

機関番号：若手研究（B）

研究種目：

研究期間：2009～2010

課題番号：21791947

研究課題名（和文）抗細菌性タンパク産生誘導型インプラントの開発

研究課題名（英文）

Development of implant inducing antimicrobial protein production

研究代表者

草野 薫 (KUSANO KAORU)

北海道医療大学・歯学部・助教

研究者番号：80382498

研究成果の概要（和文）：

本研究では、臨床応用されている4種類の歯科インプラント（機械研磨処理（P）、ブラスト処理（B）、酸エッチング処理（AE）、ブラストエッチング処理（SLA））および各種サイズのマイクロ Gap box を用い、各種インプラント表面形状におけるインプラント周囲組織関連細胞の伸展、増殖能およびPANA とディフェンシン(HBD)の発現に与える影響について検討した。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the influence of surface topographies on cell shape, proliferation, and human beta-defensin (HBD) expression of the tissues surrounding the implants for clinically-applied dental implants with four different surface topographies: mechanically polished (PO), coarse sand blasted (B), acid etched (AE), and sandblasted and acid etched (SLA), and micro gap-cornered-box (MGCB) surface topography.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯科インプラント、インプラント表面、ディフェンシン、インプラント周囲炎

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科用 CT やインプラント用診断ソフトの開発、普及により、インプラ

ント治療がより身近なものとなり、日本のあらゆる歯科医院で患者が簡単にインプラント治療を選択できる環境が整

ってきた。しかし、その一方で経験の浅い歯科医によるインプラント治療が増え、インプラント予後不良例に遭遇するものも少なくない。これまでインプラントの基礎的研究は、インプラント表面における骨形成に関するものや、表面処理法と骨形成関連細胞の増殖に関するものが多く、より早いオステオインテグレーションの獲得に関する研究が、インプラントの高い生着率につながったものと推察する。しかし、インプラントの抜歯即時埋入、即時加重、早期加重や糖尿病などの易感染性患者のインプラント治療など、患者のQOLの向上に伴い、インプラント治療の適応範囲も拡大され、術後感染リスクの高いインプラント治療が増えてきたが、インプラント表面形状における感染防御機構に関する研究はほとんどなされていない。

術後感染のリスク減少因子の1つに、生体が産生する抗細菌性タンパクの存在がある。抗細菌性タンパクには様々なものが報告されてきているが、細菌、真菌、ウイルスなど、広範囲スペクトルをもっていることから、特にディフェンシンによる感染防御機構が注目されてきている。ディフェンシンには、 α と β 、 θ の三つのタイプが報告されてきており、 α ディフェンシンは好中球やマクロファージ、ナチュラルキラー細胞など、主に血球から産生されることがわかっている。一方、 β ディフェンシンには、弱く恒常的に抗細菌作用を発揮する β ディフェンシン type-1 と、細菌接触や機械的刺激など、炎症刺激によりその抗細菌作用が増強する β ディフェンシン 2、3、4がある。 β ディフェンシンのいずれも主として、上皮細胞で産生されるものであり、口腔上皮での発現も明らかとなっている。最近になり骨の自然免疫にもディフェンシンが関与しているという報告がなされ、(D. Varoga, et al. :Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. Histochem Cell Biol 2008 Oct. Epub ahead of print) 骨と密接な関係にあるインプラント治療と、ディフェンシンとの免疫システムにより、新たなインプラントの感染防御確立に、大きく役立つものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、既に歯科インプラントに臨床応用されている4種類（機械研磨処理（P）、ブラスト処理（B）、酸エッチング処理（AE）、ブラストエッチング処理（SLA））およびサイズの異なるMicro Gapを用い、各種インプラント表面形状におけるインプラント周囲組織関連細胞のディフェンシンの発現を検索する。さらに同様に炎症刺激条件下においてもディフェンシンの発現を検索し、インプラント表面形状の違いおよび炎症刺激下におけるインプラント周囲組織関連細胞の β ディフェンシン発現の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) サーフェースの作製は、Dr. Brunette らの方法に従い、機械研磨処理（P）、ブラスト処理（B）、酸エッチング処理（AE）、ブラストエッチング処理（SLA）およびサイズの異なるMicro-Gapを有するBox型のチタンレプリカを作成し、それぞれ電子顕微鏡で観察した。
- (2) インプラント周囲組織関連細胞に分化する間葉系幹細胞と骨芽細胞様細胞において1、6、12、24時間、3、5、7日間それぞれ10%FBS含有 α -MEMにて、37°C、5%CO₂条件下で培養を行った。上記条件の細胞を下記に関して検索した。

① 各種表面における細胞伸展、細胞増殖

Cell spreadingの測定

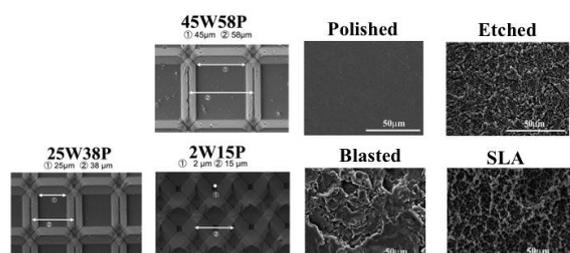


② PCNA、 β ディフェンシン2の発現およびLPS刺激時の β ディフェンシン2の発現

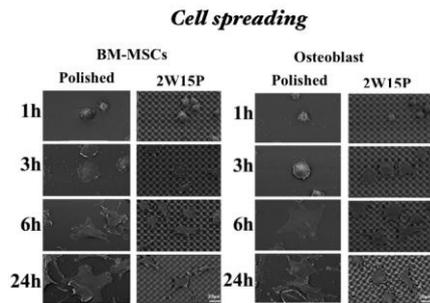
4. 研究成果

- (1) 作成されたインプラントサーフェイスレプリカを電子顕微鏡で観察した。

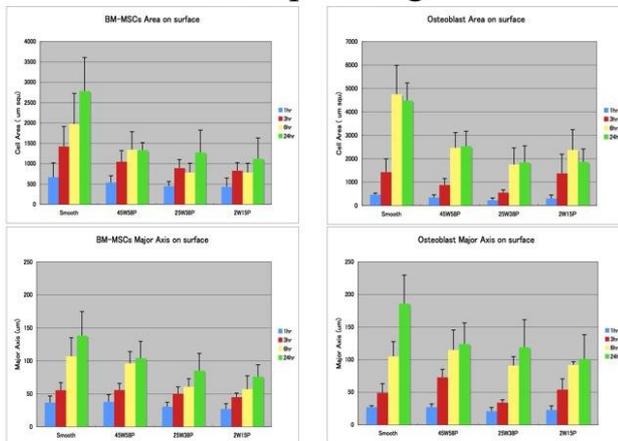
Surface Topographies



- ① インプラント周囲組織関連細胞に分化する間葉系幹細胞と骨芽細胞様細胞の細胞伸展、細胞増殖を観察したところ、細胞面積および細胞長径ともに経時的に増加傾向にあった。またいずれの細胞も表面形状間において機械研研磨(P)で長径、面積共に有意に大きく、24時間において最大であった。



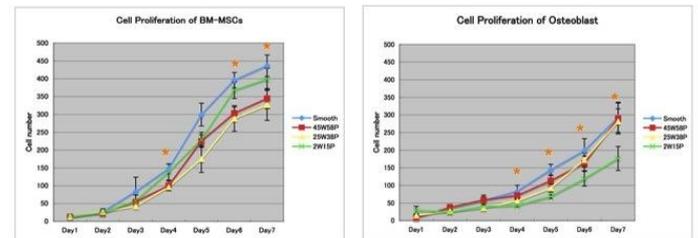
Cell spreading



- ② それぞれの表面における骨芽細胞と間葉系幹細胞の PCNA の発現変化および β ディフェンシン 2 の発現を Real time PCR 法にて検索した。PCNA の発現において、間葉系幹細胞では 2W15P が他の表面と比較し 1.6 倍高く、骨芽細胞では 2W15P が有意に他の表面より発現が低かった。 β ディフェンシン 2 ではいずれの表面でも発現が認められたが、各種表面間の発現が異なる傾向にあったが、有意な差は認めなかった。また LPS 刺激時においても発現がそれぞれ 12 時間後に上昇する傾向にある。各種表面間における発現の違いにかん

して、現時点で有意な差があるか検索中である。

Cell Proliferation



- ③ ①、②より各種インプラント表面が間葉系幹細胞、骨芽細胞において細胞増殖、細胞伸展、PCNA、 β ディフェンシン 2 の発現に影響を及ぼす可能性が示唆され、今後も検索を継続中である。

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)

- 1, Yang Y, Kusano K, Frei H, Rossi F, Brunette DM, Putnins EE. Microtopographical regulation of adult bone marrow progenitor cells chondrogenic and osteogenic gene and protein expressions. *J Biomed Mater Res A* 95(1):294-304.2010 査読あり
- 2, Waterfield JD, Ali TA, Nahid F, Kusano K, Brunette DM. The effect of surface topography on early NF κ B signaling in macrophages. *J Biomed Mater Res A* 95(3):837-47.2010 査読あり

〔学会発表〕（計1件）

1, Kusano K, Yang Y, Ghrebi S, Kushara F, Putnins EE, Brunette DM. Effects of Gap-Cornered-box Topographies on BM-MSD and Osteoblast Proliferation. 88thInternational Association for Dental Research. 2010年7月17日スペイン、バルセロナ

〔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

草野 薫 (KUSANO KAORU)

北海道医療大学・歯学部・病態機能病態学系・顎顔面口腔外科学分野・助教

研究者番号：80382498

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：