

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462926

研究課題名(和文) 表面改質によるプラークフリーインプラントアバットメントの開発

研究課題名(英文) Improvement of implant abutment surface for anti-praque

研究代表者

木原 優文 (Masafumi, Kihara)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40419536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎の原因として、過度の咬合力、歯肉貫通部となるアバットメントの材料、プラークの付着による細菌感染、喫煙、マイクロギャップ等、様々な要因が挙げられるが、その中でもプラーク付着による細菌感染は天然歯と同様、インプラント周囲炎を起こす主要な原因であると考えられる。そこでインプラント体と上部構造を連結するアバットメントの表面性状を改良することで細菌の付着を減少させ、長期的に安定しやすい状態を維持させることが重要である。そのため、本研究と同様にインプラント周囲の骨結合および上皮封鎖の獲得、維持、安定を目指した研究が数多くなされるようになった。

研究成果の概要(英文)：Porous structured poly-L-lactic acid (PLLA) and hydroxyapatite (HA) nanoparticle composite, which was fabricated using solid-liquid phase separation and freeze-drying methods, was grafted into bone defects created in rat calvarium or tibia. Rats were killed 4 weeks after surgery, and histological analyses were performed to evaluate new bone formation. Scanning electron microscopic observation showed the interconnecting pores within the material and the pore diameter was approximately 100 to 300  $\mu\text{m}$ . HA nanoparticles were observed to be embedded into the PLLA beams. In the calvarial implantation model, abundant blood vessels and fibroblastic cells were observed penetrating into pores, and in the tibia model, newly formed bone was present around and within the composite. The PLLA-HA nanoparticle composite bone substitute developed in this study showed biocompatibility, elasticity, and operability and thus has potential as a novel bone substitute.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント プラーク 水熱処理

## 1. 研究開始当初の背景

現在インプラント治療は歯科の欠損補綴において必要不可欠な治療法となっている。ところが近年では、インプラント治療は機能の回復だけでなく、審美性の回復が望まれるようになってきている。1998年インプラント治療の先駆的会議である ITI Consensus Conference トロント大会以来、成功基準として「審美的な上部構造の機能的支持」と明記されるようになった。また Osseointegration study club of Japan 等でも 2006 年の議題に上がっており、日本においても審美面を重要視したインプラント治療がなされている。加えて、この審美面と機能性を兼ね備えた治療は、出来るだけ長い期間維持されることが患者と術者の双方から強く望まれるようになってきている。

現在インプラント治療は高い成功率を示し、欠損補綴治療の主要な一選択肢となっている。その一方、インプラント周囲歯肉炎およびインプラント周囲炎の罹患率は近年増加してきており、重度の周囲炎ではインプラント体の撤去も余儀なくされる場合が多くなってきている。

インプラント周囲炎の原因として、過度の咬合力、歯肉貫通部となるアバットメントの材料、プラークの付着による細菌感染、喫煙、マイクロギャップ等、様々な要因が挙げられるが、その中でもプラーク付着による細菌感染は天然歯と同様、インプラント周囲炎を起こす主要な原因であると考えられる。そこでインプラント体と上部構造を連結するアバットメントの表面性状を改良することで細菌の付着を減少させ、長期的に安定しやすい状態を維持させることが重要である。

そのため、本研究と同様にインプラント周囲の骨結合および上皮封鎖の獲得、維持、安定を目指した研究が数多くなされるようになった。

## 2. 研究の目的

上記の通り、治療後のインプラントの安定は近年インプラント研究の中心となっている。歯科インプラント治療は基礎的データが欠落したまま、臨床現場で進歩を遂げた特殊な医療技術である。その有効性は患者需要の著しい伸びからも容易にうかがえる(後述図参照)。そのため、永久歯を失った際の歯科医療の選択肢としては必要不可欠なものである。研究は日々続けられその成功率も上昇、術後1年でも95%の症例で人工物であるインプラントが口腔内で歯と同様の働きをしているとされる。しかし、残りの5%や5~10年と長期経過症例ではインプラントの生存率は著しく減少し、脱落の理由に関しては解明されぬまま経験的に様々な憶測がされるのみである。

そこで我々は総合大学としての利点を生かし、インプラント専門の臨床チームの強力により原因を追及。それにより、独自の原因に行き当たった。これは独創的な発想であるが、基礎研究に十分裏打ちされた限りなく事実に近い概念と思われる。そこで我々はその歯科インプラント治療の失敗原因として浮上した新たな要因を解決させる治療薬として、近年臨床現場の表舞台に現れてきた間葉系幹細胞(MSC)に着目した。

この幹細胞もインプラント同様、臨床応用が基礎研究による裏打ちを飛び越えて始まっている医療であるが、その有効性は画期的

であり多方面から研究されている。しかし基礎研究と臨床研究では間葉系幹細胞の主たる働きに関して

視点が異なる。これは実に興味深い減少であるが、我々はそれを橋渡しするとともに知識の共有をはかり、また別の角度から臨床応用につなぐことを考えている。

現在すでいくつかの研究施設が MSC を用いた再生研究を行っている。事実臨床的にその成果を上げているが、今後国としてその技術を世界に発信するには、分業的に知識や技術の多施設への分散が必要と思われる。

そのため今回のような機会において、我々の研究を進め、さらに臨床応用することで、今後の国の医療技術の進歩に貢献していきたい。

現在インプラント治療は高い成功率を示しているが、インプラント周囲炎に罹患するリスクも増加しており、その主な要因としてプラーク付着による周囲歯肉の炎症があげられる。長期的に口腔内でインプラントを維持させるためにはプラークの付着しにくい表面性状を有するアバットメントを装着し、できるだけ粘膜貫通部周囲をメンテナンスしやすい状態にすることが重要であると考えられる。本研究ではインプラントアバットメント部で主に用いられる純チタンに水熱処理を施し細菌が付着しにくい超親水性の表面性状に変化させ、表面へのプラークの付着度合について解析するとともに、経時的な表面性状の変化を解析し、水熱処理による表面改質がプラーク付着の長期的な予防に有効であるか検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

水熱処理表面に対する細菌付着性、表面性状持続性を評価するため、以下の項目を段階的に解析していく。

：水熱処理に対する材料の物性試験(ぬれ性試験、表面解析、表面性状持続性)等の解析

：in vitro における細菌の初期付着性、および表面性状持続性の評価

：in vivo におけるチタン表面に対する細菌接着性および表面性状持続性の評価

：ヒトを用いたヒーリングアバットメントへの細菌付着性および表面性状持続性の短期評価

：ヒトを用いた BAB 歯肉縁上アバットメントに対する細菌付着性の評価および表面性状持続性  
以上である。

チタン製の歯科インプラント周囲において間葉系幹細胞の存在がどれほど有効であるかを明らかにするため、動物および培養実験を各 1 年ずつに分けておこなった。

研究目的を達成するための具体的な方法

【解析 : 水熱処理に対する材料の物性試験】

チタンプレートに水熱処理を行い、ぬれ性(水滴の接触角計測)、表面解析(X 線光電子分析法、SEM を用いた表面観察等)、および人工唾液中など数種類の各測定条件における表面性状の変化について未処理のものと比較し経時的に評価する。

【解析 : in vitro における細菌の初期付着性および表面性状持続性の評価】

水熱処理または未処理のチタンプレートにプラークとして表面に初期付着する S.mutans, S.sanguinis 等や P.gingivalis 等歯周病原菌の播種を行いチタンプレートに対する細菌の初期接着数、接着耐久度を測定し水熱処理による表面性状の変化が細菌の接着に影響を与えるか、また表面性

状が維持されているかを比較し解析 で行った測定と同様の方法で評価する。

【解析 :in vivo における細菌の初期付着性および表面性状持続性の評価】

ラット口腔内の臼歯を抜歯後、水熱処理したチタン製インプラントを埋入し 2 週間待機後、2 週、4 週、8 週後のプラークの付着程度および表面性状持続性の解析を解析と同様の方法で評価する。またインプラント周囲歯肉の組織学的評価および形態計測学的評価を行い上皮細胞の侵入度を天然歯と比較し、歯肉上縁のみ処理した場合の上皮付着への影響度を歯肉上皮の侵入度で評価する。

【解析 :ヒトを用いたヒーリングアバットメント細菌付着性および表面性状持続性の短期評価】

2 次手術後の患者さんに対しヒーリングアバットメントが 2mm 縁上にくるようヒーリングアバットメントの長さを選択し、歯肉縁上部位を部分的に水熱処理したものを準備しておく。プロビジョナルのための印象採得時にヒーリングアバットメントを交換し、2 週間後に回収し表面付着細菌の評価および表面性状、歯肉溝滲出液のタンパク質解析を行い、未処理のものと比較して評価を行う。

【解析 :ヒトを用いた BAB 歯肉縁上アバットメントに対する細菌付着性の評価および表面性状

持続性の中期的評価】

プロビジョナルとして用いた BAB を回収し細菌付着性の評価および表面性状の解析、歯肉溝滲出液中に含まれるタンパク質の解析を行い、未処理のものと比較して評価を行う。

【動物実験】

全身投与される MSC は 4 週齢の雄性 Wistar ラット骨髄から採取された。また 6 週齢実験モデルは、上顎右側第一臼歯を抜歯後、即時に純チタン製インプラン

ト(図 1)を埋入され、その 24 時間後に MSC が尾静脈より全身投与された。そして埋入 4 週後に軟組織の免疫組織化学的に観察した。さらにその封鎖性は西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP; 分子量約 41,000) をインプラント周囲溝に 30 分間持続投与し、その浸透深さを組織上で観察することで評価した。また図 4 で示す実験では GFP 遺伝子導入ラットを用いた。

【培養実験】

出生 4 日齢の Wistar ラット口腔粘膜より採取した上皮組織から上皮細胞 (OECs) を単離した。その後 3 日間だけ単独で培養し、同数の MSC など各種指定条件で共培養した。そして OECs が MSC から受ける影響についてアポトーシス (Apoptosis marker/ FACs)、細胞増殖能 (Brd-U assay)、接着能 (Adhesion assay) などで評価した。

なお、この際使用した MSC も正しく単離できたか分化能や増殖能などの STEMNESS を十分に評価した上で実験群に投与した。

#### 4 . 研究成果

実験に関連して以下の点に留意した。

動物研究に関しては、機器は現有、あるいは歯学研究院共同利用実験室(無償使用可)で利用、動物飼育に関しては、小動物は歯学研究院動物者を無償使用、臨床研究に関しては、当病院のインプラント治療専門施設(再生歯科・インプラントセンター)を利用、各分析も歯学研究院共同利用実験室を利用(無償)、本研究に関わる当教室在籍の研究者間では、情報交換・共有を定期的に行っており、測定手順に対して習熟している。また、連絡が別に必要な場合は、相互が側材に連絡を取りあえる状況にある。

また、研究着手にあたり、現在当大学動物実験倫理委員会および当大学病院臨

床研究倫理委員会に研究承認を受けた。

#### 【動物実験】

埋入 4 週後のモデルで、インプラント-周囲上皮界面における接着の指標としてラミニン-332 の局在を観察した。背景でも記した通りインプラント周囲上皮の接着構造は根尖側 2/3 に限局していたが、MSC 投与によりインプラント体界面全体に観察された。また上皮封鎖能を直接評価する HRP の浸漬実験でも、MSC 投与群における HRP の侵入障害能が上昇していた。

MSC 全身投与によるインプラント周囲上皮の封鎖性改善は、投与された GFP 陽性 MSC がインプラント周囲上皮と結合組織界面付近に集積することで説明出来る。ただしこの集積も1週間を過ぎると観察されない。

インプラントと周囲上皮界面におけるラミニン-332 の発現量増加や HRP の侵入抑制を示した実験結果は、インプラント周囲での封鎖性を局所的に上昇させたことを示す。この機序として MSC の集積がある。実際、腫瘍や創傷部位へのサイトカインなどの分泌による治癒促進効果が報告されている。本研究でもインプラント埋入という行為が炎症を惹起させ、MSC の集積を促したのかもしれない。ただしその集積が1週間と比較的短期間であるにも関わらず、埋入 4 週間後でも上皮封鎖性を高く維持していた。MSC が消失しても尚なぜ効果は持続したのだろうか。その疑問に答えるべく培養実験を以下の様に行った。

#### 【培養実験】

OECs の単独培養 (Cont), MSC との共培養

(Co-cul)、さらに共培養時に Trans-well<sup>®</sup> を使用し、MSC との細胞接触を遮断して共培養(Trans-well)の3群を作製した。Cont 群と比較して Trans-well 群では OECs の生存性が上昇した。また増殖性および接着性でも有意な増加が認められた。

投与 MSC が宿主側の MSC の性質を変えた事である。病的な状況下にある MSC は病態を悪化させる病的性質を有する事も知られており、本研究のように全身的な MSC 投与はインプラント体周囲の病的な MSC に対し炎症抑制や治癒促進を促す一方、上皮細胞には MSC が発現するサイトカインの効果で接着性向上などの直接的影響を及ぼしているのかもしれない。

付着上皮細胞の単離をするとともに in vitro 的にインプラント体周囲での付着上皮構造再生とその接着力向上を評価する。すなわちチタンプレート上に単離した付着上皮の細胞を播種、先に挙げた増殖因子 IGF-1、EGF そして PI3K-activator を添加し、接着性の変化を定量的、形態的、生化学的に評価する。そしてインプラント上皮封鎖に適切な増殖因子とその濃度を特定した。

さらに自家採取の付着上皮細胞を、植立したプラットホームスイッチング・インプラント周囲に填入、さらに IGF-1、EGF そして PI3K-activator 等の増殖因子を添加して周囲上皮の形成を経時的に評価した。

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考え。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)

Atsuta I, Ayukawa Y, Kondo R, Oshiro W, Matsuura Y, Furuhashi A, Tsukiyama Y, Koyano K. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. J Prosthodont Res. 2016 Jan;60(1):3-11.

〔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：  
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

木原 優文 (KIHARA, Masafumi)  
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・義歯補綴学分野・助教  
研究者番号：40419536

##### (2)研究分担者

熱田 生 (ATSUTA, Ikiru)  
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・義歯補綴学分野・助教  
研究者番号：30423487

鮎川 保則 (AYUKAWA, Yasunori)  
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・義歯補綴学分野・講師  
研究者番号：50304697

古谷野 潔 (KOYANO, Kiyoshi)  
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・義歯補綴学分野・教授  
研究者番号：50195872

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )