

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792133

研究課題名(和文)分極バイオマテリアルの骨形成制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of enhanced bone formation by the electrically polarized biomaterials

研究代表者

野崎 浩佑 (Nozaki, Kosuke)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：00507767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体材料として広く使用されているチタンを用いて、動物実験用チタンインプラントを作製し、インプラント表面にマイクロアーク酸化により酸化チタン膜を作製し、さらに酸化チタン膜を電気分極により表面改質を行い、その生体に及ぼす影響を検討した。作製したチタンインプラントを日本白色家兎の左右大腿骨内側上顆に埋入し、4, 6, 12週間後に周囲組織を含むインプラントを摘出し、生体内評価を行ったところ、インプラントの安定性の向上や、インプラント-骨接触率の向上が認められた。本表面改質法は、インプラント表面に新たな物質を追加することなく、骨形成を促進することから、幅広く臨床応用可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the effect of electrically polarized titanium implant on the bone formation, we fabricated the polarized titanium implant coated with the titanium oxide through the micro-arc oxidation process. A comprehensive assessment using biomechanical, histomorphological and radiographic analyses in a rabbit model was performed on polarized and non-polarized implants. The polarized titanium implant surfaces accelerated the establishment of implant biomechanical fixation, compared with the non-polarized surfaces and enhanced bone-implant contact ratio. Thus, the polarized implant has a significant effect on the bone formation around titanium implant. We established the application of the electrical polarization process which modified titanium implant surface without additional substances.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：電気分極 チタンインプラント 表面改質 オッセオインテグレーション 骨伝導能 マイクロCT

1. 研究開始当初の背景

純チタンは優れた機械的物性や生体親和性を有していることから歯科および整形外科領域におけるインプラント材料として使用されている。生体内に埋入されたインプラント表面では、埋入直後には近傍で炎症反応が生じ、同時に無機イオンやタンパク、糖類などの血液成分の吸着が始まる。その後、吸着物の介在によって細胞がインプラントに接近し、細胞の接着、増殖、石灰化が順次進行していくと考えられている。近年、チタンのオッセオインテグレーションの早期獲得を目指し、様々な表面改質法の検討が行われている。表面改質法のうちチタンの陽極酸化を利用したマイクロアーク酸化(以下 MAO) 処理により作製したチタニア膜は、クレータ状の隆起とその中央に孔を有する構造となり、MAO 処理を施したインプラントを骨に埋入した場合、オッセオインテグレーションの向上が認められ、その有用性が報告されている。

我々は生体親和性を有するセラミックスを電気分極による表面改質により、生体の反応をマニピュレート可能なベクトルマテリアルの創製を行い、報告してきた。電気分極処理はセラミックスを一定温度下にて直流電界により固体中に双極子モーメントを発生させ、材料に電荷を蓄積させる方法であり、負に帯電した面を N 面, 正に帯電した面を P 面, 直流電界を負荷しないものを O 面と定義する。生体材料であるハイドロキシアパタイトを電気分極により表面改質を行ったところ、擬似体液浸漬下でのハイドロキシアパタイト沈着の亢進, 骨形成能の促進, 骨芽細胞分化の亢進など良好な結果を得ており、電気分極処理がオッセオインテグレーションの早期獲得に貢献できると考えている。

2. 研究の目的

本実験は、現在臨床応用されている表面改質法である MAO 処理を用いてチタンインプラントにチタニア被膜を作製し、さらに電気分極プロセスを用いて表面改質を行い、この材料の生体に与える影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験用インプラントの作製

動物用に設計したフィクスチャー部が直径 3 mm, 長さ 5 mm の JIS2 種チタンインプラント(ミクニ総業株式会社)(図 1b)をアセトン, エタノールおよび超純水にて超音波洗浄を行った。MAO は、金属を陽極として通電した場合に、アークを伴う不連続な電気化学的酸化により、酸化層が形成される(図 1a)。電解質溶液として、0.15 M 酢酸カルシウム水和物と 0.02 M グリセロリン酸カルシウムの混合した水溶液を用い、試料をホルダーに装着し、一定時間水溶液に浸漬後、直流電源の陽極に試料を接続し、陰極にステンレス板を接続した。上限電圧を 350 V とし、陽極酸化を行った(図 1c)。MAO 処理を行った試料

は、アセトン, エタノールおよび超純水にて超音波洗浄を行い、デシケーターにて保管した。その後、表面電荷を制御するために、電気分極処理による表面改質を行った。白金電極にて、コーティング面を被覆し、コーティング面を正極になるよう回路を作製し、400 °C, 1h, 1kV の条件下にて分極処理した(図 2)。また、直流電圧を付与せず、400 °Cにて過熱処理したものを対照群とした。それぞれのインプラントは、動物実験前にガンマ線による滅菌処理を行った。

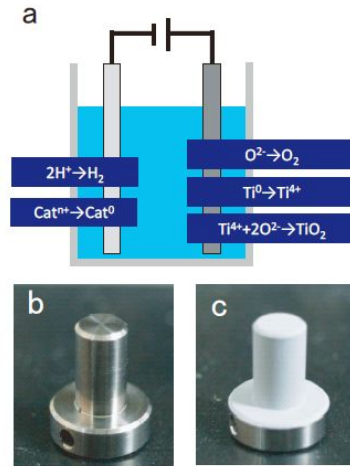


図 1 動物実験用チタンインプラントの表面処理法

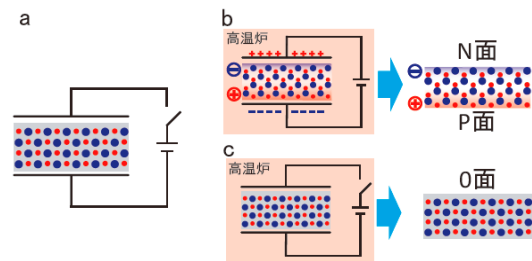


図 2 電気分極処理によるセラミックスの表面改質法

(2) キャラクターリゼーション

作製した試料を X線回折(XRD: D8 Advance, Bruker) による結晶構造および走査型電子顕微鏡(SEM: S-3400NX, Hitachi) により表面構造を解析した。また表面の化学組成を EDXにて解析を行った。電気分極の評価として、熱刺激脱分極電流(TSDC)測定を行った。

(3) 動物実験

実験動物には 10 週齢雄日本白色家兔を用いた。全身麻酔後、左右大腿骨内側上顆に直径 3 mm のインプラント埋入窩を形成後、インプラントを埋入した。インプラント埋入 4, 6, 12 週間後に麻酔の過剰投与により屠殺し、インプラントを含む左右大腿骨を摘出した。摘出した試料は軟 X線撮影を行い、インプラント埋入方向を確認後、各種評価を行った。インプラントの安定性の評価として、インプラントの引張り試験を行った。骨形成能評価として、樹脂標本の薄切片を用いた組織学的評価を行った。また、骨形成の定量評価として、μCT による骨量解析を行った。標本撮

影時に既知の骨塩密度を有するハイドロキシアパタイトのファントムを同条件にて撮影し、三次元的に構築されたX線画像を、骨塩密度に応じて色分類を行った。骨量の解析には、インプラントによるアーチファクトを回避するために、インプラント周囲 60-160  $\mu\text{m}$  の骨を解析した。なお、本動物実験は東京医科歯科大学動物実験委員会にて承認の後実施した(0110093A)。

#### 4. 研究成果

##### (1) キャラクターゼーション

得られた試料をXRDにて解析した結果(図3), アナターゼ型チタニアとチタンのピークが観察され, チタン表面にアナターゼ型チタニア膜が生成されていることが観察された。またSEMの観察により, 得られた試料の表面構造は特異的なクレーター状の隆起と, アーク発生に伴う直径 0.1-4.0  $\mu\text{m}$  の孔が観察され(図4), 過去に報告されたものと同様の傾向を示した。これらの孔は骨との機械的嵌合力を増加させるため, より強固なオッセオインテグレーションを獲得できると考えられる。また, EDXの結果より, 本コーティング法により, 形成されたチタニア膜にはカルシウムおよびリンが導入されていることが分かった。

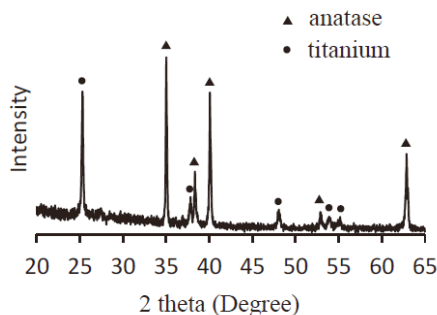


図3 MAOによりコーティングしたチタンインプラントの結晶構造

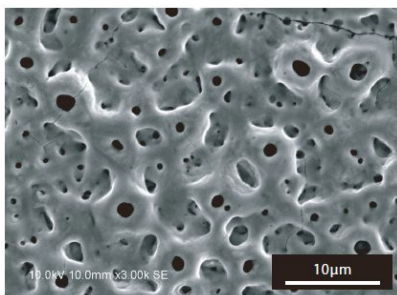


図4 MAOによりコーティングしたチタンインプラントの表面微細構造

TSDC測定の結果を図5に示す。チタンインプラントは, 温度の上昇に伴い, 脱分極電流が観察され, 分極試料においては約 550 においてピークが観察された。また, 未分極試料では約 480 においてピークが観察された。

電気分極処理の効果を検討するために, 蓄積電荷量を求めたところ, 分極試料では, 28.4  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , 未分極試料では 8.7  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ であった。電気分極による効果を求めるため, 図5の斜線に示す蓄積電荷量を求めたところ, 19.7  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ であった。

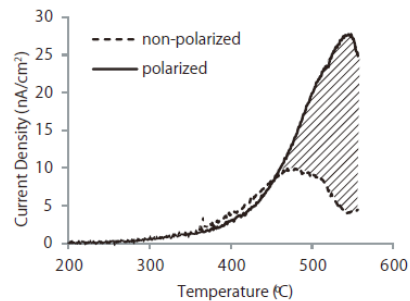


図5 TSDC 曲線

##### (2) インプラントの安定性

インプラントの安定性の評価方法として, 引張り試験, 押し出し試験, トルク試験などがあるが, 機械的強度を求める際に, 固定源である骨に応力を集中させると正確な強度を求めることは困難である。そこで, 我々は新たに設計した引張り試験を行った(図6)。本実験方法は, インプラントを埋入している骨への応力集中を軽減することが可能である。

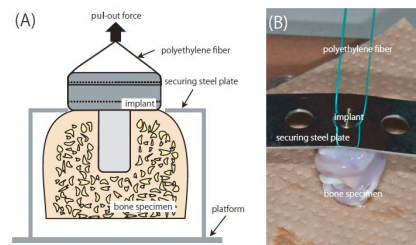


図6 インプラント引張り試験概略

引張り試験の結果を図7に示す。分極したチタンインプラントは, 未分極の試料と比較して有意に引っ張り強さが増加した。引っ張り強さの向上によりインプラントの骨内での安定性が増加し, オッセオインテグレーションの早期獲得に寄与できると考えられる。

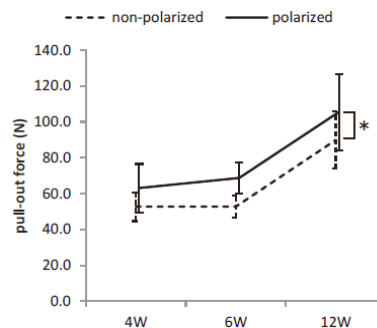


図7 インプラントの引っ張り強度  
(3) インプラントの組織学的評価

次に、インプラントと骨との親和性を評価するために、組織切片をトルイジンブルーにて染色し(図8)、骨インプラント接触率(BIC)を求めた(図9)。光学顕微鏡下にて骨とインプラントの界面は、分極インプラントおよび未分極インプラントいずれも、軟組織の介在なく結合しており、オッセオインテグレーションを獲得していることが分かった。またBIC率は分極インプラントが、未分極インプラントと比較して有意に増加していることを示したことから、分極インプラントは骨との親和性が向上することが示唆された。また、分極インプラントの引っ張り強さの増加は、骨との結合が増加したことによるものと考えられる。

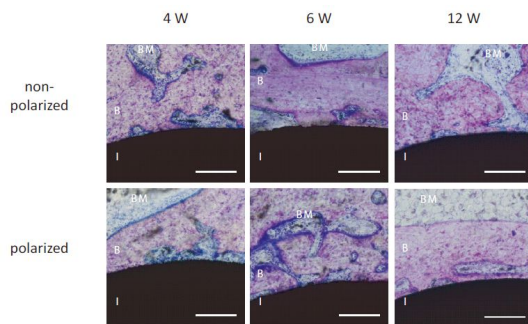


図8 インプラント-骨界面の組織学的評価

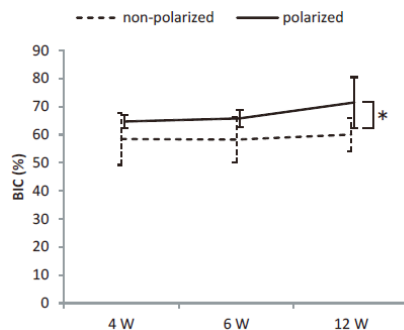


図9 BIC率

(4) 骨形成評価

μCTにてインプラント周囲の骨を抽出した結果を図10に示す。また骨量を計測した結果を図11に示す。インプラント周囲に形成された骨量は、分極インプラントおよび未分極インプラントの間に有意差は認められなかった。すなわち、分極インプラントはインプラント表面で、その効果を発揮することにより、インプラントの安定性に寄与していることが示唆された。

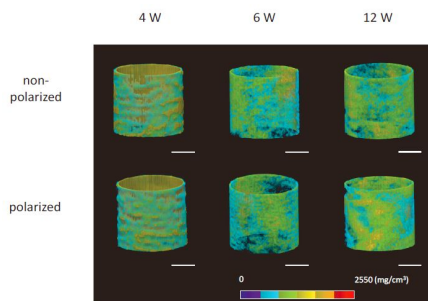


図10 μCTによるX線画像解析

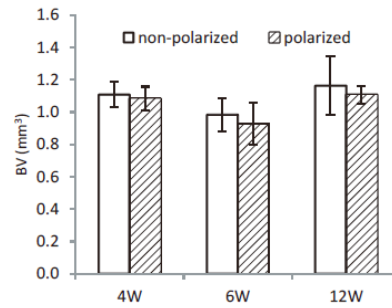


図11 インプラント周囲の骨量

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6件)すべて査読あり

(1) Nozaki K, Wang W, Horiuchi N, Nakamura M, Takakuda K, Yamashita K. Enhanced osteoconductivity of titanium implant by polarization induced surface charges. J Biomed Mater Res A. (in press) (DOI:10.1002/jbm.a.34980)

(2) Nagai A, Hattori T, Hirose M, Ogura A, Nozaki K, Aizawa M, Yamashita K. Mouse embryonic stem cells cultured under serum- and feeder-free conditions maintain their self-renewal capacity on hydroxyapatite. Mater Sci Engineer C, 34, 214-220, 2014. (DOI: 10.1016/j.msec.2013.09.012)

(3) Nakamura M, Toyama T, Morita A, Horiuchi N, Nozaki K, Nagai A, Yamashita K. Electric Poling of Cement Composites of Hydroxyapatite Whiskers with Chitosan and their Chemical Properties in Simulated Body Fluid, J. Ceram. Soc. Jpn., 121 (10), 895-900, 2013. (DOI:10.219/jcersj2.121.895)

(4) Horiuchi N, Endo J, Nozaki K, Nakamura M, Nagai A, Katayama K, Yamashita K. Dielectric Evaluation of Fluorine Substituted Hydroxyapatite, J. Ceram. Soc. Jpn., 121 (9), 770-774, 2013. (DOI:10.2109/jcersj2.121.770)

(5) Nemoto R, Nozaki K, Fukui Y, Yamashita K, Miura H. Effect of framework design on the surface strain of zirconia fixed partial dentures. Dent Mater J. 32(2):289-95(2013). (DOI:10.4012/dmj.2012-237)

(6) Nagai A., Yamazaki Y., Ma C., Nozaki K., Toyama T., Yamashita K., Response of Osteoblast-like MG63 Cells to TiO2 Layer Prepared by Micro-arc Oxidation and Electric Polarization, J. Euro. Ceram. Soc., 32(11):2647-2652, 2012. (DOI:10.1016/j.jeurceramsoc.2012.03.002)

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) Nozaki K., Nagai A., Yamashita K., Effect of Polarization Method on Osseointegration around Ti Implants. 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, (2012. 6).

(2) Nozaki K., Nagai A., Yamashita K., Effect of Polarization Method on Bone Formation around Ti Implants. AMDI-3, Toyohashi, Japan, Nov., 2012.

(3) Nozaki K., Nagai A., Yamashita K. Effect of surface charges on early osseointegration of polarized Ti implant. 13th International Conference of the European Ceramic Society. Limoges, France, Jun., 2013.

(4) Nozaki K., Horiuchi N., Nakamura M., Nagai A., Yamashita K. Enhanced osteoinductivity of titanium implant with controlled surface charge. International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS /NEMS and Applications 2013 & 5th Sensing Biology Symposium. Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, Oct., 2013.

(5) Nozaki K., Ebe N., Nakamura M., Horiuchi N., Nagai A., Yamashita K. Effect of estrogen deficiency on osseointegration around surface charged titanium implant. International Symposium on EcoTopia Science 2013 & The 4th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials. Nagoya University, Dec., 2013.

(6) 野崎浩佑, 小泉 弘樹, 大倉 利典, 山下 仁大, 永井亜希子. 歯科用セラミックブロックの表面電荷が細菌付着に与える影響. 日本バイオマテリアル学会, タワーホール舟堀, 東京, 2013 年 11 月.

(7) 野崎浩佑, 山下仁大, 永井亜希子. エストロゲンの減少が表面電荷を制御したチタンインプラント周囲の骨形成に与える影響. 日本歯科理工学会学術講演会. 日本歯科大学新潟生命歯学部校舎, 新潟, 2013 年 10 月.

(8) 野崎浩佑, 堀内尚紘, 山下仁大, 永井亜希子. 電気分極により表面電荷を制御した Y-TZP の細菌付着への影響. 日本補綴歯科学会設立 80 周年記念第 122 回学術講演会, 福岡国際会議場, 福岡, 2013 年 5 月.

(9) 野崎浩佑, 山下仁大, 永井亜希子. 表面

電荷を制御した CAD/CAM 用セラミックブロックの細菌付着評価. 日本歯科理工学会学術講演会, タワーホール舟堀, 東京, 2013 年 4 月.

(10) 野崎浩佑, 中村美穂, 堀内尚紘, 山下仁大, 永井亜希子. 分極により表面電荷を制御したチタンインプラント周囲の骨形成能の検討. 第 3 回 6 大学連携プロジェクト公開討論会, 名古屋大学, 愛知, 2013 年 3 月.

(11) 野崎浩佑, 山下仁大, 永井亜希子. 表面電荷を制御したチタンインプラントの骨結合能評価. 日本歯科骨粗鬆症研究会 第 11 回学術大会・総会, 東京医科歯科大学, 東京, 2013 年 1 月.

〔図書〕(計 4 件)

(1) 野崎浩佑, 山下仁大, 永井亜希子. 電気分極による結晶分散型ガラスの表面改質が細菌付着に与える影響. 生体材料工学研究所年報, 47:13-15, 2013.

(2) 野崎浩佑, 山下仁大, 永井亜希子. 技術情報協会. 体内埋め込み医療材料の開発とその理想的な性能・デザインの要件. 2013. 34-38.

(3) 野崎浩佑, 永井亜希子, 山下仁大, 電気分極によるチタンインプラントの表面改質がオッセオインテグレーションに与える影響, 生体材料工学研究所年報, 45:24-26, 2012.

(4) 野崎浩佑, 永井亜希子, 山下仁大, セラミックバイオマテリアルの展望, DE, 31(4):281-284, 2012.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野崎 浩佑 (Nozaki Kosuke)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号: 00507767