

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592629

研究課題名（和文）：2相性作用型再生移植材と細胞移植によるインプラント周囲炎治療法の確立

研究課題名（英文）：Establishment of Peri-implantitis treatment using a dual-purpose graft and cell transplantation.

研究代表者：松山 孝司 (MATSUYAMA TAKASHI)

鹿儿岛大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：40253900

研究成果の概要（和文）：本研究で、感染チタン表面におけるリン酸三カルシウム（ $\beta$ -TCP）パウダーアブレーション除染効果と処理後の骨形成タンパク（BMP-2）を担持させたポリ乳酸グリコール酸共重合体(PLGA)マイクロカプセルによる細胞親和性を評価した。 $\beta$ -TCP パウダーアブレーションは、細菌の除去効果を発揮した。BMP-2 担持率は、37.5%であった。担持 BMP-2 は、前駆骨芽細胞様細胞のアルカリフォスファターゼ活性を上昇させた。以上より、 $\beta$ -TCP パウダーアブレーションによる除染後、担持 BMP-2 は、チタン表面に骨再生を誘導することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of the present study was to evaluate cell biocompatibility and decontamination effect using  $\beta$ -TCP air-abrasion and BMP-2-incorporated PLGA microcapsule.  $\beta$ -TCP air abrasion decontamination led to microscopically visible alterations of the implant surface, however, it seems have a good potential to remove cytotoxic bacterial components from titanium surfaces. BMP-2 encapsulation efficiency from PLGA microcapsules was 37.5%. BMP-2 incorporated PLGA microcapsule elevated alkaline phosphatase activity in preosteoblasts. These results obtained suggest that encapsulated BMP-2 induces bone regeneration on titanium surface after removing cytotoxic bacterial components by  $\beta$ -TCP air-abrasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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・歯周外科学

キーワード：インプラント周囲炎、脱感染処理、細胞増殖因子、マイクロカプセル、骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

歯の長期保存と併行して歯周炎治療の残存歯の咬合力の負担軽減、分散にインプラント治療が取り入れられている。しかし、歯科インプラントによる咀嚼機能回復の長期成績が報告されている一方で、インプラント周囲炎という新たな疾患がクローズアップさ

れてきている。インプラント周囲の支持骨吸収の原因に感染性の要因が考えられる。インプラント周囲の細菌集落の形成と、それに引き起こる炎症反応は歯周炎と類似している。その細菌叢はある特定の細菌すなわち歯周病原細菌が検出されていることから、口腔内の天然歯の歯周病診断を怠ってはなら

ない。

インプラント周囲炎に対しては、インプラント表面の複雑性、周囲骨との親和性の再獲得性および喪失した骨の代用骨の問題等から適切な治療法は確立されていないのが現状である。

そこで、細菌感染させたチタン表面の脱感染処理効果を実証し、骨新生作用のある薬物治療の材料調整が成功すれば、今後のインプラント周囲炎治療の確立に効果的であると考へ、本研究を遂行するに至った。

## 2. 研究の目的

インプラント周囲炎により失われた歯槽骨の再生を期待した研究の結果は、歯周組織に対する再生療法よりも成功率は低いと報告されている。たとえば、Perddon ら (1994) は、歯周組織の再生に用いるバリアメンブレン (遮断膜) で 11%、Schou ら (2003) は自家骨と遮断膜を応用して 45%の再生を得たと報告している。この原因として、a. 汚染チタン表面の脱感染法 b. 汚染面の周囲骨との再獲得性 c. 骨代用材の適性が問題に挙げられる。自家骨移植は、骨誘導、骨伝導、骨形成のすべてにおいて優れた移植材であるが、採取に制限があり、大きな外科的侵襲を伴う。

細胞、増殖因子、担体の 3 要因である組織工学的手法を応用することは、生じにくい組織再生を可能にするうえで欠かせない手段となっている。これらの手法を用いた臨床応用がすでに皮膚、骨、軟骨、神経、角膜などの組織でなされているところである。しかし、歯科インプラントにおいての有用性は、これからの研究結果が待たれるところであり、明らかになっていないのが現状である。

そこで、本研究は、細菌感染チタン表面における  $\beta$ -TCP パウダーアブレーション脱感染処理効果と処理後の骨芽細胞親和性を評価し、BMP-2 担持マイクロカプセルの骨再生に与える影響を調べることにした。

## 3. 研究の方法

### (1) チタンの酸処理

チタンディスク (径 15mm) を酸処理 (48%  $H_2SO_4$ , 60°C, 1 時間) 後、水洗→超音波洗浄 (20 分) →70%エタノール洗浄→水洗 (20 分) →乾燥

### (2) 細菌培養

*A. naeslundii* (ATCC12104) と *P. gingivalis* (ATCC33277) が、嫌気培養下で Brain Heart Infusion に 37°C でそれぞれ培養された。

### (3) 汚染チタンの脱感染処理

*A. naeslundii* と *P. gingivalis* をチタンに感

染後、 $\beta$ -TCP パウダーアブレーション処理、超音波処理、未処理したものと未感染チタンの 4 グループに分けた。

### (4) 細胞培養

マウス由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) が DMEM(10%FBS) を用いて、5%CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下にて培養された。4~6 代目を本実験に使用した。

### (5) 走査電子顕微鏡観察

チタン試料を化学固定 (グルタルアルデヒド固定とオスミウム酸固定) 後、通法に従い、アルコール脱水、t-ブタノール臨界点乾燥処理を行った。観察は、イオンスパッタコーティング蒸着後、走査電子顕微鏡 (JSM-5510LV, JEOL, Tokyo) にて観察した。

### (6) BMP-2 担持 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) マイクロカプセルの作製

200mg PLGA5010 をジクロロメタン 2ml に溶解。0.01% rBMP-2/0.1% BSA200 $\mu$ l を PLGA 溶解液と混合させた後、超音波処理と 5%polyvinyl alcohol を用いた double emulsion technique を利用して作製した。

### (7) 担持 BMP-2 量測定

BMP-2 担持マイクロカプセルからの BMP-2 量を BMP-2 ELISA キット (QuantikineBMP-2<sup>®</sup>) で測定。

### (8) 担持 BMP-2 刺激による骨芽細胞分化

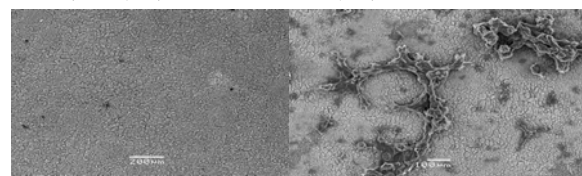
MC3T3-E1 細胞 (10<sup>5</sup>cells) を 24 穴プレートに播種した。24 時間後、担持 BMP-2 (200ng/ml) で刺激を開始し、刺激開始後 4d, 7d, 14d, 21d 後にアルカリフォスファターゼ染色を行った。

## 4. 研究成果

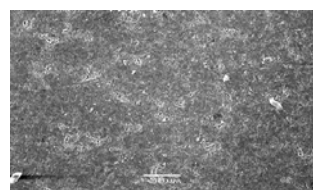
チタン表面観察 (走査電子顕微鏡像)

### (1) 未感染群と感染未処理群

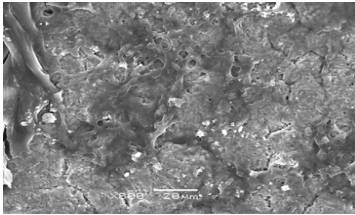
未感染群                      感染群



### (2) 感染後アブレーション処理

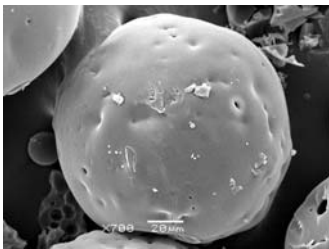


(3)  $\beta$ -TCP パウダーアブレーション処理後の細胞付着

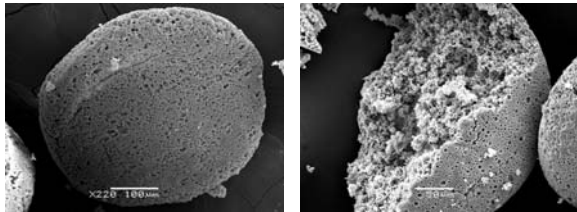


(4) BMP-2 担持マイクロカプセルの開発

1. 未担持 PLGA マイクロカプセル

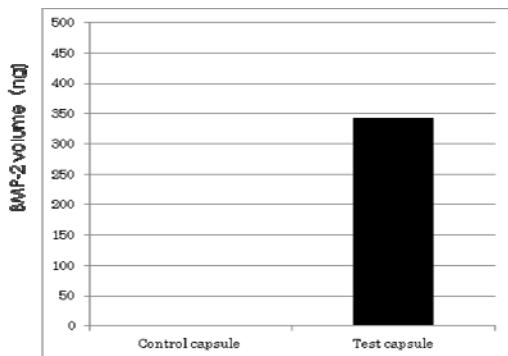


2. BMP-2 担持マイクロカプセル (原型と断面)

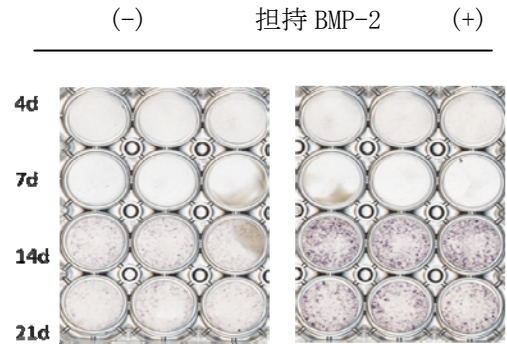


(5) BMP-2 担持マイクロカプセル (111mg) からの BMP-2 担持量

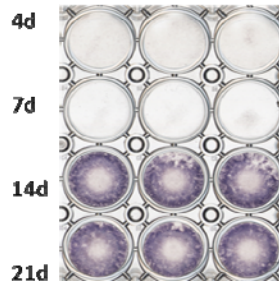
	BMP-2 担持 マイクロカプセル
BMP-2 担持率	37.5%



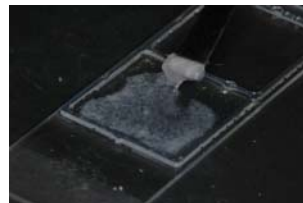
(6) アルカリフォスファターゼ染色



$\beta$ -glycerophosphate/Ascorbic acid



(7) BMP-2 担持マイクロカプセル/ゼラチン複合体の開発



(8) まとめ

炭酸水素ナトリウムを用いたエアアブレーションによる感染チタン表面の脱感染処理効果では、チタン表面にパウダー中の残留物が付着し、また、チタン表面性状を変化させることから骨の再結合を困難にする。また、化学薬品などの消毒材は、チタン表面上では細菌成分を含んだ石灰化物の除去効果はないと報告されている。 $\beta$ -TCP パウダーアブレーションによる細菌感染チタン表面の脱感染処理効果の報告はまったくない。

本研究で、 $\beta$ -TCP パウダーアブレーションはチタン表面性状を変化させるものの、チタン表面に付着した  $\beta$ -TCP による本来の骨伝導性が期待され、本研究結果が示すように骨芽細胞の付着に問題ないことが示された。また、BMP-2 担持マイクロカプセル中の担持

BMP-2 は、未担持のマイクロカプセルに比べ、多くの多孔性を示すことが断面で形態的に観察された。また、BMP-2 担持マイクロカプセルは、芽細胞の活性化を誘導できることが明らかになった。

BMP-2 担持マイクロカプセルは、乾燥状態では、粒上で操作性が悪いため、ゼラチンカプセルを加えると粘性が向上し、操作性かつ保持能が増すことから骨充填材としての機能を果たすと考えられる。

以上より、インプラント周囲炎で汚染されたチタン表面の脱感染効果と骨の再結合にβ-TCP パウダーアブレーション処理とBMP-2 担持マイクロカプセルは有効であることが示唆された。また、BMP-2 担持マイクロカプセルはゼラチンでコーティング可能であることから、ゼラチンからの徐放性を配慮した2層性作用型移植材としての機能が期待される。

#### 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 7 件)

1) 松山 孝司<sup>\*</sup>, 丸山 浩美, 上村 裕希, 松井 竜太郎, 長岡 英一  
フレアアウトを呈した歯周炎患者の動的治療開始前にインプラント埋入を計画した症例. 日口腔インプラント誌, 2011, 24 (11), 12-18

2) Nakamura T, Hasegawa-Nakamura K, Sakoda K, Matsuyama T, Noguchi K. Involvement of angiotensin II type 1 receptors in interleukin-1β-induced interleukin-6 production in human gingival fibroblasts. Eur J Oral Sci. 2011, 119(5), 345-51, 査読有 DOI: 10.1111/j.1600-0722.2011.00850.x

3) Arikawa H, Takahashi H, Minesaki Y, Muraguchi K, Matsuyama T, Kanie T, Ban S. A method for improving the light intensity distribution in dental light-curing units. Dent Mater J. 2011, 30(2), 151-157, 査読有 doi:10.4012/dmj.2010-114

4) Shirakata Y, Taniyama K, Yoshimoto T, Miyamoto M, Takeuchi N, Matsuyama T, Noguchi K. Regenerative effect of basic fibroblast growth factor on periodontal healing in 2-wall intrabony defects in dogs. J Clin Periodontol, 2010, 37, 374-381, 査読有 doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01539.x.

5) Sayaka Kozono, Takashi Matsuyama<sup>\*</sup>, Kamal Krishna Biwasa, Ko-ichi Kawahara, Yumiko Nakajima, Takehiko Yoshimoto, Yutaka Yonamine, Hideshi Kadomatsu, Salunya Tancharoen, Teruto Hashiguchi, Kazuyuki Noguchi, Ikuro Maruyama Involvement of the endocannabinoid system in periodontal healing. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394 (4), 928-933, 査読有 doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.080

6) Yutaka Yonamine, Takashi Matsuyama, Takahiro Sonomura, Hironobu Takeuchi, Yasushi Furuichi, Masanori Uemura, Yuichi Izumi, Kazuyuki Noguchi. Effectable application of vascular endothelial growth factor to critical sized rat calvaria defects. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010, 109, 225-231, 査読有) doi:10.1016/j.tripleo.2009.09.010

[学会発表] (計 6 件)

1) Relationship between human gingival tissues and the renin-angiotensin system. Toshiaki Nakamura, Kozue Hasegawa, Kenji Sakoda, Takashi Matsuyama and Kazuyuki Noguchi. 2010 Oct.30 to Nov.2 2010 American Academy of Periodontology 96<sup>th</sup> annual meeting (Honolulu)

2) 骨分化刺激したマウス iPS 細胞のラット  
歯周組織欠損への移植

迫田賢二、白方良典、中村利明、松山孝司、  
野口和行

2010年9月19日

第53回秋季日本歯周病学会学術大会（高松）  
秋季特別号第52巻 p84

3) ヒト歯肉組織中のレニン・アンジオテン  
シン系（RAS）の発現および培養ヒト歯肉線  
維芽細胞における RAS の機能解析

中村利明、長谷川 梢、迫田賢二、松山孝司、  
野口和行

2010年5月14-15日

第53回春季日本歯周病学会学術大会（岩手）  
春季特別号第52巻 p17

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松山孝司 (MATSUYAMA TAKASHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
研究者番号：40253900

### (2) 研究分担者

吉元剛彦 (YOSHIMOTO TAKEHIKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：60419653

宮本元治 (MIYAMOTO MOTOHARU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教  
研究者番号：50452901