

亜鉛クロロアパタイトのメカノケミカル
合成および粉末 X 線回折法と全反射減衰
赤外分光法による結晶性評価

2020

伊藤 丹

目次

1. 序章.....	1
1.1. ハイドロキシアパタイト.....	1
1.2. ハイドロキシアパタイトの分析法.....	2
1.2.1. 粉末 X 線回折 (PXRD)法.....	2
1.2.2. 全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法.....	4
1.3. 湿式法によるハイドロキシアパタイト合成.....	6
1.4. 乾式法によるハイドロキシアパタイト合成.....	7
1.5. イオン交換性によるハイドロキシアパタイトの反応性向上.....	7
1.6. メカノケミカル合成法.....	9
第1章 クロロアパタイトのメカノケミカル合成と粉末 X 線回折法および全反射減衰赤外分光法によるその特性評価.....	10
2. 序論.....	10
3. 実験.....	11
3.1. 試薬.....	11
3.2. 方法.....	12
3.2.1. メカノケミカル合成法.....	12
3.2.2. 粉末 X 線回折 (PXRD)法.....	13
3.2.3. 全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法.....	13
3.2.4. 定量分析.....	14
3.2.5. 走査電子顕微鏡 (SEM).....	14
3.2.6. 安定性試験 (<i>in vitro</i>).....	14
4. 結果および考察.....	15
4.1. PXRD.....	15
4.2. ATR-IR.....	16
4.3. 組成.....	17
4.4 <i>in vitro</i> 安定性試験.....	18
4.4.1. PXRD.....	18

4.4.2. 格子定数	20
4.4.3. ATR-IR	21
4.4.4. 組成	23
4.5. SEM 画像	24
5. 小括	25
第 2 章 亜鉛クロロアパタイトのメカノケミカル合成と全反射減衰赤外分光法によるその結晶性評価	26
6. 序論	26
7. 試薬および実験方法	27
7.1. 試薬	27
7.2. 実験方法	27
7.2.1. メカノケミカル合成法	27
7.2.2. 粉末 X 線回折 (PXRD)法	28
7.2.3. 全反射赤外減衰分光 (ATR-IR) 法	28
7.2.4. 定量分析	28
7.2.5. 走査電子顕微鏡(SEM)	28
7.2.6. 高湿度条件下保存試験	28
7.2.7. X 線コンピュータ断層撮影 (X 線 CT)法	29
7.2.8. 主成分分析 (PCA; Principal components analysis).....	29
8. 結果・考察	30
8.1. PXRD	30
8.2. ATR-IR	32
8.3. 組成	33
8.4. 高湿度保存試験	34
8.4.1. PXRD	34
8.4.2. ATR-IR	35
8.5. SEM 画像	36
8.6. X 線 CT	37

8.6.1. CT 画像.....	37
8.6.2. CT Analyser (CTAn)による測定.....	38
8.7. 主成分分析.....	39
9. 小括.....	41
第3章 総括.....	42
謝辞.....	43
参考文献.....	44

1. 序章

1.1. ハイドロキシアパタイト

アパタイトは $M_{10}(ZO_4)_6X_2$ の組成をもつ結晶鉱物の総称である。特に $M = Ca, Z = P, X = OH$ のもの、すなわち $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ の組成で表れる難溶性塩基性リン酸カルシウムは、ハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite; HAp) と呼ばれ、脊椎動物の骨や歯の主要無機成分としてよく知られている。人体の歯のエナメル質では、HAp の含量は 95% 以上に達する。¹⁾ 骨には水が約 45% 含まれるが、乾燥後の骨ではその約 75% を HAp が占め、他に有機成分としてコラーゲン (約 20%) などが含まれる。²⁾

骨折や腫瘍切除などによる骨の欠損は、通常、金属材料や生体親和性セラミックスなどを用いて治療される。合成 HAp は、その高い機械的強度と生体活性 (直接、自家骨と化学結合する性質) のために治療に有用な生体親和性セラミックスとなりうる。³⁾ そのため、合成 HAp の生体親和性のさらなる向上のための研究成果が数多く報告されてきた。⁴⁻⁶⁾ 合成 HAp は、骨充填剤として使用されるだけでなく、生体活性の低いチタンなどの材料のコーティング剤としても用いられる。生体内に人工物を埋め込むと、人工物は異物として認識され、免疫反応が起こる。免疫反応がバランスを欠くと人体に有害となるため、治療用人工物は免疫反応を引き起こさない生体適合性材料である必要がある。

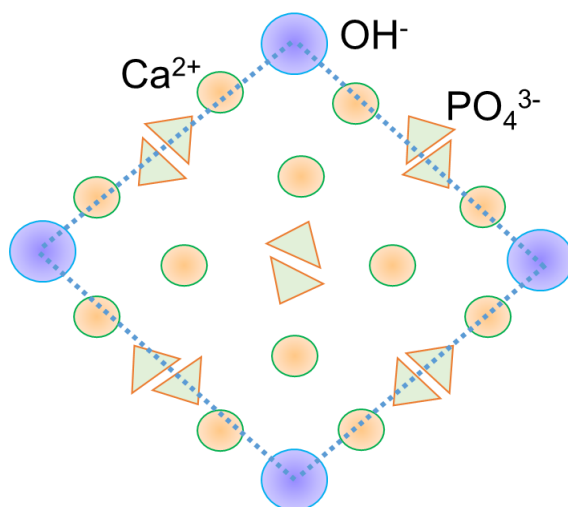


Fig. 1 ハイドロキシアパタイト模式図

1.2. ハイドロキシアパタイトの分析法

1.2.1. 粉末 X 線回折 (PXRD)法

入射 X 線の大部分は試料を通過するが、一部は試料中の電子を強制振動させ、その振動電子は電磁波 (散乱 X 線)を放射する。試料内の原子位置が固定されていると、散乱 X 線は、その散乱方向により、互いの位相が一致するときには強め合い、互いの位相が半波長ずれるときには打ち消しあう。このような電磁波の相互作用を干渉という。X 線回折は、この散乱 X 線が干渉を起こすことで現れる。結晶に入射角 θ で X 線が照射された場合、2つの結晶面により反射角 θ の方向で X 線が強め合うためには Fig. 3 に示したブラッグの式 ($2d\sin\theta = n\lambda$)を満たす必要がある。

X 線発生装置では、X 線管球内で加熱された陰極から出た熱電子を加速し、対陰極にある金属に衝突させることで X 線を発生させる。発生する X 線は連続的な波長分布をもつ連続 X 線と、特定波長の固有 X 線 (特性 X 線)とからなる。X 線回折法では、特性 X 線を用いる。特性 X 線の波長は、対陰極に用いる金属の種類によって異なる。有機物の X 線回折の測定には、原子間結合距離に近い波長の特性 X 線が得られる Cu や Mo が用いられる。

粉末 X 線回折法は、無配向化した粉末試料に X 線を入射させ、生じる回折像の回折強度を各回折角について測定する方法である。無配向化とは、試料を粉砕することで、微細化した結晶があらゆる方向を向いている状態にすることをいう。結晶性物質の粉末 X 線回折パターンは各化学物質に固有かつ特徴的である。粉末 X 線回折パターンを標準物質のそれと比較したり、既知物質のデータと比較することで、結晶形の同定ができる。このため、粉末 X 線回折法は結晶多形や溶媒和結晶の存在の確認にも用いられる。すなわち、同一の化学構造を持つ物質であっても、結晶形が異なると、X 線回折パターンにも相違が見られる。非晶質 (アモルファス)では、明確な回折ピークが観察されないハローパターンを示す。結晶の回折パターンと非晶質の回折パターンの違いを利用して、結晶化度 (試料に含まれる結晶の割合)の評価を行うこともできる。

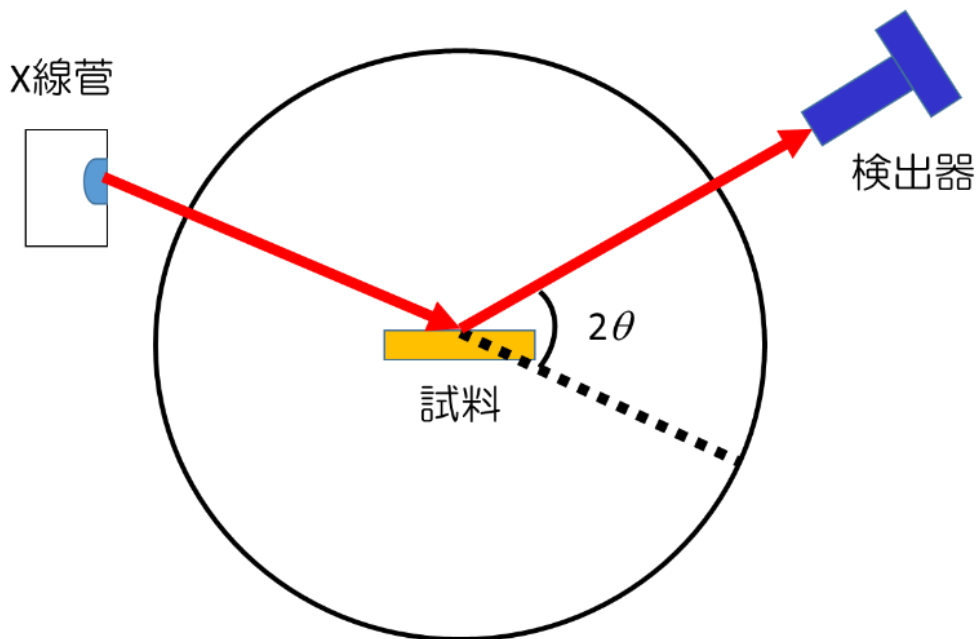
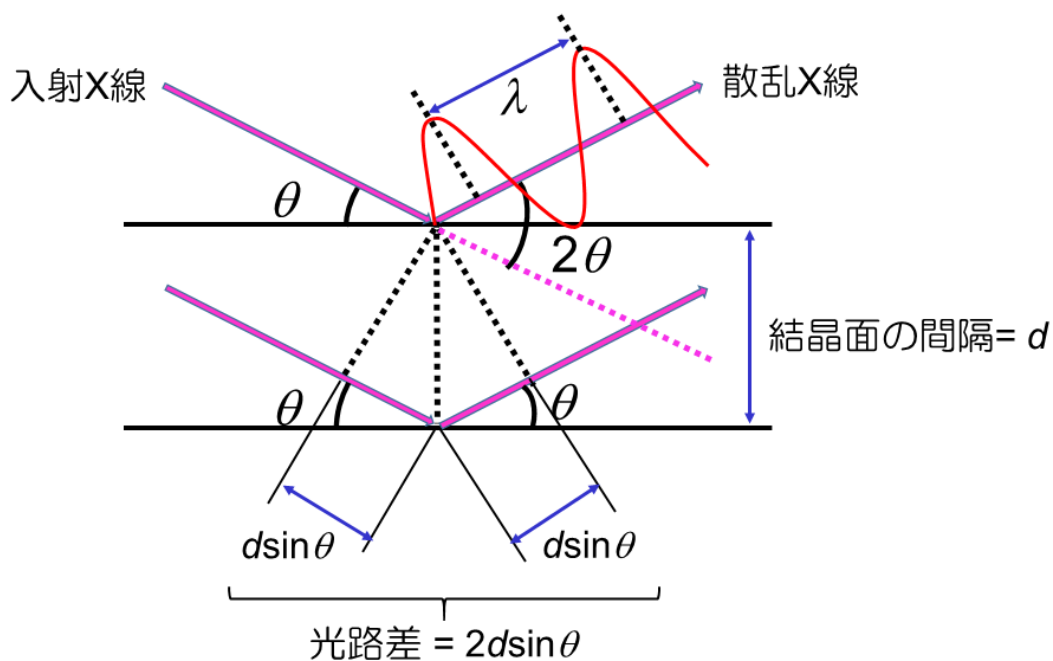


Fig. 2 粉末 X 線回折装置模式図



$$2d\sin\theta = n\lambda$$

d : 結晶格子面の面間隔

λ : 入射X線の波長

θ : X線の入射角及び反射角

n : 回折の次数(整数)

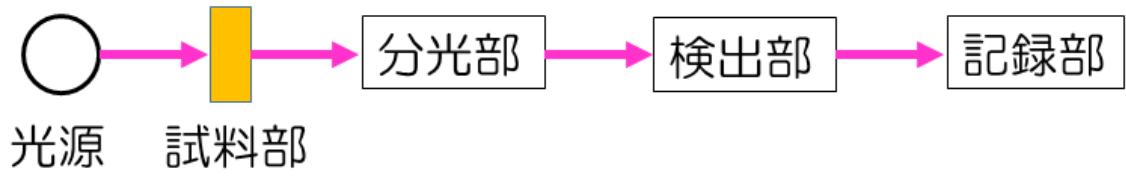
Fig. 3 ブラッグの条件

1.2.2. 全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法

赤外吸収スペクトル (IR スペクトル)は、赤外領域の光の吸収を各振動数に対して測定したものであり、分子の振動エネルギーを調べることができる。この振動スペクトルは、化合物の同定、定量、構造解析に幅広く利用されており、特に官能基の情報を得るときに有用である。IR スペクトル測定法では、分子を構成する原子核間の振動状態の変化に伴い光を吸収する現象を利用している。一般に分子を構成する原子間の振動に関するエネルギーは、赤外線のもつエネルギーに対応する。全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法においては、試料表面で全反射する光を測定することによって、試料表面の吸収スペクトルを得る。IR スペクトルは通常、横軸に波数 (cm^{-1})、縦軸に透過率 (%)または吸光度をとり、波数 $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ の範囲で測定される。

水酸基、カルボニル基、ニトロ基、芳香環など、官能基に特徴的な吸収を特性吸収という。特性吸収帯は 1500 cm^{-1} 以上で観測される。したがって、そのスペクトル吸収位置から物質がもっている官能基がわかり、部分構造を知ることができる。これに対して、 1500 cm^{-1} 以下は指紋領域という。指紋領域ではいくつもの吸収が重なり合って分子固有の複雑なスペクトルが現れるため、化合物の同定に利用できる。化学構造の特徴が類似している化合物同士では、これらの吸収スペクトルは特性吸収帯では類似しているが、指紋領域では明らかな相違がみられる。医薬品のような分子は、さまざまな官能基を持ち、これらに起因する振動は周囲の影響をあまり受けない。そのため、化合物が違ってほぼ同じ位置にその吸収帯が観測される。日本薬局方において、医薬品の確認、同定に赤外吸収スペクトルが汎用されており、多くの医薬品について、その参照スペクトルが収載されている。IR スペクトルを測定する装置を赤外分光光度計という。赤外分光光度計は、分散型 (複光束型)およびフーリエ変換 (FT)型 (単光束型)があり、光源、分光部、試料部、検出部および記録部からなる。FT-IRの方が、感度が良く、短時間での測定が可能であり、多くはこちらが利用されている。

〈単光束型〉



〈複光束型〉

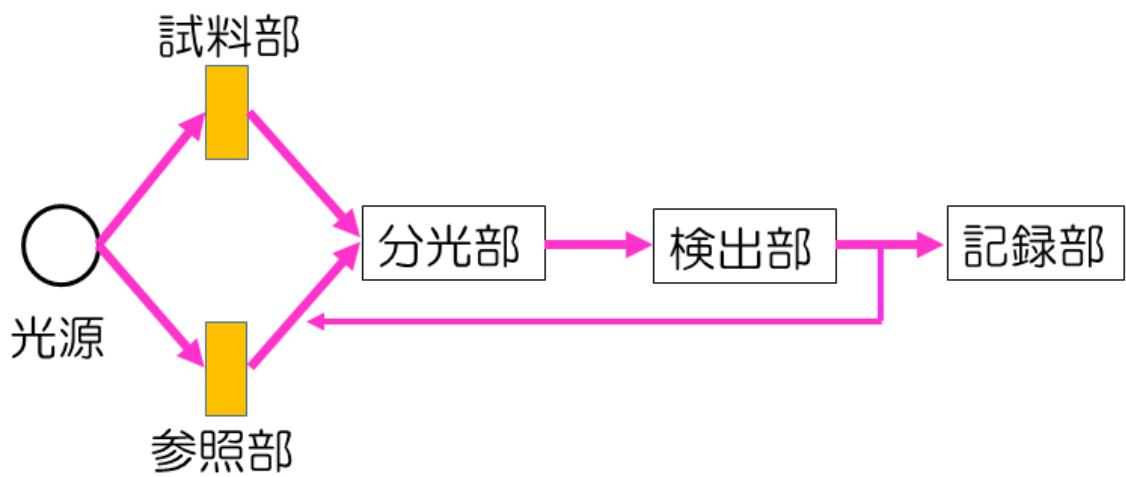


Fig. 4 赤外分光光度計

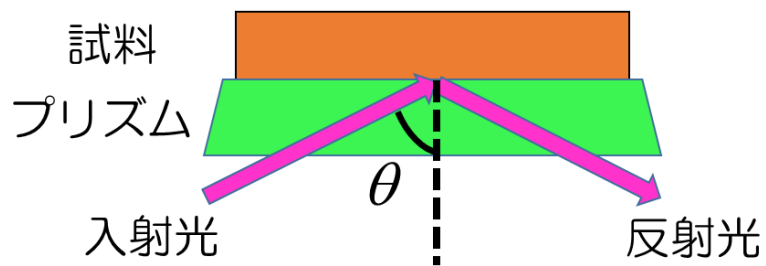


Fig. 5 全反射減衰赤外分光 (ATR-IR) 法模式図

1.3. 湿式法によるハイドロキシアパタイト合成

HAp の合成法は、水溶液内の化学反応を利用する湿式法と、固相反応を利用する乾式法に大別される。⁷⁾ 湿式法では、原料物質の種類 ($\text{Ca}(\text{OH})_2$ と H_3PO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ と $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ など), それらの添加順序や添加速度, 反応温度, 反応時間などによって生成 HAp の結晶状態や物理的・化学的性質が変化する。化学量論性に劣るものの、比表面積の大きな結晶を得ることができ、このことが HAp のさまざまな界面挙動をもたらす。たとえば、HAp は非調和溶解性 (incongruent solubility) ⁸⁾ を示すことが知られている。これは HAp の溶解挙動が固/液比によって変動したり、溶解平衡において溶液中の Ca/P 比が固相におけるそれと異なるというものである。

窒素雰囲気下で沸騰している水に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を焼結して得た CaO を懸濁させ、そこに Ca/P 比を物質量比で 1.67 になるように H_3PO_4 を少しずつ滴加する湿式法では、反応式は $10\text{CaO} + 6\text{H}_3\text{PO}_4 \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 8\text{H}_2\text{O}$ で表される。しかし、同一合成法であっても合成の度に Ca/P 比が変動することが報告されており、この非化学量論性については、吸着説, occlusion 説, 異種相混在説, イオン欠損説, $\text{HAp-Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (リン酸八カルシウム; OCP) 互層説などで説明されている。⁹⁾

湿式法における留意点としてオストワルトの段階則 Ostwald rule of stages がある。これは、過飽和溶液から沈殿相が生成する際には、熱力学的に不安定な相から出現し、相転移によって順次より安定な相へと変化するというものである。 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD), OCP, HAp を比較すると、 $\text{pH} < 6.7$ では OCP, DCPD, HAp の順で、 $\text{pH} > 6.7$ では DCPD, OCP, HAp の順でより安定になり、これらの順で固相が生成することが報告されている。¹⁰⁾ $\text{pH} 7.4$ では DCPD, OCP, TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), HAp の順で相転移するという報告¹¹⁾ もある。文献によって数値に差異があるが、概ね $\text{pH} 4.5$ 以上では、リン酸カルシウムの最も安定な相は HAp である。しかし、高い過飽和度で急速に HAp を湿式合成する際には、相転移のための時間が十分でないために HAp 以外のリン酸カルシウム相が残存している可能性がある。

1.4. 乾式法によるハイドロキシアパタイト合成

乾式法¹²⁾における出発原料は主に粉体となる。粉体同士の混合とその後の加熱による固相反応を経由して HAp が合成される。この場合、反応速度に影響を与える因子には、出発原料 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ と CaO , $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ と CaCO_3 , CaHPO_4 と CaCO_3 など)の組成、各々の結晶構造、粉体の粒径分布・空隙率・比表面積などがある。¹³⁾ 通常、乾式法によって合成された HAp は、湿式法によって得られた HAp に比べて化学量論的に優位であるものの、非晶質相を多く含み、結晶性が低い傾向にある。低結晶性 HAp は高い化学ポテンシャルを有するため、骨置換能などにおいて優れた反応性を示す。しかし、その機械的強度は高結晶性 HAp に比べて低くなる。通常、HAp の結晶性を高めるためには、熱処理が用いられる。この熱処理は、HAp 中に混入している炭酸イオンを除去するためにも有効である。高結晶性 HAp は溶解性が低いため、骨置換に時間を要するという短所がある。¹⁴⁾ その改善策として、HAp のイオン交換性の利用がある。

1.5. イオン交換性によるハイドロキシアパタイトの反応性向上

HAp はイオン交換性を有しており、イオン交換により、結晶の形態や粒径、格子定数、熱安定性、化学的安定性、溶解性などの物理化学的性質が変化する。HAp のイオン交換性を利用することで、その生体親和性材料としての特性を調整することが可能となる。骨のリモデリング、磁気特性の付与、抗菌活性の増強などを目的として、これまで数十種類の異なるイオンの導入研究が行われてきた。 Ca^{2+} は主に 2 価陽イオンと、 PO_4^{3-} は CO_3^{2-} と、 OH^- はハロゲン化物イオンとの置換がそれぞれ可能である。¹⁵⁾

亜鉛イオン (Zn^{2+})は、骨芽細胞による骨形成を促進し、破骨細胞による骨吸収を抑制する。¹⁶⁾ 亜鉛は、骨代謝に密接に関連する酵素であるアルカリ性ホスファターゼの補酵素やビタミン D_3 受容体タンパクなどの構成因子として重要な役割を有する細胞内遍在微量元素である。アルカリ性ホスファターゼは骨芽細胞から放出され、コラーゲン繊維にカルシウムとリン酸を沈着させる。 CO_3^{2-} を導入した炭酸アパタイトは、結晶性の低下や結晶形態の変化により溶解性の上昇、化学反応性の増大、破骨細胞の媒介性の発現な

どの特性をもつ。¹⁷⁾ ハロゲン化物イオンを置換した HAp は溶解性、細胞吸着性などが変化する。Fig. 6 に示すように、HAp の溶解度積 ($pK_{sp} = \text{約 } 115$ ¹⁸⁾) と比較した場合、F⁻ を導入したフルオロアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$; FAp) は $pK_{sp} = 120$,¹⁹⁾ Cl⁻ を導入したクロロアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$; ClAp) は $pK_{sp} = 108$ であり,²⁰⁾ ClAp は HAp 系材料の溶解性向上のために有効であると期待できる。また、Cl⁻ は、骨吸収プロセスにおいて破骨細胞を活性化し、骨周囲の微視的環境を酸性側へと傾かせる。HAp は酸性条件下で溶解性が上昇するため、HAp への Cl⁻ の取り込みは骨代謝を促進する。

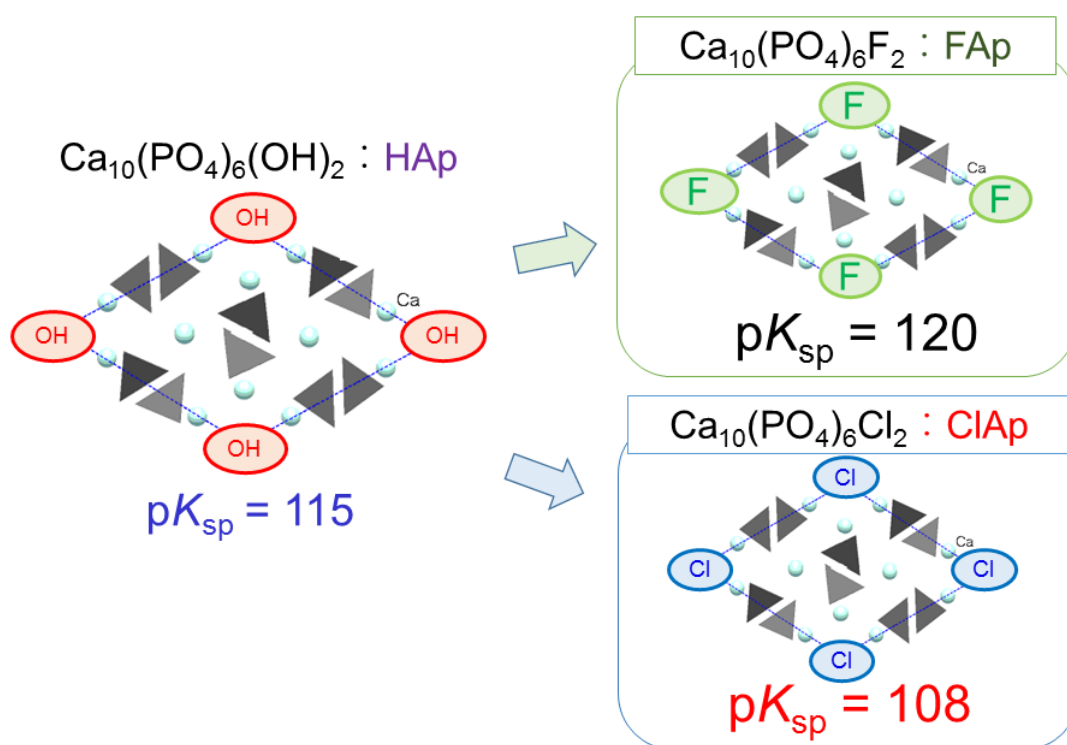


Fig. 6 イオン交換による溶解度積の変化

1.6. メカノケミカル合成法

メカノケミカル合成法は乾式法の一方法であり，固相間の反応により新しい結晶を生成させる。このうち，遊星型ボールミルを用いるメカノケミカル合成では，反応エネルギーとして摩擦および圧縮などの機械的エネルギーを供給する。この方法は，1) 操作が簡便，2) 高い収率，3) 装置が単純，4) コンタミネーションが少ない，5) 環境負荷が低い（有機溶剤廃棄物を生じない）などの長所がある。²¹⁾ HAp については， $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ， CaCO_3 ， H_2O を出発原料とするメカノケミカル合成が報告されている。²²⁾ さまざまなイオンの導入によって物性や反応性を改善させた HAp をメカノケミカル合成できるならば，再生医療の発展への貢献が期待できる。本研究では， Zn^{2+} や Cl^- を含むことにより，合成 HAp よりも反応性や生体活性が高いと期待される亜鉛クロロアパタイト ($(\text{Ca})_{10-x}(\text{Zn})_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; ZnClAp)に着目し，そのメカノケミカル合成と粉末 X 線回折法および全反射減衰赤外分光法による物性評価を行った。まず，反応性向上が期待できる ClAp のメカノケミカル合成を検討した。²³⁾ その成果をもとに，生体活性の向上も期待される ZnClAp のメカノケミカル合成を行った。^{24,25)}

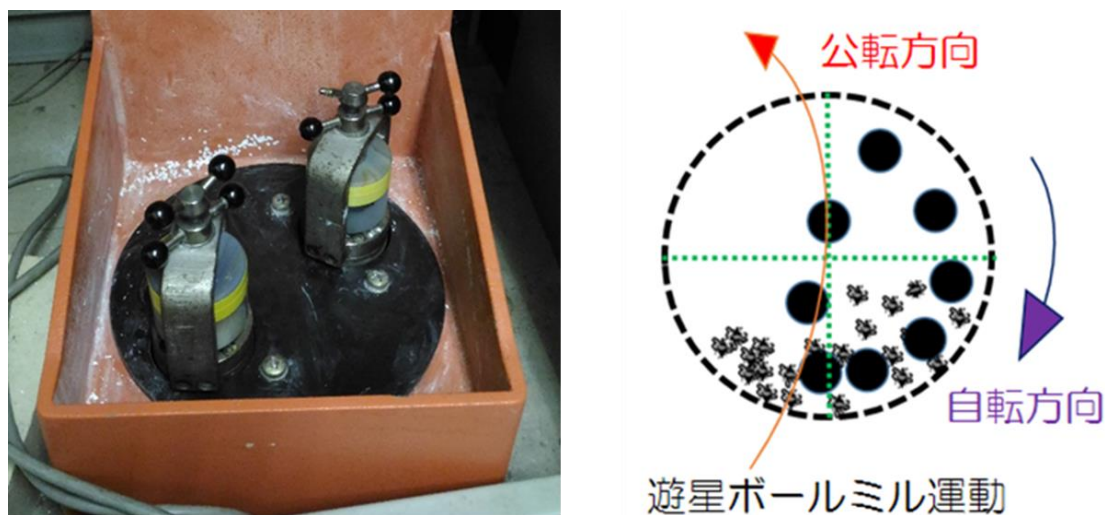


Fig. 7 遊星型ボールミル装置および模式図

第1章 クロロアパタイトのメカノケミカル合成と粉末 X 線回折法および全反射減衰赤外分光法によるその特性評価

2. 序論

本章では、クロロアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$; ClAp)のメカノケミカル合成について述べる。序章でも述べたように、人工的に合成した HAp は高い機械的強度に加え高い生体親和性を有し、生体骨と直接結合することができる。しかし、HAp の自家骨との置換は、HAp の溶解度および溶解速度の低さから、長い時間を要する。HAp のイオン交換性を利用することにより、Clを導入した ClAp を合成することができる。ClAp は HAp よりも溶解性に優れる。骨のリモデリング (再構築)は骨吸収と骨形成の繰り返しによって進む。したがって ClAp の溶解性の上昇は、骨吸収の速度の増大につながると期待できる。ClAp は、 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD)、CaO および CaCl_2 を原料として、遊星型ボールミルを用いて、メカノケミカル合成した。ここでは、DCPD と CaO から非晶質のリン酸カルシウムが生成した後に CaCl_2 を添加する方法 (合成法 1)と、最初からすべてを混合する方法 (合成法 2)の 2 つを検討した。

生体親和性材料の結晶性評価を目的として、粉末 X 線回折 (PXRD) 法や全反射減衰赤外分光 (ATR-IR) 法が活用されている。本研究ではこれらをメカノケミカル合成した ClAp に応用し、その組成および結晶性を評価した。さらに、得られた ClAp をゴム製の型に流し込み、 37°C の疑似体液中に 7 日間保存することで、*in vitro* 安定性試験も行った。ClAp の保存前後の組成を各種分析法により求めると共に、PXRD 法および ATR-IR 法により結晶性の変化を評価した。また、格子定数計算ソフト CellCalc を用いてそれぞれの格子定数を計算した。

3. 実験

3.1. 試薬

DCPD, CaO は和光薬品株式会社 (大阪), CaCl₂ は関東化学株式会社 (東京), HAp は新田ゼラチン株式会社 (大阪) から購入した。Table 1 に示すように, 溶存イオン濃度がヒト血漿中のそれぞれの濃度と同等である疑似体液 (SBF) を調製した。本研究で使用された試薬は分析試薬等級のものであり, さらなる精製をすることなく使用した。

Table 1. SBF およびヒト血漿中の無機イオン濃度

Ion	SBF	Human plasma
Na ⁺	142	142
K ⁺	5	5
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	148.8	103
HCO ₃ ⁻	4.2	27
HPO ₄ ²⁻	1	1
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

3.2. 方法

3.2.1. メカノケミカル合成法

合成法 1：はじめに DCPD, CaO, H₂O を遊星型ボールミル (Pulverisette 7, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Germany) のメノウ製ポッドに入れた。カルシウムとリンの物質量比 (Ca/P 比) は 1.5, 粉液比は 0.5 mL/g となるように調整した。原料は, 1000 rpm の回転速度で, 回転 (30 分) と休止 (30 分) を 1 セットとし, これを 12 回繰り返しながら計 12 時間粉碎混合した。その後, 最終的な Ca/P 比が 1.67 になるように, 混合物に CaCl₂ を加えた。CaCl₂ の添加後, 同様の方法で計 12 時間混合した。得られた生成物 (Form A) をゴム製の型 (直径 6 mm, 高さ 4 mm) に注ぎ, 電気乾燥器 (MOV-112, 三洋電機株式会社, 大阪) を用いて 37 °C で 24 時間乾燥させた。

合成方法 2：DCPD, CaO, CaCl₂, 純水の混合物 (Ca/P 比 : 1.67, 液粉比 : 0.5 mL/g) を遊星型ボールミルで反応させた。粉碎混合は回転 (30 分) と休止 (30 分) のセットを 24 回, 計 24 時間行った。生成物 (Form B) を上述のゴム製の型に注ぎ, Form A と同じ条件で乾燥させた。



Fig. 8 自作のゴム型

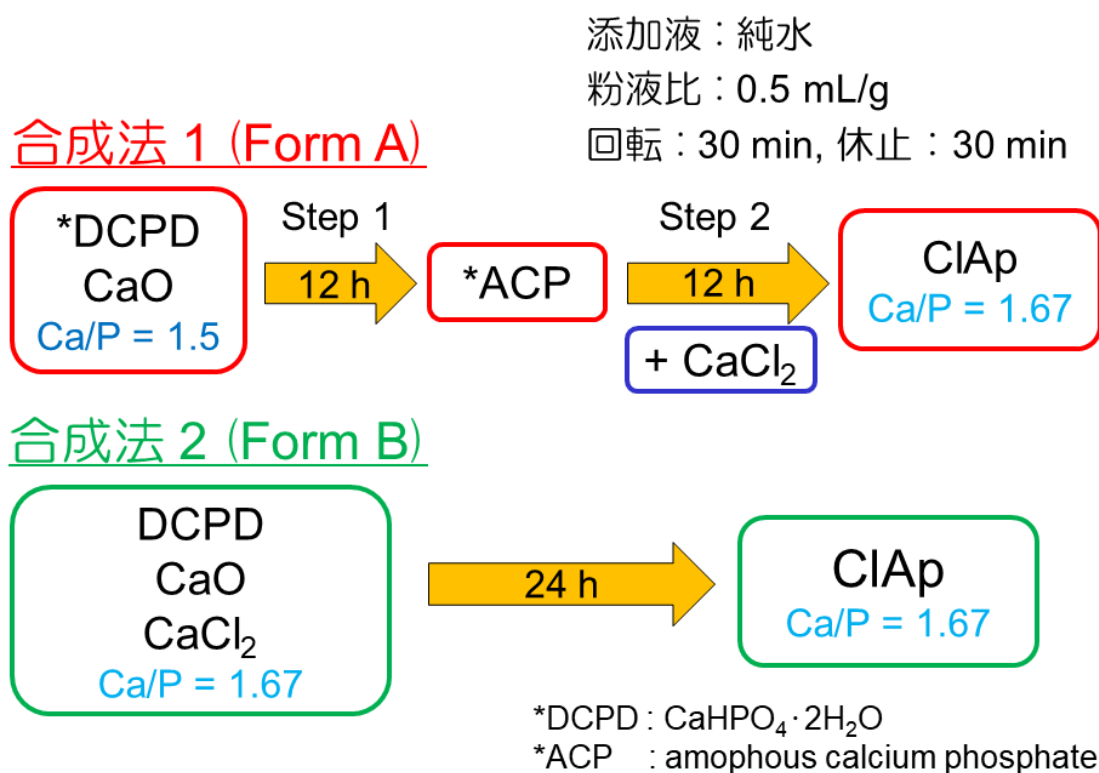


Fig. 9 ClAp のメカノケミカル合成

3.2.2. 粉末 X 線回折 (PXRD)法

PXRD パターンは、X 線回折装置 (MiniFlex, Rigaku Co. Ltd., 東京) を用いて測定した。測定条件は以下の通りである。スキャンタイプ：連続スキャン, 散乱スリット：4.2°, X 線光源：Cu-K α , K α フィルター：Ni, X 線波長：0.1541 nm, 電圧：30 kV, 電流：15 mA, ステップ幅：0.2°, 測定範囲： $2\theta = 5.0 - 45.0^\circ$ 。サンプルの格子定数は、PXRD の結果に基づいて CellCalc ver. 2.20²⁶⁾ によって計算した。

3.2.3. 全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法

ATR-IR スペクトルは、FT-IR 分光光度計 (FT-IR 6200, JASCO Co., 東京) を用いて測定した。測定条件は以下の通りである。プリズム：ダイヤモンド, 測定間隔：4 cm^{-1} , 積算回数：32 回, 測定範囲：600 - 4000 cm^{-1} 。

3.2.4. 定量分析

合成 ClAp は、カルシウムイオン、リン酸イオン、塩化物イオンを定量するために、酢酸緩衝液 (pH 4.2) に溶解した。

カルシウムイオンは、キレート試薬として 0.001 mol/L エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩を、金属指示薬としてエリオクロムブラック T をそれぞれ用い、pH 10 (NH₃-NH₄Cl 緩衝液) においてキレート滴定することにより定量した。

リン酸イオンは、モリブデンブルー吸光光度法²⁷⁾で定量した。0.408 mol/L L-アスコルビン酸と 0.0097 mol/L モリブデン酸アンモニウム水溶液を 1 : 5 の体積比で混合することにより、呈色試薬を調製した。リン酸イオンの標準溶液は、KH₂PO₄ を純水に溶解して調製した。試料溶液または標準溶液は、呈色試薬と混合した後、純水と混合して、最終体積を 20 mL にした。混合液は 15 分間静置し、紫外可視分光光度計 (U-3900H, 日立ハイテクサイエンス, 東京) を使用して、青色の呈色生成物の吸収極大波長である 880 nm における吸光度を測定した。

塩化物イオンは、チオシアン酸水銀法^{28,29)}によって定量した。塩化物イオン標準液は、乾燥した NaCl を純水に溶解して調製した。試料溶液または標準溶液は、1.65 mol/L 硝酸鉄 (III) と 0.0126 mol/L チオシアン酸水銀(II) を含む 10 mL の呈色試薬溶液と混合して、最終体積を 13 mL にした。混合液を 10 分間静置し、紫外可視分光光度計を使用して、橙赤色の呈色生成物の吸収極大波長である 460 nm における吸光度を測定した。

3.2.5. 走査電子顕微鏡 (SEM)

合成 ClAp の表面状態を、走査型電子顕微鏡 (SEM; JCM5700, JEOL Co. Ltd., 東京) で観察した。SEM の加速電圧は 15 kV に設定した。撮影倍率は 300 倍または 3000 倍とした。感度を高めるためにイオンコーティング装置 (IB-3, エイコーエンジニアリング株式会社, 東京) によって、測定前に合成 ClAp の表面を金コーティングした。コーティング時間は 3 分間とした。

3.2.6. 安定性試験 (*in vitro*)

合成 ClAp を、純水中または SBF 中で 7 日間保存した。一部の試料を 2 日目に回収し、残りを 7 日目に回収した。試料を、電気乾燥器で 37 °C のもと 24 時間乾燥させた。

4. 結果および考察

4.1. PXRD

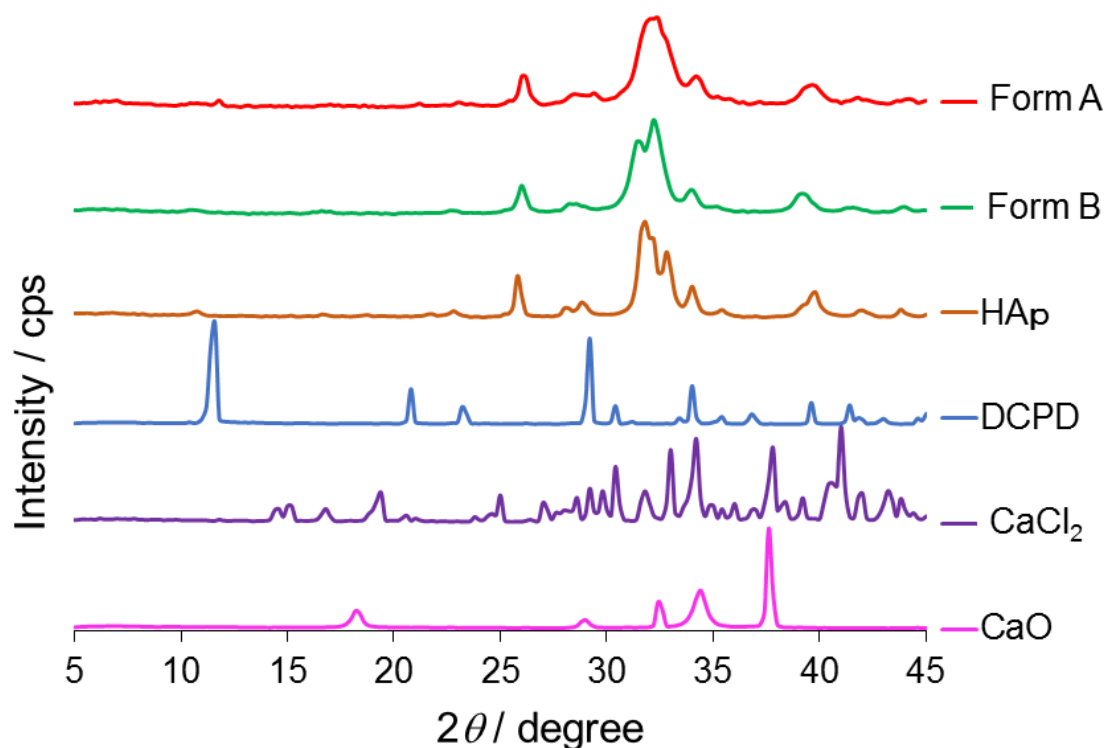


Fig. 10 合成サンプルおよび参照物質の PXRD パターン

Fig. 10 に、合成したサンプル (Form A, Form B) および原料物質の PXRD パターンをそれぞれ示す。Form B は 32.2° に 2 つの主要な HAp ピークを示した。各ミラー指数は (2.1.1) と (1.1.2) である。^{30,31)} Form A も 32° 付近に大きなピークをもつ。さらに、Form A には 12.2°, 21.4°, 29.2° に小さなピークがあり、未反応の DCPD が存在することを示唆している。これらの結果は、Form A と Form B のいずれもが HAp 構造を有していることを示しているが、前者の結晶性は後者のそれよりも低い。いずれの生成物も、CaCl₂ のピークを示していないため、原料物質のである CaCl₂ に由来する塩化物イオンはメカノケミカル合成によって ClAp 中に組み込まれたと考えられる。

4.2. ATR-IR

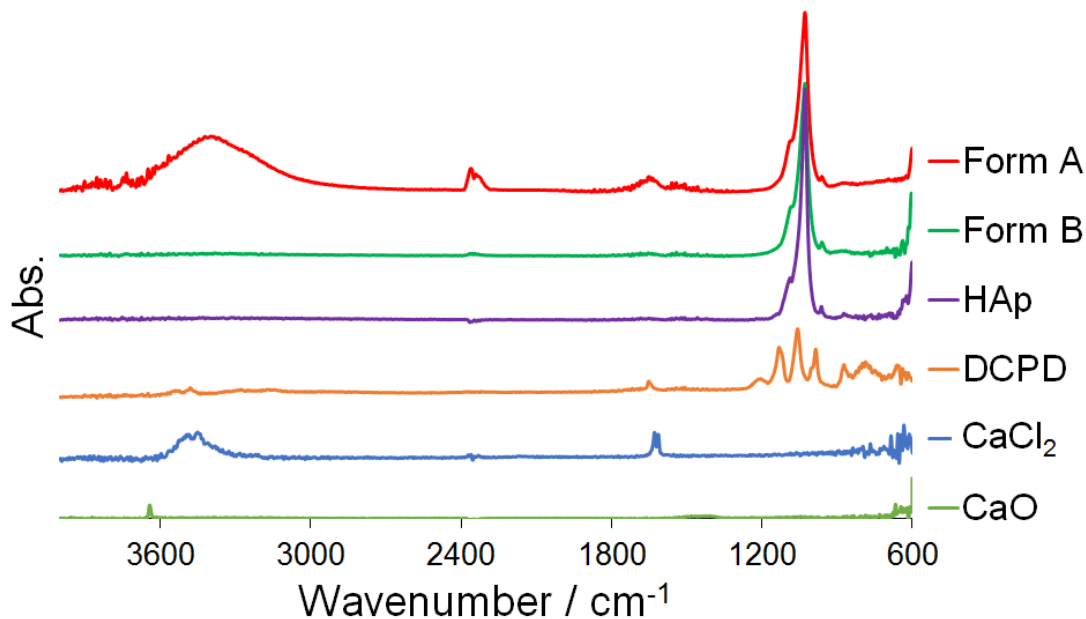


Fig. 11 合成サンプルおよび参照物質の ATR-IR スペクトル

Fig. 11 に、Form A と Form B の ATR-IR スペクトル、および原料物質の ATR-IR スペクトルをそれぞれ示す。いずれの生成物も、HAp 構造に典型的な 605, 959, および 1025 cm^{-1} のピーク³²⁻³⁵⁾を有している。605, 959, および 1025 cm^{-1} の IR バンドは、それぞれ $\nu_4\text{PO}_4$, $\nu_1\text{PO}_4$, $\nu_3\text{PO}_4$ 由来のバンドである。Form A と Form B は、 CaCl_2 に特徴的なピークを示さなかった。この結果は、今回のメカノケミカル合成によって ClAp が形成できたことを示唆する。Form A には 1420 - 1560 cm^{-1} の $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ バンドがわずかに見られた。これはメカノケミカル合成中に Form A に少量の CO_3^{2-} が混入したことを意味する。Form A 合成における懸濁液は、 CaCl_2 添加前はアルカリ性となっている。そのため空気中の CO_2 が、合成中に中間生成物である非晶質リン酸カルシウムに吸収されやすい。炭酸イオンは HAp ベースの生体材料の特性 (結晶性, 溶解度など) に影響を与え、その生体親和性を変化させる。また、Form A は 1600 - 1650 cm^{-1} および 3000 - 3700 cm^{-1} の範囲に吸着水バンドをもつ。この吸着水は、添加した水から供給されたと考えられる。

4.3. 組成

Table 2 合成 ClAp 組成

	Ca ²⁺	PO ₄ ³⁻	Cl ⁻	Ca/P	Ca/Cl
Form A	4.81	2.78	0.727	1.73	6.62
Form B	4.99	3.04	0.767	1.64	6.50

各種定量分析法によって決定した Form A と Form B の組成を、各成分のモル分率として Table 2 に示す。カルシウムとリンの物質量比 (Ca/P) およびカルシウムと塩素の物質量比 (Ca/Cl) も示している。ClAp の理想的な Ca/P 比は 1.67 である。Form A の Ca/P 比は 1.73 であり、1.67 よりも高かった。ATR-IR の結果より、Form A には炭酸イオンが含まれていることが明らかになった (4.2 節) ことから、Form A 中のリン酸イオンが炭酸イオンと置換されたことにより、Ca/P 比が高くなったと考えられる。対照的に、Form B では炭酸イオンの混入は確認されなかった。このため、Form B の Ca/P 値は理想的な Ca/P 比 (1.67) に近くなったと考えられる。純粋な ClAp の Ca/Cl 比は 5 である。Form A と Form B におけるその比率は、それぞれ 6.62 と 6.50 であった。本法のメカノケミカル合成が完全に進み、ClAp のみが合成された場合の Cl のモル分率は 1.00 である。4.1 節の PXRD の結果は、Form A および Form B がアパタイト系結晶であることを示している。Form A および Form B における Cl のモル分率の不足分、すなわち 0.273 および 0.233 は、生成した ClAp に含まれる HAp に起因するものと考えられる。すなわち、Form A と Form B の主生成物は ClAp であるが、副生成物として HAp がそれぞれ 27.3% および 23.3% 含まれている。

HAp の結晶性は、破骨細胞と骨芽細胞の両方の増殖に影響を与えると報告されている。³⁶⁻³⁸⁾ 通常、湿式合成法で合成される HAp には非晶質相が含まれる。そのような HAp は、機械的強度と安定性が不十分であるため、骨置換にはあまり適さない。骨置換を強化するために、湿式合成 HAp には熱処理が行われる。この処理により、HAp の結晶性が向上する。本研究の結果は、特に Form B の場合、メカノケミカル合成が、熱処理なしで高結晶性 ClAp を得るのに有効な合成法であることを示している。

4.4 *in vitro* 安定性試験

4.4.1. PXRD

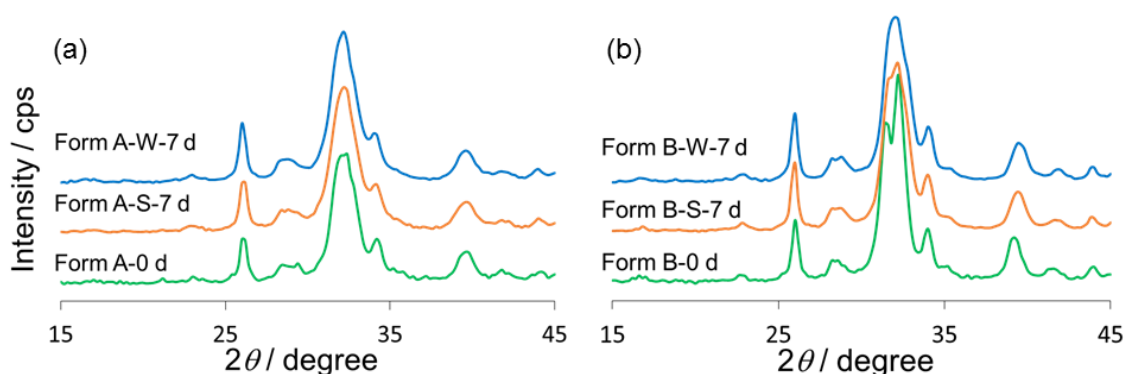


Fig. 12 安定性試験後の(a) Form A, (b) Form B の PXRD パターン

Form A-W-7 d : Form A (純水中 7 日間保存), Form A-S-7 d : Form A (SBF 中 7 日間保存),

Form A-0 d : Form A (保存前), Form B-W-7 d : Form B (純水中 7 日間保存), Form B-S-7 d :

Form B (SBF 中 7 日間保存), Form B-0 d : Form B (保存前)

Table 3 合成 ClAp の PXRD 強度

Sample	X-ray intensity / cps	Δ cps	2θ / degree
Form A	373.1	—	26.0
Form A-S-7 d	409.6	+36.5	26.0
Form A-W-7 d	469.8	+96.7	26.0
Form A	876.6	—	32.2
Form A-S-7 d	987.1	+110.5	32.2
Form A-W-7 d	1018.5	+141.9	32.2
Form B	487.0	—	26.0
Form B-S-7 d	530.0	+43.0	26.0
Form B-W-7 d	527.7	+40.7	26.0
Form B	1361.8	—	32.2
Form B-S-7 d	1131.2	-230.6	32.2
Form B-W-7 d	1096.6	-265.2	32.2

サンプル名の意味は Fig. 12 に示したものと同一

Figs. 12a, b に, *in vitro* 安定性試験前後の合成 ClAp の PXRD パターンを示す (図中のサンプル名の意味はキャプション中にそれぞれ示した)。Table 3 は $2\theta = 26.0^\circ, 32.2^\circ$ における各サンプルの X 線強度 (cps) をそれぞれ示す。Form A の $2\theta = 26.0^\circ$ における PXRD 強度は, 純水中 7 日間の保存で 96.7 cps, SBF 中 7 日間の保存で 36.5 cps 増加した。 $2\theta = 32.2^\circ$ では, 純水中, SBF 中でそれぞれ 141.9 cps, 110.5 cps 増加した。つまり, Form A の結晶性は, 純水中と SBF 中の両方で増加した。対照的に Form B の PXRD 強度は, 26.0° では, 純水中および SBF 中でそれぞれ 40.7 cps, 43.0 cps 増加し, 32.2° では, それぞれ 265.2 cps, 230.6 cps 減少した。したがって, Form B の結晶性は, 純水中, SBF 中の両方で減少したと言える。

4.4.2. 格子定数

Table 4 ClAp 格子定数

Sample	$a / \text{\AA}$	$c / \text{\AA}$
Form A	9.471	6.826
Form A-S-7d	9.423	6.842
Form A-W-7d	9.423	6.842
Form B	9.526	6.832
Form B-S-7d	9.484	6.805
Form B-W-7d	9.460	6.846
HAp	9.418	6.884

サンプル名の意味は Fig. 12 に示したものと同一

Table 4 に *in vitro* 安定性試験前後の Form A と Form B の格子定数をそれぞれ示す。HAp の結晶構造は、六方晶系に属する。六方晶系の格子定数 (a, b, c) の関係は、 $a = b \neq c$ である。³⁹⁾ HAp の格子定数は、 a 軸で 9.403 - 9.49 \AA 、 c 軸で 6.866 - 6.940 \AA と報告されている。^{40,41)} 安定性試験前後の Form A の a 軸格子定数は、いずれも HAp の格子定数よりも大きかった。これは Form A の結晶内に Cl⁻ が存在するためであると考えられる。すなわち、Cl⁻ の結晶イオン半径 (1.81 \AA) は、OH⁻ (1.35 \AA) よりも大きいため⁴²⁾、格子定数が増加したと考えられる。安定性試験後の a 軸格子定数は純水および SBF の両液中で減少し、HAp の格子定数に近くなった。これは安定性試験の過程で Form A の Cl⁻ が溶出し、そこに HAp 構成イオンである OH⁻ が入ったため (後述 4.4.4 節 Table 5) と考えられる。

Form B も Form A と同様の傾向を示した。Form B は Form A よりも Cl⁻ を多く含むため (Table 2)、その a 軸の格子定数は Form A よりも大きくなる。一方、Form A と Form B の c 軸格子定数は安定性試験前後のいずれにおいても HAp よりも小さく、その増減については明確な傾向は観察されなかった。

4.4.3. ATR-IR

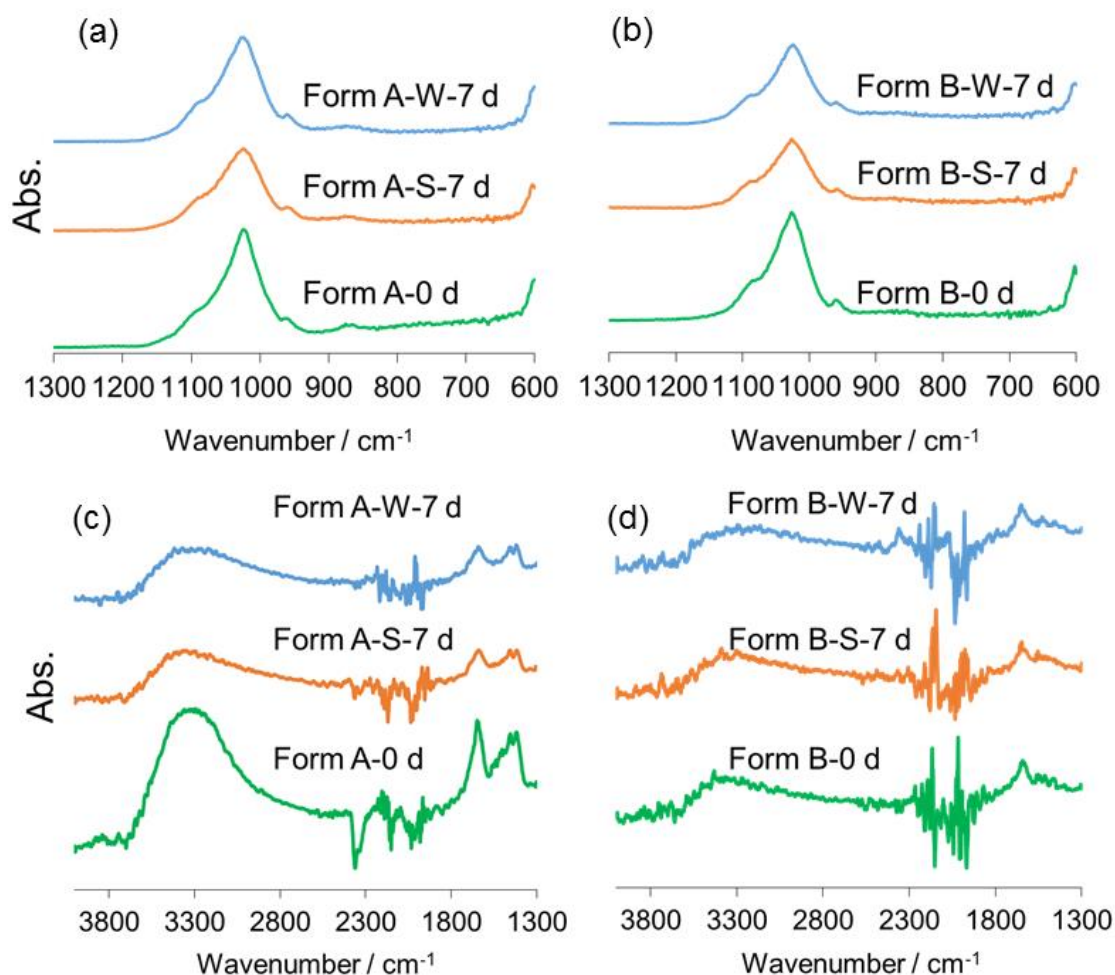


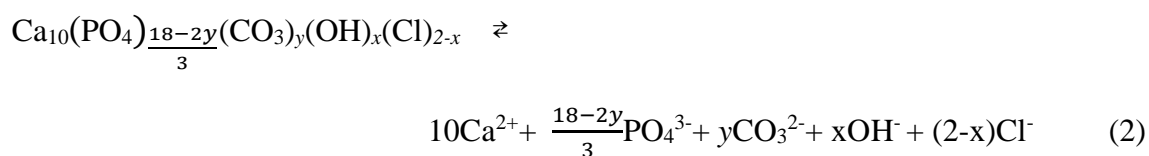
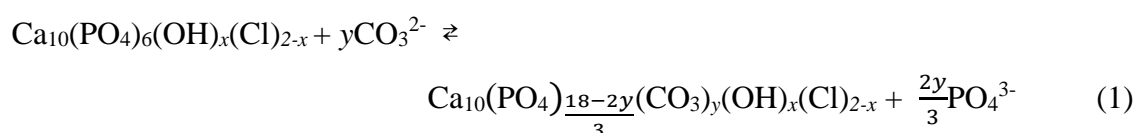
Fig. 13 安定性試験後 ClAp の ATR-IR スペクトル
サンプル名の意味は Fig. 12 に示したものと同一

Figs. 13a - d は、安定性試験前後の ClAp の ATR-IR スペクトルを示す。Form A (Figs. 13a, c)では、870 および 1420 - 1560 cm^{-1} の IR バンドは、それぞれ $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ 、 $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ に由来する。³²⁻³⁴⁾ また、1650 および 3325 cm^{-1} の IR バンドは、吸着水に起因する。これらのバンドは、純水中と SBF 中のいずれにおいても減少した。この結果は、Form A が含有する炭酸イオンが放出されたことを示しており、保存中に Form A の結晶性が増加したことを示す。

一方、Form B では 1420 - 1560 cm^{-1} の $\nu_2\text{CO}_3^{2-}$ および 3325 cm^{-1} 付近の吸着水の IR バンドは観察されなかった (Fig. 13d)。Form B は、1 段階合成法により合成されており、 CO_3^{2-} の混入はほぼないと考えられる。また、1050 cm^{-1} の $\nu_3\text{PO}_4$ の IR バンドの高さは減少し

た (Fig. 13b)。この結果は、PXRD の結果でも示されているように、安定性試験の過程で Form B の結晶性が低下したことを意味する。

安定性試験において、炭酸の混入が確認された Form A は式(1)および(2)に示すような平衡にあると考えられる。Fig. 13 c より、 $\nu_3\text{CO}_3^{2-}$ の IR バンド(1420 - 1560 cm^{-1})が減少しているので、Form A では式(1)の左側に向かって平衡が移動したと考えられる。純水中保存した Form A (Form A-W-7 d)において、式(1)右式の PO_4^{3-} は式(2)で示すように、わずかに溶解した Form A から供給される。



4.4.4. 組成

Table 5 安定性試験後の合成 ClAp 組成

Sample	Ca ²⁺	PO ₄ ³⁻	Cl ⁻	Ca/P	Ca/Cl
Form A	4.81	2.78	0.727	1.73	6.62
Form A-S-7d	6.23	2.94	0.617	2.12	10.1
Form A-W-7d	4.87	2.87	0.570	1.69	8.54
Form B	4.99	3.04	0.767	1.64	6.50
Form B-S-7d	6.12	3.13	0.743	1.96	8.24
Form B-W-7d	5.15	3.06	0.615	1.68	8.38

サンプル名の意味は Fig. 12 に示したものと同一

3.2.4 節で述べた方法で安定性試験前後の Form A および Form B の Ca²⁺, PO₄³⁻, Cl⁻組成を決定した。Table 5 に、モル分率として得られた組成値と、Ca/P と Ca/Cl の物質質量比を示す。Form A の Ca/P 比は、SBF 中での安定性試験の間に増加した。これは、SBF 中の Ca²⁺が Form A に導入されたためと考えられる。対して、Form A の Ca/P 比は、純水中保存後に僅かに減少した。これは 4.4.3 節で述べたように Form A 中の CO₃²⁻が純水中へと移動し、そこへ PO₄³⁻が入ったためと考えられる。Form A の Cl 含有量は、Form A から周囲溶液への Cl⁻の移動により、SBF 中と純水中の両方で減少した。SBF 中への Cl⁻の移動量が少なかった理由は、SBF 中には初めから Cl⁻が含まれているため、その分、Cl⁻の移動量が少なくなったためと考えられる。

SBF 中での安定性実験の過程で、Form B の Ca/P 比は、Form A と同じく大きく増加した。一方、純水中においては、その比はわずかな増加にとどまった。また、Cl⁻の含有量はいずれの溶液中においても減少した。Form B の Cl⁻の減少は、Form A の場合と同様に、純水中よりも SBF 中の方で小さかった。これは SBF 中に元々含まれる Cl⁻ (148.8 mmol/L)のため、Form B からの Cl⁻の放出が抑制されたことによると考えられる。

4.5. SEM 画像

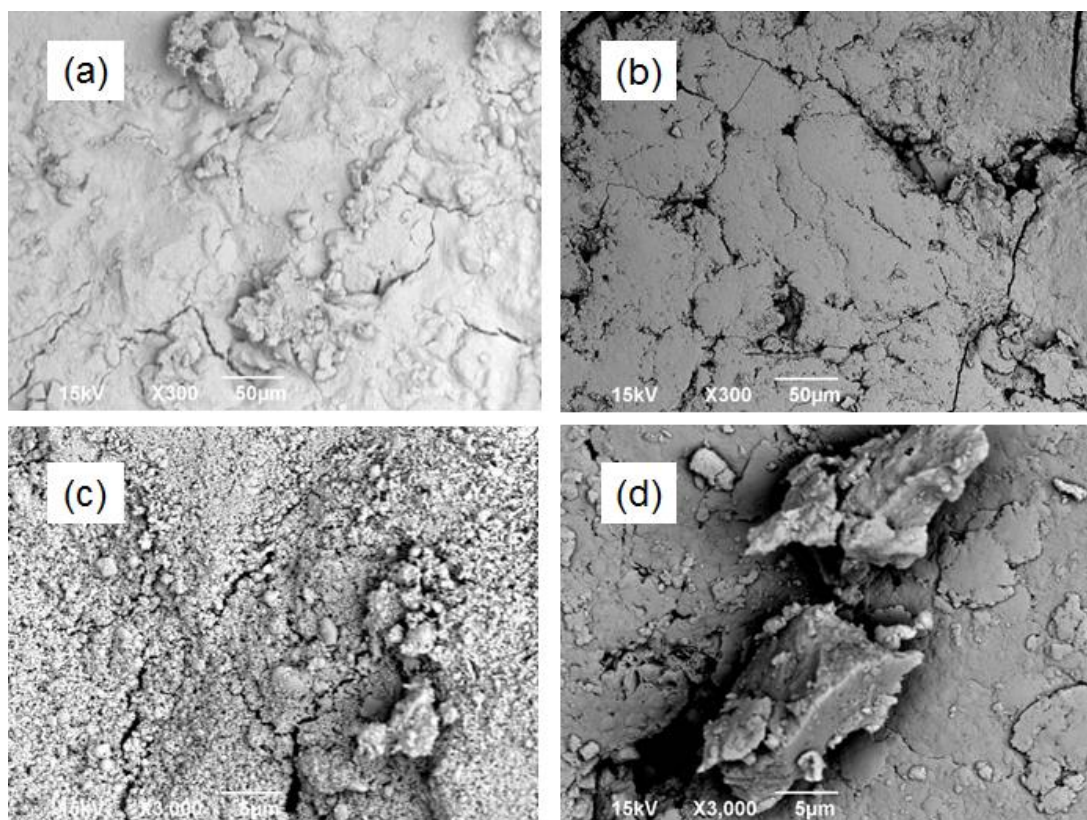


Fig. 14 合成 CIAP の SEM 画像

- (a) Form A (純水中 2 日間保存) (×300) (b) Form B (純水中 2 日間保存) (×300)
(c) Form A (SBF 中 2 日間保存) (×3000) (d) Form B (SBF 中 2 日間保存) (×3000)

Figs. 14a - d は、合成 CIAP の SEM 画像を示す。Form A の表面は粗い状態であり、これは炭酸イオンの混入により非晶質相が形成されたことを示唆している。対照的に、炭酸イオンを含まない Form B の表面はより滑らかだった。

5. 小括

広く使用されている生体材料である HAp よりも溶解性の高い ClAp を、遊星型ボールミルを使用して DCPD, CaO, CaCl₂ からメカノケミカル合成した。生成物を、粉末 X 線回折法, 全反射減衰赤外分光法, キレート滴定法および分光光度測定法によって評価した。生成された ClAp の組成は, 合成方法によって異なった。DCPD と CaO から非晶質リン酸カルシウムが形成された後に CaCl₂ を添加すると, 生成物 (Form A) には炭酸イオンと水が混入した。一方, 1 段階合成法で得られる ClAp (Form B) は高結晶性を有した。安定性試験の結果より, 炭酸イオンが, 純水および SBF に浸された ClAp の挙動に影響することが示された。ATR-IR スペクトルと PXRD パターンの両方を測定することにより, 結晶の構造を詳細に分析できる。以上の研究により, ClAp の合成にメカノケミカル合成が応用できること, ATR-IR と PXRD の組み合わせが, ClAp の結晶性評価にも有効であることがわかった。これらの知見を元に ClAp の生体反応性をさらに向上させた亜鉛クロロアパタイト (ZnClAp) の合成を検討した。次章では, その結果, すなわち ZnClAp のメカノケミカル合成とその結晶性評価について述べる。

第2章 亜鉛クロロアパタイトのメカノケミカル合成 と全反射減衰赤外分光法によるその結晶性評価

6. 序論

Zn^{2+} は、骨芽細胞のはたらきを促進し、破骨細胞のはたらきを抑制することによって、骨形成および骨吸収を調節する。そのため、 Zn^{2+} を導入した亜鉛アパタイト (ZnHAp) は、HAp や前章で述べた ClAp よりも良好な骨代謝能を有することが期待される。⁴³⁾ 実際、ZnHAp は *in vitro* 細胞培養試験において、HAp よりも優れた生物活性を示すことが報告されている。⁴⁴⁾ 従って、亜鉛クロロアパタイト (ZnClAp) は、HAp さらには ClAp よりも優れた溶解性と骨代謝能を併せ持つと期待できる。そこで $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ (DCPD), CaO, $CaCl_2$, ZnO を出発原料とし、4種類の粉液比のもとで ZnClAp をメカノケミカル合成した。⁴⁵⁾ メカノケミカル合成は、遊星型ボールミルを用いて行った。得られた ZnClAp をゴム製の型に流し込み、相対湿度 100%, 37 °C の条件下で7日間保存し、成型した。成型した ZnClAp を、全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法と粉末 X 線回折 (PXRD) 法により測定し、前者のデータをもとに主成分分析によって結晶性を評価した。

7. 試薬および実験方法

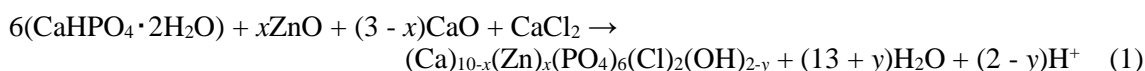
7.1. 試薬

DCPD, CaO, ZnO は, 和光薬品株式会社 (大阪)から, CaCl₂ は関東化学株式会社 (東京)から, HAp は新田ゼラチン株式会社 (大阪)から購入した。実験に供した水は逆浸透水をさらに Arium 611 DI 超純水製造装置で脱イオンした超純水である。本研究で使用した他の試薬は分析試薬等級のものであり, さらなる精製を行うことなく使用した。

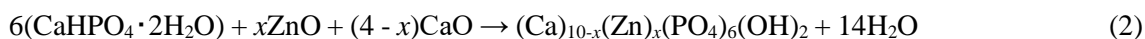
7.2. 実験方法

7.2.1. メカノケミカル合成法

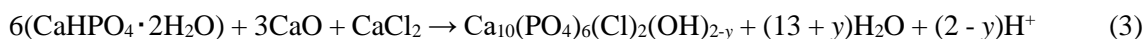
合成法 1 Product A : ZnClAp : 原材料である DCPD, CaO, ZnO, CaCl₂ と H₂O を遊星型ボールミル (Pulverisette 7, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Germany)のメノウ製ポッドに入れた。Ca と Zn, (Ca + Zn)と P の物質質量比は, それぞれ 19 : 1 と 1.67 : 1 に調整した。出発物質と H₂O は, 0.5, 0.75, 1.0, および 1.2 mL/g の粉液比で練合した。原料は, 1000 rpm の回転速度で, 回転 (30 分)と休止 (30 分)を 1 セットとし, 12 セット繰り返しながら計 12 時間混合粉碎した。得られた生成物を, ゴム製の型 (直径 6 mm, 高さ 4 mm)に注ぎ, 乾燥オーブン(MOV-112, 三洋電機株式会社, 大阪)で 37 °C で 24 時間乾燥させた。合成法 1 の反応式は式(1)のように表わされる。



合成法 2 Product B : ZnHAp : DCPD, CaO, ZnO を出発物質とした。Ca/Zn 比および (Ca + Zn)/P 比は, 合成法 1 におけるそれぞれの比と同じであり, 粉液比 1.0 mL/g のもとで練合した。混合は, 回転 (1000 rpm, 30 分)と休止 (30 分)のセットを 24 セット, 計 24 時間繰り返した。生成物をゴム製の型に流し込み, Product A と同じ条件で乾燥させた。合成法 2 の反応式は, 式(2)のように表わされる。



合成法 3 (ClAp)²³⁾ : DCPD, CaO, CaCl₂, および H₂O 純水の混合物 (Ca/P 比 : 1.67, 粉液比 : 0.5 mL/g)を遊星型ボールミルを用いて反応させた。合成および乾燥の条件は、合成法 1 と同じである。合成法 3 の反応式は、式(3)のように表わされる。



7.2.2. 粉末 X 線回折 (PXRD)法

合成したサンプルを PXRD 法で分析した。測定条件は 3.2.2 節で述べた条件と同じである。サンプルの格子定数も同じく PXRD の結果より計算した。

7.2.3. 全反射赤外減衰分光 (ATR-IR) 法

合成したサンプルを ATR-IR 法で分析した。測定条件は 3.2.3 節で述べた条件と同じである。

7.2.4. 定量分析

合成したサンプルのカルシウムイオン、亜鉛イオン、リン酸イオン、塩化物イオンを 3.2.4 節で述べた定量分析法により定量した。なお、カルシウムイオンと亜鉛イオンはキレート滴定法により定量した。

7.2.5. 走査電子顕微鏡(SEM)

合成したサンプル表面状態を SEM により観察した。観察条件は 3.2.5 節で述べた条件と同じである。

7.2.6. 高湿度条件下保存試験

合成したサンプルを、37 °C, 相対湿度 100%で 7 日間保存した。保存後、サンプルは 37°C で 24 時間乾燥した。

7.2.7. X線コンピュータ断層撮影 (X線 CT)法

X線 CT法は、はじめて非侵襲的に人体の内部構造を断層画像として映像化した医療用診断方法である。人体を横断する一平面に対し、いろいろな角度からX線を当て、身体の横断画像をコンピュータで処理し、最終的に三次元の画像を得ることも可能である。画像化には、人体組織によって放射線の吸収率に違いがあることを利用している。骨は特にX線の吸収率が高い。このことを利用して、脳外科、整形外科などの医療の現場では、骨損傷の診断や手術支援に使われている。

X線 CTの測定には、SkyScan 1176 高解像度 X線マイクロ CT システム (Bruker microCT, Kontich, ベルギー)を用いた。測定条件は以下の通りである。フィルター設定なし、電圧：40 kV、電流：600 μ A、ピクセルサイズ：35 μ m。また、X線 CTソフトウェア (CT Analyser, ver. 1.15.4.0, Bruker microCT, Kontich, ベルギー)を使用して、気孔率、質量、体積、密度を計算した。

7.2.8. 主成分分析 (PCA; Principal components analysis)

PCAは、非線形反復部分最小二乗 (NIPALS; Nonlinear Iterative Partial Least Squares)アルゴリズムに基づくケモメトリックソフトウェア (The Unscrambler, ver.10.4, CAMO, ノルウェー)を使用してATR-IRスペクトルに適用した。NIPALSアルゴリズムは、固有ベクトルを求めるために広く使用されるアルゴリズムの1つである。⁴⁶⁾ スペクトル変数には、600 - 4000 cm^{-1} の範囲で得られた合計7056個のデータを選択した。

8. 結果・考察

8.1. PXRD

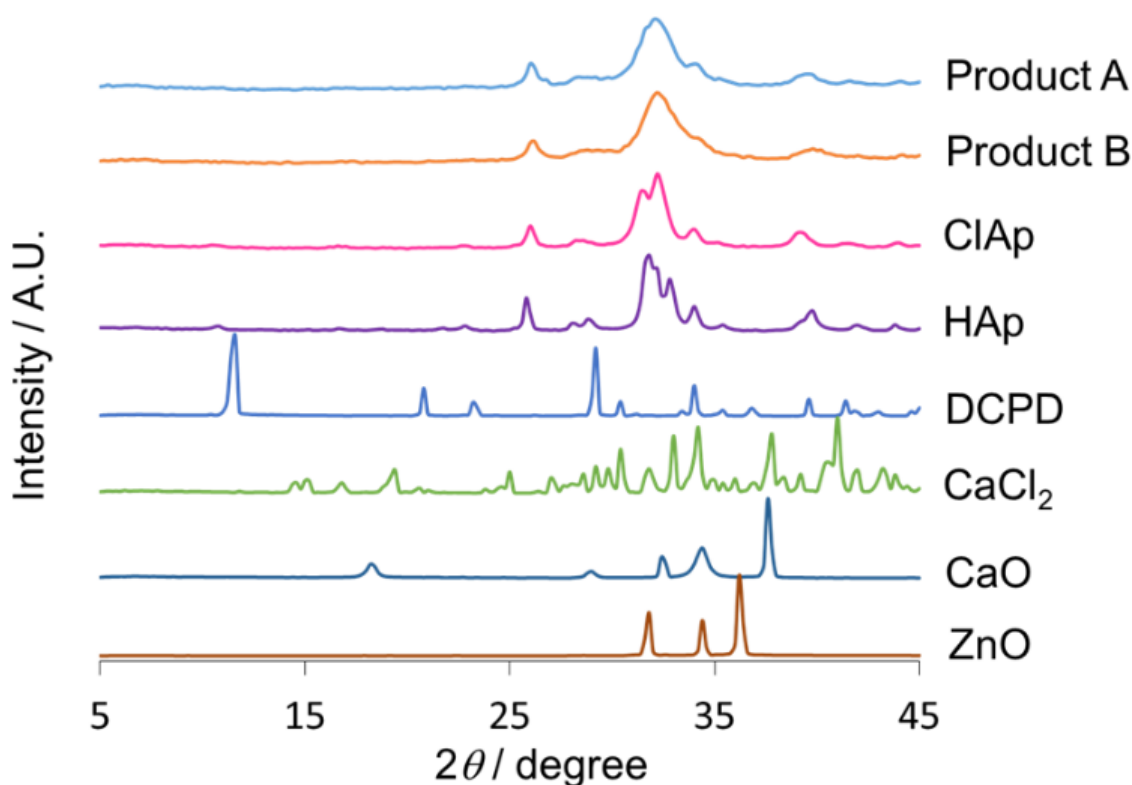


Fig. 15 合成サンプルと参照物質の PXRD パターン

Products A と B はそれぞれ合成法 1 と 2 で合成された (粉液比 : 1.0 mL/g)

Fig. 15 に、合成サンプル (Product A, Product B) と参照物質 (ClAp, HAp, DCPD, CaCl₂, CaO, ZnO)²³⁾ の PXRD パターンを示す。生成したサンプルは、26.0°, 32.2°, および 39.6° に特徴的ピークを示し、ミラー指数はそれぞれ(0.0.2), (1.1.2), および(3.1.0)^{47,48)}である。これらのピークは、25.8°, 31.8°, 32.2°, 32.8°, および 39.8° に特異的ピークを示す HAp 構造を生成物が有していることを意味する。HAp 中の Ca²⁺が他の 2 価陽イオン (本研究では Zn²⁺)で置換されると、HAp ピークがわずかにシフトすることが報告されている。⁴⁹⁾ また、格子定数も 2 価陽イオンの影響を受ける。合成されたサンプルからは、DCPD, CaCl₂, CaO, ZnO のピークは検出されなかった。これらの結果は、本法のメカノケミカル合成法によって、出発材料から ZnClAp (Product A) および ZnHAp (Product B) が合成できることを示している。

格子定数は、5.0 - 45.0°の範囲のPXRDの結果から計算した。HApの結晶構造は六方晶系に属し、六方晶系の格子定数 (a , b , c)の関係は、 $a = b \neq c$ ⁵⁰⁾である。合成されたZnClAp, ZnHAp, ClAp, HApの格子定数は、 a 軸でそれぞれ9.429, 9.252, 9.526, 9.410 Å, c 軸で6.842, 6.850, 6.832, 6.809 Åだった。ZnClApの a 軸格子定数は、ZnHApおよびHApの格子定数よりも大きかった。これは、ZnClAp結晶中にCl⁻が存在するためである。すなわち、Cl⁻の結晶イオン半径 (1.81 Å)はOH⁻の結晶イオン半径 (1.35 Å)よりも大きく、その結果、4.4.2節で述べたように格子定数が増加する。同様に、ZnClApとClApとの間の a 軸格子定数の差 (9.429 Å および 9.526 Å)も、Zn²⁺の結晶イオン半径 (0.74 Å)がCa²⁺の結晶イオン半径 (0.99 Å)⁴²⁾よりも小さいことから説明できる。

8.2. ATR-IR

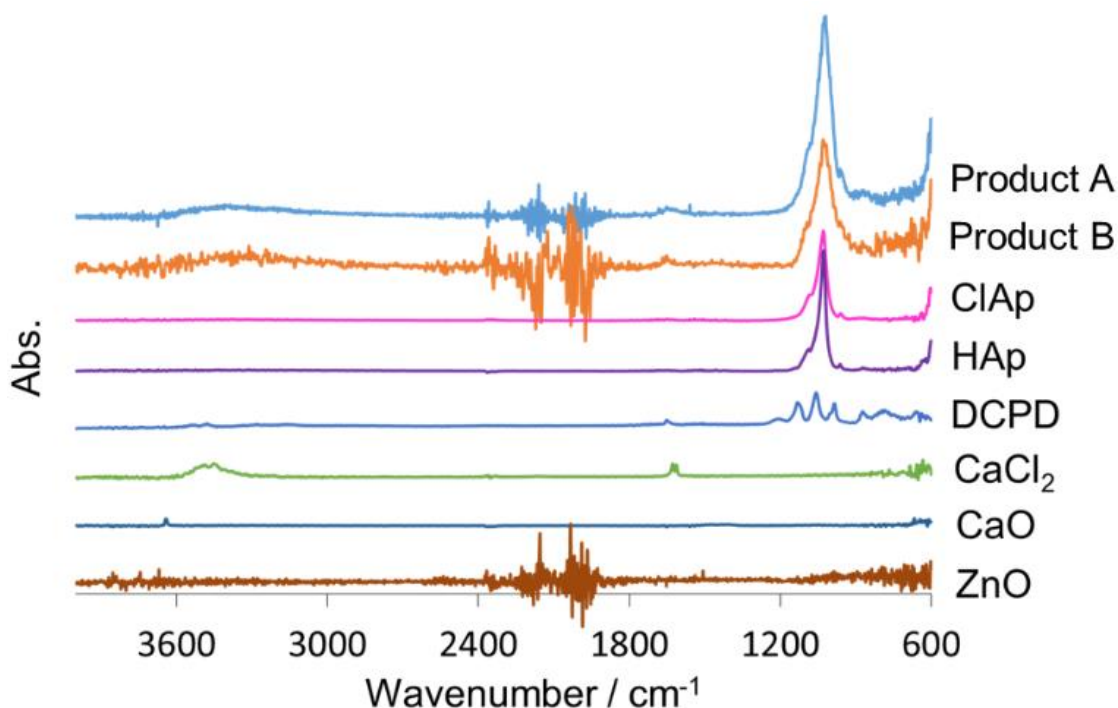


Fig. 16 合成サンプルと参照物質の ATR-IR スペクトル

サンプル名の意味は Fig. 15 に示したものと同一

Fig. 16 に、合成サンプルと参照物質の ATR-IR スペクトルを示す。生成物は、HAp 構造に典型的な 600 および 1021 cm⁻¹ のピーク^{43-45,51)}を示した。各ピークは $\nu_4\text{PO}_4$ および $\nu_3\text{PO}_4$ 由来のバンドに帰属する。1590 - 1700 cm⁻¹ および 3000 - 3600 cm⁻¹ の範囲で、吸着水の広いバンドも観察された。この水は、CaCl₂ の結合水および出発原料に加えられた水から供給されたと考えられる。合成したサンプルは 37°C で 24 時間乾燥したが、吸着水は除去しきれなかった。これらの結果は、ZnClAp (Product A) および ZnHAp (Product B) が本合成法によって合成でき、生成物には少量の H₂O が含まれていることを示している。H₂O は HAp ベースの生体材料の物理化学的特性 (結晶性、溶解度など) に影響を及ぼし、その結果、生体適合性が変化する。

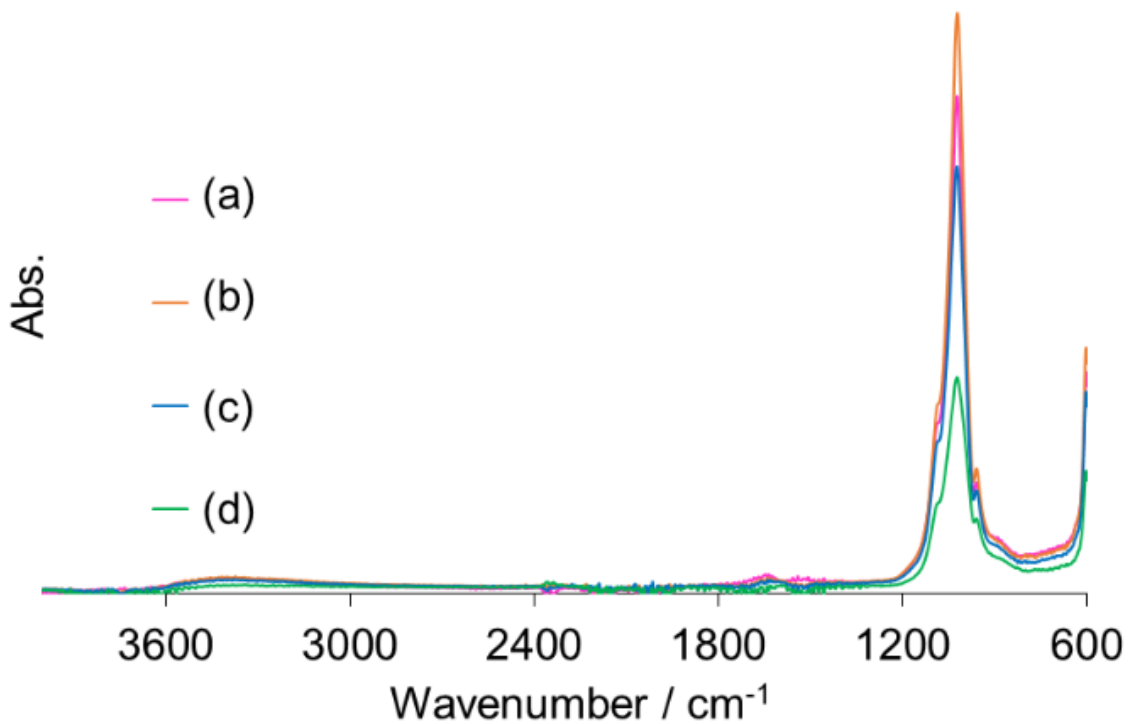


Fig. 17 合成 ZnClAp の ATR-IR スペクトル (300 °C 1 時間乾燥).
粉液比 : 1.2 (a), 1.0 (b), 0.75 (c), 0.5 mL/g (d)

Fig. 17 に、300°C で 1 時間乾燥した合成 ZnClAp の ATR-IR スペクトルを示す。乾燥後、1590 - 1700 cm^{-1} および 3000 - 3600 cm^{-1} の範囲の吸着水の IR バンドが減少した。この結果は、吸着水が除去されたことを示している。また、ZnClAp (b) (粉液比 : 1.0 mL/g) は、1021 cm^{-1} で最も高い $\nu_3\text{PO}_4$ ピークを示した。対照的に、ZnClAp (d) (粉液比 : 0.5 mL/g) は、最も低い $\nu_3\text{PO}_4$ ピークを示した。

8.3. 組成

定量分析によって決定された合成 ZnClAp の組成は、 $\text{Ca}^{2+} + \text{Zn}^{2+}$ 、 PO_4^{3-} 、 Cl^- のモル分率が、それぞれ 4.82, 2.83, 0.565 だった。カルシウムと亜鉛の合計とリンの物質質量比 ($(\text{Ca}^{2+} + \text{Zn}^{2+})/\text{P}$)、塩素の物質質量比 ($(\text{Ca}^{2+} + \text{Zn}^{2+})/\text{Cl}$) は、それぞれ 1.70 と 8.54 だった。これらの値は、ZnClAp の理想値 (1.67, 5.00) から逸脱している。これは副産物として HAp が生成したことにより、ZnClAp のリン酸イオンの置換が起こったことが原因であると考えられる。

8.4 高湿度保存試験

8.4.1. PXRD

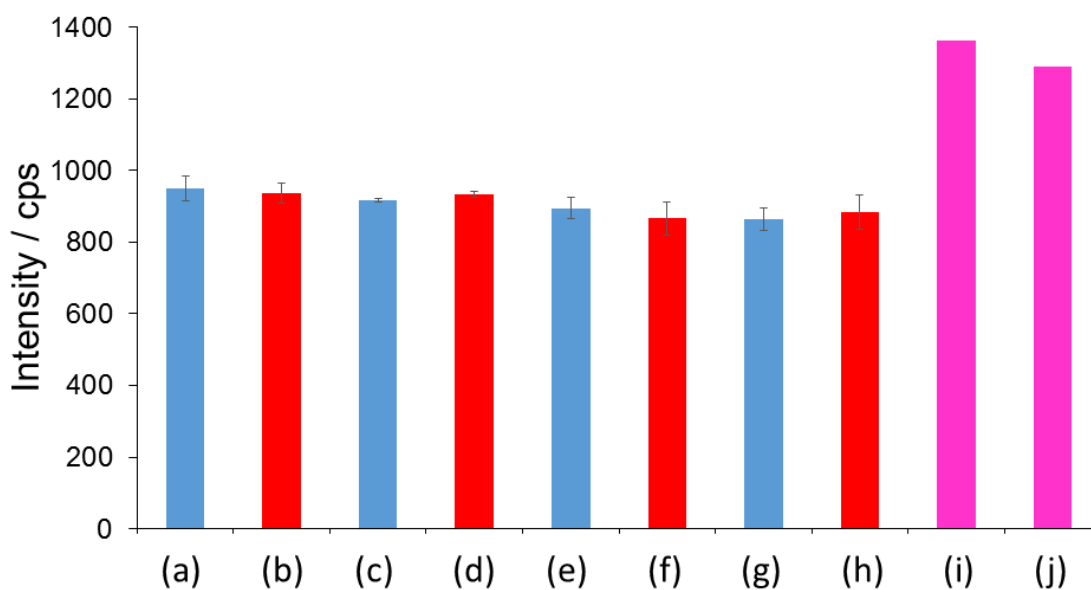


Fig. 18 PXRD 強度 ($2\theta = 32.2^\circ$) (ZnClAp (a-h), ClAp (i), HAp (j))

青線 (a, c, e, g) と赤線 (b, d, f, h) はそれぞれ保存前後の強度を示す
粉液比 : 1.2 (a, b), 1.0 (c, d), 0.75 (e, f), 0.5 mL/g (g, h).

Fig. 18 に、高湿度条件下保存試験 (37°C, 相対湿度 100%, 7 日間)前後の合成 ZnClAp の 32.2° (2θ)における PXRD 強度を示す。37°C で乾燥し高湿度保存していない ClAp (i) および HAp (j)の強度も参照として示す。サンプルの結晶性は高湿度保存後も保持されたが、ClAp および HAp の結晶性よりも低かった。Zn²⁺などの 2 価陽イオンは HAp の結晶成長を抑制する。⁵²⁾ よって、合成 ZnClAp の低い結晶性も、Zn²⁺による結晶成長抑制効果に起因すると考えられる。

8.4.2. ATR-IR

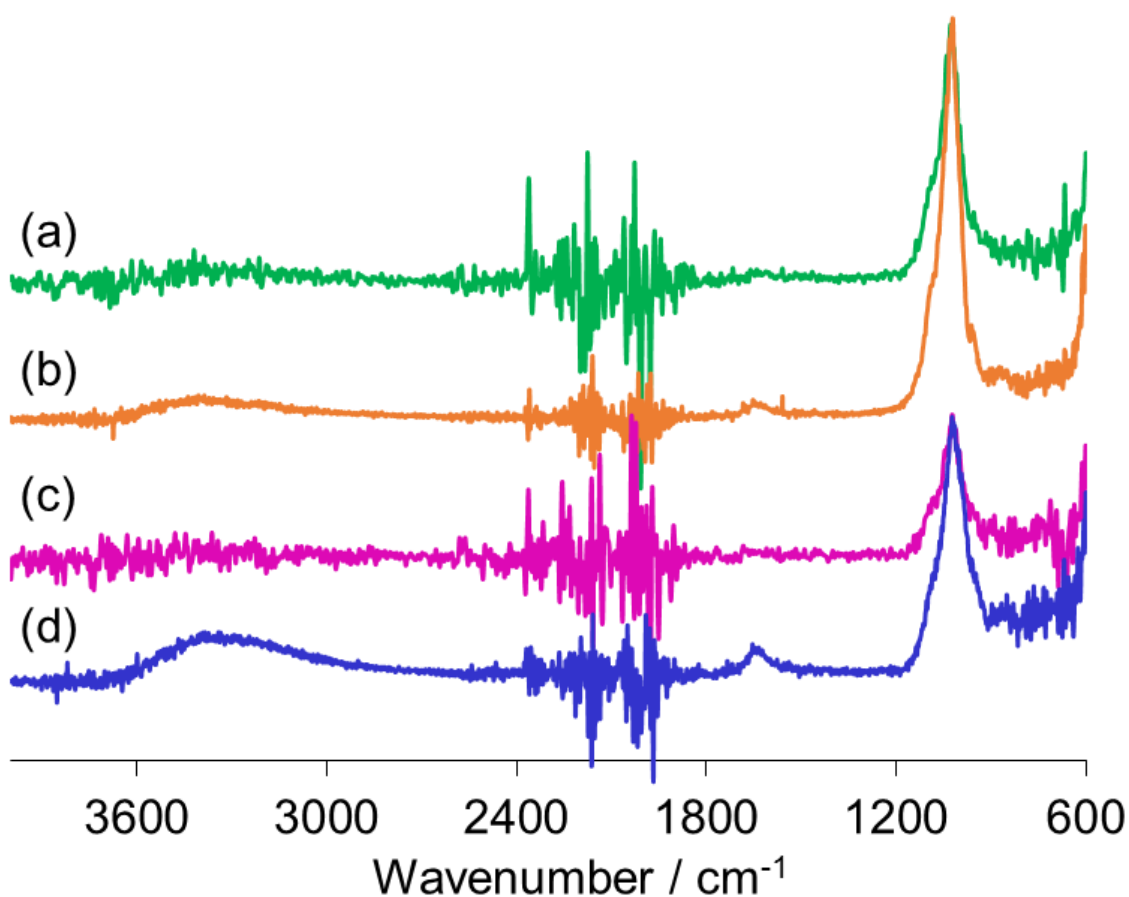


Fig. 19 高湿度条件下保存試験前後の ZnClAp の ATR-IR スペクトル
(a) 保存後 ZnClAp 粉液比 : 1.2 mL/g, (b) 保存前 ZnClAp 粉液比 : 1.2 mL/g
(c) 保存後 ZnClAp 粉液比 : 0.5 mL/g, (d) 保存前 ZnClAp 粉液比 : 0.5 mL/g

Fig.19 に、高湿度条件下保存試験前後の合成 ZnClAp の ATR-IR スペクトルを示す。PXRD の結果では見られなかったが、ATR-IR の結果は、高湿度保存中における結晶性のわずかな変化を示した。保存中、1021 cm⁻¹における $\nu_3\text{PO}_4$ の IR バンドは減少し、ZnClAp の結晶性が低下していた。また、1650 および 3300 cm⁻¹ 付近の吸着水の IR バンドも保存後に減少した。この結果は、高湿度保存中に吸着水が ZnClAp から放出されたことを示す。

8.5. SEM 画像

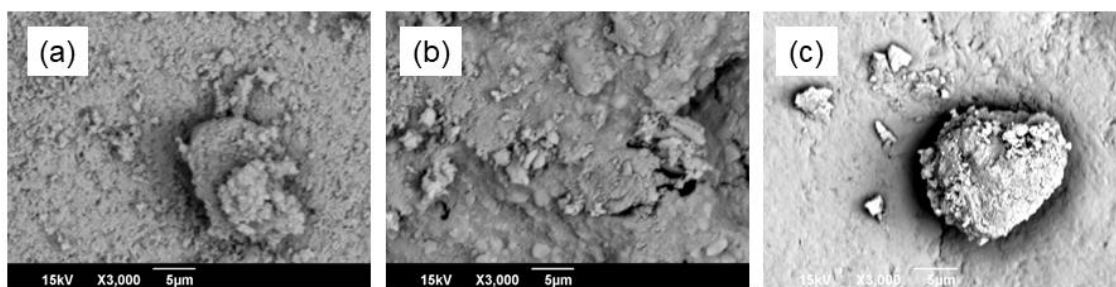


Fig. 20 合成 ZnClAp (a, b), ClAp (c)の SEM 画像

粉液比 : 1.0 (a), 0.5 (b) mL/g

Fig. 20 に、合成 ZnClAp (a, b)および ClAp (c)の SEM 画像を示す。ZnClAp (a, b)の表面は、ClAp (c)の表面とは対照的に粗い。8.1 節で述べたように、 Zn^{2+} のイオン半径は Ca^{2+} のイオン半径よりも小さい。 Zn^{2+} による結晶成長抑制に加えて、 Zn^{2+} と Ca^{2+} の間の結晶イオン半径の違いは、ZnClAp 表面の粗さにも影響する可能性がある。

8.6. X線CT

8.6.1. CT画像

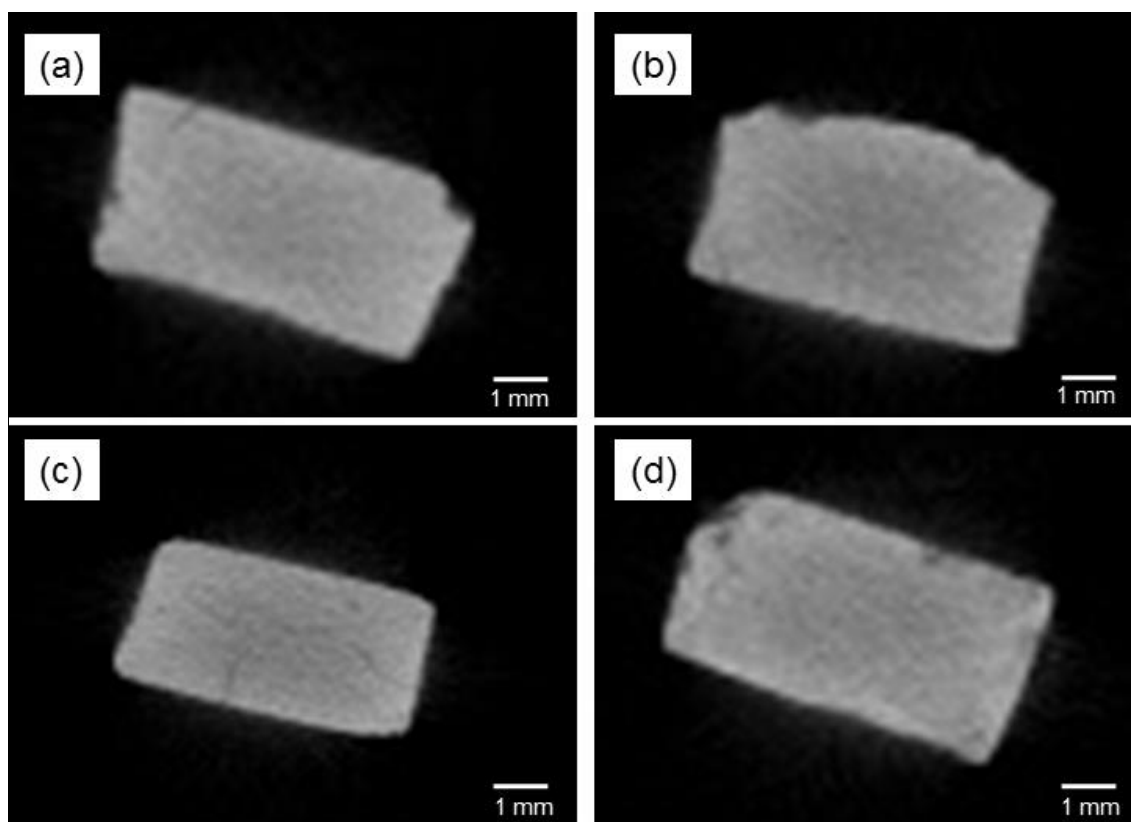


Fig. 21 高湿度条件下保存試験後 ZnClAp X線CT画像
粉液比 : 1.2 (a), 1.0 (b), 0.75 (c), 0.5 mL/g (d)

Fig. 21 に、高湿度保存後の合成 ZnClAp を X 線 CT 撮影した画像を示す。内部に亀裂は観察されなかった。X 線 CT は、X 線の透過性の違いにより断層像を得る検査法である。X 線を透過しやすい (吸収率が低い) 水や空気は黒く、通しにくい (吸収率が高い) 骨 (カルシウム) は白く、その中間は灰色として表示される。画像より、気相と接する表面部は、サンプル内部よりも白色が強く観察された。画像の白い部分は、サンプルの密度が高い領域である。サンプル中心部は表面部よりも灰色であった。この結果は、メカノケミカル合成された ZnClAp の結晶性が、内部よりも表面で高いことを示す。8.4.1 節に述べた PXRD 法の結果では、保存試験前後のサンプルの PXRD 強度に大きな差は認められなかった。X 線 CT 画像は、PXRD 法では確認できなかったサンプル内の僅かな結晶性の偏りを示した。

8.6.2. CT Analyser (CTAn)による測定

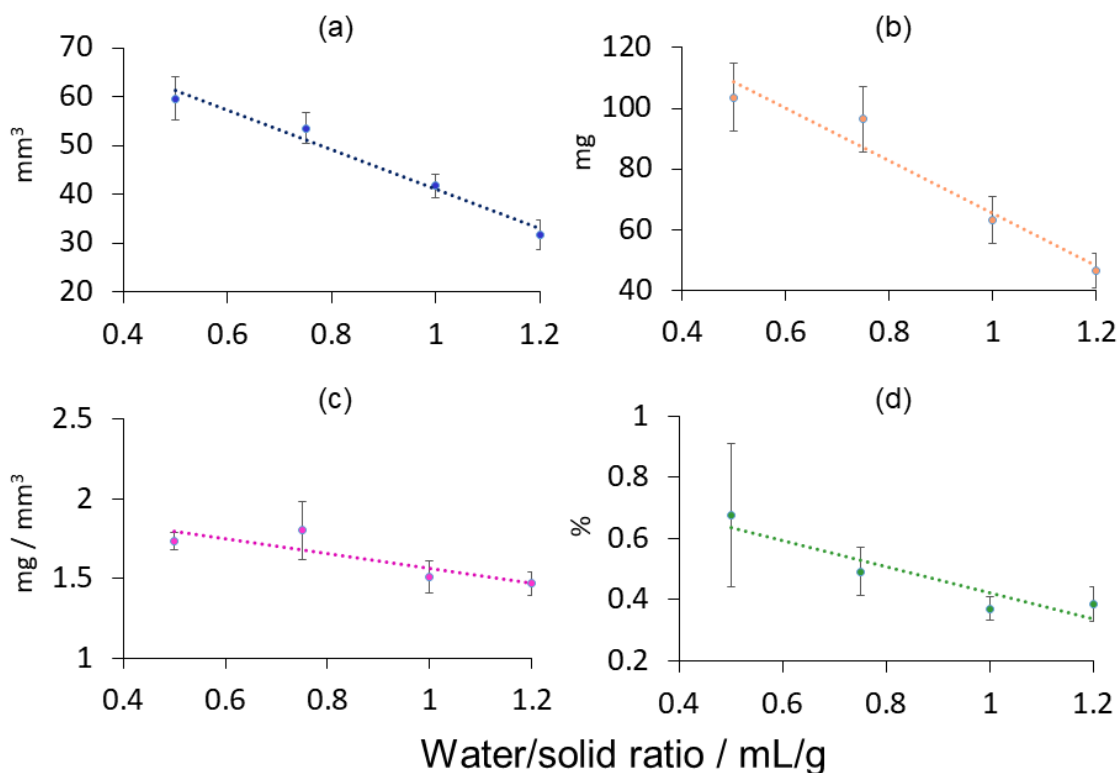


Fig. 22 高湿度条件下保存試験後 ZnClAp の体積 (a), 質量 (b), 密度 (c), 気孔率 (d)

Fig. 22 に、高湿度保存後の ZnClAp の体積 (a), 質量 (b), 密度 (c), および気孔率 (d) を示す。すべての値は、粉液比の増加とともに減少した。HAp の密度が低いほど、HAp の溶解性が高くなる。⁵³⁾ 気孔率の高さは骨置換の促進に繋がるが、HAp の機械的強度は低下する。⁵⁴⁾ これらの結果は、粉液比を変化させることにより、意図した特性を持つ ZnClAp を合成できることを示唆している。

8.7. 主成分分析

Table 6 累積寄与率

	PC-1	PC-2	PC-3
Calibration	75.26	86.58	89.22
Validation	76.61	85.42	87.25

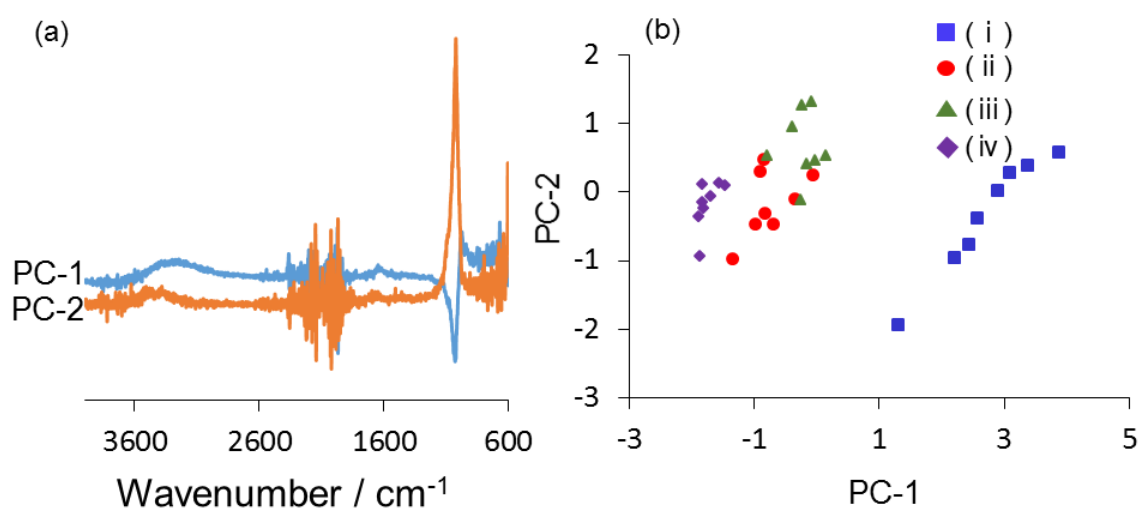


Fig. 23 PCA による計算結果 Loadings (a), Score (b)

粉液比 : 0.5 (i), 0.75 (ii), 1.0 (iii), 1.2 mL/g (iv)

ZnClAp の IR スペクトルの結果に PCA⁵⁵⁻⁵⁷⁾ を適用した。分析によって得られた累積寄与率を Table 6 に示す。累積寄与率の増加値は、PC-1 から PC-2 への 8.81% に対して、PC-2 から PC-3 は 1.83% と低いため、PC-2 を主成分として選択した。

Fig. 23a に Loadings の結果を示す。Fig. 16 に示した ATR-IR スペクトルを参照することにより、PC-2 が ZnClAp の ATR-IR スペクトルに対応すると判断できる。一方、粉液比のみがサンプル間で変化しているため、PC-1 は ATR-IR スペクトルに対する粉液比の影響を示すと考えられる。粉液比は、H₂O ピーク (1624, 3000 - 3500 cm⁻¹) および ν₃PO₄³⁻ ピーク (1021 cm⁻¹) に影響した。ピーク変化量は後者の方が大きい。ν₃PO₄³⁻ ピーク強度は、ZnClAp の濃度および結晶性に比例する。

Fig. 23b に、PC-2 と PC-1 の Score の関係を示す。サンプルは、i とその他 (ii-iv) の 2 つのグループに分類できる。i の PC-1 は正であり、これは粉液比が低いことを意味する。一方、i の PC-2 は負であり、 $\nu_3\text{PO}_4^3$ ピークの減少を意味する。すなわち、ZnClAp の結晶性は、粉液比の減少と共に低くなっている。一方、ii-iv の PC-1 は負であり、PC-2 は i と比較して正の傾向を示した。これは粉液比 0.75 - 1.2 mL/g の場合、粉液比が高いほど結晶性が高くなることを意味する。以上の結果は、ZnClAp の結晶成長を促進するために、一定量以上の水が必要であることを示している。PXRD の結果 (8.4.1 節) で、粉液比と ZnClAp の結晶性との間に明確な関係を見出すことはできなかった。これに対して、PCA を適用することにより結晶性に対する粉液比の影響を明らかにすることができた。したがって、PCA は、高結晶性 ZnClAp を得るために最適な粉液比を知るのに有用であると考えられる。

9. 小括

骨治療への利用に有望な材料である亜鉛クロロアパタイト(ZnClAp)を、メカノケミカル合成法により合成した。出発物質 ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaO , ZnO , CaCl_2)を、遊星型ボールミルで4種類の粉液比で水と練合した。得られた生成物を、PXRD法およびATR-IR法によって評価した。PXRDおよびATR-IRの結果は、ZnClApが本研究の方法で合成されたことを示した。定量分析によって、合成ZnClApは副産物としてHApを含んでいることがわかった。高湿度条件下での保存試験の前後において、合成ZnClApのPXRDおよびATR-IRの結果に大きな差異は確認されず、合成ZnClApはその結晶性を保持していた。また、ATR-IRスペクトルに適用された主成分分析(PCA)によって、ZnClApの結晶成長促進には、最適な粉液比が存在することが明らかとなった。このことからPCAは、高結晶性ZnClA合成に最適な粉液比の予測に適用できると考えられる。本法のメカノケミカル法は簡便かつ経済的であり、ZnClApの合成に有用であると結論できる。

第3章 総括

ハイドロキシアパタイト(HAp)に Cl を導入したクロロアパタイト ($(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$; ClAp)は溶解性上昇による骨置換能の向上が期待できる。一方, Zn^{2+} を導入した亜鉛アパタイト($(\text{Ca}_{10-x}(\text{Zn})_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; ZnHAp)は, 骨芽細胞による骨形成を促進し, 破骨細胞による骨吸収を抑制する。両イオンを含む亜鉛クロロアパタイト ($(\text{Ca}_{10-x}(\text{Zn})_x(\text{PO}_4)_6(\text{Cl})_2$; ZnClAp)は, 両者の特徴を併せ持つと予想される。そこで本研究は, HAp よりも反応性, 生物活性の高い ZnClAp を簡便かつ経済的に合成する方法を確立することを目的とした。この目的のために, メカノケミカル合成法に着目した。生成物を粉末 X 線回折 (PXRD)法および全反射減衰赤外分光 (ATR-IR)法により解析し, その結晶性を評価した。

まず $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (DCPD), CaO , CaCl_2 を原料として, 遊星型ボールミルを用いる ClAp のメカノケミカル合成を検討した。DCPD と CaO から非晶質リン酸カルシウムが形成された後に CaCl_2 を添加する 2 段階合成法と, 最初からすべてを混合する 1 段階合成法の 2 種類を検討した。PXRD 法, ATR-IR 法, キレート滴定法および分光光度測定法による分析結果は, 合成物が ClAp であることを示した。その組成は, 合成方法によって異なり, 2 段階合成法では炭酸を含む低結晶性 ClAp が, 1 段階合成法では炭酸を含まない高結晶性 ClAp がそれぞれ得られた。*in vitro* 安定性試験後は, 低結晶性 ClAp の結晶性が上昇した。一方, 高結晶性 ClAp の結晶性は低下した。

ClAp 合成で得られた知見を参考に, ZnClAp のメカノケミカル合成を行った。出発物質 (DCPD, CaO , ZnO , CaCl_2) を, 4 種類の粉液比のもとで練合し, 合成物を得た。PXRD 法, ATR-IR 法, キレート滴定法および分光光度測定法の結果より, ZnClAp が合成されたことが確認できた。ATR-IR スペクトルに対して主成分分析 (PCA)を行った。結果, 粉液比が高いほど ZnClAp の $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ ピークも高くなること, ZnClAp の結晶成長を促進するためには最適な粉液比が存在することが明らかとなった。

本研究の結果から, メカノケミカル合成により HAp よりも反応性, 生物活性の高い ZnClAp が合成できることがわかった。PXRD 法, ATR-IR 法の組み合わせは, ZnClAp の結晶性評価に有効であった。PCA は, 高結晶性 ZnClAp 合成に最適な粉液比の予測を可能にすると考えられる。本法は, Zn^{2+} や Cl に限らず, さまざまなイオンの HAp への導入にも応用可能であると考えられる。反応性の高い HAp を簡便かつ経済的に合成できるならば, 再生医療発展への貢献が期待できる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御指導頂いた徳島大学大学院 医歯薬学研究部薬学域 分析科学分野の田中秀治 教授，竹内政樹 准教授，東京理科大学薬学部生命創薬科学科の大塚裕太 助教に感謝いたします。徳島大学大学院 医歯薬学研究部歯学域 生体材料工学分野の浜田賢一 教授には，遊星型ボールミルの使用許可および操作に関する御指導をいただきました。心より御礼申し上げます。有益な助言，激励の言葉を頂いた分析科学研究室の諸氏にも御礼申し上げます。

参考文献

1. 吉子裕二, 「骨と歯」, リンの事典, 朝倉書店, p. 88 (2017)
2. D. E. C. Corbridge, “Phosphorus”, 6th ed., CRC Press, Boca Raton, p. 925 (2013).
3. M., Jacho, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clin. Orthp.*, **157**, 259 (1981).
4. B. Ben-Nissan, G. Pezzotti, Bioceramics: processing routes and mechanical Evaluation, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **110**, 601 (2002).
5. S. Deville, E. Saiz, A. P. Tomsia, Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials.*, **27**, 5480 (2006).
6. E. Saiz, L. Gremillard, G. Menendez, P. Miranda, K. Gryn, A. P. Tomsia, Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C.*, **27**, 546 (2007).
7. 金澤孝文, 門間英毅, 「リン酸カルシウムの化学 アパタイトの組成・構造・物性, 最新の進歩 (1)」, 化学の領域, **27**, 662 - 673 (1973).
8. 金澤孝文, 梅垣高士, 徳永恭之, 木村陽一, 「湿式合成水酸アパタイトの酸溶解速度」, *Gypsum & Lime*, **153**, 53 - 60 (1978)
9. 金澤孝文, 梅垣高士, 近沢正敏, 永井正幸, 門間英毅, *Gypsum & Lime*, **167**, 158 (1980).
10. M.J.J.M. Van Kemenade, P.L. De Bruyn, *J. Colloid Interface Sci.*, **118**, 564 (1987).
11. J.C. Heughebaert, G.H. Nancollas, *J. Phys. Chem.*, **88**, 2478 (1984).
12. P. Luo, T. G Nieh, Synthesis of ultrafine hydroxyapatite particles by a spray dry method, *Mater. Sci. Eng. C.*, **3**, 75-78 (1995).
13. N., Matsuda, M., Aizawa, Classification of Phosphorus-containing Inorganic Compounds and Their Production *Phospho. Lett.*, **88**, 12 (2017).
14. V. I. Chissov, I. K. Sviridova, N. S. Sergeeva, G. A. Frank, V. A. Kirsanova, S. A. Achmedova, I. V. Reshetov, M. M. Filjushin, S. M. Barinov, I. V. Fadeeva, V. S. Komlev, Study of in vivo biocompatibility and dynamics of replacement of rat shin defect with porous granulated bioceramic materials, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 139 - 143 (2008).
15. B. Yilmaz, A. Z. Alshemary, Z. Evis, Co-doped hydroxyapatites as potential materials for biomedical applications, *Microchem. J.*, **144**, 443 - 453 (2019).
16. M. Yamaguchi, R. Yamaguchi, Zinc stimulates osteoblastogenesis and suppresses osteoclastogenesis by antagonizing NF- κ B activation, *Biochem. Pharmacol.*, **35**, 773 - 777 (1986).
17. A. Fahami, B. Nasiri-Tabrizi, G. W. Beall, B. Pingguan-Murphy, Effect of ion concentration on mechanosynthesis of carbonated chlorapatite nanopowders, *Mater. Lett.*, **146**, 16 - 19 (2015).
18. S. Chander, D.W. Fuerstenau, “Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite,” ed.

- by D.W. Misra, Plenum Press, New York, p. 29 - 49 (1984).
19. 金澤孝文, 門間英毅, 「リン酸カルシウムの化学 アパタイトの組成・構造・物性, 最新の進歩 (2)」, 化学の領域, **27**, 752 - 761 (1973).
 20. I. Demnati, D. Grossin, O. Marsan, G. Bertrand, G. Collonges, C. Combes, M. Parco, I. Braceras, J. Alexis, Y. Balcaen, C. Rey, Comparison of Physical-chemical and Mechanical Properties of Chlorapatite and Hydroxyapatite Plasma Sprayed Coatings, *Open Biomed. Eng. J.*, **9**, 42 - 55 (2015).
 21. M. Sopicka-Lizer, High-energy ball milling, mechanochemical processing of nanopowders, Woodhead Publishing, New York, p. 224 (2010).
 22. S. H. Rhee, Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment, *Biomaterials*, **23**, 1147 (2002).
 23. A. Ito, Y. Otsuka, M. Takeuchi, H. Tanaka, Mechanochemical synthesis of chloroapatite and its characterization by powder X ray diffractometry and attenuated total reflection infrared spectroscopy, *Coll. Polym. Sci.*, **295**, 2011 - 2018 (2017).
 24. A. Ito, Y. Otsuka, M. Takeuchi, H. Tanaka, Mechanochemical synthesis of zinc chloroapatite and evaluation of its crystallinity by attenuated total reflection - infrared spectroscopy and principal component analysis, *Phosphorus Res. Bull.*, **35**, 16 - 22 (2019)
 25. 伊藤 丹, 大塚裕太, 竹内政樹, 田中秀治 「クロロアパタイトおよび亜鉛クロロアパタイトのメカノケミカル合成」, 枯渇資源と技術開発, 国立大学法人徳島大学 産業院出版部, 33 - 37 (2020).
 26. H. Miura, CellCalc: a unit cell parameter refinement program on windows computer, *J. Cryst. Soc. Jpn.*, **45**, 145 - 147 (2003).
 27. 「リン酸イオン(PO_4^{3-})」, 工場排水試験方法 (JIS K 0102, 46.1)
 28. T. Okutani, Spectrophotometric study of the complex of Hg (II)-X-diphenylcarbazone [X: I, Br], *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **41**, 1728 - 1729 (1968).
 29. I. Hideaki, M. Muneo, K. Masa, Y. Takehiko, A new spectrophotometric method for the determination of chlorine-containing organic compounds using 1, 5-bis (6-methyl-4-pyrimidyl) carbazone, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 739 - 745 (1986).
 30. S. Padilla, R. Garcia-Carrodegua, M. Vallet-Regí, Hydroxyapatite suspensions as precursors of pieces obtained by gelcasting method, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **24**, 2223 - 2232 (2004).
 31. M. Ashok, S. N. Kalkura, N. M. Sundaram, D. Arivuoli, Growth and characterization of hydroxyapatite crystals by hydrothermal method, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **18**, 895 - 898 (2007).
 32. W. L. Suchanek, P. Shuk, K. Byrappa, R. E. Riman, K. S. TenHuisen, V. F. Janas, Mechanochemical-hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature, *Biomaterials*, **23**, 699 - 710 (2002).

33. A. Fahami, G. W. Beall, B. Nasiri-Tabrizi, B. Pingguan-Murphy, Effect of high-energy ball milling on the formation and microstructural features of carbonated chlorapatite nanopowders, *Ceram. Int.*, **41**, 4750 - 4758 (2015).
34. A. Fahami, B. Nasiri-Tabrizi, R. Ebrahimi-Kahrizangi, Mechano-synthesis and characterization of chlorapatite nanopowders, *Mater. Lett.*, **110**, 117 - 121 (2013).
35. H. R. Ramay, M. Zhang, Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods, *Biomaterials*. **24**, 3293 - 3302 (2003).
36. T. Yuasa, Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Takechi, Y. Momota, S. Tatehara, M. Nagayama, Effects of apatite cements on proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro, *Biomaterials*, **25**, 1159 - 1166 (2004).
37. G. Balasundaram, M. Sato, T. J. Webster, Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD, *Biomaterials*, **27**, 2798 - 2805 (2006).
38. A. Bernhardt, R. Dittrich, A. Lode, F. Despong, M. Gelinsky, Nanocrystalline spherical hydroxyapatite granules for bone repair: in vitro evaluation with osteoblast-like cells and osteoclasts, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **24**, 1755 - 1766 (2013).
39. R. A. Young, D. W. Holcomb, Role of acid phosphate in hydroxyapatite lattice expansion, *Calcif. Tissue Int.* **36**, 60 - 63 (1984).
40. H. J. M. Heijligers, F. C. M. Driessens, R. M. H. Verbeeck, Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and strontium hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.*, **29**, 127 (1979).
41. A. Peeters, E. A. P. De Maeyer, C. V. Alsenoy, R. M. Verbeeck, Solids modeled by ab initio crystal-field methods. 12. Structure, orientation, and position of A-type carbonate in a hydroxyapatite lattice, *J. Phys. Chem. B*, 101, 3995 - 3998 (1997).
42. Y. Q. Jia, Crystal radii and effective ionic radii of the rare earth ions, *J. Solid State Chem.*, **95**, 184 - 187 (1991).
43. W. L. Suchanek, P. Shuk, K. Byrappa, R. E. Riman, K. S. TenHuisen, V. F. Janas, Mechanochemical-hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature, *Biomaterials*, **23**, 699 - 710 (2002).
44. A. Fahami, G. W. Beall, B. Nasiri-Tabrizi, B. Pingguan-Murphy, Effect of high energy ball milling on the formation and microstructural features of carbonated chlorapatite nanopowders, *Ceram. Int.*, **41**, 4750 - 4758 (2015).
45. A. Fahami, B. Nasiri-Tabrizi, R. Ebrahimi-Kahrizangi, Mechano-synthesis and characterization of chlorapatite nanopowders, *Mater. Lett.*, **110**, 117 - 121 (2013).
46. H. Wold, E. Lyttkens, Nonlinear iterative partial least squares (NIPALS) estimation

- procedures, *Bull. Intern. Statist. Inst.: Proc.*, **37**, 1 - 15 (1969).
47. S. Padilla, R. García-Carrodeguas, M. Vallet-Regí, Hydroxyapatite suspensions as precursors of pieces obtained by gelcasting method, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **24**, 2223 - 2232 (2004).
 48. M. Ashok, S. N. Kalkura, N. M. Sundaram, D. Arivuoli, Growth and characterization of hydroxyapatite crystals by hydrothermal method, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **18**, 895 - 898 (2007).
 49. H. B. Pan, Z. Y. Li, W. M. Lam, J. C. Wong, B. W. Darvell, K. D. K. Luk, W. W. Lu, Solubility of strontium-substituted apatite by solid titration. *Acta Biomaterialia, Acta Biomater.*, **5**, 1678 - 1685 (2009).
 50. H. J. M. Heijligers, F. C. M. Driessens, R. M. H. Verbeeck, Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and strontium hydroxyapatite, *Calcif. Tissue Int.*, **29**, 127 (1979).
 51. H. R. Ramay, M. Zhang, Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods, *Biomaterials*, **24**, 3293 - 3302 (2003).
 52. M. Wakamura, K. Kandori, T. Ishikawa, Surface composition of calcium hydroxyapatite modified with metal ions, *Colloid Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, **142**, 107 - 116 (1998).
 53. H. M. Rootare, V. R. Deitz, F. G. Carpenter, Solubility product phenomena in hydroxyapatite water systems, *J. Coll. Sci.*, **17**, 179 - 206 (1962).
 54. Y. Haiying, W. M. Howard, H. W. Paul, Y. Shang-you, you Y (2008) Effect of Porosity and Pore Size on Microstructures and Mechanical Properties of Poly e Caprolactone Hydroxyapatite Composites, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **86**, 541 - 547 (2008).
 55. F. Stoppa, Y. Liu, Chemical composition and petrogenetic implications of apatites from some ultra-alkaline Italian rocks, *Eur. J. Mineralogy*, **7**, 391 - 402 (1995).
 56. I. Kuzmanovski, M. Trpkovska, B. Šoptrajanov, V. Stefov, Kuzmanovski I, Trpkovska M, Šoptrajanov B, Stefov V (2003) Determination of the composition of human urinary calculi composed of whewellite, weddellite and carbonate apatite using a rtificial neural networks. *AnalAnal. Chim. Acta.*, **491**, 211 - 218 (2003).
 57. T. J. U. Thompson, M. Islam, M. Bonniere, Thompson TJU, Islam M, Bonniere M (2013) A new statistical approach for determining the crystallinity of heat altered bone mineral from FTIR spectra, *J. Archaeol. Sci.*, **40**, 416 - 422 (2013).