

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25年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390523

研究課題名（和文） 骨形成誘導機能を有するバイオアクティブ型チタン合金の開発

研究課題名（英文） Development of the bioactive titanium alloy equipped with an osteoinductive property

研究代表者

高田 雄京（TAKADA YUKYO）

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10206766

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Mg イオン徐放による骨誘導機能を持つ Ti-Mg 合金の開発を試みた。Mg イオンを徐放できる Ti-Mg 固溶体の作製に至らなかったが、Mg イオンの存在下で DNA 量と細胞増殖はコントロールと同等以上であり、ALP 活性値が有意に増加する結果を得た。血管内皮細胞の増殖と管腔形成では、血管増生が確認されたため、Mg イオンを徐放できる Ti-Mg 固溶体を新規機能材料として開発する必要性が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

In this research program, we tried to develop the titanium alloy equipped with an osteoinductive property derived from sustained delivery of Mg ions. Although the Ti-Mg solid solution with the sustained delivery of Mg ions could not be obtained, under the conditions of Mg ions, the amount of DNAs and cell growth were as same as those of controls, and the ALP activity values significantly increased. Since the vascular proliferation was observed in the vascular endothelial cells and the lumen formation, we concluded that it is preferable to develop the Ti-Mg solid solution as a new functional material.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：チタン合金、Mg 合金、骨誘導、Mg イオン、細胞培養、ALP、Ti-Mg 合金、骨形成

1. 研究開始当初の背景

生体内で吸収される骨固定材料として Mg や Mg 合金が注目されている。骨芽細胞を Mg

や Mg 合金上で培養した例では、Mg イオンは毒性がなく、細胞の吸着、分化、成長を助け

ることが報告¹⁾されている。また、Mg合金を豚の大腿骨に埋入した例では、高濃度のMgイオンが骨芽細胞の活性を促し、無機質の増加速度を速め、骨生成量が増加する報告²⁾や、ラットの臼歯を移植した初期において、その臼歯の象牙質表面にMgの分布が多く現れることなどが報告³⁾されている。しかしながら、Mgの骨誘導を積極的に利用した合金やそれに関する研究は国内外を通して見当たらない。

Ti-Mg系状態図によると、MgはTiに数%固溶するため、Mgイオンを徐放できる固溶体形成の可能性が高い。さらに、Mgはアルカリ土類金属で溶出しやすいため、少量の添加で十分な徐放量を得ることができ、Ti本来の性質も損なうことのない骨誘導型インプラントの材料として有望と考えられるが、このような固溶体合金作製に関する研究は見当たらない。

このようなことから、骨形成においてマグネシウムが必要不可欠であることに着目し、適量のMgイオンを徐放させ、生体組織を積極的に刺激し、骨形成の誘導を促すTi-Mg合金の開発を着想した。

- 1) A. Pietak, P. Mahoney, G. J. Dias, M. P. Stainger: Bone-like matrix formation on magnesium and magnesium alloys, *J Mater Sci: Mater Med* 19, 407-415, 2008.
- 2) F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C. J. Wirth, H. Windhagen: In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response, *Biomater*, 26, 3557-3563, 2005.
- 3) N. Akiba, Y. Sasano, O. Suzuki, K. Sasaki: Characterization of dentin formed in transplanted rat molars by electron probe microanalysis, *Calcif Tissue Int*, 78, 143-151, 2006.

2. 研究の目的

本研究では、骨形成初期に必要な不可欠と考えられるMgイオンをトリガーとして生体組織を積極的に刺激し、骨形成の誘導を促すことができるインプラントに最適なバイオアクティブ型Ti-Mg合金の開発を目的とする。目的遂行に当たっては、Tiの融点よりも沸点が600℃以上低いMgをTiと合金化する方法を検討し、Ti-Mg固溶体合金作製の可能性を明らかにする。同時に、細胞培養実験を行うことで、Mgイオンが骨形成および骨吸収マーカーに及ぼす効果を明らかにし、骨形成に効果的なMgイオン濃度やその安全性を評価する。

3. 研究の方法

(1) Ti-Mg固溶体合金の作製

①Ti-Mgインゴットの熔製

・TiとMgの混合融解

スポンジTi (>99.8mass%)を融解し、インゴットを作製後、圧延切断して短冊状のTi板を作製した。Mgインゴット (>99.9mass%)を粉砕後、Ti-Mg (Mg:0.2, 0.5, 1.0, 2, 2.5, 5mass%)となるように秤量し、アルゴンアーク溶解炉 (TKS-ARC3: H21年度申請)で融解した。

・Ti箔被覆による融解

TiとMgは融点が1000℃以上異なり、Mgの沸点がTiの融点よりも約600℃低いので、Mgの揮散を避けるため、Ti箔で金属Mgを覆い、上記の組成となるように秤量し、アルゴンアーク溶解炉で融解した。

・Ti板とMgのクラッドによる融解

上記の融解法では、Mgが揮散したため、1mm厚の2枚のTi板の間に1mm圧に切断したMg板を挟み、それを圧延した後に同様の方法で融解した。(図1)

②熔製インゴットの評価

各融解法で熔製したインゴットについて、融解前後における質量変化を測定した。また、インゴットの組成をEPMA (JXA-8900) を用いて定量分析し、Ti-Mg 固溶体の形成を調べた。

(2) Mg イオンの生物学的評価

①骨芽細胞に及ぼす Mg イオンの影響

MgCl₂ 粉末を細胞培養液 (MEM および α-MEM) に加え、Mg イオン濃度が 0、10、100、1000ppm になるように調整し、Mg イオン溶液を調整した。この Mg イオン溶液に牛胎児血清と NaHCO₃ を加え、SaOS-2 骨芽細胞を 37℃ の 95% Air-5%CO₂ インキュベーター内で 4~14 日培養し、DNA 量と ALP 酵素活性を測定した。DNA 量はピコグリーン蛍光試薬と蛍光光度計で測定し、ALP 酵素活性は和光のキットとマイクロプレートリーダー405nm で測定した。また、可溶蛋白 (コラーゲン性細胞間基質と細胞質等) 量を BCA Protein Assay Kit (PIERCE 社) とマイクロプレートリーダー570nm で測定し、細胞増殖率を評価した。

②血管造成に及ぼす金属 Mg の影響

ヒト血管内皮細胞と線維芽細胞を共培養した血管形成キット (kurabo) を使用し、血管内皮細胞の増殖、管腔形成を調べ、4 日および 8 日後の血管内皮細胞の分化増殖を比較した。

4. 研究成果

(1) Ti-Mg 固溶体合金の熔製

本研究で試みたいずれの融解方法においても Mg が揮散し、融解の前後の質量が添加した Mg の質量以上に減少が生じ、Ti-Mg 固溶体を得ることができなかった。Ti と Mg のクラッドでは、融解時間を短縮し、Mg の揮散を極力少なくすることを試みたが、加熱時間短縮により、金属 Mg がそのまま残留し、固溶体形成には至らなかった。(図 1) この問題点を解決するため、Ti の融点以下の 1100℃ で Mg を加熱して Mg 蒸気の雰囲気を作り、その

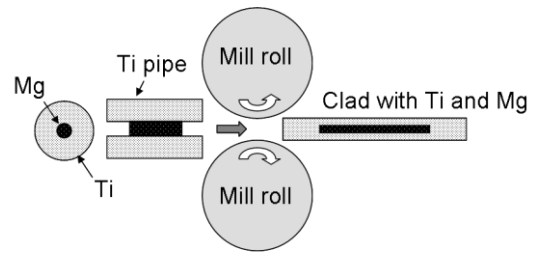


図1 TiとMgのクラッド加工

中に Ti を保持する気固反応で Ti 表面に Mg 固溶体を形成する方法を考案した。(図 2) Ti と Mg を石英管に真空封入し、気固反応を進める方法で目的組成の Ti-Mg 固溶体合金を得ることが今後の課題であることが明らかになった。

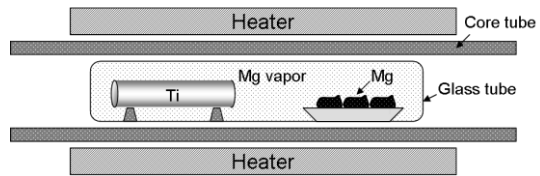


図2 気固反応によるTi-Mg固溶体合金の熔製

(2) Mg イオンに対する骨芽細胞の挙動

骨芽細胞を用いた実験では、Mg イオン濃度を 300ppm~3000ppm に制御した細胞培養液 (MEM および α-MEM) およびコントロール (30ppmMg²⁺ 300~3000ppmCl⁻) 中で 3 種類の株化細胞 (L929, MC3T3-E1, V79) を培養した結果、1000ppm 以下の Mg イオンの存在において DNA 量は減少せず、(図 3) 細胞増殖がコン

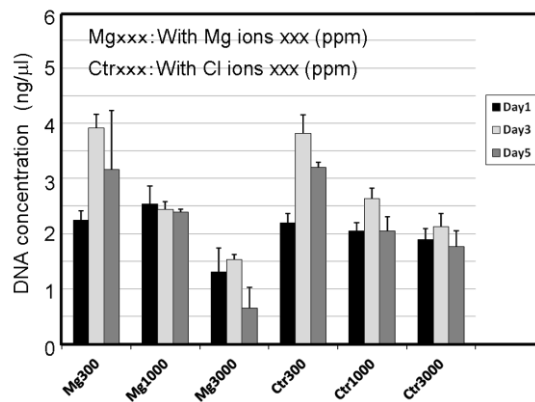


図3 MgイオンのDNAに及ぼす影響

コントロールと同等以上であった。(図 4、5) 5

日間の培養において、1000ppmのMgイオンの存在で、ALP活性値がコントロールの比べ有意に増加したことから、Mgイオンが細胞を活性化した。(図6)

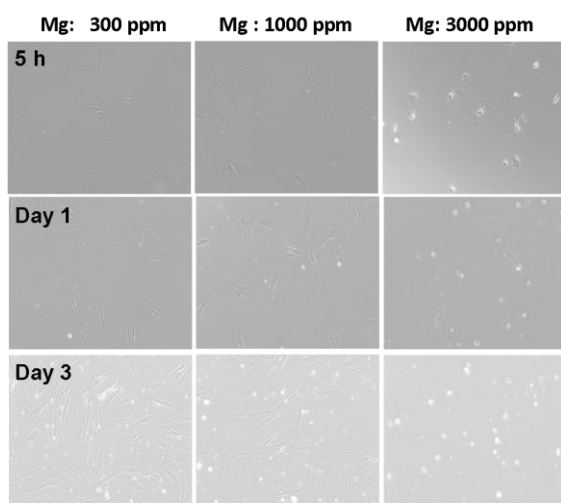


図4 細胞増殖(MgCl 300~3000ppm)

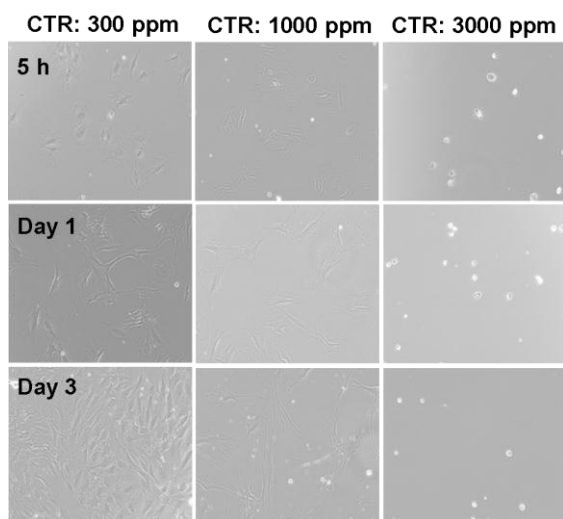


図5 細胞増殖(MgCl(30ppm)+NaCl 300~3000ppm)

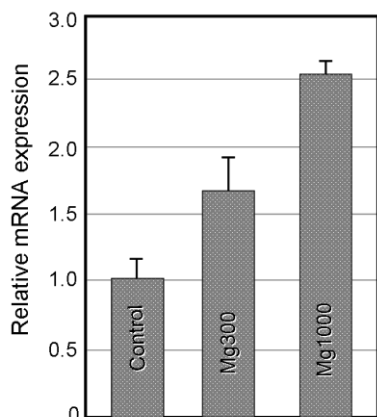


図6 MgイオンのALP活性値に及ぼす影響

これより、1000ppm以下のMgイオンが細胞に対して為害性を示すことなく、骨形成を促すことが示唆された。

(3) Mgの血管造成

ヒト血管内皮細胞と線維芽細胞を共培養した血管形成キット(kurabo)を使用し、血管内皮細胞の増殖、管腔形成を調べ、金属Mgを入れた系で血管増生が確認された。しかし、培養液中のpHがややアルカリ性を示しコントロールに比べ血管増生はやや抑制された。このことはMgイオンが、血管形成を含めた不要な炎症反応、肉芽形成を抑制する可能性があると考えられ、Mgイオンを微量で徐放できるTiのMg固溶体を新規機能材料として開発する必要性が明らかになった。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 雄京 (TAKADA YUKYO)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10206766

(2) 研究分担者

金高 弘恭 (KANETAKA HIROYASU)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：50292222

清水 良央 (SHIMIZU YOSHINAKA)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：30302152

(3) 連携研究者

菊地 聖史 (KIKUCHI MASAFUMI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・

教授

研究者番号：50250791

高橋 正敏 (TAKAHASHI MASATOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50400255