レーザー光を用いた生体硬組織複合材料の開発

松谷 貴臣、熊崎 建二、中山 斌義、久保 宇市

近畿大学 理工学部 電気工学科

Development of biocompatible composite material using laser irradiation method

Takaomi MATSUTANI, Kenji KUMAZAKI, Takeyoshi NAKAYAMA, and Uichi KUBO

Department of Electrical Engineering, Faculty of Science and Technology, Kinki University

Abstract

In order to obtain a biocompatibility of an alumina (Al_2O_3) ceramics, a hydroxyapatite (HAp) layer on the surface has been formed by KrF excimer laser irradiation. The biocompatibility of HAp/ Al_2O_3 composite material has been confirmed *in vitro*. An apatite - wollastonite glass (A-W glass) and a simulated body fluid (SBF) have been used as a substitute of a bone and a human blood plasma, respectively. The HAp/ Al_2O_3 sample which is faced to A-W glass was immersed into SBF keeping at 36.5 °C and pH 7.2. In the case of sample immersed for 2 weeks, morphological change on the HAp/ Al_2O_3 surface was observed by an electron probe microanalyzer (EPMA). An X-ray diffraction (XRD) pattern was indicated that a bone-like apatite was formed on the HAp/ Al_2O_3 surface. From these results, it is considered that HAp/ Al_2O_3 composite material formed by KrF excimer laser irradiation has a good biocompatibility.

1. はじめに

医療用セラミックスとして用いられているアルミナ [Al_2O_3] は、他のセラミックスに比べ高強度、耐摩耗性に優れている等の特徴から、負荷の大きい人工関節や人工歯根等に古くから用いられている¹⁾。しかし、生体に対して不活性であるため、生体との接合には、ねじ切り等の機械的な接合が

必要であった。一方、骨の無機成分と同じ構造を持つハイドロキシアパタイト [HAp : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] は、生体と化学的に結合する生体親和性材料として知られている²⁾。近年、HAp 自身では機械的強度に欠けるため各母材の表面に付加し、生体となじみのある複合材料の研究が各種行われている³⁻⁷⁾。著者らは、レーザー光を用いた

HAp/Al₂O₃ 複合材料の開発を試み、Al₂O₃ 表面へ密着性が高く、結晶性に優れた HAp 層の形成に成功している^{8,9)}。本報告は、その作製した試料の生体親和性の有無を確認するため擬似生体液 (Simulated Body Fluid: SBF) を用いた生体外試験 (*in vitro*) を行ったものである。

2. 実験方法

2.1 HAp/Al₂O₃ 複合材料の作製

紫外光に対して透明な Al₂O₃ を HAp に密着させ Al₂O₃ 側から KrF エキシマレーザー ($\lambda=248$ nm, $\tau=23$ nsec) を 400 回照射した。照射条件は、照射フルエンス $0.7\text{J}/\text{cm}^2\cdot\text{pulse}$ 、繰り返し周波数 2 Hz である。レーザー照射後、HAp と Al₂O₃ の密着性を確認するため脱イオン水中にて 10 分間超音波洗浄を行った。その後、電子線プローブマイクロアナライザー (EPMA) を用いて作製した試料の形状観察及び成分分析を行った。Fig. 1 (a) は作製した試料の断面写真を示す。この断面写真と同位置に対応した X 線ラインプロファイルを示す。上からそれぞれ Al-K α 線、Ca-K α 線、P-K α 線に対す

Fig. 1 EPMA observation of (a) cross-sectional view and (b) X-ray line profiles of laser irradiated sample.

る X 線の強度を示している。表面 (図中左) から深さ方向 (図中右方向) に約 3-5 μm 程度まで Ca-K α 線及び P-K α 線の強度が強くなっている。即ち、Al₂O₃ 表面に Ca と P のリッチ層が形成されている事が判る。この層の Ca/P 比を測定した結果、HAp と同様 1.67 を示した。また光電子分光法、電子線回折等の評価から熱変性の少ない、結晶性に優れた HAp 層である事が確認された。

2.2 *in vitro* による生体親和性確認

作製した試料の生体親和性を確認するため *in vitro* 試験を行った⁹⁾。その実験概略図を Fig. 2 に示す。生体内と同条件の環境を作り出すため、血漿の代わりに SBF、骨の代用として apatite - wollastonite glass (A-W glass) を用いた。A-W glass は、試料の石灰化に必要な Ca イオン及び P イオンを骨同様に生体液中で溶出し、それらを過飽和の状態に維持するためのものである。

Fig. 2 Biocompatibility confirmation of HAp/Al₂O₃ composite material using A-W glass and SBF.

Table 1 Component ratio of A-W glass (wt%).

Element	MgO	CaO	SiO ₂	P ₂ O ₅	CaF ₂
Component ratio (wt%)	4.6	44.7	34.0	16.2	0.5

本実験で用いた A-W glass は、Table 1 に示す各成分の重量比で粉末を調合した。錠剤形成器によって加圧整形した後、その錠剤を 700 °C で 5 時間、アニールを行ったものを使用した。

SBF は、NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, 及び Na₂SO₄ を蒸留水に溶解して、血漿のイ

Fig. 3 SEM images of sample surface after immersion into SBF. (a) unirradiated and (b) laser irradiated sample soaked for 2 days. (c) unirradiated and (d) laser irradiated sample soaked for 2 weeks.

オン濃度に近いものを作製した。SBF 及び血漿中のイオン濃度を Table 2 に示す。上記以外に緩衝薬としてトリアミノメタン $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2]$ を用い、pH を 7.3 に維持するために HCl を 45mM 添加した。本実験では、石灰化の促進を図るため SBF のイオン濃度を 2 倍にして用いた。

作製した試料の HAp 層表面と A-W glass を厚さ 0.15mm のスペーサーを介して密接させ、体温近くの 36.5 °C に保持した SBF 中に、2 日間及び 2 週間浸漬させた。浸漬後の試料表面を脱イオン水中で超音波洗浄を 5 分間行い、EPMA を用いて表面の形状観察及び成分分析を行った。また、結晶性の確認には、Cu-X α ($\lambda = 0.154 \text{ nm}$) を線源とする X 線回折 (XRD) 装置を使用した。

3. 実験結果及び考察

レーザー照射によって作製した HAp/ Al_2O_3 複合材料の生体親和性を確認するため A-W glass と共に SBF 中に浸漬した。Fig. 3 (a), (b) はそれぞれ 2 日間浸漬後のレーザー未照射部分 (Al_2O_3 表面)、

Table 2 Ion concentration of SBF (mM).

Ion	SBF	Blood plasma
Na^+	142.0	142.0
K^+	5.0	5.0
Ca^+	2.5	2.5
Mg^+	1.5	1.5
Cl^-	147.8	103.0
HCO_3^-	4.2	27.0
HSO_4^{2-}	1.0	1.0
SO_4^{2-}	0.5	0.5

レーザー照射部分 (HAp 層表面) の表面写真である。 Al_2O_3 表面は非常にフラットな面であるのに対し、HAp 表面には凹凸が見られ、若干の繊維状の物質が形成している。さらに Fig. 3 (d) 2 週間浸漬後の HAp 層表面では、その物質が成長している事が判る。これは K.Kurashina らの報告した、SBF を用いた *in vitro* によって磷酸カルシウムセメント (calcium phosphate cement) 上に成長した HAp の形状によく似ている¹⁰⁾。一方、Fig. 3 (c) に見られる様に

Fig. 4 XRD pattern of HAp/Al₂O₃ soaked in SBF for 2 weeks (upper line), bone (middle line) and HAp standard sample (lower line).

Al₂O₃ 表面には 2 週間浸漬後でも全く変化が無い。これは、Al₂O₃ が生体に対して不活性である事を示唆している。

SBF 中に浸漬する事によって成長した繊維状の物質を調べるため XRD を用いた。Fig. 4 は、上段に SBF 浸漬後 2 週間の試料、中段及び下段は比較のため牛大腿部の皮質骨、HAp 標準試料の XRD スペクトルである。SBF 浸漬後の試料から 25° 32° 及び 52° 付近にピークを示した。25° 及び 52° のピークはそれぞれ Al₂O₃ の (012), 及び (024) 面からの回折線である。32° 付近のピークは、右肩にテールを引いており、その強度比から比較すると HAp の (211), (112), 及び (300) 面に対応している。EPMA を用いて各表面の Ca/P 比を比較を行った結果、SBF 浸漬後の試料表面、皮質骨及び HAp 標準試料はそれぞれ 1.596, 1.549, 及び 1.667 を示した。浸漬前の試料表面より P リッチな膜になっており、皮質骨の Ca/P 比に近い値になっている。また皮質骨と類似した XRD スペクトルを示している事から、繊維状の物質は新生骨を示唆する骨様アパタイトであると判断できる。以上の結果から、レーザー照射によって作製した HAp/Al₂O₃ 複合材料は、生体親和性に優れている事が判った。

4. まとめ

KrF エキシマレーザーを用いて作製した HAp/Al₂O₃ 複合材料の生体親和性の有無について

SBF を用いた *in vitro* 試験を行った。骨の代わりに用いた A-W glass と作製した試料を 0.15 mm のスペーサーを介して密接させ、血漿中のイオン濃度に対し 2 倍の SBF 中に 2 週間浸漬させた。その結果、未照射部の Al₂O₃ 上には変化が生じなかったのに対し、レーザー照射によって Al₂O₃ 上に形成した HAp 層表面には、繊維状の物質が新たに形成されていた。その物質を評価した結果、結晶構造及び Ca/P 比共に、骨に類似したアパタイトが再形成されている事が判った。以上の事から、レーザー照射によって作製した HAp/Al₂O₃ 複合材料の生体親和性向上が認められた。

本研究は、平成 7 年度文部省科学研究費補助金 (一般研究 B・研究課題番号 07455296) によってなされたものである。

- 1) 日本機械学会：生体材料学 (オーム社, 1993) 100
- 2) 片岡 一則：生命材料工学 (裳華房, 1991) 104
- 3) Y. ABE, T. KOKUBO and T. YAMAMURO : J. Mater. Sci. Mater. Med. 1(1990) 233
- 4) HUAXIAJI, C. B. PONTON and P. M. MARQUIS : J. Mater. Sci. Mater. Med. 3(1992) 283
- 5) M. YOSHINARI, Y. OHTSUKA and T. DÉRAND : Biomaterials 15 (1994) 529
- 6) R. K. SINGH, F. QIAN, V. NAGABUSHNAM, R. DAMODARAN and B.M. MOUDGIL : Biomaterials 15 (1994) 522
- 7) M. SHIRKHAZADEH : J. Mater. Sci. Mater. Med. 6 (1995) 90
- 8) 松谷 貴臣、熊崎 建二、中山 斌義、久保 宇市：第 16 回日本レーザー医学会大会論文集 (1996) 325
- 9) 熊崎 建二、松谷 貴臣、中山 斌義、久保 宇市：近畿大学理工学部研究報告 (1996) 55
- 10) K. KURASHINA, H. KURITA, M. HIRANO, J. M. A. de BLIECK, C. P. A. T. KLEIN and K. de GROOT : J. Mater. Sci. Mater. Med. 6(1995) 342