

授与番号 甲第 340 号

論文内容の要旨

Establishment of perpendicular protrusion of type I collagen on TiO₂ nanotube surface as a priming site of peri-implant connective fibers

－ I 型コラーゲンによる抗上皮細胞付着性を有する生体模倣インプラント表面の開発－

(野尻俊樹、Chia-YuChen、David M. Kim、John Da Silva、Cliff Lee、前野雅彦、Arthur A McClelland、Bryan Tse、Shigemi-Ishikawa-Nagai、畠山航、近藤尚知、Masazumi Nagai)

(Journal of Nanobiotechnology, 第 17 巻、第 34 号, 平成 31 年 3 月掲載)

野尻^{のじり} 俊樹^{としき}

I. 研究目的

インプラント周囲炎の原因として、インプラントと軟組織の界面構造における天然歯との違いが挙げられる。天然歯では、コラーゲン線維の一部がセメント質に垂直に入り込んだ結合組織性の付着により、上皮のダウングロスを防止している。しかし、インプラント周囲粘膜のコラーゲン線維はインプラント表面と平行に走行しているため、インプラント表面に結合組織性付着は存在せず、封鎖性に乏しく、容易に上皮のダウングロスを引き起こす。天然歯におけるコラーゲン線維の走行を模して、インプラント表面に I 型コラーゲンを垂直に配向することが可能になれば、天然歯類似の強固な付着構造が形成され、臨床的にも有用であることが予測される。本研究の目的は、酸化チタンナノチューブアレイ製作条件の至適化および I 型コラーゲンを垂直配向させる手技の開発、また、この新規表面修飾の安定性評価、および新規表面修飾酸化チタンナノチューブアレイへの上皮細胞の付着動態の検討であった。

II. 研究方法

初めに、チタン片表面に、陽極酸化によって直径 50~100nm の酸化チタンナノチューブを最も多く形成するための条件を決定した。電圧および通電時間を調整しながら、陽極酸化後のチタン片表面を走査型電子顕微鏡にて確認し、形成された酸化チタンナノチューブの数を計測した。酸化チタンナノチューブアレイを有するチタン片に、電気泳動により I 型コラーゲンを付着させたものを実験群として用いた。対照群として、平滑なチタン片に電気泳動により I 型コラーゲンを付着させたもの、及び前述の 2 種類のチタン片にホスホン酸誘導体処理により I 型コラーゲンを付着させたものを用いた。チタン片上に付着された I 型コラーゲンの結合安定性は、超音波洗浄試験により評価した。フーリエ変換赤外分光光度計 (FTIR) により、チタン片表面の I 型コラーゲンの残存量を比較することで、I 型コラーゲンの結合力を分析した。不死化ヒト歯肉上皮細胞 (OBA9) を各チタン片上で培養することにより、I 型コラーゲン付着様式の違いが細胞挙動へ及ぼす影響を検討した。

Ⅲ. 研究成績

1. 陽極酸化を 30 ボルトの電圧下にて 3 時間行うことで、明瞭な輪郭を有し、規則正しく配列された酸化チタンナノチューブアレイが観察された。
2. 原子間力顕微鏡による観察において、電気泳動により I 型コラーゲンを酸化チタンナノチューブアレイに付着させたチタン片上では、I 型コラーゲンはナノチューブ表面に垂直に付着し、ナノチューブの縁および内面に微細な突起様構造として観察された。
3. チタン片の超音波洗浄試験後に FTIR による表面分析を行った結果、電気泳動により I 型コラーゲンを酸化チタンナノチューブアレイに付着させたチタン片では、I 型コラーゲンが最も多く残存していた。
4. 各群における不死化ヒト歯肉上皮細胞の培養の結果、垂直に付着した I 型コラーゲンを有する酸化チタンナノチューブアレイ表面では、他の群と比較して少数の伸展の抑制された上皮細胞が観察された。

Ⅳ. 考察及び結論

新規表面修飾法により、チタン表面に垂直に配向させた I 型コラーゲンは、高い結合力を有し、その微細な表面構造は上皮細胞の初期付着を抑制する傾向があることが明らかとなった。すなわち、上皮細胞付着抑制環境下で線維芽細胞が優先的に結合・線維化することで天然歯類似の封鎖構造獲得が可能となり、本手法をインプラントに応用した時、インプラント周囲炎の発症率減少に寄与できることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 野田 守 教授 (歯科保存学講座う蝕治療学分野)
副査 八重柏 隆 教授 (歯科保存学講座歯周療法学分野)
副査 近藤 尚知 教授 (補綴・インプラント学講座)

歯科におけるインプラント治療は、その高い予知性と患者満足度により欠損補綴治療の第一選択肢として広く用いられている。近年、インプラント治療が普及する一方で、治療に伴う合併症が問題となっている。その一つに、インプラント周囲炎がある。インプラント周囲炎の原因の多くは細菌感染と言われている。天然歯では、コラーゲン線維の一部がセメント質に垂直に入り込んだ結合組織性の付着により、上皮のダウングロースに伴う細菌の侵入を防止している。一方、インプラント周囲粘膜のコラーゲン線維はインプラント表面と平行に走行しているため、インプラント表面に結合組織性付着は存在しない。したがって、インプラント周囲の粘膜は、封鎖性に乏しく、容易に上皮のダウングロースを引き起こすため、細菌感染に対する防御機構が不十分と言える。天然歯におけるコラーゲン線維の走行を模して、インプラント表面に I 型コラーゲンを垂直に配向することが可能になれば、天然歯類似の強固な付着構造が

形成され、細菌感染に対する抵抗性が高くなり、インプラント周囲炎の発症抑制につながる事が予測される。最終的な目的は、インプラント周囲炎の発症を抑制できるインプラント表面修飾法の開発にある。本研究における目的は、酸化チタンナノチューブアレイ製作条件の至適化およびI型コラーゲンを垂直配向させる手法の開発、また、この新規表面修飾の安定性評価、および新規表面修飾酸化チタンナノチューブアレイへの上皮細胞の付着動態の検討であった。

初めに、チタン片表面に、陽極酸化によってチタンナノチューブを形成した。チタンナノチューブアレイを有するチタン片に、電気泳動によりI型コラーゲンを付着させたものを実験群として用いた。対照群として、平滑なチタン片に電気泳動によりI型コラーゲンを付着させたもの、及び前述の2種類のチタン片にホスホン酸誘導体処理によりI型コラーゲンを付着させたものを用いた。チタン片上に付着されたI型コラーゲンの結合安定性は、超音波洗浄試験により評価した。フーリエ変換赤外分光光度計(FTIR)により、チタン片表面のI型コラーゲンの残存量を比較することで、I型コラーゲンの結合力を分析した。不死化ヒト歯肉上皮細胞(OBA9)を各チタン片上で培養することにより、I型コラーゲン付着様式の違いが細胞挙動へ及ぼす影響を検討した。

原子間力顕微鏡による観察において、電気泳動によりI型コラーゲンを酸化チタンナノチューブアレイに付着させたチタン片上では、I型コラーゲンはナノチューブ表面に垂直に付着し、ナノチューブの縁および内面に微細な突起様構造として観察された。これは、従来のインプラント表面にはない、天然歯に類似した形態でのチタン表面へのコラーゲン修飾である。また、チタン片の超音波洗浄試験後にFTIRによる表面分析を行った結果、電気泳動によりI型コラーゲンを酸化チタンナノチューブアレイに付着させたチタン片では、I型コラーゲンが最も多く残存していた。さらに、各群における不死化ヒト歯肉上皮細胞の培養の結果、垂直に付着したI型コラーゲンを有する酸化チタンナノチューブアレイ表面では、他の群と比較して少数の伸展の抑制された上皮細胞が観察された。これは、この新規表面修飾が上皮のダウングロスを防止する可能性を示唆している。

上記より、新規表面修飾法により、チタン表面に垂直に配向させたI型コラーゲンは、高い結合力を有していた。本手法をインプラントの粘膜貫通部に応用した際には、天然歯類似の封鎖構造獲得が可能となり、上皮のダウングロスに伴う細菌の侵入を防止し、インプラント周囲炎の発症率減少に寄与できることが示唆された。よって本研究の内容は、学位論文に値すると評価した。

主査・副査から野尻に対して、多くの質問があり、下記のような質疑応答が行われた。

野田教授より

問：本手法によりI型コラーゲンを表面に垂直に付着したインプラントが生体に適応され

たとき、代謝過程でそのI型コラーゲンはどう処理されるか？

答：本研究の最終的な目的は、本手法によりインプラント表面に垂直に付着したI型コラー

ゲンが生体内で安定して機能し、生体の分泌するコラーゲンと統合・同化することで天然歯類似の強固な封鎖構造を得ることにある。生体内では、軟組織および硬組織の両者に代謝機構が存在し、双方からの栄養供給を受けることで歯周組織は良好に維持されているが、インプラント自体にはそのような代謝機構が存在しないため、人工的にインプラント表面に付着したI型コラーゲンがリモデ

リングの結果どのような代謝を受けるのかは、現段階では不明である。今後、動物実験等で確認が必要な検討課題と思われる。

問：コラーゲンの大きさはどれくらいか？

答：コラーゲンモノマーは直径 1.5 nm、長さ 300 nm と言われている。SEM 像および AFM 像で確認できるコラーゲン線維と思われる像はそれよりも太く見えるが、コラーゲンモノマーが集積し、線維化しているためと思われる。

問：ポリアクリルアミドゲルの格子構造中を I 型コラーゲンがうまく通過するのか？

答：本手法における I 型コラーゲンの電気泳動では、電気泳動条件は通法に基づいて 25 ボルトで 2 分間の通電を行った。走査型電子顕微鏡 (SEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) による観察の結果、電気泳動により I 型コラーゲンはチタン表面に垂直に付着したように思われる。

問：コラーゲン線維の配向を意図的にコントロールすることは出来ないのか？

答：今回の実験では、電気泳動装置の使用法に基づいた前述の 1 条件のみで I 型コラーゲンの電気泳動を行った。ポリアクリルアミドゲルの濃度および電気泳動における電圧や通電時間を調整することで、I 型コラーゲンの付着状を改善することは可能と考える。

問：なぜサンプルの n 数は 3 だったのか？

答：研究を行うにあたり、本研究と同様にインプラントの表面性状改変を目的としたいくつかの論文を参考とした。それらの実験におけるサンプル数は多くの場合 n=3 を用いていたことから、本実験においても n=3 を採用した。今後の研究においては、野田先生からご指摘があったようにサンプルサイズの検出力分析等を行った上でサンプルサイズを決定したい。

問：本手法をどのようにインプラント表面に応用するつもりか？

答：本実験では、インプラントとその周囲軟組織の強固な封鎖性獲得を最終的な目的としていることから、インプラント頸部あるいはアバットメント部に選択的に I 型コラーゲンを修飾することが必要と考える。しかし、現状で得られている結果は *in vitro* における平面に対しての I 型コラーゲン修飾の成功のみである。野田先生のご指摘にあった通り、インプラント埋入に先立ち、事前にコラーゲンを選択的にコーティングする手法の開発が必要と考える。

八重柏教授より

問：天然歯では歯根膜がセメント質に対して垂直に入り込むことにより、その配列方向を維持しているが、本研究においてはどのようにコラーゲン線維の方向を規定および維持しているのか？

答：本研究において、天然歯のように歯根膜線維の配列方向を歯面に対して垂直に規定および維持するセメント質は存在していない。よって本手法では、電気泳動の際にポリアクリルアミド

ゲルを介在させることにより、コラーゲン線維の方向をナノチューブアレイに対して垂直に規定した。また、フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR）による分析の結果、電気泳動されたコラーゲンは共有結合に類似した形態で、ナノチューブ表面上に化学的に強固に結合していることが明らかとなった。

問：臨床応用へ移行する際の課題は？

答：本研究において、電気泳動によりナノチューブ表面へ垂直に付着した I 型コラーゲンの結合安定性を評価するため、超音波洗浄試験を施行した。試験結果を FTIR により分析した結果、電気泳動により付着した I 型コラーゲンはナノチューブ表面に垂直に対して高い結合強度を有していることが明らかとなった。しかし、実際の臨床におけるインプラント埋入では、インプラントと骨の摩擦等の機械的な外力が多く影響するため、現状の結果のみでは臨床における結合安定性に関して言及することは出来ない。また、現状では本手法を選択的にインプラント頸部あるいはアバットメント部に応用することは出来ない。よって、今後は I 型コラーゲンをインプラント表面に選択的にコーティングする手法の開発および動物実験等による生体内での安定性の評価が必要になると思われる。

近藤教授より

問：実際には、どれくらいの割合で I 型コラーゲンがサンプル表面に対して垂直に付着していたのか？

答：ナノチューブアレイを有するチタン片表面に対し I 型コラーゲンの電気泳動を行った際、サンプル表面の 30%程度に垂直に付着したと思われる I 型コラーゲンの層が確認された。今後は、より広範囲に垂直に付着した I 型コラーゲンの層を獲得するため、ポリアクリルアミドゲルの濃度および電気泳動条件の調整等の工夫が必要になると考える。

ハーバード大学では、本研究成果をさらに継続・発展させ、コラーゲンのインプラント表面への結合精度をより高めている。本年の IADR で成果発表が予定されている。今後は動物実験において、さらなるエビデンスを構築していくべきであるとのアドバイスがあった。