

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17054

研究課題名（和文）生体機能を付与したPEEKインプラントの創製

研究課題名（英文）Creation of PEEK implants with biological functions

研究代表者

西崎 真理子（NISHIZAKI, Mariko）

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20823529

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本実験のハイドロキシアパタイト薄膜の成膜条件として、ターゲットはcellyardアパタイトとし、結晶化条件については、140℃3時間による水熱処理が最も適した条件であることが明らかとなった。各種表面解析の結果より、HApの結晶構造がPEEK表面に薄膜形成されていることが明らかとなった。ラット骨髄細胞を使用したin vitro評価では、実験群のすべての計測結果が有意に高い数値を示していた。また、実験群の材料表面での骨髄細胞の細胞突起が伸長していることが明らかとなった。本研究の結果より、PLD法を使用することによって、媒介を使用せずPEEK材料表面へのHAp成膜が可能であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的な特色は、PEEK材料とPLD法に着目し、新たな生体材料を開発し他分野への応用を視野に入れているという点にある。また、構造制御の方法も比較的簡易であることから、PEEKインプラント材料の生体親和性の著しく向上することが期待でき、この結果は医科界・歯科界において多くの患者に普及させることを期待できる。また、中間層を使用せずHApを成膜することができるという画期的な方法であることから、特許申請予定である。

研究成果の概要（英文）：In this experiment, cellyard apatite was used as the target, and hydrothermal treatment at 140 °C for 3 hours was found to be the most suitable condition for the deposition of the hydroxyapatite thin film. From the results of various surface analyzes, it was clarified that the crystal structure of HAp was formed as a thin film on the PEEK surface. In vitro evaluation using rat bone marrow cells showed significantly higher values for all the measurement results in the experimental group. In addition, it was clarified that the cell projections of bone marrow cells on the material surface of the experimental group were elongated. From the results of this study, it was clarified that HAp deposition on the surface of PEEK material is possible without using a medium by using the PLD method.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：PEEK PLD法 インプラント

1. 研究開始当初の背景

近年, 超高齢社会の到来により, 健康寿命の増進のために歯科医療が占める役割が非常に重いと推察される. インプラント治療は欠損歯の多い高齢者にとって, 健康寿命を延長する可能性を秘めた治療であると推察される. しかし, 高齢者に対する歯科治療には全身疾患の存在および骨質が低いことから, 従来の金属の弾性では咬合力を与えた時に骨の破折を引き起こし, 更なるリスクを与えてしまう可能性が高いと推察される.

一般的にインプラント治療は歯列欠損補綴治療において有望な方法として広く受け入れられている. しかし, 従来の歯科インプラント材料とするチタンおよびその合金は, X線撮影でアーチファクトが生じるとともに, 皮質骨よりも著しく高い弾性率を有し, 応力遮蔽および骨吸収をもたらす. 近年, 整形外科および歯科におけるチタンおよびその合金に対する代替の生体材料として, ポリエーテルエーテルケトン (polyetheretherketone, PEEK) は歯科インプラントの理想的な材料と考えられている. PEEK 製インプラントはチタン製インプラントと比較して, 優れた X線透過性を持ち, 弾性が皮質骨に近いためインプラント周囲骨に対する応力遮蔽効果を抑え, 骨の育成を促進すると評価されている. 但し, PEEK はチタンに比べて骨伝導能が非常に限られている.

申請者の所属する講座では金属アレルギー患者に対するインプラント材料の開発に取り組んでいる. 注目される新規材料であるナノジルコニアは PEEK と同じく, その強い曲げ強さと弾性を有していることから, インプラント材料として期待されているものの, 表面処理が必要である. 本材料の濃アルカリ処理がインプラント埋入周囲組織の硬組織形成に有用であることを明らかにしており, 本テーマは International Journal of Molecular Sciences に掲載された. しかし, この表面制御でも純チタン金属表面には至らず, バイオインテグレーションを誘起する表面制御が必要であると考えられる.

PEEK がポリマー材料の一つの種類であり, X線透過性や高い弾性を持ち, 整形外科および歯科用途におけるチタンの代用品としてより多くの注目を集めている. 本材料にバイオインテグレーションを誘起するような表面処理を与えることができれば, 超高齢者社会が到来しても, インプラント治療の幅を広げることができるのではないかと推察される.

本申請者の共同研究者である近畿大学生物理工学部 本津茂樹教授は PLD 法により, 10 μ m 以下の薄くて曲がる極薄アパタイトシートの開発に成功した. このシートは歯質と同素材であるため, 骨や歯質に直接貼り付き, 骨組織の再生に有用な材料として期待される. 大阪歯科大学では歯科保存学講座がこのシートを利用し, エナメル質を容易に修復する「歯の絆創膏」として臨床応用され, 各種メディアでも取り上げられた. アパタイトシートは純チタンインプラント表面にも容易に薄膜形成することが可能で, 本講座では近畿大学 本津茂樹教授との共同研究でアパタイトをレーザーコーティングした純チタン金属インプラント材料がインプラント埋入周囲組織の硬組織分化誘導能を向上させることを *in vitro* および *in vivo* の両面から検討し, 新規バイオ材料の作成に成功した. また, 本講座では PLD 法を利用した新規アパタイトコートインプラントの創製で若手研究 (科研費) を受諾しており, ナノジルコニアへのアパタイトコートに成功し, 特許「セリア安定型ジルコニア - アルミナ複合セラミック材料の表面改質方法」特許番号: 特許第 6978116 号」を受諾している.

2. 研究の目的

そこで, 本研究では, 金属アレルギー患者に有用である PEEK 材料へ PLD 法によってハイドロキシアパタイトをコーティングすることでインプラント埋入周囲組織にどのような影響を与えるのか *in vitro* および *in vivo* の両面から検討を行い, オッセオインテグレーションとバイオインテグレーションを兼ね備えた新規インプラント材料の開発を目指す.

3. 研究の方法

本研究では, PLD 法によりアパタイトシートをコーティングしたインプラント体として生体に埋入した場合の SD 系ラットのインプラント周囲骨組織の評価を中心とする. SD 系ラットの大腿骨骨髄から間葉系幹細胞を単離し, 各種実験材料上にこれを播種・培養し, 細胞接着能, 細胞増殖能, 骨芽細胞への分化能について評価する. また, ラット大腿骨にチタンナノ構造を析出した各種実験材料を埋入し周囲骨組織の評価を MicroCT 分析および免疫蛍光染色で行い, オッセオインテグレーションの評価を行う.

(1) 試料作製および表面評価

クオドラント社より購入した PEEK 材料 (円板およびスクリュー) へ PLD 法にてハイドロキシアパタイトをコーティングし, 実験試料とする. PLD 法は近畿大学 本津茂樹教授のご協力の下, 本学大学院生が行う. 成膜条件はターゲットは cellyard ターゲット, 基板温度を室温, 雰囲気ガス O_2+H_2O , ガス圧 1×10^{-4} Pa, 周波数 10Hz とする. 結晶化には加熱処理が必要だが, PEEK の融点は低いため, 140 $^{\circ}$ C 3 時間で水熱処理を行うこととした. 材料表面の解析は SEM, EDS, TF-XRD, FTIR にて行い, 材料表面へのハイドロキシアパタイトの成膜強度を引張試験機

にて解析した。

(2) in vitro 評価

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 °C、5 %CO₂ 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 mMβ-グリセロリン酸ナトリウム(和光純薬, 東京, 日本), 80 μg/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。実験群および対照群の PEEK 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 4×10⁴ 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。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。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。実験群および対照群の PEEK 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。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

PEEK 材料への HAp のコーティングには成功したものの、結晶化条件に関しては 130, 140, 150, 160 °C での水熱処理を行い、結晶化測定と接着強度試験によって検証を行った。その結果、140 °C 3 時間での水熱処理が材料表面の HAp の結晶化に最も有用であることが明らかとなった。

同条件での材料表面を観察したところ、実験群の試料表面はハイドロキシアパタイト粒子の偏光反応により、色調の変化が認められた。TF-XRD の結果では、実験群の材料表面にアパタイトのピーク 210.112300.301.310.113 が検出されており、結晶化されたアパタイトの形成が明らかとなった。SEM の結果では、対照群の PEEK 材料表面には、研削されたスレッドが確認された。実験群の材料表面には、スレッド以外に小さな均一な丸みを帯びた突起が確認されたが、これは膜形成時のハイドロキシアパタイト粒子が大きくなったものと推察される。引張試験の結果により、固着強度は 2.9MPa であることが明らかとなった。元素マッピングの結果、実験群の材料表面に Ca, P, O が試料中に一定分布していることが確認された。FTIR の結果によって、実験群の材料表面にアパタイトの水酸化物とリン酸塩が存在することが明らかとなった。

ラット骨髄細胞を使用した in vitro 評価における解析結果では、全ての検討項目において実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。また、実験群の材料表面上で骨髄細胞の細胞突起は大きく伸長していることが明らかとなった。In vivo 評価は現在進行中である。

以上より、PLD 法を使用することで、PEEK 材料表面に中間層を介在させることなく、HAp をコーティングできることが明らかとなった。現在、共同研究者の本津先生の指示の下、特許申請予定である。

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 1件）

1. 著者名 Ma Lin, Li Min, Komasa Satoshi, Yan Sifan, Yang Yuanyuan, Nishizaki Mariko, Chen Liji, Zeng Yuhao, Wang Xin, Yamamoto Ei, Hontsu Shigeki, Hashimoto Yoshiya, Okazaki Joji	4. 巻 15
2. 論文標題 Characterization of Hydroxyapatite Film Obtained by Er:YAG Pulsed Laser Deposition on Sandblasted Titanium: An In Vitro Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2306 ~ 2306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma15062306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	本津 茂樹 (HONTSU Shigeki) (40157102)	近畿大学・生物理工学部・名誉教授 (34419)	
研究協力者	小正 聡 (KOMASA Satoshi) (70632066)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------