

令和元年6月10日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05520

研究課題名(和文) 選択的ラジカル応用によるインプラント周囲炎に対する包括的リカバリーシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of comprehensive recovery system for peri-implantitis by selective radical application

研究代表者

金高 弘恭 (Kanetaka, Hiroyasu)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：50292222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)： 歯科インプラントは予知性の高い治療法として広く普及しているが、一方で、インプラント周囲炎に対する根本的な解決方法はない。そこで本研究では、最新の工学技術により、部位や時期を選択してラジカルを応用することで、インプラント周囲炎に対する全く新しい包括的インプラントリカバリーシステムを構築することを目的とした。

本研究では、まず、インプラントリカバリーシステムに最も適した可視光応答型酸化チタン、および、大気圧プラズマジェット照射装置を開発した。これらを用い、口腔内において、撤去せずに確実かつ安全に機能回復できるインプラントリカバリーシステムを構築するための基本技術を獲得することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラントの撤去を余儀なくされた場合、インプラントおよび周囲骨の喪失に伴う患者の身体的、心理的および経済的負担は著しく大きい。本研究結果により、口腔内リカバリーシステムが構築されれば、これら全ての問題を解決する可能性があり、臨床的・社会的意義は極めて大きいと考えられる。

口腔内環境といった厳しい条件下での、再活性化による新しいリカバリー法の確立は、生体内での変化に対して適応が難しい生体材料の生物学的、臨床的課題を解決する可能性を持つ。すなわち、人工関節治療など他の医療分野への応用展開として広がる可能性も大きく、歯科医学分野からの技術発信として医学全体へ大きく貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)： Dental implants are widely used as highly predictive treatments, however, there is no fundamental solution to peri-implantitis. Therefore, in this research, we aimed to construct a completely new comprehensive implant recovery system for peri-implantitis by selecting the site and time and applying radicals using the latest engineering technology.

In this study, we first developed visible light responsive titanium oxide and atmospheric pressure plasma jet irradiation equipment that are most suitable for the implant recovery systems. Using these, we were able to acquire the basic technology to construct an implant recovery system that can be reliably and safely restored without removal in the oral cavity.

研究分野： 歯科医用工学

キーワード： 歯学 歯科インプラント バイオマテリアル 酸化チタン 再活性化 大気圧プラズマ ラジカル

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療は、改善を積み重ね、現在では予知性の高い治療法として広く普及している。しかし一方で、術後感染や長期経過症例でのインプラント周囲炎等によるインプラントの撤去が増加傾向にあることが問題視されている。(Suzuki et al., 2005; Matsuzaka et al., 2007; Fransson C et al., 2008)

インプラント体は一旦炎症を起こすと、細胞侵入や炎症性物質、pH変化などにより表面での電気化学的性質が変化し、生体活性が失われてしまうため(Mombelli et al., 2002)、歯石、不良肉芽の外科的除去を行っても、周囲骨を再生することは非常に困難であることが知られている。そのため、病的変化も含めた過酷な口腔内環境でも撤去せずに確実かつ安全に機能回復できるインプラントリカバリーシステムの開発が望まれていた。

そこで本研究グループは、研究分担者川下が開発に関わり、高い骨結合能を有するアルカリ加熱処理酸化チタンに着目した(Miyazaki et al., 2002; Kokubo et al., 2006)。先行実験として、アルカリ-加熱処理チタンを2週間模擬炎症環境下に置いた後、口腔内で実施可能な処理条件での低温(40℃)アルカリ処理により、再び表面活性を回復させる全く新しいリカバリー方法を発見した。(図1)

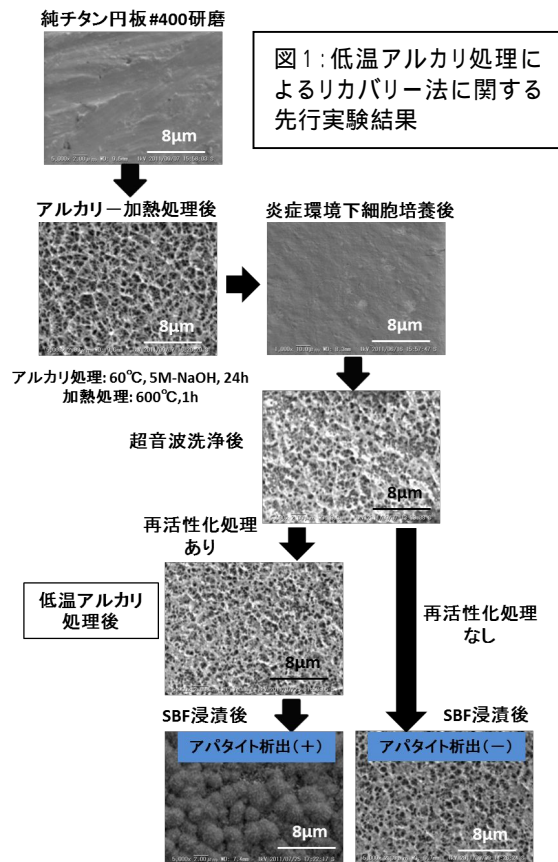
この方法により口腔内でのインプラント表面再活性化処理の可能性が示唆されたが、処理時間や殺菌の効力についてさらなる効率化が必要であった。そのため、低温でありながら高いエネルギー粒子を放出できる大気圧プラズマジェット技術に着目し(Kaneko et al., 2012)、殺菌、表面再活性化、組織再生の処理を大幅に効率化する方法を確立しているところである。

さらに近年、NaOH-温水-アンモニア雰囲気加熱処理にて窒素ドーパ酸化チタンが形成され、可視光によるラジカル生成、擬似体液(SBF)でのアパタイト形成を示すことを新たに見出した。(Kawashita et al., 2014)。これら最新の工学技術により、選択的にラジカル応用することで、全く新しいリカバリーシステムを構築できると考えた。

2. 研究の目的

歯科インプラントは予知性の高い治療法として広く普及しているが、一方で、術後感染やインプラント周囲炎による歯槽骨吸収により、インプラント体の撤去を余儀なくされたり、インプラント体の露出による機能的、審美的な障害が問題となっている。しかしながら、現在のところ、インプラント周囲炎に対する根本的な解決方法はなく、臨床現場では喫緊の課題となっている。

そこで本研究では、最新の工学技術により、部位や時期を選択してラジカルを応用することで、インプラント周囲炎に対する全く新しい包括的インプラントリカバリーシステムを構築することを目的とする。具体的には、可視光応答型酸化チタンのラジカル生成能による術後感染リスク低減および中長期的なプラークコントロール、低温プラズマジェットによる口腔内リカバリーシステム開発を主体として、長期にわたり安心安全な歯科インプラントシステムの構築を目指す。



3. 研究の方法

(1) 可視光応答型酸化チタンの開発

アルカリ - 加熱処理を行うと、チタン酸ナトリウムとチタン水酸化物(Ti-OH)に富む網目構造の剥離しにくい生体活性層が作られる(Kokubo et al., 2004)。さらに、研究分担者川下はNaOH - 温水 - アンモニア雰囲気加熱処理にて 5atm%程度の窒素を含むアナターゼ型窒素ドーピング酸化チタンが形成されることを明らかにした。本研究では、再活性化処理を前提としたアルカリ - 加熱処理に関し、NaOH 濃度、加熱温度、アンモニア雰囲気加熱について、ラジカル生成能や骨結合能等を比較した上で最適な条件を明らかにする。

なお、チタン表面の構造解析には XRD、XPS を利用する。

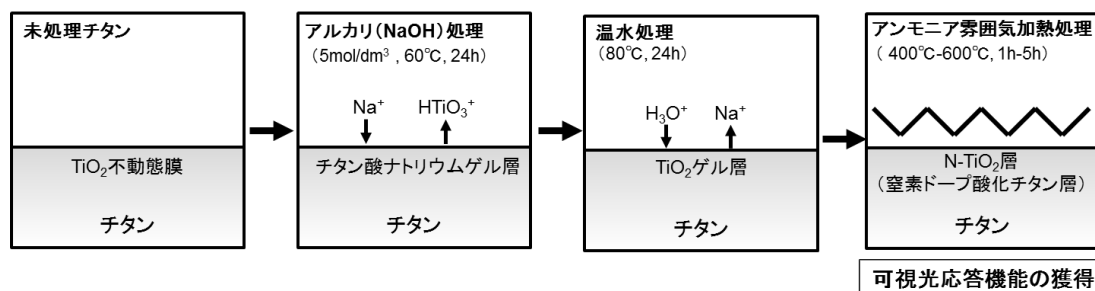
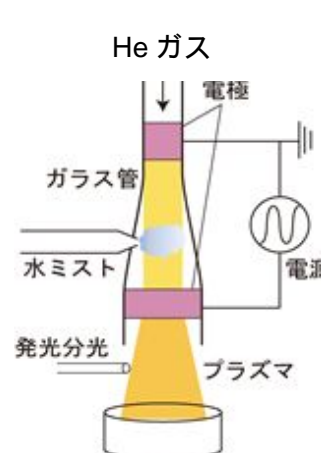


図2: 可視光応答型酸化チタン(窒素ドーピング型)の作製手順

(2) 低温プラズマジェット照射装置の開発

直径5mmのガラス管にヘリウムガスを供給し、1対のリング状電極を1-4cm程度の間隔で設置し、電圧5-20kV、周波数10-20kHzの低周波高電圧を印加することで、大気圧低温(40程度)プラズマを生成する。ガス流量、印加電圧等を制御することで、プラズマをジェット状で噴射することができることから、図3のような低温プラズマジェット照射装置を製作する。プラズマ中の水酸化ラジカルの密度を変化させるために、ミスト状の水をプラズマ内に導入することにより、従来のプラズマジェットとは異なり、水酸化ラジカルを制御して生成可能な装置を開発する。

図3: 低温プラズマジェット照射装置



(3) 生体安全性に関する検討

細胞実験およびモデル動物を用いた実験に先立ち、可視光応答型酸化チタンおよび低温プラズマジェット装置から生成するラジカル量を電子スピン共鳴(ESR: Electron Spin Resonance)法により測定する。生成される水酸化ラジカルの寿命は数ms程度と短く、研究分担者の佐々木らの研究(Kanno, Sasaki, et al., 2012)により、低濃度であれば生体応用への安全性が確認されている。

予備実験結果からは、プラズマから生成されるラジカルも酸化チタンと同じく低濃度であり、生体安全性に大きな問題はないと考えられるが、さらにスーパーオキシドなど他のラジカルも同様に定量する必要がある。なお、可視光を照射しない場合、ラジカルはほとんど生成されないことが確認されており、選択的なプラズマ応用が可能であると考えられる。

(4) in vitro系での炎症環境モデルにおける再活性化

in vitro系での炎症環境モデルの製作

酸化チタン円板上に上皮系細胞としてラット由来Rat-1線維芽細胞株を播種し、さらにNR8383マクロファージ細胞株を非接触共培養する。(図4)

生体での炎症反応を模擬的に再現するためにLPS(Lipopolysaccharide)を1-5µg/ml添加し、さらに2週間培養する。なお、炎症状態が再現されているかどうか確認するため、炎症性サイトカインのmRNA発現レベルの評価(リアルタイムPCR)、炎症性サイトカインの分泌量(ELISA法、2次元電気泳動装置による解析)、炎症反応に伴うpH低下を測定する。

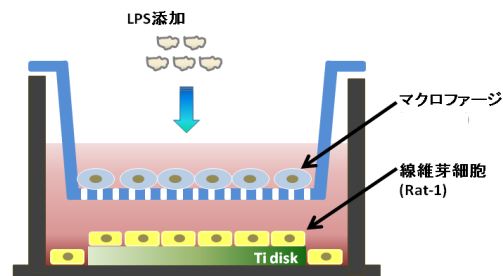


図4: トランスウェル法による炎症環境モデル(線維芽細胞とマクロファージによる非接触共培養)

再活性化処理による殺菌・不良組織除去効果評価

可視光応答型酸化チタン円板上に上ラット由来Rat-1線維芽細胞株を炎症環境下において培養した後、プラズマ照射および低温アルカリ処理により再活性化を行う。NaOHの濃度、プラズマ照射時間について、殺菌・不良組織除去効果に関する再活性化最適条件を明らかにする。

a. 殺菌作用の評価

口腔内細菌を含むバイオフィルムに対しプラズマ照射を行い、殺菌作用について評価する。

b. 付着細胞の観察

トリプシンにより、付着細胞を分離し、DNA量を測定することで付着細胞量を定量する。

c. 残留タンパク質の定量

セルスクレーパーを用いてTiディスク表面に付着したタンパク質を剥離し、ブラッドフォード染色液と混和後、分光吸光度計(波長:595nm)にてタンパク質濃度を定量する。

再活性化処理による骨形成能評価

再活性化処理条件の最適化のために、各種再活性化処理条件における骨形成能について、下記の通り、疑似体液浸漬により、および、細胞生物学的手法により評価する。

a. 疑似体液(SBF)浸漬によるアパタイト形成評価

b. 細胞増殖

DNA量の定量により細胞量を評価

c. 細胞代謝活性

アラマブルー試薬の呈色反応により評価

d. 骨芽細胞分化の評価:

- ・マーカー遺伝子発現量 (ALP、オステオカルシン、RUNX2等)のリアルタイムPCR定量
- ・アルカリホスファターゼ活性の定量
- ・石灰化結節形成の定量 (アリザリンレッド染色法)

4. 研究成果

(1) 可視光応答型酸化チタンおよび低温プラズマジェット照射装置の開発

再活性化処理を前提としたアルカリ-加熱処理に関し、NaOH濃度、加熱温度、アンモニア雰囲気加熱について、ラジカル生成能や骨結合能等を比較した上で最適な条件を明らかにした。

また、電圧5-20kV、周波数10-20kHzの低周波高電圧を印加することで、大気圧低温(40程度)プラズマの生成を確認した。さらに、ガス流量、印加電圧等を制御することで、プラズマをジェット状で噴射することができる低温プラズマジェット照射装置の開発に成功した。

(2) *in vitro*系での炎症環境モデルにおける再活性化

*in vitro*系での炎症環境モデルの製作

ラット由来Rat-1線維芽細胞株をNR8383マクロファージ細胞株と非接触共培養し、さらにLPSを加えることにより、*in vitro*系での炎症環境を再現することに成功した。

再活性化処理による殺菌・不良組織除去効果評価

可視光応答型酸化チタン円板上に上ラット由来Rat-1線維芽細胞株を炎症環境下において培養した後、プラズマ照射および低温アルカリ処理により再活性化を行い、殺菌・不良組織除去効果に関する再活性化最適条件を明らかにした。

再活性化処理による骨形成能評価

再活性化処理条件の最適化のために、各種再活性化処理条件における骨形成能について、疑似体液(SBF)浸漬によるアパタイト形成評価を行った。

【各再活性化処理条件】

・プラズマ照射

(He: 6kV, 3L/min)

条件 1分

条件 1分×5回

・アルカリ処理

条件 0.01M NaOH 1分

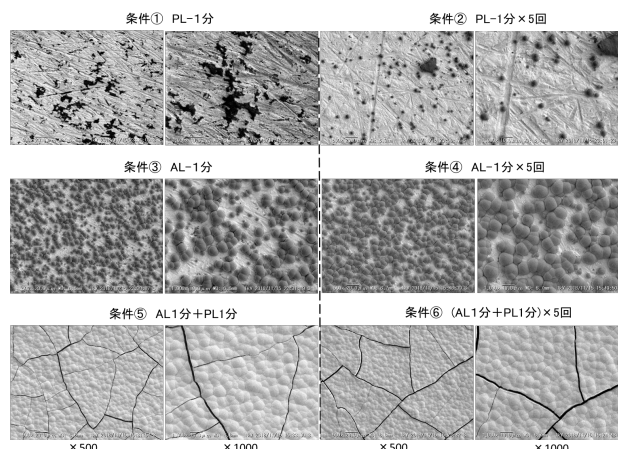
条件 0.01M NaOH 1分×5回

・アルカリ処理+プラズマ照射

条件 アルカリ1分+プラズマ 1分

条件 (アルカリ1分+プラズマ 1分)×5回

【アパタイト形成評価】



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- Kawashita M, Iwabuchi Y, Suzuki K, Furuya M, Yokota K, Kanetaka H.
Surface structure and in vitro apatite-forming ability of titanium doped with various metals.
Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 555, 558-564, 2018
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.07.027 (査読有り)
- Hashimoto M, Kitaoka S, Obata Y, Muto S, Ogawa T, Furuya M, Kanetaka H.
Control of HAp formation and osteoconductivity on nitrogen-doped TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti.
Key Engineering Materials 758, 86-89, 2017
DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.758.86 (査読有り)
- Tominami K, Kanetaka H, Sasaki S, Mokudai T, Kaneko T, Niwano Y.
Cold atmospheric plasma enhances osteoblast differentiation.
PLoS ONE 12(7): e0180507, 2017
DOI: 10.1371/journal.pone.0180507 (査読有り)
- Sasaki S, Kanzaki M, Hokari Y, Tominami K, Mokudai T, Kanetaka H, Kaneko T.
Roles of charged particles and reactive species on cell membrane permeabilization induced by atmospheric-pressure plasma irradiation.
Jpn. J. Appl. Phys. 55(7S2): 07LG04 1-5, 2016
DOI: 10.7567/JJAP.55.07LG04 (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

- 鈴木 香苗、川下 将一、岩津 実里、目代 貴之、金高 弘恭
銀または銅をドーブしたチタンのアパタイト形成能と可視光照射による抗菌性の向上
第 40 回バイオマテリアル学会大会, Nov.12-13, 2018, 神戸
- Iwatsu M, Ogawa T, Mokudai T, Kanetaka H, Kawashita M, Watanabe T, Sasaki K.
Visible light-induced antimicrobial activity of N-doped TiO₂ on Ti substrates
27th Annual Scientific Meeting of the European Association For Osseointegration,
October 11-13th, 2018, Vienna, Austria
- Hashimoto M, Kitaoka S, Obata Y, Muto S, Ogata T, Furuya M, Kanetaka H.
Control of HAp formation and osteoconductivity on nitrogen-doped TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti.
29th Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine
(Bioceramics29), October 25-27, 2017, Toulouse, France
- Hashimoto M, Kitaoka S, Obata Y, Muto S, Furuya M, Kanetaka H.
HAp formation and osteoconductivity of nitrogen-doped TiO₂ scale formed by oxynitridation of Ti exhibiting different surface charge.
The 15th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017)
August 29, 2017, Kyoto, Japan
- Kaneko T, Sasaki S, Takashima K, Kanzaki M, Kanetaka H, Tachikawa M.
Gas-liquid interfacial plasmas for enhancing gene transfer into living cells.
The 44th European Physical Society Conference on Plasma Physics, June 26-30, 2017
Belfast, UK 【招待講演】
- Kaneko T, Sasaki S, Takashima K, Sato T, Kanetaka H, Tachikawa M, Kanzaki M.
Gas-Liquid Interfacial Atmospheric Pressure Plasmas for Medical Applications.
The 3rd Japan-Taiwan Workshop on Plasma Life Science and Technology, Dec.16, 2016,
New Taipei City, Taiwan (Ming Chi University of Technology)
【招待講演】 (Plenary)

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：佐々木 啓一
ローマ字氏名：(SASAKI, keiichi)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院歯学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：30178644

研究分担者氏名：金子 俊郎
ローマ字氏名：(KANEKO, toshiro)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院工学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：30312599

研究分担者氏名：川下 将一
ローマ字氏名：(KAWASHITA, masakazu)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院医工学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70314234

研究分担者氏名：工藤 忠明
ローマ字氏名：(KUDO, tadaaki)
所属研究機関名：東北大学
部局名：大学院歯学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：50431606

研究分担者氏名：目代 貴之
ローマ字氏名：(MOKUDAI, takayuki)
所属研究機関名：東北大学
部局名：金属材料研究所
職名：助教
研究者番号（8桁）：30466544

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。