

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592895

研究課題名(和文) DLC膜コーティングと化学修飾を併用したチタン製口腔インプラントの表面機能化

研究課題名(英文) Biofunctionalization of titanium oral implant by DLC coating and chemical modifications.

研究代表者

遠藤 一彦 (ENDO, Kazuhiko)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70168821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：純チタンの表面にDLC膜を形成し、さらにその表面に生体機能性分子を固定化することによって、耐久性と機能性に優れた口腔インプラントを開発することを目的とした。PBIID法を用いて3 μmの厚さにコーティングしたDLC膜によって、酸性フッ化物溶液中および疑似体液中における純チタンの耐食性を著しく向上させ、腐食による表面荒れを防止できることが分かった。また、DLC膜の表面を細胞接着性タンパク質や抗菌タンパク質でコーティングすることによって、細胞適合性に優れ、かつ抗菌性を有するインプラント用材料が開発できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study was aimed to develop a novel titanium implant with high durability and biofunctionality by coating DLC film together with chemical surface modifications. The corrosion resistance of the titanium in acidic fluoride solution was significantly improved by coated DLC film using the PBIID method, suggesting that the DLC coatings prevent surface roughness due to corrosion. It was also suggested that chemical modifications of the DLC coated titanium with cell adhesive proteins or antibacterial molecule was effective in producing the oral titanium implant with improved biofunctionalities such as high cytocompatible and antibacterial properties.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：口腔インプラント DLCコーティング 化学修飾 耐食性 細胞適合性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔インプラント治療は、骨埋入部(フクスチャー)と粘膜貫通部(アバットメント)にチタン系の材料が使用されるようになってから、欠損補綴における有用な治療オプションとして認識されるに至っている。しかし、インプラントの周囲組織を早期に再生するといった観点から、フクスチャーやアバットメントの表面には、より高い生体親和性が求められている。また、現在の口腔インプラント治療においては、インプラント周囲炎の予防が最も重要な課題であることから、アバットメントの表面には、腐食や磨耗による荒れやそれとともなうプラークの形成を防止とするために、高い耐食性と耐摩耗性を有することが求められている。

(2) 口腔インプラントの骨埋入部や粘膜貫通部には純チタンおよびチタン合金が用いられているが、コバルトクロム合金やステンレス鋼と比較して耐摩耗性が低いことが知られている。また、チタンは塩化物環境下では不動態が安定で高い耐食性を示すが、口腔内で使用されている歯磨剤や洗口剤に含まれているフッ化物により激しく腐食することが報告されている。チタンの耐食性と耐摩耗性を向上させる硬質な薄膜であり、かつ生体親和性を有するコーティング膜の候補としては、ダイヤモンドライクカーボン膜(DLC膜)がある。DLC膜は高硬度や化学的安定性などダイヤモンドと似た特性を有する水素を含むアモルファスなカーボン膜であり、高硬度による優れた耐摩耗性および高い耐食性と低い摩擦係数などの特性は、口腔インプラントに使用されているチタン系材料のコーティング膜として有用と考えられる。

(3) 筆者らは、チタン表面に生体機能性分子を化学修飾することによって、細胞の付着、伸展、増殖といった細胞の基本行動を制御する手法を最初に報告し、金属系バイオマテリアルの表面の生体機能化に道を開いてきた(K. Endo: Chemical modification of metallic implant surfaces with biofunctional proteins, Dent. Mater. J., 14, 185-198, 1995)。DLC膜をコーティングしたチタンの表面をさらに生体機能性分子で化学修飾することによって、生体機能性を有する口腔インプラントの開発が可能と考えられる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、純チタンの表面にDLC膜を形成し、さらにその表面に生体機能性分子を固定化することによって、耐久性と機能性に優れた口腔インプラントの粘膜貫通部と骨埋入部を開発することを目的とした。

具体的には、マグネトロンスパッタリング装置を用いて厚さ約 $3\mu\text{m}$ のDLC膜を形成

した純Tiに関して、レーザーラマン分光法および走査プローブ顕微鏡を用いたDLC薄膜のキャラクタリゼーション、ナノインデンテーション法を用いたDLC膜の機械的特性の評価、電気化学的手法やICP発光分光分析法を用いた耐食性の評価を行う。さらに、DLC膜の表面に生体機能性分子を化学修飾する手法を検討し、In vitroで細胞の動態や分化を促進する手法ならびに抗菌性を付与する手法を確立する。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料

試料には純チタン(JIS第2種)を用いた。試料の表面は、耐水研磨紙(#240-#1,000)で研磨した後、コロイダルシリカと過酸化水素の混合液を用いたバフ研磨を行って鏡面に仕上げた。蒸留水中で超音波洗浄し、オイルを含まない圧搾空気を吹き付けて乾燥させた後、シリカゲルを入れたデシケータ内に保存した。DLC膜は、プラズマイオン注入・成膜法(PBIID法)を用いて成膜した。反応ガスには、メタン、アセチレンおよびトルエンの混合ガスを用い、真空度 $0.7\text{ Pa}$ 、プラズマ生成高周波出力 $300\text{ W}$ 、高電圧パルス印加電圧 $10\text{ kV}$ の条件下で、約 $3\mu\text{m}$ のDLC膜を形成した。

### (2) DLC膜の構造と機械的特性の評価

純チタン上に形成したDLC膜の構造は、レーザーラマン分光装置(NR-1800; 日本分光)を用いて、励起波長 $532\text{ nm}$ 、波数範囲 $1150\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ においてラマンスペクトルを測定して調べた。得られたスペクトルをGピーク( $\text{sp}^2$ )とDピーク( $\text{sp}^3$ )に波形分離し、両ピークの積分強度比を算出した。DLC膜の硬さと弾性係数は、ナノインデンテーション装置(ENT-1100a; エリオニクス)を用いて測定した。ダイヤモンドの三角錐圧子を $5\text{ mN}$ の荷重になるまで押し込み、荷重負荷・除荷曲線から硬さと弾性係数を求めた。

### (3) 耐食性の評価

研磨したチタンおよびDLC膜でコーティングしたチタン試料の耐食性を評価するために浸漬試験を行った。腐食液には、チタンに対する腐食性が高いNaFを $1\text{ g/l}$ 含む $0.9\% \text{ NaCl}$ 溶液( $\text{pH } 4.0$ )および $0.1\text{ M}$ 塩化ナトリウム・ $0.1\text{ M}$ 乳酸混合溶液( $\text{pH } 2.3$ )を用いた。超高純度アルゴンガスで脱気した腐食液中で純チタンおよびDLCコーティングした純チタン試料の分極曲線を測定した。参照電極には銀/塩化銀電極を用い、電位の走査速度は $10\text{ mV/min}$ とした。また、試料を37の腐食液に12時間浸漬し、エレクトロメータ(HZ-3000; 北斗電工)を用いて腐食電位を測定した。溶出したチタンイオンはICP-AES(Optima 5300 DV; Perkin-Elmer)を用いて定量した。浸漬前後

の試料表面は、走査プローブ顕微鏡 (SPM-9500; 島津製作所) を用いて調べた。

#### (4) 試料表面のぬれ性と細胞動態の評価

DLC 膜をコーティング試料の表面を親水性化するために酸素プラズマ処理し、さらにタイプ1コラーゲンで処理した試料のぬれ性と細胞親和性を評価した。酸素プラズマ処理は、酸素圧 30Pa、試料電流 20mA の条件下で 90 秒間行った。ぬれ性は、試料上に 10  $\mu$ l の蒸留水を液下し、10 秒後に接触角を測定することによって評価した。細胞の付着・増殖は、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞を 24 穴プレートに設置した各試料上に  $5 \times 10^5$  cells/well の細胞濃度で播種した。37°C で 72 時間培養後、付着していない細胞は PBS を用いて洗浄し除去した。付着した細胞は、0.05%トリプシン (Invitrogen) を 5 分間作用させ剥離した。得られた細胞懸濁液からトリプシンを遠心分離にて除去し、新しい培養液に細胞を懸濁した。懸濁液中の細胞数は、血球計算盤を用いて計測した。

#### (5) 細菌の付着挙動の評価

PBS にて  $1 \times 10^9$  cfu/ml に調整した菌液にて 2 時間培養した試料を洗浄後、0.1%クリスタルバイオレットにて試料表面に付着している菌を染色した。洗浄後、99.5%エタノールにて脱色し、脱色液の 595 nm における吸光度を測定した。細菌には、プラークの形成に参与している *Streptococcus gordonii* を用いた。また、母乳や牛乳に含まれている抗菌性タンパク質 (ラクトフェリン) の細菌の初期付着に及ぼす影響についても調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) DLC 膜の構造と機械的特性

ラマンスペクトルには、グラファイト構造 ( $sp^2$ ) に由来する G ピークとダイヤモンド構造 ( $sp^3$ ) に由来する D ピークが明瞭に認められ、それらの強度はほぼ同じであった (図 1)。また、図 2 に示すナノインデンテーション法で求めた荷重-変位曲線から求めた硬さは、純チタン試料で約 2.5GPa であったのに対して、DLC 膜をコーティングした試料では約 17GPa と大きな値を示した。

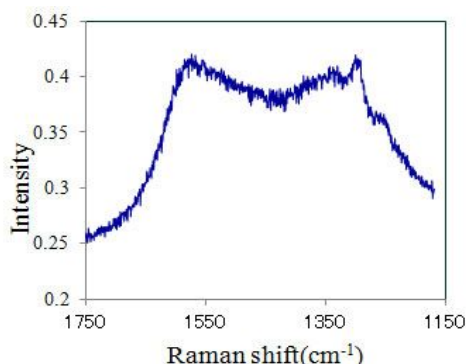


図 1 DLC 膜をコーティングした純チタン試料で得られたラマンスペクトル

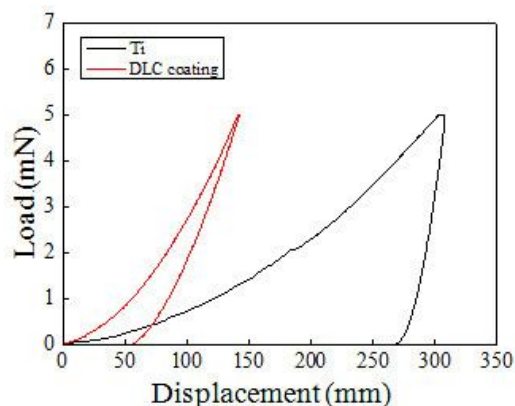


図 2 純チタンと DLC コーティングした純チタン試料で得られた荷重-変位曲線 (荷重 5mN)

#### (2) 耐食性の評価

図 3 に研磨した純チタンと DLC 膜をコーティングした純チタン試料の酸性フッ化物溶液中 (pH4.0) における腐食電位の時間変化を示す。研磨した Ti は、腐食電位が浸漬直後に -1.1 V まで急激に低下し、活性に腐食した。酸性フッ化物溶液中では、純チタンの不動態皮膜は、次式に示す反応を起こして溶解したものと考えられる。



一方、DLC 膜を形成した Ti では、腐食電位は時間の経過とともにわずかに低下するが、浸漬 12 時間後まで -0.2 V の値を維持した。

腐食液に 12 時間自然浸漬後に定量されたチタンイオン量は、研磨した純チタン試料で  $235.8 \text{ ng/cm}^2$  であったのに対して、DLC 膜でコーティングした試料では  $0.2 \text{ ng/cm}^2$  であり、純チタン試料と比較して約 1/1000 となることが明らかとなった。酸性フッ化物溶液に 12 時間浸漬前後の試料表面を SPM で観察したところ、研磨した純チタン試料では腐食によって表面が荒れ、表面粗さの値 ( $R_a$ ) は浸漬前の  $2.2 \pm 0.1 \text{ nm}$  から  $48.3 \pm 7.3 \text{ nm}$  に増大することが分かった。一方、DLC 膜でコーティングした試料では、浸漬後も  $5.8 \pm 0.1$  であり、腐食による表面粗さの変化はごくわずかであった。

図 4 に酸性フッ化物溶液中で得られた分極曲線を示す。-0.4 V から 1.5 V の電位域における DLC 膜でコーティングした試料の電流密度は、研磨した純チタン試料と比較して約 1/1000 であることが分かった。

これらの結果から、純チタンの酸性フッ化物溶液中における耐食性は、DLC 膜をコーティングすることによって著しく向上することが分かった。したがって、純 Ti 製アバットメントの表面に DLC 膜をコーティングすることによって、フッ化物含有歯磨剤や洗口液による腐食にともなう表面荒れを防止し、プラークの形成に参与する細菌の付着量を低減できる可能性が示唆された。

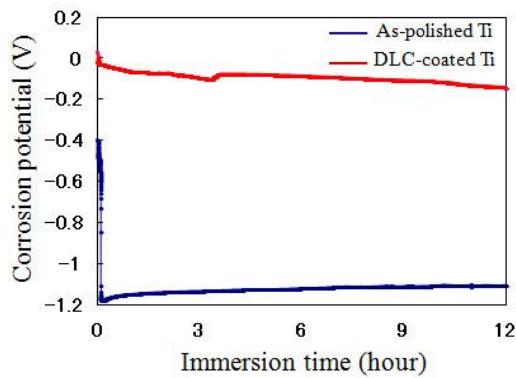


図3 酸性フッ化物溶液中における腐食電位の時間変化

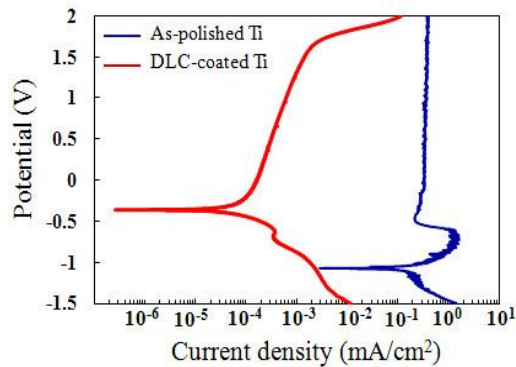


図4 酸性フッ化物溶液中における分極曲線

### (3) 表面のぬれ性と細胞親和性の評価

骨芽細胞様細胞 MT3T3-E1 を 72 時間培養後、各試料の表面に存在していた細胞数を図 5 に示す。鏡面に研磨した試料 (Ra 2.2 nm) とサンドブラスト処理した試料 (Ra 366.2 nm) における細胞数と比較すると、DLC 膜をコーティング試料では細胞数が約 60%に減少していた。この理由は、表面粗さが異なる 2 種類の純チタン試料における蒸留水の接触角は、30°前後であるのに対して、DLC 膜でコーティングした試料では 50 - 60°であり、疎水性化しているため、細胞の初期付着数が少なかったものと考えられる。酸素プラズマ処理した DLC 膜コーティング試料 (Ra 2.2 nm) では、接触角は 5°以下となり超親水性を示すが、細胞数は増加しなかった。しかし、酸素プラズマ処理後にタイプ 1 コラーゲンを化学修飾した DLC コーティング試料では、細胞数は鏡面に研磨した純チタン試料と同等となることが分かった。

以上の結果から、DLC 膜のコーティングによって細胞親和性は低下するが、化学修飾法を適用することによって、この問題を解決できる可能性が示唆された。

### (4) DLC 膜コーティング純チタン試料への抗菌性の付与

0.1%クリスタルバイオレットにて試料表面に付着している菌を染色した後、99.5%エタノールにて脱色した液の 595 nm における吸光度を図 6 に示す。研磨した純チタン試料と比較して、DLC 膜をコーティングした試料

では付着細菌数が約 2 倍となっていることが分かった。この原因は明らかではないが、DLC 膜が疎水性を示すことが関係している可能性がある。しかし、DLC 膜コーティング試料に抗菌性タンパク質であるラクトフェリンを吸着させたところ、初期付着細菌数は減少し、その数は研磨した純チタンと同等となることが明らかとなった。口腔インプラントの粘膜貫通部では、DLC 膜のコーティングによって付着する細菌数は増加する可能性があるが、定期的に生体に安全な抗菌タンパク質を表面に吸着させることによって、細菌付着数の低減化やプラーク形成の抑制を実現できる可能性がある。今後、さらに DLC 膜の表面に高い抗菌性を付与する手法を検討する必要がある。

### (5) インプラントを固定源とした歯列矯正法への DLC 膜コーティング法の適用

インプラント体のみならず、矯正用のブラケットの表面を DLC 膜でコーティングすることによって、歯の移動時に生じるワイヤーとの静止摩擦力ならびに動摩擦力を低減できることが分かった。したがって、PBIID 法を用いた DLC 膜コーティングを矯正装置に施すことによって、インプラント体を固定源とした矯正治療における歯の移動を効率的に行えることが明らかとなった。

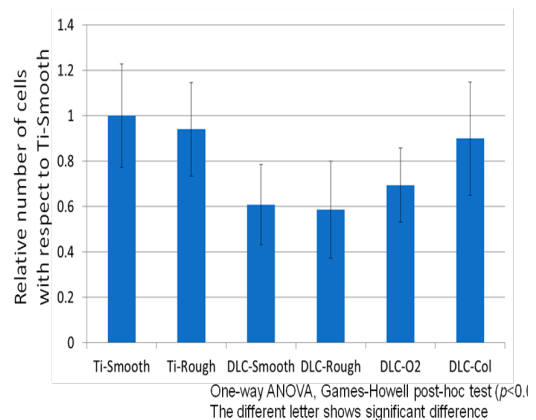


図5 研磨した純チタン試料に対する各試料上の相対細胞数

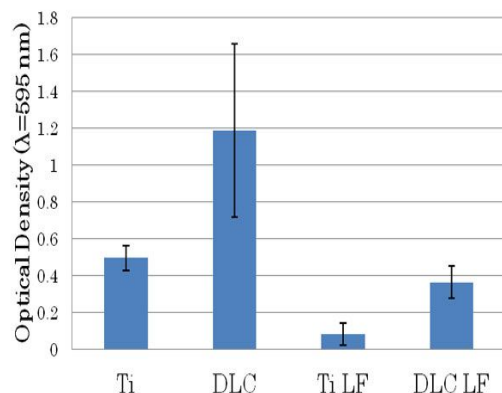


図6 各試料に付着した細菌数 (LF: 抗菌性タンパク質、ラクトフェリン)

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) T. Muguruma, M. Iijima, W. A. Brantley, S. Nakagaki, K. Endo, I. Mizoguchi, Frictional and mechanical properties of diamond-like carbon-coated orthodontic brackets, Eur. J. Orthod, 査読有り, 35, 2013, 216-222.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) A. B. Dithi, H. Toshima, Y. Ida, F. Nagano-Takebe, K. Endo, Evaluation of MC3T3-E1 responses to DLC-coated titanium, 32th Annual Meeting of Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido, March, 1, 2014, Sapporo, Japan.

- (2) 遠藤一彦, 飯嶋雅弘, 井田有亮, 橋本正則, 長野二三, 戸島洋和, 溝口 到, DLC膜をコーティングした純チタンの疑似体液中における腐食挙動, 第 60 回日本歯科理工学会学術講演会, 平成 24 年 10 月 13 ~ 14 日, 九州大学医学部 百年講堂, 福岡市.

- (3) K. Endo, M. Iijima, M. Hashimoto, F. Nagano, Y. Ida, H. Toshima, I. Mizoguchi, Corrosion resistance of diamond-like carbon-coated titanium in fluoride solutions, International Association of Dental Research (IADR), July 19-29, 2012, Convention Center (Iguassu fall, Brasil).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 一彦 (ENDO Kazuhiko)  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号: 70168821