

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：30110

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792289

研究課題名(和文)チタン表面改質による抗菌性インプラント材料の開発

研究課題名(英文)Surface modification for anti-bacterial effect on titanium implant

研究代表者

建部 二三 (TAKEBE, Futami)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：10534448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：歯科インプラントは軟組織を貫通し、細菌の巣窟である口腔と生体内の顎骨を連結するという構造のため、埋入時に無菌的に処置してもその後の感染のリスクは極めて高い。本研究では、インプラント(特にアバットメント部)に使用される材料表面へ抗菌蛋白質であるラクトフェリンを修飾し、抗菌性を持つインプラント材料を創製することを検討した。結果、ラクトフェリンを吸着したチタン、窒化チタン、ジルコニアにおいてブラク初期形成菌である*S.gordonii*をはじめ、インプラント周囲炎原因菌である*P.gingivalis*、*F.nucleatum*の付着を抑制できることがわかり、臨床応用への可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Dental implants have been recognized as an effective treatment for the loss of teeth. However, biological and technical complications frequently occur because dental implant abutments are located at trans mucosal sites. The aim of the present study was to inhibit bacterial accumulation on dental implant, especially abutment surfaces to prevent peri-implantitis. We examined the effects of human lactoferrin (LF), an antibacterial protein present in saliva, as an antibacterial coating on the titanium surface and evaluated its effects on oral bacterial adhesion. We found that LF coated surface inhibited *S. gordonii*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum* adhesion showing the positive possibility for clinical application.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生医学

キーワード：インプラント ラクトフェリン 細菌付着 抗菌性

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントは軟組織を貫通し、細菌の巣窟である口腔と生体内の顎骨を連結するという構造のため、埋入時に無菌的に処置してもその後の感染のリスクは極めて高い。インプラントアバットメント材料の表面に付着した細菌が原因で炎症を生じると、顎骨内への感染をも容易に引き起こしてしまうという危険がある。

現在、歯科インプラント用材料の主流はチタンである。チタン自体に抗菌性はないが、チタン表面の改質により細菌付着の抑制や抗菌作用が発現するという興味深い報告がある。また、近年ジルコニアが優れた機械的強度と審美性を有することから、新規インプラント材料として着目されている。

しかし、細菌付着に関する研究は少なく、細菌付着のメカニズムにまで及ぶ研究も十分に行われているとは言えない。さらに、抗菌作用もしくは静菌作用をもつインプラント材料の開発は信頼性の高いインプラント治療のために必須の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、インプラント（特にアバットメント部）に使用される材料表面への細菌付着を促進する要因、また抑制する要因を調べ、材料表面への細菌付着のメカニズムの解明することと、材料表面へ抗菌蛋白質を修飾し、抗菌性をもつインプラント材料の開発することであった。特に、唾液に含まれる抗菌蛋白質であるラクトフェリンに着目し、純チタン、表面改質を行ったチタン、ジルコニア表面に予め抗菌蛋白質を結合させることにより、抗菌性を持つインプラント材料を創製することを検討した。

3. 研究の方法

<材料>

歯科インプラント材料として、直径14 mm、高さ3 mmと、直径5 mm、高さ3 mmの円盤状のJIS第2種純チタンおよびイットリア安定化ジルコニアを鏡面研磨した(以下Ti, YSZ)。一部のTiに、イオンプレーティング法により表面に窒化チタンをコーティングした(以下TiN)。いずれの試料もアセトンと蒸留水にて超音波洗浄し、70%エタノールにて消毒を行った。

ヒトホロラクトフェリン(RPR-595, ITST Biosciences LLC)は0.1 mg/mlになるよう蒸留水にて調整し、濾過滅菌した(以下LF)。

<方法>

(1) ラクトフェリンの結合

ラクトフェリンの試料表面への結合は、吸着する方法；つまり試料をLF溶液に浸漬する方法と、化学修飾；つまり試料を1% p-vinyl benzoic acid 溶液に2時間浸漬しカルボキシル基を導入し、続いてカルボジイミド系の縮合剤であるEDCとLF溶液中で72時間反応させLFを試料に固定化する方法について行

った。その後、X線光電子分光分析(XPS)にてN 1s スペクトルを測定し、LFの存在を確認した。

(2) 細菌付着

被験菌種は *Streptococcus gordonii* ATCC 10558 (以下 *S. g.*)、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (以下 *P. g.*)、*Fusobacterium nucleatum* JCM 8532 (以下 *F. n.*) のいずれか、もしくは *S. g.+P. g.*、*S. g.+F. n.* の組み合わせで用いた。Ti, TiN, YSZ について LF 吸着の試料に対し下記の実験を行った。

① クリスタルバイオレット染色による細菌付着量の測定

PBS にて 1×10^9 cfu/ml に調整した菌液にて2時間培養した試料を洗浄後、0.1%クリスタルバイオレットにて試料表面に付着している菌を染色し、99.5%エタノールにて脱色し、脱色液の595 nmにおける吸光度を測定した。

② 走査型電子顕微鏡(SEM)による形態観察

上記の方法で培養した試料を、2.5%グルタルアルデヒドで固定し、系列脱水、臨界点乾燥後、金蒸着を行い、試料表面に付着している菌のSEM観察を行った。

③ LIVE/DEAD 染色と共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察による抗菌性試験

上記の方法で培養した試料を LIVE/DEAD BacLight bacterial viability kit にて生細胞を緑、死細胞を赤に蛍光染色し、CLSMで観察し、試料表面に付着している細菌の生死を観察した。

(3) 細胞毒性

LFを吸着したTi, TiN, YSZ上にてヒト歯肉線維芽細胞を48時間培養し、MTT assayにより細胞毒性試験を行った。

(4) 表面粗さの影響

酸性フッ化物溶液にTi, TiNを一定時間浸漬し、表面粗さ(AFM)、ぬれ性(接触角)を測定した。続いて細菌付着量の測定を行い、細菌付着と表面粗さの関係を調べた。

(5) 唾液の影響

LFを吸着したTiについて、Russelらの方法により調整した人工唾液(以下AS)に浸漬し、FITC標識した抗LF抗体を用いて染色し、唾液浸漬後のLFの存在を確認した。また、AS浸漬後の細菌付着について調べた。

(6) 処理時間の検討

LFの吸着時間を短縮し、超音波洗浄やAS浸漬による脱着の可能性を、XPSによりN 1s スペクトルの測定と、FITC標識した抗LF抗体を用いた蛍光強度の測定により検討した。

4. 研究成果

(1) ラクトフェリンの結合

図1にXPSにおけるTi, TiN, YSZのLF吸着試料のN 1s スペクトルを示す。

Ti, TiN, YSZいずれの試料においても400 eVにLFに由来する明瞭なN 1s スペクトルが認められた。またスペクトル強度については、試料間においても、吸着した試料と化学修飾した試料の間においても有意な差は認

められなかった。以上から、吸着、化学修飾どちらの方法でも全ての試料表面に LF を結合させることができることが示された。

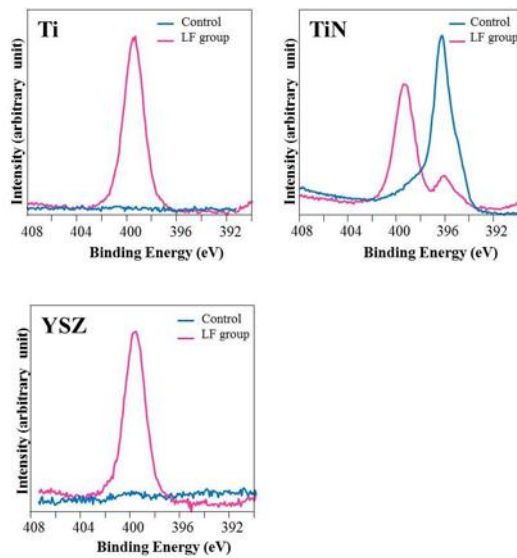


図1. XPSによるTi, TiN, YSZのN 1s スペクトル

(2) 細菌付着

図2にクリスタルバイオレット染色による細菌付着量の結果を示す。S. g, S. g+P. g, S. g+F. nともに、Ti, TiN, YSZの全てにおいて、LFの吸着により細菌の付着が有意に減少した。

図3にSEM観察の結果を示す。LF吸着試料においては、細胞膜もしくは細胞壁の傷害により、菌体の一部が膨張している像や、丸くなっている像が多く認められた。

図4にLIVE/DEAD染色の結果を示す。LF吸着試料では生細胞を示す緑色の菌が減少し、死細胞を示す赤色の菌が増加していた。

LFの抗菌作用については、これまで、LFのもつ強いキレート作用により、細菌の生育に不可欠な鉄を奪うことによる静菌作用と、LFが細胞膜に直接作用する殺菌作用の機序が報告されてきた。

本研究では鉄飽和型のホロラクトフェリンを使用したことと、SEM観察、LIVE/DEAD染色の結果から、後者の機序で抗菌性を発現し、細菌付着を抑制していることが示された。

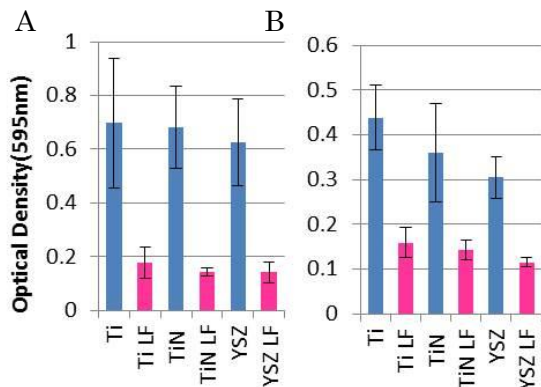


図2. 細菌付着量 (A: S. g + P. g, B: S. g + F. n)

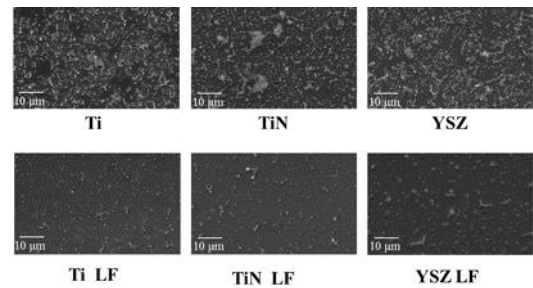


図3. 試料表面に付着したS. gのSEM像

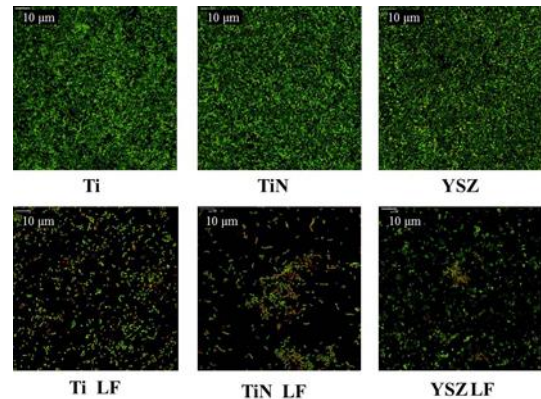


図4. LIVE/DEAD染色後のCLSM像

(3) 細胞毒性

図5にMTT assayによる細胞毒性の結果を示す。48時間培養では、いずれの試料においてもLF吸着による細胞毒性は認められなかった。

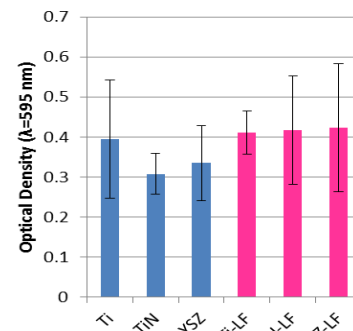


図5. MTT assayによる細胞毒性試験

(4) 表面粗さの影響

図6に酸性フッ化物溶液中におけるTiとTiNの腐食時間を2, 6, 12時間と延長したときの細菌付着量の結果を示す。Tiの表面粗さ(Ra)は腐食前で0.009 μm, 2時間で0.058 μm, 6時間で0.072 μm, 12時間で0.081 μmと経時的に表面が粗くなったが、TiNでは腐食前0.010 μm, 2時間で0.024 μm, 6時間で0.025 μm, 12時間で0.028 μmと、腐食時間を延長しても表面粗さに大きな変化は認められなかった。Tiでは表面粗さの増加に伴い細菌付着量も増加傾向が見られたが、Ti, TiNいずれにおいてもLFの吸着により細菌付着量は著しく抑制された。

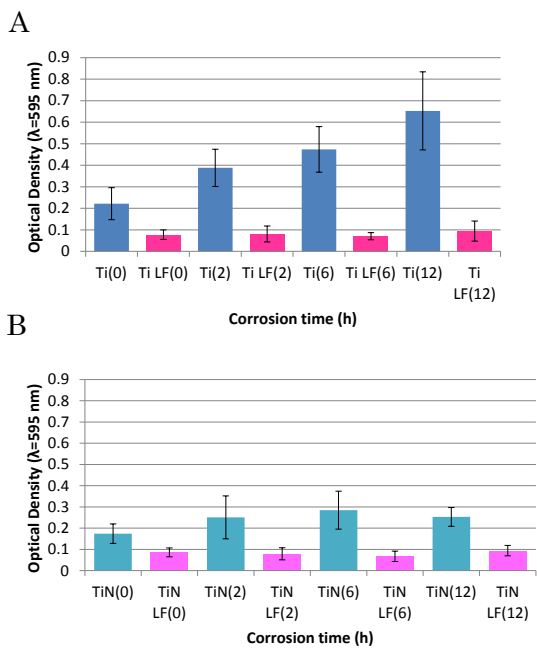


図6. 腐食時間と細菌付着量 (A:Ti, B: TiN)

(5) 唾の影響

図7~9にLF吸着後ASに浸漬したTiのLFの蛍光強度、細菌付着量、LIVE/DEAD染色の結果から測定した細胞の生死を示す。人工唾液へ浸漬すると細菌の付着量は増加したが、一度吸着したLFは試料表面に残存していることがわかり、抗菌作用も維持されることが示された。

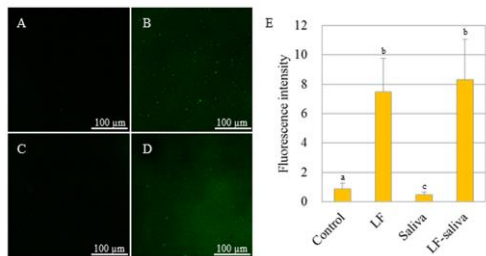


図7. FITC標識LFのCLSM像と蛍光強度 (A:Control, B: LF吸着, C: 人工唾液浸漬, D: LF吸着後人工唾液浸漬, E: 蛍光強度)

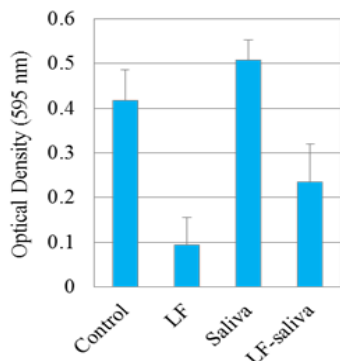


図8. 細菌付着量

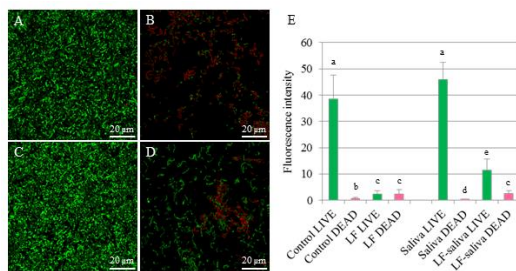


図9. LIVE/DEAD染色後のCLSM像と蛍光強度 (A:Control, B: LF吸着, C: 人工唾液浸漬, D: LF吸着後人工唾液浸漬, E: 蛍光強度)

(6) 処理時間の検討

図10にLF吸着時間を30秒に短縮した試料表面をAS中に1, 3, 7日浸漬したときのLFの蛍光強度、図11にその細菌付着量を示す。処理時間を短縮しても、試料表面にLFは存在し、ASに浸漬すると、経時的に蛍光強度は減少するが、細菌付着を抑制することがわかった。

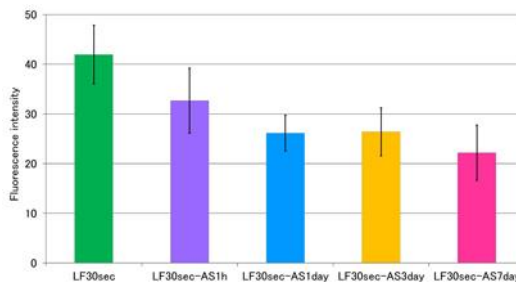


図10. FITC標識LFの蛍光強度

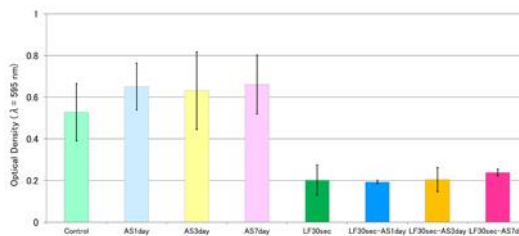


図11. 細菌付着量

(7) 今後の展望

本研究の結果から、LF吸着インプラント材料は基質の種類に関わらず、抗菌性を持つインプラント材料として有望であることが示された。

今後、臨床応用のために適した処理方法について検討していきたい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

①Futami Nagano-Takebe, Hiroshi Miyakawa, Futoshi Nagazawa, and Kazuhiko Endo, Inhibition of initial bacterial adhesion on titanium surfaces by lactoferrin coating, Biointerphases 9, 2014 (in press), 査読有, DOI: 10.1116/1.4867415

[学会発表] (計5件)

- ① 建部二三, 井田有亮, 戸島洋和, 遠藤一彦, ラクトフェリン吸着による口腔インプラントアバットメントへの細菌の付着抑制ー吸着・脱着に関する検討ー, 第63回日本歯科理工学会学術講演会, 2014年4月12日, 東京
- ② Futami Nagano-Takebe, Hiroshi Miyakawa, Futoshi Nakazawa, Kazuhiko Endo, Inhibition of initial bacterial adhesion to titanium by lactoferrin, The 4th International Symposium on Surface and Interface of Biomaterials, 2013年9月27日, ローマ
- ③ 建部二三, 赤沼正康, 橋本正則, 井田有亮, 越智守生, 遠藤一彦, 酸性フッ化物溶液による口腔インプラントアバットメント材料の腐食とラクトフェリン吸着による細菌の付着抑制について, 第61回日本歯科理工学会学術講演会, 2013年4月14日, 東京
- ④ 長野二三, 橋本正則, 井田有亮, 戸島洋和, 遠藤一彦, ラクトフェリン吸着による口腔インプラントアバットメントへの細菌の付着抑制, 第60回日本歯科理工学会学術講演会, 2012年10月13日, 福岡
- ⑤ 長野二三, 井田有亮, 橋本正則, 遠藤一彦, 歯科用インプラントアバットメント材料の表面に結合したラクトフェリンによる細菌の付着抑制に関する検討, 第59回日本歯科理工学会学術講演会, 2012年4月14日, 徳島

6. 研究組織

研究代表者

建部 二三 (旧姓: 長野),

(Futami Nagano-Takebe)

北海道医療大学・歯学部・生体材料工学分野・助教

研究者番号: 10534448