

# 溶解性制御型生体活性ガラスコーティングによる チタンインプラントの抗菌機能化

東北大学 大学院工学研究科 上田恭介

## Antibacterial Properties of Titanium Implants via Dissolubility-Controlled Bioactive Glass Coating

Kyosuke Ueda

Department of Materials Processing, Faculty of Engineering, Tohoku University

エタノール溶媒とクエン酸を用いた蒸発誘起自己組織化(EISA)ゾルゲル法により、Ag, Ta 共添加  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  系生体活性ガラス粉末作製プロセスを開発した。Ta 添加により  $\text{SiO}_2$  系ガラスにおいてもその溶解性を抑制することができた。加えて、Ag イオンの溶出量も抑制することができた。チタン基板への NaOH 処理とゾルゲル・ディップ法を組み合わせることにより、密着性の高い Cu 添加  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$  系生体活性ガラスコーティングプロセスを開発した。ゾル組成を変化させることでコーティング膜中の Cu 含有量を制御できた。擬似体液中におけるコーティング膜構成元素の溶解を確認し、Cu の放出に伴う抗菌性も発現した。

We developed a process for synthesizing Ag- and Ta-co-doped  $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$  bioactive glass powders using evaporation-induced self-assembly (EISA) sol-gel method with ethanol solvent and citric acid. The addition of Ta suppressed the dissolution of the  $\text{SiO}_2$ -based glass. Furthermore, the elution of Ag ions was also reduced. We also developed a highly adhesive Cu-doped  $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ -based bioactive glass coating process by combining the NaOH treatment of a titanium substrate with the sol-gel dip-coating method. By varying the sol composition, the Cu content in the coating film could be controlled. The dissolution of coating film constituents in simulated body fluid was confirmed, and antibacterial properties were observed due to the release of Cu ions.

### 1. はじめに

世界的な高齢者人口の増加に伴い、骨や歯などの硬組織疾患も増加している。硬組織は運動機能や食生活の基盤を支えており、生活の質(QOL)や健康寿命に直結する重要な組織である。これらの疾患に対しては、人工関節や歯科用インプラントといった硬組織代替デバイスによる治療が有効であり、症例数は年々増加している。人工関節やボーンプレートのような硬組織代替デバイスにはチタンが用いられている。これはチタンが優れた耐食性や強度・延性バランスを持つだけでなく、他の金属にはない骨との直接接合性—オッセオインテグレーション<sup>1)</sup>—を有しているためである。

一方、デバイス表面に細菌が付着すると埋入後に感染症を引き起こし、デバイス周囲の骨融解や骨破壊によるデバイスの緩みを招くことがある。特に歯科用インプラントは皮膚

(口腔粘膜)を貫通する経皮デバイスであり、かつ口腔内には多くの細菌群が存在するため、埋入時のみならず埋入後も細菌付着による感染症のリスクに常に晒されている。そのため、細菌の付着および増殖の段階で抑制することが重要であり、デバイス表面への抗菌性付与は有効な対策である。さらに骨組織には食細胞が少なく生体防御機構が弱いことに加え、加齢に伴い免疫機能や骨形成能が低下することから、デバイスの固定には時間を要する場合がある。そのため、デバイス埋入術の成功には、抗菌性と骨形成能の双方を備えることが重要である。

現在、チタン製インプラントの骨適合性向上を目的として、骨の無機成分であるリン酸カルシウム、特にハイドロキシアパタイト(HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )コーティングが実用化されている。しかし、HApは生体内で安定であるためコーティング膜は溶解すること無く、骨はコーティング膜を介してチタン製インプラントと結合することになり、チタンが有するオッセオインテグレーションを活用できていない。近年では、マイクロレベルの表面形態制御による骨形成促進が注目されており、インプラント表面の精緻な形状制御が行われている。

$\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5$ 系45S5として1969年にHenchらが開発したバイオガラス<sup>®</sup>は、生体内においてガラス構成元素イオンを放出(溶解)することで表面にリン酸カルシウム(アパタイト)を形成し、異物と見なされないで骨と結合する画期的な材料である<sup>2)</sup>。「生体内溶解性」というコンセプトは、従来のアルミナ等の「生体不活性」セラミックスに対してゲームチェンジングな発想であり、「生体活性」ガラス(セラミックス)として新たな分野を切り開いた。国内でも小久保らが一部を結晶化させたアパタイト-ウォラストナイト(A-W)ガラス<sup>®</sup><sup>3)</sup>を開発する等、多くの発展を遂げた分野である。

著者らはこれまで、生体内溶解性を有するCa-P-O系非晶質リン酸カルシウム(ACP)に着目し、RFマグネトロンスパッタリング法による元素添加ACPコーティングに関する研究を行ってきた<sup>4-6)</sup>。ACPへの元素添加を検討する中で、ACP膜の溶解性制御にはTa添加が有効であること、ACPにAgを固溶させることでACPの徐放に伴いAgイオンを放出し抗菌性を発現させることを見出した<sup>7)</sup>。そこで本研究では、生体活性ガラス構成元素であるSiを含むSi-Ca-O系に着目し、抗菌性元素添加による抗菌性発現およびTa添加による溶解性制御を検討した。プロセスとしては、低温プロセスであり元素の添加が容易なゾルゲル法に着目し、ゾルゲル法での合成が行われているSi-Ca-P-O系生体活性ガラスである58S( $60\text{SiO}_2\text{-}36\text{CaO}\text{-}4\text{P}_2\text{O}_5$ (mol%))へのAg, Ta共添加プロセス開発を目的とした。チタンへの生体活性ガラスコーティングには、複雑形状の基板にもコーティング可能なゾルゲル・ディップ法を用い、Cu添加 $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ 系生体活性ガラスコーティングプロセスを検討した。

## 2. 実験方法

### 2.1 ゾルゲル法によるAg, Ta共添加 $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$ 系生体活性ガラス合成

58Sはゾルゲル法による合成が一般的であるが、結晶化しやすい組成である。そのため、クエン酸添加による結晶化抑制を検討<sup>8)</sup>した。本研究ではAgを添加するが、塩化物イオン存在下ではAgClを析出する。そのため塩化物を原料として用いることができない。そこで、Ta原料としてペンタエトキシタンタル( $\text{Ta}(\text{OC}_2\text{H}_5)_5$ )を用いた。しかし、 $\text{Ta}(\text{OC}_2\text{H}_5)_5$ は水との高い反応性を有することから、非水溶媒系であるエタノールを溶媒として用い、

蒸発誘起自己組織化法(EISA)<sup>9)</sup>による合成を試みた。

58S (60SiO<sub>2</sub>-36CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)を基本組成とし、そこにAgおよびTaを添加した60SiO<sub>2</sub>-36CaO-4P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-XAg-YTa(mol) (0 ≤ X ≤ 15, 0 ≤ Y ≤ 20)組成で試料を合成した。エタノール(溶媒)、0.05 M 硝酸(HNO<sub>3</sub>)(触媒)、クエン酸一水和物(無添加系、添加系)混合溶液に、30min 間隔でSi原料:テトラエトキシシラン(TEOS, Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>)、P原料:リン酸トリエチル(TEP, PO(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>)、Ta(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>5</sub>、Ca原料:硝酸カルシウム四水和物(Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)、Ag原料:硝酸銀(AgNO<sub>3</sub>)をそれぞれ所定の分量で添加した。24h 攪拌後、いずれの条件において透明なゾルが得られた。298K, 24hにてエイジング、313K, 168hにて乾燥させ、ゲル化を完了させた。得られたゲルを粉碎し、大気中 873K, 24h(クエン酸添加系)または6h(クエン酸無添加系)にて焼成し、再度粉碎することで粉末試料を得た。

粉末試料は、SEM-EDX、XRD、FTIRで分析した。溶解性の評価は、粒径38-100μmの粉末(12.5mg)を用い、Tris-HNO<sub>3</sub>溶液(50mL)への浸漬試験により行った。溶液中イオン濃度をICP-AES、ICP-MSにより分析した。

## 2.2 ゾルゲル・ディップ法によるチタン基板へのCu添加SiO<sub>2</sub>-CaO系生体活性ガラスコーティング

ゾルゲル法は組成および形態制御性に優れ、元素添加も容易であるため、ガラスやセラミックス粉末の合成に用いられている。加えて、ディップ法と組み合わせることで、複雑形状の基板へのコーティングも可能である。一方、金属基板上へのゾルゲル・ディップコーティング膜の密着力は低い。そこで本研究では、基板であるチタンの骨形成能向上プロセスとして実用化されているNaOH処理によりTi-Na-OHゲル層を作製し<sup>10)</sup>、その上にディップ法により生体活性ガラスコーティングを施した。Fig.1にNaOH処理(333Kの10M NaOH溶液に24h浸漬)後、873Kにて焼成したチタンの表面および断面SEM像を示す。微細な凹凸を有しており、膜厚は0.8μm程度であった。

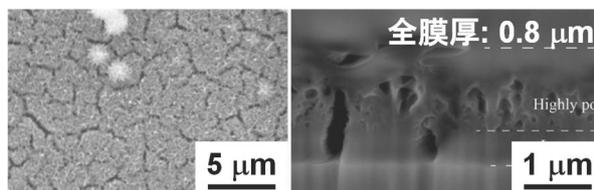


Fig.1 Surface and cross-section of titanium substrate after NaOH treatment and calcination at 873K.

抗菌元素としてCuに着目した。コーティング材として、二元系生体活性ガラスである80SiO<sub>2</sub>-20CaO(mol%)のCaOをCuOで置換した80SiO<sub>2</sub>-(20-x)CaO-xCuO(mol%, x = 0, 1, 5, 10)組成を検討した。原料にはTEOS、硝酸カルシウム四水和物および硝酸銅三水和物(Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O)を、溶媒には水およびエタノールを、触媒として0.05M硝酸をそれぞれ用い、所定の時間攪拌してゾルを作製した。得られたゾル中にNaOH処理チタン基板を浸漬させ、各引抜速度でディップコーティング後、873Kにて焼成した。得られたコーティング膜はFIB-SEM、薄膜XRD、GD-OESにて分析した。コーティング膜と基板との密着力は、ピン引抜法により評価した。溶解性試験として、Tris-HNO<sub>3</sub>溶液中への浸漬後、溶液中への溶出イオン濃度をICP法により測定した。抗菌性試験として、大腸菌を用いたシェーク法により3h共培養後の生菌数を測定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 ゼルゲル法によるAg, Ta共添加SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>系生体活性ガラス合成プロセス開発

クエン酸無し、Ag, Ta 無添加試料(58S組成)において、XRD分析からはHAp相が検出されガラスを得ることができなかった。Fig.2に、クエン酸無しの条件で作製したAg, Ta共添加粉末のXRDパターンを示す。Ta無添加の3Ag0Taでは結晶質相としてHAp相および金属Ag相が、多量のTaを添加した3Ag15TaではTa<sub>2</sub>O<sub>5</sub>相が検出された。一方、3Ag9Ta、3Ag12Taの条件において、結晶質相由来のピークの無い非晶質相、すなわちAg, Ta共添加ガラスを作製することができた。Ag添加量、Ta添加量で整理した、クエン酸無しおよび有り系の生成相マップをFig.3に示す。クエン酸無し系ではAg: 0 < X < 4.5 molかつTa: 6 < Y < 13.5 molの条件でガラス相が得られた。クエン酸有り系では、Ag, Ta無添加58S組成において非晶質単相となった。さらに、クエン酸添加によりHAp以外の結晶相形成も抑制され、広い組成範囲でAg, Ta含有58Sガラスが得られた。特にAg:X = 6 mol、Ta:Y = 12 molは、これまで報告されている58SガラスへのAg添加量<sup>11)</sup>よりも多く、新たな組成のガラスを作製できた。

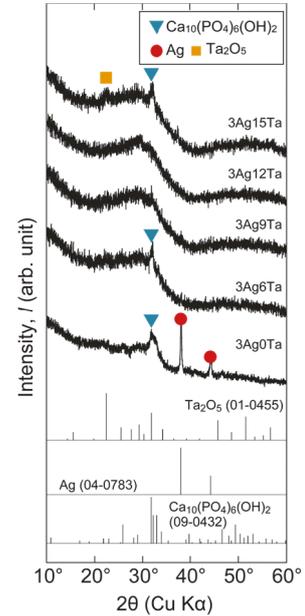


Fig.2 XRD patterns of 3AgYTa powders synthesized without citric acid.

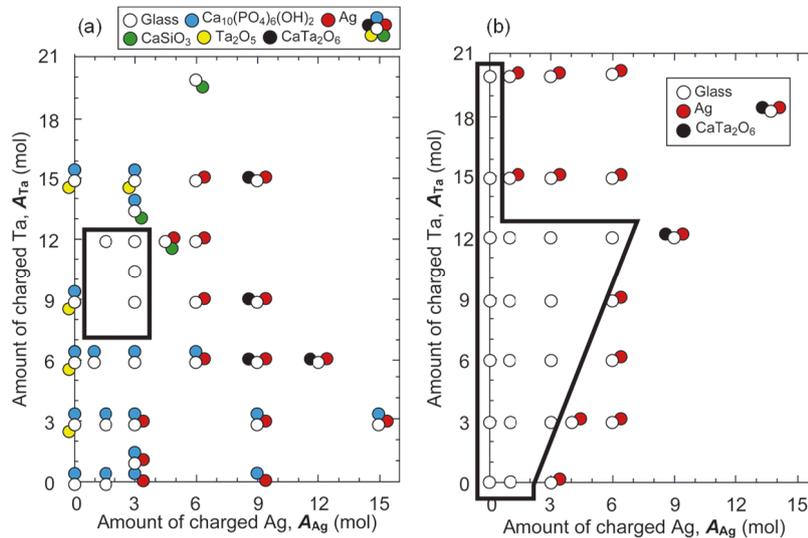


Fig.3 Phase maps of powders synthesized (a) without and (b) with citric acid addition as functions of amounts of Ag and Ta added. Glass formation regions are represented by the black frame.

Fig.4に、各試料粉末のTris-HNO<sub>3</sub>溶液への浸漬時間と溶出したSiおよびAgイオン濃度の関係を示す。溶出SiおよびAgイオン濃度は時間とともに増加した。Ta添加量の増加に伴い溶出Siイオン濃度は減少していることから、Ta添加によりSiO<sub>2</sub>系ガラスの溶解性も抑制できることを明らかにした。FTIRスペクトルからはTa添加量の増加に伴い

Si-O-Ta 結合の形成が確認され、この結合によってガラスが安定化されたと考察した。加えて、Ta 添加により溶出 Ag イオン濃度も抑制していることから、Ag イオン放出量も制御できることを明らかにした。

### 3.2 ゼルゲル・ディップ法によるチタン基板へのCu添加SiO<sub>2</sub>-CaO系生体活性ガラスコーティングプロセス開発

コーティング膜組成を検討するために、ゾルゲル法により 80SiO<sub>2</sub>-(20-x)CaO-xCuO (mol%) 組成の粉末を合成した。得られた粉末は、 $x = 10$  (mol%) までは非晶質(ガラス)相であることが分かった。よって、コーティング膜の作製には 80SiO<sub>2</sub>-20CaO から 80SiO<sub>2</sub>-10CaO-10CuO ( $x = 10$ ) 組成(以下、 $x = 0 : 0\text{Cu}$ ,  $x = 10 : 10\text{Cu}$  と表記)のゾルを用いることとした。

Fig.5 に 1Cu ゼル作製時の溶媒の水 / エタノール比およびディップコーティング時の引抜速度をそれぞれ変化させて、1 回ディップコーティングを行って作製した膜の表面および断面 SEM 像を示す。なお、焼成条件は大気中 873K、10min とした。溶媒の水 / エタノール比 20/80 (mol%)、ディップコーティング時の引抜速度  $0.9\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$  の条件(図中赤枠)において、基板全体にクラックの無いコーティング膜を作製することができた。ピン引抜法により基板との密着力を評価したところ、最適条件で作製したコーティング膜は 40MPa 以上の密着力を有していた。ISO 13779-4 において、歯科インプラント用リン酸カルシウムコーティング膜の密着力は 25MPa 以上であること、と規定されているが、それよりも高い値であり、十分な値であると判断した。

1Cu ゼルを用い、1 回のディップコーティング後に 873K にて焼成を行った結果、焼成時間 10min までは、NaOH 処理により作製された Na<sub>2</sub>Ti<sub>6</sub>O<sub>13</sub> 相に加え、非晶質相が検出された。すなわち、Na-Ti-O 層の上に 1Cu ガラス層が形成されていることを示唆する。一方、焼成時間 30min 以上では非晶質相は見られず、CaTiO<sub>3</sub> 相が検出された。長時間の焼成によりガラス層中の CaO と基板(Ti)が反応したためと考えられる。

ディップコーティング回数を増加させることでガラス層厚さも増加し、膜厚はディップコーティング回数により制御できることが分かった。各ディップコーティング間の中間焼成の有無も検討した。中間焼成無しの方が、中間焼成ありよりもコーティング膜は平滑であり、基板との密着力も高いことが分かった。Fig.6 に、1Cu ゼルに 2 回のディップを行って作製したコーティング膜(中間焼成無し、最終焼成 10min)の断面 STEM 像を示す。Ti の分布を見ると、Ti 基板の上に微細なポアを有する層と NaOH 処理により作製された網目構造を有する層が存在することが分かる。Si は表面側の網目構造部分からのみ検出

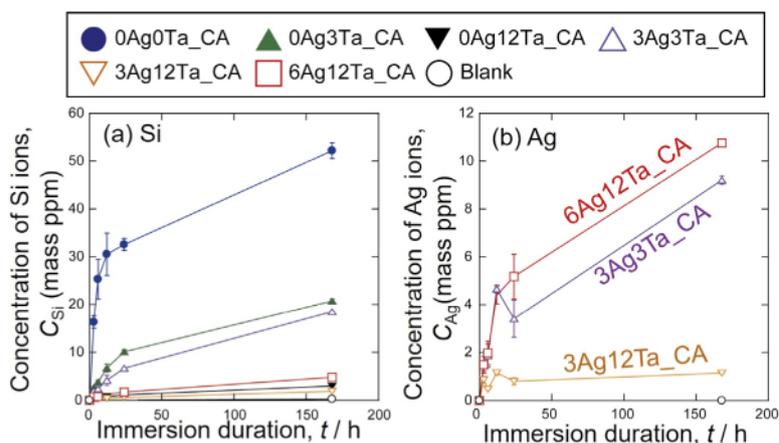


Fig.4 Change in concentration of (a) Si and (b) Ag ions in Tris-HNO<sub>3</sub> solution with immersion duration.

されたことから、ゾルは網目構造の中まで侵入し、機械的に結合していることが分かる。一方、CaはTiが検出された網目構造および微細なポアを有する層の両方から検出された。長時間焼成のXRD分析からは $\text{CaTiO}_3$ 相が検出されたが、10minの焼成においても、ガラス中のCaOと基板であるTiが反応していたと予想される。加えて、Cuは網目構造の基板側に粒子状で存在していることが分かった。XPS分析からは、このCuが金属Cuもしくは $\text{Cu}^{1+}$ (CuO)のいずれかであることが分かった。以上の結果から、NaOH処理チタン上への $\text{SiO}_2$ -CaO-CuOガラスコーティング機構が考えられる。

1. NaOH処理により基板の上に網目構造が形成される。
2. ディップコーティング時にゾルが網目構造まで侵入する。
3. 焼成時にガラス中のCaOと基板のTiが反応し微細なポアを有するCa-Ti-O層を形成する
4. その際に、Cuも網目構造の基板側に濃化する。

抗菌性発現の観点から、Cuの濃化は均一なCu放出を妨げることが予想される。そこで、1回目のディップコーティングではCuを含まない0Cuゾルを用い、2回目のディップコーティングでは1Cuゾルを用いてコーティング膜を作製した。得られたコーティング膜の表面・断面SEM像をFig.7に示す。SEM像からは均一な表面形態をしていることが分かる。GD-OESによる膜の断面プロファイル測定からは、Cuは膜の表面のみに存在していることが分かった。その領域においては、SiやCaも濃化していることから、2回目のディップコーティング膜は表面のみに存在することが示唆された。

コーティング膜の溶解性評価として、Tris- $\text{HNO}_3$ 溶液への浸漬試験を行った。Fig.8に、1回目0Cu, 2回目0~10Cuのディップコーティングを行い作製したコーティング膜(0Cu\_0Cu~0Cu\_10Cu)の、Tris- $\text{HNO}_3$ 溶液5日間浸漬後の各元素溶出濃度を示す。コーティング膜の構成元素であるSi, Ca, Cuいずれも溶出していることが分かる。特に、2

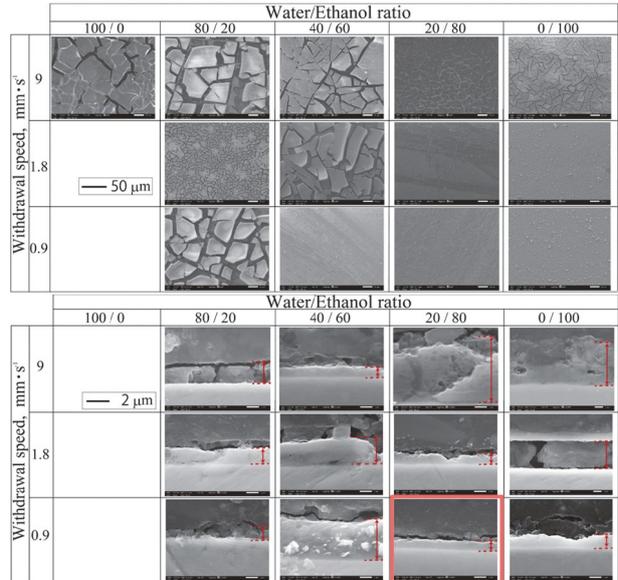


Fig.5 Surface and cross-sectional SEM images of coating films formed with various sol compositions and withdrawal speeds during dip coating.

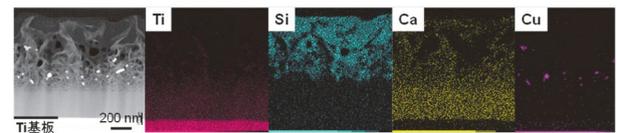


Fig.6 Cross-sectional STEM images of coating films formed two-times dip coating with the same sol composition.

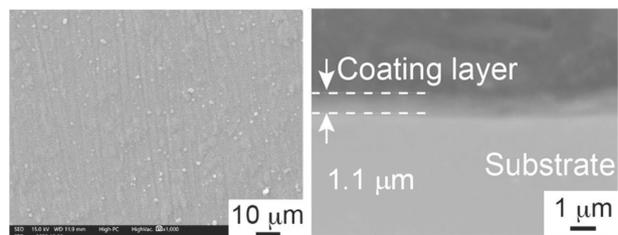


Fig.7 Surface and cross-sectional SEM images of the coating films formed with two-times dip coating using 0Cu for the 1<sup>st</sup> and 1Cu for the 2<sup>nd</sup> dipping.

回目ディップコーティング時の Cu 濃度の増加に伴い Cu 溶出濃度も増加していた。これらの試料について、大腸菌を用いたシェーク法による抗菌性試験を行ったところ、0Cu\_10Cu 試料について、生菌数は減少しており、抗菌性を示すことが示唆された。

以上の結果から、骨形成を促進する Si, Ca イオンおよび抗菌性元素である Cu を放出する、基板と高い密着力を有する生体活性ガラスコーティング膜作製プロセスを構築することができた。コーティング膜の完全溶解後においては、Ti-Na-O 層が露出するが、この層は優れた骨形成能を有しており、埋入初期には抗菌性を示しつつ、埋入後期では骨形成能を促進・維持する表面を創製できたと言える。

#### 4. 結論

エタノール溶媒とクエン酸を用いた蒸発誘起自己組織化(EISA)ゾルゲル法により、Ag, Ta 共添加 SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>系生体活性ガラス粉末作製プロセスを開発した。Ta 添加により、SiO<sub>2</sub>系ガラスにおいてもその溶解性を抑制できることを明らかにした。加えて、Ag イオンの溶出量も抑制することができ、抗菌性維持期間を制御できることが示唆された。

チタン基板への NaOH 処理とゾルゲル・ディップ法を組み合わせることにより、密着性の高い Cu 添加 SiO<sub>2</sub>-CaO 系生体活性ガラスコーティングプロセスを開発した。ゾル組成を変化させることでコーティング膜中の Cu 含有量を制御できた。擬似体液中においてコーティング膜構成元素の溶解を確認し、Cu の放出に伴う抗菌性を発現した。

#### 5. 謝辞

本研究は、公益財団法人日本板硝子材料工学助成会、令和4年度(第44回)研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝いたします。

#### 6. 参考文献

- 1) P.I. Brånemark, J. Prosthet. Dent., 50 (1983) 399–410.
- 2) L.L. Hench, R.J. Splinter, W.C. Allen, T.K. Greenlee. J. Biomed. Mater. Res., 2 (1971) 117–141.
- 3) T. Nakamura, T. Yamamuro, S. Higashi, T. Kokubo, S. Ito, J. Biomed. Mater. Res., 19 (1985) 685–698.
- 4) T. Narushima, K. Ueda, G. Goto, H. Masumoto, T. Katsube, H. Kawamura, C. Ouchi, Y. Iguchi, Mater, Trans, 46 (2005) 2246–2252.
- 5) K. Ueda, T. Narushima, T. Goto, M. Taira, T. Katsube, Biomed. Mater., 2 (2007) S160–S166.
- 6) S. Yokota, N. Nishiwaki, K. Ueda, T. Narushima, H. Kawamura, T. Takahashi, Implant

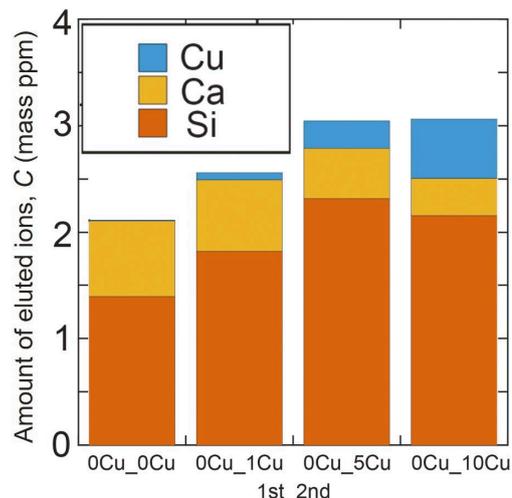


Fig.8 Amount of eluted ions from the coating films after immersion in Tris-HNO<sub>3</sub> solution for 5 days.

- Dentistry, 23 (2014) 343–350.
- 7) J. Wu, K. Ueda, T. Narushima, *Mater. Sci. Eng. C*, 109 (2020) 110599.
  - 8) J.H. Lopes, O.M.V.M. Bueno, I.O. Mazali, C.A. Bertran, *Mater. Sci. Eng. C*, 97 (2019) 669–678.
  - 9) Z. Tabia, S. Akhtach, K.E. Mabrouk, M. Bricha, K. Nouneh, A. Ballamurugan, *Biomed. Glasses*, 6 (2020) 10–22.
  - 10) T. Kokubo, F. Miyaji, H.-M. Kim, T. Nakamura, *J. Am. Ceram. Soc.*, 79 (1996) 1127–1129.
  - 11) A.M. El-Kady, A.F. Ali, R.A. Rizk, M.M. Ahmed, *Ceram. Int.*, 38 (2012) 177–188.