

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10009

研究課題名(和文)セリアジルコニアインプラントの軟組織接着に関する先進的研究

研究課題名(英文)Cutting-edge Research on Soft Tissue Integration around Zirconia Dental Implants

研究代表者

岩佐 文則 (Fuminori, Iwasa)

昭和大学・歯学部・客員教授

研究者番号：60297025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究はセリア安定化ジルコニア/アルミナナノ複合体(Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)表面に対しヒト歯肉線維芽細胞(HGF-1)およびヒト口腔上皮細胞(JE-1)の付着能を検証した。HGF-1を使用した培養実験では、機械研磨(Ra=0.9)、鏡面研磨(Ra=0.02)を施したCe-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>基盤上で7日間培養し評価したところ、鏡面研磨表面上でHGF-1の表現系(接着、増殖能、形態)のデータが増進されていた。最終年度の主実験はCe-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>ミニインプラントを使用してラットに埋入し粘膜貫通部における軟組織封鎖性を評価しており、その研究成果の学術的意義や社会的意義を施行していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

長期に安定したインプラント治療を目指すにあたって、インプラント周囲炎への対策は大きな課題である。すなわち高度な軟組織封鎖性を有するインプラントの開発が重要である。粘膜貫通部の適切な表面性状の探索は、インプラント周囲炎に抵抗性を持つインプラントの開発に向けた研究基盤を確立できると確信している。

研究成果の概要(英文)：The proposed research investigated the attachment ability of human gingival fibroblasts (HGF-1) and human oral epithelial cells (JE-1) to the surface of ceria-stabilized zirconia/alumina nanocomposites (Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). In the culture experiments using HGF-1, the cells were cultured for 7 days on Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> substrates with machined (Ra = 0.9) and mirror-polished (Ra = 0.02) surfaces. The results showed that the expression system (adhesion, proliferation, and morphology) of HGF-1 was enhanced on the mirror-polished surface. In the final year, the main experiment involved implanting Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mini-implants in rats and evaluating the soft tissue seal at the mucosal penetration site. The academic and social significance of these research findings will be discussed

研究分野：歯科補綴学

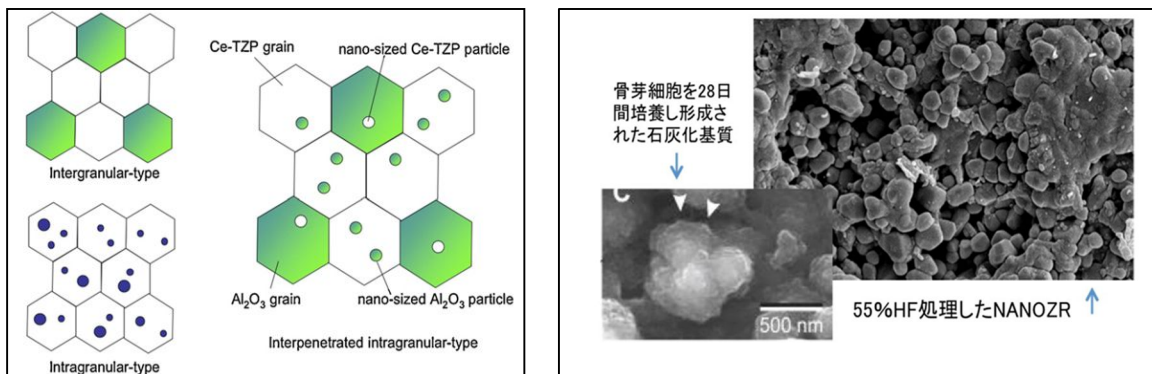
キーワード：ジルコニアインプラント 軟組織付着 インプラント周囲組織 セリア安定化ジルコニア/アルミナナノ複合体

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、セリア系ジルコニア粒子とアルミナ粒子のナノ複合セラミックス（製品名「NANOZR」）（左図）に高濃度フッ化水素による酸処理を加え、骨結合部表面にナノ構造体を形成させることに成功した。（Oshima et al. Journal of oral & maxillofacial implant, 2017）特にそのトポグラフィー（表面形状）は下写真（右図）に示すように生体模倣的な形態を示すことを見つけ出し、骨芽細胞の生物学的応答が酸処理したチタン上よりも活性化されることを報告した。一方、軟組織付着部には、鏡面研磨を施した HGF-1 と親和性の高い表面性状を見つけ出した。（Akiyama et al. Dental materials Journal 2020）



### 2. 研究の目的

本研究計画では、NANOZR のナノ構造を有する表面形態により軟組織親和性だけでなく、組織体の付着力を定量化し、その表面形態を最適化することによって即時荷重あるいは全身疾患を有する患者や本来骨造成が必要であるような難症例においても高い成功率を上げられるインプラントの開発を目的とする。また超高齢社会を睨んだ高齢者に対するインプラント適応の拡大と新たな有効性と臨床応用への展開に関する基盤研究を行う。

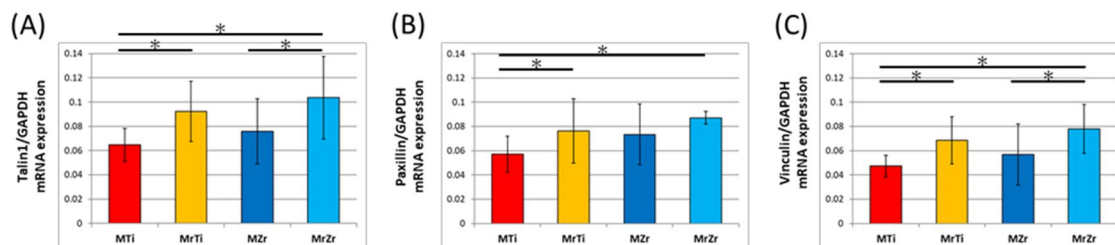
### 3. 研究の方法

計画している具体的な研究項目は、(1) HGF-1 による培養実験 細胞接着試験 Triboindenter を用いた Nano-Scratch test (2) JE-1 による培養実験 細胞接着試験 細胞増殖試験 細胞形態観察 (3) ラットを用いた動物実験 の3つである。

### 4. 研究成果

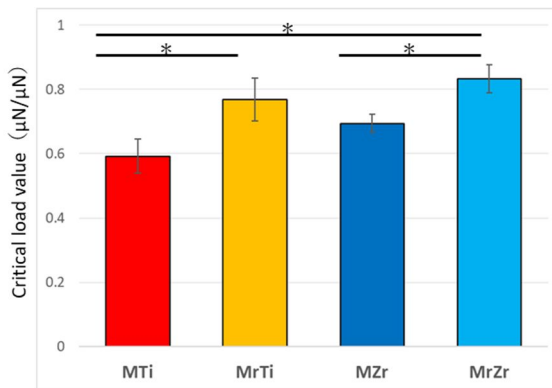
#### (1) HGF-1 による培養実験

粗造な表面粗さ ( $R_a = 0.9$ )、滑沢な表面粗さ ( $R_a = 0.02$ ) を持つ基盤を Ti, Ce-TZP/A203 でそれぞれ製作し、走査電子顕微鏡 (SEM), 原子力顕微鏡で表面形態を観察した。各基盤上で 7 日間 HGF-1 を培養し SEM にて形態観察を行った。また細胞形態、接着性タンパク質の発現量を評価するために Talin1, Actin に対して免疫染色および Talin1, Paxillin, Vinculin に対してリアルタイム PCR を行った。



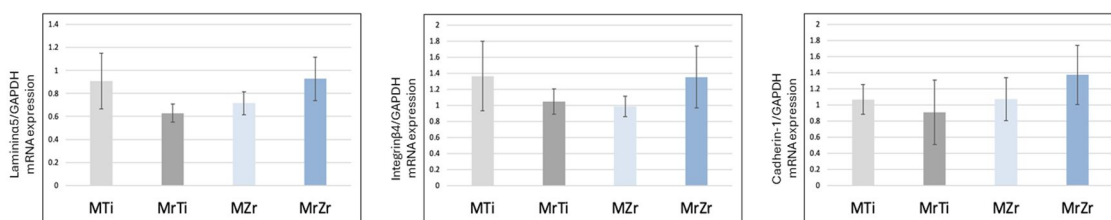
培養 7 日目の HGF-1 および産生された細胞外マトリックスに対して Triboindenter (BRUKER, TI980) を用いてナノスクラッチテストを行い、基盤から剥離する際の臨界荷重値を測定することでインプラント材料に対する結合組織の付着力を評価した。

Ce-TZP/A203 と Ti の表面形態分析により、Ra0.9 の均一な線形構造と Ra0.02 の滑らかで平坦な構造が認められた。細胞の形態は、それぞれ紡錘形と大きな円形を示した。またリアルタイム PCR における Talin1, Paxillin, Vinculin の発現は Ce-TZP/A203, Ti とともに Ra = 0.02 の基盤上で有意に高かった。ナノスクラッチテストによって得られた臨界荷重値は Ce-TZP/A203, Ti とともに Ra = 0.02 の基盤上で有意に高かったが、両者の比較では統計学的有意差は得られなかった。

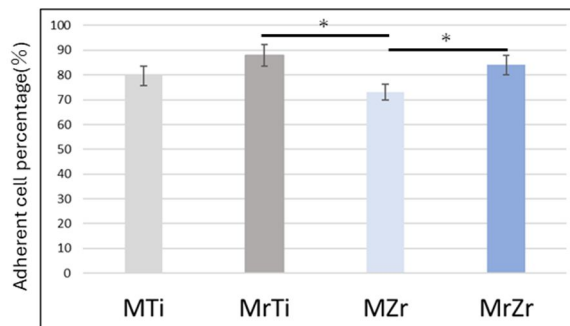


### (2) JE-1 による培養試験

各基盤に JE-1 を培養し、3 時間、3 日後、7 日後の細胞生存率を吸光度にて測定した。また、各基盤上で 7 日間培養した JE-1 のアクチンを免疫蛍光染色することで細胞形態の測定を行い、上皮細胞の接着性タンパク質 (Laminin5, Integrin 4, E-Cadherin) の分布を免疫蛍光染色で観察、リアルタイム PCR にて各接着性タンパク質の遺伝子発現量の定量を行った。さらにロータリーシェイカーを用いた振盪刺激により基盤への JE-1 の接着強さを測定した。

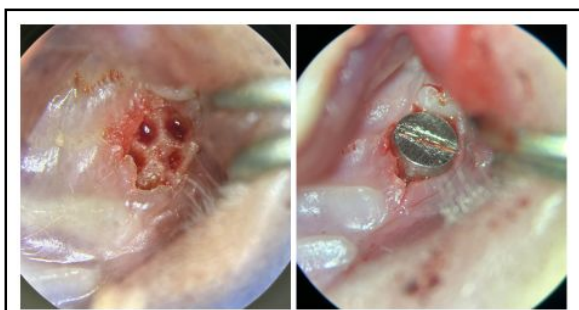


各基盤において培養時間に比例した細胞の増加がみられ、7 日間の培養では各材料で機械研磨よりも鏡面研磨の方が高い細胞増殖がみられた。7 日間培養後の細胞形態はそれぞれの基板上的 JE-1 において有意な差はみられなかった。また、免疫蛍光染色にて各基盤の JE-1 で Laminin5, Integrin 4, E-Cadherin の発現がみられ、Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基盤上の各接着性タンパク質の遺伝子発現量は機械研磨よりも鏡面研磨の方が高い傾向を示した。さらに、Laminin5 の発現において鏡面研磨では Ti よりも Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の方が優位に高い値を示した。細胞接着力の評価では、Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 基盤上において機械研磨よりも鏡面研磨の方が有意に高い値を示した。



### (3) ラットモデルによる骨結合能、軟組織封鎖性の評価

使用した動物は、動物種：rat 系統：Wistar 週齢：6 週齢を選択している。麻酔方法としてはラットの体重を測定し、体重 100g 当たり 0.5ml の三種混合麻酔薬を腹腔内投与した。埋入するインプラントサイズを直径 2mm、長さ 4mm とし、埋入部位として、ラットの上顎第一臼歯の抜歯窩を選択した。インプラントの種類は下部 1/2 を酸処理、上部 1/2 を研磨したチタンインプラント（機械研磨群、鏡面研磨群）同じく処理をしたジルコニアインプラント（鏡面研磨群、機械研磨群）とする。また、平均値を出す上で個体数は各試料に対し、4 匹（片側の口腔内）を必要とする。1 群 4 匹 × 4 実験群 = 16 匹【チタン（機械研磨群、鏡面研磨群）、ジルコニア（機械研磨群、鏡面研磨群）】とし解析を行う。現段階で 1 群のみ埋入しているが、今後さらなる埋入を行っている。検証が完了し次第報告していく予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahito Osawa, Eri Urano-Morisawa, Fuminori Iwasa, Kazuyoshi Baba	4. 巻 33
2. 論文標題 Mirror-polished surface of ceria-stabilized zirconia/alumina nanocomposite enhancement in the adhesion strength of human gingival fibroblasts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 247-255
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大澤昂史, 浦野絵里, 岩佐文則, 馬場一美
2. 発表標題 ナノインデンターを応用した培養細胞の接着力に対する定量的測定法の確立
3. 学会等名 第52回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大澤昂史, 浦野絵里, 岩佐文則, 馬場一美
2. 発表標題 Mirror-polished surface of ceria-stabilized zirconia/alumina nanocomposite enhanced the adhesion strength of human gingival fibroblasts
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2023 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大澤昂史, 浦野絵里, 岩佐文則, 馬場一美
2. 発表標題 ナノインデンターを応用した培養細胞の接着力に対する定量的測定法の確立
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大澤昂史, 浦野絵里, 岩佐文則, 馬場一美
2. 発表標題 ヒト歯肉線維芽細胞のCe-TZP/Al2O3に対する接着力の定量的評価
3. 学会等名 令和3年度日本補綴歯科学会東京支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山森庄馬, 大澤昂史, 浦野絵里, 岩佐文則, 馬場一美
2. 発表標題 Effect of Surface Roughness of Ceria- Stabilized Zirconia/ Alumina Nanocomposites (Ce-TZP/Al2O3) on Adhesion of Mouse Gingival Junctional Epithelial Cells (JE-1)
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2024 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 歯科用インプラント及び表面処理方法	発明者 馬場 一美, 岩佐 文則ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6958874	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 歯科用インプラント及び表面処理方法	発明者 馬場 一美, 岩佐文則ほか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6958874	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------