

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 670 号	論文提出者 小林 周一郎
論文題目 アルゴンイオンボンバードメントによるポリ塩化ビニリデンフィルムの生体活性の増強と骨再生誘導法への応用	

I. 緒言

口腔領域の骨欠損部の再建は歯周治療、インプラント治療においてきわめて重要であり、近年、骨再生誘導法(GBR)が広く普及している。しかし、骨の再生能が低い事および GBR の技術依存性により、その適応性は限られている。最近の研究では、ポリ塩化ビニリデン (Polyvinylidene chloride、PVDC) フィルムが優れた生体適合性や遮蔽性、骨伝導性を持ち、特に歯科用ボンディング材を介した骨との接着性を有することから、足場材料および遮蔽膜として有用であると報告されている。しかしながら、PVDC フィルム上では培養皿と比較し、細胞増殖が遅延するとされ、生体における治療の遅れが懸念される。

細胞の初期接着は細胞増殖において必須であり、細胞増殖はぬれ性、電荷、表面形態といった多くの要素に左右される事が知られている。その中でもぬれ性は細胞の初期接着に最も重要な因子であり、紫外線照射や大気圧プラズマ照射といった表面のぬれ性を向上させる処理方法が現在使用されている。しかし、紫外線によって、PVDC は変性すること、また、大気圧プラズマ照射に必要な温度は PVDC の耐熱温度を大きく超えることから、これらの方法は PVDC へ応用する事が不可能であった。一方、低圧プラズマは比較的低い温度で処理が可能のため、工業界において、有機物の表面処理に広く用いられている。特にアルゴンイオンボンバードメントと呼ばれるアルゴン (以下、Ar)を用いたプラズマは、温度の影響が最も少ないこと

が知られている。

そこで、本研究では、Ar イオンボンバードメント処理による、PVDC 表面におけるぬれ性、化学構造変化および形態変化について検討を行なった。

また、Ar イオンボンバードメント処理の有無が、PVDC の生体活性に与える影響を評価するため、*in vitro* における線維芽細胞様細胞と骨芽細胞様細胞の初期付着と増殖性の比較ならびに、*in vivo* における骨修復に与える効果をラット頭蓋骨に形成した骨欠損部位に移植することにより検討した。

II. 材料および方法

1. 実験試料

厚さ $20\mu\text{m}$ の PVDC フィルム (旭化成株式会社、東京、日本) をオートクレーブ滅菌後、*in vitro* 用に $\phi 15\text{mm}$ 、*in vivo* 用に $\phi 7\text{mm}$ および $\phi 10\text{mm}$ に成形、滅菌し、乾燥させ実験試料とした。

2. Ar イオンボンバードメント処理

マグネトロンスパッタリング装置 (JUC-5000、日本電子株式会社、東京) を応用し、処理条件は 6Pa、10mA、3 分間とした。電圧は装置固有の値である。

3. 表面改質の検討

1) ぬれ性試験

未処理 PVDC フィルムと、Ar イオンボンバードメント処理後 30 分、1 時間、3 時間、6 時間、12 時間および 24 時間経過した PVDC フィルムに対

し、 $10\mu\text{l}$ の蒸留水を滴下し、接触角 θ を $\theta/2$ 法を用いた計算によって求めた ($n=3$)。接触角の計測はソフトウェア(Sensiv measure、三谷コーポレーション、東京)を用いた。液滴法の計算式を下記に示す。ここで、 r は水滴の半径、 h は水滴の高さとする。

$$\theta = 2\arctan(h/r)$$

2) 表面構造変化の検討

PVDC表面構造変化はフーリエ変換型赤外分光分析(FT-IR)を用い検討した。Arイオンボンバードメント処理30分後のPVDCフィルム(Ar-PVDC)と未処理群(PVDC)を、FT-IR光度計を用いスペクトルを描記した。

3) 表面形態の観察

表面形態の観察は走査型電子顕微鏡(JSM-5900LV、日本電子、以下SEM)像によって行なった。

4. *in vitro* 試験

1) 細胞初期接着試験および細胞形態の観察

前述の方法にて作製したAr-PVDCとPVDCを、24ウェルマイクロプレートの底面に貼り付け、滅菌綿棒を用いて圧接した。マウス線維芽細胞由来L929懸濁液(1.0×10^5 cells/ml)を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で3、24時間培養後に細胞数を計測した。接着細胞の測定はCell Counting Kit-8

(CCK-8) を用い、マイクロプレートリーダーで、450nm における吸光度を測定した (n=5)。また培養後、細胞を固定し任意に抽出された 20cells の面積を、ソフトウェアを用いて計測した。さらに脱水後、t-ブチルアルコールに置換、凍結乾燥後、SEM にて細胞形態を観察した。

2) 細胞増殖試験

① L929 を用いた細胞増殖試験

4. 1) と同様の方法で試料を作製し、細胞を播種、培養した。培養期間は 5 日間で、培養液は毎日交換した。細胞増殖の測定は CCK-8 を用い、4. 1) と同様の方法で測定した。

② マウス頭蓋骨骨芽細胞様細胞由来 MC3T3-E1 を用いた細胞増殖試験

実験材料は前項の L929 と同様の方法で作製した。培養期間は 10 日間とし、培養液は毎日交換した。細胞増殖の測定は、2 日ごとに行ない、吸光度は 4. 1) と同様の方法で測定した。

5. *in vivo* 試験

1) 移植材料の作製

φ 7mm の未処理 PVDC フィルムを用いた群を PVDC 群、φ 7mm の Ar-PVDC を用いた群を Ar-PVDC 群、ゴアテックスを φ 10mm に成形した試料群を Reference control とし、GORE 群とした。

2) ラット頭蓋骨骨欠損の形成と移植

5 週齢 Sprague-Dawley ラット雄の頭部皮膚を 10mm 程度切開し、骨膜を

剥離後、 $\phi 5\text{mm}$ のトレフィンバーを用い頭蓋骨正中に深さ 0.5mm の骨欠損を形成した。骨欠損部に対し、2種の PVDC フィルムを貼り付けた（内膜）。その後、内膜の固定と形状付与のため、 $\phi 10\text{mm}$ の PVDC フィルムに G-BOND+ を塗布、内膜を覆うように貼り付け、光照射を行い、切開部を縫合した。GORE 群は欠損部をゴアテックスにて覆った後、切開部を縫合した。骨欠損のみの群を DEF 群とした。移植期間は 3、6 週間とした ($n=3$)。実験動物に対する処置ならびに飼育については愛知学院大学歯学部実験指針に準じた（承認番号 AGUD139 号）。

3) X 線写真および三次元的解析

移植期間終了後、各群 3 体ずつを安楽死させ、頭蓋骨を摘出した。採取後、*in vivo* microCT による撮影を行った。CT 値を較正し、TRI/3D BON を用いて三次元構築した画像（CT 画像）を作成した。CT 画像上で、 $\phi 5\text{mm} \times$ 高さ 0.5mm の関心領域（ROI）を作成し、ROI 内の石灰化物を新生骨と見なし、体積の百分率を測定した。

4) 組織学的観察

試料を固定後、脱水し樹脂包埋した。厚さ約 $50\ \mu\text{m}$ の切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色し、光学顕微鏡を用いて組織学的観察を行なった。

6. 統計処理

全ての実験結果における統計学的解析は、Tukey の多重比較検定を用いた。

Ⅲ. 実験結果

1. 表面改質の検討

1) ぬれ性試験

未処理 PVDC における接触角の平均は $66.7 \pm 1.3^\circ$ であった。Ar イオンボンバードメント処理 30 分後 PVDC における接触角は $10.3 \pm 0.5^\circ$ であり、高親水性を示した。Ar イオンボンバードメント処理 1, 3, 6, 12 および 24 時間後 PVDC における接触角はそれぞれ $12.6 \pm 0.7^\circ$, $15.1 \pm 0.6^\circ$, $18.6 \pm 0.5^\circ$, $23.4 \pm 1.0^\circ$, $34.3 \pm 2.1^\circ$ であり、時間の経過とともに接触角は増加するが、どれも高い親水性を維持していた。

2) FT-IR 分析

Ar-PVDC 群において、 $3,200\text{-}3,600\text{ cm}^{-1}$ の OH 基を示す領域での吸収が PVDC 群と比較し増加していた。

3) 表面形態の観察

両者の表面形態に関して、著明な変化は認められなかった。

2. *in vitro* 試験

1) 細胞初期接着試験および細胞形態の観察

24 時間において、Ar-PVDC 群に有意な接着細胞数の低下を認めた。一方、PVDC 群の吸光度は、Ar-PVDC 群と比較し、有意な細胞接着の減少を認められた。3、24 時間後における Ar-PVDC 群上の細胞は、PVDC 群と比較し約 37% の面積の増大を示し、3 時間後において有意差を認めた。Ar-PVDC 群

と培養ウェル上の細胞面積の間には、有意な差は認めなかった。SEM 像において、Ar-PVDC 群上の細胞は平面になっているのに対し、PVDC 群上の細胞は半球上を呈していた。強拡大像において、Ar-PVDC 群上の細胞からは多数の糸状仮足の伸展が認められたが PVDC 群上の細胞においては、糸状仮足はほとんど認められなかった。

2) 細胞増殖試験

① L929 を用いた細胞増殖試験

培養ウェル群の細胞は 4 日目にコンフルエントに達した。Ar-PVDC 群における細胞増殖は 4 日目では遅延を認めたが、培養 5 日目にコンフルエントに達した。一方、PVDC 群における細胞増殖は Ar-PVDC 群、培養ウェル群と比較し、有意に低かった。

② MC3T3-E1 を用いた細胞増殖試験

Ar-PVDC 群、培養ウェル群の細胞は 8 日目にコンフルエントに達したのに対し、PVDC 群における細胞増殖は、10 日目まで、有意に低かった。

3. ラット頭蓋骨骨欠損部位への PVDC フィルムの移植

1) CT 画像および三次元的解析

CT 画像において、DEF 群では移植 3、6 週後ともに、きわめてわずかな新生骨のみが形成されていた。他の群においては、新生骨が認められた。特に、Ar-PVDC 群においては、他の群と比較し新生骨が著明に認められた。

三次元的解析では 3 週後において、Ar-PVDC 群は他の群と比較し、有意な新生骨の増加を認めた。6 週後においては、Ar-PVDC 群における新生骨は他の移植材との間に有意な差は認めなかったものの増加傾向を示した。

2) 組織学的観察

DEF 群において、新生骨が認められなかったのに対し、他の 3 群においては、新生骨が認められた。特に Ar-PVDC 群においては、母床骨と新生骨の連続性を認めた。

IV. 考察

PVDC の表面処理に Ar イオンボンバードメントを用いた理由は以下の通りである。

1. Ar ガスは反応性がきわめて低いため、PVDC と化合物を作らないこと。
2. Ar イオンボンバードメントは減圧下で行なうため、処理中のプラズマの温度はきわめて低い。
3. 装置に内蔵される磁石により、基質が傷害されない。

これらの要素は、PVDC を変性させないために必須であると考えられる。

PVDC フィルム表面は Ar イオンボンバードメント処理により、親水性が向上した。プラズマ処理後の表面は高反応性であり、時間の経過とともに、大気中の炭化水素をはじめとした不純物が吸着した結果、ぬれ性が低下したと考えられる。SEM 像において、PVDC 群と Ar-PVDC 群の間には表面形態に著明な変化を認めなかった。また、処理前後において、変色、変形

は認められなかった。即ち、Ar イオンボンバードメント処理が、PVDC フィルム表面のぬれ性の変化に与えた影響は、形態的な変化ではなく、化学的な変化であるとであると考えられる。FT-IR 分析の結果より、Ar イオンボンバードメント処理後の PVDC フィルム表面に水酸基が検出された。これは、処理によって、PVDC フィルム表面に付着している炭化水素などの不純物が除去され表面が活性化し、そこに大気中の水分が吸着し、それらが検出されたと考えられる。これらの結果より、Ar イオンボンバードメント処理後に PVDC 表面に吸着した水酸基によって、PVDC フィルムのぬれ性が向上したと考えられる。

培養初期において Ar-PVDC 群では PVDC 群と比較し、より多くの細胞付着と伸展が認められた。SEM 像において、Ar-PVDC 群の細胞には多数の長い糸状仮足が認められ、強固に付着している事が確認された。これは Ar-PVDC の表面の親水性が上昇し、細胞の付着に好ましい表面性状になっているためと考えられる。

細胞増殖試験では、Ar-PVDC フィルムは培養ウェルと同等の値を示した。前述のように、細胞増殖は、細胞の初期接着に影響を受けるとされている。即ち、細胞増殖は足場依存性として知られており、細胞の結合力の増加は細胞分裂の S 期を刺激し、細胞増殖が促進すると考えられている。また、骨芽細胞は高い表面エネルギー上でより分化傾向を示す事が報告されており、Ar-PVDC はこれらの条件を満たしていると考えられる。

in vivo 試験では Ar-PVDC 群において、著しい新生骨の増加が見られた。これは、*in vitro* 試験と同様、細胞の付着と増殖の促進によるものと考えられる。また、フィルムと頭蓋骨の間への線維性結合組織の侵入を防いでいることから、PVDC フィルムの持つ高い遮蔽性および操作の簡便性が証明されたと考えられる。

V. 結論

PVDC フィルムに対し、Ar イオンボンバードメントによる表面処理を行った結果、以下の結論を得た。

1. PVDC フィルムに Ar イオンボンバードメント処理を施した結果、表面に水酸基が吸着することで、親水性の向上が見られた。
2. Ar イオンボンバードメント処理によって、PVDC フィルム上における線維芽細胞様細胞および骨芽細胞様細胞の、初期接着性と細胞増殖の促進が認められた。
3. ラットを用いた *in vivo* での骨再生療法において、Ar イオンボンバードメント処理 PVDC フィルムを移植した群に最も多くの新生骨を認めた。
4. 以上のことから、Ar イオンボンバードメント処理 PVDC フィルムは、優れた骨伝導性をもつ GBR 膜として適していることが示唆され、今後の歯科臨床への応用が期待される。