

令和元年5月24日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26462976

研究課題名(和文)単結晶ナノチューブアパタイトの応用

研究課題名(英文)Application of the single-crystal nanotubes apatite

研究代表者

見明 康雄 (Miake, Yasuo)

東京歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：00157421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、単結晶ナノチューブアパタイトの作製と生体材料への応用を目的とした。実験には湿式のアパタイト合成装置を用いた。リン酸アンモニウムを加温してアンモニア溶液でpHを調整後、酢酸カルシウムを滴下した。また、合成実験後半に結晶性を高めるため、溶液中にフッ化水素を添加した。合成された結晶中央にナノスペースの孔を空けるため、乳酸に浸漬した。

浸漬後の結晶を透過電子顕微鏡で観察すると、中央に孔の空いた棒状のアパタイトが多数観察された。結晶のc軸断面は六角形で、結晶中央には尖孔像が観察された。ラットの抜歯窩にこのアパタイトを埋入したが、治癒の促進等はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒドロキシアパタイトは多方面で利用されているが、単結晶ナノチューブアパタイトは、これまで合成されたことのない全く新しい構造物で、種々の物質の吸着性があると考えられ、イオンあるいはタンパク質や薬品を吸着させて生体に応用することで、これまで利用されてきたアパタイト系物質とは異なった動態を示すと考えられる。医学的には生体親和性が高いことより、骨充填剤や生体成分吸着剤、抗菌剤や他の薬剤を吸着させ、薬物のデリバリーシステムとして利用可能と考えている。

研究成果の概要(英文)： This study aimed at preparation of single crystal nanotube apatite and its application to biomaterials. A wet apatite synthesizer was used for the experiment. After heating ammonium phosphate and adjusting the pH with an ammonia solution, calcium acetate was added dropwise. In addition, hydrogen fluoride was added to the solution in order to enhance the crystallinity later in the synthesis experiment. It was immersed in lactic acid in order to open the pores of nanospace in the center of the synthesized crystal.

When the crystals after immersion were observed with a transmission electron microscope, a large number of rod-shaped apatites with holes in the center were observed. The c-axis cross section of the crystal is hexagonal and a sharp hole image is observed at the center of the crystal. The apatite was implanted in the rat's tooth extraction cavity, but no acceleration of healing was observed.

研究分野：歯学

キーワード：生体材料 ヒドロキシアパタイト 結晶合性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒドロキシアパタイトは多方面で利用されており、医学的には生体親和性が高いことより、バイオセラミックとして、人工骨や人工歯根(インプラント)材として利用され、骨充填剤や生体成分吸着剤、抗菌剤担体、薬剤担体、歯の漂白時に利用されることもある。また、工業的には、アパタイトが強い吸着作用をもつことからクロマトグラフィー用カラム充填剤やイオン交換体、触媒担体、温度センサー、種々の物質の固定用担体として利用されており、ウイルスや細菌あるいは有害な化学物質や汚れ、重金属を吸着させ除去することなどの応用が考えられている。

これらに用いられているアパタイトは、合成法により種々の形態を取り、柱状、板状、球状、薄膜あるいは繊維状、その他色々な形態を示す。このアパタイトの結晶形態や集合状態を制御し、表面積を大きくする提案が特許出願されているが、ミクロンサイズのものほとんどで、しかも多くは多結晶構造物である。

アパタイトは、結晶学的には六方晶系に属し、*a*面は  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが多く + に帯電し、*c*面は  $\text{OH}^-$  と  $\text{PO}_4^{3-}$  が存在するため、- に帯電している。この結晶面の電荷により種々の物質が吸着されると考えられ、例えばタンパク質では *a*面に負電荷を持つ酸性タンパク質が、*c*面には塩基性タンパク質が特異的に吸着される。今回の研究では、中空の六角柱状の結晶を作製するので、*a*面が内外に露出し、*c*面が極めて少ないアパタイト構造となる。また表面積は、中空構造なので棒状のものより広くなり、板状の構造物より外力に対しても抵抗性があると考えられる。また、数十ナノメートル以上のチューブ状の構造は、毛細管現象のような能動的な作用を示し物質の取込みを積極的に行うと考えられるが、それより細い領域では、分子量や物質の電荷状態、その他種々の物理学的影響を受けるので、ナノメートルサイズの間隙を持つアパタイトと他の物質との相互関係は不明の点が多い。金属元素を含む組成物をナノ構造体になると、量子効果を含めた微細構造特有の触媒的特性や電気化学的特性、また磁気特性なども発現することが予測されており、チューブ状アパタイトのナノ構造化は極めて興味深い現象が発現すると思われる。

単結晶ナノチューブアパタイトは、これまで合成されたことのない全く新しい構造物で、種々の物質の吸着性があり、イオンあるいはタンパク質や薬品を吸着させて生体に应用することで、これまで利用されてきたアパタイト系物質とは異なった動態を示すと考えられる。医療系では歯や骨の充填剤や薬品デリバリーシステムへの応用が考えられ、また工業関係でも広く利用される可能性を持つと考えている。

### 2. 研究の目的

この研究で作製および応用を考えている単結晶ナノチューブアパタイトとは、これまで合成されたことのないチューブ状のアパタイト単結晶構造物で、*c*面の直径がナノメートルサイズのアパタイトの単結晶中央に空洞を形成したものである。しかし、同様のチューブ状構造物が単独で人工的に作られたことはなく、その性質や他の物質との反応性は全く不明である。

この研究では、まず単結晶アパタイトを作製し、その大きさや内部に空けるチューブの直径を制御する条件を検索する。その後、医療関係の利用法として、単体では歯科用充填剤や裏剤あるいは骨充填剤などへ応用し、従来用いられているリン酸カルシウム系製剤と比較してその違いを明確にしていく事を目的とする。

### 3. 研究の方法

ヒドロキシアパタイトの工業的合成方法には、高温で行う固相反応法、転化反応法、水熱

反応法、リフックス法や 100 以下で行う加水分解法、沈殿反応法などがある。本研究では、沈殿反応法（湿式法）を主に用い、柱状で 2 層構造の単結晶アパタイトを作製し、そこから溶液条件を変えて単結晶をチューブ状に成形する方法を考案した。

湿式法でアパタイトを合成する場合の装置は岡崎らの装置を改変したものを用いた (Biomaterials, 20:1421-1426, 1999., M.Okazaki et al.)。基本的な合成装置は多口フラスコ内に緩衝液を入れ、温度をマントルヒーターと温度コントローラーで一定に保つ。ここにカルシウムとリン酸イオンを含む水溶液をマイクロチューブポンプを用いて一定の割合で添加し、攪拌装置を用いて均一に攪拌する。

本研究における装置の最終的な組合せは、均一な結晶を作製するためセパレート式の多孔フラスコを湯煎する形で加温することとした。これにより、溶液の部分的かつ急激な温度変化が抑えられる。フラスコ内の水溶液を均一に攪拌するためには、丸底のフラスコを用い、ラグビーボール型の攪拌子を採用した。一般的な平底フラスコだと中心部と辺縁部の水流にむらができることや攪拌棒を用いたモーター式では装置が大きくなり、操作しにくいためである。温度と pH を継続的に計測するためには、100 度まで耐えられる pH 測定端子を用い、リアルタイムで計測した。また、イオン溶液の滴下は 3 台のマイクロチューブポンプで行った。

結晶性の良い層と悪い層を持つ 2 層構造の単結晶アパタイトを合成するため、数種のカルシウム溶液とリン酸溶液を用い比較した。また、合成中の pH を安定させるため、フラスコ内に入れる溶液を数種類用いた。合成温度は  $80 \pm 1$  で、pH は 7.4 あるいは  $8.0 \pm 0.1$  に保った。合成後半に数 mM のフッ素溶液を入れ、数時間経過させ、2 層構造を持つアパタイトを合成した。これを純粋で洗浄し基本試料とした。基本試料の状態は電子顕微鏡を用いて構造を確認した。

2 層構造の柱状アパタイトは内部の結晶性が悪く、周囲を結晶性の良いアパタイトが取り囲む構造をしているので、チューブ構造の作成のためにこの基本試料を別の溶液に入れ、結晶性の悪い部分を溶解除去することにより中空状とした。溶解のための酸と pH は複数用いた。合成結晶の状態を走査電顕および透過電顕を用いて観察し、構造を確認した。

生体材料への応用のため、気孔率 20 ~ 30% 程度の試料を用いて動物実験を行った。実験は抜歯窩の治癒過程にこのアパタイトがどのような影響を与えるかを検索したもので、生後 4 週のウイスター系雄ラットお上顎第二大臼歯抜去し、抜歯窩に 10 ~ 30mg 程度のアパタイトを埋入した。埋入は生理食塩水で泥状にしたアパタイトを注射器で押し込む方法とし、埋入後 1 週間経過させ試料を採取した。試料は 4 % フォルムアルデヒドで固定後、パラフィン切片とし、H-E 染色を施して観察した。なお、実験は東京歯科大学動物実験指針に基づき行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) 結晶合性とナノチューブの作製

純水中に硝酸カルシウムあるいは酢酸カルシウムとリン酸アンモニウムを滴下していく方法：

pH 調整には水酸化カリウムを使用した。また、結晶性の低下を促すためには硝酸マグネシウムを合成溶液に添加し、結晶性を高めるためにはフッ化ナトリウムを利用した。合成条件は、 $80 \pm 1$  で、pH は  $7.3 \pm 0.1$  とした。その結果、硝酸カルシウムあるいは酢酸カルシウムとリン酸アンモニウムの組合せでは滴下開始 20 分後で針状の結晶が合成され、その外形的な違いはほとんど無かった。これらの結晶は時間経過と共に増量したが、大きさの増大傾向はあまり明瞭ではなかった。硝酸マグネシウムを合成溶液に添加したものでは、針状結晶は形成されず、amorphous calcium phosphate と思われるものが最終産物として形成された。これに合成途中

でフッ化ナトリウムを添加しても結晶性は回復しなかった。従って、硝酸マグネシウムの添加は不適切と考えられた。

酢酸緩衝液に硝酸カルシウムあるいは酢酸カルシウムとリン酸アンモニウムを滴下していく方法：

pH 調整には水酸化カリウムを使用した。合成後半に結晶性を高めるためフッ化水素を溶液滴下途中から添加した。合成条件は、 $80 \pm 1$  で、pH は  $7.3 \pm 0.1$  とした。

その結果、緩衝液に滴下した場合、純水より合成初期の pH の変動が少なく安定していた。いずれの組合せでも滴下開始 10~30 分後に針状の結晶が合成され、その外形的な違いはほとんど無かった。これらの結晶は時間経過と共に増量したが、合成条件の違いによる、大きさの増大傾向はあまり明瞭ではなかった。また、結晶同士が塊となって毬栗のような外形をしており、合成初期の結晶成長点からそのまま成長した結晶が多いことを示していた。高分解能電子顕微鏡で観察すると、c 軸断面が概ね正六角形の結晶が多くみられ、結晶中央には格子欠陥も観察された。フッ素を添加した結晶では、添加しないものより結晶周囲の格子欠陥は少なかった。これらの結晶の中央に穴を空けるため、乳酸あるいは酢酸緩衝液(pH4.5~5.0)に浸漬した。脱灰速度の調整には、合成アパタイトを溶解し添加した。急速に脱灰した場合、結晶周囲から脱灰されるものが多く中央の孔は少なかったが、脱灰速度を落とすと中央尖孔像と思われるものもみられた。しかし、尖孔の範囲は短く結晶全体にわたるものはみられなかった。

リン酸アンモニウム溶液を加温し、炭酸アンモニウムで pH を調整後、炭酸カルシウムを滴下する方法：

結晶性の悪い Ca 欠損型アパタイトを初期に合成するために作製手順を変更した。合成条件は、 $80 \pm 1$  で、pH は  $8.0 \pm 0.1$  とした。合成された結晶を、幕を張ったグリッド上に撒布して経時的に透過電子顕微鏡で観察すると、初めは顆粒状の結晶が観察されたが、合成 120 分後位から棒状のものがみられるようになった。また、合成後半に結晶性を高めるため、溶液中にフッ化水素を 0.1M の割合で添加した。このリン酸アンモニウム溶液に炭酸カルシウムを滴下する方法だと合成時間中の pH の変動がかなり少なく、以前の方法より安定していた。合成された結晶は、結晶同士が塊となって毬栗のような外形をしており、合成初期の結晶成長点から放射状に成長した結晶が多いことが示された。合成の終了した結晶中央にナノスペースの孔を空けるため、乳酸を加温し 2~3 日間浸漬した。浸漬後の撒布試料を透過電子顕微鏡で観察すると、中央に孔の空いた棒状のアパタイトが多数観察された。超薄切片作成後、高分解能電子顕微鏡で観察すると、c 軸断面が概ね正六角形の結晶が多くみられ、結晶中央には尖孔像が観察された。

リン酸アンモニウム溶液を加温し、アンモニア溶液で pH を調整後、炭酸カルシウムを滴下する方法：

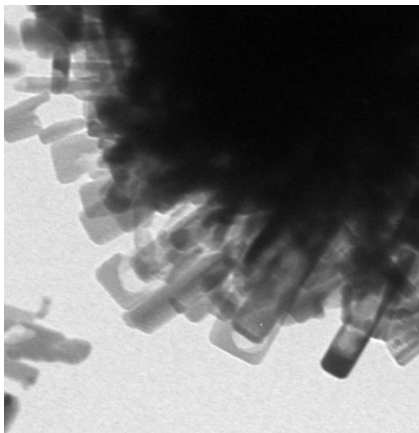
合成条件は  $80 \pm 1$  で、pH は  $8.0 \pm 0.1$  とした。合成中の pH 調整は炭酸アンモニウムで行った。フッ化水素の添加は、短時間に多量添加する方法と少量を時間をかけて滴下する方法を比較したが、時間をかけた方が結晶性の良いものが得られた。透過電子顕微鏡で観察すると、合成 30 分後位から棒状の結晶がみられた。合成の終了した結晶中央にナノスペースの孔を空けるため、乳酸を 50 度に加温し 3 日間浸漬した。浸漬後の撒布試料を透過電子顕微鏡で観察すると、中央に孔の空いた棒状のアパタイトが多数観察された。この試料を樹脂に包埋して超薄切片を作成し、高分解能電子顕微鏡で観察すると、c 軸断面が概ね正六角形の結晶が多くみられ、結晶中央には尖孔像が観察された。尖孔部の格子像は一樣ではなく、部分的に電子線の透過性が異なり、格子欠損が観察されたので、結晶内部の結晶性が不均一である可能性が示唆された。

リン酸アンモニウム溶液を加熱し、アンモニア溶液で pH を調整後、酢酸カルシウムを滴下し、pH を炭酸アンモニウムで一定に調整する方法：

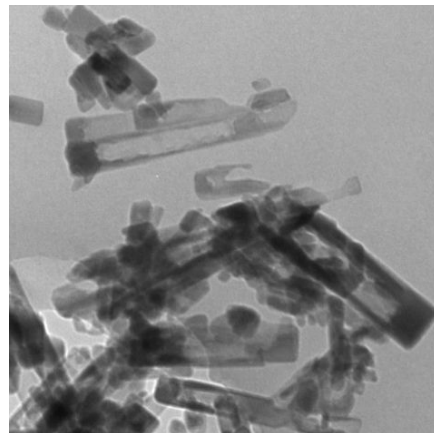
合成条件は、リン酸 2 水素アンモニウム 1.38g を 200ml の蒸留水に溶解し、 $80 \pm 1$  度に加温後アンモニア水で pH を 8.0 に調整し、溶液に酢酸カルシウム 3.35g を 200ml の蒸留水に溶解して滴下した。アパタイトの合成が進むと pH が低下するので、10%炭酸アンモニウムで pH を常に  $8.0 \pm 0.1$  に調整した。滴下終了後に 0.1M フッ化水素をさらに滴下し、合成粉末を水洗、乾燥して回収した。単結晶の中心に空洞を作成するためには、回収した粉末 0.1g に対し 0.1M 乳酸、塩酸、ギ酸脱灰液、どれも pH2.5~4.5 のものを 10ml 用い、2~21 日間脱灰してチューブ状の穿孔の形成状態を観察した。

脱灰速度の抑制のため、脱灰液に 0.3mM の HA (ヒドロキシアパタイト) を溶解した。さらに脱灰時に溶液に粘性を持たせることにより脱灰速度が抑制され、結晶性の弱い部分から脱灰が進行すると思われたため、CMC (カルボキシメチルセルロース) を 0.1~0.05% 混入させた脱灰溶液やグリセリンあるいはゼラチンを用いたものも作成して検討した。また、脱灰中に溶出したイオンの濃度が上昇すると、微結晶の再沈着や amorphous calcium phosphate 様の構造物の沈着がみられたため遊離した Ca イオンの沈着を防ぐためキシリトールの添加を試みた。

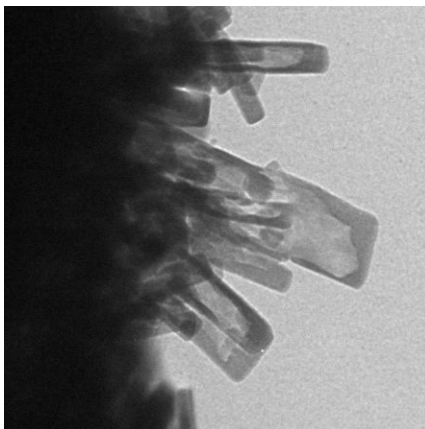
その結果 HA や CMC を混入しない溶液よりも混入した方が空洞化率は増大したが、CMC は水洗で絵除去するのが困難で粉末が塊状になってしまった。20% のキシリトールを添加すると空洞化率が上昇したが、必要な空洞化率は得られなかった。グリセリンないしゼラチンを混入する験でも十分な気孔率を得る条件までには達していない。



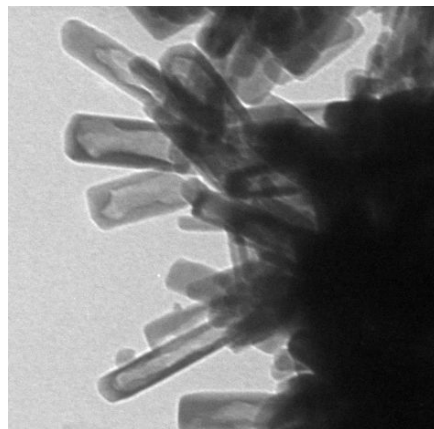
乳酸 2 日脱灰例



乳酸 + キシリトール添加 2 日例



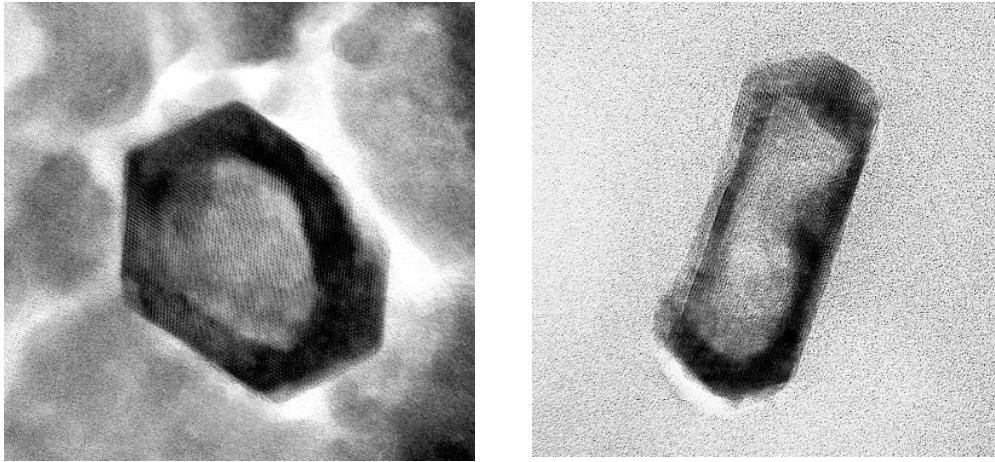
ギ酸 3 日脱灰例



塩酸 3 日脱灰例

どれも  $50^{\circ}\text{C}$ 、pH2.5、0.2M の酸で脱灰

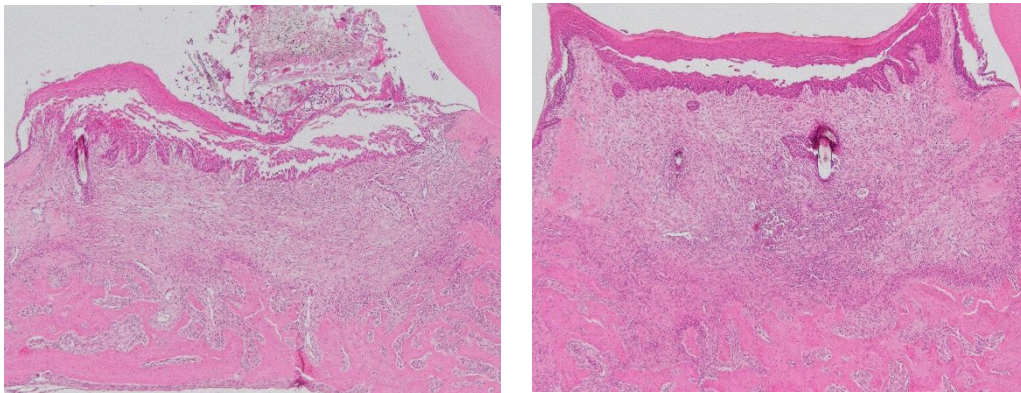
## 高分解能電子顕微鏡所見



超薄切片を作成後、超高分解能透過電顕で格子像を観察したもの。アパタイトのc軸断面は、左で約60nm、孔径30~40nm、右で30~80nm、孔径20~60nm。

## 2. 動物実験結果

抜歯窩における埋入実験は、出血などで埋入量を規定するのが困難であった。観察対照は、抜歯後そのまま放置した抜歯窩で、埋入後1週間の抜歯窩の状態を比較してみたが、試料間の治癒状態のバラツキが大きく、明確な違いがみられなかった。



抜歯窩のH-E染色像。左は対照例、右はアパタイト挿入例。抜歯1週間後。