

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20632

研究課題名(和文) 歯科用インプラントのチタン表面処理による骨形成促進と機能安定性に関する基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental researches of bone formation acceleration and functional stability about dental implant by surface modification

研究代表者

井田 裕人 (Ida, Hiroto)

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：20746979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、我々の研究グループが開発したCa修飾法によって作製されたCa修飾純チタンインプラントやCa修飾酸エッチング純チタンインプラントが生体埋入後に高い骨形成能を示し、骨組織内で高い安定性を得られるという仮説を動物実験で証明することである。酸エッチング純チタンインプラントにCa修飾を行うとインプラントの機械的安定性は高くなり、組織学的評価においては、インプラント周囲に多くの新生骨形成が確認できた。さらに、生体内の残留金属元素濃度に異常は認められなかった。以上の結果から、Ca修飾酸エッチング純チタンインプラントは生体材料として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study is to prove the hypothesis that Ca modified titanium implants and Ca modified acid etching titanium implants made by using novel Ca modification method that our study group developed show increased new bone formation and high stability after being implanted to organism by animal study.

As a result, Ca modified acid etching titanium implants showed high mechanical stability, increased new bone formation around implants by histomorphometric evaluation. Moreover, Ca modified acid etching titanium implants demonstrated no significant accumulation of metal ions. Collectively, these findings suggest the usefulness of Ca modified acid etching titanium implants for biomedical applications.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：インプラント表面処理方法 生体親和性 表面構造の変化 生体力学的評価 新生骨形成量

1. 研究開始当初の背景

現在、チタン製インプラントは臨床で広く使用されているが、問題点として、歯科用インプラントは歯槽骨の吸収した高齢者を対象とする際、予後の安定性が低いこと、歯科矯正用アンカースクリューでは、動揺や脱落があること、成熟した骨でなければ安定しないこと、また整形外科インプラントは骨との接合部にゆるみが生じる可能性があることが挙げられる。骨組織への結合を向上することが可能となれば、これらの問題点は一挙に改善する。これまでのインプラント表面処理の方法として、まずアルカリ加熱処理が挙げられる。チタンが骨結合性を示すのはチタン表面が酸化チタンであることに起因する。この酸化チタン層の厚さを増大するためにアルカリ処理が考案されたが、表面がゲルとなるため骨結合力は限定的であった。これを解決するために、ゲル層を焼きしめ、加熱処理を行う方法が開発され (Nishiguchi et al. 2003 J Biomed Mater Res)、大腿骨頭置換術で用いられるシステムで実用化されている (Kawanabe et al. 2009 J Biomed Mater Res)。このアルカリ加熱処理チタンは、生体内に埋入されてから Ca がインプラント表面に結合する。すなわち生体内のCa(血中濃度約2.5mmol/L)によって生体内の環境(37°C、タンパク等が存在する)でしかインプラント表面に Ca が結合できない。もし、製品段階でインプラントに Ca を結合することができれば、アルカリ加熱処理チタン以上のアパタイトを形成する能力が期待できる。

CaSiO₃ セラミックコーティングは、生物活性を示すCaイオンを放出できる最も典型的なセラミック材料であり、それを応用したCaSiO₃ セラミックコーティング処理法もその有効性が報告されている。しかしCaSiO₃ は分解能(劣化能)が高く、周囲のpHが高くなり、細胞活性が低くなり、脱落率が高くなるという報告もある (Chengtie et al. J Biomed

Mater Res 2008.402-410)。一方、粗面チタン(酸エッチングが一般的な調製法である)もアルカリ加熱処理チタンに比較して骨形成能に高い効果があることが知られている。酸エッチング処理を行ったチタン表面の細胞は、ALP、オステオカルシン陽性細胞数が多く (Zhao et al. 2005 J Biomed Mat Res)、酸エッチング処理を行なった歯科用チタンインプラントなどが臨床応用されている。以上の報告から、骨結合が強くなるインプラント表面処理の条件として、(1)細胞活性を示すCaイオンが適度に放出されること。(2)表面コーティングがはがれない。腐食しないこと。(3)周囲のpHが上昇しないこと(細胞活性が低下する)が挙げられる。そこで本研究は、我々の研究グループによって開発された表面処理方法によって作製された、Ca修飾純チタンインプラントおよび表面処理を併用した酸エッチングCa修飾純チタンインプラントと、これまで臨床で用いられている純チタンインプラント、アルカリ加熱処理純チタンインプラント、酸エッチング純チタンインプラントの5種を用いて、インプラント周囲の骨形成能についてin vivo、in vitroにおいて比較検討を行う。

2. 研究の目的

本研究は、我々の研究グループによって開発された表面処理方法によって作製された、Ca修飾純チタンインプラント、酸エッチングCa修飾純チタンインプラントを用い、表面粗さの測定、試料表面を構成する元素の組成および化学結合状態の分析、疑似体液への浸漬試験、骨芽細胞、歯根膜細胞を用いた細胞接着、増殖・分化試験、単球の細胞株を用いた炎症性マーカー試験、実験動物を用いた埋入試験を行ない、インプラント周囲の骨形成能と安定性および生体安全性について評価し、これまでに臨床で用いられている純チタンインプラント、アルカリ加熱処理純チタンイン

プラント、酸エッチング純チタンインプラントと比較する。

3. 研究の方法

(1) 純チタン、アルカリ加熱処理純チタン、酸エッチング純チタン、Ca修飾純チタン、酸エッチングCa修飾純チタンの5種のインプラントの表面粗さを確認するために、カラー3Dレーザー顕微鏡を用いた測定を行なう。さらに、X線光電子分光測定を用いて、試料表面を構成する元素の組成、化学結合状態の分析を行なう。

(2) 上記5種の金属小片を24個ずつ用意し、疑似体液5.0ml中に各小片を3つずつ入れ、7日後、28日後の金属片からの溶出成分の挙動をICP-MSにて観察する。pHは2.0に調整し温度は37.5で、測定は計4回行なう。

(3) 上記5種の金属試料片表面上で骨芽細胞と歯根膜細胞の培養を行い、初期接着率(5時間後)をヘモサイトメーターで計測する。また、7日後までの細胞増殖率をMTTアッセイにて計測する。さらに、骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシンの経時変化、Bone nodule 形成量などを評価する。また、5種の金属片表面上で単球の細胞株であるRAW264.7細胞を培養し、それらにLPS刺激を加え、炎症性マーカーの発現を確認する。

(4) 上記5種の金属のインプラントの表面構造の違いをSEMを用いて比較検討する。さらに12週齢の雄性Wistarラットを50匹用い脛骨に各種インプラントを埋入しインプラントに荷重を付加しない群と10gの荷重を付加する群に分け、埋入7日後28日後に撤去したインプラント表面構造と埋入前のそれらとの変化もSEMを用いた観察、比較をし、損傷度などの検討をおこなう。

(5) トルクゲージを用いて上記4のラットにおいて各種インプラントの埋入トルク値および埋入直後、埋入7日後、埋入28日後の撤去トルク値の測定を行い、それぞれのトルクの最高値を記録する。また埋入後のインプラ

ントの安定性を評価するため動揺度を測定する。測定方法として、インプラントと垂直にペリオテストを3か所から当て、その平均値を記録する。さらに上記4のラットとは別に40匹を用い埋入7日後、28日後に各種インプラント埋入ラット別にそれぞれ2匹ずつ屠殺し、インプラント1本を含んだ骨ブロックを作製し、引張り試験機により各種インプラントの引張り強さを測定する。

(6) 実験動物として12週齢の雄性Wistarラットを40匹用い、インプラント埋入7、28日後に屠殺し、インプラント1本を含んだ骨ブロック体を摘出し、樹脂包埋を行い、インプラント長軸方向と平行に、ミクロトームを用い、インプラント中心1か所を含む厚さ100 μ mの非脱灰切片とする。実験期間28日群に関しては屠殺10日前にカルセイン、3日前にテトラサイクリンの腹腔内注射を行い、生体染色による新生骨への蛍光色素の局在沈着により1日における新生骨形成率(MAR)を蛍光顕微鏡にて測定する。続いて切片をピラヌエバ骨染色液により染色し、明視野顕微鏡による観察を行い組織形態計測を行う。インプラント表面のそれぞれの部位から240 μ m範囲内の骨を計測対象としインプラント周囲と骨との接触率であるBICと測定範囲内中に存在する骨の面積率BAの2種類の項目の計測を行う。

(7) 上記4のラットについてインプラント埋入直後、7日、14日、21日、28日後に動物用CTから、インプラント周囲の新生骨密度、海綿骨密度、皮質骨厚さを解析し、それらの値の経時的な変化の推移を定量的に評価する。

(8) 撤去したインプラントにアリザリンレッド溶液を添加し、10分間常温にて静置した後、高精細顕微鏡デジタルカメラP71にてインプラント表面の石灰化物の観察を行う。その後、超純水にインプラントを入れ、超音波を1時間かけ成分を溶出させ、溶液を濾過し、硝酸を加えて加熱し、加熱後、25mlに定容しCaおよびPの含有量を測定することで、インプラント

表面の新生骨量を定量的に評価する。

(9) 上記4のラットについて、インプラントの種類間および即時荷重の付加が、インプラント埋入部周囲の新生骨形成における骨リモデリングの状態に与える影響を評価するため、インプラント撤去後に埋入窩部組織をトレフィンバーにより採取し、リアルタイムPCRにより埋入7日、28日後における骨芽細胞関連因子および破骨細胞関連因子の各種インプラント間における発現量を比較検討する。

(10) インプラント埋入前のラット4匹および、上記4のラットについて、埋入前と埋入7日、28日後の臓器中の残留イオン量の測定、比較を行うことによりインプラントの生体への安全性を評価する。屠殺後、臓器(脳、肺、腎、肝)をそれぞれのラットから採取し計量を行い、ICP-MSにより臓器残留イオン量を測定する。

4. 研究成果

疑似体液残留Ca元素の濃度について、純チタン、酸エッチング純チタン、Ca修飾純チタン、酸エッチングCa修飾純チタンの4種の金属箔間で有意差は認められなかった。また、Ca修飾により金属箔からのTi溶出量は低下するという結果が得られた。pH測定結果は、各種金属試験片ともに、浸漬1日後から28日後まで、pH7前後の値で一定の値を呈していた。上記4種の金属組成インプラントの表面粗さはほぼ同等で、有意差は認められなかった。また、Ca修飾純チタンインプラント、酸エッチングCa修飾純チタンインプラントではCaの2つのピークシフトが出現した。よって、Ca修飾純チタンインプラント、酸エッチングCa修飾純チタンインプラントの表面には確実にCaが接着していることが明らかとなった。埋入トルク値については、酸エッチング純チタンインプラント、酸エッチングCa修飾純チタンインプラントの値は純チタンインプラントと比べ、有意に大きな値を示した。撤去トルク値、動

揺度の測定では埋入7、28日とも酸エッチングCa修飾純チタンインプラントの値が他のインプラントより高くなり、即時荷重でその傾向はさらに大きくなることが明らかになった。動物用CTによるインプラント周囲の全骨密度は、全種のインプラントにおいて経時的な増加を示した。インプラント埋入28日後では酸エッチングCa修飾純チタンインプラントの荷重付加群が最も高い値を示した。さらに、非脱灰組織切片による骨形態計測値(BIC、BAおよびMAR)でも、酸エッチングCa修飾純チタンインプラントの値が他のインプラントより高くなり、即時荷重でその傾向はさらに大きくなることが明らかになった。SEMによる撤去後のインプラント表面構造の観察では、Ca修飾純チタンインプラント、酸エッチング純チタンインプラント、酸エッチングCa修飾純チタンインプラントの表面に、純チタンインプラントと比べ、多くの骨様沈着物が認められた。また、どのインプラントも大きな損傷は認められなかった。撤去したインプラントに対するアリザリンレッド溶液添加後の観察では、純チタンインプラントの表面に石灰化物の沈着がほとんどみられなかった一方で、酸エッチングCa修飾純チタンインプラント表面には、他のインプラントよりも多くの石灰化物の沈着が観察でき、インプラント表面大部分で、赤く染色された石灰化物がみられた。生体残留元素濃度については、全ての臓器(肝、肺、脳、腎)において、非インプラント埋入群および各種インプラント埋入群間でCaとTiの臓器残留元素濃度に有意な差は認められなかった。これらの実験結果から、我々が開発した新規の純チタン表面処理法により作製した酸エッチングCa修飾純チタンインプラントは、優れた骨形成能を示し、生体安全性も問題無いことが示された。

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2件)

Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Goudarzi F, Fukunaga T, Seiryu M, Daimaruya T, Takeshita N, Kamioka H, Adachi T, Ida H, Mayama A. Synergistic acceleration of experimental tooth movement by supplementary high-frequency vibration applied with a static force in rats. Sci Rep. 2017 October 7(1):13541-13517. DOI: 10.1038/s41598-017-13541-7. 査読有り
井田裕人、清流正弘、山本照子. 歯列正中不一致の改善における歯科矯正用アンカースクリューの有用性. 東北大学歯学雑誌. 2017年 6月 35(2)・36(1):127-136. 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

井田裕人、清流正弘、山本照子. 歯科矯正用アンカースクリューを用いて、上顎歯列の正中偏位を改善した症例. 第33回東北矯正歯科学会大会. 2017年5月13、14日. 秋田(にぎわい交流館AU(あう))

〔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
井田 裕人 (IDA, Hiroto)
東北大学・大学病院・医員
研究者番号：20746979

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()