水熱法により得られた水酸アパタイトナノ結晶のタンパク質吸着特性及び抗菌性

笠原英充・小形信男・荻原 隆

福井大学大学院工学研究科ファイバーアミニティ工学専攻, 910-8507 福井市文京 3-9-1

Protein Adsorption and Antibacterial Behavior for Hydroxyapatite Nanocrystals Prepared by Hydrothermal Method

Hidemitsu KASAHARA, Nobuo OGATA and Takashi OGIHARA

Graduate School of Fiber Amenity Engineering, Fukui University, 3-9-1, Bunkyo, Fukui-shi 910-8507

Homogeneous hydroxyapatite nanocrystals which have aspect ratio with more than four were synthesized by hydrothermal method. X-ray fluorescence analysis revealed that the Ca/P ratio of hydroxyapatite nanocrystals was maintaining start composition. The protein adsorption properties and bacteria-resistant of hydroxyapatite nanocrystals were investigated. The protein adsorption properties of hydroxyapatite nanocrystals were improvement after the hydrothermal treatment. Bacteria-resistant behavior of hydroxyapatite nanocrystals was not observed, however, multiplication of bacteria was not observed, either.

[Received December 27, 2004; Accepted April 21, 2005]

Key-words : Hydroxyapatite, Nanocrystal, Hydrothermal, Protein, Bacteria-resistant

1. 緒 言

水酸アパタイト (以下 HAp: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) はリン酸カルシウム化合物の中でも生体親和性に優れており, その特徴的な吸着作用は, クロマトグラフィー用カラム充填剤や各種固定担体として応用されている¹⁾. HAp の吸着作用は医用分野でも注目されており, 歯垢を吸着させる歯磨材や酵素等を徐放する生体埋入材料などへの適用が期待されている²⁾.

上記の各種用途に要求される HAp 粒子としては粒子径がナノオーダーで, かつ, 結晶相の制御が重要であると考えられる. ところで HAp の合成方法には, 湿式法, 水熱法, 加水分解法や乾式法などが挙げられ, 特に, 水熱法は, c 軸成長したウイスカー状あるいは柱状の, HAp 単結晶が得られやすく^{3),4)}, 著者らも過去に水熱法による原料因子と結晶形態の影響に関して既に報告している⁵⁾. また, 水熱法は, 結晶学的異方性を積極的に活用しやすく, Ca^{2+} と錯体形成しやすいクエン酸等の有機物の添加や⁶⁾, Ca^{2+} 以外の陽イオンを添加した際のイオン交換性など, 成長プロセス中での相互関係の検討がなされているが⁷⁾, 共存される種類や量などの複合的な要素の解明には課題が多いのも事実である. 本研究では, 水熱合成法で得られた HAp ナノ結晶のアルブミン吸着特性及び抗菌特性について検討し, 吸着特性と複合的な因子について報告する.

2. 実験方法

2.1 水酸アパタイトナノ結晶の調製及び評価

リン酸カルシウム粒子の合成はつぎのとおりである. 20°C に保持したステンレス製容器中で塩化カルシウム (CaCl_2) 水溶液に, リン酸-水素ナトリウム (Na_2HPO_4) 水溶液をローラーポンプにより 30 min で滴下した. 滴下中の pH は 6.5~7.5 の範囲になるように水酸化ナトリウムで調整した. 滴下終了後, 更に 1 h (20°C) 熟成を行った. 混合中のかくはん速度は 270 rpm とし, 塩化カルシウム及びリン酸-水素ナトリウムのモル比は 1.67 になるようにし, 濃度は混合後で 1 M になるようにした. 得られた白色のスラリーはオートクレーブ中で 120°C-12 h 水熱

処理と 150°C-12 h 水熱処理を 2 系統行い, 処理後, 生成物を濾過した後, 水洗して試料を得た.

生成後の HAp ナノ結晶の状態は, FT-IR (FT/IR-410, 日本分光製) 及び粉末 X 線回折装置 (XRD, M3X, マックサイエンス製) で検討した. HAp ナノ結晶における Ca/P の組成比や純度は, 蛍光 X 線分析 (EDX, JSM-5610, JEOL) と原子吸光光度計 (AA-6800, 島津製作所製) により求めた. HAp ナノ結晶の比表面積 (SSA) は BET 法 (NOVA2000, ユアサ製) により求めた. HAp ナノ結晶の水中の表面電位は電気泳動法 (ゼータ電位, ゼータサイザー ナノ ZS, Malvern) により求めた. HAp ナノ結晶を水中に浸漬し, その水の pH は, ハンディ pH 計 (pH81-11, 横河電機製) により求めた. HAp ナノ結晶の形態は透過型電子顕微鏡 (TEM: FX-2000, JEOL) を用いて観察した. HAp ナノ結晶の平均粒径及びアスペクト比は TEM 写真から 200 個の粒子を無作為に抽出して求めた.

2.2 タンパク質吸着特性

タンパク質には牛血清アルブミン (BSA: Bovine Serum Albumin) を用い, 1.0 g/L 濃度の BSA 溶液を調製した. 200 ml の BSA 溶液中に試料を 2.0 g 投入し, かくはんした後, 37°C のインキュベーターに静置した. 溶液中のタンパク質濃度を Bio-Rad Protein Assay による Bradford 法にて吸光光度計 (Maltiskan JX, Thermo) を使用して測定 ($\lambda = 525 \text{ nm}$) した. 測定は試料浸漬後, 0~72 h の範囲で行った. また, 試料未添加 (Control) との吸着効果の比較を行った.

2.3 抗菌性

水熱処理前後の試料を 16 mmφ×3 mm の円盤状に加圧形成したものを測定試料とした. 12 h 培養後の口腔内の代表的なウエック菌 (*Streptococcus mutans* MT⁸¹⁴⁸) の懸濁液を希釈した 3 mL の細胞懸濁液 (4×10^7 cells/mL) 中に試料を投入した. 37°C で 1 h 及び 3 h 静置培養した後, おおのの懸濁液を希釈し, MSB (*Mitis-Salivarius* Bactracin) 寒天培養皿にプレーディングした. この MSB 寒天プレートで 37°C で 48 h 培養し, コロニーの形成を計測した. 本実験では, この試験を 3 回繰り返した.

また、試料未添加 (Control) との吸着効果の比較を行った。

3. 結果及び考察

3.1 HAp 粒子の粒子特性

得られた HAp ナノ結晶の水熱処理前後の XRD と IR スペクトルから、水熱処理前の結晶性は非常に低いものの、HAp が生成していることが分かった。水熱処理後、HAp ナノ結晶の結晶性は著しく向上していることが分かった。XRD から HAp 相以外の結晶相は観察されなかった。また、IR から CO_3^{2-} 起因 (870 cm^{-1}) の吸収が水熱処理前後ともわずかに確認された。図 1 に水熱処理前後の HAp ナノ結晶の TEM 写真を示す。水熱処理後の HAp 粒子は、電子線回折から明確なスポットが観察され、ほぼ単結晶であることが分かった。ナノ結晶の TEM 観察から求めた生成粒子の平均粒径及びその他の物性を表 1 に示す。水熱処理後、HAp ナノ結晶のアスペクト比は 4 以上となり、 c 軸に成長していることが分かる。BET 法から求めた HAp ナノ結晶の比表面積は $122\text{ m}^2/\text{g}$ であったが、 120°C 、 150°C の水熱処理後では、それぞれ $61\text{ m}^2/\text{g}$ と $42\text{ m}^2/\text{g}$ まで減少していることが分かった。また、蛍光 X 線分析により求めた HAp 粒子の Ca/P 比は、1.65 (120°C) と 1.67 (150°C)

Fig. 1. TEM photographs of HAp nanocrystals prepared by hydrothermal method using the aqueous solution of $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$.

であることから、ほぼ出発組成を維持していた。

3.2 タンパク質吸着特性及び抗菌効果

水熱処理前後の HAp ナノ結晶におけるタンパク質吸着特性の変化を図 2 に示す。 c 軸成長した HAp ナノ結晶の BSA 吸着特性は、水熱処理前と比較すると高いことが分かる。タンパク質の吸着には、多くの因子が複雑に関与していると考えられているが、BSA の性質としてカルボキシル基 ($-\text{COOH}$) が存在するため、負の電荷を示すと考えられている。水熱合成後の HAp 粒子は、 c 軸に成長していることから、Ca 原子により構成される a 面 (Ca サイト) の表面積の占める割合が、酸素原子により構成される c 面 (P サイト) より増大する。このため、正の電荷を示す Ca 原子と結晶表面で静電的な相互作用する面積が増大することにより、水熱処理後の HAp は高い BSA 吸着性を示すものと考えられる^{8),9)}。一方、水熱処理後の比表面積 (表 1) は約 $1/2\sim 1/3$ に減少していることから、タンパク質吸着に対して一般的にいわれる物理的因子 (ファンデルワールス吸着) の影響は、静電的な相互作用より少ないものと推察される。また、IR スペクトルによる CO_3^{2-} 起因の吸収量は、水熱前後であまり変化していないことから、含有 CO_3^{2-} とタンパク質吸着との関連性は把握することができなかった¹⁰⁾。一方、ゼータ電位の値 (表 1) は、水熱処理前はほぼ等電点であるのに対し、水熱処理後は負に帯電している傾向を示していた。また、HAp ナノ粒子中での、 Ca^{2+} のイオン半径 (0.099 nm) が似た値である Na^+ (イオン半径 0.097 nm) の存在量 (表 1) が、水熱処理後には著しく減少していた。HAp の溶解度は、溶解度積 $K_{\text{sp}}(=[\text{Ca}^{2+}]^{10}\cdot[\text{PO}_4^{3-}]^6\cdot[\text{OH}^-]^2)$ に束縛されるため、水熱合成により、Ca/P のモル比が高くなるほど、 PO_4^{3-} の溶出量も当然増えると考えられる。これは、水熱後の pH がわずかながら酸性側に傾いたことにも一致し、ゼータ電位値がマイナス側へ傾いたものと考えられる。

以上のことから、水熱法による HAp ナノ粒子の Ca/P モル

Fig. 2. Protein adsorption capacity of HAp nanocrystals prepared by hydrothermal method using the aqueous solution of $\text{CaCl}_2\text{-Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$.

a) Control, b) before hydrothermal treatment, c) after hydrothermal treatment at 120°C , d) after hydrothermal treatment at 150°C .

Table 1. Particle Size, Ca/P Ratio, Na Content, SSA and Zeta Potential of HAp Nanocrystals Prepared by Hydrothermal Method

	c :axial / a :axial (nm)	Ca/P	Na (ppm)	SSA (m^2/g)	Zeta potential (mv)
(a)Before Hydrothermal	—	1.56	8700	122	-0.8 (pH6.6)
(b)After Hydrothermal(120°C)	90/22	1.63	260	61	-10.3 (pH6.2)
(c)After Hydrothermal(150°C)	135/24	1.67	80	42	-10.3 (pH6.2)

Table 2. Bacteria-Resistant Properties of HAp Nanocrystals Prepared by Hydrothermal Method

	1 hour after	3 hour after
Control	$5.9 \times 10^7/\text{mL}$	$3.1 \times 10^8/\text{mL}$
(a) Before Hydrothermal	$7.5 \times 10^7/\text{mL}$	$1.8 \times 10^8/\text{mL}$
(b) After Hydrothermal (120°C)	$5.3 \times 10^7/\text{mL}$	$1.7 \times 10^8/\text{mL}$
(c) After Hydrothermal (150°C)	$5.1 \times 10^7/\text{mL}$	$1.7 \times 10^8/\text{mL}$

比の増大は、表面電位や電気的な吸着特性に影響を与えられ¹¹⁾。

水熱処理により得た HAp ナノ結晶の吸着特性を、細菌への応用についても検討してみた。表 2 に抗菌性の結果を示す。表 2 より、水熱処理前後で抗菌性に有意差は見受けられなかった。しかしながら、一般的に HAp は細菌との親和性があるといわれており¹²⁾、抗菌試験で菌が増殖する場合もあるが、今回の菌試験では Control と比較し、そのような増殖は観察されなかった。

4. 結 論

水熱法により c 軸に成長した水酸アパタイトナノ結晶を合成し、タンパク質吸着特性及び抗菌効果について検討した。その結果、以下の知見が得られた。

(1) 水熱法によりアスペクト比が 4 以上の HAp ナノ結晶が得られた。

(2) 水熱処理により HAp ナノ結晶のアルブミンの吸着特性が向上した。

(3) HAp ナノ結晶は、水熱処理による抗菌効果は観察されなかったが、菌の増殖も観察されなかった。

References

- 1) Narasaraaju, T. S. B. and Phebe, D. E., *J. Mater. Sci.*, Vol. 31, pp. 1–21 (1996).
- 2) Otuka, M., *Seitai Zairyo*, Vol. 14, pp. 224–229 (1996) [in Japanese].
- 3) Ioku, K., Yoshimura, M. and Sōmiya, S., *J. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 9, pp. 1565–1570 (1988) [in Japanese].
- 4) Asaoka, N., Suda, H. and Yoshimura, M., *J. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 1, pp. 25–29 (1995) [in Japanese].
- 5) Kasahara, H., Ogata, N. and Ogihara, T., *J. Ceram. Soc. Japan*, Vol. 112, pp. 650–654 (2004) [in Japanese].
- 6) Yoshimura, M., Suda, H., Okamoto, K. and Ioku, K., *J. Mater. Sci.*, Vol. 29, pp. 3399–3402 (1994).
- 7) Aizawa, M., Kinoshita, M., Yamada, K., Itatani, K. and Kishioka, A., *Inorganic Materials*, Vol. 5, pp. 387–397 (1998) [in Japanese].
- 8) Ohta, K., Monma, H. and Kawasaki, T., *Inorganic Materials*, Vol. 6, pp. 224–230 (1999) [in Japanese].
- 9) Kawasaki, T., *Ceramics Japan*, Vol. 20, pp. 195–203 (1985) [in Japanese].
- 10) Ikenoya, O., Sato, K., Soeno, Y. and Aoba, T., *Jpn. J. Oral-Biol.*, Vol. 44, pp. 210–224 (2002) [in Japanese].
- 11) Kandori, K., *Phosphorus Letter*, No. 27, pp. 12–16 (1996) [in Japanese].
- 12) Makishima, A. and Aoki, H., “Bio Ceramics,” Gihodo Shuppan (1984) pp. 59–60 [in Japanese].