

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4月16日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592452

研究課題名（和文） 組織適合型チタンインプラントの開発を目指した高次生体機能性ナノ表面改質

研究課題名（英文） Higher biofunctional nano-surface modification for development of histocompatibility typed titanium implants

研究代表者

阿部 泰彦 (ABE YASUHIKO)

広島大学・病院・講師

研究者番号：00253097

研究成果の概要（和文）：チタン表面を Hydroxyapatite にて表面改質することを想定し，Hydroxyapatite のナノ表層をさらに β -tricalcium phosphate 様に構造改質するため Ca/P 比に着目し，Hydroxyapatite を 30%リン酸溶液で 10 分間処理する方法を確立した。さらに，本法は骨芽細胞の増殖・分化を向上させることが確認され，高次生体機能性ナノ表面改質の有用性が示唆できた。

研究成果の概要（英文）：Concerning titanium implant coated with hydroxyapatite, processing method to treat hydroxyapatite with 30% phosphoric acid for 10 minutes was established for modification of a nanostructured surface with a ratio of calcium to phosphorus analogous to β -tricalcium phosphate. This higher biofunctional nano-surface modification could accelerate the proliferation and differentiation of osteoblast cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

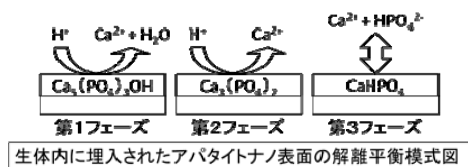
キーワード：チタン，インプラント，表面改質，Hydroxylapatite， β -tricalcium phosphate，SPR 解析，ESCA 分析

1. 研究開始当初の背景

インプラントと骨組織界面におけるオッセオインテグレーション成立において，チタン表面の生体反応における詳細なメカニズムを解明することは，組織適合型チタンインプラントの開発において重要である。そこで，チタン表面に対する生体分子の結合・解離特性について，ナノレベルかつリアルタイムで解析し，そのメカニズムを検証する目的で，

表面プラズモン共鳴法（SPR）用チタンバイオセンサーを開発し，その有用性を明らかにした（雑誌論文1）。次に，生体分子と反応し，組織再生を誘導する生体機能性タンパク質により改質したチタン表面の化学的安定性は，表面改質法の信頼性につながると考え，改質表面を超音波洗浄し，生体機能性タンパク質のチタン表面への化学結合状態を SPR および X 線光電子分光法（ESCA）にて分析

した。その結果、生体機能性タンパク質内における分子間結合が失われ、生体機能性タンパク質本来の特徴を生かすことが難しいことが明らかとなった(雑誌論文 2, 3)。そこで、生体骨と直接結合する生体活性を有するアパタイトを用いて、チタン表面を化学的に安定に改質する手法を検証することとした。



すなわち、生体内に埋入されたアパタイトナノ表面の解離平衡(上図)を考慮し、アパタイトナノ表面の溶解性を高めることで、生体骨との骨結合を促進させる高次生体機能性ナノ表面改質を着想した。

2. 研究の目的

(1) アパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) のナノ表面層をリン酸三カルシウム ($\text{8-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) 様の構造に改質する方法を確立する。

(2) アパタイトナノ改質表面における骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の増殖・分化について評価し、ナノ表面改質の有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アパタイト(以下、HAP)プレート(10 mm×10 mm×2 mm; APP-101, Pentax, 東京, 日本)を、10, 20, 30, 40, 50, 60%の各濃度に調整したリン酸溶液(H_3PO_4 ; Lot No. T1949, Sigma-Aldrich Japan, 東京, 日本)にて、25°C, 10分間処理し、超純水(MilliQ water: >18 MΩcm)で洗浄した試料(HAP-10, 20, 30, 40, 50, 60%PA)を実験に供した。また、コントロールは、未処理HAPとリン酸三カルシウムパウダー(8-TCP; Taihei Chemical Industrial, 岐阜, 日本)とした。これらの表面をESCAにて分析し、Ca/P比を算出した。また、表面性状について、共焦点レーザー顕微鏡(VK-8500, Keyence, 大阪, 日本)を用いて観察し、同時に、表面粗さRa(μm)を測定した。得られたデータは、one-way ANOVAおよび多重比較Tukey法を用い、有意水準1%で統計学的分析を行った。

(2) MC3T3-E1細胞を、4時間UV滅菌したHAPおよびHAP-30%PAプレート上に播種し、37°C, 5% CO_2 下にて培養し、培養期間は、以下の評価項目に従って設定した。

①増殖

増殖は、培養期間を1, 4, 7日とし、Cell counting kit-8 assay (Dojindo Lab., 熊本, 日本)を用いて分析した。

②分化

分化は、培養期間を7, 14, 21日とし、SensoLyte™ pNPP secreted ALP reporter gene assay (AnaSpec Corporate Headquarter, San Jose, CA)を用いてALP活性を分析した。

また、定量RT-PCR法によるALP, Collagen I, Osteocalcin, OsteopontinのmRNA発現を検索するため、コンフルエントに達した日を0日とし、培養期間を4, 7, 14, 21, 28日とした。各培養期間にて細胞を回収し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 東京, 日本)を用いてRNAを抽出・定量した。cDNAは、定量したRNAからReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo, 大阪, 日本)を用いて合成した。PCR増幅は、THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (Toyobo, 大阪, 日本)および特異的プライマーを用いて行い、融解曲線で確認した後、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法にて定量した。また、mRNA発現量の補正には、ハウスキーピング遺伝子であるglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を選択した。

以上、得られたデータは、two-way ANOVAおよび多重比較Tukey法を用い、有意水準1%で統計学的分析を行った。

4. 研究成果

(1) HAPナノ表面改質

①HAPと8-TCPのCa/P比は、それぞれ1.66と1.50で、理論値に一致していた。HAP-30%PAのCa/P比は1.52で、8-TCPの1.50と有意差はなく、30%リン酸溶液処理をナノ表面改質の手法として選択した。

②HAP-30%PAにおけるCa 2p-P 2p結合エネルギーは 214.04 ± 0.05 eVで、8-TCPにおける結合エネルギー 214.18 ± 0.04 eVより有意に小さく、HAPにおける結合エネルギー 214.02 ± 0.04 eVとは有意差を認めなかった。このことは、HAPのナノ表面において、CaとPの化学結合状態はそのまま、Ca/P比のみを変化させたことを示唆していた。

③HAPとHAP-30%PAの表面粗さRaは、それぞれ 0.17 ± 0.02 μmと 0.70 ± 0.04 μmで、30%リン酸溶液処理によりHAP表面は粗造となるものの、MC3T3-E1細胞の増殖・分化に影響を与える表面粗さには至っていなかった。

(2) MC3T3-E1細胞の増殖・分化

①HAP および HAP-30%PA における接着細胞の SEM 像 (培養 1 日) (図 1) より, HAP での接着細胞は伸展した平面的形態をとり, 一方, HAP-30%PA での接着細胞は立体的な形態を示した。

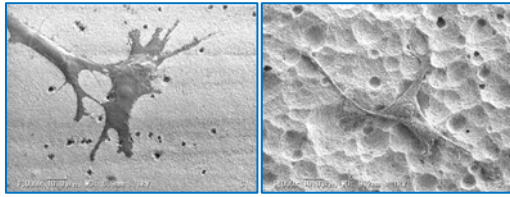


図 1 HAP (左) および HAP-30%PA (右) における接着細胞の SEM 像 (培養 1 日)

②HAP-30%PA における細胞増殖は, 培養 7 日で HAP に比較して有意に向上した (図 2)。

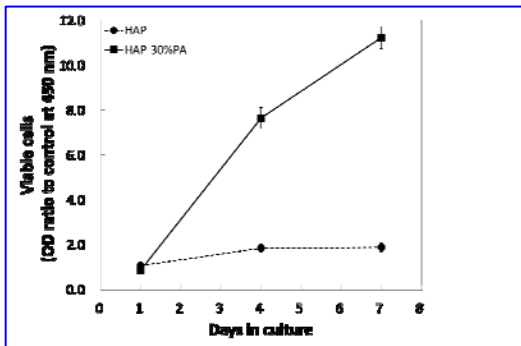


図 2 細胞増殖

③HAP-30%PA における ALP 活性は, 7 日から 21 日にかけて, HAP と同様に有意に上昇した。また, HAP-30%PA における ALP 活性の上昇は, HAP より大きいものの, 有意差は認められなかった (図 3)。

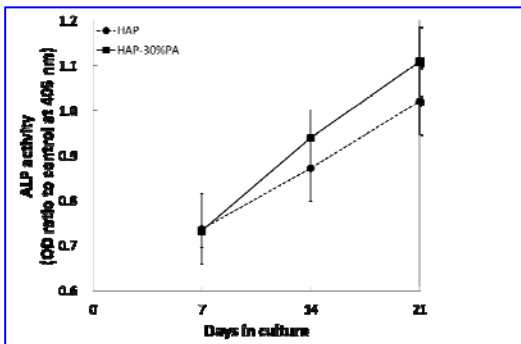


図 3 ALP 活性

④ALP の mRNA 発現は, HAP および HAP-30%PA のいずれにおいても, 4 日では認められず, 7 日で認め, 14 日では, HAP-30%PA においてのみ発現量の上昇を認めた (図 4)。また, mRNA 発現は, ALP 活性の上昇と同様に, いずれにおいても, 7 日に比べ 28 日には有意に増加していた。

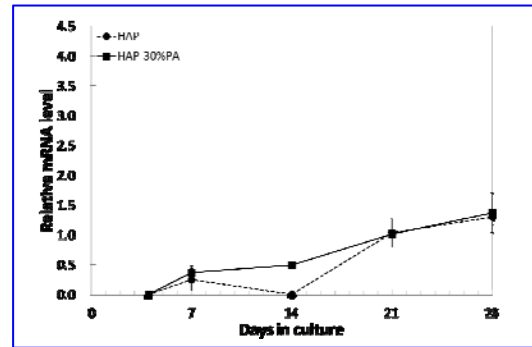


図 4 ALP の mRNA 発現

⑤HAP および HAP-30%PA のいずれにおいても, 各培養期間で Collagen I の mRNA 発現が認められ, HAP では 21 日以降に有意に増加し, HAP-30%PA では 28 日に有意に増加した (図 5)。

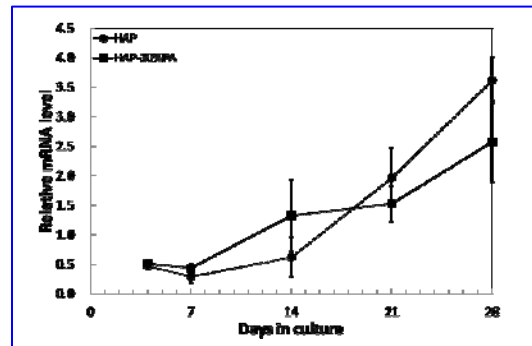


図 5 Collagen I の mRNA 発現

⑥Osteocalcin の mRNA 発現は, HAP および HAP-30%PA のいずれにおいても, 培養 7 日でわずかに認めたものの, 14 日では認められず, 21 日以降で有意に増加した。Osteocalcin は, 石灰化促進よりも, むしろ結晶の安定性や過剰な石灰化を抑制する調節因子として働くと言われている。したがって, 本研究の培養期間では, 21 日以降に石灰化の過程に入ったものと考え (図 6)。

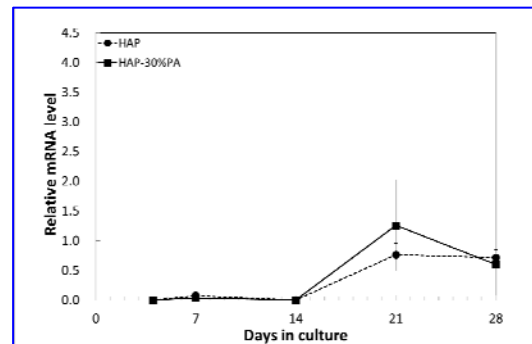


図 6 Osteocalcin の mRNA 発現

⑦HAP-30%PA における Osteopontin の mRNA は、4 日で HAP に比較して有意に発現し、7 日以降は有意に減少し、HAP と同程度となった。HAP における発現量は、培養期間中変化しなかった (図 7)。

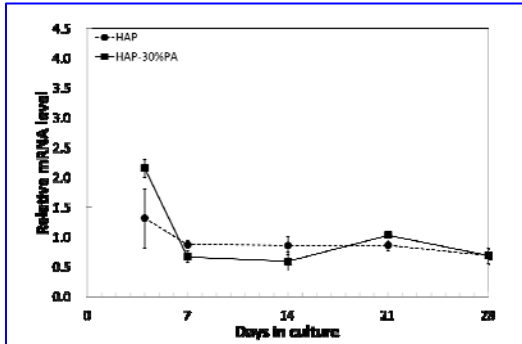


図 7 Osteopontin の mRNA

以上、①～⑦の結果から、HAP-30%PA は MC3T3-E1 細胞の増殖・分化に有効であることが明らかとなり、HAP のナノ表面改質の有用性を示唆できた。

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 3 件)

1. Hirata, I., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Hiasa, K., Abe, Y., Maekawa, K., Kuboki, T., Akagawa, Y., Suzuki, K., Meerbeek, B. V., Messersmith, P. B. and Okazaki, M., Real time assessment of surface interactions with a titanium passivation layer by surface plasmon resonance, *Acta Biomaterialia*, 査読有, 8, 2012, 1260-1266
2. Abe, Y., Hiasa, K., Hirata, I., Okazaki, Y., Nogami, K., Mizumachi, W., Yoshida, Y., Suzuki, K., Okazaki, M. and Akagawa, Y., Detection of synthetic RGDS(PO₃H₂)PA peptide adsorption using a titanium surface plasmon resonance (SPR) biosensor, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 査読有, 22, 2011, 657-661
3. Abe, Y., Okazaki, Y., Hiasa, K., Hirata, I., Yoshida, Y., Taji, T., Suzuki, K., Okazaki, M. and Akagawa, Y., Degree of immobilization of synthetic RGDS(PO₃H₂)PA peptides on titanium surfaces, *Dental Materials Journal*, 査読有, 29, 2010, 668-672

[学会発表] (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 泰彦 (ABE YASUHIKO)
広島大学・病院・講師
研究者番号：00253097

(2) 研究分担者

日浅 恭 (HIASA KYOU)
広島大学・病院・助教
研究者番号：60304432

平田 伊佐雄 (HIRATA ISAO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40346507

(3) 連携研究者

()

研究者番号：