

表面における化学的・物理化学的特性と材料／細胞間に生じる相互作用との関連性を検討し、医用材料の生体適合性を評価するための新たな化学的及び物理化学的指標を見いだすことを最終的な目的とする。そこで、本研究では、汎用性の高い種々の医用材料を使用して行われてきた従来研究では困難であった化学的及び物理化学的特性が制御された表面を、自己組織化単分子膜 (SAM) を用いて調製して各種検討を行う。具体的には、種々の比率で2種類の官能基が存在する表面を調製することで異なる化学及び物理化学的特性をもつモデル表面を調製し、それらの上で培養した細胞の挙動変化を様々な角度から観察することにより材料表面特性と細胞挙動変化との関連性を検討する。また、得られた結果から、材料に求められる生体適合性の条件や評価指標についての考察を行う。

昨年度、メチル基を中心とした様々な2官能基表面上での細胞間連絡機能変化を検討したが、細胞間連絡機能検討に使用した評価手法が細胞占有面積にも影響を受けることから、今年度はその影響を排除して考察するための検討が必要となった。また、2官能基表面のうち、硫酸基、あるいはアミノ基をもう一つの官能基として表面を調製した場合、その接触角が反応時の仕込み比には比例しないことが認められた。このことは、当初の仮定とは異なり、2官能基表面における官能基組成が反応時の試薬仕込み比からは推定できないことを示している。よって、材料／細胞間に生じる相互作用を正確に評価するためには、調製した2官能基表面の組成や分散状態を適切且つ簡便な手法で検討する必要がある。さらには、

その結果から、必要な2官能基表面組成を調製できる条件を見いだす必要がある。

そこで、今年度は、2官能基表面における接触角変化は各々の試薬の反応速度が末端官能基の種類に影響を受けると仮定し、水晶振動子マイクロバランス装置を用いて単一官能基からなる様々なSAM形成速度解析を行い、試薬に応じた反応速度の違いを検討した。また、官能基による接触角への影響の違いを考察するため、調製した2官能基表面における元素分析を行った。

一方、細胞間連絡機能と細胞占有面積との関連性を明らかにするため、播種する細胞数を変化させることで細胞占有面積の変化を模倣することができると仮定した検討を行った。得られた結果を、昨年度の結果に挿入し、改めて細胞間連絡機能に細胞占有面積及びモデル表面上の官能基が与える影響についての検討を行い、細胞挙動変化とモデル表面特性との関連性を考察した。

B. 研究方法

1. SAMを利用したモデル表面の調製

モデル表面は、金蒸着表面へ自己組織化単分子膜を形成させることで作製した。

基材は、マツナミ社製の円形カバーガラス (15 mm 径、厚さ 0.2 mm) の片面に 3 nm のチタン層をコートした後に 25 nm の金層をコートしたものをを用いた (村中医療器製)。

この基材を、Pirahna 溶液 (濃硫酸と過酸化水素水を 3 対 1 で混合した溶液) 及び純水で洗浄、乾燥後、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販の decanethiol 類と反応させることでモデル表面を調製した。

具体的には、1 mM の decanethiol (メチル

基用試薬) エタノール溶液に対して別の試薬 1 mM エタノール溶液を種々の比率で混合した溶液に基材を 24 時間浸漬、その後洗浄、真空乾燥を行い、2 官能基モデル表面を調製した。調製したモデル表面特性は、モデル表面の水に対する接触角を Sessile drop 法で、表面に存在する元素を Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA) で測定して評価した。

2. 水晶振動子マイクロバランス法を用いた SAM 形成速度の解析

(株) イニシウムから購入した AFFINIX シリーズ専用分離型センサーセルを使用し、そのセンサーセル上にある金上に形成される SAM 層の形成速度を水晶振動子マイクロバランス装置 (AFFINIX QN μ 、(株) イニシウム製) で検討した。予め Piranha 溶液で洗浄したセンサーセルの水晶振動をエタノール中で安定化させた後、SAM 形成用試薬を添加してその振動数の時間変化を測定した。使用した 6 種類の試薬 (メチル基、水酸基、カルボキシル基、アミノ基、リン酸基、硫酸基用試薬) 全てを対象に測定を行った。

3. 代謝協同阻害試験

モデル材料上における Chinese hamster 由来の繊維芽細胞である V79 とその変異体 TG1 を利用した代謝協同阻害試験は、以下の手順で行った。24 ウェルプレートの 1 ウェルあたり TG1 50 個に対し V79 細胞を通常の 2 倍の数である 160000 個から 5000 個まで 1/2 段階希釈させて 24-well plate に播種し、M05 培地 (Earle の平衡塩類溶液培地に非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (0.11 g/l), L-グルタミン (0.292 g/l), 炭酸水素ナトリウム (2.2 g/l), ペニシリン・ストレプトマイシン及

び FCS 5 % を含んだ培地) を 1 ml 中で培養を行った。4 時間後、変異体である TG1 が代謝できない 6-thioguanine を添加し、1 週間後に形成された変異体のコロニー数を計測することで細胞間連絡機能の阻害程度を判断した。

なお、TG1 のみを播種して同様の検討を行うことで V79 細胞数による細胞毒性試験系への影響も検討した。また、V79 を播種した 1 日後の細胞写真を基に、ImageJ 1.429 (NIH, USA) による画像処理によりモデル表面上の細胞 1 個あたりの細胞占有面積を算出した。

C. 研究結果

メチル基とアミノ基、あるいは硫酸基からなる様々な 2 官能基表面を調製しその接触角を測定したところ、昨年度までの検討同様、アミノ基を用いた場合には、反応時の仕込み比が 20 % 以上になるとアミノ基単一表面と同程度の接触角 (約 65°) を示すことが確認された。また、硫酸基を用いた場合には、アミノ基とは逆に、硫酸基の仕込み比 80% まではメチル基単一表面と同程度の接触角を示し、硫酸基単一表面での接触角は 30° 程度を示すことが確認された。

そこで、メチル基/アミノ基表面では、アミノ基用試薬の仕込み比を 0 から 20% の間で、メチル基/硫酸基表面では 80 から 100 % の間で細かく仕込み比を変えてモデル 2 官能基表面を調製し、接触角の測定を行った。その結果、前者の 2 官能基表面ではアミノ基試薬の仕込み比が 10 % 以下の場合、後者の 2 官能基表面では硫酸基試薬の仕込み比が 85 % 以上の場合、その仕込み比に依存した接触角の変化が観察された (図

1、2)。接触角の仕込み比に依存した変化が認められた範囲で、各々の2官能基表面における元素分析を ESCA で行ったところ、硫酸基/メチル基からなる2官能基表面では、接触角と表面に存在する酸素元素量との間に明確な相関性が認められた(図3)。また、より溶解性の高い溶媒である水・エタノール混合溶媒(1:1)を用いた場合でも同様の結果が得られた(図4)。しかしながら、アミノ基/メチル基2官能基表面では、そのような相関性は認められなかった。

これらの結果から、各試薬の金表面に対する反応性が異なることが予想されたため、水晶発振子マイクロバランス装置(QCM)用分離型センサーセルを使用し、そのセンサーセル上にある金上に形成されるSAM層の形成速度をQCMで測定した。

SAMの形成は

- 1) 試薬の初期吸着
- 2) 試薬の脱吸着とメチレン鎖の疎水性相互作用による配向
- 3) 試薬の未反応金表面への反応と安定化

のように起こると仮定できる。そうすると、QCMで測定された水晶振動の時間変化曲線の初期勾配からその反応速度を算出することができる。そこで、反応初期における曲線変化を詳細に検討し、上述した仮定の1)及び2)の段階に相当する1次及び2次反応速度定数を算出した。その結果、カルボキシル基用試薬で1次反応速度定数が他の2倍程度を示した以外は、いずれの試薬においても反応速度定数に大きな差は認められなかった(表1)。

代謝協同阻害試験における細胞占有面積の影響を検討する目的で、「細胞数の減少=細胞占有面積の減少」と仮定し、V79の播種数を変化させることで疑似的に細胞占有面積を変化させた代謝協同阻害試験を行った。その結果、細胞占有面積比率が低下するに従い細胞間連絡機能も低下する傾向が認められ、その傾向はこれまでの経験を基に昨年度予測したものと非常に似通ったものであった(図5)。なお、細胞毒性に関して、V79細胞数、すなわち細胞占有面積との関連性は認められなかった。

D. 考察

これまでに報告されてきた、各種材料上における細胞挙動変化は、表面の化学的要因、あるいは物理化学的要因各々の影響をどのような割合で受けているのかが明確にするのは困難であった。例えば、表面の物理化学的特性の指標である接触角に着目して各種材料上における細胞挙動を検討しても、往々にして各々の材料における表面の化学組成が異なっているため、どちらの要因が細胞挙動変化に影響を与えているのかを検討するのは困難であった。材料との界面における細胞挙動変化機構を明らかにするためには、官能基・細胞間相互作用と接触角(表面自由エネルギー)・細胞間相互作用のいずれが、あるいは両者がどの程度の割合でその変化を支配しているのか、を明らかにする必要がある。同じ化学組成の材料で接触角が異なるものを調製することはほぼ不可能である。そこで、本研究では、メチル基とそれ以外の官能基を種々の比率で含む2官能基表面を調製して検討を行うことで、細胞挙動に対する接触角の影響と

表面化学組成の影響とを別々に検討することができると考え、検討を重ねてきた。

上述した考えの元、メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬を混合した溶液を用いて、2官能基モデル表面を調製しその特性解析を行った結果、表面における官能基存在比率は異なるものの、異なる官能基を含み、また様々な接触角をもつモデル表面の作製が可能であることを示してきた。また、調製した様々な2官能基表面上での接触角に対する細胞挙動変化を検討することで、接着後の細胞占有面積、細胞毒性及び細胞機能に対する接触角、表面化学組成の影響を考察することが可能であることを示してきた。

これら2官能基表面を調製するにあたって、各々の試薬の金表面への反応性が同程度であると仮定して表面を調製してきたが、これまでの各種表面の接触角測定結果から、アミノ基表面調製試薬と硫酸基表面調製試薬とは、他の試薬と反応性が異なることが示唆されてきた。そのため、これらを用いた2官能基表面では、種々の接触角をもつ表面を調製するために反応条件を検討し直す必要があった。本年度は、まず、これらを用いた2官能基表面の調製条件を検討した。その結果、アミノ基を含む2官能基表面では、アミノ基試薬の仕込み比を0から10%の間で変化させることで、接触角の異なる表面の調製が可能であることが判明した。一方、硫酸基を含む2官能基表面の調製には、硫酸基試薬の仕込み比を85から100%の間で変化させることで、その表面接触角の制御が可能であることが判明した。この結果、同程度の接触角をもち、且つ化学組成の異なる表面を再現性よく調製でき

るようになった。

また、ESCAを用いた表面元素解析によって、調製した硫酸基/メチル基2官能基表面における表面化学組成と接触角との間に相関性があることが認められた。このことから、最終的なモデル表面における化学組成は、反応時の試薬仕込み比とは関係ないこと、調製されたモデル表面における接触角に反映されることが示唆された。すなわち、2官能基モデル表面の接触角が、その表面における官能基存在比率の指標となることが示唆された。なお、今回は窒素元素に対する検出感度が低かったため、アミノ基/メチル基2官能基表面でこのような相関性は認められなかったと考えられる。引き続き、様々な2官能基表面を用いた同様の検討を行って、接触角と表面化学組成との相関性を明らかにしていかなければならない。

これらの結果は、当初の想定とは異なり、SAM調製用試薬の反応性は官能基の種類に応じて異なることを示唆するものである。今後、種々の2官能基モデル表面を調製していくためには、各々の試薬の反応性を明らかにしていく必要がある。これまでの検討から、試薬の反応性は

硫酸基<メチル基、水酸基、カルボキシル基、リン酸基<アミノ基

の順になることが予想される。そこで、QCMを用いて各々の試薬の金表面への反応速度解析を行った。しかしながら、その結果はいずれの試薬も同程度の反応性をもつことを示唆するものであった。カルボキシル基用試薬での1次反応速度定数が他の

2倍の値を示したが、これまでの検討からはその違いが調製した2官能基表面組成に影響しているとは考えられない。この点に関しては異なる手法を用いて再検討する必要があるが、末端官能基同士の相互作用が、最終的な表面化学組成に影響している可能性も考えられる。今後は、様々な組み合わせの2官能基表面を調製しその特性解析を行うことで、更なる検討を行いたい。

なお、硫酸基/メチル基2官能基表面の調製時に水・エタノール混合溶媒を用いた場合、出来上がった硫酸基単独表面の接触角は他の溶媒を用いた場合よりも小さくなることが明らかとなった。これは、硫酸基試薬の溶解性、安定性が溶媒に応じて異なることが原因と考えられる。事実、「試薬の溶媒として使用可能」とされていたDMSOを用いた場合、硫酸基単独表面の接触角は40°弱と高い値になった。NMRによる分析の結果、当該試薬はDMSO中において末端のチオール基が分解することが判明し、これが原因で表面全体にSAMが形成されていなかったことが予想される。今回観察された接触角の値はそのことを示唆したものと考えられる。このように、DMSOは当該試薬の溶媒としては不適切なものであることが判明した。(この結果を受けて、メーカーに対して反応溶媒からDMSOを除外するよう要求し、受け入れられたことを参考までに記しておく。)

代謝協同阻害試験においては、V79とその変異体との間で細胞間連絡機能が発揮できるよう両者がある程度の確率で接触することが必須である。言い換えれば、この2種類の細胞が接触する確率が実験結果に影響を与えることになる。よって、この試

験で材料上での阻害活性を評価する場合、化学物質の評価とは異なり、材料上に細胞が接着した後のその占有面積が結果を大きく左右する因子となる。細胞占有面積の減少に伴い、見かけ上の代謝協同阻害が生じ得る(疑陽性)可能性があることを留意しなければならない。そこで、

1) 単純に細胞占有面積と代謝協同阻害検出確率とが比例する

2) 細胞占有面積と細胞播種数が比例すると仮定し、代謝協同阻害試験にV79細胞は種数が与える影響を検討した。その結果を、昨年度までに得られた細胞占有面積に対する代謝協同阻害(細胞間連絡機能阻害)の結果を示した図に加えた(図5)。その結果は、昨年度に仮定した変化と同様のものであり、細胞間連絡機能は明らかに細胞播種数が少なくなるに従って阻害されていき、ある特定の数以下になると急激に阻害が増大することが示された。この結果を踏まえて図5を見ると、そのプロット位置から、硫酸基、リン酸基及びカルボキシル基を含むモデル表面で細胞間連絡機能が阻害されることが示唆された。また、細胞毒性試験にV79細胞播種数が影響を与えなかったことから、細胞占有面積そのものは細胞毒性試験に影響しないことも示された。よって、昨年度の細胞毒性に関する考察、すなわち、モデル表面の細胞毒性においては表面の化学構造、すなわち化学的特性がより影響することが考えられた。

このように、SAMを利用した2官能基モデル表面を利用することで、物理化学的特性と化学的特性各々が細胞挙動に与える影響を検討することが可能であることが示唆された。よって、今後は、より化学組成が

制御された2官能基表面の調製方法の検討を行うとともに、その調製した2官能基表面の表面特性が細胞挙動に与える影響を検討することによって、より詳細な考察を行っていききたい。

E. 結論

材料表面特性による細胞挙動への影響を別々に考慮するために、2種類の官能基からなるモデル表面を自己組織化膜により調製した。その結果、官能基の組合せに応じて、反応し込み比と作製された表面の官能基組成は相関しないことが改めて明らかとなった。相関性が見られなかった原因として、各試薬の金表面への反応速度が異なることが予想されたが、検討の結果、予想されたような反応速度の明らかな違いは認められなかった。一方、作製した表面の接触角が官能基組成と相関する可能性を示す結果が得られたことから、調製した表面の官能基組成を接触角から推定することができると考えられる。

代謝協同阻害試験において、播種するV79細胞数を変化させることで、試験時における細胞占有面積の影響を擬似的に検討した。その結果は、昨年度、推定した挙動に近い結果を示した。この結果を、昨年度検討した代謝協同阻害試験の結果と比較検討したところ、表面に存在する官能基の種類に応じてV79繊維芽細胞の細胞間連絡機能を阻害する可能性を示唆する結果を得た。また、V79細胞播種数は細胞毒性試験に影響を与えなかったことから、表面の物理化学的特性よりも化学的特性が細胞機能に影響を与える可能性が示唆された。

ここまでの結果は、表面特性の影響程度

を化学的及び物理化学的特性に分けて詳細に検討することにより、材料と相互作用した生体に引き起こされる様々な反応の機構を解明する上で重要であることを示している。また、その検討手段として、自己組織化膜を利用したモデル表面は非常に有用であることが示された。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 中岡竜介、松岡厚子「種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について(4): 初期細胞接着と細胞間連絡機能変化に関する検討」、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2010年11月21、22日
- 2) 植松美幸、中野達也、瀬川勝智、靄島由二、中岡竜介、松岡厚子「分子動力的シミュレーションを用いた医用高分子材料表面の水和状態の可視化」、第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2010年11月21、22日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 水晶発振子マイクロバランス装置による測定により算出された
各種 SAM 用試薬の金表面に対する反応速度

末端官能基	CH ₃	OH	COOH	NH ₂	OPO ₃	SO ₃
1次反応速度定数	2.94.E-02	1.49.E-02	4.58.E-02	1.74.E-02	1.52.E-02	1.78.E-02
2次反応速度定数	3.44.E-03	1.00.E-03	9.85.E-04	8.88.E-04	1.56.E-03	9.01.E-04

図1. メチル基とアミノ基から調製した2官能基モデル表面の接触角変化

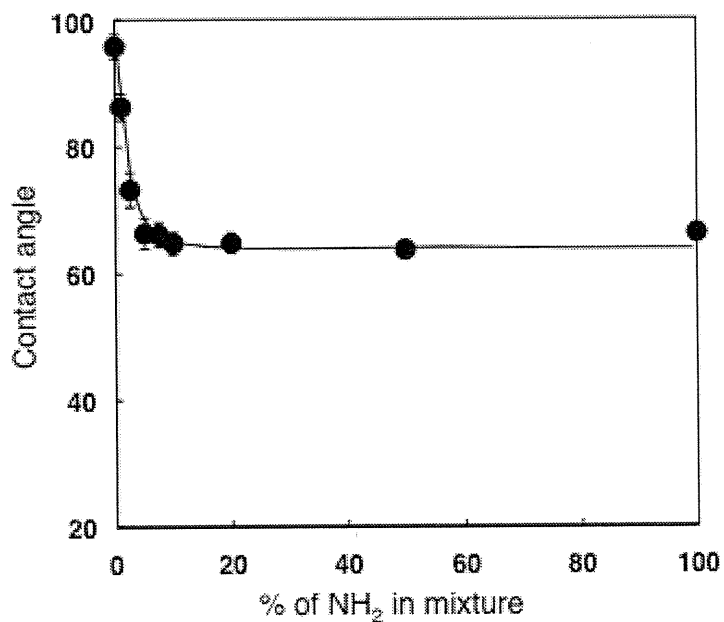


図2. メチル基と硫酸基から調製した2官能基モデル表面の接触角変化

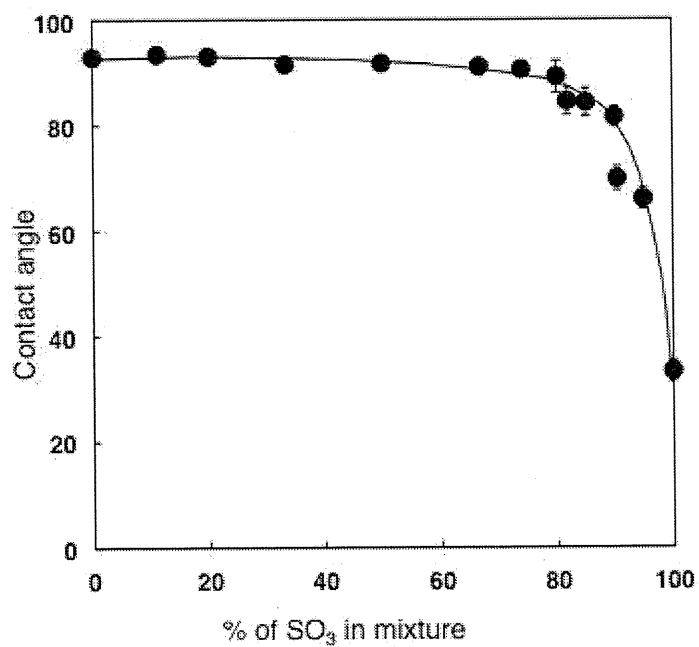


図 3. メチル基と硫酸基から調製した 2 官能基モデル表面の接触角と表面に存在する酸素元素比との関連性 (エタノール使用時)

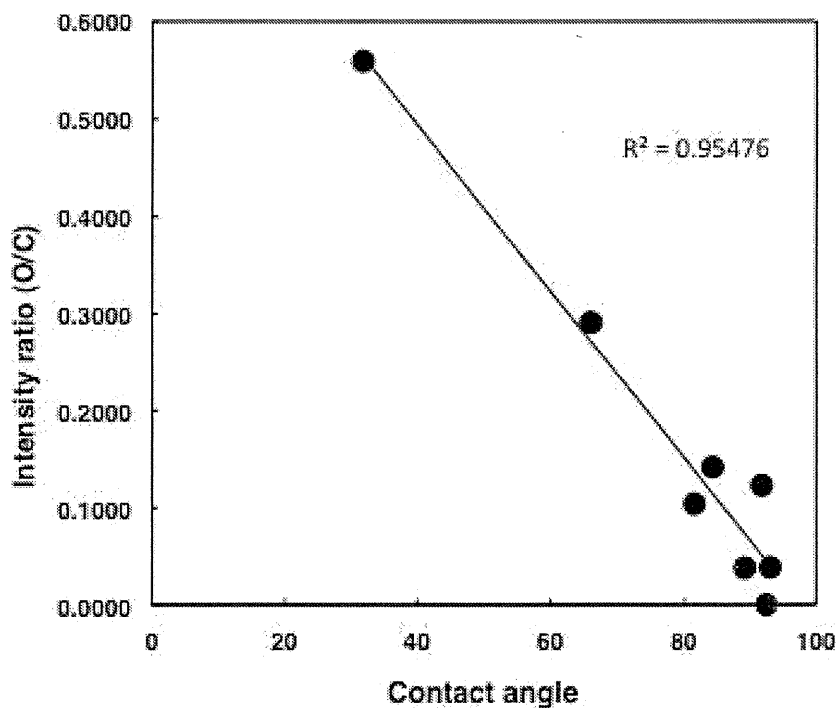


図 4. メチル基と硫酸基から調製した 2 官能基モデル表面の接触角と表面に存在する酸素元素比との関連性 (水・エタノール混合溶媒使用時)

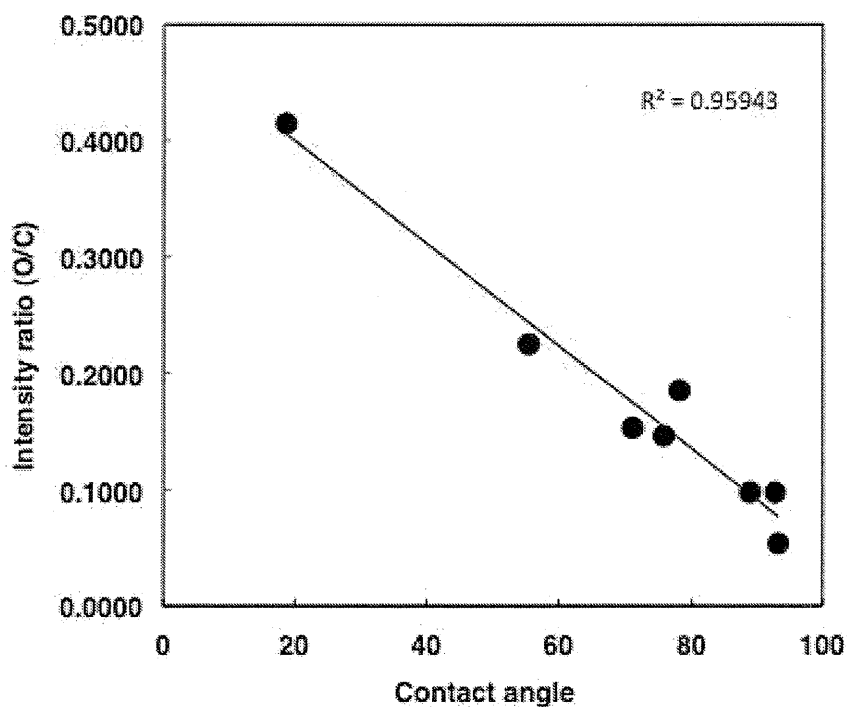
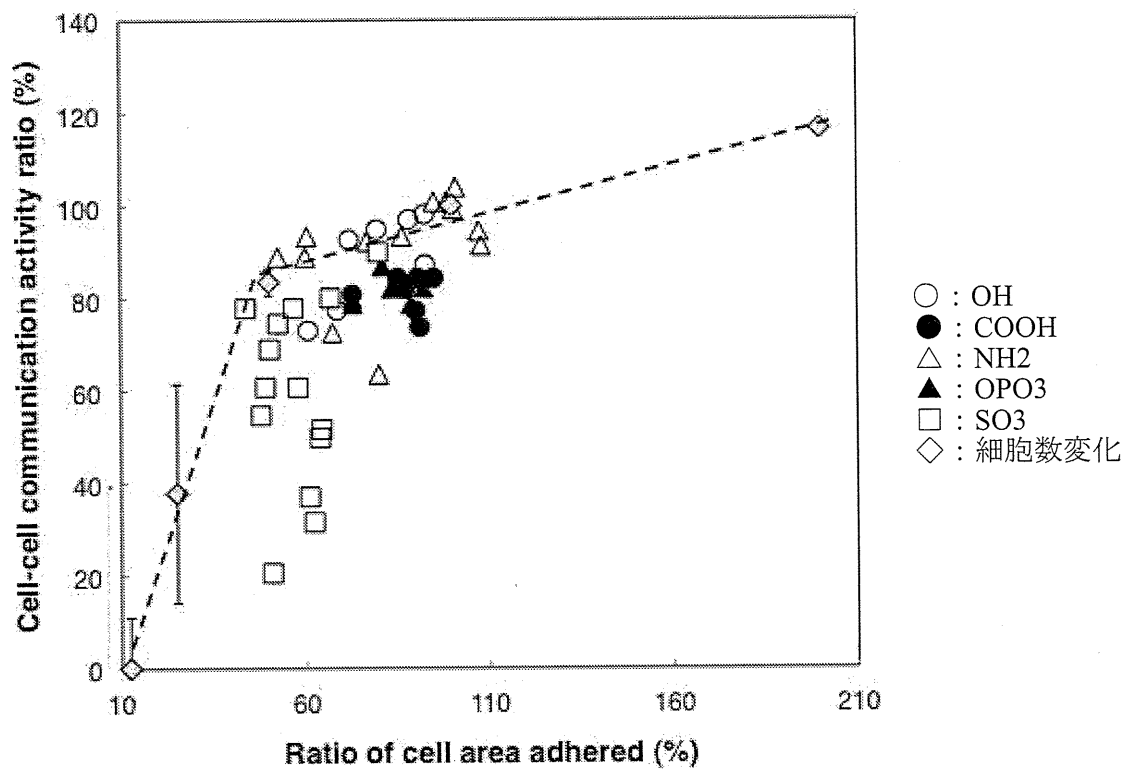


図5. モデル表面上での代謝協同阻害に対する細胞占有面積の影響
 (細胞数変化により占有面積変化を模倣した場合の結果を点線で示す)



分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

「材料／細胞・組織界面特性に着目した医用材料の新規評価方法の開発に関する研究」

アパタイト形成におけるイオン吸着挙動の解析

研究分担者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第四室長

研究協力者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官

研究要旨：アパタイト形成能が高い材料は、生体骨と直接結合でき、骨系埋植医療機器への応用が期待できる。我々は、ジルコニウムにアパタイト形成能を付与するために、NaOH 処理後に CaCl_2 処理又は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理を施して、材料表面にカルシウムを導入した。それらを擬似体液に浸漬し、カルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオンの試料表面への吸着量を調査した。その結果、NaOH 処理及び CaCl_2 処理したジルコニウムは浸漬 7 日目からカルシウム量及びリン量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。一方、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理したジルコニウムは浸漬 5 日目からカルシウム量及びリン量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。特に、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理したジルコニウムは擬似体液浸漬初期からカルシウム量及びリン量が経時的に増加した。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 処理によりジルコニウムに最も高いアパタイト形成能を付与することができた。

A. 研究目的

整形外科領域で使用される骨系埋植医療機器には、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髄内釘、人工関節などがあり、高齢者人口の増加等によってこれら骨系医療機器の使用は年々増加している¹⁾。しかし、構造の複雑化や使用期間の長期化などによって、これらの機器の不具合は増加傾向にある²⁾。特に、埋植初期に見られる機器の破損や埋植部位近傍の骨折は、埋植した機器と骨との接

着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した医用材料が開発されてきた。その代表例として、アルカリ加熱処理を施したチタン合金が開発され、これを実用化した人工股関節は平成 19 年 10 月に製造販売承認された³⁾。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成することが知られている。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材

料は、埋植後に生体骨と早期に直接結合することが期待できる^{4,5)}。我々は、擬似体液としてハックス平衡塩溶液を用いて、フーリエ変換赤外光音響分光法によるアパタイト形成能の定量的評価法を検討し⁶⁾、高いアパタイト形成能を付与するために材料表面にカルシウムを導入したチタン合金等のアパタイト形成能を評価した⁷⁾。その結果、水酸化カルシウムによりカルシウムを導入したものは、塩化カルシウムによりカルシウムを導入したものに比べて、高いアパタイト形成能を示し、カルシウム導入量とアパタイト形成能との相関が認められた⁷⁾。

金属材料表面へのイオンの吸着挙動は、アパタイト形成や蛋白質吸着を支配すると考えられている。そこで、本研究は、チタン及びジルコニウム等へのイオンの吸着挙動とアパタイト形成能との関係を解析することを目的とする。今年度は、アルカリ処理及びカルシウム導入処理を施したジルコニウムの擬似体液浸漬におけるカルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量の推移を調査した。

B. 研究方法

1. 試験材料

株式会社高純度化学研究所製の純ジルコニウム片（純度：98%、金属不純物：Al 不検出、Cr 0.002%、Fe 0.08%、Mg 不検出、サイズ：5 mm×5 mm×t 1 mm）を用いた。試料片は、酢酸エチル、アセトン、エタノール及び超純水の順に、超音波洗浄した後に使用した。

2. 表面処理

試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬工業株式会社）3.5 mL を加え、温度 60°C で 24 時間静置した（NaOH 処理）。

また、NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.1 mol/L 塩化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、温度 60°C で 24 時間静置した（CaCl₂ 処理）。

さらに、前述の CaCl₂ 処理とは別に、NaOH 処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、0.01 mol/L 水酸化カルシウム水溶液 3.5 mL を加え、温度 60°C で 24 時間静置した（Ca(OH)₂ 処理）。

3. 擬似体液浸漬

表面処理した試料をポリプロピレン製遠沈管に入れ、カルシウム及びマグネシウムイオンを含有するハックス平衡塩溶液（GIBCO #14025、インビトロジェン株式会社）7 mL を加え、温度 37°C に設定したインキュベータ内に静置した。なお、ハックス平衡塩溶液は一日おきに新鮮なものと交換した。

4. 吸着イオンの定量

擬似体液浸漬後の試料を超純水で洗浄した後、10%硝酸に 37°C で 2 時間浸漬し、試料に吸着したイオンを溶解した。その後、超純水で 2 倍に希釈し、5%硝酸溶液とした。

溶解液中のカルシウム、マグネシウム及びリンの濃度は、誘導結合プラズマ質

量分析 (ICP-MS) 装置を用いて、内標準法により定量した⁸⁾。ICP-MS 装置には、Agilent 7500ce ORS ICP-MS (アジレント・テクノロジー株式会社) を使用した。ICP-MS の測定条件は、

高周波出力 : 1500 W

プラズマガス : Ar 15 L/min

キャリアガス : Ar 0.7 L/min

メイクアップガス : Ar 0.33 L/min

コリジョンガス : He 5 mL/min

サンプリング位置 : 7.8 mm

スプレーチャンバー温度 : 2°C

積分時間 : 1-2 sec/element

測定回数 : 3 times

とした。また、各測定元素及び内標準元素の測定質量数 (m/z) は、

カルシウム : 43

マグネシウム : 24

リン : 31

コバルト : 59 (内標準)

とした。

検量線作成用の混合標準液は、カルシウム、マグネシウム及びリンの各 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業株式会社) を用いて、5%硝酸で段階希釈して調製した。また、コバルトの 1 µg/L 溶液 (アジレント・テクノロジー株式会社) を内標準溶液として用いた。

C. 研究結果

1. ICP-MS 分析の精度

5%硝酸 (ブランク) 及び段階希釈した混合標準液を用いて、内標準法による ICP-MS 測定におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの検出下限値、定量下限値及びバックグラウンド相当濃度を求め

た (表 1)。これらの定量下限値から、今回の測定条件において、試料 1 cm² 当たり吸着した定量可能なカルシウム、マグネシウム及びリンの下限値は、それぞれ 804、53.4 及び 65.4 pmol/cm² と算出された。

2. 表面処理によるカルシウム導入量

表面処理後の試料表面のカルシウム量、マグネシウム量及びリン量を表 2 に示した。CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理によってジルコニウム表面にカルシウムが導入されたことが確認できた。また、Ca(OH)₂ 処理によるカルシウム導入量は、CaCl₂ 処理によるカルシウム導入量の 3.78 倍であった (表 2)。

3. 擬似体液浸漬時のイオン吸着挙動

擬似体液浸漬 0.5 日目から 9 日目までの、未処理、NaOH 処理、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したジルコニウム表面に吸着したカルシウム量、マグネシウム量及びリン量並びに Ca/P 比を図 1 に示した。

未処理のジルコニウムは、浸漬時間に係わらず微量のカルシウムイオンの吸着が認められ、浸漬時間に伴ってリン酸イオンの吸着量の増加傾向が認められた。浸漬時間に係わらずマグネシウムイオンの吸着は認められなかった。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って徐々に低下し、浸漬 7 日目以降は約 2 になった (図 1)。

NaOH 処理したジルコニウムは、浸漬 7 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した。

浸漬 9 日目にはマグネシウムイオンの吸着も認められた。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って徐々に低下し、浸漬 7 日目以降は約 1.5 になった (図 1)。

CaCl₂ 処理したジルコニウムも、浸漬 7 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した。浸漬 7 日目からはマグネシウムイオンの吸着も認められた。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って徐々に低下し、浸漬 7 日目以降は約 1.5 になった (図 1)。

Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムは、浸漬 5 日目からカルシウムイオン、及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した。浸漬 5 日目からはマグネシウムイオンの吸着量も増加した。また、Ca/P 比は、浸漬時間に伴って減少し、浸漬 5 日目以降は約 1.5 になった (図 1)。

表面処理間で擬似体液浸漬による材料表面のカルシウム量、マグネシウム量及びリン量の変化を比較した (図 2)。カルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量は、Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムにおいて、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したジルコニウムに比べて、浸漬 5 日目以降で顕著に多かった。また、浸漬 3 日目までの初期におけるカルシウム量及びリン量の変化を比較すると、Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムにおいて、浸漬 0.5 日目から経時的なカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量の増加が認められた。

D. 考察

チタン及びジルコニウムは、どちらも生体為害性が低く、埋植医療機器の材料

として使用されている。チタンは、生体内や生体模擬環境において、材料表面にアパタイトを形成することが知られている。一方、ジルコニウムは、生体内や生体模擬環境において、アパタイトを形成しない⁹⁾。さらに、チタンにジルコニウムを添加していくと、チタンのアパタイト形成能は低下し、ついにはアパタイトを形成しなくなる⁹⁾。チタン-ジルコニウム合金は、純チタンや純ジルコニウムに比べて、強度が高いという特長があり¹⁰⁾、チタン-ジルコニウム合金に高いアパタイト形成能を付与できれば、医療機器としての応用範囲が益々広がることが考えられる。

チタン合金に骨結合性を付与する表面処理法として、アルカリ加熱処理技術が開発され、人工股関節に應用されている⁹⁾。さらに、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討されている¹¹⁾。チタン合金は、水酸化ナトリウム処理により、チタン酸水素ナトリウムの層が材料表面に形成される¹²⁾。その後、塩化カルシウム溶液に浸漬すると、ナトリウムイオンがカルシウムイオンと置換してチタン酸水素カルシウムに変化し、アパタイト形成能がより高くなる¹¹⁾。我々は、アルカリ性条件下でカルシウムへの置換が可能な水酸化カルシウム溶液によるカルシウム導入法について検討した⁷⁾。その結果、Ca(OH)₂ 処理は、CaCl₂ 処理に比べて、チタン表面へカルシウムを多く導入することができ、高いアパタイト形成能を示した⁷⁾。そこで、ジルコニウムに CaCl₂ 処理及び

Ca(OH)₂ 処理を施し、カルシウム導入量を比較した。その結果、Ca(OH)₂ 処理は CaCl₂ 処理よりカルシウムを多く導入できることが示され (表 2)、Ca(OH)₂ 処理がジルコニウムへのカルシウム導入法として優れていることが確認された。

未処理のジルコニウムは擬似体液に浸漬してもアパタイトを形成しないことが知られている⁹⁾。今回の結果も、カルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量はわずかであり、浸漬時間に伴うカルシウムイオン吸着量の増加は認められず、浸漬 9 日目までにアパタイトは形成されなかった (図 1)。

NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したジルコニウムは、CaCl₂ 処理したジルコニウムの方がカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量がわずかに多かったものの、ほぼ同様な挙動を示した。すなわち、擬似体液浸漬 7 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した (図 1)。一方、Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムは、擬似体液浸漬 5 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加した (図 1)。特に、擬似体液浸漬初期からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が経時的に増加した (図 2)。

ジルコニウムが生体内や生体模擬環境においてアパタイトを形成しないのは、リン酸イオンと直ちに反応し、リン酸ジルコニウムを形成するためである⁹⁾。今回、アルカリ処理及びカルシウム導入処理によりジルコニウムがアパタイトを形成したのは、これらの処理によってリン

酸ジルコニウムの形成が阻害されたと考えられる。

また、NaOH 処理、CaCl₂ 処理及び Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムに形成されたアパタイトの Ca/P 比はいずれも約 1.5 となり、ハイドロシキアパタイトの化学量論的 Ca/P 比の 1.67 より小さく、マグネシウムイオンを含んだいわゆる生体アパタイトが形成されたと考えられる。

同じ表面処理をしたチタンに比べて¹²⁾、ジルコニウムへのカルシウム導入量は低く、アパタイト形成能も同様に低かった。しかし、今回の表面処理により、ジルコニウムにアパタイト形成能を付与できたことは、今後のチタン-ジルコニウム基合金の開発に有益である。

E. 結論

ジルコニウムにアパタイト形成能を付与するために、NaOH 処理後に CaCl₂ 処理又は Ca(OH)₂ 処理を施して、材料表面にカルシウムを導入した。それらを擬似体液に浸漬し、カルシウムイオン、マグネシウムイオン及びリン酸イオンの試料表面への吸着量を調査した。その結果、NaOH 処理及び CaCl₂ 処理したジルコニウムは浸漬 7 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。一方、Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムは浸漬 5 日目からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が急速に増加し、Ca/P 比がアパタイトの Ca/P 比に近づいた。特に、Ca(OH)₂ 処理したジルコニウムは擬似

体液浸漬初期からカルシウムイオン及びリン酸イオンの吸着量が経時的に増加した。Ca(OH)₂ 処理によりジルコニウムに最も高いアパタイト形成能を付与することができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) K. Isama, T. Kawakami, T. Tsuchiya, A. Matsuoka: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys, International Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials, Medimond S.r.l., pp.57-61 (2012)

2. 学会発表

- 1) K. Isama, T. Kawakami, T. Tsuchiya, A. Matsuoka: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys, 24th European Conference on Biomaterials (2011.9, Dublin)
- 2) K. Isama, T. Kawakami, A. Matsuoka: Adsorption behavior of ions on calcium-incorporated titanium in simulated body fluid, The 3rd Asian Biomaterials Congress (2011.9, Busan)
- 3) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したチタンのイオン吸着挙動とアパタイト形成能、日本金属学会 2011 年秋期講演大会 (2011.11、宜野湾市)
- 4) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：

カルシウム導入したチタンの擬似体液浸漬によるイオン吸着挙動、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 (2011.11、京都市)

- 5) R. Sawada, Y. Haishima, K. Isama, A. Matsuoka: Effect of surface-modified titanium by chemical treatment on the gene expression profile in osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, Society of Toxicology's 51st Annual Meeting (2012.3, San Francisco)

参考文献

- 1) 岡崎義光：整形外科用金属材料にみる標準化のメリット、バイオマテリアル、22、343-349 (2004)
- 2) 佐藤道夫：金属材料の物理的安全性評価手法の開発、平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2005)
- 3) 松下富春、鈴木順、小林尚博：アルカリ加熱処理技術の実用化研究と人工股関節への適用、バイオマテリアル、27、24-31 (2009)
- 4) T. Kokubo, S. Ito, Z.T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, J. Biomed. Mater. Res., 24, 331-343 (1990)
- 5) T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro: Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, J. Biomed. Mater. Res.,

24, 721-734 (1990)

- 6) 伊佐間和郎：骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発、平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2008)
- 7) 伊佐間和郎：骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発、平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2009)
- 8) 千賀暢子：ICP-MS による 29 元素同時定量、和歌山市衛生研究所報、13、78-82 (2001,02)
- 9) Y. Tsutsumi, D. Nishimura, H. Doi, N. Nomura, T. Hanawa: Difference in surface reactions between titanium and zirconium in Hanks' solution to elucidate mechanism of calcium phosphate formation on titanium using XPS and cathodic polarization, Mater. Sci. Eng. C, 29, 1702-1708 (2009)
- 10) E. Kobayashi, S. Matsumoto, H. Doi, T. Yoneyama, H. Hamanaka: Mechanical properties of the binary titanium-zirconium alloys and their potential for biomedical materials, J. Biomed. Mater. Res., 29, 943-950 (1995)
- 11) T. Kizuki, H. Takadama, T. Matsushita, T. Nakamura, T. Kokubo: Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment, Acta Biomater., 6, 2836-2842 (2010)
- 12) 伊佐間和郎、河上強志：アパタイト形成におけるイオン吸着挙動、平成

22 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (2011)

表 1 ICP-MS 測定におけるカルシウム、マグネシウム及びリンの測定精度

Element	Ca	Mg	P
Mass number (m/z)	43	24	31
Detection limit ^a (μg/L)	6.77	0.273	0.426
Determination limit ^b (μg/L)	22.6	0.908	1.42
Background equivalent concentration (μg/L)	84.2	12.5	7.16

^a Three times of the standard deviation of a blank.

^b Ten times of the standard deviation of a blank.

表 2 表面処理後の試料表面のカルシウム量、マグネシウム量及びリン量

Sample	Surface density (nmol/cm ²)		
	Ca	Mg	P
Untreated	ND ^a	ND	ND
NaOH treated	ND	ND	0.108
CaCl ₂ treated	0.806	ND	0.111
Ca(OH) ₂ treated	3.04	ND	0.0854

^a Less than the determination limit.

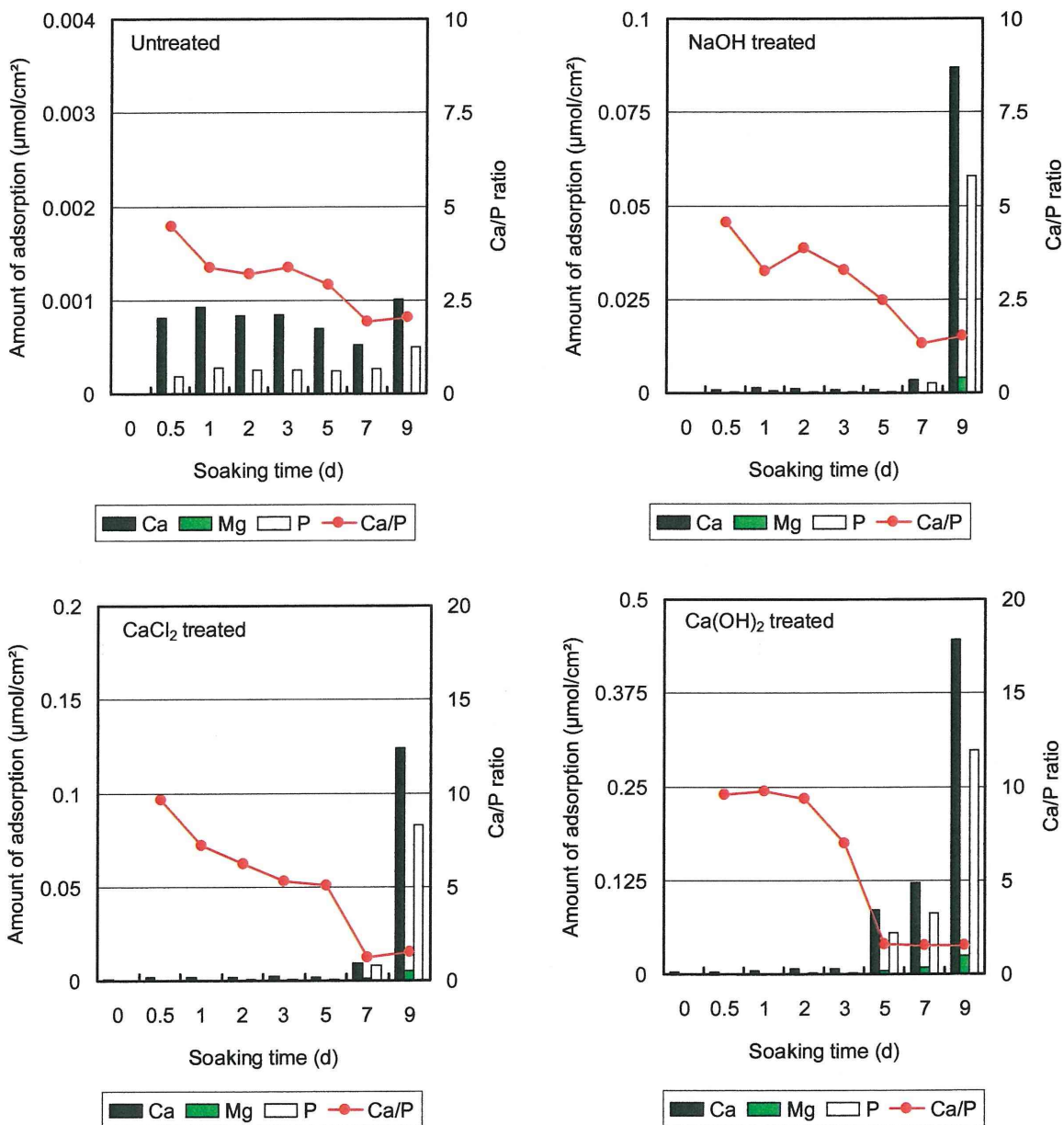


図1 擬似体液浸漬におけるイオン吸着量及び Ca/P 比の変化

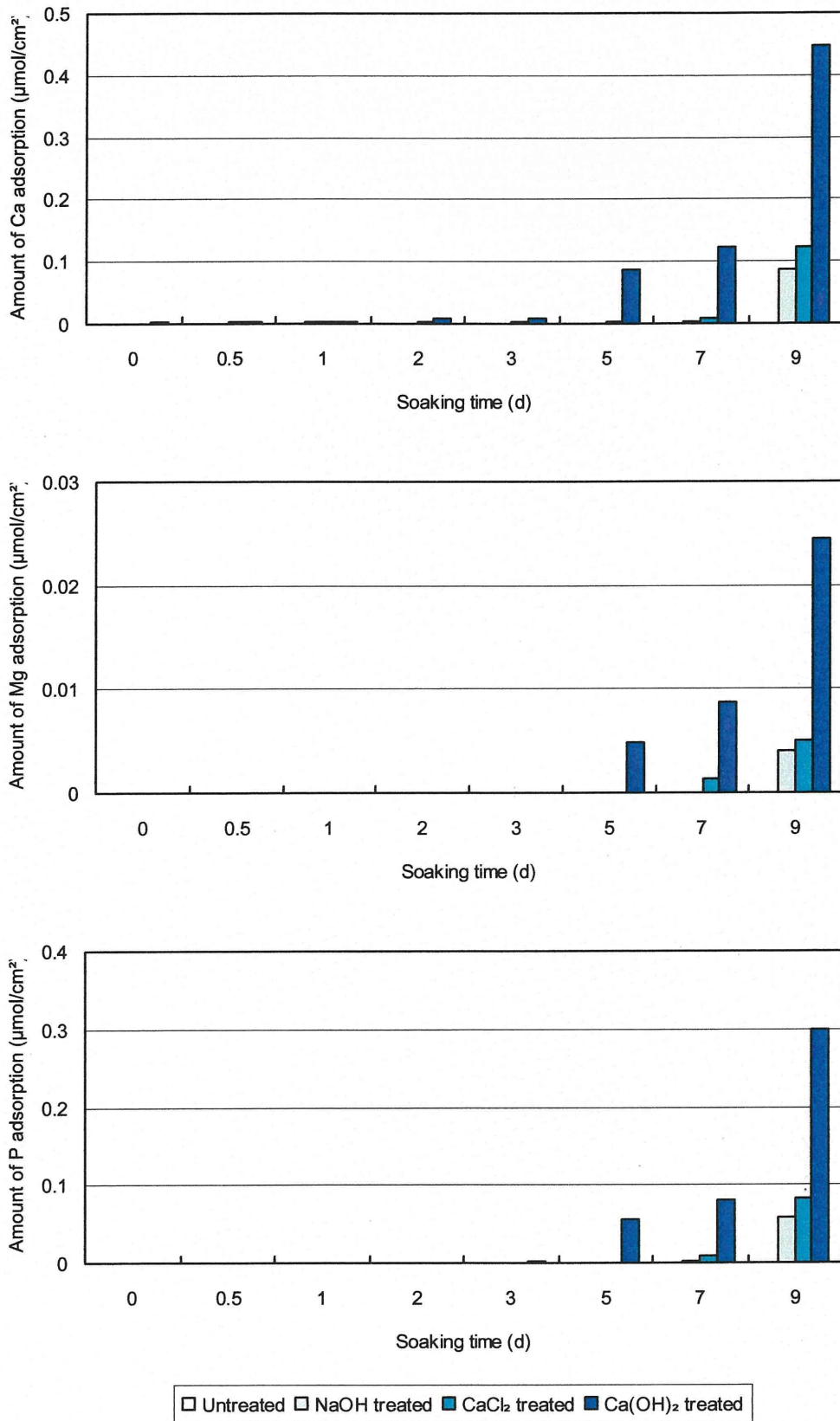


図2 擬似体液浸漬9日目までのカルシウム量、マグネシウム量及びリン量の推移