酵素反応を利用したカルシウムアパタイト粒子の合成

Synthesis of Calcium Apatite Particles using the Enzyme Reaction

06115

研究代表者 島根大学総合理工学部物質科学科

准教授 田 中 秀 和 Hidekazu Tanaka

Layered calcium phenyl phosphate ($\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4)_{0.92}(\text{HPO}_4)_{0.08}\text{Ca}\cdot 1.3\text{H}_2\text{O}$: CaPP), which is composed of a multilayer alternating bimolecular layer of phenyl groups and amorphous calcium phosphate phase, was treated in aqueous media including an enzyme such as alkaline phosphatase (ALP) at pH =9.6 and 37°C for 1 - 48 h. The CaPP was transformed into amorphous calcium phosphate with the same Ca/P molar ratio of calcium hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: Hap) by treating for 1 h. The formed amorphous material possessed no phenyl groups. Furthermore, the plate-like CaPP particles were vanished and the rod-like particles due to amorphous calcium phosphate with ca. 43nm in length and ca. 8nm in width were generated. These facts suggested that all the phenyl phosphates in CaPP were hydrolyzed to generate inorganic phosphate species such as PO_4^{3-} . The low crystalline Hap nano-particles with irregular shape were produced at 3 h. Then, the molar ratio Ca/P of the product was 1.68, almost corresponding to 1.67 of the theoretical ratio of Hap. The crystallinity of Hap was increased by elongating the treating period up to 6 h and then almost constant. The yielded Hap was rod-like particles with ca. 100nm in length and ca. 10nm in width. On the other hand, when the CaPP particles were treated in aqueous media in the absence of ALP, the CaPP was dissolved and the formation of Hap was not recognized. From these results, it can be presumed that the layered CaPP was dissolved, hydrolyzed and recrystallized to Hap nano-particles by using the ALP. This phase transformation of CaPP in Hap with ALP resembled to the formation mechanism of Hap in animal organism.

研究目的

アパタイトはカルシウムヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: Hap) に代表される塩基性金属リン酸塩の一種である。Hapは歯や骨のような生体内硬組織の主成分で、生体親和性が高く、人工歯、人工骨などに応用されている^{1, 2)}。また、工業材料としては、HPLC用吸着剤、酸塩基触媒、イオン交換体などに利用されている^{1, 2)}。一方、有機リン酸エステルは生体

の主構成物質の一つで、細胞膜を構成するリン脂質二重膜、DNAやRNAの主成分のヌクレオシド、生体活動のエネルギー源であるアデノシン三リン酸など多く存在する。これらの一部は生体内でアルカリホスホターゼ (ALP) やアシッドホスホターゼ (ACP) などの有機リン酸エステル加水分解酵素により、加水分解すると知られている。生体内でのHapの生成機構は、基質小胞内で Ca^{2+} 、 OH^- および有機リン酸エステルの加水分解により生成した PO_4^{3-} の反応と考えられてい

る^{1, 2)}。しかし、生体温度下でこれらのイオンから人工的にHapを合成すると、得られるHapはナノサイズの微粒子で、結晶性も生体内Hapより低い。そこで、我々は Ca^{2+} とアルキルあるいはフェニルリン酸イオンから有機基の2分子層と非晶質リン酸カルシウム相からなる層状有機リン酸カルシウムを合成し、これを用いたHapの合成について検討してきた³⁻⁵⁾。その結果、層状フェニルリン酸カルシウム ($(\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4)_{0.92}(\text{HPO}_4)_{0.08}\text{Ca} \cdot 1.3\text{H}_2\text{O}$: CaPP) を水溶液中、 $\text{pH}=5-7$ 、 85°C で処理すると、層間のフェニルリン酸は加水分解し、高結晶の針状Hap粒子（平均長軸長1.5 μm 、平均短軸長0.25 μm ）が生成した⁵⁾。しかし、生体温度下ではCaPPは加水分解せず、Hapは生成しなかった。

そこで、本研究では生体内に存在する有機リン酸エステルの加水分解酵素の一つであるALPを用い、生体温度下でのCaPPの加水分解によるHapの合成について検討した。

研究成果の概要

1. 実験方法

1.1 CaPPの合成

実験に用いたCaPPは既報⁵⁾に従い、湿式法で合成した。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (8.85mmol) を脱炭酸・脱イオン水450mlに溶解し、0.106mmol/dm³フェニルリン酸 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{PO}_4\text{H}_2$) 水溶液50.0mlを加えた。生成物を 37°C で24時間熟成後、ろ過、洗浄し、 50°C で24時間乾燥した。

1.2 CaPPを用いたHapの合成

調製したCaPP粒子1.20mmol (470.0mg) を蒸留水210.0mlに加え、室温で攪拌・分散した。この懸濁液に牛の腸粘膜から精製したALP (Biozyme Laboratories 社製：最活性 $\text{pH}=9.6$) 1.0-250.0mgの水溶液210mlを加え、さらに懸濁液の pH を1.0mol/dm³ NH_3 水で9.6に調整した。これを 37°C で48時間、インキュベーター内で処理した。得られた生成物はろ過、洗浄し、 50°C で24時間乾燥した。

1.3 測定

粉末X線回折 (XRD) 測定は、理学Rint-2100SLで行った。測定条件は管電圧30kV、管電流16mAで、CuK α 線を用いた。TEM観察は、Topcon EM-002Bで行った。IR測定は、日本分光FTIR660を用い、KBr法で行った。CaおよびP含有量はSeiko SPS-1200A誘導結合プラズマ発光分析 (ICP-AES) で、炭素含有量

はYanagimoto MT-6 CHNコーダーで求めた。窒素吸着等温線はQuantachrome Autosorb 1-Cで測定した。

2. 実験結果および考察

2.1 CaPPの加水分解に及ぼすALP添加量の影響

Fig. 1にALP存在下、 37°C で48時間処理したCaPPのXRDパターンを示す。CaPPのXRDパターンには $2q = 6.6^\circ$ ($d = 1.33\text{nm}$), 13.3° ($d = 0.66\text{nm}$), 20.0° (0.44nm), 26.8° (0.32nm) に回折ピークが現れ、これらの面間隔比は約1:1/2:1/3:1/4になることから、層状化合物と認められた。ALP 0mg下でCaPPを処理したところ、得られた物質のXRDパターンはCaPPと一致し、構造変化は見られなかった。また、処理後の物質の量はFig. 2のように6.3mgで、出発CaPP量 (470.0mg) と比べ大幅に減少した。よって、CaPPの大部分は処理により溶解したとわかった。処理溶液にALPを1.0mg添加したところ、生成物の収量は81.4mgと大幅に増加し、そのXRDパターンにはCaPPの回折ピークは全く見られず、 $2q = 25.8^\circ$, 32.1° , 39.6° , 49.7° にHapの回折ピークが現れた。よって、CaPPはALP存在下で溶解・加水分解し、Hapに再結晶化すると示唆される。ALP添加量が増加してもHapの回折強度に大きな変化は見られなかったが、収量はALP添加量10.0mgまで増加し、それ以降ではほぼ一定になった。

Fig. 3にALP存在下で処理したCaPPのIRスペクトルを示す。CaPPのスペクトルには 3603 , 3567cm^{-1} にOH基の伸縮振動帯、 1595 , 1493cm^{-1} にフェニル基の環伸縮振動帯、 1215 , 1112 , 1028cm^{-1} にフェニルリン酸

Fig. 1 XRD patterns of CaPP treated with different ALP amounts at 37°C .

Fig. 2 Plots of yield of the products as a function of additive amount of ALP.

Fig. 3 IR spectra of CaPP treated with different ALP amounts at 37°C.

のP-O伸縮振動帯が現れた。ALPを1.0mg添加すると、CaPPの吸収帯は消失し、 3566cm^{-1} にOH伸縮振動帯、 $1097, 1036\text{cm}^{-1}$ に PO_4^{3-} のP-O伸縮振動帯、 $570, 510\text{cm}^{-1}$ にP-O変角振動帯が現れた。これらのことから、フェニルリン酸はALPにより完全に加水分解したと示唆される。ALP添加量が増加しても生成したHapのIRスペクトルには大きな変化は認められなかった。

Fig. 4にALP存在下で処理したCaPPのモル比Ca/Pおよびフェニル基/Pを示す。CaPPのCa/P比は1.0であった。ALP 0mgではCa/P比に変化は認められなかったが、1.0mg添加すると1.68と急激に増加した。

Fig. 4 Plots of ($\square$) molar ratio Ca/P and ($\circ$) phenyl groups/P against additive amount of ALP.

ALP添加量が増加してもCa/P比に大きな変化は認められず、Hapの理論組成から求めたCa/P=1.67とほぼ一致し、ほぼ化学量論的と明らかになった。一方、CaPPのフェニル基/Pは0.92であったが、ALPを1.0mg以上添加すると、ほぼゼロになり、フェニル基は完全に加水分解したとわかった。これらは、XRDおよびIRの結果と一致する。

Fig. 5にALP存在下で処理したCaPPのTEM写真を示す。CaPPは $0.5\text{--}1.5\text{ }\mu\text{m}$ の板状粒子の凝集体で、窒素吸着等温線から求めた比表面積は $4\text{ m}^2/\text{g}$ であった。ALPを1.0mg添加すると、粒子の凝集状態に大きな変化は認められなかったが、一次粒子は板状から棒状に変化し、同時に比表面積は $198\text{ m}^2/\text{g}$ と大幅に増加した。XRDの結果から、生成した棒状粒子はHapとわかった。ALP添加量が増加してもHapの一次粒子形態および凝集状態に大きな変化は見られなかった。

以上の結果から、Hapは以下のように生成すると示

Fig. 5 TEM pictures of CaPP and CaPP treated with different ALP amounts at 37°C.

唆される。CaPPは式 (1) のように溶解する。

フェニルリン酸イオンは式 (2) のようにALPと反応し、ALP-フェニルリン酸イオン中間体を形成した後、リン酸イオン、フェノキシドイオン、ALPに加水分解する。反応後のALPは未反応のフェニルリン酸イオンを加水分解し、触媒的な働きをする。そのため、ALPを1.0mg添加するだけでフェニルリン酸は完全に加水分解する。

式 (1) で生成したリン酸水素イオンは式 (3) のようにリン酸イオンとプロトンになる。

式 (1) — (3) で生成した Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} および水溶液中の OH^- が反応し、式 (4) のようにHapが生成する。

2.2 Hapの生成過程

ALP存在下でのHapの生成過程を調べるため、CaPPをALP添加量10.0mg, 37℃, pH=9.6で種々の時間処理した。Fig. 6に各処理時間で得られた物質のXRDパターンを示す。1時間処理すると、CaPPの回折ピークは大幅に減少し、同時に $2\theta = 25-35^\circ$ に非晶質相によるハローおよび $2\theta = 29.4^\circ$ に回折ピークが現れた。このピークの帰属は現在のところ明らかになっていない。CaPPの回折ピークは3時間処理する

Fig. 6 XRD patterns of the products at different treating periods. The additive amount of ALP was 10.0mg.

と消失し、同時に $2\theta = 25.8^\circ, 32.1^\circ$ にHapのピークがわずかに現れた。6時間処理後には、ハローは消失し、Hapの回折強度は増加した。これらのことから、CaPPは6時間で加水分解し、Hapが再結晶化すると示唆される。さらに、12時間以降では、Hapの回折強度に大きな変化は認められなかった。

Fig. 7に各処理時間で生成した物質のIRスペクトルを示す。CaPPを1時間処理するとOH基帯、フェニル基帯およびフェニルリン酸のP-O伸縮帯はほぼ消失し、同時に 1053cm^{-1} に PO_4^{3-} のP-O伸縮帯、 582cm^{-1} にP-O変角振動帯が現れた。また、モル比Ca/Pは1.0から1.68に増加し、フェニル基/P比は0.92から0.17に減少した。これらのことから、CaPPを1時間処理すると、HapのCa/P比に近い非晶質リン酸カルシウムが生成すると考えられる。3時間処理するとIRスペクトル、モル比Ca/Pに変化はほとんど見られなかったが、フェニル基/P比は0.02に減少し、フェニル基はほぼ加水分解したと明らかになった。さらに6時間後には、 3566cm^{-1} にOH伸縮帯、 $1097, 1036\text{cm}^{-1}$ にP-O伸縮帯、 $601, 560\text{cm}^{-1}$ にP-O変角帯が現れ、Hapのスペクトルとほぼ一致した。

Fig. 8に各処理時間で得られた物質のTEM写真を示す。CaPPは板状粒子であったが、1時間処理すると長軸長約43nm, 短軸長約8nmの米粒状粒子が現れた。3時間後には米粒状粒子はほとんど認められなくなり、約36nmの不定形粒子が現れた。XRDおよびIR測定から、これらはHapの前駆帯の非晶質リン酸カルシウム粒子と示唆される。さらに6時間以上処理すると、不定形粒子は消失し、同時に長軸長約100nm, 短軸長約10nmの棒状Hap粒子が現れた。

Fig. 7 IR spectra of the products at different treating periods. The amount of ALP additive was 10.0mg.

Fig. 8 TEM pictures of the products at different treating periods. The additive amount of ALP was 10.0mg.

3. 今後の研究の見通し

これまでの擬生体条件下でのHapの合成では、SBF (Simulated Body Fluid) 溶液を用いた研究が中心であった。それは、生体内でのHapの生成機構は、 Ca^{2+} , OH^- および有機リン酸イオンから生成した PO_4^{3-} の無機イオン反応と考えられているためである。しかし、このような反応で人工的に合成したHapは生体内Hapと大きく異なる。したがって、生体内では従来とは異なる機構でHapは生成する可能性がある。そこで酵素による加水分解反応を用いたCaPPからのHap粒子の合成について検討したところ、以下の知見を得た。

(1) ALP存在下、生体温度 (37℃), pH = 9.6でCaPPを処理すると、CaPPの溶解、ALPによるフェニルリン酸の加水分解およびHapナノ粒子の再結晶化が起こる。

(2) ALP 1.0mgで1.20mmol (470mg) のCaPPを加水分解することができる。これは、ALPが触媒的な働きをするためと示唆される。

(3) HapはALP存在下でCaPPを6時間処理すると生成する。

本研究で得られたHapは生体内Hapと比べ、結晶性は低く、粒子サイズは小さいため、生体反応の完全な再現には十分至っていない。しかし、生体内では本研究で提案した機構でもHapは生成する可能性があると考えられる。また、生体内には酵素だけでなく、様々な無機および有機物質が存在する。したがって、Hapの生成に対するこれらの関連についても詳細に調べることで、生体内でのHapの生成機構がより明らかになるとと思われる。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ICP測定でご協力頂いた大阪教育大学教育学部 神鳥和彦教授に厚く御礼申し上げます。また、TEM観察についてご指導頂いた、島根大学 総合科学研究支援センターの米山綱雄氏に深く感謝します。

参考文献

- 1) J. C. Elliott, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- 2) R. Z. LeGeros, Hydroxyapatites and Related Materials, CRC Press, London, 1994.
- 3) H. Tanaka, T. Watanabe, M. Chikazawa, K. Kandori, T. Ishikawa, *Colloids Surf. A*, **139**, 341-349 (1998).
- 4) H. Tanaka, K. Oomori, R. Hino, *J. Colloid Interface Sci.*, **273**, 685-689 (2004).
- 5) H. Tanaka, K. Ibaraki, M. Uemura, R. Hino, K. Kandori, T. Ishikawa, *Mater. Res. Bull.*, **42**, 1364-1373 (2007).

発表論文

- 1) H. Tanaka, K. Taniguchi, Synthesis, Structure and Phase Transformation of Layered Iron Phenyl Phosphate, *Colloids Surf. A*, **20**, 165-170 (2009).