

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11666

研究課題名（和文）原子層堆積処理をした生体移植用材料のin vitroおよびin vivo評価

研究課題名（英文）Evaluation of biomaterials modified by atomic layer deposition in vitro and in vivo

研究代表者

林 達秀（HAYASHI, TATSUhide）

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：70367621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、歯科用インプラント材料として用いられる純チタン試料上に、原子層堆積（ALD）によってジルコニアまたはシリカの超薄膜を成膜し、同試料上における細胞増殖能を評価した。

ジルコニアまたはシリカ超薄膜試料の溶出試験において、ジルコニウムあるいはシリコンとも検出限界値以下であったことから、何れも純チタン表面上に化学的に安定して成膜されていることが分かった。また、細胞増殖試験の結果から、特にジルコニア超薄膜試料は、純チタンあるいはシリカ超薄膜試料よりも骨芽細胞様細胞との親和性が高いことが示唆された。

以上から、原子層堆積は純チタンの新たな表面処理法となり得る可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科において、インプラント材料を中心に様々な表面処理法が考案されている。ALDは半導体工学分野を中心に既に応用されている技術である一方、歯科あるいは医科においてはほぼ未知の分野である。したがって、ALD処理した移植用材料が、優れた骨欠損治癒能力を有することが証明できる。あるいは、ALD処理した歯科用インプラント材料がより高いオッセオインテグレーション能を獲得できることが証明できれば、ALDが新たな生体移植用材料の有効な表面処理法になり得ることを提唱することができ、歯科界のみならず医療界全体への貢献は計り知れないと考える。

研究成果の概要（英文）：Surface modification of pure Ti, which is used as a dental implant material, can enhance the osseointegration potential of the implant. Atomic layer deposition (ALD) was used in this study to form ZrO₂ or SiO₂ ultra-thin film on pure Ti, and the cell proliferation ability on the film was evaluated.

The number of cells on each sample increased over time. Particularly in the ZrO₂ ultra-thin film sample, the number of cells was significantly higher compared to that in pure Ti and SiO₂ ultra-thin film samples on day 7.

It is suggested that the application of ALD to pure Ti could be a new surface processing method in the near future.

研究分野：生体材料

キーワード：生体材料 原子層堆積 超薄膜 純チタン 細胞適合性 オッセオインテグレーション

1. 研究開始当初の背景

現在、医科・歯科において様々の生体移植用材料が臨床応用されている。歯科においては、歯の欠損部に対して純チタンを材料ベースとするインプラント治療が盛んに行われているが、そのインプラント材料は、より高いオッセオインテグレーションが獲得できるよう、純チタン表面に、酸処理、陽極酸化、ハイドロキシアパタイトコーティング、バイオガラスコーティングなど、種々の表面処理法が考案され、臨床応用されている。¹⁾あるいは、100%のオッセオインテグレーションが得られないのは純チタン表面に炭化水素化合物が付着するためであるが、特定波長の紫外線を照射することによって、付着した炭化水素化合物を除去することができ、その後の純チタンは超親水性になるとの報告もある。²⁾

また近年、3次元造形 (Additive Manufacturing; AM) 技術の進歩により、作成した CAD データを元に、選択的レーザー焼結法 (Selective Laser Melting; SLM) や電子ビーム粉末積層造形法 (Electron Beam Melting; EBM) を用いることによって、複雑な形状を有する幾何学的構造体でも比較的簡便に、また、高精度で造形することが可能となってきた。その際に使用される材料は主に、チタン合金、純チタン、コバルトクロム合金などの金属粉末である。³⁾

一方、原子層堆積 (Atomic Layer Deposition; ALD) とは、超薄膜を成膜可能とするナノテクノロジーの一種であり、半導体工学分野で既に応用されている技術である。⁴⁾ 現在 ALD により成膜可能な材料には TiO₂, ZrO₂, Al₂O₃, SiO₂, ZnO などがある。これらの材料を用いて成膜する際には同時に超純水も併用し、さらに 150~400°C の温度下にさらすため使用材料は蒸気化する。よって、低アスペクト比 (幅が広く、浅い) の構造体のみならず、高アスペクト比 (幅が狭く、深い) の構造体にも、成膜が可能となる。さらに、これまでの化学的気相成長 (Chemical Vapor Deposition; CVD) や物理的気相成長 (Physical Vapor Deposition; PVD) といった成膜技術では不得手としていた 100nm 以下の孔径を有する構造体や、ナノワイヤーなどのナノスケールの構造体への成膜も可能である。また、成膜は各サイクルにおける ALD プロセスを正確に 1 原子層として、成膜プロセスを完全に制御することが可能であり、1 サイクルでおおよそ 1Å (0.1nm) ずつ成膜できる。したがって、100Å の膜厚が必要なら 100 サイクル行うことになる。

以上から、ALD が歯科あるいは医科においても有効な表面処理法として応用可能であるかを検討したいと考え、本研究のテーマとした。

2. 研究の目的

歯科において、インプラント材料を中心に様々な表面処理がなされている。ALD は半導体工学分野を中心に工学系では周知されている技術であり、既に様々な用途に応用されている一方、歯科あるいは医科においてはほぼ未知の分野である。即ち、ALD によって成膜した超薄膜に対して、培養細胞がどのような挙動を示すか、あるいは生体がどのような反応を示すかという報告は皆無と言っても過言ではない。したがって、生体移植用材料上に ALD により成膜した超薄膜に対して、また、超薄膜を成膜する際の材料の違いによって、培養細胞がどのような挙動を示すかを検証することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究で使用した純チタン試料は、電子ビーム粉末積層造形 (Electron Beam Melting; EBM) 装置 (Arcam Q10, Arcam AB) によって作製した。ジルコニアまたはシリカの超薄膜の成膜は、EBM で作製した純チタン試料をバレル研磨後、原子層堆積装置 (AT-400, ANRICH TECH.) を用いて行い、成膜後は STEM (JEM-2100, 日本電子株式会社) および EDS (JED-2300T, 日本電子株式会社) 分析によりその状態を観察した。

純チタンおよび、ジルコニアまたはシリカ超薄膜を成膜した試料を 30 ml の超純水中に浸漬し、最長 2 週間 37°C の恒温槽中で保管した。浸漬 1 週間および 2 週間後に誘導結合プラズマ (Inductively Coupled Plasma; ICP) 発光分析装置 (Optima 7300 DV, パーキンエルマージャパン) を用いてジルコニウムまたはシリコンの溶出量の測定を試みた。

また、ALD による成膜処理をした試料上での細胞増殖能の評価は、マウス線維芽細胞 (L929) および、マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いて行った。細胞培養は、エチレンオキソドガス滅菌した各試料を 48 穴プレート上に配置し、細胞数を 1×10^5 cells/ml に調整後、各試料上に 200 μ l ずつ播種し、37°C, 5% CO₂ インキュベータ中で所定の期間培養した。細胞数は、L929 では培養 1, 3, 5 日後、MC3T3-E1 では培養 1, 4, 7 日後に Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 同仁化学研究所) を用い、マイクロプレートリーダーにて 450nm における吸光度を測定し細胞数の指標とした。なお、未成膜の純チタン試料をコントロールとした。

4. 研究成果

(1) 成膜厚の計測および成膜状態の観察

STEM 観察により、ALD によるジルコニアの膜厚は約 76 nm であり、シリカの膜厚は約 65 nm であった。また EDS 分析において、ジルコニア、シリカとも純チタン試料上にほぼ均一に成膜されていることが確認できた (図 1)。

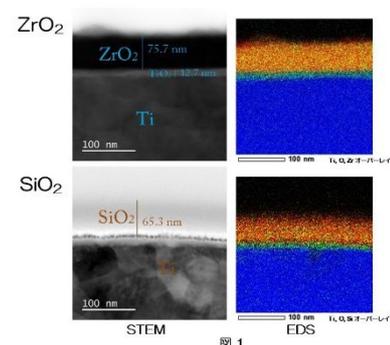


図 1

(2) 各種元素の溶出量の測定

ICP によりジルコニウムまたはシリコンの溶出量を測定した結果、浸漬 1 週間および 2 週間とも検出限界値以下であった。また、何れの試料においてもチタンも検出限界値以下 (Not Detected) であった (図 2)。したがって、ジルコニア、シリカとも純チタン試料上に化学的に安定して成膜されていることが分かった。

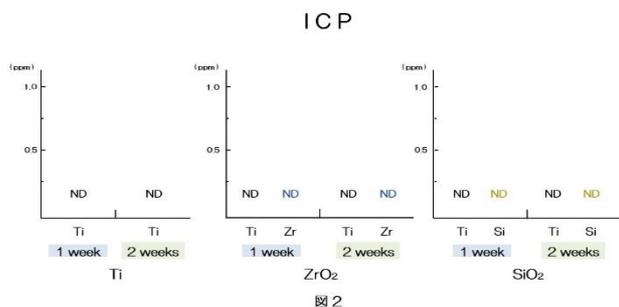


図 2

(3) 細胞増殖試験

各試料上での L929 の細胞数は何れの試料も経時的に増加しており,ジルコニア超薄膜試料,シリカ超薄膜試料ともコントロールと同等かやや高い値を示した.何れの試料上でも良好な細胞形態を示し,培養 5 日目にコンフルエントに達したと思われる。(図 3).

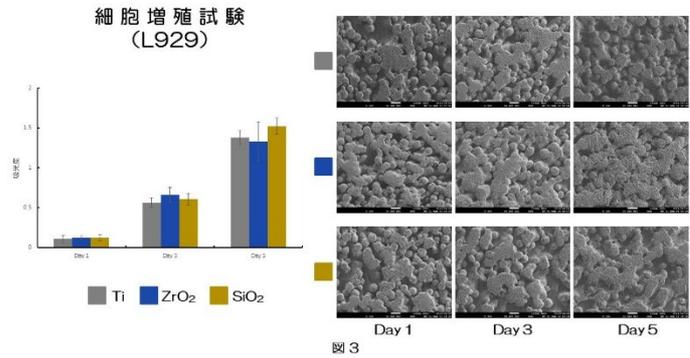


図 3

また, MC3T3-E1 においても L929 と同様に何れも経時的に細胞数は増加しており,特に培養 7 日目のジルコニア超薄膜試料の細胞数はコントロールおよびシリカ超薄膜試料より有意に高い値を示した.ジルコニア超薄膜試料は培養 7 日目にコンフルエントに達したと思われる.また細胞形態は,何れの試料上でも良好な形態を示していた(図 4)

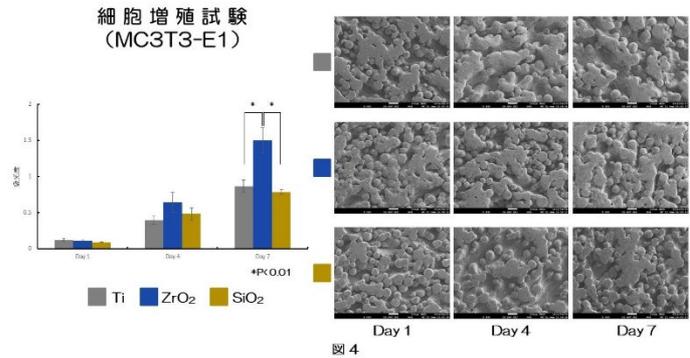


図 4

これらの結果から,ジルコニア超薄膜試料は純チタンあるいはシリカ超薄膜試料よりも特に骨芽細胞様細胞との親和性が高いことが示唆された.

以上から,原子層堆積は純チタンの新たな表面処理法となり得る可能性があると考えられる.

< 引用文献 >

1. Wennerberg A, Bougas K, *et al.* Implant coatings: new modalities for increased osseointegration. *Am J Dent.* 2013 Apr; 26(2): 105-12.
2. Aita H, Hori N, *et al.* The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone. *Biomaterials.* 2009 Feb;30(6):1015-25. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.004. Epub 2008 Nov 29. PMID:19042016
3. Li X, Feng YM, *et al.* Evaluation of biological properties of electron beam melted Ti6Al4V implant with biomimetic coating in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2012; 7(12): e5209. doi: 10.1371/journal.pone.0052049. Epub 2012 Dec 18.
4. Iancu AT, Logar M, Park J, Prinz FB. Atomic layer deposition of undoped TiO₂ exhibiting p-type conductivity. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015 Mar 11;7(9):5134-40. doi: 10.1021/am5072223. Epub 2015 Jan 25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawase M, Hayashi T, Asakura M, Tomino M, Mieki M, and Kawai T	4. 巻 40 (10)
2. 論文標題 Proliferation of fibroblast-like and osteoblast-like cells on pure titanium films manufactured by electron beam melting	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1116-1122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayashi, T., Asakura, M., Kawase, M., Kobayashi, S., Mieki, A., Iwata, J., Uematsu, Y., Kawai, T.	4. 巻 7 (12)
2. 論文標題 Influence of Ca ²⁺ on bone-like tissue induction from immature muscular tissue and its calcification/ossification potential	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biomaterials and Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 1319-1325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1166/jbt.2017.1688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimoto, T., Hayashi, T., Kondo, T., Kittaka, M., Reichenberger, E.J., Ueki, Y.	4. 巻 33 (8)
2. 論文標題 Second-Generation SYK Inhibitor Entospletinib Ameliorates Fully Established Inflammation and Bone Destruction in the Cherubism Mouse Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1513-1519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.3449	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayashi T, Kawase M, Kataoka H, Tomino M, and Kawai T
2. 発表標題 Possibility of bone regeneration of bone-like tissue induced by recombinant human BMPs in vitro
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 達秀, 朝倉正紀, 鯉江 信, 松原正和, 植松康明, 三枝樹明道, 河合達志
2. 発表標題 原子層堆積処理した純チタン上での細胞増殖能の評価
3. 学会等名 日本歯科理工学会 秋期 第74回学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----