

## 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 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 年度～2011 年度

課題番号：21390527

研究課題名（和文）チタンインプラントと生体界面微小領域でのバイオフィーム抑制能と組織適合性向上

研究課題名（英文）Antimicrobial and osteoconductivity of titanium implant surface.

## 研究代表者

宮崎 隆 (Miyazaki Takashi)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：40175617

研究成果の概要（和文）：平均寿命の向上と急速な高齢化により、体の機能を喪失した患者が人工材料に頼らざるを得ない期間も長くなりつつある。このため歯科治療では従来の義歯に対する不満も増加し、これに代わる理想的な人工歯根（インプラント）が求められている。これまでチタン製インプラント表面処理は、硬組織との結合能と新生骨のボリュームを向上させることを目的としてきた。近年、経皮デバイスであるインプラントは骨との界面だけでなく、インプラント表面と口腔粘膜との界面微小領域が注目されている。この微小領域でインプラント表面と生体とは、硬組織および軟組織さらには微生物の生存する口腔液それぞれとの界面を形成するためである。術創を速やかに閉鎖し、インプラントを機能させるには、材料表面と組織の適合性が求められる。また口腔液との界面微小領域では細菌付着を防止し、バイオフィーム形成を予防する必要がある。本研究では電解液中での放電陽極酸化処理により、チタンの抗菌効果と生体適合性を向上させた。塩化ナトリウム溶液中で放電陽極酸化したチタンプレートの抗菌効果の影響する範囲を特定した。Ti-Cl および未処理のチタンプレート上にグラム陰性菌および陽性菌の細胞膜・細胞壁成分それぞれ Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PGN) および phospholipid 層約 70-80% を占める主成分である L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine (PE) を試薬として用い、全反射法を併用した赤外分光分析法にて、それぞれの IR スペクトルの経時的減衰と代謝産物を検出した。次亜塩素酸の過酸化作用により分解された細胞膜・細胞壁成分は C=O 二重結合の減衰と代謝産物であるアルデヒドやケトングループが検出されると考えられる。接着機構の違いによる細菌および細胞の Ti-Cl 上での生存率を評価した。Ti-Cl は PGN に特異的な酸化作用を示し、接着細胞への為害性がなくチタンインプラントの表面処理として有効である。

研究成果の概要（英文）：Initial adhesion of micro-organisms onto such orthopedic and dental implant surfaces is an unavoidable event that triggers biofilm formation. Biofilm formation on implanted medical devices is a major complication leading to potential surgical failure. When titanium is anodized by discharge in NaCl solution, both antimicrobial activity and osteoconductivity are conferred. The viability of adherent micro-organisms and cells on antimicrobial titanium remains uncertain. We hypothesized that a thin peroxidation barrier would efficiently destroy adherent bacteria, whereas adherent osteoblastic cells would be viable, since these cells adhere to the surface indirectly through serum proteins. The efficacy of antimicrobial titanium appears to be based on peroxidation, since peroxidation products were detected in parallel with the destruction of bacterial cell-surface structures. The peroxidation effect of antimicrobial titanium was confined to the surface within narrow limits. The viability of osteoblastic cells on the surface was strongly dependent on the presence of serum protein, whereas that of adherent *Streptococcus mutans*

was not affected by the presence of serum proteins. Therefore, differences in the adherent systems used by bacteria and osteoblastic cells are important determinants of their viability on antimicrobial titanium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
22年度	2,800,000	840,000	3,640,000
23年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	12,400,000	3,720,000	16,120,000

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、抗菌、表面分析

### 1. 研究開始当初の背景

平均寿命の向上と急速な高齢化により、体の機能を喪失した患者が人工材料に頼らざるを得ない期間も長くなりつつある。このため歯科治療では従来の義歯に対する不満も増加し、これに代わる理想的な人工歯根（インプラント）が求められている。これまでチタン製インプラント表面処理は、硬組織との結合能と新生骨のボリュームを向上させることを目的としてきた。近年、経皮デバイスであるインプラントは骨との界面だけでなく、インプラント表面と口腔粘膜との界面微小領域が注目されている。この微小領域でインプラント表面と生体とは、硬組織および軟組織さらには微生物の生存する口腔液それぞれとの界面を形成するためである。術創を速やかに閉鎖し、インプラントを機能させるには、材料表面と組織の適合性が求められる。また口腔液との界面微小領域では細菌付着を防止し、バイオフィーム形成を予防する必要がある。先端医療としてのインプラントシステムは表面改質による口腔との界面微小領域制御、すなわち組織適合性向上とバイオフィーム抑制能を同時に獲得する必要がある。

### 2. 研究の目的

組織界面での細胞増殖を向上させるだけでなく、口腔液との界面での十分なバイオフィーム抑制能を獲得しており、既存の技術で達成し得ない、インプラント表面と口腔界面微小領域の適合性を向上する新たな表面処理方法の開発。

### 3. 研究の方法

塩化ナトリウム溶液中で放電陽極酸化したチタンプレート (Ti-CI) の抗菌効果の影響する範囲を特定する。細菌の細胞壁および細胞膜成分を Ti-CI 上に処理し、その減衰および代謝産物を分析することで、Ti-CI の抗菌作用機序を明らかにする。接着機構の違いによる細菌および細胞の Ti-CI 上での生存率を評価した。

### 4. 研究成果

Ti-CI および未処理のチタンプレート上にグラム陰性菌および陽性菌の細胞膜・細胞壁成分それぞれ Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycan (PGN) および phospholipid 層約 70-80% を占める主成分である L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamine (PE) を試薬として用い、全反射法を併用した赤外分光分析法にて、それぞれの IR スペクトルの経時的減衰と代謝産物を検出した。次亜塩素酸の過酸化作用により分解された細胞膜・細胞壁成分は C=O 二重結合の減衰と代謝産物であるアルデヒドやケトングループが検出されると考えられる。接着機構の違いによる細菌および細胞の Ti-CI 上での生存率を評価した。Ti-CI は PGN に特異的な酸化作用を示し、接着細胞への為害性がなくチタンインプラントの表面処理として有効であることが判明した。

### 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 8 件）

- (1) Iwai-Yoshida M., Shibata Y., Wurihan, Suzuki D., Fujisawa N., Tanimoto Y., Kamijo R., Maki K. and Miyazaki T.: Antioxidant and osteogenic properties of anodically oxidized titanium. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials** 2012 DOI: **10.1016/j.jmbbm.2012.01.016** (article in press)
- (2) Murakami A., Arimoto T., Suzuki D., Iwai-Yoshida M., Otsuka F., Shibata Y., Igarashi T., Kamijo R. and Miyazaki T.: Antimicrobial and osteogenic properties of a hydrophilic-modified nanoscale hydroxyapatite coating on titanium. **Nanomedicine** 8:374-382, 2012
- (3) Shibata Y., Suzuki D, Omori S, Tanaka R, Murakami A, Kataoka Y, Baba K, Kamijo R, Miyazaki T.: The characteristics of *in vitro* biological activity of titanium surfaces anodically oxidized in chloride solutions. **Biomaterials** 31:8546-8555, 2010
- (4) Tanaka R., Shibata Y., Manabe A., Miyazaki T.: Micro structural integrity of dental enamel subjected to two tooth whitening regimens. **Archives of Oral Biology** 55: 300-308, 2010
- (5) Deng J.Y., Arimoto T., Shibata Y., Omori S., Miyazaki T., Igarashi T.: Role of chloride formed on anodized titanium surfaces against an oral microorganism. **Journal of Biomaterials Applications** **25:179-189, 2010**
- (6) S. Omori, Y. Shibata, T. Arimoto, T. Igarashi, K. Baba, T. Miyazaki: Micro-organisms and cell viability on antimicrobial modified titanium. **Journal of Dental Research** 88: 957-962, 2009
- (7) Tanimoto Y., Shibata Y., Murakami A., Miyazaki T., and Nishiyama N.: Effect of varying HAP/TCP ratios in tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics on response *in vitro*. **Journal of Hard Tissue Biology** 18:71-76, 2009
- (8) Tanaka R., Shibata Y., Manabe A., Miyazaki T.: Mineralization potential of polarized dental enamel. **PLoS One** 4: e5986, 2009

〔学会発表〕（計 6 件）

- (1) Y. Shibata, M. Iwai-Yoshida, Y. Tanimoto, H. Nakano, K. Maki, T. Miyazaki: Antimicrobial and osteogenic properties of a hydrophilic-modified nano scale hydroxyapatite coating on titanium. ICMOBT 2011
- (2) M. Iwai-Yoshida, Y. Shibata, Y. Tanimoto, H. Nakano, K. Maki, T. Miyazaki: The in vitro characteristics of anodically oxidized titanium. ICMOBT 2011
- (3) Y. Tanimoto, R. Uchida, H. Teshima, N. Nishiyama, Y. Shibata, T. Miyazaki: Physical properties of sintered tricalcium phosphate laminates with addition of milled Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-fibers. ICMOBT 2011
- (4) R. TANAKA, Y. SHIBATA, D. SUZUKI, A. MANABE, H. HISAMITSU, and T. MIYAZAKI: Antimicrobial activity and osteoblastic responses to anodically oxidized titanium surfaces. IADR 2011
- (5) 柴田 陽, 宮崎 隆: チタンインプラントの高機能化を目指した表面改質. 日本口腔インプラント学会 2010
- (6) 田中 玲奈, 柴田 陽, 宮崎 隆: 分極エナメル質の石灰化能. 再生補綴医学研究会 2009

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 隆 ( Miyazaki Takashi )  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：40175617

### (2) 研究分担者

柴田 陽 ( Shibata Yo )  
昭和大学・歯学部・助教  
研究者番号：30327936

山本 松男 ( Yamamoto Matsuo )  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：50332896

五十嵐 武 ( Igarashi Takeshi )  
昭和大学・歯学部・教授  
研究者番号：10159585

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：