

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

船登 彰芳

論文題目

紫外線照射処理チタン上で培養した2型糖尿病モデルラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞の増殖と分化に関する研究

## I. 緒言

近年、日本人における糖尿病が強く疑われる患者数は推計約 1,000 万人、糖尿病予備軍は推計約 1,000 万人と報告されており、その数は年々増加している。糖尿病患者では骨の治癒遅延や治癒不全がみられることが知られており、糖尿病患者のインプラント治療の成功率は正常患者よりも低く、健常者に比べてオッセオインテグレーションの獲得が難しいとされている。そこで本研究では、チタン表面への UV 照射処理が 2 型糖尿病モデルラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞の分化能に与える影響を評価し、糖尿病患者へのインプラント治療の有用性を検討した。なお、本研究では糖尿病治療により血糖コントロールが行われている状態でのインプラント治療を想定し、低グルコース環境での培養とした。

## II. 実験方法および材料

### 1. チタンディスクの表面処理

チタンディスクには機械研磨された直径 20 mm、厚さ 1 mm の純チタンディスクを用いた。このチタンディスクに対して表面の酸処理を行った後、蒸留水で 3 回洗浄し、オートクレーブにより滅菌した後に暗所にて 4 週間保管した酸処理チタンディスクを用いた。

### 2. 紫外線照射処理 (UV 処理)

本研究では 15W の殺菌灯を用いてチタンディスク表面に対して UV 処理を 48 時間行い、その直後に細胞培養に用いた。

### 3. チタンディスクの表面性状

対照チタンディスクおよび UV 処理チタンディスク表面の親水性の検索のために、10  $\mu$ L の蒸留水を滴下して水滴との接触角を計測した。さらに、UV 処理後のチタンディスクの表面形状を走査型電子顕微鏡にて観察した。

### 4. 骨髄細胞の採取と細胞培養

30 週齢の雄性 SDT ラットを 2 型糖尿病モデルラットとして用いた。血糖値の比較対照として 30 週齢の雄性 SD ラットを用いた。骨髄細胞の採取前に血糖試験測定器で血糖値を計測した後に使用した。血液は尾静脈より採取した。

採取した骨髄細胞は低グルコース  $\alpha$ -MEM basal medium に 1  $\mu$ M Dexamethasone、5 mg/mL Ascorbic acid、0.85% Antibiotec-Antimycotic、15% FBS を加えた分化誘導培地を用いてインキュベーターで直径 10 cm のシャーレ上で 2 日間細胞培養を行った。培養上清の除去後、phosphate-buffered saline で 2 回洗浄して非接着細胞を分別除去し、さらに 2 日間培養した。培養上清の除去後、PBS で 2 回洗浄し、0.25% Trypsin-EDTA を加えて細胞を剥離して回収した。これらの細胞を  $\alpha$ -MEM 中に浮遊させた状態で 12 well microplate 内に配置したチタンディスク上に細胞を播種した。細胞濃度は  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> に調整して培養を行った。

本実験では、4 週間保管した酸処理チタンディスク上に SDT ラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞を用いた群 (対照群) と UV 処理チタンディスク上に

SDT ラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞を用いた群 (UV 群) の 2 群に分けた。実験は愛知学院大学動物実験倫理規程に基づいて行った (承認番号 AGUD No.185)。

## 5. 細胞数の検索

WST-1 Cell Counting Kit を用いて接着細胞数を計測した。前述のように 12 well microplate 内にチタンディスクを配置し、各群 4 枚のチタンディスク上に  $3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞濃度で細胞を播種した後、3 時間経過後に各 well の培養液を除去し、PBS で 2 回洗浄した。その後、各 well に培養液を入れ、WST-1 液を加えて 1 時間インキュベートした後に培養上清を回収し、420 nm における吸光度を測定した。

## 6. 骨分化能および石灰化能の検索

### 1) 骨分化能

Alkaline phosphatase (ALP) 活性測定キットを用いて骨分化能の検索を行った。前述のように 12 well microplate 内にチタンディスクを配置し、各群 4 枚のチタンディスク上に細胞を播種した後、3 日および 7 日後に各 well の培養上清を除去して蒸留水にて 2 回洗浄した後、ALP 活性測定キットを用いて Microplate Reader で 405 nm の吸光度を測定し、標準曲線から得られる吸光度に対する p-ニトロフェノール濃度 (mM/L) より ALP 活性値を求めた。

また、ALP 染色を行い、ALP 染色陽性率の検索を行った。各群 3 枚のチタ

ンディスクに細胞を播種した後、3日および7日後に培養液を除去してPBSで洗浄後、100%エタノールで細胞を固定した。PBSで洗浄した後、120 mM Tris buffer に 0.9 mM Naphthol AS-MX Phosphate、1.8 mM Fast Red TR 溶解して染色液を作製し、インキュベーター内で30分間染色を行った。その後、PBSで洗浄してデジタルカメラで撮影し、画像をImageJで解析した。

## 2) 石灰化能

Alizarin red 染色を用いて培養細胞の石灰化能を評価した。前述のように12 well microplate 内にチタンディスクを配置し、各群4枚のチタンディスク上に細胞を播種した後、14日および21日で培養上清を除去して蒸留水にて2回洗浄した後、95%エタノールを用いて細胞を固定した。その後、蒸留水で洗浄して1% Alizarin Red S 水溶液で3分間染色を行い、蒸留水にて2回洗浄を行った後、チタンディスク上のAlizarin red 染色陽性部位の面積を画像処理 ImageJ にて計測し、チタンディスク上における Alizarin Red 染色陽性率を算出した。

## 7. 統計学的解析

細胞接着能、細胞分化能の統計学的解析には Student' s t-test を用い、有意水準は5%とした。

## Ⅲ. 結果

### 1. チタンディスクの表面性状

対照チタンディスクの表面は疎水性を示したが、UV 処理チタンディスクは超親水性となり、滴下した蒸留水はチタンディスク全面へ広がっていた。

また、チタンディスク表面の SEM 像では、酸処理面は尾根状の突起部と谷状の陥凹部からなり、突起間が対照チタンディスクでは  $1.06 \pm 0.15 \mu\text{m}$ 、UV 処理チタンディスクでは  $1.04 \pm 0.32 \mu\text{m}$  の微細な凹凸のみられる粗造面を示していた。この結果から、UV 処理後の表面構造は、対照チタンディスクと同様であった。

## 2. 接着細胞数

各群のチタンディスク上に細胞を播種後 3 時間において、接着細胞数を計測した。対照群と比較して、3 時間後では UV 群で細胞数は有意に少なかった。

## 3. 骨分化能および石灰化能

### 1) 骨分化能

培養 3 日目では ALP 活性値において対照群と UV 群では有意差は認められなかったが、培養 7 日目では UV 群の ALP 活性値および ALP 染色陽性率は対照群よりも有意に高値を示した。培養 3 日目の ALP 染色では、対照群、UV 群ともに画像からは陽性率が検出できなかった。

### 2) 石灰化能

細胞播種後 14 日目では、UV 群は対照群よりも有意に Alizarin red 染色陽性率が高く、21 日目においても UV 群の陽性率は有意に高値を示していた。

#### IV. 考 察

本研究では、4週間保管したチタンディスクを48時間UV処理した結果、その表面は超親水性を示し、 hidrocarbon が効果的に除去されたと判断できた。このディスクを用いたUV処理群のALP活性は対照群と比較して活性は高く有意な差がみられた。石灰化能でもUV群が対照群と比べて有意に高値を示した。この結果は、細胞の採取時の高血糖状態から低血糖状態へ移行し、血糖コントロールが良好な状態に類似した環境で培養を行ったことで、骨芽細胞様細胞が正常に分化できる状態に移行したためと考えられた。以上の結果から、チタンディスクへのUV処理は低グルコース環境で培養したSDTラット由来骨芽細胞様細胞の接着能に抑制傾向がみられたものの、ALP活性および石灰化能を高め、チタン表面の骨形成を促進させることが推測された。このことから、チタン表面のUV処理が糖尿病患者におけるインプラント治療への有用性が示唆された。

#### V. 結論

本研究では、低グルコース環境において、2型糖尿病ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞を用い、UV処理を施したチタンディスク上、および未処理のチタンディスク上で培養して比較検討した結果、骨芽細胞の分化・石灰化が促進することが判明した。この結果から、チタンのUV処理が血糖コントロールを受けている糖尿病患者におけるインプラント治療の有用な方法の

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

一つとなる可能性が示唆された。