

## 論文審査の結果の要旨

氏名：佐藤 諒 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：大気圧窒素プラズマ刺激は *osterix*, *osteocalcin* と ALP 発現増加および *iNOS* と *COX-2* 発現低下によって骨芽細胞の分化を促進する

審査委員：(主査) 教授 磯川 桂太郎

(副査) 教授 本吉 満

教授 篠田 雅路

教授 鈴木 直人

プラズマは、狭義には部分的あるいは完全に電離シオン化した気体であって、その物理的特性は通常の気体と異なり、固体、液体、気体に次ぐ第4の状態として定義される。プラズマの性質は、圧力、温度、密度、純度あるいはガス種などの条件によって異なる。酸素や窒素のような非貴ガスのプラズマは、弱い紫外線や活性酸素など多くの反応種を発生させることが知られ、被照射体への生理活性効果が期待される。大気圧プラズマジェット (APPJ) は、医療機器の滅菌、癌細胞の増殖抑制および創傷治癒など医療用として広く利用されている。特に、被照射体が熱によるダメージを受けることのない低温 APPJ は、生体への使用が可能であることから、新しい医療器具としても期待される。APPJ に適用する気体は選択が可能で、用いるガス種によって細胞に対する APPJ 照射の影響に差異が生じるが、窒素ガスを用いた APPJ (N-APPJ) 照射が骨芽細胞分化に及ぼす影響の詳細は未だ不明である。

そこで、本研究では、N-APPJ 照射培地における骨芽細胞分化について、細胞生物学的な検討を行った。供試細胞はマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞) とし、培地には 10%ウシ胎児血清と 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B 溶液を添加した  $\alpha$ -modified Eagle's medium を用いた。細胞培養に先立って、培地 20 mL に N-APPJ (outflow 6 L/min) を用いて大気圧窒素プラズマを照射して bubbling させた。培地表面から約 5-10 mm での照射を 60, 120 および 180 秒間行った培地を照射培地とし、細胞培養に用いた。なお、照射の 0, 5, 10, 15, 30, 60 および 180 分後に培地の pH 測定を行った。また、MC3T3-E1 細胞は、 $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で非照射培地によってあらかじめ 24 時間培養して生着を確認した後に、照射培地あるいは非照射培地による培養を開始した。培地は 3 日毎に交換し、14 日目まで培養を行った。交換用照射培地はその都度新たに照射、調製を行った。

照射培地によって 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日間培養した MC3T3-E1 細胞を試料とし、細胞増殖と alkaline phosphatase (ALP) 活性を調べた。また、N-APPJ 照射 120 秒の培地によって 3, 7 および 14 日間培養した MC3T3-E1 細胞を試料し、 runt-related transcription factor 2 (Runx2), *osterix*, 細胞外マトリックスタンパクとしての type I collagen (ColI) および *osteocalcin* (OCN), 加えて、*inducible nitric oxide synthase* (*iNOS*) および *cyclooxygenase-2* (*COX-2*) について、遺伝子発現とタンパク発現を調べた。

その結果、APPJ 照射培地で培養した MC3T3-E1 細胞について、以下の結論を得た。

1. 細胞増殖には影響が認められなかった。
2. ALP の遺伝子発現および活性に上昇がみられた。
3. *osterix* の遺伝子およびタンパクの発現が上昇したが、Runx2 の発現には影響がみられなかった。
4. OCN の遺伝子およびタンパクの発現が上昇したが、ColI の発現には影響がみられなかった。
5. *iNOS* および *COX-2* の遺伝子およびタンパクの発現が低下した。

以上のことから、N-APPJ 照射を受けた培地が及ぼす作用によって、MC3T3-E1 細胞における *osterix*, OCN, ALP の発現と ALP 活性の促進、*iNOS* と *COX-2* の発現抑制が生じることが示された。大気圧窒素プラズマ照射に起因する間接的な作用が、骨芽細胞分化や骨形成に促進的に働く可能性を示唆するものであり、口腔科学に寄与するところがあると考えられた。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和3年3月10日