

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560821

研究課題名(和文) 微小反応器内で流動する疑似体液からのチタン上へのリン酸カルシウム系化合物の生成

研究課題名(英文) Production of calcium phosphate on titanium from a simulated body fluid flowing in a confined space

研究代表者

木村 勇雄 (KIMURA, ISAO)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00169921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：微小空間を有する反応器を製作し、疑似体液(SBF)を流通させてチタン板上にリン酸カルシウム系化合物(CaP)を生成させた。インパルス応答試験により反応器内の混合特性を評価し、疑似体液の間欠流通条件とCaP生成量との関係を検討した。生成するCaPはカルシウム欠損型ヒドロキシアパタイトであることを確認した。混合特性の評価指標には、一般的に用いられる分散数の代わりに分散強度の使用が有用であることを見出した。CaP生成は分散強度が大きい条件で静止時よりも促進されることが示された。SBF組成の影響についての知見も得た。

研究成果の概要(英文)：A small reactor involving a confined space was fabricated, in which calcium phosphate (CaP) was produced on titanium by flowing a simulated body fluid (SBF). The mixing characteristics in the reactor were evaluated by the impulse response testing. The relationship between the intermittently flowing conditions of SBF and the CaP yield was discussed. The crystalline phase of the product was identified as calcium-deficient hydroxyapatite. It was found that dispersion intensity is useful as an evaluation index of mixing characteristics instead of dispersion number used in general. The production of CaP was accelerated at larger dispersion intensity more than static condition. The knowledge on the effects of the SBF composition was also obtained.

研究分野：工学

キーワード：リン酸カルシウム チタン 疑似体液 流動

1. 研究開始当初の背景

整形外科や補綴歯科での再生医療においては、骨欠損部の空間確保と骨誘導の促進を目的としてリン酸カルシウム系化合物(CaP)で被覆したチタンインプラント材料が用いられる。CaP層の形成方法として、適切に表面処理したチタンあるいはチタン合金板を疑似体液(SBF)中に数日間浸漬してCaPを析出させる方法[文献 ~]がある。これらの手法によって生成するCaPは主に自然骨に類似したカルシウム欠損型ヒドロキシアパタイト(CDHAp)であり、生体適合性に優れる。このプロセスを静止した微小空間内で実施すると、CaPの生成が加速されることが知られている[文献 ~]。生体内では、体液が絶えず流動して患部に各種成分を供給しているため、生体外の系におけるCaP生成においてもSBFが流動する状況下で最適化されるものと推測される。しかし、SBFの流動がCaP生成に及ぼす影響を定量的に解析した研究例はない。

2. 研究の目的

本研究課題は、早期定着性に優れるインプラント材料の工業的製造に資する情報収集のための基礎研究と位置づけた。研究期間内には、微小反応器内におけるSBFの流動状態を解析することにより、CaP生成に及ぼす反応器内空間の幾何学的特性、SBFの流動条件および組成の影響を調査すること、ならびにSBF組成を基にCaP生成における支配的因子を把握することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微小反応器の設計・製作と混合特性の解析

微小反応器はアクリル樹脂を用いて製作した。反応器内部に設置した直方体空間を有効空間と定義した。図1に示すように、流れ方向の寸法を長さ L と定義する。幅 $W = 10$ mmと長さ $L = 30$ mmは固定し、高さは $H = 0.40, 1.00, 2.00$ mmの3種類に変更した。有効空間の体積を有効容積 V_e とすると、 H によって $V_e = 120 \sim 600 \mu\text{L}$ となった。チタン板は有効空間上部に設置した。

微小反応器中に純水を流動させ、色素水溶液をトレーサーとしてインパルス注入し、排出水中の色素濃度を分光光度計によって測定した。微小反応器を接続せずに導管のみを用いた場合を参照基準とし、Levenspielの方

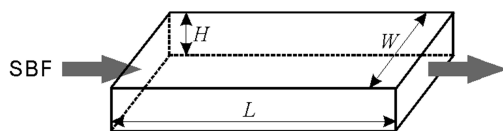


図1 有効空間

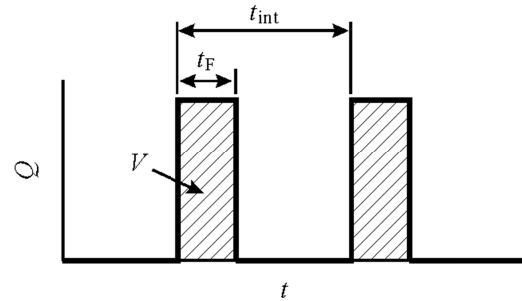


図2 間欠流通プロファイル

法[文献 ~]にしたがって分散数 N_D を評価した。

(2) CaPの生成

チタン板を粒度#2000の砥粒で機械的に研磨した後、NaOH水溶液および CaCl_2 水溶液を用いて化学的 surface 処理[文献 ~]を行った。SBFを装置内部に満たして反応開始とし、定期的の間欠流通した。図2にSBF流量 Q の設定プロファイルを示す。1回の流通時間は $t_F = 0.15 \sim 24.0$ min、流通間隔は $t_{int} = 12 \sim 42$ h、流通時の平均流速は $u = 2.5 \sim 100$ mm/minと設定した。反応時間は $t_r = 24 \sim 168$ hと設定した。1回の流通量 V を無次元体積 V_F に換算すると $V_F = 0.25 \sim 4.0$ となり、無次元総流通体積は $V_{F,all} = 3.0 \sim 12.0$ となった。すなわち、反応時間全体をかけて有効空間体積の3.0~12.0倍の体積のSBFを間欠流通したことになる。反応温度は 36.5 °Cとした。SBFとしてはGey平衡塩類溶液を用いた。

生成物については、走査型電子顕微鏡(SEM)による形態の観察および粉末X線回折(XRD)による結晶相の同定を行った。CaPの生成量は、電子線マイクロアナライザ(EPMA)によってPKのカウント数を測定し、それぞれの H における静止条件($t_r = 168$ h)でのカウント数に対する比を相対生成量 RP として評価した。

(3) SBF組成の影響

SBFの構成化学種のうち、カルシウムイオンとリン酸水素イオン以外の主要な無機成分であるカリウムイオン、マグネシウムイオン、炭酸水素イオン、硫酸イオンについて組み合わせを変えて溶液を調製し、(2)と同様にCaPの生成を試みた。このとき、不足分はナトリウムイオンおよび塩化物イオンで補償した。

界面反応法によってCDHAp粉体を合成し、いくつかの組成の溶液中に懸濁させた。24 hまでの所定の時間に懸濁液を採取し、ろ過した後の溶液中のカルシウム全濃度およびリン全濃度をICP発光分光分析法によって測定した。イオン強度から活量係数を求め、溶解度を算出し、CaP生成との関係を検討した。

4. 研究成果

(1) 微小反応器内の混合特性

レイノルズ数 Re はどの条件においても 100 未満と求められ、有効空間内の流れは層流であると判定された。

図 3 に u と N_D の関係を示す。 $H = 0.40$ mm の場合、 u が小さい条件では押し出し流れと判定される。 u が増すにつれて N_D は増大し、逆混合の寄与が増大することが見出された。 N_D は $u = 200$ mm/min で最大になり、それ以上になると減少した。 H が大きくなると N_D は増大する傾向が認められた。

N_D と幾何学的因子 d_c/L から分散強度 I_D を求めた。図 4 に u と I_D の関係を示す。 $H = 0.40$ mm の場合に I_D が著しく増大する条件が見出された。 H が大きくなると I_D は小さくなる傾向が認められた。

(2) 生成 CaP の形態および結晶相

SEM により、直径 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ の粒子状析出物がチタン板表面を被覆する様子が観察された。

XRD により、どの条件においても生成物は CDHAp 単一相であることを確認した。配向

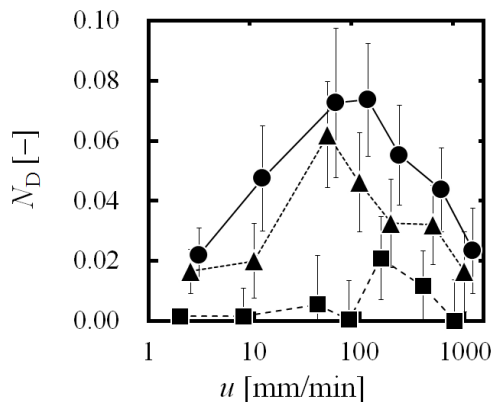


図 3 分散数に及ぼす平均流速の影響
 H [mm] : 2.00, : 1.00, : 0.40

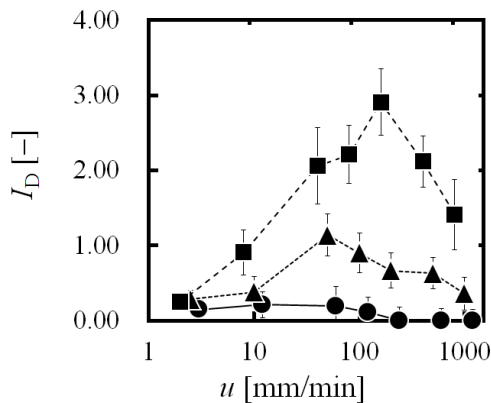


図 4 分散強度に及ぼす平均流速の影響
 H [mm] : 2.00, : 1.00, : 0.40

は認められなかった。

(3) SBF 静止時の CaP 生成

図 5 に SBF 静止時における t_r と RP の関係を示す。 H が小さいほど CaP 生成速度が大きくなることを見出された。

(4) SBF 間欠流通時の CaP 生成

図 6 に $V_{F.all} = 6.0$, $t_{int} = 24$ h における、 RP に及ぼす I_D の影響を示す。 $H = 0.40$ mm の場合、 RP が 1 を超える条件が見出された。すなわち、SBF は反応時間のほとんどにおいて静止しているにもかかわらず、間欠流通が静止条件以上に CaP の生成を促進する条件が存在することが確認できた。他の t_{int} においても同様の結果を得た。

図 7 に $u = 100$ mm/min, $t_{int} = 24$ h における、 RP に及ぼす $V_{F.all}$ の影響を示す。どの H においても、 RP は $V_{F.all}$ によって変化しなかった。他の t_{int} においても、同様の結果が得られた。すなわち、SBF 供給量は設定した最小量でも不足ではなかったことが確認された。

以上のことから、間欠流通が有効であるこ

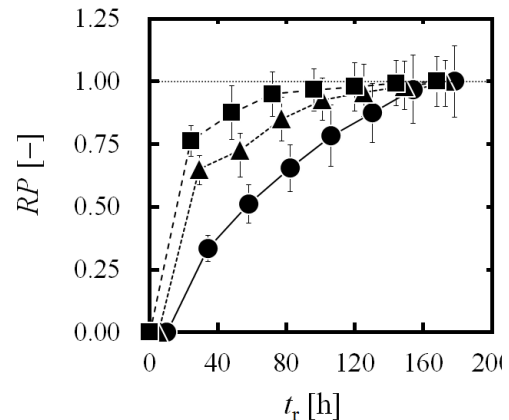


図 5 相対生成量に及ぼす反応時間の影響
(SBF 静止)
 H [mm] : 2.00, : 1.00, : 0.40

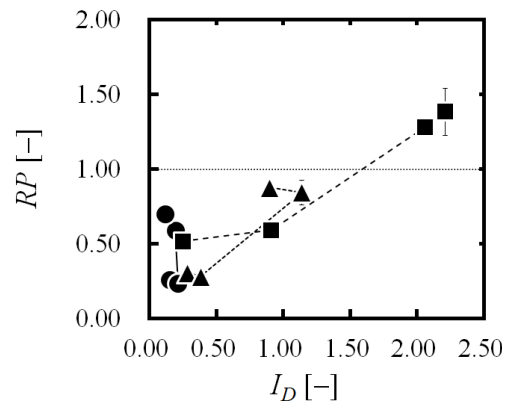


図 6 相対生成量に及ぼす分散強度の影響
($t_{int} = 24$ h)
 H [mm] : 2.00, : 1.00, : 0.40

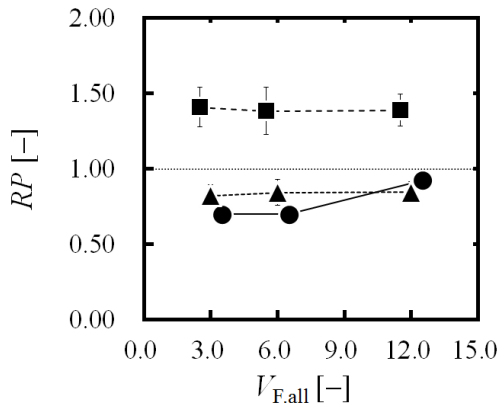


図7 相対生成量に及ぼす総流通量の影響
($t_{int} = 24$ h)

H [mm] : 2.00, : 1.00, : 0.40

と、および最適な流通間隔と流通時間が存在することが確認された。

(5) SBF 組成の影響

流動の CaP 生成への影響を考察するために、SBF 中の各種成分の作用を検討した。カルシウムイオンおよびリン酸水素イオン以外の化学種では、炭酸水素イオンがもっとも重要な因子であることを見出した。

CaP 生成を直接的に追跡すること以外に、固体析出の逆現象である溶解の挙動からの検討を試みた。イオン強度と溶解度との関係から固体生成促進について示唆を得た。ただし、明快な結論を得るには、熱力学的基礎データの収集が必要である。

< 使用記号 >

D	軸方向拡散係数
d_e	有効空間断面の相当長さ
H	有効空間の高さ
I_D	分散強度 ($= D / u d_e$)
L	有効空間の長さ
N_D	分散数 ($= D / u L$)
Q	流量 ($= W H u$)
Re	レイノルズ数 ($= d_e u \rho / \mu$)
RP	相対生成量
t	時間
t_F	1 回の流通時間
t_{int}	流通間隔
t_r	反応時間
u	流通時の平均流速
V	1 回の流通量 ($= Q t_F$)
V_e	有効容積
V_F	無次元体積 ($= V / V_e$)
$V_{F.all}$	無次元総流通体積
W	有効空間の幅
μ	粘度
ρ	密度

< 引用文献 >

T. Kizuki *et al.*, "Preparation of bioactive Ti metal surface enriched with calcium ions by chemical treatment", *Acta Biomater.*, 6 巻, 2836–2842 (2010).

H. C. Hsu *et al.*, "Formation of calcium phosphates on low-modulus Ti-7.5Mo alloy by acid and alkali treatments", *J. Mater. Sci.*, 45 巻, 3661–3670 (2010)

A. Rakngarm *et al.*, "Formation of hydroxyapatite layer on bioactive Ti and Ti-6Al-4V by simple chemical technique", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 19 巻, 1953–1961 (2008)

H. Takadama *et al.*, "XPS study of the process of apatite formation on bioactive Ti-6Al-4V alloy in simulated body fluid", *Sci. Tech. Adv. Mater.*, 2 巻, 389–396 (2001)

A. Sugino *et al.*, "Effect of spatial design and thermal oxidation on apatite formation on Ti-15Zr-4Ta-4Nb alloy", *Acta Biomater.*, 5 巻, 298–304 (2009)

Y. Totani *et al.*, "Acceleration of calcium phosphate formation on bioactive PMMA-based bone cement by controlling spatial design", *Mater. Sci. Eng. C*, 30 巻, 624–630 (2010)

A. Sugino *et al.*, "Induced deposition of bone-like hydroxyapatite on thermally oxidized titanium substrates using a spatial gap in a solution that mimics a body fluid", *J. Ceram. Soc. Japan*, 117 巻, 515–520 (2009)

Y. Nakao *et al.*, "Enhancement of apatite-forming ability of parallelly aligned Ti-substrates with optimum gaps by autoclaving", *J. Ceram. Soc. Japan*, 118 巻, 483–486 (2010)

A. Sugino *et al.*, "Gap effect on the heterogeneous nucleation of apatite on thermally oxidized titanium substrate", *Bioceram.*, 20 巻, 621–624 (2008)

O. Levenspiel, "Chemical Reaction Engineering 3rd. ed.", Wiley, 293 (1998).

5 . 主な発表論文等

[学会発表] (計 10 件)

佐藤裕昭, 田口佳成, 木村勇雄, "リン酸カルシウム系化合物の生成に及ぼす疑似体液の間欠流通間隔および流速の影響", 化学工学会新潟大会, 2014 年 11 月 22 日, 新潟大学(新潟県・新潟市).

鈴木浩正, 木村勇雄, "チタン上でのリン酸カルシウム生成に及ぼす水溶液組成の影響", 化学工学会新潟大会, 2014 年 11 月 22 日, 新潟大学(新潟県・新潟市).

岡村 駿, 木村勇雄, "回転反応器中におけるチタン上でのリン酸カルシウム化合物の生成", 化学工学会新潟大会, 2014 年

11月22日,新潟大学(新潟県・新潟市).
Zhang Zhongying, Isao Kimura, "Dissolution behavior of hydroxyapatite microspheres in HBSS", 化学工学会新潟大会, 2014年11月22日,新潟大学(新潟県・新潟市).
佐藤裕昭, 田口佳成, 木村勇雄, "リン酸カルシウム系化合物の生成に及ぼす疑似体液の流動乱れの影響", 日本セラミックス協会東北北海道支部研究発表会, 2014年11月6日,秋田市にぎわい交流館 AU(秋田県・秋田市).
Zhang Zhongying, Isao Kimura, "Solubility of hydroxyapatite microspheres synthesized in a W/O/W emulsion", 日本化学会北海道支部2014年夏季研究発表会, 2014年7月12日,苫小牧高専(北海道・苫小牧市).
佐藤裕昭, 田口佳成, 木村勇雄, "制限空間内でのリン酸カルシウム系化合物の生成に及ぼす混合特性の影響", 化学工学会第45回秋季大会, 2013年9月16日,岡山大学(岡山県・岡山市).
Isao Kimura, Hiroaki Sato, Yoshinari Taguchi, "Deposition of calcium phosphate on titanium in a confined space", Collaborative Conference on 3D & Materials Research 2013, 2013年6月27日, Jeju (韓国).
佐藤裕昭, 田口佳成, 木村勇雄, "疑似体液からの化合物生成装置の作製と混合特性評価", 化学工学会第78年会, 2013年3月18日,大阪大学(大阪府・豊中市).
佐藤裕昭, 田口佳成, 木村勇雄, "制限空間内でのヒドロキシアパタイトの生成に及ぼす疑似体液間欠流通の影響", 日本セラミックス協会2013年年会, 2013年3月17日,東京工業大学(東京都・目黒区).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 勇雄 (KIMURA ISAO)
新潟大学・自然科学系・教授
研究者番号: 00169921

(2) 研究分担者

田口 佳成 (TAGUCHI YOSHINARI)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 30293202