

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592189

研究課題名（和文）トレシルクロリド法で細胞接着タンパク質を表面固定したインプラント周囲の組織反応

研究課題名（英文）Tissue reaction around the implants coated with cell adhesive protein using the tresyl chloride method.

研究代表者

小澤 知倫 (OZAWA TOMOMICHI)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30381479

研究成果の概要（和文）：今回われわれは、トレシルクロリド法を用いて、チタン製スクリューに細胞接着タンパク質を固定し、その後、ラットの上顎第一臼歯抜歯窩に埋入することで、チタンと上皮の付着が確認された。今後は、チタンと軟組織の接着により、インプラント周囲炎の軽減につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We immobilized cell-adhesive protein onto the titanium screw using tresyl chloride method and confirmed that epithelial tissue attached to titanium screw after the insertion in upper molar extraction socket of rat. The soft tissue adhesion onto the titanium screw suggested the possibility for decreasing peri-implantitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：細胞接着・インプラント

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科インプラントの埋入予定部位に骨量が不足する場合でも、骨移植は行われずに長さの短い、いわゆるショートインプラントを埋入するようになってきた。このショートインプラントを長期間機能させるためには、インプラント体表面の形状や性状を修飾することで、インプラント体表面と周囲組織との接合を強固にすることが極めて重要となっている。このうち、骨との接合性を向上させるための表面改質法として、現在までさまざまな取り組みがなされてきた。研究代表者は、インプラント表面の更なる改質の手が

かりを得るため、チタンをはじめとする各種生体材料表面に対する擬似体液を利用したリン酸カルシウム薄膜形成について検討し、報告した (Apatite deposition on several dental biodegradable materials in simulated body fluid Tomomichi Ozawa, Tohru Hayakawa, Makoto Hirota, Yoshiyuki Okamoto, Shinsuke Ohta, Yoshiro Mastui, Iwai Tohnai J Oral Tissue Engin vol.4 No.4)。このリン酸カルシウム薄膜による修飾は、リン酸カルシウム膜が溶解して体液と化学反応を起こして結晶が形成される場合と、体液中で過飽和であるハイドロキシアパ

タイトがリン酸カルシウム薄膜の結晶格子を核として結晶、成長する場合とが考えられている。本法は蒸着法やイオン導入法などによるリン酸カルシウム薄膜形成法に比べて極めて簡便であり、かつ形成された膜も均一なため、骨インプラント表面接合能を向上させる手段として、極めて有望視されている。

一方、ショートインプラントではインプラント体と上皮あるいは結合組織との接合を強固にして、インプラント周囲炎とそれに継発する骨吸収を抑制することも長期予後に欠かせない。チタンと細胞との接着はこれまで、接着タンパク質を介さずにカルシウムイオンの橋渡しにより接着するという説があったが、現在ではチタン表面に吸着したフィブロネクチンなどのRGD配列を有する接着タンパク質が必要と言われている。接着タンパク質を認識した細胞はチタン表面に強力に接着し、細胞内骨格の形成から細胞質を著しく進展させ核に増殖のシグナルを伝達する。

しかし、表面の反応性の乏しいチタンへの生理活性物質の固定化は一般的に困難とされてきたため、生理活性物質の固定化を用いたインプラント表面の改質について研究は少なく、インプラント体と上皮あるいは結合組織との接合については、骨との接合に比べ、有効な手段がない。

Cannasらはチタン表面をフィブロネクチンでコーティングすると、繊維芽細胞の付着が向上し、細胞がより進展することを報告している。また、Deanらは、チタン表面へのフィブロネクチンコーティングは歯肉由来繊維芽細胞の増殖を向上させるが、ラミニンでコーティングすると歯肉由来上皮細胞の増殖が向上することを見出している。しかし、これらの報告では、フィブロネクチンやコラーゲンがコーティングされているだけであり、共有結合など化学的に固定されている訳ではない。

研究代表者は、トレシルクロリド法により細胞接着タンパク質（コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン）を固定化させるインプラント表面改質法を考えた。これが実現すれば、骨組織のみならず、上皮や結合組織との接合も可能になると思われる。その結果、今まで臨床で大きな問題になってきたインプラントと上皮との接合部に生じやすい炎症についての問題も解決可能となるため、歯科インプラント界に画期的な進歩が期待できる。

インプラントと骨との接合をより早期に、かつより強固に生じさせるために、リン酸カルシウムコーティングや酸処理などの表面改質が行われてきた。その一部はすでに実用化されているが、上皮あるいは結合組織との接合について研究は大きく立ち遅れている。今までに細胞接着タンパク質をチタン表面

へ固定化する試みとして、シランカップリング剤を用いる報告（Endo K Chemical modification metallic implant surfaces with biofunctional proteins(part 1). Molecular structure and biological activity of a modified NiTi alloy surface. Dent Mater J 1995;14:185-198）がある。しかしこの方法は煩雑で、また細胞接着タンパク質の固定状態やコンフォメーションの制御も困難である。これに対し細胞接着タンパク質などを確実に固定化できれば、生体内に長期間埋入しても安定して細胞に働きかけることができるようになる。トレシルクロリド法では、チタン表面をトレシルクロリド処理してTi-O-SO₂CH₂CF₃を生成した後に、細胞接着タンパク質とのカップリング反応させて細胞接着タンパク質を固定化する。この2段階のみで、確実にチタン表面に細胞接着タンパク質を固定化できるため、チタンファイバー焼結体を利用した再生医療など、広い範囲への応用が期待できる。

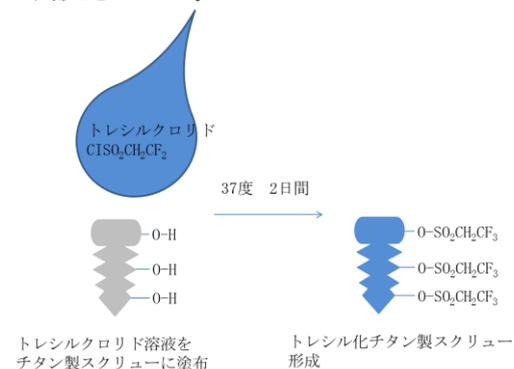
2. 研究の目的

本研究では、今までの臨床で大きな問題になってきたインプラントと上皮との接合部に生じやすい炎症の解決の一步として、骨組織のみならず、上皮や結合組織との接合も可能になるインプラントの開発のため、トレシルクロリド法により細胞接着タンパク質を表面に固定化させたチタン製のスクリューをラットの上顎第一臼歯の抜歯窩に埋入し、その周囲組織、特に上皮との反応について検討を行う。

3. 研究の方法

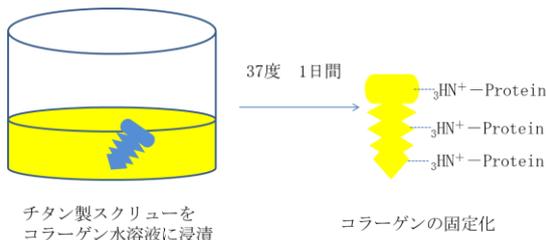
(1)チタン製スクリューのトレシル化処理

トレシルクロリド溶液(CISO₂CH₂CF₃)を直接チタン製スクリュー全面に塗布して37°Cで2日間反応させた。



(2)細胞接着タンパク質との固定

細胞接着タンパク質として、I型コラーゲンを使用した。I型コラーゲン溶液にトレシル化チタンを浸漬し37度で1日間反応させた。



(3) ラットの上顎第一臼歯へのチタン製スクリューの埋入

動物実験は、横浜市立大学医学部動物実験倫理委員会の指針に従って行った。(承認番号：11-127) 埋入に利用するスクリューは、直径 1.5mm・長さ 3mm の純チタン製のスクリュー(シンセス社製)を利用した。

ラット(Wistar・5 週齢)の上顎第一臼歯を抜歯し、抜歯窩の治癒に 4 週間の待機期間を置いた後、コラーゲン固定をしないコントロール群とコラーゲン固定した群に分け 1 本/匹ずつ、上皮下にスクリューを完全に埋入せず、上皮上スクリューが露出するように埋入を行った。

埋入 4 週経過した後に、スクリューを組織ごと摘出しホルマリン固定、アルコール系列による脱水後、メチルメタクリレート樹脂にて包埋し、厚み約 50 μ m の非脱灰研磨標本を作製した。標本は、2NHCL でエッチングを行った後、メチレンブルーで 60 秒間染色し、洗浄後に、さらに塩基性フクシンにより 30 秒間染色を行い、二重染色により、光学顕微鏡下で、スクリューと骨・軟組織の接触状態について、病理組織学的に検討を行った。

4. 研究成果

(1) チタン製スクリューのトレシル化処理

トレシル化チタンの高感度反射フーリエ変換赤外分光スペクトル(FT-IR-RAS)測定から-O-S-O₂-結合の存在を確認でき、チタン表面にトレシルクロリドが反応したことを確認できた。

(2) 細胞接着タンパク質との固定

チタン製スクリューにコラーゲンが固定化されたことが X 線 光電子分光(XPS)、FT-IR-RAS の測定から分かった。

また、コラーゲンは超音波洗浄によっても脱離することなく固定化されていた。チタン表面の酸化処理により、塩基性水酸基の割合の増加に伴い、その結果、細胞接着タンパク質の固定化が多くできるのではと考えた。そこで、0.1MH₂O₂/PBS 溶液あるいは、0.1MH₂O₂/0.1MNaOH 水溶液による酸化処理を行った。しかし、細胞接着タンパク質の固定化に大きな影響は確認出来なかった。

(3) ラットの上顎第一臼歯抜歯窩へのチタン製スクリューの埋入

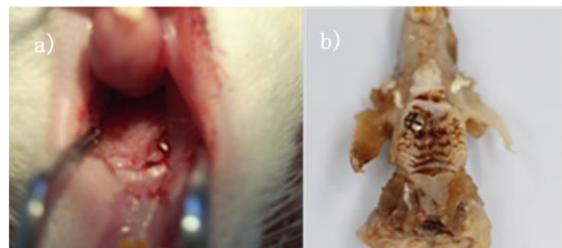
はじめに、ラットの上顎骨のどの部位に埋入するか検討した。口蓋骨への埋入を試みたが、

骨が薄く安定が得られなかった。そこで、ラットの抜歯窩に埋入を検討した。ラットは、5 週齢程度であれば、抜歯が可能であることが分かり、抜歯後即時に埋入した場合と抜歯後一定時間を置いた後に埋入する場合など実験系として最適な埋入時期の検討を行い、その結果、ラットの上顎第一臼歯の抜歯後に抜歯窩の治癒に 4 週間の待機期間を置いたのち、スクリューを埋入するのが最適と判断した。

上顎第一臼歯を抜歯した抜歯窩にコントロール群と I 型コラーゲンコーティング群にわけてそれぞれスクリューの埋入を行った。埋入後は、2 週経過例と 4 週経過例に分けて経過観察を行った。

2 週経過例は、コントロール群と I 型コラーゲンコーティング群は全てのスクリューの残存を確認出来た。

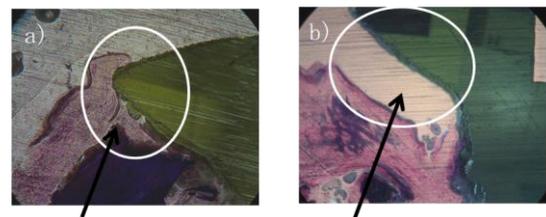
4 週経過例は、コラーゲンコーティングされていないコントロール群では、餌を食べる際の咬合の影響かスクリューは全て脱落してしまっ。しかし、コラーゲンコーティング群では 4 本のスクリューの残存を確認することが出来た。



a) 埋入直後のスクリューが上皮上に露出している。
b) 組織ごと摘出したスクリュー。

	コントロール群	I 型コラーゲンコーティング群
埋入後4週 スクリュー残存本数	0/40本	4/40本

病理組織学的所見では、I 型コラーゲンコーティング群で脱落しなかった 4 週経過例の中に一部上皮とスクリューの接合が確認できた。しかし、2 週経過例のコントロール群には、上皮との付着は確認されなかった。



a) チタン表面上皮の付着が認められる
コーティング群4週例
×200
b) チタンと上皮の付着は認めず
コントロール群2週例
×200

以上、本研究から、トレスルクロリド法を用いることにより、反応性の低いチタン表面に細胞接着タンパク質を固定化することが出来た。トレスルクロリド法は、比較的操作が容易で、確実な固定化手法と思われる。細胞接着タンパク質の種類にもあまり影響を受けないと考えられ、細胞接着タンパク質以外の生体活性物質の固定化への応用にも可能性が広がることが推測される。

今後は、この手法を用いることで、各種のタンパク質を固定化し、より生体活性に優れたインプラント体の作製へと研究を進めていくつもりである。また、インプラント体のみならず、チタンファイバー焼結体にもタンパク質の固定化には有効と考えられ、硬組織のみならず軟組織に至る再生分野における良好な三次元的な臓器再生の足場としての利用にも貢献出来るように開発を進めて行きたい。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 知倫 (OZAWA TOMOMICHI)
横浜市立大学・附属病院・助教
研究者番号：30381479

(2) 研究分担者

早川 徹 (HAYAKAWA TOURU)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：40172994
廣田 誠 (HIROTA MAKOTO)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号：20347305