

## 論文の内容の要旨

氏名：池田善之

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：チタン表面の親水性が骨芽細胞に及ぼす効果

歯科インプラント体は、新しい表面性状を持ったものが毎年のように開発され、そのたびに osseointegration（骨インプラント結合）が改善されたと提唱されている。しかし、いずれのインプラント体においてもインプラント骨接触率は 100%にはならず、長期の治癒期間でも 50~65%あるいは  $45 \pm 16\%$  と報告されている。酸処理等のチタン表面処理直後と処理後時間が経過したチタンを比較した研究では、*in vitro*において時間経過したチタンで、細胞の接着および増殖の減少が認められ、*in vivo*において骨結合速度の遅延と骨結合強度の減少が認められた。これらの結果からチタンの時間経過による老化現象がインプラント骨接触率を低下させる原因であると考えられている。チタン老化現象の原因として、チタン表面への炭素などの有機物質の付着があり、時間の経過とともにチタン表面の炭素量が増加することが知られている。その解決策としてチタン表面へ紫外線照射することでインプラント体の表面構造を作成直後の状態と同等の炭素付着量、同等かそれ以上の細胞接着および増殖、早期の骨結合および高い骨結合強度を得ることが判明した。また、インプラント体作成直後にインプラント体を生理食塩水中に密封することによって、チタン表面への炭素の付着を防ぐ方法も開発されている。

紫外線照射によるチタンの親水性への変化は、以前から知られており、現在では、汚染浄化システムや車のミラーの曇り止めなどに応用されている。しかし、疎水性から親水性への変化の機序については炭素など有機化合物が除去されたことによるもの、チタン表面の化学的変化によるもの、その両者によるものなど研究者によって意見が分かれている。また、チタン表面は酸処理などの処理直後では親水性であるが短時間で疎水性へと変化していく。処理直後に水中保存など、外気に接触しない環境下では、チタン表面に炭素などの有機化合物が付着しにくく、さらに親水性を保った状態となっている。しかし、親水性を保つ機序については、有機化合物がチタン表面に付着していないためなのか、親水性の履歴特性によるものなのか明らかでない。さらに、市販されているほとんどの歯科インプラント体は疎水性であるため、疎水性と親水性のみに着目した研究を行ってこなかった。したがって、親水性が osseointegration にどのような影響を与えているか明らかとなっていない。インプラント体表面が親水性に変化することは、インプラント体全面に血液が行き渡り易い状態にあり、細胞接着と細胞増殖および細胞分化に何らかの影響を与えることが推察される。埋入初期のインプラント体周囲に多くの骨芽細胞が接着し、その細胞が増殖および分化して骨を形成することは、骨のインプラント接触率および力学的強度を向上させ、さらに、早期の osseointegration が可能となる。

そこで、本研究ではチタン表面の親水性が骨芽細胞に与える影響について明らかにすることを目的としている。

実験はグレード 2 の純チタンを直径 20.0 mm、厚さ 1.5 mm のディスク状に成型し、表面を machined surface として使用した。試料のチタンディスクは distilled water (DW) を用い超音波洗浄を行い、滅菌処理後 15 週間遮光下にて保管した。その後、親水性を持つディスクを作成するために DW に浸漬し 1 週間遮光下にて保管した。チタンディスクの親水性度は DW 10  $\mu$ l をチタンディスク表面に滴下し、写真撮影後に接触角および接触面積を ImageJ Ver. 1.43u にて測定した。

骨芽細胞は 8 週齢の雄 Sprague-Dawley ラット骨髄から採取した。採取した細胞は増殖培地を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。培養 4 日目後に 100 mm セルカルチャーディッシュに付着した細胞のみを 0.5% Trypsin-EDTA にて分離、継代を行った。継代培養は硬組織誘導培地にて行った。なお本研究は日本大学歯学部動物実験指針 (AP14D008) に従って行った。

細胞接着の評価は、12 穴プレートに設置したチタンディスク上に細胞を播種し、3 時間および 24 時間後にチタンディスクに接着した細胞を測定した。測定は WST-8 を 3 時間および 24 時間培養後の各プレートに 100  $\mu$ l 添加し、37°C で 4 時間インキュベート後、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。細胞増殖の評価は、12 穴プレートに設置したチタンディスク上に細胞を播種し、2 日間および 4 日間後に細胞

増殖能を測定した。測定は各プレートに BrdU を添加後 24 時間インキュベートし、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。

チタンディスク上に播種した骨芽細胞の形態は、3 時間および 24 時間培養後、共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて測定した。測定試料は培養後 10%ホルマリンにて固定し、fluorescent dye rhodamine phalloidin にてアクチンフィラメントを染色した。さらに、ビンキュリンの発現および局在性を観察するために一次抗体として mouse anti-vinculin monoclonal antibody および二次抗体として FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody を用い染色した。染色後アクチンフィラメントおよびビンキュリン陽性部位の面積、周径、フェレ経を ImageJ にて測定した。

骨芽細胞のアルカリホスファターゼ(ALP) 活性は 5 日間及び 10 日間培養後に測定した。チタンディスク上で培養された細胞を DW で数回洗浄後 *p*-ニトロフェニルリン酸錠を基質溶解液で溶解した溶液を 250  $\mu$ l ずつ添加した。その後 37°C で 15 分間インキュベートし、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し ALP 活性値を求めた。

カルシウム量は培養10日目および20日目に細胞層をPBSで洗浄後、1 M HClを1 ml添加して室温で24時間脱灰処理を行い、その後DWを50  $\mu$ lずつ加え2時間静置した。この検体液とカルシウムEテストワコーを用いて検体(標準液50  $\mu$ l, 緩衝液2 ml, 発色試薬1 ml)と、標準(標準液50  $\mu$ l, 緩衝液2 ml, 発色試薬1 ml)を調整し、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。得られた値からカルシウム濃度[(mg/dl)=検体/標準 $\times$ 10]を算出した。

親水性度、細胞接着、細胞増殖、ALP活性およびカルシウム量は各群3枚の異なるディスクを用いその結果を分析した(n=3)。細胞形態測定は各群9個の細胞を用いてその結果を分析した(n=9)。分析はStudent *t*-testを用い有意水準は5%とした。

本研究はチタン表面の親水性が担う役割について明らかにすることを目的としているため、紫外線照射処理やチタン表面作製直後の生理食塩水保存などのチタン表面処理によって得られる親水チタンディスクではなく、親水性の履歴特性を利用した親水性チタンディスクを用いて実験を行うこととした。その結果機械研磨チタン表面は遮光保存で接触角度 74.36° ( $\pm$ 2.9) の疎水性であるのに対して水中保存では 7.39( $\pm$ 1.6)と親水性となり、接触面積は約8倍となった。したがって、履歴特性を利用した水中保存においてもチタン表面を親水性とすることが可能であることが明らかとなった。

細胞接着試験では、培養3時間および24時間において親水性ディスクが疎水性ディスクを有意に上回る結果となった。弱拡の confocal 画像で視覚的に確認したところ、親水性ディスクにおいて細胞数が多いことが確認でき、このことからチタンの親水性は初期細胞接着に有利な影響を与えることが示唆された。しかし、BrdU を用いた細胞増殖測定では、両者に差が認められず、チタンディスクの親水性は細胞の増殖能に影響を与えなかった。

初期に細胞が接着した際の細胞形態、アクチンおよびビンキュリンの発現を検討したところ、全ての項目で差を認めなかった。形態に差がなくアクチンおよびビンキュリンの発現に差がないことからチタンディスクの親水性は細胞の接着力に影響ないことが判明した。このことから親水性はチタンディスク上への細胞接着を強固にしているのではなく、初期接着の確率を高めていると考えられた。

ALP 活性およびカルシウム量は細胞の骨芽細胞分化のマーカーであるため、この両者に有意差がないことは、親水性は骨芽細胞の分化に影響しないと考えられた。

以上のことから、チタン表面の親水性は細胞の初期接着の確率を高めることによって、その後の細胞増殖や細胞分化の促進に繋がり、チタン表面構造が本来持っている osseointegration 能力を向上させる可能性が示唆された。