

過飽和液相レーザープロセッシングによる リン酸カルシウム球状粒子合成と機能付加

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門
研究員 中村 真紀
(平成 26 年度奨励研究助成 AF-2014223)

キーワード：レーザー，リン酸カルシウム，機能性粒子

1. 研究の目的と背景

ヒトの歯や骨の無機成分であるリン酸カルシウムは、生体適合性と安全性に優れた材料である。中でも、サブマイクロメートルサイズのリン酸カルシウム球状粒子は、薬剤などの体内送達用担体として有用である。このため、生体応用可能な安全性と、簡便・迅速性を兼ね備えた、サブマイクロメートルサイズのリン酸カルシウム球状粒子合成法の開発が望まれている。

近年、液相中に分散させた金属・金属酸化物などの原料粉体に、紫外・可視領域の低エネルギーパルスレーザー光を照射するだけで、サブマイクロメートルサイズの球状粒子を得る手法が報告され、レーザープロセッシングによる簡便な球状粒子合成法として注目されている¹⁾。しかし、この手法では、紫外・可視領域においてレーザー光吸収性に乏しいリン酸カルシウムの原料粉体から球状粒子を合成することはできなかった。

これに対し、我々は最近、リン酸カルシウムの原料粉体に代えて、カルシウムイオン水溶液とリン酸イオン水溶液を混合して調製されるリン酸カルシウム過飽和溶液を原料とし、同溶液中に光吸収剤として鉄(III)イオンを添加することで、紫外レーザー照射によりサブマイクロメートルサイズのリン酸カルシウム球状粒子を合成する技術(過飽和液相レーザープロセッシング)を開発した²⁾。本手法は、簡便(一段階工程)かつ迅速(数十分)であり、界面活性剤や有機溶媒などの有害試薬を一切用いず、安価な無機塩の水溶液のみを原料としている。本手法においては、過飽和溶液中に添加された鉄(III)イオンが、リン酸カルシウム析出物に取り込まれることで、レーザープロセッシングにおける析出物の光吸収と、同析出物の溶融・球状化を促していると推測される。実際、本手法で得られたリン酸カルシウム中には、鉄イオンが種々の含有量で担持されていた。従って、鉄(III)イオンに代えて、他の金属イオンを光吸収剤として適用できれば、同イオンの特性に応じた様々な機能をリン酸カルシウム球状粒子に付加できると期待される。

そこで本研究では、磁性材料の原料である鉄(II)イオン、ならびに、抗菌性を示す銀(I)イオンを光吸収剤として用いて過飽和液相レーザープロセッシングを実施し、リン酸カル

シウム球状粒子への機能付加(磁性、抗菌性)を試みた。まず、これらの金属イオンを様々な濃度で添加して過飽和液相レーザープロセッシングを実施し、生成粒子の組成・構造などを調べた。続いて、得られた結果を解析し、機能性リン酸カルシウム球状粒子を合成するための、基礎的条件を追求した。さらに、合成粒子の機能(磁性ならびに抗菌性)について、予備的な評価を行った。

2. 実験方法

2.1 過飽和液相レーザープロセッシング

カルシウムイオン水溶液(CaCl_2 または $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、リン酸イオン水溶液($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、各種金属イオン水溶液($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ または AgNO_3)をそれぞれ調製し、最終濃度として、Ca: 16.7 mM, P: 10 mM, Fe(II) or Ag(I): 0, 1, 2, 5, 10, 20 mM となるように混合し、過飽和溶液を調製した。この過飽和溶液(4 mL)に、攪拌下、非集光のNd:YAGパルスレーザー光(Quanta-Ray LAB-150-30, Spectra-Physics製, 周波数: 30 Hz, 波長: 355 nm, エネルギー密度: 200 mJ/pulse/cm²)を20または30分間照射した(図1)。照射後、遠心操作により析出物を回収し、試料を得た。得られた試料は、更なる遠心操作により、分画L(500 rpm, 5分で沈降させた分画)ならびに分画S(分画Lの上澄液を1000 rpm, 10分で沈降させた分画)に分けた。

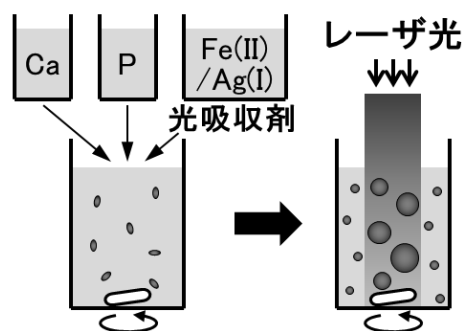


図1 過飽和液相レーザープロセッシングの概略図

2.2 生成粒子の組成・構造評価

得られた粒子の組成・構造は、走査型電子顕微鏡(SEM: XL30, FEI製)ならびに透過型電子顕微鏡(TEM: JEM-2010,

JEOL 製; Tecnai Osiris, FEI 製) 観察、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDX: Genesis2000, EDAX 製)、X 線回折法 (XRD: M18X, MAC Science 製) により調べた。

2.3 生成粒子の抗菌性評価

得られた粒子を超純水に分散し (0, 0.1, 0.5 mg/mL)、ミュータンス菌の懸濁液に加えて 24 時間インキュベートした。インキュベート後、細菌懸濁液の濁度 (総細菌量に対応) を測定した (590 nm)。

3. 研究成果

3.1 鉄(II)を光吸収剤とする過飽和液相レーザープロセッシング³⁾

本項では、まず、光吸収剤として 5 mM の鉄(II)イオンをリン酸カルシウム過飽和溶液に添加し、レーザー光照射 (20 分) を行った。得られた粒子の SEM 観察の結果、分画 S にサブマイクロメートルサイズの球状粒子、分画 L にマイクロメートルサイズの球状粒子が観察された (図 2)。また、EDX による元素分析により、粒子は、分画 S、分画 L ともにカルシウム (Ca)、リン (P)、鉄 (Fe)、酸素 (O) を含むことがわかった (図 3)。XRD パターンでは、分画 S、分画 L ともに、 30° を中心にブロードなハローが検出された (図 4)。以上の結果から、分画 S および分画 L の粒子はいずれも、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムであると考えられた。

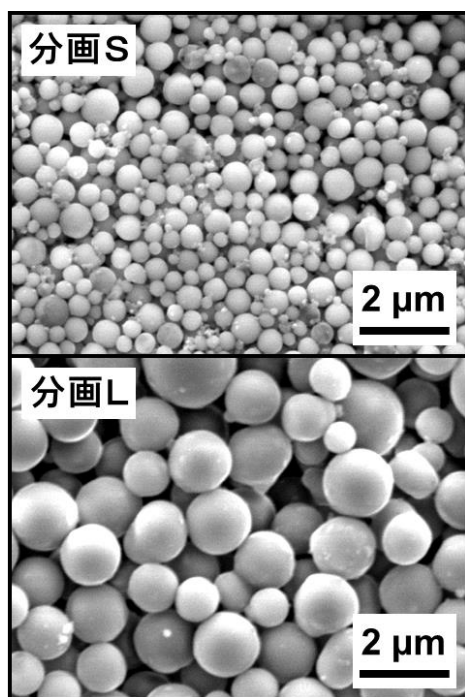


図 2 分画 S (上) ならびに分画 L (下) に得られた粒子の SEM 像 (鉄(II)イオン : 5 mM、照射時間 : 20 分)

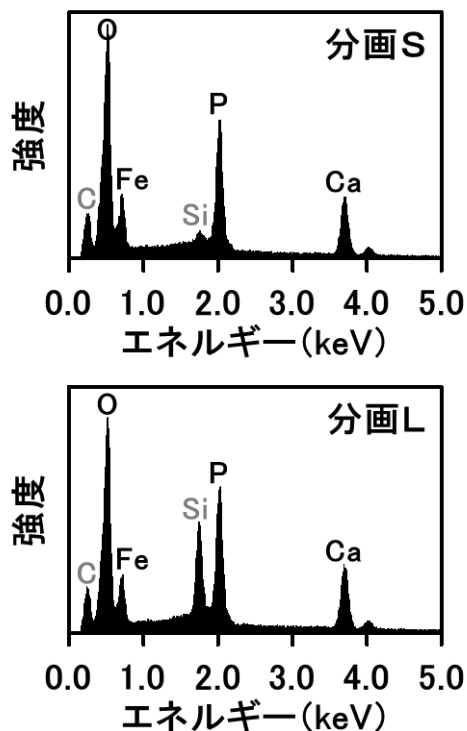


図 3 分画 S (上) ならびに分画 L (下) に得られた粒子の EDX スペクトル (鉄(II)イオン : 5 mM、照射時間 : 20 分) (シリコン (Si) : 下地の基板、炭素 (C) : 蒸着カーボンに由来)

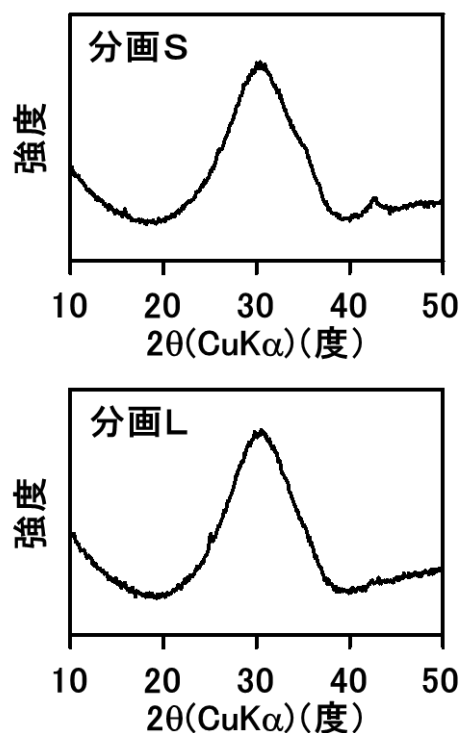


図 4 分画 S (上) ならびに分画 L (下) に得られた粒子の XRD パターン (鉄(II)イオン : 5 mM、照射時間 : 20 分)

続いて、過飽和溶液中の鉄(II)イオン濃度を変化させてレーザー照射(30分)を行った。各濃度における生成物をSEM観察し、球状粒子生成の有無を調べた。鉄(II)イオン濃度が0 mMの場合には、球状粒子は観察されなかった。また、鉄(II)イオン濃度が1 mMの場合には、わずかに球状粒子が観察されたが、遠心操作では球状粒子のみを得ることができなかった。一方で、鉄(II)イオン濃度が2 mMの場合には、分画Sにサブマイクロメートルサイズの球状粒子が得られ、5~20 mMでは、それに加えて分画Lにマイクロメートルサイズの球状粒子が得られた。なお、得られた球状粒子は、鉄含有リン酸カルシウムであり、鉄(II)イオン濃度の増加に伴って、球状粒子内の鉄含有量も増加した。

本反応における球状粒子生成のメカニズムは、鉄(III)イオンを光吸収剤とした場合と同様と考えられる。3種の原料イオン水溶液を混合すると、溶液中に鉄を含むリン酸カルシウムの不定形粒子が直ちに析出する。この不定形粒子の分散液にパルスレーザー光を照射すると、レーザー光吸収性の不定形粒子が瞬間的にレーザー光を吸収し、加熱されて熔融液滴となる。さらに、レーザーパルス間隔で周囲の溶液により急冷され、球状のまま固化し、球状粒子となると考えられる。このようにして生成した球状粒子は、溶液中の原料イオンなどを取り込みながら徐々に成長し、サブマイクロメートルサイズ(条件によってはマイクロメートルサイズ)の鉄含有リン酸カルシウム球状粒子が生成すると推察される。低濃度の鉄(II)イオン(1 mM)では、レーザー照射前に析出する不定形粒子のレーザー光吸収性が十分でな

かったため、球状粒子がわずかにしか生成しなかったと考えられる。

以上、過飽和液相レーザープロセッシングによる球状粒子合成技術において、鉄(III)イオンと同様、鉄(II)イオンも光吸収剤として有用であることが明らかとなった。ただし、得られた鉄含有リン酸カルシウム球状粒子は、アモルファス状であり、磁性を示す酸化鉄(マグネタイト)は含まれていなかった。一般に、マグネタイトは、鉄(II)イオンと鉄(III)イオンの共存下、液性を塩基性にすることで生成する。鉄(II)イオンは鉄(III)イオンへと酸化されやすいことから、鉄(II)イオンを光吸収剤として添加したリン酸カルシウム過飽和溶液中では、鉄(II)イオンと鉄(III)イオンが共存していると考えられる。しかし、同過飽和溶液が弱酸性であったために、マグネタイトが析出しなかったと推測される。

そこで、リン酸カルシウム球状粒子中にマグネタイトを析出させるため、鉄(II)イオン(20 mM)を添加したリン酸カルシウム過飽和溶液に、水酸化ナトリウム(25 mM)を加え、溶液のpHを上昇させ、この溶液にレーザー光を20分間照射した。SEM観察(図5 a)ならびにEDX(図5 b)により、分画Sにカルシウム(Ca)、リン(P)、鉄(Fe)、酸素(O)から成る、サブマイクロメートルサイズの球状粒子の生成が確認された。同粒子のXRDパターンには、マグネタイトならびにウスタイトに由来する回折ピークが検出された(図5 c)。また、TEM観察では、サブマイクロメートルサイズの粒子中に多数のナノ粒子が見られたことから(図5 d)、得られた粒子は、リン酸カルシウ

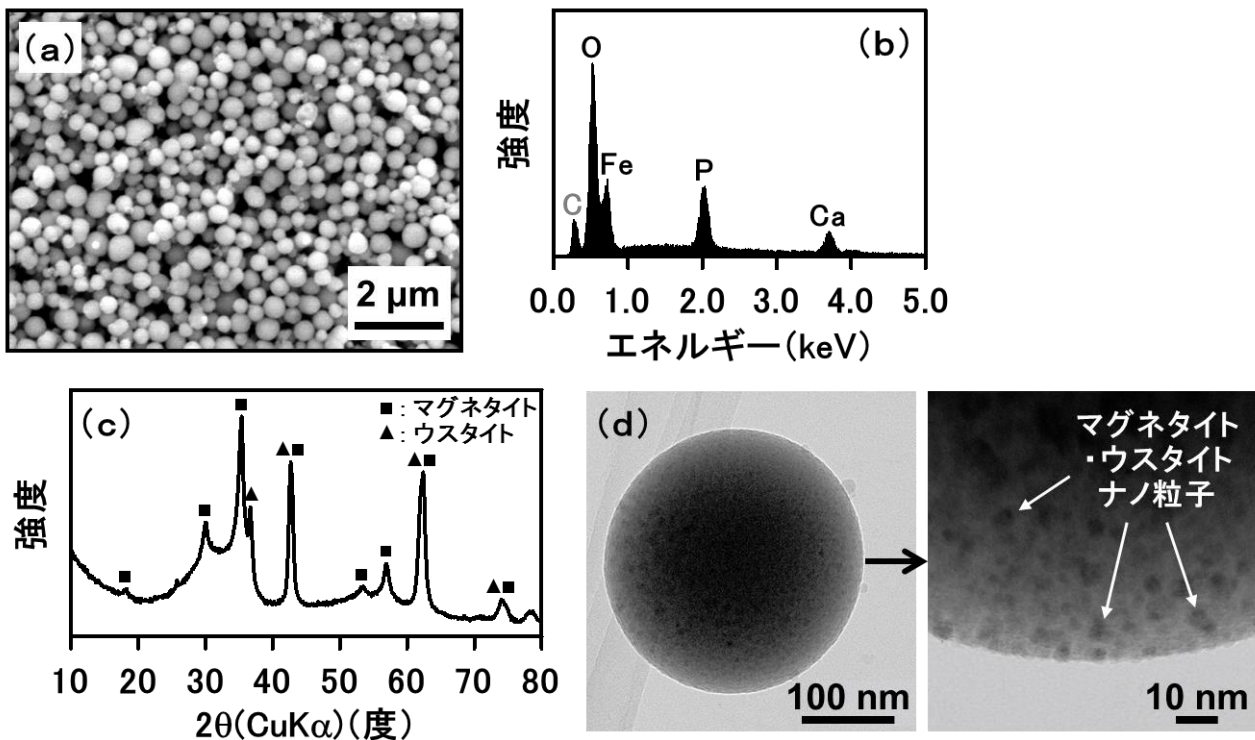


図5 磁性リン酸カルシウム球状粒子 (a) SEM像、(b) EDXスペクトル、(c) XRDパターン、(d) TEM像

ムを主成分とするサブマイクロメートルサイズの球状マトリックス中に、多数のマグネタイト(ウスタイトも共存)ナノ粒子を含む構造を持つと考えられた。なお、得られた粒子は、磁石に引き付けられたことから(図6)、磁性リン酸カルシウム球状粒子が生成したと言える。

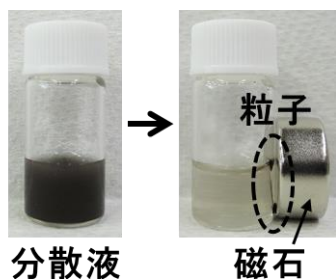


図6 磁性リン酸カルシウム球状粒子の分散液と磁石への反応

以上、鉄(II)イオンを光吸収剤として用いた過飽和液相レーザープロセッシングにおいて、溶液のpHを適切に設定することで、リン酸カルシウム球状粒子に磁性を付加できることが明らかになった。

3.2 銀(I)を光吸収剤とする過飽和液相レーザープロセッシング⁴⁾

本項では、まず、光吸収剤として5 mMの銀(I)イオンをリン酸カルシウム過飽和溶液に添加し、レーザー照射(20

分)を行った。得られた粒子のSEM観察(図7 a)ならびにEDX(図7 b)の結果、分画Sにカルシウム(Ca)、リン(P)、銀(Ag)、酸素(O)から成る、サブマイクロメートルサイズの球状粒子が観察された。また、同粒子のXRDパターンには、金属銀に由来するピークが検出された(図7 c)。更に粒子の断面分析を行った結果、得られた粒子は、リン酸カルシウムを主成分とするサブマイクロメートルサイズの球状マトリックス中に、多数の金属銀ナノ粒子を含む構造を持つと考えられた(図7 d)。本反応においては、レーザー照射により、銀(I)イオンが光還元され、リン酸カルシウム球状粒子の内部あるいは表面に金属銀ナノ粒子が析出したと推測される。

続いて、過飽和溶液中の銀(I)イオン濃度を変化させてレーザー照射(20分)を行い、生成物のSEM観察により球状粒子生成の有無を調べた。その結果、銀(I)イオン濃度が1~2 mMの場合には、球状粒子とともに不定形粒子が生成し、遠心操作で球状粒子のみを得ることができなかったのに対し、銀(I)イオン濃度が5~20 mMの場合には、サブマイクロメートルサイズの球状粒子を得ることができた。また、鉄(II)イオンの場合と同様、過飽和溶液中の銀(I)イオン濃度の増加に伴って、球状粒子内の銀含有量も増加した。

次に、5 mMの銀(I)イオンを添加した過飽和溶液から得られた粒子を用いて、虫歯菌であるミュータンス菌に対して予備的な抗菌性評価を行った。粒子の濃度を変化させて細菌懸濁液に添加した結果、濃度依存的にミュータンス菌

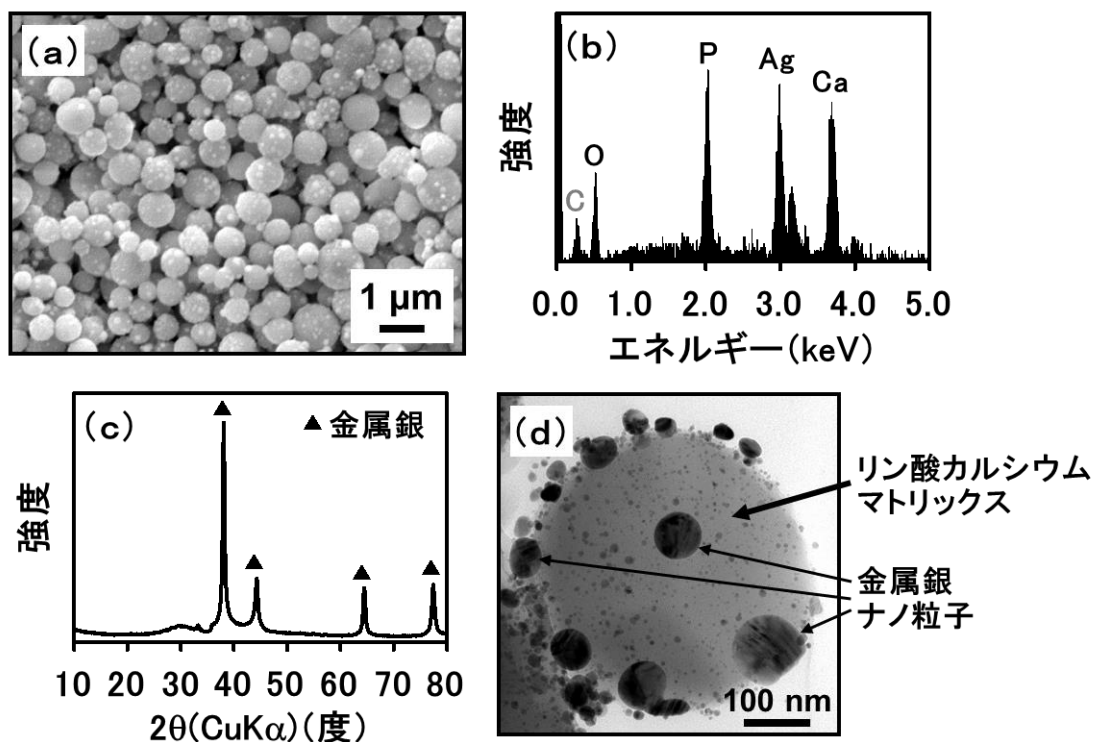


図7 抗菌性リン酸カルシウム球状粒子 (a) SEM像、(b) EDXスペクトル、(c) XRDパターン、(d) 粒子断面のTEM像(エポキシ樹脂に包埋後、イオンミリング法により薄膜化)

の増殖が抑制された (図8)。すなわち、得られた粒子は抗菌性リン酸カルシウム球状粒子であると言える。

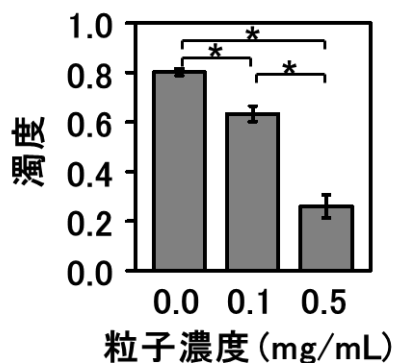


図8 抗菌性リン酸カルシウム球状粒子を添加した細菌懸濁液の濁度 (n = 6, *P < 0.05)

以上、過飽和液相レーザープロセッシングによる球状粒子合成技術において、鉄(III)イオン、鉄(II)イオンに加えて、銀(I)イオンも光吸収剤として有用であること、また、銀(I)イオンを光吸収剤として用いることにより、リン酸カルシウム球状粒子に抗菌性を付加できることが明らかになった。

4. 結論

過飽和液相レーザープロセッシングによる球状粒子合成技術において、これまでに報告した鉄(III)イオンと同様、鉄(II)イオンならびに銀(I)イオンも光吸収剤として有用で

あることが明らかとなった。また、反応条件を適切に設定することで、リン酸カルシウム球状粒子に、磁性や抗菌性といった機能を付加できることがわかった。本手法は、簡便かつ迅速であり、安価な無機塩の水溶液のみを原料とすることから、機能性リン酸カルシウム球状粒子の合成技術としての応用が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、産業技術総合研究所の大矢根綾子博士、清水禎樹博士、川口建二博士、北海道大学の宮治裕史博士、宮田さほり氏からご指導、ご協力をいただきました。粒子断面のTEM解析は、つくばイノベーションリーナ推進センターに依頼しました。また、多大なご支援を頂きました公益財団法人天田財団に感謝いたします。

参考文献

- 1) Hongqiang Wang, Alexander Pyatenko, Kenji Kawaguchi, Xiangyou Li, Zaneta Swiatkowska-Warkocka and Naoto Koshizaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **19**, 6361-6364 (2010).
- 2) Maki Nakamura, Ayako Oyane, Ikuko Sakamaki, Yoshie Ishikawa, Yoshiki Shimizu, Kenji Koga, Kenji Kawaguchi and Naoto Koshizaki, *RSC Adv.*, **4**, 38442-38445 (2014).
- 3) Maki Nakamura, Ayako Oyane, Ikuko Sakamaki, Yoshie Ishikawa, Yoshiki Shimizu and Kenji Kawaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **17**, 8836-8842 (2015).
- 4) Maki Nakamura, Ayako Oyane, Yoshiki Shimizu, Saori Miyata, Ayumi Saeki and Hirofumi Miyaji, *Acta Biomater.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.09.015> (2016).