

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

岡部 栄治郎

論文題目

ヒト口腔由来上皮細胞の  
ジルコニアに対する付着特性

## I. 緒言

歯科用インプラントは純チタンやチタン合金をインプラント体やアバットメント材料として用い、広く一般臨床に普及してきた。しかし、インプラント周囲上皮の防御機能は接合上皮よりも低く、インプラント周囲上皮による上皮性封鎖は脆弱ではないかということと、歯周疾患の既往はインプラント周囲炎と深い関連性を示し、事実、インプラント周囲炎に罹患する患者は近年増加している。したがって、生体適合性に優れ、細菌の付着が少なく、上皮の付着を妨げない性質を有する材料が、インプラント体やアバットメントに有用ではないかと考えられる。

ジルコニアはその優れた化学的安定性や機械的強度、破壊靱性から生体材料として用いられ、医科あるいは歯科において金属に代わる材料として臨床に応用されている。また、チタンアレルギーの問題あるいはチタンの金属色がインプラント周囲粘膜を透過する審美的な問題を解決するために、インプラント材料としてジルコニアが注目され発展してきている。ジルコニアはイットリア添加量が 3mol% の場合、室温で正方晶が 100% 近くになり、正方晶ジルコニア多結晶体 (TZP) と呼ばれ、特性改善を達成したのが Ce-TZP/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ナノ複合体 (NANOZR) である。NANOZR は TZP と比較して、高い曲げ強さと破壊靱性を有している。

これまでに、動物実験においてインプラント体と骨との接着面積はチタンとジルコニアではほぼ同程度であったと報告されている。また、ジルコニ

アはチタンと比較して細菌が付着しにくく、口腔内にチタンあるいはジルコニアアバットメントを装着し、3ヶ月後にインプラント周囲のポケット深さを測定したところ、ジルコニアアバットメントはチタンと比較して有意に浅かった。したがって、ジルコニアはインプラントアバットメントとして優れた材料になり得るのではないかと考えられる。しかし、ジルコニアの上皮との付着や上皮細胞の増殖能について調べた研究はほとんどない。

そこで本研究では、ヒト口腔由来上皮細胞を純チタン、ジルコニアおよびアルミナディスク上で培養し、培養後の付着細胞形態、付着生細胞数、integrin  $\beta_4$  と laminin  $\gamma_2$  遺伝子発現量、他の接着分子については、信頼性が高く正確な遺伝子プロファイリング機能をもつPCR-Array解析により96種類の接着分子について比較検討し、ジルコニアのアバットメントやインプラント上部構造としての生体適合性を評価した。

## II. 実験材料および方法

### 1. 実験材料

純チタン (cpTi)、セリア系ジルコニア/アルミナ・ナノ複合材料 (P-NANOZR)、イットリア系ジルコニア (Cercon) およびアルミナ (inCoris AL) の4種類の試料を用いた。直径15 mm、厚さ1 mmになるように調製し、鏡面研磨を施した。

## 2. 試料の表面性状評価

### 1) 表面形態の観察

走査型電子顕微鏡 (SEM) にて表面形態の観察を行った。

### 2) 表面粗さの測定

表面粗さ・輪郭形状測定機にて測定した。

### 3) ぬれ性の評価

試料表面のぬれ性を検討するため、接触角測定試験を行った。

## 3. 細胞培養

ヒト口腔由来上皮細胞株である Ca9-22 を 24well プレートに設置した試料上にて培養し、直接 24well プレート上で Ca9-22 を培養したものを Control とした。

## 4. 付着細胞形態の観察

2 時間および 24 時間培養後に試料上に付着した Ca9-22 を SEM にて観察した。

## 5. 付着生細胞数の測定

2 時間および 24 時間培養後の生細胞数を Cell-Counting Kit-8 を用いて計測した。

## 6. real-time quantitative PCR (qPCR) 解析

1 時間、3 時間および 24 時間培養後の integrin  $\beta_4$ 、laminin  $\gamma_2$ 、catenin  $\delta_2$  および E-cadherin 遺伝子発現について検討した。

## 7. PCR Array 解析

1時間培養後の96種類のヒト細胞外マトリックスと接着分子の検出を行った。

## 8. 統計的処理

すべての値は、平均値 ± 標準偏差で表し、本実験結果の統計解析にはTukey法による多重比較検定を行った ( $p < 0.05$ )。

## III. 結果

### 1. 試料の表面性状評価

#### 1) 表面形態の観察

各試料の表面形態に明確な差は認めなかった。

#### 2) 表面粗さの測定

各試料間に有意差は認めなかった。

#### 3) ぬれ性の評価

各試料間に有意差は認められなかったが、P-NANOZRは他の試料と比較して接触角が小さい傾向を示した。

### 2. 付着細胞形態の比較

2時間培養後では各試料上で球状を示し、24時間培養後では各試料上で細胞が伸展し、細胞と細胞が接触している像が認められた。

### 3. 付着生細胞数の比較

2 時間培養後の生細胞数は、各試料間に有意差は認めなかった。24 時間培養後の生細胞数では、Cercon と inCoris AL が cpTi と比較して有意に高かった。

### 4. integrin $\beta_4$ および laminin $\gamma_2$ 遺伝子発現比較

1 時間培養後の integrin  $\beta_4$  遺伝子発現量は、P-NANOZR が control と比較して有意に高かったが、3 時間培養後では、各試料間と control の間で有意差は認めなかった。1 時間培養後の laminin  $\gamma_2$  遺伝子発現量は、cpTi と P-NANOZR が control と比較して有意に高く、3 時間培養後では、control と比較して各試料における laminin  $\gamma_2$  遺伝子発現量が有意に高かった。24 時間培養後では各試料と control の間で、integrin  $\beta_4$  と laminin  $\gamma_2$  遺伝子発現量に有意差を認めなかった。

### 5. PCR Array 解析

cpTi と比較した catenin  $\delta_2$  遺伝子発現量が、P-NANOZR において約 10 倍、Cercon では約 11 倍、inCoris AL では約 3 倍を示した。

### 6. catenin $\delta_2$ 遺伝子発現比較

catenin  $\delta_2$  遺伝子発現量は、P-NANOZR が control と比較して有意に高かったが、P-NANOZR、Cercon および inCoris AL すべてにおいて、cpTi と比較して有意差は認めなかった。

## 7. E-cadherin 遺伝子発現比較

1 時間培養後の E-cadherin 遺伝子発現量は、P-NANOZR が control と比較して有意に高かった。3 時間培養後の E-cadherin 遺伝子発現量は、Cercon が control と比較して有意に高く、P-NANOZR は control および cpTi と比較して有意に高かった。さらに、24 時間培養後の E-cadherin 遺伝子発現量では、cpTi と Cercon は control と比較して有意に高く、P-NANOZR は control と cpTi と比較して有意に高かった。

## IV. 考察

歯科臨床において、アバットメントやインプラント上部構造は研磨された状態で使用されることが多い。そのため、本実験では鏡面研磨を施した試料上でヒト口腔由来上皮細胞を培養し、培養後の付着細胞形態、付着生細胞数、接着分子である integrin  $\beta_4$ 、laminin  $\gamma_2$ 、catenin  $\delta_2$  および E-cadherin 遺伝子発現量を測定し、ジルコニアのアバットメントやインプラント上部構造としての生体適合性について、チタンやアルミナと比較検討した。

今回の実験では、各試料上の付着上皮細胞形態は類似しており、付着生細胞数は、チタンに比べてジルコニアの方が有意に多かった。一方、ジルコニアコーティングしたチタン上での線維芽細胞や骨芽細胞様細胞の細胞増殖能は未処理のチタンに比べて亢進していたという報告から、上皮細胞においてジルコニアの方がチタンに比べて細胞増殖を阻害しない材料であ

ると考えられた。

接合上皮と歯は細胞外マトリックス構成分子の1つである laminin  $\gamma_2$  と細胞外ドメインである integrin  $\beta_4$  を介した細胞—細胞外基質接着によるヘミデスモゾーム結合により付着している。上皮細胞をチタンあるいはジルコニア上で培養した場合の、integrin  $\beta_4$  と laminin  $\gamma_2$  遺伝子発現レベルはほぼ同じであったことから、上皮細胞のジルコニアとの接着能はチタンと同程度ではないかと考えられた。

PCR Array 解析により他の接着分子についてスクリーニング解析したところ、ジルコニアやアルミナはチタンに比べて、catenin  $\delta_2$  遺伝子発現がいずれの接着分子よりも高かった。catenin  $\delta_2$  は p120-カテニンファミリータンパク質であり、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的な細胞間接着分子としてタイトジャンクションの形成に重要な E-cadherin のエンドサイトーシスを抑制し、細胞膜上の E-cadherin 発現量や機能制御を行っている。そこで、E-cadherin 遺伝子発現について各試料間で比較したところ、アルミナ含有ジルコニアはチタンに比べて有意に高かった。歯周病原細菌刺激された歯肉上皮細胞は E-cadherin 産生を減少することや、歯周病原細菌感染を用いてラットに実験的歯周炎を惹起した場合、接合上皮部における E-cadherin の発現の減少が報告されている。さらに、歯肉上皮における E-cadherin の発現は歯周炎患者の方が健常者と比較して少ないなど E-cadherin の発現が外来刺激の抵抗性に関与していることが示唆されている。したがって、ジルコニアをアバットメン



トやインプラント上部構造として用いた場合、細胞—細胞間接着が強固となり、外来刺激に対して抵抗性を有することができる優れた材料になり得る可能性が示唆された。

## V. まとめ

上皮細胞のジルコニアに対する付着能や親和性は、チタンおよびアルミナと同程度であることが示唆された。また、ジルコニアをアバットメントやインプラント上部構造として用いた場合、口腔歯肉上皮の恒常性の維持を補佐し得る優れた材料である可能性が示唆された。