

# 博士学位論文

氏名(本籍)	望月 千尋 (秋田県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博乙第117号
学位授与年月日	平成26年2月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項
学位論文題目	Ca錯体を用いるアパタイト粉末合成および 薄膜形成と生体硬組織再生への応用

論文審査委員	主査 佐藤 光史
	副査 木村 雄二
	副査 大倉 利典
	副査 門間 英毅 (法政大学)
	副査
	副査
	副査

工学院大学大学院

## 博士論文 目次

<b>第 1 章 研究の背景と目的</b>	— 1
1-1 本研究の背景	
1-1.1 生体材料	
1-1.2 バイオセラミックスの現状	
1-1.3 生体硬組織	
1-1.4 水酸アパタイト (HA) と合成方法	
1-1.5 アパタイト膜の形成	
1-1.6 骨再生用スキャフォールド	
1-2 本研究の目的	
1-3 使用装置概要	
1-3.1 アパタイト粉末および薄膜の構造解析および表面観察	
1-3.2 アパタイト粉末の化学的分析	
1-3.3 アパタイト薄膜の分析	
1-3.4 アパタイト導入スキャフォールドの分析	
1-4 アパタイト粉末の組成同定のための XRD の検量線	
1-5 Ca 錯体の安定度定数	
1-6 リン酸緩衝液 (PBS) およびハックス溶液 (HBSS) の調製	
参考文献	
<b>第 2 章 Ca 錯体からのアパタイト粉末合成</b>	
<b>第 1 節 EDTA の Ca 錯体を經由するアパタイト合成</b>	— 41
2.1-1 緒言	
2.1-2 実験方法	
2.1-2.1 試薬	
2.1-2.2 EDTA の Ca 錯体の合成	
2.1-2.3 低結晶性 CDHA (PA) 粉末の合成	
2.1-2.4 高結晶性 CHA/CDHA (PB) 粉末の合成	
2.1-2.4 測定	
2.1-3 結果	
2.1-3.1 EDTA の Ca 錯体	
2.1-3.2 低結晶性 CDHA (PA) および高結晶性 CHA/CDHA (PB) 粉末の同定と溶解度	
2.1-4 考察	

2.1-4.1 過酸化水素水による錯体の分解とアパタイト形成

2.1-4.2 反応温度による結晶性制御

2.1-4.3 生成アパタイトの溶解度と結晶性

2.1-5 結言

## 第 2 節 IDA の Ca 錯体を経由するアパタイト合成

— 55

2.2-1 緒言

2.2-2 実験方法

2.2-2.1 試薬

2.2-2.2 IDA の Ca 錯体の合成

2.2-2.3 低結晶性 CDHA (PC) 粉末の合成

2.2-2.4 低結晶性 HCA/HA (PD) 粉末の合成

2.2-2.5 低結晶性 HA/CHA (PE) 粉末の合成

2.2-2.6 測定

2.2-3 結果

2.2-3.1 IDA の Ca 錯体

2.2-3.2 低結晶性 CDHA (PC) , HA/CHA (PD) , HA/CHA (PE) 粉末

2.2-4 考察

2.2-4.1 錯体の安定度定数による反応への影響

2.2-4.2 加熱による Ca 充足型アパタイトの合成

2.2-4.3 結晶性と溶解度

2.2-5 結言

## 第 3 節 Asp の Ca 錯体を経由するアパタイト合成 – Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液の形成 –

— 70

2.3-1 緒言

2.3-2 実験方法

2.3-2.1 試薬

2.3-2.2 Asp の Ca 錯体の合成

2.3-2.3 低結晶性 CDHA (PF) 粉末の合成

2.3-2.4 低結晶性 HA/CHA (PG) 粉末の合成

2.3-2.5 測定

2.3-3 結果

2.3-3.1 Asp の Ca 錯体

2.3-3.2 低結晶性 CDHA (PF) および HA/CHA (PG) 粉末

2.3-4 考察

- 2.3-4.1 Asp の Ca 錯体
- 2.3-4.2 配位子による反応系への影響
- 2.3-5 結言
  - 参考文献

### 第 3 章 結晶性制御アパタイトと生分解性ポリマー複合スキャフォールド

— 87

- 3-1 緒言
- 3-2 実験方法
  - 3-2.1 試薬
  - 3-2.2 PLGA/アパタイト多孔質複合材スキャフォールドの作成
  - 3-2.3 *in vitro* 試験
    - 3-2.3.1 PLGA/アパタイト複合材の吸水試験
    - 3-2.3.2 PLGA/アパタイト複合材上への CP 析出
    - 3-2.3.3 ヒト由来線維芽細胞の付着試験
    - 3-2.3.4 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の 14 日間培養と付着形態
    - 3-2.3.5 細胞の観察
  - 3-2.4 *in vivo* 試験
    - 3-2.4.1 埋め込み
    - 3-2.4.2 マイクロ CT と組織観察
  - 3-2.5 測定
- 3-3 結果
  - 3-3.1 PLGA/アパタイト多孔質複合材の物性評価
    - 3-3.1.1 形状および形態
    - 3-3.1.2 PBS 中での吸水試験
    - 3-3.1.3 HBSS 中での CP 析出試験
  - 3-3.2 ヒト由来線維芽細胞の付着試験
  - 3-3.3 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の培養試験
  - 3-3.4 埋め込み試験
    - 3-3.4.1 マイクロ CT 観察
    - 3-3.4.2 組織観察
- 3-4 考察
  - 3-4.1 PLGA/アパタイト多孔質複合材
  - 3-4.2 *in vitro* 試験による PLGA/アパタイト多孔質複合材の組織結合予測の検討
  - 3-4.3 *in vivo* 試験による PLGA/アパタイト多孔質複合材の骨再生

### 3-5 結言

#### 参考文献

## 第4章 水溶液スプレー法の開発と形成 CA 薄膜評価

### 第1節 水溶液を用いたアパタイト膜形成スプレー法の開発

— 119

#### 4.1-1 緒言

#### 4.1-2 実験方法

##### 4.1-2.1 試薬

##### 4.1-2.2 市販アパタイト粉末を用いた飽和 HA スプレー溶液 (S1) の調製

##### 4.1-2.3 炭酸ガスバブリングによる過飽和 HA スプレー水溶液 (S2) の調製

##### 4.1-2.4 水溶液スプレー法による Ti 基板への膜形成と熱処理

##### 4.1-2.5 PBS 水溶液浸漬試験

##### 4.1-2.6 引張り試験による密着性評価

##### 4.1-2.7 測定

#### 4.1-3 結果

##### 4.1-3.1 スプレー溶液の調製

##### 4.1-3.2 スプレー条件の探索

##### 4.1-3.3 形成膜と熱処理

##### 4.1-3.4 PBS 水溶液浸漬試験

##### 4.1-3.5 引張り試験による密着性評価

#### 4.1-4 考察

##### 4.1-4.1 霧化液滴の組成と温度変化

##### 4.1-4.2 基板到達液滴からの固体析出と膜の付着性

##### 4.1-4.3 非晶質膜の加熱処理と HA への結晶化

#### 4.1-5 結言

### 第2節 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液を利用した CA 膜形成と熱処理による膜特性の変化— 133

#### 4.2-1 緒言

#### 4.2-2 実験方法

##### 4.2-2.1 試薬

##### 4.2-2.2 水酸化カルシウムと炭酸ガスバブリングによる高濃度 Ca<sup>2+</sup>スプレー水溶液 (S3) の調製

##### 4.2-2.3 成膜と熱処理

##### 4.2-2.4 形成膜および熱処理膜からの粉末の回収

##### 4.2-2.5 測定

#### 4.2-3 結果

4.2-3.1 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系スプレー溶液の調製

4.2-3.2 熱処理による形成膜の膜厚と組成の変化

4.2-3.3 形成膜のせん断試験による密着性評価

4.2-3.4 XPS による深さ方向の組成変化

4.2-4 考察

4.2-4.1 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系スプレー溶液の安定性と形成膜の形態

4.2-4.2 形成膜の熱処理による組成変化と密着性

4.2-5 結言

### 第 3 節 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液のスプレーによる CP 成膜と MC3T3-E1 細胞の膜上挙動

— 147

4.3-1 緒言

4.3-2 実験方法

4.3-2.1 試薬

4.3-2.2 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系スプレー水溶液の調製

4.3-2.3 成膜と熱処理

4.3-2.4 形成膜の HBSS 浸漬試験

4.3-2.5 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞培養

4.3-2.6 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の初期付着試験

4.3-2.7 初期付着試験後の WST-8 による細胞数測定

4.3-2.8 MC3T3-E1 の付着試験 1 時間後の表面形態観察

4.3-2.9 MC3T3-E1 の細胞増殖とオステオカルシン定量試験

4.3-2.10 測定

4.3-3 結果

4.3-3.1 形成膜の表面観察および隆起部高さ

4.3-3.2 HBSS 溶液中における CA 膜の生体親和性評価

4.3-3.3 CA 膜の骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の初期付着挙動

4.3-3.4 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の細胞増殖とオステオカルシン発現評価

4.3-4 考察

4.3-4.1 スプレー量による CA 膜の膜厚と網目状構造

4.3-4.2 HBSS 中での CA 膜上への CP 析出挙動

4.3-4.3 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞初期付着挙動

4.3-4.4 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の細胞増殖挙動およびオステオカルシン発現評価

4.3-5 結言

参考文献

**第5章 アミノ酸のCa錯体を用いるアパタイト/ゼラチン複合スキャフォールドの形成** — 171

## 5-1 緒言

## 5-2 実験方法

## 5-2.1 試薬

5-2.2 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>錯体水溶液の調製とArgの反応によるアパタイト合成5-2.3 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>錯体ゲルの調製

## 5-2.4 Arg水溶液の調製

5-2.5 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>錯体ゲルとArg水溶液の反応

## 5-2.6 ゲルの凍結乾燥

## 5-2.7 測定

## 5-3 結果

5-3.1 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>錯体水溶液とArgの反応によるアパタイト粉末5-3.2 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>錯体ゲルとArg水溶液の反応

## 5-3.3 凍結乾燥サンプルの分析

## 5-4 考察

5-4.1 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>錯体水溶液とArgの反応によるアパタイト粉末5-4.2 Ca-Asp-PO<sub>4</sub>固相化とArg水溶液との反応

## 5-4.3 ゲルの凍結乾燥によるアパタイト/ゼラチン複合材形成

## 5-5 結言

参考文献

**第6章 総括** — 192

## 6-1 Ca錯体を経由したアパタイト合成

## 6-2 水溶液スプレー(ASC)法によるアパタイト膜形成

## 6-3 骨再生用スキャフォールド

## 6-4 これからの再生医療材料

参考文献

## 研究業績 — 198

謝辞

## 第1章 研究の背景と目的

### 1-1 本研究の背景

#### 1-1.1 生体材料

進行する高齢化社会において、患者の負担を最小限にしつつ、病気やけがで失われた生体機能、特に硬組織を修復する医療技術が望まれている。硬組織の治療に必要な人工骨や人工歯根、人工股関節の施術例は年々増加しており、その患者数は2013年に日本で20万人／年を超すといわれている。このような硬組織の代替材料は、体内に埋入した際にかかる荷重や、繰返し応力に対する機械的強度が求められる。同時に、埋入時の材料へのタンパク質などの吸着や接触によっても材料表面が劣化せず、かつ材料が生体内に溶出して刺激や炎症を惹起しないことなどが重要で、これを生体適合性という。このような生体適合性に優れ、毒性や発がん性がなく、埋入後長期間にわたって安全に使用できる生体材料が必要である。

現在使用されている生体材料は、大別すると金属材料、無機材料、有機材料の3種類である。金属材料は加工しやすく、機械的強度が高いことから、歯科材料やステント、人工弁の弁輪部に広く使用されている。しかし、一般に重いことや高価なこと、金属の種類によっては腐食の可能性もあることなどから、使用範囲が限られる。無機材料には、セラミックスやガラスが含まれる。機能性材料として現在広く用いられているが、成形性に劣る点から、人工骨、人工股関節用の材料に限定されている。プラスチックに代表される有機材料は、成形性に優れ、腐食しにくいことから、医療機器などに多用されている。しかし、長期的な劣化が問題であり、生体内での使用用途に限界がある。生体由来材料もこの有機材料に含まれ、コラーゲンなどの生体組織がある。

生体と直接接触する生体材料がどのような条件を備えるべきか、Table 1-1 に条件を記した [1-1]。目的と

する機能を十分に発揮することはもっとも重要な条件であり、例えばコンタクトレンズの透明性、人工骨の硬さ、人工関節の耐摩耗性などである。さらに、材料を使用する前には感染を防ぐ滅菌が必要である。滅菌は、材料に付着している雑菌を加熱、薬品、γ線、電子線などで死滅させることを目的とするが、これらの操作の後でも、生体材料が機能を保つべきことは当然である。

Table 1-1 医用材料の備えるべき条件 [1-1]

機能面からの条件	目的とする機能を満足すること
材料固有の条件	1: 医療用としての再現性をもつこと 2: 加工性, 成形性が適切であること 3: 物性, 耐疲労性が適切であること 4: 消毒・滅菌が可能なこと
生体から材料への作用	生体内劣化（生分解性）が適切であること
材料から生体への作用	1: 生体に毒性のないこと 2: 生体への刺激性, 炎症惹起性が適切であること 3: 血液成分を破壊, 変性しないこと 4: 血栓をつくらないこと（ただし, 例外材料もある） 5: 発癌性, 催奇性のないこと

### 1-1.2 バイオセラミックスの現状

前節で生体材料を素材で分類した。この中で、無機材料のセラミックスやガラスを主成分とする材料を、特にバイオセラミックスといい、ホストの骨組織表面への骨形成を促す性質、すなわち骨伝導性を持つ優れた材料として利用されている。骨伝導性を備えたバイオセラミックスは、1972年、Hench L. L. により報告された  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{SiO}_2$  系ガラス（バイオガラス）が最初とされている [1-2]。生体骨と無機材料が直接結合することが証明され、リン酸カルシウム化合物に代表される水酸アパタイトやアルミナ、ジルコニア等のバイオセ

ラミックスの研究・開発が急速に伸展した。現在では、ポリマーや金属などの異種材料とのコンポジット化や微細構造制御などへの展開や、分極アパタイトなどの手法も提案されている [1-3]。

バイオセラミックスの代表的な成分を Table1-2 に示す。

Table 1-2 バイオセラミックスの成分による分類

生体との反応	材料の成分	
生体不活性	酸化物	アルミナ ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )
		ジルコニア ( $\text{ZrO}_2$ )
		カルシウムアルミネート ( $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系)
		アルミノシリケート ( $\text{Na}_2\text{O-Al}_2\text{O}_3\text{-SiO}_2$ 系)
	非酸化物	カーボン (vitrourous, pyrolytic, graphite)
		窒化ケイ素 ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) 炭化ケイ素 ( $\text{SiC}$ )
生体活性	生体ガラス	バイオガラス ( $\text{SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ 系) CPSAガラス繊維複合材料 ( $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ 系)
	結晶化ガラス	マイカ系結晶化ガラス ( $\text{SiO}_2\text{-B}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-MgO-K}_2\text{O-F}$ 系)
		A-W結晶化ガラス ( $\text{SiO}_2\text{-CaO-MgO-P}_2\text{O}_3$ 系)
		b-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 系結晶化ガラス ( $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ 系)
	リン酸カルシウム	ハイドロキシアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )
生体内崩壊性	リン酸カルシウム	TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )
		4CP ( $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$ )
		低結晶化ハイドロキシアパタイト
	カルシウムアルミネート	可溶性カルシウムアルミネート ( $\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ 系)

バイオセラミックスは、酸化物系とリン酸カルシウム系に大きく分類でき、さらに生体との反応性から、それぞれ3種類ずつに分類される。第1は、体液中に長期間浸漬されても化学的変化を起こさない生体不活性材料；第2は、インプラント表面と組織の間で化学的な結合が起こる生体活性材料；第3は、生体内で吸収され骨組織と置換される生体内崩壊性材料である。リン酸カルシウム系セラミックスにはバイオガラスや結晶化ガラスも含まれ [1-2, 1-3]、骨伝導性を持つ生体材料は、ポリマー、金属を含めた生体材料の中でもいくつかのリン酸カルシウム化合物のみである。酸化物系セラミックスは、直接組織と結合しない生体不活性材料である。リン酸カルシウム化合物をまとめて Table1-3 に示す。

Table 1-3 代表的なリン酸カルシウム

Compounds	Abbreviation	Chemical formula	Ca/P ratio
Monocalcium phosphate monohydrate	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.50
Dicalcium phosphate	MTCP	$\alpha, \beta, \gamma\text{-Ca}_2(\text{PO}_3)_2$	1.00
Calcium hydrogenphosphate	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}, \text{CaHPO}_4$	1.00
Calcium pyrophosphate	$\alpha, \beta, \gamma\text{-CPP}$	$\alpha, \beta, \gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1.00
Octacalcium phosphate	OCP	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
Tricalcium phosphate	$\alpha, \beta, \gamma\text{-TCP}$	$\alpha, \beta, \gamma\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50
Ca deficient hydroxylapatite	CDHA	$\text{Ca}_9\text{H}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$	1.50
Hydroxylapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67
Carbonate apatite	CA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	1.67
Tetracalcium phosphate	TeCP	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2.00

リン酸カルシウム化合物は類似する化学組成をもつが、生体内での性質は大きく異なる。たとえば、リン酸三カルシウム（TCP）は生体不活性な一方、生体内で吸収され自家骨と置換する生体吸収性（崩壊性）セラミックスとして知られる。リン酸カルシウム系セラミックスの成型材料は脆性が高いため、適用部位は限定されるものの、生体内反応は非常に魅力的で、適材適所で臨床応用されている。

現在のバイオセラミックス研究は、材料単独で自家骨に匹敵する生体活性などが発現する高機能性を目指す方向と、細胞や成長因子、遺伝子を積極的に活用して新しい機能の賦活や特性向上を目指す 2 つの方向で行われている [1-4]。ここ数年で発売されたバイオセラミックス製品のコンセプトも、i) 細胞と組織の侵入性を高めた材料、ii) 生体内で吸収されて骨に置換する材料、iii) 低侵襲治療を目指したペースト状人工骨に分けられる [1-5]。i) は、微細構造を制御した多孔質セラミックスで、例えばコバレントマテリアル(株)が 2003 年に販売した気孔率が 72~78%で、かつ気孔が三次元的に隣接している（連通性が高い）多孔質セラミックスや[1-6]、HOYA(株)が 2006 年に販売した 85%の気孔率を有する HA 多孔質セラミックスがある [1-7]。ii) の生体内で吸収されて骨に置換する材料には、2006 年にオリンパスヘルモバイオマテリアルから販

売された $\beta$ -TCP 多孔質セラミックスがよく知られている[1-8]。これは、生体内で1~2年程度で吸収され、その後自骨と置き換わる性質を備えている。患者への負担をできる限り低減させる iii) の低侵襲治療を目指したペースト状人工骨（骨セメント）は、高齢者特有の骨疾患に有効である。骨セメントの最初の報告は、門間らによる $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\alpha$ -TCP) と水の反応により水酸アパタイト (HA) を形成し、それが水和硬化体となる現象の発見である [1-9]。また、これとは別に Brown と Chow らによって  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$  (TeCP) と  $\text{CaHPO}_4$  (DCPD) との水和硬化反応も報告されている [1-10]。これら人工骨はペースト状であるため、任意の形状に加工可能で、注射器などで注入することもできるため、低侵襲な治療を実現するバイオセラミックスとして注目されている。2002年に三菱マテリアル(株)が開発した $\alpha$ -TCPの水和硬化反応を利用した骨セメントがHOYAより販売され [1-11]、また、日本特殊陶業(株)で開発された TeCP/DCPD 二成分系の水和硬化ペースト人工骨が2005年から販売されている [1-12]。最近では、HAなどへの水和硬化反応を伴わない、新しいペースト状人工骨も提案されている [1-13~1-15]。このセメントは、イノシトールリン酸をHAなどの出発原料の表面に修飾し、イノシトールリン酸のもつキレート能で粒子同士を結合して硬化させるキレート硬化型セメントで、実用化が期待されている。

京都大学の山中教授による人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の報告から[1-16]、バイオセラミックスの開発にも新展開がみられる。以下に、相澤らがまとめたバイオセラミックス像のコンセプトを示す [1-17]。

### 1. 確実な骨癒合を実現する骨誘導能を備えたバイオセラミックス

→ 骨粗しょう症患者にも適用可能な次世代型人工骨の創製（自家骨と同等の機能をもつ人工骨）

### 2. 複数の組織を同時に構築できるバイオセラミックス

→ 人工材料であるセラミックスの微細構造制御とサイトカインなどの併用による高次の組織構築の実現

### 3. iPS 細胞の分化を制御するバイオセラミックス

→ 人工材料であるセラミックスと iPS 細胞との組み合わせによる組織再生（骨や軟骨など）

バイオセラミックスは、高齢化社会に必要不可欠なもので、今後の展開が注目されている。

### 1-1.3 生体硬組織

生体材料には、硬組織の代替材料としての需要や、生活の質（QOL）を維持できる審美性や低侵襲性が要求される。したがって、設計される生体材料は、できる限りその機能性や形状がホストの生体を模倣している必要がある。生体硬組織は主に歯と骨に大別でき、各組織には無機物以外の有機物や水分が含まれる。

Fig. 1-1 に組織名称と基質構成要素を示す [1-18]。

歯は骨よりも多くの無機成分を含み、特にエナメル質はほとんどが無機成分で構成されている。歯の表層のエナメル質は硬く、その結晶性は高い [1-19]。この無機成分は HA と Na や Mg などの微量元素を含み、さら

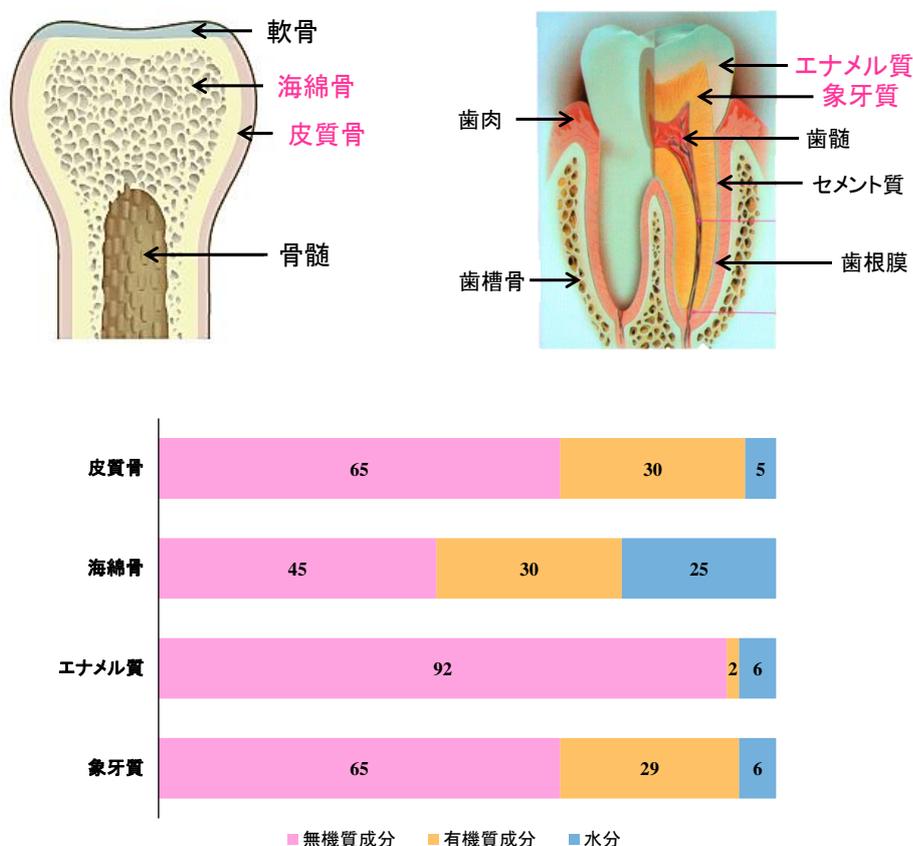


Fig. 1-1 人硬組織の名称と組織の基質構成要素（mass%）

に 1~2%の比較的多くの炭酸を含んでいる。エナメル質中の炭酸濃度は、エナメル質の酸溶解性を増大させるため、齲蝕との関係が注目されている。一方、歯の象牙質や骨はコラーゲンを主体とする有機質成分を2割程度含み、無機質の組成は複雑である。組織液や唾液との間できわめて活発なイオン交換が行われている歯の象牙質や骨では、エナメル質よりも比表面積が大きく、含まれる微量元素や炭酸も多い[1-20]。直接組織と結合する部位では、エナメル質のような強度よりも環境イオンがアパタイトの格子イオンと交換できる表面積や組成が必要となる。このような理由から、歯の象牙質や骨のアパタイト組成は一定ではないとの認識が一般的であるが、平均組成として、 $[\text{Ca}_9^{2+}(\text{H}_3\text{O}^+)_2(\text{PO}_4^{3-})_6(\text{OH}^-)_2] \cdot [\text{Ca}^{2+} \cdot \text{Mg}_{0.3}^{2+} \cdot \text{Na}_{0.3}^+ \cdot \text{CO}_3^{2-} \cdot \text{cit}_{0.3}]$ が Neuman W. らによって提案され [1-21]、現在でも用いられている。

骨や歯の象牙質に含まれる約2割の有機質成分はその88%はI型コラーゲンである。有機質成分の構成を

Fig. 1-2 に示す [1-22]。

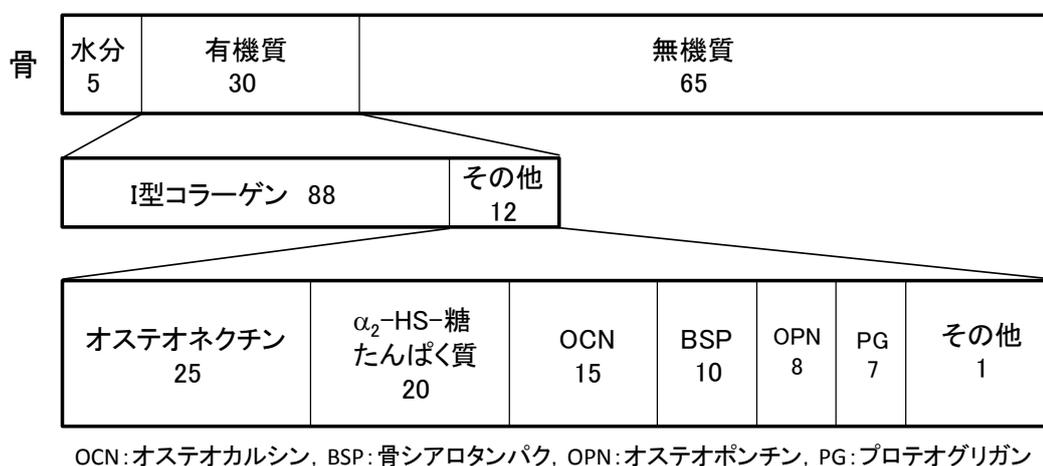


Fig. 1-2 骨と歯の無機質、有機質および水分含有量 (mass%)

I型コラーゲン以外の成分は、非コラーゲタンパク質 (NCP) と呼ばれ、酸性タンパク質を多く含み、アパタイトと相互作用するものがあり、石灰化に関与する物質とされている。これら NCP と石灰化の相互作用は解

明されていないが、鉄筋・鉄骨に相当するコラーゲン線維に NCP などの作用により、コンクリートに相当する HA が沈着することで骨の力学的強度が獲得されることは既に解明されている。リモデリング（改造現象）のある骨では、NCP 成分、中でもオステオカルシン（OCN）が多く存在しているが、リモデリングのほとんど起こらないエナメル質には存在していない。このことから、硬組織のリモデリングには、NCP が  $\text{Ca}^{2+}$  やアパタイトとの相互作用を介して石灰化組織における石灰化と吸収という無機質代謝における役割を担っていると考えられている。

#### 1-1.4 水酸アパタイト (HA) と合成方法

生体活性を持つ唯一の材料、リン酸カルシウム化合物は Table 1-3 に示したように、多くの組成を持っている。中でも、Ca/P 比 1.67 の水酸アパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA) は、生体硬組織の組成に一番近いとされ、多くの研究者によって合成法、構造解析等の報告がある。先にも述べたが、リン酸カルシウム化合物はその組成により特性も大きく異なる。例えば、Fig. 1-3 に示すように純水への溶解性は、第一リン酸カルシウムは高く、第二、第三と低くなり、HA はほとんど溶解しない [1-23, 1-24]。いずれのリン酸カルシウム化合物でも、中性またはアルカリ性の水溶液に浸漬すると、いずれは HA に変化する。このことは、HA が最安定構造であることを示している。

また、Fig. 1-4 には、いくつかのリン酸カルシウム化合物の溶解度を示す [1-25]。DCPD や TCP はう蝕結晶といわれ、う蝕部位に時々みられる結晶である。HA は中性からアルカリ性領域で最も難溶性で、かつ生体中硬組織の組成に近いことが、硬組織代替用無機成分として適切な理由である。

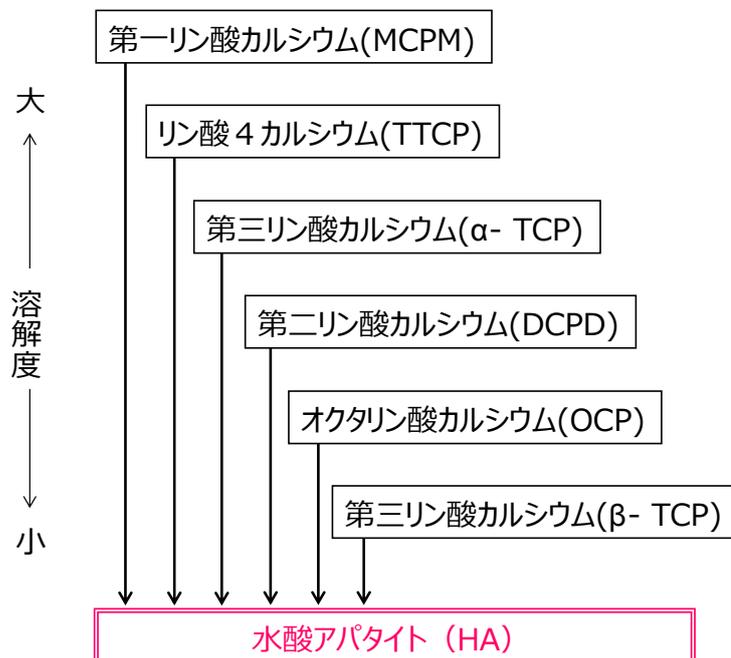


Fig. 1-3 Solubility of the calcium phosphate compounds under water.

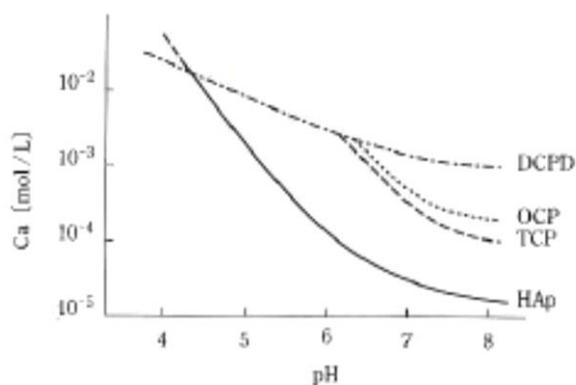


Fig. 1-4 The solubility of calcium phosphate compounds.

HA の結晶構造を Fig. 1-5 に示す [1-26]。この結晶構造は、中央の OH 基が六方晶の c 軸方向に平行に配置しており、約 1000°C まで構造を維持できるほど安定である。

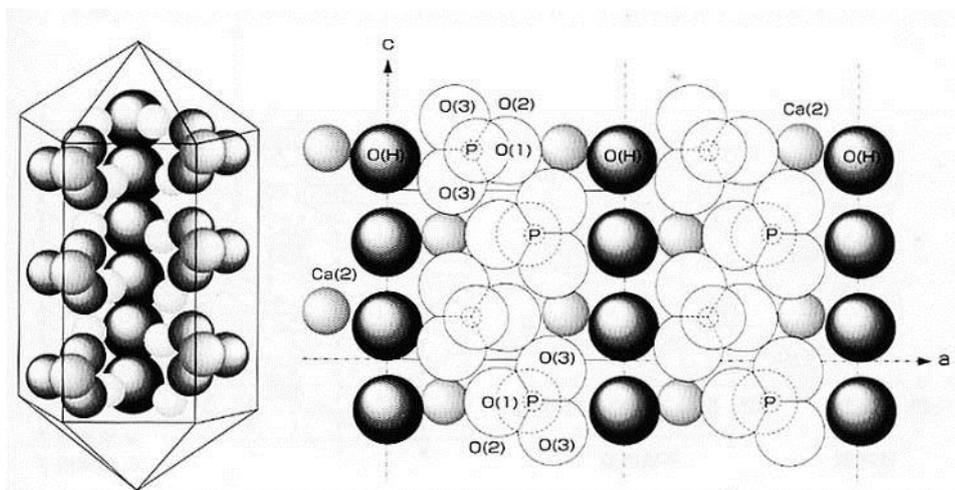


Fig. 1-5 Crystal structure of hydroxyapatite.

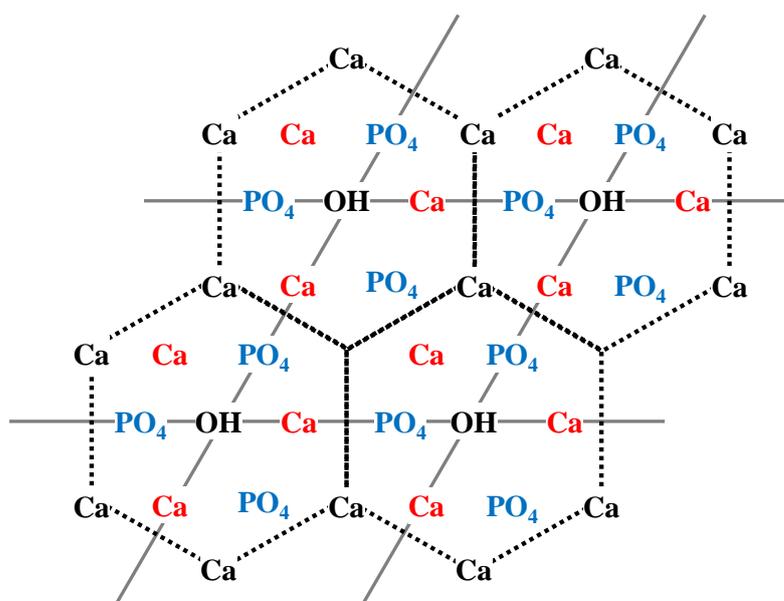


Fig. 1-6 Schematic of crystal structure for hydroxyapatite, view from c axis.

Fig. 1-6 に示すように,  $\text{Ca}^{2+}$  は正六角形の各頂点に位置し, さらに 3 回らせん軸上の  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{PO}_4^{3-}$  が中央に配列した OH 基の周囲に配置している。格子定数は,  $a = 0.942 \text{ nm}$ ,  $c = 0.688 \text{ nm}$  である。 $\text{Ca}^{2+}$  が他の元素に置換した構造や, OH<sup>-</sup> や  $\text{PO}_4^{3-}$  が  $\text{CO}_3^{2-}$  に置換した構造など, 多種の組成が存在する。歯科・

整形外科分野で、アパタイト粉末として多用されている物質が TCP のこともあり、注意が必要である。本論文では、六方晶系リン酸カルシウム化合物のみを“アパタイト”とした。

アパタイトは、人工合成が可能である。その粉末の合成だけでなく、膜形成法も多数報告されている。粉末の合成法としては、湿式法 [1-27~1-30]、固相法 [1-31]、水熱法 [1-32~1-34]、噴霧熱分解法 [1-35]等があり、膜の形成法としては、プラズマ溶射法 [1-36~1-43]、乾式法 [1-44~1-49]、SBF 浸漬法 [1-50~1-53]、ゾル-ゲル法 [1-54~1-57]、静電スプレー法 (ESD) [1-58~1-63]、分子プレカーサー法 [1-64~1-69]等がある。膜形成法は後述するので、ここでは、粉末の合成について述べる。

湿式法：最も多用されているのは、湿式法である。工業的には、中和反応か、塩と塩との反応を用いる方法がある。式 (1-1) に示す中和反応では、反応中 pH が酸性にならないように制御する必要がある。



塩と塩との代表的な反応を式 (1-2) に示す。この反応の場合には、原料の正確な質量を秤量し、かつ反応溶液の  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{PO}_4^{3-}$  の濃度を逐次分析する必要がある。また、1-2 式からも明らかのように、生成した副生成物が含まれる可能性もある。



このように、湿式法によるアパタイト合成は、一般に長時間を要するほか、pH や各イオン濃度の制御などの煩雑な操作が必要である。

固相法：1000°C 以上で固体と固体を反応させる方法で、代表的な反応を式 (1-3) に示す。



この式中の  $\text{H}_2\text{O}$  は、空気中の水蒸気である。この方法は、反応生成物が不均一になりやすく、工業的に

はあまり使用されない。

水熱法：熱水反応ともいい、オートクレーブ中で高温、高圧下での反応を用いる。得られる結晶の量が少ないために、多くの研究者がこの方法で単結晶アパタイトを合成している。オートクレーブ中に種結晶を吊るし、10～100 気圧で 150～300°C の範囲内で温度昇降を繰り返し、30 日程度で 10 mm の単結晶が得られる。

噴霧熱分解法：金属塩溶液を高温雰囲気中に微細な液滴として噴霧し、瞬時に熱分解させる方法。硝酸カルシウムとリン酸をメタノール-水-硝酸の混合溶媒に溶解し、800°C の噴霧装置中に噴霧する。得られた粉末を 800°C で 1 時間熱処理して HA を得る。

### 1-1.5 アパタイト膜の形成

アパタイトは、単独で用いるには機械的強度が劣るため、粉末を別の材料と混合することや、金属材料にコーティングして使用するのが普通である。現在、歯科用インプラントで多用されている Ti は、生体不活性であるため、組織と結合するまでに6か月～1年以上を要し、この間の感染症が問題となっている。一方、生体活性な HA を Ti 表面にコーティングすると、生体組織との結合が3～6か月程度に短縮され、感染症が減少して、患者への負担を軽減できることが臨床現場から報告されている [1-70]。インプラント材料へのコーティング方法の利点と短所を以下に記載する。

プラズマ溶射法：歯科用インプラント材料へのアパタイトコーティング方法。アパタイト粉末を高温で熔融し、対象インプラントにプラズマスプレーする方法で、現在のアパタイトコーティングインプラントのほとんどがこの方法でコーティングされている。しかし、熔融させたアパタイトの組成が変化しやすく、コーティング膜の組成が不均一になったり、20 μm 以上の厚膜となるため、下地金属との密着性が低く、インプラント埋入時に膜が剥離し、周辺組織が炎症する事例も多い [1-71]。

スパッタリング法：乾式コーティング法。イオンビームミキシング法や RF マグネトロンスパッタリング法などがある。均一で緻密な薄い膜を形成できるが、大型の真空装置を必要とし、またターゲットとなるバルクアパタイトが大変高価である。

ゾル-ゲル法：湿式法のコーティング方法。金属アルコキシドの加水分解によりゲル化した膜を焼成し、膜形成する。CaCO<sub>3</sub>や毒性のあるCaOなどの不純物ができやすい。

静電スプレー (ESD) 法：2003年に Jansen JA *et al.* によって報告された。Fig. 1-7に装置の概略図を示す。Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>OとH<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>を溶解したアルコール（ブチルカルビトール：C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>）溶液を470°Cに加熱したTi基板に2 mL h<sup>-1</sup>で1時間静電スプレーすると、膜厚が2 μmの多孔性CA膜の形成が可能。有機成分を含んだ溶液を用いるため、基板温度を高く保つ必要がある。

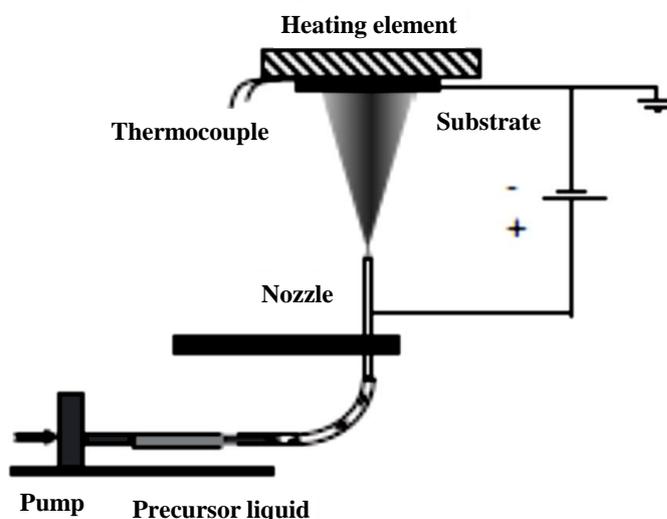


Fig. 1-7 Experimental set-up of the Electrostatic Spray Deposition (ESD) technique.

分子プレカーサー法：分子プレカーサー法は、Sato M *et al.* によって1996年に提案された金属酸化物薄膜の形成法で[1-72]，目的とする金属酸化物の金属を含む錯陰イオンを用いる比較的新しい化学的薄膜

形成法である。例えば、TiO<sub>2</sub> 膜を形成しようとした場合、エタノール中に Ti の EDTA 錯体をアルキルアミンで可溶化させたプレカーサー溶液を調製する。スピコート法でガラス基板に塗布した膜は、空气中 450°C の焼成で 100 nm 程度の膜厚をもつアナターゼ膜を容易に形成できた。この分子プレカーサー法は、高分子化過程を要しないため、長期保存可能な安定溶液を合成できる。また、金属濃度を整え混合することで複数の金属イオンを含む化合物膜も形成できる。2013 年、Nagai H *et al.* が、分子プレカーサー法を用いた LFP および LTO 膜による透明リチウムイオンバッテリーを作成し、その充放電に伴う電極の着色現象を見出し、分子プレカーサー法による応用例として報告している [1-73]。

分子プレカーサー法は、金属酸化物薄膜だけでなく、アパタイト膜の形成も達成した。2005 年に Hayakawa T *et al.* により、Ca の EDTA 錯体を用いた分子プレカーサー液の調製と Ti 基板上へのアパタイト膜形成が報告された [1-64~1-69]。単分散分子量の金属錯体を用いるため、チタンウェブスキャフォールドの内部繊維にも均一にアパタイトがコーティングされ (Fig. 1-8) , Ti 単一よりも組織との結合性に優れて

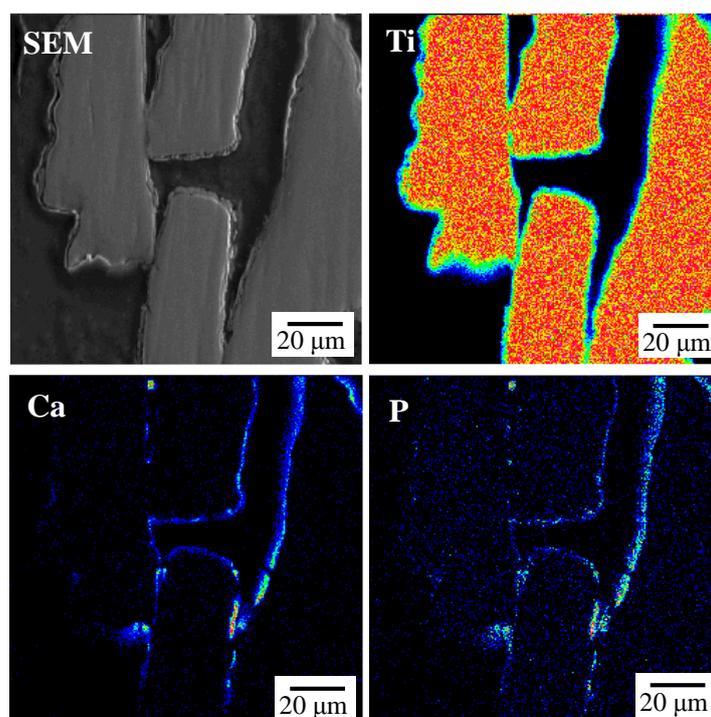


Fig. 1-8 EDX and SEM images of apatite coated Ti web scaffold by molecular precursor method.

いることが報告された。

### 1-1.6 骨再生用スキャフォールド

骨再生用スキャフォールドとして、Ti ウェブや生分解性ポリマー、コラーゲンスポンジがある。Ti ウェブは、生体不活性であるため、組織との早期結合のために骨伝導性のよいアパタイトコーティングが行われている。しかも、埋め込んだとき、Ti は生体内に取り残される。一方、生分解性ポリマーやコラーゲンスポンジは、生体内で分解するため、生体内に取り残されることがない。このことから、再生材料としては、後者に注目が集まっている。コラーゲンスポンジは現在上市され、実用化されているが、原料が高価で、かつ施術時に体液に触れると表面が溶解して粘性が高くなるため、高度な施術技術が必要である。一方、生分解性ポリマーは、使用ポリマーの混合割合で分子量や生分解速度を大きく変化させることができる。使用ポリマーの組み合わせによって特性が異なることから、スキャフォールドを設計しやすい反面、生体内での酸性分解生成物が問題である。

骨再生スキャフォールドは、治療部位に埋め込んで骨再生を促進させる役割をもち、その細胞挙動が重要な因子である。骨芽細胞は、骨を構築する細胞である。その大きさは 10  $\mu\text{m}$  程度であるが、細胞の仮足を伸展させ、扁平になることが特徴である。そのため、スキャフォールド中の気孔径は、細胞の仮足を伸展できる 200~300  $\mu\text{m}$  が適切と報告されている [1-74]。また、骨芽細胞は、 $\text{Ca}^{2+}$  イオンやリン酸イオンが存在すると活性化するといわれている。そのため、骨再生を促進させる部位に、アパタイトを導入することが注目されている。骨の主成分である HA は溶解性が低く、イオンを即座に供給できないため、 $\beta$ -TCP のような溶解性の高いリン酸カルシウム化合物が導入されている例も多い。しかし、これらは骨の成分や構造とは異なるため、溶解性の高い HA の開発が望まれている。

## 1-2 本研究の目的

人体が、より単純な生物に比べて再生しにくいのはなぜだろうか。組織再生が容易な生物と比較して、人間の幹細胞が少ないからである。そこで、高齢化社会に突入した現在、人体を構成する機能を維持するための再生医療工学技術は非常に重要である。

最近の人工多能性幹細胞（iPS 細胞）の報告 [1-16]により、再生医療における細胞分野での問題が解決される可能性が高まった。多分化能をもつ細胞の分化および組織再生を制御するためには、成長因子の決定、および三次元組織を構築するための細胞の足場材が必要となる。さらに、人体の骨格を構成する生体硬組織は、人工代替材料の研究が進行していたことから、iPS 細胞による組織再生の研究はあまり進展していない。しかし、骨はリモデリングが活発で、比較的幹細胞が多い部位である。早期に骨再生を促せるスキャフォールドがあれば、iPS 細胞を培養している間に、骨組織が再生する可能性は十分にある。

研究室では、分子プレカーサー法による Ti 基板上への CA 膜形成を達成している。これは、EDTA の Ca 錯体とリン酸イオンが共存しても CP が析出しない均一アルコール溶液である。Ca イオンを適切な配位子と組み合わせた錯体は、Ca イオンとリン酸イオンの直接反応を防止できることを示している。この直接反応の防止が水溶液中でも可能であれば、従来均一水溶液では難しいアパタイト合成を単純化し、短時間で実現できる可能性がある。

そこで、本研究では、安価で安全な生体硬組織再生材料の新規開発を一つの目的とし、

- I. 安定した組成をもつアパタイトの化学合成と生成物の特徴の解明
- II. 合成アパタイトと生分解性ポリマーからなる複合スキャフォールドの形成と生体適合性および骨再生能の評価
- III. インプラントのアパタイトコートに有効な新たなコーティング法の開発と形成材料の評価

#### IV. 錯体を利用する生体高分子化合物をマトリックスとするアパタイト複合化スキャフォールドの新規形成法の開発

の4パートに分け、リン酸イオンが共存する複数の三元系 Ca 錯体を利用したアパタイト粉末合成、水溶液スプレー法によるアパタイト薄膜形成、低結晶性アパタイト導入スキャフォールドの作成までアパタイト調製の新規技術として提案し、その有効性を評価した。

### 1-3 使用装置概要

#### 1-3.1 アパタイト粉末および薄膜の構造解析および表面観察

X-ray Diffraction (XRD) : BRUKER AXS 社製 MXP-18AHF22

試料の結晶構造を調べる。

分析原理：結晶に、ある振動数のX線が照射されると、結晶中の各原子の電子がX線（=電磁波）で強制振動させられ、各原子は入射X線と同じ振動数のX線を放出する。これをトムソン散乱という。結晶中では、多数の原子が3次元で規則的に配列しているので、原子から放出されたX線の内、規則正しく配列したX線は互いに干渉し、特定の方角で強め合って回折現象を示す。

ブラッグは、この現象が結晶の格子面による光の反射と同等に扱うことができると考え、X線の波長と格子面間隔の距離の比が入射角から単純な式で計算できることを証明した。ブラッグ父子は、X線回折を光の反射と同様に取り扱い、

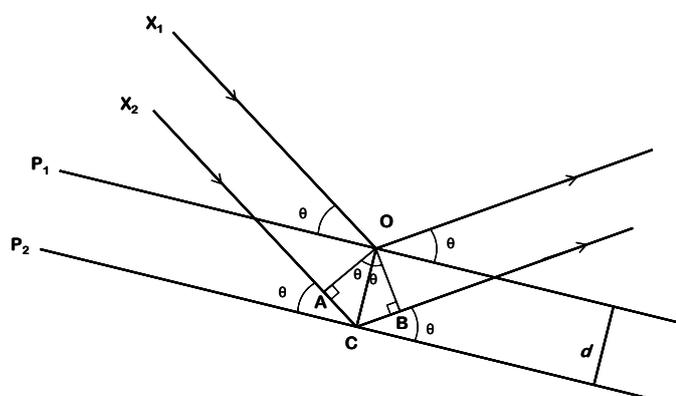


Fig. 1-9 回折条件

X線は可視光と同様に入射角 $\theta$ に等しい反射角を維持して反射されると考えた。2つの平行な格子面（面間隔 $d$ ）による波長 $\lambda$ の反射は、X線（ $X_1, X_2$ ）が平行な2面（ $P_1, P_2$ ）に入射し、このときそれぞれの格子面となす角を $\theta$ 、交点を $O, C$ とする。図12からわかるように $X_1, X_2$ は波動の進行につれて行路差を生じている。 $O$ から $X_2$ への垂線の交点を $A, B$ とすると、 $X_2$ は $X_1$ に比べ、 $AC + BC (=2AC)$ の行路が増加している。 $\angle AOC = \angle BOC = \theta$ となるため、行路差は $2d\sin\theta$ である。 $X_1, X_2$ は位相が重ならない場合はお互いに打ち消しあって合成波の振幅は減少するが、同位相のときはお互いに強めあうため、行路差が $\lambda$ の整数倍であれば反射波が観測される。

$$2AC = n\lambda \quad \dots (1-4)$$

行路差 $2AC$ は $2d\sin\theta$ と等しいことから次式(1-5)が導かれる。

$$\underline{2d \sin\theta = n\lambda} \quad \dots (1-5)$$

これがBraggの条件であり、 $\theta$ はブランク角と呼ばれる。

このBragg則は結晶によるX線の反射がどの方向に起こるか明らかにしたものであり、このときの強度を関連付けることにより結晶中の電子密度分布、すなわち原子配列の決定につながる。すなわち、結晶中のたくさんの格子面から反射波が観測されれば強い反射波が得られるはずである。しかし、結晶格子とは元々概念であり、結晶中には実際に格子点や格子面が存在するわけではない。実際には、結晶の単位構造を構成する原子の電子雲との相互作用が反射の原因であると考えられる。

測定：集中法の測定は、電圧45 kV、電流300 mAでX線を発生させ、グラファイトで単色化したCuK $\alpha$ 線源を用い、集中法（ $\theta - 2\theta$ スキャン）で、 $2\theta$ が $20 \sim 60^\circ$ の範囲を $0.05^\circ$ ステップで、計数時間1秒で測定した。平行ビーム法の測定は、電圧45 kV、電流300 mAでX線を発生させ、グラファイトで単色化したCuK $\alpha$ 線源を用い、入射角度 $0.5^\circ$ の平行ビーム法（ $2\theta$ スキャン）で、 $2\theta$ が $20 \sim 60^\circ$ の範囲を $0.05^\circ$ ス

チップで、計数時間 2 秒で測定した。

結晶子サイズは、式 (1-6) に示すシェラー & ホール法により測定した[1-75~1-77]。標準外部試料には LaB<sub>6</sub> を用いた。測定条件は、集中法、平行ビーム法共に、2θ が 20~60° の範囲を 0.01° ステップで、計数時間 5 秒で測定した。HA の結晶子サイズの算出には、JCDS カード No.9-432 の 2θ = 25.9, 31.8, 39.8, 46.7, 49.5 (それぞれ hkl (0 0 2), (2 1 1), (3 1 0), (2 2 2), (2 1 3) に対応) のピークを用いた。CDHA の結晶子サイズの算出には、JCDS カード No.46-905 の 2θ = 25.9, 31.7, 39.7, 46.6, 49.4 (それぞれ hkl (0 0 2), (2 1 1), (3 1 0), (2 2 2), (2 1 3) に対応) のピークを用いた。

$$\frac{B \cos \theta}{K \lambda} = \frac{1}{D} + \eta \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad \dots(1-6)$$

D : 結晶子サイズ, B : 結晶子サイズの大きさによる回折線の拡がり, λ : 測定 X 線波長, η : 不均一歪み,  
θ : 回折線のブラッグ角, K : シェラー定数, 0.9 を用いた。

Field Emission-Scanning Electron Microscope (FE-SEM) : 日立製作所製 S-4200 形または日本電子製 JSM-6701F

電子線を真空中で試料上に二次元的に走査し、試料表面から放出される二次電子等の強度を画像として得る。

分析原理 : 細く絞った電子線を走査しながら試料に照射し、試料表面から放出された 2 次電子を検出器に引き込み、その発生量 (強度) により 2 次元の画像を得る装置である。試料の凹凸によって 2 次電子の量が異なるため、3 次元的な像が得られる。FE-SEM は電子線源がシリコンチップに電界を印加して電子を発生させる電解放出 (FE) 方式で、電子線をより絞ることができることから、高分解能観察が可能である。

測定 : 観察試料は、カーボンテープまたは銀ペーストで Al 試料台に固定し、Au 蒸着をした後、加速電圧 5

kV で観察した。

### 1-3.2 アパタイト粉末の化学的分析

CHN 元素分析：パーキンエルマー社製 2400Series CHNS/O analyzer

測定試料中の CHN の相対質量率を調べる。

分析原理：925°C の燃焼管に試料を投入し、錫箔の閃光燃焼反応を利用して、サンプルを 1800°C 以上で分解燃焼させ、C は CO<sub>2</sub>、H は H<sub>2</sub>O、N は NO<sub>x</sub> にする。同時に発生した妨害元素は種々の試薬で除去され、640°C の Cu の還元管へと送られる。還元銅によって NO<sub>x</sub> は N<sub>2</sub> に還元され、さらにサンプルの燃焼に用いた酸素の過剰分も吸収する。これらガスはミキシングにより、均一化され、分離カラムに流し、フロントルクロマトグラフ法により保持時間に応じてカラム中を展開した成分が階段状に重なったクロマトグラフとして検出される。キャリアガスには、純度 99.999% の He ガスを用いた。予め測定した標準試料（アセトアニリド）の検量線から、未知試料の CHN の相対質量率を算出する。

測定：測定試料は測定前に室温で 1 時間真空乾燥させた。試料を 2.0 mg ± 0.2 mg で錫箔中に秤量し、俵状に丸め、CHN 測定に供した。同一試料は 3 回測定し、その平均値を算出した。±0.3% の許容範囲内で再現良く分析した。

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)：日本分光社製 FT/IR-600

試料に赤外線当てて、試料中の分子振動から、官能基を分析する。

分析原理：赤外吸収スペクトル分析法は、物質に赤外線を照射すると、原子の結合軸に沿って振動する伸縮振動、結合角に変化が起こる変角振動が起こり、この吸収したエネルギーを測定する。有機化合物を構成する基は、物質はそれぞれ固有の振動を持つ。吸収波数より、試料の定量分析が可能である。

測定：KBr 希釈法で行った。測定試料ならびに KBr は測定前に室温で 1 時間真空乾燥させた。測定範囲

は  $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$  とし、分解能  $4\text{ cm}^{-1}$ 、積算回数 100 回とした。

Thermogravimetry Differential thermal analysis (TG-DTA) : BRUKER AXS 社製

TG-DTA2020s

試料を昇温して熱特性を調べる。

分析原理：試料と標準試料を一定の温度プログラムに従って変化させながら、その物質の質量および熱量を時間または温度に対して測定し、熱的安定性に優れた標準物質 ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) との温度差と、質量変化や熱の出入りを調べる。

測定：測定試料は測定前に室温で 1 時間真空乾燥させた。測定には白金パンを使用し、試料は約 10.0 mg 秤量し、標準試料は $\alpha$ -アルミナ、10.0 mg を用いた。サンプリング間隔は 1 sec、空気流量または Ar ガス流量  $100\text{ mL min}^{-1}$  下、 $10^\circ\text{C min}^{-1}$  の昇温速度で測定した。

粒径分布：島津製作所製 SALD-3600 レーザー回折式粒度分布測定装置

粉末試料の粒径を調べる。

分析原理：粒子にレーザーを照射すると、その粒子の大きさに応じて様々な方向へ回折光、散乱光がでる。

粒子径が大きい場合( $\text{mm}\sim\mu\text{m}$ )の回折・散乱光は、粒子の後ろ側、即ちレーザービームの進行方向側に集中する。粒子径が小さくなるにつれ( $\mu\text{m}\sim\text{nm}$ )、回折・散乱光はレーザービーム進行方向の後ろ側へも広がってくる。これらの光の回折・散乱強度分布を解析して粒子径を求める。粒子が光の波長に対して充分に大きいときは、散乱よりも回折の現象が支配的になり、フラウンホーファー回折で近似される。粒子の物性係数はその近似式に寄与しないため、光の波長だけで計算できる。

測定：水中に測定粉末を 0.1 g 入れ、5 分間超音波攪拌した。予備測定を行い、測定領域になるまで測定試料を少量ずつ加えた。

## Nuclear Magnetic Resonance (NMR) : 日本電子製 JEOL ECA/ECX (400 MHz)

核磁気共鳴といい、原子の磁気的環境から分子構造の情報を得る。

分析原理：NMR は、原子核を磁場中においたとき、磁気モーメントの配向の違いによって生じるエネルギー状態の差に基づく分光法である。磁気モーメントを持つ原子核を磁場中におくと、ゼーマン効果によりいくつかのエネルギー状態が生じる。このエネルギー差に相当する周波数をもつ電磁波を照射すると、分裂した各スピン状態間の遷移に基づくエネルギー吸収が観察される。

測定： $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  スペクトルは、4 g の重溶媒（重水、 $\text{D}_2\text{O}$ ）に測定する錯体、50 mg を加え、溶解させた。ここに基準物質 1% Trimethylsilyl propanoic acid (TMSP, Sigma-Aldrich 社製) を 2 滴加え、5 mmφ のサンプルチューブに 40 mm 入れた。蓋をして測定に供した。 $^1\text{H}$  測定は、 $22.4^\circ\text{C}$ 、分解能 0.458 Hz、測定時間 2.184 秒、積算 16 回で行った。 $^{13}\text{C}$  測定は、 $22.4^\circ\text{C}$ 、分解能 0.958 Hz、測定時間 1.043 秒、積算 2048 回で行った。

### 1-3.2 アパタイト薄膜の分析

膜厚：Sloan 社製 DEKTAK-3

表面粗さ計を用いた触針法で、膜と基板の段差を測定し、膜厚を調べる。

分析原理：試料表面を移動するダイヤモンド針の上下動を電氣的に拡大して凹凸を測定する方法。使用装置の分解能は 10 nm である。

測定：形成した膜の一部を薄めた塩酸水溶液またはクエン酸に数秒浸し、基板を露出させた。よく乾燥させた膜を基板から膜まで 1 mm を 37 秒で針を走査させ、段差を測定した。同一サンプルを 5 回測定し、最高最低値を除いた 3 点の平均を膜厚とした。

### X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) : Shimadzu 社製 ESKA-K1S

試料に X 線を照射し、出てきた電子の運動エネルギーから表面近くの構成元素や化学結合状態を調べる。

分析原理：試料に X 線を照射すると、原子の内核電子が励起され、束縛を破って試料外に出てくる。これを光電子という。光電子は様々な運動エネルギーを持っており、物質内部において電子が存在する環境の違いが束縛する力を変え、そこを断ち切って飛び出す電子の運動エネルギーに違いが生じる。この光電子の運動エネルギーを測定することで、固体表面近くの構成元素の種類やその結合状態を知ることができる。

測定：Mg-K $\alpha$ X 線源 (1253.6 eV) を用いて、形成膜の表層から内部に向かって膜中に含まれる Ca, P, C, O, Ti を測定した。測定した結合エネルギーは、C の 1S 軌道のエネルギー値を 284.5 eV として較正した。深さ方向は、Ar<sup>+</sup>イオンエッチング (2 kV, 20 mA) を 2 分間行い、89~100 層削り、その都度層表面を測定した。得られた Depth profile は、測定元素を 100%としたときの、相対率である。

### スクラッチ試験 : Shinto Scientific 社製 HEIDON type22

連続的に荷重を負荷し、膜に生じる損傷形態から膜の付着性を評価する。

分析原理：鋭利な圧子を膜に押しつけながら横に滑らせ、荷重を増加させながら膜を引掻き、損傷が発生した臨界値で付着性を推定する。膜が破壊した時の圧子の荷重 W (臨界荷重) をそのまま付着性評価値とすることも多いが、式 (5) に示す Benjamin-Weaver の式 [1-78]から、押し込み痕の周縁部の最大せん断応力  $F_s$  に換算することもある。

$$F_s = \frac{H}{\sqrt{\left(\frac{\pi R^2 H}{W}\right) - 1}} \quad \dots (5)$$

R は圧子先端半径、H は基板のブリネル硬さである。

測定：スクラッチ試験は、ダイヤモンド径 50  $\mu\text{m}$  の針を用いて、室温で 40  $\text{mm min}^{-1}$  の速度で 10 mm

引掻き、最大荷重は 500 g とした。それぞれの膜は 3 回試験を行った。膜の剥離は FE-SEM により観察し、スタートから剥離までの距離を測長し、臨界荷重を算出し、平均値を出した。この数値を式 (5) に代入し、せん断強度とした。Ti 基板のブリネル硬度は 1.0 を用いた。

引張り試験：ミネベア社製 TG-5kN

材料の弾性率、耐力、強度の測定に使用される。

分析原理：試験片に圧縮荷重を加えてひずみや応力を測定し、機械的性質や変形抵抗を調べる。

測定：引張り試験用の Ti 基板およびステンレス治具は、予め 120  $\mu\text{m}$  のアルミナで接着面をブラスト処理し、アセトンで洗浄した。形成膜および Ti 基板は熱硬化性エポキシ樹脂 (Bond E39, 小西化学工業(株)) を用いて、形成膜面と基板側裏面をステンレス治具で圧着した。試験片は、治具に固定したまま、150°C で 30~50 分間乾燥させ、引張側の Ti 基板にはみ出した接着剤を取り除き、再度 150°C で 5 分間乾燥させたのち、放冷し、治具から試験片を取り外した。引張圧縮試験にセットした試験片は、クロスヘッドスピード 0.1  $\text{mm min}^{-1}$  で軸方向に連続的に荷重を負荷させた。4~5 試験片行い、その平均値を強度とした。

### 1-3.3 アパタイト導入スキャフォールドの分析

X-ray Guide Tube (XGT)：HORIBA 社製 XGT-5000

試料をスキャンしながら X 線を照射し、CCD カメラや X 線検出器と連動させることで、光学顕微鏡による観察と、X 線分析装置により元素分析する。

分析原理：マイクロフォーカス X 線管で発生させた X 線を X 線導入管 (XGT) に通すことにより、高輝度で  $\phi$  10  $\mu\text{m}$  以下の微細 X 線ビームに形成する。これを XY 軸走査ステージ上に置かれた試料に照射する。試料から発生する蛍光 X 線のエネルギー分散スペクトルを Si X 線検出器 (EDS) で、また試料を透過した X 線をシンチレーション検出器で同時に計測する。XY 軸走査信号を用いてこれらの信号を復像して、蛍光 X 線による

表面元素のマッピング像と透過 X 線による内部構造マッピング像を得る。

測定：10 μm の X 線導管を用いて、30 kV, 1.0 mA で、1000 s 8 mm<sup>-2</sup> の速度でサンプルを 10 回スキャンし、Ca および P の分布を観察した。

#### 1-4 アパタイト粉末の組成同定のための XRD の検量線

HA や CDHA の結晶構造は、いずれも六方晶系アパタイトであり XRD パターンからは区別が困難である。

HA は熱的に安定な一方、CDHA は、800°C 以上の熱処理で TCP に分解することが知られている [1-79]

(式 (6) )。



そこで、複合組成のアパタイトの同定に、検量線法を用いた。合成アパタイト粉末を空气中 850°C で熱処理して XRD 測定を行い、HA と TCP の面積比を算出する。ここで得られた割合は、質量を考慮していない。

そこで、予め、質量比率で混合した粉末の XRD 測定を行い、検量線を作成した。XRD 測定した試料の面積比を検量線から HA 質量含有率として組成を決定した。

#### 試薬

α-tricalcium phosphate (α-TCP, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, F.W. = 310.18) 和光純薬工業株式会社

β-tricalcium phosphate (β-TCP, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, F.W. = 310.18) ナカライテクス株式会社

HA (Hydroxyapatite, Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, F.W. = 1004.6, 96.0%) 純正化学株式会社

検量線は、 $\alpha$ -TCPと $\beta$ -TCPを質量比でHAと混合し、XRD測定を行い、HAの最強ピーク ( $2\theta = 31.8^\circ$ , (1 1 2) ) の面積比を算出し、作成した。それぞれの検量線を Fig. 1-10 および 1-11 に示す。

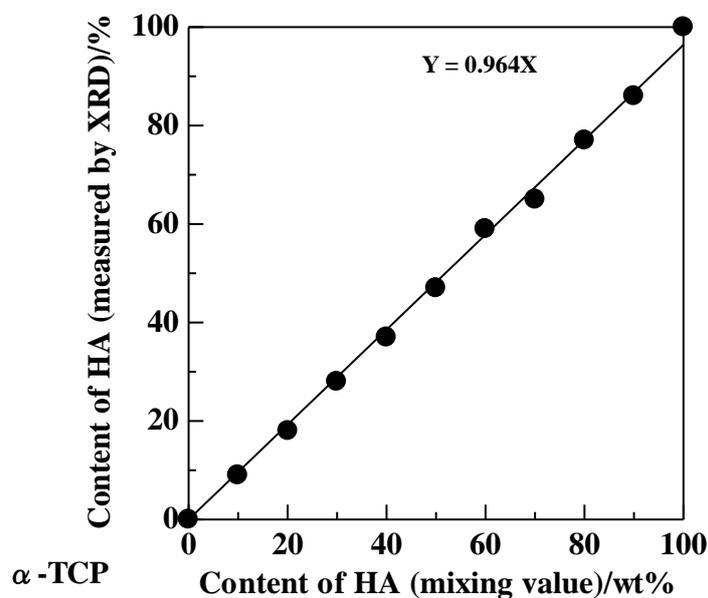


Fig. 1-10 Calibration curve of the content of HA between  $\alpha$ -TCP.

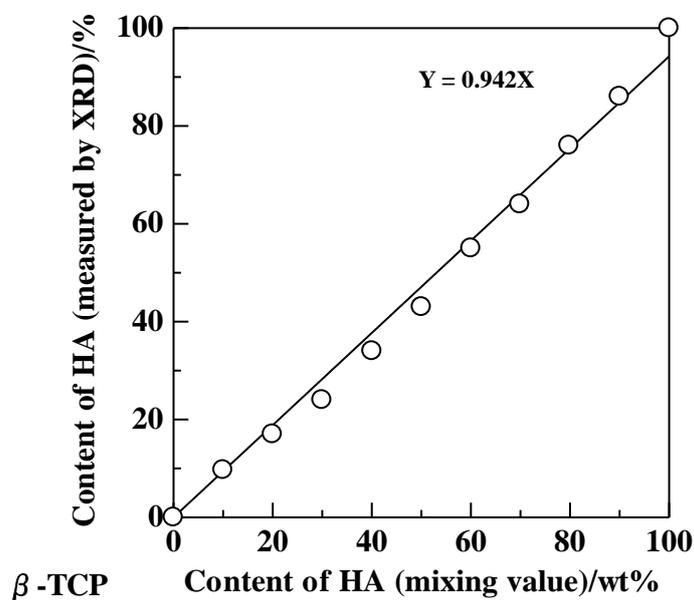


Fig. 1-11 Calibration curve of the content of HA between  $\beta$ -TCP.

### 1-5 Ca 錯体の安定度定数

金属錯体は、イオンや 0 価の中心金属に、各種の原子、イオンあるいは原子団の配位子が結合してできた分子または多原子イオンである。ある系における金属錯体の安定性は、中心金属と配位子間での結合生成反応と、その逆反応である結合解裂反応との化学平衡で決まる。この化学平衡の反応式は、金属イオン M (電荷省略) と配位子 L (電荷省略) から金属錯体 ML が生成する可逆反応 (1.1) で表す。

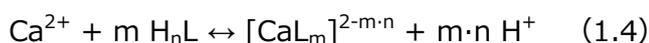


$$K = [ML]/[M][L] \quad (1.2)$$

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta G_{\neq} - \Delta G_{\neq}' \quad (1.3)$$

したがって、この反応の平衡定数  $K$  は (1.2) 式で示される。 $K$  はこの反応における自由エネルギー変化量  $\Delta G$  と (1.3) 式の関係にあり、 $\Delta G$  が負で大きいほど錯体 ML は熱力学的に安定で生成し易いことを示している。一方で、ML の生成速度  $v$ 、解離速度を  $v'$ 、生成および解離反応の活性化自由エネルギー変化量をそれぞれ  $\Delta G_{\neq}$ 、 $\Delta G_{\neq}'$  とすると、(1.3) 式の関係が成立する。このため、 $\Delta G$  は  $\Delta G_{\neq}$ 、 $\Delta G_{\neq}'$  の差分で決まり、各反応の活性化自由エネルギーの大きさと  $K$  は独立である。したがって、熱力学的に安定な錯体の解離速度が小さいとは限らず、同時に熱力学的に不安定な錯体の解離速度が大きいとも限らない。 $\Delta G_{\neq}'$  が大きく、逆反応の速度が小さい錯体は、熱力学的にどうかは別に速度論的に安定である。

(1.2) 式で示した平衡定数  $K$  を安定度定数または錯形成定数といい、錯体の熱力学的安定性の尺度である。Ca 錯体の全生成定数 ( $Ca/L = 1/m$ ) を表す一般式を (1.4) と (1.5) に示す。



$$K = [CaL_m][H^+]^{m \cdot n} / [Ca^{2+}][H_n L]^m \quad (1.5)$$

多くの錯形成反応は、数段階で起こる。各段階の平衡定数を逐次生成定数または逐次安定度定数とい

い、それらの積は (1.5) 式の  $K$  に等しく、全安定度定数という。  $m = 1$  で反応する EDTA の Ca 錯体の逐次生成定数と全安定度定数を示す。

$$K_1 = [\text{Ca}(\text{H}_3\text{edta})^+][\text{H}^+] / [\text{Ca}^{2+}][\text{H}_4\text{edta}] \quad (1.6)$$

$$K_2 = [\text{Ca}(\text{H}_2\text{edta})][\text{H}^+] / [\text{Ca}(\text{H}_3\text{edta})^+] \quad (1.7)$$

$$K_3 = [\text{Ca}(\text{Hedta})^-][\text{H}^+] / [\text{Ca}(\text{H}_2\text{edta})] \quad (1.8)$$

$$K_4 = [\text{Ca}(\text{edta})^{2-}][\text{H}^+] / [\text{Ca}(\text{Hedta})^-] \quad (1.9)$$

$$K = [\text{Ca}(\text{edta})^{2-}] [\text{H}^+]^4 / [\text{Ca}^{2+}][\text{H}_4\text{edta}] = K_1 \times K_2 \times K_3 \times K_4 \quad (1.10)$$

一般に、 $K$  は対数値で表すことが多い。

Table 1-4 Constant stability of Ca complex.

配位子	組成式	化学式	$\log K_1$
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	$\begin{array}{c} \text{HOOCCH}_2 \\ \text{HOOCCH}_2 \end{array} \Bigg\} \text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{l} \left\langle \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{COOH} \right\rangle$	10.72
IDA	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	$\text{HN} \begin{array}{l} \left\langle \text{CH}_2\text{COOH} \\ \text{CH}_2\text{COOH} \right\rangle$	2.59
Asp	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH} \\   \\ \text{CH}_2\text{COOH} \end{array}$	1.60
$\text{CO}_3$	$\text{H}_2\text{CO}_3$	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C}-\text{OH} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	1.13

Table 1-4 に、本研究で使用した各配位子と Ca 錯体の第一段階の逐次安定度定数の対数値 ( $\log K_1$ ) を示す [1-80]。全安定度定数ではないが、錯体の安定度の指標として用いた。今後、これら配位子とリン

酸イオンやリン酸水素イオンも配位している本研究が対象としている三元系錯体の安定度については、実験と理論の両面からの錯体化学的な研究が待たれる。

## 1-6 リン酸緩衝液 (PBS) およびハックス溶液 (HBSS) の調製

### 1-6.1 試薬

塩化ナトリウム (F.W. = 58.44) マナック株式会社 (特級)

リン酸水素二ナトリウム二水和物 (F.W. = 177.99) MERCK

リン酸二水素カリウム (F.W. = 177.99) 関東化学株式会社 (特級)

塩化カリウム (F.W. = 74.55) 和光純薬工業株式会社 (特級)

硫酸マグネシウム七水和物 (F.W. = 246.48) 関東化学株式会社 (特級)

炭酸水素ナトリウム (F.W. = 84.01) 関東化学株式会社 (特級)

塩化カルシウム (F.W. = 110.98) 関東化学株式会社 (特級)

精製水 共栄製薬株式会社

これらの試薬は、それ以上精製することなく使用した。

### 1-6.2 リン酸緩衝液 (PBS) の調製

1 L メスフラスコに精製水を 8 割程度入れ、塩化ナトリウムを 8.00 g、リン酸水素二ナトリウム二水和物を 2.30 g、リン酸二水素カリウムを 0.40 g を順に加えて溶解させ、メスアップしてリン酸緩衝液を調製した。リン酸緩衝液の pH は 7.4 とした。この溶液のイオン濃度を Table 1-5 に示す。この溶液は冷蔵保存し、1 ヶ月以内に使用した。

Table1-5 PBS のイオン濃度

		イオン濃度 (mM)			
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
	PBS	159.0	4.1	140.0	12.7

### 1-6.3 ハンクス溶液 (HBSS) の調製

1 L メスフラスコに精製水を 8 割程度入れ、塩化ナトリウムを 8.00 g、塩化カリウムを 0.40 g、リン酸水素二ナトリウム二水和物を 0.06 g、リン酸二水素カリウムを、0.06 g、硫酸マグネシウム七水和物を 0.20 g、炭酸水素ナトリウムを 0.35 g、塩化カルシウムを 0.35 g を順に加えて溶解させ、メスアップしてハンクス溶液を調製した。ハンクス溶液の pH は 7.4 とした。この溶液は冷蔵保存し、2 週間以内に使用した。この溶液のイオン濃度を Table1-6 に示す。

Table1-6 ヒト血漿と擬似体液 (SBF) 中における無機イオン濃度

		イオン濃度 (mM)							
		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Cl <sup>-</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
ヒト血漿		142.0	5.0	2.5	1.5	103.0	4.2	1.0	0.5
SBF	Kokubo	142.0	5.0	2.5	1.5	148.3	4.2	1.0	0.5
	Hanks	142.0	5.8	1.3	0.8	145.0	4.2	0.8	0.8

**参考文献**

- [1-1] 桜井清久. バイオマテリアルサイエンス. 化学の領域増刊 135号, 南江堂, 第1章
- [1-2] Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greeblee TK. J Biomed Mater Res Symp. 1972;2:117-143.
- [1-3] 山下仁大. バイオマテリアル. 2003;21:358-360.
- [1-4] 菊池正紀, 相澤守. 生体関連セラミックスの研究動向と将来展望. セラミックス. 2008;43:978-982.
- [1-5] 小川哲朗, 相澤守, 菊池正紀, 宮路史明. 2000年代のセラミックス 生体関連材料分野の発展. セラミックス. 2011;46:1054-1060.
- [1-6] 井村浩一, 名井陽. 骨伝導能に優れた気孔構造を持つ人工骨補填材の開発と臨床応用. セラミックス. 2005;40:839-842.
- [1-7] 中須正義, 沖花裕行, 坂本美智子, 松本智勇, 小川哲朗. 気孔径の異なる高気孔率水酸アパタイトの骨形成. セラミックス. 2005;40:828-830.
- [1-8] 入江洋之. 吸収性セラミックスの骨再生への応用. セラミックス. 2005;40:835-838.
- [1-9] Monma H, Kanazawa T. The hydration of  $\alpha$ -tricalcium phosphate. J Ceram Soc Jpn. 1976;84:209-213.
- [1-10] Chow LC. Development of self-setting calcium phosphate cements. J Ceram Soc Jpn. 1991;99:954-964.
- [1-11] 平野昌弘, 工藤孝敏. バイオアクティブ骨ペーストの開発. セラミックス. 2008;43:196-199.
- [1-12] 澤村武憲, 服部昌晃, 奥村雅彦. 生体活性骨ペーストの開発およびスキャホールドへの応用. セ

ラミックス. 2005;40:831-834.

- [1-13] Konishi T, Zhuang Z, Mizumoto M, Honda, Aizawa M. Fabrication of chelate-setting cement from hydroxyapatite powder prepared by simultaneously grinding and surface-modifying with sodium inositol hexaphosphate and their material properties. J Ceram Soc Jpn. 2012;120:159-165.
- [1-14] Yakahashi S, Konishi T, Nishiyama K, Mizumoto M, Honda, Horiguchi Y, Oribe K, Aizawa M. Fabrication of novel bioresorbable  $\beta$ -tricalcium phosphate cement on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate and its evaluation. J Ceram Soc Jpn. 2011;119:35-42.
- [1-15] Horiguchi Y, Yoshikawa A, Oribe K, Aizawa M. Fabrication of chelate-setting hydroxyapatite cements from four kinds of commercially-available powder with various shape and crystallinity and their mechanical property. J Ceram Soc Jpn. 2008;116:50-55.
- [1-16] Takahashi K, Yomanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126:663-676.
- [1-17] 相澤守, 小西敏功, 松本守雄. セラミックスデータブック 2010. 2010;38:201-205.
- [1-18] 木崎治俊他. 口腔生化学 第4版. 2010. 医歯薬出版株式会社. 第4章.
- [1-19] Jenkins GN. (河村洋二郎監訳) ジェンキンス口腔の生理・生化学. 1981. 医歯薬出版株式会社.

- [1-20] 木崎治俊他. 口腔生化学 第4版. 2010. 医歯薬出版株式会社. 第5章.
- [1-21] Neuman W, Neuman M. The chemical dynamics of bone mineral. 1958. The University of Chicago Press. Chapter 3.
- [1-22] 佐々木哲. 骨の基質をめぐって. 日歯会誌. 1989;42:513-519.
- [1-23] 金澤孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大. アパタイトの材料科学. 石膏と石灰. 1987;210:261-273.
- [1-24] 青木秀希. 驚異の生体物質 アパタイト. 1999. 医歯薬出版株式会社. 第6章.
- [1-25] Brown WE, Patel PR, Chow LC. Formation of  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  from enamel mineral and its relationship to caries mechanism. J Dent Res. 1975;54:475-481.
- [1-26] 青木秀希. 驚異の生体物質 アパタイト. 1999. 医歯薬出版株式会社. 第5章.
- [1-27] Eanes ED. Thermochemical studies on amorphous calcium phosphate. Calc Tiss Res. 1970;5:133-145.
- [1-28] Rao RR, Roopa HN, Kannan TS. Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP- $\beta$ -TCP composite ceramic powders. J Mater Sci: Mater Med. 1997;8:511-518.
- [1-29] Tadic D, Peters F, Epple M. Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites. Biomaterials. 2002;23:2553-2559.
- [1-30] Landi E, Tampieri A, Celotti G, Vichi L, Sandri M. Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite. Biomaterials. 2004;25:1963-1770.

- [1-31] Luo P, Nieh TG. Preparing hydroxyapatite powders with controlled morphology. *Biomaterials*. 1996;17:1959-1964.
- [1-32] Obata A, Fujimoto T, Kasuga T. Enhancement of bone-like apatite forming abilities of calcium phosphate ceramics in SBF by autoclaving. *J Ceram Soci Jpn*. 2006;114:63-66.
- [1-33] Ito A, Nakamura S, Aoki H, Akao M, Teraoka K, Tsutsumi S, Onuma K, Tateishi T. Hydrothermal growth of carbonate-containing hydroxyapatite single crystals. *J Crystal Growth*. 1996;163:311-317.
- [1-34] Aizawa M, Porter AE, Best SM, Bonfield W. Ultrastructural observation of single-crystal apatite fibers. *Biomaterials*. 2005;26:3427-3433.
- [1-35] Inoue S, Ono A. Preparation of hydroxyapatite by spray-pyrolysis technique. *Yogyo-Kyokai-Shi*. 1987;95:759-763. [In Japanese].
- [1-36] Huzxia JI, Ponton CB, Marquis PM. Microstructural characterization of hydroxyapatite coating on titanium. *J Mater Sci: Mater Med*. 1992;3:283-287.
- [1-37] Jansen JA, van der Waerden JP, Wolke JG. Histologic investigation of the biologic behaviour of different hydroxyapatite plasma-sprayed coatings in rabbits. *J Biomed Mater Res*. 1993;27:603-610.
- [1-38] Hulshoff JE, Hayakawa T, van Dijk K, Leijdekkers-Govers AF, van der Waerden JP, Jansen JA. Mechanical and histologic evaluation of Ca-P plasma-spray and magnetron sputter-coated implants in trabecular bone of the goat. *J Biomed Mater*

Res. 1997;36:75-83.

- [1-39] Afshar A, Ghorbani M, Saeri MR. Adsorption/desorption phenomena of plasma sprayed hydroxyapatite coating surface during immersion in the Ca-free SBF. J Ceram Soci Jpn. 2004;112:77-81.
- [1-40] Lee YP, Wang CK, Huang TH, Chen CC, Kao CT, Ding SJ. In vitro characterization of postheat-treated plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. Surf Coat Technol 2005;197:367-374.
- [1-41] Oktar FN, Yetmez M, Agathopoulos S, Lopez Goerne TM, Goller G, Ipeker I, et al. Bond-coating in plasma-sprayed calcium-phosphate coatings. J Mater Sci: Mater Med 2006;17:1161-1171.
- [1-42] Xu JL, Khor KA. Chemical analysis of silica doped hydroxyapatite biomaterials consolidated by a spark plasma sintering method. J Inorg Biochem 2007;101:187-195.
- [1-43] Dey A, Mukhopadhyay AK, Gangadharan S, Shiha MK, Basu D, Bandyopadhyay NR. Nanoindentation study of microplasma-sprayed hydroxyapatite coating. Ceram Int 2009;35:2295-2304.
- [1-44] Umegaki T, Yamada S, Hisano Y, Yamashita K, Kanazawa T. Calcium phosphate coating on titanium plate. Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem. 1990;51/52:599-602.
- [1-45] Ong JL, Lucas LC, Lachfield WR, Rigney ED. Structure, solubility and bond strength

- of thin calcium phosphate coatings produced by ion beam sputter deposition. Biomaterials. 1992;13:249-254.
- [1-46] Yoshinari M, Thtsuka Y, Deran DT. Thin hydroxyapatite coating produced by the ion beam dynamic mixing method. Biomaterials. 1994;15:529-535.
- [1-47] Yoshinari M, Hayakawa T, Wolke JGC, Nemoto K, Jansen JA. Influence of rapid heating with infrared radiation on RF magnetron-sputtered calcium phosphate coatings. J Biomed Mater Res. 1997;37:60-67.
- [1-48] Yonggang Y, Wolke JGC, Yubao L, Jansen JA. Preparation and characterization of RF magnetron sputtered calcium pyrophosphate coatings. J Biomed Mater Res. 2006;76A:744-752.
- [1-49] Yonggang Y, Wolke JGC, Yubao L, Jansen JA. The influence of discharge power and heat treatment on calcium phosphate coatings prepared by RF magnetron sputtering deposition. J Mater Sci: Mater Mrd. 2007;18:1061-1069.
- [1-50] Abe Y, kokubo T, Yamamuro T. Apatite coating on ceramics, metals and polymers utilizing a biological process. J Mater Sci: Mater Med. 1990;1:233-238.
- [1-51] Ozawa N, Ideta Y, Yao T, Kokubo T. Apatite forming anility of titanium oxide thin film synthesized from aqueous solution. Key Eng Mater. 2002;218/220:127-131.
- [1-52] Barrere F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. L Biomed Mater Res.

2003;64:378-387.

[1-53] Maeda Y, Ozawa N, Yao T. Apatite formation on hydrochloric acid treated titania thin film synthesized from aqueous solution. *Trans Mater Res Soc Jpn.* 2004;29:2281-2284.

[1-54] Haddow DB, James PF, van Noort R. Sol-gel derived calcium phosphate coatings for biomedical applications. *J Sol-Gel Sci Technol.* 1998;13:261-265.

[1-55] Hwang K, Lim Y. Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a sol-gel method. *Surf Coat Technol.* 1999;2/3:172-175.

[1-56] Weng W, Zhang S, Cheng K, Qu H, Du P, Shen G, et al. Sol-gel preparation of bioactive apatite films. *Surf Coat Technol* 2003;167:292-296.

[1-57] Choudhury P, Agrawal DC. Sol-gel derived hydroxyapatite coatings on titanium substrates. *Surf Coat Technol* 2011;206:360-365.

[1-58] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Schoonman J, Jansen JA. Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66A:330-334.

[1-59] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Schoonman J, Jansen JA. Influence of deposition parameters on morphological properties of biomedical calcium phosphate coatings prepared using electrostatic spray deposition. *Thin Solid Films.* 2005;472:105-113.

[1-60] Siebers MC, Matsuzaka k, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen

- JA. Osteoclastic resorption of calcium phosphate coatings applied with electrostatic spray deposition (ESD), in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2005;74:570-580.
- [1-61] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Siebers MC, Schoonman J, Jansen JA. In vitro and in vivo reactivity of porous, electrospayed calcium phosphate coatings, *Biomaterials* 2006;27:3368-3378.
- [1-62] Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Boerman OC, Jansen JA. Transforming growth factor-beta1 release from a porous electrostatic spray deposition-derived calcium phosphate coating. *Tissue Eng*. 2006;12:2449-2456.
- [1-63] Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. The influence of the crystallinity of electrostatic spray deposition-derived coatings on osteoblast-like cell behavior, in vitro. *J Biomed Mater Res A*. 2006;78A:258-267.
- [1-64] Takahashi K, Hayakawa T, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Sato M, Nemoto K. Molecular precursor method for thin calcium phosphate coating on titanium. *Thin Solid Films*. 2005;484:1-9.
- [1-65] Hayakawa T, Takahashi K, Yoshinari M, Hara H, Nemoto K, Sato M. Molecular precursor method can coat thin carbonate-containing apatite (CA) film inside titanium fiber mesh. *J Oral Tissue Engin*. 2005;3:17-24.
- [1-66] Hayakawa T, Takahashi K, Yoshinari M, Okada H, Tamamoto H, Sato M, Nemoto K. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2006;21:851-858.
- [1-67] Hayakawa T, Takahashi K, Okada H, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Yamamoto H,

- Sato M. Effect of thin carbonate-containing apatite (CA) coating of titanium fiber mesh on trabecular bone response. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008;19:2087-2096.
- [1-68] Hayakawa T, Ametani A, Kuboki Y, Sato M. Thin carbonate-containing apatite coating of a titanium web using a molecular precursor method under oxygen gas introduction. *J Oral Tissue Engin.* 2009;6:201-210.
- [1-69] Hirota M, Hayakawa T, Ametani A, Kuboki Y, Sato M, Tohnai I. The effect of hydroxyapatite-coated titanium fiber web on human osteoblast functional activity. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:245-250.
- [1-70] Ong JL, Chan DCN. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: A review. *Crit Rev Biomed Eng* 1999;28:667-707.
- [1-71] Paital SR, Dahotre NB. Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: materials performance factors, and methodologies. *Mater Sci Eng R* 2009;66:1-70.
- [1-72] Sato M, Tanji T, Hara H, Nishide T, Sakashita Y. SrTiO<sub>3</sub> film fabrication and powder synthesis from a non-polymerized precursor system of a stable Ti(IV) complex and Sr(II) salt of edta. *J Mater Chem.* 1999;9:1539-1542.
- [1-73] Nagai H, Hara H, Enomoto M, Mochizuki C, Honda T, Takano I, Sato M. Synchronous Electrochromism of Lithium Ion Battery with Chemically Fabricated Transparent Thin Films. *Functional Materials Letters.* 2013;6:1341001-1341008.
- [1-74] Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue

engineering. Biomaterials. 2010;31:461-466.

[1-75] Cullity BD. Elements of X-ray diffraction. Addison-Wesley Publishing Company Inc., USA;1978.

[1-76] Scherrer P. Nachr Ges. Wiss Göttingen. 1918;26:98.

[1-77] Hall WH. X-ray line broadening in metals. Proc. Phys. Soc. 1949;A62:741-743.

[1-78] Benjamin P, Weaver C. Proc. Royal Soc. London, A254 1960 163-176.

[1-79] Liou SC, Chen SY. Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into  $\beta$ -tricalcium phosphate upon calcination. Biomaterials. 2002;23:4541-4547.

[1-80] The IUPAC Stability Constant Database; Mini-SCDatabase. Academic Software UK.

## 第2章 Ca 錯体からのアパタイト粉末合成

第1章で述べたように、現在工業的に用いられているアパタイトの粉末合成は、主に湿式法による。水に石灰 ( $\text{CaCO}_3$ ) または消石灰 ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) を懸濁させて、pH が酸性にならないように懸濁溶液に水で希釈したリン酸を徐々に加える、いわゆる中和反応である。しかし、この方法は時間を要する上に、pH の変化に細心の注意を必要とする。また、硝酸カルシウムとリン酸アンモニウムを水溶液中で塩同士を反応させる方法もあるが、生成物中に硝酸やアンモニア、およびそれらの塩などの副生成物が混入する問題点がある。本論文では、ポリアミノポリカルボン酸を含むアミノ酸類を配位子とした、リン酸イオン共存三元系 Ca 錯体水溶液を利用するアパタイト粉末を新たに合成する手法について検討結果をまとめた。

### 第1節 EDTA の Ca 錯体を經由するアパタイト合成

#### 2.1-1 緒言

佐藤らは、金属錯体を出発原料とする薄膜形成を試み、分子プレカーサー法を新規な湿式薄膜形成法として提案した [2-1, 2-2]。この方法では、EDTA の Ca 錯体とジブチルアミンをエタノールに溶解させ、二リン酸ジブチルアンモニウム塩を Ca/P 比 1.67 (水酸アパタイト,  $\text{HA} : \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  の理論値) になるよう加えてアパタイト薄膜用プレカーサー溶液を合成している。Ti 基板の上にスピコート法で膜を塗布し、 $500^\circ\text{C}$  以上の温度による焼成で炭酸アパタイト ( $\text{CA} : \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)$ ) 膜を形成する [2-3]。分子プレカーサー法では、プレカーサー溶液を乾固すると目的物の粉体も得られる。そこで、この方法を応用し、EDTA の Ca 錯体を用いてアパタイト粉末を得る合成方法を検討した。また、鳥山らは硝酸カルシウムとリン酸水素二アンモニウムと EDTA の二 Na 塩を反応させて、 $90^\circ\text{C}$  の過酸化水素水中で、4 時間の反応によってアパタイト粉末を得た [2-4]。その反応では、pH が 5 以上の溶液から結晶性の良い水酸アパタイト (HA) が生成した。

しかし、EDTAを完全に酸化分解するために必要な過酸化水素は、物質質量比で40倍以上を要し、生成物中へのNaイオンの混入も推定される。

EDTAはキレート剤として知られ、硬水中の $Mg^{2+}$ や $Ca^{2+}$ を補足して軟水化できることから、工業的に多用されており安価である。本研究では、Naイオンを含まないEDTAを配位子とするCa錯体を合成し、リン酸と反応させることによって、より簡便なアパタイト粉末の合成を試みた。

## 2.1-2 実験方法

### 2.1-2.1 試薬

エチレンジアミン-N, N, N', N',-四酢酸 (EDTA =  $H_4edta$ , F.W. = 292.25) 関東化学株式会社  
(鹿特級)

酢酸カルシウム一水和物 (F.W. = 176.18) 関東化学株式会社 (特級)

過酸化水素水 (30%, F.W. = 34.01) 三徳化学工業株式会社 (試薬特級)

アンモニア水 (28%, F.W. = 17.03) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

オルトリン酸 (85% over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

エタノール (F.W. = 46.07) 甘糟化学株式会社 (試薬特級)

PBS 溶液 (第1章 1-5 参照)

EDTAのCa錯体の合成には、精製水(共栄製薬株式会社)を使用した。これらの試薬は、それ以上精製することなく使用した。

### 2.1-2.2 EDTA の Ca 錯体の合成

2 L ビーカー中に精製水を1.75 L 量り入れ、75°Cに加熱した。攪拌しながら175.37 g (0.60 mol)のEDTAを加えて、白色懸濁溶液を得た。液温を75°Cに保ちながら、105.71 g (0.60 mol)の酢酸カル

シウム一水和物を加えて、反応溶液の全量を 2 L とした。反応溶液を 75°C で攪拌中に、はじめの懸濁とは異なる白色結晶が析出し始めた。全試薬を添加後、さらに 2 時間加熱攪拌した後、室温まで放冷して一晩静置した。その後、白色沈殿を吸引ろ過した。純水で洗浄して 210.77 g の白色粉末を得た。Fig. 2-1 に合成のフローチャートを示した。

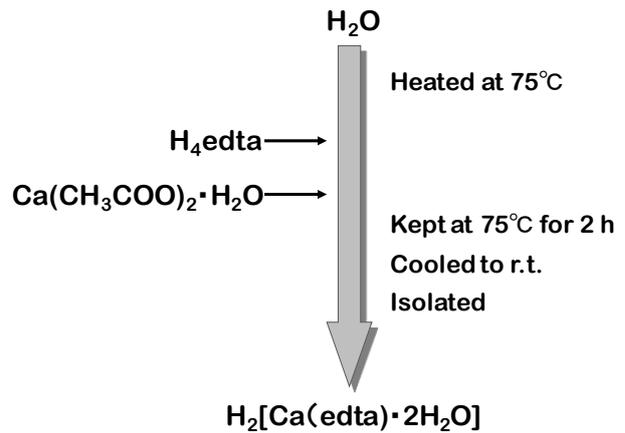


Fig. 2-1 Schematic representation for preparation of  $(H)(H_5O_2)[Ca(edta)]$ .

### 2.1-2.3 低結晶性 CDHA (PA) 粉体の合成

1 L ビーカー中に 39.37 g (0.34 mol) の 85 %  $H_3PO_4$  を量り取り、さらに 776.14 g (6.85 mol) の 30% 過酸化水素水を加えて混合溶液を調製して氷浴した。この氷冷溶液中に 209.00 g (0.57 mol, F.W. = 366.34) の  $(H)(H_5O_2)[Ca(edta)]$  を攪拌しながら添加した。液温を 5°C で一定に保ちながら、滴下口を用いて 4 秒に 1 滴の割合で、28%  $NH_4OH$  を 138.79 g (2.28 mol) を加えて攪拌し、無色透明溶液を得た。溶液中の  $H_2O_2/Ca$  物質質量比を 12, Ca/P 物質質量比を 1.68 とし、反応溶液の pH を 7.8 とした。この無色透明溶液を塩化ビニル製容器に移し、超音波を照射しながら反応溶液の温度を室温から 30 分間で 50°C まで上げた。40°C 付近で懸濁溶液となり、さ

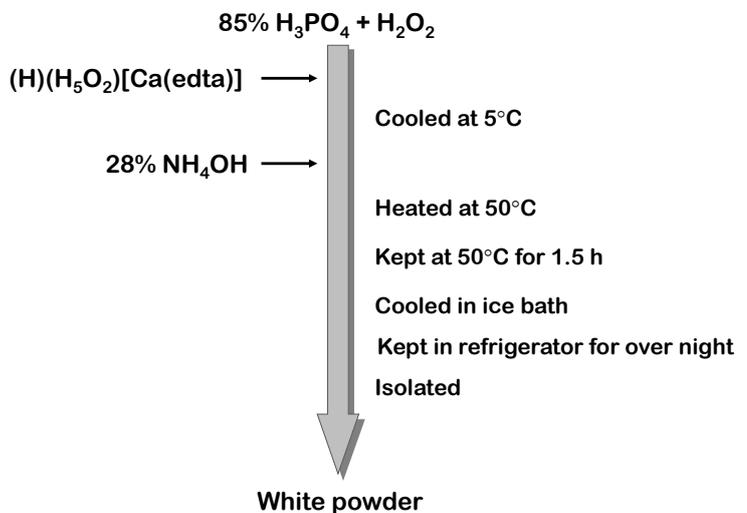


Fig. 2-2 Schematic representation for preparation of the low crystallinity CDHA powder.

らに 50°C で 1.5 時間超音波照射した後、氷浴中で急冷した。その後、冷蔵庫内で一晩静置した。

溶液を室温にした後、生じた粉末を吸引ろ過で回収し、0.5 L の精製水で洗浄した。70°C の乾燥器中で 1 時間乾燥し、極淡黄色粉末を得た。超音波照射・回収の操作を同一溶液で合計 3 回行い、8.57 g (1 回目) , 8.45 g (2 回目) , 12.0 g (3 回目) , 合計 29.02g の粉末を回収した (PA) 。Fig. 2-2 に合成のフローチャートを示す。PA の組成を同定するため、得られた粉末の一部を空气中 850°C, 30 分間で熱処理して粉末 (PA') を得た。

#### 2.1-2.4 高結晶性 CHA/CDHA (PB7) 粉末の合成

500 mL 三角フラスコ中に、9.8 g (0.09 mol) の 85%  $H_3PO_4$  と 405 g (3.60 mol) の 30% 過酸化水素水を加えて攪拌した。さらに 52.0 g (0.14 mol, F.W. = 366.34) の  $(H)(H_5O_2)[Ca(edta)]$  と 35.6 g (0.59 mol) の 28%  $NH_4OH$  を加えて良く攪拌し、無色透明溶液を得た。溶液中の  $H_2O_2/Ca$  物質質量比を 25, Ca/P 物質質量比を 1.67 とし、反応溶液の pH を 8.8 とした。この溶液を加熱し、一旦還流が始まったところで加熱を停止した。加熱時 50°C 付近から結晶が析出し、懸濁液となった。その後、発泡が止まるまで攪拌した後、再加熱して 2 時間還流し、その後放冷した。

一晩静置後、淡黄色沈殿を吸引ろ過で回収し、0.5 L の精製水で洗浄した。この淡黄色粉末 (PB) を空气中 700°C, 30 分間熱処理して 12.9 g の粉末 (PB7) を回収した。Fig. 2-3 に合成フ

ローチャートを示す。PB7 の組成を同定

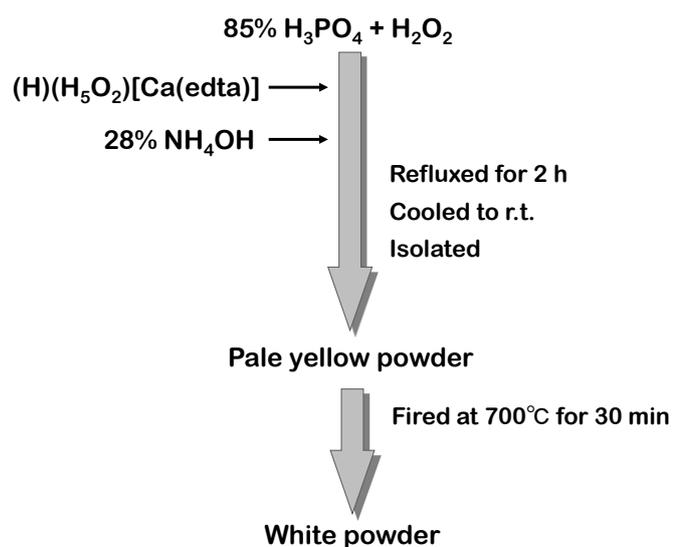


Fig. 2-3 Schematic representation for preparation of the high crystallinity of CHA/CDHA powder.

するために、その一部を空气中 850°C で、30 分間熱処理して粉末 (PB') を得た。

## 2.1-2.4 測定

EDTA の Ca 錯体の組成は、FT-IR, 元素分析, TG-DTA 測定により決定した。PA および PB7 について、XRD, FT-IR, 元素分析, 粒径分布, 溶解度の測定ならびに FE-SEM 表面観察を行い、PA と PB' については、XRD, FT-IR, 元素分析を実施した。

得られたアパタイトの PBS 水溶液への溶解度は次のように測定した。100 g の PBS 中に過剰量 (0.90～0.92 g) のアパタイト粉末を添加した溶液を、1 週間 37°C に保った。実験期間中は、定期的に攪拌した。未溶解のアパタイト粉末を自然ろ過で除去し、ろ液を 70～85°C で蒸発乾固して固形分質量  $W_{Ap+PBS}$  を測定した。別に、100 g の PBS を乾固した質量  $W_{PBS}$  を測定し、 $(W_{Ap+PBS} - W_{PBS})$  から、溶解したアパタイトの質量を算出した。

## 2.1-3 結果

### 2.1-3.1 EDTA の Ca 錯体

合成した白色粉体の FT-IR 結果を Fig. 2-4 に示す。EDTA のスペクトルに観測される  $1690\text{ cm}^{-1}$  付近

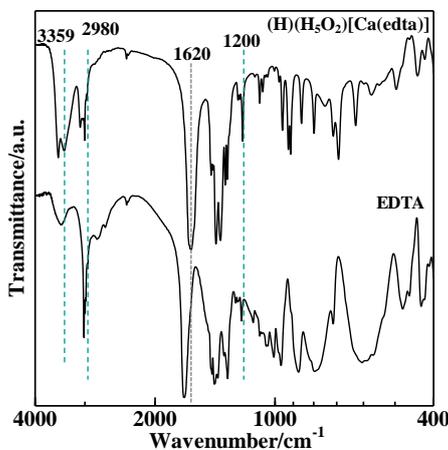


Fig. 2-4 FT-IR spectra of EDTA and Ca complex with EDTA.

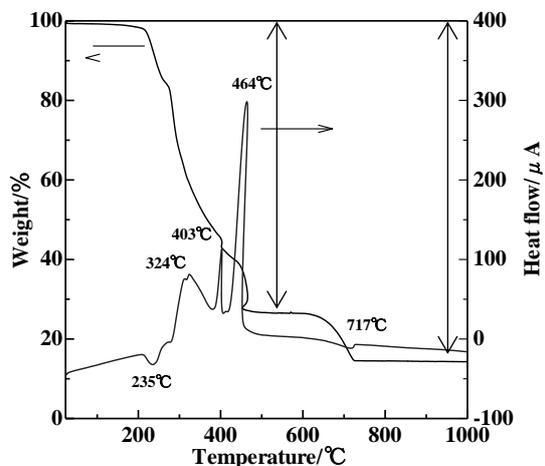


Fig. 2-5 TG-DTA curves of Ca complex with EDTA.

のカルボキシ基の特徴的なピークが、EDTA の Ca 錯体のスペクトルでは  $1620\text{ cm}^{-1}$  にシフトしていた。 $1200\text{ cm}^{-1}$  は、 $\text{H}_5\text{O}_2^+$  の中心の H,  $2980$  および  $3359\text{ cm}^{-1}$  には、 $\text{H}_5\text{O}_2^+$  の  $\text{H}-\text{O}^+-\text{H}$  の振動を観測した。

合成した白色粉体の TG-DTA 結果を Fig. 2-5 に示す。235°C の重量減少を伴う吸熱ピークは、配位水の脱離, 324, 403, 464°C の重量減少を伴う発熱ピークは EDTA の燃焼, 717°C の重量減少を伴う吸熱ピークは  $\text{CaCO}_3$  から  $\text{CaO}$  への組成変化である。235°C での重量減少率から 2 つの配位水を含む錯体であった。

合成した白色粉体の元素分析結果を Table 2-1 に示す。Ca と EDTA を 1 : 1 で含む化合物の 2 水和物,  $(\text{H})(\text{H}_5\text{O}_2)[\text{Ca}(\text{edta})]$  (F.W. 366.34) とした計算値とよく一致した。

この合成方法は、収率 92~96% で再現よく同一化合物が得られた。

Table 2-1 Elemental analyses of C, H and N in Ca complex with EDTA.

	C	H	N
	%		
Found	32.69	5.06	7.71
Calcd.	32.78	4.95	7.65

### 2.1-3.2 低結晶性 CDHA (PA) および高結晶性 CHA/CDHA (PB7) 粉末の同定と溶解度

Fig. 2-6 に示した **PA** と **PB7** の XRD パターンは、HA (JCPDS カード No.9-432) または CDHA (No.46-905) と一致した。一方、熱処理後の **PA'** の XRD パターンは、 $\beta$ -TCP (JCPDS カード No.9-169) に一致し、**PB'** の XRD パターンは HA と  $\beta$ -TCP の混合相であることを示した。HA と  $\beta$ -TCP の混合割合は、それぞれの最強ピークの強度と FWHM を算出し、検量線 (Fig. 1-11) から決定した。結果

的に, **PB'**は 25%の  $\beta$ -TCP を含有した HA であることが分かった。

また, **PA** および **PB7** の結晶子サイズは, それぞれ 24(3)および 40(6) nm であった。

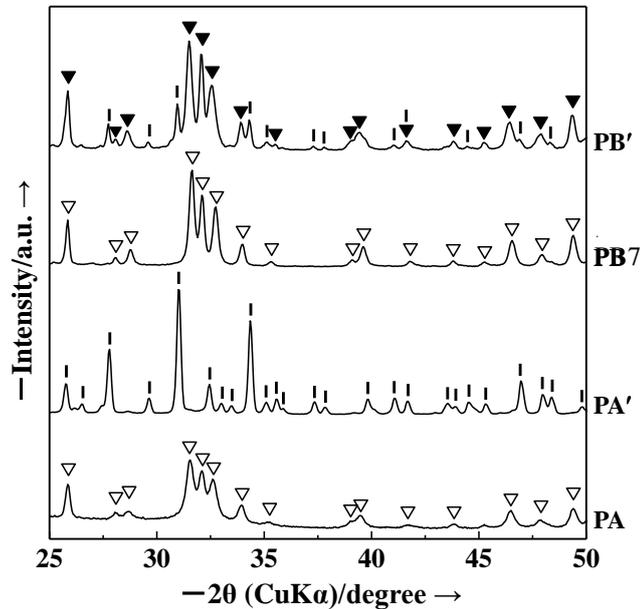


Fig. 2-6 XRD patterns of deposited powders of CDHA and the CHA/CDHA mixture and those after heat treatment. **PA**: deposited powders of CDHA with low crystallinity, **PA'**: powders obtained by heat-treated the deposited CDHA at 850°C, **PB7**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 700°C, and **PB'**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 850°C. The peak positions of CP, HA, CDHA and  $\beta$ -TCP are indicated by the inverted triangle  $\nabla$ , filled inverted triangle  $\blacktriangledown$ , stick |, and circle  $\bullet$ , respectively.

Fig. 2-7 に, **PA**, **PA'**, **PB7** および **PB'** の FT-IR スペクトルを示す。いずれの粉末も, 900~1120, 550~605  $\text{cm}^{-1}$  に, P-O 結合の伸縮および変角振動にそれぞれ帰属されるピークを示した。さらに, **PA** は, 1410 および 1620  $\text{cm}^{-1}$  に配位子のカルボキシ基の伸縮振動と 3465  $\text{cm}^{-1}$  付近に水の伸縮振動, **PB** の 636 および 3571  $\text{cm}^{-1}$  のピークはそれぞれヒドロキシ基の変角振動と伸縮振動に帰属でき, 1470 および 1555  $\text{cm}^{-1}$  のピークは, 炭酸基の伸縮振動に帰属できた。

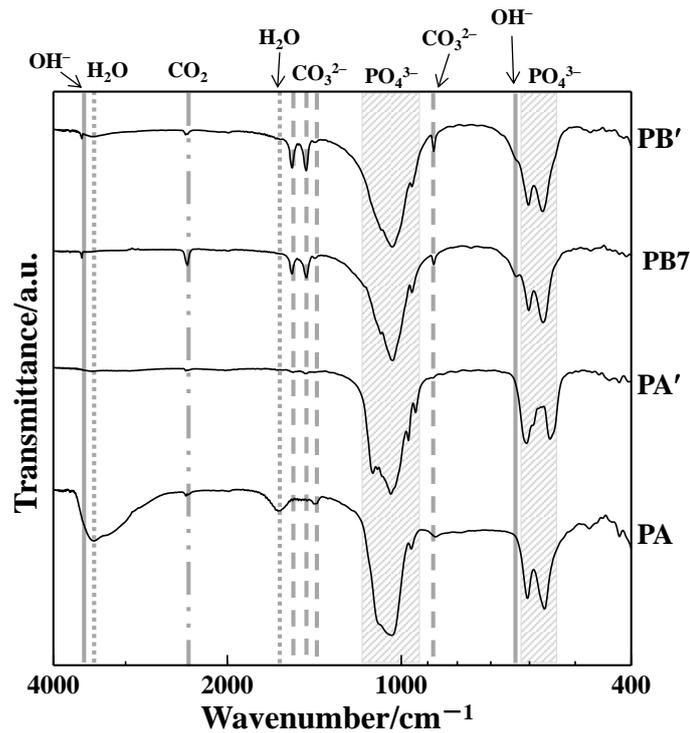


Fig. 2-7 FT-IR spectra of deposited CDHA and CHA/CDHA powder and those after heat-treatment. **PA**: deposited powders of CDHA with low crystallinity, **PA'**: powders obtained by heat-treated the deposited CDHA at 850°C, **PB7**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 700°C, and **PB'**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 850°C.

Table 2-2 には、**PA**、**PA'**、**PB7** および **PB'** の元素分析結果を示す。**PA** は、C、H、N 分析値が高く、有機物を含有していることが分かり、配位子由来の  $(\text{NH}_4)_2(\text{H}_2\text{edta})$  を含む  $2\text{CDHA} \cdot (\text{NH}_4)_2(\text{H}_2\text{edta}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  とした計算値とよく一致した。この推定は、FT-IR の結果と良く整合する。この式量から算出した収率は、40%であった。

**PA'** は、TCP の計算値とよく一致し、空気中での熱処理中に  $(\text{NH}_4)_2(\text{H}_2\text{edta})$  が燃焼除去されたことが分かった。**PB7** および **PB'** は、それぞれ、 $3\text{HA} \cdot 6\text{CHA} \cdot \text{CDHA}$ 、 $\text{HA} \cdot 3\text{CHA} \cdot \text{TCP}$  とした計算値とよく一致した。高温での熱処理によって、有機物は除去されたことが分かる。含有炭素は、FT-IR スペクトルで確認できた炭酸イオンに帰属できる。これらの結果から、EDTA の Ca 錯体 ( $\text{H}_2[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{edta})]$ ) からの **PB7** への収

率は, 89%であった。

Table 2-2 Elemental analyses of CDHA and CHA/CDHA mixture and those after heat-treatment.

**PA**: deposited powders of CDHA with low crystallinity, **PA'**: powders obtained by heat-treated the deposited CDHA at 850°C, **PB7**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 700°C, and **PB'**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 850°C.

		<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>	<b>Yield</b>	<b>Chemical formula</b>	<b>Formula weight</b>
		%			%		
<b>PA</b>	Found	5.12	1.53	2.31	40		
	Calcd.	5.27	1.42	2.46		2CDHA·(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> edta)·3H <sub>2</sub> O	2277
<b>PA'</b>	Found	0.26	0.18	0.08			
	Calcd.	0.38	0.06	0.00		TCP	310
<b>PB7</b>	Found	0.90	0.05	0.29	89		
	Calcd.	0.70	0.20	0.00		3HA·6CHA·CDHA	10254
<b>PB'</b>	Found	0.62	0.06	0.23			
	Calcd.	0.78	0.09	0.00		HA·3CHA·TCP	4595

Fig. 2-8には, **PA**および**PB7**の粒径分布を示す。**PA**の平均粒径は1.9 μm, 分布範囲は0.4~7.8 μmであった。一方, **PB7**の平均粒径は15 μmで, 分布範囲は0.3~69 μmとより広範囲に分布していた。

37°Cにおける**PA**および**PB7**の溶解度は, Ca<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝液 (PBS) 100 g 中で, それぞれ, 0.18 および 0.07 g であった。

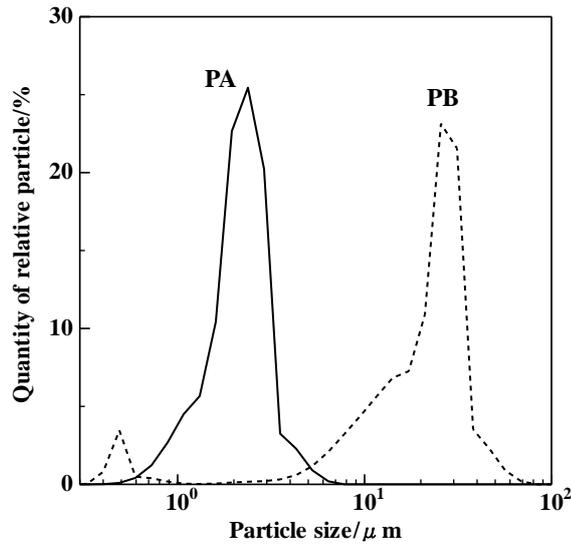


Fig. 2-8 Particle size distribution of **PA**: deposited powders of CDHA with low crystallinity and **PB**: powders obtained by heat-treated the deposited CHA/CDHA mixture at 700°C.

Fig. 2-9 に **PA** および **PB** の表面形態を示す。**PA** の粒子は、針状微細結晶の球状集合体で、**PB** は柱状結晶の球状集合体であった。両者の球状集合体の大きさは、大きく異なっていた。

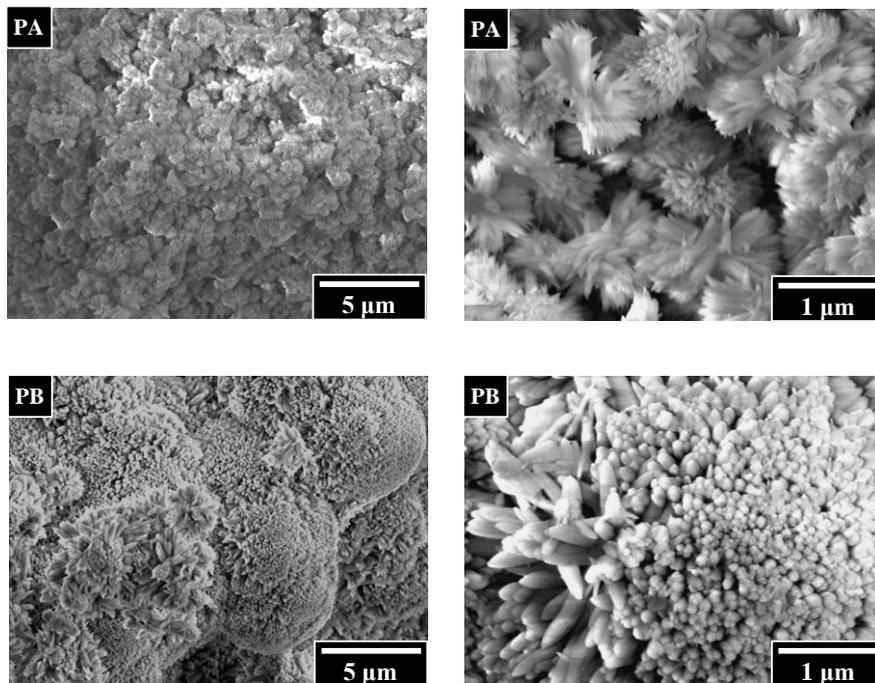


Fig. 2-9 SEM images of **PA**: deposited powders of CDHA with low crystallinity and **PB**: powders obtained by heat-treating the deposited CHA/CDHA mixture at 700°C.

## 2.1-4 考察

### 2.1-4.1 過酸化水素水による錯体の分解とアパタイト形成

EDTA の Ca 錯体の安定度定数は高く、約 11 である [2-6]。EDTA の Ca 錯体の熱分解温度は約 470°C と高いことが TG-DTA 曲線からもわかっており、錯体を分解し、 $\text{Ca}^{2+}$ を放出させるためには、反応溶媒に  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いる必要があった。酸化還元剤として作用する過酸化水素は、不安定で分解しやすい。一方、その利点は、分解しても水と酸素に分解されるため生成物に残存しないことである。分解が連続的に起こることから敬遠されがちではあるが、安定剤であるリン酸の共存で、分解が緩慢になると考えられる。そこで、本合成法では、予め過酸化水素水にリン酸を添加しておき、EDTA の Ca 錯体と急激に反応が進行しないように工夫した。この合成法では、必要な過酸化水素を EDTA の Ca 錯体に対して、物質量比 12 倍まで下げても、40%程度の収率でアパタイト粉末を合成できた。しかし、10 倍量の過酸化水素ではほとんど生成物は得られなかった。

EDTA の Ca 錯体は水と過酸化水素水にほとんど溶解せず、混合溶液は酸性で不均一だった。しかし、EDTA の Ca 錯体の物質量に対して 4 倍のアンモニアを添加して、反応溶液を塩基性にしたところ、無色透明均一溶液を一旦得ることができた。この均一溶液を加熱中に白色結晶が生じた。EDTA の Na 塩を用いる系では、HA を析出する溶液の pH は 5 以上と鳥山らによって報告された [2-4]。本研究では、反応溶液の pH を 8.8 としてアパタイトを析出させており、より強い塩基性条件下で合成した。

反応温度を変えて得られた 2 種類のアパタイトは、850°C の熱処理によって  $\beta$ -TCP に分解する成分を含んでいたことから、熱処理前のアパタイトは CDHA を含んでいたことが分かった。また、生成物の FT-IR スペクトルはいずれも炭酸基に帰属できるピークを示し、CHA が生成したことを示した。一般に、湿式法で作成したアパタイト粉末は炭酸を含有することが知られており、溶媒中に微量に溶解している  $\text{CO}_2$  が供給源とされている。本

合成においては、配位子の EDTA が部分的に分解して生じた副生成物からも供給されたと考えられる。また、得られた粉末には、EDTA 配位子由来のアンモニウム塩  $((\text{NH}_4)_2(\text{H}_2\text{edta}))$  が含まれていた。これは、錯体の分解で生じた EDTA がアンモニアで中和されて形成され、生成アパタイトに吸着して最終生成物に取り込まれたと考えられる。この塩が共存していたことから、アパタイトの形成には、EDTA の完全な酸化分解は必要ないことも明らかになった。すなわち、この塩の共存から、少なくともアパタイト形成反応の一部は、Ca 錯体の配位子置換反応で供給された  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとリン酸との反応で形成されたと推定できる。この推定は、錯体の安定度に着目した3節以降の研究を展開する上で参考とした。

この反応は、予め作成した反応溶液を加えることで連続的に反応が可能であることから、分子プレカースーの酸化分解による連続結晶化法 (C<sup>2</sup>MODE) と呼ぶ。EDTA の Ca 錯体を用いる優位点を以下に示す。

- <1> 反応溶液は均一で、得られたアパタイトの組成も均一であった。
- <2> Ca/P 比の簡単な制御により、CP の組成も制御可能であった。
- <3> CP の結晶性は、反応条件、例えば温度制御等の調製により制御可能であった。

#### 2.1-4.2 反応温度による結晶性制御

EDTA の Ca 錯体とリン酸の混合水溶液に4倍物質量のアンモニアを添加して溶液を塩基性にしても、またアパタイトも生じなかった。さらに、反応溶液に高濃度の過酸化水素水を用いても、室温では同様に反応しなかった。溶液を 50°C に加温したところ、白色生成物が析出したが、回収できるほどではなかった。そこで、過酸化水素を反応剤としながら 50°C の浴中で超音波照射したところ反応が起こり、40%程度の収率で低結晶性 CDHA 粉末が得られた。

**PA** は、EDTA の Ca 錯体に対する過酸化水素の物質量が、12 倍と低いにも関わらず、50°C での反応で合成できた。その結晶子サイズは 24 nm と小さく、低結晶性粉末だった。**PB** の合成には、過酸化水素

を25倍用い、還流温度での反応において、結晶子サイズは34 nmだった。**PA**は、Ca欠損型のCDHAであるのに対し、**PB**は4HA・8CA・CDHAで、アパタイトのほとんどはCa充足型であった。このように、約40～50°Cの反応温度の小さな差で、生成物がCa充足型と欠損型が得られたことは、EDTAのCa錯体の分解速度が温度によって大きく異なることを示唆している。高温で得られる粉末の結晶性が高いことから、反応はEDTAのCa錯体の分解によるアパタイト析出と結晶成長が同時に進行していると考えられる。一方、50°Cの反応では結晶は析出して結晶成長が緩やかで、結晶性が低かったと考えられる。このことから、C<sup>2</sup>MODEは、反応温度範囲を50°C～還流温度まで変化させて、結晶性を制御が容易な方法であることがわかった。

### 2.1-4.3 生成アパタイトの溶解度と結晶性

PBS中での溶解度は十分な固液平衡状態を得るために、溶液に溶出した成分の質量変化を1週間後に測定したことから、各物質に固有な値が得られたと考えられる。その結果、**PA**と**PB7**の溶解度は、0.18と0.07 gで2.5倍程度異なった。一般に炭酸を含有するアパタイトは、溶解度の高いことが知られている[2-7～2-10]。**PB7**は3HA・6CHA・CDHAで、炭酸を含んでいるが、溶解度は**PA**よりも低かった。**PA**は化合物中に17 mol%の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>edta)とH<sub>2</sub>Oを含有しており、これら塩と水はPBS溶液中に容易に溶出すると考えられる。この仮定に基づいて、溶解度測定に用いた**PA**の質量(約0.9 g)から(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>edta)とH<sub>2</sub>Oの質量を算出すると約0.13 gであり、**PA**の溶解量の約8割は(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>edta)とH<sub>2</sub>Oによると考えられる。したがって、**PA**中のCDHAのみの溶解量は、0.05 gと見積もることができる。一方、**PB7**の溶解量の0.07 gはすべてアパタイトの溶解に起因する。このように、アパタイト部分に起因する溶解性のみを比較すると、炭酸を含有している**PB7**が、**PA**よりも高いと考えられる。一方、**PA**は**PB7**よりも結晶子サイズが小さく、結晶性は低い。このことは、3章で検討したポリマー複合化スキャフォールドを生体に埋入した際に、これら生成物の溶解性やアパタイトの結晶性がどのように影響するか興味深い。

## 2.1-5 結言

EDTA の Ca 錯体を用いて、過酸化水素中でリン酸と反応させる C<sup>2</sup>MODE によって、低結晶性 CDHA (PA) と高結晶性 CHA/CDHA (PB) 粉末の合成を行い、以下のことが明らかとなった。

1. Ca<sup>2+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>共存下でも CP が析出しない均一水溶液反応を達成した。
2. 低結晶性 CDHA (PA, CDHA·(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>edta)·3H<sub>2</sub>O) は、EDTA の Ca 錯体と過酸化水素の物質質量比を 12 として、リン酸との 50°C の反応液にアンモニアを一度に添加して達成された。
3. 高結晶性 CHA/CDHA (PB7, 3HA·6CHA·CDHA) は、EDTA の Ca 錯体と過酸化水素の物質質量比 25 では、リン酸混合液に還流温度でアンモニアを添加する反応により達成され、引き続き得られた粉末を空气中 700°C で熱処理して、配位子由来の有機残存物を除去できた。
4. EDTA の Ca 錯体の分解に必要な過酸化水素は、物質質量比で錯体の 12 倍以上であった。
5. 生成アパタイトの結晶性は反応温度に依存し、溶解度は残存する配位子の塩の共存に大きく影響されることが分かった。

EDTA の Ca 錯体の分解には、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が有効であることはすでに報告がある [2-4]。本法では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に熱を加え、より迅速に Ca-EDTA 錯体の分解を促進させ、アパタイト析出に必要な Ca<sup>2+</sup>を供給できることを明らかとした。しかし、生成物中に配位子由来の有機残存物を含有していることは、錯体の完全な酸化分解は必要ないことを示しており、EDTA の Ca 錯体が安定すぎる。Ca 充足型アパタイトを得るための Ca<sup>2+</sup>の供給量を増やすために錯体設計が必要であることを示唆している。さらに、CDHA の結晶性を抑えたまま析出させるために、超音波照射が有効なことも明らかとした。

## 第2節 IDA の Ca 錯体を經由するアパタイト合成

### 2.2-1 緒言

EDTA の Ca 錯体を過酸化水素中で分解させて、反応温度を変えることで結晶性の異なるアパタイト粉末を容易に得られる C<sup>2</sup>MODE を前節で達成した。Ca 錯体の分解により Ca<sup>2+</sup>を供給する方法は、従来の工業的なアパタイト合成のように煩わしい pH 制御を要すことなく、均一なアパタイト粉末が得られ、安価にアパタイトを提供できる。しかし、過酸化水素を利用し加熱することは、この方法の欠点である。そこで、次の4点に着目し合成を試みた。(1) 過酸化水素を用いない合成、(2) 50%以上の収率、(3) 低結晶性粉末、(4) 配位子由来の有機物の含有率の減少。本節では、EDTA と類似するアミノポリカルボン酸で、EDTA の部分構造を有するイミノ二酢酸 (IDA) を配位子とする Ca 錯体からのアパタイト粉末合成を試みた。IDA の Ca 錯体は EDTA 錯体より安定度定数が小さく 2.6 で、水を溶媒として反応が進行することを期待した。本研究では、水中でのアパタイト粉末の合成を試み、得られた粉末の組成や溶解度などの性質を調べた。

### 2.2-2 実験方法

#### 2.2-2.1 試薬

イミノ二酢酸 (IDA = H<sub>2</sub>ida, F.W. = 133.10) 関東化学株式会社 (鹿特級)

酢酸カルシウム一水和物 (F.W. = 176.18) 関東化学株式会社 (特級)

アンモニア水 (28 %, F.W. = 17.03) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

重水 (99.9% D<sub>2</sub>O, F.W. = 20.03) 和光純薬工業株式会社

Ca-IDA 錯体の合成には、精製水（共栄製薬株式会社）を使用した。これらの試薬はそれ以上精製することなく使用した。

### 2.2-2.2 IDA の Ca 錯体の合成

2 L ビーカーに精製水を 1.5 L 量り入れ、70°C に加熱した。IDA の 106.49 g (0.80 mol) を加え、白色懸濁溶液を得た。液温を 70°C に保ちながら、酢酸カルシウム一水和物を 70.47g (0.40 mol) 加え、反応溶液の全量を 2 L とした。反応溶液を 70°C で攪拌中に白色結晶が析出した。試薬を添加後 1 時間加熱攪拌した

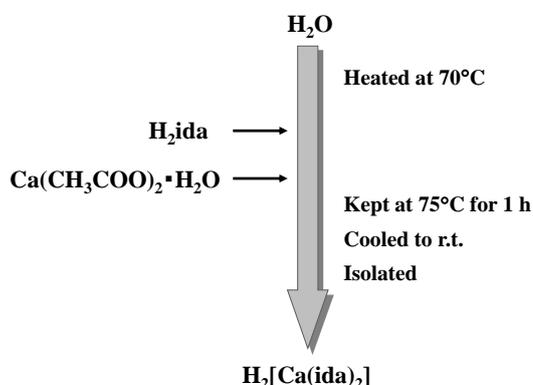


Fig. 2-10 Schematic representation for preparation of  $H_2[Ca(ida)_2]$ .

後、室温まで放冷し、一晚静置後、白色沈殿を吸引ろ過した。純水で洗浄して 93.09 g の白色粉末を得た。Fig. 2-10 に合成のフローチャートを示す。

### 2.2-2.3 低結晶性 CDHA (PC) 粉末の合成

500 mL ビーカーに  $H_2[Ca(ida)_2]$  の 5.00 g (16.4 mmol) を秤量し、精製水 325 g を加えて攪拌した。結晶が完全溶解した無色透明溶液の pH は 5.6 であった。ここに、Ca/P 比 1.67 となるように 85%  $H_3PO_4$  1.13 g (9.8 mmol) を一度に加え、10 分間攪拌した。この透明溶液の pH は 2.4 だった。その後、28%  $NH_4OH$  3.00 g (49.3 mmol) を一度に加えたところ、直ちに白色結晶が析出した。結晶析出後の溶液

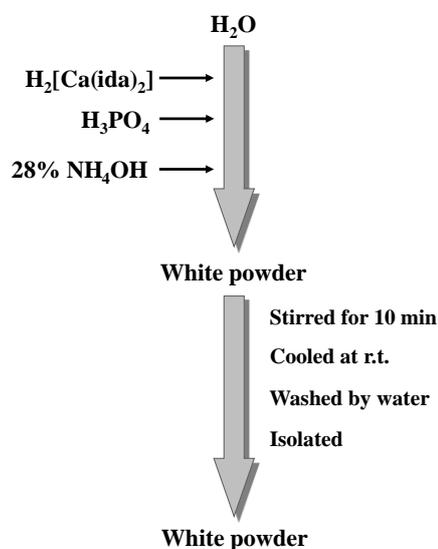


Fig. 2-11 Schematic of representation for preparation of the low crystallinity CDHA powder.

の pH は, 9.4 だった。結晶析出後, 10 分間攪拌した後, 自然ろ過した。この結晶を 0.8 L の精製水で 3 回洗浄し, 再度ろ過・回収し, 70°C の乾燥機で 1 晩乾燥させて回収した。Fig. 2-11 に合成のフローチャートを示す。収量 1.47 g。

#### 2.2-2.4 低結晶性 CHA/HA (PD) 粉末の合成

500 mL セパラブルフラスコに  $\text{H}_2[\text{Ca}(\text{ida})_2]$  を 5.00 g (16.4 mmol) 秤量し, 精製水 325 g を加えて攪拌した。完全溶解した無色透明溶液の pH は 5.6 であった。ここに, Ca/P 比 1.67 となるように 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.13 g (9.8 mmol) を一度に加え, 10 分間攪拌した。この透明溶液の pH は 2.4 であった。この溶液に 28%  $\text{NH}_4\text{OH}$  3.00 g (49.3 mmol) を一度に加えたところ, 直ちに白色結晶が析出した。溶液の pH は 9.0 であった。反応溶液を 90°C まで加熱して 1 時間攪拌し

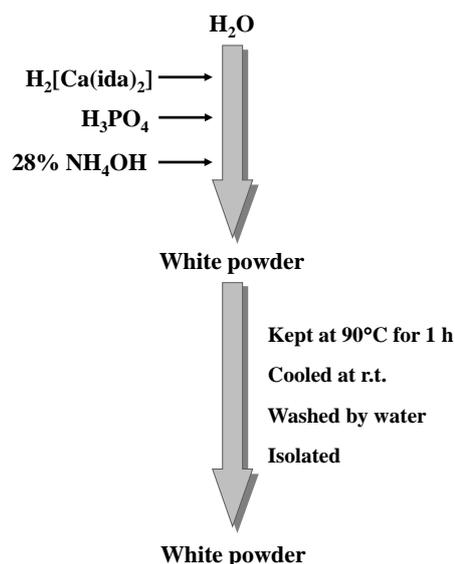


Fig. 2-12 Schematic representation for preparation of the low crystallinity CHA/HA powder.

た。その後, 40°C 以下まで放冷し, 自然ろ過した。この結晶を 0.8 L の精製水で 3 回洗浄し, さらに再度ろ過・回収し, 70°C の乾燥機で 1 晩乾燥させて回収した。Fig. 2-12 に合成のフローチャートを示す。収量 0.87 g。

### 2.2-2.5 低結晶性 HA/HA (PE) 粉末の合成

500 mL セパラブルフラスコに  $\text{H}_2[\text{Ca}(\text{ida})_2]$  の 5.00 g (16.4 mmol) を量り取り、精製水 325 g を加えて攪拌した。完全溶解した無色透明溶液の pH は 5.6 であった。この溶液に、Ca/P 比 1.95 となる 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0.97 g (8.4 mmol) を一度に加え、10 分間攪拌した。この透明溶液の pH は 2.4 であった。この溶液を 90°C まで加熱し、28%  $\text{NH}_4\text{OH}$  3.00 g (49.3 mmol, F.W. = 17.03) を一度に

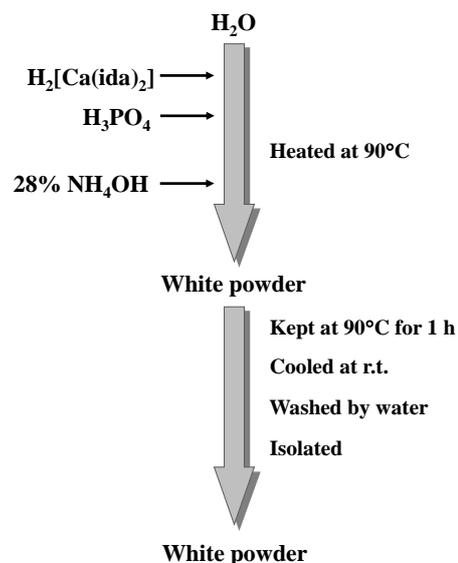


Fig. 2-13 Schematic representation for preparation of the low crystallinity HA/CHA powder.

加えたところ、直ちに白色結晶が析出した。溶液の pH は 9.6 であった。反応溶液を 90°C で 1 時間攪拌し、その後、40°C 以下まで放冷し、自然ろ過した。この結晶を 0.8 L の精製水で 3 回洗浄し、再度ろ過・回収し、70°C の乾燥機で 1 晩乾燥させて回収した。Fig. 2-13 に合成のフローチャートを示す。収量 1.38 g。

### 2.2-2.6 測定

合成した Ca 錯体は、FT-IR, NMR, TG-DTA および元素分析測定により、その化学式を同定した。合成したアパタイト粉末は、XRD, FT-IR, 元素分析, FE-SEM による表面観察, PBS 中での溶解度測定を行った。組成を同定するために生成粉末の一部を空气中 850°C で熱処理し、XRD を測定した。

## 2.2-3 結果

### 2.2-3.1 IDAのCa錯体

Fig. 2-14には、2-2.2.2で合成した白色結晶のFT-IRスペクトルを示す。IDAのスペクトルに観測された1625および1712  $\text{cm}^{-1}$ 付近のカルボキシ基 ( $\text{COO}^-$ )の伸縮振動は、1627および1647  $\text{cm}^{-1}$ にシフトしていた。

Fig. 2-15には、同じ結晶のTG-DTA曲線を示す。341, 365, 405, 430 $^{\circ}\text{C}$ には、重量減少を伴う発熱ピークが観測された。また、730 $^{\circ}\text{C}$ の重量減少を伴う吸熱ピークが観測された。

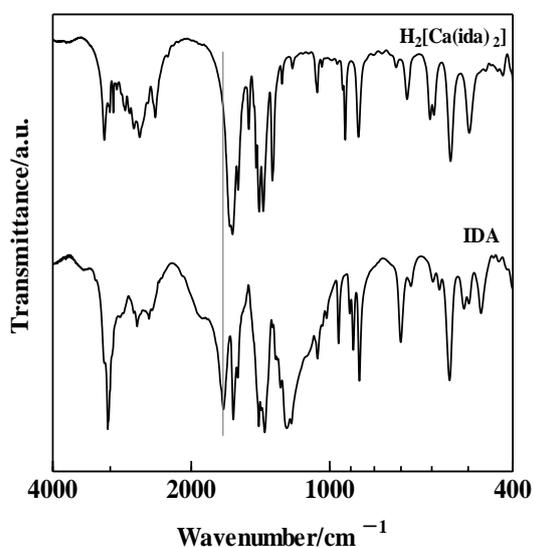


Fig. 2-14 FT-IR spectra of IDA and Ca complex with IDA.

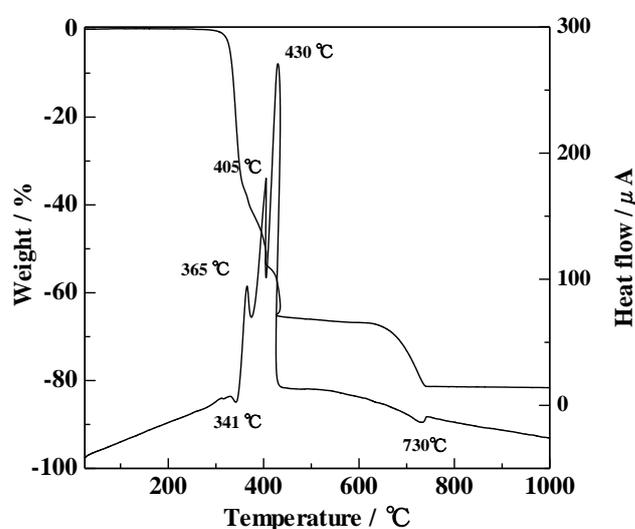


Fig. 2-15 TG-DTA curves of Ca complex with IDA.

Fig. 2-16には、同じ結晶の $\text{D}_2\text{O}$ 中でのNMRスペクトルを示す。 $^1\text{H}$ -NMRでは、3.46 ppmにシングレットが観測された。 $^{13}\text{C}$ -NMRでは、5.18, 174.3 ppmにそれぞれシングレットが観測された。

Table 2-3には、同じ結晶のCHN元素分析結果を示す。 $\text{H}_2[\text{Ca}(\text{ida})_2]$ とした計算値とよく一致した。この分子量から算出した収率は、85%であった。

この合成方法によって、再現性よく同一化合物が得られた。

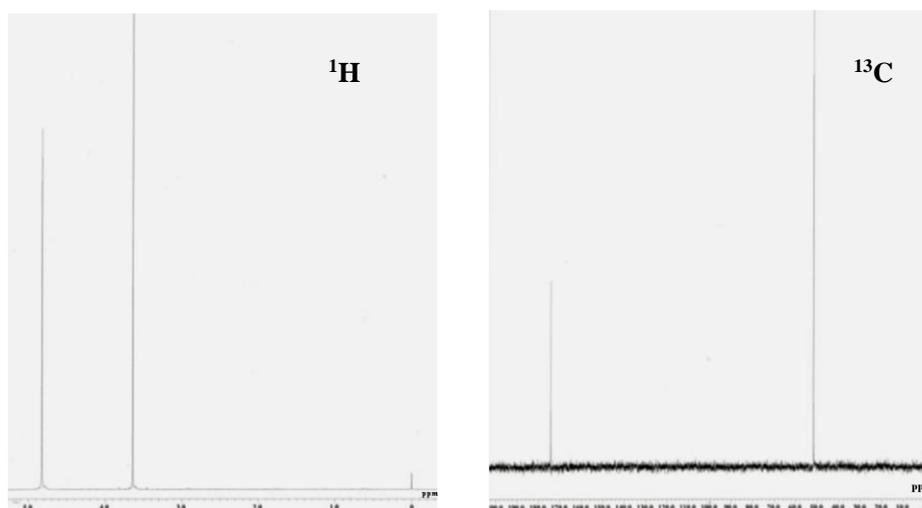


Fig. 2-16 NMR spectra of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  of Ca complex with IDA.

Table 2-3 Elemental analysis of C, H and N in Ca complex with IDA.

	C	H	N	Yield
	%			%
Found	31.97	3.86	9.26	76
Calcd.	31.85	3.99	9.35	-
Calcd. For $\text{H}_2[\text{Ca}(\text{ida})_2]$ (F.W. 304)				

### 2.2-3.2 低結晶性 CDHA (PC) , CHA/HA (PD) , HA/CHA (PE) 粉末

Fig. 2-17 には, **PC**, **PD**, **PE** の XRD パターンを示す。**PC** は,  $2\theta = 23.1, 26.1, 28.5, 29.0, 32.2, 34.2, 39.9, 42.1, 44.1, 46.9, 48.1, 49.7^\circ$  に, **PD** は,  $2\theta = 22.9, 26.0, 28.4, 32.1, 39.7, 44.0, 46.8, 49.6^\circ$ , **PE** は,  $2\theta = 22.9, 25.9, 28.3, 28.8, 32.1, 39.5, 43.9, 46.9, 49.6^\circ$  に六方晶系 CP に帰属できるピークが観測された。一方,  $850^\circ\text{C}$  で熱処理した粉末, **PC'**, **PD'** の XRD 測定の結果を Fig. 2-18 に示す。**PC'** は,  $2\theta = 20.3, 22.0, 25.9, 26.3, 26.6, 27.9, 29.7, 31.1,$

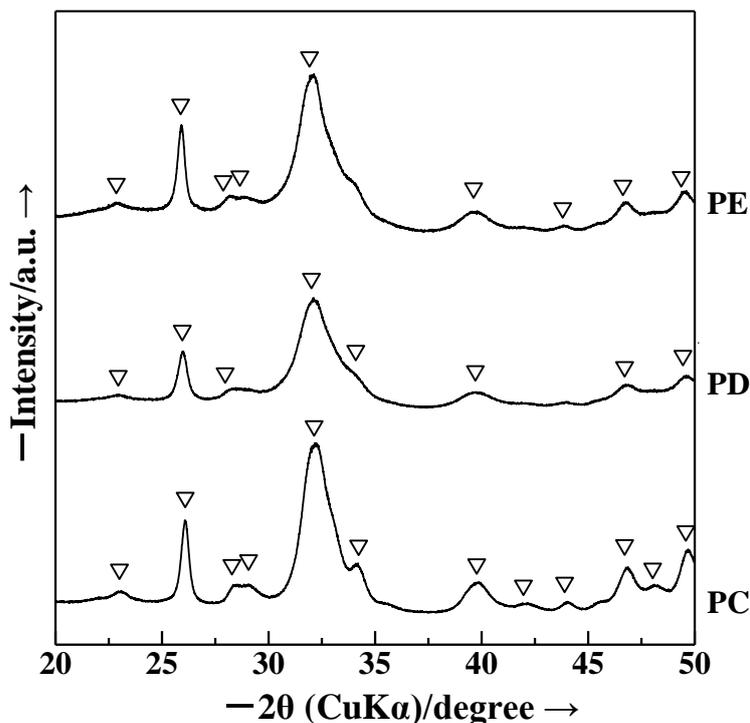


Fig. 2-17 XRD patterns of powders which were deposited by adding of ammonia to each reaction solution of the Ca-IDA complex with phosphoric acid. **PC**: deposited powders of CDHA with low crystallinity, **PD**: deposited powders of CHA/HA with low crystallinity, **PE**: deposited powders of HA/CHA with low crystallinity. The peak positions of CP are indicated by the triangle ▽.

32.5, 33.1, 33.6, 34.5, 35.2, 35.7, 36.0, 37.4, 37.9, 39.9, 41.2, 41.8, 43.1, 43.6, 44.0, 44.6, 45.4, 47.0, 48.0, 48.4, 49.9° に  $\beta$ -TCP (JCPDS カード No.9-169) に帰属されるピークを, **PD'** は,  $2\theta = 21.8, 22.9, 25.4, 25.9, 28.2, 29.0, 31.8, 32.2, 33.0, 34.1, 35.5, 39.3, 39.8, 40.5, 42.0, 43.9, 45.4, 46.7, 48.1, 48.6, 49.5^\circ$  に HA (JCPDS カード No.9-432) に帰属できるピークを, **PD'** は,  $2\theta = 21.8, 22.9, 25.4, 25.9, 28.2, 29.0, 31.8, 32.3, 33.0, 34.1, 35.5, 39.3, 39.9, 40.5, 42.1, 43.9, 45.4, 46.8, 48.2, 48.7, 49.5^\circ$  に HA (JCPDS カード No.9-432) に帰属できるピークをそれぞれ示した。

**PC, PD, PE** の粉末の結晶子サイズは, それぞれ 13(7), 16(16), 14(6) nm であった。

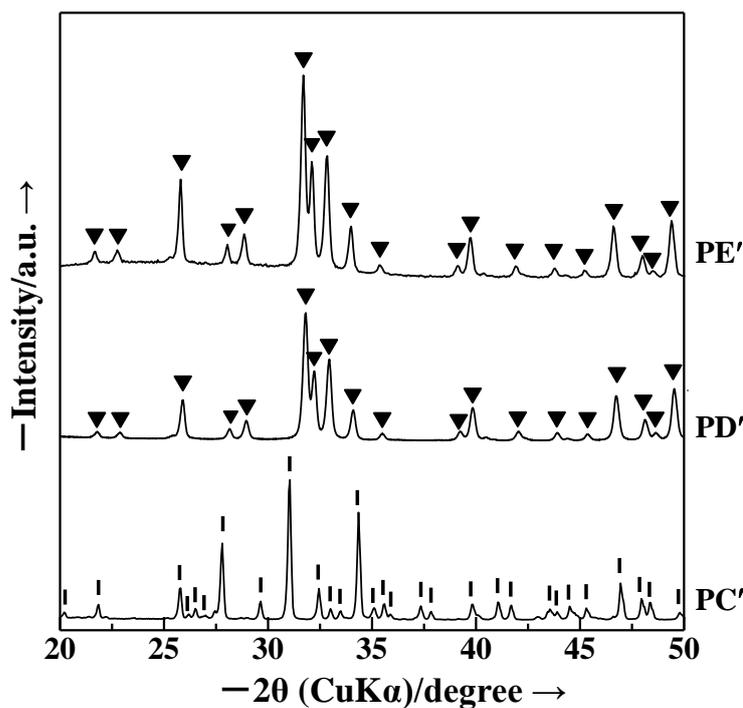


Fig. 2-18 XRD patterns of the three powders **PC'**, **PD'**, and **PE'** 850°C under air. The peak positions of HA and  $\beta$ -TCP are indicated by a filled triangle ▼ and a stick |, respectively.

Fig. 2-19 に **PC**, **PD** と **PE** の FT-IR スペクトルを示す。960-963, 1038-1039, 1094-1096  $\text{cm}^{-1}$  付近に P-O 結合の伸縮振動に帰属できるピークが, 469-474, 564-565, 603  $\text{cm}^{-1}$  付近に P-O 結合の変角振動に帰属できるピークが観測された。635-636  $\text{cm}^{-1}$  付近の肩吸収は, 水酸基に帰属できた。1630 および 3450  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークは, それぞれ水に帰属できた。1418-1422 と 1487-1488  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークは, 炭酸基に帰属できた。

Table 2-4 には, 6 つの粉末の元素分析結果とそれぞれの組成を示す。この結果から, **PD** と **PE** は炭素の含有量が異なっていた。

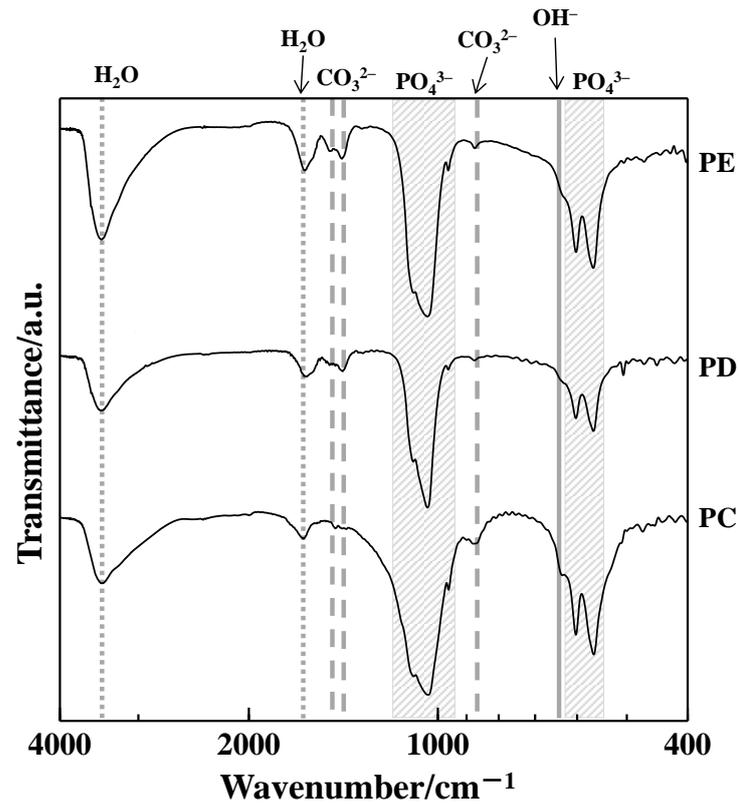


Fig. 2-19 FT-IR spectra of the powders deposited by adding ammonia to solutions of Ca-IDA complex with phosphoric acid. **PC**: deposited powders of CDHA with low crystallinity, **PD**: deposited powders of CHA/HA with low crystallinity, **PE**: deposited powders of HA/CHA with low crystallinity.

Table 2-4 Elemental analyses, yields, formula weights, and chemical formulae of the powders deposited by adding ammonia to solutions of Ca-IDA complex and phosphoric acid, assigned to **PC**: CDHA, **PD**: CHA/HA, and **PE**: HA/CHA, and those of the corresponding powders **PC'**, **PD'**, and **PE'** obtained by heating the

		C	H	N	Ca	P	Yield	Chemical formula	Formula weight
		%					%		
<b>PC</b>	Found	0.64	0.73	0.14	16.4	31.1	67		
	Calcd.	0.93	0.92	0.27	18.1	35.1		8CDHA·H <sub>2</sub> ida·20H <sub>2</sub> O	8082
<b>PC'</b>	Found	0.26	0.02	0.22	20.0	37.4	96 <sup>1</sup>		
	Calcd.	0.00	0.00	0.00	20.0	38.8		TCP	310
<b>PD</b>	Found	2.67	0.98	0.58	18.0	36.3	53		
	Calcd.	2.40	0.94	0.62	16.5	35.6		HA·CHA·H <sub>2</sub> ida·5H <sub>2</sub> O	2276
<b>PD'</b>	Found	0.11	0.12	0.05	18.4	37.7	98 <sup>1</sup>		
	Calcd.	0.00	0.02	0.00	18.5	39.9		HA	1005
<b>PE</b>	Found	1.83	0.95	0.32	14.9	32.4	67		
	Calcd.	1.82	1.28	0.45	16.1	34.7		3HA·CHA·1.5H <sub>2</sub> ida·20H <sub>2</sub> O	4623
<b>PE'</b>	Found	0.18	0.13	0.14	17.4	38.5	95 <sup>1</sup>		
	Calcd.	0.00	0.39	0.00	18.2	39.2		HA·H <sub>2</sub> O	1023

<sup>1</sup>The value was calculated by assuming that the amount of calcium ion in the heat-treated powder was equal to that before the treatment.

Fig. 2-20 に **PC**, **PD**, **PE** の表面の SEM 像を示す。表面は微細な結晶が押しつぶされたような形態を示した。

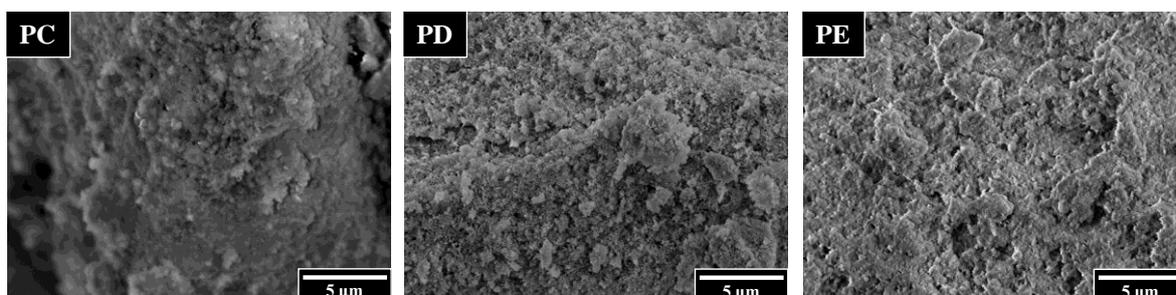


Fig. 2-20 SEM images of the powders deposited by adding ammonia to the solutions of Ca complex of IDA and phosphoric acid. **PC**; CDHA, **PD**; CHA/HA, and **PE**; HA/CHA.

Table 2-5 に **PC**, **PD**, **PE** および **PC'**, **PD'**, **PE'** の PBS 中での溶解度と平均粒径および粒径分布範囲を示す。**PC**, **PD**, **PE** の溶解度は, 0.22, 0.23, 0.20 g と高かった。熱処理した **PC'**, **PD'**, **PE'** の溶解度は, 0.02~0.04 g で約 10 分の 1 に低下した。**PC**, **PE** の平均粒径は, 各々 3.8 と 4.1  $\mu\text{m}$  と比較的大きかった。**PD** は, 装置の測定限界以下の粒径で 0.1  $\mu\text{m}$  以下であることが分かった。

Table 2-5 Solubilities in PBS, and particle sizes and distributions of the powders deposited by adding ammonia to solutions of Ca-IDA complex with phosphoric acid, assigned to PC: CDHA, PD: CHA/HA, and PE: HA/CHA, and those of the corresponding powders PC, PD, and PE obtained by heating the original products at 850°C under air.

	Solubility <sup>1</sup>	Particle size	Particle size distribution
	g	$\mu\text{m}$	$\mu\text{m}$
<b>PC</b>	0.22	3.8	0.3 – 38
<b>PC'</b>	0.02	1.7	0.3 – 17
<b>PD</b>	0.23	– <sup>2</sup>	– <sup>2</sup>
<b>PD'</b>	0.04	0.8	0.3 – 31
<b>PE</b>	0.20	4.1	0.3 – 21
<b>PE'</b>	0.04	3.3	0.4 – 14

<sup>1</sup>Solubility of apatite powders in 100 g of PBS.

<sup>2</sup>Less than 0.1  $\mu\text{m}$ .

#### 2.2-4 考察

IDA の Ca 錯体を用いたアパタイト合成は, EDTA の Ca 錯体よりもより温和な条件下で合成が可能だった。

一般に,  $\text{Ca}^{2+}$  イオンを含む水溶液にリン酸を添加すると, 広い pH 範囲で速やかにリン酸カルシウム化合物が生成する。一方, ここで用いた EDTA や IDA の Ca 錯体を溶解した水溶液にリン酸を添加しても, そのままではリン酸カルシウム化合物は生じなかった。これらの事実は, アミノポリカルボン酸が錯形成によって, 水溶液

中の  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとリン酸との直接反応を阻害していることを示しており、錯体の安定度定数が重要な因子と考えられる。

本節では、安定度定数 ( $K_1$ ) が EDTA 錯体より小さい IDA 錯体を用いることによって、過酸化水素を用いることなく、低結晶性の生成物を高収率で得ることができた。また、EDTA 錯体を經由した合成では得られなかった Ca 充足型アパタイトを得たので、その生成反応について錯体の安定度定数の観点から考察する。

#### 2.2-4.1 錯体の安定度定数による反応への影響

1 節での EDTA の Ca 錯体を用いたアパタイト合成では、錯体から反応溶液中に  $\text{Ca}^{2+}$  を供給するために過酸化水素を要した。反応の安全性向上を目的として錯体の安定度定数に着目し、EDTA の部分構造を持つ IDA を配位子とした Ca 錯体を合成した。IDA の Ca 錯体は容易に合成可能で、85%の高収率で再現よく合成できた。IDA の Ca 錯体の安定度定数は 2.6 と小さく、EDTA の Ca 錯体よりも水への溶解性が高く、水 100 g に 1 g の錯体が溶解した。ここにリン酸を加えても、結晶の析出は見られず、錯体が  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとリン酸イオンの直接反応を防止していた。その結果、IDA の Ca 錯体を用いて、過酸化水素を用いることなく、水を溶媒として容易に低結晶性のアパタイト粉末を得ることができた。さらに、IDA の Ca 錯体を用いた室温合成では、EDTA 錯体系よりも低結晶性の CDHA 粉末を得ることができた。このように、IDA の Ca 錯体は水中で適切な量の  $\text{Ca}^{2+}$  を供給でき、低結晶性アパタイト粉末の高収率な合成に適していることが示された。

IDA の Ca 錯体の水溶液にリン酸を添加した溶液は  $\text{pH} = 5.6$  の酸性溶液であった。ここにアンモニアを一度に加え、溶液の  $\text{pH}$  を一挙に高くすることで白色結晶が得られた。添加するアンモニアは、IDA の Ca 錯体に対して物質質量比 1~4 倍で検討したが、等物質質量では溶液  $\text{pH}$  が約 5 まで低下し、ブラッシャイトが得られた。酸性溶液から析出するリン酸カルシウム化合物はブラッシャイトである従来知見と一致した。2 倍以上でも、

室温反応ではいずれも CDHA が得られたが、加熱反応では、2 倍量では CDHA/CHA, 3 倍以上では CHA/HA が得られ、3 倍と 4 倍では組成や収率の変化はほとんどないことから、3 倍量で反応を行った。

また、単離した生成物は、配位子由来の有機物を少量含んでいた。また、含まれた有機物は、1 節の EDTA 錯体系とは異なり、IDA がアンモニアで中和されていない遊離の配位子であった。アパタイトは吸着力に優れることが知られており、特にアミノ酸吸着剤として利用されている [2-11, 2-12]。アパタイト形成で遊離した配位子が、アパタイト表面に吸着したと考えられる。

#### 2.2-4.2 加熱による Ca 充足型アパタイトの合成

**PD** は、室温でアパタイト結晶が析出した後、90°C で加熱攪拌して得た。ここで得た粉末は、CHA と HA の混合物で、Ca 充足型だった。CDHA は、水中の反応で、徐々に HA に転移する [2-13]。**PC** を加熱することで、反応が促進された結果、Ca 充足型のアパタイトが得られたと考えられる。さらに、生成物中に含まれる炭酸は、アンモニア添加により反応溶液の pH が塩基性になった結果、反応溶液中に取り込まれた空気中の二酸化炭素の一部が生成物中に取り込まれたと考えられる。

**PE** は、Ca/P 比を 1.95 とし IDA 錯体とリン酸混合水溶液を 90°C まで加熱してアンモニアを加えて得た粉末である。このように、反応溶液を加熱しながらアンモニアを加えて、**PD** よりも結晶性の低い Ca 充足型アパタイト粉末を得た。このことは、アンモニアを添加する反応温度と時期の制御で、生成物の種類と結晶性を決定できることを示唆している。

#### 2.2-4.3 結晶性と溶解度

加熱により、結晶性は促進されると推測したが、**PD** の結晶子サイズは 16, **PE** は 14 nm と小さかった。原料は、IDA の Ca 錯体、リン酸、アンモニアで、水中で酸化還元剤のない温和な条件下での反応であるため、90°C, 1 時間程度の反応では、結晶性の向上には至らなかったと考えられる。また、IDA 錯体はリン酸

共存下で結晶を析出しないことから、水溶液中の錯体は  $\text{Ca}^{2+}$  を徐放する役割を担い、リン酸イオンとの急激な反応を阻害していると考えられる。このため、アンモニア添加により急激に析出したアパタイトの結晶性は低いと考えられる。

得られた粉末の溶解度は 0.20~0.23 g で、配位子を含んでいた。そこで、アパタイトのみの溶解度を算出したところ、**PC**、**PD**、**PE** の溶解度はそれぞれ、約 0.21, 0.18, 0.16 g であった。結晶子サイズとの関連性は見いだせないことから、結晶子サイズが数十 nm では、溶解度に影響をおよぼさないことが分かった。

### 2.2-5 結言

IDA の Ca 錯体を用いて、リン酸との混合水溶液にアンモニアを添加することで、低結晶性 CDHA (**PC**)、CHA/HA (**PD**)、HA/CHA (**PE**) 粉末の合成を達成し、以下のことが明らかとなった。

1. EDTA の Ca 錯体よりも安定度定数の低い IDA の Ca 錯体の水溶液中、室温下でより低結晶性の CDHA を得ることができた。
2. 得られた低結晶性 CDHA (**PC**) にも、配位子由来の有機物が含まれていた。これは、アパタイトに吸着していると考えられる。
3. 室温での反応で得られた **PC** を 90°C、1 時間加熱することで低結晶性 CHA/HA (**PD**) が得られた。加熱により Ca 充足型アパタイトが得られることが分かった。
4. **PD** が炭酸を多く含んでいたのは、反応溶液が塩基性であるため、空気中の二酸化炭素を取り込み、この炭酸が生成物中に取り込まれたと考えられる。
5. IDA の Ca 錯体とリン酸比 1.95 とした反応溶液を 90°C まで加熱してアンモニアを添加し、**PD** よりも炭酸含有量の少ない HA/CHA (**PE**) の粉末が得られた。

6. IDA の Ca 錯体からのアパタイト合成反応は水溶液中で実現し、より温和な条件下でアパタイト粉末が得られた。また、短時間の加熱では、その生成物の結晶性は低いまま保持された。

以上のように、錯体の安定度定数を考慮して、アパタイト合成反応を実施することにより、期待する結果を得た。その結果、アパタイト合成反応において、Ca 錯体の安定度定数が錯体から溶液中に  $\text{Ca}^{2+}$  を供給調製する重要な因子であることが分かった。安定度定数が低いIDA 錯体を用いたことで、より温和な条件下で室温では低結晶性の CDHA、90°C でも低結晶性 CHA/HA、HA/CHA の合成を達成した。一方で、生成物に含まれている IDA は生分解性が確認されていない物質であるため、生体材料として心配な点も有している。そこで、次節では新たにCa 錯体を設計し、IDAの構造異性体で、かつ非コラーゲンタンパク質を構成する酸性アミノ酸のアスパラギン酸を配位子として、アパタイト合成反応を検討した。錯体の安定度定数は IDA の Ca 錯体よりもさらに低いことも興味深い。

### 第3節 Asp の Ca 錯体を経由するアパタイト合成 —Ca-Asp-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液の形成—

#### 2.3-1 緒言

前節までに、Ca 錯体の安定度定数は、より温和な条件下でのアパタイト粉末を合成する上で重要な因子であることを確認した。結晶子サイズが 14 nm 程度の低結晶性粉末が、合成温度により Ca 欠損型アパタイト CDHA と、Ca 充足型アパタイト HA と CHA 混合粉末を選択的に合成できる。しかし、錯体の配位子である IDA は、生分解性が確認されていない。そこで、生分解性のある配位子を用いて Ca 錯体を合成し、アパタイトの合成反応に使用できれば生体材料として適用し易くなると考えた。

そこで、IDA の構造異性体である酸性アミノ酸のアスパラギン酸 (Asp) を配位子とする Asp の Ca 錯体を合成し、これを原料としてアパタイト粉末の合成を試みた。Asp は、非コラーゲンタンパク質を構成するアミノ酸の1つで、生体硬組織の再石灰化を促進させるオステオカルシンやオステオポンチンに多く含まれているとの報告がある [2-14]。前節までの研究で、EDTA 錯体または IDA 錯体を用いたアパタイト合成において、生成物が配位子由来の有機物を含むことはすでに述べた。Asp の Ca 錯体の配位子である Asp をアパタイト組成中に積極的に残存させることができれば、骨再生メカニズムの解明に大きく貢献できると考え、むしろ積極的に配位子を含有したアパタイト合成反応を設計した。

本節では、Asp の Ca 錯体を合成し、その構造を明らかとした。さらに、Asp の Ca 錯体とリン酸の反応によるアパタイト合成を試み、生成物の特性を調べてスキャフォールド材への導入材料としての適用可能性を調べた。

#### 2.3-2 実験方法

##### 2.3-2.1 試薬

L-アスパラギン酸 (Asp = H<sub>2</sub>asp, F.W. = 133.10) 和光純薬工業株式会社 (特級)

水酸化カルシウム (99.9%, F.W. = 74.10) 和光純薬工業株式会社 (特級)

アンモニア水 (28 %, F.W. = 17.03) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

重水 (99.9% D<sub>2</sub>O, F.W. = 20.03) 和光純薬工業株式会社

Asp の Ca 錯体の合成には、精製水 (共栄製薬株式会社) を使用した。これらの試薬はそれ以上精製することなく使用した。

### 2.3-2.2 Asp の Ca 錯体の合成

精製水 100 mL に L-Asp 1.33 g (10 mmol) と Ca(OH)<sub>2</sub> 0.37 g (5 mmol) を順に加え、懸濁溶液を 30 分間超音波撹拌し、無色透明溶液を得た。その後、アセトン 800 mL 中に反応溶液を少しずつ滴下して白色結晶を得た。析出した白色結晶は、自然ろ過で回収しドラフト内で一晚乾燥させた。Fig. 2-21 に合成のフローチャートを示す。得られた白色粉末は、0.84 g であった。

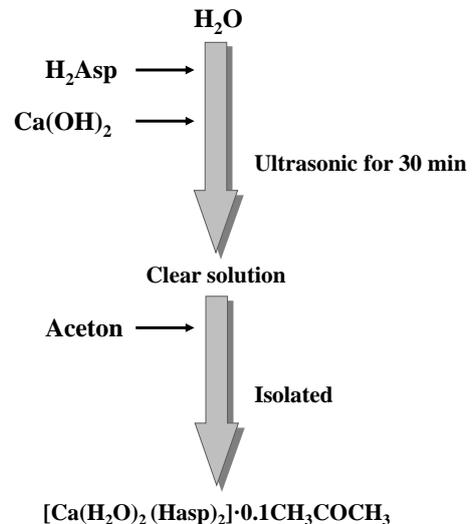


Fig. 2-21 Schematic representation for preparation of Ca complex with Asp.

### 2.3-2.3 低結晶性 CDHA/HA (PF) 粉体の合成

精製水 300 mL に L-Asp 3.99 g (30 mmol) と Ca(OH)<sub>2</sub> 1.11 g (15 mmol) を順に加え、懸濁溶液を 30 分間超音波撹拌した。完全溶解した溶液に、85 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.04 g (9 mmol) を一度に添加して約 10 分間撹拌した。得られた透明溶液の pH は、約 4.0 であった。その後加熱せず透明溶液に 28 %NH<sub>4</sub>OH 2.78 g (46 mmol) を一度に加えた。溶液の pH は、約 9.4 であった。溶液中の Ca/P 物質質量比は、水酸アパタイトの化学量論比 1.67 に調製し、NH<sub>3</sub>/Ca 物質質量比は 3 とした。白色結晶は、

アンモニア水を加えるとすぐに析出した。反応溶液を約 10 分間攪拌し、白色結晶を自然ろ過で集めた。この白色結晶は、さらに大量の精製水で洗い自然ろ過で集めた。白色粉体は、70℃の乾燥器で一晩乾燥させ、1.25 g 回収した。合成のフローチャートを Fig. 2-22 に示す。

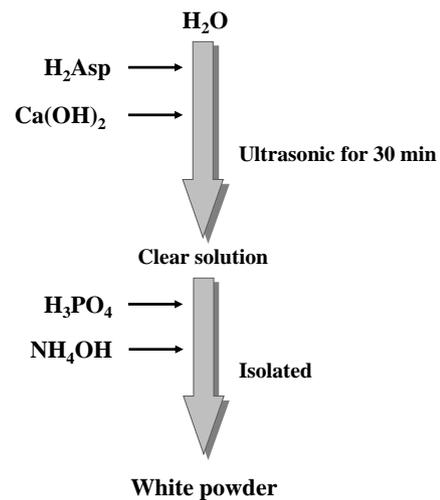


Fig. 2-22 Schematic of representation for preparation of the low crystallinity CDHA/HA powder.

### 2.3-2.4 低結晶性 HA/CHA (PG) 粉末の合成

精製水 300 g に L-Asp 3.99 g (30 mmol) と Ca(OH)<sub>2</sub> 1.11 g (15 mmol) を順に加えて、懸濁溶液を 30 分間超音波攪拌した。完全溶解した溶液に、85 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1.04 g (9 mmol) を一度に添加して約 10 分間攪拌した。透明溶液の pH は、約 4.0 であった。溶液中の Ca/P 物質質量比は、1.67 に調製した。その後透明溶液を約 30~45 分間かけて 90℃まで加熱攪拌した。加熱した溶液に側管付き

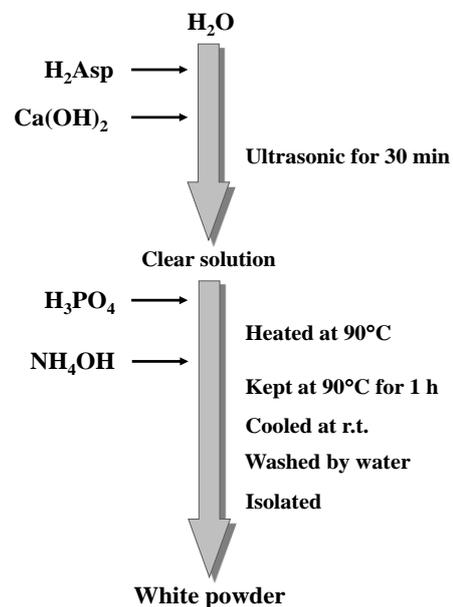


Fig. 2-23 Schematic representation for preparation of the low crystallinity HA/CHA powder.

を一度に加えた。溶液の pH は、約 8.8 であった。白色結晶は、アンモニア水を加えるとすぐに析出した。反応溶液は、約 90℃で 1 時間加熱攪拌した後 40℃以下まで放冷した。白色結晶は、大量の精製水で洗い自

然る過で単離した。白色粉体は、70℃の乾燥器で一晩乾燥させ、2.52 g 回収した。Fig. 2-23 に合成のプローチャートを示す。

### 2.3-2.5 測定

合成した Asp の Ca 錯体は、FT-IR, NMR, TG-DTA および元素分析測定により、その組成を同定した。合成したアパタイト粉末、PF および PG は、XRD, FT-IR, 元素分析, FE-SEM による表面観察, PBS 中での溶解度測定を行い、組成を同定するために生成粉末の一部を空气中 850℃ で熱処理して、XRD 測定を行った。

### 2.3-3 結果

#### 2.3-3.1 Asp の Ca 錯体

Fig. 2-24 には、2-3.2.2 で得られた白色結晶の FT-IR スペクトルを示す。Asp のスペクトルに観測される 1690 cm<sup>-1</sup> 付近のカルボキシル基 (COO<sup>-</sup>) の伸縮振動は、1590 cm<sup>-1</sup> にシフトしていた。

Fig. 2-25 には、同じ結晶の TG-DTA 曲線を示す。258℃ に吸熱を伴う重量減少、474 と 485℃ には、

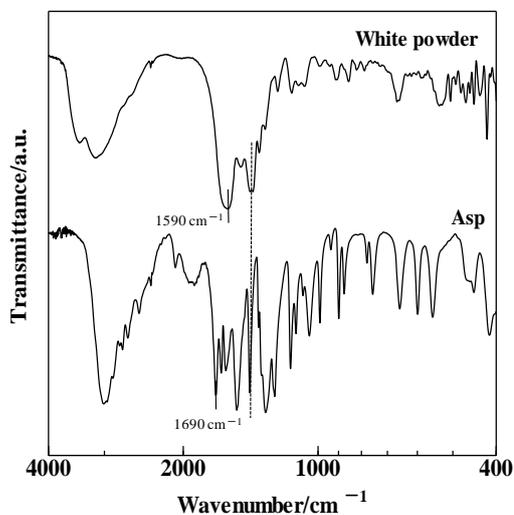


Fig. 2-24 FT-IR spectra of Asp and Ca complex with Asp.

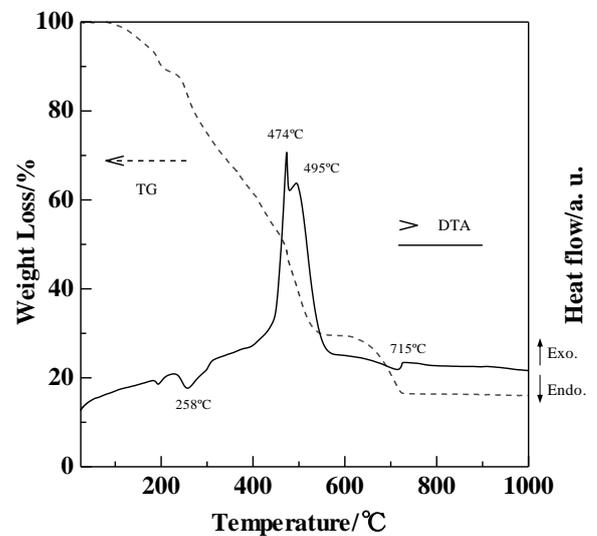


Fig. 2-25 TG-DTA curves of Ca complex with Asp.

質量減少を伴う発熱ピークが観測された。また、715°C では質量減少を伴う吸熱ピークが観測された。

Fig. 2-26 には、同じ結晶の NMR スペクトルを示す。<sup>1</sup>H-NMR スペクトルには、2.22 ppm にシングレット、3.89 ppm にマルチプレット、2.75 ppm と 2.74 ppm に 2 種類の AB カルテットを観測した。これらのシグナルは、順にアセトンの CH<sub>3</sub> 基、Asp の CH 基、CH<sub>2</sub> 基の水素原子に帰属できた。<sup>13</sup>C-NMR スペクトルには、180.4 ppm、177.0 ppm、54.9 ppm、39.2 ppm に 4 本のシングレットを観測した。これらのピークは、順にカルシウムに結合した Asp のカルボキシ基の炭素原子、Asp の γ 位（側鎖）の炭素原子、α 位の炭素原子、そして β 位の炭素原子に帰属できた。

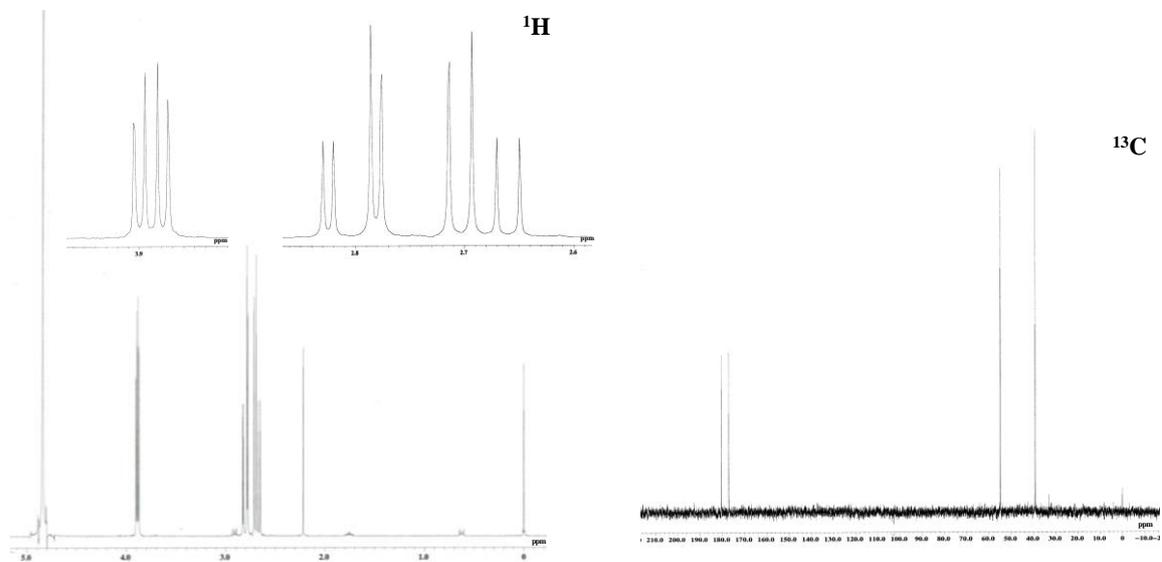


Fig. 2-26 NMR spectra of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C for Ca-Asp complex.

Table 2-6 には、同じ結晶のCHN 元素分析結果を示す。元素分析の結果は、C: 28.87 (28.79) , H: 4.44 (4.84) , N: 8.05 (8.10) % : [Ca(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(Hasp)<sub>2</sub>] $\cdot$ 0.1CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> の計算値と良く一致した。収量は、1.46 g であった。

Table 2-6 Elemental analysis of Ca complex with Asp.

	C	H	N	Yield
	%			%
Found	28.87	4.44	8.05	85
Calcd.	28.79	4.84	8.10	-
Calcd. for [Ca(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (Hasp) <sub>2</sub> ] $\cdot$ 0.1CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>				

この合成方法は、再現よく同一化合物が得られた。

### 2.3-3.2 低結晶性 CDHA/HA (PF) および HA/CHA (PG) 粉末

Fig. 2-27 には、室温と 90°C 加熱により得られた粉末、PF および PG の XRD パターンを示す。PF のピ

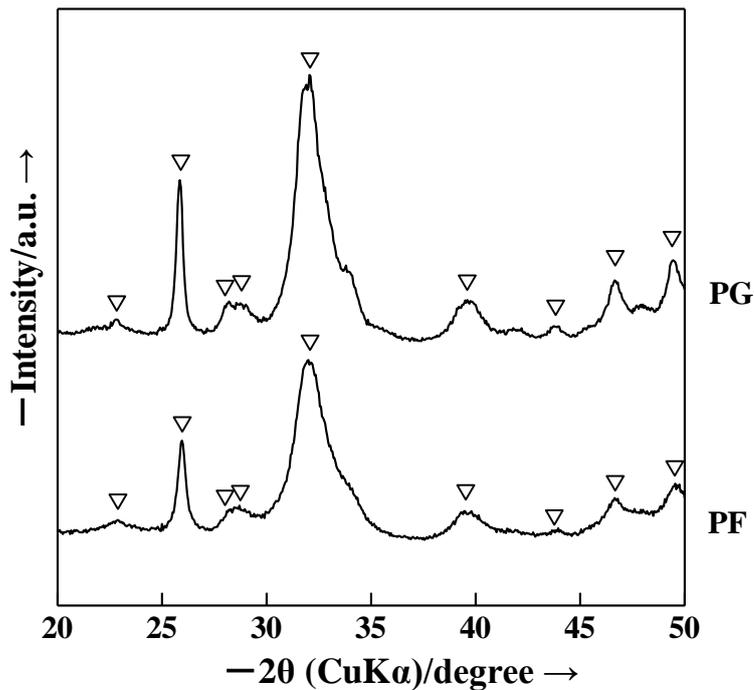


Fig. 2-27 XRD patterns of the powders which were deposited by adding of ammonia to each reaction solution of the Ca-Asp complex with phosphoric acid, and could be assigned to PF;CDHA/HA and PG; HA/CHA, respectively. The peak positions of CP is indicated by the triangle ▽.

ークは,  $2\theta = 22.9, 26.0, 28.7, 32.0, 39.5, 44.0, 46.7, 49.7^\circ$  に観測され, **また PG** のピークは,  $2\theta = 22.8, 25.9, 28.2, 32.1, 34.1, 39.6, 41.8, 43.8, 46.7, 48.0, 49.5^\circ$  に観測されたことから, 六方晶 CP に帰属できるが, HA か CDHA の区別はできなかった。

そこで, 空气中  $850^\circ\text{C}$  で熱処理した粉末 **PF'** および **PG'** の XRD パターンを Fig. 2-28 に示す。**PF'** のピークは,  $2\theta = 20.2, 21.8, 25.8, 26.2, 26.5, 27.8, 29.6, 31.0, 32.4, 32.9, 33.4, 34.3, 35.1, 35.6, 35.9, 37.3, 37.8, 39.8, 41.1, 41.7, 43.5, 43.9, 44.5, 45.3, 46.9, 48.0, 48.4, 49.5^\circ$  に観測され, JCPDS カード No. 9-169 の  $\beta$ -TCP に帰属できた。さらに,  $2\theta = 28.6, 31.8^\circ$  にピークが観測され, HA に帰属できた。したがって生成物 **PF** は, CDHA/HA 混合相で

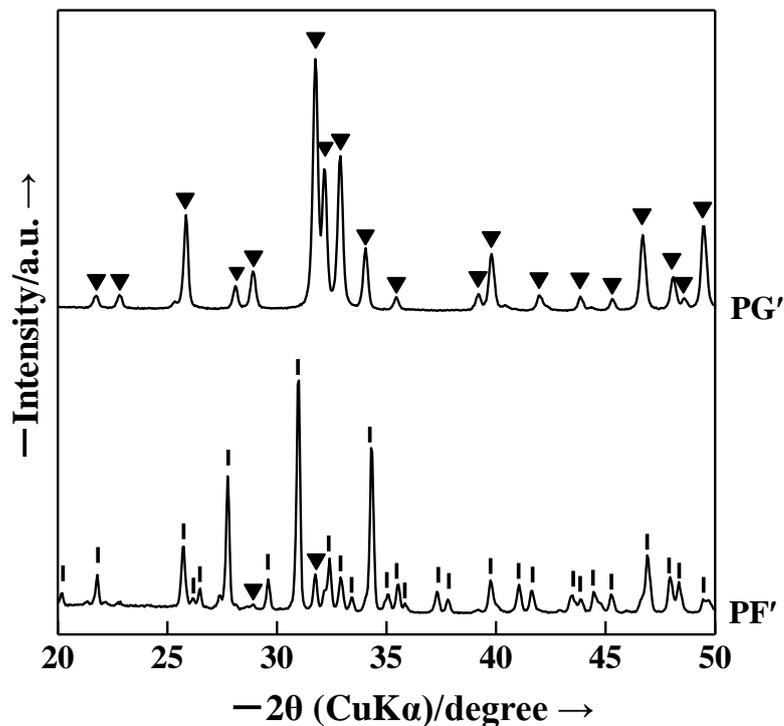


Fig. 2-28 XRD patterns of the two powders **PF'** and **PG'** which were obtained by heating of the original products C and D at  $850^\circ\text{C}$  in air, respectively. The peak positions of HA and  $\beta$ -TCP are indicated by the filled triangle ▼ and stick |, respectively.

あることが分かった。**PG'**のピークは,  $2\theta = 21.8, 22.8, 25.9, 28.1, 28.9, 31.8, 32.3, 32.9,$   
 $34.1, 35.5, 39.2, 39.8, 42.0, 43.9, 45.3, 46.7, 48.1, 48.7, 49.5^\circ$  に観測され, HA に  
帰属できた。**PF** および **PG** の結晶子サイズは, 13(9) nm と 13(8) nm で, **PF'** および **PG'** は 47(3) nm  
と 45(5)nm であった。

**PF** よび **PG** の FT-IR スペクトルを Fig. 2-29 に示す。振動の異なる二種類のリン酸基 (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) のピークが観測された。962, 1036, 1095 cm<sup>-1</sup> 付近は伸縮振動, 565, 601 cm<sup>-1</sup> 付近は変角振動に相当するピークである。634 cm<sup>-1</sup> 付近に観測されるピークは、水酸基 (OH<sup>-</sup>) に帰属できた。**PF** のスペクトルの 1624 と 3430 cm<sup>-1</sup> 付近に、**PG** のスペクトルの 1624 と 3455 cm<sup>-1</sup> 付近に観測される幅の広いピークは、

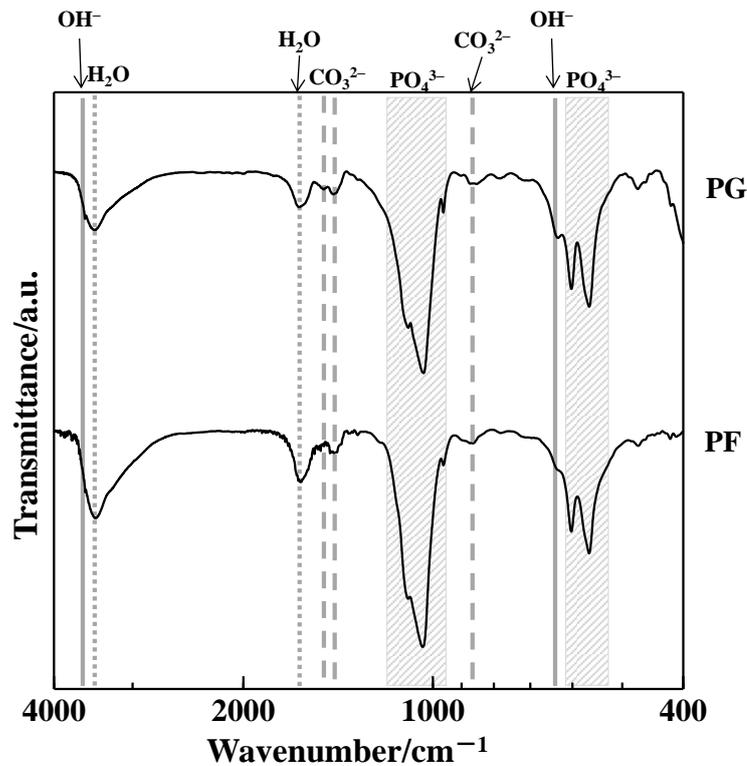


Fig. 2-29 FT-IR spectra of the powders deposited by adding ammonia to solution of Ca-Asp complex with phosphoric acid.

結晶中に含まれる水分子に帰属できた。**PF** のスペクトルの 1427 cm<sup>-1</sup> 付近に観測される弱いピークは、配位子由来のカルボキシ基 (COO<sup>-</sup>) に帰属できた。また、**PG** のスペクトルの 1426 と 1488 cm<sup>-1</sup> 付近に観測された 2 つのピークは、炭酸基 (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) に帰属できた。

Table 2-7 Elemental analysis, yield, and formula weight with chemical formula of the powders which were deposited by adding of ammonia to reaction solution of Ca-Asp complex with phosphoric acid, and could be assigned to **PF**: CDHA/HA and **PG**: HA/CHA, respectively, and those of the corresponding powders **PF'** and **PG'** which were obtained by heating of the original products at 850°C in air.

		C	H	N	Yield	Chemical formula	Formula weight
			%		%		
<b>PF</b>	Found	1.45	0.58	0.31	81		
	Calcd.	1.44	0.49	0.42		9CDHA·HA·3H <sub>2</sub> asp·4H <sub>2</sub> O	10013
<b>PF'</b>	Found	0.10	0.06	0.00	88 <sup>1)</sup>		
	Calcd.	0.00	0.02	0.00		27TCP·HA	9380
<b>PG</b>	Found	1.97	0.44	0.46	77		
	Calcd.	1.98	0.74	0.51		4HA·CHA·2H <sub>2</sub> asp·8H <sub>2</sub> O	5462
<b>PG'</b>	Found	0.05	0.08	0.04	96 <sup>1)</sup>		
	Calcd.	0.06	0.20	0.00		20HA·CHA	21125

1) The value was calculated by assuming that the amount of calcium ion in the heat-treated powder is equal to that before the treatment.

Table 2-7 には、2 つの粉末の元素分析結果とそれぞれの組成を示す。アパタイトに含有する有機物量は、**PF** にはアパタイトに対して物質質量比で 3/10 程度の配位子である Asp を内包していた。**PG** は、2/5 程度の Asp を内包していた。

Fig. 2-30 に **PF** および **PG** の表面 SEM 像を示す。表面は、微細な結晶が凝集していた。

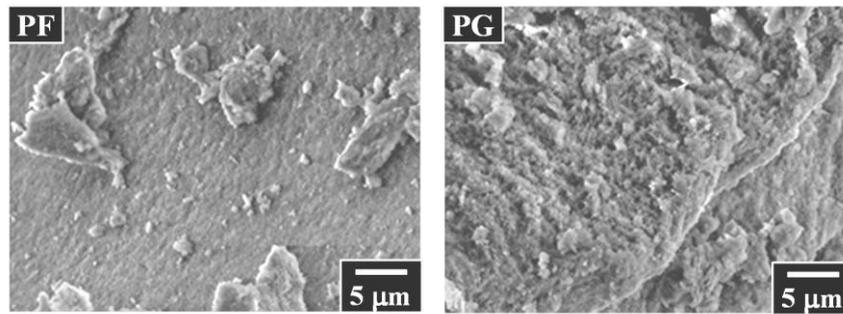


Fig. 2-30 SEM images of the powders deposited by adding ammonia to solution of Ca-Asp complex and phosphoric acid, assigned to **PF**: CDHA, and **PG**: HA/CHA.

Table 2-8 に、**PF** および **PG** の PBS 中での溶解度と平均粒径および粒径分布範囲を示す。

Table 2-8 Solubility into PBS and particle size and distribution of the powders which were deposited by adding ammonia to each reaction solution of Ca-Asp complex with phosphoric acid, and could be assigned to **PF**: CDHA/HA and **PG**: HA/CHA respectively, and those of the corresponding powders **PF'** and **PG'** which were obtained by heating of the original products at 850 °C under air.

	Solubility <sup>1)</sup>	Particle size	Particle size distribution
	g	μm	μm
PF	0.19	1.3	0.4 — 57
PF'		0.8	0.3 — 31
PG	0.19	4.0	0.3 — 38
PG'	0.05	3.5	0.4 — 17

1) The solubility of apatite powders into 100 g of PBS.

## 2.3-4 考察

### 2.3-4.1 Asp の Ca 錯体

Asp の Ca 錯体は、超音波照射により、容易に合成できた。機械的攪拌による反応では、完全に溶解しないことがあり、そのような不均一溶液からアパタイトを析出させると、CaO を含んだ粉末が得られた。このように、超音波照射による反応が有効であった。Asp の Ca 錯体の合成で、Ca(OH)<sub>2</sub> と L-Asp を 1:3 で反応させた

時に反応物は完全には溶解せず、不溶分は L-Asp であった。そこで、Ca(OH)<sub>2</sub> と L-Asp を 1:2 で反応させたところ、反応溶液は完全に溶解した。この水溶液を濃縮しても錯体が析出しなかったため、アセトン中に滴下し、白色結晶を析出させた。この白色結晶は潮解性が高く、アセトンでよく脱水する必要があった。得られた結晶の FT-IR スペクトルは、カルボキシ基が Asp の 1690 cm<sup>-1</sup> から 1590 cm<sup>-1</sup> へとシフトしたことを示した。このことから、Asp 分子中の 1 個のカルボキシ基が解離し、カルシウムに配位したと考えられる。NMR スペクトルから、Asp の Ca 錯体の構造は、Asp の側鎖 (β-カルボン酸 (R=CH<sub>2</sub>COOH)) が未配位のまま残り、五員環キレートでカルシウムに配位し、水が 2 つ配位していることを確認した。単離した Asp の Ca 錯体と Ca(OH)<sub>2</sub> と L-Asp の反応溶液 (溶媒 D<sub>2</sub>O) の NMR スペクトルが一致し、反応溶液中に生成した Asp の Ca 錯体は、[Ca(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(Hasp)<sub>2</sub>] と同定できた。これを基に、この反応溶液を Asp の Ca 錯体溶液として、アパタイト粉末の合成反応に用いた。Fig. 2-31 に Asp の Ca 錯体の推定構造を示す。

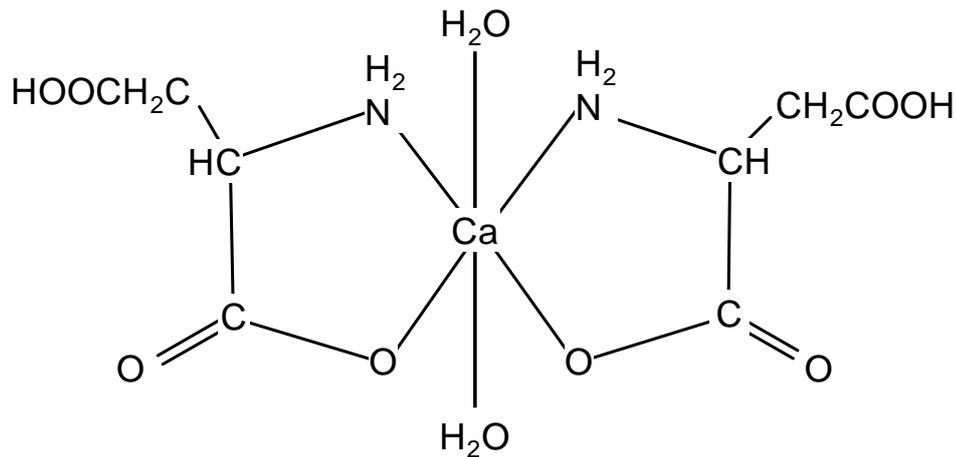
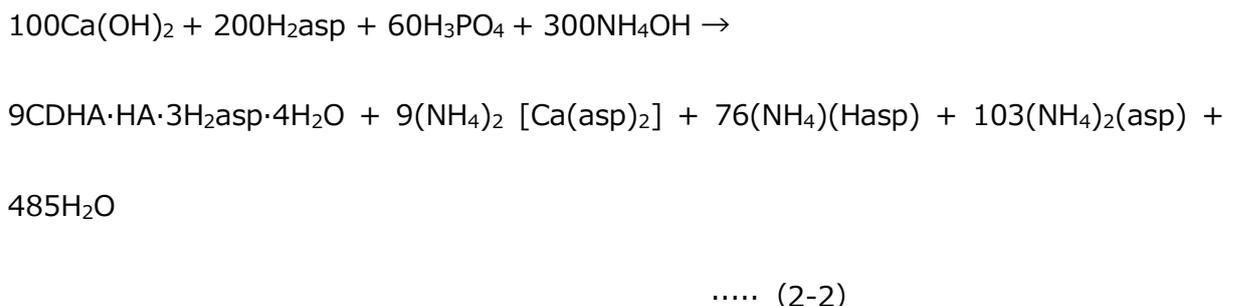


Fig. 2-31 The plausible structure of Ca complex of Asp.

### 2.3-4.2 配位子による反応系への影響

アパタイト粉末を合成する目的で、Asp の Ca 錯体溶液に Ca/P 比 1.67 となるようにリン酸を加えた。錯体の安定度定数が小さいにも関わらず、反応溶液は無色透明で、結晶は析出しなかった。この安定な均一溶液 (Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液) は、Ca イオンとリン酸イオンが配位子である Asp が直接反応を防止していると考えられる。ここに前節と同様にアンモニアを加えたところ、直ちに白色結晶が析出した。この時のアンモニアは Ca に対して物質量比 3 倍とした。2 倍量でも反応溶液の pH7.4 で結晶は析出したが、収率が低かったため、3 倍量とした。しかし、室温での反応にも関わらず、Ca/P 比 1.67 という HA の理論比において Ca 充足型アパタイトを含んだ粉末が得られたことは注目に値する。Asp の Ca 錯体の安定度定数は IDA 錯体の 2.6 よりもさらに小さい 1.6 である。室温反応では、Ca 充足型アパタイトの出現臨界領域が Asp の Ca 錯体程度の安定度であることが示唆された。一般に Ca<sup>2+</sup>イオンとリン酸イオンが共存すると、溶液の pH に応じて決まる種類の CP が速やかに析出することが知られ、アパタイトの形成反応を不均一にする最大の要因である。しかし、Asp の Ca 錯体溶液にリン酸を加えた安定な Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液を簡便に調製でき、かつ pH 調製剤が添加されると速やかに脱配位子が起こり Ca<sup>2+</sup>イオンが錯体から供給されて、リン酸イオンと反応した。この系でも、錯体からの脱配位子反応とアパタイト形成反応が速やかに起きていることになる。以下に反応式 (2-2) を示す。



また、含有する Asp は IDA 系よりも 1~2.7 倍多く、非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸を多く含むアパタイト粉末の合成が可能だった。

Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液は 90°C まで加熱しても結晶の析出のない安定した溶液であった。加熱した反応溶液に pH 調整剤であるアンモニアを加えアパタイトを析出させた **PG** では、IDA 錯体と同様に Ca 充足型 HA・CHA を得ることができた。含まれる炭酸量は、IDA 錯体を用いて合成したアパタイトよりも少なかった。このように、アミノ酸錯体の安定度定数の差と反応温度の調製によって、最終的に得られるアパタイトの種類を選択できる重要な知見が得られた。一方で、骨再生メカニズムは破骨細胞と骨芽細胞の持つたんぱく質によって行われていることは知られているが、実際のメカニズムはいまだ不明である。本研究から Ca<sup>2+</sup>の供給をアミノ酸錯体が担っている可能性も推定され、今後の研究が期待される。

### 2.3-5 結言

Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 水溶液にアンモニアを添加することによって、低結晶性 CDHA/HA (**PF**) および HA/CHA (**PG**) 粉末の合成を達成し、以下のことを明らかとした。

1. Asp の Ca 錯体は、Ca(OH)<sub>2</sub> と L-Asp を 1:2 で超音波照射下で反応させることによって、[Ca(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>(Hasp)<sub>2</sub>]が得られた。この結晶は、潮解性が高かった。
2. Asp の Ca 錯体水溶液にリン酸を加えて安定な無色透明溶液、Ca-Asp-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液が得られた。この溶液にアンモニアを添加すると、脱配位子反応が起こり直ちに白色結晶が得られ、室温で 10%の HA を含有した CDHA/HA 粉末が得られた。
3. Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液からの室温でのアパタイト粉末合成において、Ca 充足型アパタイトが得られたことは、Ca 欠損型と Ca 充足型に分岐する臨界点が Asp の Ca 錯体の安定度定数程度であることを示していた。

4. 90°C で加熱した合成では, Ca/P 比 1.67 で Ca-IDA 系よりも炭酸の少ない HA/CHA を得ることができた。また, 含有している配位子は, IDA 錯体系よりも 2.7 倍多量であった。

5. 得られた粉末は, 結晶子サイズ, 溶解度共に IDA 錯体系と同程度であった。

以上ように, 酸性アミノ酸とその構造異性体を配位子とする Ca 錯体を用いて, 温和な条件下で結晶子サイズの極端に小さいアパタイト合成を達成できた。この合成法は, 錯体が化学平衡を通してアパタイト形成に必要な Ca<sup>2+</sup> イオンを短時間で放出できる機能を利用しており, 生成物の組成を均一に保つことが可能であった。

これまで, アミノ酸を含有したアパタイトの報告はないが, 骨再生に必要とされる非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸を含んだアパタイトが容易に合成できることは, 今後の再生材料の開発に十分適用可能と推測される。次章では, PLGA (ポリ乳酸-グリコール酸共重合体) をマトリックスとしたスキャフォールドに混合して, 骨再生材料としての適用を検討した。

## 参考文献

- [2-1] Sato M, Tanji T, Hara H, Nishide T, Sakashita Y. SrTiO<sub>3</sub> film fabrication and powder synthesis from a non-polymerized precursor system of a stable Ti(IV) complex and Sr(II) salt of edta. J Mater Chem. 1999;9:1539-1542.
- [2-2] Nagai H, Hara H, Enomoto M, Mochizuki C, Honda T, Takano I, Sato M. Synchronous Electrochromism of Lithium Ion Battery with Chemically Fabricated Transparent Thin Films. Functional Materials Letters. 2013;6:1341001-1341008.
- [2-3] Takahashi K, Hayakawa T, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Sato M, Nemoto K. Molecular precursor method for thin calcium phosphate coating on titanium. Thin Solid Films. 2005;484:1-9.
- [2-4] Toriyama M, Kawamoto Y, Suzuki T, Yokogawa Y, Nishizawa K, Nagae H. Synthesis of hydroapatite by an oxidative decomposition method of calcium chelate. J Ceram Soc Jpn. 1992;100:950-954.
- [2-5] Liou SC, Chen SY. Transformation mechanism of different chemically precipitated apatitic precursors into β-tricalcium phosphate upon calcination. Biomaterials. 2002;23:4541-4547.
- [2-6] Martell AE, Smith RM edit. Critical stability constants: Amino acids Vol.1.1974 Plenum Press New York.
- [2-7] Sato K, Ikenoya O, Shimazu Y, Aoba T. Carbonation of enamel apatite crystals: Lattice substitutions and surface adsorption. Jpn J Oral Biol. 1999;41;61-68.

- [2-8] Monma H, Takahashi T. Preparation and thermal changes of carbonate-containing apatite. *Gypsum & Lime*. 1987;210:29-33. [In Japanese].
- [2-9] Suetsugu Y. Carbonate ions in apatite structure. *Inorg Mater Jpn*. 1996;3:48-54. [In Japanese].
- [2-10] Rau JV, Cesaro SN, Ferro D, Barinov SM, Fadeeva IV. FTIR study of carbonate loss from carbonated apatites in the wide temperature range. *J Biomed Mater Res B Appl Mater* 2004;71B:411-447.
- [2-11] 岩井廣茂. フルオロアパタイトおよびフッ化カルシウムの表面性状に関する研究. *歯科医学*. 1989;52:361-380.
- [2-12] Hiratsuka Y, Kambara M. Interfacial-electrochemical study on the adsorption of protein to fluoride-treated synthetic hydroxyapatite. *Shika Igaku*. 1991;54:315-332. [In Japanese].
- [2-13] Toriyama M, Kawamura S, Ito Y, Nagase H. Thermal change of calcium deficient apatite obtained by mechanochemical treatment. 1989;97:554-558. [In Japanese].
- [2-14] 木崎治俊他. *口腔生化学* 第4版. 2010. 医歯薬出版株式会社. 第4章.

### 第3章 結晶性制御アパタイトと生分解性ポリマー複合スキャフォールド

#### 3-1 緒言

近年、生体組織の再生を促す医療に注目が集まり、この分野を特に組織工学という。この分野は、工学と医学の融合分野で、細胞と材料科学の幅広い知見と連携が必要である。組織工学に必要な代表的な要素は、優れた細胞（組織）、細胞増殖と分化のためのタンパク質、組織固定のための足場（スキャフォールド）とされ、特に細胞外マトリックスとなるスキャフォールドは、細胞増殖と分化のために不可欠で、開発が急務となっている。現在市販されているスキャフォールドには、生分解性ポリマー（例えば、ポリ乳酸（PLLA）やポリ乳酸-グリコール酸共重合体（PLGA））、コラーゲンスポンジ、チタンメッシュ、多孔質セラミックスなどがある。その中でも、安価な生分解性ポリマーや、成形性に富むチタンメッシュが注目されている。しかし、チタンメッシュは生体不活性で組織と直接結合しないため、組織との早期結合を可能とするアパタイトなどをコーティングして補っている [3-1~3-4]。たとえば、分子プレーカーサー法により CA コーティングされたチタンメッシュは、内部まで均一にコーティングされ、組織との結合はチタンと比較してより速かった [3-2]。一方、生分解性ポリマーは、生体に埋め込むと最終的には二酸化炭素と水に分解される高分子材料である [3-5]。PLGA を溶液鑄造/塩浸出法により 3 次元構造にしたスキャフォールドは、細胞の増殖に有効とする報告がある [3-6]。しかし、PLGA は、分解途中で酸性物質を生成し、周辺組織に炎症が起こる問題点を有している [3-7]。そこで、PLGA に分解酸性物質による pH 変化を緩和できる物質を混合して、炎症の防止が試みられている [3-8]。中でも、HA や TCP のようなバイオセラミックスを導入した PLLA や PLGA は生体適合性が良く、骨伝導性も高いことから、生体硬組織のスキャフォールドとして注目されている [3-9~3-11]。PLGA に混合した $\beta$ -TCP は、分解生成物を中和する効果があると報告されている [3-12]。一方、硬組織に近い成分の HA は、その

溶解性が低いために、分解酸性生成物を十分に中和できないことが短所とされている。前章で合成した Ca 錯体を経由したアパタイト粉末は、結晶性が低く、その溶解度は 100 g の PBS 中で約 0.2 g と高い。このように、非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸の Asp を残存させた低結晶性のアパタイト粉末を混合した PLGA は、骨再生スキャフォールドとして期待される。

そこで、本研究では、第 2 章で合成したアパタイト粉末 (PA, PB7, PE, PE', PG) を導入した PLGA 多孔質複合材を作成し、*in vitro* で吸水率、CP 析出速度、細胞の付着性を評価し、*in vivo* でウサギの大腿骨に埋め込み、12 週間までの骨形成の評価を行った。

## 3-2 実験方法

### 3-2.1 試薬

エチレンジアミン-N, N, N', N',-四酢酸 (EDTA = H<sub>4</sub>edta, F.W. = 292.25) 関東化学株式会社 (鹿特級)

イミノ二酢酸 (IDA = H<sub>2</sub>ida, F.W. = 133.10) 関東化学株式会社 (鹿特級)

L-アスパラギン酸 (Asp = H<sub>2</sub>asp, F.W. = 133.10) 和光純薬工業株式会社 (特級)

酢酸カルシウム一水和物 (F.W. = 176.18) 関東化学株式会社 (特級)

水酸化カルシウム (99.9%, F.W. = 74.10) 和光純薬工業株式会社 (特級)

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

過酸化水素水 (30%, F.W. = 34.01) 三徳化学工業株式会社 (試薬特級)

アンモニア水 (28%, F.W. = 17.03) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

L-乳酸, グリコール酸, NaCl 粒子, Collagen I は、中国科学院で準備した試薬を用いた。

これらの試薬はそれ以上精製することなく使用した。アパタイト導入 PLGA (70/30) 複合材の作成は、中国科学院の王身國教授に依頼した。複合材の動物埋込試験は、鶴見大学歯学部及早川教授に依頼した。

### 3-2.2 PLGA/アパタイト多孔質複合材スキャフォールドの作成

PLGA (70/30) [PLLA/PGA = 70/30 (mol/mol)]は、触媒となるジ(2-エチルヘキサン酸)ズズ(II)の共存下で、シールしたガラスアンプル中、65 Pa、160°Cで24時間、L-乳酸とグリコール酸を重合させて合成した。生成した PLGA はクロロホルムに溶解させて精製し、エタノール中で再沈殿させた。再沈殿させた生成物は、恒量になるまで室温真空乾燥して、純粋な PLGA (70/30) を得た。PLGA の分子量は、Shodex KF-800 カラムを備えたゲル浸透クロマトグラフィーによりクロロホルムを溶離液として 35°C、1.0 mL/min の流速で測定した。

PLGA (70/30)とアパタイトの多孔質複合材は、溶液鑄造/塩溶出法により作成した [3-12,3-13]。最初に、それぞれのアパタイト粉末 (PA, PB7, PE, PE', PG) は、PLGA/アパタイトが 50/50 wt%になるように 1,4-ジオキサンの PLGA 溶液に加え、懸濁液を得た。この懸濁液に、ふるいで選別した NaCl 粒子を加え、スラリーを得た。このスラリーを型に流し入れ、冷凍し、3日間凍結乾燥した。得られた複合材は、6時間水洗いを12回、計72時間行い、NaCl 粒子を溶出させ、室温乾燥して PLGA/アパタイト多孔質複合材を得た。それぞれの複合材は混合したアパタイト粉末 PA, PB7, PE, PE', PG に対して、CA, CB, CE, CE', CG とした。

得られた PLGA/アパタイト複合材は、Samco プラズマ反応装置 (Model PD-2) を用いて、アンモニア気流中 13.56 MHz でプラズマ処理した [3-14]。処理したそれぞれの複合材は、直ちに 0.1 mg/mL の I 型コラーゲン中に2時間浸漬し、PBS 水溶液で3回洗浄した後、凍結乾燥した。

### 3-2.3 *in vitro* 試験 [3-13]

#### 3-2.3.1 PLGA/アパタイト複合材の吸水試験

PLGA/アパタイト複合材の吸水は、PBS 溶液浸漬後の質量変化から評価した。各複合材を  $10 \times 5 \times 0.3$  mm の大きさに切断し、30 mL の PBS 溶液の入った遠沈管に入れた。複合材の上から遠沈管の径に合わせたポリエチレンメッシュを載せて沈め、溶液中に完全に浸漬させた。この遠沈管を  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温槽内に保持し、PBS 溶液を 2 週間ごとに交換した。それぞれ、各 3 サンプル試験し、いずれか 1 つに形状破壊がみられた時点を終了点とした。PBS 溶液浸漬前後の質量変化を測定し、3 サンプルの平均値と吸水期間の相関を評価した。Control として、PLGA 単独成型体も同様に実験した。

#### 3-2.3.2 PLGA/アパタイト複合材上への CP 析出

ハanks溶液 (HBSS) 中に PLGA/アパタイト複合材を浸漬し、質量変化と FE-SEM による観察から CP 析出の度合いを評価した。各複合材を  $10 \times 2.5 \times 0.3$  mm の大きさに切断し、30 mL の HBSS の入った遠沈管に入れた。複合材の上から遠沈管の径に合わせたポリエチレンメッシュを載せて沈め、溶液中に完全に浸漬させた。この遠沈管を  $37^{\circ}\text{C}$  の恒温槽内に保持し、HBSS を毎日交換した。1, 3, 5 日間浸漬したサンプルを HBSS から取出し、表面の溶液をキムワイプで軽く拭き取り、デシケーター中で保管した。Control として、PLGA 単独成型体も同様に実験した。

#### 3-2.3.3 線維芽細胞の付着試験

得られた PLGA/アパタイト複合材上への細胞付着性を調べるために、CA および PLGA 単独成型体にヒト由来線維芽細胞を播種し、90 分間培養して、付着した細胞数を比較した。

ヒト由来線維芽細胞は、日本大学松戸歯学部の歯科病院（倫理委員会承認番号 No: EC02-002）において、ヒトから外科的に取り出した歯周組織から採取した。予備培養は、10%ウシ胎児血清と  $100 \mu\text{g}$

$\mu\text{L}^{-1}$ ストレプトマイシン,  $100 \text{ U mL}^{-1}$ ペニシリンG,  $100 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ アムホテリシンBを加えたイーグル培地中,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ ,  $95\%$ 空気的环境下で培養した。24-wellのポリエチレン培養皿にPLGAと**CA**を入れ, ヒト由来線維芽細胞を細胞密度  $1 \times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$  で播種した。細胞懸濁液は, 空の培養皿にも播種した。90分間培養後, 3回PBS溶液で洗浄し, 付着していない細胞を洗い流した。細胞の付着したPLGAと**CA**は, トリプシン処理により細胞を剥がし, コルターカウンター(Nikkaki, Tokyo, Japan)で細胞数を計測した。測定データは,  $p < 0.05$  を統計的に有意とし, 一方向の分散分析と比較に対するFisher'sのPLSDテストを用いて評価した。

#### 3-2.3.4 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の14日間培養と付着形態 [3-15]

凍結保存したMC3T3-E1 (Riken Cell bank) を解凍し,  $\alpha$ -MEM+10%FBSを用いて70~80%コンフルエントになるまで拡大培養した。拡大培養した細胞表面をPBS溶液で3回洗浄し, 0.25% Trypsin-1mM EDTAを加えて $37^\circ\text{C}$ , 5分間培養し細胞を回収した。血球計算盤にて細胞数を測定し,  $\alpha$ -MEM + 10%FBSを用いて細胞数を所定の濃度に調製した。この溶液を感作用細胞浮遊液として実験に供した。

**CA** および **CB** を24-wellの培養皿に入れ,  $\alpha$ -MEM+10%FBSを1 mL添加し,  $37^\circ\text{C}$  で1時間培養した。複合材を50 mLチューブに移し, 感作用細胞浮遊液を500  $\mu\text{L}$  加えて,  $37^\circ\text{C}$  の温浴で3時間 (agitation : 65 回/min) 培養した。細胞感作終了後, 複合材を24-wellの培養皿に移し,  $\alpha$ -MEM + 10%FBSを1 mL加え $37^\circ\text{C}$  で14日間培養した。培地は1日おきに交換した。

#### 3-2.3.5 細胞の観察

付着した細胞の形態は, FE-SEMで観察した。**CA**, **CB** は, 細胞培養後PBS溶液で洗い, 付着細胞は1%グルタルアルデヒド15分間で固定させ, PBS溶液で3回洗った。すぐに, 段階的に高濃度化したエタノー

ルに浸漬して脱水し、トリメチルシランで乾燥した。Au 蒸着した後、FE-SEM で細胞を観察した。

### 3-2.4 *in vivo* 試験

#### 3-2.4.1 埋め込み

CA, CB, PLGA の埋め込み実験は日本大学松戸歯学部（倫理委員会承認 No. ECA-07- 0021）, CE, CE', CG の埋め込み実験は鶴見大学歯学部（倫理委員会承認 No. 091）で行った。埋め込み試験には、生後3か月の3.5~4 kg, メスの日本白色種ウサギを使用した。各ウサギに、2サンプルずつ埋め込んだ。埋め込み試験前に、サンプルはすべてエチレンオキシドガスで滅菌処理した。

埋め込み手術は、4%のイソフルランと酸素を混ぜた一般的な吸入麻酔を投与して行った。外科手術中は、2%のイソフルランを用いた。キシロカイン注射で局所麻酔した。術中感染症危険を減らすために、予防抗生物質 Shiomalin®（ラタモキシセフナトリウムと同等、塩野義製薬株式会社、日本）を、手術後に皮下注射により投与した。

PLGA/アパタイト多孔質複合材と PLGA は、 $4.5 \times 3.5 \times 2$  mm に切断し、ウサギの左右の脛骨骨幹に挿入した。挿入するため、背中を固定したウサギの後脚を剃毛し、洗浄後ヨードチンキで消毒した。左右の脛骨の中間の表面に沿って傷をいれ、骨を露出した。皮質骨欠損（ドリルホール）は、内側皮質と骨髄を通して  $2 \times 4$  mm<sup>2</sup> で開けた。ドリルホールは、低回転穿孔速度（500 rpm）と連続内部の冷却を用いた非常に穏やかな外科的技術で開けた。サンプル挿入後、軟部組織を Vicryl 3-0 縫合材で、それぞれ縫合した。

手術後には、ウサギは標準的なおりに入れた。ウサギは、規定量のエサを自由に食べ、水を飲み、すべての時間無制限に動くことができた。ウサギは、12 週間の埋め込み後、過量のペントバルビタールナトリウム（Isozol®）の腹膜注入により屠殺した。

### 3-2.4.2 マイクロCTと組織観察

埋め込みサンプル周囲の骨は、屠殺直後に切除した。切除した過剰な組織部位を除去し、10%ホルマリソリン溶液に入れた。その後、PLGA/アパタイト多孔質複合材とPLGAを含んでいる組織塊は、段階的な一連のエタノールを通して脱水乾燥して、メチルメタクリル酸塩に埋包し、37°Cで重合後、埋め込みサンプルを得た。

埋め込みサンプルの埋包前に、脛骨の欠陥の治療状態を高解像度マイクロフォーカスX線コンピューター断層撮影（マイクロCT）でスライス観察した。埋め込みサンプル **CA**, **CB**, PLGAは、0.16 mmごとに74 kV, 110  $\mu$ AのマイクロCT（TOSCANER-30000 $\mu$ hd, 東芝ITコントロールシステム株式会社, 東京）で撮影した。埋め込みサンプル **CE**, **CE'**, **CG**は、0.1 mmごとに50 kV, 1 mAのマイクロCT（Latheta, LCT-100, 日立アロカメディカル株式会社, 東京）で撮影した。サンプルごとの3つの乾燥体は、ランダムに選択してマイクロCT観察した。

マイクロCT観察の後、非脱灰薄片は、カット研磨技術（EXAKT-cutting Grinding System, BS-300CP band system & 400 CS microgrinding system, EXAKT）を使用して準備した。最終的な厚さが約50  $\mu$ mの薄片は、埋め込まれたサンプルの長い軸と平行方向に製作し、埋め込みサンプル **CA**, **CB**, PLGAは、トルイジンブルーで、埋め込みサンプル **CE**, **CE'**, **CG**は、メチレンブルーと塩基性フクシンで染色した。サンプルの組織を、光学顕微鏡（BX51, オリンパス株式会社, または Eclipse E800M, 株式会社ニコン, 倍率  $\times 100$ ）で観察した。

組織学的観察の他に、**CA**, **CB**, PLGAについて、4または5つの薄片を同一サンプルから準備し、その中の1つを新生骨形成の組織形態測定評価に用いた。埋め込み域の骨再生割合は、イメージ分析ソフトウェアを用いて算出した（Image Pro-Plus, Media Cybernetics. MD. USA）。評価サイズは、埋め込ん

だサンプルよりわずかに小さい  $2 \times 3 \text{ mm}$  とした。新生骨形成率は、手術前の評価サイズ内に存在した最初の骨の領域に対し、新生骨領域の割合を新生骨形成率 (%) として定義した。

測定データは、 $p < 0.05$  を統計的に有意とし、一元配分散分析と、多重比較検定には Scheffe と PLSD を用いて評価した。

### 3-2.5 測定

作成した PLGA/アパタイト多孔質複合材は、FT-IR, TG-DTA, 元素分析から組成を同定し、FE-SEM, XGT でアパタイトの分散状態を確認した。SEM 観察から平均気孔径 [3-12], 密度測定から気孔率 [3-5]を測定した。

## 3-3 結果

### 3-3.1 PLGA/アパタイト多孔質複合材の物性評価

#### 3-3.1.1 形状および形態

PLGA/アパタイト複合材の作成は、異なる時期に行った。1 回目に作成した複合材は **CA**, **CB**, PLGA, 2 回目は **CE**, **CE'**, **CG** である。いずれも作成方法は同一である。Fig. 3-1 には、作成した PLGA/アパタイト多孔質複合材 **CA** の写真を示す。白い形成物は柔らかく、ピンセットで掴むと接触部が凹んだ。断面は多孔質なスポンジ状形態であった。これは、他のどの複合材, PLGA 単独成型体も同じだった。

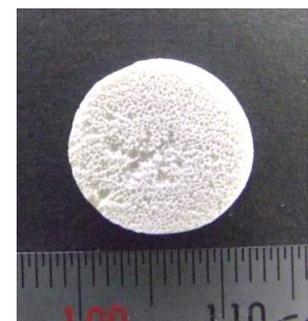


Fig. 3-1 Photograph of the fabricated PLGA/apatite

異なる作成時期のサンプル **CA** および **CE'** の FE-SEM 像を Fig. 3-2 に示す。FE-SEM による観察から、サンプルの気孔径は、すべて  $200 \sim 300 \mu\text{m}$  であった。しかし、密度測定から気孔率を算出したところ、**CA**

CB, PLGA は 92%, CE, CE', CG は 96% で異なっていた。

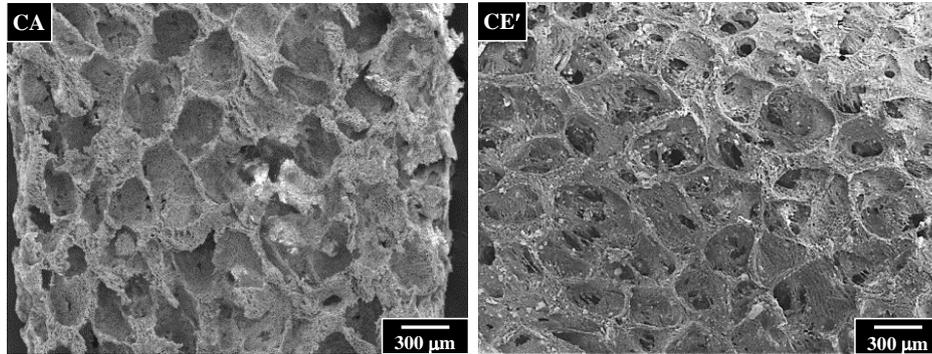


Fig. 3-2 Surface morphologies of CA and CE' PLGA/apatite

Fig. 3-3 には、それぞれのサンプルの細孔内部を拡大観察した SEM 像を示す。PLGA 以外のサンプルにはマトリックスの PLGA 中にアパタイト粒子（図中矢印）の点在が観察できた。

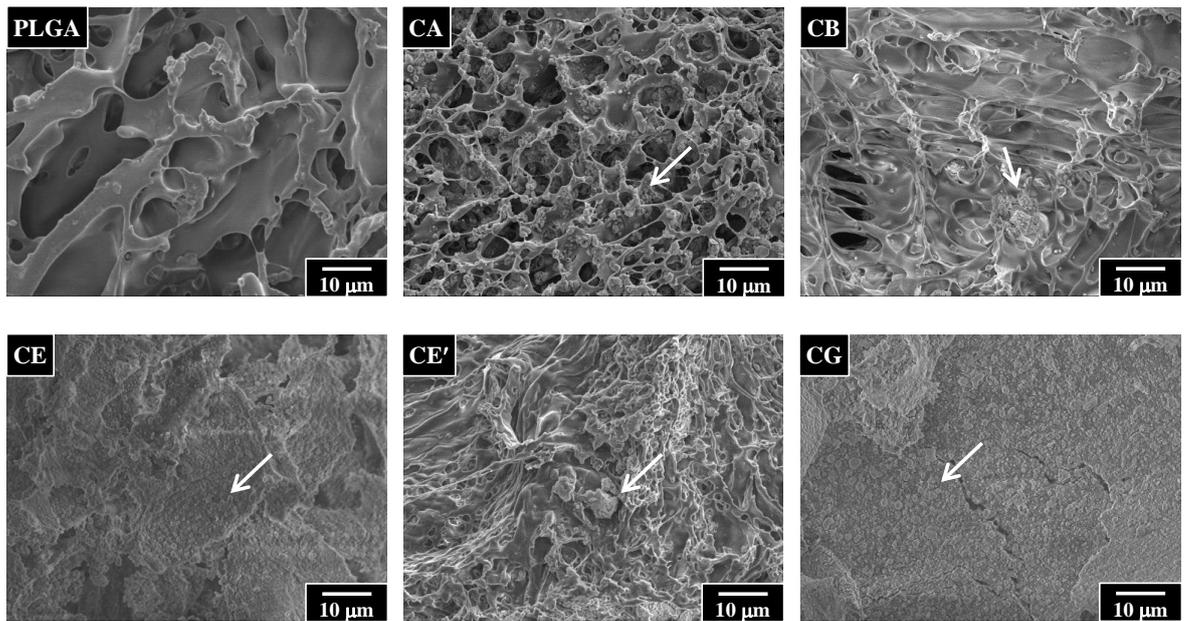


Fig. 3-3 SEM images of PLGA and PLGA/apatite porous composites CA, CB, CE, CE' and CG, apatite powder assigned to arrow.

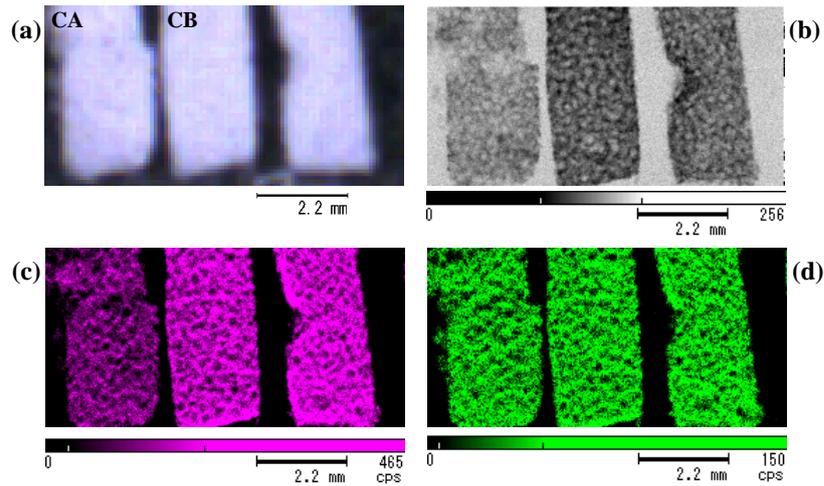


Fig. 3-4 Dispersion of apatites in PLGA/apatite porous composite, **CA** and **CB**, observed by XGT measurement. (a) Optical images, (b) X-ray transmitted (c) distribution of Ca atoms observed by Ca  $K\alpha$ , and (d) distribution of P atoms observed by P  $K\alpha$ .

Fig. 3-4には、**CA** および **CB** のXGT 観察後の像を示す。(a) は光学像、(b) は透過X線像、(c) はCa  $K\alpha$ 線によるCa原子の分散、(d) はP  $K\alpha$ 線によるP原子の分散を示す。**CA** および **CB** のサンプルは、いずれもCaとPが均一に分散していた。

Fig. 3-5には、PLGAとPLGA/アパタイト複合材、**CA**、**CB**、**CE**、**CE'**、**CG**のXRDパターンを示す。複合材料のXRDは、第1章記載の平行ビーム法で測定した。

PLGAは、 $2\theta = 21.1, 25.9, 26.2, 31.5, 45.2^\circ$ にピークが観測された。**CA**、**CB**、**CE'**には、六方晶系CPに帰属できるピーク ( $2\theta = 32.0, 32.6, 33.9, 39.4, 43.5, 46.3, 49.3^\circ$ 付近) が観測されたが、**CE** および **CG** は明確なピークを示さなかった。

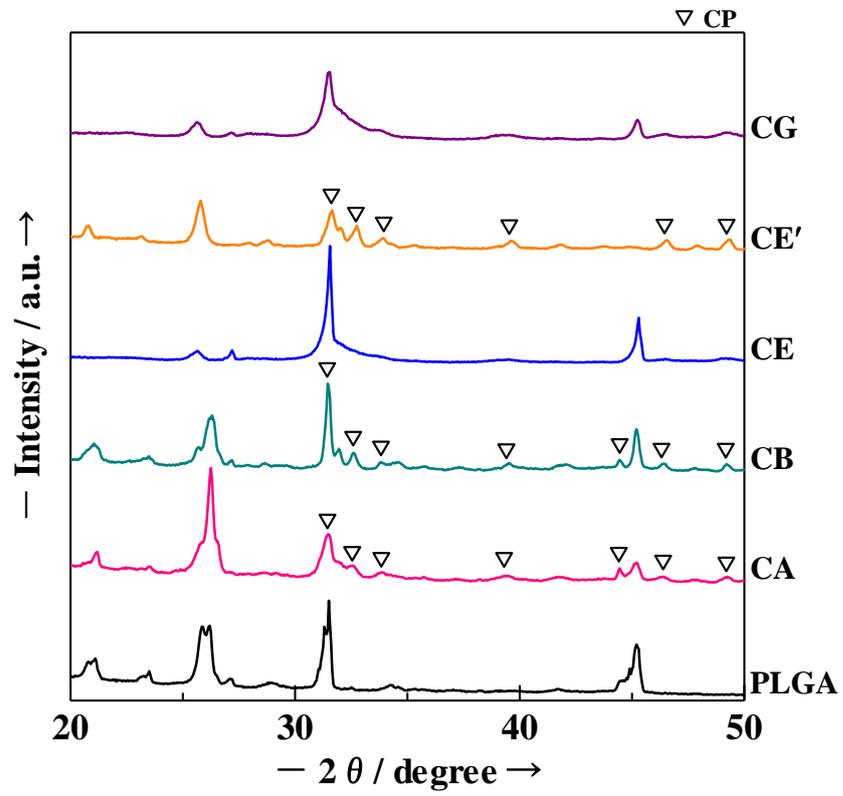


Fig. 3-5 XRD patterns of PLGA and PLGA/apatite composites **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG**. The major peaks are marked: filled triangle ▽; CP.

Fig. 3-6 には, PLGA と PLGA/アパタイト複合材の FT-IR スペクトルを示す。すべてのサンプルに, PLGA 由来のエステルに帰属されるピークが, 1085~1179 と 1760  $\text{cm}^{-1}$  に観測された。また, 1620~1640  $\text{cm}^{-1}$  付近のブロードなピークは, アンモニアプラズマ処理によるアンモニア由来のアミノ基に帰属できた。**CA**, **CB**, **CE**, **CE'**, **CG** には, 550~605 および 940  $\text{cm}^{-1}$  にリン酸基の振動に帰属されるピークが観測された。

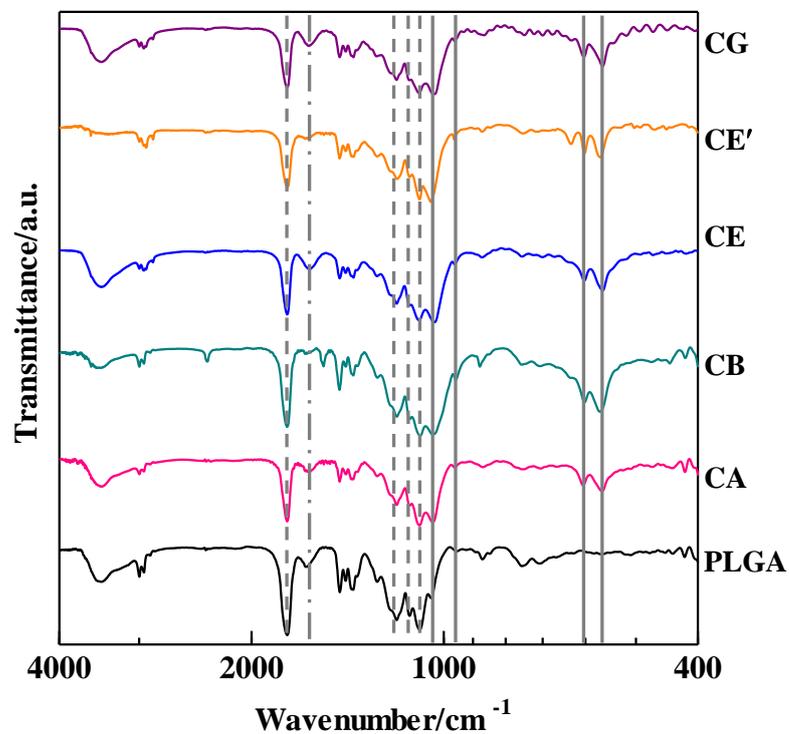


Fig. 3-6 FT-IR spectra of PLGA and PLGA/apatite porous composite **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG**. The major peaks are marked: Line =  $\text{PO}_4^{3-}$ , Dashed line = ester, Dot and dashed line =  $\text{NH}_4^+$ .

Fig. 3-7には、PLGA/アパタイト複合材 **CA**, **CB**, **CE**, **CE'**, **CG** のTG 曲線を示す。すべてのサンプルで、300~400°C に大きな質量減少がみられた。この減量温度は、**CE'** だけ約 50°C 高かった。また **CB** にのみ 600~700°C にも質量減少が観測され、**CA**, **CB**, **CE**, **CG** は 800~950°C の温度範囲で質量減少した。1000°C まで加熱した固形分割率は、それぞれ 32, 45, 36, 33, 34%であった。

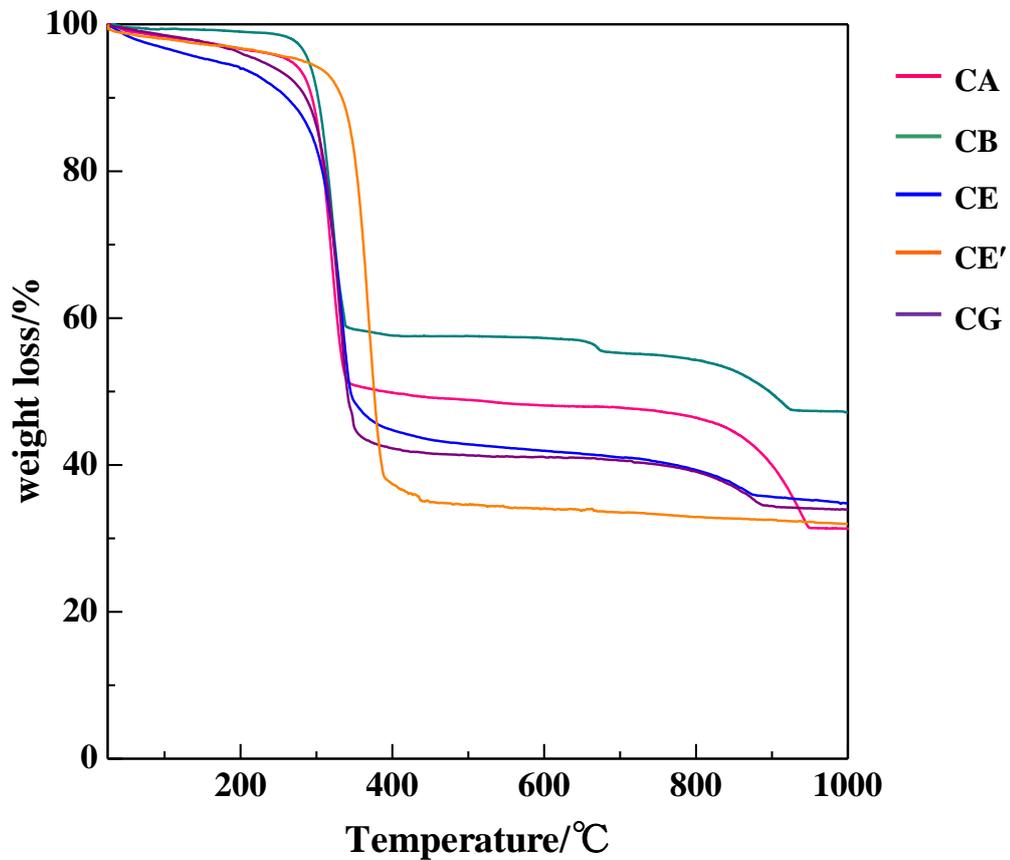


Fig. 3-7 TG curves of the PLGA/apatite porous composites **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG**.

### 3-3.1.2 PBS 溶液中での吸水試験

Fig. 3-8に、37°CのPBS溶液に各サンプルを浸漬した時の吸水速度と劣化挙動を示す。サンプルは、吸水・脱水による質量の増減を繰り返し、最終的に破壊した。PLGAの吸水性は、アパタイト導入複合材よりも高かった。CE'の吸水率も浸漬後に急激に高くなったが、その後急激に減少し、増減後破壊した。

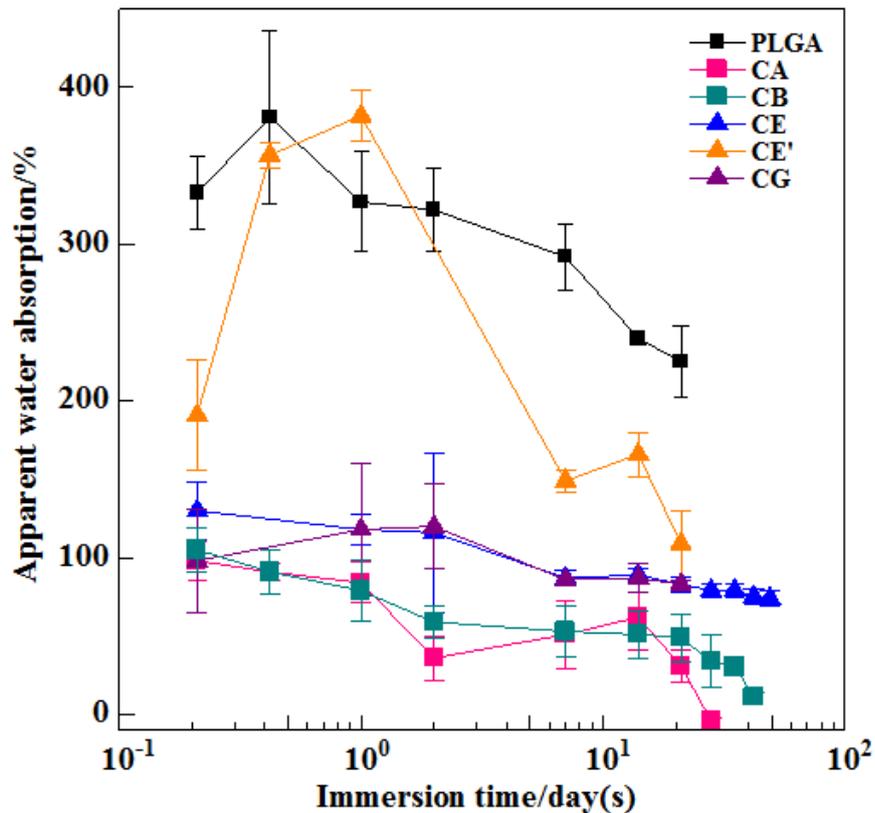


Fig. 3-8 Dependency of the apparent water absorption ratio in PBS on immersion time.

### 3-3.1.3 HBSS 中での CP 析出試験

HBSS 中に浸漬した各サンプルの質量を測定した。浸漬時間ごとに、PLGA の質量を基準として各サンプルの質量変化を標準化した。その結果を Fig. 3-9 に示す。CA は、PLGA に比較して顕著に質量増加し、CB は微増で、それ以外のサンプルは PLGA と同等だったことが分かる。また、CA 以外のサンプルは、3 日以上の浸漬で PLGA より質量が減少したことも分かった。

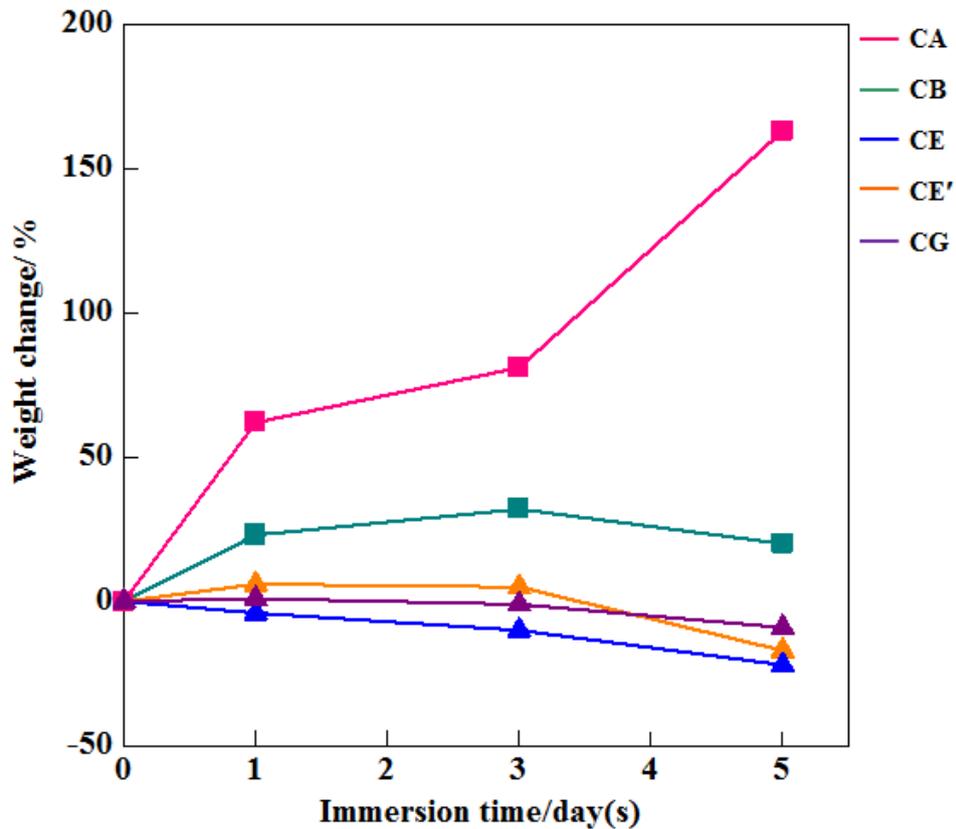


Fig. 3-9 Normalized deposition rates of calcium phosphates on PLGA/apatite porous composite **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG** in HBSS as compared with the deposition rate of PLGA alone.

HBSSに浸漬後のサンプル表面形態を Fig. 3-10 に示す。PLGA および **CE'**以外のサンプルは、浸漬 1 日後からサンプル表面に析出物が観察できた。浸漬 3 日後、PLGA と **CE'**表面にも析出物が確認できた。1 日後から析出したサンプルでは、いずれも表面が析出物で覆われており、5 日後も顕著な違いは観られなかった。3 日後に析出物が確認できた PLGA も 5 日後には表面全体が析出物で覆われていたが、**CE'**は 5 日後でも浸漬前と同じ状態のマトリックスが観察された (Fig. 3-10 中の白丸部分)。析出物の組成を調べるため、HBSS 浸漬 5 日後のサンプル表面を XRD の平行ビーム法で測定した。その結果を Fig. 3-11 に示す。いずれも六方晶系 CP に帰属されるブロードなピークが観測された。**CB** と **CE'**では、 $2\theta = 31\sim 35^\circ$ に観測されるアパタイトに特徴的な XRD ピークが他のサンプルよりも分離していた。

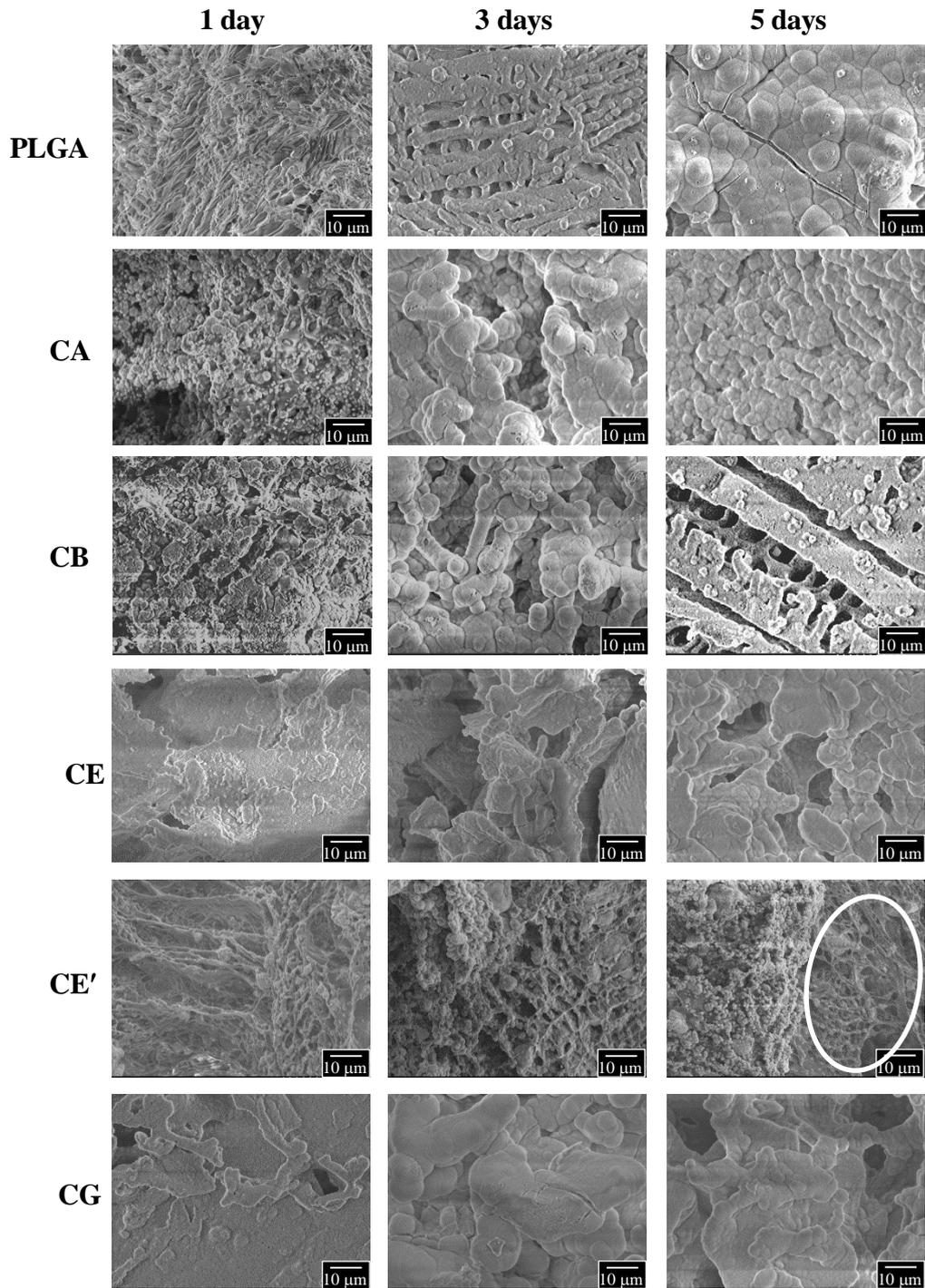


Fig. 3-10 SEM image of PLGA and PLGA/apatite composites **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG** after immersion in HBSS.

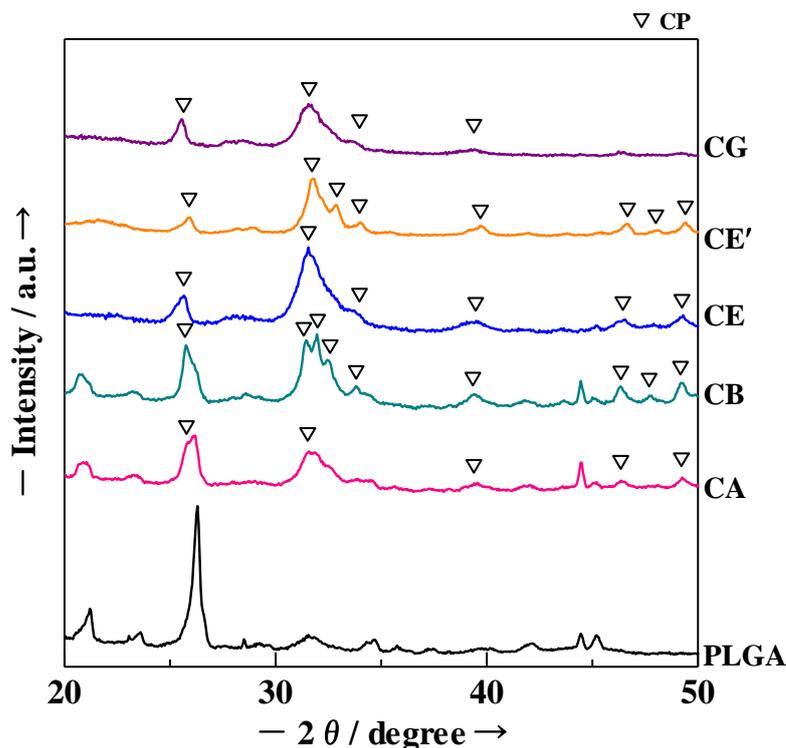


Fig. 3-11 XRD patterns of the deposited materials on PLGA and PLGA/apatite porous composites **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG** after immersion in HBSS. The major peaks are marked: ▽ = CP.

### 3-3.2 ヒト由来線維芽細胞の付着試験

PLGA/アパタイト多孔質複合材, **CA** 上への細胞適合性を調べるため, ヒト由来線維芽細胞を播種, 培養して細胞数の変化を調べた。その結果を Table 3-1 に示す。TCPS を Control とした。90 分間培養後の

Table 3-1 Number of initially attached fibroblasts cultured for 90 min on PLGA, PLGA/apatite porous composite **A** or TCPS dish.<sup>1)</sup>

PLGA	<b>CA</b>	TCPS dish
35,650 (271)	36,894 (8,198)	38,766 (10,400)

1) Standard deviations are presented in parentheses.

細胞数は、PLGA, CA, TCPS間で顕著な差はなかった。Fig. 3-12には、CA表面に付着したヒト由来線維芽細胞のFE-SEM像を示す。ヒト由来線維芽細胞は、気孔内壁によく付着していた。

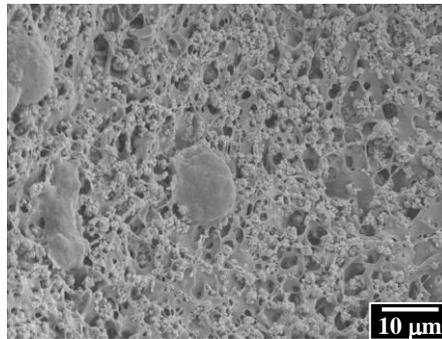


Fig. 3-12 SEM image of PLGA/apatite porous composite CA after cell culture for 90 min.

### 3-3.3 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の培養試験

作成したPLGA/アパタイト多孔質複合材の上で、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を14日間培養した。14日間培養後のCAとCBの材料表面のFE-SEM像をFig. 3-13に示す。培養した細胞は、CAの気孔内部に入り込み、仮足を伸ばして伸展していた。一方、CBの表面にも細胞は付着していたものの、その伸展は見られなかった。

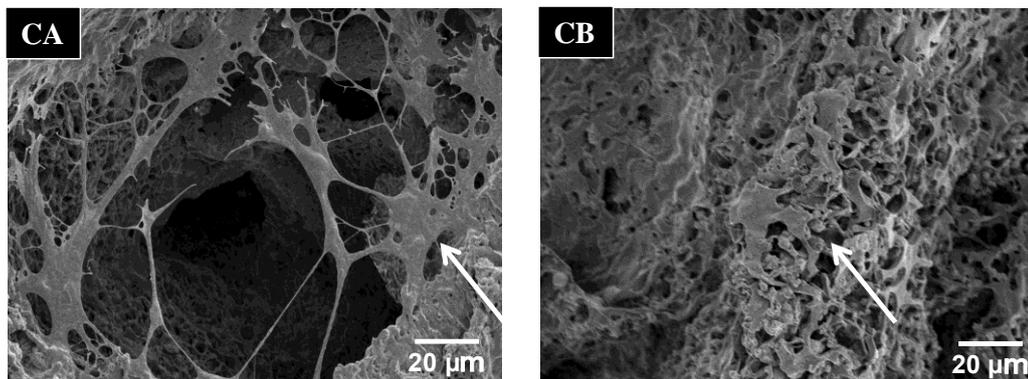


Fig. 3-13 SEM images of the morphology of attached cell to porous PLGA/apatite composite scaffold, CA and CB, after MC3T3-E1 cell culture 14 days.

### 3-3.4 埋め込み試験

試験期間中、サンプルを埋め込んだウサギはよい健康状態であった。炎症の臨床徴候や逆組織反応は観察されなかった。

#### 3-3.4.1 マイクロCT 観察

Fig. 3-14 は、**CA**と**CB**を4週間埋入した大腿骨のマイクロCT像で、サンプル埋入用のドリルホール部分を黄色の枠線で示した。**CA**を埋入したドリルホール周辺には、当初の穴が塞がるほど新生骨の形成が認められた一方、**CB**を埋入した大腿骨にそのような兆候は見られなかった。

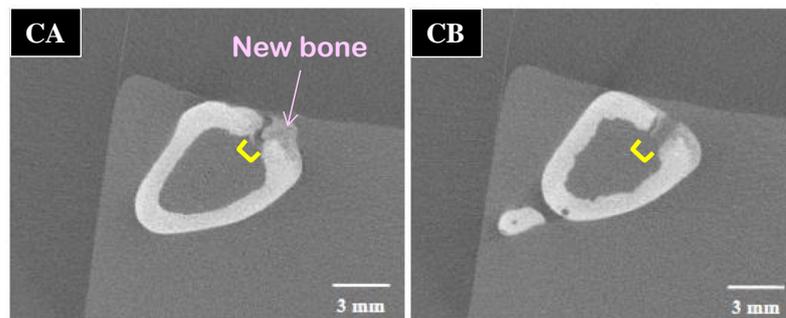


Fig. 3-14 Micro-CT views of rabbit tibiae after 4 weeks implantation.

Fig. 3-15 には、埋め込み 12 週間後の PLGA, **CA**, **CB**, **CE**, **CE'**, **CG** のマイクロCT像を示す。PLGAを埋入した大腿骨はドリルホールが開いたままで、新生骨は形成されていなかった。しかし、**CA**を埋入した大腿骨は、新生骨でドリルホールが埋められ、**CB**, **CE**, **CE'**, **CG** の場合にも、ドリルホールの一部に新生骨が形成していた。また、**CE**と**CG**を埋入した大腿骨には、骨髓内部に流入した物質が確認された。

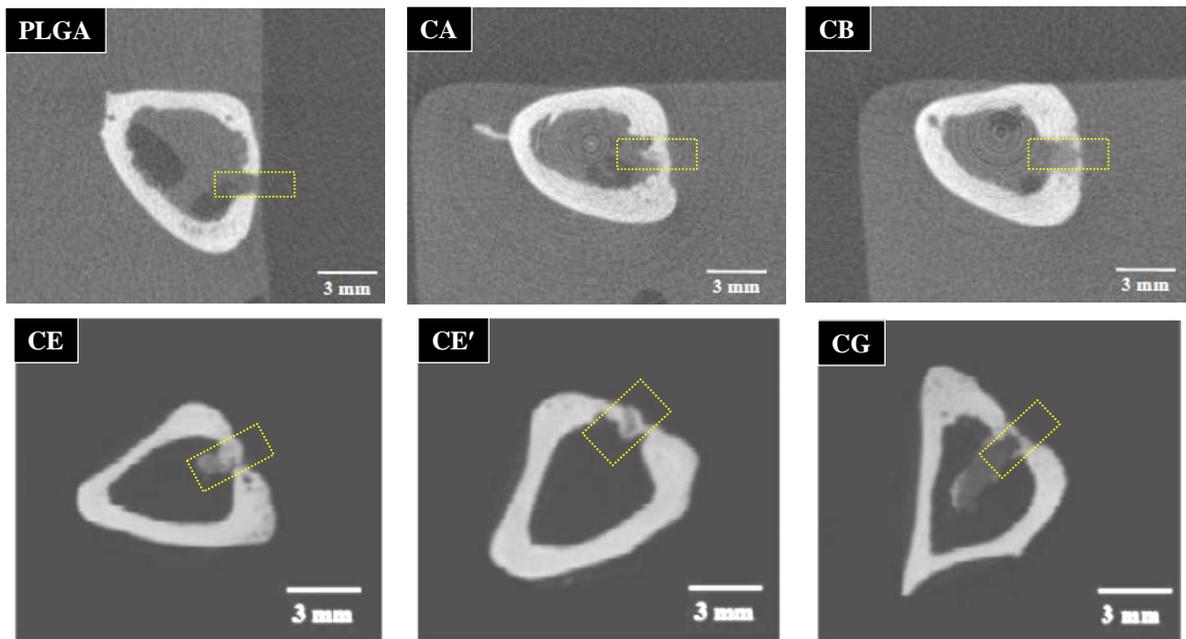


Fig. 3-15 Micro-CT views of rabbit tibiae after 12 weeks of implantation of PLGA and PLGA/apatite porous composites **CA**, **CB**, **CE**, **CE'** and **CG**.

### 3-3.4.1 組織観察

Fig. 3-16 には、**CA** と **CB** を 4 週間埋入した大腿骨の組織観察像を示す。**CA** は、**CB** よりも活発に骨形成したが、骨再生は不完全で一部に欠損が見られた。しかし、その欠損部には **CA** の成分（図中茶色い部分）が残留していた。**CB** を埋入した大腿骨では、わずかな骨形成が見られる一方、ドリルホールは空いたままで、その部分に **CB** の残留が確認できた。このように、大腿骨中のドリルホールでの新生骨形成は、**CA** と **CB** で明らかに異なっていた。

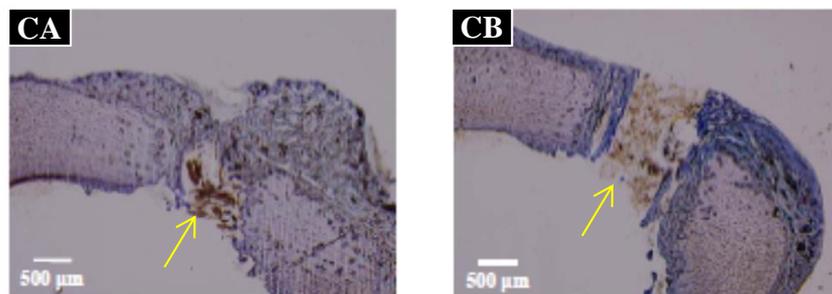


Fig. 3-16 Histological appearances of rabbit tibiae after 4 weeks implantation. Yellow arrow shows PLGA/apatite composite.

埋め込み 12 週間後の PLGA, **CA**, **CB**, **CE**, **CE'**, **CG** の組織写真を Fig. 3-17～Fig. 3-22 に示す。各図中で, (a)は低倍率で, ドリルホール周辺, (b) は, (a) で注目すべき部位を拡大した高倍率の像である。12 週間後の PLGA のドリルホール (Fig. 3-17) には, 新生骨の形成は全く見られなかった。しかし, 皮質骨近傍でわずかながら新生骨が生成し, 拡大すると石灰化している (図中(b) の矢印部分) ことが確認できた。

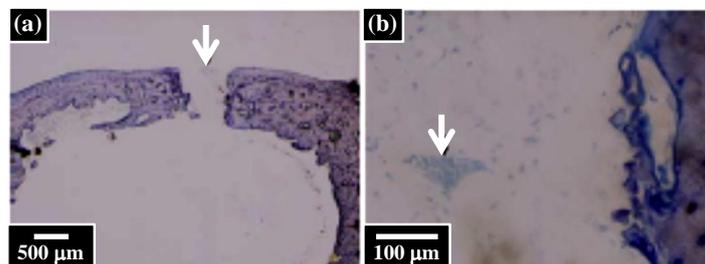


Fig. 3-17 The histological appearance after 12 weeks of implantation of PLGA alone.

**CA** を 12 週間埋入した後の埋入部位組織写真を Fig. 3-18 に示す。**CA** を埋入したドリルホールは, 新生骨によってほとんど埋められていた。(a) のアスタリスク周辺には, 骨髄細胞が見られ, (a) の□を拡大すると石灰化したアパタイト結晶は, 新生骨の端に沿っていることが分かる。このように, 新生骨は, 成熟した皮質骨と一体化するほど骨再生が進行していた。また, 複合材の残存物はなかった。

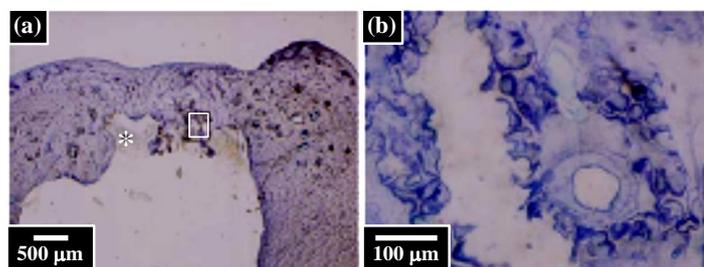


Fig. 3-18 The histological appearance after 12 weeks of implantation of PLGA/apatite composite **CA**.

CB を 12 週間埋入した後の埋入部位組織写真を Fig. 3-19 に示す。CB を埋入したドリルホールは、新生骨により粗密なものの埋まりつつあった。また、複合材が分解した小片が、ドリルホール周辺の骨髄液中に分散していた。(b)のトルイジン染色部分が示すように、新生骨は複合材が分解した小片を取り囲んで生じていた。

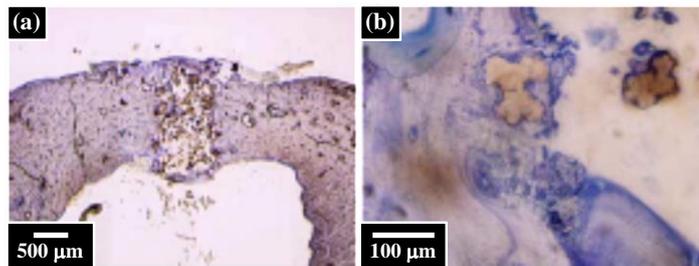


Fig. 3-19 The histological appearance after 12 weeks of implantation of PLGA/apatite composite

CE を 12 週間埋入した後の埋入部位組織写真を Fig. 3-20 に示す。CE を埋入したドリルホールには、新生骨の形成がほとんど見られなかった。複合材の PLGA の分解物が骨髄中に観察されたが、導入したアパタイト結晶は確認できなかった（図中(b) 矢印部分）。

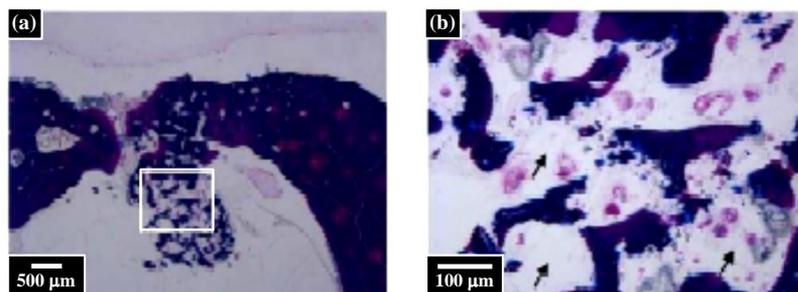


Fig. 3-20 The histological appearance after 12 weeks of implantation of PLGA/apatite composite CE.

CE'を12週間埋入した後の埋入部位組織写真を Fig. 3-21 に示す。CE'を埋入したドリルホールには、新生骨は形成されたが、(a) に観られるように、分解した PLGA が骨髄中に確認された。しかし、高倍率で観察すると、図中(b) のアスタリスク部分に、結晶性の高いアパタイトの存在が確認できた。

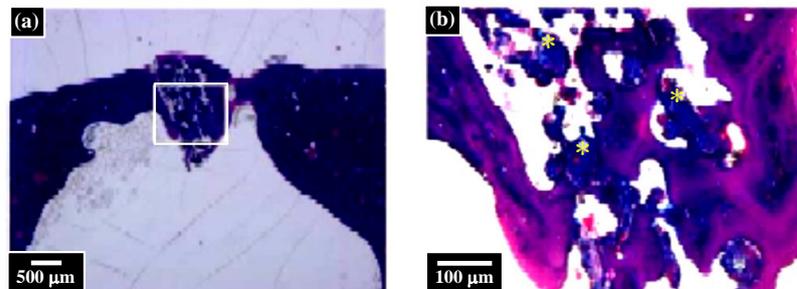


Fig. 3-21 The histological appearance after 12 weeks of implantation of PLGA/apatite composite CE'.

CGを12週間埋入した後の埋入部位組織写真を Fig. 3-22 に示す。CGを埋入したドリルホールは、CEと同様新生骨の形成はあまり認められず、PLGAの分解物が骨髄液中に観られた。しかし、CE同様に、アパタイト結晶は存在していなかった。

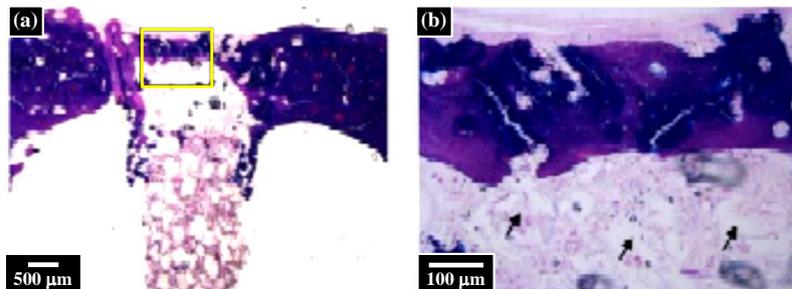


Fig. 3-22 The histological appearance after 12 weeks of implantation of PLGA/apatite composite CG.

Table 3-3には、新生骨が形成され、かつ複合材の分解物が骨髄液中に拡散していなかった PLGA, **CA** および **CB** サンプルの 12 週間埋入後の新生骨形成率を示す。PLGA の生成率は低く、**CA** の生成率は十分に高かった。

Table 3-3 The percentage of bone regeneration in rabbit cortical bone defects after porous composite implantation.

PLGA	CA	CB
51.4 ± 9.0	87.0 ± 5.4*	71.9 ± 4.2*

$n = 6$

\*, \*\* Means were significantly different at  $p < 0.05$

### 3-4 考察

#### 3-4.1 PLGA/アパタイト多孔質複合材

PLGA/アパタイト多孔質複合材は、溶液鑄造/塩溶出法により作成した。この方法は、NaCl の粒子径で気孔径を、添加量で気孔率を調製でき、多孔質材料を形成するために有効である。一方、今回 PLGA にアパタイトを 50/50 mass% 混合したにも関わらず、PLGA の燃焼が終了した 600°C の熱処理後に含有されていたアパタイトを調べたところ、**CA**、**CB**、**CE**、**CE'**、**CG** はそれぞれ 48, 57, 42, 34, 41 mass% であった。このことは、気孔を形成した NaCl 粒子を大量の水で洗い流す際に、アパタイト粒子の溶解や流出などによって減少したことを示している。

Fig. 3-7 の TG 曲線の 310°C の減量は、**CE'** のみが約 50°C 高温側にシフトしていた。その理由は、アンモニアプラズマ処理に依存していると考えられる。たとえば、PLGA の対応する温度は、プラズマ処理無で 60°C ほど高温側にシフトした。また、同様なシフトは、Fig. 3-23 に示す **CB** についてのアンモニアプラズマ処理の有無で変化した TG の測定結果にも観測される。このような温度シフトは、プラズマ処理で修飾された  $\text{NH}_4^+$  やコラ

ーゲンによるものと考えられる。これらの結果から、アンモニアプラズマ処理した **CE'** の処理が不十分だったと考えられる。この推定は、**CE'** の FT-IR スペクトルにおいて、 $\text{NH}_4^+$  ピークが他のサンプルほど明確でないことと一致する。なお、**CB** でのみ観測された  $670^\circ\text{C}$  付近の質量減少は、炭酸基の脱離により、一般的なアパタイトの熱反応でよく報告されている温度と一致していた [3-16~3-18]。その後、 $750^\circ\text{C}$  以上で **CA**, **CB**, **CE**, **CG** に観られる質量減少は、CDHA から TCP に転移する際の  $\text{H}_2\text{O}$  の脱離と考えられる。**CA** は CDHA 単一相で、**CB** も CDHA を含んでいることから合理的である。

一方、熱処理後の粉末の XRD パターンから、**CE** と **CG** は元々 CDHA を含ないことが示されており、複合材形成過程で生じたことが推定される。これまでに、Ca 錯体を経由する反応で得た HA を水中に浸漬すると、一般には起こらないとされている HA から CDHA に転化する現象を見出している（未発表データ）。この転化

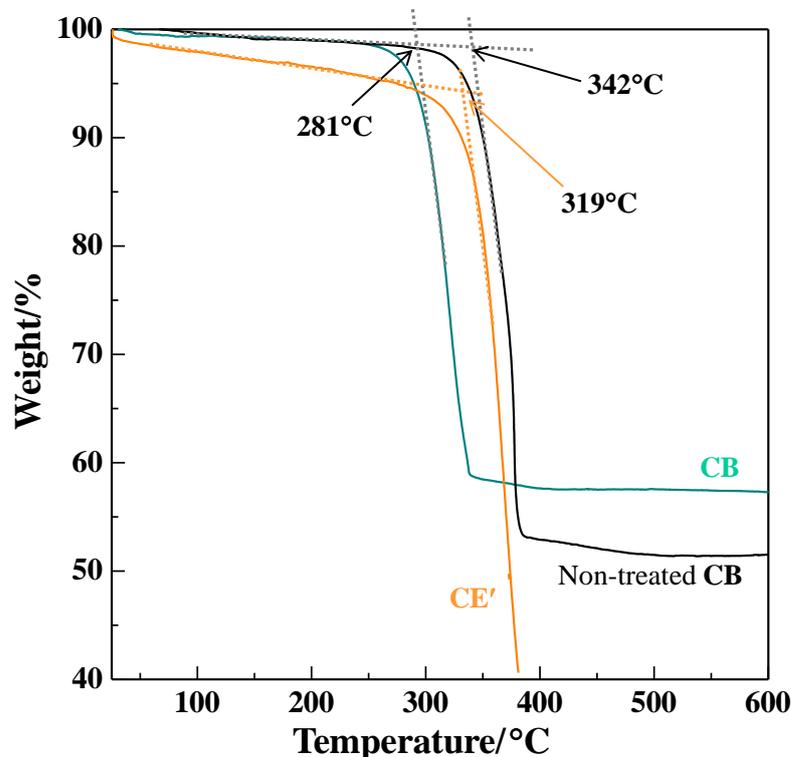


Fig. 3-23 TG curves of the plasma treated PLGA/apatite composites **CB** and **CE'**, and non-treated PLGA/apatite composite **CB**.

反応は、HA がアミノ酸配位子を含む時のみに起こる。**CE** と **CG** は、IDA と Asp を含んだアパタイトで、PLGA/アパタイト複合材作成時の 72 時間の水洗中に、HA の一部が CDHA に転化したと推定できる。このように、Ca 充足型 HA を導入したサンプルでも、結果的には若干の CDHA を含んだ複合材であった可能性が高く、上の熱分析結果に反映されたと考えられる。

気孔率の低い **CA** と **CB** のアパタイト含有量は、**CE**、**CE'**、**CG** よりも高かった。Fig. 3-3 で確認できるように、導入されたアパタイトは、マトリックスの PLGA 中によく分散していた。気孔率の高い **CE**、**CE'**、**CG** を混合した複合材はマトリックス量が少なく、含まれるアパタイト含有量が減少したと考えられる。

### 3-4.2 in vitro 試験による PLGA/アパタイト多孔質複合材の組織結合予測の検討

PLGA/アパタイト多孔質複合材および PLGA は、PBS 溶液浸漬直後から著しく吸水し、PLGA 単独の吸水率が複合材より高かった。PLGA の大きな吸水率増加は、PBS 溶液中で PLGA の一部が分解をはじめ、その酸性生成物が試料内に水を貯留したためと考えられる。一方、複合材中のアパタイトは、周辺の酸性化で溶解する。このため、同様に PLGA が分解して酸性生成物を生じると、速やかにアパタイトが溶解する。溶解で供給される  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが酸性生成物を中和したために、複合体が吸水を抑制したと考えられる。**CE'** のみが浸漬後、急激な吸水率増加を示した。**CE'** は、**CE** を熱処理して得た HA 単一相で結晶性も高く、溶解度が低い上に、溶解速度も小さいと推定される。このため、複合材であっても、**CE'** では中和が進まず、結果として吸水が抑制されなかった可能性が高い。**CE'** の浸漬 1 週間後の急激な吸水率低下は、この時点で導入アパタイトが溶解して中和されたためと考えられる。一方、混合したアパタイトの結晶性が高い **CB** では **CE** のような急激な吸水率増加は起きなかった。これは、**CB** が CHA や CDHA の溶解の速やかなアパタイトを含み、分解生成物が早期に中和されたためと推測される。このように、PLGA と混合するアパタイトは、溶解速度が重

要な因子であることが分かった。また、PLGAの分解は、適切なアパタイトを混合すると、抑制されることが分かった。

HBSS中でのCP析出量は、PLGA/アパタイト複合材の気孔率とアパタイトの種類に大きく依存し、今回のアパタイト含有量範囲では含有量と無関係だった。気孔率92%のCAおよびCBは、CE、CE'およびCGよりも析出速度が高く、混合したアパタイトの種類でその差は顕著であった。低結晶性CDHAを導入したCAは、高結晶性CHA/CDHAを導入したCBの6倍の速度でCPが析出し、低結晶性アパタイトはCP析出に有効であった。CE、CE'とCGの間には、このような差は見られなかった。しかし、FE-SEMによる観察において、CEおよびCGはHBSS浸漬1日後から、表面がCPで覆われていた一方、CE'は浸漬5日後でも表面にはマトリックスのPLGAが部分的に露出していた。

ヒト由来線維芽細胞は、いずれのPLGA/アパタイト多孔質複合材上にも初期付着した。MC3T3-E1骨芽細胞様細胞の14日間の培養により、毒性がないことも確認できた。また、MC3T3-E1細胞の培養において、CBよりもCAの方が細胞の伸展がよく、細胞数も多かった。このように、PLGAに低結晶性アパタイトを導入した複合材は、骨芽細胞様細胞を活性化し、早期の骨再生を期待できることが分かった。

### 3-4.3 in vivo 試験によるPLGA/アパタイト多孔質複合材の骨再生

埋め込み4週間後の新生骨生成は、CAとCBで大きく異なり、CAを混合した複合材は良好に新生骨を生成した。CAからのCa<sup>2+</sup>イオンの溶解が骨芽細胞を活性化させ、骨形成が促進されたことを示しており、in vitroの結果と一致する。Ca<sup>2+</sup>イオンが溶解して過飽和になるとCaが組織に沈着し、石灰化する[3-18, 3-19]ことから、CAがCa<sup>2+</sup>を十分供給したと考えられる。また、PLGA単独体は4週間後でもドリルホールに留まり、混合アパタイトを保持できることも確認できた。

CA を混合した複合材の埋め込み 12 週間後では、ドリルホールが新生骨で完全に満たされていた。CB, CE も新生骨の形成が観られたことから、アパタイトが高結晶性であっても、PLGA 単独体よりはアパタイトを混合する効果があることは分かった。一方、マトリックスの気孔率も重要な因子であった。気孔率の高い PLGA 複合材は、埋入時の形状保持が困難で、さらにアパタイトの溶解が速くなり、より形状変化が促進されて治療部位に留まらなかった。これは、骨再生材料として複合材を設計する上で、重要な情報である。

### 3-5 結言

PLGA (70/30) に、結晶性を制御した 5 種類のアパタイト、低結晶性 CDHA、高結晶性 CHA/CDHA、IDA 含有低結晶性 CHA/HA、高結晶性 HA、Asp 含有低結晶性 HA/CHA を導入した多孔質複合材を作成し、in vitro および in vivo 試験を行った結果、以下のことが明らかとなった。

1. PLGA (70/30) にアパタイト粉末を導入し、溶液鑄造/塩溶出法で、気孔径 200~300  $\mu\text{m}$ 、気孔率 92~96% の多孔質複合材を作成できた。
2. アパタイト粉末は複合材に均一に分散し、含有率は 34~57% であった。
3. 作成した PLGA/アパタイト多孔質複合材は、PLGA 単独成型体よりも吸水率が低く、複合化したアパタイトが PLGA の分解酸性生成物を中和し、分解速度を抑制したと推定される。
4. 低結晶性アパタイトを混合した複合材 CA は、HBSS 中での CP 析出速度が顕著に高く、かつその上で MC3T3-E1 細胞の増殖も他の複合材よりも優れていた。これは、低結晶性アパタイトが、溶解により  $\text{Ca}^{2+}$  を供給し、骨芽細胞が活発化するためと考えられる。

5. 埋め込み試験でも, **CA** は 4 週間後から新生骨形成が見られ, 12 週間後には皮質骨と一体化したのに対し, PLGA 単独体は 12 週間経過しても新生骨をほとんど形成しなかった。骨形成には,  $\text{Ca}^{2+}$  の供給が重要なことが明らかとなった。

6. 複合材の気孔率と導入アパタイトの溶解速度は, 複合材形状を維持する上で重要な因子であった。

これまで, PLGA にリン酸カルシウム化合物を導入した複合材の報告はいくつかあった。しかし, 導入アパタイトの低い溶解性が問題となり, 実用化されていないのが現状である。本研究では, 結晶性と組成の異なるアパタイトを導入した PLGA の多孔質複合材の *in vitro*, *in vivo* 試験から, 早期に骨再生可能な低結晶性アパタイト導入 PLGA を実現し, さらにアパタイト導入の利点や適切な気孔率があることを明確にした。当初はアパタイト粉末中に残存する配位子の骨形成への効果も検討課題としていたが, 作成複合材の気孔率が異なったため, この点に関しては明確な結論は得られなかった。非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸 Asp を含有した低結晶性アパタイト粉末を適切な気孔率のマトリックスと組み合わせることにより, さらに早期の骨再生も期待される。

## 参考文献

- [3-1] Hayakawa T, Takahashi K, Yoshinari M, Hara H, Nemoto K, Sato M. Molecular precursor method can coat thin carbonate-containing apatite (CA) film inside titanium fiber mesh. *J Oral Tissue Engin.* 2005;3:17-24.
- [3-2] Hayakawa T, Takahashi K, Yoshinari M, Okada H, Tamamoto H, Sato M, Nemoto K. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21:851-858.
- [3-3] Hayakawa T, Takahashi K, Okada H, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Yamamoto H, Sato M. Effect of thin carbonate-containing apatite (CA) coating of titanium fiber mesh on trabecular bone response. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008;19:2087-2096.
- [3-4] Hayakawa T, Ametani A, Kuboki Y, Sato M. Thin carbonate-containing apatite coating of a titanium web using a molecular precursor method under oxygen gas introduction. *J Oral Tissue Engin.* 2009;6:201-210.
- [3-5] Wang SG. Cells scaffold in tissue engineering. *Clin J Rehabil Theory Pract.* 2002;8:264-267.
- [3-6] Shi G, Cai Q, Wang C, Lu N, Wang SG, Bei J. Fabrication and biocompatibility of cell scaffolds of poly(L-lactic acid) and poly(L-lactic-co-glycolic acid). *Polym Adv Technol.* 2002;13:227-232.
- [3-7] Pachence JM, Kohn J. Biodegradable polymers for tissue engineering. Lanza RP, Langer R, Chick WL, editors. Texas, USA: R.G. Landed and Academic Press; 1997. Pp273-293.

- [3-8] Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003;24:2133-2151.
- [3-9] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:4749-4757.
- [3-10] Champa JA, Assad M, Ebraheim NA, Jayatissa AH. Dissolution behavior of biomimetic minerals on 3D PLGA scaffold. *Surface & Coatings Technology* 2006;200:6336-6339.
- [3-11] Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Cha Yong C, Kim BS. Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds in vitro. *Tissue Engineering* 2006;12:2997-3006.
- [3-12] Yang F, Cui WJ, Xiong Z, Liu L, Bei JZ, Wang SG. Poly(L-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its various changes during degradation in vitro. *Polym Degrad Stab*. 2006;91:3065-3073.
- [3-13] Mochizuki C, Sasaki Y, Hara H, Sato M, Hayakawa T, Yang F, Hu Z, Shen H, Wang SG. Crystallinity control of apatite through Ca-EDTA composites and porous composites with PLGA. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2009;90B:290-301.
- [3-14] Yang J, Bei J, Wang SG. Enhanced cell affinity of poly (D,L-lactide) by combining plasma treatment with collagen anchorage. 2002;23:2607-2614.

- [3-15] Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Fukushima T, Yang F, Shen H, Wang SG, Sato M. Influence of apatite crystallinity in porous PLGA/apatite composite scaffold on cortical bone response. *J Hard Tissue Biology*. 2009;18:7-12.
- [3-16] Rau JV, Cesaro SN, Ferro D, Barinov SM, Fadeeva IV. FTIR study of carbonate loss from carbonated apatites in the wide temperature range. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*. 2004;71B:441-447.
- [3-17] Young RA, Bartlett ML, Spooner S, Mackie PE, Bonel G. Reversible high temperature exchange of carbonate and hydroxyl ions in tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *J Biol Phys*. 1981;9:1-25.
- [3-18] Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA, Cooper LF. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. *In vivo* studies. *Int Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:17-29.
- [3-19] Cooper LF, Masuda T, Yliheikkilä PK, Felton DA. Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. *In vivo* studies. *Int Oral Maxillofac Implants*. 1998;13:163-174.

## 第4章 水溶液スプレー法の開発と形成 CA 薄膜評価

### 第1節 水溶液を用いたアパタイト膜形成スプレー法の開発

#### 4.1-1 緒言

HA は、骨や歯の主成分であり、生体適合性に優れている。しかし、HA 成形体は脆性破壊しやすく、人工骨などの代替材料としてそのままでは不適切である。また、高い強度と靱性に優れる Ti 成形体の表面を HA でコーティングした複合化材料は、Ti 単独よりも一般に短時間で生体内に固定でき、治療期間を短縮できる [4-1]。

現在、Ti 成形体への HA コーティングは、主にプラズマ溶射法で行われている。この方法は、HA をガラス状に溶融させてチタン成形体にスプレーするため、HA が部分的に熱分解して不均一組成になりやすく、20  $\mu\text{m}$  以上の厚膜となるために、チタンの塑性変形に追従できない HA の剥離や亀裂などの破壊が生じやすい。

我々は、新たな成膜ウェットプロセスとして、分子プレカーサー法を提案した [4-9]。最近、アパタイト薄膜への適用も可能とし [4-10]、一回の塗布・焼成で約 400 nm 程度の膜厚の HA を得ており、インプラント材料として優れた動物実験試験結果を得た [4-11]。

Jansen らは、有機化合物が共存するアルコール溶液を利用して、金属基板上への静電スプレー析出法 (ESD) による HA コートを最近報告した [4-12,4-13]。一方、我々は、HA 水溶液を金属基板上に直接スプレーする方法を検討し、HA 膜の形成に成功した [4-14]。分子プレカーサー法を含め、従来のプロセスでは、含有する有機物を除去するために、HA や基板を 600 $^{\circ}\text{C}$ 以上に長時間加熱する必要があった。水溶液スプレー (ASC; Aqueous Spray Coating) 法は、成膜に際して揮発性有機物 (VOC) フリーで、かつ HA や基板が高温にさらされる時間を著しく短縮でき、簡素な装置を用いるため、複雑な大表面への膜形

成を期待できる。本節では、市販 HA を溶解させるリン酸カルシウム膜形成用水溶液の調製とスプレー条件、得られた膜の密着性、PBS 中での耐溶解性について詳細に検討し、水溶液スプレー法の有効性について記載した。

#### 4.1-2 実験方法

##### 4.1-2.1 試薬

ヒドロキシルアパタイト ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , 96.0%, F.W. = 1004.62) 純正化学株式会社

産業用炭酸ガス (F.W. = 44.01) 太陽日酸ガス&ウエルディング株式会社

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

塩酸 (35 %, F.W. = 36.46) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

Ti 基板 (99 mass%, 10 × 10 × 0.5 mm) 添川理化学株式会社

PBS 溶液の調製は1章の方法に従った。

スプレー溶液の調製には、精製水 (共栄製薬株式会社) を使用した。これらの試薬はそれ以上精製することなく使用した。本論文では、純正化学社製ヒドロキシルアパタイトを市販 HA とした。Ti 基板は、アセトン中で15分間、精製水中で10分間それぞれ超音波洗浄し、70°Cの乾燥機で乾燥させ、試験に供した。

##### 4.1-2.2 市販アパタイト粉末を用いた飽和リン酸カルシウムスプレー溶液 (S1) の調製

市販 HA の 1.00 g (1.00 mmol) と精製水 2.0 L を室温で2日間攪拌し、懸濁溶液を得た。この溶液を一晩静置後、0.8 μm のメンブランフィルターでろ過した透明溶液をスプレー溶液 **S1** とした。

##### 4.1-2.3 二酸化炭素吹き込みによる飽和リン酸カルシウムスプレー水溶液 (S2) の調製

市販 HA の 1.00 g (1.00 mmol) と精製水 2.0 L を攪拌し、ボールフィルターを通して炭酸ガスを供給しながら7時間攪拌した。得られた白濁溶液を0.8 μm のメンブランフィルターでろ過した透明溶液をスプレー

溶液 **S2** とした。

#### 4.1-2.4 水溶液スプレー法による Ti 基板への膜形成と熱処理

エアブラシ (HP-SAR, アネスト岩田株式会社) を用いて, Ti 基板上に各溶液をスプレーした。ステンレス板中央に Ti 基板 9 枚を接着せずに, 正方形に配置した。エアブラシは, 基板に対して垂直に固定した。Ti 基板とエアブラシノズル先端は 200 mm とした。スプレー圧力は 0.1~0.5 MPa の範囲で検討したが, 0.2 MPa を超える空気圧では, 加熱時に基板が移動するため, 0.2 MPa 一定とした。溶解度, 基板面積, HA の理論密度から 100 nm の膜厚を得るスプレー量を算出したところ, **S1** では 400 mL, **S2** では 13 mL であった。スプレー時のロス分を考慮し, **S1** は 600 mL, **S2** は 30 mL をスプレーした。単位時間当たりの吐出量は約 5 mL min<sup>-1</sup> とした。シーズヒーターで基板を下から加熱し, 熱電対で基板表面温度を測定した。スプレー装置概略図を Fig. 4-1 に示す。

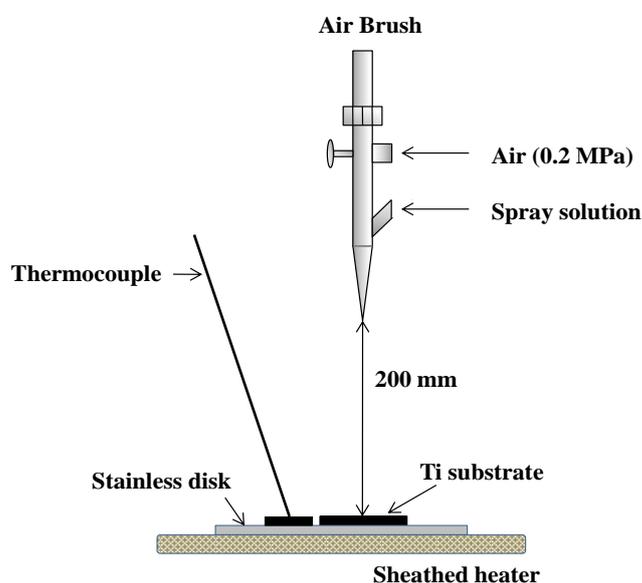


Fig. 4-1 Schematic aqueous spray-coating (ASC) method

**S1** を 600 mL 用いて形成した膜を F1-as, **S2** を 30 mL スプレーして形成した膜を F2-as とした。形成

膜は、Ar 流量  $0.5 \text{ L min}^{-1}$  の管状炉中で、 $600^\circ\text{C}$  で 10 分または 30 分間熱処理した。得た各サンプル名に“-6\_10”または“-6\_30”を付して表す。

#### 4.1-2.5 PBS 水溶液浸漬試験

体内での膜の溶解速度を予測するために、成膜試料を PBS 水溶液に浸漬した。pH = 7.4 に調製した PBS 水溶液 30 mL に試料を浸漬し、 $37^\circ\text{C}$  の恒温槽内で保持した。浸漬期間中に PBS 水溶液は交換しなかった。1, 7 および 14 日後に試料を取り出し、よく水洗して、 $70^\circ\text{C}$  の乾燥器中で乾燥した後、表面観察および Ca/P 比を XPS で測定した。

#### 4.1-2.6 引張り試験による膜の密着性評価

形成した膜の基板への密着性は、引張り試験で評価した。引張り試験用の Ti 基板およびステンレス治具は、予め  $120 \mu\text{m}$  のアルミナで接着面をブラスト処理し、アセトンで洗浄した。吉成らの報告 [4-5]に基づいて試験片を作成した。熱硬化性エポキシ樹脂 (Bond E39, 小西化学工業(株)製) を用いて形成膜面と基板側裏面をステンレス治具で圧着した。試験片を  $150^\circ\text{C}$  で 30~50 分間乾燥させ、引張り側の Ti 基板にはみ出した接着剤を取り除き、再度  $150^\circ\text{C}$  で 5 分間乾燥させた後、放冷した。引張り試験は、引張圧縮試験機 (TG-5kN, ミネベア(株)製) を用い、クロスヘッドスピード  $0.1 \text{ mm min}^{-1}$  で軸方向に連続的に加重を負荷させた。4~5 試料について試験し、膜側基板とステンレス治具が外れた荷重を引張荷重 (kN) とした。次式により、引張り強さ (MPa) を算出し、平均値を膜の密着性とした。

$$\text{引張り強さ (MPa)} = (\text{引張荷重} \times 1000) / (2.5 \times 2.5 \times 3.14)$$

この式における 2.5 は、ステンレス治具の半径 (mm) である。

#### 4.1-2.7 測定

市販 HA は、XRD, FT-IR, XPS 測定で組成を同定した。調製したスプレー溶液はドライアップして、溶

解したアパタイト量を調べた。

形成したアパタイト膜は、FE-SEMにより表面を観察し、XRD測定（平行ビーム法）により結晶構造を同定した。膜厚は触針法により測定した。膜の一部を10%塩酸に浸して膜を溶解させ、基板表面を露出させた。ダイヤモンド探針により、膜と基板表面の段差を5点測定し、最高、最低値を除く3点の平均値を膜厚とした。Ca/P比は、XPSを用いて、膜表面を3点測定し、Ca 2pとP 2pのピーク面積の比から平均値を算出した。

### 4.1-3 結果

#### 4.1-3.1 スプレー溶液の調製

原料に用いた市販 HA の XRD パターンを Fig. 4-2、FT-IR スペクトルを Fig.4-3 に示す。XRD パターンに観測された  $2\theta = 25.9, 28.1, 28.9, 31.8, 32.9, 34.0, 35.5, 39.2, 39.8, 42.0, 43.8^\circ$  はいずれも JCPDS カード No.9-432 の六方晶系 HA に帰属できた。FT-IR スペクトルに観測された、546, 604, 963,

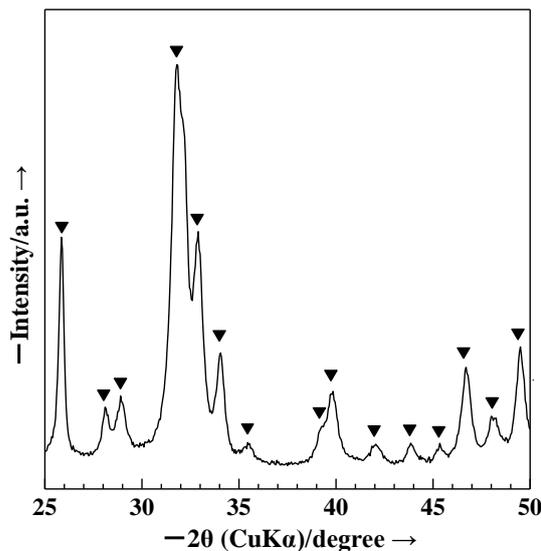


Fig. 4-2 XRD pattern of hydroxyapatite manufactured by Junsei Chemical.

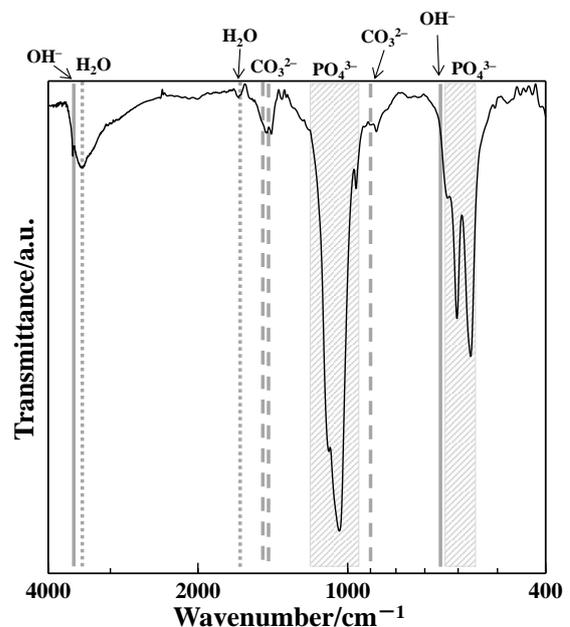


Fig. 4-3 FT-IR spectrum of hydroxyapatite manufactured by Junsei Chemical.

1040, 1091  $\text{cm}^{-1}$ は、P-O 基, 628, 3552  $\text{cm}^{-1}$ は OH 基, 1664, 3422  $\text{cm}^{-1}$ は  $\text{H}_2\text{O}$ , 868, 1416, 1460  $\text{cm}^{-1}$ は  $\text{CO}_3^{2-}$ に帰属できた。XPS スペクトルによる Ca/P 比は, 1.58 であった。

調製した **S1**, **S2** 溶液中のアパタイト粉末の溶解度は, それぞれ 7.3と 220  $\text{mg L}^{-1}$ , 溶液の pH は 7.0 と 5.6 であった。調製した各溶液は, 室温保存で 3 ヶ月経過しても沈殿を生じない安定な溶液であった。

#### 4.1-3.2 スプレー条件の探索

スプレー条件の探索は **S1** で行った。予め熱した Ti 基板に溶液をスプレーすると, Ti 表面の凹凸によく追従した膜形成されていることを FE-SEM による観察で確認した。この膜中には, 微細な球状粒子も点在していた。

一方, 240°C での加熱による基板の変色により, 暗黄色を呈していた Fig. 4-4 (b)。そこで, 予め加熱をし

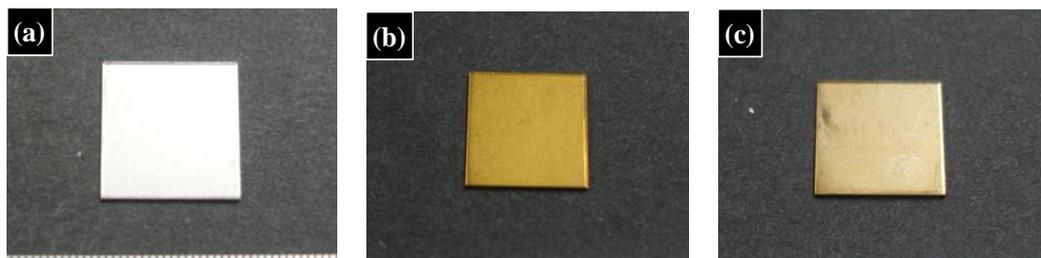


Fig.4-4 Photograph of the sprayed S1 on Ti substrate. (a) Ti substrate, (b) heated Ti substrate before spray, (c) non-heated Ti substrate before spray.

ない Ti 基板にスプレーと加熱を同時に開始し, 膜を形成した。その結果, 基板の変色は大幅に抑制され, 淡黄色を呈した Fig. 4-4 (c)。しかし, いずれの膜も XRD 測定では CP に帰属されるピークは観測されなかった。

#### 4.1-3.3 形成膜と熱処理

**S1** および **S2** をスプレーした Ti 基板の FE-SEM 像 (Fig. 4-5) は, いずれも Ti 基板上に網目状構造の析出物が観察された。

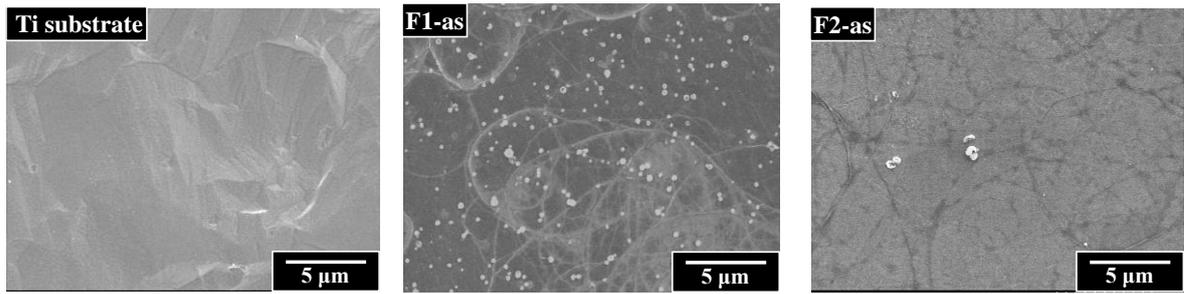


Fig. 4-5 SEM images of the surface appearance of Ti substrate and apatite coatings by S1 and S2.

F1-as と F2-as の膜厚はそれぞれ、100～150 と 80～100 nm で、スプレー量が十分なことを確認した。

また、HA 含有量の多い **S2** を用いることによって、スプレー時間を極端に短縮でき、さらに基板が変色しなかった。Ca/P 比は、1.35 と 1.21 で、HA の理論比および市販 HA の Ca/P 比よりも低かった。

F1-as および F2-as の XRD ピークは、いずれも CP に帰属できなかったため、各膜を熱処理した。空气中

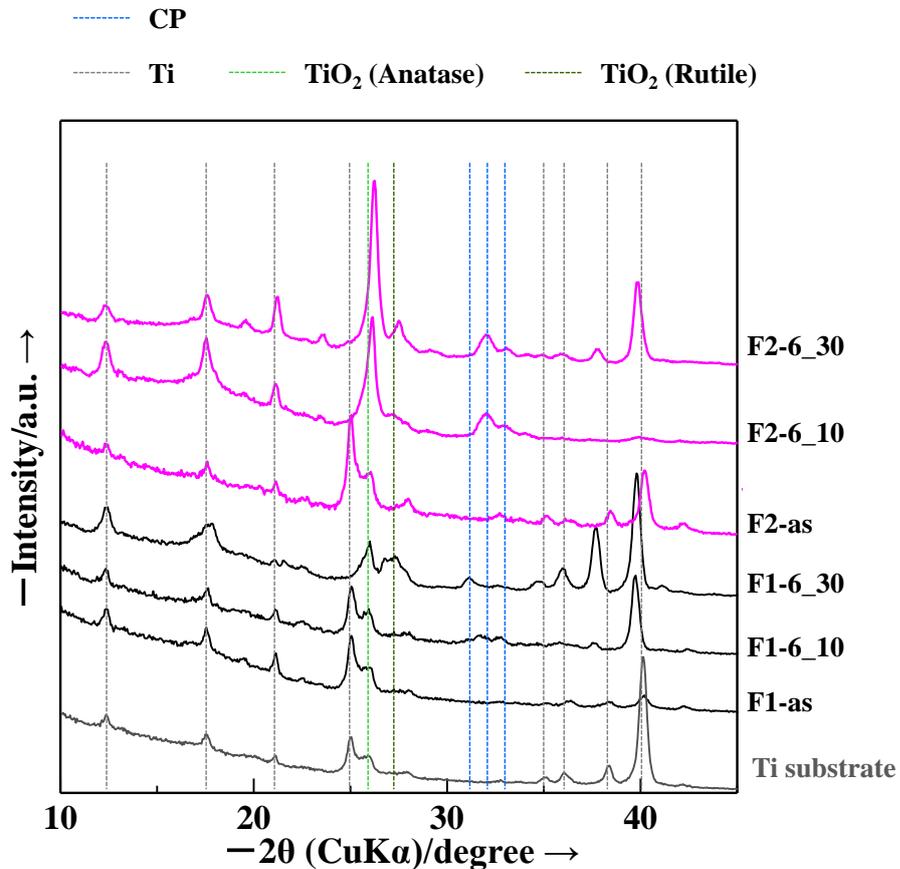


Fig. 4-6 XRD patterns of Ti substrate and CP coatings after several heat-treated film fabricated by S1 and S2.

で熱処理したところ基板が青く変色し、 $\text{TiO}_2$  のピークが大きく観測された。Fig. 4-6 に F1-as, F1-6\_10, F1-6\_30, F2-as, F2-6\_10, F2-6\_30 および Ti 基板の XRD パターンを示す。Ti 基板は  $2\theta = 25.7^\circ$  に  $\text{TiO}_2$  のアナターゼに帰属されるピークを観測した。

**S1** で形成した F1-as は CP に帰属されるピークを示さなかったが、 $600^\circ\text{C}$  で 10 分熱処理した F1-6\_10 は、 $2\theta = 32.0^\circ$  付近にブロードなピークを示した。熱処理時間を延長した F1-6\_30 では、 $2\theta = 31.8^\circ$  に六方晶系 CP に帰属できるピークが観測できた。**S2** で形成した F2-as も CP に帰属されるピークを示さなかった。しかし、熱処理した F2-6\_10 および F2-6\_30 は、 $2\theta = 32.0, 33.1^\circ$  に六方晶系 CP に帰属できるピークを示した。F2-6\_30 は F2-6\_10 よりもピーク強度が増大していた。

熱処理した膜の表面 SEM 像を Fig. 4-7 に示す。

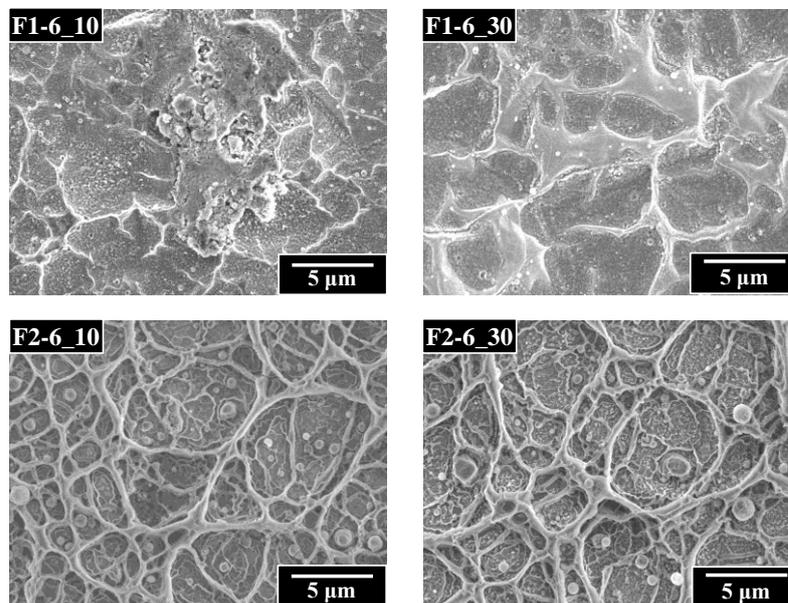


Fig. 4-7 SEM images of the surface appearance of fabricated film after heat-treated at  $600^\circ\text{C}$  for 10 or 30 min.

F1-as は、 $600^\circ\text{C}$  での熱処理により表面の網目状構造の凹凸がより顕著になり、局所的に粒子の凝集が観察された。また、熱処理時間の延長により、隆起部分は丸みを帯びて平滑化していた。一方、F2-as は、

網目状構造の隆起部が明確になり、球状粒子も明確に観察された。熱処理時間の延長により網目状構造の大きな変化はないものの、粒子の凝集が認められた。

Table 4-1 Ca/P ratios of CP coatings after immersion in PBS.

Notation	Immersion period (days)			
	0	1	7	14
F1-as	1.35	0.54	0.46	0.13
F1-6_10	1.39	0.81	1.08	0.76
F1-6_30	2.19	1.24	1.03	1.05
F2-as	1.21	0.39	0.18	0.19
F2-6_10	1.43	1.35	0.99	1.11
F2-6_30	1.67	1.21	1.22	1.01

#### 4.1-3.4 PBS 水溶液浸漬試験

Table 4-1 に、PBS 水溶液溶液浸漬前後の形成膜表面の Ca/P 比を示す。浸漬日数と共に Ca/P 比は顕著に低下した。

Fig. 4-8 には、PBS 溶液浸漬後の膜の表面 SEM 像を示す。熱処理前の膜は PBS 溶液中で溶解し、基板が露出していた。しかし、熱処理した膜は、基板の露出がなく、溶解しにくいことが分かった。

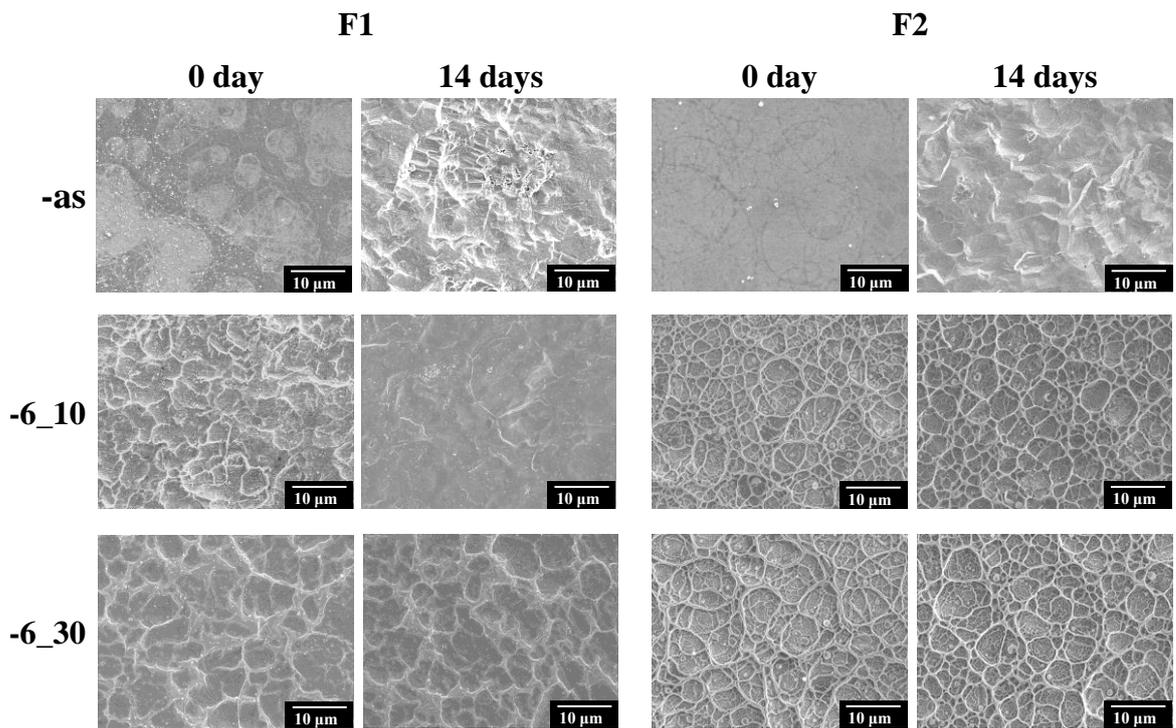


Fig. 4-8 SEM images of the surface appearance of fabricated films before and after immersion in PBS.

#### 4.1-3.5 引張り試験による密着性評価

Fig. 4-9 に、形成膜の引張り試験結果を示す。形成膜の引張強度は、いずれも 20 MPa 以上であった。

F1, F2 共に、Ar 気流中 600°C, 10 分間の熱処理では引張り強度は低下しなかったが、熱処理時間を 30 分間に延長すると、強度が著しく低下した。

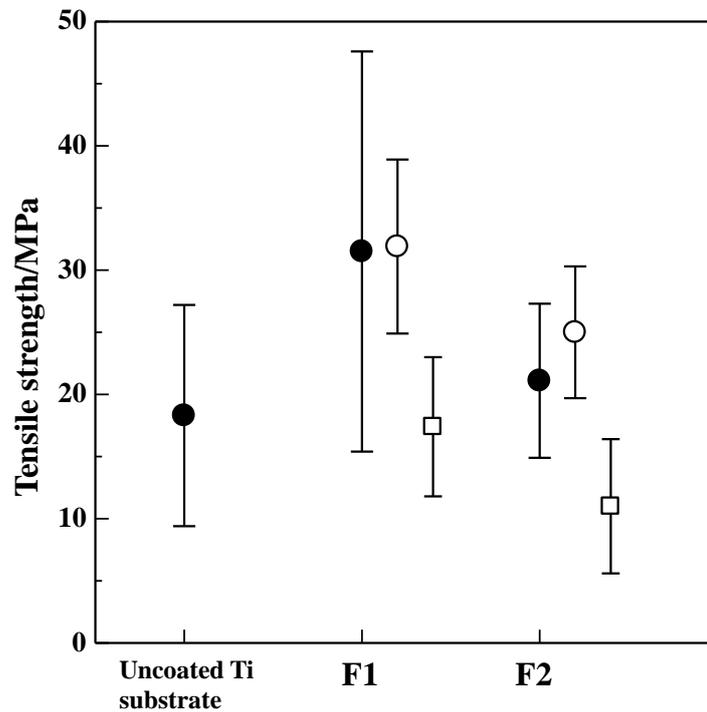


Fig. 4-9 Tensile bond strength of formed films on a Ti substrate, ● –as films, ○ films after heat-treated at 600°C for 10 min, and □ films after heat-treated at 600°C for 30 min. The heat-treated was carried out under Ar gas flow with 0.5 L min<sup>-1</sup>.

#### 4.1-4 考察

本節では、水溶液を用いたアパタイト膜の形成法としてスプレーを使用した。HA を溶解した 2 種類の水溶液を準備し、低温で加熱した Ti 基板の上にスプレーして、非晶質膜を得ることができた。スプレー開始時の Ti 基板温度を制御して、基板変色の抑制が可能なのも見出した。特に、炭酸ガスを共存させて市販 HA 組成物の溶解量を増加させたスプレー溶液を用いた際には、全液量を短時間でスプレーできた。今回の CP 膜を形成するために有効性が示された水溶液スプレー法について、その原理について考察した。

##### 4.1-4.1 霧化液滴の組成と温度変化

噴射された霧状液滴中には、Ca<sup>2+</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>、HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>、H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>、H<sup>+</sup>、OH<sup>-</sup>などのイオンの他、特に

炭酸ガスによって溶解量を増加させた場合には、 $\text{HCO}_3^-$ などのイオンや、 $\text{H}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{H}_2\text{CO}_3$ などの分子も溶存している。各イオンは水分子で溶媒和されており、固体を析出させるためには、脱溶媒和と構成イオンの濃縮のために、水の沸点近傍の加熱が必要である。

噴射された霧状液滴は、ノズル先端から熱源である基板に向かって接近する間に、液滴の先頭部分から水が揮発する濃縮過程を伴うと予想される。一方、基板への接近に伴う液滴の温度上昇は、気体成分以外の溶存イオンの溶解度を高くする効果をもつ。これらの拮抗作用により、今回のノズル-基板間距離と基板の加熱温度、送出空気圧、熱対流と空気抵抗で決まる液滴の移動速度の条件では、液滴の基板到達前には HA の結晶核生成や再結晶化は起こらず、霧化した微小液滴が徐々に濃縮しながら加熱基板に衝突し、水が揮発して、成膜が達成されたと考えられる。

#### 4.1-4.2 基板到達液滴からの固体析出と膜の付着性

基板に液滴が衝突した後、基板上での加熱によって水が除去されて固体が析出し、その際に HA 組成物が直接再結晶化せずに、各イオンの組み合わせで電荷を中和しただけの非晶質固体が膜を形成したと推定される。非晶質固体が析出した基板界面には、熱処理によって XRD で測定可能なチタニアが容易に生じることから推定されるように、基板表面のチタンイオンに結合した水酸化物イオンや酸化物イオンが存在する。このような表面イオンと衝突した液滴中のイオンが化学反応し、界面に比較的強固な化学結合を生じたと考えられる。ESD 法で形成された膜の密着性に関する報告はないが、真空中でこれらイオンを基板上に直接堆積させるスツパタリング法と同程度の高い密着性を本研究で実現できた。

#### 4.1-4.3 非晶質膜の加熱処理と HA への結晶化

形成された非晶質膜が基板の凹凸によく追従していたことから、液滴の基板への衝突は効果的に起こっており、また外輪部の明確な円形構造の形成は、液滴の衝突がその一因と考えられる。外輪部が他の平面部より

も濃縮された状態でわずかに盛り上がることは、基板に衝突した隣接する液滴同士が基板平面に広がりながら、横方向に衝突したことを示唆している。スプレー初期の固体の析出状態が、その後の表面形態に大きく影響した可能性が高い。

一般に、薄膜を構成する組成物の結晶化は、基板界面からの影響を受けやすい。また、高純度な Ti の熱伝導率が低いことから、電気炉内で熱処理した際に、非晶質膜中での HA 結晶核生成とその結晶成長は、基板から隆起した外輪部から起こり始めたと考えられる。さらに、原子の拡散が可能な 600°C での加熱で、これら外輪部を起点として網目状構造が発達し、結晶化後に観察された HA 膜の表面構造が形成されたと考えられる。なお、加熱時間の延長によって、結晶成長が促進されることは一般的である。本研究では、加熱による Ti 基板裏面の酸化反応を防止するために、乾燥した Ar 気流中で加熱し、基板変色の防止と HA の結晶化の両方に有効なことを確認した。非晶質膜が乾燥気流中でも結晶性 HA 膜に容易に変換されたことから、非晶質膜中には脱溶媒していない成分も多数存在し、PBS に短時間で溶解したと考えられる。

CO<sub>2</sub> で HA 組成物の溶解量を増加させた溶液のスプレーでは、炭酸アパタイトや Ca 欠損型炭酸アパタイトも生成した可能性も高い。

#### 4.1-5 結言

Ti 基板への水溶液を用いたスプレー法により、リン酸カルシウムコーティング膜の形成を検討したところ、次のことが明らかとなった。

1. エアブラシを用いた飽和 HA 水溶液を空気圧 0.2 MPa で Ti 基板上にスプレーしたところ、基板温度が 100°C 程度で膜を形成できた。
2. スプレーにより形成された膜は、粗な表面によく追従していた。
3. 形成した膜は、付着性・結晶性共にスパッタリング法で形成した膜と同程度であったが、複雑な組成の非

晶質で、PBS 溶液中で短時間内に溶解した。

4. 形成膜を Ar 気流中、600°C で熱処理したところ、30 分間で結晶化が進行し、PBS 溶液への耐溶解性が向上した。熱処理で膜の密着性は変化せず、剥離することなく、結晶化した。

これらのことから、飽和 HA 水溶液や二酸化炭素で溶解度を高めた HA 水溶液をスプレーする方法が、CP 膜形成に有効なことが示された。本節の 2 種類のスプレー溶液よりも溶存  $\text{Ca}^{2+}$  イオンとリン酸濃度を高くできれば、より短時間で厚膜が形成できる可能性も示唆された。次節では、より短時間に厚膜を形成する方法について、炭酸を配位子とする三元系錯体スプレー溶液の調製法から検討した。

## 第 2 節 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液を利用した CA 膜形成と熱処理による膜特性の変化

### 4.2-1 緒言

前節において、市販の HA 粉末を懸濁した水溶液に二酸化炭素を吹き込みながら攪拌した水溶液を、加熱した Ti 基板に垂直方向からエアブラシでスプレーして膜を形成した [4-8]。約 100 nm の析出膜は非晶質で化合物の同定には至らなかった。そこで、スプレー用液中の Ca<sup>2+</sup>イオンとリン酸濃度を高めるために、新たなスプレー水溶液の合成を試みた。スプレー水溶液中の Ca<sup>2+</sup>イオン供給原料として CaCO<sub>3</sub>や Ca(OH)<sub>2</sub>が考えられる。しかし、いずれも水に対する溶解度が低いために、Ca(OH)<sub>2</sub>の水溶液に二酸化炭素を反応させて、Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>として溶解させ、水溶液中の Ca<sup>2+</sup>イオンの高濃度化を試みた。その水溶液が、リン酸と共存できれば、新たなスプレー水溶液が調製可能となる。一般には、Ca(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>水溶液がリン酸などの酸性物質と共存することは困難と考えられるが、炭酸イオンとリン酸イオンを配位子として共存できることを期待して三元系錯体均一溶液の調製を試みた。

本節では、得られたスプレー溶液を用いて、Ti 基板上に膜を形成し、熱処理による組成変化やスクラッチ試験による密着性を評価した。

### 4.2-2 実験方法

#### 4.2-2.1 試薬

水酸化カルシウム (Ca(OH)<sub>2</sub>, 99.9%, F.W. = 74.10) 和光純薬工業株式会社

産業用炭酸ガス (F.W. = 44.01) 太陽日酸ガス&ウェルディング株式会社

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

クエン酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 99.5%, F.W. = 210.14) 大成化学株式会社 (一級)

Ti 基板 (99 mass%, 20 × 20 × 0.5 mm) 添川理化学株式会社

スプレー溶液の調製には、精製水 (共栄製薬株式会社) を使用した。これらの試薬はそれ以上精製することなく使用した。Ti 基板は、アセトン中で 15 分間、精製水中で 10 分間それぞれ超音波洗浄し、70°C の乾燥機で乾燥させて用いた。

#### 4.2-2.2 水酸化カルシウムと炭酸ガスバブリングによる高濃度 Ca<sup>2+</sup>スプレー水溶液 (S3 ; Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系錯体スプレー水溶液) の調製

水酸化カルシウムの 0.166 g (2.25 mmol) と 300 mL の精製水を室温で 10 分間攪拌した。この懸濁溶液を 4°C の氷浴中で 0.6 L min<sup>-1</sup> の二酸化炭素を吹き込みながら、超音波を 40 分間照射した。その結果、無色透明溶液が得られた。pH は 5.80 であった。この溶液に、リン酸の 0.156 g (1.35 mmol) を攪拌しながら加え、pH5.57 の均一溶液を得た。この溶液は、冷蔵庫内に保管した。

#### 4.2-2.3 成膜と熱処理

スプレーは、前節と同様に行った。Ti 基板は、スプレーノズルから垂直に 200 mm 離れたステンレス板上の中央に 1 枚配置した。シーズヒーターで加熱し、Ti 基板温度を制御した。スプレーの空気圧は 0.2 MPa 一定とし、スプレー速度は 5 mL min<sup>-1</sup>、25 mL の溶液をスプレーした。

形成膜を管状炉中で、0.5 L min<sup>-1</sup> の Ar を通気しながら 400, 500, 600, 700°C で 10 分間熱処理した。

#### 4.2-2.4 形成膜および熱処理膜からの粉末の回収

形成膜の組成を調べるために、膜成分をスパチュラで機械的に削り取って回収した。TG-DTA, FT-IR, 元素分析を行った。熱処理した膜も同様に削り、FT-IR 測定を行った。TG-DTA 測定は、Ar 気流中 0.1 L min<sup>-1</sup> で行った。

#### 4.2-2.5 測定

調製したスプレー溶液はドライアップにより、溶解したアパタイト量を調べた。

形成膜は、FE-SEM で表面観察し、XRD 測定（平行ビーム法、X 線入射角度 = 0.5°）により結晶構造を同定した。膜厚は、触針法により次のように測定した。膜の一部を 0.5 mol L<sup>-1</sup>クエン酸水溶液に 5 秒浸して膜を溶解させ、基板表面を露出させた。ダイヤモンド探針を用いて、膜と露出基板表面の段差を 5 点測定し、最高、最低値を除く 3 点の平均値を膜厚とした。Ca/P 比は、XPS を用いて膜表面を 3 点測定し、Ca 2p と P 2p のピーク面積の比から平均値を算出した。形成した膜の基板への密着性は、引張り試験で評価した。試験方法は、前節 4.1-2.6 と同様に行った。スクラッチ試験による膜のせん断強度は、25 mL スプレーして形成した膜と Ar 気流中で 400, 500, 600, 700°C 熱処理した膜の計 5 枚を測定した。1 試料 3 回スクラッチし、SEM 観察により膜の剥離距離を測定し、臨界点とした。臨界点から臨界荷重を出し、Benjamin-Weaver の式 [4-9]からせん断強度を算出した。

#### 4.2-3 結果

##### 4.2-3.1 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系スプレー溶液の調製

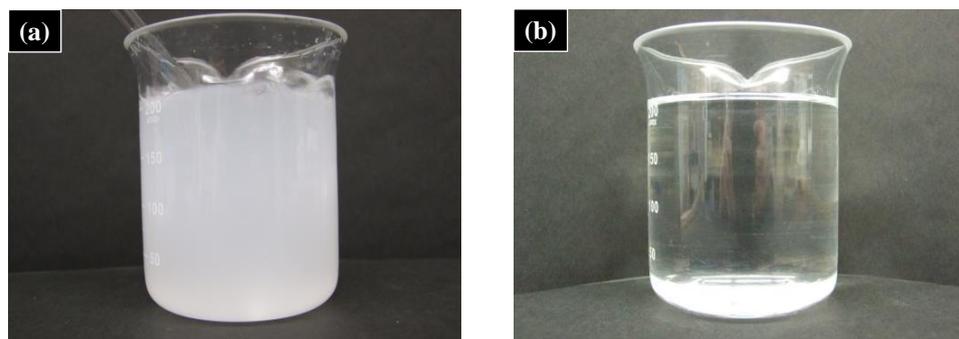


Fig. 4-10 Photograph of Ca(OH)<sub>2</sub> solution. (a) before CO<sub>2</sub> gas bubbling and (b) after CO<sub>2</sub> gas bubbling.

Ca(OH)<sub>2</sub> 懸濁溶液に二酸化炭素を吹き込んで得た水溶液は、透明で安定だった。溶解した Ca(OH)<sub>2</sub> の最終濃度は 0.55 g L<sup>-1</sup> で、二酸化炭素を吹き込む前よりも高濃度の溶液が得られた (Fig. 4-10)。リン酸

を Ca/P 比 1.67 になるように加えた溶液も、冷蔵庫内保管で 6 日間は結晶が析出することなく、安定な溶液だった。この溶液に 1 mW の赤色レーザー光を照射してもチンダル現象は観察されないことから、溶液中にコロイド粒子が生じていないことを確認した (Fig. 4-11)。溶液の pH は 5.57 で、5 日毎に二酸化炭素を吹き込むと、20 日以上結晶は析出しなかった。



Fig. 4-11 Photograph of the Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> aqueous spray solution.

#### 4.2-3.2 熱処理による形成膜の膜厚と組成の変化

得られた溶液を用いて、Ti 基板へのスプレーを試みた。スプレー条件は、1 節と同様に、Ti 基板とスプレーノズル距離は 200 mm、空気圧 0.2 MPa とした。Ti 基板は予熱せず、5 mL min<sup>-1</sup> の速度でスプレーした。25 mL のスプレーは約 5 分で終了した。この間の基板温度は 50~75°C であった。スプレー後、Ti 基板の金属光沢はなくなって、Fig.4-12 に示すように白色になり、膜が均一に形成されていることを目視で確認できた。

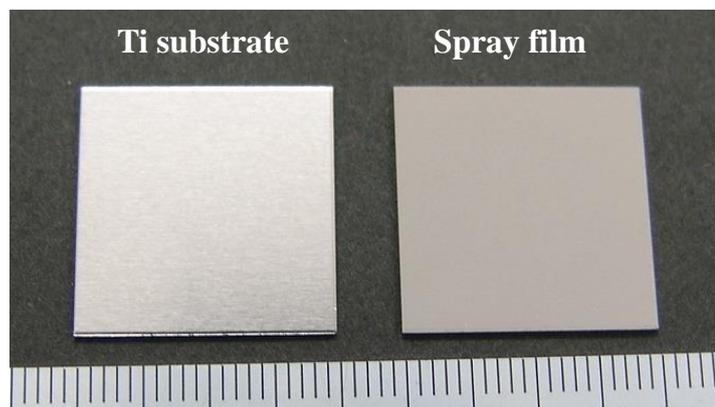


Fig. 4-12 Photograph of Ti substrate (left side) and fabricated film (right side).

形成した膜の表面と Ti 基板表面の SEM 像を Fig. 4-13 に示す。形成膜は網目状構造をしており、Ti 基板表面全体を覆っていることが分かった。また、0.8~1.4 μm 程度の直径の球体粒子が存在した。網目構造の径は、10~15 μm 程度であった。また、熱処理後の SEM 像を Fig. 4-14 に示す。表面形態にはほとんど

変化は見られなかった。

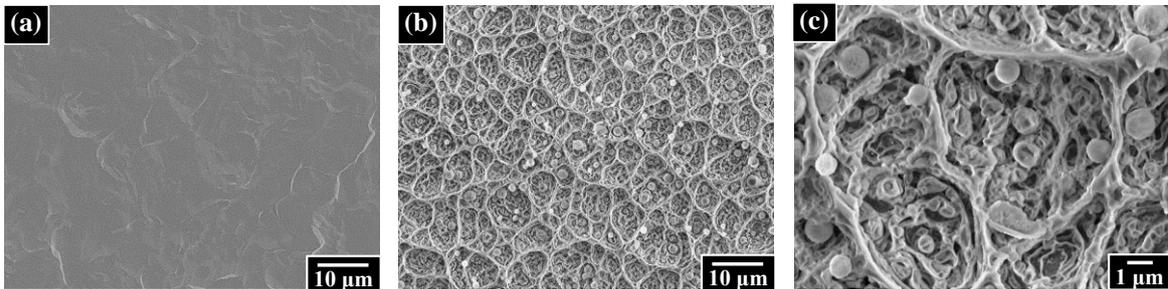


Fig. 4-13 Surface morphologies of the (a) Ti substrate and (b, c) fabricated films that were deposited using the ASC method observed.

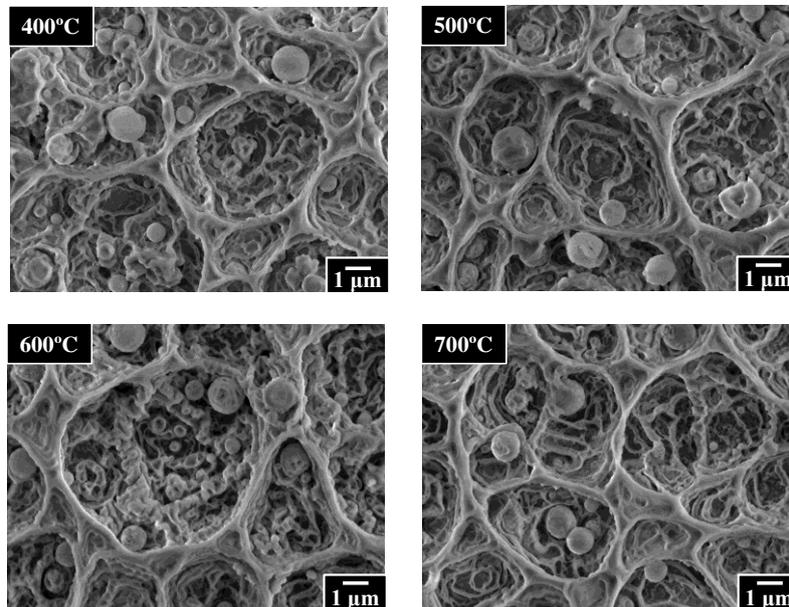


Fig. 4-14 Surface morphologies of the films after heat treatment at several temperatures for 10 min under Ar gas flow.

Table 4-2 Average thicknesses of the sprayed film and films heat-treated at several temperatures for 10 min under Ar gas flow.<sup>1)</sup>

	Sprayed film	Heat treated films (heat-treatment temperature/°C)			
		400	500	600	700
Before treatment/μm	1.23(4)	1.21(17)	1.21(16)	1.40(3)	1.21(12)
After treatment/μm	–	1.22(17)	1.12(11)	1.21(4)	1.05(13)
Percentage reduction/%		0	7	14	14

1) Standard deviations are presented in parentheses.

形成膜の膜厚と熱処理後の膜厚を Table 4-2 に示す。形成膜の膜厚は、1.23  $\mu\text{m}$  であった。400°C、10分の熱処理で膜厚は変化しなかった。一方、500°C以上で10分間熱処理した膜の膜厚は0.03~0.17  $\mu\text{m}$  減少した。また、熱処理により、膜の色が若干青黒くなった。

Fig. 4-15 には、形成した膜と熱処理した膜の XRD パターンを示す。形成膜は、 $2\theta = 25.8, 28.9, 31.7, 32.8, 33.9, 46.7, 49.4^\circ$  に JCPDS カード No. 35-180 の CA に帰属されるピークと、 $2\theta = 38.4, 40.1^\circ$  に JCPDS カード No. 44-1294 の Ti に帰属されるピークが観測された。500°C までは、ピーク位置はほぼ同じであったが、600°C 以上では、TiO<sub>2</sub> の Rutile に帰属される  $2\theta = 27.9, 41.9^\circ$  (JCPDS カード No. 21-1276)

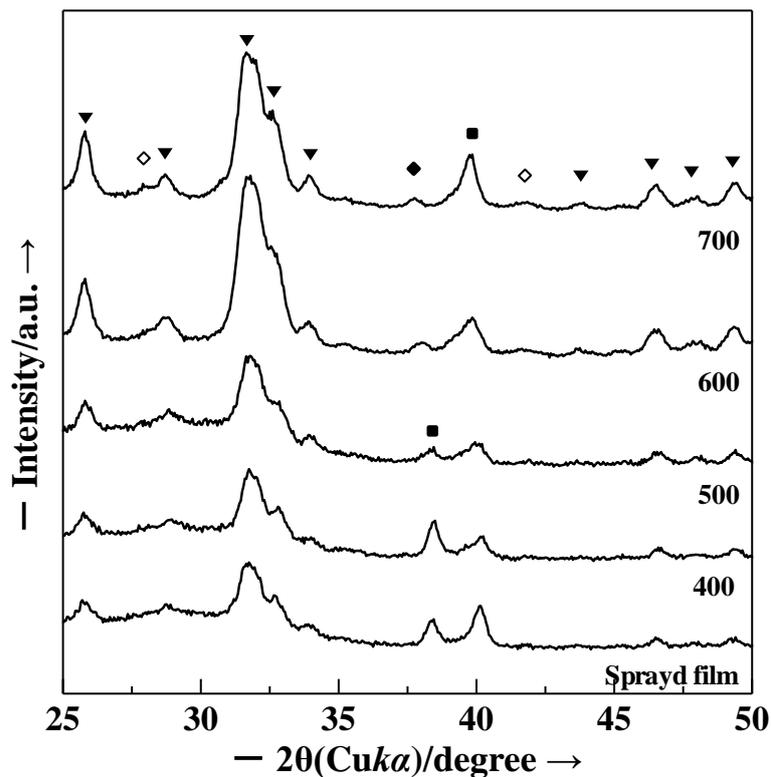


Fig. 4-15 XRD patterns of the sprayed film without any heat treatment and those that were heat-treated at several temperatures for 10 min under Ar gas flow. The peaks for CA, rutile TiO<sub>2</sub>, anatase TiO<sub>2</sub>, and Ti are indicated by the filled triangles ( $\blacktriangledown$ ), diamonds ( $\diamond$ ), filled diamonds ( $\blacklozenge$ ), and filled squares ( $\blacksquare$ ), respectively.

とTiO<sub>2</sub>のAnataseに帰属される2θ = 37.8° (JCPDSカードNo. 21-1272) が観測された。

Table 4-3には、形成膜と熱処理膜の平均結晶子サイズを示す。形成膜の結晶子サイズは16 nmと小さく、熱処理 500°C までは増加したが、600°C で急激に減少した。

Table 4-3 Average crystallite sizes of the sprayed film and films heat-treated at several temperatures for 10 min under Ar gas flow. <sup>1)</sup>

	Sprayed film	Heat-treated films (heat-treatment temperature/°C)			
	–	400	500	600	700
Average crystallite size/nm	16(10)	20(14)	32(25)	14(7)	16(8)

1) Standard deviations are presented in parentheses.

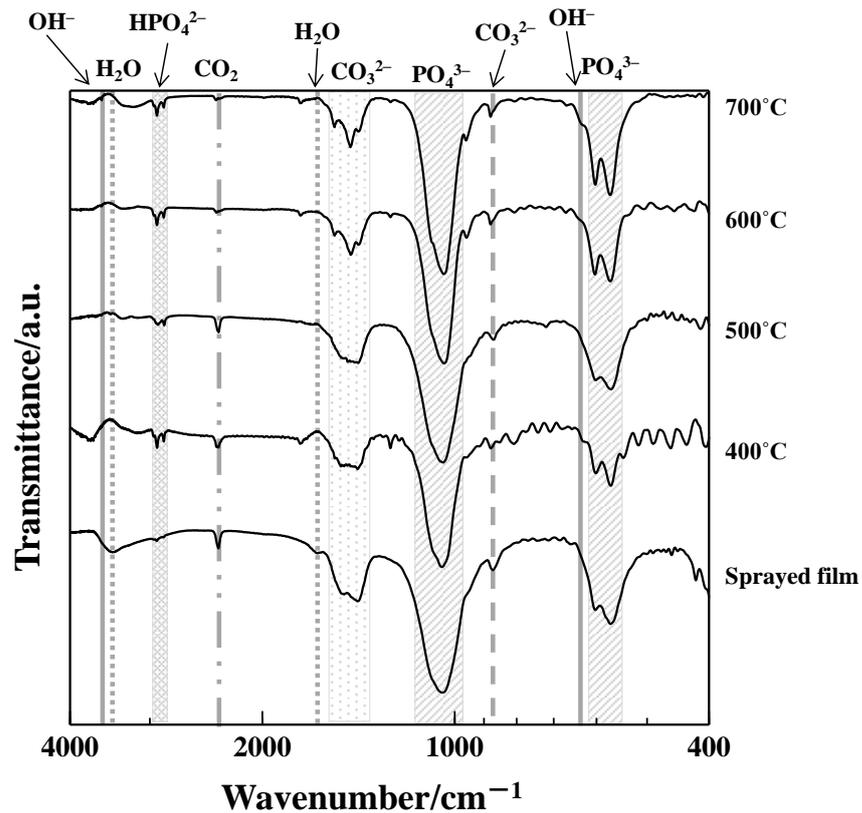


Fig. 4-16 FT-IR spectra of the powders obtained from the sprayed film and heat-treated films. The peaks are assigned as follows: The shaded area is PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, the meshed area is HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, the dashed line and dotted area is CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, the line id OH<sup>-</sup>, the chain double-dashed line

Fig. 4-16 には、各膜から回収した粉末の FT-IR スペクトルを示す。どの膜も PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>と CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>に帰属されるピークが観測された。600°C 以上の熱処理では、OH<sup>-</sup>が観測される一方で、CO<sub>2</sub> のピークはかなり減少した。また、500°C 以下での CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>ピーク (1420, 1480 cm<sup>-1</sup> 付近) は、600°C 以上の熱処理により 3 本のピーク (1406, 1452, 1545 cm<sup>-1</sup> 付近) になった。

Fig. 4-17 に形成膜から削り取った粉末の TG-DTA 曲線を示す。220°C から質量の減少が見られ、362, 600, 908°C では、4.3, 7.2, 10.8%の質量減少率だった。1000°C までの最終質量減少率は、11.6%であった。

形成膜から削り取った粉末の元素分析結果は、C, H, N がそれぞれ 3.03, 0.50, 0.02%で、Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(CO<sub>3</sub>)·2CO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O の C, H, N ; 3.07, 0.52, 0.00%の計算値とよく一致していた。Ar 気流中 600°C, 10 分間の熱処理をした膜から削り落とした粉末の元素分析結果は、C, H, N がそれぞれ 1.81, 0.18, 0.09%で、Ca<sub>10</sub>(HPO<sub>4</sub>)(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)(OH)·CO<sub>2</sub>の C, H, N ; 2.20, 0.18, 0.00%の計算値とよく一致していた。

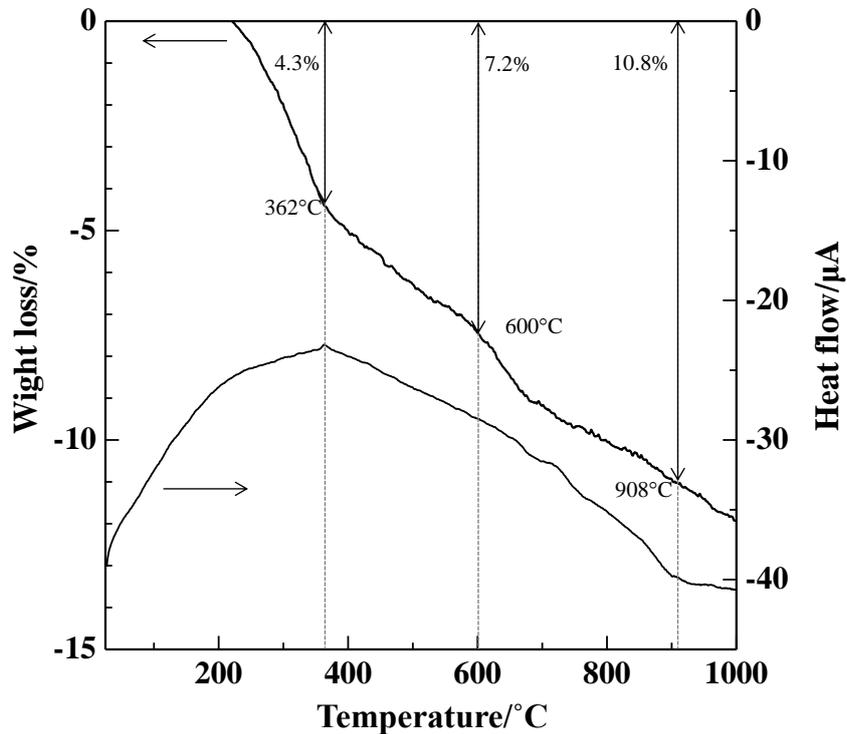


Fig. 4-17 TG-DTA curves for the powder collected from the sprayed film.

#### 4.2-3.3 形成膜の密着性評価

形成膜の密着性は、前節と同様に引張り試験により評価した。5点平均は18 MPaであった。しかし、破面観察により膜内部の破壊であることがわかった。

Table 4-4には、スクラッチ試験による各膜のせん断強度を示す。スクラッチ試験後の膜は、スクラッチ開始後、FE-SEMによる観察から膜の剥離が観察できる距離を臨界点として、Benjamin-Weaverの式からせん断強度を算出した。形成膜のせん断強度は21 MPaと大きく、プラズマ溶射法によるアパタイト膜のせん断強度よりも大きかった。400、500°Cでは、強度低下は見られたが、600°C以上の熱処理では、せん断強度は高くなり、700°C以上では測定装置の測定限界を超える強度であった。

Table 4-4 Shear stress of the sprayed film and films heat-treated at several temperatures for 10 min under Ar gas flow.<sup>1)</sup>

	Sprayed film	Heat-treated films (heat-treatment temperature/°C)			
	—	400	500	600	700
Shear stress/MPa	21(1)	8(3)	12(5)	47(1)	>133

1) Standard deviations are presented in parentheses.

#### 4.2-3.4 XPS による深さ方向の組成変化

Fig. 4-18 には、形成した膜 (a) と Ar 気流中 600°C で熱処理した膜 (b) の表層部から深さ方向への XPS 分析を行った結果を示す。深さ方向へは、0.8 μm まで 80~100 層程度 Ar<sup>+</sup>エッチングしながら測定を行った。どちらの膜にも 289~291 eV の炭酸イオンに帰属される C1s が観測された。この面積比から算出した Ca/P 比は、1.6 および 1.7 であった。しかし、膜の深さ方向プロファイルは、Ca<sup>2+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>は均一に存在していないことを示していた。表層から 80 nm の Ca/P 比は 1.1 および 1.5 で、一方、深さ 0.8 μm から 80 nm 手前までは 2.1 および 2.4 であった。

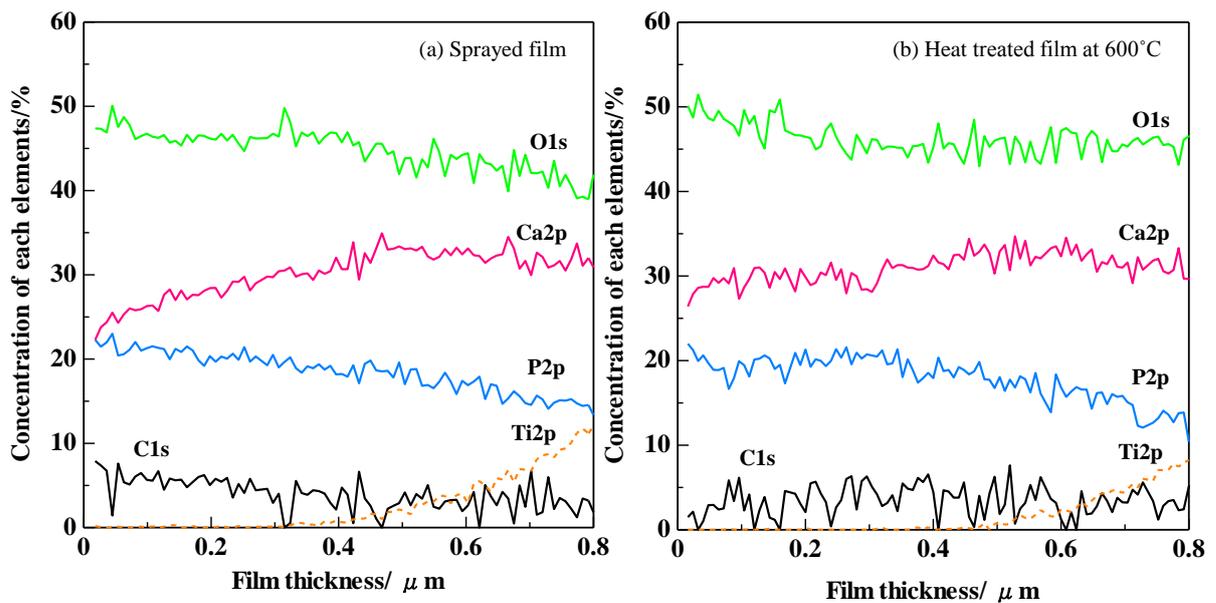


Fig. 4-18 XPS depth profiles of (a) the sprayed film without any heat treatment and (b) the film heat-treated at 600°C.

#### 4.2-4 考察

##### 4.2-4.1 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系スプレー溶液の安定性と形成膜の形態

Ca/P 比を 1.67 とした Ca<sup>2+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>を含むスプレー溶液は、水酸化カルシウムと二酸化炭素の反応により準備することができた。この反応式は次式で表される。



得られた溶液に H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> を加えても結晶は析出せず、スプレー溶液として使用可能であった。これは、二酸化炭素を過剰に吹き込むことにより、Ca<sup>2+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>の直接反応を阻害する錯体が形成されたと考えられる。実際に、この溶液は冷蔵保管で 6 日ほどの安定で、それ以降結晶が析出した。しかし、5 日ごとに二酸化炭素を吹き込むと、20 日を過ぎても結晶は析出せず、二酸化炭素の吹き込みにより錯体が安定化することが分かった。なお、溶存二酸化炭素が減少して析出する結晶の XRD パターンから、ブラッシャイト (CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) が析出することが分かった。これは、溶液 pH が 5.57 の酸性溶液から析出するリン酸カルシウム種として合理的である [4-16]。

このような酸性溶液を加熱した Ti 基板上にスプレーして、CA 膜を形成できた。したがって、ASC 法による膜形成プロセスは、次の 4 つのステップで構成されると推測される。Fig. 4-19 に、ASC による膜形成プロセスの概略図を示す。① スプレー溶液は、霧化液滴となって、エアブラシのノズルから押し出される。② 噴射された霧化液滴は、ノズルから熱源である基板に向かう間に、溶媒の揮発による濃縮が起こる。この時に、液滴中に含まれる二酸化炭素も脱離する。③ 濃縮された液滴は、コロイドミストとなり、基板に衝突して、横方向に広がる。④ 基板に到達した液からは直ちに溶媒が揮発し、膜ができる。基板に到達する前の液滴は、二酸化炭素の脱離や濃縮によって pH が中性に近づき、Ca 充足型 CA になったと考えられる。

また、ASC 法の特徴の 1 つとして膜形態が挙げられる。Fig. 4-13 に示すように、膜は網目状構造を有して

いた。ESD 法による形成膜 [4-17~4-21]もこのような網目状構造を有していたことから、網目状構造の形成はスプレー法の特徴と考えられる。ASC 法により形成された膜中には、球状粒子が観察されたが、ESD 法では見られない。ASC で観られた粒子は、霧化した液滴が濃縮され、Ti 基板上で結晶核となった CA が、その後の連続スプレーにより、成長したと考えられる。

スプレー量は、溶液濃度から HA 密度  $3.14 \text{ g cm}^{-3}$  を用いて  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  の Ti 基板面積上に約  $1 \text{ }\mu\text{m}$  の膜厚形成を目標に、 $25 \text{ mL}$  スプレーした。形成した膜の膜厚は実測値  $1.23 \text{ }\mu\text{m}$  で、予測よりも  $0.23 \text{ }\mu\text{m}$  上回っていた。これは、網目状構造として膜の一部が隆起することや、膜が HA よりも密度の低い組成からなることに起因すると考えられる。

#### 4.2-4.2 形成膜の熱処理による組成変化と密着性

形成膜の XRD パターン (Fig. 4-15) と FT-IR スペクトル (Fig. 4-16) は、膜の組成が水酸基を含まない CA で、FT-IR スペクトルと元素分析は、膜組成が  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3) \cdot 2\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  であることを示した。

形成膜から削り落とした粉末の TG-DTA (Fig. 4-17) 曲線から、熱処理による組成変化を調べた。 $600^\circ\text{C}$  までに見られる質量減少率は、 $\text{CO}_2$  と  $2\text{H}_2\text{O}$  の脱離に相当した。もう 1 つの水分子は、水酸基として構造中に取り込まれ、残った水素は  $\text{PO}_4^{3-}$  と結合し、 $\text{HPO}_4^{2-}$  になった。 $900^\circ\text{C}$  までに  $\text{CO}_2$  が脱離し、最終的に  $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{CO}_3)(\text{OH})$  となった。このように、ASC 法により形成した膜の熱処理は、特に  $600^\circ\text{C}$  を境に、その組成を変化させることが明らかとなった。これまで、門間らによって組成中に  $\text{CO}_2$  を含むアパタイト粉末の報告がある [4-22]。しかし、格子中に含まれているのか、付着しているのかという議論は結論に至っていなかった。本研究において、CA 格子中に  $\text{CO}_2$  を含有した明確な例を提示することができた。

熱処理による膜の結晶子は、 $600^\circ\text{C}$  で一旦大きく減少した。これは、熱処理で  $\text{CO}_2$  や  $\text{H}_2\text{O}$  が脱離する際に、それまでに成長した結晶子が破壊したためと考えられる。 $700^\circ\text{C}$  で再度結晶子サイズが増加し、膜厚が減

少していることもこれを裏付けている。

Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液を ASC 法で形成した膜の密着性は良好であった。形成膜から粉末を削り落とす際も容易ではなかった。最初、前節と同じ引張り試験による密着性評価を行なった。その強度は Ti 基板にスパッタリング法でアパタイトコーティングした膜と同程度の強度であった。しかし、破壊は膜内部で起こっており、基板と膜の密着強度が膜内部の強度よりも大きいことを示し、膜の粗密性を反映したのと考えた。そこで、形成膜と熱処理した膜の密着性をせん断強度から評価した。熱処理により CO<sub>2</sub>と H<sub>2</sub>O が脱離する 600°C 以上ではせん断強度が大きく、熱処理による組成変化は密着性にも大きく影響していることが分かった。しかし、形成膜のせん断強度は 21 MPa であった。一方、400°C と 500°C で熱処理した膜のせん断強度は大きく低下した。これは、H<sub>2</sub>O や CO<sub>2</sub> を多く含むアモルファス膜が、熱処理で H<sub>2</sub>O や CO<sub>2</sub> の一部が脱離するプロセスで結晶が徐々に壊れ、せん断強度が低下したと考えられる。600°C 以上では、深さ方向深層部の CO<sub>2</sub> は除去されたことが XPS の結果からも確認できた。膜組成の緻密化が密着性の向上要因だと考えられる。

#### 4.2-5 結言

前節で開発したスプレー法に用いる水溶液、Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液を新たに調製して、短時間で厚膜形成できる方法を開発した。ASC 法によるアパタイトコーティング用溶液の調製ならびに膜形成を検討したところ、以下のことが明らかとなった。

1. 水酸化カルシウムを懸濁させた水溶液に炭酸ガスを吹き込むことで、高濃度 Ca<sup>2+</sup>水溶液を得ることができた。ここに、Ca/P 比 1.67 となるようリン酸を加えても、結晶の析出が見られない安定なスプレー溶液を得ることができた。この溶液は pH5.57 の酸性溶液であった。
2. この溶液は冷蔵保管で 6 日間は安定であったが、その後、無色棒状結晶が析出し、分析によりブラッシャイトであることを確認した。しかし、5 日ごとに炭酸ガスを吹き込むことで、20 日まで結晶の析出がないこ

とも確認した。

3. 準備したスプレー溶液は VOC フリーで、エアブラシを用い、加熱した Ti 基板にスプレーする ASC 法に適していた。
4. 高濃度 Ca<sup>2+</sup>溶液は、25 mL を 5 分間スプレーすることで、1.23 μm の膜を得ることができた。
5. 形成された膜の組成は Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(CO<sub>3</sub>)·2CO<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O で、Ar 気流中 0.5 L min<sup>-1</sup> 中 10 分間の熱処理により組成が変化した。600°C で、Ca<sub>10</sub>(HPO<sub>4</sub>)(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)(OH)·CO<sub>2</sub> となり、最終的には 900°C 付近で Ca<sub>10</sub>(HPO<sub>4</sub>)(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>(CO<sub>3</sub>)(OH) になった。
6. 形成膜の Ar 気流中、600°C 以上の熱処理は、結晶子サイズの低下や膜のせん断強度の増大がみられた。これは熱処理により膜中の CO<sub>2</sub> や H<sub>2</sub>O が脱離し、膜の緻密化や原子の再配列によるものと考えられる。
7. 形成された膜は網目状構造を有しており、その径は 10 μm 程度の骨芽細胞様細胞が入り込むには適当な大きさであると考えられた。

これらのことから、水酸化カルシウムを出発原料とした高濃度 Ca<sup>2+</sup>水溶液、Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液を用いた膜形成法は、VOC フリーで短時間に厚膜を形成できる新規の CA 膜形成法である。また、この特徴的な表面形態や Ar 気流中の熱処理による組成変化は、骨芽細胞様細胞へおよぼす影響が大変興味深い。

### 第3節 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液のスプレーによる CP 成膜と MC3T3-E1 細胞の膜上挙動

#### 4.3-1 緒言

前節で、低温加熱した Ti 基板上に Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系錯体水溶液を 25 mL スプレーし、約 5 分で約 1.2 μm の CA 膜形成を記載した。膜は、サイズが約 10 μm の特徴的な網目状構造をもち、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞が適合する大きさである。一方、骨再生用材料としてコートされたアパタイト膜の表面はほとんどが平滑で、表面形態が細胞挙動に与える影響に関する報告は少ない。また、3 章の PLGA/アパタイト複合化スキャフォールドの in vivo の結果から、骨再生用材料中にアパタイトが保持される重要性も示唆されたことから、網目状構造上における細胞挙動を調べることは、今後のスキャフォールド作成の設計指針も与えると期待される。

本節では、Ti 基板上の膜について、スプレー溶液の量と網目状構造の隆起部高さの関係などを検討した。また、前節で得られた熱処理による膜の組成変化を踏まえ、熱処理前後の網目状構造アパタイト膜に対する MC3T3-E1 細胞の挙動を調べ、アパタイト膜の三次元的構造の効果について評価した。

#### 4.3-2 実験方法

##### 4.3-2.1 試薬

水酸化カルシウム (Ca(OH)<sub>2</sub>, 99.9%, F.W. = 74.10) 和光純薬工業株式会社

産業用炭酸ガス (F.W. = 44.01) 太陽日酸ガス&ウェルディング株式会社

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

クエン酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, 99.5%, F.W. = 210.14) 大成化学株式会社 (一級)

Ti 基板 (99 mass%, 20 × 20 × 0.5 mm) 添川理化学株式会社

MC3T3-E1 骨芽細胞 (Passage 2) 理研バイオリソースセンター

Alpha-Modified Eagle Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM) GIBCO BRL

Fetal bovine serum (10% FBS, CCB) Dickinson and Company

Antibiotic-antimycotic (AB-AM, 1%抗生物質, 100 U mL<sup>-1</sup> penicillin, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> streptomycin and 0.25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> amphotericin B) GIBCO BRL

炭酸水素ナトリウム (7.5 w/v%, NaHCO<sub>3</sub>) GIBCO BRL

L-アスコルビン酸 (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>, 99%, F.W. = 176.12) SIGMA-ALDRICH

$\beta$ -グリセロリン酸二ナトリウム塩 (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NNaO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 99%, F.W. = 187.13) CALBIOCHEM

トリプシン/EDTA (0.25% w/v trypsin/0.025% EDTA) GIBCO BRL

リン酸緩衝粉末 (Dulbecco's PBS(-)) 日水製薬株式会社

トリパンブルー溶液 (テトラナトリウム=3,3-[(3,3-ジメチル-4,4-ビフェニレン)ビス(アゾ)]ビス[5-アミノ-4-ヒドロキシ-2,7-ナフタレンジスルホナート], 0.4%) GIBCO BRL

MST assay (WST-8; 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, Cell Counting Kit-8) 株式会社同人化学研究所

パラホルムアルデヒド ((CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>, 95%, ) MERCK

グルタルアルデヒド溶液 (HOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CHO, 8%, F.W. = 100.12) 和光純薬工業株式会社

カコジナル酸ナトリウム水溶液 ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>AsO<sub>2</sub>Na·3H<sub>2</sub>O, 0.2 mol/L, 塩酸で pH7.4 に調製した水溶液) ナカライテクス株式会社

塩酸 (HCl, 35~37%, F.W. = 36.46) 和光純薬工業株式会社

塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>, 95%, F.W. = 110.98) 和光純薬工業株式会社

オスmium酸溶液 (OsO<sub>4</sub>, 4%, F.W. = 254.23) ナカライテクス株式会社

Enzyme-linked immunosorbent assay kit (Intact human osteocalcin EIA kit) Biomedical Technologies

これらの試薬は、精製することなく使用した。スプレー溶液の調製に、精製水（共栄製薬株式会社）を、細胞培養にはミリQ超純水装置から採水した純水を使用した。Ti基板は、アセトン中で15分間、精製水中で10分間それぞれ超音波洗浄し、70°Cの乾燥機で乾燥させた。リン酸緩衝液（PBS水溶液）は、Dulbecco's PBS(-)粉末9.6gを水に溶解させ、1Lにメスアップして調製した。

#### WST-8 :

WST-8は、細胞内脱水素酵素により還元され、高感度水溶液ホルマザンを生成する。このホルマザンの450nmの吸光度を測定し、生細胞数を算出できる。未知試料の生細胞数は、細胞数既知のWST-8分析から求めた細胞数と吸光度の検量線を用いて算出した。

#### Karnovsky 溶液の調製 :

水2.8mLに0.361gのパラホルムアルデヒドを加え、50°Cの温浴で攪拌して溶解させた。1mol/LのNaOHを駒込ピペットで2滴加えて透明溶液とし、室温まで放冷して11.4%のパラホルムアルデヒド溶液を得た。このパラホルムアルデヒド溶液3.5mLを13.1mLの0.2Mカゴジナル酸ナトリウム溶液に加え、さらに8%グルタルアルデヒド溶液9.4mLを加えた。1mol/L塩酸でpH7.4に調製し、使用直前に塩化カルシウム0.012gを溶解させた。

#### **4.3-2.2 Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub>三元系スプレー溶液 (S3) の調製**

前節(4.2-3.1)と同様に、スプレー溶液を次のように調製した。水酸化カルシウムに精製水を入れ、室温で10分間攪拌した。この懸濁溶液を4°Cの氷浴に入れ、0.6Lmin<sup>-1</sup>の二酸化炭素をバブリングし、超音波を40分間照射した。得られた無色透明溶液のpHは5.80であった。この溶液を攪拌しながらリン酸を加え、

最終透明溶液 (pH5.57) を得た。この溶液 **S3** を冷蔵庫保管した。

#### 4.3-2.3 成膜と熱処理

前節と同様の装置で、**S3** をスプレーして膜を得た。Ti 基板は、スプレーノズルから垂直に 200 mm の距離にあるステンレス板上の中央に 1 枚配置した。加熱はシーズヒーターで行い、Ti 基板温度を制御した。スプレーの空気圧は 0.2 MPa 一定とし、スプレー速度は 5 mL min<sup>-1</sup>、スプレー量は 25 mL (**A**)と 5 mL (**B**)とした。形成膜をそれぞれ **FA**, **FB** とした。

形成膜 **FA** と **FB** を管状炉中で、Ar 気流中 (0.5 L min<sup>-1</sup>)、600°C で 10 分間熱処理した。熱処理した膜をそれぞれ **FA'** と **FB'** とした。これら 4 種類の膜の生体適親和性と細胞挙動を調べた。

#### 4.3-2.4 形成膜の HBSS 浸漬試験

**FA**, **FB**, **FA'**, **FB'** 上への CP 析出挙動を調べるため、37°C で 30 mL の HBSS に 1 日間浸漬した。浸漬後、取り出した試料表面から水分を柔らかい紙で拭き取り、デシケーター中で乾燥させた。その後、表面を FE-SEM で観察した。

#### 4.3-2.5 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞培養

細胞培養試験で使用する器具 (ディスポ以外) は、予めすべてオートクレーブ滅菌 (120°C, 30 分間) した。

MC3T3-E1 細胞は、 $\alpha$ -MEM に 10%FBS と 1%抗生物質を添加した標準培地中、37°C, 5%CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。培養フラスコは、BD Falcon 社製細胞培養フラスコ (75 cm<sup>2</sup>) を使用した。

#### 細胞の解凍

DMSO 溶媒で凍結させた細胞を急激に解凍して、直ちに溶媒を取り除いた。標準培地と細胞解凍用 70%エタノールをビーカーに入れ、37°C に温めた。標準培地を細胞培養フラスコ (2 個) に 2.5 mL 分注し、

インキュベーターに入れた。標準培地の一部を4°Cに冷却し、クリーンベンチ内で遠沈管に分注した。37°C エタノールに、凍結細胞が入っているセラムチューブを入れて緩やかに振とうした。容器中の凍結塊が球状になったところで、クリーンベンチに入れ、セラムチューブ内でよく懸濁させて、完全に解凍した。これを先にクリーンベンチ内に入れた標準培地に加えてゆっくり懸濁させ、4°C, 2000 rpm, 3 分間遠心分離した。この間に 37°C の標準培地をクリーンベンチに入れた。遠心分離した管の下に細胞が沈み、培地が透明なことを確認して、クリーンベンチ内に入れ、培地だけを取り除いた。標準培地を 5 mL 程度加え、よく懸濁させ、4°C, 1500 rpm で 5 分間遠心分離した。この間にインキュベーターから培養フラスコを取出してクリーンベンチ内においた。遠心分離が終わったら、先と同様に培地を取り除き、5 mL の培地を加えて、ピペットでよく懸濁させ、2.5 mL をフラスコに分注して、蓋をしてゆっくりとフラスコを揺らして細胞を分散させた。位相差顕微鏡で細胞の分散を確認後、インキュベーター内に静置した。MC3T3-E1 細胞は、20 時間に 1 回増殖するので、解凍した細胞は 48 時間以内に培地交換し、継代した。

#### 細胞の培養（培地交換・継代）

細胞を解凍した翌日、培地を交換した。インキュベーターから培養フラスコを取り出し、オレンジ色の培地内の細胞を位相差顕微鏡で観察した。MC3T3-E1 細胞の場合、球体細胞が仮足を伸ばし、扁平になっていた。死細胞は球体のまま浮遊していた。クリーンベンチ内にフラスコを入れ、細胞が剥がれないよう、素早く培地を吸出し、マイクロピペッターで 37°C に温めた標準培地 5 mL を加え、蓋を閉めて緩やかに振とう後、インキュベーターに静置した。

2 日ごとに細胞を観察し、コンフルエントになる前に継代した。本実験では 1 週間ごとに継代した。標準培地を 37°C に温めておいた。インキュベーターから培養フラスコを取り出し、標準培地の濁りがないことを確認して、位相差顕微鏡で検鏡し、おおよその細胞量を確認した。クリーンベンチ内で標準培地を吸出し、標準培地の

1/3 量の PBS 水溶液で数回洗った。PBS 水溶液を取り除き、37°C に温めたトリプシン/EDTA を 1 mL 程度加え、細胞をフラスコ培養面から剥がした。蓋をして、インキュベーターに 5 分間入れた後フラスコを取り出し、クリーンベンチ内で標準培地を 5 mL 加えてよく懸濁させ、培養面からすべての細胞を取り去った。この溶液を遠沈管に入れ、4°C、1200 rpm、5 分間遠心分離した。遠心分離した管の下に細胞が沈み、培地が透明であることを確認して、クリーンベンチ内で培地だけを取り除いた。標準培地を 20 mL 程度加えてよく懸濁させ、4°C、1200 rpm で 5 分間遠心分離した。その後、先と同様に標準培地を取り除き、20 mL の標準培地を加え、ピペットでよく懸濁させた。

生細胞数は、トリパンブルーによる色素排除法と血球計算板で次のように測定した。よく懸濁させた細胞入り標準培地 100  $\mu$ L をチューブに取り、トリパンブルー 100  $\mu$ L を加えてよく懸濁させ、ヘモサイトメーターに混合液を浸み込ませた。位相差顕微鏡下で、四辺内の細胞数を数えた。8 回計測し、最小最大細胞数が 2 倍以内になった計測から、最小最大値を除いた 6 点の平均値を生細胞数とした。

その後、400 cells  $\text{cm}^{-2}$  になるように培養フラスコに播種し、培地 3 日ごとに交換し、1 週間ごとに継代した。15 日後、細胞の状態を位相差顕微鏡で観察し、PBS 水溶液で細胞を 2 回洗浄後、トリプシン/EDTA で剥がして初期付着試験に供した。

#### 4.3-2.6 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の初期付着試験

初期付着試験に用いたサンプル (FA, FA', FB, FB', Ti) は、70%エタノール中に 2 時間浸漬後、PBS 水溶液で 2 回洗浄し、6 well (non-treatment 型, 9.62  $\text{cm}^2$ ) 皿に各 3 枚入れた。ここに、回収した細胞を 3,550 cells  $\text{cm}^{-2}$  でそれぞれ播種し、培地の全量を 2 mL としてから、1 または 6 時間培養した。所定時間培養後、基板表面を PBS 水溶液で洗った。

#### 4.3-2.7 初期付着試験後の WST-8 による細胞数測定

基板を新しい試料皿に入れ、標準培地に WST-8 試薬を 10 vol% 加えた混合試薬を 2.2 mL づつ加え、1 時間インキュベーター内に静置した。その後、0.1 M HCl を 200  $\mu$ L 加え、よく攪拌して反応を停止させた。各 well から 100  $\mu$ L を  $n = 3$  で採取し、96 well 皿に入れた。溶液に気泡が入った場合は、10  $\mu$ L のエタノールを加え、気泡を除去した。マイクロプレートリーダーで溶液の 450 nm の吸光度を測定し、作成した検量線からサンプル上に付着した細胞数を求めた。検量線は、細胞数既知の細胞入り培地に WST-8 試薬を加え、6 well (treatment 型, 9.62 cm<sup>2</sup>) 皿に細胞を 0, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000 cells mL<sup>-1</sup> 程度播種した。1 時間インキュベーター内に静置した。その後、0.1 M HCl を 200  $\mu$ L 加え、よく攪拌して反応を停止させた。それぞれの well から 100  $\mu$ L を  $n = 3$  でとり、96 well 皿に入れ、450 nm の吸光度を測定した。検量線用の実際の生細胞数は、トリパンブルーによる色素排除法と血球計算板により求めた。

#### 4.3-2.8 付着試験 1 時間後の MC3T3-E1 細胞の表面形態観察

付着した細胞の形態を FE-SEM で観察した。培養は、上記条件で行い、所定時間培養後、PBS 水溶液で 3 回基板を洗浄した。Well 皿を氷上に置き、Karnovsky 溶液を加えて 4°C で 24 時間静置し、細胞を前固定した。PBS 水溶液で 3 回基板を洗浄した。1%オスミウム酸を含む PBS 溶液を調製し、試料が浸る程度入れた。パラフィルムで試料皿を 2 重に巻き、冷蔵庫で 90 分間静置した。オスミウム酸溶液を除去し、PBS 水溶液で 2 回基板を洗浄した。50, 70, 80, 90, 95, 100%エタノールで、この順に基板を 15 分ずつ浸漬した。100%エタノールには 8 分間の浸漬を 3 回繰り返す。液化炭酸ガスによる臨界点乾燥した。表面に Pt-Pd 合金を蒸着し、観察した。

#### 4.3-2.9 MC3T3-E1 の細胞増殖とオステオカルシン定量試験

細胞増殖およびオステオカルシンの定量には、標準培地に 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> の L-アスコルビン酸と 2 mM mL<sup>-1</sup>

のβ-グリセリン酸塩を加えた分化誘導培地中で培養した。サンプル (FA, FA', FB, FB', Ti) は、70%エタノール中に2時間浸漬後、PBS水溶液で2回洗浄し、6 well (non-treatment型, 9.62 cm<sup>2</sup>) 皿に入れた (n = 6)。ここに、回収した細胞を 5,600 cells cm<sup>-2</sup> で播種後、分化誘導培地の全量を 2 mL として、10 日間と 16 日間培養した。培養後、基板上の細胞シートを回収し、WST-8 によって細胞数を測定し、ELISA によってオステオカルシンを定量した (n = 3)。WST-8 は、初期付着と同様に行った。回収した細胞シートを ELISA 測定用の緩衝液 (Sample buffer) 2 mL にそれぞれ入れた。6000 rpm, 10 sec のホモジナイザーで細胞シートを破壊し、よく攪拌した。ELISA 用 well に天然オステオカルシン抗血清 (Native Osteocalcin antiserum) をそれぞれ 50 μL 入れ、そこに測定サンプルと検量線用サンプル 25 μL を加えた。この操作は天然オステオカルシン抗血清を加えてから 15 分以内に行った。1 分ほど well を攪拌し、カバーをして 1 時間室温で静置した。希釈したビオチン付加抗血清 (Biotinylated antiserum) を 50 μL 加えてよく攪拌し、カバーをして 1 時間室温で静置した。Well 内の溶液を完全に除去し、300 μL の洗浄用緩衝液 (Wash buffer) で 3 回洗浄した後、100 μL の Streptavidin 種西洋わさびペルオキシダーゼ (Streptavidin-Horseradish peroxidase) を入れてよく攪拌し、カバーをして室温に 30 分間静置した。Well 内の溶液を完全に除去して、300 μL の洗浄用緩衝液で 3 回洗浄し、TMB と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の混合基質を 100 μL 加え、カバーをして暗所で 10 分間静置した。基質が反応し、青色を呈した溶液に 100 μL の反応停止溶液 (Stop Solution) を加え、黄色を呈した溶液の 450 nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。検量線用サンプルから検量線を作成し、測定サンプルのオステオカルシン量を算出した。

#### 4.3-2.10 測定

市販 HA は XRD, FT-IR, TG-DTA, XPS 測定を行い、組成を同定した。調製したスプレー溶液はドライアップにより、溶解したアパタイト量を調べた。

FE-SEM で形成膜の表面を観察し、XRD 測定（平行ビーム法、X 線入射角度 = 0.5°）により結晶構造を同定した。膜厚は、次のように触針法で測定した。膜の一部を 0.5 mol L<sup>-1</sup>クエン酸水溶液に 5 秒浸して膜を溶解させ、基板表面を露出させた。ダイヤモンド探針により、膜と基板表面の段差を 5 点測定し、最高、最低値を除く 3 点の平均値を膜厚とした。

### 4.3-3 結果

#### 4.3-3.1 形成膜の表面観察および隆起部高さ

アパタイト膜上での細胞挙動は、スプレー量が 25 mL (**FA**) と 5 mL (**FB**)のスプレー膜、およびそれぞれを熱処理した 4 種類のサンプルで調べた。スプレーによる膜形成時間は、それぞれ 5 分と 1 分で、基板温度は 40 ~75°C および 40~45°C であった。0.5 L min<sup>-1</sup> の Ar 気流中で **FA**と **FB** を 600°C、10 分間熱処理した膜を **FA'**、**FB'**とした。

Table 4-5 には、形成した膜の膜厚を示す。**FA** および **FA'**の膜厚は、前節で 25 mL スプレーで形成した膜厚と同程度であった。**FB** のスプレー量は **FA** の 1/5 であるが、膜厚は 1/10 であった。**FA** と **FB** を 600°C で熱処理した結果、各々 8%および 9%膜厚が減少した。

Table 4-5 Average thicknesses, proportion of network sizes above 10 μm, and average border height of the network on the CA films **A** and **B**, which were evaluated before heat treatment, and those of the films **A'** and **B'**, which were evaluated after heat treatment at 600°C for 10 min under Ar gas flow of 0.5 L min<sup>-1</sup>.

Notation	Average film thickness <sup>a</sup>	Proportion of network sizes above 10 μm	Average border height <sup>a</sup>
	μm	%	Mm
<b>A</b>	1.31(9)	45	0.84(7)
<b>A'</b>	1.21(4)	41	0.98(9)
<b>B</b>	0.12(2)	68	0.29(3)
<b>B'</b>	0.11(1)	61	0.31(6)

<sup>a</sup>Standard deviations are presented in parentheses.

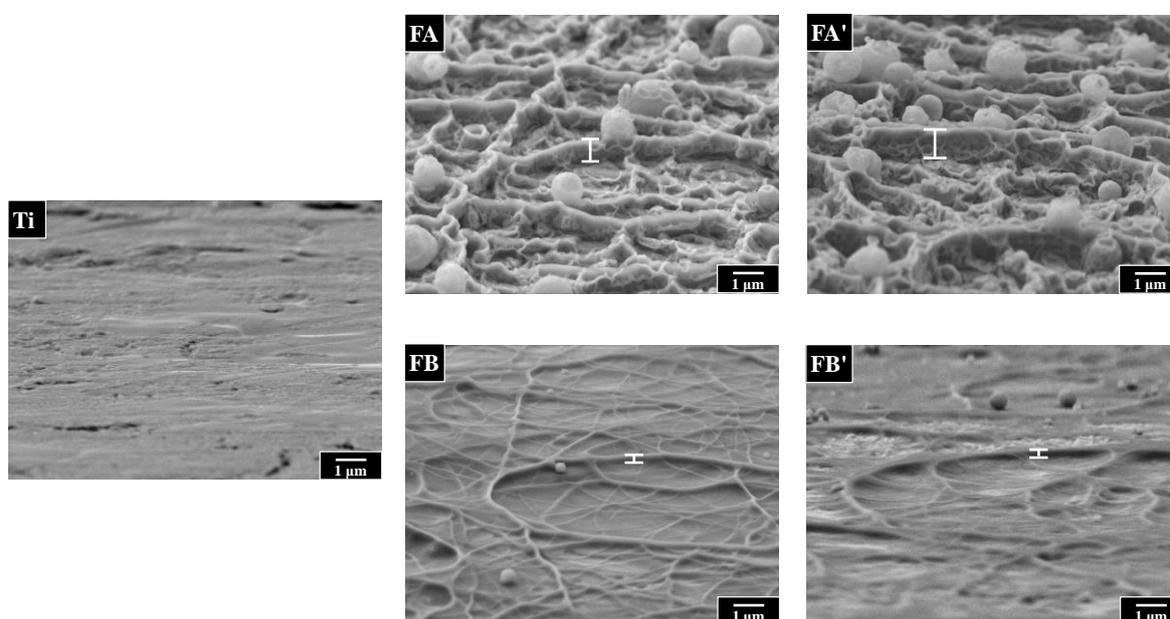


Fig. 4-19 Tilt-viewed FE-SEM images of the film surfaces of **FA**, **FA'**, **FB**, and **FB'** on Ti plates, and an uncoated Ti plate. The tilt angle was 85°.

**FA**, **FA'**, **FB**, **FB'**の4枚とTi基板の85°傾斜観察結果を Fig. 4-19 に示す。この図から、計測した **FA**,

FA', FB, FB'の網目状構造隆起部高さは、それぞれ 0.84, 0.98, 0.29, 0.31  $\mu\text{m}$  で、形成膜 FB, FB'の隆起部高さは、FA, FA'の約 1/3 だった。

網目構造の径サイズ分布を、Fig. 4-20のSEM像をImageJで画像処理して求めた。その結果をFig.4-21に示す。FA および FA'の径サイズはほとんどが 20  $\mu\text{m}$  以下であるのに対し、FB および FB'では 30  $\mu\text{m}$  程度の大きいものが多かった。細胞の大きさである 10  $\mu\text{m}$  以上の大きさの相対割合を算出した結果、FA, FA', FB, FB'はそれぞれ 45, 41, 68, 61%であった。

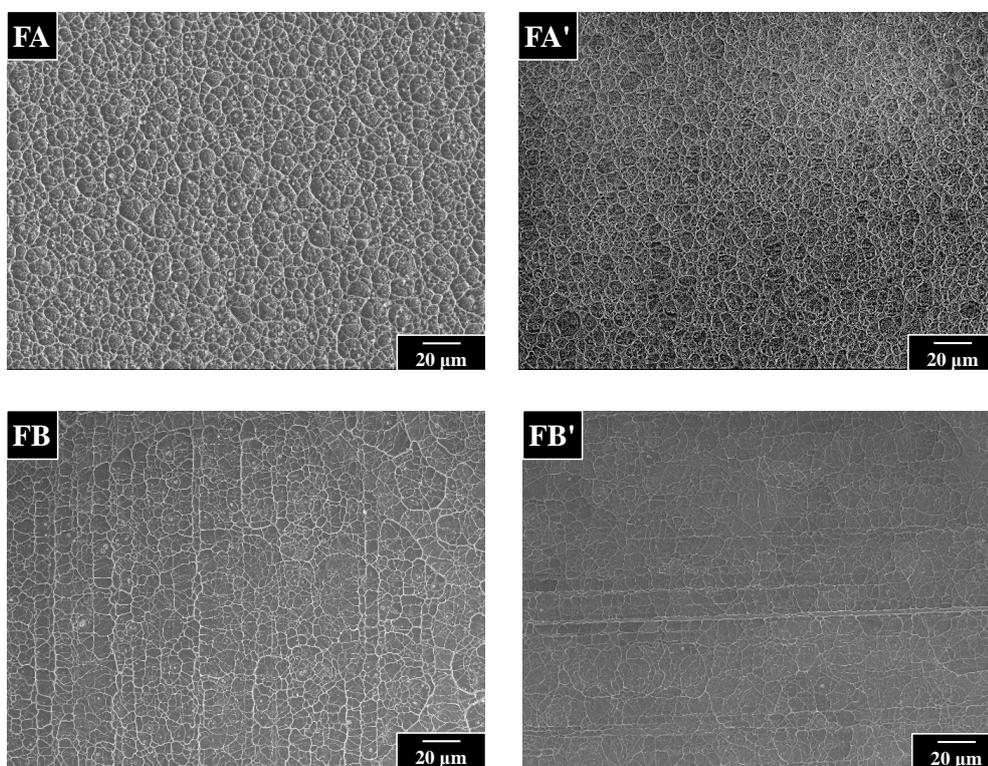


Fig. 4-20 Top-viewed FE-SEM images of the film surfaces of FA, FA', FB, and FB', which were fabricated by the ASC method on Ti plates.

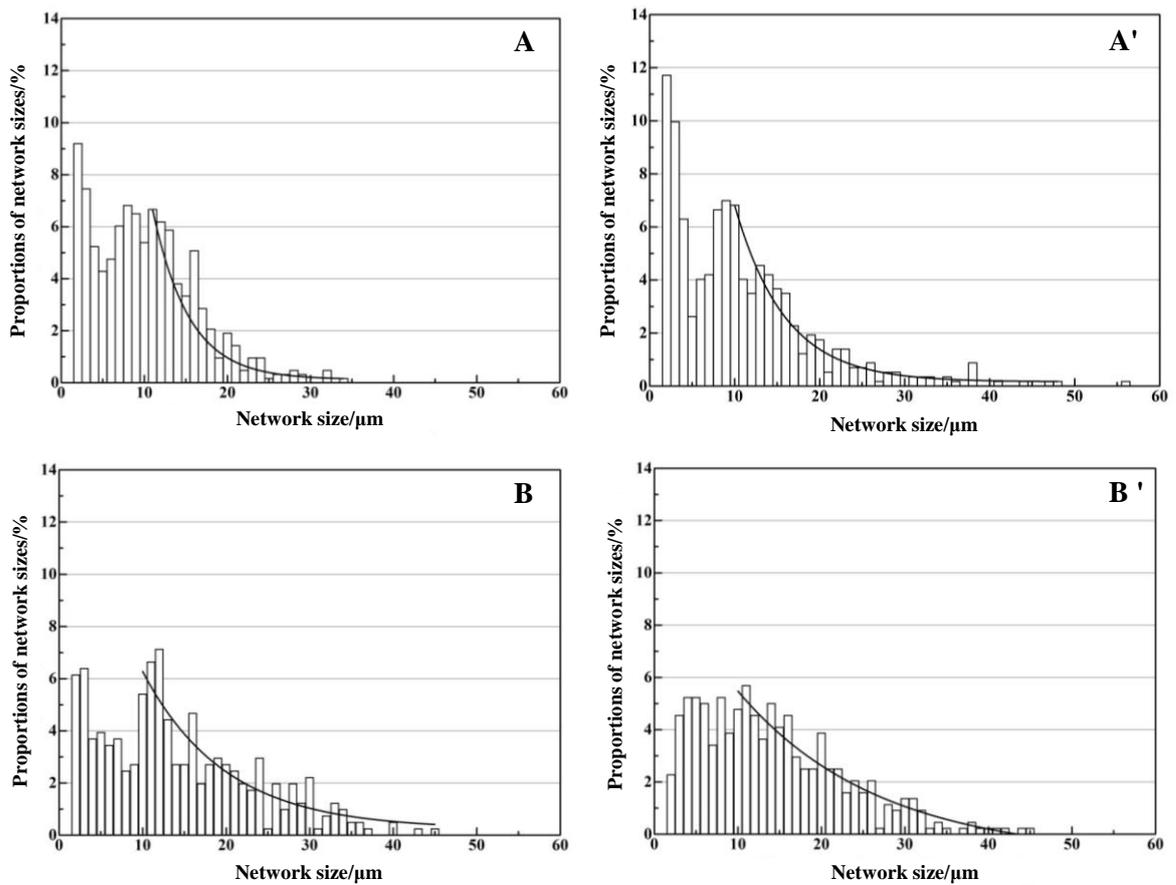


Fig. 4-21 Diameter distribution of network structure for **FA**, **FA'**, **FB**, and **FB'**, fabricated by the ASC method on Ti plates.

#### 4.3-3.2 HBSS 溶液中における CA 膜の生体親和性評価

形成膜を HBSS 溶液に 1 日浸漬し、その表面を FE-SEM で観察しての生体活性を予測した。SEM 像を Fig. 4-22 に示す。**FA**, **FA'**, **FB'**は、網目状構造に沿って CP が大量に析出していた。**FB**と Ti 基板上への析出はほとんどなかった。**FA'**上への析出量は、膜にクラックが観察されるほど顕著だった。

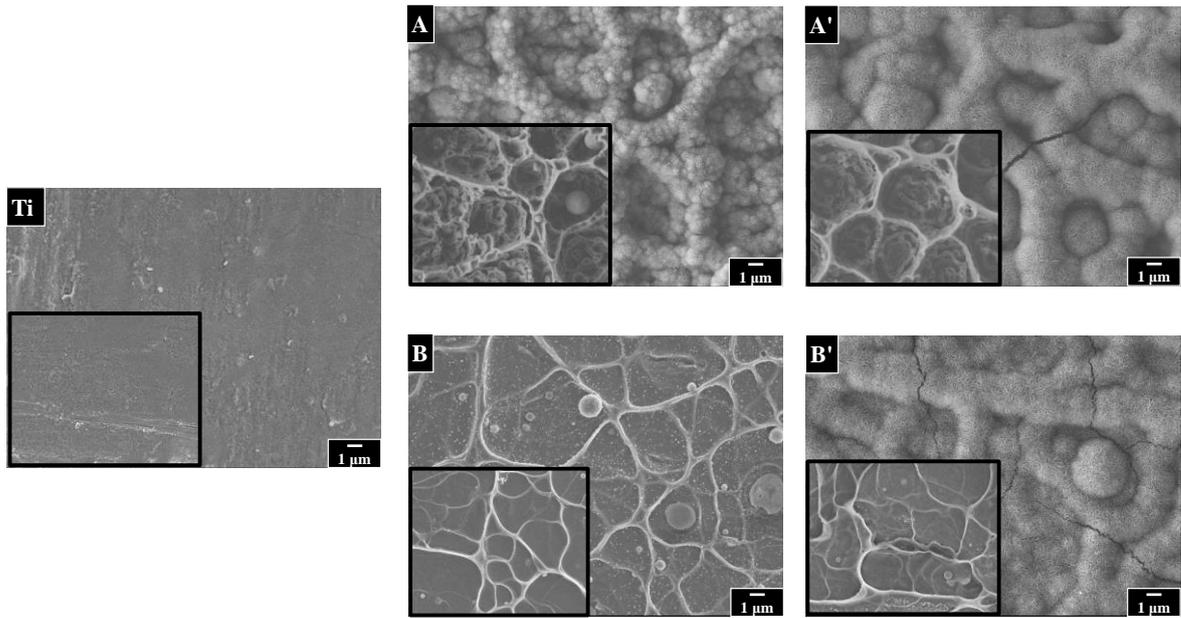


Fig. 4-22 Top-viewed FE-SEM images of the film surfaces after immersion in HBSS for 1 day, of the films **FA**, **FA'**, **FB**, and **FB'**, which were fabricated by the ASC method on Ti plates, and the uncoated Ti plate.

#### 4.3-3.3 CA 膜の骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の初期付着挙動

**FA**, **FA'**, **FB**, **FB'**および Ti 基板上に, 骨芽様細胞 MC3T3-E1 細胞を 1 または 6 時間培養した。細

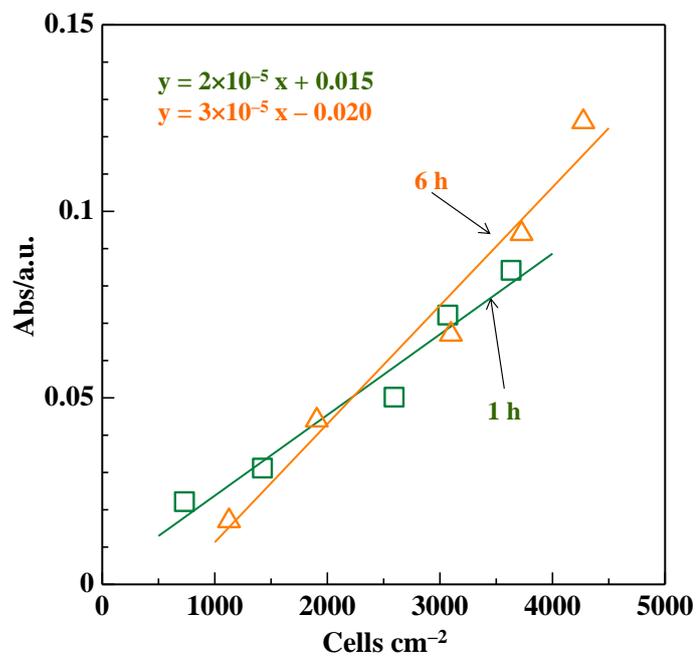


Fig. 4-23 Calibration curve of the absorbance and cell number after cell culture for 1 or 6 h.

胞数測定に使用した検量線を Fig. 4-23 に示す。この検量線を用いて、基板に付着した細胞数を算出した結果を Fig. 4-24 に示す。Ti 基板に対する一元配置 ANOVA 有意差検定によって、1 時間培養後では、FA' と FB' に顕著な有意差が得られ、熱処理による効果を確認できた。6 時間培養では、Ti 基板に対する有意差は FB 以外には観られず、FB に対しては FA' と FB' に優位性が認められた。また、6 時間培養後は、播種した細胞のほとんどが基板上に付着していた。

MC3T3-E1 細胞の形成膜表面への付着挙動を、細胞播種 1 時間後のサンプルの表面を FE-SEM で詳

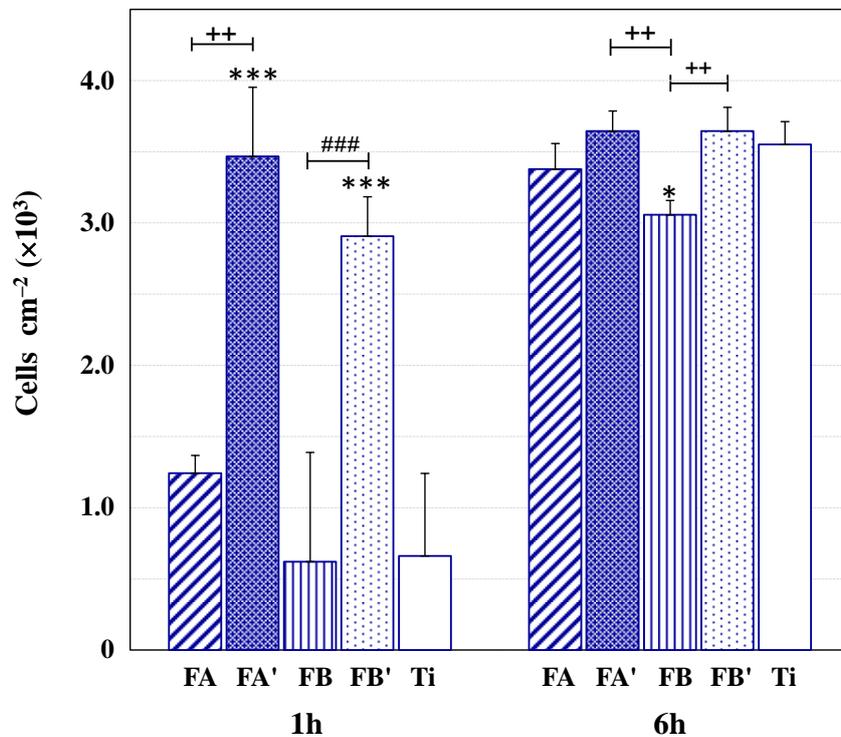


Fig. 4-24 Initial cell attachment of MC3T3-E1 osteoblasts on ASC-derived films before and after heat treatment, along with that on the uncoated Ti plate. Values are mean  $\pm$  SD. \* indicates  $p < 0.05$  and \*\*\* indicates  $p < 0.001$  compared to the Ti plate at the same cultivation time; ++ indicates  $p < 0.01$ , FA vs. FA' for 1 h, FA' vs. FB for 6 h, and FB vs. FB' for 6 h, ### indicates  $p < 0.001$ , FB vs. FB' for 1 h.

細に観察した結果を Fig. 4-25, 26 に示す。1 時間の培養では、いずれの基板上でも MC3T3-E1 細胞は球状で、著しい形状変化はなかったが、FA, FA', FB, FB' 上では、多数の仮足が伸展していた。仮足の接

着している部分を拡大して観察すると, Fig.4-26 に観られるように, 形成した網目状構造の隆起部分に仮足

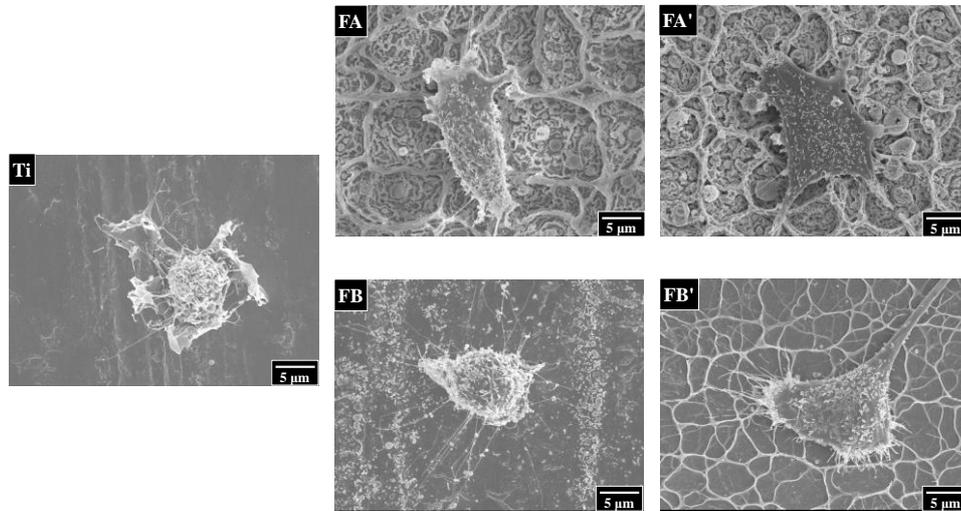


Fig. 4-25 Top-viewed FE-SEM images of the attached cells after cell culture for 1 h on the non-heat-treated ASC-derived films **FA** and **FB**, and on the heat-treated ASC derived films **FA'** and **FB'**, along with that on the uncoated Ti plates at low magnification.

の接着が確認できた。隆起部のない Ti 基板上では, Ti 基板の凹凸に仮足を接着していた。

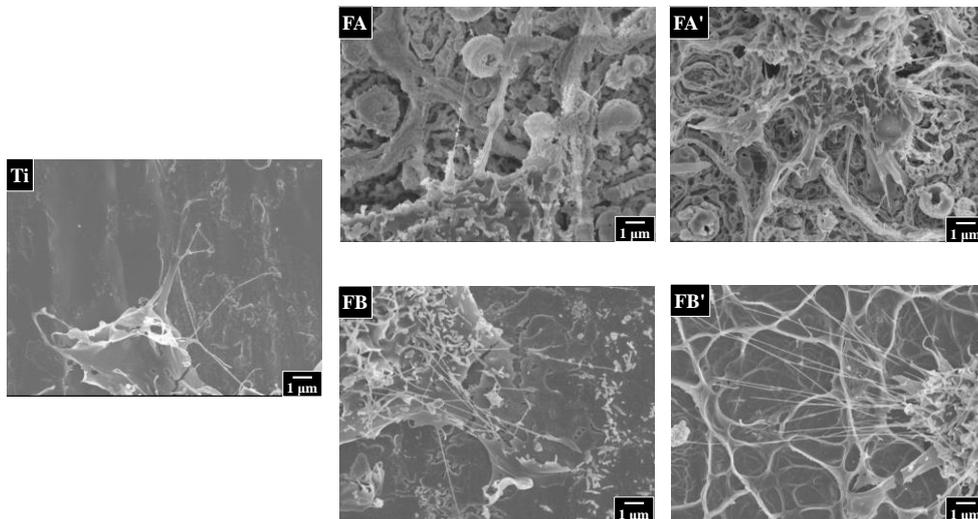


Fig. 4-26 Top-viewed FE-SEM images of the attached cells after cell culture for 1 h on the non-heat-treated ASC-derived films **FA** and **FB**, and on the heat-treated ASC derived films **FA'** and **FB'**, along with that on the uncoated Ti plates at high

Fig. 4-27 に, 1 時間の細胞培養後に細胞が付着していなかった部分の表面の FE-SEM 像を示す。培養

前には明確に観察できた網目状構造は、1時間培養後の **FB** では観察されず、**FA** も網目隆起部の平滑化が認められた。

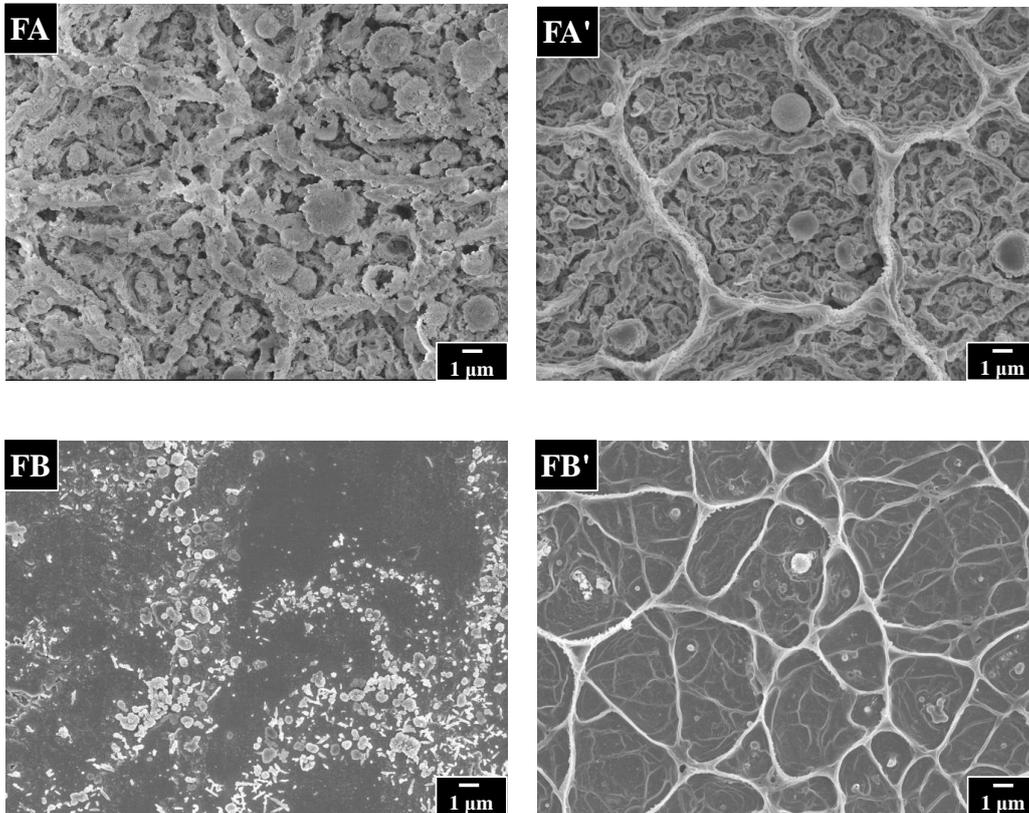


Fig. 4-27 Top-viewed FE-SEM images of the surfaces after cell attachment test for 1 h on the films, **A**, **A'**, **B**, and **B'**, fabricated by the ASC method on the Ti plate. The film surfaces on which no cells were attached were observed in order to examine changes in the films under cell cultivation conditions.

#### 4.3-3.4 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の細胞増殖とオステオカルシン発現評価

検量線から求めた細胞数と吸光度の関数式は、

$$\text{培養 10 日後} : y = 1 \times 10^{-5} x + 0.0058$$

$$\text{培養 16 日後} : y = 2 \times 10^{-5} x - 0.0167 \text{ であった。}$$

Fig.4-28には、10日と16日間、分化誘導培地中で培養した後の細胞数を示す。どの試料も10日後よ

りも16日後の細胞数が減少していた。細胞初期付着と同じように有意差を検定したところ、培養10日後では、各々FAとFBおよびFB'、FA'とFBおよびFB'の間で有意差がみられたが、Ti基板との有意差はなかった。

16日後ではどのサンプル間でも有意差はみられなかった。

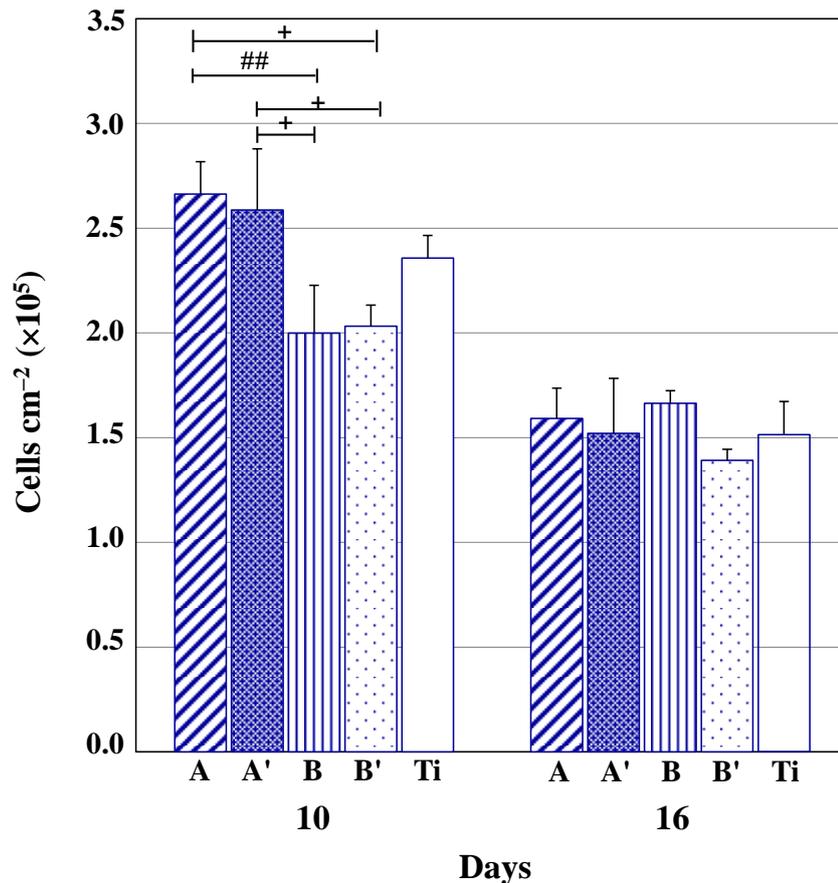


Fig. 4-28 Proliferation of MC3T3-E1 cells, cultured for 10, 16, and 28 days on the ASC-derived films and on the uncoated Ti plate. Values are the mean  $\pm$  SD. + indicates  $p < 0.05$ , FA vs. FB', FA' vs. FB and FB'; ## indicates  $p < 0.01$ , FA vs. FB.

Fig. 4-29 には、10 日と 16 日間、分化誘導培地中で細胞培養した基板上でのオステオカルシン発現量を示す。この発現量は、細胞数当りに換算した。10 日後のオステオカルシン量は、Ti 基板に対して FA', FB, FB' に有意差が見られ、FA と FB および FA' と FB' 間で有意差が見られた。16 日間培養では、いずれのサンプル間にも有意差はなかった。また、いずれのサンプルも、培養 10 日目よりも 16 日目で増加し、その後減少

した。

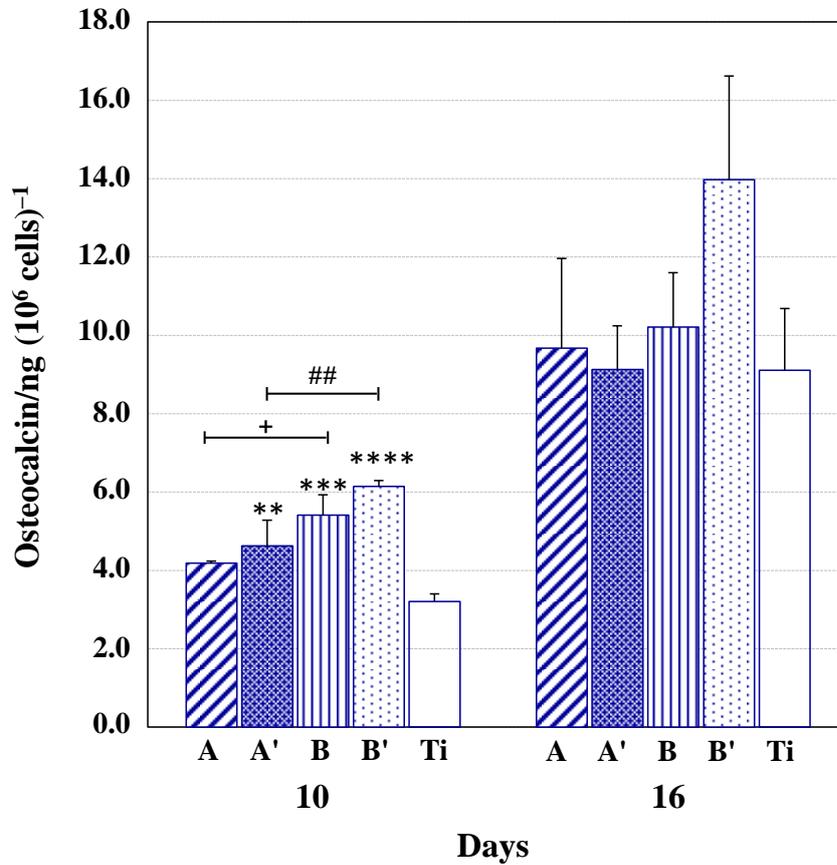


Fig. 4-29 Osteocalcin content after 1,000,000 cells were cultured for 10, 16, and 28 days on the ASC-derived films and on the uncoated Ti plate. Values are the mean  $\pm$  SD. \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\* indicates  $p < 0.001$ , and \*\*\*\* indicates  $p < 0.0001$  compared to the Ti plate at the same cultivation time; + indicates  $p < 0.05$ , **F A** vs. **F B**; ## indicates  $p < 0.01$ , **FA'** vs. **FB'**.

#### 4.3-4 考察

##### 4.3-4.1 スプレー量による CA 膜の膜厚と網目状構造

使用した成膜条件下で、スプレーノズルから水溶液を吐出でき、基板全面にスプレー可能だった。また、途中でノズル先端部を詰める固形物の析出もなく、容易に成膜できた。スプレーする水溶液量を変えたところ、膜厚や網目状構造が大きく変化した。スプレー量を5倍 (**FA**/**FB**) にすると膜厚は10倍になり、網目径のサ

イズは **FB** の方が **FA** よりも大きいものが多かった。(Fig. 4-21) 。なお、膜厚は膜の最も薄い部分で測定し、網目隆起部の高さは、測定した膜厚部分からの距離である。網目隆起部の高さは、**FA** と **FB** および **FA'** と **FB'** の間で各々約 3 倍の差があった。

これらの形状の差異は、4 章 2 節に述べた成膜メカニズムに関連する。スプレーの液滴は、濃縮されながら基板に衝突して横方向に拡がり、隣接する液滴が衝突して網目状構造の隆起部ができる。スプレー量の少ない時には隆起部はなく、横方向に容易に拡がるために、網目径サイズは大きい。一方、スプレー量が増えると、網目構造の隆起部が高くなると同時に、網目内部で液滴が衝突し、径がより小さい網目が内部に発生する。このように、スプレー量に応じて膜厚、網目状構造が変化したと考えられる。

#### 4.3-4.2 HBSS 中での CA 膜上への CP 析出挙動

各膜を HBSS に 1 日浸漬して膜上への CP 析出状態から生体親和性を予測したところ、熱処理の有無によって明確な差異があった。CP の析出は膜厚に依存せず、熱処理が膜の生体親和性をより高める可能性がわかった。

#### 4.3-4.3 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞初期付着挙動

培養 1 時間後の膜上への細胞初期付着数は、熱処理した **FA'** および **FB'** は、各々 **FA**、**FB** に対して 2.8 倍、4.7 倍であった。Ti 基板に対する各膜 (**FA**、**FB**、**FA'**、**FB'**) の細胞数比率は、それぞれ 1.9、0.9、5.2、4.4 だった。これらの結果は、HBSS 浸漬による生体親和性を予測する CP 析出挙動と一致しており、CA 膜の Ar 気流中 600°C、10 分間の熱処理は、生体親和性と細胞初期付着を高める効果があることを示した。また、CA 膜と Ti 基板上での培養 6 時間後の細胞付着数に有意差はなく、CA 膜の熱処理は、細胞の付着初期段階のみに影響を与えることが分かった。

Fig. 4-25, 4-26 に示されるように、CA 膜上に付着した細胞は伸ばした仮足を、網目構造の隆起部分に

接着したことがわかる。一方で、Fig. 4-27 に示すように細胞の接着がない部分の **FA**、**FB** の膜は、溶解によって膜が喪失していた。炭酸を含んだアパタイトは溶解性が高いことが一般的に知られており [4-23, 4-24]、**FA** と **FB** の膜は浸漬した培地中で溶解して、細胞が接着する良好な足場にならなかったと考えられる。一方、6 時間の培養では、いずれも Ti 基板上での細胞数と変わらず、膜間での比較は意味がなかった。

#### 4.3-4.4 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の細胞増殖挙動およびオステオカルシン発現評価

形成した CA 膜上への細胞付着が良好だったことから、骨再生用材料として検討するために、細胞増殖を評価した。培養 10 日目の **A**、**FB**、**FA'**、**FB'**表面上の細胞数は、各々初期播種数 (5,600 cells cm<sup>-2</sup>) の 48, 46, 36, 36 倍であった。このことから、CA 膜は骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞に対して毒性がないことが証明できた。また、16 日後で細胞数が減少しているのは、分化が始まったためと考えられる [4-25]。その後、増殖と分化を繰り返し、石灰化に至ると推測される。これまで、細胞が増殖しなかった報告がある [4-26, 4-27] 一方、Ti 基板にアパタイトコートした膜上での細胞増殖の報告はほとんどなかった。今回得られた結果から、従来のアパタイトコート膜が平滑だったために、その有効性が発現しなかったものと推定できる。

オステオカルシンは、オステオポンチン、オステオネクチンと共に、骨成分の非コラーゲンタンパク質の一つである。骨芽細胞は、分化誘導開始後 ALP 活性をまず発現して石灰化の準備を整え、次いで骨形成タンパク質として重要なオステオカルシンが発現する。その発現量を Ti 基板上と比較すると、いずれの CA 膜上でもオステオカルシン量が多く、コーティングによる効果は明らかであった。細胞培養 10 日後の **FB** および **FB'** 上でのオステオカルシン量は、**FA** および **FA'** 上よりも多かった。スプレー量の違いで膜表面形状が大きく異なり、特に網目径と隆起部高さが顕著である。**FB** と **FB'** 上でのオステオカルシン量増加は、網目状構造の隆起高さが低く、細胞の伸展や分化に好条件だったと考えられる。細胞培養 16 日後のオステオカルシン量は、試料間で差はあまりなかった。

#### 4.3-5 結言

アパタイトコーティング用溶液スプレー量の異なる膜の生体親和性と細胞適合性を検討したところ、以下のことが明らかとなった。

1. Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液の 5 mL を 1 分間スプレーして、0.11 μm の CA 膜を得た。
2. スプレー量を変えると、膜厚と網目状構造の隆起部高さが変化した。
3. 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を CA 膜上で培養し、その初期付着を調べたところ、Ar 気流中 600°C で熱処理した膜は、細胞の初期付着に優位だった。また、細胞の仮足は、網目状構造の隆起部に接着していた。
4. 細胞増殖とオステオカルシン量は、スプレー量の少ない膜上で良好だった。これは、網目状構造の隆起高さが低く、細胞の伸展を阻害しないためと考えられる。

これらのことから、水酸化カルシウムを出発原料とした Ca-CO<sub>3</sub>-PO<sub>4</sub> 三元系錯体スプレー水溶液を用いたアパタイト膜形成法は、スプレー量により膜厚だけでなく、表面の網目状構造を変えることができた。形成した CA 膜は細胞に対する毒性がなく、細胞の初期付着や細胞の増殖、オステオカルシンの発現量が培養初期段階で Ti 基板単独よりも優位であった。また、CA 膜の熱処理や構造の特徴で比較すると、CA 膜の熱処理は、培養初期段階での細胞付着性を良好にした。これは、熱処理した膜が培養液中で溶解せずに、その特徴的な構造を維持して、細胞の仮足が付着するために有効だったためと考えられる。さらに、CA 膜の網目状構造の隆起部高さは適度に低い方が、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の増殖やオステオカルシン発現に対して有効なことが分かり、今まで見過ごされてきた膜の表面形状の重要性を明らかにした。

## 参考文献

- [4-1] Yang Y, Bumgardner JD, Cavin C, Carnes DL, Ong JL. Osteoblast precursor cell attachment on heat-treated calcium phosphate coatings. *J Dent Res* 2003;82:449-453.
- [4-2] Klein CPAT, Wolke JGC, de Blic-Hongervorst JMA, de Groot K. Calcium phosphate plasma-sprayed coatings and their stability: An *in vivo* study. *J Biomed Mater Res*, 1994;28:909-917.
- [4-3] Cheang P, Khor KA. Addressing processing problems associated with plasma spraying hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*. 1996;17:537-544.
- [4-4] Ogiso M, Tamashita Y, Matsumoto T. Microstructural changes in bone of HA-coated implants. *J Biomed Mater Res*. 1998;39:23-31.
- [4-5] Yoshinari M, Ohtsuka Y, Dérand T. Thin hydroxyapatite coating produced by the ion beam dynamic mixing method. *Biomaterials*. 1994;15:529-535.
- [4-6] Jansen JA, Wolke JGC, Swann S, van der Waerden JPCM, Groot KD. Application of magnetron sputtering for producing ceramic coatings on implant materials. *Clin Oral Impl Res*. 1993;4:28-34.
- [4-7] 鹿島長門, 赤尾勝 日本化学会第 85 春季年会特別企画「錯体とコーティング技術」2005;特別講演 1S5 06
- [4-8] Zhou P, Akao M. Preparation and characterization of double layered coating composed of hydroxyapatite and perovskite by thermal decomposition *Bio-Med Mater Eng*. 1997;6:67-81.
- [4-9] Sato M, Tanji T, Hara H, Nishide T, Sakashita Y. SrTiO<sub>3</sub> film fabrication and powder synthesis from a non-polymerized precursor system of stable Ti(IV) complex and Sr(II) salt of edta. *J Mater Chem*. 1999;9:1539-1542.
- [4-10] Takahashi K, Hayakawa T, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Sato M, Nemoto K. Molecular precursor method for thin calcium phosphate coating on titanium. *Thin Solid Films*. 2005;484:1-9.

- [4-11] Takahashi K, Hayakawa T, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Sato M, Nemoto K. Properties of hydroxyapatite thin film prepared by molecular precursor method. *The J Dent Mater.* 2005;24:39-46. [In Japanese].
- [4-12] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Schoonman J, Jansen JA. Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66A:330-334.
- [4-13] Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. *Biomaterials.* 2004;25:2019-2027.
- [4-14] Mochizuki C, Hara H, Sato M. Fabrication of HAp film by spray method of its aqueous solution. *PacifiChem2005.* 2005;programNo.623.
- [4-15] Mochizuki C, Hara H, Hayakawa T, Sato M. Calcium phosphate coatings on Ti substrate by aqueous spray method. *塗装工学* 2006;41:200-209. [In Japanese].
- [4-16] Benjamin p, Weaver C. Measurement of adhesion of thin films. *Proc R Soc Lond A.* 1960;254:163-176.
- [4-17] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Schoonman J, Jansen JA. Electrostatic spray deposition (ESD) of calcium phosphate coatings. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66A:330-334.
- [4-18] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Siebers MC, Schoonman J, Jansen JA. In vitro and in vivo reactivity of porous, electrospayed calcium phosphate coatings, *Biomaterials* 2006;27:3368-3378.
- [4-19] Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Siebers MC, Schoonman J, Jansen JA. Influence of deposition parameters on chemical properties of calcium phosphate coatings prepared by using electrostatic spray deposition. *J Biomed Mater Res A.* 2005;74A:275-284.
- [4-20] Siebers MC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, Jansen JA. The influence of the crystallinity of electrostatic spray deposition-derived coatings on osteoblast-like cell behavior, in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2006;78A:258-267.
- [4-21] Siebers MC, Wolke JGC, Walboomers XF, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA. In vivo evaluation of the trabecular bone behavior to porous electrostatic spray deposition-derived

- calcium phosphate coatings. Clin Oral Impl Res 2007;18:354-361.
- [4-22] Monma H, Takahashi T. Preparation and thermal changes of carbonate-containing apatite. Gypsum & Lime. 1987;210:29-33. [In Japanese].
- [4-23] Sato K, Ikenoya O, Shimazu Y, Aoba T. Carbonation of enamel apatite crystals: Lattice substitutions and surface adsorption. Jpn J Oral Biol. 1999;41:61-68.
- [4-24] Doi Y, Moriwaki Y, Aoba T, Okazaki M, Takahashi J, Joshin K. Carbonate apatites from aqueous and non-aqueous media studied by ESR, IR, and X-ray diffraction: Effect of NH<sup>4+</sup> ions on crystallographic parameters. J Dent Res 1982;61:429-434.
- [4-25] Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ , Bone Morphogenetic Protein-2, and Protein-4 on Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins and Differentiation of Dental Pulp Cells. Dev Biol. 1994;162:18-28.
- [4-26] Chou YF, Huang W, Dunn JCY, Miller TA, Wu BM. The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. Biomaterials 2005;25:285-295.
- [4-27] Hirota M, Hayakawa T, Ametani A, Kuboki Y, Sato M, Tohnai I. The effect of hydroxyapatite-coated titanium fiber web on human osteoblast functional activity. Int J Oral Maxillofac Implants 2011;26:245-250.
- [4-28] Yoshida E, Yoshimura Y, Uo M, Yoshinari M, Hayakawa T. Influence of nanometer smoothness and fibronectin immobilization of titanium surface on MC3T3-E1 cell behavior. J Biomed Mater Res Part A 2012;100A:1556-1564.

## 第5章 アミノ酸のCa錯体を用いるアパタイト/ゼラチン複合スキャフォールドの形成

### 5-1 緒言

第2章では、Ca錯体とリン酸溶液にアンモニアを添加するpH制御で、いくつかのアパタイト粉末の合成を達成した。用いるCa錯体の安定度定数で適切な反応条件が変わり、より低い安定度定数のAspのCa錯体では、水溶液中の室温反応で若干のHAを含むCDHA粉末が、90°C加熱合成ではHA/CHAが得られた。いずれも結晶子サイズは13 nm程度と小さく、PBS溶液中での溶解度も0.2 g程度と高かった。これまで、骨再生用スキャフォールドとしてPLGA（ポリ乳酸-グリコール酸共重合体）に導入されるアパタイト粉末は高結晶性で、溶解性に乏しかった。そのため、PLGAの溶解速度とアパタイト粉末のCa<sup>2+</sup>イオンの溶出速度が異なり、PLGAの分解酸性生成物が中和できず、組織炎症が起こることが問題となっていた [5-1～5-6]。第3章では、第2章で合成した低結晶性アパタイト粉末をPLGAに導入することでポラスなスキャフォールドを溶液鑄造/塩溶出法により作成し、in vitroおよびin vivo試験を行った。その結果、低結晶性のアパタイト粉末PAを導入した気孔率92%のスキャフォールドは、in vitroでのスキャフォールドの分解速度が抑制され、CPの析出はPLGA単独や高結晶性アパタイト導入PLGAよりも速かった [5-7]。埋め込み実験においても、4週間後には新生骨の生成が確認され、12週間後には新生骨により埋入部のドリルホールが完全に埋められていた [5-8, 5-9]。Ca-IDA錯体およびCa-Asp-PO<sub>4</sub>水溶液から合成した低結晶性アパタイトHA/CHAを導入したスキャフォールドは、配位子を含んでいることから、早期の骨生成を期待していた。しかし、スキャフォールドの気孔率が96%と高く、埋め込み実験において形状を保持できずに複合材の分解物が骨髓内に流入し、骨形成には至らなかった。これにより、スキャフォールドの形状保持性が重要な要因であることが分かった。

また、アパタイト粉末導入 PLGA スキャフォールドの作成には時間を要し、さらに溶液鑄造/塩溶出法を用いていることから、作成時の水洗による導入アパタイト粉末や含有アミノ酸の溶出が起こり、導入アパタイトの量を制御できない等の問題点も明らかとなった。一方で、 $\beta$ -TCP 導入コラーゲンスポンジが骨再生材料として市販されている [5-10]。しかし、製造工程が複雑で、高価な材料である。そこで、第 2 章でのアパタイト合成を発展させ、マトリックス材料として生体成分のゼラチンを用いるスキャフォールドを新たに設計した。ゼラチンはコラーゲンの主成分であり、かつコラーゲンよりも安価である。アパタイト導入ゼラチンスキャフォールドを作成できれば、早期の新生骨形成が可能と期待できる。

そこで、本研究では、第 2 章で得た非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸である Asp を配位子とする Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液を活用して、ゼラチン固相中へのアパタイト析出を試みた。アパタイト析出に用いる pH 調製剤は、Asp 同様非コラーゲンタンパク質構成塩基性アミノ酸であるアルギニン (Arg) を用いることで、すべての原料を生体内に存在する物質とした。さらに、作成したゼラチンを凍結乾燥し、スキャフォールド材料としての評価を行った。

## 5-2 実験方法

### 5-2.1 試薬

L-アスパラギン酸 (Asp = H<sub>2</sub>asp, F.W. = 133.10) 和光純薬工業株式会社 (特級)

水酸化カルシウム (99.9%, F.W. = 74.10) 和光純薬工業株式会社 (特級)

オルトリン酸 (85 % over, F.W. = 98.00) 大成化学株式会社 (ツル印特級)

L-アルギニン (Arg, F.W. = 174.2) 和光純薬工業株式会社 (特級)

メディゼラチン (低エンドトキシン HMG-BP, F.W. = 185,500) ニッピ株式会社

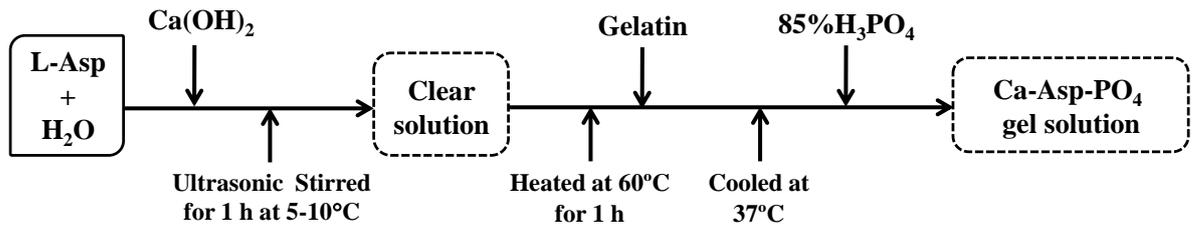
AspのCa錯体の合成には、精製水（共栄製薬株式会社）を使用した。これらの試薬はそれ以上精製することなく使用した。

### 5-2.2 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体水溶液の調製と Arg の反応によるアパタイト合成

精製水 250 mL に L-Asp 3.32 g (25 mmol) , Ca(OH)<sub>2</sub> 0.92 g (12 mmol) の順番で加え、懸濁溶液を 5~10°C で 1 時間超音波撹拌した。完全に溶解した溶液を 60°C に加熱し、1 時間撹拌した。この溶液を 37°C まで放冷し、85 %H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.87 g (7.5 mmol) を一度に添加して約 10 分間撹拌した。透明溶液の pH は、約 4.2 であった。37°C の透明溶液に L-Arg 8.72 g (50 mmol) を一度に加えた。溶液の pH は、約 8.7 であった。溶液中の Ca/P 物質比は、水酸アパタイトの化学量論比 1.67 に調製した。白色結晶は、Arg を加えるとすぐに析出した。反応溶液を約 10 分間撹拌し、白色結晶は自然ろ過で集めた。白色粉体は、70°C の乾燥器で一晩乾燥させ、1.54 g 回収した。

### 5-2.3 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルの調製

精製水 100 g に L-Asp 1.33 g (10 mmol), Ca(OH)<sub>2</sub> 0.37 g (5 mmol) の順で加え、懸濁液を 5~10°C で 1 時間超音波照射を行った。完全溶解した無色透明溶液を 60°C まで加熱し、1 時間撹拌した。ここにゼラチン濃度 3 質量%となるようメディゼラチンを 3.0 g 加え、溶解するまで 10 分間加熱撹拌し、37°C まで放冷した。ここに Ca/P 比 1.67 となるよう 85%H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.35 g (3 mmol) を一度に加え、10 分間撹拌した。合成のフローチャートを Fig. 5-1 に示す。この溶液の pH は 4.8 だった。得られた溶液約 13 g は先端を封じたシリンジに入れ、冷蔵庫で一晩固化させた。対称材料として、ゼラチン 3.0 g を 60°C の精製水 100 g に溶解し、約 13 g は先端を封じたシリンジに入れ、冷蔵庫で一晩固化させた。ゼラチン溶液の pH は 6.4 だった。

Fig. 5-1 Schematic of representation for preparation of Ca-Asp-PO<sub>4</sub> gel

#### 5-2.4 Arg 水溶液の調製

精製水 13 g に L-Arg 0.45 g (2.6 mmol) 加え、溶解させた。この溶液の pH は 10.8 であった。

#### 5-2.5 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルと Arg 水溶液の反応

5-2.2 で作成した Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルとゼラチンゲルにそれぞれ約 13 g の Arg 水溶液を加え、冷蔵庫中で保管した。Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルは、Arg 水溶液の静置で直ちに界面が白色になり、反応が起こった。

5 日後、Ca-Asp-PO<sub>4</sub>ゲル中上部半分に白色結晶が析出した。この白色ゲルを **SA** とする。一方、ゼラチンゲルには析出物はなく、これを **SC** とした。Arg 水溶液未添加の Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルおよびゼラチンゲルをそれぞれ **SB**, **SD** とした。

#### 5-2.6 ゲルの凍結乾燥

**SA** の白色結晶が析出したゲル部分を切り、上下約 2.5 mm を切断し、中央部分の約 10 mm を切り出した。**SB**, **SC**, **SD** も同様に同じ部分を切り出した。約 10 × 8 mm, 高さ約 4 mm に切断し、ポリエチレンメッシュ上に静置し、冷凍庫で一晩凍結させた。翌日、凍結したサンプルを凍結乾燥用フラスコに移し、9 時間凍結乾燥した。凍結乾燥したサンプルはそれぞれ、**SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'** とした。

### 5-2.7 測定

凍結乾燥した **SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'**は, FT-IR, XRD, 元素分析, FE-SEM による表面観察を行った。**SA'**および **SB'**は, TG-DTA 測定ならびにアパタイト組成の同定のため, 空气中 850°C, 30 分間の熱処理を行い, XRD, FT-IR 測定を行った。熱処理によって得られた粉末は, **SA'**<sub>850</sub> および **SB'**<sub>850</sub> とした。

## 5-3 結果

### 5-3.1 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 水溶液と Arg の反応によるアパタイト粉末

Fig. 5-2 に示した白色結晶の XRD パターンは, CP であることを示し, 結晶子サイズは 15 nm であった。

詳細な組成を調べるために空气中 850°C, 30 分間熱処理した粉末の XRD 測定を行い, 検量線法を用い

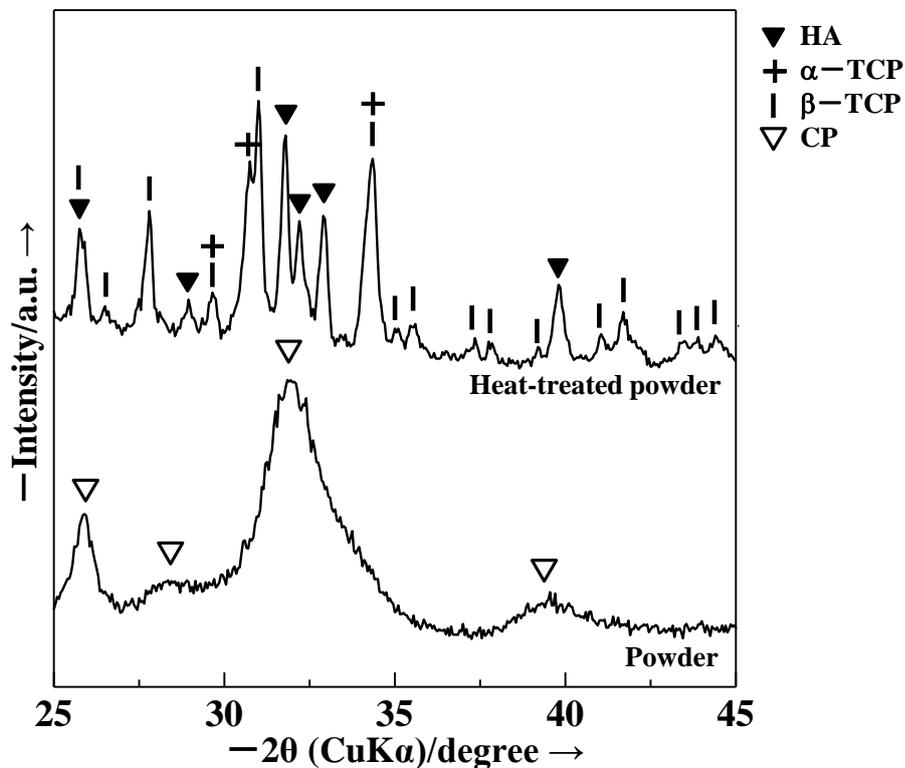


Fig. 5-2 XRD patterns of the reacted powder with Ca-Asp-PO<sub>4</sub> solution and Arg, and after heat-treated powder at 850°C for 30 min in air.

てHAの含有量を算出したところ、35%であった。残りの65%はCDHAであった。

Fig. 5-3には、白色結晶のFT-IRスペクトルを示す。520~620  $\text{cm}^{-1}$  付近と970~1190  $\text{cm}^{-1}$  付近のピークは $\text{PO}_4^{3-}$ に帰属できる。874  $\text{cm}^{-1}$ と1320~1420  $\text{cm}^{-1}$ 付近には、AspまたはArgのカルボキシ

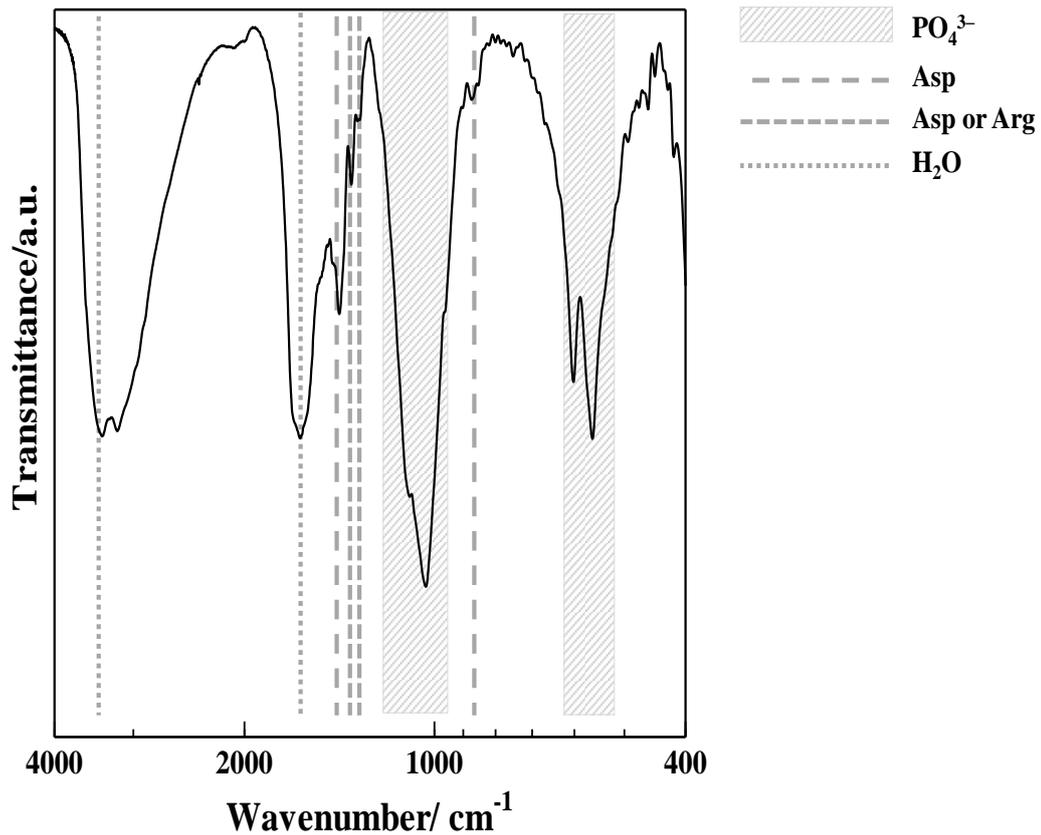


Fig. 5-3 FT-IR spectrum of the reacted powder with Ca-Asp-PO4 solution and Arg.

基が観測された。1630 および 3360  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\text{H}_2\text{O}$  に帰属されるピークが観測された。

Fig. 5-4には、得られた白色結晶のTG-DTA曲線を示す。200°Cまでに8%、520°Cまでに37.4%の質量減少が起こり、1000°Cでの最終残渣は61%であった。

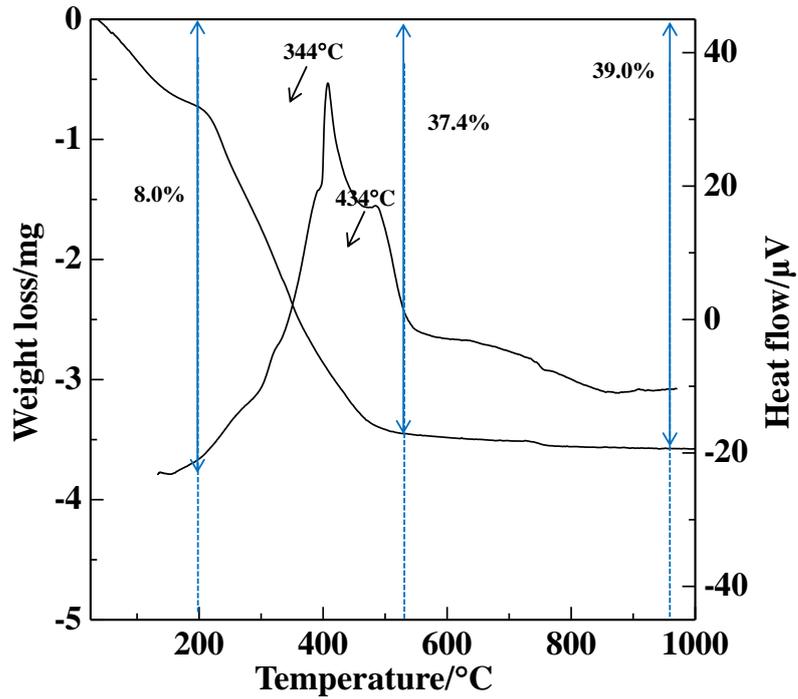


Fig. 5-4 TG-DTA curves of the reacted powder with Ca-Asp-PO<sub>4</sub> solution and Arg.

Table 5-1 には得られた白色結晶の元素分析結果を示す。この結果から、得られた白色結晶は、2HA·CDHA·4Asp·4Arg·20H<sub>2</sub>O (F.W. = 4547.4) とした計算値とよく一致した。この分子量から算出した収率は、83%であった。

Table 5-1 Elemental analysis of the powder obtained by the reaction of the Ca-Asp-PO<sub>4</sub> solution and Arg powder.

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
Fund	10.14	2.38	6.05
Calcd.	10.57	2.88	6.16

### 5-3.2 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルと Arg 水溶液の反応

Fig. 5-5 に、ゲル上に Arg 水溶液を添加した直後の Ca-Asp-PO<sub>4</sub>ゲル-Arg とゼラチンゲル-Arg の写真を示す。Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体ゲルは、Arg 水溶液を加えると直ちに界面から反応し、白色結晶が固相中下方に向かって析出した。ゼラチンゲルのみでは、このような変化はなかった。

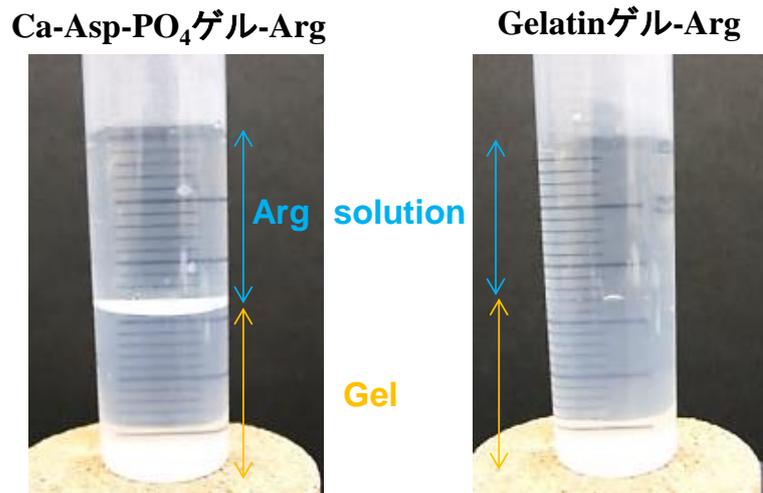


Fig. 5-5 Photograph of reaction for Ca-Asp-PO<sub>4</sub> gel and gelatin gel with Arg solution.

5日後には、固相（30 mm）の半分（15 mm）まで白色結晶が析出した（Fig. 5-6）。ここで Arg

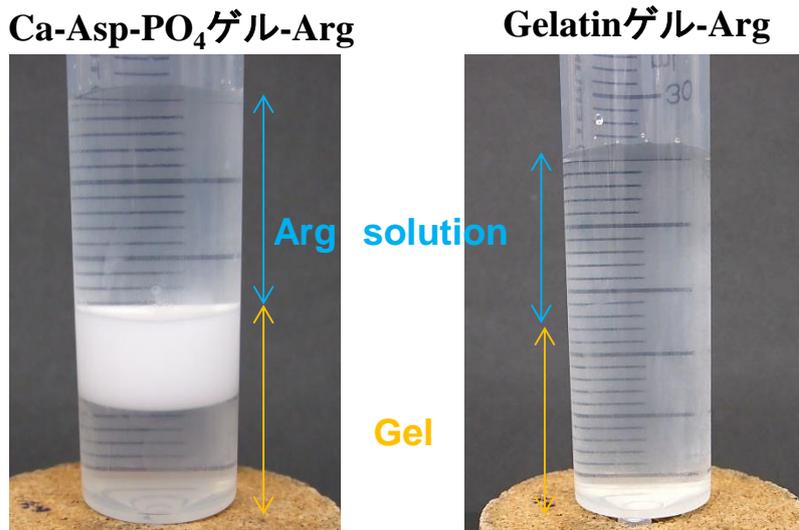


Fig. 5-6 Photograph of reaction for Ca-Asp-PO<sub>4</sub> gel and gelatin gel with Arg solution after 5 days.

水溶液を取り除いた。反応前後の Arg 水溶液の質量を Table 5-2 に示す。**SA** は質量が増加し，**SC** は質量が大幅に減少していた。

Table 5-2 Masses of the Arg solution before and after reaction.

Notation	Mass of solution/g	
	Before	After
<b>SA</b>	13.02	13.18
<b>SC</b>	13.07	11.1

また，Table 5-3 には，**SA** および **SC** の反応前後の Arg 水溶液の pH とゲルの上部および底部の pH を示す。反応後の Arg 水溶液の pH は，**SA** も **SC** も低くなっていたが，**SC** よりも **SA** の方がより低かった。ゲルの pH は，上部と底部で大きく異なっており，底部に向かって pH は反応前のゲルの pH に近かった。

Table 5-3 The pH value of reacted solution and gel.

		<b>SA</b>	<b>SB</b>	<b>SC</b>	<b>SD</b>
Solution	Before	10.82	non	10.82	non
	After	8.81		9.81	
Gel	Upper	8.07	4.80	9.27	6.42
	Bottom	4.88		7.46	

また，ゲルを切断したサンプル写真を Fig. 5-7 に示す。**SA** 以外は，無色透明のゲルだった。

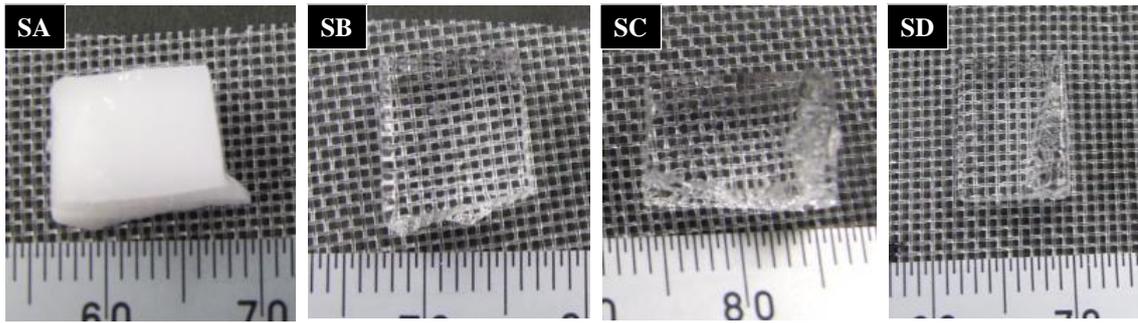


Fig. 5-7 Photograph of SA, SB, SC, SD gel.

Fig. 5-8 には凍結乾燥後の SA', SB', SC', SD' の写真を示す。どのサンプルも凍結乾燥により壊れて飛散することは無かった。SA' は凍結乾燥により収縮したが、SB', SC', SD' は凍結前の形状をほぼ維持していた。SA', SB' は SC', SD' よりも硬い固体になった。

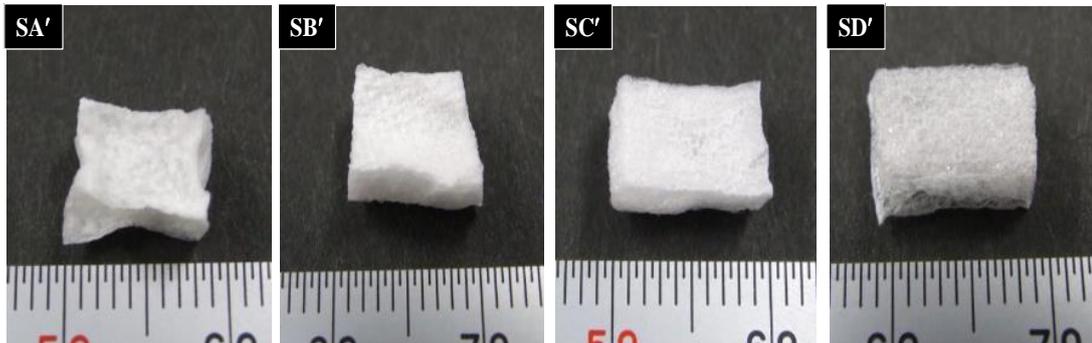


Fig. 5-8 Photographs of the fabricated gels obtained by freeze-drying for 9 h.

### 5-3.2 凍結乾燥サンプルの分析

Fig. 5-9 には、SA' と SB' の TG-DTA 曲線を示す。SA' は、553°C まで吸熱・発熱を伴う質量減少を繰返し、それ以降の質量減少はほとんどなく、白色結晶が 18% 残渣として残った。SB' は、358 と 541°C に発熱を伴う質量減少が見られ、これ以降の質量変化はほとんどなく、11% が白色粉末として残った。ゼラチンの

みは、608°Cで燃焼し、残渣はなかった。

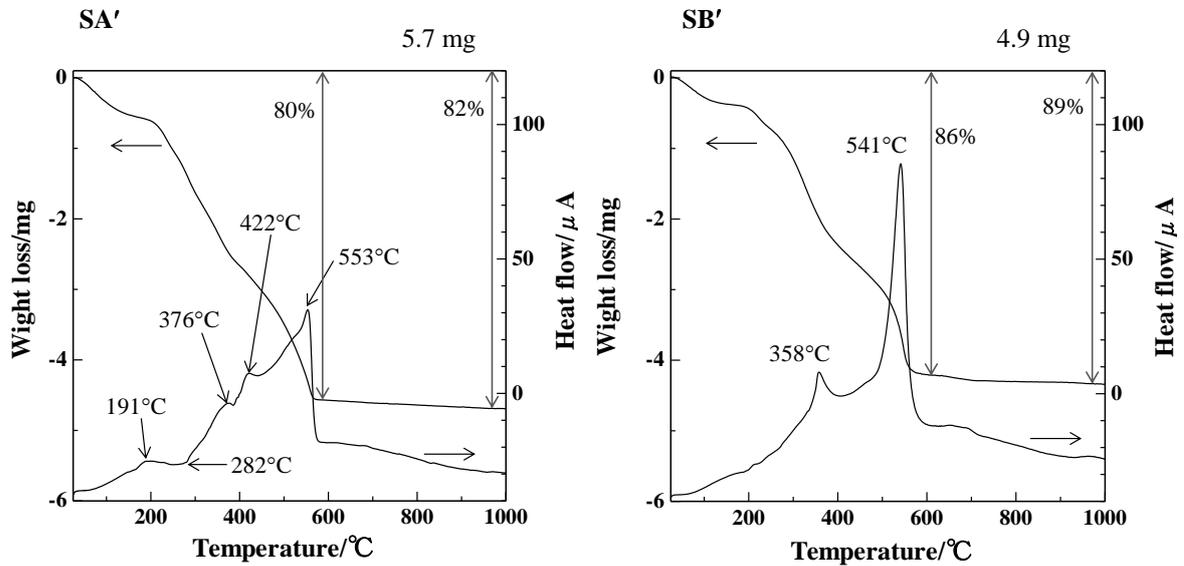


Fig. 5-9 TG-DTA curves of SA' and SB'.

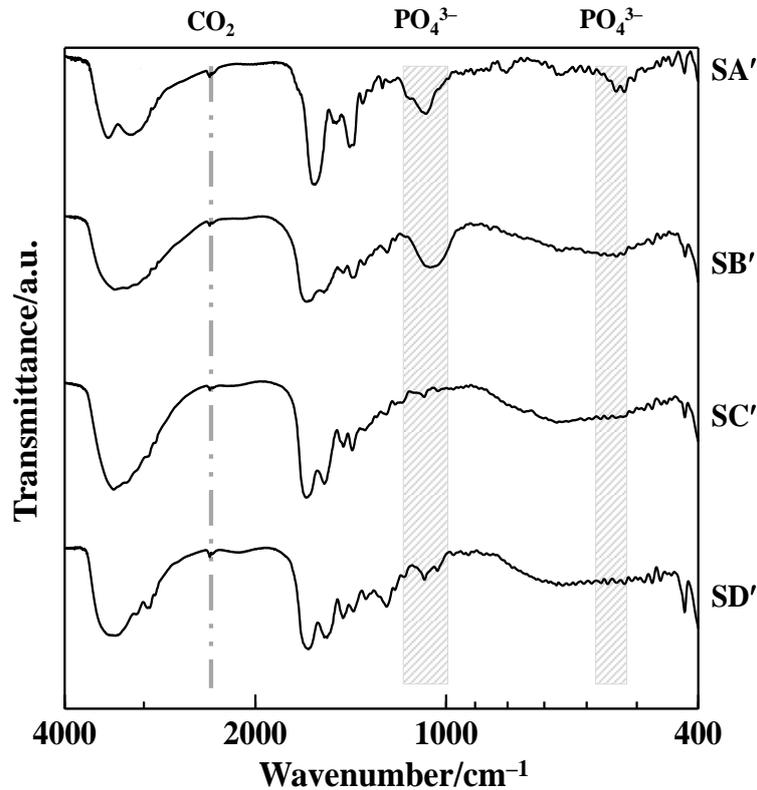


Fig. 5-10 FT-IR spectra of SA', SB', SC' and SD'.

Fig. 5-10 には, **SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'**の FT-IR スペクトルを示す。**SA'**, **SB'**は, リン酸基に帰属される振動を 560~620 と 1020~1100  $\text{cm}^{-1}$  付近に観測した。

Fig. 5-11 に, **SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'**の XRD パターンを示す。**SA'**にのみ, 六方晶系の最強ピーク付近にブロードなピークが観測された。

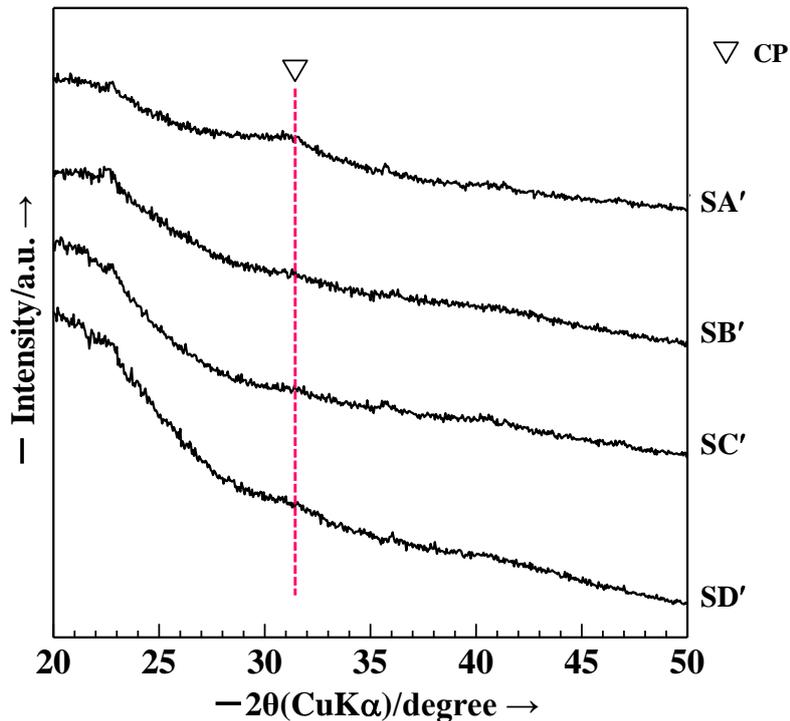


Fig. 5-11 XRD patterns of **SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'**.

Fig. 5-12 には, **SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'**の FE-SEM 像を示す。凍結乾燥したゲルは, 水の脱離部分が気孔となっていた。この図から, 凍結乾燥後の **SA'**, **SB'**, **SC'**, **SD'**平均気孔径は, 約 250, 238, 264 および 191  $\mu\text{m}$  であった。

Fig. 5-13 には, Fig. 5-12 のゼラチン部分を拡大した FE-SEM 像を示す。**SA'**のみに半球状の物質が観られ, これ以外にはこのような凹凸は観られなかった。**SA'**の半球体の平均半径は, 約 0.6  $\mu\text{m}$  であった。

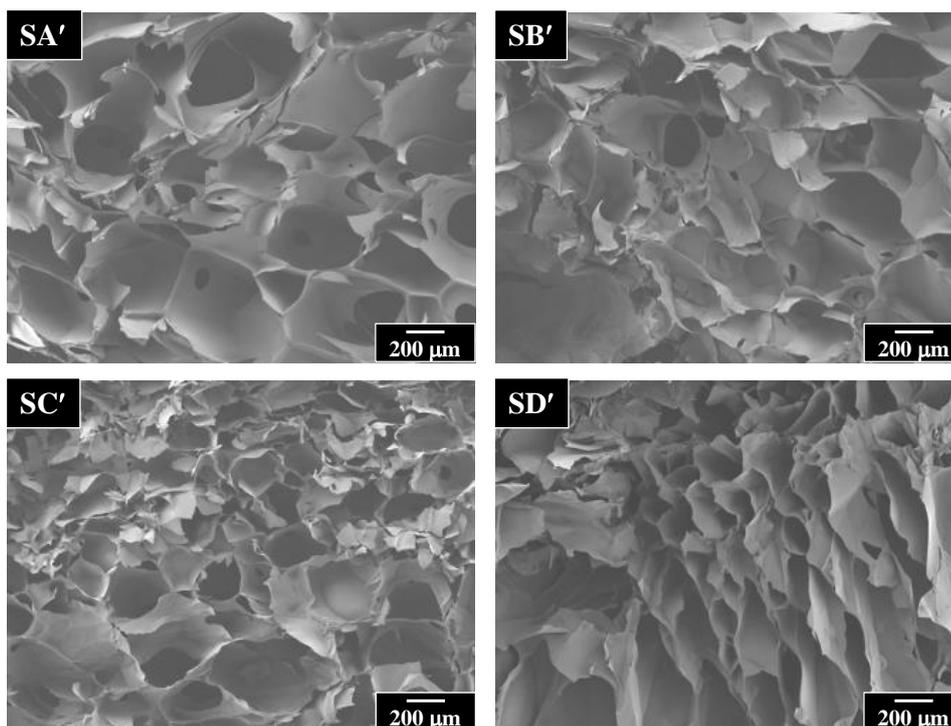


Fig. 5-12 SEM images of the inner part morphologies for SA', SB', SC',

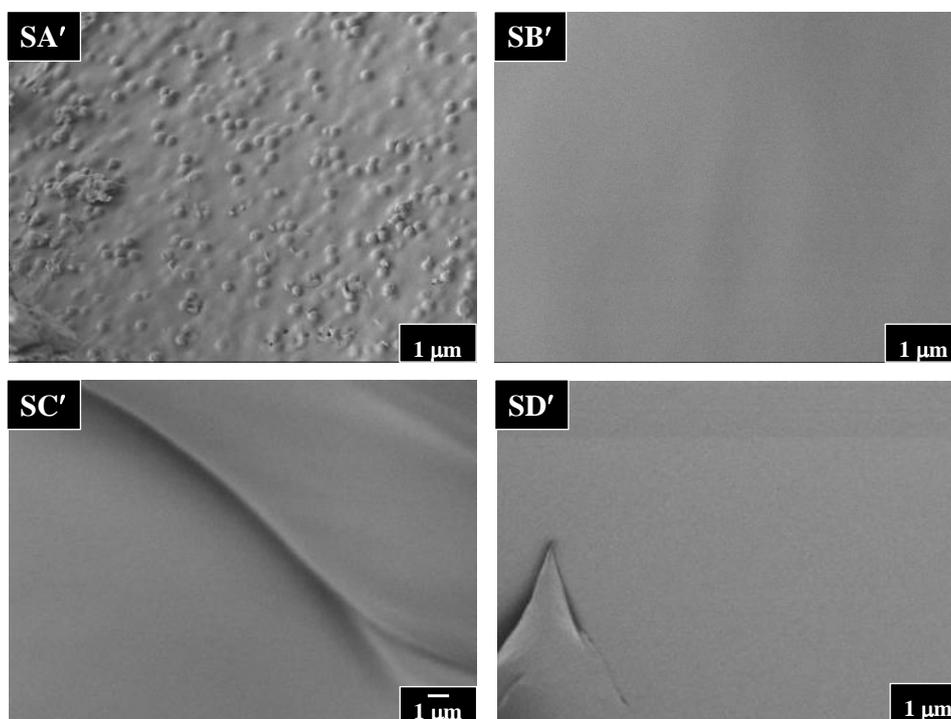


Fig. 5-13 SEM images of high magnification for SA', SB', SC',

Fig. 5-14 には, **SA'**<sub>850</sub> および **SB'**<sub>850</sub> の XRD パターンを示す。**SA'**<sub>850</sub> は  $2\theta = 25.8, 28.6, 29.6, 31.5, 32.0, 32.5, 32.9, 33.8, 39.4, 39.7^\circ$  に観測されたピークは JCPDS カード No. 35-180 の CA に, さらに,  $2\theta = 25.8, 26.5, 27.7, 28.6, 29.6, 31.0, 32.5, 34.3, 35.1, 35.5, 37.2, 37.8, 39.7, 41.0, 41.6, 43.8, 44.4^\circ$  に観測されたピークは, JCPDS カード No. 9-169 の  $\beta$ -TCP に帰属できた。**SB'**<sub>850</sub> は,  $2\theta = 25.8, 28.1, 28.9, 31.7, 32.2, 32.9, 34.0, 35.4, 37.3, 39.2, 39.8, 42.0, 43.8^\circ$  に観測されたピークは, JCPDS カード No. 9-432 の HA に帰属できた。このことから, **SA'**<sub>850</sub> は, CA と  $\beta$ -TCP の混合相, **SB'**<sub>850</sub> は HA 単一相であった。

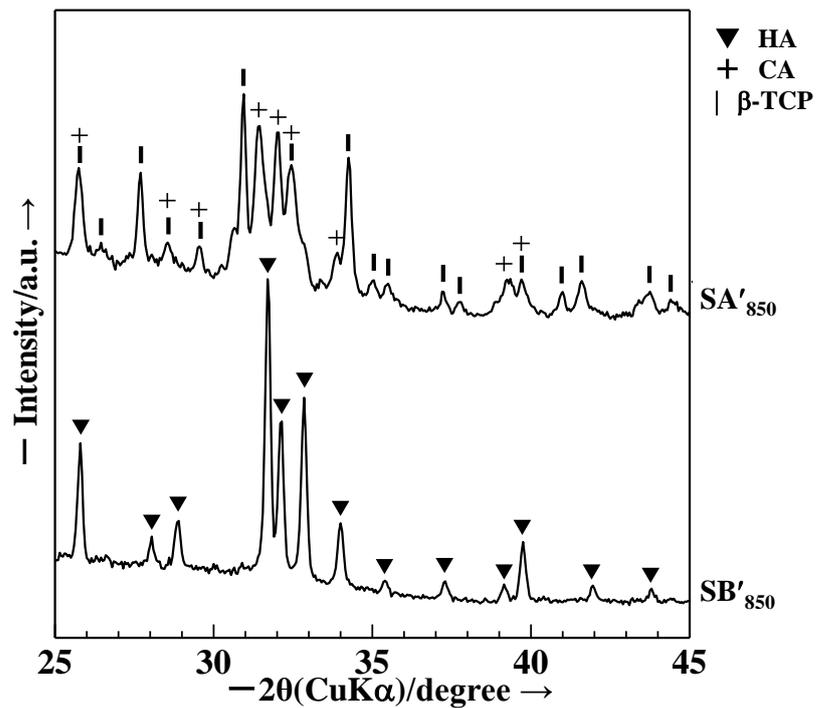


Fig. 5-14 XRD patterns of **SA'**<sub>850</sub> and **SB'**<sub>850</sub> powders after heat-treated **SA'** and **SB'** at 850°C for 30 min under air.

Fig. 5-15 には, **SA'**<sub>850</sub> および **SB'**<sub>850</sub> の FT-IR スペクトルを示す。**SA'**<sub>850</sub> は, 571, 602, 1038, 1091  $\text{cm}^{-1}$  にリン酸基の伸縮振動および変角振動, 631, 3575  $\text{cm}^{-1}$  に OH 基, 877, 1452, 1545

$\text{cm}^{-1}$ に  $\text{CO}_3^{2-}$ に帰属できるピークを観測した。**SB'**<sub>850</sub>は、572, 604, 1044, 1091  $\text{cm}^{-1}$ にリン酸基, 632, 3642  $\text{cm}^{-1}$ にOH基, 872, 1434  $\text{cm}^{-1}$ に  $\text{CO}_3^{2-}$ に帰属できるピークをそれぞれ観測した。

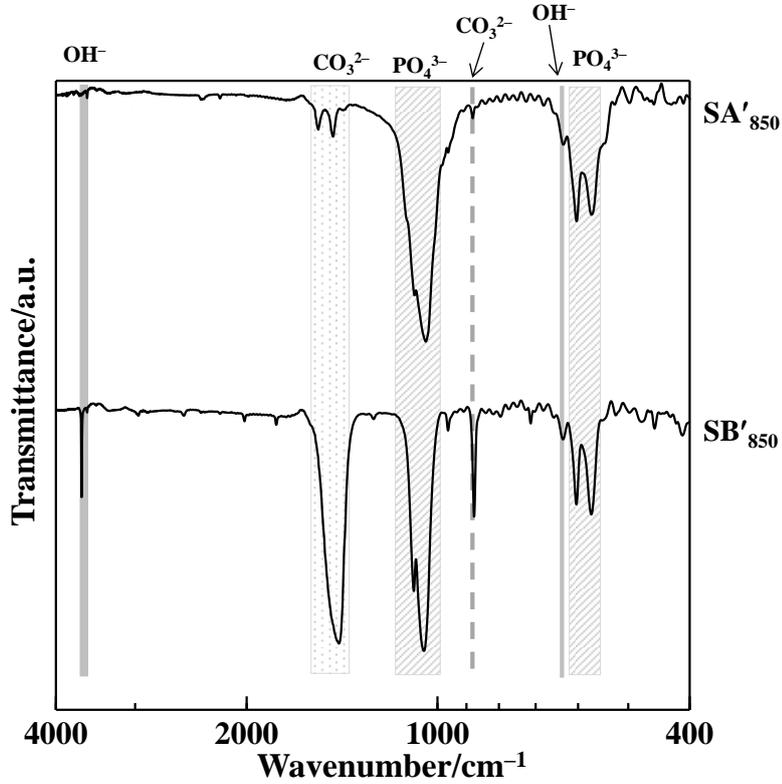


Fig. 5-15 FT-IR spectra of **SA'**<sub>850</sub> and **SB'**<sub>850</sub> powders after heat-treated **SA'** and **SB'** at 850°C for 30 min under air.

Table 5-4 には、**SA'**、**SB'**、**SC'**、**SD'**および **SA'**<sub>850</sub>、**SB'**<sub>850</sub> の元素分析結果を示す。

Table 5-4 Elemental analysis results of SA', SB', SC', SD', SA'<sub>850</sub>,

	C	H	N
	----- %		
<b>SA'</b>	43.51	7.39	20.67
<b>SB'</b>	37.49	5.86	12.95
<b>SC'</b>	34.35	6.34	16.33
<b>SD'</b>	44.86	7.11	16.33
<b>SA'<sub>850</sub></b>	0.75	0.07	0.09
<b>SB'<sub>850</sub></b>	4.99	0.34	0.12

## 5-4 考察

### 5-4.1 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 錯体水溶液と Arg の反応によるアパタイト粉末

本章での Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液の合成法は、2章3節で用いた Ca(OH)<sub>2</sub> と L-Asp を 30 分間超音波照射する調製方法と若干異なる。後の固相化のことも考慮し、Asp の Ca 錯体水溶液を 60°C で 1 時間加熱し、それに H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液を加えて Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液を得た。この水溶液も 2章3節と同様に無色透明溶液で、溶液の pH は 4.2 で、2章3節の 4.0 と同等なことから、Asp の Ca 錯体を加熱しても同じ Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液が得られたと考えられる。

Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液と Arg 水溶液との反応は、アンモニア水の時と同様に、後者を添加後すぐに白色結晶を析出した。室温での反応にもかかわらず、得られた生成物中の HA 含有率は 35% と高く、pH 調製剤を塩基性アミノ酸にすると、得られるアパタイトの組成変化が明らかとなった。得られたアパタイト粉末

中には Asp と Arg が含まれていた。この反応は、塩基の Arg 添加により Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体から Asp が脱離し、Ca<sup>2+</sup>と PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>が速やかに反応した脱配位子反応である。脱離した Asp が Arg と中和した塩がアパタイト表面に吸着したと考えられる。

#### 5-4.2 Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 固相化と Arg 水溶液との反応

固相化のための Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系水溶液は、Asp の Ca 錯体水溶液を 60°C で 1 時間加熱しゼラチンを加えて得た。この温度は、アミノ酸の分解温度とゼラチンの溶解度を考慮して決定した。ゼラチンを加えた溶液は冷蔵庫一晩静置して固化させた。ゼラチン濃度は、1~5 mass%の間で検討したが、形状を維持できる最低濃度であった 3 mass%で調製した。Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 水溶液にゼラチンを加えても結晶の析出等の変化は現れなかったことから、Ca-Asp-PO<sub>4</sub>ゲルとして固相化したと考えられる。Ca-Asp-PO<sub>4</sub>ゲルと Arg 水溶液の白化反応は、界面から固相方向に進行した。これは、Arg がゲル中に浸透して、Asp を中和して錯体から引き抜く脱配位子反応が起こり、Asp を失った Ca-Asp-PO<sub>4</sub> からリン酸カルシウム化合物が析出したことを示唆している。反応後、上層の Arg 水溶液のクロマトグラフィー分析で、Arg と Asp の両方が検出された。したがって、SA の反応溶液の質量増は、Asp が Arg 水溶液中に移動したためと考えられる。一方、SC 上の Arg 反応液の質量は減少し、SCゲル上部の pH が 6.4 から 9.3 に変化した。このことは、Arg が水溶液からゲル中に容易に浸透することを示しており、SAゲル中での反応と整合した。

#### 5-4.3 ゲルの凍結乾燥によるアパタイト/ゼラチン複合材形成

9時間の凍結乾燥で得られたサンプルは、いずれも多孔質であった。SEM像から測長した細孔径はいずれも 100~300 μm で、細胞の足場材として適当とされる 200~300 μm に近い[5-11]ことから、ゼラチン濃度 3 質量%でスキャフォールドに適した細孔径の複合材が得られた。観察された半球体の高さは、約 0.1~0.4 μm で、第4章で作成した ASC 法による CA 膜の網目隆起高さ 0.3 μm とほぼ同程度であった。したがって、

得られたアパタイト/ゼラチン複合材は、骨再生材料スキャフォールドとして有効と考えられる。

凍結乾燥したサンプルのXRDパターンは、CPに帰属できる明確なピークを示さなかった。しかし、Fig. 5-9に示すように、**SA'**にのみ半球状の析出物が観られ、これがアパタイト結晶と推定される。FT-IRでも、**SA'**は**SB'**よりもリン酸基に帰属できるピークが明確に観測された。析出物の組成を調べたところ、Fig.5-10に示すように、**SA'**<sub>850</sub>はCAが54%とβ-TCPが46%からなる混合相であり、**SA'**はCA/CDHAであると考えられる。CAを含むことは、Fig.5-11のCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>がOH置換型であることと一致する。一方、**SB'**<sub>850</sub>はHA単一相だったが、FT-IRおよび元素分析結果から、リン酸基に炭酸基が置換したCa<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(CO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub>と推定される。

## 5-5 結言

Ca-Asp-PO<sub>4</sub>三元系水溶液とArgの反応およびCa-Asp-PO<sub>4</sub>水溶液を固相化したゼラチンゲルとArg水溶液を固液相間で反応させたところ、以下のことが明らかとなった。

1. Ca-Asp-PO<sub>4</sub>三元系水溶液とArgの反応により、室温でHAを35%含有した結晶子サイズ15 nmのアパタイト粉末が得られた。この粉末はAspとArgを含んでいた。
2. Ca-Asp-PO<sub>4</sub>三元系水溶液はゼラチン濃度3 mass%で固相化できた。
3. Ca-Asp-PO<sub>4</sub>ゲルの上層に、非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸のArg水溶液を静置すると、ゲルと水溶液の界面からゲル内に向かって白色結晶が析出した。これは、Argによる脱配位子反応によるものである。
4. 結晶の析出したゲルは、凍結乾燥により細孔を有するアパタイト/ゼラチンコンポジットを与えた。
5. 得られたアパタイト/ゼラチンコンポジットは、18%のCA/CDHAを含んでいた。

6. アパタイト/ゼラチンコンポジットの細孔径は 100~300  $\mu\text{m}$  で、スキャフォールド材として細胞の増殖に適した大きさであった。
7. アパタイト/ゼラチンコンポジットには、表面に半球状のアパタイト結晶が多く析出し、細胞の仮足接着の足場として有効と考えられる。

このように、Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 溶液を固相化したゼラチンゲルと Arg 水溶液の反応により、ゲル内に自発的にアパタイトの結晶を析出させることができた。操作は極めて容易で、錯体の安定度定数を考慮して開発した Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 溶液の応用の有効性を示すことができた。骨形成や再石灰化に必要とされる非コラーゲンタンパク質の役割は未知である。しかし、Ca<sup>2+</sup>イオンやリン酸イオンの脱離・供給に関与しているのであれば、非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸と錯形成している可能性もあり、興味深い。さらに、作成したアパタイト/ゼラチンコンポジットが骨組織の再生にどのように寄与するか、含有しているアミノ酸効果と合わせて動物埋込実験を実施中である。

## 参考文献

- [5-1] Liu L, Chen R, Lin Y, Li C, Tian W, Li S. Comparison among four kinds of bone tissue engineering scaffold. *Key Eng Mater.* 2007;330-332:963-966.
- [5-2] Xue Q, Bie J, Wang SG. Cell affinity of bone-like apatite coating modified poly(L-lactide-co-glycolide). *Journal of Tissue Engineering and Reconstructive Surgery.* 2007;3:15-18.
- [5-3] Li L, Zhou X, Yongnian Y, Yunyu H, Renji Z, Wang SG. Porous morphology, porosity, mechanical properties of poly(alpha-hydroxy acid)-tricalcium phosphate composite scaffolds fabricated by low-temperature deposition. *J Biomed Mater Res A.* 2007;82:618-629.
- [5-4] Wiria FE, Chua CK, Leong KF, Quah ZY, Chandrasekaran M, Lee MW. Improved Biocomposite Development of poly(Vinyl Alcohol) / hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds fabrication using selective laser sintering. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008;19:989-996.
- [5-5] Simpson RL, Wiria FE, Amis AA, Chua CK, Leong KF, Hansen UN, Chandrasekaran M, Lee MW. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide) / hydroxylapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J Biomed Mater Res B.* 2008;84:17-25
- [5-6] Yang F, Cui WJ, Xiong Z, Liu L, Bei JZ, Wang SG. Poly(L,L-lactide-co-glycolide)/tricalcium phosphate composite scaffold and its

various changes during degradation in vitro. *Polymer degradation and stability*.

2006;91:3065-3073.

[5-7] Mochizuki C, Sasaki Y, Hara H, Sato M, Hayakawa T, Yang F, Hu X, Shen H, Wang SG.

Crystallinity control of apatite through Ca-EDTA complexes and porous composites

with PLGA. *J Biomed Mater Res B*. 2009;90B:290-301.

[5-8] Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Fukushima T, Yang F, Shen H, Wang SG, Sato M.

Influence of apatite crystallinity in porous PLGA/apatite composite scaffold on

cortical bone response. *J Hard Tissue Biology*. 2009;18:7-12.

[5-9] Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Yang F, Shen H, Wang SG, Sato M. In vivo

evaluation of composites of PLGA and apatite with two different levels of crystallinity.

*J Mater Sci: Mater Med*. 2010;21:251-258.

[5-10] Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair.

*European Cells and Materials*. 2006;11:43-56.

[5-11] Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment,

proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue

engineering. *Biomaterials*. 2010;31:461-466.

## 第6章 総括

本章では、本論文を総括し、アパタイトと再生医療材料の今後の展開の可能性について議論する。

### 6-1 Ca 錯体を経由したアパタイト合成

HA 粉末は、主に中和反応による湿式法で合成されている。本研究では、Ca 錯体を用いて、pH や濃度の逐次制御を要せずに、アパタイト粉末を短時間で合成できる方法を検討した。また、Ca 三元系錯体水溶液の同一条件下でのいくつかの反応で、得られるアパタイト粉末の組成が Ca 錯体の配位子に依存することを示した。キレート剤の EDTA を配位子とする錯体を用いたアパタイト合成の報告はいくつかある [6-1~6-3]。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ の物質質量に対して40倍の過酸化水素水を要し、 $\text{Na}^+$ が生成物中に取り込まれる。一方、本研究における  $\text{H}_4\text{edta}$  を配位子とした Ca 錯体を用いるアパタイト合成でも過酸化水素水を要したが、その量は  $\text{Ca}^{2+}$ の物質質量に対して12~25倍程度にできた。しかし、過酸化水素水を加熱する工程は、安全性に問題がある。また、加熱条件下でも Ca 充足型アパタイトが完全には生成しなかった事実から、EDTA 錯体の安定度定数が高過ぎ ( $\log K_1 > 10$ ) で、 $\text{Ca}^{2+}$ の供給量が不足していると推定した。一方、生成物は EDTA のアンモニウム塩を含んでおり、アパタイト生成に Ca 錯体の完全な酸化分解は不要なことも分かった。

そこで、より安定度定数が低く、EDTA の部分構造をもつ IDA の Ca 錯体 ( $\log K_1 = 2.6$ ) を利用した。IDA2 分子を含む Ca 錯体を単離し、その水溶液にリン酸を加えたところ、EDTA 錯体系と同様に、 $\text{Ca}^{2+}$ とリン酸の直接反応を防止できることが分かった。一方、規定量のアンモニアを加えると直ちに白色結晶が析出し、室温での反応にも関わらず過酸化水素は不要で、Ca 欠損型水酸アパタイト CDHA が得られた。なお、CDHA が生成した反応溶液の加熱によって、Ca 充足型水酸アパタイトに短時間で変化することも見出し、生

成物を選択できた。また、得られたアパタイト粉末は配位子の遊離 IDA を含むことも分かった。さらに、IDA は生分解性をもたないことから、Ca 錯体の配位子を IDA の構造異性体である酸性アミノ酸のアスパラギン酸 Asp で反応を試みた。その結果、Asp の Ca 錯体水溶液にリン酸を加えても  $\text{Ca}^{2+}$  と直接反応は起きず、安定な Ca-Asp- $\text{PO}_4$  三元系錯体水溶液を得ることができた。さらに、この三元系錯体水溶液に  $90^\circ\text{C}$  でアンモニアを加えたところ、Ca 充足型アパタイト結晶が速やかにかつ高収率で得られた。このように Ca 錯体の安定度定数に着目して設計したリン酸イオンを含む三元系 Ca 錯体水溶液からのアパタイト形成は、その均一水溶液に pH 調製剤を一度に加えることで可能だった。なお、Asp の Ca 錯体の安定度定数  $\log K_1$  は 1.6 で、室温の三元系錯体水溶液から配位子脱離で生成するアパタイトが、Ca 欠損型になるか、Ca 充足型になるかを決定する臨界領域であることを明らかにできた。また、いずれの生成アパタイトも、配位子を含んでいた。

## 6-2 水溶液スプレー（ASC）法によるアパタイト膜形成

均一な三元系錯体水溶液は、短時間のアパタイト合成に有効なことを示した。そこで、より安定度定数が低い炭酸を配位子とする Ca- $\text{CO}_3$ - $\text{PO}_4$  三元系錯体水溶液を調製し、アパタイト膜の形成を試みた。調製した溶液は、無色透明でコロイド粒子を含まなかった。この溶液は冷蔵保存すると、5 日間は安定で、5 日目毎に二酸化炭素を補充すると、結晶が析出しない状態を少なくとも 20 日間以上保てることを実証し、溶液中の二酸化炭素の分圧が重要なことが示唆された。このように、錯体の安定度がより低い ( $\log K_1 = 1.1$ ) 炭酸配位子でも、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{PO}_4^{3-}$  の直接反応を防止できることが分かった。そこで、先ず HA を溶解した水溶液スプレー（ASC）法を検討した。この方法に、上の Ca- $\text{CO}_3$ - $\text{PO}_4$  三元系錯体水溶液を適用して、アパタイト膜の形成を試みた。その結果、VOC を発生することなく、スプレー量で膜厚を容易に制御できる方法であることを明らかにした。

本法で形成したアパタイト膜が、特徴的な網目状構造をもつことは重要である。Ar 気流中 10 分間の熱処理でその形態に変化はなかったが、600°C で膜組成が変化した。形成膜に含まれる CO<sub>2</sub> や H<sub>2</sub>O は熱処理により脱離し、結晶崩壊による結晶子サイズの減少やせん断強度の増加に影響を及ぼした。スプレー量 5 mL の形成膜は、25 mL をスプレーした膜と比較して、膜厚が 1/10 になり、網目状の隆起部高さは 1/3 であった。このような形態の違いが細胞挙動にどのように影響するか調べたところ、隆起部高さが 0.3 μm 程度が、細胞増殖特性やオステオカルシン発現量に優れることが確認できた。また、形成膜の熱処理による効果を調べたところ、より溶解性の低い熱処理膜が細胞への初期付着が良好なことも分かった。アパタイトの表面形態、特に網目径や隆起高さに対する細胞挙動の報告はなく、アパタイトを含むスキャフォールドを作成する際の重要な指針になると考えられる。

### 6-3 骨再生用スキャフォールド

本研究は、2 種類の骨再生用スキャフォールドを提案した。いずれもアパタイトを混合した多孔質複合スキャフォールドで、マトリックスは PLGA(70/30) またはゼラチンである。前者の PLGA スキャフォールドの研究報告は比較的多い [6-4~6-6]。しかし、いずれも混合した市販 HA の溶解速度は遅く、PLGA の分解酸性生成物による pH 変化を緩和できない問題点があった。本研究では、Ca 錯体を経由する温和な条件下で合成した低結晶性アパタイトを混合した PLGA 多孔質複合スキャフォールドを調製し、in vitro と in vivo で試験した。その結果、高結晶性アパタイトを混合したスキャフォールドと比較して、低結晶性アパタイトを混合したスキャフォールドがより早期に骨再生することを実証し、低結晶性アパタイトを混合した骨組織再生用スキャフォールドの有効性を示した。このように、多孔質複合材の気孔率と混合アパタイトの溶解速度が骨再生に影響を与えることは、本研究において初めて示された [6-7]。これらのことから、PLGA/アパタイト骨組織再生用スキャフォールドは、

PLGA の気孔率と混合アパタイトの結晶性により、骨再生の速度が大きく異なり、適切なアパタイトとの組み合わせにより材料設計が可能であることを示した。

一方、PLGA/アパタイト多孔質複合材を作成するために、粒径の揃った塩を導入し、洗い流す必要がある。この際、混合した低結晶性アパタイトが溶解し、気孔率が96%の複合材は埋入時の強度が保てず、スキャフォールド自体が十分機能しない場合もあった。

そこで、新たな多孔質スキャフォールドを作製するために、Ca-Asp-PO<sub>4</sub> 三元系錯体水溶液をゼラチンで固相化することによって、析出物なく透明なゲルを得た。ゲル上に非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸の塩基性アミノ酸 Arg 水溶液を静置すると直ちに反応が始まり、固液界面から固相方向に白色結晶が析出した。この反応は、pH 制御の必要な中和反応や濃度調製を要する塩-塩反応では困難で、均一系の三元系 Ca 錯体の利用に固有な反応である。

また、反応したゲルの凍結乾燥により、ちょうど骨芽細胞の増殖に適している気孔径 200~300 μm [6-8] を持つ多孔質複合スキャフォールドを作製できた。このスキャフォールドには、非コラーゲンタンパク質構成アミノ酸と半球状アパタイト粒子が含まれており、骨再生材料として興味深く、既に動物実験に着手し、新たな局面で研究を展開している。このように、新規な複合化多孔質スキャフォールド作製法を提案しただけでなく、錯体を用いた固相反応の可能性を示した。

#### 6-4 これからの再生医療材料

生活の質（QOL）を維持する高性能な人工生体材料の開発は、高齢化社会において益々重要である。歩行機能や咀嚼機能の維持・回復は QOL の上位条件に上げられ、安価で安全な生体硬組織代替材料の開発が期待されている。本研究において、アパタイト形成分野でほとんど用いられることのなかった、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>イオ

ン共存下での Ca 錯体水溶液を用いて、いくつかのアパタイト粉末を合成する方法を確立できた。また、これら均一系三元系 Ca 錯体水溶液はスキャフォールドや膜形成への応用も可能で、骨形成や細胞挙動を良好にする条件も明確にできた。

骨のリモデリングには、破骨細胞と骨芽細胞の両方が関わることが知られている。また、複数のタンパク質の関与は特定されている [6-9] が、それらのタンパク質がどのような機構によって骨のリモデリングを促しているかは未だ明らかでない。骨のリモデリングには、原料のカルシウムイオンとリン酸イオンが、同時に順次供給される必要があり、リン酸とカルシウムイオンが共存する生体中の反応場において、アミノ酸やペプチドが配位子として同時に錯形成している可能性は十分予想できる。本研究は、石灰化を促す非コラーゲンタンパク質を構成するアミノ酸の Asp を配位子とする  $\text{Ca}^{2+}$  錯体が、リン酸と共存しても安定な均一水溶液を形成できることを明らかにし、さらに 25°C の低温で、同じく非コラーゲンタンパク質の構成アミノ酸である Arg との均一反応によって、Ca 充足型 HA の形成が可能であることを示した。今後、骨のリモデリング機構解明に際して、これらアミノ酸やペプチドを含む三元系錯体形成の可能性を探索することは、意義深いと考える。

このように、 $\text{PO}_4^{3-}$  イオン共存下での三元系 Ca 錯体は、さらなる材料創成だけでなく、硬組織再生の機構解明など、再生医療に貢献することが十分に期待できる。

**参考文献**

- [6-1] Toriyama M, Kawamoto Y, Suzuki T, Yokogawa Y, Nishizawa K, Nagae H. Synthesis of hydroapatite by an oxidative decomposition method of calcium chelate. *J Ceram Soc Jpn.* 1992;100:950-954.
- [6-2] Jia Y, Kanno Y. Hydroxyapatite coatings on Ti plate via chemical bath deposition. *Mater Sci Res Int.* 2003;9:149-153.
- [6-3] Yusufoglu Y, Akinc M. Deposition of carbonated hydroxyapatite (CO<sub>3</sub>HAp) on Poly(Methylmethacrylate) surface by decomposition of calcium-EDTA chelate. *J Am Ceram Soc.* 2008;91:3147-3153.
- [6-4] Wei G, Ma PX. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004;25:4749-4757.
- [6-5] Champa JA, Assad M, Ebraheim NA, Jayatissa AH. Dissolution behavior of biomimetic minerals on 3D PLGA scaffold. *Surface & Coatings Technology* 2006;200:6336-6339.
- [6-6] Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Cha Yong C, Kim BS. Accelerated bonelike apatite growth on porous polymer/ceramic composite scaffolds in vitro. *Tissue Engineering* 2006;12:2997-3006.
- [6-7] Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Amemiya T, Hirayama S, Yang F, Shen H, Wang SG, Hamada T, Sato M. Cortical bone response towards porous composites of PLGA and apatite prepared from calcium complexes. *J Hard Tissue Biol.* 2012;21:345-150.
- [6-8] Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31:461-466.
- [6-9] Hoang QQ, Sicheri F, Howard AJ, Yang DSC. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature.* 2003;425:977-980.

## 研究業績

## I. 審査付論文

1. 望月千尋, 原広樹, 早川徹, 佐藤光史, 「水溶液スプレー法によるTi表面へのリン酸カルシウムコーティング1」, 塗装工学 2006;**41**:200-209
2. Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Yang F, Shen H, Wang SG, Sato M. Effect of thin carbonate-containing apatite (CA) coating of titanium fiber mesh on trabecular bone response. J Mater Sci: Mater Med 2007;19:2087-2096.
3. Mochizuki C, Sasaki Y, Hara H, Sato M, Hayakawa T, Yang F, Hu X, Shen H, Wang SG. Crystallinity Control of Apatite Through Ca-EDTA Complexes and Porous Composites With PLGA. J Biomed Mater Res B: Appl Biomater 2009;90B:290-301.
4. Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Fukushima T, Yang F, Shen H, Wang SG, Sato M. Influence of apatite crystallinity in porous PLGA/Apatite composite scaffold on cortical bone response. J Hard Tissue Biology 2009;18:7-12.
5. Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Yang F, Shen H, Wang SG, Sato M. In vivo evaluation of composites of PLGA and apatite with two different levels of crystallinity. J Mater Sci: Mater Med 2010;21:251-258.
6. Zheng L, Yang F, Hu X, Shen H, Mochizuki C, Sato M, Wang SG, Zhang Y. 3-Dimensional porous composite scaffolds of PLGA-calcium phosphate compound for tooth-tissue engineering. Biomaterials 2011;32:7053-7059.
7. Hayakawa T, Mochizuki C, Hara H, Amemiya T, Hirayama S, Yang F, Shen H, Wang SG, Hamada Y, Sato M. Cortical Bone Response Towards Porous Composites of PLGA and Apatite Prepared from Calcium Complexes. J Hard Tissue Biology 2012;21:345-350.
8. Mochizuki C, Hara C, Takano I, Hayakawa T, Sato M. Application of carbonated apatite coating on a Ti substrate by aqueous spray method. Mater Sci Eng C 2013;33:951-958.
9. Mochizuki C, Hara H, Oya K, Aoki S, Hayakawa T, Fujie H, Sato M. Behaviors of MC3T3-E1 cells on carbonated apatite films, with a characteristic network structure, fabricated on a titanium plate by aqueous spray coating. Mater Sci Eng C, accepted for publication.

## II. その他の研究論文(著書、学術雑誌,研究機関への研究報告,解説など)

1. 望月千尋, 佐藤光史, 「錯体とコーティング技術 – 塗装工学と配位工学の接点を求めて –」 塗装

工学 2006;41:106-110.

2. 望月千尋, 佐藤光史, 早川徹, 「アパタイト薄膜形成と粉体合成へのカルシウム錯体の応用」, PHOSHORUS LETTER 2010; 69:27-36.
3. 望月千尋, 佐藤光史, 「硬組織再生用スキャフォールドとアパタイト薄膜付与材料の形成と応用」, 材料の科学と工学 2012;49:256-259.

### Ⅲ. 口頭研究発表

#### 国外

1. Chihiro Mochizuki, Hiroki Hara, Mitsunobu Sato. "Fabrication of HAp film by spray method of its aqueous solution". PACIFICHEM2005, Hawaii (2005. 12. 17).
2. Chihiro Mochizuki, Mitsunobu Sato. "Synthesis of Hydroxyapatite with lower crystallinity". 5<sup>th</sup> International Symposium on Advanced Technology, Southern Taiwan University of Technology (2006. 11. 9).
3. Chihiro Mochizuki, Hirokazu Kato, Hiroki Hara, Tohru Hayakawa and Mitsunobu Sato. "Evaluation of composite scaffolds of PLGA and calcium phosphate compounds with controlled crystallinity via Ca complexes". 14<sup>th</sup> The Society of Pure and Applied Coordination Chemistry-CSJ Symposium, National Taiwan University (2007. 12. 21).
4. Hirokazu Kato, Chihiro Mochizuki, Hiroki Hara, Tohru Hayakawa, Mitsunobu Sato. "Syntheses of hydroxyapatite and calcium deficient hydroxyapatite with lower crystallinity via a Ca-IDA complex for PLGA composites". 2<sup>nd</sup> International congress on ceramics, Verona (2008. 6. 30).
5. Chihiro Mochizuki, Hirokazu Kato, Hiroki Hara, Tohru Hayakawa, Mitsunobu Sato. "In vitro biocompatibility of crystallinity-controlled apatite/PLGA composite". 2<sup>nd</sup> International congress on ceramics, Verona (2008. 6. 30).
6. Hirokazu Kato, Chihiro Mochizuki, Hiroki Hara, Tohru Hayakawa, and Mitsunobu Sato. "Reaction route to hydroxyapatite from a Ca complex of L-Asp and phosphoric acid in an aqueous medium". 16<sup>th</sup> The Society of Pure and Applied Coordination Chemistry-CSJ Symposium, Liaocheng (2009. 10. 28-29).
7. Chihiro Mochizuki, Hirokazu Kato, Hiroki Hara, Tohru Hayakawa, and Mitsunobu Sato. "Crystallinity-controlled apatites via a Ca complex of iminodiacetic acid". 16<sup>th</sup> The Society of Pure and Applied Coordination Chemistry-CSJ Symposium, Liaocheng (2009. 10. 28-29).
8. Chihiro Mochizuki, Tohru Hayakawa, Sheng-Guo Wang, and Mitsunobu Sato. "In vitro examination of apatite/PLGA composite including low crystallinity apatites

prepared from Ca complexes of IDA and Asp". 18<sup>th</sup> The Society of Pure and Applied Coordination Chemistry-CSJ Symposium, Whistler (2011. 8. 5).

9. Chihiro Mochizuki, Kei Oya, Shun Aoki, Tohru Hayakawa, Ichiro Takano, Hiromichi Fujie, Mitsunobu Sato. "Behavior of osteoblast-like cells toward the apatite coating films formed on Ti substrate by the aqueous solution spray method". The 11<sup>th</sup> international Symposium on Advanced technology, Tokyo (2012.10.30).

#### 国内

1. 望月千尋, 原広樹, 佐藤光史, 早川徹, 「水溶液スプレー法による Ti 表面への HA コーティング」, 第 21 回塗料・塗装研究発表会, 成蹊大学 (2006. 3. 10).
2. 望月千尋, 原広樹, 佐藤光史, 高橋健一, 早川徹, 「水溶液スプレー法による Ti 表面へのリン酸カルシウム厚膜コーティング」, 第 22 回塗料・塗装研究発表会, 工学院大学 (2007. 3. 9).
3. 望月千尋, 笹木雄司, 原広樹, 早川徹, 佐藤光史, 「結晶性の異なるアパタイトを導入したスキャフォールドの in vitro での分解および CP 生成挙動」, 無機マテリアル学会 第 115 回学術講演会, 岩手大学 (2007. 10. 25).
4. 早川徹, 高橋健一, 原広樹, 望月千尋, 吉成正雄, 佐藤光史, 根本君也, 「分子プレカースー法によるチタン基板上へのアパタイト薄膜形成」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 東京大学 (2008. 11. 17-18).
5. 早川徹, 望月千尋, 原広樹, 佐藤光史, 「EDTA/Ca 錯体を用いた結晶性の異なるアパタイト合成およびその PLGA 複合体の骨適合性」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 京都 (2009. 11. 16-17).
6. 望月千尋・原田悠・佐藤光史, 「アスパラギン酸の Ca 錯体を經由するアパタイトの低温合成と生成物の反応時間依存性」, 日本化学会 第 91 春季年会, 神奈川大学 (2011. 3. 29).
7. 早川徹, 望月千尋, 原広樹, 佐藤光史, 「Ca 錯体から合成したアパタイトと PLGA との多孔質複合体の骨形成について」, 第 21 回硬組織再生生物学会学術大会 愛知 (2012. 8. 25).

#### IV. 学会（委員会関係も含む）および社会における活動状況等

2000年～現在 日本化学会

2004年～現在 表面技術協会

2007年～現在 無機マテリアル学会

#### V. その他の業績（特許・資格・賞罰も含む）

2006. 3. 10 第 21 回塗料・塗装研究発表会 ; 研究発表優秀賞

2007. 12. 21 The 16<sup>th</sup> International Symposium of Pure and Applied Coordination Chemistry ; Poster Award

## 謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、多くのご指導とご支援を賜りました、指導教員である工学院大学 基礎・教養教育部門 佐藤光史教授に深く感謝いたします。時に応じて、厳しくご指導いただいたこと、また、励まして下さったこと、私自身の至らなさを実感することができたことは、今後の努力の糧とさせていただきます。本研究を遂行するにあたり、多岐にわたりご指導いただき、辛抱強く見守って下さった鶴見大学歯学部歯科理工学講座 早川徹教授、さらに本論文作成にあたり、審査委員としてご助言いただいた、工学院大学 工学部 環境エネルギー化学科の木村雄二教授、大倉利典教授、工学院大学名誉教授・法政大学客員教授の門間英毅教授に深く感謝いたします。

XPS 測定ならびにスクラッチ試験を行うにあたり、ご指導、ご支援いただきました工学院大学 工学部 電気システム工学科 鷹野一郎教授、細胞培養試験を行うにあたり、ご指導賜りました首都大学東京 藤江裕道教授、東海大学 大冢溪博士ならびに SMBC でご支援いただいた方々、また、凍結乾燥機の使用にあたり、ご支援いただきました工学院大学 工学部 応用化学科 菅原康里准教授に感謝いたします。

本研究生生活において、的確なアドバイスやご支援をしてくださった総合研究所 ポストドクターの永井裕己博士、配位工学研究室 客員研究員 株式会社 TFTECH の原広樹社長、そして多くの配位工学研究室の修了生、卒業生、学生に深く感謝いたします。楽しい研究生生活を送れたのは皆様方のおかげです。

また、本論文はここにお名前を記載させていただいた以上の方々にご支援いただきましたことに深く感謝し、皆様方のさらなるご活躍をお祈りしております。

最後に、これまで自分の思う道を我儘に進むことに対し、温かくそして辛抱強く支援してくれた両親と妹、望月勲、望月ゆう子、森ひかる、そして夫である清野秀岳博士に対して深い感謝の意を表して謝辞といたします。