

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656386

研究課題名(和文) 隙間空間を利用したチタン系医用インプラント材料の設計と評価方法の開発

研究課題名(英文) Design and in vitro evaluation method for biomedical titanium implant materials using a spatial gap

研究代表者

早川 聡 (HAYAKAWA, SATOSHI)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20263618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：隙間環境下及び動的環境下における熱酸化処理を施した金属チタン試片表面上に誘発される骨類似アパタイト粒子の析出挙動を評価するために、ペリスタティックポンプで流速を調整できる擬似体液フローリアクターシステムを開発した。隙間空間を利用した新規インプラントデバイスの設計指針を得るために、化学酸化及び熱処理を施した金属チタン試片をチタン合金あるいは異種基材と対面配置させた場合のアパタイト形成機構を提案した。

研究成果の概要(英文)：A recently developed "GRAPE technology" provides titanium or titanium alloy implants with spontaneous apatite-forming ability in vitro, which requires properly designed gaps and optimum heat treatment in air. We developed a new flow reactor system of a simulated body fluid combined with a spatial gap consisting of parallel-aligned two pieces of thermally-oxidized titanium substrates to examine in vitro apatite deposition behaviors in the spatial gap. The mechanism of in vitro apatite formation on the thermally-oxidized titanium substrate that parallel-aligned to another titanium-alloy substrate with optimized 0.5-mm gap width was proposed in order to establish design concept for a new implant device using a spatial gap.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・無機材料・物性

キーワード：酸化チタン アパタイト 擬似体液 動的環境

1. 研究開始当初の背景

申請者は、チタン系インプラントの骨癒合に寄与する酸化チタン層に着目し、酸化チタン層に高分子基材を対面配置させた独創的な隙間空間デザインを施して、細胞外液の無機イオン濃度を模倣した擬似体液 (SBF: 小久保溶液, pH7.4) に静置浸漬 (自然対流系) すると、幅 0.5 mm 以下の隙間でアパタイトの析出が誘起されることを発見した。この知見に基づき、幅 0.5 mm 以下の溝をつけたチタン系インプラントを 500°C 程度で加熱 (熱酸化) するだけの簡単な方法で優れた骨組織結合性を有するインプラントを開発した。これを *GRAPE*[®] (GRoove and APatitE) と名付け、国の先端医療開発特区 (内閣府) で取り組んだ。本研究課題では、*GRAPE*[®] 技術の更なる発展のために、隙間空間の評価方法を開発して、同種基材や異種基材を対面配置させた際のアパタイトの核形成が誘起あるいは抑制される機構を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

- [1] 擬似体液フローリアクターシステム (SBF-FRS) を開発して、強制的流通系 (層流) の擬似体液中で対面配置させた二つの酸化チタン層の隙間空間 (幅 0.5 mm 以下で誘起されるアパタイト粒子の析出機構を解明する。
- [2] 擬似体液中で異種基材 (金属、高分子、セラミックス) と対面配置させた酸化チタン層表面でのアパタイト粒子層の析出挙動を調べ、アパタイトの核形成が誘起・抑制される機構を解明する。

3. 研究の方法

サブミリ隙間空間では分子やイオンの運動・拡散が規制され「淀み」が生じ、「体液成分や生理活性イオン種の濃度ゆらぎ」や「化学反応」に影響を及ぼすと考えられる。材料が体内に埋入された際の組織液との動的な接触挙動を考慮した評価方法として

SBF-FRS システムを新たに提案した。従来の自然対流系と、強制的流通系 (層流) での擬似体液中での酸化チタン層表面における骨類似アパタイト粒子の析出挙動を追究し、その機構を解明する。

[1] SBF-FRS システムの開発

熱酸化処理によってルチル型の酸化チタン層を表面に作製した二枚の金属チタン試片を、幅 0.5 mm の間隔で対面配置して設置する。本システムを 36.5 に保持した恒温器内に静置し、擬似体液の流速は、ペリスタティックポンプと適切なチューブ径を選択することにより 0.01 ~ 0.10 mL/min の定速で制御する。

[2] SBF-FRS システムによる *in vitro* 評価

所定の流速及び浸漬時間 SBF (pH 7.4, 36.5°C) に浸漬した試片の表面構造を薄膜 X 線回折法で調べ、表面形態を走査電子顕微鏡で観察し、SEM 写真から画像解析ソフト (Image-Pro[®]Plus, Media Cybernetics, Inc., USA) を用いて、申請者等の発表論文 (Nakao, *et al.*, *J. Ceram. Soc. Japan*, **118**[6], pp.483-486 (2010)) と同様の方法で、アパタイト核形成誘導期間、アパタイト粒子層の被覆率、半球状アパタイトの二次粒子数、半球状アパタイトの二次粒子径を調べ、隙間空間で酸化チタン層 (HT 試片) の表面で誘起されるアパタイト析出機構を考察する。

- [3] アパタイトの核形成が困難な動的環境下の場合には、初期においては擬似体液の自然対流下に所定期間浸漬してアパタイトの核形成を誘導し、続いて強制的流通下 (動的環境下) に連続的に移行することで、「一次核形成と成長」と「二次核形成と成長」の二つの視点から、隙間空間における擬似体液の流通がアパタイト析出挙動に及ぼす影響

を調べた。

- [4] 従来の自然対流系を用い、擬似体液中で異種基材と対面配置させた酸化チタン層表面でのアパタイト粒子層の析出挙動を調べた。Al系金属基板(Ti64合金, Al板)にナノ結晶性酸化チタン層を有する基板を対面配置させてSBFに浸漬し, Al系金属基板及びナノ結晶性酸化チタン層を有する基板が隙間環境下でアパタイト粒子の析出挙動に及ぼす影響を調べた。市販の鏡面チタン板(10×20×2 mm³)を80°Cに保持した30 mass%過酸化水素水10 mLに3時間浸漬した。この基板を400°Cで1時間熱処理し, ナノ結晶性酸化チタン層を有する試片を作製した。この試片をCHTとした。この試片と未処理のチタン板, Ti64合金基板もしくはAl板を対面配置させ, 幅0.3 mmの隙間環境を有する試片を作製した。これらの隙間環境試片を40 mLのSBF(36.5°C, pH7.4)中に垂直につるした。浸漬後の試片表面を走査電子顕微鏡(SEM)で観察し, 表面構造を薄膜X線回折法, 分子構造をフーリエ変換赤外反射分光法で調べた。SBF浸漬前後の表面化学状態をX線光電子分光法で調べた。

4. 研究成果

- [1] 小久保の方法(Kokubo, Takadama, *Biomater.* 27, 2907-2915 (2006))に従って擬似体液(SBF, pH7.4, 36.5)を作製した。SBFのフローリアクターシステム(SBF-FRS)を用いて隙間空間におけるアパタイト粒子の析出挙動を調べた。鏡面チタン板を界面活性剤, アセトンおよび超純水を用いてそれぞれ10分間超音波洗浄し, この試片を400°Cに保持したマッフル炉で1時間熱処理を行い, その後自然放冷し, ルチル型酸化チタン層を形成させ

た試片を酸化チタン試片(HT)とした。SBF-FRSに, HT試片2枚を対面配置させた隙間空間について, アパタイト粒子の析出挙動に及ぼす流速及び浸漬時間の影響を調べた。所定の流速及び浸漬時間SBFに浸漬した試片の表面構造を薄膜X線回折法で調べ, 表面形態を走査電子顕微鏡で観察し, SEM写真から画像解析ソフトを用いて, 申請者等の発表論文(Nakao, *et al.*, *J. Ceram. Soc. Japan*, 118[6], pp.483-486 (2010))と同様の方法で調べた。静的環境(S)の条件としてSBF-FRS内に500 µLのSBF(pH7.4, 36.5°C)を1日間および2日間保持した。得られた試片をそれぞれS1dおよびS2dと表記した。動的環境(F)の条件としてリザーバーに溜めたSBF(pH7.4, 36.5°C)をペリスタティックポンプを用いて0.01 mL/minの流速で2日間保持した。得られた試片をF2dと表記した。静的環境に2日間保持した後に, 続けて動的環境に1日間保持した。得られた試片をS2dF1dと表記した。S2dおよびS2dF1dには試片表面上に白色の析出物が観察されたが, F2dの試片表面上には析出物は観察されなかった。SEM画像より, S2dの試片表面上には半球状の粒子(0.5~2.5 µm)が少量分散して析出しているのが観察されたのに対して, S2dF1dの試片表面上には全面にアパタイト粒子(10 µm程度)が析出し, 粒子同士が融合している様子が観察された。一方, 動的環境によって隙間空間のSBFの淀みが打ち消されたSBF動的環境ではアパタイト粒子が析出しなかった。SEM画像より, S2dF1dはS2dと比較してアパタイトの粒子径および被覆率は大きく増加した。したがって, 静的環境に保持した期間内に熱酸化チタン層の表面に所定量のアパタイト粒子が一端析出すれば, その後に続く動的環境下で新規のアパ

イトの核形成が誘導され、二次粒子の成長が著しく促進されることがわかった。

- [2] SBF-FRS内に500 μ LのSBFを2日間および3日間の静的環境で保持し、得られた試片をS2dおよびS3dと表記した。SBF-FRS内に500 μ LのSBFを2日間の静的環境で保持した後に、SBFリザーバーから流速0~0.30 mL/minで、所定の期間 (nh, n=3, 6および12)保持した。SBFへ浸漬後に得られた試片をS2dF(流速)nhと表記した。

S2dF(0.01)12h, S2dF(0.05)12h および S2dF(0.10)12hにアパタイト粒子が確認された。S2dの後に続けて動的環境に保持した試片では保持時間および流速に比例してアパタイト形成量が増加した。0.5-2.0 μ mの粒子径のアパタイト粒子が観察された。S2dおよびS3dでは粒子数および被覆率に差はなかった。S2dF6hの全ての試片はS2dおよびS3dよりも粒子数および被覆率が増加した。S2dF(0.10)6hは、S2dF(0.01)6hおよびS2dF(0.05)6hよりも被覆率が増加した。

以上の結果に基づいて、隙間環境下でのアパタイト形成機構を考察すると、(1) SBF動的環境ではあらかじめ析出したアパタイト粒子層からアパタイト結晶の微粒子または核がSBFの流れによって飛散する。(2) アパタイト結晶の微粒子または核は動的環境の流れ方向に沿ってHT試片表面のアパタイト核形成サイトに沈着して、そこで成長する。(3) SBFの流速(0~0.10 mL/minの範囲)に比例して、飛散するアパタイトの微粒子および核が増加し、沈着する頻度も増加し、アパタイト粒子数および被覆率が増加したと考えられる。

- [3] 各種基板(cpTi, Ti6Al4V, Al)と対面配置してSBFに7日間浸漬後のCHT試片のTF-XRDパターンに基づけば、チタン、チタン合金と対面配置したCHT試片では

$2\theta = 32^\circ$ 付近にアパタイトに帰属される回折ピークがみられた。また、チタンと対面配置したCHT試片では $2\theta = 28^\circ$ 付近にもアパタイト由来の回折ピークがみられた。アパタイト由来のピーク強度はCHT(vs. Ti64)よりもCHT(vs. cpTi)が高かった。Al板と対面配置したCHT試片では7日間SBFに浸漬してもアパタイトに帰属される回折ピークはみられなかった。これより、CHT試片のアパタイト形成能は対面基板が cpTi > Ti64 > Alの順に低下することがわかった。また、7日間SBFに浸漬後の全ての対面基板 (cpTi, Ti64, Al) でアパタイトに帰属される回折ピークはみられなかった。そこで、試片表面をより詳細に調べるために、XPSで試片表面の化学状態を調べた。7日間各種基板と対面配置してSBFに浸漬したCHT試片のワイドスキャンXPSスペクトルには、浸漬後の全ての試片で、347.5 eVにCa $2p_{3/2}$ のピーク、133.9 eVにP $2p$ のピークが検出された。Ca $2p_{3/2}$ のピーク位置はヒドロキシアパタイト (HAp) の文献値 (Ca $2p_{3/2}$: 347.4 eV, P $2p$: 133.2 eV)と一致したのに対して、P $2p$ のピークはHApよりも0.7 eV高束縛エネルギー側にみられた。このP $2p$ の化学シフトは、CaHPO $_4 \cdot 2H_2O$ (DCPD) (Ca $2p_{3/2}$: 347.4 eV, P $2p$: 133.7 eV)の文献値と近かった。全ての試片において、TF-XRDでDCPD由来の回折ピークが検出されなかったことから、全ての基板表面にDCPDに近いリン酸カルシウムの化学状態でCa()及びP()が存在すると考えられる。また、CHT(vs. Al)表面で、74.6 eVにAl $2p$ のピークが検出された。Al $2p$ のピーク位置が、Al(OH) $_3$ (Al $2p$: 74.7 eV)の文献値に近かったことから、Al()はAl板から溶出して、隙間内を拡散し、水酸化物としてCHT表面に吸着すると考えられる。また、CHT(vs. Al)を、新しいSBF

に7日間浸漬したところ、新たなアパタイト粒子層の析出は確認されなかった。これらの結果から、隙間環境下でCHT表面に吸着したAlによってアパタイト形成が阻害されることがわかった。SBF中でAl系金属基板からAl()が溶出して、対面基板に向かって拡散し、対面基板上に吸着する。このCHT表面に吸着したAl()はアパタイトの核形成を阻害すると考えられる。

- [4] 本研究成果は、整形外科や歯科のインプラントデバイスに骨組織結合性を付与するために、熱酸化処理や化学酸化処理を施して酸化チタン層を形成させるなどの表面改質を行い、これを金属チタン及びチタン合金や異種基材と組み合わせて隙間空間を適用する際的设计指針を与えるものである。

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 件)

[学会発表](計 2件)

早川聡・岡本啓吾・小西敏功・尾坂 明義・増田佳丈・加藤一実・城崎由紀, 隙間環境下でチタン合金表面に *in vitro* アパタイト形成を誘起する酸化チタンコーティング, 日本セラミックス協会 2014 年年会, 2014 年 3 月 19 日, 横浜市 (慶應義塾大学)

岡本啓吾・小西敏功・早川 聡, 水熱処理した金属チタン基板の隙間環境下での *in vitro* アパタイト形成能の評価, 第 52 回セラミックス基礎科学討論会, 2014 年 1 月 9 日, 名古屋(ウイנקあいち)

[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

早川 聡 (HAYAKAWA SATOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 20263618

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

尾坂 明義 (OSAKA AKIYOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 20033409