

# 皮膚組織再生を促進するリン酸カルシウム真球粒子の創製

国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門

大矢根 綾子、中村 真紀

Submicron spheres of calcium phosphate have potential as biocompatible and functional cosmetic materials. In the present study, we developed surfactant-free techniques for the synthesis of submicron-sized calcium phosphate-based spheres. In our techniques, pulsed laser irradiation was applied to dispersions of calcium phosphate integrated with various light-absorbing agents: ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ions, ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ions, and carbon nanopowders.

For the integration of calcium phosphate and ferric/ferrous ions,  $\text{FeCl}_3$  or  $\text{FeCl}_2$  was supplemented to a calcium phosphate reaction mixture. Pulsed laser irradiation was performed to the reaction mixture during spontaneous precipitation of calcium iron phosphate. After irradiation, submicron- and micron-sized spheres of amorphous calcium iron phosphate were fabricated. In this process, ferric/ferrous ions integrated in the nano-sized precipitates induced melting and spheroidization of the precipitates *via* selective laser heating in the reaction mixture. Nucleation-growth process and Ostward ripening under supersaturated condition might be involved in the sphere growth.

For the integration of calcium phosphate and carbon nanopowders, hydroxyapatite nanopowders as the calcium phosphate source and carbon nanopowders were mixed using a ball mill. Pulsed laser irradiation was performed to a dispersion of the carbon-integrated hydroxyapatite nanopowders in ethanol. After irradiation, submicron spheres of amorphous calcium phosphate were fabricated. In this process, carbon nanopowders integrated with the hydroxyapatite nanopowders induced melting, spheroidization, and amorphization of the hydroxyapatite nanopowders *via* selective laser heating in the ethanol solvent. The carbon nanopowders were decomposed and/or evaporated during laser irradiation; hence, there was hardly any carbon remaining in the final spheres.

Our laser fabrication techniques would provide a new way to produce submicron-sized calcium phosphate-based spheres. The resulting spheres have a potential as biocompatible and functional cosmetic materials.

## 1. 緒言

リン酸カルシウムはヒトの歯や骨の主要無機成分であり、身体に優しい安全・安心素材として、ファンデーション添加剤などのコスメトロジー素材や、人工骨などの生体材料に応用されている。また、リン酸カルシウムはタンパク質、抗体、DNAなどの生体分子を吸着する特性を有していることから、薬剤送達システム (Drug delivery system: DDS) 用担体としての応用も期待されている。本研究では、DDS機能を有するコスメトロジー素材への応用を目指し、細胞内への取り込みに適したサブミクロン球状構造を有するリン酸カルシウムを合成するための技術開発を行った。DDS機能を有するリン酸カルシウムサブミクロン球状粒子は、健常な皮膚の美容・保全だけでなく、創傷・皮膚炎・瘢痕などの治療・予防にも有効な高機能コスメトロジー素材として有用と期待される。

従来のリン酸カルシウムサブミクロン球状粒子の合成法としては、界面活性剤を用いる手法 (ミセル法、エマルジ

ョン法など) が挙げられる。しかし、化学合成により得られる界面活性剤には、細胞毒性や製造コストなどの課題があった。これに対して最近Koshizakiらは、界面活性剤を必要としない簡便・迅速なサブミクロン球状粒子の合成法として、液中レーザー溶融法を報告している<sup>1)</sup>。液中レーザー溶融法は、液相中に分散させた不定形ナノ粒子原料に低エネルギー密度のパルスレーザー光を非集光で照射することで、サブミクロン球状粒子を合成する手法である。この手法は、様々な金属や金属酸化物に適用されてきたものの、レーザー光吸収性に乏しいリン酸カルシウムへの適用は困難であった。

そこで我々は、リン酸カルシウムを種々の光吸収剤と複合化することによって、液中レーザー溶融によるサブミクロン球状粒子の合成を試みた。リン酸カルシウムと光吸収剤の複合化手法としては、鉄イオン共沈法およびカーボンミリング法の2種について検討した。鉄イオン共沈法 (2.1. 節) においては、光吸収剤として鉄 (III) イオンおよび鉄 (II) イオンを用いた。リン酸イオンとカルシウムイオンの混合反応液に鉄 (III) イオンまたは鉄 (II) イオンを添加し、同反応液に低エネルギーのパルスレーザー光を非集光で照射した。また、カーボンミリング法 (2.2. 節) においては、Liらの報告<sup>2)</sup> に倣ってカーボンナノ粒子を光吸収剤として用いた。リン酸カルシウム原料として水酸アパタイトの不定形ナノ粒子原料を用い、光吸収性のカーボンナノ粒子をミリング混合によって複合化した。得られた複合粒子をエ



Fabrication of calcium phosphate spheres for skin tissue repair and regeneration

Ayako Oyane\*, Maki Nakamura  
Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

タノール中に分散させ、低エネルギー密度のパルスレーザー光を非集光で照射した。

以上の2つの手法において、反応条件（レーザー光のエネルギー密度、照射時間など）を変化させ、得られた生成物の形態、化学組成、および構造を評価することによって、リン酸カルシウム系サブミクロン球状粒子を得るための基礎的条件を追求した。さらに、反応液中におけるレーザー光ならびに光吸収剤の役割・相互作用を基礎的に追及し、粒子の生成機構について考察した。

## 2. 実験

### 2.1. 試料作製 [鉄イオン共沈法]<sup>3,4)</sup>

鉄イオン共沈法における試料作製スキームを図1に示す。まず、カルシウムイオン水溶液、リン酸イオン水溶液、鉄(Ⅲ)イオン水溶液、および鉄(Ⅱ)イオン水溶液として、それぞれ200mM CaCl<sub>2</sub> (ナカライテスク製)水溶液、200mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (ナカライテスク製)水溶液、200mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (ナカライテスク製)水溶液、およびFeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (和光純薬工業製)水溶液を、各々の試薬を超純水に溶解して調製した。

上記の原料溶液ならびに超純水をガラス製容器内に所定の容量比で添加、混合・攪拌することによって、種々の鉄イオン濃度(Fe(Ⅲ):0、1、2、5、7、10mM、Fe(Ⅱ):0、1、2、5、10、20mM)を有する反応液(4mL)を調製した。反応液のカルシウムイオン濃度(16.7mM)およびリン酸イオン濃度(10mM)は一定とした。なお、原料溶液混合後の反応液は直ちに白濁した。

攪拌下、調製直後の上記反応液にナノ秒パルスレーザー光(Nd:YAG, Quanta-Ray LAB-150-30, Spectra-Physics製, ビーム径8mm)を集光せずに、30分までの種々の時間照射した。レーザー光の周波数は30Hz、波長は355nmとし、

エネルギー密度を67、133、200mJ/pulse/cm<sup>2</sup> (それぞれ2、4、6 W/cm<sup>2</sup>)と変化させた。

照射後、遠心操作(6000rpm、10分)により生成物を回収、超純水で洗浄し、試料を得た。得られた試料は更なる遠心操作により、大粒径の分画L(500rpm、5分で沈降させた分画)、および小粒径の分画S(分画Lを沈降させた後の上澄液から、さらに1000rpm、10分で沈降させた分画)に分けた。

### 2.2. 試料作製 [カーボンミリング法]<sup>5)</sup>

カーボンミリング法における試料作製スキームを図2に示す。水酸アパタイトの不定形ナノ粒子(1.5g、一次粒子径約100nm、太平化学産業株式会社提供)およびカーボンナノ粒子(0.3g、粒子径500nm以下、Sigma-Aldrich製)を遊星型ボールミルで10分間混合(600rpm)することにより複合化した。得られた複合粒子(0.005g)をエタノール(4mL)に分散させ、同分散液に攪拌下、2.1.項と同じナノ秒パルスレーザー光(30Hz、355nm)を非集光で20分間照射した。レーザー光のエネルギー密度は200mJ/pulse/cm<sup>2</sup>(6 W/cm<sup>2</sup>)とした。照射後、遠心操作(6000rpm、10分)により生成物を回収、超純水で洗浄し、試料を得た。得られた試料は更なる遠心操作を行い、1000rpm、10分で粒子を沈降させた後の上澄液から、さらに2000rpm、10分で沈降させた粒子を回収した。

### 2.3. 試料評価

得られた試料(遠心操作後、超純水中に分散)の粒径分布を、動的光散乱法(DLS: Zetasizer Nano-ZS、Malvern製)により調べた。また、試料の形態、化学組成、ならびに結晶構造を、電界放射走査型電子顕微鏡(SEM: XL30、FEI製)観察、エネルギー分散型X線分光法(EDX、Genesis2000、

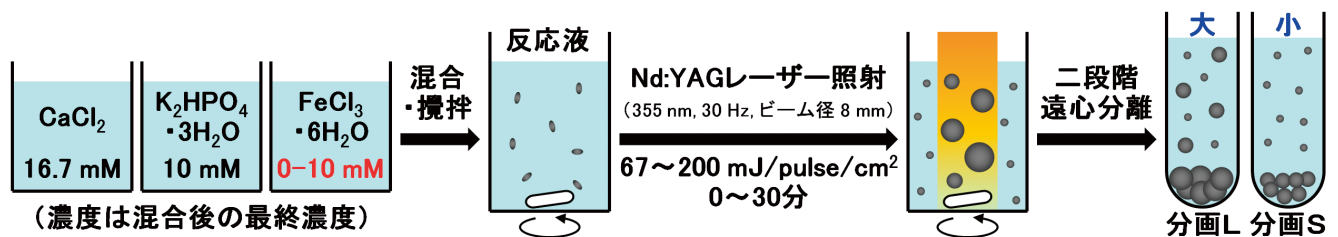


図1 鉄イオン共沈法による試料作製スキーム(鉄(Ⅲ)イオンの例)

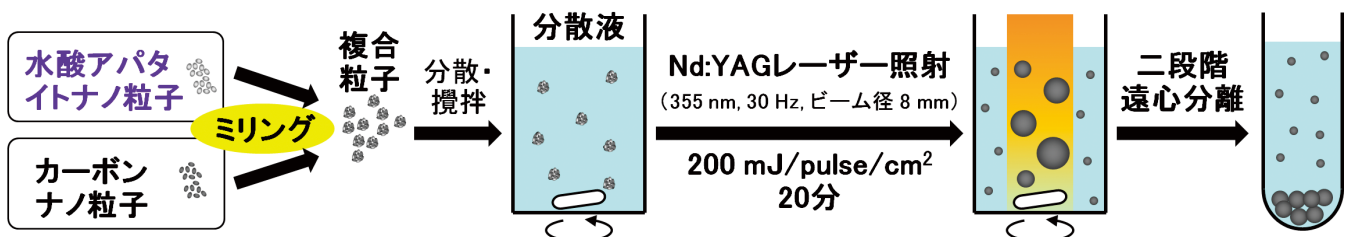


図2 カーボンミリング法による試料作製スキーム

EDAX 製)、透過型電子顕微鏡(TEM: JEM-2010、JEOL 製) 観察、および薄膜X線回折法(XRD: M18X、MAC Science 製) により調べた。SEM 観察およびEDX においては、試料をシリコン基板上にマウントし、表面にカーボンあるいは金を蒸着した。また、XRD においてはCuK $\alpha$ 線を用いた。

### 3. 結果と考察

#### 3. 1. 鉄イオン共沈法

##### 3. 1. 1. 光吸収剤として鉄(III)イオンを用いた場合<sup>3)</sup>

鉄(III)イオンを光吸収剤として用いて検討を行った。まず初めに、鉄(III)イオン濃度5mM、レーザー光のエネルギー密度200mJ/pulse/cm<sup>2</sup>、照射時間30分の条件下で作製された試料について、構造と組成の評価を行った。SEM 観察の結果、分画L に得られた試料は、主としてミクロンサイズ(DLS による平均粒子径=800nm)の球状粒子群であった(図3上)。一方、分画S に得られた試料は、サブミクロンサイズ(DLS による平均粒子径=450nm)の球状粒子群であった(図3下)。以上の結果から、本法によって、サブミクロンからミクロンサイズの球状粒子を合成できることが確認された。

分画S の球状粒子のEDX スペクトルを図4上に、XRD パターンを図4下に示す。EDX スペクトルでは、試料マウント用のシリコン基板およびカーボン蒸着膜に由来するピークの他に、カルシウム、リン、鉄、および酸素のピークが検出された(図4上)。XRD パターンでは、回折角2 $\theta$

=30° を中心にブロードなハローが検出された(図4下)。分画L に得られた粒子についても、同様のEDX スペクトルおよびXRD パターンが得られた。以上の結果から、分画S および分画L の球状粒子はいずれも、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムであると考えられた。

球状粒子の生成過程においては、反応液中の鉄(III)イオン濃度、およびレーザー光照射条件(エネルギー密度、照射時間)が重要な要素であると考えられた。そこで、レーザー光照射条件(200mJ/pulse/cm<sup>2</sup>、30分)を固定し、鉄(III)イオン濃度を変化させて試料を作製した。分画S および分画L の球状粒子生成の有無をSEM 観察により調べた結果を表1に示す。鉄(III)イオン濃度1mM以下の反応液からは、リン酸カルシウムの不定形沈殿物のみが生成し、いずれの分画にも球状粒子は確認されなかった。一方、鉄(III)イオン濃度2mMの反応液からは、分画S にサブミクロン球状粒子が確認された。反応液の鉄(III)イオン濃度を5mMに高めると、分画S のサブミクロン球状粒子(図3下)に加え、分画L のミクロン球状粒子(図3上)の生成も認められた。さらに鉄(III)イオン濃度を高めていくと、7mMでは分画S のサブミクロン球状粒子のみが生成し、10mMではいずれの分画にも球状粒子は生成しなくなった。この理由については、3.1.2.項で考察する。

次に、鉄(III)イオン濃度(5mM)およびレーザー光照射時間(30分)を固定し、レーザー光のエネルギー密度を変化させて試料を作製した。SEM 観察の結果(表2)、レー

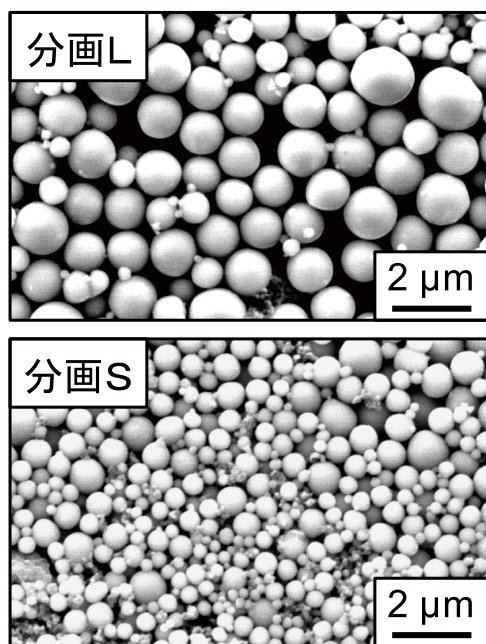


図3 鉄イオン共沈法で得られた分画L(上)と分画S(下)の試料のSEM像([Fe(III)]=5mM、30分照射)

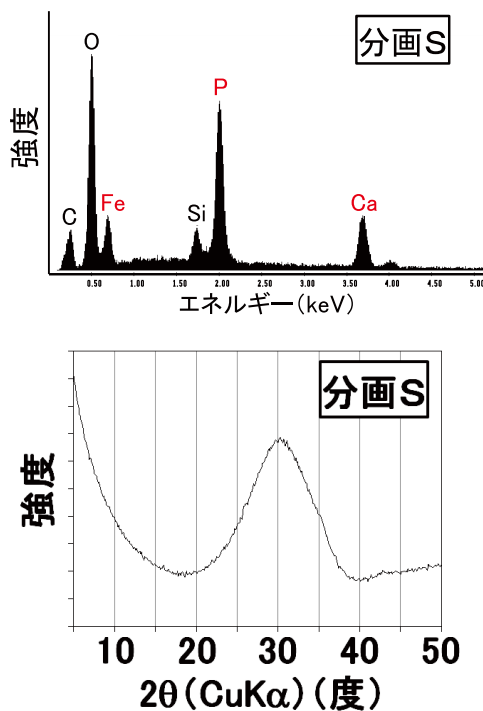


図4 鉄イオン共沈法で得られた分画Sの球状粒子のEDXスペクトル(上)とXRDパターン(下)([Fe(III)]=5mM、30分照射)

レーザー光のエネルギー密度  $67 \text{ mJ/pulse/cm}^2$  の条件では、いずれの分画にも球状粒子は確認されなかった。エネルギー密度を高めていくと、 $133 \text{ mJ/pulse/cm}^2$  の条件では分画 S にサブミクロン球状粒子が、 $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$  の条件では分画 S のサブミクロン球状粒子と分画 L のミクロン球状粒子の両方が生成するようになった。

続いて、鉄(III)イオン濃度(5mM)とレーザー光のエネルギー密度( $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ )を固定し、照射時間を変化させて試料を作製した。SEM観察の結果(表3)、照射時間10~15分の条件では分画Sにサブミクロン球状粒子が確認され、照射時間20~30分の条件ではさらに分画Lのミクロン球状粒子も確認された。この結果から、レーザー光の照射開始後10分以内にサブミクロン球状粒子が生成し、20分以内に一部の粒子がミクロンサイズにまで成長すると考えられた。

球状粒子の生成過程は以下のように考察される。反応液

表1 鉄イオン共沈法における鉄(III)イオン濃度と粒子生成の関係( $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ 、30分照射)

Fe(III) (mM)	0	1	2	5	7	10
粒子生成	×	×	S	S+L	S	×

×: 球状粒子生成せず

S: 分画Sに球状粒子生成

L: 分画Lに球状粒子生成

表2 鉄イオン共沈法におけるレーザー光のエネルギー密度と粒子生成の関係( $[\text{Fe(III)}] = 5 \text{ mM}$ 、30分照射)

エネルギー密度( $\text{mJ/pulse/cm}^2$ )	67	133	200
粒子生成	×	S	S+L

表3 鉄イオン共沈法におけるレーザー光照射時間と粒子生成の関係( $[\text{Fe(III)}] = 5 \text{ mM}$ 、 $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ )

レーザー時間照射(分)	0	5	10	15	20	30
粒子生成	×	×	S	S	S+L	S+L

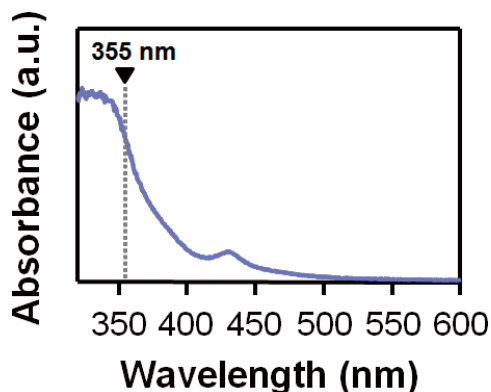


図5 鉄イオン共沈法において調製された反応液( $[\text{Fe(III)}] = 5 \text{ mM}$ )の初期析出ナノ粒子の吸収スペクトル

は調製直後に(レーザー光照射前)、波長355nmの紫外光吸収性(図5)を示すナノ粒子を自発析出する。この反応液にパルスレーザー光を照射すると、初期析出ナノ粒子の凝集体がレーザー光エネルギーを吸収し、加熱溶融されて球状液滴となる。球状液滴は、レーザーパルスの間隔において周囲の水溶媒によって急冷され、アモルファス球状構造を保ったまま固化する。以上のような溶融・急冷反応がパルスレーザー光照射下で繰り返されるのに並行して、生成粒子が反応液中のカルシウムイオン、リン酸イオン、鉄イオン、クラスターを取り込み成長していくことで、サブミクロンおよびミクロンサイズの鉄含有リン酸カルシウム球状粒子が生成したと考えられる。

### 3.1.2. 光吸収剤として鉄(II)イオンを用いた場合<sup>4)</sup>

続いて、鉄(III)イオンに代えて鉄(II)イオンを光吸収剤として用い、検討を行った。初めに、鉄(II)イオン濃度5mM、レーザー光のエネルギー密度 $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ 、照射時間20分の条件下で試料を作製した。SEM観察の結果、鉄(II)イオンを用いた場合にも、3.1.1.と同様、サブミクロンからミクロンサイズの球状粒子を合成できることが確認された(図6)。また、EDXおよびXRDの結果から、分画Sおよび分画Lの球状粒子はいずれも、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムであることも確認された。鉄(III)イオンと同様、鉄(II)イオンが反応液調製直後に析出するナノ粒子に含有されることで、レーザー光吸収と溶融・球状化を促したと考えられる。

続いて、レーザー光のエネルギー密度( $200 \text{ mJ/pulse/}$

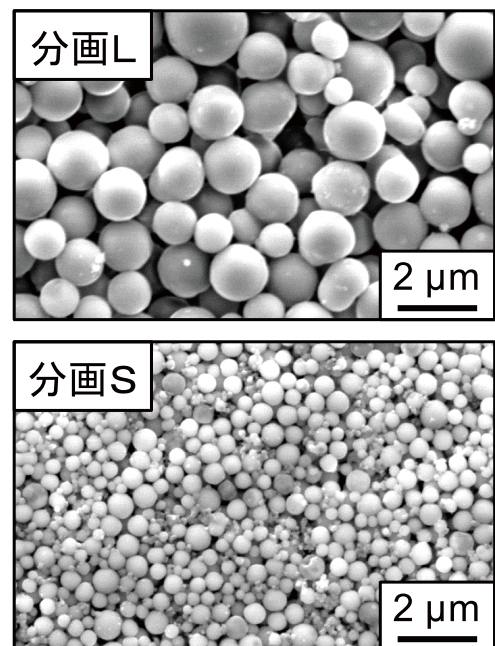


図6 鉄イオン共沈法により得られた分画L(上)と分画S(下)の試料のSEM像( $[\text{Fe(II)}] = 5 \text{ mM}$ 、20分照射)

cm<sup>2</sup>)と照射時間(30分)を固定し、鉄(II)イオン濃度を变化させて試料を作製した。分画Sおよび分画Lの球状粒子生成の有無をSEM観察により調べた結果を、鉄(III)イオンの結果(表1)と合わせて表4に示す。鉄(II)イオン濃度2mM以上の条件で、分画Sにサブミクロン球状粒子の生成が認められ、5mM以上の条件では、さらに分画Lにミクロン球状粒子の生成も確認された。また、鉄(III)イオンを用いた場合(2~7mM)と比較して、鉄(II)イオンを用いた場合(2~20mM)には、より広い濃度範囲において球状粒子が生成した。この理由の1つとして、調製直後の反応液の液性(pH)が考えられる。すなわち、鉄(III)イオンの原料試薬FeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oが酸性物質であることから、添加濃度の増加により反応液のpHが低下する(図7)。鉄(III)イオン濃度の高い反応液中では、リン酸鉄およびリン酸カルシウムの溶解度が上昇する結果、球状粒子の生成が抑制される。一方、鉄(II)イオンの原料試薬FeCl<sub>2</sub>・4H<sub>2</sub>Oの酸性度はFeCl<sub>3</sub>・6H<sub>2</sub>Oよりも弱いため、添加濃度の増加による反応液のpH低下が抑えられる。その結果、より高濃度(~20mM)の鉄(II)イオンを添加した場合にも、球状粒子が生成したと考えられる。

以上の結果から、光吸収剤として鉄(III)イオンまたは鉄(II)イオンを用いる鉄イオン共沈法により、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムからなるサブミクロンおよびミクロンサイズの球状粒子を合成できることが確認された。

表4 鉄イオン共沈法における鉄(II)/鉄(III)イオン濃度と粒子生成の関係(200mJ/pulse/cm<sup>2</sup>、30分照射)

鉄イオン濃度(mM)	0	1	2	5	7	10	20
Fe(II)	×	×	S	S+L	-*	S+L	S+L
Fe(III)	×	×	S	S+L	S	×	-*

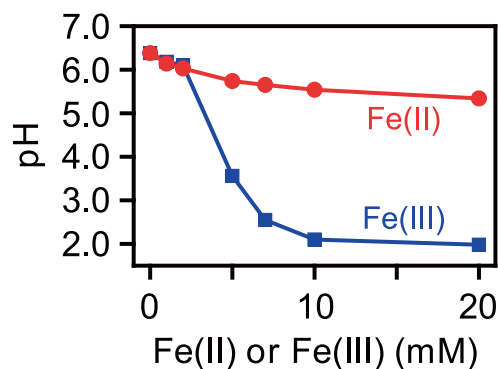


図7 鉄イオン共沈法において調製された反応液のpH(調製直後、レーザー照射前)

### 3.2. カーボンミリング法<sup>5)</sup>

カーボンミリング法で作製された試料のSEM像を図8上に、EDXスペクトルを図8下に示す。SEM観察の結果(図8上)、サブミクロンサイズ(100~400nm)の球状粒子の生成が認められた。EDXスペクトル(図8下)では、試料マウント用のシリコン基板および金蒸着膜に由来するピークの他に、カルシウム、リン、酸素、およびカーボンのピークが検出された。カーボンのピーク強度は、レーザー照射前の複合粒子と比較して大幅に減少した。これは、Liらも報告しているように<sup>2)</sup>、レーザー光照射により複合粒子中のカーボンが昇華あるいは分解したためと考えられる。生成したサブミクロン球状粒子の多くは、単一孔構造(Type A)または多孔構造(Type B)を有していたが、一部、緻密な構造(Type C)を有する粒子も確認された(図9)。透過電子線回折(TED)分析の結果、いずれの粒子もアモルファス構造を有していることが明らかになった(図9右上、Type Aの例)。

粒子の生成機構については、Liらの報告<sup>2)</sup>と同様と考えられる。すなわち、カーボンナノ粒子がレーザー光エネルギーを吸収し、それを水酸アパタイトナノ粒子との複合粒子に伝えることで、同複合粒子の熔融・球状化を促すと考えられる。この際、大部分のカーボンは昇華あるいは分解し、球状粒子中にはほとんど残らない。また、熔融液滴中に生じた気泡が、レーザーパルス間隔で急冷・固化される

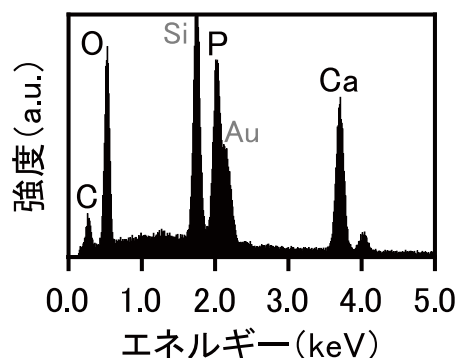
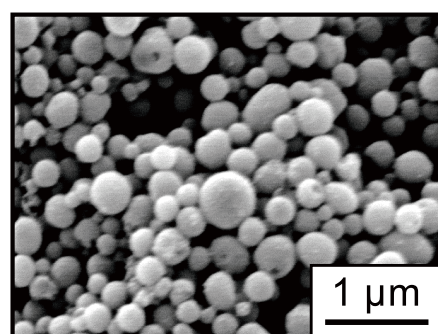


図8 カーボンミリング法により得られた試料のSEM像(上)とEDXスペクトル(下)

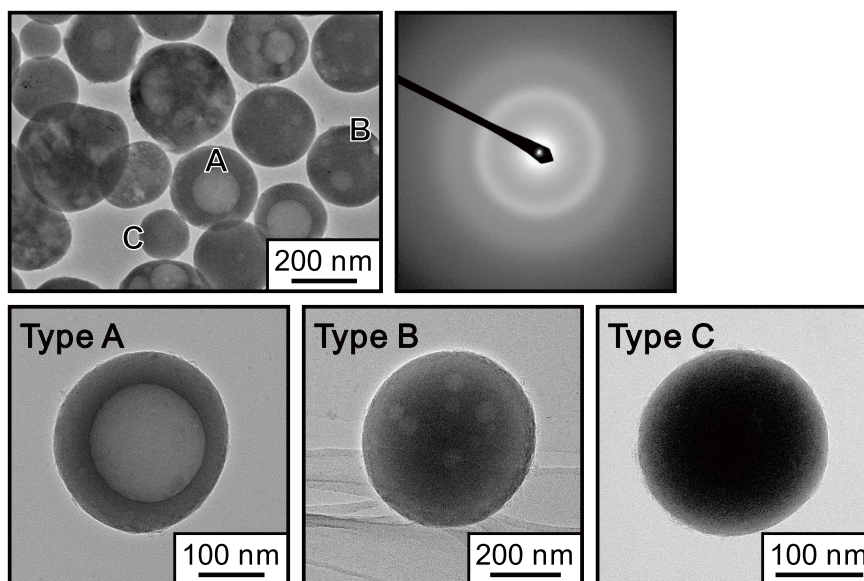


図9 カーボンミリング法で得られた試料のTEM像(左上、下)とTEDパターン(右上)

際に脱気できた場合には緻密構造が、脱気できずに残存した場合に孔構造 (Type A、Type B) が形成されると推察される。

以上、光吸収剤としてカーボンナノ粒子を用いるカーボンミリング法により、アモルファスリン酸カルシウムのサブミクロン球状粒子を合成できることが確認された。本手法で得られる球状粒子は孔構造を有することから、様々な薬剤分子のDDS担体として有用と考えられる。

#### 4. 総括

液中レーザー溶融法<sup>1)</sup>を発展させ、リン酸カルシウムに種々の光吸収剤を複合化することにより、リン酸カルシウム系サブミクロン球状粒子の合成に成功した。光吸収剤の複合化手法として、鉄イオン共沈法ならびにカーボンミリング法について検討し、それぞれの反応過程を明らかにするとともに、球状粒子を得るための基礎的条件を明らかにした。得られたリン酸カルシウム系サブミクロン球状粒子は、DDS担体として適した構造を有することから、治療効果を付加したコスメトロジー素材としての応用が期待される。今後の課題としては、粒子サイズの精密制御、大量合成技術の開発などが挙げられる。

#### 謝辞

本研究は、平成24年度コスメトロジー研究振興財団の助成を受けて行われたものである。研究の実施にあたっては、産業技術総合研究所の清水禎樹博士、坂巻育子氏をはじめ、関係各位にご協力を頂いた。

#### (引用文献)

- 1) H. Wang, A. Pyatenko, K. Kawaguchi, X. Li, Z. Swiatkowska-Warkocka and N. Koshizaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 6361.
- 2) X. Li, Y. Shimizu, A. Pyatenko, H. Wang and N. Koshizaki, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 14406.
- 3) M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Ishikawa, Y. Shimizu, K. Koga, K. Kawaguchi and N. Koshizaki, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 38442.
- 4) M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Ishikawa, T. Shimizu and K. Kawaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 8836.
- 5) M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Shimizu, K. Koga and N. Koshizaki, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 22620.