

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659911

研究課題名（和文）骨形成促進金属イオン徐放型インプラントのワンポット作製と骨接着性

研究課題名（英文）Osseointegration and one-pot preparation of the metal ion releasing implants to promote bone formation

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：既存の臨床用インプラント表面に骨形成促進因子（亜鉛イオン及びストロンチウムイオン）を徐放する機能を付与するための容易なインプラント表面処理方法を開発し、実験動物の大腿骨との骨接着性を検討した。その表面処理法は、水酸化ストロンチウムあるいはテトラヒドロキシ亜鉛酸を用い、60～70℃でインプラントを浸すことであった。金属イオンは表面処理インプラントから時間の増加に伴い放出された。これら作製したインプラントの骨接着性は、臨床インプラントの2～3倍高い値を示した。

研究成果の概要（英文）：A simple one-pot method for preparing a new implant was established. Strontium ions and zinc ions as bone formation factor are released gradually from clinical implant surface. The surface treatment method was to use tetra-hydroxy zinc acid ( $Zn(OH)_4^{2-}$ ) or strontium hydroxide and to immerse the implant the chemical solution at 60～70℃. Bone bonding strength between the femur and fabricated implant were studied. It was found that the fabricated implants exhibited higher bone fixation than clinical implant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生体材料学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医療工学・再生歯学

キーワード：インプラント，骨結合，骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯科におけるインプラント材料は生体内で毒性を示すことなく、骨と強固に直接結合することが求められている。そのため、周囲組織に適合するように物性値を合わせ、長期間生体内で機能させるアルミナやカーボンと云った第一世代材料、生体内に埋入した材料が周囲線維性結合組織を介することなく直接結合するアパタイトやβ-リン酸カルシウムと云った第二世代材料、そしてイオン・分子レベルで骨細胞の増殖、分化、組織化に働きかける機能をもたせた第三世代材料が開発されてきた。増殖・分化・組織化に作用する金属イオンとしては、亜鉛、マグネシウム

及びストロンチウムが知られており、アパタイト結晶中にこれら金属を固溶する方法（固溶型アパタイト）が考案され、研究が進んできたが、固溶型アパタイトのインプラントへの適用は困難であった。平成22年になり、ストロンチウム修飾型インプラントの作製と *in vivo*・*in vitro* 評価の論文(Park et al., Acta Biomater., Vol.6,(2010)2843-2851)が掲載され、インプラント表面から放出されたストロンチウムイオンの効果によって、4週の骨埋入試験で純金属インプラントより有意な骨接着性(3MPa)が認められた。しかし、その作製には高温耐圧容器を必要とし、2～3ステップの煩雑な操作を要した。臨床用インプラント

を作製する場合、多段階の操作は不純物の混入や高価となる可能性がある。そのため、簡便で安価なワンポット作製法の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨増殖因子として注目されている亜鉛イオンあるいはストロンチウムイオンを徐放する機能をもつインプラントの常圧・低温さらに1つの容器中ワンステップ(ワンポット)で作製するための方法、作製したインプラントの骨接着性を動物実験で評価することを目的とし、臨床用インプラントより高い骨接着強度を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 亜鉛イオン徐放型インプラント

ワンポット作製用亜鉛水溶液の表面処理は次のように行った。まず、水酸化ナトリウム水溶液に硝酸亜鉛を加え、テトラヒドロキシ亜鉛錯体 $[Zn(OH)_4]^{2-}$ を含む水溶液を調製する。この溶液に表面粗さの異なる純チタンロット浸漬し、所定の温度・時間環流を行い、エタノール及び蒸留水で洗浄後、乾熱滅菌処理して亜鉛イオン徐放型インプラントを作製した。

### (2) ストロンチウムイオン徐放型インプラント

ストロンチウム水溶液を用いたインプラントのワンポット表面処理は次のように行った。蒸留水中に含まれる炭酸ガスを除くために高純度アルゴンガスでバブリングし、そこに水酸化ストロンチウムを加える。表面粗さの異なる純チタンロットを水酸化ストロンチウム水溶液に浸漬し、高純度アルゴンガスを通気しながら、所定の温度・時間環流を行い、エタノール及び70℃の炭酸無含有蒸留水で洗浄した後、乾熱滅菌処理してストロンチウム徐放型インプラントを作製した。

### (3) インプラントの表面評価

作製したイオン徐放型インプラント表面粗さを3次元レーザー顕微鏡システムで評価し、表面形状を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。また、表面の化学的特性は、薄膜X線折測定(TF-XRD)、フーリエ変換型赤外分光光度計(FT-IR)及びX線光電子分光分析(XPS/ESCA)で評価し、深さ方向の組成変動はXPS/ESCAに付属するArレーザー研磨機能を用いて行った。

また、各インプラント表面からのイオン徐放挙動は、37℃の生理食塩水中にインプラントを浸漬し、所定時間毎に生理食塩水をサンプリングする。生理食塩水中に徐放した金属イオンの量を誘導結合プラズマ発光分析

(ICP-AES)で調べた。

## (4) 骨接着性試験

確立したワンポット作製法に基づき、チタンインプラントを表面処理し、亜鉛イオン徐放型・ストロンチウム徐放型インプラントを作製した。得られた徐放型インプラントを動物実験に用いた。

麻酔下におかれた3.5~4.0kgの日本白色家兔の大腿骨に、インプラントを埋入し、埋入後4, 8, 12及び24週で、インプラントの大腿骨とともに摘出した。摘出した大腿骨を分割し、インプラントに接していない部分の骨を除去し、万能試験機の台座に固定した。固定した試料からインプラントを押し出し、最大ピークロード値(kN)を骨と接しているインプラント表面面積(mm<sup>2</sup>)で除した補正值を骨接着強度(kN/mm<sup>2</sup>: MPa)とした。

本動物実験は、山形大学動物実験委員会の承認の下、行われた。

## 4. 研究成果

### (1) ワンポット作製法の確立

確立した亜鉛イオン徐放型インプラントの作製方法を図1に示す。この方法によって得られた溶液でチタンを処理することで、チタン表面に-Ti-O-Zn-OH基が導入できることを明らかにした。



図1 亜鉛イオン徐放型インプラントの作製手順

これに対して、ストロンチウムイオン徐放型インプラントの作製では、まず、水酸化ストロンチウムを溶解する前にアルゴンガスバブリングにより蒸留水中の容存炭酸ガス及び酸素を除去する必要があった。これら容存ガスが存在した場合には、水酸化ストロンチウムは炭酸ストロンチウムあるいは酸化ストロンチウムとして沈殿した。前述の結果から、図2に示す作製手順を確立し、チタン表面に結晶性チタン酸ストロンチウムを形成することに成功した。

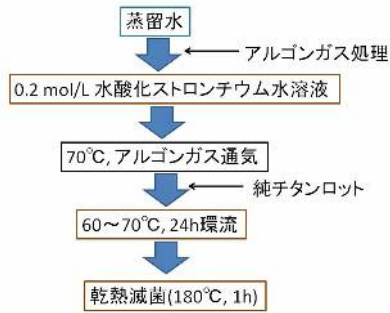


図 2 ストロンチウムイオン徐放型インプラントの作製手順

(2)インプラントの表面状態

チタン表面亜鉛イオン徐放型インプラントの表面には、数 nm～数十 nm の粗い編み目構造が観察された (図 3)。一方、ストロンチウムイオン徐放型インプラントでは、チタン酸ストロンチウムの形成に伴う島状突起物が観察された (図 4)。

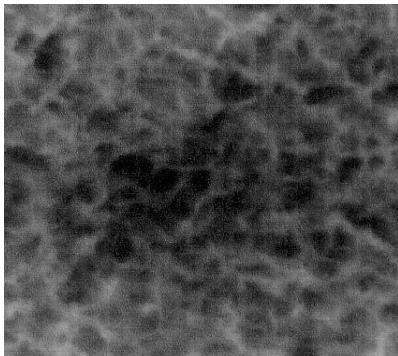


図 3 亜鉛イオン徐放型インプラント表面の SEM 写真

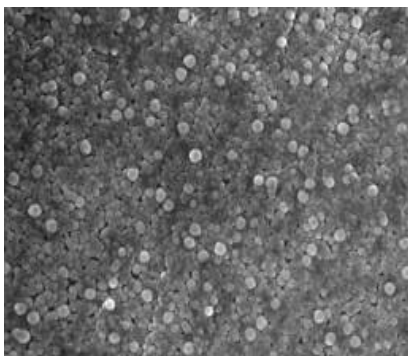


図 4 ストロンチウムイオン徐放型インプラント表面の SEM 写真

(3)骨接着性

①亜鉛イオン徐放型インプラント

図 5 に亜鉛イオン徐放型インプラント (Zn-modified micro-patterned Ti) と市販チタン (micro-patterned Ti:control) の骨剪断強度試験の結果を示す。

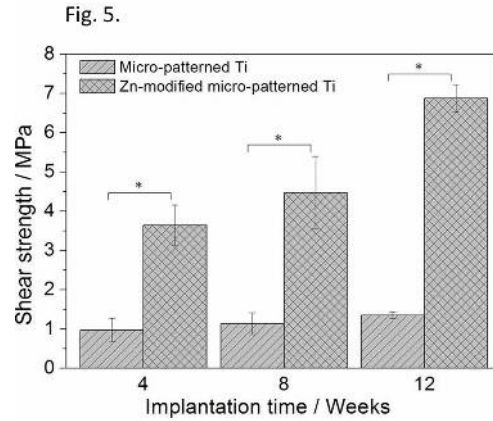


図 5 亜鉛イオン徐放型インプラントと骨との間の剪断強度 (\* $p > 0.05$ )

亜鉛イオン徐放型インプラントの骨剪断強度は、ウサギ大腿骨埋入 4 週で 3.7MPa であり、埋入期間の増加に伴い増加した。12 週埋入では、7MPa の高い剪断強度が得られた。これに対して、市販インプラントの骨剪断強度は 1～1.2MPa であり、亜鉛イオン徐放型インプラントより極めて低い値となった。これらの結果から、亜鉛イオン徐放型インプラントは、市販インプラントより強い骨接着性を示すことが明らかとなった。

②ストロンチウムイオン徐放型インプラント

ストロンチウムイオン徐放型インプラント (SrTi) と市販インプラント (Ti) の骨剪断強度試験の結果を図 6 に示す。

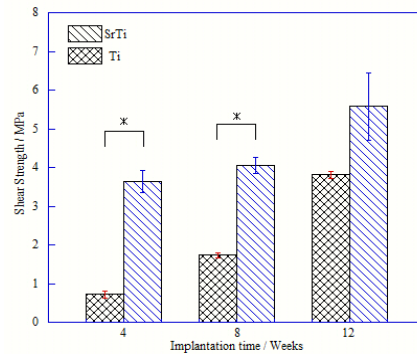


図 6 ストロンチウムイオン徐放型インプラントと骨との間の剪断強度 (\* $p > 0.05$ )

ストロンチウムイオン徐放型インプラントの骨剪断強度は4週埋入で3.8MPaであり、埋入期間の増加に伴い増大し、12週埋入で5.8MPaとなった。市販インプラントにおいても埋入期間の増加に伴い骨剪断強度が増大したが、ストロンチウムイオン徐放型と比較すると剪断強度が低いことがわかった。

以上の結果から、本研究で開発したワンポット作製法を臨床インプラントに適用することで、さらに強固な骨接着性の実現できると考えられる。

### ③イオン徐放インプラント間の骨接着性の比較

亜鉛イオン徐放型とストロンチウムイオン徐放型の骨剪断強度を比較すると、亜鉛イオン徐放型の方が剪断強度は高い。骨接着性を議論する上で、これら金属イオンの骨増殖因子としての作用は極めて重要である。骨接着性の結果から、亜鉛イオンにはストロンチウムイオンと比較して骨増殖因子として有意性が認められると考えられる。

## 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4件)

- ① 山本修, セラミックスの抗菌活性と表面修飾インプラント, バイオマテリアル, 査読無, 29巻, 2011, 271-181
- ② K. Yusa, O. Yamamoto, M. Fukuda, S. Koyota, Y. Koizumi, T. Sugiyama, In vitro prominent bone regeneration by release zinc ion from Zn-modified implant, Biochem. Biophys. Res. Com., 査読有, Vol. 412, 2011, 273-278
- ③ O. Yamamoto, K. Alvarez, Y. Kashiwaya, M. Fukuda, Significant effect of a carbon layer coating on interfacial bond strength between bone and Ti implant, 査読有, Carbon, Vol. 49, 2011, 1588-1598
- ④ O. Yamamoto, K. Alvarez, Y. Kashiwaya, M. Fukuda, Surface characterization and biological response of carbon-coated oxygen-diffused titanium having different topographical surfaces, 査読有, J. Mater. Sci. Mater. Med., Vol. 22, 2011, 977-987

[学会発表] (計11件)

- ① 山本修, 生体埋植用人工物の開発動向～医工学連携の必要性と条件～, 東九州メディカルバレー構想講演会(招待講演), 2013年2月4日, 大分大学(大分県)
- ② Y. Li, Osseointegration of Zn-modified

titanium implant with the regular pattern of micron order, The 51th Symposium on Basic Science of Ceramics, 2013年1月10日, 仙台国際センター(宮城県)

- ③ 山本修, 異なる地形学的表面をもつパイロカーボン被覆チタンの表面特性と細胞学的応答, 第39回炭素材料学会年会, 2012年11月28日, 長野市生涯学習センター(長野県)
- ④ O. Yamamoto, Fabrication and in vivo osseointegration of pyrocarbon-coated Ti implant, 2012 Asian BioCeramics Symposium, 2012年11月21日, 台南市(台湾)
- ⑤ 山本修, 低熱分解炭素を被覆したインプラントの骨結合能, 第32回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部学術大会, 2012年11月3日, 奥羽大学(福島県)
- ⑥ 山本修, 医療用人工物の開発動向と産学連携～先端研究成果を踏まえて～, 山形大学・福島大学・福島市産学官連携技術交流会(招待講演), 2012年10月18日, コラッセ福島(福島県)
- ⑦ O. Yamamoto, In vivo osseointegration of carbon-coated oxide-gradient Ti implant, Fray International Symposium on Metals and Materials Processing in a Clean Environment(招待講演), 2011年11月28日, カンクン(メキシコ)
- ⑧ 遊佐和之, 亜鉛修飾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25日, 秋田県総合食品研究所(秋田県)
- ⑨ 山本修, 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・北海道支部学術大会, 2011年11月5日, 秋田県民会館(秋田県)
- ⑩ 山本修, 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研究発表会, 2011年10月28日, 日本大学(福島県)
- ⑪ 山本修, パイロカーボン被覆インプラントの腐食性と骨接着性, 平成23年度化学系学協会東北大会(招待講演), 2011年9月18日, 東北大学(宮城県)

[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]

ホームページ等

<http://ymlab.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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