

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06482

研究課題名(和文)骨形成促進作用を有する次世代型生体活性チタン金属の開発

研究課題名(英文)Development of next generation bioactive titanium

研究代表者

藤林 俊介 (Fujibayashi, Shunsuke)

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：30362502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ストロンチウムイオンやマグネシウムイオンを導入した生体活性処理チタンではin vitroにおいて、MC3T3-E1 cellのintegrin 1の発現上昇を認め、骨芽細胞への分化促進作用を示した。家兎脛骨に埋植するin vivoモデルでは早期において骨と生体活性処理チタンの結合力の上昇を認めた。導入したイオンが生体活性チタン近傍の骨で認められたことから、イオンが徐放されて近傍の骨に作用したことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bioactive titanium metals induced strontium ions or magnesium ions enhanced expression of integrin 1 and osteogenic differentiation in in vitro studies using MC3T3-E1 cells. In rabbit in vivo studies, they also provided greater biomechanical strength between bone and bioactive titanium metals. Because induced strontium ions were detected in the bone near the implant, strontium ions were released and influenced the bone near the implant.

研究分野：整形外科学

キーワード：生体活性チタン ストロンチウム マグネシウム 骨芽細胞

### 1. 研究開始当初の背景

我々はチタン金属(Ti)の表面の様々な処理方法を開発してきた。アルカリ加熱処理は水酸化ナトリウムを用いた化学処理および熱処理により純チタンおよびチタン合金に生体活性(骨伝導能:骨と結合する能力)を付与する技術であり、すでにセメントレス人工股関節として臨床応用されている。また、多孔体チタンへの応用では骨伝導能のみならず骨誘導能(骨を形成する能力)を見出し、その成果を脊椎固定術において臨床応用した。さらに骨伝導能を向上させ、安定した処理層を得るためのカルシウム(Ca)処理を開発した。

ただ、従来の生体活性チタンが有する骨伝導能、骨誘導能は受動的な機能であり、脆弱な骨に対する金属製インプラント手術の成績向上のためにはインプラントに骨形成促進作用といった能動的な機能を付与した新規生体活性チタン材料の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

骨粗鬆症は高齢社会とともに増加してきているが、金属製インプラントを脆弱な骨に固着させるためにはインプラント側のみならず、脆弱な骨を改変する必要がある。そのために骨形成促進作用を有する金属イオンを放出する新規生体活性チタン材料の開発を目的としている。

近年、マグネシウム(Mg)イオンやストロンチウム(Sr)イオンの骨形成に対する有効性が報告され、注目を集めている。骨形成を促進するMgイオンあるいはSrイオンをチタンインプラント表面の処理層に導入したCa処理チタンの生体内での評価を行い、その安全性と有効性を評価する。

### 3. 研究の方法

実験は純チタン金属(cp-Ti)、Ca処理Ti(Ca-Ti)、Srを処理層に導入したTi(Sr-Ti)、Mgを処理層に導入したTi(Mg-Ti)の4群で行った。

(1)細胞実験では、上記4種類のインプラント上にMC3T3-E1細胞(マウス頭蓋由来骨芽系細胞株)を播種し、細胞毒性(XTT assay)、遺伝子の発現(Real-time qPCR)、細胞接着因子の一つであるintegrin 1の蛍光免疫染色、骨芽細胞への分化の程度の評価としてALP活性、石灰化能評価(Alizarin red染色)を行った。

(2)動物実験では、日本白色家兔の脛骨に4種類のインプラントを埋入した。予定週数で摘出し、骨とインプラントの結合力、組織学的な評価、イオンの血中濃度推移、インプラント近傍の骨の元素分析をXPSを用いて行った。

### 4. 研究成果

(1)細胞における毒性試験ではSr-TiやMg-Tiに明らかな毒性は認めず、むしろMg-Tiでは細胞活性の上昇が認められた(図1)。これは(2)に示す*cyclin D1*発現上昇や図2に示す蛍光免疫染色の結果と矛盾しないものである。

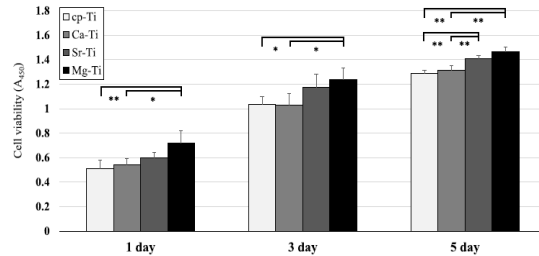


図1

(2)細胞の遺伝子の発現ではSr-Ti、Mg-Tiにおいて細胞接着因子の一つである*integrin 1*や細胞分裂に重要な*cyclin D1*の発現上昇を認めた。Integrin 1の蛍光免疫染色ではSr-Ti、Mg-Tiいずれも高い発現を認め、良好な細胞の伸展性が観察された(図2)。また、骨分化マーカー遺伝子である*Runx2*、*Alp*、*Ocn*、*Opn*もSr-Ti、Mg-Tiで一部有意な上昇を認めた。

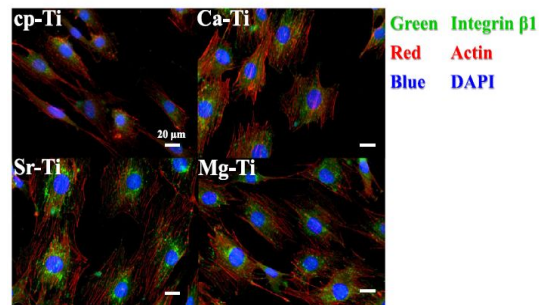


図2

(3)骨芽細胞分化の評価としてALP活性と石灰化能を行ったところ、Sr-Ti、Mg-Tiいずれにおいても有意な上昇を認めた(図3)。

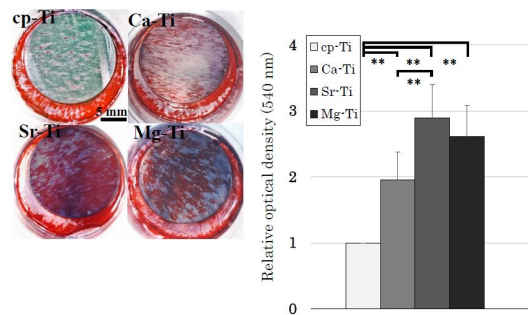


図3

以上より *in vitro* においては徐放されたイオンあるいはインプラント処理層に含まれる元素により細胞活性や細胞接着性の向上とそれに伴う骨分化促進作用を認めた。骨芽細胞の分化促進についてはSrやMg含有イオン

プラントに関連する過去の報告と類似する結果であるが、細胞接着因子や細胞周期に関連する遺伝子などについて踏み込んでいるものは少なく、本研究の結果は重要な知見であると考えている。

(4)家兔を用いた *in vivo* においては骨とインプラントとの結合力評価でインプラント埋植後早期の4、8週においてMg-TiでCa-Tiと比し、有意な上昇を認めた。Sr-Tiも有意ではないが、上昇傾向を認めた。この傾向は16、24週の長期においても維持されていた(図4)。

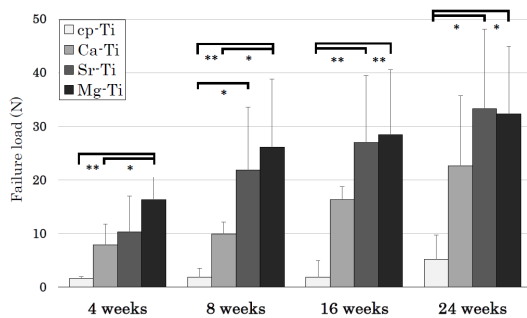


図4

(5)組織学的評価では骨とインプラントとの直接の接触を示す Bone implant contact は(4)の結合力評価と同様の結果であり(図5)、結合力試験の結果を反映しているものと思われる。

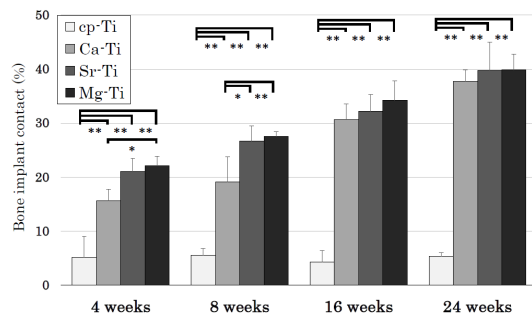


図5

組織像では4週においてSr-Ti、Mg-Tiではインプラント周囲に旺盛な新生骨の形成を認めた。骨のリモデリングが始まる8週以降においてもインプラント周囲の骨量は維持されていた。

(6)イオンの血中濃度推移ではMgイオンは術前後で有意な変化は認めなかったが、Srイオンは埋植後16週目において約0.1ppmの有意な上昇を認めた(図6)。術後16週目のみ上昇した原因は現時点では不明である。ただ、過去の報告から0.1ppm程度の上昇では人体への影響はほとんどないものと考えられた。イオン含有インプラントの報告で血中濃度推移を示した論文はほとんどなく、本研究は重要な結果であると考えている。この血中濃度

上昇について今後追試を行う予定であり、メカニズムについても解明が必要であると考えている。

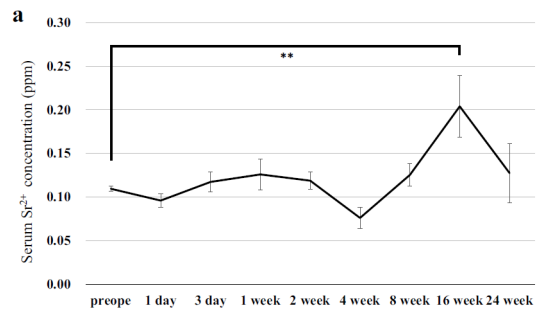


図6

また、Sr-Ti近傍の骨でXPSを行ったところ、Srが検出された。インプラントから徐放されたSrが近傍の骨に取り込まれ、近傍の骨に作用している可能性が示唆された。Mg-Tiにおいても近傍の骨でMgが検出されたが、元来骨に含まれている元素であり、含有量はその他の部位の骨と比べて明らかな上昇は認めなかった(図7)。ただ、Srと同様に徐放されたMgは周囲の組織に影響を及ぼしていたものと考えている。

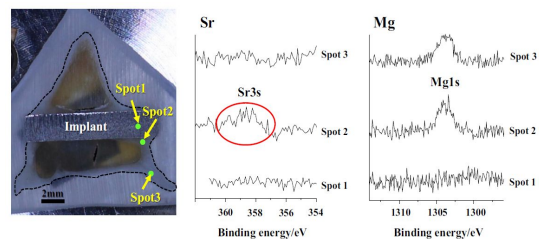


図7

*In vivo* で実際に徐放しているか、あるいは作用しているかを確認している論文は少ない。この点において今回の我々が作成したインプラントが生体内で意図した作用を發揮していることが示唆されたと考えている。

本研究における重要な所見をまとめると

- ・細胞接着因子の integrin 1 の関連を示したこと
- ・細胞周期にも影響していることが示唆されること
- ・埋植後早期における生体活性能の上昇
- ・血中濃度推移を示したこと
- ・インプラント周囲の骨で目的とするイオンが検出されたこと。

今後の課題として

- ・細胞内シグナルの解明
- ・破骨細胞との関連性の評価
- ・porous 構造体や Ti 合金における生体活性能・安全性の評価
- ・Sr 血中濃度上昇の追試、メカニズムの解明

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 1 件)

Okuzu Y, Fujibayashi S, Yamaguchi S, Yamamoto K, Shimizu T, Sono T, Goto K, Otsuki B, Matsushita T, Kokubo T, Matsuda S. Strontium and magnesium ions released from bioactive titanium metal promote early bone bonding in a rabbit implant model. Acta Biomaterialia. 2017;63:383-392.  
Doi: 10.1016/j.actbio.2017.09.019.(査読有)

[学会発表](計 5 件)

Okuzu Y, Fujibayashi S, Yamaguchi S, Yamamoto K, Goto K, Otsuki B, Matsushita T, Kokubo T, Matsuda S. Bioactivity of titanium metal releasing strontium ions or magnesium ions. (Poster) Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2017

奥津 弥一郎, 藤林 俊介, 後藤 公志, 大槻 文悟, 山本 浩司, 山口 誠二, 松下 富春, 小久保 正, 松田 秀一. Sr イオンや Mg イオンを徐放するチタン金属の生体活性性能の評価. 日本バイオマテリアル学会第 10 回関西若手研究発表会. 2015 年

奥津 弥一郎, 藤林 俊介, 後藤 公志, 大槻 文悟, 山本 浩司, 山口 誠二, 松下 富春, 小久保 正, 松田 秀一. Sr イオンや Mg イオンを徐放するチタン金属の生体活性性能の評価. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015 年

奥津 弥一郎, 藤林 俊介, 後藤 公志, 大槻 文悟, 山本 浩司, 山口 誠二, 松下 富春, 小久保 正, 松田 秀一. Sr イオンや Mg イオンを徐放するチタン金属の生体活性性能の評価. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会. 2015 年

奥津 弥一郎, 藤林 俊介, 後藤 公志, 大槻 文悟, 山本 浩司, 山口 誠二, 松下 富春, 小久保 正, 松田 秀一. 骨形成促進イオン徐放性チタン金属の生体活性性能の評価. 第 35 回整形外科バイオマテリアル研究会. 2015 年

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤林 俊介 (FUJIBAYASHI, Shunsuke)  
京都大学・大学院医学研究科・特定教授  
研究者番号: 30362502

(2)連携研究者

山口 誠二 (YAMAGUCHI, Seiji)  
中部大学・生命健康科学部・講師  
研究者番号: 50726198