

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592964

研究課題名(和文)細胞のリシーリングを用いたインプラント周囲組織における抗炎症性の獲得

研究課題名(英文) acquisition of anti-inflammatory on the implant surrounding tissue by cell re-sealing

研究代表者

草野 薫 (KUSANO, Kaoru)

北海道医療大学・歯学部・講師

研究者番号：80382498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臨床応用されている異なるタイプの歯科インプラント(機械研磨処理(P)、プラストエッチング処理(SLA)、マイクロボックス(MB))を用い、細胞のリシーリングを用いた抗炎症性獲得のために、各種インプラント表面形状におけるインプラント周囲組織細胞の伸展、増殖能およびPCNAとインテグリンの発現に与える影響について検討した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the influence of surface topographies on cell shape, proliferation, PCNA and integrin expression of the implant surrounding tissue for clinically-applied dental implants with different type surface topographies (mechanically polished (P), and sandblasted and acid etched (SLA), and micro-box (MB)) for acquisition of anti-inflammatory by cell re-sealing.

研究分野：医歯薬

キーワード：歯科インプラント インプラント周囲炎 表面形状 細胞増殖 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント(以下:インプラント)は感染に弱いとされているが、天然歯とのインプラントの大きな違いは、歯牙と上皮、インプラントと上皮の接着様式にある。接着の弱いインプラント周囲上皮では天然歯周囲上皮と比較し、容易に細菌が侵入し、炎症が置きやすい状況にある。これまでインプラントの基礎的研究は、インプラント表面における骨形成に関するものや、表面処理法と骨形成関連細胞の増殖に関するものが多く、より早いオステオインテグレーションが獲得され、インプラントの高い生着率につながっているものと推察される。インプラントの生着率があがると同時に、インプラントの永続性が大きな課題で、定期的なオーラルハイジーンに関するメンテナンスが重要となってくる。本来、天然歯-歯周組織とインプラント-周囲組織との大きな違いは界面での接着様式にある。インプラント周囲組織の辺縁封鎖に関連する重要な因子として、細胞接着タンパクがあげられる。接着タンパクにはとしてインテグリンやカドヘリンがある。いずれも細胞表面に存在するタンパク質で、カドヘリンには上皮に関連する E-カドヘリンがあり、同種分子間の結合に重要な役割を担っている。また、インテグリンはコラーゲンやフィブロネクチン、ラミニンなどに関連する膜通過型ポリペプチドで、細胞骨格や細胞形態に重要な役割をもち、異種分子間の結合を担っている。

インプラント周囲炎の感染リスク減少因子の1つに、免疫機能向上因子を合わせ持つ、抗細菌性タンパクの存在があげられる。抗細菌性タンパクには様々なものが報告されてきているが、さまざまな細菌に広範囲スペクトルをもつディフェンシンによる感染防御機構が注目されている。自然免疫の役割を担うディフェンシン、細菌接触など、炎症刺激によりその抗細菌作用が増強し、獲得免疫の役割を担うディフェンシン type-2、3、4がある。炎症と密接な関係にあるインプラント治療と、ディフェンシンとの免疫システムにより、新たなインプラントの感染防御確立に、大きく役立つものと考えられる。また、歯周疾患に罹患していない天然歯は寿命が長く、その要因として付着上皮が炎症のバリアーとして働いていることがあげられる。しかし歯周疾患に罹患したインプラント、いわゆるインプラント周囲炎は、炎症の波及が早く、早期にインプラントの脱落の原因となっているケースに度々遭遇する。このことからインプラントの恒久性をめざすべく、インプラントに天然歯と同様の付着上皮のリシーリング(再付着) 辺縁封鎖性向上による炎症の下方進展の防御することが、直接的に抗細菌作用備え持つ付着上皮をインプラント

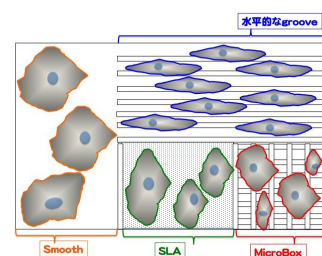
界面に維持させることが出来ると考える。その結果、恒常的なインプラント治療の感染防御機構の付与につながるものと考えられる。

2. 研究の目的

インプラント界面での細胞接着の弱いインプラント周囲上皮では天然歯周囲上皮と比較し、容易に細菌が侵入し、炎症が置きやすい状況にある。そこで本研究では、既に歯科インプラントに臨床応用されている機械研磨処理(P)、プラストエッチング処理(SLA)マイクロボックス(MB)を用い、インプラント表面形状におけるインプラント周囲組織と同じ、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)、ヒト口腔上皮細胞(OE)を用い、細胞増殖、細胞接着密度、細胞増殖能および細胞接着の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

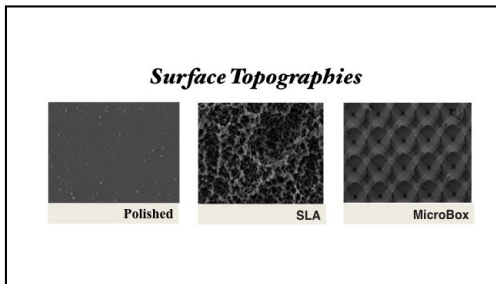
- (1) インプラントサーフェースの作製は Dr. Brunette らの方法に従い、オリジナルテンプレートから、機械研磨処理(P)、プラストエッチング処理(SLA)、マイクロボックス(MB)の各インプラントサーフェースレプリカを作製し、それぞれ電子顕微鏡で確認した。
- (2) 各種インプラント表面形状における細胞増殖数の検索について細胞は、インプラント周囲組織と同じ、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)、ヒト口腔上皮細胞(OE)を用い、それぞれ10%FBS含有MEMにて、37℃、5%CO₂条件下で培養を行った。24穴細胞培養用プレート内に配置した試料に、細胞を 2×10^4 cell/mlに調整して播種し、1、3、5、7日間前述の条件下に培養する。それぞれの細胞の各時期に、トリプシンEDTAにて細胞を浮遊させ、ハンディ自動セルカウンターにて細胞数をカウントし細胞増殖数を評価した。
- (3) ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)、ヒト口腔上皮細胞(OE)の各種インプラント表面形状における細胞密度を観察するため、24穴細胞培養用プレート内に配置した試料に、それぞれ細胞を播種し、1、3、5、7日間前述の条件下に培養固定し、DAPI染色を行い、電子顕微鏡に細胞密度、増殖を観察した。



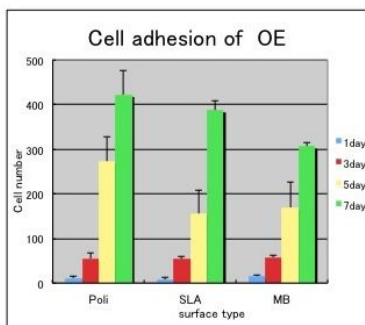
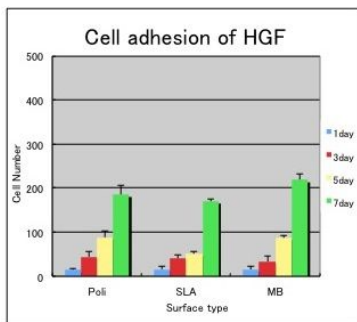
- (4) ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) ヒト口腔上皮細胞 (OE) の各種インプラント表面形状における細胞増殖能について PCNA およびインテグリン 6 4 の発現を Real time PCR 法にて検索した。

4. 研究成果

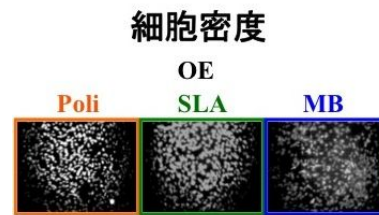
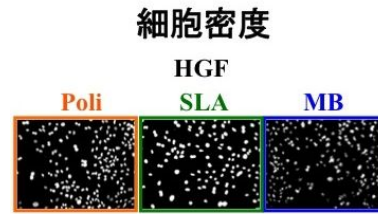
- (1) 作製されたインプラントサーフェスレプリカを電子顕微鏡で確認した。



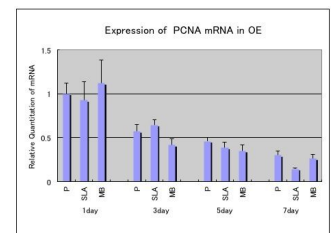
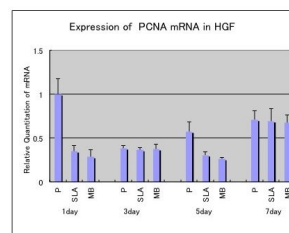
- (2) 各種インプラント表面形状における細胞増殖数の検索についてヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) ヒト口腔上皮細胞 (OE) のいずれも経時的な細胞増殖が観察された。細胞数ではヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) よりヒト口腔上皮細胞 (OE) において細胞増殖が高かった。また、ヒト口腔上皮細胞 (OE) 培養 7 日目において MB が他の表面形状より有意に低かった。



- (3) 各種インプラント表面形状における細胞密度を観察したところ、細胞増殖と同様に細胞培養 7 日目においてヒト口腔上皮細胞 (OE) がいずれの表面形状においてもヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) より細胞密度が高かった。



- (4) ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) ヒト口腔上皮細胞 (OE) の各種インプラント表面形状における細胞増殖能について PCNA の発現を観察したところ、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) の培養 1 日目において機械研磨処理 (P) での発現が高く、7 日目ではいずれも発現に各表面形状間において有意な発現の差はみられなかった。またヒト口腔上皮細胞 (OE) では培養 1 日目の初期に PCNA の発現が高く、経時的に減少している。インテグリン 6 4 の発現については現在も検索継続中である。



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 2 件)

草野 薫

BioHorizons Laser-Lok® Implant System
が可能にする複雑な Implant 治療 インプ

ラント YEAR BOOK 2014 P65-72 クイン
テッセンス出版社 2014年4月

南田 康人, 村田 勝, 草野 薫, 赤澤 敏之,
永易 裕樹
傾斜機能構造を有する生体模倣セラミックス
の特性と巨細胞出現の評価
日本口腔インプラント学会誌 Vol. 27 (2014)
No. 4 p. 513-520

〔学会発表〕(計 4 件)

建部廣明、仲西康裕、草野 薫、松原秀樹、
木村和代、廣瀬由紀人、越智守生
口腔インプラント手術の周術期管理に対す
る DEPIIM 法を用いた 細菌数測定法の有効性
に関する検討
第 28 回日本歯科産業学会・学術講演会 平
成 25 年 8 月 25 日 郡山

建部廣明、草野 薫、松原秀樹、廣瀬由紀人、
有末 眞、越智守生
当科における DEPIIM 法を用いた細菌数測定装
置が口腔インプラント手術管理に及ぼす影響
第 54 回日本歯科医療管理学会総会・学術大会
平成 25 年 6 月 29 日 岐阜

Kusano K. The role of surface topography
of dental implant as a defender. Third
ACAD International Conference (Australian
Central Association of Dentists Inc.)
Hokkaido (Japan) 2013年01月

Kusano K. Brunette DM, Arisue M.
Gap-Cornered-box surface topography
affects bone marrow mesenchymal stromal
cell growth and spreading Astra Tech
World Congress 2012, Gothenburg (Sweden)
2012年05月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

草野 薫 (KUSANO Kaoru)

北海道医療大学・病態機能病態学系・顎顔
面口腔外科学分野・講師

研究者番号：80382498

(2) 研究分担者

西村 学子 (NISHIMURA, Michiko)

北海道医療大学・病態機能病態学系・臨床
口腔病理学分野・講師

研究者番号：10337040

伊藤 勝敏 (ITO, Katsutoshi)

北海道医療大学・病態機能病態学系・顎顔
面口腔外科学分野・助教

研究者番号：50433438

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

