

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

鈴木 丈夫

論文題目

チタン表面の経時的変化とその回復方法

I. 緒言

現在、歯科領域におけるチタンインプラント製品は長期保存が可能な材料として市販されている。チタンインプラント製品は製造後、滅菌、梱包され、販売店へ配送され保管された後、診療施設へと配送され、そして患者への使用まで保管されるといった経過を辿り、その時間的制御は不可能である。これまで、チタンは最も生体親和性の高い金属の一つとして、その物理化学的性質は経時的変化を受けにくく、また、時間経過によるチタンへの生物学的影響の変化については検索されていなかった。近年、骨-チタン結合に大きく影響を与える要因の一つとして経時的なヒドロカーボンの沈着によるチタン表面の変化が知られるようになり、さらには、チタン表面へ沈着したカーボンの除去方法の一つとして紫外線照射による方法が報告された。そこで本実験では、時間経過に伴うチタン表面の変化、紫外線照射によるチタン表面の変化、骨芽細胞の増殖・分化におよぼすチタンの時間経過の影響、骨芽細胞の増殖・分化におよぼすチタンへの紫外線照射の影響について明らかにする目的で、異なるチタン表面（加工直後新鮮面、4週経過面、4週経過紫外線処理面）を作製してチタン表面の変化や骨芽細胞の増殖・分化への影響を検索し、さらに紫外線照射による影響を検索した。

II. 研究方法

1) チタン表面処理

実験には、直径20 mm、厚み1.5 mmのグレード2の純チタンディスクと直径1 mm、長さ2 mmのグレード2純チタン製シリンダー型インプラントを用いた。67%硫酸を使用して120°C、75秒間のエッチング処理を行った純チタン（酸処理群）と粒径50 μm の酸化アルミナによるサンドブラスト処理を行った純チタン（サンドブラスト群）の2種類の表面を作製した。これら表面構造は走査型電子顕微鏡を用いて検索した。表面処理後、直ちに実験を行った群（FD群）、暗室にて4週間保管後に使用した群（OD群）、15Wの殺菌灯を用いて48時間の紫外線照射後に使用した群（OD+UV群）に分けた。紫外線の強度と波長は約0.1 mW/cm^2 ($\lambda = 360 \pm 20 \text{ nm}$) および2 mW/cm^2 ($\lambda = 250 \pm 20 \text{ nm}$) を使用した。チタン表面の親水性の定量には自動接触角計測器を用い、チタンディスク表面上に1 μL の超純水を滴下して測定した。チタンディスクの表面構造は、酸処理では0.5-2 μm 間隔の凹凸からなる比較的均一な微小粗面であった。サンドブラスト処理では酸処理と比較して不規則で大きい微小粗面の特徴を有していた。

2) タンパク吸着能

チタンディスクを牛血清由来アルブミン溶液に浸漬し、2, 24, 72時間インキュベートさせてBCA法を用いて定量測定した。

3) 細胞培養

ヒト間葉系幹細胞（MSCs）をチタンディスク上に播種して細胞培養を行った。

4) 細胞誘導能

直径 8 μm 穴のセルカルチャーインサートを用いて、酸処理チタンディスクを下段のチャンバーに置き、上段のチャンバーに細胞を播種した。細胞播種後 3 時間インキュベートし、下段のチタンに付着した細胞をカルセイン-AM を用いて染色して定量測定した。播種した細胞数を 100% として 3 つの異なるチタン表面に付着した細胞数の割合をそれぞれ定量分析した。

5) 培養初期における細胞接着能

培養開始 3 時間および 24 時間後、血球計測盤による細胞数計測およびテトラゾリウム塩 (WST-1) を用いてチタン表面に接着した細胞数の計測、定量を行った。

6) 細胞の形態と形態測定

培養開始 3 時間後にローダミンファロイジンとマウス抗パキシリンモノクローナル抗体を用いて細胞骨格や接着斑を染色し、細胞の面積、周径、フェレーの直径について共焦点レーザー顕微鏡から得た画像を使用して画像分析ソフトウェアにより定量化して解析した。

7) 細胞増殖能

培養開始 3 日後に MSCs の BrdU DNA 結合量を定量測定して細胞増殖能を検索した。また、培養 2 日後および 4 日後に血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

8) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性

培養開始 10 日後に MSCs の ALP 活性について定量測定を行い、細胞分化能を検索した。

9) 石灰化能

MSCs の石灰化能の検索については 25 日間の培養後カルシウム沈着量を定量測定した。

10) インプラント埋入方法

雄性 Sprague-Dawley ラット (8 週齢) の大腿骨の遠位先端から 9 mm の部位に小孔を形成し、シリンダー型チタンインプラントを埋入した。

11) 骨-インプラント結合強度

シリンダー型チタンインプラントを大腿骨に埋入して 2 週間後にプッシュインテストを行い、骨-インプラント結合強度を検索した。

III. 結果

1. 紫外線処理によるチタン表面の変化

酸処理群において FD 群の接触角は超親水性とされる 3° 以内であった。OD 群の接触角は 55° より高い疎水性を示した。OD+UV 群の接触角は 3° 以内に減少し、超親水性を示した。サンドブラスト群でも同様であった。

2. 紫外線処理によるチタン表面へのタンパク吸着能の変化

培養 2 時間後において、OD 群では約 10% のアルブミンが吸着されていたが、FD 群では約 60% のアルブミンが吸着されていた ($p < 0.01$)。培養 72 時間後においても、OD 群では FD 群と比較してアルブミン吸着の量は 40%

以下になっていた ($p < 0.01$)。培養 2 時間後および 24 時間後において、OD+UV 群では FD 群と同等のアルブミン吸着量を示し、72 時間後ではさらに多くなっていた ($p < 0.05$)。

3. 酸処理チタン表面の細胞誘導能と初期細胞接着能

OD 群において、培養 3 時間後にチタン表面上の細胞数は、FD 群と比較して 50%程度であり、OD+UV 群と比較して 25%程度であった ($p < 0.01$)。OD+UV 群では、FD 群の約 2 倍となっていた ($p < 0.01$)。酸処理チタン表面の細胞数は、OD+UV 群 > FD 群 > OD 群の順に多くなっていた ($p < 0.01$)。

4. 酸処理チタン表面上の細胞形態

培養 3 時間後において、細胞の面積、周径、およびフェレーの直径においては、加工直後新鮮面および OD+UV 群では、OD 群と比べて 5-8 倍になっていた ($p < 0.01$)。FD 群と OD+UV 群の間には有意な差はみられなかった。

5. 酸処理チタン表面における細胞増殖能

培養 4 日後においては、FD 群では OD 群よりも細胞が約 30%多くなっていた ($p < 0.05$)、一方、OD+UV 群では OD 群よりも細胞が約 150%多くなっていた ($p < 0.01$)。細胞あたりの BrdU DNA 結合は OD+UV 群が最も高く、FD 群、OD 群と続き ($p < 0.01$)、増殖した細胞数と同様の結果を示した。

6. 酸処理チタン表面における骨芽細胞分化能および石灰化能

細胞培養 10 日後の FD 群と OD+UV 群の細胞数あたりの ALP 活性は OD 群の細胞数あたりの ALP 活性より有意に高くなっていた ($p < 0.05$)。総カルシウ

ム沈着量は OD+UV 群で最も多く、OD 群で最も少なくなっていた ($p < 0.05$)。OD+UV 群の総カルシウム沈着量は OD 群と比較して約 70%多くなっていた。

7. サンドブラスト群のチタン表面における細胞増殖能

サンドブラスト群においては酸処理群での結果と同様に、細胞密度と増殖活性は加工直後新鮮面が 4 週経過面より高くなっていた ($p < 0.01$)。細胞培養 4 日後における細胞密度と培養 3 日後における細胞増殖能は FD 群よりも OD+UV 群が有意に高くなっていた ($p < 0.05$)。細胞あたりの ALP 活性は FD 群と OD+UV 群が OD 群よりも高くなっていた ($p < 0.01$)。また、FD 群と OD+UV 群の間には有意な差は認めなかった。総量カルシウム沈着量については、OD 群では FD 群よりも有意に少なくなっていた ($p < 0.01$)。OD+UV 群の総カルシウム沈着量は FD 群よりも有意に多くなっていた ($p < 0.05$)。

9. 骨-インプラント結合強度

インプラント埋入後 2 週において、酸処理群の FD 群は酸処理群の OD 群よりもプッシュインテストの値が約 2 倍高くなっていた ($p < 0.01$)。酸処理群の OD+UV 群におけるプッシュインテストの値は酸処理群の FD 群とほぼ同等であった。サンドブラスト群の OD 群のプッシュインテストの値はサンドブラスト群の FD 群の約半分程度であった ($p < 0.05$)。サンドブラスト群の OD+UV 群では、サンドブラスト群の FD 群と比較してプッシュインテストの値は高くなっていた ($p < 0.05$)。

IV. 考察

本研究の結果、加工直後新鮮面と比較して4週経過面では親水性が失われてタンパク吸着能が低下し、培養ヒト間葉系幹細胞 (MSCs) に対する細胞誘導能は低下していた。また、4週経過面での細胞接着能、細胞の大きさ、細胞増殖能、細胞分化能は低下し、大腿骨に埋入したインプラントでは骨-インプラント結合の低下がみられた。これらのことから、4週経過面は加工直後新鮮面よりも生体親和性が低いことが考えられた。また、4週経過面への紫外線照射によりチタンディスク表面は超親水性となり、タンパク吸着能および細胞誘導能の向上がみられた。細胞接着能、細胞の大きさ、細胞増殖能、細胞分化能は高くなり、大腿骨に埋入したインプラントでは骨-インプラント結合の向上が見られた。これらのことから、紫外線照射による生体親和性の改善が示唆された。さらに、4週経過後紫外線処理面では加工直後新鮮面よりも生物学的能力が向上していた。酸処理とサンドブラスト表面においては、同様の傾向が認められた。

V. まとめ

本研究の結果から、時間の経過によりチタン表面の生体親和性は低下するが、紫外線照射によって生体親和性が回復することが示唆された。