

生体適合性アパタイト粒子の 結晶形態制御プロセスの確立とその応用

明治大学理工学部応用化学科

相澤 守

Hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) has been applied widely as a biomaterial for substituting human hard tissues and as an adsorbent for chromatography. The HAp crystal has two crystal planes with different charges: positive on a -planes and negative on c -planes. Thus, novel properties of the HAp may be produced by controlling the orientation of the crystal planes. Controlled orientation may be achieved by modifying the morphology of HAp crystals. For example, in order to increase the positive charge on the surface of the HAp fibres, it is possible to grow hexagonal-shaped HAp fibres which are oriented along the c -axis so that the $a(b)$ -plane is wider than the c -plane. It is expected that these apatite fibres have high specificity of adsorption to acidic proteins with negative charges. One of the objectives of the present investigation was to establish the novel process for the syntheses of the HAp crystals with well-controlled morphology. We indicated the novel syntheses process of plate-shaped HAp crystals using amorphous calcium phosphate (ACP) as a starting material. This process contains the control of growth direction of ACP to HAp by the adsorption of amino acids, and the accelerated crystal growth using an enzyme reaction of urea and urease. In particular, in the case using a glutamine acid as an amino acid, the plate-shaped HAp crystals were synthesized by hydrothermal treatment of the HEPES buffer including the Ca^{2+} and PO_4^{3-} ions, as well as urea and urease.

1. 目的

水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAp) は生体硬組織を構成する無機成分と極めて近い化学組成をもち、これを骨欠損部などにインプラントすると新生骨と直接結合するという優れた生体適合性を有する。このアパタイトは緻密質や多孔質のセラミックスや顆粒などに加工されて整形外科および口腔歯科領域において臨床応用されている。また、アパタイトはタンパク質などの生理活性物質の吸着剤としても有用であり、吸着操作中にタンパク質の変性をほとんど起こさない吸着剤として知られている。

アパタイトは結晶学的には六方晶系に属する。そのモデル図を図1に記載する。このモデル図のように、アパタイトには a 面と c 面という二つの結晶面がある^[1]。一般的に、 a 面側は Ca^{2+} が多く存在して正に帯電し、一方、 c 面側は主に OH^- と PO_4^{3-} が存在するために負に帯電している。この結晶面の電荷により、タンパク質が吸着すると考えることができ、 a 面には負電荷をもつ酸性タンパク質が、 c 面には塩基性タンパク質が特異的に吸着する。我々はこれまでにアパタイトのタンパク質吸着の特異性を向上させるために、アパタイト結晶の形態制御法の確立を試み、 a 面を多く露出した構造をもつアパタイト単結晶ファイバー

の合成に成功している^[2-4]。しかしながら、いまだ c 面を多く露出した板状アパタイトの合成には成功していない。

板状アパタイトの合成に関する報告には、結晶学的に板状の形態をとりやすいリン酸水素カルシウムを前駆物質として、これを加水分解させて板状アパタイトを得る方法があるが、この手法で得られる板状アパタイトは多結晶体であり壊れやすい。また、アルコール共存下での水熱法により合成する方法も報告されているが、サブミクロンオーダーの微細なものしか得られない^[5]。我々の知る限り、図1に示したような六角板状のアパタイト単結晶の合成に関する報告はなく、もし本提案でこの板状アパタイトの合成に成功すれば、世界で初めての合成例を示すことになると考えている。

もし、この板状アパタイトの合成に成功すれば、上述したタンパク質吸着剤としての用途だけでなく、その形状を活用することによりコスメトロジー分野への応用が十分に期待できる。例えば、板状粒子は表皮への接着性がよく(化粧のりがよい)、また屈折率を変化させるため、くすみなどを薄く見せる効果が期待できる。さらに、もともと生体適合性の高い物質を素材に用いているためにアレルギー



Processing of biocompatible apatite particles with well-controlled morphology and its application

Mamoru Aizawa

Department of Applied chemistry,
Faculty of Science and Technology,
Meiji University

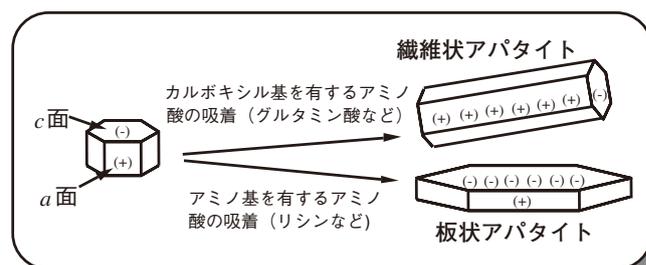


図1 アミノ酸共存下におけるHApの結晶成長 (モデル)

やアトピー性皮膚疾患をもつユーザーへの安心感も高いと考えられる。

そこで、本研究では、HApの形態制御プロセスの確立を指向し、特に板状アパタイトの合成方法について2つのプロセスで検討した。具体的には、1) HApと近い構造をもつ非晶質リン酸カルシウム (Amorphous calcium phosphate; ACP) を出発物質とし、ACPとアミノ酸の官能基とを相互作用させて、ACPからHApへの転化反応およびその結晶成長を制御することでHAp粒子の形態制御を試みた。もうひとつのプロセスは、2) 炭酸カルシウム (CaCO₃) とオルトリン酸 (H₃PO₄) との水溶液反応および尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用し、板状のリン酸水素カルシウム (dicalcium phosphate anhydrate: DCPA) を経由して、その形態を維持したままc面を多く露出したHApに転化させる合成方法である。

2. 実験

2.1 非晶質リン酸カルシウムを出発物質とする板状アパタイトの合成とキャラクター化

出発物質の非晶質リン酸カルシウム (ACP) は以下のような手順で合成した。すなわち、0.75 mol·dm⁻³ Ca(NO₃)₂水溶液 (pH 10) 50.0 cm³ に 0.25 mol·dm⁻³ (NH₄)₂HPO₄水溶液 (pH 10) 87.7 cm³ を加え、氷冷下で1分間攪拌した。生成した沈殿を固液分離した後、洗浄後、凍結乾燥してACP粉体を調製した。

次に、合成したACP粉体を用いて板状アパタイトの合成を試みた。今回、適用したプロセスは、(i) ACPへのアミノ酸の吸着および(ii) HAp合成バッファー中でのACPからのHApへの転化および結晶成長からなる。その実験プロセスおよび実験条件をそれぞれ図2および表1に

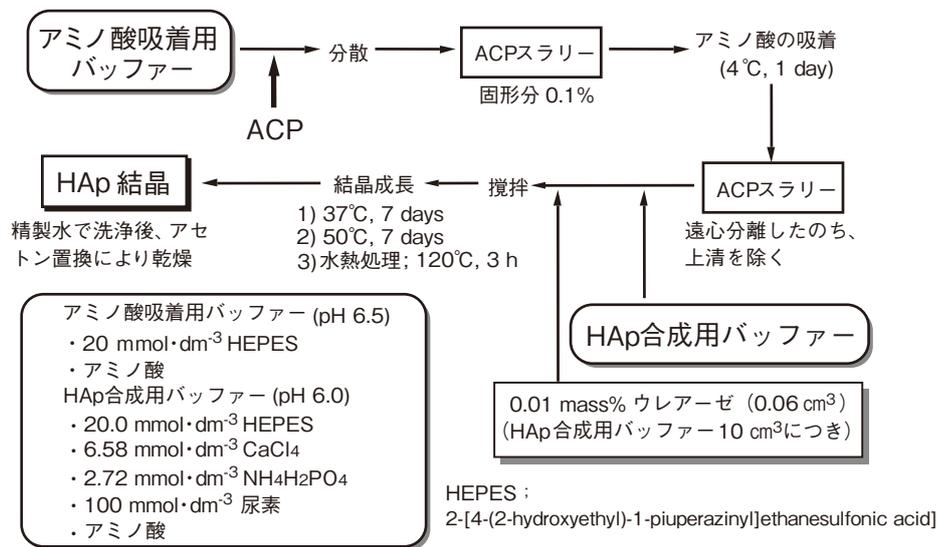


図2 ACPからのHAp合成プロセス

表1 ACPへのアミノ酸の吸着およびHApの合成条件

ACPへのアミノ酸の吸着 (20 mM HEPESバッファー使用)				HApへの転化反応および結晶成長		
添加アミノ酸**	アミノ酸濃度 mM	pH	吸着温度	成分	アミノ酸濃度 mM	合成条件
無添加	---	6.5	4 °C	*	50, 100	37 °C, 7 day
Glu	50, 100, 200 , 300	6.5	4 °C	*	50 , 100	37 °C, 7 day
Lys	50, 100, 200, 300	6.5	4 °C	*	50, 100	37 °C, 7 day
無添加	---	6.5	4 °C	*	50 , 100	50 °C, 7 day
Glu	50, 100, 200 , 300	6.5	4 °C	*	50 , 100	50 °C, 7 day
Lys	50, 100, 200 , 300	6.5	4 °C	*	50 , 100	50 °C, 7 day
無添加	---	6.5	4 °C	*	50 , 100	120 °C, 3 h
Glu	50, 100, 200 , 300	6.5	4 °C	*	50 , 100	120 °C, 3 h
Lys	50, 100, 200 , 300	6.5	4 °C	*	50 , 100	120 °C, 3 h

*) 20 mM HEPES + 6.58 mM CaCl₂ + 2.72 mM NH₄H₂PO₄ + 100 mM Urea (10 cm³), 0.1% Urease (0.6 cm³)

***) ここで、添加したアミノ酸はグルタミン酸ナトリウムおよびリシン塩酸塩の形で使用した。

示す。ACP を所定濃度のアミノ酸を添加した HEPES バッファーに分散させてスラリー（固形分 0.1 mass%）を調製し、4℃で1日静置した。アミノ酸は酸性アミノ酸としてグルタミン酸ナトリウム（Glu）、塩基性アミノ酸としてリシン塩酸塩（Lys）を使用した。続いて、遠心分離によりアミノ酸を吸着させた ACP を固液分離し、それに所定量の HAp 合成バッファー（アミノ酸、Ca²⁺、PO₄³⁻、尿素、ウレアーゼを含む溶液）を加え、37℃および50℃で7日間保持して HAp を合成した。また、水熱条件（120℃、3 h）下でも同様に合成した。HAp 合成バッファー中の尿素とウレアーゼは合成中に反応系の pH を増加させ、さらにバッファー中の Ca²⁺ および PO₄³⁻ が HAp 生成を促進させる。

合成した ACP および HAp は粉末 X 線回折法（XRD）および赤外吸収スペクトル法（FT-IR）により同定し、それらの化学組成を高周波誘導結合プラズマ分析（ICP）により決定した。得られた粒子の形態は走査型電子顕微鏡（SEM）および透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した。

2.2 炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応による板状アパタイトの合成とキャラクタリゼーション

本プロセスでは、炭酸カルシウム（CaCO₃）とオルトリン酸（H₃PO₄）との水溶液反応および尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用し、最初に板状リン酸水素カルシウムを形成させ、その形態を維持したまま HAp に転化させて板状アパタイトの合成を試みた。

0.01, 0.05, 0.10 mol・dm⁻³ の炭酸カルシウムと沈殿剤である尿素を 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mol・dm⁻³ を含むスラリー（1000 cm³）に、Ca/P 比が 1.67 となるようにオルトリン酸水溶液（1000 cm³）を滴下した。1 時間攪拌後、硝酸を添加して pH を 3.00 に調整し、水溶液とした。その試料溶液にウレアーゼを添加して 50℃で 24 時間加熱し、尿素を加水分解

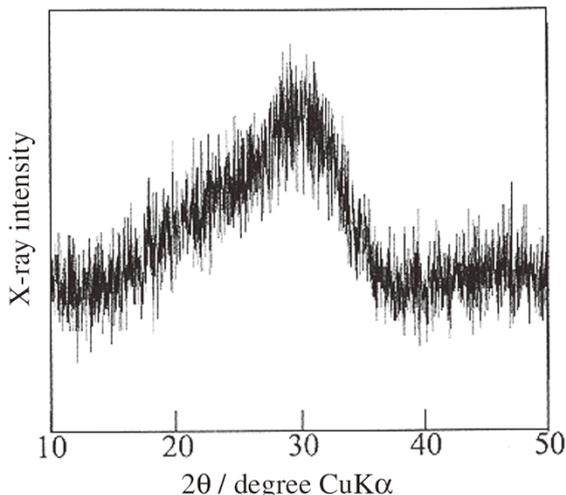


図3 ACPのXRDパターン

させてアパタイトを合成した。なお、ウレアーゼは試料溶液中の尿素に対して 24h 以内に加水分解するように添加した。得られた粉体のキャラクタリゼーションは 2.1 節と同様な方法で行なった。

3. 結果と考察

3.1 非晶質リン酸カルシウムを出発物質とする板状アパタイトの合成とキャラクタリゼーション

図3に HAp 合成の出発物質に用いた ACP の XRD 図を示す。HAp の最大ピークである 31.7° 近傍を中心としてブロードな回折パターンが得られた。この粉体を TEM により観察したところ（図4）、粒径約 100 nm の微粒子の集合体であることが分かった。これらの粒子の制限視野電子線回折（SAED）図形はハローパターンを示し、図3の XRD の結果と併せてこれらの粒子が非晶質であることが分かった。この粒子の化学組成を ICP 発光分析により調べたところ、カルシウム含有量 33.46 mass% およびリン含有量 17.48 mass% であった。その Ca/P モル比は 1.48 と計算され、約 1.5 と見積もりことができる。また、示差熱重量分析（DTA-TG）によりこの ACP 粉体の加熱変化を調べたところ、600℃までの加熱で加熱による重量減少は一定となり、その減少率は 14.6 mass% であった。

これらの結果から、今回の実験で使用した ACP は Ca₉(PO₄)₆・8.8H₂O と表記できる。伊藤らの報告によれば⁶⁾、非晶質リン酸カルシウム（ACP）の構造単位は組成式 Ca₉(PO₄)₆ で表せるクラスターであり、最近、ヒトの血漿の無機イオン濃度と等しくした生体疑似体液（SBF）中でのアパタイトの成長がこの ACP を成長単位とするクラスター成長であることが明らかにされている。本研究で得られている ACP もほぼ同様な化学組成であり、これを出発物質として用い、所定の Ca²⁺ イオンおよび PO₄³⁻ イオンを含む溶液中に懸濁し、結晶成長させることにより水酸アパタイトの結晶形態制御法の確立を試行した。

この ACP 粉体を出発原料として板状アパタイトの合成

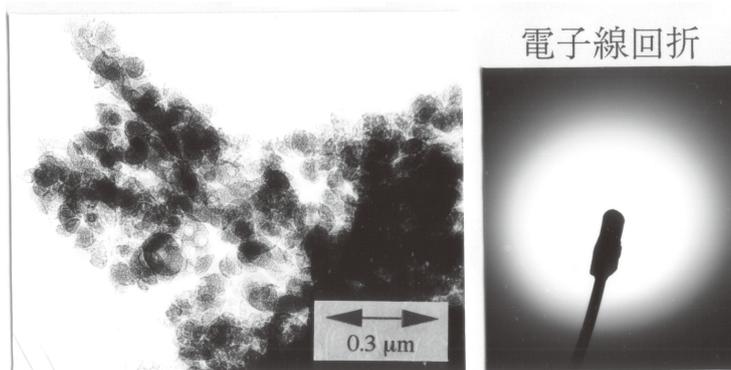


図4 ACPのTEM写真及びその電子線回折

を行なった。まず、合成プロセスを確立するための予備的検討として、

- 1) 異なるバッファーを用いた HAp 合成
- 2) 異なる pH 条件下での HAp 合成 (pH 一定)
- 3) 弱酸性からアルカリ性への pH のダイナミックな変化を利用した合成
- 4) HAp 生成に必要な Ca^{2+} および PO_4^{3-} イオンの供給の4つの独立した実験を行なった。

これらの知見を総括すると、バッファーとしては HEPES を利用し、pH をダイナミックに変化させながら Ca^{2+} および PO_4^{3-} イオンを供給することが ACP から HAp への転化反応に有効であることが分かった。そこで、これらの知見をもとに次のプロセスを考案し、合成実験を行なった。

本合成プロセスは、(i) ACP へのアミノ酸の吸着および (ii) HAp 合成バッファー中での ACP からの HAp への転化および結晶成長からなる。その実験プロセスおよび実験条件は既にそれぞれ図2および表1に示している。なお、(i) で吸着させたアミノ酸と (ii) の結晶成長で使用

されるアミノ酸は同一のものである。

先に述べた ACP を用いて HAp の合成を試みたところ、すべての実験条件において ACP は HAp に転化した。その結晶性は合成温度が高くなるにつれて向上し、水熱条件下で最も結晶性の高い HAp が生成した。また、IR スペクトルから、生成した HAp が炭酸イオンを含有していることが分かった。その炭酸イオンに帰属されるスペクトルの吸収は合成温度が低い方がより顕著であった。

代表例として、アミノ酸として Glu を使用し、異なる温度で合成した HAp の XRD パターンと SEM 写真を図5に示す。XRD パターンでは、いずれも HAp に帰属される回折線が見受けられるが、37℃および50℃では結晶性が低く、120℃の水熱条件下では結晶性の比較的高い HAp が得られた。特に、酸性アミノ酸である Glu を用いて合成した場合には HAp の (002) 面 ($2\theta=25.8^\circ$) が比較的高い強度で検出された。SEM 観察では、得られた粉体は板状粒子から構成されて、合成温度の増加とともにその粒径も増大することが分かった。XRD の結果と併せて考えると、板状の平面が HAp の c 面に対応している可能性がある。

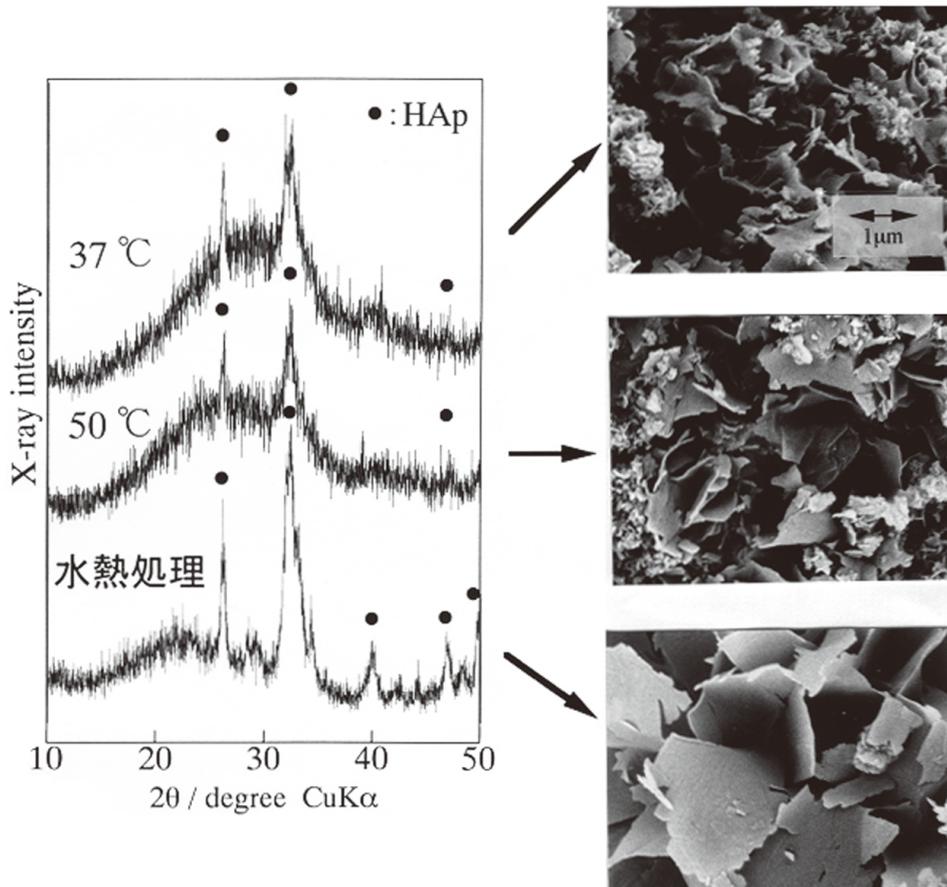


図5 HApの形態に及ぼす合成温度の影響

- *アミノ酸 (Glu) 共存下での合成： 1) アミノ酸吸着バッファー：200 mM
2) HAp合成バッファー：50 mM

次に、50℃および水熱条件下で合成した HAp の粒子形態を図 6 に示す。これらの SEM 写真は表 1 の Bold で示した実験条件に対応している。合成温度を 50℃とし、アミノ酸無添加で合成した場合は粒状、酸性アミノ酸 (Glu) および塩基性アミノ酸 (Lys) を添加して合成した場合はいずれも板状結晶が生成した。カルボキシル基を多くもつ Glu を添加した方がアミノ基を多くもつ Lys を添加した場合よりも板状粒子が生成しやすい傾向が認められた。

これらの結果より、アミノ酸共存下で ACP から HAp への添加反応および結晶成長を行なうと板状粒子が生成することが見いだされた。また、結晶成長を水熱条件下で行なうと 50℃の場合よりも結晶性の高いより大きな HAp 結晶が得られることが分かった。逆に、37℃で合成した場合には 50℃や水熱条件に比べて微細な HAp 結晶が生成した。

アミノ酸共存下での HAp 合成により板状粒子が生成した理由として、HAp を構成する ACP クラスタは HAp と類似した構造をであり、その負に帯電した *c* 面とアミノ酸のアミノ基が相互作用して *c* 面方向の結晶成長速度が遅くなるため、板状粒子が生成したものと考えられる。また、アミノ酸のカルボキシル基は溶液中の Ca^{2+} とキレート化して、ACP クラスタの *a* 面と相互作用しにくくなるため、*a* 面方向への特異的な結晶成長が起こらなかったものと思われる。

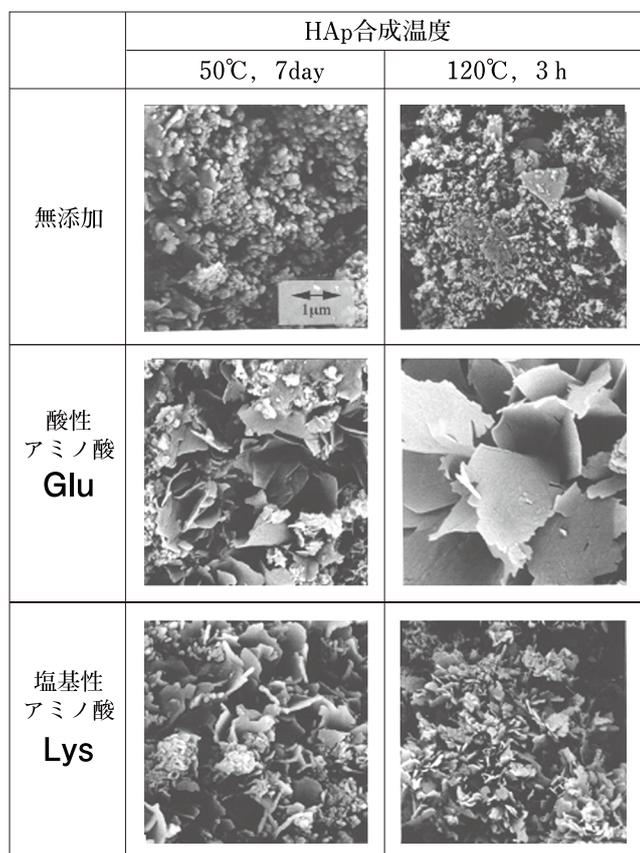


図 6 HApの形態に及ぼすアミノ酸添加の影響

3.2 炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応による板状アパタイトの合成とキャラクターシオン

3.1 節のプロセスでアパタイトの板状化には成功したが、目的とするアパタイトの配向性 (*c* 面が多く露出した表面構造) という観点ではいまだ課題を残していた。そこで、別のアプローチにより *c* 面が多く露出した板状アパタイトの合成を試みた。具体的には、1) 炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応および 2) 尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用して板状アパタイトを合成するという試みである。

今回の報告では、炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応に限定しているが、この出発原料の組み合わせは他の種類のカルシウム原料とリン酸塩原料との組み合わせを実際に試した実験結果に基づいて決定したものである。

まず、炭酸カルシウムとオルトリン酸の各出発原料の濃度および尿素濃度をパラメータとして変動させ、トータル 24 種類の実験を行なった。 Ca^{2+} および PO_4^{3-} の濃度をあげると pH が上昇しにくくなるためリン酸水素カルシウム (DCPD) が多く存在し、尿素濃度が高い場合にのみ HAp とリン酸八カルシウム (Octacalcium phosphate: OCP) が生成した。

特に、 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CaCO}_3$, $0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ H}_3\text{PO}_4$ の場合、いずれの尿素濃度でも HAp と OCP との混合相となり、 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 尿素のときは配向性が見られず、特に $1.0\text{--}2.0 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 尿素のとき *c* 面に相当する (002), (004) 面の回折強度が特異的に高い HAp が生成した (図 7 (a))。

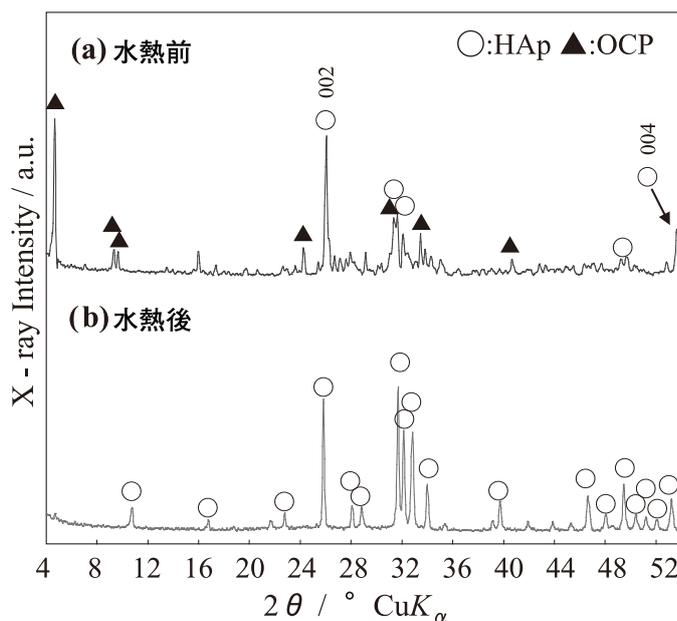


図 7 酵素反応を利用して合成した HAp 粉体の XRD 図
 出発物質: $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CaCO}_3$, $0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CH}_3\text{PO}_4$, $1.50 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$, HNO_3 により pH 3 に調整
 (a) 合成粉体 (50℃, 24 h)
 (b) (a) を 120℃, 24 h 水熱処理した粉体

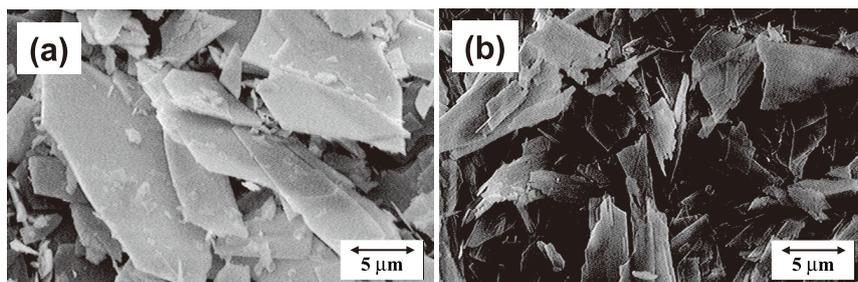


図8 c面を多く露出したHAp粉体のSEM写真
 出発物質： $0.01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CaCO}_3$, $0.006 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ CH}_3\text{PO}_4$
 $1.50 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{NH}_2)_2\text{CO}$, HNO_3 によりpH3に調整
 (a) 合成粉体 (50°C, 24 h) (b) (a)を120°C, 24 h水熱処理した粉体

また、この粉体の粒子形態を図8 (a)に記載したが、板状の形態をしていることが観察された。この表面に多く露出している面がHApのc面に相当すると思われる。

この配向性の原因は出発原料の CaCO_3 の緩衝能により尿素の加水分解によるpHの上昇が緩やかに起こり、DCPDからOCPそしてHApへとDCPDの形態を維持したまま加水分解が進行したためと考えられる。

さらに、この配向性の高いHApとOCPとの混合粉体を120°C, 24 hで水熱処理した結果を図7 (b)および図8 (b)に示す。図7 (a)のXRD図から、水熱処理後にOCPはすべてHApに転化していること、および(002)面に対応する反射が比較的強く検出されていることが分かる。この結果は水熱処理後も目的とするc面を多く露出したアパタイトが合成できていることを示している。また、図8 (b)のSEM写真からも板状の形態が水熱処理後も維持されていることが確認できる。

したがって、本プロセスはACPを出発物質とする方法よりもアパタイトの配向性を制御可能な方法として有望であり、今後、大量合成の方法を構築することにより従来のアパタイトとは異なる新しい機能を持った「生体適合性粒子」の創出が可能となると考えられる。

4. 総括

アパタイトの形態制御プロセスの確立を指向して2つのプロセスにより板状アパタイトの合成を試みた。まず、ACPを出発物質として、アミノ酸の吸着による成長方向の制御と尿素とウレアーゼの酵素反応を利用した新規な板状アパタイトの合成プロセスを提案した。特に、アミノ酸としてグルタミン酸(Glu)を利用し、ACPにGluを吸着させた後、それを尿素およびウレアーゼとともに Ca^{2+} および PO_4^{3-} を含むHEPESバッファーに懸濁させて、水熱

処理することにより板状のアパタイトを合成できることが分かった。

また、1)炭酸カルシウムとオルトリン酸との水溶液反応および2)尿素とウレアーゼとの酵素反応を併用し、板状アパタイトの合成を試みたところ、前述の方法よりも高い配向性を維持した板状アパタイトが生成することが分かった。

アパタイトは生体適合性が高く、しかも板状の粒子形態はコスメトロジー分野への応用が大いに期待できる。例えば、板状粒子は表皮への接着性がよいと考えられ、また屈折率を変化させるため、くすみなどを薄く見せる効果が期待できる。さらに、アパタイトはあらゆる素材のなかでも生体適合性の高い物質のひとつであるため、アレルギーやアトピー性皮膚疾患をもつユーザーへの適用も可能であろう。今後は産学連携も視野に入れながら、この新素材のコスメトロジー分野への応用を検討していきたい。

(引用文献)

- 1) T. Kawasaki, *J. Chromatogr.*, **544**, 147 (1991).
- 2) M. Aizawa, A. E. Porter, S. M. Best and W. Bonfield, *Biomaterials*, **26**, 3427-3433 (2005).
- 3) M. Aizawa, F. S. Howell, K. Itatani, Y. Yokogawa, K. Nishizawa, M. Toriyama and T. Kameyama, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **108**, 249-253 (2000).
- 4) 相澤守, 木下真喜雄, 山田耕二, 板谷清司, 岸岡昭, 無機マテリアル, **5**, 387-397 (1998).
- 5) F. Nagata, Y. Yokogawa, M. Toriyama, Y. Kawamoto, T. Suzuki and K. Nishizawa, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **103**, 70-73 (1995).
- 6) 伊藤敦夫, 小沼一雄, 立石哲也, 日本結晶成長学会誌, **25**, A134 (1998).