

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02310

研究課題名(和文) 金属インプラントの生体活性を司る表面階層構造の厳密な構築とin vivo評価

研究課題名(英文) Strict construction and in vivo evaluation of the surface hierarchy governing the bioactivity of metal implants

研究代表者

興戸 正純 (OKIDO, Masazumi)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・教授

研究者番号：50126843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,300,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント表面階層構造制御の深化を目指して、種々のインプラント材料の表面改質を行った。Nb, Ta, Ti-Nb-Ta-Zrなどをラット脛骨に2週間埋植し、表面への硬組織生成量から骨伝導能を評価した。材質には依存せず、水滴接触角によって整理できることがわかった。65度の水滴接触角を界として、より親水性あるいは疎水性になるほど骨伝導性が向上した。タンパク質吸着量も、骨伝導性と同様に表面親水性に強く依存した。一方、各種プラスチックを表面改質することにより親水化することに成功した。ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)を超親水化させると高い骨伝導性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Surface modification of various implant materials was carried out in order to deepen the control of implant surface hierarchical structure. Nb, Ta, Ti-Nb-Ta-Zr and so on were implanted in the rat tibia for 2 weeks, and the osteoconductivity was evaluated from the amount of hard tissue formation on the surface. It is found that it can be arranged by water drop contact angle without depending on the kind of material. With the water drop contact angle of 65 degree as the boundary, osteoconductivity improved as more hydrophilic or hydrophobic. Protein adsorption was strongly dependent on surface hydrophilicity as well as osteoconductivity. On the other hand, it succeeded in making the surface hydrophilic by surface modification of various plastics. It was clarified that polyether ether ketone (PEEK) with super-hydrophilicity had high osteoconductivity.

研究分野：材料工学

キーワード：インプラント チタン合金 生体活性 骨伝導性 親水性 タンパク質接着 動物実験

1. 研究開始当初の背景

人工歯根や人工関節などのインプラント材の多くにチタン合金が使用されている。このような固体表面での生体組織の挙動を知ることは、ステム、歯根、骨ねじなどのインプラント材などの開発において重要である。固体表面に生体適合性を柔軟にかつ的確に付与するためには、表面処理・官能基修飾の技術が欠かせない。固体/表面/表面官能基/タンパク質/細胞といった階層構造(図1)が、タンパク質や細胞の接着と分化、活性化を大きく左右し、硬組織・軟組織生成能に多大なる影響を与える。しかし、従来は、階層構造最下部の固体表面を変化させるコーティング物質にのみ多大な労力が払われてきた。我々も、かつては Ti 表面を水溶液中で湿式処理することによる高骨伝導化を進めてきた。すなわち、水酸アパタイト(HAp)の結晶形態や TiO₂ の表面粗さ、作製プロセスの相違が骨伝導性(ラット体内での新生骨の早期成長性)に影響を及ぼすことを報告してきたが、必ずしも十分骨伝導の性能が得られているとはいえない。

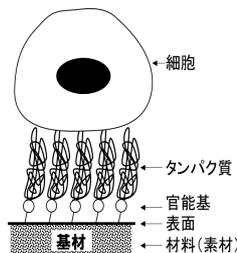


図1 理想的表面階層構造

2. 研究の目的

骨伝導性に効果がある因子を調べたところ、親水性が最も効果のあることが判明した。生体材料開発においては、人工物固体と体液・軟組織・硬組織などの生体組織との界面反応を知ることが必要であり、材料化学、生体工学、医歯学研究者が共同で構築することが迫られている。そこで、表面改質技術を開発し、生体内(in vivo)埋入試験や生体外(in vitro)タンパク吸着試験により評価し、生体親和性(骨伝導性)の高い材料を作製することを目的とした。

3. 研究の方法

生体材料に使われる金属・合金、セラミックス、ポリマーなどの固体物質を基材として取り扱った。固体の表面改質には新たに骨の無機成分である HAp を被覆する Epi-coat 法と Ti 表面を TiO₂、CaTiO₂ に変化させる Endo-coat 法がある。スパッタ、溶射、めっきなどを利用した前者の研究は多いが皮膜の密着性、均一性、粗度、プロセス温度などが問題となる。一方、後者の研究は少ないものの、前者の問題点を解決できる手法であるため、種々の Endo-coat を生体材料の開発のための表面改質に用いた。すなわち、固体表面の親水化処理としては、180 蒸留水中水熱処理、紫外線照射、大気圧プラズマ、濃

硫酸常温溶液浸漬等を試みた。また、親水化処理として気相プロセスと液相プロセスの違いについても検討した。

幹細胞が放出したタンパク質を含有する水溶液(培養上清)に、親水性ならびに疎水性固体を浸漬させ、吸着タンパク質の種類と量を液体クロマトグラフィー等により評価した。特に、細胞接着性タンパク質である I 型コラーゲン、フィブロネクチン等について詳細に検討した。細胞に動物埋植実験として、表面処理材料をラット脛骨に埋植し、その表面に生成した硬組織の割合、すなわち次式で定義する「骨-インプラント接触率(R_{B-I})」によって、生体活性を評価した。

$$R_{B-I}(\%) = \frac{\text{試料上に硬組織が生成した部分の長さの合計}}{\text{試料の埋植部分の長さ}} \times 100$$

なお、各種 Endo-coat 処理を施した後の表面は、研磨まま材の平滑性と同様に Ra/μm < 0.1 となる処理条件のみを採用した。これは、表面粗度も影響因子のひとつであるためである。

4. 研究成果

水酸アパタイト HAp 被覆

骨の無機成分である HAp, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, やコラーゲン複合体を被覆した Ti では、骨伝導性が高い。図2に示すように、HAp は過飽和度をコントロールすることにより水溶液中

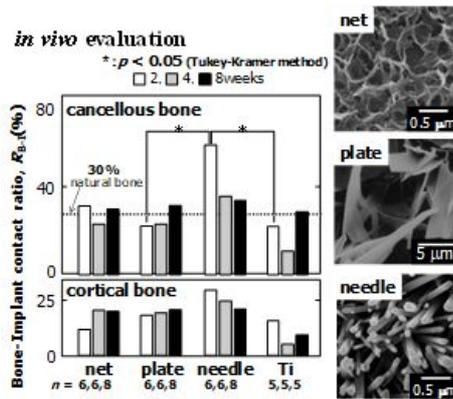


図2 水溶液中で合成した HAp 膜の表面形態と骨伝導の関係

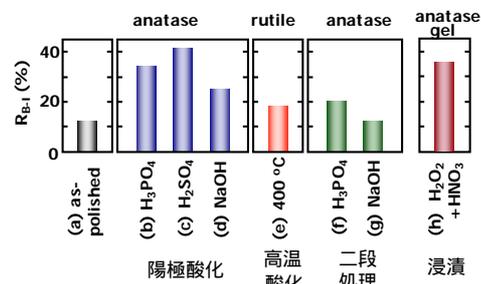


図3 各種方法で表面酸化した Ti の皮質骨部の骨伝導性。

中から表面形態を変えて皮膜として形成させることができる。HApの溶解度は温度上昇により低下するので基板の温度を上げることや水溶液中カソード電解による水素発生によりOH⁻イオンを供給してイオン積を増加させるなどでの手法がある。形成されるHAp皮膜は過飽和度の増加により、網状から板状、針状へと変化する。R_{B-1}値(上が海綿骨部、下が皮質骨部)はC軸配向した針状HAp結晶が海綿骨で著しく高くなる。骨芽細胞の培養でも針状HAp上では細胞数の増加は顕著な差はないものの、その活動度であるALPは極めて高いことが判明している。このようにHAp結晶形態が骨伝導性に多大な影響をおよぼすことが明らかとなった。

チタンの陽極酸化

酸化物は金属より骨伝導能が高いといわれている。そこで、種々の方法でチタン表面を酸化しチタニア膜を作製した。図3に示すように酸化法により骨-インプラント接触R_{B-1}に違いがでる。磨いただけのTiと比較すると、陽極酸化材は高いR_{B-1}を示すが、空气中で高温酸化したものは示さない。一旦、陽極酸化後に高温酸化しても効果はない。結晶系がアナターゼだから良いというわけでもない。

次に、異なる溶質イオン種を含有する種々の水溶液中でTiを陽極酸化することで、選択的に溶質イオンを皮膜中に取り込み、骨伝導におよぼす影響を検討するとともに、溶質イオンの混入が表面親水性におよぼす影響について検討した。図4に結果を示す。SO₄²⁻あるいはPO₄³⁻を含む無機酸性水溶液あるいは中性水溶液中での陽極酸化試料のXPSでは、皮膜中に各水溶液中のアニオンが含有されていることが確認された。また、陽極酸化時の

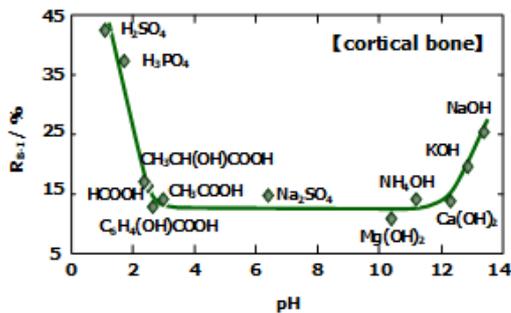


図4 各種水溶液中で陽極酸化した試料の骨伝導性

水溶液にMg²⁺, Ca²⁺, K⁺, あるいはNa⁺が含まれている場合には、皮膜中に各カチオンが含まれていることも確認された。陽極酸化後の試料の*in vivo*試験から得られた皮質骨部のR_{B-1}の値と陽極酸化水溶液のpHの関係では、骨伝導性は溶液の種類ではなく、溶液のpHに依存することがわかる。後述するが、強酸性あるいは強アルカリ性で処理したTi表面の水滴接触角は小さく、親水性を示すことが判明した。

表面親水性制御

表面の親水性と硬組織生成量の関係を系統的に調べた例は少なく、表面親水性と骨伝導性との定量的関係は未だ明らかではない。そこで、生体材料用に開発されてきた各種金属・合金を用い、陽極酸化や水熱法などを駆使して材料表面の親水性を変化させ、骨伝導能との関係を評価した。

人工股関節や人工膝関節など、強度を必要とする部位では純Tiよりも機械的強度に優れたα+β型Ti合金が多く使用されている。また、ストレスシールディングによる骨吸収を軽減するために、皮質骨と弾性率の近いβ型Ti合金の開発が盛んに行われている。これまで用いてきたTiをベースとし、α+β型Ti合金であるTi-6Al-4V ELI (Ti64), Ti-6Al-7Nb (Ti67), β型Ti合金であるTi-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ), Ti-13Cr-1Fe-3Al (TCFA)を評価した。図5にそれらの結果をまとめて示す。Tiの水滴接触角は、研磨後で70度程度、陽極酸化

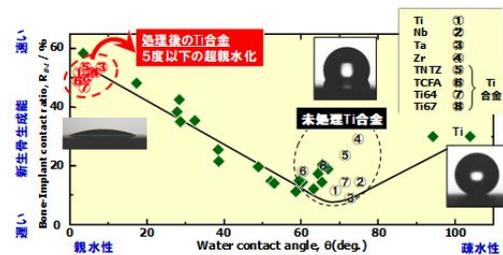


図5 金属、合金の表面親水性と骨伝導性の関係。

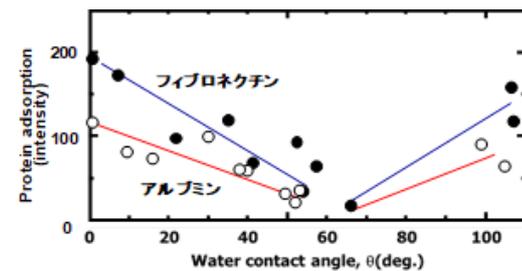


図6 材料表面親水性とタンパク質吸着量の関係。

後で30度程度である。処理(水熱処理後に陽極酸化)を行いPBS溶液に浸漬しておくことで5度以下の超親水性が得られる。

浸漬液を蒸留水に変えると18度止まりである。空气中に保存するとホコリ等で簡単に親水性は衰える。図5より、合金の研磨まま材は60~80度の水滴接触角であり、骨伝導は低い。適当な処理により親水性を高めると骨伝導も上昇する。用いた生体用金属・合金全てで、ほぼ同様の傾向があることがわかる。70度を境に疎水化することでも幾分骨伝導は上昇する傾向がみられるが、これはタンパク質の吸着と関係がある。

タンパク質吸着

新生骨生成は表面に吸着するタンパク質の種類・量に依存するといわれている。さら

に、骨芽細胞はタンパク質を足場としてインプラントに接着する。新生骨生成に効果のあるフィブロネクチン（細胞接着性タンパク質）とアルブミン（細胞非接着性タンパク質）を溶かした蒸留水にサンプルを浸漬し、表面吸着量を FT-IR のアミド結合（ペプチド結合）から検出した。図 6 に示すように、両タンパク質ともに水滴接触角 60 度を境として親水性側でも疎水性側でも吸着しやすくなる。図 5 の骨伝導と比較すると、超親水性表面では、タンパク質が多く吸着し、新生骨の生成も多くなることが理解できる。親水化処理とタンパク質塗布の両効果について検討した結果、タンパク質塗布だけでも効果はあるが、表面超親水化を併用することで飛躍的に骨生成能が向上することも実証している。

ポリマーなどへの応用

スーパーエンジニアリングプラスチックは化学的・機械的安定性の高いポリマーである。PEEK（ポリエーテルエーテルケトン）は、骨に近い弾性率（曲げ弾性率は約 3.6 GPa）を持つ。しかし、化学的に極めて安定なため表面改質が困難であり、疎水性表面（水滴接触角 85 度）であるため、無電解めっきなども難しく工業的にも使用しにくい。生体材料へ適用するために、現状では PEEK 粉末を HAp 粉末と混練し複合材とする、PEEK 基材表面に HAp などを析出・加熱固着する、PEEK 表面に HAp や Ti、TiO₂ を溶射するなどの対策が考えられている。我々は生体活性を上げる目的で、これまでの手法を発展させた超親水化法を模索している。各種ポリマーを研磨

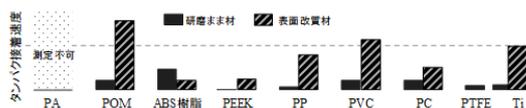


図 7 各種ポリマーへのタンパク質吸着速度。

して平滑 (Ra<0.1 μm) にし、強酸などを用いた水溶液浸漬処理と大気圧プラズマ処理あるいは紫外線照射処理を組み合わせた表面改質することにより、平滑性を維持したまま親水化することができている。図 7 に、ポリアミド(PA)、ポリオキシメチレン(POM)、アクリロニトリルブタジエンスチレン樹脂 (ABS 樹脂)、ポリプロピレン(PP)、ポリ塩化ビニル(PVC)、ポリカーボネート(PC)に、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)について、表面改質によるタンパク質の吸着速度の比較を示す。多くのポリマーは Ti と同様に表面改質により親水化し、その結果タンパク質の吸着速度が増加しているが、PA や PTFE では不十分である。

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 8 件)

S. Tsuchiya, K. Sugimoto, H. Kamio, K. Okabe, K. Kuroda, M. Okido, H. Hibi, Kaempferol-immobilized titanium dioxide promotes formation of new bone: effects of loading methods on bone marrow stromal cell differentiation in vivo and in vitro, International Journal of Nanomedicine 2018(13), pp. 1665-1676(2018)

<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S150786>, 査読あり

K. Kuroda, M. Okido, Osteoconductivity Control Based on the Chemical Properties of the Implant Surface, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2018(9), pp. 26-40(2017) <https://doi.org/10.4236/jbnt.2018.91003>, 査読あり

K. Kuroda, M. Okido, Osteoconductivity of Protein Adsorbed Titanium Implants using Hydrothermal Treatment, Mater. Sci. Forum, 879, pp. 1049-1052(2017) <http://dx.doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.879.1049>, 査読あり

M. Okido, K. Kuroda, Osteoconductivity of Superhydrophilic Ti- and Zr-Alloy for Bio-medical Application, Mater. Sci. Forum, 879, pp. 2524-2527(2017) doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.879.2524, 査読あり

M. Omori, S. Tsuchiya, K. Hara, K. Kuroda, H. Hibi, M. Okido, M. Ueda, A new application of cell-free bone regeneration: immobilizing stem cells from human exfoliated deciduous teeth-conditioned medium onto titanium implants using atmospheric pressure plasma treatment, Stem Cell Research & Therapy, 6, pp. 124-136(2015) 10.1186/s13287-015-0114-1, 査読あり

(学会発表)(計 91 件)

黒田健介, 興戸正純, Ti 表面への銀イオン吸着と抗菌性, 六研連携プロジェクト, 生体医療・福祉材料分野全体会議, 1 月 19 日, 東京(2018)

興戸正純, 軽金属の表面処理技術と Ti, Mg 合金の生体材料への応用, TECH Biz EXPO 2017, 11 月 15 日, 名古屋(2017)

M. Okido, K. Kuroda, Surface modification to improve osteoconductivity of metals and polymers, 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials 2017(ESB 2017), Sep. 4-8, Athens, Greece(2017)

K. Kuroda, M. Okido, Osteoconductivity and Protein Adsorbability of Hydrophilic Titanium Implant Surface using Hydrotreatment, Frontiers in Materials Processing Applications, Research and Technology 2017(FiMPART2017), Jul. 10-12, Bordeaux, France(2017)

興戸正純, 生体材料のための AZ91 合金上への親水性皮膜作製, 日本マグネシウム協会 第 25 回マグネシウム技術研究発表会, 6 月 7

日, 東京(2017)

〔図書〕(計1件)

黒田健介, 新家光雄, 超親水・超撥水化のメカニズムと品質向上, 情報機構(2017)

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: 医科歯科用材料およびその製造方法

発明者: 黒田健介, 山口勇氣, 興戸正純

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2016-099824, 特開 2017-205295

出願年月日: 2016年5月18日

国内外の別: 国内

名称: 樹脂材料およびその製造方法

発明者: 黒田健介, 五十嵐健太, 興戸正純

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-167882, 特開 2017-043713

出願年月日: 2015年8月1日

国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: 医科歯科用材料の製造方法および保存キット

発明者: 興戸正純, 黒田健介

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許第 5963133 号

取得年月日: 平成 28 年 7 月 8 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://f2.numse.nagoya-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

興戸正純 (OKIDO, Masazumi) 名古屋大学・未来材料・システム研究所・教授

研究者番号: 50126843

(2)研究分担者

黒田健介 (KURODA, Kensuke) 名古屋大学・未来材料・システム研究所・准教授

研究者番号: 00283408

土屋周平 (TUCHIYA, Syuhei) 名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20569785

日比英晴 (HIBI, Hideharu) 名古屋大学・

医学系研究科・教授

研究者番号: 90345885

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()