

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 7 年 5 月 2 2 日現在

機関番号： 1 7 1 0 2

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2012 ~ 2014

課題番号： 2 4 7 9 2 0 9 2

研究課題名 ( 和文 ) チタンイオンがインプラント周囲の骨、歯肉に与える影響

研究課題名 ( 英文 ) The effects of titanium ions on the inflammation and bone resorption around an implant

研究代表者

的野 良就 (Yoshinari, Matono)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号： 3 0 4 3 2 9 1 7

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 ) : 本研究は実際に生体内 ( 骨内、歯肉貫通部 ) でチタンイオンが溶出した際、チタンイオンがインプラント周囲の骨、歯肉にどのような影響を与えるかを、動物実験を用いて明らかにしていく。平成24年度はラットの顎骨に埋入したミニインプラントにNaFを塗布したのちインプラント周囲の歯肉、骨組織を回収した。平成25年度は、この平成24年度に回収した歯肉、骨組織中の金属イオンを測定した。その結果、歯肉中から有意に多くの量のチタンが検出された。平成26年度は、平成25年度に得たデータを参考にチタンイオンがインプラント周囲に与える影響について分子生物学的手法を用いて詳細に検討し、欧文誌に報告した。

研究成果の概要 ( 英文 ) : The effects of titanium ions on the inflammation and bone resorption around an implant were investigated. The accumulated amount of Ti ions released into gingival and bone tissues from an implant exposed to sodium fluoride solution was measured using inductively coupled plasma mass spectrometry. Next, the cellular responses in gingival and bone tissues to Ti ions and/or (P.g.-LPS) were assessed using a rat model. More Ti ions were detected in the gingival tissues around an implant after treatment with sodium fluoride (pH 4.2) than in its absence. The injection of Ti ions significantly increased the mRNA expression of chemokine CCL2, as well as the ratio of RANKL to OPG, in rat gingival tissues exposed to P.g.-LPS in a synergistic manner. These data suggest that Ti ions may be partly responsible for the infiltration of monocytes and osteoclast differentiation by increasing the sensitivity of gingival epithelial cells to microorganisms in the oral cavity.

研究分野： 歯科補綴学

キーワード： チタン インプラント チタンイオン 腐食

## 1. 研究開始当初の背景

インプラント治療は、近年、欠損補綴の選択肢として確立され、需要も急速に増加している。また、インプラント治療の技術の向上と、材料の開発および改善によって、インプラント治療の成功率も安定して伸びてきている。

しかし、インプラント周囲炎、埋入時のオーバーヒート、骨の圧迫等の原因でインプラントを撤去せざるを得ない症例もいまだに多く存在する。撤去症例の中には原因不明のものも存在し、インプラントにおけるチタンアレルギーを指摘する声も最近多く聞かれるようになってきた。

インプラントに多く用いられている材料であるチタンは、高い生体親和性と耐食性を有していることは周知の事実であるが、口腔内において、酸性、フッ素が存在、という2つの条件が整えば、チタン及びチタン合金は腐食する。また、実際に口腔内から撤去されたインプラントの研磨面にも腐食が観察されている。

申請者は、これまでにチタンに微量の白金(Pt)またはパラジウム(Pd)を添加することにより、これらが不動態化しやすくなることに着目して、チタンに白金を0.5wt%添加したチタン合金が高耐食性、強度等においてもっとも有用であることを明らかにした。

従って、白金添加チタンは、従来の歯科インプラントの基盤材料よりもすぐれたインプラント材料となる可能性が高い。

Ti はそれ自体は生体適合性に優れた材質であるが、100 µm以下の大きさになると生体内での炎症反応を引き起こし、粒径が10 µm以下になると好中球の貪食を受け、その際には炎症細胞からのTNF- $\alpha$ の放出や活性酸素産生量の上昇など生体為害性に寄与する可能性を持つ反応を引き起こすことが確認されている。また、先述したようにTi は腐食されることによってイオン化されることがわかっており、Ti イオンは骨芽細胞の増殖、アパタイトの形成促進を抑制することも報告されている。

このようなことから、インプラント埋入後からオッセオインテグレーションを獲得するまでの間、さらに、オッセオインテグレーションを獲得した後にTi イオンが溶出した際に歯周組織に与える影響を検討する事は急務であると考えられる。しかし、溶出したTi イオンが歯周組織に及ぼす影響に関するin vivo における検討を行った論文はない。

そこで本研究では、骨内でTi イオンを溶出させ、それがインプラントにおける骨結合性および骨伝導性にどのような影響を及ぼすかをTi イオンをほとんど溶出しない高耐食性チタン合金と比較して検討することを目的とする。

## 2. 研究の目的

研究期間内にチタンにフッ素が作用した際に起きるTi イオンの溶出が骨結合性、骨伝導性に与える影響について動物実験を用いて多面的検索を行う。Ti を埋入した後オッセオインテグレーション獲得前(1~8週)、獲得後(8週以降)でのTi イオンが与える影響。開発された高耐食性チタン合金にフッ素が作用した際の骨結合性、骨伝導性、および生体親和性を評価し、の結果と比較検討する。

## 3. 研究の方法

### 材料および方法

#### 材料

本実験で1,000 ppm, pH 4.2 のフッ化ナトリウム溶液(以下 NaF 溶液)をフッ化物単体溶液として、超純水(MQ)をコントロール試料(以下 コントロール)として用いた。JIS2種の純チタン板(以下 チタン板)(10 mm×10 mm×1 mm)は小田鋼機株式会社製(大阪)を使用した。粘膜貫通部2 mm、スレッド部2 mm計長さ4 mm、幅2 mmの純チタン製インプラント(JIS2 種)をラットの口蓋突起に埋入した(以下 ミニインプラント体)。

#### チタン板の浸漬

チタン板表面を耐水研磨紙(1000, 1500, 2000)(三共理化学, 埼玉)をそれぞれ用いて研磨した後、コロイダルシリカ溶液にてバフ研磨を行った後、アセトンとエタノールを用いてそれぞれ15分間、十分に超音波洗浄し乾燥させた。フッ化物を2.0 mLずつ注入した12穴の培養用皿に、チタン板を半面のみ4分間浸漬し、その後、浸漬しない側をMQに4分間浸漬しコントロール側とした。その後、蒸留水にて15分間の超音波洗浄を3回、アセトンおよびエタノールにて超音波洗浄をそれぞれ15分間行い、以下の実験に用いた。

#### 色差と表面粗さの差の測定

歯科用色彩計(シェードアイ NCC センサー,

松風, 京都)を用いて浸漬前後の色および表面粗さを測定した。色彩計によって得られた色の値を利用して、浸漬前と浸漬後の色の差である色差(NBS単位)を算出した。

表面粗さ計(VK Viewer, KEYENCE)を用いて得られた浸漬前後のチタン表面の表面粗さ(Ra)の値から表面粗さの変化量を算定式: (表面粗さの差  $\mu\text{mRa}$ )=(浸漬後の表面粗さ; Ra:  $\mu\text{m}$ )-(浸漬前の表面粗さ Ra:  $\mu\text{m}$ )を用いて算出した。各チタン板のコントロール側および浸漬側につき5点の表面粗さを無作為に測定し、それらの平均値をそのチタン板の表面粗さの代表値とした。

色差と表面粗さの実験は、5枚ずつ同様の検体を用いて行い、各試料の代表値の平均値を求めた。

走査型電子顕微鏡によるチタン板表面の観察

Scanning electron microscopy (VE-8800, キーエンス, 大阪)(以下 SEM)を用いてチタン表面を観察し、浸漬前後の各試料のコントロール側および浸漬側を観察した。

歯肉組織中のチタン量の測定

九州大学動物実験倫理委員会の承認を得た後、雄性Wistar系ラットの口蓋部にミニインプラント体を埋入した。埋入1週間後、口腔内に露出したミニインプラント体部を清拭し、その部にNaF溶液を塗布した。その後速やかに安楽死させ、インプラント体周囲の歯肉および骨組織を回収し、ICP質量分析(ICP-MS)を用いてそれぞれに蓄積されたチタン濃度を計測した。また、口腔内より撤去したミニインプラント体の口腔内露出部および粘膜貫通部表面をSEMにて観察した。

歯肉組織中の骨吸収関連遺伝子の発現解析

上記方法と同様に、ミニインプラントにNaF溶液を塗布させた後、ミニインプラント周囲歯肉に *Porphyromonas gingivalis* 由来の Lipopolysaccharide (以下 *P.g.*-LPS) を注入した。その後、インプラント周囲の歯肉および骨組織を回収し、トータルRNAを抽出後、炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor- (以下 TNF- ), interleukin-1 (以下 IL-1 ) および骨吸収関連遺伝子である C-C motif chemokine 2 (以下 CCL2), Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (以下 RANKL) と osteoprotegerin (以下 OPG) の発現変化を

real-time RT-PCR により解析した。

#### 4. 研究成果

NaF 溶液がチタン表面の色と表面粗さに与える影響

NaF 溶液は、チタン表面の色差を増加し、表面粗さも増加させた。

NaF 溶液がミニインプラント表面および周囲組織からのチタン検出に与える影響

NaF 溶液が暴露したミニインプラント周囲の歯肉組織から検出されたチタン量はコントロール組織から検出されたチタン濃度と比較して有意に高かった (図1)。

チタンイオンとLPSがミニインプラント周囲組織の炎症と骨吸収関連遺伝子の発現に与える影響

チタンイオン存在下において *P.g.*-LPS がインプラント周囲組織(歯肉、骨)に与える影響について real-time RT-PCR を用いて解析した結果を図2と図3にそれぞれ示す。

LPS とチタを両方投与した場合、それぞれの単独およびコントロールと比較して、歯肉組織における CCL2 と RANKL の発現を相乗的に促進し、逆に、OPG の発現を相乗的に抑制した(図2)。骨組織においては、CCL2 の発現に関してのみ同様の相乗的促進が認められた(図3)。したがって、1,000 ppm, pH 4.2 のフッ化ナトリウム溶液は、チタンを溶出させた。さらにチタンイオンは、LPS による炎症を促進する可能性が示唆された。

以上より、研究目的の および に関しては実施期間内に概ね達成できた。研究目的の

に関しては、材料の作製までは実行したが、高耐食性チタン合金の *in vivo* における検証にまでは至らなかった。しかしながら、本研究によって、唾液緩衝下においても低 pH で高濃度のフッ素によってチタンが溶出し、その溶出チタンがインプラント周囲組織においてLPSの作用を増強させる為害性があることが示唆された。今後のインプラントのメンテナンス方法の発展に有意義な研究となった。

#### 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1件)

Takanori Wachi, Takahiro Shuto, Yoshinori Shinohara, Yoshinari Matono, and Seicho Makihiro Release of titanium ions from an implant surface and their effect on cytokine production related to alveolar bone resorption Toxicology, 2;327:1-9. 2015

〔学会発表〕(計 5 件)

「チタンイオンと LPS が歯周組織に与える影響」  
和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 栗田賢一, 牧平清超  
日本補綴歯科学会九州支部学術大会 佐賀  
ポスター 2013.8.24～25

「チタンイオン存在下で LPS が歯周組織に与える影響」  
和智貴紀, 首藤崇裕, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超  
日本歯科理工学会九州地方会(夏期セミナー) 長崎 2013.8.30～31  
口演発表

「ラット実験モデルを用いたインプラント周囲粘膜炎の解析」  
首藤崇裕, 和智貴紀, 片山洋子, 篠原義憲, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超  
日本補綴歯科学会第 123 回学術大会  
2014 年 5 月 24-25 日  
宮城県仙台市  
(ポスター発表)

「インプラント体表面からの溶出チタンの検討」  
和智貴紀, 首藤崇裕, 中村優介, 的野良就, 篠原義憲, 諸井亮司, 牧平清超  
2014 年 5 月 24-25 日 宮城県仙台市  
(ポスター発表)

「動物モデルを用いたチタン製インプラント周囲組織中のチタンに関する解析」  
和智貴紀, 首藤崇裕, 的野良就, 諸井亮司, 牧平清超  
日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー  
2014.8.8  
鹿児島市  
(口頭発表)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 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 0 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等 なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
的野良就  
(2)研究分担者  
  
(3)連携研究者