

平成 30 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20529

研究課題名(和文)新規開発したハイドロキシアパタイト薄膜処理によるインプラント治療適応拡大への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to the expansion of the adaptation cases with the implant treatment by Chemical Treatment Process by using calcium phosphate slurry that we originally developed

研究代表者

伊藤 達郎(Ito, Tatsuro)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：70750933

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文): 今回の研究では、チタン製のネジをインプラントと見立て、このネジにスラリー埋没加熱処理法という材料表面にハイドロキシアパタイト(骨と同じ成分)を付着させる処理を施した。このように表面処理したネジと処理していないネジを、先天的に糖尿病を患っているラットの顎骨に埋め込み、ネジ周囲に新しくできた骨の観察を行った。

その結果、1週、4週後ともにネジ周囲に新生骨ができていたが、1週後において処理したネジ周囲の骨は細胞間がより緊密であった。4週後においては両者ともに緊密な新生骨が形成されていたが、処理したネジ周囲の新生骨は元の骨とより強固に結合しており、スクリューがより強く骨と結合している可能性が示された。

研究成果の概要(英文): In this study, I diagnosed screws made by titanium as an implant body and put processing to attach hydroxyapatite (ingredient same as a bone) to the these screws surface called Chemical treatment process by using calcium phosphate slurry. I implanted the surface treated screw and not treated screw in the rat jaw bone which suffered from diabetes inherently, and observed the newly formed bone around the implanted screws.

As a result, at 1 week after surgery, newly bone was observed around both types of screws. Although, more close adherence to adjoining osteocyte was occurred around surface treated screw than not treated. At 4 weeks, close adherence to adjoining osteocyte was observed around both of screws, but newly bone around surface treated screw was bonding to existing jaw bone more closely and newly bone around not treated peeled off the existing bone. So it was suggested that the Chemical treatment process was effective for osseointegration on the bone that contracts a diabetes.

研究分野：生体材料

キーワード：スラリー埋没加熱処理法 インプラント ハイドロキシアパタイト 糖尿病

1. 研究開始当初の背景

現在のインプラント治療は健常者において高い成功率を収めており、歯科治療の一環として広く普及するようになった。一方、糖尿病患者は現在 270 万人に達しており、その患者数は年々増加傾向を示している。そのため、インプラント治療を希望するが糖尿病を合併しているケースが実際にあり、また、今までに治療を受けた健常者が今後、糖尿病に罹患するというケースも考えられる。しかし、糖尿病によるインスリン欠乏や高血糖状態は骨芽細胞の機能障害を引き起こし、骨の治癒やオッセオインテグレーションが得にくいいため、その予後は健常者に比較し劣るとされている。そのため、インプラント治療を希望したとしてもその選択肢として適応できないケースも少なくない。

一方、ハイドロキシアパタイト (HAp) により表面処理したインプラント自体は、臨床で使用されており良好な成績も報告されている。しかし、その一方でコーティング操作が煩雑であること、膜自体が厚いため埋入時や埋入後に剥がれたり、溶解するといった問題も報告されている。

そこで代表研究者は Ti 表面に HAp の薄膜を簡便な方法で形成できるスラリー埋没加熱処理法という表面処理法に着目した。これは、図 1 に示すように、試料をリン酸カルシウムが含まれたスラリー内に埋没し、大気圧中 973K、2 時間熱処理する方法で、以下の特長を持つため先述した問題を解決しようと考えた。

(1) スラリー埋没加熱処理法の特長

・ナノレベルのハイドロキシアパタイト薄膜形成ができる

- ・処理方法が簡便である
- ・設備や材料などの処理コストが安価である
- ・処理に特別な技術を要さない
- ・処理時間が短い
- ・表面処理する基材の形態を問わない

実際、代表研究者はこれまでにこの処理法で表面処理したチタン周囲において、早期に骨が形成されること、また、骨関連タンパクや遺伝子の計測においても有意に高い発現を認めため、骨髄細胞から骨芽細胞への分化を促進することを明らかにした。

一方、インスリンの骨における標的細胞は骨芽細胞であり、受容体を介して骨芽細胞の増殖・分化を促進する。したがって、糖尿病によるインスリン欠乏や高血糖状態は、骨芽細胞の機能や数を減少させ、低回転型の骨代謝を招き、骨の治癒やオッセオインテグレーションにとって高いリスクとなる。しかし、スラリー処理したインプラント体は骨芽細胞の分化を促進するため糖尿病により低下した骨芽細胞の機能を回復し、良好なオッセオインテグレーションが獲得されるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

糖尿病ラットを実験動物として用いて、スラリー埋没加熱処理法を行ったチタンインプラントを顎骨内に埋入しインプラント周囲での骨形成を、表面処理を行っていない群と比較検討し、本処理法の有効性を明らかにする。また、免疫染色により、形成された骨の改造についても詳細に検討する。

以上により、代表研究者は本研究において、簡便かつ低コストでハイドロキシアパタイトの表面処理ができるスラリー埋没加熱処理法により表面処理したチタンを糖尿病ラットの顎骨に埋入し、骨との結合における有効性を検討し、骨代謝の低下した有病者や高齢者への安全・確実なインプラント治療の適応拡大に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と材料

実験動物には糖尿病モデルラットとして、4 週齢の 2 型糖尿病モデルの雄性 Wistar ラットである Goto-Kakizaki ラット (以下、GK ラット) を用いた。(平均体重 74 グラム、血糖値 243mg/dL) 31 匹

埋入材料としてのインプラント体は、直径 1.7mm、長さ 3mm、純度 99.9% のチタンスクリューを用いた。

(2) スラリー埋没加熱処理

チタンスクリューを図 1 に示すようにリン酸カルシウムが含まれたスラリー内に埋没し、大気圧中 973K、2 時間熱処理 (スラリー処理 Ti) し、コントロール群としてスラリーに埋没せずに同条件で熱処理のみ施したチタンスクリュー (熱処理 Ti) を用いた。表面処理後、表面を超音波洗浄し、光学顕微鏡にて表面を観察したのち、オートクレーブ滅菌を施した。

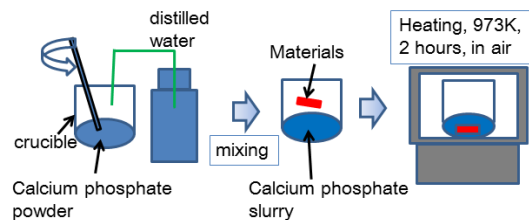


図 1. スラリー埋没加熱処理法

(3) 埋入実験

GK ラットの左側上顎第一臼歯を抜歯後、スラリー埋没加熱処理したチタンスクリューもしくは熱処理のみのチタンスクリューを図 2 のように抜歯窩に即時埋入を行った。

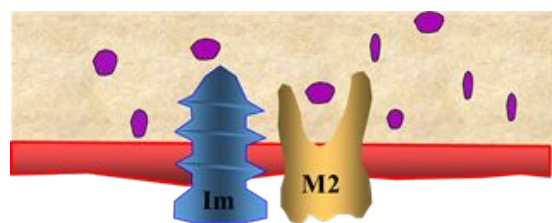


図 2. チタンスクリュー埋入

埋入後、1 週および 4 週後にサンプリングし、20%EDTA (pH 7.4) にて脱灰後、矢状面でスクリュー周囲を切断してスクリューを取り出し、パラフィン包埋した。パラフィン標本はスクリューの埋入方向に対して矢状面および水平面で薄切し H.E. 染色を施し、スクリュー周囲の骨組織および上皮組織の形態学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) 体重および血糖値の変化

GK ラットの血糖値および体重の推移は図 3 (左：体重変化、右：血糖値変化) に示す。体重は経時的に増加しており、血糖値は 300mg/dL 前後で高血糖状態を維持していた。

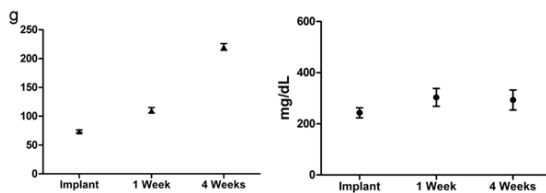


図 3. 体重および血糖値

(2) チタンスクリューの表面観察

スラリー埋没加熱処理法によりスクリュー表面にスラリー処理されたことは視認にて色の変化で確認された。また、熱処理のみのスクリューも同様に処理なされたことが視認できた。しかし、図 4 の通り顕微鏡にて観察したところ、973K による加熱処理によりスラリー処理、熱処理のみのスクリューともに先端部が少しなめられているのが確認された。



図 4. スクリューの顕微鏡像 (左から未処理チタン、熱処理 Ti、スラリー処理 Ti)

(3) 埋入成功率

今回、埋入実験において抜歯窩にスクリューを埋入できず、抜歯のみで終了した GK ラット (7 匹) や埋入はできたがサンプリング時点でスクリューが顎骨から脱落している GK ラット (9 匹) が発生した。これは全体の約半数に当たる。これまで、当教室では健全ラットに未処理のスクリューを埋入する研究を行っており、埋入において問題は生じなかった。しかし、今回、973K で加熱したスクリューは埋入時にうまくネジが骨にかみこまず、また熱処理のみの影響なのかを確認するため、未処理のチタンスクリューを GK ラットに埋入してみたが、熱処理ほど埋入は困難ではなかったが、やはり健全ラットに比べるとネジを骨に噛ませるのが難しかった。今回の研究においては、条件をそろえるために

加熱後にネジに特に加工は施さなかった。しかし、今回の結果を踏まえると、熱処理によるスクリュー先端部が鈍化したこと、また、GK ラットの骨質がもろいことが埋入失敗につながった可能性が大きく、ネジ頭の形態についても今後検討していくべき課題を考えられる。また、

(4) 組織学的所見

前述した通り、今回の研究においては埋入できなかったラットが発生したために、十分なサンプル数を確保できなかった。そのため本実験ではサンプリングできたラットはすべて脱灰標本とし、HE 染色を施した。その結果、1 週および 4 週後ともに新生骨は観察された (図 5, 6. A~D)。

1 週間においては、細胞成分の多い幼弱な骨組織が観察されたが、スラリー処理 Ti 周囲の骨は骨細胞間が緊密であるのに対し熱処理 Ti 周囲では骨細胞同士が剥がれているのが確認された (図 5. A,B)。また、熱処理 Ti では新生骨の細胞成分がより多く認められたので、スラリー処理 Ti のほうが骨の成熟が進んでいることが確認された (図 6. A,B)。

4 週間においては両者ともに周囲に新生骨が形成されており、骨細胞同士も緊密に接しているのが観察された (図 5. C,D)。しかし、スラリー処理 Ti 周囲の新生骨は既存骨とより緊密に結合しており埋入したスクリューがより強固に骨と結合しているのが確認された。また、形成された新生骨の厚みもスラリー処理 Ti 周囲でより厚いことが認められた (図 5. C,D および図 6. C,D)。

黒矢印がインプラント体 (図 5, 6 中 Im と表記) と接している面で、赤矢印が既存骨と接している面 (図 5) になる。その厚みを観察すると 1 週のスラリー処理 Ti で一番薄く、4 週のスラリー処理 Ti が一番厚かった。しかし、先述した通り、図 6 において 1 週のスラリー処理 Ti は 1 週のスラリー処理 Ti 周囲の新生骨より幼弱な骨であるため、スラリー処理 Ti 周囲では骨のリモデリングが起こり始め、そのために骨幅が薄くなっている可能性が考えられる。今後、骨の成熟度を確認するためサンプル数を当初の計画通りに確保し、ALP 活性などの免疫染色をしていく必要がある。

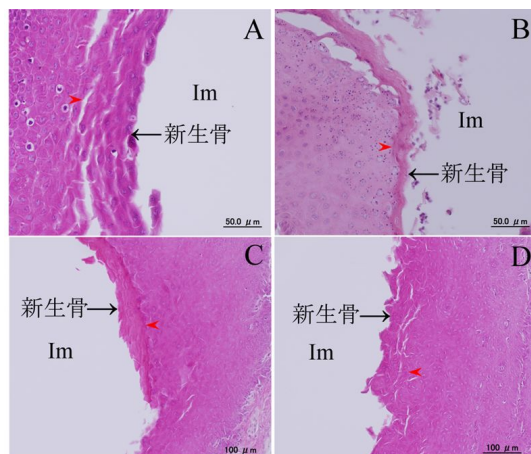


図5．光学顕微鏡像（スクリュー長径に対し水平面断、H.E染色）

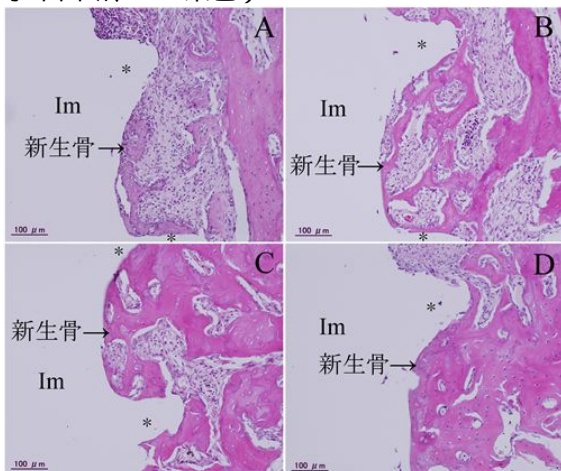


図6．光学顕微鏡像（スクリュー長径に対し矢状面断、H.E染色）(*：スクリューのスレッド)

- A: 1週後熱処理 Ti
- B: 1週後スラリー処理 Ti
- C: 4週後熱処理 Ti
- D: 4週後スラリー処理 Ti

本研究において、新生骨の骨質はスラリー処理 Ti のほうが熱処理 Ti より良好であることが観察され、スラリー埋没加熱処理法は GK ラットのよう糖尿病を患っているラットにおいても有効に働く可能性が示唆された。これは、糖尿病状態の患者さんに対してのインプラント治療の確立への第1歩となる。しかし、いずれの標本においても、新生骨だけでなく既存骨自体が健全ラットに比べ、細胞間に隙間のある脆弱な骨であることが観察された。これは先にも述べたが、糖尿病により骨代謝が低下していることに起因していると考えられる。

今後は、骨-インプラント体接触率や新生骨量を組織定量学的に比較検討するとともに引き抜き試験を加えることで糖尿病状態の骨質が悪い状態でもオッセオインテグレーションが獲得できるかを確認する必要がある。また、健全ラットのデータと比較することでその獲得したオッセオインテグレーションが臨床的に問題ない数値であるかどうかを検討していく必要があり、糖尿病治療と併用することでオッセオインテグレーションの獲得がどの程度向上するかも検討することで糖尿病患者さんへのインプラント治療はより確実性の増す治療として確立できると考えている。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

- ① 伊藤達郎 ,加我公行 ,平田恵理 ,山本悟 ,

小松原浩実,横山敦郎,スラリー埋没加熱処理法によるチタン表面処理が骨髄細胞の動態に及ぼす影響,第36回日本口腔インプラント学会東北・北海道支部大会,2016年7月2日~2016年7月3日,アイーナいわて県民情報交流センター(盛岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 (計0件)

6．研究組織

(1)研究代表者

伊藤 達郎 (ITO TATSURO)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：70750933

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

横山 敦郎 (YOKOYAMA ATSURO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：20210627

高田 紗理 (TAKADA SARI)
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生

前田 由佳里 (MAEDA YUKARI)
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生