

チタン表面へのリン酸カルシウムコーティングによる生体機能化と その生体内外評価

東北大・工 成島尚之, 上田恭介, 東北大・歯 川村仁, 勝部朝之, 中川浩伸,
岩手医大・歯 平雅之, 東北大・金研 後藤孝, 塗溶

1. はじめに

骨-チタンインプラント間の迅速で強固な密着を達成するために、種々のチタン表面改質・処理法が検討されており¹⁾、その中でもリン酸カルシウムコーティングは有力な手法と考えられている。チタン製人工歯根や人工股関節では熱スプレー法によるアパタイトコーティングが実用化されているが、コーティング膜と基板との密着性や微細組織制御などに関する課題も指摘されている。これに対し、スパッタリング法は低温プロセスにおいて均一・緻密で基板との密着性に優れた薄膜を作製できることが知られており、アパタイトなどリン酸カルシウム系材料のコーティングプロセスとしても有力である。特に、 β 型チタン合金へのコーティングにおいては、高温プロセスでの微細組織変化を回避する観点からも、低温プロセスへの期待は大きい。著者らのグループでは、これまで RF マグネトロンスパッタリング法による工業用純チタン(CPチタン)基板へのリン酸カルシウムコーティング膜の作製と評価に関する研究を行ってきた^{2,4)}。その過程で、鏡面研磨 CP チタンプレート上に形成されるリン酸カルシウムコーティング膜の相、配向性、成膜速度とスパッタリング条件との関係²⁾やそれらの擬似体液中における表面反応、密着強度などを報告した^{3,4)}。また、生体内評価として、リン酸カルシウムコーティングを施した円柱状 CP チタンインプラントのビーグル犬下顎骨への埋入実験を行い、コーティング膜が骨/チタンインプラントの接触率向上に寄与することを明らかにした^{3,4)}。

人工歯根や人工股関節ステム部へ応用されるチタンインプラント表面には、表面の粗造化に伴う骨/インプラント界面積の向上を意図したブラスト処理や酸エッチングがなされることが多い。コーティング膜を利用してチタンインプラントの骨に対する迅速・強固な密着の達成などに関連した骨適合性向上を図る際にも、チタン基板表面に関する考慮が必要である。

そこで、本研究では、チタン基板としてブラスト処理を施した Ti-6mass%Al-4mass%V(Ti-6Al-4V)合金製プレートおよびインプラント上に、RF マグネトロンスパッタリング法によりリン酸カルシウムコーティング膜を作製すると共に、コーティング膜の密着強度、骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、動物埋入実験におけるインプラントの回転除去トルクなどの生体内外評価を行った結果に関して報告する。

2. 研究経過

(1) リン酸カルシウムコーティング膜の作製

β 型リン酸三カルシウム(β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)をターゲットとした RF マグネトロンスパッタリング法により、ブラスト処理を施した Ti-6Al-4V 合金製プレート(10×10×1 mm, JMM)およびスクリュー型 Ti-6Al-4V 合金製インプラント(ϕ 3.3×8 mm, JMM)上にリン酸カルシウムコーティング膜を作製した。用いた基板をそれぞれ、ブラスト Ti-6Al-4V プレート、スクリュー型ブラスト Ti-6Al-4V インプラントと表記することとする。ブラスト処理法は、プレートおよびインプラントに共通であり、平均粗さ(Ra)は 4.6 μm である。スパッタリング時の、RF 出力(P)、チャンバー内ガス全圧力(P_{tot})、Ar-O₂ スパッタリングガス中の酸素濃度(CO₂)は、それぞれ 75~150 W、0.5~5 Pa、0~50%と変化させた。コーティング膜作製方法の詳細は、既に報告している^{2,3)}。Ti-6Al-4V 基板の加熱は行わなかったが、成膜プロセス中、基板温度は最大 373 K 程度まで上昇した。後述の動物実験に供した一部のコーティング膜に関しては、シリカアンプル中、873 K で 7.2 ks の熱処理を行った。ブラスト Ti-6Al-4V プレート上に作製されたリン酸カルシウムコーティング膜の相は、低角入射 X 線回折(α -2 θ XRD, $\alpha=1^\circ$)により同定した。

(2) 生体内外評価

生体外評価としてブラスト Ti-6Al-4V プレート上に作製したリン酸カルシウムコーティング膜(厚さ: 0.5 μm)の密着強度および ALP 活性の測定を行った。コーティング膜の密着強度評価方法は以下の通りである。あらかじめエポキシ系接着剤を塗布したアルミニウム製スタッド(接着部直径: 2.7 mm, P/N 901106, Quad Group)を試料表面にセットし、大気中 423 K で 3.6 ks 熱処理する。その後、薄膜強度試験機(Romulus IV, Quad Group)を用いたスタッドの引張試験において測定される最大荷重からコーティング膜の密着強度を評価した。5 つ以上の試料で測定を行い、密着強度の平均値と標準偏差を算出した。本研究で利用した接着剤の密着強度は約 70 MPa とされている。密着強度評価後のブラスト Ti-6Al-4V プレート側破面および断面の観察

を走査型電子顕微鏡(SEM, XL30-FEG, PHILIPS)により行った。

プラスト Ti-6Al-4V プレート上のリン酸カルシウム膜が ALP 活性に及ぼす影響をヒト骨芽細胞 SaOS-2(RCB0428, 理研 BRC)の培養試験により評価した。10%ウシ胎児血清配合 Eagle's α -MEM 中、リン酸カルシウムコーティングを施したプラスト Ti-6Al-4V プレート、コーティングを施していないプラスト Ti-6Al-4V プレートおよびハイドロキシアパタイト(HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)ペレット(CELLYARD HA ペレット, PENTAX/旭テクノグラス)上で SaOS-2 細胞を 2、4、8 日間培養し、掻き出し遠心捕集後、細胞を溶解液(1%Triton-X100(表面活性剤)配合リン酸緩衝液(PBS(-))に懸濁し細胞中の DNA 量と ALP 活性量を測定した。DNA 量は定量キット(Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay kit, Molecular Probes/Invitrogen)と蛍光光度計により測定し、ALP 活性量は定量キット(アルカリ性フォスファ B-テストワコー、和光純薬)と 96 穴マイクロプレート吸光リーダーにより測定した。本研究では、細胞当たりの ALP 活性を評価するために、ALP 活性量を DNA 生成量で除したもの(ALP/DNA)を ALP 活性とした。

(3) 生体内評価

生体内評価として、スクリュー型プラスト Ti-6Al-4V インプラントの埋入後の回転除去トルク測定を行った。リン酸カルシウムコーティング(厚さ: 0.5 μm)を施したスクリュー型プラスト Ti-6Al-4V インプラントを日本白色家兎(雄、平均体重 3 kg)大腿骨へ埋入した。埋入数は片側 3 本とした。2 または 4 週後、全身麻酔下において、インプラント体を骨組織から回転除去するのに要するトルク値をトルクゲージ(ATG24CN BTG150CN, Tonichi)により測定した。各埋入条件における家兎数は 5 羽とし、平均値および標準偏差を算出した。回転除去トルク試験後のインプラント表面および付着骨とインプラント界面の観察を SEM により行った。

3. 研究成果

(1) プラスト Ti-6Al-4V プレート上に作製されたリン酸カルシウム膜

Fig. 1(a)および(b)に、リン酸カルシウムコーティングを施したプラスト Ti-6Al-4V プレートの表面および断面を示す。Fig. 1 中のコーティング膜は、断面観察を考慮し、生体内外評価で使用したコーティング膜厚の 0.5 μm よりもやや厚く作製されているが、コーティング後もプラスト Ti-6Al-4V プレート初期の表面粗さは保持されており、また、緻密かつ均一なコーティング膜が複雑な表面凹凸を良くカバーしていることが見て取れる。プラスト処理は、骨/インプラント界面積の増加を目的に、人工歯根や人工股関節ステム部に応用されており、その表面粗さの保持は、熱スプレー法などの比較的厚いリン酸カルシウムコーティング膜の形成を意図した手法に対する RF マグネトロンスパッタリングによる薄膜コーティングの優位性を示すものと思われる。

Fig. 2 に、 $P = 100 \text{ W}$ 、 $P_{\text{tot}} = 0.5 \text{ Pa}$ においてプラスト Ti-6Al-4V プレート上に作製したリン酸カルシウム膜の XRD パターンを示す。 CO_2 が 20%または 50%の場合には、オキシアパタイト(OAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$)の形成が確認された。OAp は、ハイドロキシアパタイト(HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)から H_2O が脱離した組成を有しているリン酸カルシウム相である。HAp と OAp の格子定数の違いに伴う XRD パターンにおけるピークのシフトが報告されているが^{5,6)}、本研究においては OAp コーティング膜と HAp 粉末におけるピーク位置の違いは検出できなかった。しかしながら、(イ)ターゲットに β -TCP を採用しており OH 基源が系内に存在しない、(ロ)FTIR を用いた分析でもコーティング膜からは OH 基の存在は確認されない²⁾、ことから、Fig. 2 における CO_2 が 20%または 50%でのコーティング膜の相は OAp と判断した。なお、OAp コーティング膜と HAp 粉末でピーク位置の違いが観察されなかった理由は、OAp コーティング膜の結晶性が低く、格子定数変化の検出が困難であったためかも知れない。一方、 $\text{CO}_2 = 0\%$ では $2\theta = 30^\circ$ 付近にわずかなハローパターンが確認され、非晶質リン酸カルシウムの存在が示唆される。本研究においてプラスト Ti-6Al-4V プレート上に作製されるリン酸カルシウムコーティング

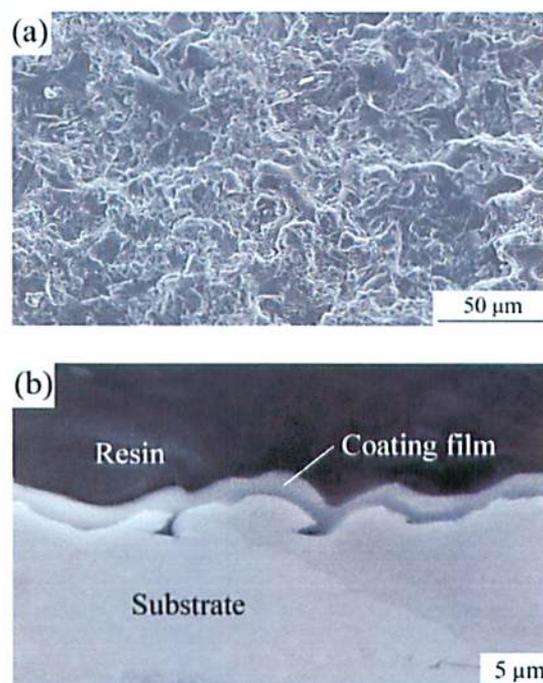


Fig. 1 SEM images of (a) surface and (b) cross-section of blast-treated Ti-6Al-4V plate after coating of calcium phosphate film.

膜の相は OAp または ACP であり、コーティング膜厚を $0.5 \mu\text{m}$ とした際のスパッタリング条件と相の関係を Fig. 3 にまとめて示す。鏡面研磨 CP チタンプレート上では RF 出力(P)およびスパッタリングガス中の酸素濃度(Co_2)が高い条件で OAp 相の形成が観察され²⁾、プラスト Ti-6Al-4V プレートの場合も鏡面研磨 CP チタンプレートほど顕著ではないものの、同様の傾向が観察された。

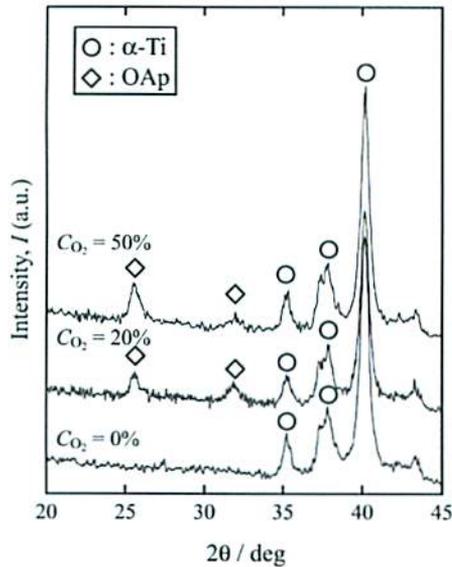


Fig. 2 XRD patterns of coating films fabricated on blast-treated Ti-6Al-4V plate at various oxygen gas concentrations (Co_2) with thickness of $0.5 \mu\text{m}$ under conditions of $P_{\text{tot}} = 0.5 \text{ Pa}$ and $P = 100 \text{ W}$.

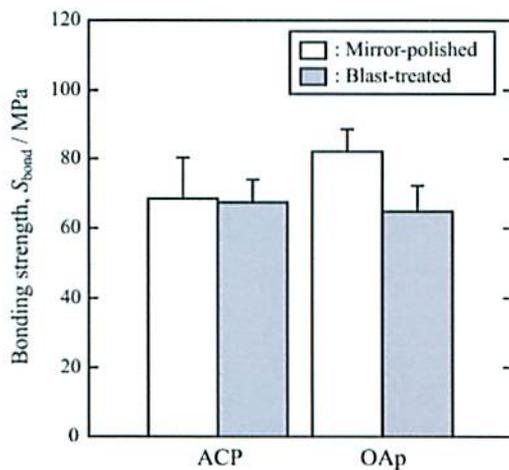


Fig. 4 Bonding strength calculated using maximum load in adherence tests with ACP- and OAp-coated titanium plates.

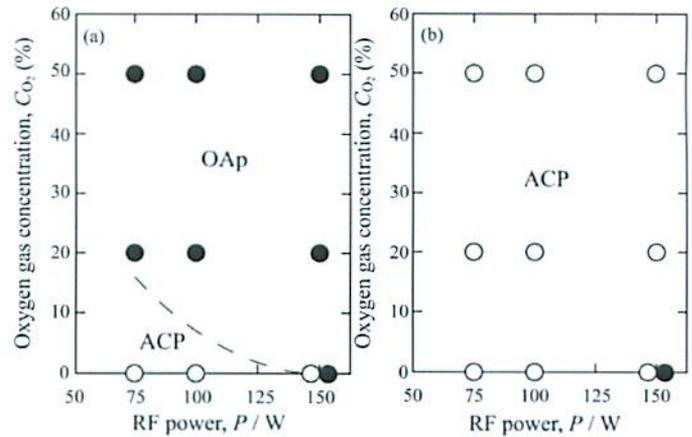


Fig. 3 Effect of oxygen gas concentration in sputtering gas and RF power on phase in films fabricated on blast-treated Ti-6Al-4V plate at P_{tot} of (a) 0.5 Pa and (b) 5 Pa with thickness of $0.5 \mu\text{m}$.

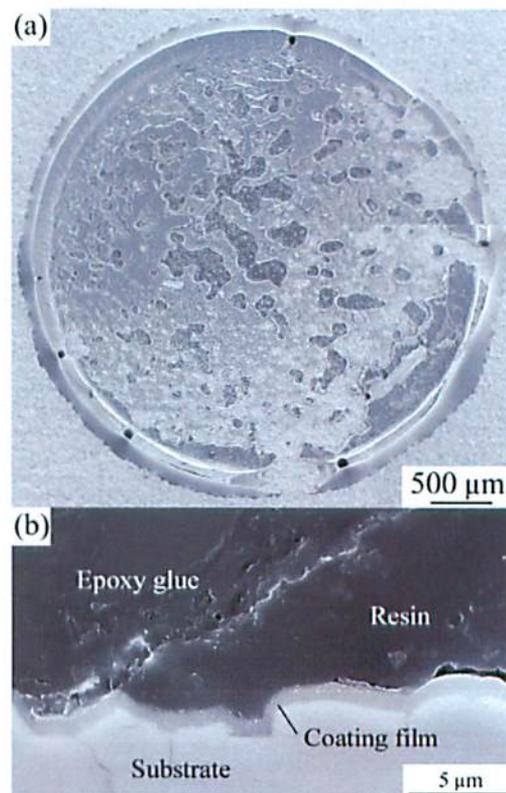


Fig. 5 SEM images of (a) fracture surface and (b) cross-section of OAp-coated Ti-6Al-4V plate with blast-treated surface after adherence test.

(2) 生体外評価

コーティング膜とブラスト Ti-6Al-4V プレートとの密着性を、アルミニウムスタッドがコーティングを施した試料と離断する際の最大荷重から計算される密着強度により評価した(Fig. 4)。図中には比較のために、鏡面研磨 CP チタンプレート上での密着強度も示した。ブラスト Ti-6Al-4V プレート上における密着強度の計算値は 60~70 MPa 程度であった。密着強度評価後の OAp 膜をコーティングしたブラスト Ti-6Al-4V プレート側破面および断面を Fig. 5 に示す。密着強度評価後においてコーティング膜がブラスト Ti-6Al-4V プレート上に存在しており、また、接着剤の存在も確認される。同様の状況は ACP コーティング材においても観察された。これらの結果は、密着強度評価試験におけるアルミニウムスタッドの離断が、接着剤/コーティング膜界面よりもアルミニウムスタッド側で起こったことを示唆する。すなわち、Fig. 4 に示した密着強度が、正確にはコーティング膜とブラスト Ti-6Al-4V プレート間の密着強度を反映していないことを意味する。前述の通り、本研究で用いた接着剤の接着強度は約 70 MPa とされており、Fig. 4 に示した 60~70 MPa 程度の密着強度はそれとほぼ一致する。以上より、RF マグネトロンスパッタリングでブラスト Ti-6Al-4V プレート上に作製されたリン酸カルシウムコーティング膜の密着強度は、基板の表面粗さに依存せず接着剤の密着強度以上であり、60 MPa 以上と判断できる。鏡面研磨 CP チタンプレート上での密着強度は、ブラスト Ti-6Al-4V プレートよりもやや大きい、70 MPa という接着剤の密着強度を考慮すれば、その違いは有意なものではないと考えられる。

本研究で得られた密着強度は、ブラストチタン基板上にプラズマスプレー法により作製されたリン酸カルシウム膜の密着強度、20~30 MPa よりも大きく、インプラントのコーティング膜に必要とされる密着強度(約 50 MPa⁷⁾)も満足している。スパッタリングプロセスにおいては、チタン基板の吸着ガスなどが除去されることが知られており、高い活性基板表面が得られるために、コーティング膜と基板間の優れた密着力が達成されたものと考えられる。

Fig. 6 に ACP および OAp コーティングを施したブラスト Ti-6Al-4V プレート上で、SaOS-2 細胞を 2、4、8 日間培養した後の ALP 活性(ALP/DNA)を、HAp ペレットおよびコーティングを施していないブラスト Ti-6Al-4V プレート上での結果と共に示す。ACP、OAp いずれをコーティングした場合にも、HAp ペレットよりは低いものの、コーティングなし材を有意に上回る ALP 活性が確認された。ALP 活性は造骨性を示す指標の一つで初期骨系分化誘導能を表し、骨系分化の進展に伴い一旦増加してから漸減する^{8,9)}。ブラスト Ti-6Al-4V プレート上において、リン酸カルシウムコーティング膜は細胞レベルで有意に骨系分化を誘導していると考えられた。

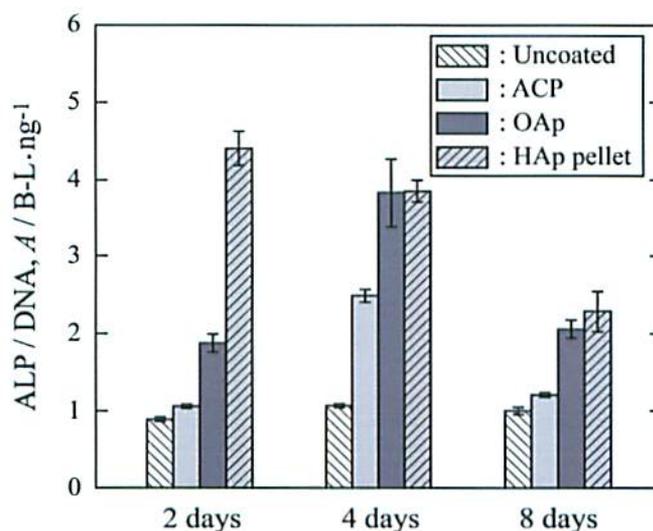


Fig. 6 ALP activity (ALP/DNA) of SaOS-2 cells on uncoated (control), ACP- and OAp-coated Ti-6Al-4V plates with blast-treated surface, and HAp pellet cultured for 2, 4 and 8 days.

(3) 生体内評価

Fig. 7に、スクリー型ブラスト Ti-6Al-4V インプラント上に形成されたリン酸カルシウムコーティング膜の断面を示す。動物実験に供したコーティング膜は、ACP および OAp をシリカアンプル中 873 K で 7.2 ks 熱処理したもの(OAp-Vac)の二種類である。曲率を有するインプラント体表面であっても、コーティング膜がブラスト処理により形成された凹凸を良くカバーしていることがわかる。スクリー型ブラスト Ti-6Al-4V インプラント上のコーティング膜の XRD 分析による相の同定は困難であったが、同様の手順により作製したブラスト Ti-6Al-4V プレート上の OAp-Vac は、熱処理前よりも結晶化が進行した OAp 単相であることを確認している。ACP および OAp-Vac コーティングを施したインプラントを家兎大腿骨から回転除去する際のトルク値を、コーティングなし材(コントロール)と比較して Fig. 8 に示す。埋入期間の増加に伴い回転除去トルクが向上しており、いずれのインプラントにおいてもオッセオインテグレーションが進行していることが示唆される。また、ACP コーティング材において、2 週間の埋入後、コントロール材と比較して有意に大きい回転除去トルクが得られた($p < 0.05$)。OAp-Vac コーティング材の回転除去トルク値に関しては、コントロール材と比較して平均値は大きいものの、標準偏差が大きく、コントロール材との有意差が観察されていない。OAp-Vac 膜に関しては熱処理後に若干の密着強度の低下が確認されており、それが回転除去トルクにおける大きな標準偏差の原因と考えられる。RF マグネトロンスパッタリング法により作製したリン酸カルシウムコーティング膜の熱処理プロセスの最適化は今後の課題である。

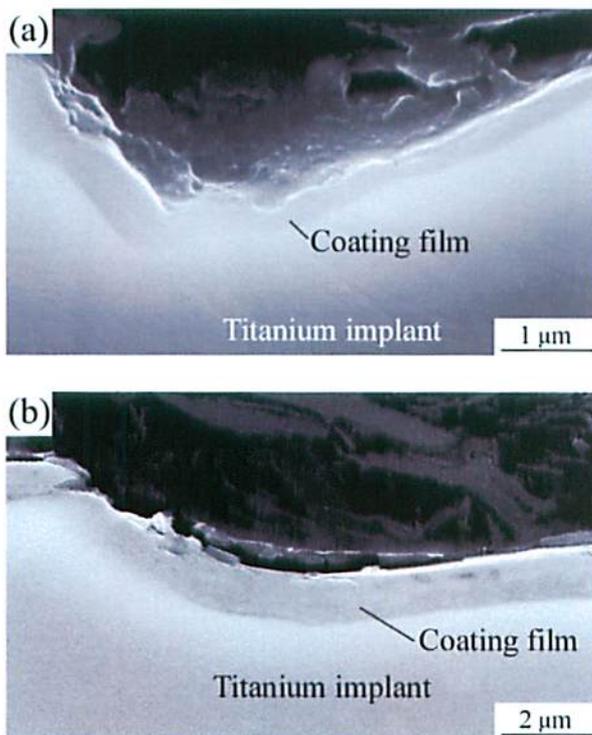


Fig. 7 SEM images of cross-section of (a) ACP- and (b) OAp-Vac-coated screw type Ti-6Al-4V implants with blast-treated surface before implantation.

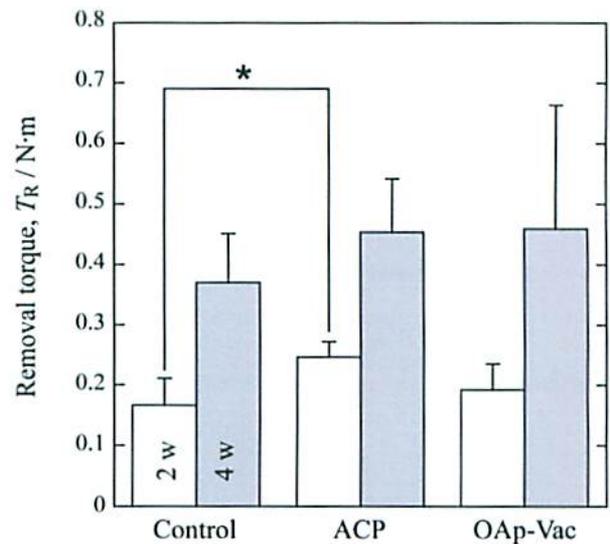


Fig. 8 Removal torque of uncoated (control), ACP- and OAp-Vac-coated screw type Ti-6Al-4V implants with blast-treated surface from femur of Japanese white rabbits after 2- and 4-week implantation.

4. まとめ

RF マグネトロンスパッタリング法によりプラスト処理を施した Ti-6Al-4V 合金基板上にリン酸カルシウムコーティング膜を作製すると共に、その生体内外評価を行い、リン酸カルシウムコーティングがチタンの骨適合性に及ぼす影響について検討した。得られた結果は以下の通りである。

- (1) 作製されたコーティング膜は、プラスト Ti-6Al-4V 基板の表面凹凸を良くカバーしており、基板の表面粗さを保持していた。コーティング膜は、非晶質リン酸カルシウム(ACP)相または結晶質のオキシアパタイト(OAp)相により構成されており、スパッタリング条件により相の制御が可能であった。
- (2) コーティング膜の密着強度は、リン酸カルシウムコーティング膜の相に依存せず 60 MPa 以上であり、プラズマプレー法により作製されたリン酸カルシウムコーティング膜の密着強度、20~30 MPa よりも大きく、インプラント用コーティング膜として十分な値と考えられた。
- (3) リン酸カルシウムコーティングはプラスト Ti-6Al-4V プレート上における骨芽細胞の ALP 活性を有意に向上させることが確認され、骨系分化を誘導していると考えられた。
- (4) リン酸カルシウムコーティングを施したスクリュウ型プラスト Ti-6Al-4V インプラントの家兎大腿骨からの回転除去トルクは、コントロール材よりも大きく、特に非晶質リン酸カルシウムコーティングを施した場合、2 週埋入後にコントロール材との有意差が確認された。これらの結果は、リン酸カルシウムコーティング膜が、チタンインプラントの骨適合性の向上に有効であることを示唆する。

参考文献

- 1) 成島尚之: バイオマテリアル, 25 [4] (2007), 252-260.
- 2) T. Narushima, K. Ueda, T. Goto, H. Masumoto, T. Katsube, H. Kawamura, C. Ouchi and Y. Iguchi: Mater. Trans., 46 (2005), 2246-2252.
- 3) K. Ueda, T. Narushima, T. Goto, T. Katsube, H. Nakagawa, H. Kawamura and M. Taira: Mater. Trans., 48 [3] (2007), 307-312.
- 4) K. Ueda, T. Narushima, T. Goto, M. Taira and T. Katsube: Biomedical Materials, 2 (2007) S160-S166.
- 5) K. A. Gross, C. C. Berndt, P. Stephens and R. Dinnebier: J. Mat. Sci., 33 (1998) 3985-3991.
- 6) K. A. Gross, V. Gross and C. C. Berndt: J. Am. Ceram. Soc., 81 (1998) 106-112.
- 7) Y. Yang, K.-H. Kim and J. L. Ong: Biomaterials, 26 (2005) 327-337.
- 8) L. Postiglione, G. Di Domenico, L. Ramaglia, S. Montgnani, S. Salzano, F. Di Meglio, L. Sbordone, M. Vitale and G. Rossi: J. Dent. Res., 89 (2003) 692-696.
- 9) K. Ogata, S. Imazato, A. Ehara, S. Ebisu, Y. Kinomoto, T. Nakano and Y. Umakoshi: J. Biomed. Mater. Res., 72A (2005) 127-135.

5. 発表 (投稿) 論文

- (1) K. Ueda, T. Narushima, T. Goto, M. Taira, and T. Katsube,
"Fabrication of Calcium Phosphate Films for Coating on Titanium Substrates Heated up to 773 K by RF Magnetron Sputtering and their Evaluations,"
Biomedical Materials, 2 (2007) S160-S166.
- (2) K. Ueda, T. Narushima, T. Katsube, H. Kawamura and T. Goto,
"In Vitro Evaluation of RF Magnetron-sputtered Calcium Phosphate Films on Titanium,"
Key Engineering Materials, 352 (2007), 305-309.
- (3) K. Ueda, T. Narushima, T. Goto, H. Nakagawa, H. Kawamura and T. Katsube,
"In vivo and in vitro Evaluations of Calcium Phosphate Films Coated on Titanium by RF Magnetron Sputtering,"
Ti-2007, Science and Technology, Proc. the 11th World Conference on Titanium (JIMIC-5), (2007), 1477-1480.
- (4) 成島尚之, 上田恭介, 後藤孝, 勝部朝之, 川村仁, 中川浩伸, 平雅之,
"プラスト処理を施した Ti-6Al-4V 合金基板へのリン酸カルシウムコーティングと生体内外評価,"
粉体および粉末冶金, 印刷中.
- (5) 中川浩伸, 勝部朝之, 上田恭介, 栗原淳, 後藤孝, 成島尚之, 川村仁,
"RF マグネトロンスパッタリング法を用いた吸収性薄層リン酸カルシウムコーティングインプラントに関する実験的研究,"
日本顎顔面インプラント学会誌, 投稿中.