

表2 アルブミンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of albumin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	1.28E+06	7.84E-07	1.50E+03	1.18E-03
PHM7525	1.31E+06	7.64E-07	1.51E+03	1.15E-03
PHM5050	1.26E+06	7.93E-07	1.49E+03	1.18E-03
PHM2575	1.30E+06	7.68E-07	1.52E+03	1.17E-03
PMEA	1.33E+06	7.54E-07	1.51E+03	1.14E-03

表3 フィブリノーゲンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of fibrinogen			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	2.49E+07	4.01E-08	2.37E+04	9.49E-04
PHM7525	2.23E+07	4.48E-08	2.26E+04	1.01E-03
PHM5050	2.20E+07	4.54E-08	2.29E+04	1.04E-03
PHM2575	2.01E+07	4.97E-08	2.18E+04	1.08E-03
PMEA	1.24E+07	8.05E-08	1.85E+04	1.49E-03

表4 フィブロネクチンの吸着挙動

Polymer	Adsorption of fibronectin			
	K_a (M^{-1})	K_d (M)	K_{on} ($M^{-1} \cdot sec^{-1}$)	K_{off} (sec^{-1})
PHEMA	6.02E+06	1.66E-07	1.78E+04	2.96E-03
PHM7525	5.71E+06	1.75E-07	1.74E+04	3.05E-03
PHM5050	5.23E+06	1.91E-07	1.60E+04	3.07E-03
PHM2575	5.34E+06	1.87E-07	1.65E+04	3.09E-03
PMEA	5.03E+06	1.99E-07	1.56E+04	3.09E-03

分担研究報告書
厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名
材料表面近傍の水和状態とタンパク質吸着挙動解析

研究分担者 石原一彦 (東京大学大学院工学系研究科 教授)

研究要旨

タンパク質の溶存状態での高次構造の維持、材料表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質のコンフォメーション変化には、静電相互作用、水素結合さらに疎水性相互作用など種々の分子間相互作用が影響を与える。同時に、これらの相互作用は水を媒体として作用する力である。これらのことから、タンパク質吸着現象には、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用の両者が強く関与すると考えられる。そこで本研究では、表面特異的な水和構造および表面で働く分子間相互作用が、材料表面とタンパク質との間に働く相互作用に与える影響を定量的に解析することを目的とする。本年度は、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定を用いることで、タンパク質吸着挙動を分子間相互作用の観点から解析した。構造が明確であると同時に、広範囲にわたる界面科学的特性を有する表面を、種々のモノマーユニットからなる高密度ポリマーブラシ構造を用いて構築した。作製したモデル表面に対するタンパク質および官能基の直接的な相互作用は、ポリマーブラシ表面により大きく異なったが、タンパク質とほとんど相互作用しない双性イオン型ポリマーブラシ表面では、タンパク質に存在している官能基との相互作用がほとんど検出されなかった。また、ポリマーブラシ表面近傍で作用する分子間相互作用の種類、大きさ、伝播範囲を解析することにより、双性イオン型ポリマーブラシ表面では、静電的相互作用および疎水性相互作用が働いていないことが明らかとなった。これまでに確立した表面特異的な水和構造および分子間相互作用の解析手法は、タンパク質吸着挙動の理解につながるとともに、タンパク質から認識されない表面設計を提示することを可能とする。

A. 研究目的

バイオマテリアルが生体環境と接した際に誘起される細胞レベルの初期生体反応の多くに吸着タンパク質層の特性が関連している。このため、材料表面における生体反応を高度に規定し、医療機器開発に関する規制環境を整備するためには、タンパク質吸着過程を正確に把握することが必要不可欠である。材料表面の吸着タンパク質層は、タンパク質が材料表面と直接相互作用して形成される単層吸着層と、単層吸着層を形成するタンパク質の変性等を引き金として起こる多層吸着層から形成される。このようなタンパク質吸着層の成り立ちから、タンパク質吸着過程を正確に理解するためには、材料表面における吸着タンパク質の量、組成、分布、コンフォメーション、配向などの静的な特性評価はもとより、タンパク質の競争的吸着や吸着後の変性過程などに関わる動的な特性の解析が重要である。しかしながら、タンパク質吸着の動的特性は、静的特性の経時的変化として解析されることが多く、その起源は明確にされていない。そこで本研究では、材料表面とタンパク質との間に働く分子間相互作用の観点からタンパク質吸着挙動を解析する方法論を確立する。これは、タンパク質が表面と相互作用する際の駆動力を明確にできるため、タンパク質吸

着現象の動的特性の起源を明らかにできる。具体的には、現在界面科学の研究分野で大きな発展を遂げているコロイドプローブ科学に着目し、タンパク質を固定化したプローブと材料表面間にナニュートンオーダーで働く相互作用を原子間力顕微鏡(Atomic force microscopy, AFM)のフォースカーブ測定により定量する方法を利用した。

タンパク質の溶存状態での高次構造の維持、材料表面へのタンパク質吸着や吸着タンパク質のコンフォメーション変化には、静電相互作用、水素結合さらに疎水性相互作用など種々の分子間相互作用が影響を与える。同時に、これらの相互作用は水を媒体として作用する力である。これらのことから、タンパク質吸着現象には、材料表面における水分子のネットワーク構造(水和構造)と材料表面近傍で働く分子間相互作用の両者が強く関与すると考えられる。そこで本研究では、表面特異的な水和構造および表面で働く分子間相互作用が、材料表面とタンパク質との間に働く相互作用に与える影響を定量的に解析することを目的とする。

材料表面における水和構造や分子間相互作用は非常に微細であるため、これらを定量的に分析するためには構造明確な表面が必要不可欠である。そこで本研究では、様々なモノマーユニット

を用いて構築したポリマーブラシ構造をモデル表面として利用した。

これまで、マイクロオーダーのシリカ粒子を用いてナノオーダーの微小空間を構築し、そこに封入された水分子の特性を核磁気共鳴法により高い時間分解能で評価する方法論を確立した。これにより、シリカ粒子表面を覆ったポリマーブラシ層の特性に強く影響されたナノ間隙水の磁気緩和時間や自己拡散係数を定量的に評価することで、ポリマーブラシ層の化学構造に対応した表面特異的な水和構造を解析してきた。

本年度は、タンパク質や材料表面に存在する官能基同士の相互作用や材料表面で作用する分子間相互作用に着目した。つまり、様々な分子により修飾された AFM プローブを用いてフォースカーブ測定を行うことで、プローブと材料表面間に働く種々の相互作用を定量的に評価するとともに、これらが、タンパク質との相互作用に与える影響について議論した。

B. 研究方法

1. ポリマーブラシ表面の構築

シリコン基板に原子移動ラジカル重合(ATRP)の開始基を固定した後、表面開始型 ATRP (SI-ATRP)法を用いて、下記に示すポリマーブラシ層を構築した(図 1)。ポリマーブラシ層を構築する際のモノマー濃度とフリー重合開始剤の比は 100 とした。双性イオン性モノマーとして、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) (ホスホベタイン型)を、カチオン性モノマーとして、trimethylammoniummethyl methacrylate (TMAEMA) (トリメチルアンモニウム基)を、アニオン性モノマーとして、3-sulfopropyl

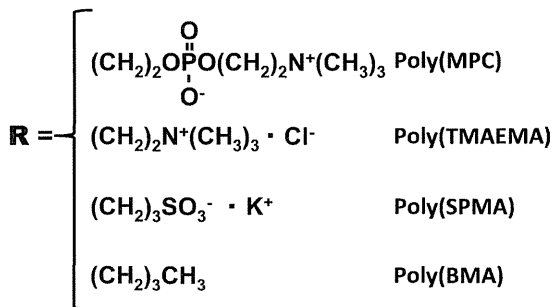
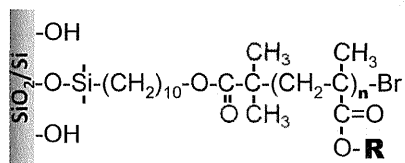


図 1. 作製されたポリマーブラシ層の化学構造。

methacrylate (SPMA) (スルホプロピル基)を、疎水性モノマーとして、*n*-butyl methacrylate (BMA) (ブチル基)をそれぞれ用いた。

作製したポリマーブラシ表面の物理化学的な構造および表面特性を X 線光電子分光(XPS)測定、原子間力顕微鏡(AFM)、分光エリプソメーター、動的接触角測定、および表面ゼータ電位測定(10 mmol/L の NaCl 水溶液中)により評価した。

2. 二表面間の相互作用測定

図 2 に示すような AFM のフォースカーブ測定により、様々な表面間に働く相互作用を測定した。本研究では、タンパク質、種々の官能基を有する SAM 膜および同化学種のポリマーブラシ層をカンチレバーに固定化した。直接的な相互作用を定量する際には、接近/接触したカンチレバーを表面から引き離す際に引力側へ変位する力を相互作用と定義した。また、間接的に働く遠距離力を評

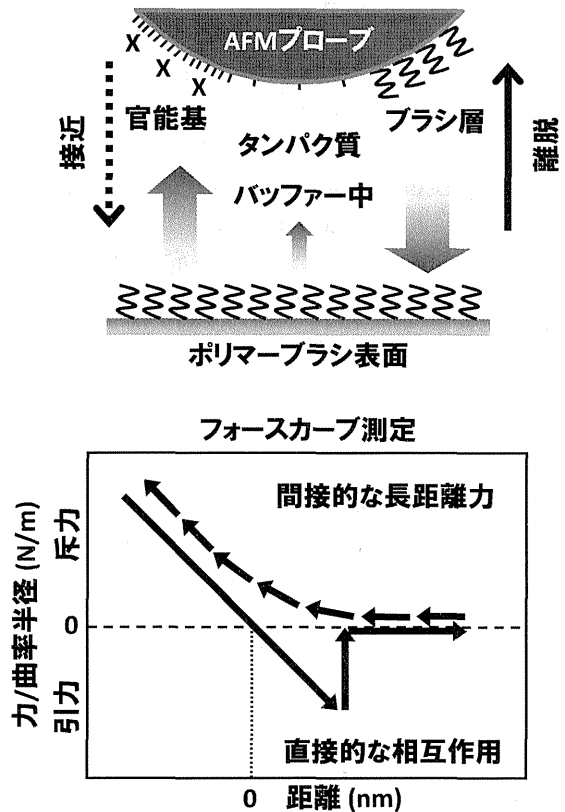


図 2. 原子間力顕微鏡を利用した分子間力相互作用の解析方法。

価する際には、カンチレバー表面とポリマーブラシ表面とが接近する際に変位する力を評価した。

タンパク質との直接的な相互作用

タンパク質として、ウシ血清アルブミン(BSA)およびニワトリ卵白由来リゾチーム(Lys)を使用

し、各ポリマーブラシ表面との間に働く直接的な相互作用を、下記に従い定量した。

金薄膜をスパッタした Si_3N_4 製カンチレバー(曲率半径: 45 nm)を作製し、表面にカルボキシル基末端自己組織化単分子(SAM)膜を形成させた。同カンチレバーを 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl)carbodiimide hydrochloride (0.10 mol/L)と N-hydroxy succinimide (0.05 mol/L)の水溶液に30分間浸漬した。純水による洗浄後、直ちに各タンパク質のリン酸緩衝液(PBS)に浸漬し、37°Cで1時間静置した(BSA: 1.0 mg/mL, Lys: 0.3 mg/mL)。表面を PBS により洗浄した後、得られたタンパク質固定化カンチレバーを、室温の PBS 中におけるフォースカーブ測定に使用した。各ポリマーブラシ表面に対し、アプローチカーブとリトラクトカーブの最大変位差を100箇所程度測定し、その平均値を直接的な相互作用と定義した。

官能基との直接的な相互作用

プローブレスカンチレバーの先端に直径が 20 μm のシリカ粒子を手動で固定化し、そこに接着層としてクロムを 3.0 nm、続いて金薄膜を 27 nm スパッタした。同カンチレバー表面に、11-mercapto-undecanoic acid、11-amino-1-undecanethiol (hydrochloride)、および 1-dodecanethiol のエタノール溶液(1.0 mmol/L)を用いて、それぞれカルボキシル基、アミノ基およびメチル基末端の SAM 膜を形成した。作製したカンチレバーを用いて、室温の PBS 中における各ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用を定量した。

ポリマーブラシ層同士の間接的長距離力

前述の直径 20 μm のシリカ粒子を用いて、1と同様の手法により、図1に示したポリマーブラシ層を構築し、プローブレスカンチレバー先端にこれを固定した。作製したカンチレバーを用いて、様々な塩濃度の水環境下にて、同種のポリマーブラシ表面間に働く遠距離力を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、合成高分子やタンパク質を使用するものであるため、倫理面に関して特段の配慮は不要であると判断した。

C. 研究結果および D. 考察

1. ポリマーブラシ表面の構造および特性

作製されたポリマーブラシ表面は、エリプソメトリーから乾燥膜厚が 10 nm 程度であり、原子間力顕微鏡(AFM)による高さ観察から、乾燥状態で比較的小さい凹凸構造を有し、表面粗さの指標で

ある二乗平均平方根(RMS)値は 1.0 nm 以下であった。表1より、各ポリマーブラシ表面のグラフト密度はすべて 0.10 chains/nm² を超えており、作製されたポリマーブラシ層が高密度領域にあることがわかった。グラフト密度とポリマー鎖の断面積から表面被覆率を概算した結果、グラフト鎖で被覆されていない下地表面は 1.0 nm 以下のオーダーであり、数ナノメートルのオーダーを有するタンパク質と比べて十分小さかった。つまり、作製されたポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着において、タンパク質の下地表面への直接的な吸着(一次吸着)やグラフトポリマー鎖間への吸着(三次吸着)は回避され、ポリマーブラシ層最表面への吸着が支配的であることが示唆された。

生体応答が誘起される水環境下での表面特性を示す水中の気泡の接触角は、疎水性の側鎖を有する poly(BMA)ブラシ表面を除いて一様に小さい値となった。また、10 mmol/L の塩化ナトリウム水溶液における表面電位は、ポリマー自体が有する荷電特性と同様の傾向であった。ただし、poly(BMA)は側鎖に電荷を持たないにも関わらず、負の電荷を有する表面であった。これは疎水性表面に観測される現象であり、表面への電解質イオンの吸着に由来すると考えられる。このように、高密度ポリマーブラシ層により、均一な構造を有し、ポリマー鎖の配置がナノメートルオーダーで明確である表面を構築した。また、様々な化学構造を有するグラフト鎖を配置することで、濡れ性

表 1. ポリマーブラシ表面の特性.

Polymer	Graft density (chains/nm ²)	Water contact angle (deg)		ζ -potential* (mV)
		In air	In water	
Poly(MPC)	0.33	10	9	-5.9
Poly(TMAEMA)	0.45	17	17	64.9
Poly(SPMA)	0.55	11	13	-74.0
Poly(BMA)	0.75	86	73	-37.2

重合度100. * 10 mmol/L NaCl aqueous solution.

や表面電位などに代表される界面科学的な表面特性を広範囲に制御した。

2. ポリマーブラシ表面とタンパク質との直接的相互作用

本研究では、生理条件下でそれぞれ全体として、負および正の正味電荷を有するタンパク質である BSA および Lys を用いた。図3に示すように、ポリマーブラシ表面とタンパク質との相互作用は、その組み合わせにより大きく異なった。BSA との相互作用はカチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面で最大であった。これは、poly(TMAEMA)表面の正電荷と BSA の有する負電荷との間の静電的な引力に起因すると考えられる。また、アニオン性の側鎖を有する

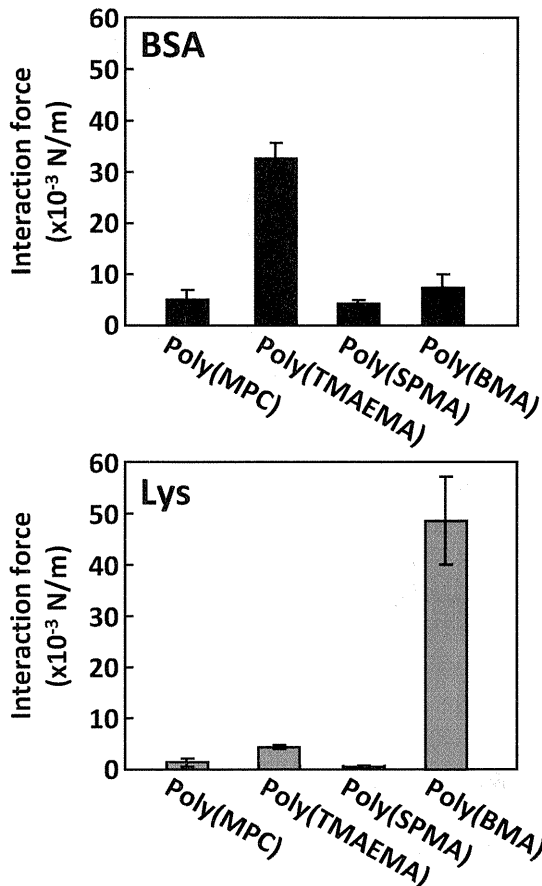


図 3. ポリマーブラシ表面に対するタンパク質の相互作用.

poly(SPMA)ブラシ表面に対する BSA の相互作用は小さかった。これは、負電荷同士の斥力に起因すると考えられる。一方、正の正味電荷を有する Lys は、疎水性の側鎖およびアニオン性の電位を有する poly(BMA)ブラシ表面と強く相互作用した。しかしながら、Lys と poly(SPMA)との相互作用は非常に小さかった。この理由は現時点では明らかではないが、塩強度の強い PBS 中にて、溶液中に存在するイオンにより静電的な相互作用が遮蔽されていることが考えられる。タンパク質の正味電荷に関わらず、双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面はタンパク質との相互作用が非常に小さかった。

3. ポリマーブラシ表面と官能基との直接的相互作用

様々な官能基により修飾したプローブを用いてフォースカーブ測定を行い、ポリマーブラシ表面と官能基との間に働く相互作用を定量的に評価した(図 4)。選択した官能基はカルボキシル(COOH)基、アミノ(NH₂)基およびメチル(CH₃)基であり、これらはタンパク質中に多く存在する代表的な官能基であると同時に、それぞれアニオン性、カチオン性および疎水性の特性を有するため、

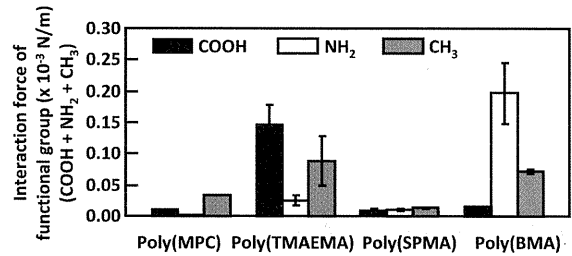


図 4. ポリマーブラシ表面に対する官能基の相互作用.

静電的相互作用や疎水性相互作用の指標になると考えられる。双性イオン性の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面はいずれの官能基との相互作用も極めて小さかった。この結果から、poly(MPC)ブラシ表面では静電的相互作用や疎水性相互作用に由来する力がほとんど働かないことが示唆される。また、水中の気泡の接触角および表面電位から、これらの表面が水環境下において高い親水性かつ電的に中性を有する表面であったこととも一致する。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面はカルボキシル基との特に強い相互作用を示した。これは、poly(TMAEMA)の側鎖に存在する正電荷と、解離したカルボキシル基(COO⁻)の負電荷との間に強い静電的引力が働いていることを示す。疎水性の側鎖を有する poly(BMA)ブラシ表面はメチル基およびアミノ基との強い相互作用を示した。メチル基との強い相互作用は、水中において働く疎水性相互作用に由来すると考えられる。同時に上述のように、poly(BMA)ブラシ表面はアニオン性であったため、プロトン化したアミノ基(NH₃⁺)の正の電荷との間の静電的相互作用に由来する力が働いたと考えられる。一方で、アニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面は PBS 中ではいずれの官能基との相互作用も示さなかった。しかしながら、純水中においては poly(SPMA)ブラシ表面とアミノ基との強い相互作用が観測された。このため、poly(SPMA)表面では、塩強度の強い PBS 中において、静電的相互作用が静電遮蔽の効果をを受けているものと考えられる。以上のように、様々な官能基で修飾されたプローブを用いたフォースカーブ測定により、ポリマーブラシ表面に働く分子間相互作用の一部を定量的に明らかとした。

バイオマテリアル表面における官能基レベルの相互作用が、タンパク質との相互作用に与える影響を定量的に評価することは、タンパク質吸着挙動のさらなる理解へと繋がる。図 5 に、ポリマーブラシ表面におけるタンパク質の相互作用と官能基との相互作用の総和との関係を示す。図 5 より、官能基との相互作用の総和が小さいポリマ

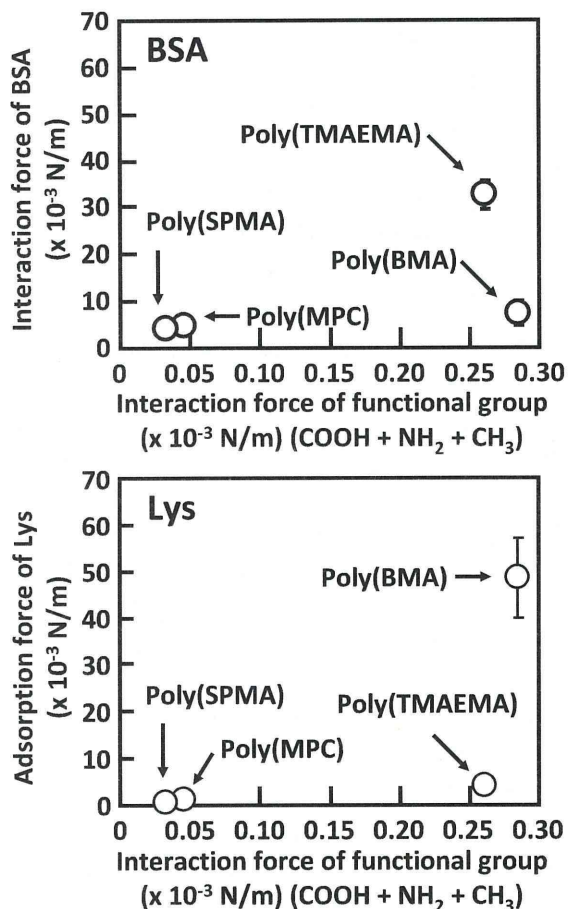


図 5. 各ポリマーブラシ表面におけるタンパク質との相互作用と官能基との相互作用の関係。

ーブラシ表面と大きいポリマーブラシ表面に分けることができる。官能基との相互作用の総和が小さいポリマーブラシ表面は、タンパク質の正味電荷によらず、タンパク質との相互作用が小さいことが示された。一方、官能基との相互作用の総和が大きいポリマーブラシ表面では、同等の総和であってもポリマーブラシ表面とタンパク質との組み合わせにより、その関係が大きく変化した。つまり、負電荷の乖離カルボキシル(COO⁻)基と強く相互作用する poly(TMAEMA)ブラシ表面は、負の正味電荷を有する BSA と強く相互作用し、疎水性のメチル基および正電荷のプロトン化アミノ(NH₃⁺)基と強く相互作用する poly(BMA)ブラシ表面は、正の正味電荷を有する Lys と相互作用した。これは、突出した相互作用を有する官能基との相互作用が、タンパク質との相互作用を決定することを示唆する結果である。このような結果から、タンパク質との非特異的な相互作用を排除するためには、官能基レベルの相互作用を回避する必要があることが示された。

4. 同種のポリマーブラシ表面間で働く長距離力

図 6 に、純水およびイオン強度が異なる PBS (1.5 mmol/L および 150 mmol/L) 中において、同種のポリマーブラシ表面間に働く遠距離相互作用の表面間距離依存性を示す。カチオン性の側鎖を有する poly(TMAEMA)ブラシ表面およびアニオン性の側鎖を有する poly(SPMA)ブラシ表面では、純水中において 100 nm 以上の距離から強い斥力が観測され、溶液のイオン強度の増加に伴い斥力の強さと伝播距離が低下した。これは、これらの斥力が主として静電的な力に由来するものであることを示している。つまり、これらの表面近傍では静電的相互作用が支配的に働いていると考えられる。また、疎水性の側鎖を有する poly(BMA)ブラシ表面では、純水中において二表面の接近時には力が観測されなかったが、接触後、離脱時のみに強い引力が観測された。この引力は水中で疎水性表面間に働く疎水性相互作用に起因するものであると考えられる。これらに対し、双性イオン型の側鎖を有する poly(MPC)ブラシ表面では、溶液のイオン強度に依らない弱い斥力のみが観測された。力の働き始める距離が poly(MPC)ブラシ層の膜厚の 2 倍程度の距離であったことから、この力はポリマー鎖の圧縮によるものと考えられる。すなわち、他の表面で観測されたような静電的・疎水的な相互作用に由来する力は全く観測されなかった。

同種の表面間のフォースカーブ測定により、各ポリマーブラシ表面で固有に働く相互作用の種類、大きさおよび伝播距離を評価する方法論が確立された。これらのパラメータは、今後タンパク

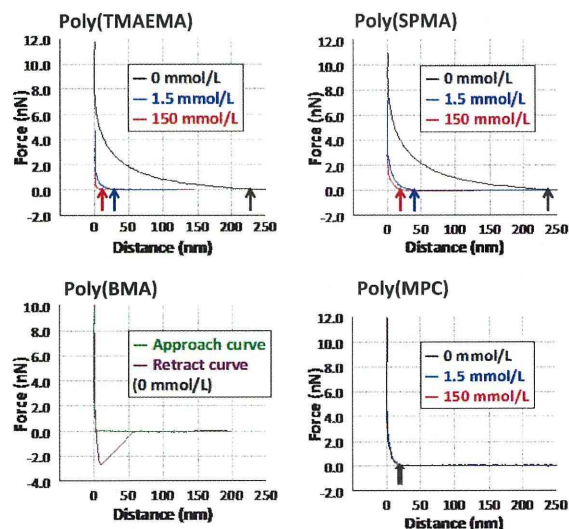


図 6. 様々なポリマーブラシ表面に働く力と表面間距離の関係。

質吸着挙動を理解する上で、有益な情報を与えると考えられる。

E. 結論

原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定により、材料表面に対する種々の相互作用を定量的に分析する手法を確立した。特に、タンパク質との直接的な相互作用が回避される双性イオン型ポリマーブラシ表面では、官能基との相互作用が検出されなかった。つまり、タンパク質吸着を誘起させないためには、官能基との微細な相互作用を排除することが重要であることがわかった。さらに、双性イオン型ポリマーブラシ表面では、静電的相互作用および疎水性相互作用が働いていなかった。つまり、タンパク質吸着を高度に抑制するためには、官能基との相互作用を引き起こす分子間相互作用を排除する表面設計が必要不可欠であることがわかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Quantitative Evaluation of Interaction Force between Functional Groups in Protein and Polymer Brush Surfaces", *Langmuir*, in press (2014) ([dx.doi.org/10.1021/la404981k](https://doi.org/10.1021/la404981k)).

2. 学会発表

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Interaction forces related to protein adsorption on polymer brush surfaces", The Society For Biomaterials 2013 Annual Meeting and Exposition: Biomaterials Revolution, Boston, USA, 2013/4/10-13.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「種々の力が作用するポリマーブラシ表面へのタンパク質の吸着挙動」、第 62 回高分子学会年次大会、京都、2013/5/29-31.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質非吸着を実現する表面相互作用力の定量解析」、第 62 回高分子討論会、金沢、2013/9/11-13.

○Sho Sakata, Yuuki Inoue, Kazuhiko Ishihara, "Nano-force Analysis for Understanding Protein-Materials Interactions", 2nd International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013, Tokyo, Japan, 2013/10/8-10.

○井上祐貴、坂田翔、石原一彦、「タンパク質吸着の AFM ナノフォース解析」、第 35 回バイオマテリアル学会大会、東京、2013/11/25-26.

○坂田翔、井上祐貴、石原一彦、「タンパク質吸着の理解を目指したナノスケールの相互作用力解析手法の確立」、第 23 回日本 MRS 年次大会、横浜、2013/12/9-11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名

国際標準歯科インプラント材料の有効性及び安全性評価に関する研究

研究分担者 佐々木 啓一 東北大学大学院歯学研究科長

研究要旨

本研究では、アカデミアと独立行政法人医薬品医療機器総合機構が連携し、歯科用インプラントの機械的強度の承認審査で行うべきワーストケース設定やインプラント表面処理方法などに関する考え方を、科学的エビデンスに基づき学術的に検討、整理し、歯科インプラントが真に具備すべき要件を再考し、「課題解決に向けた提言」の取り纏めを行った。本研究をベースとして我が国での審査基準など審査の考え方を再構築することで、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を図り、さらには、新たな国際標準設定に資するものとして、世界に情報発信することにより、国内歯科医療機器産業への波及効果も期待できる。

A. 研究目的

歯科分野の各種医療機器の承認審査において、審査期間の長期化をはじめとするいくつかの課題が指摘されている。殊に、近年、国内外で数多くの新製品が創出されている歯科インプラント分野では、これら課題が顕在化しつつあり、新規製品の上市の遅延が本邦における国際標準の歯科インプラント治療の拡大を妨げる一因となっているとの指摘がある。さらに国産プロダクトの上市遅延が国内企業の競争力を低下させているとの指摘もある。

その解決へ向けて、厚生労働省から平成21年5月に「歯科用インプラント承認基準の制定について」、平成24年7月に「歯科用インプラントの承認申請に関する取扱いについて(Q&A集)」が通知され、具体的な審査の取扱いが示されたところである。しかし、現時点においてもなお、関連団体から申請時に必要な疲労試験における機械的強度の評価項目の明確化や簡素化が求められるなど、未だ課題を残している。

また厚生労働省は、平成21年12月にとりまとめた「医療機器の審査迅速化アクションプログラム」に基づき、審査迅速化に取り組んでいるところであり、全体としては審査期間の改善がみられている。しかし歯科分野の審査については依然、長期化している品目も多く、業界団体からも更なる改善が求められている。これら背景から、承認申請が多い歯科インプラントの審査の改善は急務となっている。

そこで本研究では、承認審査で特に課題となっている歯科用インプラントの機械的強度の審査におけるワーストケース設定の根拠や、インプラント表面処理方法などに関する考え方を、科学的エビデンスに基づき検討、整理し、歯科インプラントが具備すべき要件を再考することを目的とした。

本研究の成果を基盤とし、本邦での審査基準等、審査の考え方を再構築することで、申請資料作成の効率化および審査の迅速化を図るとともに、新たな国際標準の設定に資するものとして世界に情報発信することにより、国内歯科医療機器産業への波及効果も期待できる。

B. 研究方法

本研究では、現在の歯科インプラント承認審査の課題を抽出、科学的な根拠に基づき、その解決策を検討することを目的とするため、歯科インプラントに関連する学会や大学等からの研究者(アカデミア)と、独立行政法人医薬品医療機器総合機構(PMDA)とが密に連携し、研究を遂行した。

具体的には、以下のように行った。

① 歯科インプラントに関連する代表的な学会である、公益社団法人日本補綴歯科学会、公益社団法人日本口腔インプラント学会、一般社団法人日本歯科理工学会等が連携した上で検討することとし、まずは歯科インプラントの承認審査のうち、特に歯科インプラントの機械的強度のワーストケース設定の根拠や、インプラント表面処理方法などの考え方について審査側と申請者側で問題と考えている事項を把握する。

② ①で把握した問題点について、科学的エビデンスに基づき、学術的に整理する。検討に当たっては、国際的な動向も踏まえるとともに、機械的強度に関する評価については実際に有限要素解析法(FEM)を用いた実験を行う。これらの検討を踏まえ、承認審査が円滑に進むための課題解決のための考え方を提言する。本提言は、PMDAにおいて国際標準に整合する審査基準など審査の考え方を再構築するために用いられることが期待できる。

歯科インプラントの承認審査は、材料学的評価、力学的評価、生物学的安全性評価など、多岐に渡るため、効率的かつ迅速にコンセンサスを得るためには、本研究で提案するように、関連する学会の全てが一同に介し、明確な科学的エビデンスに基づき検討することが効率的であり、必要不可欠である。

上記①および②を検討するために、下記メンバーにより、3回の研究班会議を開催した。

次ページにその概要を記す。

【班会議構成メンバー】

研究分担者	
佐々木啓一	(東北大学大学院歯学研究科 研究科長・教授、日本補綴歯科学会 理事・元理事長)
研究協力者	
新家 光雄	(東北大学金属材料研究所 研究所長・教授、日本金属学会 理事)
塙 隆夫	(東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 研究所長・教授、日本歯科理工学会 理事長)
渡邊 文彦	(日本歯科大学新潟生命歯学部 教授、日本口腔インプラント学会 理事長)
古谷野 潔	(九州大学歯学研究院 教授、日本口腔インプラント学会 理事・学術委員長、日本補綴歯科学会 理事・前理事長)
矢谷 博文	(大阪大学大学院歯学研究科 教授、日本補綴歯科学会 理事長)
窪木 拓男	(岡山大学大学院医歯薬総合研究科 歯学部長・教授、日本補綴歯科学会 理事・学術委員長)
東藤 貢	(九州大学応用力学研究所 准教授)
金高 弘恭	(東北大学大学院歯学研究科 准教授、PMDA医療機器審査第二部)

なお、班会議にはオブザーバーとして、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）の関係部署（医療機器審査第二部および第三部、規格基準部）が参加して、審査の現状や問題点を説明した。

【第1回研究班会議】

日時：平成26年2月7日（水） 17:30～19:00
場所：「東京八重洲ホール」412号室
内容：本研究の目的および承認審査の現況について、厚生労働省やPMDAより説明があり、その後、班員間の議論により、承認審査に関する情報の共有および問題点の整理を行った。

【第2回研究班会議】

日時：平成26年3月17日（月） 17:30～19:30
場所：「フクラシア東京ステーション」6階 会議室A
内容：歯科インプラントに関して承認申請を行った実績を持つ国内外の企業を数社招聘し、申請者側から見た現状での承認審査の問題点および要望、意見をヒアリング調査した。これにより企業側が考える承認審査における問題点の整理を行った。

【第3回研究班会議】

日時：平成26年3月24日（水） 15:30～17:00
場所：「東京八重洲ホール」511号室
内容：第1回および第2回班会議において抽出した審査側（PMDA）および申請者側からの課題について整理、集約し、科学的な根拠に基づき学術的に検討し、「課題解決に向けた提言」として取り纏めを行った。

（倫理面への配慮）

本研究はヒトを対照としていないため、該当なし。

C. 研究結果

（1）現在の歯科インプラント承認審査の問題点の整理

歯科インプラントの機械的強度の評価におけるワーストケースの設定などに関する考え方を検討するため、承認審査における問題点について審査側、申請者側から意見を聞いて検討すべき論点を明確にしたところ、結果は下記のとおり。

①歯科用インプラントの審査における諸問題：審査側からの意見（第1回班会議）

1) 歯科用インプラントの承認審査
歯科用インプラントの審査方針等については、平成21年5月に承認基準を策定した。現在は、その解釈通知（Q&A）を示しながら、承認基準の範囲内で評価出来る申請（承認基準あり品目）と、承認基準の範囲を超えた評価を必要とする申請（承認基準なし品目）とに区分して審査を行っている。

2) 承認基準制度後の申請状況
承認基準が制定された平成21年より前は、形状の同一性による評価が一般的で、疲労強度試験の考えが申請者に浸透していなかった。このため、Q&Aによって疲労強度試験に関して周知を図ってきたが、承認基準の考え方、一品目の取扱い、審査の考え方などが必ずしも明確でなかった。そこで平成24年7月に、Q&Aを全面的に改正し、考え方の明確化を図った。

3) 申請品目の現状
申請された歯科インプラントの種類としては、アバットメントだけを見ても、現状ではストレート、アングル、ボール、キャストブル、切削加工して使用するもの、マルチピース等があり、さらにそれぞれのアバットメントで、原材料の異なるタイプが含まれるなど、1品目内（1申請内）においても、その構成内容が多岐に及ぶものが申請されている。そのため、申請品目の疲労強度評価によるワーストケースの選定は多様であり、統一的な考え方には到っていない。現行の審査では、申請内容の個々のバリエーションにおいて、それぞれワーストケースの選定を行い、その疲労強度を評価しているが、選定理由等についての基本的な考え方について違いがあることから審査に時間を要する品目がある。

4) ワーストケースの考え方

2ピースタイプ、または3ピース以上のタイプ（マルチピースタイプ）の組合せから構成される歯科インプラントについて、疲労強度試験におけるワーストケースの基本的考え方は、以下のとおりである。①と②の構成にて組み合わせられた検体をワーストケースと判断している。

①フィクスチャ：各嵌合部種類において、最も細く、最も短いもの。

②アバットメント：各バリエーションにおいて、最も細く、最も長いもの。

各バリエーションは以下a～eが代表例。

- a) 既製のアバットメント
- b) 切削加工するアバットメント
- c) キャスタブルアバットメント
- d) マルチピースアバットメント
- e) ボールアバットメント

a)～d)については、それぞれにストレートタイプとアングルタイプが存在する場合があるため、ストレートとアングルは別途評価が必要となる。なお、ワーストケース選定のために、形状の類似性が認められるものについては、有限要素解析（以下、FEMという。）によるリスク評価を行ってもよいこととしている。

5) 問題点等

歯科用インプラントは製品によって形状や構成が多種多様であり、形状からワーストケースを選定することが適切でない場合や、ワーストケースの選定根拠の説明と疲労試験の結果が異なる場合もあり、その妥当性が説明できない場合がある。他方、FEMを用いた場合では、FEMの結果による応力集中部位と実機による疲労試験の破折部位が一致しないケースも多数あり、ワーストケースの選定の判断に的確に利用されるところに到っていない。

② 歯科用インプラントの薬事承認における問題点と要望：企業側からの意見（第2回班会議）

歯科用インプラントの機械的強度の評価において、以下の各項目の考え方が必ずしも明らかにされておらず、明確化が必要である。

1) ワーストケース設定基準の明確化

- ・ISO14801規格に準拠した設定
- ・インプラント（フィクスチャ・アバットメント）形状からの設定根拠の明確化
 - ・長さ
 - ・径
 - ・アングルの有無
 - ・嵌合機構の形状

2) FEM解析データ活用方法の明確化

- ・疲労試験との相関性の提示の必要性
- ・妥当性の評価の在り方
- ・原料違いの場合の評価の在り方

3) FDAでの評価データ受入の可否

- ・ストレート、アングルでのワーストケース選定
- ・代表ケースでのデータ受入の可否

4) 既承認品をコントロールとする疲労試験実施の必要性

- ・規格値の設定の可否
- ・同一の実験条件の範囲

③ 「課題解決に向けた提言」提案のための論点整理

審査側と申請者側から意見を聞いた結果、疲労試験におけるワーストケースの設定について双方の考え方が一致していない点が多く見受けられた。したがって、本研究班においては歯科用インプラントの審査の的確化、適正化を図るべく、臨床的観点、工学的・材料学的視点を踏まえて、今後の審査におけるワーストケースの選定の考え方について、科学的な根拠に基づき検討、整理し、現時点における考え方を示すこととした。

また、検討に当たっては、①国内製造品、外国製造輸入品とも、形状、嵌合部、材質等、様々な製品が製造されていること、②例えば、フィクスチャの選定など、各国における臨床現場での使用実態に違いがあること、③製品自体の強度を評価することは重要であるが、実際に使用される際のインプラントの強度は臨床現場での使用状況によっても変わり得るものであること等の状況を十分考慮した上で、我が国におけるワーストケース選定の考え方を合理的に定め、承認審査では個別製品に応じて柔軟に判断することが必要と考えられた。

以上を踏まえ、「課題解決に向けた提言」提案のために検討が必要な論点を以下のとおり整理した。

【論点】

- 1) 疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方（臨床現場の使用実態、工学的評価の観点）
- 2) FEM解析データの適切な活用方法
- 3) FDAでの評価データ受入のための方策
- 4) 既承認品との比較の必要性

（2）追加評価実験の実施

① 方法

疲労試験における機械的強度評価におけるワーストケース設定に関し、FEMにおける簡略モデルの可能性を検討する目的で、JFEテクノリサーチ（株）に委託し、有限要素解析法（FEM）を用いた実験を行った。

フィクスチャ／アバットメント／アバットメントスクリューからなる歯科用インプラント（φ3.3）を基本に、アバットメントに荷重を作用させるための半球治具を付加したものを基本モデルとした。

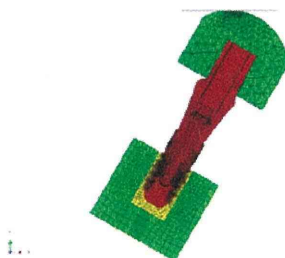
さらに、アバットメント-半球治具の構造を変化させた2つの簡略モデルを作成し、計3ケースにつき弾性FEM解析（ISO14801準拠）を行い、各部位に発生する応力状態を比較した。

今回はあくまでも下記の実験条件での結果であり、今後、実機試験とのバリデーションを要する。

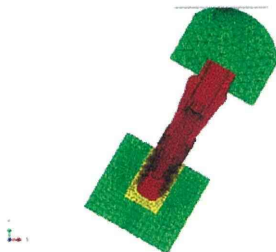
【解析した3ケースのモデルの特徴】

- ・基本モデル
 - ・全部品とも形状省略しないオリジナルモデル
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離:13.5mm (包埋平面と荷重中心との距離:11mm)
- ・簡略モデル I
 - ・アバットメントの荷重中心から上部の2.5mm削除
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離:11mm (包埋平面と荷重中心との距離11mm)
- ・簡略モデル II
 - ・解析には、最も簡略化したモデル
 - ・アバットメントの荷重中心から上部の2.5mm削除
 - ・半球治具を削除
 - ・包埋平面からアバットメント先端の距離:11mm (包埋平面と荷重中心との距離:11mm)
 - ・アバットメント上部端面に(仮想)剛体面を取り付け、荷重中心に荷重を負荷

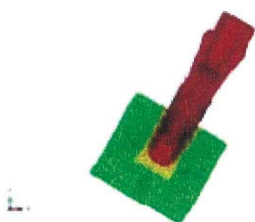
・基本モデル



・簡略モデル I



・簡略モデル II



② 実験結果

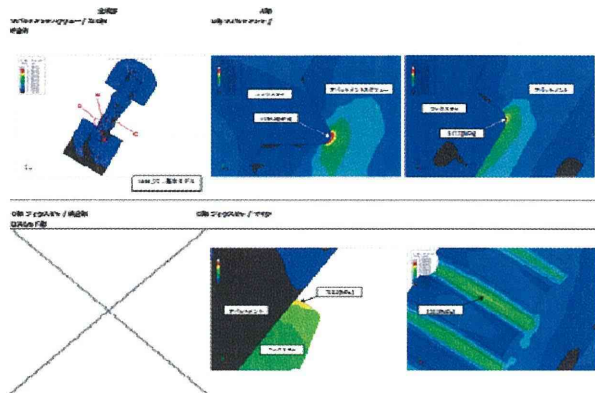
アバットメント～半球治具の構造を変化させた3ケースのインプラントについて、ISO14801の圧縮疲労試験に準拠した強度解析(3次元弾性FEM解析:荷重100[N])を行い、下記の結果を得た。

- 1)包埋平面と半球荷重部の中心との距離が11mm以上の部位については、削除しても最大主応力分布には影響しない。
- 2)解析した範囲内では、半球治具を削除しても最大主応力分布に影響がなかったことから、解析モデルの簡略化についての可能性が示唆された。

【結果1】

- ・基本モデル

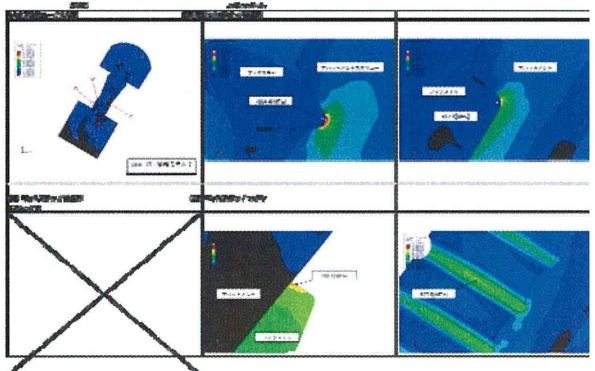
100[N]負荷時の最大主応力分布図



【結果2】

- ・簡略モデル I

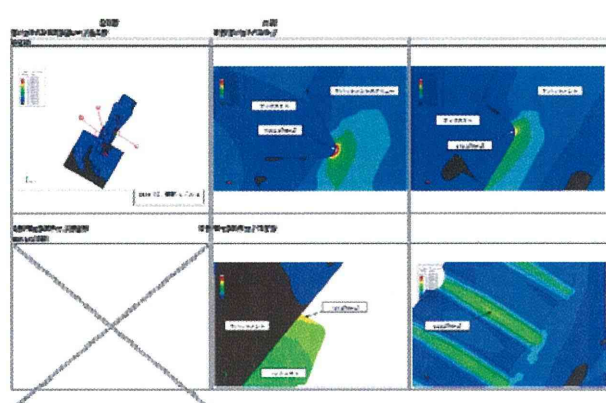
100[N]負荷時の最大主応力分布図



【結果3】

- ・簡略モデル II

100[N]負荷時の最大主応力分布図



【各ケースで高応力となる4部位の最大主応力】

ケース	(A)	(B)	(C)	(D)
case_00 基本モデル	1064.9	817.7	732.3	628.0
case_01 簡略モデルⅠ	1064.4	817.4	732.1	627.8
case_02 簡略モデルⅡ	1062.9	818.2	731.8	628.2

(3) 米国FDAでの評価の考え方

申請者側からのヒアリングにおいて、FDAでの評価データの受け入れの可否について意見があったが、FDAはISOとは異なる試験方法及びワーストケースシナリオの考え方をガイダンスで推奨しており、その概要は以下のとおりである。

- ・静的圧縮試験を行い、その80%の荷重から開始し、疲労限に達するまで疲労試験を行う。(4荷重以上、12検体以上試験すること。荷重数を減らす方法をとる場合には選択した荷重にて5検体すべて破壊しないことを確認する)

- ・金属材料の疲労試験は水中環境下にて荷重繰返し速度2Hzで 2×10^6 サイクルまで行う。

- ・使用前に加工されるアバットメントは加工後の状態にて、最も角度の大きいアバットメントを用いる
- ・ 20° 以下のアングルアバットメントであっても、アングルアバットメントの角度付き部分の軸より 10° 大きく固定するのではなく、インプラント軸から最低でも 30° の角度を成すように固定し試験を行うこと。

(4) 国際標準歯科インプラント材料の有効性・安全性評価法の構築

本研究での成果、すなわち抽出された課題ならびに課題に対しての科学的な検証結果に基づき、我が国での歯科インプラント審査基準等、審査の考え方を検討した結果得られた「課題解決に向けた提言」を下記に示す。

本提言内容は引き続き整理が必要な点もあるが、これを基盤として、将来的には、国際標準に整合した日本発の国際標準インプラントを世界に情報発信することを目指す。

【課題解決に向けた提言】

1) 基本方針

- ・疲労試験は、ISO14801規格に準じるものとする。
- ・ISO14801規格に基づく疲労試験は、歯科インプラント複合体に関する評価であり、歯科インプラントの構成体の疲労強度を評価する。そのため、骨等の生体に対する評価とは切り離して考えなければならない。
- ・ワーストケースの選定については、臨床での使用も考慮することが重要であり、このような考え方が併せて議論されているISOの検討状況も十分勘案する。

2) ワーストケースの選定

① インプラント体（フィクスチャ）の形状

・インプラント体の直径

- ・包埋平面での断面の径が最小のものを選択
- ・インプラント体の頸部が細いタイプにおいても、径の変化を考慮し、包埋平面断面で最小径となるものを選択

・インプラント体の長さ

- ・ISO14801では、インプラント体を包埋固定し、荷重を付加するため、基本的にはインプラント体の長さに関する評価は困難である。長さ8mm未満のインプラント体はそもそも包埋が困難であるため試験系で用いることは現実的ではなく、8mm未満のインプラント体の包埋平面での断面の径が最小であっても8mm以上で最も短い検体にて疲労試験すること。よって、8mm以上のインプラント体の長さは評価されていると判断することは可能と考えられる。

② アバットメントの形状

- ・各バリエーションにおいて、最も径が細いものを選択する。
- ・長さについては、包埋平面と半球荷重部の中心との距離がISO規格の11mmとすることを基本とする。
- ・長さが大きく変わらない場合には、径が優先される。

なお、以下に関しては現状での考え方であり、今後、さらなる検討を行う。

- ・ストレートとアングルは、別途の評価が必要である。
- ・アバットメントで現在考えられるバリエーションのうち、以下のものについては、流通する形態そのものではなく、臨床現場で用いるための加工後に想定される径・角度を用いる。
 - a) 切削加工するアバットメント
 - b) キャスタブルアバットメント
 - c) マルチピースアバットメント

③ 接合部の形状

以下に関しては現状での考え方であり、今後、さらなる検討を行う。

- ・各形状ごとに検討が必要である。
- ・インプラント体とアバットメント、それぞれの材料が同じで、嵌合部が同一形状であれば、破折機序等に鑑みインプラント体またはアバットメントの外形の肉厚がうすいものを選択する。

3) FEM解析データを活用したワーストケースの選定について

ワーストケースの選定に当たっては、2)に基づき判断することが基本であるが、FEMを用いて説明することも可能と考えられるため、FEMをどのように活用できるか考え方を整理した。

① 現時点でのFEM利用に関する基本的な考え方

- ・FEMの一般的な解析では、静的な荷重条件下での構造体内部の応力分布をみているものであり、繰返し荷重下での疲労試験による破壊強度とは異なるものである。
- ・従って、その数値が比較できるものではない。
- ・同一の材料であれば応力集中が高いものほど疲労破壊を起こしやすい、という前提に立つ。

② 今後の具体的な活用方法

これまでの検討結果から考えうるFEMの活用方法(案)は以下のとおりであるが、今後さらに検討を進める。

今後は、FEMの結果を受け入れ可能とする条件、すなわちFEMのモデル条件、荷重条件等を明示し、それらをフロー図等で作成、提示することが求められる。そのうえでISOへ提案していく。

FEMはワーストケース選定のための解析手法となり得るが、その場合は、申請品目においてFEMにてワーストケース選定が可能である妥当性を説明できる必要があり、申請者がその点を十分理解した上でFEM解析を実施する必要がある。

【FEMの活用方法(案)】

- 嵌合機構が同じ場合には、同一原材料のサイズの違いを比較検討することが可能であること。
- 比較する部位以外の試験条件は揃えること。
- 通常はストレートとアングル、その他類似形状、サイズ違いの比較も含めてワーストケースの選定に使用することができること。
- 応力集中度合いの高いものをワーストケースと判断すること。
- 応力集中部位と実機試験の破折部位が一致する必要があること。

③ FEMにおけるバリデーションの考え方の整理

FEMでの検討結果と実機での疲労試験との相関性について、実験を行いながら、どこまで示すことが可能か今後検討する。

4) その他

審査における課題を解決するためには、1)から3)のほか、以下の点についても今後整理すべきと考えられた。

- ・既承認品を利用した疲労試験の必要性
 - ・比較検討のための既承認品との試験条件の同一性の必要条件を明らかにする。
 - ・規格値の設定
- ・医療現場の状況(使用方法の制限、市販後調査等)からリスクを管理することで評価を簡素化できるかどうか：市販後の管理

D. 考察

我が国は、世界最高水準のモノ作り技術を有しているものの、医療機器に関しては、その多くを輸入

に頼っているのが現状である。歯科分野で用いられる各種医療機器の状況も同様であり、特に歯科インプラントについては8割以上を輸入に頼っている。現在政府では、医療分野を成長戦略として位置づけており、国内の医療機器産業を活性化し、革新的な製品を世界に先駆けて実用化できるような環境整備の取組を進めている。このためには薬事規制に関する取組も必要であり、承認審査に関しても迅速化に向け産業界のみならず、学・官も含めたオールジャパン体制での対策が急務となっている。

しかしながら、歯科分野、特に歯科用インプラントでは承認審査に時間がかかる品目も多く、上市が遅れることにより、結果的に本邦での国際標準の歯科インプラント治療の展開の遅れ、また国産インプラントの国内・国際競争力の低下等を招く結果となっている。

したがって、本研究により、特に審査において問題となっている歯科インプラントに関して、アカデミアとPMDAが連携して課題を整理し、今後の承認審査が合理的に対応できるような提言を取りまとめた。

現在の状況を作り出している一因は、審査基準や関連のQ&Aがまとめられているものの、当該基準の解釈について、審査側と申請者側の考え方が一致していないことにあると考えられ、その結果として承認審査のやりとりに時間が生じることであった。

承認審査では、有効性・安全性が確認できるデータをもとに評価していくのは当然であり、申請者側でもそのためのデータ収集は必須である。他方、歯科インプラントで今回論点となった機械的強度(疲労試験)は、実際に臨床現場で使用される実態を考えると、製品自体の強度のほか、使用実態等による影響もあることから、一定の合理性をもって製品の強度が確認できれば現時点では大きな問題は生じないと考えられる。

したがって、今回の提言のような考え方を導入することで、疲労試験のワーストケースの選定については合理的な判断ができ、歯科インプラント審査の問題点の一部は改善できるものと考えられる。これにより、我が国での審査基準など審査の考え方を再構築し、申請資料作成の効率化及び審査の迅速化を可能にすることが期待される。

また、申請者側としては、機械的強度に関しては科学的根拠に基づきしっかり説明できるような申請資料を作成する必要があり、特に輸入品を取り扱う場合は海外で試験等が行われているので、海外企業との連携が必須である。今回の提言により申請者の負担も軽減できることが期待される。

さらに間接的な波及効果としては、我が国の最新技術を利用した日本発の世界標準インプラント開発によって追い風になり、歯科医療機器産業のさらなる向上、発展に寄与するものと考えられる。

本年度には、疲労試験のワーストケース選定の基本的考え方について、インプラント形状における長さ、径、アングルの有無、嵌合機構の形状に関して審査基準に関する提言を取り纏めることができた。

引き続き、最終年度である次年度には、残りの問題点について提言を取り纏めていく予定である。具体的には、①FEM解析データの適切な活用方法、②既承認品との比較方法などについて、本年度と同様に検討することとする。

E. 結論

関連学会や大学等のアカデミアと独立行政法人医薬品医療機器総合機構とが連携して、現在の歯科インプラント承認審査の様々な課題を抽出、その解決策を検討し、国際標準に整合する有効性・安全性評価を提案することにより、新たな歯科インプラント材料の審査基準を構築するためにコンセンサスを得て、「課題解決に向けた提言」として取り纏めることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

① Kawano M, Nakayama M, Aoshima Y, Nakamura K, Ono M, Nishiya T, Nakamura S, Takeda Y, Dobashi A, Takahashi A, Endo M, Ito A, Ueda K, Sato N, Higuchi S, Kondo T, Hashimoto S, Watanabe M, Watanabe M, Takahashi T, Sasaki K, Nakamura M, Sasazuki T, Narushima T, Suzuki R, Ogasawara K.

NKG2D(+) IFN- γ (+) CD8(+) T Cells Are Responsible for Palladium Allergy.

PLoS One. 12:9(2):e86810, 2014.

② Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K,

Shirato M, Sasaki K, Niwano Y.

In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide.

PLoS One. 25:8(11):e81316, 2013.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A.	The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells	Journal of Biomed. Mater. Res. Part A	101	2573-2585	2013
Sakata S, Inoue Y, Ishihara K.	Quantitative evaluation of interaction force between functional groups in protein and Polymer brush surfaces	Langmuir	30	2745-2751	2014
Ikai H, Odashima Y, Kanno T, Nakamura K, Shirato M, Sasaki K, Niwano Y.	In vitro evaluation of the risk of inducing bacterial resistance to disinfection treatment with photolysis of hydrogen peroxide	PLoS One	8	e81316	2013

IV. 研究成果の刊行物・別刷り

Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells

Rumi Sawada,¹ Ken Kono,¹ Kazuo Isama,² Yuji Haishima,¹ Atsuko Matsuoka¹

¹Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

²Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Received 21 September 2012; accepted 13 December 2012

Published online 11 February 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.34566

Abstract: In this study, a titanium surface was chemically modified with calcium ions and assessed for its influence on osteogenic differentiation and molecular responses of human mesenchymal stem cells (hMSCs). Titanium disks were treated with NaOH (NaOH treatment), NaOH + CaCl₂ (CaCl₂ treatment), or NaOH + Ca(OH)₂ (Ca(OH)₂ treatment). Ca(OH)₂ treatment caused significantly greater calcium incorporation onto the titanium surface and apatite formation than CaCl₂ treatment. The morphology of hMSCs differed on CaCl₂- and Ca(OH)₂-treated disks. The osteopontin (OPN) expression in hMSCs cultured on CaCl₂-treated titanium was significantly higher than that in cells cultured on NaOH-treated disks; OPN expression was significantly higher in cells cultured on Ca(OH)₂-treated disks than on un-, NaOH-, and CaCl₂-treated disks. Osteocalcin (OCN) protein expression in hMSCs cultured on Ca(OH)₂-treated disks was significantly higher than

that on all the other disks. Comparative expression profiling by DNA microarray and pathway analyses revealed that calcium modification of the titanium surface induced integrin β 3 after OPN upregulation and promoted Wnt/ β -catenin signaling in hMSCs. In addition, Ca(OH)₂ treatment upregulated the expression of bone morphogenetic protein 2, cyclooxygenase 2, and parathyroid hormone-like hormone in comparison to CaCl₂ treatment. These observations suggest that calcium-modified titanium surfaces affect osteogenic differentiation in hMSCs and that Ca(OH)₂ treatment induced osteogenic differentiation in hMSCs, whereas CaCl₂ treatment had a limited effect. © 2013 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 101A: 2573–2585, 2013.

Key Words: surface modification, titanium, calcium, stem cell, osteogenesis, gene expression

How to cite this article: Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A. 2013. Calcium-incorporated titanium surfaces influence the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res Part A* 2013;101A:2573–2585.

INTRODUCTION

Titanium is widely used in orthopedic and dental implants due to its corrosion and wear resistance, durability, and biocompatible interface. The topography of titanium implants plays a major role in cell–material interaction. Several studies have shown that surface modifications influence protein adsorption,^{1,2} cell–substrate interactions,³ cell adhesion,^{3–5} cell morphology,^{5,6} osteogenic differentiation,^{5,7–10} and, consequently, the tissue integration of titanium implants.^{11,12}

The nanoscale and microscale surface roughness of titanium has been reported to increase osteogenic differentiation in osteoblasts cultured on titanium surfaces^{7,9–12} and promote osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells (hMSCs) in the presence of osteogenic supplements.⁸ Osteoblast response has also been reported to be modulated by a modified microstructured titanium surface with increased wettability due to a polyelectrolyte thin film coating.¹³ Titanium nanopores also affect osteogenic differentiation and hMSC cell morphology.⁵ Integrin is critical for the responses of osteoblasts^{4,10,14} and hMSCs⁵ to some tita-

nium surface modifications. Gene expression studies have shown an increase in the expression of the osteoinductive genes RUNX2, osterix, alkaline phosphatase, bone sialoprotein, and osteocalcin (OCN) in osteoblasts^{6,15} and hMSCs^{16,17} grown on micro- and nanoroughened surfaces in the presence of osteogenic supplements.

Alkali- and heat-treated titanium forms a bone-like apatite surface layer in the body and bonds to the bone via this layer.^{18–22} In addition to chemical and thermal treatments, the porous structure of titanium contributes to its biocompatibility²³ and bone formation²⁴ *in vivo*. Fluoride ion modification of a TiO₂ grit-blasted surface enhances osteoblastic differentiation in hMSCs in the presence of osteogenic supplements.²⁵ Calcium ion incorporation into a titanium surface by CaCl₂ treatment yields slightly better apatite formation than alkali (NaOH) treatment *in vitro*,²⁶ but the influence of calcium ion modifications of titanium surfaces on osteogenic differentiation of hMSCs has not been explored.

hMSCs are pluripotent and can differentiate into cells of mesodermal origin, for example, bone, cartilage, adipose,

Correspondence to: R. Sawada; e-mail: rsawada@nihs.go.jp

Contract grant sponsor: Health and Labour Sciences Research Grants for Research on Regulatory Science of Pharmaceuticals and Medical Devices from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan; contract grant numbers: H22-IYAKU-IPPAN-009, H24-IYAKU-SHITEI-018

and muscle cells.^{27–31} hMSCs also have the capacity to differentiate into myocytes,^{32,33} hepatocytes,^{27,34} and neural cells.²⁹ hMSCs are currently being used with biomedical materials in several clinical studies on bone regeneration.

We aimed to evaluate the influence of CaCl₂- or Ca(OH)₂-modified titanium surfaces on osteogenic differentiation and molecular responses in hMSCs. We examined the amount of calcium ion incorporation and apatite formation on CaCl₂- and Ca(OH)₂-treated surfaces. We investigated the morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of hMSCs cultured on the chemically modified titanium. To definitively conclude whether incorporation of calcium ions on a titanium surface induces osteogenic differentiation in hMSCs, osteogenic supplements were not used in this study. Whole genome expression analysis provided a comprehensive understanding of the mechanism of osteogenic induction by chemically modified titanium.

MATERIALS AND METHODS

Chemical treatment of titanium disks

Titanium disks (grade II commercially pure titanium, 33.5 mm diameter, 2-mm thick) were supplied by Nakashima Medical Co. (Okayama, Japan). They contain over 99.3075% of titanium, and their surface roughness (Ra) is 0.4 μm. NaOH treatment was performed by soaking the disks in 5.0 mol/L NaOH aqueous solution at 60°C for 24 h and then washing gently with distilled water. CaCl₂ or Ca(OH)₂ treatments were performed by soaking the NaOH-treated disks in 0.1 mol/L CaCl₂ or 0.01 mol/L Ca(OH)₂ at 60°C for 24 h and then gently washing with distilled water. Untreated titanium disks served as controls.

Scanning electron microscopy

The topography of the chemically modified titanium disks was characterized by Scanning electron microscopy (SEM) performed with a JSM-5800 microscope (JEOL, Tokyo, Japan). Images were recorded with 15 kV accelerating voltage.

Calcium ion incorporation and apatite formation

To investigate apatite formation on the titanium surface, untreated or chemically modified disks were soaked in Hanks' balanced salt solution that included calcium and magnesium (Life Technologies Co., Carlsbad, CA) for 7 days at 37°C. The solution was changed every 2 days.

The incorporated calcium ions were dissolved in nitric acid and their concentration was measured by Agilent 7500ce ORS ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry; Agilent, Santa Clara, CA) in helium collision mode with monitoring at *m/z* 43.

Cell culture

hMSCs derived from bone marrow were purchased from Lonza (Walkersville, MD). The hMSCs were cultured in MSCGM BulletKit, a mesenchymal stem cell basal medium with mesenchymal cell growth supplement, L-glutamine, and gentamycin/amphotericin-B (Lonza Walkersville, MD), at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The medium was changed every 3 days. The cells were detached by mild

treatment with trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid solution for hMSCs (Lonza Walkersville, MD) and subcultured when they were just subconfluent (approximately 80–90% confluence). Cell passages 2–4 were used for experiments. hMSCs were cultured on each surface-modified titanium disk for 1, 4, 7, and 28 days.

Cell morphology and immunofluorescence staining

To analyze the morphology of hMSCs cultured on the chemically modified titanium disks, the cells were stained with CellTracker (Lonza) according to the manufacturer's protocol.

To examine the expression of OCN, cells stained with CellTracker were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature and permeabilized with a blocking solution [10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, PA), 0.1% Triton X-100, and 0.01% NaN₃ in PBS]. The cells were stained with anti-OCN antibody (Abcam, Cambridge, MA) in blocking solution without Triton X-100 for 16 h at 4°C for primary staining and were secondarily stained with Alexa Fluor 647-conjugated donkey anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories) for 30 min at room temperature.

Images were collected and analyzed by confocal microscopy (FLUOVIEW FV1000; Olympus, Tokyo, Japan).

Cell proliferation

The proliferation of hMSCs on titanium disks for 7 days was determined by using a cell proliferation assay reagent, TetraColor ONE (Seikagaku Co., Tokyo, Japan). Cultures were incubated for 2 h in medium containing the reagent. The absorbance was read at 450 nm (reference at 600 nm) on a plate reader (SH-9000, Corona Electric Co., Ibaraki, Japan).

Preparation of total RNA and real-time polymerase chain reaction

hMSCs were seeded on untreated and chemically modified titanium disks in 35 mm culture dishes at an initial seeding density of 1.2×10^4 cells/cm² and cultured for 7 days before evaluating transcript expression of osteopontin (OPN), OCN, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The housekeeping gene GAPDH was used as a control. Total RNA was extracted from hMSCs with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA). Total RNA was eluted in RNase-free water and quantified on a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE). Total RNA was reverse transcribed with the SuperScript III First-Strand Synthesis System for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR; Life Technologies Co., Carlsbad, CA). Amplification of OPN, OCN, and GAPDH was performed with LightCycler Primer Sets (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) and LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science) in a Roche LightCycler instrument (software version 4.0).

Microarray analysis

Whole genome expression was analyzed after 7-day culture of hMSCs on chemically modified titanium disks. Total RNA

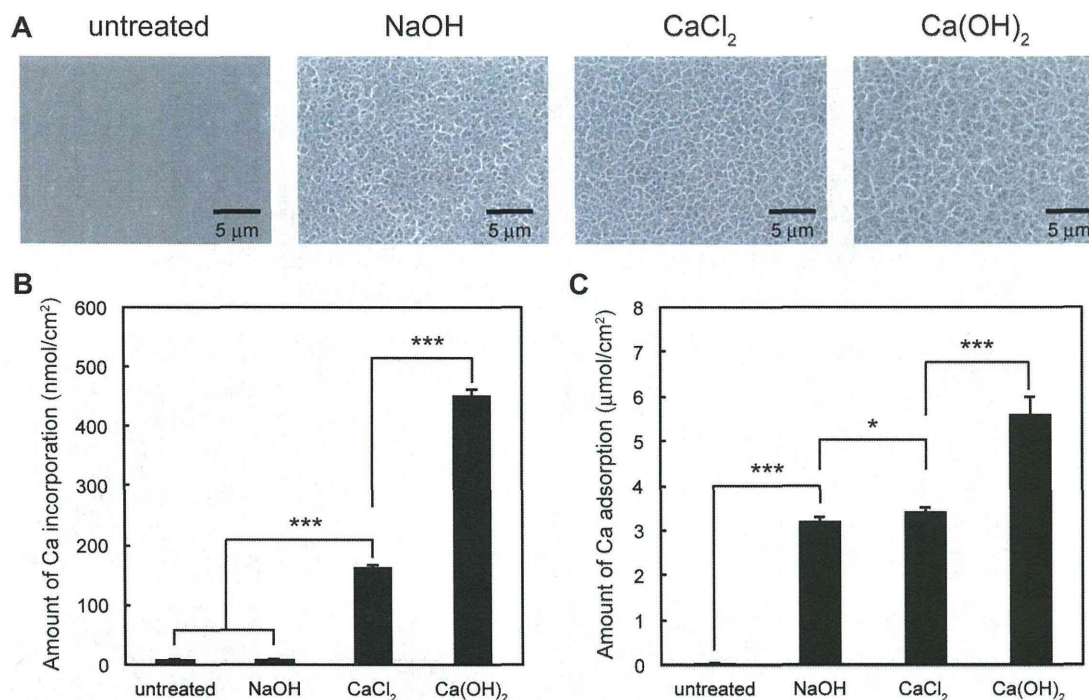


FIGURE 1. SEM images of the surface of untreated, NaOH-, NaOH + CaCl₂ (CaCl₂-), and NaOH + Ca(OH)₂ (Ca(OH)₂-) treated titanium disks (A). Images are representative of three independent experiments. The amount of Ca²⁺ incorporation into the chemically modified titanium disks (B; left) and the amount of Ca²⁺ adsorption onto the modified disks after soaking in Hanks' balanced salt solution including calcium and magnesium at 37°C for 7 days (B; right) were measured by ICP-MS ($n = 3$). Significant differences between groups are shown as * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

quantity and quality were assessed on an Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent, Santa Clara, CA); 100 ng of total RNA was used to generate biotin-modified amplified RNA (aRNA) with the GeneChip 3'IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). Reverse transcription of first-strand complementary DNA (cDNA) with a T7 promoter sequence was performed with T7 oligo(dT) primer. Second-strand cDNA synthesis was used to convert the single-stranded cDNA into a double-stranded DNA template. The reaction employed DNA polymerase and RNase H to simultaneously degrade the RNA and synthesize second-strand cDNA. *In vitro* transcription of biotin-modified aRNA with IVT Labeling Master Mix generated multiple copies of biotin-modified aRNA from the double-stranded cDNA templates. The aRNA was purified and quantified; after fragmentation, it was hybridized to the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix). The arrays were stained with phycoerythrin and washed at the GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix). The microarrays were scanned and data extracted using GeneChip scanner 3000 7G (Affymetrix), image analysis was performed using the Affymetrix GeneChip Command Console Software and digitized using Affymetrix Expression Console.

Data processing and pathway analysis

Data analysis was performed with GeneSpring GX 11.0 software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Raw data were normalized to the 50th percentile per chip and the median per gene. Normalized means for the four kinds of titanium disks (un-, NaOH-, CaCl₂-, or Ca(OH)₂-treated) were generated for the experimental interpretation. Differentially

expressed genes were selected and flagged for further analysis. To determine whether particular osteogenic differentiation functions were significantly overrepresented, the data set was analyzed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 9.0 (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Statistical analysis

All results are shown as means \pm SD. Significance was evaluated by the Student's *t* test.

RESULTS

Surface characterization of chemically modified titanium disks

Titanium disks were treated with NaOH (NaOH treatment), NaOH + CaCl₂ (CaCl₂ treatment), and NaOH + Ca(OH)₂ (Ca(OH)₂ treatment; see Materials and methods section). SEM demonstrated a porous network structure formed on the surface of the disks after chemical treatment [Fig. 1(A)]. There were no significant differences between the chemically treated surfaces.

Calcium ion incorporation and apatite formation on the titanium surface

We measured the amount of calcium ion incorporation on the surface of the modified titanium disks [Fig. 1(B)]. As expected, no calcium ions were incorporated into the untreated or NaOH-treated disks. Significantly more calcium ions were incorporated into the Ca(OH)₂-treated disks than the CaCl₂-treated disks.

To investigate the effects of chemical treatments on apatite formation on the titanium surface, the disks were