

## 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 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21560712

研究課題名（和文）ヒドロキシアパタイト中空粒子の組成・形態制御と抗菌剤徐放歯科インプラントへの応用

研究課題名（英文）Control of composition and morphology of hollow hydroxyapatite microspheres and their application to dental implant materials releasing an antimicrobial agent

研究代表者

木村 勇雄 (KIMURA ISAO)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00169921

研究成果の概要（和文）：複合エマルジョンを利用してヒドロキシアパタイトやリン酸水素カルシウムなどのリン酸カルシウム系化合物中空ミクロスフィアを調製した。マグネシウム塩、炭酸塩、あるいは低分子有機化合物を添加することにより、組成、形態、結晶性などを制御した。抗菌剤徐放歯科インプラントに応用するための基礎的知見を得るために、チタン上へそのミクロスフィアを付着させる条件を検討した。チタンねじ表面上にミクロスフィア層を形成し、そこに抗菌剤モデル物質としての色素溶液を含浸させ、生分解性ポリマーであるポリ乳酸で被覆してモデルインプラントを作製した。さらに、インプラント術前の歯根治療への応用を念頭に置いて、ミクロスフィアと生分解性ポリマーとの複合マイクロカプセルを調製した。

研究成果の概要（英文）：Hollow microspheres of calcium phosphate compounds (such as hydroxyapatite, calcium hydrogen phosphate, etc.) were prepared by using multiple emulsions. The composition, morphology, and crystallinity were controlled by the addition of one of a magnesium salt, a carbonate, and low molecular weight organic compounds. For obtaining fundamental knowledge to apply the microspheres to dental implants which release an antimicrobial agent, the conditions for making them adhere onto titanium were investigated. A model implant was fabricated through the following procedures: the formation of microsphere layers on the surface of a titanium screw, the impregnation of a dye solution as the model material of an antimicrobial agent into the microsphere layer, and the coating with biodegradable polymer, poly(lactic acid). With the aim of applying the microspheres to a root canal treatment, composite microcapsules of the microspheres with biodegradable polymer were prepared.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学，複合材料・物性

キーワード：複合粒子，無機質壁マイクロカプセル，医用材料

### 1. 研究開始当初の背景

チタン製人工歯根の定着性を向上させるために、チタンと顎骨の結合（オッセオインテグレーション）の促進を目的として、チタン表面のヒドロキシアパタイト（HAp）コーティングが国内外を問わず以前から試みられている。しかし、臨床現場ではほとんど活用されていない。その原因として、チタン表面の HAp コーティング段階で HAp の変成を招く材料プロセシング的瑕疵が挙げられる。本申請課題では、HAp 中空ミクロスフィアを組成と構造を制御しながら調製し、温和な条件下でチタンインプラント表面に付着させる。そこに抗菌剤を含浸させることで、施術直後は抗菌剤を徐放して感染症を防ぎ、その後オッセオインテグレーションを促進する機能を有するインプラントを設計した。

### 2. 研究の目的

抗菌剤徐放歯科インプラント作製のための基礎研究として、複合エマルジョンを利用する HAp 中空ミクロスフィアの組成・形態制御と形成機構解明、チタン上への HAp 中空ミクロスフィアの付着条件の最適化、モデルインプラントの作製と抗菌剤モデル物質の徐放特性評価、および抗菌剤モデル物質含有複合マイクロカプセルの調製と徐放制御を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) リン酸カルシウムミクロスフィアの調製と形態制御

リン酸水素二カリウム ( $K_2HPO_4$ ) 水溶液を内水相とした。シクロヘキサンにソルビタンモノオレエート (Span80) を溶解して油相とした。硝酸カルシウム ( $Ca(NO_3)_2$ ) 水溶液にポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (Tween20) を溶解して外水相とした。油相に内水相を加え、ホモジナイザで高速攪拌して W/O 分散系を調製した。これを外水相に投入し、ディスクタービン翼で攪拌して W/O/W 分散系を調製した。洗浄、分離した後、凍結乾燥して HAp 中空ミクロスフィアを得た。走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) による形態の観察、X線回折 (XRD) による相の同定などの評価を行い、調製条件との関係を検討した。

#### (2) Mg 含有 HAp 中空ミクロスフィアの調製

(1)の系において、外水相に硝酸マグネシウム  $Mg(NO_3)_2$  あるいは内水相に炭酸カリウム ( $K_2CO_3$ ) を加え、同様の操作を実施した。内水相の pH は水酸化カリウム (KOH) によって調整した。得られた生成物の評価としては、XRD による格子定数および結晶子径の測定、赤外分光法 (FTIR) による微量含有相の同定などを行った。

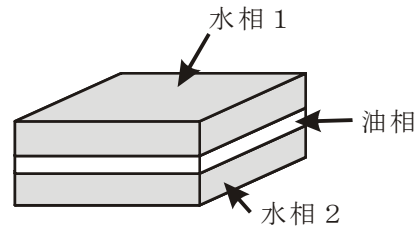


図1 W/O/W系モデル反応系の概略図

#### (3) 複合エマルジョンにおける HAp 生成機構の推定

(1)で用いた2水相にメチルセルロースを溶解し、ゲル化温度以上に保持することでそれぞれをゲル化させた。これらのゲル化した水相が、図1に示すように、意図した厚さの油相と重ね合わせることができる装置を製作した。これを一定温度に保つことにより、リン酸カルシウム系固体の生成を試みた。

#### (4) チタン平板上への HAp 中空ミクロスフィアの付着

鏡面研磨したチタン板をフッ化水素酸 (HF) によってエッチングした。HAp 中空ミクロスフィアをハンクス溶液 (HBSS) に懸濁させてスラリーとし、チタン板で挟んでマイクロプレート中で保持した。このとき、温度を 310 K 一定 (プロファイル A)、あるいは 303 K と 323 K に変動 (プロファイル B) させ、その効果を検討した。HAp 中空ミクロスフィアの付着量は電子線プローブマイクロアナライザ (EPMA) によって評価した。

#### (5) HAp の疑似体液中での溶解析出挙動

HAp 中空ミクロスフィアを疑似体液および純水中に懸濁し、Ca および P 濃度の経時変化を ICP 発光分光分析によって評価した。攪拌方式として往復振盪による弱攪拌とディスクタービン翼による強攪拌を採用して、その効果を比較した。

#### (6) モデルインプラントの作製

チタンねじ表面を(4)と同様に処理し、その表面に HAp ミクロスフィア層を形成させた。ミクロスフィア層に抗菌剤のモデルとなる色素水溶液を含浸させ、ポリ乳酸 (PLA) で被覆した。PLA を溶解する溶媒としてトリクロロメタン (TCM) -シクロヘキサン溶液を使用し、TCM 濃度と浸漬回数を変えて被覆した。HBSS 中への色素の放出濃度を分光光度計によって測定した。

#### (7) PLA/HAp 複合マイクロカプセルの調製

(2)と同様の手法で HAp 中空ミクロスフィアを調製した。HAp 生成後に W/O/W 系に

PLA-TCM 溶液を投入して油相に吸収させた。昇温して TCM を除去し、PLA を析出させることで HAp ミクロスフィアを PLA が被覆する複合粒子を調製した。ここに(6)と同様の手法で色素水溶液を含浸させ、徐放特性を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 生成物の結晶相は無水リン酸水素カルシウム (DCPA) あるいはリン酸水素カルシウム二水和物(DCPD)だった。水相にエタノールアミンを添加すると、粒子は微細化した。複合エマルジョンで得られる生成物は、SEM では粒子表面が起伏に富むミクロスフィアとして観察された。TEM では、シート状ナノ1次粒子がかご上に集合した中空ミクロスフィアである構造が観察された。油相および外水相中の界面活性剤濃度によって生成物の結晶相と形態が制御できることを見出した。

(2) 外水相中の Mg 濃度を増すと、SEM では粒子表面が平滑になる傾向が認められ、注射可能製剤への応用が期待される結果を得た。図 2 にその TEM 写真を示す。シート状粒子のほかに、径が 10~30 nm 程度のナノスフィアが観察される。シート状粒子の割合が相対的に減少したことで、ミクロスフィア表面が平滑化したものと考えた。XRD の結果、HAp 相のほかに whitlockite 相の生成と、HAp 相の結晶性低下が確認された。内水相に CO<sub>2</sub> を含有させた場合にも、結晶性は同様に低下した。これらの結果は、体内溶解性の向上を期待させる。

(3) 水相 1 に K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液を用い、水相 2 に Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 水溶液を用いた場合と、逆の組み合わせにした場合のどちらにおいても K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 水溶液側界面に白色固体が生成した。これまでに提案されている生成機構のうち、Ca<sup>2+</sup>が油相中を移動する種であることが改めて確認できた。一般に言われている油相滴の分裂や浸透圧は関係しないことが示唆された。

(4) HAp 中空ミクロスフィアの付着量は、図 3 に示すようにエッチングに用いる HF 濃度お

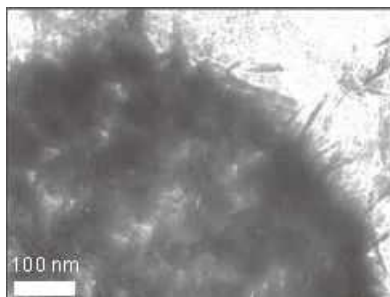


図 2 Mg 含有 HAp 粒子の TEM 写真

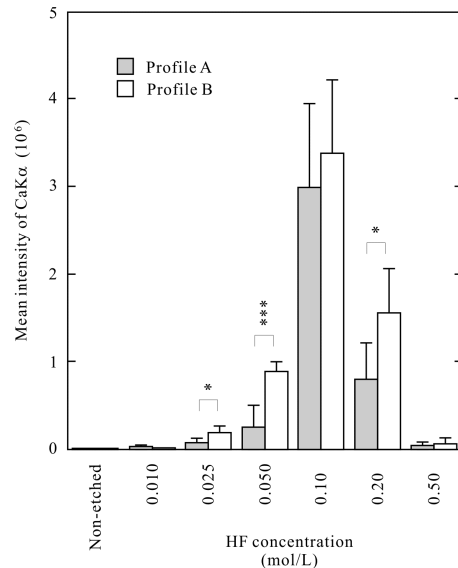


図 3 HAp 中空ミクロスフィアの付着量に及ぼす HF 濃度および処理温度プロファイルの影響

よび処理温度プロファイルによって変化した。付着量はプロファイル A よりもプロファイル B の方が多くなった。これは溶解析出が促進されたためであると考えた。

(5) 溶液中の Ca/P 比は元の HAp より小さく、リン酸カルシウム化合物に関して一般に知られる不一致溶解現象が観察された。ここに、ネルンスト拡散層と速度境界層を考慮したモデルを適用して、(4)で観察されたチタン上への HAp ミクロスフィアの付着に関する機構を推定した。攪拌強度の違いは溶液中の Ca/P 比に影響することを見出した。このことからチタン上に HAp を生成させる際には疑似体液の流動状態が影響することが示唆された。

(6) モデルインプラントとして用いたチタンねじは絞り加工で作製されたものであり、起伏の大きい表面状態を呈していた。適切なエッチング条件を設定することによって、どのような起伏状態の部位にもミクロスフィアを多重層として付着させられることを確認した。市販のインプラントにおいても、その表面は鏡面研磨されたものから不規則に粗いものまで多様である。この手法はどのようなインプラントでも適用可能であることが示唆された。被膜条件によって色素水溶液の含浸量および徐放速度を制御できた。

(7) 得られた生成物は、HAp 中空ミクロスフィアの凝集体を PLA が被覆する構造の複合マイクロカプセルであり、抗菌剤の徐放に対して適切な構造であることを確認した。PLA の被覆条件がモデル抗菌剤としての色素水

溶液の徐放特性に及ぼす影響を調査した。インプラント術前に施す歯根治療のためのマイクロカプセル製剤としての応用が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

① I. Kimura, T. Wei, Y. Kikushima, R. E. Riman, T. Akazawa, "Effects of organic additives on the morphology of various calcium phosphates prepared via solution and emulsion methods", *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 査読有, 18 巻, 2011 年, pp. 1~4, DOI: 10.1088/1757-899X/18/19/192017.

② I. Kimura, M. Kanatani, K. Watanabe, "Adhesion of hollow calcium-deficient hydroxyapatite microspheres onto titanium", *Dental Materials Journal*, 査読有, 28 巻, 2009 年, pp. 700~707.

③ I. Kimura, H. Sato, "Preparation of hollow hydroxyapatite microspheres containing magnesium or carbonate by using a multiple emulsion", *Archives of Bioceramics Research*, 査読有, 7 巻, 2009 年, pp. 199~202.

〔学会発表〕(計11件)

① I. Kimura, S. Shibasaki, T. Tanaka, "Preparation of hydroxyapatite/poly(lactic acid) composite microspheres in a W/O/W emulsion", The 11th Asian Bioceramics Symposium, 2011 年 11 月 30 日, つくば.

② 阿部 司, 木村勇雄, "炭酸カルシウムの多形がリン酸カルシウム系化合物への転化に及ぼす効果", 化学工学会第 44 回秋季大会, 2011 年 9 月 15 日, 名古屋.

③ 木村勇雄, "W/O/W 分散系における無機質ミクロスフィアの形成過程", 日本セラミックス協会第 24 回秋季シンポジウム, 2011 年 9 月 9 日, 札幌.

④ I. Kimura, T. Wei, Y. Kikushima, R. E. Riman, T. Akazawa, "Effects of organic additives on the morphology of various calcium phosphates prepared via solution and emulsion methods", The 3rd International Congress on Ceramics, 2010 年 11 月 16 日, 大阪.

⑤ 菊島祐太, 木村勇雄, "複合エマルジョンを利用するりん酸カルシウム化合物ミクロスフィアの調製 第 2 報 油相界面活性剤濃度の影響", 化学工学会第 43 回秋季大会, 2010 年 9 月 7 日, 京都.

⑥ 野村智哉, 木村勇雄, "W/O 分散系の液滴径制御と無機質ミクロスフィア調製への応用", 化学工学会第 43 回秋季大会, 2010 年 9 月 7 日, 京都.

⑦ 菊島祐太, 木村勇雄, "複合エマルジョンを利用するりん酸カルシウム化合物ミクロスフィアの調製 第 1 報 外水相界面活性剤

濃度の影響", 化学工学会宇都宮大会, 2010 年 8 月 19 日, 宇都宮.

⑧ I. Kimura, H. Sato, "Preparation of hollow hydroxyapatite microspheres containing magnesium or carbonate by using a multiple emulsion", The 9th Asian Bioceramics Symposium, 2009 年 12 月 9 日, 名古屋.

⑨ 木村勇雄, 宮村健司, "界面反応法により調製したヒドロキシアパタイトミクロスフィアの溶解挙動", 日本セラミックス協会東北北海道支部研究発表会, 2009 年 10 月 30 日, 札幌.

⑩ 木村勇雄, 金谷 貢, "カルシウム欠損型ヒドロキシアパタイト中空ミクロスフィアのチタンねじへの付着", 第 54 回日本歯科理工学会学術講演会, 2009 年 10 月 1 日, 鹿児島.

⑪ 佐藤悠正, 木村勇雄, "界面反応法によるマグネシウムおよび炭酸を含有するヒドロキシアパタイト粒子の調製", 化学工学会米沢大会, 2009 年 8 月 11 日, 米沢.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

木村 勇雄 (KIMURA ISAO)  
新潟大学・自然科学系・教授  
研究者番号: 00169921

##### (2)研究分担者

金谷 貢 (KANATANI MITSUGU)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 40177499  
田中 孝明 (TANAKA TAKAAKI)  
新潟大学・自然科学系・准教授  
研究者番号: 00217043

##### (3)連携研究者

赤澤 敏之 (AKAZAWA TOSHIYUKI)  
北海道立総合研究機構・工業試験場・材料化学科長  
研究者番号: 80469692