

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24249089

研究課題名(和文)インプラント界面成立機構の解明と機能的界面の維持に関する研究

研究課題名(英文)The construction and maintenance of functional tissue-implant interface.

研究代表者

古谷野 潔 (Koyano, Kiyoshi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50195872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞は粗造面を有する純チタンに接着しやすいが、線維芽細胞や上皮細胞は、骨芽細胞が接着しやすい粗造面では接着が劣ることが報告されている。このように、歯科インプラントの材料であるチタンに対して硬組織と軟組織の細胞が接着しやすい表面は異なっているため、本研究では種々の界面の成立機序を解明し、その知見に基づき、界面の維持安定と向上を目指すことを目的とした。その結果、チタン-骨界面の構成タンパクはオッセオインテグレーション成立の間経時的に変化していくこと、CaCl₂溶液でチタンを水熱処理すると生体親和性が高まることやスタチン系脂質異常症治療薬による歯肉の創傷治癒促進効果が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Titanium has been used as a dental implant material and osteoblast is known to attach well to titanium with moderately rough surface. In contrast, gingival epithelial cell and fibroblast are known to attach well to titanium with turned surface. The aim of the present study is to elucidate the nature of tissue-implant interface and improve the tissue response toward implant, using both implant surface functionalization and host tissue activation. As a result, we could report that the distribution of proteins which localized at the bone-titanium interface changed over time, hydrothermal treatment of titanium with CaCl₂ solution improved biocompatibility, and statins enhanced the wound healing of peri-implant tissue.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：インプラント 界面 骨 歯肉 プラーク

1. 研究開始当初の背景

平成 23 年度の日本補綴歯科学会学術大会では、「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」をタイトルにメインシンポジウムが開かれた。このことは、補綴領域においても「バイオエンジニアリング=生体工学」が中心に据えるべき課題の一つであると認識されていることの表れであるといえる。現在、ongoing な補綴臨床においてもっとも身近な生体工学は、インプラント治療に関連するものだといえる。インプラント治療においては、骨補填材や PRP などの成長因子を用いた生体工学的治療が既に行われており、さらにインプラント治療のすべてが人工材料と密接に関連することより、コンベンショナルな補綴治療より生体工学が導入しやすい環境にあると考えられる。

これまでの研究より、骨を形成する骨芽細胞はある程度粗造な面に接着しやすいことが報告されている (Lincks ら、1998)。一方、結合組織を形成する線維芽細胞や上皮細胞は、骨芽細胞が接着しやすい粗造面では接着が劣ることが、我々を含むいくつかの研究室から報告されている (Furuhashi ら、2011 ; Hamilton ら、2009)。

このように、インプラントの構造体は骨から歯肉軟組織を貫通する連続体として生体内に留置されるが、硬組織と軟組織が接着しやすい表面は異なっているため、表面構造を単純化することが困難である。また、口腔内に露出している部位では表面に細菌が接着するが、この接着は「阻止すべき接着」であり、上記の界面とは正反対の機能が求められているといえる。この「細菌-インプラント界面」についてこれまでの報告を渉猟すると、特定の菌がどのような基質に接着しているかについて検討を加えた研究はあるものの (Sato ら、2011 ; Kocar ら、2010)、網羅的解析によるインプラント構造体に接着する口腔内常在菌の分析やその接着メカニズムについては十分なエビデンスが蓄積されていない。さらに、歯肉貫通部材料は多種多様であるため、さらにこの界面に対する理解を複雑にしているといえる。

2. 研究の目的

以上のことを踏まえ、本研究では種々の界面の成立機序の解明を目標とし、またその知見に基づき、界面の維持安定と向上を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

解析 1 : 骨基質-チタン界面の形成機序と維持に関する検討

チタンと骨の間には厚さ数十 nm の無構造層が介在することが知られているが、チタン-骨界面成立時における経時的变化に関する知見はない。ここでは無構造層を含むインプラント界面近接部位の骨におけるタンパク質の超微細構造学的局在の経時的变化を観

察した。

解析 2 : インプラント表面の機能化による生体-インプラント界面の維持向上に関する研究

これまでに我々は、塩化カルシウム水溶液中でチタンを水熱処理すると、骨や口腔軟組織への親和性が高まることを報告した。本解析では、同処理が口腔軟組織へどのように作用するか、培養および動物実験にてより詳細に検討した。

解析 3 : インプラント表面の機能化による細菌接着性が低いインプラント表面の検討

塩化カルシウム水熱処理チタンへの口腔内細菌への付着特性を検討するために、歯面にごく早期に接着することが知られているストレプトコッカス属細菌の初期付着特性を検討した。また、口腔内装置 (ポリカーボネート製マウスピースにアバットメント素材を接着したもの) を作製し、ボランティア被験者の口腔内に 1 日装着することによって材料表面に付着する菌叢を分析した。

解析 4 : 生体の界面維持力促進によるインプラント-生体界面安定化に関する研究

これまで我々は高脂血症治療薬のインプラント周囲骨増生能について研究し、特に有用な徐放化キャリアとの組み合わせを開発してインプラントの骨結合を飛躍的に高めることに成功した (Masuzaki ら、2010)。本解析ではスタチン系薬剤の口腔硬軟組織に対する影響に関して検討した。

4. 研究成果

解析 1 : 骨基質-チタン界面の形成機序と維持に関する検討

インプラント-チタン界面の形成初期には、インプラントの最近部の骨には I 型コラーゲンがほとんど認められなかった。オステオカルシン等から構成される無構造層がインプラントと骨の間に介在し、この層は時間が経過しても変化しなかった。

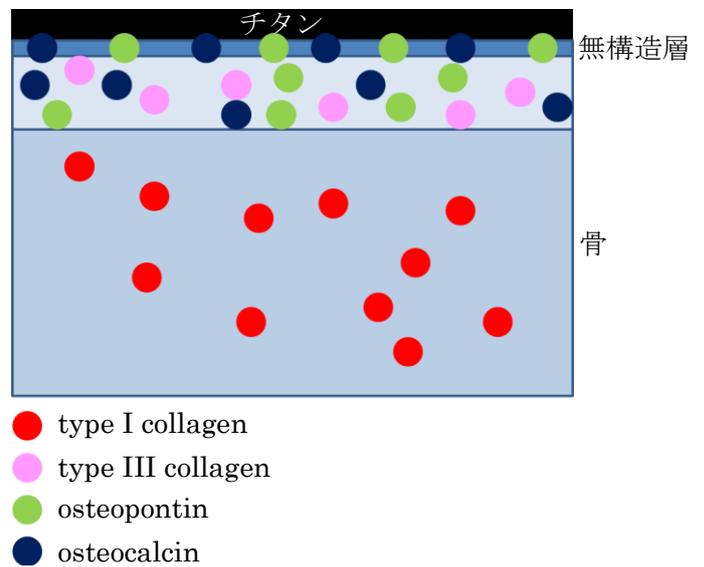


図 1 14 日目における各タンパクの局在

解析 2：インプラント表面の機能化による生体-インプラント界面の維持向上に関する研究

チタンを水あるいは塩化カルシウム水溶液中で水熱処理（それぞれ DW-HT、Ca-HT）し、ラット口腔内に埋入した。その後上皮付着の指標となる laminin-332 の局在を免疫組織化学法で調べたところ、Ca-HT 群は天然歯に匹敵する強い laminin-332 の発現を示した。また、外来因子を模した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) をインプラント周囲溝に滴下すると、Ca-HT 群は HRP の結合組織への浸透を有意にブロックした。

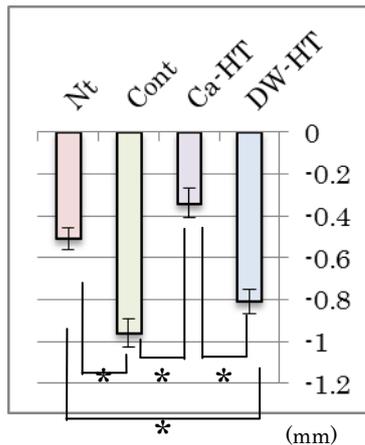


図 2 HRP 浸透深度 (* $P < 0.05$) Nt：天然歯

また、上皮細胞を各群チタン上で培養すると、Ca-HT チタン上で培養した上皮細胞は有意に強い接着を示した。

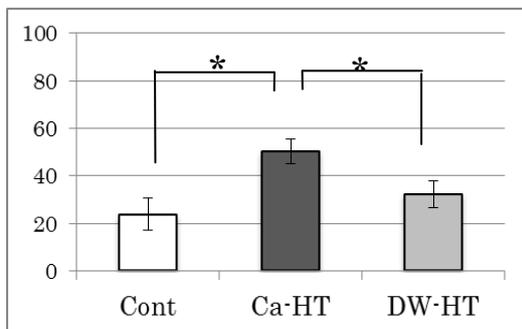


図 3 培養上皮細胞の接着率 (* $P < 0.05$)

解析 3：インプラント表面の機能化による細菌接着性が低いインプラント表面の検討 *Streptococcus gordonii* を DW-HT、Ca-HT、未処理各群チタン上で培養し付着数の比較を行った。その結果、培養 6 時間時点において Ca-HT 群への菌付着数は他群より有意に少なかった。また、口腔内装置をボランティアに装着し、チタン各群への付着総菌数の比較、検討を行ったところ、ヒト口腔内における付着総菌数には各群間に有意な差を認めなかった。

解析 4：生体の界面維持力促進によるインプラント-生体界面安定化に関する研究

徐放性キャリアに含浸したフルバスタチンをラット抜歯窩に注射にて単回投与すると、抜歯窩の軟組織および骨の治癒を有意に促進した。

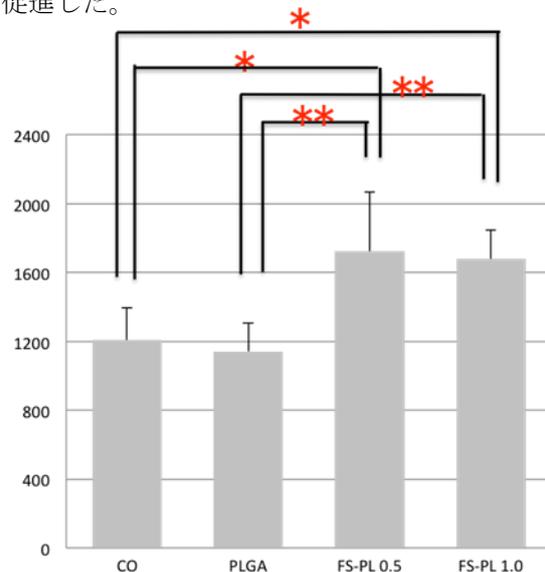


図 4 抜歯後 28 日目における抜歯窩結合組織面積。CO:対照群 PLGA：キャリアのみ投与群、FS-PL：フルバスタチン含浸キャリア投与群 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

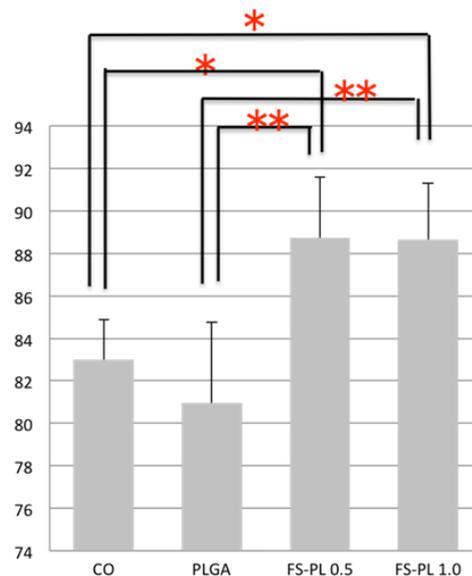


図 5 抜歯後 28 日目における抜歯窩骨密度。

また、ラット抜歯窩にインプラントを即時埋入し、同時にインプラント近傍に徐放性キャリアに含浸したフルバスタチンを注射にて単回投与すると、インプラント周囲の骨の治癒を有意に促進した。

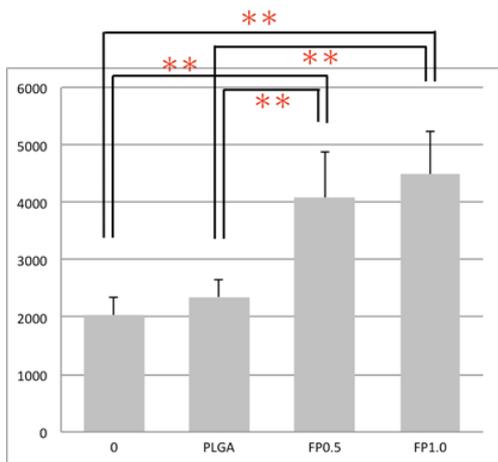


図5 インプラント埋入後 28 日目における骨-インプラント接触率。

以上より、インプラント材料であるチタンが生体と形成する界面（歯肉-チタン界面、骨-チタン界面）成立機序と、感染等のリスクを考慮に入れた界面の維持安定と向上を達成する可能性がある方法を、インプラント表面の機能化と生体反応の促進の両面から検討し、今後の発展性がある知見が得られた。

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 6 件）

- ① Yasunami, N. Ayukawa, Y. Furuhashi, A. Atsuta, I. Rakhmatia, Y.D. Moriyama, Y. Masuzaki, T. Koyano, K. Acceleration of hard and soft tissue healing in the oral cavity by a single transmucosal injection of fluvastatin-impregnated poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. An in vitro and rodent in vivo study. *Biomedical Materials*, 11, 015001, 2016. (doi: 10.1088/1748-6041/11/1/015001)
- ② Atsuta, I. Ayukawa, Y. Kondo, R. Oshiro, W. Matsuura, Y. Furuhashi, A. Tsukiyama, Y. Koyano, K. Soft tissue sealing around dental implants based on histological interpretation. *Journal of Prosthodontic Research*, 60, 3-11, 2016. (doi: 10.1016/j.jpor.2015.07.001)
- ③ Oshiro, W. Ayukawa, Y. Atsuta, I. Furuhashi, A. Yamazoe, J. Kondo, R. Sakaguchi, M. Matsuura, Y. Tsukiyama, Y. Koyano, K. Promoting effect of CaCl₂ hydrothermal treatment to titanium implant surface

for early epithelial sealing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 131, 141-147, 2015. (doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.025)

- ④ Atsuta, I. Ayukawa, Y. Furuhashi, A. Ogino, Y. Moriyama, Y. Tsukiyama, Y. Koyano, K. In vivo and in vitro studies of epithelial cell behavior around titanium implants with machined and rough surface. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16, 772-781, 2014. (doi: 10.1111/cid.12043)
 - ⑤ Atsuta, I. Ayukawa, Y. Yamaza, T. Furuhashi, A. Kondo, R. Koyano, K. Expression of Integrin alpha-3 and beta-4 subunits on the process of peri-implant epithelium formation. *Key Engineering Materials*, 529-530, 407-412, 2013. (doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.407)
 - ⑥ Furuhashi, A. Ayukawa, Y. Atsuta, I. Rakhmatia, Y. D. Yasunami, N. Koyano, K. Influence of titanium surface topography on peri-implant soft tissue integration. *Key Engineering Materials*, 529-530, 559-564, 2013. (doi: 10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.559)
- 〔学会発表〕（計 11 件）
- ① Yasunami, N. Ayukawa, Y. Furuhashi, A. Atsuta, I. Rakhmatia, Y.D. Moriyama, Y. Koyano, K. Accelerated Healing of Extraction Socket and Peri-implant Tissue by Statin. IADR, Boston (USA), March, 2015.
 - ② Oshiro, W. Ayukawa, Y. Atsuta, I. Furuhashi, A. Kondo, R. Koyano, K. The Facilitatory Effect of Calcium-hydrothermal Treatment on Peri-implant Epithelial Sealing. IADR, Boston (USA), March, 2015.
 - ③ 鮎川保則. インプラント治療に関連したマテリアル創成. 第 12 回日本再生歯科医学会学術大会, 徳島大学藤井節郎記念ホール (徳島県徳島市), 2014 年 8 月
 - ④ Ayukawa, Y. Atsuta, I. Furuhashi, I. Oshiro, W. Okawachi, H. Koyano, K.

Hydrothermal treatment of titanium with divalent cation solutions enhances the fibroblastic and epithelial cell adhesion. The 9th scientific meeting of the Asian Academy of Osseointegration, 札幌教育文化会館（北海道札幌市），2014年7月.

- ⑤ 大城和可奈、熱田生、鮎川保則、山添淳一、近藤綾介、坂口真実、古谷野潔. チタンのカルシウム水熱処理による上皮封鎖性の向上. 第123回日本補綴歯科学会学術大会, 仙台国際センター（宮城県仙台市）, 2014年5月.
- ⑥ Oshiro, W. Ayukawa, Y. Atsuta, I. Yamazoe, J. Kondo, R. Sakaguchi, M. Furuhashi, A. Koyano, K. Promoting effect of CaCl₂ hydrothermal treatment to titanium implant surface for epithelial sealing. 86th Annual Meeting of the American Prosthodontic Society, Chicago (USA), February, 2014.
- ⑦ Yasunami, N. Ayukawa, Y. Furuhashi, A. Atsuta, I. Koyano, K. Effect of fluvastatin on proliferation and migration of fibroblast, 2013 Biennial Joint Congress of CPS-JPS-KPS, Cheju (Korea), April, 2013.
- ⑧ Ayukawa, Y. Osseo-/Soft Tissue Integration. How Are They Established? The First Joint Workshop on Prosthodontic Research between Shanghai JiaoTong Univ., Kyushu Univ., and Korea Univ., Cheju (Korea), April, 2013.
- ⑨ 鮎川保則、熱田生、古谷野潔. インプラントー生体界面の統合的理解と持続性ある界面獲得のストラテジー. 第29回歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い, 歯科医師会館（東京都千代田区）, 2013年1月.
- ⑩ 鮎川保則、大川内秀幸、古橋明大、熱田生、古谷野潔. 二価カチオン処理チタンに対する口腔上皮様細胞および線維芽細胞接着性の検討. 第42回日本口腔インプラント学会学術大会, 大阪国際会議場（大阪府大阪市）, 2012年9月.

[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

熱田 生 (ATSUTA, Ikiru)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30423487

森山 泰子 (MORIYAMA, Yasuko)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：50452769

(3) 連携研究者

鈴木 由美子 (SUZUKI, Yumiko)
九州大学・大学病院・医員
研究者番号：20432916

(4) 研究協力者

Professor Clark M. Stanford
(University of Iowa, IA, USA)