

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792122

研究課題名(和文)迅速骨結合性、高強度骨結合性、歯肉上皮接着性を併せ持つチタンインプラントの創製

研究課題名(英文) Hydrothermal treatment of titanium implant surface with calcium promotes epithelial sealing

研究代表者

山添 淳一 (Yamazoe, Jyunichi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30452717

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)：カルシウム修飾したチタンインプラントを骨内に埋入した際に早期に骨と結合し、かつ結合強度が高いかどうかを検討した。さらに、歯肉上皮と高度に接着し、インプラント周囲からの外的因子の侵入を防ぐかどうかを検討した。これによりインプラント治療期間の短縮ができ、感染に対して抵抗性の強いチタンインプラント材料の創製をおこなうことができた。

研究成果の概要(英文)：Improvement of oral epithelial adhesion to titanium (Ti) may significantly enhance the efficacy of dental implants. We aimed to investigate whether CaCl₂ hydrothermal-treated (Ca-HT) Ti could promote sealing of the peri-implant epithelium (PIE) around the implant. Right maxillary first molars were extracted from rats and replaced with either Ca-HT implants (Ca-HT group), distilled water-HT implants (DW-HT group) or non-treated implants (Cont group). We also investigated the effect of Ca-HT on the attachment of rat oral epithelial cells (OECs). OEC adherence on Ca-HT Ti plates was stronger, with greater expression levels of adhesion proteins, compared with Cont and DW-HT groups. These results indicated that HT with CaCl₂ improved the integration of soft tissue cells with Ti, which may facilitate the development of a soft tissue barrier around the implant.

研究分野：補綴・理工学

キーワード：カルシウム水熱処理 インプラント

1. 研究開始当初の背景

現チタンおよびチタン合金は生体親和性に優れる歯科用インプラント材料として多用されている。チタンおよびチタン合金は骨結合性であるが、**即時負荷インプラントやインプラント治療の適応症例拡大などの臨床上の要求に応えるためには、これらを骨結合性から骨伝導性(線維性組織の介在なしに材料と骨が直接結合する。さらに骨形成速度が速い)にする必要がある。**申請者は、アパタイトなどの骨伝導性材料が骨欠損部にインプラントされた場合に マイナス電荷の材料表面に Ca^{2+} が結合する。

電荷がプラスとなった表面にリン酸イオンが結合する。形成された非晶質リン酸カルシウムが熟成され骨様アパタイトとなり、骨芽細胞が骨を形成するというシーケンスで骨伝導が発生することに着目し、当初より材料表面にカルシウムを結合すれば骨伝導性を制御できるのではと考えた。そこでチタンを塩化カルシウム中で水熱処理したところチタン表面に Ca^{2+} が結合することを見出した。その塩化カルシウム水熱処理を施した試料をヒトの細胞外液とほぼ等しい無機イオン濃度を有する水溶液(擬似体液)に浸漬する実験を行ったところ、試料表面にアパタイト層が形成された。このことによりチタンの表面を骨結合性から骨伝導性にできる可能性を示した。インプラント治療におけるもう一つの臨床上の要求は、**インプラント体を口腔内に長期にわたり維持していくことである。**しかし、これは困難であると考えられている。その理由は、歯槽骨に植立されたインプラント体は、口腔内に露出しているため、口腔粘膜貫通部位が感染経路になりやすく、インプラント周囲炎によるインプラントの脱落に至る場合があるためである。したがって、**口腔歯肉上皮組織とインプラント体との細胞接着によるインプラント周囲の生物**

学的封鎖の獲得は、インプラント治療の成功のために、必要不可欠な治療目標であると考えられる。そこで、申請者は細胞の接着機構に關与する細胞接着分子に着目した。インテグリンなどの細胞接着分子はカルシウム依存性があるので、申請者らが開発したカルシウム修飾チタンによって細胞接着分子の活性が高まり、従来のチタンでは得られない生物学的な接着が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、上皮細胞の接着と移動に關与し、上皮-結合組織界面での基底膜構成成分の一つであるラミニン5に注目した。ラミニン5は、天然歯周囲の付着上皮(接合上皮)において内側基板および外側基板に存在することが知られているが、インプラント周囲粘膜に局在しているという報告はない。

本研究計画では、チタンおよびチタン合金にカルシウム修飾を行い、歯科インプラント材料に求められる迅速骨結合性、高強度骨結合性、歯肉上皮接着性を併せ示す基盤材料の創製を目的とした。

具体的には、研究期間中には、チタンおよびチタン合金(Ti-6Al-4V)に対して、カルシウム修飾前後の機械的強度の評価。

骨芽細胞を用いた接着、増殖、分化、骨形成に關する検討。実験動物を用いた組織親和性、骨伝導性の多面的検索。ラット口腔粘膜由来の口腔上皮細胞を用いた、カルシウム修飾チタン表面における口腔粘膜上皮の細胞が接着する事を示す。実験動物を用いた上皮封鎖性の評価を行う。

3. 研究の方法

カルシウム修飾チタン及び無処理チタンの引張り強さを測定する。ラットの大腿骨から骨髓細胞を採取し、細胞接着数と細

胞増殖性を顕微鏡にて測定する。分化能はタイプ コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの発現量を測定する。Bone nodule の形成量をアリザリンレッド染色にて定量化する。実験動物を用いた組織学的検討。実験動物を用いた骨結合力の評価。ラット口腔粘膜上皮細胞を用いた adhesion assay と免疫組織化学的手法を用いたラミニン5の検索。実験動物を用いた HRP 局所滴下投与におけるインプラント周囲の組織学化学的観察。具体的な方法論は以下に示す。

Ca 修飾チタン (Ti) 及びチタン合金 (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Ti-0.5Pt, Ti-6Al-4V-0.5Pt, Ti-6Al-7Nb-0.5Pt)、未処理のチタン及びチタン合金の平板からダンベル状の試片を切り出し、万能試験機 (現有設備) により引張り強さを測定する。白金の添加や Ca 修飾が、チタンおよびチタン合金の機械的強度に及ぼす影響を調べた。具体的には、ラットの大腿骨を取り出し、骨周囲の軟組織を除去後、大腿骨の両端を切断し、骨髄細胞を採取する。 α -MEM 中で初代培養後 (現有設備) 浮遊細胞を除いた細胞を、試料の上に播種する。細胞接着性に関しては培養 7 時間後の接着細胞数を顕微鏡にて測定する。細胞増殖性に関しては 3, 6, 9 日後の細胞数を顕微鏡にて測定する。さらに、分化能に関しては、初期分化マーカーとしてタイプ I コラーゲン、中期分化マーカーとしてはアルカリフォスファターゼ活性、後期分化マーカーとしてはオステオカルシン発現量を測定する。また、9, 15, 21 日後にアリザリンレッド染色を行い Bone nodule の形成量を定量化する。対照には未修飾材料を用いた。

さらに実験動物 (Wistar rat 8 weeks old) にペントバルビタールによる全身麻酔を行った後、切開し、脛骨にラウンドバーを用いて骨髄腔まで貫通後、No.80、No.90、No100

の K ファイルにて規格化された骨欠損を形成する。生理食塩水で周囲の骨片を除去し、直径 1 mm×長さ 2 mm の円柱状試料を埋入した。この際、右足に未処理の試料を埋入し、左足に CaCl_2 処理を施した試料を埋入する。1, 2, 4 週間経過後、試料を周囲の組織とともに取り出し、固定後、マイクロ X 線 CT (現有設備) を用いて骨伝導性を評価する。試料をウルトラマイクローム (現有設備) で切り出し、さらにトルイジンブルー染色後、非脱灰組織標本を作製する。試料と周辺骨との界面をデジタル処理機能付き光学顕微鏡 (現有設備) により観察した。

口腔粘膜上皮の培養は初代培養としてまず、生後4日齢のWistar系ラットの口腔粘膜を採取し、5000IU/5ml ディスパーゼ含有 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 不含有 0.1M PBS に 4、12 時間浸漬する。その後、培地中で口腔粘膜上皮と粘膜下層を分離する。分離した上皮の基底細胞側を 10 回ピペティングし、遊離した細胞を含む上清を採取。900rpm で 10 分間遠心し、口腔上皮細胞を集積させる。細胞ペレットを再懸濁した後、鏡面研磨を施した直径 30mm、厚さ 1mm のチタンプレートに 5×10^5 個/ml で播種し、1 週間培養した。

口腔上皮細胞の接着力は Goodwin and Pauli (1995) の Adhesion assay 法に基づき評価する。培養細胞を培養液で 2 回洗浄し、遊離細胞を除去した後 0.01M PBS 中で 37、50rpm にて 5 分、3 回振盪する。その後、25% trypsin および 1mM EDTA を用いて試料より細胞を剥離し、遠沈した。細胞ペレットを懸濁し、血球計測版で細胞数を算出する。これにより無処理チタンとカルシウム修飾チタンの比較をし、細胞の接着力の評価をした。

また、**ウェスタンブロット法にてラミニン5の発現量の評価を行った。**

4. 研究成果

現在インプラント治療は需要の増大と共に各個人歯科でも年々症例数を増やしている。高額治療であるため求められる治療効果への要

求は常に高く、より高い成功率を求め研究が進められている。インプラントに関する論文掲載雑誌は国際的なものでも 10 以上や国際学会は年に 6 回以上行われる。国内の企業や個人で開かれる説明会などを含めると数えられるものではない。すなわち現在の歯科における中心的治療といえる。すなわち、これらの研究を新概念の下、システム化することが出来ればその影響力は、歯科領域だけにとどまらず医療全体、国内だけでなく世界に及ぶものとする。我々のような研究施設を臨床応用施設引き上げていくことで、研究内容において切磋琢磨し研究の質が著しく向上し国際的な競争力を得られるであろう。

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)

Oshiro W, Ayukawa Y, Atsuta I, Furuhashi A, Yamazoe J, Kondo R, Sakaguchi M, Matsuura Y, Tsukiyama Y, Koyano K. **Effects of CaCl₂ hydrothermal treatment of titanium implant surfaces on early epithelial sealing.** Colloids Surf B Biointerfaces. 2015 in press

〔学会発表〕(計 件)

〔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

山添 淳一 (YAMAZOE Jyunichi)

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座インプラント・義歯補綴科

研究者番号: 30452717

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: