

機関番号：30110

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19592257

研究課題名 (和文) ヒドロキシアパタイトで被覆した骨伝導型多孔質インプラントの開発と骨伝導機構の解明

研究課題名 (英文) Development of HA coated implant with porous surface structure and analysis of its osteoconductive property.

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

研究成果の概要 (和文)：表面をポーラス構造にしたチタン製人工歯根をリン酸カルシウム溶液中で電氣的に加熱し、骨の無機成分であるヒドロキシアパタイト(HA)の皮膜を均一に形成する手法を開発し、骨と早期に強く結合する人工歯根を製作した。また、形成した HA が骨の新生を促進する作用は、人工歯根埋入時に生じる炎症によって低下した周囲組織の pH を速やかに上昇させる HA の pH 緩衝能が一因となっている可能性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)： Thermally induced liquid-phase deposition method was developed to produced a thin hydroxyapatite (HA) film on a porous surfaced titanium oral implant in a calcium phosphate solution. It was also demonstrated that osteoconductive properties of HA film was most likely attributed to its buffering action in inflammatory tissue with low pH when the implant was inserted into bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生体材料工学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：口腔インプラント、多孔質インプラント、ヒドロキシアパタイトコーティング、純チタン、骨伝導性

1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔インプラントの骨埋入部をヒドロキシアパタイト (HA) 薄膜でコーティングする表面処理法は、骨伝導性の付与に有効であることが、多くの実験によって確認されている。しかし、純TiやTi合金の表面にHA薄膜を形成する様々な手法が提案されているが、多孔質な表面に対しても均一なHA薄膜を簡

便に形成できる方法は、本研究課題申請時には開発されていなかった。表面に形成されたポーラス構造の空隙に骨の侵入を早期に実現できる骨伝導型多硬質インプラントが開発され、骨とインプラントフィクスチャーとの機械的結合が強化されれば、インプラントの初期固定が向上するばかりでなく、短いインプラントの使用が可能となり、臨床きわ

めて有効であるものと考えられた。

一方、申請者等は、HAの溶解度が温度の上昇とともに低下することを利用し、リン酸カルシウム溶液中でTi基盤を加熱することによって、簡便にHA薄膜を形成できることを見出している。本手法は、湿式法でHA薄膜を形成するため、多孔質な表面構造を有するインプラントの表面処理に有効であり、HA薄膜で被覆した骨伝導型多孔質インプラントの開発に活用できるものと考えられた。

(2) HAをコーティングすることによって、①早期に骨結合が得られる、②骨との接合強度が高くなるなどの効果が実験的に確かめられているが、どのような機構でHAが骨伝導性を発現しているかに関しては明らかにされておらず、HAの骨伝導機構の解明が急務であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、HAが骨伝導性を発現する機構を明らかにするとともに、多孔質なインプラントフィクスチャーに対しても、高い骨伝導性を有するHA薄膜を細孔の内部まで均一に形成するコーティング法を確立し、骨伝導型多孔質インプラントを開発することである。具体的な研究項目としては、(1) HA薄膜形成時の基盤加熱温度やHA薄膜の熱処理条件と析出したHAの結晶性や溶解性との関係を調べる、(2) HA薄膜の溶解性とpH緩衝能との関係を明らかにし、仮説として提示している骨伝導モデルを理論的に構築するための基礎データを得る、(3) HAコーティング前後における純TiやTi合金の耐食性を評価するなどである。最終的には、(1)～(3)の基礎データに基づいて、溶解性およびpH緩衝能を調整したHA薄膜を均一にコーティングした多孔質インプラントを製作する。

3. 研究の方法

(1) 材料

口腔インプラントのフィクスチャーに用いられているJIS第2種純Tiを用いた。基盤加熱法で均一なHA薄膜を形成させるための前処理として、60℃に保った6Mの水酸化ナトリウム溶液中に試料を1時間浸漬するアルカリ処理を施した。

(2) HA薄膜の形成

前処理を施した基盤を自発的に沈着物が生じることのない準安定石灰化溶液(リン酸カルシウム溶液、pH7.4、Ca/P=1.67)に浸漬し、電流の印加にともなうジュール熱で加熱することによって、基盤の表面にHA皮膜を形成した。HA薄膜を形成する条件として、①溶液のpH、②基盤温度(40℃～70℃)、③

基盤加熱時間(0.5h～5h)を検討し、析出したHA薄膜の構造と特性を評価した。

(3) 形成したHA薄膜の構造と特性の評価析出したHA結晶の形態ならびにHA薄膜の厚さは、試料の表面と断面を走査電子顕微鏡(SEM)で観察することによって調べた。また、HAの結晶性は、X線回折で調べた。析出したHA結晶のCa/Pは、基盤上に生成したHAを酸溶液に溶解し、カルシウムイオン濃度(原子吸光法)とリン酸イオン濃度(リンモリブデン酸比色定量法)を測定することによって求めた。

(4) HA薄膜の溶解性とpH緩衝能の評価HA薄膜を形成した基盤を生理食塩水およびトリシューマリン酸系緩衝液(初期のpHを5.2および7.0に調整)に1時間、24時間および168時間(7日間)浸漬し、溶出したCaイオンを原子吸光法で定量して、HA皮膜の溶解性を評価した。また、基盤浸漬前後における溶液にpHを測定した。

(5) アルカリ処理した純Tiの耐食性評価5M NaOH溶液中(60℃)に24時間浸漬してアルカリ処理を施した試料およびアルカリ処理に引き続き、高温酸化処理(700℃、1時間)を施した試料の耐食性を電気化学的手法とICPを用いて調べた。各試料の不動態特性は、Arガスで脱気した0.9%NaCl溶液中で分極曲線を測定することによって評価した。また、0.9%NaCl溶液中に72時間自然浸漬し、溶出したTiイオンをICPで分析した。

4. 研究成果

(1) HA薄膜の形成条件と薄膜の構造

アルカリ処理を施した純Ti上に液中基盤加熱法によって形成するHA皮膜の形成条件と析出したHA薄膜の構造ならびに特性との関係を詳細に調べた。その結果、自発的に沈着物ができるとのしない準安定化リン酸カルシウム溶液(Ca/P=1.67)中では、溶液のpHが7.0-7.4、基盤温度が50℃-70℃の条件下で純Ti基盤上にHA薄膜が形成されることが明らかとなった。特に、①溶液のpHはHA析出に大きく影響し、pHが7.0よりも低い場合には均一なHA薄膜は形成しない、②化学量論比1.67に近いHA結晶が析出する、③基盤温度が低いほど薄膜を形成するHAの結晶が微細になる、④基盤加熱時間に比例して薄膜の厚さが増大することが分かった。

図1に加熱処理によってHA結晶が析出したTi基盤で得られたX線回折パターンを示す。HAと下地のTi基盤に由来する回折ピークが認められる。 $2\theta=25.9^\circ$ に存在するHA(002)の回折ピーク強度は著しく高く、HA結晶はc軸方向に優先的に成長しており、Ti基盤表面に配向

析出していることが分かった。

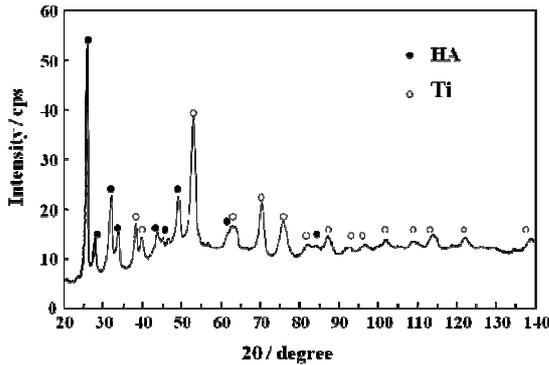


図1 形成したHA薄膜のX線回折パターン (60°C、3h)

(2) HA 薄膜の形成機構 (HA 結晶の核生成とその前駆過程)

図2にアルカリ処理を施したTi基盤表面およびアルカリ処理後に60°Cの塩化カルシウム溶液に0.5時間浸漬したTi基盤表面で得られたESCA広域スペクトルを示す。アルカリ処理後のTi基盤表面で得られたスペクトルには、チタン酸ナトリウム水和ゲルに由来するNa 1sピークが明瞭に認められる。しかし、アルカリ処理後に塩化カルシウム溶液中に浸漬したTi基盤表面で得られたスペクトルでは、Na 1sピークの強度が著しく低下しており、新たにCa 2pピークとCa 2sピークが出現している。SEMで観察したチタン酸ナトリウム水和ゲルの網目構造に変化は認められないことから、ESCAの分析深さである1 nm程度の表面で、NaイオンとCaイオンの交換が生じていることが分かった。したがって、アルカリ処理に生成したチタン酸ナトリウムの表面にCaイオンが濃縮することが、基盤温度の上昇にともなうHAの析出反応にとって重要であることが明らかとなった。

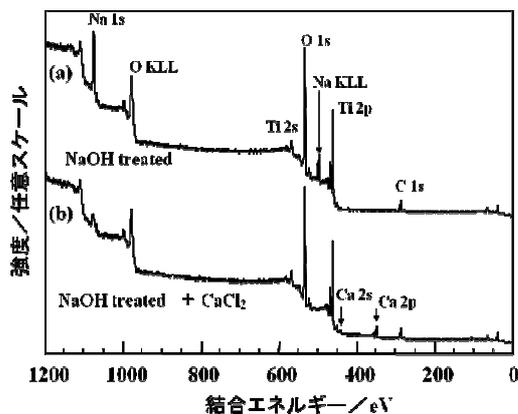


図2 Ti基盤表面で得られたESCA広域スペクトル (a) 5M NaOH溶液 (60°C、24h)、(b) 5M NaOH溶液+2.2 mM CaCl₂溶液 (60°C、24h)

(3) HA 結晶の析出速度

HAの析出速度を求めたところ、50°Cでは0.23 mg/cm²/h、60°Cでは0.41 mg/cm²/h、70°Cでは0.65 mg/cm²/hとなり、基盤温度が高いほどHAの析出速度は速くなることが分かった。HA析出速度の対数を基盤温度(絶対温度)の逆数に対してプロットした結果を図3に示す。直線の傾きから求めた活性化エネルギーの値は、47 kJ/molとなった。したがって、液中基盤加熱法によるHA薄膜の成長反応では、E_aの値が47 kJ/molと大きいことから、Ca²⁺とPO₄³⁻が溶液バルクからTi基盤界面へ拡散する過程が律速となっているのではなく、これらのイオンが結晶化する過程が律速となっている。石灰化溶液中におけるCa²⁺やPO₄³⁻の拡散過程が律速となる場合には、基盤の表面と比較して細孔内部には、これらのイオンが溶液バルクから供給されにくくなる。したがって、細孔内部には十分なHAが析出しないため、均一なHA薄膜が形成されない。それに対して、本研究で開発した液中基盤加熱法では、活性化エネルギーが47 kJ/molと高く、結晶化の過程が律速となっている。その結果、細孔内部まで溶液バルクからCa²⁺やPO₄³⁻が供給されるため、表面のみならず細孔の内部にもHA薄膜を形成することができる。これらの結果から、本手法は多孔質な表面構造を有するインプラントの表面に均一にHA薄膜を形成する手法として優れていることが明らかとなった。

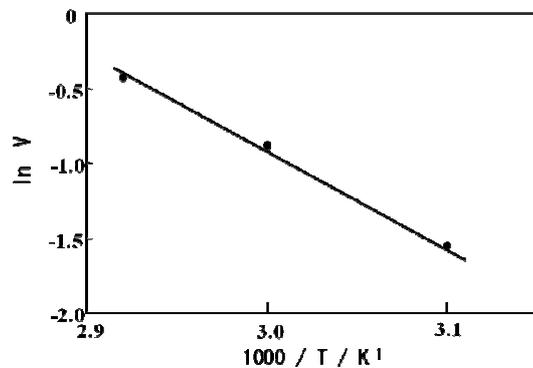


図3 HA結晶成長反応のアレニウスプロット

(4) HA 薄膜の溶解性とpH緩衝能

図4にHA薄膜を形成したTi基盤を生理食塩水(pH5.8)およびトリスマレイン酸系緩衝液(pH7.03及びpH5.23)にそれぞれ1時間、1日、1週間浸漬し、HAの溶解にともなう溶液中に溶出したCaイオン量を示す。図中に示した数値は、浸漬試験終了時における溶液のpHである。pH5.23の緩衝液中では、浸漬1時間で100 μg/cm²以上のCaイオンが溶出した。時間の経過とともに溶出量は増加する傾向が認められ、1週間浸漬した試料では、基盤上のHAが全て溶解していた。したがって、実際に1週間の浸漬期間中に溶出す

る Ca イオンの量は、図 4 に示した値よりも高いものと考えられる。pH 7.03 の緩衝液中における Ca イオン溶出量は、pH5.23 の緩衝液中と比較すると少ない。また、浸漬 1 日後と 1 週間後の溶出量には、有意な差が認められなかった。したがって、pH 7.03 の緩衝液中では、浸漬 1 日後には HA の溶解は停止していることが分かった。いずれの緩衝液においても、試験前後で pH の値に変動は見られなかった。生理食塩水中では、時間の経過とともに Ca イオンの溶出量が増加した。また、溶液の pH は HA の溶解にともなって上昇し、弱酸性から中性へと変化した。

生理食塩水中において HA の溶解にともなう pH の上昇は、(1)～(4)式に示すように、HA の溶解にともなって溶出した水酸化物イオン(OH⁻)やリン酸イオン(PO₄³⁻)が弱酸性溶液中のプロトン(H⁺)を中和するために生じる。

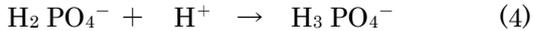
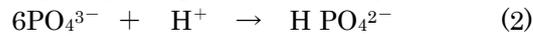
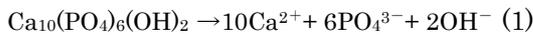


図 4 に示すように、pH 7.03 の緩衝液中では、浸漬 1 日後には HA の溶解が停止していた。これらの結果から、Ti 基盤上に析出した HA 薄膜は、弱酸溶液中で溶解することによって、その pH 緩衝作用によって溶液の pH を上昇させるとともに、溶液が中性化すると HA 薄膜の溶解は停止することが明らかとなった。

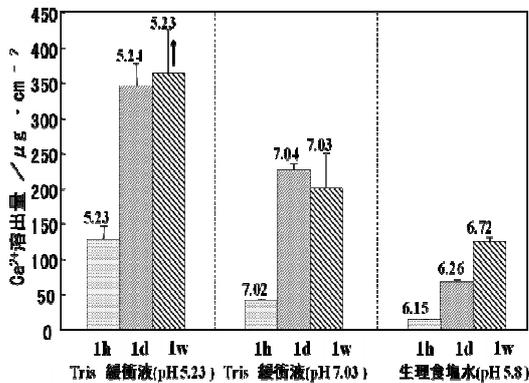


図 4 HA 薄膜からトリス-マレイン酸緩衝液 (pH5.23、pH7.03) および生理食塩水中に溶出した Ca²⁺ と pH の時間変化 (図中の数値は、浸漬試験後における溶液の pH を示す)

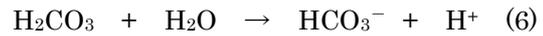
(5) HA 薄膜の骨伝導能発現機構

動物実験の結果から、HA をコーティングした Ti インプラントでは、埋入初期における骨の接触率や回転除去トルクの値が Ti インプラントと比較して高くなることが明らかとなっている。現在までに、HA の溶解にともなって

溶出する Ca²⁺ が骨芽細胞の細胞増殖やコラーゲンの合成及び骨形勢タンパク質の遺伝子発現を刺激することが、細胞培養系で明らかにされているが、HA が新生骨の形成を促進する機構に関して十分に解明されているとは言えない。そこで、周囲組織の pH がインプラントの埋入直後に低下することに着目し、HA 薄膜の溶解性および pH 緩衝作用と骨伝導能との関係について考察する。インプラントの埋入直後は、骨に急性炎症が生じているために周囲組織の pH が 5.2 程度まで低下することが知られている。急性炎症が生じている組織の pH が低下する理由は明らかにされていないが、免疫系細胞の集積と呼吸活性の上昇に関係した現象と考えられる。すなわち、集積した膨大な数の細胞の呼吸によって放出される CO₂ は、体液中では炭酸 (H₂CO₃) と平衡状態にある。



H₂CO₃ は(6)、(7)式に示すように解離するため、組織の pH は低下して弱酸性になる。



急性炎症によって pH が低下したインプラント周囲組織では、pH が中性化するまでは骨組織の再生は起こらないものと考えられる。その理由は、pH が低下した組織では HA の飽和度が低下するために、骨の無機成分である HA が析出しなくなるためである。前述したように、本実験で用いた石灰化溶液では、pH が 6.7 よりも低下すると Ti 基盤を 60 °C に加熱しても HA はほとんど析出しなかった。生体内で見られる石灰化には細胞が関与しており、単純な HA の物理化学的析出過程とは異なる。しかし、pH が低下し HA の飽和度が低い環境下では、新生骨が形成されにくいものと考えられる。

図 4 に示したように弱酸性の環境下では、HA の溶解は促進される。また、(1)～(4)式で示した HA の pH 緩衝作用によって、弱酸性の環境を中性化する。したがって、Ti インプラントの表面にコーティングされた HA には、溶解にともなって Ca²⁺ を供給するばかりでなく、低下した周囲組織の pH を中性化し HA の飽和度を上昇させることによって、新生骨の形成を促進する効果があると考えられる。コーティングされた HA は、周囲組織の pH 低下に反応して溶解し、その緩衝能によって周囲組織の pH が上昇すると溶解が自動的に停止することから、極めて制御された徐放系として機能し、骨伝導能を発現しているものと考えられる。

(6) アルカリ処理した純 Ti の耐食性

分極曲線を測定した結果、研磨した純 Ti 試料とアルカリ処理を施した純 Ti 試料で得られ

た不動態保持電流密度に差はみられなかった。自然浸漬状態で0.9%NaCl溶液に溶出したTiイオンは、いずれの試料においてもICPの定量下限以下であった。以上の結果から、アルカリ処理を施した純Tiは0.9%NaCl溶液中で研磨した試料と同様に不動態化しており、その耐食性は高いことが明らかとなった。

(7) TiN皮膜でコーティングした純Ti製アバットメントの耐食性と細胞適合性

多孔質なインプラントの骨埋入部と組み合わせるアバットメント(粘膜貫通部)の耐食性および組織適合性を向上させるため、TiNコーティングに関しても検討を加えた。インプラントの純Ti製アバットメントにアークイオンプレーティング法を用いて、厚さ3μmのTiN皮膜を形成し、その耐食性と細胞の動態を調べた。その結果、生理食塩水中および酸性フッ化物溶液中における耐食性は研磨した純Tiと比較して、著しく高くなることが分かった。また、TiN皮膜上における上皮細胞や線維芽細胞の付着、伸展および増殖挙動を調べた結果、純Tiと同等の細胞親和性を有することが明らかとなった。

(8) 得られた成果の位置づけと今後の展望
石灰化溶液中でTi基盤を加熱する簡単な処理によって、表面にHA薄膜を均一に形成できる手法を開発した。本手法は、湿式で簡単にTi基盤にHA薄膜コーティングを施すことができるため、特に多孔質な表面構造を有するインプラントの表面処理法として有用である。石灰化溶液のpHを厳密にコントロールすれば、HA薄膜の形成速度、厚さ及び密度は基盤温度と基盤加熱時間を制御することによって簡単に調節できるなどの利点を有していることから、本手法は骨伝導型多孔質インプラントの実用化に大いに寄与するものと考えられる。

液中基盤加熱法によるHA薄膜形成法の欠点としては、その適用が電子伝導性を有する金属に限定されることである。今後の課題としては、現在インプラント材として検討されているジルコニアなどのセラミックスの表面にも、均一なHA薄膜を形成するために、レーザー照射による加熱法などを検討する必要がある。

(9) 結論

本研究では石灰化溶液中で純Ti基盤に電流を印加して加熱する簡単な処理によって、基盤表面にHA薄膜を均一に形成する手法を検討した。また、基盤温度や基盤加熱時間ならびに溶液のpHなどの処理条件と形成したHA薄膜の構造との関係を詳細に調べた。さらに、形成したHA薄膜の溶解性とpH緩衝能を調べ、それらの性質とHAの骨伝導能との関係について検討した。得られた知見を以下に示す。

①石灰化溶液中で純Ti基盤に電流を印加する

簡単な操作で、表面にHA薄膜を形成することができる。

②チタン酸ナトリウム水和ゲルは、HA結晶生成の前駆過程として、表面にCa²⁺を取り込んで濃縮し、HA核生成の自由エネルギーを低下させることによって、均一なHA薄膜の形成に寄与する。

③HA結晶の成長反応はCa²⁺とPO₄³⁻の拡散過程が律速ではなく、結晶化の過程が律速となっていた。

④HA薄膜の形成速度、厚さ及び密度は基盤温度と基盤加熱時間を制御することによって、簡単に調節できる。

⑤石灰化飽和溶液のpHはHAの析出に大きく影響し、本研究で用いた溶液では、pHを7.2～7.4の範囲に厳密に調整することが、HA薄膜を形成する上で重要である。

⑥アルカリ処理を施しても、純Tiの不動態は維持されており、高い耐食性を示す。

⑦純Ti表面に対するアークイオンプレーティング法によるTiN皮膜の形成は、耐食性の著しい向上に効果的であるため、HAコーティングした多孔質なフィクスチャーと組み合わせるアバットメントの表面処理法として優れている。

⑧HA薄膜は、周囲組織のpHに応答して溶解し、pHを緩衝するインテリジェントな薄膜として機能することによって骨伝導性を発現しているものと考えられる。

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1件)

① K. Endo, M. Hashimoto, K. Haraguchi, H. Ohno: Crystal growth by restorative filling materials, Eur. J. Oral Sci., 査読有, 118, 2010, 489-493.

[学会発表] (計7件)

① K. Endo, M. Hashimoto, et. al.: Corrosion Behavior of Alkali-Treated Titanium in 0.9% NaCl Solution, The 88th General Session & Exhibition of IADR, July 17, 2010, Barcelona, Spain.

② H. Naganuma, K. Endo, et.al.: Corrosion Resistance of TiN-coated Ti in Acidic Fluoride Solution, The 88th General Session & Exhibition of IADR, July 17, 2010, Barcelona, Spain.

③ 遠藤一彦、橋本正則、他2名: 液相析出法を用いてTi表面に形成したHA薄膜の溶解性とpH緩衝能, 第54回日本歯科理工学会学術講演会, 2009年10月2日, 鹿児島(県民交流センター).

④ 長沼広子、遠藤一彦、他6名: TiNコーティングした純Tiの酸性フッ化物溶液中における耐食性, 第54回日本歯科理工学会学術講演会, 2009年

10月2日, 鹿児島(県民交流センター)。

⑤遠藤一彦、亀澤広子、他4名: Ptコーティング併用高温酸化処理を施した純Tiの酸性フッ化物溶液中における腐食挙動, 第53回日本歯科理工学会学術講演会, 2009年4月11日, 東京(タワーホール船堀)。

⑥遠藤一彦、亀澤広子、他3名: 酸性フッ化物溶液中におけるTiおよびTi合金の腐食挙動第51回日本歯科理工学会学術講演会, 2008年4月27日, 横浜(鶴見大学)。

⑦K. Endo, M. Tamura, H. Ohno: Mechanism of Hydroxyapatite Film Formation on Titanium Substrate by Thermally Induced Liquid-phase Deposition Method, International Dental Materials Congress 2007, November 24, 2007, Bangkok, Thailand.

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