パルス電解法により作製したチタニア/水酸アパタイト複合膜の骨伝導性評価^{*1}

黒田 健介¹ 志津 裕信^{1,*2} 市野 良一¹ 興戸 正純¹ 関 あずさ²

¹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

²ハムリー株式会社

J. Japan Inst. Metals, Vol. 72, No. 5 (2008), pp. 383-387

© 2008 The Japan Institute of Metals

Osteoconductivity of Titania/Hydroxyapatite Composite Films Formed Using Pulse Electrolysis

Kensuke Kuroda¹, Hironobu Shidu^{1,*2}, Ryoichi Ichino¹, Masazumi Okido¹ and Azusa Seki²

¹Department of Materials Science & Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University, Nagoya 464-8603

²Hamri Co., Ltd., Tokyo 110-0005

Titania (TiO₂)/hydroxyapatite (HAp) composite films were prepared on commercial pure titanium rods (2 mm in diameter, 5 mm in length) by anodic-cathodic pulse electrolysis in an aqueous solution consisting of 0.3 mM Ca(H₂PO₄)₂ and 0.7 mM CaCl₂ and pH=5.5. The electrolysis was carried out in an autoclave at 120°C for 30 min. using +8.7 V vs. Ag/AgCl sat. KCl as the anodic potential and -9.3 V as the cathodic potential, and changing the electrolysis cycle (60~600 s) and duty ratio. We obtained TiO₂/HAp composite films in which fine HAp particles were uniformly dispersed on a thin TiO₂ layer. The coated rods were implanted in the tibiae of 10-week-old male rats. The constructs were retrieved 14 d postimplantation and examined for new bone formation and tissue response in the cancellous and cortical bone. They were compared with HAp-coated titanium rods, TiO₂-coated rods (anodizing in an aqueous solution), TiO₂/HAp-coated rods formed by the high temperature oxidation of specimens coated with HAp by cathodic electrolysis, and uncoated titanium rods. Fourteen days after implantation, new bone had formed on all the coated samples (HAp, TiO₂, and TiO₂/HAp) and noncoated titanium rods in the cancellous bone and cortical bone. In particular, TiO₂/HAp composite films prepared by pulse electrolysis had very high osteoconductivity in the part of cortical bone, which resulted from a synergistic effect of HAp and TiO₂ on the bioactivity.

(Received December 17, 2007; Accepted February 13, 2008)

Keywords: hydroxyapatite, titania, composite coating, pulse electrolysis, anodizing, hydroprocess

1. 緒 言

水酸アパタイト(Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, 以下 HAp と略す)や TiO₂ は高い骨伝導性を有することから、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、多くの研究者により研究が進められている¹⁻⁴。著者らは、いずれも単独コーティングによって高い骨伝導性を付与できる TiO₂ や HAp を複合化させた TiO₂/HAp 複合皮膜とすることで、それらの相乗効果から、TiO₂ や HAp をそれぞれ単独にコーティングするよりも、高い骨伝導性を実現できるのではないかと考えた。TiO₂/HAp 複合コーティング膜の作製方法については、一般に、二つあるいはそれ以上の工程を必要としており、あらかじめ作製した TiO₂ 基板上への HAp コーティング法⁵や TiO₂ 粒子を含んだ溶液中からの HAp コーティング時における複合化⁶、HAp と TiO₂ 粒子を含んだ溶液を用いたゾル・ゲル法⁷などが報告されている。このうち、Ti-TiO₂-HAp といったサンドイッチ型の三層構造を有する

複合膜の作製については、Ti 基板上へ形成させる HAp コーティング皮膜の密着性改善のために有効とされている⁸。しかし基材直上に生成させた TiO₂ が、緻密で厚い HAp 膜で完全に覆われている場合には、高い骨伝導性を有する TiO₂ が中間層として存在しているものの、表層に露出していないため、TiO₂ の持つ骨伝導性は有効には働かないものと考えられる。そこで著者らは、水溶液中において単一工程によって Ti 基板上に TiO₂/HAp 複合皮膜を形成させることが可能なアノード-カソード・パルス電解法を提案し、Ti 基板上に薄く生成した TiO₂ 皮膜上に細かな HAp 粒子が均一に分散した TiO₂/HAp 複合皮膜の生成に成功した^{9,10}。そこで本稿では、本法によって Ti 基材上に TiO₂/HAp 複合皮膜をコーティングしたインプラント材をラット脛骨に最長 14 日間埋入し、新生骨の形成割合から骨伝導性を評価することを目的とした。

2. 埋植試料の作製ならびに in vivo 評価

2.1 TiO₂/HAp 複合コーティング

実験装置と方法は前報^{9,10}と同様であるため、ここでは簡

^{*1} Mater. Trans. 48(2007) 328-331 に掲載

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

潔に記すこととする。水溶液には 0.3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ならびに 0.7 mM CaCl_2 を含み、室温にて pH を NaOH 添加により 5.5 に調製したものをを用いた。ここで、M は mol dm^{-3} を表す。あらかじめ #400 の SiC 研磨紙を用いて湿式研磨した市販品レベルの Ti 棒(直径 2 mm × 長さ 5 mm)を基材として用いた。これを作用極とし、対極(Pt コイル)、擬似参照極(Pt 線)ならびに熱電対をオートクレーブ内にセットしたビーカー内の 0.2 dm^3 の水溶液中に浸漬して電解実験を行った。電極電位は全て Ag/AgCl sat. KCl 基準に補正して表記するものとする。実験中、ビーカー内の水溶液はスターにより攪拌した。オートクレーブ外部に設置したヒーターにより水溶液を 120°C まで昇温し、電解実験を開始した。実験中は、液温を常に 120°C に保持した。パルス電解に用いた電位は、アノード電位 +8.7 V、カソード電位 -9.3 V とし、全電解時間は 1800 s とした。電解周期ならびにならびにデューティー比を、アノード電解 30 s + カソード電解 30 s (A30 s-C30 s)、アノード電解 30 s + カソード電解 60 s (A30 s-C60 s)、アノード電解 60 s + カソード電解 60 s (A60 s-C60 s) の 3 種類として電解を行った。作製した膜の同定には XRD を、表面ならびに断面観察には SEM を用いた。

2.2 その他のコーティング

パルス電解法による TiO_2/HAp 複合コーティング膜の in vivo 評価を行うに当たり、比較材料として、他の手法によっても TiO_2/HAp 複合コーティング膜、 TiO_2 単独コーティング膜ならびに HAp 単独コーティング膜を作製した。以下にそれぞれのコーティング膜の作製方法を示す。

2.2.1 水溶液中カソード電解と気相中高温酸化を組み合わせた TiO_2/HAp 複合コーティング

3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ と 7 mM CaCl_2 を含み、pH を 5.5 に調製した 55°C の水溶液中で、電流密度 -1 mA cm^{-2} で 300 s 間、カソード電解を行い、HAp コーティングを行った。その後、HAp コーティング試料を Ar-3% H_2 雰囲気電気炉にセットし、昇温速度 5°C min^{-1} にて 600°C まで昇温した。600°C に到達後、電気炉の電源を切断し、試料を同雰囲気下で炉冷した。ここで、高温酸化の条件として、上記の条件を選定した理由は以下のとおりである。Ti は極めて活性の高い金属であるため、低酸素分圧下でも容易に表面酸化が生じる。すなわち、600°C における Ti/TiO₂ 平衡酸素分圧 $p\text{O}_2/\text{atm}$ は、 10^{-47} と計算される¹¹⁾ため、大気下ならびに中性の Ar 雰囲気下での高温保持では、Ti 表面に多量の TiO_2 が生成し、電解コーティングによって生成した HAp の剥離が生じるなど適当ではないと判断した。よってここでは、わずかに還元性の雰囲気である Ar-3% H_2 雰囲気下において、HAp を電解コーティングした Ti 基材を 600°C において加熱・炉冷することによって、表面に薄い TiO_2 皮膜を形成させた。

2.2.2 水溶液中陽極酸化による TiO_2 単独コーティング

パルス電解に用いた水溶液と同様の水溶液 (0.3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, 0.7 mM CaCl_2 , pH 5.5) を用いた。+8.7 V で 900 s 間、120°C に保持したオートクレーブ内でアノード電解を行った。

2.2.3 水中熱基板法による HAp 単独コーティング^{4,12)}

0.3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ と 0.7 mM CaCl_2 を含み、室温にて pH を 5.5 に調製した水溶液に、エタノールを 1 M 添加した水溶液に、基材を浸漬させ、外部から基材に電流を直接印加して(水中熱基板法)、基材を 40°C に保持することによって、HAp コーティングを行った。HAp コーティング中には、HAp の基材上への核発生・成長を促すために、超音波(100 kHz)を印加した¹²⁻¹⁴⁾。なお、動物埋入試験によって、HAp コーティング表面の結晶形態が、骨伝導性に大きな影響を示すことがわかっているため、ここでは、2.2.2 のカソード電解によって得られる HAp 皮膜と類似の結晶形態が得られるように、上記の条件を選定した。

2.3 in vivo 評価

各種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入し、新生骨の生成の割合から生体活性(骨伝導性)を評価した。評価の方法も前報¹²⁾と同様であるため、ここでは簡潔に記すこととする。埋入手術の前に、すべ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°C, 20 分)した。ラットには、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。両足の埋植部位を剃毛・消毒の後、 $\phi 2 \text{ mm}$ 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、14 d 後に、ラットから埋入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。

インプラント材の骨伝導能を評価するために、埋植したインプラント材の長さ(骨との接触部)に対する、その表面に骨が生成した部分の長さの割合を表す骨-インプラント接触比 R_{B-I} を使用し、皮質骨と海綿骨に分けて算出・評価した¹²⁾。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 TiO_2/HAp 複合コーティング、 TiO_2 単独コーティング、HAp 単独コーティング

作製した試料の表面 SEM 写真ならびに XRD 分析結果の一例を Fig. 1 ならびに 2 に示す。図中において、(a)~(c) はパルス電解、(d) は陽極酸化、(e) はカソード電解による HAp コーティング後に気相中高温酸化、(f) は水中熱基板法による HAp コーティングによる表面改質試料であり、(g) は Ti 基材(#400 研磨まま材)を表す。これより、(a)~(c) と (e) では作製方法は異なるものの、いずれも TiO_2/HAp 複合皮膜となっており、(d) では TiO_2 (アナターゼ) 単相膜、(f) では HAp 単相膜となることがわかる。断面の

Fig. 1 SEM photographs of the surface of the coated samples in an aqueous solution at pH=5.5 by (a) (b) (c) pulse electrolysis using +8.7 V as the anodic potential and -9.3 V as the cathodic potential for 1800 s at 120°C ((a) Anodic 30 s: Cathodic 30 s, (b) A 30: C 60, and (c) A 60: C 60), (d) anodizing at +8.7 V for 900 s at 120°C, (e) high temperature (600°C) oxidized specimen after HAp coating by cathodic electrolysis at -1 mA cm^{-2} for 300 s at 55 °C, (f) the thermal substrate method for 1800 s at 40°C, and (g) as-polished Ti. (a) (b) (c) (d) (f): 0.3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and 0.7 mM CaCl_2 (e): 3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and 7 mM CaCl_2

SEM-EDX 分析より、陽極酸化((a)~(d))によって生成した TiO_2 皮膜厚さは、およそ 50 nm 以下、HAp 皮膜厚さは 3 μm 以下と見積もられた⁹⁾。一方、2 段階操作によって得られた TiO_2/HAp 複合皮膜(e)では、XRD 分析結果からは TiO_2 が検出されているものの、水中熱基板法(f)によって得られた表面と同様に、表面全体が多くの孔を有する網目状の HAp で覆われていることがわかる。このような表面形態は、単独のカソード電解によって生じた網目状の HAp 膜の構造と同様であり¹⁵⁾、高温酸化によって生成した特異な表面形態ではない。さらに、上と同様の SEM-EDX によって高温酸化前後の皮膜断面の観察を行ったところ、生成した TiO_2 膜は極めて薄く、 TiO_2/HAp 複合膜の膜構造を明らかにすることはできなかった。しかし、 TiO_2 の生成の原理と併せて考えると、HAp 全体が TiO_2 で覆われているとは考えにくい。ため、(e)では、3 μm 程度の厚さで疎に生成している HAp の隙間の最下層(Ti 表面)を埋めるように、極めて薄い TiO_2 膜が生成しているものと考えられる。

なお、アナターゼやルチルといった TiO_2 の結晶構造の相違による骨伝導性への影響については、擬似体液浸漬評価によっては差が認められるという報告もある¹⁶⁾ものの、著者らが行った *in vivo* 試験の範囲内では、ほとんど差はないことが既にわかっているため¹⁷⁾、結晶構造の相違については特に考慮せず検討を行った。このことについては、別稿にて詳細に報告する。

3.2 *in vivo* 評価

本研究では、動物埋植試験に先立って、全ての試料をオートクレーブ滅菌(121°C, 20 min.)している。この滅菌処理によって、作製した種々のコーティング試料の表面形態に大きな変化は認められないことをあらかじめ確認して、試料を動物埋植試験に供した。パルス電解法によって作製した TiO_2/HAp 複合コーティング材の骨-インプラント接触率 R_{B-I} を、他のコーティング材ならびにコントロール材(研磨まま材)とあわせて Fig. 3 に示す。これより、パルス電解法によって作製した TiO_2/HAp 複合コーティング材((a) (b) (c))の R_{B-I} は、 TiO_2 や HAp をそれぞれ単独でコーティングしたもの((d) (f))より、特に皮質骨部において、高い値を示していることがわかる。これは、単独のアノード電解による TiO_2 被覆材(d)が HAp 単独コーティング材(f)や研磨まま材(g)よりも高い骨伝導性を示していることから、複合膜((a) (b) (c))においても、 TiO_2 の影響が大きく現れているものと考えられる。一方、海綿骨部においては、単独のアノード電解による TiO_2 被覆材(d)、HAp 単独コーティング材(f)を比較すると、研磨まま材(g)よりもわずかに高い骨伝導性を示しているものの、大きな相違は認められないことから、複合化((a) (b) (c))によっても、骨伝導性の大幅な向上は認められなかった。しかしこのことは、もともと単体のコーティングでもわずかに骨伝導能が向上する程度の TiO_2 と HAp を複合化しても、それぞれ単体の持つ骨伝導能を阻害することではなく、その相乗効果からわずかに骨伝導性が向上すること

Fig. 2 XRD patterns of the coated samples in an aqueous solution at pH=5.5 by (a) (b) (c) pulse electrolysis using +8.7 V as the anodic potential and -9.3 V as the cathodic potential for 1800 s at 120°C ((a) Anodic 30 s: Cathodic 30 s, (b) A 30: C 60, and (c) A 60: C 60), (d) anodizing at +8.7 V for 900 s at 120°C, (e) high temperature (600°C) oxidized specimen after HAp coating by cathodic electrolysis at -1 mA cm^{-2} for 300 s at 55°C, (f) the thermal substrate method for 1800 s at 40°C, and (g) as-polished Ti.
(a) (b) (c) (d) (f): 0.3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and 0.7 mM CaCl_2
(e): 3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and 7 mM CaCl_2
●: HAp, ■: anatase, □: rutile.

を意味している。

一方、HAp カソード電解コーティングと高温酸化を組み合わせて作製した TiO_2/HAp 複合コーティング材(e)の R_{B-I} は、水中熱基板法による HAp 単独コーティングの場合(f)とほとんど変化はない。これは、SEM 写真からも明らかにように、極めて多くの HAp が基材表面に存在していることにより、骨伝導性の高い TiO_2 を HAp が覆い隠すことになり、 TiO_2 の有する骨伝導性を引き出させない状況になっており、このような状態の TiO_2/HAp 複合コーティング材は、パルス電解によって作製したもののような高い骨伝導性は得られないものと考えられる。ただし、単独のカソード電解法を用いた場合には、パルス電解法によって作製したような細かな HAp 粒子が TiO_2 上に分散したコーティング膜を作製することはできなかったため、上記のことを厳密に検証するには至らなかった。また本研究においては、 TiO_2/HAp 複合皮膜中において、最も高い骨伝導性を示す TiO_2 と HAp

Fig. 3 Bone-implant contact ratio, R_{B-I} , for the coated samples in the aqueous solution at pH=5.5 by (a) (b) (c) pulse electrolysis using +8.7 V as the anodic potential and -9.3 V as the cathodic potential for 1800 s at 120°C ((a) Anodic 30 s: Cathodic 30 s, (b) A 30: C 60, and (c) A 60: C 60), (d) anodizing at +8.7 V for 900 s at 120°C, (e) high temperature (600°C) oxidized specimen after HAp coating by cathodic electrolysis at -1 mA cm^{-2} for 300 s at 55°C, (f) the thermal substrate method for 1800 s at 40°C, and (g) as-polished Ti.
(a) (b) (c) (d) (f): 0.3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and 0.7 mM CaCl_2
(e): 3 mM $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ and 7 mM CaCl_2
(A) cancellous bone, (B) cortical bone. *: $p < 0.05$

の存在割合を決定することはできなかったが、パルス電解法により作製した細かな HAp 粒子が TiO_2 層上に均一に分散した表面形態を有する TiO_2/HAp 複合膜が、 TiO_2 や HAp 単独でコーティングしたインプラント材よりも埋入初期において、特に皮質骨部において高い骨伝導性を示すことは特筆に値するものと考ええる。

5. 結 言

(1) パルス電解法により作製した細かな HAp 粒子が TiO_2 層上に均一に分散した表面形態を有する TiO_2/HAp 複合膜が、本研究で取り上げた他のコーティング材(陽極酸化法による TiO_2 単独膜や水中熱基板法による HAp 単独膜)よりも、特に皮質骨部において、高い骨伝導性を示すことがわかった。すなわち、 TiO_2 と HAp の複合化は、単独コーテ

ィングに比べ、皮質骨部において骨伝導性を高める効果があることがわかった。

(2) しかし、水溶液中カソード電解法と気相中高温酸化法を組み合わせで作製した TiO_2/HAp 複合膜のように、最表面に多量の HAp が存在する複合膜では、骨伝導性の高い TiO_2 を HAp が覆い隠すことになり、 TiO_2 の有する骨伝導性を十分に引き出すことができないことがわかった。

文 献

- 1) L. L. Hench and J. Wilson: *An Introduction to Bioceramics* (World Scientific, Singapore, 1993).
- 2) R. Hazan, R. Brenner and U. Oron: *Biomater.* **14**(1993) 570–574.
- 3) M. Keshmiri and T. Troczynski: *J. Non-cryst. Solids* **324**(2003) 289–294.
- 4) K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido and M. O. Takai: *J. Biomed. Mater. Res.* **59**(2002) 390–397.
- 5) W. Song, Y. Jun, Y. Han and A. Hong: *Biomater.* **25**(2004) 3341–3349.
- 6) X. F. Xiao, R. F. Liu and Y. Z. Zheng: *Surf. Coat. Technol.* **200**(2006) 4406–4413.
- 7) P. A. Ramires, A. Wennerberg, C. B. Johansson, F. Cosentino, S. Tundo and E. Milella: *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**(2003) 539–545.
- 8) W. Xu, W. Hu, M. Li and C. Wen: *Mater. Lett.* **60**(2006) 1575–1578.
- 9) K. Kuroda, H. Shidu, R. Ichino and M. Okido: *Mater. Trans.* **48**(2007) 322–327.
- 10) K. Kuroda, H. Shidu, R. Ichino and M. Okido: *J. Jpn. Inst. Metals*, in submit.
- 11) Nippon-kinzoku-gakkai: *Kinzoku-Seiren-kougaku*, (Maruzen, 1999) p. 187.
- 12) K. Kuroda, S. Nakamoto, R. Ichino and M. Okido: *Mater. Trans.* **47**(2006) 1391–1394.
- 13) K. Kuroda, S. Nakamoto, R. Ichino and M. Okido: *J. Jpn. Inst. Metals* **71**(2007) 342–345.
- 14) Y. Fang, D. K. Agarwal, D. M. Roy, R. Roy and P. W. Brown: *J. Mater. Res.* **7**(1992) 2294–2298.
- 15) M. Okido, K. Nishikawa, K. Kuroda, R. Ichino, Z. Zhao and O. Takai: *Mater. Trans.* **43**(2002) 3010–3014.
- 16) M. Uchida, H.-M. Kim, T. Kokubo, S. Fujibayashi and T. Nakamura: *J. Biomed. Mater. Res.* **64A**(2003) 164–170.
- 17) H. Shimizu, S. Nakamoto, K. Kuroda, R. Ichino and M. Okido: *Proc. of the spring meeting of Japan Institute of Metals*, (2005) p. 241.