

ナノ複合ゾル中における生体高分子との相互作用の
ヒドロキシアパタイトの結晶特性と配向に及ぼす影響

平成 16 年度
根本 励

目次

| | ページ |
|------------------------------|-----|
| 第 1 章 緒言 | 1 |
| 1.1.背景 | 1 |
| 1.1.1.アパタイト | 1 |
| 1.1.1.1.アパタイトの結晶構造 | 1 |
| 1.1.1.2.ヒドロキシアパタイトの合成法 | 2 |
| 1.1.2.生体中のアパタイト | 2 |
| 1.1.3.ヒドロキシアパタイト - 生体高分子複合材料 | 3 |
| 1.1.3.1.絹フィブロイン | 3 |
| 1.1.3.2.ヒアルロン酸ナトリウム | 4 |
| 1.1.4.絹フィブロインの前処理 | 4 |
| 1.2.本研究の目的と内容の概略 | 5 |
| 1.2.1.本研究の目的 | 5 |
| 1.2.2.本論文の構成と内容 | 6 |
| 第 1 章の引用文献 | 13 |
| 第 2 章 実験方法 | 22 |
| 2.1.出発原料 | 22 |
| 2.2.メカノケミカル処理方法 | 22 |
| 2.3.特性評価法 | 22 |
| 2.3.1.粉末 X 線回折(XRD)測定 | 22 |
| 2.3.1.1.定性分析 | 22 |
| 2.3.1.2.Rietveld 解析による定量分析 | 23 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.1.3.内部標準法による結晶化度の定量分析 | 23 |
| 2.3.2.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定 | 23 |
| 2.3.3.蛍光 X 線(XRF)測定 | 24 |
| 2.3.4.透過型電子顕微鏡(FE-TEM) | 24 |
| 2.3.5.粒度分布(LPA)測定 | 24 |
| 2.3.6.レオロジー測定 | 25 |
| 2.3.7.原子吸光分析(AAS) | 25 |
| 第 2 章の引用文献 | 30 |
| 第 3 章 湿式メカノケミカル法によるヒドロキシアパタイト - 絹フィブロインナノ複合ゾルの直接合成 | 31 |
| 3.1.緒言 | 31 |
| 3.2.実験方法 | 32 |
| 3.2.1.試料の調製 | 32 |
| 3.2.2.ヒドロキシアパタイト - 絹フィブロイン複合膜の調製 | 32 |
| 3.2.2.1.キトサン膜の調製 | 32 |
| 3.2.2.2.ディップコーティング | 32 |
| 3.3.結果と考察 | 34 |
| 3.3.1.透過型電子顕微鏡(FE-TEM)による観察 | 34 |
| 3.3.2.粉末 X 線回折(XRD)測定結果 | 34 |
| 3.3.3.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定結果 | 35 |
| 3.3.4.蛍光 X 線(XRF)測定結果 | 35 |
| 3.3.5.粒度分布(LPA)測定結果 | 37 |
| 3.3.6.コーティングに用いたスラリーのレオロジー特性 | 37 |
| 3.3.7.膜の観察 | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.総括 | 38 |
| 第3章の引用文献 | 55 |
| 第4章 生体高分子共存下での機械的応力によるヒドロキシアパタイトナノ粒子の結晶性の増加 | 57 |
| 4.1.緒言 | 57 |
| 4.2.実験方法 | 58 |
| 4.2.1.試料の調製 | 58 |
| 4.2.2.豚の海綿骨 | 58 |
| 4.3.結果と考察 | 59 |
| 4.3.1.透過型電子顕微鏡(FE-TEM)による観察 | 59 |
| 4.3.2.粒度分布(LPA)測定結果 | 59 |
| 4.3.3.粉末 X 線回折(XRD)測定結果 | 59 |
| 4.3.3.1.結晶化度 | 60 |
| 4.3.3.2.結晶子サイズと格子歪の変化 | 60 |
| 4.3.4.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定結果 | 61 |
| 4.4.総括 | 62 |
| 第4章の引用文献 | 73 |
| 第5章 溶解前処理を施した絹フィブロイン微粒子共存下でのヒドロキシアパタイトナノ結晶の核生成と異方成長 | 74 |
| 5.1.緒言 | 74 |

| | |
|-----------------------------|----|
| 5.2.実験方法 | 75 |
| 5.2.1.SF の溶解前処理 | 75 |
| 5.2.2.試料の調製 | 75 |
| 5.3.結果と考察 | 76 |
| 5.3.1.透過型電子顕微鏡(FE-TEM)による観察 | 76 |
| 5.3.2.粉末 X 線回折(XRD)測定結果 | 76 |
| 5.3.2.1.結晶子サイズと格子歪の変化 | 76 |
| 5.3.2.2.結晶化度 | 76 |
| 5.3.3.HAp の核形成サイト量の変化 | 77 |
| 5.3.4.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定結果 | 77 |
| 5.4.総括 | 78 |
| 第 5 章の引用文献 | 91 |
| 第 6 章 本研究の総括および今後の課題 | 92 |
| 6.1.本研究の総括 | 92 |
| 6.2.今後の課題 | 93 |
| 学術論文および口頭発表 | 95 |
| 謝辞 | 99 |

第1章 緒言

1.1.背景

1.1.1.アパタイト

我々の身体は約 60%の水と 36%の有機物と 4%の無機物からなっている。この無機物の大部分を占める骨や歯を構成している化学物質がアパタイトである。アパタイトという言葉はギリシャ語の“惑わす”という意味からきており、晶癖が一定しないということを示している。本来アパタイトは $M_{10}(RO_4)_6X_2$ の組成である結晶鉱物グループの総称であり、M、R、X には種々の元素が入り得る。アパタイトのうち最も重要かつ代表的なのがリン酸カルシウム系アパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6X_2$; X=OH、F、Cl)であり、X が OH、F、Cl の場合、それぞれヒドロキシアパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$:HAp)、フッ素アパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6F_2$:FAp)、塩素アパタイト($Ca_{10}(PO_4)_6Cl_2$:CAp)などと呼ばれる[1-1~1-4]。

ヒドロキシアパタイトはその生体親和性の高さから人工歯根、人工骨などの生体材料[1-5, 1-6]、構造安定性から触媒[1-7]、センサー[1-8]、プロトン導電体[1-9]、イオン交換体[1-10]、吸着剤[1-11]、固体電解質[1-12]などの機能材料として応用されており、大きな注目を集めている。

1.1.1.1.アパタイトの結晶構造

ヒドロキシアパタイトの主要物性データを Table.1.1.1 に、骨格基本構造の模式図を Fig.1.1.1 に示す[1-4]。

アパタイト全体の構造は、三次元的に緊密に組みあがって堅牢になっているが、内部のイオンが一部抜け落ちても全体の構造を保つことができる。Ca サイトには Na^+ 、 Mg^{2+} 、 K^+ 等が置換した報告例[1-13~1-16]、 PO_4 サイトには CO_3^{2-} 、 SiO_4^{4-} 等が置換した報告例[1-14]があり、また、Ca および OH 位置のイオン欠陥を H^+ や H_2O で補償した報告例[1-15]などもある。Ca/P 比は、1.3 から 2 近くまで変化させることができ、化学量論比でなくてもアパタイト構造が保たれるということが知られている[1-17~1-20]。

特に湿式合成の際、アパタイト構造中に空気中の CO_3^{2-} が容易に置換するということがよく知られており、OH サイトに置換する場合、 PO_4 サイトに置換する場合をそれぞれ、A サイト置換、B サイト置換と呼んでいる[1-21~1-24]。

1.1.1.2. ヒドロキシアパタイトの合成法

アパタイトの合成法としては一般に乾式法、湿式法が挙げられる[1-4]。それぞれの合成法において様々な特徴をもつアパタイトを合成することができる。

乾式法は湿式法に比べて必要成分以外の不純物混入の心配が少なく、純品取得の目的においては優れた方法であり、化学量論的な組成を持つ HAp を得るのに優位な方法である[1-25, 1-26]。門間らは β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ と CaCO_3 から HAp を合成し[1-27]、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ と CaCO_3 の系、 CaHPO_4 と CaCO_3 の系などから HAp を合成した報告例もある[1-28]。ただし、セラミック的な形状の一定しない微粒子になりやすく、微細な粉体を得るには、熱処理後に長時間の粉砕が必要であるという欠点がある。

共沈法[1-29~1-31]、ゾルゲル法[1-32~1-34]、水熱法[1-35~1-39]などに代表される湿式法は比較的微細な粉体を得ることができ、粒子を成長させて一定形状を持つヒドロキシアパタイトを得ることが可能である。Kokubo らは擬似体液と呼ばれる溶液を用いて様々な基板上に HAp を析出させるバイオミメティック法という優れた方法を見出している[1-40]。しかし、合成中に空気中の炭酸イオンの混入や、均一分散系からの脱溶媒過程における不均質さのため純粋なヒドロキシアパタイトを取得するのは困難で、ヒドロキシアパタイト単一相を得るためには厳密な pH 調整や温度調整が必要である。

メカノケミカル法はこれらの方法の中でも非常に簡単にヒドロキシアパタイトを合成できることが特徴であり、それとともに攪拌では容易に起こらない反応を進行させることが可能である。熱処理を施さずに、短時間で粒径の均一な粒子を得ることができる方法である。Toriyama らは $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 CaCO_3 、 SrHPO_4 などを用いて Sr 含有 HAp を合成し[1-41, 1-42]、 CaO と CaHPO_4 の系、 CaO と $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の系などから HAp を合成した報告例もある[1-43~1-45]。ポリエーテルエーテルケトンと $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 HNO_3 などを出発原料として、混合摩砕処理を施した後、擬似体液中で HAp を析出しアパタイト-有機物の複合材料を合成した報告例もある[1-46]。

1.1.2. 生体中のアパタイト

人の歯や骨の無機成分はアパタイトであり、このフィラーとしての無機結晶に、マトリックスとしてのコラーゲンが結合性や柔軟性を付与している。骨は人の体内で、毎日少しずつ細胞によって作り替えられている[1-29, 1-47, 1-48]。骨を壊す破骨

細胞は、骨に接着し無機物のアパタイトとタンパク質のコラーゲンを分解して骨を吸収する。破骨細胞が骨を吸収した後に、骨を作る骨芽細胞が現れ、コラーゲンを細胞の外に放出し、その上に骨芽細胞が作りだしたナノスケールのアパタイトが自発的に c 軸方向に向きをそろえて並んで骨ができていく (Fig.1.1.2)。この細胞による骨の代謝は「骨のリモデリング」と呼ばれ、細胞の外でアパタイトとコラーゲンが自発的に並ぶ現象は「自己組織化」と呼ばれている[1-29, 1-47~1-49]。

1.1.3.ヒドロキシアパタイト - 生体高分子複合材料

ヒドロキシアパタイト-生体高分子複合体の合成は、生体高分子としてコラーゲン[1-29, 1-47~1-54]、ゼラチン[1-55, 1-56]、キチン[1-57]、キトサン[1-58]、絹フィブロイン[1-59, 1-60]、ヒアルロン酸[1-54, 1-61, 1-62]、コンドロイチン硫酸[1-62~1-65]などを用いた例が報告されている。これらの研究は生体内の硬組織代替材料として用いる際に、アパタイトを単独で用いるより、有機物と複合化することによって、できるだけ生体内の硬組織の組成に近づけ、生体親和性をあげることを目的として行われている。

1.1.3.1.絹フィブロイン

絹糸タンパク質は熱水可溶性と不溶性の二種のタンパク質からなることがよく知られており、可溶性タンパク質をセリシン、不溶性タンパク質をフィブロインという[1-66~1-68]。その組成はフィブロインが 70~80%、セリシンが 20~30%であり、95%以上をこの 2 種類のタンパク質で占めている[1-67~1-69]。

フィブロインは極めて特徴的なアミノ酸組成を有し、また比較的容易に純粋なタンパク質として得られることから、フィブロインの化学構造の研究は古くから始められ、いわば、タンパク質化学の歴史とともに歩んできたといってもよい。Fig.1.1.3 に示すグリシン、アラニン、セリン、チロシンがフィブロインの主要構成アミノ酸で、多くのフィブロインにおいては、この 4 種のアミノ酸で全アミノ酸の 80%以上を占め、他のタンパク質と明瞭に区別することができる。

また、フィブロインの二次構造はそのアミノ酸構造を考慮にいれて Fig.1.1.4 に示すような構造が提案されている[1-68~1-70]。逆平行型 β 構造の板の片側にアラニンの側鎖のメチル基が全部揃って、他面はグリシンの水素だけで平らになる。そこで

この板がグリシン同士向き合って一組となり、これが重なり合って結晶状の絹となっている。そこで面間隔は一つおきに 3.5 Å、5.7 Å と狭くなったり広くなったりする。

1.1.3.2. ヒアルロン酸ナトリウム

ヒアルロン酸ナトリウムは Fig.1.1.5 に示すように N-アセチル-D-グルコサミンの C₃ 位に D-グルクロン酸が、また、D-グルクロン酸の C₄ 位に N-アセチル-D-グルコサミンが互いに β グリコシド結合した重合した高分子量の粘液性ムコ多糖類のナトリウム塩である[1-71~1-73]。

ヒアルロン酸は *in vivo*(生体内)で、心臓弁・血管壁・皮膚・脳・眼球・関節・臍の緒など一般に結合組織に広く分布しており[1-74]、タンパク質と結合して粘稠な状態で接合物質として存在し細菌や毒物の侵入を防いでいると考えられている[1-75]。また水素イオン化した酸の形ではなく、ポリアニオンとして存在することから、ヒアルロナン(HYALURONAN)などとも呼ばれている[1-76~1-79]。

1.1.4. 絹フィブロインの前処理

複合材料を設計する場合、異なる材料間に生じる界面は、その複合材料の性質を決める重要な役割を担うことはよく知られている[1-49, 1-80~1-85]。そのために有機材料あるいは無機材料の表面を改質することは、複合材料開発において極めて有効な手法であり、多くの報告例がある[1-86~1-91]。Wang らはフィブロインにアルカリ処理や酵素処理を施した後 HAp との複合化を行っており[1-92, 1-93]、有機物上にリン酸基や、カルボキシル基などの化学反応性の高い基を修飾して HAp のカルシウムとの結合性を高める研究も報告されている[1-59, 1-94~1-96]。

フィブロインは水に不溶であるが、LiBr、CaCl₂ などの無機塩の水溶液中で溶解するということが知られている[1-97~1-101]。フィブロインと HAp の複合材料を設計する時に、フィブロインに溶解前処理を行うことによってフィブロインの表面積を増加させ、表面に Ca などの HAp の核形成サイトを導入することにより、複合材料の性質を改善できると考えられる。

1.2.本研究の目的と内容の概略

1.2.1.本研究の目的

これまで述べてきたように、実際の人の歯や骨はナノスケールのヒドロキシアパタイトがコラーゲンと相互作用し、c 軸方向に向きをそろえて配向した有機無機ナノ複合体である。よって、これらにかわる生体移植材料を設計した場合、ヒドロキシアパタイトの結晶子サイズや、結晶性、生体高分子上への配向の程度などが、移植材料の強度、生体内での安定性などに大きく影響してくる。従来の研究では、熱処理によりヒドロキシアパタイトの結晶性を制御した報告例[1-44, 1-102]、生体高分子との複合化によりヒドロキシアパタイトを配向させた報告例[1-63, 1-64]などがある。しかし、いずれの報告例においてもアパタイトと生体高分子の相互作用の詳細、また、相互作用のアパタイトの結晶特性、配向等に及ぼす影響などは明らかにされていない。

一方、最近の研究において、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ を H_3PO_4 水溶液中で湿式混合摩砕処理を施すことにより高分散性のヒドロキシアパタイトのナノゾルが得られるということが報告された[1-103]。このような背景のもと、本研究においては、湿式メカノケミカル法、絹フィブロインへの前処理などにより、生体骨の微構造を模倣したアパタイトと生体高分子とのナノ-ナノ複合体を調製することを目的とした。湿式メカノケミカル法、生体高分子への前処理の生成物の特性に及ぼす影響を主にヒドロキシアパタイトの結晶特性、生体高分子上への配向等に重点をおいて検討した。

湿式メカノケミカル法によるヒドロキシアパタイト-生体高分子複合ゾルの調製では、生体高分子として、生体親和性の高い、基礎研究の豊富な、絹糸タンパク質の主成分である絹フィブロイン、関節軟骨の主成分であり、骨の石灰化の際に重要な役割を果たすと言われるヒアルロン酸のナトリウム塩などを選択し、絹フィブロインの溶解前処理には CaCl_2 、 MgCl_2 などの無機塩水溶液を選択した。水溶液中での摩砕処理、絹フィブロインへ溶解前処理などを施すことにより、ゾルの均一性、分散性を高め、有機-無機材料間の接触面積を増加することによって、アパタイトと生体高分子とのナノ-ナノ複合体を調製することを目的としている。

1.2.2.本論文の構成と内容

本論文は全6章から構成されている。

第1章では、本論文の緒言として、ヒドロキシアパタイトについての基礎物性、合成法、実際の人々の歯や骨の組成、ヒドロキシアパタイト-生体高分子複合材料の有用性について等、本研究の背景について述べるとともに、最後に本研究の目的と論文の構成について述べた。

第2章では各章に共通する実験方法である、出発原料、粉碎機、得られた試料の特性評価方法についてまとめる。

第3章では、湿式メカノケミカル法によってヒドロキシアパタイト-絹フィブロイン複合体を調製し、主にメカノケミカル法によるアパタイト生成のメカニズム、フィブロインのアパタイトの生成に及ぼす影響等を調査し、生体移植材料としての臨床応用を視野に入れてディップコーティングによる膜の調製を試みる。

第4章では、湿式メカノケミカル法により調製した複合体について主にアパタイトの結晶特性について検討する。生体高分子として絹フィブロイン、ヒアルロン酸ナトリウムなどの共存下においてメカニカルストレスを加えることによるアパタイトナノ結晶の結晶子サイズ、結晶化度等に及ぼす影響等を調べ、実際に生体骨として豚の肋骨中のアパタイト結晶と比較することによって議論する。

第5章では、溶解前処理を施した絹フィブロインの共存下において溶液法により調製した複合体の特性について検討する。フィブロインの溶解前処理によるアパタイトの核形成サイトの増加がアパタイトの結晶特性、配向等に及ぼす影響について検討する。

第6章では、第3章～第5章の結果の総括を述べるとともに今後に残された課題について指摘する。

Table.1.1.1. Physical properties of HAp [1-4].

| Trivial name | Hydroxyapatite | |
|-------------------|--|-------------|
| Crystal system | Monoclinic $\xrightarrow{211,5^{\circ}\text{C}}$ Hexagonal | |
| Space group | $\text{P}2_1/\text{b} \xrightarrow{211,5^{\circ}\text{C}} \text{P}6_3/\text{m}$ | |
| Lattice parameter | $a=0.941\sim 0.944\text{nm}$, $b=2\times a$, $c=0.684\sim 0.694\text{nm}$, $\gamma =120^{\circ}$, $z=4$ | |
| Density (25°C) | 3.17g/cm ³ | |
| Refractive index | ω | 1.649~1.652 |
| | ε | 1.643~1.644 |
| Melting point | 1250°C | |

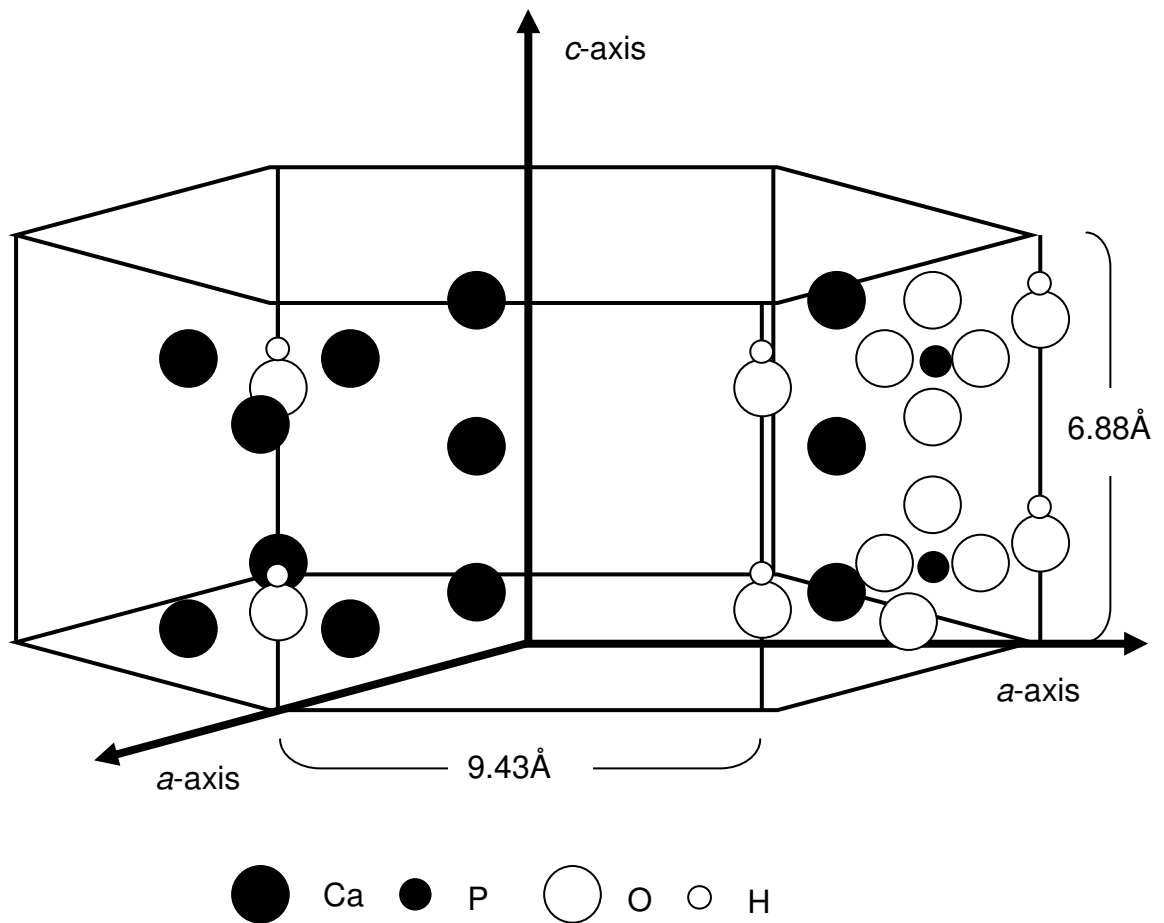


Fig.1.1.1. Schematic structure of the calcium phosphate system apatites [1-4].

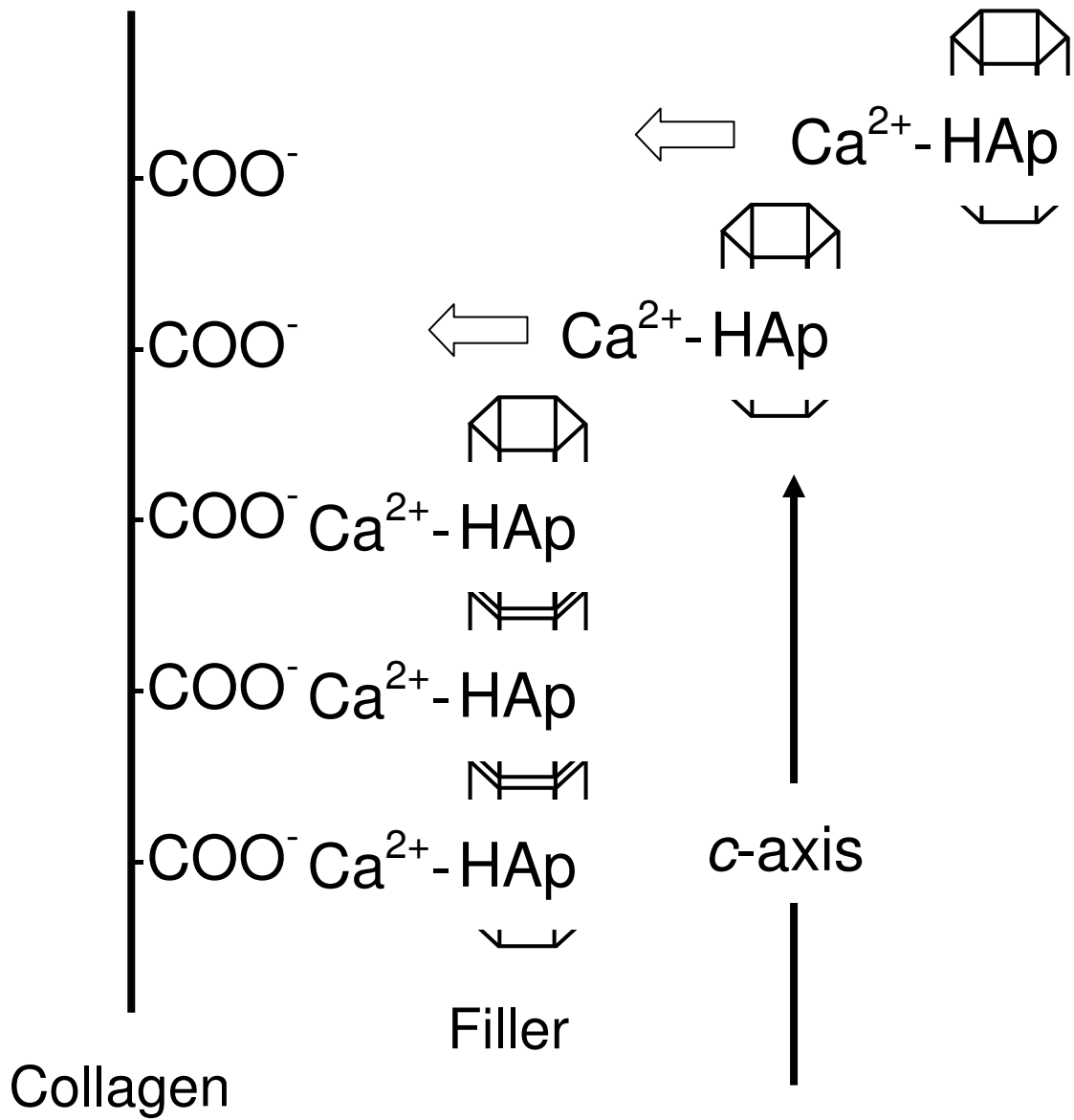
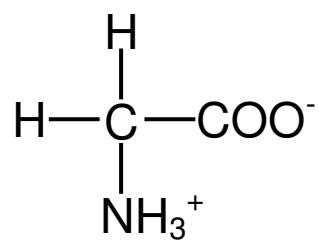
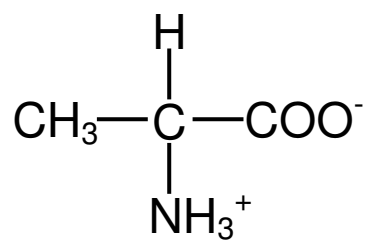


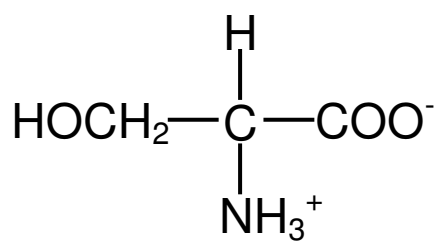
Fig.1.1.2. Chemical interaction between HAp and collagen.



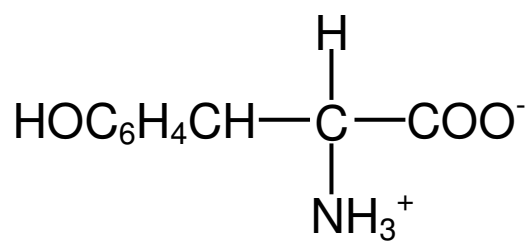
Glycine



Alanine



Serine



Tyrosine

Fig.1.1.3. Main amino acids of silk fibroin.

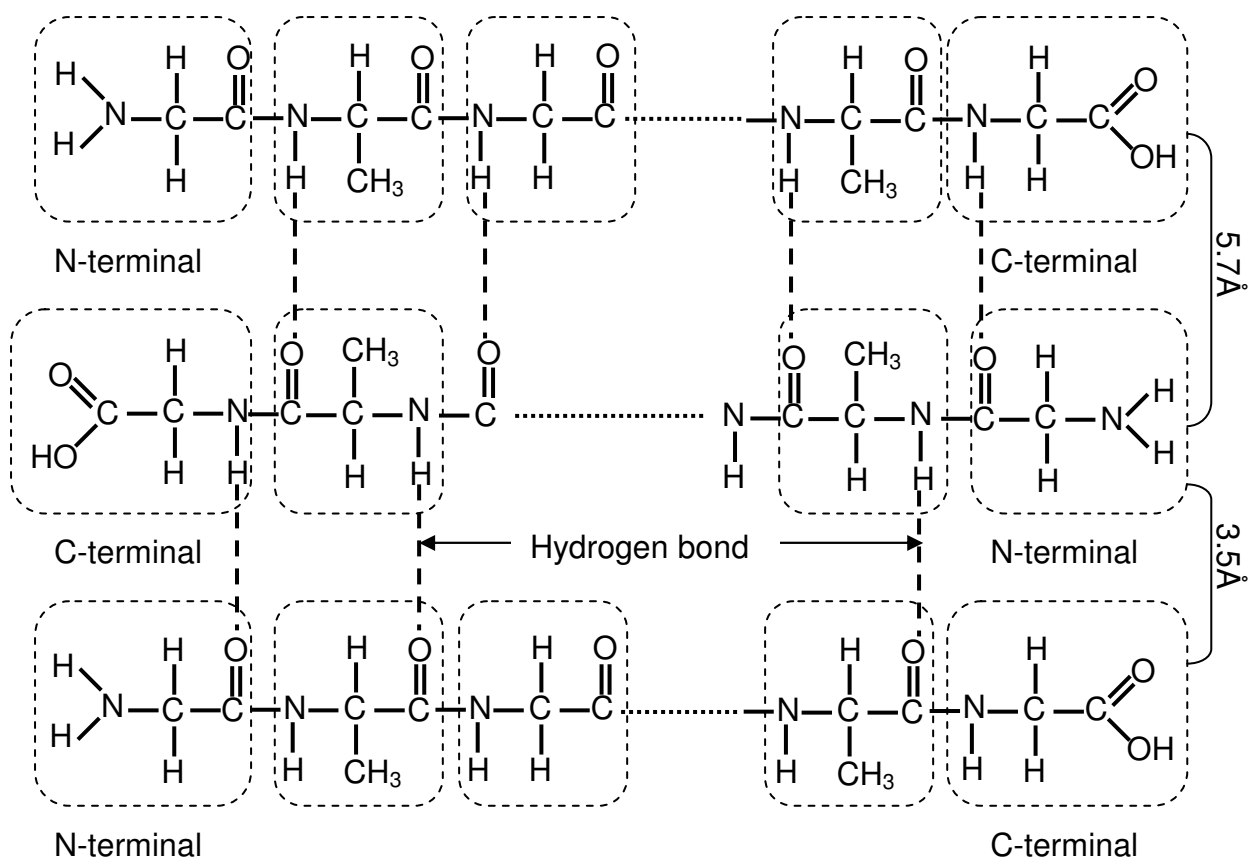


Fig.1.1.4. Secondary structure of SF [1-68, 1-69].

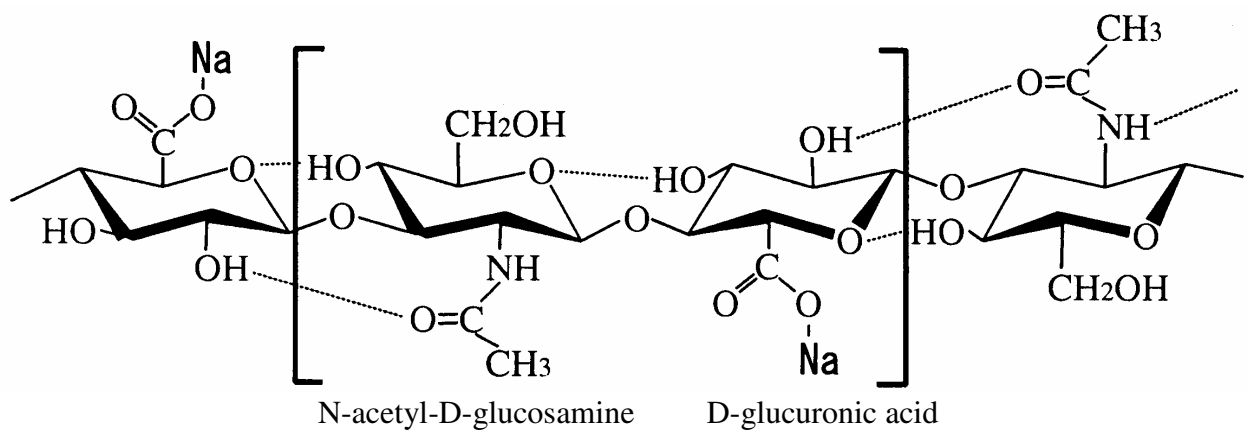


Fig.1.1.5. Structural formula of sodium hyaluronate.

第1章の引用文献

- [1-1] E. Valsami-Jones and G. Cressey, "The dissolution of apatite in the presence of aqueous metal cations at pH 2-7", *Chem. Geol.*, **151**[1/4], 215-233 (1998).
- [1-2] 大石修治, 神谷照幸, "フッ素アパタイト結晶のフラックス育成", *日本化学会誌*, **9**, 800-804 (1994).
- [1-3] 大井聡, 鈴木孝臣, 大石修治, "塩素アパタイト結晶のフラックス成長におよぼす冷却速度の影響", *日本結晶成長学会誌*, **29**[2], 111 (2002).
- [1-4] 金澤孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大, "アパタイトの材料化学", *石膏と石灰*, **210**, 261-273 (1987).
- [1-5] 赤松功也, 坂東和弘, "整形外科用材料の臨床の現状と期待", *まてりあ*, **37**(10), 822-826 (1998).
- [1-6] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants", *J. Mater. Res.*, **13**, 94-117 (1998).
- [1-7] B. Liptakova, M Hronec and Z Cvengrosova, "Direct synthesis of phenol from benzene over hydroxyapatite catalysts", *Catal. Today.*, **61**(1/4), 143-148 (2000).
- [1-8] 寒川喜光, 斎藤勝義, 金子泰成, "低コスト・省資源水酸アパタイトの合成と応用 第3回 射出成形による反応焼結法水酸アパタイトの製造", *機能材料*, **10**(8), 52-59 (1990).
- [1-9] 斉藤宗輝, 橋本和明, 戸田善朝, "アパタイト粉体の材料科学", *色材協会誌*, **70**(1), 26-34 (1997).
- [1-10] T. Suzuki, T. Hatsusika and Y. Hayakawa, "Synthetic hydroxyapatites employed as inorganic cation-exchangers", *J. Chem. Soc. Faraday. Trans. 1.*, **77**(5), 1059-1062 (1981).
- [1-11] A. Nzihou and S. Bailliez, "Mechanisms of Sintering of Macroporous Hydroxyapatite Adsorbents", *High. Temp. Mater. Process.*, **21**(5), 281-295 (2002).
- [1-12] A. Laghizil, N. Elherch, A. Bouhaouss, G. Lorente, T. Coradin and J. Livage, "Electrical behavior of hydroxyapatites $M_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (M=Ca, Pb, Ba)", *Mater. Res. Bull.*, **36**(5/6), 953-962 (2001).
- [1-13] 竹内啓泰, "バイオセラミックスとしてのリン酸カルシウム", *石膏と石灰*,

240, 338-345 (1992).

- [1-14] S.R. Kim, J.H. Lee, Y.T. Kim, D.H. Riu, S.J. Jung, Y.J. Lee, S.C. Chung and Y.H. Kim, "Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatite and their sintering behaviors", *Biomaterials*, **24**, 1389-1398 (2003).
- [1-15] I.Y. Pieters, E.A.P.D. Maeyer and R.M.H. Verbeeck, "Influence of Na⁺ on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of octacalcium phosphate", *Inorg. Chem.*, **37**, 6392-6395 (1998).
- [1-16] A. Athanasopoulou, D. Gavril, A. Koliadima and G. Karaiskakis, "Study of hydroxyapatite aggregation in the presence of potassium phosphate by centrifugal sedimentation field-flow fractionation", *J. Chromatogr. A*, **845**, 293-302 (1999).
- [1-17] M. Vallet-Regí, L.M. Rodríguez-Lorenzo and A.J. Salinas, "Synthesis and characterization of calcium deficient apatite", *Solid. State. Ionics.*, **101/103**[2], 1279-1285(1997).
- [1-18] A. Hadrich, A. Lautie and T. Mhiri, "Vibrational study and fluorescence bands in the FT-spectra of Ca_{10-x}Pb_x(PO₄)₆(OH)₂ compounds", *Spectrochimica. Acta. Part A.*, **57**, 1673-1681 (2001).
- [1-19] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant and P. Thomas, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio. I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders", *Biomaterials*, **23**[4], 1065-1072 (2002).
- [1-20] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant and J.P. Laval, "Determination of Calcium/Phosphorus Atomic Ratio of Calcium Phosphate Apatites Using X-ray Diffractometry", *J. Am. Ceram. Soc.*, **84**[2], 359-366 (2001).
- [1-21] Y. Suetsugu, I. Shimoya and J. Tanaka, "The detailed configuration of carbonate ions in apatite structure determined by polarized IR spectroscopy", *Bioceramics*, **10**, 249-252 (1997).
- [1-22] A. Aminzadeh, S. Shahabi and L.J. Walsh, "Raman spectroscopic studies of CO₂ laser-irradiated human dental enamel", *Spectrochimica. Acta. Part A.*, **55**, 1303-1308 (1999).
- [1-23] T.S.S. Kumar, I. Manjubala and J. Gunasekaran, "Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave irradiation", *Biomaterials*, **21**, 1623-1629

(2000).

- [1-24] R.N. Pandaa, M.F. Hsieha, R.J. Chung and T.S. Chin, “FTIR, XRD, SEM and solid state NMR investigations of carbonate-containing hydroxyapatite nano-particles synthesized by hydroxide-gel technique”, *J. Phys. Chem. Solids.*, **64**, 193-199 (2003).
- [1-25] 加藤功一, 筏義人, “人工鋳物:その製法と応用 人工アパタイト バイオセラミック”, *エネルギー・資源*, **18**[5], 465-471 (2001).
- [1-26] 吉岡隆嗣, 鍛冶文宏, 山下進, “化粧品の新原料・新技術 (2) 形態制御されたヒドロキシアパタイトの特性と化粧品への応用”, *Frag. J.*, **27**[1], 145-150 (1999).
- [1-27] 門間英毅, 金澤孝文, “乾式法による水酸アパタイトの生成反応”, *日本化学会誌*, **2**, 339-343 (1972).
- [1-28] 金澤孝文, 門間英毅, “リン酸カルシウムの化学～アパタイトの組成・構造・物性・最近の進歩～”, *化学の領域*, **1972**, 662-673 (1972).
- [1-29] 田中順三, 菊池正紀, “コラーゲンと無機化合物の複合化”, *表面科学*, **20**[9], 600-606 (1999).
- [1-30] S. Suzuki, M. Ohgaki, M. Ichiyanagi and M. Ogawa, “Preparation of needle-like hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci. Lett.*, **17**, 381-383 (1998).
- [1-31] J.D. Termine and A.S. Posner, “Infrared determination of the percentage of crystallinity in apatic calcium phosphates”, *Nature*, **211**, 268-270 (1966).
- [1-32] A. Jilavenkatesa and R.A. Condratesr, “Sol-gel processing of hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci.*, **33**, 4111-4119 (1998).
- [1-33] 鈴木傑, 中根英樹, 大島正成, 高橋実, 引地康夫, “ゾルーゲル法を用いたヒドロキシアパタイト厚膜の作製とイオン交換性”, *材料*, **41**[465], 939-944 (1992).
- [1-34] M. Aizawa, K. Itatani, F.S. Howell, M. Kinoshita and A. Kishioka, “Preparation of hydroxyapatite through hydrothermal treatment of the composites in the CaO-P₂O₅-SiO₂-B₂O₃ system prepared by Sol-Gel process”, *J. Ceram. Soc. Japan*, **103**[8], 777-781 (1995).
- [1-35] W. Suchanek, H. Suda, M. Yashima and M. Kakihana, “Biocompatible whiskers with controlled morphology and stoichiometry”, *J. Mater. Res.*, **10**[3], 521-529 (1995).

- [1-36] 吉村昌弘, 須田洋幸, 岡本健吾, 井奥洪二, “水酸アパタイト針状結晶の水熱合成”, *日本化学会誌*, **10**, 1402-1407 (1991).
- [1-37] 浅岡伸之, 須田洋幸, 吉村昌弘, “水熱法によるヒドロキシアパタイトホイスターの合成”, *日本化学会誌*, **1995**, 25-29 (1995).
- [1-38] 木下真喜雄, 板谷清司, 中村清一郎, 岸岡昭, “水熱均一沈殿法による炭酸含有水酸アパタイトの合成と生成物の形態”, *石膏と石灰*, **227**, 207-215 (1990).
- [1-39] A. Ito, S. Nakamura, H. Aoki, M. Akao, K. Teraoka, S. Tsutsumi, K. Onuma and T. Tateishi, “Hydrothermal growth of carbonate-containing hydroxyapatite single crystals”, *J. Cryst. Growth.*, **163**, 311-317 (1996).
- [1-40] H.M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo and T. Nakamura, “Bioactivity of Na₂O-CaO-SiO₂ Glasses”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **78**, 2405-2411 (1995).
- [1-41] M. Toriyama, A. Ravaglioli, A. Krajewski, C. Galassi, E. Roncari and A. Piancastelli, “Slip casting of mechanochemically synthesized Hydroxyapatite”, *J. Mater. Sci.*, **30**, 3216-3221 (1995).
- [1-42] 横川善之, 鳥山素弘, 河本ゆかり, 鈴木高広, 西澤かおり, 永田夫久江, マイケルロジャームツァロ, “メカノケミカル法によるカルシウム、マグネシウム、ストロンチウムアパタイト固溶体の合成”, *名古屋工業技術研究所報告*, **45**[4], 161-166 (1996).
- [1-43] P. Boudeville, B. Pauvert, M.P. Ginebra, E. Fernandez and J.A. Planell, “Dry mechanochemical synthesis of apatites another calcium phosphates”, *Key. Eng. Mater.*, **192-195**, 115-118 (2000).
- [1-44] K.C.B. Yeong, J. Wang and S.C. Ng, “Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄”, *Biomaterials*, **22**, 2705-2712 (2001).
- [1-45] S.H. Rhee, “Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment”, *Biomaterials*, **23**, 1147-1152 (2002).
- [1-46] S.B. Kim, S.B. Cho, K.J. Cho, Y.J. Kim, H.S. Jeon, T.H. Lee and Y. Hwang, “Bioactive organic-inorganic composite prepared by mechanochemical method”, *Key. Eng. Mater.*, **218/220**, 295-298 (2002).
- [1-47] M. Martínez, M.H. Aliabadi and H. Power, “Bone remodelling using sensitivity

- analysis”, *J. Biomech.*, **31**[11], 1059-1062 (1998).
- [1-48] P. Ducheyne and Q. Qiu, “Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function”, *Biomaterials*, **20**[23/24], 2287-2303 (1999).
- [1-49] 田中順三, “有機・無機複合材料の研究開発”, *金属*, **68**, 213-222 (1998).
- [1-50] E. Banks, S. Nakajima, L.C. Shapiro, O.Tilevitz, J.R. Alonzo and R.R. Chianelli, “Fibrous Apatite Grown on Modified Collagen”, *Science*, **198**, 1164-1166 (1977).
- [1-51] S.H. Rhee, and J. Tanaka, “Hydroxyapatite Coating on a Collagen Membrane by a Biomimetic Method”, *J. Am. Ceram. soc.*, **81**[11], 3029-3031 (1998).
- [1-52] 岡崎正之, “アパタイト・コラーゲン複合体”, *高分子加工*, **40**[11], 547-552 (1991).
- [1-53] 田中順三, 趙晟佰, “自己組織化機構に基づいた有機・無機複合体人工骨の開発”, *顎顔面バイオメカニクス学会誌*, **2**[2], 14-19 (1996).
- [1-54] D. Bakos, M. Soldan and I. Hernandez-Fuentes, “Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite”, *Biomaterials*, **20**, 191-195 (1999).
- [1-55] A. Bigi, S. Panzavolta and N. Roveri, “Hydroxyapatite-geratin films: a structural and mechanical characterization”, *Biomaterials*, **19**, 739-744 (1998).
- [1-56] K.S. TenHuisen and P.W. Brown, “The formation of hydroxyapatite-gelatin composites at 38°C”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 27-33 (1994).
- [1-57] 横川善之, “キチンと無機化合物の複合化”, *表面科学*, **20**[9], 592-599 (1999).
- [1-58] 矢ヶ崎裕, 森厚二, 中島三晴, 日高勇一, 鈴木和夫, 伊藤充雄, “キチン・キトサンに関する研究 その7 ハイドロキシアパタイト含有キチン・キトサンフィルム引張りの強さと室内温度の関係”, *生体材料*, **16**[6], 338-342 (1998).
- [1-59] Y. Tamada, T. Furuzono, T. Taguchi, A. Kishida and M. Akashi, “Ca-adsorption and apatite deposition on silk fabrics modified with phosphate polymer chains” *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **10**[7], 787-793 (1999).
- [1-60] T. Furuzono, T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi and Y. Tamada, “Preparation and characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 344-352 (2000).
- [1-61] S.G. Rees, D.T.H. Wassell and G. Embery, “Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite”,

- Biomaterials*, **23**, 481-489 (2002).
- [1-62] H. Tanaka, T. Arai, K. Miyajima, S. Shimabayashi and K. Nakagaki, "Effect of adsorption of glycosaminoglycans on the dissolution properties of hydroxyapatite", *Colloids. Surf.*, **37**, 357-368 (1989).
- [1-63] S.H. Rhee, Y. Suetsugu and J. Tanaka, "Biomimetic configurational arrays of hydroxyapatite nanocrystals on bio-organics", *Biomaterials*, **22**, 2843-2847 (2001).
- [1-64] S.H. Rhee and J. Tanaka, "Synthesis of a hydroxyapatite/collagen/chondroitin sulfate nanocomposite by a novel precipitation method", *J. Am. Ceram. Soc.*, **84**[2], 459-461 (2001).
- [1-65] S.H. Rhee and J. Tanaka, "Effect of chondroitin sulfate on the crystal growth of hydroxyapatite", *J. Am. Ceram. Soc.*, **83**[8], 2100-2102 (2000).
- [1-66] 志村憲助, タンパク質化学4, 共立出版, P.711 (1978).
- [1-67] 平林潔, "豊かな可能性を秘めたバイオ素材 絹の機能性とその応用", *工業材料*, **44**[14], 118-123 (1996).
- [1-68] 平林潔, "絹の化学と構造・物性", *繊維と工業*, **40**[4/5], 119-124 (1984).
- [1-69] 小松計一, "絹糸の化学と構造", *皮革化学*, **16**[1], 1~21 (1970).
- [1-70] 野田春彦, "繊維タンパク質の構造", *皮革化学*, **11**[1], 1~12 (1965).
- [1-71] 荻野一善, "ヒアルロン酸水溶液の粘弾性", *高分子論文集*, **55**[12], 736-748 (1998).
- [1-72] E.T. Pirc, I. Arcon, P. Bukovec and A. Kodre, "Preparation and characterization of copper(II) hyaluronate", *Carbohydr. Res.*, **324**, 275-282 (2000).
- [1-73] S. Takahashi and K. Ogino, "Viscoelasticity of hyaluronic acid alkaline salts in aqueous solutions (II)", *日本レオロジー学会誌*, **25**[3], 143-148 (1997).
- [1-74] 玉虫文一他, 理化学辞典, 岩波書店, P.1065 (1987).
- [1-75] 志田正二, 化学辞典, 森北出版, P.992 (1981).
- [1-76] J. Grimshaw, J. Trocha-Grimshaw, W. Fisher, A. Rice, S. Smith, P. Spedding, J. Duffy and R. Mollan, "Quantitative analysis of hyaluronan in human synovial fluid using capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, **17**, 396-400 (1996).
- [1-77] M. Moulabbi, H. Broch, L. Robert and D. Vasilescu, "Quantum molecular modeling of hyaluronan", *J. Mol. Struct.*, **395-396**, 477-508 (1997).

- [1-78] P.L. Deangelis, W. Jing, M.V. Graves, D.E. Burbank and J.L. Van-Etten, “Hyaluronan synthase of Chlorella virus PBCV-1”, *Science*, **278**[5344], 1800-1803 (1997).
- [1-79] A. Gamini, S. Paoletti, R. Toffanin, F. Micali, L. Michielin and C. Bevilacqua, “Structural investigations of cross-linked hyaluronan”, *Biomaterials*, **23**[4], 1161-1167 (2002).
- [1-80] M. Ohgaki and K. Yamashita, “Preparation of polymethylmethacrylate-reinforced functionally graded hydroxyapatite composites”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **86**[8], 1440-1442 (2003).
- [1-81] 玉田靖, “有機－無機複合生体材料への絹の利用”, *まてりあ*, 42[1], 52-57 (2003).
- [1-82] 田中順三, 田口哲志, “骨、軟骨および骨-軟骨界面を再生する生体材料”, *生体材料*, 20[2], 77-84 (2002).
- [1-83] W. Bonfield, M. Wang and K.E. Tanner, “Interfaces in analogue biomaterials”, *Acta Mater.*, 46[7], 2509-2518 (1998).
- [1-84] W. Suchanek, M. Yashima, M. Kakihana and M. Yoshimura, “ β -Rhenanite(β -NaCaPO₄) as Weak Interface for Hydroxyapatite Ceramics”, *Key. Eng. Mater.*, **132/136**, 2025-2028 (1997).
- [1-85] M. Wang, W. Bonfield, M. Li and F. Guiu, “Interphase in Composite Materials”, *Key. Eng. Mater.*, **127/131**, 583-590 (1997).
- [1-86] J.D. Santos, F.J. Monteiro and L.J. Jha, “Surface modifications of glass-reinforced hydroxyapatite composites”, *Biomaterials*, **16**[7], 521-526 (1995).
- [1-87] T. Kameyama, “Hybrid bioceramics with metals and polymers for better biomaterials”, *Bull. Mater. Sci.*, **22**[3], 641-646 (1999).
- [1-88] M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, J.D. Santos, A.P. Serro, B. Saramago and I.R. Gibson, “Effect of chemical composition on hydrophobicity and zeta potential of plasma sprayed HA/CaO-P₂O₅ glass coatings”, *Biomaterials*, **22**[23], 3105-3112 (2001).
- [1-89] Y. Yokogawa, K. Nishizawa, F. Nagata and T. Kameyama, “Bioactive Properties of Chitin/Chitosan-Calcium Phosphate Composite Materials”, *J. Sol-Gel. Sci. Technol.*, **21**[1/2], 105-113 (2001).

- [1-90] K. Suzuki, T. Yumura, M. Mizuguchi, T. Taguchi, M. Akashi, K. Sato and J. Tanaka, "Apatite-Silica Gel Composite Materials Prepared by a New Alternate Soaking Process", *J. Sol-Gel. Sci. Technol.*, **21**[1/2], 55-63 (2001).
- [1-91] J.S. Mao, H.F. Liu, Y.J. Yin and K.D. Yao, "The properties of chitosan-gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods", *Biomaterials*, **24**[9], 1621-1629 (2003).
- [1-92] L. Wang, R. Nemoto and M. Senna, "Effects of alkali pretreatment of silk fibroin on microstructure and properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, in press.
- [1-93] L. Wang, R. Nemoto and M. Senna, "Changes in microstructure and physico-chemical properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite with varying silk fibroin content", *J. Eur. Ceram. Soc.*, in press
- [1-94] 横川善之, マイケルロジャームツァロ, 鳥山素弘, 鈴木高広, 河本ゆかり, 永田夫久江, 西澤かおり, 亀山哲也, "リン酸エステル化したセルロース繊維への水酸アパタイトの成長", *名古屋工業技術研究所報告*, **45**[8], 449-456 (1996).
- [1-95] M. Tanahashi and T. Matsuda, "Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid", *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 305-315 (1997).
- [1-96] H. Unuma, K. Ito, T. Ota and M. Takahashi, "Precipitation of hydroxyapatite under stearic acid monolayers", *J. Am. Ceram. Soc.*, **79**[9], 2474-2476, (1996).
- [1-97] K. Furuhashi, A. Okada, Y. Chen Y, Y.Y. Xu and M. Sakamoto, "Dissolution of silk fibroin in lithium halide/organic amide solvent systems", *J. Seric. Sci. Jpn.*, **63**[4], 315-322 (1994).
- [1-98] K. Chen, Y. Umeda and K. Hirabayashi, "Enzymatic hydrolysis of silk fibroin", *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**[2], 131-133 (1995).
- [1-99] X. Chen, D.P. Knight, F. Vollrath and Z. Shao, "Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR", *Polymer*, **42**[25], 9969-9974 (2001).
- [1-100] J. Nam and Y.H. Park, "Morphology of regenerated silk fibroin: Effects of freezing temperature, alcohol addition, and molecular weight", *J. Appl. Polym. Sci.*, **81**[12], 3008-3021 (2001).

- [1-101] H. Kweon and Y.H. Park, "Dissolution and characterization of regenerated *Antheraea pernyi* silk fibroin", *J. Appl. Polym. Sci.*, **82**[3], 750-758 (2001).
- [1-102] K.A. Gross, V. Gross and C.C. Berndt, "Thermal analysis of amorphous phases in hydroxyapatite coatings", *J. Am. Ceram. Soc.*, **32**, 5533-5543, (1997).
- [1-103] S. Nakamura, T. Isobe and M. Senna, "Properties of hydroxyapatite nano sol prepared via a wet mechanochemical route," *J. Nanoparticle. Res.*, **3**, 57-61 (2000).

第2章 実験方法

2.1. 出発原料

ヒドロキシアパタイト合成の出発原料にはカルシウムソースとして $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Wako Pure Chemical Ind., Guaranteed grade) を、リン酸ソースとして H_3PO_4 水溶液 (Taisei Chemical Co., Guaranteed grade) をそれぞれ使用した。生体高分子としては絹フィブロイン粉末 (Idemitsu Petrochemical, Lot. B98)、ヒアルロン酸ナトリウム (Seikagaku Kogyo, molecular weight 640000) を用いた。分散剤としてはポリアクリル酸アンモニウム (Allied Colloid, Dispex A-40) を用いた。

2.2. メカノケミカル処理方法

Fig.2.2.1 に本研究に用いたマルチリング型超微粉砕機 (MICROS) の構造を示す。

本体はケーシングとその中で回転する主軸、主軸の回転と連動して公転する数本の副軸から構成されており、各副軸には多数のリング状粉砕媒体が取り付けられている。粒子は、この回転しているリングとケーシング内壁面の間にはさまれ、磨砕等の作用を受け、粉砕・分散が行われる [2-1]。

MICROS は従来の粉砕機に比較して 1/6~1/30 の処理時間でサブミクロンまでの粉砕を行うことができ、繊維状物質の粉砕(切断)・層状物質の剥離粉砕が可能である。幅広いスラリー濃度に対応でき、200G にも及ぶ強い力を粉体に与えることができるためメカノケミカル反応やメカニカルアロイングのアクティベーターとして活用が可能であり、Hamada らは $\text{Mg}(\text{OH})_2$ と TiO_2 を出発原料に MgTiO_3 の合成に [2-2]、Lee らは PbO 、 Nb_2O_5 、 $2\text{ZnCO}_3 \cdot 3\text{Zn}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ を出発原料に $\text{PbZn}_{1/3}\text{Nb}_{2/3}\text{O}_3$ の合成に MICROS を用いている [2-3]。本研究では MICROS を湿式条件で使用した。

2.3. 特性評価法

2.3.1. 粉末 X 線回折 (XRD) 測定

2.3.1.1. 定性分析

生成物の同定のために粉末 X 線回折測定 (Rigaku, RINT 2000) を行った。Table.2.3.1 に定性分析の際の XRD 測定条件を示す。

2.3.1.2.Rietveld 法による定量分析

生成物の結晶子サイズ、格子歪、格子定数などの摩砕処理による経時変化、および生体高分子の前処理等による相違等を確認するために XRD 測定結果から RIETAN-2000[2-4]を用いて Rietveld 解析を行った。Rietveld 解析用には XRD データの精密測定を行った。Table.2.3.2 に精密測定の際の XRD 測定条件を示す。装置定数のキャリブレーションには Si 多結晶を用い、プロファイル関数としては pseudo-Voigt 関数、ピークの非対称化には Howard の方法、ヒドロキシアパタイトの結晶構造は六方晶系の空間群 $P6_3/m$ (No.176)とした。出発原子座標は Kay 等[2-5]の座標を利用した。

2.3.1.3.内部標準法による結晶化度の定量分析

HAp の結晶化度を解析するため内部標準法により結晶化度の解析を行った。精密測定には Table.2.3.2 の測定条件を用いた。CaF₂ を内部標準試料として用い、Hydroxyapatite(cHAp, Mitsui Toatsu)を 100%結晶質のサンプルとして解析を行った。各試料の相対結晶化度 $I(hkl)$ は以下の式により計算した。

$$I(hkl) (\%) = 100 \times [I_s(hkl)/I_{is}(111)]/[I_c(hkl)/I_{ic}(111)] \quad (2-1)$$

$I_s(hkl)$: Integral intensities of the sample

$I_{is}(111)$: Integral intensities of the internal standard

$I_c(hkl)$: Integral intensities of cHAp

$I_{ic}(111)$: Integral intensities of the internal standard used for cHAp

生体高分子の共存による非晶質部分への影響を取り除くため、予め酸素雰囲気下、600°Cにおいて一時間の焼成処理を行った試料についても同様に結晶化度の解析を行った。

2.3.2.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定

生成物の同定、アパタイト構造中における CO₃²⁻の存在、HAp との相互作用による SF 中のアミド結合の振動モードの変化等を確認するために赤外線吸収スペクトル

ル測定(BIO-RAD, FTS-175)を KBr-disk 法で行った。Table.2.3.3 に FT-IR 測定条件を示す。

2.3.3.蛍光 X 線(XRF)測定

生成物の Ca/P モル比を確認するために蛍光 X 線測定(Rigaku, 3080)を行った。測定溶液は生成粉末を塩酸で完全に溶解させ、イオン交換水で希釈したものを用いた。Ca と P の検量線試料は Ca 標準液(Wako Pure Chemical Ind., 1000mg/l)、P 標準液(Wako Pure Chemical Ind., 1000mg/l)をイオン交換水に希釈して調製した。Fig.2.3.2 に検量線を、Table.2.3.4 に XRF 測定条件を示す。

2.3.4.透過型電子顕微鏡(TE-TEM)

格子像、一次粒子の大きさと形状およびその凝集状態を、透過型電子顕微鏡(Philips, TECNAI F20)で観察した。電子線の加速電圧は 200kV とした。ゾルを 1000 倍に希釈し、サンプル管をよく攪拌して、試料を均一に分散させた後、超音波洗浄機で 5 分間分散させた。その後、マイクロシリンジでサンプルを採取後、コロージオン膜の張った銅メッシュ上に滴下し、室温で 24h 乾燥した。試料の結晶性、配向等を確認するため、制限視野電子線回折像(SAD)も観察した。

2.3.5.粒度分布(LPA)測定

スラリーを 0.4cm^3 採取し、 100cm^3 のイオン交換水の入ったサンプル管に注入した。希釈することによって、粒子間同士の著しい凝集作用を抑えた。次に試料の入ったサンプル管をよく攪拌して、試料を均一に分散させた後、超音波洗浄機で 5 分間分散させた。その後、ただちにレーザー光散乱・回折式粒度分布(LPA)測定装置(Beckman Coulter, LS230)を用いて粒度分布測定を行った。測定時、試料濃度が 8~12%および PIDS 強度が 45~55%になるようにさらに希釈した。測定中は試料に一定の強さの超音波を 1 秒おきにかけて凝集を防いだ。Table.2.3.5 に測定時に使用した各屈折率を示す。ただし、ここでの虚数部とはサンプルの色に依存する吸光係数というパラメーターであり、白の HAp を 0、黄色の SF を 0.1 とおいた。

2.3.6.レオロジー測定

スラリーのレオロジーはレオメーター(Haake, RT20)を用い、超音波洗浄機で 10 分間分散させた後、pre-shear を 350s^{-1} で 120sec かけたあと 5min で $0 \rightarrow 350\text{s}^{-1}$ とせん断速度を変えながらせん断応力の変化を測定した。

2.3.7.原子吸光分析(AAS)

フィブロインに吸着した各種陽イオンを定量するために原子吸光分析(HITACHI, 170-30)測定を行った。

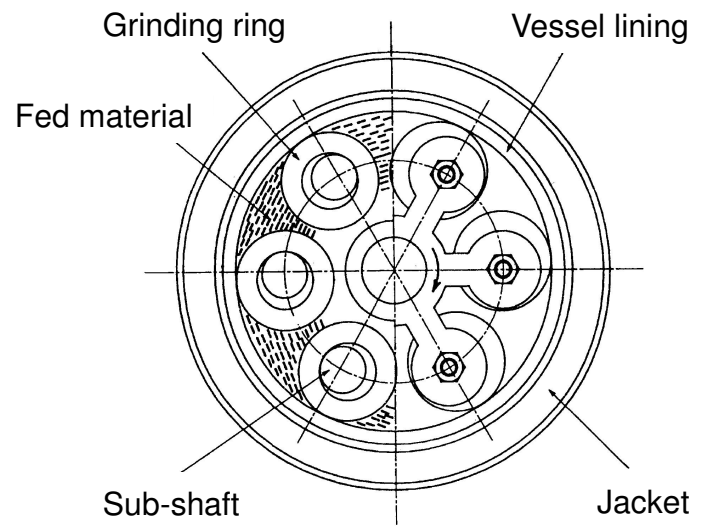


Fig.2.2.1. MICROS

Table.2.3.1. Conditions of XRD measurement.

| | | | |
|----------------|---------------|----------------|-----------------|
| Target (X-ray) | CuK α | Scanning speed | 2deg/min |
| Filter | Monochromator | Scanning step | 0.05deg |
| Voltage | 30kV | Scanning mode | Continuous scan |
| Current | 40mA | Slits | DS1 SS1 RS0.3 |

Table.2.3.2. Conditions of XRD measurement (Rietveld analysis).

| | | | |
|----------------|---------------|---------------|----------------|
| Target (X-ray) | CuK α | Fixed time | 8s |
| Filter | Monochromator | Scanning step | 0.05deg |
| Voltage | 40kV | Scanning mode | Fixed time |
| Current | 50mA | Slits | DS1 SS1 RS0.15 |

Table.2.3.3. Conditions of FT-IR measurement.

| | |
|-----------------|-------------------|
| Number of scans | 64 |
| Resolution | 1cm ⁻¹ |
| Scan type | Transmission |
| Velocity | 5kHz |
| Filter | 1.2kHz |
| Atmosphere | Air |

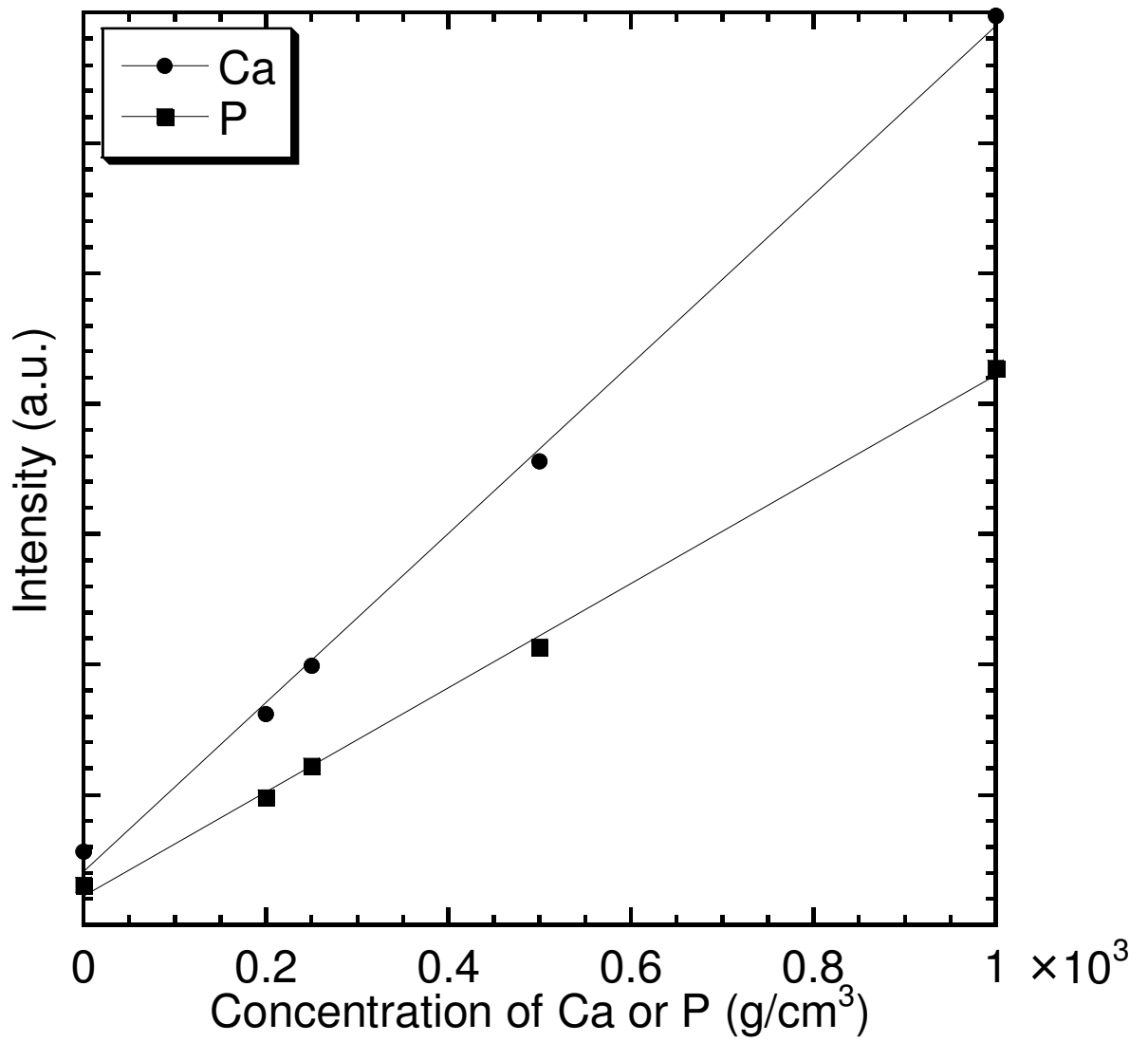


Fig.2.3.2. Calibration curves of XRF.

Table.2.3.4. Conditions of XRF measurement

| Target(X-ray) | Rh | Job | Quan |
|---------------|--------|-----------------|------------------|
| Voltage | 50kV | Angle(2θ) | Ca:45.35 P:89.65 |
| Current | 40mA | Time const. | 1sec |
| Crystal | PET | Preset time | 50sec |
| Filter | Out | Number of scans | 5 |
| Slit | Coarse | | |

Table.2.3.5. Refractive index of samples [2-6, 2-7]

| SAMPLE | H ₂ O | HAp | SF |
|------------------|------------------|-------|-------|
| Refractive index | 1.333 | 1.649 | 1.553 |

第2章の引用文献

- [2-1] K. Hamada and M. Senna, “Mechanochemical effects on the properties of starting mixtures for PbTiO_3 ceramics by using a novel grinding equipment”, *J. Mater. Sci.*, **31**, 1725-1728 (1996).
- [2-2] K. Hamada and M. Senna, “Compressive studies of the mechanochemical synthesis of MgTiO_3 precursors by milling various mixtures containing oxide and hydroxides”, *J. Mater. Sci. Lett.*, **15**, 603-605 (1996).
- [2-3] W.S. Lee, T. Isobe and M. Senna, “An X-ray photoelectron study on mechanochemical reactions toward ferroelectric lead zinc niobate”, *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **25**[1], 135-138 (2000).
- [2-4] F. Izumi and T. Ikeda, “A Rietveld analysis program RIETAN-98 and its applications to zeolites”, *Mater. Sci. Forum.*, **198**, 321-324 (2000).
- [2-5] M.I. Kay, R.A. Young and A.S. Posner, “Crystal structure of hydroxyapatite”, *Nature*, **204**, 1050-1052 (1964).
- [2-6] 金澤孝文, 梅垣高士, 門間英毅, 山下仁大, “アパタイトの材料化学”, *石膏と石灰*, **210**, 261-273 (1987).
- [2-7] 金東建, 伊藤孝, 小西孝, “絹フィブロインフィルム of 熱処理とエタノール処理後の延伸による構造変化”, *繊維学会誌*, **53**[9], 365-370 (1997).

第 3 章 湿式メカノケミカル法によるヒドロキシアパタイト - 絹フィブロインナノ複合ゾルの直接合成

3.1. 緒言

最近の研究において、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と H_3PO_4 との湿式メカノケミカル反応により、高分散性のヒドロキシアパタイト(HAp)のナノゾルが得られるということが報告された[3-1]。湿式メカノケミカル反応とは、固体微粒子と、それに接する溶液との界面における溶解・析出反応を基調としたメカノケミカル反応で、ITO や PbTiO_3 など多くの需要がありながら合成の容易でない材料の合成に極めて有用な方法である[3-2, 3-3]。

人工骨、人工歯根などの臨床応用を目的に HAp 合成には多くの系での報告例があり[3-4~3-7]、より生体親和性の高い材料を得るために HAp - 生体高分子複合材料についても多くの系での合成が報告されている[3-8~3-10]。しかし、これらのプロセスと比較して室温で簡単、低コストかつ短時間で比較的粒径の均一な複合ゾルを得られる湿式メカノケミカル法を用いて HAp - 生体高分子複合材料を調製したという報告例はなく、また機械的な応力によってアパタイトと生体高分子の相互作用を制御したという報告例もない。

そこで、本章では湿式メカノケミカル法によりナノメートルオーダーで無機物相として単相のヒドロキシアパタイトと生体高分子とが相互作用し、均一に分散した有機無機ナノ - ナノ複合ゾルの調製を試みた。生体高分子として絹糸タンパク質の主成分である絹フィブロイン粉末(SF)を用いた。本章では主に湿式メカノケミカル法による HAp の生成機構の解明および生体材料としての臨床応用を視野に入れて、得られた複合ゾルの粘弾性、膜へのゲル化等について述べる。得られた複合体中の HAp ナノ結晶の特性、生体高分子と HAp との有機 - 無機相互作用の詳細等は次章で扱う。

3.2.実験方法

3.2.1.試料の調製

27.91g の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と 15cm^3 の H_3PO_4 水溶液、 185cm^3 のイオン交換水で HAp の Ca/P モル比の化学量論比 1.67 となるように調製し、この調製の際、化学量論的な反応を仮定したときの HAp 量の 2.83wt% のポリアクリル酸アンモニウム、および 0.10 wt%、1.00 wt%、または 10.00wt% の絹フィブロイン粉末(SF)とを添加した。これらの試料名はそれぞれ SF0.1、SF1、SF10 とした。マグネティックスターラーを用いた攪拌処理 1 時間後、MICROS により回転数 1250rpm で湿式混合摩砕処理を行った。処理時間は 0、5、30、60、180 分の 5 通りとした。摩砕 5、30、60 分の試料については装置を途中で一時停止して、 5cm^3 ずつ分析用試料を採取した。摩砕後は吸引濾過により溶液から試料を濾別し、 50°C 恒温乾燥機中で 24 時間乾燥し粉末化した。比較のため SF を添加していない系においても同様の処理を行った(SF0)。

Fig.3.2.1 に試料合成の手順を示す。

3.2.2.ヒドロキシアパタイト - 絹フィブロイン複合膜の調製

生体材料へのコーティングを目的に、キトサン膜をコーティングしたスライドガラス上に摩砕後のスラリーをディップコーティングした。Fig.3.2.2 に膜の調製手順を示す。

3.2.2.1.キトサン膜の調製

酢酸(Kanto Chemicals, Guranteed grade)をイオン交換水で希釈して得た 100cm^3 の 0.5N 酢酸水溶液に 1.00g のキトサン(Wako Pure Chemical Ind., Chitosan 10)を 24 時間攪拌することにより完全に溶解させ、キトサン酢酸溶液を調製した。さらに 2.00g のポリアクリル酸アンモニウムを 100cm^3 の蒸留水に溶解させ、界面活性剤溶液を調製した。

スライドガラスにキトサン酢酸溶液を 0.4mm/sec でディップコーティングし、続いて界面活性剤溶液に 30 秒浸してから室温で乾燥した。

3.2.2.2.ディップコーティング

キトサン膜上に 0.02vol% の摩砕後のスラリー(SF0、SF10)を 10 分間の超音波照射

を施した後、0.4mm/sec でディップコーティングし、室温で乾燥することで膜を作成した。膜の観察には電界放射型走査電子顕微鏡(FE-SEM)(Hitachi, S-4700)を用いた。

3.3.結果と考察

3.3.1.透過型電子顕微鏡(FE-TEM)による観察

Fig.3.3.1 に摩砕後の SF10 の透過型電子顕微鏡による観察結果を示す。Fig.3.3.1(a) の凝集粒子の観察においては 100~500nm 前後の球状の粒子が生成している。この凝集粒子さらに拡大すると、Fig.3.3.1(b)に示すように平均粒径 $11.0\pm 2.4\text{nm}$ の一次粒子で構成されている。

Fig.3.3.1(c)に示すように結晶格子の観察結果においては 0.817nm 間隔の HAp における(100)面格子が確認でき、さらにその 1/3 格子が 0.272nm 間隔の結晶格子(300)として出現しており、主生成物ナノ粒子は HAp 結晶とみられる。

3.3.2.粉末 X 線回折(XRD)測定結果

SF0、SF10 の摩砕試料についての XRD 測定結果を、Fig.3.3.2.1、Fig.3.3.2.2 に示す。いずれの反応系においても摩砕初期時には Brushite ($\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)が共存しているが、摩砕の進行に伴い、HAp の単相へと変化している。このことから、摩砕時のせん断応力は、Brushite→HAp の変化を促進することがわかる。二つの系を比べると、SF10 においては 30 分の段階で Brushite のピークが消失し、HAp 単相になっているのに対し、SF0 においては 30 分まで Brushite のピークを確認できる。よって SF の共存が Brushite→HAp の変化を促進していることがわかる。

Fig.3.3.2.3 で示すように溶液反応によると、5 分では XRD において中間生成物として Monetite (CaHPO_4)の共存[3-11, 3-12]が見られ、1 時間の攪拌処理を施したことにより、Monetite が結晶構造中に水溶液中の H_2O を取り込んで、2 水和物である Brushite に変化している[3-13]。また、その後 24 時間の攪拌処理を施しても HAp 単相への変化は確認できない。

摩砕による Brushite→HAp の変化を促進した理由については次のように説明できる。摩砕のせん断応力により分散媒中で $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 粉末と $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 粉末の微細化、均一化が起こり、Fig.3.3.2.4 に示すような脱水反応により HAp が生成する。このような脱水反応は $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と SiO_2 などの系においても報告されている[3-14]。また、乾式摩砕による Silva らの系においても $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 粉末と $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 粉末の固相反応により HAp が生成している[3-15]。

SF の共存下では COOH 基、OH 基などが反応の触媒となり、同様のメカニズムで

Brushite 中の HPO_4^{3-} との脱水反応をおこすことによって、Brushite \rightarrow HAp の変化が促進されたのではないかと推測できる。乾式摩砕における金山らの系においても SF の共存により HAp 生成の促進が確認されている[3-16]。

3.3.3.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定結果

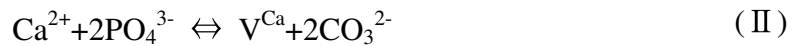
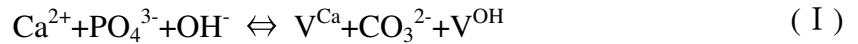
SF0、SF10、それぞれの $400\sim 1800\text{cm}^{-1}$ における FT-IR スペクトルを Fig.3.3.3.1、Fig.3.3.3.2 に示す。 875cm^{-1} 付近、 1420cm^{-1} 付近及び 1470cm^{-1} 付近のピークは、B サイト(PO_4^{3-})置換の炭酸アパタイト(CO_3Ap : $[\text{Ca}_{10-y}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH}, \text{CO}_3)_2]$)の生成を示唆するものであり、空気中の CO_2 がアパタイト結晶内に取り込まれたことがわかる[3-17]。また、SF10 においては 30 分の段階で Brushite のピークが消失し、HAp 単相になっているのに対し、SF0 では 30 分においても Brushite のピークが確認できる[3-18]。よって SF の共存が HAp 単相への変化を促進していることがわかり、この結果は XRD における測定結果と一致する。

次に、 1650cm^{-1} 付近に SF の C=O 伸縮(amide I)によるピーク、 1536cm^{-1} 付近の N-H 変角(amide II)によるピーク[3-19, 3-20]が見られ、SF10 系においては摩砕の進行とともに amide II が明瞭に確認できるようになった。これは 1470cm^{-1} 付近の CO_3Ap によるピークと重なっていたピークが 1536cm^{-1} 付近にブルーシフトしたためと考えられる。このことから、SF の二次構造が β -シートから α -ヘリックスやランダムコイル構造に変化したことがわかり[3-21]、詳細は次章で述べる。

3.3.4.蛍光 X 線(XRF)測定結果

Table.3.3.4 に、摩砕後の SF0 \sim SF10 の Ca/P モル比測定結果を示す。いずれの試料においても仕込み量である HAp の化学量論比よりもカルシウムの値の少なくなっており、Ca 欠損型アパタイトが生成していることがわかる[3-22]。

次に FT-IR によって確認した HAp の PO_4^{3-} サイトに CO_3^{2-} が存在する B サイト置換型炭酸アパタイトの生成の Ca/P 比に対する影響、溶液中に含まれる金属イオンの影響について考える。アパタイト構造中に金属または CO_3^{2-} イオンが置換することによる電荷補償のメカニズムとしては次の六つのメカニズムが提案されている[3-23]。



ここで V^{X} はアパタイトの X によって占められる格子サイトの vacancy を表し、M はアルカリ金属を表す。(I)~(III)及び(V)のメカニズムにおいては CO_3^{2-} イオンが PO_4^{3-} サイトに置換した場合である。(I)~(III)式で表される置換により Ca/P 比が変化したとすると、(I)、(III)の場合、電荷補償のため、Ca と P が一対一でアパタイト構造中から水溶液中に溶出し、(II)の場合では Ca と P が一対二で溶出することになる。よって Ca 過剰型アパタイトが生成することになる。また、(V)式で表される置換により Ca/P 比が変化したとすると、アパタイト構造中から P だけが水溶液中に溶出し、Ca の量に変化はない。よってこの場合も Ca 過剰型アパタイトが生成することになる。

次に(IV)式で表される置換により Ca/P 比が変化したとすると、ここでは Ca だけがアパタイト構造中から水溶液中に溶出し、P の量に変化はない。よって Ca 欠損型の HAp が生成することになる。他方、(VI)式で表される置換は Ca/P 比の変化は伴わない。

以上のことから考えると、Ca 欠損型アパタイトが生成する原因として、(IV)式で表される置換が、イオン交換水中に不純物として含まれる Na^+ や K^+ などの存在によって引き起こされるか、(VII)式で示すように PO_4^{3-} イオンサイトに HPO_4^{2-} が置換したためだということがわかる。



しかし、TEM 付属の EDX など元素分析の結果において他の金属イオンの存在がほとんど確認されないことから、炭酸アパタイトとともに HPO_4^{2-} が置換した Ca 欠損型アパタイトが生成しているということが推測できる。

3.3.5.粒度分布(LPA)測定結果

Fig.3.3.5 に摩砕後の SF0、SF10 の粒度分布測定結果を示す。いずれの試料においても粒度分布は Bimodal な形となり、SF の共存により粒度分布の測定結果には大きな違いは見られなかった。摩砕により粒度分布が Bimodal な形となった理由については次章で述べる。また、摩砕前の SF のみの平均粒径は $6.1\pm 3.5\mu\text{m}$ なので、SF も摩砕の結果微細化したことがわかる。測定結果は TEM で確認された凝集粒子の大きさとほぼ一致し、一次粒子の存在は粒度分布測定装置の測定範囲($0.04\sim 2000\mu\text{m}$) より小さいため確認することはできなかった。

3.3.6.コーティングに用いたスラリーのレオロジー特性

Fig.3.3.6 にコーティングに用いた 0.02vol% の摩砕後のスラリー(SF0、SF10)のレオロジー測定結果を示す。この結果を見ると SF0、SF10 系ともに非常に類似しており、どちらの系においても Newton 流体に近い挙動を示し、分散状態が良好であった。このことは本章で調製した試料の濃度、摩砕条件では SF の共存が HAp の凝集状態に大きな影響を与えない事を意味しており、粒度分布の測定結果と一致している。また、Nakamura らによって報告された降伏応力は本章では確認されなかった[3-1]。これは分散剤濃度、スラリーの希釈条件によるものと考えられる。

3.3.7.膜の観察

SF0、SF10、それぞれの膜の FE-SEM 写真観察結果を Fig.3.3.7.1、Fig.3.3.7.2 に示す。表面の観察は斜め 45 度の角度で行った。いずれの観察結果においても TEM、粒度分布測定等で確認された $0.3\sim 2.0\mu\text{m}$ 程度の凝集粒子を表面の観察結果で確認でき、断面の観察は比較的均一な部分で観察を行った。断面の観察結果においてはキトサン膜上にコーティングされた SF0、SF10 の各膜の様子を観察することができ、得られた膜の膜厚はおよそ $1.8\sim 4.0\mu\text{m}$ であった。このように膜の観察結果から、ディップコーティングによりキトサンを基板として $1.8\sim 4.0\mu\text{m}$ 程度の膜厚の膜を得ることができるということがわかった。

3.4.総括

湿式メカノケミカル法によりナノメートルオーダーで無機物相として単相のヒドロキシアパタイトと生体高分子とが分散した有機無機ナノ-ナノ複合ゾルを合成した。XRD、FT-IRの結果、ともに中間生成物として Brushite が生成し、3時間の摩砕処理により完全に HAp 単相に変化した。SFの共存下において Brushite から脱プロトン化による HAp への変化は促進された。生成物の Ca/P モル比は 1.44~1.55 でカルシウム欠損型の HAp であった。キトサンがコートされたガラス基板上にディップコーティングによりゲルフィルムを作成した。

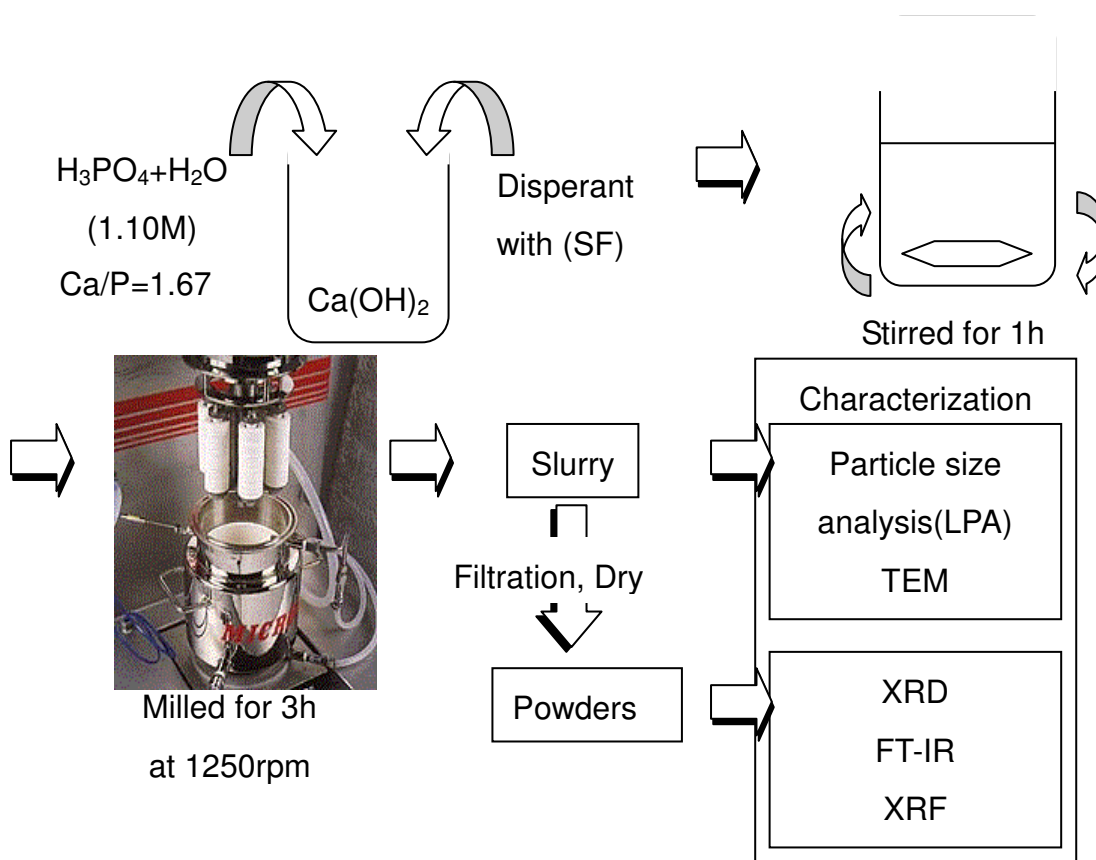


Fig.3.2.1. Synthesis scheme of samples.

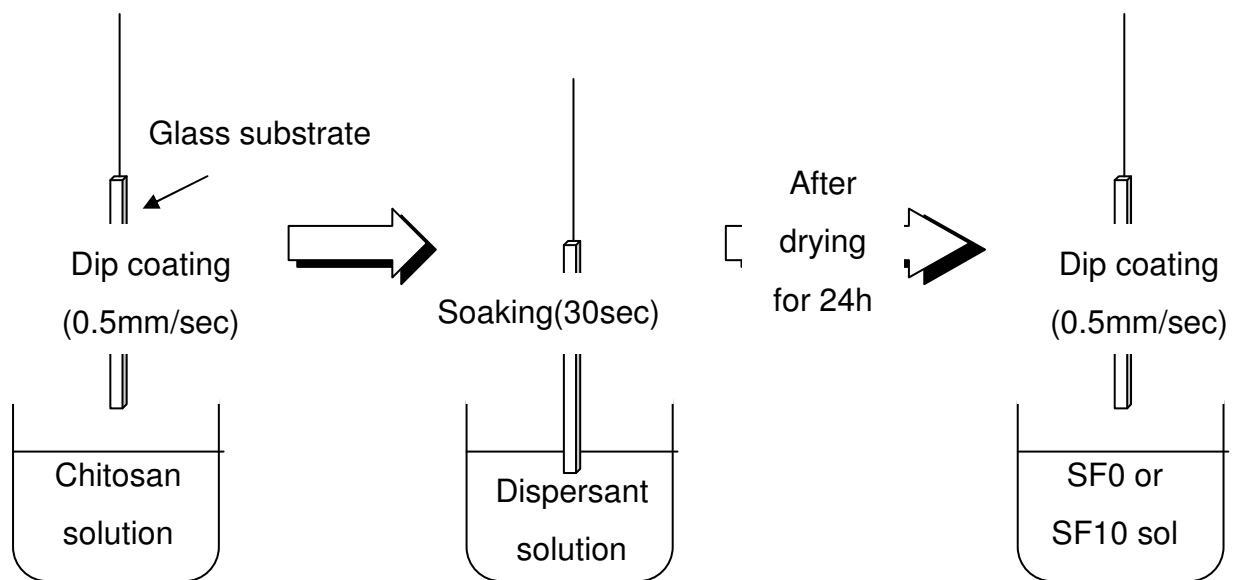
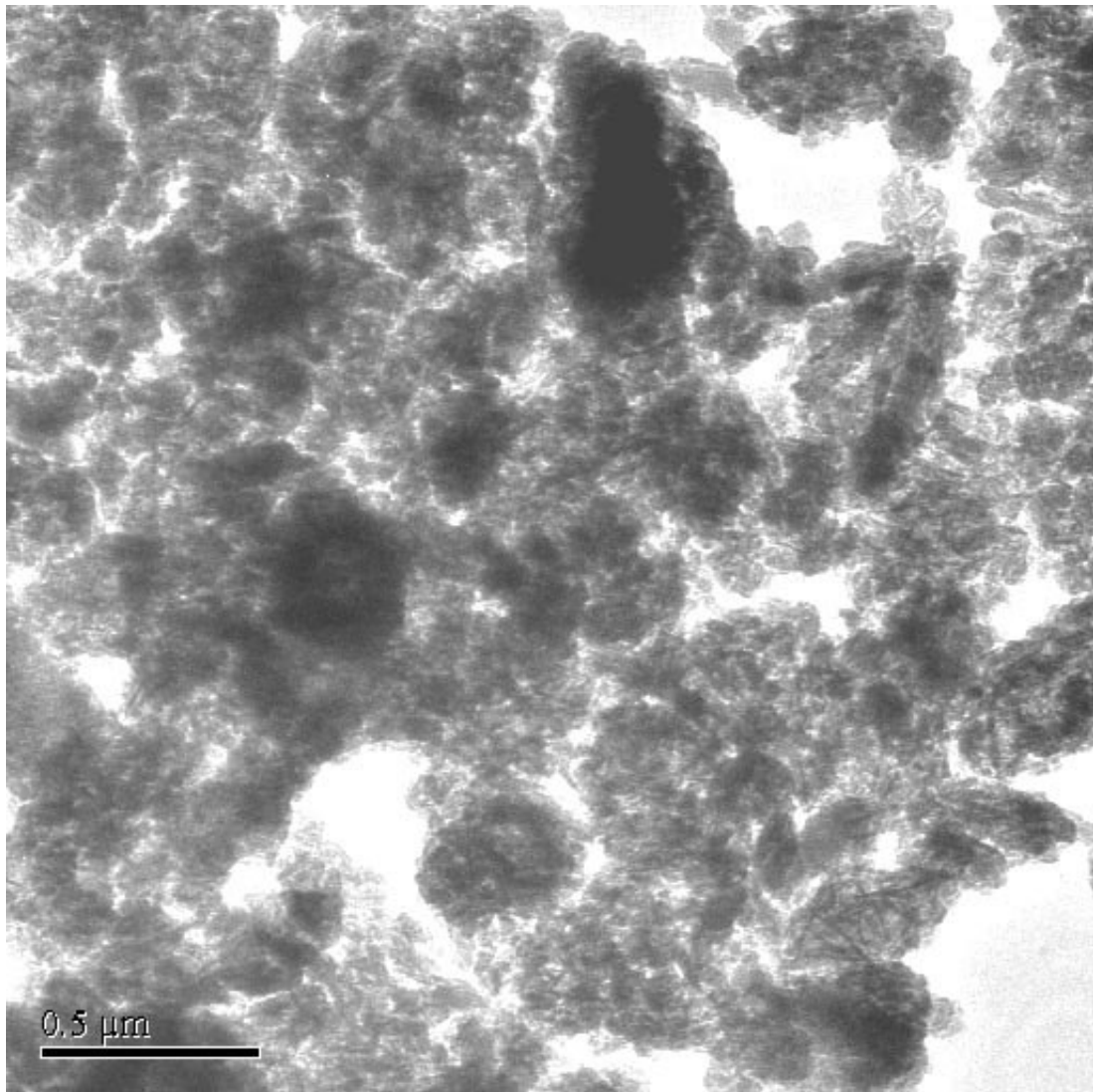
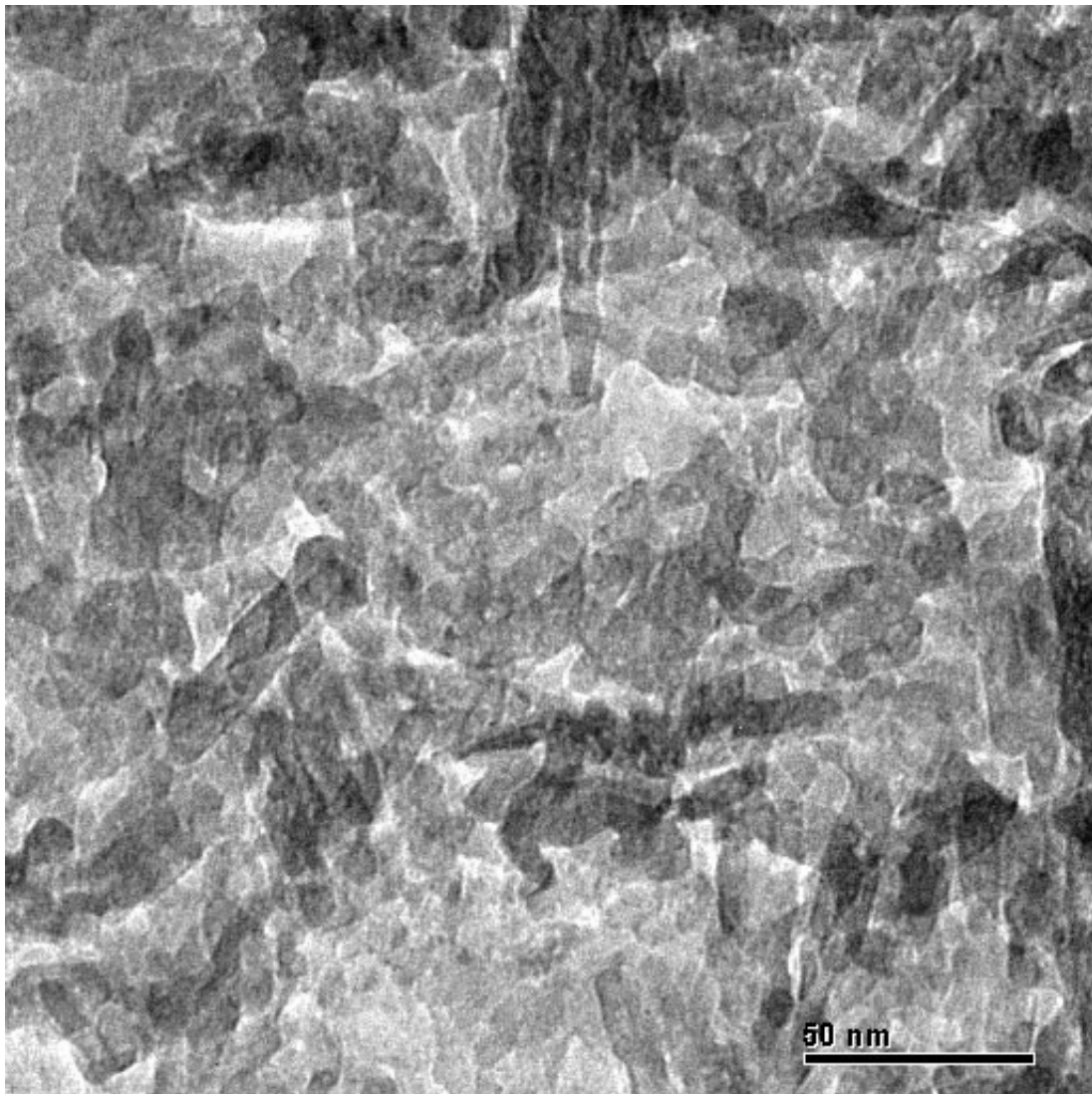


Fig.3.2.2. Preparation scheme of SF10 film.



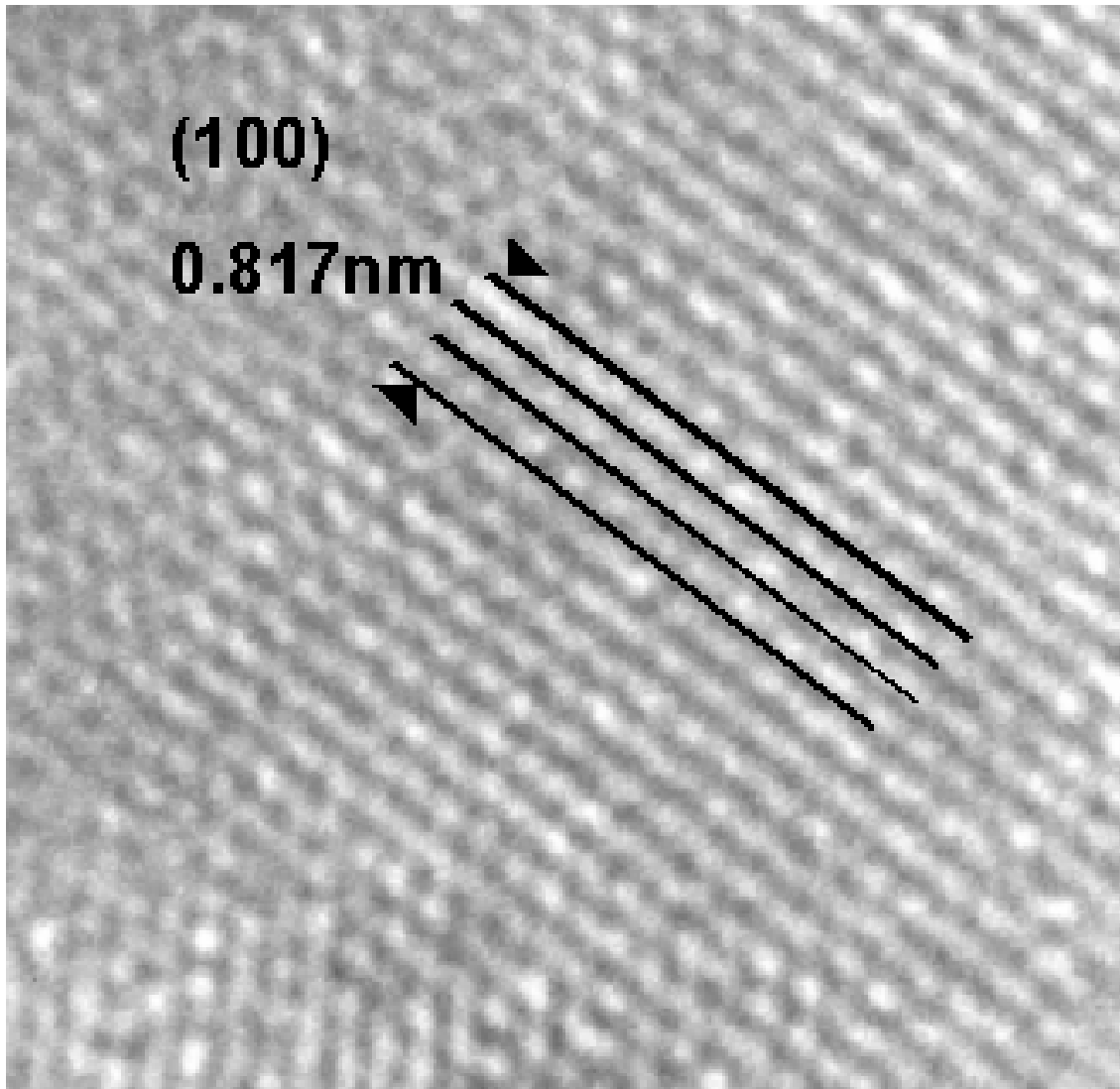
(a) Aggregates at lower magnification

Fig.3.3.1. Transmission electron micrograph of SF10.



(b) Aggregates at higher magnification

Fig.3.3.1. Transmission electron micrograph of SF10.



(c) Lattice image

Fig.3.3.1. Transmission electron micrograph of SF10.

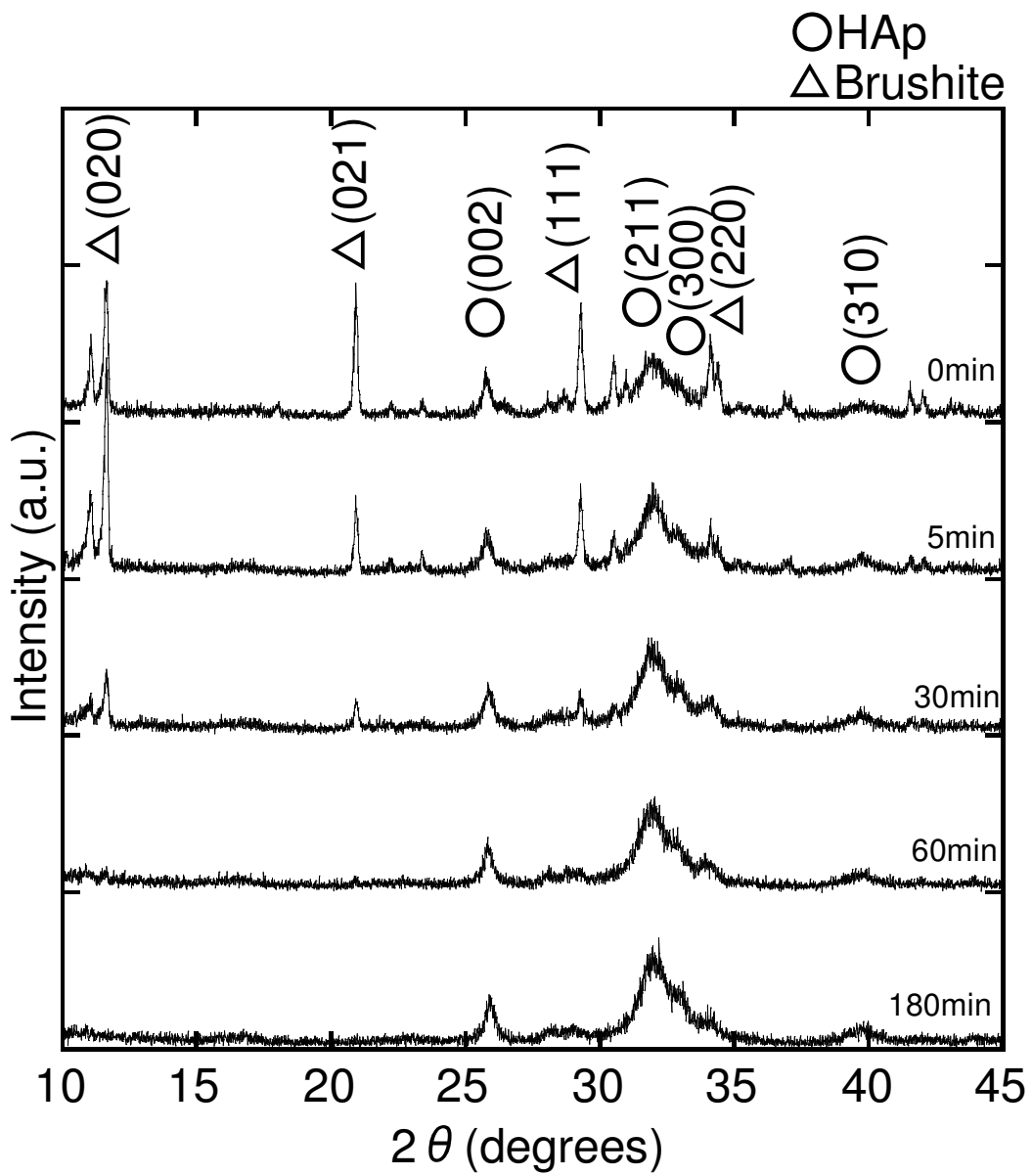


Fig.3.3.2.1. XRD profiles of SF0

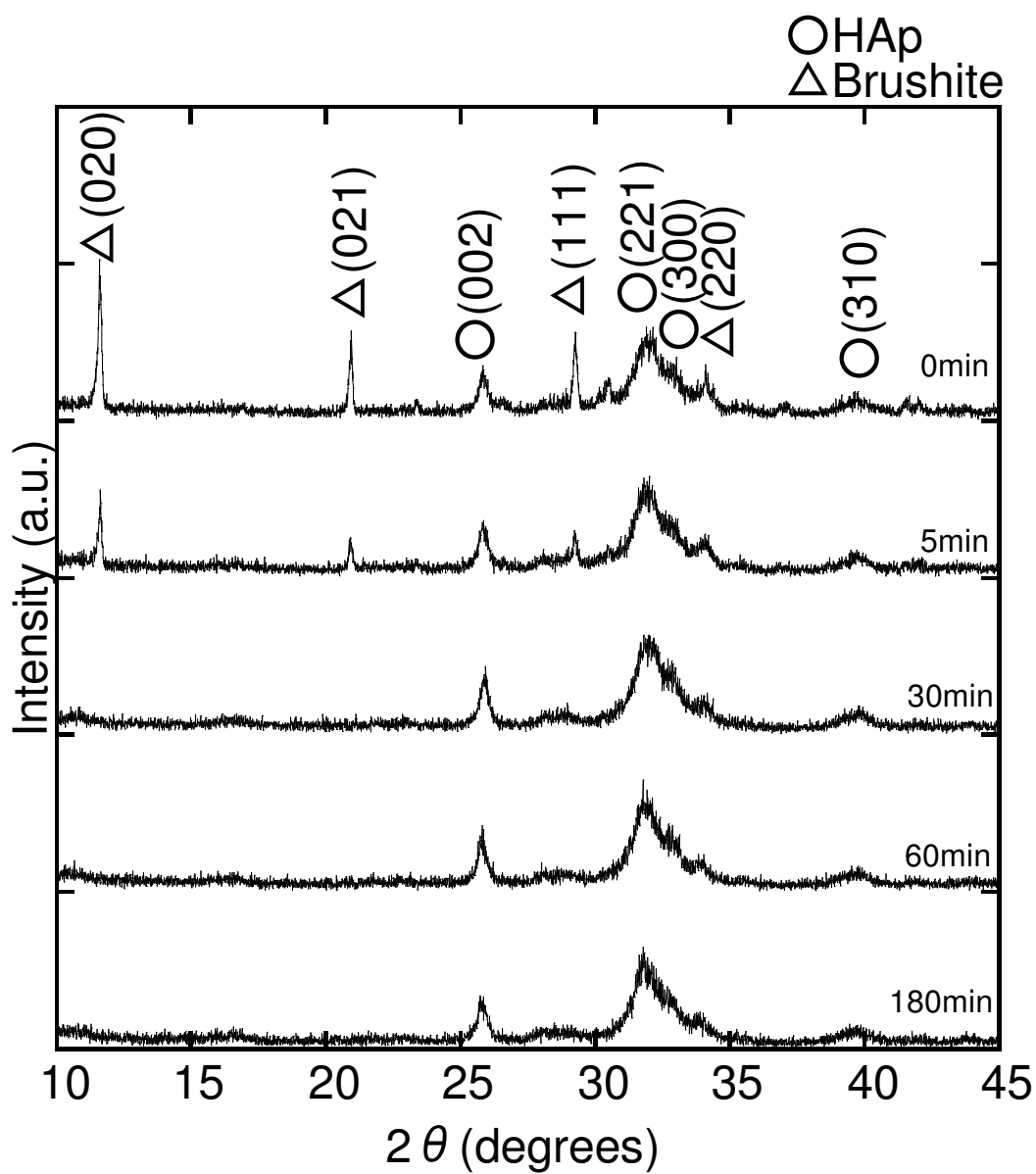


Fig.3.3.2.2. XRD profiles of SF10

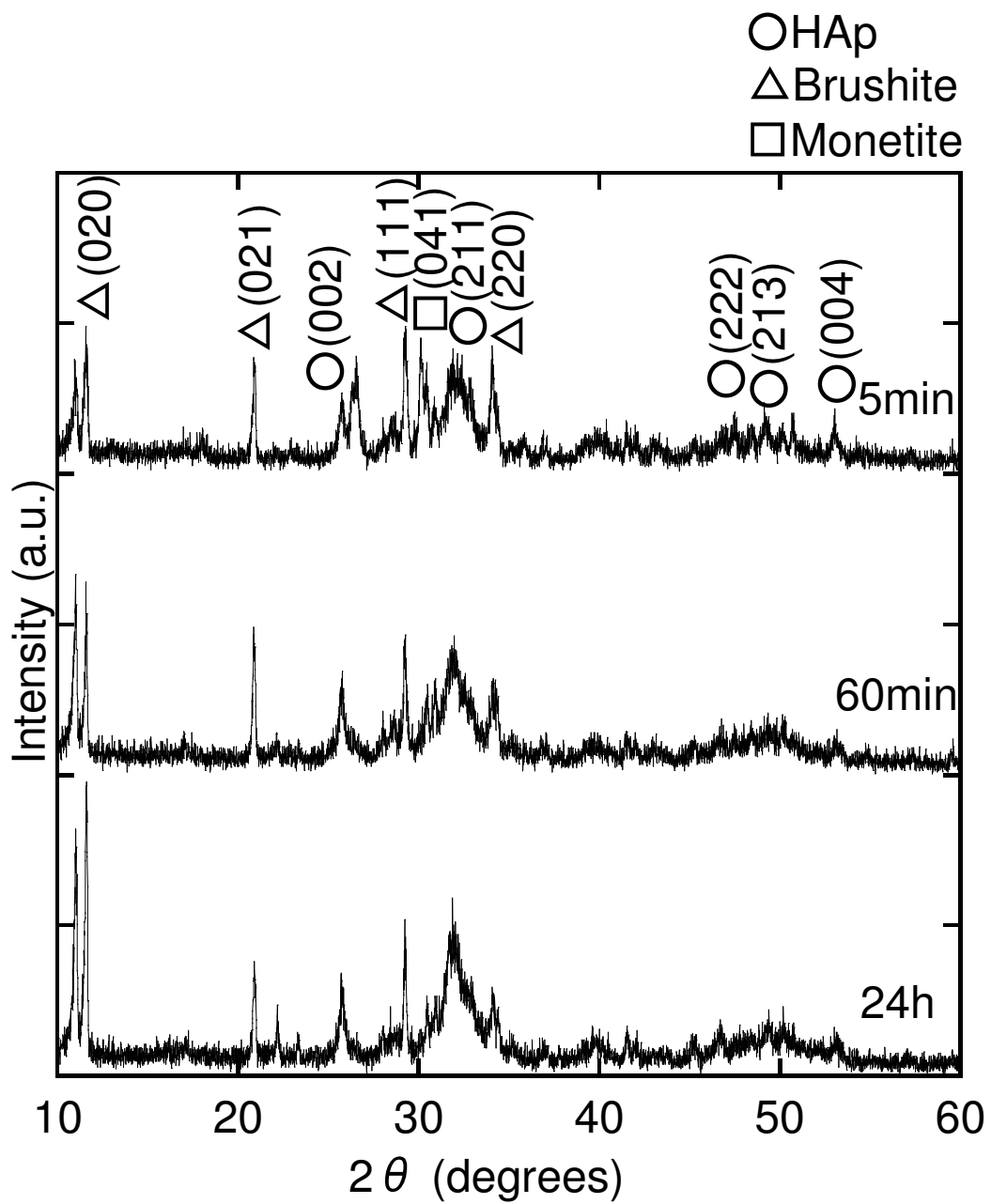


Fig.3.3.2.3. XRD profiles of SF10 prepared by stirring.

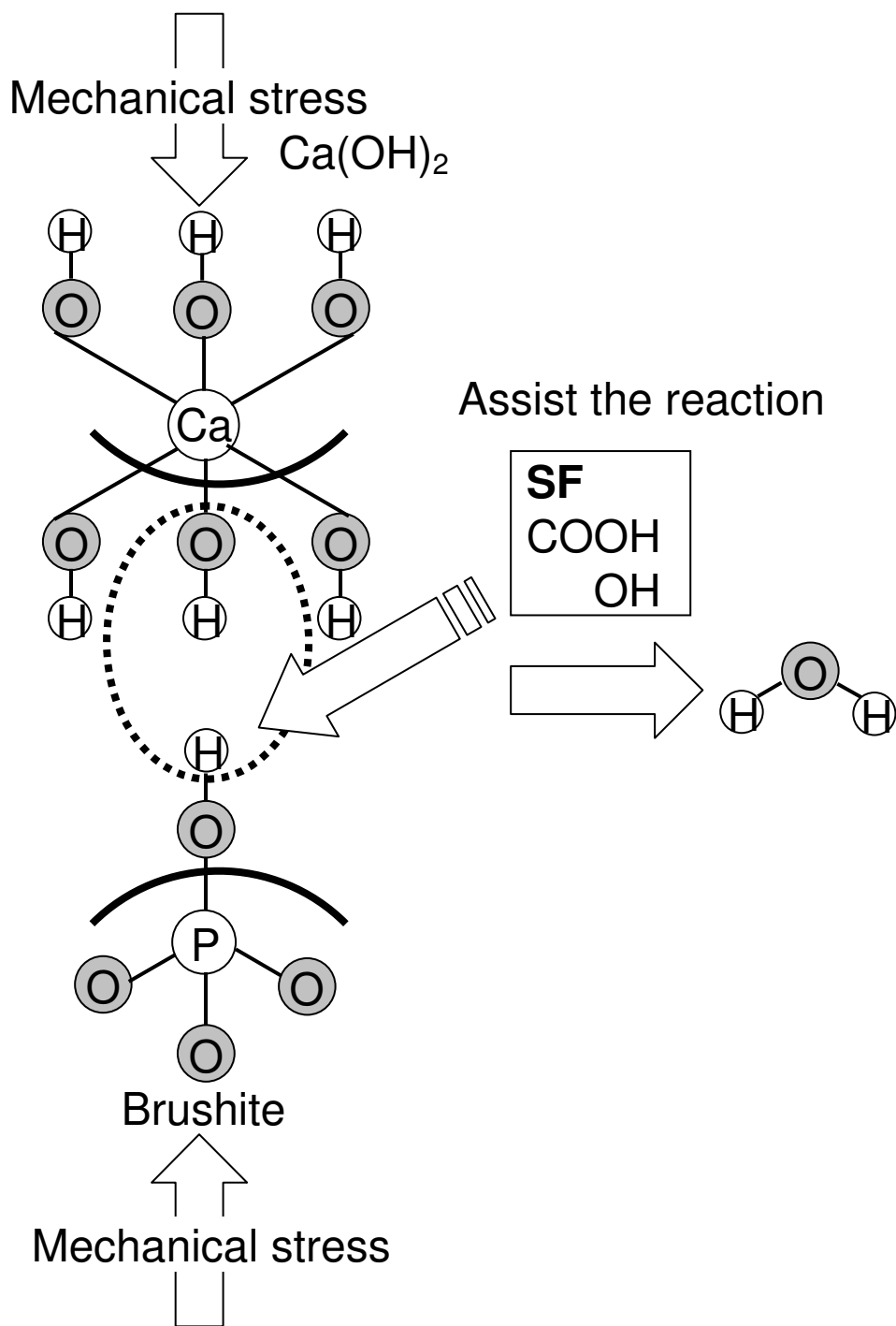


Fig.3.3.2.4. Effect of mechanical stress on the reaction between Ca(OH)_2 and Brushite.

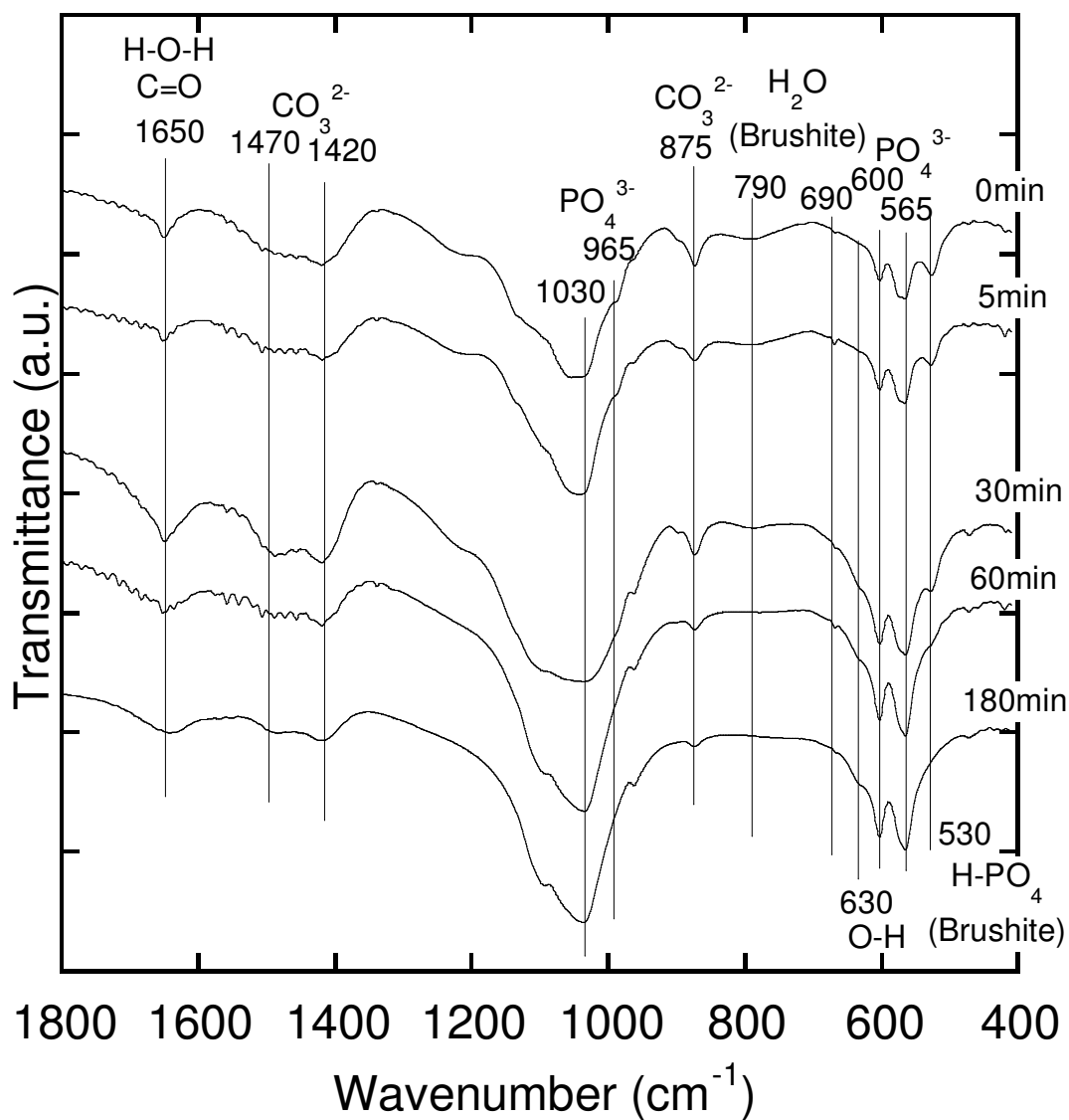


Fig.3.3.3.1. FT-IR spectra of SF0.

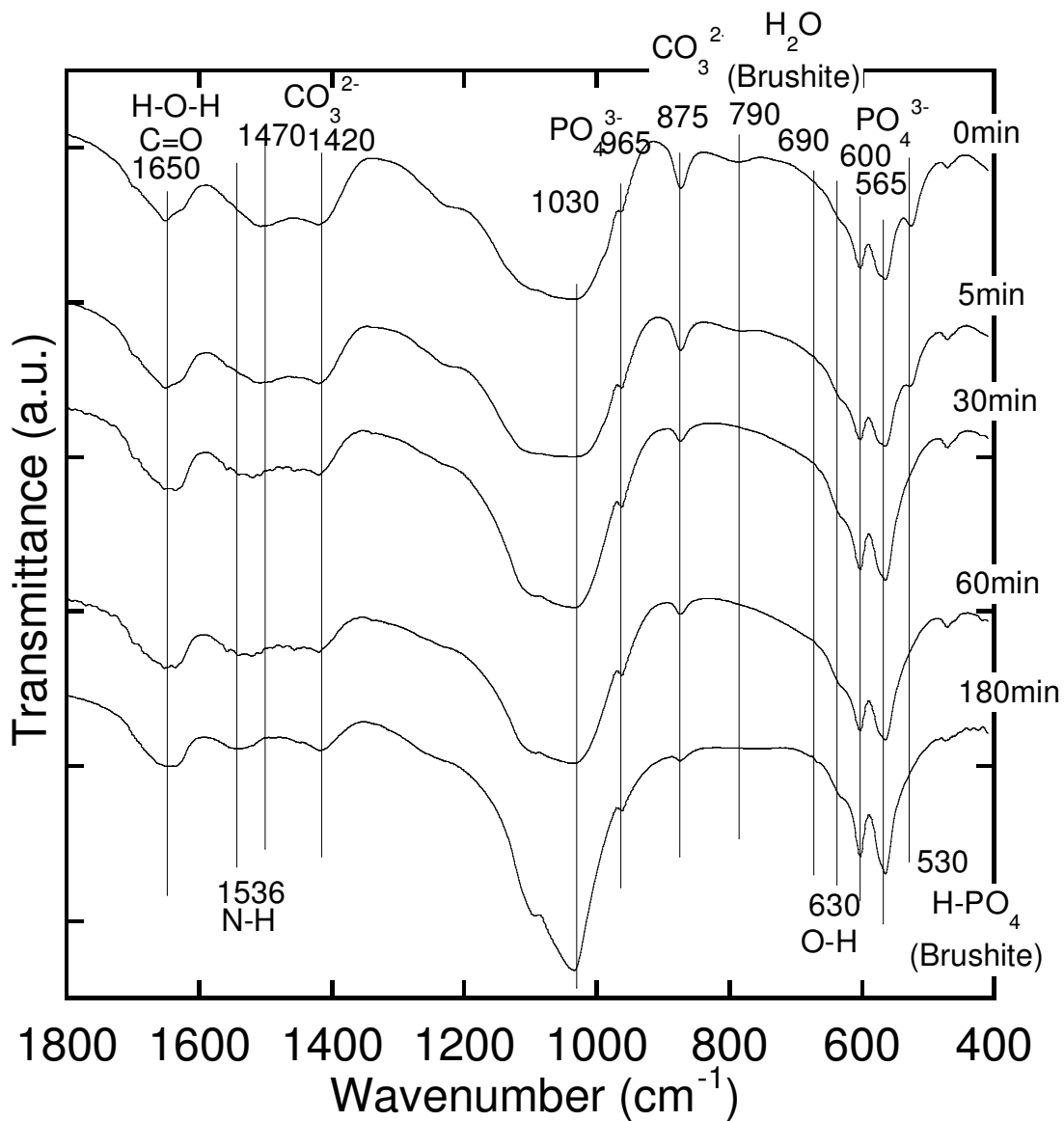


Fig.3.3.3.2. FT-IR spectra of SF10.

Table.3.3.4. Ca/P molar ratio of samples.

| Sample | Ca/P ratio |
|--------|-----------------|
| SF0 | 1.52 ± 0.13 |
| SF0.1 | 1.44 ± 0.10 |
| SF1 | 1.47 ± 0.07 |
| SF10 | 1.55 ± 0.07 |

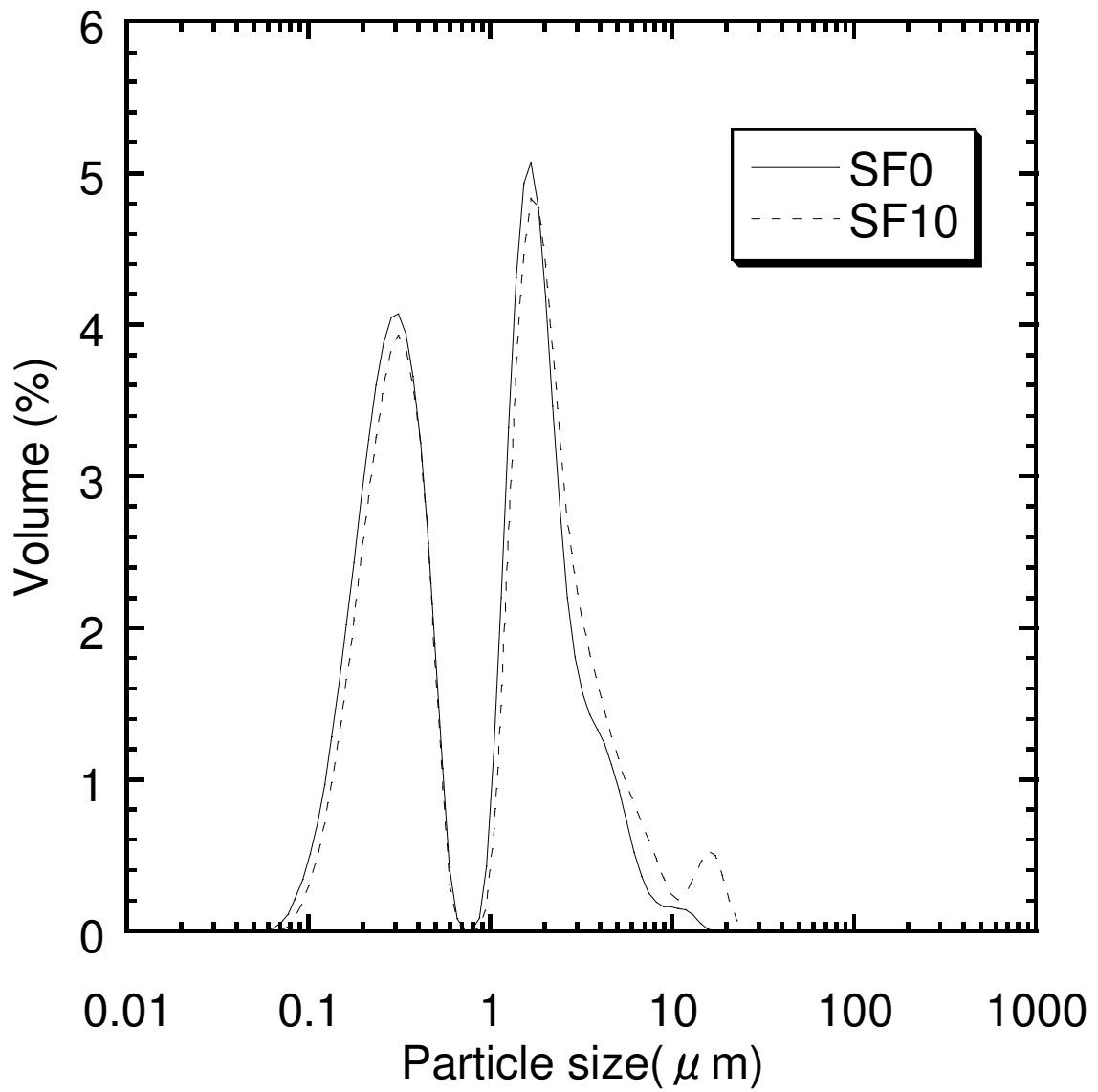


Fig.3.3.5. Particle size distribution of samples.

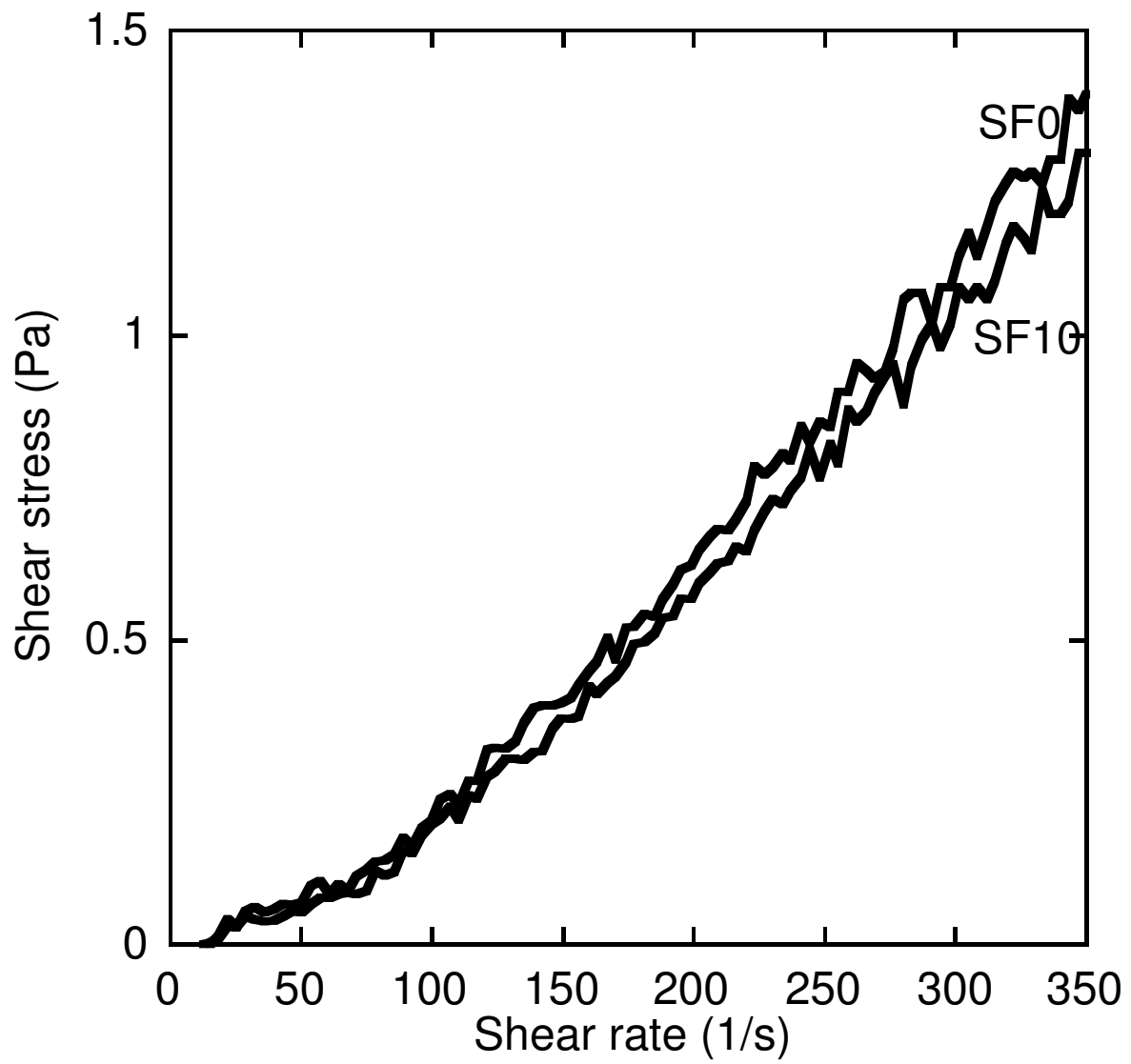
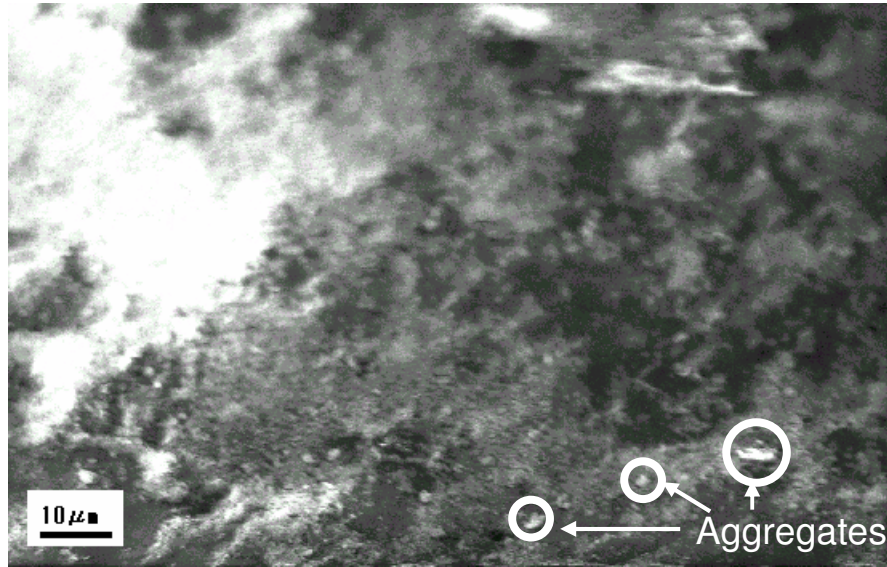
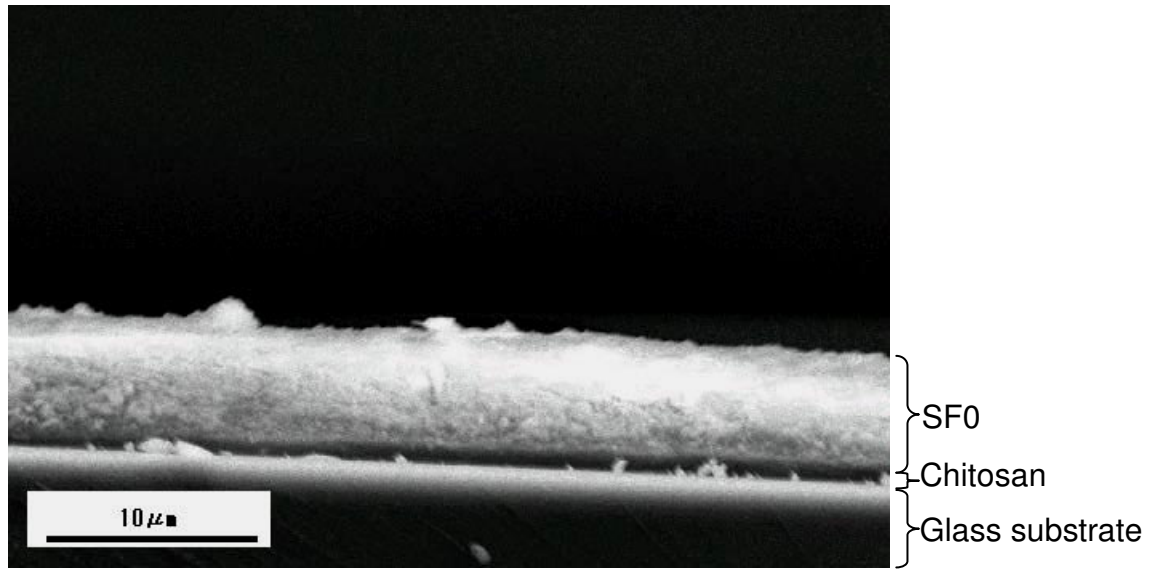


Fig.3.3.6.Flow curves of samples.

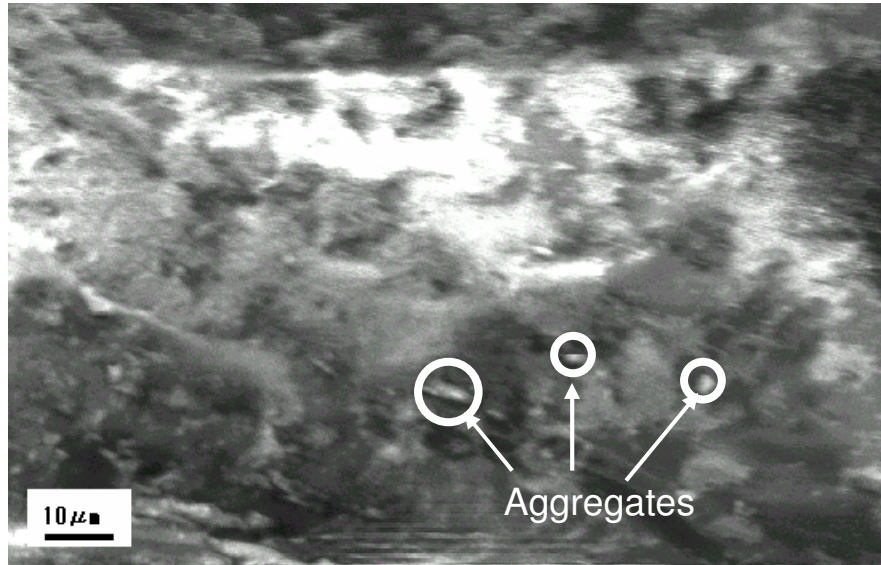


(a) Surface structure

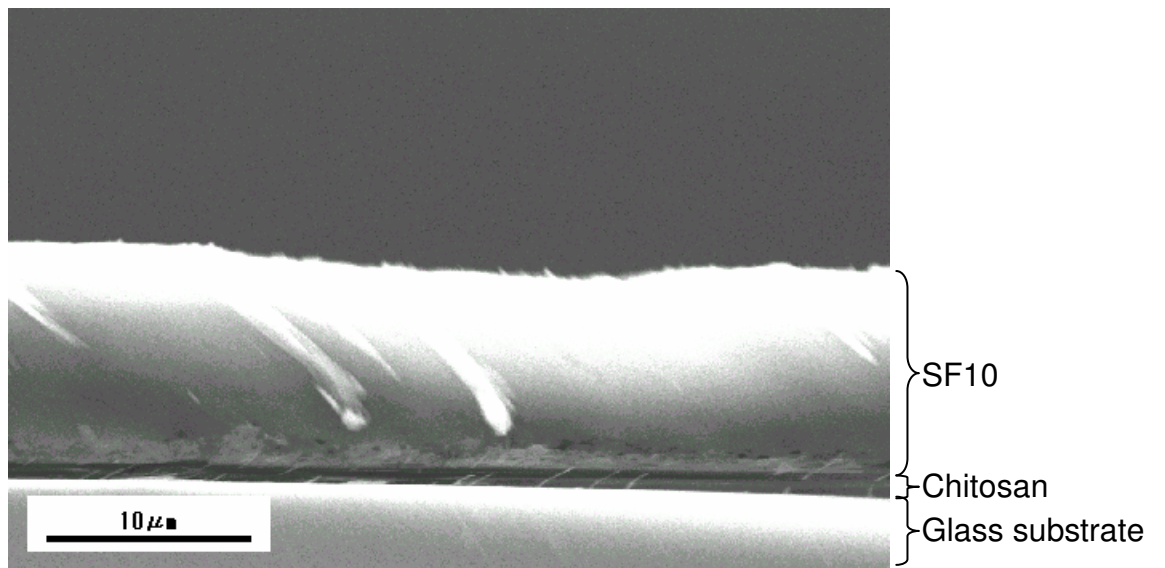


(b) Cross section

Fig.3.3.7.1. SF0 gel film on the chitosan precoated glass substrate.



(a) Surface structure



(b) Cross section

Fig.3.3.7.2. SF10 gel film on the chitosan precoated glass substrate.

第3章の引用文献

- [3-1] S. Nakamura, T. Isobe and M. Senna, "Properties of hydroxyapatite nano sol prepared via a wet mechanochemical route", *J. Nanoparticle. Res.*, **3**, 57-61 (2000).
- [3-2] K. Iwasa, T. Isobe and M. Senna, "Enhanced densification of indium-tin oxide ceramics for sputter target through wet mechanochemical processing", *Solid. State. Ionics.*, **101/103**, 71-78 (1997).
- [3-3] K. Hamada and M. Senna, "Mechanochemical effects on the properties of starting mixtures for PbTiO₃ ceramics by using a novel grinding equipment", *J. Mater. Sci.*, **31**, 1725-1728 (1996).
- [3-4] S. Suzuki, M. Ohgaki, M. Ichiyanagi and M. Ogawa, "Preparation of needle-like hydroxyapatite", *J. Mater. Sci. Lett.*, **17**, 381-383 (1998).
- [3-5] A. Jilavenkatesa and R.A. Condratesr, "Sol-gel processing of hydroxyapatite", *J. Mater. Sci.*, **33**, 4111-4119 (1998).
- [3-6] 浅岡伸之, 須田洋幸, 吉村昌弘, "水熱法によるヒドロキシアパタイトホイスターの合成", 日本化学会誌, **1995**, 25-29 (1995).
- [3-7] W. Suchanek, H. Suda, M. Yashima, M. Kakihana and M. Yoshimura, "Biocompatible whiskers with controlled morphology and stoichiometry", *J. Mater. Res.*, **10**[3], 521-529 (1995).
- [3-8] A. Bigi, S. Panzavolta and N. Roveri, "Hydroxyapatite-gelatin films: A structural and mechanical characterization", *Biomaterials*, **19**[7/9], 739-744 (1998).
- [3-9] M. Kikuchi, Y. Suetsugu, J. Tanaka and M. Akao, "Preparation and mechanical properties of calcium phosphate/copoly-L-lactide composites", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **8**[6], 361-364 (1997).
- [3-10] S.H. Rhee and J. Tanaka, "Hydroxyapatite Coating on a Collagen Membrane by a Biomimetic Method", *J. Am. Ceram. soc.*, **81**[11], 3029-3031 (1998).
- [3-11] 中村智, 磯部徹彦, 仙名保, "固液法メカノケミカル反応によるヒドロキシアパタイト・ナノ粒子の1ステップ合成", 第37回粉体に関する討論会講演論文集, 14-17 (1999).
- [3-12] 井奥洪二, 村上猛志, 伊熊泰郎, 吉村昌弘, "反応焼結法による水酸アパタイトとβ-リン酸三カルシウムの微構造制御多孔性複合体", 日本セラミックス

- 協会学術論文誌, **100**[8], 1015-1019 (1992).
- [3-13] 化学大辞典編集委員会, 化学大辞典 9, 共立出版, 803-804 (1997).
- [3-14] 仙名保, “ソフトメカノケミカル反応の機構と材料創製への新しいコンセプト”, 粉砕, **44**, 11-19 (2000).
- [3-15] C.C.Silva, D. Thomazini, A.G. Pinheiro, F. Lanciotti Jr., J.M. Sasaki, J.C. Goes and A.S.B. Sombra, “Optical properties of hydroxyapatite obtained by mechanical alloying”, *J. Phys. Chem. Solids*, **63**, 1745-1757 (2002).
- [3-16] 金山学, 磯部徹彦, 仙名保, “ヒドロキシアパタイトのメカノケミカル合成における絹フィブロインの同時複合化”, 第36回粉体に関する討論会講演論文集, 14-18 (1998).
- [3-17] Y. Suetsugu, I. Shimoya and J. Tanaka, “The detailed configuration of carbonate ions in apatite structure determined by polarized IR spectroscopy”, *Bioceramics*, **10**, 249-252 (1997).
- [3-18] E.E. Berry and C.B. Baddiel, “The infra-red spectrum of dicalcium phosphate dihydrate (brushite)”, *Spectrochim. Acta.*, **23**, 2089-2097 (1967).
- [3-19] 金東建, 伊藤孝, 小西孝, “絹フィブロインフィルムの熱処理とエタノール処理後の延伸による構造変化”, 繊維学会誌, **53**[9], 365-370 (1997).
- [3-20] G. Freddi, P. Monti, M. Nagura, Y. Gotoh and M. Tsukada, “Structure and Molecular Conformation of Tussah Silk Fibroin Films: Effect of Heat Treatment”, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **35**, 841-847 (1997).
- [3-21] G. Fredd, P. Monti, M. Nagura, Y. Gotoh and M. Tsukada, “Structure and molecular conformation of Tussah silk fibroin films: effect of heat treatment”, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **35**, 841-847 (1997).
- [3-22] M. Vallet-Regí, L.M. Rodríguez-Lorenzo and A.J. Salinas, “Synthesis and characterization of calcium deficient apatite”, *Solid. State. Ionics.*, **101/103**[2], 1279-1285 (1997).
- [3-23] I. Y. Pieters, E.A.P.D. Maeyer and R.M.H. Verbeeck, “Influence of Na⁺ on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of octacalcium phosphate”, *Inorg. Chem.*, **37**, 6392-6395 (1998).

第 4 章 生体高分子共存下での機械的応力によるヒドロキシアパタイトナノ粒子の結晶性の増加

4.1. 緒言

3 章では湿式メカノケミカル法により高分散性のヒドロキシアパタイト(HAp) - 絹フィブロイン(SF)ナノ複合ゾルが得られることがわかった。しかし、得られた複合ゾル中の HAp ナノ結晶の特性、フィブロインとの相互作用の詳細については明らかになっていない。また一方、生体移植材料としてアパタイトを用いる際、アパタイトの非晶質部分が移植材料としての溶解性を上げ、結果として生体内での安定性を下げることが知られている[4-1]。

本章においては、3 章において確認された空気中からの CO_3^{2-} の混入を制御するため、Ar 雰囲気下で実験を行った。生体高分子として絹フィブロイン、ヒアルロン酸ナトリウム(HYA)などを用い、これらの共存下において、前章に引き続き湿式メカノケミカル法により複合ゾルの調製を試みた。本章では合成中に系内の pH が偏るのを防ぐため、リン酸水溶液を分液ロートにより滴下して複合ゾルの調製を行った。ヒアルロン酸は人体の真皮層に多量に存在するムコ多糖類の一種で、軟骨中でタンパク質と複合体を形成して存在することが知られており、アパタイトやタンパク質と複合化させる試みも数多く報告されている[4-2, 4-3]。摩砕または生体高分子との相互作用の生成物に対する影響を、HAp ナノ結晶の特性、主に結晶化度、格子歪に注目して検討する。

4.2.実験方法

4.2.1.試料の調製

27.91g の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と 185cm^3 のイオン交換水とを混合した $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 懸濁液に、Ar 雰囲気下で、 15cm^3 の H_3PO_4 水溶液を HAp の Ca/P モル比の化学量論比 1.67 となるよう $1\text{cm}^3/\text{min}$ で滴下した。この調製の際、化学量論的な反応を仮定したときの HAp 量の 3.00wt% のヒアルロン酸ナトリウム(HYA)、10.00wt% の絹フィブロイン粉末(SF)、または 3.00wt% の HYA と 10.00wt% の SF の両方とを添加した。これらの試料名はそれぞれ HAp-HYA、HAp-SF、HAp-SF-HYA とした。攪拌モーターを用いて 200rpm の攪拌処理 1 時間後、MICROS により回転数 1250rpm で湿式混合摩砕処理を行った。処理時間は 3 時間とし、摩砕前の試料についても 5cm^3 採取した。試料は室温で 24 時間真空乾燥し粉末化した。比較のため SF を添加していない系においても同様の処理を行った(試料名:HAp)。

Fig.4.2.1 に試料合成の手順を示す。

4.2.2.豚の海綿骨

本章では生体骨のリファレンスとして豚の海綿骨を使用した。豚の肋骨の破片をアセトン中 56°C で 3 時間還流加熱して付着している軟組織を取り除いた後、室温で 24 時間真空乾燥した。

4.3.結果と考察

4.3.1.透過型電子顕微鏡(FE-TEM)による観察

Fig.4.3.1 に摩砕後の HAp-SF-HYA の透過型電子顕微鏡による観察結果を示す。Fig.4.3.1(a)の凝集粒子の観察においては 300~1200nm 前後の球状の粒子が生成している。この凝集粒子さらに拡大すると、Fig.4.3.1(b)に示すように約 $25 \times 10 \text{nm}$ の一次粒子で構成されている。

Fig.4.3.1(c)に示すように結晶格子の観察結果においては 0.817nm 間隔の HAp における(100)面格子が出現している。さらにその $1/3$ 格子が 0.272nm 間隔の結晶格子(300)として出現しており、生成物ナノ粒子は HAp 結晶であり、さらにそのまわりには非晶質の部分も共存している。

4.3.2.粒度分布(LPA)測定結果

Fig.4.3.2 に HAp-SF-HYA の粒度分布測定結果を示す。摩砕前の $50 \mu\text{m}$ 付近のピークは摩砕により $2 \mu\text{m}$ 付近(HAp 大粒子群)と $0.3 \mu\text{m}$ 付近(HAp 小粒子群)にピークを持つ Bimodal な分布となった。6 時間までの摩砕では徐々に HAp 小粒子群のピーク強度が増加し、HAp 大粒子群のピークが小粒子側にシフトしていくことから大きな粒子が摩砕により削られているということが推測できる。

4.3.3.粉末 X 線回折(XRD)測定結果

HAp、HAp-SF-HYA についての XRD 測定結果を Fig.4.3.3.1 に示す。摩砕前後、生体高分子の共存によっての大きな変化は見られない。3 章で摩砕初期時に見られた Brushite の共存は、リン酸水溶液を $2 \text{cm}^3/\text{min}$ 以上の速度での滴下までは確認されたが、 $1 \text{cm}^3/\text{min}$ で滴下することで合成中系を pH8~13 のアルカリ性に保持することができたため、酸性条件下で生成しやすい Brushite 及びその無水物である Monetite は生成しなかった[4-4]。HAp ピークのブロードニングについてはナノサイズの HAp 結晶子が生成することが原因であり、詳細は後述する。

HAp-SF-HYA についての Rietveld 解析結果を Fig.4.3.3.2 に示す。Goodness of fit indicator の S 値は各試料で 1.3~1.5 の間に収まり、測定結果と計算結果がよく一致している。格子定数は $a=0.9423 \pm 0.0002 \text{nm}$ 、 $c=0.6884 \pm 0.0002 \text{nm}$ となり、生体高分子、摩砕の影響による有意な差は見られなかった。

4.3.3.1.結晶化度

Table.4.3.3.1 に結晶化度の定量結果を示す。生体高分子の非共存下では摩砕により HAp の結晶化度は 1~24%減少し、非晶質化している。しかし、生体高分子の共存下では逆に摩砕により HAp の結晶化度は 2~18%増加し、結晶化している。また、結晶化度の異方性($I_{(002)}/I_{(300)}$)は摩砕により 5~10%減少している。生体高分子の共存による試料の結晶化度への影響を調べるため、酸素雰囲気下、600°Cで焼成し、生体高分子を完全に除去した試料についても結晶化度を調べたが、同様に、生体高分子非共存下で合成した試料は摩砕により結晶化度が減少し、生体高分子共存下で合成した試料は摩砕により結晶化度が増加するという傾向が見られた。

4.3.3.2.結晶子サイズと格子歪の変化

Table.4.3.3.2 に結晶子サイズと格子歪の計算結果を示す。生体高分子の共存に関わらず、a 軸、c 軸方向の HAp の結晶子サイズ(L_a 、 L_c)とそのアスペクト比(L_c/L_a)は摩砕により減少し、豚海綿骨中の HAp の結晶子サイズに近づいている。摩砕後の HAp-SF-HYA の結晶子サイズ 22.0×10.6nm は Fig.4.3.1(b)の TEM 観察で見られた一次粒子サイズとほぼ一致している。

乾式摩砕処理を施した結果も同様に、HAp の結晶子サイズとアスペクト比は $L_a=12.0\text{nm}$ 、 $L_c=29.1\text{nm}$ 、 $L_c/L_a=2.42$ から $L_a=8.9\text{nm}$ 、 $L_c=17.3\text{nm}$ 、 $L_c/L_a=1.94$ に減少した。このように機械的応力によって HAp の結晶子サイズは減少するということがわかるが、溶解析出による結晶子サイズの変化の影響もあるので単に機械的応力のみによって結晶子サイズが変化するとは言いきれない。一ヶ月の熟成の結果では 42%以下の結晶子サイズの増加が見られた。

生体高分子の非共存下において HAp の格子歪は摩砕により $e_a=0.35\%$ 、 $e_c=0.50\%$ から $e_a=0.43\%$ 、 $e_c=0.61\%$ に増加した。一方、生体高分子共存下で摩砕すると、格子歪は $e_a=0.35\sim 0.43\%$ 、 $e_c=0.43\sim 0.71\%$ から $e_a=0.25\sim 0.43\%$ 、 $e_c=0.35\sim 0.56\%$ に減少した。このように摩砕により HAp の結晶化度が増加し、格子歪が減少するという現象は、生体高分子が共存する場合のみ確認できるので HAp と生体高分子との相互作用に起因するということがわかる。

4.3.4.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定結果

HAp と SF の相互作用に及ぼす摩砕の影響を調べるため FT-IR スペクトルを用いた。Fig.4.3.4 に 400~1800 cm^{-1} における HAp-SF の FT-IR スペクトル測定結果を示す。875 cm^{-1} 付近及び 1420 cm^{-1} 付近のピークは、B サイト置換(PO_4^{3-})の CO_3Ap の生成を示唆するものであり、Ar 雰囲気下での合成においても空気中からの CO_2 の混入を制御しきれずアパタイト結晶内に取り込まれたことがわかる。

HAp-SF においては、1639 cm^{-1} 付近に SF の C=O 伸縮(amide I)によるピーク、1510 cm^{-1} 付近の N-H 変角(amide II)によるピーク[4-5, 4-6]が見られ、摩砕により 1653 cm^{-1} 付近、1546 cm^{-1} 付近にそれぞれブルーシフトした。このブルーシフトは SF の二次構造が β -シートから α -ヘリックスやランダムコイル構造に変化したためである[4-7]。SF 単独で摩砕した場合、このような変化は見られず、SF の構造変化は HAp の共存下においてのみ引き起こされる。一ヶ月の熟成後には C=O 伸縮(amide I)の大きなレッドシフトが観測され、SF の構造変化後に、HAp の溶解析出により HAp の Ca^{2+} と SF の C=O との間の相互作用が活性化されたことがわかる[4-8, 4-9]。

また、固体濃度が低濃度系では理論生成量の HAp に対して 50wt%以上のヒアルロン酸を添加すると COO $^-$ に起因するピークが確認でき[4-10]、ピークシフトによる HAp との相互作用が確認できたが MICROS によると高濃度系での合成しかできないため、HYA の分量を増加すると粘度の問題により、攪拌、摩砕等の操作を行うことができなかった。

硬質の基板で、HAp の格子定数と基板の置換基の周期性との間に幾何学的一致があるならば、機械的応力により HAp の結晶化度が増加し、格子歪が減少する理由は直接説明することができる。しかし本研究においては溶液中に生体高分子が分散している系なので明らかにそれとは異なる。よって、摩砕による結晶性の増加は溶解析出と HAp の Ca^{2+} と SF の C=O や HYA の COO $^-$ との有機無機相互作用の結果によるものとして解釈することができる。乾式摩砕により HAp を摩砕した結果では、生体高分子の共存下においても結晶化度は 10~30%減少し、格子歪は 8~24%増加した。水溶液分散系ではメカニカルストレスにより溶解析出が活性化されるので[4-11]、溶解した HAp の有機官能基上への再析出が活性化される事が推測できる。この有機官能基上への HAp の再析出により平均的に結晶化度は増加し、格子歪は減少すると考えられる。また、摩砕による機械的応力を介した溶解析出では結晶子

サイズの微細化と共に結晶子の等方化が見られるが、摩砕を介さない溶解析出のみでは結晶子サイズが増加し、サイズの異方性には大きく影響を与えないということがわかった。結晶子サイズの減少と有機無機相互作用による HAp の結晶性の増加についての詳細は次章で言及する。

4.4.総括

生体高分子の共存下において室温での湿式混合摩砕処理によって HAp の結晶化度は増加し、格子歪は減少した。湿式メカノケミカル法により合成した HAp の結晶子サイズとアスペクト比は豚海綿骨の HAp の値に近づいた。摩砕による HAp の結晶化度の増加と格子歪の減少は、溶解析出と HAp の Ca^{2+} と SF の $\text{C}=\text{O}$ との間の相互作用に起因するということの説明できる。

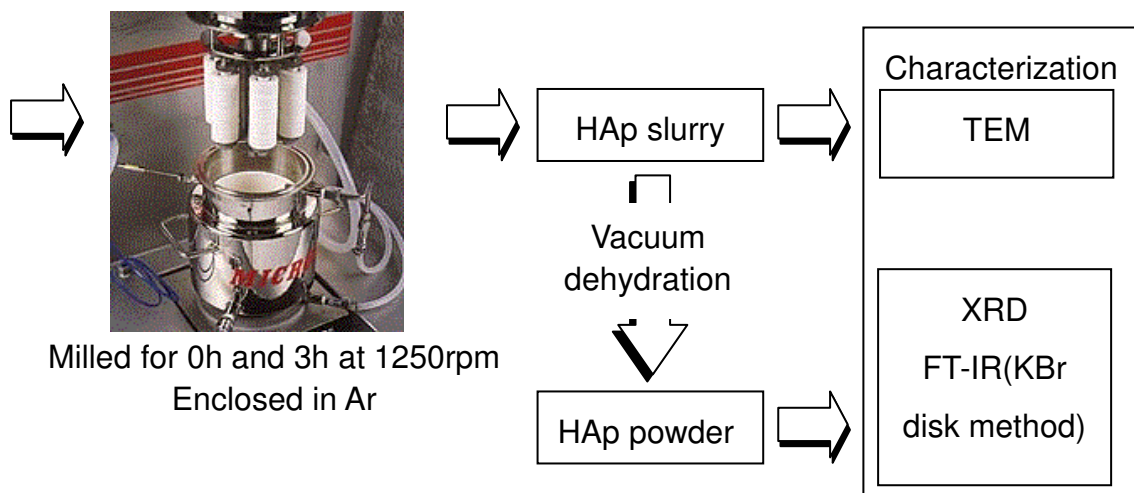
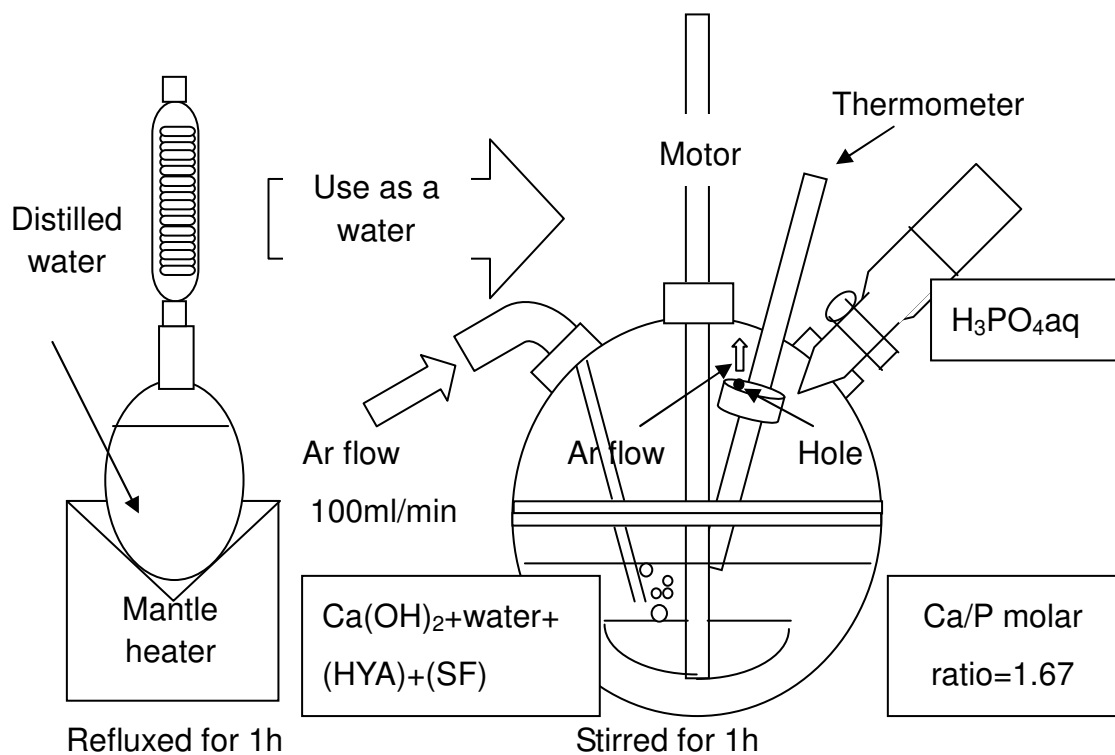
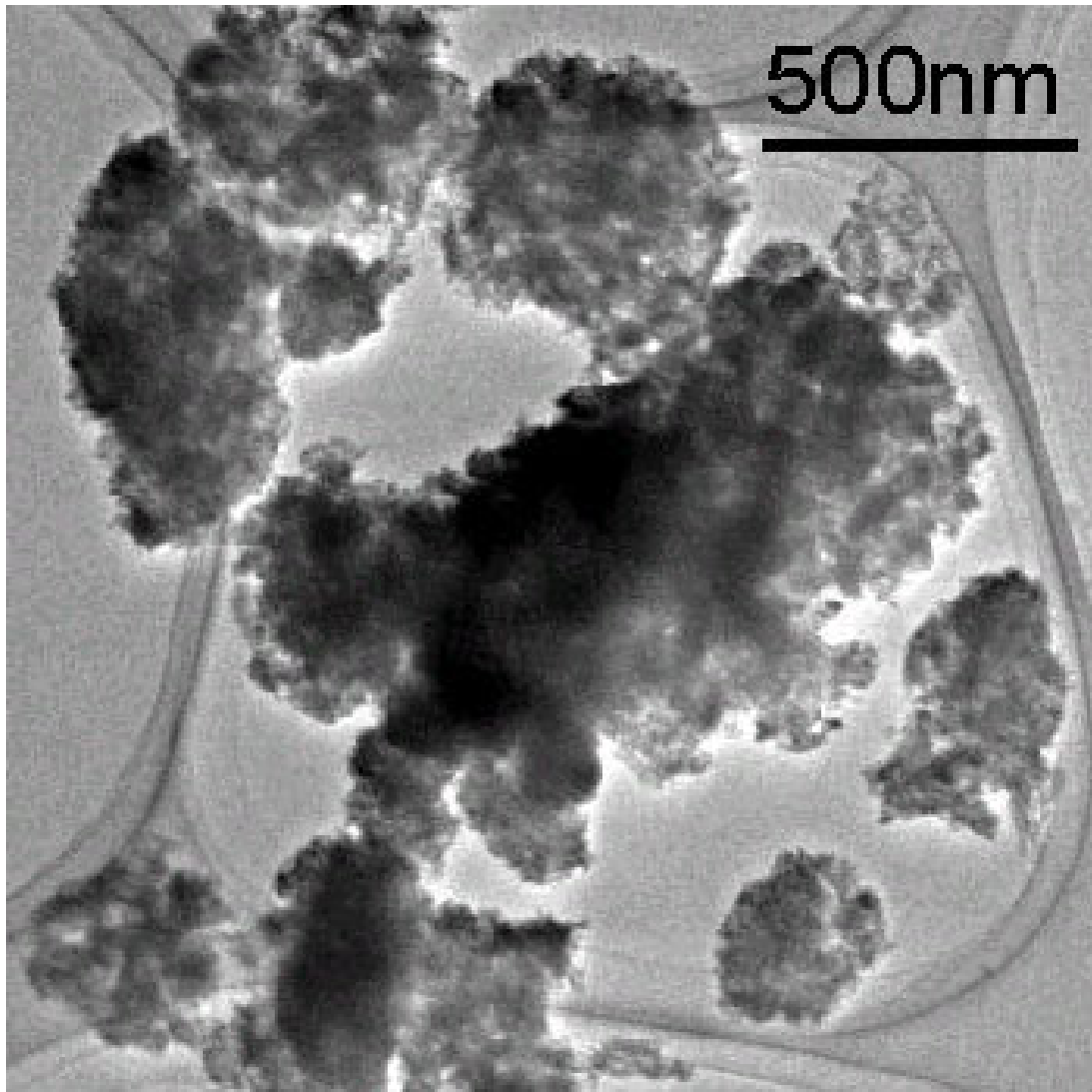
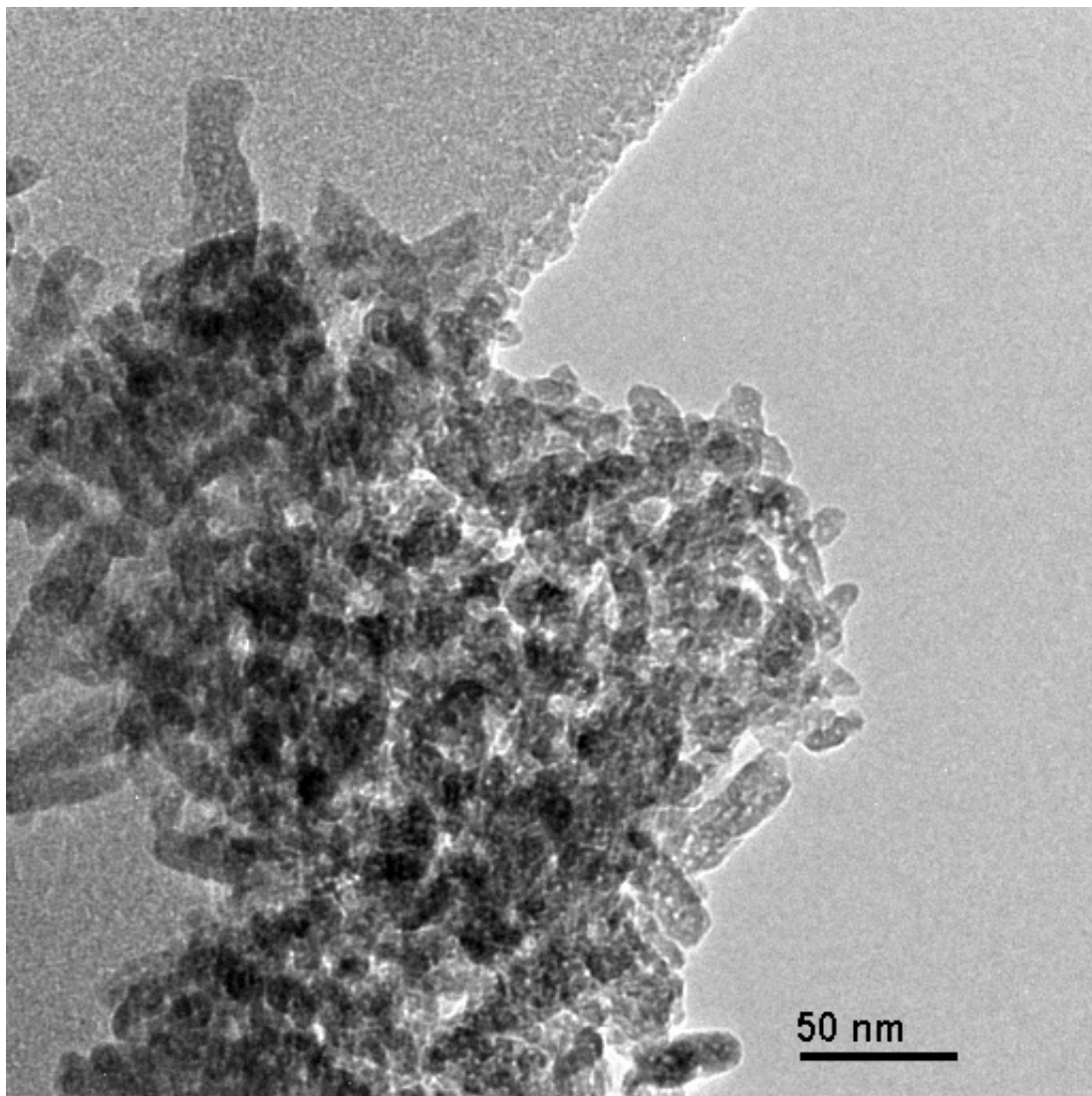


Fig.4.2.1. Synthesis scheme of samples.



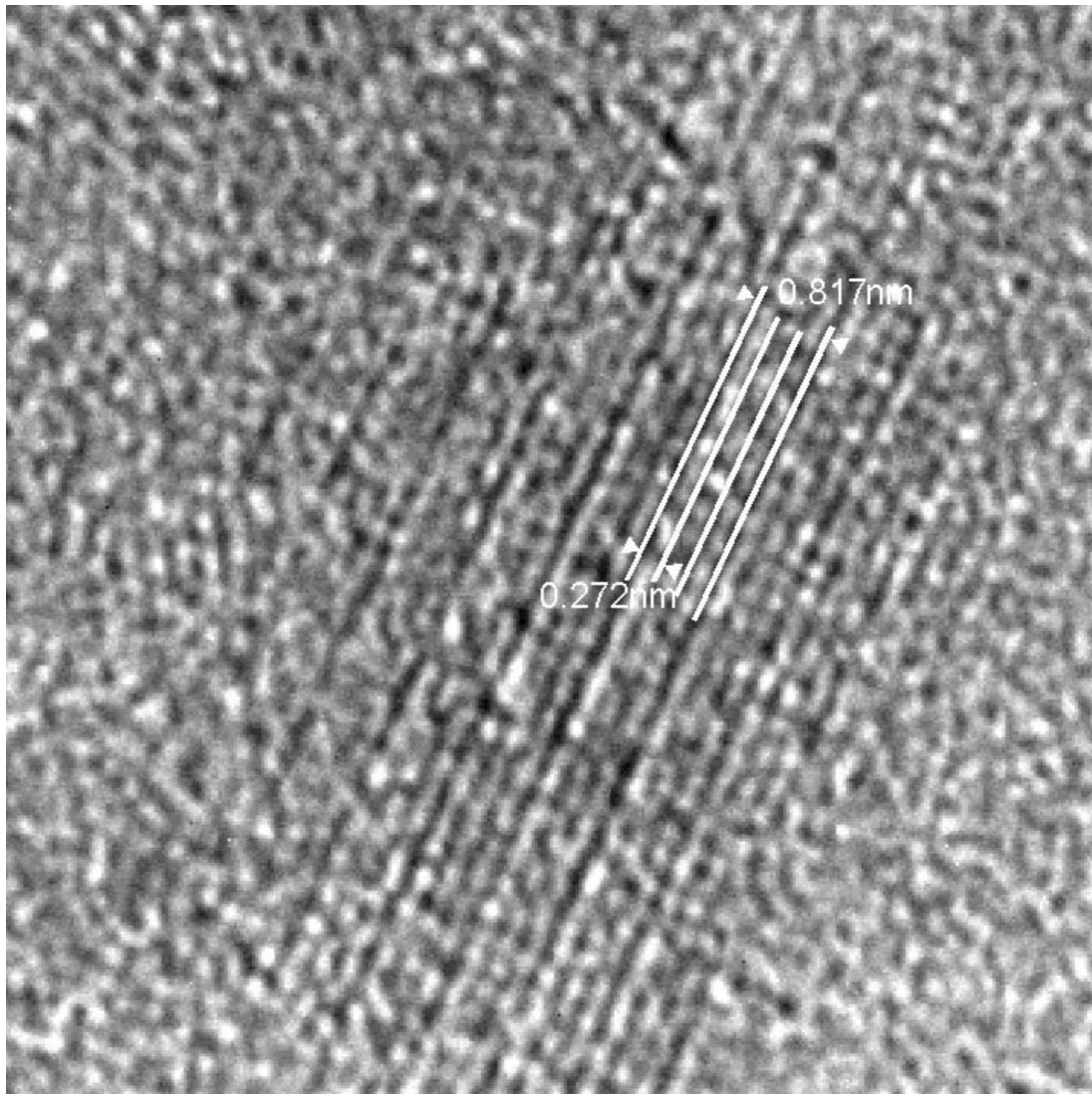
(a) Aggregates at lower magnification

Fig.4.3.1. Transmission electron micrograph of HAp-SF-HYA after milling for 3h.



(b) Aggregates at higher magnification

Fig.4.3.1. Transmission electron micrograph of HAp-SF-HYA after milling for 3h.



(c) Lattice image

Fig.4.3.1. Transmission electron micrograph of HAp-SF-HYA after milling for 3h.

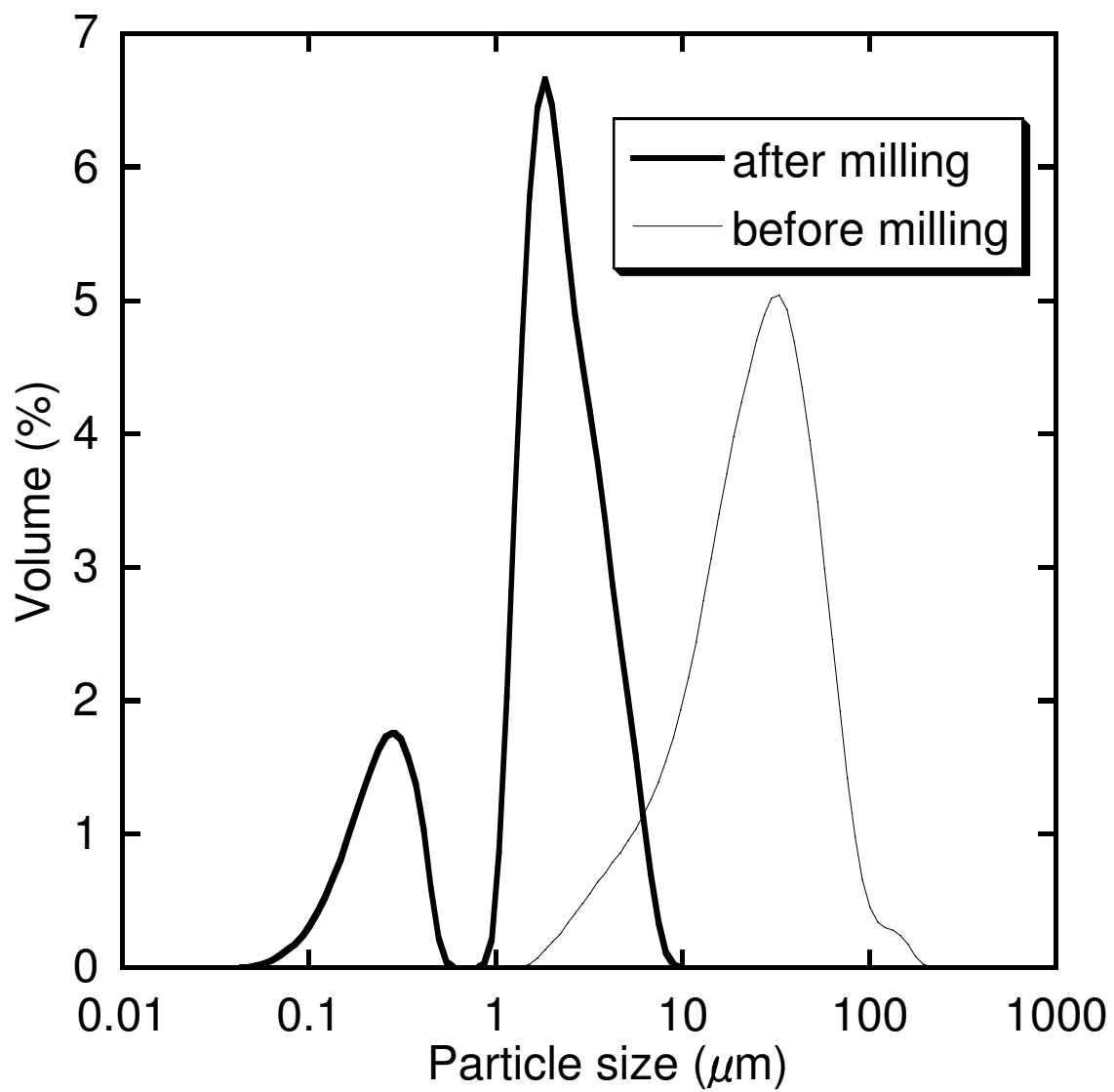


Fig.4.3.2. Particle size distribution of HAp-SF-HYA

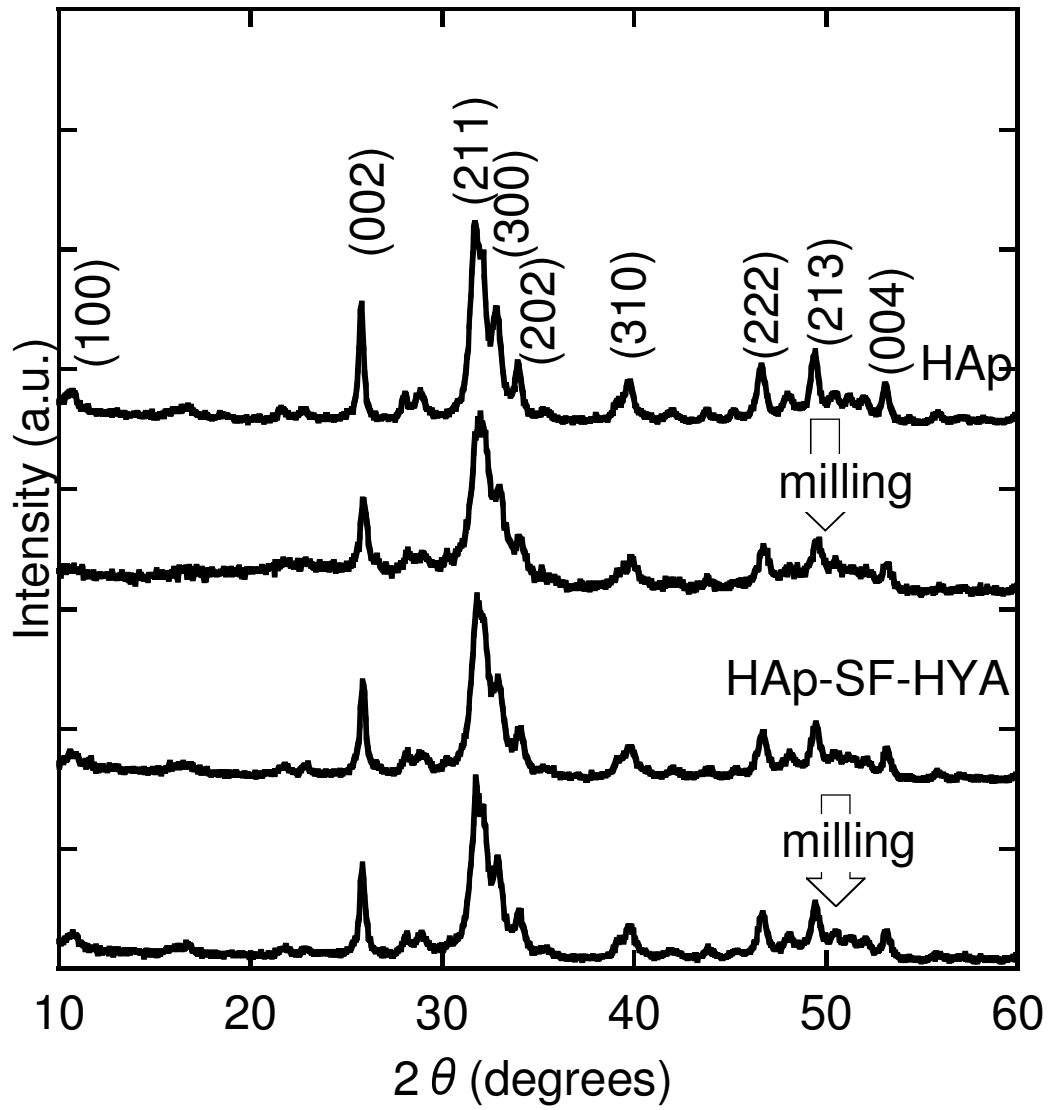


Fig.4.3.3.1. XRD profiles of the samples

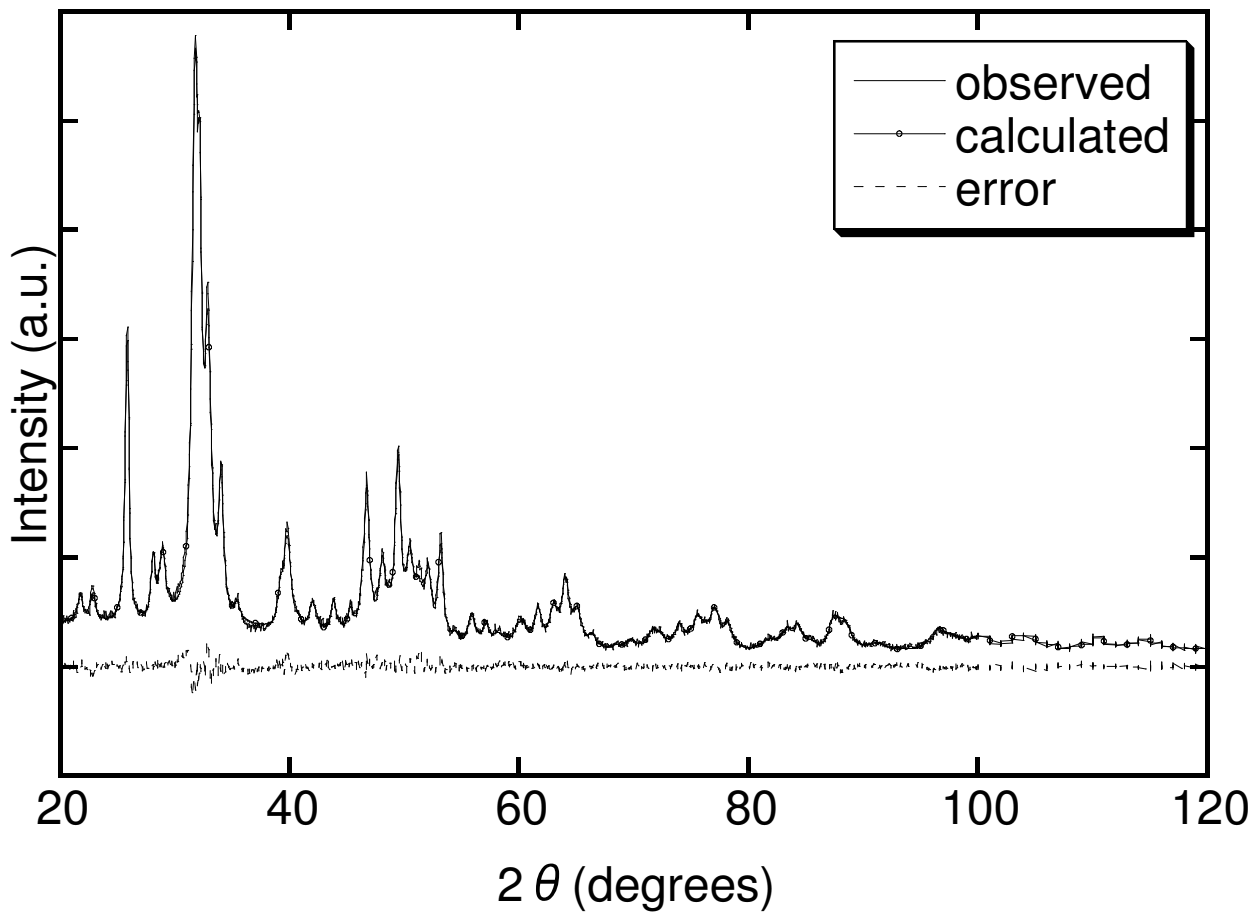


Fig.4.3.3.2. Rietveld refinement plots of HAp-SF-HYA after milling for 3h

Table.4.3.3.1. Relative crystallinity (%) of the samples

| sample | milling | $I_{(002)}$ | $I_{(300)}$ | $I_{(202)}$ | $I_{(002)}/I_{(300)}$ |
|------------|---------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
| cHAp | - | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 1.00 |
| HAp | before | 81.5 | 55.7 | 67.1 | 1.46 |
| | after | 58.0 | 43.0 | 66.0 | 1.34 |
| HAp-HYA | before | 61.5 | 39.8 | 49.1 | 1.55 |
| | after | 73.0 | 50.8 | 51.2 | 1.44 |
| HAp-SF | before | 74.8 | 48.4 | 43.0 | 1.55 |
| | after | 77.3 | 55.3 | 49.6 | 1.40 |
| HAp-SF-HYA | before | 60.1 | 46.5 | 46.9 | 1.29 |
| | after | 64.0 | 52.3 | 63.8 | 1.22 |

$I_{(hkl)}$: Relative integral intensity of (hkl)

Table.4.3.3.2. Crystallite size and microstrain of the samples

| sample | | L_c^* (nm) | e_c^{**} (%) | L_a^* (nm) | e_a^{**} (%) | L_c/L_a |
|-----------------------|------------------------|--------------|----------------|--------------|----------------|-----------|
| HAp | Before milling | 29.1 | 0.35 | 12.0 | 0.50 | 2.42 |
| | After milling | 17.3 | 0.43 | 8.9 | 0.61 | 1.94 |
| | After aging for 1month | 20.0 | 0.35 | 10.3 | 0.43 | 1.95 |
| HAp-HYA | Before milling | 36.7 | 0.35 | 14.5 | 0.43 | 2.52 |
| | After milling | 25.3 | 0.25 | 12.8 | 0.35 | 1.97 |
| | After aging for 1month | 24.8 | 0.25 | 12.8 | 0.35 | 1.94 |
| HAp-SF | Before milling | 32.1 | 0.35 | 12.5 | 0.61 | 2.56 |
| | After milling | 20.0 | 0.35 | 10.8 | 0.50 | 1.86 |
| | After aging for 1month | 23.3 | 0.25 | 12.6 | 0.43 | 1.84 |
| HAp-SF-HYA | Before milling | 26.1 | 0.43 | 10.3 | 0.71 | 2.54 |
| | After milling | 22.0 | 0.43 | 10.6 | 0.56 | 2.09 |
| | After aging for 1month | 22.0 | 0.25 | 11.9 | 0.35 | 1.84 |
| Swine trabecular bone | - | 14.8 | 0.35 | 6.9 | 1.03 | 2.15 |

* L_c or L_a represents the crystallite size along c -axis or a -axis

** e_c or e_a represents the lattice microstrain along c -axis or a -axis

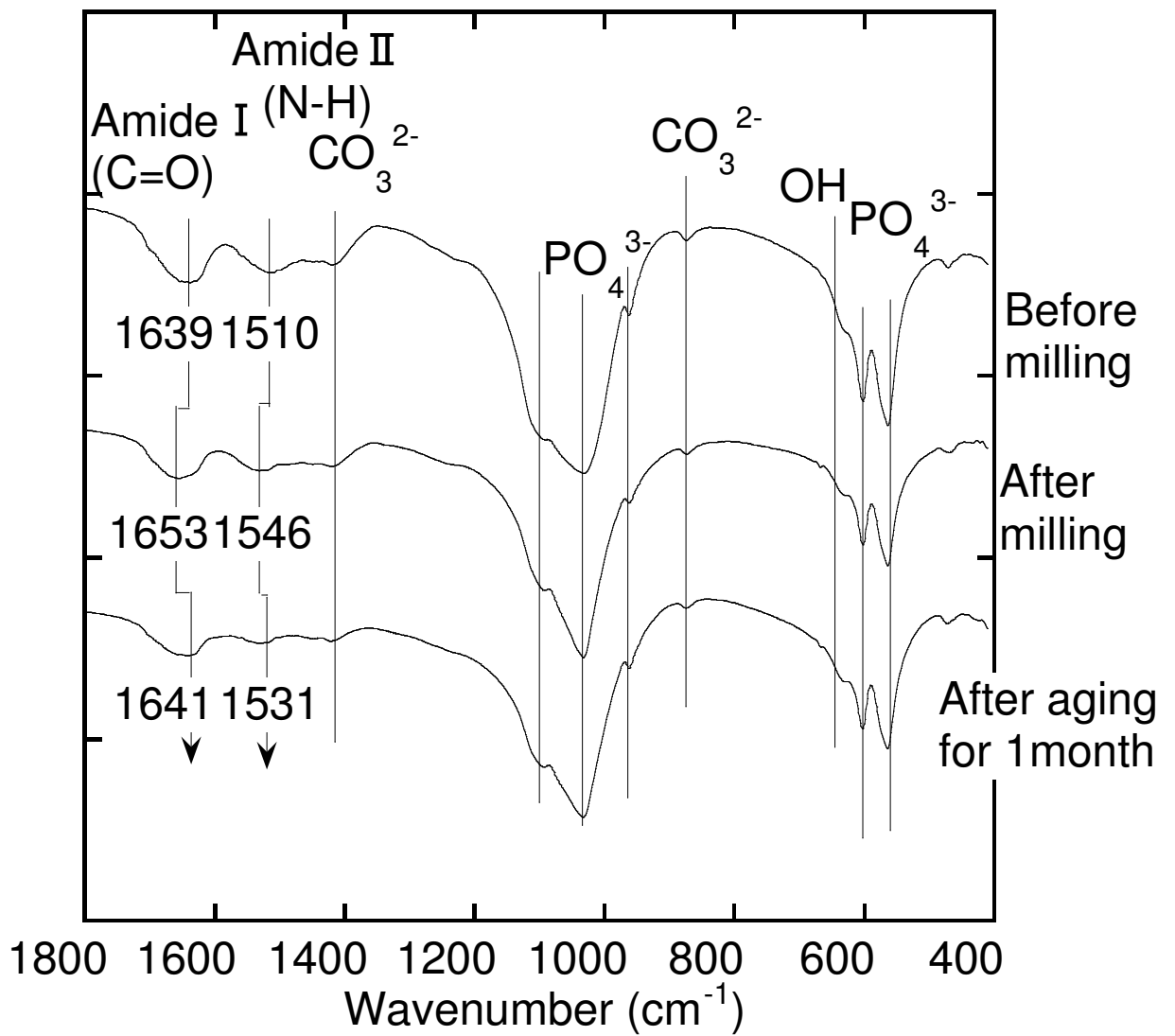


Fig.4.3.4. FT-IR spectra of HAp-SF

第4章の引用文献

- [4-1] K.A. Gross, V. Gross and C.C. Berndt, “Thermal analysis of amorphous phases in hydroxyapatite coatings”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **32**, 5533-5543 (1997).
- [4-2] D. Bakos, M. Soldan and H.I. Fuentes, “Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite”, *Biomaterials*, **20**, 191-195 (1999).
- [4-3] A. Denuziere, D. Ferrier, O. Damour and A. Domard, “Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties”, *Biomaterials*, **19**, 1275-1285 (1998).
- [4-4] 化学大辞典編集委員会, 化学大辞典 9, 共立出版, 803-804 (1997).
- [4-5] 金東建, 伊藤孝, 小西孝, “絹フィブロインフィルム of 熱処理とエタノール処理後の延伸による構造変化”, *繊維学会誌*, **53**[9], 365-370 (1997).
- [4-6] G. Freddi, P. Monti, M. Nagura, Y. Gotoh and M. Tsukada, “Structure and Molecular Conformation of Tussah Silk Fibroin Films: Effect of Heat Treatment”, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **35**, 841-847 (1997).
- [4-7] G. Freddi, P. Monti, M. Nagura, Y. Gotoh and M. Tsukada, “Structure and molecular conformation of Tussah silk fibroin films: effect of heat treatment”, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **35**, 841-847 (1997).
- [4-8] M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya and J. Tanaka, “Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo”, *Biomaterials*, **22**, 1705-1711 (2001).
- [4-9] S.H. Rhee and J. Tanaka, “Hydroxyapatite coating on a collagen membrane with a biomimetic method”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81**[11], 3029-3031 (1998).
- [4-10] S.H. Rhee, D.T.H. Wassel and G. Embery, “Interaction of glucuronic acid and their iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite”, *Biomaterials*, **23**, 481-489 (2002).
- [4-11] K. Iwasa, T. Isobe and M. Senna, “Enhanced densification of ITO ceramics for sputter target through wet mechanochemical processing”, *Solid State Ionics*, **101-103**, 387-392 (1997).

第 5 章 溶解前処理を施した絹フィブロイン微粒子共存下でのヒドロキシアパタイトナノ結晶の核生成と異方成長

5.1. 緒言

3、4 章では HAp と生体高分子のナノ - ナノ複合体を調製するために湿式メカノケミカル法を用いた。しかし、この方法では、生成した HAp と生体高分子の間にせん断応力をかけることになり、HAp 核形成の際の生体高分子上への配向は制御できていない。

SF に前処理を施すことにより PO_4^{3-} を導入した報告例[5-1]、アルカリ処理などにより SF に表面改質を施した報告例もあり[5-2]、前処理によりゾルの均一性、分散性を高め、有機 - 無機材料間の接触面積を増加することができることがわかっている。また、SF は水には溶解しないが高温、高濃度の LiBr、 CaCl_2 水溶液などに溶解することがよく知られている[5-3, 5-4]。よって、SF に溶解前処理を施すことにより有機 - 無機材料間の接触面積を増加することができると考えられる。しかし、ここで溶解前処理に用いる残存イオンによる HAp の結晶構造への影響を無視することはできない。有機物の共存状態によって、HAp の配向度も異なるという報告例もある[5-5]。

よって本章では SF に溶解前処理を施すことにより、生体骨を模倣した HAp が c 軸方向に配向した有機 - 無機のナノ - ナノ複合体を調製することを目的とした。SF の溶解処理には CaCl_2 と MgCl_2 の二種の無機塩を用い、異なるカチオンを前処理に用いることによる複合体への影響も調べた。HAp ナノ結晶の配向とその結晶特性の変化に重点をおいて検討した。

5.2.実験方法

5.2.1.SF の溶解前処理

SF 粉末 10.00g を 0.5% Na_2CO_3 水溶液 500 cm^3 中で 30 分の煮沸処理を二回行った後、直ちに遠心分離、洗浄し、SF 純試料(RSF)とした。RSF3.70g を沸騰した 30 倍量の 50% CaCl_2 水溶液または MgCl_2 水溶液に溶解し、常温になるまで放置後、4 日間の透析を施した。透析液を SF の濃度が HAp 理論生成量の 10wt%となるように調整し、SF 水溶液とした。溶液名は CaCl_2 で溶解した場合、 MgCl_2 で溶解した場合をそれぞれ CaDSF、MgDSF とした。

5.2.2.試料の調製

1.86 g の $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と 100 cm^3 の CaDSF、または MgDSF を混合した溶液に、Ar 雰囲気下で、100 cm^3 の H_3PO_4 水溶液を HAp の Ca/P モル比の化学量論比 1.67 となるよう 1 cm^3/min で滴下した。これらの試料名はそれぞれ HAp-CaDSF、HAp-MgDSF とした。攪拌モーターを用いて 200rpm の攪拌処理を 1 時間施した。試料は室温で 24 時間真空乾燥し粉末化した。比較のため RSF 水溶液中での調製も行った(HAp-RSF)。Fig.5.2.2 に試料合成の手順を示す。

5.3.結果と考察

5.3.1.透過型電子顕微鏡(FE-TEM)による観察

Fig.5.3.1.1 に HAp-RSF の透過型電子顕微鏡による観察結果を示す。0.1~1.0 μ m 程度の凝集粒子は、25 \times 10nm 程度の一次粒子で形成されている。SAD 像からは、典型的な HAp 多結晶のリングパターンである。

Fig.5.3.1.2 に HAp-CaDSF 複合体の TEM 写真を示す。25 \times 10nm 程度の一次粒子は 150 \times 20nm 程度の針状の凝集体を形成しており SAD 像によれば、(002)面と(004)面が 10 $^\circ$ の弧を描いており、HAp ナノ結晶が凝集粒子の長軸方向に c 軸をそろえて配向している。

また、Fig.5.3.1.3 に HAp-MgDSF 複合体の TEM 写真を示す。SF の溶解処理に MgCl₂ を用いたのにも関わらず、HAp-CaDSF 複合体の場合と非常に類似した凝集体、一次粒子を観察できた。SAD 像によると、(002)面と(004)面が 20 $^\circ$ の弧を描いており、HAp-CaDSF 複合体の場合よりランダムに HAp ナノ結晶が配向していることがわかった。このように異なる無機塩を SF の前処理に使用することにより配向度が変わってくることは、後述する HAp の核形成サイトの量の変化と HAp の結晶構造中に無機イオンが置換することに起因すると考えられる。

5.3.2.粉末 X 線回折(XRD)測定結果

5.3.2.1.結晶子サイズと格子歪の変化

Table.5.3.2.1 に結晶子サイズと格子歪の計算結果を示す。a 軸、c 軸方向の HAp の結晶子サイズ(L_a 、 L_c)とそのアスペクト比(L_c/L_a)は SF の溶解前処理により減少し、27~36%等方化した。得られた結晶子サイズは Fig.5.3.1.1~Fig.5.3.1.3 の TEM 観察で見られた一次粒子サイズとほぼ一致している。a 軸、c 軸方向の HAp の格子歪(e_a 、 e_c)はそれぞれ SF の溶解前処理により $e_a=0.50\%$ 、 $e_c=1.15\%$ から $e_a=0.18\sim 0.35\%$ 、 $e_c=0.61\sim 0.94\%$ に減少した。HAp-MgDSF の格子歪は HAp-CaDSF の格子歪に比較して大きいことがわかった。

5.3.2.2.結晶化度

Table.5.3.2.2 に結晶化度の定量結果を示す。HAp-CaDSF の結晶化度は HAp-RSF より 19~93%高く、HAp-MgDSF は 16~73%高い。HAp-MgDSF と HAp-CaDSF とを

比較した場合、HAp-MgDSFの方が格子歪が大きく、結晶化度が低くなったことは Ca^{2+} (0.99Å)に比べイオン半径の小さい Mg^{2+} (0.69Å)がアパタイト構造中に組み込まれることによると考えられる。HAp-MgDSFの格子定数($a=0.9422\pm 0.0004\text{nm}$ 、 $c=0.6877\pm 0.0002\text{nm}$)はHAp-RSFの格子定数($a=0.9426\pm 0.0004\text{nm}$ 、 $c=0.6888\pm 0.0002\text{nm}$)、HAp-CaDSFの格子定数($a=0.9426\pm 0.0004\text{nm}$ 、 $c=0.6886\pm 0.0002\text{nm}$)と比較しても小さくなり、 Mg^{2+} がアパタイト構造中に組み込まれたという結果を支持しており、Vegard則からは2%未満のMgが置換したことになる。

5.3.3.HApの核形成サイト量の変化

Table.5.3.3.1にSF溶液中の Ca^{2+} と Mg^{2+} の含有量を示す。透析中の溶液のイオン濃度変化を時間ごとに測定し、平衡状態に達した濃度での含有量を示した。SF溶液中のカチオン含有量はSF溶解前処理によっておよそ40~68倍に増加した。これは、SFに吸着しているカチオンが原因であると考えられる。また、Table.5.3.3.2に反応系内のHAp結晶子数を示す。結晶子数は系全体のHApの理論生成体積とHAp一結晶子の体積とから算出した。HAp一結晶子の体積はTable.5.3.2.1で示した結晶子サイズから六角柱の結晶子を仮定して算出した。反応系内のHApの結晶子数もSFの溶解前処理により50~75%増加している。これらのことからSFに吸着したカチオンがHApの核形成サイトとして働いているということがわかった。Ca/Pモル比は 1.66 ± 0.02 となり前処理による有意な差はみられなかった。これは透析後のSF溶液中のカチオン量が全Ca量の0.05~0.07%と測定したCa/Pモル比の標準偏差内であったためである。

5.3.4.赤外線吸収スペクトル(FT-IR)測定結果

HApとSFの相互作用に及ぼす溶解前処理の影響を調べるためFT-IRスペクトルを用いた。SFの前処理によるFT-IRスペクトルの変化をFig.5.3.4.1、溶解前処理を施したSFとHApとの複合体のFT-IRスペクトルをFig.5.3.4.2に示す。Fig.5.3.4.1の吸収ピークのブルーシフト(amide I : $1625\rightarrow 1651\text{cm}^{-1}$ amide II : $1519\rightarrow 1541\text{cm}^{-1}$)はSFの二次構造が β -シートから α -ヘリックスやランダムコイル構造に変化したためである[5-6]。RSFとHApとを複合化すると、amide Iは 8cm^{-1} ブルーシフトし、amide IIにはほとんど変化が見られなかった。このことからHApの Ca^{2+} とSFの COO^- や

OHなどの官能基が相互作用して[5-7]、これがC=Oの振動エネルギーに影響しているのではないかと考えられる。一方、CaDSFやMgDSFにHApを複合化した場合、amide Iは 4cm^{-1} レッドシフトし、amide IIは消失した。このamide Iのレッドシフトとamide IIの消失はHApの Ca^{2+} とSFのamide I (C=O)が相互作用し、電子密度を下げることによりamide II (N-H)が脱プロトン化したためであると考えられる。SFの溶解前処理によるHApとSFの相互作用の変化はSF上の核形成サイトの増加によるということが考えられ、SFのC=OがHApの核形成サイトとして働いているのではないかと推測することができる。合成後の溶液中のpHはHAp-RSF、HAp-CaDSF、HAp-MgDSFそれぞれ8.0、8.1、8.0とこの結果を支持している。

SFの溶解前処理によるHApの結晶性の増加はHAp核形成サイト量の増加の影響ということによって説明できる。Fig.5.3.4.3にHApと生体高分子の相互作用のモデル図を示す。核形成サイトが増加すると生成粒子の数も増加し、結果として小さなサイズの粒子ができる。また、SFはタンパク質でありペプチド結合の繰り返しにより形成されている。このカルボニル基はCaイオンと結合し、HApの核形成サイトとなっている。カルボニル基間の距離は0.723nmであり、この長さはHApのc軸(0.688nm)の長さとはほぼ一致する。さらにHApは $z=1/4, 3/4$ にカルシウムイオン密度の高い位置がある。このためHApの結晶成長はSF分子鎖にそったエピタキシャル成長をとるが、摩砕、核形成サイトの増加などにより結晶子サイズが小さいほど分子間のミスフィットを無視できるようになるため、結果として結晶化度が上がり、格子歪が下がることになる。生体高分子としてコンドロイチン硫酸、コラーゲンなどの分子鎖に沿ってアパタイトがエピタキシャル成長した報告例[5-8, 5-9]がありSF上へのHApの成長結果を支持している。また、基板との格子不整合により BaTiO_3 、 $\text{Pb}(\text{Zr},\text{Ti})\text{O}_3$ などの結晶性が減少した報告例[5-10, 5-11]があり、ミスフィットが結晶化度を減少したという結果を支持している。4章で述べたようにHApの結晶性の増加は有機官能基上への溶解析出と同様、SFの前処理によるHApとSF間の相互作用によっても引き起こされることがわかった。

5.4.総括

SFに溶解前処理を施すことによってナノ複合体中のHApの結晶化度は増加し、格子歪は減少した。溶解前処理によりSFへのカチオンの吸着量が増加し、HApの

核形成サイトも増加した。HAp ナノ結晶は凝集粒子の長軸方向に c 軸をそろえて配向していた。このように SF の溶解前処理を施すことによって、より生体骨の結晶子サイズに近い HAp ナノ結晶が配向した複合体を調製した。

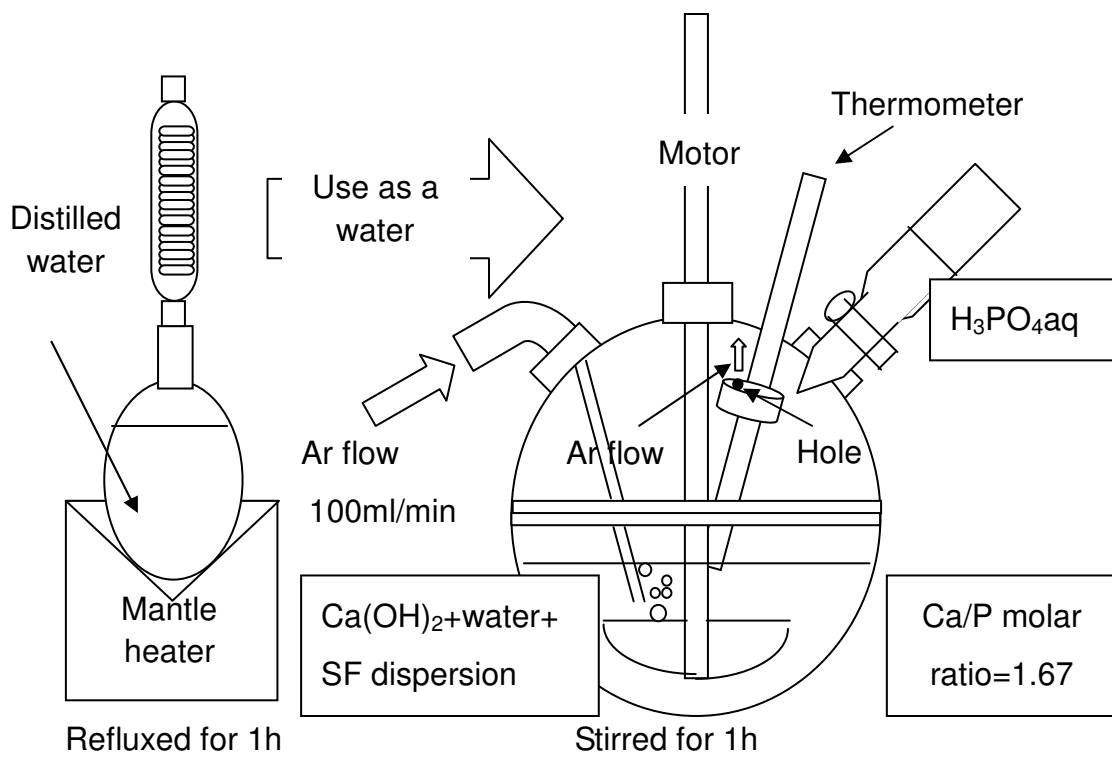
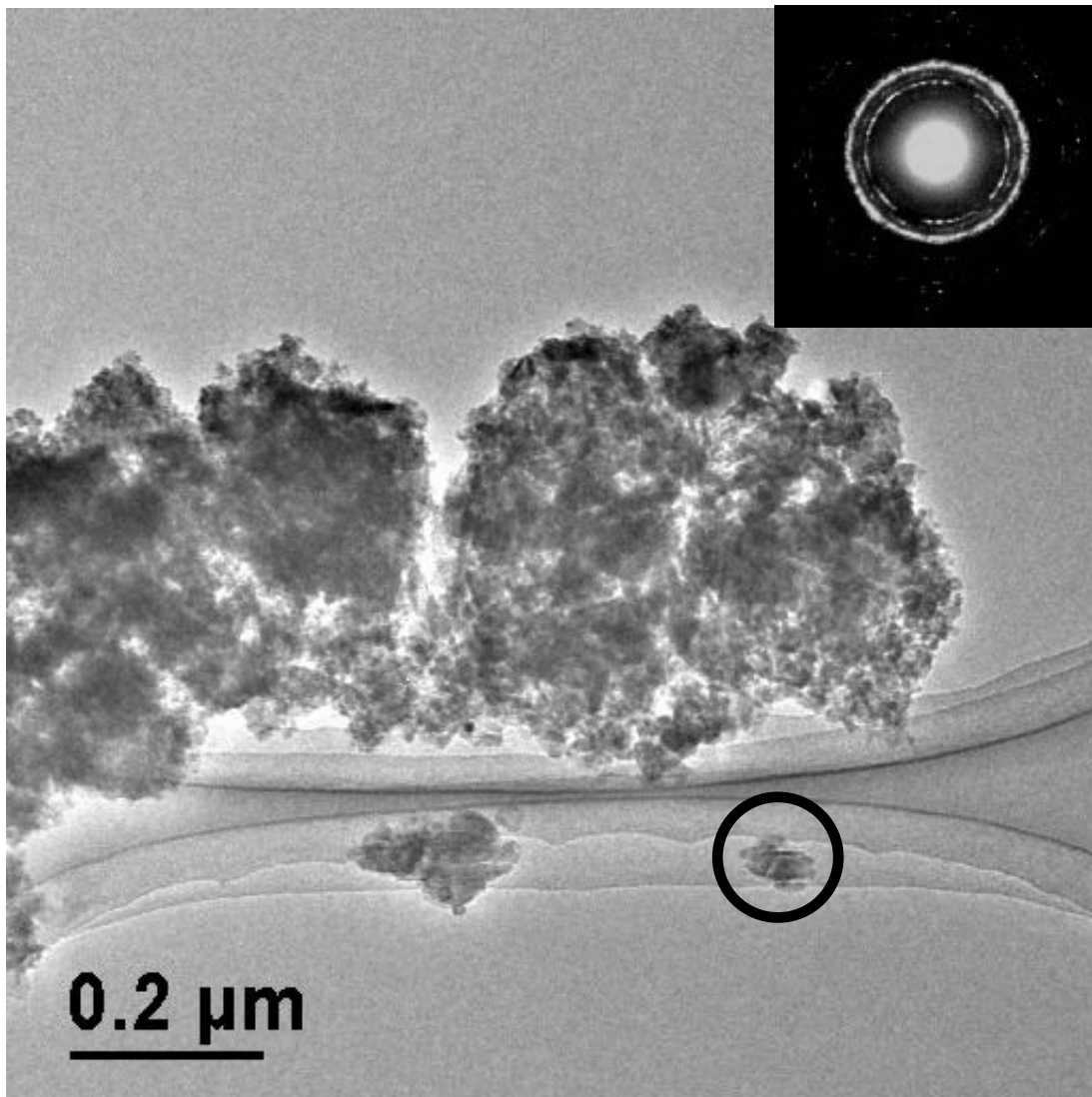
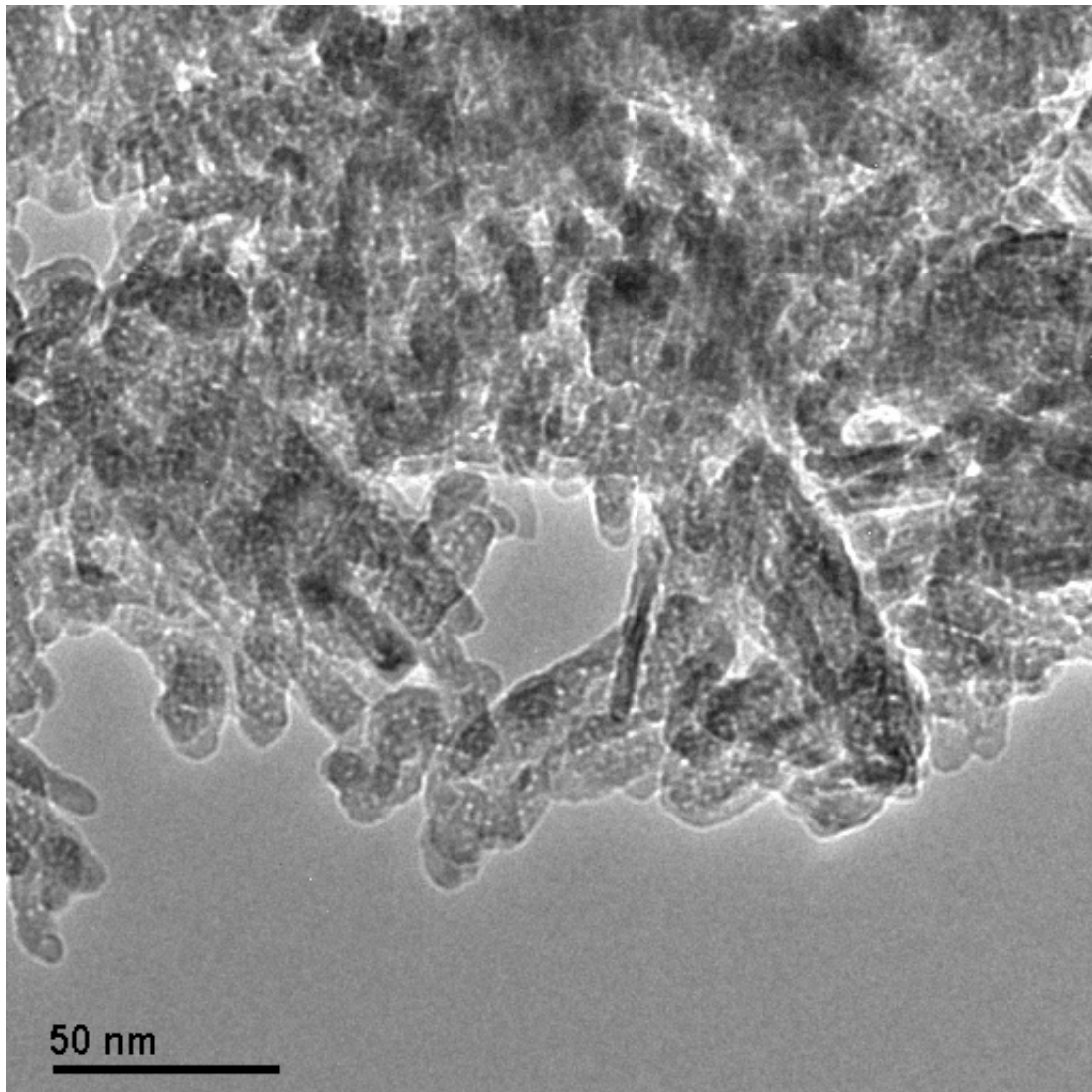


Fig.5.2.2. Synthesis scheme of samples.

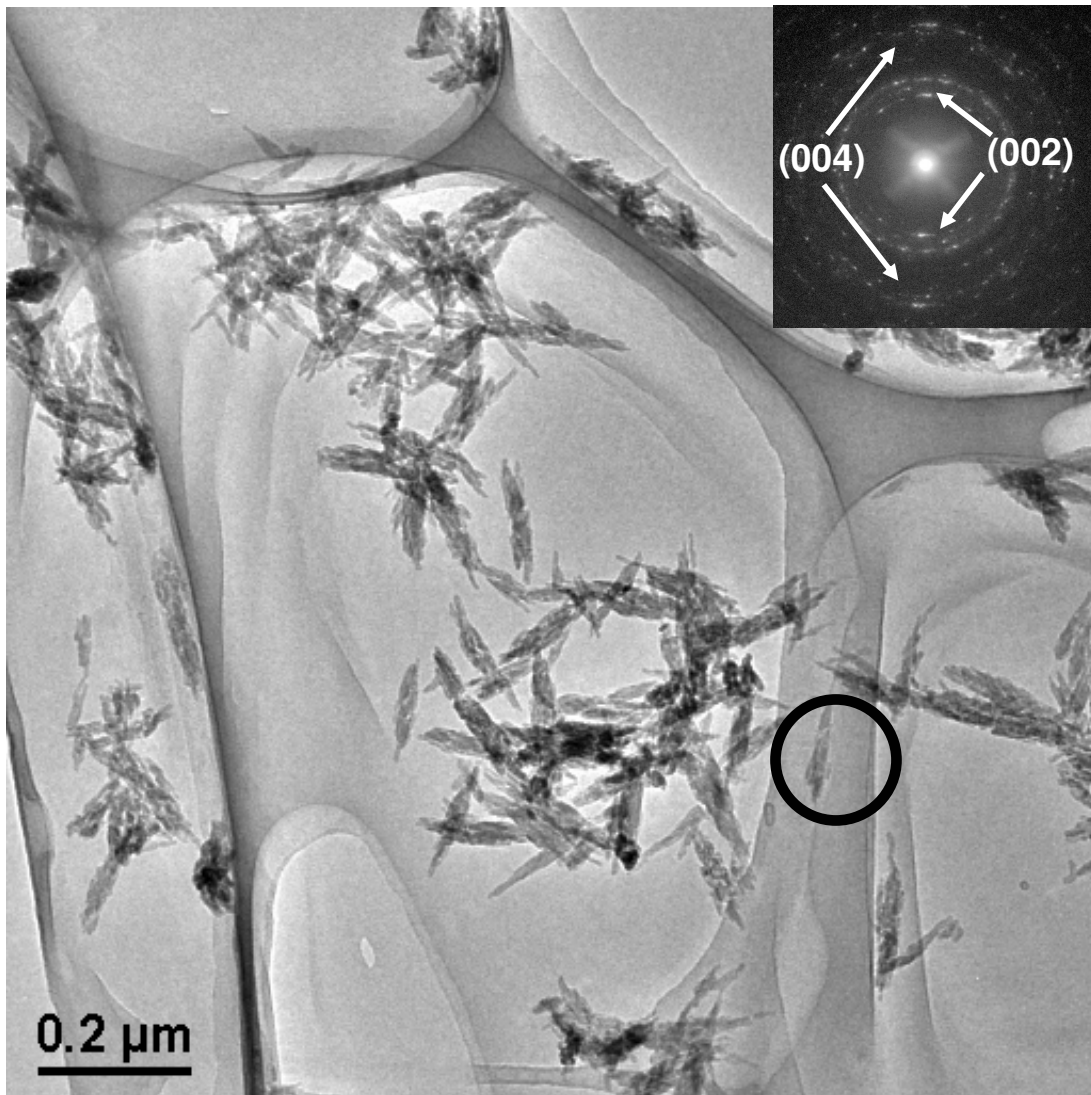


(a) Aggregates at lower magnification

Fig.5.3.1.1. Microstructure of HAp-RSF

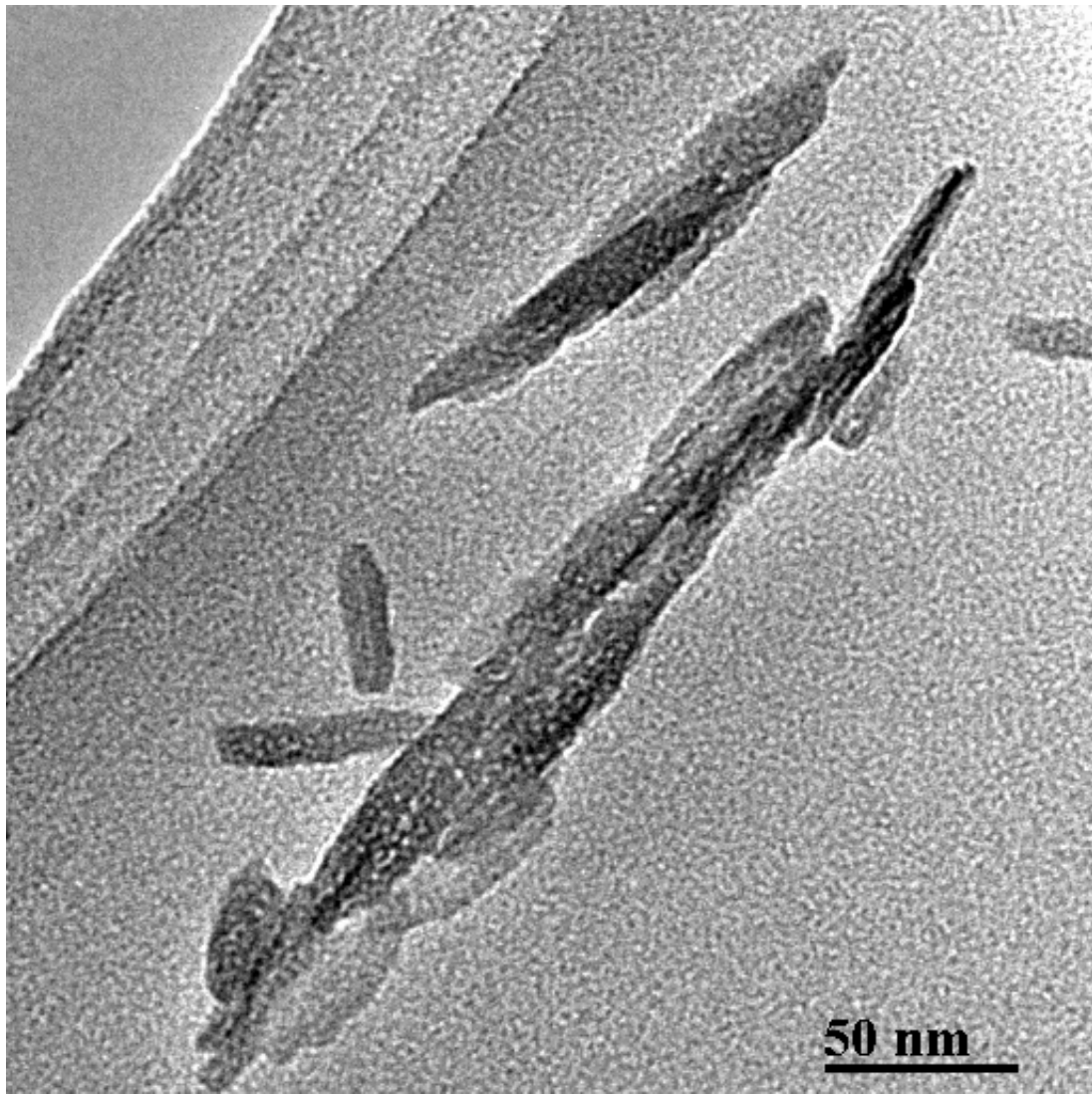


(b) Aggregates at higher magnification
Fig.5.3.1.1.Microstructure of HAp-RSF



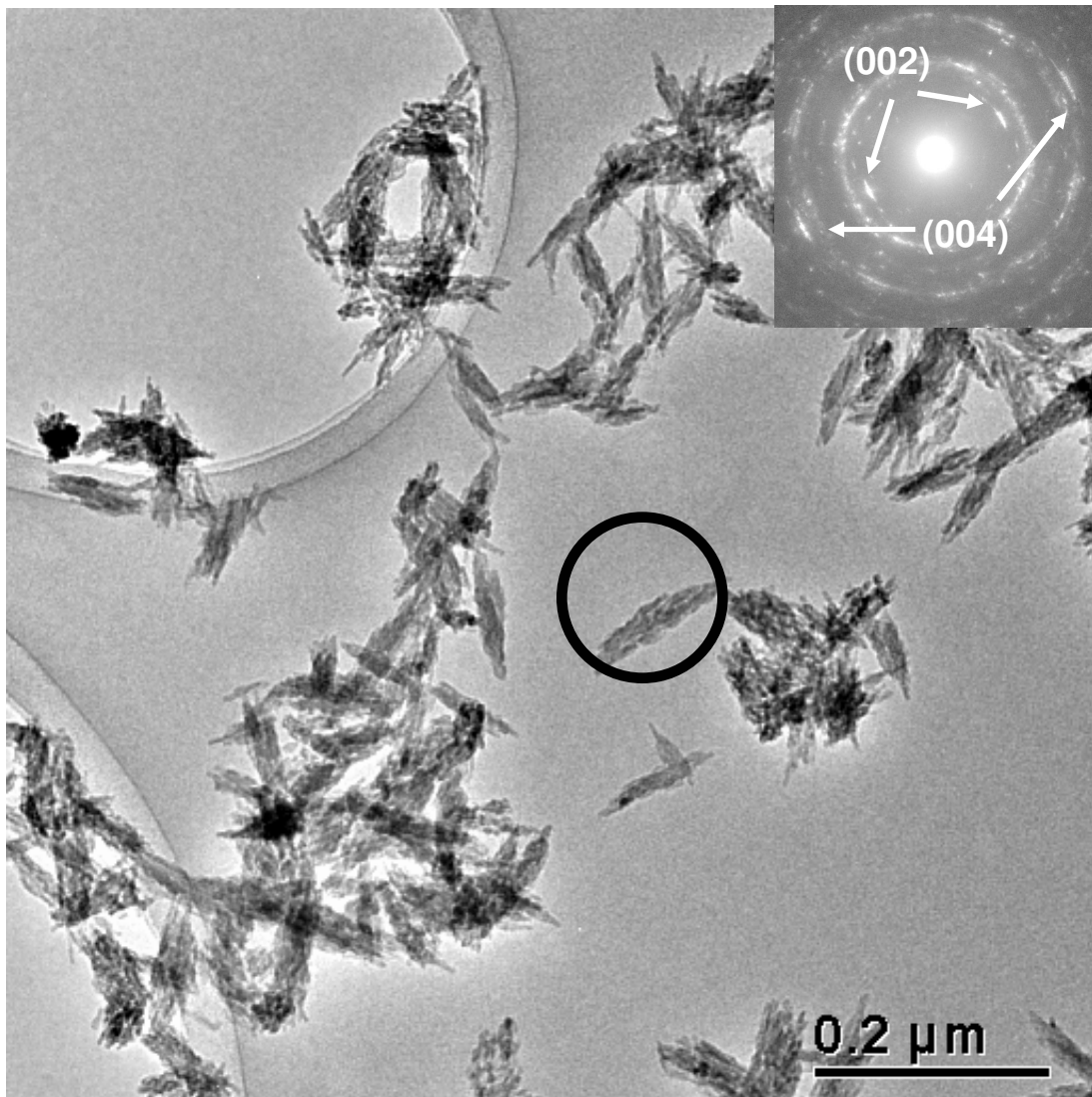
(a) Aggregates at lower magnification

Fig.5.3.1.2. Microstructure of HAp-CaDSF.



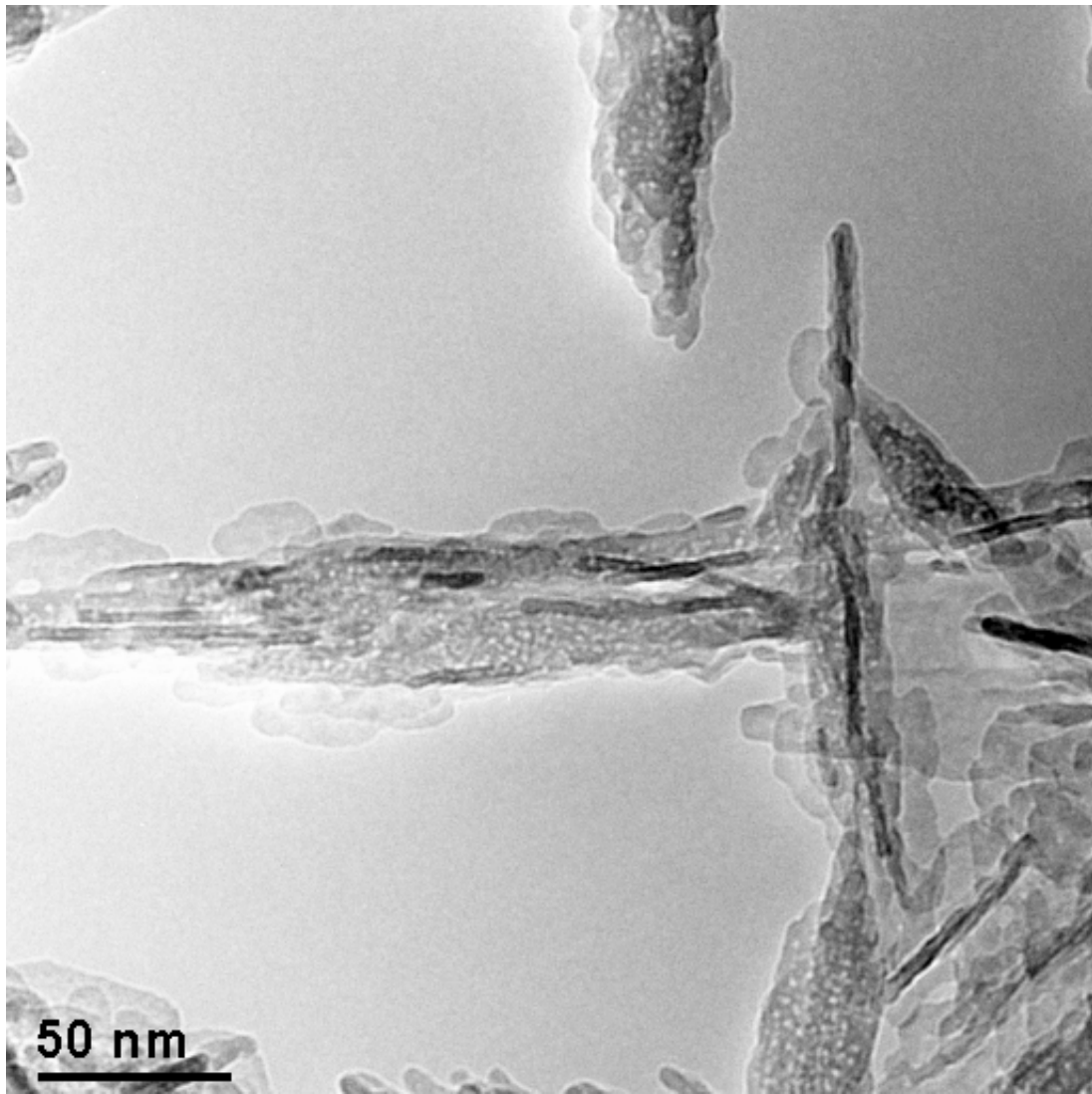
(b) Aggregates at higher magnification

Fig.5.3.1.2.Microstructure of HAp-CaDSF.



(a) Aggregates at lower magnification

Fig.5.3.1.3. Microstructure of HAp-MgDSF.



(b) Aggregates at higher magnification

Fig.5.3.1.3. Microstructure of HAp-MgDSF.

Table.5.3.2.1.Crystallite size and microstrain of the samples

| sample | L_a (nm) | e_a (%) | L_c (nm) | e_c (%) | L_c/ L_a |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| HAp-RSF | 8.3 | 1.15 | 20.0 | 0.50 | 2.42 |
| HAp-CaDSF | 7.6 | 0.61 | 13.5 | 0.18 | 1.77 |
| HAp-MgDSF | 8.2 | 0.94 | 16.6 | 0.35 | 2.03 |

L_x : Crystallite size along their x axis

e_x : Microstrain along their x axis

Table.5.3.2.2.Relative crystallinity (%) of the samples

| sample | $I_{(002)}$ | $I_{(300)}$ | $I_{(202)}$ |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| cHAp | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| HAp-RSF | 65.8 | 44.0 | 28.6 |
| HAp-CaDSF | 78.4 | 65.4 | 55.1 |
| HAp-MgDSF | 76.3 | 52.5 | 49.4 |

$I_{(hkl)}$: Relative integral intensity of (hkl)

Table.5.3.3.1.Contents of cations in silk fibroin dispersion (at dialysis equilibrium)

| sample | Ca (mg Ca/ g fibroin) | Mg (mg Mg/ g fibroin) |
|--------|-----------------------|-----------------------|
| RSF | 0.04±0.03 | 0.03±0.02 |
| CaDSF | 2.72±0.08 | - |
| MgDSF | - | 1.17±0.06 |

Table5.3.3.2.Number of the HAp crystallite in the reaction systems

| sample | Number of the HAp crystallite / cm^3 |
|-----------|--|
| HAp-RSF | 4.4×10^{15} |
| HAp-CaDSF | 7.7×10^{15} |
| HAp-MgDSF | 6.6×10^{15} |

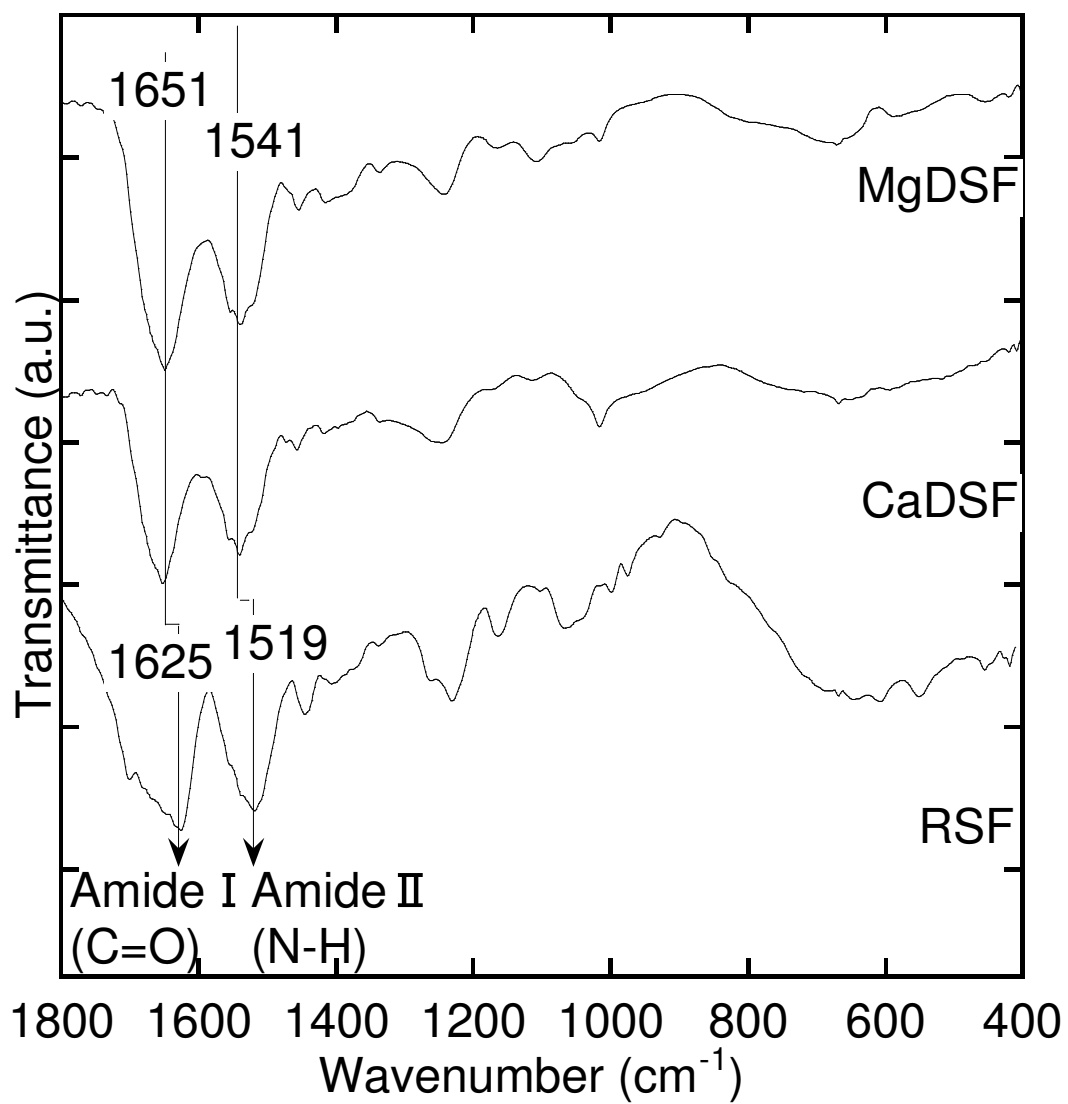


Fig.5.3.4.1.FT-IR spectra of SF.

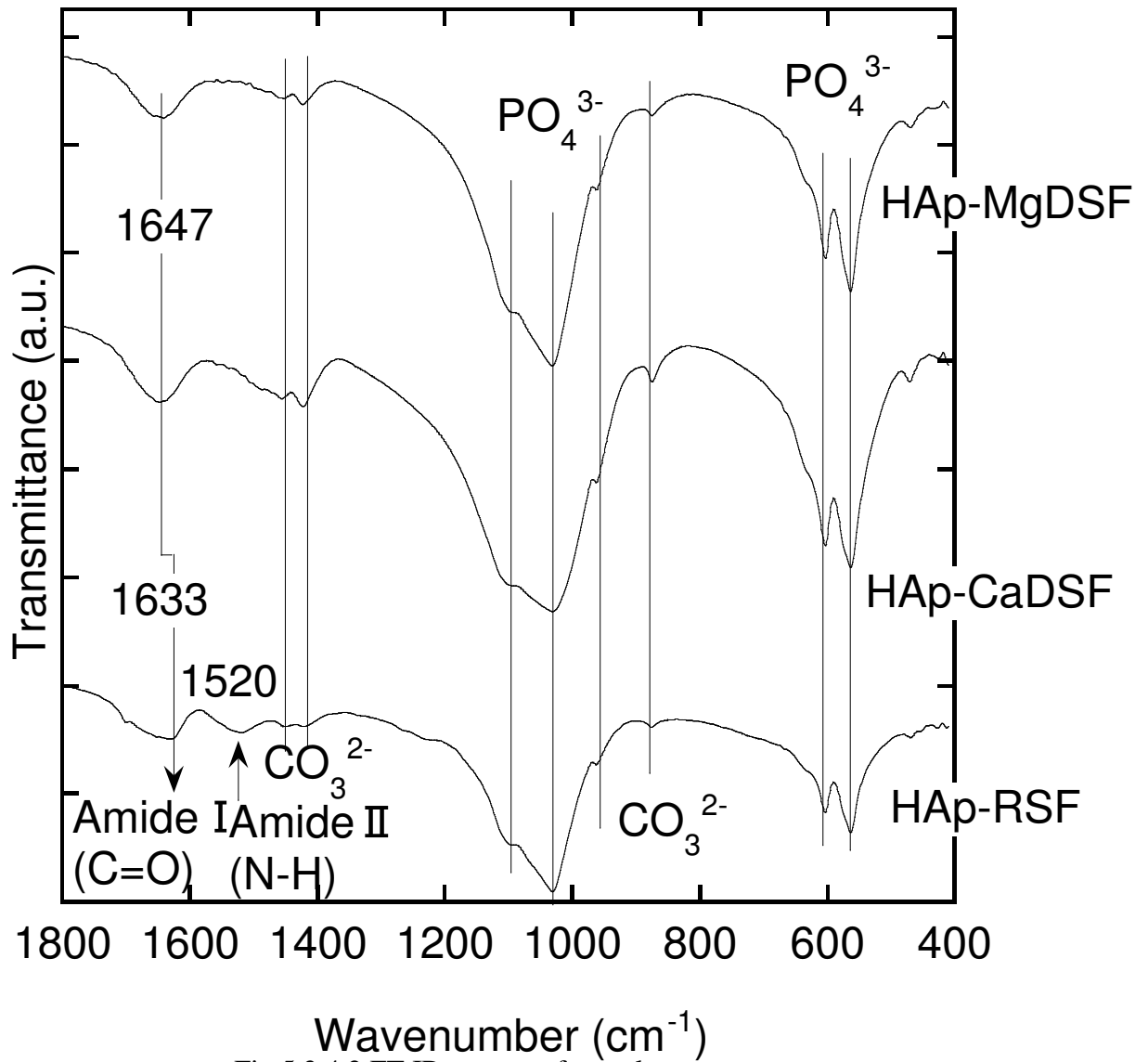


Fig.5.3.4.2.FT-IR spectra of samples.

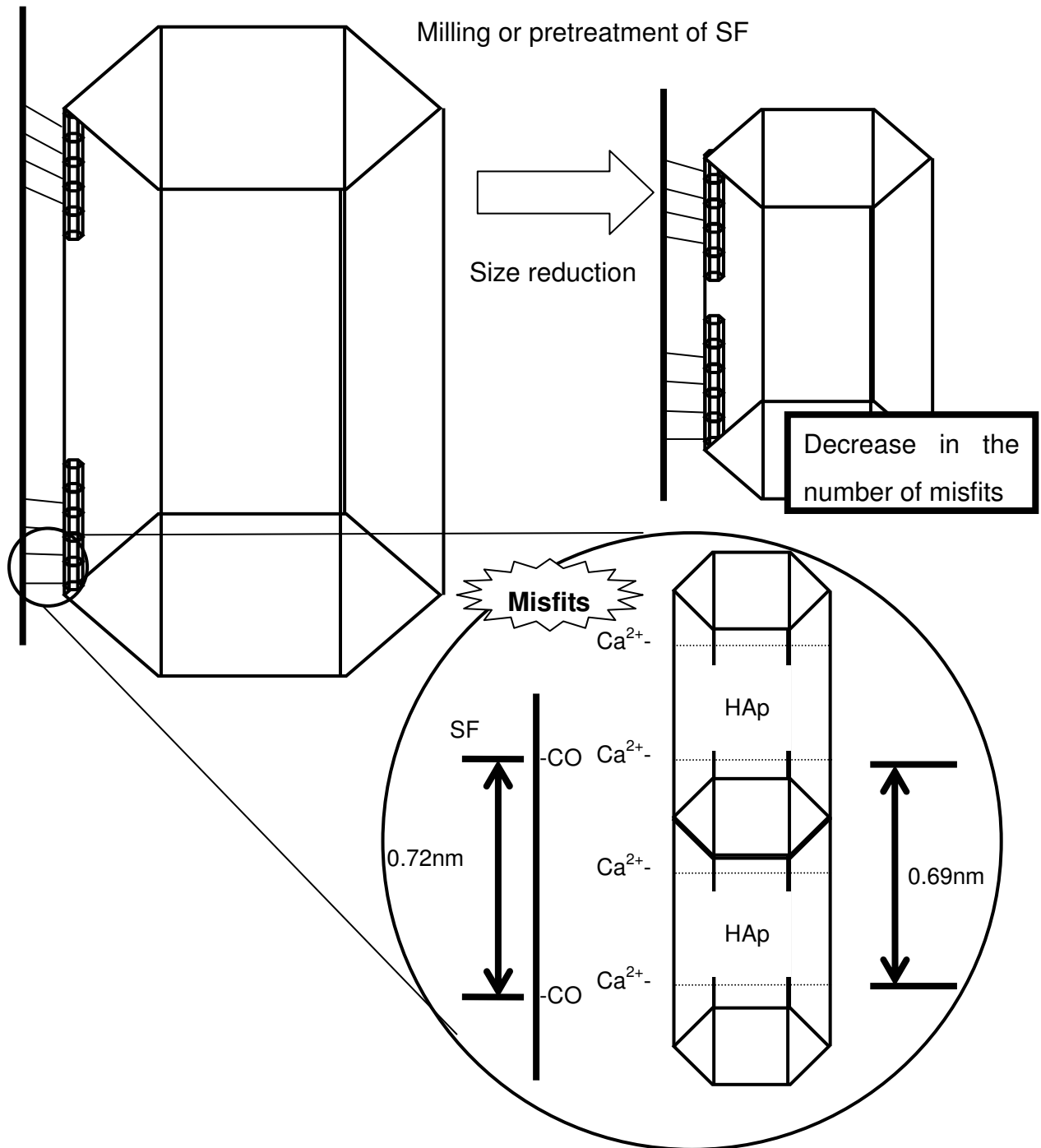


Fig.5.3.4.3. Decrease in the number of misfits between Ca²⁺ of HAp and C=O of SF.

第5章の引用文献

- [5-1] Y. Tamada, T. Furuzono, T. Taguchi, A. Kishida and M. Akashi, “Ca-adsorption and apatite deposition on silk fabrics modified with phosphate polymer chains”, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **10**[7], 787-793 (1999).
- [5-2] L. Wang, R. Nemoto and M. Senna, “Microstructure and chemical states of hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite synthesized via a wet-mechanochemical route”, *J. Nanoparticle. Res.*, **4**, 535-540 (2002).
- [5-3] K. Furuhashi, A. Okada, Y. Chen, Y.Y. Xu and M. Sakamoto, “Dissolution of silk fibroin in lithium halide/organic amide solvent systems”, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **63**[4], 315-322 (1994).
- [5-4] K. Chen, Y. Umeda and K. Hirabayashi, “Enzymatic hydrolysis of silk fibroin”, *J. Seric. Sci. Jpn.*, **65**[2], 131-133 (1995).
- [5-5] S.H. Rhee, Y. Suetsugu and J. Tanaka, “Biomimetic configurational arrays of hydroxyapatite nanocrystals on bio-organics”, *Biomaterials*, **22**, 2843-2847 (2001).
- [5-6] G. Fredd, P. Monti, M. Nagura, Y. Gotoh and M. Tsukada, “Structure and molecular conformation of Tussah silk fibroin films: effect of heat treatment”, *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.*, **35**, 841-847 (1997).
- [5-7] T. Furuzono, T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi and Y. Tamada, “Preparation and characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **50**, 344-352 (2000).
- [5-8] S.H. Rhee and J. Tanaka, “Synthesis of a hydroxyapatite/collagen/chondroitin sulfate nanocomposite by a novel precipitation method”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **84**[2], 459-461 (2001).
- [5-9] S.H. Rhee and J. Tanaka, “Effect of chondroitin sulfate on the crystal growth of hydroxyapatite”, *J. Am. Ceram. Soc.*, **83**[8], 2100-2102 (2000).
- [5-10] Y. Yoneda, T. Okabe, K. Sakaue, H. Terauchi and J. Tanaka, “Growth of ultrathin BaTiO₃ films on SrTiO₃ and MgO substrates”, *Surf. Sci.*, **410**, 62-69 (1998).
- [5-11] H.S. Hwang, T. Manabe, T. Nagahama, I. Yamaguchi, T. Kumagai and S. Mizuta, “Effect of substrate material on the crystallinity and epitaxy of Pb(Zr,Ti)O₃ thin film”, *Thin. Solid. Films.*, **347**, 106-111 (1999).

第6章 本研究の総括および今後の課題

6.1.本研究の総括

湿式メカノケミカル法、絹フィブロインへの前処理などにより、生体骨の微構造を模倣したアパタイトと生体高分子とのナノ-ナノ複合体を調製することができた。調製した各複合体について以下にまとめる。

第3章では湿式メカノケミカル法により HAp - 絹フィブロイン(SF)複合ゾルを合成した。XRD、FT-IR の結果、ともに中間生成物として Brushite が生成し、3時間の摩砕処理により完全に HAp 単相に変化した。SF の共存下においては Brushite から脱プロトン化による HAp への変化が促進された。生成物の Ca/P モル比は 1.44~1.55 でカルシウム欠損型の HAp であった。キトサンがコートされたガラス基板上にディップコーティングによりゲルフィルムを作成した。

第4章では引き続き湿式メカノケミカル法により HAp - 生体高分子の複合ゾルを調製し、主に複合ゾル中のアパタイトナノ結晶の特性について検討した。生体高分子の共存下においての室温での湿式メカノケミカル処理によって HAp の結晶化度は増加し、格子歪は減少した。摩砕のせん断応力により HAp の結晶子サイズとアスペクト比は減少し、豚海綿骨中の HAp の値に近づいた。摩砕後の HAp の結晶化度の増加と格子歪の減少は溶解析出と HAp の Ca^{2+} と SF の $\text{C}=\text{O}$ との間の相互作用に起因することがわかった。

第5章では SF に溶解前処理を施した後、攪拌による水溶液反応により HAp - SF 複合ゾルを調製した。SF に溶解前処理をほどこすことによってナノ複合体中の HAp の結晶化度は増加し、格子歪は減少した。溶解前処理により SF へのカチオンの吸着量が増加し、HAp の核形成サイトも増加した。HAp ナノ結晶は凝集粒子の長軸方向に c 軸をそろえて配向していた。このように SF の溶解前処理によって複合体の性質が変わり、より生体骨の結晶子サイズに近い HAp ナノ結晶 HAp 結晶が c 軸方向に配向した複合体を調製した。

以上のような特性から判断すると、本研究で得られた HAp-SF 複合体は、生体材料として医療分野への応用が期待される。

6.2.今後の課題

本研究によって、湿式メカノケミカル法、生体高分子への前処理などによりヒドロキシアパタイト - 生体高分子系のナノ - ナノ複合ゾルを得ることができ、有機無機相互作用によるアパタイトの核形成機構などが明らかとなった。しかし、摩砕、HAp との相互作用による生体高分子の分子量の変化、二次構造変化の割合など生体高分子の特性変化についての詳細は明らかになっていない。したがって、レーザー飛行時間型質量分析装置での生体高分子の分子量の測定、FT-IR での二次構造に起因するピークの定量分析などを行う必要がある。さらに、理論計算等を用いて、実験結果の裏付けをとることが必要である。また、HAp と各種有機物との有機無機相互作用の理解を深めることも重要である。よって SF の構成単位である各種アミノ酸と HAp の吸着実験などを行い、各種官能基と HAp との親和性、相互作用の種類等を見極めることが必要である。

得られた複合体中への空気中からの炭酸イオンの混入を制御するため、グローブボックス中での合成や低 pH からの合成も行ってみる必要がある。HAp の Ca/P 比の制御のためには乾式系での合成、出発物質の再検討等も行う必要があり、誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析法などの精度の高い分析装置による生成物の Ca/P 比の精密化も必要となってくる。更に、本研究でリファレンスとして使用した生体骨は豚の肋骨から得た海綿骨であり、実際に人体に埋入するためにはこれが的確か、他の生体骨についても比較してみる必要がある。

ゾルの性質をよく理解するためには、本研究でも用いたレオロジー測定などを更に掘り下げる必要があり、ラマン分光法などによる合成中、合成後などのその場測定が重要となってくる。

また、得られたゾルを臨床応用に利用するためには目的に応じた各種加工を施す必要がある。骨欠損部などに注入材料として用いる場合、手術中の短時間で硬化させ、高強度の硬化体を得ることが重要であるため、硬化液に有機酸などを用い、ゾルの固体濃度等を検討する必要がある。また、人工骨、人工歯根などの移植材料として使用する場合、生体高分子の分解を防ぐため、低温での成型プロセスが重要である。そのため、遠心成型法、冷間等方圧法など熱処理を経由しない方法によって、膜、成型体等のバルクの生体移植材料を作るプロセス、最適条件を確立することが必要である。また、膜の基板となる生体材料についてもよく吟味し、基礎研究、応

用において最適な基板を使用することが必要となってくる。

得られた成型体の強度の評価、細胞培養実験などから生体外での実験で、移植材料としての安定性、毒性などを調べ、その後、実際の動物への移植による生体埋入試験を行い、材料の生体内での安定性、骨誘導性等を検討する必要がある。

学術論文および口頭発表

本研究の成果は、以下により公表されている。

[1] 主論文に関する公刊論文

1. Rei Nemoto, Satoshi Nakamura, Tetsuhiko Isobe and Mamoru Senna, “Direct synthesis of hydroxyapatite-silk fibroin nano composite sol via a mechanochemical route”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2001, **21**, 7-12.
2. Rei Nemoto, Li Wang, Masahiro Aoshima, Toshiyuki Ikoma, Junzo Tanaka and Mamoru Senna, “Increasing the crystallinity of hydroxyapatite nanoparticles in composites containing bioaffinitive organic polymers by mechanical stressing”, *Journal of the American Ceramic Society*, in press.
3. Rei Nemoto, Li Wang, Toshiyuki Ikoma, Junzo Tanaka and Mamoru Senna, “Preferential alignment of hydroxyapatite crystallites in nanocomposites with chemically disintegrated silk fibroin”, *Journal of Nanoparticle Research*, in press.

[2] 口頭発表

国際会議発表：

1. Rei Nemoto, Satoshi Nakamura, Tetsuhiko Isobe and Mamoru Senna, “Properties of hydroxyapatite-silk fibroin nano composite particles synthesized by a one step wet mechanochemical reaction”, First Asian Particle Technology Symposium, 2000年12月 (Bangkok)
2. Satoshi Nakamura, Rei Nemoto, Tetsuhiko Isobe and Mamoru Senna, “Properties of hydroxyapatite nano sol prepared via a wet mechanochemical route”, First Asian Particle Technology Symposium, 2000年12月 (Bangkok)
3. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Effects of chemical modification of protein on the gelation behavior of hydroxyapatite/protein nano-composite sol”, The 40th Symposium on Basic Science of Ceramics • International Symposium on New Wave of

Ceramics for the 21st Century, 2002 年 12 月 (大阪)

4. Rei Nemoto, Li Wang, Toshiyuki Ikoma, Junzo Tanaka and Mamoru Senna, “Properties of hydroxyapatite/protein composite nanosol in the presence of bioaffinitive dispersant”, The International Symposium on Biomaterials and Tissue Engineering, 2002 年 3 月 (東京)
5. Rei Nemto, Li Wang, Toshiyuki Ikoma, Junzo Tanaka and Mamoru Senna, “Preparation and characterization of bioaffinitive hydroxyapatite – protein nano composite sol”, World Congress on Particle Technology 4, 2002 年 7 月 (Sydney)
6. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Microstructure and gelation behavior of hydroxyapatite/protein composite nanosol”, World Congress on Particle Technology 4, 2002 年 7 月 (Sydney)
7. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Preparation and Characterization of Hydroxyapatite-based Nanocomposite Containing Enzyme Pretreated Silk Fibroin”, The 2nd Asian Particle Technology Symposium, 2003 年 12 月 (Malaysia)

国内会議発表：

1. 根本 励, 中村智, 小林友善, 磯部徹彦, 仙名保, “溶液法メカノケミカル反応によるヒドロキシアパタイトー絹フィブロイン系複合ナノ粒子の合成と特性”, 粉体工学会 1999 年度秋期研究発表会, 1999 年 11 月 (東京)
2. 中村智, 磯部徹彦, 仙名保, 根本 励, 田中順三, “ヒドロキシアパタイト・ナノゾル生成反応の機構と組成制御因子の解析”, 日本セラミックス協会第 13 回秋季シンポジウム, 2000 年 10 月 (北九州)
3. 根本 励, 青嶋真裕, 磯部徹彦, 仙名保, “ヒドロキシアパタイトータンパク質系ナノコンポジットの直接合成と特性”, 粉体粉末冶金平成 12 年秋季大会, 2000 年 10 月 (京都)
4. 根本 励, 仙名保, 生駒俊之, 田中順三, “タンパク質微粒子共存下でのヒドロキシアパタイトナノ結晶の核生成と異方成長”, 第 12 回固体の反応性討論会, 2001 年 11 月 (東京)
5. 根本 励, 仙名保, 生駒俊之, 田中順三, “生体親和性分散剤共存下におけるヒドロキシアパタイトータンパク質系ナノ複合ゾルの調製と特性”, 第 17 回日本ア

パタイト研究会, 2001年12月(山口)

6. L. Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “A rheological study on gelation behavior of hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite sol,” 第50回レオロジー討論会, 2002年10月(長岡)
7. 根本 励, 仙名保, 生駒俊之, 田中順三, “ナノ複合ゾル中におけるヒドロキシアパタイト - 生体高分子相互作用に及ぼすメカノケミカル効果”, 第18回日本アパタイト研究会, 2002年11月(埼玉)
8. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Formation and properties of interconnective porous hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite”, The 6th Symposium on Ceramics in Medicine, 2002年12月(大阪)
9. 根本 励, 王莉, 生駒俊之, 田中順三, 仙名保 “溶解前処理を施した絹フィブロイン微粒子共存下におけるヒドロキシアパタイトナノ結晶の合成と特性”, 第19回日本アパタイト研究会, 2003年12月(東京)
10. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Microstructure and properties of the nanocomposite comprising hydroxyapatite and enzyme pretreated silk fibroin”, 第19回日本アパタイト研究会, 2003年12月(東京)

[3] その他の公刊論文

1. Tetsuhiko Isobe, Satoshi Nakamura, Rei Nemoto, Mamoru Senna and Hocine Sfihi, “Solid-State Double Nuclear Magnetic Resonance Study of the Local Structure of Calcium Phosphate Nanoparticles Synthesized by a Wet-Mechanochemical Reaction”, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2002, **106**, 5169-5176.
2. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Microstructure and chemical states of hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite synthesized via a wet-mechanochemical route”, *Journal of Nanoparticle Research*, 2002, **4**, 535-540.
3. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Effects of alkali pretreatment of silk fibroin on microstructure and properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004, **15**[3], 261-265.
4. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Changes in microstructure and

physico-chemical properties of hydroxyapatite-silk fibroin nanocomposite with varying silk fibroin content”, *Journal of the European Ceramic Society*, in press

5. Li Wang, Rei Nemoto and Mamoru Senna, “Three-dimensional porous network structure developed in hydroxyapatite-based nanocomposites containing enzyme pretreated silk fibroin”, *Journal of Nanoparticle Research*, in press.

謝辞

本論文をまとめるにあたり、修士一年で他大学の修士論文をまとめるという形からの出発にも関わらず他の研究室メンバーと同様、あるいはそれ以上に懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部、仙名保教授には心からの感謝の意を表明します。

また、貴重な御助言を賜りました慶應義塾大学理工学部、磯部徹彦助教授には厚く御礼申し上げます。本論文の審査にあたり、副査の任を快く引き受けてくださいました慶應義塾大学理工学部、平島碩教授、木村敏夫教授、物質・材料研究機構生体材料研究センター長の田中順三先生には、本論文の内容につきまして細部にわたり貴重な御教示、御助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

また、実験の遂行に当たりましては、物質・材料研究機構生体材料研究グループ諸氏、物質・材料研究機構ナノマテリアル研究所諸氏、慶應義塾大学中央研究所諸氏に温かい御協力を賜りました。ここに記して感謝の意を表明します。

また、中学時代からの友達、大学時代の友達の皆様には卒業してからもなお変わらぬ御厚意に感謝の意を表明します。

仙名・磯部研究室では5年間という長い間を過ごしてきて研究だけでなく様々な時間を皆様と共有してきました。この他人にはない特別な時間を、これだけ恵まれた環境で皆様と共に成長できたということに非常に感謝しております。

最後に 27 年間私を支えてくれた両親、家族に感謝し、謝辞とさせていただきます。

平成 16 年 5 月 8 日