

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 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22760546

研究課題名（和文）

チタン表面の骨形成を抑制するセラミックス膜の水熱合成

研究課題名（英文）

Hydrothermal synthesis of ceramic films for inhibition of bone formation on titanium

研究代表者

上田 正人 (UEDA MASATO)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：40362660

研究成果の概要（和文）：化学・水熱複合処理における水熱処理溶液として $ZrOCl_2/NH_3/C_6H_8O_7$ (クエン酸) 水溶液を用いることにより、純 Ti 表面へ TiO_2-ZrO_2 複合膜を合成できた。その膜上では、擬似体液中でのハイドロキシアパタイトの析出、ならびにラット脛骨における骨伝導が抑制されることが明らかとなった。合成膜/骨界面の透過型電子顕微鏡観察により、合成膜と骨は直接結合していないことが確認できた。

研究成果の概要（英文）： TiO_2-ZrO_2 composite film could be synthesised on pure Ti by the chemical-hydrothermal combined treatment with $ZrOCl_2/NH_3/C_6H_8O_7$ aqueous solution. Apatite formation and bone conduction was suppressed on the film.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・構造・機能材料

キーワード：生体材料，表面・界面物性，セラミックス，表面修飾，骨形成制御，水熱処理，生体不活性，ジルコニア

1. 研究開始当初の背景

Ti や Ti 合金は機械的性質、生体適合性に優れるため生体材料として広く利用されている。その骨誘導能は生体活性セラミックスに比べ低いが、体内に長期埋入すると生体骨と直接結合することが知られている。Ti や Ti 合金をセメントレスな硬組織代替材料として用いる場合は骨誘導能を向上させる必要があり、逆にボーンプレート、ボーンスクリュー等、治癒後抜去する器具として用いる

場合は骨形成を抑制することが好ましい。前者では生体用 Ti 合金に表面修飾を施すことで生体活性を付与しているが、後者では骨形成能が低いとされる Zr をベースとした新たな合金設計が行われている。前者の生体活性化に関する研究は盛んに行われているが、後者の生体不活性化に関する研究は非常に少ない。我々研究グループも Ti 表面の生体活性化に関する研究を行い、化学処理と水熱処理を組み合わせたプロセスにて Ti 表面に生体

活性な TiO_2 や CaTiO_3 膜を合成する手法を見出した。そこで既存の生体用 Ti 合金において、その生体活性化と類似のプロセスにて、骨誘導能を表面修飾のみで積極的に抑制できないかと考えた。

2. 研究の目的

今まで行ってきた化学・水熱複合処理による生体活性 TiO_2 膜の合成を発展させ、Ti 表面の骨形成を効果的に抑制するための表面修飾法を確立することを目的とした。具体的には、以下の事項を行った。

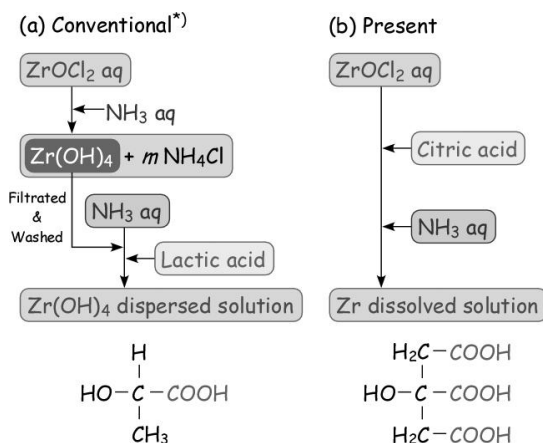
- (1) 化学・水熱複合処理により ZrO_2 を含有する酸化物膜の合成方法の確立。また合成膜における Zr 含有量、表面形態に及ぼす水熱処理条件（溶液、成分濃度、pH）の影響の系統的な整理。
- (2) 擬似体液浸漬試験により、リン酸カルシウムの形成能を評価。
- (3) 動物実験による、骨伝導能の評価。また、そのインプラント/生体骨界面の電子顕微鏡観察。

3. 研究の方法

(1) ZrO_2 含有膜の水熱合成

工業用純チタンディスク ($\phi 6 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$) を 80°C に保持した $5 \text{ M H}_2\text{O}_2/0.1 \text{ M HNO}_3$ 水溶液に 20min 浸漬した。その試料をテフロン容器中で $100 \text{ mM ZrOCl}_2/5 \text{ M NH}_3/C^{\text{CA}} \text{ mM C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (クエン酸, $C^{\text{CA}} = 0, 200, 400, 600$) 水溶液に浸漬し、 180°C で 12h の水熱処理を行った。

図1は従来行っていた ZrO_2 含有膜の水熱合成法と今回の合成における溶液調整法である。従来法では、 Zr(OH)_4 ゲルを予め合成し、さらに所定の量を分散するなど複雑なプロセスを経ている。それに対し、新たな調整法では、Zr を含有する溶液に対するヒドロキシ脂肪酸とアンモニア水溶液の添加順序を変更し、さらに、乳酸からクエン酸に置換することで Zr を完全に溶解させた透明の水溶液を得ることができた。そこで、その Zr 含有水溶液を用いて水熱処理を行った。



*) M. Ueda, Y. Sasaki, M. Ikeda and M. Ogawa, Mater. Trans. 2009; 50: pp. 2104-2107.

図1 水熱処理溶液の調整方法の比較;(a)従来法, (b)本合成法

(2) 擬似体液 (SBF) 浸漬試験

各種表面修飾を施した試料をハンクス溶液 ($\text{Na}^+ 142.0, \text{K}^+ 5.8, \text{Mg}^{2+} 0.9, \text{Ca}^{2+} 1.3, \text{Cl}^- 145.6, \text{HCO}_3^- 4.2, \text{HPO}_4^{2-} 0.8, \text{SO}_4^{2-} 0.4 \text{ mM}$) に所定の時間浸漬させた。SBF は 2 days 毎に交換した。試料は蒸留水で洗浄した後、 50°C で 3h 乾燥させ、走査型電子顕微鏡 (SEM) で表面観察を行った。

(3) 動物実験

8 週齢 SD 系 (Crj:CD) IGS ラットの脛骨にロッド状試料 ($\phi 2 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) を埋入し、2 weeks 後の骨-インプラント接触率 (次式) を測定し、骨伝導を評価した。

$$R_{\text{BT}} (\%) = \frac{\text{Total length of hard tissue formation on implant}}{\text{Total length of implant}} \times 100$$

さらに、骨-インプラント界面近傍から収束イオンビーム (FIB) 装置で薄片を切り出し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。

4. 研究成果

(1) ZrO_2 含有膜の水熱合成

TiO_2 ゲルを $100 \text{ mM ZrOCl}_2/5 \text{ M NH}_3/C^{\text{CA}} \text{ mM C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 水溶液中で水熱処理した試料の表面形態を図2に示す。クエン酸無添加の場合、 $50 \sim 100 \text{ nm}$ 程度の立方体状の結晶が合成された。これは、 NH_3 水溶液を用いた水熱処理で得られる形態と同じである。一方、クエン酸を $200 \text{ mM}, 400 \text{ mM}$ 添加した場合、その結晶は顕著に微細化された。さらに、クエン酸の添加量を 600 mM まで増加させると、表面の結晶は粗大化し、表面形態の均一性は低下した。

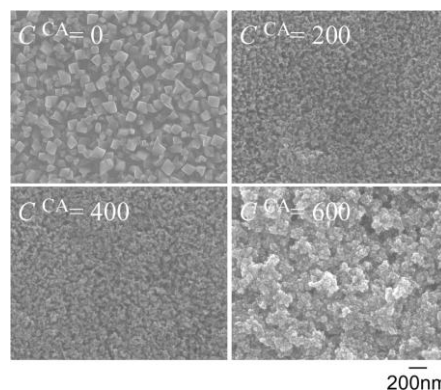


図2 クエン酸添加量を変化させて水熱合成

した膜の表面形態

クエン酸添加量を変化させて水熱合成した膜の X 線回折 (XRD) プロファイルを図 3 に示す。クエン酸無添加の場合、アナターゼ型 TiO_2 のピークが観察された。水熱処理により TiO_2 ゲルの結晶性が高められたことを示している。一方、クエン酸を添加した場合、非常に弱い ZrO_2 のピークも観察された。また、アナターゼ型 TiO_2 のピークは無添加のそれに比べブロードになった。

水熱合成により得られた $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 複合膜の蛍光 X 線プロファイルを図 4 に示す。XRD プロファイルでは ZrO_2 からのピークが非常に小さかったが (図 3)、このプロファイルには Zr からのピークが明瞭に観察された。

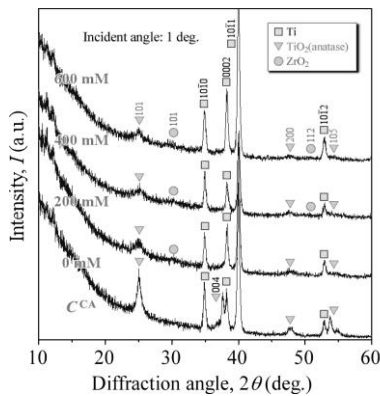


図 3 クエン酸添加量を変化させて水熱合成した膜の X 線プロファイル

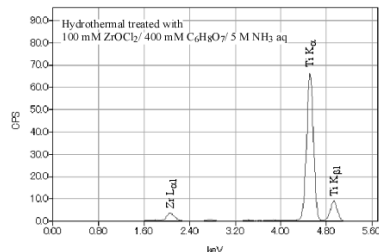


図 4 100 mM ZrOCl_2 /5 M NH_3 /400 mM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 水溶液中で水熱合成した膜の蛍光 X 線プロファイル

擬似体液中でリン酸カルシウムの析出挙動や細胞接着・増殖挙動は表面の物質に加え、その形態や粗さに強く影響することが予想される。本研究では走査型プローブ顕微鏡にて表面を観察し (図 5)、そこから算術平均粗さ (Ra) を求め、表面の諸特性を比較する際の一つのパラメータとした。

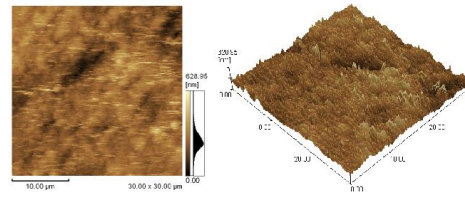


図 5 合成膜の走査型プローブ顕微鏡像

蛍光 X 線プロファイルに現れた Zr と Ti のメインピークから、強度比 $I_{\text{Zr}}/I_{\text{Ti}}$ を算出し、添加したクエン酸濃度に対してプロットした (図 6)。また、同図には Ra ならびに用いた水溶液の pH も同時に示した。クエン酸を添加すると合成膜中の Zr の含有率は増加し、クエン酸濃度が 400mM の時、極大を示した。一方、Ra はクエン酸濃度が 200~400mM で極小を示した。

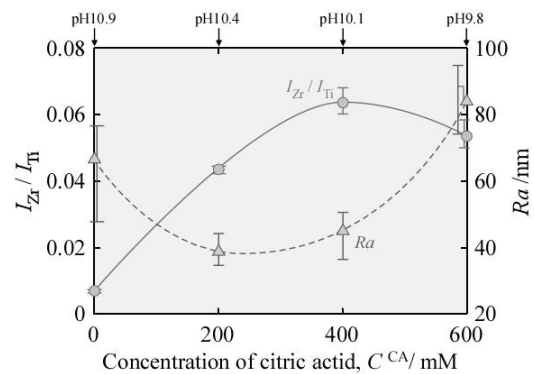


図 6 合成膜における Ti に対する Zr の強度比 ($I_{\text{Zr}}/I_{\text{Ti}}$)、算術平均粗さ (Ra) に及ぼすクエン酸添加量の影響

Zr の存在比が最大を示したクエン酸 400mM 添加の条件で合成した膜の断面における Ti と Zr の分布を図 7 に示す。合成膜において、Ti 基板表面から合成膜表面に向かって、Ti は徐々に減少し、逆に Zr は徐々に増加した。言い換えると、Zr は合成膜表面で最も高濃度になるよう傾斜的に分布していた。Ti 表面に直接 ZrO_2 膜が合成されず、 TiO_2 を介することで、 $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 複合膜の基板密着性に関しても、その構造が有利に働いていると考えている。

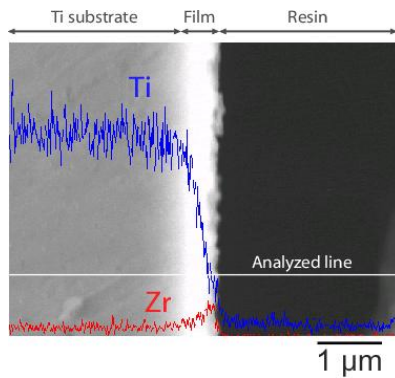


図7 純Ti表面に合成したTiO₂-ZrO₂複合膜断面におけるTiとZrの分布

図8は、本プロセスにおけるTiO₂-ZrO₂複合膜の合成メカニズムを示している。水熱合成に用いる水溶液中では、Zrがクエン酸中のカルボキシル基と配位結合し、完全に溶解していると考えている。水熱環境下で、その溶解しているZr化合物は不安定であるため、Zr(OH)₄ゾルとして析出すると考えられる。そのゾル表面のZrはカルボキシル基と配位結合したままである。TiO₂はアルカリ溶液にわずかに溶解することが知られており、その環境で水熱処理を施すとTiO₂は溶解と再析出を繰り返す。この過程において、表面が化学的に活性化されたZr(OH)₄ゾルはTiO₂と結合し、膜中に取り込まれると考えている。このように、Zr(OH)₄をTiO₂中に取り込むには、クエン酸が必要であるが、過剰に添加すると水溶液のpHが低下し、TiO₂の溶解・再析出が鈍化する。結果として、あるクエン酸添加量でZr含有量が極大を示すことが予想され、実際に400mMで極大を示した(図6)。

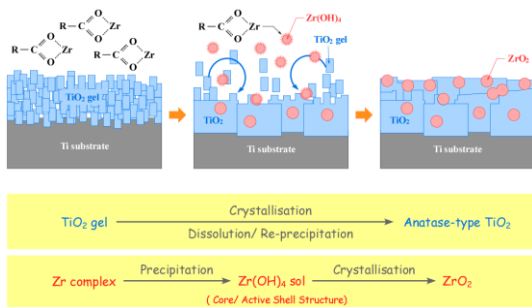


図8 ZrOCl₂/NH₃/C₆H₈O₇水溶液中での水熱合成によるTiO₂-ZrO₂複合膜の形成過程

(2) 擬似体液 (SBF) 浸漬試験

表面のハイドロキシアパタイト (HAp) 誘導能を評価するため、擬似体液浸漬試験を行った。HApの析出が早い試料においても、XRDではその析出を14 days以降しか捉えることができない。そこで本研究では、SEM像からその析出開始点を決定した。SBFに浸漬

した試料表面のSEM像の例を図9に示す。(a)はHApが析出した表面、(b)は析出していない表面である。

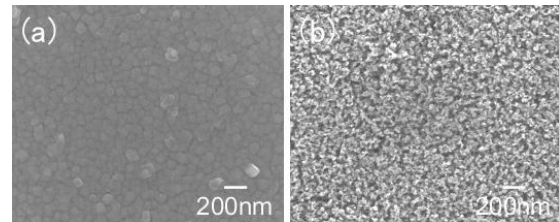


図9 擬似体液に4 days浸漬した試料の表面形態; (a)C^{CA}=0 (b)C^{CA}=400

表1にSBF浸漬試験のまとめを示す。図9に示すようなSEM像にて判定したHApの生成開始点を「P」で示した。純Ti表面ではSBF浸漬後、6 daysよりその析出が観察された。クエン酸無添加 (C^{CA}=0)、添加濃度が200mMの場合は浸漬後4 daysよりHApの生成が観察された。それに対し、クエン酸添加濃度が400mMでは、純Tiと同様の6 daysより、600mMでは、8 daysよりその析出が観察された。合成した複合膜の主物質は、HApの析出を促進するTiO₂であるにもかかわらず、クエン酸を添加し、合成膜中にZrO₂を含有させると、HApの析出は遅延した。これは少量のZrO₂がHAp析出の遅延に対し効果的に寄与していることを示唆している。また、微細な凹凸はHApの析出を促進すると考えられるが、C^{CA}=400近傍では、含有されてるZrO₂の効果の方が強く表れたと考えている。

表1 SBF浸漬試験のまとめ

Samples	Soaking period in SBF					
	2 d	4 d	6 d	8 d	14 d	20 d
C ^{CA} /mM						
0		P				
200		P				
400			P			
600				P		
TiO ₂		P				
Pure Ti			P			

合成膜中へのZrO₂の含有率が最も高かったC^{CA}=400の試料をSBFに20days浸漬し、その表面生成物を薄膜XRDで調べた。HApに加え、リン酸ジルコニウムからのピークも明瞭に観察された(図10)。SBF浸漬中のHAp析出の遅延には、このリン酸ジルコニウムの析出が関与していると推察している。

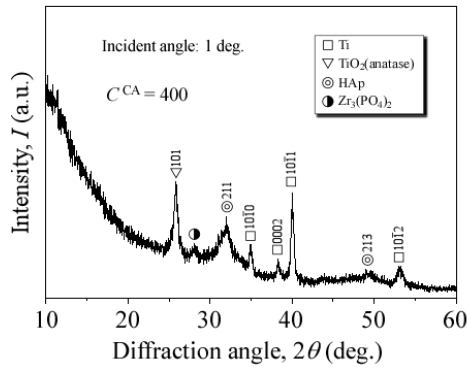


図 10 SBF に 20days 浸漬した試料における表面生成物の X 線プロファイル

(3) 動物実験

埋入 2 weeks 後の骨-インプラント接触率を図 11 に示す。皮質骨において TiO_2 膜では、未処理の Ti に比べ、著しく接触率が向上している。一方、 TiO_2 - ZrO_2 複合膜では、未処理の Ti と有意な差がないものの、 TiO_2 に比べ著しく低い。また、骨伝導が低く、骨と直接結合しないといわれている Zr の接触率よりも若干低い傾向を示した。海綿骨においては、 TiO_2 よりもわずかに低い傾向が認められた。このように SBF 浸漬試験の結果と同様、わずかに含有される ZrO_2 が骨伝導の抑制に効果的に寄与していることが示唆された。

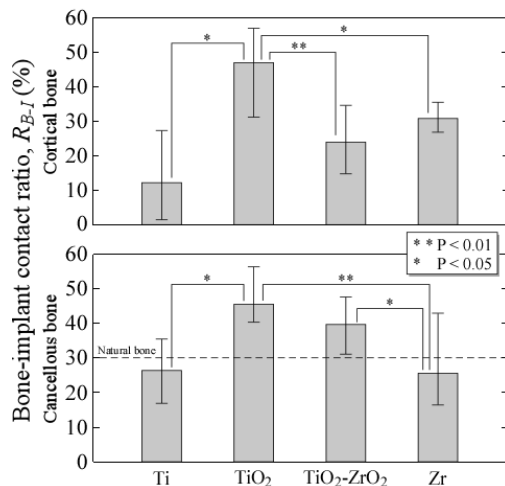


図 11 骨-インプラントの接触率

骨とインプラントの界面状態や結合状態を調べるため、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。図 12 は収束イオンビーム (FIB) で TEM 試料を作製する過程の一部を示している。生体骨は水分を含むため、FIB 装置のチャンバー内で減圧されると収縮し、インプラントから骨が剥離しやすくなる。そこで観察対象とした皮質骨部の骨-インプラント界

面に Pt を厚くコーティングし、界面が剥離しないようブリッジ固定した。その後、FIB 加工により、その Pt に沿って TEM 試料を採取した。

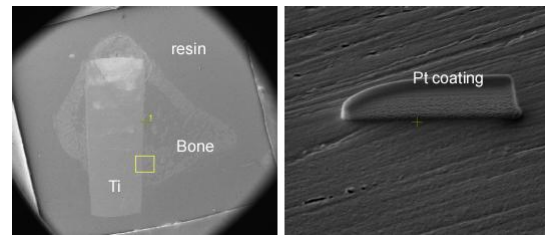


図 12 TEM 試料採取部位と予備処理 (Pt コーティング)

図 13 は生体活性 TiO_2 膜と生体骨界面の明視野像を示す。生体骨は脱水により収縮しているにもかかわらず、 TiO_2 を介してインプラント材と結合したままである。 TiO_2 表面では、骨伝導が促進されるだけではなく、骨との密着力も向上していることが示唆された。また、その界面近傍には小さなクラックが生じている部分も観察された。そのクラックを横切るように組成分析を行った。そのラインプロファイルを図 14 に示す。クラックの両側に Ca と P が明瞭に観察されることから、そのクラックは生体骨内を伝播したことがわかる。 TiO_2 - インプラント界面の密着強度が骨の強度を上回っていたため、クラックが骨内を伝播したと考えられる。

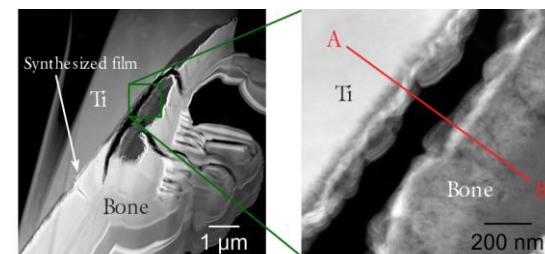


図 13 生体活性 TiO_2 膜と生体骨界面の明視野像

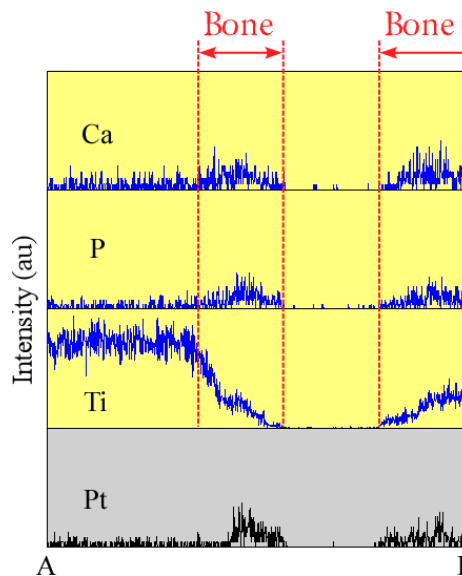


図 14 TiO_2 膜-インプラント界面近傍に生じたクラックにおける Ca, P, Ti のラインプロファイル。

生体活性 $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 膜と生体骨界面の明視野像と周辺の制限視野回折像を図 15 に示す。 $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 膜と骨は常に剥離し、コーティングした Pt が剥離した部分に侵入していた。制限視野回折により、 $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 膜とインプラントの界面でクラックが生じていることが確認できた。このように、 $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 膜上では、骨伝導が抑制されるのみならず、インプラントと生体骨の密着性も低下している。本手法は、治癒後抜去するデバイスの表面修飾として有望であることが示された。

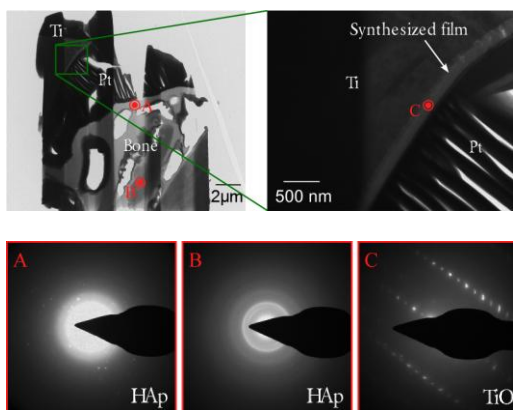


図 15 生体活性 $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ 膜と生体骨界面の明視野像と周辺の制限視野回折像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- ① M. Ueda, M. Ikeda, R. Langford, J. Skepper, R.E. Cameron, S.M. Best, Hydrothermal Synthesis of Bioinert Oxide Film on Pure Ti:

In-vitro and In-vivo Studies, Proceeding of MRS Fall Meeting, 査読有, (2012), in press.

- ② M. Ueda, R. Kozakura, M. Ikeda, R.E. Cameron, S.M. Best, Chemical-Hydrothermal Synthesis of Bioinert Oxide Films on Ti Substrates, Proceeding of the 12th World Conference on Titanium, 査読有, (2012), in press.

- ③ R. Kozakura, M. Ueda, M. Ikeda, Hydrothermal Synthesis of Bioinert $\text{TiO}_2\text{-ZrO}_2$ Films on Ti Substrates with Zr-dissolved Alkaline Solutions, Resources Processing, 査読有, **59**(2012)17-21.

- ④ Y. Suzaki, M. Ueda, M. Ikeda, K. Doi, S. Terauchi, Hydrothermal synthesis of bioactive titanium oxide- CaCO_3 films with aqueous $\text{Ca(OH)}_2/\text{KHCO}_3$ on pure Ti, Resources Processing, 査読有, **59**(2012)22-26.

〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 上田正人, 化学・水熱複合処理による機能性酸化物膜の合成, 日本金属学会2012年春期大会(招待講演), 2012年3月29日, 横浜国立大学

- ② 上田正人, 池田勝彦, 化学・水熱処理によるチタンの表面修飾とその生体内外評価, 日本金属学会 機能性チタン合金研究会 講演会「最新のチタン材料の表面改質の研究開発」(招待講演), 2011年12月16日, ちよだプラットフォームスクウェア(東京都)

- ③ M. Ueda, M. Ikeda, R. Langford, J. Skepper, R.E. Cameron, S.M. Best, Hydrothermal Synthesis of Bioinert Oxide Film on Pure Ti: In-vitro and In-vivo Studies, 2011 MRS Fall Meeting & Exhibit, 2011年11月28日, Boston, MA, USA

- ④ 小桜龍一, 上田正人, 池田勝彦, Ti表面への ZrO_2 含有酸化物膜の水熱合成に及ぼすクエン酸添加の影響, 軽金属学会 第121回秋期大会, 2011年11月12日, 名古屋大学

- ⑤ 上田正人, 池田勝彦, 骨形成を抑制するチタンの表面修飾, 東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ, 日本バイオマテリアル学会東北地域講演会(招待講演), 2011年9月30日, 東北大学金属材料研究所

- ⑥ M. Ueda, R. Kozakura, M. Ikeda, R.E.

Cameron and S.M. Best, Chemical-Hydrothermal Synthesis of Bioinert Oxide Films on Ti Substrates, The 12th World Conference on Titanium, 2011年6月22日, Beijing, China

⑦ Y. Suzaki, M. Ueda and M. Ikeda, Low Temperature Synthesis of Bioactive $\text{CaTiO}_3\text{-CaCO}_3$ Composite Films on Ti Substrates, The 9th Japan/Korea International Symposium on Resources Recycling and Materials Science, 2011年5月30日, 関西大学

⑧ R. Kozakura, M. Ueda, M. Ikeda, Low Temperature Synthesis of Bioinert $\text{ZrO}_2\text{-TiO}_2$ Composite Films on Ti Substrates, The 9th Japan/Korea International Symposium on Resources Recycling and Materials Science, 2011年5月30日, 関西大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/ecmate/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 正人 (UEDA MASATO)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：40362660