

## 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4月22日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592205

研究課題名（和文）：骨芽細胞の分化・増殖を促進する亜鉛修飾型チタン系インプラントの開発

研究課題名（英文）：Development of titanium implants after alkali heating treatment with a  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  complex to promote osteoblast proliferation and differentiation

研究代表者

福田 雅幸（FUKUDA MASAYUKI）

秋田大学・医学部・准教授（病院教授）

研究者番号：20272049

研究成果の概要（和文）：チタン表面に亜鉛錯体を修飾させることによって亜鉛修飾型チタン系インプラント（Zn-Ti）を作製し、骨芽細胞の分化・増殖を促進する効果について検討した。作製した Zn-Ti は亜鉛イオンを徐放させることができ、この亜鉛イオンは、材料周囲の細胞を骨芽細胞へ分化・増殖させ、さらに石灰化を促進させることが判った。動物実験では、すべての試料において、経時的に剪断強度が大きくなり、実験期間を通して、Zn-Ti の剪断強度は Ti より有意に高い値であった。

研究成果の概要（英文）：Titanium implants chemically-modified with a solution containing  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  complex (Zn-Ti) were fabricated and assessed the effect of promoting osteoblast proliferation and differentiation. Zn-Ti released  $Zn^{2+}$  ions and these ions promoted osteoblast proliferation, differentiation and calcium deposition around the Zn-Ti. Zn-Ti demonstrated significantly stronger bone fixation than non-modified implants at all healing times.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・外科系歯学

キーワード：チタン系インプラント，亜鉛修飾，骨芽細胞，分化・増殖

### 1. 研究開始当初の背景

現在、臨床応用されている骨内埋入を目的とした金属生体材料（インプラント）の多くは、チタンあるいはチタン合金製で、生体内で安定しているため、それらを用いた治療は予知性の高い治療法として広く認識されている。これらのチタン系材料の表面には、微量のナトリウムと骨形成の足場となる水酸基が存在し、この水酸基を介して骨芽細胞が

形成した骨性蛋白と接着するが、接着には生体内の自発的細胞分化が律速となる。そこで、骨との接着性を短時間で高めるために、骨芽細胞の分化・増殖を反応触媒のように促進する因子が必要であると考えられる。われわれは、その促進因子として微量な亜鉛イオンに注目している。

従来のインプラントの表面設計は、金属系では、(1)表面粗さの増加（アンカーリング効

果)、(2)骨形成の足場としての機能を期待したヒドロキシ基やカルボキシル基などの官能基の導入(化学結合の導入)を期待して表面処理が行われている。水酸化ナトリウムを用いたアルカリ加熱処理は、チタン酸ナトリウム層の形成、イオン交換、表面電荷の制御などを考慮した表面処理で、良好な骨形成と接着性が確認されている。しかし、これらインプラントは骨接着性について考慮されているが、(3)細胞との相互作用には配慮がされていない。

そこで申請者らは、骨芽細胞への分化とミネラル化の促進をさせるシグナルとして、徐放型の亜鉛イオンに注目し、亜鉛修飾型チタン系インプラント(亜鉛修飾チタン)を研究している。亜鉛は、ヒト体内に約2g存在し、その2~3割が骨に含まれ、骨芽細胞の分化・増殖の促進と破骨細胞の分化と機能を抑制の関わっていると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、

- (1) 亜鉛修飾型チタン系インプラントを作製し、表面性状をさまざまな分析機器で表面性状を評価する。
- (2) 生体外評価を、亜鉛イオンの除放試験、擬似体液中のアパタイト形成能、骨芽細胞の分化・増殖試験で評価する。この結果を、(1)にフィードバックさせ、徐放する亜鉛濃度などの表面性状を再検討する。
- (3) 亜鉛修飾型チタン系インプラントと骨との反応を動物実験にて検討する。

## 3. 研究の方法

原材料は純チタンで(Ti)、表面処理には、水酸化ナトリウム水溶液に硝酸亜鉛水溶液を加え、さらに水酸化ナトリウム水溶液を加えて得られたテトラヒドロキシ亜鉛酸錯体を含む水溶液を用いた。亜鉛修飾型チタン系インプラント(Zn-Ti)は、目的に応じた形状のチタンをこの錯体水溶液に浸漬し、60℃で24時間保持し、作製した。コントロールには、未処理のTiを用いた。

- (1) 試料の表面性状を電子顕微鏡写真(SEM)、エネルギー分散型X線分析(EDX)、薄膜X線回折(TF-XRD)、X線光電子分光分析(XPS)等で評価した。
- (2) 生体外(*in vitro*)評価を、亜鉛イオンの除放試験、擬似体液中のアパタイト形成能、骨芽細胞の分化・増殖試験で評価した。材料は、Zn-Tiの板状の試料で、細胞は株化したヒト骨髄由来骨芽細胞(hBMCs)を用いた。試料上でhBMCsを培養し、細胞増殖試験はMTT法で、骨芽細胞への分化

能はELISA法で、アルカリフォスファターゼ(ALP)、I型コラーゲン(type I col)、オステオポンチン(OPN)のタンパク量を検討した。また、石灰化に関しては、アリザリンレッド染色を行った。

- (3) 亜鉛修飾型チタン系インプラントと骨との反応を動物実験(*in vivo*)で検討した。Zn-Tiの棒状の試料をウサギ大腿骨に埋入し、埋入後4、12、24週に摘出し、試料と骨との間の接着(剪断)強度を測定した(図1)。

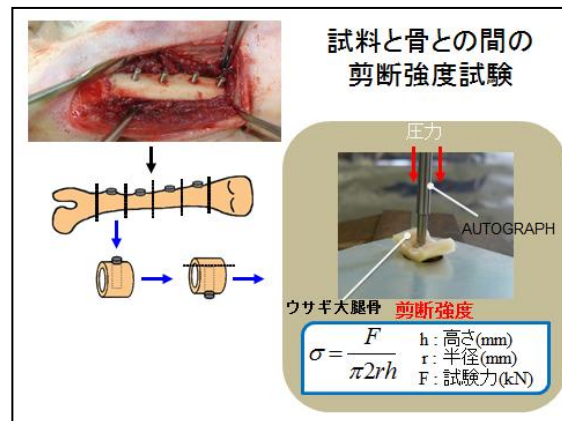


図1

## 4. 研究成果

### (1)表面性状の評価

SEMでは、Zn-Tiの表面は、非常に細かい凹凸が形成しており、EDXの元素分析では、亜鉛が検出された(図2A, B)。TF-XRDでは、非常にブロードな酸化チタンに相当する回折ピークが検出され、表面にはアモルファスに近い酸化チタンが形成された。XPSからは、TiO<sub>2,x</sub>の傾斜組成をもち、その表面に約20nmの厚さの化学修飾亜鉛層が認められた。

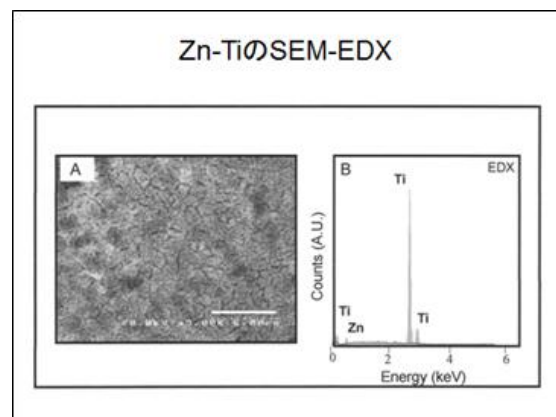


図2

### (2)*in vitro* 評価

亜鉛イオンの除放試験では、浸漬後4時間以降から徐放し始めることが判った(図3)。

濃度は、細胞毒性をはるかに下回る値であったが、細胞環境に最適な濃度の検討は、今後追加実験を行う予定である。

細胞増殖試験は、実験期間（10日間）を通して Zn-Ti と Ti に差はなかった。

ALP 活性は、培養 4 日目と 7 日目で Zn-Ti が Ti より有意に高く、type I col 産生は培養 4 日目で Zn-Ti が Ti より有意に高く、OPN 産生は培養 14 日目と 21 日目で Zn-Ti が Ti より有意に高く（図 4）、石灰化は培養 4 週目で Zn-Ti が Ti より有意に高い値を示した。

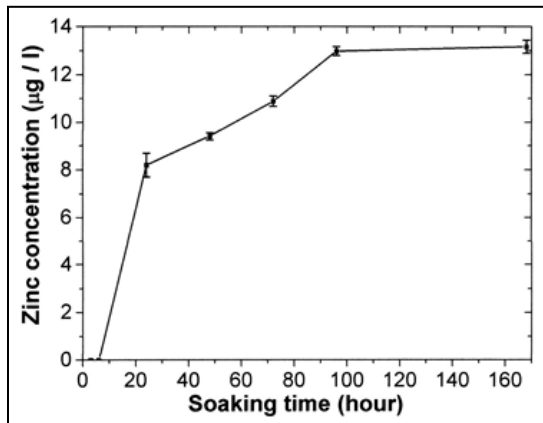


図 3

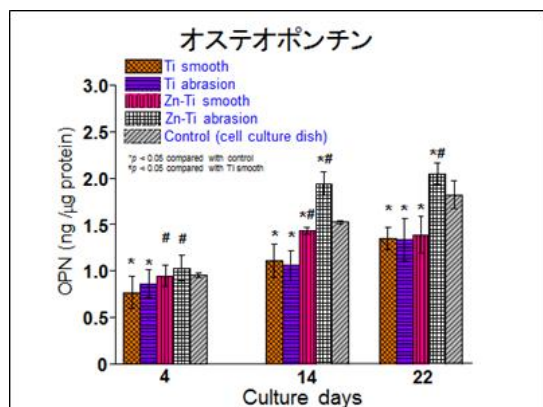


図 4

### (3)in vivo 評価

Ti 表面の錯体水溶液処理および未処理を問わず、インプラントを埋入した期間が長くなると剪断強度が大きくなった（図 5）。すべての期間を通して、錯体水溶液処理インプラントの剪断強度は、未処理インプラントより高い値であった。さらに、表面が比較的滑らかなインプラントの剪断強度がアンカーリング効果を期待して行ったアブレーション処理インプラントとほぼ同じになっていた。つまり、錯体水溶液で処理することによって、アンカーリング効果以上の接着性の実現できた。また、剪断強度試験後のインプラント

表面には、骨の接着が観察された。これは、骨自身の結合強度より、インプラントと骨との間の結合の方が高いことを示している。

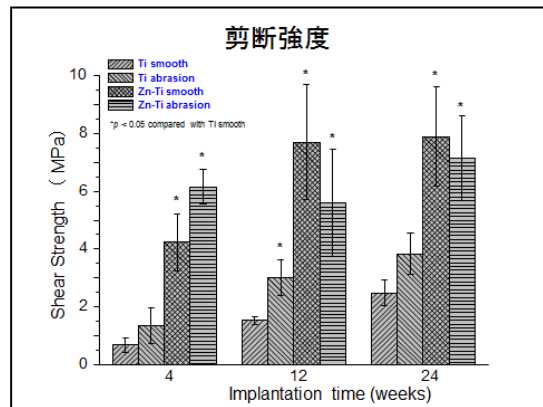


図 5

今回作製した Zn-Ti は、チタン表面に亜鉛錯体を修飾することで、生体内に埋入した後に亜鉛イオンを徐放させることができた。そしてこの亜鉛イオンは、材料周囲の細胞を骨芽細胞へ分化・増殖させ、さらに石灰化を促進させることが判った。徐放された亜鉛イオン濃度は細胞毒性をはるかに下回る値であったが、新生骨形成のために最適な徐放濃度に関しては、今後追加実験を行い、臨床応用に展開させる予定である。また、亜鉛の破骨細胞に及ぼす影響は検討していないので、骨吸収抑制作用がどの程度あるのかも解明する必要がある。

### まとめ

- 亜鉛修飾型チタンの表面分析**
  - 1) 表面は、アモルファスに近いTiO<sub>2</sub>層である。
  - 2) TiO<sub>2</sub>の傾斜組成をもつ。
  - 3) その表面上に亜鉛が化学修飾している。
  - 4) 化学修飾亜鉛層は20nm以下の厚さである。
- 生体外評価**
  - 1) 亜鉛イオンは、4時間以降から徐放し始め、7日間以上継続した。
  - 2) 細胞増殖試験では、TiとZn-Tiに有意な差はなかった。
  - 3) Zn-Ti上で培養した骨髄細胞は、早期からALP、Col 1、OPNを発現し、石灰化度もTiより有意に高かった。
- 生体内評価**

Zn-Tiと骨との間の剪断強度は、実験期間を通じてTiより有意に高かった。

→亜鉛イオンを徐放する亜鉛修飾型チタンは、細胞機能を亢進する新型インプラントと考えられる。  
→実用されている医療用金属系インプラントへの応用も可能であり、臨床応用の拡大が期待できる。

### 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)

1. Ohira T, Kawamura M, Fukuda M, Alvarez K, Özkal B, Yamamoto O: Extension of the optical absorption range in Zn-doped MgO powders and its effect on antibacterial activity.

- Journal of Materials Engineering and Performance, 19(3), 374-379, 2010.
- Alvarez K, Fukuda M, Yamamoto O: Titanium implants after alkali heating treatment with a  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  complex: analysis of interfacial bond strength using push-out tests. Clinical Implant Dentistry and Related Research, 12(supplement 1), e114-125, 2010.
  - Yamamoto O, Ohira T, Alvarez K, Fukuda M: Antibacterial characteristics of  $CaCO_3$ -MgO composites. Material Science and Engineering B, 173, 208-212, 2010.
  - Yamamoto O, Fukuda M: Effect of carbon coating on biocompatibility of titanium - in vitro cytotoxicity evaluation by using human bone marrow cells -. TANSO, 245, 183-187, 2010.
  - Yamamoto O, Fukuda M: In vivo evaluation of the bonding strength between bone and Zn-modified Ti (Effect of surface treatment with  $[Zn(OH)_4]^{2-}$  complex). Archives of BioCeramics Researches, 10, 46-49, 2010.
  - Naruse K, Fukuda M, Hasegawa H, Yagami K, Udagawa N: Advanced alveolar bone resorption treated with implants, guided bone regeneration, and synthetic grafting: a case report. Implant Dentistry, 19, 460-467, 2010.
  - Yamamoto O, Alvarez K, Kashiwaya Y, Fukuda M: Significant effect of a carbon layer coating on interfacial bond strength between bone and Ti implant. CARBON, 49, 1588-1598, 2011.
  - Yamamoto O, Alvarez K, Kashiwaya Y, Fukuda M: Surface characterization and biological response of carbon-coated oxygen-diffused titanium having different topographical surfaces. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 22, 977-989, 2011.
  - Yusa K, Yamamoto O, Fukuda M, Koyota S, Koizumi Y, Sugiyama T: In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant. Biochem Biophys Res Commun, 412(2), 273-278, 2011.
  - Yamazaki M, Kanzaki S, Tominaga K, Miyamoto I, Yamauchi K, Fukuda M, Takahashi T: Evaluation of secondary bone grafting of the alveolar cleft in adult cleft lip and palate patients. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 24(2), 86-89, 2012.
  - 本間高志, 中田 憲, 福田雅幸: 口腔癌に対する皮下埋め込み式リザーバー用いた逆行性超選択的動注化学療法の経験. 頭頸部癌, 38(1), 21-25, 2012.
  - 福田雅幸: 生体内微量元素としての亜鉛の

利用. 秋田大学環境安全センター報, 32, 13-15, 2012.

[学会発表] (計 11 件)

- Yamamoto O, Fukuda M: *In vivo* evaluation of the bonding strength between bone and Zn-modified Ti. The 10th Asian BioCeramics Symposium, November 2010, Indonesia.
- Yamamoto O, Fukuda M: Osseointegration evaluation of carbon-coated implants by animal experiments. 20th MRS-Japan Academic Symposium, December 2010, Yokohama, Japan.
- 山本 修, 福田雅幸: インプラント-骨間の剪断強度に及ぼすパイロカーボン被覆膜の効果. 第 37 回 炭素材料学会年会. 2010 年 12 月, 姫路.
- 遊佐和之, 山本 修, 福田雅幸, 杉山俊博: 生体内微量元素である亜鉛は骨形成を促進する - 亜鉛修飾型新規生体材料の骨接着性および骨芽細胞誘導に関する検討 -. 第 31 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会. 2011 年 11 月, 秋田.
- 山崎雅人, 高野裕史, 中田 憲, 桑島精一, 福田雅幸: チタンメッシュトレーと腸骨骨髓海綿骨細片移植による下顎骨再建後のインプラント治療による咬合再建症例に対する臨床的検討. 第 31 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会. 2011 年 11 月, 秋田.
- 山本 修, 遊佐和之, 福田雅幸: 亜鉛修飾型インプラントの有意的骨接着性. 第 31 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会. 2011 年 11 月, 秋田.
- 山本 修, 福田雅幸: 炭素被覆酸素拡散チタンインプラントの骨接着性. 平成 23 年度日本セラミックス協会東北北海道支部発表研究会および第 31 回基礎科学部会東北北海道支部地区懇話会. 2011 年 10 月, 郡山.
- 遊佐和之, 山本 修, 福田雅幸, 小泉幸央, 小代田宗一, 杉山俊博: 亜鉛修飾型インプラントの骨接着性および骨芽細胞誘導に関する検討. 第 19 回秋田応用生命科学研究会. 2011 年 11 月, 秋田市.
- 大淵真彦, 高野裕史, 桑島精一, 中田 憲, 福田雅幸: 当科における外傷後の歯の欠損に対するインプラント治療の臨床的検討. 第 42 回日本口腔インプラント学会総会. 2012 年 9 月, 大阪.
- 山本 修, 福田雅幸, 飯野光喜: 低熱分解炭素を被覆したインプラントの骨接着性. 第 32 回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会. 2012 年 11 月,

郡山.

11. 桑島精一, 高野裕史, 中田 憲, 山崎雅人, 福田雅幸: 下顎骨エナメル上皮種術後の広範囲な骨欠損に対して下顎骨再建とインプラント治療を施行した1例. 第32回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部総会・学術大会. 2012年11月, 郡山.

**〔図書〕 (計 0 件)**

**〔産業財産権〕**

○出願状況 (計 1 件)

名称: 亜鉛官能基を付与したチタン系生体埋入材料の製造方法およびチタン系生体埋入材料

発明者: 山本修 福田雅幸

権利者: 国立大学法人秋田大学

種類: 特許

番号:

国際公開番号; WO2010/150788

出願番号; 特願 2011-519907

国際出願番号; PCT/JP2010/060571

出願年月日:

国際公開日; 平成 22 年 12 月 29 日

再公表日; 平成 24 年 12 月 10 日

国際出願日; 平成 22 年 6 月 22 日

国内外の別: 国内外

**〔その他〕**

ホームページ等

**6. 研究組織**

(1)研究代表者

福田 雅幸 (FUKUDA MASAYUKI)

秋田大学・医学部・病院教授

研究者番号: 20272049

(2)研究分担者

山本 修 (YAMAMOTO OSAMU)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 00230540

(3)連携研究者

高野裕史 (TAKANO HIROSHI)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 30282172

中田 憲 (NAKATA AKIRA)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号: 50400510