

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：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861664

研究課題名(和文)糖尿病患者に対するナノ構造制御新規インプラント材料の創製

研究課題名(英文) Fabrication of nano-modified implant material for diabetes patients

研究代表者

小正 聡 (KOMASA, Satoshi)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70632066

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)：生活習慣病である糖尿病罹患患者では創傷治癒期間の長期化によりインプラント周囲炎の罹患リスクが高くなるため、早期のオッセオインテグレーション獲得が期待される。そこで、本研究ではこれまで早期の骨形成を誘導すると報告してきた加熱処理を加えたナノ構造析出純チタンが糖尿病環境下においてラットの硬組織分化誘導能に与える影響について検討した。各種分化マーカーの評価を行ったところ通常および高グルコース浸漬群でナノ構造純チタンにおいて無処理純チタンと比較して高い値を示した。以上の結果により、グルコース濃度の変化に関わらずナノ構造が確実な初期固定を誘導する可能性の一端を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Since the morbidity risk of peri-implant inflammation is increased by the prolonged wound healing period in diabetic patients suffering from a lifestyle-related diseases, early osseointegration acquisition is expected. Therefore, nano-structure precipitated pure titanium, which in this study which was added to the heating process, which has been reported to induce bone formation in the early stage was examined the impact of the hard tissue differentiation-inducing ability of rats under the diabetes environment. It was higher as compared with untreated pure titanium in the nanostructures pure titanium with normal and high glucose immersion group was evaluated for various differentiation markers. The above results suggested one end of possibility of nanostructures regardless of changes in glucose concentration to induce a reliable primary stability.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ナノ材料 インプラント

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科治療においてインプラント治療は必須の選択肢となった。そのため、全身疾患を有する患者に対し、インプラント治療を施す機会は増加している。現在、生活習慣病として患者が増加している糖尿病患者は一般的に歯の喪失が多いとされており、歯の喪失部位に対する補綴治療としてインプラント治療のなす役割は大きいといえる。基礎的研究によれば、糖尿病患者における創傷治癒期間は長いという報告があるが、一度オッセオインテグレーションが獲得されれば、糖尿病患者においても非糖尿病患者と同程度のオッセオインテグレーション量が獲得できると報告されている。治療期間の長期化の最大の要因であるオッセオインテグレーションの期間の短縮がインプラント治療の課題として挙げられる。

申請者は、純チタン金属を 10Mの水酸化ナトリウム水溶液に室温で 24 時間浸漬することで純チタン金属表面にナノ構造が析出することを明らかにし、*in vitro* レベルで本構造が SD 系ラットの骨髄間葉系細胞の培養開始 3 日後の Runx2 mRNA の発現および培養開始 14, 21 日後 ALP 活性、培養開始 28 日後の Ca 量、Osteocalcin 量の値を有意に上昇させ硬組織誘導能を向上させる可能性を示唆した。また、同構造はラットの下大動脈より抽出した血管内皮細胞の初期接着および遺伝子発現、および管腔形成能を向上させ、インプラント埋入周囲組織の微小血管構築にも有用であることを報告した。本構造はインプラントの初期固定時に優れた構造であり、これまで報告してきたように TNS 構造は *in vitro*、*in vivo* 両面において有用であることが明らかであり、オッセオインテグレーションの早期化に寄与する可能性の一端を示した。本構造は骨と接着しやすい状態にする技術であり、糖尿病患者に対しても同様の効果を示せば、インプラント生存率は格段に上昇することが期待できる。

また、純チタン金属板を SD 系ラットの大腿骨に埋入後、術後 3, 4 週の純チタン金属板周囲の組織を切り出し、HE 染色を行い病理組織学的観察および骨接触率を求めたところ、TNS 表面ではチタンプレート周囲に著明な新生骨骨梁が形成され、高い骨接触率を示し、*in vivo* レベルにおいても有用であるという結果を示した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ナノレベルでの表面構造制御により糖尿病患者に対しても早期の硬組織形成を促し、オッセオインテグレーションの期間を短縮させる新規インプラント材料の創製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 試料作製

実験材料として TNS を析出させた市販の

JIS2 級金属板 (直径 15mm, 厚さ 10mm) を使用し、対照群として #2000 まで研磨した同材料を使用した。TNS の析出には、各試料を 10M 水酸化ナトリウム水溶液に浸漬し、攪拌した状態で室温および大気圧条件下で 24 時間反応させた。反応後、試料を取り出し、イオン交換水にて導電率が $5 \mu\text{S}/\text{cm}$ 以下になるまで洗浄を行った。その後、自然乾燥させ、純チタン金属表面に TNS を析出させた。さらに TNS 析出材料を 600 で 1 時間加熱処理を加えた。試料は実験群、対照群ともに、アセトン、エチルアルコールおよびイオン交換水で各々 10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。

(2) 表面解析

試料の微細構造の観察には、実験群および対照群の純チタン金属表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000, 島津) 走査型プロトン顕微鏡 (SPM, SPM-9600, 島津) を使用して X, Y および Z 方向に $2 \mu\text{m}$ の範囲をスキャンした。試料表面における元素分析を X 線電子分光分析装置 (XPS, PHI x-tool, アルバックファイ) にて行い、結晶構造を XRD にて解析した。また、各種センサ表面における蒸留水の接触角を VSA 2500 XE にて測定した。

(3) 細胞培養

生後 8 週齢の GK 雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。プレートに 1 穴あたり 4 万個の細胞を播種後、培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37°C , 5 % CO_2 を含む加湿条件下で培養した。細胞はコン플レントに達するまで、各試料上で培養した。培地に 10 % FBS および骨分化誘導剤 (10 mM -グリセロリン酸ナトリウム (和光純薬, 東京, 日本), 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸 (ナカライテスク, 京都, 日本), 10-8 M デキサメタゾン含有の分化誘導培地を用い分化誘導を開始した。さらに培地に通常グルコース群 (5.5mM) と高グルコース群 (24mM) の 2 群を添加し、糖尿病状態を再現した。

(4) ALP 活性

培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.2 % トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には、Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit® (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を、the Pico green Double standard DNA Assay Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) を用いメーカー指示に従い行った。DNA の定量後、DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した。

(5) カルシウム析出量

培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10%ギ酸にて抽出した。カルシウム析出量は、Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本) を用いて定量した。

(6) OCN 産生量

本研究で用いた ELISA Kit (DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本) は, 細胞培養上清中で直接 OCN 産生量を測定するラット OCN に特異的な検査薬である。培養の 21 および 28 日後に, 細胞培養上清中の OCN 産生量は, メーカーの指示に従って測定した。

(7) アリザリン染色

培養開始 21, 28 日後の純チタン金属板を Alizarin Red 染色液にて染色を施し, オールインワン蛍光顕微鏡にて観察を行った。

(8) 統計解析

各試験の評価をそれぞれ 3 回行い, 各実験の得られたデータの統計処理は SPSS 14.0 J for Windows を用いて行った。実験群および対照群の有意差検定は Student の t 検定を用いて行い, 5%以下を有意水準とした。

4. 研究成果

(1) 表面解析

実験群では SEM ではナノレベルネットワーク構造が観察され, SPM では 13nm のノジュール構造が形成された。XPS の観察では, 実験群で Ti, O, Na の存在が確認されたが, 対照群では Na の層を認めなかった。実験群にはチタニアゲル層の形成が推察される。XRD の解析では 600 で結晶化の開始を示す rutile の層が確認された。接触角の評価では, 対照群で 88° を示すのに対し, 実験群では超親水性を示した。(図 1-5)

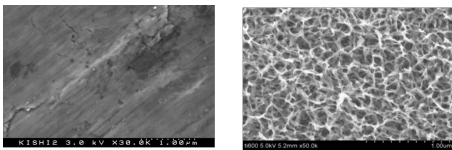


図 1 SEM 像

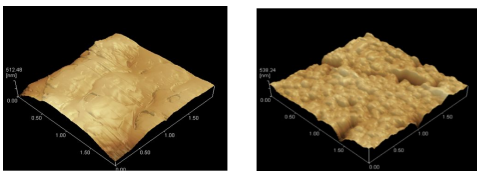


図 2 SPM 像

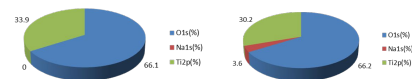


図 3 XPS 解析結果

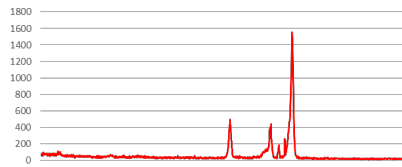


図 4 XRD 解析結果 (実験群)



図 5 接触角

(2) ALP 活性

通常グルコース濃度における実験群および対照群の ALP 活性の比較では培養開始 7, 14 日後で実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。高グルコース濃度における実験群および対照群の ALP 活性の比較では培養開始 7 日後では有意差を認めなかったものの実験群で高い値を示した。また, 14 日後で実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

(3) カルシウム析出量

通常グルコース濃度における実験群および対照群のカルシウム析出量の比較では, 培養開始 21, 28 日後で実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。高グルコース濃度における実験群および対照群のカルシウム析出量の比較では培養開始 21, 28 日後で実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

(4) オステオカルシン産生量

通常グルコース濃度における実験群および対照群のオステオカルシン産生量の比較では, 培養開始 21 日後では有意差を認めなかったものの, 28 日後で実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。高グルコース濃度における実験群および対照群のオステオカルシン産生量の比較では, 培養開始 21, 28 日後で実験群で対照群と比較して有意に高い値を示した。

(5) アリザリン染色

通常グルコースおよび高グルコース濃度同様に実験群の観察で高いアリザリン染色を示した。



通常グルコース

高グルコース

先行研究により, 600 の加熱処理で純チタン金属表面にアルカリチタン酸塩のアモル

ファス層が基盤に強固に結合した TNS の結晶構造が形成された。この構造はアパタイトに対する過飽和度を高め、迅速なアパタイト層の形成が期待できる。通常グルコースおよび高グルコース下同様に無処理の純チタン金属表面では分化誘導能の低下を認めた。

通常グルコースおよび高グルコース下同様に、TNS 析出純チタン金属表面では培養初期時には、分化誘導および石灰化にまばらな結果を示したものの、中後期ではすべての分化誘導のマーカーで実験群で高い値を示した。通常の骨髄細胞と比較すると分化誘導の速度は落ちるものの、TNS を使用すれば初期固定の早期化が期待できる。

以上の結果により、グルコース濃度の変化に関わらず TNS がインプラント埋入周囲組織の確実な初期固定を誘起する可能性の一端を示唆した。

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 5 件)

1. Komasa S, Su Y, Taguchi Y, Yamawaki I, Tsutsumi Y, Kusumoto T, Nishizaki H, Miyake T, Umeda M, Tanaka M, Okazaki J. Bioactivity of Titanium Surface Nanostructures Following Chemical Processing and Heat Treatment. *J Hard Tiss Biol*. 査読有 24(3): 257-66, 2015.

2. Komasa S, Taguchi Y, Nakazawa Y, Kusunoki T, Tashiro Y, Kusumoto T, Nishizaki H, Komasa Y, Okazaki J. Effect of titanium at nanosheet surface on initial attachment of cells. *日本口腔リハビリテーション学会雑誌*. 査読有 28(1): 1-10, 2015.

3. Xing H, Taguchi Y, Komasa S, Yamawaki I, Sekino T, Umeda M, Okazaki J. Effect of Porphyromonas Gingivalis Lipopolysaccharide on Bone Marrow mesenchymal Stem Cell Osteogenesis on a Titanium Nanosurface. *J Periodont*, 査読有 86: 448-55, 2015.

4. Komasa S, Kusumoto T, Taguchi Y, Nishizaki H, Sekino T, Umeda M, Okazaki J, Kawazoe T. Effect of Nanosheet Surface Structure of Titanium Alloys on Cell Differentiation. *J Nanomater*, 査読有 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/642527> Vol.2014, 2014.

5. Komasa S, Xing H, Taguchi Y, Kayama T, Fujio M, Miyake A, Shimamura S, Kusumoto T, Nishizaki H, Okazaki J. Osteogenesis related gene expression on titanium surfaces with nano-network structures formed by treatment with alkali solutions. *J Osaka Dent Univ*, 査読有, 48(2): 133-9, 2014.

[学会発表](計 10 件)

1. 藤尾美穂, 小正 聡, 西崎真理子, 西崎宏, 岡崎定司. ナノ構造析出純チタン金属に加熱処理が与える影響について. *バイオインテグレーション学会第 6 回学術大会・総会* 2016.3.13, 大阪市

2. 蘇 英敏, 小正 聡, 関野 徹, 西崎 宏, 岡崎定司. アルカリ加熱処理を施したナノ構造制御 Ti6Al4V 合金-特性評価と細胞接着-公益社団法人日本口腔インプラント学会第 35 回近畿・北陸支部学術大会 2015.12.13, 金沢市

3. 小正 聡, 田口洋一郎, 西崎真理子, 楠本哲次, 西崎 宏, 岡崎定司. チタン合金への濃アルカリ処理が硬組織形成誘導に与える影響について. 第 29 回日本口腔リハビリテーション学会学術大会, 2015.11.14 徳島市

4. 小正 聡, 田口洋一郎, 蘇 英敏, 藤尾美穂, 西崎真理子, 内藤大介, 楠本哲次, 西崎 宏, 岡崎定司. グルコース濃度の変化が TNS 析出純チタン金属表面に及ぼす影響について. 平成 27 年度日本補綴歯科学会関西支部学術大会, 2015.5.30, 神戸市

5. 山脇 勲, 田口洋一郎, 小正 聡, 小石玲子, 奥田麻貴子, 田中昭男, 梅田 誠. ナノ構造制御チタン金属表面における硬組織分化誘導に及ぼすグルコース濃度の影響. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会 2015.5.14, 千葉市.

6. 小正 聡, 西崎 宏, 岡崎定司. 化学合成法によるチタン合金表面上へのナノ構造の析出と生体適合性評価. *日本セラミックス協会*, 2015 年年会, 2015.3.18, 岡山市.

7. Komasa S, Taguchi Y, Xing H, Kusumoto T, Fujio M, Terada C, Nishizaki H, Okazaki J. Effect of Titanium Surfaces With Various Alkali Concentration on Osteogenic Differentiation. 93rd General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. 2015.3.13, Boston, U.S.A.

8. 小正 聡, 田口洋一郎, 楠本哲次, 西崎宏, 岡崎定司. チタン合金表面上に析出させた TNS 構造が細胞の初期接着に与える影響について. 第 44 回日本口腔インプラント学会学術大会, 2014.9.13, 東京.

9. 小正 聡, 蘇 英敏, 田口洋一郎, 楠本哲次, 関野 徹, 西崎 宏, 田中昌博, 岡崎定司. チタン合金表面に析出されたナノ構造への加熱処理がラットの骨髄細胞の硬組織分化誘導能に与える影響について. 平成 26 年度日本補綴歯科学会中国・四国・関西支部合同学術大会. 2014.9.6, 倉敷市.

10. 小正 聡, 三宅晃子, 橋本典也, 中野蓉子, 田口洋一郎, 楠本哲次, 西崎 宏, 岡崎定司. QCM センサを利用したジルコニアおよび純チタン金属表面への PRP 吸着量の比較. *日本歯科補綴歯科学会第 123 回学術大会*

2014.5.25, 仙台市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小正 聡 (KOMASA, Satoshi)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 70632066