

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23659910

研究課題名（和文） バイオミメティクス工学に基づいた高機能インプラントの開発

研究課題名（英文） Development of a sophisticated dental implant based on biomimetic engineering

研究代表者

島内 英俊 (HIDETOSHI SHIMAUCHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70187425

研究成果の概要（和文）：本研究では、インプラントのオッセオインテグレーションと周囲骨の再生に至るプロセスのキーファクターであるフィクスチャー表面における微細トポグラフィーをミクロンオーダーで制御することを目指して、チタン表面に均一な形状を生成する革新的表面機能化手法としてマイクロディンプルインプリントモデルを構築することに成功した。すなわちハニカムフィルムより導出したエッチング用マスクを鏡面加工された Type I 純チタン表面に貼付してウェットエッチング法による酸エッチングを行うことで、チタン表面に直径 5 μm に均一化されたディンプル形状が規則的なピッチで配置された表面を生成することができた。マイクロディンプル化チタンにヒト歯根膜あるいは歯胚由来 (STRO-1+) 培養細胞を播種培養したところ、未処理の場合と比べていずれの細胞においてもその増殖が刺激されたのみならず、付着細胞の形状にも変化がみられ、 μm でコントロールされた表面トポグラフィーが細胞の挙動に明らかに影響を与えることが示された。

研究成果の概要（英文）： This study was aimed to develop the new fabrication method that can fabricate an ideal surface structure on implant fixture to control the microscopic surface topography suitable for osseointegration and bone regeneration. For this purpose, we used “micro-dimple imprint method” by applying honeycomb films. We fabricated the regularly arrayed micro-dimple structure on the mirror-like finished surface of Type 1 Ti plate masked with honeycomb film by wet-etching. After the etching, we obtained the regularly arrayed dimples on Ti surface with identical diameter and pitch as a honeycomb mesh structure of the mask. Human periodontal ligament (hPDL) or STRO-1+ dental follicle (STRO-1+DF) cells were seeded and culture on the honeycomb-fabricated and control Ti. hPDL/ STRO-1+DF cells showed stimulated proliferation and a unique forms on the fabricated Ti, that is completely different from the uniformed pattern of cell behavior on control Ti surface, suggesting that our newly developed micro-dimple imprint method is useful for the processing of implant fixture surface and fabrication the surface topography at a μm order.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

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：歯科インプラント，生体模倣 (biomimetics)，スキャフォールド

1. 研究開始当初の背景

1969年に Brånemark らがチタンと骨組織の直接的接合を見いだしたことにより、骨結合型 (osseointegrated) インプラントが開発された。それ以降歯科用インプラントは“第3の歯”として急速に普及した。しかし、骨結合型インプラントは歯槽骨と歯根膜を介さずに接合しているため、天然歯と全く同等に考えることはできない。すなわち、(1)インプラントに加わった咬合力は直接骨へ伝達されるばかりでなく、また歯根膜の感覚神経を欠くため、過剰な咬合力が加わりやすく骨の傷害とそれによる吸収を生じる可能性がある。(2)歯根膜を有する天然歯とは異なり生理的動揺がなく、力学的に異なった挙動を示すため天然歯とインプラントを上部構造で結合することはできない。さらに(3)歯根膜という口腔からの感染に対する物理的バリアーを持たないため、感染抵抗性が弱く、急速にインプラント周囲炎が進行するという問題がある。これらの相違点は、インプラント補綴の設計ばかりでなく、インストール前後における歯周疾患の治療と厳密な管理の必要性という適用上の制限を与えている。そこでこれらの欠点を克服し、天然歯とほぼ同等の機能を有する新たなインプラント治療を創生することを目指した。これまでにオッセオインテグレーションを高めるために、インプラント表面に様々な工夫が行われてきたが、未だ細胞付着のみならずその増殖を飛躍的に上げるようなものは存在しない。その理由としては、表面処理が機械加工されたものが多く μm オーダーでの加工制御が不十分であること、また酸処理やブラストされたものでは表面の凹凸は不規則で全く制御されていないことが考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景に照らして考えたのが、生体工学における“biomimetics (生体模倣)”という概念である。インプラントも“第3の歯”という意味ではその一つと考えられる。しかし厳密にみると、チタン表面には天然歯のようなセメント質は存在せず、またたとえハイドロキシアパタイト (HA) をコートしたとしても、その中にコラーゲン線維の埋入を生じることはない。すなわちインプラント表面は“生体模倣性”に乏しいため、それを取り巻く再生組織にとっては細胞の足場がない状態と考えられる。その結果、周囲組織の再生を迅速に誘導することができず、また周囲組織との付着が強固でない部分ができるため、生物学

的封鎖が不十分となりインプラント周囲炎に対する抵抗力も弱くなる。この弱点を克服するために mm オーダーでのトポグラフィをチタン表面に形成することを目指した。我々がこれまで新規スキャフォールドとして開発を進めてきたハニカムアレイフィルムが持つ構造をチタン表面に直接生成することで、細胞の足場を作った上で歯根膜細胞を播種し、歯周組織に類似した結合様式が再現されるか否かを *in vitro* でまず検証する。また *in vivo* モデルを用いて、再現された結合様式が機能ユニットとしての役割を果たすかを検証する。

3. 研究の方法

平成 23 年度においては、純チタン試料へのハニカムマイクロアレイ構造生成を行う。それとともにハニカムフィルム上で各種歯周組織細胞 (ヒト歯根膜細胞, 不死化マウスセメント芽細胞及びマウス骨芽細胞株) を培養し、小孔サイズが細胞の挙動及び増殖・分化に与える影響を明らかにすることを目指した。またこれらの実験を通じて、チタン表面でのマイクロアレイの至適条件を明らかにするとともに、硬組織ならびに歯根膜様組織形成の可能性について検討を行った。引き続き 2 年目においては、ハニカムマイクロアレイ構造をパターニングしたチタン試料 (チタンマイクロアレイ) に細胞を播種して、実際に歯根膜様組織あるいはセメント質様硬組織がインプラント周囲で形成されるか否かについて *in vitro*, *in vivo* での検討を行うこととした。

4. 研究成果

(1) チタン表面へのハニカムマイクロアレイのパターニング技術の開発

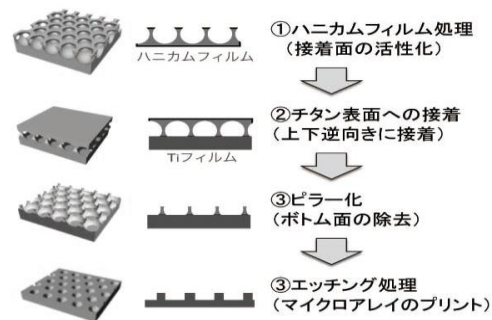
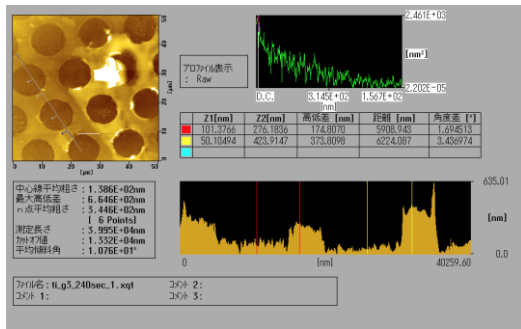


図 ハニカムフィルムを用いたチタン表面のマイクロパターンニング

上図の方法中の、①～④の各ステップにおける至適条件を明らかにすることで、チタン表面上へのハニカム構造のプリントと小孔サイズのコントロール技術の確立を試みたところ、次の結果が得られた。

図2 wet-bondingによりTi表面上に生成されたdimple形状の計測結果(孔径5・μm)



Polystyrene 製ハニカムフィルム(孔径5μm)をマスクングに用いてHF+HNO₃溶液へ浸漬すると、180sec(図2)では深さ100~400nmのdimpleがTi表面上に規則的に生成され、その配置はマスクとして用いたハニカムフィルムのポア形状を再現したものであることが明らかとなった。しかしdimpleの深さを深くするために浸漬時間を延長するとフィルム自体の剥離が生じ、dimple形状、特にリム部分に乱れを生じた。

そこでハニカムフィルムの孔径を上げて実験を試みることにした。

図3 孔径10のハニカムフィルムを用いて得られたdimpleのSEM像

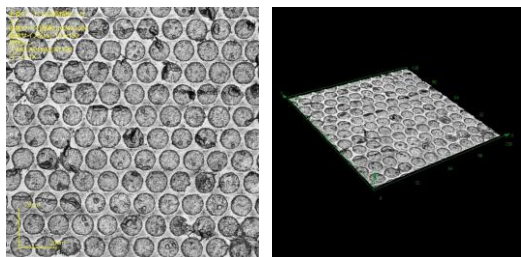


図3は、孔径10μmのハニカムフィルムをマスクとして用いてエッチングしたもので、dimple平均深さ~760nmまで良好にパターンを再現してTi表面に行うことができた。またハニカムの孔径を15μmにするとさらに深いdimple(~1200nm)をリムの形状を保持したまま形成できることが明らかとなった。以上の結果から、ハニカムフィルムを用いたwet-bonding法においては、フィルムの孔径がTi表面に生成されるdimple形状の決定に重要であることが示唆された。

(2)ハニカムフィルムの孔径が歯周組織由来細胞の増殖・分化に与える影響

Ti表面へ加工されるdimpleの孔径のみならず深さがマスクングに用いるハニカムフィルムの孔径に依存することが明らかとなったため、孔径の異なるHFを用いて孔径サイズが細胞の増殖・分化に及ぼす影響を検討

することとした。

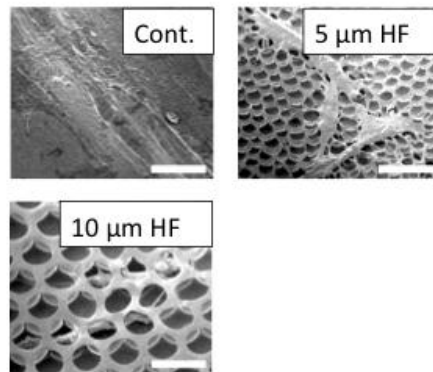


図4 各孔径のハニカムフィルム(HF)上で培養したhPDL細胞の形状(SEM像)

図4に示したように、エッチング後のdimple形成において十分な深さを得ることができる孔径10μm以上のハニカムフィルムにおいてはhPDL細胞がポア内部に侵入してmulti-layerの細胞層を形成するのに対して、孔径5μmでは細胞はpillar部分をつかんで増殖するものの、ポア内には侵入できないことが明らかとなった。さらに細胞分化の指標としてosteopontin発現及び石灰化ノジュール形成を調べたところ、いずれもが孔径10μmのハニカムフィルムで培養した場合に上昇がみられ、この孔径においてはtopography効果により細胞の分化・増殖が促進されることが示された。

(3)マイクロアレイ形成を行ったTi表面上での細胞の挙動

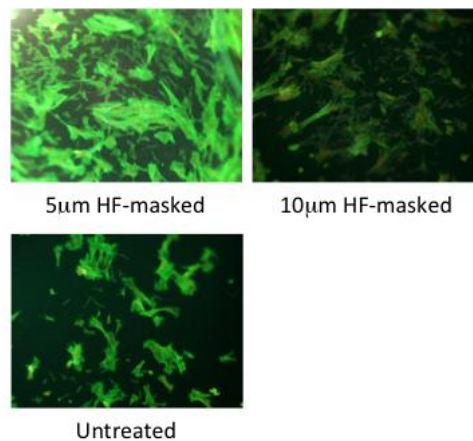


図5 各孔径のハニカムフィルム(HF)でマスク後wet-bondingしたTi表面上でのSTRO-1+DFCの増殖

5μmあるいは10μm孔径ハニカムフィルムでマスクした後dimpleを生成したTi表面上でSTRO-1+歯胚由来細胞を培養したところ、図に

示したように培養 7 日目で明らかに未処理 (dimple 無し) と比べて著しい細胞の増殖が認められるとともに、細胞の形状に違いが観察された。特にリム部の多い 5 μ m 孔径ハニカムフィルムマスキングの Ti でみられるように、細胞体を伸展させてチタン表面に付着する像が認められた。すなわち増殖パターン及び細胞形態に変化が観察され、Ti 表面加工による topography 効果が確認された。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小林洋子、遠藤直樹、石幡浩志、岩間張良、島内英俊。チタンメッシュを用いたヒト智歯歯胚由来細胞の培養。日本歯科保存学会平成24年度秋季学術大会(第137回)、2012年11月22~23日、広島市。
- ② 石幡浩志、小林洋子、下西 充、遠藤耕生、神田佳明、生 宏、高橋健太、宇塚理紗、小泉俊郎、長峰勝、吉川研一、大森 整、佐々木啓一、島内英俊。Φ0.02mm純チタンマイクロメッシュを用いた歯槽骨再生誘導(GBR)の試み。第22回日本歯科医学会総会、2012年11月9日~11日、大阪市。
- ③ 島内英俊。歯周組織再生~医療としての現状と課題。日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、2012年10月26日~27日、仙台市。
- ④ Shimauchi H, Ishihata H, Yoshikawa K, Nagamine M, Ohmori H, Komatsu M, Sasaki K. Micro-pierce Fabricated Titanium Mesh as a New Cell- Interactive Barrier Membrane. 第98回アメリカ歯周病学会総会、2012年9月28日~10月3日、ロサンゼルス市、アメリカ合衆国
- ⑤ Ishihata H, Nagamine M, Yoshikawa K, Sasaki K, Shimauchi H. development of 20mm micro-pored full titanium membrane for bone augmentation. 日本

機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会” Japan-Korea joint symposium bioceramics and biomaterials for hard tissue”、2012年1月12日、大阪。

[図書] (計 1 件)

石幡浩志、長峰勝、島内英俊。日本工業出版、機械と工具、チタンのマイクロピアース加工-再生医療をリードするものづくり-、2011、58-62。

[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

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70187425

(2) 研究分担者

石幡 浩志 (ISHIHATA HIROSHI)
東北大学・病院・助教

研究者番号：40261523

根本 英二 (NEMOTO EIJI)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40292221

金谷 聡介 (KANAYA SOUSUKE)
東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80375097

(3) 連携研究者
()

研究者番号：