

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20524

研究課題名(和文) 親水性を付与した硬組織早期誘導ジルコニアインプラント材料の創製

研究課題名(英文) Creation of hydrophilic-imparted hard tissue early induction zirconia implant material

研究代表者

小正 聡 (KOMASA, Satoshi)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70632066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：強い曲げ強さと強固な破壊靱性を有するナノジルコニアに濃アルカリ処理を施すことによって、全ての計測時間でウシ血清アルブミンの吸着、骨髄細胞の初期接着、各種分化誘導マーカーおよび遺伝子マーカーの発現が対照群と比較して実験群で高い値を示した。以上の結果により、ナノジルコニア板へ濃アルカリ処理を施すことが、材料表面を機械的および化学的な相互依存的变化させることにより、ラット骨髄細胞の初期接着および分化誘導の向上に有用であることの一部が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, zirconia has been a recognized implant material in clinical dentistry. In the present study, I investigated the performance of an alkali-modified ceria-stabilized tetragonal ZrO₂ polycrystalline ceramic-based nanostructured zirconia/alumina composite (NANOZR) implant by assessing surface morphology and composition, wettability, bovine serum albumin adsorption rate, rat bone marrow (RBM) cell attachment, and capacity for inducing bone differentiation. NANOZR surfaces without and with alkali treatment served as the control and test groups, respectively. The alkali-treated NANOZR surface increased ALP activity, OCN production, calcium deposition, and osteogenesis-related gene expression in attached RBM cells. These data suggest that alkali treatment enhances the osteogenesis-inducing capacity of NANOZR implants and may therefore improve their biointegration into alveolar bone.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノジルコニア

1. 研究開始当初の背景

近年、ジルコニアをはじめとしたオールセラミック修復が CAD/CAM 技術の進歩とともにその優れた審美性、生体親和性から広く用いられてきている。その適用は、単独歯修復だけでなく、複雑な補綴物およびインプラント治療へと応用されている。優れた審美性および生体親和性をもったジルコニアに適用を加えれば、インプラント治療への適用もさらに進歩すると考えられる。しかし、ジルコニアはその表面性状および機械的性質からインプラントフィクスチャーとしては不安が残る。

申請者の所属する講座では、純チタン金属を 10M の水酸化ナトリウム水溶液に室温で 24 時間浸漬することで純チタン金属表面にナノ構造が析出することを明らかにし、*in vitro* レベルで本構造が SD 系ラットの骨髄間葉系細胞の硬組織誘導能を向上させる可能性を示唆した。また、同構造はラットの下大動脈より抽出した血管内皮細胞の初期接着および遺伝子発現、および管腔形成能を向上させ、インプラント埋入周囲組織の微小血管構築にも有用であることを報告した。本構造はインプラントの初期固定時に優れた構造であることが推察される。

近年開発されたナノジルコニアはイットリア系ジルコニアの欠点を克服するため、水熱特性に優れたセリアを安定剤として用いアルミナ粒子の複合体の材料研究が進められ双方向ナノ複合体が構築されたナノ複合セラミックスが開発された。ジルコニア粒の中にはナノサイズの酸化アルミナ粒子が、さらに酸化アルミナ粒子の中にはナノサイズのジルコニア粒子が取り込まれ複合化している。通常の粒界では不純物が混入されやすく、強度を低下させる原因となってしまうが、ナノジルコニアでは不純物が無く粒界がきわめて強くなる。これにより強い曲げ強さと強固な破壊靱性値を有している。また、このナノジルコニアは厚みを薄くすることで弾性を持つことが知られており、本講座ではこの材料をクラスプに応用する研究を開始している。

また、この強い曲げ強さと弾性はインプラント材料の具備すべき材料条件としても一致しており、インプラント材料として期待されるが、確実な初期固定を得るためには表面構造制御が必須である。

2. 研究の目的

本研究の目的は金属アレルギー等に悩む歯牙欠損患者に対し、治療の選択肢の幅を広げることを期待し、歯科用ナノジルコニア材料表面へのナノレベルでの表面構造制御により親水性を付与した新規インプラント材料の創製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料作製

実験材料として濃アルカリ処理を施したパナソニックヘルスケアより購入したナノジルコニア板 (直径 15mm, 厚さ 10mm) を使用し、対照群として機械処理を施した同材料を使用した。濃アルカリ処理には、各試料を 10M 水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で室温および大気圧条件下で 24 時間反応させた。反応後、試料を取り出し、イオン交換水にて導電率が $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下になるまで洗浄を行った。その後、自然乾燥させた。試料は実験群、対照群ともに、アセトン、エチルアルコールおよびイオン交換水で各々 10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。

(2) 表面解析

試料の微細構造の観察には、実験群および対照群の純チタン金属表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000, 島津)、走査型プローブ顕微鏡 (SPM, SPM-9600, 島津) を使用して X, Y および Z 方向に $2 \mu\text{m}$ の範囲をスキャンした。試料表面における元素分析を X 線電子分光分析装置 (XPS, PHI x-tool, アルバックファイ) にて行い、結晶構造を XRD にて解析した。また、各種センサ表面における蒸留水の接触角を VSA 2500 XE にて測定した。

(3) タンパク質吸着試験

実験群および対照群のチタン合金金属板上におけるタンパク質の吸着量をウシ血清アルブミン (Sigma, St. Louis, MO, USA) を使用して行った。1mg/ml に希釈した各タンパク質をプレートに 1 穴あたり 300 μl ずつ実験群および対照群の純チタン金属板上に塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ の 5% 炭酸ガス恒温器中で 1, 3, 8 および 24 時間培養し、上清を捨て、各群の純チタン金属表面における両タンパク質の吸着量を BCA Protein assay kit (Pierce, Lockfold, IL) にて測定した。

(4) 細胞培養

生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。プレートに 1 穴あたり 4 万個の細胞を播種後、培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 を含む加湿条件下で培養した。細胞はコンフレントに達するまで、各試料上で培養した。培地に 10% FBS および骨分化誘導剤 (10 mM β -グリセロリン酸ナトリウム (和光純薬, 東京, 日本), 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸 (ナカライテスク, 京都, 日本), 10^{-8} M デキサメタゾン含有) の分化誘導培地を用い分化誘導を開始した。

(5) 接着試験および増殖試験

実験群および対照群のナノジルコニア板を 24well プレート (Falcon, Becton Dickson

Labware, NJ, USA)に配置し、ラット骨髄細胞を 4×10^4 個/ml ずつ播種し、1, 3, 8, 24 および 72 時間それぞれ培養し、各培養後の細胞増殖について CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)を用いて測定した。

(6) ALP 活性

培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.2% トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には、Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit® (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を、the Pico green Double standard DNA Assay Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) を用いメーカー指示に従い行った。DNA の定量後、DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した。

(7) カルシウム析出量

培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10% ギ酸にて抽出した。カルシウム析出量は、Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本) を用いて定量した。

(8) OCN 産生量

本研究で用いた ELISA Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) は、細胞培養上清中で直接 OCN 産生量を測定するラット OCN に特異的な検査薬である。培養の 21 および 28 日後に、細胞培養上清中の OCN 産生量は、メーカー指示に従って測定した。

(9) 骨形成に関する遺伝子の発現

実験群および対照群のナノジルコニア表面上の培養 3 日後の培養細胞より逆転写後、mRNA を抽出し、アプライドバイオシステム社製 StepOne Plus™ Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における骨形成に関する遺伝子のマーカーについて比較検討した。

(10) 統計解析

各試験の評価はそれぞれ 3 回行い、各実験の得られたデータの統計処理は SPSS 14.0 J for Windows を用いて行った。実験群および対照群の有意差検定は Student の t 検定を用いて行い、5%以下を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 表面解析

SEM の観察では、ナノジルコニア板には変化はなかったものの (図 1) SPM の解析では実験群で Ra の上昇を認めた。(図 2) XPS の観察では実験群で C のピークの減少および水酸化物の形成を認めた。(図 3, 4) 実験群で親水性を示すことが明らかとなった。

(図 5)

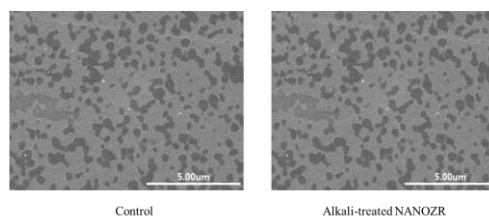


図 1 SEM 像

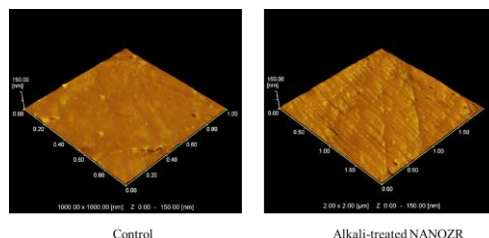


図 2 SPM 像

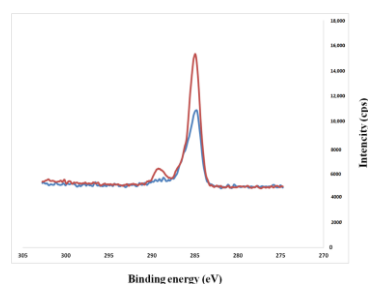


図 3 XPS-C ナROWSキャン

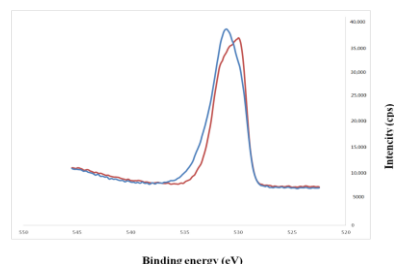


図 4 XPS-O ナROWSキャン

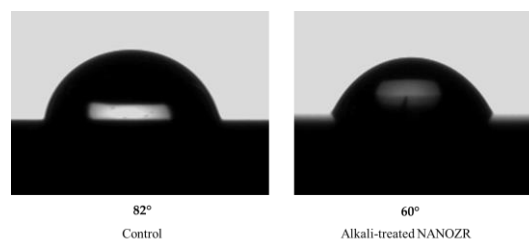


図 5 接触角

(2) タンパク質吸着量

すべての計測時間で、ウシ血清アルブミンの付着量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(3) 細胞接着および増殖

すべての計測時間で、細胞接着および増殖量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(4) ALP 活性

すべての計測時間で、ALP 活性は実験群で対

照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(5) カルシウム析出量

すべての計測時間で、カルシウム析出量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(6) OCN 産生量

すべての計測時間で、OCN 産生量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

(7) 骨形成に関与する遺伝子マーカーの発現

すべての計測時間で、Runx2mRNA の発現量は実験群で対照群と比較して統計学的に有意に高い値を示した。

以上の結果から、ナノジルコニア材料へ濃アルカリ処理をすることでラット骨髄細胞の硬組織分化誘導能の向上に寄与することが明らかとなった。

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 8 件)

1. Chen L, Shen R, Komasa S, Xue Y, Jin B, Hou Y, Okazaki J, Gao J. Drug-Loadable Calcium Alginate Hydrogel System for Use in Oral Bone Tissue Repair. *International Journal of Molecular Science* 査読有 <http://doi.org/10.3390/ijms18050989>, 18(5), 2017.

2. Nishizaki M, Komasa S, Taguchi Y, Nishizaki H, Okazaki J. Bioactivity of NANOZR Induced by Alkali Treatment. *International Journal of Molecular Science* 査読有 <http://doi.org/10.3390/ijms18040780>, 18(4), 2017.

3. Zhang H, Komasa S, Mashimo C, Sekino T, Okazaki J. Effect of ultraviolet treatment on bacterial attachment and osteogenic activity to alkali-treated titanium with nanonetwork structures. *International Journal of Nanomedicine* 査読有 12:4633-4646,2017.

4. Komasa S, Nishizaki M, Kusumoto T, Terada C, Yin D, Kawamoto A, Yamamoto S, Yoshimine S, Nishizaki H, Shimizu H, Okazaki J, Kawazoe T. Osteogenesis-Related Gene Expression on Alkali-Modified NANOZR and Titanium Surfaces with nanonetwork Structures. *バイオインテグレーション学会雑誌* 査読有 7:87-94,2017.

5. Kusumoto T, Yin D, Zhang H, Chen L, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J, Komasa S. Evaluation of the Osteointegration of a Novel Alkali-Treated Implant System In Vivo. *Journal*

of Hard Tissue Biology 査読有 26(4):355-360, 2017.

6. Fujio M, Komasa S, Nishizaki H, Sekino T, Okazaki J. Biocompatibility of titanium surface nanostructures following chemical processing and heat treatment. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology* 査読有 3(1):1-10, 2017.

7. Su Y, Komasa S, Li PQ, Nishizaki M, Chen L, Terada C, Yoshimine S, Nishizaki H, Okazaki J. Synergistic effect of nanotopography and bioactive ions on peri-implant bone response. *International Journal of Nanomedicine* 査読有 12:925-934, 2017.

8. Komasa S, Miyake A, Fujio M, Nishizaki M, Taguchi Y, Kusumoto T, Okajima Y, Yoshioka K, Yoshimine S, Yamamoto S, Onchi Y, Kon-I H, Nishizaki H, Okazaki J. Influence of titanium surface topography on in vitro differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts. *バイオインテグレーション学会雑誌* 査読有 6:17-26, 2016.

[学会発表] (計 14 件)

1. Chen L, 小正 聡, Zhang H, 寺田知里, Yin D, 波床真依, 吉峰茂樹, 西崎 宏, 岡崎定司.

ナノ構造析出純チタン金属表面へのラクトフェリンのコーティングが歯周組織再生に与える影響について

平成 29 年度日本補綴歯科学会関西支部総会ならびに学術大会

2018 年 1 月 21 日

京都市歯科医師会館 (京都府京都市)

2. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, 西崎 真理子, Chen L, Yin D, 波床 真依, 藤原到, 吉峰茂樹, 西崎 宏, 小正 裕, 岡崎定司.

アメリロジェニンコーティングナノ構造析出純チタン金属がインプラント埋入周囲組織に与える影響について

平成 29 年度日本補綴歯科学会関西支部総会ならびに学術大会

2018 年 1 月 21 日

京都市歯科医師会館 (京都府京都市)

3. 小正 聡.

自己再生足場材料としてのチタニアナノシート構造の応用

第 15 回日本再生歯科医学会大会

2017 年 10 月 21 日

大阪歯科大学 100 周年記念館 (大阪府大阪市)

4. 西崎真理子, 小正 聡, 田口洋一郎, 西崎宏, 岡崎定司.

アルカリ処理したナノジルコニアの生体活性

第 47 回日本口腔インプラント学会学術大会

2017 年 9 月 24 日

仙台国際センター (宮城県仙台市)

5. 小正 聡, 楠本哲次, Zhang H, Chen L, 小正 裕, 西崎 宏, 岡崎定司.

歯根膜細胞がタンパク質をコーティングしたナノ構造析出純チタン金属のインプラン

ト材料へ与える影響について
第 47 回日本口腔インプラント学会学術大会
2017 年 9 月 24 日
仙台国際センター（宮城県仙台市）
6. 藤尾美穂, 小正 聡, 西崎 宏, 関野 徹,
岡崎定司.
化学合成法と加熱処理を施したナノ構造析
出純チタン金属表面の生体適合性
日本補綴歯科学会第 126 回学術大会
2017 年 7 月 1 日
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
7. 寺田知里, 小正 聡, 楠本哲次, 西崎真理
子, Su Y, Zhang H, Chen L, 西崎 宏, 岡崎定
司
ナノ構造析出純チタンへのタンパク質のコ
ーティングが硬組織分化誘導能に与える影
響
日本補綴歯科学会第 126 回学術大会
2017 年 7 月 1 日
パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
8. Zhang H, Komasa S, Su YM, Mashimo C,
Kusumoto T, Wang PL, Wanghong Zhao,
Nishizaki H, Okazaki J
Antibacterial effect of silver nanoparticles coated
titanium nanosheet
The 95th General Session and Exhibition of the
IADR
2017 年 3 月 24 日
Moscon West, San Francisco, USA
9. 西崎真理子, 小正 聡, 藤尾美穂, 寺田知
里, 楠本哲次, 西崎 宏, 田中昌博, 岡崎定司.
表面制御新規インプラント材料表面におけ
る生体適合性について
第 30 回日本口腔リハビリテーション学会学
術大会
2016 年 11 月 20 日
京都府国際交流会館（京都府京都市）
10. Zhang H, 小正 聡, 真下千穂, Chen L, 西
崎 宏, 王 宝禮, 岡崎定司.
ナノ構造析出純チタン金属表面に対する細
菌付着の検討
第 23 回日本歯科医学会総会
2016 年 10 月 21 日
福岡市国際会議場（福岡県福岡市）
11. 西崎真理子, 小正 聡, 藤尾美穂, 寺田
知里, 西崎 宏, 岡崎定司.
親水性付与ナノジルコニア新規インプラ
ント材料の創製
第 23 回日本歯科医学会総会
2016 年 10 月 21 日
福岡市国際会議場（福岡県福岡市）
12. 小正 聡, 田口洋一郎, 楠本哲次, 岡島
裕梨, 吉岡紀代子, 篠原憲吾, 武田智香子,
西崎 宏, 岡崎定司.
糖尿病状態が TNS 析出純チタン金属表面に
及ぼす影響について
第 23 回日本歯科医学会総会
2016 年 10 月 21 日
福岡市国際会議場（福岡県福岡市）
13. 小正 聡, 西崎真理子, 田口洋一郎, 楠

本哲次, 佐藤 航, 寺田知里, 西崎 宏, 岡
崎定司.

濃アルカリ処理を行った新規インプラント
材料の生体適合性
第 46 回日本口腔インプラント学会学術大会
2016 年 9 月 17 日
名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

14. 藤尾美穂, 小正 聡, Su Y, 西崎真理子,
楠本哲次, 関野 徹, 西崎 宏, 岡崎定司.
加熱処理ナノ構造析出純チタン金属が骨髄
細胞の初期接着能に与える影響について
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（石川県金沢市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小正 聡 (KOMASA, Satoshi)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号： 70632066