

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670827

研究課題名(和文) 生体模倣的なナノ構造を有するNANOZRインプラントの開発

研究課題名(英文) Development of nanoZR implant with nanofeatured topography

研究代表者

馬場 一美 (Baba, Kazuyoshi)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80251536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：NANOZRインプラントの開発を目指し、表面にHF処理(0, 4, 55%)を施し骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)に及ぼす影響と骨結合能について評価した。SEM像より、HF処理したNANOZRの表面は、55%でナノレベルの球状構造が顕著に認められた。蛍光二重染色では、発達した細胞骨格、細胞突起が認められ、細胞接着・増殖では、顕著な増加が認められた。骨形成関連遺伝子の発現でもAETiと比較し有意な上昇が観察された。ラット大腿骨埋入後の骨結合力は、55%でAETiと比較し有意に高い値となった。NANOZRはHF処理による表面改質によって、骨芽細胞の接着・増殖・分化並びに、骨結合力を促進させた。

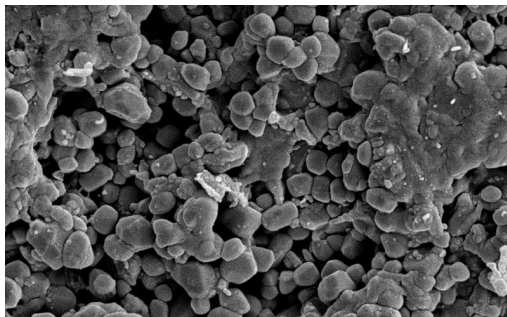
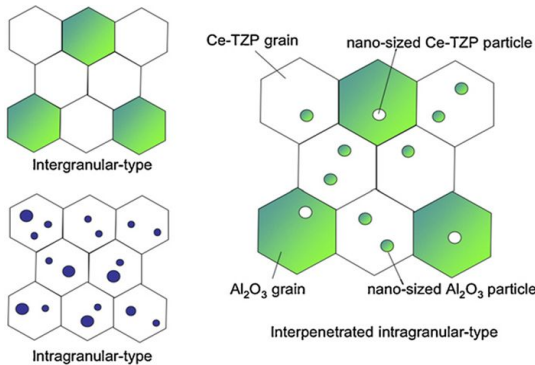
研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to evaluate osteogenic and osseointegration capability of Ce-TZP-based nanostructured zirconia/alumina composite (NANOZR). The surface of Zr(55%) rendered nanofeatured topography with a greater surface area and roughness, and extensive geographical undercut as ceria-zirconia crystal disappeared from the superficial layer and resembled the surface morphology of biomineralized matrices. Culture studies showed that the attachment, proliferation, spread, and functional phenotypes of osteogenic cells, such as alkaline phosphatase activity and bone-related gene expression, were remarkably increased on Zr(55%) surface. The strength of osseointegration measured by a biomechanical push-in test in a rat model was stronger for the Zr(55%) implants than that for AETi implants by 1.6 times. Nano structured NANOZR surface substantially enhanced osteogenic response in vitro and osseointegration capability in vivo.

研究分野：prosthodontics

キーワード：NANOZR

## 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、株式会社パナソニックと東京大学マテリアル工学部との共同プロジェクトのもと、セリア系ジルコニア粒子とアルミナ粒子のナノ複合化セラミックス（製品名「NANOZR」）（下図）に高濃度フッ化水素による酸処理を加え、その表面にナノ構造体を形成させることに成功した。特にそのトポグラフィ（表面形状）は下写真に示すように生体模倣的な形態を示すことを見つけた。特にセリア系ジルコニア粒子とアルミナ粒子のナノ複合化セラミックスは、イットリア系ジルコニアセラミックスと比較して約2倍の強靱性と、水熱環境下でも劣化しない優れた特性を有し、さらに、各結晶粒内で相互にナノサイズの粒子を分散させた双方向ナノ複合化を達成した（Nawa et al 2005）。また従来のセラミックス材料と比べ射出成形が可能であり、現在の切削加工に比べてはるかに安価であることなど、「NANOZR」は優れた靱性を活用して歯科インプラントおよび人工関節等の生体材料への適用が期待される。



## 2. 研究の目的

セリア系ジルコニアであるナノジルコニアの歯科インプラントフィクスチャーへの可能性を検討するため、フッ酸処理したその表面上で培養した株化細胞、MC3T3-E1 骨芽細胞様細胞の挙動を現在チタンインプラントフィクスチャー表面形状の標準となっているラフサーフェイス酸処理チタンと比較観察することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1. 表面性状及び特性の解析

#### 1) 断面の観察

Transmission electron microscope(TEM)による階層上の表面形態を断面から観察する。

#### 2) 表面元素の解析

基本的に NANOZR は先に図で示したようにジルコニア、アルミナの粒とナノ粒子から構成されているが、X線光電子分光(XPS)法にて表面元素または官能基を分析することで酸化膜(O)の程度並びに有機物(C)の存在を確認する。

#### 3) 動的接触角(DCA)の測定

水環境下での表面自由エネルギー量を測定する。

#### 4) ゼータ電位測定

10 mM NaCl 水溶液中にて表面電位の測定を行う

### 2. タンパク質との相互作用解析

#### 1) タンパク吸着

表面プラズモン共鳴(SPR)を用いたタンパク質吸着の速度論的解析

#### 2) タンパク吸着力

原子力間顕微鏡(AFM)のフォースカーブモードを用いて100カ所以上の接触点の平均値を吸着力と定義

### 1. 培養実験

#### 1) 細胞接着試験

播種後、3, 24時間の生骨芽細胞数を細胞増殖試薬 WST-1 にて発色測定する。

## 2) 細胞接着力試験

照射播種後 24 時間の培養皿を歯科用バ  
イブレーターにて 5 分間振動を与え剥離する。  
残存細胞を calceinAM にて染色し ELIZA  
reader で測定する。

## 3) 細胞増殖能試験

播種後 48,72 時間の細胞増殖能を細胞増殖  
ELISA, BrdU 化学発光キットにて DNA 合成  
を測定し定量する。

## 4) 初期細胞形態観察

初期接着時の細胞形態は細胞の運動性や  
周囲環境との相互作用に重要な意味を持っ  
ている。特に細胞骨格および接着斑の形成は  
その後の早期骨形成に必須であることから、  
播種後 3,24 時間の接着細胞の細胞骨格分子  
F - アクチンと接着斑マーカー、ピンキュリ  
ンを蛍光抗体法で 2 重染色し、共焦点レーザ  
ー顕微鏡にて観察する。またイメージ写真か  
ら画像解析ソフト Image J で形態計測を行い  
定量化して評価する。

## 5) 骨基質形成能試験

骨芽細胞の初期骨形成マーカーである  
ALP(アルカリフォスファターゼ)及び骨形成  
遺伝子(型コラーゲン、オステオカルシン)  
の発現を経時的に観察する。

## 2. 動物実験

### 1) 骨-インプラント結合能の解析

オッセオインテグレーション(骨 インプ  
ラント結合)能を生体力学的に評価すること  
のできる万能試験機インストロン(現有設備)  
を用いたラットモデル push in test 法  
(Ogawa et al,2000)に基づいて行う。これに  
より経時的に実際のインプラントの結合力  
を定量化し、解析することができる。

### 2) 骨接触率の算出

ラット大腿骨へ埋入したインプラントの  
脱灰研磨標本から組織学的に骨接触率を算  
定し、形態学的骨結合能の指標とする。

以上すべての実験は硫酸処理した純チタン  
を対照群としておこなう。

## 4. 研究成果

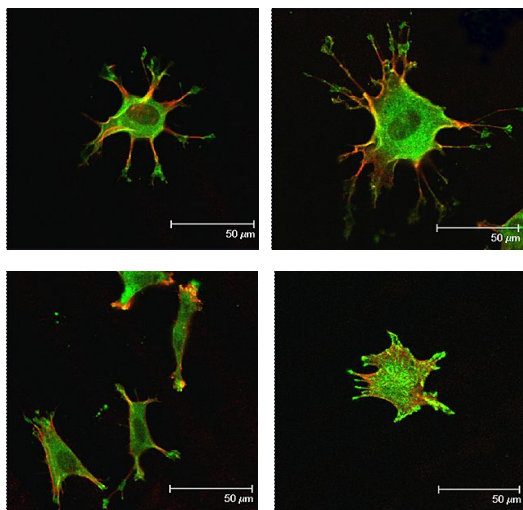
SEM 所見では、硫酸処理した Ti(AETi)は、波  
打った針状の凹凸を示し、下段の表にありま  
すようにその表面粗さは 0.564 という数字  
を示しました。一方、フッ酸未処理のナノ  
ジルコニアは、同倍率の SEM での観察では機  
械研磨による規則性のあるディスク上のキ  
ズが観察されましたが、全体的にはほぼ平坦  
な像を示し、表面粗さは 0.258 でした。  
4%、55%でフッ酸処理したナノジルコニ  
アは、未処理のものに比べ不規則な特有の球  
状構造が見られるようになります。しかし  
4%Zr は形態計測計では平らな面として認識  
され、表面粗さは、Zr の Ra と近い 0.25  
8 という値になりました。特有な球場構造は  
Zr55%において Zr4%よりもより顕著に見られ、  
表面は丸みを帯びた突起状のナノ構造が見  
られました。Zr55%の表面粗さは 0.566、と  
なり、この値は酸処理したチタン AETi と  
0.564 とほぼ同等な値を示しました。

細胞増殖試験の結果です。培養 3 時間後のナ  
ノジルコニア上の接着細胞数は、コントロ  
ール群である AETi と比較し、未処理群は 6%  
減少、Zr4%は 13%増加、Zr55%では 52%の増加  
を認め 55%Zr は酸処理チタン、未処理のナ  
ノジルコニア文と比較して有意に接着数が増  
加していました。

同様に培養 24 時間後の接着細胞数は、AETi と  
比較して Zr は 31%の増加、4%Zr では 27%の  
増加と 55%Zr では 64%の増加が見られ 55%  
Zr は 4%Zr に対しても有意に接着数の増加  
を認めました。これらの結果から、培養 24  
時間後までにおいて Zr(55%)が他と比較し最  
も細胞が接着し易い表面形状を有している  
ことが考えられます。

蛍光免疫染色による細胞形態観察の結果を  
示します。

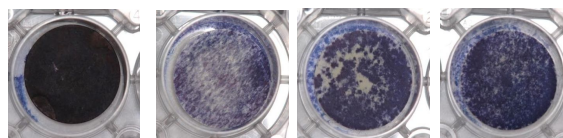
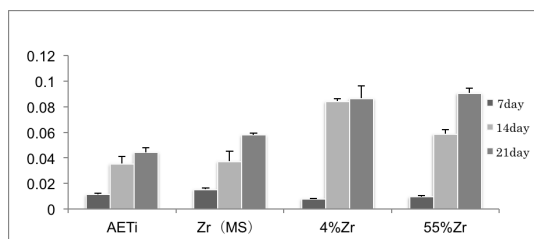
初期細胞接着時の細胞骨格と細胞の接着因子を観察する為に、赤の蛍光色素で、細胞骨格分子のアクチンフィラメントを、緑の蛍光色素で接着班裏打ちタンパクビニキュリンを染色しました。スライドで示しているように酸処理チタン上の骨芽細胞は紡錘形を呈したのに対し、ナノジルコニアではすべての群で円形を示していました。さらにナノジルコニア群では表面粗さの増加とともに、細胞の伸展を認め、数値は示してありませんが、Zr55%上では平均で酸処理チタンの2倍以上の細胞面積を示しました。また、AETi 上と比較すると細胞骨格，細胞突起の発達が強まり、フッサン処理したジルコニア上では明らかに細胞突起の発達並びに接着班の形成が強まっている様子が観察されました。



アルカリフォスファターゼ染色の結果を示

します。Zr 上のアルカリフォスファターゼ染色ではフッ酸処理による Ra の増加とともにその活性が高まっている様子が観察されました。表面未処理のナノ Zr に比べ、Zr(4%)と Zr(55%)は濃く発色し、Zr(55%)が最も濃く発色されていました。このことから、ナノジ

ルコニア上においても酸処理を加えることにより、表面粗さを増すことが、骨芽細胞の石灰化の促進に好影響を与えることが示唆されました。



## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 大嶋瑤子, 岩佐文則, 田中晋平, 舘慶太, 大野育代, 馬場一美

ナノジルコニア上で培養した MC3T3-E1 細胞の挙動解析について

第 317 回 昭和大学学士会例会(歯学部会主催)プログラム, p5, 2014

(第 317 回 昭和大学学士会例会, 東京, 2014 年 6 月)

2. 大嶋瑤子, 岩佐文則, 田中晋平, 舘慶太, 馬場一美

セリア安定化ジルコニア/アルミナ・ナノ複合体上で培養した骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞)の挙動解析について

第 44 回 日本口腔インプラント学会学術大会・学会誌, P290, 2014

(第 44 回日本口腔インプラント学会学術大会, 東京, 2014 年 9 月)

3.大嶋瑤子, 岩佐文則, 田中晋平, 舘 慶太, 松本貴志, 秋山智人, 馬場一美  
ナノ構造をもつセリア安定化ジルコニア/  
アルミナ・ナノ複合体の骨形成とオッセオ  
インテグレーションへの影響

**Enhanced osteogenesis and osseointegration on ceria-stabilized zirconia/alumina nanocomposite with Nanofeatured topography**

若手研究会, 熱海, 2015年3月21~22日  
抄録集 P.20

4.大嶋瑤子, 岩佐文則, 田中晋平, 舘 慶太, 松本貴志, 秋山智人, 馬場一美  
セリア安定化アルミナ/ジルコニアイン  
プラントの開発

昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的  
研究基盤形成支援事業平成26年度シンポ  
ジウム, 東京, 2015年3月28日

昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的  
研究基盤形成支援事業平成26年度シンポ  
ジウム プログラム・抄録集 P.56

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 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  
昭和大学歯学部歯科補綴学講座教授  
馬場一美

研究者番号: 80251536

(2)研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: