

マトリックス固定したハイドロキシアパタイトナノ粒子の溶出挙動

Dissolution behavior of hydroxyapatite nanoparticles immobilized in polymer matrix

清田 法子

Noriko SEIDA

1. 緒言

口腔内の環境条件が歯の脱灰や酸蝕に及ぼす影響や多様な要因の複合影響を分子レベルで簡易評価が可能であればその基礎データは有用であると考えられる。これまで分子プローブ質量センサーである水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance; QCM) を用いて、ハイドロキシアパタイト (HAp) 溶解挙動を簡便に分子レベルで把握する検討を行ってきた^[1-4]。QCMはこれに負荷する物質に起因する水晶片のズリ振動の周波数変化と振動の位相変化から負荷物質の物理化学的な変化を観測可能なツールである。HAp ナノ粒子をQCMと複合化してHApのステイン吸着・形成機構、インプラント材料との相互作用などが検討されている^[5-13]。筆者は、QCMに無機材料を複合する手法としてQCM電極表面に化学修飾した弱酸基とHApナノ粒子間の静電的相互作用に基づく固定化方法^[5]を利用しHApの吸着や溶解特性評価の検討を行ってきた。このHAp固定手法は静電的相互作用を利用することから、溶液のpHやイオン強度条件によってはHApナノ粒子の脱離が起こると考えられるため、吸着や溶解挙動を検討する溶液条件の制約がある。無機材料のQCM固定方法は種々報告されているものの、いずれもその調整に多くの手間と技術を要する。非静電的かつ簡便な手法で無機微粒子をQCMに固定できれば、種々の溶液条件における溶解挙動の検討が容易になるうえ、溶解挙動のモニタリングに及ぼす不要要因を排除することも可能と考えられる。そこで、本報告ではポリマーマトリックス中にナノ粒子を分散し、これをQCM上に固定する簡易手法の検討を行った。マトリックス材料を用いる微粒子固定は古くから利用されている固定化手法の一つであるが、ナノ粒子の固定は必ずしも容易ではなく、マトリックスが形成する空間サイズならびにその迷宮度と固定する粒子のサイズや形状依存性が一般に知られている。マトリックスに用いる材料は系の外乱要因とならない物質を選択する必要もある。本検討では質量センサーであるQCM上のナノ粒子固定を図ることから、用いるマトリックス材料は接する溶媒の液性や固定する粒子との相互作用等の影響がない物質が理想的である。そこで、いくつかの有機ポリマーを用いた簡易スクリーニング検討を

経て、非イオン性で乾燥後に疎水的な性質を呈する水溶性アクリル樹脂ポリマー (AP) を選択して HAp ナノ粒子固定の適用性を検討することにした。HAp ナノ粒子を AP のマトリックス中に固定した QCM 複合デバイスを作製し、HAp 溶解挙動評価におけるポリマーマトリックス固定法の影響を実験的に観察し、その適用性を検討した。

2. 試料ならびに実験方法

2.1 実験試料

本研究では、株式会社ソフセラ製のハイドロキシアパタイト (HAp) ナノ粒子を用いた。この HAp ナノ粒子は、球形、平均粒径 $39 \pm 6.5 \text{ nm}$ 、ゼータ電位 $2.6 \pm 3.8 \text{ mV}$ の物性を有する^[5]。アクリルポリマーとして、市販の水溶性アクリル樹脂を希釈して用いた。pH 緩衝水溶液および NaCl 水溶液を溶解実験の試験液として用いた。その他、市販の特級試薬を調整に用いた。

2.2 HAp ナノ粒子固定

0.1g/10mL の HAp 水溶液を調整し、10分間超音波により分散させた。1h 室温にて静置したのち、上澄液を採取して所定比率でアクリレートポリマー (AP) 水溶液と混合した。この混合液を 5 μL 採取して QCM 電極上に滴下し室温で乾燥した。乾燥後の試料は QCM に付着し剥離等のないことを確認したものを用いた。QCM 電極はセイコー EG&G 社製の QCM (AT カット、金電極、基本振動数 $f_0 = 9 \text{ MHz}$ 、電極サイズ 5 mm ϕ) を用いた。電極はアセトンおよび蒸留水で洗浄したものを用いた。

2.3 QCM 測定方法

QCM 測定はアドミッタンス解析法 (QCM-A) を適用した^[12]。5 ml の蒸留水を満たしたガラス製のセルに QCM を浸漬し、セイコー EG&G 社製の QCM922A を用いて共振周波数 f_r および共振抵抗 R を経時的に測定し、QCM の応答挙動を評価した。測定手法およびその原理についての詳細は既報を参照されたい^[1-3]。

2.4 HAp ナノ粒子の電極固定条件影響ならびに溶出挙動の検討方法

HAp ナノ粒子と AP の比率を変えて種々の HAp ナノ粒子複合 QCM を作製し、乾燥時の大気中における QCM 応答ならびに水中における経時的な応答をモニタリングした。同時にマトリックス材の無い HAp ナノ粒子のみをキャストした QCM および AP のみをキャストした QCM についても同様に測定して応答挙動を比較した。

ついで、酸性水溶液に HAp ナノ粒子複合 QCM を浸漬し、応答挙動の観察を行った。まず、QCM を蒸留水中に浸漬し、QCM の発振が定常状態になるまで発振挙動（共振周波数 f_r と共振抵抗 R ）をモニターした。QCM の発振が一定の揺らぎの範囲内に収まる定常状態に達した後、所定の pH に調整した酸性水溶液（緩衝液）もしくは所定濃度の NaCl 水溶液に QCM を浸漬し、応答をモニタリングすることによって HAp ナノ粒子の溶出挙動を評価した。

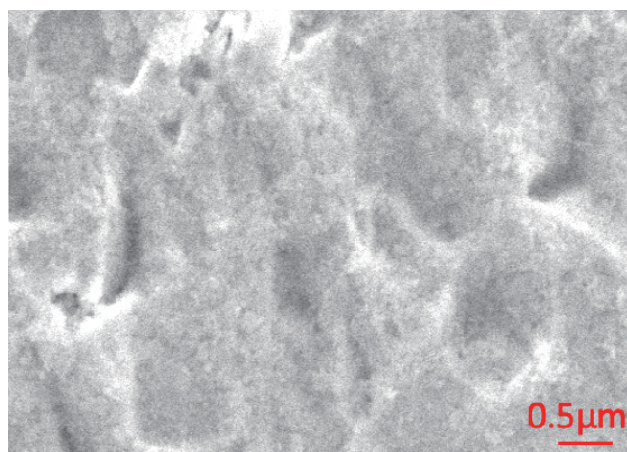


図2 SEM 像

3. 結果と考察

3.1 HAp-AP 混合組成の影響

図1に HAp ナノ粒子をマトリックス固定（HAp 水溶液-AP 水溶液比率=100:0, 99:1, 70:3, 90:10、負荷量 5 μL ）した QCM について、HAp 固定前および固定乾燥後の定常応答値を示す。AP/HAp 溶液比率の増加とともに f_r 値は低下し R 値は増加する。特に、AP/HAp 溶液比が 0.1 では AP の負荷量が多いことから R 値も非常に大きくなってしまふ。この系では、QCM の発振も不安定になり、HAp 溶出挙動の検討においては AP の負荷量が大きくなるように注意する必要がある。

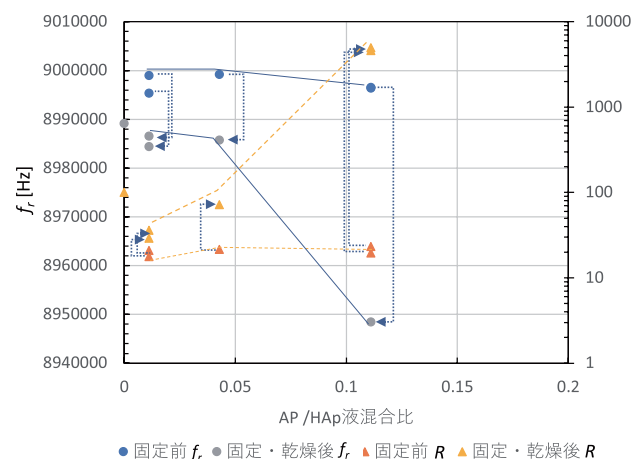


図1 HAp-AP 水溶液の混合比と QCM 応答

図2に Ap/HAp 比率=0.04 の混合液を用いて HAp ナノ粒子を固定した QCM の表面 SEM 像を示す。電極面のラフネスに由来する凹凸表面と HAp ナノ粒子が AP 中に分散している様子が観察される。

3.2 水中（水との接触）における QCM 応答

図3に HAp ナノ粒子のみを被覆した QCM の水中浸漬後の発振挙動を示す。水中浸漬により共振周波数 f_r は大きく低下し共振抵抗 R は大きく増加する。その後、 f_r 値は

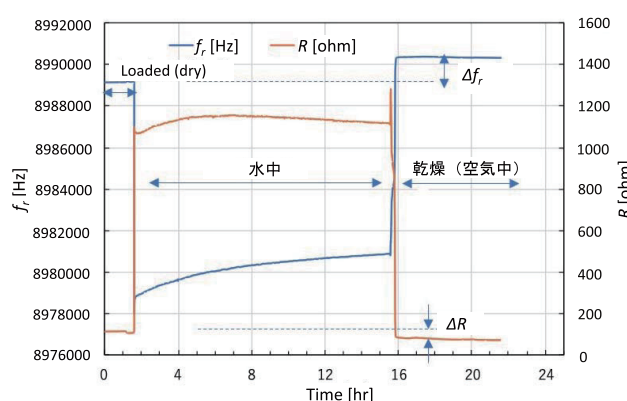


図3 HAp 被覆 QCM (AP なし) の水中における挙動

徐々に上昇し、 R 値は徐々に上昇したのちやがて低下に転じた。この QCM 応答は HAp ナノ粒子層の吸水・膨潤や HAp ナノ粒子の脱離に伴う現象であると考えられる。 R 値が上昇する領域では HAp の吸水による膨潤により f_r 値が上昇しつつも R 値の上昇を生じたものと考えられる。16 時間後に QCM を引き上げ乾燥すると、 f_r 値は水中浸漬前よりも高い値（図中 Δf_r だけ増加）、 R 値は ΔR だけ小さい値になり、水中で HAp ナノ粒子の脱離が起こっていることが確認できた。しかしながら脱離せずに QCM に吸着している HAp ナノ粒子も相当数存在することが酸性水溶液中における溶出実験の結果から把握できた。

AP のみを被覆（5 μL ）した QCM の水中における応答挙動を図4に示す。AP は乾燥により疎水化して水溶性が著しく低下する。乾燥した AP においては、水中では f_r 値は徐々に低下し、同時に R 値は単調に増加して一定値に落ち着く挙動を示した。AP の溶出が発生する場合に生じる f_r 値の上昇や R 値の低下は全く認められなかった。ただし、水中においては定常発振に達するまでに長時間を要することがわかった。この挙動は AP 水合反応が非常にゆっくりと進むことに起因すると考えられる。図4の結果を得た AP 被覆量の QCM では、一定の安定した共振値に達するまでに12時間の保持が必要と分かる。この結果から、AP に起因する QCM の発振が安定状態に到達しているこ

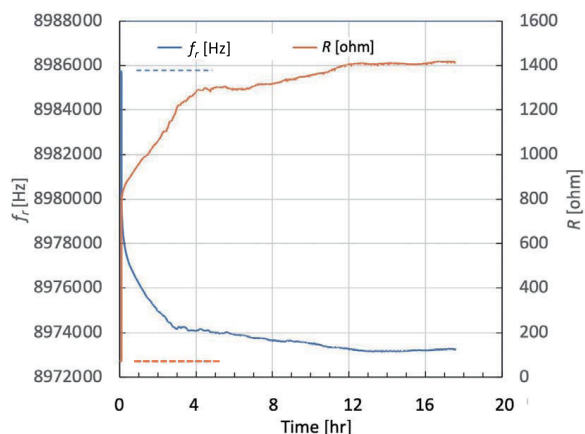


図4 AP被覆 QCM (HAp なし) の水中応答挙動

とを確認してから溶出実験を行うことが必要であると分かった。

AP/HAp 比率=0.04 の混合液を用いて HAp ナノ粒子を固定した QCM について、純水中で定常発振に達したのち酸性水溶液中に投入した際の応答挙動を図 5 (a) に示す。pH=4.2 の酸性水溶液と接触すると速やかに共振周波数 f_r が高周波数側にシフトし始め、やがて一定の値に落ち着く。AP/HAp 比率が 0.1 の QCM の場合は 2 モードの f_r 挙動が見られ、マトリックスの影響があるものと推察された。

図 5 (b) に 0.1M NaCl 水溶液中における応答を示す。酸性水溶液と異なり、急速な f_r 値や R 値の変化は観測されず、HAp ナノ粒子の溶出が小さいことを示唆している。NaCl 水溶液中では HAp ナノ粒子は溶解しないと考えられることから長時間の浸漬を経て一部脱離もしくは水和構造の変化に起因する f_r 値、 R 値の変化を生じているものと推

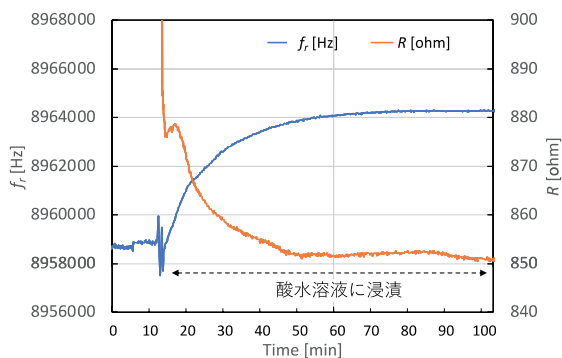


図 5 (a) AP/HAp=0.04 vol/vol, pH=4.3

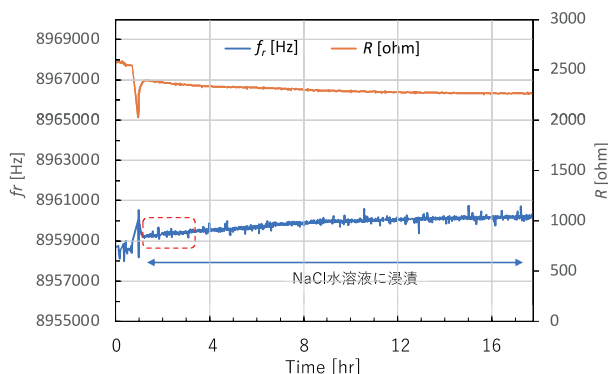


図 5 (b) NaCl 水溶液中の応答

察している。

4. まとめ

ハイドロキシアパタイト (HAp) ナノ粒子を高分子マトリックスを用いて電極表面に簡便に固定する手法について検討した。アクリレートポリマーを用いて HAp ナノ粒子を分散した液をキャストにより被覆・複合化した QCM を作製し、その発振挙動に及ぼす AP/HAp 比率の影響を把握するとともに固定した HAp の溶出挙動を観察した。アクリレートポリマーのマトリックスによる HAp ナノ粒子固定は可能であること、AP/HAp 比率に依存して QCM の応答が異なることを確認した。AP/HAp 比率が小さいと HAp ナノ粒子の脱離が多く、比率が高いと QCM 発振の R 値が相対的に大きくなり発振の不安定化、観測感度の低下につながる。マトリックスの存在により HAp ナノ粒子の溶解挙動が複雑になることも推察された。

以上のことから、マトリックス材で HAp ナノ粒子を簡易固定した QCM 法の適応可能性を見出すことができた。HAp 溶出挙動を評価する簡易 QCM 固定手法として適用するには、マトリックス材料とナノ粒子の組合せや組成を最適化する必要がある。

5. 参考文献

- 1) 清田法子, ステイン付着の評価を指向した QCM-A によるアパタイト吸着特性評価の予備的検討, 鶴見大学短期大学部紀要, 55, 97-101 (2018)
- 2) 清田法子, QCM-A を用いたハイドロキシアパタイトナノ粒子溶解挙動の観測, 鶴見大学短期大学部紀要, 56, 13-16 (2019)
- 3) 清田法子, 数理モデルを用いた QCM-A 応答特性の把握, 鶴見大学短期大学部紀要, 57, 89-94 (2020)
- 4) 清田法子, 静電的に吸着したハイドロキシアパタイトナノ粒子の脱離に関する検討, 鶴見大学短期大学部紀要, 58, pp.5-7 (2021)
- 5) Masahiro Okada, Keiko Furukawa, Takeshi Serizawa, Yoshihiko, Yanagisawa, Hidekazu Tanaka, Tomoji Kawai, and Tsutomu Furuzono, Interfacial Interactions between Calcined Hydroxyapatite Nanocrystals and Substrates, Langmuir, 25 (11), pp.6300-6306 (2009), DOI: 10.1021/la804274q
- 6) Tomohiko Yoshioka, Hiroshi Yonekura, Toshiyuki Ikoma, Motohiro Tagaya and Junzo Tanaka, Investigation of Multilayered Protein Adsorption on Carbonate Apatite with a QCM Technique, Key Engineering Materials, Online 2012-11-29, ISSN: 1662-9795, Vols.529-530, pp. 74-77, DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.74, Trans. Tech. Publications, Switzerland
- 7) Toshiyuki Ikoma, Motohiro Tagaya, Nobutaka Hanagata, Tomohiko Yoshioka, Dinko Chakarov, Bengt Kasemo and Junzo Tanaka, Protein Adsorption on Hydroxyapatite Nanosensors with Different Crystal Sizes Studied In Situ

- by a Quartz Crystal Microbalance with the Dissipation Method, *J. Am. Ceram. Soc.*, 92[5], pp.1125-1128 (2009), DOI: 10.1111/j.1551-2916.2009.02957.x
- 8) J. Langford, K. D. Pavey, C. J. Olliff, P. J. Cragg, G. W. Hanlon, F. Paul and G. D. Rees, Real-time monitoring of stain formation and removal on calcium hydroxyapatite surfaces using quartz crystal sensor technology, *Analyst*, 127, pp.360-367 (2002), DOI: 10.1039/b109684m
- 9) Hiroki Yamamoto, Study on dissolution behavior of polymer-bound and polymer-blended photo acid generator (PAG) resists by using quartz crystal microbalance (QCM) method, *Microelectronic Engineering*, 129, 5, 65-69 (2014)
- 10) Kota Shiba, Satoshi Motozuka, Tadashi Yamaguchi, Nobuhiro Ogawa, Yuichi Otsuka, Kiyoshi Ohnuma, Takuya Kataoka and Motohiro Tagaya, Effect of cationic surfactant micelles on hydroxyapatite nanocrystal, Formation: An Investigation into the Inorganic-Organic Interfacial Interactions, *Cryst. Growth Des.*, 16, pp.1463-1471 (2016), DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01599
- 11) 藤原努、種々のヒドロキシアパタイトの溶解性に関する研究、*Jpn. J. Oral Biol.*, 30, 54-69 (1988)
- 12) 岩田耕三、ハイドロキシアパタイト (HAP) の組成、表面形状、溶解性が骨伝導性および組織親和性に与える影響—in vivo, in vitro における検討 一、*J. Jpn. Stomatol Soc.*, 39 (4), 1039-1065 (1990)
- 13) Hiroki Yamamoto, Quartz-Crystal-Microbalance Study for Dissolution of Resist Polymers, *J. Photopolym. Sci. Tech.*, 20 (4) :585-590 (2007) DOI: 10.2494/photopolymer.20.585