

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

古田 弘樹

論文題目

老年性骨粗鬆症モデルマウスで検討した
チタンへの紫外線照射による骨伝導能の向上

I. 緒言

骨粗鬆症は骨密度の低下と骨質の劣化により骨強度が低下する疾患であり、口腔インプラント治療に対する全身的风险ファクターであるといわれているが、影響の詳細については明らかとはいえない。また、現在の口腔インプラントに用いられるチタンは、製造からの時間経過とともに骨伝導能が低下し、骨とインプラントの結合力が低下することが報告されている。その対策として、チタン表面への紫外線 (Ultraviolet、UV) 照射により骨-インプラント結合が強化できることが報告されている。

そこで本研究は、老年性骨粗鬆症モデルマウス (senescence- accelerated mouse prone 6 : SAMP6) を用い、UV照射がチタンの骨伝導能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

II. 材料および方法

1. 実験動物

老年性骨粗鬆症モデルマウスとして 16 週齢の雄性 SAMP6、24 尾を用いた。

2. 実験用チタン

骨-インプラント結合の力学的検討用のインプラント体として直径 0.8 mm、長さ 3 mm のチタンワイヤ、組織切片用のインプラント体として厚さ 0.5 mm、一辺 2 mm の正方形チタンプレート、細胞培養用チタンとして直径 20 mm、厚さ 1 mm のチタンディスク、それぞれ純度 99.5% のものを用

いた。すべての実験用チタンは粗面化のため H_2SO_4 で酸処理を行い、洗浄、滅菌を行った。常温暗所で 90 日間保管したものを OLD 群とし、OLD 群を紫外線照射装置により紫外線照射を行ったものを UV 群とした。

3. *in vivo* 試験

吸入麻酔下にて SAMP6 の大腿骨骨体部を露出、歯科用エンジンと歯科用ラウンドバーおよびダイヤモンドバーにて 12 尾にインプラント窩、6 尾にチタンプレート窩を形成し、左の大腿骨に OLD 群、右の大腿骨に UV 群のインプラント体、チタンプレートを埋入した。

インプラント埋入 14、21、28 日後に安楽死させ大腿骨を採取し、金属枠に固定後、力学試験機 (EZ-S) を用いて、圧縮荷重 (N) と圧入変位量 (μm) を測定し、骨-インプラント結合の力学的検討を行った。

チタンプレート埋入 7 日後に蛍光標識法のため Calcein を腹腔内投与した。埋入 14 日後に安楽死させ大腿骨を採取、固定、包埋後、切片標本 (厚さ $200\ \mu\text{m}$) を作製した。その後、新生骨の形態を評価するため共焦点レーザー顕微鏡を用いて画像を取得し、画像解析ソフトにより、骨とチタンプレートの接触率 (%) を算出した。さらに、光学顕微鏡により組織観察を行い、骨-インプラント結合の組織学的検討を行った。

また、チタンプレート周囲の組織の成分を確認するために、切片標本を電子線マイクロアナライザ (Electron Probe Micro Analyzer : EPMA) により Ca、P、Ti について元素分析を行った。

4. *in vitro* 試験

SAMP6 6尾の大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を FBS、抗菌薬-抗真菌薬合剤を α -MEM に添加した基本培地で懸濁後、培養皿に播種した (3×10^6 cells/well)。培養 7 日後に継代し、骨芽細胞様細胞の誘導培地を用いた細胞培養用チタン上で培養した (6×10^5 cells/well)。

培養 4、7 日後に細胞増殖試験として WST-8 法を用いて細胞数の変化を相対値として測定した。

培養 7、14 日後に、ALP 活性を相対値として測定した。

培養 14、21 日後に Alizarin Red S 染色により染色された面積を定量し、石灰化を評価した。

5. 統計処理

測定値は、「経過日数」と「UV 照射の有無」の 2 要因による二元配置分散分析を行った。要因間に交互作用が認められた場合は「経過日数」ごとに一元配置分散分析を行った。また、測定日が 3 日以上の場合は Bonferroni 法を用いて「経過日数」ごとの多重比較を行った。統計学的有意水準は 5% 未満に設定した。

III. 結果

1. *in vivo* 試験

力学的検討において、圧縮荷重はインプラント体の圧入とともに上昇し、最大値を示した直後に急激に低下した。インプラント体埋入 14、21 日後に

において、UV群はOLD群と比較して圧縮荷重の最大値は有意に上昇した。

一方、埋入28日後ではOLD群とUV群に有意差は認められなかった。

組織学的検討において、インプラント埋入14日後では、UV群はOLD群と比較して骨とチタンプレートの接触率(%)は有意に上昇した。切片標本におけるCa、P、Tiについての元素マッピングでは、骨髓腔内のチタンプレートを示すTi周囲にCaとPがほぼ同部位で検出された。また光学顕微鏡像では骨髓腔内に骨様組織が観察された。

2. *in vitro*試験

細胞増殖試験において、培養4日目ではOLD群とUV群に有意な差は認められなかったが、培養7日目では、UV群はOLD群と比較して有意に細胞数が多かった。

ALP活性試験において、培養7日目、14日目では、UV群はOLD群と比較して有意にALP活性が高かった。

石灰化の評価において、培養14日目ではUV群はOLD群と比較して有意に染色面積は大きかったが、21日目では有意な差は認められなかった。

IV. 考察

1. SAMP6について

SAMP6は骨髓の幹細胞の異常に起因するとされる骨粗鬆症による骨量減少が特徴的に観察されるマウスであり、骨量変化のパターンがヒト老人性骨粗鬆症のパターンと一致していることから、SAMP6における骨粗鬆

症はヒトにみる退行性骨粗鬆症のなかでも老人性骨粗鬆症のモデルになりうると考えられている。

2. チタンの骨伝導能の低下について

チタンは製造からの時間経過とともに、親水性から疎水性への変化、炭素の付着などにより、細胞の接着や骨形成に必要なタンパク質の吸着が顕著に低下し、骨とインプラント結合が低下するといわれている。また近年、歯科分野ではインプラントのUVによる表面改質法（光機能化）が開発され、チタン表面の疎水性から親水性への変化、炭素原子比率の減少、負から正電荷への変化という物理化学的変化を起こすことが知られている。

3. 力学試験について

現在までSAMP6を用いたインプラントの力学試験モデルは確立しておらず、本研究ではラットの力学試験モデルを参考に、SAMP6の体躯サイズを考慮したインプラント体を作製し、大腿骨への埋入は貫通型とした。圧縮荷重はインプラント体の圧入とともに上昇、最大値を示した直後に急激に低下した。この値は骨-インプラント結合が破壊される時に相当すると考えられ、本法はSAMP6における骨-インプラント結合の力学的特性について検討する方法として利用できることが示唆された。力学試験の結果、時間経過とともに骨治癒が進行したと考えられ、圧縮荷重の最大値は経過日数とともに有意に上昇した。また、UV群ではOLD群と比較して有意に圧縮荷重の最大値が上昇した。以上の結果はインプラント体へのUV照射

により、インプラント体埋入から初期における骨治癒が促進され、骨-インプラント結合の強化に寄与したことを示唆している。

4. 組織学的検討について

大腿骨は長管骨でありチタンプレートの埋入部位は皮質骨と骨髄からなること、元素マッピングにおいて骨髄腔内のチタンプレートを示すTi周囲にCaとPがほぼ同部位で検出されたこと、光学顕微鏡によりチタンプレート周囲に骨様組織を認めたことにより、骨髄腔内のチタンプレート周囲に形成されていた組織は組織学的にも新生骨であることを確認した。

新生骨の骨接触率において、UV群はOLD群と比較して有意に骨接触率の上昇を認めた。力学試験におけるOLD群とUV群での圧縮荷重の最大値の差は、UV照射によりチタンの骨伝導能が向上し、インプラント体と骨の接触率が増加したことに起因していると推察している。

5. 細胞培養について

骨髄から初代細胞を採取し基本培地にて培養、継代後、骨髄中の間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させるため、骨芽細胞様細胞の誘導培地で培養を行った。

細胞増殖試験において、培養7日目で認められた有意差に関しては、4日目における細胞が増殖曲線の初期の段階である誘導期であったことから両群間で増殖の差は認められず、その後、対数増殖期に移行したことにより増殖の差が顕著になったと考えている。

ALP活性と石灰化の評価に関してUV群はOLD群と比較して有意に大きい値を示した。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 hidroキシアパタイトの結晶の成長を促進するといわれている。これらの結果は、UV照射によりチタンディスク表面の親水性への変化、炭素原子の分解、負電荷から正電荷への変化がおこることで、タンパク質の吸着や骨系細胞のマイグレーション、接着、生着、増殖、機能発現が高められたためだと考えられる。また、石灰化の評価において21日で有意差を認めなかったことは、石灰化の領域がチタンディスク全面に及んだことによる。

V. まとめ

骨粗鬆症モデルマウス・SAMP6において、チタンへのUV照射による骨伝導能の向上が有効かを明らかにすることを目的とした。

SAMP6に埋入したインプラント体に対する試験モデルにより力学的、組織学的な検討を行った。また、SAMP6から得た骨芽細胞様細胞の増殖と分化について検討した。

その結果、*in vivo*、*in vitro*のいずれにおいてもUV照射によりチタンの骨伝導能が向上した結果が得られた。

以上より、チタンへのUV照射による骨伝導能の向上は、骨粗鬆症状況下においても有効なことが示唆された。