

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791932

研究課題名（和文）：生体活性化表面改質法によるジルコニアインプラントの開発と生体適合性評価

研究課題名（英文）：Development of a novel hydroxyapatite coating method on zirconia implant

研究代表者：山下 大輔 (YAMASHITA DAISUKE)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80550053

研究成果の概要（和文）：

本研究はジルコニアへの新規表面改質技術の開発により生体適合性高強度セラミックス複合体インプラントを開発することを目的とした。1) ジルコニア表面へガラスコーティング技術を用いて生体活性化相を生成し、生体適合性高強度セラミックス複合体を作製した。2) ジルコニア表面の細胞適合性の確認をジルコニアおよび生体適合性高強度セラミックス複合体板上でマウス骨芽細胞様細胞を用いて培養することにより、ジルコニアと比較して生体適合性高強度セラミックス複合体板上で優れた分化・石灰化能を示した。以上のことより本研究の表面改質法は生体活性能を有し、ジルコニアインプラントへの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study were to develop a novel HA coating method on zirconia using glass coating technique and to investigate the response of osteoblast-like cells to the surface of hydroxyapatite-containing glass coating on zirconia (HA-G-Zr) in comparison to yttria stabilized zirconia (Y-TZP). The hydroxyapatite containing glass-coated zirconia could be systematically produced using the glass coating technique. Osteoblast-like cells on HA-G-Zr plates showed higher differentiation and mineralization than Y-TZP. These results demonstrated that HA-G-Zr showed better cellular biocompatibility than Y-TZP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：【医歯薬学】

科研費の分科・細目：【補綴系歯学】

キーワード：【ジルコニア，表面改質，インプラント，アパタイト】

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントがオッセオインテグレーションを獲得する要因に、表面性状があげられることから、我々は新たなジルコニア基板の表面改質法及び臨床応用の可能性を検討するため、基板と歯周組織（骨）の観点か

ら考察することにした。金属チタン、ジルコニア共に生体においては不活性な材料であるため、よりインプラント体の生体適合性を良好にするためには表面改質が必須となる。現在チタンインプラント体においては種々の表面改質法が適用されている。インプラン

ト埋入後即時負荷させることさえ可能となり、表面性状の重要性が大いに関係しうると示唆している。しかしながら、より優れた表面改質技術の研究は今もなお行われている。同様に生体不活性な材料であるジルコニアもより良好な生体適合性を得るためには表面改質が重要になってくる。一方、HAは骨や歯の無機成分に類似しており、石灰化の促進能があり骨伝導能を有する生体適合性の高い人工材料として知られている。現在市販されているチタンインプラントにおけるHAコーティングインプラントは機械的強度、接着強度が弱く剥離するような欠点があり、化学的結合しないジルコニアには応用が難しいと思われた。BanらはHAとガラスを複合化して、金属チタンへコーティングした生体適合性複合体の創製、生体適合性を報告している。さらに我々はガラス・コーティング技術の応用によりジルコニアへのHAコーティングに成功した。サンドブラスト等にてジルコニアの表面処理を行い、さらにこの方法を用いることにより、強度な機械的結合が可能となる。以上の方法を応用することにより生体活性を有するジルコニアインプラント体の創製が可能であり、骨芽細胞の誘導、分化の促進が図れ、早期にOsseointegrationの獲得を得られると考え、着想に至った。

2. 研究の目的

生体活性材料であるハイドロキシアパタイト(HA)はチタンインプラントにコーティングすることにより、早期のOsseointegrationの獲得、高い成功率が報告されている。ジルコニアは生体不活性であるが、表面の凸凹とHAの作用によりインプラント周囲組織の早期治癒及びインプラント体と骨の早期のOsseointegrationが予想される。本研究はジルコニアに独自の手法でHAをコーティングしたジルコニアのインプラントを実用化するための生体適合性評価を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生体適合性高強度セラミックス複合体の作製

ジルコニア板を均一に表面処理するため、規格化された基板を作製する。その基板をランダムに抽出して表面改質の評価を行い、規格をクリアした基板のみを使用する。

基板の作製方法

①HA及びガラス(G)のフリットの作製

と粒度調整を行い、種々の割合(0~90wt%)でHA-G混合粉末を作製する。

②ジルコニア基板表面に粒径70 μm のアルミナ(Al_2O_3)を用いて各基板面にサンドブラスト処理を行い、表面粗さを増大させる。

③ジルコニアはサンドブラスト後、大気圧下において1000 $^{\circ}\text{C}$ 5分間熱処理を行う。

④試料は、アセトン脱脂、純粋中での超音波洗浄後室温にて乾燥。

⑤第1層として100%ガラス(G)を塗布し950 $^{\circ}\text{C}$ にて大気圧にて焼成

⑥第2層として30wt%ハイドロキシアパタイト(HA)-G、第3層に50wt%HA-G、第4層に70wt%HA-G、第5層に90wt%HA-G、第6層に100wt%HAを塗布し、各層900 $^{\circ}\text{C}$ 大気圧にて焼成を行う。

⑦焼成後3%HF+5%HNO₃混合酸にて3分間浸漬し、表層のガラスを溶解させる。

以上の過程により最表層においてHAがほぼ100%露出し、かつHA粒子が均一に分散し無数の空孔を有するセラミックス複合体を作製する。

(2) 骨芽細胞様細胞の初期における付着・伸展能の確認

①細胞骨格のActin形成を蛍光顕微鏡にて確認。

(3) 骨芽細胞様細胞の細胞増殖の確認

①細胞の形態観察をSEMにて確認。

②細胞増殖をMTT assayにて確認。

(4) 骨芽細胞様細胞の分化、石灰化の確認

①分化の指標であるアルカリフォスファターゼ活性の確認

②分化の指標であるオステオカルシンのタンパク発現をELISA法にて確認。

③アリザリンレッド染色にて石灰化の確認

4. 研究成果

(1) 生体適合性高強度セラミックス複合体の作製

XRD (Fig. 1) および FTIR (Fig. 2) にて結晶層の定性, SEM 像 (Fig. 3) にて表面の状態確認を行ったところ, ジルコニア (Y-TZP) の表面と比較し, 生体適合性高強度セラミックス複合体 (HA-G-Zr) の表面においてアパタイトを含むガラス層が形成されていることが確認された。

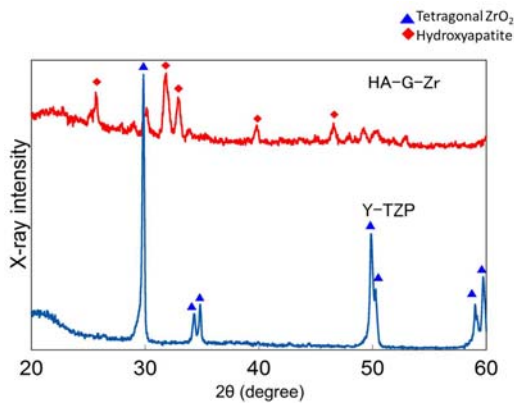


Fig. 1 結晶相の定性 (XRD)

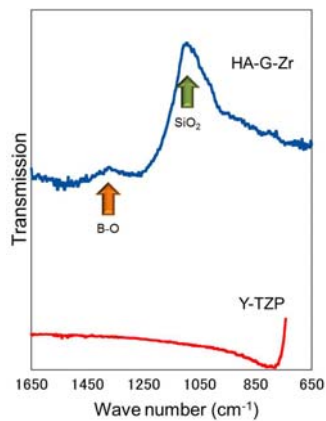


Fig. 2 結晶相の定性 (FTIR)

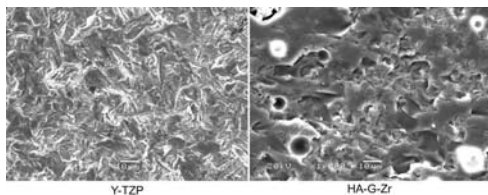


Fig. 3 各試料の表面形態 (SEM)

(2) 骨芽細胞様細胞の初期における付着・伸展能の確認

試料表面とのビンキュリンの発現, 細胞骨格の形態を蛍光顕微鏡にて比較したところ試料間に差は見られなかった。

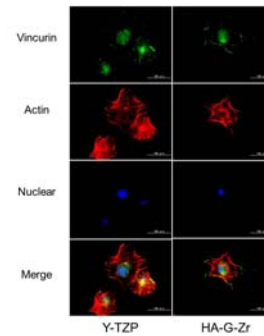


Fig. 4 ビンキュリン, アクチンの発現

(3) 骨芽細胞様細胞の細胞増殖の確認

MTT assay にて細胞の増殖 (Fig. 5), SEM (Fig. 6) にて細胞の形態観察を行ったところ, 増殖には有意な差は認められなかった. しかしながら SEM による形態観察では 15 日目の HA-G-Zr 表面において石灰化物の形成が認められた.

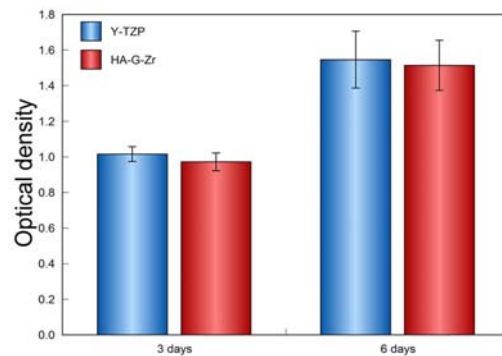


Fig. 5 試料上における細胞増殖

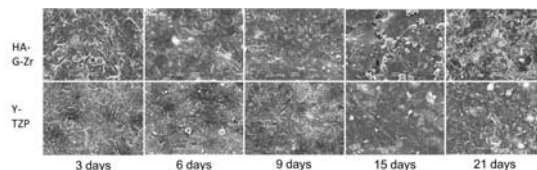


Fig. 6 試料上における細胞形態

(4) 骨芽細胞様細胞の分化, 石灰化の確認

細胞の分化をアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性 (Fig. 7) およびオステオカルシン (OCN) の発現 (Fig. 8) にて確認した. またアリザリンレッド染色にて細胞の石灰化 (Fig. 9) を確認した. ALP 活性は 9 日目において有意に高く, OCN の発現は 15 日目

において有意に高いことが確認された。また、15日目の細胞の石灰化がHA-G-ZR上においてのみ確認された。

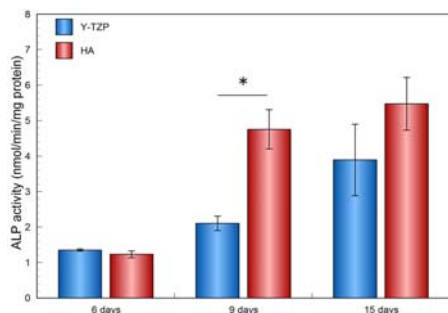


Fig. 7 試料上におけるALP活性

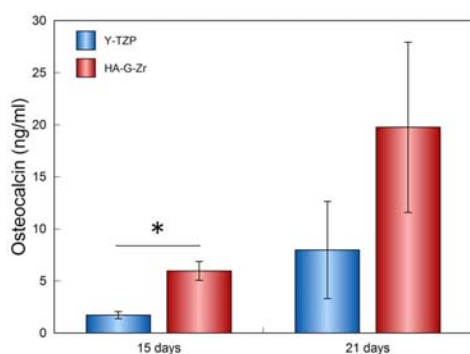


Fig. 8 試料上におけるOCNの発現



Fig. 9 試料上での細胞の石灰化

以上の結果よりジルコニア表面に比べHA-G-Zr表面では、分化、石灰化が優位に発現することが確認できた。よって本研究の表面改質法は生体活性を有し、ジルコニアインプラントへの応用が期待できるものと思われる。

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2件)

- ① D. Yamashita, M. Noda, M. Machigashira, M. Miyamoto, H. Takeuchi, N. Takeuchi, H. Kono, K. Noguchi, and S. Ban, In

vitro evaluation of hydroxyapatite-containing glass coating on zirconia, Key Engineering Materials, 査読有, Vol. 23, 2012, 7-9

DOI:

10.4028/www.scientific.net/KEM.493-494.7

- ② D. Yamashita, M. Machigashira, M. Miyamoto, H. Takeuchi, N. Takeuchi, H. Kono, K. Noguchi, and S. Ban, Comparison of osteoblast-like cell response to zirconia and titanium, Archives of BioCeramics Research 査読有, Vol. 10, 2010, 34-37

〔学会発表〕(計3件)

- ① D. Yamashita, M. Noda *et al*, In vitro evaluation of hydroxyapatite-containing glass coating on zirconia, The 23rd International Symposium on Ceramics in Medicine, 2011/11/08, Istanbul, Turkey_
- ② D. Yamashita, M. Machigashira *et al*, Comparison of osteoblast-like cell response to zirconia and titanium, Asia Bioceramics 2010, 2010/11/03, Yogyakarta, Indonesia_
- ③ D. Yamashita, M. Machigashira, *et al*, Biocompatibility of osteoblast-like cells to zirconia/alumina nanocomposite, International Association for Dental Research, 2010/07/14, Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 大輔 (YAMASHITA DAISUKE)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・医員

研究者番号：80550053

(3) 連携研究者

伴 清治 (BAN SEIJI)

愛知学院大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：10159105

町頭 三保 (MACHIGASHIRA MIHO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80253897

宮本 元治 (MIYAMOTO MOTOHARU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50452941

河野 博史 (KONO HIROSHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20507165

武内 博信 (TAKEUCHI HIRONOBU)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70452951

(4) 研究協力者

野田 誠 (NODA MAKOTO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・大学院

生