

平成 27 年度 学位論文

レーザーによるジルコニアインプラントの粗面化が
オッセオインテグレーションに及ぼす影響

谷口 祐介

福岡歯科大学大学院歯学研究科
口腔インプラント学分野専攻

指導教員
城戸 寛史
山崎 純

Effect of zirconia implants with surface roughness
created with laser on osseointegration

Yusuke Taniguchi

はしがき

本学位論文は、YAG レーザー、およびファイバーレーザー処理によるジルコニア表面の粗面化を行い、ジルコニアプレート上の骨芽細胞様細胞の増殖と分化における有用性、並びにジルコニアインプラントとその周囲骨組織に及ぼす影響を研究した結果について記載している。

第一章は本研究を遂行するに当たって必要な背景 - インプラント材料・インプラント表面解析の歴史・チタンアレルギーについて述べており、チタンインプラントとの比較データ(谷口, 未発表)も示している。第二章はKakuraら(2014)の論文(本人共著者, 参考論文1)に基づいて、YAG レーザー処理ジルコニアインプラントがインプラント周囲骨組織に与える影響と YAG レーザー処理によりジルコニアインプラントのスレッドが損傷する問題点について記載している。この問題点を解決するために、別の論文にてジルコニアインプラントのスレッドに損傷を与えないファイバーレーザー処理したジルコニアインプラントの周囲骨組織に与える影響について研究を行い、共著者として報告した(Yasuno ら, 2014)。第3章・第4章では、Taniguchiら(in press)の論文(参考論文2)に基づいてファイバーレーザー処理をしたジルコニアプレート上の骨芽細胞様細胞の増殖と分化における有用性についての結果を記載した。さらに、スレッドによる除去トルク値への影響を無くすためにスレッドのないジルコニアインプラントを用いてその周囲骨組織に及ぼす影響について記載している。第五章は、論文の背景、目的、および結果を踏まえた論文全体の総括およびジルコニアインプラントの臨床応用に向けた今後の展望について述べている。

参考論文 1

タイトル : Zirconia implant with rough surface produced by YAG laser treatment: evaluation of histomorphology and strength of osseointegration.

掲載雑誌名 : Journal of Hard Tissue Biology 2014; 23:77-82

著者 : Kakura K, Yasuno K, Taniguchi Y, Yamamoto K, Sakai T, Irie A, Kido H.

所属 : Section of Oral Implantology, Department of Oral Rehabilitation

参考論文 2

タイトル : Accelerated osteogenic differentiation and bone formation on zirconia with surface grooves created with fiber laser irradiation.

掲載雑誌名 : Clinical Implant Dentistry and Related Research 2015(in press)

著者 : Taniguchi Y¹⁾, Kakura K¹⁾, Yamamoto K¹⁾, Kido H¹⁾, Yamazaki J²⁾

所属 : 1) Section of Oral Implantology, Department of Oral Rehabilitation

2) Department of Physiological Science & Molecular Biology

略語一覧

Sa	三次元算術平均高さ
Sdr	表面展開面積率
Spd	スレッドの頂点密度
Y-TZP	イットリア添加正方晶ジルコニア (Yttria stabilized tetragonal zirconia)
S-ZrI	機械加工ジルコニアインプラント
R-ZrI	粗面ジルコニアインプラント
BIC	インプラント - 骨接触
BA	実験用インプラントスレッド内を占める骨面積
S-ZrP	機械加工ジルコニアプレート
R-ZrP	粗面ジルコニアプレート
Runx2/Cbfa1	Runx-related transcription factor 2
OCN	Osteocalcin
ALP	アルカリホスファターゼ
ACTB	β -actin
SEM	走査型電子顕微鏡
MMA	メチルメタクリレート
SD ラット	Sprague-Dawley rats

目次

第一章	序論	P. 7
	1.1 インプラント材料について	P. 8
	1.1.1 インプラント材料の種類	P. 8
	1.1.2 ジルコニアの物性について	P. 8
	1.2 インプラント表面改質の歴史	P. 10
	1.2.1 機械加工インプラント	P. 10
	1.2.2 粗面インプラント	P. 10
	1.3 粗面化による石灰化促進効果メカニズム	P. 12
	1.4 チタンアレルギー	P. 12
	1.5 引用文献	P. 13
第二章	YAG レーザーによるジルコニアインプラント表面改質 <i>in vivo</i> 実験	P. 17
	2.1 緒言	P. 18
	2.2 目的	P. 18
	2.3 材料と方法	P. 18
	2.4 実験結果	P. 22
	2.4.1 インプラントの表面解析	P. 22
	2.4.2 BIC 率・BA 率・除去トルク値	P. 23
	2.5 考察	P. 24
	2.6 引用文献	P. 25
第三章	ファイバーレーザーによるジルコニアインプラント表面改質 <i>in vitro</i> 実験	P. 29
	3.1 緒言	P. 30
	3.2 目的	P. 30
	3.3 材料と方法	P. 31
	3.4 実験結果	P. 33
	3.4.1 ジルコニアプレート表面解析	P. 33
	3.4.2 細胞形態・細胞伸張度	P. 34
	3.4.3 細胞増殖	P. 36
	3.4.4 細胞骨形成	P. 38
	3.5 考察	P. 41
	3.6 引用文献	P. 42

第四章	ファイバーレーザーによるジルコニアインプラント表面改質	
	<i>in vivo</i> 実験	P. 47
4.1	緒言	P. 48
4.2	目的	P. 48
4.3	材料と方法	P. 48
4.4	実験結果	P. 50
	4.4.1 インプラントの表面解析	P. 50
	4.4.2 BIC 率・除去トルク値	P. 50
4.5	考察	P. 51
4.6	引用文献	P. 52
第五章	総括および展望	P. 53
5.1	総括	P. 54
5.2	展望	P. 54
COI 開示		P. 55
謝辞		P. 55
研究業績		P. 55

第一章 序論

1.1 インプラント材料について

1.1.1 インプラント材料の種類

インプラント材料は、金属とセラミックスに大別される。これらの材料は骨との結合様式により、介在性骨結合する生体内許容性材料、接触性骨結合する生体内不活性材料、および化学的骨結合する生体内活性材料に分類される(表 1)。

表 1 インプラント材料の分類

骨組織との界面 (生体内性質による 材料の分類)	金属	セラミックス
介在性骨結合 (生体内許容性材料)	オーステナイト系 ステンレス鋼 コバルトクロム合金	——
接触性骨結合 (生体内安定性材料)	チタン チタン合金	アルミナ ジルコニア カーボン
化学的骨結合 (生体内活性材料)	——	バイオガラス ハイドロキシアパタイト リン酸三カルシウム

現在、臨床で多く用いられているインプラント用金属材料であるチタンは、材料表面に酸化膜(不導態被膜)が生成されるため耐食性に優れ、骨と直接接触する(生体内安定性材料)ことが報告されている(Boyan ら, 2001)。

セラミックスは、腐食や拒絶反応がほとんど認められない材料であり、医用材料として様々な方面で用いられている。その中でジルコニアは、機械的強度が大きい生体内安定性材料であり、チタンと同等のオッセオインテグレーションを獲得でき(Kohal ら, 2004; Ko ら, 2007; Yamashita ら, 2009)、色調が白いため審美的な理由で、前歯部を中心に臨床応用されている(Oliva ら, 2007; Oliva ら, 2010; Gahlert ら, 2013)。

1.1.2 ジルコニアの物性について

ジルコニアは、ジルコニウム(Zirconium, 原子番号 40)の安定酸化物である二酸化ジルコニウム(ZrO_2)の総称であり、 $ZrSiO_4$ を主成分とするジルコン砂(Zircon sand)から、湿式により抽出され、これを加熱して粉末状にする。ジルコニアは高い生体親和性、白い色調、光透過性、放射線不透過性、優れた機械的強度を有するため、アバットメントや歯冠修復材として広く臨床に使用されている(Vinothkumar ら, 2011; Wang ら, 2013)。

純粋なジルコニアは、単斜晶、正方晶、立方晶の三つの結晶相があり、温度により転移する。単斜晶から正方晶へは1170 °C、正方晶から単斜晶へは950 °Cで転移し、正方晶と立方晶は2370 °Cで双方向に転移する。

単斜晶は正方晶が歪んだような構造をしており、より大きな体積を有し、単斜晶と正方晶の間の転移では約4%の体積変化を伴う。このように、相転移はおおきな体積変化を伴うため、焼結体は昇降温を繰り返すことによって破壊に至る。

室温における純粋ジルコニアの結晶相は単斜晶が最も安定である。しかし、ジルコニアにジルコニウムよりも大きな半径を持つY、Ca、Mg、Ceなどのイオンを固溶させると、構造中に酸素空孔が形成され、室温において立方晶あるいは正方晶が準安定となる。これにより、昇降温による破壊が抑制される。破壊靱性は Y_2O_3 の添加量が増加するに伴い急激に小さくなる。一方、曲げ強度は3 mol% Y_2O_3 で1000 MPa以上の値が得られると報告されている(津久間ら, 1984)。これらのことから、現在、歯科に应用されているジルコニアは、 Y_2O_3 を3 mol%含むY-TZPが主流である。

我々は、*in vitro*実験においてチタンプレート機械加工面とジルコニアプレート機械加工面上で骨芽細胞を培養し、細胞形態、増殖、ALP活性に差が無いことを確認した(図1, 表2; 未発表データ)(材料と方法は第三章3.3参照)。

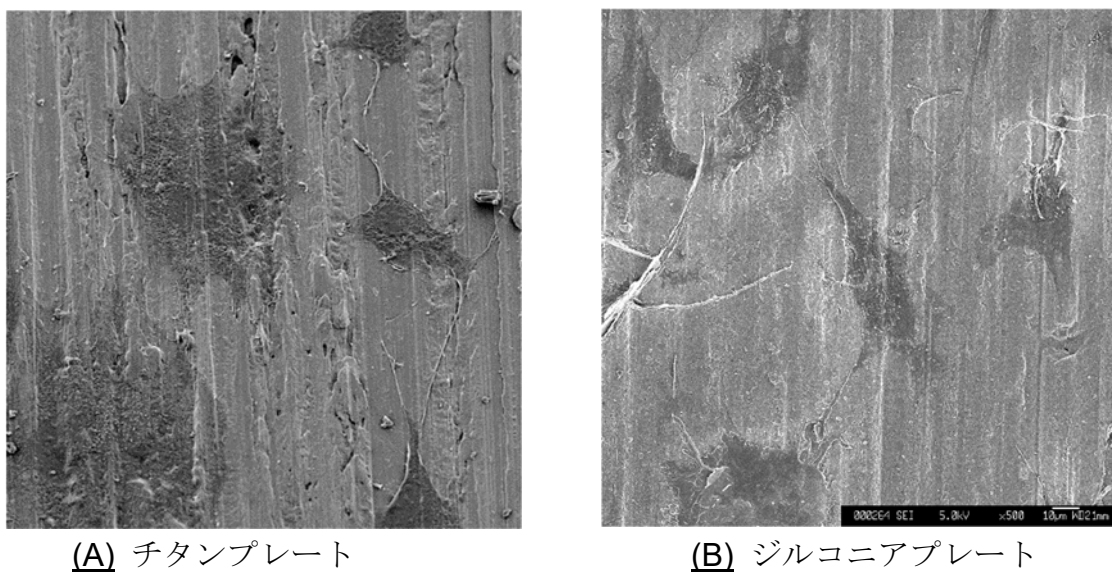


図1 機械加工面のチタンプレートとジルコニアプレート上に播種したMC3T3-E1細胞の形態
骨芽細胞様細胞の播種6時間後のチタンプレート(A)とジルコニアプレート(B)のSEM像。

表 2 ジルコニアプレートとチタンプレートの特徴と播種した MC3T3-E1 細胞の比較

Parameters	チタン	ジルコニア
Sa (μm)	0.347 ± 0.071 (3) *	0.185 ± 0.035 (3)
Sdr	0.106 ± 0.009 (3)	0.052 ± 0.004 (3)
細胞増殖 (吸光度)		
3 日目	0.430 ± 0.084 (3)	0.408 ± 0.067 (3)
7 日目	0.564 ± 0.039 (3)	0.558 ± 0.036 (3)
14 日目	1.216 ± 0.081 (3)	1.173 ± 0.100 (3)
ALP 活性		
7 日目	11.832 ± 3.476 (3)	14.094 ± 2.718 (3)
14 日目	8.933 ± 2.512 (3)	10.206 ± 0.762 (3)

Sa と Sdr はそれぞれ、三次元算術平均高さ と 展開面積率を示す (注)。

ALP : アルカリホスファターゼ。

データは平均 \pm 標準偏差を示す。

カッコ内の数字は測定回数を示す。

* : $P < 0.05$, S-ZrI との比較。

一方で、チタンとジルコニアへの細胞接着因子には違いがあるとの報告もあり、ジルコニアに生じるオッセオインテグレーションがチタンと同等であるかについてはさらなる検証が必要であると思われた (Gong ら, 2013)。

(注) Sa は表面の平均面に対して、各点の高さの差の絶対値の平均を算出し求める。Sdr は展開面積 (表面積) が、定義領域の面積に対してどれだけ増大しているか算出し求める。

1.2 インプラント表面改質の歴史

1.2.1 機械加工インプラント

近年の歯科インプラントの発展は、Brånemark 博士が、チタンがオッセオインテグレーションを起こすことを発見したことが契機となったことは広く知られている (Brånemark ら, 1969)。当時のインプラントは機械加工表面であったため、オッセオインテグレーションを獲得するまでに上顎で 6 ヶ月、下顎で 3 ヶ月の治癒期間 (免荷期間) が必要と指示されていた。

1.2.2 粗面インプラント

チタンと骨のオッセオインテグレーションを強化し、インプラントの免荷期間を短縮するために、チタンの表面性状を改質する研究が盛んに行われてきた。すなわち酸処理 (Martin ら, 1995)、サンドブラスト処理 (Cochran ら, 1998)、陽極酸化 (Lausmaa ら, 1990) などによってチタンインプラント体の表面を粗造化し、中等度の粗さの粗面 ($Sa = 1\text{--}2\ \mu\text{m}$) を作り出すことで、早期に高いオッセオインテグレーションが獲得できることが示された (Albrektsson ら, 2004)。

それらの研究の成果によって、チタンインプラントの治療成績は 10 年累積残存率が約 95%と、良好な結果を示すようになった (Shalabi ら, 2006; Wennerberg ら, 2010; DohanEhrenfest ら, 2011)。

しかしながら、現在チタンインプラントの表面修飾の際に多く用いられているサンドブラスト、酸エッチング等の粗面化処理はインプラント表面に酸化金属や有機物が検出されるという問題点が指摘されている。レーザーによる表面処理は非接触であるため、インプラント表面に異物が残留しないことが報告されている (Gaggl ら, 2000; Cho ら, 2003)。さらに、チタンインプラントの頸部をレーザー処理により粗面化することで、インプラント頸部に結合組織性付着が獲得され、インプラント周囲骨吸収が抑制されたとの臨床報告もある (Linkevicius ら, 2015)。これらのことよりレーザーによるインプラントの粗面化は有用であると考えられる。しかし、現在までにインプラント全体の表面をレーザーにより粗面化したインプラントの効果に関する報告はほとんどない。

一方、ジルコニアは、その硬さからチタンインプラントで用いられているサンドブラスト、酸エッチング等の粗面化処理ではチタンと同じような中等度の粗さを付与することは困難とする報告がある (Bächle ら, 2007; Wada ら, 2012)。これらのことから、レーザー処理は、材料に多様な変化を与えることができ、硬く加工が難しいジルコニアに対しても適切な粗さの表面を作り出すことができる可能性がある (Kakura ら, 2014; Yasuno ら, 2014)。

レーザー発振管はレーザー媒体、励起源、増幅器の三つの要素から構成されている。励起源からレーザー媒体に向けて原子、または励起光を当てることにより光放射を誘導し、その誘導された光放射を増幅することによりレーザー発振が得られる。

YAG レーザー： YAG (イットリウム・アルミニウム・ガーネット) 結晶構造を、媒体に用いた固体レーザーの一種である。熱量が大きいため溶接等に適している。医療機器へも応用されている。

YVO₄ レーザー： YVO₄ (イットリウム・バナデート) 結晶構造を、媒体に用いた固体レーザーの一種である。非常に高品質でピークパワーが高いレーザーを生み出し、瞬時に強いエネルギーを与えるため、少ない熱のストレスでインプラント体に表面加工を施すことができる。しかし、結晶が繊細なため、高出力化が難しい。

ファイバーレーザー： Yb(イッテルビウム)添加ファイバーを、媒体にも増幅器としても用いたレーザーである。ファイバー内で励起光を与えることで、ビーム品質が非常に優れたレーザーが得られる。高出力の連続発振のものと低出力のパルス発振のものがある。高出力のものには切断や溶接に適しており、低出力のものは微細加工やマーキングに適している。共振器が不要で放熱性も高く、比較的容易に出力を上げることが出来る。ビームが空間的に揺らがないため安定しており、インプラントに均一な表面性状を付与するのに適している。

1.3 粗面化による石灰化促進効果のメカニズム

インプラントの粗面化による石灰化促進メカニズムは、骨芽細胞のインテグリンが、インプラント粗面に付着したフィブロネクチンなどの接着性タンパクを認識した後、インプラント体表面に焦点接着し、細胞内骨格を形成して細胞質を著しく進展させ、MAPK を介して核に増殖・分化のシグナルを伝達し、骨基質の石灰化、骨形成を促進させることが報告されている（武部ら，2001）。

骨芽細胞同士の接着には、gap junction と N-cadherin を介する結合が関与しており、cadherin の細胞内成分が β -カテニンと直接結合し、さらにその複合体は細胞内骨格線維であるアクチンなどと結合すると報告されている（Yamada ら，1997）。さらに、インプラントの粗面化は骨芽細胞同士の接着を減少させるため、骨芽細胞のアクチン重合が阻害されて細胞骨格の形成に影響を与え、カテニンを介する cadherin の発現が抑制されることが報告されている（正木，2003）。また、cytochalasin D を用いてアクチン細胞骨格を分解することで MC3T3-E1 のプロテインキナーゼ D が活性化され、ALP 活性の亢進、OCN 産生と石灰化の増大が引き起こされると報告されている（Higuchi ら，2009）。これらのことから、インプラントの粗面化による骨芽細胞の石灰化促進メカニズムとして、粗面形状によりインテグリンを介して MAPK が活性化することや、骨芽細胞のアクチン重合が阻害されることにより、cadherin の発現が抑制され遺伝子転写活性調節因子である β -カテニンが細胞質内に遊離する、または、プロテインキナーゼ D が活性化することが関与していると考えられる。

1.4 チタンアレルギー

チタンを粗面化することにより、インプラント体に強いトルクをかけることでチタン表面が剥がれる可能性があることが報告されている（Mints ら，2014）。また、チタンインプラントは異種金属が口腔内に存在する場合や酸性条件下でフッ素イオンが存在する場合は、耐食性が極端に低下するとの報告もある（Cortada ら，2000；Koike ら，2001 a；Koike ら，2001 b；Madono ら，2006）。その影響でチタンが生体内に取り込まれることが危惧されている。さらに、チタンによるアレルギーや過敏症が近年報告されるようになり、無視できない問題となってきている（Sicilia ら，2008）。

一方で、イットリア添加正方晶ジルコニアはチタンインプラントと比較して金属のイオン化による溶出はほとんどなくアレルギーの報告はない（Milleding ら，2002）。審美性の回復、アレルギーの問題に対応できるインプラント材料としてジルコニアの利用が進められているところである。

1.5 引用文献

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: part 1 - review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int. J. Prosthodont.* 2004; 17:536-43.

Brånemark PI, Breine U, Adell R, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A, Intra-ossous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.* 1969; 3:81-100.

Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu. Rev. Mater. Res.* 2001; 31:357-371.

Bächle M, Butz F, Hübner U, Bakaliniš E, Kohal RJ. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2007; 18:53-59.

Cochran DL, Schenk RK, Lussi A, Higginbottom FL, Buser D. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 40:1-11.

Cortada M, Giner L, Costa S, Gil FJ, Rodriguez D, Planell JA. Galvanic corrosion behavior of titanium implants coupled to dental alloys. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2000; 11:287-293.

Cho SA, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials* 2003; 24:4859-4863.

DohanEhrenfest DM, Vazquez L, Park YJ, Sammartino G, Bernard JP. Identification card and codification of the chemical and morphological characteristics of 14 dental implant surfaces. *J. Oral. Implantol.* 2011; 37:525-542.

Gaggl A, Schultes G, Muller WD, Karcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces—a comparative study. *Biomaterials* 2000; 21:1067-1073.

Gahlert M, Burtscher D, Pfundstein G, Grunert I, Kniha H, Roehling S. Dental zirconia implants up to three years in function: a retrospective clinical study and evaluation of prosthetic restorations and failures.

Int. J. Oral. Maxillofac. Implants 2013; 28:896-904

Gong SH. Gene expression of MC3T3-E1 osteoblastic cells on titanium and zirconia surface. J. Adv. Prosthodont. 2013; 5:416-22.

Higuchi C, Nakamura N, Yoshikawa H, Itoh K. Transient dynamic actin cytoskeletal change stimulates the osteoblastic differentiation. J. Bone Miner. Metab. 2009; 27:158-167.

Koike M, Fujii H. *In vitro* assessment of corrosive properties of titanium as a biomaterial. J. Oral. Rehabil. 2001a; 28:540-548.

Koike M, Fujii H. The corrosion resistance of pure titanium in organic acids. Biomaterials 2001 b; 22:2931-2936.

Kohal RJ, Weng D, Bachle M, Strub JR. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. J. Periodontol. 2004; 75:1262-1268.

Ko HC, Han JS, Bachle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ. Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. Dent. Mater. 2007; 23:1349-1355.

Kakura K, Yasuno K, Taniguchi Y, Yamamoto K, Sakai T, Irie A, Kido H. Zirconia implant with rough surface produced by YAG laser treatment: evaluation of histomorphology and strength of osseointegration. J. Hard Tiss. Biol. 2014; 23:75-80.

Lausmaa J, Kasemo B, Mattsson H, Odelius H. Multi-technique surface spectroscopic characterization of electropolished and anodized Ti. Appl. Surf. Sci. 1990; 45:189-200.

Linkevicius T, Puisys A, Svediene O, Linkevicius R, Linkeviciene L. Radiological comparison of lasermicrotextured and platform-switched implants in thin mucosal biotype. Clin. Oral Implants Res. 2015; 26:599-605.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells(MG63). J. Biomed. Mater. Res. 1995; 29:389-401.

Milleding P, Haraldsson C, Karlsson S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 61:541-550.

Madono Y, Nakagawa M, Matsuya S, Ishikawa K, Terada Y. Corrosion behavior of pure titanium and titanium alloys in various concentrations of acidulated phosphate fluoride (APF) solutions. *Dent. Mater. J.* 2006; 25:104-112.

Mints D, Elias C, Funkenbusch P, Meirelles L. Integrity of implant surface modifications after insertion. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2014; 29:97-104.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. One-year Follow-up of first consecutive 100 zirconia dental implants in humans: a comparison of 2 different rough surfaces. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2007; 22:430-435.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. Five-year success rate of 831 consecutively placed zirconia dental implants in humans: a comparison of three different rough surfaces. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2010; 25:336-344.

Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J. Dent. Res.* 2006; 85:496-500.

Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2008; 19:823-835.

Vinothkumar TS, Kandaswamy D, Chanana P. CAD/CAM fabricated single-unit all-ceramic post-core-crown restorations. *J. Conserv. Dent.* 2011; 14:86-89.

Wennerberg A and Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2010; 25:63-74.

Wada Y, Mizuno M, Nodasaka Y, Tamura M. The effect of enamel matrix derivative on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblasts cultured on zirconia. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2012; 27:849-858.

Wang CF, Huang HL, Lin DJ, Shen YW, Fuf LJ, Hsu JT. Comparisons of maximum deformation and failure forces at the implant-abutment interface of titanium implants between titanium-alloy and zirconia abutments with two levels of marginal bone loss. *Biomed. Eng. Online* 2013; 12:45.

Yamada KM, Gerger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1997; 9:76-85.

Yamashita D, Machigashir M, Miyamoto M, Takeuchi H, Noguchi K, Izumi Y, Ban S. Effect of surface roughness on initial responses of osteoblast-like cells on two types of zirconia. *Dent. Mater. J.* 2009; 28:461-470.

Yasuno K, Kakura K, Taniguchi Y, Yamaguchi Y, Kido H. Zirconia implants with laser surface treatment: peri-implant bone response and enhancement of osseointegration. *J. Hard Tiss. Biol.* 2014; 23:91-98.

武部 純, 石橋 寛二. 分子・細胞学的側面からみたインプラント表面上での骨形成. *岩医大歯誌*. 2001; 26:61-76.

津久間 孝次, 窪田 吉孝, 延谷 宏治. イットリア部分安定化ジルコニアの熱的・機械的性質. *Yogyo-kyokai-shi* 1984; 92:11-19.

正木 千尋. A Cellular Biological Study on the Effect of Rough Surface Properties of Titanium on Proliferation, Differentiation of Osteoblasts *広島大学歯学雑誌* 2003; 35:49-63.

第二章
YAG レーザーによる
ジルコニアインプラント表面改質
in vivo 実験

2.1 緒言

チタンは、加工性に優れ、他の歯科用金属と比較して腐食やイオン溶出が極めて少なく、骨との親和性が高いため、歯科インプラント材料として臨床で広く使用されている。チタンインプラントが成功した理由は、インプラント表面が骨と直接接触する状態、すなわちオッセオインテグレーションを獲得できることにある。そのため、さらに強固なオッセオインテグレーションが獲得できるようなインプラントの表面改質が行われてきた (Gottlander ら, 1991; Buser ら, 1991; Larsson ら, 1996; Buser ら, 2004)。

しかし、チタンインプラントでは、インプラント材料の黒味がかかった色調が審美的問題を引き起こすことがある。また、チタンインプラントの使用量が増加するにつれて、チタンに対する金属アレルギーや過敏症が報告されている (Thomas ら, 2006; Müller ら, 2007; Egusa ら, 2008; Mine ら, 2010)。他方、ジルコニアセラミクスは白色で、歯と類似した色調を有すること、生体親和性および強度において優れた特性を有していることから、すでにインプラント体としての臨床応用も報告されており (Oliva ら, 2007; Oliva ら, 2008; Kohal ら, 2008)、審美的でアレルギーのリスクが極めて低い次世代のインプラント材料として注目されている。しかし、ジルコニアの表面改質は技術的に難しく、表面性状と周囲組織の反応に関する研究の数は限られている (Akagawa ら, 1993; Akagawa ら, 1998; Kohal ら, 2004; Sennerby ら, 2005; Gahlert ら, 2007; Ferguson ら, 2008; Langhoff ら, 2008; Depprich ら, 2008; Gahlert ら, 2009; Oliva ら, 2010; Schliephake ら, 2010)。そのため、ジルコニアインプラントを広く臨床応用するためには、表面性状の変化が周囲組織に及ぼす影響を検討することが不可欠な課題である。

2.2 目的

本研究の目的は、YAG レーザー処理によってジルコニア表面の粗面化を試みることである。また、実験用インプラント体を使用し、表面性状の変化がインプラント周囲組織に及ぼす影響を検討することである。

2.3 材料と方法

実験用インプラント

実験に使用したジルコニアインプラントはイットリア添加正方晶ジルコニア (Y-TZP) で、直径 2.0 mm、長さ 7.0 mm のスレッドタイプである。ジルコニアパウダー (HSY-3FSD, Daiichi Kigenso Kagaku Kogyo, Tokyo, Japan) を加圧し、仮焼結を行った後インプラント体を削り出し、本焼結を行った。削り出したインプラント体の半数は、表面を YAG レーザー照射により表面を粗面処理し、粗面ジルコニアインプラント (R-ZrI) とした。また、残りの半数はコントロールとしてレーザーの照射なしの機械加工ジルコニアインプラント (S-ZrI) とした。非脱灰研磨標本用に 22 本、除去トルク計測用に 18 本のインプラントを使用した。インプラントは、アルコール内での超音波洗浄を行い、乾燥後、オートクレーブ (120 °C、2 気圧、20 分) により滅菌した。

走査型電子顕微鏡 (SEM)

ジルコニアインプラント表面に白金のコーティングを行い、走査型電子顕微鏡 (JSM-6330 F, JEOL) を用いて表面性状を観察した。

表面性状の評価

インプラント表面は、Wennerberg ら (2000) のガイドラインに従って評価した。スレッドの底部、側面、頂部のそれぞれ 3 点をレーザーマイクロスコープ (VK-100、キーエンス、フィルターサイズ $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$) で計測し、その平均を算出した。三次元算術平均高さ (Sa)、展開面積率 (Sdr)、およびスレッドの頂点密度 (Spd) の 3 種類のパラメータで評価を行った。

動物実験

実験動物として、8週齢の雄性 Sprague-Dawley rats (SD ラット) を 20 匹用い、ラットの左右脛骨に実験用インプラントとレーザー照射なしのコントロール用インプラントを各 1 本ずつ埋入した (図 1)。この実験は福岡歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号 #10004)、動物実験ガイドラインに基づき行われた。

ラットには、吸入麻酔後、ペントバルビタール (0.1 mg/kg) による腹腔内麻酔を行なった。全身麻酔下にて、ラットの膝関節周囲の剃毛を行い、膝関節よりラット脛骨前縁に沿って約 15 mm 切開し、粘膜骨膜弁剥離後、骨を明示した。インプラント埋入は、ラット脛骨膝関節から末端側へ約 10 mm の位置に脛骨の長軸と垂直になるよう内側から外側に向けて埋入した。埋入後、まず筋膜、骨膜を縫合し、次に皮膚を縫合した (Vicryl, Johnson & Johnson, Tokyo, Japan)。外科処置後、実験用ラットの術後合併症や死亡は見られなかった。

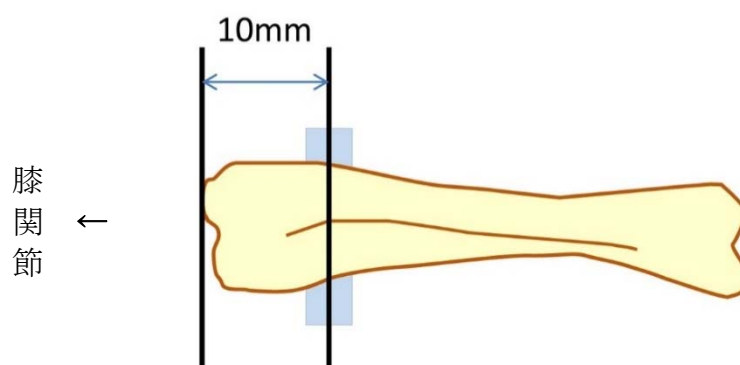


図 1 ラットの脛骨へのインプラント埋入位置

ジルコニアインプラントを関節部骨頂から約 10 mm の位置を目標として埋入した。

組織学的評価

埋入 4 週後に、麻酔薬の過剰投与により実験動物を屠殺し、インプラント体を含む脛骨を試料として採取した。試料は 10 %ホルマリン液 (pH 7.0) にて浸漬固定した。脱水後、通法に従ってメチルメタクリレート (MMA) 樹脂に包埋し、インプラント体の長軸方向のほぼ中央を通る断面となるよう、非脱灰研磨標本を作製した。トルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡 (BX51-DP 12, OLYMPUS, Tokyo, Japan) にて組織形態学的評価を行った。インプラント周囲の皮質骨側 4 か所および骨髄側 2 か所を観察し、合計 6 か所で行った。それぞれ 3 スレッドずつ計測し、インプラント 3 スレッドの全長とインプラントと骨が接触する長さを用いて算出したインプラント-骨接触 (BIC) 率とインプラント 3 スレッド分で、緑の破線より内側の骨組織面積から算出した骨面積 (BA) 率を評価した (図 2)。

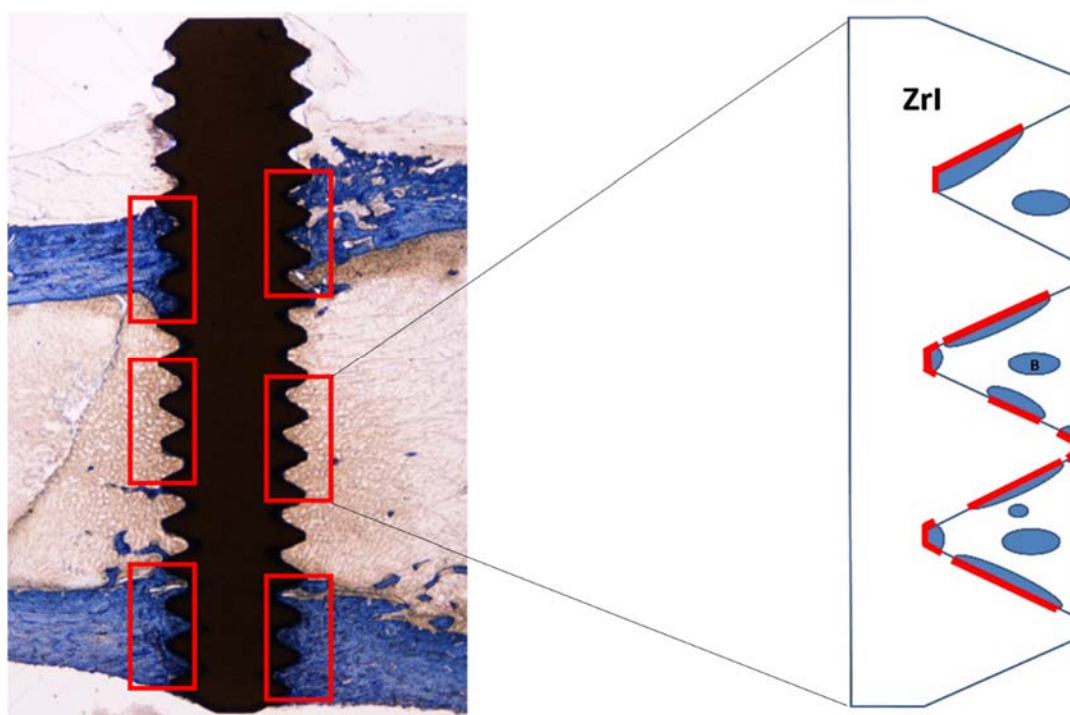


図 2 ジルコニアインプラントの周囲組織の計測

Implant: ジルコニアインプラント。BIC 率: 骨とインプラントの接触を赤色ラインで示す。骨とインプラントの接触率はインプラント 3 スレッドの全長と赤色ラインを用いて算出した。BA 率: 骨面積率はインプラント 3 スレッド分で、緑の破線より内側の骨組織 (B) 面積から算出した。

除去トルク計測

除去トルク測定のため、9 匹に埋入したインプラント体を使用した。埋入 4 週後に、インプラント体を含む脛骨を採取し、直ちにトルク測定器 (BTG60CN-S、東日) をインプラント体に装着し、逆回転の負荷をかけて、除去トルクを計測した。

統計

BIC 率、BA 率、除去トルク値は t 検定 (等分散を仮定した 2 標本による検定) により評価した。

2.4 実験結果

2.4.1 インプラントの表面解析

最初に今回作製した未使用の R-ZrI を SEM にて観察した。その結果、スレッド先端部に YAG レーザー照射によるものと思われる小さな損傷が確認された(図 3)。S-ZrI と R-ZrI の平均三次元算術平均高さ (Sa) は、それぞれ 1.06 μm 、および 3.33 μm であった (表 1)。

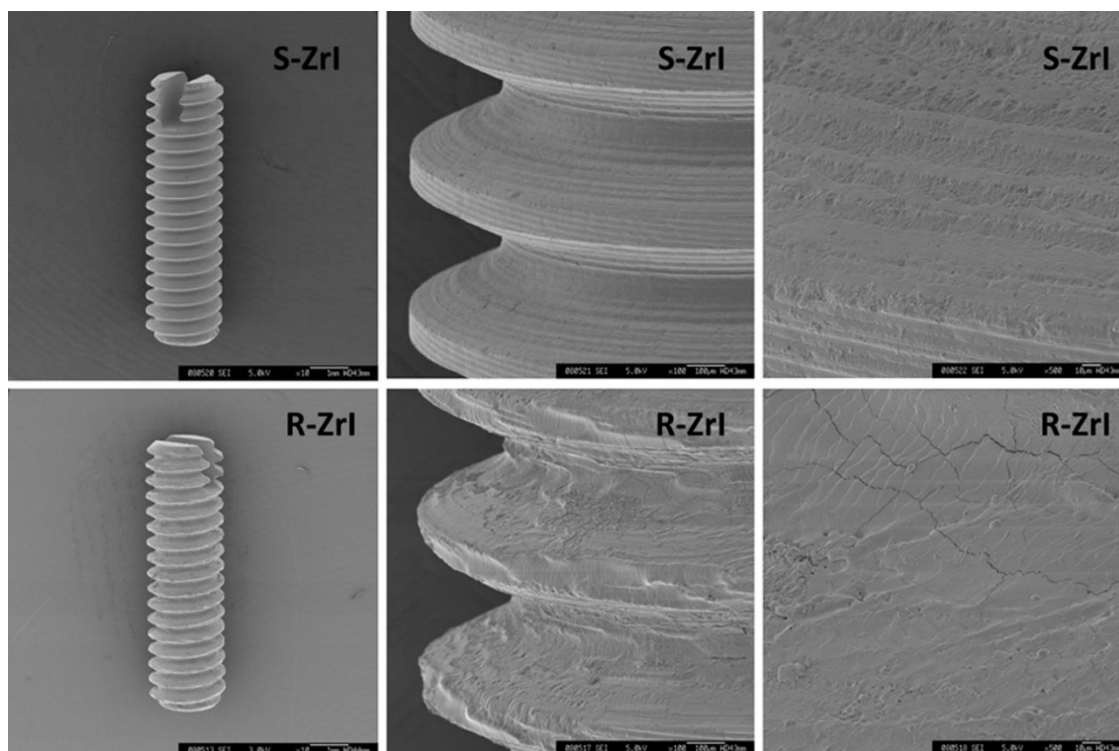


図 3 機械加工面 (S-ZrI) と、粗面 (R-ZrI) ジルコニアインプラントの SEM イメージ

表 1 実験用インプラントの表面分析

	Sa (μm)	Sdr (%)	Spd (mm^{-2})
S-ZrI	1.06 ± 0.44 (3)	11.40 ± 4.27 (3)	530862.44 ± 283758.86 (3)
R-ZrI	3.33 ± 2.11 (3) *	49.91 ± 23.88 (3) *	588881.18 ± 163249.21 (3)

Sa、Sdr、と Spd はそれぞれ、三次元算術平均高さ、展開面積率、スレッドの頂点密度を示す。(注)

データは平均±標準偏差を示す。

カッコ内の数字は測定回数を示す。

* :P < 0.05, S-ZrI との比較。

(注) SdP は単位面積当たりの山頂点の数を算出し求める。

2.4.2 BIC 率・BA 率・除去トルク値

今回の実験で合計 40 本のインプラント体を使用した(S-ZrI、R-ZrI 各 20 本)。埋入手術後、特に感染を疑う炎症所見は見られなかった。光学顕微鏡による観察結果では、埋入 4 週間後には両方のタイプのインプラント周囲において、皮質骨側では既存骨とインプラント間、骨髄側ではインプラント表面に沿って骨の新生が観察され、オッセオインテグレーション獲得が推測された(図 4)。

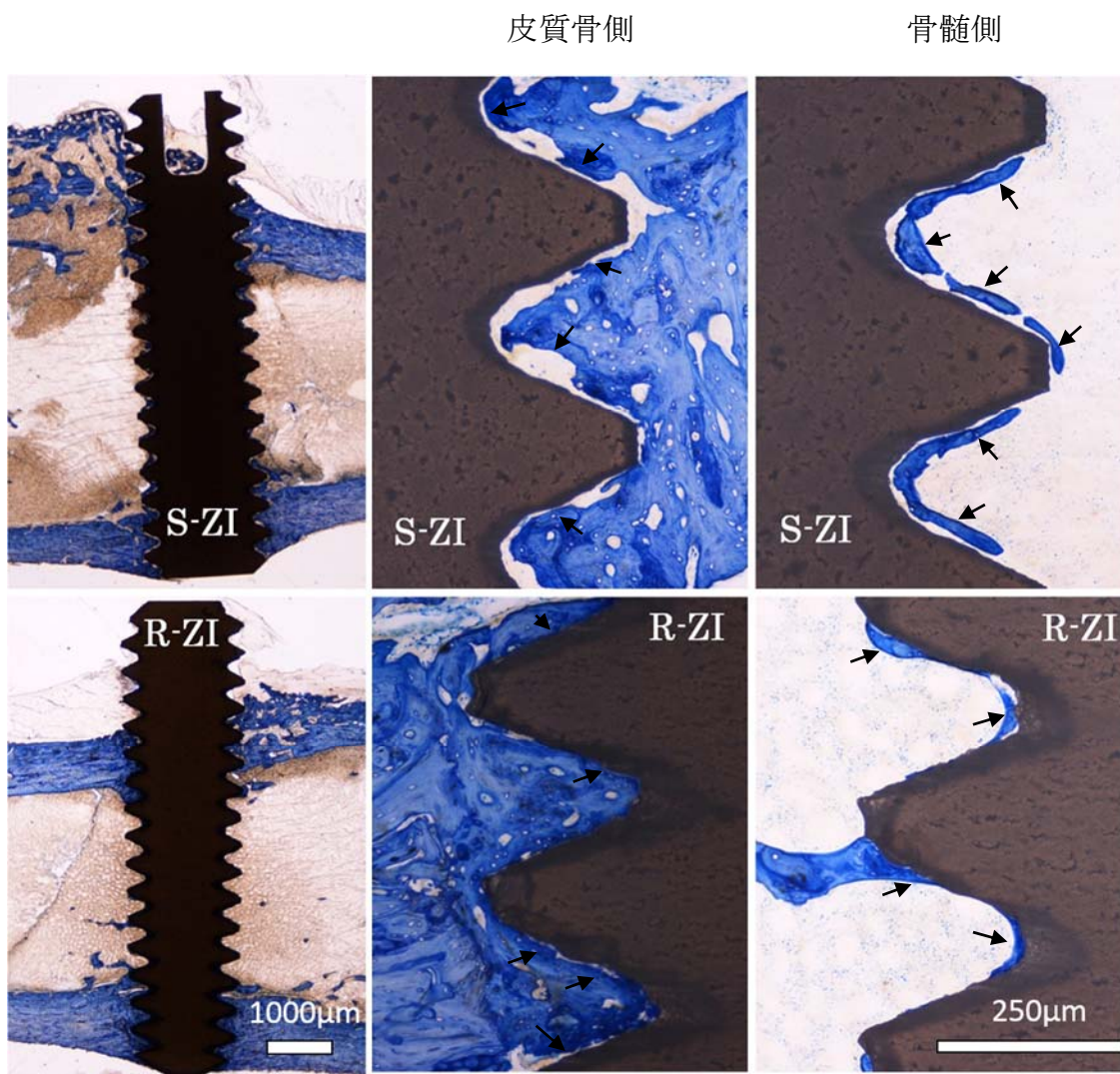


図 4 インプラント埋入 4 週間後の S-ZrI と R-ZrI ジルコニアインプラントの光学顕微鏡像

矢印：新生骨。

R-ZrI の皮質骨側と骨髄側のインプラント-骨接触 (BIC) 率は、S-ZrI のそれと比べそれぞれ約 2 倍、および 1.2 倍であった。R-ZrI の皮質骨側と骨髄側の骨面積 (BA) 率は、S-ZrI のそれと比べそれぞれ、約 1 倍、および 0.6 倍であった。R-ZrI の除去トルク値は S-ZrI と比べて約 7 倍であった(表 2)。

表 2 YAG レーザーを照射したジルコニアインプラント体の特徴

Parameters	S-ZrI	R-ZrI
BIC 率(%) (皮質骨側)	27.1 ± 22.7 (11)	57.3 ± 18.7 (11) *
(骨髄側)	33.9 ± 19.7 (11)	41.5 ± 17.6 (11)
BA 率(%) (皮質骨側)	48.3 ± 14.2 (11)	51.2 ± 23.7 (11)
(骨髄側)	18.4 ± 5.1 (11)	11.3 ± 12.6 (11)
除去トルク値(RTQ)	1.7 ± 3.7 (9)	12.2 ± 6.6 (9) *

BIC 率と BA 率はそれぞれ、インプラント-骨接触率と骨面積を示す。

データは平均±標準偏差を示す。

カッコ内の数字は実験回数を示す。* P < 0.05, S-ZrI との比較。

2.5 考察

近年、歯科インプラント材料の主流として純チタン、およびチタン合金が用いられている。一般的にチタンは生体親和性が高くアレルギーのリスクは低いとされているが、チタンインプラントを埋入した患者において、顔面の湿疹や口腔粘膜の発赤などの金属アレルギーの症状がみられ、インプラント体の除去に至った報告がある (Egusa ら, 2008)。チタンアレルギーや過敏症はインプラントの失敗の原因になる可能性が報告されている (Thomas ら, 2006; Müller ら, 2007; Mine ら, 2010)。また、入手可能なほとんどのアバットメントはチタン合金製であり、チタン合金中に含まれるチタン以外の含有金属が金属アレルギーや過敏症の原因となる可能性も示唆されている (Javed ら, 2013)。今後、チタンインプラントの使用が増加するにつれて金属アレルギーや過敏症が増大する可能性があり、その対策を準備する必要がある。

歯科材料として利用される酸化物系セラミクスは、生体内親和性や耐腐食性において金属に優る。特にジルコニアは破壊強度が大きく、白色であるため、補綴物やインプラントのアバットメントとしてすでに広く歯科臨床に用いられている。ジルコニアは生体親和性の高いインプラント体材料としても魅力的であるが、機械的性質として、弾力性に乏しく、加工が難しい。そのため、ジルコニア表面の粗面処理に関する報告はチタンに比べると非常に少ない。これまでに、機械加工 (Akagawa ら, 1993; Akagawa ら, 1998)、サンドブラスト処理 (Kohal ら, 2004; Gahlert ら, 2007; 2009) やリン酸系セラミクスのコーティングによる表面改質の研究 (Sennerby ら, 2005) が報告されてきた。近年、チタンインプラントのようにブラスト処理やエッチング処理によってジルコニア表面を加工する研究がいくつか報告されている (Ferguson ら, 2008; Langhoff ら, 2008; Depprich ら, 2008; Oliva ら, 2010; Schliephake ら, 2010)。

今回の研究で YAG レーザーによる表面改質で新たに開発した粗面ジルコニアインプラント (R-ZrI) の表面粗さは $Sa = 3.33 \mu\text{m}$ で、臨床応用されているチタンインプラントでは、プラズマ溶射チタンや、ハイドロキシアパタイトコーティングインプラントに相当する粗さであった。新しく開発した R-ZrI をラットの脛骨に埋入した結果、埋入後 4 週で、インプラント周囲に骨の新生がみられ、オッセオインテグレーションの獲得が確認された。

表面性状の変化がインプラント周囲組織におよぼす影響を検討した結果、BIC率は、皮質骨側部では、R-ZrIがS-ZrIに比べ約1.3倍高かった。BA率は、皮質骨側と骨髄側の両部位で、R-ZrIとS-ZrIとの間に差は認められなかった。また、R-ZrIの除去トルク値はS-ZrIと比較して約7倍高かった。これらのことから、粗面処理によるインプラント除去に対する抵抗には皮質骨部での骨新生による骨結合が有効に働いていることが示唆された。これらの現象は、ジルコニアの表面性状の違いが、インプラント周囲骨形成や、新生骨の形態の違いに影響を及ぼすことを示唆している (Gahlert, 2007; Gahlertら, 2009; Schliephakeら, 2010)。

S-ZrIとR-ZrIのBA率を皮質骨側と骨髄側で比較すると、両インプラントにおいて皮質骨側のBA率が大きかった。これは、既存骨の骨構造による影響と考えられる。今後、新しく開発したジルコニアインプラントの周囲組織の経時的変化の観察が必要であると思われる。

粗面のチタンインプラントと粗面のジルコニアインプラントのBIC率とBA率値に大きな差はない、もしくは、ジルコニアのほうが高いことが報告されている。一方、チタンインプラントの方が明らかに除去トルク値は高いことが報告されている (Akagawaら, 1993; Hoffmannら, 2012)。このように、ジルコニアインプラント周囲の骨形成は良好な結果が得られているが、骨-インプラント界面の機械的強度は、材質の違いによって影響を受けることが示唆された。チタンの粗面の効果に関しては、非常に多くの研究が行われてきたが、ジルコニアの表面性状に関する研究は始まったばかりである。Sennerbyら (2005) は、粗面加工による周囲骨との結合の強化は除去トルク値を上昇させるが、チタンとジルコニアは、表面粗さは同等でも、表面の化学的組成の違いにより骨結合のメカニズムが異なる可能性を示唆している。

今回作製した実験用インプラント体の表面性状のSEMによる観察結果では、YAGレーザー照射による粗面処理において、表面の変性は確認されなかったが、スレッド先端部にYAGレーザー照射の影響と思われる小さな損傷が認められた。Stübingerら (2008) は diode、YAG、およびCO₂レーザー照射によってジルコニア表面に起こる変性を調べた結果、CO₂レーザーを用いた場合のみに表面の変性がみられたと報告している。今後、レーザーの種類を検討も含めて、効果的な粗面を作るためのレーザーの照射方法を検討する必要があると思われる。さらに、新しいジルコニアインプラントシステムを臨床に応用するために、口腔内での軟組織の反応や、咬合負荷に対する検討を行う必要があると考えている。

2.6 引用文献

Akagawa Y, Ichikawa Y, Nikai H, Tsuru H. Interface histology of unloaded and early loaded partially stabilized zirconia endosseous Implant in initial bone healing. *J. Prosthet. Dent.* 1993; 69: 599-604.

Akagawa Y, Hosokawa R, Sato Y, Kamayama K. Comparison between freestanding and tooth-connected partially stabilized zirconia implants

after two years' function in monkeys: A clinical and histologic study. *J. Prosthet. Dent.* 1998; 80: 551- 558.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25:889-902.

Buser D, Broggin N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J. Dent. Res.* 2004; 83:529-533.

Depprich R, Zipprich H, Ommerborn M, Naujoks C, Wiesmann HP, Kiattavorncharoen S, Lauer HC, Meyer U, Kübler NR, Handschel J. Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. *Head. Face. Med.* 2008; 11:4-30.

Egusa H, Ko N, Shimazu T, Yatani H. Suspected association of an allergic reaction with titanium dental implants: A clinical report. *J. Prosthet. Dent.* 2008; 100:344-347.

Ferguson SJ, Langhoff JD, Voelter K, von Rechenberg B, Scharnweber D, Bierbaum S, Schnabelrauch M, Kautz AR, Frauchiger VM, Mueller TL, van Lenthe GH, Schlottig F. Biomechanical comparison of different surface modifications for dental implants. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2008; 23:1037-46.

Gottlander M, Albrektsson T. Histomorphometric studies of Hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 1991; 6:399-404.

Gahlert M, Gudehus T, Eichhorn S, Steinhauser E, Kniha H, Erhardt W. Biochemical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pig. *Clin. Oral. Implant. Res.* 2007; 18:662-668.

Gahlert M, Röhling S, Wieland M, Sprecher CM, Kniha H, Milzt S. Osseointegration of zirconia and titanium dental implants: a histological and histomorphometrical study in the maxilla of pigs. *Clin. Oral. Implant. Res.* 2009; 20:1247-1253.

Hoffmann O, Angelov N, Zafiroopoulos GG, Andreana S. Osseointegration of zirconia implants with different surface characteristics: an evaluation in rabbits. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2012; 27:352-358.

Javed F, Al-Hezaimi K, Almas K, Romanos GE. Is titanium sensitivity associated with allergic reactions in patients with dental implants? A systematic review. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2013; 15:47-52.

Kohal RJ, Klaus G. A zirconia implant/zirconia crown system. A case report. *Int. J. Periodontics. Restorative. Dent.* 2004; 24:147-153.

Kohal RJ, Weng D, Bächle M, Strub JR. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *J. Periodontol.* 2004; 75: 1262-1268.

Larsson C, Tmsen P, Adonsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, Ericson LE. Bone Response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 1996; 17:605-616.

Langhoff JD, Voelter K, Scharnweber D, Schnabelrauch M, Schlottig F, Hefti T, Kalchhofner K, Nuss K, von Rechenberg B. Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2008; 37:1125-32.

Müller K, Valentine-Thon E. Hypersensitivity to titanium: clinical and laboratory evidence. *Neuro. Endocrinol. Lett.* 2007; 27:31-35.

Mine Y, Makihiro S, Nikawa H, Murata H, Hosokawa R, Hiyama A, Mimura S. Impact of titanium ions on osteoblast-, osteoclast- and gingival epithelial-like cells. *J. Prosthodont. Res.* 2010; 54:1-6.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. One-year follow-up of first consecutive 100 zirconia dental implants in humans: a comparison of 2 different rough surfaces. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2007; 22: 430-435.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. Ovoid zirconia Implants: Anatomic design for premolar replacement. *Int. J. Periodontics. Restorative. Dent.* 2008; 28:609-615.

Oliva J, Oliva X, Oliva JD. Five-year success rate of 831 consecutively

placed zirconia dental implants in humans: a comparison of three different rough surfaces. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2010; 25:336-334.

Sennerby L, Dasmah A, Larsson B, Iverhed M. Bone tissue responses to surface-modified zirconia implants: A histomorphometric and removal torque study in the rabbit. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2005; 7 Suppl 1:S13-20.

Stübinger S, Homann F, Etter C, Miskiewicz M, Wieland M, Sader R. Lasersurgery effect of Er: YAG, CO₂ and diode laser irradiation on surface properties of zirconia endosseous dental implants. *Lasers in Surgery and Medicine* 2008; 40: 223-228.

Schliephake H, Hefti T, Schlottig F, Gédet P, Staedt H. Mechanical anchorage and peri-implant bone formation of surface-modified zirconia in minipigs. *J. Clin. Periodontol.* 2010; 37:818-828.

Thomas P, Bandl WD, Maier S, Summer B, Przybilla B. Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature. *Contact. Dermatitis.* 2006; 55:199-202.

Wennerberg A, Albrektsson T. Suggested guidelines for the topographic evaluation of implant surfaces. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2000; 15:331-344.

第三章
ファイバーレーザーによる
ジルコニアインプラント表面改質
in vitro 実験

3.1 緒言

骨とのオッセオインテグレーションを起こすチタンインプラントの開発により、インプラント治療は広く応用されている。歯科インプラントの材料である純チタンやチタン合金が良好な骨芽細胞の細胞接着、増殖、分化、石灰化を起こすためには適度な粗面化が必要であると報告されている (Schwartz ら, 1994; Boyan ら, 2001; Ponche ら, 2010)。チタンインプラントに関する研究では、チタンと骨の結合、いわゆるオッセオインテグレーションを強化するために、インプラント表面性状の改良に関する *in vitro* と *in vivo* の研究が盛んに行われてきた (Buser ら, 1991; Bowers ら, 1992; Swart ら, 1992; Stanford ら, 1994; Larsson ら, 1996; Matsuura ら, 2005; Oya ら, 2009)。その結果、酸エッチング、サンドブラスト、陽極酸化、およびサンドブラスト後に酸エッチングなどを施した様々な表面性状のインプラントが臨床応用され、良好な臨床結果が報告されている (Albrektsson ら, 2004 a; Albrektsson ら, 2004 b; Shalabi ら, 2006; Wennerberg ら, 2010; DohanEhrenfest ら, 2011)。

In vitro (Ko ら, 2007; Gong ら, 2013)、および *in vivo* (Kohal ら, 2004) の実験において、ジルコニアはチタンと類似した生体反応を示すことが報告されている。ジルコニアは機械的強度が高く、さらに、イオン溶出がほとんどない (Milleding ら, 2002) のでアレルギー反応 (Mitchell ら, 1990; Sicilia ら, 2008) を起こすリスクが低く、さらに、白い色調 (Vinothkumar ら, 2011; Wang ら, 2013) を有する点はチタンには見られない性質である。これらの優れた特徴からジルコニアはすでにアバットメントや歯冠修復材料として臨床応用されており、次世代のインプラント体材料としても注目されている (Andreiotelli ら, 2009)。

臨床応用を行う上でジルコニアインプラントの表面性状についての詳細な調査が必要であるが、ジルコニアの表面改質についての十分な研究は行われていない (Stübinger ら, 2008)。これまでの研究で、我々はレーザーを用いることでジルコニア表面の粗面処理に成功した。YAG レーザーを用いて粗面化させたジルコニアインプラントの *in vivo* の実験では、光学顕微鏡による評価において BIC 率が有意に向上し、除去トルク値も有意に増加することが明らかとなった (Kakura ら, 2014)。しかし、この方法ではインプラント体のスレッド形態に損傷を与える可能性があった。そこで、我々はファイバーレーザーを用いてナノ構造を併せ持った 2 μ m 幅の溝状の粗面形状を付与することにした (Yasuno ら, 2014)。インプラントの材質は骨芽細胞の増殖や分化に影響するので、適度な粗さの表面性状がオッセオインテグレーションを促進すると期待される。

3.2 目的

この研究の目的は、ファイバーレーザー処理を施したジルコニアの表面性状と周囲組織の生物学的反応の関係を明らかにすることで、ファイバーレーザー処理を行ったジルコニア表面上でマウス由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を培養し、その増殖と分化について検討した。

3.3 材料と方法

ファイバーレーザーによる表面加工

ファイバーレーザー処理を行ったジルコニア表面の特性を解析するためにジルコニアプレートを作製した。すなわち、ジルコニアパウダー (HSY-3FSD, Daiichi Kigenso Kagaku Kogyo, Tokyo, Japan) を用いて冷間等方圧加圧装置 (DR. CIP-M, Kobe Steel Co., Ltd., Kobe, Japan) により全 132 枚のジルコニアプレート (yttria-stabilized tetragonal zirconia polycrystal ceramics; 10 mm square, 1 mm thick) を作製し 1500 °C で焼結した。それらのプレートは、表面性状別に以下の二つのグループに分けた：

ジルコニア表面をダイヤモンドホイール (SDC-600, Asahi Diamond Industrial Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、回転数 2000 rpm で磨いた機械加工グループ (S-ZrP) 、

S-ZrP の表面にファイバーレーザー (MD-F3000, Keyence, Osaka, Japan) を一方向に照射し、高さが約 20 μm 、幅が約 50 μm の溝状粗面を形成した粗面グループ (R-ZrP) (図 1)。

材料の強度を評価するために、四点曲げ試験 (ID014704) が行われ、平均値は $1167.16 \pm 225.85 \text{ MPa}$ であった。粗面はレーザー顕微鏡 (VK-X100, Keyence) を用いてそれぞれのサンプルの任意の三か所の $50 \times 50 \mu\text{m}$ の範囲を計測し、表面粗さは三次元算術平均高さ (Sa) と表面展開面積率 (Sdr) のパラメータで表示した。

細胞培養

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (RIKEN Cell Bank, Tsukuba, Japan) を 10 % ウシ胎仔血添加 α -minimum essential medium (Gibco-BRL Life Technologies, Carlsbad, CA) 中で培養した。この培地中に ascorbic acid、 β -glycerophosphate、hydrocortizone (Osteoblast-Inducer Reagent, TaKaRa, Shiga, Japan) を添加してこの骨芽細胞様細胞を骨芽細胞に分化させた。細胞はジルコニアプレート上、または、ポリスチレンディッシュ上に播種され ($1.4 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$)、5 % CO_2 で 37 °C の湿潤下にて培養した。培地は 3 日ごとに交換した。

細胞形態の評価

ジルコニアプレート上の細胞を 10 % ホルマリンにより固定し、段階的濃度のエタノールで脱水し、臨界点乾燥器を用いて液化 CO_2 により乾燥させた。その後、ジルコニアプレートは 2 分間白金を蒸着した後に 30 ° 傾けた状態で走査型電子顕微鏡 (SEM) (JSM-6330F, JEOL, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

細胞を光学顕微鏡で観察するためにヘマトキシリン染色 (Diff Quik, Sysmex Co., Ltd., Hyogo, Japan) を行った。細胞の長さ と 幅 を計測して、その比 (長さ/幅) を細胞形態指数とした。プレート上に形成された溝を基準として、溝方向に伸張している細胞の長軸を細胞の長さとした。また、その垂直軸を幅とした。細胞形態指数は、細胞が溝に沿って伸張していることを示す。

アクチン線維を観察するために、細胞をPBSに溶解した4%パラホルムアルデヒドで15分間固定し、0.5% Triton X-100で5分間細胞膜を穿孔させた。細胞をAlexa Fluor 350-結合 phalloidin (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)で1時間染色し、蛍光顕微鏡(BZ-9000, Keyence)にて蛍光染色部位を観察した。

細胞増殖試験

細胞数は、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)を用いてWST assayにより評価した。培地中の492 nm吸光度は、マイクロプレートリーダー(PerkinElmer, Waltham, MA)を用いて計測した。細胞数は、サンプル値から細胞が培養されていない培地(blank)の吸光度値を差し引いて計算した。吸光度値を細胞増殖指数とした。

アルカリホスファターゼ活性の計測

アルカリホスファターゼ (ALP) 活性は、酵素反応の基質である *p*-nitrophenyl phosphate (TRACP & ALP Assay kit, TaKaRa) を用いて評価した。細胞懸濁液に基質を加え、15分後にNaOH (0.5 mol/L) を加え、吸光度を計測した。*p*-Nitrophenolの標準曲線を用いることにより、ALP活性は、タンパク量に対する時間当たりの *p*-nitrophenol 産生物(nmol/min/ μ g protein) として表した。

骨芽細胞関連遺伝子の定量的PCR

細胞の全RNAを逆転写のためにISOGEN (Nippon gene, Toyama, Japan)を用いて分離した。逆転写には、Primescript II (TaKaRa)を用いた。SYBR Green法 (SYBR Premix EX Taq, TaKaRa)に従い7500 Realtime PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)を用いて定量RT-PCRを行った。定量RT-PCRには、runx-related transcription factor 2 (Runx2/Cbfa1)、osteocalcin (OCN) (Hayashiら, 2012)の遺伝子プライマーを使用し、内部コントロールとして β -actin (ACTB) (Stephensら, 2011)を使用した(表1)。

表1 本研究で使用されたPCRプライマーの配列

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Runx2	AGAAGGCACAGACAGAAGC	CTGGAAGGGTCCACTCTG
OCN	CCGCCTACAAACGCATCTACG	AGGATCAAGTCCCGGAGAGC
ACTB	CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA	GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG

定量RT-PCRにおける温度変化の設定は、以下の順番で行った：95℃ 2分の後に、95℃ 5秒、55℃ 30秒、72℃ 45秒を40回行った。標的mRNA (X)の ΔC_T 値は $C_T(X) - C_T(\text{ACTB})$ を計算することにより求めた。さらに、相対的な発現レベルを求めるために $\Delta \Delta C_T$ 値は $\Delta C_{T, \text{sample}} - \Delta C_{T, \text{calibrator}}$ を計算することにより求めた。ポリスチレンディッシュ上で培養した3日目の細胞の ΔC_T 値を1として全体の値を調整した(calibrator)。mRNAの相対値は $2^{-\Delta \Delta C_T}$ 値

で表した。

石灰化計測

ジルコニアプレート上の細胞を 10 %ホルマリンで固定し、数回洗浄し、アリザリンレッド S (Calcified nodule Staining kit; Primary Cell, Hokkaido, Japan) を用いて石灰化部位を染色した。アリザリンレッド染色部位を面積計測ソフト (Win Roof; Mitani Co., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

統計分析

すべての値は平均±標準偏差により示した (N, 実験回数)。統計分析は SPSS version 19 を用いて実施した (SPSS Inc., Chicago, IL)。計測は 3 回行った。有意差検定は Student's *t*-test または、two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by Bonferroni's *post hoc* test により実施した。; P 値 < 0.05 の時に有意差ありとした。

3.4 実験結果

3.4.1 ジルコニアプレートの表面解析

S-ZrP は、その表面に機械加工によるものと思われる多数の浅い溝が認められた (図 1A, 1C)。

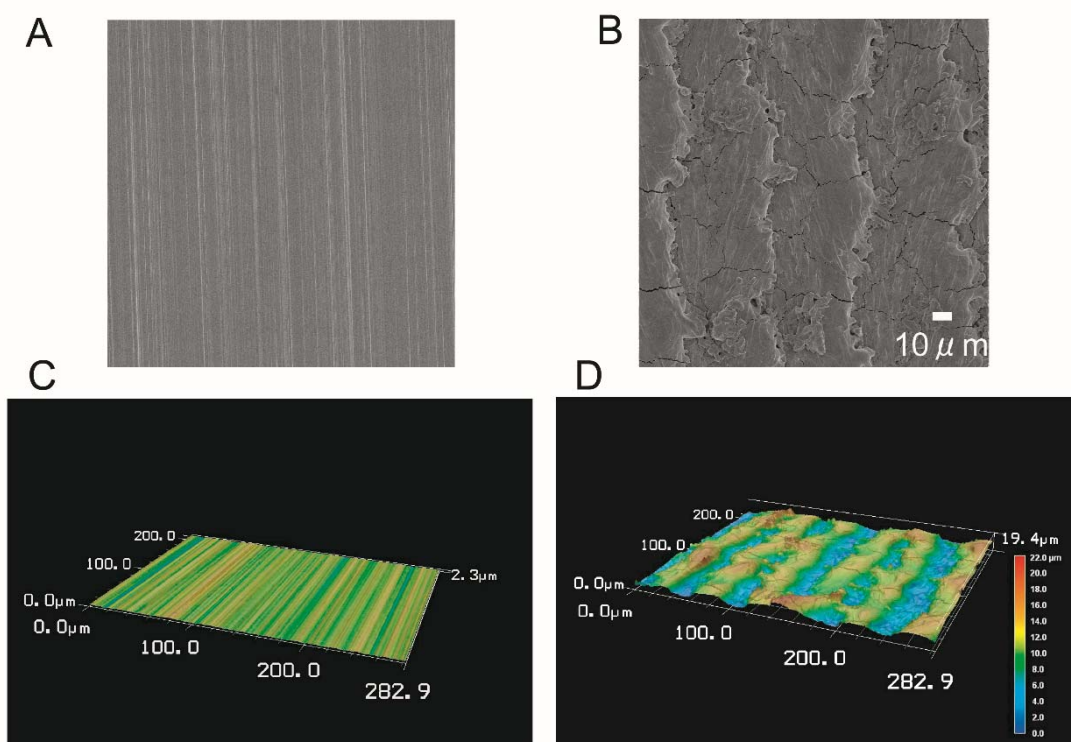


図 1 S-ZrP 表面 (A, C) と R-ZrP 表面 (B, D)

A, B: SEM 像 C, D: レーザー顕微鏡像。

レーザー照射により粗面化された R-ZrP には、高さが約 $20\ \mu\text{m}$ 、幅が約 $50\ \mu\text{m}$ の深い溝と細かい裂け目が認められた (図 1B, 1D)。表 2 に表面性状の粗さの指標として Sa と Sdr 値を示す。R-ZrP の Sa 値は S-ZrP よりも 9.7 倍と、有意に大きく、R-ZrP の Sdr 値は S-ZrP よりも 7.8 倍と、有意に大きかった ($p < 0.05$, $N=3$)。

表 2 ジルコニアプレートの機械加工後とレーザー照射後それぞれの表面粗さ値

Parameters	S-ZrP	R-ZrP
Sa (μm)	0.18 ± 0.04	$1.75 \pm 0.32^{**}$
Sdr	0.005 ± 0.004	$0.039 \pm 0.029^*$

Sa は三次元算術平均高さ、Sdr は表面展開面積率を意味するデータは平均±標準偏差 ($n = 3$)を示す。

* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、S-ZrP との比較。

3.4.2 細胞形態・細胞伸張度

MC3T3-E1 播種 6 時間後と 24 時間後の S-ZrP と R-ZrP 上で細胞形態をそれぞれ比較した。S-ZrP 上の細胞は多方面に広がりよく進展していた (図 2)。いくつかの細胞に糸状仮足を認められ、細胞同士の接触も認められた。一方で、R-ZrP 上に播種した細胞の 6 時間後と 24 時間後では、細胞はレーザー照射によって形成された溝に沿って伸長していた (図 3)。

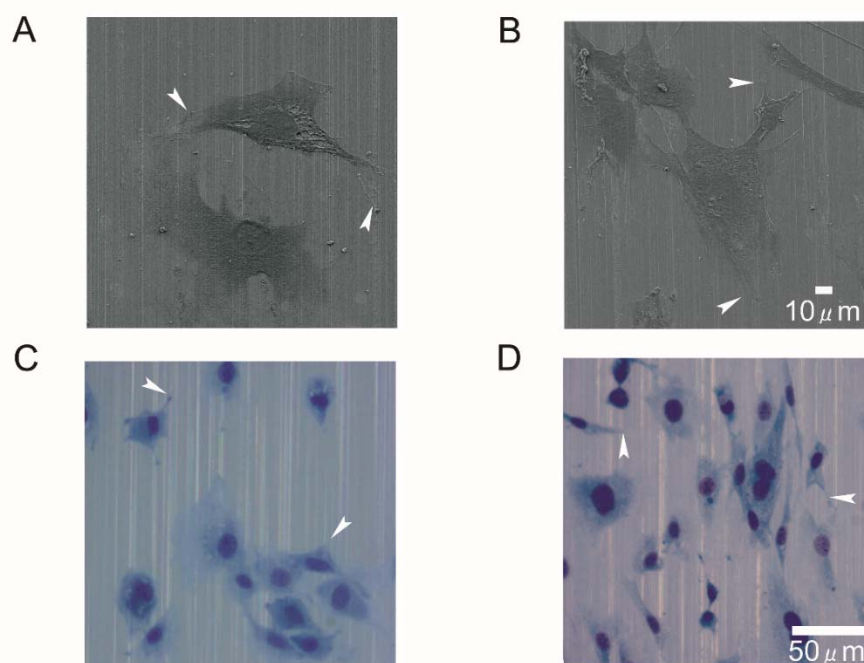


図 2 S-ZrP 上に播種した MC3T3-E1 細胞の形態

S-ZrP 上の骨芽細胞様細胞の播種 6 時間後 (A) と 24 時間後 (B) の SEM 像。S-ZrP 上の骨芽細胞様細胞の播種 6 時間後 (C) と 24 時間後 (D) の光学顕微鏡像。矢頭は糸状仮足を示す。

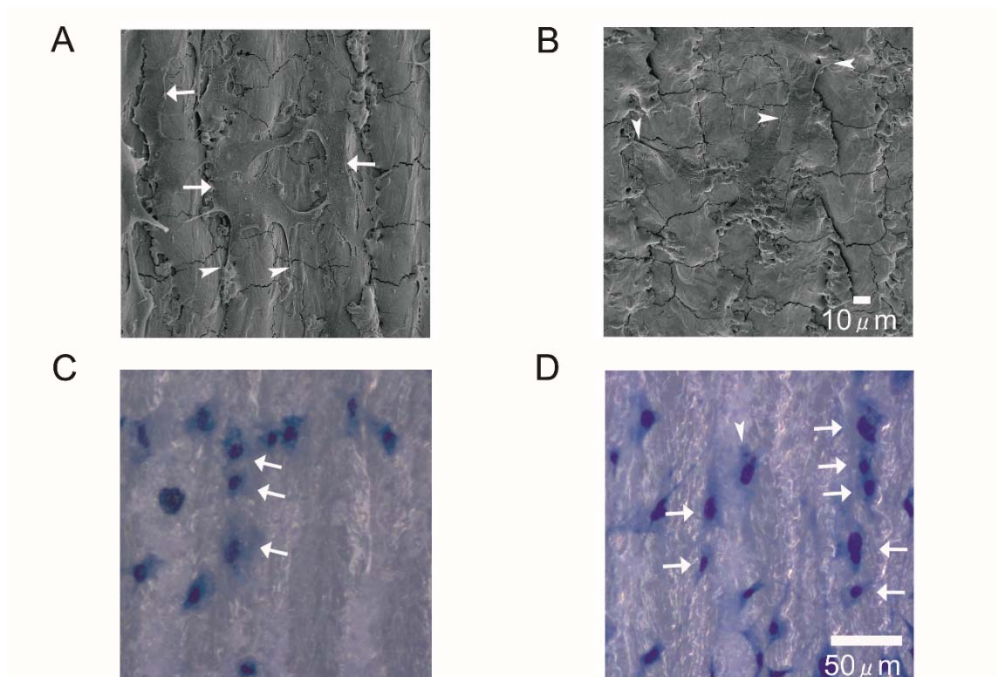


図 3 R-ZrP 上に播種した MC3T3-E1 細胞の形態

R-ZrP 上の骨芽細胞様細胞の播種 6 時間後 (A) と 24 時間後 (B) の SEM 像。R-ZrP 上の骨芽細胞様細胞の播種 6 時間後 (C) と 24 時間後 (D) の光学顕微鏡像。矢頭は糸状仮足を示す。矢印は細胞がプレートの溝状に沿って伸展していることを示す。

細胞形態を評価するために、細胞の直行する縦と横の長さ比を算出した。細胞播種 6 時間後において、R-ZrP の細胞形態指数は S-ZrP に比べて 1.9 倍大きかった (図 4A) さらに、24 時間後では 2.9 倍大きかった ($p < 0.05$, $N = 3$)。これらの結果は、粗面が MC3T3-E1 の細胞形態を大きく変化させることを示している。

粗面がアクチン骨格を変化させるかどうかを調査するために、R-ZrP と S-ZrP 上で培養した細胞を Phalloidin 染色して比較した (図 4B)。S-ZrP 上の細胞のストレスファイバーはよく形成しており、また、細胞内では規則正しく配列し、細胞の伸展方向に沿って形成されていた。一方、R-ZrP 上の細胞のストレスファイバーは染色性が低く、ストレスファイバーの発現が減少していた。

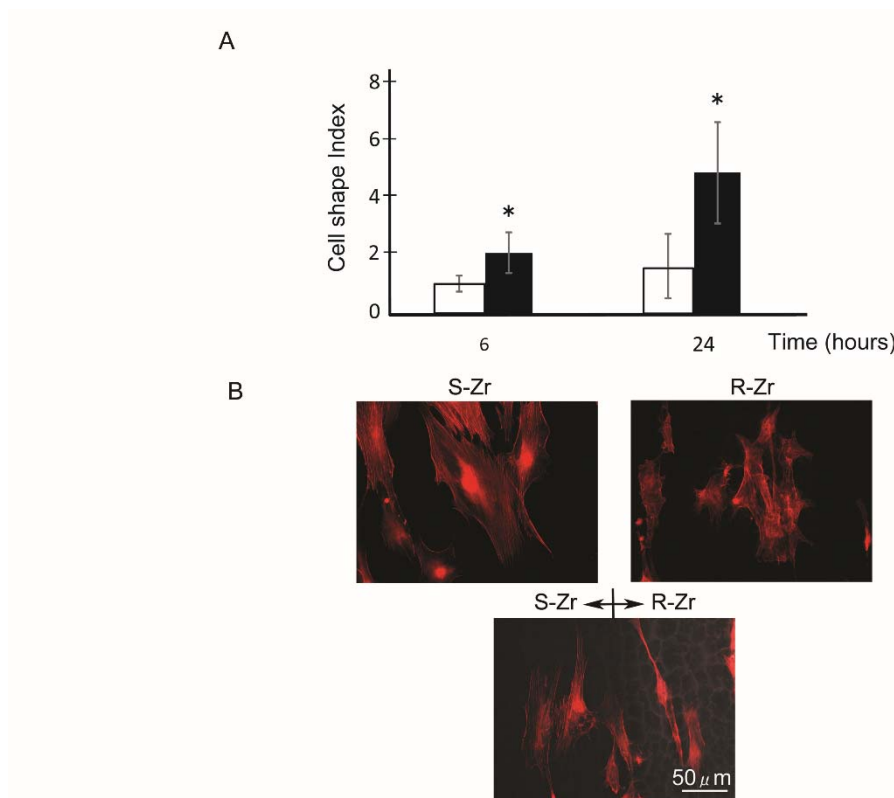


図 4 MC3T3-E1 細胞の形態および細胞骨格の定量的評価

A: S-ZrP (白カラム) と R-ZrP (黒カラム) 上で培養された細胞の形態指数を計測した (方法参照)。* $P < 0.05$; S-ZrP との比較 ($n = 3$)。 B: アクチンストレスファイバーの蛍光染色像 (red) を比較した。細胞は S-ZrP と R-ZrP 上で 24 時間培養した。一番下の写真は、機械加工面と粗面が半分ずつ存在しているジルコニアプレート上で、明確なアクチン染色の違いを示したものである。

3.4.3 細胞増殖

S-ZrP 上の MC3T3-E1 細胞は様々な方向に向かって増殖したが (図 5A, 5B)、R-ZrP 上で 3 日間および 7 日間培養された細胞は、溝に沿って増殖していた (図 5C, 5D)。

S-ZrP と R-ZrP 上の MC3T3-E1 細胞増殖を WST assay により比較した。培養された細胞数は、ポリスチレン培養用ディッシュ上での培養に比べ、ジルコニア上では、はるかに少なかった。プラスチック上の細胞数指数は、S-ZrP の細胞指数と比べて 3 日目で 2 倍 (吸光度 = 0.80 ± 0.02)、7 日目で 2 倍 (1.13 ± 0.05)、14 日目で 1.9 倍 (2.25 ± 0.07) と有意に大きかった。

ジルコニアの表面粗さは細胞増殖指数を改善させた。すなわち、S-ZrP の指数と比較して、R-ZrP の指数は 3 日目では差がなかったが、7 日目と 14 日目で 1.2 倍大きかった ($p < 0.05$, $N = 3$) (図 5E)。

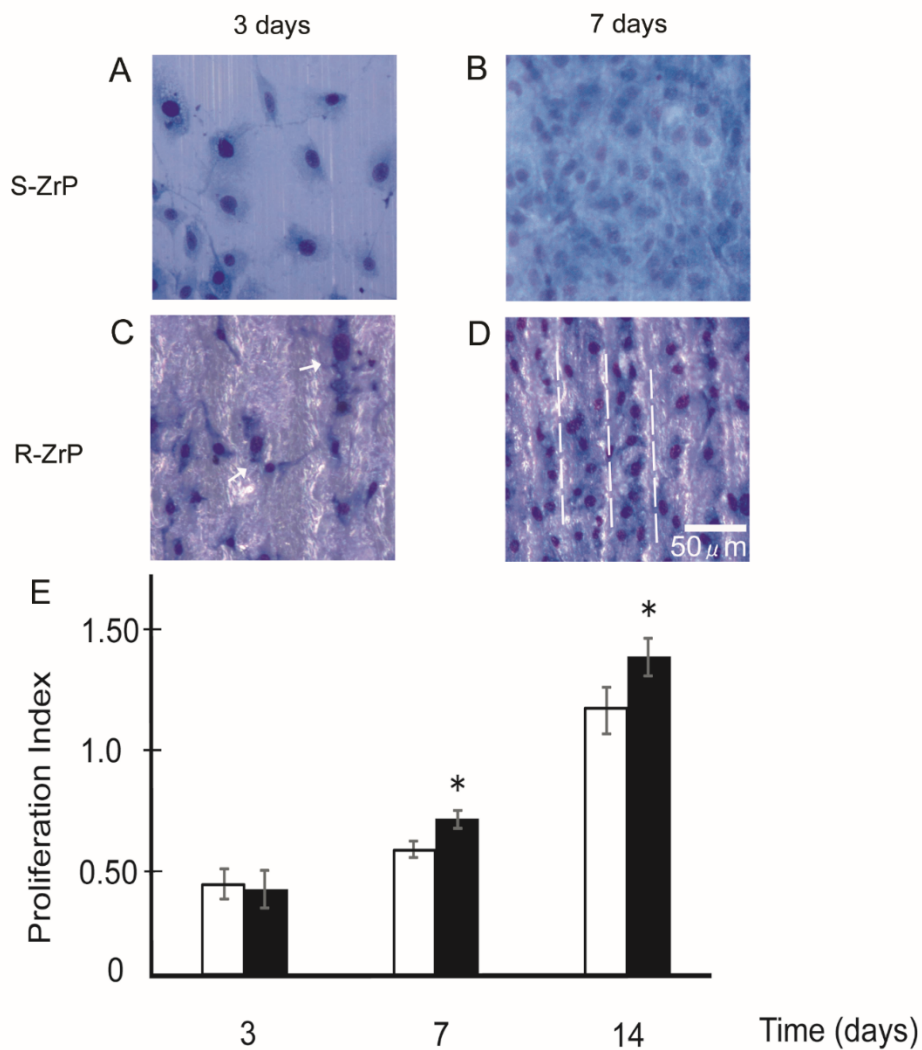


図 5 顕微鏡写真と MC3T3-E1 細胞の細胞増殖

細胞播種後、3 日目 (A , C) と 7 日目 (B, D) の S-ZrP (A, B) と R-ZrP (C, D) の光学顕微鏡像。矢印は細胞が溝に沿って伸展していることを示す。破線は細胞が並んでいる粗面の溝と溝の間を示している。 E: WST assay によって細胞増殖が推定された (方法参照)。

白カラム: S-ZrP; 黒カラム; R-ZrP。 * $P < 0.05$; S-ZrP との対応する値との比較 ($n = 3$)。

3.4.4 細胞骨形成

MC3T3-E1 細胞の分化時に、表面性状の違いが骨系の遺伝子発現と ALP 活性に与える影響についてリアルタイム PCR 法により調査した。Runx2 mRNA 発現は、ポリスチレンディッシュ上では、分化誘導後 3 日目に比べて 7 日目では 21.4 倍、14 日目では 43.9 倍増加した。ジルコニアプレート上における mRNA の発現量はポリスチレン上よりも少なかった。3 日目から 14 日目にかけて時間経過とともに発現量は増加しており、3 日目においては S-ZrP 上よりも R-ZrP 上で有意に高い発現を示した ($p < 0.05$, $N = 3$) (図 6A)。

osteocalcin の発現は、分化誘導 14 日目において S-ZrP 上よりも R-ZrP 上で 7 倍と、有意に高かった(図 6B) ($p < 0.05$, $N = 3$)。

ALP 活性は、分化誘導 7 日目において、ポリスチレン上 (33.64 ± 0.99) では S-ZrP よりも 2.4 倍高く、有意に亢進していた ($p < 0.05$, $N = 3$)。分化誘導 7 日目において、R-ZrP での活性は、S-ZrP よりも 1.4 倍亢進しており、粗面化により ALP 活性が促進された ($p < 0.05$, $N = 3$) (図 6C)。他方、14 日目の分化誘導後の ALP 活性は 7 日目に比べ低下した。また、R-ZrP 上の ALP 活性の減少は S-ZrP と比較して著しかった。また、分化誘導後 14 日目において、ポリスチレン上の ALP 活性も著しい減少が観察され (8.37 ± 1.55)、S-ZrP や R-ZrP 上の活性に比べ有意差は認められなかった。

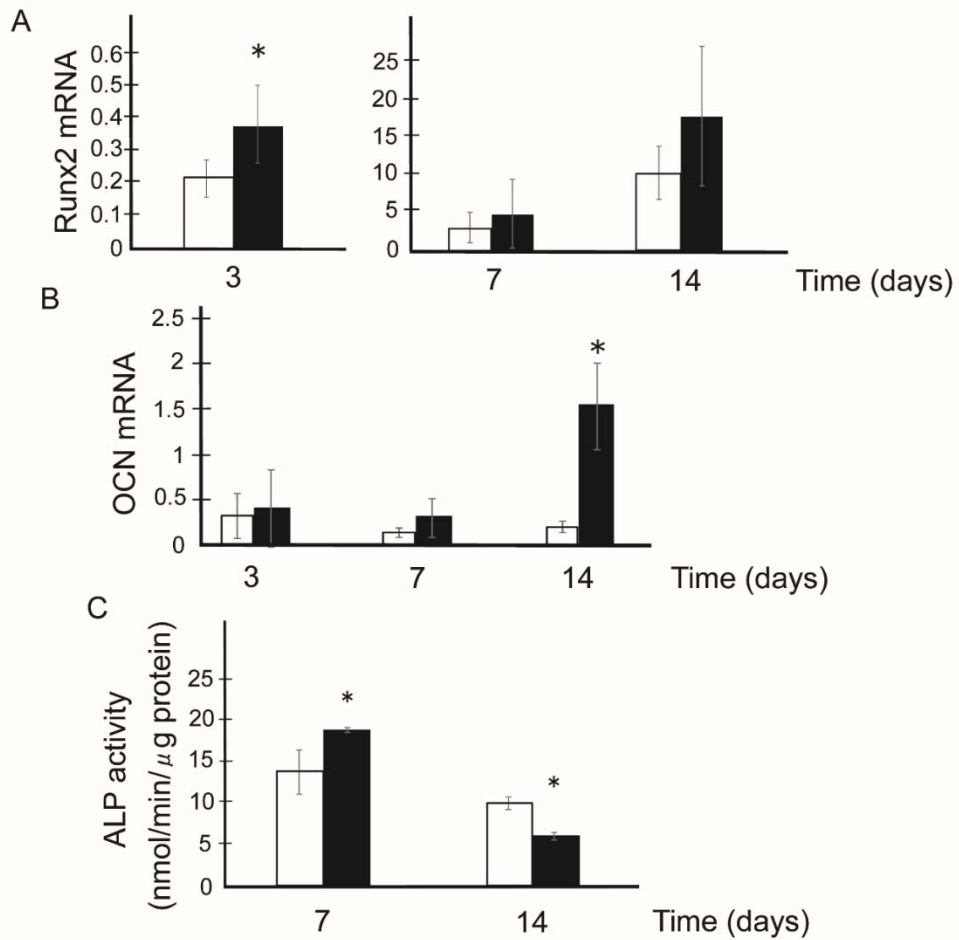


図 6 S-ZrP (白カラム) と R-ZrP (黒カラム) 上で分化誘導後の Runx2 (A)、
osteocalcin (OCN, B) の mRNA 相対発現と
MC3T3-E1 細胞のアルカリホスファターゼ活性 (ALP, C)

* $P < 0.05$: S-ZrP との対応する値との比較 ($n = 3$)。A and B: ポリスチレン上で 3 日間培養した細胞の ΔC_T の値を基準 ($2^{-\Delta \Delta C_T} = 1$) とした。

S-ZrP と R-ZrP 上における MC3T3-E1 細胞の石灰化度合いを比較するために、ジルコニアプレート上で分化誘導した細胞をアリザリンレッドで染色した (図 7)。S-ZrP と R-ZrP 上の細胞は時間経過とともに染色度合いは増加し、特に、R-ZrP で顕著に増加していた。分化誘導 7 日目において、R-ZrP のアリザリンレッド染色の度合いは S-ZrP と比べて 14 倍多く染色されていた。14 日目においては、R-ZrP のアリザリンレッド染色部位は S-ZrP と比べて 5 倍多く見られた ($p < 0.05$, $N = 3$)。

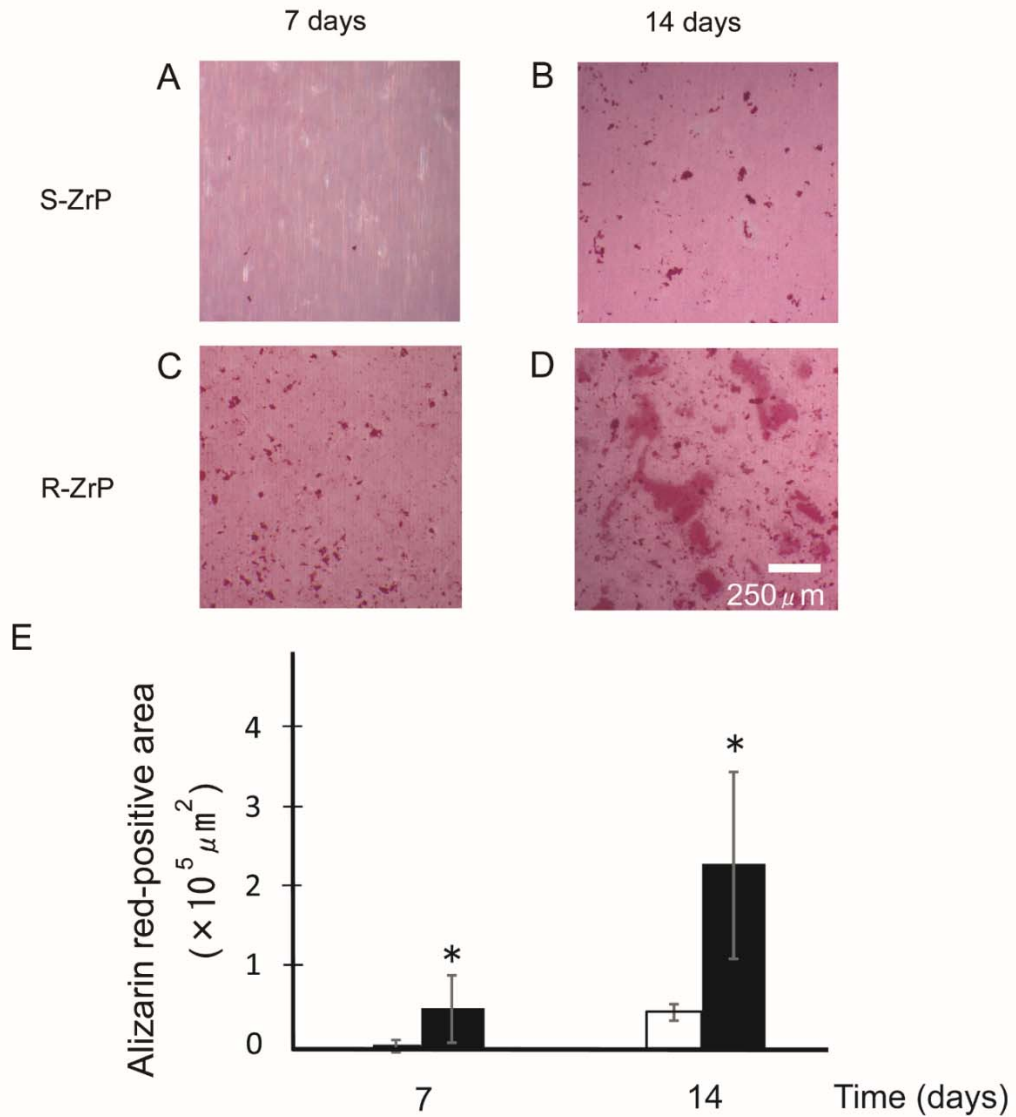


図 7 S-ZrP (A, B) と R-ZrP (C, D) 上で 7 日間 (A, C) と 14 日間 (B, D) 分化誘導後の MC3T3-E1 細胞アリザリンレッド染色像 E: S-ZrP (白カラム) と R-ZrP (黒カラム) 上のアリザリンレッド染色部位の比較

* $P < 0.05$, S-ZrP との対応する値との比較 ($n = 3$)。

3.5 考察

本研究では、機械加工した平滑面 ($Sa = 0.18$)、およびファイバーレーザー処理を施した粗面 ($Sa = 1.75$) のジルコニアプレート上に MC3T3-E1 を播種し、それぞれのプレート上での細胞動態の違いを解析した。光学顕微鏡での観察と、算出された細胞形態指数から、MC3T3-E1 は S-ZrP 上ではあらゆる方向に伸展しているのに対して、R-ZrP 上では粗面の溝にそって伸長することが明らかになった。これらの細胞形態の変化は、過去のポリスチレン表面性状が細胞形態に影響を及ぼすとの報告と一致していた (Matsuzaka ら, 2004)。さらに、粗面上の細胞増殖は、S-ZrP 上と比べて 7 日目以降から有意に亢進していることがわかった。Albrektsson ら (2004) の報告によると、インプラントの表面粗さ (Sa) は 4 つに分類することができる。: 滑沢な面 ($Sa < 0.5 \mu\text{m}$)、微小な粗面 ($Sa 0.5-1.0 \mu\text{m}$ の間)、中等度の粗面 ($Sa 1.0-2.0 \mu\text{m}$ の間)、粗面 ($Sa > 2.0 \mu\text{m}$)。ジルコニア上で培養した CAL72 骨芽細胞様細胞の細胞増殖は、3 日目において機械加工面 ($Sa = 0.15$) よりも微粒子 ($Sa = 0.85$) やサンドブラスト ($Sa = 0.95$) 処理を施した粗面の方が亢進していたが、6-12 日目では、違いはなかったことが報告されている (Bächle ら, 2007)。Wada らは (2012) ジルコニアディスク上で培養した MC3T3-E1 の細胞形態と細胞増殖は、機械加工面 ($Sa = 0.037$) とサンドブラスト粗面 ($Sa = 0.330$) の間に差はなかったと報告している。それらの報告ではジルコニアにサンドブラストを用いて粗面化させても、ジルコニアの硬さの影響で細胞の形態、分化を促進するような $Sa > 1 \mu\text{m}$ の中等度の粗さに粗面化することが出来なかったことを示している。一方で、本研究ではジルコニア表面をファイバーレーザー処理により粗面化することで、 Sa が $1-2 \mu\text{m}$ の中等度の粗面化に成功した。さらに、ファイバーレーザー照射で形成された溝状の凹凸により細胞骨格・形態は変化し、増殖能は促進することがわかった。

過去に、培養用ディッシュやチタンプレートを粗面化することで骨芽細胞の分化や石灰化促進に適した表面となることが報告されている (Bowers ら, 1992; Schwartz ら, 1994; Stanford ら, 1994; Takemoto ら, 2010)。本研究において、ジルコニアプレートのファイバーレーザー処理粗面上の細胞は、3 日目で Runx2 mRNA の発現が有意に高くなり、7 日目には ALP 活性が亢進し、14 日目において OCN mRNA の発現が認められた。これらの結果はファイバーレーザー処理を施した表面性状が時間依存的に骨芽細胞分化遺伝子の発現を増加させることを示している。Runx2 は骨芽細胞の分化に不可欠な転写因子であることが示されている (Yamaguchi ら, 2000)。Runx2 等の遺伝子発現の増加は骨形成分化関連遺伝子の発現を促進させ、成熟骨芽細胞は基質石灰化の直前から OCN の産生を始める (Stein ら, 1993)。OCN のノックアウトマウスを用いた研究で OCN の欠如により骨形成が促進したことより、オステオカルシンは骨芽細胞の基質産生を負に制御する分子である可能性が報告されている (Ducy ら, 1996)。これらの報告は、本実験においてファイバーレーザー処理粗面で 14 日目に ALP 活性が低下したことと矛盾しないと思われた。

骨芽細胞は石灰化の核となる基質小胞を分泌することが報告されている。ALP は無機リン酸を産生しハイドロキシアパタイト結晶を形成するために、石灰化

抑制因子であるピロリン酸を分解することが示されている (Murshed ら, 2005)。石灰化は、骨芽細胞により初期に分泌されたコラーゲン繊維束の中にアパタイトが沈着することによって起こると報告されている (Binderman ら, 1974)。本研究では、アリザリンレッド染色の結果、7 日目の ALP 活性の亢進に続いて、7 日目と 14 日目において石灰化が有意に増加したことが明らかとなった。これらのは、ファイバーレーザー処理粗面が石灰化過程を促進させることを示唆している。

S-ZrP 上の細胞形態と、R-ZrP 上のファイバーレーザー照射で形成された溝状の凹凸による細胞形態の違いが、細胞分化に必須の細胞骨格形態の違いを反映している傾向がある。粗面化されたチタンディスク上ではファロイジンの染色性が減少したことが示されている (Nishimoto ら, 2008)。本実験では、蛍光免疫染色において粗面のアクチンストレスファイバーのネットワークが機械加工面のものよりも少ないことが明らかになった。Higuchi らは (2009)、cytochalasin D を用いてアクチン細胞骨格を分解することで MC3T3-E1 のプロテインキナーゼ D が活性化し、ALP 活性の亢進、OCN 産生と石灰化の増大が引き起こされたと報告している。このようにして、異なる表面性状が細胞形態と細胞骨格を変化させ、次に、骨芽細胞の細胞分化を変化させる可能性がある。さらに、表面性状は血清中のフィブロネクチンやビトロネクチンなどの細胞接着タンパクの吸収と膜内外の接着タンパクの発現にも影響を与える可能性がある。インテグリンは、生体材料に骨芽細胞が接着する際に必要とされることが知られている (Boyan ら, 2001)。また、骨芽細胞のインテグリン β_1 の mRNA の発現はチタンよりもジルコニアプレート上で多く発現することが報告されている (Ko ら, 2007)。今後の研究において、粗面形状と溝の凹凸形状が、骨芽細胞の分化・石灰化に及ぼす効果を明らかにしていく必要がある。

3.6 引用文献

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1-review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int. J. Prosthodont.* 2004; 17:536-543. (a)

Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 2-review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *Int. J. Prosthodont.* 2004; 17:544-564. (b)

Andreiotelli M, Wenz HJ, Kohal R-J. Are ceramic implants a viable alternative to titanium implants? A systematic literature review. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2009; 20 (Suppl. 4):32-47.

Binderman I, Duksin D, Harell A, Katzir E, Sachs L. Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. *J. Cell. Biol.* 1974; 61:427-439.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25:889–902.

Bowers KT, Keller JC, Randolph BA, Wick DG, Michaels CM. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 1992; 7:302–310.

Boyan BD, Lohmann CH, Dean DD, Sylvia VL, Cochran DL, Schwartz Z. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annu. Rev. Mater. Res.* 2001; 31:357–371.

Bächle M, Butz F, Hübner U, Bakaliniš E, Kohal RJ. Behavior of CAL72 osteoblast-like cells cultured on zirconia ceramics with different surface topographies. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2007; 18:53–59.

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382:448–452.

DohanEhrenfest DM, Vazquez L, Park YJ, Sammartino G, Bernard JP. Identification card and codification of the chemical and morphological characteristics of 14 dental implant surfaces. *J. Oral. Implantol.* 2011; 37:525–542.

Gong SH, Lee H, Pae A, Noh K, Shin YM, Lee JH, Woo YH. Gene expression of MC3T3-E1 osteoblastic cells on titanium and zirconia surface. *J. Adv. Prosthodont.* 2013; 5:416–422.

Higuchi C, Nakamura N, Yoshikawa H, Itoh K. Transient dynamic actin cytoskeletal change stimulates the osteoblastic differentiation. *J. Bone. Miner. Metab.* 2009; 27:158–167.

Hayashi T, Misawa H, Nakahara H, Noguchi H, Yoshida A, Kobayashi N, Tanaka M, Ozaki T. Transplantation of osteogenically differentiated mouse iPS cells for bone repair. *Cell. Transplant.* 2012; 21:591–600.

Kohal RJ, Weng D, Bächle M, Strub JR. Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: an animal experiment. *J. Periodontol.* 2004; 75:1262–1268.

Ko HC, Han JS, Bächle M, Jang JH, Shin SW, Kim DJ. Initial osteoblast-like cell response to pure titanium and zirconia/alumina ceramics. *Dent. Mater.* 2007; 23:1349–1355.

Kakura K, Yasuno K, Taniguchi Y, Yamamoto K, Sakai T, Irie A, Kido H. Zirconia implant with rough surface produced by YAG laser treatment: evaluation of histomorphology and strength of osseointegration. *J. Hard Tiss. Biol.* 2014; 23:75–80.

Larsson C, Thomsen P, Aronsson BO, Rodahl M, Lausmaa J, Kasemo B, Ericson LE. Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses. *Biomaterials* 1996; 17:605–616.

Mitchell DL, Synnott SA, VanDercreek JA. Tissue reaction involving an intraoral skin graft and CP titanium abutments: a clinical report. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 1990; 5:79–84.

Milleding P, Haraldsson C, Karlsson S. Ion leaching from dental ceramics during static in vitro corrosion testing. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 61:541–550.

Matsuzaka K, Yoshinari M, Shimono M, Inoue T. Effects of multigrooved surfaces on osteoblast-like cells in vitro: scanning electron microscopic observation and mRNA expression of osteopontin and osteocalcin. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2004; 68:227–234

Matsuura T, Tsubaki S, Tsuzuki T, Duarte WR, Yamauchi M, Sato H. Differential gene expression of collagen-binding small leucine-rich proteoglycans and lysyl hydroxylases, during mineralization by MC3T3-E1 cells cultured on titanium implant material. *Eur. J. Oral. Sci.* 2005; 113:225–231.

Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes. Dev.* 2005; 19:1093–1104.

Nishimoto SK, Nishimoto M, Park SW, Lee KM, Kim HS, Koh JT, Ong JL, Liu Y, Yang Y. The effect of titanium surface roughening on protein absorption, cell attachment, and cell spreading. *Int. J. Oral. Maxillofac.*

Implants 2008; 23:675-680.

Oya K, Tanaka Y, Saito H, Kurashima K, Nogi K, Tsutsumi H, Doi H, Nomura N, Hanawa T. Calcification by MC3T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG. *Biomaterials* 2009; 30:1281-1286.

Ponche A, Bigerelle M, Anselme K. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: physico-chemical effects. *Proc. Inst. Mech. Eng. H*. 2010; 224:1471-1486.

Swart KM, Keller JC, Wightman JP, Draughn RA, Stanford CM, Michaels CM. Short-term plasma-cleaning treatments enhance in vitro osteoblast attachment to titanium. *J. Oral. Implantol.* 1992; 18:130-137.

Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.* 1993; 14:424-442.

Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J. Cell. Biochem.* 1994; 56:340-347.

Stanford CM, Keller JC, Solursh M. Bone cell expression on titanium surfaces is altered by sterilization treatments. *J. Dent. Res.* 1994; 73:1061-1071.

Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *J. Dent. Res.* 2006; 85:496-500.

Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin. Oral. Impl. Res.* 2008; 19:823-835.

Stübinger S, Homann F, Etter C, Miskiewicz M, Wieland M, Sader R. Effect of Er:YAG, CO₂ and diode laser irradiation on surface properties of zirconia endosseous dental implants. *Lasers. Surg. Med.* 2008; 40:223-228.

Stephens AS, Stephens SR, Morrison NA. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts,

osteoclasts and macrophages. *BMC. Res. Notes.* 2011; 4:410.

Takemoto K, Matsuzaka K, Shimono M, Yoshinari M, Inoue T. The effect of different surface roughnesses on the differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblasts in vitro. *Oral. Med. Pathol.* 2010; 15:45-51

Vinothkumar TS, Kandaswamy D, Chanana P. CAD/CAM fabricated single-unit all-ceramic post-core-crown restoration. *J. Conserv. Dent.* 2011; 14:86-89.

Wennerberg A and Albrektsson T. On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2010; 25:63-74.

Wada Y, Mizuno M, Nodasaka Y, Tamura M. The effect of enamel matrix derivative on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblasts cultured on zirconia. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants* 2012; 27:849-858.

Wang CF, Huang HL, Lin DJ, Shen YW, Fuh LJ, Hsu JT. Comparisons of maximum deformation and failure forces at the implant-abutment interface of titanium implants between titanium-alloy and zirconia abutments with two levels of marginal bone loss. *Biomed. Eng. Online* 2013; 12:45.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.* 2000; 21:393-411.

Yasuno K, Kakura K, Taniguchi Y, Yamaguchi Y, Kido H. Zirconia implants with laser surface treatment: peri-implant bone response and enhancement of osseointegration. *J. Hard Tiss. Biol.* 2014; 23:91-98.

第四章
ファイバーレーザーによる
ジルコニアインプラント表面改質の *in vivo* での実験

4.1 緒言

我々はこれまでの研究で、スレッドを有するジルコニアインプラントの動物実験を行ってきた (Kakura ら, 2014; Yasuno ら, 2014)。本研究では、スレッドが除去トルク値に及ぼす影響を排除するため、新たに実験用インプラントを製作し、表面性状の違いが周囲骨組織の反応に及ぼす影響を調べた。

4.2 目的

この研究の目的は、ジルコニアにファイバーレーザー照射によって作られた表面性状が骨結合を強化することを明らかにすることである。

4.3 材料と方法

ジルコニアインプラント体はこれまでに行ってきた実験と同様の方法、すなわちジルコニアパウダー (HSY-3FSD, Daiichi Kigenso Kagaku Kogyo, Tokyo, Japan) を加圧し、仮焼結を行った後インプラント体を削り出し、その後、本焼結を行って製作した (Kakura ら, 2014)。インプラント体を SEM で観察するためにインプラント表面は白金で蒸着処理を行った (JSM-6330F, JEOL)。形態はスレッドなしのシリンダータイプのインプラントを製作し、表面をファイバーレーザー処理することによって粗面化したものを実験用インプラントとした。機械加工面のインプラント (S-ZrI) をコントロールとした (図 1A)。R-ZrI は、S-ZrI にレーザー照射し粗面化したものである。スレッドなしの 32 本のシリンダー型インプラント (直径 1.6 mm; 長さ 8.0 mm) (DR. CIP-M, Kobe Steel Co., Ltd., Kobe, Japan) を準備した。12 本のインプラントは非脱灰標本作製に用いられ、20 本のインプラント体が除去トルク値の測定に用いられた。

インプラントは表面性状により機械加工ジルコニアインプラント (S-ZrI) 群およびインプラントを一定の速度で回転させ、長軸方向にレーザーを均一に照射し、高さが約 20 μ m、幅が約 50 μ m の溝状粗面を形成した粗面ジルコニアインプラント (R-ZrI) 群の 2 つのグループに分けた。インプラント体はエタノールで超音波洗浄し、オートクレーブにより滅菌した。

動物実験

実験はすべて福岡歯科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号 #14007)、動物実験ガイドラインに則って行った。

16 匹の 8 週齢雄性 SD ラットを実験に用いた。ラットにイソフルランを用いて吸入麻酔を行った (Abbott Japan, Tokyo, Japan)。手術の手順は Kakura ら (2014) の方法に準じている。すなわち、ラット脛骨の一方に S-ZrI、もう一方に R-ZrI を埋入した。インプラントは脛骨の長軸に対して垂直に、膝関節から約 10 mm 離れたところに内側から外側に向けて埋入された。インプラント埋入後、筋膜と骨膜を縫合した。

インプラント埋入から 4 週間後、ラットを過麻酔により屠殺し、インプラント体を含んだ脛骨を試料として採取した。試料は 10 % ホルマリンにより固定した。脱水後、標本を MMA レジンに包埋した。インプラント体の長軸方向で中心に

近い部位で非脱灰標本切片を作製した。非脱灰標本切片はヘマトキシリン・エオジンで染色し、インプラント体周囲におけるインプラント体の長さに対するインプラント-骨接触部の長さの計測からインプラント-骨接触 (BIC) 率を算出した。皮質骨の厚みの中間点から骨髄側に 0.5 mm の長さについて BIC 率を計測した(皮質骨側の BIC 率値)。また、骨髄の中間点から両側 0.25 mm ずつの長さ(全 0.5 mm) について BIC 率を計測した(骨髄側の BIC 率値)。

インプラント体埋入から 4 週間後に、トルクゲージ(BTG60CN-S, Tohnichi MFG, Tokyo, Japan)を用いてインプラント体を脛骨から除去する際の除去トルク値を計測した。

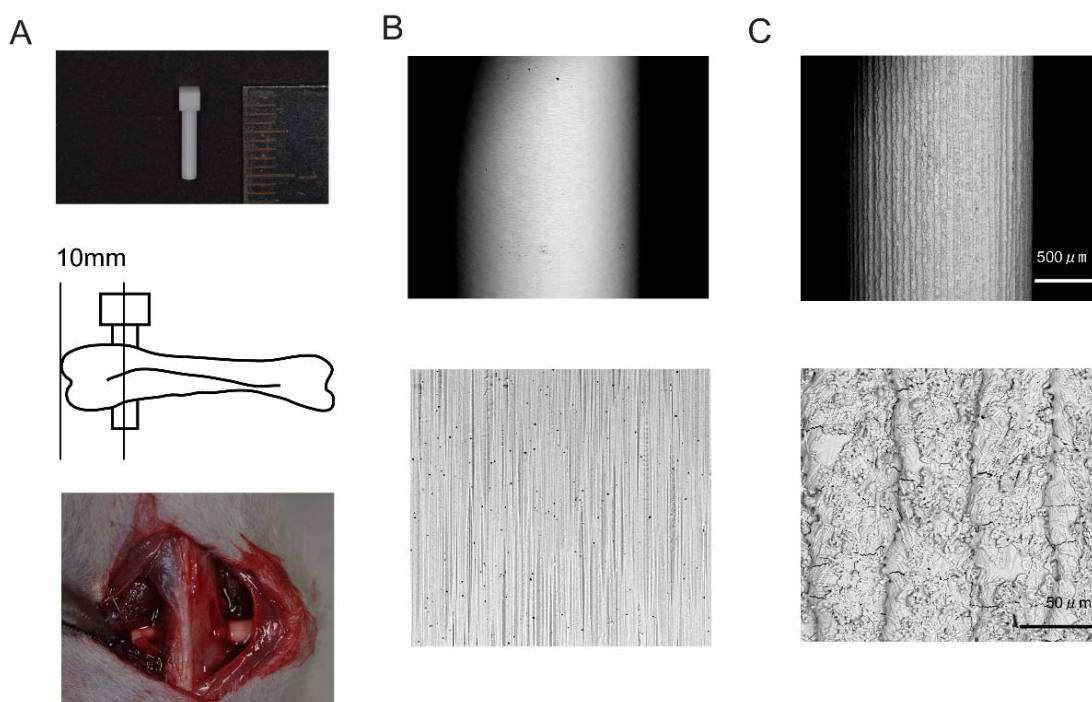


図 1 実験用ジルコニアインプラント

A: 実験用インプラントの写真と、ラット脛骨にインプラント体を埋入したイラストと術中所見 (材料と方法参照)。B: スレッドのない機械加工ジルコニアインプラント体の SEM 像 (S-ZrI)。C: スレッドのない粗面ジルコニアインプラント体 SEM 像 (R-ZrI)。

統計分析

計測は 3 回行った。すべての値は平均±標準偏差により示した (N, 実験回数)。統計分析は SPSS version 19 を用いて実施した (SPSS Inc., Chicago, IL)。有意差検定は Student's *t*-test または、二元配置分散分析 (two-way ANOVA) と、その後の検定として Bonferroni's *post hoc* test を実施した。; P 値 < 0.05 の時に有意差ありとした。

4.4 実験結果

4.4.1 インプラント体の表面解析

インプラント体表面性状を、SEMを用いて観察したところ、S-ZrIの表面にはS-Zrプレートと同じように、たくさんの浅い溝が認められた(図1B、第三章図1Aと1C参照)。レーザー処理を施したインプラント体の表面には長軸方向に沿って深い溝と細かい裂け目上の構造が認められた(R-ZrI)。エッジと深い溝のパターンは、R-ZrPと同様であった(図1C、第三章図1Bと1D参照)。S-ZrIと比べてR-ZrIのSa値は13.0倍大きく、Sdr値は37.8倍大きかった($p < 0.05$, $N = 3$) (表3)。

4.4.2 BIC率・除去トルク値

ラット脛骨へのインプラント体埋入手術後に感染を認めたラットはなかった。埋入後4週目の光学顕微鏡による観察で、皮質骨側に新生骨の形成を認め、骨髄側ではS-ZrIとR-ZrI表面に沿って新生骨の形成が認められた(図2)。

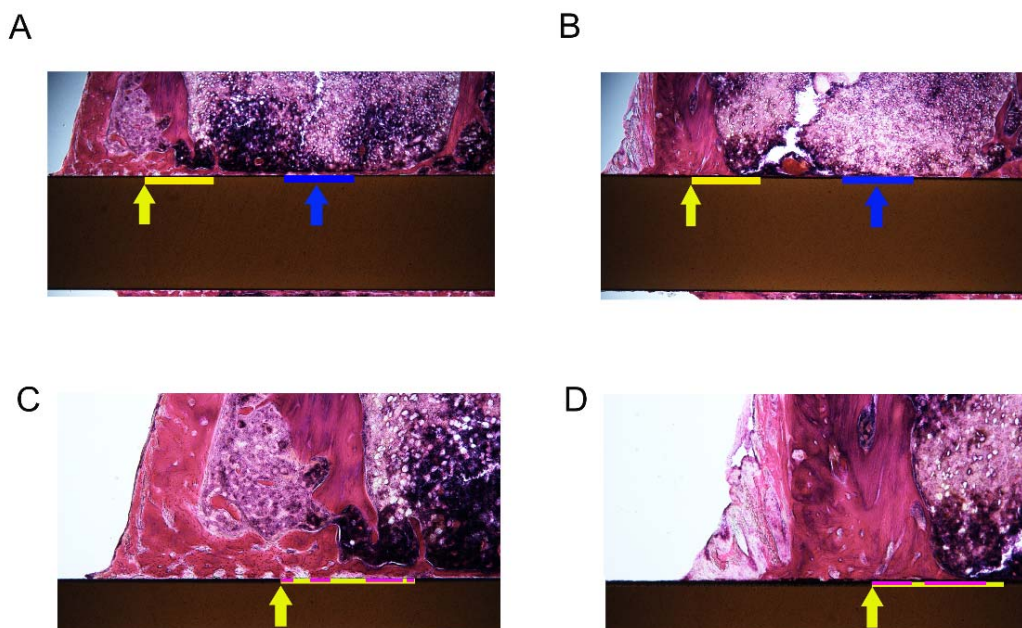


図2 ラット脛骨にインプラント埋入4週後のS-ZrI(A, C)およびR-ZrI(B, D)のヘマトキシリン・エオジン染色組織標本の光学顕微鏡像

A, B: 黄色と青色の矢印は、それぞれ皮質骨と骨髄の中間ポイントを示す。黄色と青色の線は、BIC率を計算するために用いたインプラント上の0.5 mm長を示す(材料と方法参照)。C, D: 皮質骨の中間点から内側のインプラント上の0.5 mm長(黄色線)内にBIC率(赤線)を示す拡大写真。

S-ZrIとR-ZrIのオッセオインテグレーションを比較するために、骨とジルコニアインプラントの接触を示すBIC率と除去トルク値を計測した。R-ZrIの皮質

骨側 BIC 率は S-ZrI に比べて 2.1 倍と有意に高かった。一方で、骨髄側 BIC 率は R-ZrI と S-ZrI の間には有意差は認められなかった ($p < 0.05$, $N = 6$)。R-ZrI の除去トルク値は S-ZrI に比べて 2.8 倍と有意に大きかった ($p < 0.05$, $N = 10$) (表 3)。

表 3 ファイバーレーザーを照射したジルコニアインプラント体の特徴

Parameters	S-ZrI	R-ZrI
Sa (μm)	0.21 ± 0.03 (3)	2.74 ± 0.52 (3)**
Sdr	0.058 ± 0.013 (3)	2.19 ± 0.14 (3)**
Bone-implant contact (%)		
Bone marrow side	61.3 ± 40.1 (6)	66.6 ± 20.5 (6)
Cortical bone side	39.8 ± 19.2 (6)	81.9 ± 20.4 (6) *
Removal torque (N cm)	3.52 ± 1.71 (9)	9.92 ± 2.51 (9) *

Sa と Sdr はそれぞれ、三次元算術平均高さ と 展開面積率を示す。

データは平均 ± 標準偏差を示す。

カッコ内の数字は実験回数を示す * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, S-ZrI との比較。

4.5 考察

我々の過去の *in vivo* の研究は、レーザー照射による表面処理がオッセオインテグレーションへの刺激効果を示した (Kakura ら, 2014; Yasuno ら, 2014)。

本研究では、スレッドが無いインプラント体を用いることでレーザー照射による表面性状のみの効果を評価し、*in vivo* と *in vitro* の結果 (第三章参照) を比較することを企図した。

本結果より、レーザー照射により粗面化されたインプラント体は新生骨形成を促進させることが示された。皮質骨側にのみ BIC 率の違いが示されたことから、除去トルク値の増大には、皮質骨側のインプラント周囲骨形成が重要である可能性が示唆された。

これらの結果は、ジルコニアインプラント体のレーザーによる表面加工はオッセオインテグレーションの促進に効果があることを示している。

最近のジルコニアインプラントの臨床研究では、ジルコニアインプラントの残存率はチタンインプラントよりも低いことが報告された。しかし、症例数や観察期間が限られているため、今後より多くのジルコニアインプラントシステムに関する長期的で多くの症例数による臨床研究が必要である (Depprich ら, 2014)。

本研究結果から、ファイバーレーザー照射による表面加工はジルコニアインプラントのオッセオインテグレーションを改善する有効な選択肢であると考えられ、ジルコニアインプラントの長期安定性を向上させる可能性がある。

4.6 引用文献

Depprich R, Naujoke C, Ommerborn M Schwarz F, Kübler NR, Handschel J. Current findings regarding zirconia implants. Clin. Implant. Dent. Relat. Res. 2014; 16: 124-137.

Kakura K, Yasuno K, Taniguchi Y, Yamamoto K, Sakai T, Irie A, Kido H. Zirconia implant with rough surface produced by YAG laser treatment: evaluation of histomorphology and strength of osseointegration. J. Hard Tiss. Biol. 2014; 23:75-80.

Yasuno K, Kakura K, Taniguchi Y, Yamaguchi Y, Kido H. Zirconia implants with laser surface treatment: peri-implant bone response and enhancement of osseointegration. J. Hard Tiss. Biol. 2014; 23:91-98.

第五章 総括および展望

5.1 総括

これまでの実験で、YAG レーザー、ファイバーレーザーを用いてジルコニアインプラントの粗面処理を行った。その結果、両者ともジルコニア表面を粗面加工することが出来た。しかし、YAG レーザーによる表面処理ではジルコニアインプラントのスレッドが一部破壊されていた。ファイバーレーザー処理によって得られた粗面ではインプラントのスレッドに損傷を与えることなく中等度以上の粗さ ($Sa = 1-2 \mu m$ 以上) が得られた。

また、ファイバーレーザーによるジルコニアインプラントの表面処理では、骨芽細胞様細胞の形態を変化させ、細胞増殖と石灰化を著しく増加させることが示された。さらに、レーザーで表面処理されたジルコニアは、新生骨の形成を促進し、インプラントと骨の結合力を増加させた。これらのことから、ファイバーレーザー処理はインプラント周囲のオッセオインテグレーションの促進と強化に有効な技術であることが示唆された。

5.2 展望

ジルコニアインプラントの表面性状の改良実験は、ジルコニアの材料的特性から審美領域におけるインプラント治療とチタンアレルギー患者の治療のオプションとして有効な治療選択肢となりうる。本実験ではジルコニアインプラントの粗面化と硬組織との関係について調査し、ファイバーレーザー処置がインプラント表面の粗面化に有効であり、オッセオインテグレーションを促進、強化することを明らかにした。今後は、ジルコニアインプラントを実用化させるために①大型実験動物を用いてジルコニアインプラントに咬合負荷を与え、荷重下のインプラント周囲骨組織の反応を観察すること、②ジルコニアインプラントへ形態を自由に与えられる特性を活かして、患者個々に適合するようなカスタムインプラント体の作製方法を開発すること、③ジルコニアインプラントの外科的・補綴的治療の自由度が大きくなるようツーピースタイプのインプラント体を作製すること、④ジルコニア表面性状が軟組織に及ぼす影響について調査することが必要であり、ジルコニアインプラントが審美領域のインプラント治療とチタンアレルギー患者への治療オプションとして有効であることを検証していきたい。

COI 開示

This study was supported by Grant-in-Aid for the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT)-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities (S1001059), 2010-2015.

謝辞

本研究の遂行と本論文作成に際し、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました本学大学院咬合修復学講座口腔インプラント学分野城戸寛史教授ならびに本学大学院細胞分子生物学講座分子機能制御学分野山崎純教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究遂行にあたり、御指導、ご鞭撻を賜りました東京歯科大学松浦正朗教授、本学咬合修復学講座口腔インプラント学分野加倉加恵博士ならびに、本学咬合修復学講座冠橋義歯学分野安野貴美恵博士に心より感謝の意を表します。さらに、株式会社ナントーの方々に謝意を表します。

研究業績

原著論文

1. Taniguchi Y, Kakura K, Yamamoto K, Kido H, Yamazaki J. Accelerated osteogenic differentiation and bone formation on zirconia with surface grooves created with fiber laser irradiation. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* in press

(その他の論文)

2. Yasuno K, Kakura K, Taniguchi Y, Yamaguchi Y, Kido H. Zirconia Implants with Laser Surface Treatment: Peri-Implant Bone Response and Enhancement of Osseointegration. *Journal of Hard Tissue Biology* 2014; 23:93-100.

3. Kakura K, Yasuno K, Taniguchi Y, Yamamoto K, Sakai T, Irie A, Kido H. Zirconia Implant with Rough Surface Produced by YAG Laser Treatment: Evaluation of Histomorphology and Strength of Osseointegration. *Journal of Hard Tissue Biology* 2014; 23:77-82

国際学会発表

4. Taniguchi Y, Yamazaki J, Kakura K, Yasuno K, Kido H. Development of a new zirconia implant with rough surface produced by laser treatment: assessment of osseointegration strength in vivo and osteoblastic differentiation in vitro. *ICOI XX*, 2013. 10. 3-5, Istanbul

5. Taniguchi Y, Yamazaki J, Kakura K, Yasuno K, Matsuura M, Kido H. Effects of zirconia and titanium as implant materials on osteoblastic differentiation. *ICOI the 16th Asia Pacific Section Congress*, 2013. 11. 22-24, Taipei

6. Taniguchi Y, Yamazaki J, Kakura K, Yasuno K, Matsuura M, Kido

H. Effect of surface morphology of zirconia on osteoblastic differentiation and iPS cell differentiation. The 29th AO Annual meeting, 2014. 3. 6-8, United states seattle

8. Yasuno K, Kakura K, Taniguchi Y, Matsuura M, Yamazaki J, Kido H. Development of zirconia implants with Laser surface treatment in Vivo and in Vitro Evaluations. The 29th AO Annual meeting, 2014. 3. 6-8, United states seattle

9. Kakura K, Taniguchi Y, Yasuno K, Matsuura M, Kido H. Comparison of titanium and zirconia dental implants:evaluation of peri-omplant tissue response. ICOI XXX I, 2014. 10. 3-5, Tokyo

国内学会発表

10. 安野貴美恵, 加倉加恵, 鴨川和子, 谷口祐介, 山口雄一朗, 柳東, 松浦正朗, 城戸寛史: ジルコニアインプラントの開発-新しい粗面での骨結合の強さ-第 39 回福岡歯科大学学会総会, 2012 年 11 月 18 日 福岡県

11. 谷口祐介, 安野貴美恵, 加倉加恵, 山崎純, 城戸寛史: ジルコニアインプラントの表面改質について-表面性状が骨芽細胞の分化に及ぼす影響-. 第 43 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会, 2013 年 9 月 13-15 日 福岡県

12. 谷口祐介, 城戸寛史, 山崎純: 骨芽細胞の分化にジルコニアの表面性状が及ぼす影響. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2013 年 9 月 20-22 日 岡山県

13. 谷口祐介, 山崎純, 安野貴美恵, 加倉加恵, 松浦正朗, 城戸寛史: ジルコニアインプラントの表面改質について-レーザーによる表面処理が骨芽細胞の接着および分化に及ぼす影響-第 17 回日本顎顔面インプラント学会学術大会, 2013 年 11 月 30-31 日 東京都

14. 安野貴美恵, 加倉加恵, 谷口祐介, 松浦正朗, 城戸寛史: 新しい粗面でのジルコニアインプラントにおける周囲組織の反応と骨結合の強さ-第 17 回日本顎顔面インプラント学会学術大会, 2013 年 11 月 30-31 日 東京都

15. 加倉加恵, 柳東, 谷口祐介, 城戸寛史. インプラント周囲骨欠損部への DNA/プロタミン複合体の骨形成. 第 18 回日本顎顔面インプラント学会学術大会, 2014 年 11 月 29-30 日, 島根県

優秀研究発表 (課題口演)

16. 加倉加恵, 安野貴美恵, 谷口祐介, 松浦正朗, 城戸寛史: ファイバーレーザーを用いた新しいジルコニアインプラントの開発-表面性状が骨芽細胞の分化と周囲組織の反応と骨結合の強さに及ぼす影響-第 44 回日本口腔インプラント学会学術大会総会, 2014 年 9 月 12-13 日 東京都

17. 谷口祐介, 加倉加恵, 安野貴美恵, 山崎純, 城戸寛史: Zirconia Implant 表面のファイバーレーザー処理粗面が骨結合に及ぼす影響について-骨結合強さおよび咬合荷重下における周囲骨の反応-第 45 回日本口腔インプラント学会学術大会総会, 2015 年 9 月 21-23 日 岡山県

シンポジウム

18. Taniguchi Y, Yamazaki J, Kakura K, Yasuno K, Matsuura M, Kido H. Development of a New Zirconia Implant with Rough Surface Produced by Laser Treatment: Assessment of Osseointegration Strength in vivo and Osteoblastic Differentiation in vitro The 18th China Int`l Symposium on Dental Equipment, Technology & Products, 2014.10.22-25, Shanghai

上海交通大学特別講義

19. Taniguchi Y, Yamazaki J, Kakura K, Yasuno K, Matsuura M, Kido H. Development of a New Zirconia Implant with Rough Surface Produced by Laser Treatment : Assessment of Osseointegration Strength in vivo and Osteoblastic Differentiation in vitro. 2014.10.23, Shanghai

賞

ICOIXXX Poster presentation award.