

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09713

研究課題名（和文）高齢者における骨質の制御を期待する生体材料の創製とインプラントへの応用

研究課題名（英文）Creation of biomaterials expected to control bone quality in the elderly and application to implants

研究代表者

楠本 哲次（Kusumoto, Tetsuji）

大阪歯科大学・医療保健学部・教授

研究者番号：70186394

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：PEEK材料の生物学特性を改善するために、様々なコーティング方法が試みられている。その中に、PEEK表面にチタンナノ構造での表面改質は、親水性を増加させ、細胞早期接着および硬組織分化誘導を促進することを示している。しかし、本材料の生体適合性は明らかではない。そこで、本研究では純チタン金属成膜PEEK材料へのナノ構造処理がラット骨髄細胞の挙動にどのような影響を与えるのか検討したところ、プラズマ処理により純チタン金属をコーティングし、ナノ構造を析出したPEEK材料表面が高い硬組織分化誘導能を示す可能性の一端が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な特色は、ナノテクノロジーの一つである材料表面のナノ構造制御に着目し、新たな生体材料を開発し他分野への応用を視野に入れているという点にある。また、構造制御の方法も比較的簡易であることから、PEEKインプラント材料の生体親和性の著しく向上することが期待でき、この結果は医科界・歯科界において多くの患者に普及させることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：Various coating methods have been attempted to improve the biological properties of PEEK materials. Among them, it is shown that surface modification with titanium nanostructures on the PEEK surface increases hydrophilicity and promotes early cell adhesion and induction of hard tissue differentiation. However, the biocompatibility of this material is not clear. Therefore, in this study, we investigated how the nanostructure treatment of pure titanium metal-deposited PEEK material affects the behavior of rat bone marrow cells. As a result, the pure titanium metal was coated by plasma treatment to precipitate nanostructures. Part of the possibility that the surface of PEEK material exhibits high ability to induce hard tissue differentiation was shown.

研究分野：再生歯学

キーワード：PEEK インプラント in vitro in vivo

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、超高齢社会の到来により、健康寿命の増進のために歯科医療が占める役割が非常に重いと推察される。インプラント治療は欠損歯の多い高齢者にとって、健康寿命を延長する可能性を秘めた治療であると推察される。しかし、高齢者に対する歯科治療には全身疾患の存在および骨質が低いことから、従来の金属の弾性では咬合力を与えた時に骨の破折を引き起こし、更なるリスクを与えてしまう可能性が高いと推察される。

一般的にインプラント治療は歯列欠損補綴治療において有望な方法として広く受け入れられている。しかし、従来の歯科インプラント材料とするチタンおよびその合金は、X線撮影でアーチファクトが生じるとともに、皮質骨よりも著しく高い弾性率を有し、応力遮蔽および骨吸収をもたらす。近年、整形外科および歯科におけるチタンおよびその合金に対する代替の生体材料として、ポリエーテルエーテルケトン (polyetheretherketone, PEEK) は歯科インプラントの理想的な材料と考えられている。PEEK 製インプラントはチタン製インプラントと比較して、優れた X線透過性を持ち、弾性が皮質骨に近いためインプラント周囲骨に対する応力遮蔽効果を抑え、骨の育成を促進すると評価されている。但し、PEEK はチタンに比べて骨伝導能が非常に限られている。

我々は今まで、インプラントが早期的にオッセオインテグレーションを獲得するため検討をしてきた。申請者は、純チタン金属を 10M の水酸化ナトリウム水溶液に室温で 24 時間浸漬することで純チタン金属表面にナノネットワーク構造 (titanium nanonetwork structures, TNS) が析出することを明らかにし、*in vitro* レベル硬組織誘導能を向上させる可能性を示唆した。また、同構造はインプラント埋入周囲組織の微小血管構築にも有用であることを報告した。本構造はインプラントの初期固定時に優れた構造であることが推察される。また、TNS インプラントスクリューを SD 系ラットの大腿骨に埋入後、術後 4、8 週の純チタン TNS インプラントスクリュー周囲の組織を切り出し、MicroCT 分析を行い、骨接触率を求めたところ、TNS 表面では純チタンに比べて、著明な新生骨骨梁が形成され、高い骨接触率を示し、*in vivo* レベルにおいても有用であるという結果を示した。

PEEK がポリマー材料の種類であり、X線透過性や高い弾性を持ち、整形外科および歯科用途におけるチタンの代用品としてより多くの注目を集めている。本材料に表面処理を与えることができれば、超高齢者社会が到来しても、インプラント治療の幅を広げることができるのではないかと推察される。

2. 研究の目的

PEEK 材料の生物学特性を改善するために、様々なコーティング方法が試みられている。その中に、PEEK 表面にチタンナノ構造での表面改質は、親水性を増加させ、細胞早期接着および硬組織分化誘導を促進することを示している。そこで、本研究では、医療用 PEEK 材料表面にチタンを真空蒸着でコーティングし、常温でアルカリ処理することで、PEEK 表面にチタンナノネットワーク構造を析出させ、ナノレベルでの表面構造制御により PEEK 材料の早期硬組織形成を促し、PEEK 製インプラントのオッセオインテグレーションの獲得期間を短縮させる新規インプラント材料の創製を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、チタンナノ構造を析出した PEEK 材料をインプラント体として生体に埋入した場合、SD 系ラットのインプラント周囲骨組織の評価を中心とする。SD 系ラットの大腿骨骨髓から間葉系幹細胞を単離し、チタンナノ構造を析出した PEEK 材料上にこれを播種・培養し、細胞接着能、細胞増殖能、骨芽細胞への分化能について評価する。

(1) 試料作製

実験材料としてクオドラント社より購入した直径 10mm の PEEK 材料を使用した。純チタン金属のコーティングは株式会社尾池工業の協力を得て行った。純チタン金属のコーティングはプラズマ処理を用いて行い、プラズマの強度は 2 種類とし、純チタン金属の膜厚は 200nm、1000nm とし、4 つの実験条件とした。なお、プラズマ処理前には各試料をアセトン、エチルアルコール、イオン交換水で各 10 分間超音波洗浄を行った。

ナノ構造の析出には、各試料を 30 の 10 M の水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で大気圧条件下にて 24 時間反応させた。反応後、試料を取り出し、イオン交換水にて導電率が 5 μm 以下になるまで洗浄を行った。

(2) 表面解析

試料の微細構造の観察には、実験群および対照群の純チタン金属表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000, 島津)、走査型プロ - プ顕微鏡 (SPM, SPM-9600, 島津) を使用して X、Y および Z 方向に 2 μm の範囲をスキャンした。試料表面における元素分析を X線電子分光分析装置 (XPS, PHI x-tool, アルバックファイ) にて行った。

(3) 細胞培養

生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。プレートに 1 穴あたり 4 万個の細胞を播種後、培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37℃、5 %CO₂ を含む加湿条件下で培養した。細胞はコンフレントに達するまで、各試料上で培養した。培地に 10 %FBS および骨分化誘導剤 (10 mM β -グリセロリン酸ナトリウム (和光純薬, 東京, 日本), 80 μ g/ml アスコルビン酸 (ナカライテスク, 京都, 日本), 10⁻⁸ M デキサメタゾン含有の分化誘導培地を用い分化誘導を開始した。

(4) 接着試験および増殖試験

実験群および対照群のナノジルコニア板を 24well プレート (Falcon, Becton Dickson Labware, NJ, USA) に配置し、ラット骨髄細胞を 4 × 10⁴ 個/ml ずつ播種し、1, 3, 8, 24 および 72 時間それぞれ培養し、各培養後の細胞増殖について CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて測定した。

(5) ALP 活性

培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.2 % トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には、Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit® (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を、the Pico green Double standard DNA Assay Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) を用いメーカー指示に従い行った。DNA の定量後、DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した。

(6) カルシウム析出量

培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10 %ギ酸にて抽出した。カルシウム析出量は、Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本) を用いて定量した。

(7) 骨形成に関する遺伝子の発現

実験群および対照群のナノジルコニア表面上の培養 3 日後の培養細胞より逆転写後、mRNA を抽出し、アプライドバイオシステム社製 StepOne Plus™ Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における骨形成に関する遺伝子のマーカーについて比較検討した。

(8) 統計解析

各試験の評価はそれぞれ 3 回行い、各実験の得られたデータの統計処理は SPSS 14.0 J for Windows を用いて行った。実験群および対照群の有意差検定は Student の t 検定を用いて行い、5%以下を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 表面解析

SEM の所見では、濃アルカリ処理前で滑らかな像が観察されるのに対し、濃アルカリ処理を施したすべての群ではナノレベルネットワーク構造が観察された。SPM の所見では濃アルカリ処理前で滑らかな像が観察されるのに対し、濃アルカリ処理を施したすべての群ではナノメートルレベルのノジュール構造が観察された。(図 1)

濃アルカリ処理前後の PEEK 材料表面を直接観察したところ、弱プラズマ処理を施した PEEK 材料にコーティングされた純チタン金属表面は一部剥離していた。また、強プラズマ処理の 1000nm の膜厚の PEEK では剥離は認めなかったものの、純チタン金属の膨張を認めた。強プラズマ処理の 200nm 膜厚の PEEK では濃アルカリ処理前後で変化は認めなかった。

(2) 細胞接着および増殖

すべての計測時間で、細胞接着および増殖量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。(図 2)

(3) ALP 活性

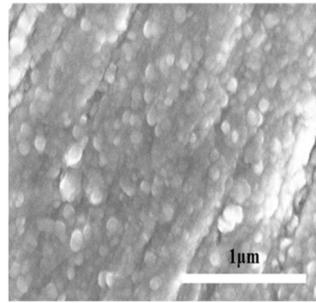
すべての計測時間で、ALP 活性は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(4) カルシウム析出量

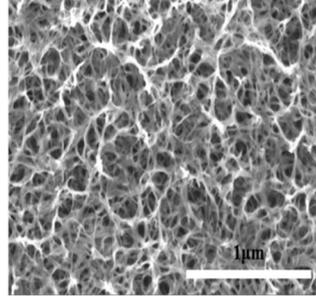
すべての計測時間で、カルシウム析出量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(5) 骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現

すべての計測時間で、骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

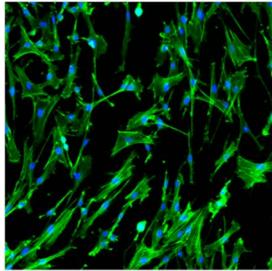


**Ti coated
PEEK**

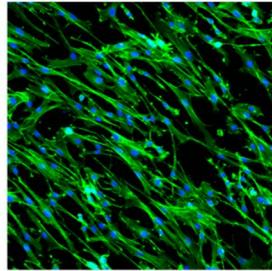


**TNS modified
PEEK**

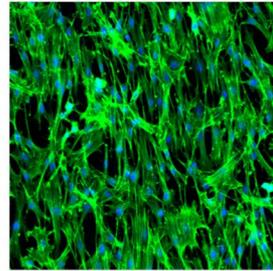
图 1 SEM 像



PEEK



**Ti coated
PEEK**



**TNS modified
PEEK**

图 2 骨髓细胞染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Takao Seiji, Komasa Satoshi, Agariguchi Akinori, Kusumoto Tetsuji, Pezzotti Giuseppe, Okazaki Joji	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of Plasma Treatment on the Bioactivity of Alkali-Treated Ceria-Stabilised Zirconia/Alumina Nanocomposite (NANOZR)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21207476	査読の有無 無
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 Komasa Satoshi, Takao Seiji, Yang Yuanyuan, Zeng Yuhao, Li Min, Yan Sifan, Zhang Honghao, Komasa Chisato, Kobayashi Yasuyuki, Nishizaki Hiroshi, Nishida Hisataka, Kusumoto Tetsuji, Okazaki Joji	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of UV Treatment on Ceria-Stabilized Zirconia/Alumina Nanocomposite (NANOZR)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13122772	査読の有無 無
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 Yan Sifan, Li Min, Komasa Satoshi, Agariguchi Akinori, Yang Yuanyuan, Zeng Yuhao, Takao Seiji, Zhang Honghao, Tashiro Yuichiro, Kusumoto Tetsuji, Kobayashi Yasuyuki, Chen Liji, Kashiwagi Kosuke, Matsumoto Naoyuki, Okazaki Joji, Kawazoe Takayoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Decontamination of Titanium Surface Using Different Methods: An In Vitro Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13102287	査読の有無 無
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 Komasa S, Takao S, Zhang H, Li M, Yan S, Zeng Y, Yang Y, XU HANG, Kashiwagi K, Kusumoto T, Yoshimine S, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J, Kawazoe T	4. 巻 32
2. 論文標題 Amelogenin promotes bone regeneration using human dental pulp cells on modified titanium nanostructures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Japan Association of Oral rehabilitation	6. 最初と最後の頁 32-45
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 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 Zeng Y, Yang Y, Chen L, Yin D, Zhang H, Tashiro Y, Inui S, Kusumoto T, Nishizaki H, Sekino T, Okazaki J, Komasa S	4. 巻 20(5)
2. 論文標題 Optimized Surface Characteristics and Enhanced in Vivo Osseointegration of Alkali-Treated Titanium with Nanonetwork Structures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Komasa S, Nishizaki M, Zhang H, Takao S, Yin D, Terada C, Kobayashi Y, Kusumoto T, Yoshimine S, Nishizaki H, Okazaki J, Chen L	4. 巻 20(4)
2. 論文標題 Osseointegration of Alkali-Modified NANOZR Implants: An In Vivo Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Terada C, Komasa S, Kusumoto T, Kawazoe T, Okazaki J	4. 巻 19(5)
2. 論文標題 Effect of Amelogenin Coating of a Nano-Modified Titanium Surface on Bioactivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
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 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 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高尾誠二, 小正 聡, 林 莉菜, 上り口晃成, 楠本哲次, 西崎 宏, 吉峰茂樹, 岡崎定司
2. 発表標題 生体適合性の向上を目指した新規セラミック材料の創製
3. 学会等名 令和2年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊 元元, Zhang H, 李 敏, Yang S, 林 莉菜, 小正 聡, 楠本哲次, 小正 裕, 岡崎定司
2. 発表標題 ポリエーテルエーテルケトン (PEEK) 材料への純チタンコーティング及びナノ構造析出条件の検討
3. 学会等名 第34回一般社団法人日本口腔リハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楊 元元, Zhang H, 小正 聡, 楠本哲次, 小正 裕, 岡崎定司
2. 発表標題 純チタンコート成膜PEEK材料へのナノ構造析出条件の検討
3. 学会等名 第50回公益社団法人日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楠本哲次, 小正 聡, 楊 元元, Zhang H, 小正 裕, 岡崎定司
2. 発表標題 ナノ構造を析出した新規セラミック材料の生体適合性の検討
3. 学会等名 第50回公益社団法人日本口腔インプラント学会記念学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高尾誠二, 小正 聡, 上り口晃成, 曾 昱豪, 楊 元元, 李 敏, Yan Sifan, 楠本哲次, 西崎 宏, 吉峰茂樹, 岡崎定司
2. 発表標題 大気圧プラズマ処理が新規セラミック材料表面に与える影響
3. 学会等名 令和元年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小正 聡, 高尾誠二, 田代悠一郎, 乾志帆子, 楠本哲次, 西崎 宏, 山本さつき, 吉峰茂樹, 岡崎定司
2. 発表標題 ナノ構造析出純チタン金属表面へのアメロジェニンコーティングが歯髄細胞に与える影響について
3. 学会等名 第33回日本口腔リハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小正 聡, 西崎真理子, 楠本哲次, 西崎 宏, 吉峰茂樹, 小正 裕, 岡崎定司
2. 発表標題 金属アレルギー患者への適応を目指す新規セラミックインプラント材料の創製
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高尾誠二, 小正 聡, 上り口晃成, 曾 昱豪, 楊 元元, 松本卓巳, 楠本哲次, 吉峰茂樹, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎定司
2. 発表標題 濃アルカリ処理を施したナノジルコニアへの大気圧プラズマ処理が与える影響について
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小正 聡, 西田 尚敬, 楠本 哲次, 西崎 宏, 岡崎 定司, 関野 徹
2. 発表標題 埋入周囲組織の硬組織・軟組織複合体への再生誘導を目指す新規材料
3. 学会等名 日本セラミックス協会2019年年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波床 真依, 小正 聡, 寺田 知里, 高尾 誠二, 松本 卓巳, 西崎 真理子, 楠本 哲次, 吉峰 茂樹, 小正 裕, 岡崎 定司
2. 発表標題 ナノ構造析出純チタン金属への加熱及びUV処理が血管内皮細胞の初期接着能に与える影響
3. 学会等名 平成30年度日本補綴歯科学会関西支部総会ならびに学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小正 聡, 西崎 真理子, 寺田 知里, Chen Luyuan, 波床 真依, 尹 徳栄, 高尾 誠二, 楠本 哲次, 西崎 宏, 吉峰 茂樹, 小正 裕, 岡崎 定司
2. 発表標題 アルカリ処理したナノジルコニアとナノ構造析出純チタン金属表面上の硬組織分化誘導関連の遺伝子発現の比較
3. 学会等名 第32回口腔リハビリテーション学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小正 聡, 寺田 知里, 楠本 哲次, 波床 真依, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎 定司
2. 発表標題 硬組織および軟組織の同時再生を目指す新規インプラント材料の創製
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田 知里, 小正 聡, 楠本 哲次, Chen Luyuan, Zhang H, 尹 徳栄, 吉峰 茂樹, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎 定司
2. 発表標題 アメリロジェニンコーティングナノ構造析出インプラントの生体適合性
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第127回学術大会
4. 発表年 2018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	小正 裕 (Komasa Yutaka) (10131385)	大阪歯科大学・医療保健学部・教授 (34408)	
研究 分担者	小正 聡 (Komasa Satoshi) (70632066)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	
研究 分担者	岡崎 定司 (Okazaki Joji) (80169094)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

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
---------	---------