

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10021

研究課題名(和文) タンパク質固定化により軟組織付着の獲得を目指したジルコニアインプラントの創製

研究課題名(英文) Invention of zirconia implant which has a tight attachment towards soft tissue by means of protein immobilization

研究代表者

早川 徹 (Hayakawa, Tohru)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：40172994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ジルコニアインプラントの軟組織付着能の向上を目指して、まず、ジルコニアへの二段階タンパク質吸着についてQCM法を用いて解析し、タンパク質吸着はその順番が影響することを見出した。さらに、フィブロネクチンを固定化したジルコニアインプラントの動物埋入実験を行い、インプラント付着軟組織において、インプラント体に垂直に配向しているコラーゲン線維が確認できた。本研究の結果から、フィブロネクチン固定化は軟組織付着能の向上に効果があることが結論できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、歯科用インプラントとして、ジルコニアが注目を集めている。本研究では、生体内を模倣した二段階吸着を解析することによって、ジルコニアへのタンパク質に関する新たな知見を得ることができた。また、我々が開発したトレシルクロリド法を用いることによって、ジルコニアに細胞接着タンパク質を固定することができた。軟組織付着能の向上だけでなく、生体反応を制御できる生理活性物質固定化ジルコニアインプラント創製の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：First, two-step protein adsorption was analyzed by using QCM method to improve the soft tissue attachment on zirconia implant. It revealed that the order of protein adsorption influence the following protein adsorption. Next, we did the animal implantation experiments of fibronectin adsorbed zirconia implants. Perpendicularly oriented collagen fibers towards zirconia implants were observed in the attached soft tissue. It concluded that fibronectin immobilization was effected to improve the soft tissue attachment.

研究分野：歯科理工学

キーワード：トレシルクロリド ジルコニア Y-TZP 細胞接着タンパク質 フィブロネクチン 軟組織付着 QCM

### 1. 研究開始当初の背景

歯科用インプラント材料としては、現在ではチタンまたはチタン合金が用いられている。しかしながら、チタンまたはチタン合金には、歯肉からの金属色が透けて見えるメタルトーンや歯肉の退縮による金属の露出などの審美性の問題点などが指摘されている。また、症例数はそれほど多くはないものの金属アレルギーの危険性も懸念されており、歯科インプラント患者の 0.6% にチタンアレルギーがみられるとの報告もある。

一方、欧米ではチタンの代替材料としてジルコニアが注目を集めている。歯科材料としてイットリアやセリアを数パーセント添加した部分安定化ジルコニア(ジルコニア)が、クラウンやブリッジ、義歯床などに臨床応用されている。インプラント体としても欧米では臨床応用が進んでおり、10 社以上のメーカーが参入している。わが国では医療用具としていまだに認可はされていないが、これら欧米のインプラント体の原材料のほとんどは日本のメーカーである。

ジルコニアインプラントの骨適合性向上のために、サンドブラスト処理などの表面処理が報告されており、アパタイトコーティングやレーザ加工処理によりジルコニアインプラントの骨適合性が向上することを報告してきた。しかしながら、ジルコニアインプラントの軟組織付着に関しては、ほとんど報告がない。ジルコニアはチタンに比較して硬度が高く機械加工が困難であり、化学反応性も低く、タンパク質固定などの化学処理も困難である。

インプラント体を生体内に埋入すると、生体内での反応としてタンパク質の吸着が起こり、その後、骨形成や軟組織付着などの生体反応が起こる。そこで、細胞接着タンパク質をジルコニア表面に固定化することによって、細胞付着が促進され、骨形成や軟組織付着が促進されるとの仮説をたてた(図1)。研究では、我々が開発したトレシルクロリド法によりジルコニア表面へのタンパク質の固定化を試み、硬組織適合性のみならず、軟組織付着能にも優れたジルコニアインプラントの開発を目指す。

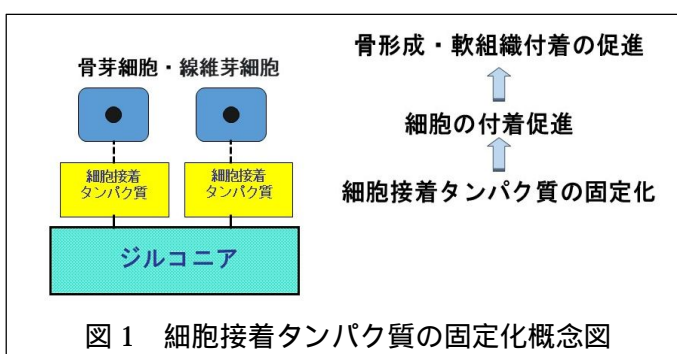


図1 細胞接着タンパク質の固定化概念図

### 2. 研究の目的

インプラント体を生体内に埋入すると、生体内での反応としてタンパク質の吸着が起こり、その後、骨形成や軟組織付着などの生体反応が起こる。本研究では、まず、基礎的な検討としてジルコニアへのタンパク質吸着挙動について検討を行う事とした。ナノグラムレベルで定量化できる水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を用いて、フィブロネクチンおよびアルブミンのジルコニア表面への二段階吸着について解析を行った。一定周波数で振動している水晶発振子にタンパク質などの生体分子が吸着すると、物質の量に比例して振動数が減少する。この振動数の減少挙動からタンパク質の吸着量や吸着速度などを求めて、タンパク質の吸着挙動を解析することができる。今までに、各種のタンパク質のジルコニアに対する吸着をQCM法で調べて来たが、生体内では複数のタンパク質が共存している。そこで、本研究では、より生体を模倣して、2種類のタンパク質を吸着させる順番を変化させた2段階吸着についてQCM法で検討した。

次に、軟組織付着能の向上を目指してジルコニア表面へのタンパク質固定を試みる。インプラントとしては、硬組織適合性の向上も必須である。我々はチタン表面への新規なタンパク質固定化方法として、チタンの水酸基とトレシルクロリド( $\text{ClSO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ )との反応を利用したトレシルクロリド法を開発した。この方法は、簡便にかつ確実にタンパク質が固定化でき、様々な種類のタンパク質や成長因子、ペプチドの固定化が可能である。本研究では、このトレシルクロリド法をジルコニアに応用して、タンパク質の固定化を試みる。硬組織適合性、軟組織付着能については動物埋入実験によって評価し、タンパク質固定化の効果について検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) QCMを用いたジルコニア表面へのタンパク質二段階吸着の解析

タンパク質二段階吸着の解析には、ジルコニアセンサーを装着した27 MHzのQCM装置(AFFINIX QN $\mu$ , ULVAC)を用いた。吸着させるタンパク質としては、フィブロネクチン(Fn, Human plasma fibronectin, Harbor Bio-Products)およびアルブミン(Alb, ウシ血清由来, WAKO)を用い、それぞれを0.5 mg/mLでリン酸緩衝液(PBS, pH=7.4)に溶解させた。まず、QCMのセンサーセル内(温度設定:  $25 \pm 1$  , 攪拌条件: 1000 rpm)に0.5 mLのPBSを注入し、その後、調整したFnあるいはAlb溶液を以下の手順で吸着させた。

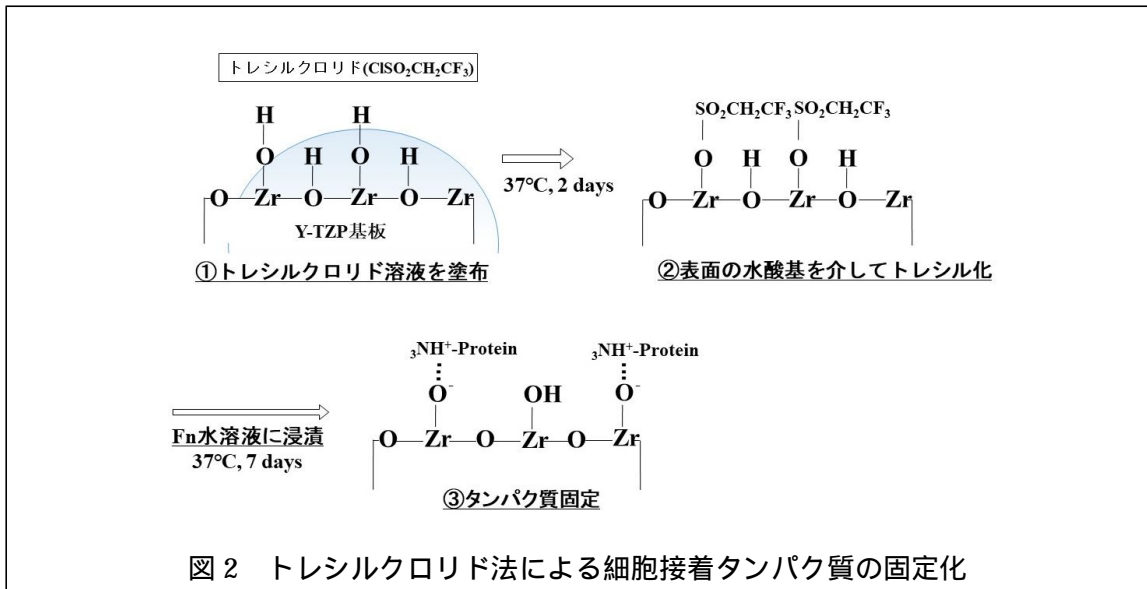
手順1) Fn-Alb系列: まずステップとしてFn溶液を滴下し60分間吸着させた後に、ステップとしてAlb溶液を滴下し60分間吸着させた。

手順 2) Alb-Fn 系列：ステップ として Alb 溶液を滴下し同様に 60 分吸着させた後に，ステップ として Fn 溶液を滴下し吸着挙動を 60 分間調べた．

タンパク質総吸着量を Sauerbrey の式を用いて算出した．さらに，振動数減衰曲線のカーブフィッティングにより見かけの反応速度定数  $k_{obs}$  を得た．得られたデータは，t 検定を行い危険率 5% で統計処理した．

### (2) トレシルクロリド法によるジルコニアへの細胞接着タンパク質の固定化

図 2 にトレシルクロリド法によるジルコニアへの細胞接着タンパク質の固定化の概要を示す．イットリア 3 mol% 正方晶部分安定化ジルコニア (TZ-3YSB-E, 東ソー) 製ディスク (Y-TZP, 12 mm, 厚さ 1 mm) を細胞接着タンパク質の固定化確認飼料とした．耐水研磨紙 (#4000) およびダイヤモンドペーストにて鏡面研磨を行って表面仕上げを行った．Y-TZP 表面にトレシルクロリド溶液 (2,2,2-トリフルオロエタンスルフォニルクロリド,  $CF_3CH_2SO_2Cl$ ) を塗布し, 37 °C で 2 日間放置した．0.5 mg/mL のフィブロネクチン (Human plasma fibronectin, Harbor Bio-Products) 水溶液を調整し, トレシル化 Y-TZP を 37 °C で 7 日間反応させ, Fn/Y-TZP を作製した．



その後, SEM, AFM による表面観察, XPS および FT-IR による試料表面の分析, 接触角の測定を行い, 細胞接着タンパク質の固定化を確認した．以下, 測定条件を示す．

SEM による表面観察: Au 蒸着後 SEM (JSM-5600LV, JOEL) を使用し, 加速電圧 15 kV にて観察を行った．

AFM による表面微細構造の観察と表面粗さ測定: AFM (Easyscan2, Nanosurf AG, カンチレバー: Tap190Al-G, Budget sensors) を使用し, 大気中, タッピングモードにて観察した．得られた画像から Sa 値を算出した．

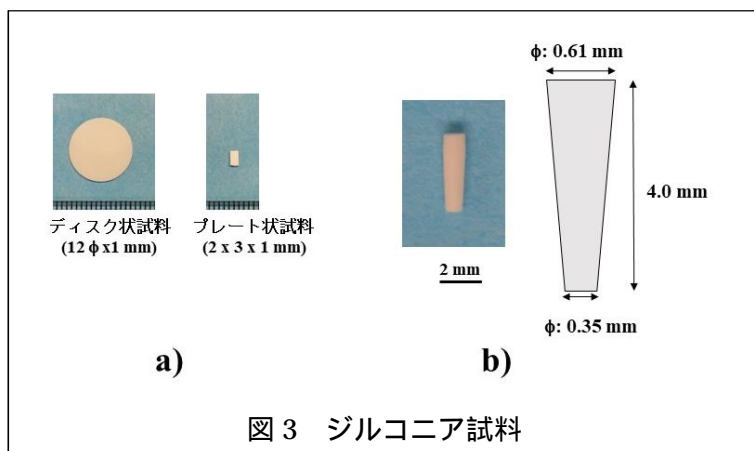
XPS および FT-IR による試料表面の元素分析: XPS (ESCA-750, Shimadzu) および FT-IR (ATR 法, FTIR-8400S, Shimadzu) を使用し, タンパク固定化後の定性分析を行った．

接触角測定: 純水に対する表面のぬれ性を, 接触角計 (DMe-201, 協和界面科学) を用いて測定した．

### (3) 動物埋入実験

細胞接着タンパク質としてフィブロネクチンを固定化したジルコニアインプラントの骨形成能, および軟組織付着能について動物埋入実験によって評価した．

まず, 骨形成の評価としては, ディスクから加工したプレート状基板 (図 3a, 1.0 × 2.0 × 3.0 mm) に前記と同様にトレシルクロリド法により Fn/Y-TZP を作製した．コントロールとして鏡面研磨した Y-TZP 試料を作製した．それぞれの試料を, 6 週齢の Wistar 系



ラット(雄)の大腿骨欠損部に埋入して、新生骨の形成状態を評価した(鶴見大学歯学部動物実験委員会:承認番号19A050,20A002,21A010,22A008)。埋入から2週,4週後にインプラント試料を組織ごと摘出し,ホルマリン固定,アルコール系列による脱水処理を行い,メチルメタクリレートレジンにより包埋した。その後,EXAKT 精密切断機および精密研磨機を用いて,非脱灰研磨標本を作製した。標本は,塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を行い,光学顕微鏡を用いてインプラント周囲の新生骨形成状態を観察した。

軟組織付着能の評価には,CAD/CAM法にて製作したシリンダー状Y-TZP試料(図3b,上径0.35mm,下径0.61mm,長さ4.0mm)を用いた。機械加工処理されたY-TZP試料に180 $\mu$ mアルミナ粒子を用いてサンドブラスト処理を行った後にフッ酸処理を施した(サンドブラスト+フッ酸処理)。トレシルクロリド(CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl)をY-TZP試料表面全体に塗布し,37 $^{\circ}$ Cで2日間反応させた。その後,0.5mg/mLのフィブロネクチン水溶液にトレシル化Y-TZPを浸漬し,37 $^{\circ}$ Cで7日間反応させ,フィブロネクチンの固定化を行った。6週齢のWistar系ラット(雄)の上顎第一大臼歯を鉗子にて抜歯を行い,その後デンタルリーマーを用いて抜歯窩を拡大し,インプラント体の埋入を行った(鶴見大学歯学部動物実験委員会 承認番号:21A043,22A007)。インプラント体としては,サンドブラスト+フッ酸処理(SLA)群,フィブロネクチン固定化(Fn/SLA)群の2群を用いた。インプラント埋入3週後に,試料を周囲組織とともに採取し,前記と同様の手順で非脱灰研磨標本を作製し,偏光顕微鏡にて軟組織の付着状態およびコラーゲン線維の配向状態について観察した。

#### 4. 研究成果

(1) QCMを用いたジルコニア表面へのタンパク質二段階吸着の解析

図4に二段階吸着させたタンパク質の振動数減衰曲線を示す。両系列共に測定開始直後から振動数の減少が認められた。総吸着量は600ng/cm<sup>2</sup>であり,ジルコニアはチタン表面へのタンパク質吸着量よりも大きな減衰を示した。

2ステップ終了後の各段階でのFnおよびAlbの吸着量を比較した結果,FnおよびAlb吸着量はFn-Alb系列とAlb-Fn系列の間で有意差は認められなかった(図5,  $p > 0.05$ )。一方,ステップ1の初期吸着速度  $k_{obs}$  は,Fn,Alb共に,第一段階のタンパク質吸着によりステップ1の吸着速度より有意に遅く(図6,  $p < 0.05$ )なることが判明した。

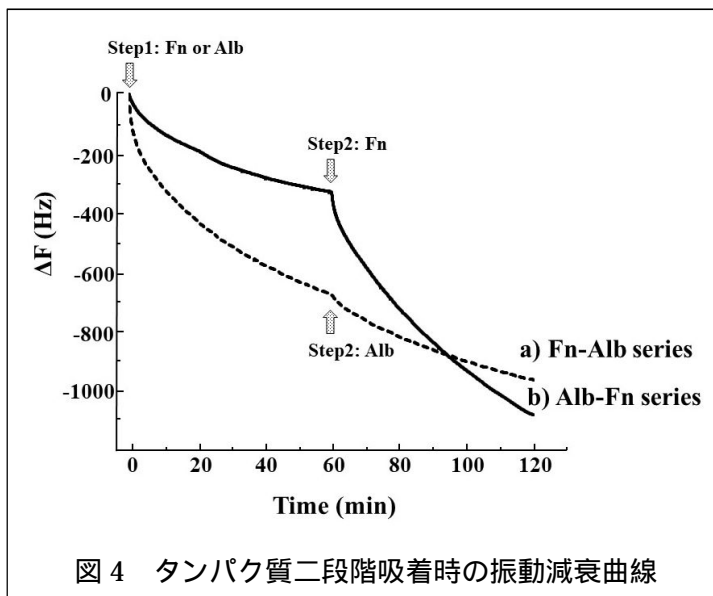


図4 タンパク質二段階吸着時の振動減衰曲線

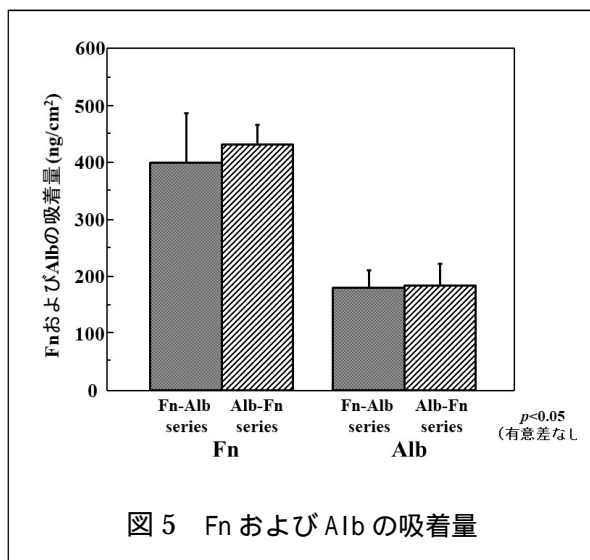


図5 FnおよびAlbの吸着量

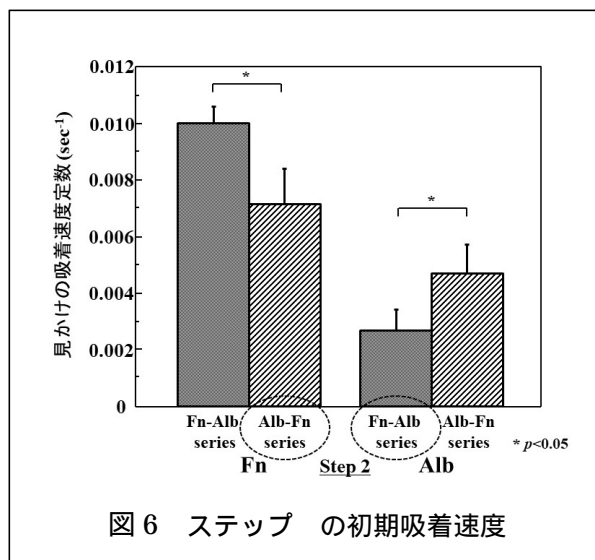


図6 ステップ1の初期吸着速度

(2) トレシルクロリド法によるジルコニアへの細胞接着タンパク質吸着

SEMおよびAFM観察の結果,Y-TZPにおいては研磨痕および空孔が観察された。Fn/Y-TZPでは

不定形の隆起や突起などの堆積物が試料表面全体に観察された。両者の表面粗さを比較すると、Y-TZP (約 3.3nm) よりも Fn/Y-TZP (約 57.1nm) において有意に高い Sa 値を認めた (Y-TZP: 約 3nm, Fn/Y-TZP: 約 57nm,  $p < 0.05$ )。さらに Fn/Y-TZP においては、Y-TZP に比較して有意に低い接触角が得られ (Y-TZP: 約 60°, Fn/Y-TZP: 約 30°,  $p < 0.05$ )、親水性表面を示した。XPS 分析の結果、Fn/Y-TZP 表面にアミド基由来の N1s ピークを認めた。また FT-IR 測定においもアミド基に帰属したピークを認め、Fn の固定化が確認できた。以上の結果から、トレスルクロリド法によりジルコニア表面へ Fn を簡便な操作方法により化学的に固定できることが判明した。

動物埋入実験では、ラット大腿骨へのインプラント埋入後 2 週および 4 週のインプラント周囲の組織学的観察により、Y-TZP に比較して Fn/Y-TZP においてより多くの新生骨形成が認められる傾向であることが分かった (図 7)。また Fn/Y-TZP 試料においては、骨髓腔内のインプラント周囲に新生骨形成が認められる傾向にあった。

軟組織付着の観察では、SLA 群、Fn/SLA 群を、どちらもインプラント体に付着している軟組織の存在が確認できた。偏光顕微鏡により、コラーゲン線維の配向状態を観察したところ、SLA 群では天然歯と同様にインプラント体に並行に配列している線維が多く存在していたが、Fn/SLA 群では部分的ではあるがインプラント体に垂直に配向していた (図 8)。このことから、Fn 固定はコラーゲン線維の配向に影響している可能性が示唆された。コラーゲン線維の配向を垂直に制御することによって軟組織の付着能を向上させることができると期待される。

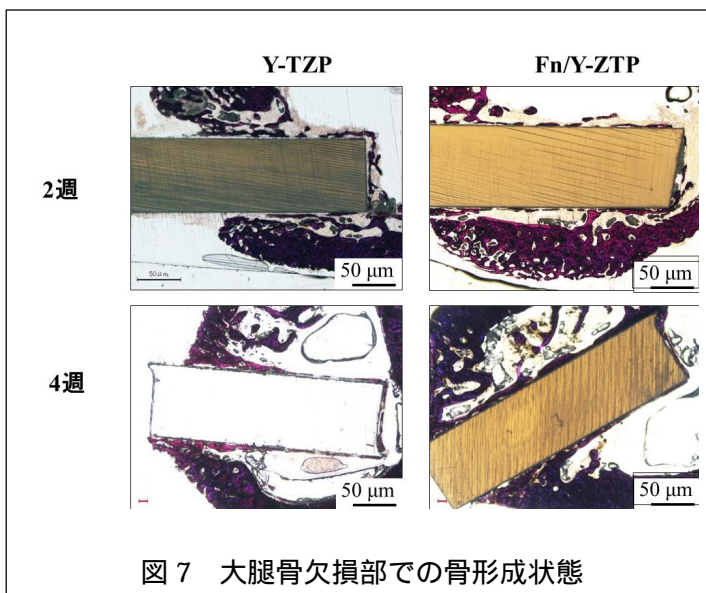


図 7 大腿骨欠損部での骨形成状態

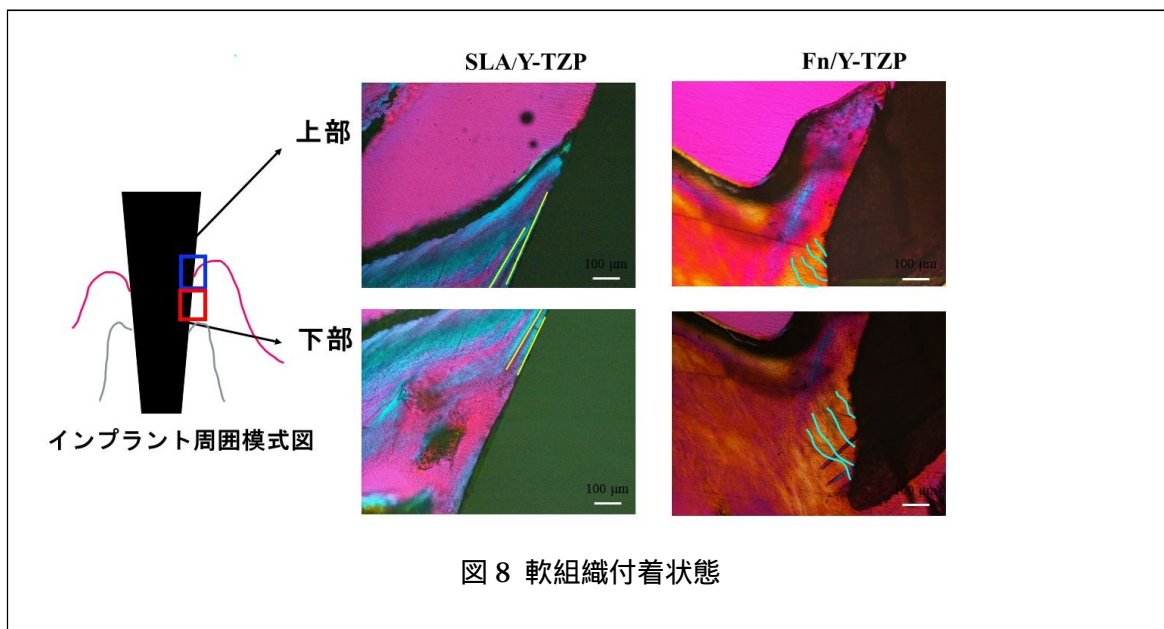


図 8 軟組織付着状態

以上、本研究では、まず、ジルコニアへのタンパク質吸着は、タンパク質の吸着の順番によって影響されることも見出した。さらにジルコニア表面に細胞接着タンパク質を固定化することによって、骨髓内での骨形成が促進され、インプラントに付着している軟組織ではインプラント体に垂直に配向しているコラーゲン線維が観察された事から、Fn 固定化は軟組織付着能の向上に効果があることが示唆された。今後は、軟組織付着状態のより詳細な観察によって、インプラント体に垂直に配向しているコラーゲン線維の割合やインプラント周囲のコラーゲン線維の定量的な評価検討を行っていく。また、Fn 以外の細胞接着タンパク質についても固定化の効果を検証し、硬組織適合性のみならず、軟組織付着能にも優れたジルコニアインプラントの開発を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hirota Masatsugu, Hayakawa Tohru	4. 巻 2021
2. 論文標題 QCM Analysis for Two-Step Adsorption of Albumin and Fibronectin on Zirconia Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advances in Materials Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/2492387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 早川 徹	4. 巻 36
2. 論文標題 デンタルインプラント 表面改質のあれこれ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯科産業学会誌	6. 最初と最後の頁 17~25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 早川 徹
2. 発表標題 シンポジウム デンタルインプラントーあれこれ
3. 学会等名 令和3（2021）年度秋期第78回日本歯科理工学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古屋広樹, 廣田正嗣, 早川 徹
2. 発表標題 トレスルクロリド法によるジルコニア表面へのフィブロネクチン固定化
3. 学会等名 令和3（2021）年度春期第77回日本歯科理工学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早川 徹
2. 発表標題 デンタルインプラント - 表面改質のあれこれ
3. 学会等名 日本歯科産業学会第37回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 早川 徹
2. 発表標題 接着そしてインプラント
3. 学会等名 日本歯科理工学会令和4年度関東地方会セミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masatsugu Hirota, Tohru Hayakawa
2. 発表標題 Two validation approaches using QCM analysis and animal studies to clarify the bone compatibility of zirconia implants.
3. 学会等名 International Dental Materials Congress 2022（国際歯科材料会議2022 / IDMC2022）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------