

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592145

研究課題名（和文） 生体用新チタン合金の開発

研究課題名（英文） Development of biological new titanium alloy

研究代表者

小林 喜平（KOBAYASHI KIHEI）

日本大学・松戸歯学部・研究所教授

研究者番号：9005004

研究成果の概要：本研究は生体内環境を重視し、Al や V 以外の細胞毒性が指摘されていない元素（Zr, Nb, Ta）をチタンに添加し、長期予後を考慮したより高い生物学的安全性および機械的性質を有する Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金（以下；Ti-15-4-4）について、生体用インプラント材料としての適応を目指すべく研究・開発を行う。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：インプラント、チタン合金、動物実験

1. 研究開始当初の背景

われわれのグループでは、細胞毒性が指摘されていない合金元素（Zr, ニオブ（以後，Nb），Ta）をチタンに添加し、生物学的安全性および耐食性が高く、しかも高強度、高延性を有する Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金の開発をおこなっている。この合金は、金属単体では細胞毒性が報告されていない Zr, Nb, Ta など生体適合性に優れた合金元素を選定し合金設計がなされている。強度増加に対する添加効率の良い Zr を第一添加元素とし、耐食性を向上させるため Nb, Ta を添加し、さらに二相組織とし熱間加工性を良好にするため安定化元素である Nb, Ta が添加されて

いる。溶解性の観点から高融点金属である Nb, Ta は低めにし、Zr：20%以下、Nb：8%以下、Ta：4%以下としている。Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金の焼鈍材の室温強度は、Ti-6Al-4V 合金の ISO（国際標準化機構）の規格値に比較し、わずかに高い強度を有し、Ti-6Al-7Nb の力学特性同等となっている。耐食性に関しては、JIS T0302 に規格化されているアノード分極試験法に準じて電気化学的に評価したところ、生体内および口腔内模擬環境下において不動態皮膜の破壊による電流密度の急増はみられず、優れた耐食性を有することが報告されている。また、Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金は、合金プレート、合金の摩擦摩耗液および合金

摩耗粉を用いた細胞適合性評価試験において、いずれも溶出する金属の量が少なく、細胞適合性に優れていることが示されている。

2. 研究の目的

歯科インプラントは、顎骨内へフィクスチャーの埋入手術を行い、皮質骨を1次固定源として約3~6ヶ月の安静期間に、フィクスチャー周囲へ新生骨の形成を待ち、補綴処置を行う治療法である。インプラントは、材料(純チタンおよびチタン合金)と生体の骨における骨接合(osseointegration)が起こり、骨のモデリングおよびリモデリングの過程から、インプラント周囲に形成された新生骨の成熟によりインプラントを長期安定に導くことが重要である。天然歯列を有する成人の最大咬合力は400 Nまたは430 Nと報告され、通常の補綴物と同様にインプラントにも同等の力が負担されると考えられる。したがって、そのような過酷な条件下でインプラントを長期間、維持・安定させるには、インプラント周囲に形成された新生骨の存在は大変重要である。

インプラント周囲に形成された新生骨は、多くの研究報告において、「海綿骨」と報告されている。しかし、形状は海綿骨様であっても新生骨の骨質は皮質骨様に成熟しているか、本当に海綿骨、類骨、または軟骨程度で未熟なのか、判別が困難なために骨質評価の必要性が問われている。

インプラント周囲の骨質評価に関する研究において、Nakanoや石本らは新生骨の骨密度や生体アパタイトの配向性について報告し、またGuptaらは生体アパタイト結晶における微小サイズでの石灰化器質について報告している。また骨質評価に関連する我々の研究グループでは、インプラント周囲に形成された新生骨と皮質骨の骨質評価として偏光顕微鏡および走査電子顕微鏡を利用した骨組織の観察、顕微 Fourier transform Raman (FT-Raman)分析で新生骨におけるリン酸のピークの分、Position Sensitive Proportional Counter -Micro- X-ray Diffractometer (PSPC-Micro-XRD)でアパタイトのピークの分析、顕微 Fourier Transform infrared Spectrometer (FTIR)分析で生体アパタイト結晶の分析、Micro-computed tomography (Micro-CT)で新生骨の骨梁形成の観察および骨塩量の測定、さらにパラメトリック X線による新生骨の観察などの研究から、新生骨と皮質骨での骨質評価を行い、両者には異なる骨質であることを示唆してきた。特に新生骨に関連する基礎的研究は極めて少なく、骨の基本構造である生体アパタイトの分子や元素の状態においては今日まで

見過ごされているのが現状である。

そこで本研究の目的は、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金インプラント周囲に形成された新生骨と皮質骨を X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)を用いて骨質評価を行い、元素の定量および化学結合の状態から、新たに開発した Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金は生体用チタン合金として生体応用可能な材料であることを *in vivo*で明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

本研究における動物実験プロトコールは、日本大学松戸歯学部動物実験倫理委員会の承認を受けたものである(承認番号第 ECA-07-0016号)。動物実験は、18週齢の New Zealand White Rabbit (三協ラボ株式会社)を6匹使用した。

(2) 試験材料

本研究で使用したインプラントは、日本工業規格 (Japanese Industrial Standards: JIS)の外科用インプラントに登録された生体用チタン合金である Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta (Ti-15-4-4)を使用し、化学組成を Table 1に示す。Ti-15-4-4インプラントは、直径3.0 mm、高さ7.0 mmに成型し、インプラントはエッチング処理(硫酸およびフッ酸による酸処理)を施したものを実験に用いた。

(3) 埋入方法

兎の脛骨への埋入方法は、ケタール静注用^R(三共株式会社)2.0 mg/kgおよびセラクター^R(バイエルメディカル株式会社)0.1 mg/kgを投与して全身麻酔を行った。手術野は左右下肢の内側皮膚と設定し、同部を剃毛後、アルコールおよびヨードチンキにて消毒して、浸潤麻酔(2% Xylocaine^R: 藤沢薬品工業)を施した。その後、膝関節から末梢側へ約20 mmの脛骨に、メスを用いて切開して骨膜を剥離し、骨面を露出した。埋入窩はインプラント用エンジン(IMPLANTOR-S^R: 京セラ株式会社)で、滅菌生理食塩水の注水下で緻密骨の長軸に対し垂直に直径3.0 mmの形成を行い、インプラントを埋入した。創は通法に従い、サージカルシルク針付き縫合針(734H, 針 J-1 17mm: ETHICON)を用いてマットレスおよび単純縫合を行い、ヨードチンキにて消毒した。インプラント埋入後4週、8週ごとにペントバルビタールナトリウム溶液の耳静脈内過剰投与にて3羽ずつ安楽死させた後、左右側の脛骨を取り出し、生理食塩水で十分洗浄した後でホルマリンによる浸漬固定を行った。

(4) 非脱灰組織標本の製作

非脱灰組織標本の製作は骨組織の固定後、70~100%エタノールおよび100%アセトンにより骨組織の脱水および脱脂を行い、樹脂(オステオレジン包埋キット[®]:和光純薬工業)に包埋した。試料は脛骨の長軸に対し平行で、7.0mmのインプラント試験片の軸に垂直な方向で、ダイヤモンドディスク(Isomet[®]:Buhler)を用いて100 μ mの間隔で10~15枚に薄切し、脛骨の非脱灰組織標本を作製した。

(5) XPS 分析

本実験は、インプラント周囲に形成された新生骨と皮質骨の骨質評価のために、X線光電子分光(XPS Quantera SXM, Physical Electronics)分析法により、元素の定量分析および化学結合の状態を示唆するために測定を行った。測定は、薄切した非脱灰組織標本においてインプラントに近接する新生骨とインプラントには接しない皮質骨の測定を行った。分析条件は、X線源:単色化 AlK (1486.6 eV), 検出領域:20 μ m⁰, 検出深さ:約4~5nm(取出角45°)とした。

骨組織の測定は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の両者が進行(リモデリング)することから、測定結果に差が生じ易いため測定部位を特定するのが極めて困難である。そこで本研究は、インプラントに近接する新生骨や皮質骨の3カ所以上の測定を行い、平均的な値が得られたスポットを「新生骨」並びに「皮質骨」と決定し、測定部位とした。

XPS分析は、新生骨における測定箇所をFig. 1に示し、Wide Scan測定における定性分析および検出された元素のNarrow Scan測定による結合状態の分析を行った。定量分析および結合状態は、ハイドロキシアパタイト(HA)の粉末を標準試料として相対感度係数(RSF)を用いた補正を行い、測定を行った。

4. 研究成果

XPS分析はWide Scan測定において、インプラント周囲に形成された新生骨と皮質骨における定性分析のピークを重ねた4週の結果をFig. 2に、8週の結果をFig. 3に示す。Fig. 2およびFig. 3の結果では、カルシウム(Ca)、酸素(O)、リン(P)、炭素(C)、マグネシウム(Mg)、窒素(N)、およびナトリウム(Na)のピークが検出され、8週と比較して4週のピークに大きなばらつきが見られた。Wide Scan測定からCa₁₀(PO₄)₆OH₂に関連する元素は、Narrow Scan測定を行い、検出された新生骨と皮質骨のC1s, O1s, Ca2p, および

P2pを重ねた4週の結果をFig. 4に、8週の結果をFig. 5に示す。Ca2pスペクトルはスピン・軌道相互作用により、ピークが2つに分裂するため、結合状態の判定は通常強度の高いピーク(Ca2p_{3/2})を利用した。Narrow Scan測定は、NaおよびMgの存在がオージェピーク(Na Auger: 495 eV付近, Mg Auger: 305 eV付近)により判断して定量不可能であった。

Narrow Scan測定からCa₁₀(PO₄)₆OH₂のピークは、O1sで531 eV付近, P2pで133~133.5 eV付近で、Ca_{2p}で346~347 eV付近で見られた。C1sにおけるC-CおよびC-Hのピークは、284.8 eV付近, C-OおよびC-Nのピークは286 eV付近, C=Oのピークは287~288 eV付近, O=C-Oのピークは289 eV付近で見られた。さらにO1sにおけるC=OおよびC-O-Cのピークは532~533 eV付近で見られた。

4週のNarrow Scan測定の結果(Fig. 4)は、O1sでは新生骨と皮質骨のピーク強度はほぼ一致するが、新生骨では半値幅が小さくなった。P2pでは、新生骨と皮質骨でピークのシフトを観察し、半値幅が小さくなった。C1sでは、新生骨と皮質骨でピーク強度はほぼ一致するが、新生骨では半値幅が小さくなり、286.4~288 eV付近で皮質骨よりもピーク強度の低い部分が見られた。Ca2p(Ca2p_{3/2})では、新生骨と皮質骨でピーク強度はほぼ一致するが、新生骨では半値幅が小さくなり、ピークのシフトを観察した。これらの各元素において、新生骨は皮質骨にない結合状態であることが観察された。

8週のNarrow Scan測定の結果(Fig. 5)は、O1sおよびCa2pでは新生骨と皮質骨で半値幅と強度がほぼ一致した。P2pでは、新生骨において半値幅が小さくなり、ピークのシフトを観察した。C1sでは、新生骨と皮質骨で半値幅と強度がほぼ一致する結果となったが、新生骨で286.6~288 eV付近のピークに低い部分が観察された。これらの各元素において、新生骨は皮質骨に近似する結合状態であることが観察された。

各元素の定量およびCa/P比の結果はTable 2に示す。定量分析にはピーク面積とRSFを使用し、検出元素の総和を100 atomic%とした。4週および8週における各元素の定量分析結果は、Ca, P, O, およびNの各元素は経時的に増加する結果となった。骨の主成分であるCaとPの成分は4週でCa: 8.7 atomic%, P: 4.9 atomic%, 8週でCa: 9.3 atomic%, P: 5.1 atomic%となり、皮質骨(Ca: 9.5 atomic%, P: 5.6 atomic%)における同元素の結果と比較すると経時的に近づく値となり、骨の成熟を想定する結果となった。4週および8週におけるCaとPの定量分析の結果に差は見られなかった。

Table 1 Chemical composition (mass %) of the Ti-15-4 alloy used in the study

Element (at%)	Ti	Al	V	Fe	Cu	Zn	Si	C	O	N
Ti-15-4-0	91.24	5.39	1.02	0.22	0.022	0.102	0.049	0.011	0.002	0.01**

** Bal. (Balance) (mass %)

Table 2 Results of the spatial analysis of newly formed bone around implants at 4 and 8 weeks, and cortical bone

Element	C	O	Ca	P	N	Ca/P
Implant						
Newly formed bone, 4 weeks	44.2	53.6	8.7	0.8	8.7	1.78
Newly formed bone, 8 weeks	40.3	56.0	9.3	1.1	9.3	1.01
Cortical bone	38.4	57.1	9.3	1.0	8.4	1.70

(atomic %)

Table 3 Data chemical bonding of each element and peak position (eV)

Peak	Chemical Bonding	Peak Position (eV)	Peak	Chemical Bonding	Peak Position (eV)
O1s	Metal-O	530-531	F1s	Metal-F	684
	Metal-PO ₄ -OH	531-532		Metal-DO ₄	684.5
	Ca-O, Ca-O-C	532-533		P2s	711
Ca2p	Ca-OH	285.8	Ca2p3/2	Ca ₂ (PO ₄) ₂ (OH) ₂	285-285.9
	Ca-O	286		C-S, C-S, S-F	168.1-168
	C-S	287-288		Metal-S	169-168
	Ca-O-C	288		S	161-160
Ti2p	Ca	147	S2s, S2p	S	161-160
	CaO	147-148		S2s, S2p	161-160
Al2p	Ca ₂ (PO ₄) ₂ (OH) ₂	147-148	S2s, S2p	S2s, S2p	161-160

Fig. 1 Measurement areas for EPR analysis (upper) (in a surface spectrum, lower on large images), X-ray measurement around

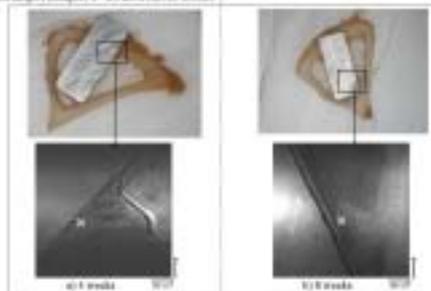


Fig. 2 Wide area peaks of each element at 4 weeks

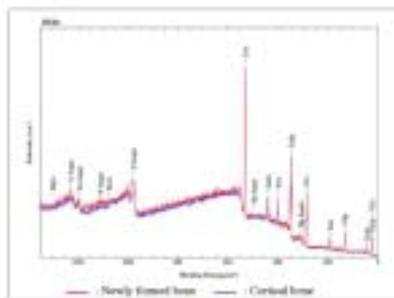


Fig. 3 Wide area peaks of each element at 8 weeks

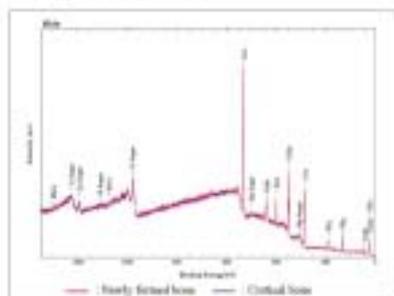


Fig. 4 XPS peaks of each element at 4 weeks

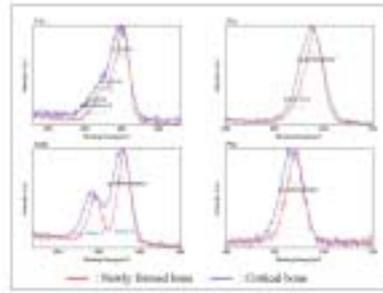
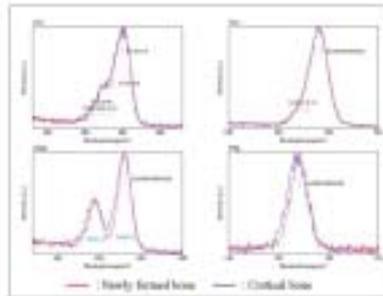


Fig. 5 XPS peaks of each element at 8 weeks



本研究は助成金交付 3 年間で、Ti-15-4-4 インプラント周囲に形成される新生骨を対象に Micro-CT, SEM, BSI, PM, FTIR, XRD および XPS を用いて結晶レベルの生体適合性について分析を行い、「おおむね順調に進展している」と考える。さらに最終年度では、予定していなかった XPS 分析を追加することができたことにより、更なるデータの充実ができ、今日まで明らかにできなかった元素・分子レベルの経時的変化について研究が行えたことは、大きな成果といえるであろう。

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 12 件)

Yasuko Numata, Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Hiromi Kimura-Suda, Racquel Z. LeGeros, Kihei Kobayashi and Masaharu Makimura, Qualitative study of the New Bone formation Surrounding the Ti-implant by FTIR and Polarizing Microscope, J. Hard Tissue Biology, 17,131-140, 2008. 査読有

Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Yoshimitsu Okazaki, Yasuhiro Tanimoto, Hiroyuki Tamaki, Takao Kato, Atsushi Ookubo, Kihei Kobayashi and Racquel Z. LeGeros, Comparison of Bone Mineral Density and Area of Newly formed Bone around

Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta Alloy and Ti-6%Al-4%V Alloy Implants, J. Hard Tissue Biology, 17, 99-108, 2008. 査読有

中田浩史, 沼田靖子, 寒河江登志朗, 諏訪武利, 佐伯啓行, 谷本安浩, 加藤仁夫, 河相安彦, 金澤英作, 小林喜平, Racquel Z. LeGeros, インプラント周囲に形成された新生骨を X-ray Photoelectron Spectroscopy 分析により骨質評価を行った基礎的研究、日大口腔科学、34 巻 2 号, 52-62, 2008. 査読有

沼田靖子, 寒河江登志朗, 中田浩史, 諏訪武利, 小林喜平, 佐藤勇, 硬組織の質的評価に Micro FT-Raman を使用した基礎的研究、Journal of Hard Tissue Biology, 16(4), 209-213, 2007. 査読有

Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Hiroshi Nakada, Taketoshi Suwa, Racquel Z. LeGeros, Yoshimitsu Okazaki and Kihei Kobayashi, Micro-CT Analysis of Rabbit Cancellous Bone Around Implants, J. Hard Tissue Biology, 16,91-93, 2007. 査読有

Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Hiroshi Nakada, Racquel Z. LeGeros and Kihei Kobayashi, Qualitative and quantitative evaluation of bone and synthetic calcium phosphates using Raman Spectroscopy, Key Engineering Materials, 361 - 363, pp.135-138, 2008. 査読有

Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Taketoshi Suwa, Yoshimitsu Okazaki, Racquel Z. LeGeros, Toshiro Sakae, Takao Kato, Katsuhisa Kuwahara, and Kihei Kobayashi, Newly formed bone around implanted new titanium alloy: Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta, Key Engineering Materials, 361 - 363, pp.661-664, 2008. 査読有

沼田靖子, 寒河江登志朗, 中田浩史, 諏訪武利, 小林喜平, 佐藤勇, 硬組織の質的評価に Micro FT-Raman を使用した基礎的研究、Journal of Hard Tissue Biology, 16(4), 209-213, 2007.

査読有

諏訪武利, 寒河江登志朗, 中田浩史, 小林喜平, ウサギ脛骨における炭酸カルシウム結晶の検出 - 微小部 X 線回析法による研究 -、Journal of Hard Tissue Biology, 16(4), 195-198, 2007. 査読有

Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Racquel Z. LeGeros, John P. LeGeros, Taketoshi Suwa, Yasuko Numata, Kihei Kobayashi, Early Tissue Response to Modified Implant Surfaces Using Back Scattered Imaging, Implant Dentistry, 16(3):281-289, 2007. 査読有

Hiroshi Nakada, Taketoshi Suwa, Yasuko Numata, Yoshimitsu Okazaki, Toshiro Sakae, Tohru Hayakawa, Masataka Kato, Takashi Kaneda, Racquel Z. LeGeros, Takao Kato, Atsuko Gunji, Katsuhisa Kuwahara and Kihei Kobayashi, Analysis of bone mineral density and bone area of newly formed bone around implants using micro-CT after pull-out tests, Int J Oral-Med Sci, 5:97-106, 2007. 査読有

諏訪武利, 寒河江登志朗, 中田浩史, 加藤仁夫, 小林喜平, アパタイトプラスト処理インプラント周囲における新生骨の結晶性の評価、日本口腔インプラント学会誌,19 巻 4 号, 453-460, 2006. 査読有

[学会発表](計 8 件)

Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Yoshimitsu Okazaki, Kihei Kobayashi, Usefulness of implant-surrounding newly formed bone quality evaluation method using micro-CT. 平成 20 年 11 月 28 日, 第 1 回再生補綴医学研究会, 名古屋

Yasuko Numata, Hiroshi Nakada, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Yoshimitsu Okazaki, Kihei Kobayashi, John P. LeGeros, and Racquel Z. LeGeros, Observation of the biocompatibility of surface-treated Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta alloy, and measurement of bone mineral density,

平成 20 年 9 月 14 日,
The 4th International Symposium on
Apatite and Correlative Biomaterials,
Manila.

Hiroshi Nakad, Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Hiroyuki Tamaki, Takao Kato, Kiyoshi Arai, Takahide Maeda, Kihei Kobayashi, and Racquel Z. LeGeros, Basic study on micro-CT- measurement of the bone mineral density and serial observation of the maturation degree of newly formed bone around implants, 平成 20 年 9 月 14 日,
The 4th International Symposium on Apatite and Correlative Biomaterials, Manila.

沼田靖子, 中田浩史, 寒河江登志朗, 諏訪武利, 岡崎義光, 小林喜平, John P. LeGeros, and Racquel Z. LeGeros,
表面処理を施した生体用 Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta 合金の生体適合性の観察, 平成 20 年 8 月 30 日,
第 17 回硬組織再生生物学会, 徳島

Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Hiroshi Nakada, Racquel Z. LeGeros and Kihei Kobayashi,
Qualitative and quantitative evaluation of bone and synthetic calcium phosphates using Raman Spectroscopy, 平成 19 年 10 月 24 日,
20th International Symposium of Ceramics in Medicine, France- Nantes.

Hiroshi Nakada, Yasuko Numata, Taketoshi Suwa, Y. Okazaki, Racquel Z. LeGeros, Toshiro Sakae, Takao Kato, Katsuhisa Kuwahara, Kobayashi Kobayashi,
Newly formed bone around implanted new titanium alloy: Ti-15%Zr-4%Nb-4%Ta, 平成 19 年 10 月 24 日,
20th International Symposium of Ceramics in Medicine, France- Nantes.

Yasuko Numata, Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Hiroshi Nakada, Racquel Z. LeGeros, Katsuhisa Kuwahara and Kihei Kobayashi,
Micro-CT Analysis of Rabbit Cancellous Bone around Implants, 平成 18 年 11 月 8 日,

6 th Asian Bioceramics symposium ,
Thailand.

Toshiro Sakae, Taketoshi Suwa, Yasuko Numata, Hiroshi Nakada, I. Sato and Racquel Z. LeGeros,
Quantitative Radiographic Study of New Bone Formed around the Implant Using a Newly Developed Parametric X-Ray Method, 平成 18 年 11 月 8 日,
6 th Asian Bioceramics symposium ,
Thailand.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小林 喜平 (KOBAYASHI KIHEI)
日本大学・松戸歯学部・研究所教授
研究者番号 : 90050046

(2)研究分担者

寒河江 登志朗 (SAKAE TOSHIRO)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号 : 20112948

加藤 仁夫 (KATO TAKAO)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号 : 80147719

桑原 克久 (KUWAHARA KATSUHISA)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号 : 30147714

中田 浩史 (NAKADA HIROSHI)
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号 : 10349970

(3)連携研究者

諏訪 武利 (SUWA TAKETOSHI)
日本大学・松戸歯学部・大学院生

沼田 靖子 (NUMATA YASUKO)
日本大学・松戸歯学部・大学院生

Racquel Z. LeGeros
New York University College of Dentistry,
Department of Biomaterials &
Biomimetics, Professor

John P. LeGeros
New York University College of Dentistry,
Department of Biomaterials &
Biomimetics, Professor