

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592897

研究課題名(和文) 歯根膜付きチタンインプラントの実現を目指したチタン表面へのECMの固定研究

研究課題名(英文) The study of ECM fixation for Ti implant with an artificial periodontal membrane

研究代表者

齋藤 設雄 (Saitoh, Setsuo)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：70137537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：チタン表面にタンパク質を固定することを想定し、蒸着時間を変えて金蒸着したチタン板をカルボキシル基を有するアルカンチオール溶液に浸漬する方法について検討した。その結果、蒸着時間の増加とともに金被覆率が増加し、アルカンチオール浸漬後は、S%と金被覆率との間に高度な正の相関が見られた。また、S 2p, C 1s, O 1sスペクトルからAu-S, COO-, OH-由来のピークが検出された。FTIRスペクトルから、脂肪族カルボン酸に帰属するピークが検出され、カルボキシル基を末端にもつアルカンチオールと確認された。以上の結果から、金蒸着はアルカンチオール処理の上で有効な処理であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A new method to enhance the biofunctionalization of Ti materials was developed by the immersion of Au-sputtered titanium plates into a solution of alkanethiol with a carboxy group end (HS-C11-COOH). X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis showed that the gold content increased with the Au sputtering time. The content of the characteristic alkanethiol elements (S, C, and O) in the immersed Ti specimens increased with the Au sputtering time, which indicates that the binding of alkanethiol molecules is enhanced by the Au modification on the Ti surface. Qualitative analysis of XPS (Au-S, COO-, and OH-species) and FTIR (peaks assignable to an aliphatic carboxylic acid) spectra for the sample after immersion also supported this. A strong positive correlation between the S and Au content confirms that Au sputtering is an effective method to control the alkanethiol treatment of Ti substrates.

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：チタンインプラント 歯根膜 表面処理 金蒸着 アルカンチオール

### 1. 研究開始当初の背景

インプラント歯科治療は広く普及しているが、一部の患者においては失敗例も報告されており、今だ治療法として完成しているわけではない。インプラントと天然歯とで明らかに異なるのは、天然歯には歯根膜が有り、インプラントには歯根膜が無いということである。歯根膜は歯に応力が作用した際の応力緩衝能、負荷圧検知のほか、歯肉上皮との付着構造により、外からの感染防止の役割も担っている。この点から、歯根膜付きチタンインプラントの開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

歯根膜付きチタンインプラントの創成を目的に、下記の3項目にねらいを絞って実験を遂行する。(1) 安定に歯根膜を誘導できる強固なペプチド接着層を、インプラント表面に形成すること。(2) インプラント表面で歯根膜を垂直方向に伸展させるために、パターンニングによりチタンインプラント上にECM層を形成すること。(3) 歯根膜細胞を分離、チタンインプラント上のECM層に播種して、垂直に増殖させる。歯根膜付きチタンインプラントの有用性を動物実験から評価する。以上の研究からペプチド結合接着層、ECM層、歯根膜細胞について、個々に最適な条件を探索し、これらを機能的に結びつけた歯根膜付きインプラントを作製する。

### 3. 研究の方法

(1) チオール化合物の結合におよぼす金蒸着の効果

初めに金属チタンにタンパク質を固定化する基盤として、基板へのアルカンチオールの結合を試み、結合に及ぼす金属チタンへの金蒸着の効果について検討した。実験には基板として第2種純チタン板(10×10×1 mm)を用いた。アルミナ粒子にてサンドブラストしたのち、アセトン、30%硝酸、蒸留水の順にそれぞれ10分間超音波洗浄を行った。空气中で乾燥させたのち、イオンコーター(E-1030, 日立)にて10 mA、10 Paの条件下で5, 10, 20, 50, 100, 200秒間、金蒸着を施した。金蒸着の有無がチオール化合物の付着に及ぼす影響を検討するため、未蒸着ならびに金蒸着済みのチタン板を2 mM アルカンチオール(12-mercaptododecanoic acid: HSCH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>CH<sub>2</sub>COOH, Aldrich) エタノール溶液に2時間浸漬した。その後、エタノール、蒸留水の順に洗浄、乾燥を行った。表面分析にはXPS(Axis-NOVA, KRATOS)を使用し、X線源:単色化Al、電圧:15 kV、電流:10 mA、分析範囲:300×700 μm、パスイネルギー:160 eV(ワイドスキャン)/40 eV(ナロースキャン)の条件下で測定を行った。また、アルカンチオール浸漬後の金蒸着チタン板(蒸着時間:100秒)をFTIR(Spectrum One, Perkin Elmer, Yokohama, Japan)を使用して、拡散反射法(積算回数:16回)にて分析

を行った。

(2) レーザー加工後のチタン表面形状の解析

インプラント表面の形状や性状は細胞の接着や伸展、分化に影響を及ぼすといわれており、その加工方法および表面状態の評価が重要である。本研究では、Nd:YVO<sub>4</sub>レーザー加工機を用いチタン板を種々の条件下で表面加工した後、形成された微細構造について、パターンの周期、深さなどを数値化することを試みた。チタン基板としてJIS第2種の純チタン板(10×10×1 mm)を使用した。

#### レーザー照射

チタン板のレーザー表面加工にはNd:YVO<sub>4</sub>レーザーマーカ(YVO4-10W, コマックス)を使用した。加工領域はチタン板中央部の6 mm×6 mmの正方形とし、掃引周波数(7500, 15000, 30000 Hz)とマーキング速度(50, 100, 200 mm/s)を変え、マーキングの繰り返し回数は20回とした。

#### 表面形状の観察と評価方法

レーザー加工表面の観察(平面像)にはデジタル顕微鏡(PCS-81X, コレクトメディアス)を用いた。一方、加工表面の深さ方向の形状は、加工後エポキシ樹脂に試料を包埋し、ダイヤモンドカッター(ISOMET 1000, BUEHLER)にて薄切、研磨した後、断面を金属顕微鏡(CK40M, オリパス光学)にて観察した。また、加工表面の微細構造パターンの周期性や方向は、撮影したデジタル画像を画像解析ソフト(ImageJ, NIH)によりフーリエ変換した画像(FFT像)から評価した。

### 4. 研究成果

(1) チオール化合物の結合におよぼす金蒸着の効果

Fig. 1は金蒸着時間の関数として、金とチタンの相対濃度を示す。

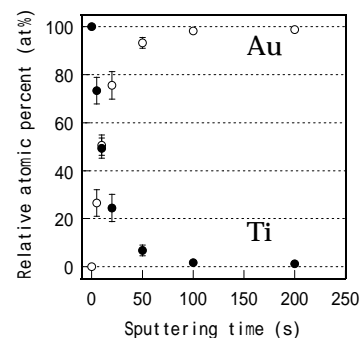


Fig. 1 金蒸着Ti板上のAu, Tiのat%

蒸着時間の増加とともに、金濃度は増加、チタン濃度は減少した。金のat%とチタンのat%から次式により金被覆率を求めた。

$$\text{金被覆率(\%)} = \frac{\text{Au at\%}}{\text{Au at\%} + \text{Ti at\%}} \times 100$$

Fig. 2は100秒間金蒸着したチタン板のアルカンチオール溶液浸漬前後のS 2pとC 1sスペクトルを示す。

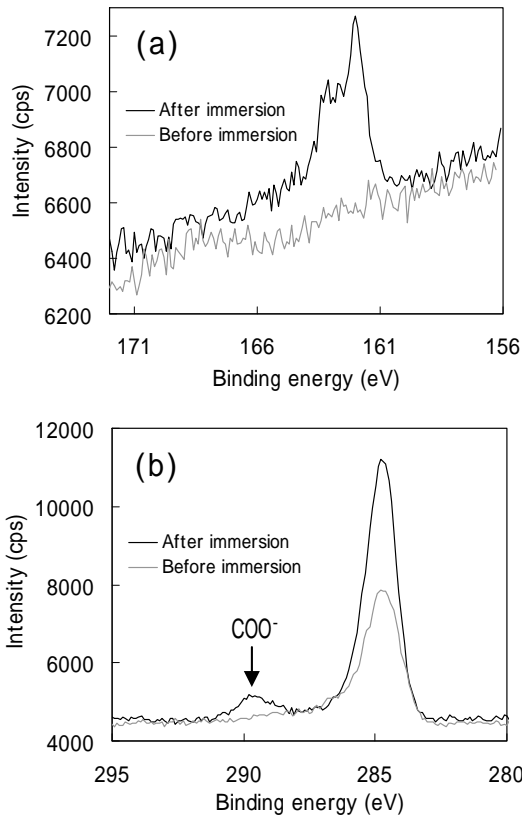


Fig. 2 金蒸着(100秒)Ti板のアルカンチオール溶液浸漬前後の(a) S 2pと(b) C 1s スペクトル

S 2p では浸漬後のみ、162.0 と 163.2 eV にピークが見られた。C 1s では浸漬前に 284.8 eV にコンタミ由来のC-CあるいはC-Hのピークが見られ、浸漬後には同ピークは2倍の強度に、また、289.5 eV に-COO<sup>-</sup>基由来のピークが見られた。

Fig. 3 にアルカンチオール溶液浸漬前(a)と浸漬後(b)の金蒸着(5, 20, 100 秒)チタン板のO 1s スペクトルを示す。浸漬前には5秒間金蒸着したチタン板で、酸化チタンのO<sup>2-</sup>に由来するピーク(530.0 eV)と酸化物表面のOH<sup>-</sup>に対応するピーク(532 eV)が見られた。

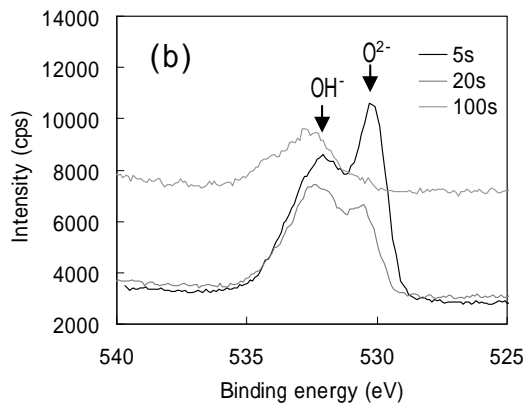
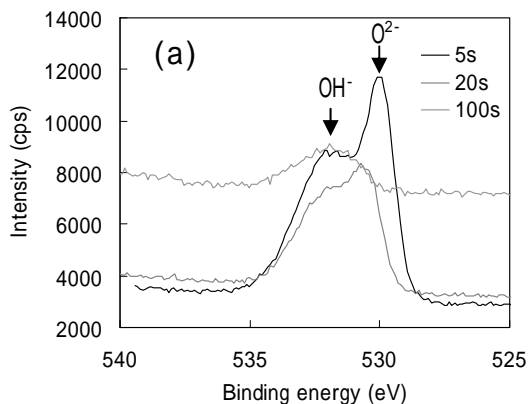


Fig. 3 金蒸着(5, 20, 100 秒)Ti板のアルカンチオール溶液浸漬前(a)と浸漬後(b)のO 1s スペクトル

20 秒間金蒸着したチタン板では、5 秒よりピーク強度が低下する一方、OH<sup>-</sup>ピークの低下は小さい。蒸着時間の増加(100 秒)によりO<sup>2-</sup>ピークは消失した。同じような特徴がアルカンチオール溶液で処理した金蒸着チタン板で見られ、O<sup>2-</sup>ピークは大きく減少し、OH<sup>-</sup>ピークはより顕著になった。

Fig. 4 にチタン板の金被覆率とアルカンチオール溶液浸漬前(白丸)と浸漬後(黒丸)のAu, Ti, S, C, O 元素濃度の依存性を示す。Au 濃度は金被覆とともに増加するが、アルカンチオール浸漬後は減少した。Ti 濃度は金被覆により減少し、浸漬によりさらに減少した。

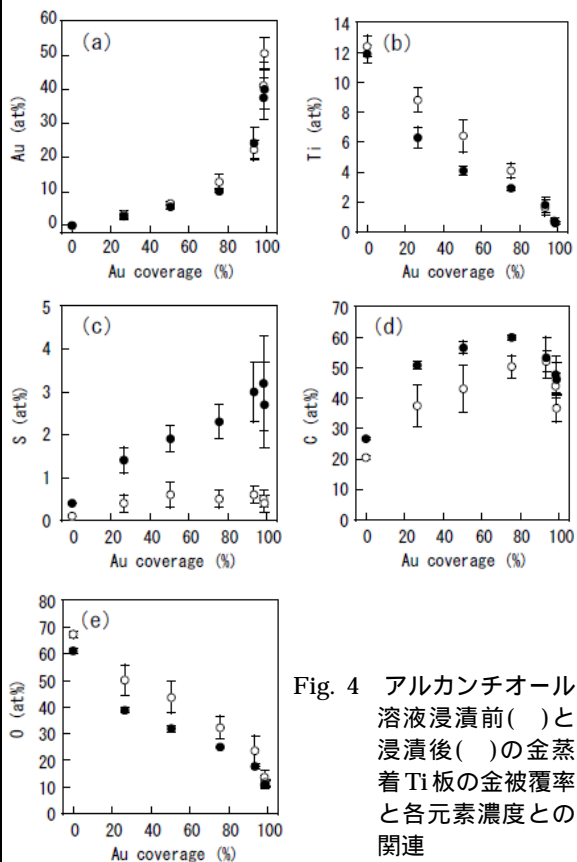


Fig. 4 アルカンチオール溶液浸漬前( )と浸漬後( )の金蒸着Ti板の金被覆率と各元素濃度との関連

S 濃度はアルカンチオール溶液浸漬により、金被覆率とともに増加した。0 濃度の金被覆依存性は Ti とほぼ同様で、金被覆とともに減少し、浸漬後さらに低下した。

Fig. 5 にアルカンチオール溶液浸漬後の金蒸着 Ti 板の FTIR スペクトルを示す。

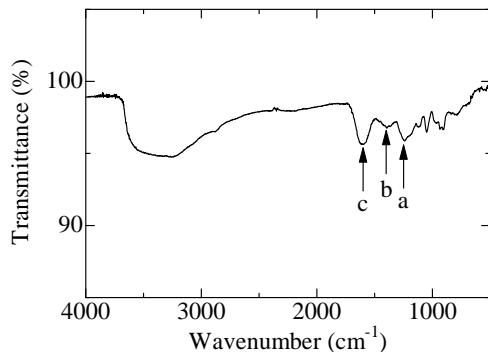


Fig. 5 アルカンチオール溶液浸漬後の金蒸着 (100 秒) Ti 板表面の FTIR スペクトル

1250  $\text{cm}^{-1}$  付近(a)には  $\text{CH}_2$  のひねり、縦ゆれ、1420  $\text{cm}^{-1}$  付近(b)には C-H 変角およびカルボン酸塩、また、1620  $\text{cm}^{-1}$  付近(c)にはカルボン酸塩に帰属するピークが検出された。

Fig. 6 に金被覆率と結合した S at%との関係を示す。

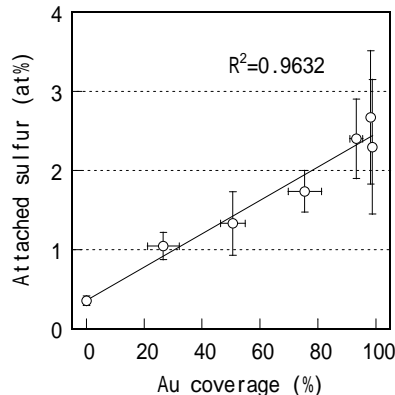


Fig. 6 金被覆率と結合した S との関係

S at%は金被覆率の増加とともに増加し、両者間には高度な相関 ( $R^2=0.9632$ ) がみられた。

本実験ではチタン基板に金蒸着を施したのち、アルカンチオール溶液に浸漬処理する方法を採用した。これは同処理法が末端基の異なるアルカンチオール分子を使用することにより基板表面に親水性、疎水性、タンパク質吸着抵抗性など種々の性質を付与できるため、本研究ではペプチド結合によりインプラントにタンパク質を固定化させることを想定しているため、末端基にカルボキシル基を有する 12-Mercaptododecanoic acid:  $\text{HSCH}_2(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{COOH}$  をアルカンチオールとして選択した。アルカンチオール浸漬後、S 2p スペクトル (Fig. 2a) から 2 つのピークが検出され、162 eV 付近のピークは Au-S の結合チオールに由来する。一方、高結合エ

ネルギー側のピークは 163.2 eV 付近にあり、低結合エネルギー側のピークとの強度比がほぼ 2:1 で S 2p ダブルピーク S 2p<sub>3/2</sub>, S 2p<sub>1/2</sub> の光イオン化断面積の比率に対応していることから、S は多くが結合チオールを形成しているものと推測される。C 1s スペクトル (Fig. 2b) からは 289.5 eV 付近にカルボキシル基由来のピークが検出され、さらに、C-C, C-H 由来のピーク強度が浸漬前に比べ、約 2 倍に増加しており、このことからアルカンチオールの結合が示唆された。さらに、O 1s スペクトル (Fig. 3) では浸漬後 (Fig. 3b) は浸漬前 (Fig. 3a) より酸化物由来のピーク強度は低下するが、OH のピークは変わらないか蒸着時間 100 秒ではむしろ増加していた。これは、浸漬により基板表面をアルカンチオール分子が被覆することで、下層の酸化物ピークの強度が弱められ、一方、アルカンチオールのカルボキシル基由来の OH ピークが付加され強度が増したことを示唆している。これら XPS の元素分析に加え、FTIR 分析による吸収ピークの帰属から脂肪酸カルボン酸の可能性が示唆され、カルボン酸を末端を持つアルカンチオールと矛盾しないことが確認された。以上のように、アルカンチオール溶液浸漬により、基板表面にアルカンチオール分子による被膜が形成され、基板表面の S% と金被覆率との間に高度な正の相関が見られた (Fig. 6) ことは、金蒸着がアルカンチオール処理する上で有効な処理であることを示唆している。

## (2) レーザー加工後のチタン表面形状の解析

周波数 15000 Hz、マーキング速度 200 mm/s の条件下でレーザー加工処理した試料の平面像、FFT 像、断面像を Fig. 7 に示す。

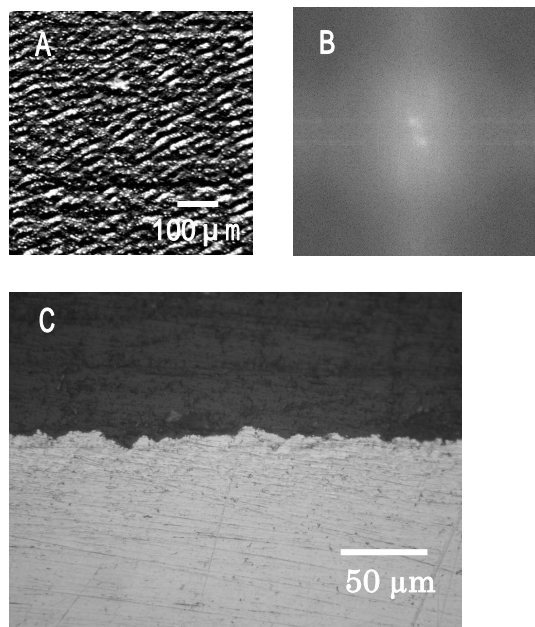


Fig. 7 周波数 15000 Hz, マーキング速度 200 mm/s で加工した試料の平面像 (A), FFT 像 (B) および断面像 (C)

加工により左から右上方向に走行する縞状のパターンが観察された (Fig. 7A)。FFT 像からは中央部に 2 つの明るい領域が観察され (Fig. 7B)、この方向が縞状パターンの法線方向に対応している。縞状パターンの周期は 23  $\mu\text{m}$  で、平面像から計測した実測値 (約 25  $\mu\text{m}$ ) にほぼ対応していた。また、断面像 (Fig. 7C) から縞状パターンの溝の深さは 3 ~ 10  $\mu\text{m}$  程度であった。他の条件で同様に観察、計測して得られた結果も含めて、レーザー加工時の周波数の増加およびマーキング速度の減少により縞状パターンの溝幅、深さとも増加することがわかった。また、レーザー表面加工により形成されたパターンの周期性は FFT 像に基づいて数値化することが可能であり、本法を用いることで、意図する周期パターンを材料表面に形成することが可能になると思われる。

3 年間の研究で当該研究の当初の目的であった、歯根膜付きチタンインプラントの創成には至らなかったが、チタン表面にタンパク質を結合させるための基板の表面処理の可能性を確認することができた。今後、さらに有効な処理法を探索し、歯根膜付きチタンインプラントの創成に向け研究を進めたい。

#### 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)

Saitoh, S., Nezu, T. Sasaki, K., Taira, M. and Miura, H. Effect of gold deposition onto titanium on the adsorption of alkanethiols as the protein linker functionalizing the metal surface. Dent. Mater. J. peer reviewed. 33. 2014. 111-117.

[学会発表](計 2 件)

(1) 齋藤設雄、チタンへの金蒸着がチオール化合物の付着に及ぼす影響、第 58 回日本歯科理工学会学術講演会、2011.10.22、郡山

(2) 齋藤設雄、チタン表面のレーザー加工と表面形状の解析、第 61 回日本歯科理工学会学術講演会、2013.4.13、船堀

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

齋藤 設雄 (Saitoh Setsuo)

岩手医科大学・歯学部・講師

研究者番号：70137537

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：