

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

Observation of dissolution behavior of hydroxyapatite nanoparticles by QCM-A

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口腔衛生の観点においてもその基礎データは有用であると考えられる。分子レベルの溶解挙動を観測・評価するツールとして水晶振動子マイクロバランス (QCM) がある。水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance: QCM) は分子レベルの質量変化や分子間相互作用を観測可能な分子プローブセンサーである。QCM 上に負荷する物質に由来する水晶のズリ振動の周波数変化と振動の位相変化から QCM 上の負荷物質の変化を観測可能である。ハイドロキシアパタイト (HAp) 関連では、QCM を用いた HAp のタンパク質吸着特性を検討している報文が多数見られる [1-5]。QCM と HAp を複合化したデバイス (QCM-HAp 複合デバイス) を用いて、ペリクル、ステインなどの形成機構の解析やインプラント材料などとの相互作用の解明がなされている。著者も QCM-HAp 複合デバイスを作製し、ステイン形成物質の吸着特性評価における QCM の適用性検討を行なっている [6]。ハイドロキシアパタイトの溶解挙動に関わる研究については以下のような報告例がある。藤原らは種々の金属置換ヒドロキシアパタイトを合成し、その溶解度積を求めるとともに、種々の有機酸溶液中における溶解量を測定している [7]。吉成はチタンにコーティングしたアパタイトのプラズマ溶射膜の溶解性を検討し、比較的酸性度の小さな pH=6 の生理食塩水中でアパタイトが溶解することを報告している。結晶化した HAp に比べアモルファス HAp の溶解性が高いものの、溶射膜中には HAp 以外のリン酸カルシウムを含み、これが溶解するとの解釈を示している [8]。馬越らは、生体親和性を HAp の溶解性としてとらえ、*in vitro* (生体擬似溶液中における溶解試験) および *in vivo* (生体内埋め込み溶解試験) の両面で生体内において HAp の溶解性を支配する因子を検討し、生体内に溶解しやすい材料の開発を行っている [9]。高分子膜の分野では QCM を用いた溶解、溶出挙動の評価を試みている例が多数ある [10-12]。例えば、Mitsuyasu らは、レジスト膜の分子レベルの溶解挙動について QCM を適用している [10]。一方で、QCM を用いて

HAp の溶解特性を分子レベルで評価した例は見当たらない。物理化学的観点では、HAp のナノレベルの溶解挙動の知見は、HAp 粒子のラフネスや表面結晶面とその溶解に及ぼす種々の要因影響の相関性や動力学的理解にも貢献する。そこで、本研究では QCM 上に HAp ナノ粒子を複合化したデバイスを作製し、これを用いて種々の溶液環境における HAp ナノ粒子の溶解挙動のナノレベル観測を試みた。HAp の溶解挙動の観測・評価における QCM の適用性を検討した。

2. QCM 測定 (アドミッタンス解析)

QCM 測定はネットワークアナライザー (Advantest 社製 r3755) を用いたアドミッタンス解析法 (QCM-A) を適用した [13]。本手法では、QCM の共振点近傍で周波数を走引しながらアドミッタンスの実数成分 G (コンダクタンス) と虚数成分 B (サセプタンス) を測定する。 G 値と B 値の周波数依存スペクトルから、 G スペクトルの最大値を得る発振周波数 (共振周波数 f_r)、 G 値の逆数 (共振抵抗 R)、 B スペクトルの極大、極小値における周波数 (f_1 , f_2) のそれぞれが求まる (図 1 参照)。 G ($=1/R$) と B 値からいわゆるアドミッタンス円が得られる (図 1)。 f_r は QCM 負荷試料の重量変化や粘弾性変化に依存して変化する。負荷重量が増加すると f_r は低周波数側にシフトし、負荷重量が減少すると高周波数側にシフトする。 $1/G$ ($=R$) は試料の粘性を反映し、負荷試料の粘性が増加すると値は大きくなる。QCM の発振挙動が Martin の理論モデルに従うと仮定すると、 f_1 , f_2 はそれぞれ粘性影響を大きく反映する周波数、粘性影響の小さい (すなわち質量変化に依存する) 発振周波数である [14]。本測定では、粘性変化に対する感度は G 値に比べ、 f_r , f_1 値の感度 (分解能) が高い。

3. 試料ならびに実験方法

3.1 試薬および QCM 電極

用いた試薬はいずれも市販の特級試薬である。QCM 表面に官能基を化学修飾する物質として、3-メルカプトプロピオン酸 ($C_3H_6O_2S$)、2-アミノエタンチオールを用いた。ハイドロキシアパタイト (HAp) ナノ粒子は、株式会社ソ

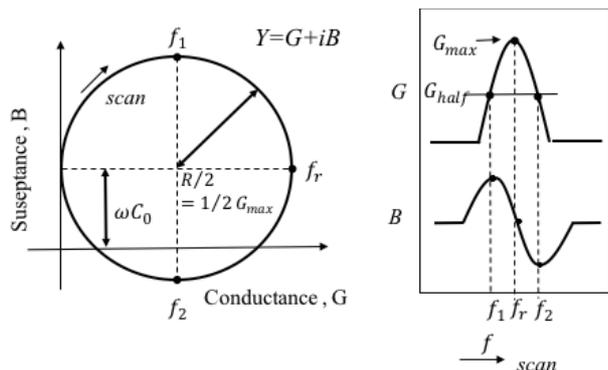


図1. アドミッタンス解析
(左図 アドミッタンス円, 右図 G, B スペクトル)

フセラ製のナノ粒子 (平均粒径 40nm, 球形粒子) を用いた。HAp ナノ粒子は, 外形球形, 粒径 39 ± 6.5 nm, ゼータ電位 2.6 ± 3.8 mV の物性を有する[1]。

溶解実験に供する試験液として, pH=3~5 の緩衝液 (和光純薬製試薬) と市販の炭酸飲料 (コーラ飲料, pH=2.9) を用いた。炭酸飲料の販売元資料によると, 用いた炭酸飲料の成分は糖類 (果糖ぶどう糖液糖, 砂糖), 炭酸, カラメル色素, 酸味料, 香料, カフェインが含まれ, 炭水化物総量は 11.3g/100mL 飲料である。タンパク質, 脂質, 塩分は含まれない[14]。

茶葉の浸出成分を吸着させた HAp の溶解挙動についても観測を行なった。文部科学省の食品成分データベースによると紅茶の標準成分はカテキン, カフェイン, 塩分などであり, カテキンがステインの原因になることは知られている。一方, ほうじ茶は製造元の資料によると, 抽出液 125ml あたりにカテキン 27mg, カフェイン 8mg, 塩分 0.02g が含まれる[15]。

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 $f_0 \approx 9$ MHz, 電極サイズ 5mm ϕ , 鏡面研磨仕上げ品) を用いた。

3.2 測定用電極の作製

既報の手順に従って, ハイドロキシアパタイト (HAp ナノ粒子) を複合した QCM を作製した[6]。まず, 電極表面を $H_2SO_4:25\%H_2O_2=3:1$ vol/vol のピラニア溶液にて 1 分間洗浄処理することによって表面洗浄し, 次の大量の蒸留水でピラニア液を洗い流した。この操作を二回繰り返したのち, すぐに表面水分を除去してエタノール中にて保管した。次に 3-メルカプトプロピオン酸 ($C_3H_5O_2S$) のアルコール (8 μ L/ mL) もしくは 2-アミノエタンチオール (8mg/mL) のエタノール溶解液に 24 時間浸漬することによって, 金-チオール結合により QCM 電極表面にプロピオン酸もしくはアミノ基を化学修飾・固定した。化学修飾した QCM 表面をエタノールで十分洗浄したのち, 化学修飾した官能基とハイドロキシアパタイト (HAp) 表面間の静電的相互作用を利用して QCM 上に HAp ナノ粒子を吸着 (QCM 表面のハイドロキシアパタイト複合化) させた。HAp ナノ粒子の 1mg/10ml エタノール溶液を調整し, 超音波を

用いて 1 分間分散処理を行なったものを用いた。化学修飾を施した QCM を本液に全面浸漬して HAp ナノ粒子を吸着させた。浸漬後, HAp ナノ粒子の吸着に伴う QCM 応答をモニターした。ネットワークアナライザーを用いて G プロファイルモニターし, 周波数シフトが十分落ち着く 1 時間をめどに QCM を取り出しエタノールで十分洗浄した後に乾燥した。乾燥後の f_r と G 値を測定し HAp ナノ粒子吸着前後の変化を確認した。Okada らによると, 本手法により QCM 電極表面上に一樣に HAp ナノ粒子が吸着固定されることが電子顕微鏡観察にて確認されている (SEM 写真で単層吸着していることが確認できる)。本手法により作製した QCM の表面は, Okada らにより接触角 $37^\circ \pm 10^\circ$, 表面電位 -46 ± 6 mV (カルボキシル基 (COOH) を化学修飾した電極表面), 接触角 $66^\circ \pm 6^\circ$, 表面電位 12 ± 10 mV (アミノ基 (NH₂) を化学修飾した電極表面) と報告している[2]。 f_2 は粘性影響周波数であり, f_2 のシフトは実質的な質量増減分 (アパタイト吸着量) に対応する変化と見なせる[1]。

3.3 溶解実験

HAp を複合した QCM をテフロン製のセルに設置し, 片面を各試験液と接触させた。もう一方の電極面は接触しないようにテフロン製のカバーで覆った。セルに試験液 0.2 ml の蒸留水を投入し, ネットワークアナライザーを用いて QCM の発振が安定することを確認してから溶解実験を開始した。セル内の蒸留水を試験液と入れ替えることにより実験開始とした。QCM の発振挙動をアドミッタンス解析によりモニターして共振周波数 (f_r, f_1, f_2) と共振抵抗値 (コンダクタンス G の逆数) を測定した。溶解実験に供する試験液として, pH=4, 4.5 の緩衝液, 市販の炭酸飲料 (コーラ飲料, pH=2.9) を用いた。炭酸飲料については, 容器開栓後, 室温にて 30 分静置したものを用いた。溶解実験時には QCM 電極表面における気泡発生がないことを目視により確認した。ほうじ茶および紅茶の抽出成分を吸着した HAp についても溶解実験を行なった。市販の紅茶 (イングリッシュティー) もしくはほうじ茶のティーバッグを 80°C の熱湯に 2 分浸すことによってお茶を入れ, このお茶 0.2ml を HAp 複合 QCM を設置したセルに投入して抽出成分の吸着を行った。QCM 応答が飽和したのち溶解実験を行った。溶解実験はいずれも室温にて行った。溶解試験前後に試験液の pH を測定した。

4. 結果と考察

4.1 HAp ナノ粒子吸着

図 2 に HAp ナノ粒子吸着過程における QCM の応答曲線 (吸着応答曲線) を示す。共振周波数 f_r および共振抵抗 R が時間の経過とともにそれぞれ低周波数側にシフトし, ナノ粒子の吸着に伴う共振周波数の低周波数側シフトが認められる。 f_r は負荷物の粘性変化によってもシフトするため, 粘性変化の影響が少ない f_2 の変化を観測しても低周波数側へのシフトが認められる。この f_2 のシフト曲

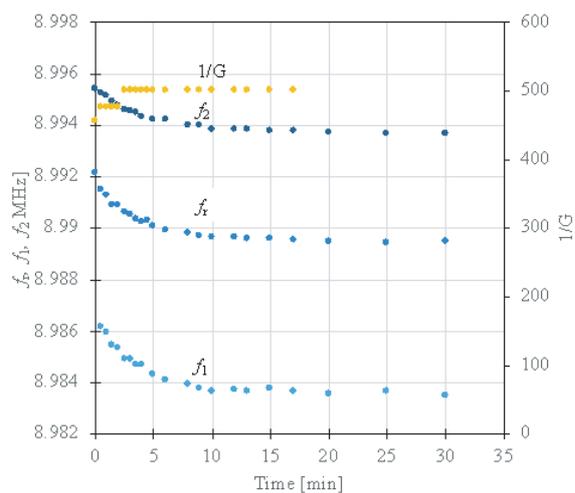


図2. ハイドロキシアパタイトナノ粒子吸着過程のQCM応答 (-NH₂ グラフト QCM)

線は単調減少プロファイルを示しており、ナノ粒子の拡散プロセスがQCMの応答を律速している可能性が示唆される。-COOH グラフトタイプ QCM および -NH₂ グラフトタイプ QCM 共に同様の吸着挙動 (QCM 応答) を示した。

4.2 緩衝溶液中における溶解挙動

図3に緩衝溶液中におけるQCM応答を測定した結果を示す。溶液と接触するとすぐに共振周波数 f_r が高周波数側にシフトし、やがて一定の値に落ち着く。ハイドロキシアパタイトの溶解 pH は 5.5 付近と報告されている。図3に示すように pH が小さいほど f 値の低下が速い。すなわち、アパタイトの溶解速度が速くなっている。発振周波数が定常化するまでの時間は QCM 上の HAp 量に依存する。なお、試験前後の溶液 pH に変化はなかった。

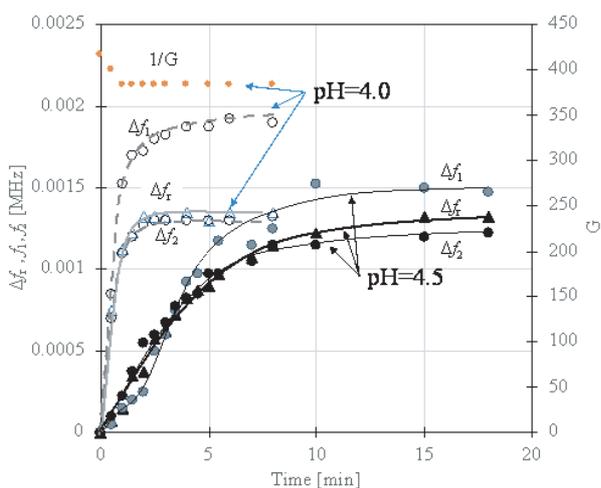


図3. pH の異なる酸性緩衝水溶液中における HAp 吸着 QCM の応答挙動 (-NH₂ グラフト QCM)

4.3 お茶中の吸着・溶解応答挙動

図4,5にお茶の抽出液における HAp 修飾 QCM の応答および pH=4 の緩衝溶液中における応答を示す。QCM を蒸留水中に浸漬し発振が落ち着いたところで水中における発振挙動を確認した後、ついで QCM を紅茶の溶液に入れ

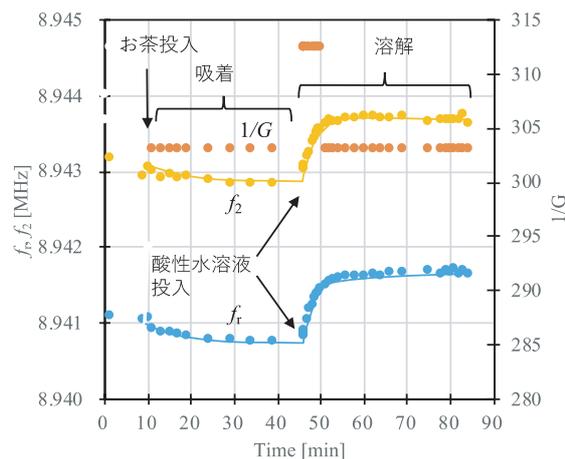


図4. 酸性水溶液中の HAp 吸着 QCM の応答 (ほうじ茶接触処理後)

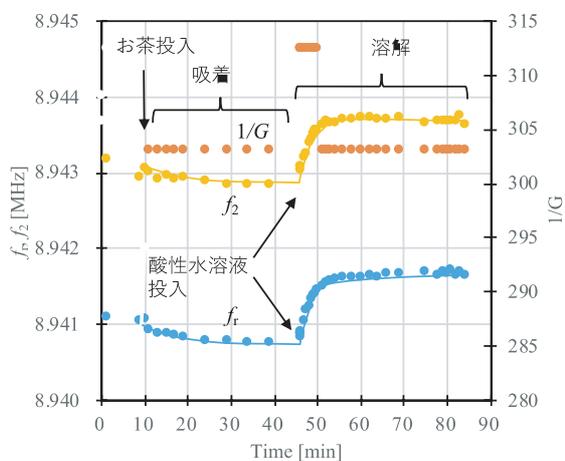


図5. 酸性水溶液中の HAp 吸着 QCM の応答 (紅茶接触処理後)

替えて挙動を観測している。図4にほうじ茶中における HAp 修飾 QCM 応答を示す。まず f_r の低周波数側シフトが認められる。同時に G 値は一度増加し緩やかに減少した。酸性溶液と接触後は急激に周波数が高周波数側に単調にシフトし、HAp の溶解が認められる。この溶解に伴うシフトは、HAp が QCM の片面に吸着することによって生じる共振周波数 f_r のシフト幅と概ね同じであり、HAp の溶解に起因することを裏付ける。しかしながら、ナノ粒子の脱離によるシフトである可能性は排除できないため、なんらかの手法による検証を行う必要がある。

図5は紅茶の場合における吸着と溶解の挙動を示す。本系も図4の結果と同様に解釈ができる。紅茶と接触するとすぐに f_r の低下が見られ、同時に $1/G$ 値の増加が認められる。初期の不連続な低下は溶液の粘度が異なることに起因すると考えられる、この結果は、紅茶の成分がアパタイトに吸着していることを意味する。図4,5の結果は、種々のアパタイトを調整し、分子レベルの溶解挙動を観測することが可能であることを示している。

4.4 炭酸飲料との接触による溶解挙動

図6に炭酸飲料と接触した場合の応答を示す。初期の段

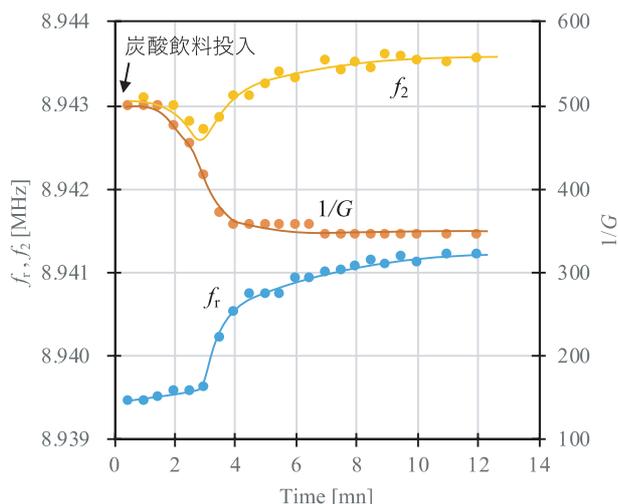


図6. 炭酸飲料と接触した際の HAp ナノ粒子吸着 QCM の応答 (-COOH グラフト QCM)

階は f_1 の変動と G 値の変動が大きく、グラフト鎖のコンホメーション変化に伴う粘性変化や静電的に吸着しているナノ粒子の脱離による影響が考えられる。実際、図6に見られる様に f_2 は少し減少気味であり、試験溶液と接することに伴う高分子鎖のコンホメーション変化や溶媒和による負荷の変化（見かけ上の増加）を反映したものと考えられる。一方、3分過ぎ頃から見られる f 値の増加は溶解に伴う負荷の低下に起因するものと考えられる。この領域では f_2 の増加と $1/G$ の減少挙動から HAp 溶解に伴い負荷質量と粘性が減少していると解釈できる。

5. まとめ

ハイドロキシアパタイト (HAp) ナノ粒子を表面固定した QCM を作製し、種々の酸性緩衝水溶液中や炭酸飲料水中における HAp ナノ粒子の溶解挙動観測を試みた。また、紅茶及びほうじ茶中で吸着を行なった HAp ナノ粒子やお茶の抽出成分と接触処理した HAp ナノ粒子の酸性緩衝水溶液中における挙動 (QCM の応答挙動) を観測した。酸性緩衝水溶液中では溶液の pH に応じて HAp 溶解挙動の異なる様子が分子レベルで観測された。酸性緩衝水溶液中における溶解挙動は QCM の単調な f_1 の変化 (高振動数側へのシフト) とともに粘性の増加を伴うことが示唆された。炭酸飲料中における溶解挙動は単調ではなく、HAp ナノ粒子固定時に用いたグラフト分子の影響や静電的相互作用を用いてナノ粒子の固定していることの影響を評価することが課題である。

本検討により、HAp 溶解挙動の評価に QCM 法が有用であることを確認するとともに、HAp 溶解挙動を高感度かつ簡易に測定する手順を構築する見込みを得ることができた。

6. 参考文献

- [1] Masahiro Okada, Keiko Furukawa, Takeshi Serizawa, Yoshihiko, Yanagisawa, Hidekazu Tanaka, Tomoji Kawai, and Tsutomu Furuzono, Interfacial Interactions between Calcined Hydroxypatite Nanocrystals and Substrates, *Langmuir*, 25 (11), pp. 6300-6306 (2009), DOI: 10.1021/la804274q
- [2] 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
- [3] 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
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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, *鶴見大学紀要*, p.55: 97-101 (2017)
- [7] 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)
- [8] 吉成正雄, インプラント材料とその表面: その2. インプラント材料としてのアパタイト, *歯科学報*, 103 (6), 481-490 (2003)
- [9] 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)
- [10] 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)
- [11] Msaki Mituyasu, Hiroki Yamamoto and Takahiro Kozawa, Study on dissolution behavior of poly (4-hydroxystyrene) as model polymer of chemically amplified resists for extreme ultraviolet lithography, *J. Photopolymer Science and Technology*, 28 (1), 119-124 (2015), https://www.jstage.jst.go.jp/article/photopolymer/28/1/28_119/_pdf
- [12] Hiroki Yamamoto, Quartz-Crystal-Microbalance Study for Dissolution of Resist Polymers, *Journal of Photopolymer Science and Technology*, 20 (4): 585-590 (2007) DOI: 10.2494/photopolymer.20.585
- [13] Yoshimi Seida, Refitting evaluation of viscoelastic parameters in QCM-A measurement of large viscosity load, *J. Toyo Univ., Nat. Sci. Lab.*, 60, 85-92 (2016)
- [14] Martin, S. J., Granstaff V.E., Frye G.C., *Analytical Chemistry*, 63, 2272-2281 (1991)
- [15] Japan Coca Cola HP, <https://www.cocacola.co.jp/brands/cocacola>
- [16] 文部科学省, 食品成分データベース <https://fooddb.mext.go.jp/>