

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893082

研究課題名(和文) 材料-上皮組織間の組織学的評価を行うための簡便なin vitro試験法の確立

研究課題名(英文) Establishment of simple in vitro test for histological evaluation of between Material and Epithelium.

研究代表者

古橋 一憲 (FURUHASHI, kazunori)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30711840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：天然歯と違い、デンタルインプラントと周囲上皮組織の接着は一般的にないと考えられている。材料と軟組織の接着性評価は、動物実験によって研究されてきたが、本研究では、3次元培養上皮モデルを用い、材料との接着結合性をシミュレーション評価した。材料としてナノアパタイト修飾材料、ジルコニア、チタンを用いた。ナノアパタイト修飾材料は上皮モデルと強く接着している像が観察され、ジルコニアにおいても上皮と弱く接着している像が観察された。上皮モデルにより接着性の評価をより簡便に、in vitro下で行うことが可能となり、軟組織親和性の高い材料の開発や処理条件の最適化のためのツールとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The use of dental implants currently entails problems associated with lack of adhesion to the oral mucosa at the point of abutment, which differs from that of natural teeth. Usually, the experimental evaluation of adhesion between test implant materials and soft tissue requires animal experiments. In this study, to facilitate easier evaluation, adhesion experiments were performed using a 3D in vitro epidermal cell culture model. The implant materials examined were nano hydroxyapatite (nHAp) coated polyethylene terephthalate (PET), uncoated PET, zirconia, and Ti. The nHAp particles exhibited high cell adhesion, and nHAp coated PET exhibited high tissue-adhesion in the 3D epidermal cell culture in vitro. Zirconia exhibited substantial tissue adhesion to the 3D epithelial tissue. This 3D in vitro epidermal cell culture model could be useful in screening tests for the development of tissue adhesive materials and processing conditions.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：歯学 口腔インプラント 細胞 3次元培養 in vitro

1. 研究開始当初の背景

天然歯は付着上皮による上皮封鎖が存在するが、デンタルインプラント-上皮組織間には、封鎖性や接着性が一般的にはないといわれている。ゆえに感染に対する十分な防御機構が獲得できず、インプラント周囲炎などの炎症が生じやすい状況にある。しかし、軟組織との親和性に重点をおいたインプラントの開発は現在、ほとんど行われていない。インプラント周囲上皮組織の組織的構造については、研究者によって様々な見解があるが、インプラント周囲上皮の防御機構が正常付着上皮のそれよりも劣っている点では一致しており、インプラント喪失の最大の原因はインプラント周囲炎である。(図1)[1,2]

これまで、材料-上皮組織間の接着性評価は、主に動物実験によって研究されてきた。しかし、倫理的問題や実験の煩瑣性、種差などの様々な問題があり、動物愛護の観点や細胞や組織の培養技術の発展と共に、動物実験代替法を使用すべきであるというコンセンサスは世界的に高まってきている。

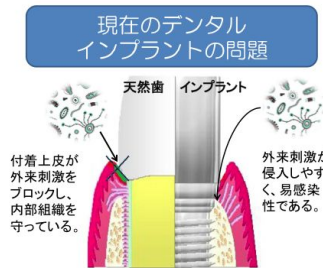


図 1

2. 研究の目的

本研究では、これまで動物実験にて研究されてきた、材料-上皮組織間の接着性及び生化学的適合性の評価をヒト 3 次元上皮モデル(上皮モデル)を応用することで in vitro 下でシミュレーションを行い、その有用性を検討することである。

将来目標として、本実験にて確立された簡便な in vitro 法にて軟組織との親和性の高いデンタルインプラント材料を開発することである。軟組織に接着能をもつ材料の開発は、インプラント周囲歯肉組織の感染の防止や歯肉退縮といった現在のデンタルインプラントの持つ最大の問題点の解決の一助になると思われる。

3. 研究の方法

(1)材料

評価する材料として、ナノアパタイト複合化材料を使用し、ジルコニア、チタンについても比較検討した。また、ナノアパタイト添加効果を調べるために線維芽細胞 NIH-3T3 を用いた評価試験も行った。

試料として、粒径 40nm のナノアパタイト微粒子 SHAp® (ソフセラ社)(nHAp)を表面に修飾したポリエチレンテレフタレート(PET)プレートを使用した。Control として PET を使用し、比較対象として純チタン、ジルコ

ニアブロックをプレート状に CAD/CAM 成形加工、研磨した物を使用した。

材料学的評価のために、PET 表面の nHAp を SEM(S-4000, hitachi high technologies) 観察し、また、粉末 X 線回折分析 (XRD) (Multi Flex, Rigaku)にて結晶性を調査した。

(2)細胞接着能及び増殖能評価

NIH Swiss マウス胚細胞由来の線維芽細胞 NIH-3T3 を使用し、培地として 10%FBS を添加した高グルコース DMEM を用いた。nHAp が修飾された PET (nHAp/PET)上に $3 \sim 5 \times 10^3$ cells/cm² で細胞を播種し、SEM 観察を行い細胞接着性を評価した。

また、細胞増殖率を WST8 (Cell Counting Kit-8, 同仁化学)を用いて評価した。

(3)ヒト 3 次元培養組織モデルを用いた材料-上皮組織間の接着性評価

すでに培養技術が確立しているセレンテック社のヒトケラチノサイト 3 次元培養システムを応用することで、従来必要であった線維芽細胞の下地(feeder layer 法)を省略し、簡易に 3 次元上皮モデルを構築した。具体的には、ミリポア社の Millicell-PCF cell culture insert (インサート)のポリカーボネート(PCF)膜上に一定数の表皮角化前駆細胞を播種し、PCF 膜上の細胞が 100%コンフルエントになるまで培養を行い。その後、高カルシウム培地に交換し、上皮細胞間の架橋を強化させた。この際、インサート中に材料の最下部が PCF 膜上に接するように、垂直に挿入させた。細胞を空気に暴露させ、3 次元分化を誘導させ上皮モデルを構築した。培養終了後、4%パラホルムアルデヒド 4 にて固定、通法に従って標本作成、HE 染色を施し、光学顕微鏡にて組織学的観察を行った。(図 2)

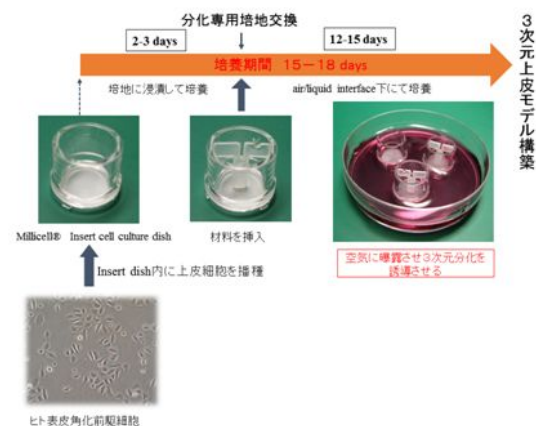


図 2 ヒトケラチノサイト 3 次元培養法簡略図

4. 研究成果

(1) nHAp が修飾された PET 表面の SEM 像から 40-100nm の等方性の nHAp で均一に修飾されていることが確認された。XRD から、nHAp は JAPANCHEMICAL 社の HAp 粉末と比較して、全体的にピーク強度が高く、各ピ

ークが鮮明であり、nHAp が高い結晶性を有していることが確認された。(図 3)

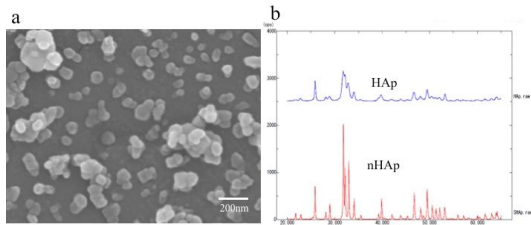


図 3(a) nHAp/PET 表面 SEM 像 (b) 各ハイドロキシアパタイト粉末の XRD パターン

(2) NIH3T3 を用いた細胞接着能及び増殖能評価

NIH3T3 を用いた細胞接着能試験においては、SEM 像より nHAp/PET 上での細胞の活発な伸展、仮足形成とナノ粒子への細胞突起の進展、結合が確認された。(図 4)

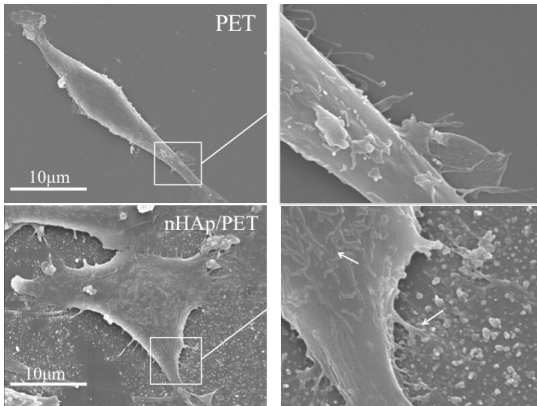


図 4 PET、nHAp/PET 表面の細胞挙動像

増殖能試験では nHAp/PET 上での有意な細胞増殖の向上が認められ、nHAp が細胞増殖のための足場材料として有効であることが確認された。(図 5)

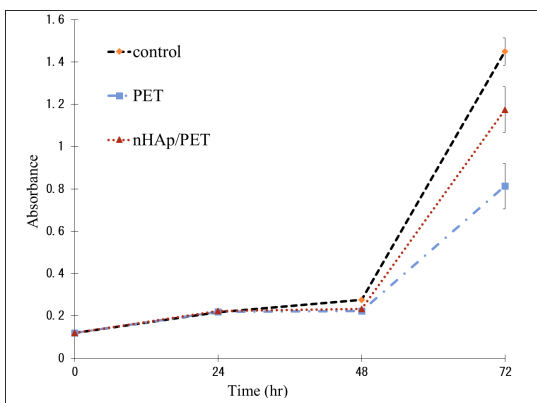


図 5 PET、nHAp/PET 上での細胞増殖能比較

(3) ヒト 3 次元上皮モデルを用いた試験。

Control の上皮モデルでは PCF 膜上に厚さ約 100 μ m の基底細胞層から角化層に分化した多層化した上皮組織の構が確認された。今回、ヒトの表皮に類似した重層扁平上皮が確認された。(図 6)

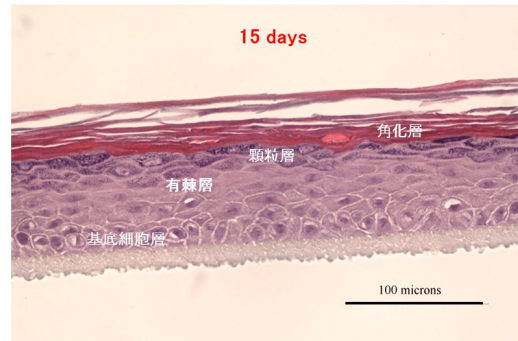


図 6 Control 上皮モデルの組織学像

プレート-上皮モデル界面の断面像。nHAp/PET、PET は培養上皮モデルに緊密にて接触していた。特に nHAp/PET では角化層を含む全層にわたり接触しており、界面に厚い重層扁平様上皮の構築が確認され、上皮細胞の旺盛な分化、及び増殖が示唆された。(図 7)

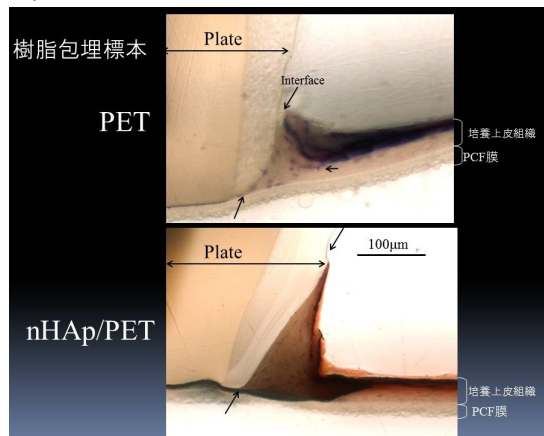


図 7 材料-上皮モデル界面の断面像

引き抜き試験：上皮モデルを構築し、固定後にプレートを抜去した組織像では、PET の場合、界面組織が無変形なままであるのに対して、nHAp/PET では組織が反・変形し、断裂した像が観察された。nHAp/PET と上皮が強く接着性していたことが推測された。(図 8)

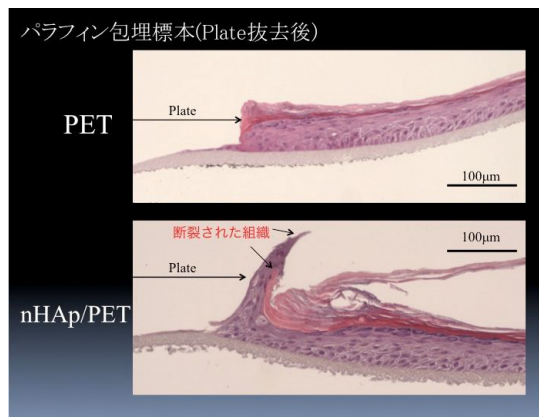


図 8 プレート抜去後の界面周囲組織像

また、抜去後 nHAp/PET 表面 SEM 像では基底細胞から角質までの全層の細胞と組織の

付着が観察され、上皮の接着が確認された。特に非角化細胞の棘細胞の付着が多数見られ、構築された重層扁平上皮モデルの非角化層での接着が確認された。(図 9)

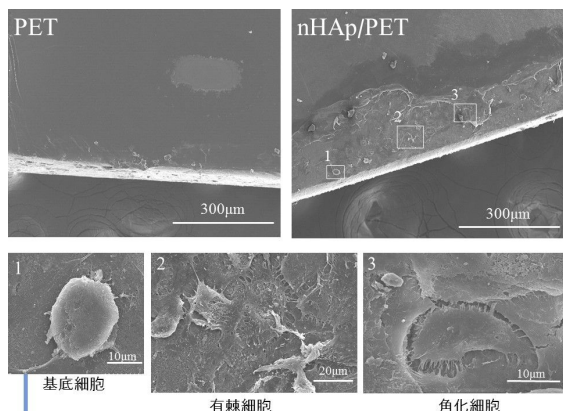


図 9 抜去した PET、nHAp/PET 表面の SEM 像

ジルコニアプレートの抜去後の組織像では、界面周囲の組織の外反・変形など nHAp/PET と類似した組織像が得られたが、組織の断裂は観察されなかった。ジルコニアは接着性タンパク質を介して上皮細胞が接着するという報告があり[3]、今回の結果でも、非角化細胞層での弱い接着が示唆された。(図 10)

パラフィン標本
ジルコニアプレート抜去後

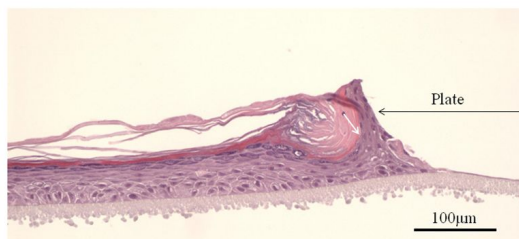


図 10 ジルコニア抜去後の界面周囲組織像

チタンプレートを挿入した場合の組織像では、直下には多層化した薄い、培養上皮が形成されるのみで、上皮との積極的な接着は確認されなかった。この上皮モデルに角質が形成されているが、角化した上皮には一般的に接着能はないことから、接着能は弱いものと推察された。(図 11)

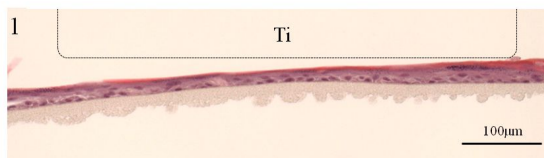


図 11 チタン適応像(点線がチタンプレートの位置を示している)

(4)まとめ

デンタルインプラントの接着性評価には、口腔粘膜細胞由来の上皮モデルが理想的であるが、今回は培養技術が確立しており、同

じ外胚葉由来の皮膚細胞を用いた上皮モデルを構築した。筆者は 2015 年 3 月 23 日から福井大学医学附属病院において、患者の口腔粘膜から上皮細胞を単離し、口腔粘膜上皮モデル構築を試みている。

生体活性の高いナノハイドロキシアパタイトを修飾することにより、生体内不活性物質に bioactive な性質を付加することが可能となった。基材となる高分子、金属等のすぐれた機械的特性を保持したまま、高い生体活性を付与した材料開発に期待される。

本研究の 3 次元上皮モデルにより、これまで動物実験で行われてきたデンタルインプラントと口腔粘膜との接着・封鎖性の評価をより簡便に in vitro 下で行うことが可能となり、軟組織親和性の高い材料の開発や処理条件の最適化のためのスクリーニング検査として有用であることが示唆された。

引用文献

- 1) Shioya K, Sawada T, Miake Y, Inoue S, Yanagisawa T. Ultrastructural study of tissues surrounding replanted teeth and dental implants. Clin Oral Implants Res 2009;20:299-305
- 2) Atsuta I, Yamaza T, Yoshinari M, Goto T, Kido M, Kagiya T, Mino S, Shimono M, Tanaka T. Ultrastructural localization of laminin-5 ($\gamma 2$ chain) in the rat peri-implant oral mucosa around a titanium-dental implant by immuno-electron microscopy. Biomaterials 2005;26:6280-6287
- 3) 古橋明大、鮎川保則、熱田 生、坂口真実、山根晃一、Rakhmatia YD、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、別冊 Quintessence Year Book 2012,184-190,2012.03.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

古橋一憲、小林淳一、松田慎平、吉村仁志、大場誠悟、佐野 和生

材料-上皮組織間の組織学的評価を行うための簡便な in vitro 試験法の確立

日本口腔外科学会雑誌、査読無、60 巻、2014、151

〔学会発表〕(計 2 件)

古橋一憲

ヒト 3 次元上皮モデルを用いた材料-上皮組織間の封鎖性評価、第 67 回日本口腔科学会学術集会、2013 年 5 月 23 日、栃木 栃木総合文化センター

古橋一憲

材料-上皮組織間の組織学的評価を行うための簡便な in vitro 試験法の確立、第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2014 年 10 月 18 日、千葉 幕張メッセ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.u-fukui.ac.jp/home/ufms/file/kenkyu/2013/13-44>

<http://sika.med.lab.u-fukui.ac.jp/ja/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古橋 一憲 (FURUHASI, KAZUNORI)
福井大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30711840

(2)連携研究者

佐野 和生 (SANO, KAZUNO)
福井大学・医学部附属病院・教授
研究者番号：20145270

吉村 仁志 (YOSHIMURA, HITOSHI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40362917