

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)	鈴 木 琢 磨 (神奈川県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 420 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	Bone response of TGF- β 2 immobilized titanium in a rat model (ラットモデルにおける TGF- β 2 固定化チタンの骨反応) Dental Materials Journal impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 里村一人 副査 教授 大久保力廣 副査 教授 五味一博

内 容 の 要 旨

【緒言】

チタンは優れた機械的性質と生体適合性を有することから、歯科および整形外科領域で幅広く臨床応用されている。しかしながら、チタンは骨組織を再生させることはできず、骨治癒過程を促進および向上させるための様々な機械的処理、化学的処理による表面改質が行われている。チタンに細胞接着タンパク質などの生理活性物質を固定化して、生体適合性を向上させる試みも報告されているが、固定化手法が煩雑であるという欠点を有している。近年、タンパク質固定化手法として、トレシルクロリド法が開発された。トレシルクロリド法とは、チタン表面の塩基性水酸基をトレシルクロリド ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$) で活性化し、トレシル化したチタン表面とタンパク質のアミド基をカップリング反応させ化学結合によって固定化する技術である。この方法では、他の方法と比較して大規模な設備を必要とせず、簡便で確実に固定化できると言う利点を有している。

一方、TGF- β (transforming growth factor- β) ファミリーは細胞の分化、増殖、炎症などの生体反応を制御する生理活性物質の一群であり、哺乳類では TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3の3種類が知られている。今までに骨膜下への TGF- β 2 投与は軟骨および骨形成を促進することが報告されている。

本研究では、トレシルクロリド法を用いてチタン表面に TGF- β 2 を固定化し、ラット大腿骨欠損モデルにおける TGF- β 2 固定化チタンインプラントの骨組織に対する反応を検討した。

【材料と方法】

1. チタンへの TGF- β 2 固定化

純チタン (JIS2 種, 99.9%mass, フルウチ化学) をトリミング ($2 \times 1.5 \times 0.5$ mm) し、アセトンにて脱脂処理を行った。無処理チタン (Ti) 表面へトレシルクロリドを滴下し 37°C, 2 日間インキュベーターにて反応させトレシル化チタンを作製し、その後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TGF- β 2 溶液を滴下し、37°C, 1 日間反応させ TGF- β 2 をチタンへ固定化させ、TGF- β 2 固定化チタン (TGF- β 2/Ti) を作製した。TGF- β 2 固定化の確認は、フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR), X 線光電子分光分析 (XPS) にて行い、

TGF- β 2 固定化表面性状の分析として水接触角および表面粗さの測定，原子間力顕微鏡（AFM）による形態観察にて評価した．

2. 動物実験

鶴見大学歯学部動物実験委員会実施指針に基づいて行った（承認番号：24A001）．6 週齢の雄性 Wistar 系ラット（対照群 4 匹，実験群 4 匹）を用い，吸入麻酔下で大腿骨を露出させた．歯科用エンジンを用い，注水下にてカーバイトバーを用いて低速回転で大腿骨に骨欠損（ $0.8 \times 2 \times 0.5$ mm）を形成した．骨欠損部に Ti，TGF- β 2/Ti 試料埋入後，感染防止のため抗生物質を皮下投与した．

新生骨の形成状態を観察するため，屠殺 1 週間前にカルセイン，屠殺 1 日前にアリザリンを投与し，新生骨の蛍光標識を行った．埋入，2,4 週後で試料の摘出を行った．その後，中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し，アルコール上昇系列で脱水を行った後，メタクリル酸メチル（和光純薬）に包埋した．EXAKT 精密切断機および精密研磨機を用いてインプラントに対して近遠心，長軸方向で厚さ約 50 μ m に研磨し，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．また，標本染色前に，共焦点レーザー顕微鏡にて新生骨の蛍光標識を観察した．インプラントー骨界面の骨接触率（BIC）およびインプラント周囲の骨量（BM）を，画像解析ソフトを用いて定量的に評価した．

3. 統計学的分析

組織学的測定による結果は，Origin Pro 8.0J を使用し，one-way analysis of variance（ANOVA）および $p < 0.05$ で平均値間での多重比較を Bonferroni test によって評価した．

【結果】

1. 表面分析

FT-IR 測定の結果，TGF- β 2 由来のアミド結合のピークが $1450\text{--}1550$ cm^{-1} ， $1600\text{--}1800$ cm^{-1} で認められた．また，XPS 測定ではアミド基由来の窒素元素，N1s のピークが認められ，チタン表面への TGF- β 2 の固定化が確認された．純水に対する接触角測定では，Ti と比較し TGF- β 2/Ti は統計学的に有意に小さい値であった（ $p < 0.05$ ）．表面粗さは，Ti，TGF- β 2 で有意差が認められなかった．AFM による観察では，固定化された TGF- β 2 の球状構造が確認された．

2. 新生骨の観察

カルセインによる緑色蛍光は，インプラント周囲骨において TGF- β 2/Ti の方がより明瞭に観察された．カルセインによる蛍光標識がアリザリンレッドの蛍光標識よりもより明瞭に確認されたため，設定した ROI 内のカルセイン蛍光標識の長さの総和を新生骨の形成量の目安として定量評価したが，埋入 2，4 週間後ともに，Ti と TGF- β 2/Ti インプラントとでカルセイン蛍光標識長において有意差は認められなかった．

3. 組織学的評価

病理組織学的な観察を行った所，埋入 2 週後で Ti と TGF- β 2/Ti とともにインプラント周囲の組織で炎症兆候は認められず，Ti と比較して TGF- β 2/Ti の方がインプラントにより近接した新生骨組織が観察された．埋入 4 週後では，より成熟した骨形成が認められ，骨リモデリングはまだ進行しており，TGF- β 2/Ti は Ti よりもより明瞭に骨形成が確認された．

BIC 測定の結果，埋入 2 週目後では，Ti と TGF- β 2/Ti の間で統計学的に有意な差は認められなかったが，4 週後において Ti と比較して TGF- β 2/Ti の骨接触は有意に向上していた（ $p < 0.01$ ）．BM 測定においても，2 週後では Ti と TGF- β 2/Ti の間で有意な差は認められなかったが，埋入 4 週後で

は Ti と比較して TGF- β 2/Ti は有意に高い値を示した ($p<0.01$).

【考察】

本研究では、トレシルクロリド法を用いて、チタン表面への TGF- β 2 の固定化を試みた。TGF- β 2 固定化処理を行ったチタン表面に対して FTIR, XPS 測定の結果、TGF- β 2 由来のアミド結合のピークおよび窒素原子のピークが認められ、チタン表面に TGF- β 2 が固定化されたことが確認できた。また TGF- β 2 の固定化により、チタン表面の親水性が向上した。

動物埋入実験を行った結果、BIC, BM を計測では、埋入 4 週後で Ti と比較して TGF- β 2 を固定化した TGF- β 2/Ti では統計学的に有意に大きい値を示したことから、チタン表面に固定化した TGF- β 2 が周囲組織に作用し、埋入初期の段階で骨形成を促進したと考えられる。

【結論】

1. トレシルクロリド法により、チタン表面に TGF- β 2 を固定化することができた。
2. TGF- β 2 固定化チタンは、ラット骨欠損モデルにおいて骨形成を促進することが示唆された。