

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11633

研究課題名(和文)チタン最表面層超微小領域の石灰化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the calcified mechanism on the titanium surface

研究代表者

片岡 有 (KATAOKA, YU)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：90527300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：各種表面処理を行ったJIS2種チタン板を実験に供し、ワイヤ放電加工表面を施したEDSurfaceとコントロールとして機械加工表面を用い、分化誘導培地を用い間葉系骨髄細胞の培養をし、通法の細胞形状、遺伝子解析を行った。さらに石灰化組織顕微ラマン分光分析およびナノインデンテーションを用い、骨質の評価を総合的に行った。その結果、ワイヤ放電表面での骨質は優位に優れている結果となった。また、チタン表面での結晶配列を規定するための水熱合成による人工ハイドロキシアパタイト結晶の樹立することができた。単結晶の比較的大きいサイズの結晶を得ることができ、チタン表面での合成系を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在行われている表面処理技術が、インプラント治療による早期機能回復に寄与することは、多く報告されている。しかしながら、生体反応は分子・ナノレベルの反応でもあるにもかかわらず、今研究では、今まで申請者らが検討してきたナノレベルでの分析機器を用いた検討を行うことで、それらを明らかにしようとする先駆的なものであった。また、超高齢社会のインプラント治療では、骨粗しょう症に代表される骨質の良くない患者も対象になることが考えられる。今回の研究で、骨質向上で重要であるコラーゲンとアパタイトの結合および配列が網羅的に明らかになれば、骨質改善を視野に入れたインプラント体開発も可能になる。

研究成果の概要(英文)：The calcified tissue on the EDSurface showed extremely higher mechanical properties than that on the machined surface, sandblasting, and etching, and a little higher than that on the anodic oxidation. Higher mechanical properties of the calcified tissue on the the EDSurface and the anodic oxidation were achieved by the strong crosslink of collagen matrix as a result of reaction of radicals. The EDSurface can increase bone quality of calcified tissues.

In addition, artificial hydroxyapatite crystal was composed by the water heat composition, and to prescribe the crystal sequence at the titanium surface was able to establish it. The crystallization of the single-crystal relatively big size were available for an experiment.

研究分野：歯科理工学、生体材料学

キーワード：チタン オッセオインテグレーション ナノインデンテーション 水熱合成 人工アパタイト結晶

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨質を明らかにする必要がある。

チタンインプラントの成功は、オッセオインテグレーション(直接的骨結合)の獲得であり、早期獲得に向けて現在までに様々な挑戦がされてきた。今までの報告で、機械加工表面よりラフサーフェス、そして、超親水性に代表される表面エネルギーの高い表面が、早期にオッセオインテグレーションを獲得することが明らかにされている。しかしながら、インプラント治療の成功に必要なのは骨量だけでなく、機能下の負荷に耐えうる「骨質」である。

(2) チタン最表層の生体反応は明らかにされていない。

チタン最表層での生体反応は、器質小胞性石灰化モデルで考えることができる。石灰化は、器質小胞中のリン酸カルシウム結晶生成と、コラーゲン分泌および成熟の2系統から始まる(図1)。最終的に石灰化組織は、コラーゲンとアパタイト結晶のナノコンポジット組織となり、この生成反応はチタン最表層で生じる。しかし、「分析が難しかった」という理由でチタン最表層超微小領域の生体反応は未だ解明されていないので、骨質の着目に至らなかった。

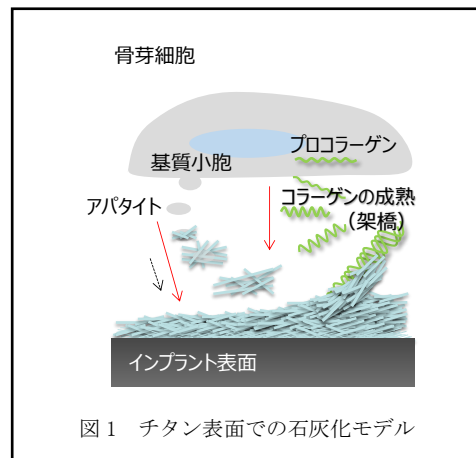


図1 チタン表面での石灰化モデル

(3) ナノ領域の分析の必要性

今までの多くの研究では、細胞数の増減、細胞内繊維の蛍光染色の密度、そして RT-PCR や Real time-PCR で細胞内遺伝子発現の高低によって、あたかもチタン表面での生体反応をとらえているように説明してきた歴史がある。また、最終的に生体硬組織との差異を考察することは難しかった。申請者らは、顕微ラマン分光分析とナノインデンテーション法を駆使することで、「骨質」の評価に取り組んできた。陽極酸化チタン表面と機械加工表面で、分化誘導培地を用いて細胞培養して石灰化物を析出させた。ナノインデンテーションのパーシャルローディング法を用いて試験したところ、機械加工表面では劣っている骨質が、陽極酸化表面では優位に良好であり生体の骨組織とも同等の骨質であることを示した。また、顕微ラマン分光分析でラマンシフトを得たところ、リン酸基やアミド基のスペクトルから、陽極酸化表面ではコラーゲン架橋がより強固であることを明らかにした。さらに、チタン最表層の XPS 分析から、酸化チタン表面からのラジカルの特異性が生体内と同様の LOX による架橋を促進していると考察している。

(4) チタン最表層超微小領域でのアパタイト結晶の異方性決定メカニズムは解明されていない。

生体内骨組織では、コラーゲンに結合するアパタイト結晶の異方性が骨質に強く影響することが報告されている。コラーゲンに対するアパタイト結晶のc軸方向が一致すると、力学的に大きな強度な負荷がかかる部位を担うことができ、さらにそれらがリモデリング後の配列を支配しているというものである。しかし、歯周囲の顎骨のアパタイト結晶の異方性について言及しているが、歯根膜組織のない口腔インプラント周囲に関する報告は今までない。先に述べた通り申請者らは、顕微ラマン分光分析とナノインデンテーションにより、コラーゲンの架橋反応が骨質に影響し、それが生体骨組織と同様の物性を示すことを報告した。これに加え、チタン最表層でのコラーゲンとアパタイト結晶の異方性を決定できれば、骨のリモデリングの過程において、より骨質を高めることができる。このことは、インプラント治療の維持に重要であり、骨質改善を視野に入れたインプラント治療も可能になる。

(5) 各種表面処理によるチタン最表層のひずみおよび応力による生体反応は解明されていない。

金薄膜上で、蛍光タンパク質と融合させたアクチンを発現した細胞の蛍光が、結晶ひずみの違いにより4倍の差があったことが報告されている。このことは、生体反応がひずみおよび応力により影響を受けることを示唆している。現在、骨伝導性向上の為にに行われている各種表面処理は、結果としてラフサーフェスおよび超親水性を示すが、チタン最表層の生体に対する評価としては情報が乏しく、ナノレベルでの結晶構造解明が重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、チタンインプラント最表層での生体反応を明らかにし、超高齢社会に適した骨質改善を視野に入れたインプラント治療を可能にすることである。

インプラント治療の成功は、オッセオインテグレーションの獲得と維持であり、チタン最表層での生体反応向上による早期の石灰化をめざし様々な表面処理技術が応用されている。石灰化組織はコラーゲンとアパタイト結晶のナノコンポジット組織であり、器質小胞性石灰化モデルで示される。しかし、チタン最表層での石灰化メカニズムはすべて明らかにされていない。超微小領域の分析が可能であるナノインデンテーション、顕微ラマン分光分析、および顕微エックス線回折などの最先端分析法を用いることで、チタン最表層超微小領域の石灰化メカニズ

ムの解明に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) チタン最表層超微小領域での石灰化組織結晶の異方性決定メカニズムの解明 (*in vitro*)

各種表面処理を行った JIS 2 種チタン板を実験に供す。ワイヤ放電加工表面を施した EDSurface とコントロールとして機械加工表面を用いる。分化誘導培地を用い間葉系骨髄細胞の培養をし、4 週間にわたり培地交換をする。アリザリンレッド染色により石灰化組織が確認されたら細胞動態試験および分析に用いる。遺伝子を抽出し、Real time-PCR 法により骨関連遺伝子を抽出し、遺伝子解析を行う。また、通法に従い、試料をレジン樹脂に包埋し、試料を切断し研磨したものを分析に用いる。顕微エックス線回折により、チタン最表層石灰化組織のハイドロキシアパタイト結晶の異方性を求める。また、顕微ラマン分光分析およびナノインデンテーションを用い、骨質の評価を総合的に行う。さらに、ラジカルの供与によるアパタイト結晶の異方性に与える影響と、LOX などによるコラーゲン架橋を促進する酵素を人為的に付与することで、チタン最表層微小領域で基質小胞性石灰化のメカニズムが明らかになる。

(2) オッセオインテグレーション獲得期および機能下の結晶の異方性変化メカニズムの解明 (*in vivo*)

昭和大学動物実験実施規定に従い動物実験実施のための承認番号を取得し、当大学の動物実験施設で実験を行う。Wister 系ラットを適当数用意し、麻酔下で、ワイヤ放電加工で作製した動物用ミニインプラント体を埋入し、1 週間 (初期)、2 週間 (オッセオインテグレーション獲得期)、8 週間、12 週間 (リモデリング期) 後に、マイクロ CT 撮影を行い画像処理ソフトで三次元画像を得る。マイクロ CT 装置を使うことで無理に動物を賭殺することなく、経時的な観察が可能である、得られた像から骨形成の 3 次元的な解析を行い、骨形成量を評価する。また、骨質評価については取り出した組織を (1) と同様に試料作製し、チタン最表層微小領域をナノインデンテーション、顕微ラマン分光分析、および顕微エックス線回折を行い、力学的特性、コラーゲン架橋およびアパタイト結晶の異方性を求め、*in vitro* で得られた結果との整合性を解析する。経時的に結晶の異方性決定を明らかにすることで、リモデリング期におけるチタン最表層石灰化メカニズムも明らかにできる。

(3) チタン最表層のナノレベル結晶構造が生体反応に与える影響とそのメカニズムの解明

各種表面処理されたチタン板表面を用意する。(1) 同様に X 線回折結果が X 線回折用標準試料 (SRM640e、シリカ) を用い検出結晶の結晶子サイズの決定、結晶方位評価 (配向性評価)、その結果から表面加工による最表層の応力の算出が可能である。この結果と (1) および (2) を合わせることで、インプラント治療で最も大事である維持に必要な骨質改善に適した表面処理方法の提案をする。

(1)~(3) を総合的に考察することで結晶の異方性決定に着目したチタン最表層の石灰化メカニズムのナノレベルでの解明ができる。特に、申請者らは器質小胞性石灰化モデルでのコラーゲン架橋と骨質にをすでに明らかにしたが、それに続くアパタイト結晶の異方性決定メカニズムが明らかになる。

4. 研究成果

(1) ワイヤ放電加工表面において陽極酸化チタン表面と同様の石灰化メカニズムが示唆された。

極酸化チタン表面と機械加工表面で、分化誘導培地を用いて細胞培養して石灰化物を析出させた。ナノインデンテーションのパーシャルローディング法を用いて試験したところ、機械加工表面では劣っている骨質が、陽極酸化表面では優位に良好であり生体の骨組織とも同等の骨質であることを示した。また、顕微ラマン分光分析でラマンシフトを得たところ、リン酸基やアミド基のスペクトルから、陽極酸化表面ではコラーゲン架橋がより強固であることを明らかにした。さらに、チタン最表層の XPS 分析から、酸化チタン表面からのラジカルの供与が生体内と同様の LOX による架橋を促進していると考察している (Wurhan, Shibata Y. et al T. European Cells and Materials 29: 290-302, 2015)。ワイヤ放電加工表面においても同様のメカニズムによる石灰化メカニズムが示唆された (図 2)。

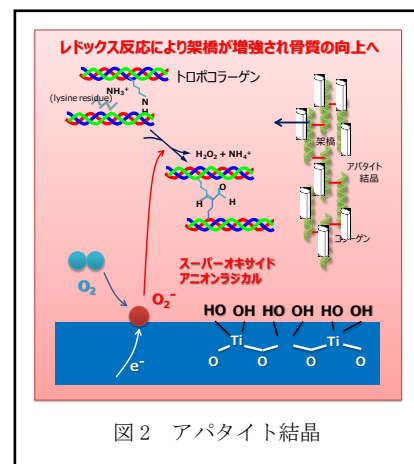


図 2 アパタイト結晶

(2) チタン表面の結晶配列決定に必要なアパタイト合成に成功した。

巨大単結晶を用いることで硬組織で起こる現象を限定的ではあるが可視化および単純化することが可能であった。Jongebloedらはリン酸カルシウム的一种であるモネタイトを3ヶ月かけて合成し、それを300℃で3ヶ月の水熱反応をすることで25本の結晶を得ている。モネタイトが全重量の1%を超えると反応が起こらず、300℃という温度はテフロン容器の耐熱性を超えるため、貴金属で容器を作成して合成を行った。彼らの方法は手間とコストが得られる結晶の量に比べて過大であり、継続的な実験は行われていない。我々はリン酸を重合させたポリリン酸と酸化カルシウムの大結晶のキレート物を合成起点とすることで、量産されているテフロンのチャンバーの中でモネタイト生成を順次起こし、反応熱で300℃を超えることにより3日で大量の結晶を得られるため、豊富に結晶を得られる(図3)。

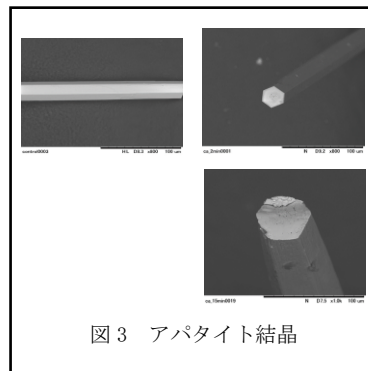


図3 アパタイト結晶

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 吉川 和子, 片岡 有, 小林 幹宏, 山口 麻衣, 小川 弘美, 宮崎 隆, 真鍋 厚史	4. 巻 61
2. 論文標題 波長掃引光干渉断層装置 (SS-OCT) による歯科材料の光屈折率の測定	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 368-377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11471/shikahozon.61.368	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 成澤英明、片岡 有、柴田 陽
2. 発表標題 酸化カルシウムとポリリン酸からのアパタイト水熱合成 第十二報 フッ素の影響
3. 学会等名 第74回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成澤英明、片岡 有、宮崎 隆
2. 発表標題 酸化カルシウムとポリリン酸からのアパタイト水熱合成 第十一報 不純物の分析
3. 学会等名 第73回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yu kataoka, Takashi Miyazaki
2. 発表標題 Bone substance on titanium by wire-type electric discharge machining
3. 学会等名 EAO 27th Annual Scientific Meeting in Vienna (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成澤英明、大和田弘幸、片岡 有、宮崎 隆
2. 発表標題 酸化カルシウムとポリリン酸からのアパタイト水熱合成 第九報 放射光 X 線回析
3. 学会等名 第 71 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片岡 有、池田祐子、田仲持郎、原 哲也、堀田康弘、宮崎 隆
2. 発表標題 粉液混和型高性能 PMMA/MMA 系レジンの開発(その2) MMAに添加した架橋モノマーが重合反応性に及ぼす影響
3. 学会等名 第 71 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成澤英明、片岡 有、宮崎 隆
2. 発表標題 酸化カルシウムとポリリン酸からのアパタイト水熱合成 - 第十報 - 純 HAP 合成と応用例
3. 学会等名 第 72 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池田祐子、片岡 有、田仲持郎、原 哲也、堀田康弘、宮崎 隆
2. 発表標題 粉液混和型高性能 PMMA/MMA 系レジンの開発(その3) MMAに添加した架橋モノマーが硬度に及ぼす影響
3. 学会等名 第 72 回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yu Kataoka, Yo Shibata, Takashi Miyazaki
2. 発表標題 Quality of newly formed bone on titanium implants processed by wire-type electric discharge machining
3. 学会等名 EAO-SEPES Joint Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 片岡 有、柴田 陽、宮崎 隆
2. 発表標題 ワイヤ放電加工表面に形成された骨様組織の骨質分析
3. 学会等名 公益社団法人 日本口腔インプラント学会 第36回関東・甲信越支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yu Kataoka, Takuma Tobe, Yuichi Takiguchi, Yo Shibata, Takashi Miyazaki
2. 発表標題 Quality of Newly Formed Bone by Contact Osteogenesis on the Wire-type Electric Discharged Machined Titanium Surfaces
3. 学会等名 25TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR OSSEOINTEGRATION
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	柴田 陽 (Shibata Yo) (30327936)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮崎 隆 (Miyazaki Takashi) (40175617)	昭和大学・歯学部・特任教授 (32622)	