

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26709049

研究課題名(和文) 溶解性制御型非晶質リン酸カルシウム薄膜を用いた生体に働きかけるインプラントの創製

研究課題名(英文) Creation of implants to influence human body using bioresorbable amorphous calcium phosphate films

研究代表者

上田 恭介 (Ueda, Kyosuke)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40507901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文)：硬組織代替デバイスへの骨適合化表面処理として、生体吸収性を有する非晶質リン酸カルシウム(ACP)膜に着目し、ACP膜への元素添加による溶解性制御およびAg添加による抗菌性発現を試みた。RFマグネトロンスパッタリング法を用いることで膜厚0.5 μmの元素添加ACP膜を作製することができ、Nb、Ta添加によりACP膜の溶解性を抑制することができた。Ag添加ACP膜は大腸菌および黄色ブドウ球菌に対して抗菌性を発現することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Amorphous calcium phosphate (ACP) film known as bioresorbable material was focused on the surface modification of bone substitutes to improve the bone compatibility. Controlling the bioresorbability and giving the antibacterial activity to the ACP film were conducted by addition of elements and Ag, respectively. Nb and Ta addition to ACP film suppressed the bioresorbability of ACP film. Ag added ACP film showed antibacterial activity against E. coli and S. aureus.

研究分野：医用材料工学

キーワード：生体材料 材料加工・処理 非晶質リン酸カルシウム コーティング 抗菌性 硬組織適合性

1. 研究開始当初の背景

人工関節ステム部や人工歯根といった硬組織代替デバイスにはチタンが使用されているが、これはチタンの優れた耐食性、強度-延性バランスのみならず、骨と光学顕微鏡レベルで直接接着するオッセオインテグレーションを有するためである。オッセオインテグレーションは長期間埋入後においては安定したインプラントの固定をもたらす。一方、チタンの表面処理は、機械的特性を損なうこと無く生体機能を付与できるため、多くの研究が国内外で行われている。その中で、リン酸カルシウムの高い骨形成能を利用したコーティング方法として、プラズマスプレー法が実用化されている。しかし、プラズマスプレー法は高温プロセスであるため主構成相はヒドロキシアパタイト($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp)であり、膜厚も数十 μm と厚膜である。HApは生体内において安定であるため、インプラントはHApコーティングを介して骨と接触しており、長期間の埋入においてはチタンのオッセオインテグレーションを活用できているかは疑問である。

一方、硬組織代替デバイス表面に付着した細菌による手術部位感染症(SSI)が問題になっており、人工関節の置換術における発生頻度は数%と報告されている。加えて、インプラントの十分な固定が得られず再手術となるケースも報告されている。

上記の問題点を踏まえ、チタンの骨適合化表面処理としては、

- (1) 埋入時および埋入後においても抗菌性を発現すること
- (2) 埋入初期の骨接着を促進すること
- (3) 所定の期間後は生体内に溶解・吸収され、最終的にはチタンと骨とが直接接着すること、

が理想的であると考えられる。

抗菌性を示す元素として、Ag、Zn、Cu等が知られている。その中でもAgは微量でも高い抗菌性を示し、多くの細菌に対して抗菌性を発現する、耐性菌を生じにくい、生体に対して低毒性、といった特徴を有している。生体内に溶出したAgイオンが抗菌性を示すため、Agイオンの継続的な徐放は、効果的な抗菌性発現に有効である。

当グループではこれまで、リン酸カルシウムの生体吸収性に着目し、RFマグネトロンスパッタリング法により、高い密着性を有する膜厚0.5 μm の非晶質リン酸カルシウム(ACP)膜を作製できること、生体内において埋入2週間でコーティング膜は完全に溶解し、4週間埋入後では骨とチタンインプラントと直接の接着を獲得したこと、を明らかにしてきた。一方、ACP膜の生体吸収性制御は、患部の適用範囲の拡大、薬剤徐放等への応用につながる。名工大の春日・小幡らとの共同研究により、Nb添加によりリン酸カルシウム系ガラスが安定化されること、微量の溶出Nbイオンが骨芽細胞を活性化させること、を見出した。

この知見を基に、RFマグネトロンスパッタリング法によりNb添加ACP膜を作製し、擬似体液中への溶解量はコーティング膜中Nb添加量の増加に伴い減少することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) 元素添加によるACP膜の生体吸収性制御

ACP膜の生体吸収性制御方法として、元素添加に着目した。スパッタ法はターゲット組成を変化させることにより、容易に膜組成を制御可能である。加えて、ACPは添加元素の溶解度が高いため、組成の自由度が高い。そこで、添加元素として、細胞毒性を示さず、かつ添加元素自体が徐放することで骨形成能を促進させることが知られている、Ti、Sr、Zr、Nb、Taに着目した。これらの元素を含むACP膜をRFマグネトロンスパッタリング法により作製し、擬似体液への溶解性に及ぼす元素添加の影響を調査した。

(2) Ag添加による抗菌性発現ACP膜の作製と評価

抗菌性元素としてAgに着目し、Ag含有ACP膜の作製およびその抗菌性評価を目的とした。これまで細菌の扱いについては経験が無いため、①細菌の取扱いおよび手技の獲得、②Ag含有ACP膜の抗菌性評価方法の確立、③抗菌性の評価、をそれぞれ行った。

3. 研究の方法

(1) 元素添加によるACP膜の生体吸収性制御

Ti、Sr、Zr、Nb、Taそれぞれの酸化物粉末(10 mol%)と β 型リン酸三カルシウム(β -TCP)粉末を混合後、ホットプレス法により高密度焼結体ターゲットを作製した。これらのターゲットを用い、鏡面研磨およびブラスト処理基板(10×10×1 mm)上にRFマグネトロンスパッタリング法により膜厚0.5 μm の元素添加ACP膜を作製した。ICP法による組成分析、薄膜XRDおよびTEM観察による生成相同定、Raman分光法による構造解析を行った。

ACP膜と基板との密着力はピン引き抜き試験およびスクラッチ試験により評価した。溶解性は、ブラスト処理基板上に作製した元素添加ACP膜をTris緩衝溶液15 mL中に所定の期間浸漬させ、ICP法により溶出元素濃度を測定することで評価した。

(2) Ag添加による抗菌性発現ACP膜の作製と評価

β -TCP、Agおよび Nb_2O_5 を原料粉末として、ホットプレス法によりターゲットを作製した。xAg/TCP系においては、 β -TCPに対してAgが0、15、30 mass%となるように、15AgNb/TCPは、 β -TCPに対してAgが15 mass%、Nbが12.3 mass%となるように混合し、ターゲットの原料とした。これらのターゲットを用いてRFマグネトロンスパッタリング法によりコーティング膜を作製した。得られた膜の生成相を薄膜XRDにて、組成をEDXにて分析した。

Ag添加ACP膜の評価にはブラスト処理基

板上に作製した膜を用いた。500 倍希釈普通ブイオン溶液(1/500NB 溶液) 15 mL 中に試料を浸漬し、310 K にて 10.8 および 86.4 ks 保持した。溶出した膜構成元素(Ag, Ca, P, Nb)イオン濃度を ICP 法により測定することで、膜の溶解性を評価した。

抗菌性の評価には、大腸菌(*E. coli*)および黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)を用いた。各初期濃度(*E. coli*: 1×10^7 CFU \cdot mL⁻¹、*S. aureus*: 1×10^5 CFU \cdot mL⁻¹)を有する 1/500NB 溶液 2 mL に試料を浸漬し、310 K、200 rpm にて 10.8 および 86.4 ks 振盪培養した。培養後の溶液中の生菌数を塗抹平板培養法により測定した。試料無しで培養した場合をコントロール(Ctrl)とし、以下の式より抗菌活性値(*R*)を算出し、*R* \geq 2 の場合に抗菌性ありと判断した。

$$R = \log_{10}(N_{\text{Ctrl}}/N_{\text{Ctrl},t=0}) - \log_{10}(N_{\text{film}}/N_{\text{Ctrl},t=0}) \\ = \log_{10}(N_{\text{Ctrl}}/N_{\text{film}})$$

ここで、*N*_{Ctrl} は一定時間培養後の Ctrl の生菌数、*N*_{film} は一定時間培養後の試料の生菌数、*N*_{Ctrl,t=0} は培養前の Ctrl の生菌数である。

4. 研究成果

(1) 元素添加による ACP 膜の生体吸収性制御
断面 SEM, TEM 観察から、いずれの元素添加膜も緻密かつ基板とよく密着した膜であった。図 1 に各元素添加ターゲットを用いて作製した膜の XRD パターンを示す。添加元素によらず得られた膜はいずれも非晶質相であり、元素添加 ACP 膜を作製することができた。ACP 膜の構造を解析するために、ラマン分光測定を行った結果を図 2 に示す。いずれの添加元素 ACP 膜からも架橋酸素を持たない Q_p⁰ および架橋酸素を一つ持つ Q_p¹ ユニットで構成されていることが分かった。Nb、Ta 添加に

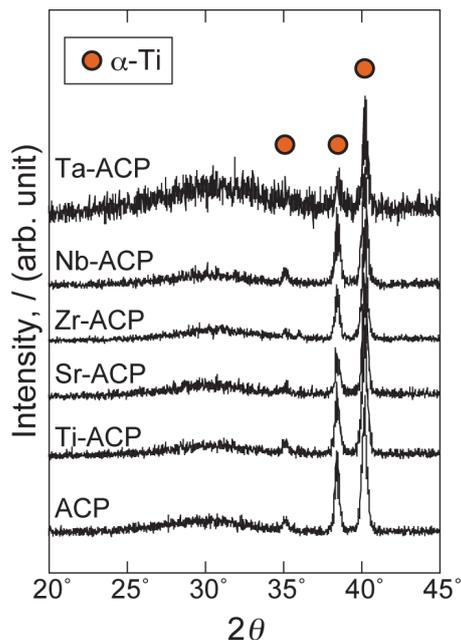


図 1 元素添加ターゲットを用いて作製した膜の XRD パターン

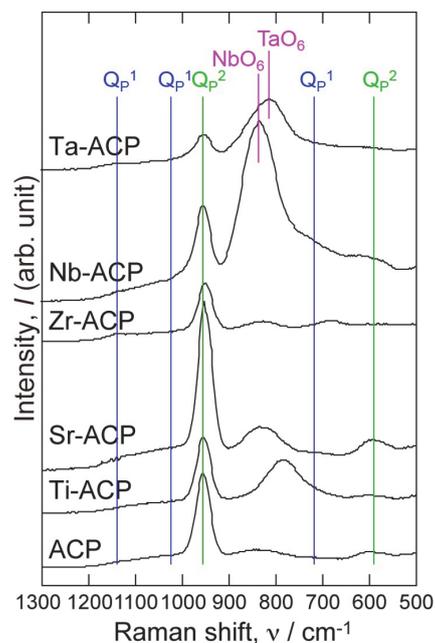


図 2 元素添加 ACP 膜のラマンスペクトル

より、Q_p¹ に対する Q_p⁰ 比は減少した。NbO₆ および TaO₆ 構造も確認され、Nb や Ta はリン酸構造に取り込まれることが分かった。

図 3 に添加元素の蒸気圧と成膜速度の関係を示す。成膜速度は添加元素の蒸気圧に依存することが示唆された。ピン引き抜き試験によるブラスト処理基板との密着力はいずれも 50 MPa 以上の値を示した。

Zr、Nb、Ta 添加により、擬似体液中への溶出量は減少した。図 4 に各元素添加 ACP 膜の組成に対するリン酸イオンの溶出割合とラマンスペクトルより算出した ACP 膜中の Q_p⁰ 比の関係を示す。Nb、Ta 添加により Q_p⁰ 比は小さくなりリン酸イオンの溶出割合も小さくなった。これらの元素は架橋酸素を増加させ、ACP 膜のガラス構造を安定化させることが示唆された。

(2) Ag 添加による抗菌性発現 ACP 膜の作製と評価

15Ag/TCP および 15AgNb/TCP ターゲットを用いて各 RF 出力にて鏡面研磨基板上に作製した膜の XRD パターンを図 5 に示す。15Ag/TCP ターゲットを用いた場合、いずれの RF 出力においても ACP 相が確認された。一方、15AgNb/TCP ターゲットを用いた場合、RF 出力 50、100 W においては ACP 相が確認されたが、150 W においてのみ Ag および Ag₃PO₄ のピークが確認された。なお、30Ag/TCP ターゲットを用いた場合においても、ACP 相のみが確認された。15Ag/TCP および 30Ag/TCP ターゲットを用いた場合、いずれの RF 出力においても膜中の Ag 含有量はターゲット組成よりも小さくなった。一方、15AgNb/TCP ターゲットを用いた場合、膜中の Ag および Nb 含有量はターゲット組成よりも大きくなった。これ以降は、0Ag、15Ag および 30Ag/TCP ター

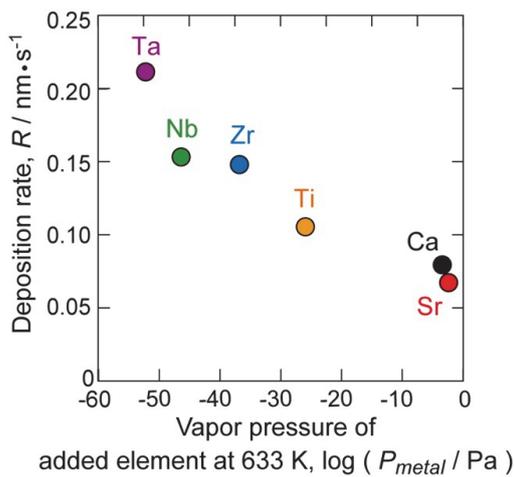


図 3 成膜速度と添加元素の 633 K における蒸気圧の関係

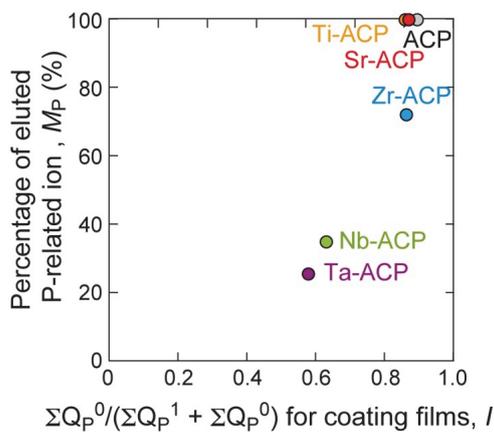


図 4 各元素添加 ACP 膜の組成に対するリン酸イオンの溶出割合とラマンスペクトルより算出した ACP 膜中の Q_P^0 比の関係

ターゲットを用いた場合は RF 出力 150 W にて、15AgNb/TCP ターゲットを用いた場合は 100 W にて成膜した膜を評価に用い、それぞれ 0Ag, 15Ag および 30Ag/ACP 膜、15AgNb/ACP 膜と称することとする。

1/500NB 溶液中への浸漬時間と 15Ag/ACP および 15AgNb/ACP 膜からのイオン溶出量の関係を図 6 に示す。総溶出量は 15Ag/ACP 膜の方が大きいことから、Nb 添加は Ag 添加 ACP 膜の溶解性を抑制することが明らかとなった。

図 7 に、*E. coli* および *S. aureus* を用いた際の 15Ag/ACP 膜の培養時間と生菌数の関係を示す。*E. coli* においては、10.8 ks の培養により生菌数は 1 未満となった。*S. aureus* においても、10.8 ks 培養により生菌数は減少し、86.4 ks 培養では 1 未満となった。10.8 ks 培養後の R 値はそれぞれ 7.37 および 3.94 であり、Ag 含有 ACP 膜は *E. coli* および *S. aureus* のいづ

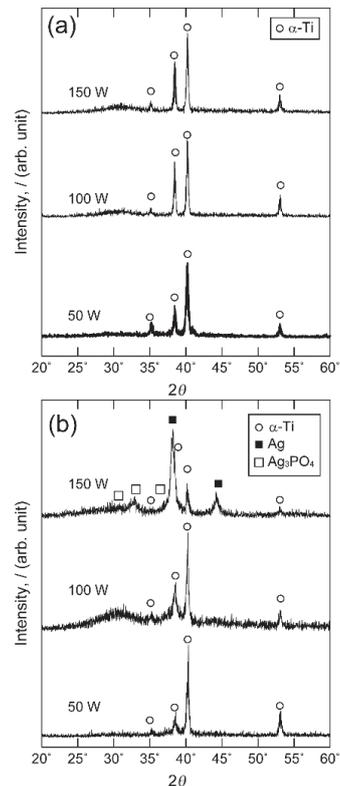


図 5 (a) 15Ag/TCP および (b) 15AgNb/TCP ターゲットを用いて作製した膜の XRD パターン

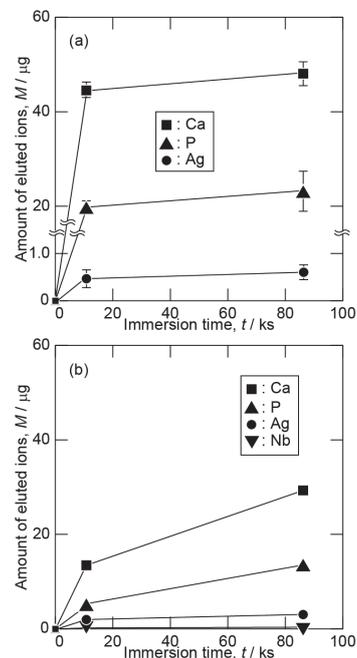


図 6 1/500NB 溶液中への浸漬時間と 15Ag/ACP および 15AgNb/ACP 膜からのイオン溶出量の関係

れに対しても抗菌性を示すことが分かった。

15AgNb/ACP 膜の *E. coli* に対する抗菌活性値は、86.4 ks 培養後では 7.32 であり、抗菌性を有することが確認された。

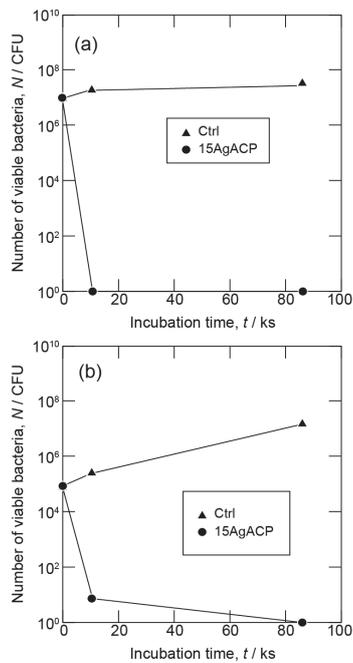


図. 7 *E. coli* および *S. aureus* を用いた際の 15Ag/ACP 膜の培養時間と生菌数の関係

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 1 件)

- (1) O. Gokcekaya, K. Ueda, K. Ogasawara, H. Kanetaka, T. Narushima: "In vitro evaluation of Ag-containing calcium phosphates: Effectiveness of Ag-incorporated β -tricalcium phosphate," *Mater. Sci. Eng. C*, 75 (2017) 926–933. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.msec.2017.02.059
- (2) T. Ueda, N. Kondo, S. Sado, O. Gokcekaya, K. Ueda, K. Ogasawara, T. Narushima: "Ceramic coating of Ti and its alloys using dry processes for biomedical applications," *Interface Oral Health Science 2016, Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface*, (2016) Chapter 2 pp. 23–34. (査読有り)
DOI: 10.1007/978-981-10-1560-1_2
- (3) O. Gokcekaya, K. Ueda, T. Narushima, C. Ergun: "Synthesis and characterization of Ag-containing calcium phosphates with various Ca/P ratios," *Mater. Sci. Eng. C*, 53 (2015) 111–119. (査読有り)
DOI: 10.1016/j.msec.2015.04.025

〔学会発表〕 (計 5 6 件)

- (1) K. Ueda, O. Gokcekaya, K. Ogasawara, H. Kanetaka, T. Narushima: "Effect of chemical state of silver added to calcium phosphates on dissolution behavior, antibacterial activity, and cytotoxicity," *International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced*

Materials (THERMEC' 2016)

2016 年 5 月 31 日, MESSE GRAZ, Graz, Austria. (招待講演)

- (2) K. Ueda, A. Obata, T. Kasuga, T. Goto, K. Ogasawara, T. Narushima: "Fabrication and evaluation of Nb-containing amorphous calcium phosphate coating film on Ti," 10th World Biomaterials Congress (WBC2016) 2016 年 5 月 21 日, Palais des Congrès de Montréal, Montréal, Canada.
- (3) 上田恭介, 成島尚之, 後藤孝, 小幡亜希子, 春日敏宏, 小笠原康悦: "ドライプロセスによるチタンの骨適合化表面改質," 日本金属学会 2015 年春期 (第 156 回) 2015 年 3 月 20 日, 東京大学駒場キャンパス, 東京. (基調講演)

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) 成島尚之, 上田恭介, 上田隆統志, 佐渡翔太: "セラミックコーティングによる金属表面処理," 歯科再生・修復医療と材料, シーエムシー出版刊, (2015), pp. 175–185. ISBN コード: 978-4-7813-1084-8

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 恭介 (UEDA, Kyosuke)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 40507901

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し