

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792136

研究課題名(和文) 強固上皮付着を目指した液中プラズマ放電ナノ・ディンプル付与金属インプラントの開発

研究課題名(英文) Development of the Metal Implant Having Nano-dimples on the Surface by the Plasma Discharge in Aqueous Solution to Enhance Epithelial Attachment

研究代表者

中石 典子(寺田典子)(Nakaishi, Michiko)

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：60374550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：脆弱なインプラント 上皮付着能により惹起されるインプラント周囲炎は、時としてインプラント除去に至らしめる。本研究は近年開発され、未だ研究対象になっていない液中プラズマ放電によるナノディンプル付与チタン(液中放電Tiと呼ぶ)を作製し、チタンと口腔粘膜上皮細胞の付着状態を2次元および3次元培養にて検討を行った。結果、液中プラズマ放電により、Ti表面に一樣なナノオーダーディンプルを付与させることができた。また、その表面には細胞増殖、細胞親和性が認められ、細胞の付着も良好であった。さらに、液中放電Tiと上皮との付着環境が悪くとも、上皮と剥離することなく付着しているのが確認された。

研究成果の概要(英文)：The peri-implantitis, which is induced by poor epithelial attachment to the implant surface, often causes the removal of implant. In this study, we first developed titanium having nano-dimples on the surface by means of the plasma discharge in aqueous solution, referred to as "in-liquid discharge Ti". Since in-liquid discharge Ti is a novel material and its properties have not fully investigated, we examined the ability of oral mucosa keratinocytes to attach the surface of in-liquid discharge Ti under two- and three-dimensional cell culture environment. As a result, we were able to coat the titanium surface with nanometer order dimples by means of the plasma discharge in aqueous solution. Our results also showed the cell proliferation and biocompatibility of the titanium surface. Furthermore, it was confirmed that epithelium did not detach from in-liquid discharge Ti even if the cell-attachment environment of titanium and epithelium was poor.

研究分野：医歯学系

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：液中プラズマ放電 ナノ・ディンプル 歯科インプラント 口腔粘膜上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

歯肉付着上皮と歯科用金属インプラントは接着能が非常に低く、インプラント周囲炎発症の原因の一つとされている。また、低い上皮付着能により、インプラントに沿って粘膜上皮が入り込む結果生じた深い溝が歯周炎を助長する。さらにインプラント歯周炎が進行すれば、インプラントを除去しなければならなくなる。このような問題を解決する1つの手段として、歯肉上皮と歯科用金属インプラントの付着をより強固にし、インプラントと上皮歯肉の間隙(歯周ポケット)に歯周病菌の侵入、停滞を阻止することが挙げられる。

酸化チタン(Ti)ナノチューブを用いたナノディンプル(ナノレベルの小孔)を付与した面では、上皮付着を破壊する歯周病菌の細菌付着能が落ちるといった報告、さらに、酸化Tiナノチューブや陽極酸化アルミニウムの表面に上皮組織(上皮細胞)を強固に付着するということが示されている。これらの所見から、申請者はナノディンプルをTi表面に付与することで、より強固に上皮を付着させ、歯周病菌を侵入、停滞させず、歯周病罹患を下げる可能性があるのではないかと考えた。そこで申請者は、従来とは違い、作製容易でディンプルサイズの制御可能な“金属基盤表面での微小放電により、金属ナノ粒子を剥離・生成する液中プラズマ放電”の報告に注目した。

一方、2次元培養の報告はあるものの3次元培養や、歯周病の環境を再現した上皮とインプラントの付着を破壊するような炎症惹起状態での解析報告は皆無であったことから、上皮細胞を2次元培養に加え、3次元培養および炎症惹起状態での培養を行い、液中プラズマ放電によるTi表面のナノディンプルが、上皮細胞の付着を強固にすることを実証する必要があると考えられた。

2. 研究の目的

歯肉付着上皮と歯科用金属インプラントの低接着能が、インプラント周囲炎発症を助長する。さらにインプラント歯周炎が進行すれば、インプラントを除去しなければならなくなる。この事象を解決するため、歯肉上皮と歯科用金属インプラントの付着をより強固にし、インプラントと上皮歯肉の間隙(歯周ポケット)に歯周病菌の侵入、停滞を阻止することが重要となってくる。そこで、本研究目標は、液中プラズマ放電で付与Ti表面に付与されたナノディンプルが上皮細胞の付着を強固にすることを2次元培養、3次元培養、炎症励起状態での培養から実証し、液中プラズマ放電によりTi表面にナノディンプルを付与した歯科用インプラントを開発するための検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)液中プラズマ放電ナノディンプル付与Ti(液中放電Tiと呼ぶ)の作製

電圧、電流、処理時間条件を変え、電解質(0.1Mリン酸バッファー(pH6.86))中のTiチューブ(99.5%, Nilaco Co.)にプラズマ放電をかけ、液中放電Tiを作製した。

(2)液中放電Tiの表面形態、性状の解析  
走査型電子顕微鏡(SEM)にてTi表面のナノディンプル形態を立体的な情報として観察し、元素マッピングにて、Ti表面の構成元素を分析した。

(3)2次元培養での検討

ヒト口腔粘膜上皮細胞を液中放電Tiに接種し、SEM、蛍光染色にて液中放電Tiの細胞親和性、増殖性を継時的に検討した。

液中放電Ti上に上皮細胞を接種し、コンフレント後、0.04%EDTA-Trypsinにて細胞をTiから剥離させ、継時的な細胞残存量を比較し、細胞接着性を検討した。

(4)3次元培養での検討

3次元培養(ヒト屍体真皮(AlloDerm®)を用い、ヒト口腔粘膜上皮細胞のみ培養)したscaffoldに基板を挿入し、通常培養と炎症惹起状態培養(基板挿入直後TNF添加)を行う。樹脂包埋後、ヘマトキシリン染色にて形態の比較を行った。

(5)尚、培養に関しては、インフォームドコンセントを得た患者の小手術時に余剰となったヒト正常口腔粘膜組織片より口腔粘膜上皮細胞を単離し、無血清培地中で培養を行い、細胞を順次継代し、2-4代目を使用した。

4. 研究成果

(1)液中放電Tiの作製および表面形態、性状の解析

当初の研究方法では、Ti板を採用していたが、Ti板にプラズマ放電をかけると板の辺縁にスパークが生じ、板の全面にナノディンプルを付与することができなかった。このため、Ti板の代わりにTiチューブを用いてプラズマ処理を行ったところTi全表面に均一なナノディンプルを付与することができた。

次に、プラズマ放電の電圧、電流、処理時間を変えてTiチューブを処理したところ、ディンプル付与表面の性状やディンプル量をSEM観察、元素マッピングより確認した。221V, 2.6A, 10分処理では、221V, 2.6A, 5分処理より、ナノ単位のディンプル量が多く、マイクロ単位の凹凸が少ない印象であった(図1)。

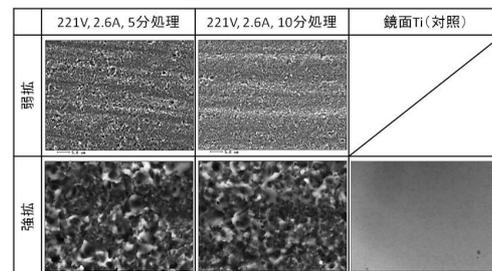


図1 液中放電TiのSEM像  
Ti全表面に均一なナノディンプルが付与されていた。また、221V, 2.6A, 10分処理では、221V, 2.6A, 5分処理より、ナノオーダーのディンプル量が多く、マイクロ単位の凹凸が少ない印象であった。

またマッピング分析を行ったところ、表面の酸化層の他にカリウムやリンも存在していた。これは、プラズマ処理に用いた電解液がチタン表面に組み込まれたと考えられた(図2)。

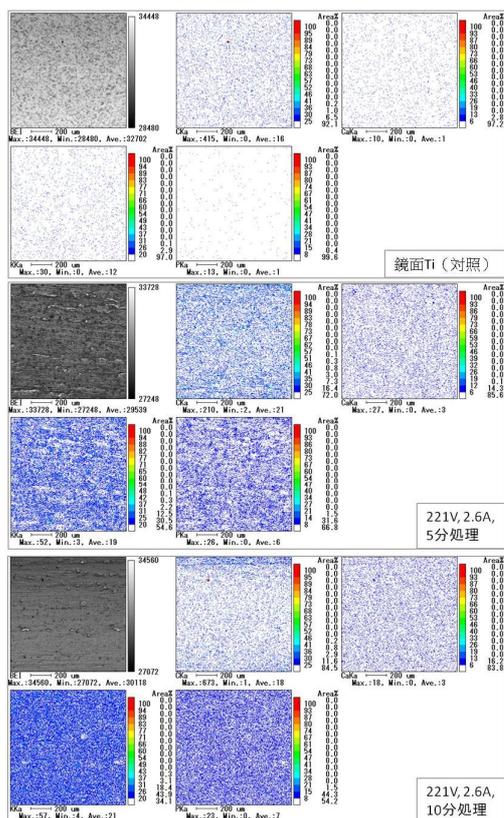


図2 液中放電Tiのマッピング分析  
 対照の鏡面Ti表面には組成が組み込まれていないがKやPが存在していた。  
 各々の条件のマッピング画像はそれぞれ、上段左:BEI、中央:C、右:Ca、下段左:Ka、右:Pの分析結果を示している。

Ti 表面のナノ単位のディンプル量およびリン含有などから、細胞接着に優位なのは、221V, 2.6A, 10分処理の液中放電Tiだと予測した。

### (2)2次元培養での検討

上皮細胞を液中放電Ti(221V, 2.6A, 5および10分処理の2種)に60K/cm<sup>2</sup>で播種し、継時的(1, 3, 5日)にSEM観察を行ったところ、対照の鏡面Tiより細胞数は少ないが、継時的に増殖が認められた(図3)。また、蛍光染色にて液中放電Ti上の上皮細胞は生存し、細胞親和性があると確認した(図4)。

次に、液中放電Ti上の上皮細胞がコンフレントになった後、0.04%EDTA-Trypsinにて細胞をTiから剥離させ、継時的な細胞残存量を比較したところ、対照の鏡面研磨板よりも長く細胞が基板上に存在したことが確認できた(図5)。

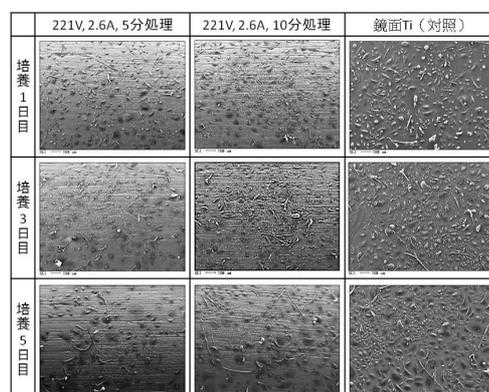


図3 液中放電Ti上でのヒト口腔粘膜細胞2次元培養(SEM像)  
 対照の鏡面Tiより細胞数は少ないが、継時的に細胞増殖が認められた。

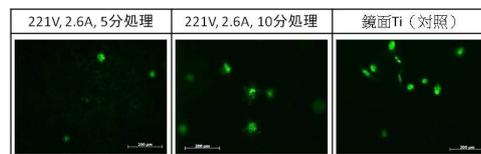


図4 培養3日目の液中放電Ti上でのヒト口腔粘膜上皮細胞(Calcein-AM染色像)  
 液中放電Ti上の上皮細胞は生存し、細胞親和性があると確認した。

### (3)3次元培養での検討

研究当初、ヒト線維芽細胞含有ゲル上にヒト上皮細胞を播種した3次元培養系を用いようとしたが、基板を挿入する際、ゲルのカットが思うようにならず、ヒト屍体真皮(AlloDerm®)上に上皮細胞を播種する3次元培養系を採用した。

通常培養と炎症惹起状態培養(基板挿入直後TNFを添加し、細胞の接着能を低下させた培養法)の2種類の培養を行い、樹脂包埋後、ヘマトキシリン染色にて形態的比較を行ったところ、炎症惹起状態培養の鏡面Ti板と上皮を確認すると、Ti表面から上皮が離れて存在しているように見られた。それに対し、液中放電Tiと上皮を確認するとTi処理表面と接しているように見られた(図6)。

(4)以上の結果から、液中プラズマ放電ナノディンプル付与Tiは、その表面の形態(ナノディンプル)または性状(カリウムやリンの存在)から上皮細胞と強固に接着し、その増殖までも抑制してしまうことが考えられた。しかし、液中放電Ti処理表面と上皮との接着は、問題なく接着されていたことが観察された。これらのことから、液中放電Tiは、上皮細胞、上皮と強固に接着することが示唆された。

(5)申請者が示した結果は、当初の研究目的で掲げたナノディンプルへの上皮細胞の増殖、付着への有効性を2次元培養で明らかにし、3次元培養、および炎症惹起状態でもナノディンプルと上皮細胞の付着が強固になるか否かをほぼ検証できたと考えられる。今後、更なる検討を行っていく。

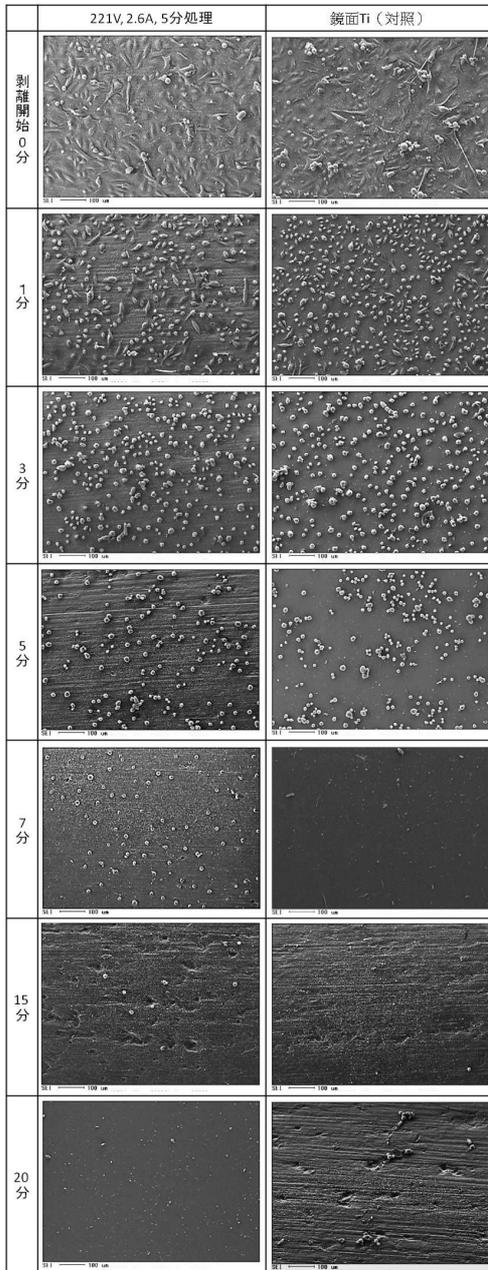


図5 液中放電Ti上でのヒト口腔粘膜細胞の剥離試験(SEM像)  
対照の鏡面Tiでは5分後には基板表面に細胞は存在しなくなったが、液中放電Tiの表面には、15-20分の剥離処理を行っても細胞が存在した。

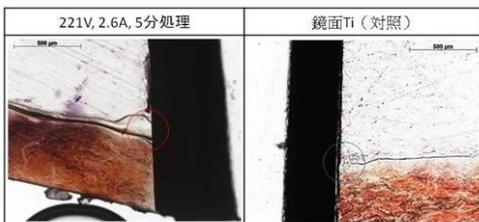


図6 液中放電Tiと培養口腔粘膜上皮(樹脂包埋、Haematoxylin染色)  
炎症惹起状態培養で、対照の鏡面Ti板表面から上皮は離れて存在しているように見られた(○)のに対し、液中放電Ti表面と上皮は接しているように見られた(○)

## 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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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  
中石 典子(寺田 典子)(NAKAISHI,  
Michiko (TERADA, Michiko))  
新潟大学・医歯学系・特任助教  
研究者番号：60374550

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：