

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861855

研究課題名(和文)カルシウム修飾を用いた生体活性セラミックスの創製

研究課題名(英文)Effect of CaCl<sub>2</sub> hydrothermal treatment of ceramics

## 研究代表者

宮崎 真実(坂口真実)(Miyazaki, Mami)

九州大学・大学病院・研究員

研究者番号：80608977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント材料として使用されているジルコニアと口腔上皮との間に生体親和性があるかを解析することを目的とした。その結果、ジルコニア表面に材料の濡れ性を左右する水酸基が存在することが明らかになった。ヒト口腔上皮由来細胞を用いた培養実験の結果、細胞はジルコニア表面に接着し、増殖することが明らかになった。また細胞はジルコニア上で接着分子を発現し、明瞭な歯科細胞骨格を形成することが明らかになった。ジルコニア周囲の口腔軟組織には健康な生物学的幅径が形成されることが明らかになった。ジルコニアは濡れ性を有し、ヘミデズモソーム結合によって上皮細胞と接着し、良好な生物学的幅径を形成することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We explored the affinity reaction of zirconia as an implant abutment material and soft tissue.

We examined for quantitative estimation of hydroxyl, serum protein and proliferation of epithelial cells on the face of zirconia. In oral study in rats, the implants which abutment was composed of zirconia were placed. We examined the sealing of the epithelium around zirconia.

On the face of zirconia, there are some hydroxyl groups that showed affinity for zirconia. Oral epithelial cells adhered and promoted on the surface of zirconia. There formed healthy biologic width around zirconia abutment. In addition, laminin-5 which a component of hemi-desmosome, was expressed at the interface between epithelium and zirconia. In conclusion, on the surface of zirconia, this study demonstrated that it has an adsorptive property of serum protein and adhere to epithelium by bonding structure including hemi-desmosome junction, and formed the healthy biologic width.

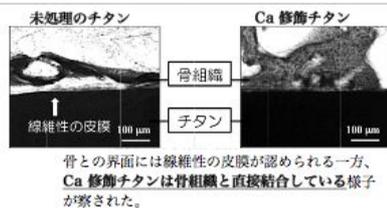
研究分野：歯科補綴

キーワード：セラミック 生体親和性 カルシウム修飾 口腔上皮

## 1. 研究開始当初の背景

ジルコニアやアルミナ等のセラミックスは審美性や機械的強度に優れるため、インプラント材料をはじめ歯科および医科領域において様々な応用が期待されている。しかし、生体不活性材料であるため（生体内に埋入されると線維性の皮膜で覆われ、骨組織や軟組織との直接的な接触が獲得できない）、インプラントの材料として用いると経時的にゆるみが生じ、再手術を余儀なくされる。

一方、現在インプラント体に主に用いられているチタンも骨組織と直接結合する性質（骨伝導性）は持たないため、これまでに国内外においてチタンに骨伝導性を付与する様々な表面改質法が試みられてきた。骨伝導性材料として最近臨床応用が認可されたアルカリ加熱処理チタンを生体内に埋入するとまずカルシウムイオン（ $Ca^{2+}$ ）が材料表面に結合するという報告から、予めチタン表面をCa修飾しておけば、より骨伝導性が高いチタンが創製できるのではないかと着想し、 $Ca^{2+}$ 水溶液中でチタン基板を水熱処理したところ、骨伝導性の高いチタンを創製できることを明らかにした。



この方法を応用し、ジルコニアの表面にCa修飾を行えば生体不活性材料であるジルコニアが骨伝導性になるのではと考えた。しかし、ジルコニアやアルミナは水熱処理の高温・高圧環境下では強度の低下や表面の荒れを起こすことが報告されており、マイルドな方法で材料表面にCaを修飾する新たな手法も考慮しなければならない。

また、近年の臨床的な問題点としては、チタンインプラントにおいて、歯肉貫通部における上皮封鎖は細菌などの外来因子の侵入を防ぐ上で重要と考えられており、インプラント歯肉間の封鎖性を高める有効な手段が模索されている。チタンでは表面性状を改変することで骨との接触率を上げているが、軟組織との封鎖性を高めるための研究も報告されている。本研究では、チタンに骨伝導性を付与することができたCa修飾によって、上皮封鎖性が得られるか、そして軟組織に対する親和性はどうなるのかの検討を行う必要があった。またジルコニアのようなセラミック材料自体が、上皮封鎖性および軟組織に対する親和性を持ちうるか、骨伝導性の付与は可能かなど、まだ基礎的に解明されていないことが多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、審美的、機械的強度を持ち合わせたセラミックスのインプラントへの応用を目指し、その前段階の基礎的な実験として、材料の骨伝導性（線維性結合組織の介在なしに骨組織と材料とが直接結合する性質）および軟組織への親和性（上皮封鎖性、軟組織を構成する細胞の濡れ性）を検討し、骨伝導性材料として最近臨床応用が認可されたアルカリ加熱処理チタンを生体内に埋入するとまずカルシウムイオン（ $Ca^{2+}$ ）が材料表面に結合するという報告の応用であるカルシウム-水熱処理を行うことで、チタンおよびセラミックスに骨伝導性や軟組織親和性を付与することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) カルシウム-水熱処理チタンに対する上皮封鎖性、軟組織親和性について

塩化カルシウム水溶液中で純チタンに水熱処理(200℃ 24時間)を施し、カルシウム修飾チタン(Ca-HT)を作製した。対照群は未処理(Cont)、あるいは蒸留水を用いて水熱処理(DW-HT)したチタンとした。

動物実験にて6週齢の雄性Wistarラット上顎骨に実験用インプラント(直径2mm;長さ4.5mm)を抜歯後即時に埋入し、その1週、4週および16週後に観察を行い、

上皮細胞接着の指標となるラミニン332(Ln)の発現からPIEの接着構造について免疫組織学的に解析した。

インプラント体と周囲組織との界面に、外来因子を模したトレーサーとして西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP: horseradish peroxidase)を滴下し、その浸透の程度から上皮封鎖性を定量的に評価した。さらにこれらのインプラントの生存率を経時的に評価した。

培養実験では、生後4日齢のWistarラットより採取したOECsをチタン上で1週間培養し、細胞の接着能・移動能・増殖能をそれぞれadhesion assay, scratch assay, BrdU assayを行い評価した。加えて接着関連タンパク(Ln, plectin, integrin 4, integrin 3, E-cadherin)の発現と細胞骨格(actin-filament: Ac-F)の発達を免疫蛍光染色法により形態学的に観察した。

### (2) ジルコニアに対する上皮付着性、軟組織親和性について

試料として直径5mm、厚さ1.5mmのジルコニアプレートをを用いた。表面荒さ $Ra=0.15\sim 0.20\mu m$ の間に調整した。塩化アンモニウムと塩化亜鉛を2:1の割合で混合した腭液中にジルコニア試料を300秒間浸漬し、蒸留水にて洗浄後乾燥、硝酸中に600秒浸漬させ、プラズマ原子放出検出装置にて硝酸中の亜

鉛濃度を計測することにより、間接的にジルコニア表面水酸基の定量を行った。また、試料をウシ胎児血清(FBS)に浸漬し、24 時間後に試料を洗浄して非吸着タンパクを除去し、エックス線光電子スペクトルメーターにて材料表面の窒素量を計測し、吸着タンパク量とした。ジルコニア試料を 48 穴ディッシュ底面に置き、上からヒト歯肉由来上皮細胞様細胞 Sa3 を含む培養液を滴下した。12 時間培養後 WST 法にて接着細胞数を計測した。

直径 2.3mm、長さ 4mm のラット口腔内埋入用インプラントを製作した。このインプラントは、粘膜貫通部に長さ 2mm の円筒状ジルコニアをチタン製スクリューに圧入することで製作した(図)。4 週齢雌性ラットを用い口腔内へのインプラント体を埋入した。4 週の治癒期間後に固定し、上顎骨を取り出し、インプラントを除去して前頭断連続凍結切片を作製した。組織標本は免疫染色および 3,3'-Diaminobenzidine(DAB)染色を用いてラミニン-5 の局在を可視化した。

(図)ジルコニアインプラント(粘膜貫通部にジルコニアの圧入)



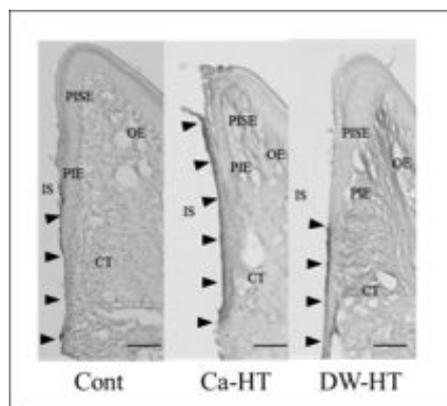
#### 4. 研究成果

##### (1) カルシウム-水熱処理チタンに対する上皮封鎖性、軟組織親和性について

PIE の接着構造：Ca-HT 群においてのみ埋入 1 週間後より Ln 陽性の新生上皮がインプラント表面に沿って観察された。また 4 週後の対照群において Ln 陽性反応が根尖側 2/3 に限局していたのに対し、Ca-HT 群ではチタン上皮界面全体に認められた。16 週間においても Ca-HT 群では Ln の発現が認められたのに対し、対照群では Ln の発現をほとんど認めず上皮の深部増殖が観察された。

HRP 滴下実験：インプラントと PIE の界面に沿った歯肉溝からインプラント先端へと向かう HRP の侵入は、Ca-HT 群では対照群より明らかに抑制された。

培養実験：Ca-HT 群では細胞の接着能が対照群より明らかに向上していた。細胞の移動量は対照群より小さく、増殖能は高かった。さらに接着関連タンパクの発現と細胞骨格の発達を観察され、カルシウム修飾が接着能の向上に寄与したことが示唆された。これらの結果より塩化カルシウム水溶液を用いたチタンの水熱処理は、上皮細胞のチタン表面との接着性を高めることで上皮封鎖性を長期的に向上させることが示唆された。

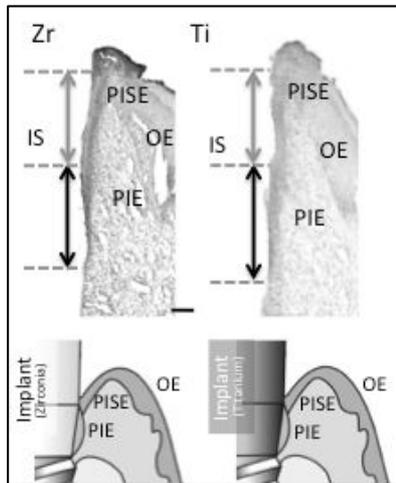


埋入 4 週間後の PIE における Ln の発現

##### (2) ジルコニアに対する上皮付着性、軟組織親和性について

水酸基の定量を行った結果、ジルコニア表面に  $1.45 \times 10^{21}/\text{mm}^2$  の水酸基が存在した。FBS 浸漬群では対照群より優位な窒素原子付着を認めた。このことより、ジルコニア表面にタンパクが吸着することや、この吸着は強固なものであることが明らかになった。培養実験にて、培養開始 12 時間後、72 時間後ともジルコニア上にヒト口腔上皮様細胞が正着し、経時的に増加した。また免疫染色の結果、ジルコニア上のヒト口腔上皮由来細胞がインテグリン 4 を産生していることが明らかになった。すなわち、ジルコニア上における細胞接着分子の発現を可視化することができた。

動物実験において、ジルコニアを粘膜貫通部にもつインプラントは口腔内で動揺なく、肉眼的に炎症所見も認められなかった。また、ジルコニアと粘膜は緊密に接触していた。組織学的所見として、ジルコニアに接触していた部分の粘膜に炎症性の細胞は認めず、炎症状態を示す細胞間隙の拡張も認められなかった。またインプラントと軟組織の界面については過去の報告にあるチタンとの界面に類似し形態を示していた。すなわちジルコニアとの界面において健全な生物学的幅径が形成されることが明らかとなった。免疫組織学的所見として、上皮とジルコニアの界面にラミニン-5 の存在を示す強い DAB 反応を認めた。すなわち、インプラント周囲上皮とジルコニアは単に接触しているだけでなく、接着構造物を介して接着していることが明らかになった。



ジルコニアインプラントとチタンインプラントの上皮付着性

結論：塩化カルシウム水溶液を用いたチタンの水熱処理は、上皮細胞のチタン表面との接着性を高めることで上皮封鎖性を長期的に向上させることが示唆された。また、ジルコニア自体は濡れ性やタンパク吸着性を有し、ヘミデスマゾーム結合をはじめとする接着物構造物によって上皮細胞と接着し、良好な生物学的幅径を形成することが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 2件)

Wakana Oshiro, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, Akihiro Furuhashi, Jyunichi Yamazoe, Ryosuke Kondo, Mami Sakaguchi, Yuri Matsuura, Yoshihiro Tsukiyama, Kiyoshi Koyano. Effects of  $\text{CaCl}_2$  hydrothermal treatment of titanium implant surfaces on early epithelial sealing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.*, 査読あり、131巻、2015、141-147  
DOI:10.1016/j.colsurfb.2015.04.025  
古橋明大、鮎川保則、熱田 生、坂口真実、山根晃一、Yunia Dwi Rakhmatia、大川内秀幸、古谷野 潔、インプラントアバットメント材料としてのジルコニアに対する上皮性付着および生物学的幅径の形成、第1回クインテッセンス論文奨励賞、査読あり、2011、184-190

##### 〔学会発表〕(計 1件)

大城和可奈、鮎川保則、熱田生、古橋明大、近藤綾介、坂口真実、古谷野潔、チタンのカルシウム水熱処理による上皮封鎖性の向上、日本補綴歯科学会 123 回学術大会、2014

##### 〔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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

坂口 真実 (SAKAGUCHI Mami)  
九州大学病院・研究員  
研究者番号：80608977

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：