

# SBFおよびAPF浸漬における多孔質チタンの気孔率と水分率

坂本 裕紀

機械工学科

チタンは人体に無害で耐食性に優れ、近年では生体材料として用いることを目的とした多孔質チタンの研究が行われている。チタンおよび多孔質チタンが広く普及するためには動物実験が不可欠であるが、そのための基礎実験が重要とされる。多孔質チタンは気孔に骨が侵入して材料と強固に結合することが期待できる。さらに、チタンの生物学的適性に寄与する表面積が大きくなり、理論的にアパタイトの量が增大する。すなわち、気孔に侵入する体液の量とアパタイトの析出量との間に関連性があると考えられる。本研究では、遠心分離機を用いて多孔質チタンに浸透する水分率を測定し、気孔内に浸透する水分量を比較した。また、擬似体液(SBF)による浸漬を行い、アパタイトの析出量との関連性を調べた。その結果、遠心機による浸漬で水分率の増加が確認でき、アルカリ・加熱処理の過程における、水酸化ナトリウムの浸漬に応用でき、アパタイト析出がより促進されることが分かった。

キーワード：多孔質チタン、気孔率、水分率、SBF

## 1. 緒言

チタンは人体に無害で耐食性に優れることから、歯科インプラントや人工骨など生体内でよく用いられている。歯科インプラントの例を挙げると、顎の骨に直接埋め込むことで、入れ歯では成し得ることの出来ない、天然歯に近い構造を得ることが可能である。しかし、チタンは骨と弾性係数(チタン：105~110GPa<sup>1)</sup>、骨：17~20GPa)が異なるため、かかる負荷がインプラントに偏り、ストレスシールドが生じることで骨と直接結合せず、チタンインプラントの治療期間は、一般に約6~12ヶ月を要するといわれる。この問題の解決方法の一つとして、チタンを多孔質化する方法がある。チタンを多孔体にすることで弾性係数を低くすることができ、さらには気孔に骨が侵入して材料と強固に結合することが期待できる。

化学的に生体適合性を高める方法であるアパタイトをより多く被覆させる表面処理方法として、アルカリ・加熱処理<sup>2)</sup>がある。アルカリ・加熱処理はチタンの表面におけるアパタイト生成を促進する表面化学処理技術である。チタンの表面は薄い酸化膜に覆われており、通常は骨と直接結合しない。一般にチタンインプラントの治療期間は約6~12ヶ月、アパタイトの被覆により約3~6ヶ月に短縮されるという研究報告がある。アルカリ・加熱処理を施すことでチタンの表面に多くの官能基を生成し、体液中でのアパタイト生成を促進させることができる。アパタイトは骨と成分が類似しており、チタンよりも生体適合性に優れているという利点がある。力学的に生体適合性を高める多孔質

チタンの製法として、粉末の粒子間隙を利用して気孔を形成させる粉末焼結法が多く研究されている。特に放電プラズマ焼結(SPS: Spark Plasma Sintering)法はエネルギー制御性、短時間焼結などにおいて優れており、ホットプレスなどの従来法に比べ200~500℃ほど低い温度域で、昇温・保持時間を含め、5~20分程度の短時間で焼結あるいは焼結結合を可能とする近年実用化された次世代型の材料合成加工技術である<sup>3)</sup>。

多孔質化によって、チタンの生物学的適性に寄与する表面積が大きくなり、理論的にアパタイトの量が增大する。すなわち、気孔に侵入する体液の量とアパタイトの析出量との間に関連性があると考えられる。しかし実際は、空孔形状や表面積などによって体液の侵入は阻害される。また、前処理によって溶液を侵入させれば、静置して浸漬した際よりも気孔に浸透する水分率が大きくなると考えられる。本研究では、気孔率の違いによる水分率の変化を見る。また、静置と遠心機による2つの浸漬方法を用いて多孔質チタンに浸透する水分率を測定し、気孔内に浸透する水分率を比較した。さらに、擬似体液(SBF: Simulated Body Fluid)による浸漬を行い、アパタイトの析出量との関連性を調べた。

## 2. 実験方法

### (1) アルカリ・加熱処理

本研究では、チタン表面のアパタイト形成を誘起させる化学処理として試料にアルカリ・加熱処理を施した。この

処理ではチタンを5molの水酸化ナトリウム水溶液(NaOH)に浸漬し、60°Cのインキュベーター内に24時間保持する。その後、600°Cの電気炉内で1時間保持し、炉冷する。この処理によりチタン表面に官能基を持つ非晶質チタン酸ナトリウムを形成させる。こうして処理したチタンはSBFに浸漬すると、ナトリウムイオン(Na<sup>+</sup>)の溶出により表面に多数のTi-OH基が形成される。このTi-OH基がSBF中のカルシウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)とリン酸イオン(HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>)と反応し、アパタイトの核を形成され、表面に骨類似アパタイト層を形成する。これにより、化学処理を施したチタンを体内に埋入すると、その表面へ迅速に骨類似アパタイトを形成できると考えられる。

## (2) SBF調製方法

ヒトの血漿はTable 1に示す無機イオンから生成される。そこで、これに近い無機イオン濃度を有する溶液を次のように調製してSBFとする。ビーカー内に入れた蒸留水約700mlに、Table 2に示す試薬を順に溶液に溶解させる。この時、一度に複数の試薬を投入せず、それぞれの試薬が完全に溶けてから次の試薬を順に投入する。吸湿性のKCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・3H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>・6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>の秤量は短時間で済ませるように注意する。

すべての試薬が完全に溶けた後、pHメーター(C-73, アズワン株式会社)を用いてpHの調節を行なう。この液に1M-HClをスポイトで徐々に滴下し、そのpHを7.40に調節する。その後、蒸留水を加えて液量を1000mlに調節し、これをSBFとする。

最後に、SBFをガラス製のビンに移し、オートクレーブ(SX-300, トミー精工株式会社)を使用し、液体滅菌にて滅菌を行なう。滅菌されたSBFはポリエチレン製の試薬瓶にて、5~10°Cの冷蔵庫で保存する。

## (3) 水分率測定

気孔率の違い及び静置と遠心機による2つの浸漬方法による水分率の変化を調べるため、放電プラズマ焼結法で作成した、粒子直径がそれぞれ100~125μm, 200~250μmの多孔質チタン(平均直径d=5.0mm, 平均長さl=9.4mm)をそれぞれ3つずつ試料として使用する。Fig.1, Fig.2は、各粒径の試料とそのSEM写真である。テフロン製容器の中に入れた各粒径の試料に水を20ml満たし、体温を想定して37°Cに保ったインキュベーター内に保持する。浸漬期間は1~4週間とし、各週に水分計(MOC63u, アズワン株式会社)を用いて水分率を測定する。浸漬後の試料を取り出し、キムワイプで表面張力により付着した水を取り除き、水分率計に入れる。測定が開始すると機器内で温度が120°Cまで上昇し、水分が蒸発する。一定時間水分率の変化がなくなると測定が終了する。ここで測定された水分率は重量割合[wt%]であるが、気孔に浸透する水の体積を調べるため、体積割合[vol%]に換算する。

まず、測定で表示される水分率 $q_m$ [wt%]は、

$$q_m = \frac{M_w}{M_{Ti}} \times 100 \quad [\text{wt}\%] \quad (1)$$

ここで、 $M_w$ :水分質量[g],  $M_{Ti}$ :試料質量[g], 水の密度を $\rho_w$ [g/cm<sup>3</sup>]とすると、含有水分の体積は、

$$V_w = \frac{M_w}{\rho_w} \quad [\text{cm}^3] \quad (2)$$

緻密体のチタン密度を $\rho_{Ti}$ とし、試料の密度 $\rho'$ を質量と寸法により求めると、試料の気孔率 $p$ は、

$$p = 1 - \frac{\rho'}{\rho_{Ti}} \quad (3)$$

気孔の体積 $V_p$ は、

$$V_p = V_{Ti} \times p \quad [\text{cm}^3] \quad (4)$$

気孔の体積に対する水分の体積割合 $q_v$ は、

$$q_v = \frac{V_w}{V_p} \times 100 \quad [\text{vol}\%] \quad (5)$$

前処理として、遠心機(2410, 久保田商事株式会社)を用いた。試料を水に浸漬させた容器を遠心機の中にセットするが、回転軸に対する対角位置の重量が異なると、回転させる際にバランスが取れずに機器が故障するため、同じ重量の水を入れた容器を反対側にセットした。回転数1000~4000rpm, 回転時間10~20minの各条件で回転させ、最も多くの水分が浸透する最適な条件を導出した。遠心機を用いることにより、遠心力で水分率が增大すればアルカリ・加熱処理の際の溶液増加に繋がりに、アパタイト析出が増加すると考えられる。

## (4) 擬似体液浸漬

静置における気孔率の違い及び前処理の有無によるアパタイト析出量の変化を調べるため、水分率測定で用いた試料を用い、上記の方法で調製されたSBFに試料を浸漬させ、37°Cのインキュベーター内に保持する。前処理の方法は、試料をSBFに浸漬させた状態で、回転数3000rpm, 回転時間10分間の条件で、上記と同様の方法で、遠心機により回転させた後、テフロン製容器にSBFを20mlほど満たし、

試料を浸漬した。なお、pHやイオン濃度の変化を防ぐため3日おきにSBFを交換する。1週間おきに試料を取り出し、SEMによる表面観察、水分率測定、そして、析出物による重量変化を調べるため、電子天秤を用いて重量測定を行った。なお、水分が含有した状態で重量測定を行わないために、水分率測定により水分を蒸発させた後、重量測定を行った。

(5) 走査型顕微鏡 (SEM) による観察

走査型顕微鏡 (SEM) とは対象物に電子ビームを当て、反射した一次電子または二次電子を検出器で捉えて、拡大像として表示するものである。光学顕微鏡に比べ焦点深度が深いので、凹凸の激しい試料表面も立体的に観察でき、材料の結晶粒度、結晶粒の形状、析出物の形状及び分布状態の観察による材料評価に利用される。

本実験で表面観察に使用したSEM (JSM-5310LV, 日本電子株式会社) は倍率を15~200000倍まで変えることが出来る顕微鏡である。装置は真空排気から画像観察、フォーカス合わせなど写真撮影までの一連の操作を自動化し、デジタル処理された静止画像表示が標準装備されるため、操作性に優れている。本研究では、浸漬した試料を1週間ごとに観察し、チタン粒子を観察するために200~2000倍の倍率で観察を行った。

Table 1 Inorganic ion concentration of human blood plasma and SBF (mM)

Inorganic ion	SBF	Human blood plasma
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5
Cl <sup>-</sup>	14.8	103.0
HCO <sup>3-</sup>	4.2	27.0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5

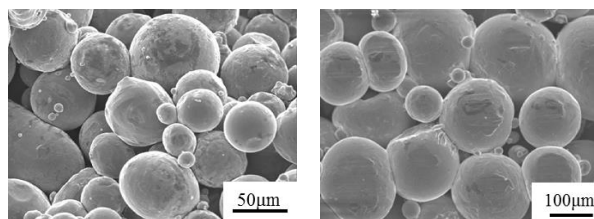
Table 2 Order to dissolve the reagents (pH7.40, 1L)

	Reagents	Volume
1	NaCl	7.996g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0.350g
3	KCl	0.224g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	0.228g
5	MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.305g
6	1M-HCl	20mL
7	CaCl <sub>2</sub>	0.278g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.071g
9	(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	6.057g



(a) 100~125μm (b) 200~250μm

Fig.1 Ti compacts



(a) 100~125μm (b) 200~250μm

Fig.2 SEM micrographs of Ti compacts

3. 結果および考察

(1) 静置での浸漬における水分率及びSBF浸漬

Fig.3に各粒径の水分率の変化を、Fig.4に試料の重量変化を示す。また、Fig.5に各粒径のSBF浸漬後のSEM写真を示す。各試料に粒径以下の粒子が確認されるが、これは、篩い分けした際に静電気などにより残留したものである。Fig.3より、浸漬期間の増加に伴い、水分率の増大が確認できたが、気孔率の違いによる水分率の変化は大きく見られなかった。Fig.4より、試料の重量変化は小さかった。Fig.5から、粒径100~125μmの試料は析出物の確認は見られず、200~250μmでは、析出物が少量確認できた。また、重量変化の結果と比較すると、3週目から4週目にかけて水分率は増加しているが、試料の重量変化は見られなかった。これは、アパタイトが気孔の内部に析出する前に、試料の表面に析出したことにより気孔が塞がれ、アパタイトが気孔内まで析出されなかったものと考えられる。すなわち、遠心機による浸漬を行うことで体液を気孔内へ浸透させることが予想される。

(2) 遠心機による浸漬における水分率およびSBF浸漬

Fig.6に遠心機による浸漬での水分率の変化を示す。Fig.7に遠心機を用いた3つの試料と、遠心機を用いてない試料の、SBF浸漬における重量変化の比較を示す。Fig.8にSBF浸漬後のSEM写真を示す。Fig.6より、静置での浸漬では、浸漬期間の増加に伴い、水分率も増加しているが、試料内の水分率は約4%に留まっている。それに対

し、遠心機を用いることで、最大で約 7.5% まで増大した。また、回転時間の変化による水分率の変化は大きく見られなかった。このことから、通常の浸漬では、試料の気孔内まで水分が浸透していないが、遠心機による浸漬では、気孔内まで水分が浸透していると考えられる。しかし、3000rpm 以上から水分率の増加は大きく見られなかった。これは、気孔の形状が限られているため、一定以上の水分が浸透しないためであると考えられる。

これにより、多孔質チタンの試料の気孔率は約 30% であるが、気孔内に浸透する水分率の上限は、本研究で用いられている試料の気孔構造によって 7% であると考えられる。すなわち、最も多くの水分を浸透させることが出来る最適な遠心機の条件は、回転数 3000rpm、回転時間 10min と判断した。Fig.7 より、重量変化の結果では、1 週目にかけて増加したが、それ以降は増加の量は小さくなっていった。Fig.8 の SEM 写真からも、1 週目に析出物が確認され、2 週目以降も析出物の増加が確認できた。Fig.9 は、過去の研究における、SBF 浸漬後 4 週目の SEM 写真<sup>4)</sup> である。これまでの研究から、この析出物はアパタイトだと考えられる。2 週目以降は大きな変化は見られなかった。通常の浸漬では重量変化がほとんど見られなかったが、遠心機を用いることにより、1 週目に析出物が生成されたと考えられる。2 週目以降の重量変化が小さかったのは、アルカリ・加熱処理を施さなかったためだと考えられる。また、Fig.7 の No.1 の試料の重量測定結果では、1 週目から 2 週目にかけて重量が減少した。これは、試料に生成された析出物が剥離したと考えられる。

アパタイトにより気孔が埋め尽くされたと仮定した場合、本研究で用いた試料をもとに概算すると、約 0.170g の重量増加が見込まれる。遠心機による SBF 浸漬の重量変化と比較すると、気孔が埋め尽くされた場合の約 45% の重量変化であった。また、Fig.8 より、試料表面にもアパタイトが析出しているため、気孔に析出したアパタイトの析出量は実験結果よりもさらに低いといえる。

これらの結果から、遠心機による浸漬を行なうことで SBF が気孔内に浸透し、通常の浸漬よりもアパタイト析出量が多くなったといえるが、気孔を埋め尽くした場合と比較すると少量であるといえる。しかし、アルカリ・加熱処理の過程における水酸化ナトリウムの浸漬に応用すると、気孔内まで官能基が生成され、アパタイト生成がより促進され、気孔を埋めつくした場合の重量変化に近づくことが期待できる。

#### 4. 結言

気孔率の違いによる水分率の変化、多孔質チタンに侵入する水分量とアパタイトの析出量との関連性を調べるために、各浸漬方法における水分率の測定と SBF 浸漬を行った。得られた結果を以下に示す。

1) 水分率測定の結果から、気孔率の違いによって試料内の水分率の変化には影響を及ぼさない。また、重量変化測定から、アパタイトの析出量の増加は大きく見られなかった。アパタイトが気孔内部に析出せず、試料表面に析出されたといえる。

2) 静置させた試料の気孔率に対する、侵入した水分率が小さいことから、気孔の奥まで水が侵入していないといえる。それに対し、遠心機にかけた試料では、静置させた試料よりも水分率が高いことから、気孔の中まで水分が浸透していると考えられる。

3) 遠心機による浸漬で水分率の増加が確認でき、重量変化測定でも静置での浸漬と比べ、重量の増加が確認できた。これにより、SBF が気孔の内部まで浸透し、アパタイト析出量が増大したといえる。さらに、アルカリ・加熱処理の過程における、水酸化ナトリウムの浸漬に応用できると考えられ、アパタイト析出がより促進されると考えられる。

#### 5. 参考文献

- 1) 三浦織四, 井田一夫: チタンの歯科利用, 第1版, クインテッセンス出版(株), 東京, pp.28-32, (1988)
- 2) Yuki Sakamoto, Kenzo Asaoka, Masayuki Kon, Toshio Matsubara, Kenichi Yoshida: Chemical surface modification of high-strength porous Ti compacts by spark plasma sintering. Bio-Medical Materials and Engineering, Vol.16 No.2, pp.83-91, (2006)
- 3) Asaoka K, Kon M: Sintered porous titanium and titanium alloys as advanced biomaterials. Mater Sci Forum, 426, pp.3079-3084, (2003)
- 4) 水上貴史: 生体内環境及び腐食における多孔質チタンの研究. pp.1-38, (2012)

(2017.9.29 受付)

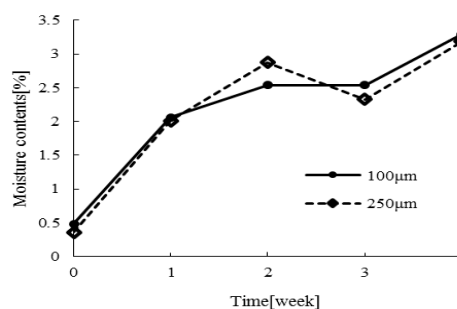


Fig.3 Result of moisture contents

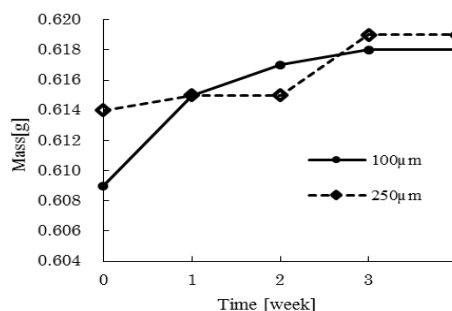


Fig.4 Mass gain of porous titanium in SBF solution

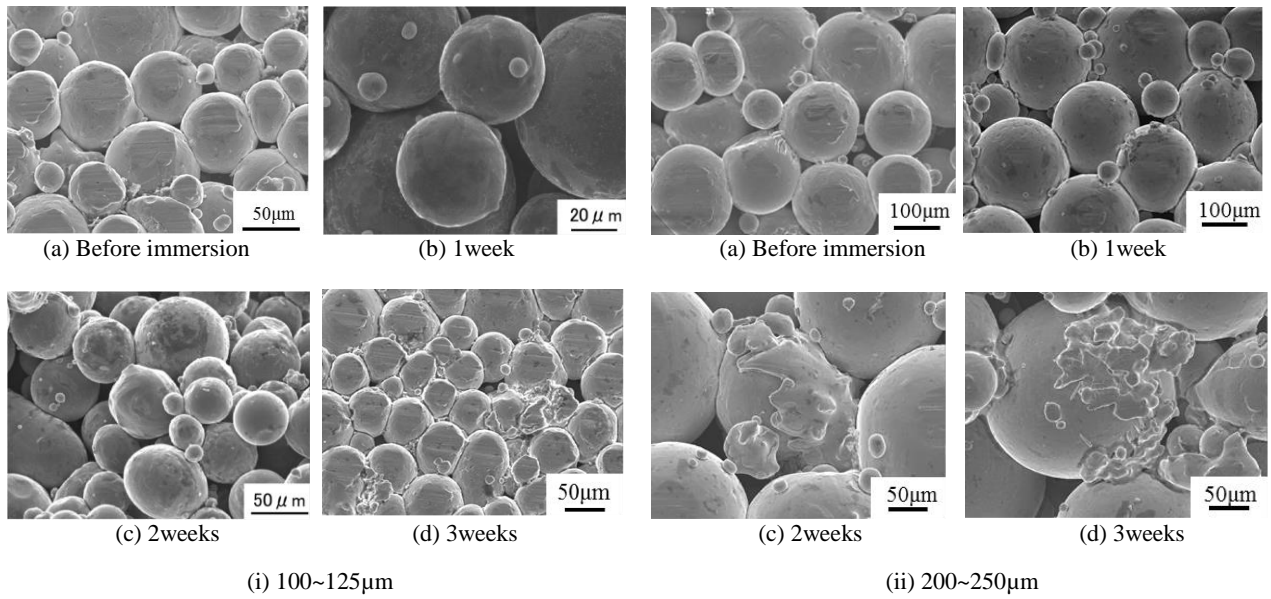


Fig.5 Surface morphologies of Ti compacts immersed in SBF

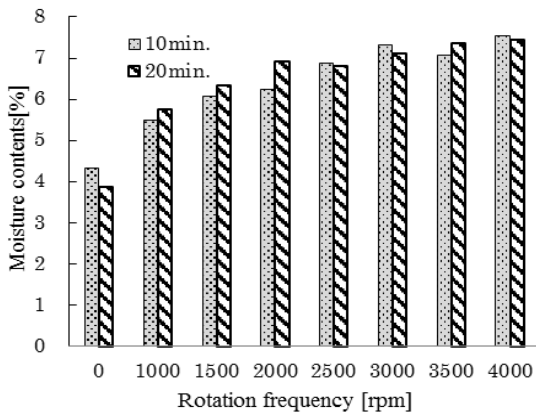


Fig.6 Result of moisture contents

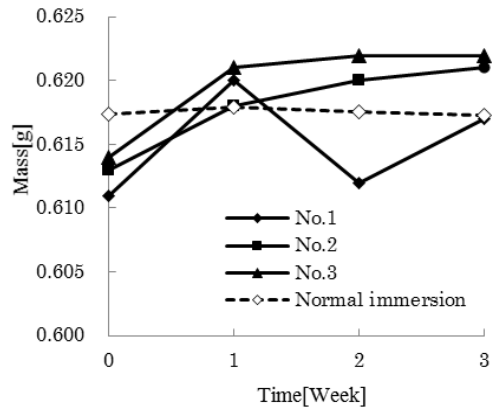


Fig.7 Mass gain of porous titanium in SBF solution

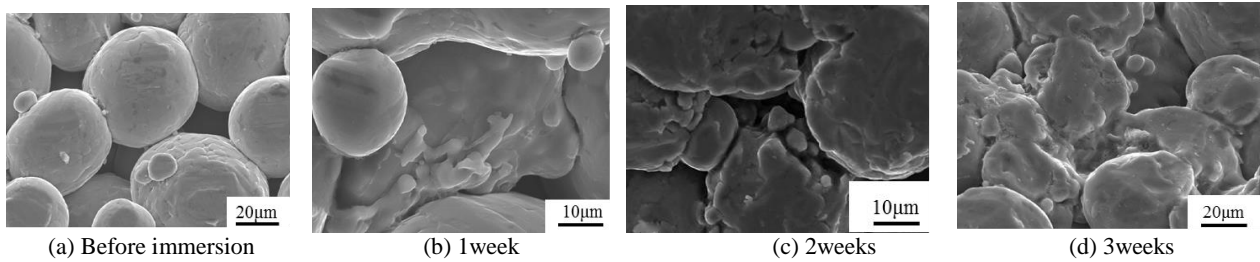


Fig.8 Surface morphologies of Ti compacts immersed in SBF

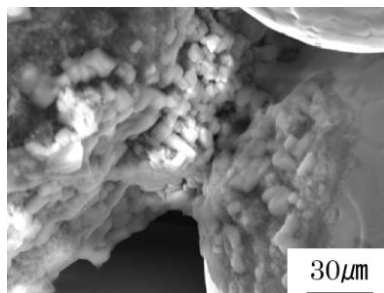


Fig.9 Surface morphologies of porous titanium immersed in SBF for 4 weeks