

氏名	みや た きょう へい 宮 田 京 平
学位の種類	博士 (歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第 288 号
学位授与の日付	平成25年 3 月 8 日
学位論文題目	Anodized-hydrothermally treated titanium with a nanotopographic surface structure regulates integrin- α 6 β 4 and laminin-5 gene expression in adherent murine gingival epithelial cells -陽極酸化・水熱処理チタン表面におけるマウス由来歯肉上皮細胞からの integrin- α 6 β 4 と laminin-5 遺伝子発現

論文内容の要旨

I 研究目的

口腔インプラント治療に必要な条件として、顎骨内におけるオッセオインテグレーションの早期獲得が挙げられる。この課題に対して当研究室では、ハイドロキシアパタイト (HA) 結晶とナノ構造を有する陽極酸化・水熱処理チタン表面上での陽極酸化被膜における骨形成能について検討し、インプラント治療への有用性を報告してきた。一方、陽極酸化・水熱処理チタン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、インプラント体とインプラント周囲上皮・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、インプラント周囲上皮と接するインプラント体表面への陽極酸化・水熱処理法の効果を検討することを目的として、歯肉上皮細胞の初期接着形態と細胞増殖率、細胞接着に関わる laminin-5 と integrin- α 6 β 4 の遺伝子発現について分析した。

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。マウス由来歯肉上皮細胞 (GE1) を各試料上に播種し 24-72 時間培養後、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた細胞接着形態の観察, 分光光度計を用いた細胞増殖率, Real-time PCR 法を用いた laminin-5 (α 3, β 3, γ 2) と integrin- α 6 β 4 遺伝子発現について分析した。

III 研究成績

SEM 観察では、培養 72 時間の陽極酸化・水熱処理チタン表面上における細胞は、他の試料に比較して陽極酸化被膜上に密着しており、培養 24 時間に比較してより伸展していた。細胞増殖率では、陽極酸化・水熱処理チタンにおいては培養日数の増加にともない他の試料に比較して増殖率が有意に高値を示した。Real-time PCR 法による laminin-5 (α 3, β 3, γ 2) と integrin- α 6 β 4 の遺伝子発現では、培養 72 時間の陽極酸化・水熱処理チタンにおいて他の試料に比較して有意に高値を示した。

IV 考察及び結論

陽極酸化・水熱処理チタンでは、純チタンと陽極酸化処理チタンに比較して歯肉上皮細胞の伸長が促進され、さらに細胞増殖率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歯肉上皮細胞の接着に関わる laminin-5 とその受容体である integrin- α 6 β 4 の発現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歯肉上皮細胞の初期接着機構の一端が確認され、陽極酸化

化・水熱処理チタンは歯肉上皮細胞の接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 近 藤 尚 知 (補綴・インプラント学講座)
副査 准教授 武 部 純 (補綴・インプラント学講座)
副査 教授 石 崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)

口腔インプラント治療においては、インプラント体と骨組織との結合（オッセオインテグレーション）の獲得は必須であり、そしてその状態が長期にわたり維持されることが重要である。当研究室においては、純チタンインプラント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、結晶性の高いハイドロキシアパタイトを含んだナノ構造を有する陽極酸化被膜形成法を確立し、その骨組織に対する親和性について報告してきた。一方、埋入されたインプラント体が顎骨内から顎堤粘膜を貫通して口腔内に露出する部分では、歯肉上皮がインプラント体あるいはアバットメントに付着することで封鎖機構が形成されている。この封鎖機構によって、口腔内細菌や外来刺激を遮断することが、インプラントの長期維持獲得のために重要な条件と考えられている。本研究では、純チタンインプラント体表面への陽極酸化・水熱処理法の効果が、このインプラント体表面とインプラント周囲上皮との接合状態に与える影響を検索することを目的とし、歯肉上皮細胞のインプラント体表面への接着能を分子細胞学的手法を用いて評価した。

走査型電子顕微鏡（SEM）による形態学的観察の結果から、上皮細胞のチタンディスク表面への接着性は、陽極酸化・水熱処理チタン表面上の方が、未処理あるいは陽極酸化処理チタン表面上の場合よりも良好であることが判明した。細胞増殖率測定では、陽極酸化・水熱処理チタン表面上で、未処理あるいは陽極酸化処理チタン表面上の場合に比較して有意に高い細胞増殖率が確認された。リアルタイム RT-PCR 法を用いた laminin-5 ($\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$) と integrin- $\alpha 6 \beta 4$ 発現量の解析では、陽極酸化・水熱処理チタン表面上の細胞においては、未処理あるいは陽極酸化処理チタン表面上の細胞よりも多量の laminin-5 ($\alpha 3, \beta 3, \gamma 2$) と integrin- $\alpha 6 \beta 4$ 発現が認められた。

上記のように、チタンインプラント体表面へ陽極酸化・水熱処理する技術により、上皮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明らかにした。この陽極酸化・水熱処理チタンは、その表面へのインプラント周囲上皮の付着性獲得を期待するインプラント体表面処理法として極めて有用であると判断された。本研究成果は、将来の口腔インプラント臨床への新たな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

本研究における臨床的意義、研究方法・結果・考察、さらに、インプラント表面へ接着した歯肉上皮細胞からの遺伝子発現とタンパク発現に関する現象、陽極酸化・水熱処理チタンの表面性状について試問したところ的確な解答がなされていた。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。