

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2014～2016  
 課題番号：26462978  
 研究課題名(和文) アルカリ熱処理チタン表面の歯肉線維芽細胞機能と結合組織性付着獲得に対する効果  
  
 研究課題名(英文) Effects of alkali-heated titanium surface on function of gingival fibroblasts and achievement of connective tissue attachment  
  
 研究代表者  
 山田 将博 (Yamada, Masahiro)  
  
 東北大学・歯学研究科・講師  
  
 研究者番号：90549982  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： 歯列・顎顔面欠損の再建治療に効果的なチタンインプラントの欠点の一つは、歯肉や皮膚の結合組織層と付着しないことにある。本研究の目的は、アルカリ熱処理を用いてチタン表面にナノ形態を付与することにより、結合組織と付着するチタンインプラントを開発することにある。

特定条件でアルカリ熱処理を施したチタン表面は無数のナノ孔と密な突起を特徴とするナノ形態を示した。本ナノチタン表面は、ラット歯肉線維芽細胞やヒト真皮線維芽細胞のコラーゲン産生能や細胞外基質の付着力を増大させた。ウサギ上顎骨モデルで、ナノチタン表面インプラントは、歯肉線維端を表面内に封入し、歯周組織様の結合組織性付着を獲得することが示された。

研究成果の概要(英文)： One disadvantage of titanium implants effective for reconstruction of dental / maxillofacial defects is that they do not adhere to the connective tissue layer of the gingival tissue and skin. The purpose of this study is to develop titanium implants adhering to connective tissue by forming nano-topography on titanium surface using alkali-heat treatment.

Titanium surface subjected to alkali-heat treatment under specified conditions exhibited nano-topography characterized by numerous nano-pores and dense nano-spikes. The nano-titanium surface increased the amount of collagen production from rat gingival and human dermal fibroblasts and the adhesion strength of extracellular matrix. In the rabbit maxilla model, it was demonstrated that the nano-titanium surface implant encapsulated the end of gingival fiber within the surface and acquired periodontal-like connective tissue attachment.

研究分野： 歯科補綴学

キーワード： 線維芽細胞 歯肉 ナノテクノロジー チタン 表面改質 結合組織 生体模倣

1. 研究開始当初の背景

(1) インプラントの粘膜貫通部の封鎖性はインプラントの長期予知性に影響する。天然歯のセメント質にみられるシャープ線維のように、内部へコラーゲン線維が入り込む結合組織性付着を獲得できるチタン表面は未だない。

(2) アルカリ熱処理 (Alkali-heat treatment : 以下、AH)により、細菌よりも小さくコラーゲン線維よりも大きな三次元網目構造と付着細胞の機能を制御し得る突起を併せ持つナノ構造体をチタン表面上に形成することができる。

(3) AHチタン表面は、骨芽細胞分化を促進することで骨結合を向上させるが、歯肉結合組織を産生する歯肉線維芽細胞の機能や結合組織性付着に与える影響は明らかでない。

2. 研究の目的

AHチタン表面が歯肉および皮膚線維芽細胞の接着性と機能に与える影響を培養試験的に検証し、結合組織性付着を獲得するかどうかを動物実験的に検証することである。

3. 研究の方法

(1) 機械研磨面グレード II 純チタンディスクおよびミニインプラントを用いた。チタン試料に熱濃硫酸処理を施したものを酸処理面として、異なる条件で AH を施した表面をそれぞれ AH 表面①および②とし、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、エネルギー分散型 X 線分析およびナノインデンテーション解析を行った。

(2) 細胞培養試験により、AH 表面が線維芽細胞機能 (細胞接着能、増殖能およびコラーゲン産生能) に与える影響を検証した。

ラット硬口蓋歯肉由来初代継代線維芽細胞もしくはヒト皮膚線維芽細胞を試料上で一定期間培養後、細胞接着、細胞増殖および細胞外基質産生を評価した。また、細胞外基質が産生された AH 表面の縦断切片を SEM 観察し、基細胞外基質の表面内部への侵入を判定した。さらに、コラゲナーゼもしくは過酸化水素水を添加したリン酸緩衝液へ培養ディスクを曝露させ、その後のコラーゲン残存率を算出し、炎症環境下での各表面の結合組織付着強度を評価した。

(3) AH 処理および機械研磨面のチタンミニインプラントを 16 週齢ウサギ切歯口蓋辺縁部に埋入し (図 1)、8 週間の治癒期間後、インプラント表面の SEM 観察を行い、インプラ

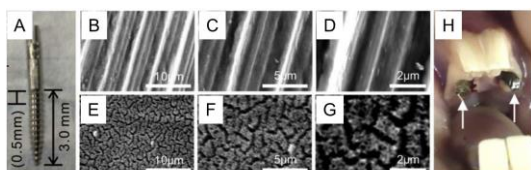


図1 チタンミニインプラント (A) の機械研磨面 (E-D) と AH 表面 (E-G) の SEM 像とウサギ切歯口蓋部歯肉に埋入した2種のミニインプラント (H)

ント表面に対する歯肉結合組織の付着性を評価した。また、組織切片の光学顕微鏡観察

を行い、インプラント周囲組織のコラーゲン線維の走行を検証した。

4. 研究成果

(1) AH 表面①および②の両方において、2000 倍でチタン機械研磨面に認められる機械切削痕を確認したが、5000 倍では、無数のナノサイズの孔と突起で構成された特徴的なナノ三次元構造をそれぞれ認めた (図 2)。典型的なマイクロ粗面である酸処理面よりも、より小さく密度の高いナノサイズの突起が AH 表面に形成された。また、AH 表面の孔は数十 nm 程度であった。AH 表面②では AH 表面①に比べて、よりナノ突起が密集しており、孔の数はより少なく、また、孔の配置はよりランダムに配置されていた。縦断切片の SEM 観察により、AH 表面では、一方向に配向した線状の網目状構造がチタン基盤上に形成されていることが確認された (図 3)。網目状構造の厚みは、AH 表面①で約 600~800nm 程度、AH 表面②で約 1 μm であった。AH 表面②の孔はチタン基盤直上まで貫通していた。また、エネルギー分散型 X 線分析 (EDX) から、AH 表面①と②の構成元素に違いは無かった。

以上から、AH の条件を変えることにより、表層の構成成分に変化はないが、多孔性やナノ突起の密度など、AH 表面の厚みや三次元的構造変化を引き起こすことがわかった。

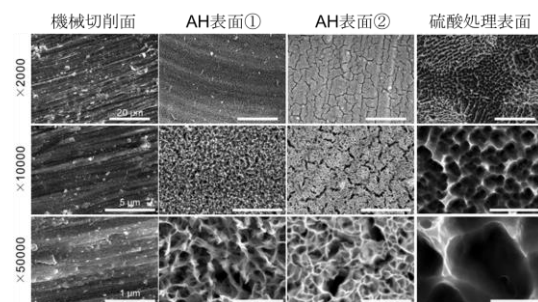


図2 チタン機械切削面とそれにAH①、②または硫酸処理したチタン表面のSEM

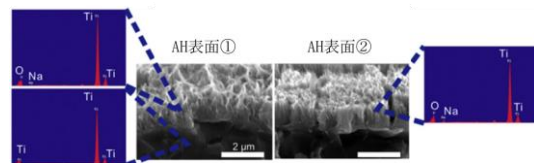


図3 細胞培養前のAH表面①および②チタンの縦断切片のSEM像 (20000倍)

(2) ナノインデンテーション解析を行った

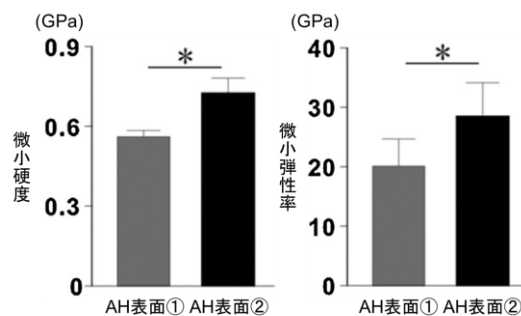


図4 AH表面の微小硬度と微小弾性率の比較 (\*: 統計学的有意差有、Student's t-test)

結果、AH 表面②は AH 表面①よりも微小硬度

および微小弾性率ともが高かった (図4)。

以上のことから、AH表面②の方がAH表面①に比べて、機械的強度が高いことが示唆された。

(3) 培養1日後の機械研磨面上のラット歯肉線維芽細胞は、同一方向に伸展した紡錘形を示し、糸状仮足および葉状仮足の形成が活発であったが、アクチン線維の集積を認めなかった (図5)。一方、酸処理面またはAH表面①上では、それぞれ小さい円形から多角形または三角形から多角形の細胞形態を示したが、著明な細胞突起の形成を認めなかった。AH表面①上の細胞は酸処理面上よりも小さいが、細胞内に、より発達したアクチン線維網の形成とより密なアクチン線維の集積 (図5 arrowhead) を示した。小さい三角形から多角形の細胞形態を示した。AH表面②上の細胞は酸処理面またはAH表面①上の細胞よりも大きく、多数の細胞突起の形成を伴う円形から三角形、多角形といった多様な形態を示した。AH表面②上の細胞は、細胞内アクチン線維網を発達させ、細胞突起先端と細胞内にアクチン線維を集積させていた。

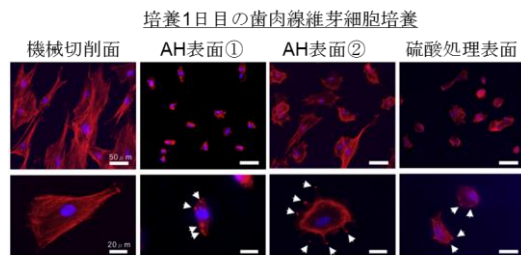


図5 各表面上で培養1日目の歯肉線維芽細胞のFアクチン染色 (赤) と核染色 (青) 後の蛍光顕微鏡写真

培養1日目のヒト歯肉線維芽細胞は、歯肉線維芽細胞の各試料上での特徴と類似した細胞形態を示した。AH表面①ではアクチン線維の細胞内集積を認めた (図6、arrowhead) が、AH表面②上では、細胞内部および周辺部のアクチン線維の集積 (図6、arrowhead) とともに様々な方向に細胞突起を伸展させていた。

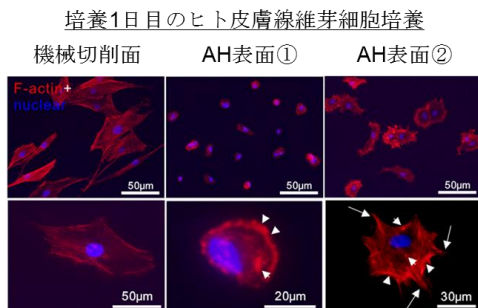


図6 各表面上で培養1日目のヒト皮膚線維芽細胞のFアクチン染色 (赤) と核染色 (青) 後の蛍光顕微鏡写真

以上から、ラット歯肉線維芽細胞およびヒト皮膚線維芽細胞とも、各表面形態に応じた異なる細胞形態を示すため、メカノトランスダクション機構により細胞機能が表面の種類により異なる可能性を示唆した。また、機

械研磨面上ではよく伸展するが接着斑形成に乏しいことから、細胞遊走は活発だが細胞接着性に乏しいこと、AH表面①では接着斑形成は活発であるが、細胞突起形成に乏しいことから、細胞接着性は強いが遊走性に乏しいこと、一方、AH表面②では、細胞の伸展性、細胞突起の形成程度、接着斑形成はいずれも活発であることが示唆された。

(4) ラット歯肉線維芽細胞培養において、AH表面上の付着細胞数は、培養1日目で酸処理面上と類似し、機械研磨面の半分であったが、培養7日目では機械研磨面上とほぼ同程度となった (図7)。ヒト線維芽細胞でも類似し、AH表面上の付着細胞数は、培養1日目で機械研磨面の半分以下であったが、培養7日目で約80%の値まで増加した。どちらの細胞においても一貫して、AH表面①よりも②上で付着細胞数は多かった。

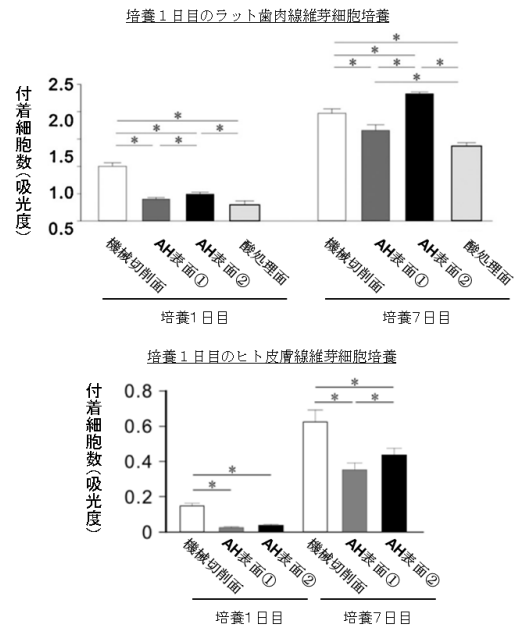


図7 培養1および7日目の各表面上での付着細胞数 (WST-1解析) (\*: 統計学的有意差有、Bonferroni multiple comparison)

培養4日目の歯肉線維芽細胞の細胞増殖活性は酸処理面上で最も低かった (図8)。一方、AH表面上の細胞増殖活性は機械研磨面と差が無かった。ヒト皮膚線維芽細胞においても同様に、機械研磨面とAH表面との間には差は無かった。

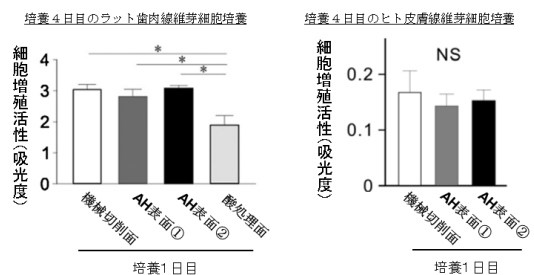


図8 培養4日目の各表面上での細胞増殖活性 (BrdU解析) (\*: 統計学的有意差有、Bonferroni multiple comparison)

以上のことから、ナノ形態をもつAH表面



上では、酸処理面のようなマイクロ粗面上で見られる線維芽細胞の増殖活性低下を認めず、細胞増殖は平滑面と同等であることが示された。

(5) ラット歯肉線維芽細胞の *COL3A1* 遺伝子発現は培養 7 日目の AH 表面②と酸処理面で最も高かった (図 9)。また、*COL1A1* の遺伝子発現は培養 14 日目の AH 表面②上で著明に高かった。また、培養 21 日目のシリウス赤染色から、コラーゲン沈着量は機械研磨面よりも AH 表面と酸処理面でより高いことがわかった。以上のことから、特に、AH 表面②において、歯肉線維芽細胞のコラーゲン産生能が亢進することが示された。

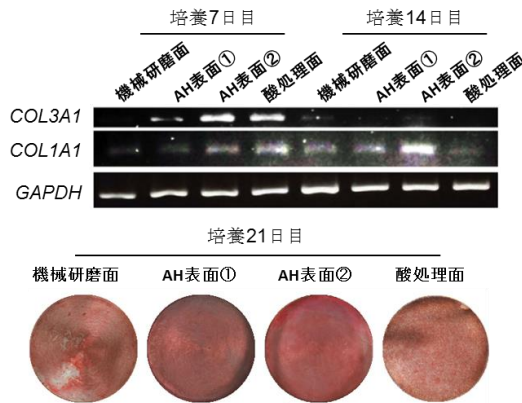


図9 各表面上での歯肉線維芽細胞における培養7および14日目のコラーゲンをターゲットとした遺伝子発現解析結果(上)と培養21日目のシリウス赤によるコラーゲン染色結果(下)

培養 7 日目におけるヒト皮膚線維芽細胞の真皮構成要素の遺伝子発現は、*COL1A1*、*COL3A1*、*FN1* および *ELN* いずれにおいても、機械研磨面に比べて、AH 表面で高かった。特に主成分であるコラーゲン関連遺伝子の発現は AH 表面②で最も活発であった。培養 28 日目のシリウス赤染色から、コラーゲン沈着量は機械研磨面よりも AH 表面、特に AH 表面②で高かった。

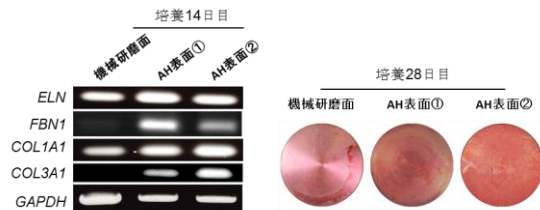


図10 各表面上でのヒト皮膚線維芽細胞における培養7日目の真皮構成要素をターゲットとした遺伝子発現解析結果(上)と培養28日目のシリウス赤によるコラーゲン染色結果(下)

以上から、AH 表面上では平滑面に比べて、線維芽細胞の細胞外基質産生能は亢進することが示された。

(6) ラット歯肉線維芽細胞 21 日目の SEM 観察で、機械研磨面や酸処理面は細胞外基質が表面に堆積しているのみであるが、AH 表面ではナノ突起へ細胞外基質が絡み付くとともにナノ孔内へ細胞外基質の一部が侵入していた (図 11、黄色矢印)。AH 表面上に付着した細胞外基質と表面の縦断切片の SEM 観察

ヤリン (P) の分布に関する EDX 分析により、AH 表面の多孔層内部に細胞外基質が侵入していることが示された。特に、AH 表面②では多孔質層中間部まで細胞外基質の侵入が確認された (図 11、arrow)。

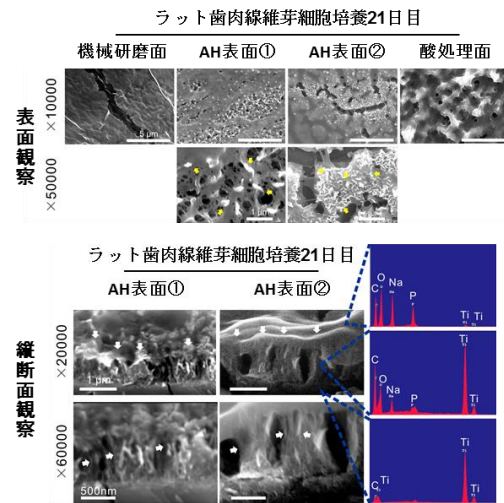


図11 各表面上でのラット歯肉線維芽細胞培養21日目のSEMによる表面観察像(上)と培養21日目のAH表面の縦断切片のSEM観察像とEDX解析結果(下)

ヒト皮膚線維芽細胞においても同様に、培養 28 日目の表面および縦断切片の SEM 観察から、細胞外基質 (図 12、\*部) の一部が表面のナノ孔へ侵入 (図 12、黄色△) していた。

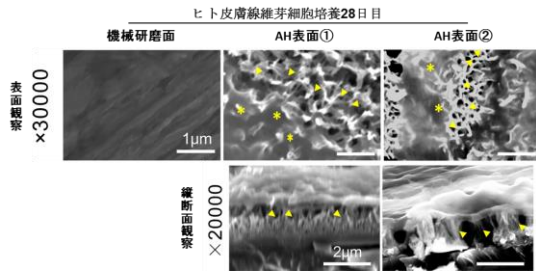


図12 各表面上でのヒト皮膚線維芽細胞培養28日目の表面(上)および縦断面(下)のSEM観察像

以上から、歯肉線維芽細胞の細胞外基質は AH 表面内へ侵入する可能性が示唆された。

(7) ラット歯肉線維芽細胞 21 日目に超音波、コラゲナーゼまたは過酸化水素水処理後の残存コラーゲン率は、いずれの処理においても、20 から 40%の範囲内であった機械

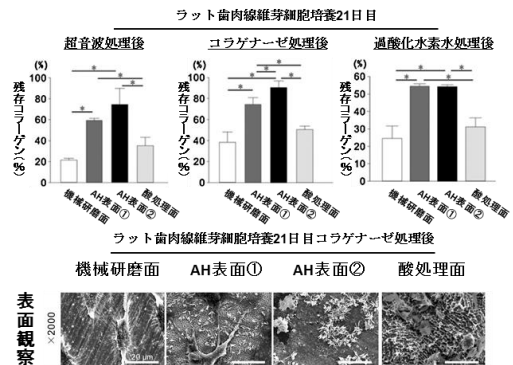


図13 各表面上でラット歯肉線維芽細胞培養21日目に各別種処理後の残存コラーゲン率(上) (\*: 統計学的有意差有、Bonferroni multiple comparison) とコラゲナーゼ処理後のSEM表面観察像(下)

研磨面および酸処理面に比べて、AH 処理面で

はより高く、50%以上に達した(図13)。コラゲナーゼ処理後のAH表面②の残存コラゲン率は80%を超え、AH表面①よりも高かった。コラゲナーゼ処理後の細胞外基質のSEM表面観察から、機械研磨面および酸処理面上では、わずかな細胞外基質や細胞の残骸のみ認めただのに対し、AH表面上では、細胞外基質表層のみの剥離であり、残存細胞外基質が表面に固着していることが示された(図13)。

ヒト皮膚線維芽細胞においても同様に、培養28日目に超音波、コラゲナーゼまたは過酸化水素水処理後の残存コラゲン率は、いずれの処理においても、5から30%の範囲内であった機械研磨面とは異なり、AH表面上では30から50%の範囲内であった(図14)。

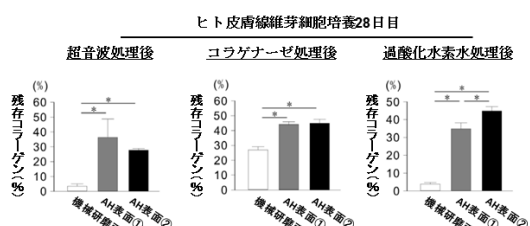


図14 各表面上でヒト皮膚線維芽細胞培養28日目に各剥離処理後の残存コラゲン率 (\*: 統計学的有意差有、Bonferroni multiple comparison)

(8) ウサギ口蓋部に埋入したミニチタンインプラントの術後8週における粘膜貫通部のSEM観察結果から、機械研磨面インプラントでは歯肉結合組織がわずかに表面に付着しているのみ(図15A-C, arrow)であったのに対し、AH表面②インプラント上では、多量の歯肉結合組織が表面に付着するとともに、付着した組織が表面内へ侵入していた(図15D-G, arrow)。また、ピラヌエバゴールドナー染色した樹脂包埋切片の光学顕微鏡観察の結果、機械研磨インプラントでは、歯肉線維が、表面近傍領域(図15K 両矢印の範囲)では表面に対し平行に走行し、遠位領域(図15HとK, 片矢印の範囲)では無秩序な走行(図15HとK, 黒△)を示した。それに対し、AH表面②インプラントでは、天然歯歯周組織

のセメント歯肉線維の走行(図15JとM, arrow

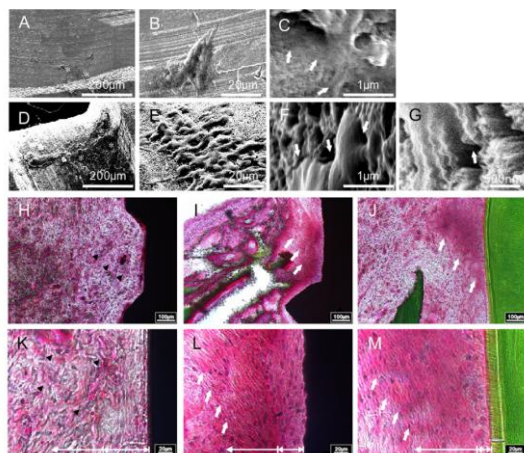


図15 ウサギ口蓋部に埋入8週後の粘膜貫通部のSEM観察像とピラヌエバゴールドナー染色した樹脂包埋切片の光学顕微鏡像。機械研磨面インプラント(A-CおよびH, K)、AH表面②インプラント(D-GおよびI, L)および天然歯歯周組織(JとM)

)と類似した歯肉線維の走行を示した(図15IとL, arrow)。また、AH表面近傍領域(図15L, 両矢印の範囲)では、天然歯歯周組織よりも厚い付着細胞層が確認された。

以上から、チタンインプラントにAH表面②処理を施すことにより、機械研磨面インプラントでは得られない、天然歯歯周組織に類似した結合組織性付着を獲得し得ることが示された。また、歯肉線維芽細胞の培養試験結果とほぼ同様結果が皮膚線維芽細胞培養で得られたことから、経皮的インプラントへAH表面を応用することにより、真皮結合組織とチタンインプラントが結合し得ることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計55件)

- ① Nakazawa M, Yamada M, Wakamatsu M, Egusa H, Sakurai K. Activation of osteoblastic function on titanium surface with titanium-doped hydroxyapatite nano-particle coating: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 査読有, in press.
- ② Yamada M, Kato E, Yamamoto A, Sakurai K. Titanium surface with nano-ordered spikes and pores enhances human dermal fibroblastic extracellular matrix production and integration of collagen fibers. *Biomed Mater*, 査読有, 11(1): 015010, 2016. DOI: 10.1088/1748-6041/11/1/015010.
- ③ Koizumi C, Yamada M, Ishizaki K, Ueda T, Sakurai K. Anti-infective control in human bronchiolar epithelial cells by mucin phenotypic changes following uptake of N-acetyl-L-cysteine. *Free Radic Res*, 査読有, 49(12): 1449-58, 2015. DOI: 10.3109/10715762.2015.1087642.
- ④ Nishimiya H, Yamada M, Ueda T, Sakurai K. N-acetyl cysteine alleviates inflammatory reaction of oral epithelial cells to poly (methyl methacrylate) extract. *Acta Odontol Scand*, 査読有, 73(8): 616-25, 2015. DOI: 10.3109/00016357.2015.1021834.
- ⑤ Kato E, Sakurai K, Yamada M. Periodontal-like gingival connective tissue attachment on titanium surface with nano-ordered spikes and pores created by alkali-heat treatment. *Dent Mater*. 査読有, 31(5): e116-e130, 2015. DOI: 10.1016/j.dental.2015.01.014.
- ⑥ Kato E, Yamada M, Sakurai K. Retrospective clinical outcome of

nanopolymorphic crystalline hydroxyapatite-coated and anodic oxidized titanium implants for 10 years. J Prosthodont Res, 査読有, 59(1): 62-70, 2015.

DOI: 10.1016/j.jpor.2014.11.004.

- ⑦ Yamazaki M, Yamada M, Ishizaki K, Sakurai K. Ultraviolet-C irradiation to titanium implants increases peri-implant bone formation without impeding mineralization in a rabbit femur model. Acta Odontol Scand, 査読有, 73(4): 302-11, 2015.  
DOI: 10.3109/00016357.2014.956332.
- ⑧ Yamada Y, Yamada M, Ueda T, Sakurai K. Reduction of biofilm formation on titanium surface with ultraviolet-C pre-irradiation. J Biomater Appl, 査読有, 29(2): 161-171, 2014.  
DOI: 10.1177/0885328213518085.
- ⑨ Uchiyama H, Yamada M, Ishizaki K, Sakurai K. Specific ultraviolet-C irradiation energy for functionalization of titanium surface to increase osteoblastic cellular attachment. J BiomaterAppl, 査読有, 28(9): 1419-1429, 2014.  
DOI: 10.1177/0885328213511678
- ⑩ Kato E, Lemler J, Sakurai K, Yamada M. Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen® in a Rat Critical-Size Defect Model. Clin Implant Dent Relat Res, 16(2): 202-211, 2014.  
DOI:10.1111/j.1708-8208.2012.00467.x.

[学会発表] (計 107 件)

- ① Yamada M. Preconditioning strategy for bone regeneration in autologous bone marrow stromal cell transplantation. China-Japan Korea Dental Science Symposium 2016、2016 年 12 月 10 日、福州 (中国)
- ② Yamada M. Titanium surface with nano-sized, but not micron-sized, topography for transgingival component to establish periodontal-like peri-implant tissue. Chulalongkorn-Tohoku Joint Symposium in Dental Science 2015、2015 年 12 月 9 日、バンコク (タイ)
- ③ 山田将博、江草 宏、櫻井 薫、異方性ナノ形態チタン表面へのヒト真皮線維芽細胞の細胞外基質の結合、平成 27 年度公益社団法人日本補綴歯科学会東北、北海道支部 総会・学術大会、2015 年 10

月 25 日、岩手県歯科医師会 8020 プラザ (盛岡)

- ④ Yamada M、Sakurai K. Periodontal-like Connective Tissue Attachment on Cementum-mimetic Titanium Surface. 93rd General Session & Exhibition of the IADR、2015 年 3 月 11 日、ボストン (米国)
- ⑤ 中澤正博、山田将博、石崎 憲、上田貴之、櫻井 薫、骨芽細胞増殖を活性化させるチタンアパタイトナノコーティング、公益社団法人日本補綴歯科学会東京支部総会・第 18 回学術大会、2014 年 11 月 9 日、昭和大学歯学部講堂 (東京)
- ⑥ Yamada M、Nakazawa M、Sakurai K. Enhancing osteoblastic extracellular matrix formation on titanium-hydroxylapatite-coated micro-roughened surfaces. 38th Annual Conference of the European Prosthodontic Association、2014 年 9 月 25 日、イスタンブール (トルコ)
- ⑦ 山田将博、石崎 憲、櫻井 薫、毛羽立ち状ナノ構造体チタン表面と結合組織線維との嵌合、日本顎顔面補綴学会第 31 回総会・学術大会、2014 年 6 月 20 日、仙台市民会館 (仙台)

[図書] (計 4 件)

- ① 櫻井 薫 (編著)、医歯薬出版社、「老年歯科医学用語辞典 第 2 版」、2016 年、1 - 300 ページ
- ② 櫻井 薫 (共著)、デンタルダイヤモンド社、「THE SOFT LINING」、2015 年、83 - 88、98 - 104、106 - 111、132 - 133、454 - 455 ページ
- ③ 櫻井 薫 (共著)、医歯薬出版、「老年歯科医学」、2015 年、165 - 168、212、454 - 455 ページ

他 1 編

[その他]

東北大学大学院歯学研究科 分子・再生歯科補綴学分野

<http://crbr.dent.tohoku.ac.jp/>

東京歯科大学老年歯科補綴学講座

<http://portal.tdc.ac.jp/dept/rpg/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 将博 (YAMADA, MASAHIRO)

東北大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：90549982

### (2) 研究分担者

櫻井 薫 (Sakurai, Kaoru)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20153950

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者 なし