薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
104 (10) 1024-1029 (1984)

ヒドロキシアパタイトの分散性に及ぼすコンドロイチン硫酸イオンと カルシウムイオンの添加の影響

嶋林三郎,* 角谷重幸, 中垣正幸
京都大学薬学部

Effect of Chondroitin Sulfate Ion and Calcium Ion on the Dispersion of Hydroxyapatite

SABURO SHIMABAYASHI,* SHIGEYUKI SUMIYA, and MASAYUKI NAKAGAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Yoshida-
Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan

(Received May 23, 1984)

Optical density (OD), as an index for the suspension stability of hydroxyapatite (HAP; 5 g/dl), was measured at 550 nm in an aqueous solution of CaCl_2 mixed with sodium chondroitin-6-sulfate (Na_2Chs). The contour lines for OD with respect to concentrations of CaCl_2 and Na_2Chs were obtained. It was found that the suspension stability of HAP decreases with an increase in concentration of CaCl_2 , but increases with an increase in concentration of Na_2Chs . It was concluded that HAP suspension is stabilized mainly by virtue of steric hindrance effect and inter-particle electrostatic repulsion effect of negatively charged segments of adsorbed Chs, even though ionic strength is high and the net charge of HAP particles becomes positive (*i.e.*, the amount of adsorbed Ca^{2+} is larger than that of adsorbed Chs).

Keywords—hydroxyapatite; suspension stability; dispersion; aggregation; chondroitin sulfate; polymer adsorption; steric hindrance; hard tissue; renal calculus

緒 言

コンドロイチン硫酸 (Chs) はコラーゲン等のタンパクと共に硬組織の形成に関与しているといわれている。¹⁾ この硬組織はヒドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HAP) の微結晶の集合体から成り、骨マトリックス中には Chs が含有されている。²⁾ また尿中に含まれている Chs は、HAP 等を構成成分とする尿路結石の形成抑制物質の1つとしても知られている。³⁾

本報においては、前報⁴⁾ で得られた Ca^{2+} と Chs の HAP に対する吸着量をもとにして、HAP 懸濁液の分散・凝集に及ぼす Chs と Ca^{2+} の影響について考察する。また、前報⁵⁾ で述べた Chs とリン酸イオンとが共存する系における HAP の分散性との比較も行う。

実 験

試料 HAP は前報^{4,5)} と同一試料である。島津製作所製 粉体比表面積測定装置 SS-100 によれば HAP の平均粒径は $0.155 \mu\text{m}$, 比表面積は $12.2 \text{ m}^2/\text{g}$ である。⁵⁾

Chs は科研薬化工(株)より提供されたコンドロイチン 6-硫酸ナトリウムを用いた。⁴⁾ 本試料中には微量のコンドロイチン 4-硫酸ナトリウムが含まれている。分子量は $7-8 \times 10^4$ である。本報においては、コンドロイチン硫酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸カルシウムをそれぞれ Na_2Chs , CaChs と表し、電離度あるいは対イオンの種類にかかわらず、コンドロイチン硫酸糖鎖を Chs で表すことにする。

他の試薬は半井化学(株)あるいは和光純薬(株)より購入した試薬特級を用いた。

方法 HAP (1 g) を、種々の濃度の CaCl_2 と Na_2Chs とを混合した水溶液 (20 ml) 中へ懸濁させ、約 5 分間試験管中で激しく振り混ぜた後、 25°C で 45 h 静置した。実験結果のバラツキをできるだけ防ぐため、振り混ぜ

の強度と時間 (5 min) は一定とし、試験管は同一種のもの (内径 18 mm) を使用した。⁵⁾

45 h 経過したのちに試験管を傾斜して試験管上層部の HAP が懸濁している部分を取りだし、波長 550 nm における光学密度 (OD) を測定して HAP 分散性の尺度とした。^{5,6)} 別途に、HAP をはかりこんで懸濁させ、ただちに OD を測定する場合に、HAP 粒子濃度と OD とがほぼ比例することを確認した。したがって、OD が大なるほど HAP 懸濁液の安定性が大であるといえる。なお、種々の濃度の Na_2Chs 、 CaCl_2 、HAP を含む懸濁液の pH はほぼ中性であった。

本報における Na_2Chs の濃度単位は、溶液 100 ml あたりのグラム数 (g/dl) または繰り返し単位 (2 糖単位) あたりのミリモル濃度 (mM) で表す。すなわち本報では形式上 Chs は 2 価アニオンとみなされている。

結 果

Na_2Chs と CaCl_2 が共存する時の HAP の分散性

はかりこんだ CaCl_2 と Na_2Chs の濃度比 (すなわち $[\text{CaCl}_2]_t/[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$) を一定にして $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ を変化させた時の OD の変化を Fig. 1 に示した。各曲線は $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ と共に S 字型に単調に増加する。これらの曲線は前報⁵⁾ に示した $\text{Na}_2\text{Chs} \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 混合系へ HAP を懸濁させた場合の鐘状の曲線とは対照的な形状をなしている。 CaCl_2 を加えない場合 (○) に比べ、 $[\text{CaCl}_2]_t/[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ の増加と共に曲線は下方 (あるいは右側) へ移行し、 CaCl_2 添加により懸濁液が不安定化することを示している。

Fig. 2 は $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t/[\text{CaCl}_2]_t$ を一定にして OD と $[\text{CaCl}_2]_t$ との関係を見た図である。 Na_2Chs を添加しない場合 (⊗) には HAP の分散性は悪くほとんどの HAP 粒子は沈降してしまうが、少量の Na_2Chs を添加することによって OD は大となり、HAP の分散性は良好となる (たとえば △; $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t/[\text{CaCl}_2]_t = 0.00934$)。 Na_2Chs の CaCl_2 に対する濃度比が大となれば曲線は左側へ移行する。

OD の等高線

Figs. 1 及び 2 をもとにしてえられる OD の等高線を Fig. 3 に実線で示した。 Fig. 3 より、 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ が大で $[\text{CaCl}_2]_t$ が小である領域においては HAP 分散系は安定 (OD が大) であり、 $[\text{CaCl}_2]_t$ が大で $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ が小である領域では HAP 分散系は不安定 (OD が小) であることがわかる。前報⁵⁾ の $\text{Na}_2\text{Chs} \cdot \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 混合系においては、等高線図には地形図でいう尾根や谷がみられたが、本報の場合には斜面しかみられない。これは、 Na_2HPO_4 とは異なり CaCl_2 が HAP 粒子に対して凝集作用を示すのみで分散作用をほとんど示さないためである (Fig. 2 の ⊗ 参照)。

前報⁴⁾ で得られた Ca^{2+} と Chs の吸着等温線をもとにして、HAP に対する Ca^{2+} の吸着量の等高線を点線 (·····) で、Chs の吸着量の等高線を破線 (----) で同じく Fig. 3 に示した。

Fig. 1. Relationship between Concentration of Na_2Chs and Optical Density

$[\text{CaCl}_2]_t/[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ (mM/mM): ○, 0 (CaCl_2 is not added.); ●, 2.49; ⊗, 12.74; △, 107.0.

Fig. 2. Relationship between Concentration of CaCl_2 and Optical Density

$[\text{Na}_2\text{Chs}]_t/[\text{CaCl}_2]_t$ (mM/mM): ⊗, 0 (Na_2Chs is not added.); △, 0.00934; ●, 0.04938; ⊗, 0.07849; ●, 0.4016.

Fig. 3. Contour Lines for Optical Density and the Amounts of Adsorption of Chs and Ca^{2+}

P (●): OD=1.0, $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t = 4.0 \times 10^{-2}$ g/dl, and $[\text{CaCl}_2]_t = 7.6$ mM

—: contour lines for OD.

---: contour lines for the adsorbed amount of Chs $\times 10^5$ /(mol/g-HAP).

....: contour lines for the adsorbed amount of $\text{Ca}^{2+} \times 10^5$ /(mol/g-HAP).

The adsorbed amount of Ca^{2+} shown here is the sum of the amount of Ca^{2+} adsorbed directly to the surface of HAP and that of Ca^{2+} captured as a counter-ion for the adsorbed Chs on the surface of HAP.

Fig. 4. Concentration of Na_2Chs (A) and Adsorbed Amounts of Chs and Ca^{2+} (B) as a Function of Concentration of CaCl_2

(1) Chs adsorbed by HAP, $[\text{Chs-HAP}]$.

(2) Ca^{2+} adsorbed directly to the surface of HAP, $[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$.

(3) ionized amount of Chs on the surface of HAP, $z [\text{Chs-HAP}]$.

OD=1.0.

HAP の分散性を一定に保つ時の、 Na_2Chs と CaCl_2 の添加量と吸着量

HAP の分散性、すなわち光学密度 OD (=1.0) が一定の時の $[\text{CaCl}_2]_t$ と $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ との関係を Figs. 1, 2 及び 3 より求めて Fig. 4 (A) に示した。 $[\text{CaCl}_2]_t$ の増大と共に $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ が増大している。

Fig. 4 (A) に示された濃度の Na_2Chs と CaCl_2 とが共存する水溶液中での、HAP に対する Chs の吸着量 $[\text{Chs-HAP}]$ を前報⁴⁾ の吸着等温線より求めて Fig. 4 (B) の曲線 (1) で表し、吸着 Chs を介しないで HAP 表面へ直接吸着する Ca^{2+} 量 $[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$ を曲線 (2) で表した。 後者は、 Ca^{2+} の HAP に対する全吸着量から吸着 Chs の対イオンとして結合している Ca^{2+} 量を差し引くことによって求められる。⁴⁾ また、 Ca^{2+} と Na^+ とが共存する系における吸着 Chs の電離度 z の値を前報^{7,8)} より求め、HAP 表面で電離している Chs の量 $z [\text{Chs-HAP}]$ を曲線 (3) で表した。 なお、吸着した Chs の電離度 z が水中に溶存している Chs の電離度にほぼ等しいことは前報^{4,8)} で確めてある。

一定濃度の Na_2Chs 水溶液中へ CaCl_2 を添加する時の HAP の分散性

Na_2Chs の添加濃度 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ を一定に保ち (4.0×10^{-2} g/dl), CaCl_2 の添加濃度 $[\text{CaCl}_2]_t$ を増大させる時、すなわち Fig. 3 の OD の等高線群のほぼ中央部に選んだ点 P を通って垂直方向へ移動する時の OD の値を Fig. 1 及び 3 より求めて、Fig. 5 (A) に示した。 $[\text{CaCl}_2]_t$ の増大と共に HAP の分散性が低下するのがわかる。 この時の $[\text{Chs-HAP}]$, $[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$, $z [\text{Chs-HAP}]$ の変化を Fig. 4 の場合と同じく $[\text{CaCl}_2]_t$ の関数として Fig. 5 (B) に示した。

一定濃度の CaCl_2 水溶液中へ Na_2Chs を添加する時の HAP の分散性

CaCl_2 添加濃度 $[\text{CaCl}_2]_t$ を 7.6 mM に保ち、 Na_2Chs の添加濃度 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ を増大させる時 (すなわち Fig. 3 の点 P を通って水平方向へ移動する時) の OD の変化を Fig. 6 (A) に示した。 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ の増大と共に OD, したがって HAP の分散性が大となっている。 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ の小さい時 (図 (A) の左下) には OD の値が上下するが、この OD の値は小さいので (0.01—0.05) 実質上 HAP 粒子のほとんどは沈降してしまっている。

Fig. 6 (A) が示す各 OD の値におけるそれぞれの値, $[\text{Chs-HAP}]$, $[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$, $z [\text{Chs-HAP}]$ を $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$

Fig. 5. Optical Density (A) and Adsorbed Amounts of Chs and Ca^{2+} (B) as a Function of Concentration of CaCl_2

- (1) Chs adsorbed by HAP, $[\text{Chs-HAP}]$.
 (2) Ca^{2+} adsorbed directly to the surface of HAP, $[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$.
 (3) ionized amount of Chs on the surface of HAP, $z [\text{Chs-HAP}]$.
 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t = 4.0 \times 10^{-2} \text{ g/dl}$.

$[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$ も $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ と共に減少し、⁴⁾ 曲線 (2) はやや右下りとなっている。

考 察

HAP 粒子の分散の安定性に影響を及ぼす要因の1つである HAP の荷電状態を詳細に検討するためには、界面動電現象のデータが必要である。しかし、本節においては Figs. 4, 5 及び 6 の結果をもとにして、それぞれの場合の分散性を Fig. 3 の点 P の近傍において比較することにする。点 P の近傍においては存在するイオン種とその濃度がほぼ共通しているので定性的な比較は可能である。

$[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$ は遊離平衡状態にある Ca^{2+} の濃度によって定まるが、^{4,8)} 対イオンの Cl^- は HAP 表面のリン酸イオンとほとんどイオン交換をしないことから⁹⁾ Cl^- の HAP に対する親和性は比較的弱いと考えられる。したがって、本報では吸着 Ca^{2+} は HAP 表面 (すなわち Stern 層) へ取り込まれるが対イオンの Cl^- は大部分が拡散電気二重層に分布しており、 Ca^{2+} の吸着によって HAP は正荷電をもつようになるを考える。一方、吸着 Chs によっては $z [\text{Chs-HAP}]$ だけの負荷電が HAP に与えられるので、両者の差が HAP 粒子表面がもつ正味の荷電密度の便宜的な尺度となる。

前節で述べたように Na_2Chs とのイオン交換によって CaCl_2 の一部が消費されて NaCl と CaChs とになること、⁷⁾ 及び Ca^{2+} の一部は HAP へ吸着されることを考慮すれば前報⁴⁾ の吸着等温線を参考にして溶液中のイオン強度を算出することができる。

このようにして求められた HAP の荷電密度とイオン強度 I との関係を Fig. 7 (A) に、Figs. 4, 5 及び 6 の曲線 (1) によって示されている Chs の吸着量と I との関係を Fig. 7 (B) に図示した。図中の点 P は Fig. 3 の点 P に相当する位置を示している。また図中 s, u で $\text{OD}=1.0$ (○印) の場合よりも安定 ($\text{OD}>1.0$)、あるいは不安定 ($\text{OD}<1.0$) であることを表わす。

Fig. 7 (A), (B) によれば、 I の増大に伴い正味の荷電量と Chs の吸着量の両者が増大することによって OD が一定 ($=1.0$) に保たれている (○印)。しかし $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ を一定にする時には ($=4.0 \times 10^{-2} \text{ g/dl}$)、 I の増大と共に荷電量は増大しているが (Fig. 7 (A), ●印), Fig. 5 (A) に示したように OD は低下して系は不安定化している。

Fig. 6. Optical Density (A) and Adsorbed Amounts of Chs and Ca^{2+} (B) as a Function of Concentration of Na_2Chs

- (1) Chs adsorbed by HAP, $[\text{Chs-HAP}]$.
 (2) Ca^{2+} adsorbed directly to the surface of HAP, $[\text{Ca}^{2+}\text{-HAP}]$.
 (3) ionized amount of Chs on the surface of HAP, $z [\text{Chs-HAP}]$.
 $[\text{CaCl}_2]_t = 7.6 \text{ mm}$.

の関数として Fig. 6 (B) に示した。 $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t$ の増大と共に、陽イオン交換によって溶液中の CaCl_2 ($=7.6 \text{ mm}$) の一部が消費されて CaChs と NaCl となるので、⁷⁾ 溶液中の CaCl_2 濃度はやや低下する。このため、水中で遊離状態にある Ca^{2+} の濃度によって定まる HAP へ直接吸着する Ca^{2+} の量

Fig. 7. Charge Density of HAP (A) and Adsorbed Amount of Chs (B) as a Function of Ionic Strength

○: OD=1.0, ●: $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t = 4.0 \times 10^{-2} \text{ g/dl}$, ○: $[\text{CaCl}_2]_t = 7.6 \text{ mM}$,
 s: OD>1.0, u: OD<1.0,
 P: OD=1.0, $[\text{Na}_2\text{Chs}]_t = 4.0 \times 10^{-2} \text{ g/dl}$, and $[\text{CaCl}_2]_t = 7.6 \text{ mM}$.

また, Fig. 7 (A) の ○印 (OD=1.0) で示される場合よりも正味の荷電量が大きであっても系が不安定化する場合もあり (Fig. 7 (A) の ○ (u); この時添加 Chs 濃度は低く Chs の吸着量も少ない), また逆に正味の荷電量が小さであっても系が安定化する場合もみられる (Fig. 7 (A) の ○ (s); この時には添加 Chs 濃度は高く Chs の吸着量も高い).

一方, Fig. 7 (B) によれば●の場合にも○の場合にも Chs の吸着量が○印で示されるよりも大となれば系は安定化し (s; OD>1.0), 小となれば不安定化 (u; OD<1.0) している. したがって, HAP 粒子のもつ正味の荷電量よりもむしろ Chs の吸着量の方が HAP の分散性に大きく影響を及ぼしているといえる.

TiO_2 を水中に懸濁させ, これにポリアクリル酸ナトリウムと CaCl_2 とを添加して TiO_2 の荷電量を 0 にすると, TiO_2 は凝集することが知られている.¹⁰⁾ しかし本報の場合には HAP 粒子の正味の荷電量が吸着 Ca^{2+} と吸着 Chs とによって相殺されて 0 になる場合にも, また Ca^{2+} の過剰の吸着によって HAP の正味の荷電が正になる場合にも, 吸着 Chs による分散作用がみられた. この吸着 Chs による分散作用には, 立体保護効果の他に, 吸着 Chs の電離基がもつ負荷電による HAP 粒子間の反発の効果も関与しているものと考えられる. これはバルク水相中のイオン強度が大であっても, また Ca^{2+} 添加濃度が大であっても, 吸着 Chs の電離基は電離していると考えられるためである.^{4,7,8)}

Chs は, 水中で形成される HAP 沈澱粒子内の結晶子の大きさに対してはほとんど影響を及ぼさないが,⁶⁾ HAP 沈澱粒子の分散に対しては影響を及ぼす. したがって尿中の Chs¹¹⁾ による尿路結石形成抑制作用とは⁸⁾ 尿路結石を構成する微結晶粒子 (たとえば HAP) の凝集を妨げる作用 (分散作用) をさすといえる. なお, Nancollas の表¹²⁾によれば尿のイオン強度は 108—417 mM と高いので, 帯電粒子間の静電反発作用は相当弱まっているものと考えられる.

謝辞 この研究に要した費用の一部は文部省科学研究費一般研究 (B) “ヒドロキシアパタイトの微結晶形成に関するコロイド化学的研究” (課題番号 00547121) 補助金によった. ここに感謝する.

引用文献

- 1) J. D. Termine, "Inorganic Biological Crystal Growth," ed. by B. R. Pamplin, Pergamon Press, London, 1981, part 1, pp. 65—75.
- 2) 岩田 久, “鉍質病, ミネラルの代謝異常,” 藤田拓男編集, 南江堂, 東京, 1980, p. 11.
- 3) 高崎悦司, 治療, **53**, 9 (1971); 高安久雄, 高崎悦司, 診療, **19**, 1016 (1966).
- 4) S. Shimabayashi, S. Sumiya, M. Nakagaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3824 (1984).
- 5) S. Shimabayashi, S. Sumiya, T. Aoyama, M. Nakagaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1279 (1984).
- 6) J. A. Bzdawka, D. T. Hawarth, *J. Dispersion Sci. Technol.*, **1**, 323 (1980).

- 7) 中垣正幸, 嶋林三郎, 早川栄治, 小槻 節, 薬誌, **99**, 618 (1979).
- 8) S. Shimabayashi, Y. Suzuki, S. Sumiya, M. Nakagaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3337 (1984).
- 9) 嶋林三郎, 近藤孝子, 中垣正幸, 薬誌, **103**, 391 (1983).
- 10) A. Foissy, J. Persello, J. M. Lamarche, G. Robert, *J. Dispersion Sci. Technol.*, **3**, 105 (1982); A. Foissy, A. El Attar, J. M. Lamarche, *J. Colloid Interface Sci.*, **96**, 275 (1983).
- 11) Å. Wasteson, E. Wessler, *Biochim. Biophys. Acta*, **252**, 13 (1971).
- 12) G. H. Nancollas, M. B. Tomson, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, **61**, 175 (1976).