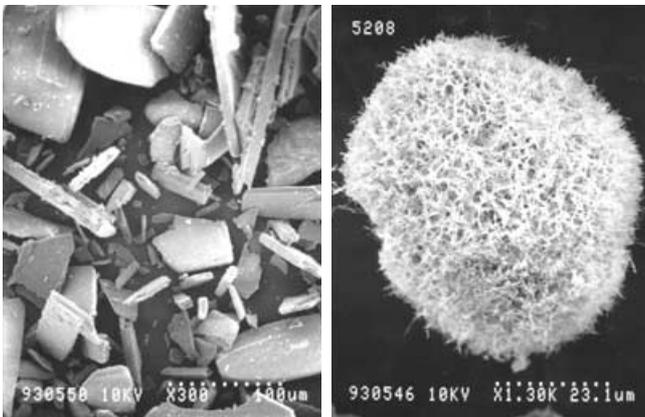


Photo.1 Plate-type HAp

Photo.2 Needle-like HAp

3.2 タンパク質吸着量と溶出パターンの比較

バッチ法によるタンパク質吸着試験結果をTable 1に示した。また各タンパク質の特徴をTable 2に示した。針状HApは、板状HApに比較して、酸性タンパク質のBSA吸着量が多く、塩基性タンパク質の塩化リゾチーム吸着量が少ないことが判る。更にHApにおけるタンパク質の溶出クロマトグラムをFig.1に示した。BSA溶出時のリン酸濃度を比較すると、針状HApからのリン酸濃度の方が高いことより、針状HApの方がBSAをより強く吸着していると考えられる³⁾。

Table.1 Adsorption capacity of HAp

HAp	Lysozyme-chloride	BSA
Needle-like	13.0	23.5
Plate-type	46.2	19.4

Table.2 Tested-protein

Table 2. Tested-protein		
protein	M.W.	p.I.
BSA	65000	4.8

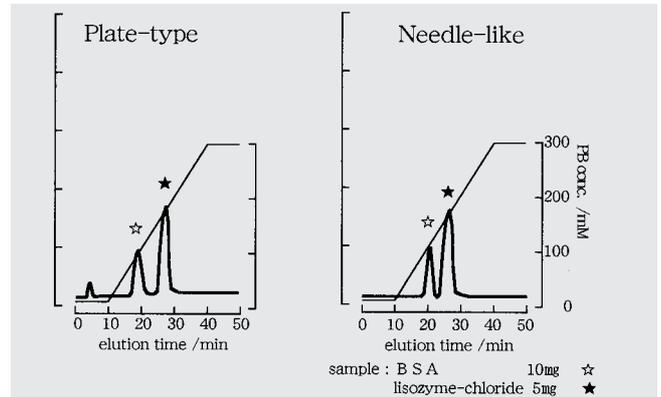


Fig.1 Difference of protein elution pattern

flow-rate : $4\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$
 column size : $\phi 15\text{mm vol.} 7\text{ml}$
 method : linear gradient
 starting buffer solution : 10mM-Potassium phosphate buffer (pH6.8)
 end buffer solution : 300mM-Potassium phosphate buffer (pH6.8)

3.3 pHの影響

pHを変化させた場合の電位をFig.2-1に示した。またタンパク質吸着量の変化をFig.2-2に示した。更に、タンパク質溶出時のリン酸緩衝液の濃度をFig.3に示した。

pHを酸性側からアルカリ性側へ変化させた時の電位は、針状HApと板状HApで大きく異なる。タンパク質吸着量の変化、溶出時のリン酸緩衝液濃度の変化及びタンパク質の特性から、タンパク質は針状HApにも電気親的に吸着している為であると考えられる。

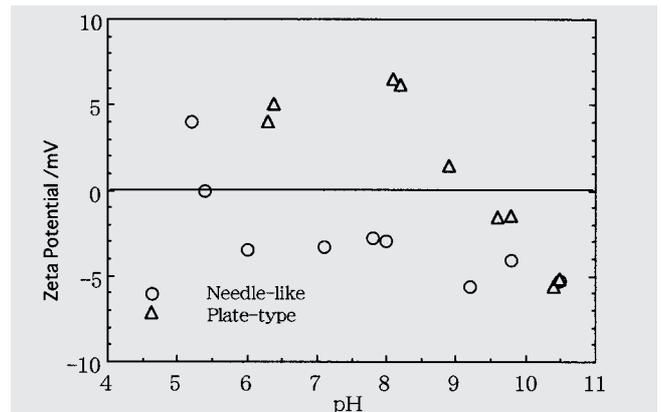


Fig.2-1 Effect of pH on zeta potential

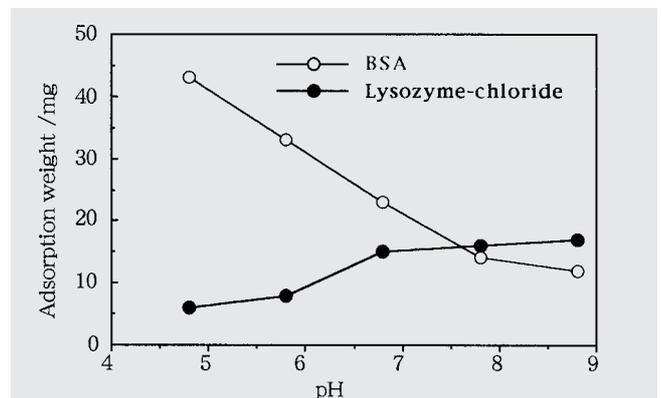


Fig.2-2 Effect of pH on protein adsorption

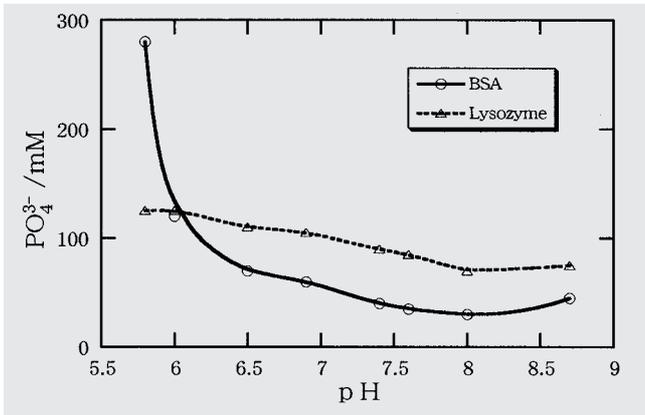


Fig.3 Release of phosphate from HAp

板状HApは、板の頂面をc面、側面をa面とした六方晶と呼ばれる構造をしている⁴⁾。結晶の表面は、Fig.4の様に考えられる。a面では、Fig.4(右下)に見られるように2通りの面が考えられるが、結晶表面には、面密度の高い面が表われ易いと仮定するならば、左側の面が表われ易い。この面では、カルシウム原子4個に対してリン酸基が2個存在する。一方、c面では、4通り考えられ(Fig.4左側) 1番目と3番目の面が表われ易い。この面では、カルシウム原子3個に対してリン酸基が3個表われる。この、カルシウムとリン酸基の比の差から、a面は主に正に帯電し、c面は比較的負に帯電していると考えられる。針状HApが塩化リゾチームに比較して、BSAを多く且つ強く吸着することから、c面よりa面の表面積に占める割合が高いと考えられる。よって針状結晶の側面はa面と考えられる。

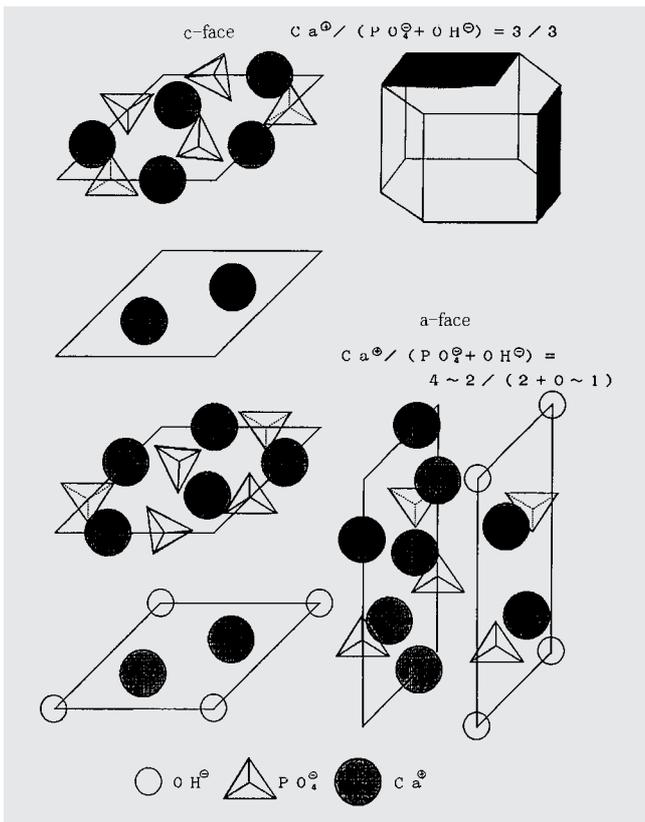


Fig.4 Plane structure of HAp and charge balance

3.4 加熱の影響

加熱処理したHApによるカルシウムとリン酸のモル比をTable 3に示した。700 までの加熱では、カルシウムとリンのモル比に変化はみとめられない。

Table.3 Ca/PO₄ of heat-treated HAp

Temp.	Ca wt%	PO ₄ wt%	Ca/PO ₄ mole-ratio
60°C	35.8	54.6	1.55
200°C	36.3	55.4	1.55
400°C	36.7	56.6	1.54
700°C	37.0	56.7	1.55

また、一般に、HApの化学量論比は、Ca/PO₄=1.67であり、下記のように示され、天然の鉱物や乾式合成⁵⁾したHApで多く見られる。



湿式法で合成したHApは、一般に非化学量論的組成⁶⁾であると言われており、以下の様に考えられている(例外もある⁷⁾)



針状HApの化学組成は化学組成分析結果よりX=9,Y=2とした。厳密には、水酸基またはリン酸基の位置に炭酸基が配置されていることも考えられる⁸⁾。

加熱処理した針状HApの加熱時のIRをFig.5に示した。3500cm⁻¹付近に見られる水酸基の吸収は、自由水のブロードな吸収の為、定量的なところまで議論はできない。しかし傾向として、100~220 加熱処理では、水酸基(631,3573cm⁻¹)による吸収が増加し、700 まで加熱すると水酸基の量は減少した。

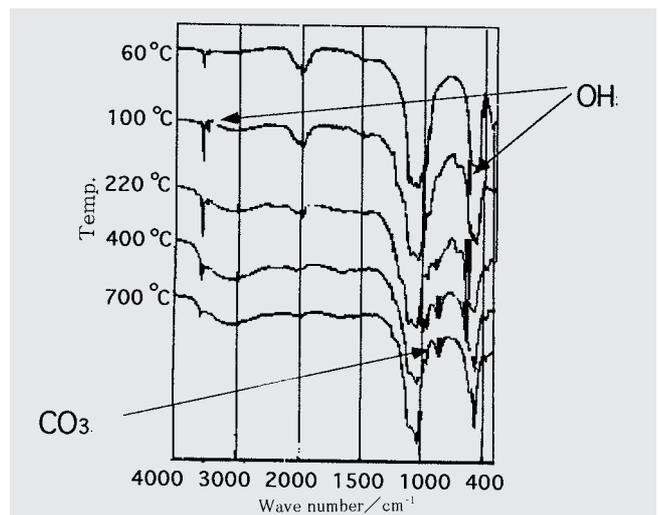


Fig.5 IR spectra(thermal change)

非化学量論的なHApの熱安定性に関して、従来の湿式法HApでは、以下のような現象が起こると考えられている。⁹⁾

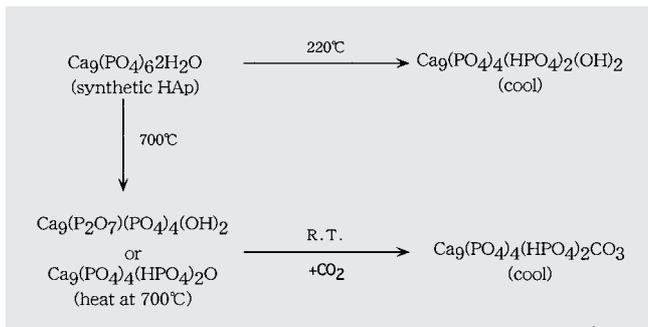
吸着水の脱着 (200 以下)

格子中の水分子の揮発 (200 付近)

HPO₄²⁻ · 1/2H₂O () (250~600)

P₂O₇⁴⁻ + 2OH⁻ → 2PO₄³⁻ + H₂O (700~800)

炭酸基のピーク (870,710 cm^{-1}) は、220 以上で大きくなるのが認められた。これに関しては、Scheme 2のように考えている。即ち、100~220 の加熱処理では、結晶化が促進し、水酸基が明確になる。更に220~700 の加熱処理では、水酸基からの脱水が生じてオキシアパタイトの生成と結晶欠陥が発生し、冷却時に不安定な欠陥部分に空気中の炭酸ガスが吸着して炭酸化アパタイトが生成する。



Scheme.2 Thermal change of HAp⁹⁾

加熱処理したHApのタンパク質吸着量を、Table 4に、溶出パターンの変化をFig.6に示した。

まず最初に酸性タンパク質の代表であるBSAについて考える。溶出時のリン酸緩衝液濃度が高いほど、タンパク質の吸着力が大きいと考える。加熱温度が高くなるにつれて、BSA吸着量は減少し、吸着力も低下した。

一方、塩基性タンパク質の代表である塩化リゾチームでは、処理温度が高くなるにつれ、吸着量は僅かに増加していき、吸着力も殆ど変化しない傾向にある。

このことは、加熱によりBSAの吸着できるサイト数が減少し、塩化リゾチームの吸着サイト数は変化しなかったと考えられた。

粉末X線回折法により得られた回折パターンから、格子定数を求め、Fig.7に示す。a軸は処理温度が上がるにつれ短くなり、c軸は殆ど変化しないと考える。尚、700 加熱品は、三リン酸カルシウムが生成している為、HApは約半分になっていた(粉末X線の定量分析より)。

a軸が短くなるということは、c面の面積が減少するのと同じである。即ち、塩基性タンパク質が優先的に吸着する面積が減少するということである。これは、加熱処理したHApの吸着挙動の変化と矛盾している。加熱処理したHApとタンパク質吸着量の関係に付いては次のように考える。

- ・c面に対する吸着は、a面に比較して無視できる程度であり、僅かに収縮した程度では塩基性タンパク質の吸着量に対しても影響が少ない。
- ・加熱により水酸基が抜け、冷却時に炭酸基が入ったとするならば、炭酸基の方が水酸基に比較して、塩基性タンパク質の吸着を阻害する効果が少ない。

Table.4 Adsorption weight of heat-treated HAp

Temp.	BSA/mg	Lysozyme-chloride/mg
60°C	3.6	2.4
100°C	3.2	2.7
220°C	2.4	2.8
300°C	2.2	3.1
400°C	1.0	3.1
500°C	3	3.2
700°C	1.1	1.7

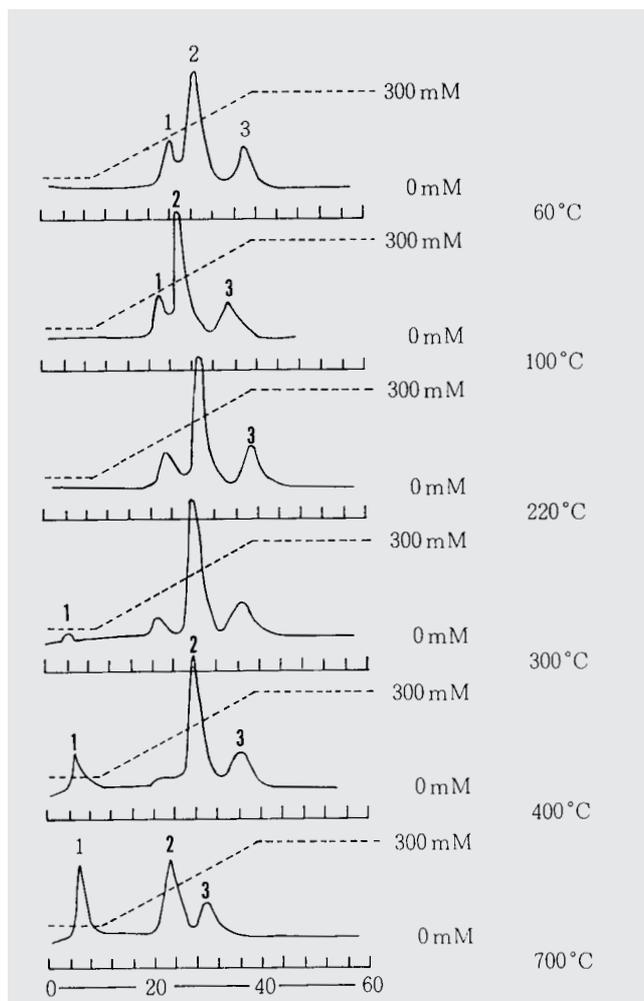


Fig.6 Chromatogram of heat-treated HAp
1:BSA 2:Lysozyme chloride 3:Cytochrome C

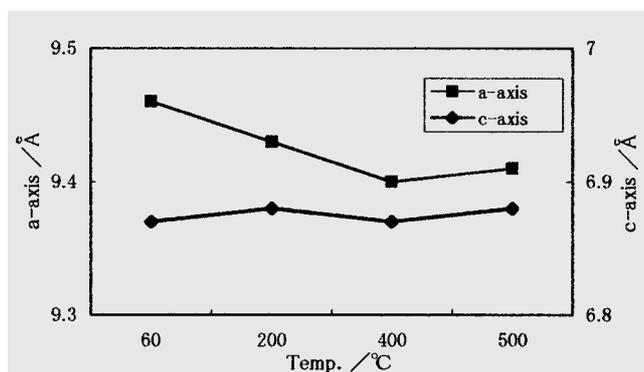


Fig.7 Cell constant of HAp

3.5 通液性能

通液性能を測定した結果をTable 5に示した。針状HApの方が、はるかに通液性に優れている。細孔分布をFig.8に示した。HApの密度が約3.17g/cm³であるので、90vol%以上が空隙であることがわかる。これが高通液性の要因と思われる。

通液速度は、タンパク質などの生体高分子をカラム分離する研究者にとって、非常に重要なことである。例えば、HPLCなどでポンプを用い、加圧しても板状HApでは、'通液しない=分離出来ないばかりか有用物質の回収すら出来ない'であり、通液しても、'通液速度が遅い=有用物質の失活を招く、時間のロス'の為である。

カラム充填剤の性能として、分離性能以外に'処理能力=吸着量×流速'が重要なのは言うまでもない。

Table.5 Flow rate of HAp chromato-column

HAp	LV/mm·min ⁻¹
Needle-like	8.3
Plate-type	0.7

(Bed-vol: 8 ml)

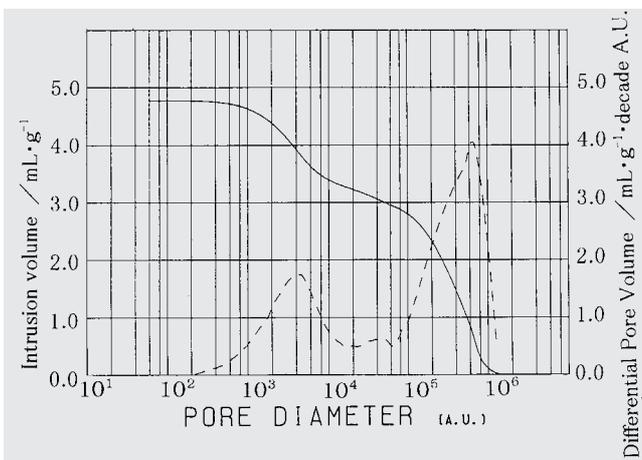


Fig.8 Pore distribution

4 固相合成担体への応用

針状HApは、従来の板状HApと違い、実用的なカラム充填剤である事が分かった。しかし、分離精製カラムとしては、アフィニティカラムや逆相クロマトカラム、イオンクロマトカラムなど、殆どの分離モードは既に揃っている。通液性能を改良しただけでは、HApとして優位な部分が少ない。前述したように、「最後の分離手段」にしかない。そこで、生体親和性が高く、吸着剤としてのモードもはっきりしていることからHAp表面の吸着特異性を利用して、新規な固相反応剤として応用する方法を検討した。

針状HApへのタンパク質などの吸着傾向は、Table 6に示すようであり、この吸着力の差を利用して、HAp表面で、固相反応=生体高分子の吸着を利用した他の物質との複合化が

来る可能性が有る。

吸着力の差が分かれば、比較的短時間に複合化と、複合体の精製が同時に行われ、効率よく高純度の複合体が得られるはずである¹⁰⁾。

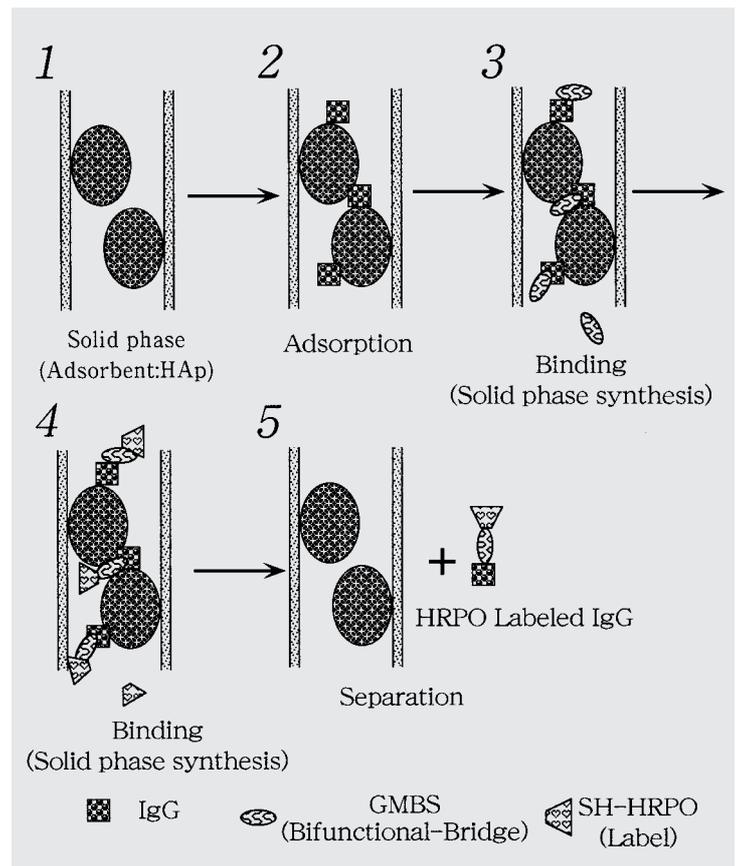
Table.6 Characteristic adsorption on HAp

non-adsorption	weak-adsorption	strong-adsorption
GMBS FITC HRPO Peptide	AIP KLH	IgG, IgM BSA Lysozyme

4.1 酵素標識化抗体の合成^{11) 12)}

酵素と抗体の複合体は、市販されており、酵素の部分を選択として抗体の検出に用いられる。酵素標識化抗体は通常、液相で合成後に精製して得られるが、精製の工程が面倒で純度を上げようとすると収率が落ちるという問題があった。

HApを固相にした場合の酵素標識化抗体合成工程をScheme 3のように考えた。この仮定が正しければ、最後に溶出される物質は単一物質であり、酵素活性と抗体活性の両方が認められるはずである。しかも本法によればロスが無いはずである。



Scheme.3 Solid phase synthesis on HAp

4.1.1 実験

(1) 原材料

標識酵素：SH化したホースラディシュパーオキシダーゼ
(以下SH-HRPO)

サンプル：抗マウスIgG (ラビット) 含有腹水 (このIgG
が被標識化抗体となる)

架橋剤：N-(4-Maleimidobutyryloxy)succinimide (DOJIN製
以下GMBS。)

HAp：1cm カラムに針状HAp5mlを充填

(2) 固相合成

抗体含有液10 μ lを10mM-PBS、pH6.8以下A液で10倍
に希釈した。予めA液で平衡化したHAp充填カラムに添
加した。

A液で洗浄し、雑たん白を除去。平衡化した。

アセトニトリルにGMBSを10%溶解させた溶液をA液で
3倍に希釈した後、カラムに添加した。

カラム上下とペリスタポンプをチューブで接続し、室
温で30分循環した (流速2ml/分)

チューブを外し、A液でカラムを洗浄し、未反応物を除去
した。

SH-HRPOを添加し、と同様にして2hrs.循環した。

再度、A液で洗浄、平衡化後、300mM - PBSを用いて
リニアグラジエント法で溶出した。

(3) 反応性の測定

EIA法を用い、溶出液の各フラクションの抗体活性と、酵素
活性 (反応性) を測定した。

4.1.2 結果と考察

Fig.9に各フラクションの酵素活性及び抗体活性を示した。
反応のピークが一致しており、IgGが全量、酵素標識化されて
いることを確認した。参考としてFig.10に市販品の酵素標識
化抗体をHApカラムでエリューションした結果を示した。ク

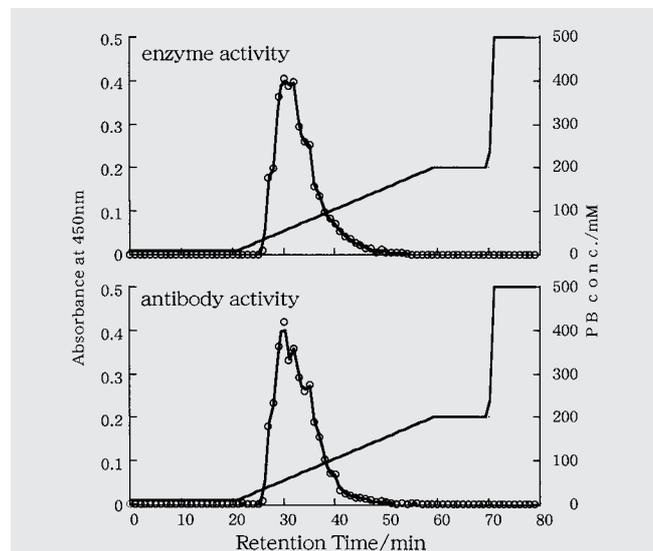


Fig.9 Chromatogram of HPRO-labeled antibody

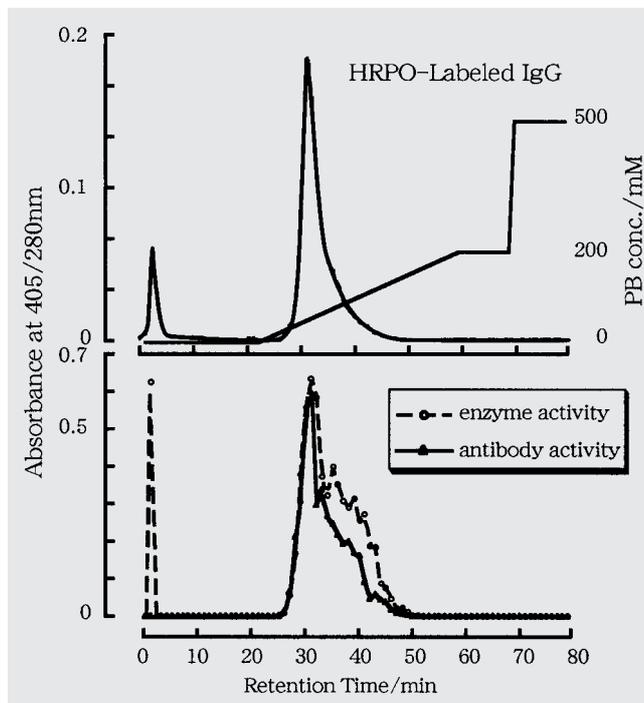


Fig.10 Chromatogram of HRPO-labeled antibody
(commercial)

ロマトグラムの初期に見られる溶出ピークでは酵素活性が認
められたのに対し、抗体活性は認められなかった。即ち未結
合の酵素が不純物として存在することが分かった。標識化抗
体中に未反応の酵素が存在すると、抗原活性を測定する場合
において、バックグラウンドとなり、高精度の測定を阻害する
要因となる。以上の結果から、HApを用いた固相合成法が有
意であるといえる。

4.2 蛍光標識化抗体の合成

Fluorescein isothiocyanate, isomer (以下FITCと略す)は、
目視で確認できる蛍光標識としてよく知られている。FITCを標
識に用いた場合にも、固相法により標識化抗体が合成できる
か検討した。

4.2.1 実験

(1) 原材料

標識：FITC蛍光標識 (DOJIN製)

抗体：Human ミエローマIgG (DEAE精製品)

(2) 実験

4.1.1と同様に針状HAp表面で蛍光標識化抗体を固相合成
した。

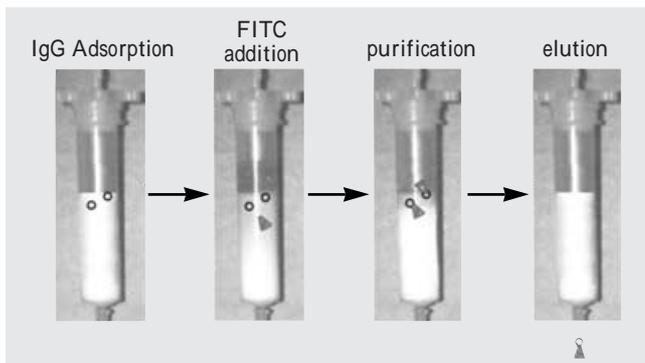
(3) 溶出パターン測定

OD280nmでFITC-抗体複合体のカラム溶出パターンを測定
した。

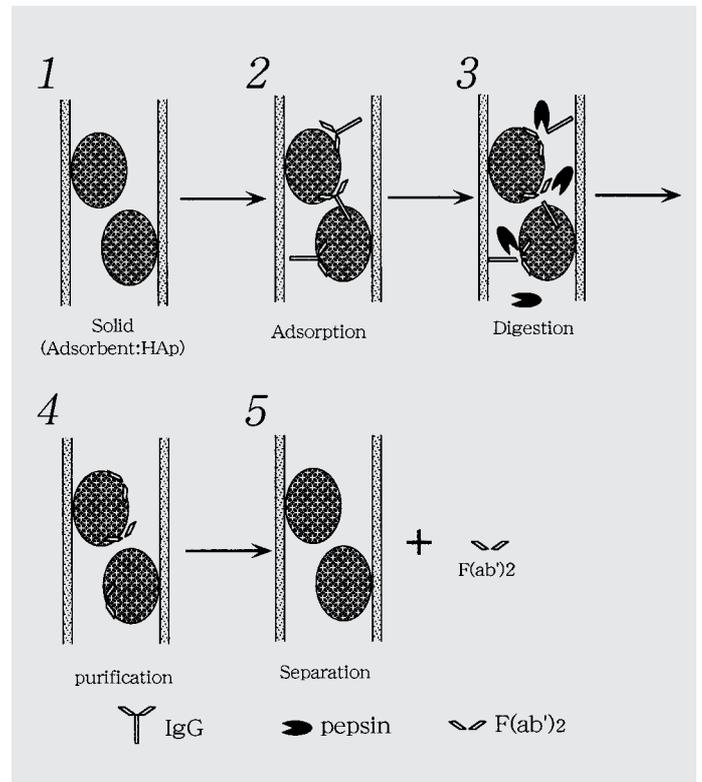
試験中のカラムの着色を観察した。

4.2.2 結果と考察

Scheme 4にカラムの変化を示した。Fig.11下段にカラム溶出パターンを示した。カラム全体がFITC添加により全体に黄色く着色していくが、10mM-PBS洗浄後は、カラム上部のみが黄色くなっていることがわかった。この着色物を溶出したところEIA法でIgGであることが確認された。以上からカラム中では、未反応のFITCは除去され、HApに吸着したIgGのみと反応していることが判った。



Scheme.4 Column of solid phase synthesis
 ▲ : FITC
 ○ : IgG
 ◐ : FITC-labeled IgG



Scheme.5 Solid phase reaction on HAp

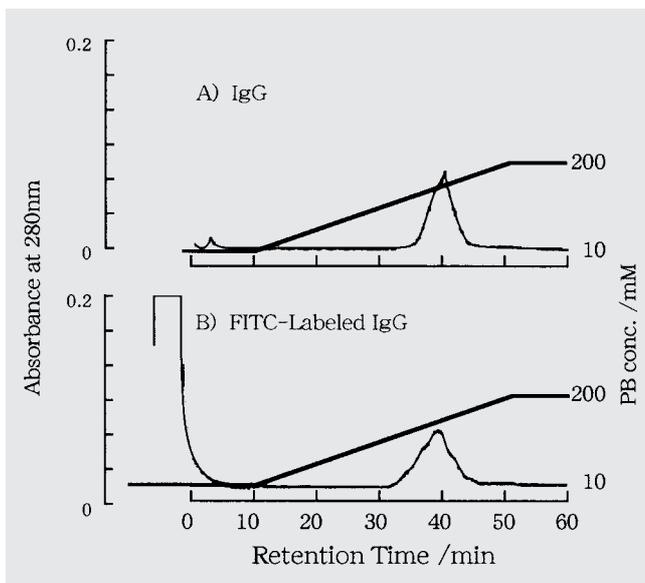


Fig.11 Chromatogram of FITC-labeled IgG

4.3 IgGのペプシン消化（分解）

一般に、IgGは、種に特異的なFc部分と、抗原に対して特異的なF(ab')₂部分からなるといわれている。またFc部分はペプシンにより消化される事が知られている。このペプシンによる消化がHApの固相上で行えるか検討した。その分解過程をScheme 5に示した。この仮定が正しければ、針状HApは固相合成の反応場としてだけでなく、分解反応場としても応用できると考えられた。

4.3.1 実験

(1) 原材料

抗体：Human-ミエローマIgG

pepsin：DOJIN製

酢酸ナトリウム：SIGMA製

(2) 消化

Human-ミエローマIgG10mgを10mM-PBS、pH6.8（以下A液）で10mlに溶解した。予めA液で平衡化したHAp充填カラムに添加した。

HAp充填カラムをA液で洗浄し、雑たん白を除去。平衡化した。

更にカラムを0.1M 酢酸ナトリウム(pH4.5)で平衡化した。カラム溶液内が0.1M NaClとなるように塩化ナトリウムを添加。

pepsin 1.0mgをA液に1mlに溶解させ、カラムに添加。カラム上下とペリスタポンプをチューブで接続し、室温で30分循環した（流速2ml/分）

37±1 に保持し、24時間反応させた。

チューブを外し、A液でカラムを洗浄した。

200mM-PBSでグラジエント溶出する。

(3) 分析

・クロマト溶出パターンを同じカラムで、分解前のIgGと比較した。

・SDS-PAGEで分子量を調べた（2ME無添加）

4.3.2 結果と考察

Fig.12にIgGのクロマトパターンとSDS-PAGEを示した。分解反応物BのSDS-PAGEには、IgG分子量150Kが見られず、分子量110Kの物質が確認された。F(ab')₂の分子量は110Kである為、BはF(ab')₂であると考えられた。以上より、HApを固相に用いた分解反応も可能であるといえた。

(更に、F(ab')₂は、HApカラム上でFabに分解でき、そのまま酵素標識化出来る事も確認した¹³⁾)

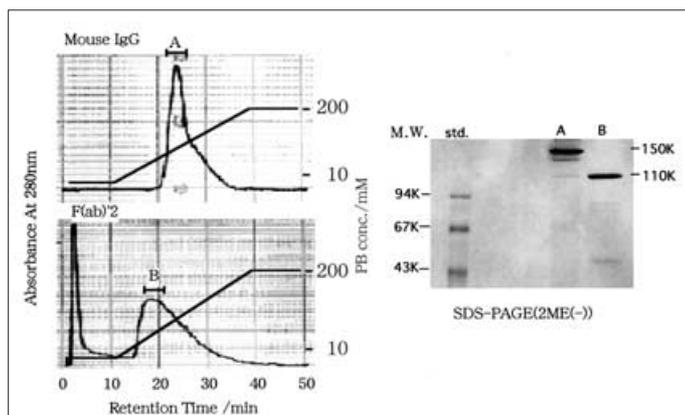


Fig.12 HAp Column chromatogram of IgG and F(ab')₂ (Mouse, monoclonal antibody)

5 結 言

これまでの検討で、以下のことが判った。

- (1) 針状HApは、従来の板状HApと大きく異なるタンパク質の吸着溶出挙動を示す。
- (2) 針状HApの吸着溶出挙動は、HApの加熱条件を調節することにより、変化させられる。また、板状HApより炭酸化し易い。
- (3) 針状HApは、pH依存性などからイオン交換的、あるいは電気親和的にタンパク質を吸着溶出することが判った。これは、板状HApと同じ傾向である。
- (4) 針状HApは多孔質であるので、高通液性が得られ、使い易く、吸着量が多いので、カラム充填剤として、有用である。
- (5) 針状HApの吸着性を利用して固相反応が行えることが判った。反応としては、複合化、分解の両方が可能であった。

6 おわりに

筆者の都合により引用できなかった文献が多数あることをお詫び致します。また本研究にあたり、懇切丁寧なご指導をして頂き且つ貴重なサンプルをお分け頂いた名古屋市立大学第2生化学教室国松己歳先生、ならびに研究室の方々、またHApの合成ならびに分析にご助言頂いた名古屋工業大学物質工学専攻鈴木傑先生、更に手前勝手な研究を続けさせて頂いた関係各位に深謝致します。

引用文献

- 1) H.Hirano, T.Nishimura, T.Iwamura, *Agric.Biol.Chem.*, 50(1), 219 (1986).
- 2) A.Tiselius, S.Hjerten, O.Levin, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, 65, 155(1956).
- 3) D.M.Kay, R.A.Young and A.S.Posner: *Nature*, 204, 1050 (1964).
- 4) 高木 修, 加藤ゆかり, 井上英武, 第6回アパタイト研究会要旨集, 22(1990).
- 5) 門間英毅, 金沢孝文, 日化要旨集, 339.(1972).
- 6) 金沢孝文, 梅垣高士, 門間英毅, セラミックス, 10, 461.(1975).
- 7) 大垣政子, 名古屋工業大学大学院物質工学専攻修士論文(1996).
- 8) 佐藤満雄, 関根丈司, 第6回アパタイト研究会要旨集, p.20, 21(1990).
- 9) “ファインセラミックス事典”, 技報堂出版, 524(1987).
- 10) 高木 修, 国松己歳, 第68回日本生化学会大会発表抄録集, 67, 878(1995).
- 11) 渡部慶一, 中根一穂編, “酵素抗体法”, 改定3版, 1, 学際企画(1995).
- 12) 石川栄治, 河合忠, 宮井潔, “酵素免疫測定法” 第3版, 医学書院(1987).
- 13) 高木 修, 国松己歳, 第70回日本生化学会大会発表抄録集(1997).