

水熱処理を行ったプラズマ溶射ハイドロキシアパタイトフィルターの評価

田中 孝国*、池田 篤史、川越 大輔、武 成祥
小山工業高等専門学校 物質工学科(〒323-0806 小山市中久喜 771)

*tanakatakakuni@oyama-ct.ac.jp

Estimation of plasma sprayed hydroxyl apatite filter with hydrothermal treatment

Takakuni TANAKA, Atsushi IKEDA, Daisuke KAWAGOE, Seisho TAKE

Oyama National College of Technology

(771 Nakakuki, Oyama-city, Tochigi-Pref., 323-0806, JAPAN)

(Received December 7, 2011; Accepted December 26, 2011)

The removal of endotoxin (Et) contaminants from high-purity water is a serious challenge for manufacturers of medical products. We fabricated a new filter with plasma-sprayed hydroxyl apatite on an SUS. However, this new filter showed no absorption. In this study, we treated the HAp filter surface under hydrothermal conditions (the hydrothermal method is known to change HAp powder crystallization). We then evaluated the Et removal using this hydrothermal HAp filter and, to analyze the hydrothermal treatment effects of HAp crystallization, we observed the filter surface using SEM. Through the experiments, we found that the Et removal ability was restored by hydrothermal treatment.

Key words: endotoxin, hydroxyl apatite, plasma spray, hydrothermal treatment

1. 背景

発熱性物質エンドトキシン(Et)の除去は、医療用水製造現場において大きな問題である。Et は、分子量分布が約2,000～約20,000と幅広く(分子サイズは0.01 μ m以下と考えられる)、250°C条件下1時間以上の乾熱滅菌が必要な耐熱性毒素として水溶液中に存在する物質である[1]。従って、注射用水や透析水、注射用薬剤などの医療用水製造時における Et 除去は、ろ過操作が有効であるとされている。その一方で、これらの Et 除去フィルターは高性能である反面、高分子素材であり使い捨てである等の点から、医療費の高騰や産業廃棄物を生じさせる問題点を残した

ままである[2]。

我々は再利用型エンドトキシン除去フィルター開発を行うため、耐熱性および生体親和性が強いバイオセラミックスであるハイドロキシアパタイト(以下 HAp)を用いた除去法に着目した。HAp 粉体粒子は表面積が広く、親水性基(OH)、疎水性基(PO₄)を持つことが知られており、吸着素材としてタンパク質、脂質、糖等といった生体物質と幅広く結合可能である[3]。この吸着特性を生かし、HAp をカラムに充填して使用する手法がある(使い捨てタイプ[4])。しかし、粉末状 HAp は物理的強度に弱いため、透析用水のように大量の医療用水を短時間で生産する際

には、水圧に耐えられない欠点があると考えられる。我々は、HAp の持つ物理的強度を補うことが出来れば、利点である耐熱性と生体物質吸着特性を利用した再利用型の新規 Et 吸着除去法が開発できると考えた。

以前我々が試作したプラズマ溶射 HAp フィルターは、再利用に耐えうる強度は確保できたものの、Et の吸着除去特性が完全に失われていることが判明した[5]。電子顕微鏡を用いたフィルターの表面観察により、原因として粉末時の HAp は広い表面積を持っていたものの、プラズマ溶射後にはその広い表面積が失われていたことが考えられた。この観察結果より、我々は作製した HAp フィルターの表面をサンドブラストによる再粗化を行うことで表面積を広げ、フィルターの Et 除去能の上昇を図ったが、Et 試験液をろ過した際の除去率は約 20%しか向上しなかった[6]。

今回我々は溶射後の後処理法として、粉末状 HAp の形態を変化させ、生体高分子の吸着特性を上昇させる手法とされている水熱法に着目した。永田らの解説[7]によれば、水熱法は加熱加圧された媒体に HAp を入れて溶解および化学反応を行い、形状、大きさ、組織が均一で結晶性の高い微粒子の合成を行う手法(形態制御法)とされる。一般に媒体の pH 制御法や有機物添加法により、ウィスカー状や板状の HAp を得ることが可能であるとされている[7]。特に有機物添加における効果として、溶液中の官能基が HAp の特定の結晶面に特異的に吸着し、その面に垂直な軸方向への結晶成長を制御する効果があるとされている。

今回我々は、水熱法をプラズマ溶射 HAp フィルターに施すことで、プラズマ溶射後の HAp の表面状態の改質を試みた。同時に水熱処理を施したプラズマ溶射 HAp フィルターの示す Et 除去特性について評価を行ったので報告する。

2. 実験操作

まずプラズマ溶射 HAp フィルターの作製法について述べる。フィルターの基盤としてステンレスフィルター(ADVANTEC 社製)を採用した。このフィルターをサンドブラスト(株式会社不二製作所ニューマ・ブラスター、圧

力 3.0kg/cm²、アルミナ粒子を用いて 60 秒処理)により 1 分間処理を行った後に、チタン(Ti)をプラズマ溶射し、その後 HAp をプラズマ溶射することでフィルターを作製した。Ti 溶射条件は、アルゴン(Ar)ガスをキャリアガスとし、溶射電流 400A、溶射距離 120mm で行った。続いて行った HAp 溶射は、溶射時間を 30 秒とし、他は Ti 溶射と同条件で行った。HAp の溶射後、HAp の結晶性を回復させるために作製した試料の熱処理を武らの方法[8]により行った。熱処理の条件は、Ar 雰囲気の下 600°C で 1 時間保持し、プラズマ溶射 HAp フィルターを得た。

得られたプラズマ溶射 HAp フィルターを超純水によって洗浄後に乾燥し、水熱反応装置(ステンレス製の耐熱耐圧の反応装置、反応物は反応装置内側のテフロン容器に入れる)に反応媒体と共に入れた。反応媒体として、形態変化の報告例のある試薬および濃度(形態変化の観察された最大濃度)を参考に、アンモニア水(15wt%)・エチルアミン(15wt%)・クエン酸(50wt%)・酢酸(50wt%)・EDTA(15wt%)の 5 種を選択した[7,9]。それぞれにプラズマ溶射 HAp フィルターを浸漬させたのち、水熱反応装置を密閉して乾燥機でオートクレーブを行った。水熱反応条件は媒体量 28mL、昇温速度 5°C/min で 200°C まで昇温、24hr 保持後自然冷却し、水熱処理プラズマ溶射 HAp フィルターを得た(図 1)。

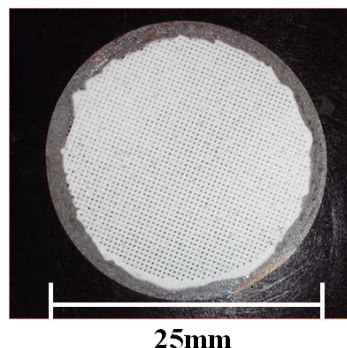


図 1 水熱処理プラズマ溶射 HAp フィルター

続いて水熱処理後のフィルターの Et 除去特性を評価するために、試験液のろ過実験を行った。水熱処理プラズマ溶射 HAp フィルターを専用のステンレスフィルターホル

ダー(ADVANTEC 社製)にセットし乾熱滅菌を行った。Et を含む試験液(以降、試験液と略す)として、医療用水製造装置における蒸留水を想定した煮沸水道水(10分煮沸を行って室温まで自然冷却)を準備し、以降の実験に用いた。続いて試験液の流速を図 2 中に示した微量ポンプのダイヤル 0.7mL/min に設定し、ろ過操作を行った。ろ過前の洗浄操作として、まず試験液を 20mL 流した後 1 回分のろ過 100mL を得た。100mL とした理由は、粉末状の HAp 1g を用いて 100mL の試験液中の Et 除去を行った場合、短時間で検出限界値以下まで Et 除去が可能であることが判明しているからである[5,6]。ろ過後のろ液の Et 濃度を測定し、フィルターの示す Et 除去特性を測定した。フィルターの表面観察は電子顕微鏡(以降 SEM)を用いた。同時に X 線回折(XRD)による形態変化についても観察を行った。

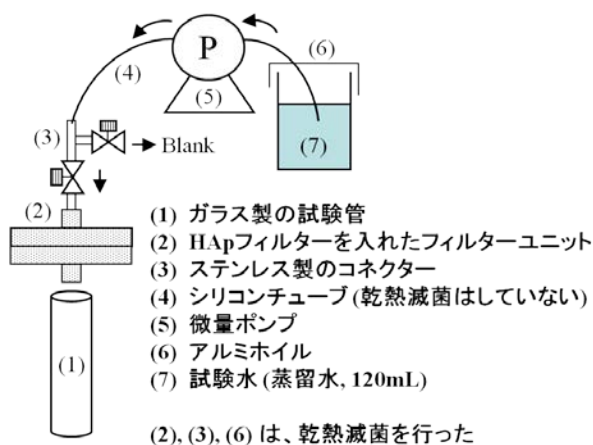


Fig. 1 ろ過試験

図 2 ろ過試験装置図

Et の定量法として、比色法であるエンドポイント法(エンドスペシー、生化学工業社製)を採用した。実験に使用したガラス器具類は Et 失活操作として乾熱滅菌を 250°C・2 時間行った。溶射に用いた HAp は、太平洋化学産業社の白色粉末製品、化学式は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、式量は 1004.6、平均粒径 4~6 μm であった。比色定量時のゼロブランクは、Et フリーの注射用水(大塚製薬社製)を用いた。比色法における濃度測定は分光光度計(UV1240,

島津製作所)を用いた。検量線の作成には、Et 標準品(*E. coli* 113:H10 株由来、生化学工業社製)を用いた。検量線作成手法は、分光光度計による光学的定量法である。まず、Et 標準品を注射用水に溶解し、Et 標準溶液を作成した。続いて、作成した Et 標準溶液を希釈し、5 種類の濃度を作成した。各濃度を比色法にて 3 回以上測定して検量線を作成し、直線回帰分析により相関係数 r を求め、その絶対値 $|r|$ が 0.98 以上であることを確認し、以降の濃度計算に使用した。

3. 実験結果及び考察

水熱処理を行わない HAp フィルターは、表面の平滑化による表面積減少が原因と考えられる Et 除去能の大幅な低下が見られることが、我々の以前の研究[5]により判明している(図 3)。その原因として、プラズマ溶射によって HAp が溶融状態で基盤であるフィルター表面に到達し急冷されることで、平滑化していることが考えられた。我々はプラズマ溶射後に HAp の結晶性回復を目的とした熱処理操作[8]を行っているが、今回新たに複数作製したフィルターで同様の観察結果が得られたことから、プラズマ溶射 HAp フィルターを Et 除去可能な状態にするために、続いて水熱処理を行った。

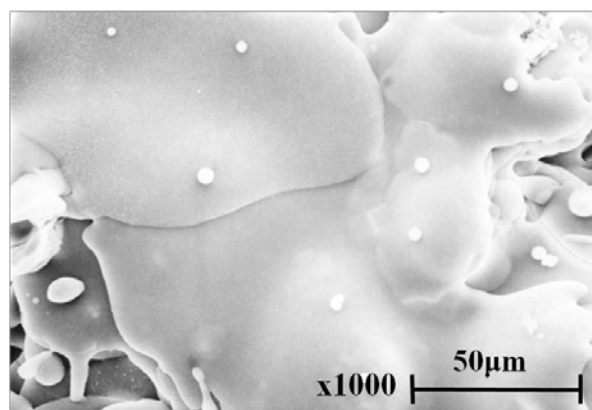


図 3 水熱処理前の HAp フィルターの表面写真

図 4-8 に水熱処理後の HAp フィルターの表面の SEM 写真を記載した。また、Et の除去率や粉末時の水熱処理文献[7,9]との比較を表 1-2 に示した。EDTA およびクエ

ン酸を用いて水熱処理を行った場合、Et 除去率がマイナスの値であった(表 1)。これは、試験液の濃度より作製した HAp フィルターのろ液の Et 濃度が高くなる現象を示しているが、この原因については現時点では解明出来ない。

図 4-8 の画像より、クエン酸以外の反応液では、様々な形態の結晶が析出することが判明した。今回我々の得られた結果を、粉末状 HAp の結晶の変化データと比較した場合、酢酸を用いた HAp 粉末の水熱処理では、HAp の結晶は柱状に変化すると報告されていた[7]が、複数枚の HAp フィルターを作製し、その表面観察を行っても報告例と一致はしなかった。同様に酢酸以外の試薬を各々用いて水熱処理を行っても、粒状の析出物のみが観察された。プラズマ溶射時の HAp は、大きな温度変化を受けるため粉末状の HAp とは性状が大きく異なる。従って、水熱処理後の表面形状の予測や結晶状態の変化は報告通りでは無く、それらの予測は現時点では困難であると考えられた。SEM に見られる表面上の不定形の物質については吉成が報告している。吉成によれば、HAp をプラズマ溶射すると HAp 以外に TCP(リン酸三カルシウム)や TeCP(リン酸四カルシウム)が生成すること、市販のインプラント製品数種を解析した結果、プラズマ溶射後に析出した TCP は水熱処理では HAp に転換することは困難であると報告されている[10]。また、稲垣らは CaO(酸化カルシウム)も生成されると報告している[11]。今回確認出来なかったものの、図 4-8 の SEM 写真で見られる小粒子は、おそらくこれらの物質であることが考えられた。

今回 5 種の試薬それぞれの水熱処理によって得られた HAp フィルターは、Et の除去能が無い、もしくは著しく低かったことから、HAp が今回の水熱処理条件では粉末時の広い表面積状態に戻っておらず、観察された粒子群による表面積の上昇だけでは Et 除去能が十分得られなかったことが示唆された。

図 8 の酢酸を用いて水熱処理を行ったプラズマ溶射 HAp フィルター表面は、処理前と比較すると $1\mu\text{m}$ 未満の微細な結晶が多く析出していた。このことから、酢酸処理の場合のみ、HAp フィルター表面における、見かけ上の

表面積が増していることが判明した。表 1 より、酢酸を用いて水熱処理を行った場合のみ、約 20%前後の回復が見られた。一方で、他の試薬では変化が無い、もしくは除去率の悪化が見られた。除去率の悪化の理由に関しては、フィルターの破損等も見られないことから、現在のところ不明である。同時に pH が及ぼす水熱処理への影響についても無関係であることが判明した。酢酸処理で Et 除去率が改善した理由としては、フィルター表面の見かけ上の表面積増加により、試験液中の Et が付着し除去された現象が考えられたが、SEM を用いた観察では確認出来なかった。続いて、XRD による観察を行った。図 9 の X 線回折パターンから、粉末状 HAp とプラズマ溶射後のパターンでは鋭利な回折パターンが失われていないことが確認出来た。同時に Et 除去の見られた酢酸による水熱処理後のパターンは、プラズマ溶射後と大きな違いは見られず、結晶性に大きな変化は無かったことが判明した。

今回得られたデータより、プラズマ溶射後の HAp フィルターは、酢酸を用いた水熱処理を行うことによってフィルター表面に析出した不定形の析出物に吸着し、除去されている可能性が考えられたが、プラズマ溶射 HAp フィルターの失った Et 除去能を復活させる手法、もしくは TCP 等の物質になった HAp を転化させる手法として、今回の水熱反応では不十分であり、再検討の必要があることが判明した。

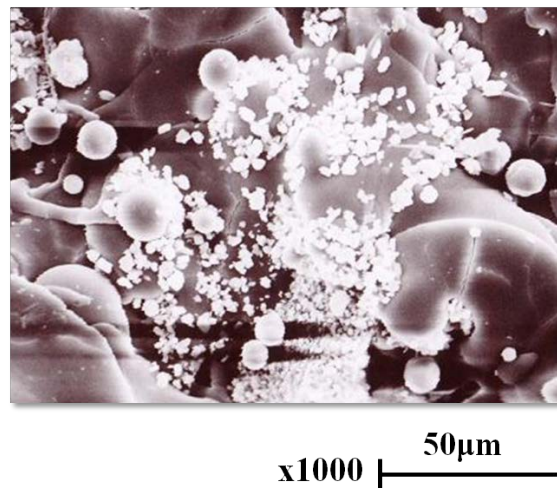
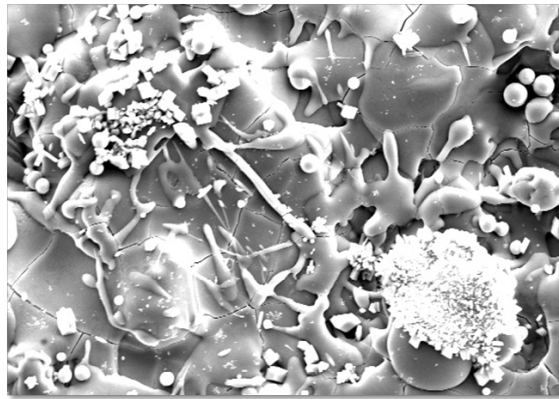
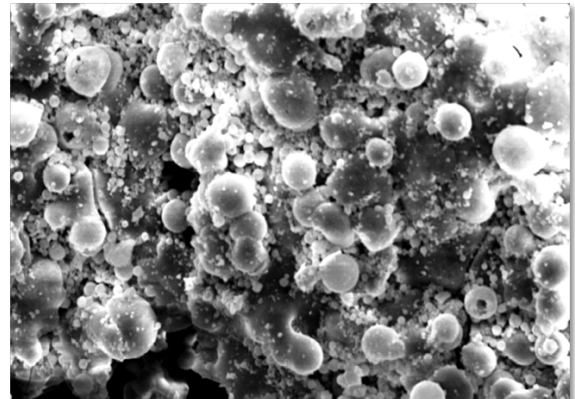


図 4 アンモニア水で水熱処理を行った HAp フィルター



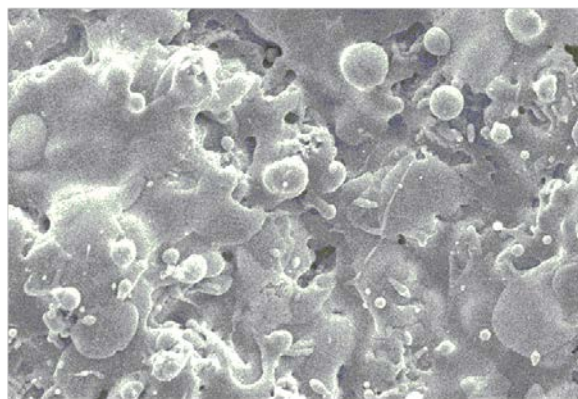
x1000 | 50μm

図 5 エチルアミンで水熱処理を行った HAp フィルター



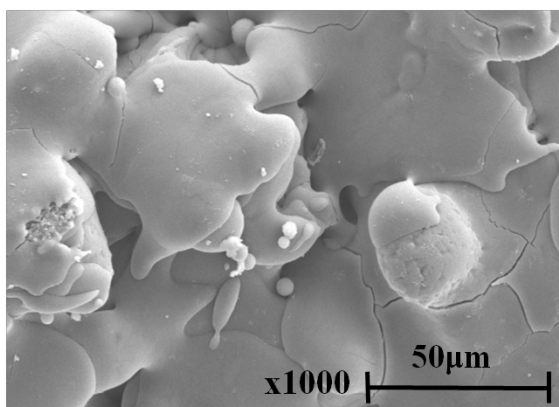
x1000 | 50μm

図 8 酢酸で水熱処理を行った HAp フィルター



x1000 | 50μm

図 6 EDTA で水熱処理を行った HAp フィルター



x1000 | 50μm

図 7 クエン酸で水熱処理を行った HAp フィルター

表 1 水熱処理を行った HAp フィルターの示す Et 除去率
(表中の Et 除去率は、以下の式(1)により計算した)

$$\text{Et除去率 [\%]} = \frac{\text{試験液中のEt濃度} - \text{ろ液のEt濃度}}{\text{試験液中のEt濃度}} \times 100 \quad (1)$$

試薬	pH [-]	Et除去率 [%] (Sample数 = 4)
アンモニア水	12	2.0±3.6
エチルアミン	9	9.0±3.5
EDTA	8	-1.8±8.7
酢酸	5	23±4.4
クエン酸	3	-3.0±5.9

表 2 水熱処理を行った粉末状 HAp 報告例と
水熱処理を行った HAp フィルターの比較まとめ

試薬	HAp粉末の 水熱処理形態 (文献より)	溶射したHApの 水熱処理形態 (本研究)
アンモニア水	結晶性の成長	微結晶の析出物
エチルアミン	板状	微結晶/不定形の析出物
EDTA	ウィスカー状	球形の析出物
酢酸	柱状	不定形の析出物
クエン酸	ウィスカー状	変化なし

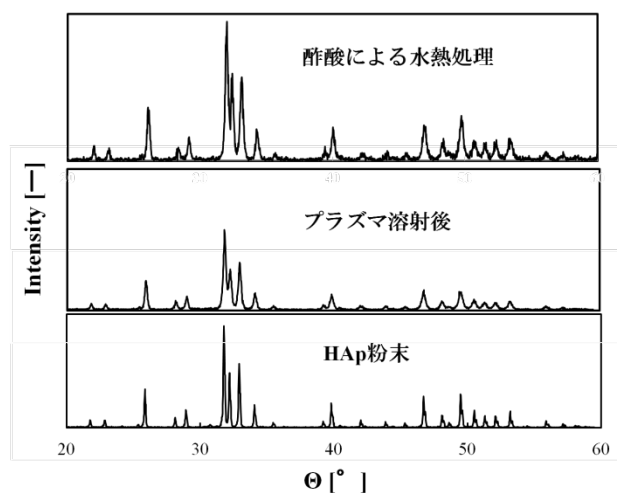


図9 各状態におけるXRDのパターンの変化

4. まとめと今後の展望

水熱処理を行わない HAp フィルターは、プラズマ溶射法により平滑化した表面を持ち Et 除去能を失ったが、酢酸を用いた水熱処理を行うことにより、約 20% の Et 除去能の回復が見られる事が判明した。酢酸による水熱処理は、XRD による観察によれば、結晶系が変化する強い反応では無かったが、フィルター表面の見かけ上の表面積を広げ、Et 除去を促進していた。今後、別の試薬、特に有機物の種類や構造について更に検討を加えて、水熱処理を行いたいと考えている。

参考文献

[1] 中野昌康, 小玉正智, 「エンドトキシン」, p.8-27, 講談社 (1995)
[2] 江口圭, 峰島三千男, 「血漿交換療法」, クリニカルエ

ンジニアリング, Vol.17, pp. 455-464 (2006)

[3] 青木秀希, アパタイト, p.9-12, 医歯薬出版 (1999)
[4] 例えば BIO-RAD 社カタログ”ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー”製品シリーズ, pp.52-61 (2004/05)
[5] 田中孝国, 渡辺勇太, 笠原麻菜美, 澤井亮, 武成祥, ”ハイドロキシアパタイトを用いた新規エンドトキシン除去法の開発”, 日本材料科学会誌, Vol.44, No.5, pp. 27-30 (2007)
[6] 田中孝国, 福井悠太, 渡辺勇太, ”サンドブラスト処理を行ったプラズマ溶射ハイドロキシアパタイトフィルターの特性”, 膜, Vol.34, No.1, pp. 34-37 (2009)
[7] 永田夫久江, 横川善之, ”水熱反応法による水酸アパタイトの形態制御”, 無機マテリアル, Vol.4, pp. 246-250 (1997)
[8] 武成祥, 上野達也, 川村大介, 奥山優, ”後処理によるプラズマ溶射アパタイト被覆材の改質”, 小山工業高等専門学校研究紀要第 30 号, pp.151-156 (1998)
[9] 遠山岳史, 大島敦夫, 安江任, ”非晶質リン酸カルシウムを原料とする水酸アパタイトウイスキーの水熱合成とカルボン酸の効果”, *J. Ceramic Society of Japan*, Vol.109, No.3, pp.232-237 (2001)
[10] 吉成正雄, ”インプラント材料とその表面 その 2 インプラント材としてのアパタイト”, 歯科学報, Vol.103, No.6, pp.481-490 (2003)
[11] 稲垣雅彦, 亀山哲也, ”プラズマバイオマテリアルコーティング”, *J. Plasma Fusion Res.*, Vol.83, No.7, pp.595-600 (2007)