

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25年 5月15日現在

機関番号：17102
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23890153
 研究課題名（和文） より早期に高度なオッセオインテグレーションを達成可能な新規インプラント表面の開発
 研究課題名（英文） Development of the new implant surface which can achieve high osseointegration
 研究代表者
 坂口 真実（SAKAGUCHI MAMI）
 九州大学・大学病院・医員
 研究者番号：80608977

研究成果の概要（和文）：

本研究では、チタンの表面にカルシウム（Ca）を修飾することで優れたオッセオインテグレーションを達成可能なインプラント体を創製することを目的とし、実験を行った。チタン板をオゾン（O₃）ガスを溶存させた塩化カルシウム水溶液に浸漬し処理を施したところ、Ca修飾チタンを作製できることを確認した。さらに、細胞実験や動物実験の結果より、チタン表面にCa修飾することで、チタンが優れたオッセオインテグレーションを獲得する可能性が示唆された

研究成果の概要（英文）：

We found that Ca-bonded Ti implant fabricated by using O₃ treatment with CaCl₂ solutions showed excellent tissue response and better osseointegration when compared to untreated Ti implant. And thus, Ca-bonded Ti is thought to have a good potential for the alteration of the Ti-based implant materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、補綴・理工系歯学

キーワード：インプラント

1. 研究開始当初の背景

金属チタンはオッセオインテグレーションと呼ばれる骨結合性を持つが、表面処理など何も行わないチタンを生体内に埋入した場合、骨とチタンとの間には部分的に線維性結合組織などが介在し、骨とインプラント体との固定に長期間を要することが知られている。これまでに国内外においてチタン対する様々な表面改質法が試みられているが、依

然としてインプラント治療の適応には制限があり、その生存率は未だ100%には至っていない。また一方で、患者QOLの向上のために治癒期間のさらなる短縮が求められている。そこで、インプラント体と新生骨とがより早期に、より広範囲にそしてより強固に結合するような、バイオマテリアルサイエンスに裏付けられた新規インプラント表面が望まれている。

チタンと骨組織との界面を調べた研究 (Ayukawa et al. 1998) によると、その界面には osteopontin や osteocalcin などのカルシウム (Ca) 結合性骨タンパクが存在することが確認されている。このことは、カルシウムイオン (Ca^{2+}) が骨結合の獲得に寄与する極めて重要な因子である可能性を示唆している。この考えに基づき申請者らは、もしチタン表面に Ca^{2+} を修飾することができれば、早期に質の高い骨結合が獲得できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

インプラント治療においては、治療期間の短縮や治療成績の向上、および患者 QOL の向上のためにインプラント体が優れたオッセオインテグレーションを獲得すること、すなわちインプラント体周囲により早期に、より広範囲にそしてより強固に新生骨が形成されることが望まれる。本研究では、インプラントの素材であるチタンの表面に Ca イオンを修飾することで優れた骨結合能を持つインプラント体を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、

- (1) チタンに対する Ca 表面修飾とキャラクタリゼーション
- (2) 細胞実験による in vitro 骨結合能評価
- (3) 実験動物を用いた in vivo 骨結合能評価の3点を目標として行った。

- (1) チタンに対する Ca 表面修飾とキャラクタリゼーション

鏡面研磨した純チタン板 (直径 14 mm、厚さ 1 mm) を、オゾン (O_3) ガスを溶存させた 10 mM 塩化カルシウム水溶液 (25 度) に浸漬し、24 時間処理を施した (Ca-O_3 処理)。その後、X 線光電子分光法や発光分光分析法、電界放射型走査電子顕微鏡などを用いてチタンの表面分析を行った。

- (2) 細胞実験による in vitro 骨結合能評価

ラット骨髄細胞を用いて、Ca 修飾チタンに対する細胞毒性、初期細胞接着挙動や細胞増殖挙動を調べた。さらに、細胞の分化 (アルカリフォスファターゼ活性や、オステオカルシン産生量など) に与える影響や、骨石灰化 (Bone-like nodule formation など) に与える影響も調査した。Ca- O_3 処理を施した群 ($\text{Ca-O}_3\text{-Ti}$)、コントロールとして未処理の群 (Ti) および O_3 処理群 ($\text{O}_3\text{-Ti}$) の3種類を準備した。

- (3) 実験動物を用いた in vivo 骨結合能評価
10 週齢雄性 SD ラットを用いて、Ca 修飾チタンインプラントに対する組織反応性および骨結合能の評価を行った。未処理および処理を施した直径 1 mm、長さ 2mm の純チタンインプラントをラット両側脛骨に埋入し、以下の評価を行った。Ca- O_3 処理を施した群 ($\text{Ca-O}_3\text{-Ti}$)、コントロールとして未処理の群 (Ti) および O_3 処理群 ($\text{O}_3\text{-Ti}$) の3種類を準備した。

- ① 組織学的評価および形態計測学的評価

埋入 2 週間後および 4 週間後に屠殺し、非脱灰研磨標本を作製した。すべての標本について染色には Masson Trichrome 染色 Goldner 改良法を用い、光学顕微鏡を用いて組織学的評価を行った。また、骨-インプラント接触率 (骨接触率) を計測し、骨結合能の評価を行った。

- ② 力学的評価

埋入 2 週間後および 4 週間後に屠殺し、可及的速やかにインプラント体を含む両側脛骨を採取した。注意深く軟組織を取り除いた後、万能試験機を用いて pull-out test を行いインプラント体と周囲骨の接着強度を計測した。Pull-out value はインプラント長軸方向に応力を作用させ、骨結合が破壊されたときの力を測定した。

4. 研究成果

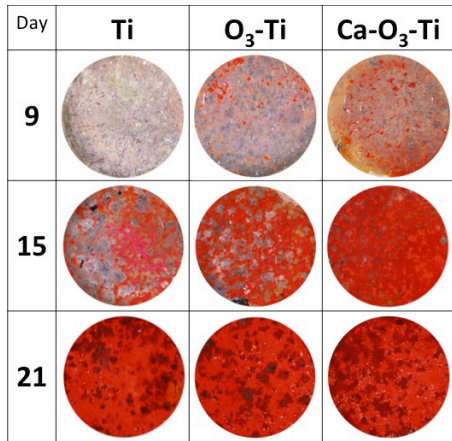
- (1) チタンに対する Ca 表面修飾とキャラクタリゼーション

X 線光電子分光法によって処理基盤の表面を分析した結果、Ca- O_3 処理を行った試料上にも Ca のピークが認められ、Ca- O_3 処理によりチタン表面に Ca が修飾できることを確認した。さらにその Ca 修飾密度を発光分光分析法を用いて分析したところ、チタン 1 平方ナノメートルあたり、Ca 原子が約 300 個存在していることが明らかとなった。また、その修飾密度は修飾直後、1 週間後、4 週間後においても変化は認められなかった。

さらに電界放射型走査電子顕微鏡を用いて処理前後の試料表面構造を観察したところ、本処理によるナノ~マイクロオーダーサイズの表面構造変化は認められなかった。

- (2) 細胞実験による in vitro 骨結合能評価

ラット骨髄細胞を用いて未処理および Ca 修飾チタンに対する初期細胞接着挙動、増殖挙動、分化挙動 (アルカリフォスファターゼ活性) および骨石灰化 (Bone-like nodule formation) に与える影響を調査した。その結果、Ca 修飾チタン上の細胞は未処理のチタンよりも有意に初期接着、増殖、分化および骨石灰化が促進した (図 1)。



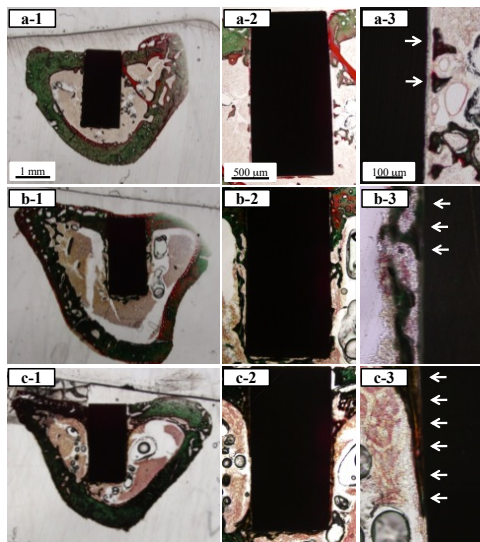
(図1) ラット骨髄細胞播種から9日後、15日後、および21日後の Bone-like nodule formation (Alizarin Red Stain)。Ca 修飾チタン上では、より早期に骨石灰化が起こっていることが確認できた。

(3) 実験動物を用いた in vivo 骨結合能評価

①組織学的評価

[2週間後]

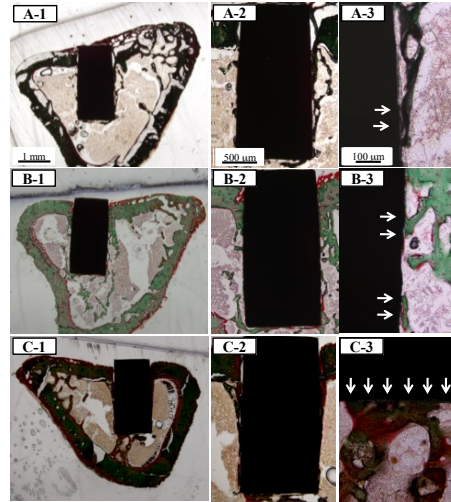
未処理のインプラント体周囲には新生骨の形成が認められたがその量は少なく、骨とインプラント体界面に結合組織の介在が認められた(図2(a))。一方、Ca-O₃処理を行ったインプラント体周囲には、他群と比較して最も多くの新生骨形成が認められた(図2(c))。



(図2) 埋入2週間後の光学顕微鏡像。(a-1, 2, 3) Ti群、(b-1, 2, 3) O₃-Ti群、(c-1, 2, 3) Ca-O₃-Ti群。

[4週間後]

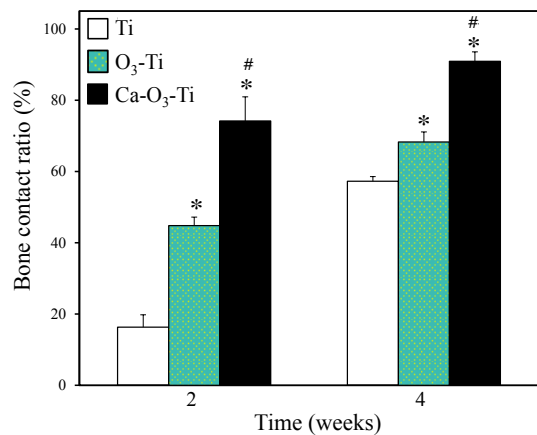
未処理のインプラント体周囲には新生骨の形成が認められたが、骨とインプラント体の界面に結合組織の介在が多く認められた(図3(A))。一方、Ca-O₃処理を行ったインプラント体周囲には、2週間と同様に他群と比較して最も多くの新生骨形成が認められた(図3(C))。



(図3) 埋入4週間後の光学顕微鏡像。(A-1, 2, 3) Ti群、(B-1, 2, 3) O₃-Ti群、(C-1, 2, 3) Ca-O₃-Ti群。

②形態計測学的評価

骨接触率はCa-O₃処理群で埋入2週間後、4週間ともに最も高く、未処理群と比較して2週間後で約4.5倍、4週間後で約1.5倍の値を示した。

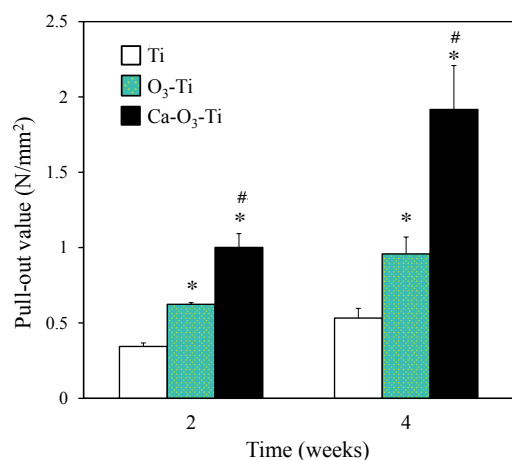


* : p<0.01 (compared with Ti), # : p<0.01 (compared with O₃-Ti)

(図4) 埋入2週間および4週間後の骨接触率(n=4)

③力学的評価

Ca-O₃処理群の Pull-out value は 2 週後、4 週後ともに最も高い値を示した。



* : p<0.01 (compared with Ti), # : p<0.01 (compared with O₃-Ti)

(図5) 埋入 2 週および 4 週後の Pull-out value (n=4)

以上のことより、チタンに Ca-O₃ 処理を施すことにより Ca 修飾チタンが作製でき、その Ca 修飾チタンインプラントは早期に強固なオッセオンテグレーションを獲得できる可能性が示唆された。本方法はチタン系インプラント材料に優れたオッセオインテグレーションを付与するための新しい表面改質法として有用であると考えられる。

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 2 件)

①古橋明大、鮎川保則、熱田生、坂口真実、Yunia Dwi Rakhmatia、山根晃一、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

The Quintessence YEAR BOOK 2012、査読有、1 巻、2012、184-190

② Okawachi H, Ayukawa Y, Atsuta I, Furuhashi A, Sakaguchi M, et al.

Effect of Titanium Surface Calcium and Magnesium on Adhesive Activity of Epithelial-Like Cells and Fibroblasts.

Biointerphases、査読有、7:27、2012、1-8
DOI: 10.1007/s13758-012-0027-9

[学会発表] (計 2 件)

①Furuhashi A et al
Enhanced Soft Tissue Integration around Hydrothermal Calcium-Treated Dental Implants

International Association for Dental Research General Session

2013 年 3 月 20 日-23 日

シアトル (アメリカ合衆国)

②古橋明大ら

インプラントアバットメント材料の違いが周囲軟組織に与える影響

平成 24 年度日本歯科理工学会九州支部夏期セミナー

2012 年 8 月 17 日-18 日

長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂口 真実 (SAKAGUCHI MAMI)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号 : 80608977