

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

佐藤 伸明

論文題目

ラット歯髄由来細胞のチタン表面での骨形成能

I. 緒言

現在、インプラント治療は咬合の回復のための有効な治療法として広く行われている。インプラント治療では、早期に良好なオッセオインテグレーションを獲得することが必須となる。このオッセオインテグレーションを獲得するまでの期間を短縮するため、様々な研究が行われてきた。

近年、歯髄中の間葉系幹細胞が骨様の硬組織を形成することが報告されている。現在、間葉系幹細胞の細胞源として骨髓由来幹細胞が検討されているが、骨髓液を得るためには腸骨骨髓穿刺を行わなければならない、採取するのは困難である。これに対して、歯髄由来細胞は抜去した智歯から入手することができ、比較的に入手が容易なため、その有用性が期待されている。しかしながら現在までに、歯髄由来細胞をインプラント治療へ応用した報告はあまりみられない。

そこで本研究では、実験1としてラット切歯歯髄由来細胞のチタン表面における細胞増殖能および細胞分化能について検索を行った。また、実験2としてラットの大腿骨にシリンダー型チタンインプラントの埋入および培養細胞の移植を行い、その機械的強度及び組織学的検索を行った。

II. 実験1

1. 材料および方法

1) チタンディスクおよび表面処理

チタンは厚さ 1 mm、直径 20 mm の第 2 種純チタンディスク (機械研磨) を、アルミナによるサンドブラスト処理をした後に、67%硫酸で 120°C、75 秒間反応させて酸処理を行ったものを用いた。

2) 走査型電子顕微鏡によるチタン表面の観察

表面処理を施したチタンディスクは、走査型顕微鏡を用いて表面形態を観察した。

3) 歯髄由来細胞の培養

本研究では、SD ラットの上下顎切歯から歯髄組織を採取し、骨芽細胞分化誘導培地にて培養した。2 回継代を行った後、ウェル内に静置したチタンディスク上に、細胞を播種して培養を行った。

4) 細胞増殖試験

培養 1、3 日目 (n=3) に WST-1 cell counting kit を用いて細胞増殖能を検索した。

5) Alkaline Phosphatase (ALP) 活性測定

培養 5、10 日目 (n=3) に、アルカリフォスファターゼ活性測定試薬を用いて ALP 活性を測定した。

6) Alkaline Phosphatase (ALP) 染色

培養 5、10 日目 (n=3) に ALP 染色を行い、チタンディスクの表面積に対する染色された陽性面積率を測定した。

7) Alizarin Red 染色

石灰化能の評価は、培養 10、20、30 日目 (n=3) に Alizarin Red 染色を行い、その陽性面積率を測定した。

8) Real-time PCR による遺伝子発現解析

培養 1、3、5、10、20、30 日目 (n=4) に、チタン表面で培養した細胞について、Real-time PCR 法を用いて遺伝子発現の検索を行った。

9) 統計分析

実験における各データは、それぞれ統計学的解析として Student's t-test および、Tukey 法による多重比較検定を行い、有意水準を 5% とした。

2. 結果

1) チタンディスクの表面性状

表面処理を施したチタン表面には直径約 $42.6 \pm 13.4 \mu\text{m}$ の凹凸構造がみられた。また拡大像では表面に直径約 $1.9 \mu\text{m}$ の小孔よりなる微細構造が確認できた。

2) 細胞増殖能 (WST-1)

チタンディスク上での細胞増殖能は、培養 3 日後において 1 日後と比較して有意に高かった。

3) ALP 活性および ALP 染色

培養細胞の ALP 活性および ALP 染色陽性部位の面積率はともに、培養 10 日後において 5 日後と比較して有意に高かった。

4) Alizarin Red 染色

Alizarin Red 染色陽性部位の面積率は、培養開始 10 日後、20 日後、30 日後と経時的に有意な増加がみられた。

5) Real-time PCR による遺伝子発現解析

各遺伝子の相対発現量に関して、Col は培養 5 日目、ALP は 10 日目、OPN は 20 日目、OCN は 30 日目においてそれぞれ最大値を示した。

III. 実験 2

1. 材料および方法

1) チタン (シリンダー型) および表面処理

チタンの埋入には、長さ 2 mm、直径 1 mm のシリンダー型の第 2 種純チタンを使用し、表面処理は実験 1 と同様とした。

2) シリンダー型チタンインプラントの埋入

2%イソフルラン吸入麻酔下にて、ラットの大腿骨の遠心端から 10 mm の位置に直径 1 mm の小孔を形成し、シリンダー型チタンインプラントを埋入した。実験群には、インプラント埋入処置の直前に回収した培養歯髓由来細胞を埋入窩へ注入した。また、対照群には、インプラントのみを埋入した。

3) Push-in test による骨-インプラント結合強度の測定

インプラントの埋入後、2週および4週においてラットの大腿骨を摘出し、常温重合レジンを用いアルミ製枠内に固定した。その後、力学試験機を使用してインプラント体の長軸方向に荷重を付加(1 mm/分)し、荷重変位曲線のピーク値を測定した。

4) 非脱灰研磨標本の組織学的評価

インプラントの埋入後、2週および4週で大腿骨を摘出し、非脱灰研磨標本を作製した。染色にはマッソン・ゴールドナー染色変法を用いた。インプラント体と周囲に形成された骨組織の接触面積率および、インプラント体の表面から外方へ周囲 50 μm 以内の範囲に形成された骨組織の面積率を測定した。

5) 統計分析

すべての実験データは実験1と同様の統計処理を行なった。

2. 結果

1) Push-in test による骨-インプラント結合強度

シリンダー型チタンインプラントの埋入2週後、4週後ともに、実験群における力学的強度は対照群と比較して有意に高かった。

2) 組織学的評価

シリンダー型チタンインプラントの埋入2週間後、4週間後ともに、実験群における骨-インプラント接触面積率および、インプラント体周囲50 μm の範囲に形成された骨組織の面積率は対照群と比較して有意に高かった。

本実験における実験動物の扱いは、愛知学院大学歯学部動物実験指針に従って行い、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認（承認番号 104）を受けた。

IV. 考察

1. 実験1について

1) チタンディスクとその表面処理について

酸処理等によるチタン表面処理から、時間の経過したチタン表面では細胞接着および細胞増殖能の低下が認められると報告されている。これを踏まえ、本研究においてはチタンディスクおよびシリンダー型チタンインプラントについて、表面処理後1ヶ月経過したものを使用することとした。

2) 歯髄由来細胞の培養について

歯髄細胞には、多分化能を有した細胞である間葉系幹細胞が含まれることが知られている。特に歯髄由来細胞は骨組織への分化能が高く、骨髄由来細胞と比較しても高いコロニー形成能、増殖能、多分化能を有する点においても優れている点と言われている。

3) 細胞増殖能について

培養開始1日目から3日目にかけて有意な増加がみられ、歯髄由来細胞はチタンディスク上で十分に細胞増殖が可能であることが示唆された。

4) 細胞分化能について

本実験における Col の mRNA の発現量は分化の初期にあたる培養5日目において最大の発現量を示した。ALP 活性および ALP 染色陽性面積率とともに、培養5日後と比較して10日後において、有意に高い値を示していた。また ALP の mRNA の発現においても培養10日後において最大の発現量を認め、その後石灰化の始まる10日後以降は減少傾向を認めた。本実験における歯髄由来細胞は、培養10日後に分化の中期段階にあり、石灰化が開始されていると考えられる。アリザリンレッド染色の陽性面積率は、培養開始後に10日、20日、30日と経過するにつれて経時的に有意に増加しており、mRNA の発現においては、培養20日目における OPN 、30日目における OCN は実験期間中で最大の発現量を示しており、カルシウムの沈着を裏付ける結果が得られた。一般的に骨芽細胞の mRNA の発現は分化の早期には Col を発現し、その後成熟するにつれて ALP、OPN、OCN の順に発現することがわかっており、本実験においても歯髄由来細胞は、同様の発現パターンを示した。

2. 実験2について

シリンダー型チタンインプラントの埋入実験について

インプラント埋入窩に培養細胞を注入した実験群では、対照群と比較し

て、骨-インプラント結合の力学的強度は2週後では約2倍、4週後では約1.5倍程度となり、有意に高くなっていた。また、非脱灰組織標本における、骨-インプラント周表における接触面積率およびインプラント周囲に形成された骨形成量も同様に実験群において高い値を示しており、力学的強度が有意に高かったことを裏付けている。これは、インプラント埋入部に移植した培養歯髄由来細胞が、埋入したチタンインプラントの表面に付着し、早期に骨芽細胞様細胞へと分化し骨様組織を形成したことによると考えられる。また、骨髄由来の幹細胞や脂肪由来の幹細胞を用いた研究において、移植された細胞が分泌する成長因子や基質が組織再生に重要な役割を果たしているという報告がある。本研究においても培養歯髄由来細胞に含まれる幹細胞が分泌する成長因子や基質が、パラクライン効果、つまり周囲に存在する内在性の幹細胞や前駆細胞に直接作用し、チタン表面への細胞接着や細胞の遊走を促進することにより、早期に骨形成が起こったのではないかと考えられる。

近年のインプラント治療において、即時荷重法や早期荷重法などの術式の改変が行われてきているように、早期にインプラントが骨に結合することは極めて重要である。また骨量がインプラント埋入には不十分であるために自家骨移植や人工骨による再建が併用された症例においても、その骨質は既存骨と比較し脆弱である場合も多く、一般的に長期の治癒期間が必要であると言われている。これらのことを考慮すると、オッセオインテグ

レーションのさらなる向上が要求される。本実験において、歯髄由来細胞を用いることで、骨-インプラント結合の強度の向上および、早期確立が見込めることが明らかとなり、インプラント治療に大いに寄与すると考えられた。

V. まとめ

ラット歯髄由来細胞は表面処理を施したチタンディスク上で増殖可能であり、石灰化能を保持していた。また生体内においてインプラントの埋入部位へ注入した歯髄由来細胞は骨組織の形成を促進し、骨-インプラント結合の獲得を促進することが判明した。