

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：33910

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890154

研究課題名（和文） 新しいコンセプトに基づいた新規アパタイトコーティングインプラントの創製

研究課題名（英文） Fabrication of novel apatite coating implant based on new concept

研究代表者

Valanezhad S. A (バラネザハド S. A)

中部大学・生命健康科学部・研究員

研究者番号：00608870

研究成果の概要（和文）：

本研究では、プラズマ溶射法に比べて高い界面強度を有し、生体内で経時的にも安定な水酸アパタイト（HAp）コーティングチタンの創製を目標とする。工業的リン酸亜鉛被膜法に水熱処理を組み合わせた独自の手法によって、まず、Ti インプラントの表面にリン酸亜鉛被膜を形成させた。引き続き、カルシウム塩水溶液で処理することによって、リン酸亜鉛をアパタイトに組成変換させた。得られた膜の基板に対する接着強度は 36.7 ± 17 MPa とプラズマ溶射法で報告されている値のおよそ4倍の値を示した。ラットの骨髄細胞を用いて *in vitro* 骨伝導性評価を行ったところ、細胞接着性、増殖性、骨分化、石灰化のいずれも未処理のTiに比べて有意な値を示した。以上の結果から、本処理はTiインプラントへの骨伝導処理として有用であると結論付けた。

研究成果の概要（英文）：

Aim of this study is to fabricate hydroxyapatite(HAp) coating titanium(Ti) which shows high adhesive strength between HAp coating and Ti substrate and chemically stable with time after implantation when compared to HAp coating prepared by plasma spraying method. Zinc phosphate coating was successfully prepared on Ti implant using our original method employing industrial zinc phosphate coating mixed with hydrothermal treatment. Subsequently the zinc phosphate could transform to HAp by treating with appropriate calcium salt solution. Adhesive strength between obtained coating and Ti substrate was 36.7 ± 17 MPa which was approximately 4 times compared to that obtained by plasma spraying method. In vitro osteoconductivity evaluated using rat bone marrow cells indicated that cell attachment, proliferation, differentiation and calcification for HAp coating were significantly higher than that for non-treated Ti. It is concluded that novel treatment proposed in this study would be useful for osteoconductive treatment of Ti implant.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2011年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2012年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,500,000 | 750,000 | 3,250,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：Ti インプラント、アパタイトコーティング、リン酸亜鉛、生体適合性、界面強度

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において即時荷重インプラントに対する要求が増大しており、ハイドロキシアパタイト(HAp)コーティングインプラントの機能向上が社会的要求となっている。チタン(Ti)表面にHAp被膜を作製する手法として、主にプラズマ溶射法が挙げられるが、埋入後、中長期的にHAp膜の剥離が起こることが臨床上の大きな問題となっている。成膜時の原料粉末の高温曝露によって生じた熱分解生成物が、体内で中長期的に溶解することが、このHAp膜剥離の主原因と報告されている。従って、HAp皮膜をTi基板表面に、低温で且つ強固に成膜することが必要だと考えられる。

一方、鋼鉄などの防錆を目的として、表面にリン酸亜鉛被膜を形成させるパーカライジング処理が工業的に知られている。この処理は 80°C という比較的低温で処理が可能であり最も被膜接着強度が高いこと、生成される被膜は「リン酸亜鉛」であり、アパタイトの「リン酸カルシウム」と組成が類似していることから、Ti 表面に強固な HAp 被膜を形成させる処理として有用ではないかと着想した。研究代表者は、前駆的に通常のパーカライジング処理を Ti 基板に適用したところ、表面変化は見られなかったが、水熱処理の併用により Ti 基板の表面にもリン酸亜鉛被膜が形成できることが分かり、本研究を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、プラズマ溶射法に比べて高い界面強度を有し、生体内で経時的にも安定な HAp コーティングチタンの創製を目標とする。パーカライジング法に水熱処理を組み合わせた独自の手法によって、Ti インプラントの表面にリン酸亜鉛被膜が形成される条件を明らかにする。さらに、溶解-析出型反応を利用して、Ti 基板表面に作製した被膜の組成をリン酸亜鉛から HAp への相変換を試みる。得られた HAp 膜の Ti 基板に対する接着強度や HAp 膜の細胞適合性を評価して、歯科インプラントの表面処理に適用可能かどうかを結論付ける。

3. 研究の方法

3-1. Ti 表面へのリン酸亜鉛被膜形成

鏡面研磨したディスク状 Ti プレート(直径 14.7mm ϕ , 厚さ 1 mm)を基板として用いた。Ti 基板表面にリン酸亜鉛被膜を形成させるための処理溶液としては、リン酸(0.58 mol \cdot L⁻¹)と硝酸(0.63 mol \cdot L⁻¹)の混合溶液に酸化亜鉛(0.36 mol \cdot L⁻¹)を溶解させた水溶液(Zn/P=0.62)を調合して用いた。この溶液中に Ti 基板を浸漬し、100-250°C の温度で 3-10 時間の範囲で水熱処理を行った。

3-2. リン酸亜鉛から HAp への組成変換

リン酸亜鉛被膜を形成させた Ti 基板をカルシウム塩水溶液中に浸漬して HAp への組成変換を試みた。処理に用いる水溶液としては、塩化カルシウム水溶液と酢酸カルシウム水溶液を用い、種々の温度(150, 200, 250°C)で 2-24 時間の範囲で水熱処理を行った。

3-3. 膜のキャラクタリゼーション

Ti 基板表面、リン酸亜鉛被膜処理後(3-1)および HAp 組成変換処理後(3-2)の表面を電子顕微鏡(SEM)で観察するとともに、エネルギー分散型 X 線分析(EDX)を用いて元素分析を行った。生成した膜の結晶相は X 線回折装置(XRD)を用いて調査した。接着強度試験機(ROMULUS IV, Epoxy Resin Adhesive, Quad Group Inc., USA)を用いて、膜と基板の接着強度を評価した。

3-4. 膜の *in vitro* 骨伝導性評価

ラットの骨髄(RBM)細胞を用いて、HAp 膜の *in vitro* 骨伝導性を評価した。処理前後の表面における細胞の接着形態、初期細胞接着性、細胞増殖性、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、オステオカルシン(OCN)および骨石灰化基質産生量をそれぞれ比較した。

4. 研究成果

4-1. Ti 表面へのリン酸亜鉛被膜形成とキャラクタリゼーション

Ti 基板を前述のリン酸-亜鉛混合水溶液で処理した結果について述べる。最初に、処理時間を 10 時間に固定して処理温度を変化させて成膜状況を調査した結果を図 1 に示す。

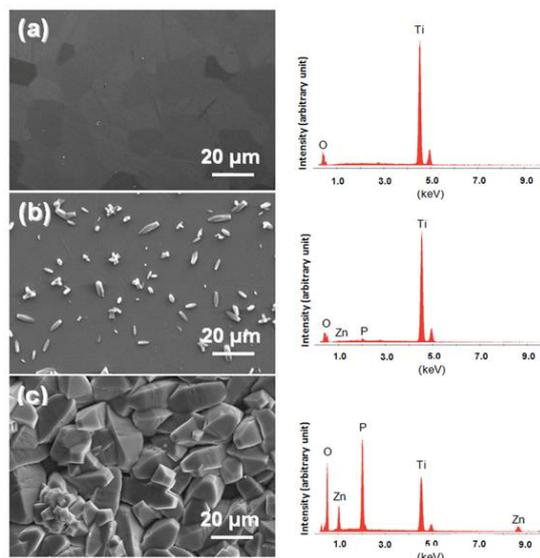


図 1 リン酸-亜鉛混合水溶液で処理した Ti 基板表面の SEM 像および EDX 分析結果 処理条件 10 hrs, (a)150°C, (b) 200°C, (c) 250°C

150°C で処理した Ti 表面に膜は形成されておらず、200°C においては結晶の析出が観察されるものの、その量はわずかで成膜するに至らなかった。一方、250°C で処理した Ti 表面は Zn と P を主成分とする新たな結晶が多数析出し表面全体を覆っている様子が観察された。次に、処理温度を 250°C に固定し、種々の時間処理を行った結果、処理後 6 時間までは結晶の析出がまばらに観察されたのに対し、7 時間以降から結晶の析出量が増加し、10 時間処理後に膜が表面全体を覆うことが分かった。以上の結果から、Ti 基板を 250°C のリン酸-亜鉛混合水溶液で 10 時間処理すれば、表面にリン酸亜鉛被膜が形成されることが分かった。

次に 250°C で 10 時間水熱処理を行った試料の断面観察を行ったところ、膜は Ti 基板に対して強固に接着しており、その接着強度は $48.3 \pm 9.2 \text{ MPa}$ と極めて高い値を示すことが分かった。EDX および XRD より膜はリプスコマイト様構造(空間群: $I4_1/amd$)で化学組成は $\text{Zn}_{0.27}\text{Ti}_{0.86}(\text{PO}_4)(\text{OH})_{0.39}(\text{H}_2\text{O})_{0.61} \cdot 0.33\text{H}_2\text{O}$ と同定された。

4-2. リン酸亜鉛から HAp への組成変換とキャラクタリゼーション

Ti 基板を 250°C のリン酸-亜鉛混合水溶液で 10 時間水熱処理を行い、リン酸亜鉛被膜を形成させた試料(Ti-Zn- PO_4)を用いて HAp への組成変換を検討した。塩化カルシウムおよび酢酸カルシウムのいずれの水溶液を用いても HAp に組成変換できることが分かった。Ti-Zn- PO_4 試料および $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 水溶液を用いて 250°C で 2 時間処理した試料の表面の SEM 像を図 2 に示す。塩化カルシウム水溶液で処理した後の表面には新たな結晶が析出している様子が観察された。

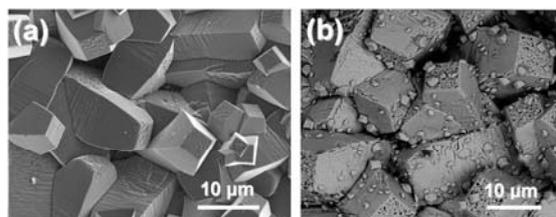


図 2 (a)Ti-Zn- PO_4 試料および(b) $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液を用いて 250°C で 2 時間処理した試料表面の SEM 像

Ti-Zn- PO_4 試料および $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液を用いて 200°C で 6 時間および 48 時間処理した試料の XRD 測定結果を図 3 に示す。XRD 測定より、処理によって表面に析出した結晶は HAp に帰属された。処理温度について検討を行ったところ、150°C では HAp への変換速度が遅く、250°C では長時間処理すると、HAp 格子中に Cl が導入されることが明らかとな

ったため、以降の評価は 200°C で処理した試料を用いることとした。

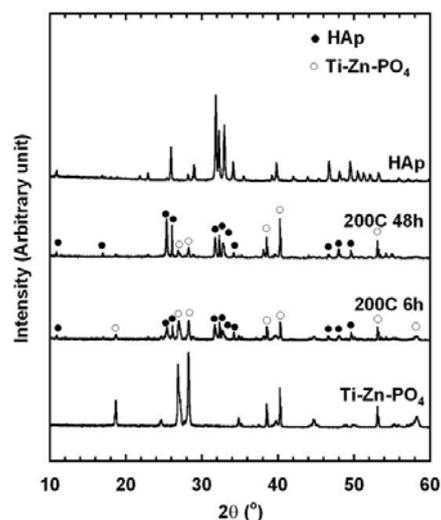


図 3 Ti-Zn- PO_4 試料および $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 水溶液を用いて 200°C で 6 時間および 48 時間処理した試料の XRD 測定結果

一方、酢酸カルシウム水溶液を用いても HAp への変換が可能であった。 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 水溶液で 24 時間処理した Ti-Zn- PO_4 試料表面の SEM 像および EDX 分析結果を図 4 に示す。酢酸カルシウム水溶液

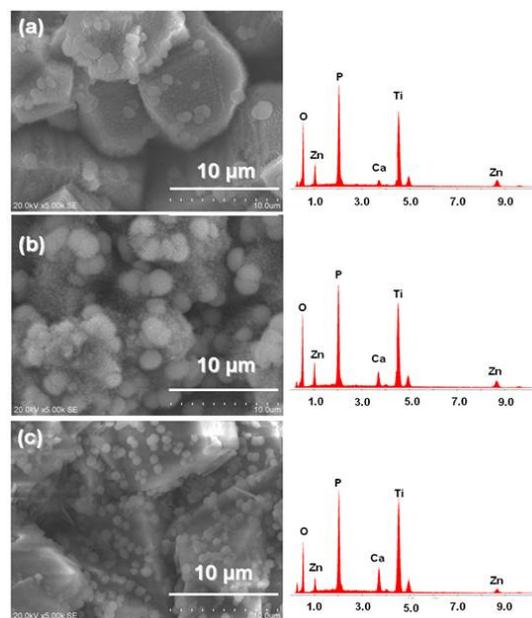


図 4 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 水溶液で 24 時間処理した Ti-Zn- PO_4 試料表面の SEM 像および EDX 分析結果(a)150°C, (b) 200°C, (c) 250°C

で処理した後の表面には新たな結晶が析出している様子が観察され、処理時間と共にその析出量は増加していた。 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 水溶液を用いて 200°C で 12, 24

および48時間処理した試料のXRD測定結果を図5に示す。処理によって表面に析出した結晶はHApに帰属されたが、CaCl₂水溶液で処理した場合に比べて極めて結晶性が低いことが分かった。

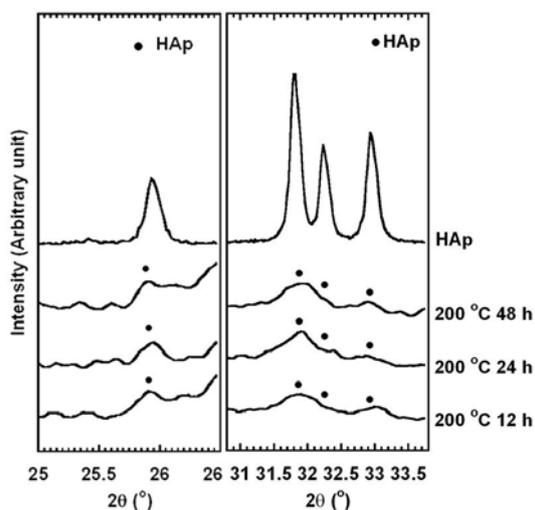


図5 1 mol・L⁻¹ Ca(CH₃COO)₂ 水溶液を用いて200°Cで12, 24および48時間処理した試料のXRD測定結果

4-3. 膜のin vitro骨伝導性評価

Ti基板表面で3時間培養した後のRBM細胞の接着形態は球状をしていたのに対し、HAp被膜を形成したTi基板表面の細胞は仮足を伸ばして伸展している様子が観察された。播種3時間後の細胞接着率、細胞増殖率、ALP活性、OCN濃度のいずれにおいても、HAp被膜を形成したTi基板表面の値は、Ti基板表面の値に比べて、有意に高い値を示した。Ti基板およびHAp被膜を形成したTi基板表面でRBM細胞を21日培養した際の骨石灰化基質をアリザリンレッドで染色した結果を図6に示す。赤色に染色された箇所、即

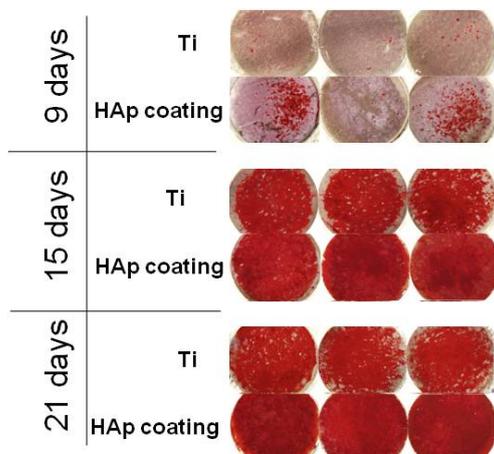


図6 Ti基板およびHAp被膜を形成したTi基板表面でRBM細胞を21日培養した際の骨石灰化基質の産生（アリザリンレッド染色）

ち、骨石灰化基質の産生量を比較すると、HAp被膜を形成したTi基板表面の値は、Ti基板表面の値に比べて、多くの骨石灰化基質を産生することが分かった。

本研究で創製されたTi基板表面のHAp被膜はTi基板に比べて高いin vitro骨伝導性を示すことから、Tiインプラントへの骨伝導処理として有用であると結論付けた。

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 Alireza Valanezhad, Kanji Tsuru, Michito Maruta, Giichiro Kawachi, Shigeki Matsuya, Kunio Ishikawa. A new biocompatible coating layer applied on titanium substrates using a modified zinc phosphatizing method, *Surface and Coatings Technology*, 206: 2207-2212, 2012, 査読有

〔学会発表〕（計3件）

- ① Alireza Valanezhad, Kanji Tsuru, Michito Maruta, Shigeki Matsuya, Kunio Ishikawa. Protectivity and Adhesive Strength of Zinc phosphatized Coating on 316L Stainless Steel. The 24th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics24). Centennial Hall Kyushu University School of Medicine, Fukuoka, Japan, 2012.10.21-24 (Oral 10.22)
- ② Alireza Valanezhad, Kanji Tsuru, Michito Maruta, Shigeki Matsuya, Kunio Ishikawa. Hydroxyapatite Coating on Zinc Phosphatized Titanium. 9th World Biomaterials Congress. Chengdu, China, 2012.6.1-5 (6.4).
- ③ Aireza Valanezhad, Kanji Tsuru, Michito Maruta, Shigeki Matsuya, Kunio Ishikawa. A Novel HAp Coating Method on Titanium. The 23rd Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 23). Istanbul, Turkey. 2011.11.06-09 (11.09).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

Valanezhad S.A（バラネザハド S.A）
中部大学・生命健康科学部・研究員
研究者番号：00608870