リン酸八カルシウム骨前駆体の調製と アパタイトへの転化特性評価

Preparation and Evaluation of Octacalcium Phosphate Bone Precursor Transformable to Apatite

魚田 浩志, 松田 恵利, 山本 辰美, 森 英利

Hiroshi Uoda, Eri Matsuda, Tatsumi Yamamoto, Hidetoshi Mori

Received 25 March 2011; Accepted 24 June 2011

Reaction of an aqueous suspension of dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) and calcium carbonate at 30~80°C was applied to prepare octacalcium phosphate (OCP) powder expected to be a bone precursor in accord with bone remodeling process. XRD analysis confirmed that the reaction temperature and reaction time strongly exert an influence on a crystalline form of prepared OCP. OCP synthesized at 60°C showed a characteristic stability to time changes. Increasing reaction temperature however resulted in the rapid decomposition of OCP to hydroxyapatite (HAp) because of the consecutive reaction $\text{DCPD} \rightarrow \text{OCP} \rightarrow \text{HAp}$. OCP powders were immersed in simulated body fluid (SBF) to evaluate its transformation ability to HAp. SEM micrographs and EDS analysis demonstrated that calcium-deficient HAp should be crystallized after the dissolution of OCP into SBF. OCP synthesized at 60°C was transformed to HAp rapidly after the immersion time of 21 days.

Keywords: Hydroxyapatite, Octacalcium phosphate, Simulated body fluid, Bone precursor, Bone remodeling

1. 緒 言

水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp) 焼結体は、HAp に対して過飽和な生体内では溶解することなく安定しており、結果として良好な生体親和性と線維性結合組織の介在なしで母床骨と直接結合する骨伝導性を示し、骨代替材料として広く臨床応用されている。しかし、破骨細胞による材料の吸収を起点とする骨形成は起こらないため、破骨細胞と骨芽細胞の調和によって進行する骨リモデリングに組込まれることなく、生体内で単に骨代替物として存在するだけのスペースメーカーとしての役割を果たすのみである^{1,2)}。そのため、いかに親和性に優れていても、周

囲の骨が経時的にリモデリングされて新しい骨に置換されていく段階で異物とみなされ、いずれ排泄や排除あるいは結合組織による被包化に移行する可能性が大きいといえる。したがって、埋入される材料は骨のモデリング素材となるものであり、その後に生ずるリモデリングにも対応して成熟骨に移行することが望ましい。

骨は、骨芽細胞が I 型コラーゲンや非コラーゲン性タンパク質を分泌して類骨を形成し、その上で HAp が核付けされて石灰化が始まるといわれている (Fig. 1 参照)。最近になり、この核付けされる結晶は HAp ではなく、その前駆体のリン酸八カルシウム ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: OCP) であり、この OCP と非コラーゲン線維が相互作用して骨形成が進行する可能性が指摘されている^{3~7)}。OCP は HAp と結晶構造が類似しており⁸⁾、生理的環境下において加水分解によって HAp へと結晶構造を転換する物理化学的性質をも

富山大学大学院 理工学研究部
(〒930-8555 富山市五福3190) TEL 076-445-6856
Graduate School of Science and Engineering for Research,
University of Toyama
(3190 Gofuku, Toyama 930-8555, Japan)

Fig. 1 Schematic illustration of biomimetic method compared with pathological calcification mechanism

つのが特徴である⁹⁾。そこで、この OCP を骨前駆体として骨欠損部に埋入すれば、生体内で HAp に転化し、その後は生理的な骨の形成過程に組み込まれることが期待できる。

一般に OCP は HAp の準安定相であるため、純粋な結晶相の OCP 合成は極めて困難といわれている¹⁰⁻¹²⁾。本報では、反応が比較的容易なリン酸水素カルシウム二水塩 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: DCPD) と炭酸カルシウム CaCO_3 の反応を利用して、結晶性の高い OCP 合成を目的とした。この反応は逐次反応で、OCP は中間生成物として得られるため、反応温度や反応時間が OCP 結晶性に及ぼす影響を中心に考察を行った。また、得られた OCP の HAp への転化能を考察するため、Fig. 1 に示す類骨上での石灰化を模擬したバイオミメティック法により評価した。すなわち、無機成分がヒト血漿成分と類似した組成をもつ擬似体液 (SBF) を調製し、合成した OCP を SBF 中に浸漬させて、その形態や結晶相の経時変化の観察より OCP が HAp に転化する速度について考察した。

2. 実験方法

2. 1 OCP 合成条件の最適化

出発原料には DCPD と CaCO_3 (和光純薬、いずれも試薬特級) を用い、以下の反応によって OCP を合成する。

この反応は $\text{DCPD} \rightarrow \text{OCP} \rightarrow \text{HAp}$ の逐次反応であるため、中間生成物の OCP を安定かつ効率的に生成す

Fig. 2 Characteristic XRD patterns of DCPD, HAp and OCP

るための合成条件の特定を行った。

DCPD と CaCO_3 を Ca/P 比が OCP の化学量論比となるよう、それぞれ 0.02 と 0.0067 mol を蒸留水 200 mL とガラスビーカー内で混合した。反応はマグネチックスターラー攪拌下で行い、恒温槽により反応温度を 30~80°C、反応時間を 1~48 h の範囲内で設定し、OCP の結晶成長に及ぼす影響を検討した。得られた生成物は濾過・水洗したのちデシケータ内で十分乾燥させ、FE-SEM (日本電子, JSM-6700F) による形態観察および粉末 XRD (島津製作所, LabX XRD-6100) による結晶相の同定に供した。Fig. 2 に示すように、各結晶相の特異的なピークとして、OCP の場合は (010) 面 ($2\theta = 4.7^\circ$)、DCPD の場合は (020) 面 ($2\theta = 11.6^\circ$)、HAp の場合は (300) 面 ($2\theta = 32.9^\circ$) を用い、各結晶相の生成量を相対的に比較した。ここで、HAp の最強回折ピークは (211) 面 ($2\theta = 31.8^\circ$) であるが、OCP の (241) 面 ($2\theta = 31.7^\circ$) と重なるため、HAp 生成の判定には (300) 面を用いることとする。なお、XRD による走査範囲は $3.00 \sim 45.00^\circ$ とし、走査ステップ 0.05° 、走査速度 $0.5^\circ/\text{min}$ に設定した。

2. 2 OCP の HAp への転化能評価

反応温度、反応時間を変化させて合成した OCP を SBF に浸漬させ、HAp への転化能を評価した。SBF は Kokubo らの方法¹³⁾に従って調製した。すなわち、PE 製容器に 800 mL の蒸留水を入れ、温度 $36.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に調節した恒温槽内にて、NaCl, NaHCO_3 , KCl, K_2HPO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 および Na_2SO_4 (和光純薬、いずれも試薬特級) を、この順序に所定量ずつ溶解させた。また、pH はトリス緩衝液 (トリスヒドロキシメチルアミノメタン $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) および 1 mol/L-HCl (和光純薬、いずれも試薬特級) によって

Fig. 3 XRD patterns of the products prepared at various reaction temperature and reaction period ;
○ : OCP, Δ : DCPD, □ : HAp

調製し、体温下36.5℃で標準の pH=7.25~7.4 とした。なお、調製した SBF の Ca および P イオンを ICP 発光分析装置 (PerkinElmer Optima 7300 DV) によって定量し、ヒト血漿成分の分析値 (Ca^{2+} 2.5 mmol/L, HPO_4^{2-} 1.0 mmol/L) と一致することを確認している¹³⁾。

OCP の SBF への浸漬では、SBF 50 mL を入れた PE 製容器に合成した OCP 粉末 0.25 g を入れ、恒温槽内で SBF 温度を 36.5℃ に保持して、最長 56 日間浸漬を続けた。なお、長期にわたる浸漬では SBF 中の Ca および P イオンの過飽和度が減少することが予想される。その影響を把握するため、SBF を 7 日ごとに交換する浸漬実験も併せて行った。所定時間浸漬を続けた試料は濾過・水洗したのちデシケータ内で十分に乾燥させ、FE-SEM による形態観察、粉末 XRD による結晶相の同定、および EDS (日本電子, JED-2200)

Fig. 4 Time changes in X-ray diffraction intensity of OCP (010) line at various reaction temperature

による表面の元素分析に供した。

3. 実験結果および考察

3. 1 OCP 生成に対する反応温度、反応時間の影響

XRD で観察された生成物の回折パターンの反応時間への依存性を、反応温度ごとにまとめた図を Fig. 3 に示す。反応温度 30℃ では、反応時間 24 h まではほとんど変化が見られないが、24 h から OCP ピークがわずかに出現し、さらに、48 h ではピークもやや増加していることから OCP の合成が確認できる。しかし、DCPD ピークはわずかな減少しかみられず、ほとんどが未反応 DCPD であるといえる。40℃ では 30℃ とほぼ同様な傾向が確認されるが、48 h では DCPD ピークが大きく減少し、一方、HAp ピークが特徴的に出現している。さらに、50℃ では 1 h 程度の反応時間で OCP ピークが出現し、24 h 後には DCPD ピークが完全に消滅して、OCP が合成されたことが確認できる。また、OCP の出現とともに HAp ピークもみられ、逐次反応の進行が推察される。しかし、24 h 以降の回折パターンには、大きな変化はみられず、さらに、40℃ の場合と比べると、48 h 後には 40℃ の場合の HAp ピークの方がやや大きく出ている。

反応温度 60℃ では、1 h の反応で DCPD ピークが消滅して OCP ピークが明確に出現し、その後も安定して OCP が存在していることが分かる。さらに、反応温度を 70℃ まで上昇させると、60℃ の場合と同様に 1 h の反応で OCP が合成されることが確認できるが、8 h 程度からは HAp ピークが時間経過とともに増大しており、48 h ではほとんどが HAp まで反応が進行している。また、80℃ についてもほぼ同様な結果が得ら

Fig. 5 SEM micrographs of HAp crystallized over OCP surfaces as a function of immersed period
Samples were synthesized under the temperature of 60°C and reaction period of 12 h

Fig. 6 SEM micrographs of HAp crystallized over OCP surfaces as a function of immersed period
Samples were synthesized under the temperature of 80°C and reaction period of 1 h

れたが、4 h 程度から HAp ピークが増大し、24 h 後にはほぼ HAp に変化している。

Fig. 4 では、**Fig. 3** で示した OCP (010) 面における X 線回折強度の時間変化を、反応時間に対して相対的に比較した。図の結果より、反応温度の上昇とともに、短い反応時間で OCP が合成される傾向がみられ、また、60°C では OCP 強度が反応時間に対して安定していることが認められる。さらに、70°C、80°C では 1 h の反応で OCP が生成されるものの、その後の減少は高い温度ほど速く、HAp まで反応が進行している。これより、反応温度と反応時間を変化させた定性的な結果の比較からではあるが、本報の実験範囲においては、反応温度 60°C および反応時間 12 h で、結晶化度の高い OCP を安定的に合成できることが明らかとなった。また、回折強度からの相対的な考察ではあるが、反応温度 60°C において、OCP 収率も 80~85% となることが確認できる。

3. 2 OCP の SBF 中における HAp へ転化能の評価

骨欠損部に OCP を埋入した場合の HAp への転化特性を調べるため、**Fig. 4** で示した各反応温度で最も結晶化度の高い OCP、すなわち、反応温度 30°C を除く 40°C-18 h、50°C-24 h、60°C-12 h、70°C-4 h、および 80°C-1 h の反応条件で合成した OCP を SBF に浸漬させ、その形態や回折パターンの変化を中心に考察した。

Fig. 5 および **Fig. 6** には、60°C および 80°C で合成した OCP の SEM 撮像による形態変化の測定結果を例示した。いずれも OCP は、三斜晶系に特徴的な薄刃状の形態を呈している。反応温度 60°C の OCP は、浸漬 7 日頃から表面に微小な結晶が析出し始め、浸漬時間の経過により析出量および結晶の大きさが成長し

Fig. 7 SEM micrograph of HAp crystallized with typical prism morphology

ている様子が確認できる。ここで、28日間浸漬したサンプルの、拡大した SEM 撮像を **Fig. 7** に示す。薄刃状の OCP 結晶の上に、長さ 200~300 nm の柱状結晶が析出しており、その形態から六方晶系の HAp であると考えられる。さらに、この結晶を EDS により元素分析した結果、量論比からの OCP と HAp の Ca/P 値の比 0.8 に対して測定値 0.87 が得られ、HAp の Ca が量論比より低い Ca 欠損型 HAp であることが予測される。ヒト体内で産生される HAp も Ca サイトが Mg や K、Na に、また、PO₄ サイトが CO₃ に置換された Ca 欠損型 HAp であり、その結晶構造は化学量論的 HAp に酷似している²⁾。

一般に OCP は Ca²⁺ と PO₄³⁻ の配列が HAp に類似するアパタイト層と、DCPD に類似する水和層が OCP の a 軸方向に向かって交互に積層した結晶構造を有することが知られている⁸⁾。したがって、このような結晶構造の類似性も、OCP がヒト体内での HAp 生成機構に前駆体として関与する可能性を示唆していると考えられ、OCP を骨欠損部に埋入した場合には Ca 欠損

Fig. 8 SEM micrographs of HAp crystallized over the surfaces of OCP immersed in controlled SBF

型 HAp への転化が期待でき、生体活性材料としての用途も広がるといえる。

OCP から HAp への転化機構については、アパタイト層を基にした *in situ* における加水分解¹⁴⁾と、OCP 溶解後に HAp が再析する機構¹⁵⁾が知られているが、本報の実験で析出した HAp は後者のメカニズムに基づくことが推測される。リン酸カルシウム $[\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}]$ 系における水中 (25°C, pH=5~10) での溶解度曲線に基づけば¹⁾, HAp がどのリン酸カルシウムよりも溶解度が低く、最も安定している。そのため、HAp 以外のリン酸カルシウム系材料は、pH=7.2~7.4 の生理的環境下であっても一旦溶解し、その後の最終生成物としては最安定の HAp として再析出すると考えられる。このことは、水中という平衡状態における溶解度積を基準にしているが、HAp が過飽和となっている体液内では、HAp とその他のリン酸カルシウムの溶解度の差は相対的にさらに大きくなる。加えて、生体内に埋入した場合には、体液が還流していることを考慮すれば、OCP のような HAp 以外のリン酸カルシウムはさらに溶解が大きく生じることが予想される。

反応温度 80°C で合成した OCP についても、浸漬 7 日程度で HAp の柱状結晶が析出しているものの、60°C の場合と比較して析出量が少ないことが分かる。他の反応温度条件で合成した OCP についても、HAp 析出が始まる時間は 60°C の場合に比して遅く、また、析出量も少ない傾向がみられた。サンプルには各合成条件下で最も回折強度の高い OCP を使用しており、OCP 結晶化度が HAp 転化能に影響を及ぼすことが推察されるが、さらなる詳細までは明らかにすることはできなかった。

一般に化学量論的 HAp は $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ で表されるが、 PO_4^{3-} は pH>10 でしか安定に存在しない

Fig. 9 Time changes in X-ray diffraction intensity of OCP(010) and HAp(300) lines

め、生体内環境下の pH=7.2~7.4 では $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_5(\text{PO}_4)(\text{OH})$ のような Ca 欠損型として存在している^{2,6,7)}。この Ca^{2+} が欠損していても必ずしも空孔になるとは限らず、イオン半径の近い K や Mg および Na イオンなどに置換されるのが一般的である。また、生理的環境下では CO_3^{2-} が豊富に存在するため、 PO_4 サイトの HPO_4^{2-} と容易に交換した Ca 欠損型になる。よって、SBF 中でも OCP が溶解-再析出の機序に従えば、生体内と同様に Ca^{2+} が欠落した HAp が産生されると考えられる。

Fig. 5 および Fig. 6 より HAp の析出は確認されるが、OCP 溶解後の HAp 再析出が支配メカニズムであるとするれば、SBF 中の Ca^{2+} や PO_4^{3-} の過飽和度も、HAp 析出に伴って減少することが予想される。そこで、浸漬 7 日ごとに新しい SBF に交換し、その影響を検討した。なお、サンプルには、最も結晶化度の高い OCP が得られた 60°C-12h の条件で合成した OCP を使用した。Fig. 8 に、SBF に浸漬した OCP 表面の 7 日ごとにおける SEM 撮像を例示する。Fig. 5 と同様に 7 日程度で HAp の析出が確認できるが、14 日、21 日経過後の析出量にはほとんど差がみられない。しかし、浸漬 28 日の結果からは析出量に顕著な差がみられ、また、400 nm 程度にまで c 軸方向に成長したと考えられる HAp 結晶が確認できる。さらに、Fig. 9 には、XRD 測定から得た OCP(010) 面と HAp(300) 面での回折強度の経時変化を示す。浸漬 21 日までは、OCP 強度の緩やかな減少と HAp 強度の緩慢な増加がみられるが、浸漬 28 日後では HAp の生成が急激に増加している。このことは Fig. 8 の SEM 撮像からも確認され、結晶の更なる成長が進行しているものと予測される。

骨前駆体としての OCP は、骨欠損部に埋入した場合には速やかに HAp に転化することが望ましいと考

えられ、HAp への転化速度の向上が今後の課題といえる。現在、骨折治癒促進を目的として低出力超音波パルス (LIPUS) 照射が広く利用されている。骨折部への LIPUS という物理的刺激から、骨折治癒過程における早期の骨癒合に至るまでのメカニズムは解明されていないが、臨床報告例は数多くなされており、骨形成速度に何らかの影響を及ぼすことは確かである。本研究においても、OCP 埋入後の HAp への転化促進を目的として、LIPUS 照射の効果について系統的な実験により検討を続けている。

4. 結 言

リン酸水素カルシウム二水塩 DCPD と炭酸カルシウムの逐次反応を利用してリン酸八カルシウム OCP を調製し、生成物を擬似体液 SBF 中に浸漬させて水酸化アパタイト HAp への転化能に及ぼす合成条件の影響を検討し、以下の結言を得た。

1) 反応温度および反応時間の制御により、結晶化度

の異なる OCP の合成が可能である。とくに、反応温度 60°C では 1 h の反応で OCP が合成され、その後も安定して OCP のまま存在することを示した。さらに、反応温度を上昇させると、OCP の合成は速くなるものの、時間とともに HAp まで反応が進行し、高温ほど HAp への反応も速いことが明らかとなった。

2) 合成した OCP は SBF 中で HAp に転化し、その形態観察から OCP 溶解後に HAp が再析出する機構が推測された。

3) 析出した結晶の EDS 分析により、転化した HAp は天然骨に類似するカルシウム欠損型アパタイトであることが明らかとなった。

4) 本報における実験条件の範囲では、反応温度 60°C、反応時間 12 h の条件で合成した OCP は最も結晶化度が高く、SBF に浸漬 21 日後より HAp への急速な転化が認められた。

References

- 1) Sugawara, A.: "Kotsu Saisei Technology", pp. 13-28, Zenith Press (2008)
- 2) Ishikawa, K.: "Bioceramics That Completely in accord with Bone Remodeling", *Biomaterial-Seitaizairyo*, **27**, 76-83 (2009)
- 3) Tohda, H., M. Yamada, Y. Yamaguchi and T. Yanagisawa: "High-Resolution Electron Microscopical Observations of Initial Enamel Crystals", *J. Electron Microsc.*, **46**, 97-101 (1997)
- 4) Crane, N. J., V. Popescu, M. Morris, P. Steenhuis and M. A. Ignelzi Jr.: "Raman Spectroscopic Evidence for Octacalcium Phosphate and Other Transient Mineral Species Deposited During Intramembranous Mineralization", *Bone*, **39**, 434-442 (2006)
- 5) Grynpas, M. D. and S. Omelon: "Transient Precursor Strategy or Very Small Biological Apatite Crystals?", *Bone*, **41**, 162-164 (2007)
- 6) Ozawa, H., K. Hoshi and N. Amizuka: "Current Concepts of Bone Mineralization", *J. Oral Biosci.*, **50**, 1-14 (2008)
- 7) Suzuki, O.: "Biological Role of Synthetic Octacalcium Phosphate in Bone Formation and Mineralization", *J. Oral Biosci.*, **52**, 6-14 (2010)
- 8) Mathew, M., W. E. Brown, L. W. Schroeder and B. Dickens: "Crystal Structure of Octacalcium Bis (Hydrogenphosphate) Tetrakis (Phosphate) Pentahydrate, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ", *J. Cryst. Spectrosc. Res.*, **18**, 235-250 (1988)
- 9) Nakano, Y.: "Preparation and Characterization of Porous Octacalcium Phosphate Setting Improved by α -Tricalcium Phosphate Additive", *Dent. Mater. J.*, **19**, 65-76 (2000)
- 10) Ban, S.: "Synthesis of Octacalcium Phosphate by Reactions of Dicalcium Phosphate and Calcium Carbonate", *Phosphorus Bulletin*, **1**, 155-160 (1991)
- 11) Ban, S., J. Hasegawa and S. Maruno: "Synthesis of Octacalcium Phosphate and its Transformation to Apatite", *Dent. Mater. J.*, **15**, 210-217 (1996)
- 12) Suzuki, O., S. Kamakura and T. Anada: "Octacalcium Phosphate as a Bone Substitute Material", *Biomaterial-Seitaizairyo*, **26**, 199-204 (2008)
- 13) Kokubo, T. and H. Takadama: "How Useful is SBF in Predicting in vivo Bone Bioactivity?", *Biomaterials*, **27**, 2907-2915 (2006)
- 14) Tseng, Y. H., C. Y. Mou and J. C. Chan: "Solid-State NMR Study of the Transformation of OCP to Hydroxyapatite: A Mechanistic Model for Central Dark Line Formation", *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6909-6918 (2006)
- 15) LeGeros, R. Z., G. Daculsi, I. Orly, T. Abergas and W. Torres: "Solution-Mediated Transformation of OCP to Apatite", *Scanning Microsc.*, **3**, 129-137 (1989)