

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792146

研究課題名(和文) 生体親和性を向上するアバットメント表面処理方法の確立

研究課題名(英文) Development of Abutment Surface Treatment to Improve Biocompatibility

研究代表者

尾立 哲郎 (ODATSU, Tetsurou)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：70513167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は手指や様々な研磨材等により汚染されたインプラントアバットメント表面の汚染を除去し、本来アバットメント持つ優れた生体親和性をもたらしることが出来る表面処理方法を確立することである。試作洗浄液、真空プラズマ処理により、研磨後のジルコニア表面を洗浄した。XPSによる計測結果から試作洗浄液の洗浄効率が低いことが示された。線維芽細胞培養では、試作洗浄液単独または試作洗浄液とプラズマ洗浄の併用において、細胞接着とコラーゲンの遺伝子発現の向上と、炎症性サイトカインの発現低下を示した。

研究成果の概要(英文)：Implant abutment surface made by CAD/CAM technique have contaminants due to the adjusting and polishing process by dental technician. The aim of this study was to develop the cleaning methods of implant abutment, and to investigate the effect of decontamination on human gingival fibroblasts (HGFs). Newly developed washing reagent (PK) and/or vacuum plasma (Plasma) were applied for the cleaning of zirconia surface, and evaluated the effect of decontamination by X-ray photoelectron spectroscopy. HGFs were cultured on the sample for 6, 24, and 48h, and evaluated the attachment, gene expression of VEGFA, IL-6, and collagen. Contaminants on the surface reduced by washing with PK and PK+Plasma groups. Attachments of HGFs were also increased in PK and PK+Plasma groups. Gene expressions of IL-6 and VEGFA were reduced at 6 hours and 6, 24, 48 hours, respectively. Gene expression of collagen was increased from 6 hours, especially at 48 hours after seeding.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：アバットメント ジルコニア 洗浄 表面処理

1. 研究開始当初の背景

天然歯周囲の軟組織付着は、結合組織層におけるコラーゲン繊維の歯根セメント質への陥入とヘミデスマソーム結合による上皮付着という、精巧な上皮-間葉系相互作用により構成されている。それに対してインプラント周囲軟組織は、ヘミデスマソームによる上皮付着を認めるという報告はあるものの、結合組織層のコラーゲン繊維はインプラントに対して平行に走行するのみで、アバットメント材料の生体親和性に負うところの大きい、いわゆる脆弱なバイオリジカルシールを呈する。さらにこのことが、インプラントのもっとも頻度の高い合併症とされるインプラント周囲炎の要因ともされている。

線維芽細胞は結合組織の主な構成成分の1つであり、インプラント周囲粘膜ではアバットメントから40 μ mの範囲で、全構成成分の32%を占めるという報告がある。アバットメント周囲の厚い結合組織による封鎖は、細菌の侵入、歯肉退縮、および骨吸収を抑制する効果があるといわれており、線維芽細胞が重要な役割を果たす。

当初インプラントアバットメントは既製のものが主流で、製造メーカーの厳格な製品管理により、洗浄・滅菌された状態で提供されていた。しかし近年では、色調ならびに形態的審美性付与のため、CAD/CAM法で作製されたチタンやジルコニア製のカスタムアバットメントが頻用されており、作製過程では技工士による切削や研磨が行われる。これらのアバットメント表面には研磨剤の残留が認められ、スチームや有機溶媒での洗浄では除去出来ないことが確認されている。アバットメント装着に際し、これらの汚染を除去することが、インプラント周囲粘膜の形成に優位に働くのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は手指や様々な研磨材等により汚染されたインプラントアバットメント表面の汚染を除去し、本来アバットメント持つ優れた生体親和性をもたらすことが出来る表面処理方法を確立することである。

3. 研究の方法

本研究は、以下の項目について検討した。

- (1) 洗浄方法の検討
- (2) 細胞培養による *in vitro* での細胞接着数、遺伝子発現量の比較

(1) 洗浄方法の検討

インプラントアバットメントを想定して、シリコンポイント (セラマスター、松風) およびダイヤモンドルージュ (DiaGlance、YETI)

を用いて、ジルコニアディスク (直径 10mm、厚さ 1.5mm、東ソー) 表面の研磨を行った。

次に、以下に示す3通りの方法により、研磨後のジルコニア試料を洗浄し、X線光電子分光分析法 (XPS) により表面に残留する C、N、O 量を測定した。コントロールとして研磨後、洗浄を行っていないグループも試験に供した。(Control)

- ① 試作洗浄液による超音波洗浄 (PK)
(0.5% Proteinase K, 5% Triton-X, 5% Sodium Sulfite, 0.01M EDTA, 0.05M Tris-HCL)
- ② 真空プラズマ照射 (Plasma)
(YHS-R, 株式会社魁半導体)
- ③ PK + Plasma

(2) 細胞培養による *in vitro* での細胞接着数、遺伝子発現量の比較

ヒト歯肉線維芽細胞を用いて、洗浄後のジルコニア表面への初期接着数およびジルコニア上での遺伝子発現を測定した。コントロールとして研磨後、洗浄を行っていないグループも試験に供した。(Control)

① MTS アッセイ

12well プレート上に試料を設置し、100,000 個のヒト歯肉線維芽細胞を播種した。6 時間後の細胞接着数を MTS アッセイ (CellTiter96 One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) にて計測し比較した。

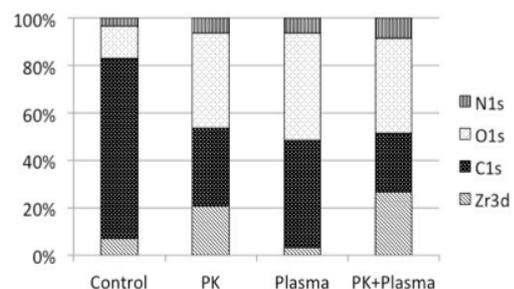
② 細胞播種 6、24、48 時間後の I 型コラーゲン (Col(I)- α 1)、インターロイキン 6 (IL-6)、および血管内皮細胞増殖因子 (VEGFA) の遺伝子発現を rt-PCR にて解析した。

4. 研究成果

(1) 洗浄方法の検討

XPS によって試料表面を分析した結果、未洗浄グループで C1s の割合が最も多かった。洗浄グループでは Plasma が多く、PK および PK + Plasma で減少し、ジルコニアの割合が増加していた。(図 1)

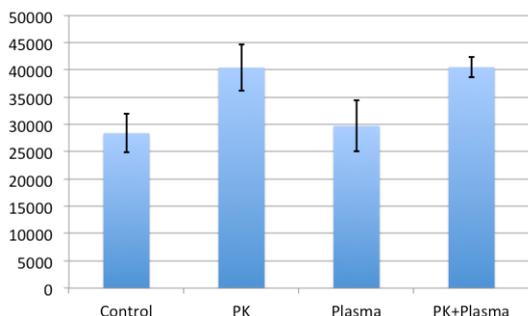
以上の結果から、真空プラズマ洗浄はごく表層の残留物を除去するのみで、試作洗浄液の方が、洗浄効率が高いことが示唆された。



(図 1) C1s, O1s, N1s, および Zr3d の割合

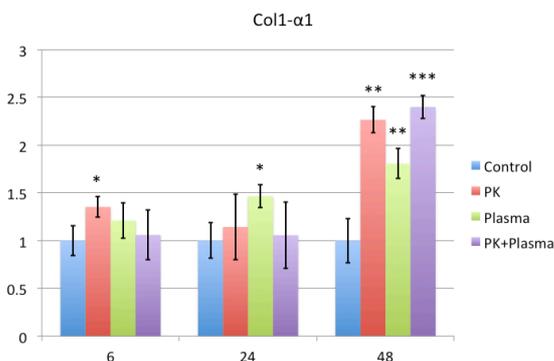
(2) 細胞培養による in vitro での細胞接着数、遺伝子発現量の比較

ジルコニアディスク上への線維芽細胞の接着数は PK および PK + Plasma グループで有意に大きな値となった。(図 2)



(図 2) 6 時間後の細胞接着数

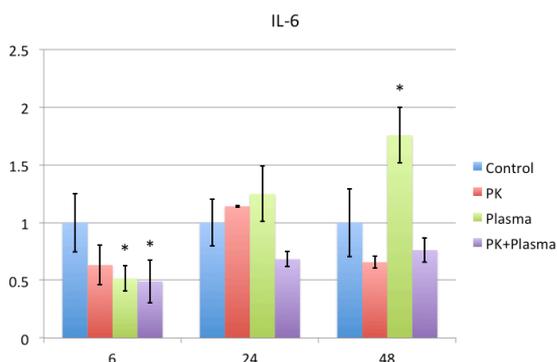
また、Col(I)- $\alpha 1$ 遺伝子の発現は 6 時間後で PK、24 時間後で Plasma、48 時間後で洗浄した全てのグループで有意に高い発現を示した。(図 3)



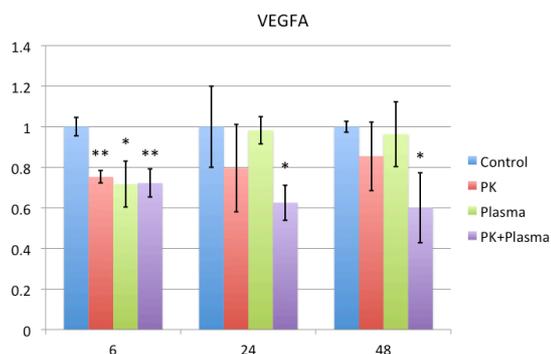
(図 3) Col(I)- $\alpha 1$ 遺伝子発現

以上の結果から、試作洗浄液または試作洗浄液と真空プラズマを併用した洗浄は、線維芽細胞のアバットメント表面への付着とコラーゲン産生を促進することが示された。

IL-6 遺伝子発現は 6 時間後で発現の抑制が認められた。(図 4) また、VEGFA でも同様に 6 時間後に遺伝子発現の低下が認められ、試作洗浄液または試作洗浄液と真空プラズマを併用したグループでは、期間を通して低下する傾向が認められた。(図 5)



(図 4) IL-6 遺伝子発現



(図 5) VEGFA 遺伝子発現

IL-6 は B 細胞の抗体産生細胞への分化誘導、T 細胞の増殖や細胞障害 T 細胞への分化を促進するなど、炎症および感染に対する生体防御反応において重要な役割を果たすサイトカインである。VEGFA は強力な血管新生能・血管透過性を持つサイトカインであり、炎症増悪因子であることが知られている。さらに線維芽細胞において VEGFA は IL-6 によって増強されるという報告がある。試作洗浄液または試作洗浄液と真空プラズマを併用したグループでは、アバットメント表面の生体親和性が向上し、周囲組織の炎症が低下する可能性が示された。インプラントとアバットメントが接合する部位は、骨に近接する場所に位置するため、炎症の抑制は骨吸収抑制に有効に働くのではないかと考える。

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 Odatsu T, Azimaie T, Velten MF, Vu M, Lyles MB, Kim KH, Aswath PB, Varanasi VG. Human periosteum cell osteogenic differentiation enhanced by ionic silicon release from porous amorphous silica scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2015 doi: 10.1002/jbm.a.35412. 査読あり
- ② Velten MF, Odatsu T, Aswath PB, Kamiya N, Kim H, Varanasi VG. PECVD SiOx accelerates hydroxyapatite surface formation for enhanced early osteogenesis differentiation. Biomaterials Science: Proceeding, Properties and Applications IV : Ceramic Transatons 2014, Volume 251, 105-113. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

- ① Odatsu T, Azimaie T, Vu M, Lyles MB, Varanasi VG. Periosteum cell differentiation enhanced by 3D porous silica fiber networks. 43rd Annual Meeting of the AADR. Presentation #278, 2014年3月19-22日、シャーロット (アメリカ)
- ② Varanasi VG, Velten MF, Odatsu T, Aswath PB. Silicon oxynitride coatings with antioxidant properties for the enhancement of osteogenesis. Materials Science & Technology 2014, Symposium: Surface properties of Biomaterials V 2014年10月12-16日、ピッツバーグ (アメリカ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾立 哲郎 (ODATSU, Tetsurou)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
助教

研究者番号 : 70513167