

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293390

研究課題名(和文)低温プラズマジェット照射による新しいインプラントリカバリーシステムの構築

研究課題名(英文) Construction of a new implant recovery system by low-temperature plasma jet irradiation

研究代表者

金高 弘恭 (Kanetaka, Hiroyasu)

東北大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50292222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)： 歯科用インプラントは予知性の高い治療法として広く普及しているが、一方でインプラント周囲炎などの課題も残されている。そこで本研究では、問題の生じたインプラントを撤去することなく口腔内で機能的かつ形態的な回復を獲得する方法として、強力な殺菌、不良組織除去、インプラント表面再活性化処理、組織再生を3本柱とする全く新しい手法による口腔内でのリカバリーシステム構築を目的とした。

研究成果として、低温プラズマジェットの最新技術を応用し、生体活性を失ったインプラントに対して、口腔内で安全に殺菌および表面再活性化処理を行うことで、良好な組織再生を促進するリカバリーシステムの基盤の構築を行った。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was to construct dental implant recovery system in the oral cavity due to a completely new approach based on three pillars; powerful sterilization and infected tissue removal, re-activation treatment of the implant surface, tissue regeneration, as a method of obtaining a functional and morphological recovery in the oral cavity without removing the dental implant with peri-implant inflammation.

As research results, by application of the latest technology of low-temperature plasma jet, the base of the dental implant recovery system to promote good tissue regeneration was constructed by carrying out the safe sterilization and surface re-activation treatment in the oral cavity for the implant which has lost its biological activity.

研究分野： 歯科医用工学

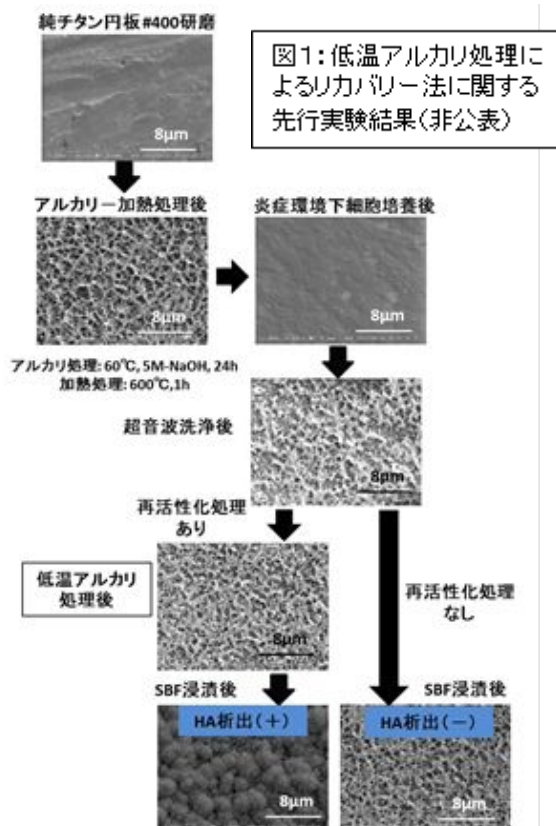
キーワード： 歯科インプラント プラズマ 生体材料

1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療は、治療法の進歩により、予知性の高い治療法として広く行われている。しかし一方でハイリスク患者への使用や長期経過事例でインプラント周囲炎等によるインプラントの撤去が増加傾向にあることが問題視されはじめています。

歯科用インプラントは、天然歯と異なり、生体組織との結合構造がないため、炎症の進行が速く、重症化しやすい (Suzuki et al, 2005; Matsuzaka et al, 2007)。また一旦炎症を起こすと、細胞侵入や炎症性物質、pH変化などにより表面での電気化学的性質が変化し、生体活性が失われてしまうため (Mombelli et al, 2002)、歯石、不良肉芽の外科的除去を行っても、周囲骨を再生することは非常に困難である。そのため、病的変化も含めた過酷な口腔内環境でも撤去せずに確実かつ安全に機能回復できるインプラントリカバリーシステムの開発が望まれていた。

そこで本研究グループは、研究分担者が開発に関わり、高い骨結合能を有するアルカリ-加熱処理に着目した (Miyazaki et al, 2002; Kokubo et al, 2006)。アルカリ-加熱処理インプラントは、骨結合能を向上させる表面処理法で、すでに人工股関節で実用化されているが、一方、生体内外での長期留置で活性が低下し骨結合能が弱くなることが知られている。我々は先行実験として、アルカリ-加熱処理チタンを2週間模擬炎症環境下に置き、その後、口腔内で実施可能な処理条件での低温(40℃)アルカリ処理により、再び表面活性を上昇させるリカバリー方法を発見した(図1)



この方法により口腔内でのインプラント表面再活性化処理の可能性が示唆されたが、処理時間や殺菌の効力についてさらなる効率化が必要であると考えられた。そこで本研究では、研究分担者が開発した低温でありながら高いエネルギー粒子を放出できる低温プラズマジェット技術に着目した。プラズマは強力な殺菌作用および金属表面の改造作用を持っているため、殺菌、表面再活性化、組織再生の3つの処理を大幅に効率化することで、最先端プラズマ技術を応用した包括的な「インプラントリカバリーシステム」を世界に先駆けて構築することが可能となる。

研究開始時に予想される結果と意義については下記に示す通りと考えられた。歯科インプラントに問題が発生し撤去を余儀なくされた場合、インプラント喪失、骨の喪失に伴う患者の身体的、心理的および経済的負担は大変大きい。本研究成果をもとに、生体内においてインプラント表面再活性化を行う方法を利用する口腔内リカバリーシステムが構築できれば、これら全ての問題を解決する可能性があり、臨床的意義は極めて大きいと考えられる。

加えて、口腔内環境のように生物学的、物理学的、化学的に厳しい条件下での、再活性化による新しいリカバリー法の確立は、生体内での変化に対して適応が難しい生体材料の生物学的、臨床的課題を解決する可能性をもつ。つまり、人工関節治療など他の医療分野への応用展開として広がる可能性も大きく、歯科医学分野からの技術発信として社会的に大きく貢献することが期待できる。

2. 研究の目的

歯科用インプラントは予知性の高い治療法として広く普及しているが、一方で長期経過の中でインプラント周囲炎での骨吸収により、インプラントの撤去を余儀なくされたり、歯槽骨吸収に伴うインプラント露出による機能的、審美的な障害が問題となっている。しかしながら、現在のところ、このような病態に対する画期的な解決方法はなく、臨床現場で重要な課題となっている。

そこで本研究では、問題の生じたインプラントを撤去することなく口腔内で機能的かつ形態的な回復を獲得する方法として、強力な殺菌、不良組織除去、インプラント表面再活性化処理、組織再生を3本柱とする全く新しい手法による口腔内でのリカバリーシステム開発を目的とした。具体的には、近年医療分野での注目を集めている低温プラズマジェットの最新技術を応用することで (Kaneko T et al, 2012)、生体活性を失ったインプラントに対して、口腔内で安全に殺菌および表面再活性化処理を行うことで、良好な組織再生を促進するリカバリーシステムの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) アルカリ - 加熱処理条件の最適化

通常、チタンは酸に対し高い耐食性を示すが、アルカリである NaOH に対しては、チタン酸ナトリウムの水和ゲルを作る。ただ、このままでは、簡単にはがれてしまうため、その後、加熱処理を行うと、チタン酸ナトリウムとチタン水酸化物(Ti-OH)に富む網目構造の剥離しにくい生体活性層が作られる(図2; Kokubo et al, 2004)。再活性化処理を前提としたアルカリ - 加熱処理について、NaOH 濃度、加熱温度などを比較した上で最適な条件を明らかにする。

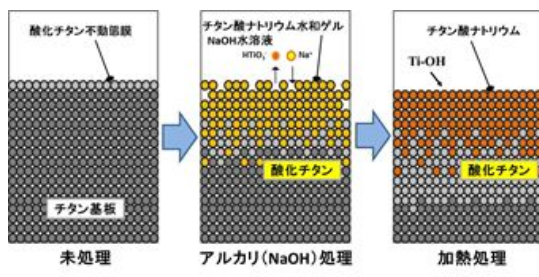


図2: アルカリ - 加熱処理

(2) 低温プラズマジェット照射装置の開発

直径 5mm のガラス管にヘリウムガスを供給し、1 対のリング状電極を 1-4 cm 程度の間隔で設置し、電圧 5-20 kV、周波数 10-20 kHz の低周波高電圧を印加することで、大気圧低温(40 程度)プラズマを生成する。ガス流量、印加電圧等を制御することで、プラズマをジェット状で噴射することができることから図3のような低温プラズマジェット照射装置を製作する。プラズマ中の水酸基ラジカルの密度を変化させるために、ミスト状の水をプラズマ内に導入する。水の導入量を 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ から 8 $\mu\text{l}/\text{min}$ まで変化させることによって、プラズマを照射した液体中に水酸基ラジカルの存在を示す波長 310nm の光吸収強度が増大しているのが観測されている。水の導入量に対する水酸基ラジカルの光吸収強度(水酸基ラジカルの生成量)の依存性は先行研究にて明らかになっており、本プラズマ照射装置は従来のプラズマジェットと異なり、水酸基ラジカルを制御して生成できる装置である。なお、生成された水酸基ラジカルの寿命は数 ms と短く、研究分担者の佐々木らの研究により、生体応用への安全性が確認されている(Kanno T,

Sasaki K, et al, 2012)。

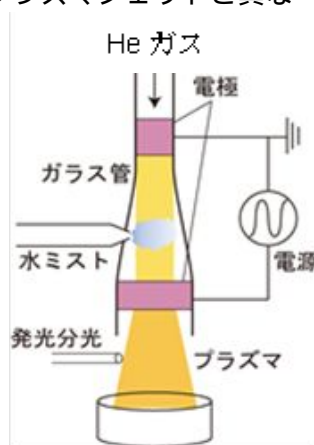


図3: 低温プラズマジェット照射装置

(3) in vitro 系での炎症環境モデルにおける再活性化

in vitro 系での炎症環境モデルの製作

チタン円板上に上皮系細胞としてラット由来 Rat-1 線維芽細胞株を播種し、さらに RAW264 マクロファージ細胞株を非接触共培養する。Rat-1 線維芽細胞株がサブコンフルエント(80%)になるまで培養した後、生体での炎症反応を模倣的に再現するために LPS を 1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加し、さらに 2 週間培養する。なお、炎症状態が再現されているかどうか確認するため、(a)炎症性サイトカインの mRNA 発現レベルの評価(リアルタイム PCR)、(b)炎症性サイトカインの分泌量(ELISA 法、2 次元電気泳動装置による解析)、(c)炎症反応に伴う pH 低下を測定する。

再活性化処理に伴う殺菌・不良組織除去効果の評価

チタン円板上に上ラット由来 Rat-1 線維芽細胞株を炎症環境下において培養した後、プラズマ照射および低温アルカリ処理により再活性化を行う。再活性化条件の最適化にあたっては、(a)NaOH の濃度、(b)処理時間について、滅菌・不良組織除去効果に関する最適条件を明らかにする。

a. 殺菌作用の評価

口腔内細菌を含むバイオフィームに対しプラズマ照射を行い、殺菌作用について評価する。

b. 付着細胞の観察

トリプシンにより、付着細胞を分離し、DNA 量を測定することで付着細胞量を定量する。

c. 残留タンパク質の定量

セルスクレーパーを用いて Ti ディスク表面に付着したタンパク質を剥離し、ブラッドフォード染色液と混和後、分光光度計(波長: 595nm)にてタンパク質濃度を定量する。

(4) in vivo 系での炎症環境モデルにおける再活性化

in vivo 系での炎症環境モデルの製作

研究代表者らが行ってきたチタンインプラントの即時荷重動物実験モデルを改良し、炎症環境モデルを作製する。具体的には、ラット脛骨に貫通型のインプラントを埋入し、片端に LPS 含有の綿糸を巻き付け放置する。LPS 含有綿糸側は炎症に伴う骨吸収が起こると考えられる。

再活性化処理に伴う滅菌・不良組織除去効果の評価

in vivo 系での炎症環境モデルに埋入されたチタンインプラントに対し、低温プラズマ照射および低温アルカリ処理により再活性化を行った後に撤去、その後、in vitro 系での実験と同様に、a. 殺菌状態の評価、b. 付着細胞の観察、c. 残留タンパク質の定量を行い、再活性化処理に伴う殺菌・不良組織除去効果の評価を詳細に検討し、再活性化処理の最適条件を明らかにする。

(5) in vitro 系での再活性化による細胞活性評価

再活性化処理条件の最適化のために、各種再処理条件における骨形成能について、前骨芽細胞株 (MC3T3-E1) を使用し、下記の通り、細胞生物学的および分子生物学的手法により評価する。

細胞増殖:

DNA 量の定量により細胞量を評価

細胞代謝活性:

アラマブルー試薬の呈色反応 を評価

骨芽細胞分化の評価:

- ・マーカー遺伝子発現量 (ALP, オステオカルシン, RUNX2 等) のリアルタイム PCR 定量
- ・アルカリホスファターゼ活性の定量
- ・石灰化結節形成の定量 (アリザリンレッド染色法)

(6) in vivo 系での再活性化による組織再生評価

各種処理条件の下、生体内でのインプラント再活性化後に骨補填剤填入術を行い、術後 1 か月、3 か月において、インプラント周囲骨形成および骨結合力に関し、下記の通り評価を行う。なお、炎症モデルのインプラント上部側 1/2 を人工的に露出した際、インプラント表面の再活性化処理を行わないグループも作成し、このグループも比較対象として利用する。

インプラント周囲骨形成の評価

インプラント-骨結合力の評価

(7) 口腔内でのインプラントリカバリーシステムの構築

アルカリ処理後、加熱処理を行うと、チタン酸ナトリウムとチタン水酸化物 (Ti-OH) に富む網目構造の剥離しにくい生体活性層が作られる。インプラント周囲炎によりインプラント表面が上皮細胞の侵入や炎症性物質に汚染され、さらには炎症により酸性環境下におかれたとしても、加熱処理が必要な網目構造まで破壊されるとは考えられず、アパタイト形成に重要なチタン酸ナトリウム層および Ti-OH 基を初期状態に回復するために、低温プラズマジェット照射を併用し、より効率的に低温 (40) アルカリ処理を行うことで、当初の生体活性を取り戻せると考える。

本研究では、SBF を利用した最適条件に関する予備的検討、再活性化処理に伴う殺菌・不良組織除去効果の評価、および in vitro 系、in vivo 系での炎症環境モデルを用いた再活性化による組織再生の評価を総合的に判断し、低温プラズマジェット照射を併用した低温アルカリ処理による再活性化処理条件の最適化を行う。最適化された再活性化条件に基づき、強力な殺菌、不良組織除去、金属表面の生体内再活処理、組織再生を 3 本柱とする口腔内における低侵襲リカバリーシステムの基盤構築を行うことを本研究全体の最終目標とする。

4. 研究成果

(1) アルカリ - 加熱処理条件の最適化

アルカリである NaOH 処理により、チタン酸ナトリウムの水和ゲルを作るが、このままでは、簡単にはがれてしまうため、その後、加熱処理を行うと、チタン酸ナトリウムとチタン水酸化物 (Ti-OH) に富む網目構造の剥離しにくい生体活性層が作られる。処理条件の最適化のため、擬似体液 (SBF; Stimulated Body Fluid) を利用して、口腔内での再活性化処理前提としたアルカリ - 加熱処理について、最適な条件を明らかにした。

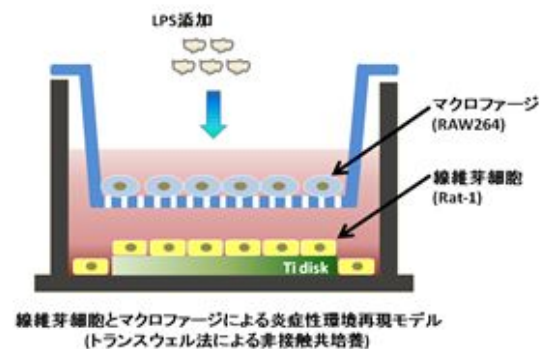
(2) 低温プラズマジェット照射装置の開発

口腔内において、インプラント周囲の殺菌およびインプラント表面の再活性化処理を行うことを目的とした大気圧低温 (40 程度) プラズマジェット照射装置を開発した。具体的には、直径 5mm のガラス管にヘリウムガスを供給し、1 対のリング状電極を 1-4 cm 程度の間隔で設置し、電圧 5-20 kV、周波数 10-20 kHz の低周波高電圧を印加することで、大気圧低温 (40 程度) プラズマを生成する装置とした。本装置では、ガス流量、印加電圧等を制御することで、プラズマをジェット状で噴射することが可能である。

(3) in vitro 系での炎症環境モデルにおける再活性化

in vitro 系での炎症環境モデルの製作

チタン円板上に上皮系細胞としてラット由来 Rat-1 線維芽細胞株を播種し、さらに RAW264 マクロファージ細胞株を非接触共培養することで、トランスウェル法による炎症環境モデルを完成した。



再活性化処理に伴う殺菌・不良組織除去効果の評価

チタン円板上にラット由来 Rat-1 線維芽細胞株を炎症環境下において培養した後、プラズマ照射および低温アルカリ処理によりチタン表面の再活性化を行った。再活性化条件の最適化にあたっては、(a) NaOH の濃度、(b) 処理時間について、滅菌・不良組織除去効果に関する最適条件を明らかにした。

(4) in vivo 系での炎症環境モデルにおける再活性化

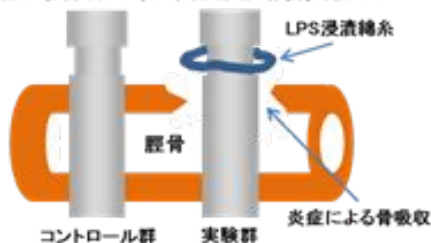
in vivo 系での炎症環境モデルの製作

研究代表者らが行ってきたチタンインプラントの即時荷重動物実験モデルを改良し、炎症環境モデルを作製した。具体的には、ラット脛骨に貫通型のインプラントを埋入し、片端に LPS 含有の綿糸を巻き付け放置した。

再活性化処理に伴う滅菌・不良組織除去効果の評価

in vivo 系での炎症環境モデルに埋入されたチタンインプラントに対し、低温プラズマ照射および低温アルカリ処理により再活性化を行った後に撤去、その後、in vitro 系での実験と同様に、a. 殺菌状態の評価、b. 付着細胞の観察、c. 残留タンパク質の定量を行い、再活性化処理に伴う滅菌・不良組織除去効果の評価を詳細に検討し、再活性化処理の最適条件を明らかにした。

炎症環境(インプラント周囲炎)動物実験モデル



(5) in vitro 系での再活性化による細胞活性評価

再活性化処理条件の最適化のために、各種再処理条件における骨形成能について、前骨芽細胞株 (MC3T3-E1) を使用し、細胞生物学的および分子生物学的手法により評価した。

細胞増殖:

細胞代謝活性:

骨芽細胞分化の評価:

(6) in vivo 系での再活性化による組織再生評価

各種処理条件の下、生体内でのインプラント再活性化後に骨補填剤填入術を行い、術後 1 か月において、インプラント周囲骨形成および骨結合力に関し評価を行った。

インプラント周囲骨形成の評価

インプラント-骨結合力の評価

(7) 口腔内でのインプラントリカバリーシステムの構築

SBF を利用した最適条件に関する予備的検討、再活性化処理に伴う滅菌・不良組織除去効果の評価、および in vitro 系、in vivo 系での炎症環境モデルを用いた再活性化による組織再生の評価を総合的に判断し、低温プラズマジェット照射を併用した低温アルカリ処理によるインプラント再活性化処理条件の最適化を行うことができた。

さらに、最適化された再活性化条件に基づき、強力な殺菌、不良組織除去、金属表面の生体内再活処理、組織再生を 3 本柱とする口腔内における低侵襲リカバリーシステムの基盤構築を行うことができた。

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 2 件)

Sasaki S, Kanzaki M, Hokari Y, Tominami K, Mokudai T, Kanetaka H, Kaneko T.

Roles of charged particles and reactive species on cell membrane permeabilization induced by atmospheric-pressure plasma irradiation

Jpn. J. Appl. Phys. (査読有), 2016. in press
Tominami K, Kanetaka H, Kudo T, Sasaki S, Kaneko T.

Apoptotic effects on cultured cells of atmospheric-pressure plasma produced using various gases.

Jpn. J. Appl. Phys. (査読有) 55(1S):
01AF03-1-01AF03-6, 2016.

DOI: 10.7567/JJAP.55.01AF03

[学会発表](計 1 件)

Tominami K, Kanetaka H, Kudo T, Sasaki S, Kaneko T.

Effects of low-temperature atmospheric-pressure plasma on cultivated cells.

7th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials / 8th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science, Mar.26-31, 2015, Nagoya, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金高 弘恭 (KANETAKA, Hiroyasu)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 5 0 2 9 2 2 2 2

(2) 研究分担者

佐々木 啓一 (SASAKI, Keiichi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 3 0 1 7 8 6 4 4

成島 尚之 (NARUSHIMA, Takayuki)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 2 0 1 9 8 3 9 4

金子 俊郎 (KANEKO, Toshiro)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号: 3 0 3 1 2 5 9 9

川下 将一 (KAWASHITA, Masakazu)
東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号： 70314234

工藤 忠明 (KUDO, Tada-aki)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号： 50431606

(3)連携研究者

なし