

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏 名 (本籍) 雨 宮 剛 志 (山梨県)
博士の専攻分野 博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号 甲 第 416 号
学位授与年月日 平成 26 年 3 月 14 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Tissue Response of Surface Modified Three-Dimensional Titanium
Fiber Structure
(表面改質 した 3 次元チタンファイバー構造体の組織反応)
Journal of Hard Tissue Biology impress
論文審査委員 主査 教授 小川 匠
副査 教授 早川 徹 副査 教授 濱田良樹

内 容 の 要 旨

【緒言】

チタンは良好な生体適合性と機械的性質を有することから、口腔外科や整形外科領域などで広く使用されている。特に、多孔性 3 次元チタンファイバー構造体 (3D-TFS) は、内部に細胞が侵入できるため、組織の再生や細胞培養の良好な足場となることが期待されている。

臨床的には、垂直的な骨造成を必要とする症例 (外向性) と、骨の欠損を補填するような骨造成を必要とする症例 (内向性) を経験することが多い。外向性の骨造成を行う場合、足場材料には周囲から受けるメカニカルストレスに耐えうる十分な機械強度が求められる。一方、内向性の骨造成を行う場合、足場材料には機械的強度よりは複雑な骨欠損の形態に適合できる成形性が求められる。

今回我々は、3D-TFS として Titanium Web (TWe) と Titanium Wire (TWi) の 2 種類を使用した。TWe は複数本のチタンファイバーを焼結し作製されるため、機械的強度に優れている。一方、TWi は 1 本のチタンファイバーを折り曲げて作製される。焼結操作を行わないため機械的強度が TWe より劣るが、成形性に優れている。TWe は骨膜下などのメカニカルストレスがかかる部位への骨造成 (外向性) の足場材料として、臨床応用を目指している。TWi は抜歯窩などの複雑な形態の骨欠損への骨造成 (内向性) の足場材料として、臨床応用を目指している。

近年、チタンの生体適合性の向上を目的に、様々な表面改質が報告されている。分子プレカーサー法は、簡便な操作で薄くて均一な炭酸含有アパタイト薄膜 (CA) を形成できる手法である。インプラントの表面を CA コーティングすることにより、骨接合率が上昇すると報告されている。また、トレスシルクロリド法は、チタン表面に細胞接着性タンパク質を固定化する手法で、コラーゲンとフィブロネクチンを固定化することにより、細胞の初期付着や形態に影響を与えることが分かっている。

本研究では、1) 3-DTFS の外向性と内向性の骨造成における骨形成能についての評価、2) 3-DTFS の表面改質の違いによる組織反応についての評価、の 2 項目を目的とした。

【材料と方法】

円板状の TWe (Φ4.0 mm x 2.0 mm、ファイバー径 50μm、気孔率 87%) と、円柱状の TWi (Φ3.5 mm x 7.0 mm、ファイバー径 85μm、気孔率 75%) を使用した。

1. TWe および TWi の表面改質

1-1. 分子プレカーサー法による CA 薄膜コーティング

EDTA-Ca 錯体/エタノール溶液に、リン酸塩を Ca/P=1.67 で添加して分子プレカーサー溶液を作製し

た。この溶液にTWeまたはTWiを20分間浸漬後、酸素雰囲気下（100ml/分）で600℃、2時間加熱してCAコーティングを施して、CA薄膜コーティングTWe（CATWe）、CA薄膜コーティングTWi（CATWi）を作製した。

1-2. トレシルクロリド法による細胞接着タンパク質の固定化

トレシルクロリド（ $(\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl})$ ）にTWe、TWiを浸漬して、37℃で2日間反応させトレシル化処理を行った。その後、I型コラーゲン（1mg/ml）溶液またはフィブロネクチン（1mg/ml）溶液に、トレシル化処理を行ったTWe、TWiをそれぞれ、37℃で24時間浸漬して、コラーゲン固定化TWe（CollTWe）、コラーゲン固定化TWi（CollTWi）、およびフィブロネクチン固定化TWe（FnTWe）、フィブロネクチン固定化TWi（FnTWi）を作製した。

2. 動物埋入実験

2-1. TWeを用いた骨膜下への埋入実験：外向性骨造成（承認番号：第11073）

9週齢の雄性Sprague-Dawley系性ラットを使用した。吸入麻酔下にて、頭頂部を剃毛し術野を消毒後、両耳間の頭頂部に約10mmの切開を加え、骨膜を剥離、挙上し骨膜と頭蓋骨の間に空隙を形成した。その空隙に各試料をそれぞれ1個挿入した。縫合後に抗生物質を皮下注射した。埋入4週後、および8週後に、骨膜を含めて頭蓋骨ごと試料を摘出した。試料数はそれぞれの条件でn=4とした。

2-2. TWiを用いた骨欠損内への埋入実験：内向性骨造成（承認番号：第25P041）

20週齢の雌性日本白色ウサギを用いた。吸入麻酔下にて両側大腿部を剃毛し、術野を消毒した。両側に切開を加え大腿骨関節顆を明示した。注水下で直径3.5mmの骨欠損を形成し、左右の骨欠損内部に各試料をそれぞれ1個ずつ、1匹に計2個を埋入した。縫合後に抗生物質を皮下注射した。埋入12週後に試料を摘出した。試料数はそれぞれの条件でn=3とした。

3. 病理組織学的観察と定量的評価

ラット埋入試料、ウサギ埋入試料、ともに試料摘出後、通法に従いホルマリン固定、アルコール系列による脱水を行い、その後、メタクリル酸メチル樹脂で包埋した。EXAKT精密切断機および精密研磨機を用いて約50 μmの非脱灰薄切研磨標本を作製した。メチレンブルー・塩基性フクシンで重染色して、新生骨の形成状態を光学顕微鏡にて病理組織学的に観察した。さらに、画像解析ソフトを用いてTWe内部に形成された新生骨量、垂直的に造成された新生骨の高さを測定した。TWiについては内部に形成された新生骨量を定量的に評価した。新生骨量を骨形成率（BFR）、新生骨の高さを垂直的骨造成率（VBR）とした。測定値は一元配置分散分析で検定後、Bonferroni testによって危険率 $p=0.05$ で評価した。

【結果】

SEM観察の結果、CAコーティングおよび細胞接着タンパク質固定化後も、TWeおよびTWiの形状は維持されており、気孔の閉塞などは認められなかった。

組織学的観察より、ラット骨膜下埋入実験、ウサギ骨欠損埋入実験、どちらにおいても、試料に対する異物反応や、試料の変形・脱落は認められなかった。

TWeを用いたラット骨膜下への埋入実験では、全ての試料において骨形成は頭蓋骨側にしか認められなかった。CollTWe、FnTWeは、血管増生と結合組織の伸張が多く認められた。

BFRを測定した結果、埋入後4週では各試料間で有意差は認めなかった（ $p>0.05$ ）が、埋入後8週ではCATWeのBFRが他の試料と比べ統計学的に有意に高かった（ $p<0.05$ ）。VBRについては、埋入後4週でCATWeがその他の試料と比べて統計学的に有意に増加していた（ $p<0.05$ ）。しかし、埋入後8週ではCATWeとTWe間のみに有意差が認められた（ $p<0.05$ ）。

TWiを用いたウサギ骨欠損内への埋入実験では、TWi、CATWiは試料内部全体にわたり骨の形成が認められたが、CollTWiとFnTWiについては皮質骨側に顕著に骨形成が認められた。BFRについては、CATWi、CollTWi、FnTWiがTWiに比べて統計学的に有意に高い値であった（ $p<0.05$ ）。

【考察とまとめ】

分子プレカーサー法は、3D-TFSをプレカーサー溶液に浸漬し加熱するだけで、内部にまで密着性が高く均一なCA薄膜を形成できる方法である。また、トレシルクロリド法も簡便な方法で、複雑な形状である3D-TFSに細胞接着性タンパク質を固定化できる手法である。この2つの方法を用いることにより複雑な形状のTWeおよびTWiの形状に影響を与えることなく表面改質が可能であった。動物埋入実験の結果、垂直的骨造成にはCAコーティングが有効であることが判明した。また、コラー

ゲンやフィブロネクチンの固定化は、骨伝導とともに軟組織の進展を促進する可能性が示唆された。骨欠損部での骨形成については、CA コーティングによる骨伝導の促進のみならずコラーゲン固定化やフィブロネクチン固定化も有効であった。これは固定化されたコラーゲンやフィブロネクチンが骨芽細胞の増殖、分化に影響を与えたためと推察される。

以上の結果から、各種表面改質を行った TWe、TWi の臨床応用の可能性が示された。