

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

吉田 弦希

論文題目

骨形成に及ぼすオゾン水処理チタンの影響

## I. 緒言

歯科領域において、インプラント治療における人工歯根の材料としてチタンが広く使用されており、その表面と骨は、オッセオインテグレーションの状態に固定されている。しかし、インプラント治療は義歯や橋義歯といった補綴治療と比べて治療に長期間を要する。その中でも特に治療初期における細胞の付着は重要である。それには、チタン表面の物理化学的特性が関与するといわれている。現在のインプラント治療に主に用いられているチタン製インプラントでは、チタンの表面に炭素化合物が付着することにより、細胞接着能や細胞増殖能、細胞分化能が製造後から時間の経過に伴って低下しつづけることが報告されている。

一方、オゾン水は、発生したフリーラジカルにより強力な酸化作用をもつ。そこで村上らは、チタン表面の炭素化合物を除去するためにチタン表面へのオゾン水の洗浄効果を検討したところ、オゾン水は表面処理の直後のチタン表面と同等にまで、炭素化合物を減少させることを確認した。

そこで本研究では、骨形成に及ぼすオゾン水処理チタンの影響を検討するため、実験1としてオゾン水で処理した純チタン上で骨芽細胞様細胞を培養し、その増殖能、分化能、石灰化能を検討した。また実験2として純チタン性インプラントをラットの大腿骨へ埋入し、力学的試験によりその機械的強度を検討した。

## II. 実験1

## 1. 材料および方法

### 1) 実験動物

実験動物は、8週齢・雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットを5匹用いた。

### 2) オゾン水製造装置

オゾン水製造装置は、電解オゾン水生成器 (オゾン・オーラル・イリゲーター) を使用し、オゾン水の濃度、5.0 mg/l (25°C)、流量 40 ml/min である。

### 3) 実験試料の作製と表面処理

実験試料は、機械加工された直径 20 mm、厚さ 1 mm の純チタン製のチタンディスク (Grade 2) を使用した。

すべての試料の表面は 67% 硫酸、125°C、75 秒間の熱硫酸処理による表面処理を行い、その後、純水中で超音波洗浄を3回行った。

すべての試料は、乾燥した後に常温・暗所で3ヵ月間保管し時効を行い、実験前に高圧蒸気滅菌を行った。

実験では、前処理としてオゾン水で10分間処理したものをオゾン群 (O<sub>3</sub> 群) とし、蒸留水で10分間処理したものを対照群 (Control 群) とした。

## 4) 実験方法

### (1) 細胞培養

細胞培養は、SD ラットの大腿骨から骨髓細胞を採取し、骨芽細胞様細胞分化誘導培地で培養した。培養は、5% CO<sub>2</sub>、37°C の環境下で行い、3日に

1 回培養液を交換した。培養7日目に継代し、チタンディスクを静置した12 well 培養皿に  $3 \times 10^4$  cells/well 播種した。

## (2) 細胞増殖試験

細胞増殖試験は、培養開始24、48時間後に WST-8 を用いて細胞数を測定した。

## (3) ALP 活性の測定

ALP 活性の測定は、培養5、7日目にラボアッセイ™ALP を用いて測定した。

## (4) 石灰化能の評価

石灰化能の評価は、培養7、14、21日目に Alizarin Red S 染色を行い、石灰化を評価した。

## (5) カルシウム量定量試験

カルシウム量定量試験は、培養14、21日目に Calcium Assay Kit を用いて、吸光度計の測定値からチタンディスク上のカルシウム濃度を定量した。

## 5) 統計処理

すべての実験において、F検定による統計処理をおこない、等分散が成り立っていることを確認した後、T検定により分析を行った。統計学的有意水準は5%未満に設定した。

## 2. 結果

### 1) 細胞増殖試験の結果

培養 24、48 時間の吸光度計により得られた値を相対値として表し、T 検定を行った。培養 24 時間において  $O_3$  群は Control 群と比較して有意に細胞数が多かった。一方、培養 48 時間では、有意差を認めなかった。

## 2) ALP 活性の測定結果

培養 5、7 日目の吸光度計により得られた値を ALP 活性の相対値として表し、T 検定を行った。培養 5、7 日目において、 $O_3$  群は Control 群と比較して有意に ALP 活性が高かった。

## 3) 石灰化能の評価

培養 7、14、21 日目における Alizarin Red S 染色の陽性部の面積を画像解析ソフトウェアより定量し、T 検定を行った。培養 7、14、21 日目において、 $O_3$  群は Control 群と比較して有意に染色面積率は有意に高くなっていた。

## 4) カルシウム量定量試験の結果

培養 14、21 日目の吸光度計により得られた値をカルシウム量の相対値として表し、T 検定を行った。培養 14、21 日目において、 $O_3$  群は Control 群と比較して有意にカルシウム量が多かった。

# III. 実験 2

## 1. 材料および方法

### 1) 実験動物

実験動物には、8 週齢・雄性 SD ラットを 22 匹用いた。

## 2) オゾン水製造装置

オゾン水製造装置は、実験 1 と同様の装置、同条件で用いた。

## 3) 実験試料の作製と表面処理

実験試料は、直径 1 mm、長さ 2 mm の純チタン製の円筒型チタンインプラント体 (Grade 2) を使用した。すべての試料は、実験 1 と同様の処理を行った。

## 4) 実験方法

### (1) 円筒型チタンインプラント体の埋入

円筒型チタンインプラント体の埋入は、SD ラットを 2% イソフルランによる吸入麻酔下にて大腿部を剃毛後にメスで切開し、筋肉および骨膜を剥離して大腿骨骨体部を露出した。大腿骨の膝頭から 10 mm の位置に 0.8 mm の歯科用ラウンドバーで小孔を形成し、#80 K ファイルにて拡大して骨窩を形成した。右側の大腿骨には Control 群、左側の大腿骨には O<sub>3</sub> 群の円筒型チタンインプラント体を埋入した。その後、筋肉および皮膚を縫合して閉創した。

### (2) オッセオインテグレーションの力学的試験

力学的試験として、Push-in test を行った。すなわち、円筒型チタンインプラント体の埋入 14、28 日目にそれぞれ 11 匹のラットを安楽死させ、眼科剪刀により大腿骨を採取して常温重合レジンにて金属枠に固定した。その後、力学試験機を用いて、円筒型チタンインプラント体の長軸方向に荷

重を付加 (1 mm/分) し、圧縮荷重 (N) と圧入変位量 ( $\mu\text{m}$ ) を計測した。

#### 5) 統計処理

すべての実験データは、実験 1 と同様の統計処理を行った。

### 2. 結果

円筒型チタンインプラント体の埋入 14 日目において、 $\text{O}_3$  群では Control 群と比較して、圧縮荷重の最大値は有意に高かった。一方、埋入 28 日目では、高い値を示すものの有意な差は認められなかった。

## IV. 考 察

### 1. 実験 1 について

#### 1) オゾン水について

今回われわれは、村上らの報告に準じて、ダイヤモンド電極を使用した電解オゾン水生成器 (オゾン・オーラル・イリゲーター) を使用した。この方法は、オゾン生成の効率が良く、オゾンガスの発生が少ない製法とされている。今回使用したオゾン水の流量および温度に関して、温度は低いほどオゾンの自己分解が遅く、オゾン濃度の半減期も長くなるが、室温で最も安定する  $25^\circ\text{C}$  に設定した。処理時間に関しては、予備実験として 1、3、5、7、10 分間の処理時間で行ったところ、10 分間の処理において細胞増殖試験で有意な差を認めたため、本研究は 10 分間の処理時間とした。

#### 2) 試料の作製について

製造直後のチタン表面は親水性を呈するが、時間経過とともに骨とチタ

ンの接触率と強度が低下することが知られている。チタン表面における炭素化合物は、製造後4週で急激に増加し、その後3ヵ月後まで緩やかに増加する。これを参考に本研究において、チタンディスクは処理後3ヵ月間経過したものを使用した。

3) 細胞増殖試験について、

培養24時間において、O<sub>3</sub>群がControl群と比較して有意に細胞数が多かった。一方、培養48時間では、有意差を認めなかった。これは、先に細胞がコンフルエントに達して増殖を停止したO<sub>3</sub>群に、Control群が追いついたため両群間で差を認められなかったと推察される。

4) ALP活性について

ALPはピロリン酸を分解し、局所のリン酸濃度を高めることによりハイドロキシアパタイトの結晶の成長を促進するといわれており、骨芽細胞への分化の指標とされる。ALP活性において、培養5、7日目にO<sub>3</sub>群はControl群と比較して有意にALP活性は高い値を示した。

5) 石灰化能の評価について

Alizarin Red S染色では、培養7、14、21日目にO<sub>3</sub>群はControl群よりも有意に石灰化部の面積がより増加することが確認された。さらに、カルシウム定量試験において、培養14、21日目ともにO<sub>3</sub>群はControl群と比較して有意に高い値を示した。培養14日目での差の1.5倍に対して、培養21日目での差は1.9倍となっていたが、Alizarin Red S染色の面積率では培養



14日目で1.2倍、培養21日目で1.1倍となっていた。これは、面積率での有意差は大きくないが、石灰化結節がO<sub>3</sub>群で大きく立体的に形成されていることを示唆している。

## 2. 実験2について

実験的インプラントのオッセオインテグレーションの獲得を確認する力学試験の一つとして、小川らにより Push-in test が提唱されている。本研究においては、小川らの方法に準じてインプラント体は直径1mm長さ2mmとし、大腿骨へ対側に貫通しないように埋入（非貫通型）した。力学試験は、埋入14日目、28日目に行った。

力学的試験の結果において、圧縮荷重の最大値は、両群で14日目と比較して28日目において上昇する傾向がみられた。その中で、円筒型チタンインプラント体埋入の14日目においてO<sub>3</sub>群は、Control群と比較して有意に圧縮荷重の最大値が上昇していたが、埋入28日目ではControl群とO<sub>3</sub>群に有意な差は認められなかった。さらに、14日目におけるO<sub>3</sub>群の圧縮荷重の最大値はControl群の28日目の値に近似していた。これは、O<sub>3</sub>群が早期にオッセオインテグレーションを獲得できたことを示していると考えられる。

## V. 結 論

本研究では、オゾン水処理を施したチタン表面における細胞付着およびオッセオインテグレーションに対する影響を検討する目的で、チタン表面での細胞培養試験として、骨芽細胞様細胞の増殖能と分化能、石灰化能の

(論文内容の要旨)

No. 9

愛知学院大学

測定および円筒型チタンインプラント体埋入後の力学的試験を行った。その結果、オゾン水処理によりチタン表面での骨芽細胞様細胞の増殖や分化は促進し、円筒型チタン埋入時においても早期に力学的強度の向上を認めたことから、骨形成を促進することが示唆された。

平成27年12月16日