

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592190

研究課題名(和文) 移植骨の生着を促進する再置換用人工関節近傍の周辺環境設計

研究課題名(英文) Osteoconductive effect of spatial design and thermal oxidation on Pure Ti and Ti-15Zr-4Ta-4Nb alloy

研究代表者

間島 直彦 (Mashima, Naohiko)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70274321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：セメントレス人工関節の骨組織親和性を高めることを目的として、チタン金属に体内で自発的にアパタイトを形成させる表面処理技術がある。その中の一つであるチタン金属に溝加工と熱処理を施す“GRAPE Technology”を適用した純チタン、Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金上を用いて、骨芽細胞を用いた増殖形態、増殖能および分化活性について評価と、ウサギを用いた力学・固定力評価、組織観察を行った。GRAPE Technology を適用した純チタン、Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金は、骨芽細胞の増殖速度および分化を促進し、生体内での良好な骨固定性を実現する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Apatite formation on the surface of titanium and its alloys is effective for inducing osteoconductivity when implanted in bony defects. One of these approaches is "GRAPE Technology," by which titanium and its alloys is grooved and thermally treated. The aim of this study was to investigate the osteoconductive effects of this technology when implanted using bone grafting in bony defects. Using Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy processed by this technique, we assessed the growth morphology, proliferative capacity, and differentiation activity of osteoblasts on the alloy. It was suggested that Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy processed employing GRAPE Technology, might enhance the growth rate and differentiation of osteoblasts to achieve favorable bone fixation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：人工関節 チタン合金 骨芽細胞 力学試験 骨伝導

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人工関節再置換の際に用いられる移植骨(自家骨や同種骨)は、高い生物活性を有し骨誘導能や骨伝導能が存在するとされている。しかし臨床の場では、移植骨が人工関節近傍で生着せず、人工関節の”再々”置換を余儀なくされる症例が散見される。移植骨を生着させる方策として、骨誘導能や骨伝導能を有する金属の開発が検討されている。チタン表面の形状(空間)を適切に制御し、その後、熱処理により表面結晶構造を改質すれば(周辺環境制御)、骨組織に対する親和性が向上するだけでなく、血管等を含む成熟骨組織を誘導できることを報告し、“GRAPE Technology”として臨床応用している。






2. 研究の目的

各種成長因子を含む自家および同種移植骨を必要とする人工関節再置換術への応用を目指したチタン近傍の細胞周辺環境に関する知見は全く得られていない。そこで、本研究では、「移植骨の生着を促進するインプラント-細胞周辺環境の設計指針」を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

材料学的アプローチ

各種サイズ・形状の空間(溝や穴)、酸化物表面を有するチタン製試験片上において、新生児 C57BL/6 マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 細胞等を用いた増殖や接着形態等を評価する。さらに、材料表面の形態や結晶構造に対する骨芽細胞様細胞の接着形態を電子顕微鏡等により観察する。

名称	cpTi	cpTi_GR	Ti1544	Ti1544_GR	Ti64
材質	純チタン		Ti-15Zr-0.2Nb-4Ta		Ti-6Al-4V
熱処理	真空炉にて 400℃, 1時間		真空炉にて 540℃, 1時間		
表面積(μm ²)	約 0.5		約 0.5		約 0.3
溝	なし	あり	なし	あり	なし
写真					

臨床的アプローチ

細胞周辺環境を設けたチタンを GR(溝形状,

幅 0.5mm, 深さ 0.5mm, 酸化チタン表面)とした。あるいは、骨芽細胞様細胞を用いた実験から最適化されたチタンを用いて、採取した自家骨とともに日本白色家兎に埋入した。種々の期間経過後、自家骨の生着ならびに、血管新生について HE 染色や各種免疫染色を施した病理標本を観察した。

4. 研究成果

【細胞培養】

細胞は新生児 C57BL/6 マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様樹立株 MC3T3-E1 を使用した。培地は牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum ; FBS) を 10 vol%, ペニシリン-ストレプトマイシンを 1 vol% 添加した MEM- α (GIBCO BRL) を用いた。それぞれの試験片をすべて 24wells プレートに入れ、細胞密度 2×10^4 個/mL の細胞懸濁液 1mL を全てのウェルに播種して培養した。試験片上で 1, 3, 5, 7 日間培養した細胞の接着・増殖形態を蛍光観察および SEM 観察により調べ、細胞増殖率を Alamar Blue[®] assay を用いて調べた。また、骨芽細胞の分化は骨代謝の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 産生量を測定した。

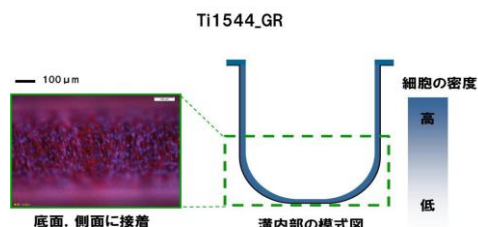
1. 蛍光観察

いずれの試験片においても細胞は一様に増殖しており、特徴的に増殖が高いもしくは低い試験片は無かった。

1 日間培養後の観察では、cpTi 表面、cpTi_GR の溝内部および Ti64 表面は、いずれのサンプルにおいても細胞がよく進展し、線維芽細胞様の接着形態を示していた。また、cpTi_GR および Ti1544_GR では、材料に関わらず、平面部と溝内部の接着形態に大きな差は見られなかった。すなわち、溝加工形状は細胞の初期接着形態に影響を及ぼしていなかった。

7 日間培養の観察画像では、溝内部の細胞形態が特徴的であった。溝の空間部では細胞同士が細胞-細胞間接着により密に接着し、細胞骨格が三次元的なネットワークを構築して

おり、細胞の層を形成していることがわかった。このように、試験片上における細胞の接着形態は材質により大きく異なることがわかった。また、溝加工を施した試験片上では、それぞれの材質で特徴的な接着形態が観察されることがわかった



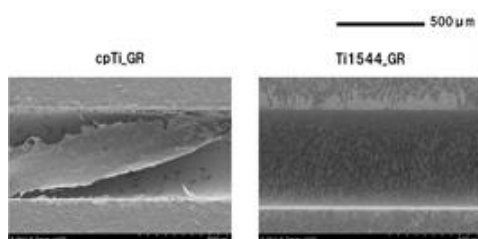
7日間培養後のTi1544_GRの蛍光観察

2. SEM 観察

それぞれの試験片上における細胞接着形態のSEM写真観察した。いずれの試験片上においても細胞はよく増殖しており、7日目ではほぼ完全に細胞被覆している様子が確認された。

7日間培養後のSEM観察では、cpTi_GRの溝内部には、溝に沿って帯状のかたまりが観察された。これは、溝の底面で増殖した細胞が、側面の細胞と底面の細胞が細胞-細胞間接着を引き起こし、底面の細胞が側面の細胞に引っ張られて剥離し、溝内部の空間を満たすような形で細胞塊を形成するものと考えられる。

これに対し、Ti1544_GRの溝内部では、このような形態の接着は観察されず、Ti1544表面上の細胞と同様に、紡錘状の接着形態を示す細胞で底面が覆われている様子が観察された。このことから、Ti-1544上では、細胞が異方性を持って接着するために細胞-細胞間接着が起こりにくい状態であることが示唆された。

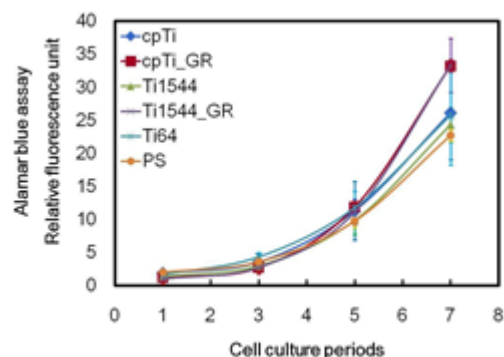


7日間培養後のcpTi_GRおよびTi1544_GRのSEM写真: cpTi_GRの溝内部の細胞塊が脱水収縮により剥離している所を示す

3. 細胞増殖率

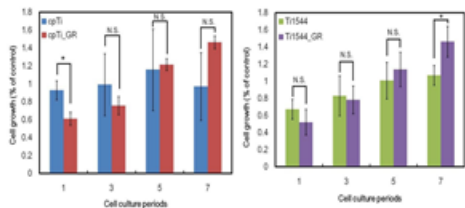
細胞増殖数の測定はAlamar Blue Assay法を用いて、励起波長550nm/測定波長615nmの蛍光強度をプレートリーダーにて測定した。

それぞれの試験片における細胞増殖曲線を示す。いずれの試験片においても細胞増殖曲線は正常な細胞の増殖曲線を描いており、培養7日目までは細胞数が増加傾向にあることがわかった。cpTi_GRとTi1544_GRの溝加工試験片の方が、細胞増殖数が多い結果となったのは、平板試験片の表面積(153.9mm²)と比較して溝加工試験片の表面積(235.0mm²)の方が大きいために、増殖・接着できる領域が広く、細胞数も多かったと考えられる。



各試験片上における細胞増殖曲線
平板試験片のcpTiと溝加工試験片のcpTi_GRの相対増殖数を、平板試験片のTi1544と溝加工試験片のTi1544_GRの相対増殖数を比較した。いずれも培養初期では平板試験片と比較して溝加工試験片の細胞数が少ない傾向にあったが、培養3日目、5日目、7日目と培養期間が進むごとに、溝加工試験片上の相対細胞増殖数が大きくなる傾向にあった。このことから、溝加工試験片は初期の細胞接着数が少なく、細胞接着にやや不利であるが、細胞増殖速度は優れた表面であ

る骨が示唆される。



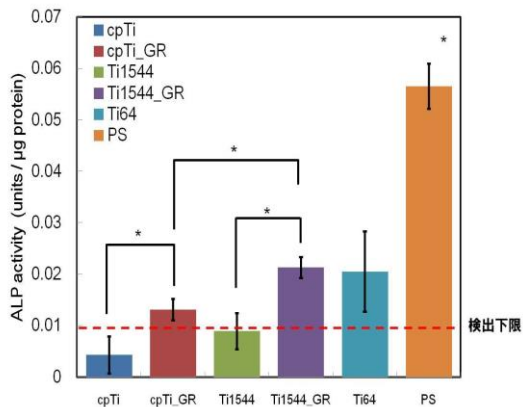
溝の有無で相対細胞増殖率比較

cpTi と cpTi_GR, Ti1544 と Ti1544_GR

* : $p < 0.05$ (student's t-test)

* 4. ALP 活性評価

* 骨芽細胞の分化の指標となる ALP 活性の測定は LabAssay™ ALP (Wako Pure Industries, Ltd.) を用いて、プレートリーダーにて測定した。それぞれの試験片上に播種した細胞の ALP 活性を示す。PS 上に播種した細胞の ALP 活性は、その他の試験片と比較して明らかに高い値を示した。平板の試験片を比較すると、Ti64 は cpTi および Ti1544 よりも高い ALP 活性を示した。溝加工試験片と平板試験片を比較すると、平板試験片である cpTi および Ti1544 よりも、溝加工試験片である cpTi_GR および Ti1544_GR の上に播いた細胞の方が、高い ALP 活性を示すことがわかった。また、cpTi_GR と Ti1544_GR を比較すると、Ti1544_GR の方が有意に高い ALP 活性を示すことがわかった。ただし、cpTi と Ti1544 の ALP 活性測定値は、今回用いた LabAssay™ ALP の濃度保証値 (検出下限) 以下である。



7 日間培養後のそれぞれの試験片上に播種した細胞の ALP 活性

* : $p < 0.05$ (student's t-test)

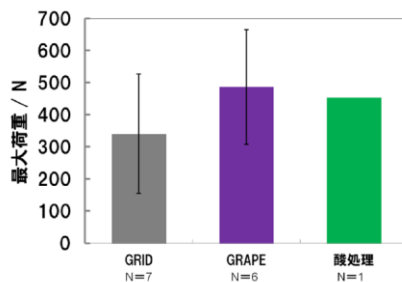
名称	cpTi	cpTi_GR	Ti1544	Ti1544_G	Ti64
材質	純チタン		Ti 15Zr 4Nb 4Ta		Ti 6Al 4V
熱処理	電気炉にて400℃, 1時間		電気炉にて500℃, 1時間		
表面粗さ Ra (μm)	約0.5		約0.5		約0.3
溝	なし	あり	なし	あり	なし
細胞接着形態	線維芽細胞様	線維芽細胞様	紡錘状	紡錘状	線維芽細胞様
初期接着数 (培養1)	+++	+	++	+	++
細胞増殖速度 (PS 上で細胞増殖)	+	+++	++	+++	+
ALP 活性	- 検出下	+	- (検出下限)	++	+++

【動物実験】

対象試験片の生体内埋入時における、骨との固着性 (固定性) を確認するために、ウサギ大腿骨遠位端に埋入した試験片に対し、力学試験機を用いた引き抜き試験を実施し、試験片の骨組織に対するせん断荷重を測定した。また、埋め込み金属の組織標本画像解析を行い、新生骨の接触率を算出し、骨組織状態の観察 (類骨, 炎症, 血管新生) などを観察した。

1. 引き抜き試験

埋入期間4週間の各試験片の引き抜き荷重を図へ示す。Student's T-testを用いた統計学的検定の結果, GRID検体とGRAPE検体の引き抜き荷重値に有意差は無かった。



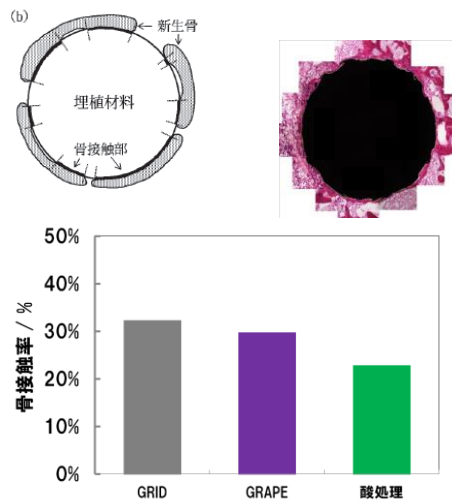
GRIDvsGRAPE:有意差なし(Student's t-test)

埋入4週間の各試験片の引き抜き荷重

N数が少なかったためか、有意様認めなかったが、GRAPE検体の固定性が大きい傾向にあった。

2. 新生骨の接触率

献体を長軸に対して平行に内側より（内顆）の位置で研磨標本を作製、切片を切り出し、厚さ数百 μm まで研磨して、透過顕微鏡での観察イメージした。定量分析（骨接触率（%）の算出）は、骨接触率（%）=骨接触部の長さの合計/埋植材料の周囲長 $\times 100$ と規定した、



埋入4週間の各試験片の骨接触率(%)

N数が少なかったためか、有意差は認めなかった

3. 骨組織状態の観察（

HE染色下の骨金属界面における以下の4領域を確認し評価した。①Osseointegrationが確認できる領域②血管新生が確認できる領域③介在組織（線維性組織）が確認できる領域④炎症が確認できる領域を、評価した。



GRAPE 検体で厚い新生骨がチタン金属表面に接触し、血管新生も確認されている。

組織のN数が少なく、金属表面処理間の評価は困難である。しかしながら Osseo integration が確認でき、血管新生が確認できる領域が多かったのは、GRAPE 検体と酸処理検体であった。

【まとめ】

GRAPE Technology を適応した試験片の特徴として、細胞増殖速度に優れており、ALP活性が高く、骨 謝活性も高い。チタンに自発的なアパタイト形成能を与える GRAPE Technology や 酸加熱処理チタン合金の、骨形成・骨伝導は良好であった。現在移植骨の癒合について検討中である。

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 5 件）

1. Nakashima, Y., Mashima, N., Imai, H.

Clinical and radiographic evaluation of total hip arthroplasties using porous tantalum modular acetabular components: 5-year follow-up of clinical trial
査読有、23 (1) 112-118 2013

Modern Rheumatology

10.1007/s10165-012-0618-9

2. 鎌田知美、間島直彦、今井浩、竹葉淳

THA 術後成績 タンタル製ポーラスを有するセメントレスカップの使用経験

査読無 日本人工関節学会誌 42 593-594 2013

3. Tsuyama, T., Nakai, K., Kobayashi, S. et al.

Effects of microstructure on mechanical property in weld metal formed with the hot-wire method applying ordinal CO₂ gas shielded arc welding method

査読無 Tetsu-To-Hagane/Journal of the Iron and Steel Institute of Japan
99 (7) 468-474 2013

4. Tsuyama, T., Nakai, K., Noumaru, K., Sakamoto, T., Kobayashi, S.
Effect of hot-wire on microstructure and mechanical property in weld metal formed with CO₂ gas shielded arc welding method
査読無 Yosetsu Gakkai Ronbunshu/Quarterly Journal of the Japan Welding Society
31(2) 104-111 2013

5. Kurishita, H., Arakawa, H., Matsuo, S. Kobayashi, S. et al.
Development of Nanostructured Tungsten Based Materials Resistant to Recrystallization and/or Radiation Induced Embrittlement
Materials Transactions
査読有 54 (4) 456-465 2013

[学会発表] (計 2件)

1. 和田祐典 小林千悟 岡野聡 仲井清眞 間島直彦 三浦裕正 木村光臣 他
Ti 合金インプラント周囲の生体骨組織の結晶学的解析
日本金属学会 2013 年春期大
2013年03月27日～29日 東京

2. 宮本 晃 小林千悟 岡野聡 仲井清眞 阪本辰顕他
Ti-Mo合金の α'' 相およびathermal ω 相生成に及ぼすFe添加効果
日本金属学会 2013 年春期大
2013年03月27日～29日 東京

[図書] (計 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
間島 直彦 (Mashima, Naohiko)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：70274321

(2) 研究分担者
小林 千悟 (Kobayashi, Sengo)
愛媛大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：10304651

今井 浩 (Imai, Hiroshi)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20380222

竹葉 淳 (Takeba, Jun)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：80598681

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：