

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592961

研究課題名(和文) 光殺菌法と進化型多血小板血漿/細胞複合体注入によるインプラント周囲炎治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Peri-implantitis treatment using injection of advanced platelet rich plasma/cells complex and photodynamic therapy.

研究代表者

松山 孝司 (MATSUYAMA, TAKASHI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40253900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、感染チタン表面の脱感染・表面性状向上のための光触媒を用いた光殺菌システムと進化型多血小板血漿/細胞複合体移植再生療法が、チタン表面性状の向上とインプラント周囲再生治療に有効かどうかを検討することである。光殺菌法によるチタン表面の脱感染処理は、表面構造を変化させない点で非常に有効な手段であることが判明した。またrh-GDF5/PRPは、下顎骨骨膜由来細胞に対してアルカリフォスファターゼ染色の強い陽性反応を誘導した。

PRPとrhGDF-5は骨形成に有用であり、PRPゲルは細胞移植の担体としてだけでなく、細胞の分化促進・維持の環境を向上させる上で骨再生に有用すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to evaluate cell biocompatibility and decontamination effect using photodynamic therapy and GDF-5/platelet-rich plasma(PRP)/mandibular periosteal cells complex. Photodynamic therapy on contaminated titanium surfaces led to decontamination without alteration of characterization on them. GDF-5/PRP complex enhanced activity of alkaline phosphatase(ALP) in periosteal cells derived from rat mandibular compared to PRP alone stimulation. Furthermore, GDF-5/PRP complex induced the calcification of these cells on 14 days. These results suggest that GDF-5/PRP complex after photodynamic therapy on the contaminated titanium has an effect to induce bone regeneration.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：インプラント周囲炎 光殺菌法 GDF-5 多血小板血漿 骨再生

1. 研究開始当初の背景

歯周炎治療の残存歯の咬合力の負担軽減、分散にインプラント治療の併用が有効である反面、インプラント周囲炎に罹患すると、天然歯の歯周炎に比べて、組織再生が困難で、周囲炎の再発率は高い。その原因として歯根膜がなく、チタン表面の脱感染の困難さと脱感染処置による表面性状の低下が生じるため、いまだインプラント周囲炎の治療法は確立されていない。

光触媒などの光感受性物質をベースにした光殺菌法は、様々な医療(光線力学的治療法)や生活環境の場で応用されており、歯科分野では、歯周病患者の歯周ポケット内細菌に有用であることが報告されている。光触媒の一つであるメチレンブルーは、グラム陰性およびグラム陽性菌の両者の細胞壁のリポ多糖類とリピッドと結合し、細菌に取り込まれる。非熱性ダイオード・レーザー(670nm)は、メチレンブルー染料の分子の周波数と一致する光子を生成する。光子が染料の分子にぶつくと、光学的連鎖反応が始まり、染料周囲の酸素分子は、電子を喪失させてできた酸素遊離基が細胞壁に対して毒性を示し、細菌を破壊させる。また、細菌成分であるリポ多糖を非活性化して宿主炎症反応を減少させ、歯周組織の局所的破壊を減少させる。また、光触媒となる酸化チタンは、紫外線(380nm付近)を受けることで、表面性状の親水化反応や酸分解作用による無害化が起こる。インプラント脱感染(無毒化)後の表面性状(酸化、親水性)の向上がオッセオインテグレーション(骨統合)に必須と思われる。また、周囲炎で喪失した周囲組織を再生させることは、インプラント周囲炎治療の最終目標であるため、自家骨移植や人工骨移植などによる修復治療がなされているが、これらの手法は、正常な遠隔組織への過大な外科的侵襲あるいは再感染を伴うことが欠点である。Growth differentiation factor (GDF-5)/リコンビナントコラーゲン注入移植や自己の多血小板血漿 (PRP) /細胞複合体 (PRP/Cell) 注入の皮下移植は、骨芽細胞あるいは骨膜由来細胞による異所性の新生骨形成を誘導することが報告されている。GDF-5 添加進化型 PRP/骨膜由来細胞の複合体移植は、歯周組織再生インプラント周囲炎治療の確立につながると思われる。

2. 研究の目的

インプラント周囲炎に罹患し、それによって喪失した周囲組織を効率的に再生させることは、インプラント周囲炎治療を確立するうえで非常に重要である。しかし、現在の周囲炎治療では、感染チタン表面の脱感染法による表面性状の低下とその後の再生治療の限界が問題となる。そこで、本研究の目的は脱感染・表面性状向上のための光触媒を用いた光殺菌システムと進化型多血小板血漿/細胞

複合体移植再生療法がチタン表面性状の向上とインプラント周囲再生治療に有効かどうかを材料学的、放射線学的また、病理組織学的に検討することである。

3. 研究の方法

(1) チタン表面の酸処理

チタンディスク(径 15mm)を酸処理(48% H₂SO₄, 60°C, 1時間)した後、超音波洗浄を20分行い、エタノール洗浄後、乾燥した。

(2) 細菌培養

A.naeslundii (ATCC12104) と *P.gingivalis* (ATCC33277)は、Brain Heart Infusion にて嫌気培養下、37°Cでそれぞれ培養された。

(3) 汚染チタンの脱感染処理

A.naeslundii と *P.gingivalis* をチタンに感染後、光殺菌法にて脱感染処理を施した。

(4) 細胞培養

ラット下顎骨膜由来細胞が DMEM (10%FBS)を用いて、5%CO₂,37°C条件下にて培養された。4~6代目を本実験に使用した。

(5) 走査電子顕微鏡観察

チタン試料を化学固定(グルタルアルデヒド固定とオスミウム酸固定)後、通法に従い、アルコール脱水、t-ブタノール臨界点乾燥処理を行った。観察は、イオンスパッタコーティング蒸着後、走査電子顕微鏡(JSM-5510LV, JEOL, Tokyo)にて観察した。

(6) GDF-5/PRP 複合体の作製

全麻下でマウスの腹大動脈から全血を採取しクエン酸ナトリウム(あるいは EDTA・2K)含有採血管に集めた。1100rpm、5分間遠心し2層に分離させた後、上層(血漿成分)をさらに2500rpm、5分間遠心した。その上層部をPPP、下層部をPRPとした。下層部のPRPをトロンビン/塩化カルシウム添加によってゲル化した。

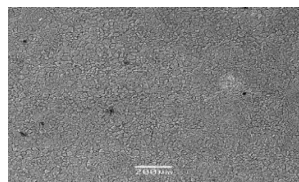
(7) GDF-5 刺激による骨芽細胞分化

下顎骨膜由来細胞(10⁵cells)を24穴プレートに播種した。24時間後、GDF-5(200ng/ml)で刺激を開始し、刺激開始後4d,7d,14d,21d後にアルカリフォスファターゼ染色を行った。

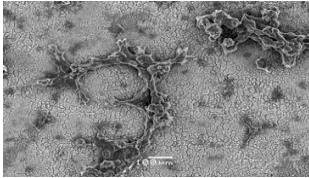
4. 研究成果

チタン表面観察(走査電子顕微鏡像)

(1) 感染チタン表面



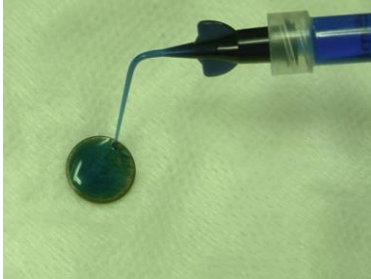
弱拡
(倍率: X1,000)



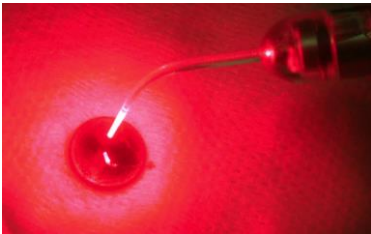
強拡
(倍率: X10,000)

(2) 光殺菌法

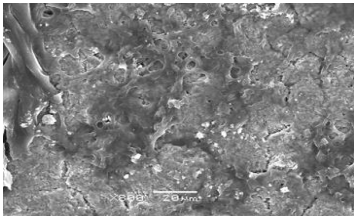
A 感染チタン表面メチレンブルー染色処理



B 染色後の光殺菌処理 (60 s)

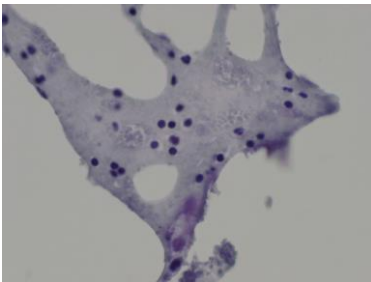


(3) 光殺菌処理後の細胞付着

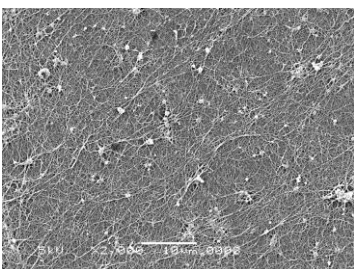


(4) GDF-5/PRP 複合体の開発

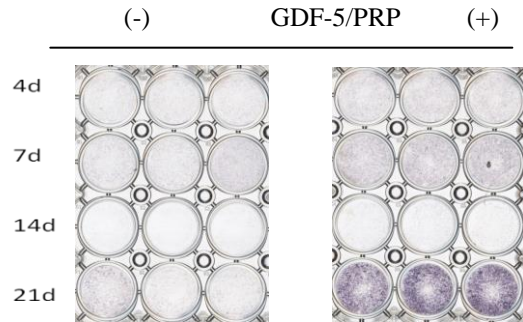
A 光学顕微鏡像



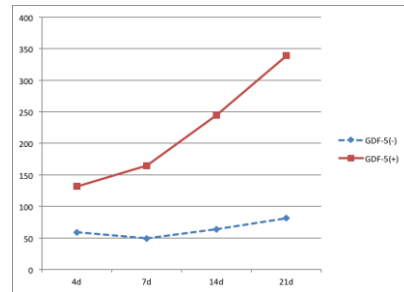
B 走査型顕微鏡像



(5) PRP/GDF-5 複合体による下顎骨骨膜由来細胞のアルカリフォスファターゼ染色



(6) GDF-5/PRP 複合体による下顎骨骨膜由来細胞のアルカリフォスファターゼ活性



(7)まとめ

歯周炎治療の残存歯の咬合力の負担軽減、分散にインプラント治療の併用が有効であるが、その反面インプラント周囲炎に罹患すると、天然歯の歯周炎に比べて、組織再生が困難で、周囲炎の再発率は高い。本研究では、光殺菌法後の細胞付着を観察し、GDF-5/PRP 複合体による下顎骨骨膜由来細胞の骨分化能を検討した。チタン表面の感染には、*Actinomyces naeslundii* と *Porphyromonas gingivalis* を用いた。

光殺菌法は、チタン表面の性状を変化させることなく、細菌除去と表面性状の維持にもっとも効果を示した。細胞付着には、なんら影響を示さなかった。

多血小板血漿(Platelet-rich plasma: PRP)は血小板を濃縮した血漿であり、多種多量の成長因子を含むとされ、近年、顎顔面口腔領域で骨再生治療のため臨床応用されているが、PRP 単独での骨再生効果は十分でないため骨移植材との併用が多い。一方、自然治癒が望めない大きな骨欠損の組織再生に、細胞、成長因子、担体を組み合わせた細胞移植の有効性が示唆されている。PRP はトロンビンでゲル化が可能なることから自己成長因子を多量に含んだ担体としての役割が期待される。また、rhGDF-5 は、筋肉内注入により、異所性軟骨内骨化を誘導することが示唆されている。そこで PRP/rhGDF-5 と細胞併用による有効な骨再生療法の開発を目的として下顎骨骨膜由来細胞の骨形成における

PRP/rhGDF-5 の効果を検討した。

PRP ゲル単独刺激に比べ、rh-GDF5/PRP 複合体は、下顎骨骨膜由来細胞に対して、刺激後 14 日目で、アルカリフォスファターゼ染色の強い陽性反応を誘導した。

以上のことから、PRP と rhGDF-5 は、骨形成に有用であり、PRP ゲルは、細胞移植の担体として期待できることが示唆された。また、PRP のゲル化は細胞移植を容易にし移植後の細胞の分化促進、維持の環境を向上させるうえで骨再生に有用な手段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 1 件)

1) Salunya Tanchaoren, Takashi Matsuyama, Ko-ichi Kawahara, Kenji Tanaka, Lyang-Ja Lee, Miho Machigashira, Kazuyuki Noguchi, Takashi Ito, Takahisa Imamura, Jan Potempa, Kiyoshi Kikuchi, and Ikuro Maruyama. Cleavage of host cytokeratin-6 by lysine-specific gingipain induces gingival inflammation in periodontitis patients. PLoS One, 2015, In press 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1) 「フェニトイン誘発性歯肉増殖症患者に包括的歯周治療を施した長期経過症例」

松山孝司、野口和行

日本臨床歯周病学会・九州 5 大学合同研修会
2013 年 11 月 10 日

2) ベニアグラフト術を応用したインプラントの長期経過 2 症例

松山 孝司、松井 竜太郎、川本 真一郎、西村 正宏、野口 和行

第 33 回日本口腔インプラント学会 近畿・北陸支部学術大会学術大会 (神戸)
2013 年 10 月 19-20 日

3) 多田 浩之、松下 健二、松山 孝司、野口 和行、島内 英俊、清浦 有祐

ジンジパインによるアレルギー性サイトカイン誘導をターゲットとしたアレルギー疾患の制御

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」

2013 年 1 月 12 日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松山 孝司 (MATSUYAMA TAKASHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40253900

(2) 研究分担者

吉元 剛彦 (YOSHIMOTO TAKEHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：60419653

町頭 三保 (MACHIGASHIRA MIHO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80253897