水中熱基板法により作製した異なる表面形態を有する水酸アパタイト皮膜の骨誘導性^{*1}

黒田 健介 中本 真二^{*2} 宮下 喜敬^{*2} 市野 良一 興戸 正純

名古屋大学大学院工学研究科マテリアル理工学専攻材料工学分野

J. Japan Inst. Metals, Vol. 71, No. 3 (2007), pp. 342–345
© 2007 The Japan Institute of Metals

Osteoinductivity of Hydroxyapatite Films with Different Surface Morphologies Coated by the Thermal Substrate Method in Aqueous Solutions

Kensuke Kuroda, Shinji Nakamoto^{*2}, Yoshihiro Miyashita^{*2}, Ryoichi Ichino and Masazumi Okido

Department of Materials Science & Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464–8603

The aim of this study was to investigate the in vivo performance of implants coated with hydroxyapatite (HAp) with different surface morphologies. HAp coatings were formed on commercially pure titanium rods (2 mm in diameter, 5 mm in length) by the thermal substrate method in an aqueous solution that included $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and CaCl_2 . The coating experiments were conducted at 40–140°C and pH=8 for 15 or 30 min. All the specimens were covered with HAp, which had different morphologies such as net-like, plate-like, and needle-like. The coated rods were implanted in the tibiae of 10-week-old male rats. Noncoated titanium rods were used as the control in this study. The constructs were retrieved 14, 28, and 56 days postimplantation and examined for new bone formation and tissue response in the cancellous and cortical bone, respectively. After 14 days implantation, new bone formed on both the HAp-coated and noncoated titanium rods in the cancellous and cortical bone. However, the bone-implant contact ratio, which was used for the evaluation of new bone formation, was significantly dependent on the surface morphology of the HAp, and the results demonstrated that the needle-like coating appears to promote rapid bone formation.

(Received November 28, 2006; Accepted December 15, 2006)

Keywords: hydroxyapatite coating, surface morphology, needle-like hydroxyapatite, thermal substrate method, in vivo

1. 緒 言

リン酸カルシウム、なかでも水酸アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, 以下 HAp と略す) は高い骨誘導能を有することから¹⁾, 骨と接触する部位へ用いるインプラント材料への応用が期待されている. 生体活性物質である HAp は医用ならびに歯科用の骨代替材料としてすでに使用されているが, 単独では機械的強度に劣るため, それを補うために金属基材にコーティングして使用される場合が多い. HAp やほかのリン酸カルシウム化合物を金属上にコーティングする多くの手法が報告されているなかで, 工業的には, 乾式コーティング法のひとつであるプラズマスプレー法²⁾が使用され, 結晶質, アモルファス, ならびにその複合体の骨誘導性が in vivo 評価によって多くの研究者によって検討されている. しかし同法を用いた場合, 複雑形状材や複雑表面を有する材料への均一な薄付けコーティングは極めて難しい. その一方で, 著者らは, リン酸カルシウム化合物をコーティングする新しい水溶液プロセスである「水中熱基板法」を提案し³⁾, 同法の適用によって基板上に HAp コーティングが可能であることを実験的に確認するだけでなく, イオン源, 溶液中の

Ca/P 比, 基板表面の粗さや形状が HAp コーティングにおよぼす影響についても検討してきた^{3–6)}. さらにコーティング条件を変化させることによって, 異なる表面形態を有する HAp 皮膜が作製でき⁷⁾, 従来の HAp コーティング技術の有する欠点を克服する, すなわち複雑表面を有する基材への均一な薄膜コーティングも可能であることを示した⁶⁾. 他の水溶液プロセスに関する報告^{8–15)}では, HAp コーティングに影響をおよぼすと考えられるいくつかの因子, すなわち, 溶質の種類と濃度, pH, ならびに添加剤などが広範にわたって検討されている. しかし, コーティングされた HAp 結晶の形や表面形態の in vivo 評価, 例えば, 骨誘導性におよぼす影響などについては, 未だに明らかになっていない. 本報では, 水中熱基板法によって Ti 基板上に, 異なる表面形態を有する HAp コーティングを施し, それをラット脛骨に埋植し, 新生骨の生成について調べた.

2. 実験装置と方法

2.1 HAp コーティング

HAp コーティングの作製に用いた実験装置を Fig. 1 に示す. $0.3 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ と $0.7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$ を含有する水溶液を使用し, NaOH 添加により pH を 8 に調製した. 試料には市販品レベルの純度 99.9 mass% の Ti 棒 ($\phi 2$

^{*1} Mater. Trans. **47** (2006) 1391–1394 に掲載

^{*2} 名古屋大学大学院生 (Graduate Student, Nagoya University)

Fig. 1 Experimental apparatus for the HAp coating.

×5 mm)を使用し、実験前に SiC 研磨紙(#400)により表面研磨を施した。Ti 試料を銅製の電極に挟み込み、0.2 dm³ の水溶液に浸漬し、手で振動させることによって、試料表面に付着している泡を除去した後、交流電流(最大 50 A)を試料に印加した。電流印加によって試料を加熱し、コーティング実験を行った。試料温度は、あらかじめ補正した熱電対を試料に直接接触させて測定し、試料温度が 40–140℃ の所定温度になるように、印加電流量を調節した。加熱時間は、温度 140℃ の場合は 15 分、60℃ ならびに 40℃ の場合は 30 分とした。製膜中には、水溶液中に水冷銅管を浸漬し、水溶液全体の温度が上昇するのを抑制した。また 60℃ 以下でのコーティング実験の場合には、上記の溶液では HAp の析出が起りにくいため、溶液に 1 mmol dm⁻³ のエタノールを添加し HAp の溶解度を低下させ¹⁶⁾、かつコーティング中には、HAp の核発生ならびに成長を加速するため、100 Hz の超音波を超音波洗浄器により印加した¹⁷⁾。作製した HAp 膜の評価には、XRD、SEM-EDX ならびに FT-IR を用いた。

2.2 in vivo 評価

コーティングを行った試料を、ラット脛骨の骨幹端部に埋植し、新生骨の生成から生体活性を評価した。埋植手術の前に、全てのコーティング試料を蒸留水中で超音波洗浄し、その後、オートクレーブ滅菌(121℃, 20 分)ならびにグルコン酸クロルヘキシジン溶液(HIBITEN)に浸漬した。ラットには、試料の大きさを考慮して、体重 340–400 g の 10 週齢の Sprague Dawley ラット(日本チャールズリバー)を使用した。ラットは、あらかじめ埋植前 7 日間の馴化飼育を行い、異常のないことを確認して用いた。埋植手術に際して、バルビタール系麻酔薬(25–30 mg kg⁻¹)を腹腔内に投与して麻酔の後、両足の埋植部位を剃毛し、ポビドンヨード(イソ

ジナールグ)と 70%エタノールによって消毒した。φ2 mm のドリルによって、試料よりわずかに大きい穴を、皮質骨とほぼ直角になり、かつ、骨を貫通しないように、生理食塩水を注水しながら両足にひとつずつ開けた後、生理食塩水により洗浄した。その後、試料を挿入し、術部の化膿予防のためにペニシリン G カリウムを投与した。筋肉および皮膚を縫合した後、外表を再びポビドンヨードによって消毒した。なお、埋植位置は可能な限り、骨の中央になるようにし、1 個体には異なる条件によって作製した試料を埋植するようにした。

術後、ラットは滅菌済みのポリカーボネート製ケージで 1 匹ずつ飼育し、1 日 1 回以上観察を行った。埋植後、14 日、28 日あるいは 56 日に、ラットから埋植試料を周辺組織とともに採取し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬し、組織の固定・保存をした。その後、蒸留水で洗浄し、アルコール脱水列で脱水、アセトン置換の後、メチルメタクリレート樹脂に埋め込み、試料を厚さ 20 μm に切断・研磨の後、トルイジンブルーにて染色して、光学顕微鏡観察用試料とした。

骨誘導能を評価するために、次式で定義する骨-インプラント接触比、 R_{B-I} を導入し、皮質骨と海綿骨に分けて算出・評価した。すなわち、 R_{B-I} は、

$$R_{B-I} =$$

$$\frac{\text{インプラント材表面に骨が生成している部分の長さの合計}}{\text{インプラント材の全長}} \times 100$$

で定義され、埋植したインプラント材表面に生成した骨の割合を表し、値が大きいほど、骨誘導能が高いことを意味する。算出した R_{B-I} は、Tukey-Kramer 法によって統計処理し、誤差 0.05 で有意差のあるものについては*を付した。

3. 結果および考察

3.1 HAp コーティング

水中熱基板法により、40–140℃ で 15 分あるいは 30 分間コーティングした試料の表面 SEM 写真ならびに XRD 分析結果を Fig. 2(a)–(c)ならびに Fig. 3 に示す。全ての試料は、白色の析出物で覆われており、XRD 分析から HAp であると同定できた。これらの HAp 皮膜には、FT-IR 分析から、CO₃²⁻を含んでおり、一部が炭酸置換型アパタイトとなっていた。さらに、EDX 分析により、カルシウムとリンのモル比は 1.49–1.52 であり、カルシウム欠損型 HAp であった。析出物の表面形態は、温度に強く依存し、低温の 40℃ では網状、高温の 140℃ では六角針状を示し、その間の 60℃ では板状を示した。HAp 結晶の温度依存性の傾向は、Ban and Maruno の報告⁹⁾に一致しているが、本研究では、HAp 皮膜の表面形態と結晶配向性ならびに結晶性についての関係を明らかにすることはできなかった。さらに、HAp 皮膜は極めて脆く、コーティング試料の表面粗さを測定することはできなかった。140℃ で 15 分間コーティングした試料の断面観察から、HAp 皮膜の厚さは 2–3 μm であった。

in vivo 評価を行う前に、全ての試料を滅菌する必要がある。本研究では、低温のコーティング実験(40℃, 60℃)より温度の高い、121℃でオートクレーブ滅菌を行った。よっ

Fig. 2 The change of surface morphology after coating in a solution at pH=8 containing $0.3 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and $0.7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$.

(a) 40°C , 30 min., ultrasonic waves (100 Hz), ethanol added (1 mol dm^{-3}), (b) 60°C , 30 min., ultrasonic waves (100 Hz), ethanol added (1 mol dm^{-3}), (c) 140°C , 15 min., no additions, (d) 40°C , 30 min., ultrasonic waves (100 Hz), ethanol added (1 mol dm^{-3}), (e) 60°C , 30 min., ultrasonic waves (100 Hz), ethanol added (1 mol dm^{-3}), (f) 140°C , 15 min., no additions, (a) (b) (c): as-coated, (d) (e) (f): after sterilization in a steam autoclave.

Fig. 3 XRD patterns after coating in a solution at pH=8 containing $0.3 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and $0.7 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ CaCl}_2$. ●: HAp.

(a) 40°C , 30 min., ultrasonic waves (100 Hz), ethanol added (1 mol dm^{-3}), (b) 60°C , 30 min., ultrasonic waves (100 Hz), ethanol added (1 mol dm^{-3}), (c) 140°C , 15 min., no additions.

て、高温のオートクレーブ滅菌処理中に、上記の HAp の表面形態が変化することが危惧された。Fig. 2(d)-(f) にオートクレーブ処理後の表面写真を示す。これより、オートクレーブ滅菌の前後で表面形態に明らかな変化はないことがわかる。さらに、XRD, FT-IR, EDX の各分析によっても、オートクレーブ処理の前後で明らかな変化は認められなかった。したがって、全ての試料は、洗浄ならびにオートクレーブ滅菌した後、in vivo 評価に供することとした。

3.2 in vivo 評価

Fig. 4 に六角針状の HAp をコーティングした試料を、14 日間インプラントした後に採取した試料の骨との界面近傍の光学顕微鏡写真の一例を示す。薄くコーティングした HAp 皮膜断面を確認することはできない。試料表面には所々に繊維状組織が観察されるものの、埋植 14 日後にすでに多くの骨がインプラント上に生成している。最長 56 日までの R_{B-I} の変化を、コーティングを施していない Ti 試料と比較して Fig. 5 に示す。海綿骨部は、皮質骨部と比較して、体液循環が活発なためか、高い R_{B-I} 値を示していることがわかる。さらに表面形態の違いによる R_{B-I} への影響は明らかであり、特に、埋植 14 日後の海綿骨部における六角針状の HAp

Fig. 4 Light microscopy of bone-implant interface of HAp coated implant (needle-like) at 14 days after implantation in cancellous bone.

Fig. 5 Histomorphometric results showing the percentage of bone formed on the HAp coated implants with various surface morphologies. (a) cancellous bone, (b) cortical bone. ■: 14 days, □: 56 weeks. * $p < 0.05$.

が最大の R_{B-I} 値を示している。これと似た傾向が、皮質骨部でも認められる。皮質骨部の網目状ならびに板状 HAp については、56 日までの埋植によって、徐々に R_{B-I} が上昇し、HAp コーティングを施していない Ti よりも高い値となっている。一方、海綿骨部においては、網目状ならびに板状 HAp については、 R_{B-I} への差がほとんど認められず、Ti とほぼ同様の値で一定となっている。これに対し、埋植初期に最大値を示した六角針状 HAp の R_{B-I} は、徐々に低下し、海綿骨

健常部の R_{B-I} である 30% に近づいていることがわかる。すなわち、海綿骨部においては、埋植初期においてのみ、六角針状の HAp の R_{B-I} が高い値を示すが、期間の延長とともに、徐々に骨誘導性への効果が失われ、56 日後では、HAp コーティングを施していない Ti との差はほとんど認められない。この原因が、コーティングした HAp の剥離によるものなのか、あるいは破骨細胞や貪食細胞による骨吸収によるものなのかを特定するには至らなかったが、六角針状の HAp が網状や板状の HAp に比べて、埋植初期段階においては極めて高い骨誘導性を有することは特筆に値するものと考えられる。

4. 結 言

(1) 水中熱基板法によって、Ti 基板表面に、表面形態の異なる HAp コーティングを施すことが可能であった。すなわち、表面形態は、コーティングの温度に強く依存し、低温の 40℃ では網状、高温の 140℃ では六角針状を示し、その間の 60℃ では板状を示した。

(2) 海綿骨部において、六角針状の HAp が網状や板状の HAp に比べて、埋植初期段階においては極めて高い骨誘導性を有することがわかった。

本研究の遂行にあたり、文部科学省・科学研究費補助金(若手研究(B)(15760520)(17760564))ならびに日本板硝子材料工学助成会からの一部資金援助を受けました。ここに感謝の意を表します。

文 献

- 1) L. L. Hench and J. Wilson: *An Introduction to Bioceramics*, (World Scientific, Singapore, 1993).
- 2) S. W. K. Kweh, K. A. Khor and P. Cheang: *Biomater.* **21**(2000) 1223-1234.
- 3) K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai: *J. Biomed. Mater. Res.* **59**(2002) 390-397.
- 4) K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and O. Takai: *J. Biomed. Mater. Res.* **61**(2002) 354-359.
- 5) K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido and O. Takai: *Mater. Trans.* **43**(2002) 3015-3019.
- 6) K. Kuroda, S. Nakamoto, R. Ichino, M. Okido and R. M. Pilliar: *Mater. Trans.* **46**(2005) 1633-1635.
- 7) K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino and M. Okido: *Mater. Sci. Forum* **426-432**(2003) 3189-3194.
- 8) H. Monma: *J. Mater. Sci.* **29**(1994) 949-953.
- 9) S. Ban and S. Maruno: *J. Biomed. Mater. Res.* **42**(1998) 387-395.
- 10) Y. Han, K. Xu and J. Lu: *J. Mater. Sci. Med.* **10**(1999) 243-248.
- 11) M. Okido, K. Kuroda, M. Ishikawa, R. Ichino and O. Takai: *Solid State Ionics* **151**(2002) 42-57.
- 12) M. Shirkhanzadeh: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **6**(1995) 90-93.
- 13) I. Zhitomirsky and L. Gal-or: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **8**(1997) 213-219.
- 14) Y. Li, L. DeGroot, J. Dewijn, C. P. A. T. Klein and S. V. D. Meer: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **5**(1994) 326-331.
- 15) T. Iizuka and A. Nozuma: *J. Ceram. Soc. Jpn.* **106**(1998) 820-823.
- 16) M. S. Tung and T. J. O'Farrell: *Coll. Surf. A* **110**(1996) 191-198.
- 17) Y. Fang, D. K. Agarwal, D. M. Roy, R. Roy and P. W. Brown: *J. Mater. Res.* **7**(1992) 2294-2298.