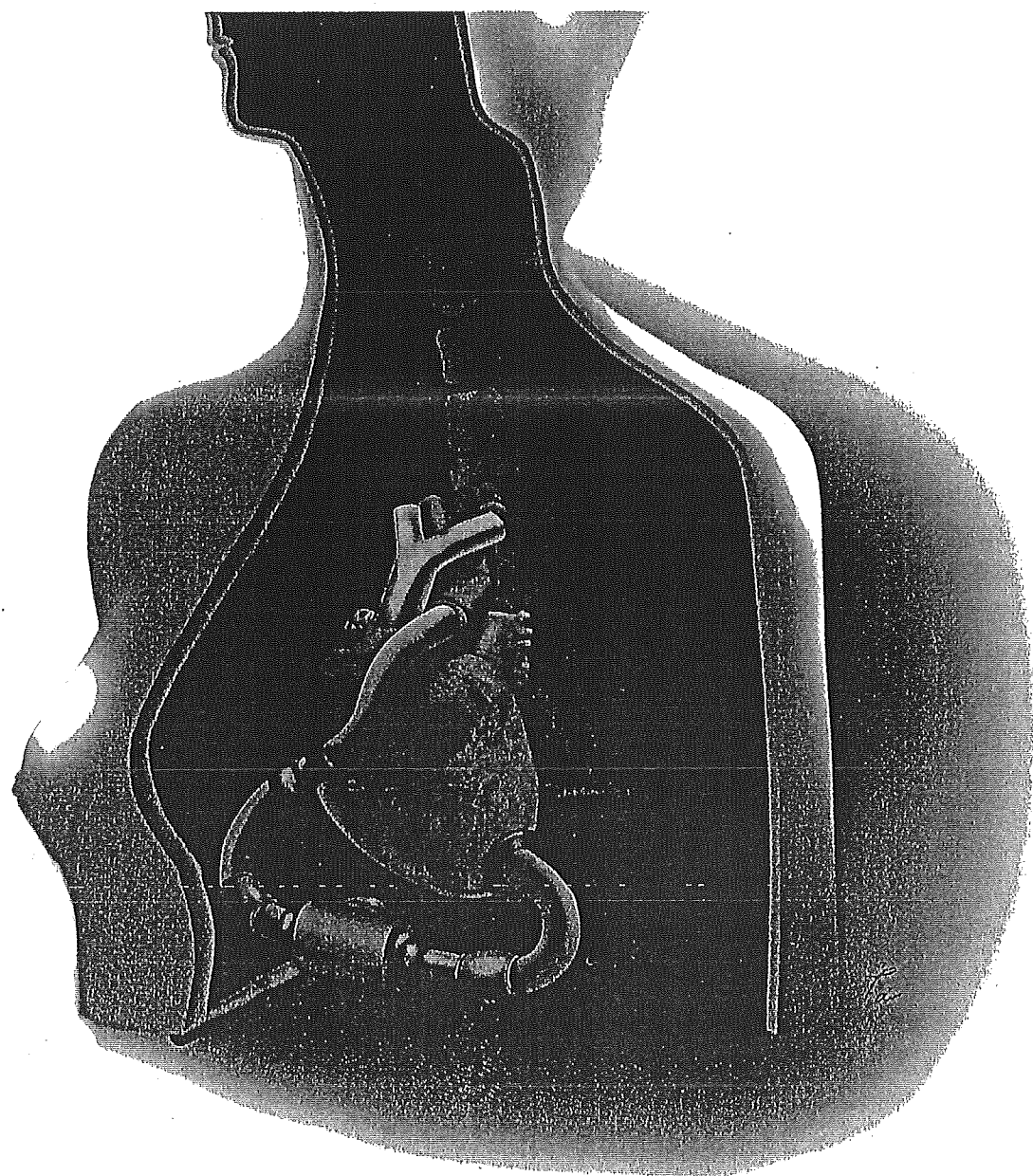


先端医療シリーズ 37

# 人工臓器・再生医療 の最先端

編集主幹 許 俊鋭・斎藤 明・赤池敏宏  
編集委員 西田 博・澤 芳樹・浅原孝之・清水達也



 先端医療技術研究所

### 3. 新しい生体/人工臓器インターフェイスとしてのナノ無機・有機複合材料

#### 3.1 はじめに

ハイドロキシアパタイト [HAp:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] は骨や歯のような硬組織の成分として知られ、整形外科および歯科領域に広く用いられている医用材料である<sup>1)</sup>。この医用材料としてのHApは人工的に作られており、合成法として溶液法(湿式法: 中性~アルカリ性条件下でカルシウムとリンの中和反応にて合成)、固相法(高温下、固体同士の反応にて合成)、水熱法(高温下、オートクレーブによる水溶液反応で合成)、アルコキシド法(カルシウムもしくはリンアルコキシドを混合、焼成にて合成)、フラックス法(無機塩もしくは酸化物の溶融物に原料結晶を添加・反応させて合成)などがある<sup>1)</sup>。得られたHApは粉末、棒状、多孔体状、繊維状などの成型品として得ることができ、またHApが高い機能性材料として認識されている大きな理由は、高い骨伝導能および蛋白質吸着能を有しているに他ならない。しかしながら一般にHApなどのセラミックスは、「硬い・脆い」といったセラミックス固有の性質から硬組織領域以外になじみが薄いとされていた。

近年、このアパタイト製セラミックスの問題点を克服する技術が数多く報告されるようになってきた。その技術のうち最も効果的な方法は、高分子と複合化させて無機材料に柔軟性や弾性を付与する無機・有機複合法である。例えば高分子マトリックス中にHAp微粒子を添加する方法<sup>2)</sup>、HApとコラーゲンを自己組織化的に複合化する方法<sup>3)</sup>、生体模倣反応により高分子表面にアモルファスHAp層を形成させる方法<sup>4)</sup>、および簡便・迅速にアモルファスHAp層を高分子表面に形成させる方法(交互浸漬法)<sup>5)</sup>などが開発されている。

我々はセラミックス固有の性質を重要視し、生体内で溶解しにくいナノスケールのHAp単結晶体(焼成体、ナノ粒子)を高分子と複合化させる技術を開発している<sup>6,7)</sup>。前述したHAp結晶を高分子溶液に練り込み成型加工する方法およびアモルファスHApを高分子表面に形成させる複合法とは異なり、高分子界面にて化学結合で強固にセラミックス微粒子を結合させ、高分子の機械的特性を損なうことなく表面をセラミックス化(HAp薄膜層形成)することを特徴とし

ている。この独自技術をこれまで人工的に十分に成し得なかった軟組織と硬物との接着に応用し、新規な軟組織適合性材料の開発を進めている。具体的には、次のキーテクノロジーを用いて経皮デバイス、人工血管および細胞足場材料等の開発を進めている。

① HAp ナノ粒子の粒径、形態および分散性制御

② 共有結合による界面無機・有機複合化

本稿ではこれらの基盤技術の説明とこれらの技術から調製された無機・有機複合体の特性について詳細に説明する。

#### 3.2 HAp ナノ粒子の粒径、形態<sup>8)</sup> および分散性制御<sup>9)</sup>

高分子基材上に高分子の機械的物性を損なうことなく無機結晶を表面修飾するには、その粒径と形態を制御し良好に基材への結合を促す必要がある。これを実現するために要求されるHAp微粒子の条件は、①高分子基材とより広い接着面積にて結合する面を有する板状もしくはロッド状構造体であること、②分散媒に分散しやすいことである。我々は独自にマイクロエマルジョン法を改良して、ロッド状構造体を成しナノスケールにて粒径制御可能なHAp単結晶体の合成法を提案している。

ドデカンオイル相、純水を水相とし、界面活性剤としてPentaethylene glycol dodecyl ether ( $\text{C}_{12}\text{E}_5$ )を添加してW/Oエマルジョン溶液を調製した。2.5M水酸化カルシウム [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] を添加した後十分に拡散し、1.5Mリン酸二水素カリウム [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ] (水溶液)を添加した。反応温度25、35、50および70℃にて24時間攪拌後、多量のエタノールおよび水を用いて遠心法にて精製した。得られた無機物は60℃にて乾燥し、さらに800℃、1時間、昇温速度10℃/分にて焼結した。

得られた典型的なHApナノ粒子は赤外分光法により、高い結晶性とカーボネート含有であることがわかる。またICP発光元素分析法により、このHApのCa/Pは1.61であった。カーボネートイオンを含むカルシウム欠損HApは化学量論的なHAp (Ca/P=1.67) に比較して、天然骨に含まれる生体由来HApの組成と近似していることから生体活性が高いことが知られ

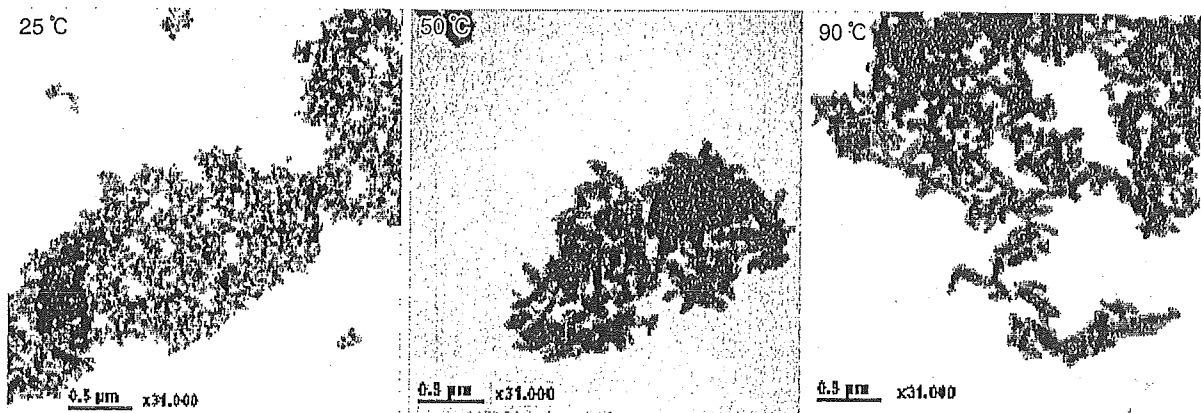


図 17.3.1 異なる反応温度にて調製された HAp ナノ粒子の TEM 像  
溶液中の反応温度が高くなるに従って、粒子の長径が大きくなっている。

ている。さらに HAp ナノ粒子の典型的な X 線回折パターンから HAp 以外の三リン酸カルシウムのようなリン酸カルシウムの混入は認められず、この試料は単一なカーボネート含有 HAp であることがわかっている。図 17.3.1 に異なる反応温度にて調製された HAp 微粒子の透過型電子顕微鏡 (TEM) 像を示す。25 °C で得られた HAp 微粒子の形態は球状～不定形を呈している。反応溶液の温度が高くなるに従い、角が丸くなったロッド状の形態を呈し始める。反応温度 25 °C における HAp ナノ粒子の短径 (a 軸方向の長さ) / 長径 (c 軸方向の長さ) はそれぞれ  $43 \pm 10$  nm および  $64 \pm 20$  nm であり、アスペクト比は 1.5 である。この粒径は反応温度が高くなるに従い大きくなっている。反応温度 50 °C における HAp ナノ粒子の短径 / 長径はそれぞれ  $78 \pm 16$  nm および  $154 \pm 48$  nm でありアスペクト比は 1.98 で、反応温度が増加するに従い増えている。密封反応系にて 95 °C まで反応温度を上昇させることにより、短径  $87 \pm 23$  nm および長径  $236 \pm 81$  nm であるナノ粒子 (アスペクト比 = 2.72) が得られている。HAp ナノ粒子 1 個の TEM 像とその電子線回折像から、得られた HAp ナノ粒子は単結晶であり、その長軸は HAp 格子の c 軸に沿って伸張している。また電子線回折パターンより、TEM 像における HAp の広い面がユニットセルの a 面、そして狭い面が c 面に帰属される。ここで HAp の a 面がカルシウムイオンリッチであり、また c 面がリン酸イオンリッチな面とされている<sup>10)</sup>。このことはロッド状 HAp の結晶成長制御により面による粒子 1 個における電荷の制御が可能であることを示している。

さらに最近、我々は分散媒 (エタノール) に一次粒子で分散する HAp ナノ粒子の合成にも成功している<sup>9)</sup>。

一般に湿式法にて調製した HAp 微粒子を焼成すると粒子表面の熱溶解のため凝集し二次粒子を形成する。前述したエマルジョン法による HAp 粒子合成・洗浄後 (焼成前) に融着防止剤 (ポリアクリル酸およびカルシウム塩) を添加することにより、各粒子間にポリマー・カルシウム複合体による境界層を形成させる。境界層を形成させたアモルファス HAp ナノ粒子を沈殿法により回収し、800 °C にて焼成後、境界層成分 (CaO) を水にて洗浄することにより HAp 一次粒子 (焼成体、単結晶) を精製する。得られた HAp ナノ粒子は分散媒 (エタノール) に対して高い分散性を呈し、また当該新技術は分散性ロッド状 HAp ナノ粒子の調製にも応用可能である。これらの分散性ナノ粒子を用いた複合化についても、現在検討を重ねている。

### 3.3 高分子表面修飾

HAp 焼結体表面に存在する水酸基と共有結合で結合する反応性基としてアルコキシシリル基およびイソシアネート基が知られている。我々は高分子基材にアルコキシシリル基およびイソシアネート基を末端に有するモノマーをグラフト重合し、そのグラフト鎖を足場に HAp ナノ粒子を固定化している。我々は高分子基材としてシルク<sup>9,7)</sup> もしくはポリエステル繊維<sup>11)</sup> を用いている。ここではシルク繊維への表面修飾法について説明する。まず重合ガラス管に十分に精製したシルク布、ラジカル開始剤として ammonium peroxydisulfate (APS) および水を混合し、その中に非イオン性界面活性剤 ( $C_{12}E_5$ ) と  $\gamma$ -methacryloxypropyl trimethoxysilane (MPTS) モノマーを混合した溶液を添加する。脱気・封緘後、所定時間および温度にてグラフト重合させる。反応物は直ちに脱水エタノールに

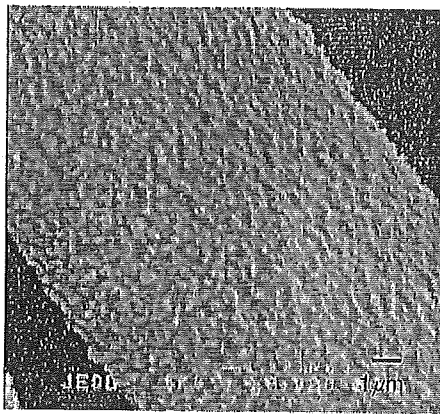


図 17.3.2 HAp・シルク繊維複合体表面のSEM像  
焼結した HAp ナノ粒子がシルク表面にグラフト重合した側鎖にアルコキシシリル基を有するポリマーと共有結合で結合している。

て十分に洗浄しグラフトに関与しないホモポリマーを除く。

### 3.4 HAp ナノ粒子による高分子コーティング

アルコキシシリル基を有するポリマーにて修飾したシルク繊維への HAp ナノ粒子との複合化反応は、HAp 分散溶液にシルク繊維を浸漬・吸着させた後に、真空中 100 °C 以上の比較的高温にてカップリング反応させている。最終的に水中に浸漬した無機・有機複合化繊維に直接、比較的高出力 (20 kHz、35 W) にて3分間超音波プローブをあてることにより、比較的弱く結合した HAp 粒子もしくは粒子集合体を除去している。図 17.3.2 に HAp ナノ粒子により表面被覆されたシルク繊維 (polyMPTS-g-SF) の走査型電子顕微鏡 (SEM) 像を示す。HAp ナノ粒子は基材表面に一次粒子から数個の粒子が凝集した状態で結合している。これは HAp ナノ粒子が単結晶であり一粒子内に陰性および陽性の面を有しているため凝集しやすい性質のためである。また、HAp ナノ粒子による SF 繊維の重量増加は熱重量分析により 10.7 wt % であった。さらに、分散性ナノ粒子を用いることによって表面被覆制御がより一層向上するものと期待している。

### 3.5 HAp 複合体の生物学的特性

複合体の生物学的特性は線維芽細胞を用いた培養試験およびラット皮下への経皮的埋植試験により調べている。1 × 10<sup>5</sup> 個のマウス線維芽細胞 (L929 細胞) を 24 ウェルマルチプレートに静置した HAp 複合シルク繊維上に播種し、24 時間培養した。培養後の未処理 SF 繊維との違いを SEM 観察により明らかにしてい

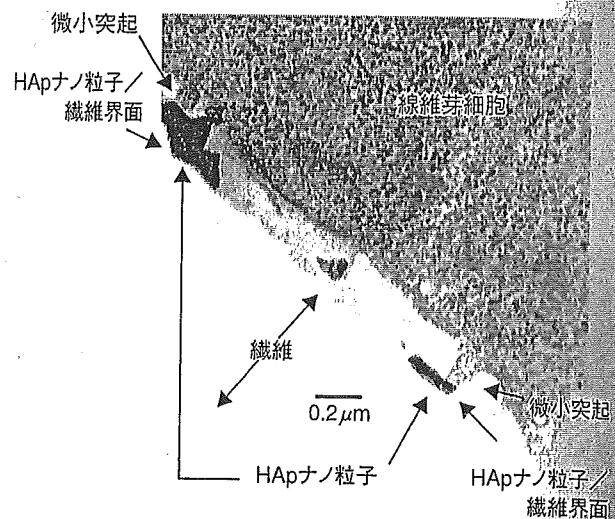


図 17.3.3 線維芽細胞が接着した HAp・シルク繊維複合体の界面像 (TEM 像、24 時間培養)

黒く染色された箇所が線維芽細胞で、白く抜けた箇所がシルク繊維の断面である。細胞/シルク繊維界面に焼結した HAp ナノ粒子が存在し、線維芽細胞から微小突起が選択的に延びている。

る。シルク繊維上では接着性細胞の接着・増殖が生じにくいことが知られている。この現象は、繊維表面の濡れ性もしくは結晶性および非結晶性成分の相分離による影響と推察しているが、現在のところ十分な検討がなされていないのが現状である。HAp 複合化シルク繊維上では十分な細胞接着性が認められている。さらに、マイクロームによる切断面を透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察すると培養初期に細胞から微小突起が HAp ナノ粒子に選択的に延伸していることがわかる (図 17.3.3)。我々の系では HAp 単結晶のカルシウムイオンがリッチである a 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。さらに接着性蛋白質との相互作用の観点からみると、一般的に HAp の特性として、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) がカーボネート含有 HAp に強く吸着しやすいこと<sup>12)</sup>、および線維芽細胞から放出される細胞接着性蛋白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<sup>13)</sup> が知られている。ただしこれらの場合、二次粒子からなる HAp 焼結体との相互作用から検討されているため、HAp 結晶表面が接着性蛋白質の吸着にどのようにに相互作用しているのか明確ではない。我々の独自技術で c 軸方向への粒径および面を制御した HAp 単結晶体を基材上に並べた界面を構築することにより、接着性蛋白質の吸着挙動やコンフォメーションをさらに詳細に明らかにできると考えている。



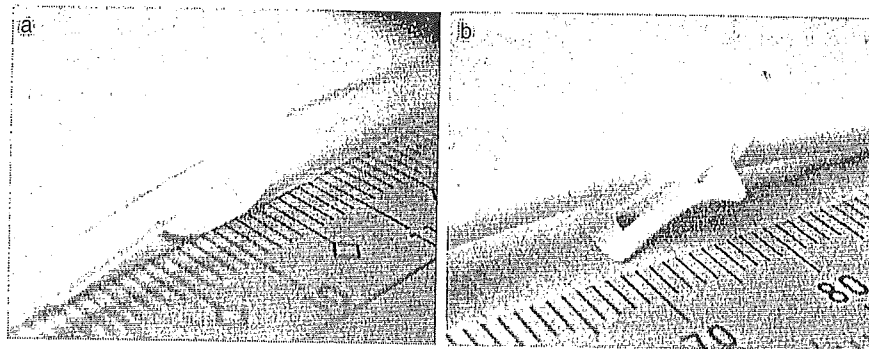


図 17.3.4 経皮デバイスの外観

a : N1 型      b : N3 型

長さ 100  $\mu\text{m}$  の繊維に HAp ナノ粒子をコートし、あらかじめボタン状に成形加工したシリコンゴム製のボタンに複合繊維を植毛してある。硬い・脆いといったセラミックの欠点を改善し、軟らかさ・しなやかさのあるセラミックデバイスができています。現在、デバイスの形態は動物実験を繰り返しながら最適化を図っている。上記の写真はその 2 タイプを示した。

### 3.6 医療デバイス加工と経皮的動物埋植実験による評価

実際に経皮デバイスとして用いる場合に、機能を最大限に発現させるため形状の設計を行っている。まずシルク繊維を約 100  $\mu\text{m}$  の長さに裁断し、その繊維状に HAp ナノ粒子をコーティングする。HAp コーティング繊維を予め中心静脈カテーテル用に設計したシリコンゴム製ボタンの表面に植毛することにより、セラミック経皮ボタンが製造される (図 17.3.4)。製造された経皮ボタンは白色状でセラミックスでありながらしなやかさを有している。ボタンの形状は動物実験による試行錯誤により最適形状を導出するため検討を重ねている。また、経皮ボタンを装着したカテーテルをウサギ背部に経皮的にインプラントして皮膚界面の密着性、炎症の有無を観察している。インプラント 10 ヶ月において、皮膚組織は隙間なくボタンに密着し、膿瘍および外観から大きな炎症および腫瘍等は認められていない (図 17.3.5)。

### 3.7 まとめ

焼成したナノスケールの HAp 単結晶体を高分子界面に化学結合で結合させた無機・有機複合材料を創出した。HAp ナノ粒子はその合成過程において反応溶液中の温度を変えることにより粒径および面制御が可能であった。また、種々の表面グラフト法を用いて無機粒子を高分子基材表面に化学結合により結合させることにより、高分子基材の柔軟性と HAp のセラミックスとしての特徴を兼ね備えた材料の創出が可能となった。

現在、医療機器製造ガイドラインに添った試験を計画し、長期留置型中心静脈カテーテルへのトランスレ

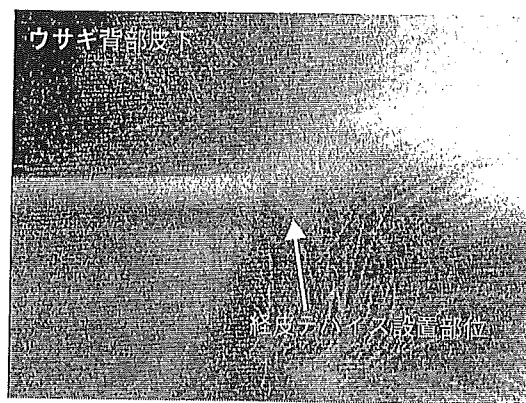


図 17.3.5 10 ヶ月間埋植した経皮デバイス (N1 型) 付きカテーテル出口部の外観 (ウサギ背部) (口絵 54 参照)

皮下トンネル作成術により埋植したカテーテルを引っ張った状態で撮影した。HAp 複合経皮デバイスは皮下直下に存在する。皮膚組織はデバイスとしっかりと密着し、炎症および膿瘍等は認められない。

ーショナルリサーチを目指した研究を進めている。最後にこの一連の研究をまとめるに当たり私感を述べる。これまで数多くの方法論により皮膚貫通部の密着性により細菌侵入を防ぐデバイスが開発されてきた。ここに至って痛感することは経皮部からの細菌感染を正確に実証する評価法が確立していないということである。おそらく多くの感染防止デバイス開発に携わってきたエンジニアが最終的に成功に至らなかった背景には、「細菌感染防止に関する *in vivo* 効能評価法がないこと」が大きな壁として行く手を遮っていたからであろう。言い換えれば、臨床家を納得させ得る臨床とリンクした感染の有無を定量的に推し量る *in vivo* 評価法 (動物実験) がいないということである。我々は、現在、医師、細菌感染学者およびエンジニアがいっしょになって (医工連携)、「血管アクセス研究会」を設

立し、当該評価法の確立を目指して検討を進めている。

【謝辞】 これらの一連の研究は科学技術振興機構研究成果活用プラザ大阪および厚生労働科学研究費の助成により実施されている。また当該研究を実施するにあたりご協力いただいた物質・材料研究機構生体材料研究センター・田中順三センター長、東京医科歯科大学生体材料工学研究所・岸田晶夫教授、研究成果活用プラザ大阪・安田昌司研究員、および国立循環器病センター研究所・岡田正弘流動研究員に深く感謝いたします。なお、本文中で紹介した「血管アクセス研究会（事務局：物質・材料研究機構生体材料研究センター内）」は2004年12月に（社）日本透析医学会（斎藤明理事長）新科学技術開発・活用小委員会（下条文武委員長）の後援のもとで設立され、医工連携で新しい急性期、中・長期留置型カテーテルの開発および評価法の開発を進めており、我が国の新しい医工連携のあり方を模索している。

## 文献

- 1) 青木秀希：アパタイト。医歯薬出版株式会社、東京、1999
- 2) Wang M, et al: Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology. *Biomaterials* **19**: 2357-2366, 1998
- 3) Kikuchi M, et al: Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized invitro and its biological reaction in vivo. *Biomaterials* **22**: 1705-1711, 2001
- 4) Tanahashi M, et al: Apatite coating on organic polymer by biomimetic process. *J Am Ceram Soc* **77**: 2805-2808, 1994
- 5) Taguchi T, et al: Hydroxyapatite formation on/in poly(vinyl alcohol) hydrogel matrices using a novel alternated soaking process. *Chem Lett*: 711-712, 1998
- 6) Furuzono T, et al: Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite I. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly(gamma-methacryloxypropyl trimethoxysilane) grafted silk fibroin fibers through chemical bonding. *J Mater Sci Mater Med* **15**: 19-23, 2004
- 7) Furuzono T, et al: Nano-scaled hydroxyapatite/composite IV. Fabrication and cell adhesion properties of a three-dimensional scaffold made of composite material with a silk fibroin substrate to develop a percutaneous device. *J Artif Organs* **7**: 137-144, 2004
- 8) Sonoda K, et al: Influence of emulsion on crystal growth of hydroxyapatite. *Solid State Ionics* **151**: 321-327, 2002
- 9) Okada M, et al: Fabrication of high-dispersibility nanocrystals of calcinated hydroxyapatite. *Nanotechnology (in contribution)*
- 10) Kawasaki K: Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *J Chromatogr* **544**: 147-184, 1991
- 11) Furuzono T, et al: Increase of cell adhesiveness on poly(ethylene terephthalate) fabric by coating of sintered hydroxyapatite nanocrystals for development of an artificial blood vessel. *ASAIO Journal (in contribution)*
- 12) Midy V, et al: Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate. *J Biomed Mater Res* **56**: 9-16, 2001
- 13) Amino S, et al: Cell attachment and spreading factors of human periodontal ligament fibroblasts. *Bull. Naniyama Dent Col* **27**: 179-192, 1992

(古菌 勉)

*Chapter for book entitled "BOTTOM-UP NANOFABRICATION: Supramolecules, Self-Assemblies, and Organized films"*

## **Nanofabrication of Inorganic-Organic Composites by Chemical Bonding for Medical Devices**

**Tsutomu FURUZONO\*, Shoji YASUDA, Masahiro OKADA**

**Affiliation:**

Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute

**Mailing Address:** Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center

Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, JAPAN

**Phone:** +81-6-6833-5012 (ext.2623)

**Fax:** +81-6-6872-7485

**E-mail:** furuzono@ri.ncvc.go.jp

## **Table of Contents**

1. Introduction
  
2. Calcined HAp Nanoparticles for Nanofabrication
  - 2.1 Background
  
  - 2.2 Control of Size and Morphology
  
  - 2.3 High Dispersibility
  
  - 2.4 Synthesis and Characterization
  
3. HAp Nanocoating by Chemical Bonding
  - 3.1 Background
  
  - 3.2 HAp Coating by Covalent Bonding
    - 3.2.1 Isocyanate Group
  
    - 3.2.2 Alkoxysilyl Group
  
  - 3.3 HAp Coating by Ionic Bonding
    - 3.3.1 Carboxyl Group
  
  - 3.4 Mechanical Properties
  
  - 3.5. Cell Interaction



## 4. Fabrication of Medical Devices

4.1 A percutaneous device

4.2 An artificial blood vessel

## 5. Conclusions

## Introduction

Hydroxyapatite (HAp:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) has unique properties for biomaterials such as hard-tissue-compatible material for bone and tooth also soft-tissue-compatible material for skin tissue [1]. The reasons for the compatibility have not been manifested completely. One of them might be favorable to adsorption of adhesion molecules or growth factors *in vivo* on the HAp surface [2]. The HAp as biomaterials is prepared artificially through the following processes: wet method using solution reaction from solution to solid, dry method using solid reaction from solid to solid, hydrothermal method using hydrothermal reaction from solution to solid, and alkoxide method using solution and solid reaction from solution to solid [1]. The HAp can be obtained as some morphologies such as powder-, needle-, rod-, fiber-, porous-like, etc. From the point of view of tissue-compatible material made up of HAp, The hard and brittle nature of HAp limits spreading over many medical applications.

Recently, many synthetic methods for the HAp composites to overcome such defects of HAp have been reported. These methods of development of

inorganic-organic composites are effective to give elasticity or flexibility to the inorganic material. For examples, there were the effective methods which dispersion of HAp crystals into polymer matrix [3-6], preparation of a self-organized composite consisting of HAp and collagen molecule using a coprecipitation method [7-9], formation of HAp crystals on polymer substrate by a biomimetic process using a simulated body fluid [10, 11], rapid formation of amorphous HAp on polymer substrate by an alternate soaking process [12-14], and preparation of composite using a plasma spraying [15].

To overcome the defects of ceramics maintaining the nature of HAp, we developed a novel inorganic-organic composite, which calcined HAp nanoparticles (crystals) [16,17] coated on polymer substrate by chemical bonding, such as covalent or ionic linkage [18-22]. The synthetic method of the nano-composite was quite different from the others as mentioned above which were prepared by mixture with HAp crystals and polymer matrix or formation of amorphous HAp on polymer surface. The significant feature of our fabrication is formation of a nano-scaled ceramic layer on substrate surface without damage to the mechanical properties of the

polymer substrate. The technology of nano-ceramic coating can be applying to increase of adhesiveness between hard materials and soft tissue in living body, and developing novel biomaterials which is compatible for soft-tissue, such as percutaneous device, artificial blood vessel, or a scaffold for regenerative medicine, and so on.

The design of the nano-composite consisting of calcined HAp nanoparticles and polymer substrates depends on two key technologies: (I) control of size, morphology and dispersiveness of calcined HAp nanoparticles, (II) fabrication of inorganic-organic composite by chemical bonding between the interface as shown in **Scheme 1**. In this chapter, we present the synthetic method of the calcined HAp nanoparticles with controlled size, morphology and dispersiveness in a liquid media, and synthesis of the nanocomposite, and also the surface-, mechanical-, and biological properties of the material as well as fabrication of medical devices in detail.

## **2. Calcined HAp Nanoparticles for Nanofabrication**

## 2.1 Background

Previously, Aoki *et al* demonstrated that sintered HAp — a ceramic disk — showed excellent biocompatibility with soft tissues of the skin, muscle and gums, and designed a percutaneous catheter with HAp disk to prevent infection [23]. However, the device as a rigid ceramic disc that partially protrudes through the skin might limit patient mobility and caused discomfort. To overcome the disadvantage, Zabetakis *et al* prepared a flexible polymeric catheter with thin film of HAp laid down by pulsed laser deposition method [24]. However, there were many cracks in the HAp coating on the polymer substrate. This was because there was weak interaction between coated HAp and the surface of catheter. The preliminary implant test using this material also showed minimal inflammatory response in subcutaneous tissue of rat due to the amorphous HAp coating.

We demonstrated a novel sintered HAp micro-particles coating onto silicone substrate with covalent linkage [25, 26]. We can expect to not only develop a new technique for HAp nucleation on an inert polymer surface but also prepare a more stable composite consisting of HAp layer and polymer substrate bonded with covalent linkage.



The adhesion strength between particle and polymer substrate, however, was believed to be unsatisfactory because a commercial grade of HAp spherical particle with 2.0  $\mu\text{m}$  of an average diameter was used in this system. To increase the interaction between a HAp particle and substrate surface, we need to synthesize a HAp nanoparticle with larger surface-area of adhesion in order to avoid strong shearing stress from outside. Here we described the characterization of calcined HAp nanoparticles synthesized by a modified emulsion system above and below the temperature of a surfactant's cloud point [16, 17]. The HAp nanoparticle can be well-controlled size and morphology, and also showed well dispersiveness in a liquid media.

## **2.2 Control of Size and Morphology**

There have been previously reported about some synthetic methods of HAp nanoparticles, such as wet chemical process [27-29], hydrothermal treatment [30-32], and sol-gel process [33-35], and emulsion system [36-38]. Calcined HAp nanoparticles were prepared by a modified emulsion system. Starting materials were dodecane [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$ ] as a continuous oil phase, pentaethylene glycol dedecyl

ether  $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}]$  as nonionic surfactant showing  $31^\circ\text{C}$  of the cloud point by our experimental measurement, calcium hydroxide  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  and potassium dihydrogen phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). 10 ml of 2.5 M  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  aqueous suspension was poured into 40 ml of the oil phase containing of 0.5 g of the surfactant at 25 and  $50^\circ\text{C}$ . After rapidly stirring of the water/oil (W/O) solution, 10 ml of 1.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aqueous supersaturated solution was added into the W/O system. After stirring for 24 h at the fixed temperature, the inorganic reactant was obtained by centrifugation with ethanol and hot-water to remove the oil and the surfactant. The powder was dried at  $60^\circ\text{C}$  for 12 h, and then calcined at  $800^\circ\text{C}$  for 1h with a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  of the heating ratio.

**Figure 1** indicates XRD patterns of the both calcined HAp powders at  $800^\circ\text{C}$ . In all the figures in the present subsection, the (a) represents HAp particles prepared by the emulsion system at 25 and (b) represents  $50^\circ\text{C}$ . Both profiles showed the presence of highly crystalline HAp, no other calcium phosphate phases could be detected. Lim *et al* reported that high purity crystalline HAp powder prepared at the same calcination temperature was obtained through an emulsion processing rout, however in

conventional process impurity phase of  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  was obtained [39]. Similarly, since there was no impurity crystalline except for HAp in our XRD result, our method lead to the formation of a more homogeneous precursor than that formed in the conventional route.

**Figure 2** shows the FT-IR spectra of the calcined HAp powders synthesized at (a) 25 and (b) 50 °C . In the spectra, bands at 603/573 and 474  $\text{cm}^{-1}$  represent  $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$  and  $\nu_2 \text{PO}_4^{3-}$  in Hap crystalline, respectively. Peaks at 964  $\text{cm}^{-1}$  reflected  $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$  and 1091/1052  $\text{cm}^{-1}$  for  $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ . The strong intensities of the OH stretching and libration at 3572 and 632  $\text{cm}^{-1}$ , respectively, indicate a well-crystallized product. The bands at 871 and 1420 ~ 1470  $\text{cm}^{-1}$  showed B-type carbonate apatite which carbonate substituted phosphate positions in the lattice of HAp [40]. Since carbonate apatite is known to be a better biomaterial than pure HAp [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] due to the similarity to the composition of biological apatite [41], the HAp particles obtained in this study are expected to show bioactivity. The Ca/P molar ratios in the particles prepared in both systems was 1.61 as determined by ICP, slightly less than a stoichiometric composition 1.67. This value implied that this powder was slightly calcium defect.

**Figure 3** shows the particle morphologies by TEM observation. The HAp particles prepared at 25 °C and then calcined at 800 °C were agglomerates of particles, which showed spherical to irregular-rod shape with the particle size of 30 ~ 60 nm [**Figure 3 (a)**]. However, the HAp particles prepared at 50 °C were truncated rod shape with distinct bevelled corners at the apex. These particles were generally larger size 100 ~ 200 nm in length and 90 ~ 150 nm in width [**Figure 3 (b)**]. The electron diffraction pattern that correspond to HAp crystalline structure was obtained [inlet in **Figure 4**]. As shown in **Figure 4 (b)**, the longitudinal axis of the rod shaped crystal was parallel to the c-axis of the HAp lattice.

The difference in the morphology and size of the both particles prepared in this study is believed to be a consequence of the different temperatures employed. The morphology and size of HAp particle previously made by an emulsion route shows a spherical to irregular-rod shape with the size of 20 ~ 100 nm [42,43]. At 25 °C in our system an immediate onset of white cloudiness upon addition of phosphate solution without precipitation indicates that precipitation occurs within the many dispersed nucleation centers formed by the surfactant bounded micelles. It is likely that initially

the micelles interact and exchange contents. Calcium phosphate nucleation occurs within the micelle cavity and micelles then merge to some extent at early stage crystal growth and the crystal enlarges. A stable emulsion is thus maintained and roughly spherical crystals are finally formed, confined within an adsorbed surfactant boundary.

When the reaction temperature increases to 50 °C beyond the cloud point, it is assumed that the shaped vesicle might be no longer able to maintain its thermodynamic stability in the emulsion system due to the increase of hydrophobicity of the surfactant molecule. After addition of the aqueous  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  suspension, calcium ion might bind to the locally- and partially-remained hydrated oxyethylene branch containing a hydroxyl head group in the surfactant molecule, resulting in the formation of local hydration space. Subsequently, such hydration space could nucleate calcium phosphate upon addition of the  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solution. The HAp crystal growth is then significantly faster than that at 25 °C as the driving force of the crystal growth remarkably plausibly preceded the formation force of the locally-assembled hydration space because of the enhanced hydrophobicity of the surfactant. The morphological development of the crystal is only moderately modified from the needle-like crystals



that develop from a surfactant free system. Low aspect ratio HAp crystals develop indicating there is some interaction of surfactant with the crystal faces, particularly the fastest growing (001) face as indicated by the unusual truncation of this face. This scheme resembles an effect of face-specific additive that inhibits the crystal growth results in an increase in the relative area of that face as growth proceeds [44].

### **2.3 High Dispersibility**

When low-crystallinity HAp nanoparticles are calcined to increase thermal and chemical stability, the particles typically sinter into large agglomerates [45-49]. Consequently, calcined HAp crystals dispersed in liquid medium on a nanoscale have been difficult to obtain. Hydrothermal treatment of HAp particles in water medium under high pressure is known to enable the preparation of agglomerate-free HAp crystals [29-31]. However, this treatment generally leads to an increase in crystal size due to Ostwald ripening [50, 51], and is restricted to laboratory-scale products as it is a high-pressure process.

This subsection describes the preparation of HAp nanoparticles by calcination

with an anti-sintering agent interspersed between the particles and the subsequent removal of the agent. There was no contact between the particles during calcination.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  was selected as an anti-sintering agent because it would not melt at the calcination temperature (800 °C), presumably not dissolve the HAp, and could be removed by washing with water after calcination. The HAp nanoparticles obtained here should be suitable for the surface coating described the later section owing to their high dispersibility in liquid media and high thermal and chemical stability.

#### **2.4 Synthesis and Characterization**

Starting HAp particles with low crystallinity were prepared by a modified emulsion system at 25°C [16, 17]. The resulting product was centrifugally washed and redispersed in water (solid content: 5 wt%). In order to intersperse  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  -- an anti-sintering agent -- between the particles, the HAp aqueous dispersion was added into a saturated aqueous  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  solution (0.17 wt%), and the mixture was dried under reduced pressure at 40°C. The resultant HAp/ $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (1/1, w/w) mixture was calcined at 800°C for 1 h in air (heating rate: 10°C/min). After calcination, the mixture