

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

鈴木 季功

論文題目

真空紫外線 (VUV) を用いた光機能化によるジルコニア表面へのヒト歯肉線維芽細胞の誘導

緒言

インプラント治療において、ジルコニアアバットメントは歯肉組織との接触部に使用されるが、その界面は細菌感染によるインプラント周囲炎を引き起こす原因ともなりえる。歯肉組織とジルコニアアバットメントとの界面を封鎖してインプラント周囲炎を防ぐためには、歯肉線維芽細胞がジルコニアアバットメントの表面上に付着・伸展する必要がある。しかし、ジルコニアに対する紫外線 (UV) 照射の影響はほとんど検討されていない。そこで、本研究では真空紫外線 (VUV) 照射したジルコニア表面上における歯肉線維芽細胞の付着・増殖を検討した。

実験方法

実験 1 VUV 光機能化処理のための最適な条件の確立

1) VUV 照射時間の検討

メチレンブルーを塗布したチタン試料に VUV 照射 (波長 172 nm) を 20 秒から 80 秒間照射した後に残留メチレンブルー量を計測した。

2) VUV と UV 光源の比較

メチレンブルーを塗布したチタン試料に、低圧水銀ランプ (UVC)、高エネルギー UV 装置 (HUVC)、歯科用 UV 装置 (PUV) および VUV 装置を用いて 1 分間の UV および VUV 照射を行った。

実験 2 VUV を用いた光機能化によるジルコニア表面へのヒト歯肉線維芽細胞の誘導

1) ジルコニア試料表面の検索

ジルコニア試料に VUV (波長 172 nm) を 1 分間照射した。試料の表面形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) および原子間力顕微鏡 (AFM) で測定し、X 線光電子分光法 (XPS) を用いて試料表面の元素分布を測定した。試料の濡れ性の検索には蒸留水を用い、接触角を計測して評価した。

2) ジルコニア試料表面への VUV 照射によるヒト歯肉線維芽細胞の細胞付着能および細胞増殖能の検索

ジルコニア試料に VUV 照射 (波長 172 nm, 60 mW/cm², 1 分間) を行い、ヒト歯肉線維芽細胞を播種して培養した。培養 1 日後、蛍光染色 (Rhodamin 染色) を施して細胞数を計測し、2 日と 4 日の細胞増殖能を WST-1 Cell Counting Kit を用いて測定した。

3) ジルコニア表面への VUV 照射による細胞形態への影響を検索

実験 2. 2) と同じ条件で VUV 照射を行い、細胞を培養した。培養 1 日のジルコニア試料上に付着した細胞に蛍光染色 (Rhodamin 染色) を施し、細胞面積、周囲長、Ferret の直径を計測した。

4) ジルコニア表面の角度が細胞増殖能におよぼす影響

実験 2. 2) と同じ条件で VUV 照射を行い、ジルコニアに角度を付与 (45° , 60°) して細胞を培養した。培養 2 日と 4 日の細胞増殖能を WST-1 Cell Counting Kit を用いて測定した。

5) ジルコニア表面へのヒト歯肉線維芽細胞の伸展および形態の検索

実験 2. 2) と同じ条件で VUV 照射を行った。ジルコニア表面でヒト歯肉線維芽細胞を培養し、新しいジルコニア試料を接触させて設置して培養した。培養 7 日に蛍光染色 (Rhodamin 染色) を行い、ジルコニア表面に伸展した細胞の距離および形態を蛍光顕微鏡で検索した。

結果

実験 1 VUV 光機能化処理のための最適な条件の確立

1) VUV 照射時間の検討

試料表面の残留メチレンブルー量は照射 60 秒までは時間の増加とともに減少し、照射 60 秒でメチレンブルーの分解量はプラトーに達した。

2) VUV と UV 光源の比較

各光源による照射後の残留メチレンブルー量には使用した光源によって有意な差が認められ、残留メチレンブルー量は VUV 装置で最も低かった。

実験 2 ジルコニア表面へのヒト歯肉線維芽細胞の誘導

1) ジルコニア表面の検索

VUV 照射後のジルコニア表面に変化は認められなかった。XPS による元素解析では炭素の割合が有意に減少し、酸素の割合が増加した。また、VUV 照射後に超親水性 ($\theta < 10^\circ$) を示した。

2) ジルコニア表面への VUV 照射による細胞付着能および細胞増殖能の検索

培養 1 日に VUV 照射群の表面に付着した細胞数は Control 群に比べ約 1.6

倍多く、有意な差が認められた。また、培養2日と4日の細胞増殖能は、培養2日ではVUV照射群の方がControl群に比べ約1.5倍高い傾向が認められ、培養4日ではControl群よりも約1.3倍高く、有意な差が認められた。

3) ジルコニア表面へのVUV照射による細胞形態への影響

培養1日のVUV照射群はControl群に比べ細胞面積は約1.2倍大きく、細胞周囲長は約1.2倍長く、Feretの直径は約1.3倍長く、有意な差が認められた。

4) ジルコニア表面の角度が細胞増殖能におよぼす影響

培養2日、4日では、試料表面に角度が付与されるほど細胞増殖能の低下が認められた。培養2日の細胞増殖能は、 45° の条件ではControl群に比べてVUV照射群は約2倍高く、有意な差が認められた。また、 60° の条件ではControl群に比べてVUV照射群は約3倍高く、有意な差が認められた。培養4日の細胞増殖能は、 45° の条件ではControl群に比べてVUV照射群は約2倍高く、有意な差が認められた。また、 60° の条件ではControl群に比べてVUV照射群は約3.5倍高く、有意な差が認められた。

5) ジルコニア表面へのヒト歯肉線維芽細胞の伸展および形態の検索

培養7日のVUV照射群の細胞が伸展した距離はControl群に比べ約6倍長く有意な差が認められた。また、細胞形態の検索では、VUV照射群はControl群に比べ、細胞面積が約1.7倍大きく、細胞周囲長は約1.5倍長く、Feret

の直径は約 1.4 倍長く有意な差が認められた。

考察

実験 1. 真空紫外線 (VUV) 光機能化処理のための最適な照射条件の検討

VUV 照射はチタン表面の有機物を 60 秒で分解することが示された。また、VUV は UV によるオゾンを経る活性酸素の生成に加え、酸素に直接作用する活性酸素の生成により、より多くの活性酸素を生成して有機物を分解する。さらに、VUV はエネルギーが高いため、化学的結合を直接分解することができ、より多くの有機物を分解できることから、他の UV 光源よりも有機物分解能が高いと考えられる。

実験 2. VUV を用いた光機能化によるジルコニア上へのヒト口腔線維芽細胞の誘導

VUV 照射したジルコニア試料では表面形態への影響は認められないが、XPS を用いた表面元素解析によって表面の炭素元素の割合が減少し、超親水性への変化がみられ、光機能化の可能性が示唆される。

実験 2-2) から、VUV 照射したジルコニア表面では、培養 1 日に付着する細胞数が増加し、培養 2 日以降の細胞増殖能が増加したことから、VUV 照射により細胞付着能と細胞増殖能が促進されたことが示唆された。この結果は 1 分間の VUV 照射による光機能化処理の影響と推測される。

実験 2-3) から、VUV 照射により細胞形態への影響は、Control 群と比較して細胞面積、細胞周囲長、feret の直径が大きくなることが観察された。

これらの結果は実験 2-2)における細胞増殖能を促進する要因と考えられる。

実験 2-4)では、細胞への重力の影響について検索した。通常の培養条件では、細胞への重力は培養面に対して垂直であるが、培養面に角度を付与すると培養細胞の付着が阻害されると仮定した。細胞増殖能は試料に付与された角度と相関がみられ、60 ° (Control 群)では水平条件(Control 群)に比べて細胞増殖能が減少したが、VUV 照射により細胞増殖能は高くなっていた。アバットメントに接する歯肉・口腔粘膜の線維芽細胞は口腔内では様々な方向から重力の影響を受けると考えられ、角度を付与した条件下での VUV 照射の効果は、臨床的に大きな意義があると考えられる。

実験 2-5)では、ヒト歯肉線維芽細胞のジルコニア表面での伸展状態や細胞形態を検索した。培養細胞が試料表面を覆った後、新しい試料への伸展を検索することは、VUV 照射による効果の継続した観察に有用と考えられる。実験 2-5)の結果から、VUV 照射されたジルコニア表面は培養 7 日において、Control 群と比較しての細胞伸展の距離に有意な差が認められた。また、細胞形態の計測においても、細胞面積、周囲長、Ferret の直径の増大が認められた。

細胞の伸展を評価する本実験の方法により、VUV 照射による効果の継続した観察が可能であった。本研究の結果から、ジルコニアへの VUV 照射は生物学的効果が少なくとも 7 日間は持続することが示唆された。

結論

本研究では、VUV 照射したジルコニア試料がヒト歯肉線維芽細胞に与える影響および伸展する能力を検索した。実験 1 より、VUV 光機能化処理では 1 分間の照射で多くの有機物を除去することを示した。実験 2 より、VUV 照射では *in vitro* の実験において付着細胞数や細胞増殖能の促進が認められた。VUV 照射は角度が大きく付与された条件ほど、細胞増殖能を促進することが示された。また、ジルコニア表面への VUV 照射はヒト歯肉線維芽細胞の伸展を促進し、その光機能化の効果は、少なくとも 7 日間は持続することが示された。