

令和 2 年 8 月 17 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11790

研究課題名（和文）ジルコニアインプラントの新規表面改質とオッセオインテグレーション獲得過程の解析

研究課題名（英文）Novel surface modification method for zirconia implant materials and the process of osseointegration

研究代表者

田辺 俊一郎（TANABE, Toshiichiro）

朝日大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60227197

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：インプラント材料に炭酸カルシウムを用いてコーティングを行うことを試みた。ペー  
スト状にした炭酸Caで試料を包埋し電気炉内で焼成して得たカルシウムコーティング試料を用いて、ヒト骨髄由  
来間葉系幹細胞（hBMSC）を培養したところ900℃で焼成した試料ではhBMSCのALP活性が上昇した。また、同様に  
培養したhBMSCの核抽出物ではHDAC活性が顕著に上昇し、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤の添加によりALP  
活性上昇がみられなくなった。以上のことから、カルシウムコーティングはhBMSCの何らかの因子を刺激し、DNA  
メチル化が調節されてALP活性等、骨芽細胞様への分化が促進される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会となったわが国では歯の喪失に対し今後ますますインプラント治療の需要が増加すると予測される。  
インプラント治療は咬合を回復する選択肢として機能面だけでなく審美面でも優れており、国民のQOL維持に大  
きく貢献している。本研究では新たなカルシウムコーティングを施したインプラント体界面の生体反応に関わ  
る因子を探索した。そして、カルシウムコーティングが培養骨髄由来幹細胞のDNAメチル化等のエピジェネティ  
ックな因子に関与することが示唆され、本研究で示した焼成によるカルシウムコーティングが簡便で有効なイン  
プラント材料の表面改質の一手法であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Zr and Ti dental implant materials have been coated with calcium carbonate.  
The sample was embedded in Ca carbonate made into a paste and sintered in an electric furnace. The  
obtained calcium-coated sample was used to culture human bone marrow-derived mesenchymal stem cells  
(hBMSCs). As a result, the ALP activity of hBMSC increased on the calcium-coated samples sintered at  
900℃. In addition, HDAC activity was markedly increased in the nuclear extract of hBMSC cultured  
in the same manner, and the ALP activity was not increased by the addition of the DNA  
methyltransferase inhibitor. From the above, it was suggested that calcium coating stimulates some  
factors of hBMSC, regulates DNA methylation, and promotes osteoblast-like differentiation such as  
ALP activity.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：カルシウム修飾 電気炉焼成 チタン ジルコニア オッセオインテグレーション 幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯科領域では歯の喪失に対する咬合回復治療としてインプラントを用いた補綴治療の需要が増加しており、今日では補綴治療の一選択肢として確立している。これまで、インプラント治療を成功させ、より早期にオッセオインテグレーションを獲得するため、チタン製インプラント体にハイドロキシアパタイト (HA) コーティング等の様々な加工が施されたり、紫外線を照射する光機能化等の表面改質が行われているが、オッセオインテグレーション獲得過程の生体組織の応答についての十分な知見が得られていない。また、近年ではより審美性の高いジルコニアが注目されるようになり、インプラント体の材料および、それぞれに対する様々な表面改質法の研究が多数なされているが、いずれの材料、方法が最適なのか不明な点は多い。

このような背景のもと、我々はチタンの細胞親和性向上を目指して HA コーティングやエキシマランプを用いた真空紫外光 (VUV, 172 nm) 照射の効果について解析を行ってきた。

一方、近年では金属が歯肉に触れることで引き起こされる歯肉の黒変や経年によるインプラント体の露出による審美障害の問題に対応すべく、ジルコニアがインプラント材料として注目されている。そこで我々は、チタンに代わる材料として強度に優れ低温劣化等の問題の少ないセリア安定型ジルコニア (nanoZr) と、HA に代わる材料として、安価に入手可能な炭酸カルシウム (炭酸 Ca) に着目した。本研究では、炭酸 Ca の焼成温度を調節して酸化 Ca の生成量を制御したうえで、炭酸 Ca を nanoZr 表面への焼付コーティング材料として応用し、コーティング効果の評価、ならびに nanoZr 表面でのオッセオインテグレーション獲得過程に關与する因子の探索を行った。

### 2. 研究の目的

インプラント治療は年々需要が増加しており、より早期にオッセオインテグレーションが得られることが求められている。本研究は、我々の開発した炭酸カルシウムコーティング法にて、コストパフォーマンスに優れたインプラント体表面のカルシウム修飾を行い、ジルコニアおよび比較対照とするチタン材料へのオッセオインテグレーションの早期獲得条件を見出すとともに、インプラント材料に対する生体組織および培養細胞の応答を解析と、オッセオインテグレーション獲得過程で作用する因子の探索を目的とする。

### 3. 研究の方法

炭酸 Ca をチタンおよび nanoZr にコーティングし、その物性解析を以下の手順で行う。

#### 1. 炭酸 Ca コーティングチタンおよび nanoZr の作製と工学的解析

試薬の炭酸 Ca と超純水とを混合し、練和してインプラント材料を埋没し、炭酸 Ca が完全に分解されない温度 (850 以下) で、インプラント材料に焼付ける。温度および係留時間については数段階の温度を設定して条件を検討する。また、この操作によるインプラント体の劣化の有無についても物性解析を行い確認する。

コントロールのチタンや nanoZr 板は鏡面研磨群の他、粗さの異なるサンドペーパーで研磨したものを用意し、表面粗さが培養細胞や生体の反応におよぼす影響にも着目する。以上の試料の工学的特性を EPMA、形状測定レーザー顕微鏡、SEM 観察等により解析する。

さらに、試料を疑似体液 (SBF) に浸漬して、浸漬前後のイオン組成を解析し、試料へのアパタイト析出評価も行う。

#### 2. 1 で作製したチタンおよび nanoZr 板上での細胞動態の評価

1 で用意したチタン板、nanoZr 板上に、インプラントを埋入した際に関わってくるであろう細胞を想定して、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト破骨前駆細胞を播種し、それぞれの接着、増殖、分化動態について解析する。

また、増殖や分化の過程で、特に顕著な差のみられた細胞種、コーティング条件について精査し、その条件での RNA を調整して PCR アレイあるいはマイクロアレイ解析を行い、チタン基板上での細胞の増殖分化に関わるジェネティックな因子の探索も進めておく。さらに、分化過程での骨形成関連タンパク質についてもウエスタンブロット法等により解析する。

#### 3. 培養系および動物モデルでのオッセオインテグレーション関連因子の探索と解析

2 で得られた結果から hBMSC 培養系を用いてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) および DNA メチル化の關与について検討した。

### 4. 研究成果

チタンおよびジルコニア材料のカルシウムコーティング方法を検討するため、試薬炭酸カルシウムを蒸留水で練和しペースト状になるように稠度を調整し、焼成皿中に静置して直径 6mm、高さ 2-3mm に成形した JIS2 種チタン円板、nano ジルコニア円板を完全に包埋した。包埋塊は 24 時間放置後に電気炉内にて最大温度 700、800 度および 900 で焼成を行った。焼成終了後に焼成塊から試料を取り出し、アセトンで 15 分間超音波洗浄後、エタノール、蒸留水で各 15 分間超音波洗浄を行い乾燥したものを試験片とし、試験片の表面の元素分析を行った。また、焼成前後の炭酸カルシウムの X 線回折分析 (XRD) を行い、主成分の構造変化についても検討を加えた。その結果、炭酸カルシウムは 900 焼成後には分解により焼成前の炭酸カルシウムのピークは焼失して新たに酸化カルシウム (CaO) のピークが観察された。一方、700、800 では炭酸カルシウムの分解が認められなかった。さらに、900 焼成後のチタンおよび nano ジル

コニア表面には、表面マッピングからカルシウム の析出が確認された。しかし、800 以下で焼成した試験片上によるカルシウムは、検出限界以下であった。さらに、上記のカルシウムコーティング試料を用いて、試料上でヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMSC) を培養したところ 900 で焼成した試料では hBMSC の増殖が阻害され、細胞増殖に関しては低温で焼成した試料で良好であった。

続いて、同様の方法でジルコニア材料 (nanoZr) についてもカルシウムコーティングと培養系での評価を行ったところ、チタン nanoZr とともに 900 で焼成した試料では hBMSC の増殖が抑制されたが ALP 活性染色では濃染された。また、hGEC や hGFB の増殖では有意な抑制はみられなかった。一方で 700 で焼成した試料では 3 種の細胞の増殖が促進された。また、これらの細胞を回収して RNA を抽出し、骨分化マーカー遺伝子の発現量を、リアルタイム PCR 法で検討したところ、Runx2、osterix、osteocalin の発現上昇が顕著であった。以上の結果から、カルシウムコーティングによる顕著な増殖阻害はみられず、細胞毒性や為害性のないコーティング法であることが示唆された。とくに 900 で焼成した試料上で培養した hBMSC でアルカリホスファターゼ活性の上昇と、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の mRNA 発現上昇がみとめられたことから、900 焼成試料を中心にエピジェネティック因子の解析を試みた。

まず、900 焼成カルシウムコーティングチタンと未処理のチタン上で培養した hBMSC より核抽出物を調整してヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 活性を測定した。その結果、カルシウムコーティング群で HDAC 活性が顕著に上昇していた。同様に培養した細胞での DNA メチル化との関連を評価するため、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤を添加して培養したところ、900 焼成カルシウムコーティング群での ALP 活性上昇がみられなくなった。以上のことから、カルシウムコーティング上で hBMSC を培養することにより、何らかの因子が刺激され、DNA メチル化が調節されて ALP 活性等、骨芽細胞様への分化が促進される可能性が示され、焼成によるカルシウムコーティングが簡便で有効なインプラント材料の表面改質の一手法であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永原國央, 小川 真, 内田聖也, 佐藤成実, 長谷川ユカ, 林 保利, 田辺俊一郎, 中本哲自
2. 発表標題 インプラント周囲炎の細菌学的因子解明のための細菌叢分析
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中由貴, 小島綾子, 大島亜希子, 川口千治, 長谷川ユカ, 田辺俊一郎, 永原國央, 中本哲自
2. 発表標題 インプラントメンテナンス継続中の患者来院状態と口腔衛生状態
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永原國央, 小川 真, 内田聖也, 佐藤成実, 長谷川ユカ, 林 保利, 田辺俊一郎, 中本哲自
2. 発表標題 インプラント周囲炎の細菌学的因子解明のための細菌叢分析
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中由貴, 小島綾子, 大島亜希子, 川口千治, 長谷川ユカ, 田辺俊一郎, 永原國央, 中本哲自
2. 発表標題 インプラントメンテナンス継続中の患者来院状態と口腔衛生状態
3. 学会等名 第49回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新谷耕平, 川木晴美, 永原櫻子, 近藤雄三, 田辺俊一郎, 永原國央, 玉置幸道, 近藤信夫
2. 発表標題 低級アルコールを用いたインプラント材料表面への水酸基導入の試み
3. 学会等名 第72回日本歯科理工学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 永原櫻子, 川木晴美, 新谷耕平, 近藤雄三, 田辺俊一郎, 永原國央, 玉置幸道, 近藤信夫
2. 発表標題 リン酸緩衝液に浸漬したインプラント材料へのヒト血清由来吸着タンパク質の解析
3. 学会等名 第72回日本歯科理工学会秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤 雄三, 長谷川 ユカ, 高橋 潤, 永原 櫻子, 野々垣 龍吾, 山田 尚子, 田辺 俊一郎, 永原 國央
2. 発表標題 上顎左側臼歯部において口蓋粘膜と上顎洞粘膜の癒着が認められた症例に上顎洞底挙上術を応用しインプラント治療を行った1症例
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川 ユカ, 近藤 雄三, 高橋 潤, 山田 尚子, 田辺 俊一郎, 上田 吉松, 林 徹, 永原 國央
2. 発表標題 インプラント周囲溝細菌叢のDNA解析
3. 学会等名 第48回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田尚子, 川木晴美, 近藤雄三, 高橋 潤, 片岡 有, 田辺俊一郎, 玉置幸道, 永原國央
2. 発表標題 カルシウムコーティングチタンの細胞親和性の検討
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤雄三, 野々垣龍吾, 岩島広明, 長谷川ユカ, 武田敦子, 上田吉松, 林 幸央, 田辺俊一郎
2. 発表標題 口腔インプラント治療中に金属アレルギーによる皮膚炎を発症した1症例
3. 学会等名 第47回日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

朝日大学歯学部口腔インプラント学分野ホームページ <a href="http://scw.asahi-u.ac.jp/~implant/index.html">http://scw.asahi-u.ac.jp/~implant/index.html</a>
---

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
研究分担者	高橋 潤  (TAKAHASHI Jun)  (20778138)	朝日大学・歯学部・ポスドクター   (33703)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 雄三 (KONDO Yuzo) (30778139)	朝日大学・歯学部・助教  (33703)	
研究分担者	近江 靖則 (OUMI Yasunori) (50313713)	岐阜大学・研究推進・社会連携機構・准教授  (13701)	
研究分担者	川木 晴美 (KAWAKI Harumi) (70513670)	朝日大学・歯学部・准教授  (33703)	
研究分担者	玉置 幸道 (TAMAKI Yukimichi) (80197566)	朝日大学・歯学部・教授  (33703)	