

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293418

研究課題名(和文)デュアルファブリケーションによる生物-非生物界面バリアー強化インプラントの創生

研究課題名(英文) Bio-nonbio interface dental implant reinforcing prevention of oral biofilm by dual surface fabrication methods

研究代表者

島内 英俊 (Shimauchi, Hidetoshi)

東北大学・歯学研究科・名誉教授

研究者番号：70187425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント周囲炎は、素材の純チタンに口腔内バイオフィームが付着して生ずる。本研究の目的は歯肉縁付近のインプラント表面に、高耐久性DLC皮膜を生成、生体親和性&抗バイオフィームの2相表面で、顎骨結合とバイオフィーム付着抑止を両立したインプラントを創出することである。純チタン試料面にGCIB-DLCを製膜した結果、従来よりも強固にチタン表面に付着する事が確認され、バイオフィーム付着防止型インプラントへの応用が可能であることを示した。またGCIB-DLCはバイオフィーム固着を抑制する作用が示された。今後、動物試験による生体親和性と安全性を検討する予定である。

研究成果の概要(英文)：The dental peri-implantitis is caused by adhesion of dental biofilm to the open surface of pure titanium. The purpose of this study is to establish a highly durable DLC film on the surface of the implant on the surface around the gingival margin, and innovative dental implant that is compatible with alveolar bone attachment and deterrence of biofilm adhesion such as dual-phase surface conditions of the biocompatible and anti-biofilm. As a result of depositing GCIB-DLC on the surface of pure titanium sample, it was confirmed that an adhesion strength of the DLC to the pure titanium surface is significantly high in comparison with a standard DLC coat. It could be applied to biofilm adhesion preventing type implants. In addition, GCIB-DLC showed an inhibitory effect on biofilm adhesion. We are going to examine biocompatibility and the safety by the animal test.

研究分野：生体材料学

キーワード：インプラント Diamond Like Carbon バイオフィーム インプラント周囲炎

## 1. 研究開始当初の背景

現在のインプラントの殆どを占める純チタンベースのシステムは、オッセオインテグレーションによる顎骨との結合のみに重きが置かれた結果、インストール後の長期的予後について、特に口腔内バイオフィームによって生ずるインプラント周囲炎に対する対策がほとんど為されて来なかった。その結果、インストール後、数年以内に多くの症例で周囲炎が惹起され、インプラントの周囲の粘膜腫脹や出血をきたし、やがては周囲骨が喪失する結果、インプラント・フィクスチャーを除去せざるを得なくなっていた。結果として、純チタン素材をそのまま利用している現在の歯科用インプラントには、自ずと寿命が限られていた。

その対策として近年ようやく、上記のようなインプラント周囲からの埋設組織内への細菌侵入抑止技術が提案、開発されてきたものの、純チタン素材をそのまま用いている事には変わりないので、根本的な手段であるはずの、インプラント表面のバイオフィーム付着を抑止する手法は開発されて来なかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、インプラント埋入部の入口に位置するカラー部とフィクスチャーの表面に GCIB-DLC をコーティング。口腔内バイオフィーム付着を抑止し、インプラント周囲炎を予防する。

開発する GCIB-DLC は、ダイヤモンドドライクカーボン (Diamond-Like Carbon, 以下 DLC) 膜と呼ばれる、炭素原子としてのダイヤモンドの  $sp^3$  結合と、グラファイトの  $sp^2$  結合の両者を骨格構造としたアモルファス炭素膜の一つであるが、通常は数十%含有する水素を殆ど持たず、加えて独自の製膜工程により通常は付着が困難な純チタンにも強固に接合する。これをインプラント・フィクスチャーのカラー部、およびアバットメントに適用することで、DLC の特徴である高硬度、高耐摩耗性、低摩擦係数、高化学安定性および生体親和性により、バイオフィーム付着抑制効果を発揮する。加えて、清掃処理に対する物理的耐久性を有し、表面荒れを防止して滑沢な表面を長期間にわたり保つ。この表面処理が為されることで、インプラント周囲炎の最大要因であるバイオフィーム付着および堆積を抑止できるので、インプラント周囲炎を長期にわたり抑止できる結果、長寿命インプラントが達成されると見込まれる。

さらに、一般の DLC は医療器具において汚染防止の観点から各種外科手術器具を中心に利用されているものの、その厚さは数  $\mu$  m 以上で黒色のため審美性に問題があり、しかもビッカース硬度(HV)が 2000 以下のため、金属器具の擦過によって損傷し剥離する恐れがある。本開発で用いる GCIB-DLC は

従来の 2~3 倍の HV5000 を達成したことで、数百 nm の極薄で十分な耐久性とバイオフィーム付着抑止効果を発揮し、かつ審美性を損なうこともない。

以上のデュアル・ファブリケーション技術を利用したインプラント用純チタン試験体を製作の上、物性、生物学的特性について評価を実施した。

## 3. 研究の方法

協力企業である(株)野村鍍金(大阪市)および、東京都市大学工学部表面加工研究室(佐藤秀明准教授)の共同研究として実施した。(株)野村鍍金の有する GCIB-DLC 技術の純チタン切片に対する適用を行い、物性試験および細菌培養、付着試験により諸元性能を評価、さらに動物試験によってその有用性を評価した。

### (1) 純チタンに対する、GCIB-DLC 製膜技術の確立

予備実験において、実際に GCIB-DLC を施し実用耐久性の向上を図るため、GCIB 処理の際のイオンビームエッチングを強化する方法、あるいはチタン、カーボン双方に親和性を有し、医療用として歯科用合金、心臓血管用ステントにも含有する素材のクロムを介した新たなコーティング法を開発した。

### (2) 物性・耐久性評価：歯科用インプラントへの清掃を想定した試験装置の調整、および歯科用スクレーラーによる搔爬試験

上記の方法により生成された純チタン試験片に対する GCIB-DLC の効果について、東京都市大学においてステンレススクレーラーによる摺動搔爬試験を実施した。搔爬試験用の専用治具を製作、圧力、ストローク、搔爬回数を臨床に準じた条件に設定して実施した。搔爬試験終了後に表面粗さの変化や搔爬面の形状を計測した。また、実体顕微鏡を用いて、試験片の表面性状を観察した。

### (3) 生物学的評価：培養細菌によるバイオフィーム付着抑制能試験

GCIB-DLC 処理チタン試験片上に口腔内細菌による人工培養バイオフィームを形成、チタンへの付着性の高い菌種による付着試験を実施し、バイオフィームの形成度および菌付着性について、未処理の純チタン切片と比較して評価した。

### (4) 製品性能評価：ビーグル犬口腔内におけるバイオフィーム付着抑制能試験

ビーグル犬の口腔内で開発材の有用性試験を行った。下顎骨内にインプラント埋入と同様に骨窩洞形成を行った上、GCIB-DLC 処理チタン試験片埋入し、口腔内バイオフィームの付着抑制効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) 純チタンに対する、GCIB-DLC 製膜技術の確立

ガスクラスターイオンビーム法による従来の製膜法に加え、製膜前にチタン材表面に対しレーザーエッチングより入念に行う方法、さらに基本的に接着性が乏しいチタン、DLC 双方に親和性を有するクロムを介して結合するクロム中間層を設けた純チタン-DLC 表面コート試験片を製作した

(2) 物性・耐久性評価：歯科用インプラントへの清掃を想定した試験装置の調整、および歯科用スケーラーによる掻爬試験

GCIB-DLC 表面処理を施したチタン標本切片に対するステンレススケーラーによる摺動掻爬試験の結果、コーティングを行わないコントロール切片に比べ、表面粗さの増加を大幅に縮小できた。しかし、3000 回を超える摺動で DLC 層の剥離が見られた。そこで、GCIB 処理の際のイオンビームエッチングを強化する方法を行ったところ、耐久性の向上が認められた。さらにクロム中間層を設けたコーティング法を開発したところ、3000 回の摺動後もコーティング層の剥離は見られず、表面粗さの増加も殆ど見られなかった。

GCIB-DLC は純チタン製が殆どを占める歯科用インプラント上において、十分な耐久性を有すると共に、歯科におけるインプラントの清掃メンテナンスに対して表面粗さの増加を抑止する事が確認された。

(3) 生物学的評価：培養細菌によるバイオフィーム付着抑制能試験

GCIB-DLC 処理チタン試験片上に対し、口腔内細菌に含まれる *Actinomyces viscosus* によるバイオフィームを培養したところ、実験群およびコントロール(研磨した表面を有する純チタン試験片)とも同量のバイオフィームが形成された。その後、流水により洗浄したところ、試験片上に残遺したバイオフィームは、コントロール試験片において若干多い事が認められた。

GCIB-DLC 試験片上でも菌の成長は阻害されず、その適用によっても、これまでのインプラントと同様に周囲にバイオフィームは形成される。しかしその付着が従来の純チタン表面より強固でなく、清掃で容易に除去できると見られ、セルフケアによるインプラント周囲炎の予防をバックアップする効果が期待される。

(4) 製品性能評価：ビーグル犬口腔内におけるバイオフィーム付着抑制能試験

東北大学動物実験委員会の承認の下、ビーグル犬下顎骨第一大臼歯を抜歯後、抜歯窩を利用して骨窩洞を形成、直径 4mm、長さ 10mm の純チタン製の円柱状試験片で、実験群には埋入する部位の骨縁上に相当する片側 4mm 部分に GCIB-DLC コーティングを実施した試験

片、コントロールは同じ形状の表面コーティングを行わない純チタン材を埋入した。

術後の動物は健康上、問題無く経過したが、一週間後の最初の観察時において、埋入した試験片がすべて脱落していた。これは試験片に顎骨との固定を強化するスクリュー構造を設けておらず、術後における動物の咀嚼力回復による強い咬合に耐えられなかったためと思われる。報告書執筆時点において、スクリュー付き試験片を完成し、埋入時に顎骨内にスレッド形成を行う特性タッピング手術器具を製作の上、動物試験によって製作試験片のバイオフィーム付着抑制試験を実施する予定である。

## 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 8 件)

1. Tada H, Suzuki R, Nemoto E, Shimauchi H, Matsushita K, Takada H. Increases in IL-33 production by fimbriae and lipopeptide from *Porphyromonas gingivalis* in mouse bone marrow-derived dendritic cells via Toll-like receptor 2. *Biomed Res*. 38:189-195, 2017.

doi: 10.2220/biomedres.38.189. (査読あり)

2. Sakisaka Y, Kanaya S, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Nemoto E. p38 MAP kinase is required for Wnt3a-mediated osterix expression independently of Wnt-LRP5/6-GSK3 $\beta$  signaling axis in dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 478:527-532, 2016.

doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.076. (査読あり)

3. Kanaya S, Komatsu H, Shimauchi H, Nemoto E. Metabotropic glutamate receptor 1 promotes cementoblast proliferation via MAP kinase signaling pathways. *Connect Tissue Res*. 57:417-426, 2016.

doi: 10.1080/03008207.2016.1195826. (査読あり)

4. Tada H, Matsuyama T, Nishioka T, Hagiwara M, Kiyoura Y, Shimauchi H, Matsushita K. *Porphyromonas gingivalis* Gingipain-Dependently Enhances IL-33 Production in Human Gingival Epithelial Cells. *PLoS One*. Apr 8;11(4):e0152794, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0152794. (査読あり)

5. Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, Furuichi Y, Fujii T, Mori M, Kunimatsu K, Shimauchi H, Ogata Y, Yamamoto M, Nakagawa

T, Sato S, Ito K, Ogasawara T, Izumi Y, Gomi K, Yamazaki K, Yoshie H, Fukuda M, Noguchi T, Takashiba S, Kurihara H, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Sakagami R, Hara Y, Noguchi K, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Ohmae M, Koizumi H, Watanuki M, Murakami S. Randomized Placebo-Controlled and Controlled Non-Inferiority Phase III Trials Comparing Trafermin, a Recombinant Human Fibroblast Growth Factor 2, and Enamel Matrix Derivative in Periodontal Regeneration in Intrabony Defects. *J Bone Miner Res.* 31:806-814, 2016. doi: 10.1002/jbmr.2738. (査読あり)

6. Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, Shimonishi M, Shimauchi H. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *J Periodontal Res.* 51:164-174, 2016. doi: 10.1111/jre.12294. (査読あり)

7. Sakisaka Y, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Nemoto E. Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. *Exp Cell Res.* 336:85-93, 2015. (査読あり)

8. Boreak N, Ishihata H, Shimauchi H. A photochemical method for in vitro evaluation of fluid flow in human dentine. *Arch Oral Biol.* 60:193-198 2015. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.09.010. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

1. The 2017 Japan-NIH Joint symposium, 2017/2/15-17, Sendai  
A signaling independent of Wnt/GSK3 $\beta$  signaling is required for Wnt3a-mediated dental follicle differentiation  
Yukihiko Sakisaka, Sousuke Kanaya, Takashi Nakamura, Masato Tamura, Hidetoshi Shimauchi, and Eiji Nemoto

2. The 2017 Japan-NIH Joint symposium, 2017/2/15-17, Sendai  
Extracellular calcium increases gene expression of fibroblast growth factor-2 via a PKA and ERK1/2 pathway in mouse dental papilla cells  
Binlu Xiao, Sousuke Kanaya, Yukihiko Sakisaka, Mizuki Suto, Kentaro Maruyama, Masahiro Saito, Eiji Nemoto

3. 第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、

2016/10/7-8、新潟

Wnt3a による歯小囊分化誘導には Wnt/GSK3 $\beta$  シグナル非依存性経路が必要である  
向阪幸彦、根本英二、島内英俊

4. 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会、2015/11/12-13、東京  
ベルベリンはヒト歯根膜細胞アルカリフォスファターゼを抑制し細胞増殖を誘導する  
池野修功、金谷聡介、根本英二、須藤瑞樹、向阪幸彦、島内英俊

5. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、2015/5/15-16、千葉  
歯小囊細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる Osterix 発現への p38MAP キナーゼの関与  
向阪幸彦、根本英二、金谷聡介、中村卓史、田村正人、島内英俊

6. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、2015/5/15-16、千葉  
高濃度細胞外カルシウム刺激に対する間葉系未分化細胞の反応性の解析 ~fibroblast growth factor 2 および bone morphogenetic protein 2 の発現誘導~  
肖滨璐、金谷聡介、向阪幸彦、須藤瑞樹、齋藤正寛、根本英二

7. 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、2015/5/15-16、千葉  
新規開発チタンメンブレンによる顎骨増生  
石幡浩志、須藤瑞樹、向阪幸彦、小松秀裕、島内英俊

8. The 93rd International Association for Dental Research General Session & Exhibition, 2015/3/11-14, Boston, Massachusetts  
Wnt5a Attenuates Dental Follicle Cells Differentiation Triggered by Wnt3a  
Yukihiko Sakisaka, Eiji Nemoto, Mizuki Suto, Sousuke Kanaya, Masato Tamura, Hidetoshi Shimauchi

9. The 6th International Symposium for Inerface Oral Health Science, 2015/1/18-19, sendai  
Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells  
Yukihiko Sakisaka, Masahiro Tsuchiya, Takashi Nakamura, Masato Tamura, Hidetoshi Shimauchi, Eiji Nemoto

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

研究代表者

島内 英俊 (Hidetoshi Shimauchi)

東北大学・大学院歯学研究科・名誉教授

研究者番号：70187425

(2)研究分担者

根本 英二 (Eiji Nemoto)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40292221

佐藤 秀明 (Hideaki Sato)

東京都市大学・工学部・准教授

研究者番号：00196263

石幡 浩志 (Hiroshi Ishihata)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：40261523

金谷 聡介 (Sousuke Kanaya)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：80375097

真柳 弦 (Gen Mayanagi)

東北大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：10451600

川嶋 順子 (Junko Kawashima)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：50633707

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

田口 純志 (Junji Taguchi)

株式会社野村鍍金・技術部・グループマネージャー

吉川 亮太 (Ryouta Yoshikawa)

株式会社野村鍍金・技術部・エンジニア

藤本 佑典 (Yusuke Fujimoto)

株式会社野村鍍金・技術部・エンジニア