

## 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5月18日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791894

研究課題名（和文） カルシウム表面修飾による高強度セラミックスへの骨伝導性付与

研究課題名（英文） Ca surface modification gives osteoconductivity to ceramics of high mechanical property

研究代表者

Tarique A. A. (タリク A. A.)

九州大学・歯学研究院・学術研究員

研究者番号：00568983

研究成果の概要（和文）：

高強度セラミックスの表面に原子分子～ナノオーダーレベルで Ca イオンを修飾することにより骨伝導性を付与することを試みた。処理条件の最適化を行った結果、アルミナ基板を 125°C で 7 日間 50mmol・L<sup>-1</sup> の塩化カルシウム水溶液で水熱処理を施した試料表面に、最も多くの Ca が固定化されることが明らかになった。この条件で処理したアルミナ基板は擬似体液中でアパタイトの自発析出能を示した。さらに、ラット骨髄由来細胞の応答を調べたところ、処理群は未処理群と比較して有意に高い値を示した。

研究成果の概要（英文）：

We examined whether Ca surface modification ranging from molecular to nano order level gave osteoconductivity to ceramics with high mechanical property. As a result of optimization for treatment condition, it was appeared that much Ca ions could be immobilized onto alumina substrate when hydrothermally-treated at 125°C in the presence of 50 mmol・L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> solution for 7 days. The treated alumina substrate showed spontaneous apatite deposition in simulated body fluid. Response to rat bone marrow cell was investigated so that the response on the treated alumina substrate was significantly higher than those on non-treated alumina substrate.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：アルミナ、表面改質、骨伝導性

## 1. 研究開始当初の背景

アルミナは優れた審美性、生体親和性を示すだけでなく、機械的強度にも優れているが、生体不活性（生体内に埋入されると線維性の皮膜で覆われ、骨組織との直接的な結合が獲得できない）である。そのため、インプラント材として用いると、経時的にルーズニング（ゆるみ）が生じ、再手術を余儀なくされる。

申請者の所属する研究室では、骨伝導性材料として、最近、臨床使用が認可されたアルカリ加熱処理チタンに学び、この材料を生体内に埋入すると Ca イオンが材料表面に結合するという報告から、あらかじめチタン表面を Ca で修飾しておけば、骨伝導性を持つチタンが創製できるのではないかと考え、Ca 塩水溶液中でチタン基板を水熱処理したと

ころ、アルカリ加熱処理以上に骨伝導性の高いチタンが創製できることが分かった。

## 2. 研究の目的

Ca 塩水溶液中におけるチタン基板の水熱処理においては、チタン基板表面の水酸基を媒介して Ca がチタン表面に修飾されるが、チタンと同様にアルミナにも水酸基が表面に多く存在することから、同様の水熱処理がアルミナにも適用できるのではないかと考えられた。

よって、本研究では、アルミナ基板に対して、チタン基板同様に Ca イオンを含む水溶液中で水熱処理する手法を適用し、アルミナ表面への Ca の修飾を試み、アルミナに骨伝導性が付与できたかどうかを、擬似体液を用いた *in vitro* 骨伝導性評価および細胞試験によって明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)アルミナ基板の水熱処理

10 mm x 10 mm の大きさに切り出したアルミナ基板を異なる濃度のカルシウム塩水溶液の入ったテフロン製容器に入れ、ステンレス製の耐圧容器に封入し、種々の期間（最大 7 日）、種々の温度（最大 200°C）で水熱処理を施した。X 線光電子分光分析装置

(XPS) を用いて、処理によって修飾された Ca の量を調査した。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて処理前後のアルミナ基板の表面構造を観察した。3D レーザー顕微鏡を用いて処理前後のアルミナ基板の表面粗さを調べた。

### (2)擬似体液を用いた *in vitro* アパタイト形成能評価

ISO/FDIS23317 に基づき、(1)の検討で最適化された処理条件で処理を施したアルミナ基板を、擬似体液 (36.5°C, pH=7.4) に 7 日間浸漬し、その表面におけるアパタイト析出の状況を調べた。未処理試料をコントロールとして用いた。薄膜 X 線回折装置

(TF-XRD) を用いて表面の析出物の結晶相がアパタイトであるかどうかを確認した。さらに、SEM を用いて析出物の量や形態を観察するとともに、付属のエネルギー分散型 X 線マイクロアナリシス (EDX) を用いて化学組成を分析した。

### (3)ラット骨髄由来細胞による細胞応答

ラット骨髄由来細胞を用いて、Ca 修飾を施したアルミナ基板の表面における、初期の細胞接着形態、細胞増殖挙動、分化、石灰化を調べ、未処理のアルミナ基板および CaCl<sub>2</sub> を含まない蒸留水を用いて水熱処理を施したアルミナ基板の結果との比較を行うことで、本処理の有効性を評価した。

## 4. 研究成果

最初に、本処理に用いるカルシウム塩水溶液に関する検討を行った。水酸化カルシウムを用いた処理では、今回条件を変動させた濃度、処理温度、処理時間範囲において、処理後のアルミナ基板表面に Ca の存在を確認することはできなかった。唯一、塩化カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) を用いた場合には、125°C で処理したアルミナ基板において Ca の存在が確認され、CaCl<sub>2</sub> 水溶液の濃度に関する検討では 50 mmol・L<sup>-1</sup>、処理時間に関する検討では 7 日処理において、最も多くの Ca が表面修飾されることが明らかになった (図 1)。水熱環境下におけるアルミナ基板と溶液の反応性の違いが Ca の固定に影響を及ぼしたと推察された。150°C, 200°C と処理温度を高めると基板表面に存在する Ca 量が低下した原因については、水熱処理環境において、相反する二つの反応、即ち、基板表面への Ca の固定と基板の腐食が同時に生じており、処理温度が高すぎると、腐食反応が高まり Ca の固定に不利に働いたと考察された。

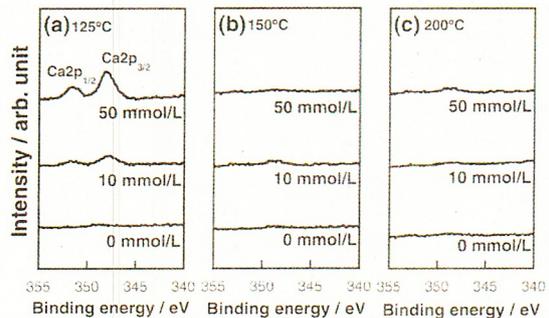


図 1 種々の濃度の CaCl<sub>2</sub> 水溶液中で、種々の温度で 7 日間水熱処理を行ったアルミナ基板表面の Ca<sub>2p</sub> XPS スペクトル。(a) 125°C, (b) 150°C, (c) 200°C

3D レーザー顕微鏡や SEM を用いた表面の形態観察によると、本処理によるアルミナ基板の表面粗さの変化や形態変化は観察されなかった。

異なる条件で処理を施したいくつかのアルミナ基板を擬似体液に 7 日間浸漬し、アパタイト形成能評価を行った結果、125°C で処理を施した試料にのみ、その表面に析出物が観察された (図 2)。EDX および TF-XRD により、その析出物は Ca 欠損型の低結晶性アパタイトであることが判明した。このアパタイト形成の結果は、XPS によって検出された基板表面の Ca 修飾量 (図 1) と正の相関が認められることから、アルミナ基板表面に修飾された Ca は、体液環境下におけるアパタイトの析出に優位に働くと考えられた。

この結果に基づき、50 mmol・L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> 水溶液を用いて 125°C で水熱処理を施したアル

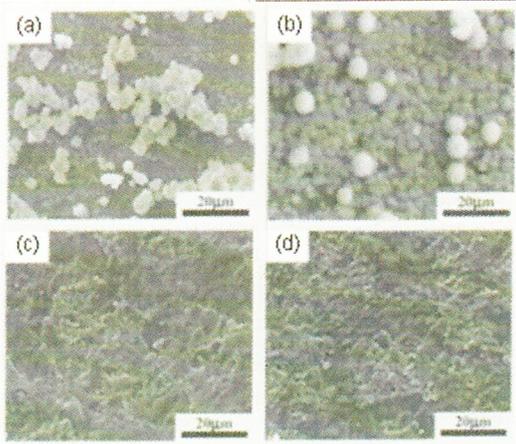


図2 CaCl<sub>2</sub>水溶液中で水熱処理を施したアルミナ基板を7日間擬似体液に浸漬した後の表面のSEM写真。

(a) 10mmol·L<sup>-1</sup>, 125°C, (b) 50mmol·L<sup>-1</sup>, 125°C, (c) 50mmol·L<sup>-1</sup>, 150°C, (d) 50mmol·L<sup>-1</sup>, 200°C

ミナ基板 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>)) を用いて、ラット骨髄由来細胞による細胞応答が調査された。コントロールとしては、未処理のアルミナ基板 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none)) および CaCl<sub>2</sub> を含まない蒸留水を用いて 125°C で水熱処理を施したアルミナ基板 (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)) が用いられた。

各種アルミナ基板上における、ラット骨髄由来細胞播種 24 時間後の細胞形態を図 3 に示す。

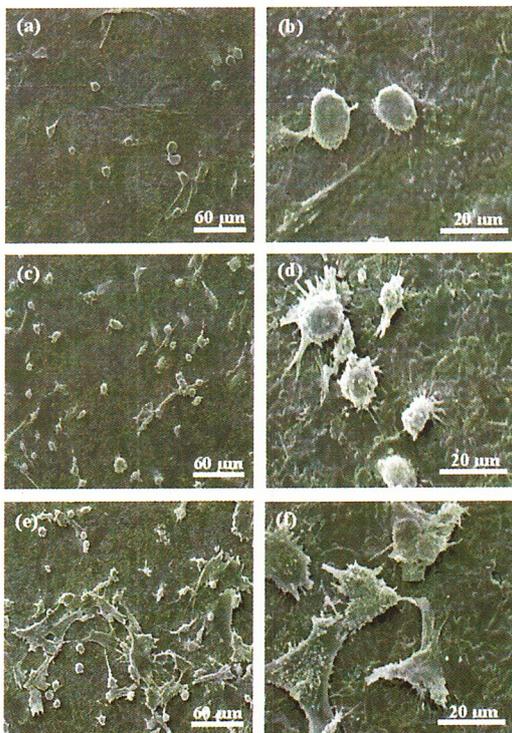


図3 ラット骨髄由来細胞を24時間培養した後のアルミナ基板表面のSEM写真。

(a)(b): Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none), (c)(d): Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O), (e)(f): Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>), (b)(d)(f): 高倍率

細胞の接着形態は試料間において明らかな差が観察された。Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none)表面の細胞は球状の形態を有するのに対し、処理試料上の細胞には多数の仮足が観察された。Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>)上の細胞は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)上の細胞に比べてより伸展し、試料に接着する様子が観察された。

細胞の増殖挙動について調べたところ、培養5日および7日後の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>)上の細胞数は、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none)および Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)上の細胞数に比べて有意に高い値を示すことが分かった (図4)。

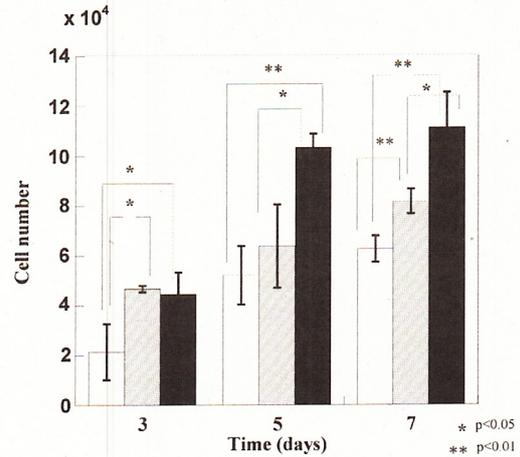


図4 アルミナ基板表面におけるラット骨髄由来細胞の増殖挙動. □: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none), ▨: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O), ■: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>)

細胞の骨分化挙動について調べたところ、培養6日後の ALP 活性 (図5) および培養15日後のオステオカルシン量について、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>)は Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none) および Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)に比べて有意に高い値を示すことが分かった。

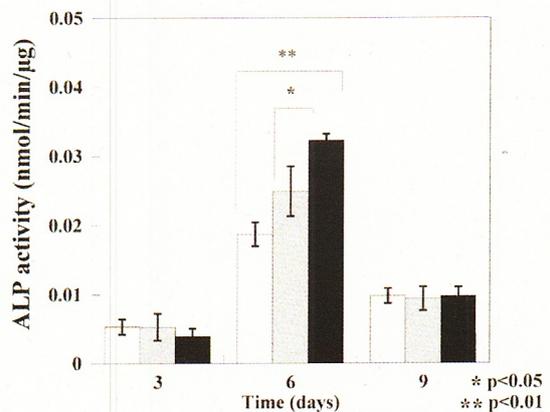


図5 アルミナ基板表面におけるラット骨髄由来細胞の ALP 活性. □: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(none), ▨: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O), ■: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(CaCl<sub>2</sub>)

細胞の石灰化挙動について調べたところ、すべての試料において、培養9日後には石灰化している様子が観察されたが、 $\text{Al}_2\text{O}_3(\text{CaCl}_2)$  は  $\text{Al}_2\text{O}_3(\text{none})$  および  $\text{Al}_2\text{O}_3(\text{H}_2\text{O})$  に比べて、有意に広い領域で石灰化している様子が観察された (図6)。

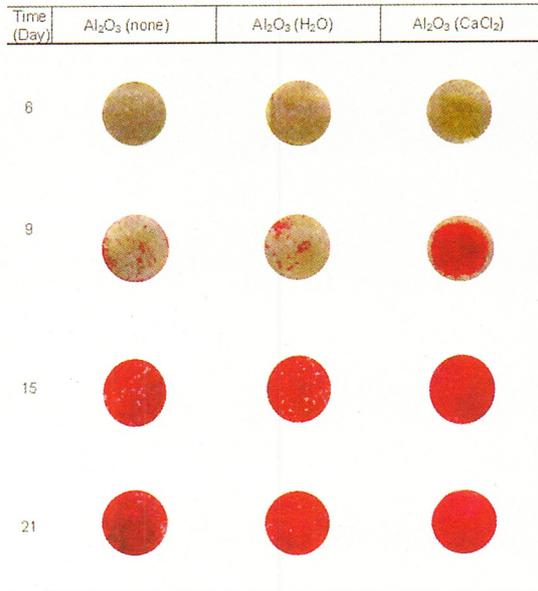


図6 アルミナ基板表面で培養されたラット骨髄由来細胞が生成した骨様結節。(アリザリンレッド染色)

以上の結果をまとめると、擬似体液中におけるアパタイト形成能、ラット骨髄由来細胞の接着、増殖、分化および石灰化挙動のすべての評価において、Caを修飾したアルミナ基板は未処理のアルミナ基板に比べて有意に高い能力を発揮することが明らかになった。

本研究で試みた水熱処理によるCa修飾法はアルミナの力学的強さを低減させないことから、アルミナ基材表面に骨伝導性を付与するための一手法として有望であると結論づけた。

#### 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)

Abdullah Al-Mahmood Tarique, Kanji Tsuru, Michito Maruta, Akari Takeuchi, Shigeki Matsuya, Yoshihiro Terada and Kunio Ishikawa: In vitro osteoconductivity evaluation of alumina treated hydrothermally in  $\text{CaCl}_2$  solution. Journal of the Ceramic Society of Japan, 118(6): 512-515, 2010.

[その他]

該当なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

Tarique A.A. (タリク A.A.)

研究者番号: 00568983

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし