

機関番号：3 2 6 2 2

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791949

研究課題名 (和文) 表面制御による歯根膜再生型チタンインプラントの開発

研究課題名 (英文) Development of the periodontal reproduction type titanium implant by the surface control

研究代表者

片岡 有 (KATAOKA YU)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90527300

研究成果の概要(和文): *in vitro* の実験からインプラントの表面性状が細胞の分化に影響することを明らかにした. ワイヤ放電加工を用いナノ修飾した表面が機械研磨面よりも早期に細胞接着が生じ, 骨芽細胞や骨髄間葉系細胞の分化に影響することを明らかにした. また, 分化誘導培地で骨芽細胞様細胞を培養し, EDSurface の細胞分化に与える影響について検討できた. さらに, 生体内でインプラント表面から骨形成が生じる Contact osteogenesis が期待されているが, *in vivo* においてその可能性を示唆できた.

研究成果の概要(英文): The surface property of the implant influenced the differentiation of cells *in vitro*. Cell adhesion occurred earlier than machine polished surface, and the nanosurface which it modified determined that we influenced the differentiation of osteoblasts and marrow mesenchyma system cells using wire electric discharge method. Also, we cultured osteoblasts-like cells with differentiation instruction culture media and were able to examine effect to give cell differentiation of EDSurface. Furthermore, Contact osteogenesis where the implant surface caused bone formation was expected *in vivo*.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 歯科医用工学・再生歯学

キーワード: 歯科インプラント学

## 1. 研究開始当初の背景

歯根膜のないインプラントは, 咬合機能圧に対する挙動が天然歯と異なる. 歯根膜は血管と神経および細胞成分を含むコラーゲン繊維性の軟組織であり, 咬合圧に対する感覚受容器が存在することから, 歯周組織を保護するために咀嚼筋の力を調節する上で重要な組織である. このため歯根膜のないオッセオインテグレーションインプラントに天然歯と同等の咬合を与えるとインプラントにオーバーロード(過重負担)がかかり,

周囲組織や補綴物破壊が進行する. このため, インプラント上部構造の咬合調整は, 歯根膜のないことによる沈下量不足を考慮し, 天然歯の咬合よりも 25  $\mu$ m 程度低くする. 臼歯部ではオフセット配列により水平力を分散する対策が採られるが, 咬合機能圧に対する挙動が本来の歯のものとは異なっているインプラントと天然歯を長期に並存させることはできない. さらに歯根膜には免疫細胞や造骨・破骨細胞が存在し, 歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たしてい

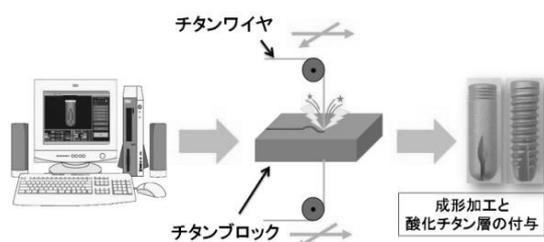
る。これらの理由から、歯根膜の存在しない現在のインプラントシステムは、現状よりも長期的な維持を目指すことが難しいとされている。

## 2. 研究の目的

これまで研究開発に取り組んできた表面修飾技術の応用により、チタン製インプラント表面に歯根膜を含めた歯周組織を再生させ、長期的な維持と口腔機能を向上させることである。小動物の口腔内で行う最終段階の *in vivo* のインプラント機能・適合性試験を踏まえ、予備実験としてナノ微粒子で表面処理したチタンプレートとを用いて *in vitro* の歯根膜細胞培養試験を行う。ナノ微粒子に歯根膜細胞の分化誘導因子を結合させ、培養細胞に対する増殖・分化誘導能を検討する。また培養細胞が産出したコラーゲン繊維との化学反応を検討すると同時に、培養後に形成されたナノ微粒子とコラーゲンの複合体とチタン表面の接着性をナノスクラッチテストにより測定し、再生歯根膜に対するアンカー機能を検討する。チタンプレートに電解液中での放電陽極酸化により抗菌処理を施し、インプラント体アバットメント部での抗菌作用を *in vitro* で検討する。これまでの研究で、本処理の口腔細菌に対する有効性は明らかであるが、その作用機序が不明である。バイオフィルムに対する抗菌作用機序は、活性酸素の発生により細菌の細胞壁が傷害されることに依存すると推察される。そこで、チタンプレート上に培養バイオフィルムを処理、あるいはグラム陰性菌の細胞壁成分を抽出し、抗菌チタン表面での化学反応を赤外分光で経時的に分析することで、抗菌効果のエビデンスが得られると考えられる。本研究の最終段階では、ワイヤ放電による超精密加工により小動物の口腔内に埋入可能なチタン製ミニインプラントを設計する。埋入用ミニインプラントは、各種表面処理後に培養歯根膜細胞と融合させ、実験動物の口腔内で機能したのちに組織標本を作製し、インプラント周囲の再生歯周組織を評価する。

## 3. 研究の方法

チタン製インプラント表面に歯根膜を含めた歯周組織を再生させ、長期的な維持と口腔機能を向上させることである。本研究を遂行するにあたり、その特殊性から *in vivo* での動物実験が不可避である。しかし、予備実験として表面分析と *in vitro* での細胞実験を組み合わせることにより、これにつづく動物実験の個体数を減らすことができる。



(1) 歯周組織細胞を実験室で増殖させる。ナノ修飾したチタンプレート表面に播種し、epidermal growth factor(EGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), Leukemia inhibitory factor(LIF)添加培地で一定期間の培養の後に化学構造の分析を行う。培養細胞が産出したコラーゲン繊維は、ナノ就職との化学反応によってチタン表面でセメント質様の複合体を形成すると考えられる。培養後の乾燥試料は ATR アタッチメントを用いた全反射赤外分光分析法によりコラーゲンの分子間結合を測定する。またX線光電子分光分析法を併用して、ミネラルとコラーゲン分子との架橋結合を検出する。

(2) 小動物の顎骨にインプラント体を埋入する。ワイヤ放電技術による精密加工によって、超小型のインプラント体を作製できるため、ラットのような小動物でも口腔内で検討を行うことが可能になった。インプラント周囲に再生された歯根膜が実際に天然歯と同様の機能を発現するには、シャープ繊維の走行と歯周組織との結合状態が重要であり、動物実験からこれを明らかにする。

(3)ラットの顎骨に埋入する小型のインプラント体を作製する。インプラント体の形状はシリンダータイプおよびスクリュータイプとする。インプラント体の加工は現有のワイヤ放電加工装置により行う。

(4)インプラント体の表面ナノ修飾および歯根膜細胞の培養インプラント体の表面処理として、現有の液中放電装置によりリン酸カルシウムナノ微粒子による表面修飾をおよび増殖・分化因子を結合させる。

(5)個体の大きさを考慮し、歯根膜を採取したラットが10週齢以上に達した時期を埋入時とし、インプラント体を大腿骨に埋入する。

(6) インプラント体埋入後1-4週で灌流固定により組織を固定したのち、現有の硬組織薄切機、研磨機をもちいて標本を作製する。灌流固定は、動物実験倫理規定を遵守し、エーテル麻酔下で開胸し、左心室より中性ホルマリンを導入する。また、途中経過での骨形成を評価するために $\mu$ -CTによる評価を行う。

(7)光学顕微鏡によりインプラント周囲のシャープ繊維走行および歯周組織再生を判別することができる。これらは現有の光学顕微鏡下で観察する。

(8)以上の実験結果をもとに放電によりナノ修飾したチタンインプラント表面での歯周組織再生について総合評価を行う。

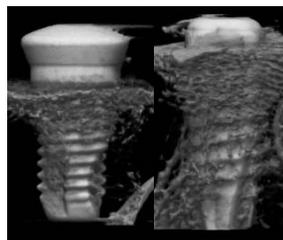
#### 4. 研究成果

(1)初期の細胞適合性に対する表面微小形状と表面化学構造の影響に関しては不明であった。そこで、レプリカを作製する事で両者の影響を比較・検討した。ワイヤ放電加工は放電エネルギーを利用した精密加工であり、チタンワイヤを電極に用いることにより、特徴的なマイクロメータオーダーの梨地凹凸の微小形状が付与されると同時に、最表層に従来のチタンインプラントよりも厚いTiO<sub>2</sub>-TiO傾斜構造を有する酸化チタン層を付与することができる。ワイヤ放電加工処理チタン面(W)を表面微小形状をエポキシ樹脂で再現し、表面にチタンをイオンコーティングしたレプリカ(R)を作製した。コントロールとして平滑面を有する研磨チタン板(C)を用いた。レーザ共焦点顕微鏡観察および表面粗さ測定により、WとRは同一の表面微小形状を有していることを確認した。また、X線電子分光分析とX線回折分析により、W最表層はTiO<sub>2</sub>-TiO傾斜構造を有する厚い酸化チタン層であるのに対し、RとCはTiO<sub>2</sub>のみの極薄い酸化チタン層に被覆されていた。細胞接着の指標となるインテグリンの発現は、Wが24時間後であったのに対し、RとCでは3日後であった。既に細胞接着にチタンの表面化学構造が影響することは明らかにされており、Wの特徴的な表面化学構造は細胞の初期接着に有利であることが判明した。1週間培養後の細胞数は、W>R>Cの順であり、平滑面よりも凹凸面上で細胞増殖が亢進することが判明した。さらにアルカリフォスファターゼ活性は、Wで3日後に発現したのに対し、Rでは1週間後に、Cでは2週間後に発現したため、W上では細胞活性が早期に高まっていることが判明した。以上のことからワイヤ放電加工処理チタンの優れた細胞適合性は、特徴的な表面化学構造と表面微小形状の相乗効果であることが判明した。

(2)分化誘導培地で骨芽細胞様細胞を培養し、Real-time PCR法で細胞の分化因子と石灰化因子の解析を行い、EDSurfaceの細胞分化に与える影響について検討した。コントロールとして、同サイズのチタン板を耐水研磨紙で#500から順に#1200まで研磨し、機械研磨面(Machined)とした。走査型電子顕微鏡(SEM)、X線回折(XRD)、X線光電子分光分析(XPS)により表面形状および表面化学構造の解析を行った。2種類の試料をアセトン、エタノールおよび蒸留水で15分間ずつ超音波洗浄し、細胞培養に供した。マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1 cells)を、4×10<sup>4</sup>cells/wellの濃度で試験片に播種し、分化誘導培地中で培養した。3日後および7日後の分化度を比較するために、細胞内のmRNAを回収し(QIAGEN<sup>®</sup> RNeasy Mini Kit)、cDNAを合成後、Real-time PCR(Taq Man<sup>®</sup> Gene)により遺伝子の相対発現量を測定した。EDSurfaceは特徴的なクレーター状の表面微小形状を有し、

Machinedよりも厚く傾斜的な酸化チタン膜を有していた。Real-time PCRの結果より、3日後でintegrin α2が十分に発現し、差は両試験片でなかったため両試験片とも十分に細胞接着していることが確認できた。osteocalcin, osterix, Runx2は3日後よりEDSurfaceでMachinedよりも発現量が有意に高かった。さらに、OsteocalcinやALPも3日から7日後に有意に高く発現していたため、EDSurface上で早期に石灰化が生じる可能性が示唆された。この結果は動物実験の結果を支持するものであり、EDSurfaceのすぐれた骨伝導性を証明することができた。

(3)ウサギの脛骨内側部を十分に剃毛し皮膚の消毒後、骨膜を剥離し脛骨に達する。腓骨と合



流する部位や遠位(膝関節面から45mm遠位部)に通法通りに、インプラント体を埋入した。埋入後、洗浄し骨膜を可及的に縫合し閉

創した。埋入したインプラント体は、EDSurfaceを特徴としたインプラント体(シリンダー形状およびスパイラル形状、直径3.8mm、長さ8mm)とした。特にシリンダータイプのインプラント体には先端に回転防止のベントを形成してあるものを用いた。コントロールとして機械加工(Machined)で作製されたインプラント体(スパイラル形状、直径3.8mm、長さ8mm)とした。1, 2, 4週間後にウサギを屠殺し、micro-CT(卓上型マイクロフォーカスX線CTシステム、SMX-90CT、(株)島津製作所)により撮影した。マイクロCTによる観察では、埋入後4週間のインプラント周囲にはEDSurfaceおよびMachinedの両者ともに多量の緻密な骨様組織が見られ、オッセオインテグレーションが獲得されていることが確認できた。骨様組織量を部位別で比較すると、4週間後においてはいずれの部位でも、抽出した空間に対し40%以上の組織が確認できた。また、H-E染色による切片においても新生骨が確認でき、マイクロCTにおいて骨様組織と思われる部位は骨組織であることが確認できた。EDSurface上では、1週間から骨形成が見られ、シリンダー形状のベント部にも骨形成が見られた。2週間後および4週間後と成熟していく様子が確認できた。骨形成は、皮質骨側からのみではなくインプラント周囲全体からインプラント体表層に沿って形成されていた。Machined上では、1週間後では骨形成が見られず、2週間後から骨形成が見られた。骨形成はインプラント体表層からでなく皮質骨側からであった。4週間後に両タイプのインプラント体でオッセオインテグレーションが確認されたが、骨形成のスピードと骨形成のあり方は異なっていた。EDSurfaceはMachinedよ

りも早くそして直接インプラント体表面から骨形成が起こる Contact osteogenesis であることが示された。EDSurface による表面改質は、早期に確実なオッセオインテグレーションする可能性が示唆された。

#### 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4件)

- ① 宮崎 隆, 片岡 有, 藤野, New Material&Technology ワイヤ放電加工処理チタンインプラント(IAT EXA)の特徴 EDSurface の骨適合性を中心に, 補綴臨床, 査読有, 第 43 巻 2 号, 216-224
- ② Shibata Y, Suzuki D, Omori S, Tanaka R, Murakami A, Kataoka Y, Baba K, Kamijo R, Miyazaki T. The characteristics of *in vitro* biological activity of titanium surfaces anodically oxidized in chloride solutions. Biomaterials. 査読有, 31(33), 8546-55, 2010
- ③ Yukimichi Tamaki, Yu Kataoka, In-Kee Jang and Takashi Miyazaki, Bone Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells on a Micro-Structured Titanium Processed by Wire-Type Electric Discharge Machining The Open Materials Science Journal, 査読有, 4, 113-116, 2010
- ④ 古森 哲, 平泉 裕, 宮岡英世, 片岡 有, 雫弘 晃, 吉村賢志, 朝生悟史, 武石 洋,  $\beta$ -TCP 含有チタンの実験的研究, 昭和医学会雑誌, 査読有, 第 69 巻 4 号, 305-315, 2009

[学会発表] (計15件)

- ① Yu Kataoka, Koichi Yamaki, Fukunaga Ohtsuka, Tomohide Isobe, Fumio Ata, Gou Yamamoto, Tetsuhiko Tachikawa, Takashi Miyazaki. Promoting Bone Formation on the Surface by Wire-type EDM *in vivo*. (The 19th EAO Glasgow Annual Congress 7~9 October 2010)
- ② 八巻幸一, 滝口裕一, 池田茂, 大塚福長, 阿多史雄, 片岡有, 宮崎隆放電加工によ

るインプラント周囲の骨造成の経時的変化, (第 56 回日本歯科理工学会学術講演会, 岐阜, 2010 年 10 月 9 日 10 日)

- ③ 大塚福長, 片岡有, 八巻幸一, 柴田陽, 宮崎隆ワイヤ放電加工チタンが細胞分化に与える影響 (第 56 回日本歯科理工学会学術講演会, 岐阜, 2010 年 10 月 9 日 10 日)
- ④ 八巻幸一, 片岡有, 大塚福長, 宮崎隆. EDSurface インプラントのウサギ大腿骨への埋入と評価. (第 30 回昭和歯学会総会, 2010 年 7 月 3 日)
- ⑤ 大塚福長, 片岡有, 柴田陽, 山本剛, 立川哲彦, 宮崎隆 EDSurface の細胞分化への影響. (第 30 回昭和歯学会総会, 2010 年 7 月 3 日)
- ⑥ 片岡有, PAS (Plasma Activated Sintering) によるチタン粉末焼結体の試作 - 外科用多孔質チタンシートの生体親和性 - (昭和大学共同研究 平成 22 年度研究成果発表会, 東京, 2010 年 3 月 20 日)
- ⑦ 八巻幸一, 阿多史雄, 大塚福長, 片岡有, 柴田陽, 藤島昭宏, 立川哲彦, 宮崎隆. EDSurface を応用した歯科チタンインプラントウサギ大腿骨への埋入. (第 23 回歯科チタン学会学術講演会, 東京, 2010 年 2 月 13, 14 日)
- ⑧ 片岡有, 李元植, 杉山和孝, 藤野茂, 堀田康弘, 玉置幸道, 宮崎隆, 立川哲彦. EDSurface を応用した歯科チタンインプラントの開発と臨床経過. (第 23 回歯科チタン学会学術講演会, 東京, 2010 年 2 月 13, 14 日)
- ⑨ 阿多史雄, 八巻幸一, 片岡有, 柴田陽, 宮崎隆.  $\beta$ -tricalcium phosphate/collagen 複合体 によるラット頭蓋骨欠損部の骨形成評価. (第 29 回昭和歯学会総会, 2009 年 12 月 5 日)
- ⑩ Kataoka Yu, Tamaki Yukimichi, Ata Fumio, Shimizu Yu. Original ointment mixed with lactoferrin having anti-inflammatory activity *in vivo*. (国際ラクトフェリン会議, 北京, 2009 年 10 月 19 日)
- ⑪ Fumio Ata, Yu Kataoka, Koichi Yamaki, YoShibata, Yukimichi Tamaki, Takashi Miyazaki A combination of colloidal  $\beta$ -TCP

with collagen could improve bone regeneration (The 18th EAO Monaco Annual Congress 1~3 October 2009)

- ⑫ F. Otsuka , Y. Kataoka , W. S. Lee , K.Sugiyama , T.Miyazaki .Cell behavior on different rough surfaces of titanium by Wire-type electrical discharge machining (The 18th EAO Monaco Annual Congress 1~3 October 2009)
- ⑬ 大塚福長, 八巻幸一, 片岡有, 柴田陽, 宮崎隆ワイヤ放電加工チタン表面の細胞増殖への影響(第39回日本口腔インプラント学会総会・学術大会, 大阪, 2009年9月25日~27日)
- ⑭ 片岡有, 大塚福長, 李元植, 磯邊友秀, 阿多史雄, 柴田陽, 玉置幸道, 上條竜太郎, 立川哲彦, 宮崎隆 .PAS(Plasma Activated Sintering)によるチタン粉末焼結体の試作(第9報) 外科用多孔質チタンシートの生体親和性 (第53回日本歯科理工学会学術講演会, 船堀, 2009年4月11日12日)
- ⑮ 李元植, 片岡有, 大塚福長, 阿多史雄, 玉置幸道, 宮崎隆, 上條竜太郎 . PAS(Plasma Activated Sintering)によるチタン粉末焼結体の試作(第8報) 外科用多孔質チタンシートの製作と機械的特性 (第53回日本歯科理工学会学術講演会, 船堀, 2009年4月11日12日)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

片岡 有(KATAOKA YU)  
昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号:90527300