

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25年 5月 8日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22360299

研究課題名（和文） 生体吸収性リン酸カルシウム系コーティング膜を利用した骨適合界面の創製

研究課題名（英文） Development of bone-compatible interface using bioresorbable calcium phosphate coating film

研究代表者

成島 尚之（NARUSHIMA TAKAYUKI）

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20198394

研究成果の概要（和文）：

スパッタリング法で工業用純チタン表面に作製した非晶質リン酸カルシウム膜の生体内外評価を行った。非晶質リン酸カルシウムコーティングを施したチタンインプラントを白色家兎大腿骨および脛骨に埋入したところ、インプラント安定指数（ISQ 値）や骨接触率の有意な上昇が観察された。埋入 2 週間後には既にコーティング膜は生体吸収されており、Ca や P 関連イオンの徐放は骨適合性向上の支配因子と考えられた。非晶質リン酸カルシウム膜への Nb 添加は溶解性を低下させ、生体吸収性制御に有力であった。

研究成果の概要（英文）：

In vivo and in vitro evaluations of an amorphous calcium phosphate film formed on commercially pure titanium were conducted. Titanium implants coated with amorphous calcium phosphate were given to the femur and tibia of white rabbits. The implant stability quotient (ISQ) and bone implant contact for titanium implants were statistically improved by the coating of amorphous calcium phosphate. The coating film was absorbed during an implantation period of two-weeks; the release of Ca and P-related ions due to this absorption was suggested to play an important role in the improvement of bone compatibility. Further, the addition of Nb to the amorphous calcium phosphate film was an effective technique to control its resorbability in biological environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・材料加工・処理

キーワード：表面・界面制御

1. 研究開始当初の背景

骨伝導性を有するリン酸カルシウムを利用したコーティングは、人工股関節ステム部や人工歯根などのチタンインプラントの骨適合性向上の有力な手法である。プラズマスプレー法はチタンインプラントへのリン酸

カルシウムコーティングで実績と歴史を有するが、コーティング膜質制御の難しさが指摘されており多くの代替法が国内外で検討されている。

研究代表者らのグループでは、これまで RF マグネトロンスパッタリング法によりチ

タン表面へリン酸カルシウムコーティング膜を作製し、その生体内外評価を通してチタンと骨との迅速かつ強固な密着を得るための検討を萌芽研究(H17-H18)、基盤研究(B)(H19-H21)により行ってきた。その過程で、非晶質リン酸カルシウムコーティング膜が優れた骨形成能を有していることを見出した。非晶質リン酸カルシウムは生体吸収性を有することから、Ca や P 関連イオンの放出が骨適合性に関与すると考えられているが材料学的にも生物学的にも詳細は不明であった。そこで、生体吸収性の観点からリン酸カルシウムコーティング膜が骨形成能に及ぼす影響を明らかにする必要があるとの認識に至った。

2. 研究の目的

チタンインプラント上に作製された生体吸収性リン酸カルシウムコーティングの骨形成に関する支配因子と骨形成能向上機構の解明を目的とする。コーティング作製プロセスとしては低温での成膜が可能なドライプロセス (RF マグネトロンスパッタリング法) およびウェットプロセス (擬似体液浸漬法) を対象として、以下の研究を遂行する。

- ① チタン表面への生体吸収性リン酸カルシウム膜の作製プロセスを確立する。
- ② 生体吸収性リン酸カルシウム膜の骨形成能を細胞培養試験および動物埋入実験により評価する。
- ③ 生体吸収性リン酸カルシウム膜中への元素 (Si, Nb, Mg, Ag) 添加プロセスを確立するとともに、生体吸収性と元素添加および熱処理の関係を解明する。
- ④ チタンインプラントの骨適合性向上に最適な生体吸収性リン酸カルシウムコーティング膜の組成および製造プロセスを学術的な根拠を持って提案する。

以下、ページ数の制限を考慮し、RF マグネトロンスパッタリング法により作製した非晶質リン酸カルシウム膜および Nb 添加に関連した研究の方法・結果を述べる。

3. 研究の方法

- (1) RF マグネトロンスパッタリング法による非晶質リン酸カルシウム膜の作製

RF マグネトロンスパッタリング装置 (MS-320, ユニバーサルシステムズ) を用いて、工業用純チタン (CP Ti, Gr 4) 製インプラント ($\phi 3.75$ mm, Brånemark System Mk III RP, 機械加工まま表面, Nobel Biocare AB) 表面に厚さ約 500 nm の非晶質リン酸カルシウムコーティングを施した。成膜条件は、スパッタガス中の酸素濃度: 0%, RF 出力: 100 W、チャンバー内圧力: 0.5 Pa とした。

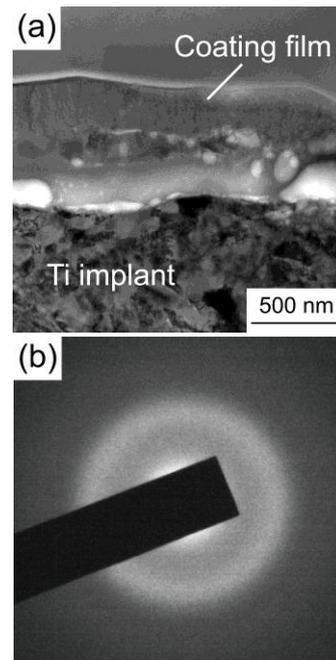


図 1 (a)非晶質リン酸カルシウム膜断面 TEM 像と (b)電子線回折パターン

図 1 に TEM による作製ままコーティング膜断面観察と電子線回折の結果を示す。緻密で均一な非晶質膜の形成が確認された。

- (2) 非晶質リン酸カルシウムコーティングを施したチタンインプラントの動物埋入実験

実験動物には平均体重約 3 kg のニュージールランド白色家兔(雄性、購入時 16 週齢)を 18 羽用いた。埋入部位は大腿骨外側の骨頭頸部より約 15 mm 末梢側および脛骨外側の膝関節部より約 15 mm 末梢側とし、右脚にコーティングインプラント、左脚にコントロールとして未処理のインプラントを骨長軸に対し垂直に埋入した。埋入期間はインプラント埋入後 1、2 および 4 週とし、各埋入期間につき家兔数を 6 とした。埋入直後および所定埋入期間経過後のインプラント固定の安定性を、共鳴振動周波数分析 (RFA: Resonance Frequency Analysis)にて評価した。RFA 測定終了後、大腿骨埋入インプラントの回転除去トルクを評価した。脛骨に埋入したインプラントとその周囲の骨組織を一塊で摘出し、組織観察に供した。

なお、本研究の実験手順は国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会によって承認されたものであり(21 歯動-56、22 歯動-69)、実験動物の取り扱いには「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づいて行った。

(3) Nb 添加非晶質リン酸カルシウム膜の作製と評価

ホットプレス法で作製した緻密な $(100-x)\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot x\text{Nb}_2\text{O}_5$ ($x=0 \sim 1.1\text{mol}\%$) 焼結体をターゲット材料とした RF マグネトロンスパッタリング法により、チタン基板上に Nb 添加非晶質リン酸カルシウムコーティング膜を作製した。生物学的評価は MC3T3-E1 細胞を用いたアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定により行った。

(4) コーティング膜の分析

SEM, TEM, α -2 θ XRD ($\alpha=1^\circ$), XRF 等によりコーティング膜の相や形態の分析を行った。コーティング膜とチタン基板との密着力をピン引き抜き試験により評価した。

Tris 緩衝液へのコーティング膜からの Ca と P 関連イオンの溶出量を ICP-MS により測定し、生体吸収性の指標とした。

4. 研究成果

(1) 非晶質リン酸カルシウムコーティングの有効性

図 2 および図 3 に家兔脛骨に埋入した非晶質リン酸カルシウムコーティングおよび未処理インプラントの骨接触率 (C_{B-I}) および骨増生量 (V_b) を示す。骨接触率および骨増生量は皮質骨部の光学顕微鏡による組織観察から以下の式で算出した。

$$C_{B-I} = B/A \times 100 \quad (1)$$

A: 皮質骨部のインプラント全表面長

B: A において骨とインプラントが直接接触する長さ

$$V_b = V_{bone} / V_{all} \times 100 \quad (2)$$

V_{all} : インプラントスレッド頂部を直線で結んだラインとインプラントで囲まれた面積

V_{bone} : V_{all} において骨が占める面積

骨接触率および骨増生量いずれも非晶質リン酸カルシウムコーティングの有無に関わらず埋入期間の増加に伴い増大しているが、骨接触率は 2 週および 4 週後に、骨増生量は 1 週後にコーティング材において有意に高い値が得られた。しかしながら、コーティング材において有意な骨接触率と骨増生量の上昇が観察される埋入時期が異なっている。骨形成は主に既存の骨側から進行するため、骨接触率では埋入後期に、骨増生量では埋入初期に有意差が観察されたものと考えられる。一方、埋入後期には骨形成可能な領域が減少するために骨増生量の有意差が確認されなかったと推察される。

図 4 に家兔大腿骨および脛骨に埋入したインプラントの RFA 測定における埋入直後および所定の期間埋入後の ISQ 値を示す。共鳴振動周波数は ISQ (Implant Stability Quotient) 値として出力される。ISQ 値は 1

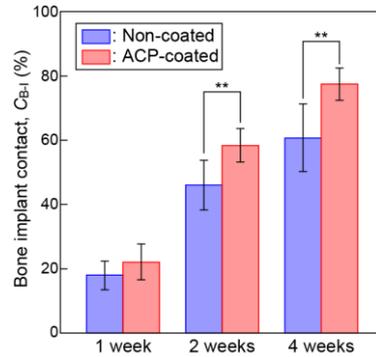


図 2 脛骨に埋入したインプラントの骨接触率 (** $P < 0.01$)

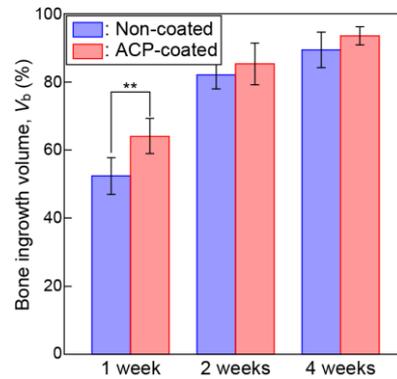


図 3 脛骨に埋入したインプラントの骨増生量 (** $P < 0.01$)

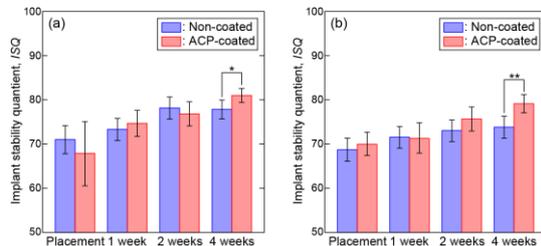


図 4 (a)大腿骨および(b)脛骨に埋入したインプラントの ISQ 値 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

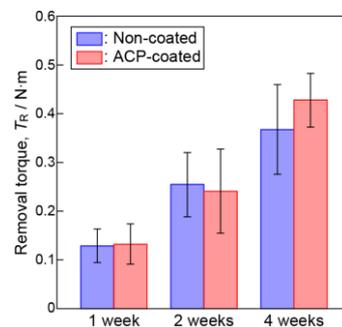


図 5 大腿骨に埋入したインプラントの回転除去トルク

～100 で出力され、大きいほどインプラントの固定が強固であることを示す。4 週埋入後にはコーティング材において有意に高い ISQ 値が得られた。大腿骨に埋入したインプラントの回転除去トルクを図 5 に示す。有意差は認められなかったものの、4 週埋入後にはコーティング材で高い回転除去トルク平均値が得られた。

図 2～図 5 の結果より、非晶質リン酸カルシウムコーティングはチタンインプラントの骨適合性の向上に有効であることを生物学的に示すことができた。

本実験系では大腿骨埋入インプラントの RFA 測定の後には直ちに回転除去トルクを測定しているため、ISQ 値と回転除去トルクの関係の直接的な検討が可能である。図 6 には ISQ 値と回転除去トルクの関係を示し、図 7 には ISQ 値の変化 (ΔISQ =所定期間埋入後の ISQ 値-埋入直後の ISQ 値) と回転除去トルクの関係を示す。埋入 1 週後では ISQ 値と回転除去トルクの間に関連は認められないものの、埋入 2 週以降、正の相関が観察された (図 6)。 ΔISQ が 10 以上で回転除去トルクが飽和する現象が認められた (図 7)。これらの結果は非侵襲的な RFA 測定により回転除去トルクを予測できることを示しており、臨床的に有用なデータである。

図 8 に埋入後のインプラント-骨界面の TEM 像を示す。埋入 1 週後のリン酸カルシウム層の厚さは、500 nm 以下であり、コーティング膜の生体吸収の進行が確認できる。さらに、埋入 2 週後のリン酸カルシウム層からは Na や Cl が観察されており、生体中で形成されたリン酸カルシウム層と考えられた。

これらの観察結果より、非晶質リン酸カルシウムコーティング膜は埋入 2 週後には既に吸収されており、その過程で放出される Ca や P 関連イオンが骨適合性の向上に寄与することが示唆された。

(2) 非晶質リン酸カルシウム膜への Nb 添加の効果

図 9 にリン酸カルシウムコーティング膜の相をターゲットへの Nb_2O_5 添加量と RF 出力の関数として示す。 Nb_2O_5 を添加していないターゲットを用いた成膜では、スパッタリング時の RF 出力が 100 W 以上で結晶質相のオキシアパタイト (OAp , $Ca_{10}(PO_4)_6O$) が観察された。一方、 Nb_2O_5 を 0.5, 0.8, 1.1 mol% 添加したターゲットにおいてはいずれの RF 出力においても非晶質リン酸カルシウム (ACP) 膜が得られた。これは、Nb がリン酸カルシウム中でネットワークフォーマーとして働き、非晶質相を安定化させたためと考えられる。この Nb 添加リン酸カルシウム膜に大気中熱処理を施しても、873 K までは結晶化しないことが確認された。873 K は

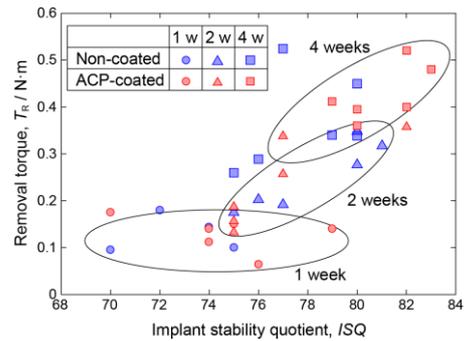


図 6 ISQ 値と回転除去トルクの関係

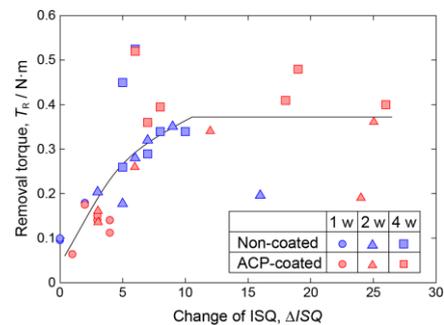


図 7 ISQ 値の変化と回転除去トルクの関係

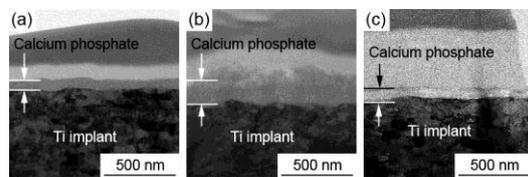


図 8 インプラント-骨界面の TEM 像 ((a)1 週間, (b)2 週間, (c)3 週間埋入後)

Nb を添加していない非晶質リン酸カルシウム膜が結晶化する温度である。また、Nb 添加リン酸カルシウム膜の基板との密着力は 60 MPa 程度と十分に高い値であった。なお、これらのコーティング膜中にはターゲット組成とほぼ同程度の Nb が含有されていた。

Nb 添加および添加していない非晶質リン酸カルシウムコーティング膜の Tris 緩衝液中浸漬における Ca および P イオン溶出量を図 10 に示す。Nb を含有していない非晶質リン酸カルシウムコーティング膜は 1 日浸漬により完全に溶解したのに対し、Nb 添加非晶質リン酸カルシウムコーティング膜は 3 日間浸漬後も溶出量はコーティング膜全体の数分の一程度と計算された。すなわち、Nb 添加による非晶質相の安定化により、生体吸収性を制御することが可能であった。さらに、リン酸カルシウムガラスへの Nb 添加は骨系細胞の初期分化誘導のマーカーである ALP 活性を有意に上昇させた。

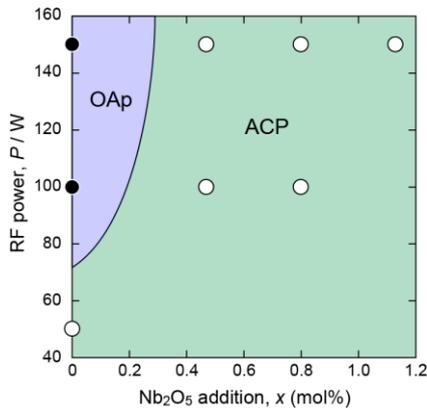


図 9 ターゲットへの Nb_2O_5 添加がコーティング膜相に及ぼす影響

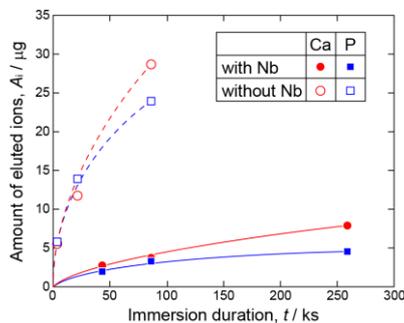


図 10 コーティング膜からの Tris 緩衝溶液中へのイオン溶出量

(3) 研究の総括

- ① RF マグネトロンスパッタリング法により作製した生体吸収性非晶質リン酸カルシウムコーティング膜はチタンインプラントの骨適合性向上に有効であることを生物学的評価および材料学的界面観察により示した。
- ② 骨適合性向上は生体中における非晶質リン酸カルシウムの生体吸収に伴う Ca や P 関連イオンの放出によることが示唆された。生体吸収性はリン酸カルシウム系材料の骨適合性に密接に関連しており、その制御が重要である。
- ③ 本研究では家兎への埋入実験において非晶質リン酸カルシウム膜の骨適合性に関する有効性が確認できたが、ヒトへの応用では骨形成に長期間を要することが予想される。非晶質リン酸カルシウムへの Nb 添加は生体吸収性の低下に有効であり、非晶質リン酸カルシウムのイオン徐放を長期間継続させることを可能にする。これは非晶質リン酸カルシウムコーティングの応用領域の拡大に有効である。

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、10 件表示) 全て査読有り

- ① N. Umetsu, S. Sado, K. Ueda, K. Tajima and T. Narushima: Formation of anatase on commercially pure Ti by two-step thermal oxidation using $\text{N}_2\text{-CO}$ gas, Mater. Trans., 54 [8] (2013), in press.
DOI: 10.2320/matertrans.ME201315.
- ② K. Ueda, S. Nakaoka and T. Narushima: β -grain refinement of $\alpha+\beta$ type Ti-4.5Al-6Nb-2Fe-2Mo alloy using rare-earth-oxide precipitates, Mater. Trans., 54 (2013) 161–168.
DOI: 10.2320/matertrans.MC201207
- ③ 成島尚之: チタンの軽元素メタラジー, チタン, 61 (2013), 126–131.
DOI, URL: 無し
- ④ N. Shiraishi, R. Tu, R. Uzuka, T. Narushima, T. Goto, M. Niinomi, K. Sasaki and O. Suzuki: Biomechanical evaluation of amorphous calcium phosphate coated TNTZ implants prepared using a radiofrequency magnetron sputtering system, Mater. Trans., 53 (2012) 1343–1348.
DOI: 10.2320/matertrans.M2012078
- ⑤ A. Obata, Y. Takahashi, T. Miyajima, K. Ueda, T. Narushima and T. Kasuga: Effects of niobium ions released from calcium phosphate invert glasses containing Nb_2O_5 on osteoblast-like cell functions, ACS Appl. Mater. Interfaces, 4 (2012) 5684–5690.
DOI: 10.1021/am301614a
- ⑥ M. Taira, W. Hatakeyama, H. Kihara, H. Kondo, K. Ueda and T. Narushima: Quantitative analyses of osteogenic-differentiation-related gene expressions in human osteoblast-like cells (Saos-2) cultured on hydroxyapatite and titanium, J. Oral Tissue. Engin., 10 (2012) 34–41. DOI, URL: 無し
- ⑦ N. Shiraishi, Y. Suzuki, N. Sato, T. Anada, T. Goto, R. Tu, M. Niinomi, T. Narushima, K. Ueda, R. Uzuka, O. Suzuki and K. Sasaki: Calcium phosphate-coated titanium alloy implants prepared by radiofrequency magnetron sputtering: a review, in Interface Oral Health Science 2011, ed. K. Sasaki, Springer, (2012) 352–354.
DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0_102
- ⑧ S. Yokota, J. Kurihara, N. Nishiwaki, S. Tamate, K. Ueda, T. Narushima and H. Kawamura: Accelerated bone formation around titanium dental implants with

amorphous calcium phosphate coating in rabbit, in Interface Oral Health Science 2011, ed. K. Sasaki, Springer, (2012) 243–245.
DOI: 10.1007/978-4-431-54070-0_69

- ⑨ T. Okazumi, K. Ueda, K. Tajima, N. Umetsu and T. Narushima: Anatase formation on titanium by two-step thermal oxidation, J. Mater. Sci., 46 (2011) 2998–3005.
DOI: 10.1007/s10853-010-5177-x
- ⑩ 新家光雄, 池田勝彦, 成島尚之: チタンおよびチタン合金, 軽金属, 61 (2011), 673–677. DOI, URL: 無し

[学会発表] (計 50 件、10 件表示)

- ① 成島尚之: 「ドライプロセスによるバイオセラミックス被覆」, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、S5 メタルベースハイブリッドバイオマテリアル, 仙台国際センター, H24.11.27.
- ② T. Narushima (keynote): 「Bioceramic coating on titanium using dry process」, The 5th International Symposium on Designing, Processing and Properties of Advanced Engineering Materials, ISAEM-2012, Hotel Nikko Toyohashi, H24.11.6.
- ③ 成島尚之: 「熱酸化法によるチタン表面へのアナターゼ形成と評価」, 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ, 東北大学, H24.9.4.
- ④ T. Narushima: 「Surface modification of titanium using dry process」, The Japan-Finland Joint Workshop on Future Implant, Research Seminar in Helsinki, Finnish Red Cross Blood Service, Helsinki, Finland, H24.8.6.
- ⑤ T. Narushima: 「Fabrication and evaluation of amorphous calcium phosphate film on titanium」, Workshop on Materials Science in Tianjin University Day, IMR, Sendai, H23.11.11.
- ⑥ 成島尚之: 「ドライプロセスを利用したチタン系材料の表面・バルク処理」, 日本鉄鋼協会・日本金属学会関西支部 材料開発研究会 平成 22 年度第 4 回研究会, 大阪大学, 吹田, H23.1.20.
- ⑦ T. Narushima (invited): 「Surface modification of titanium for biomedical applications」, The 1st Joint Workshop on Advanced Materials Research & Application, Dalian University of Technology-Tohoku University, Dalian University of Technology, Dalian, China, H22.11.4.
- ⑧ T. Narushima (keynote): 「Calcium phosphate coating on titanium using dry process」, The Seventh Pacific Rim International Conference on Advanced Materials and Processing (PRICM7), Cairns,

Australia, H22.8.2

- ⑨ T. Narushima (invited): 「Research and development of metallic biomaterials in Japan」, Special seminar, Research Center for Metallurgy, Indonesian Institute of Sciences, Serpong, Indonesia, H22. 7.16.
- ⑩ T. Narushima (keynote): 「Research and development of metallic biomaterials in Japan」, 4th National Seminar of Metallurgy and Material, University of Sultan Ageng Tirtayasa, Cilegon, Banten, Indonesia, H22.7.14.

[図書] (計 3 件、3 件表示)

- ① 成島尚之 (共著), 日本医学館: 「未来型人工関節を目指して」, (2013). 印刷中.
- ② T. Narushima and K. Ueda (共著), IGI Global, 「Technological advancements in biomedicine for healthcare applications」, (2012), pp. 223–233.
- ③ 成島尚之 (共著), 日本医学館, 「バイオマテリアルの基礎」, (2010), pp. 17–22, pp. 48–53.

[その他]

研究室のホームページ

<http://www.material.tohoku.ac.jp/~medmate/index.html>

研究代表者の実績関係

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/13b406c665928751300aaeac089d5fc9.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成島 尚之 (NARUSHIMA TAKAYUKI)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 20198394

(2) 研究分担者

上田 恭介 (UEDA KYOSUKE)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 40507901

川村 仁 (KAWAMURA HIROSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・
大学院非常勤講師
研究者番号: 00110651

春日 敏宏 (KASUGA TOSHIHIRO)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 30233729

(3) 連携研究者

平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 60179398