

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390445

研究課題名(和文)超親水性ハイドロキシアパタイト薄膜処理チタンの抗菌効果と骨形成能

研究課題名(英文)Antibacterial and osteogenic properties on hydrophilic-modified hydroxyapatite coating on titanium

研究代表者

宮崎 隆 (Miyazaki, Takashi)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：40175617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,300,000円

研究成果の概要(和文)：人工体液中での液中放電により純チタン表面におよそ1 μ mのHA超薄膜コーティングが処理できる。コーティング膜は液中放電処理中に新たに形成されたチタン酸化膜にHAナノ結晶が傾斜的に埋入されているため物理的脆弱性を克服するだけでなくチタン酸化膜の親水性官能基による超親水性を示す。本HAコーティング薄膜は、歯肉縁上プラークの初期接着菌であるStreptococcus Mitis およびStreptococcus Gordonii に対する著しい付着抑制効果を示した。したがって液中放電処理によるHA薄膜コーティングは、優れた骨結合能と抗菌性を兼ね備えた新たな歯科インプラントの表面処理として期待できる。

研究成果の概要(英文)：Preparation of hydroxyapatite (HA) coated titanium (Ti) by electrical discharge in a buffered physiological saline solution has several advantages over traditional techniques. Specifically, it can generate highly crystalline nanoscale HA with a thickness of 1 μ m. This study examined in vitro osteoblast gene expression and antimicrobial activity against early and late colonizers of supra-gingival plaque on nanoscale HA-coated Ti prepared by discharge in a physiological buffered solution. The sintered HA and HA-coated Ti surfaces enhanced osteoblast phenotypes in comparison with the bare Ti surface. The HA-coated Ti enabled antimicrobial activity against early colonizers of supra-gingival plaques, namely Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii. Such antimicrobial activity may be caused by the surface hydrophilicity, thereby leading to a repulsion force between the HA-coated Ti surface and the bacterial cell membranes.

研究分野：歯科理工学

キーワード：チタン インプラント ハイドロキシアパタイト コーティング 抗菌

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療では、早期の骨結合獲得によりインプラント体を速やかに機能させることが望ましい。インプラント材料として広く用いられるチタンおよびチタン合金は、表面化学性状や微細構造の改質により骨伝導性が向上する。また、骨の無機成分であるHAをチタンインプラント表面にコーティング処理することにより、チタンインプラントの骨結合能は飛躍的に向上することが知られている。HAコーティングインプラントが早期骨結合獲得の観点において、チタン表面改質インプラントよりも優れていることは、基礎研究や臨床データから明らかである。

埋入直後の高い成功率の反面、HAコーティングインプラントは表面改質チタンインプラントにくらべて長期的な生存率が劣ることが懸念されている。この臨床的不快事項は、コーティング膜の脆性や、コーティング層とチタンインプラント表面の結合力など、生体界面での物理的脆弱性によるコーティングの剥離が主な原因と考えられてきた。このためHAコーティングは薄膜化や高結晶化により物理的強度を向上させる試みが検討されている。

HAコーティング処理は、整形外科領域のインプラント治療でも広く利用されてきた。しかしHAコーティングインプラントの長期的生存率の低さは、歯科領域のみで顕著であり、歯周病リスクの高い患者のケースでは、HAコーティングインプラントが純チタンインプラントにくらべてインプラント周囲炎の増悪が激しいことも報告されている。申請者らの最新の研究から、歯科インプラントのみで見られる著しいHAコーティングインプラントの生存率低下は、HAの口腔細菌に対する高感受性が大きな原因であることが示唆された。歯科インプラントは生体内に完全に埋没する整形外科領域のインプラントに対して、口腔内に一部露出する経皮デバイスであり、骨結合だけでなくインプラント表面での感

染防御が重要である。HAコーティングインプラントが優れた骨結合能を維持し、インプラントの長期的な予後を確立させるには、HAコーティング薄膜化による物理的向上だけでなく、口腔細菌の感染防御により生物学的脆弱性を克服する必要があると考えられる。インプラントの抗菌処理では、主に抗菌剤をチタン表面に導入する方法が用いられている。HAコーティングインプラントにおいても、プラズマスプレー法で作成した多孔質のHAコーティング層に、抗菌物質を導入させる方法が検討された。しかし、コーティング層の抗菌物質は80-90%が最初の60分間で放出されることが報告されている。抗菌物質の導入は埋入時の感染リスク低減には効果が期待できるものの、HAコーティングインプラントの長期的生存率に貢献しない。また多孔質のHAコーティング膜は抗菌物質のキャリアとして有効である反面、物理的強度には疑問が残り、既存のコーティング方法では、HAコーティングインプラントの物理的・生物学的脆弱性を克服することは難しい。

2. 研究の目的

チタンインプラントのHAコーティング処理は顕著な骨結合能を示す一方で、生体界面での物理的脆弱性や細菌に対する高感受性などの生物学的脆弱性から、純チタンインプラントにくらべて長期的な生存率が劣る。本研究では、超親水性に改質したHA薄膜コーティングの骨形成能と抗菌効果により、チタンインプラントの早期骨結合と長期的維持を達成する。

3. 研究の方法

HAは体液中で静電的であり、口腔細菌に対する高い感受性を示すと考えられる。本研究では、HA焼結体、HA超薄膜コーティングチタンおよび純チタンを試料とし、歯肉縁上プラーク細菌に対する抗菌効果を検討し

た .HA 超薄膜コーティングチタンは疑似体液中での液中放電処理によって作製した . それぞれのチタン試料は , X線回折分析 , X線光電子分光分析により表面化学構造を , また表面の微細構造を共焦点レーザー顕微鏡で定量的に分析した . 試料表面で骨芽細胞を培養し ,リアルタイム PCR により mRNA 発現を定量することにより *in vitro* の骨形成能を評価した .

4 . 研究成果

口腔細菌の多くは細胞膜表面がマイナスに帯電しており , 材料表面を親水性に改質 (マイナスに帯電) することにより , 電気的反発力による細菌付着抑制 (抗菌) 効果が報告されている . 材料表面と微生物との電気的反発力は埋入後も維持されることから抗菌効果は長期間持続される . また抗菌物質を用いないことから , 周囲組織の為害作用などの不安がない . 本研究では , 人工体液中での液中放電により純チタン表面におよそ 1 μm の HA 超薄膜コーティング処理に成功した . コーティング膜は液中放電処理中に新たに形成されたチタン酸化膜に HA ナノ結晶が傾斜的に埋入されているため物理的脆弱性を克服するだけでなくチタン酸化膜の親水性官能基による超親水性を示す . 本 HA コーティング薄膜は , 歯肉縁上プラークの初期接着菌である *Streptococcus Mitis* および *Streptococcus Gordonii* に対する著しい付着抑制効果を示した . したがって液中放電処理による HA 薄膜コーティングは , 優れた骨結合能と抗菌性を兼ね備えた新たな歯科用インプラントの表面処理として期待できる .

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 14 件)

1. Maruyama N., Shibata Y., Mochizuki A., Yamada A., Maki K., Inoue T., Kamijo R., Miyazaki T. Bone micro-fragility caused by the mimetic aging processes in *α-klotho*

deficient mice: *in situ* nanoindentation assessment of dilatational bands.

Biomaterials 47: 62-71, 2015 (査読有)

2. Inami T., Tanimoto Y., Yamaguchi M., Shibata Y., Nishiyama N., Kasai K. Surface topography, hardness, and frictional properties of GFRP for esthetic orthodontic wires. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials** DOI: 10.1002/jbm.b.33372 (in press) (査読有)
3. Wurihan, Yamada A., Suzuki D., Shibata Y., Kamijo R., and Miyazaki T. Enhanced *in vitro* biological activities generated by surface characteristics of anodically oxidized titanium- the contribution of the oxidation effect. **European Cells and Materials** 29: 290-302, 2015 (査読有)
4. Miyamoto S., Miyamoto Y., Shibata Y., Yoshimura K., Izumida E., Suzuki H., Miyazaki T., Maki K., Kamijo R. *In-situ* quasi-static and dynamic nanoindentation tests on calcified nodules formed by osteoblasts: Implication of glucocorticoids responsible for osteoblast calcification. **Acta Biomaterialia** 12: 216-226, 2015 (査読有)
5. Maruyama N., Shibata Y., Wurihan, Swain M., Kataoka Y., Takiguchi Y., Yamada A., Maki K. and Miyazaki T. Strain-rate stiffening of cortical bone: observations and implications from nanoindentation experiments. **Nanoscale** 6(24): 14863-14871, 2014 (査読有)
6. Sato M., Fujishima A., Shibata Y., Miyazaki T. Nanoindentation tests to assess polymerization of resin-based luting cement. **Dental Materials** 30(9):1021-1028, 2014 (査読有)
7. Jang I.K., Tanaka R., Wurihan, Suzuki D., Shibata Y., Fujisawa N., Tanimoto Y., Ogura K., Kamijo R., and Miyazaki T. Nanomechanical properties and molecular structures of *in vitro* mineralized tissues on anodically-oxidized titanium surfaces. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 10(3):629-637, 2014(査読有)
8. Shibata Y. Suzuki D., Wurihan, Yamada A., Maruyama N., Fujisawa N., Kamijo R., Miyazaki T. Lysyl oxidase like-2 reinforces unsatisfactory ossification induced by bone morphogenetic protein-2: relating nanomechanical properties and molecular changes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 9(7):1036-1047, 2013 (査読有)

9. Inami T., Tanimoto Y., Ueda M., Shibata Y., Hirayama S., Yamaguchi M., and Kasai K. Morphology and *In Vitro* Behavior of Electrospun Fibrous Poly(D,L-lactic acid) for Biomedical Applications. **Advances in Materials Science and Engineering** Article ID 140643, 2013 (査読有)
10. Ogura K., Tanaka R., Shibata Y., Miyazaki T., Hisamitsu H. In vitro demineralization of tooth enamel subjected to two whitening regimes. **Journal of the American Dental Association** 144(7):799-807, 2013 (査読有)
11. Liu D., Matinlinna J.P., K.H.T. James, H.N.P. Edmond, Miyazaki T., Shibata Y., Kan C.W. A new modified laser pretreatment for porcelain zirconia bonding. **Dental Materials** 29(5):559-565, 2013 (査読有)
12. Tanimoto Y., Teshima M., Nishiyama N., Yamaguchi M., Hirayama S., Shibata Y., Miyazaki T. Tape-cast and sintered β -tricalcium phosphate laminates for biomedical applications: Effect of milled Al_2O_3 fiber additives on microstructural and mechanical properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials** 100(8):2261-2268, 2012 (査読有)
13. Iwai-Yoshida M., Shibata Y., Wurihan, Suzuki D., Fujisawa N., Tanimoto Y., Kamijo R., Maki K. and Miyazaki T. Antioxidant and osteogenic properties of anodically oxidized titanium. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials** 13:230-236, 2012 (査読有)
14. Murakami A., Arimoto T., Suzuki D., Iwai-Yoshida M., Otsuka F., Shibata Y., Igarashi T., Kamijo R. and Miyazaki T. Antimicrobial and osteogenic properties of a hydrophilic-modified nanoscale hydroxyapatite coating on titanium. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** 8(3):374-382, 2012 (査読有)

[学会発表](計 4件)

1. 宮崎 隆「生体硬組織ならびに生体材料の新しい質的・理工学的評価」第 73 回日本矯正歯科学会大会(招待講演, 2014年 10月 21日, 千葉 幕張)
2. Shibata Y. Nanoindentation tests to assess polymerization quality of resin-based luting cement. (3rd trilateral dental symposium on “Advance in zirconia and its use as a dental material” 15th June 2014

Tokyo, Japan)

3. Shibata Y. Nanomechanical testing technology for engineered tissue. (2nd trilateral dental symposium on “dental virtual education today” 14th Nov. 2013 Tokyo, Japan)
4. Shibata Y., Suzuki D., Wuirhan, Yamada A., Maruyama N., Kamijo R., Miyazaki T. Nanomechanical testing technology for in vitro mineralized tissue. (2nd meeting of IADR-APR, 2013年 8月 21日, タイ バンコク)

[図書](計 0件)

[産業財産権]
出願状況(計 0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 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

宮崎 隆 (Miyazaki Takashi)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：40175617

(2) 研究分担者

柴田 陽 (Shibata Yo)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：30327936

美島 健二 (Mishima Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50275343

山田 篤 (Yamada Atsushi)

昭和大学・歯学部・講師
研究者番号： 50407558

(3)連携研究者 ()

研究者番号：