

## 牛骨由来アパタイトの作製とその蛋白質クロマト分離特性

赤澤 敏之、蓑嶋 裕典、内山 智幸  
 松嶋 景一郎、野村 隆文、吉田 憲司  
 勝世 敬一、小林 正義\*

## Preparation and Proteins - Chromatographic Separation Properties of Cattle Bone - Originated Apatites

Toshiyuki AKAZAWA, Hironori MINOSHIMA, Tomoyuki UCHIYAMA  
 Keiichiro MATSUSHIMA, Takabumi NOMURA, Kenji YOSHIDA  
 Keiichi KATSUSE, Masayoshi KOBAYASHI\*

## 抄 録

牛骨を溶解析出したアパタイト(r-HAp)と試薬から湿式合成した化学量論性水酸アパタイト(s-HAp)について、超音波分散噴霧乾燥法により、粒子径5～30 $\mu$ mの球状粒子を作製した。2種HAp粉末は、水蒸気流中673～1073K熱処理により異なる比表面積、結晶子径及び表面組織を示した。これらの粉末を充填したカラムを用いて、牛血清アルブミンと卵白リゾチーム蛋白質の液体クロマト分離特性を比較検討した。r-HAp粉末充填カラムの液体クロマトグラフィーでは、0.5～2.0mg $\cdot$ cm<sup>-3</sup>-アルブミンとリゾチーム混合水溶液は、313Kでリン酸ナトリウム緩衝液の直線モル勾配法により明白に吸着分離された。r-HApカラムによる蛋白質の分離度とクロマトグラムの半価幅は、粒子の比表面積と表面組織に敏感に変化し、熱処理温度の選択により制御できることが明らかになった。

## 1. はじめに

近年、バイオセラミックスの研究では、優れた生体親和性及び適合性を付加した、高い機械的強度と破壊靱性を有する複合材料が開発され、その一部は既に生体硬組織代替材料として臨床応用されている<sup>1,2)</sup>。生体埋入材料の界面では、細胞、コラーゲン、ミネラル及びそれらの制御因子が複雑に関与する骨形成反応が進行する<sup>3)</sup>。その界面反応において、最も重要な無機系生成物は、歯や骨の主成分の水酸アパタイト(HAp:Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>)である。現在、生化学、分析化学及び化学工学の分野では、HApのバイオ反応性を利用した単位操作やシステム開発が注目され始めている。

HApは六方晶系の結晶であり、種々のカルシウム及びリン酸系試薬を用いて、乾式法、湿式法及び水熱法により合成

されることができる<sup>2)</sup>。1965年、Tiselius<sup>4)</sup>が生体高分子に対するHApの優れたクロマト分離特性を発見して以来、HApは、蛋白質、核酸及びウイルス<sup>5-8)</sup>の活性を損なわない吸着剤として、液体クロマトグラフィー(LC)へ応用されている。HApクロマトグラフィーは、SiO<sub>2</sub>クロマトグラフィーと比較して、充填粒子表面上で吸着質分子の変性や劣化が起こりにくいことから、試料に合わせた経験的分析条件によって、蛋白質の分画・分種等に適用されている。しかしながら、適度な分離度とカラムの耐久性を持つ充填HAp粒子がまだ開発されていない。さらに、試薬から合成したHApは、原料と製造コストが高価であり、製造プロセスも複雑であるため、多量なニーズに即応することは極めて困難である。

奥山等<sup>9)</sup>は、多孔性球状HAp粒子(粒子径5～20 $\mu$ m、細孔径10～100nm)が高速液体クロマトグラフィー用カラム充填剤に有効であることを報告した。本田等<sup>10)</sup>は、HAp/ポリエチレンの複合粒子は、高速気流中衝撃法により作製できること、その粒子は混合蛋白質の分離に有効であることを

\* 北見工業大学

示した。HAp 活性表面において、酸性蛋白質の牛血清アルブミン (BSA)<sup>11)</sup>は C- サイトに、塩基性蛋白質の卵白リゾチーム (LSZ)<sup>12)</sup>は P- サイトに、それぞれ選択的に吸着される<sup>13,14)</sup>。吸着された BSA と LSZ 分子は、LC のリン酸カリウムまたはリン酸ナトリウム緩衝液の直線モル勾配法により、両サイトから可逆的に溶離される。

このような LC 用 HAp 吸着剤に関する研究<sup>15-19)</sup>では、生体高分子の分離に対するカラム能力と HAp 調製条件の定量的な関係は明らかにされていなかった。LC 充填材料に対する HAp の表面特性は、1) 造粒された球状粒子の均質性とサイズ、2) 粒子の表面組織や結晶子径のような重要なパラメータの組み合わせによって、強く影響されると推測される。

畜産物の加工処理過程で多量に産出される牛骨は、HAp と類似の結晶構造を持ち、不純物金属イオンが比較的少ない、

安価な北海道特有の地場資源である<sup>20-22)</sup>。牛骨の溶解析出<sup>23)</sup>により調製された r-HAp は、微量金属イオン置換型であり、熱処理温度に依存し粒子の比表面積や表面形態が変化するため、異種吸着サイトの比率や性質を容易に制御することができる<sup>24-26)</sup>。もし、球状 r-HAp 粒子が噴霧乾燥技術により作製され、表面の吸着サイト (P と C) 分布及び両サイト上で蛋白質の吸着熱が容易に設計されるならば、r-HAp は LC 用新規吸着剤として期待される。

本研究では、地場資源の高度有効利用化と牛骨由来アパタイト吸着剤の開発を目的として、噴霧乾燥法により牛骨を利用したアパタイト (r-HAp) と、対照用試料の試薬から合成したアパタイト (s-HAp) について、球状粒子を設計し、その乾燥条件、熱処理温度及び異種蛋白質分離特性の関係を比較検討し、液体クロマトグラフィーへの応用性を考察した。

牛大腿皮質骨(ホルスタイン雄牛, 北海道畜産公舎(株))を 1373 K で焼成、HNO<sub>3</sub> 水溶液に溶解した<sup>23)</sup>。それに NH<sub>3</sub> 水溶液を添加し溶液の pH を 10.5 に調節した後、298 K で 24 時間熟成することにより、r-HAp 結晶を再析出させた。それを濾過、蒸留水で洗浄後、噴霧乾燥用試料として、5 ~ 20% - r-HAp 懸濁水溶液を調製した。一方、対照用試料として、特級 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O と (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 試薬を用いて、湿式法により s-HAp 結晶を合成した後、同様にして懸濁水溶液を調製した。これら 2 種 HAp 懸濁液について、噴霧乾燥機 (坂本技研(株) DCTRS-3N, 図 2 参照) によって、温度 423 ~ 523 K、ディスクの回転数 12000 ~ 18000rpm の条件で、超音波分散しながら噴霧乾燥及び造粒を行った。このようにして得られた HAp 乾燥粉末に対して、水蒸気流中 673 ~ 1073K 熱処理 (r-HAp(673 ~ 1073), s-HAp(673 ~ 1073) と表示) により、粒子の表面機能設計を行った。

## 2. 実験方法

### 2.1 アパタイト粉末の作製方法

牛骨由来アパタイト粉末の作製方法を図 1 に示す。

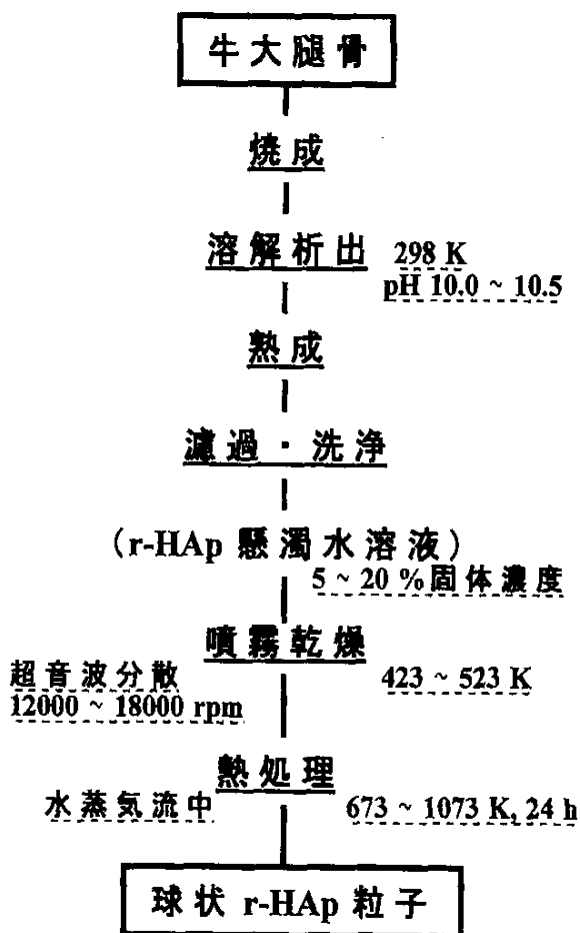


図1 噴霧乾燥法によるr-HAp粉末の作製方法

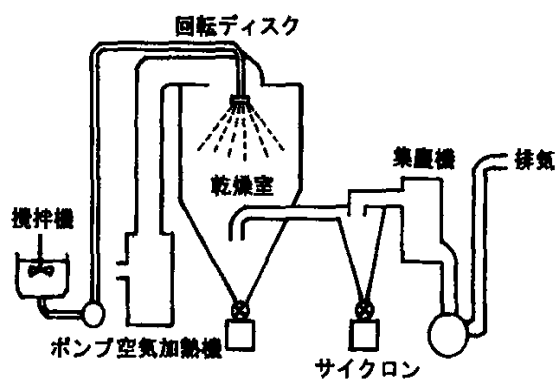


図2 噴霧乾燥装置の概観

### 2.2 アパタイトの特性評価方法

噴霧用 HAp 懸濁水溶液の分散性を評価するために、回転粘度計 (BM タイプローター No.2) による流体の粘度を測定

した。得られた HAp 粉末の特性評価については、X 線回折 (XRD) による HAp 相の同定及び格子定数の測定を行った。XRD パターンの (200) や (002) 面から、HAp 単一相の結晶子径を算出した<sup>27)</sup>。HAp ゲルや粉末粒子の表面形態及びサイズを観察するために、走査型電子顕微鏡 (SEM) 解析を行った。HAp 粒子の化学組成の把握として、電子線微小部分分析 (EPMA) により  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{P}^{5-}$  イオンの組成比 (Ca/P) を測定した。粒子の表面特性については、窒素吸着法により BET 比表面積及び水銀圧入法により細孔径分布を測定した<sup>28)</sup>。

### 2.3 アパタイトの蛋白質クロマト分離特性の評価

2 種 HAp カラムによる蛋白質クロマト分離特性を評価するために、吸着質として、比較的安価でアミノ酸の偏りが無い、水溶性酸性蛋白質のアルブミン (BSA: 牛製、和光純薬工業社製一級試薬) と塩基性蛋白質のリゾチム (LSZ: 卵白製、和光純薬工業社製生化学用試薬) を用いた。図 3 に、HAp カラムによるクロマト分離特性の評価方法を示す。

2 種 HAp 粉末を重力沈降法によりガラスカラム (8mm  $\phi$   $\times$  50mm) へ充填し、それを液体クロマトグラフィーシステム (TOSOH, SC-8020) に装着した。カラムの平衡化 (温度 313K, pH6.9,  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{Na}_2\text{HPO}_4$  と  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  緩衝溶液, 流速  $1.0\text{cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ ) を図った後、 $0.5\sim 2.0\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$

## 3. 実験結果及び考察

### 3.1 アパタイト粉末の球状粒子設計

#### 3.1.1 噴霧乾燥法による HAp 粒子の作製

均質表面を有する球状 HAp 粒子の形成には、温度、ディスク回転数及び固体試料濃度のような噴霧乾燥条件を最適化することが必要である。乾燥温度は、ディスクから噴霧された液滴が原形を保ち、変形やくぼみのない球状粒子を得るために、より高温が適当である。なぜならば、噴霧された液滴が乾燥室内壁に到達する以前に、その液滴の水分は瞬間的に蒸

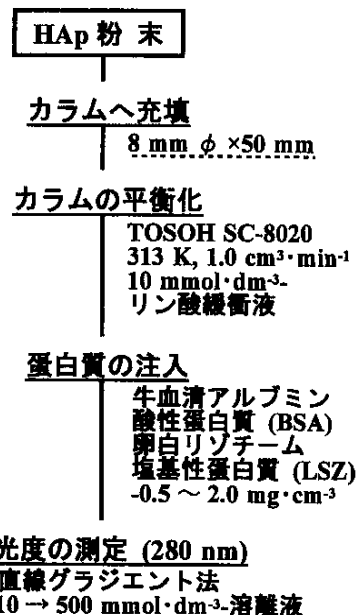
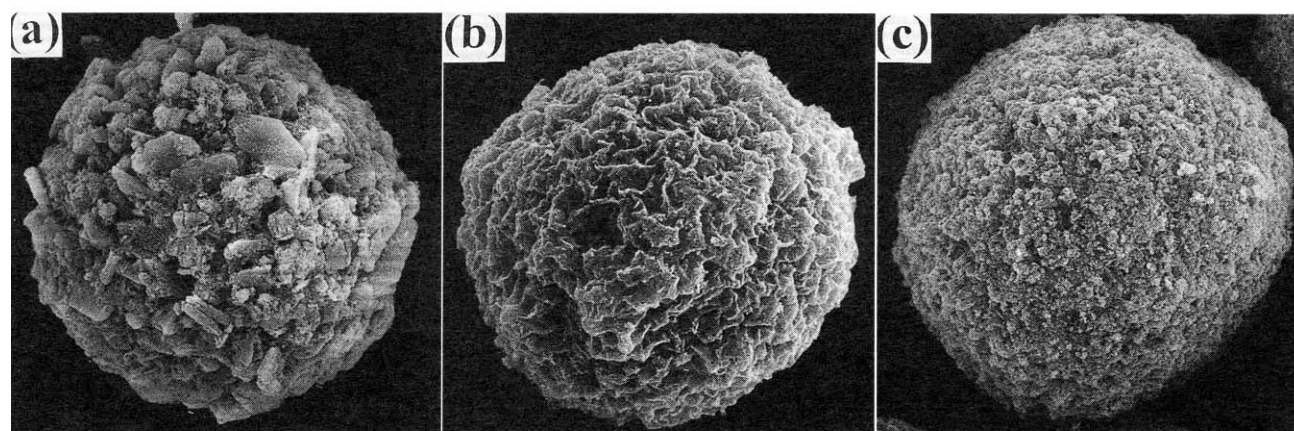


図3 HAp粉末の蛋白質クロマト分離特性試験

-BSA と LSZ 混合水溶液を注入し、直線グラジエント法 (A 液:  $10\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\rightarrow$  B 液:  $500\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , 30 分) により波長 280 nm の吸光度を経時的に測定した<sup>29)</sup>。

発ししなければならないからである。また、ディスク回転数が 12000 から 18000rpm へ増加するに伴い、HAp の粒度分布は粒子サイズが小さい方へシフトする傾向を示した。したがって、重力沈降法により、HAp 粉末をガラスカラムへ容易に充填可能な粒子径は  $5\mu\text{m}$  以上であることから、最適噴霧乾燥条件として、温度 523 K、回転数 15000 rpm を選択した。

さらに、固体試料濃度は、緻密なグレインから成る会合粒子を作製するための重要なパラメーターである。図 4 に、種々の条件下で噴霧乾燥された r-HAp 粒子の表面組織を示す。



(a) 20%懸濁液 (b) 5%懸濁液 (c) 5%懸濁液, 超音波分散

図4 噴霧乾燥法によるr-HAp粒子の表面組織 (乾燥温度523 K、ディスク回転数15000 rpm)

20% -r-HAp では、高い固体試料濃度のためにいくつかの不規則形状の塊が、5% -r-HAp では、比較的小さなグレインの組織が観察される。その HAp 懸濁液の粘度は、5% の場合が 0.040Pa・s、20% の場合が 0.180Pa・s であり、前者の方が r-HAp ゲルはよく分散されていることが分かった。その 5% -r-HAp では、超音波分散によって懸濁液の粘度は変化しないが、局所的に凝集した r-HAp ゲルが超音波の強い物理的エネルギーにより分散され、形成された球状粒子はより均質な表面になると考えられる。

3.1.2 アパタイト粒子の表面特性に及ぼす熱処理温度の影響

噴霧乾燥された粒子の比表面積は、r-HAp が  $144\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ 、s-HAp が  $69\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  であり、それらの値は、静置乾燥粉末より高い値(r-HAp が  $95\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ 、s-HAp が  $60\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ ) になった<sup>23)</sup>。この結果から、本研究の噴霧乾燥プロセスは HAp ゲルの凝集を抑制し、その球状粒子は液滴の水分量の急激な蒸発によって、より大きな細孔容積を有すると考えられる。しかしながら、HAp 粉末の熱処理において、噴霧乾燥粒子の比表面積に及ぼす熱処理温度依存性は、静置乾燥のものと同様な傾向を示した<sup>23)</sup>。図5に、噴霧乾燥法による2種 HAp 粉末の BET 比表面積 ( $S_{AD}$ ) と熱処理温度との関係を示す。

これら HAp 単一相粉末では、(Ca/P) のモル比は 1.65 を与え、323 K 静置乾燥で得られた値<sup>14,15,20)</sup>と一致した。この結果は、部分溶解特性を有する HAp は、523 K の急激な噴霧乾燥によって、その化学組成は影響されないことを示唆している。

s-HAp についても、全く同じ噴霧乾燥条件によって球状粒子が得られ、(Ca/P) のモル比は 1.67 であり、HAp の化学量論比と同じ値になった。

以上の結果から、r-HAp と s-HAp 粉末は、温度 523 K、回

転数 15000 rpm、固体試料濃度 5%、超音波分散の時、変形やくぼみのない粒子径 5~30  $\mu\text{m}$  の球状粒子が連続的に得られることが分かった。

2種 HAp の  $S_{AD}$  は、熱処理温度の上昇に伴い単調に減少し、673 K では、r-HAp の  $S_{AD}$  は s-HAp より 44% 大きな値となった。873~1073 K では、2種 HAp の  $S_{AD}$  は、 $10\sim 33\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$  になった。全細孔容積は熱処理温度の上昇に伴い減少し、r-HAp(673) が  $1.27\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ 、r-HAp(873) が  $0.78\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ 、r-HAp(1073) が  $0.74\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ 、s-HAp(673) が  $0.82\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$ 、s-HAp(873) が  $0.78\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$  及び s-HAp(1073) が  $0.68\text{cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$  になった。これらの全細孔容積は、細孔径 14nm 以上の細孔容積と一致した。BSA と LSZ は、分子サイズがそれぞれ、 $4\times 4\times 14\text{nm}$  と  $3\times 3\times 4.5\text{nm}$  であり、回転楕円体構造を有することから、両蛋白質分子は造粒された粒子の細孔に進入し拡散できることを示している。図6は、HAp 熱処理粉末の典型的な表面組織を示したものである。

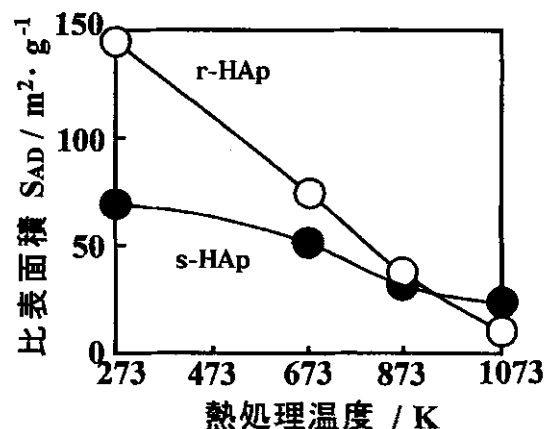
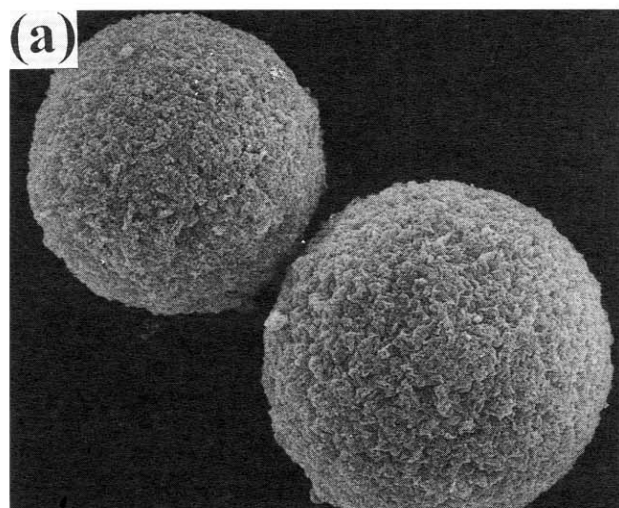
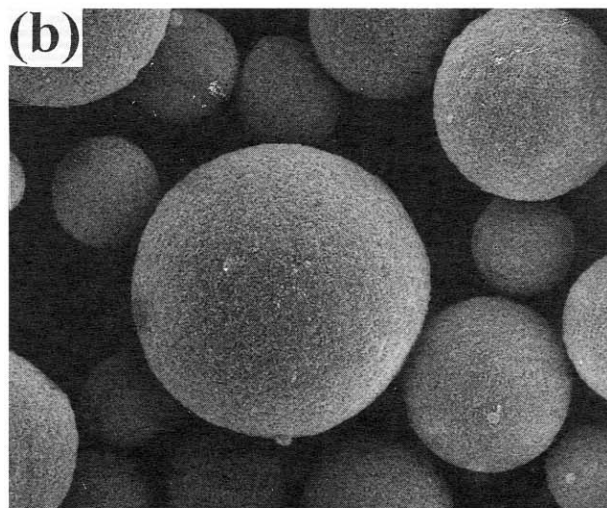


図5 噴霧乾燥法によるアパタイト粉末の比表面積に及ぼす熱処理の影響



(a) r-HAp



(b) s-HAp

図6 水蒸気流中873 K、24 h熱処理HAp粒子の表面組織 (乾燥温度523 K、15000 rpm、5% 懸濁液、超音波分散)

873 K 熱処理によっても、乾燥粉末における球形粒子の外観及び表面均一性の差は認められなかった。2 種 HAp の比表面積は近い値にも拘わらず、r-HAp 粒子は多孔質な繭状表面、s-HAp 粒子は小さなグレインで会合した緻密な表面が観察される。

六方晶系結晶の異方性を考察するために、HAp 構造において、(200)面を用いた結晶子径(CsA)及び(002)面を用いた

結晶子径(Csc)を別々に測定した。873~1073 K 熱処理では、r-HAp の CsA と Csc はしだいに増加し、s-HAp の Csc はあまり変化しないに対し、CSA は増加した。これらの結果は、r-HAp は等方的な結晶、s-HAp は c 軸に沿って a 面上に成長した結晶であることを示唆している。図 7 に、673 K と 1073 K 熱処理した HAp 粒子の表面組織を示す。

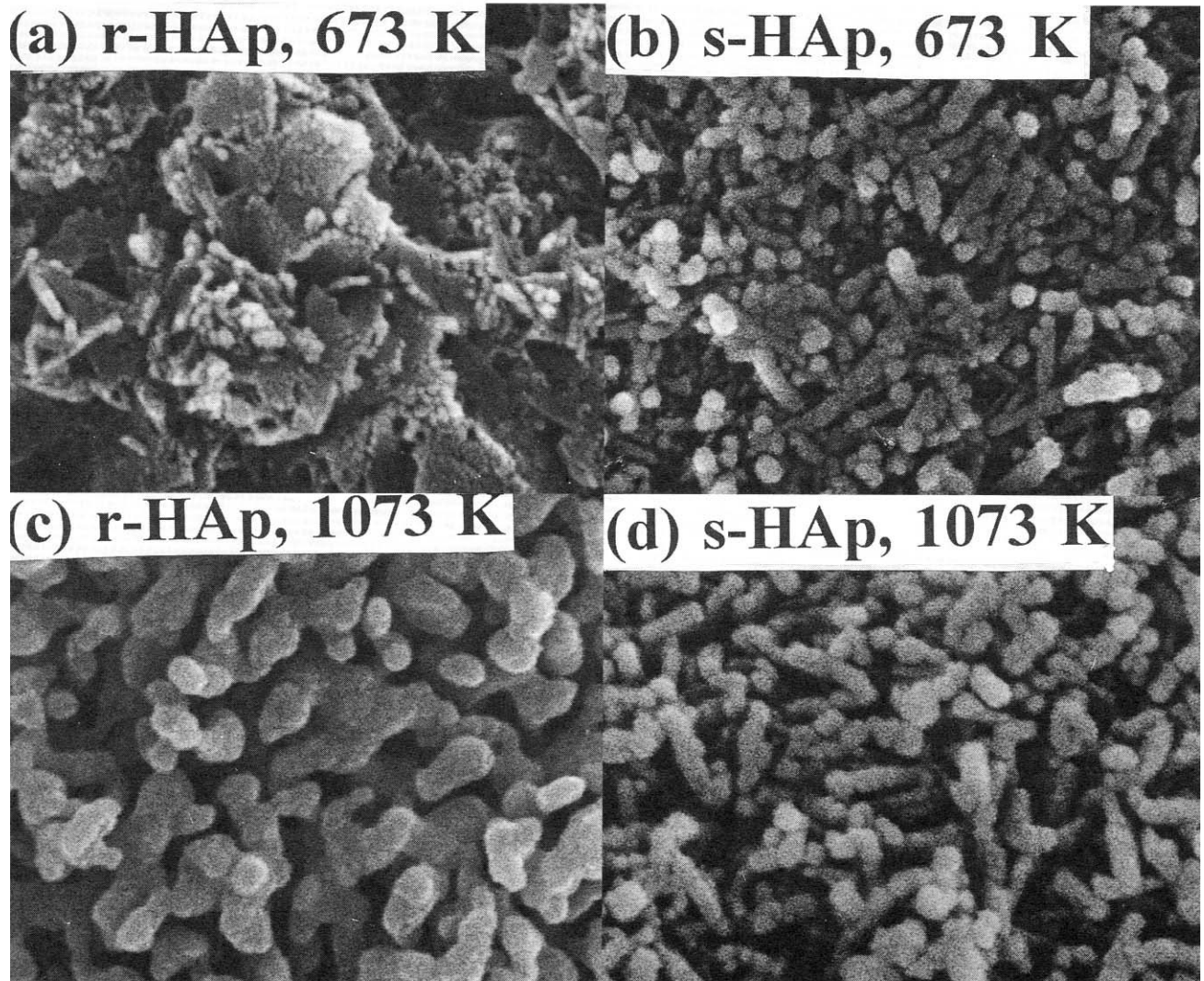


図7 HAp粒子の表面組織に及ぼす熱処理温度の影響 (乾燥温度523 K、15000 rpm、5 % 懸濁液、超音波分散)

2 種 HAp 粒子において、表面組織の顕著な差が熱処理温度に依存して明確に観察されることが分かる。すなわち、673 ~ 1073 K で粒子の焼結により、r-HAp が微細結晶の集合体から 50 ~ 200 nm の球状や柱状グレインへ、s-HAp が多くの異方性針状結晶からアスペクト比 3 ~ 5 の柱状グレインへと、それぞれ転移した。これらの HAp 粉末の格子定数

は、 $a = 0.942\text{nm}$ 、 $c = 0.688\text{nm}$  になり、JCPDS カード<sup>30)</sup>の値と一致した。

このような 2 種 HAp の結晶子径と表面組織の差は、溶解析出時におけるゲル表面形態の差に起因している。図 8 に、電子顕微鏡内で凍結乾燥された 2 種 HAp ゲルの表面組織を示す。

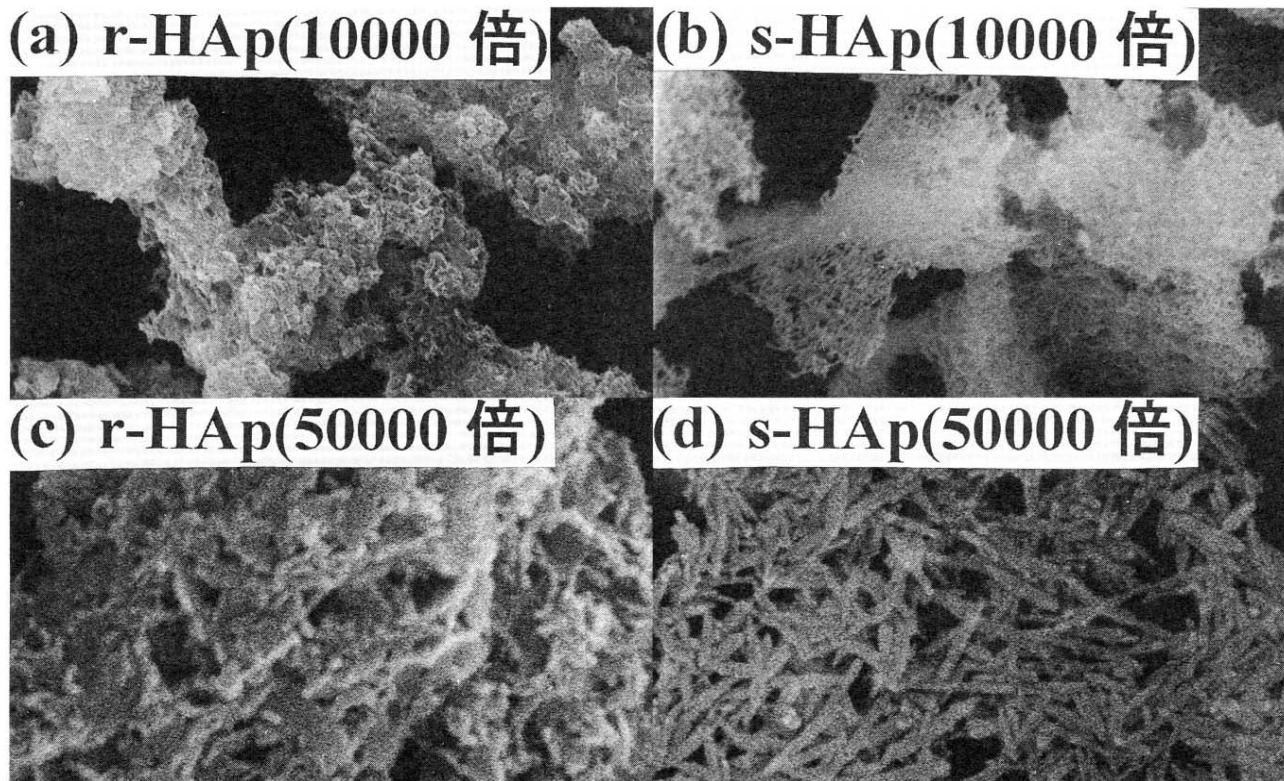


図8 アパタイトゲルの表面組織（電子顕微鏡内凍結乾燥法）

2つのゲルに異なる網目構造、すなわち、r-HApは微細結晶のフロックが、s-HApは高いアスペクト比の針状結晶が認められる。山下等<sup>31)</sup>は、疑似体液中で電気双曲子により処理された種々のセラミックス上の結晶成長において、骨のような結晶は、部分的に炭酸イオンが固溶したMg<sup>2+</sup>イオンを含むHApであることを示した。その中で、著者等が供給した牛骨アパタイト焼結体では、HAp結晶成長は促進され、図8(C)に見られる特徴的な表面組織が観察された。したがって、r-HApでは、少量の牛骨由来金属イオンを含むHAp構造が特長的結晶成長挙動に影響を与えると推察される。

以上の結果から、噴霧乾燥法によるHAp球状粒子は、熱処理温度や出発原料を選定することにより、幅広い表面特性の粒子設計が可能であることが明らかになった。

### 3.2 アパタイトカラムによる蛋白質クロマト分離特性

#### 3.2.1 混合蛋白質のクロマトグラム

種々の条件で作製した2種HAp粉末充填カラムを使用して、混合蛋白質のクロマト分離挙動を評価した。図9に、873 K熱処理HAp粉末によるBSAとLSZの典型的なクロマトグラムを示す。

HApカラムにより、1.0 mg・cm<sup>-3</sup>混合蛋白質水溶液は十分に分離された。r-HApでは、約8.5と12.2分の保持時間ピークは、それぞれBSAとLSZに帰属された。その保持時間(BSA:  $t_{WB} = 8.48 \pm 0.28$ 分, LSZ:  $t_{WL} = 12.27 \pm 0.14$ 分)と半価幅(BSA:  $W_{HB} = 46.0 \pm 5.3$ 秒, LSZ:  $W_{HL} = 34.8 \pm 1.1$ 秒)

は、蛋白質の濃度に関係なくほとんど一定であった。これらのクロマトグラムは、300回以上の試料注入後でも再現性あるパターンを与え、r-HApは市販HApより、クロマトグラフィーに対してより優れた耐久性を有することが分かった<sup>32)</sup>。市販カラム(T(株))では、同じクロマト分離条件の約250回の試料注入によって、2つの蛋白質の分離が不明瞭になることが確認された。

一方、s-HApについては、r-HApより保持時間( $t_{WB} = 7.79 \pm 0.16$ 分,  $t_{WL} = 11.56 \pm 0.21$ 分)が短く、ピークの半価幅( $W_{HB} = 49.40 \pm 7.30$ 秒,  $W_{HL} = 39.3 \pm 0.35$ 秒)が少し大きく

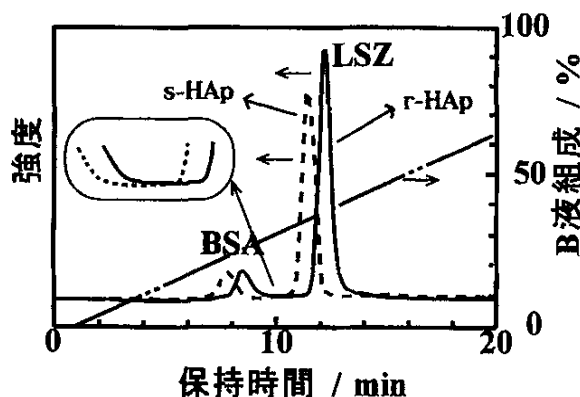


図9 アパタイト粉末充填カラムによるBSAとLSZのクロマトグラム (水蒸気流中873 K、24時間熱処理、カラムサイズ; 8 mm φ × 50 mm、直線モル勾配法; 10→500 mmol・dm<sup>-3</sup>溶解液)

なった。2種 HAp のクロマトグラムは粒子の細孔構造によるものであり、r-HAp は、s-HAp より BSA と LSZ の液体クロマト分離に有効な表面積を有すると考えられる。

### 3.2.2 蛋白質の分離度とクロマトグラムの半価幅

図 10 は、r-HAp カラムによる BSA と LSZ のクロマト分離挙動に及ぼす熱処理温度の影響を示したものである。

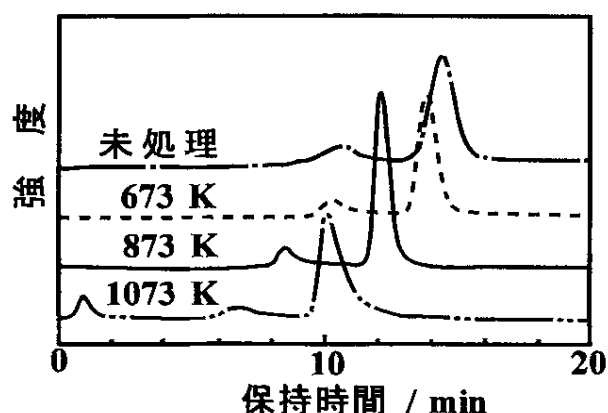


図10 r-HApカラムによるBSAとLSZのクロマト分離特性に及ぼす熱処理温度の影響（注入試料； $1.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -BASと $1.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ -LSZ、カラムサイズ； $8 \text{ mm} \Phi \times 50 \text{ mm}$ 、流量； $1.0 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ 、直線モル勾配法； $10 \rightarrow 500 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ -溶解液）

熱処理温度の上昇に伴い、 $t_{\text{WB}}$  と  $t_{\text{WL}}$  はしだいに減少し、クロマトグラムピークの形は劇的に変化した<sup>32)</sup>。これらの現象は、1)熱処理温度の上昇に伴う粒子の焼結による BSA や LSZ 分子拡散細孔容積の減少<sup>23,27)</sup>、2)2種 HAp 表面上の P と C- サイトの数、比率及び化学的性質の変化に起因すると考えられる。s-HAp 粉末カラムについては、BSA と LSZ は同様にして、14.5 分の保持時間以内に分離された。

クロマトグラフィーのカラム能力は、試料の分離度とクロマトグラムピークの半価幅を用いて代表させることができる。HAp カラムによる BSA と LSZ の分離では、分離度( $R_s$ )<sup>33)</sup>はクロマトグラムの保持時間と半価幅から(1)式によって計算される。

$$R_s = 1.18 (t_{\text{WL}} - t_{\text{WB}}) / (W_{\text{HL}} + W_{\text{HB}}) \quad (1)$$

クロマト分離特性に及ぼす熱処理温度の影響を定量的に評価するために、全てのクロマトグラムから蛋白質の分離度( $R_s$ )を計算し、その結果を図 11 に、2種 HAp の熱処理温度の関数として示す。

熱処理温度の上昇に伴い、 $R_s$ 、 $W_{\text{HB}}$  及び  $W_{\text{HL}}$  は変化し、r-HApの $R_s$ はs-HApより高く、r-HApの $W_{\text{HB}}$ と $W_{\text{HL}}$ は1073 K

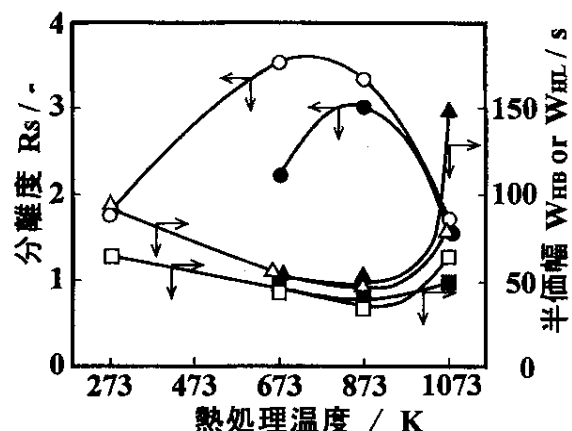


図11 アパタイト粉末の熱処理温度と蛋白質の分離度、半価幅との関係（○ r-HApの $R_s$ 、● s-HApの $R_s$ 、△ r-HApの $W_{\text{HB}}$ 、▲ s-HApの $W_{\text{HB}}$ 、□ r-HApの $W_{\text{HL}}$ 、■ s-HApの $W_{\text{HL}}$ ）

の場合を除いて少し小さい値になった。これら2種 HAp の差は、粒子表面の特徴的細孔構造に分布する吸着サイト(BSA に対する C- サイト、LSZ に対する P- サイト)の表面比率と化学的性質の変化に起因すると推察される。

673 ~ 1073 K 熱処理<sup>23-26)</sup>では、r-HAp における P- サイトの酸強度と C- サイトの塩基強度は、両サイトの数と表面比率と共に顕著に変化した。この熱処理温度範囲では、r-HAp の P- サイトは、部分的に置換された  $\text{Mg}^{2+}$  や  $\text{Na}^+$  イオンにより、LSZ 吸着に対して強い酸強度の P- サイトが形成される。C- と P- サイトの表面性質及び HAp 粒子の細孔構造は、蛋白質の  $R_s$ 、 $W_{\text{HB}}$  及び  $W_{\text{HL}}$  にかなり影響を与えると判断される。

全ての HAp カラムの最適値としては、r-HAp(673)の $R_s$ が 3.53、r-HAp(873)の $W_{\text{HB}}$ が 46 秒、r-HAp(873)の $W_{\text{HL}}$ が 35 秒になった。BSA と LSZ の最適クロマト分離のための粒子サイズと酸塩基強度は、噴霧乾燥のディスク回転数と熱処理温度を制御することによって容易に設計可能であることが分かった。

1073 K 熱処理 HAp 粉末については、 $R_s$  は著しく減少し、 $W_{\text{HB}}$  と  $W_{\text{HL}}$  は顕著に増加した。この変化は、HAp 表面上の吸着サイトの再配列を意味し、P- と C- サイト数の減少に起因すると推測される。

以上の結果から、異種蛋白質のクロマト分離特性を制御するパラメーターは、HAp の熱処理温度と出発物質であり、牛骨由来アパタイトは噴霧乾燥条件と熱処理温度を効果的に選択し、粒子の表面構造と性質を制御することにより、蛋白質分離用新規吸着剤として液体クロマトグラフィーへ応用できることが明らかになった。

#### 4. まとめ

牛骨(r-HAp)及び試薬(s-HAp)からHAp単一相の球状粒子が、523 KでHApゲルを含む水溶性懸濁液を噴霧乾燥することによって作製された。HApゲルの特徴的な網目構造は、結晶成長の方向性から明白に識別された。熱処理温度の上昇に伴い、粒子の比表面積及び全細孔容積は単調に減少した。乾燥粉末及び673 K熱処理粉末では、r-HApの比表面積は $74 \sim 144 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ でs-HApより44～210%大きな値を示し、873～1073 K熱処理では、2種HApの比表面積は $10 \sim 33 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ になった。2種HApの結晶子径は、873～1073 K熱処理でしだいに増加し、その表面組織は、r-HApが微細結晶から球状や柱状顆粒へ、s-HApが針状結晶から柱状顆粒へ変化した。

#### 参考文献

- 1) 青木秀希, 牧島亮男: バイオセラミックス, 技報堂出版, 78～94 (1986).
- 2) 金澤孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大, 石膏と石灰, No.210, 261～273 (1987).
- 3) 久保木芳徳: 硬組織再建の原理, 北海道大学歯学部口腔生化学講座, 17～258 (1989).
- 4) TISELIUS A., HJERTEN S., LEVIN O., Arch. Biochem. Biophys., 65, 132～135, (1965).
- 5) BERNARDI G., Methods Enzymol., 21, 95～139 (1971).
- 6) BERNARDI G., Methods Enzymol., 22, 325～339 (1971).
- 7) BERNARDI G., Methods Enzymol., 27, 471～479 (1973).
- 8) TSURU S., SHINOMIYA N., KATSURA Y., UWABE Y., NORITAKE M., ROKUTANDA M., Bio-Med. Mat. Eng., 1, 1～5 (1991).
- 9) 奥山典生, 小川哲朗, 蛭原正臣, 石膏と石灰, 210, 323～331 (1987).
- 10) HONDA F., HONDA H., KOISHI M., J. Chromatogr. A, 696, 19～30 (1995).
- 11) 青木, 高木, 寺田: 血清アルブミン - 生体におけるその役割 -, 1, 13, 講談社 (1984).
- 12) 今堀和友, 山川民夫: 生化学辞典, 東京化学同人, 1333～1334 (1989).
- 13) KAWASAKI T., NIIKURA M., KOBAYASHI Y., J. Chromatogr., 515, 91～123 (1990).
- 14) JURIAANSE A.C., ARENDS J., BOSCH J.J.T., Colloid Interface Sci., 76, 220～226 (1980).
- 15) BERNARDI G., KAWASAKI T., Biochem. Biophys. Acta, 160, 301～310 (1968)
- 16) KAWASAKI T., KOBAYASHI W., IKEDA K., TAKAHASHI S., MONMA H., Eur. J. Biochem., 157, 291～295 (1986)
- 17) 井上千也, 小野晃, 窯業協会誌, 95, 759～763 (1987).
- 18) ITATANI K., AIZAWA M., HOWELL F.S., KISHIOKA A., KINOSHITA M., Phosphorus Res. Bull., 1, 35～40 (1991).
- 19) ITATANI K., NISHIOKA T., SEIKE S., AIZAWA M., HOWELL F.S., KISHIOKA A., KINOSHITA M., J. Am. Ceram. Soc., 77, 801～808 (1994).
- 20) 赤澤敏之, 長野伸泰, 勝世敬一, 北海道立工業試験場報告, No.290, 19～26 (1991).
- 21) 赤澤敏之, 長野伸泰, 勝世敬一, 北海道立工業試験場報告, No.291, 21～28 (1992).
- 22) AKAZAWA T., KODAIRA K., Phosphorus Res. Bull., 1, 215～220 (1991).
- 23) AKAZAWA T., KOBAYASHI M., KANNO T., KODAIRA K., Chem. Lett., 779～780 (1996)
- 24) AKAZAWA T., KOBAYASHI M., KANNO T., KODAIRA K., Phosphorus Res. Bull., 6, 31～34 (1996).
- 25) 赤澤敏之, 小林正義, 小平紘平, 日本セラミックス協会 東北北海道支部講演要旨集, 84～85 (1996).
- 26) AKAZAWA T., KOBAYASHI M., and KODAIRA K., J. Ceram. Soc. Jpn., 104, 1030～1034 (1996).
- 27) 慶伊富長: 吸着 共立全書 157, 95～131, 共立出版 (1980).



- 29) 赤澤敏之, 内田典昭, 勝世敬一, 北海道工業試験場報告, No.294, 25 ~ 31 (1995).
- 30) Powder Diffraction File No.9-432, International Center for Diffraction Data.
- 31) YAMASHITA K., OIKAWA N., UMEGAKI T., Chem. Mater., 8, 12, 2697 ~ 2700 (1996).
- 32) 赤澤敏之, 化学工学, 61, 7, 540 ~ 541 (1997).
- 33) SNYDER L.R., GLAJCH J.L., J.J. KIRKLAND J.J. : 高速液体クロマトグラフィーの実際, 高橋昭, 荒木峻, 15 ~ 26, 東京化学同人 (1992).