

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390438

研究課題名(和文)インプラント表面処理層および骨結合界面の深さ分解XAFS解析

研究課題名(英文)Depth profiling XAFS analysis of the interface between surface treated implant and bone

研究代表者

宇尾 基弘 (Uo, Motohiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：20242042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：材料の表面状態や生体組織界面の状態、金属材料から生体組織中への微量金属元素の溶出、蓄積は種々の歯科・生体材料の生体親和性に大きく影響する。本研究ではX線マイクロビームを用いた位置特異的な元素分布・状態分析技術を用いて、歯科用合金に隣接した粘膜中に含まれる微量金属元素の分析を行い、歯科用合金からの粘膜中への合金積分の蓄積を確認した。またXAFSによる表面処理インプラント表層のチタンの状態解析を行い、深さ方向による酸化チタンの構造変化が確認された。

研究成果の概要(英文)：Biocompatibility of various dental and medical materials is affected by the conditions of materials surface, interface and erosion of trace metallic elements from the metallic materials and their accumulation in the tissues. In this study, the accumulation of dental alloy elements in the mucosa closely contacted with the metallic restorations using the position sensitive elemental and chemical state analysis method with X-ray microbeam. In addition, the chemical state analysis of the surface layer of surface treated titanium implant and the depth dependent change of titanium oxide was suggested.

研究分野：歯科理工学

キーワード：インプラント 表面処理 骨結合 X線 XAFS

1. 研究開始当初の背景

近年のインプラントには早期に強固な骨結合が得られるよう、更に高い生体親和性を目指した表面処理の研究が広く行われている。骨結合性の改善には改質表面の物理/化学的特性が大きく関与しており、表面層の状態・構造解析が不可欠である。また骨結合性の評価には機械的結合強度だけでなく、結合界面の微細構造観察・解析も必要になる。このようなインプラント原材料/表面処理層や表面処理層/骨の界面近傍の化学組成・化学状態の連続的な変化を詳細に調査することがインプラント材料開発に極めて重要である。表・界面の観察方法としては、表・界面を縦断して電子顕微鏡的手法で観察する方法があるが、切断時の界面への影響が強く、骨と金属など強度の大幅に異なる試料の場合に試料作製に熟練を要することと、化学状態を知ることが困難な点が問題となる。そこで本研究では微小部蛍光X線分析および微小部X線吸収微細構造(X-ray Absorption Fine Structure: XAFS)解析を用いて表界面の分析を試みた。

X線を用いた元素分析や状態分析は非破壊・微量物質・化学状態の分析に有益な手法として広く用いられている。特に単色化したX線を用いた蛍光X線分析(XRF)は非破壊微量分析に有用であり、さらに照射単色X線のエネルギーを走査して対象元素のX線吸収スペクトルを分析するXAFSは対象元素の化学状態を解析する有力な手法である。そのX線源としてシンクロトロン放射光がしばしば用いられる。放射光は通常のX線源に比べて桁違いに強力かつ平行なビームが得られるため、放射光を用いた蛍光X線分析(SR-XRF)やXAFSにより微量物質の分布や状態を分析することが可能になる。さらに平行光である放射光は集光が容易であり、集光X線を用いた分析により位置特異的な情報を得ることが可能となる。

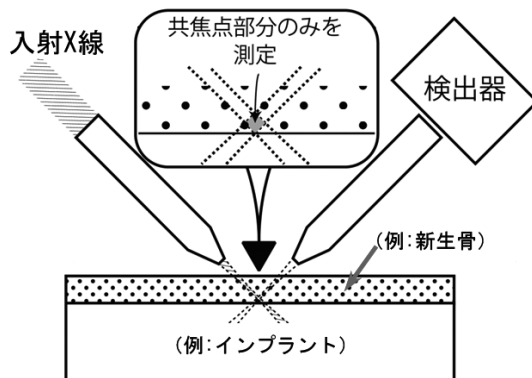


図1 三次元蛍光X線・XAFS分析の概念図

他方、微量金属元素は生体に必須微量元素として存在するだけでなく、金属アレルギーなどの種々の病変の原因ともなり、その挙動の解明が望まれている。当該手法はインプラ

ントなどの材料表面だけでなく、不均一に含有される生体組織中の微量金属元素の分布と状態を二次元、三次元的に分析する手法としても応用可能である。本研究では同手法を用いた微量金属元素の関与が疑われる疾患の病態解明や診断のための技術開発についても合わせて検討を行った。

また本手法はMEMS(Micro Electro Mechanical Systems)で作製されるような微小装置の状態解析にも応用可能であること、生物系試料のような組成分布が未知の試料に比べて、人工物の方が分析装置の特性評価に好適であることから、微小ガスセンサーも分析対象として、分析装置の特性評価を行った。

2. 研究の目的

本研究では X 線マイクロビームを用いた位置特異的な元素分布・化学状態分析技術を用いて微小装置(センサー)開発や、歯科用インプラントの表面処理層中の Ti の深さ方向における状態変化、歯科用合金に隣接した粘膜中に含まれる微量金属元素の元素分布を蛍光 X 線分析により、化学状態を蛍光 XAFS により分析し、微小領域の元素分布・状態分析機構の開発、軟組織中の微量金属元素の分布・状態分析と歯科・生体用金属材料の生体内挙動について検討した。

3. 研究の方法

(1) 微小ガスセンサーの触媒の状態解明

MEMS 技術により作製した微小ガスセンサーの触媒部(直径数百 μm)の PdO の状態を調査するため、前述の微小 XAFS 計測手法を用い、触媒の変化を計測した。XAFS 測定は高エネルギー加速器研究機構放射光科学研究施設(PF-AR) NW-10A にて行った。X 線集光用ポリキャピラリー(X-ray Optical Systems 製)により、約 25 μm に集光した X 線を試料の特定部位に照査し、19 素子半導体検出器を用いた蛍光法により EXAFS(Extended X-ray absorption Fine Structure: X 線吸収端近傍構造)スペクトルを測定した。本測定は物質構造化学研究所放射光共同利用実験(課題番号: 2012G680)として行われた。

(2) 歯科用合金に隣接した口腔粘膜中の微量合金元素分布

口腔内金属修復物との関連が示唆される口腔扁平苔癬様疾患(Oral lichenoid lesion; OLL)の原因金属の特定を行うために、同疾患の標本を SR-XRF および蛍光 XAFS を用いて微量元素局在部での状態を分析した。OLL および口腔扁平苔癬(Oral lichen planus; OLP)と診断された標本 13 例を対象とした。パラフィン包埋標本を約 8 μm に薄切し、12.5 μm のカプトンフィルム上に貼付して分析に供した。

SR-XRF 測定は KEK 放射光科学研究施設(PF) BL-4A(一部は SPring-8 BL-37XU)にて行い、一部の XAFS 測定は PF BL-9A にて行った。元素分布測定および元素の化学状態を分析し、病理組織像と対比することで、金属元素と病因との関連について検討した。本測定は放射光共同利用実験(課題番号 PF:2012G011, 2013P002&2014G017, SPring-8: 2013B1728)として行われた。

また一部の微小部分分析については放射線医学総合研究所のマイクロ PIXE 分析を併用した。

(3) 歯科用表面処理インプラントの深さ方向における Ti の状態変化

陽極酸化処理された歯科用チタンインプラント(Nobel Biocare 製 Groovy)の表面処理層内部のチタンの状態変化を調査するため、XAFS を用いた計測を行った。表面処理インプラントを非破壊で、分析深さを変化させた手法で XAFS スペクトルを測定し、標準物質(TiO₂(anatase, rutile, 非晶質)及び金属 Ti)と比較することにより、Ti の状態の推定を行った。本測定は PF 放射光共同利用実験(課題番号 2012G011)として行われた。

4. 研究成果

(1) 微小ガスセンサーの触媒の状態解明

MEMS 技術により作製された微小ガスセンサーは小型・省電力で電池駆動が可能になるため、取付け・維持が容易になるなどの利点がある。ガスセンサーは長期に感度が安定することが求められるが、使用されている触媒の変化により感度低下が起こることがあり、その解析には触媒各所の状態変化を評価することが必要である。しかし微小センサーに使用されている PdO 触媒は数百 μm 程度であり、その状態の解析を非破壊で行うのは従来法では困難であるため、本研究で開発した微小部分分析システムを用いた解析を行った。

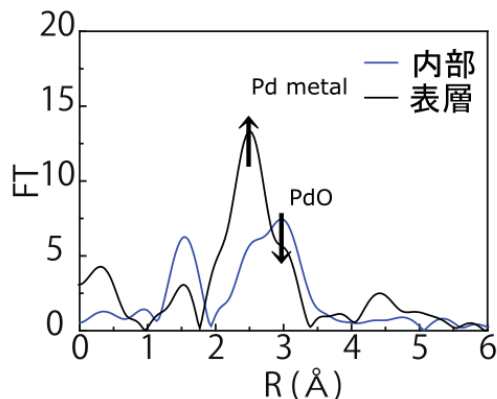


図2 感度低下したガスセンサーのPdO触媒内部および界面でのPd K端のEXAFS解析によるPd周囲の動径構造関数

図2はPdO触媒の内部及び触媒/センサー界面のEXAFS解析の結果得られた、Pd周囲の動径構造関数を示す。この結果、触媒内部はPdOのままだが、表層ではPdOの還元が起こっていることが分かった。これにより触媒活性が変化して、感度が低下したと考えられ、表層の還元を抑える工夫を施したところ、特性は向上した。

(2) 歯科用合金に隣接した口腔粘膜中の微量元素分布

OLP/OLLの臨床所見、病理学的所見は類似しているため鑑別は困難である。OLLの一部は口腔内金属が原因で発症するとの報告もあり、原因物質の同定により根治が可能となるため、原因修復物の確定手法が強く望まれている。本研究ではSR-XRFの微小部分分析システムを用いたOLP・OLL病変内の微量元素の分布と状態分析を用いることにより、疾患粘膜組織中に含まれる歯科用合金成分の検出を試みた。

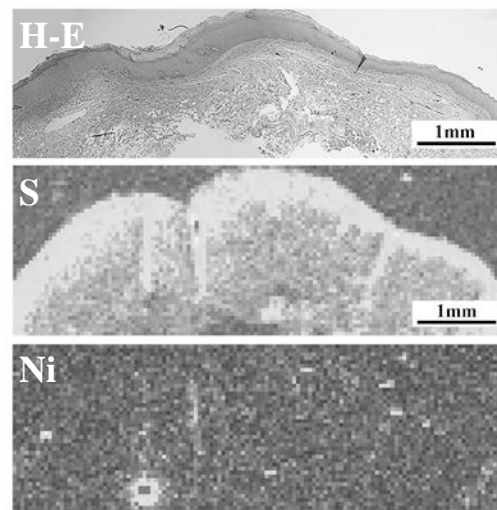


図3 OLL組織標本の病理像(H-E染色)およびSR-XRFによるS, Ni分布像

図3は典型的なOLLの組織内元素分布を示す。元素分布像では、基底層を超えてさらに深部にNiの集積が認められ、この集積部は炎症性細胞の発現領域と一致した。同部位におけるNiのXAFSスペクトルは、図4に示すように金属状態ではなくイオン状態に類似したスペクトルであった。これは、組織中のNiが金属修復物を口腔内で削合した際に発生するデブリの粘膜への混入ではなく、金属修復物からの溶出物に起因すると考えられた。

金属修復物を近傍に認めるOLL症例6例で表1に示す金属元素の集積を認めた。例えば

試料 1, 2, 4 では Ag が明瞭に検出されており、あわせて検出された元素から歯科用銀合金の影響が疑われた。その他の例でも明瞭な金属元素の局在が認められた。

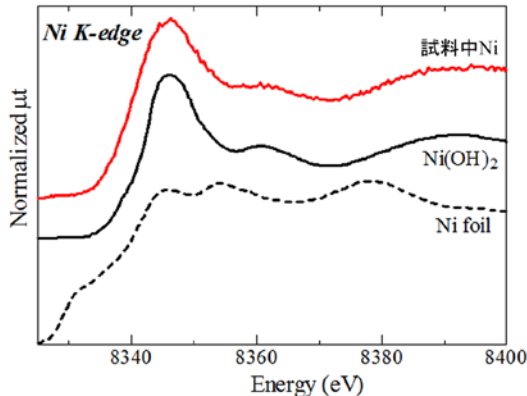


図 4 OLL 組織中の Ni の K 吸収端 XAFS スペクトル

表 1 OLL 組織中の検出元素

No.	性別(年齢)	検出元素
1	M (40)	Ag, Pd, In, Zn, Cu, Fe, Ti
2	M (40)	Ag, Ni, Cu, Zn, Ti, Cr
3	F (60)	Zn
4	F (60)	Au, Ag, Pd, Zn, Ti
5	F (50)	Zn, Ti, Cr, Bi, Fe
6	F (70)	Fe, Ni, Zn, Ti, Cu, Zn

他方、歯科用合金が関与していないと思われる OLP 標本 6 例および両病変とは関係の無い正常組織（口腔扁平上皮癌の安全域）3 例では、金属元素の局在が認められず、近接する歯科用合金が OLL の発症に関与していることが示唆された。

以上より溶出金属元素が関与する可能性のある口腔粘膜疾患の組織標本を SR-XRF で分析する事により、溶出元素に起因すると思われる微量元素の局在を検出することが可能であることが判明し、本分析手法の生物組織中の微量元素分析への有効性が示唆された。

本手法ではポリキャピラリーで集光した数十 μm サイズのセミマイクロビームを検出に用いている。現在の X 線微小部分分析のトレンドはミラーやゾーンプレート集光による $\text{nm} \sim \mu\text{m}$ の微小領域分析に向かっており、細胞内の分析まで可能にする極微小領域の分析が主流となっている。しかしながらこのような病理組織標本は最小でも数 mm のサイズがあり、極小ビームでは試料全域の走査に極端に長い時間が必要になる。また全域を極小ビームで間歇的に走査すると微小領域の局在

を見落とす可能性が高くなる。その点、セミマイクロビームは試料全域をくまなく分析することが可能であり、大型の標本の分析には好適であることが明らかになった。

歯科用合金成分としては Ag, Pd, In, Sn などが重要な対象元素となるが、これらを蛍光 X 線(K 線)で分析するには 20keV を越える入射 X 線が必要となるが、このような高エネルギーの単色光を入射できる放射光施設は少ない。本研究では SPring-8 BL-37XU も併用しているが、同時にマイクロ PIXE(Particle Induced X-ray Emission)を用いた分析も併用している。PIXE は陽子などの重粒子を入射した際に発生する特性 X 線を用いて元素分析を行う手法であり、セミマイクロビームによる SR-XRF に比べて入射ビームを絞ることが可能であり、より分解能の高い元素分布像が得られ、Ag などの重元素に対してはシグナル/バックグラウンド比の高い分析が可能であるなどの利点がある。このようなマルチプローブを用いた分析により、軟組織切片中の微量元素のような希薄元素の分布も十分に評価可能であることが示された。

(3) 歯科用表面処理インプラントの深さ方向における Ti の状態変化

陽極酸化処理はアルミニウムの酸化皮膜生成（いわゆるアルマイト）で知られており、金属の耐食性向上や干渉色による色彩付与などの目的でチタン、マグネシウムなどにも広く用いられている。特にチタンではフッ素を含む電解液中で陽極酸化処理を行うことで、多孔性の被膜を生成することが見いだされ、機械的結合力の向上や、表面積の向上による生体活性成分の吸着能を向上させるなどの目的で、歯科用インプラントの表面処理手法として応用されている。

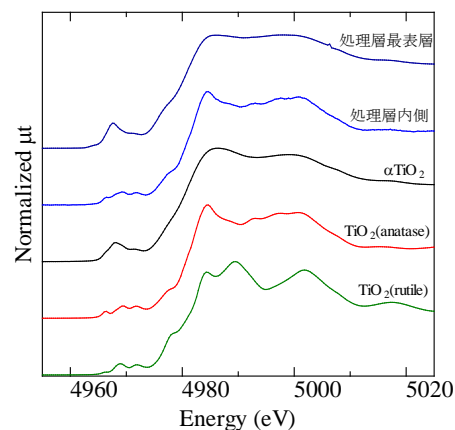


図 5 陽極酸化処理インプラント表面のチタンの XAFS スペクトルと標準物質との比較

その酸化皮膜の XAFS スペクトルを分析深度を変化させて測定したのが図 5 である。表層に敏感な手法（転換電子収量法）で測定した場合はアモルファス TiO₂ に近いスペクトルを示すのに対し、表面処理層内部は anatase 型 TiO₂ に近いスペクトルを示した。このことより、陽極酸化皮膜全体は anatase 型の TiO₂ であるが、表層数十 nm はおそらく表層は不働体被膜に由来すると思われるアモルファス型 TiO₂ であると推定された。

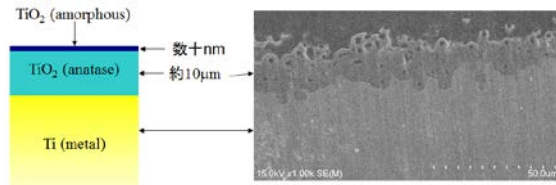


図 6 陽極酸化処理インプラント表層の断面 SEM 写真とその構造の概念図

表面処理層の化学状態の分析はインプラントの生体適合性の評価に有益な情報を与えるが、本研究で用いた深さ分解的な XAFS 解析が同目的に有用な手法であることが示唆された。

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 14 件）

- 1) Sugiyama T., Uo M., Wada T. (以下 7 名)
Detection of trace metallic elements in oral lichenoid contact lesions using SR-XRF, PIXE, and XAFS, *Scientific Reports*, in press.
- 2) Sugiyama T., Uo M., Wada T., Hongo T. (以下 5 名)
A method to visualize transdermal nickel permeation in mouse skin using a nickel allergy patch, *Biomedical Materials and Engineering*, in press.
- 3) Uo M., Sugiyama T., Wada T.: Application of X-ray fluorescence analysis (XRF) to dental and medical specimens, *Journal of Dental Science Review*, 51(1), 2–9, 2015.
- 4) Sugiyama T., Uo M., Wada T. (以下 5 名): Estimation of trace metal elements in oral mucosa specimens by using SR-XRF, PIXE and XAFS, *Biometals*, 28, 11-20, 2015.
- 5) 宇尾基弘・杉山知子・和田敬広・本郷敏雄・高師則行:各種歯科用合金からの溶出合金元素の分布および状態分析, *日本歯科理工学会誌*, 34(1), 41-47, 2015.
- 6) 宇尾基弘・和田敬広・杉山知子 (以下 6 名): 放射光 XRF および XAFS を用いた超硬合金肺病理標本中の元素分析, *X 線分析の進歩*, 46, 177-186, 2015.
- 7) Sugiyama T., Uo M., Wada T., Hongo T. (以下 6 名): Novel metal allergy patch test using

metal nanoballs, *J. Nanobiotechnology*, 12:51, 2014.

- 8) Wada T., Uo M., Asakura K. (他 5 名): Improvement of a real gas-sensor for the origin of methane selectivity degradation by μ -XAFS investigation, *Nano-Micro Letters*, DOI 10.1007/s40820-015-0035-7, 2014.
- 9) Noritake K., Uo M. (他 5 名): Use of a gelatin hydrogel membrane containing b-tricalcium phosphate for guided bone regeneration enhances rapid bone formation, *Dent Mater J*, 33(5), 674-680, 2014.
- 10) Inoue S., Uo M., Yokoyama A. (以下 6 名): The effects of the coating of anodized titanium with multi-walled carbon nanotubes on bone formation, *Key Engineering Materials*, 529-530, 621-624, 2013.
- 11) Hirata E., Uo M., Yokoyama A. (他 3 名): Carbon nanotube-coating accelerated cell adhesion and proliferation on poly (L-lactide), *Applied Surface Science*, 262, 24-27, 2012.
- 12) Yoshida E., Uo M. (他 3 名): Influence of nanometer smoothness and fibronectin immobilization of titanium surface on MC3T3-E1 cell behavior. *J Biomed Mater Res Part A*, 100A, 1556–1564, 2012.
- 13) Uo M., Sato Y., Tohji K. (以下 2 名): Toxicity evaluations of various carbon nanomaterials, *Dental Materials Journal*, 30, 245-263, 2011.
- 14) Hirata E., Uo M., Yokoyama A. (以下 3 名): Multiwalled carbon nanotube-coating of 3D collagen scaffolds for bone tissue engineering, *Carbon*, 49, 3284-3291, 2011.

〔学会発表〕（計 18 件）

- 1) ○杉山知子, 和田敬広, 宇尾基弘, 森良之: SR-XRF 用フィルム状濃度標準試料の作製, 第 3 回物構研サイエンスフェスタ(つくば 2015 年 3 月 17, 18 日)
- 2) ○宇尾基弘, 杉山知子, 和田敬広, 永井宏樹, 清水文雄: 全反射蛍光 X 線分析による病理組織標本中の微量金属元素の検出, 第 50 回 X 線分析討論会 (仙台 2014 年 10 月 30,31 日)
- 3) ○宇尾基弘, 杉山知子, 和田敬広, 及川将一, 中村圭喜, 中塚稔之, 中元絢子, 半場秀典, 二階堂徹, 田上順次: 歯質へのストロンチウムの吸収状態のマイクロ PIXE および蛍光 XAFS による評価, 第 30 回 PIXE シンポジウム (盛岡 2014 年 10 月 22~24 日)
- 4) ○杉山知子, 宇尾基弘, 尾曲大輔, 小宮山一雄, 野口忠秀, 神部芳則, 草間幹夫, 森良之: 金属ナノボールを用いた高信頼性の新規皮膚パッチテストの開発, 第 59 回日本口腔外科学会学術大会 (幕張 2014 年 10

- 月 20-22 日)
- 5) ○杉山知子, 和田敬広, 本郷敏雄, 宇尾基弘: 量子ビームを用いた口腔粘膜疾患組織に含まれる微量元素元素の評価に関する研究, 第 64 回日本歯科理工学会学術講演会 (広島 2014 年 10 月 4,5 日)
 - 6) ○杉山知子, 和田敬広, 宇尾基弘, 尾曲大輔, 小宮山一雄, 沼子千弥, 及川将一, 森良之: SR-XRF, PIXE 及び XAFS を用いた口腔粘膜疾患組織中の微量元素元素の分布と状態分析, 第 17 回 XAFS 討論会 (徳島 2014 年 9 月 1~3 日)
 - 7) ○Uo M., Sugiyama T., Wada T., Application of synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF) for the detection of the trace elements contained in human tissues, *Biometals* 2014, (Durham, 2014/7/13-18)
 - 8) ○宇尾基弘, 杉山知子, 神部芳則, 草間幹夫, 尾曲大輔, 小宮山一雄, 高師則行, 鄭漢忠: 各種歯科用合金からの溶出合金元素の分布および状態分析, 第 68 回日本口腔科学会学術集会 (東京 2014 年 5 月 7-9 日)
 - 9) ○宇尾基弘, 和田敬広, 小西智也, 東理頼亮, 岡田康男: フッ素塗布および CO₂ レーザー照射したエナメル質表面の Ca の状態変化, 第 17 回 XAFS 討論会 (徳島 2014 年 9 月 1~3 日)
 - 10) ○Uo M., Wada T., Sugiyama T., Kusama M., Omagari D., Komiyama K., Taniguchi N., Inomata T., Konno S., Nishimura M., Application of SR-XRF and XAFS for the trace element analysis contained in histopathological specimens, *Synchrotron Radiation for Nano-medicine and Advanced Health Care* (Kobe, 2014/1/9-10)
 - 11) ○和田敬広, 本郷敏雄, 宇尾基弘: S-PRG フィラー溶出液に浸漬したヒト歯質中ホウ素の ¹¹B-NMR による構造解析, 第 62 回日本歯科理工学会学術講演会 (新潟 2013 年 10 月 19, 20 日)
 - 12) ○宇尾基弘, 和田敬広, 本郷敏雄: 希土類蛍光材を用いたコンポジットレジン用高輝度蛍光フィラーの開発, 第 61 回日本歯科理工学会学術講演会 (東京 2012/2013 年 4 月 13, 14 日)
 - 13) ○Uo M., Nakajima Y., Asakawa Y., Wada T., Hongo T., Soga K., Kogo Y., Rare earth oxide containing filler for dental composite resin, 24th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (*Bioceramics* 24) (Fukuoka, 2012/10/21-24)
 - 14) ○宇尾基弘・和田敬広: XAFS 用フィルム状試料の簡易作成法, 第 15 回 XAFS 討論会 (鳥取 2012 年 9 月 10-12 日)
 - 15) ○宇尾基弘, 神野哲也, 大川 淳: 人工股関節関節液中の Ti, Co の XAFS による状態分析, 第 29 回 PF シンポジウム(つくば,

- 2012 年 3 月 15, 16 日)
- 16) ○宇尾基弘・恒松晃司・成相義樹・上野 繭美・石橋浩晃・関根浄治: 陽極酸化したチタンインプラント表面及び周囲骨中のチタンの状態分析, バイオインテグレーション学会第 2 回学術大会 (東京 2012 年 1 月 29 日)
 - 17) ○宇尾基弘: 放射光を用いた微小分析の臨床診断への応用, 第 58 回日本歯科理工学会学術講演会 (郡山, 2011 年 10 月 22, 23 日)
 - 18) ○宇尾基弘・恒松晃司・成相義樹・石橋浩晃・関根浄治: インプラント周囲骨に含まれる微量チタンの状態分析, 第 65 回日本口腔科学会学術集会 (東京 2011 年 4 月 21, 22 日)

6. 研究組織

- (1)研究代表者
宇尾 基弘 (UO MOTOHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号: 20242042
- (2)研究分担者
朝倉 清高 (ASAKURA KIYOTAKA)
北海道大学・触媒化学研究センター・教授
研究者番号: 60175164
横山 敦朗 (YOKOYAMA ATSURO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 20210627
會田 英紀 (AIDA HIDEKI)
北海道医療大学・歯学部・准教授
研究者番号: 10301011
本郷 敏雄 (HONGO TOSHIO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号: 60142444
和田 敬広 (WADA TAKAHIRO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号: 60175164