

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792345

研究課題名(和文) ナノ構造制御によるインプラント周囲炎の感染予防戦略の構築

研究課題名(英文) Foundation of infection control strategy for implantitis with nanonetwork structure

研究代表者

田口 洋一郎 (TAGUCHI, Yoichiro)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60434792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：インプラントフィクスチャーの表面性状が細胞接着・硬組織への分化誘導に影響し、期間短縮に関係するという報告があり、新規ナノ構造が無処理の表面と比較して、硬組織分化・誘導に良い影響を及ぼし酸化膜がチタネート構造を形成し骨分化誘導に関与していると報告した。

高グルコース培養系における細胞とナノ構造の相関関係のin vitroでの検索では、負の影響を及ぼすことが示され、更なる検索を行なっている。各種炎症惹起モデルを加えたin vitroでの検索はPorphyromonas gingivalis LPSでの刺激で検索し、LPS存在下の新規ナノ構造の表面の方が無処理無刺激より有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peri-implantitis can result in failure of implant osseointegration. Lipopolysaccharides (LPS) act as a chronic stimulus, maintaining peri-implant inflammation and thereby worsening the prognosis for implant osseointegration. The purpose of this study was to determine the effect of Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) LPS on the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) on a nanonetwork titanium surface.

Titanium disks treated with 10 M NaOH solution and untreated control disks were incubated with BMMSCs and then exposed to P. gingivalis LPS. The BMMSCs on the nanonetwork titanium surface with nanonetwork structure had significantly higher cell proliferation and cell differentiation when exposed to P. gingivalis LPS at different concentrations than cells on the control surfaces.

The nanonetwork titanium surface had better endotoxin tolerance under P. gingivalis LPS exposure than non-modified surfaces.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：インプラント周囲炎 表面性状 硬組織分化

1. 研究開始当初の背景

インプラント治療における良好な予後を維持するには、Osseointegrationの安定とインプラント周囲炎への対応が重要であり、Osseointegrationの早期化とメンテナンス (Supportive Implant Therapy) が必須である。また最近糖尿病患者でも全身管理が良好な場合インプラント手術を積極的に実施する傾向にあり、さらにその点が重要となってくる。我々は今般純チタン表面に新たなナノ構造を析出させ、骨分化誘導に有用であることを解明した。そこで我々の開発した rough surface を用いて炎症惹起下での Osseointegration における影響について検討し臨床応用につなげることを目標としている。

近年、歯周病患者の欠損補綴においてインプラント治療は必須の選択肢となったが、顎骨内に埋入されたインプラントフィクスチャーが良好に維持するためには、埋入後の Osseointegration の獲得と長期安定性が重要である。また課題の一つに、治療期間の長期化の最大要因である Osseointegration の期間の短縮がある。インプラントフィクスチャーの表面性状が細胞接着・硬組織への分化誘導に影響を与え、期間短縮に関係しているという報告もある。

材料のナノ化を利用し、従来にない新機能を見出す研究が進められインプラントの表面性状にも応用されつつある。酸化チタンは温度 30・大気圧下における低温溶液化学的な合成手法を用いることでプレートなどを一切使わずに、ナノチューブ構造 (TNT) を自己組織的に形成することが報告され、申請者の研究グループも TNT の生体活性について成果を得ている。

共同研究者は、この TNT 合成研究の過程において、室温での濃アルカリ溶液中において純チタン金属から酸化チタンナノシート (TNS) が形成されることを見出した。

申請者は、骨髄中の間葉系幹細胞の培養系で TNS 構造が無処理の表面と比較して、ALP 活性、オステオカルシンの産生量およびカルシウムの析出量が有意に高い値を示し、TNS 構造が骨の分化・誘導に影響するということ報告した。これは、従来と比べて Osseointegration 期間を短縮させる可能性を示唆したものである。さらに TNS 構造について評価を行ったところ、純チタン表面に存在する酸化膜が水酸化ナトリウム中のナトリウムイオンと結合し、チタネート構造を形成しているものと考えられ、他の報告にもあるようにチタネート構造が骨分化誘導に関与していることが示唆される。

2. 研究の目的

歯周病はグラム陰性嫌気性細菌を中心とする感染症と位置づけられ、インプラント周囲炎の細菌叢も類似している。また歯周病は糖尿病の 6 番目の合併症そして Periodontal Medicine の双方向的疾患と認知されており、感染という観点から糖尿病とインプラント周囲炎の関連性

(Peri-implantitis medicine) も今後の注目された問題点であり、前述のインプラント表面のナノ構造化がどのような効果を及ぼすかはインプラントの普及に伴う重要な注目点である。

インプラント周囲炎の原因となる細菌叢は歯周炎での細菌叢と類似しており、炎症惹起モデルを用いて Peri-implantitis medicine の基盤構築となるような基礎研究を目指している。

3. 研究の方法

まず純チタン板表面への TNS 構造を作製し、細胞と構造の相関を精査する。インプラント材料と主に使用されている純チタン板を 10 M 水酸化ナトリウム水溶液に加え、室温条件下で 24 時間攪拌させて反応を進行し、大気圧下と共に反応を活性化させるために室温圧

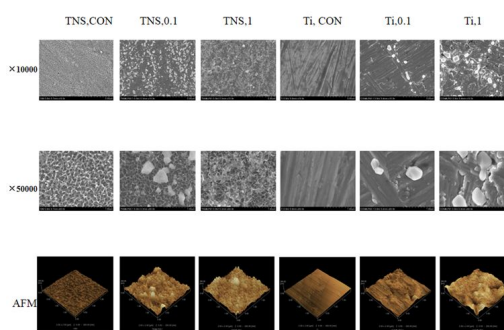
力下(0.1-15MPa)での合成を行う。合成後に超純水で洗浄を繰り返し、溶存イオンの除去を行う。洗浄の進行はろ液導電率によりモニターする。この後、真空乾燥することで試料を得る。

材料の表面構造を SEM, SPM 電子顕微鏡で観察し、構造を X 線回析で組成を EDX にて解析評価し、試料を作製する。

硬組織分化培養系下で β -glycerophosphate と ascorvin acid と dexamethasone 含有培養液にて細胞増殖能・ALP 活性について検索する。DNA マイクロアレイでの網羅的解析を行い、顕著な増加・減少している因子の mRNA に関してリアルタイム PCR での解析を予定している。とくにまた同時に培養上清に含まれる骨分化誘導を示すタンパクの ELISA 法による検索を行う。測定指標としては細胞増殖、ALP 活性、Osteocalcin, Osteopontin, Bone sialoprotein, Type collagen を測定する。細胞外マトリックスの石灰化を観察するために、Alizalin 染色を行い Ca の蓄積量を測定する。骨芽細胞への分化過程で重要な役割を担う転写因子は、Cbfa1 と、成熟度合を検討するために Osterix, AP-1 ファミリーの転写因子についてリアルタイム PCR を用いて検索する。

4. 研究成果

我々は、前述の TNS 構造を 1 つのナノレベルの表面制御モデルとして *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide による炎症惹起環境下の硬組織分化誘導能について検索している。*Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide による表面性状の変化は右上図のとおりである。



	Ti CON	Ti 0.1	Ti 1	TNS CON	TNS 0.1	TNS 1
Ra (nm)	4.747	21.131	22.884	13.011	25.295	21.589
Rz (nm)	48.690	210.982	212.400	125.545	264.685	265.745

ラット骨髄細胞の初期接着、増殖、硬組織分化誘導能すべてにおいてナノレベルの表面制御を施した方が炎症惹起環境下においても無処理群に比べて優位性を示す結果を得ている。同時に細胞からの炎症性サイトカインの産生についてもナノレベルの表面制御を施した方が有意に少ない結果を得ており、これらの結果からナノレベルの表面制御は炎症性為害因子を減弱させる効果を有していることが示唆される。

整形外科領域では、人工物との結合部に酸化チタンを応用する試みがなされている。Chennell らは in vitro において TNT による為害因子の減弱作用について報告している。Fatma らは抗菌戦略は活性酸素種 (ROS) を中心に議論されるべきだと述べており、インプラント表面の酸化膜から放出される ROS によるインプラント周囲溝に生息する嫌気性細菌への対策は今後のインプラント周囲炎への対処方法へと発展することが見込まれる。

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 4 件)

Xing H, Komasa S, Taguchi Y, Sekino T, Okazaki J: Osteogenic activity of titanium surfaces with nanonetwork structures. Int J Nanomedicine, 査読有 9 : 1741-1755, 2014.

Nakano Y, Komasa S, Taguchi Y, Sekino T, Okazaki J: Rat endothelial cell attachment, behavior and gene expression

on NaOH-treated titanium surfaces. J Oral Tissue Engin, 査読有 11:189-200,2014.

Tomoko Fujino, Yoichiro Taguchi, Satoshi Komasa, Tohru Sekino, Masahiro Tanaka: Cell differentiation on nanoscale features of a titanium surface: effect of deposition time in NaOH solution. J Hard Tissue Biol, 査読有 23 : 63-70, 2014.

Satoshi Komasa, Yoichiro Taguchi, Hisataka Nishida, Masahiro Tanaka and Takayoshi Kawazoe. Bioactivity of Nanostructure on Titanium Surface Modified by Chemical Processing at Room Temperature. Journal of Prosthodontic Research, 査読有 2012; 56:170-177.

〔学会発表〕(計 10 件)

Yoichiro Taguchi. Initial adhesion on nanoscale features of the titanium surface: effects of deposition time in NaOH solution. European Association for Osseointegration (EAO) 22nd Annual Scientific Meeting, 2013年10月16~19日, Dublin, Ireland.

小正 聡, 田口 洋一郎, 楠本 哲次, 西崎 宏, 岡崎 定司. 純チタン金属の濃アルカリ溶液への浸漬時間の変化がインプラント周囲組織の硬組織形成に与える影響について. 第43回日本口腔インプラント学会年次学術大会, 2013年9月14~15日, 福岡市.

Komasa S, Taguchi Y, Nishida H, Nakano Y, Kusumoto T, Takeda S, Tanaka M, Okazaki J. Bioactivity of nanostructure on titanium surface modified by chemical processing. International Association for Dental Research 2013 annual meeting, 2013年3月20~23日, Seattle, USA.

邢 鶴琳, 小正 聡, 田口 洋一郎, 西田 尚敬, 中野 蓉子, 藤野 智子, 楠本 哲次, 田中 昌博, 梅田 誠, 岡崎 定司. ナノシ-

ト構造を析出した純チタン金属表面の硬組織分化誘導能に与える影響について. 第16回日本顎顔面インプラント学会, 2012年12月1~2日, 北九州市.

小正 聡, 田口 洋一郎, 西田 尚敬, 藤野 智子, 中野 蓉子, 楠本 哲次, 西崎 宏, 田中 昌博, 岡崎 定司. 口腔機能の早期付与および長期維持のためのインプラント表面ナノ構造制御. 日本口腔リハビリテーション学会, 2012年10月28日, 横浜市.

Taguchi Y, Komasa S, Nishida H, Kusumoto T, Takeda S, Yamamoto K, Tanaka M, Okazaki J, Tanaka A, Umeda M. Initial biocompatibility of titanium nanostructure surface modified by new method. European Association for Osseointegration (EAO) 20th Anniversary Meeting, 2012年10月10~13日, Copenhagen, Denmark.

小正 聡, 田口 洋一郎, 橋本 典也, 楠本 哲次, 岡崎 定司. ナノ構造制御したチタン QCM センサの表面解析. 第42回日本口腔インプラント学会年次学術大会, 2012年9月22~23日, 大阪市.

楠本 哲次, 田口 洋一郎, 藤野 智子, 武田 昭二, 田中 昌博. ナノレベルでの構造制御による純チタン表面の初期接着能の向上. 第42回日本口腔インプラント学会年次学術大会, 2012年9月22~23日, 大阪市.

Fujino T, Taguchi Y, Komasa S, Nishida H, Takeda S, Kusumoto T, Umeda M, Tanaka A, Kawazoe T. Effect of modified titanium surface with nanostructure on initial adhesion. 2012 Sino-Japan Dental Conference, 2012年4月25~27日,

Chengdu,China.

Komasa S, Taguchi Y, Nishida H, Fujino T, Kusumoto T, Takeda S, Tanaka M, Kawazoe T. Bioactivity of titanium nanostructure surface modified by chemical processing at room temperature. 2012 Sino-Japan Dental Conference,2012 年 4 月 25 ~ 27 日 , Chengdu,China.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田口 洋一郎 (TAGUCHI, Yoichiro)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60434792