

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11167

研究課題名(和文) ジルコニアインプラントへの新規ハイドロキシアパタイト成膜法

研究課題名(英文) New hydroxyapatite (Calcium phosphate) coating on the zirconia implant

研究代表者

バラネザハド アリレザ (VALANEZHAD, Alireza)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：00608870

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)：ジルコニア試料はジルコニア粉末ステンレス鋼の金型に入れ一軸加圧成形によりジルコニア板を作製し、一軸加圧後それらを焼成した。焼成したジルコニア板は、リン酸亜鉛溶液とともにテフロン容器に入れ、様々な処理時間で水熱処理を行った。このように作製されたリン酸亜鉛化ジルコニアをカルシウム溶液(酢酸カルシウムまたは塩化カルシウム)に入れ、様々な処理時間で水熱処理を行った。リン酸亜鉛ジルコニアに1酢酸カルシウム溶液で水熱処理を行った試料表面のSEM像を図に示す。XRDによる結晶相解析およびEDXによる試料表面上の元素分析においてもカルシウム被膜の形成が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で創製された新しいHAによるジルコニアのコーティング手法は画期的なインプラント材への応用が可能であると考えられる。歯科インプラント臨床への貢献が期待される。また、本コーティング法は整形外科インプラント等にも応用可能であると考えられるため、歯学インプラント材のみならず歯学・医学を始めとする多方面での新規な材料開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was the preparation of a firmly adhered calcium phosphate coating layer on the zinc phosphatized zirconia to be used as a dental implant. Yttria doped ZrO<sub>2</sub> (zirconia) plates were placed in an acidic zinc phosphatizing solution in a Teflon vessel covered by a stainless jacket for hydrothermal treatment. The zinc phosphate coating layer was made by hydrothermal treatment in an acidic zinc phosphate solution. Then the zinc phosphatized zirconia substrate was hydrothermally treated by calcium acetate solutions to convert the surface structure to calcium phosphate. In this study the firmly adhered zinc phosphate coating and then calcium phosphate coating were prepared successfully. Surface morphology, elemental analysis, phase transformation, biaxial flexural strength, coating layer adhesion and surface cell response were investigated in this study.

研究分野：生体材料学

キーワード：Zirconia Zinc phosphate Calcium phosphate

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

最近、審美的な観点から、歯科インプラントへのジルコニアの利用が提案されている。正方晶系多結晶を有する 3Y-TZP と呼ばれるイットリア (3 mol%) をドープした二酸化ジルコニウム、 $ZrO_2$  (ジルコニア) が、チタン (Ti) の代替物として検討されている。ジルコニアは、その高い機械的特性、健康な歯肉の色を維持する能力、インプラント周囲での炎症の低さ、および骨結合性、半透明性、放射線不透過性、細菌定着、Ti との生体適合性から、歯科インプラントへの利用が有望視されるバイオセラミックである。ジルコニアは Ti 同様に生体不活性材料として知られており、また多くの研究者はインプラントに関する *in vivo* の検討結果から、Ti に匹敵する結果を示すことを報告している。

即時荷重インプラントに対する需要は増大しているが、バイオセラミックスの場合、3 週間から半年の治癒期間が規定されています。この期間の短縮のため、インプラント表面への生体活性材料コーティングが用いられ、リン酸カルシウムによる被覆は有望な方法の一つです。カルシウムおよびリン酸には、材料の表面に生物活性を誘導する可能性があるが、ジルコニア表面へとリン酸カルシウムを強固に接着させる方法は確立されていない。

これまでに我々は、歯科セメントとして臨床的に使用されているリン酸亜鉛皮膜を形成した後にカルシウム塩へと変換することにより、強固に結合したヒドロキシアパタイト層を Ti 上に強固に形成させる事に成功した。この手法は亜鉛 - リン酸塩処理 (パーカー) 法と呼ばれ、軟鋼上への防食被覆層の製造に利用されている。軟鋼の場合には、低温 (75~95 ) で処理されるが、この条件ではジルコニア表面への被膜形成はみられなかった。そこで本研究では、水熱処理を用いたリン酸亜鉛被膜の形成を試みる。

## 2. 研究の目的

本研究では、水熱法とパーカー法の組み合わせによるジルコニア表面へと強固に結合したヒドロキシアパタイト (リン酸カルシウムセラミック) 被膜の形成を目的としている。ジルコニアに対しリン酸亜鉛水溶液を用いて水熱処理を行い、得られた被膜の形態、化学組成、結晶構造、ジルコニア表面との接着強度、及びインピット口での細胞応答を検討し、新規な歯科用インプラントの表面処理としての有用性を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) ジルコニア上のリン酸亜鉛の生成

ジルコニア (TZ-3Y-E) ディスクを、ステンレス鋼のジャケット付き Teflon<sup>®</sup> 容器内のリン酸亜鉛溶液 ( $0.36 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ ZnO}$ ,  $0.58 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$ ,  $0.63 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HNO}_3$ ) へと浸漬し、水熱処理 (250 、0~12 時間) を施した。

### (2) 表面へのカルシウム処理

上記で得られた試料に対して、酢酸カルシウム溶液を用い水熱処理 (200 、6 時間) を施した。

### (3) キャラクターゼーション

得られたリン酸亜鉛およびリン酸カルシウム被覆試料の表面形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。試料表面の化学組成は、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) を用いて分析した。表面構造を X 線回折 (XRD) により分析した。ジルコニア表面上のリン酸亜鉛被覆層の接着強度は、接着試験装置 (ROMULUS IV, Quad Group Inc., 米国) により評価した。ジルコニア基材の二軸曲げ強度は、ISO 6872 : 1995 に従って、リン酸亜鉛およびリン酸カルシウムコーティングの前後に測定した。

### (4) 細胞応答

骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用い、リン酸亜鉛およびリン酸カルシウムコーティング前後のジルコニア試料に対する細胞応答を評価した。試料上の細胞の形態は化学固定、金スパッタの後、SEM を用いて観察した。細胞増殖の評価 (2、4、6 日目) には MTS アッセイキットを用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) リン酸亜鉛コーティング

リン酸亜鉛処理溶液を用い水熱処理（250℃、0、0.5、3、6および12時間）を施したジルコニア試料表面の形態を図1に示す。リン酸亜鉛処理0.5時間の試料では形態に大きな変化は見られなかった。リン酸亜鉛処理3時間後、非常に薄い板状結晶構造がジルコニア表面上を部分的に被覆した様子が観察された。水熱処理（6、および12時間）の後、試料表面は板状結晶により完全に覆われていた。

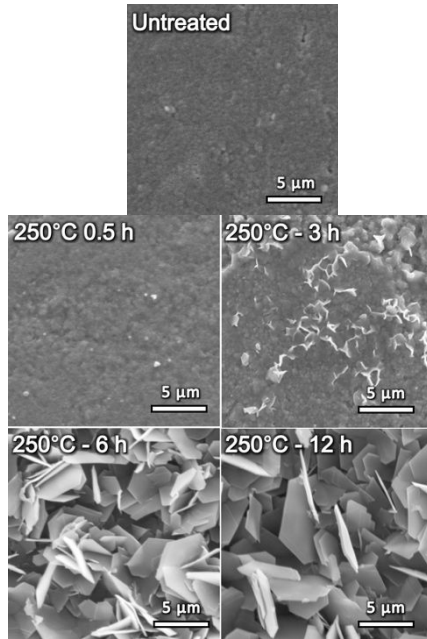


図1 水熱処理前後のジルコニア基板のSEM画像。処理時間：0 (a) 0.5 (b) 3 (c) 6 (d) および 12 h (e) 処理温度 250

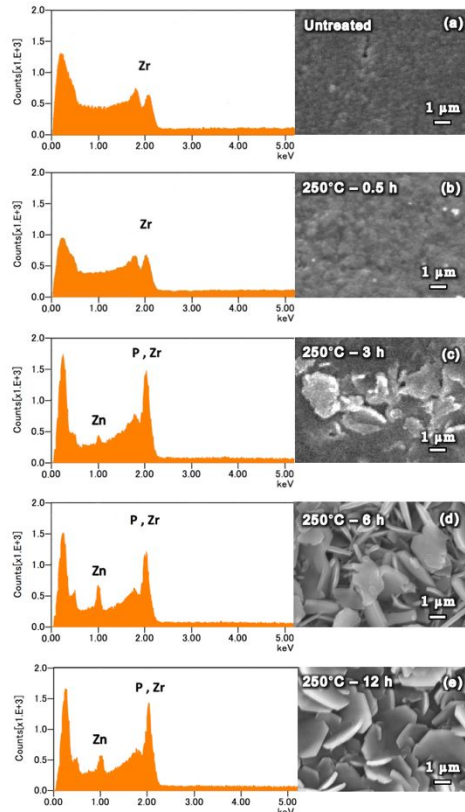


図2 水熱処理前後のジルコニア基板のEDSスペクトルおよび関連領域のSEM像。処理時間：0.5 (b) 3 (c) 6 (d) および 12 h (e) 処理温度 250

図2に、水熱処理リン酸亜鉛化ジルコニア基板のEDSスペクトルと関連領域のSEM画像を示す。水熱処理（3、6および12時間）後の試料表面から、ジルコニウム、亜鉛およびリンの各元素が検出された。水熱処理時間の増加に伴い、亜鉛のピーク強度の増加が見られたが、6時間以上では強度の変化は見られなかった。

図3に、水熱処理（250℃、0、0.5、3、6および12時間）後のジルコニア試料のXRDパターンを示す。水熱処理3時間後のXRDパターンには、ジルコニア自身のシグナルに加え、ホペイト相に帰属される小さなピークが現れた。水熱処理時間6時間ではと、ホペイトの相対的な強度が増加した。これはジルコニア表面上での結晶層の形成を示す。但し、水熱処理時間を更に増加しても、ホペイト由来のピーク強度の増加は見られなかった。EDX・XRDの結果から、リン酸亜鉛水熱反応により形成された結晶はリン酸含有亜鉛（ホペイト）と帰属された。250℃、6時間の水熱処理により形成された被膜と試料との接着強度は、 $60.25 \pm 2.6 \text{ MPa}$ であった。また、水熱処理前後で測定された二軸曲げ強度には、有意差はみられなかった。

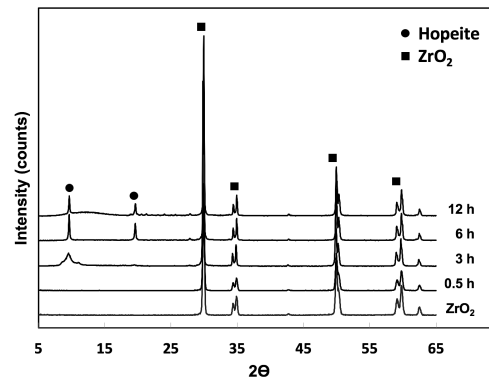


図3 水熱処理 0、0.5、3、6、および 12h のジルコニア基板のXRDパターン。処理温度 250

### (2) カルシウム処理による相変態

図4に、上述の処理で得られたリン酸亜鉛化ジルコニア基板に対し、1M酢酸カルシウム水溶液を用い、200℃で6時間、水熱処理を行った後のSEM画像およびEDSスペクトルを示す。SEM画像から、被膜の形態が変化し、試料表面への新たな相の形成が確認された。12時間(6時間?)の水熱処理後の試料表面から、カルシウム、リン、亜鉛およびジルコニウムが検出された。

図5に、水熱処理後のリン酸亜鉛化ジルコニアのXRDパターンを示す。リン酸亜鉛処理ジルコニア基板(250℃、6時間)に対し、1M酢酸カルシウム溶液で水熱処理(200℃、6時間)を行ったところ、亜鉛含有リン酸カルシウム的一种、パラゾルツァイト( $\text{CaZn}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )の形成が見られた。パラゾルツァイトは、この研究で初めて生体活性コーティングとして導入された。我々のグループは以前、Tiインプラント表面にパラゾルツァイト相を形成し、*in vivo*研究において、パラゾルツァイトはヒドロキシアパタイトに匹敵する優れた結果を示した。

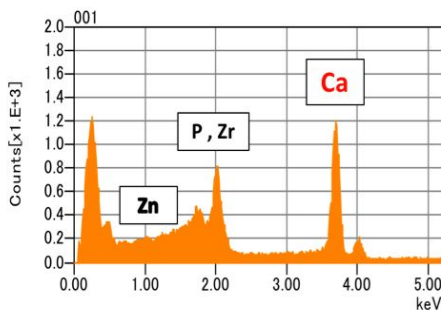
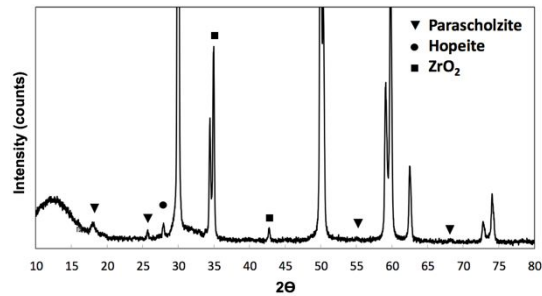
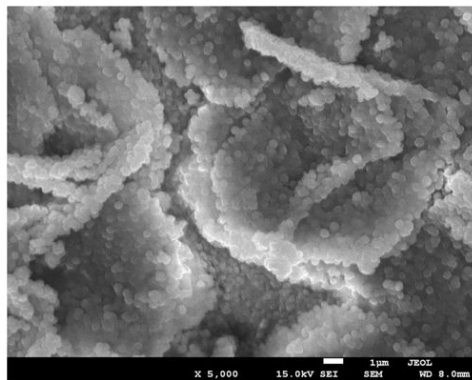


図4(左)  
水熱カルシウム処理(200℃、6h)後のジルコニア基板のEDSスペクトル(上)と関連領域のSEM像(下)

図5(右)  
水熱カルシウム処理(200℃、6h)後のジルコニア基板のXRDパターン

### (3) 形成した被膜の*in vitro* 評価

水熱リン酸亜鉛処理(250℃、0、0.5、3、6、12時間)およびカルシウム処理(200℃、6時間)を施したジルコニア試料上で3時間培養したMC3T3-E1細胞の形態を図6に示した。培養3時間で、MC3T3-E1の試料表面への付着、伸展が見られた。水熱リン酸亜鉛処理(0、0.5、3時間)の試料と比較して水熱リン酸亜鉛処理(6、12時間)更に水熱カルシウム処理を施したジルコニア試料表面では、より多くの細胞マトリックスの伸展が見られた。

図7に、水熱リン酸亜鉛処理(ホペイト被膜)、水熱カルシウム処理(パラゾルツァイト被膜)試料上で培養したMC3T3-E1の細胞増殖挙動を示す。全てのジルコニア試料において、6日間の培養で細胞は非常に増殖した。また、9日後のパラゾルツァイト

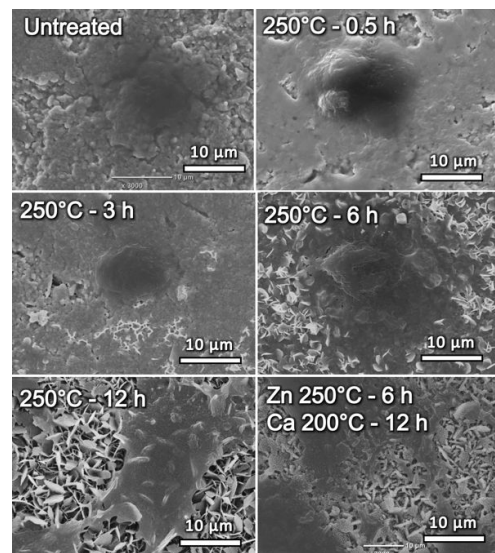


図6 各種ジルコニア試料上で培養したMC3T3-E1のSEM像。水熱リン酸亜鉛処理(250℃)処理時間:0(a)、0.5(b)、3(c)、6(d)、12h(e)。水熱リン酸亜鉛処理6hの後、水熱カルシウム処理(200℃)処理時間12h(f)。

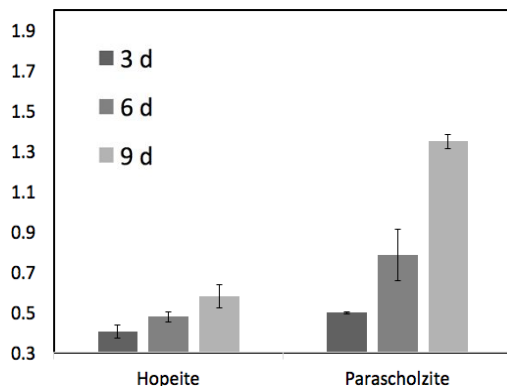


図7 ホピタイト被覆ジルコニア（左）およびパラゾルツァイト被覆ジルコニア（右）上で培養したMC3T3-E1の細胞増殖挙動。（培養期間、3, 6, 9 d）

ト被覆ジルコニア上での細胞数は、ホペイト被覆ジルコニアと比較して有意な増加が見られた。

本研究では、ジルコニアに対して水熱リン酸亜鉛処理、水熱カルシウム処理を行う事で、ジルコニア基板表面に強固に結合したパラゾルツァイト被覆ジルコニアの創製に成功した。得られた試料表面では骨芽細胞の高い増殖挙動が認められ、ジルコニアインプラントへの骨伝導処理として有用であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Yamada M, Valanezhad A, Egoshi T, Tashima Y, Watanabe I, Murata H: Bioactive Glass Coating on Zirconia by Vacuum Sol-Dipping Method, *Dental Materials Journal*, 2019, 【査読有】 , 【DOI:<https://doi.org/10.4012/dmj.2018-222>】
2. He X, Valanezhad A, Yoshida N, Watanabe I: Assessment of characteristics and cytotoxic effects of 316L stainless steel coated with a new titanium oxide nano-structure coating method, *Dental Materials Journal*, 2019, 【査読有】【DOI:<https://doi.org/10.4012/dmj.2018-222>】
3. Khodaei M, Valanezhad A, Watanabe I: Fabrication and characterization of porous beta-tricalcium phosphate scaffold for bone replacement, *Journal of environmental friendly Materials*, 2(2), 1-4, 2018, 【査読有】
4. Khodaei M, KhodaBande E, Nazemi H, Valanezhad A, Watanabe I: Corrosion behavior of bioactivated titanium dental implant using different chemical methods, *Journal of Advanced Materials and Processing*, 6(1):14-20, 2018, 【査読有】
5. Shebl S, Valanezhad A, Abdel-Karim U, Abdalla A, Elkafrawy H, Watanabe I; Shrinkage Stress of High and Low Viscosity Bulk-Fill Composites with Incremental and Bulk Fill Techniques, *Tanta Dental Journal*,15:224-233, 2018, 【査読有】【DOI: 10.4103/tj.tdj\_18\_18】
6. Khoshzaban A, Keyhanvar P, Delrish E, Najafi F, Heidari S, Watanabe I, Valanezhad A, Jafarzadeh T: Media Charge Potential of Alginate Microcapsules: In-vitro Study, *Cell Journal (Yakhteh)*, 20(1):77, 2018, 【査読有】【DOI:10.22074/cellj.2018.4508】
7. Khodaei M, Valanezhad A, Watanabe I, Yousefi R: Surface and mechanical properties of modified porous titanium scaffold, *Surface & Coatings Technology* 315: 61-66, 2017, 【査読有】 【DOI:<https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.02.032>】
8. Khodaei M, Valanezhad A, Watanabe I: Controlled gentamicin- strontium release as a dual action bone agent: Combination of the porous titanium scaffold and biodegradable polymers, *Journal of alloys and compounds*, 720: 22-28, 2017, 【査読有】 【DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2017.05.236>】 .
9. Khoshzaban A, Rakhshan V, Najafi E, Aghajanpour L, Hashemian SJ, Heidari S, Watanabe I, Valanezhad A, Jafarzadeh T: Effect of sintering temperature rise from 870 to 920 °C on physicommechanical and biological quality of nano-hydroxyapatite: An explorative multi-phase experimental in vitro/vivo study, *Materials Science and Engineering C*, 77:142-150, 2017, 【査読有】 【DOI:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.183>】
10. Valanezhad A, Odatsu T, Shiraishi T, Udoh K, Sawase T, Watanabe I: Modification of resin modified glass ionomer cement by addition of bioactive glass nanoparticles, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27:1-9, 2016, 【査読有】【DOI 10.1007/s10856-015-5614-0】

〔学会発表〕(計 13 件)

1. Asadi S, Valanezhad A, Watanabe I, Saeid T: Microstructure and mechanical properties control of dissimilar laser welding of stainless steel and NiTi shape memory orthodontic wires, The 71th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Osaka, Japan, 37(2), p.94, April 14-15, 2018.
2. He X, Valanezhad A, Yoshida N, Watanabe I: New method for titanium oxide nano-structure formation on the zirconia implant, The 70th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Nigata, Japan, 36(5), p.391, Oct 14-15, 2017.
3. Kodama K, Valanezhad A, Murata H, Watanabe I: Characterization of calcium phosphate coated

zirconia, The 70th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Nigata, Japan, p332, Oct 14-15, 2017.

4. Valanezhad A: Fabrication of a strongly adhered coating with high bone contact ratio on Ti dental implants. 57th Exhibition and Congress of Iranian Dental Association (EXCIDA 57), Tehran, Iran, 2017.

5. Valanezhad A: A novel method to prepare rough and bioactive coating on Zirconia dental implants. 57th Exhibition and Congress of Iranian Dental Association (EXCIDA 57), Tehran, Iran, 2017.

6. Davoodi A, Valanezhad A, Watanabe I, Shahabi S: Fabrication of a strongly adhered coating with high bone contact ratio on Ti dental implants. 57th Exhibition and Congress of Iranian Dental Association (EXCIDA 57), Tehran, Iran, May 15-18, 2017.

7. Khodaei M, Meratian, Valanezhad A, Pazarlioglu S, Salman S, Watanabe I: Effect of the Hardness of Spacer Agent on Structural Properties of Metallic Scaffolds. ICMSE 2017: 19th International bone contact ratio on Ti dental implants. 57th Exhibition and Congress of Iranian Dental Association (EXCIDA 57), Tehran, Iran, May 15-18, 2017.

8. Khodaei M, Meratian, Valanezhad A, Pazarlioglu S, Salman S, Watanabe I: Effect of the Hardness of Spacer Agent on Structural Properties of Metallic Scaffolds. ICMSE 2017: 19th International Conference on Materials Science and Engineering, Zurich, Switzerland, April 20-21, 2017.

9. Valanezhad A, Khodaei M, Watanabe I: Effect of thermal oxidation on the properties of porous titanium scaffold. The 69th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Tokyo, Japan, 36(2), p.102 April 15-16, 2017.

10. Kodama K, Valanezhad A, Murata H, Watanabe I: Hydrothermal treatment of the zinc phosphate coated zirconia dental implants to formation of calcium phosphate coating. The 69th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Tokyo, Japan, 36(2), p.75 April 15-16, 2017.

11. Shahenda S, Valanezhad A, Abdel-Karim U, Abdalla A, Elkafrawy H, Watanabe I: Effect of application techniques on shrinkage stress of different composite resin materials. The 69th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Tokyo, Japan, p76, April 15-16, 2017.

12. Suzue M, Valanezhad A, Shiraishi T, Watanabe I: Effect of different surface treatments of titanium on the adhesive strength of treated layer using epoxy stud pin. The 67th General Session of the Japanese Society for Dental Materials and Devices (JSDMD), Fukuoka, Japan, 35(2), p.83, April 16-17, 2016.

13. Watanabe I, Valanezhad A, Yamada M, Murata H: Effect of bioactive glass coating on cell viability of zirconia surface. 45th annual meeting & exhibition of the AADR, Los Angeles, USA, March 16-19, 2016.

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 郁哉

ローマ字氏名：WATANABE, Ikuya

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：00274671

研究分担者氏名：白石 孝信

ローマ字氏名：SHIRAISHI, Takanobu

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10150468

研究分担者氏名：尾立 哲郎

ローマ字氏名：ODATSU, Tetsuro

所属研究機関名：長崎大学

部局名：病院（歯学系）

職名：講師

研究者番号（8桁）：70513167

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。