

早稲田大学大学院 創造理工学研究科

博士論文概要

論文題目

Effects of biocompatible ions and functional groups on the formation dynamics and crystallographic structures of biogenic minerals

生体適合性イオンおよび官能基が生体鉱物の形成ダイナミクスおよび結晶構造に与える影響

申請者

Yuki	SUGIURA
杉浦	悠紀

地球・環境資源理工学専攻 応用鉱物学研究

2014年12月

生体鉱物は、人間を始めとする脊椎動物の骨格や歯、貝類などの硬組織の主要構成成分である。生体鉱物はバイオミネラリゼーションと呼称されるプロセスにて生成され、数十種類が知られているが、その中でも貝殻や珊瑚といった無脊椎動物の硬組織は炭酸カルシウム系、歯や骨といった脊椎動物の硬組織はリン酸カルシウム系が多くを占めている。硬組織を構成する生体鉱物は、いずれも多形構造や形態、結晶粒サイズが良くコントロールされた結晶として形成している。これら良くコントロールされた生体鉱物結晶が複雑に組み合わされことにより、高い機械的強度と柔軟性を併せ持つ機能的な組織を形成されている。しかしながら、生体環境下に近い、常温・常圧、弱酸性-弱塩基性の環境下で、生体鉱物結晶を無機的に合成すると、一般に結晶度の悪い不均質な生成物を得るのみである。

生体鉱物結晶が溶液中で形成する場合、複数の前駆体を経るということが知られている。端的には、アモルファス相が初生相として出現し、これが相転移により、準安定相・安定相へと変化するというものである。この、アモルファス相と準安定相間の相転移過程は、未だ不明な点が多い。部分的には、アモルファス相は、その最小単位のクラスターの不規則な集合体であり、クラスターベースの再構成が、相転移であると述べられている。申請者は、この相転移過程において、構造がアモルファス相とも、準安定相とも異なる中間遷移相が存在すると考え、この相の詳細な同定及び、ダイナミクス測定を行った。さらに、生体内に普遍的に存在するイオンや、有機物が生体鉱物形成に密接に関わり、その形成過程に大きく影響を与えるということが知られている。しかし、同じ陰イオンや、官能基を持つ物質であっても、形成過程に与える影響は大きく異なる。この理由として、イオンや官能基の価数や水和性の違いが、生体鉱物形成過程に異なる影響を与えていることが示唆されるが、未だ謎が多い。

申請者は、上記の謎を解く一助とするべく、リン酸カルシウム・炭酸カルシウム系それぞれにて研究を行った。いずれも、同じイオン・官能基の電荷及び、水和性の因子が、初生相であるアモルファス相から結晶相への相転移機構及び、この過程で出現すると考えられる中間遷移相に与える影響について研究した。添加物としては、実際の生体内に普遍的に存在し、生体鉱物結晶を制御していることが明らかな、リン酸(炭酸カルシウム系)及び、カルボン酸(リン酸カルシウム系)を選択した。

本論文は、9章から構成されている。

第1章では、本研究に関わる従来の報告を総括し、本論文の構成と概要について述べている。

第2章から第5章では、主要生体鉱物の炭酸カルシウムについて、含 PO_4 環境下での形成過程及び、溶解過程において出現すると考えられる中間遷移相の同定及び、安定性を調べた結果について述べられている。また、第6章から第8章では、リン酸カルシウム形成に対してコラーゲンやタンパク質といった不溶性カル

ボン酸に富む有機分子の共存量が与える影響について検討した結果が述べられている。具体的には、チオールの一種の MUA (11-mercaptoundecanoic acid) を Au コロイド上に固定させた数 nm サイズの粒子 (CGNs) を作製し、リン酸カルシウム相の形成に与える影響を検討した。

第 2 章では、生体内模擬環境下での炭酸カルシウム相の晶出に対するリン酸の影響を定量的に検討した結果を述べている。溶液中の Ca イオン濃度を相転移挙動の指標としてモニタリングし、出現する各多形の相同定を行った。リン酸濃度が低い条件下では、初生相としてアモルファス炭酸カルシウム相 (ACC) が出現した後、短時間の核形成時間の後にバテライト相が出現した。また、リン酸濃度の増大に伴い核形成時間は指数関数的に増大し、バテライト相は最終的に全てカルサイト相へと転移した。出現したバテライトは、晶出後短時間は中空構造を示すが、すぐに崩壊した。この現象は、リン酸濃度が炭酸カルシウムの 1000 分の 1 程度のモル比で認められた。以上の結果から、リン酸はバテライト相形成を強く抑制することを明らかにした。

第 3 章では、リン酸濃度が高い条件下で観察された中空構造バテライトの成因について述べられている。光学顕微鏡により、実際に中空構造が形成される過程を可視的に記載し、溶解挙動の速度論とリン酸濃度との関係から、バテライト球晶の内部と外縁部はリン酸イオンの応答性が異なる相で形成されていることを明らかにした。さらに両領域部の違いを、HR-TEM による格子像と電子線回折パターンの解析と比較、SAXS による結晶子サイズの解析、化学組成分析等により調べた。バテライト球晶の中心部は炭酸に富む loose な構造の「擬似バテライト相」であることがわかった。生体模擬条件下で、バテライト相及び擬似バテライト相の溶解速度は双方ともリン酸イオンの共存により抑制されるが、バテライト相の方がより抑制効果が顕著のために中空構造が形成されることを明らかにした。

第 4 章では、バテライト相及び疑似バテライト相の表面エネルギーに与えるリン酸の影響について検討した結果が述べられている。リン酸イオンのバテライトの各相に与える影響について NMR を用いて調べた。³¹P NMR スペクトルの形状から、バテライト相ではリン酸イオンは炭酸基を一部置換し、擬似バテライト相ではイオン置換ではなく結晶子表面に吸着していることがわかった。さらに、成長ダイナミクスを支配する固相の表面エネルギーと、それに対するリン酸イオンの効果を検討した。リン酸濃度をファクターとし、各相の成長ダイナミクスの過飽和度依存性と表面エネルギーを計測した。両相の表面エネルギー及び成長速度は、リン酸イオン濃度の増大に伴って増大することがわかった。そこで、前駆体である ACC 相の構造の安定性に対するリン酸イオンの効果を測定したところ、リン酸イオンの増大に伴って ACC 相はカルサイト類似構造からバテライト類似構造へと変化した。また、高濃度リン酸溶液中では、ACC 相は不安定な状態で迅速に転移した。すなわち、リン酸イオンは初生相である ACC 相の構造を変化させて、

他結晶相へ相転移する ACC 量を減少させる。その結果、各生成結晶相に対するリン酸の過飽和度が減少し成長速度が抑制された結果、見かけの表面エネルギーが増大する。また、リン酸イオン濃度が比較的高いと、擬似バテライト相が優先的に晶出する。すなわち、リン酸イオン濃度が高い脊椎動物の生体系ではバテライト相は晶出しにくく、晶出したとしても不安定な擬似バテライト相が長時間保持されにくいことを明らかにした。

第 5 章では、含リン酸有機物が炭酸カルシウム相生成に与える影響について、リン酸基の価数に着目して検討した結果について述べている。含リン酸有機物として、弱塩基性下で 2 価のリン酸基を多く含む FMN(flavin mononucleotide)を使用した。これを炭酸カルシウムに対するモル比 1/1000 程度を添加すると、カルサイト相の晶出が抑制された。蛍光顕微鏡観察により、FMN 分子がカルサイト結晶表面に吸着し、成長を抑制した。また、含 FMN バテライト球晶を部分溶解させると中空バテライトが形成した。故に、2 価のリン酸イオンは、表面吸着によりカルサイト相の形成に影響を与えるが、バテライト相の形成には殆ど影響を与えないことが示された。

第 6 章では、CGNs の共存が水酸アパタイト(HAP)相の形成過程に与える効果について検討した結果を述べている。CGNs をリン酸カルシウム溶液に添加すると、数 μM の濃度で HAP 形成時間が最大 45%ほど短縮した。さらに、CGNs 濃度の増大に伴い、初生相のアモルファス相(ACP)中で徐々に構造が変化するプロセスから、ACP 中の構造が均一になった後に HAP 相が形成するプロセスへと変化した。また CGNs を含むと、形成過程で前駆体の 8 リン酸カルシウム(OCP)相が観察されなかった。このことから、CGNs を含む溶液中では前駆体の OCP 相の形成が抑制されてプロセス変化を加速するため、HAP 相形成を促進することが示唆された。

第 7 章では、第 6 章にて形成が抑制された OCP 相の構造や形成速度に与える CGNs の影響について検討した結果を述べた。OCP 相が優先形成する弱酸性条件下で形成したリン酸カルシウム相を様々な方法により観察した。CGNs を含む溶液中では、ACP 相から OCP 相への転移過程において ACP 相の集積様式に変化が見られ、相転移に要する時間も伸長した。さらに、CGNs は OCP 中の $\text{HPO}_4^{2-}\text{-OH}$ layer 構造の形成を抑制し、特異な構造の中間遷移相を誘導した。CGNs は、OCP 相形成に対する、負触媒のような効果を示すことがわかった。

第 8 章では、カルボン酸の水和性が OCP の構造に与える影響について検討した結果が述べられている。水溶性カルボン酸である酢酸ナトリウムを添加すると、CGNs を添加した系とは逆に HPO_4^{2-} 基を有する結晶構造が発達する一連の変化を主に IR と XRD 測定により明らかにした。

第 9 章では、本研究を総括している。炭酸カルシウム・リン酸カルシウム複合系でのアモルファス相から結晶相への相転移過程において、添加物の物性の影響および相転移過程で出現する中間遷移相の詳細な結晶化学的特性をまとめている。

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

氏名 杉浦 悠紀 印

(2014年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
学術論文 (筆頭著者)	<p>○ The effects of immobilized carboxylic-functional groups on the dynamics of phase transformation from amorphous to octacalcium phosphate, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Masahiro Nagao, Atsushi Yamazaki <i>American Mineralogist</i>, Accepted</p> <p>○ Dissolution behavior of vaterite spherulites in solution containing phosphate ions, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Masahiro Nagao, Koichi Momma, Yuki Kimura, Atsushi Yamazaki, <i>Journal of the Ceramic Society of Japan</i>, 122, 679-684, 2014.</p> <p>○ Solution Chemical Synthesis of Hollow Vaterite Polycrystalline Particles for Advanced Biomaterial Applications, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma and Atsushi Yamazaki <i>Chemistry Letters</i>, DOI: http://dx.doi.org/10.1246/cl.140823, 2014.</p> <p>○ Acceleration and inhibition effects of phosphate on phase transformation of amorphous calcium carbonate into vaterite, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Yuki Kimura, Katsuo Tsukamoto, Atsushi Yamazaki, <i>American Mineralogist</i>, 98, 262-270, 2013.</p> <p>Morphological evolution of precipitates during transformation of amorphous calcium phosphate into octacalcium phosphate in relation to role of intermediate phase, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Yuki Kimura, Hitoshi Miura, Katsuo Tsukamoto, <i>Journal of Crystal Growth</i>, Elsevier, Amsterdam, 332, 58-67, 2011.</p>

早稲田大学 博士 (理学) 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者 (申請者含む)
講演 (筆頭著者)	<p>○ 擬似人工タンパク質による水酸アパタイトの形成促進、 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、山崎淳司 2014年11月 第44回結晶成長国内会議</p> <p>○ ドラッグデリバリーシステム応用のためのナノ粒子集合体バテライト作製 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、山崎淳司 2014年9月 第27回秋季セラミックスシンポジウム</p> <p>○ アモルファス炭酸カルシウム(ACC)相変化へのリン酸イオンの影響、 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、山崎淳司 2014年4月 第28回日本地球惑星科学連合同大会</p> <p>○ Ca-CO₃-PO₄ 3成分系におけるバテライトの安定性 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、山崎淳司 2013年11月 第8回バイオミネラルリゼーションワークショップ</p> <p>○ Vaterite intermediate phase: physicality and dynamics in presenting PO₄, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Yuki Kimura, Koichi Momma, Atsushi Yamazaki, 2013年8月 The 17th International Conference on Crystal Growth</p> <p>○ ACC-バテライト相転移時における中間体 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、木村勇氣、門馬綱一、山崎淳司 2012年12月 第7回バイオミネラルリゼーションワークショップ</p> <p>○ バテライト形成過程における結晶質の前駆体、 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、木村勇氣、門馬綱一、塚本勝男、山崎淳司 2012年11月 第42回結晶成長学会国内会議</p> <p>○ Crystalline Precursor of Vaterite during Mineralization via ACC, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Yuki Kimura, Katsuo Tsukamoto, Atsushi Yamazaki, 2012年7月 International Crystal Growth in Sendai</p> <p>リン酸第8カルシウム(OCP)モルフォロジー形成時における中間相の役割 <u>杉浦悠紀</u>、小沼一雄、木村勇氣、三浦均、塚本勝男、 2011年11月 第41回結晶成長学会国内会議</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>The morphological relationship of octacalcium phosphate from precursor: the role of intermediate phase, <u>Yuki Sugiura</u>, Kazuo Onuma, Yuki Kimura, Hitoshi Miura, Katsuo Tsukamoto, 2011年5月 The 3rd International School of Biological Crystallization</p>
	<p>HAP Precursor, OCP Morphology Formation and Phase Transition to β-TCP, <u>Yuki Sugiura</u>, Yuki Kimura, Kazuo Onuma, Hitoshi Miura, Katuo Tsukamoto 2010年9月 8th Japan-China-Korea Workshop on Microgravity Sciences for Asian Microgravity Pre-Symposium</p>
	<p>Phase Transition of HAP Precursors with Maintaining Morphology, <u>Yuki Sugiura</u>, Yuki Kimura, Kazuo Onuma, Hitoshi Miura, Katuo Tsukamoto, 2010年8月 The 16th International Conference on Crystal Growth</p>
	<p>HAP Precursors, OCP Formation and Phase Transition to β-TCP, <u>Yuki Sugiura</u>, Yuki Kimura, Kazuo Onuma, Hitoshi Miura, Katsuo Tsukamoto 2010年8月 The 14th International Summer School on Crystal Growth</p>
外部獲得資金	<p>日本学術振興会特別研究員 DC2 科研費奨励金「生体鉱物の中間相の構造・安定性について」 平成 25-26 年度 2400 千円</p>
受賞等	<p>“International Mohri Poster Award, Excellent Poster Award” <u>Yuki Sugiura</u>, Yuki Kimura, Kazuo Onuma, Hitoshi Miura, Katuo Tsukamoto 2010年8月 8th Japan-China-Korea Workshop on Microgravity Sciences for Asian Microgravity Pre-Symposium, Akiu, Sendai, Japan</p>