

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792154

研究課題名(和文) 歯周病原性菌の付着によるチタン合金の初期腐食評価

研究課題名(英文) Evaluation of corrosion resistance of titanium alloys on adhesion of periodontic bacteria

研究代表者

武本 真治 (Takemoto, Shinji)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70366178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯科用インプラントが抜去される症例の原因の一つであるインプラント周囲炎に焦点を当て、歯周病原性細菌によるインプラント材料(チタンやチタン合金)への耐食性についての検討を行った。特に、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* が産生する硫化物によってチタンがどのような反応をするかについて評価を行った。その結果、*in vitro* 試験ではアルカリ性の硫化物溶液中でチタンの変色が認められ、その原因はチタン表面が酸化されていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study forced corrosion resistance of dental implant made of titanium and titanium alloy in occurring implantitis which there is one reason of removal dental implant. *Porphyromonas gingivalis*, which is one of periodontic bacteria, yields sulfide, and we investigated the influence of its sulfide on titanium corrosion. Consequently, titanium was discolored in alkaline sulfide-containing solution, because the titanium oxidized by alkaline and sulfide conditions.

研究分野：歯科生体材料

キーワード：硫化物 チタン 変色 XPS 光沢度 酸化膜

### 1. 研究開始当初の背景

これまで顎骨の健全な患者を中心に行われていたインプラント治療は、早期にオッセオインテグレーションすることが求められてきた。そのための研究として、インプラント材のチタンやその合金へのリン酸カルシウムのコーティング、表面酸化処理などの表面改質法が多く検討されてきた (*Clin Oral Impl Res* 1993; 4: 28-34, *J Dent Res* 2004; 83: 529-533)。しかし、歯科インプラント治療を成功させるためには、顎骨に埋入したフィクスチャー部位でのオッセオインテグレーションの獲得が得られた後、骨のリモデリングを誘起しながら骨量を維持することで咬合力を維持することが必要となる。

埋入したインプラントを撤去する原因としてインプラント周囲炎が挙げられている (*Eur J Oral Sci* 1998; 106: 721-764)。このインプラント周囲炎は細菌感染によるものであり、その細菌は歯周病原性菌と一致している。そのような、細菌感染はインプラントフィクスチャーとアバットメントとの間に摩擦によるチタン合金の腐食が進行することが報告されている (*Biofouling* 2010; 26: 471-478)。一方、インプラントが口腔内で破折した症例では、その破断面に腐食生成物が認められている (*生体材料* 2002; 20: 10-22)。これは炎症環境でマクロファージが活性化され、生成した過酸化物質により腐食される可能性が示唆されている (*J Biomed Mater Res* 2000; 49: 238-243, *J Orthopaedic Res* 2004; 22: 1231-1236, *J Biomed Mater Res: Applied Biomater* 2009; 88B: 474-481)。これらのことから、細菌感染は口腔内で劣悪な環境を導くばかりか、インプラントや補綴装置の破折を誘引することが危惧され、その対策が必要である。

他方、生体内で起こる反応を電気化学的手法で解析する試みとして、細胞培養したチタン合金での電気化学測定が検討されている (*Electrochim Acta* 2002; 48: 387-396, *Acta Biomater* 2009; 5: 1374-1384)。細胞培養したチタン合金は、生体内の材料表面反応と近い環境であると考えられ、細胞と金属材料の相互作用に関する知見が得られている。また、チタン合金上で細菌培養したのち、pin on disk 法により細菌付着した合金を摩擦させながら電位をモニターすると腐食による電位の低下が認められることが報告されている (*Biofouling* 2010; 26: 471-478)。その電位や電流密度の変化はわずかであり、その微小電流密度や電位のモニターを可能にすることで、細胞や細菌付着に伴うインプラントフィクスチャーでの局所的な腐食挙動を解析することが可能になる。

申請者はチタン合金の口腔内での界面反応に着目し、齶蝕予防剤に含まれるフッ化物とアルブミンが存在する環境での耐食性の評価 (*Biomater* 2005; 26: 829-837, *J Biomed Mater Res: Applied Biomater* 2008; 87B: 475-481) やそれらの防食に有効なチタン - ク

ロム合金を提案した (*Dent Mater J* 2004; 23: 379-386, *Dent Mater* 2009; 25: 467-472)。これらの論文の中で、チタン合金の作製、耐食性評価としての表面分析と電気化学測定法やその解析のスキルを習得している。本研究では、チタン合金上にコロニー形成した細菌付着による局所部位での腐食機序と細胞接着による不動態化機序を明らかにし、細菌感染に対して優れた耐食性を有するチタン合金を模索する。

### 2. 研究の目的

本研究では、細菌感染に対して優れた耐食性の最適条件について、試作合金を含む種々のチタン合金 (純 Ti (JIS2 種)、Ti-6Al-4V、Ti-6Al-7Nb、試作 Ti-20Cr など) で以下の 3 点を検討する。

1. 局所的に付着した細菌によるチタン合金の電気化学的腐食挙動
2. 細胞接着したチタン合金の不動態被膜での電気化学的腐食挙動
3. 細菌および細胞培養したチタン合金の不動態被膜の表面分析

上記の検討により、チタン合金の細菌付着による局所部位での腐食機序と細胞接着による不動態化 (組織親和性) を検討する。また、細菌や細胞を培養した合金表面の形状や狭領域での組成や化学状態を調べる。これらの検討を併せて、細菌や細胞の存在下でのチタン合金の局所的な腐食・不動態機序を解析する。さらに、添加元素によるチタン合金への細菌付着や耐食性への影響についても検討し、抗菌性を有するチタン合金の設計指針を提案する。

最終的には、合金に添加する元素による細菌付着やその付着細菌による合金の耐食性を評価することで、基礎データの集積に努めるとともに、材料設計にフィードバックし、臨床で細菌感染を抑制するチタン合金を提案する。

### 3. 研究の方法

本申請研究では、歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Candida albicans* などの細菌付着によって起こるチタン合金の局所部位での腐食機序を解明することが第一の目標とする。これまでに細菌が産生する硫化物による腐食については、歯科用銀合金で多く行われ、金属硫化物塩 ( $Ag_2S$  など) の生成による腐食が起こることが明らかになっている。

本研究では、まず、硫化物によるチタンやチタン合金の *in vitro* における腐食挙動について検討した。純チタン (JIS 2 種) やチタン合金 (Ti-6Al-4V、Ti-6Al-7Nb、試作 Ti-20Cr、Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr) を準備し、金属の研磨手順にしたがって、#320 ~ #1200 の耐水研磨紙で研磨した後、ダイヤモンドスラリーまたはコロイダルシリカによりバフで研磨することにより鏡面にまで仕上げた。研磨後、アセ

トンおよび蒸留水中で5分間超音波洗浄を行った。硫化物を含む溶液は、 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Wako)を0.013 mol/L、0.05 mol/L、0.10 mol/Lとなるように超純水に溶解させて準備した。鏡面研磨した純チタンおよびチタン合金をポリプロピレン製容器の底に置き、溶液20mLを注いだ後、37℃に保持した恒温槽中に種々の期間静置した。浸漬期間は、1、3および7日間とした。種々の期間経過した後、試料を溶液から取り出し、色彩、光沢、表面形状および表面性状を調べた。また、硫化物濃度が高い溶液(0.10 M)に浸漬した試料については、より詳細に分析するため、6、12および24時間の浸漬時間でも同様の検討を行った。

浸漬前後の試料の色彩は色彩計(MCR-A、Luck Office)で、光沢度は光沢度計(GM-26D、Murakami Color Research Laboratory)で調べた。変色程度は色彩から下記の式を用いて色差( $\Delta E^*ab$ )を算出して評価した。

$$\Delta E^*ab = ((a_t - a_0)^2 + (b_t - b_0)^2 + (L_t - L_0)^2)^{1/2}$$

( $t$ : 種々の浸漬期間の時の値)

浸漬した試料の表面観察は3D粗さ解析装置を取り付けた走査型電子顕微鏡(3D-SEM: ERA-8900FE、Elionix)および電界放出型走査型電子顕微鏡(FE-SEM: SU6600、Hitachi)により観察した。表面性状の分析には、X線回折装置(XRD: Ultima IV、Rigaku)、X線光電子分光分析(XPS: Axis-Ultra、Shimadzu-Kratos)およびオージェ電子分光分析装置(AES: JAMP-7100、JEOL)を用いて行った。

硫化物を産生する歯周病原性菌によるチタン合金の耐食性を明らかにすることを目的として、純チタン上に *Porphyromonas gingivalis* (*P. Gingivalis*) の培養を試みた。

#### 4. 研究成果

硫化物を含む溶液(0.1 mol/L)中に種々の期間浸漬した純チタン(TI)の色差( $\Delta E^*ab$ )をFig. 1に示す。対照試料として、硫化物を含まない超純水(MQ)に浸漬したTIの $\Delta E^*ab$ を示す。

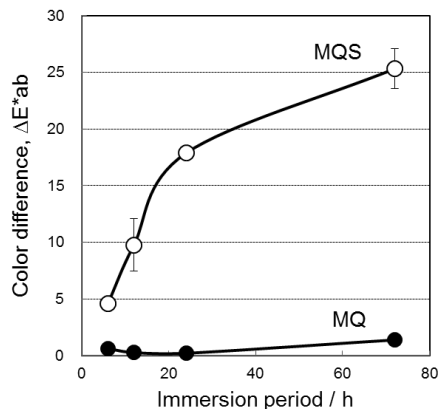


Fig. 1 Change in color difference of TI immersed in MQ and MQS solution

MQに72時間浸漬したTIの $\Delta E^*ab$ 値は1.4

であり、変色は認められなかった。MQSに浸漬したTIの $\Delta E^*ab$ 値は浸漬時間が長くなるにしたがって増加した。さらに、MQSに7日まで浸漬すると、TIの $\Delta E^*ab$ 値は僅かに減少した。

光沢度を測定した結果、浸漬期間が長くなるにしたがって、MQSに浸漬したTIでは減少が認められた。したがって、0.10 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}$ を含む溶液中ではTIの変色が進行することが明らかになった。

硫化物濃度による変色程度を確認するため、0.10 mol/L  $\text{Na}_2\text{S}$ より濃度の低い溶液への浸漬試験を行った。結果、0.05 mol/L、0.013 mol/Lと濃度が低いほど変色程度は小さくなることが明らかになった。また、光沢度の減少も小さいことが明らかになった。このことから、チタンの変色および光沢度は、粒カウ物溶液への浸漬期間および硫化物濃度に依存していることが明らかになった。

Fig. 2に各種チタン合金(Ti-6Al-4V: TAV、Ti-6Al-7Nb: TNB、Ti-20Cr: TCR、Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr: TNTZ)を0.1 mol/Lの硫化物を含む溶液中に24時間浸漬した際の色差を示す。

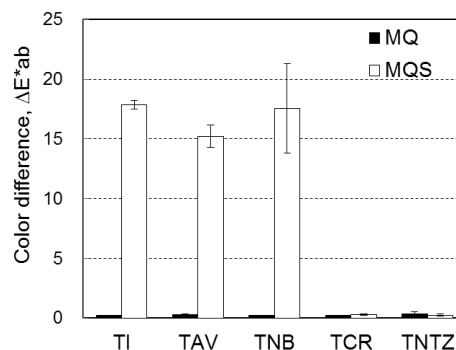


Fig. 2 Color difference of titanium alloys immersed in MQ and MQS for 1 day.

TAVおよびTNBでは、MQSに浸漬することによりTI同様に $\Delta E^*ab$ 値が大きく、変色が認められた。一方で、TCRとTNTZではMQSまたはMQに浸漬したいずれの場合でも、 $\Delta E^*ab$ 値が小さく、変色は認められなかった。

試料表面を3D-SEMおよびFE-SEMで観察したところ、MQSに浸漬したチタン表面にはナノメートルオーダーのメッシュ構造が形成していた。3D-SEMでの粗さの違いを試みたが、MQに浸漬したものと明確な差は認められなかった。

XPSにより、MQおよびMQSに浸漬したTIの表面分析を行ったところ、炭素、酸素および微量の窒素が検出されたが、硫黄は検出されなかった。Ti2pおよびO1s XPSスペクトルを詳細に分析したところ、変色していないMQに浸漬したTIのTi2pスペクトルには454 eV付近にTi0の金属状態に帰属されるピークが認められたが、MQSに浸漬したTIには認められなかった。また、MQSに浸漬したTIではO1sスペクトルは、MQに浸漬したものと比較して高エネルギー側のヒドロキシル基および吸着水に帰属されるピークが減少

していた。

一方で、オージェ電子分光分析 (AES) により、表面からの深さ方向の組成を分析したところ、変色程度が小さかった MQ と比較して、変色程度が大きかった MQS では酸化物層の厚みが深部にまで及んでいることが明らかになった。これらのことから、MQS に浸漬したチタンは酸化が進行し、その厚みが増加していることが明らかになった。

*P. Gingivalis* をチタン上に培養し、そのチタンの表面反応についての考察を試みたが、*P. Gingivalis* のみの培養で、培養雰囲気下で硫化物の発生は確認することができたが、細菌活性が3日後近辺から低下した。そのため、インプラント周囲炎のチタンインプラントのような状況は再現が困難であったため、表面反応の解析までには至らなかった。

また、微小領域での電気化学的測定も試みたが、*P. Gingivalis* の培養が困難であったため、測定が不可能であった。口腔内で起こる反応、特にインプラント周囲炎によるインプラントへの影響を推測するためには、*P. Gingivalis* のみならず、その他の口腔内細菌を含む環境を再現することが必要であると考えられる。

## 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10件)

Yamazaki T, Kobayashi M, Hirano K, Onuki H, Shimada J, Yamazaki A, Hibino Y, Nakajima H, Yokote Y, Takemoto S, Oda Y, Sakagami H. Protection against copper-induced cytotoxicity by inclusion of gold. *In Vivo* 2012; **26**: 651-656.

小田 豊、武本真治、服部雅之、河田英司、吉成正雄。接着歯根の破断強度に関する研究 - 接着システムの違いについて - 。*日本歯科産業学会誌* 2012; **26**: 9-14.

Takemoto S, Tasaka A, Hattori M, Sakurai K, Oda Y. Discoloration of Ti-20Cr alloy in oral environment and its surface characterization. *Dent Mater J* 2012; **31(6)**: 1060-1067

Takemoto S, Nakai M, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Niinomi M, Oda Y. Corrosion Resistance of Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr Alloy in a Fluoride-Containing Solution. *Key Eng Mater* 2013; **529-530**: 584-587.

Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Discoloration of titanium alloy in acidic saline solutions with peroxide. *Dent Mater J* 2013; **32(1)**: 19-24

服部雅之、武本真治、河田英司、吉成正雄、小田 豊。接着修復した破折歯根の耐久性評価—支台築造体への繰返し衝撃荷重による影

響—。*日本歯科理工学会誌* 2013; **32**: 52-58 .

武本真治、服部雅之、吉成正雄、河田英司、小田 豊。アルカリ性過酸化水素系義歯洗浄剤中でのチタン合金の変色とその表面分析。*日本歯科理工学会誌* 2013; **32(3)**: 213-219 .

Soejima H, Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Effect of adhesive system on retention in posts comprising fiber post and core resin. *Dent Mater J* 2013; **32(4)**, 659-666.

Matsumoto N, Yoshinari M, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Oda Y. Effect of intermediate ceramics and firing temperature on bond strength between tetragonal zirconia polycrystal and veneering ceramics. *Dent Mater J* 2013; **32(5)**: 734-743.

Nijhuis AWG, Takemoto S, Nejadnik RM, Li Y, Yang X, Ossipov DA, Hilborn J, Mikos AG, Yoshinari M, Jansen JA, Leeuwenburgh SCG. Rapid Screening of Mineralization Capacity of Biomaterials by Means of Quantification of Enzymatically Deposited Calcium Phosphate. *Tissue Eng Part C Methods* 2014; **20(10)**: 838-850.

[学会発表](計19件)

Takemoto S, Nakai M, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Corrosion resistance of Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr alloy in a fluoride-containing solution. 24th Symposium and Annual Meeting of International Society for Ceramics in Medicine (Bioceramics 24) Oct 21-24, 2012, Fukuoka Japan (P1-7-3).

松本直也、吉成正雄、武本真治、服部雅之、河田英司、小田豊。正方晶ジルコニア多結晶体 (TZP) と前装陶材の焼付強さに及ぼす焼成条件の影響。第 59 回日本歯科理工学会学術講演会、徳島・徳島市、2012 年 4 月 14-15 日

Soejima H, Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Oda Y. Effect of adhesive system on retention force of post. 91st General Session & Exhibition of the IADR, Mar 20-23, 2013, Seattle, Washington, USA (Abstract #1850)

服部雅之、武本真治、吉成正雄、河田英司、長谷川晃嗣、愛知徹也、小田豊。金銀パラジウム合金と各種硬質レジシシステムの接着耐久性。第 59 回日本歯科理工学会学術講演会、徳島・徳島市、2012 年 4 月 14-15 日

武本真治、仲井正昭、服部雅之、市川弘道、五十嵐俊男、吉成正雄、河田英司、新家光雄、小田豊。フッ化物溶液中での Ti-Nb-Ta-Zr 合金の電気化学腐食挙動。第 60 回日本歯科理

工学会学術講演会、福岡・博多市、2012 年 10 月 13-14 日

副島寛貴、武本真治、服部雅之、吉成正雄、河田英司、小田 豊．セルフアドヒーズブルレーティングセメントはポストの合着に使用できるか - 保存期間とサーマルサイクルの影響 - . 第 60 回日本歯科理工学会学術講演会、福岡・博多市、2012 年 10 月 13-14 日

武本真治、仲井正昭、吉成正雄、服部雅之、河田英司、新家光雄、小田豊．フッ化物溶液に浸漬した Ti-Nb-Ta-Zr 合金の表面分析．バイオマテリアルシンポジウム 2012、宮城・仙台市、2012 年 11 月 25-26 日

武本真治．義歯洗浄剤への浸漬でチタン合金は変色するか？日本歯科医学会総会、大阪府、2012 年 11 月 9-11 日

Oda Y, Takemoto S, Hattori M, Kwada E. The influence of albumin on corrosion resistance of titanium alloys. Japanese Association for Dental Research , Niigata , Dec 14-15, 2012

Takemoto S, Hattori M, Kawada E, Oda Y. Corrosion behavior of titanium in sulfide-containing solution. 91st General Session & Exhibition of the IADR. Mar 20-23, 2013, Seattle, Washington, USA

吉成正雄、原田麗乃、副島寛貴、武本真治、服部雅之、河田英司、小田 豊．表面を粗そ化したジルコニアの静的強さと疲労強さ．第 61 回日本歯科理工学会学術講演会 新潟 2013 年 10 月 21 , 22 日

Harada R, Takemoto S, Hattori M, Ichikawa H, Kawada E, Yoshinari M, Oda Y. The influence of colored zirconia core on the optical properties of all-ceramic restoration 第 62 回日本歯科理工学会学術講演会 東京 / 船堀 2014 年 4 月 12-13 日

Takemoto S, Hattori M, Yoshinari M, Kawada E, Oda Y. Surface characterization of sulfide-induced Corrosion of titanium. 15th IUMRS-ICA. Fukuoka, Aug 24-30, 2014, Fukuoka, Japan

武本真治、原田麗乃、染谷智子、田中健介、市川弘道、愛知哲也、小田豊、河田英司．硫化物を含む溶液中で変色したチタンの表面分析 第 63 回日本歯科理工学会学術講演会、広島市、2014 年 10 月 4-5 日

原田麗乃、染屋智子、田中健介、武本真治、服部雅之、吉成正雄、河田英司、小田豊．カラージルコニアコア材の光学特性が積層陶材の色調に及ぼす影響．第 297 回東京歯科大学学会総会．東京都、2014 年 6 月 5 日

木下英明、武本真治、吉成正雄、河田英司．インプラント手術における取りリング時の切削感覚を体感可能なシミュレーターの開発 第 63 回日本歯科理工学会学術講演会、広島市、2014 年 10 月 4-5 日

吉成正雄、武本真治、木下英明、長谷川晃嗣、五十嵐俊男、河田 英司．表面修飾チタンへの骨関連サイトカインの特異的吸着特性 第 63 回日本歯科理工学会学術講演会、広島市、2014 年 10 月 4-5 日

武本真治、原田麗乃、染屋智子、田中健介、木下英明、吉成正雄、河田英司．硫化物によるチタン合金の変色挙動．第 298 回東京歯科大学学会総会．東京都、2014 年 10 月 18-19 日

Takemoto S, Yoshinari M, Oda Y, Kawada E. Discoloration of titanium alloys by sulfide alkaline solution. 93th General Session & Exhibition of the IADR. March 10-14, 2015, Boston, MA, USA

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

武本真治 ( TAKEMOTO , Shinji )

東京歯科大学・講師

研究者番号 : 70366178