

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592966

研究課題名(和文) 創傷治癒と骨形成を促進するチタンインプラントの表面処理

研究課題名(英文) Antioxidant and osteogenic properties on a modified titanium implant

## 研究代表者

柴田 陽 (Shibata, Yo)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30327936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント表面での酸素供給は創傷治癒に大きく貢献するが、金属材料でこれを達成することは容易でない。一方、漂白剤に用いられる過炭酸ナトリウムを表面に分散させた高分子膜が細胞内酸化ストレスを抑制し、in vivoで創傷治癒を促進する作用が近年報告された。我々はリン酸二水素ナトリウム溶液中で放電用陽極酸化処理したチタン表面がヒドロキシラジカルを発生し、表面疎水性炭化水素の吸着を防止することから優れた生体適合性を長期間持続することを報告した。またチタンインプラントの放電陽極酸化処理は、ヒドロキシラジカル発生により周囲軟組織細胞の酸化ストレスを抑制すると同時に骨形成能を向上させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cells adhering onto implant surfaces are subjected to oxidative stress during wound healing processes. Although titanium and its alloys are among the most frequently used biomaterials in orthopedic and dental implants, titanium surfaces do not have antioxidant properties, and cells grown on these surfaces can show permanent oxidative stress. The present study assessed the antioxidant property and osteogenic properties of titanium samples with or without oxidation treatments. A thick rutile TiO<sub>2</sub> film was observed on thermally oxidized titanium surfaces, while amorphous anatase TiO<sub>2</sub> formed on anodically oxidized titanium surfaces prepared by discharging in 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. A resistance to the depletion of reduced glutathione in adherent osteoblasts, which correlates with antioxidant behavior, occurred on anodically oxidized titanium. Enhanced osteogenic gene expressions and nano-biomechanical properties of mineralized tissue were achieved on anodically oxidized titanium.

研究分野：歯科理工学

キーワード：チタン インプラント 酸化ストレス 細胞

### 1. 研究開始当初の背景

チタンインプラントは表面微細構造や化学構造修飾により、骨結合能を改善することができる。しかし、インプラント埋入時の創傷治癒に関連する血管内皮細胞、歯肉上皮の基底細胞さらにマクロファージは、酸化ストレスの影響により再生能力が低下することが報告されている。酸素供給ができない金属チタン表面では接着細胞の酸化ストレスが上昇するため、インプラント埋入後の創傷治癒が遅延される。これは細胞内ミトコンドリアの呼吸抑制により細胞内で活性酸素が発生し、接着細胞の抗酸化物質（還元型グルタチオン）が減少する（＝酸化ストレス上昇）ためと考えられている。したがってチタンインプラントでは表面改質により接着細胞への酸素供給を行い、酸化ストレス抑制による創傷治癒を促進することが重要である。

インプラント表面での酸素供給は創傷治癒に大きく貢献するが、金属材料でこれを達成することは容易でなく、研究報告は見られない。一方、漂白剤に用いられる過炭酸ナトリウムを表面に分散させた高分子膜が細胞内酸化ストレスを抑制し、*in vivo* で創傷治癒を促進する作用が近年報告された。これは漂白剤から発生したラジカルが水と酸素に分解され、周囲軟組織細胞に対する酸素供給が上昇することに起因すると考えられている。チタンインプラント表面でのラジカル発生が、周囲軟組織の酸化ストレス抑制に効果的な可能性がある。

### 2. 研究の目的

インプラント治療は人工物を生体に埋入する手術であり、創傷治癒の遅延により早期の骨結合が阻害される。本研究の目的は、チタンインプラント埋入時の創傷治癒と骨形成を促進する表面処理法を新規に開発することである。

### 3. 研究の方法

表面研磨チタン、大気加熱処理チタン、放電陽極酸化チタン、および陽極酸化後に加熱処理したチタンの表面化学分析により、ヒドロキシラジカルや親水性化学官能基の同定を行った。試料表面で骨芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞を培養し、酸化ストレスの指標であるトータルグルタチオンをリアルタイム定量することにより、チタン表面化学特性と酸化ストレス抑制能を検討した。ddYマウス頭蓋骨から採取した骨芽細胞をカルチャープレート上で培養し、骨分化誘導因子である BMP2 の添加により骨基質の発現量を上昇させ、石灰化組織を形成した。細胞が産生した幼弱なコラーゲン分子は、リジン残基の酸化により架橋反応が亢進され、生体組織が形成される。Lysyl oxidase などの酸化酵素を添加することにより骨基質の架橋構造を変化させ、ナノインデンテーション法とレーザーラマン分光法により、チタンサンプル上の石灰化組織と物理化学的特性を比較分析した。

### 4. 研究成果

リン酸二水素ナトリウム溶液中で放電用陽極酸化処理したチタン表面がヒドロキシラジカルを発生し、表面疎水性炭化水素の吸着を防止することから優れた生体適合性を長期間持続することがあきらかとなった。電解液中でのチタン陽極酸化処理は、アモルファスのアナターゼ型チタン酸化膜を成長させる。このチタン酸化膜内には  $Ti^{4+}$  と  $O^{2-}$  の正孔電子対が残存しており、大気中の酸素や水分と反応することで、ヒドロキシラジカルと親水基が維持される。放電陽極酸化チタンプレートを脱イオン水中に浸漬すると、表面ヒドロキシラジカルの分解により、経時的な溶存酸素濃度が上昇することを見出した。放電陽極酸化処理チタンは加熱により結晶性を向上させることで、表面微細構造を変化させることなく、ヒド

ロキシラジカルの発生のみを抑制することができる。ヒドロキシラジカル発生を抑制したネガティブサンプルでは、溶存酸素濃度の上昇が見られない。したがって、酸素供給のできる放電陽極酸化処理チタン表面は、接着細胞の酸化ストレスを抑制する効果が期待できる。

機能性バイオマテリアルであるインプラントでは、新生骨の物理化学的特性とバイオメカニクスが重要である。ヒドロキシラジカルを発生する放電陽極酸化処理チタン表面では、骨石灰化マーカー遺伝子 (*Opn*, *Ocn*, *Bsp2*) だけでなく、石灰化能が著しく上昇する。ddY マウス頭蓋骨から採取した骨芽細胞を放電陽極酸化処理チタン表面で培養することにより *in vitro* で析出した石灰化組織の化学的特性は、コラーゲンマトリクスの架橋構造が増加し、骨や象牙質と同様のリン酸カルシウム・コラーゲン複合体であった。また石灰化組織の微小機械特性は、硬さ・弾性係数ともに骨や象牙質での値に類似している。一方、加熱によりヒドロキシラジカルの発生が抑制された放電陽極酸化チタンサンプルでは、骨石灰化マーカー遺伝子上昇がみられるものの、培養後に形成された石灰化組織の物理化学的特性は著しく低下した。カルチャープレート上で骨分化誘導因子添加により骨芽細胞分化を向上させた培養条件でも、石灰化組織の物理化学特性は同様に低い。したがって、チタンインプラント表面の石灰化能向上にはヒドロキシラジカルによる骨基質やマトリクスタンパクの架橋構造促進が必要であると考えられる。チタンインプラントの放電陽極酸化処理は、ヒドロキシラジカル発生により周囲軟組織細胞の酸化ストレスを抑制すると同時に骨形成能を向上させる可能性が示唆された。

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)

(雑誌論文)(計 14 件)

1. Maruyama N., Shibata Y., Mochizuki A., Yamada A., Maki K., Inoue T., Kamiyo R., Miyazaki T. Bone micro-fragility caused by the mimetic aging processes in *α-klotho* deficient mice: *in situ* nanoindentation assessment of dilatational bands. **Biomaterials** 47: 62-71, 2015 (査読有)
2. Inami T., Tanimoto Y., Yamaguchi M., Shibata Y., Nishiyama N., Kasai K. Surface topography, hardness, and frictional properties of GFRP for esthetic orthodontic wires. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials** DOI: 10.1002/jbm.b.33372 (in press) (査読有)
3. Wurihan, Yamada A., Suzuki D., Shibata Y., Kamiyo R., and Miyazaki T. Enhanced *in vitro* biological activities generated by surface characteristics of anodically oxidized titanium- the contribution of the oxidation effect. **European Cells and Materials** 29: 290-302, 2015 (査読有)
4. Miyamoto S., Miyamoto Y., Shibata Y., Yoshimura K., Izumida E., Suzuki H., Miyazaki T., Maki K., Kamiyo R. *In-situ* quasi-static and dynamic nanoindentation tests on calcified nodules formed by osteoblasts: Implication of glucocorticoids responsible for osteoblast calcification. **Acta Biomaterialia** 12: 216-226, 2015 (査読有)
5. Maruyama N., Shibata Y., Wurihan, Swain M., Kataoka Y., Takiguchi Y., Yamada A., Maki K. and Miyazaki T. Strain-rate stiffening of cortical bone: observations and implications from nanoindentation experiments. **Nanoscale** 6(24): 14863-14871, 2014 (査読有)
6. Sato M., Fujishima A., Shibata Y., Miyazaki T. Nanoindentation tests to assess polymerization of resin-based luting cement. **Dental Materials** 30(9):1021-1028, 2014 (査読有)
7. Jang I.K., Tanaka R., Wurihan, Suzuki D., Shibata Y., Fujisawa N., Tanimoto Y., Ogura K., Kamiyo R., and Miyazaki T. Nanomechanical properties and molecular structures of *in vitro* mineralized tissues on anodically-oxidized titanium surfaces. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 10(3):629-637, 2014 (査読有)
8. Shibata Y. Suzuki D., Wurihan, Yamada A.,

- Maruyama N., Fujisawa N., Kamijo R., Miyazaki T. Lysyl oxidase like-2 reinforces unsatisfactory ossification induced by bone morphogenetic protein-2: relating nanomechanical properties and molecular changes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine** 9(7):1036-1047, 2013 ( 査読有 )
9. Inami T., Tanimoto Y., Ueda M., Shibata Y., Hirayama S., Yamaguchi M., and Kasai K. Morphology and *In Vitro* Behavior of Electrospun Fibrous Poly(D,L-lactic acid) for Biomedical Applications. **Advances in Materials Science and Engineering** Article ID 140643, 2013 ( 査読有 )
10. Ogura K., Tanaka R., Shibata Y., Miyazaki T., Hisamitsu H. In vitro demineralization of tooth enamel subjected to two whitening regimes. **Journal of the American Dental Association** 144(7):799-807, 2013( 査読有 )
11. Liu D., Matinlinna J.P., K.H.T. James, H.N.P. Edmond, Miyazaki T., Shibata Y., Kan C.W. A new modified laser pretreatment for porcelain zirconia bonding. **Dental Materials** 29(5):559-565, 2013 ( 査読有 )
12. Tanimoto Y., Teshima M., Nishiyama N., Yamaguchi M., Hirayama S., Shibata Y., Miyazaki T. Tape-cast and sintered  $\beta$ -tricalcium phosphate laminates for biomedical applications: Effect of milled  $Al_2O_3$  fiber additives on microstructural and mechanical properties. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials** 100(8):2261-2268, 2012 ( 査読有 )
13. Iwai-Yoshida M., Shibata Y., Wurihan, Suzuki D., Fujisawa N., Tanimoto Y., Kamijo R., Maki K. and Miyazaki T. Antioxidant and osteogenic properties of anodically oxidized titanium. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials** 13:230-236, 2012 ( 査読有 )
14. Murakami A., Arimoto T., Suzuki D., Iwai-Yoshida M., Otsuka F., Shibata Y., Igarashi T., Kamijo R. and Miyazaki T. Antimicrobial and osteogenic properties of a hydrophilic-modified nanoscale hydroxyapatite coating on titanium. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** 8(3):374-382, 2012( 査読有 )

[学会発表](計 4件)

1. Shibata Y. Nanoindentation tests to assess polymerization quality of resin-based luting cement. (3<sup>rd</sup>

trilateral dental symposium on "Advance in zirconia and its use as a dental material" 15<sup>th</sup> June 2014 Tokyo, Japan)

2. Shibata Y., Suzuki D., Wuirhan, Yamada A., Maruyama N., Kamijo R., Miyazaki T. Nanomechanical testing technology for in vitro mineralized tissue. (2<sup>nd</sup> meeting of IADR-APR, 2013年8月21日, タイ バンコク)
3. Shibata Y. Nanomechanical testing technology for engineered tissue. (2<sup>nd</sup> trilateral dental symposium on "dental virtual education today" 14<sup>th</sup> Oct. 2013 Tokyo, Japan)
4. Shibata Y. How do we achieve antimicrobial activity as well as osteoconductivity? (Sir John Walsh Research Institute Seminar Series, 18<sup>th</sup> Apr. 2012, New Zealand Dunedin)

[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:  
出願年月日:  
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

柴田 陽 (Shibata Yo)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号: 30327936

##### (2) 研究分担者

宮崎 隆 (Miyazaki Takashi)  
昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：40175617

美島 健二 (Mishima Kenji)  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：50275343

山田 篤 (Yamada Atsushi)  
昭和大学・歯学部・講師  
研究者番号：50407558

吉田美智 (Yoshida Misato)  
昭和大学・歯学部・兼任講師  
研究者番号：50555109

(3)連携研究者

( )

研究者番号：