

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390503

研究課題名（和文）

ナノアパタイト薄膜作製技術を用いた次世代インプラント治療

研究課題名（英文）

Implant treatment in next generation by preparation technology of nano apatite thin film

研究代表者

本津 茂樹(HONTSU SHIGEKI)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：40157102

研究成果の概要（和文）：

レーザーアブレーション法によるハイドロキシアパタイト(HAp)と生体アパタイト(BAp)の薄膜化および積層化技術と、シート化技術を用いて、治療部位に整合した生体活性を有する骨誘導再生用 BAp メンブレン(BApGBR)と生体内安定性と生体活性を併せ持つ複合機能 2 層 (BAp/HAp) インプラントを作製した。薄膜および積層膜の評価は化学的、物理的、分子生物学的特性について行った。また、BApGBR メンブレンと新規複合機能インプラントの臨床模擬試験を、イヌ下顎歯槽骨および大腿骨欠損モデル埋入試験を用い、次世代インプラント治療としての有用性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have aimed to develop following two types of medical/dental devices that are effective for the implant treatment in next generation. One is the freestanding membrane of biological apatite (BAp) that can be applied to the guided bone regeneration (GBR) method with the suitable bioactivity for affected region. The other is the implant in that two functions of biostability and biocompatibility were harmonized by the bilayered structure of BAp/hydroxyapatite (HAp). Both devices were prepared by using a pulsed laser deposition (PLD) technique for a thin film and bilayer formation technology. The prepared thin films and the bilayer were evaluated on chemical, physical and molecular biology. Clinical simulation test of BApGBR membrane and the function harmonized implant was carried out by using the mandibular alveolar bone and the femoral defect model of dog. As the results, the usefulness of our devices was confirmed as an implant treatment in next generation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2009 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：インプラント、アパタイト、メンブレン、骨誘導再生

1. 研究開始当初の背景

国内外において、歯の欠損に対するインプ

ラント治療はすでに一般的なものとなり、患者からのニーズも非常に高い。しかし、歯槽

骨の萎縮などによりインプラント埋入のための骨量不足で、埋入が行えずインプラントによる咀嚼機能を回復することができないケースも非常に多いのが現状である。そこで近年、ティッシュエンジニアリングの発達に伴い骨再生誘導法(GBR 法)が積極的に行われるようになった。また、インプラントとして骨との初期接着性の高いアパタイトコーティングインプラントの需要は非常に高くなっている。

現在、GBR 法に使用される市販の生体内吸収性膜は、膜を撤去する必要はないが、十分な骨再生が得られる前に膜吸収が起こることから感染の危険性が高く、さらに生体親和性に乏しく骨造能力は弱いため、膜だけで骨を再生するにはかなりの時間を要する。そこで、実際はスペーサーとして自家骨や人工骨等で骨再生を促す方法がとられているが、治療部位に整合した形状のスペーサーを用意することは難しく、新規なメンブレンの開発が望まれる。

一方、インプラント母体へのハイドロキシアパタイト(HAp)コーティングには、主にプラズマ溶射法あるいはフレーム溶射法が用いられる。しかし、これらの従来法では数千℃以上でアパタイトを溶射し、急冷して膜を作製するため、これらの溶射法で作られた HAp 被覆は、膜が厚くなり(数十~数百 μm)、膜変形時に HAp 層にクラックが発生し、金属母体-膜界面で HAp 層の剥離が起こる。さらに、従来法はアモルファス相を多く含むために HAp の組成が不均一になり、骨結合の欠落や HAp 被膜の吸収などが起こるリスクがあった。

本研究は、GBR メンブレンと HAp 被覆インプラントの上記問題点を一気に解決し、次世代インプラント治療を実現しようとするものである。

2. 研究の目的

本研究では、レーザーアブレーション(以下 PLD と記す)法によるナノアパタイト薄膜作製技術を用いた、全く新しい次世代インプラント治療を確立する。PLD 法によって治療部位に整合した生体活性を有する生体アパタイト(BAp)メンブレンを作製し、骨誘導再生(GBR)法により BAp メンブレン材および骨面の双方から骨再生を促し、短期間に骨再生を完了させる。また、チタンインプラント表面に、ナノスケールの生体内で長期安定な化学量論的アパタイト(HAp)薄膜をコーティングし、さらにその上部に BAp 薄膜をコーティングする 2 層構造とし、生体内安定性と生体活性を併せ持つ新規複合機能インプラントを開発する。薄膜評価は化学的、物理的、分子生物学的特性について行う。また、BApGBR メンブレンと新規複合機能インプ

ラントの臨床模擬試験は、イヌ下顎歯槽骨および大腿骨欠損モデル埋入試験を用いて行う。

3. 研究の方法

(1) 薄膜およびメンブレンと積層インプラントの作製

①BApGBR メンブレンの作製

- BAp として動物骨由来アパタイト粉末を用い、この粉末をプレス成形し、これを薄膜形成用のレーザーのターゲットとした。
- BAp 薄膜の作製は、基板に NaCl を用い、ArF エキシマレーザー ($\lambda=193\text{nm}$, パルス幅=20nsec) による PLD 法で行った。
- 成膜後、BAp 薄膜が被覆された NaCl を純水に浸漬して NaCl を溶解させ、BAp 薄膜のみを単離し BAp シートとした。その後、400℃で 10 時間のポストアニールを行い、BAp シートを結晶化した。このシートは柔軟性・可撓性を示すので、治療部位の形状に合わせて直接貼り付けることが可能となり、新規の GBR メンブレンとして使用した。

②BAp シェル(Shell)メンブレンの作製

- 治療部位を付加型アルジネート印象材で凹型(雌型)をとり、この凹型に水溶性型材を注入・凝固させて部位の形状を再現したモデル(凸型)を製作した。この水溶性型材上に PLD 法で BAp 薄膜を成膜し、その後 BAp の被覆された水溶性型材を純水に浸漬して NaCl を溶解させることで、部位形状を有する BAp シェルメンブレンを製作した。

③チタン上への 2 層コーティングと積層インプラントの作製

- BAp として上記の動物骨由来アパタイト粉末を、また HAp には化学量論的アパタイト粉末を用い、これらの 2 つの粉末を上記同様にプレス成形して円盤状ペレットにし、これらをレーザーのターゲットとした。
- 薄膜積層技術により 2 層構造の作製を行う。基材であるインプラントを回転機構で回転させ、まずその表面に 50nm の HAp 薄膜を成膜する。続いて、ターゲットを HAp から BAp に切り替え、HAp 薄膜の上に 300nm の BAp 薄膜を成膜し、2 層積層構造インプラントとした。

(2) 薄膜および積層膜の評価

①物理的評価

- 引張試験
固定した基板の薄膜に、引っ張り治具をシアノアクリレート系接着剤で固定して薄膜表面に垂直に力を印加し、膜が剥離する力から固着力を求めた。

②化学的評価

- 得られた薄膜について、組成はエネルギー

分散型 X 線分析法(EDX)で、その結晶性は X 線回折法で、分子構造や状態はフーリエ変換赤外分光(FT-IR)にて評価した。

③培養細胞による分子生物学的評価
チタンにコーティングした薄膜上で骨芽細胞ならびに上皮系細胞を培養し、細胞増殖ならびに細胞接着試験を行った。

(3)臨床モデル試験による生体適合性の評価

①埋入術式

実験動物にビーグル犬を用いた。鎮静は、ペントバルビタールナトリウムの静脈内注射による全身麻酔を行い以下の実験を行った。

- ・ビーグル犬の大腿骨に直径 4mm、深さ 10mm の骨欠損を形成し、術後 BApGBR シェルメンブレンを骨欠損上面に固定した。
- ・術後 1, 3, 5 週に対する骨再生状態を下記の方法で検討した。

②観察方法

微細血管鋳型標本を作成し、走査型電子顕微鏡(SEM)を用い観察した。また、通法に従い HE 染色によって骨、細胞、線維などの観察を行った。さらに、マイクロ CT を用い、360 度分の透視画像データを X 線または FPD を用いて収集した。そのデータをもとに再構成計算を行い、断面画像を作成する。以上の作業によって骨再生状態を 360 度断面で観察し新生骨の伸展状態と、新生骨の体積を検索した。

③ 2 層積層構造インプラントの埋入と評価
臨床モデルとしてイヌ下顎歯槽骨欠損モデルを作製し、BApGBR メンブレンによって歯槽骨増生を行った後、2 層積層構造インプラントを埋入し、機能的 (マイクロ振動による固着強度)、病理組織学的 (SEM、HE)、放射線学的 (マイクロ CT) に評価した。評価は埋入後 2, 4, 8, 24 週で行った。

4. 研究成果

(1) 薄膜およびメンブレンと積層インプラントの作製

動物骨由来アパタイト粉末を用い、これをターゲットとして PLD 法により板状の NaCl 基材上に天然アパタイト (BAp) 膜を成膜し、その後純水に浸漬して NaCl を溶解させ、BAp 膜のみを単離し、1cm² の可撓性 BApGBR

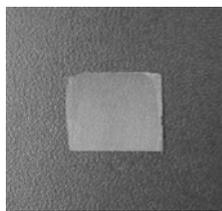


図 1. BApGBR

メンブレンを作製することができた(図 1)。また、フォトリソグラフィ用のレジスト剤を石英平板にコーティングし、そのうえ HAp 膜を作製したのちに、レジスト剤を溶解させる

ことで最大 6.25cm² の HApGBR メンブレンの作製に成功した。さらに、フォトレジストを用い、これを Si 基板にスピコートしたものを基材とし、その上に PLD 法で HAp を成膜することで、直径 50mm (28.5cm²) の大面積 HApGBR の作製技術を確立した。また、必要とされる欠陥形状の鋳型にワックスを流し込むことでシェル用基板を作製し、この基板を用いて骨増性用のシェルメンブレンの作製にも成功した。

また、BAp と HAp の二つのターゲットを用い、PLD 法によって承認済チタンインプラント表面に BAp/HAp の機能性 2 層積層構造インプラントを作製することができた。

(2) 薄膜および積層膜の評価結果

引張試験法により調べた薄膜の固着力はチタン基材上で 90MPa 以上であり、実用化に十分な固着特性を示した。また、得られた薄膜の組成を EDX で調べた結果、Na、Mg 等の微量元素の存在も含めて、目的に近い組成の薄膜を得ることに成功した。さらに、FT-IR 測定の結果、BAp 薄膜において OH 基の一部が炭酸基に置換していることも明らかになった。X 線回折結果において、HAp、BAp の単層膜および、BAp/HAp の 2 層構造の XRD パターンは原材料とよく一致しており、それぞれの膜や積層構造が得られていることを確認した(図 2)。

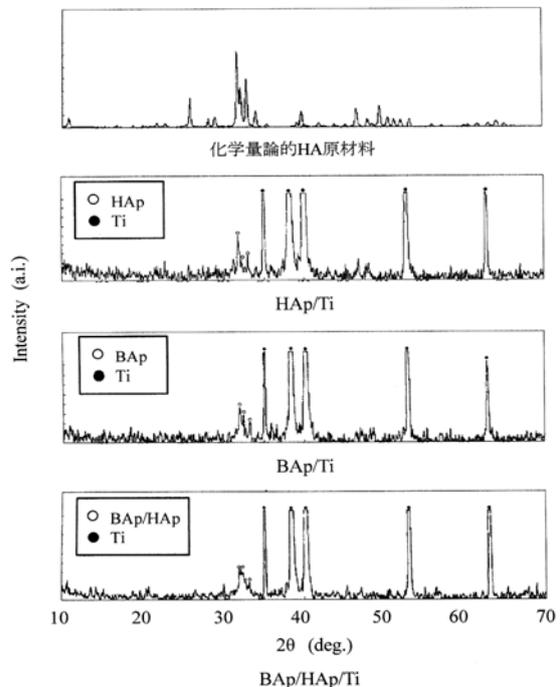


図 2. HAp 原材料および PLD 法で作製した各種薄膜の X 線回折パターン

生物学的評価として、チタンにコーティングした BAp 薄膜上で骨芽細胞を培養した結

果、チタン上に比べて3倍程度の増殖を示した。

(3) 臨床モデル試験による生体適合性の評価
骨欠損部にシェルメンブレンを固定し、術後1、3、5週における骨再生状態をマイクロCTにより観察した結果、欠損部分の骨増性を観測することができた(図3)。さらに、シェルメンブレンの作製技術を応用して、3次元HApシートを「歯の絆創膏」として歯質の修復・保存に用いることにも成功した。

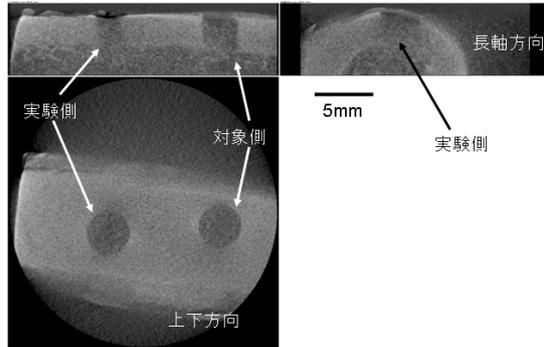


図3. マイクロCTによる新生骨増性の観察結果(3週)

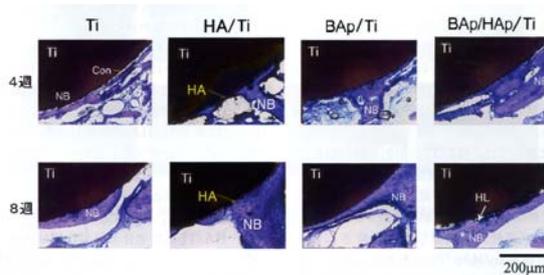


図4. インプラント先端部における各種インプラント周囲骨の組織像(NB:新生骨, HA:溶射アパタイト層, Con:結合組織, HL:ハウシツプ窩)

一方、2層構造(BAp/HAp:350nm)で被覆したインプラントをイヌ大腿骨に埋入して、埋入後2、4、8、24週術までの新生骨の形成および骨伝導能を、血管・骨同時鋳型標本の走査電子顕微鏡(SEM)観察、および非脱灰研磨標本のトルイジンブルー(TB)染色で観察形態学的・組織学的に検討した結果、骨伝導能はTiのみのインプラントに比べてBAp/HAp/Tiインプラントの方が新生骨の伝導速度、インプラントとの密着程度の観点から優れていることが示唆された。この効果は、術後8週までに顕著であった(図4)。さらに、BAp/HAp/Tiと新生骨の密着性は極めて良好で、インプラントと新生骨が直接密着していることが観察され、安定的な密着性と信頼性がより高いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Hayami, T., Hontsu, S., Higuchi, Y., Kusunoki, M., Nishikawa, Osteoconduction of a stoichiometric and bovine hydroxyapatite bilayer coated implant, *Clinical Oral Implants Research*, *In press*, 2010. 査読有
- ② 本津茂樹, 速水尚, 樋口裕一, 大橋芳夫, 橋本典也, 2層アパタイト被覆インプラントの開発:合成アパタイトおよび生体アパタイト2層薄膜被覆の骨伝導に関する組織学的検討, *日本口腔インプラント学会*, Vo.47, No.1, 697~708, 2010. 査読有
- ③ S. Hontsu, K. Yoshikawa, N. Katou, T. Hayami, H. Nishikawa, M. Kusunoki, K. Yamamoto, Restoration and conservation of dental enamel using a flexible apatite sheet, *Journal of the Australian Ceramic Society*, Vo.23, No.4, 11~13, 2010. 査読有
- ④ Kusunoki, M., Kawakami, Y., Matsuda, T., Nishikawa, H., Hayami, T., Hontsu, S. Fabrication of a large hydroxyapatite sheet, *Applied Physics Express*, 107003-1~3, 2010. 査読有
- ⑤ H. Nishikawa, R. Hatanaka, M. Kusunoki, T. Hayami, S. Hontsu, Preparation of Freestanding Hydroxyapatite Membranes with Excellent Biocompatibility and Flexibility, *Appl. Phys. Express*, Vol.1, 088001-1~3, 2008. 査読有

〔学会発表〕(計18件)

- ① S. Hontsu, K. Yoshikawa, N. Katou, T. Hayami, H. Nishikawa, M. Kusunoki, K. Yamamoto, The restoration and conservation of dental enamel using a flexible apatite sheet, *International Symposium for Apatite and Correlative Biomaterials (ISACB2010)*, 10 December 2010, Cairns, Australia.
- ② 松田太陽, 川上佳晃, 楠正暢, 西川博昭, 本津茂樹, ハイドロキシアパタイトシートの結晶性に関する検討, 第32回日本バイオマテリアル学会, 2010年11月30日, 広島.
- ③ 本津茂樹, 川上佳晃, 西川博昭, 楠正暢, 吉川一志, 山本一世, フレキシブルアパタイトシートを用いたエナメル質の修復・保存, 第32回日本バイオマテリアル学会, 2010年11月29日, 広島.
- ④ H. Nishikawa, A. Ametani, Y. Hashimoto, M. Kusunoki, T. Hayami, and S. Hontsu, Biocompatibility Evaluation of Hydroxyapatite coated Titanium Fiber Mesh Scaffold, *The 3rd International*

- Congress on Ceramics, 16 November 2010, Osaka, Japan.
- ⑤ 川上佳晃, 松村太陽, 楠正暢, 西川博昭, 速水尚, 本津茂樹, パルスレーザーデポジション法によるアパタイトシートの作製と大面積積化の検討, 平成22年電気関係学会関西連合大会, 2010年11月13日, 草津(滋賀).
- ⑥ 速水尚, 松村和明, 本津茂樹, 疑似体液由来アパタイト超薄膜の骨芽細胞接着性および基材密着特性, 第37回日本臨床バイオメカニクス学会, 2010年11月1日, 京都.
- ⑦ 西川博昭, 篠原悠, 楠本典也, 楠正暢, 速水尚, 本津茂樹, Mg含有アパタイト薄膜の作製とその生体親和性評価, 第71回応用物理学会学術講演会, 2010年9月16日, 長崎.
- ⑧ H. Nishikawa, Y. shinohara, Y. Hashimoto, M. Kusunoki, T. Hayami and S. Hontsu, Synthesis of magnesium-containing apatite thin film and its biocompatibility investigated by in-vitro cell cultivation., 11th International Conference on Ceramic Processing Science, 29 August 2010, Zurich, Switzerland.
- ⑨ Y. Hashimoto, H. Nishikawa, M. Kusunoki, T. Hayami, S. Hontsu and S. Takeda, Application to tissue engineering scaffolds of hydroxyapatite sheet, International Association for Dental Research (IADR2010), 15 July 2010, Barcelona, Spain.
- ⑩ H. Nishikawa, S. Hontsu, M. Kusunoki, Application of Freestanding Hydroxyapatite Membranes to Tissue Engineering, 9th Asian BioCeramics Symposium, 10 December 2009, Nagoya, Japan
- ⑪ 本津茂樹, 速水尚, 西川博昭, 楠正暢, 楠本典也, 樋口裕一, ナノスケール生体アパタイト/HAp積層被覆インプラントの骨伝導に関する組織学的検討, 第21回アパタイト研究会, 2009年11月27日, 福岡
- ⑫ 川上佳晃, 楠正暢, 西川博昭, 本津茂樹, PLDアパタイトの大面積積化の検討, 第21回アパタイト研究会, 2009年11月26日, 福岡
- ⑬ 篠原悠, 葛谷燈, 西川博昭, 楠正暢, 本津茂樹, Mg含有アパタイト薄膜の生体親和性評価, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16日, 京都
- ⑭ 川上佳晃, 楠正暢, 西川博昭, 本津茂樹, 大面積アパタイトシートの作製法の開発, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16日, 京都
- ⑮ S. Hontsu, H. Nishikawa, N. Taninaka, M. Kusunoki, Y. Hashimoto, Y. Higuchi, Preparation of Carbonate Apatite thin films and Evaluation of its Biocompatibility, International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT2009), 1 July 2009, Singapore
- ⑯ H. Nishikawa, Y. Hashimoto, N. Taninaka, M. Kusunoki, T. Hayami, S. Hontsu, Fabrication of Biological Apatite Membranes with Various Shapes toward the Programmable Scaffolds for Tissue Engineering, International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT2009), 1 July 2009, Singapore
- ⑰ H. Nishikawa, R. Hatanaka, H. Asano, Y. Hashimoto, M. Kusunoki, T. Hayami, S. Hontsu, Freestanding hydroxyapatite membranes with various shapes and the application to tissue engineering scaffolds, The IUMRS International Conference in Asia, 2008年12月9日, Nagoya
- ⑱ 谷中直樹, 東郷秀孝, 楠正暢, 西川博昭, 本津茂樹, 生体アパタイトシートの作製とその生体親和性評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008, 2008年11月17日, 東京
- [図書] (計1件)
- ① 本津茂樹, 楠正暢, 西川博昭, 吉川一志, フレキシブルアパタイトシートの歯科応用, 機能材料 (MAY⑤), シーエムシー出版, 63-68, 2011.
- [産業財産権]
- 取得状況 (計3件)
- ① 名称: 化学センサ装置用の検出子およびその利用
発明者: 本津茂樹, 速水尚, 西川博昭, 楠正暢
権利者: 科学技術振興機構(JST)
種類: 特許
番号: 特許第4670084号
取得年月日: 2011年1月28日
国内外の別: 国内
- ② 名称: 高生体親和性を持つ多孔質インプラント及びその製造方法
発明者: 本津茂樹, 速水尚, 西川博昭, 楠正暢, 川島将実
権利者: 近畿大学, 科学技術振興機構(JST)
種類: 特許
番号: 特許第4522822号
取得年月日: 2010年6月4日
国内外の別: 国内
- ③ 名称: 人工骨又は人工歯根インプラント
発明者: 本津茂樹, 三船英雄, 樋口裕一
権利者: 本津茂樹, 朝日インテック株式会社
種類: 特許
番号: 特許第4471257号

取得年月日：2010年3月12日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本津 茂樹 (HONTSU SHIGEKI)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：40157102

(2) 研究分担者

橋本 典也 (HASHIMOTO YOSHIYA)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20228430

樋口 裕一 (HIGUCHI YUICHI)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：10181083

楠 正暢 (KUSUNOKI MASANOBU)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：20282238