

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18572

研究課題名(和文) 歯周組織再生を促進する医用無機イオン徐放型インプラント表面処理材の創製

研究課題名(英文) Preparation of implant surface treatment materials with releasing ability of therapeutic inorganic ions towards promotion of periodontal tissue regeneration

研究代表者

中村 仁(Nakamura, Jin)

名古屋大学・工学研究科・講師

研究者番号：30771513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：液相プロセスを応用して層状構造を持つナノ複合材料微粒子をジルコニア基材の表面に形成した。さらに、その層間に生体微量元素や抗菌性を示す元素、ならびに骨分化を誘引する有機分子を組み入れる手法を確立した。これらの薄膜を形成した基材からは、体液模倣環境下においてコバルトや銀などの無機イオンを徐放可能であった。さらに、基材表面において骨芽細胞の分化促進や抗菌性などの機能が発現することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周組織を再建する人工歯の材料として、ジルコニアセラミックスやチタンが臨床で使用されている。これらの材料は異物反応を示さず歯周組織との馴染みよさに優れる。一方、歯周組織に能動的に働きかけその再生を促す機能や、抗菌性などの機能を持たず、人工歯周囲における歯周炎のリスクを低減可能な材料やその表面処理手法の開拓が喫緊の課題である。本研究課題で得た成果は、従前から使用されてきた人工歯用の材料に骨形成促進や抗菌性などの機能を付与するための新規表面処理法の指針を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Nanocomposite particles with layered crystalline structures were formed on the surface of the zirconia substrate via liquid phase processes. Furthermore, methods for incorporating biological trace elements, antibacterial elements, and organic molecules that induce bone differentiation have been established. These substrates showed the controlled release of therapeutic inorganic ions such as cobalt and silver in an environment that mimics body fluids. Furthermore, the substrates showed biological abilities such as promotion of osteoblast differentiation and antibacterial properties.

研究分野：医用材料化学

キーワード：医用材料 歯科インプラント ジルコニア 表面処理 リン酸ジルコニウム 生体微量元素 抗菌性

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来に伴い歯周疾患を抱える患者数が年々増加しており、歯周組織の再建医療のニーズが急増している。咀嚼機能の保全は、健康寿命の延伸に直結する課題である。歯科用インプラントを用いた歯周組織再建は、喪失した歯を人工歯に置き換えることにより咀嚼機能を直ちに復旧する治療技術である。一方、人工歯の周囲における炎症とゆるみは、人工歯の抜去に至らしめる重篤な合併症である。感染症の主な原因は、人工歯/歯肉の界面における細菌の侵入と、人工歯表面でのバイオフィルムの形成であり、高齢で免疫力が低下した患者に生じやすい。人工歯根用の材料として、耐摩耗性に優れ、審美性と骨組織親和性に優れるためジルコニアが用いられている。しかし、人工歯周囲における歯周炎を完全に予防するための満足なジルコニアの表面処理の指針は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体内微量元素の効果に着目し、これらを徐放することで生体機能を発現するジルコニア用表面処理材を創製することを目的とした。

表1に示すように、生体内に存在する微量な無機元素は生命活動の維持に重要な役割を担い、適切な濃度域であれば、生理学的活性を高める機能を持つ。これらの無機元素を担持でき、体液環境下でこれらを徐放する材料が得られれば、感染症の抑制や骨組織再生の促進などの生体機能を発現するためのジルコニアの表面処理材の候補になり得る。

このような表面処理材の骨格として、層状リン酸ジルコニウム (LZP) に注目した。この種の化合物は、リン酸四面体とジルコニウムからなるシートが積層した構造を有し、イオン交換反応に基づき無機イオンを層間に導入できる。さらに、リン酸エステルやホスホン酸による有機修飾が可能であり、生体機能の発現に向けた構造制御を行う上で利点となる。LZP に骨形成促進機能を持つ有機分子や抗菌性を示す無機イオンを導入することで、これらの機能を併せ持つ材料が得られると期待される。本研究では、LZP に有機修飾を施し生体微量元素の無機イオンを導入する手法を検討し、体液模倣環境下においてこれらの元素を徐放する材料の創製を試みた。骨分化を誘引するリン酸エステル分子と抗菌性を示す銀イオンをLZPに組み込み、材料に対する細胞と大腸菌の応答を *in vitro* で評価した。さらに、液相レーザープロセスを応用し、ジルコニアの基材表面へのリン酸ジルコニウム (ZP) 粒子の形成を試みた。

表1 生体微量元素と生理作用

	無機元素	生理作用
生体微量元素	ケイ素 (Si)	骨代謝、結合組織形成
	亜鉛 (Zn)	インシュリン産生ほか
	鉄 (Fe)	造血作用
	マンガン (Mn)	骨形成、酵素作用
	銅 (Cu)	造血作用、酵素作用
	コバルト (Co)	欠乏による悪性貧血
	ヨウ素 (I)	甲状腺ホルモン産生ほか
	モリブデン (Mo)	酵素作用
	ニッケル (Ni)	鉄の代謝
	セレン (Se)	脂質過酸化物質代謝
	クロム (Cr)	糖、脂質代謝
	バナジウム (V)	生殖、酵素活性
	ストロンチウム (Sr)	骨吸収抑制
	銀 (Ag)	抗菌作用

### 3. 研究の方法

#### ①有機修飾された LZP の合成

リン酸とオキシ塩化ジルコニウム八水和物を混合し水熱処理 (200°C, 48 h) した。得られた試料を遠心分離し水で洗浄したのち、40 °C で乾燥させ LZP を得た。有機修飾された LZP の合成は、出発原料に有機修飾ホスホン酸を添加する手法、および LZP をリン酸エステル中で還流する手法の2通りで試みた。フェニルホスホン酸とリン酸の混合物 (モル比 1:1) にオキシ塩化ジルコニウム八水和物を加え、100 °C で 24 h 還流した。得られた試料を遠心分離し洗浄、乾燥させ粉末状の試料 (LZPh) を得た。さらに、上述の水熱処理で合成した LZP をβ-グリセロリン酸 (β-GP) を含む水溶液に懸濁し、還流処理 (70°C, 48 h) した。得られた試料を遠心分離し洗浄、乾燥させ試料 (LZPG) を得た。LZP, LZPh および LZPG をフーリエ変換型赤外分光分析 (FT-IR)、粉末 X 線回折 (XRD) および熱重量分析 (TG) で調べた。

#### ②有機修飾 LZP への無機イオンの導入

LZPh を水酸化テトラブチルアンモニウム溶液 (TBA 溶液) に加え、2 d 静置した。このとき、TBA 溶液の濃度による層状骨格の剥離の程度を調べるために LZPh と TBA のモル比を 1:0.7 および 1:1.4 の2種類とした。塩化コバルト (II) 六水和物を所定濃度で溶解したアセトニトリル溶液 (Co 溶液)、塩化カルシウムを所定濃度で溶解した水溶液 (Ca 溶液)、または、それらの濃度に対応するように塩化コバルト (II) 六水和物と塩化カルシウムの両者を溶解した水溶液 (Co+Ca 溶液) を調製した。これらの溶液に TBA 溶液浸漬後の LZPh を浸漬し、室温で 1 d 振とうした。

### ③液相レーザープロセスによるジルコニア表面でのリン酸ジルコニウム (ZP) 粒子の形成

イットリア安定化ジルコニア粉末 ( $Y_2O_3$ : 3 mol%) 0.8 g を 200 MPa で冷間等方圧加圧しペレット状の成形体を得た。これを電気炉にて焼成 (昇温速度:  $5^\circ C \cdot min^{-1}$ ,  $1400^\circ C$ , 1 h) し、焼結体を得た。耐水研磨紙 (#400 ~ #4000) で研磨した焼結体をリン酸、過酸化水素および硝酸銀の混合溶液に浸漬し、炭酸ガスレーザーを表面全体に照射した。レーザー照射後の試料を超純水中で超音波洗浄し、 $40^\circ C$  で 1 d 乾燥させた。得られた試料を X 線回折 (XRD)、電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM)、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX)、および誘導結合プラズマ発光分光分析 (ICP-AES) で調べ、フィルム密着法による抗菌性試験および骨芽細胞培養試験を行った。

## 4. 研究成果

### ①有機修飾リン酸ジルコニウムへの生体微量元素の導入と in Vitro 評価

LZP を体液などの無機イオンに富む水溶液中に浸漬した際、イオン交換反応に伴い層間の膨潤と剥離が生じる。LZP に無機イオン徐放機能をもつ表面処理材の骨格に応用する上で、層間剥離の抑止に向けた化学耐久性の向上が必要となる。LZP の層間にはリン酸基が豊富に存在し、これらがイオン交換サイトの役割を果たす。本研究では、リン酸基の一部を非極性有機官能基で修飾することでイオン交換反応が制御され、層間の剥離が抑止されると仮定し、フェニルホスホン酸で修飾された LZP の合成を試みた。作製した試料 (LZPh) の FT-IR スペクトルからリン酸グループおよびフェニル基のピークが検出され、XRD パターンでは、フェニル基で修飾した層状ホスホン酸ジルコニウム (ICDD 44-2000) に帰属されるピークが検出された。LZP の XRD パターンからは  $\alpha$ -リン酸ジルコニウム ( $\alpha$ -ZrP) の単相に由来する回折ピークが検出された。これらのパターンから算出した層間距離は、LZP に比べて LZPh が 0.8 nm ほど大きく、対向した 2 つのフェニル基の分子サイズに合致していた。LZPh の TG 曲線からは  $200^\circ C$  以上の温度域で重量減少が見られ、フェニル基の分解、燃焼がこの温度域以上で次第に進行することがわかった。この重量減少から見積もったフェニル基の含有率より、LZPh は LZP 中の  $PO_4$  グループの約 40 mol% がフェニル修飾された構造を持つことが分かった。

$\beta$ -GP は骨芽細胞による骨分化を誘引する機能をもつリン酸エステルである。LZP に  $\beta$ -GP を組み込んだ材料は、骨形成誘引機能をもつ表面処理材の候補となり得るため、LZP の還流による  $\beta$ -GP の担持を試みた。還流後の試料 (LZPG) の XRD パターンでは LZP と同様に  $\alpha$ -ZrP の層状骨格に由来するピークが検出されたが、いずれもブロードとなっていた。さらに、LZPG の層間距離は LZP に比べて拡大していた。LZPG の FT-IR スペクトルでは、リン酸グループと  $\beta$ -GP 由来のピークが検出された。さらに、CHN 分析から求めた  $\beta$ -GP の含有率から、LZPG では LZP 中の  $PO_4$  グループの約 15 mol% が  $\beta$ -GP 由来のリン酸エステルで置換された構造を持つことが分かった。以上の結果より、出発原料中にホスホン酸を添加する手法および LZP をリン酸エステル含有水溶液中で還流する手法のいずれにおいても、有機修飾された層状リン酸ジルコニウムを合成可能であることを突き止めた。

### ②有機修飾 LZP への無機イオンの導入

LZPh への無機イオンの導入手法については明確な指針が確立されていない。本研究では、LZPh の層間よりも大きな分子サイズのカチオン性有機分子であるテトラブチルアンモニウムカチオン (TBA) を用いて層間距離を拡大し、それらに無機イオンを含む水溶液中に浸漬する手法により、生体微量元素のコバルト (Co) およびカルシウム (Ca) を同時に導入することを試みた。さらに、それら元素を導入した層状化合物からのイオンの徐放挙動について、擬似体液を用いた in vitro 実験で調べた。TBA を含む溶液に浸した LZPh では、浸漬前に比べて層間距離が拡大し、TBA 分子が層間に挿入されたことが分かった。この試料を Co, Ca およびその両元素を含む水溶液で処理した試料 (LZPh-Co, LZPh-Ca および LZPh-CoCa) の層間距離は、LZPh とほぼ同じ層間距離であった。CHN 分析により無機イオン含有水溶液に浸漬前後の試料に含まれる TBA の量を調べた結果、LZPh の無機イオン溶液への浸漬によって、導入された Co, Ca の物質質量に対して 1.6 倍以上の TBA が失われていた。約 2 倍の物質質量の TBA が失われたことから、LZPh-xT への Co と Ca の導入は、層間の TBA と電荷バランスを保ちながらイオン交換されて進行したと考えられた。ヒト体液の無機イオン濃度を模倣した擬似体液中に LZPh-CoCa を浸漬した際、24 h までに急激な Co 元素濃度の上昇が見られ、それ以降で緩やかに 3 週間にわたって濃度の上昇が認められた。LZPh-Co を浸漬した SBF においても Co の濃度上昇は同じ傾向を示した。これらの結果から、LZPh に導入された Co は試料から初期放出が起こった後にも、持続的に放出されたことが分かった。

### ③液相レーザープロセスを応用したジルコニアの表面処理手法の開拓

リン酸を含む水溶液中に浸したジルコニア基材の表面を炭酸ガスレーザーで走査する手法により、基材表面でのリン酸ジルコニウム微粒子の形成を試みた。それらの結果、リン酸、オキシ塩化ジルコニウム、過酸化水素と銀イオンを含む親水性溶媒中でのレーザー走査により銀含有 NASICON 型結晶の微粒子で被覆されたジルコニア基材が得られることを明らかにした。さらに出発原料中の硝酸銀の仕込み濃度が高くなるほど、銀の担持量が增大することが明らかになった。抗菌性試験の結果、銀を含有した試料であれば、大腸菌の繁殖は確認されなかった。一方骨芽細胞増殖性評価によれば、硝酸銀を少量に制御することで播種後 7 日目まで細胞が増殖した。これらの結果より、液相レーザープロセスによりジルコニア上に銀含有リン酸ジルコニウム粒子が形成し、細胞の増殖を妨げずに抗菌性を発現する材料が得られることを示した。

## 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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Jin, Ito Ryoya, Kozaki Ryohei, Sugawara-Narutaki Ayae, Ohtsuki Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Organic modification of layered zirconium phosphate/phosphonate for controlled release of therapeutic inorganic ions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 1000 ~ 1012
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14686996.2021.1993728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Jin, Endo Kanta, Sugawara-Narutaki Ayae, Ohtsuki Chikara	4. 巻 10
2. 論文標題 Human stem cell response to layered zirconium phosphate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 36051 ~ 36057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0RA04924G	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 Nakamura Jin, Suzuki Yuna, Narukawa Ryosuke, Sugawara-Narutaki Ayae, Ohtsuki Chikara	4. 巻 9
2. 論文標題 Preparation of layered calcium silicate organically modified with two types of functional groups for varying chemical stability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Asian Ceramic Societies	6. 最初と最後の頁 113 ~ 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21870764.2020.1854925	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17件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村 仁
2. 発表標題 ケイ酸塩・リン酸塩セラミックス複合材料への細胞応答
3. 学会等名 第16回循環高分子会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 仁、長尾 昇一郎、大槻 主税
2. 発表標題 液相レーザープロセスによるジルコニア上での銀含有リン酸ジルコニウム粒子の形成
3. 学会等名 第40回整形外科バイオマテリアル研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小崎 稜平、中村 仁、大槻 主税
2. 発表標題 フェニル基で修飾された層状リン酸ジルコニウムへのアルキルアミンのインターカレーション 3 .
3. 学会等名 43回日本バイオマテリアル学会大会・第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚 陸渡、中村 仁、大槻 主税
2. 発表標題 ソルボサーマル法により合成した層状リン酸ジルコニウムへの幹細胞の分化を促進する薬剤の導入と in vitro 評価
3. 学会等名 43回日本バイオマテリアル学会大会・第8回アジアバイオマテリアル学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小崎 稜平、中村 仁、大槻 主税
2. 発表標題 フェニル修飾層状リン酸ジルコニウムへのアルキルアミンのインターカレーション挙動
3. 学会等名 2021年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 仁、遠藤 寛太、大槻 主税
2. 発表標題 銀イオン含有層状リン酸チタンの抗菌性および骨芽細胞増殖性評価
3. 学会等名 第52回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 廉弥、中村 仁、大槻主税
2. 発表標題 フェニル修飾リン酸ジルコニウムに担持した医用無機イオンの徐放挙動
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 仁、長尾 昇一郎、大槻 主税
2. 発表標題 リン酸含有水溶液を用いた液相レーザープロセスによるジルコニアの表面改質
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚 陸渡、遠藤 寛太、中村 仁、鳴瀧 彩絵、大槻 主税
2. 発表標題 骨芽細胞への分化を促進する因子を導入した層状リン酸ジルコニウムのin vitro評価
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村仁、遠藤寛太、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 銀含有層状リン酸チタン表面での細胞および細菌応答
3. 学会等名 日本セラミックス協会2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小崎稜平、中村 仁、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 フェニル基修飾量が異なる層状リン酸ジルコニウムへの 第四級アンモニウムカチオンの担持
3. 学会等名 日本セラミックス協会2021年年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口廉弥、中村 仁、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 コバルトイオンを含有するフェニル修飾リン酸ジルコニウムからの無機イオン徐放挙動の評価
3. 学会等名 日本材料学会東海支部第15回学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長尾昇一郎、中村 仁、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 液相レーザープロセスによるジルコニア焼結体表面でのリン酸ジルコニウムの形成
3. 学会等名 2020年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村 仁、遠藤寛太、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 銀イオン導入層状リン酸化合物で被覆されたチタン基材の抗菌性評価
3. 学会等名 2020年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小崎稜平、中村 仁、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 フェニル修飾層状リン酸ジルコニウムへの多様な鎖長を持つアルキルアンモニウムカチオンの担持
3. 学会等名 2020年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小崎稜平、伊藤諒也、中村 仁、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 フェニル修飾層状リン酸ジルコニウムへのアルキルアンモニウムカチオンの担持
3. 学会等名 公益社団法人日本セラミックス協会第33回秋季シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長尾昇一郎、中村 仁、鳴瀧彩絵、大槻主税
2. 発表標題 炭酸ガスレーザーを用いたジルコニア焼結体表面でのリン酸ジルコニウムの形成
3. 学会等名 日本セラミックス協会第33回秋季シンポジウム
4. 発表年 2020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
研究協力者	伊藤 諒也 (Ito Ryoya)		
研究協力者	遠藤 寛太 (Endo Kanta)		
研究協力者	小崎 稜平 (Kozaki Ryohei)		
研究協力者	大塚 陸渡 (Otsuka Rikuto)		
研究協力者	長尾 昇一郎 (Nagao Shoichiro)		
研究協力者	山口 廉弥 (Yamaguchi Renya)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------