

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650280

研究課題名(和文) 差分化学反応による特定合金成分の選択除去と骨組織結合化

研究課題名(英文) Selective elimination of a specific component from alloys for providing bone-bonding ability

研究代表者

尾坂 明義 (OSAKA, Akiyoshi)

岡山大学・自然科学研究科・名誉教授

研究者番号：20033409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：チタン合金90Ti-6Al-4Vに、体内でのアパタイト層の自発析出能力を供与するためには、Alの同効果抑制作用の凍結が必要である。そこで、液相堆積の処方を適用し合金表面からAl成分を差分的に取り出すと共に、アパタイト層析出能に秀でた酸化チタン層を析出させた。さらに、電界紡糸法でアパタイト析出能に優れたシリカナノ中空または緻密繊維膜、あるいはアパタイト析出高分子繊維膜を被覆する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Aluminum in a 90Ti-6Al-4V titanium alloy depresses the spontaneous apatite deposition under the body environment. We applied a newly developed the liquid phase deposition not only to eliminate Al from the alloy surface but also to provide an anatase layer that leads to the apatite deposition. In addition, we employed the electrospinning technique to prepare both silica nano-tube or fibrils active to induce the apatite deposition and polymer fibril mats in which apatite was crystallized under ammonia vapor.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：液相堆積法 酸化チタン層 電界紡糸 アパタイト

### 1. 研究開始当初の背景

(1) チタン合金 90Ti-6Al-4V (以下 Ti64 合金) に、骨との直接結合性を付与する、あるいは骨類似の炭酸含有アパタイト層の自発析出能を与えることは、人工骨や人工歯根等医療の分野では焦眉の課題である。その手法の一つである、当グループ開発の過酸化水素水処理または好適微細隙間に空気酸化処理 (GRAPE®; Nakao 他, *J. Ceram. Soc. Japan*, 2010) 処理を施したところ、アパタイト層の自発的表面析出は観察されなかった。その他の関連実験から、Ti64 合金中の Al 成分が阻害成分であることが、ほぼ確実となっている。

(2)そこで、合金表面を  $H_3BO_3$  存在下で  $TiF_6^{2-}$  錯イオン溶液に曝せば、 $(1) TiF_6^{2-}$  (処理溶液中) + Al (合金中) +  $H_2O \rightarrow TiO_2$  (合金表面) +  $AlF_6^{3-}$  (処理溶液中) などの表面反応で、表面は水和酸化チタン層で覆われ、Al は差別的に溶液中に取り込まれること; (2) この水和酸化チタン層は体液中ではアパタイトを自発的に析出し Ti64 合金は強力に骨組織に固定される、と予測した。

(3)さらに、Al の妨害効果を抑制するため、体内環境下で同種のアパタイトの析出能に優れるシリカナノ中空・緻密繊維等で合金表面を被覆するのも、一つの方法であると、考えるに至った。

### 2. 研究の目的

(1)上記の背景に基づき、岡山大学と産業総合技術研究所との包括研究協定の枠組みの中で、同中部センター・テイラードリキッド集積グループの開発した、液相堆積 (LPD) の処方を用い、処理条件 (処理溶液濃度と処理温度) と小久保の擬似体液 (SBF) 中でのアパタイト析出との関係を、詳細に検討すること。

(2)その検討過程の中で、体内環境下で同種のアパタイトの析出能に優れるシリカナノ中空・緻密繊維、ないしアパタイトナノ結晶を含む高分子ナノ繊維マットの作成についても検討することを第2の目的とした。すなわち上記(1)で、LPD プロセスによる酸化チタン被膜がアパタイト析出に極めて有効であること、すなわち阻害成分である Al(III)の防護膜として働くことが明らかになった。そこで、Si-OH 基を多く保持する、化学的に活性な焼成前のシリカゾルは、Al(III)を表面に閉じ込めておく効果があり、その被覆は今回の目的にも有効であると、考えた。

### 3. 研究の方法

(1) LPD 法によるアナターゼ層の被膜化とアパタイト析出

① 平板状の純チタン試料、及び円板状 Ti64 合金試料を 500 度および 700 度の温度で 1 時間、大気中電気炉内で加熱した。これらを Ti-HT500 または Ti64-HTx00 (x: 5, 7)とする。

② さらに Ti64 試料に対して、当研究ユニットの産業総合技術研究所グループが独自に開発した LPD 法 (Masuda & Kato; *Chem. Mat.*, 2007; **203**: 2181-85) を適用した。すなわち、0.05M  $NH_4TiF_6$  および 0.15M  $H_3BO_3$  の 1 : 1 混合水溶液を調製し、それに上記試料を浸漬し 50 度で 1 時間処理した。これにより、アナターゼ層が試料表面に被覆される。これを Ti64-LPD とする。

③ Ti-HT500 方形試料と、Ti64HT-500, Ti64-HT700 および Ti64-LPD 円板状試料とを、

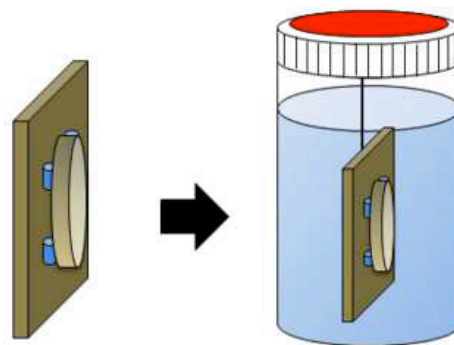


図1 Ti-HT500 方形基板と対した円板状 Ti64HT-x00 試料(左)を擬似体液 SBF(36.5°C)に浸漬 (右)。

ナイロン 6®のスペーサを介して 0.3 mm の隙間ができるように張り合わせ、試料対とする。これが GRAPE®テクノロジーの隙間に対応する。(図1)

④ 小久保の擬似体液 (以下 SBF) を既知の標準的操作 (Cho 他; *J. Am. Ceram. Soc.*, **78**, 1769-74 (1995)) の手順で調製し、pH 7.4, 36.5 度に保った。SBF は 30mL 測りとりふた付きの 50mL-ポリスチレン棒瓶に入れ、1-(3)の試料対を垂直に保持する (図1右)。~7 日間浸漬後試料の対峙表面について、走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM-6335FM) で表面構造を観察し、薄膜 X-線回折で析出結晶を同定した。

(2) 電界紡糸法によるポリビニルアルコール繊維を鋳型とするシリカ繊維の作成

① 重合度 500 のポリビニルアルコール (PVA) を蒸留水に溶かし 8 または 12 重量%PVA 溶液とした。また、15 mL の 0.05M HCl 溶液に 0.6 mmol の  $CaHPO_4$  および 0.4

mmol の  $\text{CaCl}_2$  を溶解させ（原子比  $\text{Ca/P}=5/3$ ; アパタイトの化学量論比）、この溶液に PVA を加え 12 重量%PVA-Ca/P 溶液を作成した。

② 調製した PVA 系溶液を標準的な電界紡糸装置（陰極：Al フォイル，陽極：G22 程度の注射針；印可電圧：18kV；電極間距離 15cm）（Shirosaki 他；*J. Ceram. Soc. Japan*, **120**, 520-524 (2012)）で紡糸し，約  $0.5\mu\text{m}$  太さの PVA 繊維マットを得た。

③ オルトケイ酸テトラエチル（TEOS）を塩酸触媒下（ $\text{TEOS}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}=1:5:4$ ,  $\text{HCl}/\text{TEOS}=0.5$ ）ならびにアンモニア触媒下（ $\text{TEOS}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_4\text{OH}=1:23.0:12.3:0.5$ ）（Shirosaki 他；*J. Ceram. Soc. Japan*, **120**, 520-524 (2012)）で加水分解し，それぞれ，オリゴマー型および Stöber-Fink 類似コロイド粒子型シリカゾル溶液を得た。

④ (2)で調製した PVA 繊維マットを(3)のシリカゾル溶液に浸漬し， $500^\circ\text{C}$  で 1 時間大気中で焼成して，シリカナノ緻密または中空繊維マットを得た。

(3) アパタイト内包型電界紡糸 PVA ナノ繊維および活性シリカ粒子被膜 PVA ナノ繊維

①  $\text{Ca(II)}$ と  $\text{P(V)}$ 含有 PVA 繊維マットを， $80^\circ\text{C}$  のアンモニア蒸気に暴露(操作 A)し，アパタイトを繊維内部に析出させた。

② 水溶性や PVA 繊維内ナノ空間を制御するため，グルタルアルデヒドで PVA 分子

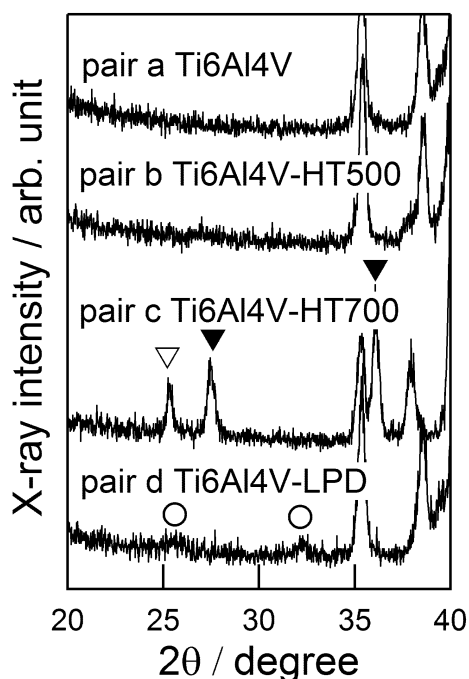


図2 Ti-HT500 と対し，SBF 中に浸漬した Ti6Al4V 系試料の薄膜 X-線回折図形。最下段の LPD 試料のみ，アパタイトを析出。

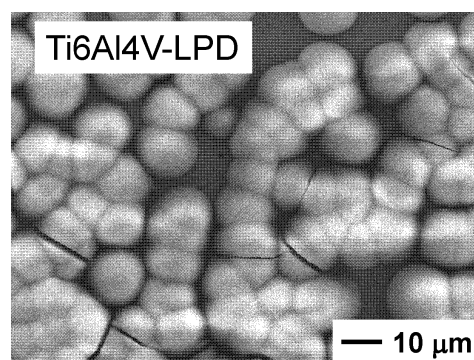


図3 図2の Ti6Al4V-LPD 試料表面構造。アパタイトが析出している。

繊維を架橋（操作 G）する操作と，上記(3) ①のアパタイト析出量との関係を調べた。さらに，TEOS 蒸気に暴露（操作 Si1）操作と，アパタイトの析出を X-線回折で確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LPD 法と Ti6Al4V 基板の生体活性化

酸化処理後の試料表面には，薄膜 X-線回折では Ti6Al4V-HT700 のみにアナターゼ及びルチルの回折が確認され，その他の試料では基板の金属チタンの回折のみが確認できる。すなわち，LPD 酸化チタン膜は  $1\mu\text{m}$  の厚みしかない。これによると，大気中加熱酸化した Ti6Al4V 試料はいずれもアパタイトを析出させず，Ti6Al4V-LPD のみがアパタイトを析出させる能力を持つ（生体活性である）。図3は SBF 浸漬後の同試料の表面にアパタイト析出していることを示す。また，Ti6Al4V-HTx00 試料は対した Ti-HT500 の生体活性をも無力化することも解った。このことから，考えにくいことではあるが，酸化皮膜から Ti6Al4V 合金中の Al または V 成分が隙間内に溶解し，生体活性発現を妨げていることは確実である。また，その表面を LPD 酸化チタン膜で被覆すれば，その妨害効果は抑制できることが解る。

##### (2) アパタイト析出能をもつシリカ繊維の作成

酸性触媒（HCl）およびアンモニア触媒条件下では，ナノサイズの長鎖状および球状シリカオリゴマー乃至コロイド溶液が得られることは，周知である。前者のシリカオリゴマーは電界紡糸 PVA 繊維中に浸透し， $\leq 600^\circ\text{C}$  で焼成後は緻密質のシリカナノ繊維を与える。また，後者の球状コロイドは，同繊維には浸透できず表面を覆うため，焼成後は中空ナノシリカ繊維を生成する（Shirosaki 他，

2012, 前出)。これらは、コラーゲンを原料とする Ca-含有シリカ繊維が、SBF 中でアパタイトを析出させた、Chen らの成果と照らし合わせると、上記 3.(2) ①の電界紡糸前駆溶液に Ca(II)を添加すれば、Ti64 基材に被膜後焼成した、シリカ緻密質および中空繊維も、体液中でアパタイトを析出する、すなわち、Ti64 に骨結合性を付与できると、いえる。

### (3) アパタイト内包 PVA 電界紡糸繊維

Ca(II)と P(V)とを化学量論比 Ca/P=5/3 となるよう、CaHPO<sub>4</sub> および CaCl<sub>2</sub> として添加し

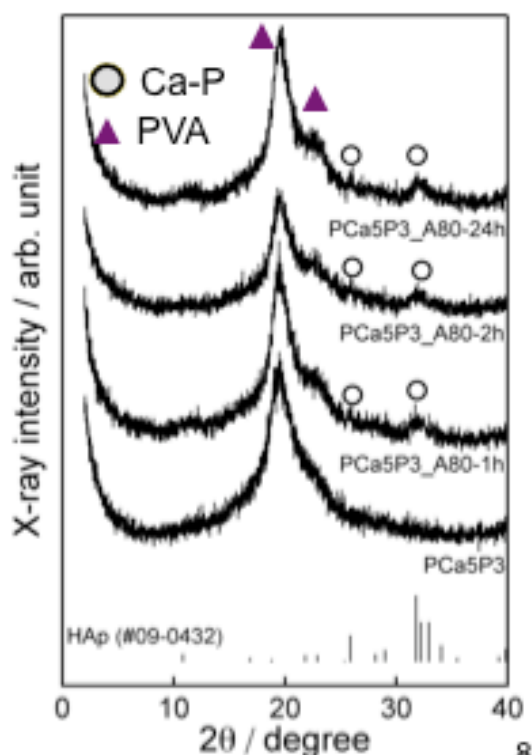


図4 Ca-P 含有 PVA 電界紡糸繊維をアンモニア蒸気に曝露すると、アパタイトが析出。

た Ca-P 含有 PVA 溶液を電界紡糸し、アンモニア蒸気に曝した所、リン酸カルシウム系結晶が析出した (図4)。なお、図で A80-2h 等はアンモニア蒸気に 80 度で 2 時間暴露したことを意味する。骨細胞は PVA 内部のアパタイトには反応しない可能性もあり、電界紡糸繊維の表面に、体内環境下でアパタイトを析出する能力を提供する必要がある。

### (4) アパタイト析出能を持つ難水溶性 PVA 電界紡糸繊維

難溶性にするためには PVA 分子の架橋が最も有効である。ここでは、試みにグルタルアルデヒドを架橋剤として利用した。また、Hench の生体ガラス 45S5 (Hench, J. Am.

Ceram. Soc., 74, 1487-1510 (1991))と同様、水和型 Si-OH 基を繊維表面近傍に提供するため、TEOS 蒸気に暴露した。その結果、架橋操作、アンモニア蒸気処理、TEOS 蒸気処理の順序によっては SBF 中でアパタイトを析出しないことがある。すなわち、架橋処理を最初に施すか、TEOS 蒸気処理に引き続き架橋処理しても、アパタイトは生成しない。しないばかりか、Ca-P を含む繊維では元の CaHPO<sub>4</sub> が析出する。アパタイトが析出したのは、アンモニア処理+架橋処理、TEOS 処理+アンモニア処理+架橋処理である。どちらの場合も継続して SBF に浸漬すると、その析出量は増大する。すなわち、アンモニアに暴露した後に架橋処理を施す必要がある。また、SBF の効果はアンモニア処理にて生成した結晶が成長の拠点を提供したと、さらに、TEOS 蒸気暴露で大量のアパタイト析出が誘導されたのは、期待した通り、Si-OH 基の働きである。

## 5. 主な論文発表

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① S. Hayakawa, Y. Masuda, K. Okamoto, Y. Shirotsaki, K. Kato, A. Osaka, Liquid phase deposited titania coating to enable in vitro apatite formation on Ti6Al4V alloy, J Mater Sci: Mater Med., 査読有, 25, 375-381 (2014). DOI 10.1007/s10856-013-5078-z

[学会発表] (計 3 件)

- ① Y. Shirotsaki, H. Yoshihara, Y. Nakamura, S. Hayakawa, S. Chen, A. Stamboulis, N. Hanagata, A. Osaka (招待講演), Silica Nano-fibers and nano-tubes from electrospun polymer templating, 10th Pacific Rim Conference on Ceramic and Glass Technology, June 2-7, 2013, Hotel Coronado, San Diego, CA, USA
- ② H. Yoshihara, Y. Shirotsaki, Y. Nakamura, S. Hayakawa, A. Stamboulis, A. Osaka, Preparation of Poly(vinyl alcohol)/Hydroxyapatite Composite Nano-Fiber Mats, 2nd International Symposium on Inorganic and Environmental Materials, October 27-31, 2013, the University of Rennes I, Rennes, France

- ③ Y. Shirotsaki, S. Hayakawa, Y. Nakamura, H. Yoshihara, A. Osaka, A. Stamboulis (招待講演), Electrospinning Preparation of PVA-Ceramic Nano-Particle Composite Fiber Mats for Tissue-Engineering Applications, 38th International Conference & Exposition on Advanced Ceramics & Composites (ICACC 2014), Jan 26–31, 2014, Hilton Daytona Beach Resort and Ocean Center, Daytona Beach, FL, USA

[図書] (計 1 件)

- ① Y. Shirotsaki, S. Hayakawa, Y. Nakamura, H. Yoshihara, A. Osaka, A. Stamboulis 根 Use of inter-fibril spaces among electrospun fibrils as ion-fixation and nano-crystallization, Ceramic Transactions Vol. 221, Advances in Bioceramics and Biotechnologies, edited by Roger Narayan and Joanna McKittrick, The American Ceramic Society, Wiley, New York. (印刷中)

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾坂明義 (OSAKA AKIYOSHI)

岡山大学大学院自然科学研究科・名誉教授

研究者番号：20033409

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：