

氏 名 三 浦 真 悟
学 位 の 種 類 博士 (歯学)
学 位 授 与 番 号 岩医大院歯博第275号
学 位 授 与 の 日 付 平成24年3月9日
学 位 論 文 題 目 Biological behavior of fibroblast-like cells cultured on anodized-hydrothermally treated titanium with a nanotopographic surface structure
- ナノ構造を有する陽極酸化・水熱処理チタン表面上における線維芽細胞の挙動に関する検討 -

論文内容の要旨

I 研究目的

当分野では、インプラント体埋入後の早期のオッセオインテグレーション獲得を目的として、純チタンを放電陽極酸化処理し、さらに水熱処理を施すことで結晶性の高いハイドロキシアパタイト (HA) を含んだナノ構造を有する陽極酸化被膜の検討を行ってきた。その結果、陽極酸化・水熱処理チタンインプラントでは初期骨形成能が高くインプラント治療への有用性が示唆された。一方、インプラント支持による補綴装置が形態的・機能的に維持されるためには、インプラント体と結合組織の界面を外界から封鎖することが重要である。

本研究では、結合組織と接するチタンインプラント体表面への陽極酸化・水熱処理の効果を検討することを目的として、培養線維芽細胞の初期付着形態、細胞付着に関わる細胞内タンパクキナーゼである focal adhesion kinase (FAK) を指標とした細胞内シグナルについて分子細胞レベルで分析した。

II 研究方法

実験試料には、純チタンディスク (直径 15 mm, 厚さ 1.5 mm, 99.8%), 純チタンディスクを β -グリセロリン酸ナトリウム (0.01 mol/l) と酢酸カルシウム (0.15 mol/l) からなる電解質溶液中にて放電陽極酸化処理 (電圧 350 V, 電流 50 mA/cm²) を施した陽極酸化処理チタン, その後にオートクレーブ (300 °C, 2 時間) にて水熱処理を施した陽極酸化・水熱処理チタンを用いた。マウス由来線維芽細胞 (NIH/3T3) を各試料上に播種して 10, 72 時間培養後, ①走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察, ②共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いたローダミン標識ファロイジン染色によるアクチンの細胞骨格形態, 特異的抗体を用いた免疫染色による FAK の観察, ③ Real-time PCR による FAK 遺伝子の発現解析を行った。

III 研究成果

- SEM 観察: 培養 10 時間後では、純チタン上の細胞は中央部で球状形態を呈していたが伸展していた。陽極酸化処理チタンでは、細胞は球状形態を呈していたが陽極酸化被膜上に沿って伸展していた。一方、陽極酸化・水熱処理チタンでは、細胞は HA 結晶とナノ構造を有する陽極酸化被膜上に沿って密着し伸展していた。培養 72 時間後では、純チタン上の細胞は密着し伸展していた。陽極酸化処理チタンでは、細胞は突起を伸ばしながら陽極酸化被膜上に沿って密着し伸展していた。一方、陽極酸化・水熱処理チタンでは、細胞は HA 結晶とナノ構造を有する陽極酸化被膜上に沿って密着し伸展しており、さらに細胞突起は放電痕へも伸展していた。
- CLSM 観察: 培養 10, 72 時間後のすべての試料上では、アクチンは細胞の伸展方向に走行していた。FAK は、培養 10 時間後ではすべての試料上において発現は認められなかった。培養 72 時間後では純チタン、陽極酸化処理チタン上において FAK の発現は認められなかったが、陽極酸化・水熱処理チタン上では FAK は細胞突起に局在している像が観察された。
- Real-time PCR: FAK 遺伝子の発現解析では、培養 10 時間後ではすべての試料に有意差は認められなかった。しかし、培養 72 時間後では、純チタン、陽極酸化処理チタンに比較して陽極酸化・水熱処理チタンでは有意に

高い発現量を認めた。

IV 考察及び結論

陽極酸化・水熱処理チタン上では、純チタン、陽極酸化処理チタンに比較して線維芽細胞の付着は促進され、さらに、FAK のタンパクならびに遺伝子発現が有意に高まることが示唆された。これは、陽極酸化処理チタンに水熱処理を施すことで陽極酸化被膜がナノ構造となっていること、また高い表面自由エネルギーと親水性を有する表面性状であることが細胞内シグナル伝達系に関与したものと考えられた。

本研究から、陽極酸化・水熱処理チタン表面上における線維芽細胞の初期付着機構の一端が確認され、陽極酸化・水熱処理チタンは結合組織の付着に有利であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 石 崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 准教授 武 部 純 (歯科補綴学講座 冠橋義歯補綴学分野)
副査 准教授 近 藤 尚 知 (歯科補綴学講座 口腔インプラント学分野)

歯科インプラント治療を成功させるためには、インプラント体と周囲歯槽骨とのオッセオインテグレーションが必須条件である。三浦真悟の所属する本学歯科補綴学講座冠橋義歯補綴学分野では、インプラント体純チタン表面を放電陽極酸化処理し、さらに水熱処理を施すことにより、ナノ構造を有する結晶性の高いハイドロキシアパタイトの被膜を形成することに成功しており、インプラント治療への貢献が期待されている。一方、埋入されたインプラント体が歯槽骨内から歯肉を貫通して口腔内に露出する部分では、インプラント体と周囲歯肉との密な接合により口腔細菌による感染を防御することが、良好な予後のための条件と考えられている。今回、三浦らは、インプラント体表面の放電陽極酸化・水熱処理が、このインプラント体表面と周囲歯肉結合組織との接合状態に与える影響について、線維芽細胞とインプラント体表面との接着性を調査することにより評価した。

走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態学的観察の結果から、線維芽細胞のチタンディスク表面への接着性は、その表面を放電陽極酸化・水熱処理を施した場合の方が、未処理あるいは放電陽極酸化処理のみを施した場合よりも良好であることが判明した。加えて、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による免疫蛍光細胞学的観察により、接着斑キナーゼ focal adhesion kinase (FAK) の線維芽細胞における発現様式を観察した。その結果、放電陽極酸化・水熱処理したインプラント体表面上の細胞においては、糸状仮足 filopodium における FAK の局在が確認されたが、未処理あるいは放電陽極酸化処理のみを施したインプラント体表面上の細胞では、そのような局在は確認されなかった。加えて、リアルタイム RT-PCR 法を用いた FAK 発現量の調査では、放電陽極酸化・水熱処理したインプラント体表面上の細胞においては、未処理あるいは放電陽極酸化処理のみを施したインプラント体表面上の細胞よりも多量の FAK 発現が認められた。

以上のごとく、三浦らはインプラント体のチタン表面を放電陽極酸化・水熱処理する技術により、線維芽細胞のインプラント体表面への接着性が有意に向上することを初めて発見した。この放電陽極酸化・水熱処理チタンは、その表面への結合組織の接着性獲得を期待するインプラント体材料として極めて有用であると判断された。本研究成果は、将来の新たな歯科用インプラント材料開発のための大きな基盤として期待され、学位論文に値すると評価した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果や考察に対する試問に適切な回答がなされていた。よって、学位に値する学識と研究能力を有すると判断した。