

図 5. 20℃において、未処理の金基板を 10 ml のエタノール中に放置して共振周波数を安定化させた後に、1 ml のエタノールを新たに加えた場合の周波数の変化。以下の実験では 1 ml のエタノール中に粒子を分散させて加えるが、媒体であるエタノールの添加による共振周波数変化はほぼ無視できることが確認できた。

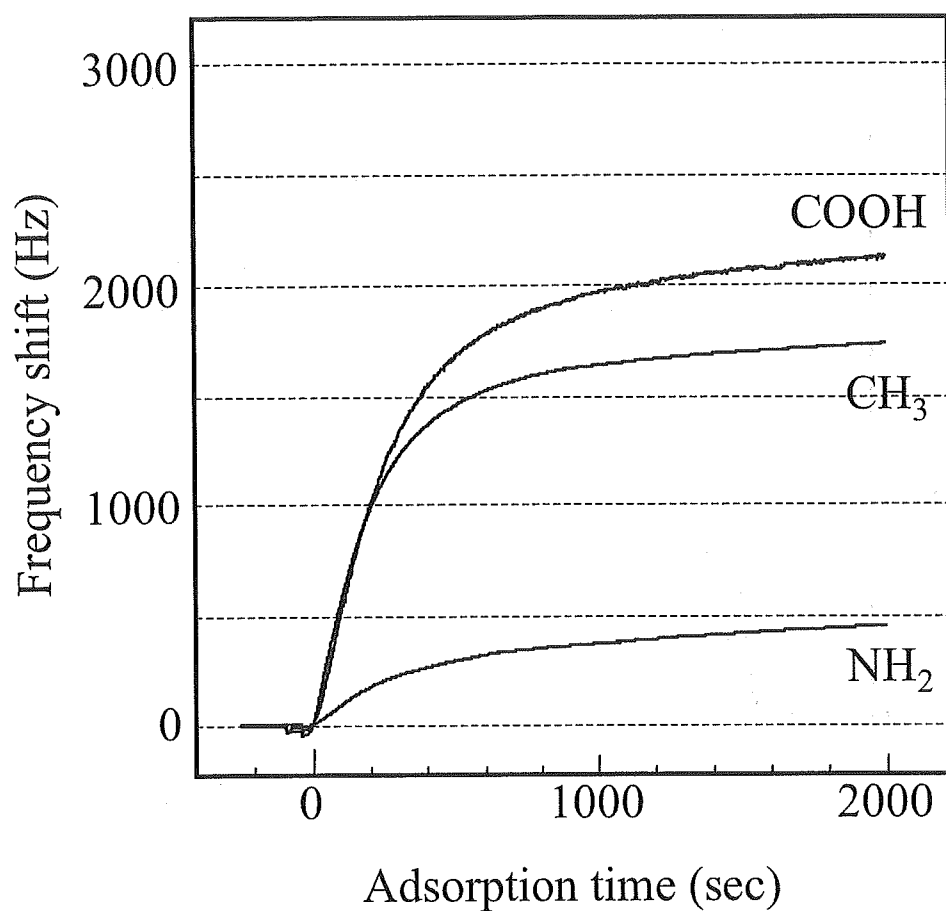


図 6. 各種官能基を導入した基板へのロッド状 HAp ナノ結晶の吸着挙動 (HAp 濃度, 0.5 wt%; 20 °C)。アミノ基<メチル基<カルボキシル基の順に吸着量および吸着速度が増加していることが分かる。これは、ロッド状結晶 *a* 面に存在するカルシウムイオンから構成されるプラス電荷のサイトに起因することと考えられる。また、メチル基への吸着は、HAp ナノ結晶表面に吸着したエタノールとの疎水性相互作用によるものと考えられる。

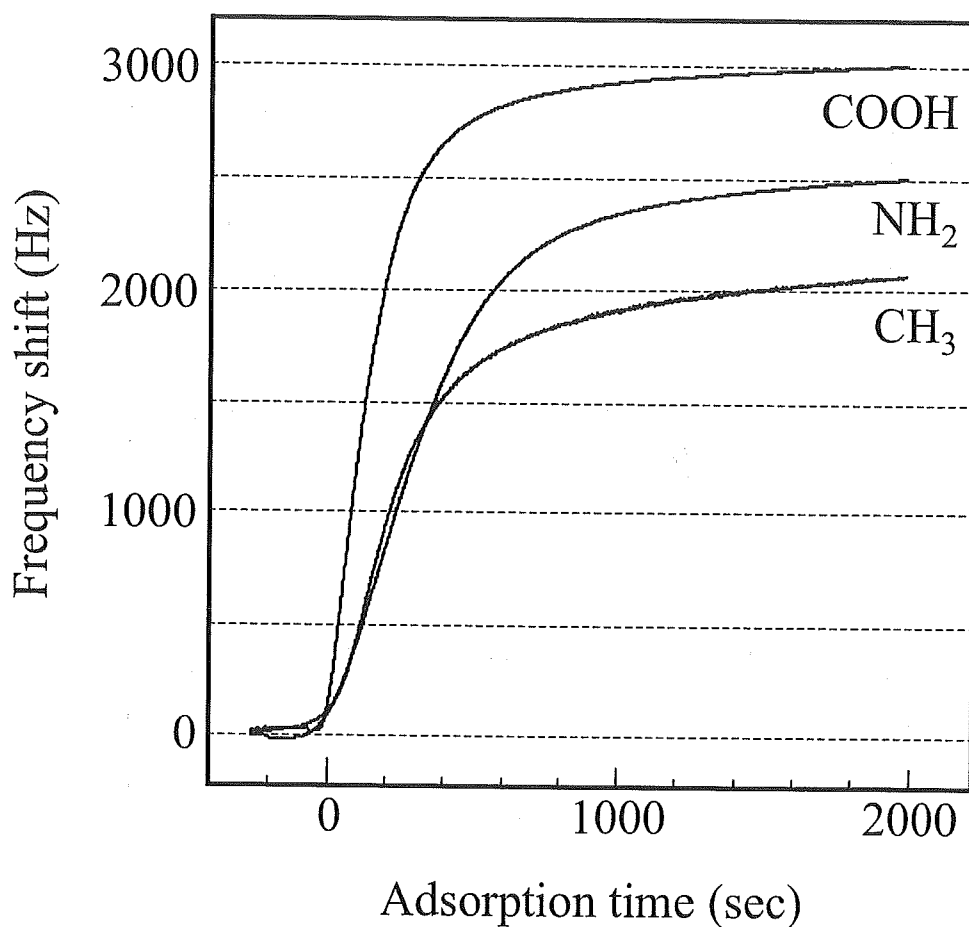


図7. 各種官能基を導入した基板への球状 HAp ナノ結晶の吸着挙動 (HAp 濃度, 0.5 wt%; 20°C)。それぞれの官能基への吸着量は、ロッド状 HAp ナノ結晶と比較して球状 HAp ナノ結晶は増加しており、また、メチル基<アミノ基<カルボキシル基の順に吸着量が増加していることが分かる。これは、ロッド状結晶と比較して不定形である球状 HAp 結晶が明確な結晶面を持たないことに起因することと考えられる。つまり、HAp 結晶間のイオンの反発が抑制され、より密に基板表面にパッキングできるためであると考えられる。

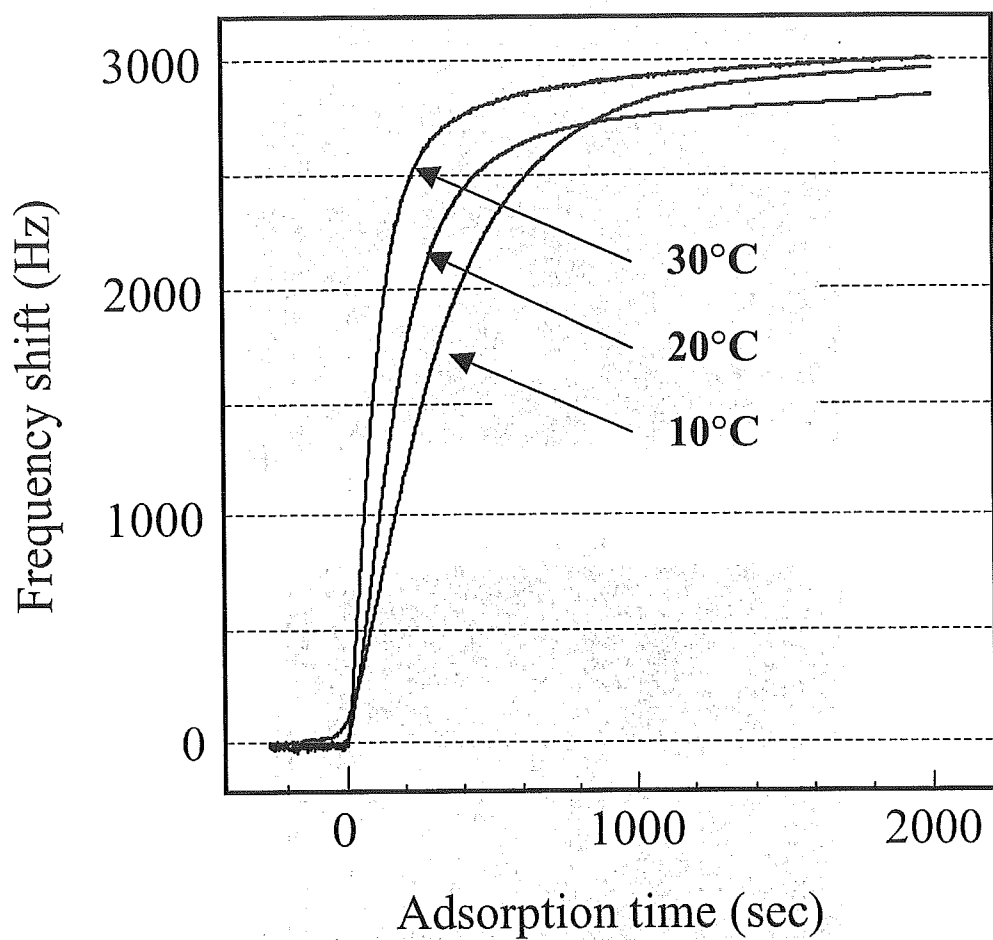


図 8. カルボキシル基を導入した基板へのロッド状 HAp ナノ結晶の吸着挙動を温度を変化させて測定した結果 (HAp 濃度, 0.5 wt%)。最終的な吸着量はほぼ変化が無かったが、測定温度の上昇によって吸着速度が増加した。これは、HAp ナノ結晶表面に吸着したエタノールが温度の上昇とともに脱着することで、エタノール分子による静電遮蔽効果が弱まったものと考えられる。

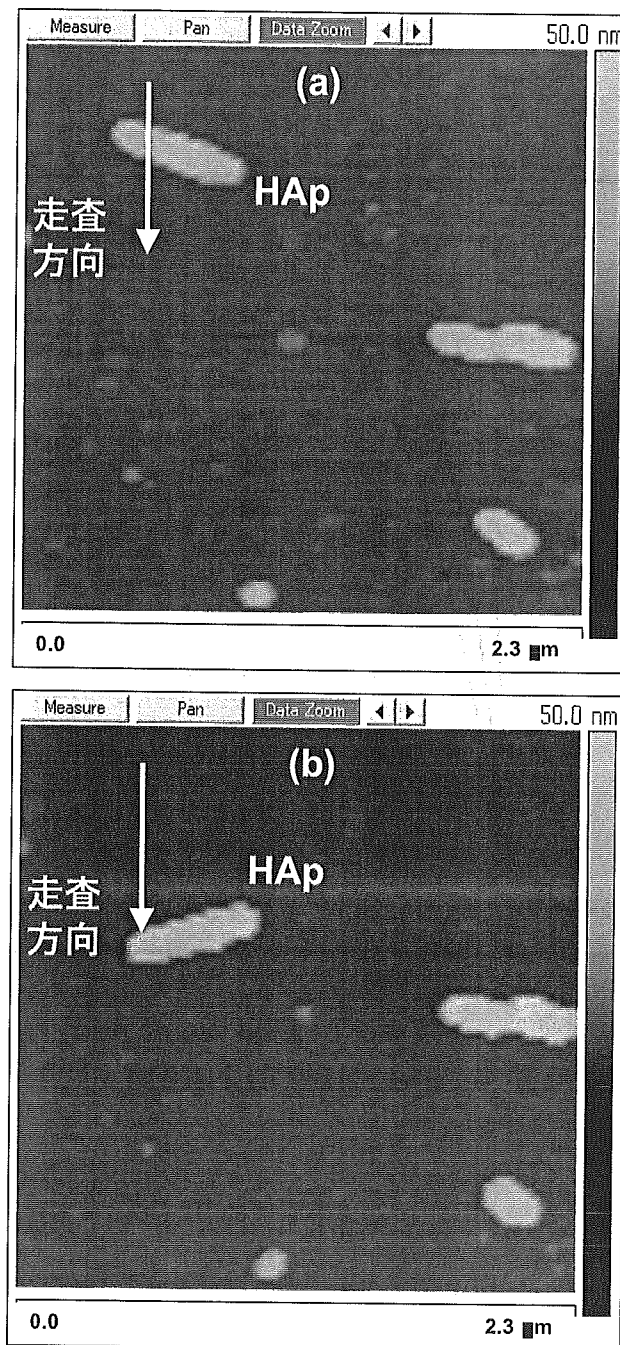


図 9. 原子間力顕微鏡 (AFM) のカンチレバーにより走査する前後の AFM 像。カンチレバーに加える力が、HAp/基板間の結合強度よりも弱い場合、HAp ナノ結晶は移動しないが、強い場合には移動する。この際にカンチレバーに加えた力を結合強度として測定した。

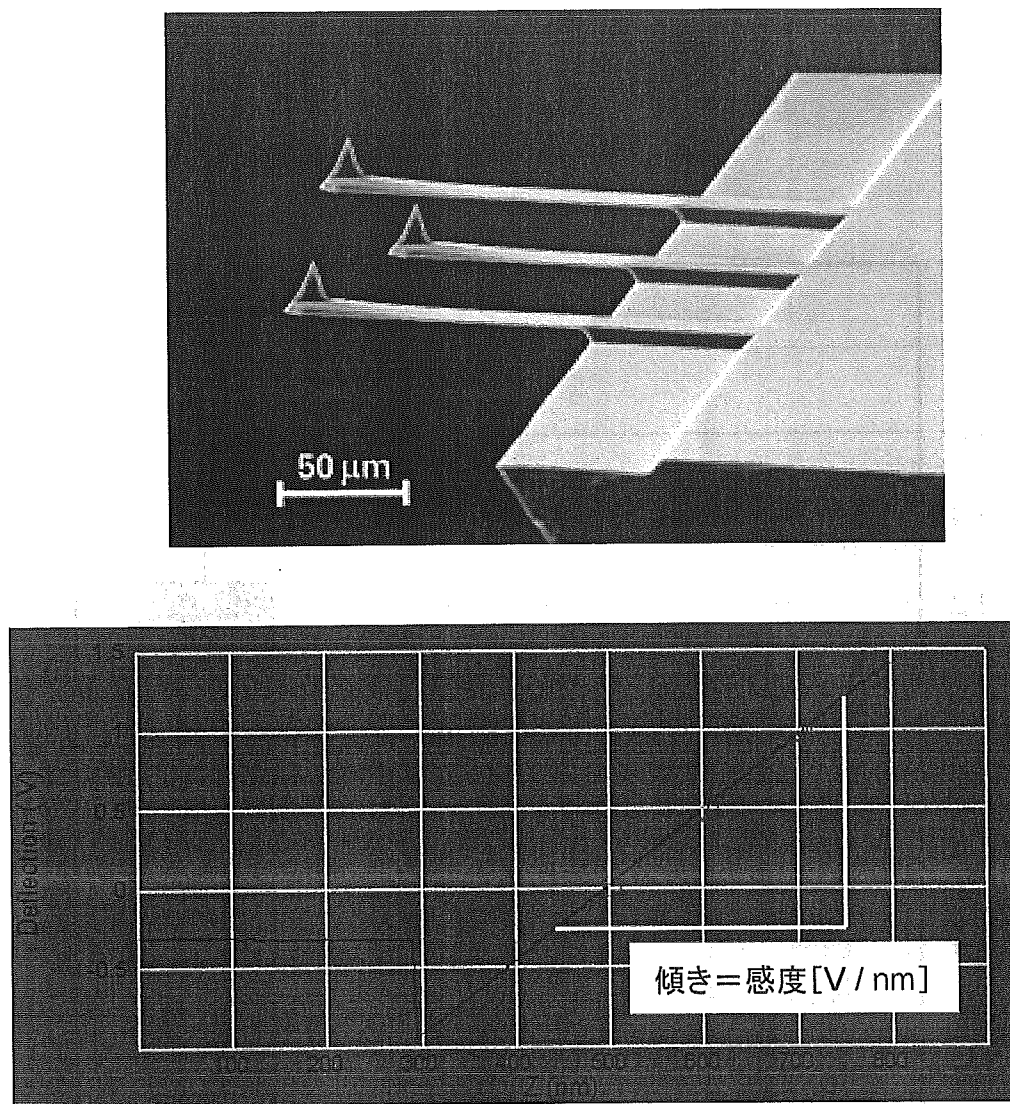


図 10. 本研究で使用したカンチレバーの走査型電子顕微鏡像とフォースカーブ。フォースカーブから、傾き $dZ/dD = 211.6 \times 10^{-9} \text{ m/V}$ であり、カンチレバーに加わる力は次式で得られる：

$$\begin{aligned}
 F [\text{N}] &= k [\text{N/m}] \cdot d [\text{m}] \\
 &= k [\text{N/m}] \cdot dZ/dD [\text{m/V}] \cdot D [\text{V}]
 \end{aligned}$$

ここで、

k , バネ定数 $[\text{N/m}]$

Z , 高さ方向の変位 $[\text{m}]$

D , レーザ検出器から求めたたわみ変位 $[\text{V}]$

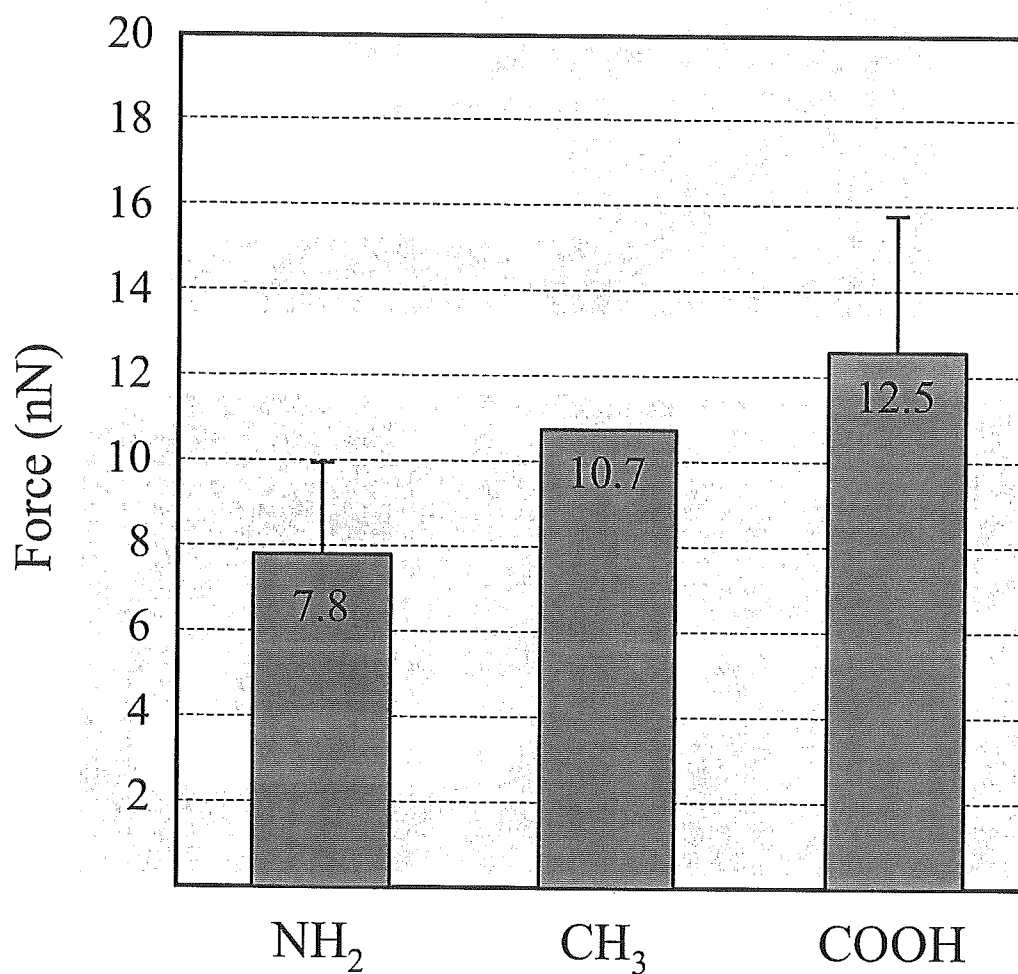


図 11. 各種官能基を導入した基板表面とロッド状 HAp ナノ結晶との結合強度。アミノ基<メチル基<カルボキシル基の順に結合強度が若干増加していることが分かる。これは、ロッド状結晶 *a* 面に存在するカルシウムイオンから構成されるプラス電荷のサイトに起因することと考えられる。また、メチル基への吸着は、HAp ナノ結晶表面に吸着したエタノールとの疎水性相互作用によるものと考えられる。

分担研究報告書

アパタイトナノコーティングステントの創出

分担研究者 宮武 邦夫（国立病院機構大阪南医療センター・院長）

研究要旨

ステント表面への早期内皮細胞被覆を目的として、ステント基材として用いられるステンレス（SUS316L）へのハイドロキシアパタイト（HAp）ナノコーティングを行った。共有結合を介して HAp ナノ結晶をステンレス表面に強固にコーティングさせるために、まず、ステンレス表面へのアルコキシシリル基含有ポリマーの導入（グラフト処理）を行った。グラフト処理を行ったステンレス表面に高分散性 HAp ナノ結晶をコーティングすることで、HAp ナノ結晶をステンレス表面に単分散で結合させることに成功し、またその細胞接着性は未処理のステンレスと比較して有意に高いことが確認できた。さらに、同様の手法を市販のステンレス製ステントに対して行うことで、HAp ナノコーティングステントを創出することができた。

A. 研究目的

本研究の目的は、生体親和性の高いハイドロキシアパタイト（HAp）をステント基材表面に共有結合を介して有機的に結合させた新規な生体親和性ステントの創出である。

HAp は生体親和性に優れた材料であることが知られており、人工骨や歯科用インプラントなどの硬組織用バイオマテリアルの表面改質のためのコーティング剤としても用いられている。金属材料表面への HAp コーティング法として、生体模倣反応、プラズマスプレー法、エレクトロフォレティック・デポジションなどが提起されている。しかし、これらの方法により得られる HAp は、生体中での分解・吸収性が高いアモルファス体であり、また、HAp—金属間の結合は弱いことが指摘されている。このため、HAp コーティングの後、800℃以上の高温において熱処理を行うこと

で HAp の結晶性、および HAp—金属間の密着性を向上させているが、この際、金属基板および HAp の一部が熱処理により劣化する。例えば、一般的な生体用ステンレス（SUS316L）の場合、500～900℃の熱処理を行うことで、クロム炭化物などの化合物が結晶粒間に析出するため機械的強度が低下することや、金属が触媒となり HAp の一部が分解することが報告されている。

一方、我々が提起する新規な HAp コーティング方法論は、生体内での分解性および吸収性の低い HAp 結晶（焼成体）をあらかじめ調製しておき、それを基材表面に化学的に結合させるものである。本方法論を内シャント不全の治療に用いるステントに適用し、HAp を強固にコーティングしたステントを創出することで、ステントの機械的物性を低下させることなく、ステント表面に細胞接着性を付与できる。つまり、ステント表面に

内皮細胞を早期に被覆でき、自己血管内シャントの長期維持が可能となると考えられる。

今回の検討では、ステント基材として一般的なステンレス (SUS316L) を用いた。ステント基材と HAp 結晶とを共有結合を介して有機的に結合させるために、アルコキシシリル基を有するポリマーを用いてグラフト処理することで HAp と共有結合可能な官能基を導入した。また、前年度の研究により創出した高分散性 HAp 結晶を用いてステンレス表面への HAp ナノコーティングを行い、その細胞接着性について検討した。さらに、実際にステント表面への HAp ナノコーティングについても同様に検討を行った。

B. 研究方法

1. 試薬

本研究で基材として用いたステンレス (SUS316L) は以下の元素組成を持つものである : C, 0.02%; Ni, 12.12%; Cr, 17.2%; Si, 0.48%; Mn, 1.39%; P, 0.33%; S, 0.24%; Fe, balance. γ -methacryloxypropyl triethoxysilane (MPTS) は信越化学工業株式会社から提供されたものを使用した。融着防止助剤として用いたポリアクリル酸 (PAA ; 重量平均分子量 12,000) および 3-mercaptopropyltrimethoxysilane はそれぞれシグマ・アルドリッチ社製のものを使用した。その他の化学試薬はナカライテスク (株) 製のものを用いた。

2. ステンレス表面のグラフト処理

ステンレス基材をアセトン中に浸漬し、超音波洗浄を行った。洗浄後のステンレスを濃硝酸中に室温で 30 分浸漬し、純水で洗浄することで表面の不動態を安定化させた。

3-mercaptopropyltrimethoxysilane を溶解させたエタノール中にステンレスを 3 時間浸漬し、エタノールで洗浄後に 110℃において 1 時間熱処理を行うことでステンレス表面にチオール基を導入した。同ステンレスを用い、以下の手順に従ってグラフト処理を行った。まず、100 ml のフラスコ中にステンレスを静置し、媒体として用いたトルエンを注入し、70℃において窒素置換を行った。その後、モノマーである MPTS を注入し、ラジカル開始剤である 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN) を溶解したトルエンを注入することでグラフト重合を開始させた。グラフト重合は 70℃において 2 時間行い、その後、エタノールで洗浄を行った。

3. 高分散性ナノ HAp 結晶の調製

まず、以下に示すエマルション法により低結晶 HAp を得た。ペンタエチレングリコールモノドデシルエーテル 0.5 g を含有したドデカン 40 mL を調製した後、Ca(OH)₂ 水懸濁液 (2.5 M) を 10 mL 添加し、室温あるいは 80℃で攪拌した。所定の温度において十分に攪拌後、水/オイル (W/O) 溶液に 1.5 M の KH₂PO₄ 水溶液を 10 mL 添加し、室温にて 24 時間反応させた。得られた反応生成物は遠心分離により分離・洗浄した。

得られた低結晶性 HAp を融着防止剤存在下において焼成することで高分散性 HAp ナノ結晶を調製した。この際、融着防止剤として用いた Ca(OH)₂ と HAp とを混合する際に、融着防止助剤として PAA を添加した。具体的な手順は以下の通りである。まず、上記のエマルション法により調製した HAp 1.0 g を含む懸濁水中に 35% PAA 水溶液 (pH, 10) 2.9 g を加え、超音波 (20 kHz;

35W) を照射することで HAp 粒子を単分散させた。その HAp 分散水中に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を約 1.0 g 含む $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和水溶液 600 mL を添加し、得られた沈殿物を濾過により回収、60°C において乾燥した。その後、800°C にて 1 時間仮焼を行った。この際の昇温速度は 10°C/min とした。仮焼後に得られたサンプルを 10 mM 硝酸アンモニウム水溶液中に添加し、pH が中性付近になるまで蒸留水で遠心洗浄を行い、最終的にエタノールに再分散させた。

4. HAp ナノコーティング

調製した HAp ナノ結晶をエタノールに分散させ、その分散液中にグラフト処理を行ったステンレスを浸漬した。1 時間後、ステンレスを取りだし、エタノールを用いて洗浄を行った後、減圧条件下 80°C において 2 時間、HAp 表面に存在する水酸基とステンレス表面に導入したアルコキシシリル基の固相縮合反応を行った。反応後、ステンレス表面に結合していない HAp ナノ結晶を除去するために、超音波洗浄機 (20 kHz; 35W) を用いて洗浄した。

5. 細胞接着性試験

HAp ナノコーティングステンレスを 24 ウェルマルチプレート上に静置し、EGM-2 中で培養したヒト臍帯静脈血管内皮細胞を 1×10^5 個播種し、37°C において 24 時間インキュベートした。その後、リン酸緩衝液で洗浄し、ステンレス表面に接着した細胞を走査型電子顕微鏡で観察した。コントロールとして未処理のステンレスを用い、上記と同様に細胞接着試験を行った。

C. 研究結果および考察

1. ステンレスのグラフト処理

ステンレス表面への HAp コーティングを共有結合を介して行うために、ステンレス表面の前処理によるアルコキシシリル基の導入を試みた (図 1)。アルコキシシリル基は HAp 表面の水酸基と化学反応し、共有結合を形成することが知られている。ステンレス表面にアルコキシシリル基を導入する方法として、アルコキシシリル基含有ポリマーのグラフト化が挙げられる。ステンレス基板表面からグラフト重合を開始させるために、まず、3-mercaptopropyltrimethoxysilane による表面処理 (以下、前処理) を行った。末端に存在するチオール基の高い連鎖移動能および再重合開始能を利用しグラフト重合を行う。ここで、前年度に行った PET 表面へのグラフト処理では、重合時間の増加とともに MPTS ポリマーのグラフト率は増加したが、重合 2 時間ではほぼ最大値を示し、その後重合時間を変化させても一定値であった。そこで本研究では、重合 2 時間で作製したものをを用いた。

まず、グラフト処理後のステンレス表面に MPTS ポリマーが導入されていることを確認するために、XPS 測定を行った。XPS は深さ数十 Å の表面測定が可能な元素分析法である。表 1 には、未処理のステンレス表面、前処理後のステンレス表面、グラフト処理後のステンレス表面の XPS 測定結果を示した。未処理 PET 表面には、ステンレスを構成する金属に由来する元素が多く観察された。炭素に起因するピークも観察されているが、コンタミネーションに起因するものと考えられる。さらに、Si 元素がほとんど存在しないことが確認できる。前処理後において Si 元素および S 元素の割合は増加しており、チオール基が表面に導入されていることが確認できる。さ

らに、グラフト処理後において、ステンレスを構成する金属に起因するピークは観察されず、MPTS ポリマーを構成する C 元素および Si 元素の割合が大きく増加した。

図 2 には、溶液重合により調製した MPTS ポリマーおよびグラフト処理後のステンレス表面の赤外吸収スペクトルを示した。ここで、グラフト処理後のステンレス表面のスペクトルは十分洗浄を行った後に測定したものであるが、MPTS ポリマーと同一のスペクトルが得られた。また、シランカップリング処理後を行わずに同様のグラフト処理を行った場合、スペクトルは全く確認できなかったことから、シランカップリング処理を行うことで MPTS をグラフト化することができたことが確認できる。

以上の結果からグラフト処理したステンレス表面に、HAp と共有結合可能なアルコキシシリル基が導入できたことが確認できた。

2. PET 表面の HAp コーティング

図 3 には、グラフト処理後のステンレスへの HAp コーティング前後の SEM 写真を示した。ここで、MPTS による前処理を行っていないステンレスを用いた場合では、HAp 粒子を表面に吸着させた後、超音波洗浄によってほとんどすべての HAp 結晶が脱離していた。一方、グラフト処理したステンレスの場合、HAp ナノ粒子が凝集無く単層にて表面に結合していることが観察された。このことから HAp ナノ結晶がステンレス表面に強固にコーティングされていることが確認できる。また、HAp の形状（球状およびロッド状）を変化させた場合でも、HAp 結晶の被覆率はほぼ一定であった。

次に、HAp ナノ結晶とステンレス表面との結

合強度を定量的に測定した。結合強度は原子間力顕微鏡（日本ビーコ（株）製 DI3100AFM；カンチレバー、MikroMasch 製 CSC37/ALBS/15）を用い、コンタクトモードによって HAp 結晶を剥離させて測定した。HAp ナノ結晶が剥離した際にカンチレバーに加えた力を図 4 に示した。未処理の場合と比較して、グラフト処理を行うことで結合強度が約 13 倍に上昇していることが確認できる。また、移動後の HAp 結晶を再度移動させた場合、結合強度が大幅に減少していることから、化学結合を介して固定化されていることが示唆される。

以上の結果は、融着防止剤を使用して調製した高分散性 HAp 結晶を用いたものである。融着防止剤を使用せずに調製した HAp 結晶を用いた場合では、複数の HAp 結晶が積層（凝集）した状態でステンレス表面に結合することから、高分散性 HAp を使用することで表面状態の制御が可能であることを示している。また、図 3 中の HAp 結晶はある程度粒子間距離が広い状態で結合したものである。その粒子間距離が細胞接着性に大きく影響を与えるものと予想されることから、この点を今後詳細に検討し、細胞接着性の最適化を行う予定である。

3. 細胞接着性試験

当該研究課題では、早期内皮細胞被覆を目的の一つとしているため、細胞接着試験はヒト血管内皮細胞（HUVEC）を対象として行った。

HAp ナノコーティングステンレスおよびコントロールとして用いた未処理ステンレス上で 24 時間培養した細胞の走査型電子顕微鏡写真を図 5 に示した。未処理のステンレス表面ではほとんど細胞が接着しておらず、一方、HAp コーティ

ングステンレスを用いた場合では、多数の伸展した細胞が表面を覆っていることが観察された。このことから、HAp コーティングステンレスは未処理ステンレスと比較して有意に細胞接着性を有することが確認された。接着性タンパク質との相互作用の観点から見ると、一般に HAp の特性として、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) が強く吸着しやすいこと、さらさらに、線維芽細胞から放出される細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンおよびコラーゲンが吸着しやすいことが知られている。今回の系では、ロッド状 HAp ナノ結晶のカルシウムイオンリッチである面が表面に露出している可能性が高いことから、細胞膜表面が陰性荷電している細胞が接着しやすいことが容易に推察される。一方、球状 HAp ナノ結晶を用いた場合においても同様に高い細胞接着性を示した。今後は、さらに細胞増殖性についても検討することで、HAp ナノ結晶の形態と細胞増殖性の関係について明らかとする予定である。

図 6 には、以上の検討から得られた知見をもとに、ステンレス製ステント表面に HAp ナノコーティングを行ったものである。ステンレス基材の結果と同様に、HAp ナノ結晶が単層で強固に結合していることが確認できた。今後は、動物実験による HAp コーティングの有用性について検討を行う。

D. 結論

ステント基材として用いられるステンレス (SUS316L) 表面に生体親和性の高い HAp を強固にコーティングした新規なステンレス基材の作製に成功した。まず、ステンレス基材表面へのアルコキシシリル基含有ポリマーの導入を行っ

た。アルコキシシリル基を導入したステンレス表面に高分散性 HAp ナノ結晶をコーティングすることで、HAp ナノ結晶をステンレス表面に単分散で結合させることに成功した。本 HAp コーティングステントは未処理のステンレス基材と比較して高い細胞接着性を示すことを明らかとした。

さらに、同様の手法を市販のステンレス製ステントに対して行うことで、HAp ナノ結晶が均一に被覆した HAp ナノコーティングステントを創出することができた。

今回作製した新規なステントは人工物のみで作製したものであり、生物学的安全性に優れた新規グラフトとして高い価値がある。今後は同ステントを用いた動物実験を行い、その有用性について評価する予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) M. Okada, M. Masuda, R. Tanaka, K. Miyatake, D. Kuroda and T. Furuzono, Fabrication of calcined hydroxyapatite nanocrystals-coated stainless steel and morphological influence of nanocrystals on cell activity, J. Biomed. Mater. Res., in preparation

2. 学会発表

- 1) 岡田正弘, 益田美和, 植木光樹, 角野弘幸, 安田昌司, 田中良一, 宮武邦夫, 古菌 勉, セラミックス-高分子-金属三元複合化による生体親和材料の開発, 第 52 回高分子研究発表会, 兵庫, 兵庫県中央労働センター (2006.7.21)

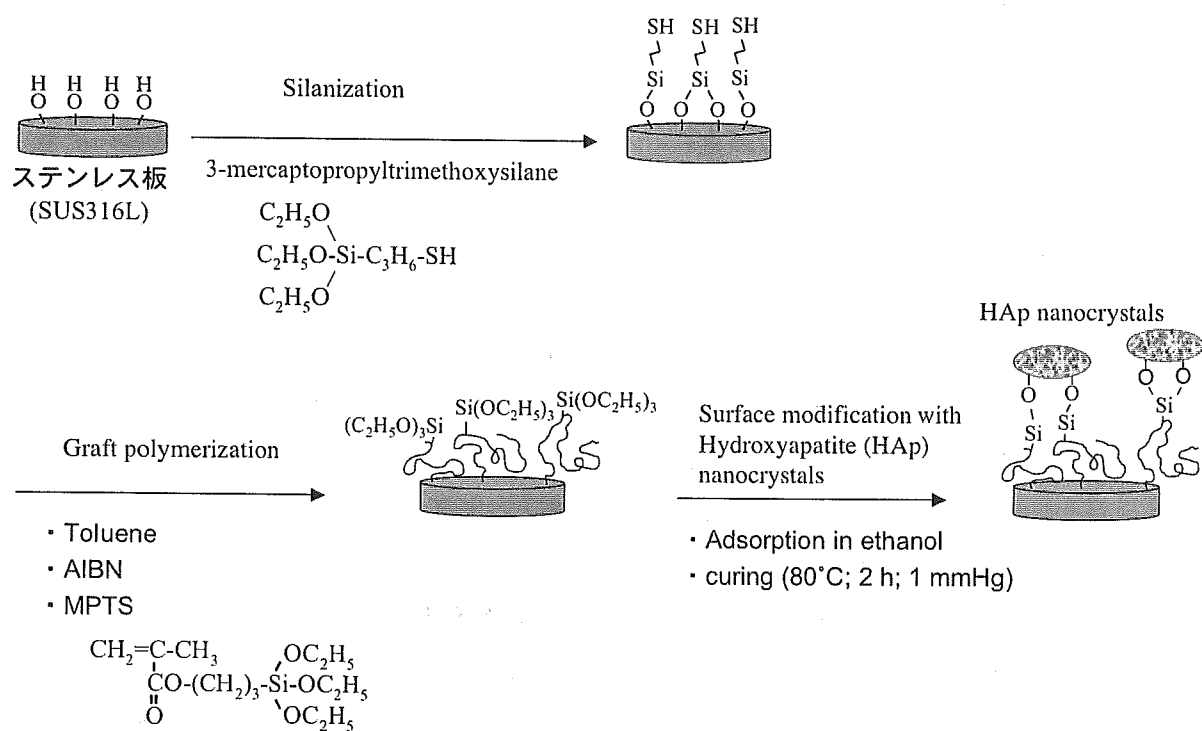


図 1. ステンレス (SUS316L) 表面のグラフト処理とハイドロキシアパタイト結晶ナノコーティング方法の模式図。まず、末端にチオール (-SH) 基を有するシランカップリング剤を用いて、ステンレス表面にラジカル連鎖移動可能な部位を導入する。その後、ハイドロキシアパタイト表面の水酸 (-OH) 基と結合可能なアルコキシシリル基を側鎖に有するモノマー (MPTS) のグラフト処理をトルエン中で行う。最終的に、グラフト処理した基板表面にハイドロキシアパタイトを吸着させ、化学反応を行うことで複合化させる。

Table 1 Atomic percentages of the surfaces of the stainless-steel substrates evaluated by X-ray photoelectron spectroscopy

	C	O	Si	S	Cr	Fe	Ni
Original	25.9	50.9	0.6	0.4	10.6	5.0	1.0
Silized	35.0	44.4	2.5	1.9	9.3	5.0	0.6
Poly(MPTS)-Grafted	68.2	27.0	4.8	-	-	-	-

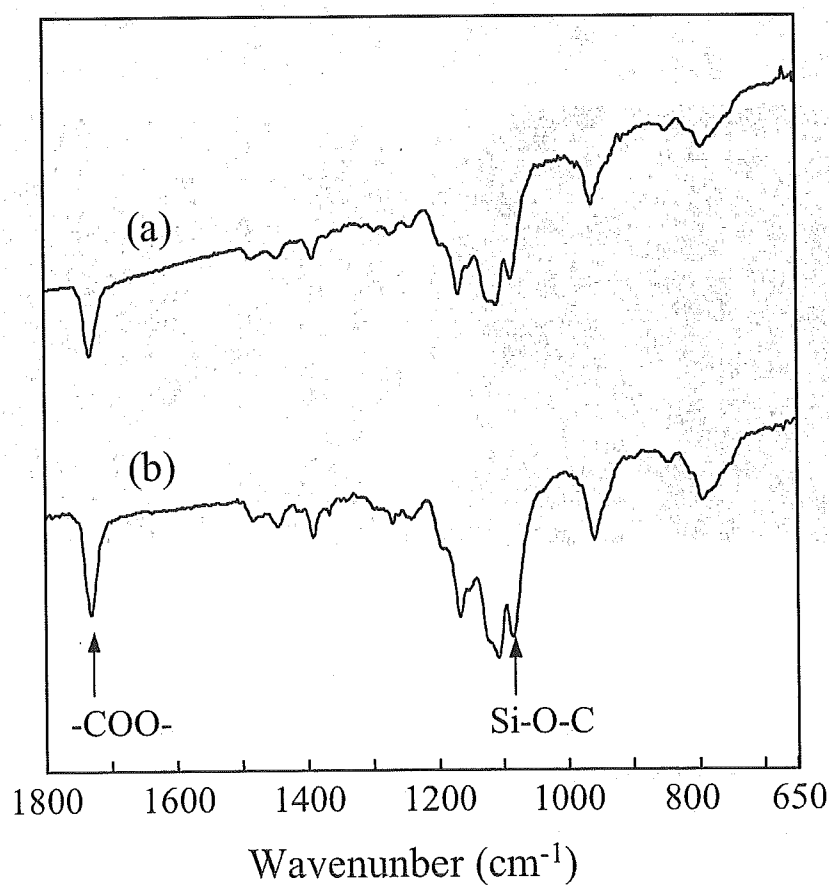


図 2. MPTS ポリマー (a) およびグラフト処理後のステンレス基板表面 (b) の赤外吸収スペクトル測定結果。両者は同一の吸収を示したことから、グラフト処理後に MPTS ポリマーが導入されていることが確認できる。

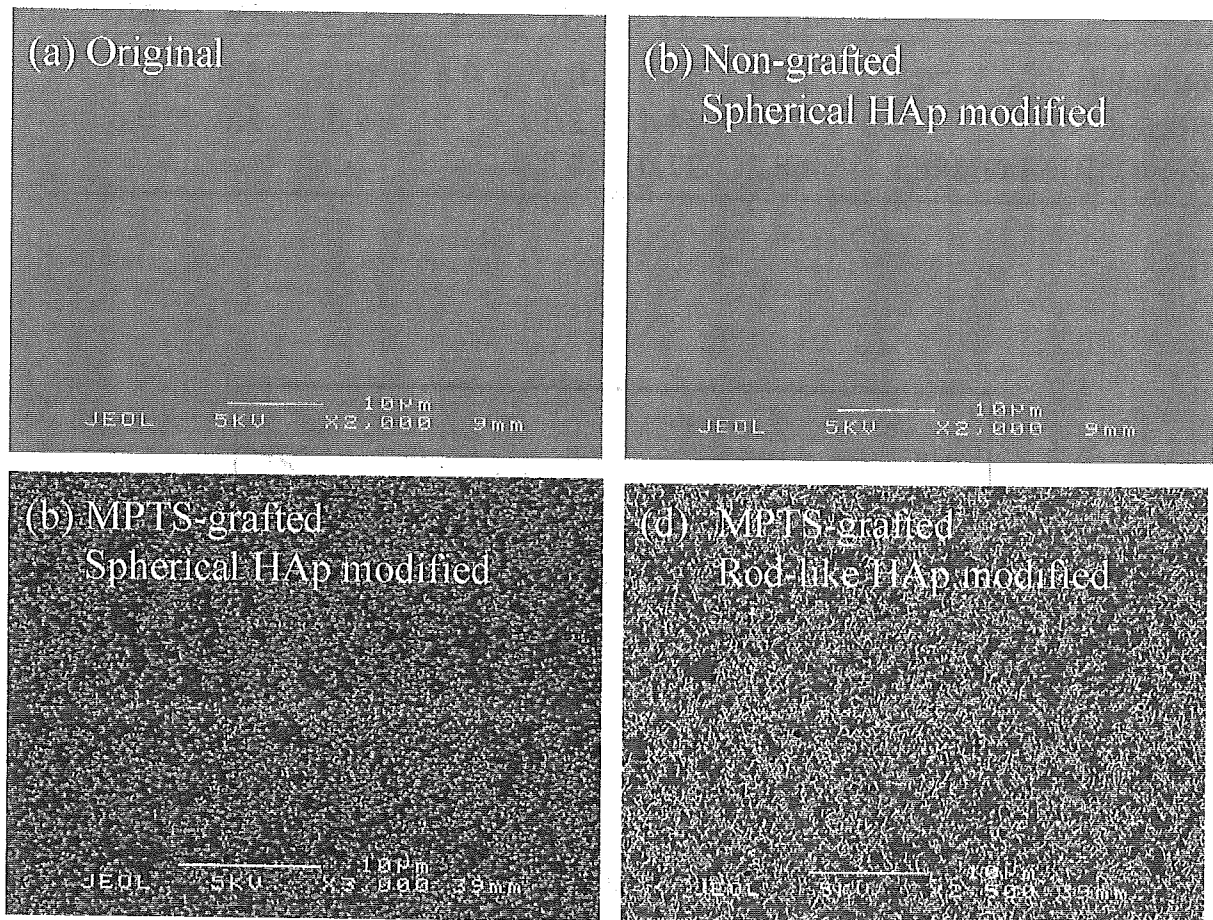


図3. 未処理のステンレス表面 (a)、未処理のステンレスを用いてHApを吸着させた後に超音波洗浄を行ったもの (b)、グラフト処理後のステンレス基板を用いて球状 HAp 結晶をコーティングしたもの (c)、およびグラフト処理後のステンレス基板を用いてロッド状 HAp 結晶をコーティングしたもの (d) の走査型電子顕微鏡写真。グラフト処理を行っていない場合、超音波処理を行うことで、吸着したHAp結晶が脱落していることが確認できる。一方、グラフト処理を行うことで、超音波処理後においてもHApナノ結晶が強固に結合している様子が確認できる。

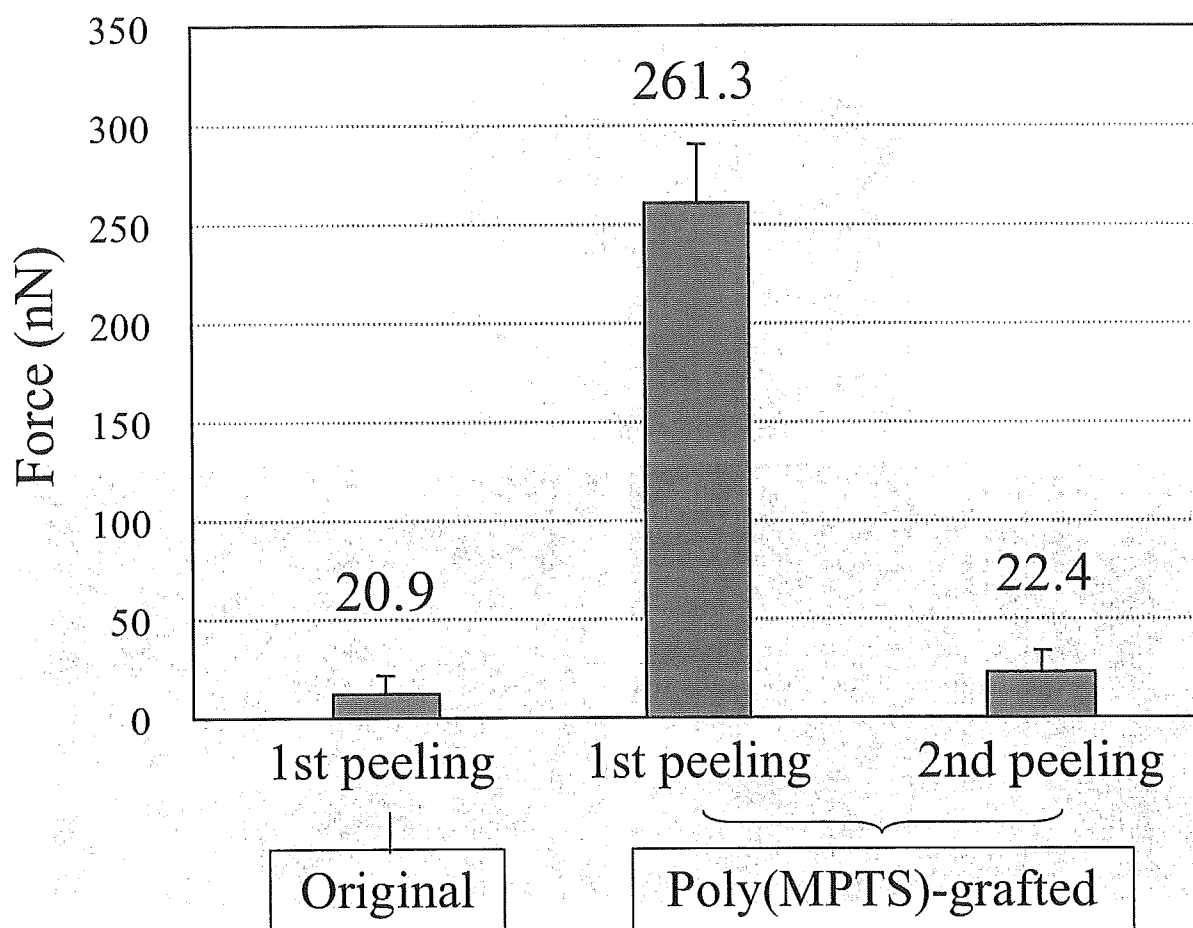


図 4. 未処理のステンレス上あるいはグラフト処理後のステンレス表面に HAp を吸着・結合させた後の結合強度。未処理の場合と比較して、グラフト処理を行うことで結合強度が 1.3 倍以上上昇していることが確認できる。また、移動後の HAp 結晶を再度移動させた場合、結合強度が大幅に減少していることから、化学結合を介して固定化されていることが示された。

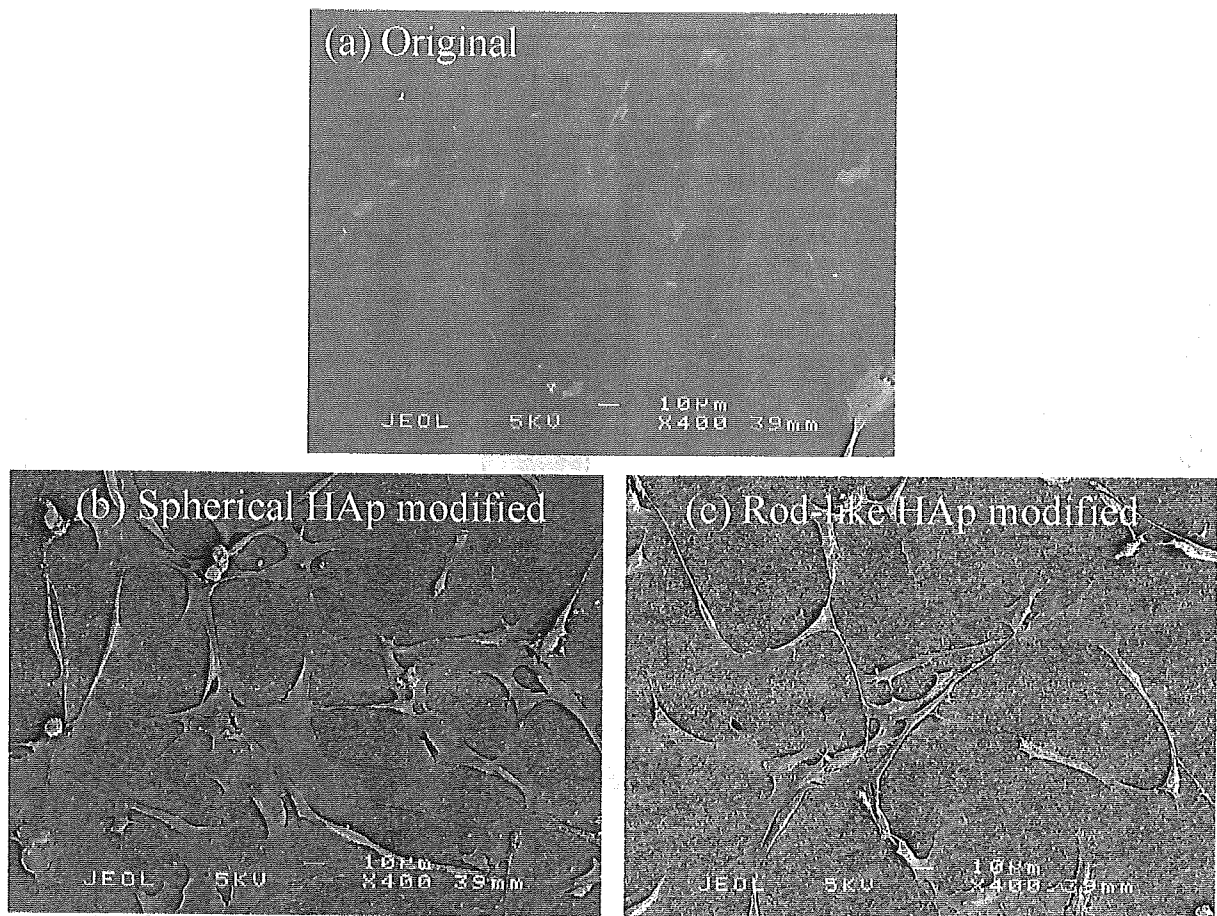


図5. 未処理のステンレス表面 (a)、グラフト処理後のステンレス基板上に球状 HAp 結晶をコーティングしたもの (b)、およびグラフト処理後のステンレス基板上にロッド状 HAp 結晶をコーティングしたもの (c) を用いて、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞 (HUVEC) の接着性試験 (37℃ ; 24 時間) を行った後の走査型電子顕微鏡写真。HAp ナノ結晶をコーティングすることで、HUVEC が有意に多く接着している様子が確認できる。

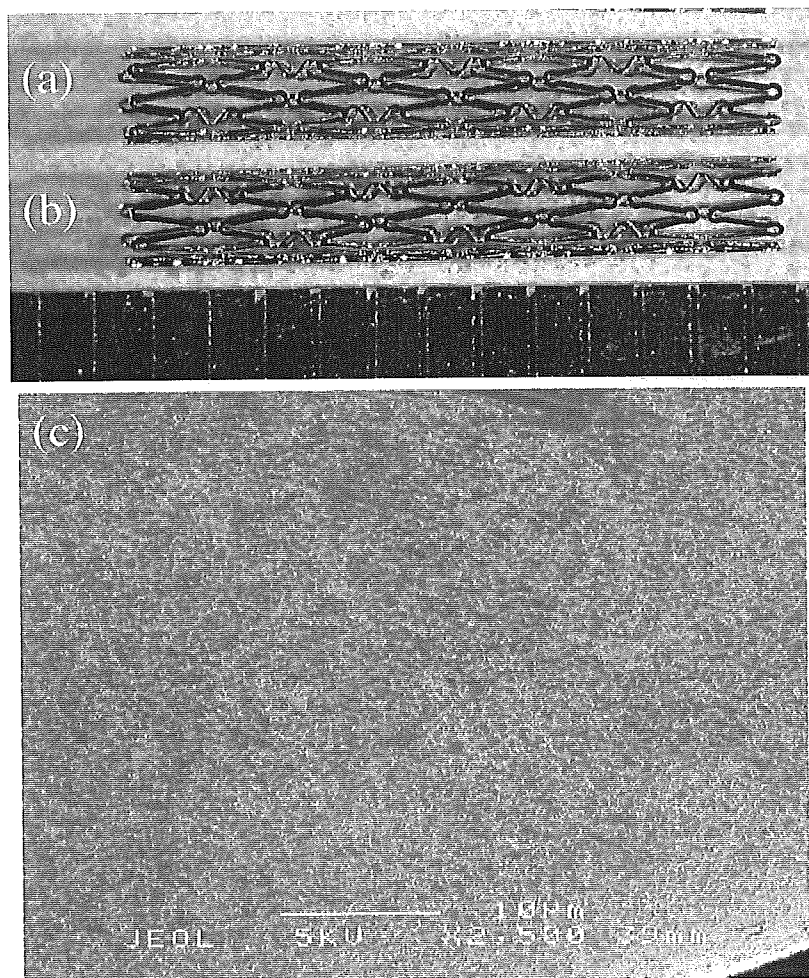


図 6. ステンレス (SUS316L) 製の未処理のステント (a)、グラフト処理後のステントに球状 HAp 結晶をコーティングしたもの (b) およびその走査型電子顕微鏡写真。ステンレス基板と同様に、均一に HAp 結晶がコーティングされている様子が確認できる。

分担研究報告書

ナノアパタイトを薬物担体とする Drug-Eluting Stent の創出

分担研究者 稲永 隆（日本海員救済会門司病院内科腎センター・内科部長）

研究要旨

ナノアパタイトコーティングステントへの Drug Eluting 機能付与を行うために、ナノアパタイトへのモデル化合物の吸着挙動および放出挙動について検討を行った。薬物に対するモデル化合物として、アニオン性、中性、カチオン性色素化合物を用いた。アパタイトの形状およびアパタイト表面の電荷状態をイオンの吸着により制御することで、各種色素化合物の吸着特性を制御できることを明らかとした。さらに、その放出は媒体中のイオン種によって影響されることが明らかとなった。

A. 研究目的

ステント留置後の再狭窄の原因として、新生内膜の過形成が現在もっとも大きな問題となっている。新生内膜となる平滑筋細胞の過増殖を抑えるために、薬物をステントに担持させ、その薬物を除放させる Drug-Eluting Stent が登場している。

現在市販されている Drug-Eluting Stent は、ステント表面に薬物担持用ポリマー（非吸収性）をコーティングし、薬物として免疫抑制剤であるシロリムスを用いたものである。新生内膜の過形成による再狭窄に対しては大きな効果を示しているものの、長期間にわたる持続的な薬物放出の結果、血流中にステント基材が長期間露出し続けるため、慢性期にステントの血栓閉塞の引き金となる危険性がある。このため、3ヶ月の塩酸クロピジン投与および無期限のアスピリン投与など、長期間の抗血小板療法が必要となる問題がある。

当該研究課題で対象とするナノアパタイトコーティングステント表面にアパタイトの吸着性

を利用して薬物を担持させ、短期（治癒期間）での薬物放出後にアパタイトの細胞接着性により内皮細胞を被覆させることで、再狭窄および血栓閉塞防止を可能とする新しいステントが創出できることが期待される。

本研究では、ナノアパタイトコーティングステントへの Drug Eluting 機能付与を行うために、まず、ナノアパタイトの吸着および放出特性について検討を行った。薬物に対するモデル化合物として、アニオン性、中性、カチオン性色素化合物を用いた。アパタイトの形状およびアパタイト表面の電荷状態を制御することで、吸着・放出特性の制御を試みた。

B. 研究方法

1. 試薬

HAp の出発原料および融着防止剤として用いた水酸化カルシウムは炭酸カルシウムの加水消化法により作製した。薬剤のモデル化合物として

用いた色素化合物（図 1）はそれぞれ和光純薬工業（株）製のものを使用した。その他の化学試薬はナカライテスク（株）製の特級試薬を用いた。

2. ナノアパタイトの調製

ナノアパタイトは、以下に示すエマルジョン法により形態制御し、新規焼成法により高結晶化させたものを用いた。

ペンタエチレングリコールドデシルエーテル 0.5 g を含有したドデカン 40 mL を調製した後、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水懸濁液（2.5 M）を 10 mL 添加し、室温あるいは 80℃で攪拌した。所定の温度において十分に攪拌後、水/オイル（W/O）溶液に 1.5 M の KH_2PO_4 水溶液を 10 mL 添加し、室温にて 24 時間反応させた。得られた反応物を遠心分離により分離・洗浄することにより、低結晶性アパタイトを得た。

得られた低結晶性アパタイトを融着防止剤存在下において焼成することで高分散性ナノアパタイト結晶を調製した。この際、融着防止剤として用いた $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と HAp とを混合する際に、融着防止助剤としてポリアクリル酸（PAA；平均分子量 12,000）を添加した。具体的な手順は以下の通りである。まず、作製した HAp 1.0 g を含む懸濁水中に 35% PAA 水溶液（pH, 10）2.9 g を加え、超音波（20 kHz; 35W）を照射することでアパタイト粒子を単分散させた。同アパタイト分散水中に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を約 1.0 g 含む $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 飽和水溶液 600 mL を添加し、得られた沈殿物を濾過により回収、60℃において乾燥した。その後、800℃にて 1 時間仮焼を行った。この際の昇温速度は 10℃/min とした。仮焼後に得られたサンプルを 10 mM 硝酸アンモニウム水溶液中に添加し、pH が中性付近になるまで蒸留水で遠心洗浄を行い、

最終的に 60℃において減圧乾燥させた。

ナノアパタイトの形状観察および粒子径測定は走査型電子顕微鏡（日本電子（株）製；JSM-6301F）を用いた。

3. ナノアパタイトの表面性状の制御

ナノアパタイト表面性状を制御するために、カルシウムおよびリン酸イオンをアパタイト表面に吸着させることを試みた。具体的な手順は以下の通りである

Ca 処理：室温において 500 mL の 100 mM CaNO_3 水溶液を調製し、乾燥させたナノアパタイト 1.0 g を添加した。超音波（20 kHz; 35 W）を照射することでアパタイトを分散させ、室温で 24 時間攪拌することでカルシウムイオンを表面に吸着させた。その後、純水を用いて洗浄を行い、60℃において減圧乾燥した。

リン酸処理：室温において 500 mL のリン酸緩衝液（pH, 7.4）を調製し、乾燥させたナノアパタイト 1.0 g を添加した。超音波（20 kHz; 35 W）を照射することでアパタイトを分散させ、室温で 24 時間攪拌することでリン酸イオンを表面に吸着させた。その後、純水を用いて洗浄を行い、60℃において減圧乾燥した。

処理前後のナノアパタイトの表面電位はゼータ電子測定装置（大塚電子（株）製；ELS-8000）を用い、10 mM KNO_3 水溶液中において測定した。

4. モデル色素化合物の吸着挙動

用いた色素化合物の構造を図 1 に示した。所定の濃度に調製した色素水溶液中に、10 mg/ml の濃度となるようにアパタイトを添加し、超音波（20 kHz; 35W）を照射することでアパタイトを分散させ、室温で 24 時間攪拌した。その後、遠