

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592301

研究課題名（和文） 迅速骨結合性と上皮歯肉付着性を有するインプラント表面処理法の開発

研究課題名（英文） Development of implant surface modification method for rapid osteoconductivity and gingival epithelial adhesiveness

研究代表者

中川 雅晴 (NAKAGAWA MASAHARU)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：80172279

研究成果の概要（和文）：インプラントの歯肉貫通部における上皮歯肉の付着性を検討するため、マウス由来の歯肉上皮細胞（GE1）を用い、初期接着および細胞増殖を調べた。塩化カルシウム水熱処理チタンは、未処理チタンと比較して、GE1細胞の初期接着が有意に高いという結果が得られた。また細胞増殖に関しては、未処理チタンの方が若干高い値を示したが、有意な差は認められなかった。したがって、塩化カルシウム水熱処理はチタンインプラントの歯肉貫通部において歯肉付着性を向上できることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Initial cell attachment and cell proliferation were examined by using gingival epithelial cell (GE1) of mouse origin to examine adhesiveness of epithelial cell of implant in gingival penetration part. As for the titanium treated by hydrothermally in calcium chloride solution, the result of initial attachment of GE1 cell was significantly high compared with untreated titanium. As for the cell proliferation, a significant difference was not admitted though the untreated titanium indicated some high values. Therefore, it was suggested that the hydrothermal treatment with CaCl₂ was able to improve the gingiva adhesiveness in the gingiva penetration part of the titanium implant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

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：チタン、インプラント、上皮歯肉付着性、骨結合性、表面改質処理

1. 研究開始当初の背景

チタン及びチタン合金は、生体親和性や骨組織との結合性が良好であることが知られており、医科及び歯科領域において、人工関節、人工歯根など多くのインプラント用材料として臨床に用いられている。最近のインプラントの多くは、骨結合性を向上させるためにサンドブラストや酸エッチング、陽極酸化処理など表面状態を粗造にする処理が行われている。また、骨伝導性を付与して、骨との直接結合を実現させ、骨との結合強度を向上させる表面処理が開発されている。しかしながら、これまでのインプラントの表面改質は、骨との結合強化を目的としたものがほとんどであり、軟組織への親和性を考慮したものはほとんど無い。特に、歯科用インプラントは、その一部が歯肉を貫通して口腔内に露出しているが、インプラント周囲上皮はインプラントとの物理的結合が弱いと細菌の侵入が生じやすく、歯周病（インプラント周囲炎）を発症して、インプラントの長期維持が困難となるケースが多くみられる。したがって歯肉上皮組織とインプラント体との確実な接着および付着上皮の形成は生物学的封鎖を達成するために重要である。現在、軟組織接着性を実現するためにフィブロネクチンやラミニン5などの接着性タンパクでチタンを表面修飾する方法が検討されている。しかしながら、これらの接着性タンパクは、チタン表面に長期間にわたって固定化することが困難であるため、一時的な接着効果しか期待できない。

2. 研究の目的

筆者らの研究によって、CaCl₂ 水熱処理を施したチタンインプラントは、優れた骨

伝導性を示し、骨への埋入早期から強い骨結合が得られることが明らかとなっている。本処理によってチタン表面には微量の Ca を含有する TiO₂ 皮膜が形成されており、この皮膜は非常に安定である。もし CaCl₂ 水熱処理を施したチタン表面と歯肉上皮細胞が良好な接着性を示せば、強固な骨結合だけでなく、歯肉付着性も得られるため、インプラント周囲炎の発症を防止し、長期間の安定したインプラントの維持が実現できると予想される。

3. 研究の方法

(1) 試料

試料は、JIS2 種の純チタン(99.5%、The Nilaco Co. Ltd., Tokyo, Japan)のディスク(直径 15mm φ、厚さ 1mm)を用いた。表面は#1500 の耐水研磨紙で研磨後、蒸留水とエチルアルコールで 15 分間、超音波洗浄を行った。水熱処理は、10 および 20mmol/L の塩化カルシウム水溶液を用い、ステンレスジャケット付きのテフロン製反応容器中で 200°C で 24 時間行った。比較のために、研磨のみの試料を用いた。細胞試験前の試料は、すべて蒸留水と 70% アルコールを用い、15 分間の超音波洗浄および滅菌を行った。

(2) 細胞培養

Gingival epithelial cell line GE1 細胞を実験に用いた。細胞は 1% fetal bovine serum (FBS, Biosource, Rockville, MD) および antibiotics (100IU/ml penicillin and 100µg/ml streptomycin, Gibco BRL, Carlsbad, CA) を添加した SFM-101 medium (Nissui, Tokyo, Japan) で継代培養した。培養は 5%CO₂ 雰囲気、37°C にて

行った。

(3) 細胞初期接着

基質の表面処理が歯肉上皮細胞の初期接着に与える影響を調べた。24穴プレートに入れた基質上に GE1 細胞を初期密度 50cells/mm² で播種し、培養を行った。培養開始から 0.5、1、2、5、7 時間後、基質を phosphate buffered saline (PBS, Nissui) で 1 度洗い、4% paraformaldehyde (PFA, Wako, Osaka, Japan) で固定した。その後、Hoechst33258(Dojindo, Kumamoto, Japan) で 15 分間染色を行った。Fluorescent microscope (TE300, Nikon, Tokyo, Japan) で 20 倍対物レンズを用いて、1 試料あたり 4 か所ずつ任意の場所を観察し、核数をカウントして比較した。

(4) 細胞増殖

基質の表面処理が歯肉上皮細胞の増殖能に与える影響を調べた。24穴プレートに入れた基質上に GE1 細胞を初期密度 50cells/mm² で播種し、24、48、72、96 時間の培養を行った。なお、2 日に 1 度、培養液を半量交換した。培養後、基質を PBS で 1 度洗い、新鮮培養液 500 μ l と交換した。これに alamarBlue 溶液 (AbD Serotec, Oxford, U.K.) 50 μ l を添加し、さらに 3 時間培養した。その後、培養液 150 μ l を採取した。96 穴プレートに入れ、プレートリーダー (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH GmbH, Germany) にて 540nm の吸光度を計測した。バックグラウンドとして 620nm 吸光度を計測し、540nm 吸光度より差し引いた値を比較した。

(5) 統計処理

初期接着細胞数、増殖細胞数の測定値に対し、各試料間の有意差検定は、すべて分散分析 (Fishes' sPLSD) にて行い、 $p < 0.05$ の場合に有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 接着細胞数の変化

培養 0.5、1、2、5、7 時間後それぞれにおける接着数の測定結果を Fig.1 に示す。2 時間までの培養で、塩化カルシウム水熱処理試料は、未処理試料に比較して細胞の初期接着数は高い値を示した。特に 20mmol/L CaCl₂ 水溶液中で水熱処理した試料上で、時間経過に伴い細胞数は最も高い値を示した。試料上の細胞数は培養 5、7 時間後では有意差はなかった。

CaCl₂水溶液で水熱処理を施したTi上の上皮細胞の初期接着数が高いことから、本水熱処理を施したチタンインプラントの歯肉貫通部における上皮歯肉接着性が良好であることが示唆され、細菌類の侵入によるインプラント周囲炎の発症を抑制することが期待される。

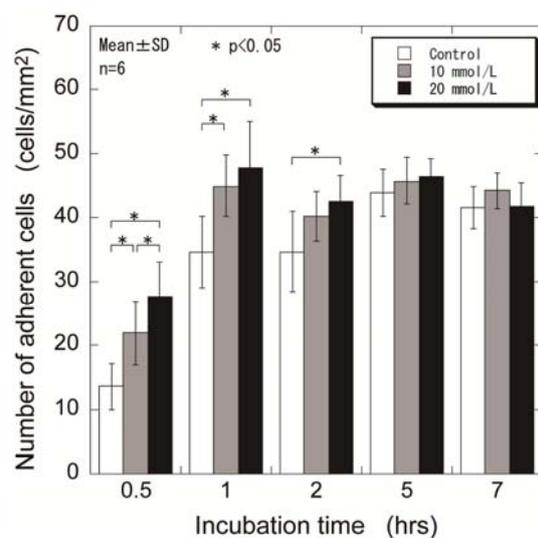


Fig.1 Hoechst 染色による初期細胞接着数

(2) 細胞の接着状態の観察

固定後の細胞を走査電子顕微鏡にて観察

した結果をFig.2に示す。0.5時間後、未処理試料上の細胞はほとんど伸展しておらず、円形を呈しているが、10および20mmol/L CaCl₂水溶液で水熱処理した試料上では、細胞の伸展が生じていた。

培養7時間後では、全ての試料上で細胞の伸展が認められた。

したがって、CaCl₂水熱処理は、歯肉上皮細胞の接着に有効であることが示唆された。

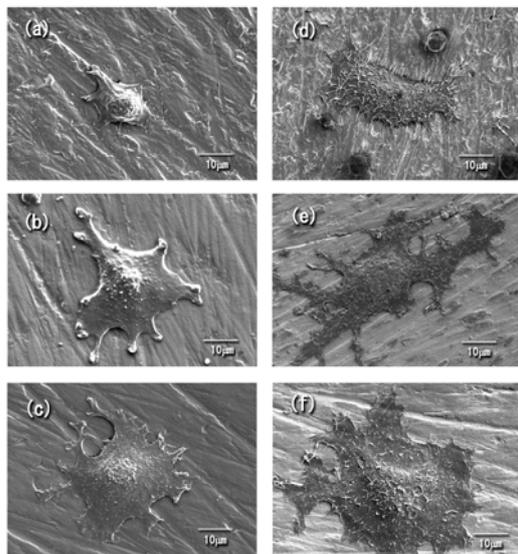


Fig 2. 上皮細胞のSEM観察像
(a)0.5h control, (b)0.5h 10mmol/L, (c)0.5h 20mmol/L
(d)1h control, (e)1h 10mmol/L, (f)1h 20mmol/L

(3) 増殖細胞数の変化

培養開始から24、48、72、96時間後の alamarBlue 溶液を用いた細胞増殖アッセイを行い、培養後の吸光度測定を行った結果をFig.3に示す。培養時間とともに細胞数は増加しており、未処理試料の値が最も高く、10および20mmol/Lの塩化カルシウム処理試料で有意差はなかった。

培養時間とともに細胞数が増加していることから、CaCl₂水熱処理は歯肉貫通部における上皮細胞の増殖に有効であることがわかる。

(4) 結論

以上の結果から、10~20mmol/L CaCl₂水溶液で200℃、24時間の水熱処理を施すことによって、チタンインプラントの歯肉貫通部における歯肉の封鎖性を向上できることが示唆された。

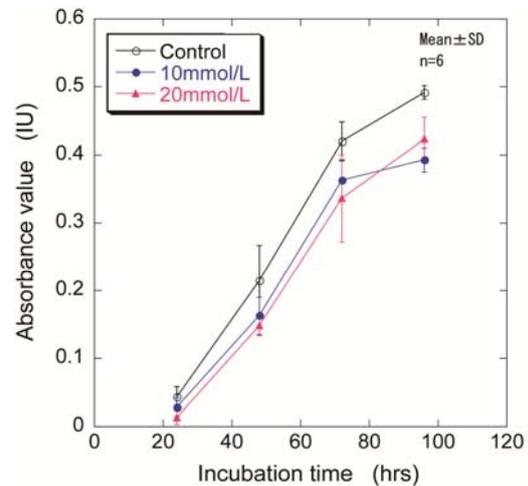


Fig.3 alamarBlue アッセイによる細胞増殖数

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 3 件)

- ① Masaharu Nakagawa, Jyunichi Yamazoe, Effect of CaCl₂ hydrothermal treatment on the bone bond strength and osteoconductivity of Ti-0.5Pt and Ti-6Al-4V-0.5Pt alloy implants, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 20, 2009, 2295-2303
- ② Yoshinari Matono, Masaharu Nakagawa, Kunio Ishikawa, Yoshihiro Terada, Effect of Corrosion Behavior of Pure Titanium and Titanium Alloy on Fluoride Addition in Acidic Environment by Streptococcus mutans, Prosthodont Research & Practice, 7, 2008, 34-39
- ③ Xin Lin, Shigeki Matsuya, Masaharu Nakagawa, Yoshihiro Terada, Kunio Ishikawa, Effect of

molding pressure on fabrication of low-crystalline calcite block, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 19, 2008, 479-484

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① W. ELSHAHAWY, I. WATANABE, M. NAKAGAWA, P.R. KRAMER, Fibroblasts Attachment to CaCl₂ Hydrothermally Treated Titanium Implant, IADR/AADR/CADR 89th General Session and Exhibition, 2011
- ② Ahmed Nafis Rashid, Masaharu Nakagawa, Kanji Tsuru, Giichiro Kawachi, Michito Maruta, Shigeki Matsuya, Kunio ishikawa, Surface modification of polyethylene terephthalate (PET) substrates for biomedical application by ozone-calcium chloride treatment, 2010
- ③ L. Zhang, M. Nakagawa, L Cong, J. Chen, Y. Ayukawa, R.Z. Legeros, S. Matsuya, K. Koyano, K Ishikawa, Studies on Improving Osteoconductivity of Titanium by Hydrothermal Treatment, The 2nd Meeteng if IADR Pan Asian Pacific Federation(PAPF) and the 1st Meeting of IADR ASIA/Pasific Region(APR), 2009

6. 研究組織

研究代表者

中川 雅晴 (NAKAGAWA MASAHARU)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：80172279