

論文の内容の要旨

氏名：大久保 貴 久

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：滅菌グローブに接触して汚染させたチタンメッシュの紫外線照射による生物学的活性

チタンは軽量、非磁性、耐食性、優れた生体親和性を有することから医療に応用されており、力学的な強度や耐久性が要求される部位において、硬組織代替材料としての使用が拡大している。疾病や事故によるものも含め生体機能の低下・喪失に苦しむ患者が快適な生活を維持するためにチタンの医療への貢献は大きい。チタンの医療への貢献は、整形外科、歯科におけるインプラントとしての用途の他に、骨折固定材としてボーンプレートやその固定のためのミニスクリュー、循環器外科・内科における血管内ステント、インプラント治療を行うための術前骨造成用のスキヤフォールドとしてメッシュプレートなどの用途がある。

歯科に関連あるものとして、チタンプレートの全域に穴を開けた、いわゆるチタンメッシュプレート（チタンメッシュ）としての応用が挙げられ、GBR（Guided Bone Regeneration）に代表されるボーンオーギュメンテーションにも用いられる。インプラントを埋入する際、顎骨に適切な幅や高さが無い場合に、骨造成が必要となる。チタンメッシュの役割は、骨補填材の保持と骨の三次元的な形態付与、維持である。しかし、チタンメッシュは平坦で様な大きさと販売されており、販売時に滅菌は施されていないので、患者に使用する前にオートクレーブなどで滅菌が必要である。チタンメッシュは術中に欠損部の大きさに適した大きさに切り取られ、術者の希望する形態に屈曲成型される。場合によっては、術前に患者の顎骨を再現した模型上でトリミング、形態付与されることもある。これらの過程で、チタンメッシュとグローブや器具、各種材料などとの接触は不可避であり、その際生物学的汚染が生じる。この生物学的汚染を除去するために、チタンメッシュは、術前にオートクレーブやエチレングスなどにより滅菌される。しかし、生物学的な汚染とともに生じる可能性のある化学的汚染については、これまでほとんど検討されておらず、化学的汚染および生物学的影響については明らかでない。

一方、光機能化は、紫外線を用いてチタン表面を使用直前に活性化するテクノロジーであり、骨芽細胞のチタン表面への接着を高め、骨結合能力を高める効果がある。動物モデルにおいて、骨-インプラント接触率が約2倍増加し、100%近くになることが知られている。それに伴って骨-インプラントの力学的安定性も初期には3倍になることが知られている。これらの生物学的効果のメカニズムの一つは光機能化によりチタン表面から炭素が分解、除去されることであると考えられている。チタンに紫外線を照射することでチタン表面から炭素が除去されると同時に超親水性が獲得された結果、骨伝導能が向上すると考えられている。また、歯科用インプラントにおいて光機能化処理は臨床応用されて、良好な成績が報告されている。

本研究では、チタンメッシュの準備時、手術時に必ず装着している医療用グローブとチタンメッシュとの接触に着目した。そこで本研究の第一の目的は、グローブが接触することによるチタンメッシュ上の化学的汚染の存在の有無、そして化学的汚染があった場合には、その生物学的影響を明らかにすることであり、さらに第二の目的は、化学的汚染があった場合、その後紫外線による処理を行うことによって、化学的および生物学的影響があるか否かを検証した。

試験体として、直径1.8 mmの孔を有する、厚さ0.2 mmのグレード2チタンメッシュプレート（マイクロメッシュ、Karl Leibinger Medizintechnik, Mühlheim, Germany）を12ウェルプレートに適合するように切り取った。試験体は3グループ用意した。チタンメッシュプレート開封し、オートクレーブ滅菌したものをAs-received (AR) 群、ラテックス製滅菌グローブ（ガメックス）と3分間0.98 N加重圧下で接触させた後にオートクレーブ滅菌したものをGlove contact (GC) 群、GCにTheraBeam SuperOsseo（Ushio, Tokyo, Japan）を用い12分間紫外線処理を施したものをGlove contact + UV

(UV) 群とした。

走査電子顕微鏡 (Nova 230 Nano SEM, FEI, Hillsboro, OR, USA) によりそれぞれのサンプルの表面を観察した。AR 群の試験体表面は粗造性を認め、外来性の構造体の付着は観察できなかった。GC 群と UV 群においては、顆粒状の外来性の物質の付着した部位が確認された。

接触角の測定は 3 μ L の超純水をチタンメッシュ上に滴下して行った。AR 群と GC 群の試験体表面は、ともに疎水性を呈した。水との接触角は AR 群では約 60° であったが、GC 群においては約 75° と有意に増加した。UV 群上では、水は広く広がり水の接触角は 5° 以下であり、超親水性を呈した。

試験体表面の化学分析は X 線光電子分光光度計 (Axis Ultra DLD, Kratos Analytical, Manchester, UK) を用いて行った。炭素 (C) 元素量は AR 群と GC 群とを比較して UV 群では約 35% 減少した。ケイ素 (Si) 元素量は AR 群に比べ、GC 群では約 70% 増加した。UV 群のケイ素元素量は GC 群と比較して約 20% 減少した。その結果チタン (Ti) 元素量は AR 群に比べ、GC 群では 1/3 に減少し、UV 群で、GC 群と比較して 4 倍以上になった。酸素 (O) 元素量は AR 群や GC 群と比較して UV 群では 2 倍になった。

骨芽細胞の増殖能をみるために、それぞれのチタンメッシュ上に 8 週齢 SD ラット大腿骨由来骨芽細胞を播種した。共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて細胞増殖の状態を観察した。6 時間、24 時間いずれにおいて細胞数は UV 群において多く、GC 群で少なかった。定量的にはチタンメッシュ上の培養 6 時間後の骨芽細胞数は AR 群に比べ、GC 群では 1/5 であった。UV 群では接着細胞数は大きく増加し、GC 群に比べ 8 倍であり、AR 群の 1.6 倍高かった。培養 24 時間後でも 6 時間後の結果と類似のパターンが認められた。この傾向は培養 48 時間、72 時間後でも同様であった。すなわち GC 群では細胞数は有意に減少し、UV 群では増加した。

培養 6 時間後、24 時間後に actin と vinculin を染色し細胞形態を評価した。各群の細胞の大きさ、周長、フェレット径、rhodamine phalloidin 陽性域、vinculin 陽性域について画像処理ソフト (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA) で観察した。GC 上の骨芽細胞は AR 上骨芽細胞に比べ有意に小さくなり、UV 群上骨芽細胞は AR 上骨芽細胞と同レベルまたはそれ以上であった。

表現型の評価については、骨芽細胞培養 5 日後及び 10 日後に ALP 染色をし、写真をもとに定量分析を行った。培養 5 日後、10 日後ともに GC 群の染色強度は AR 群より有意に減少し、UV 群の染色強度は、AR 群と同レベルまたはそれ以上であった。

von Kossa 染色を行った結果、AR 群では試験体のほぼ全体が黒染した。一方、GC 群では黒染域は明瞭でなく、UV 群では、AR 群と同様にほぼ全面が黒染された。写真をもとに定量分析を行った結果、黒染域の割合は AR 群、UV 群でほぼ 100%、GC 群では約 13% であった。

滅菌グローブと接触することにより、チタンメッシュ表面には構造的、化学的な汚染が生じる。この結果骨芽細胞との生物学的活性が有意に低下した。紫外線照射により、低下した生物学的活性は回復し、開封直後に滅菌したものと同等またはそれ以上の生物学的活性を示すことが示唆された。