

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390366

研究課題名(和文) 部位特異的な組織再生誘導を実現する多機能性インプラント

研究課題名(英文) A multifunctional implant which can achieve the site-specific tissue regeneration

研究代表者

前川 賢治 (Maekawa, Kenji)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：20304313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々が開発してきた生体内でインプラント表面にアパタイトを析出可能なチタン表面は、純チタンのみに応用可能なものであった。しかしながら実際に臨床で使用されているチタンインプラントは、チタン合金製であるため、この技術を臨床応用するためには、チタン合金に同様の性能を付与する必要があった。今回、我々は、チタン合金表面に対する新たな熱化学処理方法(LPD法)を確立することにより、生体内でアパタイトを析出可能なチタン合金表面への酸化膜作製方法を開発した。LPD法で表面改質したチタン合金表面には問題なく細胞接着が生じ、ラット骨髄由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化が亢進される傾向にあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Our previous technique for apatite deposition onto the titanium surface after insertion in human body, can be only applied to the pure titanium surface. However, in order to apply this surface modification technique to clinically used implants, improvement of the technique is necessary, because all the commercially available titanium implants are made from titanium alloy. For this purpose, we developed liquid phase deposition (LPD) technique, which can induce the apatite formation onto the titanium alloy surface after insertion in human body. We found that rat bone marrow stromal cells (rBMSC) can be attached to this modified titanium alloy surface (treated by LPD technique) and the osseogenesis of rBMSC tended to be accelerated. Recently, the investigation of the bioactivity of this surface modification technique using rat model is still ongoing.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：チタン合金 表面改質 アパタイト 自己析出 骨結合促進

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療の技術革新は、低侵襲かつ高い審美性を実現し、より患者の高い満足度を求める第2のフェーズに移っている。外科的侵襲や治療期間を減じることができる抜歯後即時埋入や即時、早期修復法は、時代の要求に答えられる臨床的手技として適応拡大が求められているが、その実現には骨結合獲得期間の短縮を可能とする技術革新が必要である。また、残存歯や軟組織との調和がとれた審美性を長期に維持するには、インプラントの粘膜貫通部やアパットメントが上皮や結合組織と強く接合し、維持されるための機能性を持たせることが重要である。しかしながら、次ページの図に示すように、無処理のチタン表面においては上皮細胞の接着を得ること自体が困難である。このような上皮の脆弱な封鎖性がインプラント周囲炎の最も大きな原因とも考えられ、現在のインプラントシステムの持つ問題点の一つとなっているが、国内外の研究成果をみても、解決法の開発には至っていない。このような問題点を解決するために、まず我々は電気化学的手法を用いて、アナターゼ酸化被膜をチタン表面に生成することにより、高い生体親和性を有し、かつ生体内の体液成分と反応してアパタイトを自己析出させようことを発見した。その結果、未処理のものに比べて約2倍の骨伝導能を付与することに成功した(特開2004-183017)。しかし、現在の酸化被膜生成法により生体内で析出するアパタイトは結晶性が高く完全に吸収しない可能性があり、層の剥離や感染の危険性がある。従って、析出するアパタイトの結晶性を低下させ、生体内で吸収する性質を持たせてやればさらに有用な処理法となる。さらに、光反応性ゼラチンをチタン表面に化学吸着させることにより、部位選択的な成長因子等の吸着制御を可能とし、上皮系細胞の応

答促進を起こさせることに遂に成功した(特願2005-220869)。

この部位特異的な上皮細胞接着制御技術の発見は、口腔インプラントの口腔粘膜貫通部に優れた上皮接合性を与えることを明白に示した意味でもエポックメイキングである。しかし、表面に吸着する活性因子は、豊富に吸着するのみでなく、有効に機能する部位、方向に提示されて初めて期待した効果を示すと考えられる。なぜなら、接着分子や成長因子のエピトープが、細胞膜上のレセプターに適切に提示されることにより、該当する機能を効率よく伝えるからである。また、このような機能を伝える接着分子やレセプターの発現を亢進させ、さらに歯周組織を成熟させる機能をもつ遺伝子をチタンに接合した細胞に自然に導入できれば、プラットフォームスイッチングの構造を与えることが難しい場合でも、これまで困難であったチタン-上皮間の強固な結合が実現できる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者がこれまで培ったチタン表面の生体活性性能を向上する技術群をもとに、

- (1)生体内で体液成分と反応して迅速に吸収性アパタイトを析出する酸化チタン被膜を生成する。
- (2)配向性を考慮することにより高い効果の得られる細胞接着因子の固定化法を確立する。
- (3)周囲粘膜の成熟に関与する遺伝子群を共固定し、安全かつ効果的な細胞内に導入する技術の確立を通して、次世代の生体置換デバイスとして最適な部位特異的機能性を、口腔インプラント表面に付与する基盤技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1)LPD法によるチタン合金(90Ti-6Al-4V)へのアパタイト析出酸化被膜の精製

これまで我々が開発してきた、過酸化水素水処理と熱処理を組み合わせることによりチタン表面に生体内でアパタイトを自己析出させる酸化被膜の精製は、純チタン表面にのみ応用が可能であった。しかしながら、現在臨床で使用されているチタンインプラントはチタン合金製であり、開発してきた技術を臨床応用に持ち込むには、新たな処理方法の開発が必要であった。そのようななか、研究分担者の早川は純チタンに対して表面にアパタイトを析出させるための熱酸化処理を改良することにより、アパタイト析出酸化被膜の精製を可能とする熱酸化処理(LPD法)の開発に成功している。従って、本申請研究では本技術を用いて作製した新規のチタン合金表面を作製して、生物学的効果を検討することとした。すなわち、

直径 15mm, 厚さ 1mm のチタン合金ディスクを 700 の温度で 1 時間大気中電気炉内で加熱した。

0.05M NH_4TiF_6 および 0.15M H_3BO_3 の 1:1 混合水溶液を調製し、熱処理したチタン合金ディスクを浸漬し、50 で 1 時間処理した。

(2) アパタイト析出酸化被膜を精製したチタンディスク上での細胞反応

CFU アッセイを用いてラット大腿骨から骨髄由来間葉系幹細胞 (rBMSCs) を採取

採取した rBMSCs を LPD 法で処理したチタンディスクと無処理のチタンディスク、培養用プレート上に播種し、24 時間培養

24 時間後に細胞を固定し、Hoechst & Phalloidin で染色し、細胞形態を比較した。

3 条件で培養した rBMSCs の骨芽細胞分化に対する影響を確認するため、各条件で 3 日間培養した細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR でオステオポンチン (Opn), Ⅰ型コラーゲン, Runx2 の発現量を比較した。

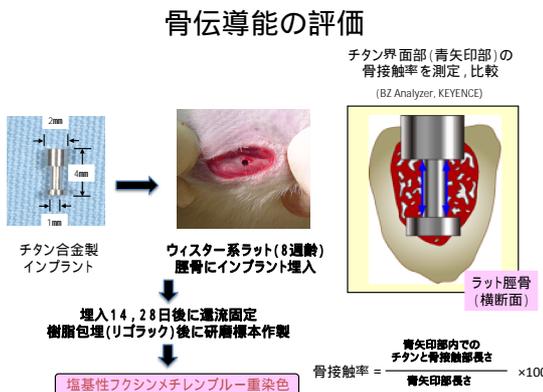
(3) アパタイト析出酸化被膜を精製したチ

タンインプラントの骨伝導能の評価

下図に示すチタン合金製インプラントに対し、LPD 法で処理、700 で熱処理のみ実施、無処理の 3 条件を設定し、ラット脛骨に埋入した。

埋入後 14 日、28 日経過後に灌流固定後に組織を回収した。

浸漬固定後、樹脂包埋を行い、研磨標本作製して染色後、骨接触率を測定 (下図)

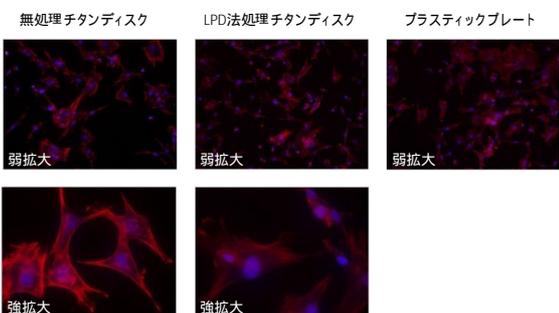


4. 研究成果

(1) アパタイト析出酸化被膜を精製したチタンディスク上での細胞反応

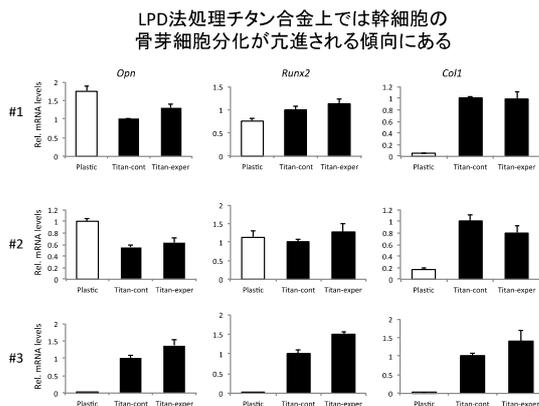
LPD 法で処理したチタンディスクと無処理のチタンディスク、培養用プレート上に播種し、24 時間経過後に細胞形態を観察したところ、細胞形態に差は見られず、LPD 法で処理したチタン表面にも細胞は問題なく接着することが確認できた。

チタンディスク上で培養したラット骨髄由来間葉系幹細胞の形態



LPD 法で処理したチタンディスクと無処理

のチタンディスク，培養用プレート上に播種し，3日後に mRNA を回収して骨芽細胞分化に関係する遺伝子群を比較した結果，LPD 法で処理したチタンディスク上で培養した場合，特にオステオポンチン，Runx2 の遺伝子発現が亢進する傾向にあった。



(2) アパタイト析出酸化被膜を精製したチタンインプラントの骨伝導能の評価

方法に示す3条件のチタンインプラントをラット脛骨に埋入(各条件 n=7)し，14日後，28日後に屠殺して組織を回収し，樹脂包埋を行ったが，樹脂の浸透が甘く，組織観察に耐えられる研磨標本が作製できなかった。樹脂包埋の方法は研究代表者らが以前用いていた方法(Maekawa *et al.* J Oral Rehabil, 2009)であるが，2度上手く行かなかったことから，手法を見直し，現在包埋方法を変更して実験を継続中である。

このように，LPD 法で処理したチタン合金の生物学的効果の検討は未だ中途ではあるが，研究代表者らがこれまで進めてきたチタンに対する他の生物学的表面改質では見られなかった，幹細胞の骨芽細胞分化誘導が亢進される傾向の結果が得られているなど，LPD 法は生体活性を高めたチタン合金製のインプラントの開発に繋がる可能性を十分に秘めている技術であると考えられる。現在臨床応用されているチタンインプラントは，早

期の骨結合獲得を目指したラフサーフェスが主流であるが，このような表面は一度細菌感染を生じると表面からの細菌叢の除去が困難であり，インプラント周囲炎の治療を難しくしていることが指摘されている。従って，本研究で用いているような研磨表面に生物学的活性を付与できるチタン合金製インプラントへの期待が高まることが予測されていることから継続している生物学的効果の検討を成就させるべき，研究を継続していく予定である。

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 3件)

Hayakawa S, Masuda Y, Okamoto K, Shirotsaki Y, Kato K, Osaka A, Liquid phase deposited titania coating to enable in vitro apatite formation on Ti6Al4V alloy, J Mater Sci: Mater Med, 査読有, 2014, 25,375-381, DOI: 10.1007/s10856-013-5078-z.

Uetsuki K, Nakai S, Shirotsaki Y, Hayakawa S, Osaka A, Nucleation and growth of apatite on an anatase layer irradiated with UV light under different environmental conditions. J Biomed Mater Res A, 査読有, **101A**[3], 2013, 712-719, DOI: 10.1002/jbm.a.34370.

Hayakawa S, Uetsuki K, Kochi A, Shirotsaki Y, Osaka A, Acceleration of apatite nucleation on parallel aligned Ti-substrates with optimum gaps by UV-light pre-irradiation, Key Engineering Materials, 査読有, 493-494, 2012, 936-939, DOI:10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.936.

[学会発表](計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川 賢治 (MAEKAWA KENJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教

授

研究者番号：20304313

(2)研究分担者

早川 聡 (HAYAKAWA SATOSHI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20263618

園山 亘 (SONOYAMA WATARU)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40325121

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

(3)連携研究者

伊藤 嘉浩 (ITOH YOSHIHIRO)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学

研究所・研究員

研究者番号：40192497