

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10106

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560841

研究課題名(和文) 難剥離性極薄アパタイト皮膜チタン材料製造のための新表面処理技術の確立

研究課題名(英文) Novel surface treatment process for forming thin hydroxyapatite coating on titanium

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ナノレベルの極薄ハイドロキシアパタイト(HA)被膜をチタン表面に簡便に形成できる新しい表面処理プロセスを開発した。この技術の確立を図るため、処理条件の最適化をおこない、さらにその形成被膜の生体適合を評価した。最適条件下で形成した被膜は、HA含む高密着性酸化被膜であり、その膜厚は約300 nmであった。さらに、細胞試験により、この被膜を有するチタンは十分な生体安全性を持ち、さらに骨芽細胞による骨形成を促進できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel and simple surface treatment process for forming thin hydroxyapatite coating of nanometer thickness on titanium. In the present research, optimization of the treatment parameters was performed, and thereafter, biocompatibility of the treated titanium was evaluated, in order to complete this process. The coating using optimum condition consisted of hydroxyapatite with excellent bonding strength, and its thickness was ca. 300 nm. Furthermore, the cell tests demonstrated that the treated-titanium has sufficient biosafety similar to an untreated surface and can activate a bone-formation of osteoblast.

研究分野：金属表面改質

キーワード：チタンインプラント ハイドロキシアパタイト被膜 骨親和性 熱化学処理 細胞培養試験

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療とは、虫歯や歯周病などによって歯を失った部位の顎の骨に、人工歯根（インプラント）を埋め込み、その上から人工歯を装着する治療である。このインプラント用素材として現在実用化されているものは、純チタンとHA（ハイドロキシアパタイト）皮膜チタンに大別される。HA皮膜を有するチタンは、純チタンと比較して、骨とより早くより強く結合出来、さらに、より多い骨形成を期待出来、骨再生機能が低下している高齢者等であっても適用可能であり、さらに治療期間も大幅に短縮できる。しかし、既存技術で作製されるHA皮膜は、皮膜自体の強度が低く壊れやすい、チタン基材と皮膜の間の密着性は弱く剥がれやすいなどの欠点がある。それ故、咀嚼による加重を繰り返しているうち、HA皮膜が壊れたり剥がれたりして、再手術が必要となった事例が報告されている。したがって、歯科医師たちからは剥離や破壊を起こさないHA皮膜を作製できる、新しい表面処理技術の開発が求められている。

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埋没させ、そのまま600℃程度で加熱すると、カルシウムおよびリン酸の拡散が促進され、このことにより、膜厚約百ナノメートルの極薄HA皮膜が作製できることを明らかにした。また、皮膜とチタン基材の間には熱拡散層が形成され、作製した皮膜が剥がれにくいこと、さらに、この皮膜を有するチタンを擬似体液中に浸漬すると、その表面にリン酸カルシウムが迅速に析出されることもわかった⁽¹⁾。以上の研究成果により、我々は、スラリー状ハイドロキシアパタイトを用いた新しい表面処理方法は、従来皮膜法の欠点を全て改善できる新しいHA皮膜技術として、極めて有望であるという結論を得た。しかも、このプロセスは特別な設備を必要とすることなく簡便であり、複雑な形状を持つ基材への皮膜形成も容易であり、さらに、その処理コストも僅かである。

2. 研究の目的

我々が開発したハイドロキシアパタイトスラリーを用いたプロセスが、既存技術に代替する新しいHA皮膜方法として、極めて有望であることは疑う余地はない。しかし、形成される皮膜の特性は、処理条件に依存して繊細に変化するため、現状では、同品質の皮膜を再現性よく製造することが難しい。また、新医療技術としての実用化を想定した場合、安全性および有効性に関する医学的検証が不可欠である。従って本研究では、これらの課題を克服および検証し、本技術を、実用化可能な新医用技術として確立することを目指した。

具体的な目的は、以下の通りである。

- 医療材料に最適なHA皮膜を、チタン基材上に、再現性よく大量生産できる技術を確立する
- 形成された皮膜の生体安全性および骨形成性能を、医学的見地から立証する。

3. 研究の方法

(1) 試料の作製

エメリー紙で研磨したチタン基材を、ハイドロキシアパタイト粉末と蒸留水を混練して調整したスラリー状処理剤中に埋没させ、汎用型電気炉（を用いて大気中で熱処理することで試料を作製した。その際、熱処理の温度を変化させることで、種々のHA皮膜を作製した。

(2) 試料の評価

種々の条件で作製したチタン材料の表面特性は、以下に示す方法で解析した。

- ・ X線回折（XRD）：相同定および構造評価
- ・ 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
- ・ 透過電子顕微鏡（TEM）：断面構造分析
- ・ スクラッチ試験：密着強度試験

(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MC3T3-E1を 2×10^4 cells·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。また、細胞形態は、グルタルアルデヒドによる固定及びエタノール脱水処理した後、走査電子顕微鏡にて観察した。

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、4週間培養を継続した。その間、6日後および12日後に、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を、さらに28日後に、後期マーカーである細胞石灰化をそれぞれ評価した。

4. 研究成果

(1) スラリー処理における熱処理温度が形成皮膜に与える影響

図1は、各熱処理条件で被膜形成したチタン基材表面のSPM像である。750℃で処理した表面には、高さ500nm程度の凹凸が観察される。これは、熱処理による酸化物スケール形成に起因するものと考えられる。他方、500℃および625℃で処理した表面は比較的平滑である。500℃、625℃および750℃で処理したチタン表面の平均算術粗さは、それぞれ、18.3、22.1および124nmであった。

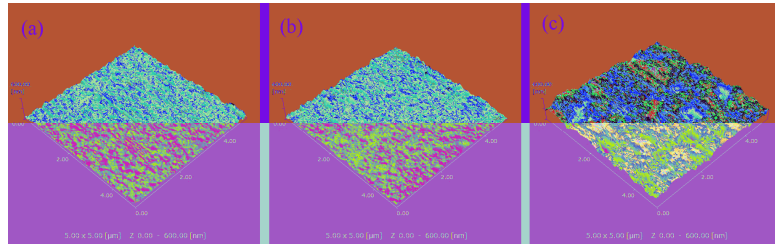


図 1. 種々の熱処理条件で被膜形成したチタン材料表面の SPM 像 : (a) 500°C、(b) 625°C、(c) 750°C

図 2 は、625°C および 700°C の条件で被膜形成した試料の断面 TEM 像である。基材表面は、被膜の覆われており、その膜厚は、625°C でおよそ 200 nm、700°C でおよそ 1000 nm であることがわかる。すなわち、熱処理温度を上昇させることで、酸化物を含む被膜成長が促進され、表面被膜粗さおよび膜厚が増大することがわかった。

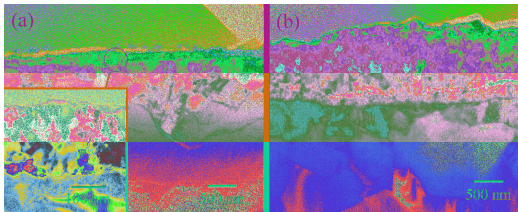


図 2. 種々の熱処理条件で被膜形成したチタン材料表面の断面 TEM 像 : (a) 625°C、(b) 700°C

図 3 は、種々の温度で形成した被膜とチタン基材の間の密着強度を、ナノスクラッチ法で評価した結果である。550°C 以下で形成した被膜は、膜厚が薄いため、評価できなかった。密着強度は、処理温度 625°C のときに最大値を示し、その後、温度増加に伴い低下していくことがわかる。SPM および TEM の結果より、処理温度の上昇により、被膜膜厚が増大し、さらに、表面粗さも増大していることがわかっていて、すなわち、処理温度を増大させると、機械的強度が低いチタン酸化物被膜の成長が進み、このことによって、被膜の内部破壊が起こりやすくなり、密着強度が低下していくと考えられる。あるいは、温度上昇による表面粗さの増大が、表面摩擦力の増大へとつながり、これがスクラッチ試験の結果に影響を及ぼしたと考えられる。

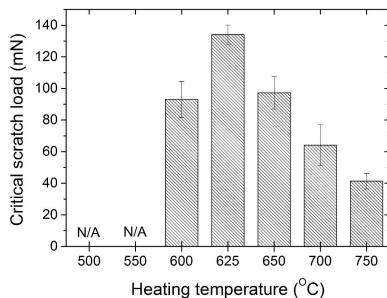


図 3 種々熱処理条件で形成被膜の密着強度

(2) スラリーしたチタン基材の表面構造

高い密着強度を示した熱処理温度 650°C で形成した表面被膜の構造を詳細に調べた。図 4 は、XPS を用いて調べた材料表面深さ方向の各元素の濃度分布である。形成した表面被膜には、Ca、P、Ti および O が含まれており、さらにこの被膜とチタン材料の間には傾斜的界面が形成していることがわかる。膜厚は 300 nm 程度であり、その表面に Ca および P が濃化していることがわかる。この領域における Ca と P の元素比は、およそ 1.7 であり、HA の化学量論比とほぼ一致した。さらに、この表面の結晶相を X 線回折法 (XRD) で調べると、形成した被膜にはルチル型 TiO₂ と水酸化ヒドロキシアパタイトが含まれていることがわかる (図 5)。以上の結果をまとめると、チタン材料を水酸化ヒドロキシアパタイト・スラリー中で、650°C 程度で熱処理することで、その表面に、優れた密着性を期待できる極薄の水酸化ヒドロキシアパタイト含有 TiO₂ 被膜を形成することがわかった。

(3) 生体機能および安全性

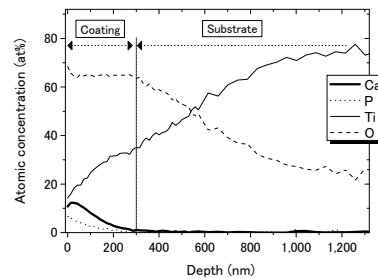


図 4. 650°C で形成した表面被膜の XPS 深さ方向プロファイル

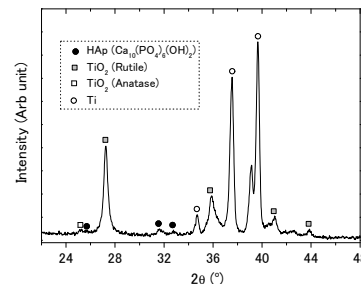


図 5. 650°C で形成した表面被膜の XPS 深さ方向プロファイル

スラリー処理を施したチタン材料を、疑似体液の一種であるハンクス緩衝塩類溶液に浸漬すると、その表面には 24 時間以内にリン酸カルシウムが析出することが確認された。一方、このような析出は未処理チタン材料では観察されなかった (図 6)。疑似体液中においてリン酸カルシウムを迅速に析出できる材料は、優れた骨親和性を持つことを期待できる。

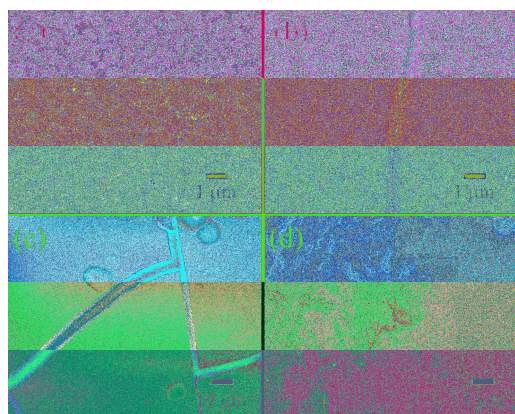


図 6. 疑似体液 (ハンクス緩衝液) 中におけるリン酸カルシウムの析出. (a) HAp 薄膜チタン 1 日浸漬, (b) 3 日浸漬, (c) 6 日浸漬, (d) 未処理チタン 6 日浸漬

次にスラリー処理チタン材料の生体安全性および骨親和性を確かめるために、スラリー処理チタン材料表面に、骨芽細胞様細胞 MC3T3E-1 を播種し、24 時間後および 72 時間後での生細胞数を計数した。その結果を図 7 に示す。スラリー処理材料表面における生細胞数は、いずれの時間においても未処理材料とほぼ同じ結果であり、統計学的有意差もなかった。すなわち、スラリー処理したチタン材料は、未処理材料と同等の生体安全性を持っていることがわかった。

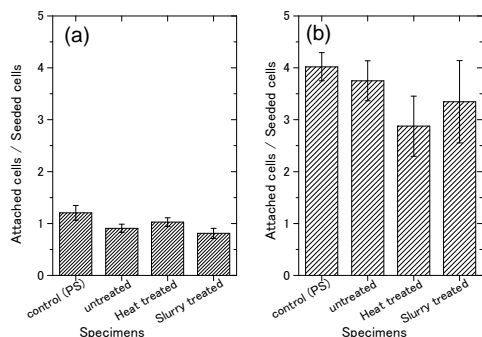


図 7. 未処理、熱処理およびスラリー処理チタン基材表面において (a) 24 時間および (b) 72 時間培養した場合の生細胞数比: n=3、エラーバーは標準偏差。

図 8 は、各試料表面に播種した骨芽細胞様細胞に分化誘導をおこない、さらに培養を継続した場合のアルカリホスファターゼ活性の値である。アルカリホスファターゼは、骨芽細胞が、骨細胞に分化する初期段階において活性となる酵素マーカーである。培養時間の増加に伴い、活性値が増加していることが確認できるが、分化誘導 6 日後および 12 日後にそれぞれにおいて、スラリー処理したチタンの活性は、未処理のものとはほぼ同等であり、アルカリホスファターゼ活性におけるスラリー処理の優位性は確認されなかった。

しかし、分化誘導 28 日後における骨細胞分化の後期マーカー、石灰化の様相を比較すると、未処理チタンには見つからないが、スラリー処理したチタン表面では、骨芽細胞が石灰化していることが確認できた (図 9)。

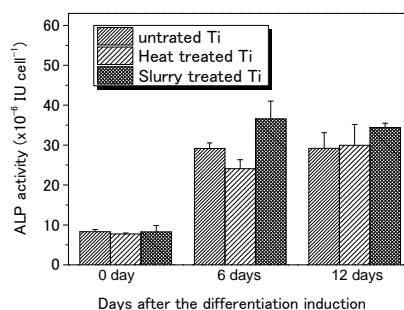


図 8. 骨芽細胞様細胞分化誘導 6 日後および 12 日後におけるアルカリホスファターゼ活性値

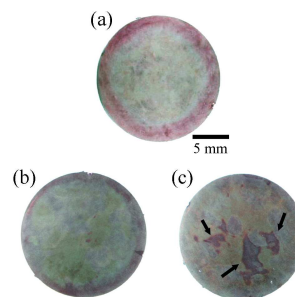


図 9. 分化誘導 28 日後における各試料表面の骨芽細胞様細胞のアリザリンレッド S 染色結果: (a) 未処理チタン、(b) 熱処理チタン、(c) スラリー処理チタン

以上の結果より、650°C の条件でスラリー処理したチタン基材表面には、優れた密着性を有する極薄 HA 被膜が形成し、そのことにより、骨芽細胞様細胞の石灰化を促進できることがわかった。

〈引用文献〉

- ① N. Ohtsu, Y. Nakamura, S. Semboshi, Thin hydroxyapatite coating on titanium fabricated by chemical coating process using calcium phosphate slurry, **Surface and Coatings Technology** 206 (2012) 2616-2621

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. M. Hirano, M. Yamane, N. Ohtsu, Surface characteristics and cell-adhesion performance of titanium treated with direct-current gas plasma comprising nitrogen and oxygen, **Applied Surface Science**, *in press*
2. N. Ohtsu, T. Kozuka, M. Hirano, H. Arai, Electrolyte effect on the surface chemistry and cellular response of anodized titanium, **Applied Surface Science**, 349 (2015) 911-945.
3. N. Ohtsu, T. Takahara, M. Hirano, H. Arai, Effect of treatment temperature on the biocompatibility and mechanical strength of hydroxyapatite coating formed on titanium using calcium phosphate slurry, **Surface and Coatings Technology** 239 (2014) 185-190
4. M. Hirano, T. Kozuka, Y. Asano, Y. Kakuchi, H. Arai, N. Ohtsu, Effect of sterilization and water rinsing on cell adhesion to titanium surfaces, **Applied Surface Science** 311 (2014) 498-502
5. N. Ohtsu, M. Hirano, H. Arai, Response of osteoblast-like MC3T3-E1 cells on bioactive titanium fabricated by a chemical treatment process using a calcium-phosphate slurry, **Journal of Biomedical Materials Research Part A** 102 (2014) 3838-3845

[学会発表] (計 9 件)

1. 角地優子、平野満大、小俣雅嗣、大津直史、スラリー埋没加熱処理を用いた Ag を含むアパタイト複合酸化皮膜の抗菌持続性、日本金属学会 2015 年春季大会 (2015. 3 / 東京)
2. N. Ohtsu, T. Kozuka, H. Arai, N. Ohtsu, Effects of electrolyte on surface chemistry and cellular response of anodized titanium, 7th Vacuum and Surface Science Conference on Asia and Australia (2014. 10 / 台湾)
3. M. Hirano, M. Yamane, N. Ohtsu, Characteristic and cellular response on titanium surface treated by nitrogen/oxygen mixed gas plasma, 7th Vacuum and Surface Science Conference on Asia and Australia (2014. 10 / 台湾)
4. N. Ohtsu, N. Tanimura, M. Hirano, Preparation of hydroxyapatite-deposited zirconium by chemical treatment process using calcium phosphate slurry, The 15th IUMRS-International Conference in Asia (2014. 8 / 福岡)

5. N. Ohtsu, M. Hirano, H. Arai, Calcium phosphate slurry processing: A novel chemical treatment technique to activate osteogenesis on titanium, IVC-19 (2013. 9 / フランス)

6. T. Takahara, M. Hirano, H. Arai, N. Ohtsu, Bioactive coating on titanium fabricated using calcium phosphate slurry – Effect of treatment temperature on bonding strength and cell proliferation, The 4th Asian Biomaterials Congress (2013. 6 / 香港)

7. N. Ohtsu, M. Hirano, T. Takahara, T. Itoh, H. Arai, A. Yokoyama, Improvement of osteoconductivity on titanium implants by simple chemical treatment process using calcium phosphate slurry, The 4th Asian Biomaterials Congress (2013.6 / 香港)

8. 高原豊文、浅野勇太、小俣雅嗣、大津直史、スラリー埋没加熱処理を用いた銀/アパタイト複合酸化皮膜の作製、日本金属学会 2014 年春季大会 (2014. 3 / 東京)

9. 平野満大、久慈泰介、新井博文、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の細胞適合性評価、第 37 回分析化学討論会 (2013 年 5 月 / 函館)

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) 研究協力者

新井 博文 (ARAI, Hirofumi)