

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06452

研究課題名(和文)人工関節予後不良を低減する難剥離性極薄Ag含有アパタイト被膜のワンステップ形成

研究課題名(英文)One-step fabrication of high-adhesive Ag-containing hydroxyapatite coating on titanium substrate

研究代表者

大津 直史(Ohtsu, Naofumi)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：10400409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工関節置換術の術後予後不良の原因となる「インプラントと骨との固着不良」、「術中術後の感染症」、「インプラントの破損」のリスクを大幅に低減できる、極薄の難剥離性Ag含有アパタイト被膜を、チタン製インプラント表面にワンステップかつローコストで形成する新プロセスの開発に成功した。本技術でAg含有アパタイト被膜は難剥離性であり、被膜形成によりチタン製インプラントは体内においてより迅速に骨と結合できる可能性がある。さらに感染症の原因となる細菌感染を防ぐこともできるが、生体に対しては無毒である。本研究成果は、新プロセスにより国民により安全な医療用インプラントを安価で提供できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The research project developed a new surface treatment process for fabricating Ag-contained hydroxyapatite layer on titanium implant and demonstrated that the new process enables to reduce the risks for surgical operation of artificial joint replacement. The coating fabricated by the new process is expected to have high-adhesive strength and furthermore, facilitate osteogenesis around the implant. In addition, the coated-implant showed an excellent antibacterial efficacy due to Ag-release from the coating although the release did not show cytotoxicity. The research project demonstrate that the new surface modification process can provide a high-performance titanium medical implant with a low cost.

研究分野：金属材料表面工学

キーワード：チタンインプラント 化学的表面処理 Ag/HAp被膜 骨組織適合性 抗菌性 難剥離性

1. 研究開始当初の背景

変形や破壊によって機能不全となった股関節や膝関節を、チタン製インプラントから成る人工関節デバイスで置き換えることで、多くの患者が自立生活を取り戻せるようになったが、人工関節を埋入した患者が、何らかの理由で再手術する必要に迫られるリスクは、手術後10年間で15パーセント前後であるという報告もある。この術後予後不良の原因として「チタン材料の骨親和性不足に由来するインプラントと骨との固着不良」、「術中術後の傷口からの感染」、「日常生活の繰り返し荷重によるインプラントの破損」の3つが挙げられ、医療現場からは、高齢者が安全安心に人工関節置換術を受けられるようにするために、これらリスクを低減できる新しい人工関節デバイスの開発が切望されている。

我々は、難溶性のハイドロキシアパタイト粉末に、少量の水を加えて攪拌することで作製できる、粘性を持った泥状（スラリー状）の処理剤中に、チタン基材を完全に埋没させ、そのままスラリーごと試料を600程度で熱処理するという斬新なプロセスで、傾斜的界面層を有する極薄ヒドロキシアパタイト（HA）皮膜をワンステップで形成できることを見出している。さらにこのプロセスで形成される被膜は膜厚100ナノメートル程度の極薄被膜であること、チタン基材との間に傾斜的界面層が存在するため密着性が高く剥がれにくいこと、形成被膜には生体毒性がなく骨芽細胞様細胞の石灰化を促進できること、さらに、ラット大腿骨内において、通常チタンインプラント比較して優れた骨親和性を示すこと、以上を明らかにしている。

2. 研究の目的

前述のプロセスは、チタン基材と接触しているスラリー含有成分を、熱エネルギーを利用して基材方向に効率的に拡散させることで、スラリー含有成分を含む高密着性被膜を基材表面に形成させるものである。これを踏まえ、銀（Ag）とハイドロキシアパタイト（HA）を含むスラリー状試薬を用いてこのプロセスを適用すれば、極薄のAg含有HA被膜をチタン基材上にワンステップで形成できる可能性がある。そこで本研究では、この斬新なプロセスを利用して、斬新な処理プロセスをベースとして、抗菌性、骨親和性および難剥離性を併せ持つ高機能被膜を、チタン基材上に、ワンステップかつローコストで形成する技術の開発を目指した。

具体的な目標は以下の通りである。

(1) スラリー状処理剤を用いる表面処理プロセスによって、チタン基材上に、難剥離性の極薄Ag含有HA被膜を、ワンステップで形成できる技術を開発する。

(2) 抗菌性発現に適切なAg含有量を明らかにし、そのAg量を含むHA被膜を、チタ

ン基材上に形成できる処理条件を明らかにする。

(3) 形成したAg含有HA被膜の骨親和性および生体安全性を、細胞培養試験にて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

エメリー紙でチタン基材研磨する。ハイドロキシアパタイト粉末と硝酸銀水溶液を混練して調整したスラリー状処理剤中に埋没させ、雰囲気制御電気炉（本研究費で申請）を用いて大気中で熱処理を施す。その際、キーパラメーターである硝酸銀水溶液の濃度を変化させ、種々条件で被膜を形成させる。

(2) 試料の評価

種々の条件で作製した被膜の表面特性は、以下に示す方法で解析した。

- ・ 走査型電子顕微鏡（SEM）及び走査プローブ顕微鏡（SPM）：表面形状の評価
- ・ X線光電子分光（XPS）：化学状態分析および深さ方向の情報
- ・ 走査型透過電子顕微鏡（STEM）：断面構造分析
- ・ 蛍光X線分析（XRF）：銀含有量の定量
- ・ 原子吸光光度法（AAS）：銀溶出量の測定

(3) 細胞学的評価

オートクレーブ滅菌後、種々の条件で作製したチタン材料表面に、骨芽細胞様細胞株Saos-2を 2×10^4 cells \cdot cm⁻²播種し、24時間および72時間培養した。生細胞数は、トリプシンによる細胞剥離およびトリパンブルー染色処理した後、血球計算版を用いて計測した。さらに、播種した細胞がコンフルエントに達した後、細胞分化誘導をおこない、10日間培養を継続した。その間、骨細胞分化の前期マーカーであるアルカリホスファターゼ活性と後期マーカーである細胞石灰化をそれぞれ評価した。

(4) 抗菌性評価

抗菌性は、大腸菌（ATCC 25922）および表皮ブドウ球菌（ATCC 14990）株を用いて調べた。未処理およびスラリー処理したチタン材料をオートクレーブ滅菌後、細菌懸濁液23 μ Lをチタン材料表面に滴下し、その後、15 \times 15mmのカバーガラスで表面を覆った。試料を湿度95%の37に設定したインキュベーターで4時間保持し、次いで、試料表面の細菌懸濁液をSCDLP培地に洗い出した。このSCDLP培地に含まれる生菌数をコロニーカウント法で計測することで、抗菌性を評価した。

4. 研究成果

(1) スラリー処理チタン材料の表面構造

図1に、スラリー処理されたチタン基材のHAADF-STEM像および対応する元素マップを示す。ここでは10 mM AgNO_3 を含むスラリーを用いて処理を行った。HAADF-STEM画像(図1(a))の明るくコントラストのついた領域は、図1(d)のAgマップ像から同定されたAgの分布に対応する。HAADF-STEM像中の明るくコントラストされた領域の大きさは50~150nmの範囲であり、領域は最表面に集中していた。O(図1(f))とTi(図1(e))のEDXマップは、TiとOからなるTi酸化物層が基板の上に形成されたことを示している。またリン酸カルシウム層に相当すると思われるCa(図1(b))とP(図1(c))のマップによって、リン酸カルシウムを含む約100nmの薄層が確認される。

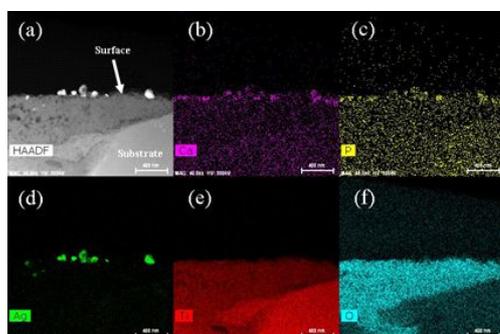


図1 スラリー処理したチタン基材の断面STEMおよびEDXマップ画像:(a) HAADF像と(b) Ca、(c) P、(d) Ag、(e) Ti、および(f) Oのマップ画像

(2) 深さ方向元素プロファイルおよび化学状態

10 mM AgNO_3 を用いたスラリー処理チタン表面の深さ方向元素プロファイルを図2に示す。最上部の表層まで100nmはAg、Ca、P、OおよびTiからなり、深さの増加に伴いCa、P、Agが共に減少し、逆にTiが増加した。XPSスペクトルから推定されるCa 2p_{3/2}およびP 2p準位の結合エネルギーは、それぞれ347.0eVおよび133.3eVであり、これはHApの値とほぼ一致した。さらに、XPSスペクトルから計算したCa対Pの原子比 $[\text{Ca}] / [\text{P}]$ は約1.7であり、化学量論的HApの比に相当した。したがって、STEM画像で観察されるリン酸カルシウム層はHApであると同定される。Ag 3d_{5/2}の結合エネルギーは367.5 eVであり、これは金属Agの値に相当した。さらに、Ag 3d_{5/2}のスペクトル形状は、高エネルギー側にわずかに広がっており、金属状態の特徴的な形状を示す。Ti 2p_{3/2}の結合エネルギーは、二酸化チタン(TiO_2)の値と一致する459.1 eVであった。STEM画像で観察される150~600 nmの範囲の最上表面層の下の表面領域は、TiおよびOのみからなるTi酸化物に対応する。

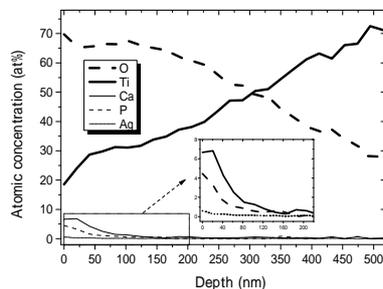


図2 10mM AgNO_3 を含むスラリーで処理されたチタン表面の元素深さプロファイル

(3) 表面の微細構造像および位相像

10 mMの AgNO_3 を用いたスラリーで処理した表面の微細構造像および位相像を、FE-SEMおよびSPMで観察した。FE-SEM像(図3(a))では、ほぼ全面が数十nmの正方形の鱗片で覆われているように見え、さらに数個の円形状の析出物が観察された。EDXを用いて沈殿物の周囲の元素組成を分析すると、Agに対応する弱いシグナルが検出された。FE-SEM像に見られるような沈殿物がSPM像でも観察され(図3(b))、その幅および高さは約150 nmであった。上記のTEM結果を考慮すると、析出物は表面に担持されたAg粒子であることが確認された。

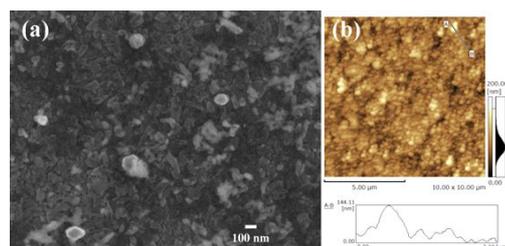


図3 10mM AgNO_3 を含むスラリーを用いて処理されたチタンの表面イメージ:(a) FE-SEM像及び(b) SPM像

(4) AgNO_3 濃度によるAg含有量の変化

1 mMまたは10 mMの AgNO_3 を含むスラリーを用いて形成された表面層中のAg含有量を評価するために、Ag L α のX線蛍光強度をXRF装置で測定した(図4)。10mMの表面からの蛍光強度は、1 mMの表面からの蛍光強度の約5倍であった。X線蛍光強度とAg濃度との間に相関がないので、10 mM表面における実際のAg含有量は1mM表面の5倍にはならないが、XRFの結果は、スラリーの AgNO_3 の濃度を調整することによって、表面層中のAgの含有量を容易に制御できることを明らかにした。

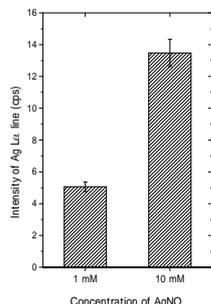


図4 1 mM 及び 10 mM の AgNO₃ を含むスラリーを用いて処理した表面の AgLz 線の X 線蛍光強度

(5) 処理表面からの Ag 溶出

試料表面からの Ag 溶出速度の時間推移を図 5 に示す。初期段階では、10 mM AgNO₃ スラリーで処理した表面からの放出速度は、1 mM AgNO₃ における速度と比較して約 2 倍であった。その後 1 mM AgNO₃ の表面の場合は、溶出速度は 10 日を超えると徐々に減少し、25 日間浸漬した後はほぼゼロとなった。他方、10 mM AgNO₃ 表面からの溶出速度は、10 日間浸漬後にわずかに増加し、その後 25 日目に減少し始めた。以上の結果は、スラリー処理チタン表面からの Ag 溶出の期間およびその速度はスラリーの AgNO₃ 濃度を調整することによって容易に制御できることが明らかになった。

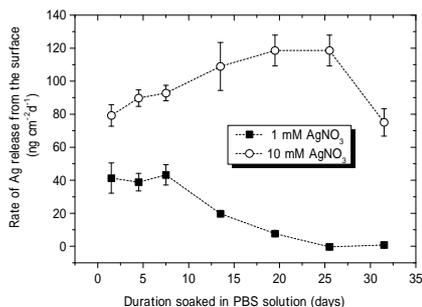


図5 試料表面からの Ag 溶出速度の時間推移

(6) 処理表面の抗菌機能

1 mM の AgNO₃ のスラリーで処理したチタン材料の抗菌性を、未処理のチタン材料のものと比較した。本研究では大腸菌および表皮ブドウ球菌をそれぞれグラム陰性およびグラム陽性の菌種として選択した。図 6 の写真は、試料表面上で 4 時間培養した後の懸濁液中の細菌数を、寒天プレートで可視化したものである。スラリー処理した表面上で培養した場合、AgNO₃ の濃度にかかわらず、寒天プレート上に大腸菌および表皮ブドウ球菌のコロニーは観察されなかった。他方、未処理のチタンの場合は、大腸菌および表皮ブドウ球菌の多くのコロニーが観察され、その数は、懸濁

液に最初に含まれていた細菌数にほぼ一致した。この結果は、AgNO₃ を含むスラリーを用いて処理されたチタン表面が、グラム陰性菌およびグラム陽性菌の両方に対して優れた抗菌効力を有することを示している。この抗菌機能は、処理された表面からの Ag 溶出に起因すると考えられる。

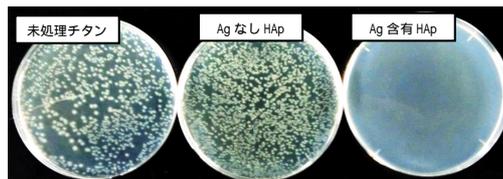


図6 未処理チタン材料、Ag を含まないスラリーで処理したチタン材料および Ag 含有スラリー処理チタン材料の抗菌性能

(7) 処理試料の細胞毒性

Ag の放出に起因する処理表面 (Ag/HAp 層) の細胞毒性を評価した。尚、細胞毒性の可能性は、10 mM AgNO₃ の場合のほうが 1 mM の AgNO₃ よりも高いと考えられるので、検証は 10 mM AgNO₃ のみについておこなった。ここでは、表面に接着している細胞数の時間的推移を未処理のチタン材料と、Ag を含まないスラリーで処理したチタン材料 (Ag を含まない HAp 被膜) と比較した。培養期間にかかわらず、3 つの標本の間には細胞数の差は見られなかった (図 7)。さらにそれらの間の細胞数に有意差もなかった。すなわち、10 mM AgNO₃ を用いて処理した表面は、細胞毒性を示さないことがわかった。1 mM AgNO₃ で形成した表面からの Ag の溶出量は 10 mM のものよりも低いいため、この試料でも細胞毒性も示さないことが容易に推測できる。

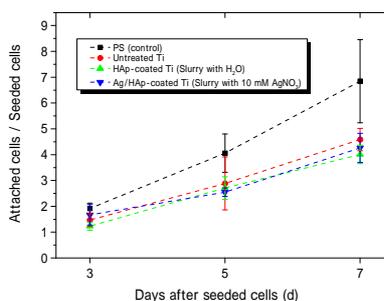


図7 未処理チタン材料、Ag を含まないスラリーで処理したチタン材料および Ag 含有スラリー処理チタン材料の表面で培養した骨芽細胞様細胞株、Saos-2 の細胞数の推移

(8) 骨芽細胞様細胞の石灰化の細胞毒性

各試料表面で骨芽細胞様細胞を 6 日および 10 日間培養した場合に細胞により生成される Ca 量を測定した結果を図 8 に示す。10 mM AgNO₃ を含むスラリーを用いて形成した Ag/HAp 表面、Ag を含まないスラリーで処理

した HAp 表面および未処理表面を比較した。6 日目の表面では、HAp 表面および Ag/HAp 表面の両方における Ca 含量は、未処理表面のそれよりも高かった。誘導から 10 日後、HAp 表面および Ag/HAp 表面と未処理の表面との間の Ca 含量の差は、6 日目と比較してさらに広がり、ANOVA を用いた統計解析においても有意差が明らかであった。他方、HAp 表面と Ag/HAp 表面との間には有意差は見出されなかった。以上の結果により、スラリー処理によってチタン材料表面に形成された HAp 層は、Ag を含む場合であったも Saos-2 細胞の石灰化を促進することが明らかになった。

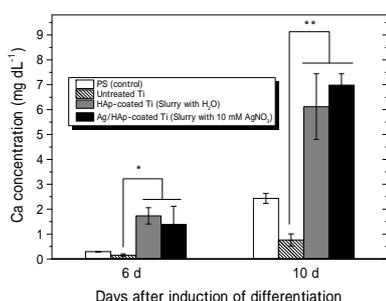


図 8 各試料表面で骨芽細胞様細胞を 6 日および 10 日間培養した場合に細胞により生成される Ca 量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. N. Ohtsu, Y. Hirano, K. Takiguchi, Comparison of NiTi alloy surfaces formed by anodization in nitric, phosphoric, and sulfuric acid electrolytes, *Surface and Coatings Technology* 335 (2018) 306-313 (査読有)

2. N. Ohtsu, Y. Kakuchi, T. Ohtsuki, Antibacterial effect of zinc oxide/hydroxyapatite coatings prepared by chemical solution deposition, *Applied Surface Science* 445 (2018) 596-600 (査読有)

3. N. Ohtsu, T. Kozuka, M. Yamane, H. Arai, Surface chemistry and osteoblast-like cell response on a titanium surface modified by a focused Nd:YAG laser, *Surface and Coatings Technology* 309 (2017) 220-226 (査読有)

4. N. Ohtsu, Y. Hirano, Growth of oxide layers on NiTi alloy surfaces through anodization in nitric acid electrolyte, *Surface and Coatings Technology* 325 (2017) 75-80 (査読有)

5. 平野雄馬, 大島裕樹, 小俣雅嗣, 大津直史, GF-AAS によるリン酸緩衝塩類溶液中 Ag, Cu 及び Ni の正確な定量分析のための溶液調製法の検討, *分析化学* 65 (2016) 457-463 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. N. Ohtsu, Y. Kakuchi, Y. Yoshida, Antibacterial hydroxyapatite coating on titanium via a simple chemical treatment process using calcium phosphate slurry, 18th International Union of Materials Research Society - International Conference in Asia (11/5 ~ 9, Taipei, Taiwan), 2017年

2. 大津直史, スラリー埋没加熱処理を利用した Ag 含有アパタイト被膜チタン材料の作製とその評価, 第 2 回日本バイオマテリアル学会北海道ブロック研究会 (5月13日, 札幌), 2017年

3. 友澤方成, 二村寛子, 山下慎平, 大津直史, スラリー埋没加熱処理で形成した Ag 含有アパタイト複合酸化被膜の疑似体液浸漬による微細組織変化, 日本金属学会 2017年春季講演大会 (3月15 ~ 17日, 東京), 2017年

4. 横岩佑城, 大津直史, スラリー埋没加熱処理を用いた Zr 材料への骨親和性付与, 日本金属学会 2017年春季講演大会 (3月15 ~ 17日, 東京), 2017年

5. 山下慎平, 大津直史, スラリー埋没加熱処理アパタイト被膜チタン材料上における骨芽細胞の石灰化, 日本金属学会 2017年春季講演大会 (3月15 ~ 17日, 東京), 2017年

6. N. Ohtsu, H. Arai, Calcium-phosphate slurry processing: a novel chemical treatment technique to activate osteogenesis on titanium, 10nd World Biomaterials Congress (5/17 ~ 22, Montreal, Canada), 2016年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mtrl.kitami-it.ac.jp/~ohtsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大津 直史 (OHTSU, Naofumi)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号: 10400409

(2)連携研究者

新井 博文 (ARAI, Hirofumi)

北見工業大学・工学部・准教授

研究者番号：70295848

(3)連携研究者

住佐 太 (SUMISA, Futoshi)

オホーツク食品加工技術センター・研究員

研究者番号：50523742