

## 分担研究総合報告書

### 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  
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

### 分担研究課題名

#### 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、チタンにアパタイト形成能を付与するために、アルカリ処理後に塩化カルシウム又は水酸化カルシウムを用いて、チタン材料表面にカルシウムを導入した。これらの処理を施したチタンの表面形状及び表面化学状態を解析した。さらに、短時間の擬似体液浸漬による表面化学状態変化を解析した。その結果、 $\text{CaCl}_2$  処置及び  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理を施しても、 $\text{NaOH}$  処理によって形成された網目形状が保持されていた。また、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理によってチタン表面にはチタン酸カルシウムが形成されていた。さらに、擬似体液浸漬によって、 $\text{CaCl}_2$  処置したチタンではカルシウムの漏出が示唆されたが、水に不溶性のチタン酸カルシウムが表面に形成された、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理したチタンではリン酸イオンの吸着が示唆された。チタンへの  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  処理は、チタン酸カルシウムの形成によって、高いアパタイト形成能を発揮したと考えられる。

#### A. 研究目的

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。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、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。その結果、水酸化カルシウムを用いてカルシウムを導入

したものは、塩化カルシウムを用いてカルシウムを導入したものと比べて、高いアパタイト形成能を獲得し、カルシウム導入量とアパタイト形成能との間に正の相関が認められた。

さらに、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) によって、カルシウム導入処理を施したチタン及びジルコニウムの擬似体液浸漬時におけるイオンの吸着挙動とアパタイト形成能との関係を解析した。その結果、水酸化カルシウムを用いてカルシウムを導入したチタン及びジルコニウムは、それぞれの材料の中で最も高いアパタイト形成能を示し、どちらも擬似体液浸漬初期からリン酸イオンの吸着量

が経時的に増加したことから、これらの材料の高いアパタイト形成能は早期のリン酸イオンの吸着に起因していると考えられた。

また、網羅的遺伝子発現解析から、チタンにカルシウム導入処理を施すことによって、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の Wnt シグナル伝達経路が活性化され、さらに、骨形成に関する転写因子などの発現が誘導または上昇した。これらの現象は、チタンのカルシウム導入量及びアパタイト形成能の増加に依存することが示唆された。

このように、チタンにカルシウム導入処理を施すことによって、高いアパタイト形成能を付与し、さらに、間葉系幹細胞の骨分化誘導が可能になる。今年度は、カルシウム導入処理を施したチタンの表面性状を解析し、表面処理によってもたらされた表面化学状態を明らかにした。さらに、カルシウム導入処理を施したチタンを擬似体液に短時間浸漬した後の表面化学状態の変化を解析した。

## 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チタン片（純度：99.9%、金属不純物：Al 0.003%、Cr 0.005%、Fe 0.02%、Ni 0.003%、サイズ：5 mm×5 mm×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

#### (1) NaOH 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、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

#### (2) CaCl<sub>2</sub> 処理

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、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

#### (3) Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

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、60°C で 24 時間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

### 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、37°C に加温した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（インビトロジェン株式会社）7 mL を加え、37°C に設定したインキュベータ内に 15 分間または 30 分間静置した。その後、超純水で十分に洗浄した。

### 4. ICP-MS

試料表面に導入されたカルシウム量を求めるため、試料を 10%硝酸に 37°C で 2 時間浸漬した後、その浸漬液を超純水で 2 倍に希釈し、5%硝酸溶液とした。その溶液中のカルシウム濃度を ICP-MS 法により測定した。

### 5. 走査型電子顕微鏡（SEM）観察

イオンスパッタリング装置 JFC-1500（日本電子株式会社）を用いて、試料表面に金を 20 nm の厚さにコーティングした。その後、走査型電子顕微鏡 JSM-5800LV（日本電子株式会社）を使用して、加速電圧 15 kV で試料の表面形状を観察した。

### 6. X 線光電子分光分析（XPS）

ESCA-3200（株式会社島津製作所）を使用して、試料表面の化学状態を分析した。XPS

スペクトルの解析には、XI Spectral Data Processor v4.3 (XPS International, LLC) を使用した。なお、結合エネルギーの帯電補正は、炭化水素の C 1s ピーク (285.0 eV) を基準とした。

## C. 研究結果

### 1. カルシウム導入量

表面処理による試料表面へのカルシウム導入量の測定結果を図 1 に示した。CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によってチタン表面にカルシウムが導入されたことが確認された。また、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によるカルシウム導入量は、CaCl<sub>2</sub> 処理によるカルシウム導入量の 2.75 倍であった。

### 2. 表面処理後の表面形状

未処理のチタン表面は、研磨痕を除いて、平坦な形状が観察された。一方、NaOH 処理、CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン表面は、いずれも網目形状が観察され、各処理間に明らかな相違は認められなかった。

### 3. 表面処理後の表面化学状態

表面処理した試料の XPS スペクトルを図 2 に示した。未処理のチタンの XPS スペクトルには、炭素に由来するピークを除き、チタン及び酸素に由来するピークのみが認められた (図 2a)。また、NaOH 処理したチタンの XPS スペクトルには、未処理のチタンで観察されたピークの外に、ナトリウムに由来するピークが認められた (図 2b)。一方、CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの XPS スペクトルには、ナトリウムに由来するピークに換わって、カルシウムに由来するピークが認められた (図 2c, d)。

未処理のチタンの O 1s ピークに比べて、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s

ピークは、高結合エネルギー側に化学シフトしていた。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s には、少なくとも 2 つ以上のピークが認められた。そこで、カルシウム導入処理に使用した塩化カルシウム水和物及び水酸化カルシウム並びにチタン酸カルシウムの O 1s XPS スペクトルと比較したところ、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピークは、チタン酸カルシウムの O 1s ピークと相似していた。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン及びチタン酸カルシウムの O 1s のピークフィッティング解析の結果、どちらもおよそ 530.1 eV 及び 531.7 eV にトップを持つ 2 つにピークに分離され、それら 2 つのピーク面積の割合も一致した (530.1 eV : 46% 及び 531.7 eV : 54%)。

### 4. 擬似体液浸漬後の表面化学状態

未処理のチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬による変化が認められなかった。NaOH 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬によってナトリウムのピークが相対的に減少し、新たにカルシウムのピークが認められた。また、CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬前には認められなかったナトリウムのピークが認められた。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの XPS スペクトルは、擬似体液浸漬前には認められなかったリンのピークが認められた。

## D. 考察

チタン合金に骨結合性を付与するためのアルカリ加熱処理技術が開発され、すでに人工股関節に応用された。さらに、アルカリ処理したチタン合金を塩化カルシウム水溶液に浸漬し、表面にカルシウムを導入する方法が検討された。チタン合金は、NaOH 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。その後、塩化カルシウム水溶液に

浸漬すると、ナトリウムがカルシウムとイオン交換して、チタン酸水素カルシウムに変化する。我々は、水酸化カルシウム水溶液を用いたアルカリ性条件下で、NaOH 処理したチタン合金にカルシウムを導入する方法を検討した。その結果、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン合金は、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理したチタン合金に比べて、高いアパタイト形成能を示した。さらに、擬似体液浸漬時におけるイオンの吸着挙動を解析したところ、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの高いアパタイト形成能は、早期のリン酸イオンの吸着に起因していることが示唆された。そこで、カルシウム導入処理を施したチタンの表面形状及び表面化学状態を解析した。さらに、カルシウム導入処理を施したチタンの擬似体液浸漬時における表面化学状態の変化を解析した。

既報と同様に、NaOH 処理及び CaCl<sub>2</sub> 処理したチタン表面は、網目形状が観察された。Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン表面も、それらと類似した網目形状が観察され、NaOH 処理後に水酸化カルシウム水溶液で処理を施しても、NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されたものと考えられる。

XPS スペクトルから、NaOH 処理によって導入されたナトリウムが (図 2b)、CaCl<sub>2</sub> 処理及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によって完全にカルシウムに置換されたことが確認できた (図 2c, d)。

また、O 1s XPS スペクトルから、NaOH 処理したチタンの O 1s ピークと CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピークは相似しており、NaOH 処理によって形成されたチタン酸水素ナトリウム中のナトリウムがカルシウムとイオン交換したことを支持している。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの O 1s ピークは、それらのピークとは明らかに異なり、むしろチタン酸カルシウムの O 1s ピークと相似していた。ピークフィッティング解析の結果、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理

したチタンとチタン酸カルシウムの O 1s ピークは、結合エネルギー及び存在比率が一致するそれぞれ 2 つにピークに分離された。これらのことから、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタン表面には、チタン酸カルシウムが形成されたことが示唆された。

CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンは、NaOH 処理によって導入されたナトリウムが、塩化カルシウム水溶液で処理することによって、完全にカルシウムと置換していた。しかし、15 分間及び 30 分間の擬似体液浸漬によって、カルシウムの一部が再びナトリウムと置換していた。CaCl<sub>2</sub> 処理したチタンのアパタイト形成能が、NaOH 処理したチタンのアパタイト形成能と比べて、顕著に向上しないのは、導入されたカルシウムの漏出によるものと考えられる。一方、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンを擬似体液に浸漬してもナトリウムが検出されなかったことは、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によってチタン表面に水に不溶性のチタン酸カルシウムが形成されたことを支持している。また、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンのみで 15 分間及び 30 分間の擬似体液浸漬によってリンが検出されたことは、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンの高いアパタイト形成能が早期のリン酸イオンの吸着に起因していることを支持している。

## E. 結論

CaCl<sub>2</sub> 処置及び Ca(OH)<sub>2</sub> 処理を施しても、NaOH 処理によって形成された網目形状が保持されていた。また、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理によってチタン表面にはチタン酸カルシウムが形成されていた。さらに、擬似体液浸漬によって、CaCl<sub>2</sub> 処置したチタンではカルシウムの漏出が示唆されたが、水に不溶性のチタン酸カルシウムが表面に形成された、Ca(OH)<sub>2</sub> 処理したチタンではリン酸イオンの吸着が示唆された。チタンへの Ca(OH)<sub>2</sub> 処理は、チタン酸カルシ

ウムの形成によって、高いアパタイト形成能を發揮したと考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A, 2573-2585 (2013).
- 2) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101A, 2630-2643 (2013).

### 2. 学会発表

- 1) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Apatite Formation on Ca-Incorporated Ti-Zr Based Alloys in Simulated Body Fluid, *The 9th World Biomaterials Congress* (2012.3, Chengdu)
- 2) 伊佐間和郎、河上強志、松岡厚子：カルシウム導入したジルコニウムのイオン吸着挙動とアパタイト形成能、*日本金属学会 2012 年秋期講演大会* (2012.9、松山市)
- 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及びジルコニウムの擬似体液浸漬によるアパタイト形成、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012* (2012.11、仙台市)

- 4) 河野健、澤田留美、伊佐間和郎、齋島由二、松岡厚子：チタン表面の化学処理による間葉系幹細胞の骨分化誘導、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012* (2012.11、仙台市)
- 1) 齋島由二、河上強志、福井千恵、田上昭人、柚場俊康、伊佐間和郎、松岡厚子：DEHP 代替可塑剤を利用した新規血液バッグの開発 –可塑剤溶出量と溶血性の関係について–、*日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012* (2012.11、仙台市)

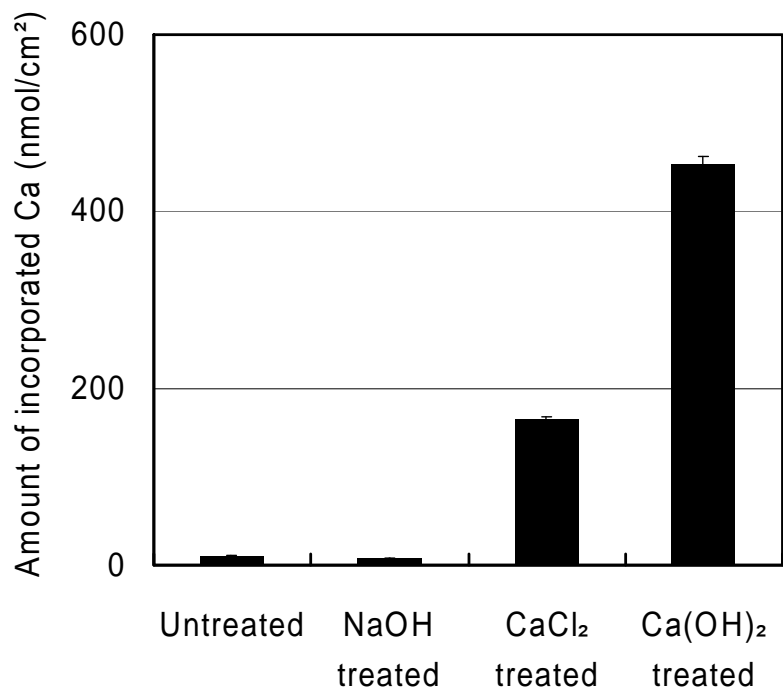


図1 チタン表面へのカルシウム導入量

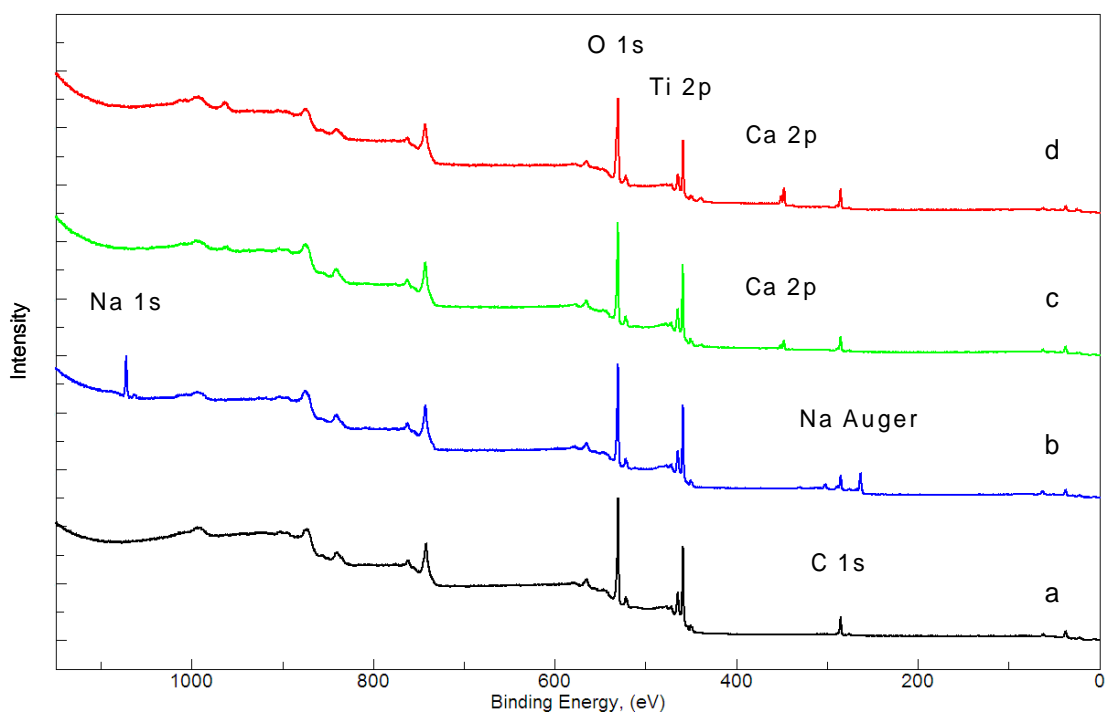


図2 表面処理を施したチタンの XPS スペクトル

a: 未処理、b: NaOH 処理、c: CaCl<sub>2</sub> 処理、d: Ca(OH)<sub>2</sub> 処理