

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861687

研究課題名(和文)細胞シートを用いた歯根膜付着型インプラントの開発

研究課題名(英文) Periodontal regeneration induced by using a complex of implant and cultured periodontal ligament cell sheet

研究代表者

鷲尾 薫 (Washio, Kaoru)

東京女子医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：50514486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：インプラント治療は審美的にも機能的にも優れ広く行われているが、治療後の細菌感染などにより炎症が顎骨まで蔓延するインプラント周囲炎が発症するという報告があり問題となっている。そこで歯根膜組織の持つ抗炎症作用に着目し、インプラント体上に歯根膜を含む歯周組織様構造を構築可能か検討した。ラット骨髓腔内へ表面処理したチタン及び歯根膜細胞シートを移植した結果、歯根膜・セメント質様構造がチタン上に構築された。臨床応用を視野に入れ、イヌ顎骨欠損モデルへ歯根膜細胞シート・チタンインプラント複合体を移植し、歯根膜様組織をチタン上に確認できた。よってインプラント体周囲に生体内に近い環境を構築できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osseo-integrated implants have been used world-widely and contributed to keep good function and aesthetic dentistry. Recently, peri-implantitis lesion is known as a common clinical case after 5 to 10 years in use without treatment. Host-defense mechanism around implant is limited because of lack of blood circulation around implant, which is caused by the lack of periodontal ligament (PDL). The aim of this study is making a complex of implant and PDL cells. Firstly, we found the PDL cell sheets was attached to the titanium with treated surface. Next, the complex of titanium implant and PDL cell sheet was inserted into a drilled hole on canine mandible and covered with gingival flap for about 3 months. The histological results showed that periodontal ligament-like-structure was induced on the treated surface of titanium implant. The presence of a PDL around the implant allows for a more dynamic role beyond the functionally osseo-integrated implant.

研究分野：歯周組織再生

キーワード：歯根膜細胞シート インプラント 歯周組織再生

### 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントは審美的にも機能的にも優れており、高価な治療であるにも関わらず近年広く行われている。インプラント療法が高額である原因の一つとして、多くを輸入に頼っている点が挙げられる。日本初の技術開発および製品化により緩和されることが期待されている。

一方、治療後の細菌感染などが原因で、炎症が顎骨まで蔓延した状態となるインプラント周囲炎が引き起こされることも報告されており、その適切な治療法を見いだせておらず問題となっていた。国内外の研究者によって多方面から研究が行われているが、決定的な方法は見つかっていない。

インプラント周囲炎の発症メカニズムは歯周病と同じであるが、インプラント体周囲に歯根膜組織がない。歯根膜組織には線維性組織のみならず血管も発達しており、炎症時には様々な細胞を遊走させ炎症を抑制させる作用を持つ。そのため歯根膜に相当する組織を持たないインプラント体周囲には咬合圧力や炎症を緩和させるものがなく、急速に炎症が広がる原因の一つとされている。

そこでインプラント体と顎骨の間に機能的な歯根膜組織を構築させることを最終目的として検討を開始した。

天然歯周囲における歯根膜組織の再生はすでに研究されている。女子医大において培養温度を低下させるだけで酵素処理を行わなくても培養細胞をシート状に剥離可能で細胞間接着を壊さず細胞外マトリックスも付着させたまま回収可能である温度応答性培養皿が開発されている。この培養皿を用いて歯根膜由来細胞を播種して得られた細胞シートを歯周病罹患部へ移植すると歯周組織再生が誘導されることが報告されている。細胞の安全性についてもすでに検討が行われ、臨床応用可能であることが示されている。

インプラント体の形態は既存法ではねじ切りがついているスクリュタイプが一般的に使用されているが本研究では感染を誘発する形態を避け、細胞の接着性向上を図るため、ねじ切りのない表面とした。金属の選択については東京医科歯科大学生体材料研究所 医療基盤材料研究部門 金属生体材料学分野 埜隆夫教授、堤祐介准教授にアドバイスをいただき生体為害性のないチタンを用いることとした。チタンへの細胞接着性を向上させるため、チタン表面に細胞が留まりやすくさせることが必要と考え、先行研究および既存方法を参考に酸処理、プラスト処理およびリン酸カルシウムコーティングの3法を行ったものを本研究に用いることとした。

### 2. 研究の目的

(1) 表面処理を行ったチタン製インプラント体にヒト由来歯根膜細胞シートを貼付し

た、歯根膜細胞シート・チタンインプラント複合体を作製し、免疫不全ラット大腿骨髄腔内へ移植することで骨内環境においてインプラント体周囲に歯周組織様構造を構築させることが可能であるか検討を行う。

(2) 臨床応用可能なサイズの歯根膜細胞シート・チタンインプラント複合体の作製方法について検討する。さらに複合体をイヌ顎骨欠損モデルへ挿入し、顎骨内でもインプラント周囲に歯周組織様組織が構築可能であるか検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト歯根膜細胞シート・チタンインプラント複合体の免疫不全ラット大腿骨髄腔内での歯周組織再生能検討

チタンの形態は直径1mm、長さ3mm程度の円柱状のものを使用し、表面処理として酸処理、サンドブラスト処理、リン酸カルシウムコーティングを組み合わせさせて施した。ヘルシードナーよりいただいた抜去歯よりヒト歯根膜由来細胞を採取し2週間拡大培養後に温度応答性培養皿に $4 \times 10^4$ 細胞ずつ播種し10~14日程度の培養後に細胞シートを回収した。

上記の円柱状チタンに細胞シートを巻き付けた複合体を免疫不全ラット大腿骨髄腔内へ4週間移植した。大腿骨ごとサンプリングしたのち、株式会社クレハ分析センターに非脱灰研磨標本作製およびヴィラヌエバゴールドナー染色を委託した。組織標本を光学顕微鏡下にて観察を行った。

(2) イヌ顎骨を用いたイヌ歯根膜由来細胞シート・チタンインプラント複合体の移植方法検討および歯周組織再生検討

臨床応用可能なサイズのインプラント体として直径約3mm、長さ約8mmの緩い円錐形のチタンを作製し表面処理3種類を行った。

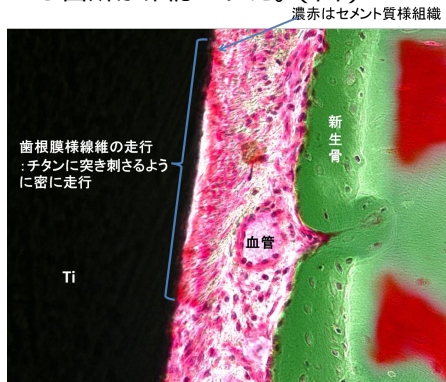
イヌに対する麻酔はミダゾラムと塩酸メドミジン筋肉注射、プロポフォルを静脈内注射して鎮静し、挿管を行いセボフルレンにて麻酔を維持した。一次手術では臼歯部より抜歯を行い抜去歯より歯根膜細胞を回収、拡大培養し、凍結保存する。移植前に最適な培養方法を検討した上で歯根膜細胞シートを作製する。抜歯後2~3ヶ月ほど治療期間を置き、治療部に骨欠損を作成してイヌ歯根膜細胞シート・チタンインプラント複合体の移植を行う。抜歯や移植処置後は感染症防止のためバイトリル筋肉注射する。移植8~11週後に麻酔下で塩化カリウムにより犠牲死させ移植部周囲組織を骨ごとサンプリングした。株式会社クレハ分析センターに非脱灰研磨標本作製およびヴィラヌエバゴールドナー染色を委託した。組織標本を光学顕微鏡下にて観察した。

#### 4. 研究成果

先行研究にて免疫不全ラットの背部皮下へ箔状チタン・ヒト歯根膜細胞シート複合体を4週間移植した結果、プラスト処理と酸処理を行ったチタンを細胞シートとともに移植した群において、肥厚した結合組織が観察された。プラスト処理・酸処理に加えリン酸カルシウムコーティングを行った群では一部のチタン表面に薄い石灰化層が形成されその上に歯根膜様線維性組織が構築されているのが観察され、生体内で観察される歯周組織に近いものが形成された。

そこで、骨内環境でも同様の再生が認められるか検討するため免疫不全ラット大腿骨内へ歯根膜細胞シートを巻き付けた棒状チタンを挿入したところ、表面処理を行ったチタンの周囲に一層のセメント質様組織が形成され、その上に歯根膜様組織が構築されている箇所が認められた。

より臨床応用に近い形で検討するため、イヌ顎骨欠損モデルを用いて臨床応用可能なサイズのインプラント体と歯根膜細胞シートの複合体を移植したところ、天然組織に類似した走行を持った歯根膜組織が構築されている箇所が確認された。(図)



図：チタンインプラントと新生骨の間に歯根膜様組織が突き刺さるように走行し、新生血管も観察された。

本成果は天然歯周囲に見られる歯周組織様構造をインプラント体周囲に構築させることが可能であることを示唆した。本法は既存法で行われていた、骨性癒着によってインプラント体を固定するという考え方を覆すものである。これによりインプラント周囲においても天然歯周囲に見られるような機能的歯根膜組織が形成されればインプラント植立後も健康的に長期保持させることが可能となり、患者のQOL向上のみならず医療費削減にもつながると考える。

#### <引用文献>

Okano T, Yamada N, Okuhara M, Sakai H, Sakurai Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials*. volume16, 1995,

p297-303.

Ishikawa I, Iwata T, Washio K, Okano T, Nagasawa T, Iwasaki K, Ando T. Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. *Periodontol* 2000.volume51,2009,p220-238.

Washio K, Iwata T, Mizutani M, Ando T, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Assessment of cell sheets derived from human periodontal ligament cells: a pre-clinical study. *Cell Tissue Res*.volume341,2010,p397-404.

Tsutsumi Y, Nishimura D, Doi N, Nomura T, Hanawa T. Difference in surface reactions between titanium and zirconium in Hanks' solution to elucidate mechanism of calcium phosphate formation on titanium using XPS and cathodic polarization. *Materials Science and Engineering C*.volume29,2009,p1702-1708.

#### 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)

[学会発表](計 4 件)

鷲尾 薫、堤 祐介、妻沼 有香、Supreda Suphanantachat、矢野 孝星、大和 雅之、岡野 光夫、塙 隆夫、石川 烈 イヌ顎骨インプラント埋入モデルを用いた歯根膜細胞シート付着型インプラントの開発、第16回日本再生医療学会総会、仙台国際センター(宮城県仙台市) 2017年3月9日。

鷲尾 薫、堤 祐介、妻沼 有香、Supreda Suphanantachat、矢野 孝星、市野瀬 志津子、大和 雅之、岡野 光夫、塙 隆夫、石川 烈 歯根膜細胞シート付着型インプラントの開発、第25回インテリジェント材料・システムシンポジウム、東京女子医科大学 TWIns(東京都新宿区) 2016年1月8日。

Washio Kaoru, Tsutsumi Yusuke, Tsumanuma Yuka, Suphanantachat Supreda, Yano Kosei, Ichinose Shizuko, Yamato Masayuki, Okano Teruo, Hanawa Takao, Ishikawa Isao. New Periodontal-like Tissue Formation on the Modified Titanium Surface. 11th Asian pacific society of Periodontology meeting, Indonesia, 2015年10月9日。

鷲尾 薫、堤 祐介、妻沼 有香、Supreda Suphanantachat、矢野 孝星、市野瀬 志津子、大和 雅之、岡野 光夫、塙 隆夫、

石川 烈 歯根膜細胞シート付着型インプラントの開発に向けた試み、第 14 回日本再生医療学会総会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2015 年 3 月 21 日。

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：IMPLANT CULTURED PERIODONTAL LIGAMENT CELL SHEET COMPLEX, METHOD FOR MANUFACTURING SAME, AND METHOD FOR USING SAME

発明者：WASHIO, Kaoru, ISHIKAWA, Isao, OKANO, Teruo, HANAWA, Takao, TSUTSUMI, Yusuke, TSUMANUMA, Yuka, SUPHANANTACHAT, Supreda, YANO, Kousei

権利者：鷺尾 薫、石川 烈、岡野 光夫

種類：特許

出願番号：15811015.5(欧州)、

15/321357(アメリカ)

出願年月日：2015-06-24

国内外の別：外国

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鷺尾 薫 (WASHIO, Kaoru)

東京女子医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：50514486

### (4) 研究協力者

矢野 孝星 (YANO, Kousei)