

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390516
 研究課題名（和文）
 アパタイトコーティング層の微細構造制御による新しい生体活性型インプラント
 研究課題名（英文）
 Newly developed bio-active implant by minute control of apatite coating layer.
 研究代表者
 前川 賢治（MAEKAWA KENJI）
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：20304313

研究成果の概要：

失われた歯を補う目的で顎の骨に埋入されるチタンインプラントが、早期に確実に骨と結合して治療期間が短縮できるよう、チタン表面に生物学的な表面の改質を施した。具体的には、生体内に埋入された時に骨と親和性の高いアパタイトがチタン表面に自己形成される酸化膜を施し、骨の形成能が亢進される表面を開発した。また、ポリリン酸をチタン表面に吸着させることにより、高い生体活性を有するチタンインプラントの開発に繋がる可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	6,300,000	0	6,300,000
2006 年度	3,700,000	0	3,700,000
2007 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	15,400,000	1,620,000	17,020,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：チタン、インプラント、表面改質、骨伝導性、酸化膜、アパタイト、ポリリン酸

1. 研究開始当初の背景

未曾有の高齢化社会の到来に伴い、口腔インプラント治療の需要は益々高まることが予測される。しかしながら、現行のインプラント治療は、数ヶ月にわたる骨結合獲得期間が必要なことや、上顎臼歯部等の骨質が脆弱な部位での骨結合成功率が低い等の問題点を抱えており、高齢化社会に対応すべく様々な解決法が模索されている。チタンインプラントに施されるハイドロキシアパタイトコーティングもその試みの一つであるが、(1) インプラント体に加わるメカ

ニカルストレスによりアパタイトがチタン表面から剥離し感染源となりうること、(2) 生体内で吸収されず、剥離した場合にはむしろ骨結合を妨げる異物として残留することなどの問題点が挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では、上述の問題点を解決するため、以下の三点に焦点を当てて段階的に検討を進めることにした。(1) チタン表面陽極酸化膜作製法によりアパタイト析出能を高めるとともに、チタン・アパタイト間の結合向上をはかる。(2) 生

体吸収性を有し、ハイドロキシアパタイトや骨類似の炭酸アパタイトを超える高い骨伝導能を有する傾斜機能性 2 価金属イオン含有アパタイトを析出させる。さらに、(3) これらナノテクノロジーをベースにした材料学的な表面改質に加え、この新規生体活性型インプラントの骨結合特異的遺伝子を解析してインプラント体を利用した埋入窩周囲組織への直接遺伝子導入によりアクティブな骨結合能の獲得を目指す。以上の検討により、安全で早期に強固の骨結合を獲得できる機能性インプラントを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) チタン表面へのアパタイト自己析出酸化膜形成

①化学熱処理 (CHT) : 細胞実験, 動物実験に用いるチタン試片の表面清掃後, 80°C の 3% 過酸化水素水に 3 時間浸漬し, その後, 400°C で 1 時間加熱処理を加えた。処理した試片の表面は走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。

②アパタイト析出処理 (CHT-HAp) : CHT 処理したチタン試片を 1 時間疑似体液に浸漬した。

(2) 細胞増殖実験

CHT 処理, CHT-HAp 処理したチタンディスクならびに無処理のディスク上にヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSC) を播種し, 細胞増殖能を MTS アッセイにて検討した。

(3) 骨伝導能評価

CHT 処理, CHT-HAp 処理したチタンピンならびに無処理のチタンピンをラット脛骨に埋入し, 14, 28 日後に還流固定を行い, 塩基性フクシン-メチレンブルー重染色を行った後, ピン周囲に形成される骨梁の骨接触率を 3 群間で比較した。

(4) チタン表面へのポリリン酸の吸着

チタン表面へのアパタイトコーティングのみでなく, 高い生体活性能を有する物質を吸着させることによる機能性インプラントの開

発も並行して試みた。すなわち, 生体内に豊富に存在し, 高い生体活性能を有するポリリン酸の吸着を試みた。チタン試片を各種濃度を設定したポリリン酸溶液に 24 時間浸漬し, 洗浄, 乾燥後にその吸着度を P を指標に X 線光電子分光分析法 (XPS 解析) により検討した。

(5) 細胞応答評価

各種濃度のポリリン酸で処理を行ったチタンディスクに hBMSC ならびにマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を播種し, 細胞応答反応を MTS アッセイにより評価した。

(6) ポリリン酸処理による成長因子吸着制御

チタン表面に吸着したポリリン酸を担体として成長因子を吸着制御できるかどうかを, チタンバイオセンサー表面における bFGF の吸着と脱離をリアルタイムにて測定する表面プラズモン (SPR) 解析により分析した。

(7) ポリリン酸処理チタンインプラントの骨伝導能評価

ポリリン酸処理により骨伝導能が促進されるかを, 2 種類のラットをモデル動物として方法 (3) と同様に検討した。

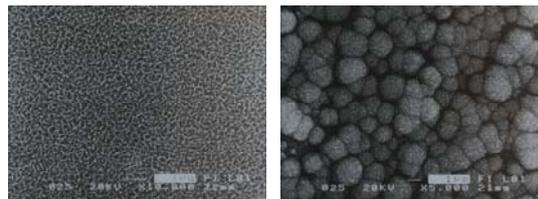
4. 研究成果

(1) チタン表面へのアパタイト自己析出酸化膜形成

SEM 観察の結果, CHT 処理後には酸化膜層が形成され (下図左), CHT-HAp 処理後にはチタン表面にアパタイト層の形成が確認された (下図右)。

(2) 細胞増殖実験

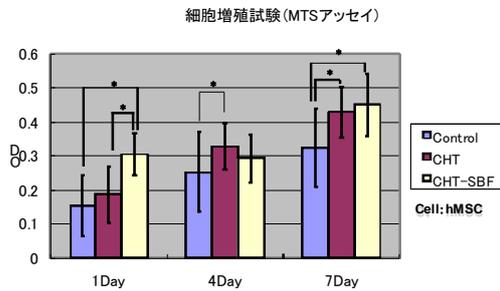
細胞増殖試験の結果, CHT 処理および



CHT-HAp 処理条件では, 無処理条件に比較して, 有意に hBMSC の増殖能が亢進される傾向にあ

った。

(3) 骨伝導能評価

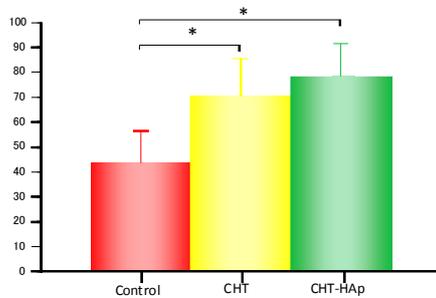


CHT処理, CHT-HAp処理したチタンピンでは, 無処理のチタンピンに比較して有意にチタン表面への骨接触率が亢進されており, チタンの骨伝導能を亢進することが明らかとなった。

(4) チタン表面へのポリリン酸の吸着

XPS解析の結果, ポリリン酸はチタン表面に濃度依存的に化学吸着されることが明らかとなった。また, 濃度依存的に表面粗さも増大

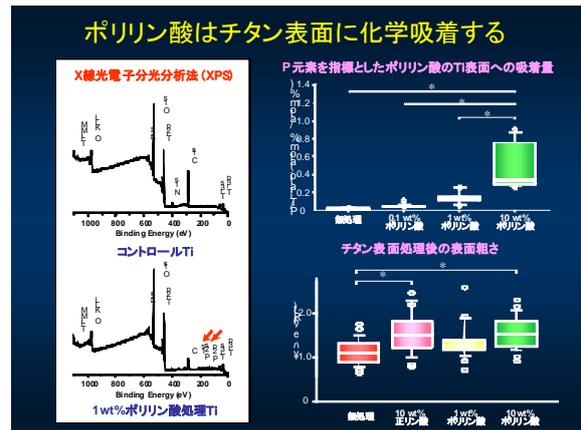
各種処理チタンピンにおける骨接触率 (n=10, 各条件)



した。

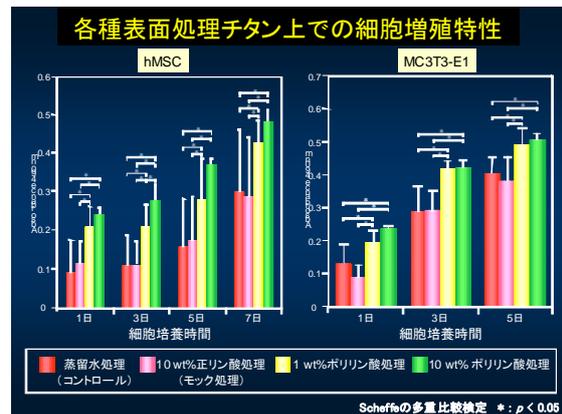
(5) 細胞応答評価

細胞接着試験の結果, 両細胞種とも全条件において継時的に接着細胞数は増加していた



が, いずれの時間帯においてもポリリン酸吸着条件が優れた細胞接着を示した。また, 細胞増殖においても, ポリリン酸吸着条件は明らかに優れた結果を示し, 濃度依存的に促進された。一方, ポリリン酸処理と同レベルの表面粗さを示した正リン酸処理ではこれらの細胞応答は亢進されず, ポリリン酸処理による細胞応答の亢進は, 表面粗さの影響ではなく, ポリリン酸自体が持つ生体活性に起因すると推測された。

(6) ポリリン酸処理による成長因子吸着制御

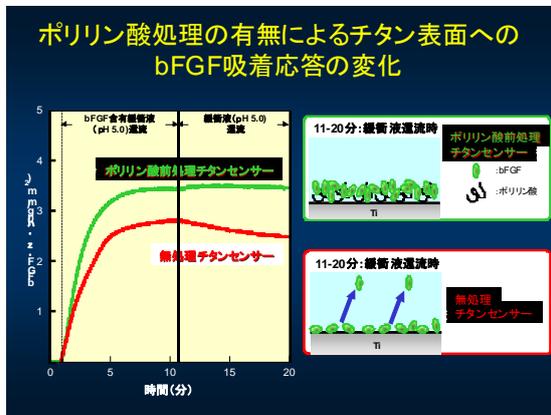


ポリリン酸で前処理すると, 無処理のチタンセンサーに比較してbFGFの吸着量は約1.3倍に増加した。また, 無処理センサーでは, 吸着後の洗浄過程でbFGFが脱離する現象が見られたが, ポリリン酸で前処理すると脱離は観察されなかった。これらの結果は, ポリリン酸処理により, チタン表面にbFGFがより豊富

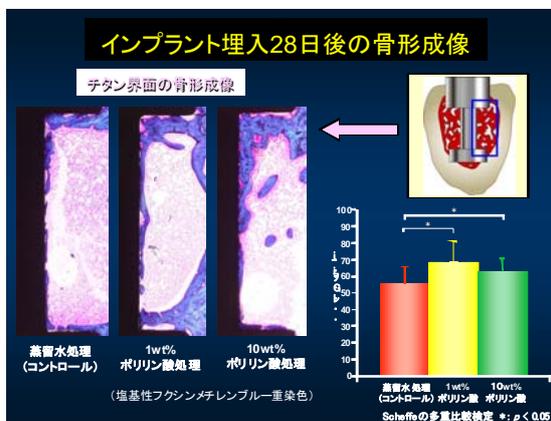
に、より強固に吸着することを示していると考えられた。

(7) ポリリン酸処理チタンインプラントの骨伝導能評価

無処理のチタンピンでは界面の骨形成像



が粗で、直接的な骨梁の接触が少ないのに対して、ポリリン酸処理を行ったチタンの界面では連続性をもった骨梁の形成が認められる傾向にあった。統計解析の結果、ポリリン酸処理を行った2つの条件では、無処理条件に比較して有意に骨接触率が增大した。すな



わち、ポリリン酸処理は確かにチタンの骨伝導能を亢進させた。

以上の結果より、チタン表面に形成される酸化膜層を微細制御することにより、生体内でアパタイトを自己析出し、細胞応答、骨伝導能を促進することが可能となることを明らかとした。今後は、研究計画の後半にあたる通常のアパタイトを超える骨伝導能を有する

傾斜機能性2価金属イオン含有アパタイトを析出(析出方法については確立済み)させたチタン表面も含めて大動物を対象に骨伝導能の評価を行い、臨床応用に繋げたい。

また、生体内に豊富に存在して高い生体活性能をもつポリリン酸が、チタン表面に強固に化学吸着して細胞応答ならびに界面での骨形成を促進する骨伝導能を付与するとともに、成長因子等を豊富かつ強固に吸着させることを明らかとした。これらの結果は、国内外で多数試みられている成長因子等を用いた生物学的な表面改質とは大きく異なり、安価で安全性の高い表面改質法であることから、より臨床応用に近く、新規高機能型インプラントの商品化に繋がる可能性が示唆された。

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 4 件)

- ① Maekawa K, Shimono K, Oshima M, Yoshida Y, Van Meerbeek B, Suzuki K, Kuboki T: Polyphosphoric acid treatment promotes bone formation around titanium implants. *J Oral Rehabil.*, in press. (査読有)
- ② Maekawa K, Yoshida Y, Mine A, Van Meerbeek B, Suzuki K, Kuboki T: Effect of polyphosphoric-acid pre-treatment of titanium on attachment, proliferation and differentiation of osteoblast like cells (MC3T3-E1). *Clin Oral Imp Res*, 19: 320-325, 2008. (査読有)
- ③ Maekawa K, Yoshida Y, Mine A, Fujisawa T, Van Meerbeek B, Suzuki K, Kuboki T: Chemical interaction of polyphosphoric acid with titanium and its effect on human bone marrow derived mesenchymal stem cell behavior. *J Biomed Mater Res A*. 82: 195-200, 2007. (査読有)
- ④ 前川賢治, ポリリン酸処理によるチタン

インプラントへの細胞応答促進と成長因子吸着制御：The Journal of Dental Engineering・156・35-36・2006 (査読無)
〔学会発表〕(計 8 件)

- ① 前川賢治, 下野賢吾, 大島正充, 峯 篤史, 吉田靖弘, 鈴木一臣, 窪木拓男: ポリリン酸を用いたチタンインプラントの生物学的表面改質. 第 38 回(社)日本口腔インプラント学会・学術大会, 2008/9/13, 14, 東京
- ② K. Maekawa, K. Kawanishi, S. Hayakawa, M. Oshika, K. Shimono, Y. Yoshida, K. Suzuki, A. Osaka, T. Kuboki: Effect of CH-treatment of titanium on bone formation around implants. 86th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2008/7/2-5, Toronto, Canada.
- ③ K. Maekawa, Y. Yoshida, I. Hirata, M. Okazaki, K. Suzuki, T. Kuboki: Chemical, mechanical, and biological properties of titanium implant surface treated with polyphosphoric acid. International Dental Materials Congress 2007, 2007/11/21-24, Bangkok, Thailand
- ④ K. Maekawa, K. Shimono, M. Oshima, Y. Yoshida, K. Suzuki, T. Kuboki: Surface treatment with polyphosphoric acid promotes osteogenesis around titanium implants. 85th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 2007/3/21-24, New Orleans, USA
- ⑤ 前川賢治, 吉田靖弘, 峯 篤史, 大島正充, 下野賢吾, 秋山謙太郎, 藤澤拓生, 鈴木一臣, 窪木拓男: ポリリン酸処理によるチタンインプラントの細胞応答促進と成長因子吸着制御. 社団法人日本補綴

歯科学会第 115 回学術大会, 2006/7/8, 9, 札幌

- ⑥ K. Maekawa, Y. Yoshida, A. Mine, K. Akiyama, M. Ohshima, T. Fujisawa, K. Suzuki, T. Kuboki: Titanium surface modification by polyphosphoric acid accelerated mouse osteoblast like cell behavior. 2006 Spring Scientific Meeting of the Korean Academy of Prosthodontics: The 3rd International Joint Meeting with Japanese Prosthodontic Society, 2006/4/28, Seoul, Korea
- ⑦ K. Maekawa, A. Mine, I. Hirata, Y. Yoshida, M. Okazaki, K. Suzuki, T. Kuboki: Ti-surface modification using polyphosphoric acid enhanced osteoblast proliferation and bFGF adsorption. 35th American Association for Dental Research, 2006/3/8-11, Orlando, USA.
- ⑧ K. Maekawa, Y. Yoshida, I. Hirata, A. Mine, T. Fujisawa, M. Okazaki, K. Suzuki, T. Kuboki: Acceleration of cell behavior and growth factor adsorption onto titanium implant surface by polyphosphoric acid treatment. The 1st Congress of Asian Academy of Osseointegration, 2005/10/15, 16, Seoul, Korea

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

- ①名称: Implant made with titanium or titanium alloy and surface treating method thereof.
発明者: Kuboki T, Maekawa K, Yoshida Y, Mine A, Fujisawa T, Van Meerbeek Bart, Kaneko T
権利者: 同上 取得年月日: 2008 年 8 月 13 日
国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前川 賢治 (MAEKAWA KENJI)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20304313

(2) 研究分担者

吉田 靖弘 (YOSHIDA YASUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90281162

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195