

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390520

研究課題名（和文）チタン・生体双方へのアプローチによるインターフェースの構築・維持に関する研究

研究課題名（英文）The construction and maintenance of titanium-tissue interface by the enhancement of both tissue response and titanium functionalization

研究代表者

古谷野 潔（KIYOSHI KOYANO）

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号：50195872

研究成果の概要（和文）：

口腔インプラントの主要構成物質であるチタンと骨や口腔軟組織のインターフェース構築を促進し、それを維持することを目的として本研究を企画した。

口腔軟組織とチタンのインターフェースに関しては、培養実験において上皮細胞はチタンとの接着が弱いことが明らかになり、動物実験でも裏付けられた。また、二価カチオンでチタンを水熱処理すると、上皮細胞、線維芽細胞の接着が向上することが示唆された。

骨とチタンのインターフェースに関しては、スタチン系高脂血症治療薬を、PLGA マイクロスフェアをキャリアとして投与すると、インプラント周囲骨形成が促進されることが明らかになった。また、塩化カルシウム水熱処理したチタンでは、骨接触率が向上することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to achieve strong and sustainable interface between dental implant and oral tissue such as bone and gingival soft tissue.

The interface between soft tissue and titanium was supposed to be weaker than tooth. The hydrothermal treatment of titanium under the presence of divalent cation enhanced adhesion of both epithelial and fibroblastic cells.

In regard to the bone-titanium interface, statins with PLGA microsphere as a carrier enhanced osteogenesis around the implant. Divalent cation treatment of titanium also enhanced bone-titanium contact.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：インターフェース、インプラント、骨、上皮

1. 研究開始当初の背景  
平成20年度の日本補綴歯科学会学術大会で

は、メインシンポジウムとして”  
Tissue-Biomaterials Interface Research for

Prosthodontic Dentistry” というタイトルの下、様々なインターフェースリサーチが取り上げられた。なかでもインプラントー組織インターフェースは、歯科領域では比較的「新しい」インターフェースであり、未解明な事象、解決すべき問題点が多数存在する。インプラントは硬組織（骨）、軟組織（骨髄、結合組織、上皮組織）と不連続にインターフェースを形成するが、それぞれの組織の特性を考慮したインターフェース開発メントへの取り組みは十分とは言い難い。また、インプラントは口腔といういわゆる”細菌叢”と接しながら、咬合力をはじめとする強大な力に耐えているため、「インターフェースの維持」は、「インターフェースの獲得」と同じレベルの重要性を有すると考えられる。このような背景より、本研究では「インプラントー組織インターフェースの獲得と維持」を高いレベルで達成するためのデータの蓄積を行うことを目標とした。本研究では特に、インターフェースを形成する組織を骨と歯肉上皮に分け、さらに、生体を活性化させてインターフェースを獲得・維持するアプローチ（A）と、材料表面の機能化によってインターフェースを獲得・維持するアプローチ（B）の双方向アプローチによって生体とのインターフェースの結合強化に係わるデータを蓄積することを目的とした。

関連するこれまでの研究成果については、骨についてこれまで我々は、スタチンと呼ばれる高コレステロール血症治療薬の骨誘導能に注目して研究を行ってきた。その研究成果は以下の通りである。骨における上記アプローチ A は、これらの成果を発展させるものとした。

- ・インプラント周囲の骨形成に非常に有効
- ・骨粗鬆症下でインプラント周囲骨形成を著しく改善
- ・局所投与により骨形成マーカー↑、骨吸収マーカー↓
- ・垂直的骨増生の可能性が示唆

また、我々のグループは、チタン表面にCaCl<sub>2</sub>水熱処理を施すことにより、培養実験で細胞接触率を著しく向上させることを示した。骨におけるアプローチ B については、この研究成果を応用するものとする。

歯肉上皮については、我々は歯肉上皮ーインプラントインターフェースにおける外来物質透過性について検討してきた。その結果以下のことが明らかになった。歯肉上皮における前ページのアプローチ A, B については、この研究成果を応用するものとした。

- ・インプラント周囲上皮（PIE）の方が封鎖性が低い
- ・PIE-チタン間には接着構造物が形成されにくい
- ・platform switching は外来物質の透過抑制

に有効

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

- ① 歯肉上皮細胞が接着しやすいチタン表面についての検討
- ② 歯肉上皮細胞がチタンに接着するために必要な上皮の増殖、分化接着機構についての検討
- ③ 骨が接着しやすいチタン表面についての検討
- ④ 骨がチタンに接着するために必要なインプラント周囲骨の増殖、分化、接着機構についての検討

以上より、優れたインプラントー生体インターフェース構築の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

本研究は、組織ーチタンインターフェースにおいて①歯肉上皮がチタンに接着するために必要な上皮の増殖、分化、接着機構の検討、②骨がチタンに接着するために必要な（インプラント周囲における）骨の増殖、分化、接着機構の検討、③歯肉上皮（上皮細胞）が接着しやすいチタン表面に関する検討、④骨（骨芽細胞）が接着しやすいチタン表面に関する検討の4点を大きな目標として計画されており、計画を達成するために組織（形態計測）学的手法、分子生物学的手法、生体工学的手法を用いることとした。

まず、これまでの我々の研究結果より、歯肉上皮ーチタンインターフェースにおける外来因子の透過性は、天然歯におけるそれより高いことが明らかになっている。このことは、天然歯よりインプラントの方がインターフェースの破壊を招きやすいことを意味する。上皮細胞については、増殖能は旺盛であるため、その点については改善の必要性は低い。しかし我々の研究により、歯肉上皮はチタン表面では接着構造物を有効的に作り出すことができないことが見出されているため、この点についての改善の可能性の検討を行った。本解析では、前提として、分化の過程で接着構造物が形成されなければ、接着も促進されないと仮定し、上皮細胞の分化促進による接着強化の可能性に関する検討を行うこととした。まず上皮細胞をチタン上で培養し、接着構造物の存在について免疫蛍光法、リアルタイム RT-PCR 法を用いて把握した。分化促進因子としては、これまで報告がある上皮細胞がチタンやエナメル質など基質に接着する際には、基質表面にラミニン-5が存在している状態が不可欠であるが、このラミニン-5は上皮細胞自身が作り出すものである。そこで、ラミニン-5の存在状態について、動物の口腔内に埋入したインプラント

周囲において確認した。

次に、骨-チタンインターフェースにおける骨新生については、これまで我々はスタチンを全身投与または局所投与することにより、インプラント周囲骨形成を促進することを報告した。しかし、インプラント治療に際しては、局所投与が望ましいものの、局所での**長期**の骨増生効果を得るには至っていない。これには徐放キャリアの改善が必要と思われるため、本解析ではスタチン徐放キャリアの改善によるインプラント周囲骨における長期の骨増生効果について検討することとした。ラット脛骨にインプラント窩を形成し、インプラント埋入と同時に種々のキャリアに含浸させたスタチンを投与し、1, 2, 4週後に組織標本を作製し、インプラント周囲新生骨に対するスタチンの効果を、キャリアの違いを考慮した上で検討した。キャリアについては、以前の研究で使用していたアルギン酸プロピレングリコールは、長期的効果が見込めなかったこと、以前使用した $\alpha$ TCP-コラーゲンは長期残存するためインプラント周囲には適さないことより、ポリ乳酸ポリグリコール酸共重合体マイクロスフィアをはじめとする可溶性キャリアを数種類ピックアップした。

次に、歯肉および骨-チタンインターフェース獲得に適した表面処理・表面性状の検討として、我々が開発した前述のCaCl<sub>2</sub>水熱処理は、チタン表面にCa<sup>2+</sup>をイオンのレベルで付着させるものである。この処理は、(電子顕微鏡レベルで)表面構造に変化を与えないが、表面のCa<sup>2+</sup>の存在のため、骨芽細胞接着に有利である。また、前解析で触れたラミニン-5は、Ca<sup>2+</sup>と親和性が高い。そこで本解析では、当処理が歯肉上皮、骨芽細胞両者ともにチタン表面への接着に有効であると仮定し、解析を行った。培養実験、動物実験を行うが、条件は前解析と同様とした。

#### 4. 研究成果

平成 21 年度は以下の項目について実験を行った。

<in vitro および小動物における骨増生効果の検討とそのメカニズムの解析>

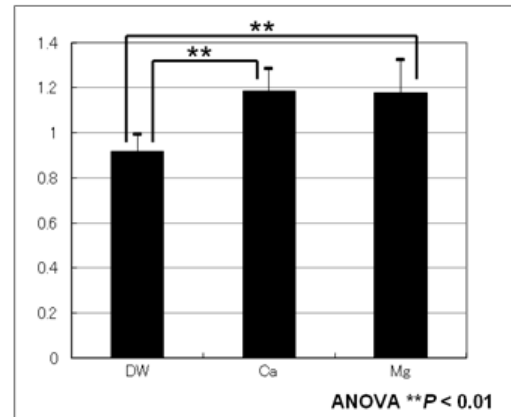
まずキャリア自身を培養した骨芽細胞に投与あるいはラット口腔粘膜下(傍骨膜)に注射し、以下の項目について為害性を検討した。

・経時的細胞数の変化(MTT アッセイ)(培養実験)・細胞形態の変化(培養実験)・炎症細胞浸潤(ラット)。その結果、今回検討したPLGA系キャリアやコラーゲン-アパタイト系キャリアには為害作用がないことが明らかになった。そこで、種々の濃度のスタチンをキャリアに混入し、骨芽細胞培養系に投与、骨芽細胞の分化促進効果について検討したところ、オステオカルシン産生量や石灰化物形成量を刺激することが明らかになった。

平成 22 年度は、歯肉および骨-チタンインターフェース獲得に適した表面処理・表面性状の検討を行うために培養実験および動物実験を行った。その結果、

<培養実験>

塩化カルシウム、塩化マグネシウム水熱処理を施したチタンにおいては、上皮細胞の接着能が向上することが明らかになった。

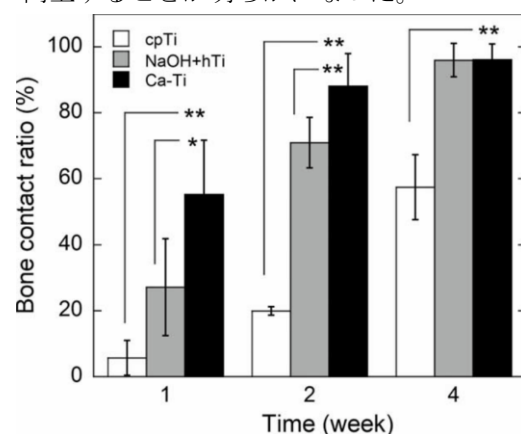


図：塩化カルシウム(Ca)、塩化マグネシウム(Mg)水熱処理を行ったチタンは、水のみで水熱処理を行ったチタン(DW)より多くの上皮細胞付着が認められた。

また、同様に骨芽細胞の接着数や分化の程度についても促進的結果が得られた。

<動物実験>

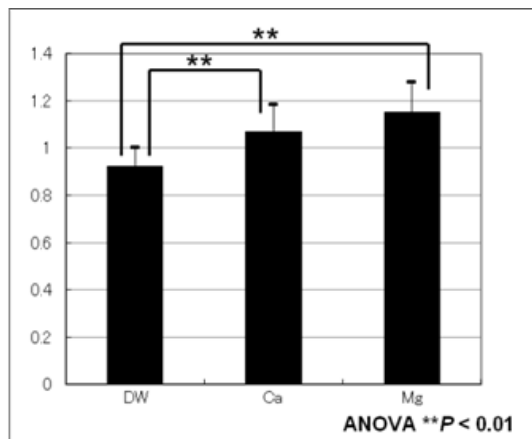
塩化カルシウム水熱処理を施したチタンインプラントをラット顎骨に埋入し、歯肉上皮組織の反応を観察したところ、未処理群に比較して接着状態が向上することが示唆された。また、ラット脛骨に埋入した同処理チタンインプラントに対する骨接触率が有意に向上することが明らかになった。



図：塩化カルシウム水熱処理を行ったチタン(Ca-Ti)は、アルカリ処理(NaOH+hTi)や無処理(cpTi)と比較してより多くの骨接触が認められた(ラット脛骨モデル)。

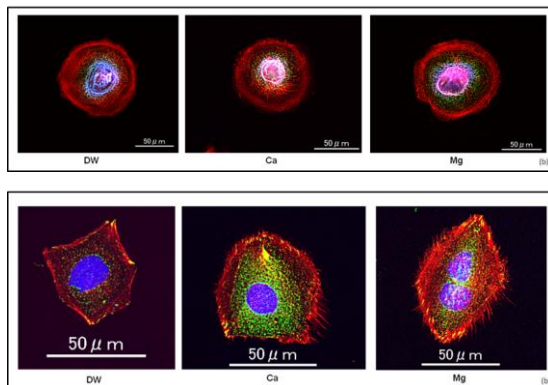
以上のことより、塩化カルシウム処理を施したチタンは骨と歯肉両方に対して接着を促進することより、インプラント臨床に寄与できる可能性が示唆された。

平成 23 年度は、特にこれまでにラットを用いて蓄積したデータに若干の追加を加えつつ、より臨床に近いセッティングでこれまでのデータを再検証することを目的とした。具体的には、チタンの CaCl<sub>2</sub> をはじめとする二価カチオン水熱処理がチタン表面への細胞接着に有効であると仮定し、解析を行った。その結果、CaCl<sub>2</sub> 水熱処理、MgCl<sub>2</sub> 水熱処理はいずれも歯肉上皮様細胞、線維芽細胞の接着数および接着強度を向上させることが明らかになった。



図：塩化カルシウム (Ca)、塩化マグネシウム (Mg) 水熱処理を行ったチタンは、水のみで水熱処理を行ったチタン (DW) より多くの線維芽細胞付着が認められた。

また、両水熱処理チタン上の細胞は、特に線維芽細胞において接着構造物を強く発現することが、免疫蛍光染色によって確認された。



図：塩化カルシウム (Ca)、塩化マグネシウム (Mg)、あるいは水 (DW) のみで水熱処理を行ったチタン上で培養した上皮細胞 (上) および線維芽細胞 (下)。特に Ca および Mg 群の線維芽細胞において接着構造物 (緑色)

の強発現が認められる。

さらに、同処理を施したチタンインプラントをラット口腔内に埋入したところ、インプラントに対する歯肉の付着の強度が向上する傾向が認められた。骨に関しては、同処理を施したチタンをラット脛骨に埋入したところ、骨接着率やインプラントの固定力が向上することが明らかになり、これらの処理が歯肉の上皮および線維芽細胞や骨の接着に対して促進的な効果を有することが示唆された。

#### 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 5 件)

古橋 明大、鮎川 保則、熱田 生、坂口 真実、山根 晃一、ラフマティア YD、大川内 秀幸、古谷野 潔、インプラントアバットメント材料としてのジルコニアに対する上皮性付着および生物学的幅径の形成、別冊 Quintessence Year Book 2012、pp.184-90、2012

H. Okawachi, Y. Ayukawa, I. Atsuta, A. Furuhashi, M. Sakaguchi, K. Yamane, K. Koyano, Effect of titanium surface calcium and magnesium on adhesive activity of epithelial-like cells and fibroblasts, Biointerphases, in press, DOI: 10.1007/s13758-012-0027-9

A. Furuhashi, Y. Ayukawa, I. Atsuta, H. Okawachi and K. Koyano, The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics, Odontology, in press, DOI: 10.1007/s10266-011-0029-y

L. Zhang, Y. Ayukawa, R. Z. LeGeros, S. Matsuya, K. Koyano and K. Ishikawa, Tissue-response to calcium-bonded titanium surface, J Biomed Mater Res A, Vol. 95, No. 1, pp.33-9, 2010

T. Masuzaki, Y. Ayukawa, Y. Moriyama, Y. Jinno, I. Atsuta, Y. Ogino and K. Koyano, The effect of a single remote injection of statin-impregnated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres on osteogenesis around titanium implants in rat tibia, Biomaterials, Vol. 31, No. 12, pp. 3327-34, 2010

〔学会発表〕(計3件)

鮎川保則. バイオエンジニアリングが拓く補綴歯科イノベーション -臨床ニーズに即した骨再生のストラテジー-, 日本補綴歯科学会第120回記念学術大会, 2011.5.21, 広島市.

鮎川保則. 歯科領域における Interface 制御 -歯科インプラントにおけるインターフェース形成と制御-, 第33回日本バイオマテリアル学会大会, 2011.11.22, 京都市.

T. Masuzaki, Y. Ayukawa, Y. Moriyama, Y. Jinno, K. Koyano, Injectable PLGA-fluvastatin Microspheres Improve Bone Quality around Titanium Implants. 88th General Session of the IADR, Barcelona, July, 2010.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.implantgishi.dent.kyushu-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古谷野 潔 (KOYANO KIYOSHI)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 50195872

### (2) 研究分担者

鮎川 保則 (AYUKAWA YASUNORI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 50304697

荻野 洋一郎 (OGINO YOICHIRO)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 50380431

熱田 生 (ATSUTA IKIRU)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 30423487

(H21のみ)

### (3) 連携研究者

石川 邦夫 (ISHIKAWA KUNIO)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号: 90202952