

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04734

研究課題名(和文) 生体必須金属イオンを生体内へ供給する高機能バイオマテリアルの創製

研究課題名(英文) High-performance biomaterial with essential metal ions to supply to in the living body

研究代表者

平栗 健二 (Hirakuri, Kenji)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：60225505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Zn溶出試験とXPSの深さ方向分析より、*in vitro*と*in vivo*の両方の環境でZn-DLCからZnが溶出していることを確認した。加えて、Znの溶出量は、*in vivo*環境で最も高かった。*in vivo*試験結果は、Zn-DLCの使用が骨を太く、強固に治療する傾向があることを示した。Zn-DLCが従来のインプラントによる骨折治療効果を大きく向上させる新しいコーティング材料として有望であることを示している。そして、最終的には骨折患部に直接Znを供給できるZn-DLCは、ZnとDLCの両方の利点を持つ新しいコーティング材料であり、骨折の早期治療と治療結果の改善が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、DLC特有の抗血栓性、化学的安定性、低摩擦、高硬度などの静的特性に加え、生体細胞の活性化に重要な役割を演じる金属元素である亜鉛(Zn)をドーブすることで、生体活性元素を含有したDLCによる表面コーティング技術のバイオマテリアルへの展開を目的とした。この研究結果を「生体内におけるZn溶出型DLC膜の骨形成促進効果」、「Z生体材料としてのZn-DLCの深さ方向におけるZn溶出特性」、「骨折治療に有効な生体材料であるZn-DLC」とした発表を行い、研究成果の社会還元に寄与した(研究発表参照)。

研究成果の概要(英文)： This study proposes that osteogenesis ability of zinc (Zn)-containing diamond-like carbon (Zn-DLC) splint was assessed *in vivo* experiments using a mouse model. The results of the *in vivo* tests using mice demonstrated that the use of Zn-DLC splints tend to stimulate the bone to grow thick. It was also shown that Zn-DLC can elute Zn even in different biological environments and that the elution amount can be the highest in an *in vivo* environment. These results indicate that Zn-DLC may improve upon the therapeutic effect of conventional implants with the eluted Zn in healing fractures.

研究分野：複合材料および界面関係

キーワード：Zn-DLCコーティング Zn溶出 骨代謝 深さ方向元素分析 骨折治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

新しい医療用材料として近年注目されているのがダイヤモンド状炭素膜 (Diamond-like Carbon : DLC) である。DLC はダイヤモンドとグラファイトの構造を併せ持つ炭素系薄膜材料であり、高硬度、低摩擦、生体適合性等の特徴がある。また、成膜時に追加の元素を含めることで、DLC の特性を向上させる研究が注目されている。現在までに、フッ素や銀を含有する DLC が開発され、さらなる研究が進められている。これらの元素を含む DLC は、抗菌性、生体適合性、耐薬品性の向上等の特性を付与が可能である。亜鉛 (Zn) は、生体必須微量元素のひとつであり、骨形成促進因子として大きな役割を果たしている。Zn の吸収能は老化と共に低下し、潜在的 Zn 欠乏状態に陥りやすい。

### 2. 研究の目的

Zn-DLC は、生体外 (*in vitro*) 環境下において骨芽細胞株の石灰化を促進し、骨形成を促進するコーティング材料であることが確認された。しかし、生体 (*in vivo*) に対する骨形成促進効果と Zn の溶出特性は不明であり、これに関する更なる実験データが必要である。本研究では、Zn-DLC の生体に対する骨形成促進効果と治癒結果の改善性能について検討するために、マウスによる骨折モデル試験を実施し、CT を用いて骨折の治癒状態を評価した。また、生物学的環境下における Zn-DLC の Zn 溶出特性を評価するために、3 種類の異なる生物学的環境モデル下に設置した後の Zn-DLC の深さ方向元素分布を測定し、結果を比較した。

### 3. 研究の方法

Zn-DLC は、チタン TP340H (JIS H 4600 X Ti) に成膜された。Zn-DLC が骨形成に与える影響について、Zn 溶出量を分析した。Zn-DLC を細胞培養用培地 (MEM- $\alpha$ ) に 1 時間浸漬した後、その MEM- $\alpha$  を全量取り出し、新たに同量の MEM- $\alpha$  を加えた。同様の操作を 3、5、9、24、32、48 時間でも行い、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-OES) を用いて MEM- $\alpha$  中 Zn 量の経時的変化を測定した。Zn-DLC を用いた場合の骨折の治癒結果を評価するために *in vivo* 実験を行った。手術後 4 週間の治癒状態を Computed Tomography (CT) を用いて作成した 3 次元像で観察した。骨折の治癒結果を目視で評価し、IV、III、II、I の 4 つのレベルに分類した。この評価指標では、数値が大きいほど完治に近いことを示している。3 次元像を用いて、骨評価パラメータ (骨体積  $V$ 、曲げに対する強さ  $I_m$ 、ねじれに対する強さ  $I_p$ 、皮質骨厚  $I_t$ 、皮質骨面積比率  $I_a$ 、海綿骨密度  $I_d$ ) を算出し、骨形成促進効果を評価した。

Zn 溶出特性を評価するために、次の 4 試料の深さ方向の元素分布を X 線光電子分光法 (XPS) 分析装置 (JPS-9030、JEOL 日本電子株式会社) の XPS 深度プロファイリングによって測定した。

### 4. 研究成果

作製した Zn-DLC は、Zn 溶出量に経時的な変化があるが、常に 0.3 ppm 以上の Zn 溶出量を維持している。このことから、作製した Zn-DLC 試料は骨折治療に有効な Zn 量を供給する能力があることが示唆された。4 週間後までに完治した個体数は、DLC サンプルで固定した場合は 2 匹であり、Zn-DLC で固定した場合は 4 匹と 2 倍になった。次に、骨折患部の治癒状態を定量化して評価した。3 次元像をもとに、各マウスの骨評価パラメータ ( $V$ ,  $I_m$ ,  $I_p$ ,  $I_t$ ,  $I_a$ , and  $I_d$ ) を算出した。Zn-DLC の方が DLC と比較して  $V$ 、 $I_m$ 、 $I_p$  がそれぞれ  $5.33 \text{ mm}^3$ 、 $10.91 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}$ 、 $11.83 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}$  向上している (Table 1)。この結果は骨折患部が Zn-DLC から溶出した Zn によってより太く、強固に治癒した傾向があることを示している。加えて、Zn-DLC の方が DLC と比較して、 $I_t$ 、 $I_a$ 、 $I_d$  がそれぞれ  $-0.0250 \text{ mm}$ 、 $-4.940 \%$ 、 $100.8 \text{ mg}/\text{cm}^3$  向上している (Table 4)。これは、Zn-DLC を用いることで皮質骨が薄化し、海綿骨量が増加した傾向を示している。海綿骨は表面積が大きく、骨髄 (血液) と広く接しているため、骨代謝が皮質骨に比べて 8 倍であると言われている。

よって、皮質骨の薄化と海綿骨量の増加は、Zn-DLCによる骨代謝の促進、つまりZn-DLCの骨形成促進効果を示唆している。また、骨粗鬆症はエストロゲンの減少などにより、骨代謝の速い海綿骨で骨量減少が生じる。よって、海綿骨量を増加させる効果のあるZn-DLCは、骨粗鬆症による骨折に有効である可能性が示された。

Table 1 Bone assessment parameters.

Parameter	DLC	Zn-DLC
	Median (25 %, 75 % Percentile)	Median (25 %, 75 % Percentile)
V [mm <sup>3</sup> ]	25.99 (25.51, 28.97)	31.32 (30.00, 35.51)
I <sub>m</sub> [μg · cm]	28.91 (26.14, 43.42)	39.82 (33.83, 44.50)
I <sub>p</sub> [μg · cm]	186.10 (168.88, 245.61)	197.93 (184.56, 258.87)
I <sub>t</sub> [mm]	0.242 (0.220, 0.253)	0.217 (0.210, 0.222)
I <sub>a</sub> [%]	54.38 (48.93, 59.35)	49.44 (47.39, 50.11)
I <sub>d</sub> [mg/cm <sup>3</sup> ]	512.9 (495.6, 596.7)	613.7 (523.6, 644.1)

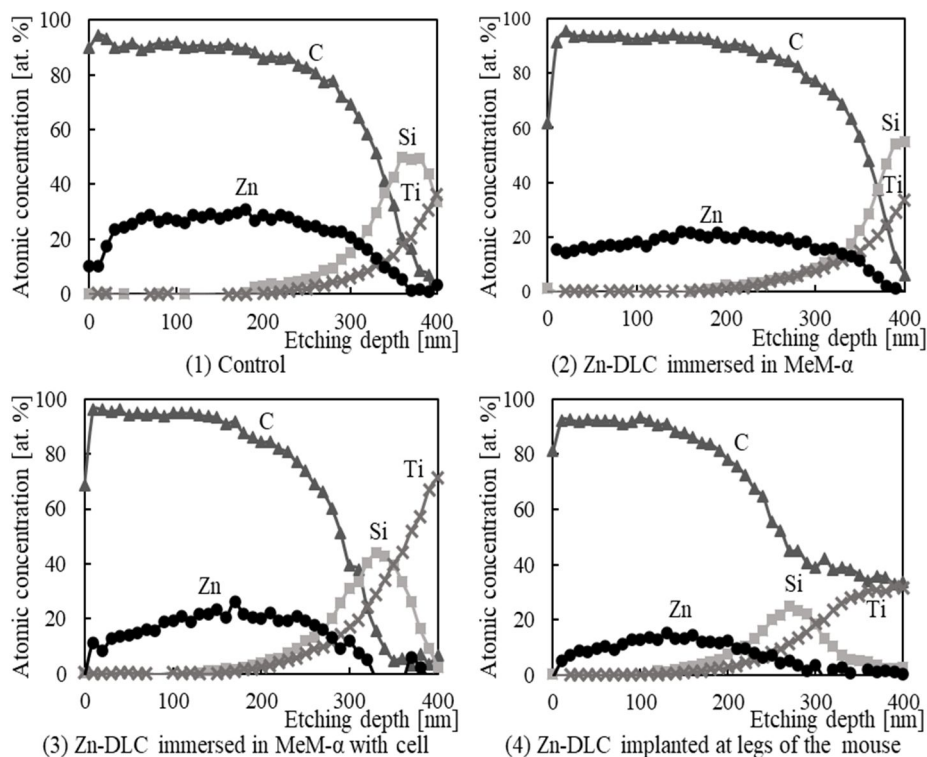


Fig. 3. Results of XPS depth profiling of each sample.

(only the measurement values of Zn were multiplied by 5 to clarify the results of Zn.)

異なる生物学的環境モデル下に置いた Zn-DLC の Zn 溶出特性を評価するために、深さ方向の原子数濃度を XPS 深度プロファイリングによって測定した。Fig. 3 は、各試料の深さ方向の原子濃度の代表例を示している。ただし、Zn の結果を見やすくするために Zn の測定値のみを 5 倍に拡大して表記している。すべての試料において、Zn、C、Si (中間層)、Ti (基板) の分布が確認できた (Fig. 1)。このことから、異なる生物学的環境モデル下に設置しても Zn-DLC サンプルの原子分布は Zn を除いて大きく変化しないと見える。Zn 濃度は (1) ~ (4) の順で低くなっていることが見て取れる。このことについて、深さ 0~200 nm における (2)~(4) の Zn 溶出量 (at. %) を算出することで詳細に検討した。Zn 溶出量は、(2)~(4) それぞれの Zn 原子濃度とコントロールである (1) の Zn 原子濃度の差を算出することで求めた。算出結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 は、(A) の Zn 溶出量が (B)、(C) と比較してすべての領域で多いことを示した。また、(B) と (C) を比較すると、(B) の方が最表面付近 (10~80 nm) で Zn 溶出量がわずかに多いことが確認できる。加えて、(A) は (B)、(C) と比べて深部でも Zn 溶出が確認できる。以上の結果から、Zn-DLC は *in vitro* 及び *in vivo* のどちらの環境でも Zn を溶出し、その溶出量は *in vivo* 環境下に設置した場合が最も多く、次いで骨芽細胞を播種し培養液中に設置した場合、培養液中に設置した場合となっている。これらの結果は、Zn-DLC が実際の骨折治療にも有望な材料である可能性を示唆している。

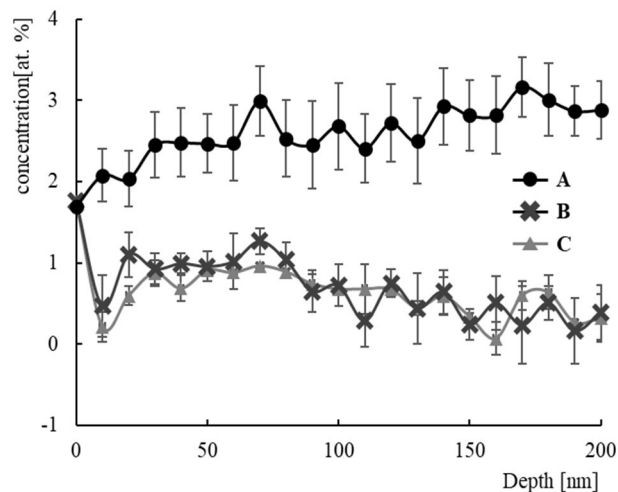


Fig. 4. The calculated concentration of Zn elution from each sample.

A: Mouse sample ((1)-(4)), B: Cell sample ((1)-(3)), C: Media sample ((1)-(2)).

Mean  $\pm$  SE, (1), (3), (4): n=3, (2): n=2

骨折患部に直接 Zn を供給できる Zn-DLC は、Zn と DLC の両方の利点を持つ新しいコーティング材料であり、骨折の早期治療と治癒結果改善が期待できる。本研究では、Zn 溶出試験と XPS の深さ方向分析より、*in vitro* と *in vivo* の両方の環境で Zn-DLC から Zn が溶出していることを確認した。加えて、Zn の溶出量は、*in vivo* 環境で最も高かった。*in vivo* 試験結果は、Zn-DLC の使用が骨を太く、強固に治療する傾向があることを示した。これらの結果は、Zn-DLC が従来のインプラントによる骨折治療効果を大きく向上させる新しいコーティング材料として有望であることを示している。

Zn は比較的安全性は高いものの、過剰摂取により貧血や細胞傷害を引き起こす。そのため、今後、最適な Zn 溶出の方法や Zn の溶出量及び溶出速度の制御について検討する必要がある。また、膜硬度分析は、Zn-DLC を生体内に留置した場合、膜厚が減少する可能性を示唆した。体内に流出した Zn-DLC が細胞及び生体に与える影響についても今後調査する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 K. Sakurai, M. Hiratsuka, H. Nakamori, K. Nakamori, K. Hirakuri	4. 巻 96
2. 論文標題 Evaluation of sliding properties and durability of DLC coating for medical devices	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diamond and Related Materials	6. 最初と最後の頁 97-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.diamond.2019.03.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 平栗建二、小野寺修、齋藤一拓	4. 巻 12
2. 論文標題 DLCのバイオマテリアルへの応用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 メカニカル・サーフェス・テック	6. 最初と最後の頁 31-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kenji Hirakuri
2. 発表標題 Keynote speech
3. 学会等名 Biomedical materials, advances in medical imaging technology, and cell therapy, Japan-Taiwan Medical Sciences Frontiers Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Saito, Yasuharu Ohgoe, Keisuke Sato, Masanori Hiratsuka, Hiroshi Honda, Yoshinobu Manome, Kenji Hirakuri
2. 発表標題 Evaluation of Zn elution from Zn-DLC as biomaterial
3. 学会等名 International Conference on Diamond and Carbon Materials（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Saito, Yasuharu Ohgoe, Masanori Hiratsuka, Hiroshi Honda, Yoshinobu Manome, Kenji Hirakur
2. 発表標題 Zn-DLC for effective treatment of fracture
3. 学会等名 International Symposium on Engineering and Natural Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤一拓、馬目佳信、平塚傑工、本田宏志、大越康晴、平栗健二
2. 発表標題 生体材料としてのZn-DLCの深さ方向におけるZn溶出特性
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 4. 齋藤一拓、藤岡宏樹、馬目佳信、平塚傑工、本田宏志、大越康晴、平栗健二
2. 発表標題 折治療に有効な生体材料であるZn-DLC
3. 学会等名 第33回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. Shunta Kidera, Kouki Fujioka, Yasuharu Ohgoe, Keisuke Sato, Masanori Hiratsuka, Hitomi Tsuboi, Hideki Nakamori, Hideki Masuda, Hiroshi Honda, Yoshinobu Manome, Kenji Hirakuri
2. 発表標題 Time course of Zn release from Zn-containing DLC
3. 学会等名 International Conference on Diamond and Carbon Materials, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 2. Shunta Kidera, Kouki Fujioka, Yasuharu Ohgoe, Keisuke Sato, Masanori Hiratsuka, Hitomi Tsuboi, Hideki Nakamori, Hideki Masuda, Hiroshi Honda, Yoshinobu Manome, Kenji Hirakuri
2. 発表標題 Evaluation of fracture treatment of Zn-DLC for biomaterial application
3. 学会等名 International Conference on Material and Chemical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 3. Kidera Shunta, Katouno Junichi, Fujioka Kouki, Ohgoe Yasuharu, Sato Keisuke, Hiratsuka Masanori, Tsuboi Hitomi, Nakamori Hideki, Masuda Hideki, Honda Hiroshi, Manome Yoshinobu, Hirakuri Kenji
2. 発表標題 Effect of Zn-release diamond-like carbon films on bone formation in vivo
3. 学会等名 第57回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 4. 齋藤一拓, 木寺俊太, 藤岡宏樹, 馬目佳信, 平塚傑工, 本田宏志, 大越康晴, 佐藤慶介, 平栗健二
2. 発表標題 生体内におけるZn-DLCのZn溶出評価
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 土肥健純、平栗健二他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京電機大学出版	5. 総ページ数 229
3. 書名 医用工学の基礎	

〔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	馬目 佳信  (Manome Yoshinobu)  (30219539)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授     (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関