

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32503

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25820344

研究課題名（和文）複合有機テンプレート法を用いた球状多孔質リン酸カルシウムの合成

研究課題名（英文）Fabrication of porous calcium phosphate spheres using hybrid organic templates method

研究代表者

柴田 裕史（Shibata, Hirobumi）

千葉工業大学・工学部・准教授

研究者番号：90434034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：リン脂質からなるリポソームを無機粒子に球状構造を付与するための鋳型に、両親媒性分子が形成する分子集合体を球状粒子に多孔質構造を付与するための鋳型に用いた複合有機テンプレート法により、多孔質球状リン酸カルシウム粒子を調製した。また、同手法を適用してシリカ粒子の合成を行うことで、多孔質球状シリカ中空粒子が得られることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Liposomes and self-assemblies of surfactants were used as template materials for the synthesis of spherical particles and porous structure, respectively. We succeeded in the fabrication of porous calcium phosphate spheres and hollow silica spheres with mesopores through sol-gel process using these template materials.

研究分野：界面化学

キーワード：複合有機テンプレート 球状多孔質粒子 リン酸カルシウム シリカ

1. 研究開始当初の背景

ハイドロキシアパタイト (HAp) に代表されるリン酸カルシウムは生物の骨を形成する主成分であり、自家骨と置換する生体適合性セラミックスとして良く知られている。そのため、合成方法に始まり、*in vivo* および *in vitro* における細胞試験なども含めて多岐に渡り研究が行われている材料である。特に「多孔質リン酸カルシウム粒子」は、ドラッグデリバリーシステムのキャリアーや骨補填材料、生体分子の分離剤などへの応用が可能な新規な生体材料として注目を集めている。しかし、リン酸カルシウムの合成では pH を調整するためのアンモニアなどの添加を行うと、ただちにリン酸カルシウムの晶析反応が進行してしまうため、得られる粒子の形状は角を有する構造となり、最悪の場合にはアスベストと類似した影響を生体に与えることとなる。そのため、構造的に安全性の高い球状リン酸カルシウム粒子の合成が望まれている。

2. 研究の目的

(1) リン酸カルシウムは骨や歯などの生体硬組織を構成する主成分であり、蛋白質などに対し高い吸着性を示す特徴を持つことが知られている。特に球状リン酸カルシウム粒子は、板状結晶や針状結晶よりも生体へのダメージが少ない、化学成分由来の毒性が無いなどの高い生体適合性を有する。

一方、リポソームの内水相は微小反応場としても注目され、無機化合物の合成についても検討が行われている。この内水相でリン酸カルシウムを合成することができれば、内水相でのみ無機合成反応が進行し、球状リン酸カルシウム粒子を合成することができると考えられる。また、晶析反応を進行させる内水相に界面活性剤を添加することにより、得られる球状リン酸カルシウム粒子の多孔質化を行うことも可能である。多孔質球状リン酸カルシウム粒子は、多数の細孔から薬物を放出するドラッグデリバリーシステム (DDS) のキャリアーや蛋白質などの分離精製カラム剤としての応用が期待される。本研究では、リポソームをリン酸カルシウム粒子の形状を制御するための鋳型に、内水相にリン酸カルシウム粒子に多孔質構造を付与するための鋳型として界面活性剤をそれぞれ用いた複合有機テンプレート法によって、多孔質球状リン酸カルシウム粒子の合成について検討を行うことを目的とした。

(2) 多孔質球状リン酸カルシウム粒子の合成に用いる複合有機テンプレート法は、研究代表者が世界的に初めて提案する多孔質球状無機粒子を合成するための新規の方法である。そのため、本手法の有用性および汎用性を明らかにすることが重要となる。そこで、リン酸カルシウムの他にシリカを用いた多孔質球状粒子の合成を行い、その構造特性に

についても検討を行い、複合有機テンプレート法の優位性について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) ハイドロキシアパタイト (HAp) を硝酸に溶解させた水溶液に、尿素および非イオン性界面活性剤である F127 を加え、室温で 24 h 攪拌を行うことで HAp 前駆溶液を調製した。リン脂質およびコレステロールをクロロホルムに溶解させ、窒素ガスを用いてクロロホルムを揮発させた後、24 h の減圧乾燥を行い、容器の内壁にリン脂質の薄膜を形成させた。その後、前駆溶液を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、リポソームを調製した。リポソームに内包されていないバルク中のカルシウムイオンなどを除去するために、得られた溶液を透析膜に入れ、1 日ごとに超純水を入れ替えることで透析を行った。その後、100 °C、6 h で水熱処理を行い、尿素からアンモニアを生成し、リン酸カルシウムの晶析反応を進行させた。得られた試料を遠心分離、エタノール洗浄、超音波処理を行った後、リポソーム及び F127 を除去するため 650 °C、12 h の焼成を行った。

(2) 前駆溶液を調製するため、純水へ尿素およびカチオン界面活性剤であるセチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) を加え、室温で 24 h 攪拌を行った後、シリカ源としてテトラエトキシシラン (TEOS) を添加し、この混合溶液を室温で 5 min 攪拌した。(1)と同様にリン脂質の薄膜を調製した容器に前駆溶液を加え、ボルテックスミキサーで攪拌し、リポソームを調製した。リポソームに内包されていないバルク中の前駆物質を除去するために、得られた溶液を透析膜に入れ、1 日ごとに超純水を入れ替えることで透析を行った。その後、100 °C、6 h の水熱処理を行い、尿素からアンモニアを生成することで、TEOS の加水分解および重縮合反応を進行させた。得られた試料は遠心分離した後、エタノールでの洗浄、10 min の超音波処理を行った。その後、400 °C で 3 h の焼成処理を行った。

4. 研究成果

(1) まず、透析における溶液の電気伝導度測定を行った。透析開始から 2 日目の電気伝導度は 540 $\mu\text{S}/\text{cm}$ であったのに対し、4 日目では 5.16 $\mu\text{S}/\text{cm}$ となった。純水の電気伝導度が 1.06 $\mu\text{S}/\text{cm}$ であることから、4 日間の透析により、リポソームに内包されずにバルク中に存在するカルシウムイオンなどが除去されていることがわかった。つぎに 4 日間の透析を行った試料を用いてリン酸カルシウムの合成について検討した。水熱処理により得られた粒子の FT-IR スペクトルにおいて、1040 cm^{-1} 近傍に PO_4 の伸縮振動に起因するピークが観測された。さらに、1450 cm^{-1} には F127

およびリン脂質に起因する C-H 伸縮振動に起因するピークが、 1750 cm^{-1} 近傍にはリン脂質に起因する C=O 伸縮振動に起因するピークがそれぞれ観測された。この結果は、水熱処理後に得られた球状粒子はリン酸カルシウム/F127 複合粒子であることを示唆する。一方、焼成後に得られた試料の FT-IR スペクトルにおいては、リポソームおよび F127 に起因するピークが消失していたことから、複合粒子から除去されていることが明らかとなった。

次に、得られた粒子の構造について FE-SEM 観察により評価を行った。図 1 に焼成後に得られた粒子の FE-SEM 像を示す。直径 $2\text{--}70\text{ }\mu\text{m}$ 程度の球状粒子が観察された。これらの結果から、焼成処理を行うことで球状リン酸カルシウム粒子が得られていることが明らかとなった。

最後に、得られた粒子の窒素吸脱着測定を行った。メソ孔の存在を示す V 型の等温線が観測された。さらに、BJH 法を用いて細孔径分布を求めたところ、約 2 nm の細孔を有することが示された。これらの結果は、球状リン酸カルシウム粒子にメソ孔が存在していることを示す。以上の結果より、複合有機テンプレート法を用いることで、多孔質球状リン酸カルシウム粒子が得られることが明らかとなった。

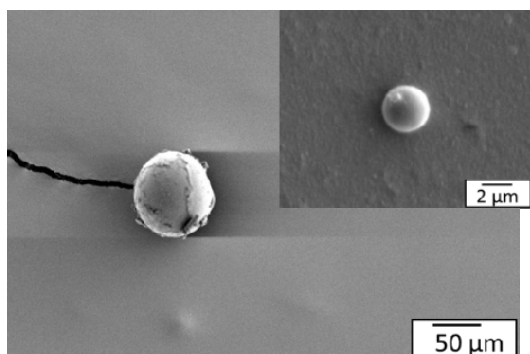


図 1 リン酸カルシウム粒子の FE-SEM 像

(2) まず、透析時における溶液の電気伝導度を測定した。透析開始から 1 日目の電気伝導度は $43.0\text{ }\mu\text{S/cm}$ であったのに対し、4 日目の電気伝導度は $4.19\text{ }\mu\text{S/cm}$ となった。この結果から、4 日間の透析により、リポソームに内包されずに、バルク中に存在する前駆溶液が除去されていることがわかった。

次に、 400°C で焼成した試料について、FT-IR スペクトル測定を行った。焼成前の試料の FT-IR スペクトルでは、 1100 cm^{-1} 近傍に Si-O 伸縮振動に起因するピークが観測された。さらに、 1450 cm^{-1} には CTAB およびリン脂質に起因する C-H 伸縮振動に起因するピークが、 1750 cm^{-1} 近傍にはリン脂質に起因する C=O 伸縮振動に起因するピークがそれぞれ観測された。一方、焼成処理後の試料の

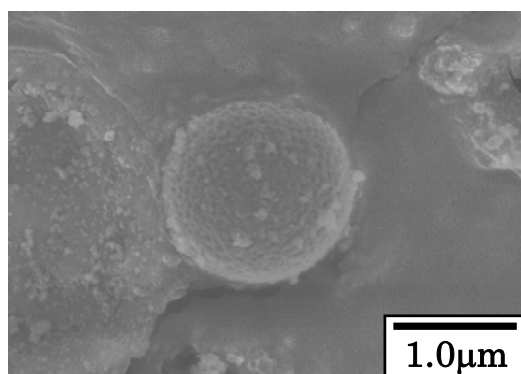


図 2 シリカ粒子の FE-SEM 像

FT-IR スペクトルでは、シリカに起因するピークのみが観測され、CTAB およびリン脂質に起因するピークは消失していた。この結果から、焼成処理をおこなった試料は、CTAB およびリン脂質が除去されたシリカであることが明らかとなった。

焼成処理後の FE-SEM 像を図 2 に示す。粒子径が約 $1\text{ }\mu\text{m}$ の表面に凹凸構造を有する球状粒子が形成している様子が観察された。また、粒子の形状について HR-SEM 観察による検討も行った。HR-SEM 像においては、FE-SEM 像と同様に粒子径が約 $1\text{ }\mu\text{m}$ の球状粒子が形成している様子が観察された。また、その粒子表面に微細な球状粒子が担持している様子も観察された。この微細な粒子の担持により、FE-SEM 像では表面の微細な凹凸が観察されたと推測される。さらに粒子の形状について詳細に検討を行うため、得られた球状粒子の断面構造について球面収差補正走査透過電子顕微鏡 (CS/STEM) 観察を行った。サンプルは、樹脂上に球状粒子を散布した後、カーボン蒸着膜によりコーティングすることで調製した。その後、FIB を用いて球状粒子の切断面を露出させた。このサンプルについて CS/STEM 観察を行った。直径 $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度の中空粒子のような構造が観察された。構造についてより詳細に検討をおこなうため、元素分析を行った。酸素およびケイ素の元素分析結果から、球状粒子の内部にはこれらの元素は存在せず、粒子の周辺のみが存在

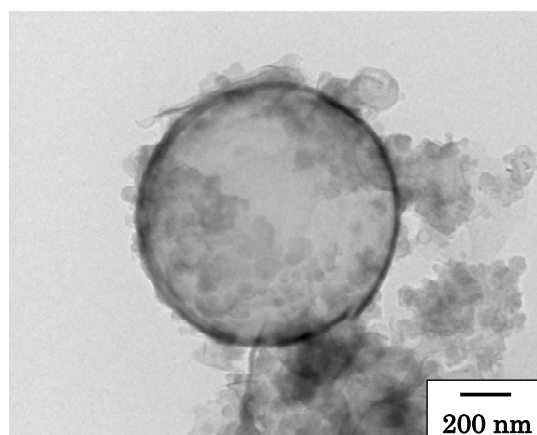


図 3 シリカ粒子の HR-TEM 像

していることが明らかとなった。さらに図 3 に示す TEM 像においても同様に中空粒子の形成が確認された。以上の結果より、得られた粒子は、中空粒子であることがわかった。

最後に、得られた粒子の窒素吸脱着測定を行った。吸着等温線はメソポーラス材料に帰属されるIV型を示した。さらに、シリンダー状の細孔の存在を示すヒステリシスも観測された。さらに、BJH 法を用いて求めた細孔径分布においても 2.5 nm 程度の細孔を有することが示された。これらの結果は、シリカ中空粒子の壁膜中にメソ孔が存在していることを示す。以上の結果より、TEOS を前駆体として用い、複合有機テンプレート法により調製した粒子は、多孔質球状シリカ中空粒子であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- ① 柴田裕史、佐野雄哉、小倉卓、油井研一、酒井秀樹、阿部正彦、橋本和明、コアーシェル構造を有するポリスチレンーハイドロキシアパタイト複合粒子の調製、材料技術、査読有、31 巻、2013、143-147

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① 遠藤光、山口達彦、柴田裕史、橋本和明、複合有機テンプレート法を用いた球状無機粒子の調製、2014 年度色材研究発表会、名古屋市工業研究所（愛知県名古屋市）2014 年 10 月 23～24 日
- ② 山口達彦、遠藤光、柴田裕史、橋本和明、複合有機テンプレート法を用いた球状リン酸カルシウム粒子の調製、第 65 回コロイドおよび界面化学討論会、東京理科大学（東京都新宿区）2014 年 9 月 3～5 日
- ③ Hikaru Endo, Masako Takeyoshi, Hirobumi Shibata, Kenichi Aburai, Hideki Sakai, Masahiko Abe, Kazuaki Hashimoto, Preparation of spherical silica particles using liposomes as a template, 20th International Symposium on Surfactants in Solution, Universidade de Coimbra (Portugal) 2014 年 6 月 22～27 日
- ④ 遠藤光、竹好正子、柴田裕史、油井研一、酒井秀樹、阿部正彦、橋本和明、リボソームを鋳型に用いた球状リン酸カルシウム/F127 複合粒子の調製、日本セラミックス協会第 26 回秋季シンポジウム、信州大学（長野県長野市）2013 年 9 月 4～6 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 裕史 (SHIBATA, Hirobumi)

千葉工業大学・工学部生命環境科学科・

准教授

研究者番号：90434034