

口腔インプラント体としての窒化チタンコーティングの有用性

著者	山崎 弘太郎
学位名	博士（歯学）
学位授与機関	北海道医療大学
学位授与年度	平成27年度
学位授与番号	30110甲第278号
URL	http://id.nii.ac.jp/1145/00010483/

口腔インプラント体としての窒化チタンコーティングの有用性

平成 27 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

山崎弘太郎

【諸言】

近年、窒化チタンコーティング法は骨切削用バーや部分床義歯のメタルフレームの表面処理等に用いられており、細胞親和性が高いことから (Annuziata et al., 2011) 生体材料の表面処理にも有用と考えられる。また窒化チタンのアーキオンプレーティング法によるコーティングによって硬質で緻密な窒化チタン薄膜を形成することができ (Sawase et al., 2005)、耐食性も向上することが知られている。更に、窒化チタンをコーティングした場合、菌の付着が減少するという報告もある (Größner et al., 2001)。

そこで本研究では、アーキオンプレーティング法により窒化チタンをコーティングした口腔インプラント体の有用性を検証するために、同インプラント体 (以下 TiN) と、機械研磨 (以下 M)、ハイドロキシアパタイトコーティング (以下 HA)、およびブラスト処理 (以下 B) したインプラント体を用いて動物実験を行い、初期の骨形成能および *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T (以下 *P. g*) の付着性について検討した。

【材料と方法】

1. インプラント体

ミューワンハイドロキシアパタイトインプラント用に機械加工されたスクリュー型のインプラント体を M とした。M にハイドロキシアパタイト粉末にてサンドブラस्ट処理した B, B にアーキオンプレーティング法により窒化チタンコーティングした TiN, B に薄膜ハイドロキシアパタイトコーティングした HA を用いた。

2. インプラント体表面の分析

スレッド部間の表面を、走査電子顕微鏡を用いて観察し、3D 測定レーザー顕微鏡による表面粗さ (Ra) を計測した。

3. 細菌付着試験

4 種類の disk と *P. g* 菌体懸濁液を嫌気培養後、付着生菌数を CFU 測定で、死菌を含めた付着全菌量を全 DNA 定量法で測定した。

4. 実験動物と期間

北海道医療大学動物実験委員会の承認を受け (承認番号第 72 号)、成熟雄日本白色ウサギ 20 羽用いた。実験期間は 2 週間とした。

5. 細菌懸濁液の調整

3 日間嫌気培養した *P. g* 菌体を PBS で OD_{660 nm} = 10 に調整した。

6. インプラント体埋入手術

全身麻酔下で左右大腿骨遠心端部内側に埋入窩を形成し、同一のインプラント体を左右の大腿骨にそれぞれ一本ずつ埋入した。埋入後アバットメント部とインプラント体部の境界部分に絹糸を 4 周巻き付け、左側には細菌懸濁液を細菌添加群 { 以下, 菌 (+) } として、右側には PBS を細菌無添加群 { 以下, 菌 (-) } として、それぞれ添加した。

7. 試料摘出および組織切片試料作製

2 週間経過後、インプラント体埋入部を周囲骨も含めて摘出した。ポリエステル樹脂にて包

埋し、埋入方向に平行に試料を薄切し、機械研磨した(Nakanisi et al., 2011).

8. 細菌の検出

実験終了後にペーパーポイントをインプラント体周囲溝内に挿入し、細菌を回収後 DNA を抽出した. 16 S rDNA ユニバーサルプライマー と *P. g* 特異的プライマー (Bogen et al, 1999)を用い PCR によって細菌を検出した.

9. Contact microradiography(CMR)像の観察

組織切片を軟 X 線発生装置で撮影し、その CMR 像から Image J で骨吸収面積、骨吸収深度および骨吸収幅を計測した.

10. 塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の観察

試料切片に塩基性フクシン・メチレンブルー重染色を施し、光学顕微鏡にて得られた組織像を Image J にて画像解析を行い、骨インプラント接触率(Bone to Implant Contact ratio ;BIC)を求めた.

【結果】

1. 材料表面の分析

M は平滑表面で、HA, B および TiN の表面には極端な高低差はない凹凸が認められた.

2. 細菌付着試験

TiN で得られた CFU 値と全 DNA 量は、他の試料 (M, B, HA) と比較すると小さな値を示した.

3. 実験動物

埋入 2 週間後の患部では、菌 (+) 群全てにおいて腫脹と発赤が認められ、HA と B においては排膿も認められた. 菌 (-) 群では、全てで腫脹、発赤、排膿は認められなかった.

4. 細菌の検出

ユニバーサルプライマーでは、菌 (-) 群の全てで PCR 産物は検出されなかった. 菌 (+) 群では、TiN 以外の埋入部位から PCR 産物が検出された. *P. g* 特異的プライマーでは、菌 (+) 群の HA, B, M にのみ PCR 産物が認められ、菌 (+) 群の TiN および菌 (-) 群の HA, B, TiN, M では、PCR 産物は検出されなかった.

5. CMR 像観察

菌 (-) 群では、いずれも顕著な骨吸収像は見られず、骨吸収面積、骨吸収深度、骨吸収幅共に、各試料間で意差は認められなかった. 菌 (+) 群では、HA および B において著しい骨吸収が認められ、HA の骨吸収面積が M, B および TiN と比較して有意に大きかった.

6. 塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の観察

新生骨様組織の形成量は菌 (-) 群に比べ、菌 (+) 群でやや少ない傾向がみられた. 菌 (-) 群の上部 BIC は M, HA, B, TiN 間で有意差は認められなかった. 菌 (+) 群の上部 BIC は、TiN が M, HA および B と比較して有意に大きな値を示した. 下部 BIC 値においては、菌 (-) 群および菌 (+) 群共に、M が HA, B, TiN と比較して有意に低い値を示した.

【考察】

口腔インプラント治療が成功するためには早期に確実なオッセオインテグレーションを獲得することが必要である。オッセオインテグレーションは生体側の条件の他にインプラント体の材質や形状、表面性状などが複雑に関与し、表面粗さの粗いインプラントに骨芽細胞様細胞が高いレベルで接着すると報告されている。(Keller et al., 1994) しかし、表面粗さの増大にともなって細菌が付着しやすくなるという報告もある (Pier-Francesco et al., 2006)。

本研究では、同サイズで表面性状が異なる4種類のインプラント体の表面を検証し、細菌を付着したインプラント体をウサギ大腿骨に埋入し、2週間後における細菌の存在の有無や感染の波及による骨吸収の程度、骨形成に及ぼす影響を検討した。

1. 材料表面の分析

HA, B, および TiN の表面には微小な凹凸が全面にみられたが、M の表面は平滑で表面粗さも有意に小さかった。また、M 以外の表面には微細な粒子から構成された皮膜の存在が確認された。しかしこれらの皮膜は極めて薄いため、サンドブラस्टィング処理後の表面粗さの値は大きく変化しなかったものと考えられる。

2. 細菌付着試験

Pier-Francesco et al は(2006)、チタンデスク表面の Ra 値が増大すると *P. g* が付着しやすくなると報告している。本研究では M の Ra 値が最も低く、HA, B, TiN のそれは M と比べて大きく、3種類の間において差が小さいにもかかわらず、付着生菌数と死菌を含めた付着菌体量のいずれも、TiN が最も少なくなり、Pier-Francesco 等の結果とは一致しなかった。しかし本実験では表面粗さだけではなく、表面の化学的性状が異なるインプラント体を使用していることから、多様な化学性状の違いが、*P. g* の付着に複合的に関与していると推定された。

3. インプラント体埋入部位の2週間後の患部所見

菌(-)群では腫脹、発赤、排膿がなく、菌(+)群では全てで腫脹が起り、HA と B では TiN や M に比べ腫脹部位が大きく、膿瘍の形成や自潰する例もみられた。これはインプラント埋入部における腫脹はインプラント体に *P. g* 菌が付着し周囲組織に感染が引き起こされた結果と思われた。

4. PCR 検査

P. g 特異的プライマーを用いた PCR 解析では、菌(+)群の HA, B, M において *P. g* が検出されたが、TiN では検出されなかった。TiN 自体が細菌の付着を減少させると報告 (Größner et al., 2001 ; Scarano et al., 2003) されている事から、細菌は TiN 表面に付着、増殖しづらいため検出されなかったのではないかと考えられる。

5. CMR 像観察

HA の骨吸収面積、骨吸収深度および骨吸収幅が最も大きいのは、HA では他と比較して細菌が付着しやすく、急激に骨吸収を引き起こしやすいと言う報告 (市川ら, 1996 ; Nakazato et al., 1989) と一致している。

6. 塩基性フクシン・メチレンブルー重染色像の所見

菌(+)における TiN の上部 BIC は、骨吸収面積の値が小さく、他のインプラント体の上部

BIC と比較して大きい値となった。しかし実験期間を長期にした場合の更なる検討が必要である。

【結論】

本研究の結果から、*P. g* の付着量が少なく、骨吸収を抑制し、高い新生骨組織の形成能を有する優れたインプラント体として、TiN が有用であることが示唆された。

【文献】

Annunziata M, Oliva A, Basile M, Giordano M, Mazzola N, Rizzo A, Lanza A, & Guida L. The effects of titanium nitride-coating on the topographic and biological features of TPS implant surfaces. *Journal of Dentistry* 39:720-728, 2011.

Bogen G & Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endodont J.* 32(3):204-210.

Größner-Schreiber B Griepentrog M, Haustein I, Müller WD, Lange KP, Briedigkeit H & Göbel UB. Plaque formation on surface modified dental implants. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res.*12:543-51, 2001.

市川哲雄, 弘田克彦, 蟹谷英生, ルディウィギアント, 川本苗子, 堀内政信, 三宅洋一郎, 松本直之. アパタイトインプラントの細菌付着に関する研究— 摘出インプラントの観察と細菌付着試験—. *Jpn Prosthodont Soc*, 40: 40-45, 1996.

Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughna RA, and Zahariasl R. Characterizations of titanium implant surfaces.III.*Journal of Biomedical Materials Research* 28, 939—946. 1994.

Nakanisi Y, Wang PL, Ochi M, Nakanisi K & Matubara H. Low-intensity Pulsed Ultrasound Stimulation Significantly Enhances the Promotion of Bone Formation Around Dental Implants .*Journal of Hard Tissue Biology* 20 : 149-156, 2011.

Nakazato G, Tsuchiya H & Sato M . In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implants* 4 :321-326, 1989.

Pier-Francesco A, Adams RJ, Waters M & Williams D. Titanium surface modification and its effect on the adherence of *Porphyromonas gingivalis*: an in vitro study. *Clin. Oral Implants Res.* 17: 633-637, 2006.

Sawase T, Yoshida K, Taira Y, Kamada K & Atsuta M. Abrasion resistance of titanium nitride coatings formed on titanium by ion-beam-assisted deposition. *J Oral Rehabilitation* 32:151-157, 2005.

Scarano A, Piattelli M, Vrespa G, Caputi S & Piattelli A. Bacterial adhesion on titanium nitride coated and uncoated implants :an *in vivo* human study *Journal of Oral Implantology* 29:80-85, 2003