

〔原著〕

細菌汚染された粗面のチタン表面に対する除染法と 生物学的成長因子を用いた骨分化の検討

仲川 碩¹⁾, 門 貴司²⁾, 根津 尚史³⁾, 建部 廣明⁴⁾, 永野 恵司⁵⁾, 古市 保志¹⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野
- 2) 北海道医療大学総合教育学系歯学教育開発学分野
- 3) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系生体材料工学分野
- 4) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系組織学分野
- 5) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野

Effects of chemomechanical decontamination methods and biological growth factors for bone differentiation on rough titanium surfaces

Hiroshi NAKAGAWA¹⁾, Takashi KADO²⁾, Takashi NEZU³⁾,
Hiroaki TAKEBE⁴⁾, Keiji NAGANO⁵⁾, Yasushi FURUICHI¹⁾

- 1) Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 2) Department of Integrated Dental Education, Division of Dental Education Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 3) Section of Biomaterials and Bioengineering, Division of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 4) Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 5) Division of Microbiology, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : peri-implantitis, alkaline electrolyzed water (AEW), EMD, FGF-2, rough titanium surfaces

Abstract

Peri-implantitis is a plaque-associated pathological condition affecting both the soft and hard tissues around implants. Ichioka et al. (2019) indicated that air-abrasive debridement followed by alkaline electrolyzed water (AEW) beneficial in restoring cytocompatibility of previously bacteria-contaminated smooth titanium surfaces. Since currently available implants are made of rough surfaces, it is also interesting to evaluate the potential effects of the proposed method on the rough surface. In addition, the present *in vitro* study assessed the effects of biological growth factors on the osteogenic cells when cultivated on the decontaminated titanium rough surfaces.

Contaminated titanium discs were mechanically cleaned using air-abrasive debridement with erythritol powder. The discs were then immersed either in 0.9% NaCl, 0.05% AEW, or 3% H₂O₂ for 1 minute. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was used to evaluate the chemical surface properties of the treated titanium discs. In addition, osteoblast-like cells (MC3T3-E1) were cultured on the treated titanium discs in cell medium in adjunct to either

enamel matrix derivative (EMD) or basic fibroblast growth factor (FGF-2). The cytocompatibility was evaluated by counting the number of attached cells and measuring cell spread area. The bone differentiation was evaluated by ALP expression of the cells.

XPS analysis demonstrated that AEW group showed significantly lower organic contamination than the NaCl and H₂O₂ groups. The number of attached cells and their spread in AEW group were significantly greater compared to those in the other groups. ALP expression was also significantly enhanced in the AEW group compared with that in the NaCl group. No additional effects of EMD or FGF-2 in ALP expression were observed.

Air-abrasive debridement followed by AEW may be beneficial to restore cytocompatibility and enhance bone differentiation of previously bacterial contaminated rough titanium surfaces. Our findings suggest that neither FGF-2 nor EMD provide additional benefits in the differentiation of MC3T3-E1 cells.

緒 言

1990年代に入ると、インプラント周囲炎が問題視され始めた (Ericsson et al., 1992). インプラント周囲炎とは、細菌感染により生じるインプラント周囲骨の破壊を伴う炎症性病変であると定義されている (Berglundh et al., 2018). インプラント周囲炎における治療は、基本的に歯周炎と同様で、インプラント表面に付着しているプラークを取り除き、消炎させ、周囲組織の破壊の進行を防ぐことである。さらには、インプラントと骨が直接再結合する再オッセオインテグレーションを獲得することが最終的な目標である。インプラント周囲炎の治療後の再オッセオインテグレーションについての *in vivo* study のシステマティックレビューによると、実験的インプラント周囲炎モデルに対して行った治療法で得られた再オッセオインテグレーション率は、実験間で1～84%と大きく差があったことが報告されている (Renvert et al., 2009). この原因として予知性の高い表面除染法が確立されていないことが考えられている。実際、いくつかの基礎研究 (Kreisler et al., 2005; Schwarz et al., 2009; Al-Hashedi et al., 2017) においても、汚染したインプラント表面に対して既存の機械的除染法を施し、可視レベルでのプラークの除去はできてもチタンの表面性状と細胞親和性は新品のチタンと同じ状態まで回復させることはできなかったと報告されている。このように、汚染されたインプラント体の除染法は確立されていない。そこで著者らは、アルカリ性電解水 (AEW) に着目し研究を進めてきた。AEWは、pH9.0の弱アルカリ性であり、次亜塩素酸イオン (OCl^-) と次亜塩素酸 (HOCl) を含み、殺菌作用とタンパク分解作用があることが知られている (Fukuzaki et al., 2006). AEWは、現在歯科の分野では洗剤や器具の消毒剤、根管内や歯周ポケット内の洗浄用としても使用されている。根管洗浄に使用する次亜塩素酸ナトリウムより安全に口腔内で使用できる。AEWを使用した汚染されたチタンディスク表面の除染に関しては、2020年のIchiokaらの研究が報告されている。この研究では、口腔内バイオフィルムの初期定着菌として知られており、インプラント周囲炎のバイオフィルム構成要素とされている *Streptococcus (S.) gordonii* が使用されている (Koyanagi et al., 2013; Shibli et al., 2008). 細菌汚染された平滑面のチタン表面において、エアフロー処理に続くAEW処理による有機窒素化合物分解効果により、新品のチタン表面に近い状態にまで細胞親和性を回復させることが明らかとなり、除染後のインプラント体と骨の再オッセオインテグレーション

が有意に働く可能性が示唆されている (Ichioka et al., 2020). しかし、近年インプラントの表面性状は、粗面であることが多い。粗面の方が平滑面と比較して骨芽細胞の接着、分化が起こりやすいため、平滑面と比較し早期にオッセオインテグレーションが得られる有意性がある (Yokose et al., 2018). 一方、インプラント周囲炎に罹患した後の骨破壊の進行スピードやインプラント周囲炎に対する外科的治療の成功率を低下させてしまう (Carcuac et al., 2013; Carcuac et al., 2016). したがって、本研究では、平滑面において良好な結果が得られたAEWについて粗面においてもその除染効果を確認することとした。

インプラント周囲炎によって引き起こされた骨欠損は、圍繞型の骨欠損が多い (Schwarz et al., 2007). インプラント体のサポートがオッセオインテグレーションによって成立していることから、インプラント周囲炎の治療においては再オッセオインテグレーションの獲得が重要である。2001年のPerssonらの動物実験の報告では、ビーグル犬の下顎左側に平滑面のインプラントを、右側に粗面のインプラントを埋入し、リガチャーを用いてインプラント周囲炎を惹きさせた。インプラント周囲炎の治療として、生理食塩水に浸したガーゼを使用してインプラント表面を除染した。6ヶ月後、生検標本を作製し、組織学的に評価したところ、平滑面のインプラントでの再オッセオインテグレーション率は22%、粗面のインプラントでの再オッセオインテグレーション率は84%であった (Persson et al., 2001). このように、粗面のインプラント表面においては、十分な除染が行われた場合、再オッセオインテグレーションが期待できる可能性がある。

2019年のTomasiらのインプラント周囲炎に対する臨床研究のシステマティックレビューによると、インプラント周囲炎に対する再生療法の臨床的効果を調べるためのコントロール群のあるランダム化比較試験は、3つのみであった (Tomasi et al., 2019). その中で、インプラント周囲炎に対して、フラップ手術単独とフラップ手術+エナメルマトリックスタンパク質 (EMD) による治療効果を比較したIshedらの報告では、1年後の骨レベルはフラップ手術単独群で0.1mmの減少が認められ、フラップ手術+EMD群で0.9mmの増加が認められたが両群間に有意差は認められなかったとされている。また、プロービングポケット深さ (PPD) の変化量に関しても、フラップ手術単独群で3.0mm、フラップ手術+EMD群で2.8mmと両群間に有意差は認められなかったとしている (Ished et al., 2016). フラップ手術単独群

とフラップ手術+骨補填材 (Porous titanium granules ; PTG) 群を比較したJepsenらの臨床研究の報告では、1年後のPPDの変化には両群間に有意差は認められなかったが、骨充填量はフラップ手術+PTG群で有意に増加したと報告されている (Jepsen et al., 2016). しかし、このような所見の解釈において、X線上で骨補填材と新生骨とを区別することが難しいという点は考慮すべきである。現在、日本で使用されている歯周組織再生療法薬剤としてはEMD、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) 等が一般的である。また、除染後のチタンディスクに対してEMDやFGF-2等の生物学的成長因子の効果を比較検討している *in vitro* studyの結果報告はない。このように、インプラント周囲炎に対する再生療法の効果を評価した臨床研究、基礎研究、及び動物実験の結果報告は少なく、その成否の要因について詳細な研究が行われていないのが現状である。

従って、本研究の目的は、細菌性バイオフィームによって汚染された粗面のチタン表面に対する、エアフロー、AEW、過酸化水素水を用いた機械的・化学的除染法の効果を *in vitro* studyによって評価すること、さらには、除染後のチタンディスクにおける生物学的成長因子による前骨芽細胞の骨分化能を比較検討することとした。

材料および方法

1. チタン試料

インプラント体に使用されている材料であるJIS第2種純チタンディスク (JIS, Japan Industrial Specification H 4600, 99.9 mass % Ti ; Morita Corp., Tokyo, Japan) を用いた。チタンディスク (直径14.0mm, 厚さ3mm及び直径5.0mm, 厚さ1.5mm) を自動研磨機 (ECOMET3, Buehler, Ltd., Evanston, IL, USA), 中間研磨用バフ (ULTRA PAD[®]; Buehler, Ltd.), ダイヤモンドポリッシングコンパウンド (MetaDi[®], II Paste, Buehler, Ltd.), ダイヤモンドポリッシングサスペンション (MetaDi[®]; Mono Suspension, Buehler, Ltd.), 仕上げ研磨用バフ (Micro Cloth, Buehler, Ltd.), コロイダルシリカ (Buehler, Ltd.) を使用して鏡面研磨を施した。研磨したディスクは脱イオン蒸留水で10分間の超音波洗浄を行った。その後、ディスクを8%フッ酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) によるエッチングを7分間行い、15分間の超音波洗浄後、73.5%硫酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) と21.6%塩酸 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) の混合酸により10分間のエッチングを行った。再度15分間の超音波洗浄後、表面粗さ

計 (HANDYSURF[®], Tokyo Seimitsu Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用し算術平均粗さ (Ra) = 1.0~2.0 μ mとなっていることを測定した。エッチング処理前及び処理後のチタンディスクの表面形状を走査電子顕微鏡 (SEM ; SSX-550, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) を用いて観察した。

2. 細菌の培養条件

S. gordonii ATCC 10558^TをTY寒天培地 (TY ; Bacto[™] tryptic soy broth and Bacto[™] yeast extract) を用いて37 $^{\circ}$ Cの嫌氣的条件 (N₂ : 80%, CO₂ : 10%, H₂ : 10%) で3日間培養した。

3. 化学的除染剤

本研究では、0.9%生理食塩水 (NaCl ; Hikari[®], Hikari Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan), 0.05%アルカリ性電解水 (AEW ; pH 9.0 ; EPIOS CARE[®], EPIOS Corp., Tokyo, Japan), 及び3%過酸化水素水 (H₂O₂ ; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いた。全ての試薬は40 $^{\circ}$ Cに調製し使用した。

4. チタン表面の処理と除染法

1) チタンディスク上でのバイオフィーム形成

*S. gordonii*を純培養したTY寒天培地から釣菌し、TY液体培地に懸濁し、OD660 : 0.5 (0.5 \times 10⁸CFU / mL) になるように菌液を調製した。細菌懸濁液500 μ lをチタンディスクを入れた24穴プレートに播種し、37 $^{\circ}$ Cで24時間嫌気培養した。培養開始から12時間後に増殖培地の交換を行った。

2) チタン表面の除染法

バイオフィームを形成後、チタンディスクは、エリスリトールパウダー (Air-Flow[®] powder PLUS, EMS, Nyon, Switzerland) を用いたエアフローシステム (Air-Flow Master, EMS) を最大出力 (水 ; 0.5MPa, 空気 ; 0.75MPa) で使用することで除染した。装置の先端とディスク間距離は2mmとし、一貫性を保つため、ディスクに対して90度の角度で設定した。ノズルは、チタンディスクの中心から周縁までを4回の同心円運動で10秒間移動させた。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、NaCl, H₂O₂またはAEWに60秒間浸漬させ、それぞれNaCl群, H₂O₂群, またはAEW群とした。コントロールには細菌汚染も表面除染もおこなっていないエッチング直後のPristineのチタン表面を用いた (Pristine群)。

5. マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) の培養

細胞は10cmのポリスチレン培養ディッシュ (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 上で10%ウシ胎児血清 (FBS, Merck, Tokyo, Japan), 1%ペニシリン/ストレブ

トマイシン (Fuji Film Wako Pure Chemical Corporation, Ltd.), L-グルタミン (Fuji Film Wako Pure Chemical Corporation, Ltd.), フェノールレッド含有細胞培養用培地 (α -MEM, Fuji Film Wako Pure Chemical Corporation, Ltd.) を使用して培養した。細胞は37°C, 5%CO₂の環境下で培養した。細胞継代は, 80%コンフルエンスに達した細胞を使用した。骨分化培地には, 1%アスコルビン酸 (Takara Bio Inc, Siga, Japan), 0.2%ヒドロコルチゾン (Takara Bio Inc) 及び2% β -グリセロリン酸 (Takara Bio Inc) を含有した α -MEMを使用した。培地は3~4日ごとに交換し, 3~5継代の細胞を使用した。

6. 表面除染及び化学特性の解析

チタン表面の除染及び表面化学特性の解析は, X線光電子分光分析装置 (XPS; ESCA-850, Shimadzu Co. Ltd., Kyoto, Japan) を使用した。励起X線源としてAl K α 線 (1.486keV) を用い, 加速電圧7kV, 真空度 1×10^{-6} Paの条件下でTi 2p, N 1sのスペクトルを測定した。さらに, 信号強度から推定される濃度を, 不変のTiについて規格化した相対濃度 (C_N / C_{Ti}) として算出した。

7. チタン表面の除染が細胞親和性と骨分化に与える影響の解析

1) 初期細胞付着数の計測

初期細胞付着数の計測は, 4時間培養後に付着した細胞の数を計測することで評価した。表面除染後のチタンディスクを24穴プレートに置き, 6.0×10^4 cells/cm²の細胞濃度でMC3T3E-1を播種した。37°Cで4時間培養後, 付着していない細胞はPBSを用いて洗浄することで除去した。付着した細胞は0.05%トリプシン (Trypsin-0.53 mM EDTA-4 Na, Invitrogen, Ltd., Paisley, UK) を用いて剥離した。得られた細胞懸濁液からトリプシンを遠心分離にて除去し, 新しい培地に細胞を懸濁した。懸濁液中の細胞数は, 自動セルカウンター (Cell Drop FL, Scrum Inc., Tokyo, Japan) を用いて計測した。

2) 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色では, 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて, チタン表面に付着したMC3T3-E1の数と面積を評価した。表面除染後のチタンディスクを24穴プレートに入れ, 5700 cells/cm²の細胞濃度で播種した。37°Cで2時間の培養後, アクチンフィラメントをローダミンファロイジン (Molecular Probes, OR, USA), 核を4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール二塩酸塩 (DAPI; Molecular Probes) を用いて染色した。共焦点レーザー走査顕微鏡画像は, 1標本あたり5つの異なるポイントで撮影した。チタン表面に付着している細胞の数及び面

積は画像解析ソフト (Image J, NIH, Bethesda, ML, USA) により計測した。

3) アルカリフォスファターゼ (ALP) 発現

ALP発現の解析では, 24穴プレートに各チタンディスクを入れ, 1.0×10^5 cells/cm²の細胞濃度でMC3T3E-1を播種した。1日間の培養後, 各群に骨分化培地, 骨分化培地+100 μ g/mLエナメルマトリックスタンパク質 (EMD; Emdogain®, Straumann, Basel, Switzerland), 骨分化培地+5ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2; R&D Systems, Minneapolis, MN) を加え37°Cで7日間の培養を行った。染色は, 0.2Mトリス緩衝液 (Fuji Film Wako Pure Chemical Corporation, Ltd.) 及びナフトールAS-MX (Merck), ファーストレッドバイオレットLB塩 (Merck) を使用して37°Cで15分間培養し, 観察した。実体顕微鏡 (Nicon AZ100, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) を使用して観察し, 染色部位の面積はImage Jを用いて定量化した。

8. 統計解析

Tukey's testsによる補正を伴うANOVA解析を用いて統計解析を行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. チタンディスク表面形状

エッチング処理前及び処理後のチタンディスクの表面形状を図1に示す。処理後の表面では, 典型的なマイクロレベルでの粗造形状が確認された。表面粗さ計による測定ではエッチング処理前ではRa=0.1 μ m, 処理後ではRa=1.7 μ mであった (図1)。

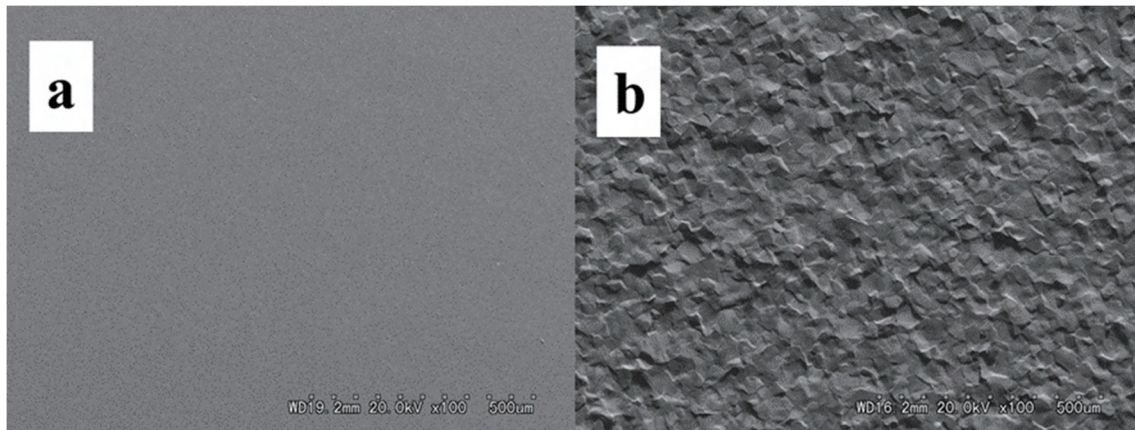
2. X線光電子分光分析

各処理群における, N 1sスペクトルを図2aに示す。NaCl群, H₂O₂群から得られた窒素のスペクトルはPristine群と比較して高いピークが検出された。それに対してAEW群ではPristine群と同程度のピークの高さであった。C_N/C_{Ti}の結果から, NaCl群及びH₂O₂群はPristine群と比較して約4倍高値を示し, 有意に窒素が残存していることが明らかとなった。一方, AEW群とPristine群の間に有意差は認められず, AEW群はPristine群と同等まで窒素を除去していることが明らかとなった (図2b)。

3. チタン表面の除染が細胞親和性と骨分化に与える影響の解析

1) 初期細胞付着数

細胞親和性の評価としてチタンディスク表面に付着した細胞を剥がした後, Cell Dropを用いて初期細胞付着数の計測をした。結果, AEW群はNaCl群と比較して約1.7倍多く細胞が付着していた。またAEW群は, H₂O₂群



	エッチング処理前 a	エッチング処理後 b
Ra値	0.1 μm	1.7 μm

図1. SEMを用いたチタン表面形状の観察とRa値

a エッチング処理前のチタンディスク表面, b エッチング処理後のチタンディスク表面とRa値を示す.

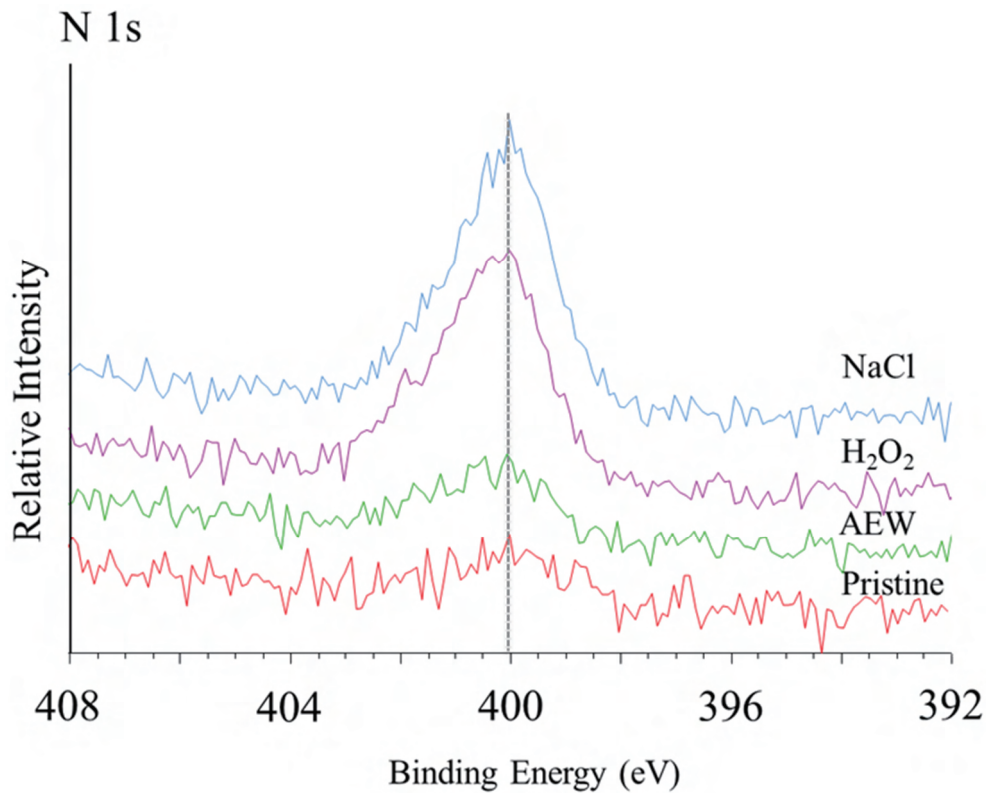


図2 a. チタン表面の除染及び化学特性の分析

各チタン表面から得られた, N 1sスペクトルを図に示す. 上から順に, NaCl, H₂O₂, AEW, Pristine群のスペクトルを示す. Pristine群と比較して, NaCl, H₂O₂群で高いピークが検出された. AEW群は, NaCl, H₂O₂群と比較して低いピークが検出され, Pristine群と同程度であった.

と比較しても有意に多く細胞が付着していた. さらに AEW群は, Pristine群よりも多く細胞が付着している傾向が認められた (図3).

共焦点レーザー走査顕微鏡を用いたDAPI染色によ

り, チタンディスク表面上の初期付着細胞を染色した画像を図4 a)に示す. Image Jを用いて画像解析した結果でも, AEW群はNaCl群と比較して約2.6倍多く細胞が付着していた. AEW群はH₂O₂群, Pristine群と比較しても有

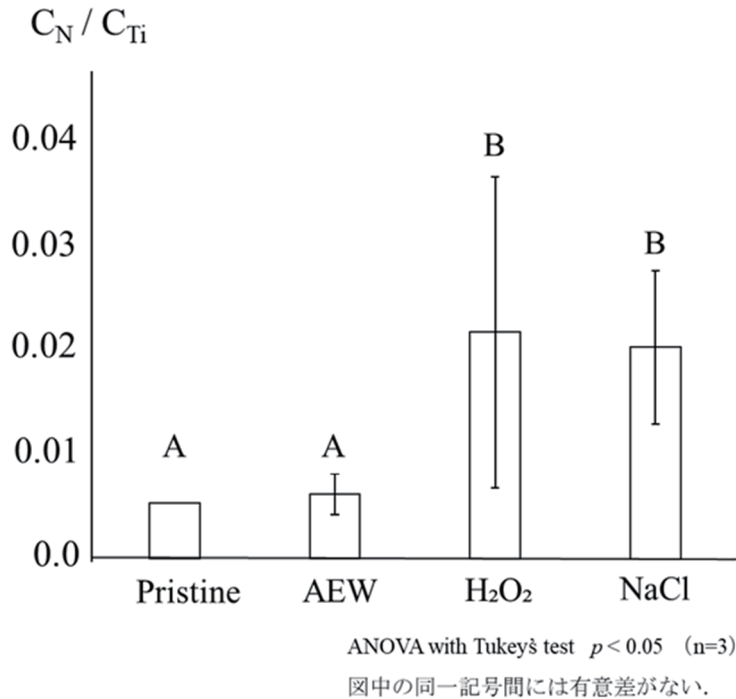


図2b. チタンに対する窒素の濃度 (C_N / C_{Ti})

C_N / C_{Ti} (mass%) はXPSから得られた数値を使用して算出した。AEW群は、NaCl、H₂O₂群と比較して有意に低値を示した。Pristine群とAEW群間に有意差は認められなかった。

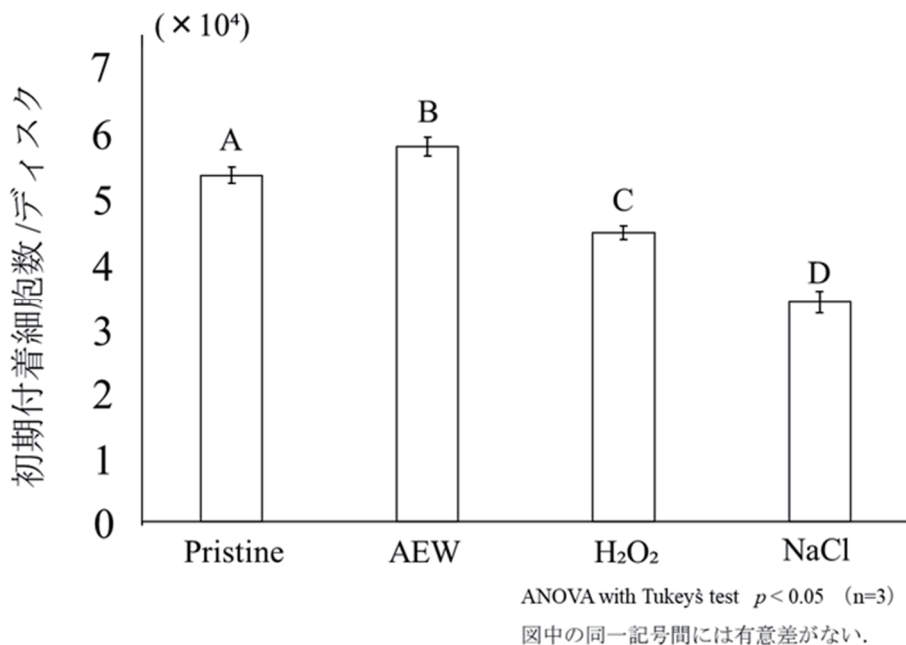


図3. 各チタン表面におけるMC3T3E-1の初期付着細胞数

培養4時間後の各表面に付着した細胞数をCell Dropを用いて計測した。AEW群は、NaCl、H₂O₂群と比較して有意に高値を示した。

意に細胞付着の増加が認められ、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた評価においてもCell Dropを用いた結果と類似した結果を示した(図4b)。

2) 細胞の形態

細胞親和性を細胞の伸展の程度から評価した。アクチ

ンフィラメントをローダミンファロイジンによって蛍光染色した、共焦点レーザー走査顕微鏡像を図5aに示す。

Image Jを用いて画像解析した結果では、AEW群のチタン表面の細胞は、NaCl群のチタン表面の細胞と比較

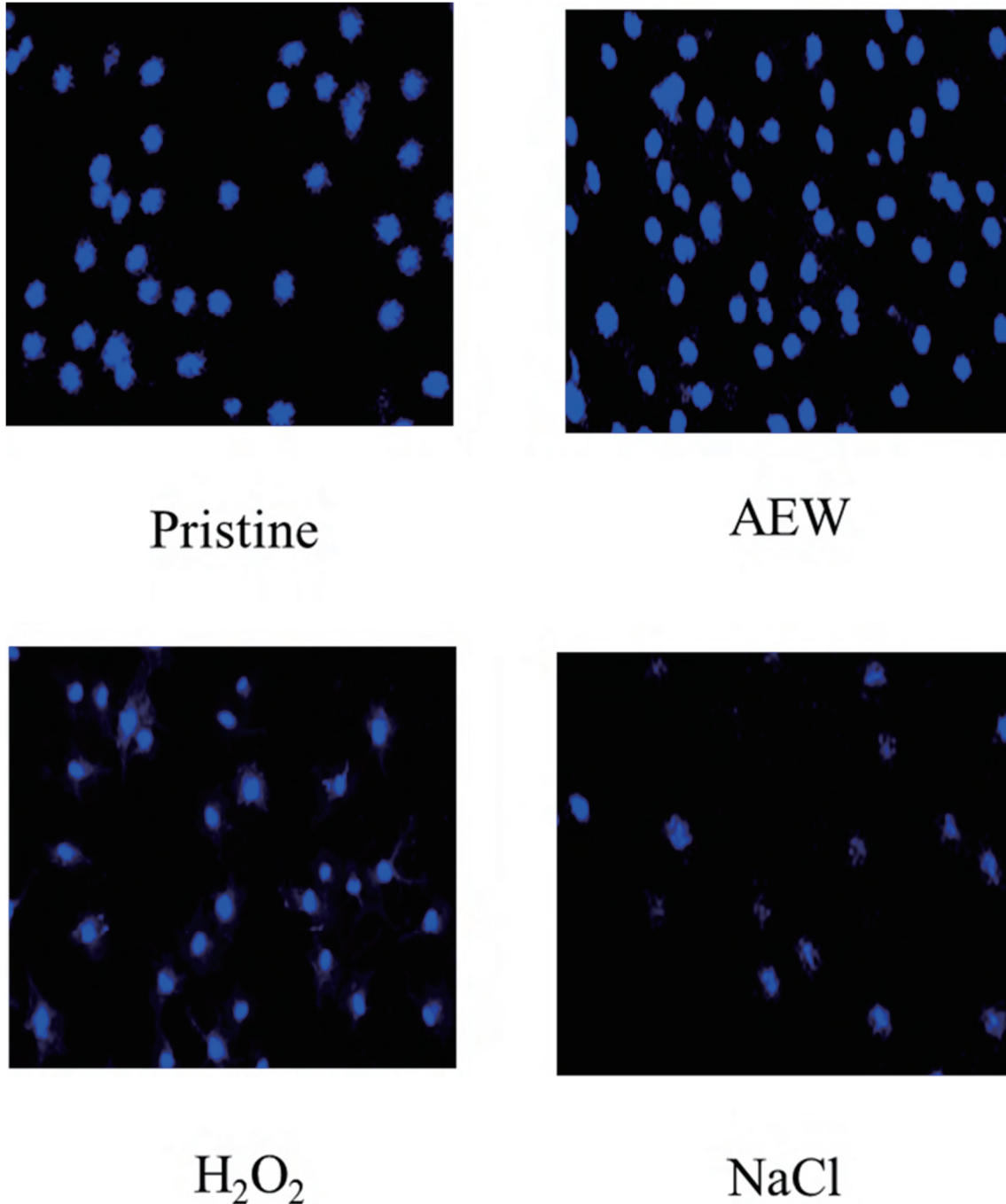


図 4 a. 各チタン表面におけるMC3T3E-1のDAPI染色による共焦点レーザー走査顕微鏡像
培養 2 時間後の各表面に付着したMC3T3E-1を共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察した。DAPI (青色) は核を示す。

して約2.8倍, また, H₂O₂群のチタン表面の細胞と比較して約2.3倍と有意に伸展しており, Pristine群とは有意差は認められなかった (図 5 b)。

3) アルカリフォスファターゼ (ALP) 発現

各処理群における, ALP染色後のチタン表面の画像ならびにImage Jを使用して染色部分を定量化した解析結果を示す (図 6 ab)。生物学的成長因子を併用していない群間での比較では, NaCl群は, Pristine群, AEW群と比較してALPの発現が減少していた。Pristine群, AEW

群の間に有意差は認められなかった。EMDを併用した群間での比較では, NaCl+EMD群は, Pristine+EMD群と比較してALP発現が減少しており, AEW+EMD群は, Pristine+EMD群との間に有意差は認められなかった。またEMDを投与した全群と, EMDを投与しない群とを比較すると, EMDを投与した群でALP発現の減少が認められた。FGF-2を併用した群間での比較では, FGF-2を投与した全群でALP発現は認められなかった。

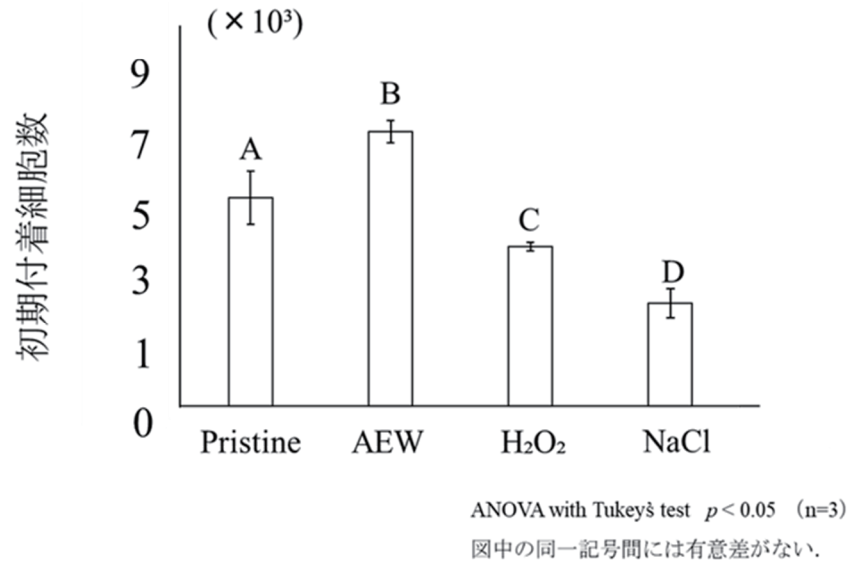


図 4 b. 初期付着細胞数
 共焦点レーザー走査顕微鏡にて得られた画像をImage Jを用いて画像解析した。
 AEW群では、NaCl、H₂O₂群と比較して有意に高値を示した。

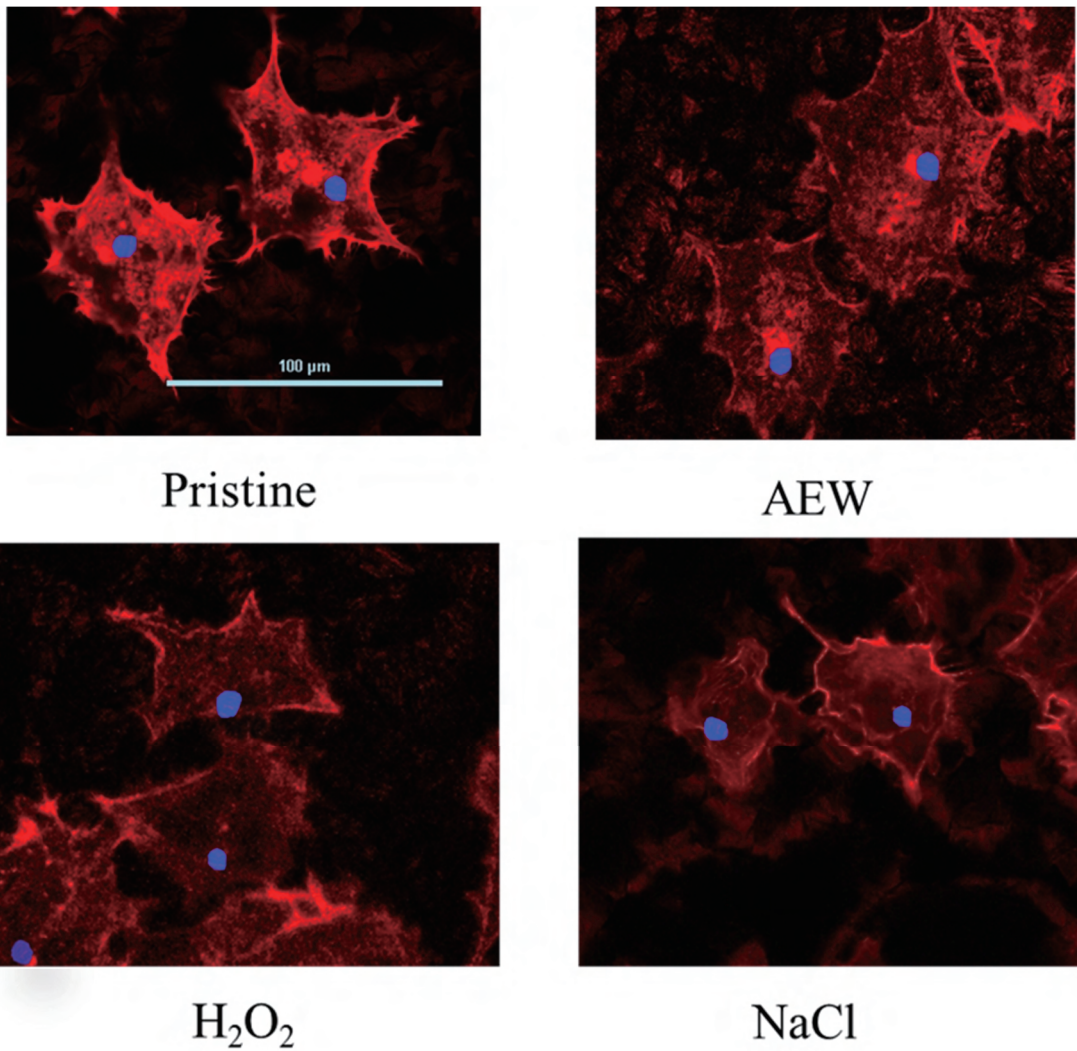


図 5 a. 各チタン表面におけるMC3T3E-1のアクチンフィラメントの共焦点レーザー顕微鏡像
 培養 2 時間後の各表面に付着したMC3T3E-1を共焦点レーザー走査顕微鏡にて観察した。アクチンフィラメント (赤色)、DAPI (青色) は核を示す。

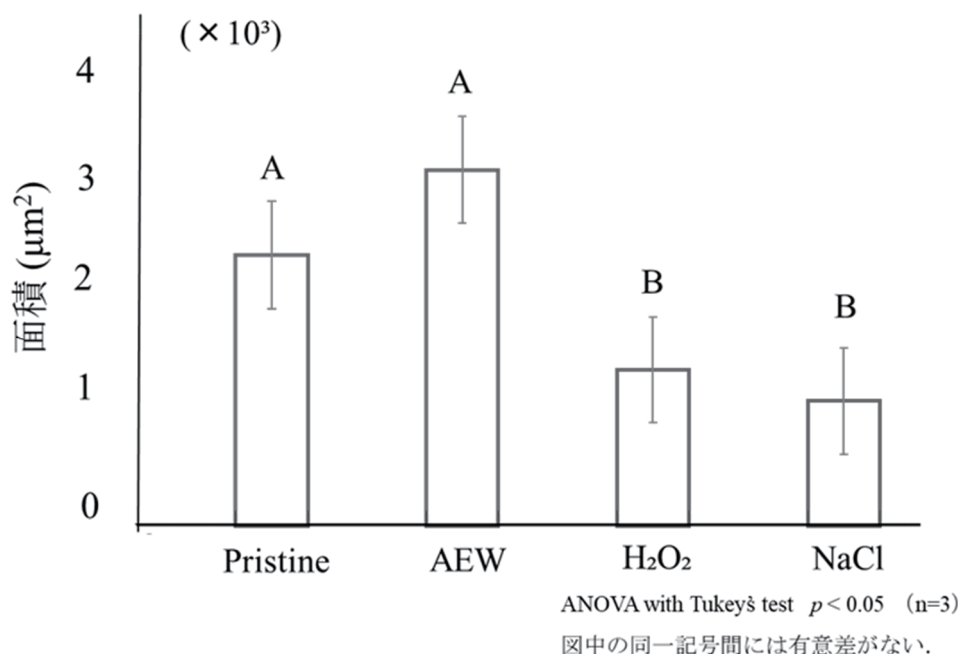


図5 b. 細胞面積

共焦点レーザー走査顕微鏡にて得られた画像をImage Jを用いて画像解析した。AEW群では、NaCl、H₂O₂群と比較して有意に高値を示した。

考 察

本研究は、細菌汚染させた粗面のチタンディスクにおいて、エアフロー処理による機械的な除染に続く化学的な除染処理により、細胞親和性の回復を目指し、さらには除染後のチタンディスクに対して生物学的成長因子の効果を比較検討した研究である。エアフロー処理に続くAEW処理は、細菌汚染された粗面のチタン表面を原子レベルで除染可能であった(図2 b)。さらには、チタン表面のAEW処理は、H₂O₂、NaCl処理と比較して前骨芽細胞の細胞親和性を向上した(図3、4 b、5 b)。

有機汚染物質の代表元素としては、炭素や酸素が考えられている。2020年のIchiokaらのXPS分析の報告では、チタン表面への細菌の付着により、N 1sスペクトルの高いピークが検出されたがO 1s、C 1sスペクトルでは高いピークが検出されなかった。このN 1sスペクトルのピークは、エアフロー処理とAEW処理を併用し、チタン表面の細菌を除染することで下げることに成功した(Ichioka et al., 2020)ことから、本研究では、窒素原子の除染に着目した。

インプラント周囲炎の治療の最終的なゴールは、インプラントと骨の再オッセオインテグレーションである。インプラント周囲炎の機械的除染法には(1)生理食塩水に浸したガーゼ(2)超音波スケーラー(3)チタン/プラスチックキュレット(4)エアフロー(5)チタンブラシ(6)レーザー等の使用があげられる。チタ

ン表面の除染として、エアフロー処理の効果を評価した*in vitro* studyのシステムティックレビューがある。その論文では、エアフロー処理は他の機械的除染法と比較して、チタン表面を傷害せずに効果的な除染が可能であり、そして除染能力に関しても、他の除染法と比較して同等かそれ以上であることが報告されている(Mohar-rami et al., 2019)。

一方、2022年のIchiokaらの*in vitro* studyの報告では、エアフローによる除染は、チタン表面での細胞親和性の回復には限界があることも報告されている。その研究では、細菌汚染させた平滑面及び粗面のチタンディスクに対して、エアフロー処理を含む既存の4種類の機械的除染法を施した。結果として、細菌を減少させることはできるが、細菌汚染前のチタンディスクと同様の状態まで細胞親和性を回復することはできなかったと報告されている(Ichioka et al., 2022)。

2009年のAttらの*in vitro* studyの報告では、酸エッチング直後の新品のチタンディスクと4週間暗所に保存したチタンディスクでの細胞親和性を比較したところ、4週間保存していたインプラントでは有意な細胞親和性の低下が認められたと報告されている(Att et al., 2009)。このように、新品のインプラントでさえも、表面に大気中の有機物が付着すると、骨接触率が低下することが報告されている。一方、2015年のkonoらの*in vivo* studyの報告では、28日間暗所で保存した動物実験用インプラントに対して、蒸留水または5%次亜塩素酸ナトリウムに24

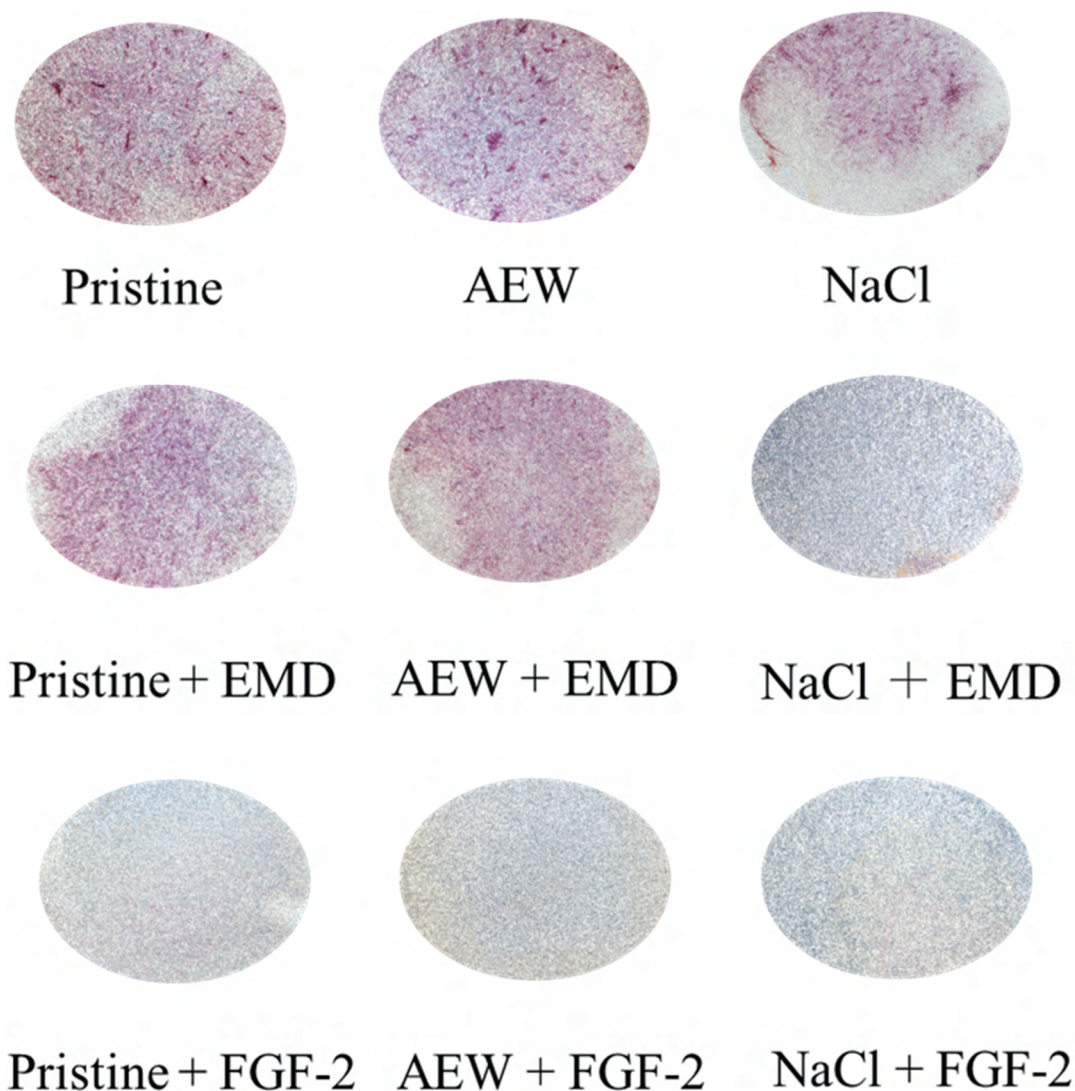


図6a. 各チタン表面におけるALP発現の実体顕微鏡像

培養7日後の各表面に付着したMC3T3E-1のALP発現について実体顕微鏡を使用して観察した。

時間浸漬後，ラットの大腿骨にインプラントを埋入し，2週間後に評価を行った．次亜塩素酸ナトリウム処理後のインプラントでは，蒸留水による処理後のインプラントと比較してせん断強さが有意に高値を示し，骨-インプラント間の結合強度が大きく，チタンのオッセオインテグレーション能を向上させたことが報告されている．また，XPS分析の結果，次亜塩素酸ナトリウム処理後のチタンディスクは，蒸留水による処理後のチタンディスクと比較して有意に炭素が除去されていることが報告されている (kono et al., 2015)．このように，新品のインプラントでは，表面に付着した原子レベルでの有機物を除去することで，さらに骨形成が促進されることが報告されている．つまり，インプラントの再オッセオインテグレーションを考えていくうえで，プラークバイオフィルムの除去のみならず，原子レベルでの表面除染が重要になると考えられる．

機械的な除染法の効果について元素レベルでの解析を行った基礎研究結果も幾つか報告されている．XPSを用いた過去の研究例のうち，Al-Hashediらの2017年の研究では，4種類の機械的除染法（プラスチック及び金属キュレット，Er:YAGレーザー，チタンブラシ）を施しても，インプラント表面には窒素や炭素を含む汚染が表面に残存していたと報告されている (Al-Hashedi et al., 2017)．一方，2020年のIchiokaらの報告では，*S. gordonii*のバイオフィルムに汚染された平滑面のチタンディスクに対して，エアフロー処理を行った群では細菌の十分な除染は達成されたが，炭素や窒素を含む原子レベルでの汚染が残存し細胞親和性の低下につながるということが明らかにされている (Ichioka et al., 2020)．本研究においても，XPSの結果からエアフロー処理後のNaCl処理ではN 1sスペクトルがPristine群と比較して有意に高く，これらの報告と一致している．このように，機械的

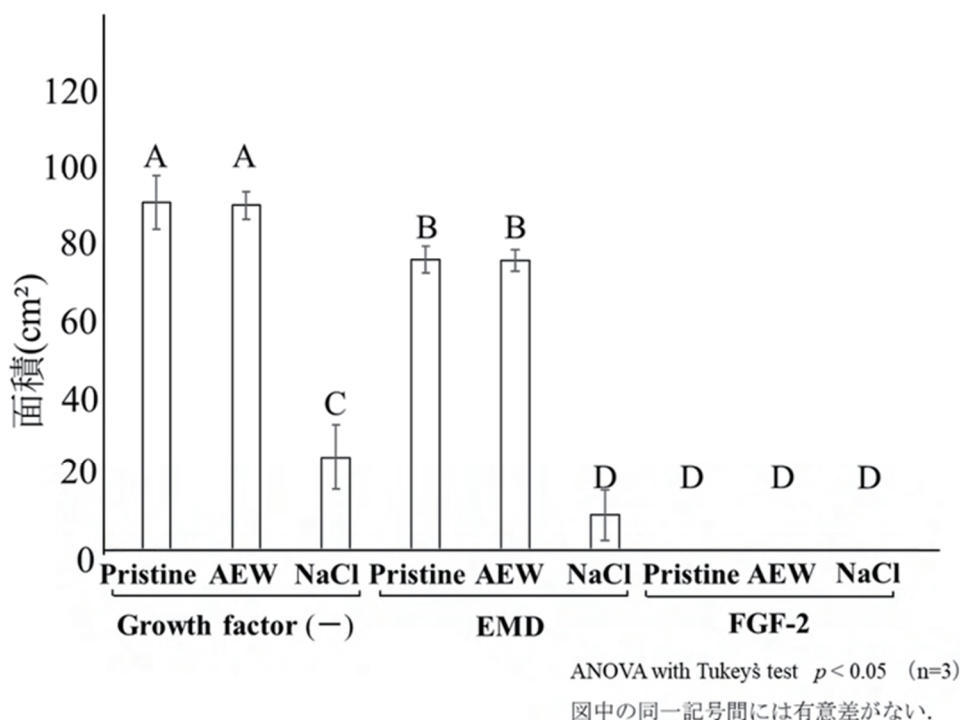


図 6b. 各チタン表面におけるALP発現

実体顕微鏡を使用して得られた画像をImage Jを用いて画像解析した。AEW群は、NaCl群と比較して有意に高値を示した。AEW群とPristine群と間に有意差は認められなかった。Pristine+EMD群、AEW+EMD群はPristine群と比較して有意に低値を示した。FGF添加群は全ての群でALP発現がほとんど認められなかった。

除染法のみでは、チタン表面の細胞親和性を汚染前の状態まで回復することは難しい。

そこで、機械的除染後の化学的除染法としてAEWに着目し研究を進めてきた。AEW中のOCIは、アミンと反応しやすく、チタン表面の有機窒素化合物を除去できることが報告されている (Ichioka et al., 2021)。AEWはNaClより殺菌作用が高く、AEWの細胞毒性、殺菌作用は、 H_2O_2 と比較して同程度であるが、有機物の分解効果は H_2O_2 と比較して高いことが報告されている (Ichioka et al., 2020)。

また汚染されたチタンディスクに対する化学的除染法として、AEWとクエン酸 (CA) またはN-アセチル-L-システイン (NAC) で比較した*in vitro* studyがある。NACは、チオール基を有するアミノ酸L-システインの誘導体である。強力な抗酸化作用を示し、ムチンのジスルフィド結合を破壊し、粘液粘度を下げる粘液溶解剤である。CAは、強酸性による殺菌作用が知られている。その報告では、AEWの細胞毒性は、CA及びNACと比較して有意に低く、細胞親和性の回復においてもAEWは有効であることが報告されている (Ichioka et al., 2021)。本研究のXPS分析の結果からも粗面のチタンディスクにおいて、エアフロー処理に続くNaCl及び H_2O_2 処理では、新品のチタンディスクと同等の表面性状

であるPristine群と比較して高いN 1sスペクトルが確認され、汚染されたチタン表面をPristine群と同等の状態まで回復することはできなかった。しかし、エアフロー処理に続くAEW処理では、N 1sスペクトルがPristine群と同等の状態まで下がり、AEW群とPristine群との間に有意差を認めなかった (図 2b)。このことから、AEW処理は粗造面のチタン表面でも表面に残存している有機窒素化合物を分解・除去し、新品のチタンディスクに近い状態にまでチタン表面を回復させることが明らかとなった。また、NaCl及び H_2O_2 処理のSD値が大きい理由としては、n数が少ないことが考えられる。しかし、AEWによる処理では、SD値が小さく、NaCl及び H_2O_2 と比較して安定した窒素化合物の分解ができていることが考えられる。

Cell Dropを使用した初期細胞付着解析の結果では、AEW群はNaCl群と比較して約1.7倍多く細胞が付着していた。AEW群は、 H_2O_2 群と比較しても有意に多く細胞が付着している結果となった (図 3)。共焦点レーザー走査顕微鏡を使用したDAPI染色によりチタンディスク表面上の初期細胞付着数を計測した結果でも、AEW群はNaCl群と比較して約2.6倍多く細胞が付着しており、AEW群は H_2O_2 群、Pristine群と比較した場合も有意に細胞付着数の増加が認められた (図 4b)。AEW群では、

Pristine群と比較して初期細胞付着数が多い結果となった理由としては、チタンディスク保管中に表面に窒素や炭素が付着していた可能性が考えられる。細胞面積の結果では、AEW群のチタン表面の細胞は、NaCl群のチタン表面の細胞と比較して約2.8倍、H₂O₂群と比較しても約2.3倍と有意に伸展しており、Pristine群と同等であった(図5b)。

2021年のIchiokaらは、機械研磨されたチタンディスクを5%次亜塩素酸ナトリウム溶液に24時間浸漬させた結果、大気中に放置していたコントロール群、蒸留水に浸漬させた群と比較してI型コラーゲンの付着量が有意に高かったと報告している(Ichioka et al., 2021)。これらの結果から、AEWの原子レベルでの有機窒素化合物分解効果によってチタンディスク表面に細胞接着タンパク質が付着しやすくなったことにより、細菌汚染前のチタンディスクと同等の状態まで細胞親和性を回復できたと考えられる。従って、今回の研究結果からエアフロー処理後のAEW処理は粗面のチタン表面における除染法として有効である可能性が示唆された。

本研究では、実体顕微鏡を使用してチタン表面のALP染色を確認し、染色部位の面積をImage Jを用いて定量化した。この方法の定量性については、予備実験の段階で実体顕微鏡の光源、光量を一定にし、同一試料に対する再現性を確認した。ALP染色の結果では、NaCl群はPristine群、AEW群と比較してALP発現が減少しており、NaClによる除染ではMC3T3-E1の骨分化を十分に回復できないことが示唆された。一方、AEW群とPristine群の比較では、ALP発現に有意差は認められなかったことから、AEWの原子レベルでの有機窒素化合物の十分な除染により、MC3T3-E1の骨分化能は、細菌汚染前のチタンディスク表面上と同様の状態にまで回復できる可能性が示唆された。

Pristine+EMD群はPristine群と比較してALP発現は減少していた。また、AEW+EMD群においてもAEW群と比較してALP発現は減少しており、EMDの併用によるMC3T3-E1の初期の骨分化に対する追加的な効果は認められなかった(図6b)。

EMDは、豚の幼若歯胚から抽出され、歯周組織再生療法に有効な材料として使用されている。EMDの主成分はアメロジェニンと報告されているが、他にもエナメルリン、アメロプラスチン、トランスフォーミング成長因子(TGF-β)や骨形成タンパク質(BMP)等が含まれており、どの成分がどのように作用しているかは不明な点が多い。本研究では、EMDを加えた群では、生物学的成長因子を加えていない群と比較して、7日目での

ALP発現が抑制される結果となった。これは以前の先行研究で、MC3T3-E1を使用し、24穴プレート上でコントロール群とEMDを併用した群でのALP発現を比較した結果と一致している(Jeong et al., 2014)。

2008年のWadaらは、TGF-βは骨芽細胞分化の過程において、ALP遺伝子の発現を阻害すると報告している。本研究においても、EMDに含まれているTGF-βがALP発現の抑制に関係している可能性を否定できず、EMDの骨再生能については今後さらなる解明が必要である。

また、Pristine+FGF-2群、AEW+FGF-2群、NaCl+FGF-2群を比較すると、3群間に有意差は認められず、3群ともにALPを検出することはできなかった。FGF-2は、未分化間葉系細胞において強い血管新生能と細胞増殖能を誘導することが報告されている(Murakami et al., 2011)。一方で、骨芽細胞の分化に対するFGF-2の影響については、確立した見解がなく、不明な点が多い。

2020年のSuzukiらの報告では、MC3T3-E1を使用し、BMP-2(100ng/mL)の存在下でFGF-2によるALP活性を確認した。結果は、FGF-2による低濃度(6.2ng/mL)の刺激ではALP活性は促進されたが、高濃度(100ng/mL)の刺激ではALP活性は抑制されていた。BMP-2は、骨再生を促進する有効な因子である(Donos et al., 2019)。FGF-2は線維芽細胞増殖因子であり、骨芽細胞においても増殖能を示すことが報告されている(Murakami et al., 2011)。本研究では、MC3T3-E1に対して5ng/mL FGF-2単独添加の全群でALP発現を確認することができなかったことから、FGF-2単独では、MC3T3-E1の分化の初期段階においては増殖能に働きかけ、分化には抑制的に働く可能性が示唆された。

本研究は、インプラント周囲炎に対する再生療法の最適化を目指したものである。本研究で用いた粗面のチタンディスクは、臨床で用いられているインプラント表面の粗さと同様に設定したが、表面の凸凹の平均値を基準線として、その区間の基準線からの距離の平均値であるRa値での評価のみである点、そしてサンドブラストによる処理をしていない点は考慮しなければならない。本研究結果では、EMDやFGF-2による骨分化への追加的な効果は確認できなかった。一方、エアフロー処理後のAEW処理による原子レベルでの有機窒素化合物の十分な除染は、Pristine群と同等のレベルまで細胞親和性、骨分化能を回復することを示した。これは、インプラント周囲炎の治療において、原子レベルでの十分な除染が行われた場合、生物学的成長因子による追加的な効果がなくとも十分に再オッセオインテグレーションが得られる可能性を示唆している。しかし本研究は、培養7

日間時点でのALP発現しか見ておらず、短期的な細胞分化能の解析結果であることは考慮しなければならない。そして、細菌を使用していることから、除染処理後のディスク表面における細胞の長期培養が困難であるため、*in vitro* studyでの比較検討には限界があり、今後、動物実験や臨床試験による長期的な評価を行う必要がある。

結 論

1. エアフロー後のAEWによる除染は、汚染された粗面のチタン表面に残存している有機窒素化合物を分解・除去し、新品のチタンディスクと同様の化学状態にまでチタン表面を回復させ、さらには細胞親和性と骨分化能を回復させることが示唆された。
2. FGF-2及びEMDは、MC3T3-E1の短期的な分化に追加的な有効性を示さない可能性が示唆された。

文 献

- Al-Hashedi AA, Laurenti M, Benhamou V, Tamimi F. Decontamination of titanium implants using physical methods. *Clin Oral Implants Res* 28 : 1013–1021, 2017.
- Att W, Hori N, Takeuchi M, Ouyang J, Yang Y, Anpo M, Ogawa T. Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity : an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials* 30 : 5352–5363, 2009.
- Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, Chen S, Cochran D, Derks J, Figuero E, Hammerle CHF, Heitz-Mayfield LJA, Huynh-Ba G, Iacono V, Koo KT, Lambert F, McCauley L, Quirynen M, Renvert S, Salvi GE, Schwarz F, Tarnow D, Tomasi C, Wang HL, Zitzmann N. Peri-implant diseases and conditions : Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol* 89 Suppl 1 : S313–S318, 2018.
- Berglundh T, Jepsen S, Stadlinger B, Terheyden H. Peri-implantitis and its prevention. *Clin Oral Implants Res* 30 : 150–155, 2019.
- Carcuac O, Abrahamsson I, Albouy JP, Linder E, Larsson L, Berglundh T. Experimental periodontitis and peri-implantitis in dogs. *Clin Oral Implants Res* 24 : 363–371, 2013.
- Carcuac O, Derks J, Charalampakis G, Abrahamsson I, Wennstrom J, Berglundh T. Adjunctive Systemic and Local Antimicrobial Therapy in the Surgical Treatment of Peri-implantitis : A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Dent Res* 95 : 50–57, 2016.
- Donos N, Dereka X, Calciolari E. The use of bioactive factors to enhance bone regeneration : A narrative review. *J Clin Periodontol* 46 Suppl 21 : 124–161, 2019.
- Ericsson I, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J. Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res* 3 : 99–103, 1992.
- Fukuzaki, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci* 11 : 147–157, 2006.
- Ichioka Y, Kado T, Mashima I, Nakazawa F, Endo K, Furuichi Y. Effects of chemical treatment as an adjunctive of air-abrasive debridement on restoring the surface chemical properties and cytocompatibility of experimentally contaminated titanium surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 108 : 183–191, 2020.
- Ichioka Y, Kado T, Aita H, Nezu T, Furuichi Y, Endo K. In vitro evaluation of NaOCl-mediated functionalization of biologically aged titanium surfaces. *Dent Mater J* 40 : 74–83, 2021.
- Ichioka Y, Derks J, Dahlen G, Berglundh T, Larsson L. In vitro evaluation of chemical decontamination of titanium discs. *Sci Rep* 11 : 22753, 2021.
- Ichioka Y, Derks J, Dahlen G, Berglundh T, Larsson L. Mechanical removal of biofilm on titanium discs : An in vitro study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 110 : 1044–1055, 2022.
- Ished C, Holmlund A, Renvert S, Svenson B, Johansson I, Lundberg P. Effectiveness of enamel matrix derivative on the clinical and microbiological outcomes following surgical regenerative treatment of peri-implantitis. A randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 43 : 863–873, 2016.
- Jeong Y, Yang W, Ko H, Kim M. The effects of bone morphogenetic protein-2 and enamel matrix derivative on the bioactivity of mineral trioxide aggregate in MC3T3-E1 cells. *Restor Dent Endod* 39 : 187–194, 2014.
- Jepsen K, Jepsen S, Laine ML, Anssari Moin D, Pilloni A, Zeza B, Sanz M, Ortiz-Vigon A, Roos-Jansaker AM, Renvert S. Reconstruction of Peri-implant Osseous Defects : A Multicenter Randomized Trial. *J Dent Res* 95 : 58–66, 2016.
- Kono M, Aita H, Ichioka Y, Kado T, Endo K, Koshino H. NaOCl-mediated biofunctionalization enhances bone-tita-

- nium integration. *Dent Mater J* 34 : 537–544, 2015.
- Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y. Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 40 : 218–226, 2013.
- Kreisler M, Kohnen W, Christoffers AB, Gotz H, Jansen B, Duschner H, d’Hoedt B. In vitro evaluation of the biocompatibility of contaminated implant surfaces treated with an Er : YAG laser and an air powder system. *Clin Oral Implants Res* 16 : 36–43, 2005.
- Moharrami M, Perrotti V, Iaculli F, Love RM, Quaranta A. Effects of air abrasive decontamination on titanium surfaces : A systematic review of in vitro studies. *Clin Implant Dent Relat Res* 21 : 398–421, 2019.
- Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s) : what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol* 2000 56 : 188–208, 2011.
- Persson LG, Berglundh T, Lindhe J, Sennerby L. Re-osseointegration after treatment of peri-implantitis at different implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 12 : 595–603, 2001.
- Renvert S, Polyzois I, Maguire R. Re-osseointegration on previously contaminated surfaces : a systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4 : 216–227, 2009.
- Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implan Res* 18 : 161–170, 2007.
- Schwarz F, Wieland M, Schwartz Z, Zhao G, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Schedle A, Brogini N, Bornstein MM, Buser D, Ferguson SJ, Becker J, Boyan BD, Cochran DL. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 88 : 544–557, 2009.
- Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res* 18 : 161–170, 2017.
- Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Favari M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res* 19 : 975–982, 2008.
- Suzuki A, Sugiyama G, Ohyama Y, Kumamaru W, Yamada T, Mori Y. Regulation of NF- κ B Signalling Through the PR55 β -RelA Interaction in Osteoblasts. *In Vivo* 34 : 601–608, 2020.
- Tomasi C, Regidor E, Ortiz-Vigon A, Derks J. Efficacy of reconstructive surgical therapy at peri-implantitis-related bone defects. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 46 Suppl 21 : 340–356, 2019.
- Wada Y, Yamamoto H, Nanbu S, Mizuno M, Tamura M. The suppressive effect of enamel matrix derivative on osteocalcin gene expression of osteoblasts is neutralized by an antibody against TGF- β . *J Periodontol* 79 : 341–347, 2008.
- Yokose S, Klokkevold PR, Takei HH, Kadokura H, Kikui T, Hibino Y, Shigeta H, Nakajima H, Kawazu H. Effects of surface microtopography of titanium disks on cell proliferation and differentiation of osteoblast-like cells isolated from rat calvariae. *Dent Mater J* 37 : 272–277, 2018.



仲川 碩

平成31年 3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業

令和2年 3月 北海道医療大学歯科クリニック 臨床研修科 修了

令和6年 3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 卒業