

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01389

研究課題名(和文)非酸化セラミックにおける骨伝導性および骨誘導性に関する研究

研究課題名(英文)Osteoinductivity and osteoconductivity of non-oxide ceramics

研究代表者

PEZZOTTI G. (Pezzotti, Giuseppe)

京都工芸繊維大学・材料化学系・教授

研究者番号：70262962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：有病者や高齢者に対し、人工関節置換術を確実にを行うには、高い骨伝導性と抗菌性を有するインプラント材料を使用することが望ましい。しかし、既存のインプラント材料はこれらの要件を十分に満たしているとは言い難い。我々は、優れた機械的性質と生体親和性を有する非酸化セラミック窒化ケイ素が、表皮ブドウ球菌や歯周病菌に対し抗菌性を有することを報告した。これまで窒化ケイ素が骨伝導や骨誘導に与える影響についての基礎的な研究は、あまり行われてこなかった。以上のことを踏まえ、本研究は、窒化ケイ素が骨芽細胞や間葉系幹細胞に効率的に与える影響を明らかにし、窒化ケイ素が次世代の人工関節デバイスになり得るか検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒化ケイ素は優れた骨伝導性と骨誘導性を有することから、基礎疾患を有する高齢者においても、迅速で強固な骨結合を獲得することが期待できる。窒化ケイ素は超高齢社会において次世代のインプラント材料として有望である。

研究成果の概要(英文)：In modern medicine, there is an increasing demand for developing a new implant material having high osteoconductivity and, concurrently, antibacterial properties in order to safely perform artificial joint replacement surgery on patients including elderly persons. We previously reported that non-oxide ceramic silicon nitride, which has excellent mechanical properties and biocompatibility, also shows antibacterial activity against *Staphylococcus epidermidis* and periodontal disease bacteria. However, basic research on the effect of silicon nitride on osteoconduction and osteoinduction has yet not been performed in details. This project clarified the chemistry behind the supportive effect of silicon nitride on osteoblasts and mesenchymal stem cells, and examined whether silicon nitride could be a candidate for the next-generation artificial joint device.

研究分野：生体材料学

キーワード：窒化ケイ素 人工関節 骨伝導 骨誘導 間葉系幹細胞 骨芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

日本が迎える超高齢化社会において、再生力や免疫力が低下した有病者や高齢者に対し、人工関節置換術を確実に行うには、高い骨伝導性と抗菌性を有するインプラント材料を使用することが望ましい。しかし、既存のインプラント材料はこれらの要件を十分に満たしているとは言い難いのが現状である。

我々は、優れた機械的性質と生体親和性を有する非酸化セラミック窒化ケイ素 (Si_3N_4 : Silicon nitride シリコンナイトライド) が、表皮ブドウ球菌や歯周病菌に対し抗菌性を有することを報告した。しかしながら、これまで窒化ケイ素が骨原生細胞に与える影響についての基礎的な研究は、あまり行われてこなかった。以上のことを踏まえ、本研究は、窒化ケイ素が骨芽細胞や間葉系幹細胞に効率的に与える影響を明らかにし、窒化ケイ素が次世代の人工関節デバイスになり得るか検討した。

2. 研究の目的

近年の人工股関節置換術や歯科インプラント(人工歯根)の術後10年における成功率は90%を超えており、安定した成功率を示している。しかし、我が国が迎える超高齢社会において、再生能力や免疫力が低下した基礎疾患を有する高齢者への人工関節置換術は、その成功率が著しく低下すると予想される。そのため、次世代のインプラント治療は組織再生を促す高機能化バイオマテリアルの開発が急務となっている。しかし、現在使用されているインプラント材料であるチタン合金やアルミナは生物不活性である。我々は優れた機械的特性と生体適合性を有する非酸化バイオセラミック窒化ケイ素に注目した。

窒化ケイ素セラミックは、タービンブレードやベヤリング等の様々な工業製品に使用されている。近年、窒化ケイ素の優れた機械的特性と生体適合性が明らかとなり、欧米では脊椎固定用インプラントとして、すでに臨床応用されており、その適応範囲が広がつつある(図1)。一般的な金属製のインプラント・デバイスはMRIやCTの撮像の際に、金属アーチファクトが生じるが、非磁性材料の窒化ケイ素は、エックス線半透過性のため、アーチファクトフリーである。これにより、MRIやCTでインプラント周囲の病変やインプラントの緩み、膿瘍を形成していないか(感染の有無)を精査することが可能となる。また、窒化ケイ素は表皮ブドウ球菌や大腸菌、歯周病菌に対して抗菌効果を有する。

以上のように窒化ケイ素は、他にないユニークな性質を有する。本研究は、骨質を解析することができるラマン分光法により、窒化ケイ素が骨芽細胞や間葉系幹細胞に効率的に与える影響を明らかにし、窒化ケイ素が次世代の人工関節デバイスになり得るか検討した。



図1.窒化ケイ素製の整形外科用インプラント（文献1より引用）

3. 研究の方法

窒化ケイ素基板上またはチタン合金基板上に骨原生細胞(骨芽細胞株・間葉系幹細胞株)を播種し、接着細胞を蛍光標識したファロイジンで染色し、蛍光顕微鏡で接着細胞を計測した。骨分化誘導培地で7日間培養を行った。形成された石灰化基質の大きさをレーザー顕微鏡で測定した。さらに、レーザーラマン顕微鏡で窒化ケイ素基板上に沈着した hidroksiapatit (骨の主成分)の局在を可視化した。

4. 研究成果

インプラントと細胞との接着は、その後の骨結合に影響を与える。窒化ケイ素上の骨芽細胞は細胞骨格であるアクチンフィラメントを強く発現し(図2A・B)、広く伸展し接着していた(図2C・D)。伸展した細胞は細胞増殖が促進され、細胞骨格の発達した方が骨芽細胞への分化が促進されるとされている。以上のことから、窒化ケイ素表面の化学的・物理的な性質が細胞増殖や細胞分化を促進している可能性が示唆された。窒化ケイ素基板上またはチタン合金基板上に形成された石灰化基質の大きさをレーザー顕微鏡で測定したところ、窒化ケイ素ではチタン以上

に石灰化基質が広範囲にわたり形成されることが明らかとなった (図 3A・B)。さらに、レーザーラマン顕微鏡で窒化ケイ素基板に沈着した水酸化ヒドロキシアパタイト (骨の主成分) の局在を可視化したところ、チタン合金以上に多くの水酸化ヒドロキシアパタイトが普遍的に形成されていることを確認した (図 3C・D)。ラマン分光分析により、窒化ケイ素上で形成された水酸化ヒドロキシアパタイトはチタンよりも結晶性が高いことが明らかとなった。さらに、マウス間葉系幹細胞株においても、同様の結果を得ることができた。インプラントと骨が十分に結合しない場合、緩みが生じインプラントの脱落やインプラント周囲骨折の原因となる。窒化ケイ素界面では、良質な骨組織が形成されるため強固な骨結合がより早く得られる可能性がある。

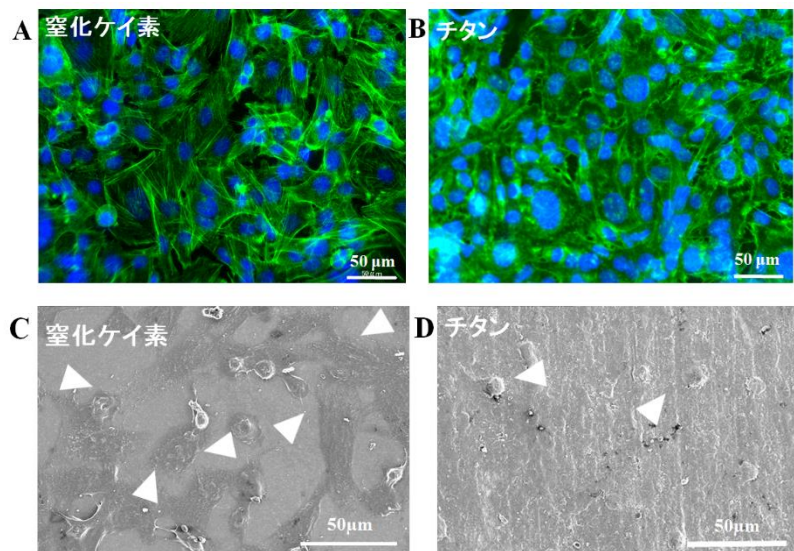


図2.窒化ケイ素基板の骨芽細胞の接着

A・B 蛍光顕微鏡像, C・D 電子顕微鏡像

A・B 窒化ケイ素上の骨芽細胞を蛍光標識したファロイジンでアクチンフィラメントを染色した。窒化ケイ素上の骨芽細胞は、アクチンフィラメントを高発現した。C・D 窒化ケイ素上の骨芽細胞は、チタンと比較し広く伸展する。

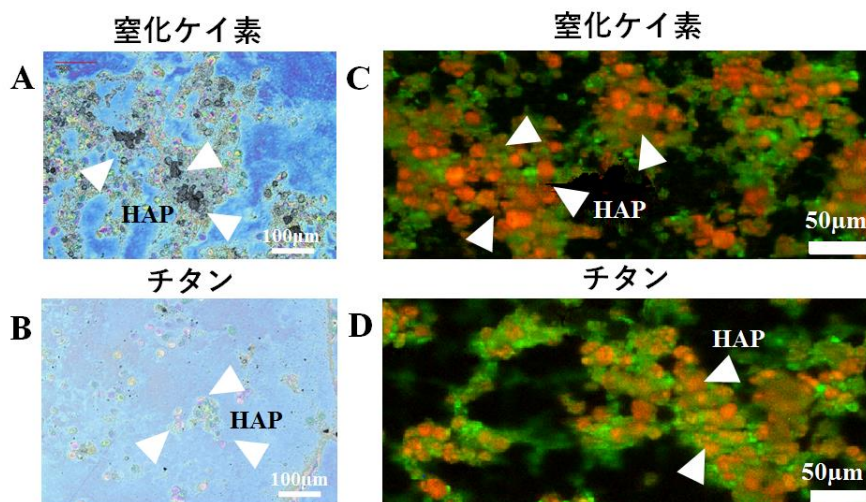


図 3. 窒化ケイ素基板の骨芽細胞の石灰化

A・B レーザーマイクロ顕微鏡像, C・D 水酸化ヒドロキシアパタイトのラマンイメージング

窒化ケイ素上の骨芽細胞は、チタンと比較し広範囲に渡り、結晶性の高い水酸化ヒドロキシアパタイト (HAP) (矢頭) を形成する。

近年、生物不活性のインプラントに成長因子を組み合わせ、骨形成を促す次世代のインプラント治療が開発されている。しかし、現在再生に使われる成長因子 (FGF-2, PDGF-BB, BMP-2 等) は、非常に高価であり、生体内では不安定であるため、改善点が多く広く普及されていない。窒

化ケイ素はインスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factors-1:IGF-1) や骨基質タンパク質の Gla オステオカルシンの産生を促すとされている。市販されている成長因子増強基質と異なり、窒化ケイ素は材料自体が生物活性を有するため、IGF-1 の骨増加作用より、材料表面や母床骨の骨増生を効率的に促すことが期待できる。興味深いことに、窒化ケイ素は破骨細胞の分化因子である RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) の発現を抑制する。前途のように、窒化ケイ素は常在菌に対し抗菌効果を有するため、人工関節周囲感染 (periprosthetic joint infection) の発症や人工関節における骨溶解の予防をできる可能性がある。

参考文献

- 1) B. S. Bal & M. N. Rahaman : Acta Biomaterialia, 8 (2012) 2889.
- 2) G. Pezzotti et al: ACS Biomaterials Science & Engineering, 2(2016) 1121.
- 3) G. Pezzotti et al: Scientific Reports. 19, (2016) 31717.
- 4) G. Pezzotti et al: Scientific Reports. 7, (2017) 44848.
- 5) G. Pezzotti et al: Applied Materials Today. 9, (2017) 82.
- 6) G. Pezzotti et al: Macromolecular Bioscience. 6,(2018):e1800033.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Boschetto Francesco, Adachi Tetsuya, Horiguchi Satoshi, Fainozzi Danny	4. 巻 23
2. 論文標題 Monitoring metabolic reactions in Staphylococcus epidermidis exposed to silicon nitride using in situ time-lapse Raman spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/1.JBO.23.5.056002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Pezzotti Giuseppe, Bock Ryan M., McEntire Bryan J., Adachi Tetsuya, Marin Elia, Boschetto Francesco, Zhu Wenliang, Mazda Osam, Bal Sonny B.	4. 巻 143
2. 論文標題 In vitro antibacterial activity of oxide and non-oxide bioceramics for arthroplastic devices: I. In situ time-lapse Raman spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3708 ~ 3721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8an00233a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Boschetto Francesco, Toyama Nami, Horiguchi Satoshi, Bock Ryan M., McEntire Bryan J., Adachi Tetsuya, Marin Elia, Zhu Wenliang, Mazda Osam, Bal B. Sonny, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 143
2. 論文標題 In vitro antibacterial activity of oxide and non-oxide bioceramics for arthroplastic devices: II. Fourier transform infrared spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 2128 ~ 2140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c8an00234g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Pezzotti Giuseppe, Marin Elia, Adachi Tetsuya, Lerussi Federica, Rondinella Alfredo, Boschetto Francesco, Zhu Wenliang, Kitajima Takashi, Inada Kosuke, McEntire Bryan J., Bock Ryan M., Bal B. Sonny, Mazda Osam	4. 巻 18
2. 論文標題 Incorporating Si3N4 into PEEK to Produce Antibacterial, Osteoconductive, and Radiolucent Spinal Implants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 1800033 ~ 1800033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.201800033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Paccotti Niccolo, Boschetto Francesco, Horiguchi Satoshi, Marin Elia, Chiado Alessandro, Novara Chiara, Geobaldo Francesco, Giorgis Fabrizio, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 8
2. 論文標題 Label-Free SERS Discrimination and In Situ Analysis of Life Cycle in Escherichia coli and Staphylococcus epidermidis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 131 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bios8040131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rondinella A., Marin E., Boschetto F., Zanocco M., Zhu W., Affatato S., Yamamoto K., Tateiwa T., Pezzotti G.	4. 巻 157
2. 論文標題 Degradation phenomena occurring in the conical taper of a short-term retrieved ZTA femoral head: A case study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Materials & Design	6. 最初と最後の頁 362 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matdes.2018.07.056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marin Elia, Adachi Tetsuya, Boschetto Francesco, Zanocco Matteo, Rondinella Alfredo, Zhu Wenliang, Bock Ryan, McEntire Bryan, Bal Sonny B., Pezzotti Giuseppe	4. 巻 159
2. 論文標題 Biological response of human osteosarcoma cells to Si3N4-doped Bioglasses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Materials & Design	6. 最初と最後の頁 79 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matdes.2018.08.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 G. Pezzotti	4. 巻 20
2. 論文標題 Bioceramics are not bioinert	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Material Today	6. 最初と最後の頁 395-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mattod.2017.06.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 C. A. Kuhns, B. J. McEntire, R. M. Bock, G. Pezzotti, B. Bal	4. 巻 17
2. 論文標題 An Assessment of the Inherent Antimicrobial Resistance of Biomaterials Utilized in Spinal Fusion Surgery	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Spine Journal	6. 最初と最後の頁 168-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.spinee.2017.07.249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 C. A. Kuhns, R. M. Bock, B. J. McEntire, B. Bal, G. Pezzotti	4. 巻 17
2. 論文標題 Enhanced Bioactivity and Bacteriostasis of PEEK Polymers Through Incorporation of Silicon Nitride Particles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Spine Journal	6. 最初と最後の頁 169-169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.spinee.2017.07.250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 G. Pezzotti, N. Oba, W. Zhu, E. Marin, A. Rondinella, F. Boschetto, B. McEntire, K. Yamamoto, B. S. Bal	4. 巻 64
2. 論文標題 Human osteoblasts grow transitional Si/N apatite in quickly osteointegrated Si3N4 cervical insert	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 411-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2017.09.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 G. Pezzotti, R. M. Bock, T. Adachi, A. Rondinella, F. Boschetto, W. Zhu, E. Marin, B. McEntire, B. S. Bal, O. Mazda	4. 巻 9
2. 論文標題 Silicon nitride surface chemistry: A potent regulator of mesenchymal progenitor cell activity in bone formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Applied Materials Today	6. 最初と最後の頁 82-95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.apmt.2017.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Giuseppe Pezzotti
2. 発表標題 バイオセラミックスにおける抗菌性について
3. 学会等名 第49回日本人工関節学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 B. J. McEntire, G. Pezzotti, R. Bock, T. Adachi, E. Marin, F. Boschetto, W. Zhu, B. S. Bal
2. 発表標題 The Antimicrobial Resistance of Oxide and Non-Oxide Ceramics
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 B. J. McEntire, G. Pezzotti, W. Zhu, E. Marin, A. Rondinella, F. Boschetto, R. M. Bock, B. S. Bal
2. 発表標題 Improved Bioactivity and Bacteriostasis of PEEK Polymers by Addition of Silicon Nitride Particles
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 G. Pezzotti, D. A. Cullen, R. M. Bock, W. Zhu, E. Marin, B. J. McEntire, K. L. More, Donovan N. Leonard, B. S. Bal
2. 発表標題 Upregulation of Osteoblastic Activity by Si-Y-N-O Phase Chemistry
3. 学会等名 Orthopedic Research Society 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Adachi ,T Horiguchi S, Rondinella A, Boschetto Adachi ,T Horiguchi S, Rondinella A, Boschetto F, Marin E, Yamamoto T, McEntire BJ , Mazda O, Kanamura N, Pezzotti G.F, Marin E, Yamamoto T, McEntire BJ , Mazda O, Kanamura N, Pezzotti G.
2. 発表標題 Osteoinductive potential of silicon nitride ceramics versus mesenchymal stem cells
3. 学会等名 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀口智史, 足立哲也, 山本俊郎, Giuseppe Pezzotti , 松田修, 金村成智
2. 発表標題 骨伝導能を有する窒化ケイ素セラミックスの歯科インプラントへの応用
3. 学会等名 日本歯周病学会60周年記念京都大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 堀口智史, 足立哲也, 山本俊郎, Giuseppe Pezzotti , 松田修, 金村成智
2. 発表標題 骨誘導と抗菌性を併せ持つ新規インプラント材料の開発
3. 学会等名 平成29年度 4 大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松田 修 (Mazda Osam) (00271164)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山本 俊郎 (Adachi Tetsuya) (40347472)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	足立 哲也 (Toshiro Yamamoto) (10613573)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	