

平成23年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390498
 研究課題名（和文）新規多糖誘導体リン酸化プルランによるチタンインプラント周囲組織の再生促進
 研究課題名（英文）Titanium implant surface modification and tissue regeneration by phosphorylated pullulan

研究代表者
 鈴木 一臣（SUZUKI KAZUOMI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：30050058

研究成果の概要（和文）：インプラント歯科治療における骨の誘導を促すことおよびインプラント上部構造体（クラウン、ブリッジ等）の新規接着材を開発した。チタン製インプラント表面をリン酸化プルラン処理することによって、ラット脛骨に埋移入2週間後でチタン表面に新生骨の形成が促進された。一方、ウレタンジメタクリレートにアミノ酸（シスチン）誘導体を15～20%添加することで、金銀パラジウム合金に対して22.4MPa（SD：1.8）の接着強さを示し、5-55℃熱負荷2万回後においても10%の低下に止まった。

研究成果の概要（英文）：The improvement of bone formation-inducing activity for dental implant treatment and the newly developed adhesive for superstructure (crown, bridge, etc) were investigated. At 2 weeks after the implant surgery in rat tibia, the enhanced new bone formation was showed on the titanium surface treated with phosphorylated pullulan. The bone strength to Ag-Au-Pt-Cu alloys of 15-20% derivatized amino acid (cystine) containing urethane dimethacrylate polymers was 22.4MPa(SD:1.8), and the degradation of the bone strength was only 10% after thermal cycling with 20,000 cycles at 5-55°C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：インプラント、チタン、表面処理、骨伝導、上部構造体、適合性、接着材

1. 研究開始当初の背景

口腔インプラント治療は、インプラント体

と骨組織のオッセオインテグレーション（骨結合）の促進を目指して改良が進められ、イ

インプラント体の材質に組織親和性からチタンおよびチタン合金が用いられている。しかし、インプラント体を埋入したにもかかわらず骨結合の獲得が得られない場合があり、骨質の脆弱な上顎臼歯部および糖尿病や骨粗鬆症などの疾患が骨結合獲得の妨げになっている。

この問題を解決するために、インプラント表面にハイドロキシアパタイト (HAp) や成長因子をコーティングする方法が行われている。すなわち、HAp についてはプラズマ溶接などによって厚さ 10~20 μm の HAp をコートしているが、母材のチタンとアパタイトが剥離、炎症が惹起される可能性が指摘されている。また、BMP などの成長因子を表面に添加すると骨芽細胞の接着や増殖、分化などの細胞応答が促進できるとされているが、生体安全性やコスト等に問題がある。

そこで、インプラント体表面の新規改質材として、天然多糖類であるプルランに着目した。すなわち、プルランは、接着性、被膜性、生体親和性および生体安全に優れており、肝細胞に特異的に取り込まれること、細胞応答促進作用が期待できることなどから、これらの特性を生かしたインプラント表面の生体活性改質剤になるのではと考えた。

2. 研究の目的

天然多糖類であるプルランをリン酸化処理したリン酸化プルランを用いてのチタンインプラント表面改質およびインプラント上部構造体の接着材の開発を目的とした。すなわち、チタンプレート上で培養した骨芽細胞様細胞株の接着、増殖、分化に対するリン酸化プルラン処理の影響および試作表面したインプラントを実験動物に埋入した際の骨形成について検討した。一方、インプラント治療の成否には、上部構造体の材質およびアバットメントとの適合性や接着システムが重要となることから、これらについても併せて検討した。

3. 研究の方法

(1) 天然多糖類プルランのリン酸化：プルラン 8.5 g を蒸留水 38m l に溶解してそこに 1M リン酸水溶液 200m l を加え、170°C で 5 時間反応させた。その後、反応液からエタノール析出を行って合成物を得た。次に、合成物の構造確認をフーリエ変換赤外分光分析によって行った。

(2) リン酸化プルラン処理したチタンプレート上での細胞応答：直径 13mm のチタン製プレートを 1.0% リン酸化プルランナトリウム水溶液に 24 時間浸漬し、10 分間超音波洗浄を行った。

①リン酸化プルランの培養細胞形態に与える影響：各処理のチタンが細胞骨格に与える

影響を検討するために、phalloidin を用いて免疫蛍光染色を行って蛍光顕微鏡にて観察した。

②リン酸化プルランの細胞増殖に与える影響：各条件のチタンプレートを 24 ウェル細胞培養用プレートに設置し、細胞を 1×10^4 個/ウェルの濃度で播種した後、1, 2 および 3 日後の細胞数を MTS 法で評価した。

③リン酸化プルランのマインドジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) ファミリーの発現におよぼす影響：MC3T3-E1 細胞を用いて MAPK ファミリーの活性化の度合をウエスタンブロッティング法によって比較した。

(3) 動物実験における組織学的検討：1.0% リン酸化プルラン処理したダンベル型チタンインプラントを、Wistar 系雄 6 週齢ラット脛骨に埋入して、2 週間後に摘出してリゴラックを用いて通法に従い樹脂包埋、研磨切片を作製した。次に、チタン周囲における骨造成の組織学的観察を行った。また、埋入したインプラント体周囲の骨接触率を Ayukawa らの手法を用いて算出した。

(4) インプラントアバットメントと上部構造体の接着適合性および接着性の検討

①試作接着材は、ウレタンジメタクリレート (UDMA) -メタクリロイルシスチンに 3 元系レドックス触媒を添加して調整した。次に、本接着材と市販の合着・接着材 6 種類についてその被膜厚さを ISO 規格試験に準じて測定した。

②試作接着材の金銀パラジウム合金に対する接着強さの測定：10×10×3mm のパラジウム合金プレートとサンドグラスト処理したステンレスロッドを接着させた後、37°C 24 時間水中浸漬および 5-55°C 熱負荷 2 万回後の条件で引張り強さをオートグラフを用いて測定した。

4. 研究成果

(1) インプラント用チタンプレートに対するリン酸化プルランの接着

①プルランのリン酸化：チタンに対するプルランの接着機能を高めるためにリン酸基の導入を計った。FT-IR スペクトルから 1000~1200 cm^{-1} 付近にリン酸基に帰属するピークが現れ合成された化合物中にリン酸基の存在が確認 (図 1) された。

②チタンプレートへのリン酸化プルランの吸着：水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) を用いたリン酸化プルランのチタンに対する接着実験では、蒸留水で洗浄後においても振動子の振動数の減少が認められ、チタン上にリン酸化プルランが吸着することが明らかとなった。

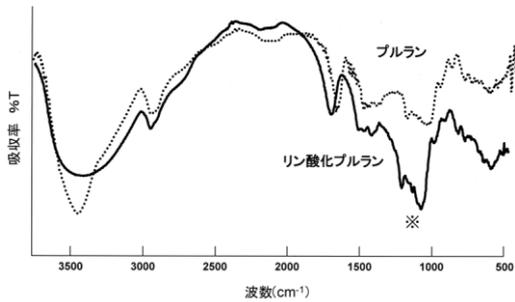


図1 プルランおよびリン酸化プルランの FT-IRスペクトル

(2) リン酸化プルラン処理したチタンプレートでの細胞応答

①リン酸化プルラン処理が培養細胞形態におよぼす影響：細胞播種3時間および24時間後における培養細胞をHoechst とファロイジンによって染色して形態を蛍光顕微鏡で確認(図2)した。その結果、リン酸化プルラン処理したチタン上およびコントロールチタン上のいずれにおいても、不規則な紡錘形の細胞が観察され、本光顕レベルでは細胞内のアクチン線維の走行やクロマチン構造および細胞形態に差は認められなかった。

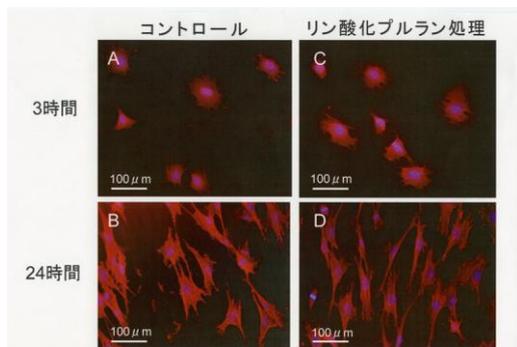


図2 MC3T3-E1細胞播種後、3時間、24時間後の蛍光免疫染色における細胞形態

②リン酸化プルラン処理が培養細胞の細胞接着および増殖におよぼす影響：リン酸化プルラン処理チタンおよびコントロールチタンの両条件とも経時的接着細胞数は増加したが、両条件間での接着細胞数に有意差は認められなかった。また、いずれの場合も経時的に細胞は増殖したが、MC3T3-E1細胞においては細胞播種1, 2, 3日後においてリン酸化プルラン処理チタンの方がコントロールと比べて有意に高い(図3)増殖反応を示した。なお、C3HIOT 1/2細胞においては、細胞播種2, 3日後でリン酸化プルラン処理チタンの方がコントロールに比べて有意に高い増殖反応を示した。

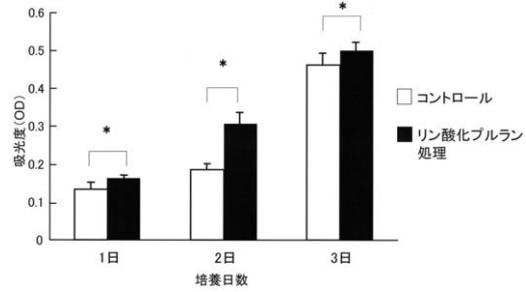


図3 MC3T3-E1細胞における細胞増殖反応の比較

③リン酸化プルラン処理が培養細胞の MAPKファミリーの発現におよぼす影響：MAPKファミリーの活性化状態をMC3T3-E1細胞を用いてコントロールチタン上とリン酸化プルラン処理チタン上でウェスタンブロッティング法によって比較した。その結果、MAPKファミリーの中でも細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)の活性化がリン酸化プルラン処理によって強く誘導されていることが判った(図4)。そこで、MEK/ERK阻害剤を添加した状態で細胞増殖実験を行ったところ、観察されていたリン酸化プルラン処理チタン上での細胞増殖反応が抑制(図5)されることが判明した。

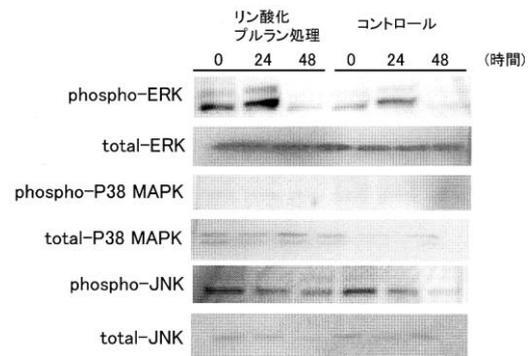


図4 ウェスタンブロッティングによるMAPKの発現におよぼすリン酸化プルランの影響

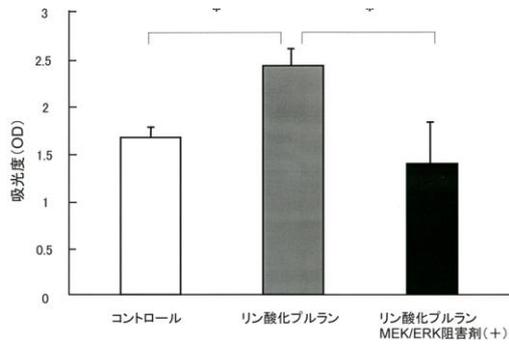


図5 MEK/ERK阻害剤添加でのMC3T3-E1細胞の増殖におけるリン酸化プルランの影響

(3) 動物実験における組織学的検討

光学顕鏡下での組織観察では、コントロールと比較してリン酸化プルラン処理したチタンインプラント体周囲のほうに新生骨の形成が顕著(図6)であった。また、インプラント体周囲の骨接触率は、リン酸化プルラン処理が79.9%、コントロールが60.8% (n=3) とリン酸化プルラン処理したインプラント体の方が高い(図7)傾向にあった。

動物実験においてリン酸化プルラン処理チタンインプラント体埋入後、2週間で新生骨の形成が促進される傾向が認められた。これは、細胞実験での増殖反応の結果と合致すると思われるが、埋入2週間後の切片であってリン酸化プルラン処理チタン周囲は炎症性の反応が強く発現している可能性も否定できない。今後は、インプラント埋入から摘出までの期間を考え、より長期間の組織像について検討する必要がある。

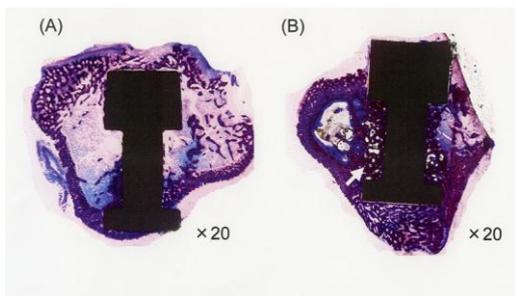


図6 リン酸化プルラン処理チタンインプラントを埋入した骨周囲の組織

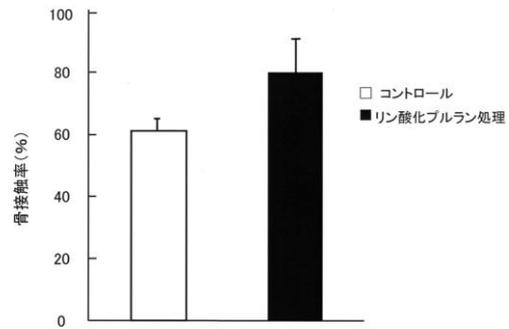


図7 チタンインプラント周囲の骨接触率

(4) インプラントアバットメントと上部構造体の接着についての検討

①試作接着材の被膜厚さについて：市販接着・接着材の練和開始180秒後の被膜厚さ(図8)は、リン酸亜鉛セメント(EL)で30 μ m、ガラスアイオノマーセメント(FI)で20 μ m、試作接着材(MB)は約5 μ mと極めて薄く、良好な適合性が期待できた。

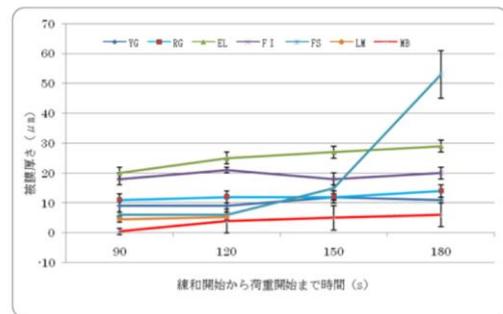


図8 試作接着材および市販接着・接着材の被膜厚さ比較

②試作レジン系接着材のAu-Ag-Pd合金に対する接着強さについて：37 $^{\circ}$ C水中24時間浸漬した後の接着強さは22.4MPa (SD: 1.8)を示し5-55 $^{\circ}$ C熱負荷2万回後においても初期強さの10%低下に止まった。これは、接着性機能性化合物中のシスチン基と貴金属原子との相互作用効果と考えている。

本研究から、多糖誘導体リン酸化プルランはチタンインプラントの表面改質の有用な物質であることおよびUDMA/メタクリロイルシスチンから成る新規接着材開発の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6件)

(1) Irie, M., Maruo, Y., Nishigawa, G., Suzuki, K. and Watts, D. C.; Determinants of early interfacial-gap performance of indirect composite restoration. Dental Materials, 査読有り, 26, 608-615, 2010.

(2) Yoshohara, K., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Fukegawa, D., Hayakawa, S., Mine, A., Nakamura, M., Minagi, S., Osaka, A., Suzuki, K. and van Meerbeek, B.; Nano-controlled molecular interaction at adhesive interfaces for hard-tissue reconstruction. Acta Biomaterialia, 査読有り, 6, 3573-3582, 2010.

(3) Lihua, E., Irie, M., Nagaoka, N., Yamashiro, T. and Suzuki, K.; Mechanical properties of resin-modified glass ionomer cements for luting: Effect of adding spherical silica filler. Dental Materials Journal, 査読有り, 29, 253-261, 2010.

(4) Irie, M., Suzuki, K. and Watts, D. C.; Delayed polishing technique on glass-ionomer restorations., The Japanese Dental Science Review, 査読有り, 45, 14-22, 2009.

(5) Nanba, N., Yoshida, Y., Nagaoka, N., Takashiba, S., Matsuura-Yoshimoto, K., Maeda, H., Van Meerbeek, B. and Suzuki, K.; Antibacterial effect of bactericide immobilized in resin matrix. Dental Materials, 査読有り, 25, 424-430, 2009.

(6) Irie, M., Tjandrawinata, R., Lihua, E. and Suzuki, K.; Flexural performance of

flowable versus conventional light-cured composite resin in long-term in vitro study., Dental Materials Journal, 査読有り, 27, 300-309, 2008.

[学会発表] (計2件)

(1) Irie, M., Tamada, Y., Maruo, Y., Nishigawa, G., Oka, M., Minagi, S., Suzuki, K. and Watts, D. C.; Early no interfacial-gap incidence vs. Flexural Modulus with injectable composites, Annual Meeting of the IADR, San Diego, USA, March 19, 2011.

(2) 鈴木一臣、接着界面の最前線：界面の形成メカニズムと機能について、第28回日本接着歯学会学術大会、(招待講演)、松江市くにびきメッセ、2010/1/23.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 一臣 (SUZUKI KAZUOMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30050058

(2) 研究分担者

入江 正郎 (IRIE MASAO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：90105594

田仲 持郎 (TANAKA JIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40171764

(3) 連携研究者

山本 敏男 (YAMAMOTO TOSHIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：30107776