

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09966

研究課題名（和文）ラマン分光法によるインプラント埋入周囲組織の骨質解析

研究課題名（英文）Bone quality analysis of tissue surrounding implant placement by Raman spectroscopy

研究代表者

岡崎 定司 (Okazaki, Joji)

大阪歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：80169094

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：インプラント埋入後の骨強度の評価法として骨質評価法による解析法が必須である。我々がこれまで材料表面に対する表面解析の検討を行う際に骨のミネラル成分のみの評価を行っており、これでは骨の状態を説明するには不十分といわざるをえない。そこで、我々はRaman分光法を利用して骨質の評価を行う方法を検討した。我々がこれまで検討してきた大気圧プラズマ処理が純チタン金属表面に与える影響を骨質の観点から解析したところ、実験群でアパタイトの形成量が多いことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞のバイオミネラリゼーションの過程を経時的に解析し、ハイドロキシアパタイトの結晶性や配向性を理解し、骨質を理解することは重要である。しかしながら、歯科領域において、この点に着目し、実験を行った研究はほとんどなかった。ラマン分光法の使用により、これまで未知の部分が多い部分を解析することで、高度の歯科医療を提供することができる。本研究の成果により、ラマン分光法が良質なインプラント治療を提供する結果となれば、ラマン分光法の臨床の現場への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Bone quality evaluation methods are essential to evaluate bone strength after implant placement. In the past, we have only evaluated the mineral components of bone when we have examined the surface analysis of material surfaces, which is insufficient to explain the bone condition. Therefore, we investigated a method to evaluate bone quality using Raman spectroscopy. We analyzed the effects of atmospheric pressure plasma treatment on the surface of pure titanium metal from the viewpoint of bone quality, and found that the amount of apatite formation was higher in the experimental group.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ラマン分光法 インプラント 大気圧プラズマ

1 . 研究開始当初の背景

歯科治療においてインプラント治療にも QOL の概念が浸透し、快適性、審美性、咀嚼満足度が強く求められるようになってきた。我々は今まで、インプラントが良好な咬合状態を維持するための検査について長く検討してきた。しかし、顎骨内に埋入されたインプラントがその良好な咬合状態を維持するためには、埋入後の初期安定性と二次安定性の獲得が重要であり、このことが長期的に安定し咀嚼機能を維持できるオッセオインテグレーション獲得へとつながっていく。近年、様々な表面性状を持ったインプラントの開発や骨量不足に対する骨造成の術式が発表され、インプラント治療の適応症も拡大している。申請者の所属する講座では純チタン金属及びチタン合金へ濃アルカリ修飾を施すことで、各金属表面にナノネットワーク構造 (titanium nanonetwork structures, TNS) が析出させ、ラットの骨髄間葉細胞の早期硬組織形成を促し、in vivo レベルにおいても著明な骨形成させることを明らかにした。また、この材料表面に親水性を付与する手法として知られる UV 処理や大気圧プラズマ処理を施すことで、高い硬組織分化誘導能および抗菌性を向上させる可能性も示唆した。しかし、どの処置が最優先なのかエビデンスはない。インプラント治療において問題となるのはインプラント埋入後に骨強度がどのように変化しているのか理解することである。骨強度とは骨密度と骨質を併せた概念である。骨密度は CT によって数値化することが可能である。しかし、骨質に関しては骨量のような単純な数値化を行う事が困難で、新しい骨質評価法による解析が必要である。我々がこれまで材料表面に対する表面解析の検討を行う際に骨のミネラル成分のみの評価を行っており、これでは骨の状態を説明するには不十分といわざるをえない。

2 . 研究の目的

純チタン金属への表面処理方法として、ブラスト処理、エッチング処理、UV 処理等があげられる。硬組織分化誘導能の向上には骨髄細胞の初期接着の早期化が重要視され、材料表面の超親水性化が注目されている。申請者の所属する講座ではこれまでの濃アルカリ処理した純チタン金属の UV 処理に着目し、抗菌性と高い硬組織分化誘導能を持った材料を開発し、International Journal of Nanomedicine に掲載された。UV 処理と同様の目的で使用される表面処理として大気圧プラズマ処理が注目されている。濃アルカリ処理した純チタン金属表面への大気圧プラズマ処理は純チタン金属表面に水酸基を形成し超親水性を与え、高い硬組織分化誘導能を持った新規材料が生成されることが報告されている。材料表面に大気圧プラズマ処理を行う方法として比較的簡易なピエゾブラッシュを使用し、ナノジルコニア材料へプラズマ処理を施したところ、超親水性を示すことが明らかとなった。しかし、UV 処理と大気圧プラズマ処理のどちらが有用であるのかは論文によって意見は様々であり、未だ明らかではない。

純チタン金属表面への表面処理が埋入周囲組織にどのような影響を与えるのか検討するためには、骨芽細胞のバイオミネラリゼーションの過程を経時的に解析し、ハイドロキシアパタイト結晶の結晶構造を解析できる技術が必要不可欠である。そこで、申請者は共同研究者の所属する京都工芸繊維大学で多くの研究成果を誇るラマン分光法に着目した。ラマン分光法は、非染色・非侵襲で細胞の代謝や分化状態、生体アパタイトと骨基質のコラーゲンの配向性をリアルタイムで計測することができ、一度に多くの情報を得ることができる。

本研究の目的は、基礎実験として純チタン金属表面への大気圧プラズマ処理がインプラント埋入周囲組織に与える影響をこれまでの評価のみではなく、ラマン分光法により、ハイドロキシアパタイトの結晶性や配向性、骨基質タンパク質の成熟度を調べることで、インプラント材料の表面処理の明確なエビデンスの解析を目指す。

3 . 研究の方法

(1) 試料作製

実験材料として市販の JIS2 級純チタン金属板およびスクリューを使用した。本実験では通常の大気圧プラズマに併せて、硬組織分化誘導能を向上しうる窒素プラズマを使用した。小型のプラズマ照射装置である Piezobrush PZ2 (アルス社、日本) を用いて材料表面から 5mm の間隔をあけて 30 秒間照射を行った大気圧プラズマ処理群 (プラズマ)、大気圧プラズマ照射と同時に窒素を噴射した群 (窒素プラズマ)、未処理群 (純チタン) の 3 群を設定した。試料は実験群、対照群ともに、アセトン、エチルアルコールおよびイオン交換水で各々 10 分間超音波洗浄を行い、その後乾熱滅菌を行った。

(2) 表面解析

試料の微細構造の観察には、実験群および対照群の純チタン金属表面を走査型電子顕微鏡 (SEM, S-4000, 島津)、走査型プロ - プ顕微鏡 (SPM, SPM-9600, 島津) を使用して X, Y および Z 方向に 2 μm の範囲をスキャンした。試料表面における元素分析を X 線電子分光分析装置 (XPS, PHI x-tool, アルバックファイ) にて行い、結晶構造を XRD にて解析した。また、各種センサ表面における蒸留水の接触角および表面エネルギーの解析を行った。

(3) 細胞培養

生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から、骨髄間葉細胞を採取した。本研究は、大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得て行った。骨髄間葉細胞の初代培養を確立、継代し 3 代目を実験に共試した。プレートに 1 穴あたり 4 万個の細胞を播種後、培地を分化誘導培地に交換し、分化誘導を開始した。細胞を 37 °C、5 %CO₂ を含む加湿条件下で培養した。細胞はコンフレントに達するまで、各試料上で培養した。培地に 10 %FBS および骨分化誘導剤 (10 mMβ-グリセロリン酸ナトリウム (和光純薬, 東京, 日本), 80 μg/ml アスコルビン酸 (ナカライテスク, 京都, 日本), 10⁻⁸ M デキサメタゾン含有の分化誘導培地を用い分化誘導を開始した。

(4) in vivo 評価

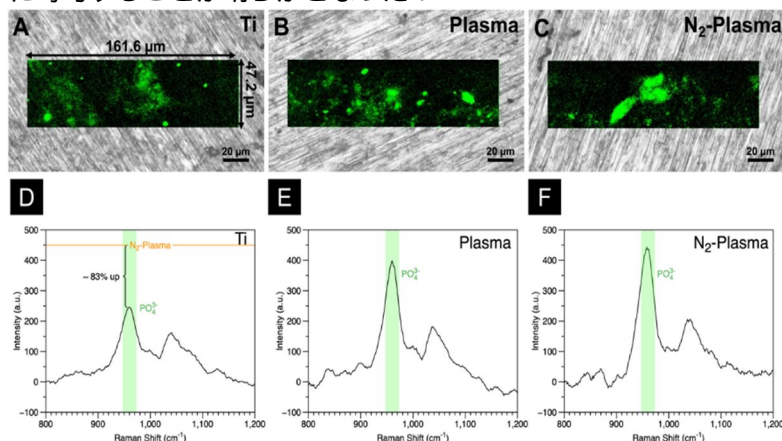
実験群および対照群の純チタン金属板を 24well プレート(Falcon, Becton Dickson Labware, NJ, USA)に配置し、ラット骨髄細胞を 4×10⁴ 個/ml ずつ播種し、1、3、8、および 24 時間それぞれ培養し、各培養後の細胞増殖について CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay Kit(Promega, Madison, WI, USA)を用いて測定した。培養開始 7 および 14 日後における各々の培養細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、0.2 %トライトン (Sigma, St. Louis, MO, USA) にて抽出・溶解した。ALP 活性の測定には、Alkali Phosphatase Luminometric ELISA Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いメーカー指示に従い ALP 活性の測定を行った。DNA の定量を、the Pico green Double standard DNA Assay Kit(DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 日本)を用いメーカー指示に従い行った。DNA の定量後、DNA の定量あたりの ALP 活性を算出した。培養 21 および 28 日後における細胞外マトリックスに析出したカルシウム量を 10 %ギ酸にて抽出した。カルシウム析出量は、Calcium E-test Kit (和光純薬, 東京, 日本)を用いて定量した。実験群および対照群のナノジルコニア表面上の培養 3 日後の培養細胞より逆転写後、mRNA を抽出し、アプライドバイオシステム社製 StepOne Plus™ Real-Time PCR System を用いて実験群と対照群における骨形成に関する遺伝子のマーカーについて比較検討した

(5) in vivo 評価

実験群および対照群の純チタン金属スクリューを生後 8 週齢の SD 系雄性ラットの大腿骨に埋入後 8 週間生育した後安楽死させ、大腿骨を摘出後、Micro-CT により CT 画像を撮影した。1 週後にテトラサイクリン、4 週後にアリザリンレッド、8 週後にカルセインを注射し、埋入後 8 週間生育した後安楽死させ、大腿骨を摘出後、通常法に従い、10%中性緩衝ホルマリンによる灌流固定後に大腿骨を一塊として摘出した。採取した大腿骨をスクリュー挿入部に沿って、矢状断方向の約 5-7μm の厚さの切片を作製し、Villanueva 染色を行い、組織学的観察を行った。また解析項目は BA、BIC、LBA とした。

4. 研究成果

表面観察の結果、表面構造の変化および粗さに著明な群間差は認めなかった。一方で、XPS 解析においてプラズマ群と窒素プラズマ群では C のピークの減少と、OH のピークの増加が観察された。また、窒素プラズマ群では、N のピークが増加した。接触角に関しては、両プラズマ群は純チタン群と比較して有意に低い値を示すとともに、両プラズマ群において高い表面エネルギーを示した。ラット骨髄細胞を使用した in vitro 評価では、細胞の初期接着、硬組織分化誘導能のマーカーおよびアパタイト形成能の評価は、両プラズマ処理群で純チタン群と比較して有意に高い値を認め、窒素プラズマ群で最も高い値を認めた。また、ラットを使用した in vivo 評価においても、新生骨の形成量が両プラズマ群において純チタン群と比較して有意に高い値を示し、窒素プラズマ群で最も高い値を示した。以上より、窒素ガスを大気圧プラズマ装置に添加することで、純チタン金属表面における骨髄細胞の生育環境を良好にし、硬組織分化誘導能の向上に寄与することが明らかとなった。



ラマン分光法を使用した各群材料表面上のアパタイト形成量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yan S, Komasa S, Agariguchi A, Pezzotti G, Okazaki J, Maekawa K	4. 巻 23
2. 論文標題 Osseointegration Properties of Titanium Implants Treated by Nonthermal Atmospheric-Pressure Nitrogen Plasma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 15420 ~ 15420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232315420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Komasa S, Okazaki J	4. 巻 15
2. 論文標題 Special Issue: Advances in Dental Bio-Nanomaterials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2098 ~ 2098
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma15062098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li M, Komasa S, Hontsu S, Hashimoto Y, Okazaki J	4. 巻 23
2. 論文標題 Structural Characterization and Osseointegrative Properties of Pulsed Laser-Deposited Fluorinated Hydroxyapatite Films on Nano-Zirconia for Implant Applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2416 ~ 2416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23052416	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yang Y, Zhang H, Komasa S, Kusumoto T, Kuwamoto S, Okunishi T, Kobayashi Y, Hashimoto Y, Sekino T, Okazaki J	4. 巻 23
2. 論文標題 Immunomodulatory Properties and Osteogenic Activity of Polyetheretherketone Coated with Titanate Nanonetwork Structures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 612 ~ 612
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23020612	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ヤン シファン, 小正 聡, 上り口晃成, Pezzotti G, 岡崎定司, 前川賢治
2. 発表標題 純チタン金属材料への大気圧窒素プラズマ処理が骨形成に与える影響
3. 学会等名 令和4年度公益社団法人日本補綴歯科学会関西支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 莉菜, 高尾誠二, 小正 聡, 馬 琳, 王 欣, 楠本哲次, 小正 裕, 岡崎定司
2. 発表標題 アルゴンプラズマ処理が純チタン金属の生体適合性に与える影響
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊 元元, Zhang Honghao, 小正 聡, 関野 徹, 岡崎定司
2. 発表標題 UV/オゾン処理により純チタン金属への免疫調節機能における骨形成に与える影響について
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高尾 誠二, 小正 聡, 上り口晃成, 楠本哲次, 曾 昱豪, 王 欣, 馬 琳, 岡崎定司
2. 発表標題 アルカリ処理したセリア安定型ジルコニア/アルミナナノ複合体 (NANOZR) の生体適合性にプラズマ処理が与える影響
3. 学会等名 第51回日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	小林 靖之 (KOBAYASHI Yasuyuki) (00416330)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・総括研究員 (84431)	
研究 分担者	PEZZOTTI G. (PEZZOTTI Giuseppe) (70262962)	京都工芸繊維大学・材料化学系・教授 (14303)	
研究 分担者	小正 聡 (KOMASA Satoshi) (70632066)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------