

## 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11日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792284

研究課題名（和文）表面カルシウム修飾による歯科用インプラント材料の骨伝導性制御法の開発

研究課題名（英文）Development of osteoconductive dental implant materials by calcium-modification.

研究代表者

竹内 あかり（TAKEUCHI AKARI）

信州大学・理学部・助教

研究者番号：40432918

研究成果の概要（和文）：

骨伝導性を示さないアルミナを塩化カルシウム水溶液中で水熱処理すると、アルミナ表面にカルシウムが結合した。ヒトの体液とほぼ等しい無機イオン濃度をもつ水溶液（擬似体液）を用いた骨伝導性の *in vitro* 評価、細胞培養実験、実験動物を用いた骨伝導性 *in vivo* 評価の結果より、カルシウム修飾アルミナは生体内で骨伝導性を示す可能性が高いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Alumina, which is known as a bioinert material, was hydrothermally treated with calcium chloride aqueous solution. After the treatment, calcium binding was detected on the surface of alumina. It was indicated that calcium-modified alumina had high possibility to show osteoconducivity in bone defect based on the results of *in vitro* test using a simulated body fluid, cell and animal study.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 ・ 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：インプラント、骨伝導性、アルミナ、アパタイト、水熱処理

## 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントの基盤材料として使用されているチタンは、骨結合性を示すが、骨伝導性を示さないため、即時荷重インプラントや適応領域拡大などの臨床上の要求に応えるためには骨伝導性の付与が不可欠である。

ハイドロキシアパタイトに代表される骨伝導性材料を骨欠損部に埋入すると、線維性皮膜が介在することなく、短期間で骨と直接結合する。申請者らはハイド

ロキシアパタイトなどの骨伝導性材料が骨欠損部にインプラントされた場合には①マイナス電荷の材料表面に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合する。②電荷がプラスとなった表面にリン酸イオンが結合する。③形成された非晶質リン酸カルシウムが熟成され骨様アパタイトとなり、骨芽細胞が骨を形成するというシーケンスで骨伝導が発生することに着目し、当初より材料表面にカルシウムを結合すれば骨伝導性を制御できるのではと考えた。そこでチタンを塩

化カルシウム中で水熱処理したところチタン表面に  $\text{Ca}^{2+}$  が結合すること、Ca 修飾チタンは骨芽細胞による骨形成を著しく促進することを見出した。さらに、実験動物を用いた病理組織学的探索により Ca 修飾チタンは骨伝導性材料となることを明らかにした。これまでの実験結果は材料表面を Ca 修飾することにより様々な材料に骨伝導性を付与できる可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究においては材料の骨伝導性の制御方法の確立を目的として、生体不活性材料（骨伝導性を示さない材料）であるアルミナに表面カルシウム修飾を行い、骨伝導性付与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### ① 表面カルシウム修飾条件の最適化

骨伝導性を示さないアルミナを塩化カルシウム水溶液とともに水熱処理用ボンベに置いて、種々の温度で保持した。種々の期間経過後、試料を取り出し、洗浄後、その表面を、X線光電子分光分析装置(XPS)を用いて分析した。

② 擬似体液中でのアパタイト形成能の評価  
Ca修飾アルミナをヒトの細胞外液とほぼ等しい無機イオン濃度を有する水溶液（擬似体液）に浸漬する。37°Cで種々の期間浸漬後、試料を取り出した。擬似体液に浸漬前後の試料表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) および X線回折測定装置 (XRD) を用いて分析し、表面化学修飾後の試料の擬似体液におけるアパタイト形成能を評価した。対照としては未修飾材料を用いた。

### ③ 骨髄間葉系細胞を用いた細胞接着性、細胞増殖性および分化能の評価

ラットの大腿骨を取り出し、骨周囲の軟組織を除去後、大腿骨の両端を切断し、骨髄細胞を採取した。 $\alpha$ -MEM 中で初代培養後、浮遊細胞を除いた細胞を、試料の上に播種した。細胞接着性に関しては培養 5 時間後

の接着細胞数を顕微鏡にて測定する。細胞増殖性に関しては3, 6, 9 日後の細胞数を顕微鏡にて測定する。さらに、分化能に関しては、初期分化マーカーとしてタイプ I コラーゲン、中期分化マーカーとしてはアルカリフォスファターゼ活性、後期分化マーカーとしてはオステオカルシン発現量を測定した。また、9, 15, 21 日後にアリザリンレッド染色を行いBone nodule の形成量を定量化した。

### ④ 実験動物を用いた組織学的検討

実験動物（ラット）に全身麻酔およびリドカインによる局部麻酔を行った後、切開し、大腿骨にフィッシャーバーを用いて規格化した骨欠損を形成した。骨髄腔まで貫通後、生理食塩水で周囲の骨片を除去し、表面化学修飾した試料を埋入した。種々の期間経過後、試料を周辺の骨組織とともに取り出し、固定後、マイクロX線CTを用いて骨伝導性を評価した。

## 4. 研究成果

種々の濃度の塩化カルシウム水溶液中、125°C で 7 日間水熱処理後のアルミナ表面、および、未処理のアルミナ表面の XPS 分析結果を図 1 に示す。未処理のアルミナ、および、蒸留水中で水熱処理したアルミナ表面にはカルシウムは検出されなかったのに対して、10 mmol/L および 50 mmol/L の塩化カルシウム水溶液中で水熱処理したアルミナ表面にはカルシウムが検出され、そのピーク強度は、塩化カルシウムの濃度が高くなるにつれ増加する傾向がみられた。

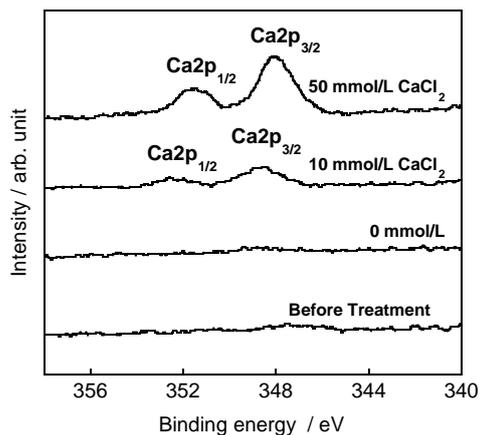


図1 種々の濃度の塩化カルシウム水溶液中で水熱処理後のアルミナ表面の XPS 分析結果

このカルシウム修飾アルミナと未処理のアルミナを擬似体液に14日間浸漬後のSEM写真を図1に示す。未処理のアルミナ表面には擬似体液に浸漬後も析出物は観察されなかったのに対して、Ca修飾アルミナ表面には粒子状の析出物が観察された。XRD分析の結果よりこの析出物はアパタイトであることが分かった。この結果より、アルミナを塩化カルシウム水溶液中で水熱処理して得られたCa修飾アルミナは骨欠損部で骨伝導性を示す可能性が高いことが示された。

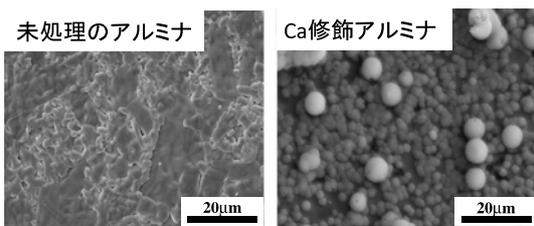


図2 未処理のアルミナおよびCa修飾アルミナを体液模倣水溶液に14日間浸漬後の走査型顕微鏡写真 Ca修飾アルミナ表面ではアパタイト層が形成され、これは生体内で骨伝導性を示す可能性が高いことがわかった。

上記の方法により調製したCa修飾アルミナ、未処理のアルミナ、ハイドロキシアパタイト焼結体への細胞親和性を調べた。Ca修飾アルミナへの細胞接着性は、未処理のアルミナへのそれよりも高く、ハイドロキシアパ

イト焼結体への接着性と同程度であった。

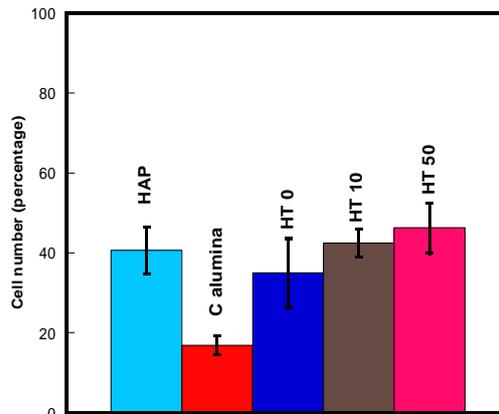


図3 種々の濃度の塩化カルシウム水溶液中で水熱処理後のアルミナ表面への細胞接着率。対照試料としてヒドロキシアパタイト(HAP)表面への接着率も示す。

Ca修飾アルミナ表面における細胞増殖性は、未処理のアルミナ表面およびハイドロキシアパタイト表面におけるそれよりも高かった。

図3に、Ca修飾アルミナおよび未処理のアルミナ表面でのBone nodule形成の結果を示す。Ca修飾アルミナ表面では未処理のアルミナよりも早期にBone noduleの形成が観察された。

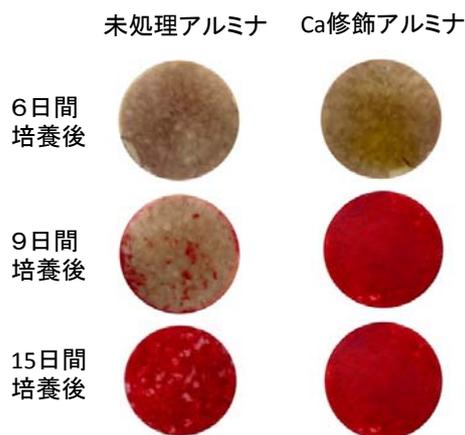


図4 骨芽細胞様細胞の培養実験によるBone nodule形成。Ca修飾アルミナ表面では細胞培養9日目にはBone noduleが形成され(赤色部分)、Ca修飾アルミナ表面では未処理アルミナより早期に骨が形成される可能性が高いことが分かった。

Ca 修飾アルミナおよび未処理のアルミナをラット大腿骨に種々の期間埋入した。マイクロ X 線 CT により分析したところ、埋入から 8 週間後には、Ca 処理アルミナ試料と周辺の骨が結合されている様子が観察された。

以上の結果より、Ca 修飾アルミナは生体内で骨伝導性を示す可能性が高いことが示唆された。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 あかり (TAKEUCHI AKARI)

信州大学・理学部・助教

研究者番号：40432918

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし