

論文要旨等報告書

氏	田 中 力
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 3 3 5 5 号
学位授与の日付	平 成 1 9 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	生体活性型口腔インプラントを目指したリン酸化糖処理チタンの検討 —細胞応答促進および組織学的観察—

論文審査委員 教授 窪木 拓男 教授 鈴木 一臣 助教授 目瀬 浩

学位論文内容の要旨

【緒 言】

口腔インプラント治療は、オッセオインテグレーションの概念のもと改良が進められ、予知性の高い欠損機能回復法の一つとして認知されるようになった。一方、インプラント体を埋入したにもかかわらず、上顎臼歯部のような骨質の脆弱な部位ではオッセオインテグレーションの獲得が得にくい場合もある。このような問題を解決するために、インプラント体表面にアパタイトや成長因子をコーティングする方法などが開発されているが、埋入後アパタイトがチタンから剥離する問題や、成長因子においてはコストや安全性の問題を解決する必要がある。そこで今回、生体親和性、金属への接着性に優れた天然多糖類であるプルランに着目し、チタンインプラント表面の新規改質剤としての応用を考えた。すなわち、本研究では、チタンプレート上で培養した骨芽細胞様細胞株の細胞応答に対するプルラン処理の影響を検討するとともに、実際に実験動物にプルラン処理したチタンインプラントを埋入し組織学的検討を行った。

【材料および方法】

1. リン酸化プルランの合成とチタンに対する接着性の検討

チタンへの接着性向上を目的にプルランをリン酸化した。リン酸化プルランの合成は、プルラン 8.5g を蒸留水 38ml に溶解後、そこに 1M リン酸水溶液 200ml を加え、170℃で 5 時間反応させた。次に反応液からエタノール析出を行って合成物を得た。合成したリン酸化プルランのチタンに対する接着性を水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) にて測定した。

2. リン酸化プルランを吸着したチタンプレート上での細胞応答

a) チタンプレートの表面処理および処理後の表面粗さ

チタンプレート (GC 社製; 径: 13mm, 厚み: 1mm) を 1.0wt% リン酸化プルラン溶液で 24 時間処理し、コントロールとして蒸留水に 24 時間処理した。表面粗さは、超精密表面粗さ測定装置 (フォームタリサーフ, PGI1240, Taylor Hobson 社) で測定した。

b) 使用細胞株および細胞培養

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞およびマウス胎仔由来線維芽細胞 C3H10T1/2 細胞を使用した。MC3T3-E1 細胞は、10% ウシ胎仔血清を含む α MEM を使用し、37℃, 5% CO₂ 気相下で培養した。C3H10T1/2 細胞は、培地に DMEM を用い同様の条件で培養した。

c) チタンプレート上で培養した細胞の形態、接着、増殖に及ぼすリン酸化プルランの影響

リン酸化プルラン処理したチタンとコントロールチタン上に細胞播種後 3, 24 時間後に、細胞形態を光学顕微鏡で観察した。細胞接着試験は、24 ウェル細胞培養用プレートに各処理後のチタンプレートを設置し、1, 3 時間後に付着細胞数を MTS 法で測定した。細胞増殖試験は、同様に 1, 2, 3 日後の細胞数を MTS 法により評価した。

d) チタンプレート上で培養した MC3T3-E1 細胞のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) の発現に及ぼすリン酸化プルラン処理の影響

MAPK ファミリーの各種タンパク (ERK, p38, JNK) の活性化の度合いを、リン酸化プルラン処理チタン上とコントロールチタン上で、ウェスタンブロッティング法で比較した。

e) MEK/ERK 阻害剤添加下での細胞増殖試験

MEK/ERK 阻害剤の細胞増殖に対する影響を、MC3T3-E1 細胞を用いた細胞増殖試験にて評価した。

3. 動物実験における組織学的検討

1. 0wt%リン酸化プルランで処理したダンベル型チタンインプラントを、Wistar 系雄性 6 週齢ラット脛骨に埋入した。埋入 2 週後の樹脂包埋研磨切片を作製しチタン周囲における骨造成の組織学的観察を行った。

【結果および考察】

1. 合成したリン酸化プルランは、FT-IR スペクトルから $1000\sim 1200\text{cm}^{-1}$ 付近にリン酸基に帰属するピークが認められた。QCM でのリン酸化プルランのチタンに対する接着実験では、チタン上にリン酸化プルランが吸着していることが明らかとなった。
2. 表面粗さを測定した結果、リン酸化プルラン処理チタンの算術平均粗さ (Pa) は $0.245 \pm 0.06 \mu\text{m}$ 、コントロールチタンの算術平均粗さは $0.249 \pm 0.08 \mu\text{m}$ となり有意差は認められなかった。すなわち、リン酸化プルラン処理はチタンの表面粗さに影響を与えないと考えられた。
3. MC3T3-E1 細胞の細胞接着は、1, 3 時間後において、リン酸化プルラン処理の有無により有意な差は認められなかった。一方、MC3T3-E1 細胞の細胞増殖試験では、細胞播種後 1, 2, 3 日後において、リン酸化プルラン処理を行った方が有意に高い増殖反応を示し、最大で 1.65 倍 ($p < 0.05$) に達した。さらに、同条件下で MAPK の中で ERK の活性がリン酸化プルラン処理チタン上で亢進していた。また MEK/ERK 阻害剤添加により、その増殖反応は抑制された。この結果、リン酸化プルラン処理により観察された MC3T3-E1 細胞の増殖促進反応は MAPK の中でも ERK の経路を介した反応であることが示唆された。
4. チタンインプラント埋入 2 週後の組織像において、リン酸化プルラン処理によりチタン表面における新生骨の形成が促進された。インプラント体表面の骨接触率は、リン酸化プルラン処理 (79.9%, $n=3$)、コントロール (60.8%, $n=3$) と、リン酸化プルラン処理したインプラント体の方が高い傾向を認めた。

【結論】

リン酸化プルラン処理は、チタン上で培養された MC3T3-E1 細胞および C3H10T1/2 細胞の増殖反応を促進することが明らかとなった。特に、MC3T3-E1 細胞において、その増殖反応は MAPK の ERK の経路を介する反応であることが示された。動物実験においても、リン酸化プルラン処理は、インプラント周囲の新生骨の形成を促進したことから、リン酸化プルランによるチタンの表面改質は、チタン製インプラントのオッセオインテグレーションを促進する有望な表面改質法となる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

口腔インプラント治療は、オッセオインテグレーションの概念のもと改良が進められ、予知性の高い欠損機能回復法の一つとして認知されるようになった。一方、インプラント体を埋入したにもかかわらず、上顎臼歯部のような骨質の脆弱な部位ではオッセオインテグレーションの獲得が得にくい場合もある。このような問題を解決するために、インプラント体表面にアパタイトや成長因子をコーティングする方法などが開発されているが、埋入後アパタイトがチタンから剥離する問題や、成長因子においてはコストや安全性の問題を解決する必要がある。そこで申請者は、生体親和性、金属への接着性に優れた天然多糖類であるプルランに着目し、チタンインプラント表面の新規改質剤としての応用を考えるに至った。すなわち、本研究では、チタンプレート上で培養した骨芽細胞様細胞株の細胞応答に対するプルラン処理の影響を検討するとともに、実際に実験動物にプルラン処理したチタンインプラントを埋入し組織学的検討を行い、以下の点を明らかにしている。

1. MC3T3-E1 細胞のチタンプレートへの細胞接着は、1, 3 時間後において、リン酸化プルラン処理の有無にかかわらず有意な差は認められなかった。一方、MC3T3-E1 細胞の細胞増殖試験では、細胞播種後 1, 2, 3 日後において、リン酸化プルラン処理を行った方が有意に高い増殖反応を示し、最大で 1.65 倍 ($p < 0.05$) に達した。さらに、同条件下でマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) ファミリーの中で細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) の活性がリン酸化プルラン処理チタン上で亢進していた。また MEK/ERK 阻害剤添加により、その増殖反応は抑制された。この結果、リン酸化プルラン処理により観察された MC3T3-E1 細胞の増殖促進反応は ERK の経路を介した反応であることが示唆された。
2. チタンインプラント埋入 2 週後の組織像において、リン酸化プルラン処理によりチタン表面における新生骨の形成が明らかに促進された。インプラント体表面の骨接触率は、リン酸化プルラン処理が 79.9% ($n=3$)、コントロールが 60.8% ($n=3$) とリン酸化プルラン処理したチタンの方が高かった。

以上の知見は、チタン製インプラントのオッセオインテグレーションを促進する有望な表面改質法となる可能性があることを示唆している。
したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。