

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11646

研究課題名（和文）インプラント治療に抗酸化治療の併用をめざした基礎的研究

研究課題名（英文）Induction of novel antioxidant capability on titanium implant

研究代表者

上野 剛史（Ueno, Takeshi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：30359674

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）：生体材料表面と細胞の関係において、細胞内の活性酸素種（ROS）という観点から、その親和性を評価した研究はみあたらない。本研究では、チタンインプラントの生体親和性を、ROSから評価することを第一の目的とした。その結果、通常のチタン（インプラント）上に培養した細胞内からもROSが発生することが示された。このROSが過剰に発生すると酸化ストレスとなって骨形成能を低下させるため、より細胞にストレスのかからないチタン処理方法の開発が求められる。チタン表面は化学的分析をすると、多くの有機物による汚れが認められる。本研究はこの有機物を除去することにより、よりチタンの生体親和性が高くなることも証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チタンは元々生体親和性の高い材料であることが知られているが、実際の骨-チタン接触率は、長期の治療時間を待っても30-60%程度であることが報告されており、この生体の反応に幅があることについての要因を提示した研究は少ない。本研究はまずチタンの生体親和性の新しい評価方法を提案した。加えて、チタン表面の有機物を除去することにより、骨芽細胞内の活性酸素種の発生が低下することを示し、骨形成能が増加することを示した。この結果は、インプラント表面の性能を、現状よりも向上させられる可能性があることを示唆しており、今後他の物理化学的因子を検討することで、表面処理方法の最適化への発展に寄与できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Regarding the relationship between the surface of biomaterials and cells, there are few studies that have evaluated the affinity of intracellular reactive oxygen species (ROS). The primary purpose of this study was to evaluate the biocompatibility of titanium implants from ROS. As a result, it was shown that ROS was also generated in the cells cultured on ordinary titanium implant. If this ROS is excessively generated, it becomes an oxidative stress and reduces the bone formation ability, so it is necessary to develop a titanium treatment method that is less stressful to cells. Past chemical analysis of the titanium surface revealed that many organic molecules were detected from implant surfaces. The present study also proved that the removal of this organic substance made titanium more biocompatible.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント 活性酸素種 酸化ストレス 抗酸化 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラント治療が補綴治療の選択肢の1つとして当然ととらえられるようになった現在においても、治療成功の指標の1つとなりえるインプラント-骨接触率は、動物モデルにおいても約30%から、高くても約70%程度であることが報告されている。骨接触率が理想的な100%に到達しないということは、インプラント材料が生体にとって最適な状態ではないという可能性を示唆しており、この点は基礎的なインプラント研究が未だに盛んに行われている理由の1つになっているといえる。

紫外線照射されたインプラント(以下、UVインプラント)の高い骨伝導能は、これまでに数編の学術論文誌に報告されており、申請者もその一人として研究を行っている。紫外線照射の効果として、チタン表面の親水性を高め、炭化水素の化学的汚染を分解することによって、骨芽細胞にとって機能を発現しやすい足場を提供し、これによりインプラント周囲の骨形成を促進するということが、細胞実験および動物実験により示されてきた。これをふまえて、研究着想にいたった背景を以下に述べる。インプラント治療、組織再生医療には、必然的に外科的処置をとまなう。そしてその刺激により、細胞内に活性酸素種(ROS)が発生することが知られている。この活性酸素種は、生命維持に不可欠なものである一方、外科処置や生体材料などの侵襲により、細胞内の抗酸化システムの閾値を越えると、生体の炎症反応を誘発し、酸化ストレスとして、細胞機能抑制や細胞膜破壊を引き起こすことが報告されている。細胞の基本的機能が酸化損傷によって妨げられることにより、インプラント周囲の骨形成の抑制、または創傷治癒の遅延が引き起こされる可能性がある。従って、UVインプラントにおける細胞内ROSが減少していることが示されれば、細胞内抗酸化物質の消費も抑えられるため、炎症時においても細胞への酸化損傷が軽減されることを意味する。同時に、インプラント表面の細胞機能のメカニズムにおいて、ROSが非常に重要な役割をもつことの証明に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

最近、酸化ストレスによる炎症と生体材料との関連が注目されている。本研究は、紫外線照射処理をしたチタンの抗酸化能力を評価することを目的とした。酸化ストレスの原因である活性酸素種は、細胞接着や細胞骨格形成時に発生することが知られており、これらに影響を与えるチタン表面における炭素付着などの物理化学的特性が変化(最適化)すれば、細胞内活性酸素量を減少させることが可能になると考えられる。インプラント治療では、外科的侵襲による活性酸素種の過剰発生を伴う炎症の誘発が避けられない。インプラントが抗酸化能をもつとすると、細胞機能への活性酸素種の侵害を抑制することが可能となり、治癒や骨形成の促進が期待される。この生物学的エビデンスを提示することは、生体材料研究の推進に重要な意味をもつと考えられる。

## 3. 研究の方法

まず、チタン表面に培養した細胞における酸化ストレスの評価と、実験的に付与した酸化ストレスが細胞におよぼす影響を評価した。チタンの表面形状は、機械研磨のものと酸処理したマイクロトポグラフィーを有するものの2種類を使用した。細胞内ROSの評価にはDCFDAを用いてROSを蛍光標識し、共晶点レーザー蛍光顕微鏡を用いて、画像データを収集した。同時に、マイクロプレートリーダーにより、蛍光強度を算出し、定量的な評価も行った。

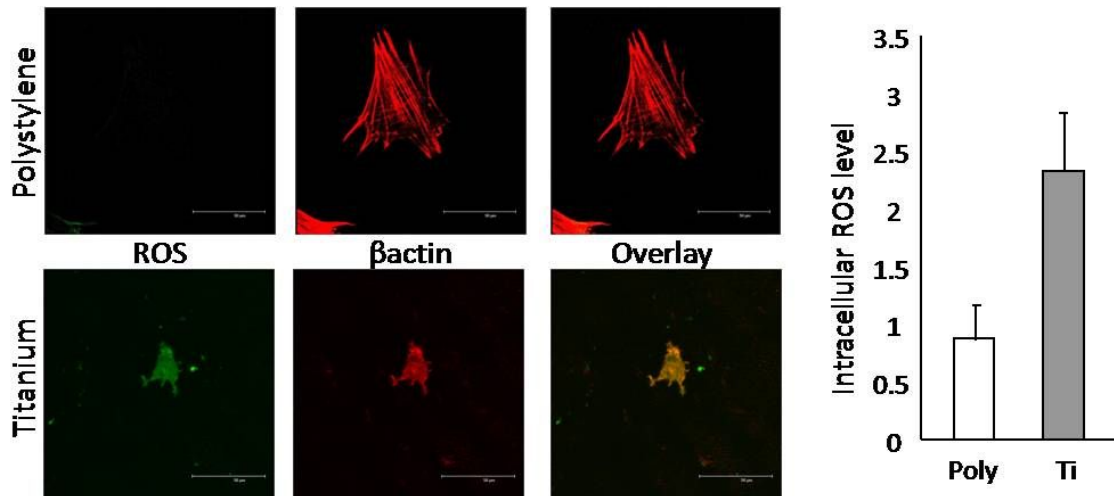
次段階として、細胞内ROSの評価に加え、酸化ストレスによるDNA損傷を、80HdG染色により評価し、また発生したROSがアポトーシスを誘導するものか否か、フローサイトメトリー法を用

いて評価する。さらに炎症性反応のマーカーとして、炎症性サイトカインの定量を行った。また実際の紫外線処理チタンの抗酸化能力に関しては、生体内で主要な抗酸化物質であるグルタチオン量の測定を行った。その際は、細胞内の総グルタチオン量と、酸化型グルタチオンであるGSSGを定量することで、抗酸化能を評価した。最終段階として、実際の臨床における炎症状態を、活性酸素を作用させることで実験的にシミュレートし、紫外線照射処理を行ったチタンと未処理のチタンにおける細胞の反応を評価した。

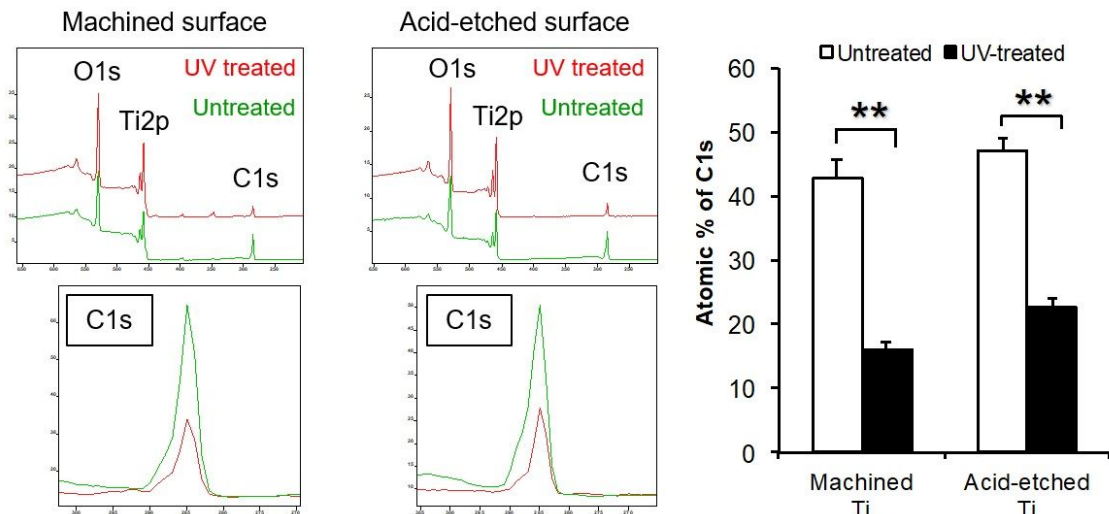
#### 4. 研究成果

まず、通常のポリスチレンディッシュとチタン上の細胞内活性酸素種（ROS）の評価を行った結果、ポリスチレンディッシュ状に培養した骨芽細胞からはROSがほとんど検出されなかったのに対し、チタン上（酸処理表面）の細胞から多くのROSが検出された（図1）。チタンは高い生体親和性を有することが知られているが、このように、細胞の接着や伸展を阻害すると考えられるROSが発生することが示された。このROSを制御することが可能になれば、インプラント表面により高い親和性を与えられる可能性が生じると考えられた。

【図1】



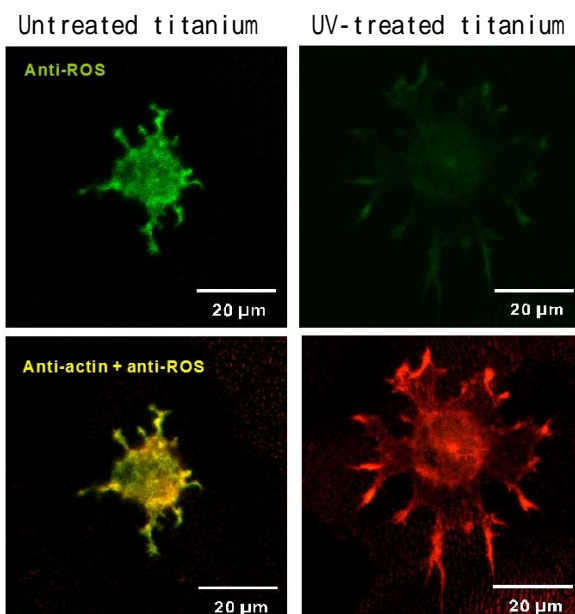
【図2】



チタンインプラントの表面の元素分析をすると、さまざまな不純物が検出されることが知られているが、その中でも最も多くの割合を占めるのが炭素である。過去の報告によれば、表面元素の75%が炭素であったというインプラントもあり、こうなると、チタンと骨が結合するというオッセオインテグレーションの前提が覆される可能性が生じると考えられる。そこで本研究では、この炭素を除去することにより、インプラント表面の骨芽細胞親和性が向上すると仮説を立て、紫外線照射による炭素の除去を行った。これは、光触媒効果と、短い波長による直接的な有機物除去に期待するものである。その結果、図2のように、明らかな炭素の減少を認めることができた。

通常チタンと紫外線照射したチタンで、培養した細胞内 ROS の発生レベルを比較した結果、図3のように、紫外線照射チタンで細胞内 ROS の発生が40-50%まで抑えられることが示された。

【図3】



従来のチタンでは緑色の活性酸素種が多く検出されたが、紫外線処理チタンではほとんど検出されず、同時に赤色の細胞骨格もよく広がっていることがわかる。このことは、細胞内の ROS が、細胞の増殖および伸展といった基本的な機能に強く関与していることを示唆するものであると考えられる。これをふまえて、細胞のアポトーシスレベルも比較したところ、有意な差は認められなかった。つまり検出された ROS は、細胞死を誘導するほどのレベルではないが、細胞の機能を抑制する可能性があるということが示された。

この他の結果として、活性酸素種による DNA の損傷レベルも約 50%減少した。また、抗酸化物質であるグルタチオンの総量には差がないものの、酸化型グルタチオン量は約 40%減少し、紫外線照射したチタン上の細胞には抗酸化能が多く残存することが示された。さらに、炎症反応のマーカである炎症性サイトカイン量も、紫外線照射チタンで有意に減少し、紫外線照射チタンが抗炎症効果をもつことが証明された。

本研究で用いたインプラントに特定の紫外線を照射する技術は、比較的簡便に達成できる技術であり、薬剤などを使わずに、インプラントそのものに抗酸化作用をもたせるという点で、臨床応用も容易である。インプラント手術などの外科処置には必ず生体に炎症反応が生じる。抗炎症効果をもつインプラントであれば、術後の早期で、良好な治癒を促し、成功率の高い治療が期待できると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihara Chie, Ueno Takeshi, Chen Peng, Tsutsumi Yusuke, Hanawa Takao, Wakabayashi Noriyuki	4. 巻 106
2. 論文標題 Inverse response of osteoblasts and fibroblasts to growth on carbon-deposited titanium surfaces	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 1869 ~ 1877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm.b.33996	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Akimoto T, Ueno T, Tsutsumi Y, Doi H, Hanawa T, Wakabayashi N	4. 巻 106
2. 論文標題 Evaluation of corrosion resistance of implant-use Ti-Zr binary alloys with a range of compositions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Materials Research part B Applied Biomaterials	6. 最初と最後の頁 73-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10 1002/jbm.b.33811.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno T, Ikeda T, Tsukimura N, Ishijima M, Minamikawa H, Sugita Y, Yamada M, Wakabayashi N, Ogawa T	4. 巻 108
2. 論文標題 Novel antioxidant capability of titanium induced by UV light treatment	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 177-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2016.08.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lee T, Ueno T, Nomura N, Wakabayashi N, Hanawa T	4. 巻 31
2. 論文標題 Titanium-Zirconium Binary Alloy as Dental Implant Material: Analysis of the Influence of Compositional Change on Mechanical Properties and in vitro Biological Response	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Maxillofacial Implants	6. 最初と最後の頁 547-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11607/jomi.4349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tianbo Tan, Takeshi Ueno, Yuki Arai, Keigo Isoshima, Hiroki Saito, Yusuke Tsutsumi, Hisashi Doi, Takao Hanawa, Noriyuki Wakabayashi.
2. 発表標題 Surface characterization and bioactivity of Ti-Zr alloy with compositional change.
3. 学会等名 The 96th general session & exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keigo Isoshima, Takeshi Ueno, Yuki Arai, Hiroki Saito, Tianbo Tan, Peng Chen, Yusuke Tsutsumi, Takao Hanawa, Noriyuki Wakabayashi.
2. 発表標題 Increased extracellular proteins adsorption on electropositive titanium surfaces.
3. 学会等名 The 96th general session & exhibition of the IADR (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Ueno, Noriyuki Wakabayashi, Takahiro Ogawa
2. 発表標題 UV pretreatment of titanium decreases intracellular ROS production in osteoblasts
3. 学会等名 The 7th international conference on mechanics of biomaterials and tissues (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Isoshima Keigo, Ueno Takeshi, Hiroki Saito, Tsutsumi Yusuke, Peng Chen, Hisashi Doi, Hanawa Takao, Wakabayashi Noriyuki
2. 発表標題 Increased cellular attachment on electropositive titanium surfaces
3. 学会等名 The 7th international conference on mechanics of biomaterials and tissues (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroki Saito, Takeshi Ueno, Keigo Isoshima, Yuki Arai, Peng Chen, Yusuke Toyoshima, Takao Hanawa, Noriyuki Wakabayashi
2. 発表標題 The change of surface charge by lithium ion coating increases osteoblastic cell activity on titanium
3. 学会等名 The 8th international conference on mechanics of biomaterials and tissues (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----