

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462964

研究課題名(和文) 骨質低下型骨粗鬆症への骨増生インプラントの臨床応用に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental research for clinical application of highly osteoconductive titanium implant to osteoporosis

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロ・ナノ構造におけるマイクロ構造の最適化を目的とし、サンドブラスト処理により種々の大きさのマイクロ構造を形成し、さらに陽極酸化処理によりナノ構造を持つナノチューブ酸化膜を形成した。試料の算術平均表面粗さ(Ra)および粗さ曲線要素の平均長さ(RSm)はブラスト粒子の粒径の増加に伴い増加した。骨芽細胞様細胞は、Ra=0.6 μm 、RSm=11.1 μm に制御されたマイクロ・ナノ構造試料において細胞増殖能の促進が認められた。

研究成果の概要(英文)：Micro-/nanostructured implant surfaces mimicking natural bone architecture are expected to have positive effects on osteoblast proliferation. In this study, to clarify the optimal microstructure scale on micro-/nano-titanium surfaces, highly controlled microstructure surfaces were fabricated with a titania nanotube oxide layer by sandblast treatment and electrochemical anodization. Average surface roughness (Ra) and mean width of the profile elements (RSm) increased in proportion to the size of the blasting media. Osteoblast-like cells showed reduced spreading area on smaller microstructure surfaces after incubation for 24 h. Cell proliferation assays, including cell counting and cell cycle analyses, showed that micro-/nanosurfaces with smaller microstructures (Ra = 0.6 μm , RSm = 11.1 μm) had the most positive effect. This result indicated that smaller microstructures of hierarchical surfaces enhanced cell proliferation.

研究分野：歯科医用工学

キーワード：歯科インプラント 骨再生 表面粗さ 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、急速な高齢化に伴い骨粗鬆症の患者が増加しつつある。骨粗鬆症は骨代謝回転のバランスの崩壊により骨折リスクを増すような骨強度上の問題をすでに持っている人に起こる骨格の疾患で、特に閉経後の女性に多く発症する。

口腔インプラント治療において、骨粗鬆症はインプラント治療を妨げる全身的リスクファクターとして問題視されており、骨量・骨質をマイクロCT等により定量的に評価することが推奨されている。また、近年、マイクロCTを代表とするX線検査では評価できない、骨質低下型新規骨粗鬆症が報告されてきた。骨質低下型新規骨粗鬆症は女性ホルモンであるエストロゲンの欠乏や加齢、生活習慣病により、骨量の減少は生じず、コラーゲンの質が悪化し骨強度が低下する疾患である。このような骨質低下型新規骨粗鬆症に対して口腔インプラントを埋入した際に生じる生体反応は、いまだ解明されていない。

口腔インプラントは生体内に埋入されると、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、生体と接する材料表面の形態や性状は生体反応に大きく影響を及ぼすことが明らかとなってきた。

表面粗さに代表される表面構造のスケールは重要な要素であり、マイクロスケールとナノスケールの構造は各々骨芽細胞挙動に影響を与えることが報告されている。

表面改質したインプラント材料は臨床応用されており骨形成促進に寄与している。近年、生体内の細胞外環境の構造を模したバイオミメティック材料が注目されており、細胞-細胞外基質相互作用における構造因子の影響を明らかにし、さらには臨床において効果的な生体材料を創製することが期待されている。生体骨はハヴァース系、オステオンなどのマイクロ構造と、コラーゲン線維や無機・有機分子などのナノ構造を併せ持つ階層的な構造を有している。さらに骨リモデリングの過程において、骨芽細胞は破骨細胞の形成した約30-100 μ mの吸収窩に接着し、骨形成を開始する。吸収窩は破骨細胞が残したコラーゲン線維によりマイクロ、ナノスケールの複雑な構造を有していることから、マイクロ・ナノ構造を有するチタンインプラントの改質が重要であると考えられる。

陽極酸化により形成されるチタンナノチューブ酸化膜(TNT)は、チューブの直径を15-100nm程度の範囲で制御可能であり、スケールの違いで細胞挙動を制御することが報告されている。マイクロ構造はサンドブラスト処理や酸処理により基盤の粗さを制御する方法が多く研究されており、細胞の機

能発現に高い効果を示す一方で、細胞増殖能が抑制されるなどの課題がみられる。また構造を評価するパラメーターとして、算術平均粗さや最大高さなどの深さ方向の指標は頻用されるが、水平方向や空間的構造の評価方法の検討は不足しており、最適なスケールのマイクロ構造の決定に至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ構造が細胞機能に与える影響を明らかにするため、マイクロ構造の形態を種々の大きさのジルコニアビーズを用いてサンドブラスト処理を用いて付与し、化学的性質およびぬれ性を統一するために、ナノ構造を陽極酸化処理により付与した作製した材料を用いて、階層構造チタンの骨芽細胞増殖能に与える影響を評価した。

3. 研究の方法

直径10mm、厚さ1.5mmの純チタンを研磨荷重800g/5個にて、耐水研磨紙#600及び#1000で研磨し、その後9 μ mダイヤモンドスペンション、0.04 μ mコロイダルシリカをそれぞれ噴霧しながら鏡面研磨した(MP)。大きさを制御したマイクロ構造を形成するため、粒径30、90、180 μ mの球状ジルコニアビーズ(TZ-B30、90、180、東ソー)をサンドブラスト粒子として用いて、投射圧力0.6MPaにてそれぞれ試料一面に均一に噴射した。ナノチューブ酸化膜形成のため、陽極酸化処理を電解溶液0.5wt%フッ化ナトリウム、1M硫酸ナトリウム水溶液を用いて電圧20V、室温下にて3時間陽極酸化を行った。得られたマイクロ・ナノ構造試料(粒径30、90、180 μ mのジルコニアビーズにてサンドブラスト処理の後、陽極酸化処理した試料:SB30TNT, SB90TNT, SB180TNT)および陽極酸化処理試料(TNT)をその後、500、2時間、大気下にてアニール処理した。

作製した試料の表面微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)にて解析した。算術平均表面粗さ(Ra)および粗さ曲線要素の平均長さ(RSm)をレーザー顕微鏡にて解析した。結晶構造をX線回析(XRD)にて、ぬれ性を静的接触角測定にて解析した。

ヒト骨芽細胞様細胞(MG63)を用いて、細胞伸展面積および細胞増殖能を解析した。試料(n=6)に細胞濃度 3×10^4 cells/cm²にて播種し、3、6、24時間後に固定した後、細胞骨格をrhodamine phalloidinにて核をDAPIにて染色し蛍光顕微鏡写真より細胞伸展面積を測定した。細胞増殖数は、試料(n=6)に細胞濃度 1×10^4 cells/cm²にて播種し、1、3日培養後に固定、核をDAPIにて染色し解析した。細胞周期解析をフローサイトメトリー法により行った。MG63を飢餓培地にて3日間培養した後、細胞濃度 3×10^4 cells/cm²にて試料に播種し24時間培養した。その後細胞を固定、染色した後に細胞周期分布を解析した(n=3)。

4. 研究成果

SEM 画像 (図 1) により, 弱拡大画像で TNT 表面に起伏はみられず, SBTNT 群の表面にはプラスト処理によるマイクロスケールの円形の凹みが観察された. 強拡大画像より, TNT および SBTNT 群には直径約 110nm のチューブ構造の形成が認められた.

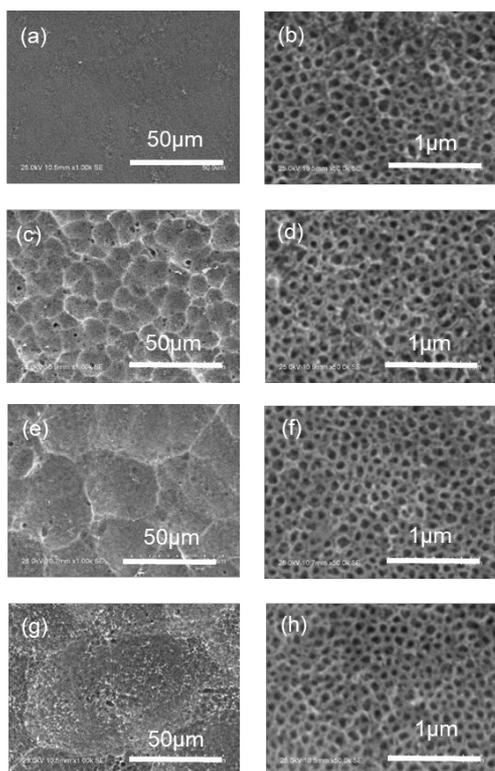


図 1 Surface morphology of the micro nano Ti substrates observed by SEM. (a)MP, (b)TNT, (c)SB30TNT, (d)SB90TNT, (e)SB180TNT. Different scaled micro craters depending on the blasted zirconia beads' size and aligned nano tubes approximately 110nm in diameter were seen.

試料の Ra および RSm は, プラストしたビーズの粒径の増加に伴い増加した (図 2). 表面結晶構造は MP ではチタンのピークのみが検出され, TNT と SBTNT 群においてはアナターゼ型 TiO₂ および基盤のチタンに一致するピークが検出された. 静的接触角測定より, TNT および SBTNT 群ではぬれ性の増加が認められ, マイクロ構造の有無, 大きさによるぬれ性の差はみられなかった.

骨芽細胞は試料の構造に従い異なる伸展を認めた. 24 時間培養後, MP 上では細胞は面積を広く多方向に伸展していたのに対し, TNT, SBTNT 上では 2, 3 方向に葉状仮足を伸展させている様子が認められた (図 3). 細胞面積解析により, MP 上で最も伸展面積が大きく, TNT は SBTNT 群より大きい傾向がみられた. 培養 24 時間後, SBTNT 群ではマイクロ構造の径の減少に伴い細胞面積が減少し, SB30TNT 上で最も低い値を示した.

細胞増殖能解析より 培養 3 日目に SB30TNT で MP と比較して細胞数の増加がみられた.

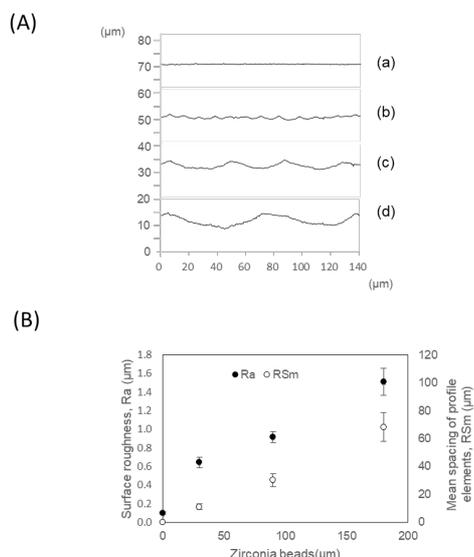


図 2 (A) Profiling images of the vertical section. (a)TNT, (b)SB30TNT, (c)SB90TNT, (d)SB180TNT. (B) Surface roughness(Ra) and mean spacing of profile elements(RSm) dependent on sandblasted zirconia size. Both roughness parameters increased in proportion to the zirconia beads' size.

細胞周期解析により, S 期にある細胞の割合は TNT と SBTNT 群が MP と比較して少なく, 一方 G2/M 期にある割合は TNT と SBTNT 群が MP よりも高く, SB30TNT が TNT よりも優位に高かった (図 4). 小さいマイクロ構造をもつマイクロ・ナノ構造において, 細胞増殖能の促進が認められた.

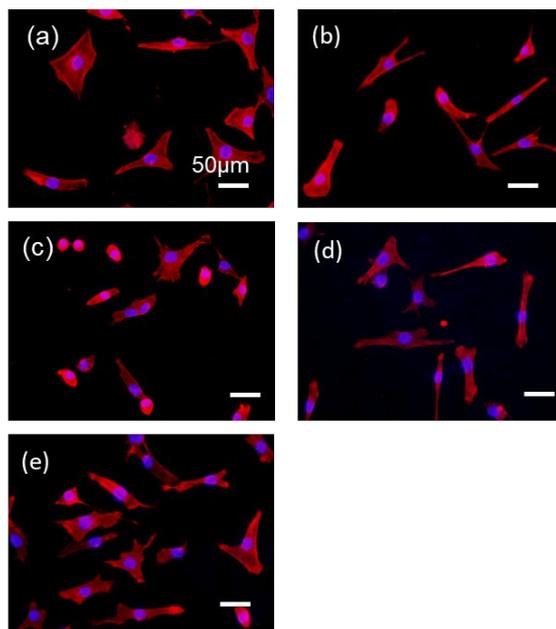


図 3 Fluorescence images showing morphology of MG63 after 24h incubation. (a)MP, (b)TNT, (c)SB30TNT, (d)SB90TNT, (e)SB180TNT. MG63 on TNT and SBTNTs showed smaller cell area than MP, though stretching their cell process further.

Among SBTNTs, cell area increased as the size of the micro crater increased.

本研究で作製したマイクロ・ナノ構造試料で骨芽細胞の伸展面積はマイクロ構造の大きさに従い異なる挙動を示した。培養時間 24 時間後に SB30TNT 上で他群と比較して最も細胞伸展面積が抑制された。TNT と SBTNT 群は同一の結晶構造およびぬれ性を有しているため、表面粗さの要素である Ra, RSm の変化が細胞の伸展面積に影響を及ぼした可能性が考えられる。様々な粗さを与えた基盤上で骨芽細胞伸展を評価した過去の研究では, Ra の値が 2 μm 以下では, 細胞伸展に差がないことが報告されている。作製試料の Ra は最大で SB180TNT の Ra=1.51 μm であり, 伸展面積に影響を与える要素ではないと考えられる。一方 RSm は約 70 μm 以下の値で細胞伸展に影響を与えることが報告されている。本実験試料では, RSm の値は 11.1 から 68.3 μm の範囲であることから, RSm の要素が影響したと考えられる。また TNT 形成面では平坦な面と比較して骨芽細胞伸展面積は小さく, また直径 100nm の TNT 構造では増殖能が促進されると報告されている。本研究の TNT は直径約 110nm であり, 細胞伸展形態も過去の報告と同様であった。しかしながら MP 試料以外はすべて同一の TNT 表面を形成されていたにもかかわらず, マイクロ構造の大きさの違いによって細胞伸展面積に差が認められた。

number decreased in S-phase and increased in G2/M-phase significantly when cultured on TNT and SBTNT compared to MP, and on SB30TNT compared to TNT.

骨芽細胞増殖能は他群と比較して小さいマイクロ構造をもつ, SB30TNT において促進された。免疫染色法より培養 3 日目に SB30TNT では MP と比較して高い細胞増殖数を示した。また細胞周期解析より 24 時間後に分裂周期の後期である G2/M 期にある細胞の割合が, TNT と SBTNT 群で MP よりも高く, また SB30TNT は TNT よりも高かった。このことより, TNT 表面およびそれと組み合わせた小さいマイクロ構造によって細胞増殖能が促進されることが確認された。

基盤の表面構造は細胞伸展や細胞骨格および様々な機能発現に影響を及ぼすことが報告されている。本結果では構造による細胞伸展の変化は培養 6 時間後から現れ, 細胞増殖能に関する変化はその後現れた。このことから, 細胞がまず試料の表面構造を認識し細胞骨格の構成や伸展を誘導し, 細胞増殖能に影響を与えた可能性が示唆された。作製した種々のマイクロ・ナノ構造が細胞外基質の構成や構造, 力学的要素に影響を及ぼし, 細胞接着機構やアクチン骨格の再構成を介して細胞内基質および核にシグナル伝達した可能性が考えられる。マイクロ・ナノ構造を持つ SB30TNT 上で, 低い RSm 値の影響により骨芽細胞は伸展面積を抑制し, 細胞内伝達を介して増殖能を促進したと考えられる。

本研究ではサンドブラスト処理と陽極酸化処理により形成されたマイクロ・ナノ構造が, 骨芽細胞の伸展と増殖能に影響を及ぼすことを示した。試料表面は同一の結晶構造, ぬれ性を有していることが確認されており, マイクロ構造のスケールの違いによって細胞挙動に変化を与えたと考えられる。SB30TNT (Ra=0.6 μm , RSm=11.1 μm) の構造が最も増殖能を促進させ, インプラント材料の基盤設計における詳細な形態制御の重要性を示した。

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 2 件)

Natsuko Iwata, Kosuke Nozaki, Naohiro Horiuchi, Kimihiro Yamashita, Yusuke Tsutumi, Hiroyuki Miura and Akiko Nagai. Effects of controlled micro-/nanosurfaces on osteoblast proliferation. J Biomed Mater Res part A, (DOI: 10.1002/jbm.a.36118) 査読有

Naohiro Horiuchi, Norio Wada, Kosuke Nozaki, Miho Nakamura, Akiko Nagai, and Kimihiro Yamashita. Dielectric relaxation in monoclinic hydroxyl-

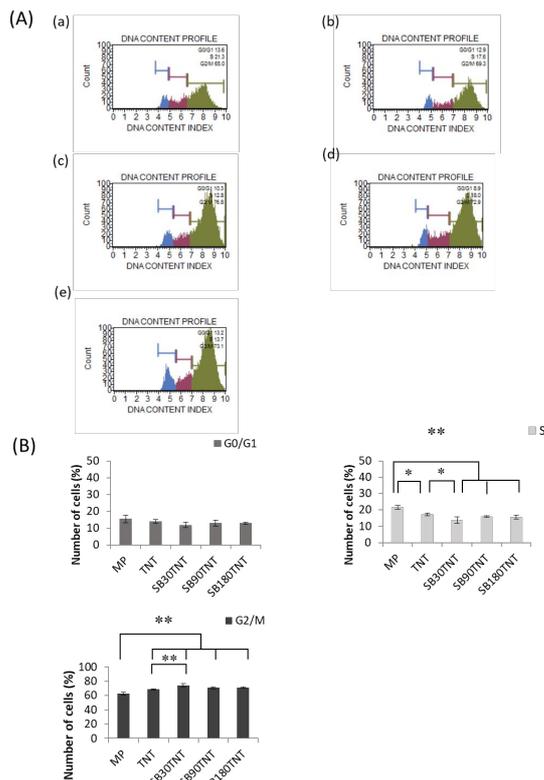


図 4 (A) Flow cytometry analysis of cell cycle on each substrate after 24h cultivation. (B) Percentage of the number of cells in G0/G1, S G2/M phases on each substrate (*: p<0.05, **: p<0.01). Cell

apatite: Observation of hydroxide ion dipoles Journal of Applied Physics. 2016.02; 119(8); 084903-6(doi: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4942236>) 査読有

〔学会発表〕(計8件)

岩田夏子, 野崎浩佑, 山下仁大, 三浦宏之, 永井亜希子. 多様なマイクロ・ナノ構造を有するチタン材料による骨芽細胞挙動の制御. 公益社団法人日本補綴歯科学会第125回学術大会. 2016年7月9日. 石川県立音楽堂, ANAクラウンプラザホテル金沢, 金沢市, 石川県

Kosuke Nozaki, Kazuhisa Fujita, Naohiro Horiuchi, Miho Nakamura, Hiroyuki Miura, Kimihiro Yamashita, Akiko Nagai. In vivo evaluation of the role of carbonate ion in hydroxyapatite for bone remodeling. 10th World Biomaterials Congress 2016.05.20

岩田夏子, 野崎浩佑, 山下仁大, 三浦宏之, 永井亜希子. マイクロ・ナノ階層構造チタンによる骨芽細胞挙動の制御. 第67回日本歯科理工学会学術大会. 2016年4月16日. 九州大学医学部百年講堂, 福岡市, 福岡県

Nozaki K, Fujita K, Miura H, Yamashita K, Nagai A. Bone remodeling-optimization of carbonated apatite for guided bone regeneration. AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition 2016.03.19 Los Angeles, CA, USA

Iwata N, Nozaki K, Miura H, Yamashita K, Nagai A. Surface modification of Ti implant with controlled micro/nano-structured topography. AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition 2016.03.17 Los Angeles, CA, USA

Natsuko Iwata, Kosuke Nozaki, Hiroyuki Miura, Kimihiro Yamashita, Akiko Nagai. The effect of titania nanotube surfaces on osteoblast behavior. 15th Asian Bioceramics Symposium 2015.12.10 Tokyo, JAPAN

岩田夏子, 野崎浩佑, 山下仁大, 三浦

宏之, 永井亜希子. ナノチューブ表面構造形成によるチタニアの骨芽細胞挙動の制御. 第37回日本バイオマテリアル学会大会 2015.11.09 京都テルサ, 京都市, 京都府

Iwata N, Nozaki K, Miura H, Yamashita K, Nagai A. The effect of titania nanotube surfaces on osteoblast behavior. The 6th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-6) 2015.06.09 Tokyo, JAPAN

〔図書〕(計1件)

Nozaki K, Ebe N, Yamashita K, Nagai A. Elsevier, Mineral Scales and Deposits: Scientific and Technological Approaches. 2015.06, 758.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/biofunctions/biofunctions-j.html>

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生体材料機能医学分野・助教
研究者番号: 00507767

(2) 研究分担者

堀内 尚紘 (HORIUCHI, Naohiro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所無機生体材料学分野・助教
研究者番号: 90598195

江部 典子 (EBE, Noriko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所無機生体材料学分野・特任助教
研究者番号: 20611099

(4) 研究協力者

永井 亜希子 (NAGAI, Akiko)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所生体材料機能医学分野・准教授
研究者番号: 40360599

山下 仁大 (YAMASHITA, Kimihiro)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所無機生体材料学分野・教授
研究者番号: 70174670