

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)	齊 藤 ま り (東京都)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 418 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	Differentiation potential of osteoblast from cultured C2C12 cells on zirconia disk (ジルコニア上で培養した C2C12 細胞の骨芽細胞分化能) Dental Material Journal impress
論文審査委員	主査 教授 二藤 彰 副査 教授 大井田新一郎 副査 教授 五味一博

内 容 の 要 旨

[目的]

歯科用インプラントは臨床において広く応用され、現在の主な材質はチタンである。チタンは生体材料として優れた特徴を有しており、生体適合性に優れ、骨と密接に接合し良好なオッセオインテグレーションを形成する。しかし、近年になって生体移植後に臓器やリンパ節でのチタンの蓄積が見られること、さらにチタンに対するアレルギー反応や過敏性が報告されるなどの問題点が指摘されるようになってきた。さらに、インプラント体が口腔内に露出し、審美的な問題を生じることがある。それらの問題点の改善のため、インプラント体の一部として応用されているジルコニアに注目した。

ジルコニアは高い生体適合性を持ち、金属アレルギーを生じず、審美性に優れるセラミックスである。ジルコニアをインプラント体として応用するにあたり、その可能性を検討する基礎的な研究として、C2C12 細胞を用い、セリア系ジルコニア/アルミナ複合体における細胞増殖および骨芽細胞分化について、チタン及び培養用カバーガラスと比較検討した。

[材料と方法]

本実験では、培養用 Poly-L-Lysine(PLL)コーティング処理された PLL ガラス、純チタン(Ti)、ジルコニアのうちセリア系ジルコニア/アルミナ複合体(Ce-TZP)の 3 種類の試料を直径 10mm のディスク状に加工した。Ti と Ce-TZP は表面研磨し、試料表面の性質を検討するため、走査型電子顕微鏡(SEM)での表面観察・表面粗さ(Ra)の計測・接触角の計測を行った。

細胞はマウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いた。骨芽細胞分化非誘導群(非誘導群)は α MEM 培地のみで培養し、骨芽細胞分化誘導群(誘導群)は細胞播種 24 時間後にアスコルビン酸、 β -グリセロリン酸、BMP2、レチノイン酸を添加した培地に交換した。

各試料上に細胞を播種し、細胞播種 3、48、96 時間後に細胞数を計測して 1cm^2 あたりの細胞数を算出し、細胞増殖能を測定した。

骨芽細胞分化誘導 5 日後、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、ALP 活性測定および遺伝子発現の解析を行った。試料を 10%ホルマリンで固定後、ALP 染色を行った。細胞を破碎した溶解液に ALP 発色液を加え、その後吸光度を計測し、ALP 活性をタンパク質あたりの *p*-nitrophenol 量で表した。また、骨芽細胞分化マーカーである *ALP*、*Type-1 collagen*、*Osteocalcin*、*Osterix* の発現を RT-PCR により解析した。

骨芽細胞分化誘導 12 日後、アリザリンレッド(ARS)染色およびカルシウム(Ca)定量解析を行った。各試料を 10%ホルマリンで固定後、ARS 染色を行った。試料上の Ca を溶解させ、吸光度を測定し、 1cm^2 あたりの Ca 量を算出した。

統計的分析は Student's t-test を用い、P 値 0.05 未満($p < 0.05$)を有意水準とした。

[結果]

表面 SEM 像において、Ce-TZP 表面は黒い粒子と灰色のバックグラウンドが観察された。Ti ディスクの表面粗さは $0.054 \pm 0.005 \mu\text{m}$ 、Ce-TZP ディスクの表面粗さは $0.054 \pm 0.010 \mu\text{m}$ であった。接触角は Ti ディスクが 37.6 度、Ce-TZP ディスクが 32.4 度であり、2 種類の試料の表面粗さおよび接触角に有意差はなく、ほぼ一致した。

細胞播種 3、48、96 時間後に細胞数を計測した。すべての試料上で細胞は順調に増殖し、細胞播種 96 時間後の各試料上における細胞数に統計学的有意差はなかった。

骨芽細胞分化誘導開始 5 日後の ALP 染色において、非誘導群と比べ誘導群の各試料上で著しい ALP 活性を示した。Ce-TZP ディスク上では、他の試料と比べて染色部と非染色部が明瞭に分かれず、試料表面が広範囲に染色される傾向にあった。ALP 活性も ALP 染色と同様に誘導群において高い値を示し、Ce-TZP ディスク上で Ti ディスクに比べやや高い活性が計測されたが、3 種類の試料上の活性に有意差はなかった。同日の遺伝子も、誘導群において *ALP*、*Type-1 collagen* の強い発現が見られた。

骨芽細胞分化誘導開始 12 日後、誘導群の全ての試料が ARS 染色に濃染され、明らかな石灰化物が形成された。PLL ガラス、Ti ディスク上では染色部と非染色部が明確に分かれているのに対し、Ce-TZP ディスク上では濃染色部に加え薄い染色部が見られ、染色範囲は広い傾向にあった。さらに、非誘導群に比べて誘導群で高い Ca 量が計測された。また、誘導群において、PLL ガラスと比べて Ti ディスクおよび Ce-TZP ディスク上における Ca 量は有意に高かった($p < 0.05$)。一方、Ti ディスク、Ce-TZP ディスク間の Ca 量に有意差はなかった。

[考察]

本研究では Ce-TZP と Ti ディスクの表面を研磨し、表面粗さ・接触角を同等にすることで表面性状を同条件とした。

各試料上における細胞増殖能は同等であった。細胞増殖の研究において、チタンとジルコニアは同等の細胞増殖能を示しており、今回の結果と一致した。Ce-TZP は、Ti と同等の細胞増殖能を示す材料であることが示された。

骨芽細胞の初期分化である分化誘導 5 日後の ALP 染色では、特に Ce-TZP ディスク上において ALP 活性を持つ細胞が全面に分布していた。ALP 活性の測定結果に有意差はないものの、Ti ディスク上よりも高い値が計測された。同日の遺伝子発現においても、Ce-TZP ディスク上の *ALP* の発現は高い傾向にあった。このような結果から、Ce-TZP は Ti と比較して細胞の初期分化が生じやすく、他の試料に比べ石灰化に有利な可能性が考えられる。

骨芽細胞分化誘導 12 日後では、Ca 量は Ti と Ce-TZP ディスク上で同等であったが、ARS 染色範囲は Ce-TZP ディスク上で広い傾向にあり、Ti ディスクと比較して石灰化物が Ce-TZP ディスクの広い範囲を覆っていることが考えられる。ALP 染色・ARS 染色において上記の結果が見られたことから、ジルコニアはチタンに近いオッセオインテグレーションを生じるとされているが、埋入後のインプラント界面における骨形成がチタンよりも広範囲に生じ、初期のオッセオインテグレーションに有利に働く可能性がある。

[結論]

以上の結果より、PLL ガラス、チタン、セリア系ジルコニア/アルミナ複合体(Ce-TZP)のどの試料上においても細胞増殖・分化は同等に起こることが明らかとなった。セリア系ジルコニア/アルミナ複合体はチタンと比較し細胞の初期分化に優れる可能性があり、細胞の分布や石灰化物形成も比較的広範囲に及ぶ傾向がある。

これらのことから、セリア系ジルコニア/アルミナ複合体はチタンと同等以上のインプラントフィクスチャー材料となり得る性質を有することが示唆された。