

科学研究費助成事業（科学研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792292

研究課題名（和文）

圧縮せん断法新規 Ti/HA 合金インプラント材としての臨床応用に関する基礎研究

研究課題名（英文）

Basic research about the clinical application as compression method new Ti/HA alloy implant material.

研究代表者

小貴 裕之 (ONUKI HIROYUKI)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：50598258

研究成果の概要（和文）：

本研究では HA と Ti を混合させた複合材料を圧縮せん断法によって作製し、その特性を明確にするとともに、この複合材料への培養骨芽細胞 MC3T3-E1 の接着・増殖性を検討した。1100℃で焼結した HA 分散 Ti 基複合プレート上に MC3T3-E1 細胞を播種して培養したところ、HA 体積含有率の増加に従って、MC3T3-E1 細胞の接着・増殖が抑制された。この抑制作用は、材料からの溶出成分によるものではなく、材料表面の性状に起因することも原因と考えられた。これらの結果から、本実験に用いた HA は細胞接着・増殖を抑制する作用を認め、焼結温度 1100℃の HA から部分的な分解により生成された他の物質が、細胞の接着・増殖を促進する可能性が示唆された。アパタイトの性状によって、細胞増殖活性は全く異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, there is a possibility that composites of Ti-HA were prepared by adding compressive shearing stress the adhesion proliferation of osteoblastic cells on the composites was investigated in culture cell experiments. The adhesion proliferation of MC3T3-E1 cultured cells on the composites was inversely suppressed by the increase in HA content. The inhibitory action of HA on the cell proliferation was not due to the released component from it materials, but rather the surface properties of the materials may be involved in this mechanism. These results suggest that the HA itself may inhibit the cell growth, but the compounds partially formed from HA by the 1100℃-sintering heat may induce cell growth slightly. The activity of cell proliferation may be entirely different by the nature of apatite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯科医用工学

科研費の分科・細目：再生歯学

キーワード：ハイドロキシアパタイト，チタン，複合材料，骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

医療で用いられる生体用材料には、生体組織との強い接着や骨誘導能、骨伝導能が要求されている。特に歯科・口腔外科領域では、咬合回復のための人工歯根や、顎骨骨折の固定、顎骨手術後の再建のための、骨接合用プレート、チタン（以下 Ti と略す）ミニプレートなどに応用されており、高い機能性が求められている。歯科用チタンインプラントは、骨組織、結合組織および上皮組織のいずれとも接触しつつ絶えず咬合負担を抱えている。生体活性セラミックスのコーティング技術により臨床成績は向上しているものの、咬合力など力学的な摩耗によるフレッティング疲労や、腐食と摩耗が伴ったフレッティング腐食疲労による薄膜剥離による脱落など、生体組織と材料との界面では、多くの問題が挙げられている。

Ti インプラント治療は、臨床現場において大きな役割を担っているが、前述のような組織界面間での問題の中で、骨内埋入部の表面処理に関して、最も優れた表面性状についてや、また表面処理の違いによる長期的に解明した基礎的な報告はほとんどみられず、いまだ理想的な表面処理に関しては不明である。このため異なる表面性状の Ti 合金は、細胞の接着及び増殖でどのような影響を与えるのかを把握する必要があると考えこれまでの研究を行ってきた。

過去の研究により、対数増殖期の MC3T3-E1 細胞において、Ser, Gln, Val, Ile, Leu の消費は、培養時間とともに消費が増加した。ヒドロキシアパタイト（以下 HA と略す。）でコーティングされた Ti 合金プレートとの接触により、トリプシンで回収される細胞数、および上記アミノ酸の消費の促進が観察され、細胞増殖が促進された可能性が示唆された。

これに対して、プラスト処理あるいは陽極酸化処理された Ti 合金プレートへの接触により、アミノ酸の消費の促進があるにもかかわらず、回収された細胞数の著しい減少が観察され、プレートへの強い接着性が示唆された。また、MC3T3-E1 細胞は、D-MEM 培地よりも α -MEM 培地で、より増殖が促進され、Arg を Gln と同程度消費していることが判明した。骨芽細胞でも同様に Arg の消費量が高いか否かは、今後の検討課題である。

この結果により、アミノ酸の消費量測定に基づく細胞増殖の測定法は、細胞の回収が困難な場合に有用であることを明らかにし、本法により、金属プレートと細胞との相互作用をより定量的に解析できる可能性を見出した。

圧縮せん断法により作製した Ti/HA 合金にもこの方法を応用して、インプラント材として

の臨床応用の可能性を検討するという本研究の構想に至った。

（しかし、その後研究を進めるにあたりアミノ酸分析での細胞増殖測定には、培養液そのもののアミノ酸濃度の変化を考慮すると、再現性に欠けるため、検討の結果、細胞増殖性測定には WST-1 を用いた。）

2. 研究の目的

Ti 合金および HA は、生体親和性が高く、また細胞毒性が少ないとされている。本研究において応募者は、千葉工業大学機械サイエンス学部武石教授らにより、従来の製法とは異なる圧縮せん断法により作製した Ti/HA 合金における細胞毒性の有無を、プラスチック板、Ti-6Al-4V 板、Ti 板を対照として、アミノ酸消費量を比較・検討する。

また、細胞付着の強さ・分化誘導剤に対する反応性について比較・検討し、生体において有害作用のないことを明らかにする。次に、同金属をブロック状にし、その後インプラント形状に加工したものをビーグル犬下顎骨に埋入し、従来の HA コーティングインプラントとのバイオインテグレーションの比較を検討し、臨床応用を目的としている。

3. 研究の方法

(1) HA 分散 Ti 基複合材料の作製

複合粉末を作製するための焼結用粉末は粒径 45 μm 以下で純度 99.9% の Ti 粉末（添川理化学株式会社、東京）及び、粒径 5~20 μm の HA (Ca/P 比 1.69) 粉末（太平洋化学産業株式会社、大阪）を使用した。Ti, HA 複合粉末は Ti 粉末を母材に HA 粉末を体積含有率 0, 5, 7.5, 10 vol% となるようにそれぞれ添加し、粉体混合機で 6 時間混合して作製した。作製した焼結用粉末を圧縮せん断装置の受圧板上に任意の充填形状で厚さ 2.5 mm となるように充填し、ネジの回転により加圧板を介して圧縮荷重 500 MPa を加えた。その後、圧縮荷重を負荷した状態で加圧板を水平方向に移動させることによって、焼結用粉末にせん断変形を与え固化成形した。せん断距離は 5 mm とした。圧縮荷重は荷重軸に 4 ゲージ法で結線した歪みゲージ (Type KFG-2-120-C1-11L1M2R: 株式会社共和電業、東京) を用いて測定した。圧縮せん断法による焼結用粉末の固化成形は常温大気雰囲気中で行い、作製した HA 分散 Ti 基複合材料を電気管状炉でアルゴン雰囲気中にて、Ti 粉末と強固に結合させるために焼結を行った。昇温速度 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で焼結温度まで昇温し、1 時間保持した後に炉冷した。焼結温度は HA が熱的に安定であるとされる 1100 $^{\circ}\text{C}$ とした。焼結する際に Ti の酸化防止のためタンタル箔で包み、高温下における空気中の酸素を吸収

して酸化を抑えるためにTi スポンジを使用した。本研究では、上記の製法によりHA分散Ti基複合材料を作製した。

(2) 細胞培養実験用試料の作製

圧縮せん断法により作製したHA分散Ti基複合材料(HA体積含有率0, 5, 7.5, 10 vol%)と、細胞の接着・増殖性に及ぼす影響を検討する実験における比較対照用に細胞培養用プラスチックディッシュ(Becton Dickinson Falcon, NJ, USA)を大きさ10 mm × 10 mm × 1.5 mmのプレートにしたものを作製した。またHA粉末(100%)の焼結温度(500 °C, 800 °C, 1100°C)を変化させHAプレートを上記と同様に作製した。

プレートの研磨は、HA分散Ti基複合材料プレートのみ研磨装置(Alpha Beta & Vector Grinder-Polishers and powerhead, 60-1990: Buehler, IL, USA)を用いて行った。はじめに耐水研磨紙(Silicon Carbide, #800, #1000, #1500, #2000: 三共理化学株式会社, 埼玉)を用い、次に研磨バフ(テックスメット2500: Buehler)と研磨材(サスペンション, 9 μm: Buehler)を用いて研磨を行った。さらに研磨バフ(テックスメット1500: Buehler)を使用し、研磨材(サスペンション, 3 μm: Buehler)で研磨を行い、最終仕上げ用研磨バフ(研磨用バフ, マスターテックス: Buehler)を使用し、酸化アルミニウム液体研磨材(酸化アルミニウム液体研磨材, マスタープレップ, 0.05 μm: Buehler)を用いて研磨を行った。研磨したプレートは、70%エタノールおよび超純水で順次それぞれ10分間超音波洗浄機(TOCHO, UC-0515: 株式会社上野製作所, 東京)で洗浄した。その後、超純水ですすぎ乾燥させ、オートクレーブ滅菌して細胞培養実験に使用した。

(3) 定性分析

HA分散Ti基複合材料プレートの作製過程の圧縮荷重とせん断距離および焼結温度によって、HAの結晶構造に変化が生じているかどうかを評価するために、XRD(RINT-2100: JEOL, 東京)を用いて以下の測定条件で定性分析を行った。測定条件(管電圧: 15.0 kV, 管電流: 14.0 mA, 発散スリット: 1°, 散乱スリット: 1°, 受光スリット: 1°, 照射X線: CuKα, 走査範囲: 2θ = 10° ~ 90°, スキャンスピード: 4° /min, ステップ幅: 0.02°)

(4) 面分析

HA分散Ti基複合材料プレートの表面におけるTiおよびHAの主成分であるCaとPの分布を評価するために、EPMA(JXA-8800: JEOL, 東京)を用いて以下の測定条件で定性面分析を行った。測定条件(ステージスキャン,

加速電圧: 15.0 kV, 照射電流: 7.770 × 10⁻⁸A, プローブスキャン: OFF, プローブビーム径: 0 μm, 倍率: 500倍, 測定時間: 10.00 ms, ピクセル点数 400 × 400)

(5) 細胞培養

培養骨芽細胞には、C57BL/6系マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞前駆細胞株MC3T3-E1(DSファーマバイオメディカル株式会社, 大阪)を用いて接着・増殖性を調べた。MC3T3-E1はalpha minimum essential medium(α-MEM; GIBCO BRL, NY, USA)を用い、ペニシリンGカリウム(100 units/ml; 明治製菓, 東京), 硫酸ストレプトマイシン(100 μg/ml; 明治製菓, 東京)を添加した。10%牛胎仔血清(FBS; 株式会社ニチレイバイオサイエンス, 東京)を添加した培地を用い、37°C, 5%CO₂, 100%湿度の環境下で細胞を培養し、0.25%trypsin(SIGMA-ALDRICH, MO, USA)と0.025%EDTA(和光純薬工業株式会社, 大阪)を含有するPBS(-)にて細胞を剥離後、培養液で希釈して継代した。

(6) 表面観察

走査電子顕微鏡(以下、SEMと略す; JSM-6360LV: JEOL, 東京)を用いて、焼結粉末のTi粉末、HA粉末およびHA分散Ti基複合材料プレートの表面観察を行った。細胞をPBS(-)で洗浄し、2%グルタルアルデヒドで固定処理後に乾燥させ、真空蒸着装置を用いてAu蒸着(200 Å)し、各プレート上に接着・増殖した細胞の形態観察を行った。

(7) 細胞増殖性測定

細胞数測定にはWST-1(Cell Counting Kit, 以下、WST-1と略す; 株式会社同仁化学研究所, 熊本)を用い、溶液中に発生するsuperoxide(O₂⁻)を消去する目的で、superoxide dismutase(以下、SODと略す; SIGMA-ALDRICH, MO, USA)を終濃度300 units/mlで用いた。24穴プレート(Becton Dickinson Falcon, NJ, USA)上に滅菌処理した各プレートを配置しMC3T3-E1細胞を4 × 10⁴ cells/ml(750 μl)となるように播種して72時間培養して付着させた。滅菌ピンセットを用いて細胞の付着したプレートをWST-1(75 μl)を含有する培地(825 μl)を含む24穴プレートに移した。1.5時間培養後に、その100 μlを96穴マイクロプレート(Becton Dickinson Falcon)に移し、細胞内脱水素酵素によってWST-1が還元されて生成する水溶性ホルマザンの吸光度を、マイクロプレートリーダー(Multiskan Bichromatic, 大日本製薬, 東京)(波長: 450 nm)を用いて測定し、細胞接着・増殖を評価した。数値は、コントロール群を100%として(% of control)示した。

また HA 分散 Ti 基複合プレートおよび焼結用粉末からの溶出した成分が MC3T3-E1 細胞の増殖に与える影響を調べるため、2000ml の培地を含む 6-穴プレート (Becton Dickinson Falcon) に滅菌処理した HA 分散 Ti 基複合プレート (HA 体積含有率 0, 5, 7.5, 10 vol%) および焼結用粉末 (HA 体積含有率 0, 5, 7.5, 10 vol%) を置いて 24 時間インキュベートした。その培地の遠心上清 (50 μ l) と 8×10^4 cells/ml のトリプシンで剥離・浮遊させた MC3T3-E1 細胞 (50 μ l) を混合し 96-穴マイクロプレートに播種して 48 時間培養して付着させた。その後、WST-1 (10 μ l) を添加し 1.5 時間培養後、上記と同様に吸光度測定を行い、細胞接着・増殖を評価した。数値は、コントロール群を 100%として (% of control) 示した。

(8) 統計学的分析

2 群間の有意差の検定は Student's t-test で行った。

4. 研究成果

本研究では HA と Ti を混合させた複合材料を圧縮せん断法によって作製し、その特性を明確にするとともに、この複合材料への培養骨芽細胞 MC3T3-E1 の接着・増殖性を検討した。圧縮せん断法により作製した HA 分散 Ti 基複合材料の特性を解析し、この複合材料に対する MC3T3-E1 細胞の接着・増殖性を細胞生物学的に検討して、HA の問題点と改善のための方向性を得た。

(1) HA は圧縮荷重やせん断距離そして 800°C では、その結晶特性に影響を与えなかったが、1100°C の焼結温度によって部分的な分解が認められた。

(2) EPMA の面分析から、1100°C で焼結された HA 分散 Ti 基複合材料表面には、HA 主成分である P の分布は HA 体積含有率増加と一致したが、Ca 分布は不一致であった。

(3) HA 分散 Ti 基複合材料上の MC3T3-E1 細胞の接着・増殖は、HA 体積含有率の増加によって抑制された。この抑制作用に複合材料からの溶出成分の影響は認められなかった。HA の存在は、細胞からの O_2 生成を減少させた。

(4) 焼結温度 500°C, 800°C の HA プレート上では、細胞は接着・増殖しなかったが、1100°C 上には、細胞の接着・増殖が認められた。

本実験に用いた HA は細胞接着・増殖を抑制する作用を認め、焼結温度 1100°C の HA から部分的な分解により生成された他の物質が、細胞の接着・増殖を促進する可能性が示唆された。アパタイトの性状によって、細胞増殖活性は全く異なる可能性が示唆された。それを決定づける化学的・細胞生物学的な機序の詳細は未だ不明であり、今後明らかにすべき課題と考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

小貫 裕之 (ONUKI HIROYUKOI)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号 : 50598258

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

