

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09992

研究課題名(和文) バイオセラミックス・コーティングによる骨伝導性の強化とインプラント周囲炎の予防

研究課題名(英文) Enhancement of osteoconductivity and prevention of peri-implant inflammation with bioceramic coating

研究代表者

PEZZOTTI G. (Pezzotti, Giuseppe)

京都工芸繊維大学・その他部局等・理事・副学長

研究者番号：70262962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：再生力や免疫力が低下した高齢者に対して、良質の歯科インプラント治療を提供するには、高い生物活性と抗菌性を有するインプラント材料を使用することが望ましい。しかし、インプラント材料として最も多く使われているチタン合金は、これらの要件を十分に満たしているとは言い難い。本研究は、骨伝導性と抗菌効果(インプラント周囲炎の予防)を窒化ケイ素コーティングによって強化できるかを *in vitro* と *in vivo* の系で検証し、さらに窒化ケイ素を始めとするバイオセラミックスが骨結合に与える影響を様々な分光学的解析法により明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科インプラント手術件数は年々増加しているものの、骨質が低下した患者や術後感染症であるインプラント周囲炎に対する対策は十分されておらず、高機能化インプラント材料の開発が喫緊の課題となっている。現在、生物活性と抗菌性を同時に強化する処理方法は国内外でも例は少ない。窒化ケイ素コーティングによりチタンの生物活性、抗菌性と骨伝導性を強化する試みは、再生力・免疫力が低下した高齢者においても早期の骨結合の獲得と術後感染予防が可能となり、QOLの向上に大いに貢献できると考えられる。本研究は、生体材料学・歯科医学領域だけでなく、整形外科や形成外科領域においても大きなインパクトを与えると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To provide high-quality dental implant treatment to elderly people with reduced regenerative and immune systems, it is desirable to use implant materials with high bioactivity and antibacterial properties. However, it is difficult to say that titanium alloys, which are the most commonly used implant material, fully meet these requirements. This study examined *in vitro* and *in vivo* systems with concurrent osteoconductivity and antibacterial properties (prevention of peri-implantitis). Both properties could be enhanced by applying on the implant a thin silicon nitride coating. In order to further clarify at the molecular scale the positive effects of silicon nitride bioceramics on synthesis of bone tissue and bacterial lysis, various spectroscopic analytical methods were applied.

研究分野：生体材料学

キーワード：窒化ケイ素 インプラント周囲炎 骨伝導 抗菌性

## 1. 研究開始当初の背景

再生力や免疫力が低下した高齢者に対して、良質の歯科インプラント治療を提供するには、高い生物活性と抗菌性を有するインプラント材料を使用することが望ましい。しかし、インプラント材料として最も多く使われているチタン合金は、これらの要件を十分に満たしているとは言い難い。新規バイオセラミックス窒化ケイ素は優れた生物活性と高い骨伝導性、歯周病菌に対する抗菌性を有することから、新たなインプラント材料として注目されている。我々はレーザー・パターンニングにより、窒化ケイ素セラミックスをチタン表面にコーティングすることで抗菌性と骨伝導性をさらに強化できると考えた。

本研究は、骨伝導能と抗菌効果（インプラント周囲炎の予防）を窒化ケイ素コーティングによって強化できるかを *in vitro* と *in vivo* の系で検証し、さらに窒化ケイ素を始めとするバイオセラミックスが骨結合に与える影響を様々な分光学的解析法により明らかにする。本法は、迅速に強固な骨結合を獲得し、インプラント周囲炎を予防することで QOL 向上に寄与する。

## 2. 研究の目的

歯科や整形外科領域などでは、インプラント埋入後の感染症に対し抗菌薬を長期間投与することで耐性菌が出現し治療に難渋することがあるため、社会的な問題となっている。そのため骨質や再生力・免疫力が低下した高齢者や有病者（骨粗鬆症・糖尿病・ステロイドの長期服用）に対してインプラント治療（歯科インプラントや人工関節）を確実にを行うには、高い生物活性と抗菌性を有するインプラント材料を使用することが望ましい。実際、骨粗鬆症患者の整形外科手術の約 20% にインプラントの緩みが生じるとされており、骨再生能や骨質が低下した患者に対し迅速に強固な骨結合を獲得し、高品質インプラント治療を提供することは、高齢化先進国として克服すべき課題となっている。しかし、代表的なインプラント材料であるチタン合金は生物不活性であり、これらの要件を十分に満たしているとは言い難い。

チタンインプラント表面を抗菌物質である銀やヨードでコーティングした高機能化インプラントでは、表面処理は抗菌性を担持できるものの、細胞親和性を損なうという欠点があった。一方で、骨再生を促す成長因子 BMP-2 や FGF-2 をインプラント表面にコーティングする試みは見られるが（Shah JN 等. *Sci Transl Med*.2013）、成長因子は高価であり、体内で不安定であるため実用化に至っていない。以上のことから、抗菌性と生物活性を併せ持つ次世代のインプラント・デバイスの開発が急務となっている。

我々の研究グループは優れた生物活性と高い骨伝導性、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) や表皮ブドウ球菌に対する抗菌性を有する新規バイオセラミックスである窒化ケイ素に注目した。窒化ケイ素は、米国において脊椎固定術用インプラントとしてすでに臨床応用されており、その適応範囲も広がっている。申請者のグループは、窒化ケイ素が骨増生因子である IGF-1 の産生を促し、同時に骨吸収抑制因子である RANKL の発現を抑制することを明らかにした（Pezzotti 等. *Sci Repo*.2016,2017, Pezzotti 等. *ACS Biomater. Sci. Eng*.2016）。また、ラマン分光法により、窒化ケイ素と骨の界面では結晶性の高いヒドロキシアパタイト (HAP) が形成されていることを明らかにしている。こうした窒化ケイ素の生物活性研究における先進的な取り組みと着実な成果は、申請者らのグループの技術力の高さを示すものである。さらに申請者らは、チタン表面を窒化ケイ素でコーティングし、インプラント界面を改質することで生物活性や骨伝導性、抗菌性を強化できると考えた。すでに、これまでの実験で YAG レーザー処理により、金属（チタン）

表面に窒化ケイ素の粉末をコーティングすることに成功している。このように、生物不活性であるチタンの欠点を補うために、バイオセラミック窒化ケイ素とチタンを複合化し、生物活性や抗菌性と骨伝導性の強化、母床骨の骨質を改善する試みは世界でも類はなく極めて独創的な研究であるだけでなく、すでに独自の成果を得ていることから、より迅速に実用化に向けた取り組みが開始されると強く期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では以下のサブテーマを設定し、窒化ケイ素コーティングチタンの生物活性・骨伝導性、抗菌効果を検討する。

#### (a) *In Vitro* における窒化ケイ素コーティングによる生物活性と抗菌効果の検討

窒化ケイ素コーティングチタン基板上に骨芽細胞様細胞株 Saos-2 を播種し、石灰化誘導培地で培養を行った。石灰化基質を免疫染色（オステオカルシン・オステオポンチン）および SEMEDX で分析を行った。窒化ケイ素コーティングチタン基板の表皮ブドウ球菌に対する抗菌効果を WST アッセイおよび Live&Dead で評価した。さらに、ホタルルシフェラーゼ遺伝子（ベクター）をトランスフォーメーションした大腸菌を窒化ケイ素コーティングに歯科インプラントおよび未処理（チタン）インプラント上に播種した。インプラント上の大腸菌の発光状況 CCD カメラで観察することで生菌数を評価した。

#### (b) *In Vivo* における窒化ケイ素コーティングの骨伝導の検討

ラットの大腿骨に窒化ケイ素コーティング・チタンインプラントを埋入後に 4 週間後屠殺し、単純 X 写真、マイクロ CT 撮影を行った。骨とインプラントの直接的な接触（Bone-to-implant contact: BIC）を光学顕微鏡レベルで確認するため、切片を作成しトルイジンブルー染色を行った。窒化ケイ素により骨伝導性が強化されか評価した。

インプラントは JMR 株式会社（新潟市）のインプラントシステムを使用した。チタン製インプラント体は、全長 2 mm となっており窒化ケイ素をインプラント全面にコーティングした。インプラント埋入は 10 週齢の SD ラットに行い、大腿骨骨面を露出させ専用のバーでドリリングし、窒化ケイ素コーティング・チタンインプラントまたは未処理インプラントを専用のドライバーで大腿骨に埋入した。4 週間後に屠殺後し大腿骨を摘出した。単純 X 線写真からインプラント埋入位置を確認し、マイクロ CT の BMD から、インプラント周囲の新生骨を可視化した。

### 4. 研究成果

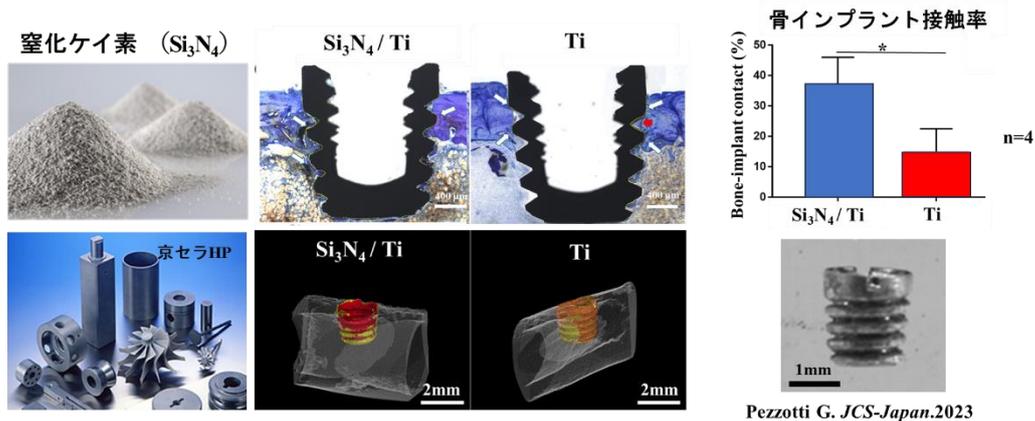
窒化ケイ素コーティングチタン基板およびチタン基板（未処理）上で形成された石灰化基質を免疫染色で評価した。骨基質タンパク質である、オステオカルシンおよびオステオポンチンで 2 重染色したところ、窒化ケイ素群ではオステオカルシンの発現強度が高いのに対し、未処理群はオステオポンチンの発現強度が高かった。オステオカルシンは成熟期に発現するのに対し、オステオポンチンは骨芽細胞分化前・中期に発現量が増加するとされている。免疫染色の結果から、窒化ケイ素群ではオステオカルシンの発現が優位であることから、より成熟した骨基質が形成されたことが示唆された。

また、窒化ケイ素コーティングチタン基板および未処理上で形成された石灰化基質の形態、Ca 元素および P 元素の分布をレーザー顕微鏡、SEMEDX で評価した。窒化ケイ素上では石灰化基質は普遍的に沈着するのに対し、未処理群では散在的に分布することを確認した。さらに、

SEMEDX 測定から HAP 由来の P 元素および Ca 元素の元素濃度の増加を確認した。以上の結果から、窒化ケイ素コーティングが抗菌性および骨伝導性を強化することを明らかにした。

WST アッセイおよび Live&Dead で抗菌活性を評価したところ、窒化ケイ素コーティング群では表皮ブドウ球菌の生存率が有意に低下することを確認した。CCD カメラで大腸菌の発光

窒化ケイ素コーティング群では未処理群と比較し、HE トルイジンブルー染色から、インプラント-骨の接触率を計測したところ、窒化ケイ素コーティング群では未処理群と比較し、骨インプラント接触率が有意に増加することが明らかとなった。



バイオセラミックス窒化ケイ素は骨伝導性や骨誘導性を強化することが可能である。これまでに、窒化ケイ素の歯周病菌に対する抗菌活性・病原真菌に対する抗真菌活性・SARS-CoV-2に対する抗ウイルス活性を世界で初めて報告した。

#### 参考文献

1: Zanocco M, Pezzotti G, et al. 3D-additive deposition of an antibacterial and osteogenic silicon nitride coating on orthopaedic titanium substrate. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2020;103:103557. doi:10.1016/j.jmbbm.2019.103557

2: Pezzotti G, et al. Silicon nitride as a biomaterial *JCS-Japan*, Pezzotti G. 2023. 131: 8. 398-428  
DOI <https://doi.org/10.2109/jcersj2.23057>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Adachi Tetsuya, Miyamoto Nao, Imamura Hayata, Yamamoto Toshiro, Marin Elia, Zhu Wenliang, Kobara Miyuki, Sowa Yoshihiro, Tahara Yoshio, Kanamura Narisato, Akiyoshi Kazunari, Mazda Osam, Nishimura Ichiro, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 23
2. 論文標題 Three-Dimensional Culture of Cartilage Tissue on Nanogel-Cross-Linked Porous Freeze-Dried Gel Scaffold for Regenerative Cartilage Therapy: A Vibrational Spectroscopy Evaluation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8099 ~ 8099
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23158099	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Mizuno Kai, Boschetto Francesco, Yamamoto Kenta, Honma Taigi, Miyamoto Nao, Adachi Tetsuya, Kanamura Narisato, Yamamoto Toshiro, Wenliang Zhu, Marin Elia, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 234
2. 論文標題 Cytotoxicity and osteogenic effects of aluminum ions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 111884 ~ 111884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jinorgbio.2022.111884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Marin Elia, Yoshikawa Orion, Boschetto Francesco, Honma Taigi, Adachi Tetsuya, Zhu Wenliang, Xu Huaizhong, Kanamura Narisato, Yamamoto Toshiro, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 17
2. 論文標題 Innovative electrospun PCL/fibroin/l-dopa scaffolds supporting bone tissue regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Materials	6. 最初と最後の頁 045010 ~ 045010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1748-605X/ac6c68	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 E. Marin, F. Boschetto, M. Zanocco, T. Honma, W. Zhu, G. Pezzotti	4. 巻 206
2. 論文標題 Explorative study on the antibacterial effects of 3D-printed PMMA/nitrides composites	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mater. & Design	6. 最初と最後の頁 109788-1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matdes.2021.109788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pezzotti Giuseppe	4. 巻 52
2. 論文標題 Raman spectroscopy in cell biology and microbiology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Raman Spectroscopy	6. 最初と最後の頁 2348 ~ 2443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jrs.6204	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sunthar Thefye P. M., Boschetto Francesco, Doan Hoan Ngoc, Honma Taigi, Kinashi Kenji, Adachi Tetsuya, Marin Elia, Zhu Wenliang, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 10
2. 論文標題 Antibacterial Property of Cellulose Acetate Composite Materials Reinforced with Aluminum Nitride	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1292 ~ 1292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10111292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. ZANOCCHO, E. MARIN, F. BOSCHETTO, T. ADACHI, T. YAMAMOTO, N. KANAMURA, W. ZHU, B. J. MCENTIRE, B. S. BAL, R. ASHIDA, O. MAZDA, G. PEZZOTTI	4. 巻 10
2. 論文標題 Surface Functionalization of Polyethylene by Silicon Nitride Laser Cladding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Science	6. 最初と最後の頁 2612, 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app10072612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Marin Elia, Zanocco Matteo, Boschetto Francesco, Santini Michele, Zhu Wenliang, Adachi Tetsuya, Ohgitani Eriko, McEntire Bryan J., Bal B. Sonny, Pezzotti Giuseppe	4. 巻 191
2. 論文標題 Silicon nitride laser cladding: A feasible technique to improve the biological response of zirconia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials & Design	6. 最初と最後の頁 108649 ~ 108649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matdes.2020.108649	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Marin E., Boschetto F., Zanoocco M., Adachi T., Toyama N., Zhu W., McEntire B.J., Bock R.M., Bal B.S., Pezzotti G.	4. 巻 17
2. 論文標題 KUSA-A1 mesenchymal stem cells response to PEEK-Si3N4 composites	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials Today Chemistry	6. 最初と最後の頁 100316 ~ 100316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtchem.2020.100316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 E. MARIN, M. ZANOCCO, F. BOSCHETTO, T. YAMAMOTO, N. KANAMIURA, W. ZHU, B. J. MCENTIRE, B. S. BAL, R. ASHIDA, O. MAZDA, G. PEZZOTTI	4. 巻 10
2. 論文標題 In Vitro Comparison of Bioactive Silicon Nitride Laser Claddings on Different Substrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Science	6. 最初と最後の頁 9039, 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app10249039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 E. MARIN, F. BOSCHETTO, M. ZANOCCO, W. ZHU, T. ADACHI, N. KANAMURA, T. YAMAMOTO, B.J. MACENTIRE, E. N. JONES, C. POWELL, J. HENDRY, R.M. BOCK, B.S. BAL, G. PEZZOTTI	4. 巻 19
2. 論文標題 Biological responses to silicon and nitrogen-rich PVD silicon nitride coatings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Today Chemistry	6. 最初と最後の頁 100404 ~ 100404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mtchem.2020.100404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Giuseppe Pezzotti
2. 発表標題 ラマン分光法による光診断技術について
3. 学会等名 第34 回NPO 法人日本口腔科学会近畿地方部会(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	足立 哲也  (Adachi Tetsuya)  (10613573)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師   (24303)	
研究分担者	Marin Elia  (Marin Alia)  (10814014)	京都工芸繊維大学・材料化学系・准教授   (14303)	
研究分担者	小原 幸  (Kobara Miyuki)  (80275198)	京都薬科大学・薬学部・准教授   (34306)	
研究分担者	扇谷 えり子  (Ohgitani Eriko)  (80300820)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授   (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------