様　式　C－１９、F－１９、Z－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ９ 日現在

機関番号： **３４４０８**
研究種目： **基盤研究(C)**
研究期間： **2012～2014**
課題番号： **２４５９２９４２**

研究課題名（和文）チタン合金のナノ構造制御によるインプラント周囲骨形成能の向上

研究課題名（英文）Effect of Nanosheet Surface Structure of Titanium Alloys on Cell Differentiation

研究代表者
楠本　哲次（KUSUMOTO, Tetsuji）

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：７０１８６３９４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではインプラント材料として使用される代表的なチタン合金の一つであるTi-6Al-4V表面上に濃アルカリ処理によりナノ構造（TNS）を形成し，ラット骨髄細胞の硬組織分化誘導について比較・検討を行った．SEM，SPMの観察ではナノメーターレベルのネットワーク構造が形成された．XPSの観察では深い酸化膜の層が形成されているのに加え，表層からはバナジウムの析出が見られなかった．濡れ性は実験群で低い接触角を示し，ラット骨髄細胞の初期接着および各種硬組織分化誘導に関するマーカーは高い値を示した．以上により，TNS析出チタン合金表面はオッセオインテグレーションの早期化に寄与できるものと示唆される．

研究成果の概要（英文）： We fabricated titania nanosheet (TNS) structures on titanium surfaces by NaOH treatment to improve bone differentiation on titanium alloy implants. The cellular response to TNSs on Ti6Al4V alloy was investigated, and the ability of the modified surfaces to affect osteogenic differentiation of rat bone marrow cells and increase the success rate of titanium implants was evaluated. The nanoscale network structures formed by alkali etching markedly enhanced the functions of cell adhesion and osteogenesis-related gene expression of rat bone marrow cells. Other cell behaviors, such as proliferation, alkaline phosphatase activity, osteocalcin deposition and mineralization, were also markedly increased in TNS-modified Ti6Al4V. Our results suggest that titanium implants modified with nanostructures promote osteogenic differentiation, which may improve the biointegration of these implants into the alveolar bone.

研究分野： 歯科補綴学

キーワード： TNS　インプラント　オッセオインテグレーション

１．研究開始当初の背景

近年、歯科治療においてインプラント治療は必須の選択肢となった。そのため、インプラント治療にも QOL の概念が浸透し、快適性、審美性、咀嚼満足度が強く求められるようになってきた。顎骨内に埋入されたインプラントがその良好な咬合状態を維持するためには、埋入後の初期安定性と二次安定性の獲得が重要であり、このことが長期的に安定し咀嚼機能を維持できるオッセオインテグレーション獲得へとつながっていく。またそもそもインプラント治療の課題の一つに、治療期間の長期化の最大の要因であるオッセオインテグレーションの期間の短縮がある。材料のナノ化や様々な形態を利用し、従来にない新機能を見出そうとする研究が盛んに進められインプラントのフィクスチャーにも応用されつつある。酸化チタンは温度 30□・大気圧下における低温溶液化学的な合成手法を用いることでテンプレートなどを一切使わずに、ナノチューブ構造（TNT）を自己組織化的に形成することが報告され，申請者も TNT の生体適合性についての成果を得ている。我々は、この TNT 合成研究を行っている過程において、室温での濃アルカリ溶液中において純チタン金属から酸化チタンナノシート（TNS）が形成されることを見出した。

共同研究者は in vitro レベルで TNS 構造が無処理の純チタン表面と比較して、骨分化誘導への指標となる ALP 活性およびカルシウム量、オステオカルシン量が有意な値を示し、TNS 構造が骨の分化・誘導に影響するということを報告した。これは、従来のインプラントと比べてオッセオインテグレーション期間を短縮させる事を示唆させるという優れた成果である。TNS 構造について評価を行ったところ、純チタン表面に存在する酸化膜が水酸化ナトリウム中のナトリウムイオンと結合し、チタネート構造を形成しているものと考えられ、他の報告にもあるようにチタネート構造が骨分化誘導に関与していることが示唆される。つまり、材料表面に酸化膜を有すれば、TNS 構造は他の材料にも応用できると考えられる。現在のインプラント材料はチタン合金製の物も多く存在する。その代表としては、Ti-6Al-4V 合金があり、チタン合金においても前述のような TNS 構造を形成する事が可能であれば、どのインプラント材料においても早期のオッセオインテグレーションを導く事が可能になる。

２．研究の目的

本研究では、主要なインプラント材料の一つである Ti-6Al-4V 合金表面上に TNS 構造を析出させ、ナノレベルでの表面構造制御がラットの骨髄細胞の初期接着および硬組織分化誘導にどのような影響を与えるか比較・検討を行う。

３．研究の方法

(1)試料作製

実験材料として TNS を析出させた市販の Ti-6Al-4V 合金金属板（直径 15mm, 厚さ 10mm）を使用し、対照群として#2000 まで研磨した同材料を使用した。TNS の析出には、各試料を 10M 水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で室温および大気圧条件下で 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 5μS/cm 以下になるまで洗浄を行った。その後、自然乾燥させ､純チタン金属表面に TNS を析出させた。試料は実験群、対照群ともに、アセトン、エチルアルコールおよびイオン交換水で各々10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。

(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)、走査型プローブ顕微鏡（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。また、各種センサ表面における蒸留水の接触角を VSA 2500 XE にて測定した。

(3) タンパク質吸着試験

実験群および対照群のチタン合金金属板上におけるタンパク質の吸着量をウシ血清アルブミン（Sigma, St. Louis, MO, USA)、を使用して行った。1mg/ml に希釈した各タンパク質をプレートに 1 穴あたり 300ml ずつ実験群および対照群の純チタン金属板上に塗布し、37℃の 5%炭酸ガス恒温器中で 1、3、8 および 24 時間培養し、上清を捨て、各群の純チタン金属表面における両タンパク質の吸着量を BCA Protein assay kit(Pierce, Lockfold, IL)にて測定した。

(4) 細胞培養

生後 7 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，継代を行い 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 %CO_2 を含む加湿条件下で培養した。細胞はコンフレントになるまで達するまで、各試料上で培養した。培地に 10 %FBS および骨分化誘導剤（10 mMβ-グリセロリン酸ナトリウム（和光純薬, 東京, 日本)、80 μg/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。培地は、2 日毎に交換した。

(5) 接着試験および増殖試験

実験群および対照群の純チタン金属板を 24well プレート(Falcon, Becton Dickson Labware, NJ, USA)に配置し，ラット骨髄細胞を $4×10^4$ 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^{TM} Cell Viability Assay Kit(Promega, Madisson, WI, USA)を用いて測定した。

(6) 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。

(7) 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.

(8) OCN 産生量

本研究で用いた ELISA Kit（DS ファーマバイオメディカル，大阪，日本）は，細胞培養上清中で直接 OCN 産生量を測定するラット OCN に特異的な検査薬である．培養の 21 および 28 日後に，細胞培養上清中の OCN 産生量は，メーカー指示に従って測定した.

(9) RunX2mRNA の発現

実験群および対照群のチタン合金表面上の培養 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^{TM} Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における Runx 2 のマーカーについて比較検討した.

(10) 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, SPM の観察では対照群で平坦な像が観察されるのに対し，実験群においてナノメーターレベルのネットワーク構造が形成された．XPS の観察では深い酸化膜の層が形成されているのに加え，表層からはバナジウムの析出が見られなかった．濡れ性は実験群で低い接触角を示した。

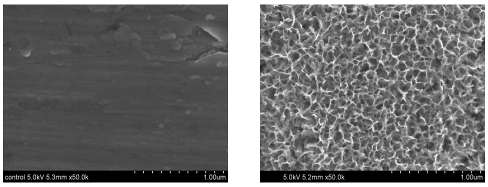

図 1　SEM 像

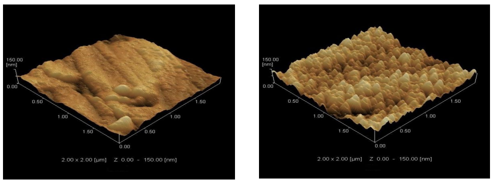

図 2　SPM 像

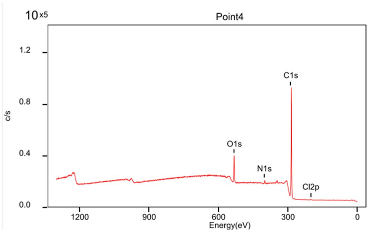

図 3　XPS 像（実験群　Wide scan）

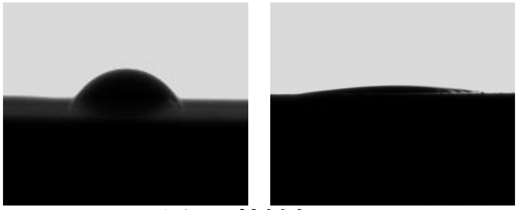

図 4　接触角

(2) タンパク質吸着量

すべての計測時間で、ウシ血清アルブミンの付着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。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) OCN 産生量

すべての計測時間で、OCN 産生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。

(7) Run2mRNA の発現
　すべての計測時間で、Runx2mRNA 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。

　以上の結果により，チタン合金表面においてもナノレベルでの構造制御は細胞の初期接着能を向上させ，ラットの硬組織分化誘導能を向上させることからインプラントのオッセオインテグレーションの早期化に寄与できるものと示唆される。

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５件）
1. Komasa S, Xing H, Taguchi Y, Kayama T, Fujio M, Miyake A, Shimamura S, Kusumoto T, Nishizaki H, Okazaki J. Osteogenesis related gene expression on titanium surfaces with nano-network structures formed by treatment with alkali solutions. Journal of Osaka Dental University 査読有 48(2):133-139, 2014.
2. Komasa S, Kusumoto T, Taguchi Y, Nishizaki H, Sekino T, Umeda M, Okazaki J, Kawazoe T. Effect of Nanosheet Surface Structure of Titanium Alloys on Cell Differentiation. Journal of Nanomaterials 査読有 http://dx.doi.org/10.1155:642527, 2014.
3. Fujino T, Taguchi Y, Komasa S, Sekino T, Tanaka M. Cell Differentiation on nanoscale Features of a Titanium Surface: Effects of Deposition Time in NaOH Solution. J Hard Tissue Biology 査読有 23:63-69,2014.
4. Nakano Y, Komasa S, Taguchi Y, Sekino T, Okazki J. Rat Endothelial Cell Attachment, Behavior and Gene Expression on NaOH-treated Titanium Surfaces. Journal of Oral Tissue Engineering. 査読有 11:189-200,2013.
5. 楠本哲次，小正　聡，田口洋一郎，岡崎定司．純チタン金属表面に析出させたナノ構造が骨髄細胞の初期接着に与える影響について．日本口腔リハビリテーション雑誌　査読有 26:43-50, 2013.

〔学会発表〕（計 13 件）

1. Kusumoto T, Komasa S, Taguchi Y, Umeda M, Okazaki J, Tanaka M.
Effect of Nanosheet Surface Structure of Titanium Alloys on Cell Differentiation
93rd General Session & Exhibition of the IADR
2015 年 3 月 11 日～14 日
Boston (USA)
2. 楠本哲次，小正　聡，田口洋一郎，堤　義文，田中昌博．
TNS 析出チタン合金表面上におけるラット骨髄細胞の生体適合性について
第 44 回日本口腔インプラント学会学術大会
2014 年 9 月 13 日
東京国際フォーラム（東京都千代田区）
3. 小正　聡，蘇　英敏，田口洋一郎，楠本哲次，関野　徹，西崎　宏，田中昌博，岡崎定司．
チタン合金表面に析出させたナノ構造への加熱処理がラットの骨髄細胞の硬組織分化誘導能に与える影響について
平成 26 年度日本補綴歯科学会　中国・四国支部関西支部合同学術大会
2014 年 9 月 6 日
倉敷市芸会館（岡山県倉敷市）
4. Komasa S, Taguchi Y, Nishida H, Nakano Y, Kusumoto T, Nishizaki H, Tanaka M, Okazaki J.
Initial attachment of endothelial cells in concering nano-modified titanium surface
43rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR
2014 年 3 月 16 日～19 日
Charlotte (USA)
5. 小正　聡，田口洋一郎，西田尚敬，刑　鶴琳，藤野智子，楠本哲次，西崎　宏，田中昌博，岡崎定司．
チタン QCM センサを利用したナノシート構造の解析
第 27 回口腔リハビテーション学会学術大会
2013 年 11 月 10 日
鶴見大学会館（神奈川県横浜市）
6. Xing H, Komasa S, Taguchi Y, Nishida H, Kusumoto T, Nishizaki H, Guo Tianwan, Okazaki J.
The Effects of Titanium Surfaces with Nano-Network Strucures, Generated Through Various Alkali Concentrations Treatment, on Osteoblastic Differentiation
15st Biennial Meeting of the International Colleage of Prosthodontics
2013 年 9 月 18 日～21 日
Turin (Italy)
7. 小正　聡，田口洋一郎，楠本哲次，西崎　宏，岡崎定司．
純チタン金属の濃アルカリ溶液への浸漬時間の変化がインプラント周囲組織の硬組織形成に与える影響について
第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会
2013 年 9 月 13 日～15 日
福岡国際会議場（福岡県福岡市）
8 藤野智子，田口洋一郎，小正　聡，西田尚敬，楠本哲次，武田昭二，岡崎定司，田中昌博．
浸漬時間の変化がナノ構造を析出した純チタン金属表面上の生体適合性に与える影響
日本補綴歯科学会第 122 回学術大会
2013 年 5 月 18 日～19 日
福岡国際会議場（福岡県福岡市）
9. Komasa S, Taguchi Y, Nishida H, Nakano Y, Kusumoto T, Takeda S, Tanaka M, Okazaki J. Bioactivity of nanostructure on titanium surface modified by chemical processing at room

temperature.
91st General Session & Exhibition of the IADR
2013 年 3 月 20 日～23 日
Seatle (USA)
10. Kusumoto T, Taguchi Y, Komasa S, Nishida H, Fujino T, Takeda S, Tanaka M, Kawazoe T. Development of titanium nanostructure surface reforming on cell initial adhesion.
91st General Session & Exhibition of the IADR
2013 年 3 月 20 日～23 日
Seatle (USA)
11. 楠本哲次, 久保大樹, 小正　聡, 田中昌博, 川添堯彬
インプラント補綴装置の長期経過時における咬合接触の評価
第 22 回日本歯科医学会総会
2012 年 11 月 10 日～12 日
インテックス大阪（大阪府大阪市）
12. Taguchi Y, Komasa S, Nishida H, Kusumoto T, Takeda S, Yamamoto K, Tanaka M, Okazaki J, Tanaka M, Umeda M.
Initial biocompatibility of titanium nanostructure surface modified by new method
European association for osseointegration 21st anniversary meeting
2012 年 10 月 10 日
Copenhagen (Denmark)
13. 小正　聡, 田口洋一郎, 橋本典也, 楠本哲次, 岡崎定司.
ナノ構造制御したチタン QCM センサの表面解析
第 42 回日本口腔インプラント学会学術大会
2012 年 9 月 22 日～23 日
大阪国際会議場（大阪府大阪市）

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
楠本　哲次(KUSUMOTO Tetsuji）
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：70186394

(2)研究分担者
武田　昭二（TAKEDA Shoji）
大阪歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号： 20067185

田口　洋一郎（TAGUCHI Yoichiro）
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号： 60434792

小正　聡（KOMASA Satoshi）
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号： 70632066