擬似体液中の生体活性純チタンのハイドロキシアパタイト 析出における超音波照射の影響について*

小林 正典^{*1}, 立松 尚紘^{*2}, 野田 恵介^{*3}

The Effect of the Supersonic Wave in the Hydroxyapatite Crystallization on the Bio-Active Pure Titanium in Simulated Body Fluid

Masanori KOBAYASHI^{*4}, Naohiro TATEMATSU and Keisuke NODA

^{*4} Department of Mechanical Engineering, Daido Institute of Technology,
10-3 Takiharu-cho, Minami-ku, Nagoya-shi, Aichi, 457-8530 Japan

In this study, the effect of the ultrasound wave stimulation for the hydroxyapatite crystalline formation on bioactive pure titanium surface was evaluated in vitro on purpose to accelerate the bone-binding to bioactive material. Pure titanium was used as a specimen, processed in the chemical treatment and the heat treatment, and soaked in simulated body fluid (SBF) under ultrasound waving for planned time-periods. The surfaces of specimens were observed by using Scanning Electron Microscope (SEM), X-ray Diffraction etc. to assess the state of apatite deposition. In result, the SEM etc. showed that more rich and fine layer with rich calcium and phosphate compounds covered on the surface in ultrasound waving group as compared with the non-ultrasound pulse group. The measurements of mass of specimens also indicated the efficiency of ultrasound waving for apatite formation. These findings suggested that the nucleation and crystallization of apatite might be promoted by micro moving and cavitation of ultrasound waving and the ultrasound waving had clinical potential to improve the osteointegration for medical implant.

Key Words: Biomaterials, Supersonic Wave, Medical Engineering

1. 緒 言

今日, チタン材料は優れた生体適合性を示すことから力学的な強度や耐久性が要求される整形外科や歯科用のインプラント材料として使用されている。近年, 特殊な表面処理を施して生体骨と直接結合する Osteointegration の能力を高めた生体活性チタンが開発されるようになってからは, その研究および臨床応用にはますます注目が集まっている。この生体活性チタン表面での骨の生成メカニズムは, 小久保ら⁽¹⁾によって骨の結晶成長に関する物理化学的な要素が大きいたことが示唆されている。

一方, 1983 年に超音波の照射が骨形成促進に有効であると発表されて以来, 主として欧米を中心として低周波超音波による骨折治療が行われてきた⁽²⁾。その骨形成促進メカニズムはまだ不明な点が多い⁽³⁾が, 骨の結晶成長の過程に何らかの影響を与えているとすれば, チタンと骨との結合促進への応用も期待される。

そこで本研究では, 擬似体液中の生体活性化した純チタンに超音波を照射し, ハイドロキシアパタイト系化合物の析出の状況を観察することで, 超音波照射の生体活性チタンの Osteointegration 機能への影響について検討した。

2. 実 験 方 法

2・1 実験試料 本実験では, 試験片として純チタン(大同特殊鋼 99.5%)を使用した。これらを 3×3×3 mm に切り出し, エメリー紙(#120~#1000)で順次研磨し, その後 NaOH[2 mol/l]に 24 時間浸漬, 600 度の炉内で 1 時間熱処理をしたのち 24 時間炉冷し生体活性のための表面処理を施した。

2・2 実験方法 上記で作製した試験片を擬似体液(SBF)に浸漬し, その直上から低周波超音波を照射した。

SBF には Lonza 社製 Hank's balanced salt solution を使用し, SBF は恒温水槽で 37 度に保ち, イオン濃度を保つ為 2 日毎に交換した。浸漬時間は各 3 day, 1 week, 2 week とした。

超音波照射には臨床で使用されている低周波超音波照射装置(® R SAFHS Teijin, 周波数 1.5 MHz)を用い, 照射間距離(試験片表面から超音波素子の距離)

* 原稿受付 2009 年 3 月 17 日。

^{*1} 正員, 大同工業大学工学部(〒457-8530 名古屋市南区滝春町 10-3)。

^{*2} 大同工業大学大学院工学研究科。

^{*3} 正員, 大同工業大学大学院工学研究科。

E-mail: mkoba@daido-it.ac.jp

を 1, 3, 5 cm として, 臨床での使用方法と同様に 1 日 20 分間の照射を行った。

また比較のために, コントロールグループとして同一条件で超音波照射なしの試料も作製した。

2・3 分析 表面状態を分析するため, 走査型電子顕微鏡(SEM), エネルギー分散型 X 線分光機(EDS), X 線回折装置(XRD)による解析を行って対照群と比較した。これらの観察には, いずれの試料でも超音波が最も直接照射される面を用いた。

各試験片の表面の析出物の量は, 電子天秤を用いて試料全体の質量変化として計測した。

3. 実験結果

3・1 SEM 画像と EDS データ 得られたデータのうち, 超音波照射距離 5 cm の試料の SEM 画像を図 1~3 に示す。

3 day~1 week の場合, 超音波照射グループの試料

表面では, コントロール群に比べて白い粒上の結晶が多く析出し, 1 week までで析出物の形状が樹枝状または針状に成長していくのが観察された。コントロール群では, この時点でも, まだ析出物の形状は粒状のままであった(図 1, 2)。2 week 以上を経過すると超音波照射グループ, コントロールグループともに析出物が球状化に成長して, 安定してきている事がわかる。

一方, これら表面状態をエネルギー分散型 X 線分光機(EDS)により分析すると, まずチタン基盤上の観察点 [図 4(b)] では P と Ca のピークと共に Ti のピークが見てとれるのに対して, 析出物上での EDS では図 4(a)に示す通り, P と Ca のピークが高く Ti のピークは消失しており, 基盤上に Ca と P による化合物が積み重なっていると考えられた。

3・2 X 線回折(XRD) 超音波照射なし(コントロールグループ)の試験片の浸漬時間 1 week のものと超音波照射グループ浸漬時間 1 week のものの X

(a) Without ultrasound wave

(b) Using ultrasound wave

Fig.1 SEM micrographs of the surface of specimen after soaking in SBF for 3 days ($\times 1000$)

(a) Without ultrasound wave

(b) Using ultrasound wave

Fig.2 SEM micrographs of the surface of specimen after soaking in SBF for 1 week ($\times 1000$)

(a) Without ultrasound wave

(b) Using ultrasound wave

Fig. 3 SEM micrographs of the surface of specimen after soaking in SBF for 2 weeks ($\times 1000$)

線回析(XRD)の結果を図5(a), (b)に示す。

既に EDS 分析から、析出物が Ca/P 系化合物であることは推察されたが、この XRD データからでは、まだ完全なハイドロキシアパタイトのパターンは認められなかった。ただ一部にハイドロキシアパタイトと見られるピークも確認できており、不完全な Ca/P 系化合物からハイドロキシアパタイトへ結晶成長している途中と考えられる。

両者を比較すると、表面処理によると考えられる TiO_2 層のピークが、超音波照射グループで小さくなっていることがわかる。このことから、超音波照射によってチタン(TiO_2)層上の P と Ca の化合物がより多く析出して表面を被覆している事が示唆された。

3.3 質量の増加量比較 超音波照射群およびコントロール群それぞれのチタン表面上での析出物の質量の経時的变化を図6に示す。計測された試料全体の質量変化を析出物の増加量とし、試料の表面積で除して単位面積当たりの析出量として評価した。

超音波照射グループで照射距離3および5 cm のものでは、全体的にコントロール群よりも析出物の増加が見られ、超音波による析出物の促進効果が認められた。照射距離1 cm のものでは逆にほとんど析出物の増加は認められなかった。

4. 考 察

骨折の治療への超音波照射の効果は、臨床的にも基礎的にも効果が実証されている。しかし、超音波が骨折治癒過程を促進するメカニズムは不明な点が多く、多くの論文では超音波が細胞を刺激して骨形成を促すという生物学的要因が議論されている。

Fig. 4 EDS Analysis of the surface of specimen after soaking in SBF for 1 week

(a) Without ultrasound wave

(b) Using ultrasound wave

Fig. 5 XRD of specimen soaking in SBF for 1 week

一方小久保らは *in vitro* のバイオマテリアルの生体活性の評価法として、擬似体液中からのアパタイト析出法を公表し、その骨形成メカニズムとして擬似体液から材料表面への PO_4^{2-} 、 Ca^{2+} 等の物理的な沈着と結晶析出過程を説明している⁽⁴⁾。このアパタイトの析出過程では細胞の要因のない全くの物理化学変化であるが、上述のように、骨形成で超音波が有効であると言う臨床報告を考えれば、このアパタイト析出過程でも超音波効果が作用していることが推測される。

実際にこの実験結果では SBF 中に純チタンを浸漬して超音波照射すると、一部アパタイトを含む Ca/P 系化合物の析出量が増加した。SEM などの形態学的

Fig. 6 Time dependence of mass of P/Ca crystallization formation

な観察から見ても、浸漬時間 1 week までについては、表面の核の数も USW 群の方で顕著に多かった。以上から、超音波照射が Ca/P 化合物の核生成と結晶成長に何らかの影響を与えたことが推測され、現在临床上で多く報告されている超音波の骨癒合のメカニズムには、単に細胞学的な機序のみでなく物理化学的な作用も関与しているということを示唆している。

このような超音波照射の Ca/P 系化合物生成促進メカニズムについては、超音波照射群の照射 1 W までに見られる結晶の初期形態が、急激な結晶成長を示すデンドライドに近い形状であったことから、結晶の核生成初期に超音波の micro-waving による P や Ca イオンの濃度や熱の揺らぎが、チタン表面での不均一核生成を促進したと考えられる。また、超音波によるキャビテーションが、Ca/P 系化合物の結晶析出過程でミクロな結晶破壊を引き起こし、逆に結晶成長に適したエピタキシャルな面の創生などに関与したと推測される。SEM で見られた超音波照射群のデンドライド状の結晶も、このような概念を連想させる。田中ら⁽⁵⁾も、樹枝状結晶成長に関する超音波の影響を考え、超音波の力学的エネルギーによって、結晶成長方位での自由度が増加していくつかの複数の優先的な成長方向が生じた可能性を考察している。同様の超音波の結晶成長への影響については近年、金属凝固分野からも報告されるようになってきたが、その詳細なメカニズムは未だ不明とされている⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

また当然のことながら、超音波の周波数や強度も、この結晶成長に大きく影響すると考えられる。本実験では、照射距離が短い場合(照射距離 1 cm)のみに

Ca/P 系化合物の結晶析出はほとんど見られず、無照射群(コントロール)よりも低い値となった。この原因としては、照射距離がチタン表面にあまりにも近いため、逆に超音波の持つ micro-waving などの力学的刺激が強くなり過ぎて、キャビテーションや溶液の乱流増加を招き、表面での核生成や結晶析出を阻害することに繋がったためと推察している。今後は、この結晶析出のための超音波効果の最適条件を見出すことも重要な課題と考えられる。

一方、臨床に翻ってみると、現在使用されている人工関節、人工歯根などのインプラント材料は、臨床上の課題として、長期にわたる生体内での固定安定性と共に、リハビリテーションや術後 ADL(日常生活動作)の観点からより早期に強固に生体骨と結合することが要求されている^{(8)~(11)}。今回の実験結果から、超音波照射を用いて生体活性チタンと生体骨との早期結合を促すことによって、このような課題が改善されることが期待される。今後は、チタン表面のアパタイト析出に関する超音波効果のメカニズムや最適条件の探索と共に、動物を用いた *In vivo* での超音波効果の確認が必要と考えられる。

5. 結 語

優れた生体適合性を持つチタンが、今後さらに人工関節やデンタルインプラントとして発展するためには、チタン表面と生体骨とが直接早く結合する生体活性機能の向上が期待される。この研究では、さらに早期にインプラントの初期固定に対する超音波照射の有効性を調べた結果、以下の結果が得られた。

(1) 超音波照射をうけたチタン表面ではより多くの化合物の析出が観察された。

(2) これらの析出物は、X 線回折や EDS などのデータから不完全なハイドロキシアパタイトまたはそれに類する Ca/P 系化合物と考えられた。

(3) これらの析出に関する超音波の効果としては、micro-waving や cavitation による PO_4 や Ca イオンの濃度のゆらぎやエピタキシャルな結晶面の形成

などが考えられた。

今回の研究結果から、今後 Bio-active なインプラントと骨との臨床的な初期固定を促進するための手段として、超音波照射の有効性が示唆された。

文 献

- (1) Kokubo, T. and Takamada, H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, Vol. 27 (2006), pp. 2907-15.
- (2) Mizuno, K., Sumida, M., Matsui, J., Fujita, M., Takigawa, S. and Kokubo, T., Current topics on fracture treatment with ultrasound, *Orthopaedic Surgery and Traumatology*, Vol. 43, No. 3 (2000), pp. 213-223, (in Japanese).
- (3) O'Brien, W. D., Ultrasound-biophysics mechanisms, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Vol. 93 (2007), pp. 280-94.
- (4) Kim, H. M. and Kokubo, T., Surface potential change in bioactive titanium metal during the process of apatite formation in simulated body fluid, *Journal of Biomedical Material Research A*, Vol. 67, No. 4 (2003), pp. 1305-9.
- (5) Tanaka, A. and Sawada, Y., The effect of the pulse ultrasonic waves in the Dendritic Crystal Growth, *Bussei Kenkyu*, Vol. 52, No. 4 (1989), pp. 430-434, (in Japanese).
- (6) Ichitsubo, T. and Matsubara, E., Crystallization accelerated by ultrasound in Pd-based metallic glasses, *Journal of Alloys and Compounds*, Vol. 434-5 (2006), pp. 194-5.
- (7) Ichitsubo, T. and Matsubara, E., Ultrasound-induced crystallization around the glass transition temperature for Pd 40 Ni 40 P 20 metallic glass, *Acta Materialia*, Vol. 52, No. 2 (2004), pp. 423-9.
- (8) Kuroda, D. and Okido, M., Surface modification of metallic implant harmonized with hard tissue, *Kinzoku (Materials Science & Technology)*, Vol. 277, No. 2 (2007), pp. 141-7 (in Japanese).
- (9) Hayashi, K., Artificial joint and hydroxyapatite, *Journal of Japanese Society for Biomaterials*, Vol. 20, No. 5 (2002), pp. 322-328.
- (10) Nakamura, T., Current trends and developments of total arthroplasty and biomaterials, *Orthopedic Surgery*, Vol. 48, No. 8 (1997), pp. 978-982 (in Japanese).
- (11) Röbber, S., Sewing, A., Stölzel, M., Born, R., Scharnweber, D., Dard, M. and Worch, H., Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coating at near-physiological pH and temperature, *Journal of Biomedical Material Research A*, Vol. 64 A (2003), pp. 655-63.