

アパタイトセラミックスの作製と評価 (第3報)

—牛骨アパタイト—シリカ複合体の作製とその吸着特性—

赤澤 敏之, 長野 伸泰, 勝世 敬一
工藤 昌史*

Preparation and Characterization of Apatite Ceramics (Part III)

—Preparation and Adsorption Properties of Cattle Bone—Apatite/Silica Composites—

Toshiyuki AKAZAWA, Nobuhiro NAGANO, Keiichi KATSUSE,
Masafumi KUDO,

抄 録

アパタイト系吸着剤の開発を目的として、湿式合成法により、牛骨アパタイト—シリカ複合体粉末 (10～70%—b—HAp) を作製し、そのアルブミンの吸着特性を検討した。複合体については、水酸アパタイト微粒子を析出した粒子径 1～2 μm, BET 比表面積 140～230m²・g⁻¹ の粉末が得られた。アルブミンの吸着特性は、Langmuir 型吸着等温線に適合し、30%—b—HAp による吸着量が大きな値を示した。アルブミンの吸着量は、複合体の熱処理温度の上昇に伴い減少する傾向がみられ、その減少率は、HAp 含有率が少ない方が小さい値になった。

1. はじめに

水酸アパタイト (HAp: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) は、優れた生体親和性とイオン交換性を有する機能性セラミックスとして、生体埋入材料と吸着剤などへ応用されている^{1),2),3),4)}。さらに、HAp は生体高分子に対する親和性と吸着特性を有することから、生体試料の活性を損なわない吸着材料として、液体クロマト分離カラム用充填剤へも利用されている^{5),6),7)}。

HAp における吸着特性は、結晶表面上の官能基分布及び結晶表面と吸着物質の相互作用に依存するため、HAp の粒子径、粒子形状、比表面積及び表面電荷を制御することは極めて重要である。一般に、HAp との固液吸着反応において、酵素、抗体、その他の蛋白質、核酸(DNA、

RNA) 及びウイルスなどの電荷を帯びた生体高分子 (分子量 10⁴～10⁹ダルトン) が吸着するサイトは、負に帯電した官能基を対象にする Ca²⁺ サイト (C サイト) と正に帯電した官能基を対象にする PO₄³⁻ サイト (P サイト) が存在すると言われている^{8),9)}。

HAp の吸着材料としての問題点は、HAp は酸性領域で化学的に不安定であり、その機械的強度は、シリカ (SiO₂)、ジルコニア及びアルミナなどのセラミックス材料と比較して著しく低いことである。たとえば、HAp クロマトグラフィーでは、酸性領域での使用により充填剤の化学的劣化が起り、高圧 (100kg・cm⁻² 以上) 下での試料の分離・精製操作は極めて困難であるとされている。

これに対して、大きな比表面積の SiO₂ と複合化された HAp は、優れた吸着能と選択性、機械的強度及び化学的耐久性を有するため、従来適用することが不可能であっ

* : 株式会社 酵生舎

た低い pH 領域で、蛋白質の吸脱着や分離・精製等が可能であると考えられる。

牛骨アパタイト (b-HAp: $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}$, $X=0.1$)^{10),11)}は、微量の多種金属イオンを含有する Ca^{2+} 欠損型 HAp であり、多量に比較的安価に作製することができるため、セラミックス複合体へのアパタイト成分の出発原料として有効である。

本研究では、アパタイト系吸着剤の開発を目的として、湿式合成法により b-HAp/SiO₂ 複合体粉末を作製し、その粉末とアルブミン (酸性蛋白質) 水溶液の固液反応を行い、アルブミンの吸着特性を検討した。

2. 実験

2.1 b-HAp/SiO₂ 複合体の出発原料

アパタイト成分の b-HAp については、既報²⁾と同様にして、ホルスタイン肉牛から切断、解体、冷凍保存された牛大腿骨を出発原料とした。

SiO₂ については、AEROSIL 社製 200 特級試薬を 1000℃, 24 時間焼成した粉末 (BET 比表面積 156m²·g⁻¹, 粒子径 1 ~ 2 μm) を用いた。

2.2 b-HAp/SiO₂ 複合体への吸着物質

複合体による吸着特性を検討するための蛋白質については、比較的安価でアミノ酸の偏りがなく、水溶性酸性蛋白質として知られているアルブミン (牛製, 和光一級試薬) を用いた。

2.3 実験操作方法

2.3.1 b-HAp/SiO₂ 複合体粉末の作製

b-HAp/SiO₂ 複合体粉末の作製方法を図 1 に示す。

牛大腿骨を煮沸処理し、コラーゲン成分をできるだけ抽出除去した。その牛蒸成骨粉末を 500~700℃ 焼成さらに 1100℃, 24 時間焼成し、牛骨アパタイト (b-HAp: $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}$) を作製した。それを 0.2M-HNO₃ 水溶液に溶解し、SiO₂ を添加後、2cm³·min⁻¹ で NH₄OH 水溶液を滴下し、pH10~11, 25℃, 24 時間攪拌反応させた。その懸濁液を濾過または遠心分離した後、沈澱物を洗浄及び乾燥することにより、b-HAp/SiO₂ 複合体 (10~70% -b-HAp) 粉末を作製した。いくつかの複合体については、400~1000℃, 24 時間の熱処理を行った。

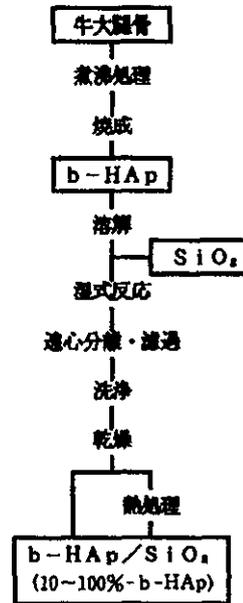


図 1 b-HAp/SiO₂ 複合体粉末の作製方法

なお、複合体と HAp の諸特性を比較するために、SiO₂ 無添加の 100% -b-HAp 粉末の合成も同様にして行った。

得られた粉末について、粉末 X 線回析 (XRD) による生成相の同定と格子定数の測定、定容法による BET 比表面積の測定、高周波プラズマ発光分光分析 (ICP) による構成成分の定量、走査型電子顕微鏡 (SEM) による表面組織の観察及び電子線微小部分析 (EPMA) による微細構造の組成分析などを行った。

2.3.2 b-HAp/SiO₂ 複合体粉末によるアルブミンの吸着特性

b-HAp/SiO₂ 複合体粉末によるアルブミンの吸着特性試験方法を図 2 に示す。

複合体粉末, 0.3~2.0mg·cm⁻³-アルブミン水溶液及び 20~200mM -リン酸緩衝溶液 (K₂HPO₄, KH₂PO₄) を 22℃, pH6~9, 0.5~120 時間, 700rpm で攪拌反応させた。その懸濁液を重力沈降と遠心分離した後、紫外可視分光分析 (UV) により 280nm¹²⁾ の吸収ピークを測定し、アルブミンの平衡濃度 C_E と吸着量 V を算出した。

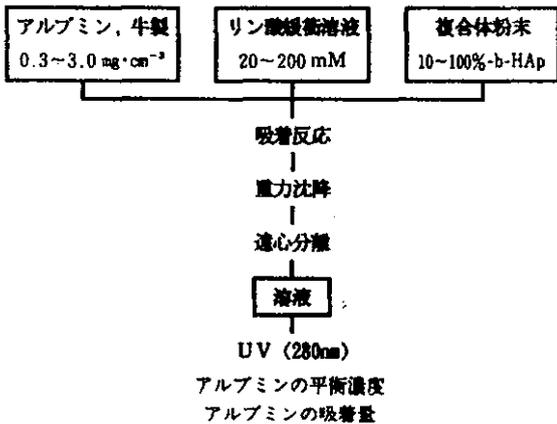


図2 b-HAp/SiO₂複合体粉末によるアルブミンの吸着特性試験

3. 実験結果及び考察

3.1 100% - b - HAp の粉体特性

湿式合成後の100% - b - HApは、SEMでは粒子径0.1 μm以下の微粒子が観察された。そのBET比表面積は85m²・g⁻¹となり、他の湿式合成法¹⁾により作製された

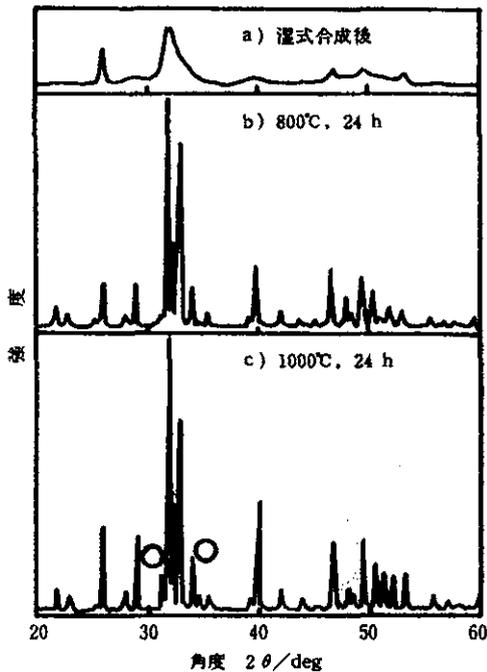


図3 100% - b - HApのX線回折パターン (条件: O; β-Ca₃(PO₄)₂)

HApと比較して大きな値が得られた。図3は、湿式合成及び800~1000℃, 24時間熱処理した100% - b - HApのXRDパターンを示したものである。

800℃熱処理では、0.1~1 μmの粒子からなる結晶性のよい六方晶系のHAp単一相が得られた。その格子定数はa=0.942nm, c=0.688nmであり、文献値¹³⁾とよく一致した。また、化学分析による(Ca/P)の値は1.66を示すことから、牛大腿骨由来の湿式合成された100% - b - HApは、Ca²⁺欠損型HApであることが分かった。

1000℃熱処理では、HAp相の他、微量のβ-Ca₃(PO₄)₂相が検出され、顕著な粒成長が認められた。このように、従来の合成アパタイトと比較して、低い熱処理温度でHApの一部が分解するのは、100% - b - HApの非化学量論性に起因すると考えられる。

3.2 b - HAp/SiO₂ 複合体の粉体特性

湿式合成後の複合体では、HApの結晶性はあまりよくなく、5~70% - b - HAp複合体のBET比表面積は140~230m²・g⁻¹であり、100% - b - HApと比較して大きな値が得られた。複合体の熱処理特性を調べるために、湿式合成後600~1000℃, 24時間熱処理した複合体のXRDパターンについて、70% - b - HApを図4に、30% - b - HApを図5に及び10% - b - HApを図6に、それぞれ示す。

図4, 5及び6より、600℃熱処理ではいずれの複合体もHApの結晶性はあまりよくなく、800℃熱処理ではその結晶化が進むと共に、10% - b - HApはクリストバライト相が、30% - b - HApはβ-Ca₃(PO₄)₂相が、70% - b - HApはα-Ca₃(PO₄)₂相, β-Ca₂P₂O₇相及びβ-Ca₃(PO₄)₂相が同定された。

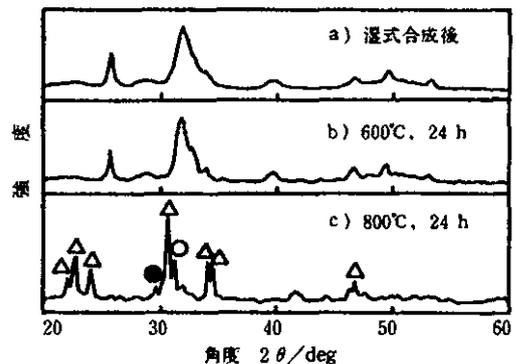


図4 70% - b - HAp複合体のX線回折パターン (条件: O; β-Ca₃(PO₄)₂, Δ; α-Ca₃(PO₄)₂, ●; β-Ca₂P₂O₇)

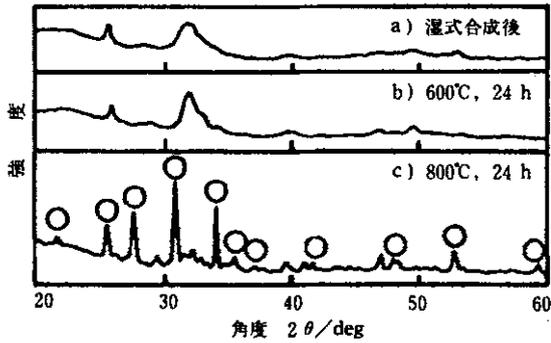


図5 30%-b-HAp複合体のX線回折パターン
(条件：○； β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

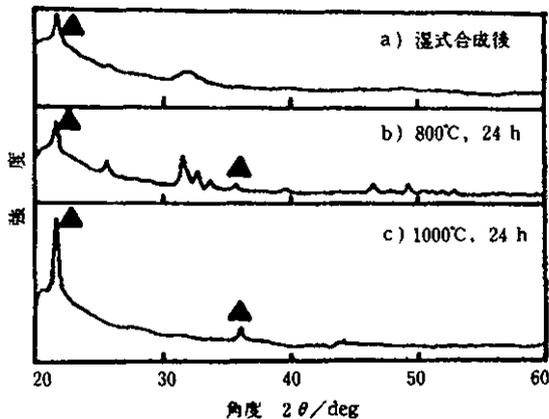
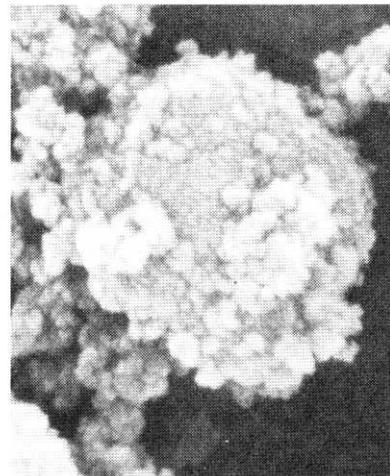


図6 10%-b-HAp複合体のX線回折パターン
(条件：▲； SiO_2 (クリストバライト))

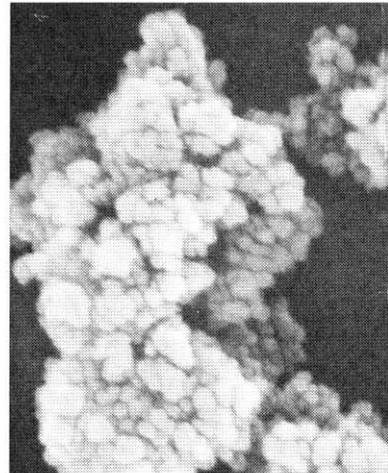
図7に、b-HAp/ SiO_2 複合体粉末の表面組織を示す。a)は湿式合成後の10%-b-HAp、b)は1000°C、24時間熱処理の10%-b-HAp、c)は1000°C、24時間熱処理の100%-b-HApの場合である。a)より、粒子径1~2 μm の複合体母粒子へ約0.1 μm の微粒子が析出した組織が観察される。EPMAによる(Ca/P)のモル比は、HApの化学量論比の1.67に近い値を示すことが分かった。b)では、粒子成長は少なく、その微粒子径は約0.2 μm であった。一方、c)では、粒子径0.3~1 μm の大きな粒子が認められる。したがって、10%-b-HAp複合体は、100%-b-HApよりも熱処理に伴う焼結が抑制された優れた粉末であることが明かとなった。

3.3 100%-b-HApによるアルブミンの吸着特性

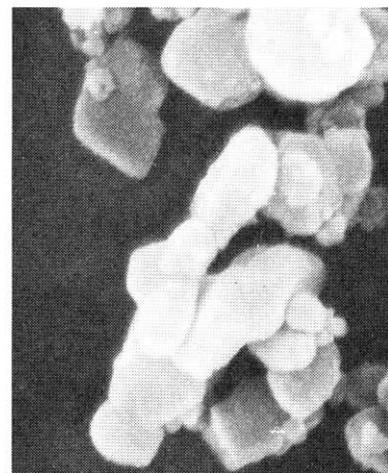
図8は、100%-b-HAp粉末によるアルブミンの吸着量の経時変化を示したものである。アルブミンの初期濃度 C_0 は、0.5 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ と2.0 $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ の場合である。



a) 10%-b-HAp
湿式合成後



b) 10%-b-HAp
1000°C, 24 h 熱処理



c) 100%-b-HAp
1000°C, 24 h 熱処理

図7 b-HAp/ SiO_2 複合体粉末の表面組織

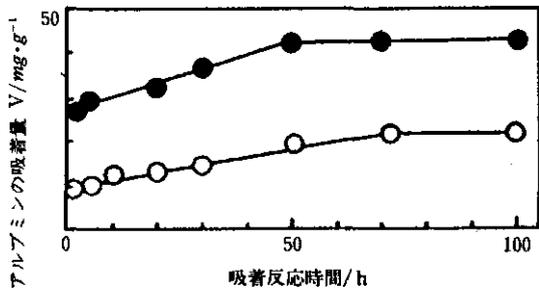


図8 100%—b-HApによるアルブミンの吸着量の経時変化

(条件：22℃，リン酸緩衝溶液濃度 20 mM，○：アルブミンの初期濃度 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ，●：アルブミンの初期濃度 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$)

アルブミンの吸着量は、 $C_0 = 0.5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ では 70 時間、 $C_0 = 2.0 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ では 50 時間の固液反応でほぼ一定値となった。したがって、以下の実験において、吸着特性を評価するための固液反応時間としては、70 時間を選択した。このように、固液吸着の平衡到達時間が、固気吸着と比較して著しく長くなる現象¹⁴⁾は、固液吸着では、吸着物質における溶液から固液境膜への物質移動、境膜内拡散、固体の細孔内拡散及び吸着反応に加えて、吸着反応に伴う溶液条件(pH, イオン濃度, イオン強度)の経時変化と溶解析出などが起こるためと推察される。

図9に、100%—b-HApによる22℃のアルブミンの吸着等温線を示す。

アルブミンの吸着量は、アルブミンの平衡濃度が高く

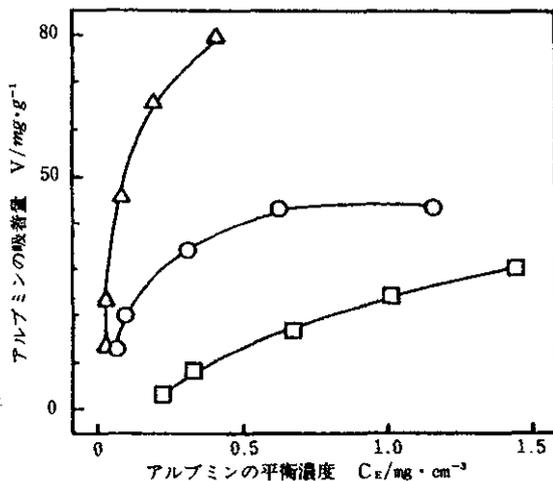


図9 100%—b-HApにおけるアルブミンの吸着等温線

(条件：22℃，リン酸緩衝溶液濃度 20 mM，▲：pH 6.3，○：pH 7.0，□：pH 8.3)

なるに伴い増加し、pHが低い場合の方が低い平衡濃度で吸着量は大きいことが分かる。これは、吸着反応溶液のpHが低くなるに伴い、HAp粒子の表面電荷が増加するためと考えられる。

HApは、図9のように塩基性領域ではアルブミンの吸着量が小さくなり、酸性領域ではHApの溶解現象が起ると言われていることから、アパタイト系吸着剤としての適用範囲は、中性領域、すなわち、pH7近傍が適当であると判断される。

図10に、100%—b-HApによるアルブミンの吸着量に及ぼすリン酸緩衝溶液濃度の影響を示す。

アルブミンの吸着量は、リン酸緩衝溶液濃度が低い場

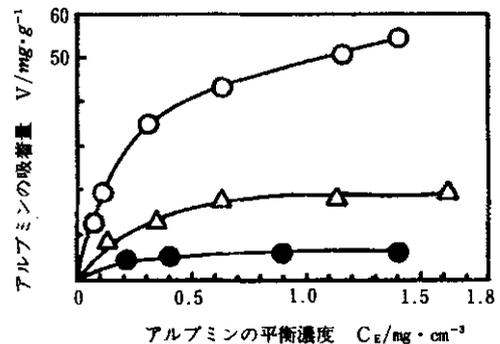


図10 100%—b-HApによるアルブミンの吸着量に及ぼすリン酸緩衝溶液濃度の影響

(条件：22℃，○：20 mM，▲：100 mM，●：200 mM)

合の方が増加する現象が認められる。この吸着量の増加は、吸着反応溶液中の PO_4^{3-} イオン濃度の上昇により、HApのCサイトと PO_4^{3-} イオンとの結合力が強まり、HApのCサイトとアルブミンの COOH^- イオンとの吸着力が減少するためと推測される。

図9と10のpH,リン酸緩衝溶液濃度とアルブミンの吸着量の結果から、b-HAp/SiO₂複合体による吸着特性を検討する条件としては、pH7.0,リン酸緩衝溶液濃度20mMを採用した。

3.4 b-HAp/SiO₂複合体によるアルブミンの吸着特性

図11は、b-HAp/SiO₂複合体粉末による22℃,pH7.0におけるアルブミンの吸着等温線を示したものである。

30%—b-HAp複合体によるアルブミンの吸着量は

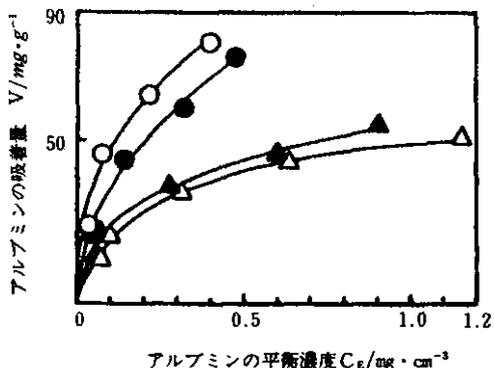


図 11 HAp/SiO₂複合体によるアルブミンの吸着等温線

(条件：22℃，pH 7.0，リン酸緩衝溶液濃度 20 mM，▲；10%-b-HAp，○；30%-b-HAp，●；70%-b-HAp，△；100%-b-HAp)

大きな値となり、アルブミンの平衡濃度 0.40mg·cm⁻³ の時、80mg·g⁻¹であった。これは、複合体の BET 比表面積は、HAp と比表面積の大きな SiO₂ との複合化により、b-HAp 含有率の減少に伴い増加するが、複合体単位面積当たりの吸着量、すなわち、吸着サイト 1 個当たりの活性は、30%-b-HAp の方が 10%-b-HAp より高いためと考えられる。

これらの複合体による吸着の種類を調べるために、図 12 に、b-HAp/SiO₂ 複合体による 22℃，pH7.0 におけるアルブミンの Langmuir プロット (C_E と (C_E/V) 値の関係) を示す。

各々の複合体の C_E と (C_E/V) 値の関係は、ほぼ直線関係が得られることから、複合体によるアルブミンの固液吸着は、単分子層均一吸着の Langmuir 型吸着等温線¹⁴

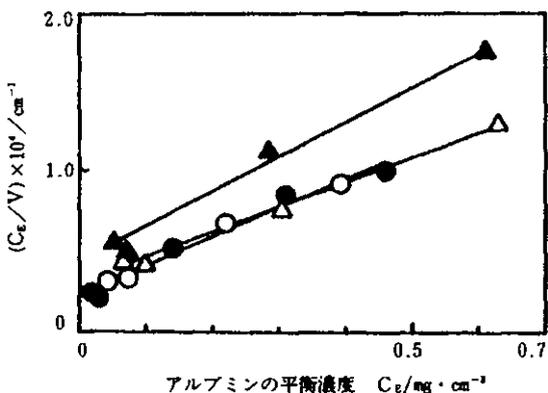


図 12 HAp/SiO₂複合体によるアルブミンの吸着量の Langmuirプロット

(条件：温度 22℃，pH 7.0，リン酸緩衝溶液濃度 20 mM，▲ 10%-b-HAp，○；30%-b-HAp，●；70%-b-HAp，△；100%-b-HAp)

に適合することが明らかになった。

図 13 は、b-HAp/SiO₂ 複合体によるアルブミンの吸着量に及ぼす熱処理温度の影響を示したものである。アルブミンの初期濃度は 1.5mg·cm⁻³，熱処理時間は 24 時間である。

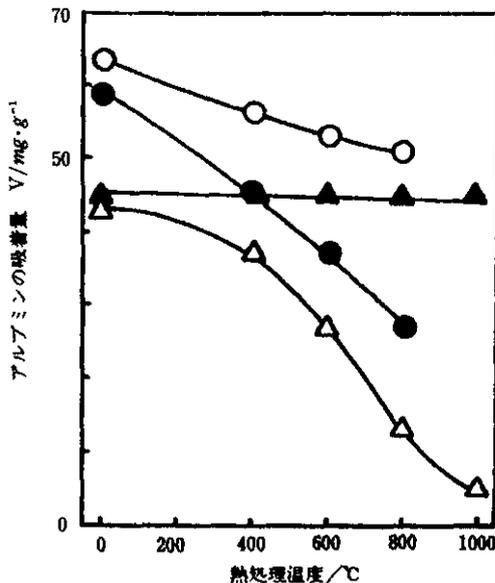


図 13 HAp/SiO₂によるアルブミンの吸着量に及ぼす熱処理温度の影響

(条件：温度 22℃，pH 7.0，リン酸緩衝溶液濃度 20 mM，アルブミンの初期濃度 1.5mg·cm⁻³，熱処理時間 24 h，▲；10%-b-HAp，○；30%-b-HAp，●；70%-b-HAp，△；100%-b-HAp)

HAp 含有率が多い場合のアルブミンの吸着量は、熱処理温度の上昇に伴い減少した。その吸着量の減少率は、HAp 含有率が少ない方が小さく、1000℃，24 時間熱処理により 10%-b-HAp 複合体で 0%，100%-b-HAp で 88%となった。30%-b-HAp 複合体によるアルブミンの吸着量は、いかなる熱処理温度でも最も大きな値となり、800℃，24 時間の熱処理で 52mg·g⁻¹であった。

以上のことから、湿式合成法により作製された b-HAp/SiO₂ 複合体粉末は、アルブミンの吸着量と 400~1000℃の耐熱性に優れたアパタイト系吸着剤であることが分かった。したがって、その複合体粉末について、粒子径と形状及び熱処理温度を選定し、粒子の耐圧強度と化学的耐久性の改善を行うことにより、液体クロマト分離カラム充填剤などへの応用が可能であると考えられる。

4. まとめ

湿式合成法により、 β -HAp/SiO₂ 複合体粉末を作製し、そのアルブミンの吸着特性を検討した結果、下記の結論が得られた。

- 1) 湿式合成後 800℃, 24 時間熱処理の 100% - β -HAp は、六方晶系の HAp 単一相が得られ、その格子定数は $a = 0.942\text{nm}$, $c = 0.688\text{nm}$ であった。
- 2) 湿式合成後の 10~70% - β -HAp 複合体の BET 比表面積は、 $140\sim 230\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ であり、100% - β -HAp ($85\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) と比較して大きな値が得られた。
- 3) 湿式合成後の複合体では、約 $0.1\ \mu\text{m}$ の HAp 微粒子が析出した粒子径 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ の粉末が得られた。
- 4) 湿式合成後の複合体は、800℃, 24 時間熱処理により、HAp の結晶化が進み、10% - β -HAp ではクリストバライト相が、30% - β -HAp では β -Ca₃(PO₄)₂ 相が、70% - β -HAp では α -Ca₃(PO₄)₂ 相、 β -Ca₂P₂O₇ 相及び β -Ca₃(PO₄)₂ 相が、それぞれ生成した。
- 5) 1000℃, 24 時間熱処理の 10% - β -HAp 複合体では、粒子成長は少なく、その微粒子径は約 $0.2\ \mu\text{m}$ であった。
- 6) 100% - β -HAp によるアルブミンの吸着量は、pH とリン酸緩衝溶液濃度が低くなるに伴い増加した。
- 7) 複合体によるアルブミンの吸着は、単分子層均一吸着の Langmuir 型吸着等温線に適合した。
- 8) 30% - β -HAp 複合体によるアルブミンの吸着量は大きな値となり、22℃, pH7.0 でアルブミンの平衡濃度 $0.40\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ の時、 $80\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ であった。
- 9) 複合体によるアルブミンの吸着量は、熱処理温度の上昇に伴い減少し、その減少率は、 β -HAp 含有率が少ない場合の方が小さい値となった。

以上のことから、湿式合成法により作製された HAp/SiO₂ 複合体粉末は、アルブミンの吸着量と 400~1000℃ の耐熱性に優れたアパタイト系吸着材料として、液体クロマト分離カラム充填剤などへの応用が期待される。

5. 謝辞

本研究の推進にあたって、御懇切な御教示と御助言を賜った北海道大学工学部教授 小平紘平博士に、さらに牛大腿骨を供給して頂いた上川畜産公社 KK 山近秀和課長に、衷心より感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 金澤孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大, 石膏と石灰, 210, 261 (1987)
- 2) 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)
- 3) AKAZAWA T., KODAIRA K., Phosphorus Research Bulletin, 2, 63~68 (1992)
- 4) TSURU S., SHINOMIYA N., KATSURA Y., UWABE Y, NORITAKE M., ROKUTANDA M., Bio - Med. Mat. Eng., 1, 1~5 (1991)
- 5) 奥山典生, 小川哲朗, 蛭原正臣, 石膏と石灰, 210, 323~331 (1987)
- 6) KAWASAKI T., IKEDA K., TAKAHASHI S., KUBOKI Y., Eur.J.Biochem., 155,249~257(1986)
- 7) KAWASAKI T., KOBAYASHI W., IKEDA K., TAKAHASHI S., MONMA H., Eur.J.Biochem., 157,291~295 (1986)
- 8) KAWASAKI T., J.Chromatogr., 151,95 (1978)
- 9) KAWASAKI T., J.Chromatogr., 157,7 (1978)
- 10) 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)
- 11) AKAZAWA T., KODAIRA K., Phosphorus Research Bulletin,1,215~220 (1991)
- 12) 菅原潔, 副島正美:蛋白質の定量法・第3版,13~28, 131~144, 学会出版センター (1990)
- 13) JCPDS カード, (9-432)
- 14) 慶伊富長:吸着, 共立全書 157,26~48,132~149, 共立出版 (1980)