

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32710  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K20492  
研究課題名(和文) アパタイト薄膜コーティングジルコニアインプラントの開発  
  
研究課題名(英文) Development of thin apatite coated zirconia implant  
  
研究代表者  
廣田 正嗣 (Hirota, Masatsugu)  
  
鶴見大学・歯学部・学部助手  
  
研究者番号：50734860  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨への早期定着と長期維持を目指したジルコニアインプラントの開発として、分子プレカーサー法による炭酸含有アパタイト(CA)薄膜コーティングについて検討した。イットリア安定型正方晶部分安定化ジルコニア(Y-TZP)にCA薄膜コーティングした。スクラッチ試験の結果、CA薄膜は高い接着強度を示した。また、温度と時間を変化させた4条件でCA薄膜を形成させると、結晶性などの性状に影響されることがわかった。さらに、Y-TZPにナノ秒パルスレーザーを照射し微細な凹凸を付与したインプラントをラット大腿骨に埋入した。レーザー照射Y-TZPは、高い骨-インプラント接触率を獲得した。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a zirconia implant system for good bone response, the aim of the present study was to evaluate thin carbonate-containing hydroxyapatite (CA) film coated yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal (Y-TZP) using a molecular precursor method. The CA film was deposited on the surface of Y-TZP using a molecular precursor solution, which was a mixture of a calcium-EDTA complex and phosphate compounds. Scratch test and AFM analysis suggested that CA film on Y-TZP was strongly adhered. Moreover, four different heating conditions in firing CA, namely, 600 °C-2 hr, 800 °C-2 hr, 1000 °C-2 hr, and 600 °C-4 hr were applied. It was suggested that properties of CA coating on Y-TZP were influenced to crystalline by the heating temperature and time. Nanosecond-pulsed laser processing technique to Y-TZP was applied to generate a surface microgrooves, and evaluating its behavior in rat femur. Bone-to-implant contact ratio was higher for laser treated Y-TZP implants.

研究分野：歯科理工学

キーワード：ジルコニア インプラント 表面改質 アパタイトコーティング 骨形成 スクラッチ試験 ナノパルスレーザー

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、部分安定化ジルコニア製のインプラント体が歯科用インプラントとして臨床応用されており、チタンの代替材料として注目されている。その理由には、高い強度および靱性、良好な審美性、アレルギーを惹起しない等が挙げられる。しかしながら、骨に対してオッセオインテグレーションを起こすか否か、どのような組織反応を惹起するかについては、現段階でエビデンス量が圧倒的に不足しており、不明な点が多いのが現状である。そこで、安全かつエビデンスに基づいたインプラント補綴を行うためには、ジルコニアインプラントへより確実な骨接触を誘導するための表面改質が必要であると考えた。

(2) 研究代表者は、以前にイットリア安定型正方晶部分安定化ジルコニア(以下、Y-TZP)上へ Ca/EDTA 錯体を応用した分子プレカーサー法を用いて炭酸含有アパタイト(以下、CA)の薄膜コーティングについて検討を行った。その結果、Y-TZP 上で厚み 1.0 μm 以下の均一な CA 薄膜形成に成功した。また、擬似体液を用いた *In vitro* における骨適合試験、およびウサギ脛骨、大腿骨への *In vivo* でのインプラント埋入実験の両者において良好な骨適合性を示し、本法で製作した CA 薄膜ジルコニアインプラントは、臨床において応用できる可能性が明らかになった。

(3) しかしながら、CA 薄膜のジルコニア基材への接着性と長期耐久性については未だ明確ではない。したがって、インプラント周囲炎を惹起しない、より基材との接着性が高いジルコニアへの前処理について検討する必要がある。さらに Y-TZP においては分子プレカーサー法による加熱処理により水熱劣化の発生が懸念されるため、新規ジルコニア基材として、セリア安定型正方晶部分安定化ジルコニア(Ce-TZP)についても検討の余地がある。

2. 研究の目的

ジルコニアインプラントに対して骨適合性に関する明確なエビデンスを確立できれば、口腔内のメタルレス治療が可能であり、アレルギー発生防止の観点からもより安全なインプラント治療を提供できる。また、部分安定化ジルコニアがより審美的で、良好な機械的強度を有することからも、インプラント治療の適応拡大とともに多くの国民の QOL 向上に寄与することができる。

以上により、本研究の目的は、実用可能なメタルフリーインプラントシステム確立のため、Y-TZP および Ce-TZP への分子プレカーサー法による CA 薄膜コーティングの前処理や製作条件について検討することである。製作した各インプラントの骨適合性についても検証することにより、より優れた CA 薄膜コーティングジルコニアインプラント開

発のための条件を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験試料には、イットリア 3%添加型正方晶部分安定化ジルコニア(TZ-3YB-E, HIP 処理品、東ソー、以下 Y-TZP)および 30 vol%の Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 含有セリア 10%添加型正方晶部分安定化ジルコニア(NANOZR, Panasonic Healthcare, 以下 Ce-TZP)の 2 種類の部分安定化ジルコニアを用意した。*In vitro* における各評価には、12 × 1 mm のディスク形状の試料、動物実験には、3 × 2 × 1 mm に加工した平板形状の試料を準備し、実験に供した。すべての試料は流水下で #1200 エメリー紙で研磨後、超音波洗浄し、さらにエタノール中で 24 時間脱脂した。

(2) 分子プレカーサー法の成膜プロセスを示す。アパタイト形成用プレカーサー溶液は、まず CaH<sub>2</sub>(edta) · 2H<sub>2</sub>O を合成、単離し、これと当量のジブチルアミンとエタノールで反応させた溶液に、別に合成させたニリン酸ジブチルアンモニウム塩を添加させ、Ca/P 比 1.67 になるよう調整し、合成した(図 1)。合成したプレカーサー溶液 0.25 mmol/g をダブルステップによるスピンコート法(500 rpm: 5 秒, 2000 rpm: 30 秒)により基板全体に塗布した。その後、管状炉(卓上型高速電気炉 EPKPO12-K, いすゞ製作所)中で酸素雰囲気下、10 分乾燥後、600 °C において 2 時間の加熱焼成を行った。CA 薄膜コーティングした各試料を以下、CA/Y-TZP および CA/Ce-TZP と称す。

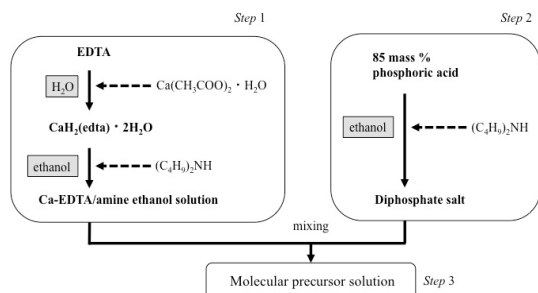


図 1. 分子プレカーサー法による CA コーティング溶液の合成方法

(3) Y-TZP 上に形成させた CA 薄膜の密着性を評価するために、スクラッチテスター(レベテスト, Anton Paar Japan)を使用し、ダイヤモンドスタイラス法にて CA 薄膜のスクラッチ試験を行い、コーティングが最初に剥離した時の荷重(Lc 値, 臨界剥離荷重)を算出した。スクラッチ荷重は 1 N から 30 N とし、ステージを 5 mm/min で 1.45 mm 移動させた。また、得られたスクラッチ痕を電子線マイクロアナライザー(EPMA, JXA-8900R, JEOL)により分析し、剥離を確認した。コン

トロールは、純チタン(99.9 mass%, JIS Grade 2, フルウチ化学)に分子プレカーサー法にて CA 薄膜コーティングした CA/Ti とした。成膜条件は、CA/Y-TZP を製作した条件と同様とした。

(4) CA/Y-TZP および CA/Ce-TZP 上のアパタイト結晶を観察するために、CA 薄膜を原子間力顕微鏡 (AFM, Nanosurf Easyscan 2, Nanosurf) を用いて、大気中で直接観察した。測定はタッピングモードで行い、専用のカンチレバー (Tap Al-G, Budget sensors, 共振周波数 190 kHz, バネ定数 48 N/m) で各試料 5 回ずつ測定した。

(5) 分子プレカーサー法における焼成温度および時間の加熱条件が CA 薄膜に及ぼす影響について検討した。従来通りの焼成条件 1) 600 °C, 2 時間をコントロールとして、2) 800 °C, 2 時間, 3) 1000 °C, 2 時間, 4) 600 °C, 4 時間の各 4 条件で CA 薄膜を形成させ比較検討した。CA 薄膜表面は、走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-5600LV, JOEL) および AFM を用いて観察し、算術平均粗さ (Ra) と算術平均高さ (Sa) を算出した (n=5)。また、純水に対する表面のぬれ性を接触角計 (DMe-201, 専用ソフト FAMAS, 協和界面科学) を用いて測定した。アパタイトの結晶性は、薄膜 X 線回折法 (XRD, SmartLab, Rigaku) にて測定した。さらに、CA 薄膜の接着性および長期耐久性を評価するため、スクラッチ試験 (ナノスクラッチテスター, Anton Paar Japan) と、リン酸緩衝水溶液へ 1 か月間の長期浸漬実験を行った。また、*In vitro* の骨適合性評価として、ハンクス溶液への擬似体液浸漬実験を行った。

(6) 機械的強度が強く、加工が困難とされるジルコニアに対し、形態的アプローチによる骨適合性向上を狙って、ナノ秒パルスレーザを照射し凹凸微細構造を付与する方法を前処理として検討した。本実験では、Nd:YAG レーザを平板試料に照射した。表面微細加工を行った Y-TZP および Ce-TZP (laser/Y-TZP, laser/Ce-TZP) の表面観察は、SEM にて行った。また、試料はオートクレーブにより滅菌後、ラット大腿骨へのインプラント埋入実験を行った。コントロールは現行で評価の高い、サンドブラスト処理後に酸エッチングを行い粗造化させる SLA (Sandblasted Large-grid Acid-etched) 表面とした。Wistar 系 ラット雌の大腿骨に laser/Y-TZP, laser/Ce-TZP および SLA 処理を施した SLA/Y-TZP, SLA/Ce-TZP をプレスフィットで 4 週間埋入した。試料摘出後、MMA に包埋し非脱灰横断薄切研磨標本を作製し、病理学組織学的に評価した。

#### 4. 研究成果

(1) CA/Y-TZP および CA/Ti 上の CA 薄膜を

スクラッチ試験した結果、CA/Ti (10.63 N ± 0.48) に比較して CA/Y-TZP (14.83 N ± 0.32) 上で有意に高い Lc 値が得られ、Ti 基板上的 CA 薄膜より Y-TZP 上の方が密着性に優れることが分かった (図 2)。EPMA 分析から、スクラッチにより基材が露出していることを確認できた。

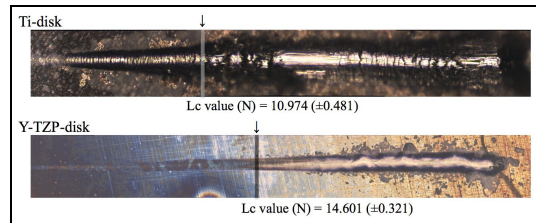


図 2. スクラッチテスターによる CA 薄膜の密着性試験

以上のことから、基材が加熱されアパタイトの結晶を生成する際、基材であるチタンやジルコニアの性質の違いが影響していると推察された。

(2) CA 薄膜の形成をアパタイトの結晶レベルで観察するため AFM による微細観察を行った。図 3 に Ti, Y-TZP および Ce-TZP 上に形成させたアパタイト薄膜の AFM 像を示す。CA/Y-TZP 上のアパタイト結晶の大きさが、CA/Ti 上のアパタイト結晶に比較して、小さい傾向が認められた。また、CA/Y-TZP と CA/Ce-TZP 上のアパタイト結晶は、大きさ、形態共に類似していた。

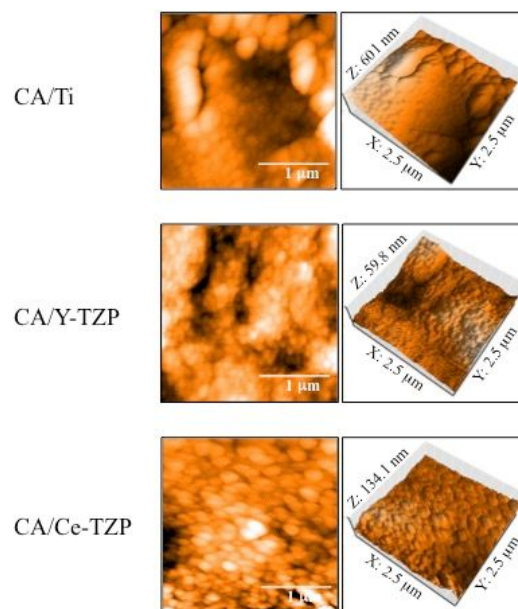


図 3. Ti, Y-TZP および Ce-TZP 上に形成させたアパタイト薄膜の AFM 像

(3) 研究成果(1)および(2)より、基材上における CA 薄膜への熱伝導が、アパタイトの結晶形態や性質に影響を及ぼしている可能性が考察されたため、分子プレカーサー法による焼成プロセスにおける加熱温度と加熱時間を 4 条件に変化させて比較検討することとした。その結果、いずれの加熱温度でも CA 薄膜の形成が観察された。SEM および AFM 観察により 1000 °C、2 時間加熱試料では、アパタイト結晶が融合して形成していることが確認できた(図 4)。

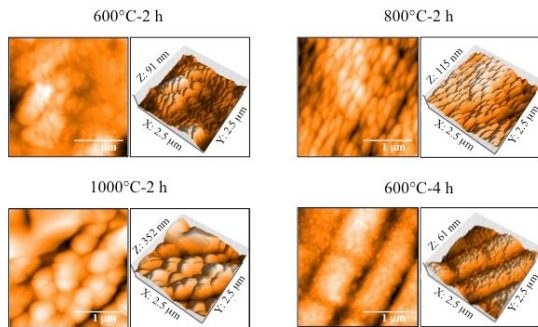


図 4. 各加熱条件で形成させたアパタイト薄膜の AFM 像

図 5 に CA 薄膜の X 線回折パターンを示す。XRD による元素分析の結果、800 °C、2 時間加熱試料の CA 薄膜は他の加熱条件の試料と比較し、最も高い結晶性を示した。CA 薄膜の接着性、長期耐久性については、どの条件においても有意差は見られず、インプラント埋入には問題のない強度であることが分かった。また、擬似体液浸漬実験では、800 °C、2 時間加熱試料においてより多くのアパタイト析出が確認でき(図 6)、他の加熱条件の試料と比較して新生骨形成を促す可能性が示された。

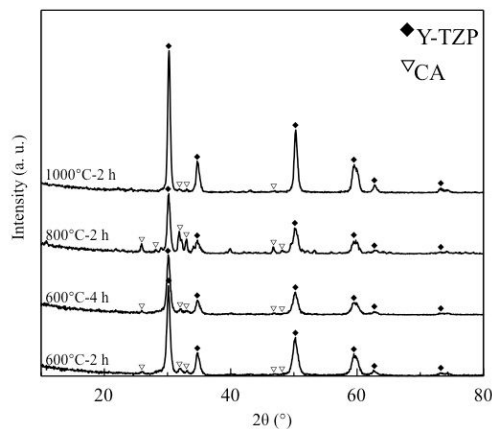


図 5. 各加熱条件で形成させたアパタイト薄膜の X 線回折パターン

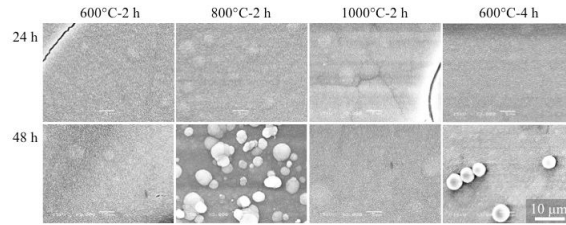


図 6. ハンクス溶液浸漬 24 および 48 時間後の SEM 像

以上により、CA コーティング上のエピタキシャルな骨成長は、アパタイトの結晶形態や結晶性に影響を及ぼす可能性が推察された。よって、分子プレカーサー法において加熱条件を変化させて CA 薄膜を形成させた結果、CA 薄膜の性状に影響することが明らかになった。

(4) Nd:YAG レーザを Y-TZP および Ce-TZP に走査させ、深さ 30 μm、ピッチ幅 30 μm の規則的な凹凸微細構造を付与することができた。平板試料全面にレーザ加工を行い、ラット大腿骨への 4 週間のインプラント埋入を行った結果、SLA/Y-TZP に比較して laser/Y-TZP では骨とインプラント間の接触部位がより多く認められた。しかしながら、laser/Ce-TZP においては、ほとんどの部位で骨と接触しない傾向が認められた。

研究当初の計画では、CA 薄膜コーティングの前処理としてレーザ加工を検討していたが、実際にレーザ加工を行った結果、非常に骨形成に有利と予想される粗造な表面が得られたため、新たにレーザ加工ジルコニアインプラントとしての検証を試みている。また、前述のように新規ジルコニアインプラント開発にとって、興味深く、有意義な結果が得られたため、今後、レーザ照射条件の確立、ピッチ幅の調整、軟組織付着を目指した動物実験等を含めて、更なる検討を行っていく所存である。なお、本項目は、平成 29 年度科学研究費助成事業、若手研究(B)、研究課題名(課題番号)「骨および軟組織付着を目指した凹凸微細表面を有するレーザ加工インプラント(17K17225)」として採択されており、継続して本研究を遂行する予定である。

#### <引用文献>

Hirota M, Hayakawa T, Ohkubo C, Sato M, Hara H, Toyama T, Tanaka Y, Bone responses to zirconia implants with a thin carbonate-containing hydroxyapatite coating using a molecular precursor method, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, Vol.102B, No.6, 2014, pp.1277-1288, DOI: 10.1002/jbm.b.33112

Takahashi K, Hayakawa T, Yoshinari M, Hara H, Mochizuki C, Sato M, Nemoto K, Molecular precursor method for thin calcium phosphate coating on titanium, Thin Solid Films, Vol.484, No.23, 2005, pp.1-9.

Ban S, Sato H, Suehiro Y, Nakanishi H, Nawa M, Biaxial flexure strength and low temperature degradation of Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanocomposite and Y-TZP as dental restorative. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, Vol.87, No.2, 2014, pp.492-498, DOI: 10.1002/jbm.b.31131

#### 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 2 件)

Hirota M, Mochizuki C, Sato M, Hayakawa T, Influence of heating conditions for formation of a thin apatite film on zirconia using a molecular precursor method, Coatings, 査読有, Vol. 7, No.69, 2017, DOI: 10.3390/coatings7050069

Hirota M, Shimpo H, Ohkubo C, Umegaki T, Toyama T, Hayakawa T, Bone adaptation of fibronectin immobilized titanium implants using a tresyl chloride activated method, Journal of Hard Tissue Biology, 査読有, Vol.24, No.4, 2015, pp.341-346, DOI: 10.2485/jhtb.24.341

[学会発表](計 4 件)

廣田 正嗣、早川 徹、ジルコニア上のアパタイト薄膜形成に及ぼす分子プレカーサー法の加熱処理条件の影響、日本補綴歯科学会第 126 回学術大会、2017 年 7 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Hirota M, Ohkubo C, Sato M, Toyama T, Tanaka Y, Hayakawa T, Development of thin apatite coated zirconia implant, International Dental Materials Congress 2016(IDMC 2016, 国際歯科材料会議 2016), 2016 年 11 月 5 日, 6 日, The Stones Hotel (Bali)

廣田 正嗣、望月 千尋、佐藤 光史、早川 徹、分子プレカーサー法の加熱処理条件がジルコニア上のアパタイト形成に及ぼす影響、第 25 回硬組織再生生物学会学術大会、2016 年 8 月 24 日、日本大学

歯学部(東京都・千代田区)

廣田 正嗣、吉田 英史、望月 千尋、佐藤 光史、早川 徹、分子プレカーサー法によりチタンおよびジルコニア上に形成させた炭酸含有アパタイト薄膜の比較、第 66 回秋季日本歯科理工学会学術講演会、2015 年 10 月 3 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

廣田 正嗣 (HIROTA, Masatsugu)  
鶴見大学・歯学部・学部助手  
研究者番号：50734860

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

早川 徹 (HAYAKAWA, Tohru)  
佐藤 光史 (SATO, Mitsunobu)  
望月 千尋 (MOCHIZUKI, Chihiro)  
遠山 岳史 (TOYAMA, Takeshi)  
水谷 正義 (MIZUTANI, Masayoshi)