

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2012 年 4 月 26 日(26.04.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/053035 A1

- (51) 国際特許分類:
A61L 27/00 (2006.01) A61F 2/28 (2006.01)
A61C 8/00 (2006.01) A61F 2/30 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/006247
- (22) 国際出願日: 2010 年 10 月 21 日(21.10.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目 3 番 2 号 Hiroshima (JP). トーヨーエイトック株式会社(Toyo Advanced Technologies Co., LTD.) [JP/JP]; 〒7348501 広島県広島市南区宇品東 5 丁目 3 番 3 8 号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 牧平清超 (MAKIHARA, Seichou) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 二川浩樹(NIKAWA, Hiroki) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 峯裕一(MINE, Yuichi) [JP/JP]; 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目 2 番 3 号国立大学法人広島大学大学院医歯薬学総合研究科内 Hiroshima (JP). 岡本圭司(OKAMOTO, Keishi) [JP/JP]; 〒7348501 広島県広島市南区宇品東 5 丁

目 3 番 3 8 号 トーヨーエイトック株式会社内 Hiroshima (JP). 阿部義紀(ABE, Yoshinori) [JP/JP]; 〒7348501 広島県広島市南区宇品東 5 丁目 3 番 3 8 号 トーヨーエイトック株式会社内 Hiroshima (JP). 中谷達行(NAKATANI, Tatsuyuki) [JP/JP]; 〒7348501 広島県広島市南区宇品東 5 丁目 3 番 3 8 号 トーヨーエイトック株式会社内 Hiroshima (JP). 新田祐樹(NITTA, Yuki) [JP/JP]; 〒7348501 広島県広島市南区宇品東 5 丁目 3 番 3 8 号 トーヨーエイトック株式会社内 Hiroshima (JP).

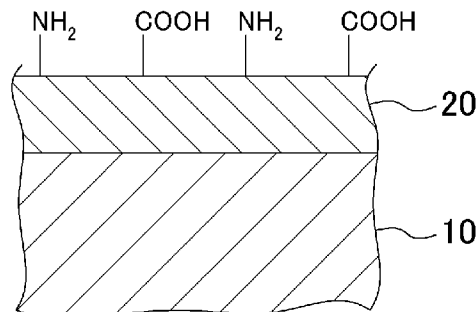
- (74) 代理人: 前田弘, 外(MAEDA, Hiroshi et al.); 〒5410053 大阪府大阪市中央区本町 2 丁目 5 番 7 号 大阪丸紅ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

[続葉有]

(54) Title: IMPLANT MATERIAL, METHOD FOR PRODUCING THE SAME, AND METHOD FOR IMPROVING COMPATIBILITY WITH OSTEOCYTES

(54) 発明の名称: インプラント用材料、その製造方法及び骨細胞との親和性向上方法

[図1]



(57) Abstract: In the present invention an implant material comprises a substrate (10) and a carbonaceous thin film (20) formed on the surface of the substrate (10). The carbonaceous thin film (20) has at least one of either functional groups containing oxygen or functional groups containing nitrogen. The percentage of functional groups containing oxygen is 4% or less, and the abundance ratio of functional groups containing nitrogen to functional groups containing oxygen is no more than 10.

(57) 要約: インプラント用材料は、基材 10 と、基材 10 の表面に形成された炭素質薄膜 20 とを備えている。炭素質薄膜 20 は、酸素を含む官能基及び窒素を含む官能基の少なくとも一方を有する。酸素を含む官能基の存在比は 4 % 以下であり、窒素を含む官能基の存在比／酸素を含む官能基の存在比は 10 以下である。

WO 2012/053035 A1



GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

インプラント用材料、その製造方法及び骨細胞との親和性向上方法

技術分野

[0001] 本開示は、インプラント用材料、その製造方法及び骨細胞との親和性向上方法に関し、特に、人工歯根及び義歯等の骨細胞との親和性が必要な材料及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 現在、人工歯根等をはじめとする生体内に埋め込むインプラントの基材としてチタン及びチタン合金が生体適合性、耐食性及び機械的強度に優れているという理由から使用されている。しかし、チタン及びチタン合金からなる人工歯根を直接顎骨に固定した場合には、顎骨の骨組織再生の代謝バランスが崩れ、人工歯根のゆるみが生じたり、顎骨破壊が生じたりするおそれがあることが知られている。

[0003] このような人工歯根の埋め込みが失敗する原因として、人工歯根の周囲において破骨細胞が誘導され、骨破壊が生じるインプラント周囲炎がある。インプラント周囲炎は、細菌感染等の微生物刺激及び過度の咬合力等の機械的刺激に起因する場合もあるが、人工歯根自体による破骨細胞の活性化によっても生じる。

[0004] 人工歯根による破骨細胞の活性化は、インプラント初期埋入時にも発生する。初期埋入時に出現した破骨細胞は、インプラントのオッセオインテグレーションを妨げ、インプラントが失敗に至る原因となる。

[0005] このような破骨細胞の活性化は、チタン及びチタン合金が骨細胞と十分な親和性を有していないことにより生じると考えられる。骨細胞との親和性が不十分な材料の表面では、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化が促進され、これにより骨破壊が生じてしまう。チタン及びチタン合金は比較的骨細胞との親和性が高い材料であることが知られている。しかし、親和性が十分とは

いえず、埋め込み対象者の顎骨の状態及び口腔内の状態等によって人工歯根の埋め込みが失敗してしまう。

- [0006] 人工歯根等のインプラントと骨細胞との親和性を向上させる方法としてダイヤモンド様薄膜（DLC膜）による被覆が試みられている（例えば、特許文献1を参照。）。DLC膜は、炭素を主成分とし、表面が平滑で不活性であるため生体との適合性に優れている。このため、骨細胞との親和性にも優れていると考えられる。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：特開2002-204825号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] しかしながら、インプラントと骨細胞との親和性は、破骨細胞の誘導抑制だけでなく、骨芽細胞への分化の促進という観点からも検討する必要がある。破骨前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制できたとしても、未熟骨芽細胞から骨芽細胞への分化が抑制されたり、骨芽細胞の増殖が阻害されたりすると、インプラントのオッセオインテグレーションは促進されない。これまで、DLC膜が骨芽細胞への分化にどのような影響を与えるかについてはほとんど知られていない。

- [0009] 本開示は、本願発明者らの検討により得られた骨芽細胞への分化にDLC膜が与える影響に関する知見に基づき、破骨細胞への誘導を抑制すると共に、骨芽細胞への分化を促進するインプラント用材料を実現できるようにすることを目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 具体的に、本開示に係るインプラント用材料は、基材と、基材の表面に形成された炭素質薄膜とを備え、炭素質薄膜は、酸素を含む官能基及び窒素を含む官能基の少なくとも一方を有し、酸素を含む官能基の存在比は4%以下

であり、窒素を含む官能基の存在比を酸素を含む官能基の存在比により除した値は10以下である。

- [0011] 本願発明者らの検討によれば、酸素を含む官能基及び窒素を含む官能基の少なくとも一方を有し、酸素を含む官能基の存在比が4%以下であり、窒素を含む官能基の存在比／酸素を含む官能基の存在比が10以下である炭素質膜の表面において骨芽細胞への分化が生じやすく、破骨細胞への分化が生じにくくなる。このため、本開示のインプラント用材料は、破骨細胞への分化を抑制できると共に、骨芽細胞への分化を促進することができるため、骨組織との親和性に優れたインプラント用材料を実現できる。
- [0012] 本開示のインプラント用材料において、基材は、金属とすればよい。また、基材はチタン又はチタン合金からなることが好ましい。
- [0013] 本開示のインプラント用材料において、基材は、人工歯根、義歯、歯冠修復物、人工骨又は人工関節とすればよい。
- [0014] 本開示のインプラント用材料において、炭素質膜の表面におけるゼータ電位は、 -50 mV 以上且つ 0 mV 未満とすればよい。
- [0015] 本開示に係るインプラント用材料の製造方法は、基材を準備する工程（a）と、炭化水素を含むガスを用いた化学気相堆積法により、基材の表面に炭素質膜を形成する工程（b）と、基材の表面に形成された炭素質膜の表面のダングリングボンドが安定するまで基材を真空状態に保持する工程（c）とを備え、炭素質膜における酸素を含む官能基の存在比を4%以下とし、窒素を含む官能基の存在比を酸素を含む官能基の存在比により除した値が10以下とする。
- [0016] 本開示のインプラント用材料の製造方法は、工程（c）よりも後に、炭素質膜に塩基性窒素含有化合物のプラズマを照射する工程（d）をさらに備えていてもよい。
- [0017] 本開示に係るインプラント用材料の骨細胞との親和性向上方法は、基材の表面に酸素を含む官能基及び窒素を含む官能基の少なくとも一方を有する炭素質膜を形成し、酸素を含む官能基の存在比は4%以下とし、窒素を含む官

能基の存在比を酸素を含む官能基の存在比により除した値を10以下とすることを特徴とする。

発明の効果

[0018] 本開示に係る炭素質薄膜及びその製造方法によれば、破骨細胞への誘導を抑制すると共に、骨芽細胞への分化を促進するインプラント用材料を実現できる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]例示のインプラント用材料を示す断面図である。

[図2]基材の表面状態と骨芽細胞の増殖との関係を示すグラフである。

[図3]基材の表面状態と骨芽細胞への分化との関係を示すグラフである。

[図4]基材の表面状態と骨芽細胞への分化との関係を示すグラフである。

[図5]基材の表面状態と破骨細胞への分化との関係を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0020] 本実施形態においてインプラントとは、人工歯根だけでなく、義歯、歯冠修復材料及び義歯修復材料等を含む。また、歯科用だけでなく、生体内に埋め込まれる、人工骨及び人工関節等の骨細胞と親和性が必要とされる器具を含む。

[0021] 炭素質膜とは、ダイヤモンド様膜（DLC膜）に代表される sp^2 炭素－炭素結合（グラファイト結合）及び sp^3 炭素－炭素結合（ダイヤモンド結合）を含む膜である。DLC膜のようなアモルファス状態の膜であっても、ダイヤモンド膜のような結晶状態の膜であってもよい。通常、 sp^2 炭素－水素結合及び sp^3 炭素－水素結合を含んでいるが、水素は必須の構成要素ではない。また、シリコン（Si）又はフッ素（F）等が添加されていてもよい。

[0022] 図1は、本実施形態に係るインプラント用材料の断面構成を示している。基材10の表面に膜厚が0.005 μ m～3 μ m程度の炭素質膜20が形成されている。炭素質膜20の表面には、カルボキシル基に代表される酸素を含む官能基及びアミノ基に代表される窒素を含む官能基の少なくとも一方が存在している。本実施形態において、炭素質膜20における酸素を含む官能

基の存在比は4%以下である。また、窒素を含む官能基の存在比を酸素を含む官能基の存在比で割った値は10以下である。なお、後で詳細に説明するが、酸素を含む官能基の存在比とは、X線光電子分光により求めた酸素の1s (O 1s) ピークのピーク面積を炭素の1s (C 1s) ピークのピーク面積で割った値であり、窒素を含む官能基の存在比とは、窒素の1s (N 1s) ピークのピーク面積を炭素の1s (C 1s) ピークのピーク面積で割った値である。

[0023] インプラント用材料は、骨細胞との親和性が非常に重要である。骨細胞との親和性とは、未熟骨芽細胞から骨芽細胞への分化の促進及び骨芽細胞の増殖の促進と、破骨前駆細胞から破骨細胞への誘導の抑制との両方の観点から評価する必要がある。

[0024] 基材の表面に炭素質膜を形成し且つ炭素質膜の表面におけるカルボキシル基等の酸素を含む官能基の存在比を4%以下とし且つアミノ基等の窒素を含む官能基の存在比をカルボキシル基等の酸素を含む官能基の存在比で割った値を10以下とすることにより、骨芽細胞への分化の促進及び骨芽細胞の増殖の促進と、破骨細胞への誘導の抑制とを実現することができることを本願発明者らは見出した。

[0025] 酸素を含む官能基の存在比を4%以下とし且つ窒素を含む官能基の存在比／酸素を含む官能基の存在比を10以下とした場合に、未熟骨芽細胞から骨芽細胞への分化が促進されると共に、破骨細胞への誘導が抑制される理由は明確ではない。しかし、酸素を含む官能基の存在比が4%以下で窒素を含む官能基の存在比／酸素を含む官能基の存在比が10よりも大きい場合に及び窒素を含む官能基の存在比／酸素を含む官能基の存在比が10以下で酸素を含む官能基の存在比が4%よりも高い場合には、骨芽細胞は増殖するが骨芽細胞への分化の促進は認められない。このことから、骨細胞の親和性は炭素質膜の表面におけるカルボキシル基とアミノ基とのバランスによって制御されることが考えられる。

[0026] 歯科インプラントの治療において、血小板が治療成績に大きな影響を与え

ることが知られている。例えば、インプラントの埋入前に、患者の血液より得た血小板を含む血漿(Platelet-Rich Plasma)にインプラントを浸漬し、インプラントの表面に血小板を吸着させると治療がより確実に行われることが知られている。一方、炭素質膜の表面におけるアミノ基の存在比及びカルボキシル基の存在比は、炭素質膜の表面のゼータ電位に影響を与え、炭素質膜の表面におけるゼータ電位ゼータ電位の値が -50 mV 以下の場合にはほとんど血小板が吸着しないことが知られている。酸素を含む官能基であるカルボキシル基の存在比が4%以下で且つ窒素を含む官能基であるアミノ基の存在比／酸素を含む官能基であるカルボキシル基の存在比が10以下の場合におけるゼータ電位の値は -60 mV 程度 $\sim 0\text{ mV}$ 程度となる。このことから、炭素質膜の表面のゼータ電位は、 -50 mV 以上且つ 0 mV 以下であることが好ましい。

[0027] 本実施形態のインプラント用材料は基材の表面を炭素質膜により覆うため、基材がどのような材質であっても優れた骨組織との親和性を示す。このため、基材は強度等の特性を満たしていればどのような材質であってもよい。例えば、チタン及びチタン合金等をはじめとする金属、樹脂又はセラミックス等を用いることができる。また、人工歯根をはじめ、義歯、人工骨及び人工関節等の骨細胞と親和性が必要とされる種々のインプラントに適用することが可能である。

[0028] 炭素質膜は、化学気相堆積法(CVD法)により形成すればよい。またCVD法以外の、スパッタ法、プラズマイオン注入法、イオンプレーティング法、アークイオンプレーティング法、イオンビーム蒸着法又はレーザーアブレーション法等により形成してもよい。

[0029] 炭素質膜の成膜中及び成膜後にチャンバ内に存在する酸素及び水分は、炭素質膜の表面にカルボキシル基等の酸素を含む官能基を生成する原因となる。このため、酸素を含む官能基の存在比を4%以下とする場合には、成膜の際に高純度の原料ガスを用い、さらに吸着脱水装置等を介して原料ガスを供給することが好ましい。また、成膜完了後における酸素との結合を抑制する

ために、成膜完了直後は一定時間真空中に保持し、炭素質膜のダングリングボンドを安定化することが好ましい。例えばプラズマCVD法により炭素質膜を成膜する場合、プラズマ生成に用いるアルゴンガスの純度を99.9999%以上とし、成膜終了後は基板の温度が常温となった後、少なくとも10分間、好ましくは60分以上真空中に放置すればよい。

[0030] 炭素質膜へアミノ基等の窒素を含む官能基を導入する必要がある場合には、塩基性窒素含有化合物のプラズマを炭素質膜に照射すればよい。塩基性窒素含有化合物としては、アンモニアをはじめとして、一般式が $\text{NR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ により示される有機アミン類（但し、 R_1 、 R_2 及び R_3 は水素、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{C}_3\text{H}_7$ 又は $-\text{C}_4\text{H}_9$ であり、 R_1 、 R_2 及び R_3 は互いに同一であっても、異なってもよい。）又はベンジルアミン及びその2級、3級アミン等を用いればよい。但し、アンモニアがコスト、取り扱いの容易さから好ましい。なお、プラズマ照射時におけるチャンバ内の到達真空度は、0.01Pa程度～500Pa程度とすればよい。但し、到達真空度が高い方が、空気中の酸素の影響を受けることがなく好ましく、 5×10^{-3} Pa程度としてもよい。

[0031] 炭素質膜に酸素を含む官能基をさらに導入する必要がある場合には、酸素プラズマ又は酸素を含むガスのプラズマ等を照射すればよい。また、アンモニア等のプラズマを照射する際の到達真空度を低くしてもよい。

[0032] なお、プラズマ照射装置は、どのような構造のものを用いてもよい。また、放電形式についても、どのようなものを用いてもよく、例えば平行平板方式、アフターグロー放電方式、電磁誘導型及び有磁場型等を用いればよい。プラズマ照射条件は特に限定されない。例えば、プラズマ発生用の電源としては、商用周波数（50Hz又は60Hz）、高周波（ラジオ周波数）又はマイクロ波領域等の各種の電源周波数を用いることができる。さらに、原料ガスの圧力制御方法や供給構造についても特に限定するものではない。しかし、であまりエッチングレートが大きいプラズマ照射条件を用いると、炭素質薄膜にダメージを与えるおそれがある。

[0033] 炭素質膜の厚さは特に限定されるものではないが、0.005 μm ～3 μm

mの範囲が好ましく、より好ましくは0.01 μm ~ 1 μm の範囲である。

[0034] また、炭素質膜は基材の表面に直接形成することができるが、基材と炭素質薄膜とをより強固に密着させるために、基材と炭素質薄膜との間に中間層を設けてもよい。中間層の材質としては、基材の種類に応じて種々のものを用いることができるが、珪素（Si）と炭素（C）、チタン（Ti）と炭素（C）又はクロム（Cr）と炭素（C）からなるアモルファス膜等の公知のものを用いることができる。その厚みは特に限定されるものではないが、0.005 μm ~ 0.3 μm の範囲が好ましく、より好ましくは0.01 μm ~ 0.1 μm の範囲である。中間層は、例えば、スパッタ法、CVD法、プラズマCVD法、溶射法、イオンプレーティング法又はアークイオンプレーティング法等を用いて形成すればよい。

[0035] （一実施例）

以下に、本実施形態のインプラント用材料について実施例を用いてさらに詳細に説明する。

[0036] ー炭素質膜の形成ー

純チタン（JIS2種）からなる基材の表面にDLC膜からなる炭素質膜を形成した。細胞培養の際には直径20mmの基材を用いた。DLC膜は化学気相堆積（CVD）法を用いて形成した。具体的には、基材を載置したチャンバ内に C_2H_2 を流量が150 sccm（ $\text{cm}^3/\text{分}$ 、但し1気圧、 0°C ）で、圧力が24.67 Pa（35 mTorr）となるように導入し、RF電極に100W~500Wの高周波電力を印加した。

[0037] DLC膜成膜後に、真空中に放置することにより酸素を含む官能基の存在比が低いDLC膜とすることができる。表1は、DLC膜を成膜後10分間真空中に放置した場合と、120分間真空中に放置した場合の酸素を含む官能基の存在比及び窒素を含む官能基の存在比を示している。なお、酸素を含む官能基はカルボキシル基（ COOH ）であるとみなし、窒素を含む官能基はアミノ基（ NH_2 ）であるとみなして評価している。成膜後10分以上真空中に放置することにより酸素を含む官能基の存在比を4%以下とすることが

できる。また、真空中に放置する時間が長いほど酸素を含む官能基の存在比を小さくすることができる。

[0038] [表1]

	[COOH]	[NH ₂]
10分	3.6%	0.63%
120分	1.2%	0.54%

[0039] ー官能基の導入ー

炭素質膜に官能基をさらに導入するためにプラズマ照射を行った。プラズマ照射は平行平板型のプラズマ照射装置により行った。プラズマ照射装置のチャンバ内に上記で得られた基材をセットした後、チャンバ内の圧力を2 Pa以下まで排気した。次に、チャンバ内にアンモニア又は酸素を所定の流量で導入し、平行平板電極の間に30 Wの高周波電力を印加することによりプラズマを発生させた。ガス流量の調整はマスフローコントローラにより行い、プラズマ照射時のチャンバ内圧力は130 Paとした。高周波電力は、マッチングボックスを介して接続された高周波電源を用いて印加した。窒素を含む官能基の導入にはアンモニアを用い、酸素を含む官能基の導入には酸素を用いた。プラズマ照射時間は15秒とした。

[0040] ー官能基存在比の評価ー

炭素質膜における官能基の存在比はX線光電子分光(XPS)測定により評価した。X線源にはアルミニウムK α 線を用い、加速電圧は10.0 kV、エミッション電流は10 mAとした。X線の入射角度は45度とし、表面から4 nm程度の深さまでの状態について測定した。

[0041] 窒素を含む官能基の存在比は、XPS測定において得られた窒素の1s(N 1s)ピークの面積と炭素(C) 1sピークの面積との比率とした。炭素質膜の表面に存在する窒素がどのような状態となっているかは明確ではない。しかし、アミノ基及びアミド基等の窒素を含む官能基(窒素性官能基)を形成していると考えられる。窒素性官能基の詳細な分析は困難であるが、X

PS測定において、399 eV付近にN 1 sピークが出現していることから主にアミノ基として存在していると考えられる。以下においては、N 1 sピークの面積とC 1 sピークの面積との比率をアミノ基の存在比 $[NH_2]$ として説明する。

[0042] 酸素を含む官能基の存在比は、XPS測定において得られた酸素の1 s (O 1 s) ピークの面積とC 1 sピークの面積との比率とした。酸素を含む官能基としてカルボキシル基以外の水酸基等も形成されている可能性があるが、以下においては、O 1 sピークの面積とC 1 sピークの面積との比率をカルボキシル基の存在比 $[COOH]$ とする。

[0043] なお、XPS測定において、ピーク面積の比率により求めた存在比は、原子% (at %) となる。

[0044] ー骨芽細胞の評価ー

直径20 mmのウェル内において試料とマウス骨芽細胞様細胞株MC 3 T 3 -E 1細胞（以下、MC 3 T 3 -E 1細胞という。）とを接触させて培養した。細胞は1ウェル当たり 5×10^4 個播種した。培養培地には10%ウシ胎仔血清 (FBS)、L-グルタミン、混合抗生物質 (Invitrogen社製) 及び $50 \mu g/ml$ のアスコルビン酸を含有した α 変法イーグル培地 (α -MEM) を用いた。培養温度は37℃とし、5%二酸化炭素雰囲気中で培養した。

[0045] 細胞を1日培養した後、細胞数をMTS (Multiple target screening) 法を用いて、細胞の増殖性を評価した。増殖性を評価するための吸光度測定の波長は490 nmとした。

[0046] 細胞を7日間培養した後、骨分化マーカー遺伝子であるRunx 2及びType Iコラーゲン (Col-I) の発現について評価した。具体的には、培養したMC 3 T 3 -E 1細胞からTRIzol試薬 (Invitrogen社製) を用いてRNAを抽出した後、ReverTra Ace reverse transcriptase (東洋紡社製) を用いてcDNAを作成した。作成したcDNAを、定量RT-PCR (Real-time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)

法により評価した。

[0047] ー骨破壊細胞の分化の評価ー

ウェル内において試料と破骨前駆細胞とを破骨細胞分化誘導因子 (Receptor Activator of NF- κ B Ligand: RANKL) の存在下において接触させ、37℃で細胞培養した。破骨前駆細胞は、RANKLの存在により破骨細胞へと分化することが確立されているセルラインRAW264.7細胞 (TIB-71, ATCC) を用いた。細胞は1ウェル当たり 5×10^3 個播種した。

[0048] 分化関連遺伝子であるカテプシンK (cathepsin K) の発現を定量RTPCR法を用いて定量することにより、破骨細胞への分化を評価した。

[0049] ー測定結果ー

表2に示す4つの試料について測定を行った。試料1はコントロールのために設けたDLC膜を形成していない純チタンの基材である。試料2はプラズマ照射を行っていないDLC膜である。試料3は、プラズマ照射によりカルボキシル基の導入量を多くしたDLC膜である。試料4は、プラズマ照射によりアミノ基の導入量を多くしたDCL膜である。

[0050] [表2]

	[COOH]	[NH ₂]	[NH ₂]/[COOH]	ゼータ電位
試料1	—	—	—	—
試料2	0.4%	1.6%	0.26	-26mV
試料3	4.1%	0.4%	0.09	-67mV
試料4	0.9%	10.7%	12.61	2mV

[0051] 図2は、MC3T3-E1細胞の増殖特性を示している。図2において縦軸は490nmの吸光度を示し、吸光度が高いほどMC3T3-E1細胞が増殖していることを示す。図2に示すように、DLC膜を形成してもMC3T3-E1細胞の増殖性は低下しなかった。また、DLC膜に導入した官能基の量によってもMC3T3-E1の増殖性は影響を受けなかった。

[0052] 図3及び図4は、MC3T3-E1細胞の分化特性を示している。図3に

において縦軸はRunx2のmRNA発現量を示し、値が大きいほどRunx2が発現し、MC3T3-E1細胞の分化が促進されていることを示している。図4において縦軸はCox-1のmRNA発現量を示し、値が大きいほどCox-1が発現し、MC3T3-E1細胞の分化が促進されていることを示している。試料2においては、Runx2及びCox-1の発現量が、純チタンの場合の約200倍に増加した。しかし、[COOH]が4%を超える試料3及び[NH₂]/[COOH]が10を超える試料4では、骨芽細胞への分化を促進する効果は認められなかった。

[0053] 図5は、破骨細胞への分化の指標であるカテプシンKの発現特性を示している。試料1及び試料2のいずれにおいても、分化促進因子であるRANKLが存在していない場合には、カテプシンKの発現量はわずかであり、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化は抑制されている。しかし、RANKLの存在下においては、試料1の場合カテプシンKの発現量がRANKLが存在しない場合の9倍以上に増加し、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化が活発に生じた。一方、[COOH]が4%以下で且つ[NH₂]/[COOH]が10以下の炭素質膜を有する試料2においては、カテプシンKの発現量の増加はわずかであった。このことから、[COOH]が4%以下で且つ[NH₂]/[COOH]が10以下の炭素質膜は、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制できることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0054] 本開示に係るインプラント用材料及びその製造方法は、破骨細胞への誘導を抑制すると共に、骨芽細胞への分化を促進するインプラント用材料を実現でき、特に、人工歯根及び義歯等の骨細胞との親和性が必要な歯科用材料及びその製造方法等として有用である。

符号の説明

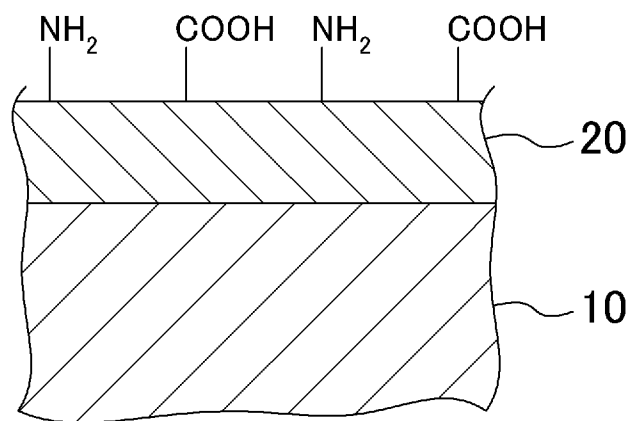
[0055] 10 基材
20 炭素質膜

請求の範囲

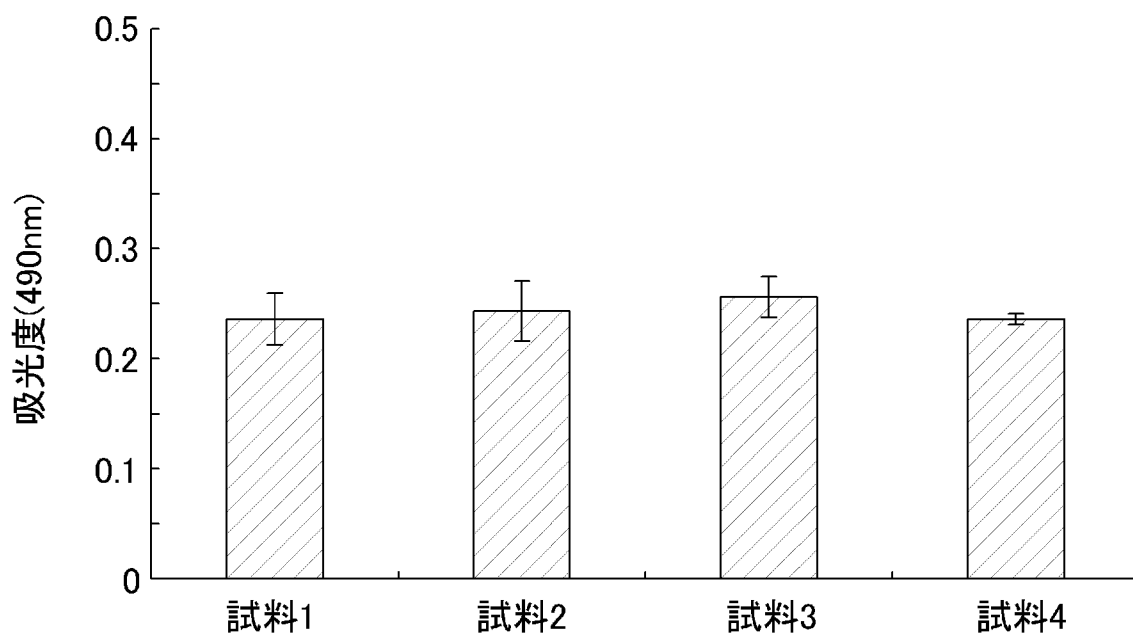
- [請求項1] 基材と、
 前記基材の表面に形成された炭素質膜とを備え、
 前記炭素質膜は、酸素を含む官能基及び窒素を含む官能基の少なくとも一方を有し、
 前記酸素を含む官能基の存在比は4%以下であり、
 前記窒素を含む官能基の存在比を前記酸素を含む官能基の存在比により除した値は10以下であるインプラント用材料。
- [請求項2] 前記基材は、金属からなる請求項1に記載のインプラント用材料。
- [請求項3] 前記基材は、チタン又はチタン合金からなる請求項1に記載のインプラント用材料。
- [請求項4] 前記基材は、人工歯根、義歯、歯冠修復物、人工骨又は人工関節である請求項1に記載のインプラント用材料。
- [請求項5] 前記炭素質膜の表面におけるゼータ電位は、 -50 mV 以上且つ 0 mV 未満である請求項1に記載のインプラント用材料。
- [請求項6] 基材を準備する工程（a）と、
 炭化水素を含むガスを用いた化学気相堆積法により、前記基材の表面に炭素質膜を形成する工程（b）と、
 前記基材の表面に形成された炭素質膜の表面のダングリングボンドが安定するまで前記基材を真空状態に保持する工程（c）とを備え、
 前記炭素質膜における酸素を含む官能基の存在比を4%以下とし、
 窒素を含む官能基の存在比を前記酸素を含む官能基の存在比により除した値を10以下とするインプラント用材料の製造方法。
- [請求項7] 前記工程（c）よりも後に、前記炭素質膜に塩基性窒素含有化合物のプラズマを照射する工程（d）をさらに備えている請求項6に記載のインプラント用材料の製造方法。
- [請求項8] 基材の表面に、酸素を含む官能基及び窒素を含む官能基の少なくとも一方を有する炭素質膜を形成し、

前記酸素を含む官能基の存在比を4%と以下とし且つ前記窒素を含む官能基の存在比を前記酸素を含む官能基の存在比により除した値を10以下とするインプラント材料の骨細胞との親和性向上方法。

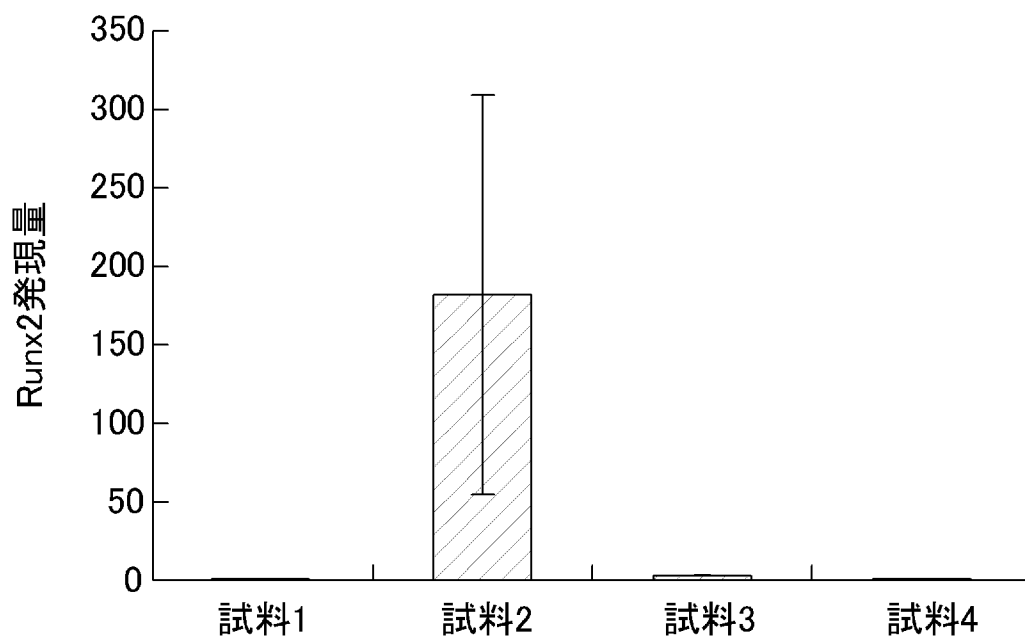
[図1]



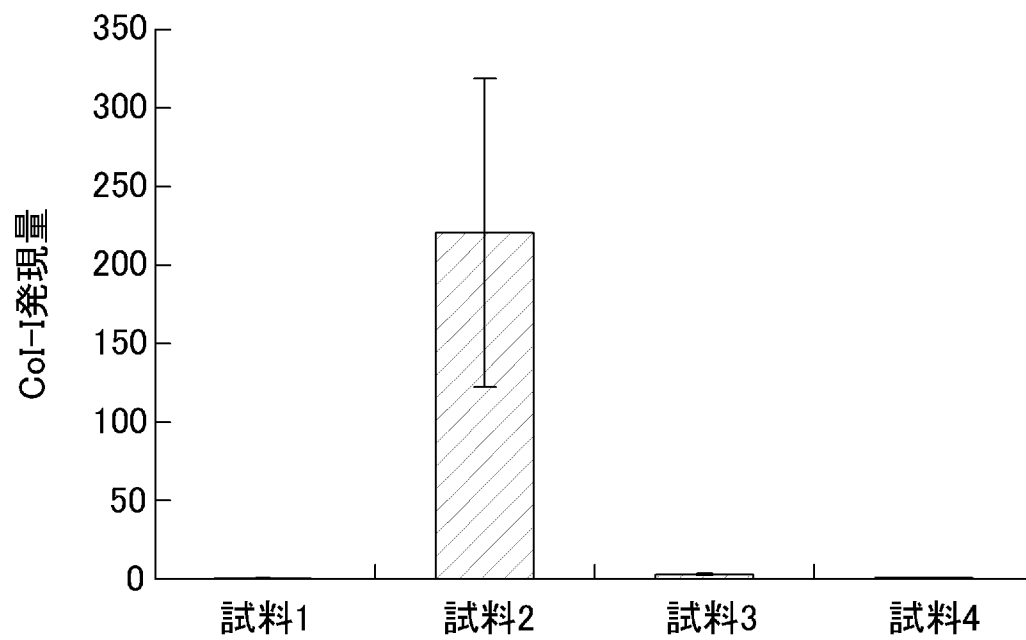
[図2]



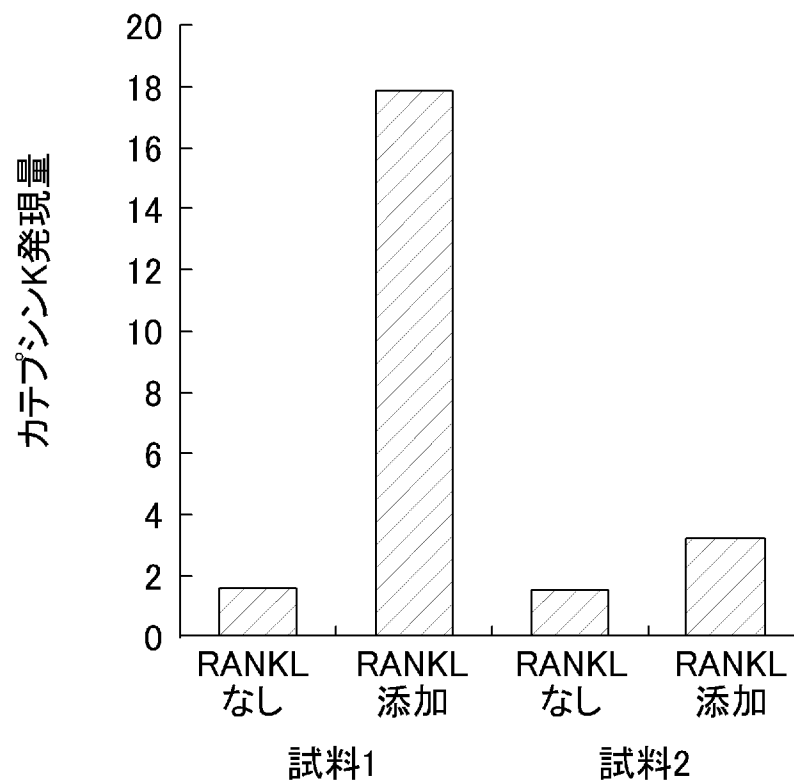
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/006247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61L27/00(2006.01)i, A61C8/00(2006.01)i, A61F2/28(2006.01)i, A61F2/30(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61L27/00, A61C8/00, A61F2/28, A61F2/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Satoshi IWATA et al., "DLC Coating shita Titanium ga Kotsuga Saiboyo Saibokabu MC3T3-E1 Saibo no Bunka ni Ataeru Eikyo", Journal of Japanese Society of Oral Implantology, 25 August 2009 (25.08.2009), vol.22, special issue, page 231, P-1-6, ISSN: 0914-6695	1-8
X	WO 2010/092616 A1 (Hiroshima University), 19 August 2010 (19.08.2010), entire text; particularly, examples (Family: none)	1-8
X	JP 2009-137888 A (Hiroshima University), 25 June 2009 (25.06.2009), entire text; particularly, examples (Family: none)	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 March, 2011 (11.03.11)

Date of mailing of the international search report
05 April, 2011 (05.04.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/006247

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kumari T.V. et al., In vitro cytocompatibility studies of Diamond Like Carbon coatings on titanium., Bio-Medical Materials and Engineering, 2002, Vol.12, No.4, pages 329 to 338, ISSN: 0959-2989	1-8
X	Yasuhiro OKADA et al., "Kakushu DLC Kiban Jo deno Kotsugayo Saibo no Zoshoku to Bunka ni Tsuite", Polymer Preprints, Japan(CD-ROM), 01 September 2010 (01.09.2010), vol.59, no.2, Disk1, page ROMBUNNO.1PC067	1-8
X	Okamoto K. et al., Differentiation Capability Evaluation of Osteoblast by Functionalized DLC Thin Films with Plasma Processing, Journal of Photopolymer Science and Technology, 2010. 07.06, Vol.23, No.4, pages 591 to 594, ISSN: 0914-9244	1-8

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61L27/00(2006.01)i, A61C8/00(2006.01)i, A61F2/28(2006.01)i, A61F2/30(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61L27/00, A61C8/00, A61F2/28, A61F2/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	岩田慧他, DLC コーティングしたチタンが骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の分化に与える影響, 日本口腔インプラント学会誌, 2009.08.25, Vol.22, 特別号, page 231, P-1-6, ISSN: 0914-6695	1-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 1 . 0 3 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

小森 潔

4 C

3 7 6 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2010/092616 A1 (国立大学法人広島大学) 2010. 08. 19, 文献全体、特に、実施例 (ファミリーなし)	1-8
X	JP 2009-137888 A (国立大学法人広島大学) 2009. 06. 25, 文献全体、特に、実施例 (ファミリーなし)	1-8
X	Kumari T.V. et al., In vitro cytocompatibility studies of Diamond Like Carbon coatings on titanium., Bio-Medical Materials and Engineering, 2002, Vol.12, No.4, pages 329 to 338, ISSN: 0959-2989	1-8
X	岡田康宏他, 各種DLC基板上での骨芽様細胞の増殖と分化について, 高分子学会予稿集(CD-ROM), 2010. 09. 01, Vol. 59, No. 2 Disk1, page ROMBUNNO. 1PC067	1-8
X	Okamoto K. et al., Differentiation Capability Evaluation of Osteoblast by Functionalized DLC Thin Films with Plasma Processing, Journal of Photopolymer Science and Technology, 2010. 07. 06, Vol. 23, No. 4, pages 591 to 594, ISSN: 0914-9244	1-8