東海大学紀要情報理工学部
Vol.47, No.2, 2007, pp.25-30

構造および光学的評価を用いたハイドロキシアパタイトに対する脱灰、石灰化処理効果の研究

杉本 康明*1、 若木 守明*2、 砂田 美和*3

Study on Decalcifying and Calcifying Processes of Hydroxyapatite HAp Using Structural and Optical Characterizations

by

Yasuaki SUGIMOTO*1, Moriaki WAKAKI*2, Yoshikazu SUNADA*3

(Received on October 10, 2007, and accepted on November 21, 2007)

Abstract

Apatite is expected to be a useful material for artificial bones in surgery and artificial dental roots in dentistry. In particular, studies have recently been conducted into the reconstruction of teeth using Hydroxyapatite (HAp), and several supplements such as gum have become popular for keeping teeth in good condition. However, the decalcifying and calcifying processes are still not well understood. The aim of this research is to study the decalcifying and calcifying mechanisms of HAp. Specifically, the calcifying process was carried out on a sintered pellet of HAp without pores using a Phosphate Acid Maltodextrin (PMD) calcifying promotion agent developed by Oji Paper Co. together with a HEPES ($C_8H_{18}N_2O_4S$) buffer solution, and a natural calcifying liquid which simulates the situation within a human mouth as a reference. SEM, EDX and X-ray analyses were used for the characterization of the structure, morphology and forming elements. Optical characterizations like IR and Raman spectroscopy were also used for the study of physical properties. As a result, it was found that the rate of decalcification can be monitored from the change of the Raman intensity corresponding to the stretching vibrational mode of PO^{3-}. It was confirmed that the calcification treatment enabled the growth of a precursor material OCP on the HAp pellet for both agents. The rate of growth was dependent on the agent, and it was found that PMD is more effective to grow OCP faster and with high density.

***Keywords:* Hydroxyapatite, Calcification, Decalcification, Ceramics, SEM**

1. はじめに

アパタイトは生体適合セラミックスとして生体親和性が高いことより、緻密な焼結体や多孔質体が人工骨や人工歯根として既に臨床応用されている。粒状のハイドロシキアパタイトは骨の欠損部や抜歯後の充填材として外科、 歯科の分野で多く用いられている。[1)]

近年では、二酸化チタンに代表される光触媒とアパタイトを複合化する事でアパタイトと二酸化チタンの特徴を持つ高機能化が行われ、応用が進められている。 具体例として、 セラミックファイバーへのアパタイトと二酸化チタン薄膜の被覆[2)]、 揮発性有機物質（VOC）の分解[3)、4)]等が報告されている。

また、 予防医学の観点から歯におけるエナメル質等の脱灰、 再石灰化についての研究が多数報告されている。[5)]特に脱灰抑制、再石灰化促進等の虫歯予防効果のある健康補助食品[6)]や歯磨き粉の商品化が実際に行われている。対処療法の研究としては、室温、 大気圧環境下でハイドロキシアパタイト(HAp)微粒子をエナメル質に高速で衝突させることにより、HAp 厚膜を成膜する新手法が提案されている。[7)]この手法は、 新しい歯質の再構築を可能にするもので、 歯科医療の分野において、 未来の新しい治療法の可能性を示すものとして期待されている。

歯のう蝕過程に対しての光学的評価の研究も多数行われている。光学測定によってエナメル質の経時変化を捉える事のメリットとして、非接触で簡便である事が挙げられる。その特徴を生かした歯のう蝕を捉える手法としてラマン分光法を用いた研究[8)]や、 健全部とう蝕部で異なる波長の蛍光を発生する事による評価[9)11)]等が提案されている。

本研究の狙いは、HAp の脱灰、石灰化のメカニズムを明らかにすることである。特に、石灰化に関するプロセスは、王子製紙株式会社が開発したリン酸マルトデキストリン(Phosphate Acid Maltodextrin: PMD)と HEPES（$C_8H_{18}N_2O_4S$）緩衝液を用いた場合の石灰化促進効果を、通常の口腔環境下を想定した自然石灰化作用と比較検討した。それらのサンプルに対し、

*1 東海大学工学研究科光工学専攻修士課程
*2 東海大学工学部光・画像工学科教授
*3 王子製紙株式会社

SEM、EDX およびＸ線回折分析を行うことで脱灰及び石灰化に伴う構造や表面モルフォロジーの変化を評価した。また、紫外、可視、赤外領域における反射スペクトルおよびラマン散乱スペクトルを用いて物性的にそれらの変化を評価した。

2. 脱灰および石灰化反応の原理

ここではHApの結晶構造、酸による脱灰反応及び直接的な石灰化、 前駆体を経由する場合の石灰化の原理について説明する。

2.1 HApおよびOCPの結晶構造

ハイドロキシアパタイトは、六方晶系に属する。その結晶構造は、1964 年 Kay らによって、Fig.1 に示すように決定された。[12] Ca^{2+}イオンは、異なる２つの位置に存在する。一つは、Columnar Ca と呼ばれ、c 軸方向に柱状に配置されている。もう一つは、Screw Ca と呼ばれ、三角形の各頂点にカルシウムが存在し、水酸化物イオンの酸素をらせん状に取り囲むように配置された構造となっている。格子定数は、a および b が、9.432Å、c が 6.881Å となっている。

リン酸第八カルシウム(Octacalcium Phosphate：OCP)は、ハイドロキシアパタイトに非常に似た構造を持っている。結晶構造は、三斜晶系であり、格子定数は、a が 19.87、b が 9.63、c が 6.87 となっている。アパタイト層の間に、水和層を持つ。[13]

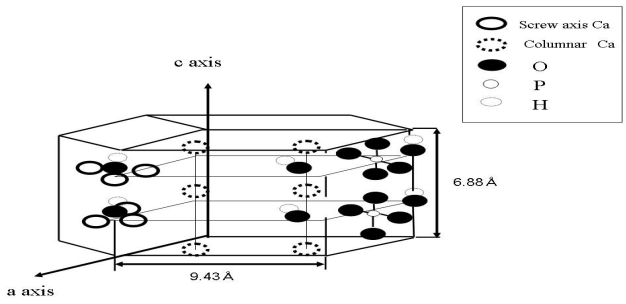


Fig.1　Crystal structure of hydroxyapatite.

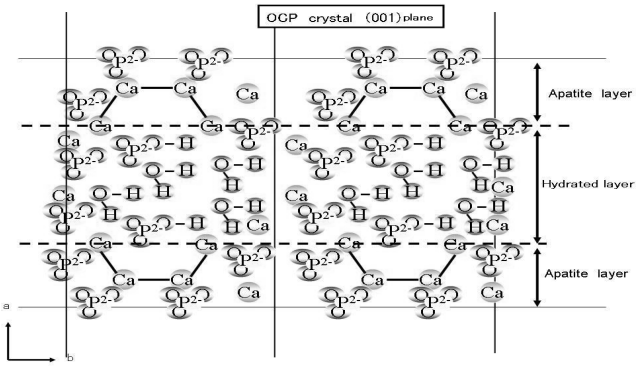


Fig.2　Crystal structure of Octacalcium Phosphate (001) plane.

2.2 脱灰、石灰化メカニズム

脱灰は HAp が酸と反応する事によりアパタイト構造が崩れ、リン酸、 カルシウムがイオン化して流出する反応である。HAp は酸に非常に弱く、 充分な酸とある一定の時間経過によって脱灰反応が促進される。 脱灰と石灰化の関係は以下の式によって表される平衡反応である。

$$Ca_{10}(PO_4)6(OH)_2 + 8H^+ \underset{\text{Re-calcify}}{\overset{\text{Decalcify}}{\rightleftharpoons}} 10Ca^{2+} + 6HPO_4^{2-} + 2H_2O$$

Hydroxyapatite　　Calcium　Phosphate

H^+イオンが何らかの要因で失われると、HAp の周囲の pH 値は酸性から中性、アルカリ性へと移行し、流出した Ca^{2+}、 PO^{3-}イオンが再び HAp 表面に供給されることで脱灰の逆反応として石灰化が生ずる。

以上が直接的にアパタイトを脱灰、形成する際の反応である。しかしアパタイトの形成には通常高温下での高いアルカリ性と、充分な熟成時間が必要であり、実際の生体内での反応ではその条件を満たさない。 そのため生体内における石灰化反応では、通常前駆体を経由したアパタイト形成モデルが用いられる。以下にそのモデルの例として、リン酸オクタカルシウム（OCP）を前駆体としたアパタイト形成モデルを示す。

$$10Ca^{2+} + 6HPO_4^{2-} + 5H_2O \longrightarrow Ca_8H_2(PO_4)_6 5H_2O + 2Ca^{2+} + 4H^+ \longrightarrow$$

Calcium　Phosphate　　OCP

$$\longrightarrow Ca_{10}(PO_4)6(OH)_2 + 8H^+$$

Hydroxyapatite

OCP は骨組織内でも存在が確認されており、中性で安定である。生理条件下、約 40℃、pH5.9-7.0 の間に最適生成条件があり、 これより高温、 アルカリ性領域下においてアパタイトの水解反応によって HAp へ転化する。 OCP から HAp に転化する際、 OCP はその形態を維持したまま HAp に分解・転化することが知られている。[10]他の前駆体としては、 フルオロアパタイト(FAp)、 β-TCP が挙げられる。

3. 脱灰および石灰化処理方法

3.1 脱灰処理手法

脱灰反応は、 生体温度条件下（約 36℃）において、アパタイトを酸に充分な時間浸す事で生ずる。脱灰処理の際に酸の攪拌を行う事でより効率の良い反応を得る事ができる。本研究では脱灰処理を行う酸として一般的な乳酸を用いて HAp の脱灰処理を行った。

3.2 石灰化処理手法

本研究では PMD（リン酸マルトデキストリン）と HEPES 緩衝液($C_8H_{18}N_2O_4S$)を用いて、石灰化処理を行

った。PMD は王子製紙が開発した石灰化促進剤であり、HEPES 緩衝液は処理の際に PMD に添加する必要がある。この石灰化促進剤を用いる事でほぼ 24 時間以内にリン酸カルシウムが定着する事が確認されている。

石灰化過程を見る標準処理として、人間の口腔環境に対応した処理も行った。この処理を、以後自然石灰化処理と呼ぶ。

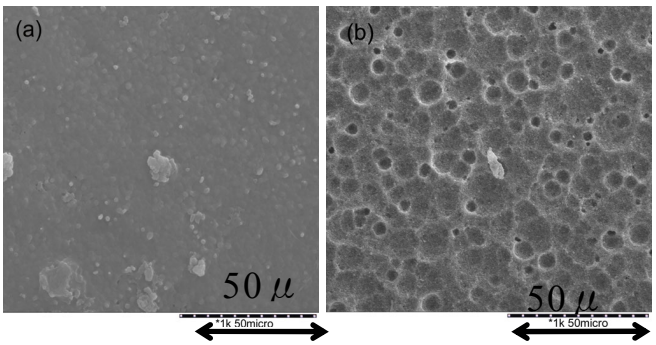
3.3 HAp サンプル

脱灰および石灰化研究に於いて、HAp に焼結処理を行った気孔率 0%のペンタックス社製 CELLYARD ペレット焼結体をサンプルとして用いた。

この標準サンプルに対して、脱灰処理を加えたサンプルを脱灰サンプル、石灰化処理を加えたサンプルを石灰化サンプルとする。

4. 脱灰プロセス評価

HAp ペレットでは、 脱灰反応によって空孔状に侵食が生じ、 更に反応が進行する事によって空孔中の HAp が剥離し、内部へと反応が進む様子が観察された。その反応は、Fig.3(b)に示されるように、月面のクレータのような形状で進行する。我々は、脱灰処理を一定時間行った試料について、ラマン散乱分光測定を行い脱灰プロセスのモニターを行った。HAp ペレットのラマン散乱スペクトルを、Fig.4 に示す。出力 200mW、励起波長 783nm のレーザーダイオード光源を持つファイバープローブ型のラマン分光計（Raman System、 R2001）を使用した。PO_4^{3-} のラマン散乱ピークは ν_1(960cm^{-1}) 、 ν_2(433cm^{-1})、 ν_3(1071cm^{-1})、 ν_4 (588cm^{-1})にあり、Ca^{2+}と PO_4^{3-}によるピークが ν_5 (300cm^{-1}) である[14)15)16)]。今回、我々は最も散乱強度が強い縮退のない伸縮モードのピークである ν_1(960cm^{-1})に着目した。



(a) HAp Pellet without processing　(b)HAp Pellet with decalcifying process (2.71%)

Fig.3 SEM images of HAp pellets with (b) and without (a) decalcification process.

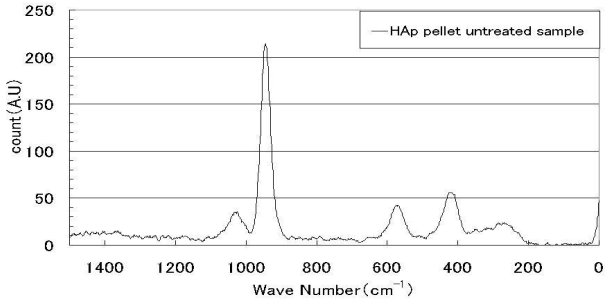


Fig.4 Raman spectrum of HAp pellet without decalcification treatment for the excitation wavelength of 783nm.

Fig.5に脱灰率に対するラマンピークの強度変化を示す。未処理の試料におけるラマン強度を１に規格化した。脱灰率は、溶液に溶出した HAp の重量変化で求めた。

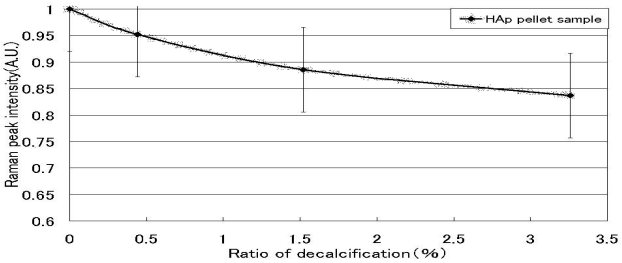


Fig.5 Change of Raman intensity of strong stretching vibration mode at 960cm^{-1} of PO_4^{3-} as the function of the ratio of calcification.

脱灰処理の進行に対してラマン信号強度の単調な減少が見られた。これは主に HAp ペレット表面での PO_4^{3-}の流出による平坦な形状から凹凸のある形状への変化により側方への散乱光が増加したために測定用プローブファイバーに入射する信号が減少した効果と考えられる。この効果は、再現性があり、脱灰過程のモニターには有効であることが分かった。脱灰処理により HAp の結晶構造が乱れて、それがスペクトルに変化を与える効果も考えられるが、表面形状変化による側方散乱効果と構造乱れによる物性変化との影響を分離するには側方へのラマン散乱光も検出する必要がある。

５章で述べる石灰化したサンプルでは、表面に成長する前駆体の OCP が板状になるために、側方散乱が非常に大きく、それによりラマン信号の急激な減少が見られた。また、表面に成長した OCP を除去し、Fig.11 に見られる OCP から HAp に転化したと思われる箇所でのラマン分光測定を行った結果、HAp ペレット標準サンプルに対して若干のラマン信号の減少傾向が見られたが、定量的な評価にまでは至らなかった。以上のことより、レーザラマン分光法では脱灰過程による評価においては大きな効果が見られたが、OCP を前駆体とした HAp の石灰化評価に

対してはあまり有効な適用が見られなかった。脱灰、再石灰化による物性変化をラマン分光により検出するには、ラマン散乱信号の積分球測定、側面散乱の軽減といった改善が必要である。 形状変化による影響と PO_4^{3-}の減少による影響を分離するための工夫が必要である。

5. 石灰化プロセス評価

5.1 SEMによる表面モルフォロジー観察

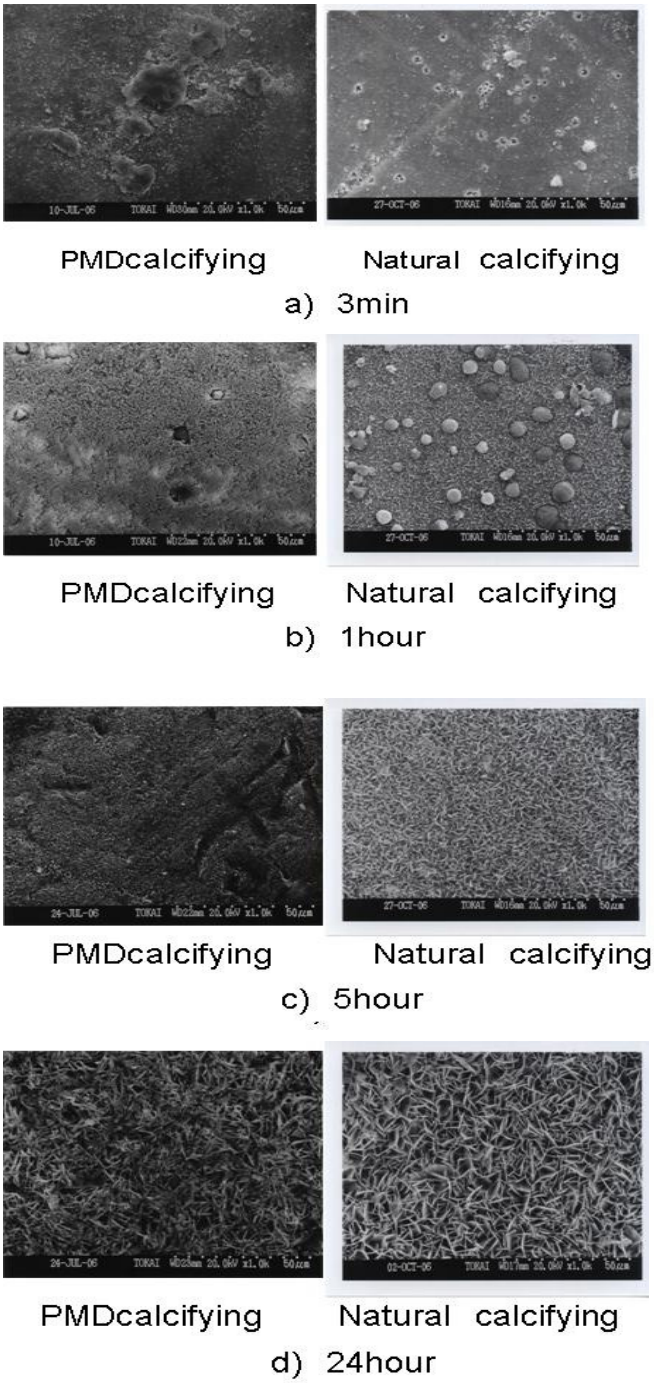


Fig.6 SEM images of HAp pellets treated using PMD and natural calcifying liquid for different times (a) 3min、(b) 1hour、(c) 5hours and (d) 24hours.

PMDおよび自然石灰化処理を行った表面のSEM画像をFig.6に示す。a)は3分、b)は1時間、c)は5時間、d)は24時間処理を行ったものである。石灰化時間1時間のSEM画像において、PMDおよび自然石灰化溶液の影響により表面に微小な板状構造が成長していることが見て取れる。PMD溶液、自然石灰化溶液共に、24時間以降では成長が停止した。SEM画像の時間変化を追うことで、両者の再石灰化プロセスの間に、形態学的に興味深い差が観察された。これらの性質の解釈は、現在考慮中である。XRDとEDXの結果から、最終的に生成されたプレート状の微細構造は、前駆体OCPであることが確認された。

5.2 XRDによる表面構造解析

Fig.7に、石灰化処理を行っていないサンプル、PMDによる石灰化を行ったサンプル、自然石灰化を行ったサンプルのXRD測定結果の比較を示した。両石灰化を24時間行ったサンプルにおいて、26°および54°の回折ピークが、HApサンプルと比較して増大し、高角度側へシフトすることが確認された。これは、HApの表面に成長したOCPによる回折線がHApに比べて僅かに高角度に位置し、X線の侵入深さに対して、大きな割合を占めることによる。[17) 18)]

また、PMD処理を行ったサンプルの回折強度は、自然石灰化サンプルに較べて約2倍の強度となっている。これは、PMD処理によって成長したOCPの密度が自然石灰化で成長したOCPに較べてかなり高いことを示していると考えられる。これは、Fig.6に示すSEMの結果と対応する。

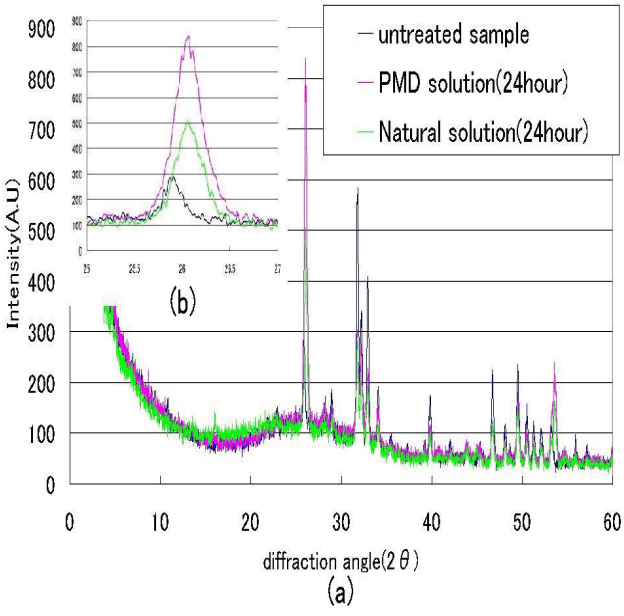


Fig.7 (a)XRD patterns for untreated、PMD and natural calcifying processed pellets.(b)Enlarged XRD patterns around 26° showing the shift of OCP line.

5.3　遠赤外反射スペクトルによる表面層の格子振動評価

Fig.8 および Fig.9 に赤外分光による反射スペクトルの測定結果を示す。Fig.8 は PMD 溶液処理によるスペクトル変化、Fig.9 は自然石灰化溶液処理によるスペクトル変化である。PMD 石灰化による反射バンドは、石灰化時間 1 時間よりスペクトル形状が大きく変化した。自然石灰化においては、石灰化時間 5 時間よりスペクトルに変化が見られた。この変化は、HAp のフォノンバンドが、表面に成長した OCP のフォノンバンドにより変化を受けたと推定される。現在までに、OCP のフォノンスペクトルについての報告は得られておらず、SEM 観察より表面を覆っていると考えられることより、OCP のフォノンバンドが 1050cm^{-1} 近傍に見られることが予測される。OCP 単体のスペクトルに関する研究を今後期待したい。この変化が OCP の成長によると考えると、PMD 石灰化溶液が自然石灰化と比較して、Fig.6 に示すように OCP 形成反応が早くより効果的に生じているといえる。反射率の全体的な低下は、OCP が HAp ペレット表面に、板状に成長するために、入射光の散乱が増加した結果と考えられる。

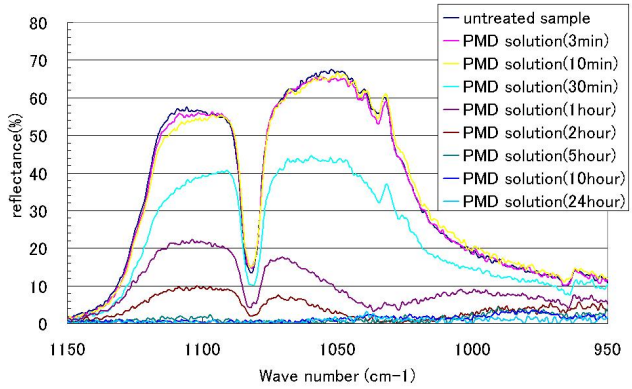


Fig.8　Infrared reflection spectra for HAp pellets treated by PMD calcifying process at different hours.

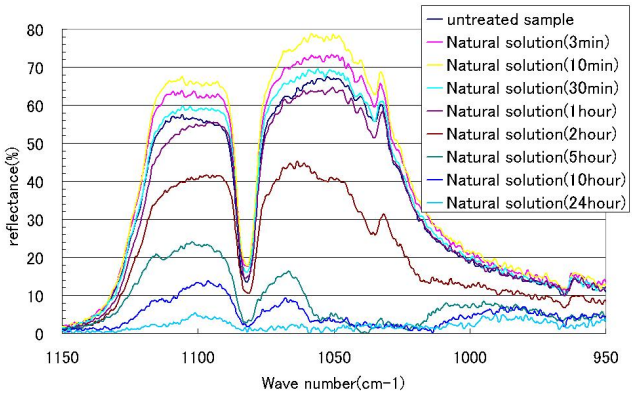


Fig.9　Infrared reflection spectra for HAp pellets treated by natural calcifying process at different hours.

5.4　紫外反射スペクトルを用いた表面層の電子状態評価

紫外域における PMD 石灰化溶液における HAp サンプルの拡散反射分光スペクトル測定結果を Fig.10 に示した。この結果、石灰化時間が進むとともに、紫外領域での反射率の増大傾向と新たなスペクトル構造が 250nm 近傍に観測された。これは HAp ペレット基板上に石灰化物（OCP）が形成され、形成された物質のバンド間遷移によるスペクトル構造を反映した結果と推定されるが、詳細については、今後検討する必要がある。

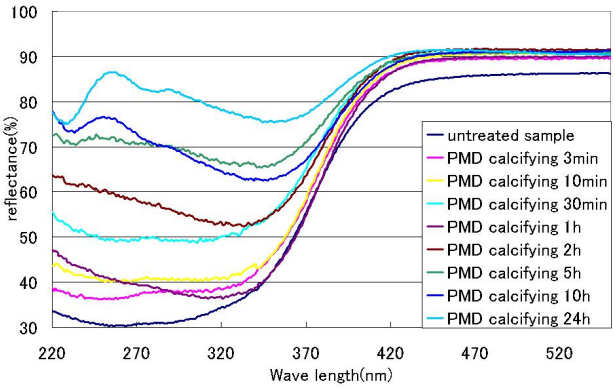


Fig.10　Ultraviolet reflection spectra for HAp pellets treated by PMD calcifying process at different hours.

5.5　SEM による成長断面観察

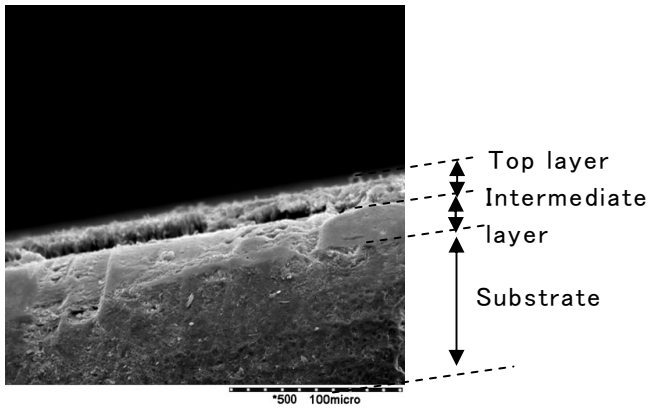


Fig.11　Sectional SEM image of calcification processed sample.

PMD 石灰化処理されたサンプルの断面 SEM イメージを、Fig.11 に示す。断面に渡る EDX を用いた元素分析の結果、最上層の Ca/P モル比は 1.31 で、Table 1 に示す OCP の Ca/P モル比にほぼ対応する。中間層においては Ca/P モル比は 1.38 で、OCP よりも若干高い Ca/P モル比が得られた。

これらより、石灰化に伴う表面層の形成過程を考

察してみる。表面層に前駆体である OCP が最初に形成され、その後 HAp 基板との境界層で、水和層が抜けてゆき Ca/P モル比が増加し、HAp に近づいてゆくのではないかと推察される。または、境界層で微小な HAp が形成され、HAp と OCP の混合層が形成されていることも考えられる。この過程については今後より詳細に研究する必要があると考えます。

Table 1 Ca/P ratio of the calcium phosphate compounds

Materials	Crystal structure	Molar ratios of Ca/P
HAP	Hexagonal	1.6667
OCP	Triclinic	1.3333
TCP	Triclinic	1.5000
DCPD	Trigonal	1.0000

6. 要約

脱灰および石灰化処理を、HAp ペレットに対して行なった。脱灰プロセスは、乳酸にペレットを浸すことによって行った。このプロセスの評価は、SEM 観察および、ラマン分光測定により行った。脱灰により生成した気孔を、SEM により観察した。溶出した HAp の重量変化で求めた脱灰率の変化を、PO^{-3} の伸縮モードのラマン強度の変化により確認できることが判明した。

石灰化処理には、PMD 石灰化溶液と自然石灰化溶液という 2 種類の石灰化促進溶液を用いた。両者の促進溶液を用いた処理で、前駆体 OCP の成長が確認された。HAp ペレット上での OCP の成長は、促進溶液の性質に依存する結果を得た。この 2 種の溶液の比較では、PMD 石灰化溶液が、自然石灰化溶液よりも、より早く、より高密度な OCP 結晶を生じることがわかった。

参考文献

1) Katsunari Nishihara, Tsuyoshi Tange, Kazushi Hirota, and Kiyoshi Kawase: DEVELOPMENT OF HYBRID TYPE ARTIFICIAL BONE MARROW USING SINTERED HYDROXYAPATITE、Bio-Medical Materials and Engineering,4(1994)40.
2) 野浪 亨: 高齢化社会とセラミックス 4 光触媒の新しい動向 アパタイトを被膜した二酸化チタン、Fine Ceram Rep,Vol.18(2000), No. 5, 102.
3) 西川 治光: カルシウム欠損型水酸アパタイトを利用した有機化合物の分解, 無機マテリアル, Vol.3(1996), No.262, 237.
4) 近藤 文雄、 猪飼 誉友、 林 留美子、 富田 伴一: 酸化チタン光触媒による室内空気中 2-エチル-1-ヘキサノール等揮発性有機化合物の除去, 愛知県衛生研究所報, Vol.55(2005),17.
5) 飯島 洋一: エナメル質を考える エナメル質の再石灰化と唾液のパワー, DE, 155(2005)19.
6) 林 善彦、 松永 常典: キシリトール含有 2 種の市販ガムそしゃく後に生ずる脱灰エナメル質再石灰化現象のエックス線微小部比較分析, 日本歯科保存学雑誌, Vol.48(2005), No.5, 648.
7) Keiichi. Sasaki、 Miyoko. Noji, Tsunemoto. Kuriyagawa: Restoration with hydroxyapatite using powder-jet-deposition, DE, No.155 、pp.11-14(2005).
8) Michael D. Morris, Shona Stewart, Catherine P. Tarnowski, Dana A. Shea, Renny Franceschi, Dian Wang, Michael A. Ignelzi Jr, Wei Wang, Evan T. Keller, Din-Lii Lin, Steven A. Goldstein and Juan M. Taboas: Early Mineralization of Normal and Pathologic Calvaria as Revealed by Raman Spectroscopy, Proc. SPIE,4614(2002) 28.
9) A. Lussi, B.Megert, C. Longbottom, E. Reich, P. Francescut: Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions, European Journal of Oral Sciences, 109(2001)14.
10) 野浪 亨: 図解 光触媒とアパタイト-第 2 版-, 日刊工業新聞社(2004).
11) Izawa,T., Wakaki,M., Proceedings of SPIE,5687,(2005)1.
12) 岡崎 正之:歯と骨をつくるアパタイトの化学,東海大学出版(1992) 7.
13) Mathew, Mathai; Takagi, Shozo: Structures of biological minerals in dental research, Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology, 106(2001)1035.
14) Morris, Michael D.; Stewart, Shona; Tarnowski, Catherine P.; Shea, Dana; Franceschi, Renny; Wang, Dian; Ignelzi, Michael A.; Wang, Wei; Keller, Evan T.; Lin, Din-Lii; Goldstein, Steven A.; Taboas, Juan M、Early mineralization of normal and pathologic calvaria as revealed by Raman spectroscopy, Proceedings of SPIE,4614,(2002)28.
15) Wieland.Hill and Verena Petrou:Caries Detection by Diode Laser Raman Spectroscopy, Applied Spectroscopy,54(2000)795.
16) Wieland.Hill and Verena Petrou: Detection of Caries and Composite Resin Restorations by Near-Infrared Raman Spectroscopy, 51(1997)1265.
17) JCPDS card: No.74-0566.
18) JCPDS card: No.74-1301.